

合成生物学によるバイオ燃料生産のための 微生物細胞工場の創製

蓮沼 誠久*・近藤 昭彦

低炭素社会を構築するために、再生可能で食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマス資源から、液体燃料や化学品原料を生産する「バイオリファイナー」の開発が求められている。糖プラットフォームを用いるバイオエタノール生産を例にとると、そのプロセスは、結晶化したバイオマスを膨潤化する前処理工程、バイオマスを加水分解する酵素処理工程、微生物（主として *Saccharomyces* 属酵母）による発酵工程、生産物の分離回収工程から成り立っており、省エネルギーかつ低コストなプロセス開発の成否が実用化の鍵を握っている。この中で、酵素処理工程と微生物発酵工程を構成するバイオプロセスは、高温処理や化学触媒を用いる非生物学的プロセスと比較して環境への負荷が低く、反応機構の特異性が高い点で有用であるが、従来の石油化学プロセスを置換するためには、より効率的なプロセス開発が求められている。

微生物の細胞表層にセルラーゼ・ヘミセルラーゼを集積させる技術（細胞表層工学技術）¹⁾は、酵素生産と糖化、発酵をワンパッケージ化することが可能であり、糖化工

程および発酵工程の設備投資を低減し、プロセスをシンプルにすることが可能である（図1）。バイオプロセスの統合化は consolidated bioprocessing (CBP) と言われるが、CBPは設備コストの圧縮やバイオプロセス全体の省エネ化を実現する技術として高い期待がもたれている^{2,3)}。さらに、高価なセルラーゼ系酵素の生産に必要な材料の供給や分離工程の省略が可能となり、酵母を再利用することで酵素の再利用も可能となるため、きわめて有用な技術である⁴⁾。筆者らは、酵母細胞表層にセルラーゼやヘミセルラーゼを提示することにより、リグノセルロース系バイオマスをワンバッチで直接エタノールに変換するシステムを開発し、さまざまな改良を行ってきた⁴⁾。また一方で、微生物の発酵能力を最大限に活用するためには、細胞内の代謝メカニズムを機能的な方向に改変する必要があるが、微生物の細胞内代謝は遺伝子レベル、タンパク質レベル、代謝物質レベルで厳密に制御されているため、これらの生体内分子ネットワークの挙動を把握し、的確に改変することが重要である。筆者らは、メタボロミクスやトランスクリプトミクスなどのマルチオ

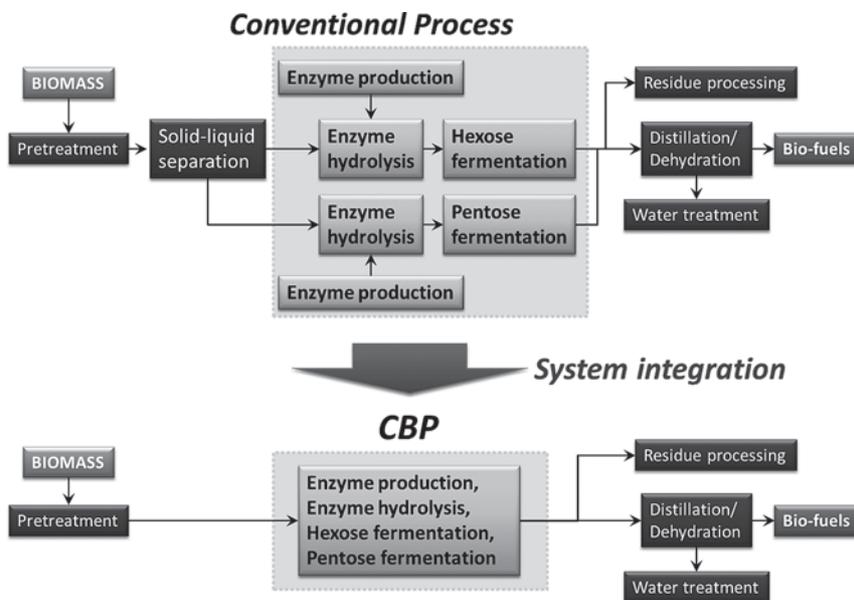


図1. システムインテグレーションによるバイオプロセスの統合化。破線枠内がバイオプロセス。

*著者紹介 神戸大学自然科学系先端融合研究環（准教授）E-mail: hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

