

効率的バイオリファイナリーに向けた バイオ前処理技術と耐性育種戦略

Bae Jungu・中西 昭仁・植田 充美・黒田 浩一*

近年、ほとんどの先進国は石油依存型社会になっており、その影響で地球温暖化や石油の枯渇、日本のように石油生産量の少ない国ではエネルギーセキュリティーといったことが大きな問題とされている。その解決策として、石油代替エネルギーが求められてきた。その例としては、太陽光・熱エネルギーや風力エネルギー、原子力エネルギー、バイオマスからのバイオ燃料などが挙げられるが、2011年3月11日の原発事故により原子力エネルギー以外のエネルギー源に対する要求が急増している。その中でもバイオ燃料は液体燃料であり、輸送が簡単でガソリンと混ぜて使うことで現状のインフラをそのまま使うことができるという点、またエネルギーとしてだけでなく、石油に代わる化学素材の原料としても使うことができるという点で特に注目を集めている^{1,2)}。

アメリカやブラジルを中心に、トウモロコシやサトウキビなどの穀物系バイオマスを原料としてバイオエタノールの生産が精力的に行われているが、食糧との競合の問題や穀物を育てるのに大きなエネルギーを要することから、非可食バイオマスであるセルロース系バイオマスが注目を集めるようになった³⁾。セルロース系バイオマスは、セルロースやヘミセルロース、リグニンから構成されており、主な例としては農業廃棄物である稲わらや荒れ地でも良好に生育するエリアンサスなどのエネルギー作物等が挙げられる。供給量が豊富であることから、次世代バイオマスとして期待されているが、主にでんぷんからなる穀物系バイオマスに比べてその分解が非常に難しいという難点がある。その要因としては幾つか考えられるが、その中でももっとも大きいのは炭素源がリグニンに囲まれていることだと考えられている⁴⁾。リグニンの存在により、セルロース分解酵素の基質への接近が阻害されるとともに、リグニンへの酵素吸着が起る。高効率なバイオエタノール生産に向け、このようなリグニンを除去するための前処理が必須であり、さまざまな前処理法が開発されている。現在、技術的にセルロース系バイオマスからバイオエタノールを生産することはできるが、オイルリファイナリーに比べ、コスト面ではまだ十分でなく、コスト削減に向けたさまざまな研究が行われている⁵⁾。

リグニン除去のためのバイオマス前処理法としては、水蒸気爆砕や酸処理、アルカリ処理などの物理化学的手法⁶⁾やリグニン分解酵素を利用する生物学的手法、といった二つに大別することができる。現在はコストや反応時間の問題で物理化学的手法が主流になってはいるが、将来的には環境負荷が少なく、常温常圧での処理が可能でコストを遥かに低く抑えることができると予想される生物学的手法が期待されている^{7,8)}。

リグニンは、自然界で白色腐朽菌が分泌するリグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼ、ラッカーゼを代表とするリグニン分解酵素によるラジカル反応で分解されている。ペルオキシダーゼは H_2O_2 を H_2O に、ラッカーゼは O_2 を H_2O に還元させると同時に電子を引き抜き、ラジカルを生成するという反応様式をとっている⁹⁾。その中でもラッカーゼはリグニン分解物や白色腐朽菌の2次代謝物などの低分子をメディエータとして反応を行うという特徴を持っており、直接反応する場合はリグニンのフェノール部位しか酸化できないのに対して、メディエータを介すと非フェノール部位も酸化できるので非常に効率よく分解できるという特徴を持っている¹⁰⁾。竹から単離された *Trametes* sp. Ha1 は、いくつかの高いリグニン分解活性をもつラッカーゼアイソザイムを分泌することが知られており¹¹⁾、筆者らはその中でも高い活性や熱安定性を示すラッカーゼIに着目した。本稿ではラッカーゼIおよびラッカーゼI提示酵母を用いたバイオマス前処理効果について紹介するとともに、糖化酵素やその発現系の改良だけでなく、バイオエタノール生産を含めたバイオリファイナリーに向けた細胞分子育種として、発酵効率・物質変換効率向上のための各種耐性付与の新たな戦略についても紹介する。

ラッカーゼIによる新聞紙の前処理

Trametes sp. Ha1の分泌するラッカーゼIは、精製酵素（ラッカーゼダイワY120）として入手可能であり、まずこの標品ラッカーゼIを用いてバイオマスの前処理を試みた¹²⁾。基質のバイオマスとしては、古紙である新聞紙を用いた。まず、シュレッターによって新聞紙を裁断した後、ラッカーゼIを添加したものとコントロール

*著者紹介 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻（准教授） E-mail: k_kuro@kais.kyoto-u.ac.jp

