

# 微生物によるキシロースからのエタノール生産

中央技術研究所 先端領域研究所 バイオ燃料グループ 小西 仁



## 1. はじめに

近年、運輸部門は次世代自動車の普及等により燃料多様化の方向に向かってはいるものの、石油燃料は引き続き重要なエネルギーの位置付けにある。一方で、エネルギーセキュリティの面からは原油の調達リスク等を踏まえ、燃料の多様化を図っていくことが重要である。また、石油などの化石燃料の使用により発生する温室効果ガスの削減が重要な課題となっている。以上の観点から、バイオ燃料はエネルギー多様化、温暖化対策の両面で有効な手段の一つであるが、採用の際にはライフサイクルでの温室効果ガス排出量を算定し、代替する化石燃料よりも低位なものを選択する必要がある。このような状況のもと、2009年にエネルギー供給構造高度化法が制定され、石油精製業者にバイオ燃料の利用が義務付けられた。同法において、2017年度には、原油換算で50万kLの持続可能性基準に適合したバイオエタノール（ライフサイクルにおける温室効果ガス排出量がガソリン比50%未満）をガソリンへ混和し、自動車燃料として供給することが目標値として掲げられている。

石油業界では、2007年度からバイオエタノールとイソブテンから合成したETBE (Ethyl tert-butyl ether) を配合したバイオガソリンの試験販売を開始し、2010年より本格導入を進めている。しかし、その原料の持続可能性基準適合エタノールは、現在ブラジルのサトウキビを原料とするエタノールであり、食料との競合を避ける意味からも、木や草などのセルロース系バイオマス原料とするエタノール製造技術の確立が急務となっている。

セルロース系バイオマスからエタノールを製造するには、これらの原料を熱や薬品により構造を破壊（前処理）した後、酵素処理により単糖まで分解（糖化）し、得られた単糖をエタノールに変換（発酵）する必要がある（図1）、各工程において効率化のための様々な取り組みがなされている。

セルロース系バイオマスはセルロース、ヘミセルロース、リグニンから構成されており、セルロースから六炭糖であるグルコースのみが、ヘミセルロースからは五炭糖であるキシロースが主成分として得られる。キシロースは得られる糖の比率として20～30%と、グルコースの40～50%に次いで多く得られる糖であり、バイオマスからのエタノール生産を考える場合、エタノール収率向上のためにはキシロ

スからのエタノール生産が重要な課題となる。本報文では微生物を用いたキシロースからのエタノール生産について概説する。

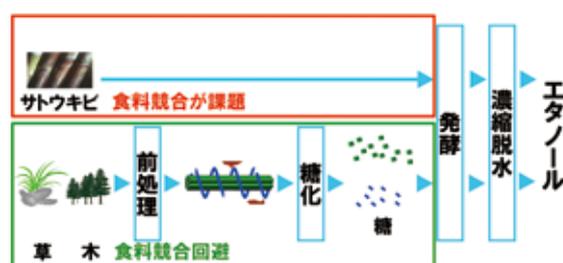


図1 バイオマスからのエタノール製造工程

## 2. キシロースからのエタノール生産に使用される微生物

キシロースからのエタノール生産には種々の微生物が用いられている。大腸菌は遺伝子改変技術が確立されていることもあり、古くから物質生産に使用されてきた。大腸菌自身キシロース利用能を有しており、エタノール生産能を付与したKO11株が構築されている<sup>1)</sup>。

また、エタノール生産能を持つザイモナス菌 (*Zymomonas mobilis*) やザイモバクター菌 (*Zymobacter palmae*) へのキシロース利用能付与も盛んに検討されている。これらの細菌は、エタノール生産速度が速く、エタノール収率が高いという特徴を持つ<sup>2) 3)</sup>。しかしながら、現在世界的に稼働している商業プラントで使用されているのは主に酵母である。