ミクス解析技術を活用して、微生物の代謝系を網羅的に解析することで新規の代謝改変戦略を導出し、その発酵性能を向上させてきた^{5,6)}。特にメタボロミクスは、代謝ネットワーク上の中間代謝物質のプロファイリングから、物質生産能力を左右する鍵要素の抽出を可能にしてきた^{7,8)}。微生物をより優れた細胞工場にするためには、目的物質の収率だけでなく細胞の増殖性を確保する必要があり、細胞をシステムとして理解し、最適化することが重要である。本稿では、「細胞表層工学技術」と細胞内代謝を合理的に改変する「合成生物学技術」を組合せた微生物のデザインとバイオエタノール生産への応用について述べる。

細胞表層工学技術による バイオエタノール生産プロセスの統合化

細胞表層工学技術とは、微生物の細胞表層に酵素などの機能性タンパク質を集積して、細胞に新しい機能を付与する技術である¹⁾。本来、微生物の細胞表層（細胞壁、細胞膜）は細胞の構造や形態を維持するだけでなく、細胞や分子の認識、シグナル伝達、酵素反応など、生理的に重要な反応の場として機能し、種々の細胞表層タンパク質を局在させている⁹⁾。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には、細胞間の性接合に参与する α -アグルチニンが細胞表層に存在している。 α -アグルチニンは、C末端側にグリコシルホスファチジルイノシトール・アンカー領域

を有しており、このアンカーにより細胞表層外殻につながりとめられている。そこで、分泌シグナル配列を付加した目的タンパク質のC末端側を、 α -アグルチニンのC末端領域と融合させることにより、酵母の細胞表層に提示することが可能になる¹⁾。

これまでにセルロースの分解に参与するエンドグルカナーゼ (*Trichoderma reesei* 由来 EGII), セロビオヒドロラーゼ (*T. reesei* 由来 CBHII), β -グルコシダーゼ (*Aspergillus aculeatus* 由来 BGL1) の各遺伝子を α -アグルチニンの3'末端領域と連結した3種類の遺伝子配列を *S. cerevisiae* の染色体ゲノムに組込んだところ3種類の酵素を同時に表層提示する形質転換酵母が得られ、10 g/l のモデル基質（リン酸膨潤セルロース）を単一炭素源とする培地中で2.9 g/lのエタノールを生産することが示された¹⁰⁾。この結果は細胞表層付近でセルロースから遊離したグルコースが細胞内に取り込まれてエタノールに変換されたことを示しており（図2）、酵母自身が発現したセルラーゼにより一段階のプロセスでエタノールを得ることに成功した。筆者らは、天然のバイオマス基質として、稲わら水熱前処理物からのエタノール生産を試みた¹¹⁾。43% (w/w) グルカンからなる天然基質を200 g/lで仕込み、10 FPU/g-biomassのセルラーゼ存在下で2時間液化したのちに、*T. reesei* EGII, *T. reesei* CBHII, *A. aculeatus* BGL1 遺伝子をそれぞれ3コピー、3コピー、1コピー導入したセルラーゼ表層提示酵母を投入して発

