

技術報告

宿主株が異なる *Saccharomyces cerevisiae* 組換え体におけるキシロース発酵能の比較

榊原祥清*, 王晓輝, 徳安健

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

Comparative evaluation of ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* derived from different host strains

Yoshikiyo Sakakibara*, Xiaohui Wang, and Ken Tokuyasu

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, Japan, 305-8642

Abstract

In order to produce ethanol from xylose, which was the second most abundant sugar in cellulosic biomass, the xylose reductase, xylitol dehydrogenase, and xylulokinase genes were overexpressed in three different *Saccharomyces cerevisiae* strains, ATCC 24860, InvSc1, and NBRC 0224. The recombinant strain derived from *S. cerevisiae* ATCC 24860 was expected to possess the high xylose-fermenting ability owing to its high ability of ethanol production from xylulose, which was an intermediate of the xylose metabolism. In contrast to the expectation, the recombinant strain of ATCC 24860 did not show higher xylose fermentation compared to the other recombinant strains. This result suggests that the conversion efficiency from xylose to xylulose is more critical for conferring the xylose-fermenting ability on *S. cerevisiae* by introducing the exogenous pathway consisting of xylose reductase and xylitol dehydrogenase, rather than the xylulose-fermenting ability of the host cells.

Key words: バイオエタノール (Bioethanol)、サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、キシロース発酵 (Xylose fermentation)、キシルロース発酵 (Xylulose fermentation)

緒言

近年、石油資源に替わり、再生可能なバイオマスを有用物質に変換してエネルギー源や工業原料として用いる技術開発が世界各国で進められている。バイオ

マスを原料として微生物の発酵により生産されるエタノール、いわゆるバイオエタノールは、石油資源の消費を抑え、大気中の二酸化炭素の増加を抑制するという観点から代替燃料として期待を集めている。とりわけ食料と競合しない燃料として、セルロースを主体とする草本類や木本類等の非可食部を利用したバイオエ

* 連絡先 (Corresponding author), sakaki@affrc.go.jp

タノールが望まれている。

すでにアメリカやブラジルで普及している澱粉或いは蔗糖を原料としたエタノール、すなわち第一世代のバイオエタノールとは異なり、第二世代のバイオエタノールとも称されるセルロース系エタノールは、糖類を取り出すプロセス（前処理、糖化）の困難さやコストの問題が解決されておらず、量産化への道程はまだ遠い。また、取り出された糖類も、澱粉系・蔗糖系バイオマスが、酵母等の微生物にとって利用が容易なグルコースが主体であるのに対して、植物の茎葉部に由来するセルロース系バイオマスには、グルコースの他にキシロースやL-アラビノース、マンノースといった多様な糖類が含まれている。草本植物には特にキシロースが多量（茎葉部に含まれる糖類全体の3～4割）に含まれており¹⁾、キシロースを効率的にエタノールに変換することが、セルロース系エタノール生産に

とって重要な課題となっている。

エタノール製造に最も利用されている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、グルコースを基質とした際には優れたエタノール生産能を示すものの、キシロースを発酵することは殆どできない。一方、自然界から単離されてきた酵母の中には、*Scheffersomyces stipitis* や *Scheffersomyces shehatae* といったキシロース発酵能を有するものも見出されている²⁾。ただし、これらの酵母はキシロース代謝に酸素を必要とし、酸素存在下においてエタノールも炭素源として消費してしまうことから、これを防ぐために通気条件等の煩雑な制御が必要になる。また、キシロース資化性の細菌 (*Escherichia coli* 等) のエタノール生産能を高めたり³⁾、エタノール生産能の高い細菌 (*Zymomonas mobilis* 等) にキシロース利用能を付与する⁴⁾ ことにより、キシロース発酵用細菌の作出も行われている。しかしな

