リグノセルロースからの高効率エタノール生産に向けた 新規代謝改変酵母の創製

Development of Metabolically Engineered Yeast Strains for Efficient Ethanol Production from Lignocellulose

蓮沼 誠久

神戸大学自然科学系先端融合研究環
〒657-8501
神戸市灘区六甲台町 1-1

Tomohisa HASUNUMA
Organization of Advanced Science
and Technology, Kobe University
1-1 Rokkodai, Nada, Kobe 657-8501

近藤 昭彦

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻
〒657-8501
神戸市灘区六甲台町 1-1

Akihiko KONDO
Department of Chemical Science and
Engineering, Kobe University
1-1 Rokkodai, Nada, Kobe 657-8501

論文要旨：低炭素社会の構築に向けて、再生可能で食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマス資源からバイオ燃料や化学品を生産する「バイオリファイナリー」の確立が求められている。糖プラットフォームを用いるバイオエタノール生産を例にとると、そのプロセスは、結晶化したバイオマスを膨潤化する前処理工程、バイオマスを加水分解する酵素処理工程、微生物による発酵工程、生産物の分離回収工程から成り立っており、省エネルギーかつ低コストなプロセス開発の成否が実用化の鍵を握っている。微生物の細胞表層にセルラーゼを集積させる「細胞表層工学技術」は、酵素生産と糖化、発酵をワンパッケージ化することが可能であり、プロセスを簡略化することができる。また、高価なセルラーゼ製剤の生産に必要な材料や設備の省略が可能となる。一方で、発酵を効率化するには、微生物細胞内の代謝メカニズムを機能的な方向に改変する必要がある。筆者らはトランスクリプトーム解析やメタボローム解析等のマルチオミクス技術を活用して微生物の代謝系を遺伝子レベルや代謝物レベルで網羅的に解析することで新規の微生物改変戦略を立案し、その発酵性能を向上させることに成功してきた。微生物をより優れたエタノール生産工場にするためには、代謝をシステムとして理解し、合理的に改変することが重要である。本稿では細胞表層工学技術と代謝工学技術を組合せた微生物によるバイオエタノール生産について紹介する。

Abstract: To build an energy and material secure future, a next generation of renewable fuels and bio-based chemicals produced from lignocellulosic biomass is required. Consolidated bioprocessing (CBP), which integrates enzyme production, saccharification and fermentation into a single process, is a promising strategy for effective production of bio-based materials. As a key technology for the development of recombinant cellulolytic microbial strains, cell surface engineering, which enables the display through genetic engineering of various types of functional proteins on microbial cell surfaces without loss of their function, is a promising tool reducing the requirement for cellulase addition, as cellulases can be displayed on the microbial cell surface. Regardless of the process used for the biomass hydrolysis, CBP-enabling microorganisms encounter a variety of toxic compounds released during biomass pretreatment that inhibit microbial growth and ethanol yield. Systems biology approaches including transcriptomics and metabolomics have been recently exploited to gain insight into the molecular and genetic traits involved in tolerance and adaptation to the fermentation inhibitors. A combination of a cell surface displayed enzyme system and an intracellular metabolic engineering system is a very effective approach to develop cells with novel fermentation ability for industrial applications.