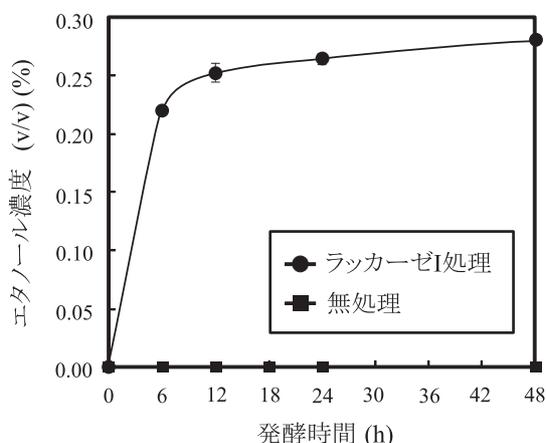


図1. ラッカーゼIで前処理した新聞紙からのエタノール発酵

としてバッファーのみを加えたもの、計2サンプルを用意した。好気条件で24時間のラッカーゼI処理の後、バッファーでよく洗浄し、新聞紙を唯一の炭素源とする培地で前述のセルラーゼ提示酵母により微好気条件下で48時間糖化・発酵を行った。その結果、ラッカーゼIで処理していないサンプルの場合はエタノール発酵がまったく見られなかったのに対し、ラッカーゼIで処理したサンプルの場合は0.28%のエタノールを生成した(図1)。したがって、エタノール生産の向上に向け、ラッカーゼIによる前処理が有効であることがわかった。ラッカーゼI処理をしていない場合、エタノール発酵がまったく見られなかったが、これはリグニンがセルラーゼの接近を阻害していることや、現状のセルラーゼ提示酵母のみでは結晶性セルロースの分解が十分でないことが原因であると考えられる。一方で、ラッカーゼI処理をした場合には、リグニンの分解や剥離によりセルラーゼの基質への接近が改善されたのではないかと考えられる。他にも、ラッカーゼによりリグニンの構造が変化し、リグニンによるセルラーゼの非特異的吸着が減少した可能性やラッカーゼがセルロース自体に作用しその結晶構造を緩めているといった可能性も考えられるため、その詳細については今後さらなる検証が必要である。

ラッカーゼI提示酵母による前処理

細胞表層工学およびその可能性 ラッカーゼI処理によるエタノール生産の向上が見られたが、この酵素を精製・濃縮して用いるには、処理時間が長いことや酵素生産コストが高いといった問題点がある。筆者らは、ラッカーゼIを酵母の表層に提示して、そのまま生体触媒として使うことができる、細胞表層工学¹³⁾を用いて上記

の問題の解決を試みた。ラッカーゼI提示酵母を用いることで、酵素の生産コストを削減できることと前処理まで含めたCBP (consolidated bioprocessing) が実現できる可能性があるといった二つのメリットが考えられる。まず、一つ目は、酵母を培養するだけで一つの細胞当たり約 $10^4 \sim 10^5$ 個の酵素を取得することができ¹⁴⁾、そのまま反応に用いることができるため、多くの酵素を低コスト、短時間で手に入れることができる。二つ目に関しては、生物学的手法では有害な薬品を使わないため、洗浄をしなくても次の酵素糖化反応に悪影響を及ぼさず、最終的には前処理から糖化・発酵のプロセスまですべてを一つの反応槽で行うことも可能である。これまでに細胞表層工学を用いた例として、Endoglucanase II, Cellobiohydrolase II, β -Glucosidaseの3種類のセルラーゼを酵母の表層に提示させることにより、セルロースから直接エタノール発酵できる酵母の創製に成功している¹⁵⁾。この酵母と本研究で構築したラッカーゼI提示酵母を一緒に用いることで上記の前処理を含むCBPへの展開も期待できる。

ラッカーゼI提示酵母の構築 酵素法の限界を克服するために、細胞表層工学を用いて上記のラッカーゼIを提示した酵母を作製した⁸⁾。白色腐朽菌 *Trametes* sp. Ha1株からラッカーゼI遺伝子のORFをクローニングし、配列決定後、*Trametes* sp. AH28-2株のラッカーゼI遺伝子配列と比較した。両遺伝子は97%という非常に高い相同性を示し、ラッカーゼI遺伝子には10個のイントロンが含まれていることがわかったのでオーバーラッピングPCRによりエキソン同士を繋げたcDNAを合成した。その後、細胞表層提示用ベクターであるpULD1¹⁶⁾に挿

