

# タンパク質工学および代謝工学に基づいた木質系バイオマス由来六炭糖・五炭糖発酵性酵母の育種

渡辺 誠也

(京都大学大学院 農学研究科 / 現所属：愛媛大学 農学部)

## 研究の目的

本研究は、世界的に実用化が急務なバイオエタノール生産の最も重要な技術である発酵性微生物の育種に関して、私がこれまでに開発した木質系バイオマス由来の主要六炭糖・五炭糖を同時発酵できる組み換え酵母菌をさらに改良し、六炭糖なみの効率で五炭糖を発酵させるための新技術の開発を行うものである。他の酵母由来のキシロース代謝遺伝子を導入した組み換えサッカロミセス酵母はキシロースからのエタノール発酵能を獲得できる。しかし、キシロースの発酵速度は六炭糖に比べて圧倒的に遅く実用化への大きな障害となっている。そこで本研究では、固有のキシロース発酵能を有する *Pichia stipitis* のゲノム配列を利用し糖輸送体およびそれに関連した遺伝子群の解析を行うとともに、有用と考えられる遺伝子をサッカロミセス酵母菌に導入することで五炭糖発酵能向上を目指した。

## 方法

*S. cerevisiae* が有する六炭糖輸送体の1つである HXT1 のアミノ酸配列をプローブとして、*P. stipitis* ゲノム配列に対して Protein-BLAST サーチを行った。30% 以上の相同性を示した 34 個の遺伝子を、それぞれ、*S. cerevisiae* の自律複製型プラスミドベクター YEpPGK の phosphoglycerate kinase (PGK) プロモーターとターミネーターの間にサブクローニングした。主要な六炭糖（五炭糖）輸送体が欠損した *S. cerevisiae* 変異株 KY73 (*hxt1-7 gal2 ura3*) は、帝京大学の笠原敏子博士より分与いただいた。発酵実験における成分解析は HPLC およびガスクロマトグラフィーで行った。

## 結果

*S. cerevisiae* は最も多くの（六炭糖）輸送体（HXT）を持つ生物である。現在までにほぼ全ての糖輸送体遺伝子が同定され、さらにそれらの糖輸送体遺伝子すべてを欠損し、六炭糖で生育できない変異株も単離され、他の生物由来の糖輸送体遺伝子の機能解析によく用いられている。また HXT（および GAL2）の一部が、五炭糖であるキシロースと L-アラビノースの輸送能も持つことも分かっている。ピキア酵母 *P. stipitis* には、その効率的な五炭糖代謝能力から *S. cerevisiae* とは異なる五炭糖輸送システムがあることが示唆されている。ゲノム上には *S. cerevisiae* の HXT 遺伝子と相同性のあるものだけで 36 個もあり、単純な分子系統学的解析のみで五炭糖輸送体を同定することは不可能であった。そこで本研究では、先ずこの 36 個の遺伝子をそれぞれ *S. cerevisiae* の六炭糖輸送体欠損株 KY73 で発現させるプラスミドシステムを構築した。次に、構築した発現プラスミドを導入した形質転換株について、各種の六炭糖を添加した最小培地での生育を調べ

