

セルラーゼ表面提示型発現酵母を用いたセルロース系素材のアルコール発酵

都築正男^{*1)}, 松澤一幸^{*1)}, 石井純^{*2)}, 近藤昭彦^{*2)}

Ethanol Fermentation from Cellulosic Materials Using Yeast Expressed Cellulase on the Cell Surface

TSUDUKI Masao^{*1)}, MATSUZAWA Kazuyuki^{*1)}, ISHII Jun^{*2)}, KONDO Akihiko^{*2)}

糸状菌のセルラーゼを酵母の細胞表面に付着させて発現させ、セルロース系素材を材料に発酵を行い、アルコールの生成を試みた。 *Aspergillus oryzae* 由来のエンドグルカナーゼ及び、セルビオヒドロラーゼ、 *Aspergillus acleatus* 由来の α -グルコシダーゼの3種類の酵素遺伝子を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入し、細胞の表面で発現させた。通常、酵母では炭素源としてセルロースを用いると発酵不可能だが、今回作成した酵母では、エンドグルカナーゼ、セルビオヒドロラーゼ、 α -グルコシダーゼの活性を示し、セルロースを炭素源として利用でき、発酵によりエタノールの生成を確認した。さらにセルロース系素材の一例としてクズ蔓抽出残渣について、前処理を検討し、作成した酵母により発酵した。

1. 緒言

近年、化石資源の枯渇や石油価格の高騰等のエネルギー問題や、廃棄物の削減や地球温暖化防止等環境問題に対して特に関心が持たれており、石油に代わるエネルギー源や化成品の原料として、バイオマスの利用が注目されており、バイオマスから化成品や燃料などを生産する技術はバイオリファインリーと呼ばれている。バイオエタノールの製造技術の研究は、自動車燃料としてバイオディーゼルとともに世界中で積極的に行われている。アメリカ合衆国やブラジルなどでは商業的な生産が積極的に進められているが、その原料はトウモロコシやサトウキビなどのデンプンもしくは糖そのものを用いており、食糧との競合が懸念されている。そこでセルロースを主たる成分とする原料が注目されている。しかし、セルロースを主成分とする植物細胞の細胞壁は、二次細胞壁としてリグニンが蓄積し、セルロースと複合体を形成することから、糖化が困難で、高活性のセルラーゼの開発と共に前処理技術の開発が現在世界中で精力的に行われている。

日本でも、この分野において様々な研究開発が行われ、ユニークな研究成果も現れてきている。その中の一つである京都大学大学院農学研究科・植田充美教授、神戸大学自然科学系先端融合研究環・近藤昭彦教授らによるタンパク質の細胞表面提示技術¹⁾²⁾を本研究で取り上げた。この技術は、細胞壁に共有結合で結合しているタンパク質である GPI アンカータンパク質と目的のタンパク質を遺伝子工学的に融合し、微生物で発現させて目的のタンパク質を細胞の表面に提示する技術である。この技術で様々な酵素を細胞の表面に提示すると、バイオマスから直接バイオエタノールなどの生成物を 1 反応槽で生産することが可能となる。

セルロースから直接エタノールを生産するには、セルラーゼを酵母の細胞表面に提示することで、本来酵母が炭素源として用いないセルロースを細胞の表面でグルコースに分解し、それを取り込み、エタノールへ変換することで可能となる。セルラーゼは単一の酵素ではなく、エンドグルカナーゼ(エンドセルラーゼ)、セルビオヒドロラーゼ(エキソセルラーゼ)、 α -グルコシダーゼが協調して働き、セルロースをグルコースに分解する。これらの酵素を酵母の細胞表面に提示することでセルロースを直接発酵してエタノールを生成する。

本研究では、セルロースを材料としてバイオマスの有用物質への変換を目指して、麹に用いられる *A. oryzae* のエンドグルカナーゼ遺伝子、セルビオヒドロラーゼ遺伝子及び強い α -グルコシダーゼ活性を示す *A. acleatus* の α -グルコシダーゼ遺伝子を、酵母の細胞表面提示型で発現させることで、セルロースを発酵してエタノールを生成した。また、セルロース系の素材として、純品のセルロースの他、イソフラボンを含むエキスを抽出したクズ蔓³⁾の抽出残渣を使用し、クズ蔓については、前処理方法の若干の検討も併せて行った。

