有機酸ストレス耐性酵母の探索・育種とバイオプロセスへの応用 未利用バイオマスの資源化に向けた酵母の機能開拓

作りすぎてしまった料理を冷蔵庫などで保存し、いざ食べようというときに、「酸っぱくならないからまだ大丈夫」といった判断をすることはないだろうか。これは、経験的に雑菌により腐敗が進んだときに生じる酢酸や乳酸などの有機酸を食品の健全性の一つの指標として活用しているということとも解釈できる。一方で、有機酸は多くの微生物の増殖に抑制的に働くため食品保存料として有効であり、あらかじめ有機酸を食品に添加することにより、雑菌汚染の抑制が可能となる。しかし、この場合には、有機酸に耐性を有する細菌や酵母に対して十分な効果は発揮できず、食品損傷の原因となる。したがって、有機酸耐性微生物は食品産業においては、悪玉微生物とも位置づけられる。本稿では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、明らかにしつつある酢酸応答・耐性機構と高度酢酸ストレス耐性株のバイオエタノール製造への応用の可能性について概説したい。

バイオエタノール製造の発酵プロセスにおいて、細菌や野生酵母の生産する酢酸や乳酸などの有機酸が発酵液中に高度に蓄積されると、糖類からのエタノール変換を触媒する酵母の発酵能が阻害される。特に、発酵液への乳酸菌の混入が問題となっており、汚染例が多数報告されている。それに加えて、第二世代バイオエタノール製造の主要原料と考えられているリグノセルロース系バイオマスの前処理・糖化工程では、アセチル化されたヘミセルロースなどから酢酸が遊離される。このような背景から、有機酸耐性を有する酵母の構築およびその利用は、発酵不良によるエタノール収量の低下防止につながる事が想定できる。

さらに、高度な有機酸耐性を有する酵母を育種することが可能になれば、有機酸をむしろ積極的に使用し、有機酸耐性酵母との組み合わせにより雑菌汚染を排除できることが考えられる。また、バイオ燃料生産では低コスト化およびエネルギー収支の適正化が望まれている現状であり、こういったコンセプトの延長線上に、高エネルギープロセスである加熱殺菌を省いたプロセスの構築も視野に入る可能性も想起される。したがって、高度な有機酸ストレス耐性を有する酵母株の開発はグリーンバイ

オにおけるキーテクノロジーの一つと考えられよう。

上記の観点から、われわれは、*S. cerevisiae* および他種酵母から構成される農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所微生物バンクの所有する酵母ライブラリーを用いて有機酸ストレス耐性酵母の探索を行った。その結果、乳酸に高度な耐性を有する *Candida glabrata*⁽¹⁾ および酢酸耐性を有する *Schizosaccharomyces pombe*⁽²⁾ を発見した。バイオエタノール製造プロセスで汚染の報告がある *Lactobacillus* 属乳酸菌などをモデル汚染菌として使用し、発見した *C. glabrata* または *S. pombe* を用いてエタノール発酵試験を行った。その結果、有機酸を適正な濃度で添加すると、*Lactobacillus* 属乳酸菌の増殖が有意に阻害され、エタノール収率を高く維持することが可能であることが示唆された。

有機酸ストレス耐性酵母の探索では、酢酸ストレス耐性を有する *S. cerevisiae* ATCC 38555 株も見いだされた。*S. cerevisiae* は、長い食経験から GRAS (Generally Recognized as Safe) に位置づけられており、バイオエタノール製造に伴い生成する副産物を肥料や飼料として利用する際に安全である。そこで、高度な酢酸耐性を有する *S. cerevisiae* 株の構築に資する知見の蓄積のため、酢酸耐性株の DNA マイクロアレイ解析を行った⁽³⁾。通常のバイオエタノール用酵母と比較して、ATCC 38555 株において発現上昇の度合いが高い遺伝子群を探索したところ、酢酸応答に寄与することが示唆されている *Haal* およびその下流で機能する遺伝子群および金属イオン代謝関連遺伝子の調節に関与する *AFT1* の高発現が観察された⁽³⁾。

図1に示すように、*S. cerevisiae* では、酢酸ストレスに関する知見が蓄積されつつある^(4,5)。酸性条件で非解離状態の酢酸は、Fps1 のチャンネルを通して細胞内に流入する。中性に近い細胞質では、酢酸は酢酸イオンとプロトンに解離し、プロトンは細胞質の酸性化を引き起こし細胞内代謝にさまざまな影響を与える。これに対して、*S. cerevisiae* では、Fps1 チャンネルの分解、細胞質のプロトンポンプ (Pma1) によるプロトンの排出、酢酸応答に寄与する転写活性化因子 *Haal* を介した酢酸ストレス応答遺伝子の発現誘導、などの応答反応が生じる。

図1 ■ 酢酸ストレスに対する *S. cerevisiae* の応答機構

S. cerevisiae においては、1) 酢酸の流入に必要なチャネル Fps1 の分解、2) プロトンポンプ Pma1 によるプロトンの排出、および 3) 転写活性化因子である Haa1 を介した酢酸耐性に関与する遺伝子群の発現誘導、により酢酸ストレス耐性を獲得すると考えられている。Fps1 の分解に関するシグナル伝達には MAP キナーゼの一種である Hog1 が関与していると考えられている⁽⁵⁾。HAA1 遺伝子を構成的発現プロモーターにより過剰発現させることにより、高度な酢酸ストレス耐性を獲得することが示された。