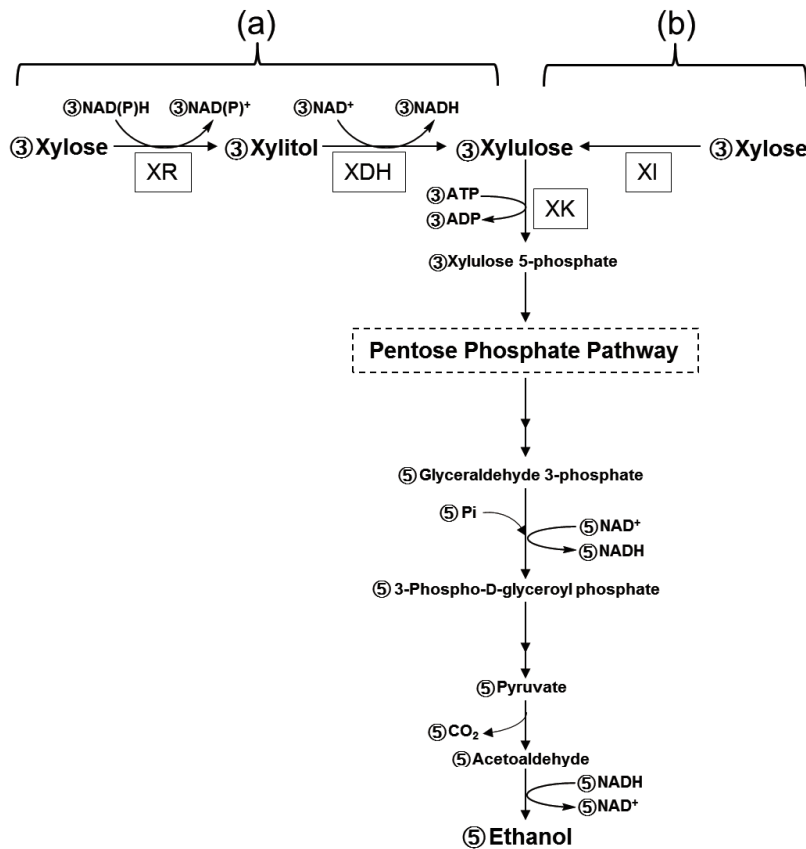


図1. キシロース発酵経路

XR-XDH 経路(a)或いは XI 経路(b)を介したキシロースからエタノールへの代謝経路を示す。XR:キシロースレダクターゼ, XDH:キシリトールデヒドロゲナーゼ, XI:キシロースイソメラーゼ, XK:キシロキナーゼ。丸数字は代謝過程におけるモル比を表す。理論的には、3分子のキシロースから5分子のエタノールが生成するため、エタノールの理論収率は0.510 g/g xyloseとなる。

表 1. プライマーの塩基配列

| Primer | Sequence (5' to 3') |
|--------------|---------------------------------------|
| PGKp-SmaI | gctctagaccggagatattataacatctgcataatag |
| PGKp-XbaI-as | gccgccgtctagatgtttatattgtgtaaaaagtag |
| XR-XbaI | gggtctagaatgccttctattaaagttgaactctgg |
| XR-KpnI | ggggtaccttagacgaagataggaatcttctgc |
| XDH-XbaI | ggctctagaatgactgtaaaccttctctggtg |
| XDH-XhoI | ccgctcgagtactcaggccgtcaatgag |
| XK-XbaI | ggctctagaatgttgttgcagtaattcagagacag |
| XK-XhoI | ccgctcgagttagatgagagcttcttccag |
| PGKp-SphI | gaccgcagccacagatattataacatctgcataatag |
| CYCt-SbfI | agccctcgaggaagcttgcataataagccttcg |
| PGKp-SbfI | gcccctcgagagatattataacatctgcataatag |
| CYCt-SalI | agccctcgacaagcttgcataataagccttcg |
| CYCt-SacI | ggcgagctcaagcttgcataataagccttcg |

がら、細菌はエタノール耐性や生育阻害物質耐性、菌の頑強性等が酵母より劣っており、エタノール生産用微生物の主流とはなっていない。

これまでに、*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与する試みが数多く行われており、その最も一般的な方法は、遺伝子組換えにより酵母細胞に異種生物のキシロース代謝系の一部を導入にするものである⁵⁻⁷⁾。微生物のキシロース代謝経路には、キシロース資化性真菌に存在するキシロースレダクターゼ (XR) 及びキシリトールデヒドロゲナーゼ (XDH) による経路 (XR-XDH経路) と、主に原核生物のキシロース代謝経路であるキシロースイソメラーゼ (XI) による経路 (XI経路) がよく知られている (図1)。1993年に世界で初めて開発されたキシロースを効率的に発酵する*S. cerevisiae*株は、*Sch. stipitis*由来のXR遺伝子 (XR) とXDH遺伝子 (XDH) から成るXR-XDH経路を導入したものであった⁸⁾。同時に、自身のキシロキナーゼ遺伝子 (XK) の高発現も遺伝子組換えにより行われており、これは野性型株の*S. cerevisiae*におけるキシロキナーゼ (XK) 活性が低いことを補うためであった⁸⁾。このHoらの方法は、*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与する手法として、現在でも多くの研究で利用されている。

図1に示したように、XR-XDH経路とXI経路とは、キシロースからキシロースに至る過程は異なるものの、キシロースから下流の代謝系は共通である。野性型の*S. cerevisiae*は、キシロースは殆ど資化及び発酵できないものの、キシロースは発酵できることが知

られている。そこで、*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与するときに、キシロース発酵能の高い株を宿主として利用する試みが行われている^{9,10)}。微生物株保存機関より入手可能な高キシロース発酵性の*S. cerevisiae*株としてATCC 24860があり、この株は一般的な出芽酵母よりも2倍以上高いキシロース発酵能を有することが報告されている¹⁰⁾。

本研究では、遺伝子組換えによって*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与する際に、宿主のキシロース発酵能が、作出される組換え株のキシロース発酵に与える影響を調べるために、キシロース発酵能の高いATCC 24860に加え、実験室株であるInvSc1, エタノール生産の実用株であるNBRC 0224¹¹⁾に対してXR-XDH経路の導入を行い、各遺伝子組換え株のキシロース発酵能について比較検討した。

方法

1. 酵母発現用ベクターの構築

*S. cerevisiae*の恒常発現型プロモーターであるホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター (*PGK1p*) を単離するために、PGKp-SmaIプライマー及びPGKp-XbaI-asプライマー (表1) を用いて、*S. cerevisiae* InvSc1のゲノムDNAを鋳型にしてPCRを行った。得られた*PGK1p*断片 (0.75 kb) を*XbaI*及び*SmaI*で消化した。次に、pYPGE15ベクター¹²⁾を*BstXI*で消化、T4 DNAポリメラーゼで平滑化後さらに*XbaI*で消化し、元々存在していた0.27 kbの*PGK1p*領域を除去した後、上述の0.75 kb長の*PGK1p*を連結し、pYPGE15Lを構築した (図2a)。

