

Candida utilisを用いたバイオリファイナリー基幹物質生産に関する研究

| | |
|--------|---|
| 著者 | 玉川 英幸 |
| 学位授与機関 | Tohoku University |
| 学位授与番号 | 11301乙第9200号 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/58309 |

Candida utilis を用いた

バイオリファイナリー基幹物質生産に関する研究

玉川 英幸

目次

| | |
|--|----|
| 緒言 | 4 |
| 第1章 <i>Candida utilis</i> によるキシロースからのエタノール生産 | |
| 第1節 序論 | 8 |
| 第2節 材料と方法 | 9 |
| 第3節 結果 | |
| 1. 補酵素要求性が変換されたキシロース代謝酵素を発現する 酵母株の構築 | 15 |
| 2. 組換え株によるキシロースからのエタノール生産 | 16 |
| 3. XDHは <i>C. utilis</i> のキシロース発酵のための重要酵素である | 17 |
| 4. キシロース代謝におけるキシロース、グルコース、エタノール濃 度の影響 | 17 |
| 第4節 考察 | 19 |
| 第2章 カクテルマルチコピー導入法による <i>Candida utilis</i> のキシロース 代謝酵素比の最適化 | |
| 第1節 序論 | 30 |
| 第2節 材料と方法 | 31 |
| 第3節 結果 | |
| 1. カクテルマルチコピー導入法による組換え株の構築と選抜 | 34 |
| 2. TMS174株におけるキシロース代謝酵素遺伝子の導入コピー数の 解析 | 35 |
| 3. 導入コピー数依存的な酵素活性増加の解析 | 36 |

| | |
|--|----|
| 4. 導入コピー数、酵素活性とキシロース発酵能の相関解析 | 37 |
| 5. 発現量比最適化株のキシロース発酵能の解析 | 37 |
| 第4節 考察 | 38 |
| | |
| 第3章 トランスクリプトーム解析とメタボローム解析による <i>Candida utilis</i> のキシロース代謝律速段階の解析 | |
| 第1節 序論 | 50 |
| 第2節 材料と方法 | 51 |
| 第3節 結果 | |
| 1. 野生株と組換え株の培養 | 55 |
| 2. 細胞内代謝物のプロファイリング | 56 |
| 3. 遺伝子発現のプロファイリング | 57 |
| 4. アルコール脱水素酵素遺伝子の過剰発現 | 58 |
| 第4節 考察 | 58 |
| | |
| 第4章 <i>Candida utilis</i> によるキシロースからの乳酸生産 | |
| 第1節 序論 | 70 |
| 第2節 材料と方法 | 72 |
| 第3節 結果 | |
| 1. 異種キシロース代謝酵素を発現する乳酸生産株の構築 | 74 |
| 2. 組換え株によるキシロースからのL-乳酸生産 | 75 |
| 3. L-乳酸生産のための培養最適化 | 76 |
| 4. ビール仕込粕糖化液からのL-乳酸生産 | 76 |
| 第4節 考察 | 77 |

| | |
|---|-----|
| 第5章 <i>Candida utilis</i> によるイソプロパノール生産 | |
| 第1節 序論 | 83 |
| 第2節 材料と方法 | 84 |
| 第3節 結果 | |
| 1. イソプロパノール生産経路が導入された酵母株の構築 | 89 |
| 2. 中和条件下でのイソプロパノール生産 | 90 |
| 3. ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子破壊の影響 | 90 |
| 4. 内在性遺伝子の過剰発現 | 91 |
| 5. <i>ACS2</i> と <i>ERG10</i> の同時過剰発現 | 92 |
| 6. 半回分培養によるイソプロパノール生産 | 93 |
| 第4節 考察 | 93 |
| | |
| 総合討論 | 102 |
| | |
| 引用文献 | 108 |
| | |
| 発表論文 | 123 |
| | |
| 謝辞 | 126 |

緒言

人類は科学を著しく発展させることにより高度な技術力を身につけ、その行動範囲は宇宙空間までに達した。また、目覚ましく産業を発展させ、豊かな社会の実現に向けて努力してきた。こうした人類の進歩において、最も大きな原動力であったと考えられているのは化石燃料である。特に石油は、エネルギー変換効率、入手性、利用汎用性に優れていることから、低コストでのエネルギー供給に貢献してきた。BPエネルギー統計2012年版によれば、石油の消費は年々増加傾向にあり、2012年の世界の石油消費量は年間4000万トンを超えている(1)。世界の電力の70%が化石燃料を用いた火力発電によって供給されているという事実は、現代文明が石油によって動いていることを示している。しかし、その代償として地球には、急激な温暖化、化石燃料の枯渇という現実と未来が待ち受けている。

こうした背景の中で非化石資源、すなわち再生可能な資源であるバイオマス为原料として石油代替素材を生産する研究が盛んに行われている。本論文のタイトルにもなっている「バイオリファイナリー」とは、バイオマスからの燃料、化成品製造を意味する米国エネルギー省(DOE)の造語であるが、今や世界共通語となりつつある。米国では、1990年代よりバイオリファイナリーに関する新規技術開発の促進、並びに新規産業としての育成を国家戦略として強力に推進しており、現在、この動きは世界中で加速、継続されている。

全ての石油代替素材をバイオマスから生産することは生物の限界を越えている側面もあり、現実的には不可能である。そのため、化学合成的手法により汎用素材へ変換可能な物質をバイオリファイナリーで生産する手法が有効と考えられている。米国DOEは従来の石油化学リファイナリーで用いられてきたフローチャートを模して、バイオリファイナリー基幹物質を軸とした誘導化合物の体系図を作成している(2)。バイオ燃料技術革新協議会の報告書(3)によれば、「バイオリファイナリー

の出発中間体として期待しうる化合物」として、エタノール、乳酸、プロパノール、ブタノールなど複数種の化合物が挙げられており、こうした基幹物質の生産技術はバイオリファイナリー推進のために必要不可欠な技術となることが予想されている。この一例として、バイオポリエチレンテレフタレート(PET)生産が実用化レベルに達しようとしている(4)。PETは現在、石油由来のパラキシレンを空気酸化することによって得られたテレフタル酸とエチレングリコールを重合することで生産されている。米国Gevo社はバイオマスからイソブタノールを生産する微生物を開発するとともに、イソブタノールをテレフタル酸に変換する技術を確立した。一方、エチレングリコールはバイオエタノールから製造するプロセスが確立している。2011年に東レ社は、これらの技術を組み合わせることによって完全バイオマス由来のPETを生産することが可能となったと発表している。

バイオリファイナリーでは、主に植物由来の糖質を原料に、細菌、酵母、糸状菌など様々な微生物などを作用させることによって目的物質を生産するプロセスが用いられる。こうした微生物種の中でも酵母は、酒類製造や調味料に用いられるなど、食品としての安全性が確認されている微生物であり、細菌や糸状菌と比較すると、耐酸性が強い、増殖・発酵が速い、培養ハンドリングが容易、栄養要求性が少ないなどの優位性がある。こうした酵母の優位性を活かしたバイオリファイナリーの取り組みの一例として、Melle-Boinot法を用いたバイオエタノール生産が挙げられる(5, 6)。これはブラジルでバイオエタノール製造に用いられる手法であり、発酵終了時に遠心分離で酵母を回収し、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。希硫酸洗浄によりコンタミネーションした雑菌は不活性化されるが、酵母は耐酸性が高いため活性に影響はない。Melle-Boinot法に代表されるように、ストレス耐性に優れる酵母は数多くの産業プロセスにおいて、その有効性を発揮している。

糖質やデンプン質を原料とする場合、食料と競合するという問題がある。そのため、食料と競合しない素材であるセルロース系原料、ヘミセルロース系原料の利用が求められている。木質系バイオマスからの汎用生産は、技術的には可能であるが、工業化までは数多くの課題が残されている。その1つが糖化液に含まれる糖の完全利用である。木質系バイオマスの加水分解物は、ヘキソースだけでなくペントースを多くの割合で含んでいる(7)。多くの酵母種はペントースを利用することができないため、バイオマスを効率的に利用するためには、こうしたペントース、特に大きな割合を占めるキシロースを効率的に利用できる酵母が必要である。

トルラ酵母*Candida utilis*は、*Saccharomyces cerevisiae*や*Kluyveromyces fragilis*とともに、アメリカ食品医薬局(FDA)が食品添加物として安全性を認めた食用酵母である。また、*Saccharomyces*属とは異なり、十分に酸素を供給した培養条件下でエタノールを生成せず、それによる増殖阻害も受けないことから、高密度で連続培養による効率的な菌体生成が可能である(8)。また、本酵母はキシロースの資化能を有し(9、発酵はできない)、無機窒素の同化能に優れている。そのため、かつては蛋白質源として注目され、ペントースを多く含む広葉樹の糖化液や亜硫酸パルプを糖源とした菌体の工業生産が実施されたことがある(10, 11)。これらの菌体はSCP (single cell protein)として主に家畜用の飼料に、菌体から抽出されたグルタチオンやリボ核酸は調味料などに利用されている(12, 13)。

*C. utilis*は高次倍数体であり、孢子も形成しないなどの理由から、*S. cerevisiae*に比べて遺伝学的な知見は遥かに乏しい。しかしながら、我々の所属機関では1990年代に本酵母を宿主とした電気パルス法による形質転換系を確立し、異種タンパク質の高生産システムを構築した(14)。これまでに、植物性甘味タンパク質のモネリンや好熱菌由来の α -アミラーゼなど幾つかの異種タンパク質を10 g/L以上のオーダーで生産することに成功している(15, 16)。また、海洋細菌由来の遺伝子を複数導入した

代謝工学的改変により、カロテノイドの生産にも成功している(17, 18)。最近、*C. utilis*においてもCre-loxP法による多重形質転換法が開発され、複雑な代謝工学を行うことが可能となった(19)。このように、トルラ酵母*C. utilis*は各種バイオリファイナリー基幹物質の生産に極めて高いポテンシャルを有していると考えられ、また、そのための遺伝子工学的手法も整備されつつある。そこで本研究では、*C. utilis*を改変してグルコースやキシロースからバイオリファイナリーの基幹物質であるエタノール、乳酸、イソプロパノールを生産する酵母株を構築することとした。

本論文は5つの章から構成される。第1章では、部位特異的変異導入法により補酵素要求性が変換されたキシロース代謝酵素群を導入することで*C. utilis*にキシロース発酵性を付与した取り組みについて記載した。第2章では、カクテルマルチコピー導入法を用いて前章で見出されたキシロース代謝酵素遺伝子群発現量比を最適化した取り組みについて記載した。ここでは、導入された遺伝子のコピー数とキシロースの発酵力を解析することで、どのような導入割合が副産物を減らし、エタノールを増加させるか考察を行った。第3章では、構築されたキシロース発酵性株のメタボローム解析、トランスクリプトーム解析を行い、キシロースからエタノールが生産される内在性代謝経路の律速段階について考察を行った。第4章では、バイオプラスチックの原料であるL-乳酸をキシロースから生産する酵母株の構築について記載した。ここでは、本酵母がビール仕込粕糖化液を用いたモデルバイオマスにおいても効率的にL-乳酸を生産することを示した。第5章では、クロストリジウム属細菌の代謝経路を導入することで、ポリプロピレンの原料ともなり得るイソプロパノールを生産する酵母株を世界で初めて構築したことについて記載した。ここではさらに、内在性代謝経路の破壊や過剰発現を行うことでイソプロパノール生産を増強するとともに、その前駆体供給に寄与が高い代謝経路について考察を行った。

第1章 *Candida utilis*によるキシロースからのエタノール生産

第1節 序論

酵母においてキシロースは、キシロース還元酵素(XR)、キシリトール脱水素酵素(XDH)、キシルロースリン酸化酵素(XK)によりキシルロース5リン酸に変換され、これがペントースリン酸経路を介して解糖系で代謝される(20–22)。*S. cerevisiae*に代表される多くの酵母は、XR、XDHに相当する遺伝子を欠落しており、キシロースを唯一の炭素源として生育することができない。*Pichia stipitis*、*Candida shehatae*など一部の酵母種は、キシロースからエタノールを生産することができる(23)。しかしながら、こうしたキシロース発酵性酵母は様々なストレス耐性に弱いことが知られており、実生産利用には適していない。そのため、実生産に耐え得る酵母株にキシロース発酵能を付与する取り組みが世界中で行われている。

酵母で最初にキシロース資化性付与のための代謝工学が行われたのは、著者が知る限り1993年のKötterらの報告である(24)。Kötterらは、キシロース発酵性酵母の一種である*P. stipitis*のXR (PsXR)、XDH (PsXDH)をコードする*PsXYL1*と*PsXYL2*を導入することで、*S. cerevisiae*にキシロース資化能を付与した。さらに、*P. stipitis* XK (PsXK)をコードする*PsXYL3*、あるいは*S. cerevisiae*のXKをコードする*ScXKS1*の過剰発現は、キシロース発酵速度を増加させるという報告がなされた(25, 26)。しかしながら、こうして得られた第1世代組換え株のキシロース発酵性は低く、消費されたキシロースの多くはキシリトールとして蓄積していた(25, 26)。この原因の1つとして、NADPH要求型であるXRとNAD⁺依存型であるXDHによって引き起こされる酸化還元状態のインバランスが挙げられる。このインバランスを克服し、キシロース発酵性を向上させるために、タンパク質工学的的手法により補酵素要求性が変換されたXRとXDHを用いた研究が報告されている(27–32)。

キシロース発酵性酵母の分子育種に関して、*S. cerevisiae*を宿主とした取り組みは

数多く報告されているものの、それ以外の酵母をターゲットとした報告は極めて少ない。その他の酵母を利用した例として、*Hansenula polymorpha*の育種例が挙げられる(33–35)。耐熱性酵母である*H. polymorpha*は、高温(48–50°C)でキシロースからエタノール生産が可能である。しかし、エタノール生産性が低いため、これらの報告ではエタノール発酵性の改善が必要であると記載されている。このように、所謂、“non-conventional yeast”の一部は、ヘミセルロース利用において高い優位性を持っている。

著者は、*C. utilis*の持つ高い異種タンパク質の生産能、あるいは強力な発酵力はキシロース発酵性株を構築する上で大きなアドバンテージになると考え、*C. utilis*を改変してキシロース発酵能を付与する研究に取り組んだ。*C. utilis*はキシロース培地で増殖することはできるものの、発酵し、エタノールを生産することはできない(9)。一方、XRとXDHの代謝物であるキシロースからはエタノールを生産できることが報告されている(9)。従って、*C. utilis*がキシロースを発酵できないのは、XRとXDHの反応に原因があると考えられた。本章では、キシロース発酵性酵母である*C. shehatae*由来のXR (CsheXR)、XDH (CsheXDH)と*P. stipitis*由来XK (PsXK)を発現する*C. utilis*株の構築を行った。また、部位特定的変異導入法によって補酵素要求性が変換されたXR、XDHを構築し、*C. utilis*のキシロース発酵に与える影響を解析した。

第2節 材料と方法

1. 使用菌株

C. utilis 野生株としてNBRC0988株を用いた。それ以外の*C. utilis*株についてはTable 1-1に示した。プラスミド構築用の宿主には*Escherichia coli* DH5 α (Toyobo, Osaka, Japan)を用いた。キシロース代謝酵素遺伝子の供与体として、*C. shehatae* NBRC1983株、*P. stipitis* NBRC10063株を用いた。

2. 培地

- YPD2培地：酵母基本増殖用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、20 g/Lグルコース

固体培地には終濃度20 g/Lのアガーを添加した。形質転換体の選抜には終濃度600 mg/Lとなるようにハイグロマイシン(Hyg)を添加した培地を用いた。

- YPX5培地：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lキシロース

- YPX5D1：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lキシロース、10 g/Lグルコース

- YPX5D2.5：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lキシロース、25 g/Lグルコース

- YPX5D5：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lキシロース、50 g/Lグルコース

- YPX5E0.75：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lキシロース、7.5 g/Lエタノール

- YPX5E1.5：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lキシロース、15 g/Lエタノール

- YPX5E2.5：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lキシロース、25 g/Lエタノール

- LB培地：大腸菌用培地

10 g/Lトリプトン、5 g/L酵母エキス、10 g/L塩化ナトリウム

固体培地には終濃度15 g/Lのアガーを添加した。形質転換体の選抜には終濃度100 mg/Lとなるようにアンピシリンを添加した培地を用いた。

3. プラスミド

プラスミド構築のためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)には、KOD plus (Toyobo)を用いた。増幅したDNA断片の塩基配列は、ABI3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)で確認した。制限酵素消化したプラスミドベクターの脱リン酸化反応にはShrimp Alkaline Phosphatase (Takara Bio Inc., Japan)を用い、DNAの連結反応にはDNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Takara Bio)を用いた。プラスミドの構築に使用したプライマーはTable 1-2に、構築したプラスミドはTable 1-3に示した。

・ pVT92 : *C. utilis* URA3座組込み型発現ベクター

URA3 上流(-708 から-196, +1 は推定翻訳開始点を示す)は、*C. utilis* のゲノム DNA を鋳型として、TM-109/TM-110 プライマーセットを用いて増幅した。グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター(*TDH1pr*)は、*C. utilis* のゲノム DNA を鋳型として、TM-111/TM-112 プライマーセットを用いて増幅した。増幅した URA3 上流配列 DNA 断片と *TDH1pr* DNA 断片を混合し、TM-109/TM-112 プライマーセットを用いてオーバーラップ PCR を行った。得られた 1.5 kbp の PCR 産物は *NotI/XbaI* 処理し、同制限酵素で処理した pBluescriptII SK⁺ (Stratagene Products Division, Agilent Technologies, La Jolla, CA)にクローニングし、pVT88 とした。Hyg 耐性遺伝子カセットは、pCU681(19)を鋳型として、TM-115/TM-116 プライマーセットを用いて増幅した。3 ホスホグリセリン酸キナーゼターミネーター(*PGK1tr*)は、*C. utilis* のゲノム DNA を鋳型として、TM-113/TM-114 プライマーセットを用いて増幅した。URA3 下流(+203 から+825)は、*C. utilis* のゲノム DNA を鋳型として、TM-117/TM-118 プライマーセットを用いて増幅した。3 つの PCR 産物を混合し、TM-115/TM-118 プライマーセットを用いてオーバーラップ PCR を行った。得られた 3.5 kbp の PCR 産