これは、酵母がエタノール生産性やエタノール耐性が比較的高く、ストレス耐性などのロバスト性にも優れ、細菌と比べて菌体の比重が大きく、実プロセスにおいて菌体分離が容易になるなどの利点を持つことによる。

キシロースからエタノールを生産できる酵母としては *Scheffersomyces stipitis*<sup>4)</sup> や *Candida shehatae*<sup>5)</sup> などが知られているが、現状ではエタノール耐性が十分でなく、遺伝子操作が容易でないなど扱いにくい面が多い。そこで我々は食品や酒類生産に実績のあるサッカロマイセス酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に着目し研究を開始した。この酵母は遺伝子操作も比較的容易であり安全性も高く、工業的利用や菌株改良の観点から有利であると考えられた。表1にキシロースからのエタノール生産に用いられる微生物をまとめた。

表1 エタノール生産に用いられる微生物

		細菌			酵母	
		<i>Escherichia coli</i> (大腸菌)	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Zymobacter palmae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (醸造酵母)	<i>Scheffersomyces stipitis</i>
グルコース	利用能	◎	◎	◎	◎	○
	エタノール生産性	×	◎	◎	◎	○
キシロース	利用能	○	×	×	×	○
	エタノール生産性	×	×	×	×	○
エタノール耐性		低	高	低	高	低
備考		物質生産の汎用宿主	ヤシ油・テキヤ製造に利用		酒造りに利用	

### 3. 酵母によるキシロースからのエタノール生産

#### 3.1 キシロース利用遺伝子の選定

*S.cerevisiae* はキシロースなどの五炭糖を利用することができないため、キシロースからエタノールを生産するために、外部からの遺伝子導入によりキシロース利用能が付与される。キシロースを利用できる酵母は、キシロースをキシロース還元酵素 (XR) によりキシリトールに、キシリトールをキシリトール脱水素酵素 (XDH) によりキシルロースに変換する。さらに、キシルロースをキシルロースリン酸化酵素 (XK) によってリン酸化し、ペントースリン酸経路を経てエタノールを生成する。

XR は補酵素としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型 (NADPH) を、XDH はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 (NAD<sup>+</sup>) を要求するが、この補酵素特異性が代謝の流れを円滑に進めるための障害になるといわれている。

一方、細菌やカビの一部はキシロースをキシロース異性化酵素 (XI) の働きでキシルロースに変換し、それ以降の代謝経路は酵母と同じとなる (図2)。XI 反応系では補酵素の問題は回避され、キシロース利用においては有利と考えられるが、異種遺伝子の発現となるためか酵母内での酵素発現が十分ではなく、XR-XDH 系と比べてエタノール生産性は低く<sup>6)</sup>、*S.cerevisiae* へのキシロース利用能付与は *S.stipitis* 由来の XR、XDH 遺伝子を利用した研究が多数報告されている。

我々はセルフクローニング株作製の観点からサッカロマイセス酵母自身が持つ遺伝子の利用を検討した。セルフクローニング株とは導入される DNA がその生物と分類学上同一の種に由来する株であり、2004年に施行された「遺伝子組換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (カルタヘナ法)」で法の対象から除外されることが規定されている。セルフクローニング株を使用することで菌株漏えいの対応などにかかるコストを削減でき、社会的受け入れが容易になると予想されるなど実際の使用には大きな利点となる。

*S.cerevisiae* は複数種の XR 遺伝子を染色体上に有しているが、その中でも *GRE3* が主要な働きをしている<sup>7)</sup>。

XDH については *S.stipitis* と相同性が高い遺伝子 *XYL2* が存在する<sup>8)</sup>。また、同様の反応を触媒するソルビトール脱水素酵素遺伝子 *SOR1* も存在する<sup>9)</sup>。両遺伝子を *S.cerevisiae* 内で発現させ、酵素活性を *S.stipitis* 由来の XDH (*SsXYL2* 由来) と比較したところ、*XYL2* を発現させた場合は酵素活性が非常に弱かったが、*SOR1* を発現させた場合は *SsXYL2* を発現させた場合とほぼ同等の酵素活性を示すことがわかった (表2)<sup>10)</sup>。キシルロースリン酸化酵素遺伝子には自身が持つ *XKSI* を使用することとし、これらの遺伝子 *GRE3*、*SOR1*、*XKSI* を利用して、*S.cerevisiae* へのキシロース利用能付与をおこなった。

