

環境ストレス耐性に着目した バイオエタノール生産酵母開発の試み

島 純^{1*}・安藤 聡²・中村 敏英²

酵母は発酵食品や酒類の製造に必須な産業微生物であり、基礎研究分野においても長年にわたり酵母を題材とした研究が精力的に展開されてきた。近年では、バイオマスの有効利用の観点から、バイオエタノールの生産微生物として、酵母はきわめて重要な位置を占めている。セルロースなどから派生するグルコースをはじめとした六炭糖の発酵には、製パン用酵母や醸造用酵母と同種である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* がおもに使用される。キシランの分解により生じるキシロースなどの五炭糖に関しては、*S. cerevisiae* が発酵能を持たないことから、*Pichia stipitis* などの酵母の使用が検討されている。また、高温耐性を有する *Kluyveromyces marxianus* などの利用に向けた取り組みもはじまっている。

バイオエタノール製造においては、バイオマスの前処理や糖化のプロセスの高度化が重要な課題となっており、さまざまな取り組みが進められている。前処理・糖化プロセスに依存して、その下流で機能する酵母などの発酵微生物に求められる特性が変化することが想定される。また、利用するバイオマスの種類によっても求められる酵母の特性は異なる。

バイオエタノール製造を含めた産業プロセスは、酵母にとって過酷なストレス環境であると考えられる。したがって、酵母をバイオエタノール製造に利用する場合に鍵となるのが環境ストレスに対する耐性と考えられる。環境ストレス耐性を有する酵母の開発および利用は、プロセスの高度化や低コスト化に直結すると期待できる。

このような背景から、筆者らの研究グループでは、さまざまなケースに応じて利用可能な酵母の作出に向けて、多面的なアプローチによるバイオエタノール用酵母の開発の試みを行っている。

バイオエタノール製造における環境ストレス

一般に、産業プロセスの発酵生産環境はきわめて過酷なストレス環境であり、高温、低温、凍結、乾燥、酸化、高浸透圧、高濃度アルコール、偏栄養、化学物質など多種多様なストレスが負荷される¹⁾。他の生物と同様に、酵母は環境ストレスに応答して、ある程度適応する能力を備えている。しかし、適応能力を超えた過酷なストレス環境では、その有用機能は著しく制限される。また、多くの産業プロセスでは単一の環境ストレスばかりではなく、複合的および連続的に環境ストレスが負荷される。

バイオエタノール製造プロセスでは、原料に由来する化学物質や高温が同時に負荷されるケースが多い。したがって、酵母の産業利用を高度化するうえで、環境ストレス応答・耐性メカニズムを科学的に理解し、その知見を活用することはきわめて重要である。

稲わらや木質バイオマスの糖化处理工程では、セルロースやヘミセルロース由来の糖過分解物であるフラン化合物（フルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラールなど）やリグニン由来のフェノール性化合物（バニリン、グアヤコール、4-ヒドロキシベンズアルデヒドなど）、弱酸（酢酸、ギ酸など）などが生成する場合がある。これらの物質は酵母にとって化学ストレスとなりエタノール発酵を阻害し、エタノール変換工程における変換効率の低下やコストの増加の原因となる。また、発酵生成物であるエタノールもストレスの一因となり得る。また、前処理・糖化プロセスで使用される酸、アルカリや中和で生成する塩なども化学ストレスとして酵母に負荷される。その他、発酵熱に由来する高温ストレスも酵母に負荷される。また、発酵プロセスが乳酸菌などの細菌により汚染された場合には、細菌の生産する乳酸や酢酸が酵母の発酵を阻害する。このように、バイオエタノールの発酵生産プロセスにおいても、さまざまな環境ストレスが存在し、発酵を阻害する因子となる。