本研究では、セルロースを材料としてバイオマスの有用物質への変換を目指して、麹に用いられる *A. oryzae* のエンドグルカナーゼ遺伝子、セルビオヒドロラーゼ遺伝子及び強い α -グルコシダーゼ活性を示す *A. acleatus* の α -グルコシダーゼ遺伝子を、酵母の細胞表面提示型で発現させることで、セルロースを発酵してエタノールを生成した。また、セルロース系の素材として、純品のセルロースの他、イソフラボンを含むエキスを抽出したクズ蔓³⁾の抽出残渣を使用し、クズ蔓については、前処理方法の若干の検討も併せて行った。

2. 実験方法

2.1 菌株及び培地

形質転換宿主として酵母 *S. cerevisiae* YPH499 株を使用した。YPH499 株の形質転換体は要求するアミノ酸 (60 mg/L アデニン, 20 mg/L ヒスチジン, 30 mg/L リジン, 60

*1) 食品・毛皮革技術チーム, *2) 神戸大学自然科学系先端融合研究環

mg/L ロイシン, 40 mg/L トリプトファン, 20 mg/L ウラシル: ロイシン・トリプトファン・ウラシルは選抜マーカーの必要に応じ除いた)を加えた SD 培地 (6.7 g/L yeast nitrogen base w/o amino acid(Difco), 20 g/L グルコース, 20 g/L 寒天) で選抜した。

2. 2 プラスミド構築

A. oryzae RIB40 株のエンドグルカナーゼ CelB 遺伝子⁴⁾, セロビオヒドロラーゼ CelC⁵⁾遺伝子を細胞表面に提示するためのプラスミドは次のように構築した。CTAB 法で調製した *A. oryzae*RIB40 株のゲノムを鋳型として PCR で CelB 遺伝子および CelC 遺伝子の全長を増幅した。プライマーは CelB 遺伝子には 5'-ATGATCTGGACACTCGCTCCCTTTG-3' 及び 5'-CTAATGCCTGTAGGTAGATCCAATATC-3', CelC 遺伝子には 5'-AGTCAAGATGGCTTCCCTTT-3'及び 5'-AAAGTAGATAAAGTTCATCACCTG-3'を用いて, TA クローニングし pTA2 (東洋紡) にライゲーションした。

酵母の表面提示発現用ベクターとして神戸大学近藤昭彦教授より提供頂いた PGK プロモーター, -アグルチニン 3' 側断片を含む pGK406-AG⁶⁾に挿入するために, シグナルペプチドに相当する部分を除き, 制限酵素認識配列を付加したプライマー (CelB 遺伝子: 5'-TTTTGTCATGCCAGCAGGTGGGA ACTACAGC-3' 及び 5'-CCCCAGATCTATGCCTGTAGGTAGATCCAA-3', CelC 遺伝子: 5'-CCTTGAATTCCAGCAGGTTGGGACTTACCA-3' 及び 5'-TTTTGCATGCGCTTTGAAGGTGGAGCCGA-3') を用いて, CelB 遺伝子及び CelC 遺伝子を含む pTA2 を鋳型として PCR で増幅した。PCR 産物は制限酵素処理し, pGK406-AG にライゲーションし, それぞれ, pGK406-CelB-AG, pGK406-CelC-AG とした (図 1)。また多重遺伝子導入を行うために, CelC 遺伝子は pGK406-AG より, *Xho*I, *Not*I 処理を行い, pRS405 にライゲーションし, pGK405-CelC-AG とした (図 1)。