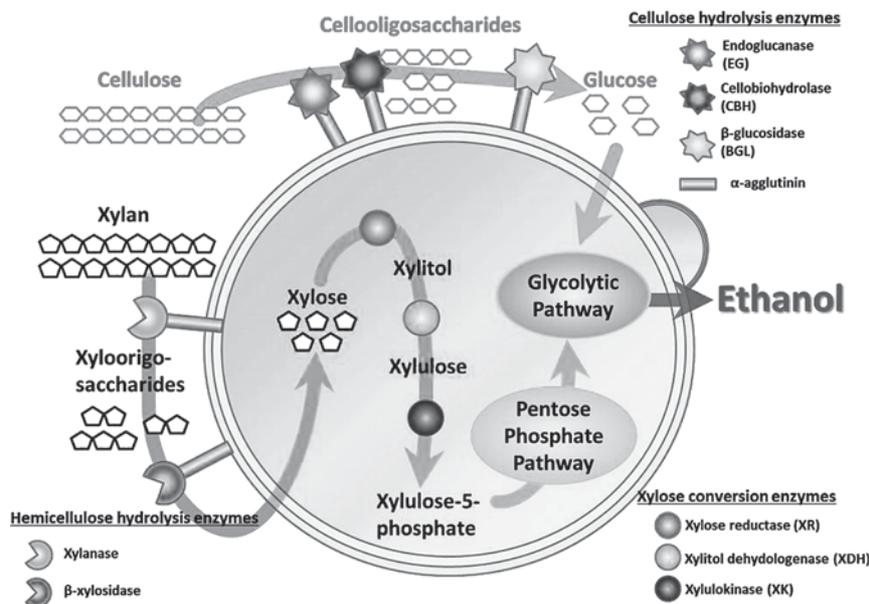


図2. 細胞表層工学技術を用いたセルロース・ヘミセルロースからのエタノールへの変換。

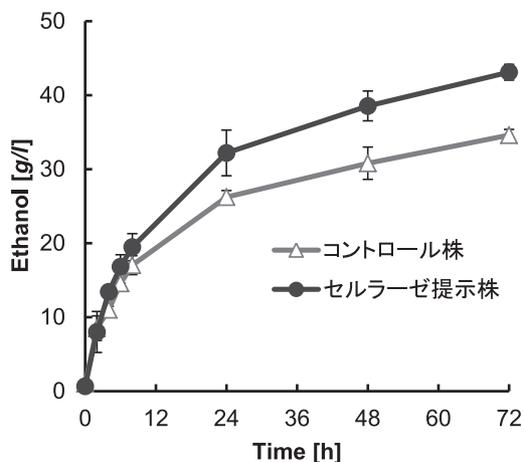


図3. 野生型酵母とセルラーゼ表層提示酵母を用いた稲わら水熱処理物からのエタノール生産

酵を行ったところ、72時間後に43.1 g/lのエタノールを生産することに成功した(図3)。細胞表層におけるセルラーゼ群の集積提示は、①連続する反応を触媒する複数の酵素を集積することにより逐次的反応が速やかに進行し、酵素反応の生成物阻害を緩和できる、②生成したグルコースを即座に微生物細胞内へ取り込むことによりリアクター内のグルコース濃度を常に低濃度に維持し、バクテリアなどのコンタミ防止につながる、③酵母が炭素源を効率よく利用することができる、④細胞の回収と同時に酵素も回収できるため繰返し発酵における酵素添加量を削減できる、など多くの利点を有している。

水熱方式による前処理は酸添加方式と比べて環境に優しいシステムであるが、液化した画分がキシランやキシログルカンなどのヘミセルロース系多糖類を含むことが特徴である。そこで、筆者らはヘミセルロース画分からの一段階発酵によるエタノール生産プロセスの開発に取り組んだ¹²⁾。ヘミセルロースの主成分はキシロースがβ-1→4結合したキシラン主鎖にグルコースなどからなる側鎖が連結した高分子である。したがって、ヘミセルロースを効果的に加水分解するために*T. reesei*由来キシラナーゼ、*Aspergillus oryzae*由来キシロシダーゼ、*A. aculeatus*由来BGL1を細胞表層に提示し、主要な加水分解物であるキシロースの資化能力を強化するために*Scheffersomyces stipitis*由来キシロースレダクターゼ(XR)、キシリトールデヒドロゲナーゼ(XDH)、*S. cerevisiae*由来キシロキナーゼ(XK)を細胞内で過剰発現する酵母を作出した。得られた形質転換酵母を用いて、稲わら水熱分解液からの発酵を行ったところ、市販酵素を添加しない条件で効率的なエタノール生産を