このような基礎的な知見から、Haa1 タンパク質を強く発現させることにより、*S. cerevisiae* は高度な酢酸耐性を獲得することが想定される。実験室酵母の遺伝的バックグラウンドで Haa1 タンパク質をコードする遺伝子を構成的発現プロモーターである *TDH3* プロモーターで過剰発現させたところ、*TPO2* や *TPO3* などの Haa1 で誘導される下流遺伝子の発現上昇を伴った著しい酢酸耐性の向上が観察された⁽⁶⁾。さらに、代表的なバイオエタノール生産用酵母である Ethanol Red 株の遺伝的バックグラウンドにおいても、HAA1 の過剰発現を行った⁽⁷⁾。その結果、実験室酵母を用いた場合と同様に、高度な酢酸耐性を獲得することが確認できた。さらに、サトウキビに由来する糖蜜をモデルバイオマスとして、エタノール発酵試験を行った。HAA1 過剰発現株は酢酸の非存在下では親株とほぼ同等の発酵パターンを示した。一方、酢酸添加条件においては、親株の発酵能は著しく阻害された。しかし HAA1 過剰発現株では、非添加条件と比較して若干の発酵の遅れは観察されたものの、最終エタノール収率はほぼ同等であった。これらのことにより、HAA1 の過剰発現は酢酸ストレス耐性酵母の分子育種に有効であり、バイオエタノール製造の

高度化に貢献しうると考えられた。

本稿では、酵母の有機酸ストレス耐性に関する研究動向をバイオ燃料製造との関連から概説した。酵母は、トレハロースやグリセロールなどストレスからの細胞保護物質を生産することが知られており、有機酸ストレス耐性との関連に興味をもたれる。また、第二世代バイオ燃料生産技術に加えて、食品廃棄物や食品ロス（食べられるのに捨てられている食品）のエネルギー化も最重要課題の一つと考えられている。有機酸は食品廃棄物などの腐敗防止にも寄与すると考えられることから、有機酸ストレス耐性酵母は廃棄物の再利用の側面からも有用であろう。低炭素化社会の実現に向けて、発酵微生物である酵母のさらなる機能開拓が期待される。

- 1) I. Watanabe, T. Nakamura & J. Shima : *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 1117 (2008).
- 2) P. Saithong, T. Nakamura & J. Shima : *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 216 (2009).
- 3) Y. Haitani, K. Tanaka, M. Yamamoto, T. Nakamura, A. Ando, J. Ogawa & J. Shima : *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 648 (2012).
- 4) S. Giannattasio, N. Guaragnella, M. Ždravlevec & E. Marra : *Font. Microbiol.*, **4**, 33 (2013).
- 5) P. W. Piper : *Adv. Appl. Microbiol.*, **77**, 97 (2013).
- 6) K. Tanaka, Y. Ishii, J. Ogawa & J. Shima : *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 8161 (2012).
- 7) T. Inaba, D. Watanabe, Y. Yoshiyama, K. Tanaka, J. Ogawa, H. Takagi, H. Shimoi & J. Shima : *AMB Express*, **3**, 74 (2013).

(島 純^{*1}, 田中晃一^{*1}, 中村敏英^{*2}, ^{*1}京都大学微生物科学寄附研究部門, ^{*2}農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所)

島 純 (Jun SHIMA)

＜略歴＞1989年東北大学農学部農芸化学科卒業／1991年同大学大学院農学研究科博士前期課程修了／同年農林水産省食品総合研究所研究員／1997年博士（農学）取得（東北大学）／2006年食品総合研究所酵母ユニット長／2010年京都大学微生物科学寄附研究部門（公益財団法人発酵研究所寄附講座）特定教授／2014年龍谷大学教授、現在に至る＜研究テーマと抱負＞微生物の機能利用全般に興味をもっています＜趣味＞お酒のテイasting、サウナで汗を流すこと

田中 晃一 (Koichi TANAKA)

＜略歴＞1995年東京大学大学院医学系研究科第二基礎医学専攻博士課程修了／同年日本学術振興会特別研究員 (PD)／1996年東京大学大学院医学系研究科分子生物学専攻分野助手／2001年日本学術振興会海外特別研究員 (Research Institute of Molecular Pathology, オーストリア共和国・ウィーンへ留学)／2004年東京大学分子細胞生物学研究所染色体動態研究分野助教 (のち講師)／2011年京都大学微生物科学寄附研究部門特定研究員 (のち特定准教授)／2014年同大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学研究室特定研究員／＜研究テーマと抱負＞さまざまな生命現象の分子メカニズムに興味をもち研究を進めています＜趣味＞京都散策, 写真撮影

中村 敏英 (Toshihide NAKAMURA)

＜略歴＞1992年名古屋大学理学部生物学科卒業／1997年同大学大学院農学研究科博士後期課程修了, 博士 (農学)／同年同大学生物分子応答研究センター学振研究員／2000年農業生物資源研究所ポスドク／2005年食品総合研究所ポスドク／2007年同研究所主任研究員, 現在に至る＜研究テーマと抱負＞酵母のストレス耐性強化を目指し, 耐性機構の解析をしています。＜趣味＞釣り, 少林寺拳法