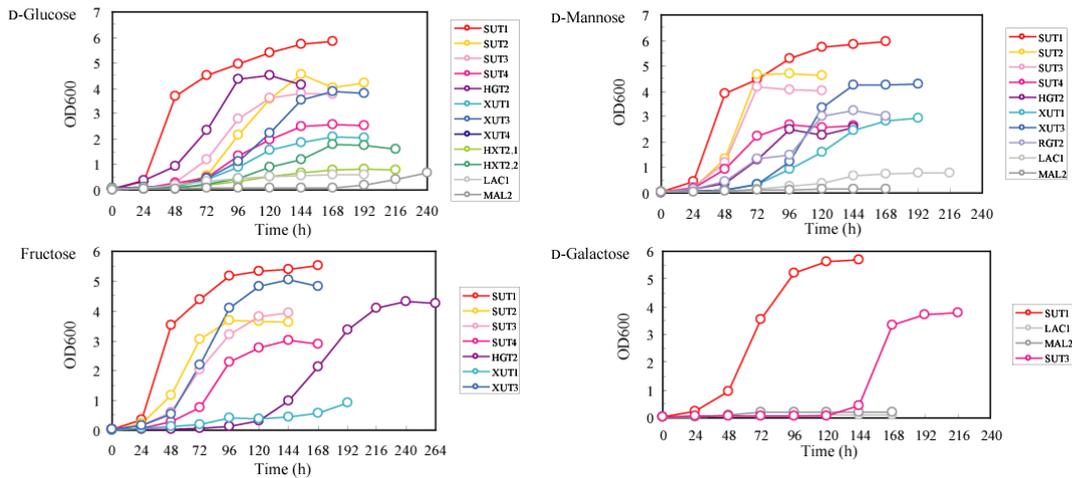


図1 ピキア酵母六炭糖輸送体の同定

ることによって、個々の遺伝子の糖輸送への関与を検討した。

図1に示した結果より、六炭糖輸送体遺伝子の数はある程度限られており、ガラクトース以外の基質特異性は低いことが分かった。*P. stipitis*の糖輸送体としては、既に *SUT1*、*SUT2*、および *SUT3* 遺伝子にコードされる糖輸送体が知られているが<sup>1)</sup>、今回それらに加え、特に *HGT2* 遺伝子産物が十分な糖輸送能を有することが示された。実は、リアルタイムPCR解析によると *HGT2* は培地に添加した六炭糖の種類にかかわらず、*P. stipitis* 細胞内で最も高発現している糖輸送体遺伝子であった（データ省略）。また、*P. stipitis* の *RGT2* および *SNF3* の2つの遺伝子は、*S. cerevisiae* 糖センサー遺伝子のホモログとしてアノテーションがなされていたが、*RGT2* 遺伝子を導入した *S. cerevisiae* KY73株が、少なくともマンノース輸送能を有することから、*P. stipitis* の糖センシング機構は、*S. cerevisiae* での機構とは、一部異なっていることが示唆された。

次に、五炭糖であるキシロースおよびL-アラビノースを添加した最小培地で培養を行い、2時間後の細胞内基質濃度をHPLCで測定することで、五炭糖に対する輸送能を持つ形質転換株をスクリーニングした。選抜した形質転換株については、さらに各基質の細胞内濃度の経時変化を測定した（図2）。

まずキシロース輸送に関しては、これまでの研究で、*SUT1*、*SUT2*、および *SUT3* 遺伝子がコードする糖輸送体がキシロース輸送能を有すること、特に *SUT1* 遺伝子産物が、比較的高いキシロース輸送能を有することが明らかになっている。また、*SUT1* 遺伝子の欠損株では、野生株と比較して、表現型に特段の変化がないことから、別の糖輸送系の存在の可能性が示唆されていた<sup>1)</sup>。今回、KY73株で発現した場合に、*SUT1* 遺伝子と