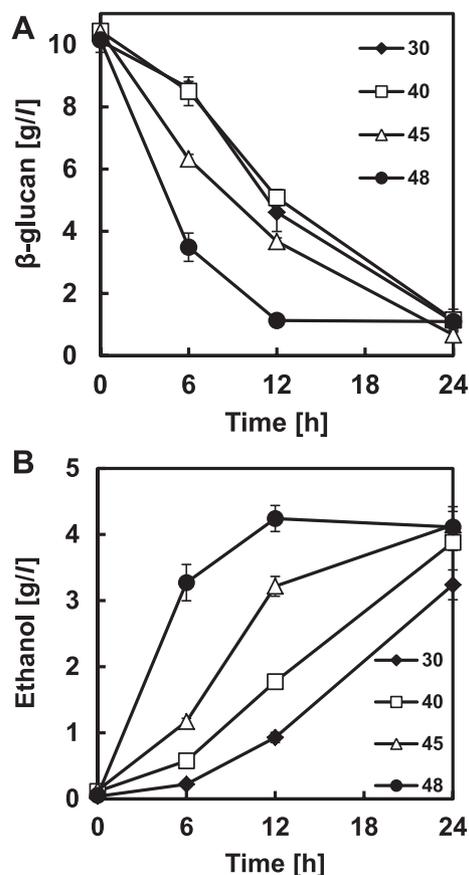


図4. セルラーゼ表層提示型*K. marxianus*による30, 40, 45, 48°Cでのβ-グルカン発酵. β-グルカンの消費(A)とエタノールの生産(B)

実現した。

CBPにおいてはエタノール生産効率を向上させる有力な手段の一つが高温でのセルロース発酵である。一般的な*S. cerevisiae*の発酵最適温度は30~35°C付近であるが、よく用いられる真菌由来のセルラーゼは50°C付近で最大活性を示す。したがって、酵母の耐熱性を向上させ、発酵可能な温度範囲を高温側にシフトさせることができれば、より高いセルラーゼ活性を発揮させることができる。筆者らは45~50°Cでも生育が可能な耐熱性酵母*Kluyveromyces marxianus*に着目し、細胞表層工学技術の導入を試みた¹³⁾。*K. marxianus*に*T. reesei*由来EGIIと*A. aculeatus*由来BGL1を細胞表層に提示する形質転換株を作出して、β-グルカンからの一段階発酵を行ったところ、発酵温度の上昇とともにエタノール生産速度が向上し、48°Cでは、発酵開始12時間で82%の対糖エタノール収率を達成した(図4)。高温での発酵は、セルロース加水分解活性を促進するだけでなく、発酵槽の冷却エネルギーを低減し、雑菌汚染リスクを低下させるためきわめて有効である。