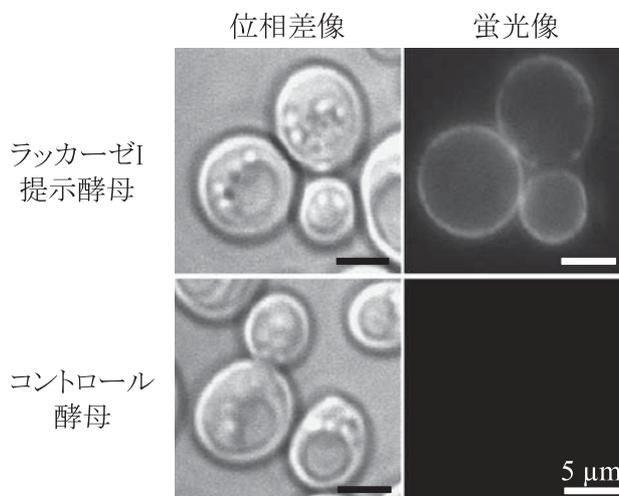


図2. 蛍光抗体染色によるラッカーゼI細胞表層提示の確認

入し、*Saccharomyces cerevisiae*に導入することによりラッカーゼI提示酵母を作製した(図2)。

構築したラッカーゼI提示酵母による酸化活性を確認するために、2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS)を基質に用いて活性測定を行った。ABTS溶液は、本来は透明であるが、ラッカーゼにより酸化されるとその色が青色に変化するという特徴を持つため、色の変化を波長420 nmでの吸光度により測定したところ、ラッカーゼI提示酵母は高い酸化活性を示した。

稲わらに対する前処理効果 ラッカーゼI提示酵母がバイオマスの前処理として有効であるかを調べるために、熱水処理後の稲わらサンプルを基質としてエタノール発酵実験を行った⁸⁾。熱水処理を行うことによりヘミセルロースを液画分に、セルロースを固体画分に得ることができるが、本実験ではセルロースを含む固体画分を用いた。すでに熱水処理という前処理を行っているため全体的なバイオマスの構造が変化し、元々の稲わらに比べると分解しやすい状態になっているものの、リグニンは約25%含まれていることからラッカーゼIによる前処理効果を調べるのに適した基質であると考えられる。

稲わらは20 g/lの濃度で用い、ラッカーゼI提示酵母で前処理を行うものとコントロール酵母で前処理を行うものを用意した。さらに、各サンプルにメディエータとしてABTSを添加し、培地成分の入っていないバッファー中で24時間好気反応を行った。その後、洗浄は行わずにグルコース以外の培地成分と前述のセルラーゼ提示酵母を添加し、微好気条件で糖化・発酵を48時間行った。その結果、両者とも12時間の時点でエタノール濃度はほぼ頭打ちになったが、ラッカーゼI提示酵母で

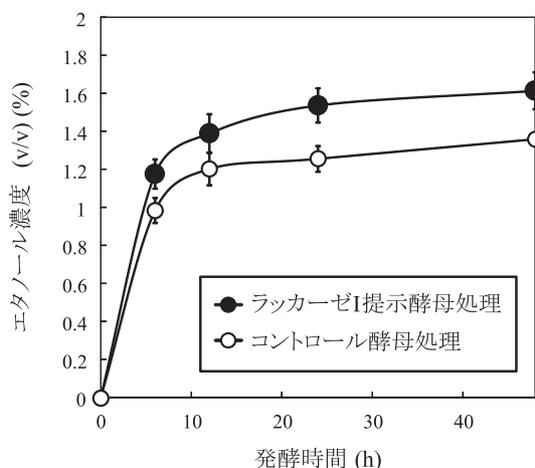


図3. ラッカーゼI提示酵母による前処理後のエタノール発酵

前処理を行ったサンプルでは1.54% (v/v)、コントロールサンプルでは1.26% (v/v) 生成しており、ラッカーゼI提示酵母の前処理によってエタノール発酵量が約1.21倍上昇したという結果が得られた(図3)。

転写因子改変による耐性付与

CBPによるバイオエタノール生産において、前処理・酵素糖化だけでなく、微生物によるエタノール発酵効率をいかに向上させるかについても重要な課題であり、発酵阻害因子に対する耐性付与が求められている。また、バイオエタノール生産に限らず、遺伝子導入や代謝改変によりさまざまな物質生産に向けた生体触媒創製の試みがなされているが、生産物毒性によって生育阻害を招くため耐性の向上が必要となる。さらに物質変換を有機溶媒中など細胞にとって不都合な環境下で行う場合においても、耐性を向上させることで効率的な変換が期待される。