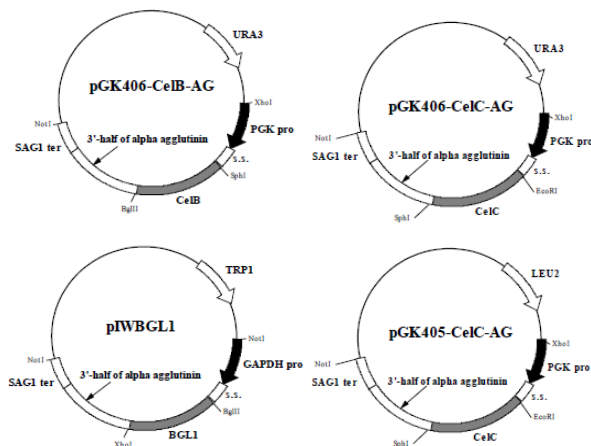


図 1 セルラーゼの細胞表面提示型発現プラスミド

A. aculeatus の -グルコシダーゼ BGL1 遺伝子は, 神戸大学近藤昭彦教授より提供された GAPDH プロモーター

-BGL1 遺伝子- -アグルチニン 3'側断片を pRS404 にライゲーションした pIWBGL1⁷⁾を用いた (図 1)。

2. 3 酵母の形質転換

pGK406-CelB-AG, pGK406-CelC-AG, pGK405-CelC-AG は *Eco*RV で切断し, 直鎖状にした。pIWBGL1 は, *Bst*1107I で切断し, 直鎖状にした。直鎖状にした pGK406-CelB-AG, pGK406-CelC-AG で, 酢酸リチウム法により *S. cerevisiae* YPH499 株を形質転換し, ウラシルを除いた SD 培地で選抜し, それぞれ CelB/YPH499, CelC/YPH499 と名付けた。生じた形質転換体は, 酵素活性の確認に供した。

CelB, CelC, BGL1 を同時に細胞表面提示型で発現させるために, 直鎖状にした pIWBGL1 で, CelB/YPH499 を酢酸リチウム法により形質転換し, ウラシル及びトリプトファンを除いた SD 培地で選抜し, CelB/BGL1/YPH499 と名付けた。さらに直鎖状にした pGK405-CelC-AG で, CelB/BGL1/YPH499 を酢酸リチウム法により形質転換し, ウラシル, トリプトファン及びロイシンを除いた SD 培地で選抜し, CelB/CelC/BGL1/YPH499 と名付けた。生じた形質転換体は, 酵素活性の確認後, 発酵試験に用いた。

2. 4 酵素活性

YPDA 培地 (10 g/L 酵母エキス, 20 g/L ペプトン, 20 g/L グルコース, 60 mg/L アデニン) で培養した菌液を遠心分離で集菌し, 蒸留水で洗浄後, 1 mL の蒸留水に懸濁した菌液を使用した。

CelB/YPH499, CelC/YPH499, CelB/CelC/BGL1/YPH499 のエンドグルカナーゼ活性及びセロビオヒドロラーゼ活性はカルボキシメチルセルロース (CMC) の加水分解により決定した。100 mM 酢酸緩衝液で pH4.0 に調製した 10 g/L の CMC に, 等量の 100 mM 酢酸緩衝液で pH4.0 に調製した菌液を加え, 45 °C で 48 時間インキュベートした。反応液は遠心分離した上清を用いて, ソモギーネルソン法で還元糖を定量して酵素活性を決定した。

CelB/BGL1/YPH499, CelB/CelC/BGL1/YPH499 の -グルコシダーゼ活性は *p*-ニトロフェニル -グルコピラノシド (pNPG) を基質として測定した⁸⁾。反応液は 10 mM pNPG, 1 M 酢酸緩衝液 (pH5.0) に 3 倍量の菌液を加え, 37 °C で 10 分間反応した。反応後, 等量の 3 M 炭酸ナトリウムを加え, 上清を用いて A_{400} を測定して活性を求めた。

2. 5 クズ蔓抽出残渣の前処理

粉碎済みのクズ蔓抽出残渣を用いて, 主にアルカリ及び酸での加水分解を行い, 前処理を検討した。残渣を 50・100・121 °C で水 2 時間処理, 50・100・121 °C で 1 M 水酸化ナトリウム 1 時間処理, 121 °C で 0.5 M 水酸化ナトリウム 1 時間処理, 100 °C で 1 M 水酸化ナトリウム 1 時間処理 + 100 °C の 0.5 M 硫酸 1 時間処理を行った。前処理後のクズ蔓抽出残渣はセルラーゼ “オノヅカ” 12S (ヤクルト薬品工業 (株)) によって糖化した。反応液は 0.1 M 酢酸緩衝液

(pH4.0) 20 mL に 0.4 g の前処理後中和したクズ蔓抽出残渣, 0.1 g のセルラーゼ “オノズカ” 12S を加え, 55 で 48 時間反応させ, グルコーステストワコーCII (和光純薬(株)) でグルコースを定量し, 前処理条件を比較した。

2.6 発酵試験

YPDA 培地 5 mL で 24 時間, 30 で振盪培養した CelB/CelC/BGL1/YPH499 の前培養液を, 500 mL の YPDA 培地に加え, 48 時間 30 で振盪培養した。培養液を 3000rpm で遠心分離して細胞を集め, 蒸留水で洗浄後, 蒸留水に懸濁し, OD₆₀₀=100 に調製したものを菌液として用いた。