物は *XbaI/XhoI* 処理し、同制限酵素で処理した pVT88 にクローニングし、pVT92 とした。pVT92 は *URA3* 上流配列、*TDH1pr*、*PGK1tr*、Hyg 耐性遺伝子カセット、*URA3* 下流配列をこの順番で有している。

・ pVT146、pVT150 : *CsheXYL1*、*CsheXYL2* 発現ベクター

CsheXR、*CsheXDH* をコードする遺伝子(*CsheXYL1*、*CsheXYL2*)は、*C. shehatae* のゲノム DNA を鋳型として、TM-119/TM-122 と TM-123/TM-124 プライマーセットを用いてそれぞれ増幅した。得られた PCR 産物は *XbaI/BamHI* 処理し、同制限酵素で処理した pVT92 にクローニングし、pVT146、pVT150 とした。

・ pVT147、pVT148、pVT149、pVT151 : *CsheXYL1* 変異体および *CsheXYL2* 変異体発現ベクター

変異型 *CsheXR*、変異型 *CsheXDH* 発現のための変異導入はインバース PCR 法 (KOD -Plus- Mutagenesis Kit; Toyobo)を用いて行った。*CsheXR* の変異導入のために pVT146 を鋳型として、TM-133/TM-134、TM-133/TM-135 および TM-133/TM-136 のプライマーセットを用いてインバース PCR を行った。K270R、K270R/N277D、R281H の変異を持つ *CsheXR* をコードする遺伝子を持つプラスミドをそれぞれ pVT147、pVT148、pVT149 とした。

CsheXDH の変異導入(D207A/I208R/F209S/N211R)には鋳型として pVT150 を、プライマーセットとして TM-137/TM-138 を用いた。得られたプラスミドは pVT151 とした。

・ pVT107 : *P. stipitis XYL3 (PsXYL3)* 発現ベクター

PsXK をコードする *PsXYL3* の *XbaI* サイトを除去するため、オーバーラップ PCR に

よる同義置換を行った。*P. stipitis*ゲノムDNAを鋳型として、*PsXYL3 ORF*の*XbaI*サイトの5'末端側と3'末端側をそれぞれTM-105/TM-43とTM-44/TM-106のプライマーセットで増幅した。2つのPCR産物を混合し、TM-105/TM-106プライマーセットを用いてオーバーラップPCRを行った。得られたPCR産物は*XbaI/BamHI*処理し、同制限酵素で処理したpVT92にクローニングし、pVT107とした。

・ pVT164、pVT166、pVT168、pVT170、pVT172、pVT174、pVT176、pVT178 :
*CsheXYL1-CsheXYL2-PsXYL3*発現ベクター

3つのキシロース代謝酵素遺伝子を同時に*C. utilis*染色体に組込むプラスミドを構築した。pVT150あるいはpVT151を*NheI/SpeI*処理して得られた*CsheXYL2*、変異型*CsheXYL2* (D207A/I208R/F209S/N211R)発現カセットを含むDNA断片をpVT107の*SpeI*サイトにそれぞれクローニングし、pVT155、pVT172とした。pVT146、pVT147、pVT148、pVT149を*NheI/SpeI*処理して得られた*CsheXYL1*、変異型*CsheXYL1* (K270R、K270R/N277D、R281H)発現カセットを含むDNA断片をpVT155もしくはpVT172の*SpeI*サイトにそれぞれクローニングし、3つのキシロース代謝酵素遺伝子がタンデムに並んだプラスミドを8つ構築した。構築したプラスミドはTable 1-3に示した。

4. *C. utilis*の形質転換

*C. utilis*の形質転換の試料として、*NotI/ApaI*で処理されたプラスミドDNAを用いた。形質転換はGene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を用い、Kondoらの電気パルスによる方法(14)に従い実施した。200 mLのYPD2培地でOD₆₀₀が2.5程度(対数増殖期初期)になるまで培養し、回収した菌体を氷冷滅菌水で1回、氷冷1 Mソルビトールで2回洗浄した。得られた菌体を2.5 mLになるように1 Mソルビトールでフィルアップした。この菌液40 μLに適当量のDNA断片を含む10 μLの試料を加えて混合

した後、0.2 cmのキューベットに移し、電気容量が25 μ F、抵抗値が800 Ω 、電圧が0.75 kVの条件で電気パルスを加えた。この菌液を2 mL YPD2培地に移し、6時間以上、30°Cで好気培養した後、Hygを含む選択培地に塗布して、30°Cで2日間培養した。

5. 粗酵素液の調製と酵素活性測定

酵素活性測定用の粗酵素液は、YPD2 培地で 30°C、24 時間培養した酵母細胞から調製した。培養菌体を 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)、1 mM EDTA、2 mM ジチオトレイトールからなる溶液で洗浄し、同溶液で再懸濁した後、適量のガラスビーズ(212-300 pm, Sigma, St. Louis, MO)と混合し、Mix Tower A-14 (Taiyo Instruments, Tokyo)を用いて4°Cで15分間激しく攪拌した。13000 rpm、10分間の遠心をした後、上清を回収し、酵素活性測定、タンパク質定量に用いた。

XR、XDH、XK 活性は、過去に報告された実験に従って行った(23)。30°Cで起こる NAD(P)H の酸化もしくは NAD(P)の還元を 340 nm の吸光変化として Molecular Devices VERSAmax Plate Reader (Molecular Devices, Crawley, West Sussex, UK)でモニターした。1 酵素単位(1 Unit)は1分間に 1 μ mol の NAD(P)H を酸化あるいは還元する酵素量と定義した。タンパク質濃度はウシ血清アルブミン(Sigma)を標準物質として用いた Bradford 法(36)で測定し、単位タンパク質量あたりの比活性 (Unit/mg-protein)として算出した。

6. 発酵試験

OD₆₀₀の測定には、GeneQuant 1300 spectrophotometer (GE Healthcare, UK)を用いた。YPX5培地で30°C、24時間好気培養した菌体を回収し、発酵用培地で遠心洗浄した。発酵は特記がない限り30 mLの発酵試験用培地を入れた100 mL容三角フラスコを用いて行った。初発OD₆₀₀ = 20、30°C、100 rpmで行い、培養上清の生産物濃度、キシ

コース濃度を分析した。なお、 $OD_{600} = 1$ の培養液は、1 Lの培養液あたり約0.46 gの乾燥菌体を含んでいる。

7. 分析方法

キシロース、キシリトール、グリセロール、エタノールの定量はShiらの高速液体クロマトグラフィーによる方法を一部改変して行った(37)。60°Cで保持したICSep-ION-300カラム(Tokyo Chemical Industry, Tokyo)を用い、溶媒として0.01 N 硫酸(流速0.4 mL/min)を使用した。検出には示差屈折率検出器(RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いた。

8. 塩基配列番号

CsheXYL1、*CsheXYL2*、*PsXYL3* の塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide database に DM015263、AF278715、AF127802 として登録されている。

第3節 結果

1. 補酵素要求性が変換されたキシロース代謝酵素を発現する酵母株の構築

タンパク質工学的手法を用いた *PsXR* の補酵素要求性の変換に関する研究は幾つか報告されており、K270R、K270R/N272D、R276H が NADPH より NADH に対して親和性が向上する変異として知られている(30)。さらに *PsXDH* においては D207A/I208R/F209S/N211R (ARSdR)の部位特異的変異が NAD^+ 依存型だった補酵素要求性を $NADP^+$ 依存型に変換すると報告されている(31)。これらの報告を基に、Table 1-4 に示すように様々な補酵素要求性を示す *CsheXR*、*CsheXDH* 変異体を発現する *C. utilis* 株の構築を行った。

それぞれの変異型酵素の発現については、それぞれの酵素活性を測定することで

確認した(Table 1-4)。野生型 CsheXR を発現する組換え株(TMS170, TMS182)の XR 活性は NADH、NADPH が存在するときにそれぞれ 0.41-0.54 Unit/mg-protein、0.73-0.76 Unit/mg-protein だった。変異型 CsheXR の中で最も NADPH に対する NADH の利用活性が高かったのは CsheXR K275R/N277D (TMS174, TMS186)であり、比活性の NADH/NADPH 比は 2.57-2.99 だった。CsheXR R281H (TMS176, TMS188)は NADH が存在するとき、最も高い比活性を示したが、比活性の NADH/NADPH 比は 1.11-1.40 だった。NAD⁺ もしくは NADP⁺ が存在するときの野生型 CsheXDH (TMS170, TMS172, TMS174, TMS176)の比活性はそれぞれ 2.26-2.72 Unit/mg-protein と 0.04-0.05 Unit/mg-protein だった。一方、各補酵素存在下における CsheXDH ARSdR (TMS182, TMS184, TMS186, TMS188)の比活性は大きく変換されていた(0.16-0.20 Unit/mg-protein、2.12-2.47 Unit/mg-protein、それぞれ NAD⁺、NADP⁺存在下の比活性)。グルコースで増殖させたベクターコントロール株で XR 活性と XDH 活性は検出されなかったが、キシロース培地で増殖させた場合、XR では NADPH、XDH では NAD⁺ 存在下で酵素活性が検出された。しかしながら、コントロール株のキシロース代謝酵素活性は異種由来の酵素(CsheXR、CsheXDH)を発現させた株より極めて低かった。

2. 組換え株によるキシロースからのエタノール生産

CsheXR と CsheXDH の補酵素要求性変化が *C. utilis* のキシロース発酵に与える影響を解析するために、50 g/L キシロースを唯一の炭素源とする培地におけるエタノール生産を検討した。ベクターコントロール株は、培養 20 時間で 13.3 g/L のキシロースを消費したが、エタノールは生産せず、7.2 g/L のキシリトールを蓄積した。それぞれ野生型の CsheXR、CsheXDH、PsXR を発現している TMS170 株は 23.4 g/L のキシロースを消費し、2.1 g/L のエタノール、10.6 g/L のキシリトールを生産した。NADH 要求性に補酵素要求性に変換された CsheXR と野生型の CsheXDH を発現す

る組換え株(TMS170, TMS172, TMS174, TMS176)においては、他の株と比較してキシロース消費とエタノール生産が大幅に増加した(Fig. 1-1)。CsheXR K275R/N277D と野生型 CsheXDH、PsXK を発現している TMS174 株は最も高いエタノール生産量を示した(17.4 g/L)。CsheXDH ARSdR を発現する株(TMS182, TMS184, TMS186, TMS188)ではベクターコントロール株よりキシリトールが蓄積していた(Fig. 1-2)。また、CsheXR K275R を発現する TMS184 株、CsheXR K275R/N277D を発現する TMS186 株がわずかにエタノールを生産した以外は、CsheXDH ARSdR を発現する株間で大きなキシロース発酵能の差は認められなかった。これらの結果は、*C. utilis* におけるキシロース発酵において、キシロース酸化反応とキシリトール脱水素反応の間で NAD^+ がリサイクルされることが重要であることを示唆している。また、今回構築した組換え株においてグリセロールの蓄積は認められなかった。

3. XDHは*C. utilis*のキシロース発酵のための重要酵素である

C. utilis のキシロース代謝における重要酵素を調査するために、CsheXR K275R/N277D と CsheXDH がそれぞれ単独で導入された株を構築した。CsheXR K275R/N277D が単独で導入された TMS304 株は培養 67 時間で 43.8 g/L のキシロースを消費し、24.3 g/L のキシリトールを蓄積し、エタノールを全く生産しなかった(Fig. 1-3)。一方、CsheXDH が単独で導入された TMS306 株は 30.2 g/L のキシロースを消費し、4.5 g/L のキシリトール、1.6 g/L のエタノールを生産した。これらの結果は *C. utilis* のキシロース発酵において、XDH 活性が重要であることを示唆している。

4. キシロース代謝におけるキシロース、グルコース、エタノール濃度の影響

キシロース発酵性が最も高かった TMS174 株のキシロース発酵特性を解析するため、キシロース濃度を变化させた条件、グルコース共存下、エタノール共存下で

発酵試験を実施した。1 種類の培地につき 2 つの通気条件で発酵を行い、通気が TMS174 株のキシロース発酵性に与える影響を解析した。ここでは 100 mL 容三角フラスコに 30 mL の培地を入れて 100 rpm で振とう培養した条件を微好気条件、50 mL の培地を入れて 100 rpm で振とう培養した条件を酸素制限条件とした。

キシロース濃度を変化させた発酵試験の結果を Fig. 1-4 に示す。微好気条件で発酵を実施した TMS174 株はキシロース濃度が 10 g/L、25 g/L、50 g/L の条件ではほぼ同等の収率でエタノールを生産し、キシロース消費後はエタノールが消費された (Fig. 1-4A-C)。しかし、100 g/L のキシロースを含む培地では培養 36 時間でエタノール生産量が 20 g/L 超で停止し、キシロースの消費、キシリトールの蓄積はその後にも継続した。この結果は、TMS174 株のキシロースからのエタノール生産量の限界が 20 g/L 程度であることを示している。酸素制限条件ではキシロースの消費速度は大きく低下しており、それに伴いエタノール生産性も低下した (Fig. 1-4D-F)。また、キシリトールはいずれの培地においても微好気条件で培養したときよりも高蓄積していた。この結果は、TMS174 株のキシロース発酵には一定量の酸素が必要であることを示している。

キシロースとグルコースが共存する条件で発酵試験を実施した結果を Fig. 1-5 に示す。いずれの条件においても、グルコースが消費された後にキシロースが消費された。また、共存グルコースの量が多いほどキシロース消費フェイズにおけるキシロース消費速度が低下し、キシロースから生産されるエタノールの生産量も併せて低下した。この結果は、グルコースが濃度依存的にキシロースの発酵性を低下させていることを示している。また、酸素制限条件ではキシロース消費速度の低下、エタノール生産性の低下、キシリトール蓄積量の増加が認められた (Fig. 1-5D-F)。

グルコース共存下におけるキシロース消費速度並びにエタノール収率の低下が、グルコースそのものによる影響か、生産したエタノールによる影響かを解析するた

めに、エタノール共存下におけるキシロース発酵性を解析した。発酵試験は Fig. 1-5 の試験で用いたグルコースから生産される最大収量のエタノールを予め培地に含む条件で実施した (Fig. 1-6)。その結果、共存エタノールの量が多いほどキシロース消費速度とエタノール収率が低下した。しかし、グルコース共存下の条件よりも最終エタノール濃度が高かったことから、Fig. 1-5 に示したグルコースによるキシロース発酵性の低下は生産したエタノールによるものとそれ以外の要因があることが示唆された。

第4節 考察

キシロース発酵性 *S. cerevisiae* 株の育種に関する研究や天然のキシロース発酵性酵母 *P. stipitis*、*C. shehatae* の発酵特性解析の研究は多数報告されているが、*C. utilis* のように「キシロース培地で生育はできるが、発酵することはできない」酵母株を基にキシロース発酵能を付与する研究はこれまでに行われていない。本章では、キシロース発酵能を有する *C. utilis* 株の構築を行い、*C. utilis* はキシロース代謝酵素、特に XDH の活性が弱いこと、さらには細胞内の NADH/NAD⁺比がキシロースからのエタノール生産を制限している可能性を明らかにした。

補酵素要求性が NADH 型に変換された CsheXR K275R/N277D、CsheXDH、PsXK を発現する組換え株は野生型の CsheXR を含むキシロース代謝酵素を発現する株よりも高いキシロース発酵性を示した (Fig. 1-1)。これは、キシロースの還元反応とキシリトールの脱水素反応の間での補酵素リサイクルがキシロースからのエタノール生産を高めていることを示している。しかしながら、野生型 CsheXR、NADP⁺依存型に補酵素要求性が変換された CsheXDH ARSdR、PsXK を発現する株は野生株とほぼ同等のキシロース利用性を示した (Fig. 1-2)。PsXDH ARSdR の NADP⁺ に対する *K_m* は NAD⁺ と比較すると 12.5 倍低いことが報告されている(31)。XDH の補酵

素に対する親和性はそのアミノ酸配列に依存しているが、*in vivo* で XDH が実際にどちらの補酵素を利用するかは細胞内の補酵素の濃度にも影響を受ける。従って、CsheXDH ARSdR 酵素は *in vivo* で NADP⁺ を効率的に利用できていない可能性が考えられる。実際に、CsheXR K275R/N277D、CsheXDH ARSdR、PsXK を発現する株では、微量ではあるがキシロースからのエタノール生産が認められた(Fig. 1-2)。CsheXR K275R/N277D 単独ではキシロース発酵能を付与することができなかったことから(Fig. 1-3A)、この結果は、CsheXDH ARSdR が *in vivo* では NAD⁺ を利用している可能性を示唆するものである。PsXR と PsXDH ARSdR を発現する *S. cerevisiae* を用いた他の報告では、キシロースからのエタノール生産が改善したという報告(32)と改善しなかったという報告(38, 39)がある。従って、最適な NADH/NAD⁺ 比、あるいは細胞内酸化還元バランスの維持の方法は菌株によって異なるのかもしれない。