Key words: biofuel, biomass, consolidated bioprocessing, lignocellulose

1 はじめに

人類は19世紀までは、植物資源から生活に必要なあらゆるものを作り出してきたが、20世紀の急速な石油化学産業の発展により大量消費・廃棄型の社会構造となり、地球規模の気候変動等の問題を生み出した。この問題を解決して持続可能な低炭素・自然共生型の未来社会を実現するためには、再生可能なバイオマスからバルクおよびファインなバイオ燃料やバイオベース化学品を経済性良く、高効率で生産する技術（バイオリファイナリー）の開発が必要である。バイオマスを積極的に利用し、バイオ由来燃料を生産する技術が確立できれば、CO₂排出削減による地球上の炭素循環の定常化、持続可能なエネルギーの供給に寄与できる。特に、賦存量が多く、食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマスの利用への期待が高い。近年、バイオリファイナリー技術の開発は世界的な競争となっており、米国等では数百億円単位の研究開発予算が投入されている。神戸大学では、バイオリファイナリーの学術基盤を整備し、技術の体系化をめざして、2007年12月に「統合バイオリファイナリーセンター」を設立した。バイオリファイナリーに関する研究センターの開設は国内では初めてであり、日本の得意とする技術領域である微生物育種技術や発酵技術の高度化を核として独自かつ世界をリードするバイオリファイナリー技術の開発を推進している。微生物を利用したバイオプロセスでは、バイオマスの分解と微生物発酵の効率化が鍵となる。本稿では、リグノセルロース系材料を分解・資化し、効率的に液体燃料に変換する微生物の開発について紹介したい。

2 リグノセルロース系バイオマスからの液体燃料生産

リグノセルロース系バイオマスは草本系（ソフトバイオマス）と木本系（ハードバイオマス）に大別されるが、バイオリファイナリーの原料として期待されるバイオマスとして、前者には稲わら、麦わら、もみ殻、バガス、コー

ンストーバーのような農業残渣やスイッチグラス、ネピアグラス、エリアンサスのようなエネルギー作物が含まれ、後者にはユーカリやスギ等の木材チップや廃材が含まれる。リグノセルロースは、光を捕集したい植物が重力に抗して自らを支えるために生合成する繊維質であり、物理的に強靱な高分子構造を形成している。その主成分がセルロースであり、グルコースが β -1 $\rightarrow$ 4グルコシド結合で直鎖状に結合した β -グルカンが水素結合を介して束となり、紐のような繊維状の結晶構造をとっている。セルロースを取り囲むようにヘミセルロース等のマトリクス分子が存在し、その外層にフェニルプロパノイド系芳香族化合物の重合体であるリグニンが沈着して高分子構造を強化している。ヘミセルロースの組成はバイオマスによって異なるが、キシロースが β -1 $\rightarrow$ 4結合したキシラン主鎖にグルコースやアラビノース、グルクロン酸からなる側鎖が連結している。セルロース、ヘミセルロース、リグニンは植物体のそれぞれ30~50%、25~50%、15~30%を占め、エタノール等の発酵生産の基質となり得る糖（主としてグルコースおよびキシロース）はセルロースおよびヘミセルロースに含まれる¹⁾。

リグノセルロース系バイオマスは、デンプンや糖蜜などの穀物系バイオマスと違って食糧と競合しない点や未利用資源を有効活用できる点で支持されているが、強靱な分子構造上、発酵を行う前の前処理が必須であり、爆砕や水蒸気処理、希硫酸処理、アンモニア処理、熱水処理等の高温・高圧条件下での物理化学的処理が必要になる（Fig. 1）。また、前処理を施してもセルロースの大部分は結晶性繊維構造を維持しているため、セルロースを加水分解して微生物が利用可能な糖類を提供する酵素処理工程が必要である。また、酵素処理を施してもセルロースを完全に糖化することは難しく、リグニンとともに発酵後の残渣となり、収率が低だけでなく微生物の回収・再利用を困難にする。つまり、リグノセルロース系バイオマスの利用には、資材や設備の調達・準備、エネルギー投入の観点から優れた効率化が必要であり、要素技術の

Fig. 1 Conventional SHF process for ethanol production from lignocellulosic materials.