なお、本研究における酵母ゲノムDNAの調製は、Genとるくん酵母用 (タカラバイオ) を用いて、メーカーのプロトコールに従って行った。また、本研究におけるPCRには、ハイ・フィデリティ型のDNAポリメラーゼであるPfuUltra II fusion HS DNA Polymerase (Agilent) を用いた。

2. XR, XDH, XK 遺伝子のクローニング

Sch. stipitis NBRC 10063のゲノムDNAを鋳型にして、XR-XbaIプライマー及びXR-KpnIプライマー (表1) を用いて、XR (0.96 kb) をPCRにより増幅した。得られたDNA断片を*XbaI*及び*KpnI*で消化した後、同じ制限酵素で消化したpYPGE15Lに連結し、*PGK1p*とシトクロームcアイソフォームI転写ターミネーター (*CYC1t*) との間にXRが挿入されたpYPGE15L-XRを構築した (図2a)。次に、*Sch. stipitis* NBRC 10063のゲノムDNA

を鋳型にして, XDH-XbaIプライマー及びXDH-XhoIプライマー (表1) を用いてXDH (1.1 kb) をPCRにより増幅した. 得られたDNA断片をXbaI及びXhoIで消化し, 同じ制限酵素で消化したpYPGE15Lと連結し, PGK1pとCYC1tとの間にXDHが挿入されたpYPGE15L-XDHを構築した (図2a). さらに, *S. cerevisiae* InvSc1のゲノムDNAを鋳型にして, XK-XbaIプライマー及びXK-XhoIプライマー (表1) を用いてXK (1.8 kb) をPCRにより増幅した. 得られたDNA断片をXbaI及びXhoIで消化し, 同じ制限酵素で消化したpYPGE15Lと連結し, PGK1pとCYC1tとの間にXKが挿入されたpYPGE15L-XKを構築した (図2a).

3. XR, XDH, XK 遺伝子共発現用プラスミドの構築

まず, pYPGE15L-XKを鋳型にして, PGKp-SphIプ

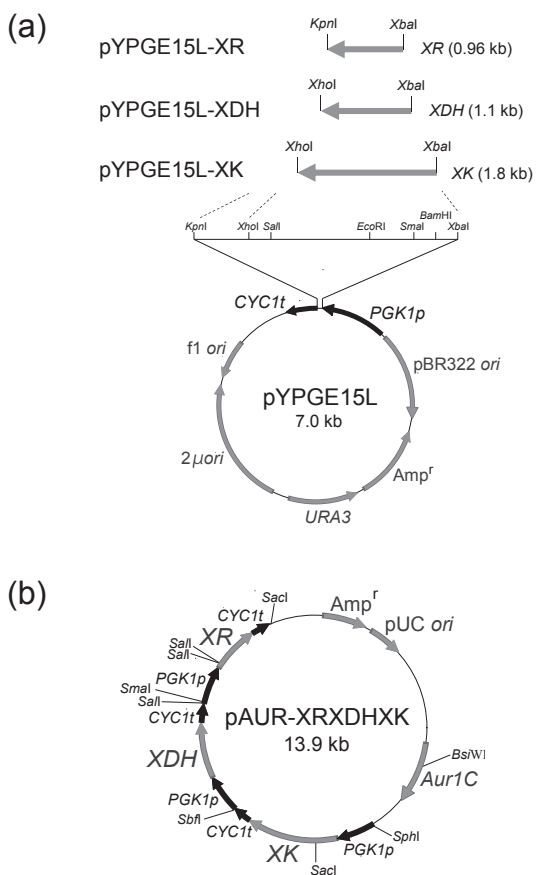


図2. プラスミドの模式図

(a) pYPGE15L ベクターの PGK1p と CYC1t の間に, *Sch. stipitis* 由来の XR 及び XDH, *S. cerevisiae* 由来の XK をそれぞれクローニングし, pYPGE15L-XR, pYPGE15L-XDH, pYPGE15L-XK とした. (b) 真菌用の薬剤耐性マーカーである *Aur1C* を含有する pAUR101 ベクターに, PGK1p-XK-CYC1t, PGK1p-XDH-CYC1t, PGK1p-XR-CYC1t 発現カセットを挿入した pAUR-XXDXHXK を構築した.

ライマー及びCYCt-SbfIプライマー (表1) を用いてPCRにより増幅した, PGK1p-XK-CYC1t融合遺伝子 (2.9 kb) をSphI及びSbfIで消化し, 同じ制限酵素で消化したpAUR101ベクター (タカラバイオ) に連結し, pAUR-XKを構築した. 次に, pYPGE15L-XDHを鋳型にして, PGKp-SbfIプライマー及びCYCt-SalIプライマー (表1) を用いてPCRにより増幅した, PGK1p-XDH-CYC1t融合遺伝子 (2.2 kb) をSbfI及びSalIで消化し, 同じ制限酵素で消化したpAUR-XKと連結し, pAUR-XDXHXKを構築した. さらに, pYPGE15L-XRを鋳型にして, PGKp-SmaIプライマー及びCYCt-SacIプライマー (表1) を用いてPCRにより増幅した, PGK1p-XR-CYC1t融合遺伝子 (2.1 kb) をSmaI及びSacIで消化した. pAUR-XDXHXKをSmaIで消化後, SacIで部分消化し, 11.8 kbのDNA断片を調製し, これとPGK1p-XR-CYC1t融合遺伝子とを連結し, XR, XDH及びXK共発現用ベクターであるpAUR-XXDXHXKを構築した (図2b).