Fig. 1-3B に示したとおり、*C. utilis* は CsheXDH の導入みでキシロースからエタノールを生産した。また、異種のキシロース代謝酵素が導入された *C. utilis* 株と比較すると、ベクターコントロール株のキシロース代謝酵素活性は極めて低く、キシロース発酵時には極めて高い効率でキシリトールが蓄積した(0.54 g/g consumed xylose)。従って、XR と XDH の補酵素特異性より、XDH 活性の方がキシロースからのエタノール生産には重要であることが考えられる。*S. cerevisiae* 組換え株において、XR に対して XDH の活性を高めることが、キシロースからのキシリトール蓄積を減少させ、エタノール生産を増加させることが報告されている(40)。また、*sensu stricto* に属する *S. cerevisiae* の中から天然のキシロース利用酵母を探索した結果見出されたキシロース利用株は、*S. cerevisiae* の標準株の 1 つである S288C 株が有していない XDH 遺伝子を有していたと報告されている(41)。このように、*C. utilis* を含む多くの酵母種では、キシロースを効率的に利用するために XDH が特に重要

であると考えられる。

TMS174株のキシロースからのエタノール生産は20 g/L程度が限界であった (Fig. 1-4)。 *C. utilis* が 150g/L グルコースから約 70 g/L のエタノールを生産することが可能であることことから(data not shown)、これはキシロース発酵特有の現象であると考えられる。また、グルコース存在下でのキシロース発酵性低下の原因の一部は生産されたエタノールであることが示唆された(Fig. 1-5, 1-6)。このように、TMS174株のキシロース発酵には数多くの課題が残されている。この原因を究明するためには、炭素源の違いによる遺伝子発現の変化や代謝変化をより詳細に解析するとともに、実際に高発酵性株を育種することが必要であると考えられる。

Table 1-1 Strains of *C. utilis* used in this study.

| Strain | Relevant genotype | Reference |
|------------------|--|------------|
| <i>C. utilis</i> | | |
| NBRC0988 | Wild type | NBRC |
| TMS33 | NBRC0988 <i>URA3::TDH1pr-PGK1tr</i> using pVT92 (empty vector) | This study |
| TMS170 | NBRC0988 <i>URA3::CsheXYL1-CsheXYL2-PsXYL3</i> | This study |
| TMS172 | NBRC0988 <i>URA3::CsheXYL1 (K275R)-CsheXYL2-PsXYL3</i> | This study |
| TMS174 | NBRC0988 <i>URA3::CsheXYL1 (K275R/N277D)-CsheXYL2-PsXYL3</i> | This study |
| TMS176 | NBRC0988 <i>URA3::CsheXYL1 (R281H)-CsheXYL2-PsXYL3</i> | This study |
| TMS182 | NBRC0988 <i>URA3::CsheXYL1-CsheXYL2 (ARSdR)-PsXYL3</i> | This study |
| TMS184 | NBRC0988 <i>URA3::CsheXYL1 (K275R)-CsheXYL2 (ARSdR)-PsXYL3</i> | This study |
| TMS186 | NBRC0988 <i>URA3::CsheXYL1 (K275R/N277D)-CsheXYL2 (ARSdR)-PsXYL3</i> | This study |
| TMS188 | NBRC0988 <i>URA3::CsheXYL1 (R281H)-CsheXYL2 (ARSdR)-PsXYL3</i> | This study |
| TMS304 | NBRC0988 <i>URA3::CsheXYL1 (K275R/N277D)</i> | This study |
| TMS306 | NBRC0988 <i>URA3::CsheXYL2</i> | This study |

Table 1-2 PCR Primers used in this study.

| Name | Sequence (5' to 3') |
|--------|--|
| TM-109 | ATCTGCGGCCGCACTCGCGCGCAAGATCTTGCTGATG |
| TM-110 | CTCGCTGTAAGCTTGCTAGCGAATCGGAATCGAACTAGGCG |
| TM-111 | GATTCCGATTGCTAGCAAGCTTACAGCGAGCACTCAAATCTG |
| TM-112 | CTAGTCTAGATATGTTGTTTGTAAGTGTGTTTTG |
| TM-115 | AGCTGACTAGTAAGCTTCGTACGCTGCAGGTCG |
| TM-116 | AGAAGTATCGATCTCTAGTGGATCTG |
| TM-113 | CGCGGATCCCTGCAAGCTACTTTGTAATTAAC |
| TM-114 | GTACGAAGCTTACTAGTCAGCTGGAGACTCTTCACACTG |
| TM-117 | ATCCACTAGAGATCGATACTTCTCTATGGAGTC |
| TM-118 | CTAGCTCGAGAGATCTATAACAAGCCAGAGCTCAAC |
| TM-119 | CTAGTCTAGAATGAGCCCAAGCCCAATTCCAGC |
| TM-122 | CGCGGATCCTTAAACGAAGATTGGAATGTTGTC |
| TM-123 | CTAGTCTAGAATGACTGCTAACCCATCGCTCGTG |
| TM-124 | CGCGGATCCTTACTCAGGACCGTCAATGATAC |
| TM-133 | TGGAATGACAGCTACGCCTCTTTGAGCGG |
| TM-134 | AGATCTAACCTTCCAGAGAGATTAGTTCAAAAC |
| TM-135 | AGATCCGACCTTCCAGAGAGATTAGTTCAAAAC |
| TM-136 | AAGTCTAACCTTCCAGAGCATTAGTTCAAAACAGAAGTTTC |
| TM-137 | GCCAGATCCGACAGAAAGTTGCAAATGGCCAAGGACATTG |
| TM-138 | AATGACAATGACACCCTTGGCACCGAAG |
| TM-105 | CTAGTCTAGAATGACCACTACCCCATTTGATGCTC |
| TM-43 | CTCGGCCGTTCTGGACCAGTATAACC |
| TM-44 | GGTATACTGGTCCAGAACGGCCGA |
| TM-106 | CGCGGATCCTTAGTGTTTCAATTCACCTTCCATC |

Table 1-3 Plasmids used in this study.

| Plasmid | Relevant genotype | Reference |
|-----------------------------|---|------------|
| pBluescript SK ⁺ | Cloning vector | Stratagene |
| pCU681 | <i>PGK1pr-HPT-GAPtr</i> (Hyg ^R cassette) | 19 |
| pVT92 | <i>C. utilis</i> integration plasmid; <i>TDH1pr-PGK1tr</i> , Hyg ^R marker, integration at <i>URA3</i> locus | This study |
| pVT146 | <i>TDH1pr-CsheXYL1-PGK1tr</i> | This study |
| pVT147 | <i>TDH1pr-CsheXYL1</i> (K275R)- <i>PGK1tr</i> | This study |
| pVT148 | <i>TDH1pr-CsheXYL1</i> (K275R/N277D)- <i>PGK1tr</i> | This study |
| pVT149 | <i>TDH1pr-CsheXYL1</i> (R281H)- <i>PGK1tr</i> | This study |
| pVT150 | <i>TDH1pr-CsheXYL2-PGK1tr</i> | This study |
| pVT151 | <i>TDH1pr-CsheXYL2</i> (ARSdR)- <i>PGK1tr</i> | This study |
| pVT107 | <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | This study |
| pVT155 | <i>TDH1pr-CsheXYL2-PGKtr</i> , <i>GAPpr-PsXYL3-PGK1tr</i> | This study |
| pVT172 | <i>TDH1pr-CsheXYL2</i> (ARSdR)- <i>PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | This study |
| pVT164 | <i>TDH1pr-CsheXYL1-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-CsheXYL2-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | This study |
| pVT166 | <i>TDH1pr-CsheXYL1</i> (K275R)- <i>PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-CsheXYL2-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | This study |
| pVT168 | <i>TDH1pr-CsheXYL1</i> (K275R/N277D)- <i>PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-CsheXYL2-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | This study |
| pVT170 | <i>TDH1pr-CsheXYL1</i> (R281H)- <i>PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-CsheXYL2-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | This study |
| pVT173 | <i>TDH1pr-CsheXYL1-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-CsheXYL2</i> (ARSdR)- <i>PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | This study |
| pVT174 | <i>TDH1pr-CsheXYL1</i> (K275R)- <i>PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-CsheXYL2</i> (ARSdR)- <i>PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | This study |
| pVT176 | <i>TDH1pr-CsheXYL1</i> (K275R/N277D)- <i>PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-CsheXYL2</i> (ARSdR)- <i>PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | This study |
| pVT178 | <i>TDH1pr-CsheXYL1</i> (R281H)- <i>PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-CsheXYL2</i> (ARSdR)- <i>PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | This study |

Table 1-4 XR, XDH, and XK activities in cell extracts obtained from recombinant *C. utilis* strains grown in YPD2 medium.

| Strain | Description | XR (U/mg protein) | | XDH (U/mg protein) | | XK (U/mg protein) |
|---------------------|-----------------------------|----------------------|-------------|-----------------------|-------------------|----------------------|
| | | NADH | NADPH | NAD ⁺ | NADP ⁺ | |
| TMS170 | XR/XDH/XK | 0.41 ± 0.03 | 0.73 ± 0.03 | 2.26 ± 0.15 | 0.04 ± 0.00 | 0.32 ± 0.02 |
| TMS172 | XR K275R/XDH/XK | 0.50 ± 0.07 | 0.53 ± 0.16 | 2.74 ± 0.36 | 0.04 ± 0.01 | 0.36 ± 0.04 |
| TMS174 | XR K275R N277D/XDH/XK | 0.75 ± 0.11 | 0.25 ± 0.10 | 2.31 ± 0.23 | 0.04 ± 0.00 | 0.32 ± 0.00 |
| TMS176 | XR R281H/XDH/XK | 1.07 ± 0.05 | 0.76 ± 0.16 | 2.62 ± 0.59 | 0.05 ± 0.01 | 0.31 ± 0.02 |
| TMS182 | XR/XDH ARSdR/XK | 0.43 ± 0.02 | 0.76 ± 0.02 | 0.20 ± 0.25 | 2.43 ± 0.04 | 0.27 ± 0.03 |
| TMS184 | XR K275R/XDH ARSdR/XK | 0.54 ± 0.06 | 0.73 ± 0.09 | 0.18 ± 0.00 | 2.47 ± 0.05 | 0.28 ± 0.01 |
| TMS186 | XR K275R N277D/XDH ARSdR/XK | 0.67 ± 0.04 | 0.26 ± 0.02 | 0.16 ± 0.01 | 2.32 ± 0.02 | 0.27 ± 0.01 |
| TMS188 | XR R281H/XDH ARSdR/XK | 0.95 ± 0.06 | 0.80 ± 0.02 | 0.19 ± 0.04 | 2.12 ± 0.03 | 0.25 ± 0.02 |
| TMS33 | Vector | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.18 ± 0.02 |
| TMS33 ¹⁾ | Vector | 0.00 ± 0.00 | 0.03 ± 0.00 | 0.09 ± 0.01 | 0.00 ± 0.00 | 0.20 ± 0.03 |

Enzyme activities were measured in extracts from stationary-phase cells (24-h samples). Data are mean values ± SD for three independent experiments.

¹⁾ Activities of cells grown on xylose.

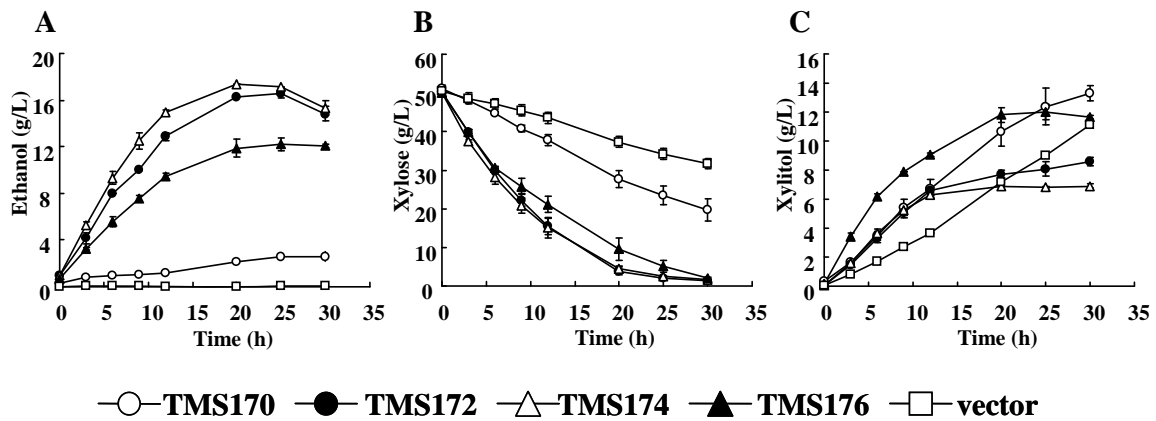


Fig. 1-1 Ethanol fermentation by recombinant *C. utilis* strains in YPX5 medium (50 g/L of xylose).

The concentrations of ethanol (A), xylose (B) and xylitol (C) in fermentation with strains expressing native/mutated CsheXR, native CsheXDH, and PsXK are shown. Data are mean values from three independent fermentation experiments. Error bars indicate SD values.

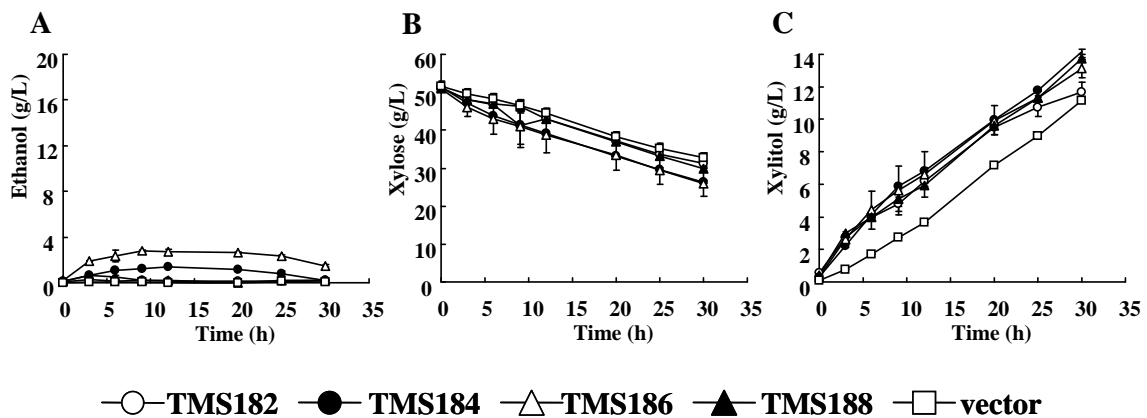


Fig. 1-2 Ethanol fermentation by recombinant *C. utilis* strains in YPX5 medium (50 g/L of xylose).

The concentrations of ethanol (A), xylose (B) and xylitol (C) in fermentation with strains expressing native/mutated CsheXR, mutated CsheXDH, and PsXK are shown. Data are mean values from three independent fermentation experiments. Error bars indicate SD values.

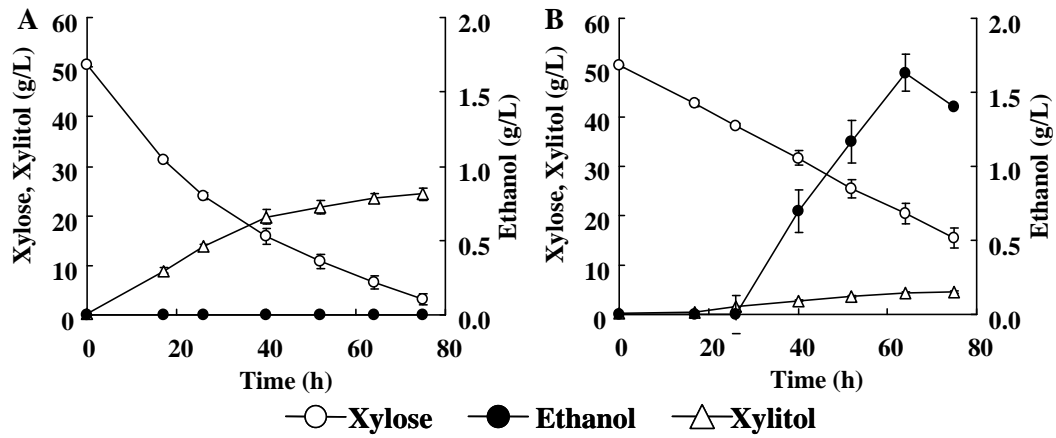


Fig. 1-3 Ethanol fermentation by recombinant *C. utilis* in YPX5 medium (50 g/L xylose).

Panels A and B show the results for TMS304 and TMS306, respectively. Data are mean values from three independent fermentation experiments. Error bars indicate SD values.

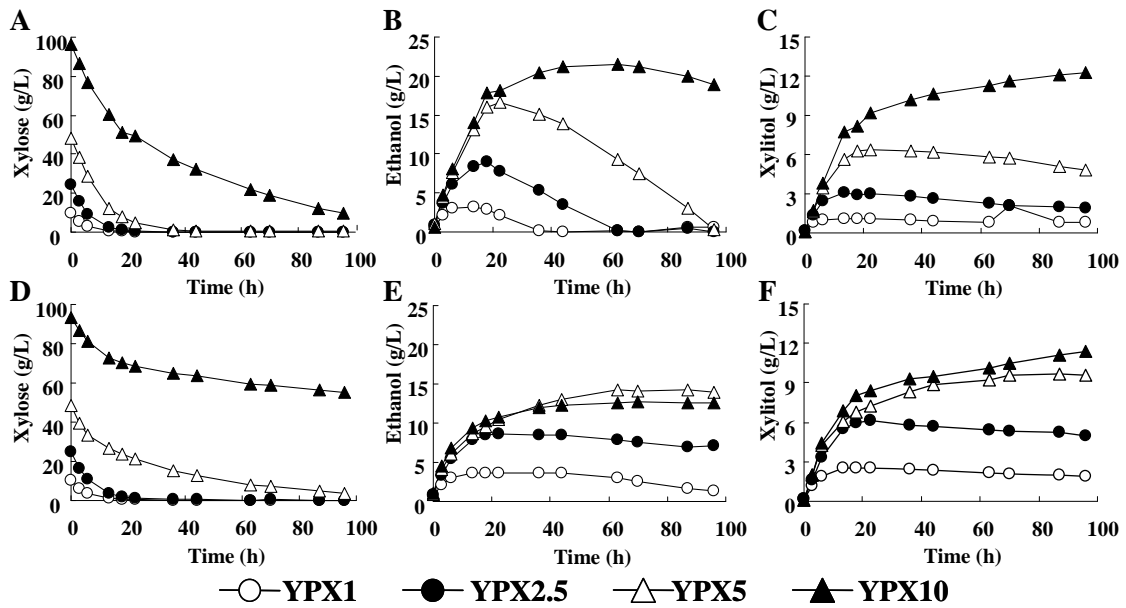


Fig. 1-4 Time-dependent ethanol fermentation profiles of TMS174 in YPX medium with 10–100 g/L of xylose.