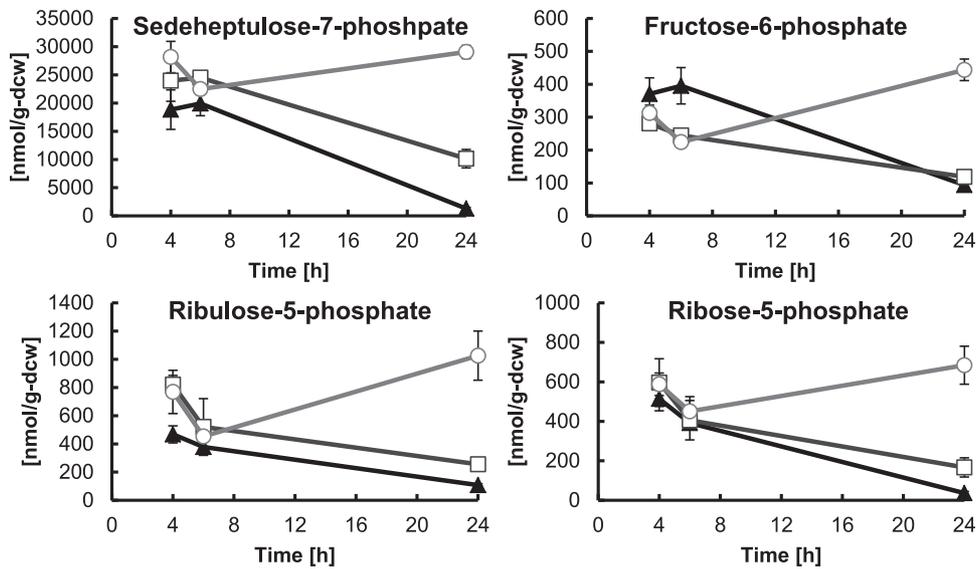


図5. 0 mM (▲), 30 mM (□), 60 mM (○) の酢酸存在下でキシロース発酵を行った時のキシロース資化性酵母における細胞内代謝物質量の経時変化。

システムバイオロジーによる発酵阻害物耐性株の育種

リグノセルロースからのエタノール生産における大きなボトルネックは、前処理工程で生成するバイオマス由来の過分解物質（フラン類、酢酸、ギ酸、バニリン、シリングアルデヒドなど）が発酵工程に持ち込まれ、酵母の生育や発酵を阻害することである。特に、酢酸やギ酸は生成量が多く、毒性が高い¹⁴⁾。これらの弱酸類は、非解離状態で細胞膜を通過し、細胞内で解離してプロトンを放出することで細胞内pHを低下させると考えられている。しかしながら、弱酸の添加がエタノール合成に及ぼす影響はよくわかっていない。そこで、細胞内の代謝物情報を俯瞰することが可能なメタボロミクス解析を用いて、弱酸が酵母のエタノール代謝に与える影響を調べた⁵⁾。発酵の炭素源には、弱酸添加により資化能力が大きく阻害されるキシロースを用い、30 mMあるいは60 mMの酢酸を培地に加えた好気発酵を行った。酵母は*S. stipitis*由来XR, XDH遺伝子, *S. cerevisiae*由来XK遺伝子をゲノムに組み込んだ形質転換株を作出し、発酵に用いた。その結果、添加した酢酸の濃度依存的にキシロース資化速度とエタノール生産速度の低下が見られた。発酵中の細胞内代謝物プロファイル解析したところ、非酸化的ペントースリン酸回路の代謝中間体が酢酸濃度依存的に蓄積していることが明らかになった(図5)。特に、発酵開始24時間後のセドヘプツロース7リン酸は、60 mM酢酸存在下の蓄積量が非存在下の22倍以上であった。この結果は、酢酸添加により非酸化的

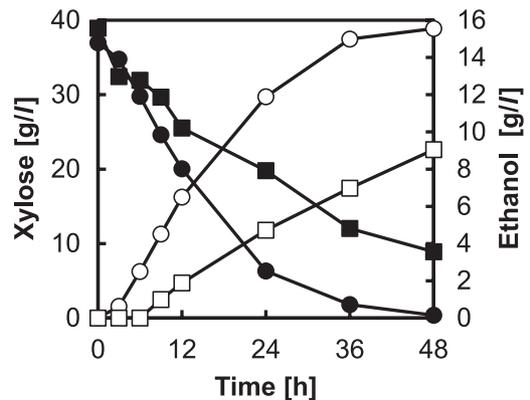


図6. TAL 過剰発現株 (○, ●) とコントロール株 (□, ■) を用いた、30 mM酢酸存在下 (B) におけるキシロースからのエタノール生産。●, ■; キシロース, ○, □; エタノール。

ペントースリン酸回路の代謝フラックスが減速している可能性を示唆している。そこで、非酸化的ペントースリン酸回路の律速段階と考えられているトランスアルドラーゼの遺伝子 (*TAL1*) を *TDH3* プロモーターの下流に連結して過剰発現させたところ、*TAL1* 遺伝子高発現型キシロース資化性酵母は酢酸存在下で高いエタノール生産性を示し、30 mM酢酸存在下では83%の対糖エタノール収率を達成した(図6)。また、*TAL1* 過剰発現株では非酸化的ペントースリン酸回路に参与する中間代謝物質の蓄積が解消されていることが確認された。