4. XR 遺伝子, XDH 遺伝子及び XK 遺伝子の酵母への導入

酵母の形質転換はElbleによる酢酸リチウム法¹³⁾によって行った. *S. cerevisiae* ATCC 24860, InvSc1, NBRC 0224をそれぞれYPD培地 (10 g/L イーストエキストラクト (Difco), 20 g/L ポリペプトン (日本製薬), 20 g/L グルコース) で1晩培養後, 1 mlの培養液から遠心分離 (5,000 ×g, 1分) により集菌し, 1 mlの滅菌水で洗浄後, 再度, 遠心分離により集菌した. *Bst*WI消化により直鎖状にしたpAUR-XXDXHXK (1 μg) を10 μlの滅菌水に溶解し, 10 μlのニシン精子DNA (10 mg/ml) と混合した. これに500 μlのPLATE溶液 (40% (w/v) ポリエチレングリコール #4000 (ナカライテスク), 0.1 M 酢酸リチウム, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) を加え混合した. この溶液で上記の酵母菌体を懸濁し, 室温で1日静置後, 遠心分離により集菌し, 200 μlの滅菌水で菌体を懸濁した. この菌体懸濁液を100 μlずつ, 2枚のYPD-AbA寒天培地 (10 g/L イーストエキストラクト, 20 g/L ポリペプトン, 20 g/L グルコース, 0.5 μg/mL オーレオバシジンA (タカラバイオ), 20 g/L バクトアガー (Difco)) に塗布した. 30 °Cで3日間静置培養し, オーレオバシジンA耐性を示したコロニーを単離することにより, ATCC 24860, InvSc1, NBRC 0224の各染色体上にPGK1p-XR-CYC1t, PGK1p-XDH-CYC1t及びPGK1p-XK-CYC1tが挿入された組換え株を取得し, それぞれATCC 24860-X, InvSc1-X, NBRC 0224-Xと命名した.

5. 酵素活性の測定

XR活性の測定は、反応によって消費されるNADPHについて、分光光度計（日立ハイテクサイエンス、UV-3010）を用いて、340 nmの吸光度を30 °Cで経時的に計測し、単位時間当たりの減少量を求めることにより行った。反応液（100 mM キシロース、0.2 mM NADPH、100 mM Tris-HCl (pH 7.0)）中において、1分間に1 μ molのNADPHを消費することができる酵素量を1ユニット (U) と定義した。

XDH活性の測定は、反応によって生成するNADHについて、分光光度計を用いて340nmの吸光度を30 °Cで経時的に計測し、単位時間当たりの増加量を求めることにより行った。反応液（100 mM キシリトール、2 mM NAD、100 mM Tris-HCl (pH 9.0)）中において、1分間に1 μ molのNADHを生成することができる酵素量を1 Uと定義した。

XK活性の測定は、キシロースからキシロース5-リン酸にリン酸化されるときに生じるADPをピルビン酸キナーゼと乳酸脱水素酵素との共役反応に利用することにより生成されるNADHについて、分光光度計を用いて340nmの吸光度を30 °Cで経時的に計測し、単位時間当たりの増加量を求めることにより行った。反応液（10 mM キシリロース、2 mM MgCl₂、5 mM NaF、2 mM ATP、0.2 mM NADH、0.2 mM ホスホエノールピルビン酸、3 mM グルタチオン、10 U 乳酸脱水素酵素、10 U ピルビン酸キナーゼ、100 mM Tris HCl (pH 7.5)）中において、1分間に1 μ molのNADHを生成することができる酵素量を1 Uと定義した。

S. cerevisiae ATCC 24860-X, InvSc1-X, NBRC 0224-X, ATCC 24860, InvSc1, NBRC 0224の各株を、YPD培地を用いて、30 °Cで24時間振とう培養した。培養液から遠心分離により集菌後、プロテアーゼ阻害剤（Roche, cOmplete ULTRA Tablet mini, EDTA-free）及び100 mM ジチオトレイトールを加えた適量の酵母タンパク質抽出試薬（Pierce, Y-PER Yeast Protein Extraction Reagent）に酵母細胞を懸濁した。細胞懸濁液を室温で20分間攪拌した後、遠心分離し、その上清を無細胞抽出液として上述の酵素活性測定に用いた。無細胞抽出液中の総タンパク質濃度は、BCA Protein Assay kit – Reducing Agent Compatible (Pierce) を用いて求めた。