遺伝子が転写されて酵素として機能するためには、プロモーター、ターミネーターとよばれる配列を遺伝子の前後につける必要がある。我々は酵母の解糖系で恒常的に強力に働くホスホグリセレートキナーゼ遺伝子のプロモーター (*PGK1p*)、ターミネーター (*PGK1t*) を選択し、これらを *GRE3*、*SOR1*、*XKSI* につけて発現カセットを構築し、*S.cerevisiae* 染色体に導入した (図3)。

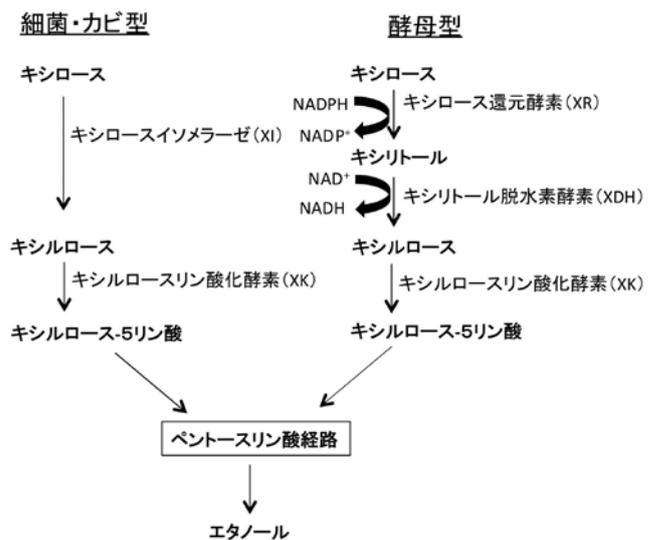


図2 キシロースからのエタノール生成経路

表 2 XDH 活性の比較

酵素遺伝子	活性, units/mg
<i>XYL2</i>	0.21
<i>SOR1</i>	2.10
<i>SsXYL2</i>	2.80



図 3 GRE3-SOR1-XKS1 カセット

### 3.2 *S.stipitis* 酵素との比較

構築した発現カセット中の *GRE3*, *SOR1* を *S.stipitis* の XR 遺伝子 (*SsXYL1*) と XDH 遺伝子 (*SsXYL2*) に置き換えた発現カセットを構築し、性能比較をおこなった。*S.cerevisiae* の XR は補酵素として NADPH しか利用できない。これに対して、*S.stipitis* の XR はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型 (NADH) と NADPH をともに利用できるため、キシロースの利用には有利と考えられている。

グルコース・キシロース共存系で培養試験をおこなった結果、意外にも *GRE3-SOR1-XKS1* カセットを導入した酵母は、*SsXYL1-SsXYL2-XKS1* カセットを導入した酵母より高いエタノール生成量を示した (図 4)<sup>10</sup>。*GRE3-SOR1-XKS1* カセットを導入した酵母は、補酵素のアンバランスにより代謝中間体のキシリトールが培養系に蓄積するものと予想されたが、*SsXYL1-SsXYL2-XKS1* カセットを導入した酵母と比べてキシリトールの生成が抑制されており、これがエタノールの高生産につながったと考えられる。キシリトール生成抑制の理由として、通気が適切であったため *SOR1* 酵素の反応に必要な NAD<sup>+</sup> の供給が十分に行われ、代謝が円滑に流れたためと推測された。