バイオエタノール用酵母の開発に向けた視点

六炭糖を基質にして高効率でエタノールを生産することができる *S. cerevisiae* は、古くから発酵食品や酒類の製造に使用されてきた。豊富な食経験を背景として、*S. cerevisiae* は安全性の高い GRAS (generally recognized as safe) 微生物としての位置を占めている。したがって、*S. cerevisiae* をバイオエタノール製造に応用した場合にも、製造廃棄物を DDGS (distiller's dried grains with solubles) などとして活用する場合に有利な要素となる。しかし、他の酵母種と比較して、*S. cerevisiae* はバイオエタノール製造において優れた特性を有しているとは必ずしも言えない。高温耐性や酸耐性などの環境ストレス耐性に関しては、*S. cerevisiae* より優れた株も多く存在する。また、*S. cerevisiae* は五炭糖からのエタノール発酵能を有していない。このような観点から、*S. cerevisiae* を用いることが有効であるか検証が必要であろう。

また、バイオエタノール用酵母の育種手法についても、

* 著者紹介 ¹ 京都大学微生物科学寄附研究部門（特定教授） E-mail: shimaj@kais.kyoto-u.ac.jp

² (独) 農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

さまざまな視点からの検討が必要である。他種生物の遺伝子の導入を伴う遺伝子組換え手法では、著しい特性の改変・向上が期待できる。たとえば、*S. cerevisiae*に五炭糖の代謝に関する遺伝子を導入することにより、キシロースなどからのエタノール生産が可能になり得る。また、セルラーゼやアミラーゼの遺伝子を導入することにより、酵素添加などを必要としない一段階での発酵プロセスの開発の可能性が広がる。環境ストレス耐性の観点から見ても、遺伝子組換えによりきわめて高度なストレス耐性を有する酵母株の作出が可能になると考えられる。しかし、遺伝子組換え株を用いたバイオプロセスの構築においては、生物多様性維持の観点から遺伝子組換え体の封じ込めなどの措置が必要となるケースが想定される。プラントレベルで遺伝子組換え体を封じ込める場合には障壁も多く、発酵残渣の利用が制限されるなどコスト面で不利にならざるを得ない。

一方、古典的な遺伝学を用いた育種法を用いた場合には、ユニークな特性を有する遺伝資源を用いることにより、酵母の特性をある程度まで高めることは可能であるが、飛躍的な特性の改変は難しい。また、他種生物の遺伝子導入を伴わない分子育種手法であるセルフクロニング法は、古典的な育種手法に比べて、簡便に酵母の改良が可能である。さらに、セルフクロニングで作出した酵母株は、遺伝子組換え株には相当しないことから、封じ込めのコスト削減の観点から有利な要素となる。糖質発酵性の改変などはセルフクロニングでは難しいと言わざるを得ないが、環境ストレス耐性の向上の観点からはきわめて有効な手法であると考えている。

このような背景から、筆者らの研究グループでは、発酵阻害の要因となる環境ストレスに対する耐性などの有用形質を有する酵母株の探索収集を行うとともに、遺伝資源として活用して多面的な手法による育種に取り組んだ。また、これら阻害因子が酵母に与える影響を表現型解析などのポストゲノム技術を用いて詳細に解析し、それらの知見を有効活用することにより発酵阻害因子に高度耐性を有する酵母株のセルフクロニング型分子育種を試みた。

環境ストレス耐性を有する酵母株の探索

バイオエタノール製造工程において効率的にエタノールを製造するためには、エタノール高生産性、エタノール耐性、発酵阻害物質耐性、高温耐性、塩耐性、酸耐性などの形質を持った微生物が必要となる。環境ストレス耐性などの有用特性を有する酵母株の確保に向けて、研究室保存株および自然界からの分離株を合わせて約1700株の酵母株を対象として特性評価を行った。供試した株には、*S. cerevisiae*株に加えて種々の属・種の酵母が含まれていた。発酵阻害の要因となる環境ストレス耐性（高温、酸、塩、パニリンなどの化学物質）およびエ