6. エタノール発酵能の評価

S. cerevisiae ATCC 24860-X, InvSc1-X, NBRC 0224-Xを、YPD培地を用いて30 °Cで好氣的に一晩前培養した後、600 nmにおける吸光度 (OD₆₀₀) を測定し、

前培養液の菌体濃度を求めた。前培養液を遠心分離により集菌し、菌体を滅菌水で洗浄した後、容量10 mlのガラスバイアル（日電理化硝子, SVG-10）に入った2 % (w/v) キシロース、或いは5 % (w/v) グルコース及び2 % (w/v) キシロースを含有する5 mlのYP培地（10 g/L イーストエキストラクト、20 g/L ポリペプトン）に、初発菌体濃度OD₆₀₀ = 1となるように添加した。バイアルをゴム栓及び穴あきキャップにて密封した後、30 °Cで振とう培養（200 rpm）を行った。注射針（テルモ、20G×70）を用いて経時的にサンプリングを行い、採取した発酵液から遠心分離によって酵母菌体を除いた後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって、発酵液に含まれるエタノール及び糖類の定量分析を行った。HPLC装置（島津製作所, Prominence）に配位子交換クロマトグラフィー用カラム（Shodex SP0810, 内径8.0 mm×長さ300 mm）を接続し、移動相に超純水を用いて、流速0.6 mL/min, カラム温度80 °Cで分析を行った。示差屈折率検出器により得られたクロマトグラムから、サンプルと標準品の保持時間及びピーク面積を比較することにより、発酵液中のエタノールや糖類の同定及び定量分析を行った。

結果及び考察

1. キシロース発酵株の作成

恒常発現型のプロモーターである*PGK1p*を融合させたXR, XDH, XKの3種類の遺伝子を染色体上に組み込んだ遺伝子組換え*S. cerevisiae*株である、ATCC 24860-X, InvSc1-X, NBRC 0224-Xについて、組み込んだ遺伝子が発現していることを確認するために、それぞれの酵素活性の測定を行った。その結果、3種類の遺伝子組換え株とも、元株では検出されなかったXR及びXDH活性が検出され、活性はこれらの3株で同等であった（表2）。また、XK活性についても、3つの遺伝子組換え株でほぼ同等であり、元株に比べ約3～4倍活性が上昇していた（表2）。これらの結果から、組み込んだ各遺伝子は、酵母細胞内において目的通り発現しているものと考えられた。*PGK1p*は、培地中のグルコースが無くなると、グルコースが存在する場合に比べ、発現活性がおおよそ半分に低下することが知られているが¹⁴⁾、各遺伝子組換え株は、グルコースが枯渇していると考えられる培養24時間においても、元株よりも高い活性を有していた。

ATCC 24860株はキシロース発酵能の高い株として報告されているが¹⁰⁾、XK活性はInvSc1やNBRC

0224のそれと大きく変わらなかった。このことは、ATCC 24860株のキシロース発酵能の高さは、XK活性の違いによるものではなく、より下流の代謝経路の活性が高いことによるものと考えられる。

2. キシロース発酵能の比較

まず、キシロースのみを基質とした場合のエタノール発酵能を検討するため、作成した遺伝子組換え株を、2% (w/v) キシロースを含むYP培地を用いて嫌氣的に培養を行った。野性型株であるInvSc1, ATCC 24860, NBRC 0224はいずれもキシロースを利用することができなかった(データ省略)。一方、遺伝子組換え株はいずれもキシロースからエタノールを生産し、NBRC 0224-X (図3c), InvSc1-X (図3b), ATCC 24860-X (図3a)の順にエタノール生産能が高かった。このときのエタノール収率(理論収率である0.51 g/g substrateに対する割合)は、それぞれ、49%, 43%, 32%であった。

ATCC 24860はキシロース発酵能が高いことが報告されており¹⁰⁾、キシロースからキシロースへの代謝系であるXR-XDH経路の導入により作出される遺伝子組換え株は、高いキシロース発酵能を有することが期待された。実際に、2% (w/v) キシロースを用いてATCC 24860のキシロース発酵能を確認したところ、発酵72時間においてNBRC 0224よりも2.4倍高いエタノール収率を示した(データ省略)。しかし、ATCC 24860-Xのキシロース発酵能は、NBRC 0224-XやInvSc1-Xよりも低かった。ATCC 24860-Xでは、最初の間産物であるキシリトールの蓄積も少なかったことから(図3a)、細胞内へのキシロースの取り込みや補酵素の供給量が少ない等の理由により、キシロースの利用能が低いものと考えられた。

3. グルコース・キシロース共発酵能の比較

次に、稲わらの糖組成比を模した糖液、すなわち5% (w/v) グルコース及び2% (w/v) キシロースの混合物を基質にしてエタノール発酵を行った。ATCC 24860-X (図4a) 及びNBRC 0224-X (図4c) は発酵12時間以内に、InvSc1-X (図4b) は発酵24時間以内に添加したグルコースの全量を消費した。さらに、キシロースのみを基質とした場合に比べ、グルコースとの共発酵では、いずれの株においてもキシロースの利用能が向上していた。すなわち、ATCC 24860-X及びNBRC 0224-Xでは、キシロース単独基質の場合、発酵72時間時の基質消費率がそれぞれ58%, 84%だったものが(図3a, c), グルコースの添加により72時間以内にすべてのキシロースが消費された(図4a, c)。InvSc1-Xにおいても、キシロース単独の場合発酵72時間における基質消費率が73%だったものが(図3b), グルコースの添加によりキシロース消費率が89%まで向上した(図4b)。