The concentrations of xylose (A and D), ethanol (B and E) and xylitol (C and F) in fermentation with TMS174 are shown. Panels A–C and D–F show the results for semi-aerobic condition (100-mL spherical flat-bottom flasks containing 30 mL of medium) and micro-aerobic condition (50 mL of medium), respectively.

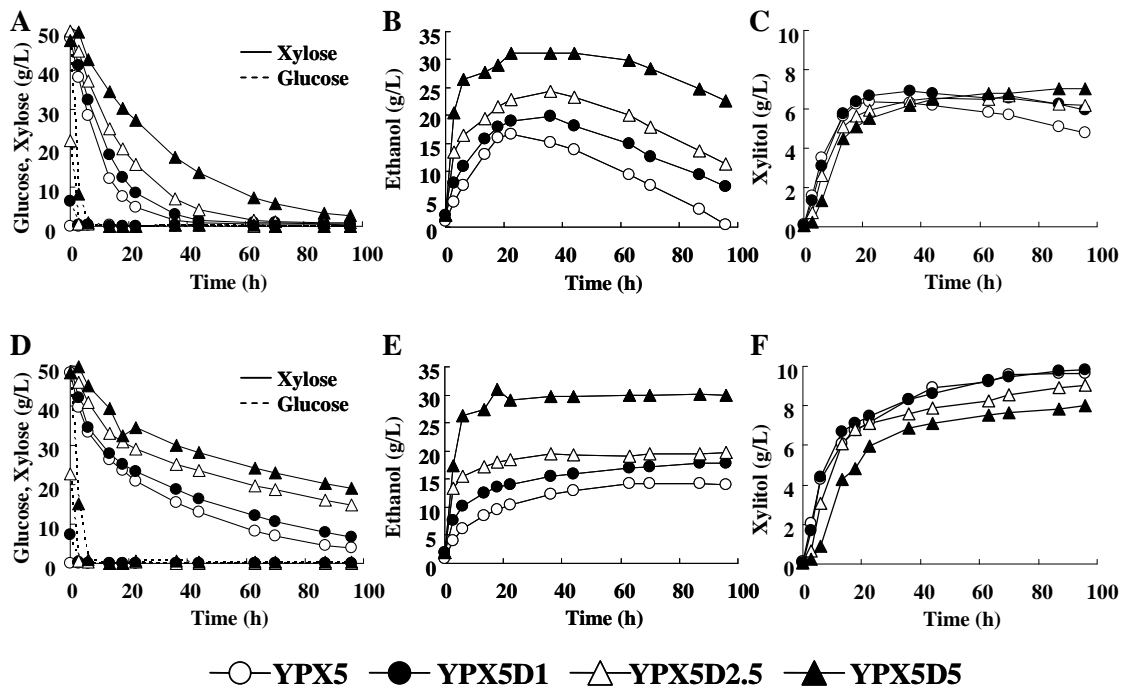


Fig. 1-5 Time-dependent ethanol fermentation profiles of TMS174 in YPXD medium with 50 g/L of xylose and 0–50 g/L of glucose.

The concentrations of xylose and glucose (A and D), ethanol (B and E) and xylitol (C and F) in fermentation with TMS174 are shown. Panels A–C and D–F show the results for semi-aerobic condition (100-mL spherical flat-bottom flasks containing 30 mL of medium) and micro-aerobic condition (50 mL of medium), respectively.

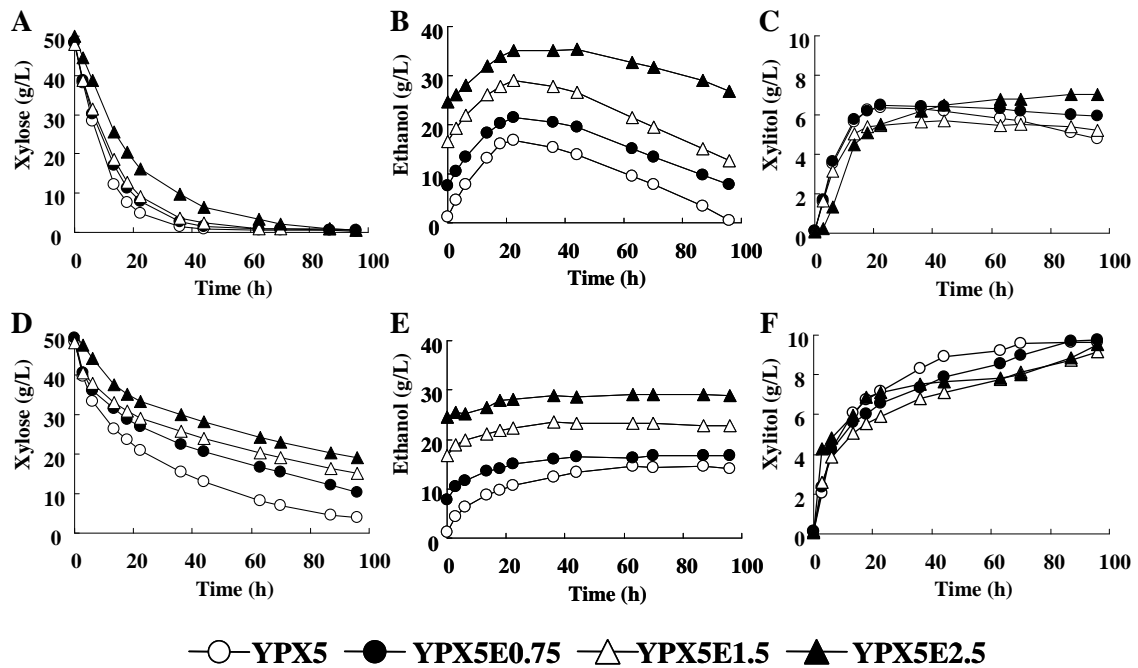


Fig. 1-6 Time-dependent ethanol fermentation profiles of TMS174 in YPXE medium with 50 g/L of xylose and 0–25 g/L of ethanol.

The concentrations of xylose (A and D), ethanol (B and E) and xylitol (C and F) in fermentation with TMS174 are shown. Panels A–C and D–F show the results for semi-aerobic condition (100-mL spherical flat-bottom flasks containing 30 mL of medium) and micro-aerobic condition (50 mL of medium), respectively.

第2章 カクテルマルチコピー導入法による*Candida utilis*のキシロース代謝酵素比の最適化

第1節 序論

第1章で構築されたTMS174株のキシロースからのエタノール収率は60%程度であり、改善の余地がある。*S. cerevisiae*組換え株においても、異種のキシロース代謝酵素遺伝子を導入したのみでは、キシリトールが高蓄積するなど、エタノール生産が不十分であることが報告されている(42)。キシロースからのエタノール生産性を向上させるために、キシローストランスポーターの導入(43)、ペントースリン酸回路遺伝子の過剰発現(25, 44)、ホスホケトラーゼ経路の導入(45)、トランスヒドロゲナーゼの導入(46)、内在性不要経路の削除(25, 47)など様々な取り組みが報告されている。

これに代わるシンプルな戦略として、3つのキシロース代謝酵素の発現レベルを最適化する方法が報告されている。例えば、YEp/YCp/YIp型のようなタイプの異なる発現ベクターを用いる手法、それぞれの酵素遺伝子に使用するプロモーターを置換するなどの手法である(48–51)。しかしながら、こうした手法では発現量比が最適化された株を取得するのに多大な時間を要してしまうという課題があった。

Yamadaらは、 δ 配列をターゲットとしたカクテルマルチコピー導入法を応用し、リン酸膨潤セルロース分解のために3種のセルラーゼの発現量比が最適化された*S. cerevisiae*株を構築したことを報告した(52)。この遺伝子導入法は、複数の遺伝子発現カセットを同時に染色体に導入し、組換えプールをスクリーニングすることで、容易に目的とする表現型の組換え株を選抜することが可能である。著者が知る限り、この手法が代謝工学の最適化に利用された例はない。本章では、*C. utilis*のカクテルマルチコピー導入法(15)を利用して、3つのキシロース代謝酵素の発現量比が最適化された*C. utilis*を取得することを目的とした。

第2節 材料と方法

1. 使用菌株

C. utilis 野生株としてNBRC0988株を用いた。それ以外の*C. utilis*株についてはTable 2-1に示した。第1章に記載した大腸菌をプラスミド構築用宿主として用いた。

2. 培地

- YPD2培地：酵母基本増殖用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、20 g/Lグルコース

固体培地には終濃度20 g/Lのアガーを添加した。形質転換体の選抜には終濃度60 mg/Lとなるようにシクロヘキシミド(Cyh)を添加した培地を用いた。

- YPX8培地：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、80 g/Lキシロース

- LB培地：大腸菌用培地

10 g/Lトリプトン、5 g/L酵母エキス、10 g/L塩化ナトリウム

固体培地には終濃度15 g/Lのアガーを添加した。形質転換体の選抜には終濃度100 mg/Lとなるようにアンピシリンを添加した培地を用いた。

3. プラスミド

プラスミド構築のための基本的な実験方法は、第1章に記載した方法に従って実施した。使用したプライマーはTable 2-2に、構築したプラスミドはTable 2-1に示した。

• pVT340、pVT342、pVT344 : *mCsheXYL1* (CsheXR K275R/N277D)、*CsheXYL2*、*PsXYL3*

の多コピー組込み型ベクター

Mutated *CsheXR* (K275R/N277D)、*CsheXDH*、*PsXK* をコードする遺伝子 (*mCsheXYL1*、*CsheXYL2*、*PsXYL3*)のDNA断片は、pVT148、pVT150、pVT107 (第1章) を *XbaI/BamHI* 処理することで取得した。pCU155は*TDH1pr*、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼターミネーター(*TDH1tr*)、*Cyh*耐性遺伝子カセットを有しており、*URA3*座を標的とした多コピー組込み型ベクターである(15)。得られた *mCsheXYL1*、*CsheXYL2*、*PsXYL3*のDNA断片を *XbaI/BamHI* 処理したpCU155にそれぞれクローニングし、pVT340、pVT342、pVT344とした。

4. *C. utilis*の形質転換

形質転換は第1章に記載した方法に従って実施した。カクテルマルチコピー導入株を構築するために、*BglIII*で処理されたpVT340、pVT342、pVT344を1:1:1のモル比で混合し、*C. utilis* NBRC0988株を形質転換した。適宜、回復培養を行った後、*Cyh*を含む選択培地に塗布して、30°Cで3日間培養を行った。

5. カクテルマルチコピー導入株のスクリーニング

マルチコピー導入株選抜のために、形質転換プールより得られた60クローンの推定組換え株をYPD2培地で30°C、24時間好気培養した。100 μ Lの前培養液を3 mLのYPX8培地(15 mL試験管)に接種し、30°C、100 rpmで振とう培養した。培養50時間後の上清中に含まれる生産物濃度、キシロース濃度を分析した。

6. 導入コピー数の定量

組換え株に導入されたそれぞれの遺伝子コピー数は、Real-time PCR で定量した(52)。鋳型とするゲノム DNA は、YPD2 培地で 30°C、24 時間培養した菌体から

QIAGEN Genomic tip 500/G (anion exchange column, QIAGEN, Hilden, Germany)と QIAGEN Genomic DNA Buffer Set (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて抽出した。 *C. utilis* *ACT1*、 *PGK1tr*、 *TDH1pr*、 *URA3*、 *mCsheXYL1*、 *CsheXYL2*、 *PsXYL3* の各 DNA 配列を検出するために、それぞれ、*ACT1f/ACT1r*、 *PGK1tf/PGK1tr*、 *TDH1pf/TDH1pr*、 *URA3f/URA3r*、 *XYL1f/XYL1r*、 *XYL2f/XYL2r*、 *XYL3f/XYL3r* のプライマーセットを用いた。使用したプライマーを Table 2-2 に示した。Real-time PCR は SYBR Premix Ex Taq Perfect real-time kit (TaKaRa Bio)を用いて、LightCycler 480II instrument (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN)で実施した。遺伝子コピー数の標準化は、*ACT1* を標準遺伝子とした Standard curve 法を用いた。なお、各組換え株の導入遺伝子コピー数は、TMS174 株に導入されたキシロース代謝酵素遺伝子のコピー数を 1 である事実に基づいて算出した。

7. 粗酵素液の調整と酵素活性測定

第 1 章に記載した方法に従って実施した。XR の酵素活性測定では補酵素として NADH を用いた。

8. 発酵試験

OD₆₀₀の測定には、GeneQuant 1300 spectrophotometer (GE Healthcare, England, UK)を用いた。YPD2培地で30℃、24時間好気培養した菌体を回収し、発酵用培地で遠心洗浄した。発酵は100 mLのYPX8培地を入れた300 mL容の三角フラスコを用いて、初発OD₆₀₀ = 1、30℃、80 rpmで行い、培養上清の生産物濃度、キシロース濃度、菌体量を分析した。なお、OD₆₀₀ = 1の培養液は、1 Lの培養液あたり約0.46 gの乾燥菌体を含んでいる。

9. 分析方法

キシロース、キシリトール、グリセロール、エタノール、酢酸の定量は、第1章に記載した方法に従って実施した。

10. 塩基配列番号

CsheXYL1、*CsheXYL2*、*PsXYL3*の塩基配列登録番号は第1章に記載した。

第3節 結果

1. カクテルマルチコピー導入法による組換え株の構築と選抜

Δ配列をターゲットとしたカクテルマルチコピー導入法は、*S. cerevisiae* では報告されているが、*C. utilis* では報告されていない。また、ゲノム解析の結果からも、*C. utilis* にΔ配列のトランスポゾンは見出されていない(53)。*C. utilis* においては、染色体多コピー導入ベクターとして pCU155 が報告されている(15)。Kondo らの報告によれば、このベクターは最大で 90 コピーを *URA3* 座にタンデムに導入することが可能であり、また、このベクターによって得られた組換え株の異種タンパク質の生産量は 50 世代の非選択培養においても大きく減少しない(15)。一方、Ikushima らは、*C. utilis* NBRC0988 株は 4 倍体酵母であることを示唆する報告を行っており、少なくとも *URA3* 遺伝子に関しては同一の *URA3* 遺伝子が 4 コピー存在することが示されている(19)。そこで、本研究では、pCU155 を複数のアレルをターゲットとしたカクテルマルチコピー導入用プラスミドとして用いることとした。

mCsheXYL1、*CsheXYL2*、*PsXYL3* をそれぞれ別々の発現ベクターにクローニングし、それらで同時に *C. utilis* を形質転換した(Fig. 2-1)。それぞれの発現ベクターには非常にプロモーター活性の弱い *Cyh* 耐性遺伝子が選抜マーカーとしてクローン化されており、多コピーが染色体に組込まれたときのみ、組換え株として選抜され

る(15)。この形質転換により、300-400 個の Cyh 耐性クローンを取得した。こうして得られたクローンは、3 つのキシロース代謝酵素遺伝子がそれぞれ異なる比で導入されている。Cyh を含む培地でサイズの小さなコロニーを形成する株では導入コピー数が少ない傾向があることから、コロニーサイズが比較的大きい 60 コロニーを選抜し、キシロースの発酵能を調査した。その結果、これらの酵母株は多様性に富んだキシロースの発酵性を示すことが明らかになった(Fig. 2-2)。

エタノール収率(消費したキシロースに対して生産したエタノールの割合として算出)は、副産物生産の観点を含んでおり、カーボンロスを反映していることから、組換え株のキシロース発酵能を評価する上で重要な指標である。そのため、まずエタノール収率に影響を与える生産物の解析を行った。その結果、エタノール収率とエタノール生産量は正の相関、エタノール収率とキシリトール蓄積量は負の相関を示した(Fig. 2-2)。エタノール生産はエタノール収率の責任要素であること、キシリトールは酵母のキシロース発酵における重要副産物としてよく知られていることから、これらの結果は極めて妥当である。また、これら組換え *C. utilis* においてグリセロールの蓄積は認められなかった。

2. TMS174株におけるキシロース代謝酵素遺伝子の導入コピー数の解析

カクテルマルチコピー導入株の導入コピー数を解析するために、まず TMS174 株の導入コピー数が 1 であることを確認した。第 1 章で構築された TMS174 株は 3 つのキシロース代謝酵素遺伝子が *URA3* 座に二点組換えで導入されている。また、導入されている 3 つのキシロース代謝酵素遺伝子はそれぞれ *TDH1pr* と *PGK1tr* でドライブされており、*URA3* 座特異的に導入されている。従って、4 倍体である本酵母のゲノムに 1 コピーのキシロース代謝酵素遺伝子が導入されていると想定される。導入コピー数の確認のために、NBRC0988 株、*URA3* の 1 回破壊株 (CUD1F)、2 回

破壊株 (CUD2F)、3 回破壊株 (CUD3F)、4 回破壊株 (CUD4F、完全破壊株) をコントロールとして用いた(19)。TMS174 株の *URA3* のコピー数は、CUD1F に近い値を示した(Table 2-3)。一方、*ACT1* あたりの *TDH1pr* と *PGK1tr* の増幅量はそれぞれ 1.73 と 2.70 であり、これは NBRC0988 株と比較するとそれぞれ 1.73 倍、1.80 倍に相当する。NBRC0988 株が 4 倍体であり、かつ本酵母株が *TDH1pr* と *PGK1tr* を 4 コピーずつ有していると仮定すると、TMS174 株における増加はそれぞれの配列が 3 コピー増加したことを示唆している(7 コピー/4 コピー = 1.75)。これらの結果から、TMS174 株には 1 コピーの *URA3* 座が破壊されることで、1 コピーのキシロース代謝酵素遺伝子が導入されているものと考えられる。

