

# イソプロパノール高生産性トルラ酵母

## *Candida utilis* の分子育種

玉川 英幸・三田 登貴子・横山 亜紀・生嶋 茂仁・吉田 聡

キリンホールディングス(株)フロンティア技術研究所

〒236-0004 横浜市金沢区福浦 1-13-5

E-mail: Hideyuki\_Tamakawa@kirin.co.jp

Home Page: <http://www.kirinholdings.co.jp/>

近年、深刻化する環境問題や石油資源の枯渇を背景に、再生可能資源であるバイオマスから微生物を用いて汎用プラスチックの原料を生産する取り組みに注目が集まっている。そこで、本研究では、酵母 *Candida utilis* を用いて、ポリプロピレンの原料であるイソプロパノールの生産を試みた。

### 1. はじめに

バイオリファイナリーとは再生可能資源であるバイオマスから燃料や化成品を生産するためのプロセスや技術のことを指す言葉である。石油資源から脱却し、環境循環型社会を構築するために、現在このフィールドでは積極的な基盤研究とプロセス構築が行われている。専門家の予測によれば、2020-30 年頃にバイオ燃料やバイオ化成品が大規模に拡大するものと予想されており、こうした取り組みは今後さらに加速するものと考えられる。

バイオリファイナリー基幹物質の一つであるイソプロパノール (IPA) は、ポリプロピレンの原料となることから、汎用プラスチック生産の観点から重要な素材である。ところで、自然界に存在する IPA 生産菌としては *Clostridium* 属細菌が良く知られている。しかし、その IPA 生産量は最大でも数 g/L レベルであり、またブタノールやエタノールなどの副産物を生産するという課題があった[1]。そこで、これらの課題を克服するために、*Clostridium* 属由来の生合成遺伝子を導入した組換え大腸菌による IPA 生産が試みられた[2-3]。

酵母は細菌と比較すると細胞強度が強く、溶剤や酸など各種のストレス耐性に優れている特長を有している。また、培養ハンドリングも容易であることから、IPA 生産の代替宿主として非常に有望である。しかし、*Saccharomyces cerevisiae* のような一般的な酵母株はエタノールの副産物を完全に抑制することが難しく、IPA の生産収率が低下することが予想された。そこで、我々は IPA 生産の宿主として、クラブツリー効果陰性のトルラ酵母である *Candida utilis* を用いることとした。C.

*utilis* は極めて高い呼吸活性を有しているため、一度生産したエタノールを速やかに再同化することができる[4]。また、我々はこれまでに遺伝子操作により、*C. utilis* のエタノール副産物を完全に抑制し、目的物質を高生産できることを報告している[5-6]。これらの理由から我々は、*C. utilis* は酵母の中でも IPA 生産に適した宿主であると考えた。

### 2. 方法と結果、考察

#### (1) *C. utilis* でのイソプロパノール合成経路の構築

*C. utilis* を含めた一般的な酵母は IPA 合成に関わる酵素遺伝子を有していないため、IPA を生産できない。そこで、IPA 生産細菌 *Clostridium* 属由来の 4 つの遺伝子(3 つの酵素をコードする)を *C. utilis* で発現させた。*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 株由来 CoA 転移酵素遺伝子 (*ctfAB*) と *Clostridium beijerinckii* NRRL B593 株由来のアセト酢酸脱炭酸酵素遺伝子 (*adc*)、2 級アルコール脱水素酵素遺伝子 (*sadh*) を持ったプラスミドを作製し、*C. utilis* 染色体に組込んだ。この組換え体を用いて 100 g/L のグルコースを含む培地で IPA 生産を検討したところ、0.21 g/L の IPA 生産が確認された(収率 0.63%)。また、構築株は同時に 6.3 g/L の酢酸を蓄積していたことから、培地の酸性化が IPA 生産を抑制している可能性が考えられた。そこで、炭酸カルシウムで中和しながら培養したところ、IPA 生産量は 1.2 g/L まで改善した(収率 3.6%)。しかし、同時に酢酸蓄積量の増加も認められた(8.8 g/L)。また、*C. utilis* は副生したエタノールを再同化し、そのエタノールが消費しきるまで IPA を生産していることが明らかとなった。