発酵72時間におけるエタノール収率(対理論収率)は、ATCC 24860-Xは82%, InvSc1-Xは81%, NBRC 0224-Xは84%であった。グルコースの共存により、特に、ATCC 24860-Xにおいてキシロース消費能及びエタノール生産能に顕著な向上が見られた。元株であるATCC 24860では、グルコースとキシロースの共発酵を行っても、キシロース単独基質の場合と比べて、キシロース消費量やエタノール収率の増加は起こらなかったことが報告されている¹⁰⁾。このことから、グルコースの添加によって、ATCC 24860-Xのキシロースからキシロースへの代謝が主に促進されたことが示唆される。この原因として、細胞がグルコースを利用することにより、細胞内の酸化還元環境やエネルギー

表2. 組換え酵母株及び元株における酵素活性

| Strain | Activity (U/ mg protein) | | |
|--------------|--------------------------|-------------------|------------------|
| | XR ^{a)} | XDH ^{b)} | XK ^{c)} |
| ATCC 24860-X | 0.28 ± 0.01 | 1.43 ± 0.17 | 0.78 ± 0.03 |
| InvSc1-X | 0.30 ± 0.03 | 1.62 ± 0.12 | 0.79 ± 0.07 |
| NBRC 0224-X | 0.35 ± 0.02 | 1.87 ± 0.11 | 0.65 ± 0.05 |
| ATCC 24860 | N.D. | N.D. | 0.23 ± 0.05 |
| InvSc1 | N.D. | N.D. | 0.21 ± 0.01 |
| NBRC 0224 | N.D. | N.D. | 0.18 ± 0.02 |

測定は3連で行い、データはその平均値±標準偏差で表す。N.D.: 不検出。

^{a)} 反応中において、1分間に1 μmolのNADPHを消費することができる酵素量を1Uとした。

^{b)} 反応中において、1分間に1 μmolのNADHを生成することができる酵素量を1Uとした。

^{c)} 反応中において、ピルビン酸キナーゼ及び乳酸脱水素酵素との共役反応により、1分間に1 μmolのNADHを生成することができる酵素量を1Uとした。

ギー環境が改善し、補酵素の供給量や代謝酵素の発現量が増加したことが考えられる。

当初、*S. cerevisiae* ATCC 24860はキシロース発酵能が優れることから、この株にキシロースからキシロースへの代謝経路を導入することにより、高いキシロース発酵能を持つ酵母株が得られるものと期待された。しかし、実際にXR-XDH経路を導入した株(ATCC 24860-X)の発酵能を調べたところ、キシロース単独発酵の場合は他株よりもエタノール収率が低く、グルコースとの共発酵の場合でも他株との顕著な差異は見られなかった。このことは、XR-XDH経路を利用したキシロース発酵では、宿主のキシロース発酵能の優劣よりも、キシロースからキシロースへの代謝に、

より留意する必要があることを示している。

グルコースとの共発酵により、ATCC 24860-Xではエタノール収率が増加したものの、キシリトールの蓄積量(72時間時、2.5% (w/v))も増加していた(図4 a)。キシリトールの蓄積はNBRC 0224-Xにおいても見られ、発酵72時間で3.5% (w/v)のキシリトールが発酵液中に蓄積していた(図4 c)。酵母へのXR-XDH系の導入では、XRとXDHとの補酵素特異性(図1)の違いに起因した、細胞内の補酵素のアンバランスがしばしば問題となる。すなわち、XRは補酵素として主にNADPHを、XDHはNAD⁺を利用することから、お互いの中で補酵素の再生が完結できず、キシロース発酵が進むに連れて補酵素のアンバランスが大きくなると