キシロース発酵においては微量の酸素が要求されるが、酸素量が多いと発酵よりも呼吸に代謝が流れ、エタノールを生成しなくなる (図 5)。酸素供給条件の最適化を図ることで補酵素のアンバランスを解消でき、エタノールの高生産につなげることができたものと考えている。

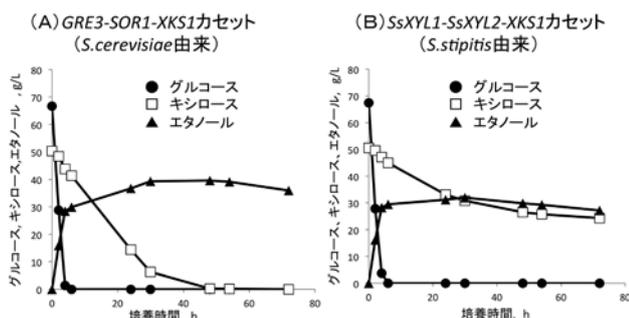


図 4 キシロース利用遺伝子発現カセット導入酵母の培養試験

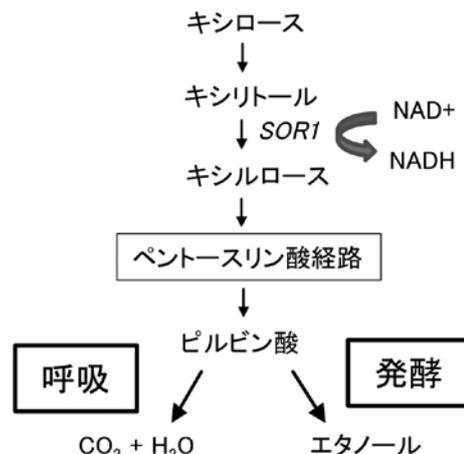


図 5 キシロース代謝の流れ

### 3.3 菌株の選定

高いエタノール生産性を達成するためには、性能の高い株の選定が重要である。*S.cerevisiae* はキシロースを利用できないが、キシリロースを利用してエタノールを生産することができる。キシリロースを基質としたエタノール高生産株に、キシロース利用能を付与することでキシロースからの高エタノール生産株を得ることができるとする報告がある<sup>11</sup>。手持ちの *S.cerevisiae* の一部にキシロース利用カセットを導入してキシロース利用能を付与し、キシロースおよびキシリトールからのエタノール生産能を調べたところ、両基質からのエタノール生産性には相関がみられなかった (図 6)。そこで、キシリロースからのエタノール生産能は、キシロースからのエタノール生産能の良し悪しの指標とはならないと判断し、手持ちの *S.cerevisiae* のすべて (約 120 株) にキシロース利用カセットを導入し、選別をおこなった。その結果、キシロースからのエタノール生産能が高い焼酎酵母 *S.cerevisiae* S2 株を取得することができた。

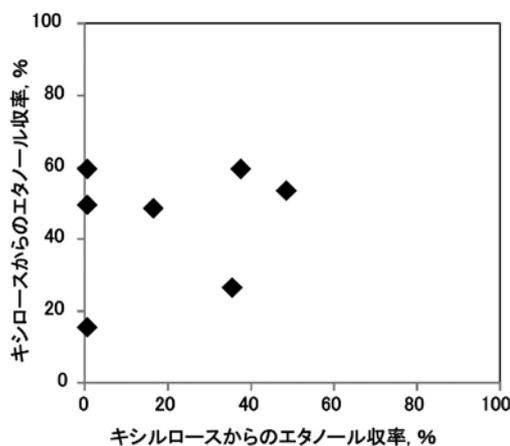


図 6 キシロース、キシリロースからのエタノール収率の関係

### 3.4 遺伝子改良によるエタノール生産能の向上

エタノール収率をさらに向上させるために、遺伝子操作による菌株改良を検討した。キシロース利用遺伝子を導

入したS2株に*SOR1*をさらに増強することにより、エタノール収率がさらに向上することがわかった(表3)<sup>12)</sup>。このことから、エタノール高生産のためには*GRE3*、*SOR1*、*XKS1*の発現バランスが重要であることが示唆された。