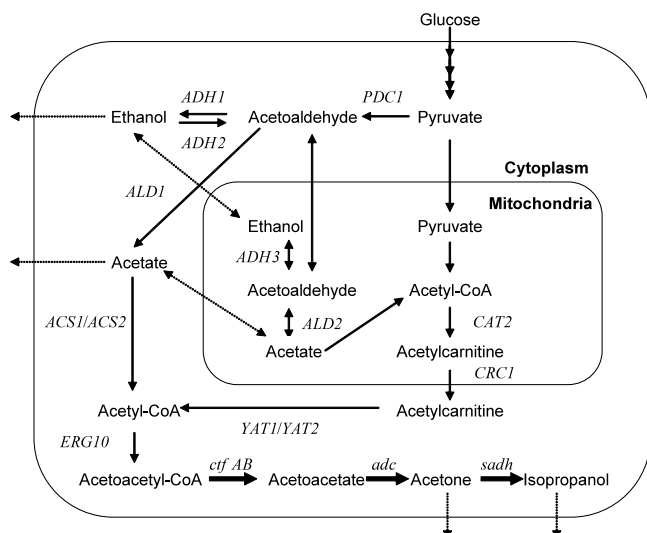


図 1. 酵母細胞内に構築した IPA 合成経路  
酵母内在性遺伝子は大文字イタリックで、導入した *Clostridium* 由来遺伝子は小文字イタリックで示した。

## (2) 内在性遺伝子の破壊と過剰発現の効果

酵母はミトコンドリアを持つなど、細菌とは異なる細胞内構造や代謝経路を有している (図 1)。我々の研究開始当初は、酵母による IPA 生産は報告がなく、IPA 生産に寄与の大きい代謝経路は不明であった。そこで、構築した *C. utilis* 株の IPA 生産性を増強するために、内在性遺伝子の破壊や過剰発現の影響を検証した。

酵母における最大の副産物はエタノールである。そこで、エタノール生産の鍵酵素であるピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子 (*PDC1*) 破壊が IPA 生産に与える影響を調査した。*pdcl* 破壊株ではエタノールの副生が完全に抑制されたものの、グリセロールが高蓄積し、最終的な IPA 生産量や生産速度が低下した。この結果より、*Pdc1* を介した代謝経路は IPA 生産に重要であることが示唆された。

IPA 合成の前駆体はアセトアセチル CoA であることから、アセトアセチル CoA の過剰供給が IPA 生産量を増加させることが期待された。そこで、アセトアセチル CoA 合成に関わる代謝経路周辺の酵素遺伝子の過剰発現を行った。マルチコピーインテグレーション法を用いて、各種酵素遺伝子を過剰発現させたところ、対照株と比較してアセチル CoA 合成酵素遺伝子 (*ACS1*, *ACS2*)、アセチル CoA アセチル基転移酵素遺伝子 (*ERG10*) の過剰発現により、培養 50 時間後の IPA 生産量がそれぞれ 2.5、2.7、2.2 倍に増加した。さらに、*ACS2* と *ERG10* を同時に過剰発現させたところ、IPA 生産量は相乗的に増加し、11.9 倍となった (生産量 9.2 g/L、収率 27.8%)。また、酢酸の蓄積は 0.7 g/L と低レベルに抑えられていた。

次に、*ACS2/ERG10* 過剰発現株で半回分培養を行った。初発グルコース量を 50 g/L とし、48 時間おきに終濃度 50 g/L のグルコースを 3 回投入したところ、培養 196 時間で 27.2g/L の IPA が生産された (収率 41.5%)。この生産量は、今まで報告されている自然界の IPA 生産菌のパフォーマンスを上回るものであった。

## 3. 今後の展望

我々が知る限り、本報告は酵母で IPA 高生産を達成した最初の報告である。これまで細菌でしか報告がなかった IPA 高生産を酵母種で達成することができたのが本研究の価値であり、本成果は今後の IPA 生産プロセス構築に新たな可能性を示すものである。その一例として、IPA 生産における Melle-Boinot 法の利用が挙げられる。Melle-Boinot 法はブラジルでのエタノール生産に用いられている方法で、発酵終了時に酵母を遠心分離で回収し、pH3 の希硫酸で洗浄した後、繰り返し使用するというものである。この洗浄により、コンタミネーションした雑菌は不活化されるが、酵母は酸耐性が高いため、エタノール生産性にほとんど影響がない。これらのプロセスは、宿主として酵母を用いたからこそ構築できた有効なプロセスである。

IPA を生産する *C. utilis* の実用化のためには、IPA の生産量や生産速度をさらに向上させる必要があるが、我々の研究成果から得られた知見はバイオリファイナリー分野の発展へ大きな貢献が期待される。

## 4. 謝辞

本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託研究として実施された。

## 参考文献

- [1] Chen JS, et al.: *Biotechnol. Lett.*, 8, 371-376 (1986).
- [2] Hanai T, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7814-7818 (2007).
- [3] Jojima T, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1219-1224 (2008).
- [4] Deken D RH.: *J. Gen. Microbiol.* 44, 149-156 (1966).
- [5] Ikushima S, et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1818-1824 (2009).
- [6] Tamakawa H, et al.: *J. Biosci. Bioeng.* 113, 73-75 (2012).