発酵に用いる炭素源としてリン酸膨潤セルロース (PASC)⁹⁾ 及び前処理後のクズ蔓抽出残渣を使用した。発酵液は, 1 × YP 培地 (10 g/L 酵母エキス, 20 g/L ペプトン), 10 g/L PASC または 20~40 g/L クズ蔓抽出残渣, 菌液 (OD₆₀₀=20), 0.5 g/L 二亜硫酸カリウムとし, 30 で 96~144 時間, 発酵を行った。

発酵液は経時的に抜き取り, 遠心分離後の上清をエタノールと糖の定量に用いた。定量は次の条件で HPLC により行った: カラム: ShimPack SPR-Pb(250mmL × 7.8mmID), 流速: 0.6ml/min., カラムオープン: 80, 検出器: RID, 溶離液: 水, 分析時間: 35 分。

3. 結果及び考察

3.1 3 種類のセルロース分解酵素を細胞表層提示型で共発現させた酵母の作成

CelB 及び CelC の酵母での組換え型酵素の活性は, 既報にはなく, その活性の有無を調べるためにそれぞれ単独で酵母に表層提示型で発現させた。その結果, いずれも pGK406-AG のみを導入した対照と比べ, 高い活性を示し (図 2A), CelB 及び CelC が酵母で活性型の酵素として発現することが分かった。また, CelB に比べ, CelC の活性がかなり低かったが, セロビオヒドロラーゼは, エンドグルカナーゼにより生じた結晶性セルロースに対して働くためであると考えられる。

次に, 3 種類のセルロース分解系の酵素 (エンドグルカナーゼ, セロビオヒドロラーゼ, β -グルコシダーゼ) を共発現する酵母を作成した。形質転換体において, CMC 分解活性, β -グルコシダーゼ活性は, いずれも認められた (図 2A・B)。セルロースはエンドグルカナーゼにより, 大まかに切断され, セロビオヒドロラーゼでセロビオースとなり, β -グルコシダーゼにより最終的にグルコースとなる。従って, この形質転換体では 3 種類全ての酵素が酵母の細胞表層に提示されて発現しており, 細胞に取り込む前に細胞表面で, セルロースからグルコースへ変換が可能であると考えられる。

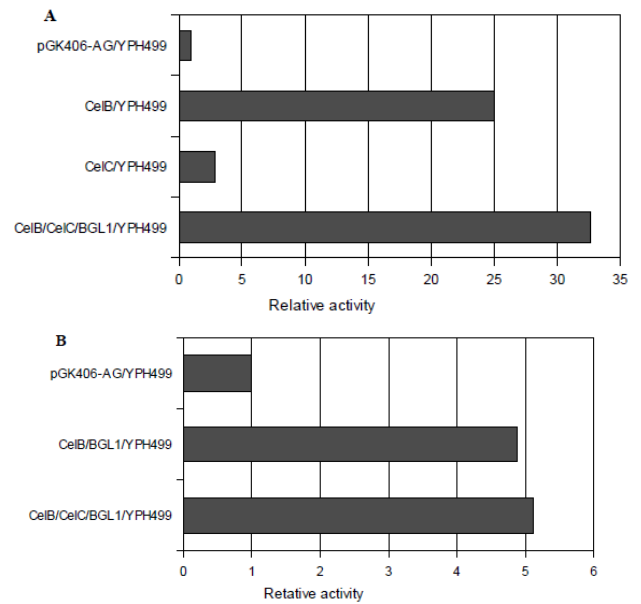


図 2 セルラーゼ表層提示型酵母の酵素活性. A; CelB, CelC の CMC 分解活性. B; BGL1 の pNPG 分解活性. いずれもベクターを導入した酵母の活性を 1 としたときの比活性を示す。