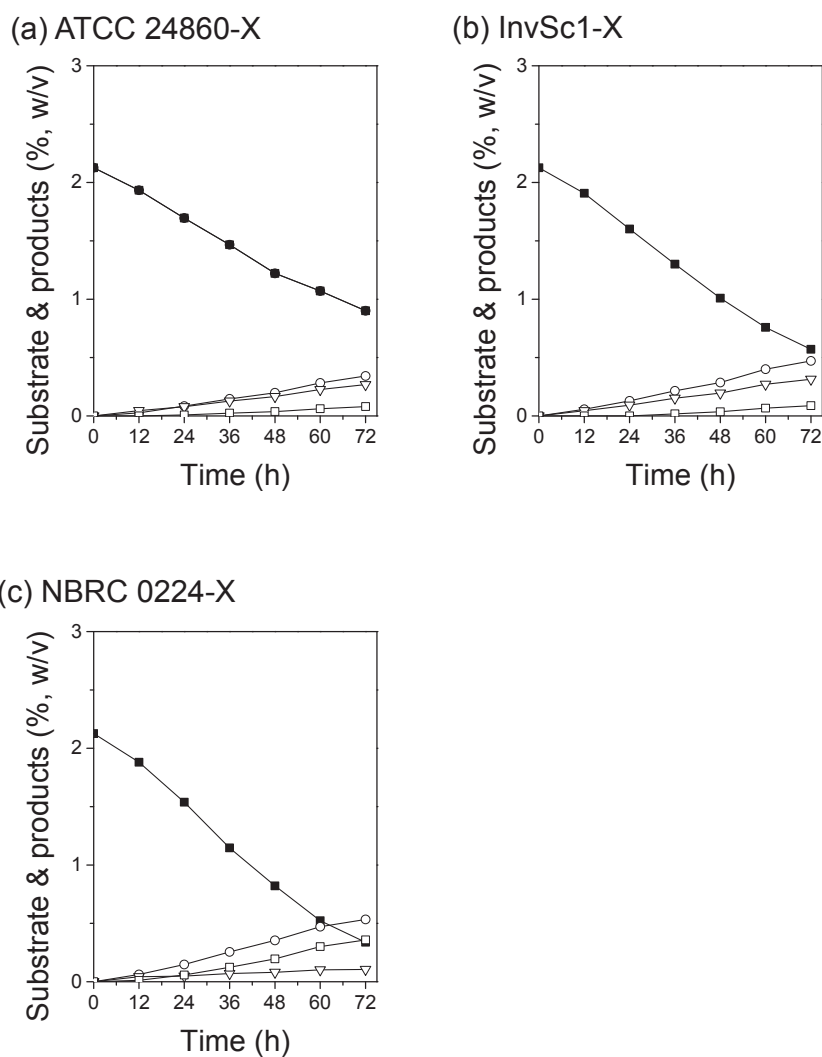


図3. 遺伝子組換え酵母株によるキシロース発酵

S. cerevisiae ATCC 24860-X (a), InvSc1-X (b) 及び NBRC 0224-X (c) を2% (w/v) キシロースを含むYP培地を用いて嫌氣的に培養し、培養液に含まれる糖類やエタノールをHPLCによって解析した。実験は3連で行い、データはその平均値を示す。■：キシロース、○：エタノール、□：キシリトール、▽：グリセロール。

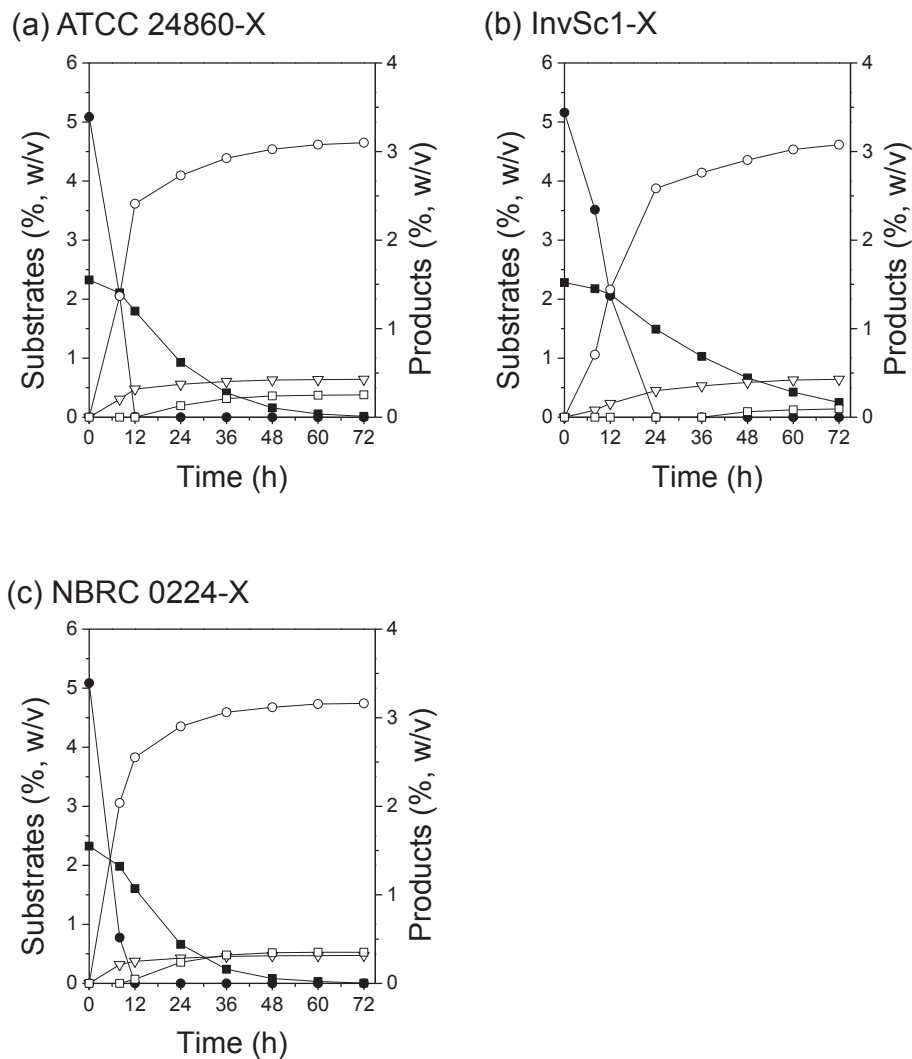


図4. 遺伝子組換え酵母株によるグルコース・キシロース共発酵

S. cerevisiae ATCC 24860-X (a), InvSc1-X (b) 及び NBRC 0224-X (c) を 5% (w/v) グルコース及び 2% (w/v) キシロースを含む YP 培地を用いて嫌氣的に培養し、培養液中に含まれる糖類やエタノールを HPLC によって解析した。実験は 3 連で行い、データはその平均値を示す。●：グルコース，■：キシロース，○：エタノール，□：キシリトール，▽：グリセロール。