さらなる改良が求められている。

エタノール生産を例にとると、醸造業や発酵産業で一般的に用いられている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた発酵が最も有力であるが、リグノセルロース系バイオマスをエタノールへ変換するためには、酵素生産、糖化、ヘキソース発酵、ペントース発酵という4段階のバイオプロセスがある (Fig. 1)。コンベンショナルな技術としては、前処理後に分画して得られるセルロース画分とヘミセルロース画分を酵素糖化した後にヘキソース発酵とペントース発酵を経てエタノールを生産する SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) がある。しかしながら、糖化が進むと生成するグルコースやセロビオースが糖化酵素の加水分解を阻害するため、糖化と発酵を同時に行う SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) や SSCF (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation) が検討されてきた (Fig. 2)。糖化反応と発酵生産を1つのバイオリアクター内で行うため、バイオマスから生成したグルコースが微生物により消費されれば酵素の反応阻害を回避することができる。また、発酵産物としてエタノールが蓄積すると、エタノール耐性のないバクテリアの繁殖が抑えられるため、リアクター内のコンタミネーションを防ぐことが可能になる。

近年、遺伝子工学的手法を用いることにより、バイオマス分解能力を持つ遺伝子組換え酵母の開発が進められ、酵素生産、糖化、発酵の生化学的変換過程をすべて統合化した、CBP (consolidated bioprocessing) の実現が可能になってきた²⁾。従来、セルロース糖化に必要な

酵素製剤は、糸状菌等の培養により得られるが、価格が高く、酵素生産のコスト削減は重要な課題であった。セルロース分解酵素を自ら生産する酵母を開発できれば、酵素生産に必要な資材や設備を低減することができる。CBP は、統合化によるトータルプロセスの簡略化により生産コストの削減と省エネルギー化を実現する技術として期待されている。

3 リグノセルロース分解能を付与した酵母の開発

酵母 *S. cerevisiae* は、高いエタノール生産能力・エタノール耐性があるだけでなく、低 pH や高浸透圧等のストレス環境への耐性が高く、雑菌汚染を抑えた発酵を実現する上で最も有利であると考えられる。古くからよく研究されているため、細胞生理学的な情報は豊富にあり、遺伝学研究のモデル生物として様々な育種 (馴養育種、変異育種、遺伝子組換え育種など) が取り組まれてきた。真核生物であるため、大腸菌やザイモナス等のバクテリアと比べて、細胞構造的にもロバストである。既に多くの発酵産業で利用されていることも実用化の観点からは有利であろう。酵母は、高いグルコース利用能力を有するが、セルロースを分解することができないため、遺伝子組換え技術により外来のセルラーゼ遺伝子 (群) を染色体ゲノムに組み込み、これらを発現させることでセルロース分解能を持たせることが可能になった³⁾。セルロースは単一の酵素による分解は不可能であり、数種の異なる分解酵素の相乗効果により糖化されている。セルラーゼとはそれらの酵素の総称であり、その機能・役割は次のように大別できる；①結晶セルロースの末端から

Fig. 2 Ethanol production from lignocellulosic materials by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process and consolidated bioprocessing (CBP).

セロピオースを遊離するエキソ型のセロピオヒドロラーゼ (CBH), ②非結晶セルロースをランダムに切断するエンド型のエンドグルカナーゼ (EG), ③セロオリゴ糖の末端からグルコースを生成するエキソ型の β -グルコシダーゼ (BGL), である。セルロースの分解機構は, EG が部分的に存在する非結晶領域を分解することで表面に結晶領域がさらに露出し, それを CBH が切断していくことによって分解が進むと考えられている。生成したセロピオースは BGL によってグルコースにまで分解される (Fig. 3)。南アフリカ・ステレンボッシュ大学の van Zyl らはセルラーゼ遺伝子群を酵母細胞内で発現させ, 生成したセルラーゼを細胞外へ分泌させることにより酵母培養液中でセルロースの分解を可能とした⁴⁾。

筆者らのラボでは, 遺伝子組換えにより酵母の細胞表面に外来のタンパク質を集積させる「細胞表面工学技術」を開発してきた。酵母の細胞表面には様々なタンパク質が局在しており, 細胞間の接合に関与する細胞表面タンパク質である α -アググチニンと目的タンパク質を連結することにより, 細胞表面に集積することが可能である。具体的には, タンパク質を細胞外へ移送するためのシグナルペプチド, 目的タンパク質, α -アググチニンの各遺伝子を連結して発現させることにより, 目的タンパク質を細胞表面に移送させてその場にとどまることができる³⁾。そこで, 糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来 EG および CBH, 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来 BGL の 3 遺伝子を酵母内で発現させ, 細胞表面工学技術を用いて細

Fig. 3 Cellulose hydrolysis mechanism by endoglucanase (EG), cellobiohydrolase (CBH) and β -glucosidase (BGL).