次に、ギ酸による発酵阻害の影響を調べるために、5~10 mMのギ酸存在下でキシロース発酵させた酵母 (XR/

XDH/XK 導入株) からRNAを抽出し、トランスクリプトミクス解析を行ったところ、ギ酸濃度依存的に *ALD5*, *HXX2*, *VCX1*, *GPD2*, *HXT4* などの転写量が增大していた。中でもギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 *FDHI* の転写量が顕著に増加していることが明らかとなった。そこで、*FDHI* を *PGK1* プロモーター下流に連結し、構成的に過剰発現するキシロース資化性酵母を作出し、ギ酸存在下でのキシロース (40 g/l) 発酵を行った。その結果、20 mM ギ酸存在下では、*FDHI* を導入していない株のエタノール生産量が半分以下になるのに対し、*FDHI* 過剰発現株はギ酸非存在下と同程度のエタノールを生産することが分かった⁶⁾。これは、*FDHI* 過剰発現株が発酵開始24 時間後に培地中のギ酸を消去させたためと考えられる。

以上のようにリグノセルロース由来の主要な発酵阻害物である、酢酸あるいはギ酸の存在下でキシロース発酵を向上させる代謝因子が見いだされた。そこで *TALI* と *FDHI* を同時に過剰発現するキシロース資化性酵母を創製し、酢酸およびギ酸共存下でのエタノール生産能の向上を目指した¹⁵⁾。さらに、キシロース資化性酵母の二倍体化が高温耐性や低pH耐性を酵母に付与することを明らかとしたため⁸⁾、異なる接合型の *TALI*/*FDHI* 共発現株を用いて二倍体 (*MATa/α*) の *TALI*/*FDHI* 共発現型キシロース資化性酵母を作出した。得られた酵母は、30 mM 酢酸、20 mM ギ酸の共存下での40 g/lキシロース発酵で、一倍体キシロース資化性株と比べて12倍高いエタノール生産速度を示した¹⁵⁾。次に、実際のバイオマスとして27 mM 酢酸、20 mM ギ酸を含む稲わら水熱分

解液を糖化处理して得られたヘミセルロース溶液からの繰返し発酵を試みた。発酵後の菌体は遠心分離により回収し、新たな稲わら糖化液と混合して発酵を開始することとし、5ラウンドの繰返し発酵を実施した。その結果、一倍体のキシロース資化性酵母では、発酵を繰り返す毎にキシロース消費とエタノール生産の低下を見せるのに対し、*TALI*/*FDHI* 共発現型二倍体キシロース資化性酵母は、5回の繰返し発酵を行ってもバイオマスからの発酵能を維持し続けていることが確認できた¹⁵⁾。菌体の繰返し利用は、酵母の増殖プロセスの省略を可能にするため、コスト・エネルギー効率的にみてきわめて有効な手段である。従来、発酵液中の阻害物質の存在が繰返し発酵のネックとなっていたが、酵母の耐性を代謝工学的に強化することにより、阻害物濃度が高いヘミセルロース画分からの繰返し発酵に成功した。

筆者らはバイオエタノール生産酵母を材料に、メタボロミクスやトランスクリプトミクスを中心としたマルチオミクス解析に基づいて、キシロース代謝を向上するための代謝改変戦略を立案し、その発酵性能を向上させてきた。特にメタボロミクスは、代謝ネットワーク上の中間代謝物質をプロファイリングする技術であり、代謝変動の最終フェノタイプを観測することができるため、物質生産能力を左右する鍵要素の抽出をする上で有効な手段であることが示された。