3. 導入コピー数依存的な酵素活性増加の解析

導入コピーの増加は潜在的には、遺伝子発現と酵素の生産を増加させ得る。コピー数の増加が直線関係を持って酵素活性を増加させるか確認するために、カクテルマルチコピー導入株およびTMS174株のキシロース代謝酵素遺伝子導入コピー数とそれに対応する酵素活性を測定した。TMS174株のXR、XDH、XK活性はそれぞれ 0.05、0.85、0.21 Unit/mg-proteinだった。一方、カクテルマルチコピー導入株では導入コピー数依存的に対応する酵素活性が増加した(Fig. 2-3)。この結果は、今回デザインした実験系において、コピー数増加による酵素生産が飽和していないことを示している。一方、コピー数の倍増は酵素活性の倍増に寄与しておらず、例えば、8-10 コピーの遺伝子が導入された株において、酵素活性は3-4倍程度しか増加していなかった。

本研究で用いたカクテルマルチコピー導入法はタンデムに遺伝子を導入するため、導入された遺伝子がループアウトする可能性が考えられる。しかしながら、60 株のカクテルマルチコピー導入株は30世代の非選択培養後でも大きな導入コピー

数の低下は認められなかった (Fig. 2-4)。この結果は、菌株を維持する際にそのような相同組換えが全く起こらないことを示すものではないが、本研究における解析結果の妥当性を支持するものである。

4. 導入コピー数、酵素活性とキシロース発酵能の相関解析

形質転換体における導入遺伝子のコピー数とキシロース発酵能の関連性を調査するために、エタノール収率と導入遺伝子のコピー数の相関解析を行った結果、*CsheXYL2* と *CsheXYL3* のコピー数はエタノール収率と正の相関を示し、*mCsheXYL1* は弱い負の相関を示した (Fig. 2-5)。導入された各遺伝子数の比がキシロース発酵性に影響を与える可能性を考慮し、各菌株が有する *CsheXYL2/mCsheXYL1*、*PsXYL3/CsheXYL2*、*mCsheXYL1/PsXYL3* のコピー数比とエタノール収率の相関について解析した。その結果、*CsheXYL2/mCsheXYL1* のコピー数比はエタノール収率と正の相関を示し、*mCsheXYL1/PsXYL3* コピー数比は負の相関を示した (Fig. 2-6)。また、酵素活性のデータを用いて同様の解析を行ったところ、同じ傾向を示した (Fig. 2-7, 2-8)。これらの結果は、XR 活性に対して XDH と XK の活性を増加させることがエタノール収率の改善に効果的であることを示唆している。

5. 発現量比最適化株のキシロース発酵能の解析

発現量比最適化株のパフォーマンスを評価するために、3つの株を選抜し、キシロース発酵能を調査した。CIS35株は、カクテルマルチコピー導入株の中で最もエタノール収率とエタノール生産量が高い株として選抜された。CIS18株は、導入された3つのキシロース代謝酵素遺伝子が同程度のコピー数(おおよそ6コピー)であった。TMS174株は、3つのキシロース代謝酵素遺伝子がそれぞれ1コピー導入された株である。Fig. 2-9とTable 2-4に、発酵試験のタイムコースと総括を示した。

CIS35 株は TMS174 株と比較して単位菌体、単位時間あたりの最大キシロース消費速度が 2.16 倍、エタノール濃度が 1.37 倍、エタノール収率が 1.42 倍増加した。CIS18 株は TMS174 株と比較して単位菌体、単位時間あたりの最大キシロース消費速度が 1.62 倍、エタノール濃度が 1.23 倍、エタノール収率が 1.20 倍増加した。CIS18 株のキシリトール収率は TMS174 株とほぼ同程度であったが、CIS35 株では 66%低下した。それぞれの菌株において、菌体量はキシロースが消費され尽くすまで増加し、増殖速度に有意な差は認められなかった。この結果は、キシロース消費速度が速い株ほど菌体収率が低くなるという結果を説明するものである。発酵試験の結果を総括すると、キシロース代謝酵素比を最適化することは、単純な遺伝子過剰発現よりも生産性改善の効果が大きいことを示している。

第4節 考察

キシロースからエタノールを高収率で生産する *S. cerevisiae* 株の構築に関する報告も、これまで幾つかなされている。一例を挙げると、HaらはPsXRとPsXR R281Hの両方をPsXDH、PsXKとともに *S. cerevisiae* で発現させ、キシロースを含む培地で継代培養することで進化株の構築を行った(54)。得られた最終株は、YPX8培地で27.9 g/Lのエタノールを60時間で生産した(エタノール収率は0.350 g/g)。本研究で構築されたCIS35株は、YPX8培地で29.2 g/Lのエタノールを70時間で生産した(エタノール収率は0.402 g/g)。過去に報告された酵母種によるキシロースからのエタノール生産の結果を比較すると、本章で構築されたCIS35株のキシロース発酵能は、*S. cerevisiae* で報告されている最高レベルのキシロース発酵性株や *P. stipitis* を含む天然のキシロース発酵性酵母と同等以上である。従って、本研究成果はキシロースからのエタノール生産宿主として、*C. utilis* が大きなポテンシャルを有していることを示唆するものである。

キシロースからエタノールを高収率で生産する *C. utilis* 組換え株ではエタノールの生産量が多く、キシリトールの蓄積量が少なかった(Fig. 2-2)。また、Fig. 2-6とFig. 2-8の結果は、*CsheXYL2/mCsheXYL1* コピー数比とXDH/XR活性比の増加がエタノール収率の改善に効果的であることを示している。これらの結果は、キシロース発酵性 *S. cerevisiae* 株構築に関する報告においても議論されている(48-51)。補酵素としてNADPH、NAD⁺を利用したとき、PsXRとPsXDHによる反応はそれぞれ、 $5.75 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ と $6.9 \times 10^{11} \text{ M}$ の平衡定数を示す(55, 21)。この結果は、XRとXDHの反応ではキシリトール蓄積が優位であることを示しており、XDH/XR活性比の増加がキシリトールの蓄積を減少させることを支持するものである。本研究ではNADH要求型に補酵素要求性が変換された*CsheXR*と*CsheXDH*を用いたが、本章の結果はキシロースからのエタノール生産の改善法が、宿主や酵素の違いによらないことを示唆していると考えられる。

キシロース利用能を付与した *S. cerevisiae* 株では、XDH/XR 活性比の増加はグリセロールと酢酸の蓄積量低下に寄与すると報告されている(48, 51)。この生産変化は、細胞内の酸化還元バランスの変化によってもたらされると考えられる。例えば、グリセロールは過剰に生産された NADH が再酸化されるときに同時に生産される(56)。本研究において、構築されたいずれの *C. utilis* 組換え株においてもグリセロールは全く蓄積しておらず、また XDH/XR 比の増減は酢酸収率に影響を与えなかった(Table 2-4)。過剰な NADH は呼吸鎖において処理され得るため、*S. cerevisiae* と *C. utilis* におけるこれらの違いは、*C. utilis* の持つ高い呼吸活性によって生じた可能性が考えられる。

キシロースからエタノールを高収率で生産する *C. utilis* 組換え株においては、*XYL3* のコピー数、および XK 活性が増大する傾向が認められた(Fig. 2-5, 2-6, 2-7, 2-8)。キシロース利用能を付与した *S. cerevisiae* 株において、*XYL2* 遺伝子を過剰発

現したとき、キシロースが細胞外に分泌されることが報告されており(50)、これは XK 活性がキシロース代謝の律速段階の 1 つであることを示している。しかしながら、XK 活性を強力に増加させたとき、*S. cerevisiae* のキシロース培地での増殖は抑制された(57)。さらに、通気量の増加は、XK の活性増強によってもたらされる毒性を高めた(57)。これらの結果を基にして、キシロース発酵性を高めた *S. cerevisiae* 株を育種する際には、内在性の XK 遺伝子(*ScXKS1*) を高発現させるか、*PsXYL3* を穏やかなプロモーターで発現させる方法が選択されている。この毒性は、リン酸化反応の亢進によってもたらされた ATP の枯渇がキシロースの取り込みを減少させていることが原因ではないかと考察されている(58, 59)。また、他の報告によれば、酵母のキシロース培地での増殖は、究極的には ATP 生産速度によって制限されると言われている(60)。*C. utilis* においても、キシロースの取り込みには ATP が必要であるという報告がなされている(61)。本研究において構築された CIS35 株は、XK 活性が強力に増加しているにもかかわらず、TMS174 株と比較してキシロース消費量は低下していなかった (Fig. 2-5, 2-6, 2-7, 2-8)。*C. utilis* においては、P/O 比(NADH 酸化の際に生産される ATP のモル数)が 2.0 と、*S. cerevisiae* の 1.5 より高いことが知られている(62, 63)。これらの結果は、発酵のように酸素が制限された環境下においても *C. utilis* は効率的に ATP を生産できることを示すものであり、また、他の酵母と比較して、*C. utilis* は ATP 生産の制約なく、効率的な物質生産が可能であることを期待させるものである。

本章で構築された CIS35 株は極めて高いパフォーマンスを示す組換え株である。導入された各遺伝子は染色体に組込まれているため、構築された組換え株は非選択培地においても用いることができるという大きな利点を有している。さらに、CIS35 株のキシロース発酵能は 30 世代の非選択培養においても大きく低下しなかった (data not shown) 。これは産業利用には有望な特徴である。

Table 2-1 Strains and plasmids of *C. utilis* used in this study.

| Plasmids and strains | Relevant features | Reference or source |
|----------------------|--|---------------------|
| Strains | | |
| <i>C. utilis</i> | | |
| NBRC0988 | Wild type | NBRC |
| CUD1F | Single <i>URA3</i> disruptant derived from NBRC0988 | 19 |
| CUD2F | Double <i>URA3</i> disruptant derived from NBRC0988 | 19 |
| CUD3F | Triple <i>URA3</i> disruptant derived from NBRC0988 | 19 |
| CUD4F | Quarduple <i>URA3</i> disruptant derived from NBRC0988 | 19 |
| TMS174 | NBRC0988 <i>URA3</i> :: <i>TDH1pr-mCsheXYL1</i> (K275R/N277D)- <i>PGK1tr-TDH1pr-CsheXYL2-PGK1tr-TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | Chapter 1 |
| CIS18 | NBRC0988 <i>URA3</i> :: cocktail multicopy integration of <i>mCsheXYL1</i> (K275R/N277D), <i>CsheXYL2</i> and <i>PsXYL3</i> Clone No. 18 | This study |
| CIS35 | NBRC0988 <i>URA3</i> :: cocktail multicopy integration of <i>mCsheXYL1</i> (K275R/N277D), <i>CsheXYL2</i> and <i>PsXYL3</i> Clone No. 35 | This study |
| Plasmids | | |
| pVT148 | <i>TDH1pr-mCsheXYL1</i> (K275R/N277D)- <i>PGK1tr</i> , Hyg ^R cassette | Chapter 1 |
| pVT150 | <i>TDH1pr-CsheXYL2-PGK1tr</i> , Hyg ^R cassette | Chapter 1 |
| pVT107 | <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> , Hyg ^R cassette | Chapter 1 |
| pCU155 | <i>C. utilis</i> multicopy integration plasmid; <i>TDH1pr-TDH1tr</i> , Cyh ^R marker, integration at <i>URA3</i> allele | 15 |
| pVT340 | <i>TDH1pr-mCsheXYL1</i> (K275R/N277D)- <i>TDH1tr</i> , Cyh ^R cassette | This study |
| pVT342 | <i>TDH1pr-CsheXYL2-TDH1tr</i> , Cyh ^R cassette | This study |
| pVT344 | <i>TDH1pr-PsXYL3-TDH1tr</i> , Cyh ^R cassette | This study |

Table 2-2 PCR primers used in this study.

| Name | Sequence (5' to 3') |
|--------|------------------------|
| ACT1f | AGCGTATGCAAAAGGAGATCA |
| ACT1r | GAACCACCAATCCAGACAGAG |
| TDH1pf | TCAATGTAGGGGAGAAGCCTTG |
| TDH1pr | ACGTAACGTCAGACAGGCACAC |
| PGK1tf | TCTGGGTGGGATGGAAGTTA |
| PGK1tr | ACTGTCAAACGGGAAGATGG |
| URA3f | TCCAAGAAGACGAACCTGTGTG |
| URA3r | AAGGACCAAGCGTATCAACGA |
| XYL1f | GGTCCTCAATCTTTCGTTGAG |
| XYL1r | GCTGGGACTTTGTTGTGCTTG |
| XYL2f | GGTGGTCGTTTCGTCCAAGTC |
| XYL2r | GAAAGAGCCGAACAAGGTGAG |
| XYL3f | CTCCCGTCAACGGAACTACA |
| XYL3r | ATCCGATCCATTCCTTCTTGG |

Table 2-3 Analysis of copy number of the xylose metabolizing enzyme genes in TMS174.

| Strain | Description | Amplification per <i>ACT1</i> | | |
|----------|---|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| | | <i>URA3</i> | <i>TDH1pr</i> | <i>PGK1tr</i> |
| NBRC0988 | Wild type | 1.17 ± 0.01 | 0.96 ± 0.05 | 1.52 ± 0.07 |
| CUD1F | Single <i>URA3</i> disruptant | 0.78 ± 0.07 | N.D. ¹⁾ | N.D. ¹⁾ |
| CUD2F | Double <i>URA3</i> disruptant | 0.55 ± 0.04 | N.D. ¹⁾ | N.D. ¹⁾ |
| CUD3F | Triple <i>URA3</i> disruptant | 0.28 ± 0.05 | N.D. ¹⁾ | N.D. ¹⁾ |
| CUD4F | Quarduple <i>URA3</i> disruptant | 0.00 ± 0.00 | N.D. ¹⁾ | N.D. ¹⁾ |
| TMS174 | The three xylose metabolizing enzyme genes were integrated at <i>URA3</i> locus ²⁾ | 0.74 ± 0.01 | 1.73 ± 0.02 | 2.70 ± 0.22 |

Data are means ±SD from three independent experiments.

¹⁾ N.D. no data

²⁾ The three xylose-metabolizing enzyme genes were driven by the *TDH1pr* and *PGK1tr*.

Table 2-4 Fermentation performance of TMS174, CIS18 and CIS35 strains in batch fermentations in YPX8 medium.

| Strain | Integrated copy number ¹⁾ (enzymatic activity U/mg protein) | | | Max. xylose consumption rate (g xylose/L/h/g biomass) | Max. ethanol concentration (g/L) | Yield (g product/g consumed xylose) ²⁾ | | | Time (h) ³⁾ | |
|--------|---|----------------------|---------------------|--|-------------------------------------|---|-------------|-------------|---------------------------|---------|
| | <i>mXYL1</i> (XR) | <i>XYL2</i> (XDH) | <i>XYL3</i> (XK) | | | Ethanol | Biomass | Xylitol | | Acetate |
| TMS174 | 1.0 (0.042) | 1.0 (0.94) | 1.0 (0.20) | 0.138±0.011 | 21.3±0.6 | 0.283±0.010 | 0.138±0.017 | 0.074±0.002 | 0.030±0.001 | 142 |
| CIS18 | 6.5 (0.120) | 6.3 (1.59) | 6.2 (0.36) | 0.223±0.018 | 26.2±0.3 | 0.342±0.022 | 0.110±0.011 | 0.072±0.003 | 0.028±0.000 | 100 |
| CIS35 | 4.9 (0.085) | 7.2 (2.14) | 7.4 (0.57) | 0.298±0.022 | 29.2±0.8 | 0.402±0.013 | 0.087±0.007 | 0.049±0.001 | 0.030±0.002 | 70 |

The parameters of fermentation experiment were summarized from the data shown in Fig. 2-9. Data are means ± SD from three independent experiments.

1) Values of the integrated copy number and the enzymatic activities were extracted from data shown in Fig. 2-3.

2) Yields were calculated at the time when ethanol concentration was maximum.

3) Time indicates when ethanol concentration was maximum.