胞表面層上に集積した (Fig. 4)。得られた酵母を用いて, 10 FPU/g-biomass の市販セルラーゼ存在下で稲わら水熱処理物からの発酵を行ったところ, 72 h で 200 g/L のバイオマスから 43.1 g/L のエタノールを生産することに成功し, 野生株を用いた場合のエタノール生産量 (37.5 g/L) を大きく上回った⁵⁾。興味深いことに, 発酵をさらに続けても野生株のエタノール生産量はセルラーゼ表面提示酵母に追いつくことはなかった。発酵後の残渣を分析したところ, セルラーゼ表面提示酵母を用いた場合の β -グルカン含量は, 野生株を用いた時よりも少ないことから, セルラーゼを細胞表面に集積させることによりセルロースの加水分解が協奏的に進み, 市販酵素製剤で分解できなかったセルロースの分解が行われていたことが考えられる^{5, 6)}。細胞表面におけるセルラーゼ群の集積提示は, ①連続する反応を触媒する複数の酵素を集積することにより逐次的反応が速やかに進行し, 酵素反応の生成物阻害を緩和できる, ②生成したグルコースを即座に微生物細胞内へ取り込むことによりリアクター内のグルコース濃度を常に低濃度に維持し, バクテリアなどのコンタミ防止につながる, ③酵母が炭素源を効率よく利用することができる, ④細胞の回収と同時に酵素も回収できるため繰返し発酵における酵素添加量を削減できる, など多くの利点を有していることが分かった。リグノセルロース系バイオマスの繰返し発酵の場合, バイオマス残渣と酵母の分画が課題であったが, 低速の遠心分離によるバイオマス粗取り操作を行うことにより, 5 回発酵を繰返してもエタノール生産量を維持する

Yeast cells co-displaying EGII, CBHII, BGL1

Fig. 4 Yeast cells co-displaying cellulases such as EGII and CBHII from *Trichoderma reesei*, and BGL1 from *Aspergillus aculeatus* using α -agglutinin anchor.

Fig. 5 Repeated batch fermentation for ethanol production from hydrothermally pretreated rice straw using wild-type and cellulase-codisplaying NBRC1440/B-EC3 strains.

ことに成功した (Fig. 5)⁷⁾。

ヘミセルロースは、セルロースと比べて構造的に弱い
ため、前処理工程である程度加水分解が進むことが多
い。筆者らはキシラン主鎖にグルコースが結合したキシ
ログルカンを変換する酵母の開発を試みた。セルロースと同様に、酵母にはキシランをキシロースに分解する能力がないためキシラン分解酵素の遺伝子を発現させる必要がある。また、*S. cerevisiae* にはキシロース資化能力がないため、キシロース代謝酵素の遺伝子を細胞内で発現させる必要がある。そこで、キシランをキシロースに分解するのに必要な *T. reesei* 由来キシラナーゼと *A. oryzae* 由来 β -キシロシダーゼを細胞表面層に集積させるとともに、*Scheffersomyces stipitis* 由来のキシロースレダクターゼ (XR) 遺伝子およびキシリトールデヒドロゲナーゼ (XDH) 遺伝子、*S. cerevisiae* 由来のキシロキナーゼ (XK) 遺伝子を過剰発現させた。稲わらを水熱処理して得られたヘミセルロース画分を基質として発酵を行ったところ、XR、XDH、XK だ

けを発現させたコントロール株と比べて 2.5 倍高いエタ
ノール生産を実現することができた (Fig. 6)⁸⁾。この結
果は、ヘミセルロースが酵母の細胞表面層でキシロースまで
加水分解され、キシロースが酵母に資化されてエタノール
に変換されたことを示している。