タノール生産性や凝集性などの有用性を評価した結果、さまざまな環境ストレスに耐性を有する酵母株が取得された。26S rDNAの塩基配列や糖の資化性パターンなどから同定を行ったところ、きわめて高度な環境ストレス耐性を有する酵母株の多くは*S. cerevisiae*以外の酵母株であった。また、*S. cerevisiae*に属する株の中にも、産業利用されている酵母株と比較して、環境ストレス耐性レベルが有意に高いと判断できる株が見いだされた。

筆者らの研究グループでは、特性評価を行った酵母株のうち、優れた酸耐性および高温耐性を有することに加えて、高エタノール生産性を示した*Candida glabrata*に着目した。*C. glabrata*は病原性酵母として知られているが、筆者らの取得した株はアジアの発酵食品からの分離株であった。本菌株の酸耐性を活用して、糖化液の雑菌汚染防除への応用の可能性を検証した。バイオマス由来糖化液には、乳酸菌などの細菌による汚染が生じ、糖の消費によるエタノール収率の低下および細菌の生産する酸による酵母の発酵阻害などの問題が指摘されている。抗生物質の添加により細菌汚染の抑制は可能であるが、廃棄物を飼料や肥料として再利用する場合には好ましい方法とは言えない。そこで、酸耐性酵母として同定された*C. glabrata*を用いて、酸性条件下で発酵するプロセスを想定して検証を行った。あらかじめ一定量の酸を糖化液に添加することにより、汚染細菌の増殖は著しく抑制されることが示唆された。一方、*C. glabrata*の発酵能は酸によっても阻害を受けず、高効率でエタノールを製造することが示された²⁾。さらに*C. glabrata*が一倍体であることを有効活用して、変異育種を行った。高温での効率的な同時糖化発酵プロセスの構築に向けて、呼吸欠損変異株の取得を行った。同時糖化発酵において、糖化効率を上げるために強い攪拌を行うと酸素が流入し、酵母が呼吸を行いエタノール収率の低下が生じる可能性がある。しかし、取得した呼吸欠損変異株では、攪拌条件でもエタノール収率の低下は観察されなかった。さらに、*C. glabrata*は高温耐性も有しているため、42°Cにおいて同時糖化発酵が可能であった³⁾。その他、エタノール発酵後の分離コストの低減につながる凝集性変異株⁴⁾やさらに高度な酸耐性およびエタノール耐性を有する変異株を取得することができた。

一方、ストレス耐性を有する*S. cerevisiae*株については、遺伝資源として活用し、交雑や細胞融合などの古典的な育種手法を用いて、複合的な環境ストレス耐性を有する株の構築に取り組んでいる。

ポストゲノム手法による環境ストレス耐性に関与する遺伝子の解析

*S. cerevisiae*は実用的に重要な微生物であるということに加えて、その遺伝学的・分子生物学的解析の容易さから、多くの基礎的研究のモデル生物となっている。そ

の研究内容は、遺伝子発現、翻訳後修飾、細胞内輸送を含めきわめて広範囲に及び、細胞に関する基礎科学的知見が集積している生物としての側面を有している。これらの研究には、形質転換効率、孢子形成性などの優れた *S. cerevisiae* 株が使用されており、一般に実験室酵母株と呼ばれ、実用酵母株と区別して考えられている。

そこで、実験室酵母株で取得されたゲノム情報やポストゲノム解析手法を活用して、バイオエタノール製造プロセスで重要となる環境ストレス耐性に関する遺伝子情報の蓄積をはかった。

S. cerevisiae の遺伝子破壊株セットや過剰発現株セットを主要なツールとして、パニリンなどの発酵阻害物質および硫酸などの酸に対する耐性に関する遺伝子の検索を表現型解析により行った。パニリンやフルフラールなどに感受性を示す破壊株の検索を行ったところ、細胞膜の主要構成成分であるエルゴステロールの生合成遺伝子の破壊株が強い感受性を示した⁵⁾。また、パニリン耐性を有する酵母株ではエルゴステロール蓄積量の高い傾向が観察されたことから、パニリンなどに対する耐性には、エルゴステロールが重要であることが示唆された⁶⁾。また、硫酸や塩酸などの酸に対する耐性に関する遺伝子を検索したところ、ゴルジ体から液胞への小胞輸送に関与する遺伝子が重要であることが示唆された。