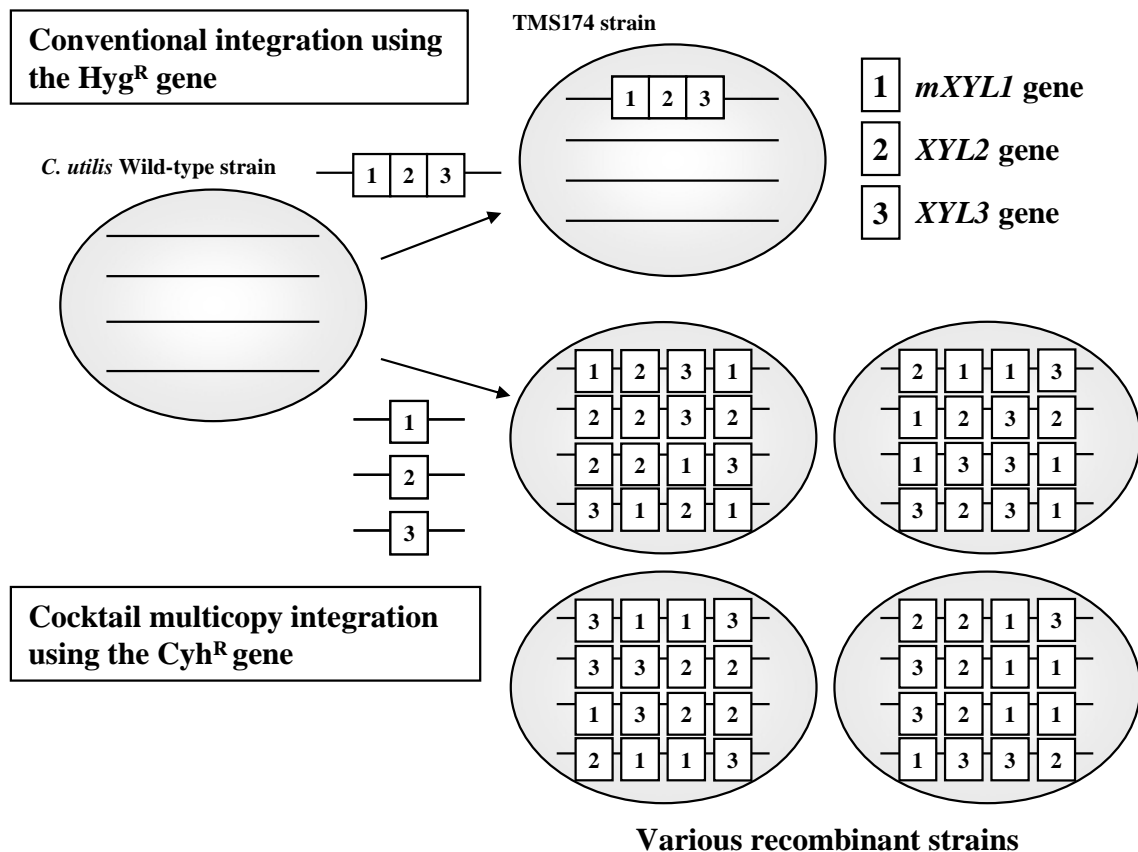


Fig. 2-1 Schematic illustration of the cocktail multicopy integration method in *C. utilis*.

In a conventional integration method using the Hyg^R gene, the vector in which the three xylose-metabolizing enzyme genes are cloned is integrated at the *URA3* locus on a chromosome by double-crossover recombination, and a single copy-integrant strain can be selected as hygromycin B-resistant transformants. In cocktail multicopy integration using the Cyh^R gene, the multicopy integrative expression vector pCU155 can be integrated in tandem at the *URA3* locus on the other chromosome by single-crossover recombination. Linearized plasmids, each containing one of the three xylose-metabolizing enzyme genes, are introduced into yeast chromosomes simultaneously. A Cyh^R gene with deficient promoters is constructed by deletion of the Cyh^R promoter region from the 5' end. As a result, only multicopy integrant strains can be selected as cycloheximide-resistant transformants. Ultimately, a pool of recombinant *C. utilis* transformants with various genes present in different numbers of copies are constructed.

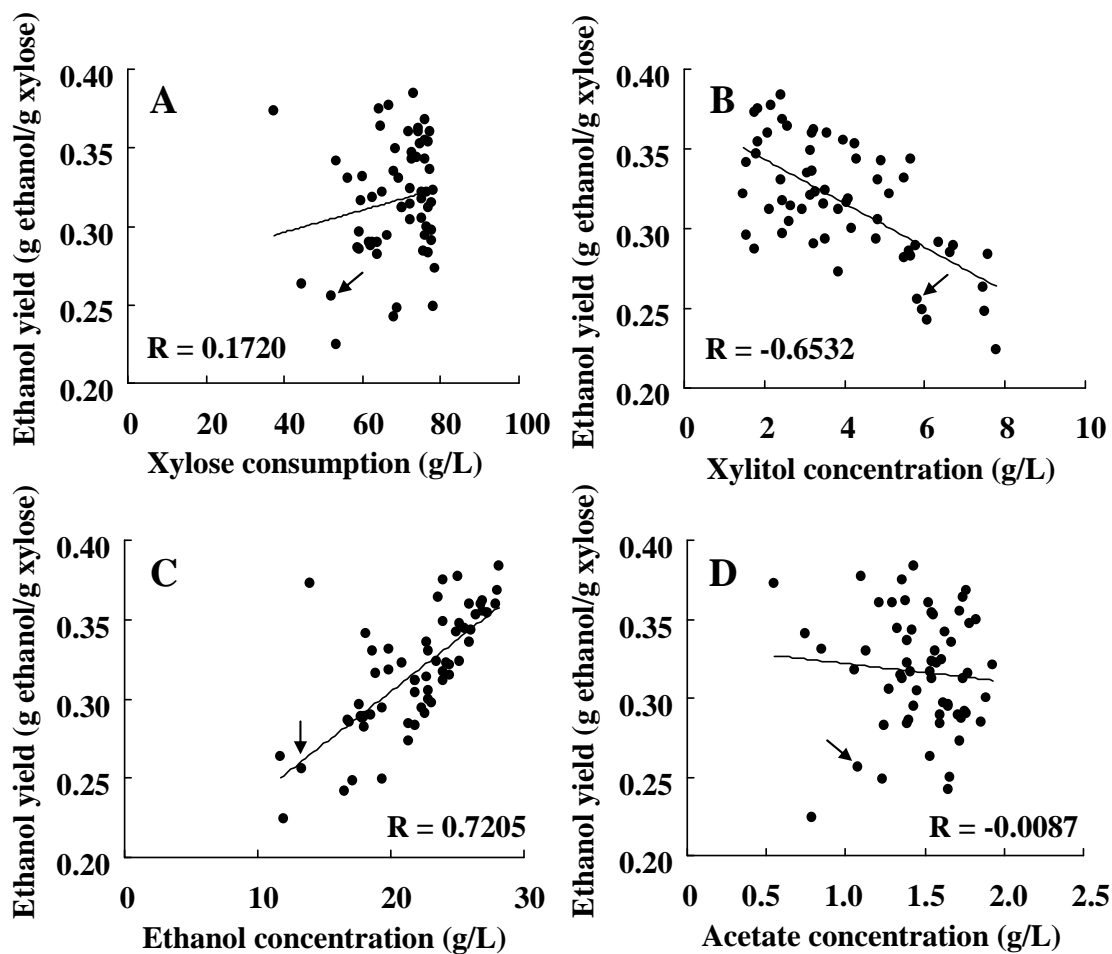


Fig. 2-2 Scatter plots of metabolites production and ethanol yield from 60 cocktail integrant strains and TMS174.

Panels A, B, C and D show the data for the xylose consumption, xylitol production, ethanol production and acetate production, respectively. The regression line was calculated by least squares method using Excel with ystat2006 software (Igakutosyosyuppan, Tokyo, Japan). “R” represents the linear correlation coefficient between the metabolite and ethanol yield. Arrows indicate the data of the TMS174 strain.

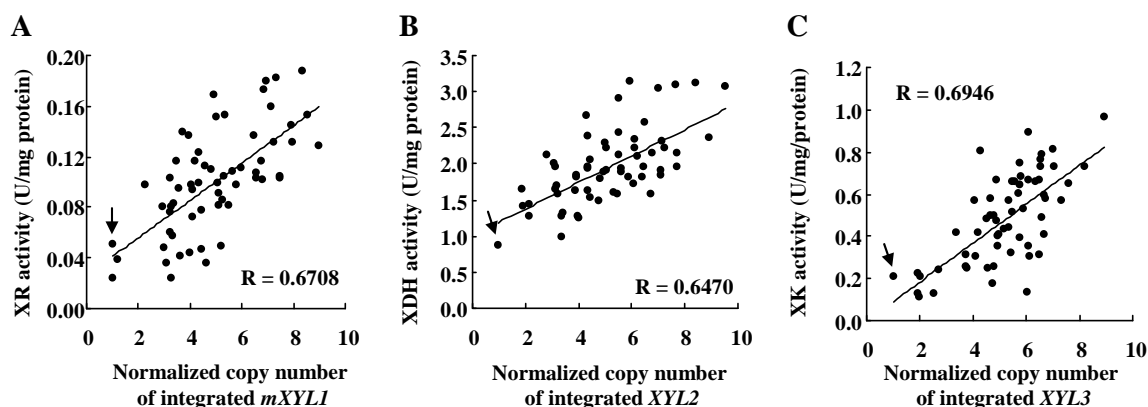


Fig. 2-3 Correlation of activities of the xylose-metabolizing enzyme with its copy number of the integrated gene.

Panels A, B and C show the scatter plots for the enzymatic activity and copy number of *mXYL1* (XR), *XYL2* (XDH) and *XYL3* (XK) from 60 cocktail integrant strains and TMS174, respectively. The regression line was calculated by least squares method using Excel with ystat2006 software (Igakutosyosyuppan). “R” represents the linear correlation coefficient between activity of the xylose-metabolizing enzyme and copy number of the integrated gene. Arrows indicate the data of the TMS174 strain.

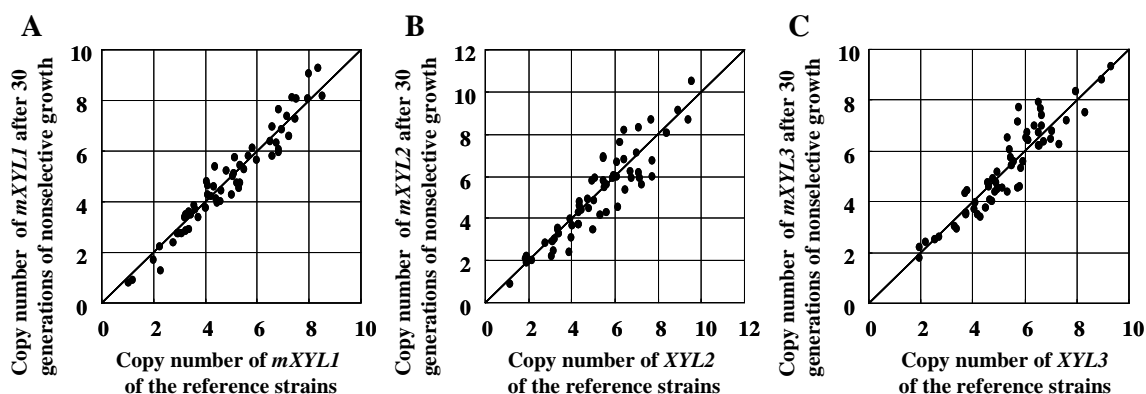


Fig. 2-4 A copy number of integrated xylose-metabolizing enzyme genes after 30 generations under nonselective conditions.

Panels A, B and C show the scatter plots of a copy number of *mXYL1*, *XYL2* and *XYL3* from 60 cocktail integrant strains, respectively. Transformants stored on YPD2 plate containing cycloheximide were inoculated in liquid YPD2 medium for 24 h at 30° C. In order to analyze the copy number of integrated xylose-metabolizing enzyme genes under nonselective conditions, genomic DNAs were prepared from the transformant cells cultivated for 30 generations in YPD2 medium.

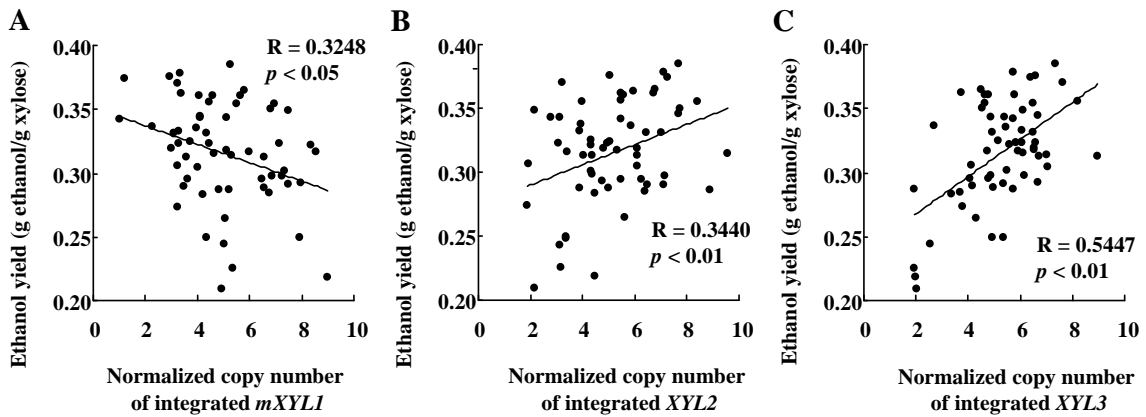


Fig. 2-5 Correlation of ethanol yield and copy number of integrated xylose-metabolizing enzyme genes.

Panels A, B and C show the scatter plots for ethanol yield and copy number of *mXYL1*, *XYL2* and *XYL3* from 60 cocktail integrant strains, respectively. The regression line was calculated by least squares method using Excel with ystat2006 software (Igakutosyosyuppan). “R” represents the linear correlation coefficient between ethanol yield and copy number of the integrated gene. Test of no correlation was performed by Pearson's correlation test using Excel with ystat2006 software.

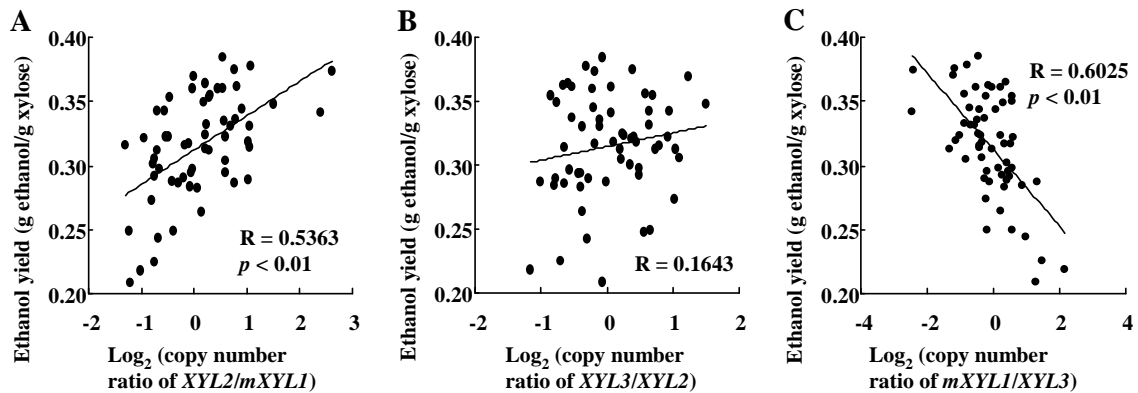


Fig. 2-6 Correlation of ethanol yield and copy number ratio of integrated xylose-metabolizing enzyme genes.

Panels A, B and C show the results for the copy number ratio of *XYL2/mXYL1*, *XYL3/XYL2* and *mXYL1/XYL3*, respectively. The regression line was calculated by least squares method using Excel with ystat2006 software (Igakutosyosyuppan). “R” represents the linear correlation coefficient between ethanol yield and copy number of the integrated gene. Test of no correlation was performed by Pearson's correlation test using Excel with ystat2006 software.

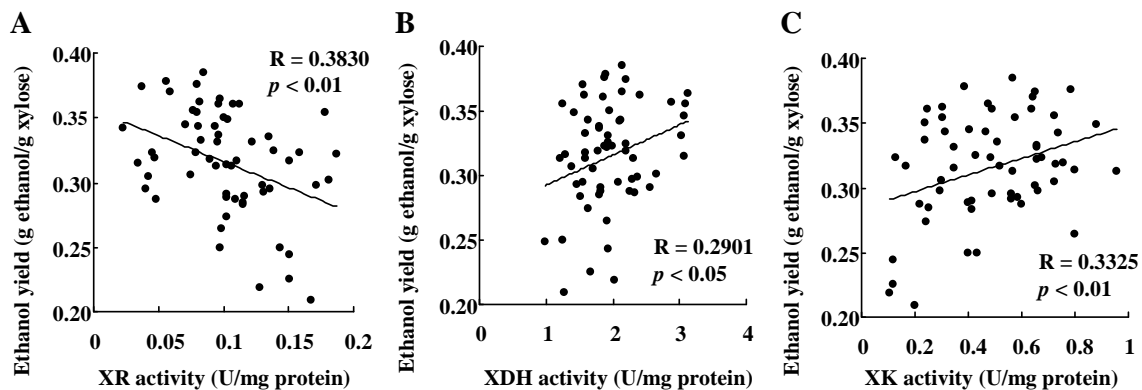


Fig. 2-7 Correlation of ethanol yield and copy number of integrated xylose-metabolizing enzyme genes.

Panels A, B and C show the scatter plots for ethanol yield and copy number of XR, XDH and XK from 60 cocktail integrant strains, respectively. The regression line was calculated by least squares method using Excel with ystat2006 software (Igakutosyosyuppan). “R” represents the linear correlation coefficient between ethanol yield and copy number of the integrated gene. Test of no correlation was performed by Pearson's correlation test using Excel with ystat2006 software.

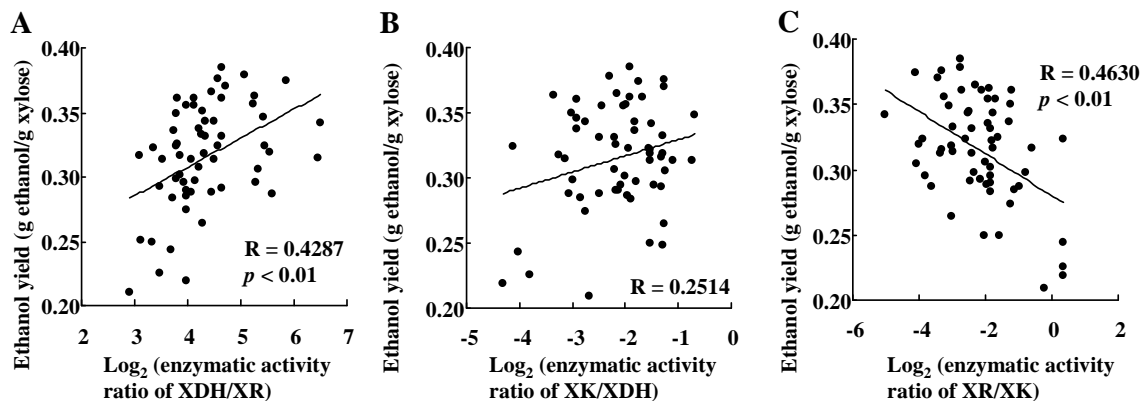


Fig. 2-8 Correlation of ethanol yield and the enzymatic activity ratio of integrated xylose-metabolizing enzyme.