4 リグノセルロース由来の発酵阻害物への耐性能を付 与した酵母の開発

リグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産
におけるもう一つの問題は、前処理工程で生成するバイ
オマス由来の過分解物質 (フラン類、酢酸、ギ酸、レブ
リン酸、バニリン、シリングアルデヒドなど) が発酵工
程に持ち込まれ、酵母の生育や発酵を阻害することであ
る。通常、高温高压条件下で行われる前処理では、構造
の弱い植物組織において、グルコースやキシロースがさ
らに分解されてフラン類や弱酸類が生成する。特に、酢
酸やギ酸は生成量が多く、細胞への毒性が高い²⁾。これ
らの弱酸類は、非解離状態で細胞膜を通過し、細胞内で
解離してプロトン放出することで細胞内 pH を低下さ
せると考えられている。細胞内 pH の低下は核酸の生合
成を阻害するだけでなく、過剰に蓄積したプロトンを出
すために ATPase が稼働して細胞内 ATP を枯渇させ
ると考えられている²⁾。そこで、バイオエタノール生産
においては、発酵阻害物が存在していても基質を高い収
率でエタノールに変換させる微生物の開発が求められて
いる。

筆者らは、まず、細胞内の代謝状態を俯瞰することが
可能な網羅的代謝物解析 (メタボローム解析) 技術を用
いて、弱酸が酵母のエタノール代謝に与える影響を調べ
た⁹⁾。*Scheffersomyces stipitis* 由来 XR 遺伝子および
XDH 遺伝子、*S. cerevisiae* 由来 XK 遺伝子を導入した
形質転換キシロース資化性酵母株を用いて、30 mM あ
るいは 60 mM の酢酸存在下でキシロース発酵を行っ
た。発酵中の細胞内代謝物プロファイル解析したところ、
エタノール生産速度の低下にともなって非酸化的バ

Fig. 6 Ethanol production from hemicellulosic materials obtained from rice straw by hydrothermally pretreatment using recombinant xylose-fermenting strain (MN8140X) and xylose-fermenting hemicellulase-dispalying strain (MN8140XBXX).

ントースリン酸回路 (Fig. 7) の代謝中間体が酢酸濃度依存的に蓄積していることが明らかになった。特に、発酵開始 24 h 後のセドヘプツロース 7 リン酸濃度は、60 mM 酢酸存在下の蓄積量が酢酸非存在下の 22 倍以上であった。この結果は、酢酸添加により非酸化的五糖リン酸回路の代謝速度が減速している可能性を示唆している。そこで、非酸化的五糖リン酸回路の律速段階と考えられているトランスアルドラーゼの遺伝子 (*TAL1*) を過剰発現させたところ、*TAL1* 遺伝子高発現型キシロース資化性酵母は酢酸存在下で高いエタノール生産性を示し、30 mM 酢酸存在下では 83% の対糖エタノール収率を達成した (Fig. 8)。また、*TAL1* 過剰発現株では非酸化的五糖リン酸回路に関与する中間代謝物質の蓄積が解消されていることが確認された⁹⁾。

次に、ギ酸による発酵阻害の影響を調べるために、5 ~ 15 mM のギ酸存在下でキシロース発酵した酵母から

RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析 (トランスクリプトーム解析) を行った¹⁰⁾。その結果、ギ酸濃度依存的に *ALD5* 遺伝子、*HXK2* 遺伝子、*VCX1* 遺伝子、*GPD2* 遺伝子、*HXT4* 遺伝子の発現量が増大していた。中でもギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*FDH1*) の発現量が顕著に増加していることが明らかとなった。ギ酸デヒドロゲナーゼはギ酸を二酸化炭素に変換する酵素であることから、解毒目的で酵母が自発的に *FDH1* 遺伝子を発現させていることが考えられる。そこで、*FDH1* を過剰発現するキシロース資化性酵母を作出し、ギ酸存在下でのキシロース発酵を行った。その結果、20 mM ギ酸存在下では、*FDH1* を導入していない株のエタノール生産量が半分以下になるのに対し、*FDH1* 過剰発現株はギ酸非存在下と同程度のエタノールを生産することが分かった¹⁰⁾。酵母は本来、培地中のギ酸濃度に応答して *FDH1* を発現するが、*FDH1* の過剰発現を人為的に促

Fig. 7 Schematic representation of ethanol biosynthesis pathway in a recombinant xylose-fermenting yeast strain.