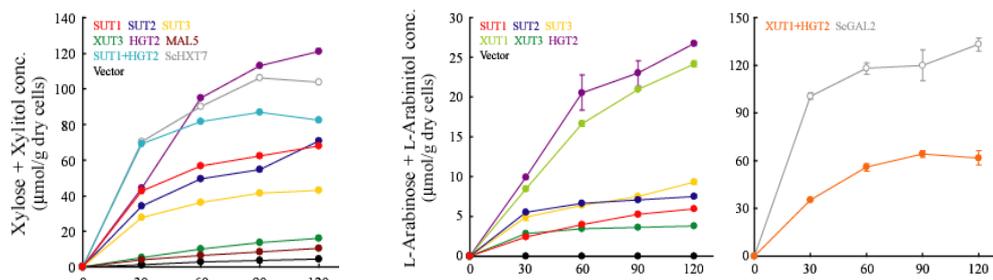


図2 ピキア酵母五炭糖輸送体の同定

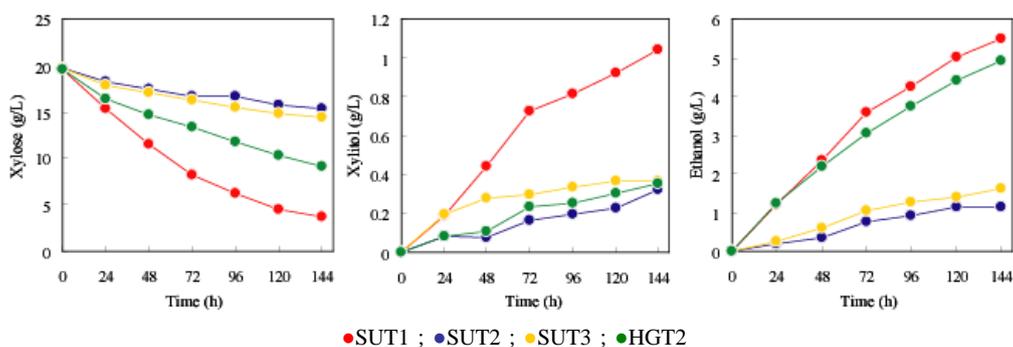


図3 ピキア酵母五炭糖輸送体のキシロース発酵性能

同程度のキシロース輸送能を宿主に付与する *HGT2* 遺伝子が新たに同定された。次に L-アラビノース輸送を見ると、*SUT* 遺伝子群にコードされる各 *SUT* 糖輸送体の輸送能は総じて低く、*HGT2* および *XUT1* 遺伝子の産物について、高い輸送活性が観察された。興味深いことに、これらの両遺伝子を共発現させると輸送能は加算的に増加した。一方、*S. cerevisiae* の L-アラビノース輸送体である *GAL2* と比較すると、ピキア酵母輸送体の L-アラビノース輸送能は低いことが分かる。また、*HGT2* の L-アラビノース輸送能はキシロース輸送能に比べてかなり低い。*P. stipitis* の L-アラビノース代謝はキシロース代謝に比べてかなり遅いことが分かっており、その原因のひとつが、L-アラビノース輸送活性の低さにある可能性が示唆された。

現時点では L-アラビノース発酵性 *S. cerevisiae* システムがないため、キシロース輸送に絞って解析を行うことにした。*S. cerevisiae* KY73 株に 3 つのキシロース代謝遺伝子を導入<sup>2)</sup>した KY73X 株を構築した。本株に *P. stipitis* の *SUT1*、*SUT2*、*SUT3* および *HGT2* 遺伝子をプラスミドとして導入し、得られた形質転換株についてキシロース発酵能を調べた (図 3)。

*SUT1* 導入株は *HGT2* 導入株に比べてキシロース消費速度が速かったが、エタノール生産は *HGT2* 導入株とほとんど変わらなかった。これは、*SUT1* 導入株では取り込まれたキシロースがキシリトールとして蓄積してしまい効率的に発酵できていないことを示唆する。

## 結論

本研究では、固有の五炭糖代謝能を有する酵母としては世界で初めて糖輸送体の網羅的解析を行い、特に五炭糖輸送能を担う新規遺伝子を多数同定した。これら一連の成果に基づいて、国内特許出願 (特願 2009-203362) と国際特許出願 (PCT/JP2010/064962) を行った。今後は、KY73 株ではなく通常の *S. cerevisiae* 株にこれら五炭糖輸送体遺伝子を導入することで、より実用性の高い酵母育種を継続する予定である。

## 文献

1. Weierstall, T., Hollenberg, C.P., and Boles, E. (1999) Mol. Microbiol. 31, 871-883.
2. Matsushika, A., Inoue, H., Watanabe, S., Kodaki, T., Makino, K., and Sawayama, S. (2009) Appl. Environ. Microbiol. 75, 3818-3822.