3.2 クズ蔓抽出残渣の前処理

クズ蔓抽出残渣の前処理は, 前処理後の酵素処理で生じたグルコース量により比較した (図 3)。水による処理では, 100 までは前処理を行わないものとほとんど変わらなかったが, 121 では, 前処理の効果が有り, グルコース量の増加がみられた。水酸化ナトリウム処理では処理温度が高いほど, 前処理効率が良く, 121 で最も多くのグルコースが生成し, 21.2 mg/100 mg 残渣であった。さらに 0.5 M の水酸化ナトリウム処理は, 121 では水処理と比べ, 処理時間が半分で同程度の前処理が可能であった。一方, 水酸化ナトリウムと硫酸を併用すると 100 でも水酸化ナトリウムのみで 121 処理するのと同等のグルコースが生じた。しかし, 水酸化ナトリウムと硫酸の併用では処理時間が 2 倍であるため, 同じ処理温度であれば, 水酸化ナトリウムのみでも処理時間を延長すれば, 同程度の前処理は可能であると考えられる。希硫酸法が木質系バイオマスの前処理として用いられる例が多いが, セルロースの過分解生成物の反応制御が困難であることや, 酸を使用することから耐酸性容器の使用などの課題がある。一方, アルカリによる加水分解は, リグニンの構成成分を分析する際の手法として用いられており, 特にリグニンのエーテル結合部分を切断し, 希硫酸法に比べて効果的に可溶化すると考えられる。またヘミセルロース・リグニン間の結合が切断されることや, セルロース繊維の膨潤が起こることなどにより, セルラーゼがセルロースに接触しやすくなり, セルロースの糖化の向上が可能であると考えられる。

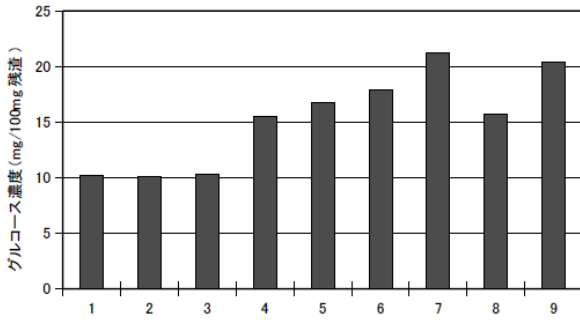


図3 各種前処理後クズ蔓抽出残渣のセルラーゼ処理後のグルコース量. 1: 前処理無し. 2: 50% 水, 2時間. 3: 100% 水, 2時間. 4: 121℃, 水, 2時間. 5: 50% 水, 1 M 水酸化ナトリウム, 1時間. 6: 100% 水, 1 M 水酸化ナトリウム, 1時間. 7: 121℃, 1 M 水酸化ナトリウム, 1時間. 8: 121℃, 0.5 M 水酸化ナトリウム, 1時間. 9: 100% 水, 1 M 水酸化ナトリウム, 1時間 + 100% 水, 0.5 M 硫酸, 1時間.

3.3 セルラーゼを表面提示させた酵母を用いたセルロースのアルコール発酵

PASC (10 g/L) を CelB/CelC/BGL1/YPH499 で発酵させると、発酵開始から1日目で1.9 g/Lのエタノールが生成し、5日目で2.2 g/Lのエタノールが生成した。本実験においてエタノールの生成量は5日目が最高となった(図4)。

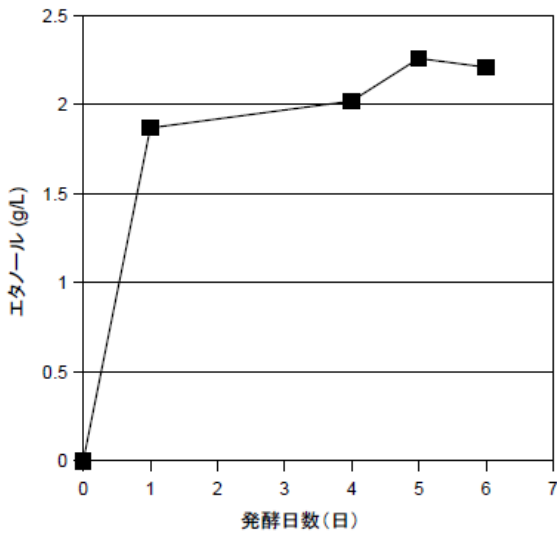


図4 CelB/CelC/BGL1/YPH499によるPASCの発酵

一方クズ蔓抽出残渣は、121℃で1 M 水酸化ナトリウム1時間前処理を行い、中和後、発酵試験を行った。その結果、40 g/Lの濃度になるように発酵液にクズ蔓抽出残渣を添加して発酵したところ、エタノールの生成は見られず、グルコースの生成が見られた。グルコースは発酵開始から徐々に増加し、発酵開始から6日目で3.4 g/Lに達した。クズ蔓抽出残渣の発酵によって、エタノールが生成せず、グルコースが蓄積したのは、添加したクズ蔓抽出残渣量が多く、

酵母の表面で酵素反応が起きているが、発酵阻害が起こり、エタノールへの変換がうまく進んでいない可能性があると考えられる。このため、発酵液中加入るクズ蔓抽出残渣を20 g/Lにしたところ、約1.5 g/Lのエタノールの生成が確認できた(図5)。