考えられている。特に、嫌気条件下では NAD^+ の再生効率が低く、 NAD^+ 不足によりキシリトールからキシロースへの変換が滞り、エタノール収率の低下を引き起こすことが XR-XDH 系の大きな問題点となっている。この問題を解消するために、代謝工学的な観点から様々なアプローチが試みられ¹⁵⁻¹⁹⁾、キシロース代謝の改善やエタノール収率の向上がなされているものの、キシリトール蓄積を完全に抑制するには至っていない。

一方、InvSc1-X には、キシロース消費速度は遅いものの、キシリトールの蓄積が少ないという特徴が見

出された (図 4 b)。消費したキシロース量に対するキシリトール生成量の割合は、ATCC 24860-X が 11.0%、NBRC 0224-X が 15.2% だったのに対して、InvSc1-X では 4.2% にとどまっていた。InvSc1-X においてキシリトール蓄積量が少ない原因については明らかではないが、InvSc1-X におけるキシロースの代謝プロファイルを解析することによって、キシリトール蓄積の抑制に役立つ知見が得られる可能性がある。

S. cerevisiae という単一の種においても株によって様々な代謝の特徴を有しており、実際にキシロース代謝系を組み込むことにより、キシロース発酵に関して

個々の株に特徴的な形質を見出すことができた。これらの形質を決定している因子をメタボロームやトランスクリプトーム等の網羅的解析手法を用いて特定することにより、酵母のキシロース発酵能の向上に資する種々の改良点が明らかになるものと期待される。

要約

セルロース系バイオマスに多く含まれるキシロースを効率的にエタノールに変換するために、キシロースレダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼ、キシロキナーゼ遺伝子を、3つの異なる*Saccharomyces cerevisiae*株において高発現させた。このうち、キシロースの代謝中間産物であるキシロースの発酵能が高いATCC 24860株に由来する組換え株は、高いキシロース発酵能を示すことが期待されたが、実際には、他の2つの株由来のものに対する優位性は見出されなかった。キシロースレダクターゼ及びキシリトールデヒドロゲナーゼの導入によって*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与する際には、キシロース以降の代謝よりも、キシロースからキシロースへの代謝により留意する必要がある。

参考文献

- 1) Thalagala, T. A. T. P., Kodama, S., Mishima, T., Isono, N., Furujo, A., Kawasaki, Y., and Hisamatsu, M., Study on ethanol fermentation using D-glucose rich fractions obtained from lignocelluloses by a two-step extraction with sulfuric acid and *Issatchenkia orientalis* MF 121, *J. Appl. Glycosci.*, **56**, 7-11 (2009).
- 2) Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J. P., and Scheffers, W. A., Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1221-1223 (1984).
- 3) Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O., Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 893-900 (1991).
- 4) Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkstein, M., and Picataggio, S., Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*, *Science*, **267**, 240-243 (1995).
- 5) Chu, B. C. H. and Lee, H., Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation, *Biotechnology Advances*, **25**, 425-441 (2007).
- 6) Jeffries, T. W., Engineering yeasts for xylose metabolism, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**, 320-326 (2006).
- 7) Jeffries, T. W. and Jin, Y. S., Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 495-509 (2004).
- 8) Ho, N. W. Y., Chen, Z., and Brainard, A. P., Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1852-1859 (1998).
- 9) Eliasson, A., Boles, E., Johansson, B., Österberg, M., Thevelein, J. M., Spencer-Martins, I., Juhnke, H., and Hahn-Hägerdal, B., Xylulose fermentation by mutant and wild-type strains of *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 376-382 (2000).
- 10) Yu, S., Jeppsson, H., and Hahn-Hägerdal, B., Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 314-320 (1995).
- 11) 中澤亮治, 霜三雄, 二つの新しい酵母菌, 日本農芸化学会誌, **12**, 356-365 (1935).
- 12) Brunelli, J. P. and Pall, M. L., A series of yeast/*Escherichia coli* λ expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and *cre/lox*-mediated plasmid excision, *Yeast*, **9**, 1309-1318 (1993).
- 13) Elble, R., A simple and efficient procedure for transformation of yeasts, *BioTechniques*, **13**, 18-20 (1992).
- 14) Partow, S., Siewers, V., Bjorn, S., Nielsen, J., and Maury, J., Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **27**, 955-964 (2010).
- 15) Jeppsson, M., Bengtsson, O., Franke, K., Lee, H., Hahn-Hägerdal, B., and Gorwa-Grauslund, M. F., The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher K_m for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.*, **93**, 665-673 (2006).
- 16) Jin, Y. S. and Jeffries, T. W., Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant

- Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **105-108**, 277-286 (2003) .
- 17) Matsushika, A. and Sawayama, S., Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity, *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 306-309 (2008) .
- 18) Verho, R., Londesborough, J., Penttilä, M., and Richard, P., Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5892-5897 (2003) .
- 19) Watanabe, S., Abu Saleh, A., Pack, S. P., Annaluru, N., Kodaki, T., and Makino, K., Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, *J. Biotechnol.*, **130**, 316-319 (2007) .