また現在、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、酸などの環境ストレスに対する耐性に重要な遺伝子の同定を行っている。

環境ストレス耐性を有する *S. cerevisiae* 株のセルフクロニング型育種の試み

ポストゲノム解析で蓄積された遺伝子情報を基盤にして、高度な環境ストレス耐性を有する *S. cerevisiae* 株の分子育種に取り組んでいる。筆者らの研究グループでは、分子育種にあたり、他種生物の遺伝子導入を伴わないセルフクロニング型育種を用いることとした。遺伝子組換え体を用いる場合と比較して、封じ込めに関わるコストの低減化や社会的な受け入れの容易さを考慮に入れたためである。

表現型解析で環境ストレス耐性における重要性が示唆されたエルゴステロールの生合成系や小胞輸送に関連する遺伝子、エタノールストレス耐性における重要性が報告されている液胞プロトンポンプ関連遺伝子⁷⁾に着目してセルフクロニング型育種に取り組んでいる。バイオエタノール製造用の *S. cerevisiae* 株において、これらの遺伝子のプロモーターを強力な恒常発現プロモーターに置換することによる過剰発現などを行っている。

おわりに

本稿では、環境ストレス耐性を有する産業酵母のバイオエタノール製造への応用に関する取り組みを紹介した。今後の産業酵母育種の方向性を論議するための話題提供としたい。

バイオエタノール製造用酵母には、バイオマスの前処理や糖化プロセスに依存して、環境ストレス耐性を含むさまざまな特性が必要となってくるのが想定される。したがって、研究の推進には、前処理・糖化研究と密接な連携が必要であると考えられる。

また、発酵食品製造のケースとは異なり、バイオエタノール製造では *S. cerevisiae* 以外の酵母種の活用をすることもできよう。バイオマス資源を最大限に活用する場合には、キシロースなどの五炭糖からのエタノール製造も重要な課題となる。五炭糖の発酵能を有する酵母株は環境ストレス耐性が低いことが指摘されており、五炭糖発酵性酵母の育種も今後の課題のひとつと考えられる。本稿では詳述しなかったが、筆者らのグループでも、五炭糖発酵性酵母の探索・育種にも取り組んでいる。

我が国では、木質や稲わらなどの未利用バイオマスの有効活用技術の構築が進んできている。また、世界的な視野から評価して、有用な未利用バイオマスを開拓し利用する技術の構築も重要な課題と言える。これに加えて、デンプンや脂質を高蓄積する藻類などの積極的活用も重要な課題と考えられる。いずれの場合にも、微生物をはじめとした生物の機能利用技術の高度化が必要不可欠であろう。

バイオ燃料の製造技術の構築は、我々の将来にとって解決すべき最重要課題の一つであることは議論の余地はないように思える。蓄積された微生物学研究的知見を最大限に活用して、この重要な問題の解決に貢献していきたいと考えている。

本稿で紹介した研究は、おもに農林水産省のバイオマスプロジェクトの支援により行った。また、本稿の作成にあたり、公益財団法人発酵研究所の支援を受けた。

文 献

- 1) 島 純ら：食科工誌, **57**, 225 (2010).
- 2) Watanabe, I. et al.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 1117 (2008).
- 3) Watanabe, I. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 176 (2010).
- 4) Watanabe, I. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 379 (2009).
- 5) Endo, A. et al.: *Biotechnology for Biofuels*, **1**, 3 (2008).
- 6) Endo, A. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **299**, 95 (2009).
- 7) Fujita, K. et al.: *FEMS Yeast Res.*, **6**, 744 (2006).