Panels A, B and C show the results for the enzymatic activity ratio of XDH/XR, XK/XDH and XR/XK, respectively. The regression line was calculated by least squares method using Excel with ystat2006 software (Igakutosyosyuppan). “R” represents the linear correlation coefficient between ethanol yield and copy number of the integrated gene. Test of no correlation was performed by Pearson's correlation test using Excel with ystat2006 software.

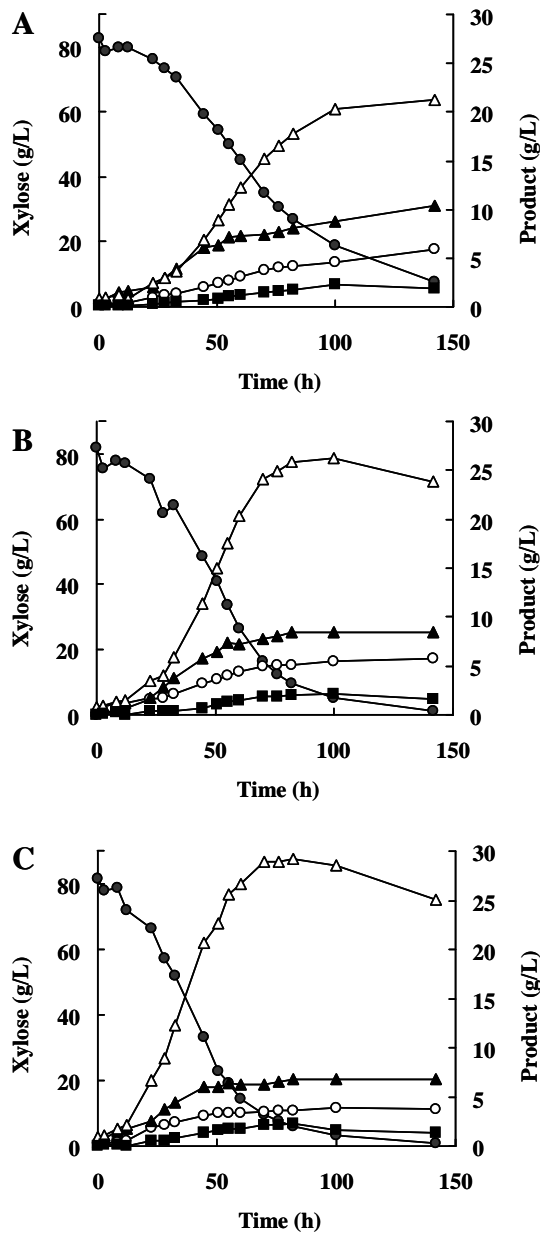


Fig. 2-9 Ethanol production by the engineered *C. utilis* strains in YPX8 medium.

Panels A, B and C show the results for TMS174, CIS18 and CIS35, respectively. Data represent the average of three independent fermentation experiments. Symbols: xylose (closed circles), xylitol (open circles), biomass (closed triangles), ethanol (open triangles), acetate (closed squares).

第3章 トランスクリプトーム解析とメタボローム解析による *Candida utilis* の

キシロース代謝律速段階の解析

第1節 序論

第1章では *C. utilis* のキシロース発酵に必要な異種酵素遺伝子を見出し、第2章ではその発現量比の最適化を実施した。しかし、内在性代謝経路の律速段階を明らかにするためには、キシロース代謝時の細胞特性をさらに詳細に解析する必要がある。

キシロースを利用するように代謝改変をされた *S. cerevisiae* のキシロース代謝に関しては、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析が数多くの研究者によって行われている(26, 60, 64–66)。キシロースで培養した *S. cerevisiae* 組換え株では、ペントースリン酸回路の遺伝子発現が穏やかに増加しており(60, 64)、酸化還元に関わる幾つかの遺伝子発現も増加している(26, 60)。また、Jinらは、キシロースを炭素源として培養した *S. cerevisiae* 組換え株のトランスクリプトーム解析を実施し、トリカルボン酸 (TCA) 回路、糖新生、呼吸鎖関連遺伝子の発現量が増加していることを報告した(26)。そこで、Jinらは過度の呼吸活性を抑制するためにキシロース代謝酵素遺伝子を導入した株から呼吸欠損変異株を取得し、当該変異株はキシロースからのエタノール生産が増加し、キシリトール蓄積が低下することを見出した。しかし、この変異株はキシロースを唯一の炭素源として増殖することはできなかったと報告している(26)。

天然のキシロース発酵性酵母である *P. stipitis* については2007年に全ゲノム解読が終了した後、グローバルな遺伝子発現解析が実施されてきた(67)。キシロースを炭素源として培養した *P. stipitis* においては、特にペントースリン酸回路やTCA回路の遺伝子が強力に誘導されていたことから、こうした変化が細胞内の酸化還元バランスや微好気条件下でのキシロースの効率的な利用に寄与していると考えられている。

このようなオミックス技術は、キシロース代謝の律速段階を知る上で強力なツールとなっている。しかしながら、これら以外の酵母のキシロース利用について、ハイスループット解析された例は報告されていない。本章では、組換え*C. utilis*によるキシロース代謝の特性を解析するため、CE-TOF MSを用いたメタボローム解析とDNAマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を実施し、効率的なキシロース代謝に必要な遺伝子改変を行うことを目的とした。

第2節 材料と方法

1. 使用菌株

C. utilis 野生株としてNBRC0988株を用いた。キシロース発酵能が付与された組換え株として、*C. utilis* TMS174株(第1章)を用いた。本株はCsheXR K275R/N277D、CsheXDH、PsXKをコードする遺伝子が1コピーずつ*URA3*座に導入されたNBRC0988株である。新たに構築した*C. utilis*株についてはTable 3-1に示した。プラスミド増幅用の大腸菌宿主については第1章に記載した。

2. 培地

- YPD2培地：酵母基本増殖用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、20 g/Lグルコース

固体培地には終濃度20 g/Lのアガーを添加した。形質転換体の選抜には終濃度60 mg/L Cyhを添加した培地を用いた。

- YPD5培地：酵母代謝物・遺伝子発現解析用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lグルコース

- YPX5培地：酵母代謝物・遺伝子発現解析用培地、酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lキシロース

・ LB培地：大腸菌用培地

10 g/Lトリプトン、5 g/L酵母エキス、10 g/L塩化ナトリウム

固体培地には終濃度15 g/Lのアガーを添加した。形質転換体の選抜には終濃度100 mg/Lとなるようにアンピシリンを添加した培地を用いた。

3. メタボローム解析およびトランスクリプトーム解析のための培養

各酵母株を100 mLのYPD2培地を用いて30°Cで1日間前培養した後、菌体は4°Cで10分間遠心して回収した。前培養した菌体は100 mLのYPD5培地もしくはYPX5培地(500 mL坂口フラスコ)に初期OD₆₀₀ = 0.1で接種し、30°C、100 rpmで振とう培養した。本培養開始後、OD₆₀₀ = 5–15の培養液をサンプリングし、DNAマイクロアレイ、CE-TOF MS解析のためのRNA抽出、細胞内代謝物抽出を行った。

4. 細胞内代謝物の抽出とCE-TOF MSによる解析

細胞内代謝物の抽出は、過去の報告に記載された方法を用いて行った(68)。菌体は0.45 μmのポアサイズフィルターを用いて培地から分離した。カチオンとアニオンの内部標準物質は、Human Metabolome Technologies (Tsuruoka, Japan)から購入した。凍結乾燥したサンプルはCE-TOF MS分析の前に50 μLの超純水に溶解させた。全てのCE-TOF MSに関わる実験は、分析マニュアルに従い、Agilent Capillary Electrophoresis System、air pressure pump、Agilent 1100 series MSD mass spectrometer、isocratic HPLC pump、G1603A Agilent CE-MS adapter kit、G1607A Agilent CE-TOF MS sprayer kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いて行った。

5. RNAの抽出とDNAマイクロアレイによる解析

DNAマイクロアレイ実験は、*C. utilis* オリゴアレイ(Agilent's eArray)を用いて行

った。それぞれのオリゴアレイは *C. utilis* のゲノム配列(53)を基にデザインされており、15,208 個のスポットプローブを有している。また、6,604 個の遺伝子について、1つの遺伝子からそれぞれ2つのプローブがスポットされている。トータルRNAの抽出にはガラスビーズを用いて行い、RNeasy column (Qiagen, Hilden, Germany)で精製した。0.5 µg の RNA を、Quick Amp Labeling Kit, One-Color (Agilent Technologies)を用いてラベル化した。アレイへのラベル化 cRNA のハイブリダイゼーションは、キット付属のプロトコールに従った。マイクロアレイは洗浄、乾燥後、DNA microarray scanner (model G2565BA; Agilent Technologies) でスキャンし、Feature Extraction と Image Analysis を行った。シグナル強度は 75%中央値を用いて標準化した。Gene ontology (GO) 解析には GeneSpring software (version 12.0, Agilent Technologies)を用いた。転写解析のデータは、2 つのプローブから得られたシグナル強度の平均値で示した。

6. 分析方法

グルコース、キシロース、キシリトール、酢酸、エタノールの定量は第1章に記載した方法に従って実施した。

7. プラスミド

プラスミド構築のための基本的な実験方法は、第1章に記載した方法に従って実施した。使用したプライマーはTable 3-2に、構築したプラスミドはTable 3-1に示した。

・ *ADH1*、*ADH2*、*TDH1* の多コピー組込み型ベクター

アルコールデヒドロゲナーゼ1、アルコールデヒドロゲナーゼ2、グルセルアルデ

ヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ をコードする遺伝子(*ADH1*、*ADH2*、*TDH1*)のDNA断片は、*C. utilis*ゲノムDNAを鋳型としたPCRによって増幅した。それぞれのDNA断片の増幅には、TM-411/TM-414、TM-380/TM-381、TM-415/TM-422のプライマーセットを用いた。pCU155は、*TDH1*pr、*TDH1*tr、Cyh耐性遺伝子カセットを有する*URA3*座を標的とした多コピー組込み型ベクターである(15、第2章)。得られた*ADH1*、*ADH2*、*TDH1*のDNA断片を*XbaI/BamHI*処理したpCU155にそれぞれクローニングし、pCU155-*ADH1*、pCU155-*ADH2*、pCU155-*TDH1*とした。

8. *C. utilis*の形質転換と菌株

形質転換は第1章に記載した方法に従って実施した。*C. utilis*の形質転換の試料として、*BglIII*で処理されたプラスミドDNAを用いた。

9. 発酵試験

OD₆₀₀の測定には、GeneQuant 1300 spectrophotometer (GE Healthcare, England, UK)を用いた。YPD2培地で30℃、24時間好気培養した菌体を回収し、YPX5培地で遠心洗浄した。発酵は30 mLの発酵試験用培地を入れた100 mL容の三角フラスコを用いて、初発OD₆₀₀ = 1、30℃、100 rpmで行い、培養上清の生産物濃度、キシロース濃度、菌体量を分析した。なお、OD₆₀₀ = 1の培養液は、1 Lの培養液あたり約0.46 gの乾燥菌体を含んでいる。

10. 細胞内NADH/NAD⁺比の測定

YPD5 培地あるいは YPX5 培地で培養した菌体は 10 分間、4℃で遠心し、回収した。サンプルは OD₆₀₀ = 5 でサンプリングした。補酵素の抽出と細胞内 NADH/NAD⁺比の測定には、NAD/NADH Quantification kit (BioVision, Mountain View, CA)を用いた。

11. 塩基配列番号

ADH1、*ADH2*、*TDH1* の塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide database に AB649224、AB641823、AB649225 として登録されている。マイクロアレイデータは Gene Expression Omnibus (GEO) database に GSE43514 として登録されている。

第3節 結果

1. 野生株と組換え株の培養

C. utilis 野生株である NBRC0988 株とキシロース発酵性組換え株である TMS174 株は、YPD5 培地において増殖速度、グルコース消費速度、エタノール生産性、最終エタノール濃度の面で同等の挙動を示す。そこで本実験では、上記 2 菌株を用いて異なる挙動を示す条件で培養し、その代謝変化を調査した。YPD5 培地で培養した野生株(WG 菌体)、YPX5 培地で培養した野生株(WX 菌体)、YPX5 培地で培養した TMS174 株(RX 菌体)を用いてメタボローム解析、トランスクリプトーム解析を実施した。

WG 菌体は培養 24 時間でグルコースを完全に消費し、19.6 g/L のエタノールを生産した。グルコース消費後、野生株はエタノールを消費し、増殖を続けた (Fig. 3-1A)。一方、WX 菌体は培養 48 時間で 12.8g/L のキシロースを消費し、1.9 g/L のキシリトールを蓄積したが、エタノールを生産しなかった(Fig. 3-1B)。RX 菌体は培養 48 時間で 40.9 g/L のキシロースを消費し、4.3 g/L のキシリトール、9.4 g/L のエタノールを生産した(Fig. 3-1C)。培養 48 時間において、RX 菌体のみが微量の酢酸を生産した(0.05 g/L)。

細胞内の代謝物や遺伝子発現は、培地や培養環境により影響を受けることが報告されている(65, 66)。炭素源の違いによる細胞生理状態の変化を調査するために、

WG 菌体、WX 菌体、RX 菌体培養液から、それぞれ残糖濃度がほぼ同等である時間を基準としてサンプリングを実施した。培養 10.5 時間、24 時間、24 時間のそれぞれの糖濃度は約 40 g/L であり、OD₆₀₀ はそれぞれ 5.7、10.4、13.5 であった(Fig. 3-1)。

2. 細胞内代謝物のプロファイリング

培養菌体から抽出した代謝物を CE-TOF MS 解析し、解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸回路に関連する 25 種の中央代謝経路代謝物、19 種のアミノ酸、10 種のエネルギー、酸化還元代謝物を定量した(Fig. 3-2)。WG 菌体では、全体として高いレベルで解糖系代謝物の蓄積が観察された。また、同じキシロースで培養した WX、RX 菌体を比較すると、RX 菌体においてグリセルアルデヒド 3 リン酸(GAP)より上流の解糖系代謝物、エリスロース 4 リン酸を除くペントースリン酸回路代謝物がより多く蓄積していた。一方、RX 菌体における GAP 下流の解糖系中間体、TCA 回路代謝物のレベルは WX 菌体より低かった。

キシロースを利用するように改変された *S. cerevisiae* のキシロース培地での増殖は、ATP 生産と細胞内の酸化還元バランスによって制限されることが報告されている(60)。Fig. 3-3 に示すように、*C. utilis* においては、いずれの測定条件でも ATP レベルの変化は観察されなかった。一方で、酸化還元代謝物には違いが認められた。例えば、RX 菌体では細胞内 NADH レベルが WG 菌体、WX 菌体と比較してそれぞれ 3.2 倍、4.0 倍に増加していた。これらの測定群において、NAD⁺レベルに大きな差は認められなかったことから、RX 菌体では NADH/NAD⁺比が大きく増加していることが示唆された。さらに RX 菌体では、NADPH もまた、WG 菌体、WX 菌体よりそれぞれ 1.2 倍、2.2 倍に増加していた。

3. 遺伝子発現のプロファイリング

各培養株の遺伝子発現量の相関解析を行った結果、WG 菌体と WX 菌体あるいは WG 菌体と RX 菌体の遺伝子発現の変化は、WX 菌体と RX 菌体の遺伝子発現の変化より大きいことが示された(Fig. 3-4)。この結果は、使用する炭素源による遺伝子発現の変化が、遺伝子操作によって引き起こされる遺伝子発現の変化より大きいことを示している。

多くの解糖系遺伝子においては、炭素源、あるいは遺伝子操作によって発現レベルの変化は観察されなかった(Fig. 3-5)。一方、ペントースリン酸回路、糖新生、TCA 回路の遺伝子においては、キシロース培養を行った 2 条件において発現量の増加が確認された。特にフルクトース 1,6 ビスフォスファターゼをコードする *FBP1* の発現量は、WG 菌体と比較して、WX 菌体、RX 菌体ではそれぞれ 9.1 倍、5.8 倍に増加していた。

エタノール生産に関わる酵素遺伝子(*ADH1*、*PDC1*)の発現量はキシロース培養時に増加していなかったが、エタノール酸化に関わる酵素遺伝子 *ADH2* はキシロース培養で発現量が増加していた。さらに、WG 菌体と比較して 2 倍以上発現量が増加した遺伝子について GO 解析を行ったところ、“aerobic respiration” (Accession GO 0009060) の GO タームを有する遺伝子群の発現量が $p < 0.05$ で有意に増加していることが明らかになった(data not shown)。これらの結果は、*C. utilis* のキシロース代謝は酸化的事であることを示している。

呼吸増殖の間、細胞質の酸化還元状態を恒常的に保つためにはレドックスシャトルが機能する必要があることから(56)、次にこれらシャトルシステムに関わる遺伝子の発現解析を行った。RX 菌体においては、エタノールやグリセロールを介したシャトルシステムである *ADH3*、*ALD6-M*、*GPD1* およびミトコンドリア内の NADH 酸化に関わる *NDII* の発現量が増加していた (Fig. 3-6)。また、リンゴ酸/オキサロ酢酸シャトルやリンゴ酸/ピルビン酸シャトルに関わる *MDH1*、*MDH2*、*PYC1*、*MAE1*

の発現量もそれぞれ 2.3 倍、4.5 倍、1.4 倍、5.1 倍に増加していた。これらの結果は、キシロース代謝時には種々の NADH/NAD⁺ シャトルシステムが重要な役割を担っていることを示唆している。