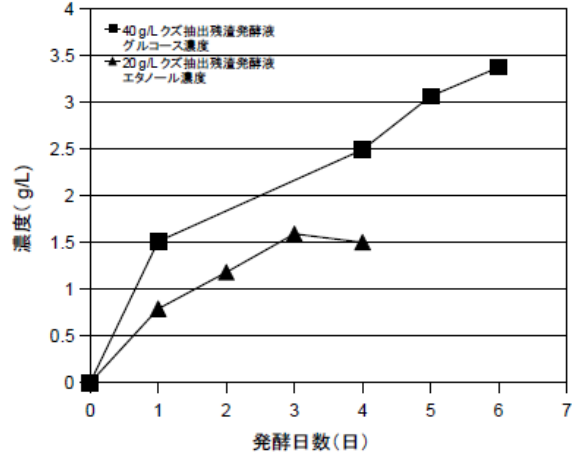


図5 CelB/CelC/BGL1/YPH499によるクズ蔓抽出残渣の発酵

A. oryzae 及び *A. acleatus* のセルラーゼを細胞表面提示型で共発現させた酵母 CelB/CelC/BGL1/YPH499 でセルロース系の素材からアルコール発酵が可能であることが示された。また、高価な酵素剤を用いず、かつ細胞を回収することで繰り返し使用でき、反応槽を変えずに1反応槽でセルロースの糖化と発酵を行うためのモデルを示すことができたと考えられる。

4. 結言

本研究で糸状菌のセルラーゼ遺伝子3種類を酵母の細胞表面で共発現させた菌株を作成し、セルロース及びクズ蔓抽出残渣を発酵させ、生成物を分析した。またクズ蔓抽出物はそのままでは、糖化されにくいので、前処理の条件検討を併せて行った。主な結果は次の通りである。

- (1) *A. oryzae*RIB40株のエンドグルカナーゼ CelB 遺伝子、セロピオヒドロラーゼ CelC 遺伝子、*A. acleatus* の α -グルコシダーゼ BGL1 遺伝子で酵母 *S. cerevisiae* YPH499株を形質転換し、3種類の活性型のセルラーゼを細胞表面提示型で共発現させた。
- (2)クズ蔓抽出残渣を加熱しながら1 M 水酸化ナトリウムで前処理することで、セルラーゼによる糖化の効率が上昇した。
- (3)*A. oryzae* 及び *A. acleatus*のセルラーゼを細胞表面提示型で共発現させた酵母で PASC、前処理後のクズ蔓抽出残渣を原料として発酵を行い、エタノールの生成を確認した。

謝辞

本研究にあたり、ご指導並びにご協力いただいた神戸大学自然科学系先端融合研究環・近藤昭彦教授、石井純助教をはじめ、同研究室の教職員、研究員、学生の皆さんに深謝いたします。

なお、本研究は、独立行政法人 科学技術振興機構 奈良県地域結集型研究開発プログラム、古都奈良の世紀植物機能活用技術開発事業並びに、奈良県廃棄物税使途事業研究の助成を受け実施した成果による。

参考文献

- 1) 植田充美, 近藤昭彦編; コンビナトリアル・バイオエンジニアリング, 化学同人, 2003
- 2) Yanase, S., Yamada, R., Kaneko, S., Noda, H., Hasunuma, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. ; *Biochem. J.*, (5), 449-455, 2010
- 3) 清水浩美, 都築正男, 松澤一幸; 奈良県工業技術センター研究報告, (33), 46-48, 2007
- 4) Kitamoto, N., Go, M., Shibayama, T., Kimura, T., Kito, Y., Ohmiya, K., and Tsukagoshi, N. ; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (46), 538-544, 1996
- 5) GenBank Accession No.AB089436; 2002
- 6) Ishi, J., Izawa, K., Matsumura, S., Wakamura, K., Tanino, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. ; *J. Biochem.*, (145), 701-708, 2009
- 7) Saitoh, S., Hasunuma, T., Tanaka, T., and Kondo, A. ; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (87), 1975-1982, 2010
- 8) Fujita, Y., Takasaki, S., Ueda, M., Tanaka, A., Okada, H., Morikawa, Y., Kawaguchi, T., Arai, M., Fukuda, H., and Kondo, A. ; *Appl. Environ. Microbiol.*, (68), 5136-5141, 2002
- 9) Walseth, C. S. ; *Technol. Assoc. Pulp Paper Ind.* (35), 228-233, 1952