*PHO13*は脱リン酸活性をもつ酵素をコードする遺伝子であるが、これを欠損させることによりキシロースからのエタノール生産能が向上することが報告されている<sup>13)</sup>。キシロース利用能を付与した協会7号酵母の*PHO13*を欠損させたところ、エタノール収率向上が認められた(図7)<sup>14)</sup>。*PHO13*欠損が効果を示す理由は明らかではないが、キシロース利用にかかわる遺伝子制御に影響を与えていると考えられている<sup>15)</sup>。

これらの改良を組み合わせるにより、さらに収率向上を図ることができるものと考えている。

表3 *SOR1* 増強株のエタノール収率

菌株	エタノール収率, %
元株(増強前)	70.1
<i>SOR1</i> 増強株 A	74.5
<i>SOR1</i> 増強株 B	74.0
<i>SOR1</i> 増強株 C	76.2

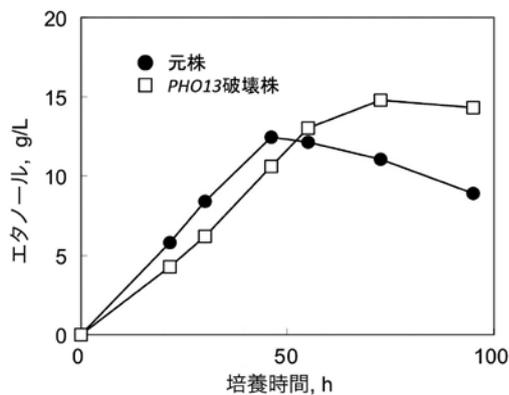


図7 協会7号*PHO13*破壊株の培養試験

#### 4. おわりに

経済的なプロセスを開発するためには、より糖消費が速くかつ高いエタノール収量をあたえる酵母の開発が必須である。酵母は約6,000もの遺伝子を持っており、機能未知の遺伝子も多い。その中からキシロースからのエタノール生産にかかわる遺伝子を抽出し、改良につなげていくことが必要である。我々は遺伝子発現解析や代謝シミュレーションによる中間代謝物の解析などの手法を活用し、エタノール生産能向上にかかわる遺伝子の探索を進めている。今後も遺伝子改良技術や解析技術を駆使して、実プロセスで使用可能な高性能セルフクロニング酵母の開発に取り組んでいきたい。

#### － 参考文献 －

- 1) Asghari, A. et al.; J. Ind. Microbiol., 16, 42-47 (1996)
- 2) Zang, M. et al.; Science 267, 240-243 (1995)
- 3) Yanase, H. et al.; Appl. Environ. Microbiol., 73, 2592-2599 (2007)
- 4) Agbogbo F.K. et al.; Process Biochem., 41, 2333-2336 (2006)
- 5) Delgenes J.P. et al.; Enzyme Microb. Technol. 19, 220-225 (1996)
- 6) Karhumaa K. et al.; Microb. Cell Fact., 6, 5 (2007)
- 7) Träff K.L. et al.; Yeast 19, 1233-1241 (2002)
- 8) Richard P. et al.; FEBS Lett., 457, 135-138 (1999)
- 9) Sarthy A.V. et al.; Gene 140, 121-126 (1994)
- 10) Konishi J. et al.; Biotechnol. Lett. 37, 1623-1630 (2015)
- 11) Matsushika A. et al.; Appl. Environ. Microbiol. 75, 3818-3822 (2009)
- 12) 日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集 p.920 (2014)
- 13) Van Vleet J.H. et al.; Metab. Eng. 10, 360-369 (2008)
- 14) 日本農芸化学会 2013 年度大会講演要旨集 p.1047 (2013)
- 15) Kim S.R. et al.; Appl. Environ. Microbiol. 81, 1601-1609 (2015)