筆者らは、有機溶媒存在下での長期連続培養中に単離した有機溶媒耐性酵母*S. cerevisiae* KK-211株¹⁷⁾のトランスクリプトーム解析を行っていく中で、耐性の原因となる転写因子の1アミノ酸変異を同定することができた^{18,19)}。KK-211株ではABCトランスポーターや各種細胞表層タンパク質をコードする遺伝子の転写レベルの上昇が見られ、これらの遺伝子の上流配列を調べたところ、幾つかの遺伝子でのpleiotropic drug response element (PDRE) という転写因子Pdr1p認識配列の存在が原因因子同定の手掛かりとなった。Pdr1pは通常条件下では制御下の遺伝子の転写抑制を行っているが、薬剤存在下ではxenobiotic binding domain (XBD) を介してさまざまな薬剤と相互作用し、薬剤排出ポンプ遺伝子など各種薬剤耐性関連遺伝子の転写を活性化させる転写因子である²⁰⁾。KK-211株のPDR1遺伝子配列を調べたところ4カ所のアミノ酸変異が見られ、その中で821番目のアミノ酸変異(R821S)を実験室株に導入することによって、実際に有機溶媒耐性を示すことが明らかとなった。したがって、このようなアミノ酸変異を導入することにより、任意の酵母株に有機溶媒耐性付与が可能となる。さらにこのPDR1-R821S変異株を用い、水/有機溶媒二相系中での3-オキソブタン酸ブチルの還元反応を行ったところ、野生株では有機溶媒毒性により反応がほとんど進行しなかったのに対して、変異株ではすべての基質を還元することができた^{19,21)}。

PDR1-R821S変異により転写活性化されたPdr1pの下流の遺伝子の中で、さらに直接有機溶媒耐性に関与しているものを明らかにするため、Pdr1p下流の遺伝子を個々に過剰発現させた株を構築し、耐性試験を行った²²⁾。

その結果、いくつかのABCトランスポーター遺伝子が直接有機溶媒耐性に関与していることが分かった。しかも、有機溶媒の種類によって耐性に有効なABCトランスポーターが異なるという興味深い知見が得られた。個々のABCトランスポーターを過剰発現した株はいずれも有機溶媒耐性を示したが、*PDR1-R821S*変異株と比べて耐性は弱いため、1種のトランスポーターだけでなく複数の因子が同時に転写活性化することが耐性獲得に重要であると推察された。

従来の耐性育種戦略としては、外来遺伝子の導入や元来細胞が有している遺伝子の強化・破壊といった個々の遺伝子に着目したものが主であった。しかし、今回のように複数の遺伝子発現を制御している転写因子を改変することによって、下流の複数遺伝子の発現を同時に変えることができるため、個々の遺伝子の制御だけでは効果が表れにくい耐性などのさまざまな表現型を付与する上で効果的な戦略であると考えられる。

おわりに

本稿にて紹介したように、ラッカーゼIを細胞表面提示した酵母でも精製ラッカーゼIと同様の酸化活性を示し、新聞紙に対して精製ラッカーゼIを、稲わら水熱処理サンプルに対してラッカーゼI提示酵母を作用させることにより、いずれもその後の糖化・発酵効率を向上させるという前処理効果を実証することができた。今後、ラッカーゼだけでなく、その他のリグニン分解酵素やリグニン分解に間接的に関わる酵素など、各種酵素の組み合わせによってリグニン分解活性をさらに高めた酵母も得られるであろう。また、このような細胞表面工学を用いた分子育種とともに、転写因子デザインによって物質変換能を付与する細胞自体の耐性育種を行うことにより、バイオリファイナリーのさらなる発展が期待される。

文 献

- 1) 中西昭仁ら：微生物によるものづくり－化学法に代わるホワイトバイオテクノロジーの全て－, p.288, シーエムシー出版 (2008).
- 2) 中西昭仁ら：エコバイオリファイナリー－脱石油社会へ移行するための環境ものづくり戦略－, p.229, シーエムシー出版 (2010).
- 3) Sims, R. E. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **101**, 1570 (2010).
- 4) Simmons, B. A. *et al.*: *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 313 (2010).
- 5) Gray, K. A. *et al.*: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 141 (2006).
- 6) Wyman, C. E. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **96**, 1959 (2005).
- 7) Martinez, A. T. *et al.*: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 348 (2009).
- 8) Nakanishi, A. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **94**, 939 (2012).
- 9) Wong, D. W.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **157**, 174 (2009).
- 10) Kawai, S. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **170**, 51 (1999).
- 11) Nakatani, M. *et al.*: *N. Biotechnol.*, **27**, 317 (2010).
- 12) Nakanishi, A. *et al.*: *Renewable Energy*, **44**, 199 (2012).
- 13) Ueda, M. and Tanaka, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 125 (2000).
- 14) Shibasaki, S. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 471 (2001).
- 15) Fujita, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1207 (2004).
- 16) Kuroda, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 713 (2009).
- 17) Kawamoto, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 476 (2001).
- 18) Matsui, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 75 (2006).
- 19) Matsui, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4222 (2008).
- 20) Thakur, J. K. *et al.*: *Nature*, **452**, 604 (2008).
- 21) 松井 健, 黒田浩一：微生物によるものづくり－化学法に代わるホワイトバイオテクノロジーの全て－, p.275, シーエムシー出版 (2008).
- 22) 黒田浩一：合成生物工学の隆起－有用物質の新たな生産法構築をめざして－, p.124, シーエムシー出版 (2012).