最後に

バイオマス分解能とプロダクト高生産能を両立する微生物の創製は、バイオプロセスによる液体燃料・化学品

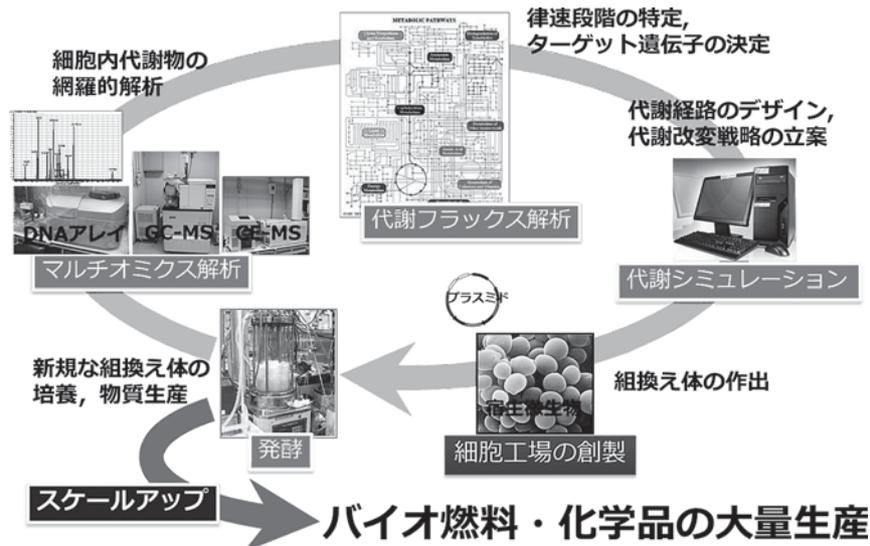


図7. システムバイオロジー解析に立脚した代謝機能の高効率化戦略

生産の実用展開を可能にする切り札と言える。近年、CBPを実現するための微生物開発は世界的な競争となっているが¹⁶⁾、酵母 *S. cerevisiae* は、グルコース資化能力が高いだけでなく、細胞が堅牢で溶菌しにくく、ストレス耐性も高いため雑菌汚染を抑えた発酵を実現する上でも有利である。また、酵母にセルロース分解能を付与する研究が広く行われているが^{4,17)}、酵母の細胞表層に提示したセルラーゼはフリーのセルラーゼが分解しにくいセルロースを加水分解できることが明らかになってきた¹¹⁾。一方で、目的プロダクトの生産能を向上するために、システムバイオロジー的アプローチが重要性を増すであろう。行き当たりばったりの形質転換体作出スキームから脱却し、合理的に微生物の代謝能力を向上させるためには、代謝システムの情報に基づいて代謝改変の戦略を立案することが重要であり、作出された微生物の物質生産能や特性を評価し、さらなるボトルネックが発見されれば、その律速を解除するための第二次代謝改変戦略を策定することができる(図7)。このサイクルを繰り返すことにより、微生物の代謝機能はファインチューニングされていくはずである。今後、微生物の高機能化がバイオプロセスの用途を拡大し、細胞の外(表層)と中をフルに活用した画期的な微生物細胞工場の創製がバイオリファイナリーの構築を促進することを期待したい。

文 献

- 1) Kondo, A. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 28 (2004).
- 2) Lynd, L. R. *et al.*: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 577 (2005).
- 3) Cardona, C. A. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **98**, 2415 (2007).
- 4) Hasunuma, T. *et al.*: *Biotechnol. Adv.* (in press)
- 5) Hasunuma, T. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **10**, 2 (2011).
- 6) Hasunuma, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 997 (2011).
- 7) Kato, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.* (in press)
- 8) Kato, H. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press)
- 9) Lesage, G. *et al.*: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 317 (2006).
- 10) Fujita Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1207 (2004).
- 11) Matano, Y. *et al.*: *Bioresour. Technol.* (in press)
- 12) Sakamoto, T. *et al.*: *J. Biotechnol.* (in press)
- 13) Yanase, S. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 351 (2010).
- 14) Almeida, J. R. M. *et al.*: *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **82**, 340 (2007).
- 15) Sanda T. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **102**, 7917 (2011).
- 16) Olson, D. G. *et al.*: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **23**, 1 (2011).
- 17) van Zyl, W. H. *et al.*: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **120**, 284 (2007).