Fig. 8 Ethanol production from xylose in the presence of 0 mM (A) and 30 mM acetate using *TAL1*-overexpressing strain (circle symbols) and control strain (square symbols).

すことにより、ギ酸消去能が向上してエタノール生産量が増大したと考えられる。

近年、システムバイオロジーという概念が定着しつつあり、遺伝子発現やタンパク質の蓄積、代謝物の生合成などの生物情報をグローバルに捉えようとする研究が進められている。システムバイオロジー解析は、ブラックボックスの多い細胞内代謝メカニズムの中から、微生物に目的の形質を付与するための改変戦略を導出するのに有効であることが示されつつある²⁾。本研究では、メタボローム解析やトランスクリプトーム解析に基づく代謝改変を行うことで、酵母の発酵阻害物耐性を向上させることに成功した。このような手法は今後、バイオリファイナリーに適した微生物を創製するためのキーテクノロジーになることが期待される。

5 おわりに

バイオマス資源から、燃料やプラスチックなどの大量生産・消費される製品群を統合的に生産して社会に供給することは、持続可能な低炭素化社会を実現する上で重要である。こうしたバイオリファイナリーは、低環境負荷型のバイオ技術を駆使して作り出すことが望ましく、今後のグリーン・イノベーションの推進力になると期待できる。神戸大学では、ラボスケールでの実験結果をもとにベンチプラントの設計・製作を行い、CBPを核として草本系バイオマスから無水エタノールを製品として回収する、一貫プロセスの実証試験を開始した。バイオマス分解能とプロダクト高生産能を両立する微生物の創製は、バイオプロセスによる液体燃料・化学品生産の実用展開を可能にする切り札と言える。近年、CBPを実

現する微生物の開発は世界的な競争となっているが、酵母は、高いグルコース資化能力を有し、細胞が堅牢で溶菌しにくく、ストレス耐性も高いため雑菌汚染を抑えた発酵を実現する上で有用な微生物の1つである。今後の研究開発の促進により、微生物の高機能化がバイオプロセスの用途を拡大し、バイオリファイナリーの構築が加速することを期待したい。

文 献

- 1) E. Gnansounou, *Handbook of plant-based biofuels* (A. Pandey ed.), CRC Press, p.57 (2008).
- 2) T. Hasunuma & A. Kondo, *Biotechnology Advances*, **30**, 1207 (2012).
- 3) T. Hasunuma, F. Okazaki, N. Okai, K. Y. Hara, J. Ishii & A. Kondo, *Bioresource Technology*, **135**, 513 (2013).
- 4) W. H. van Zyl, L. R. Lynd, R. den Haan & J. E. McBride, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **108**, 205 (2007).
- 5) Y. Matano, T. Hasunuma & A. Kondo, *Bioresource Technology*, **108**, 128 (2012).
- 6) Y. Matano, T. Hasunuma & A. Kondo, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 2231 (2013).
- 7) Y. Matano, T. Hasunuma & A. Kondo, *Bioresource Technology*, **135**, 403 (2013).
- 8) T. Sakamoto, T. Hasunuma, Y. Hori, R. Yamada & A. Kondo, *Journal of Biotechnology*, **158**, 203 (2012).
- 9) T. Hasunuma, T. Sanda, R. Yamada, K. Yoshimura, J. Ishii & A. Kondo, *Microbial Cell Factories*, **10**, 2 (2011).
- 10) T. Hasunuma, K. M. Sung, T. Sanda, K. Yoshimura, F. Matsuda & A. Kondo, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **90**, 997 (2011).