4. アルコール脱水素酵素遺伝子の過剰発現

ADH2 発現レベルの増加は、細胞質の NADH の過剰生産だけでなく、エタノール生産をも低下させる可能性がある。そこで、TMS174 株のキシロース発酵性を改善するために、著者は NADH の酸化を伴いながらアセトアルデヒドをエタノールに還元する ADH1p に注目した。すなわち、TMS174 株で *ADH1* を過剰発現することにより、細胞内の酸化還元バランスを維持するとともにエタノール生産の代謝フラックスを向上させることができると仮説を立てた。そこで、*ADH1* を過剰発現した *C. utilis* 組換え株を作製し、YPX5 培地での細胞内 NADH/NAD⁺ 比を測定したところ、コントロール株と比較して NADH/NAD⁺ 比が低下することが明らかになった。一方、*ADH2* の過剰発現株は、YPD5 培地、YPX5 培地の両方で NADH/NAD⁺ 比が増加していた (Table 3-3)。また、キシロースからのエタノール生産量を調査したところ、*ADH1* 過剰発現株でエタノール生産量が 17% 増加し、キシリトール蓄積量が 22% 減少していた (Fig. 3-7, Table 3-4)。一方、*ADH2* 過剰発現株ではエタノール生産量が 13% 減少し、キシリトール蓄積量もまた 33% 減少していた (Fig. 3-7, Table 3-4)。

第4節 考察

過去様々な報告において、メタボロミクスは細胞のある時間での状態を知る上で、強力なツールとして使われてきた (65, 66, 68, 69)。こうした代謝表現型の情報は、遺伝子発現解析結果の解釈をサポートすることを可能とした。本章では、3 つの発見がある。1 つ目は、過剰に蓄積した NADH が *C. utilis* 組換え株のキシロース利用を

制限している可能性があることである。2つ目は、TCA 回路や呼吸鎖、エタノール利用に関わる遺伝子が抑制されなかったことから、*C. utilis* のキシロース代謝は酸化的事であることである。3つ目は、アセトアルデヒドからエタノールへのフラックスの向上が細胞内の酸化還元バランスを改善し、キシロースからエタノール生産量を増加させ、キシリトール蓄積量を低下させたことである。

ADHI の過剰発現は NADH/NAD^+ 比を低下させ、キシロース発酵性を改善した (Table 3-3, Fig. 3-7)。この結果自体は、ADH1p が *C. utilis* 組換え株によるキシロース利用における律速段階の1つであることを示している。著者が所属している研究グループでは、以前グルコースで培養した *C. utilis* の全転写物の次世代シーケンサーによる定量解析を実施した(53, Whole genome transcriptome)。解析の結果、グルコースが消費され尽くした定常期では *ADHI* のアンチセンス鎖の発現量が増加し、*ADHI* センス鎖の発現量が低下することが明らかになった。こうした *ADHI* アンチセンス鎖の発現量増加は、立体障害によってセンス鎖の転写抑制を引き起こす可能性が考えられる。また、*C. utilis* が2本鎖RNAを分解する仕組みを有している場合、生成したアンチセンスRNAはADH1pの生産を低下させる可能性が考えられる。キシロース培地で *ADHI* のアンチセンス鎖の発現が増加しているかは不明であるが、グルコースが存在していないため、グルコース培養の定常期のように発現量が増加している可能性が考えられる。そのため、*ADHI* のセンス鎖の過剰生産はADH1p生産を増加させ、エタノール生産向上に結びついたものと推測される。

ADHI 過剰発現によるキシロース発酵性改善のもう1つの理由として、 NADH/NAD^+ 比の低下がグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(GAPDH、*C. utilis* では *TDHI* にコードされる)の反応性を向上させた可能性が考えられる。メタボローム解析の結果、WX菌体およびRX菌体ではGAP上流の解糖系中間体やNADHが蓄積していた(Fig. 3-2)。これは、GAPDHがキシロース利用の律速酵素であるこ

とを示唆している。しかしながら、*TDH1* の過剰発現はキシロースの発酵性や NADH/NAD^+ 比には影響を与えなかった (Table 3-3, Table 3-4, Fig. 3-7)。哺乳類や酵母の *GAPDH* は、細胞内の ATP 濃度や NADH 、活性酸素など様々な要因によって阻害を受けることが報告されている (70–72)。従って、*GAPDH* の反応性は、その酵素活性自体が低いからではなく、過度の NADH によって阻害されている可能性が考えられる。

キシロースで培養した *C. utilis* 組換え株では、糖新生、*ZWF1*、*GND1* などの酸化的ペントースリン酸回路に関わる遺伝子の発現量が増加していたため、これらの代謝フラックスが増加している可能性が考えられる (Fig. 3-5)。これらの遺伝子によってコードされるグルコース 6 リン酸脱水素酵素と 6 ホスホグルコン酸脱水素酵素は、反応に際し、 NADPH を発生するため、この代謝フラックスの増加は NADPH 蓄積を増加させる可能性がある。実際に *C. utilis* 組換え株では、 NADH だけでなく NADPH の蓄積も観察された。この代謝フラックスに関する予測は、*GAPDH* が阻害されている可能性があるという仮説と矛盾しないものである。

本章では、メタボローム解析とトランスクリプトーム解析を組み合わせ、代謝経路の律速段階の予測を行い、遺伝子操作することによってその予測の妥当性および解決法について検証を行った。この解析結果は、*C. utilis* の育種のみでなく、ヘミセルロース由来の糖質を利用する際に重要な情報となることが期待される。

Table 3-1 Strains and plasmids of *C. utilis* used in this study.

| Plasmids and strains | Relevant features | Reference or source |
|----------------------|---|---------------------|
| <i>C. utilis</i> | | |
| NBRC0988 | Wild type | NBRC |
| TMS174 | NBRC0988 <i>URA3::TDH1pr-mCsheXYL1 (K275R/N277D)-PGK1tr-TDH1pr-CsheXYL2-PGK1tr-TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | Chapter 1 |
| TMS174/Empty | TMS174 <i>URA3::pCU155</i> (multicopy integration) | This work |
| TMS174/ADH1 | TMS174 <i>URA3::pCU155-ADH1</i> (multicopy integration) | This work |
| TMS174/ADH2 | TMS174 <i>URA3::pCU155-ADH1</i> (multicopy integration) | This work |
| TMS174/TDH1 | TMS174 <i>URA3::pCU155-ADH1</i> (multicopy integration) | This work |
| Plasmids | | |
| pCU155 | <i>C. utilis</i> multicopy integration plasmid; <i>TDH1pr-TDH1tr</i> , <i>Cyh^R</i> marker, integration at <i>URA3</i> allele | 15 |
| pCU155-ADH1 | <i>TDH1pr-ADH1-TDH1tr</i> , <i>Cyh^R</i> cassette | This work |
| pCU155-ADH2 | <i>TDH1pr-ADH2-TDH1tr</i> , <i>Cyh^R</i> cassette | This work |
| pCU155-TDH1 | <i>TDH1pr-TDH1-TDH1tr</i> , <i>Cyh^R</i> cassette | This work |

Table 3-2 PCR Primers used in this study.

| Name | Sequence (5' to 3') |
|--------|------------------------------------|
| TM-411 | CTAGTCTAGATGGTTGCCATCAACAACCCATC |
| TM-414 | CGCGGATCCTCACAACGAATTCATCAGTGTAACC |
| TM-380 | CTAGACTAGTATGTCTGAGATTCCAAAGACGC |
| TM-381 | CGCAGATCTTCACTTGGAAGTGCAACAACAT |
| TM-415 | CTAGTCTAGATGTCAATTCCAAAGACACAGAAGG |
| TM-422 | CGCGGATCCTCATTTGGAAGTGCAACAACG |

Table 3-3 Intracellular NADH/NAD⁺ ratio in recombinant *C. utilis*.

| Strain | NADH/NAD ⁺ raio | |
|--------------|----------------------------|-------------|
| | YPD5 | YPX5 |
| TMS174/Empty | 0.69 ± 0.05 | 0.87 ± 0.09 |
| TMS174/ADH1 | 0.67 ± 0.04 | 0.71 ± 0.06 |
| TMS174/ADH2 | 0.95 ± 0.07 | 1.12 ± 0.09 |
| TMS174/TDH1 | 0.65 ± 0.06 | 0.91 ± 0.08 |

Data are mean values ± SD for three independent experiments.

Table 3-4 Batch fermentation of xylose by recombinant strains of *C. utilis*.

| Strain | Ethanol produced (g/L) | Xylitol produced (g/L) | Xylose consumed (g/L) | Yield (g product/g of consumed xylose) | | Time ¹⁾ (h) |
|--------------|------------------------|------------------------|-----------------------|--|---------------|------------------------|
| | | | | Ethanol | Xylitol | |
| TMS174/Empty | 13.2 ± 1.1 | 6.6 ± 0.5 | 45.4 ± 3.1 | 0.289 ± 0.012 | 0.146 ± 0.011 | 82 |
| TMS174/ADHI | 15.5 ± 0.9 | 5.2 ± 0.4 | 48.7 ± 2.9 | 0.318 ± 0.015 | 0.107 ± 0.007 | 96 |
| TMS174/ADH2 | 11.5 ± 0.8 | 4.5 ± 0.3 | 49.6 ± 4.5 | 0.232 ± 0.021 | 0.091 ± 0.007 | 144 |
| TMS174/TDHI | 12.8 ± 0.9 | 6.7 ± 0.4 | 45.1 ± 4.4 | 0.283 ± 0.011 | 0.150 ± 0.009 | 82 |

Fermentation parameters are summarized from data shown in Fig. 3-7.

Data are mean values ± SD for three independent experiments.

1) “Time” indicates when the ethanol concentration was maximal.

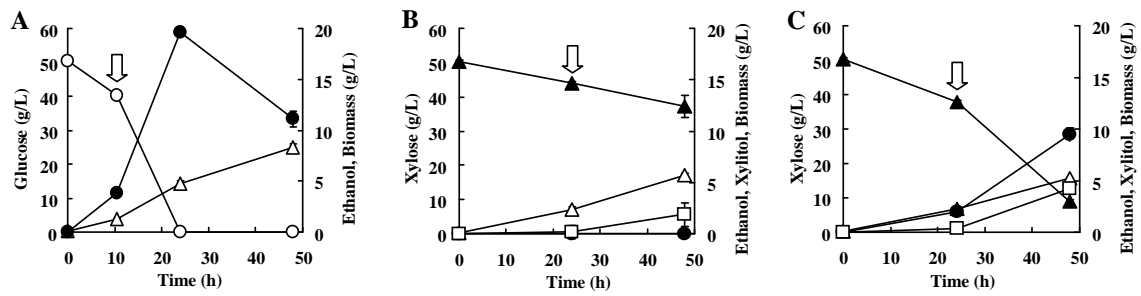


Fig. 3-1 Representative time course studies of semi-aerobic fermentations for wild type grown on glucose (A), xylose (B) and TMS174 grown on xylose (C).

Arrows indicate the time of quenching of cells. Symbols: glucose (opened circles), ethanol (closed circles), biomass (opened triangles), xylose (closed triangles) and xylitol (opened squares). Data are means from three (A and B) or two (C) independent fermentations, respectively.

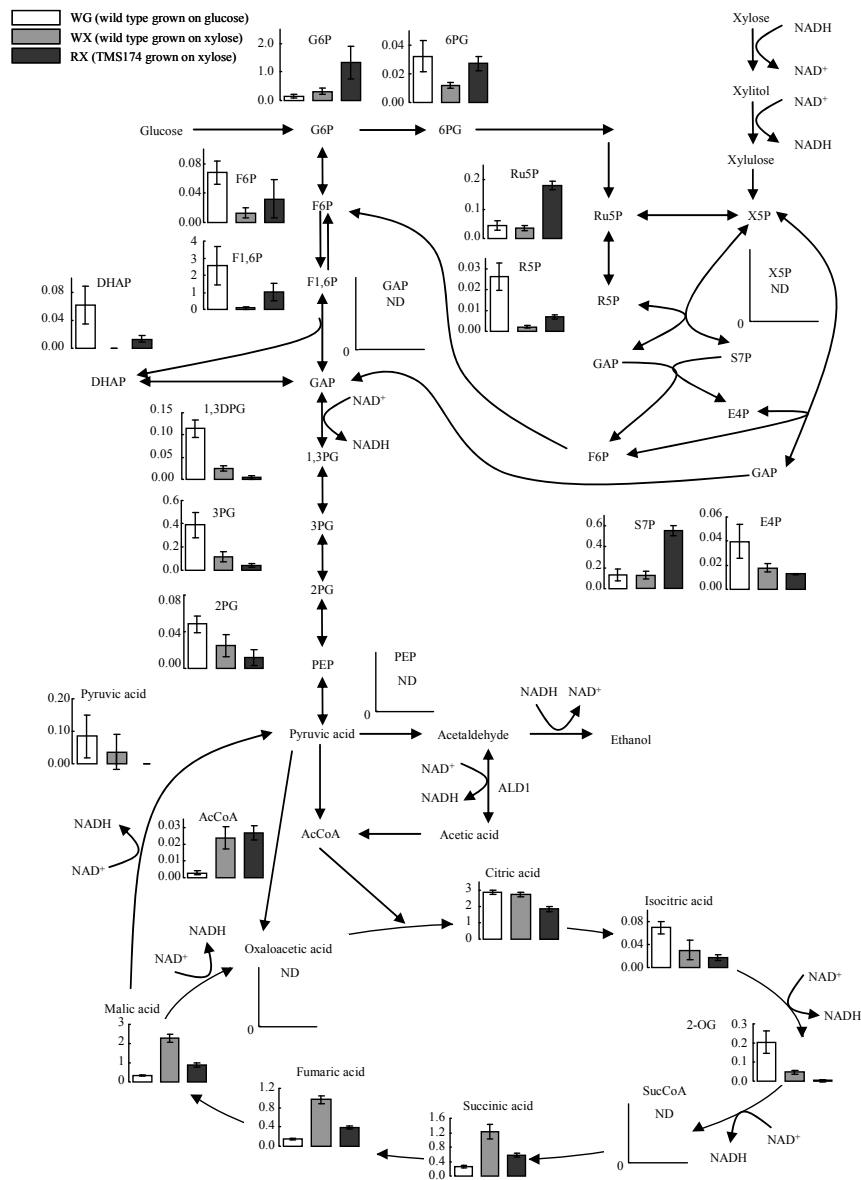


Fig. 3-2 Metabolites involved in central carbon metabolism.

Metabolomic data obtained for wild type grown on glucose, and for wild type and TMS174 grown on xylose are shown as bars from left to right, respectively. The arbitrary concentration of each metabolite is expressed as the ratio of the internal standard (methionine sulfone) to yeast biomass (an arbitrary amount of cells equivalent to $OD_{600}=10$). Three extractions from one sample were performed, and each extraction was analyzed by CE-TOF MS. Data are means of 6 to 9 samples (two or three independent growth experiments were performed, see Fig. 3-1 legend). Error bars indicate SD values. Abbreviations: 1,3PG, 1,3-bisphosphoglycerate; DHAP, dihydroxyacetonephosphate; E4P, erythrose-4-phosphate; F1,6P, fructose-1,6-bisphosphate; F6P, fructose-6-phosphate; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; 6PG, 6-phosphogluconate; 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; R5P, ribose-5-phosphate; Ru5P, ribulose-5-phosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate; X5P, xylulose-5-phosphate; ND, not detectable.

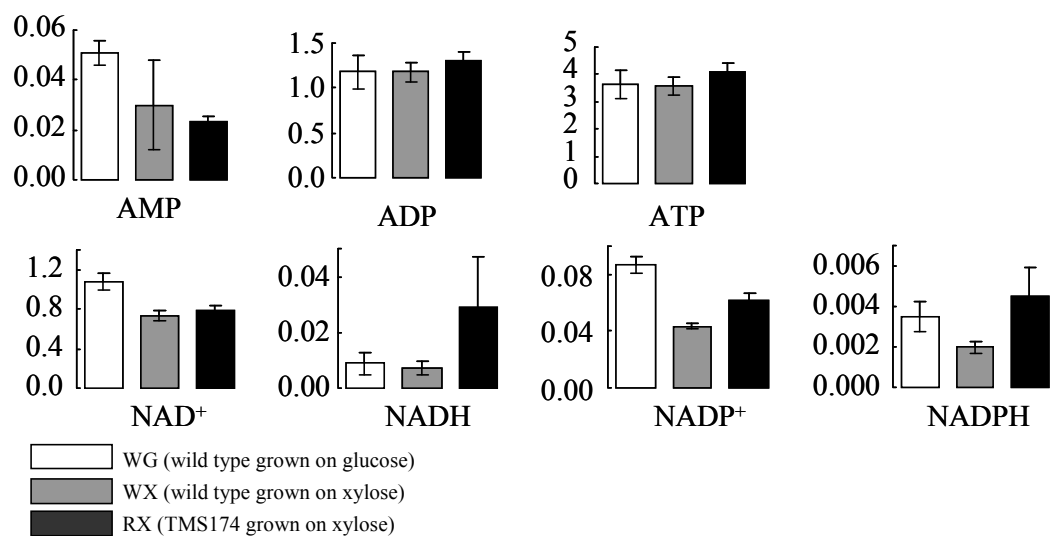


Fig. 3-3 Intracellular pools of high energy metabolites and NAD⁺, NADH, NADP⁺ and NADPH.

Metabolomic data obtained for a wild type strain grown on glucose, and for a wild type strain and TMS174 grown on xylose are shown as bars from left to right, respectively. One sample was extracted three times and each extraction was analyzed by CE-TOF MS. The arbitrary concentration of each metabolite was expressed as the ratio of the internal standard (methionine sulfone) to yeast biomass (an arbitrary amount of cells equivalent to OD₆₀₀=10). Data are means of 6 to 9 samples (two or three independent growth experiments were performed, see Fig. 3-1 legend). Error bars indicate SD values.

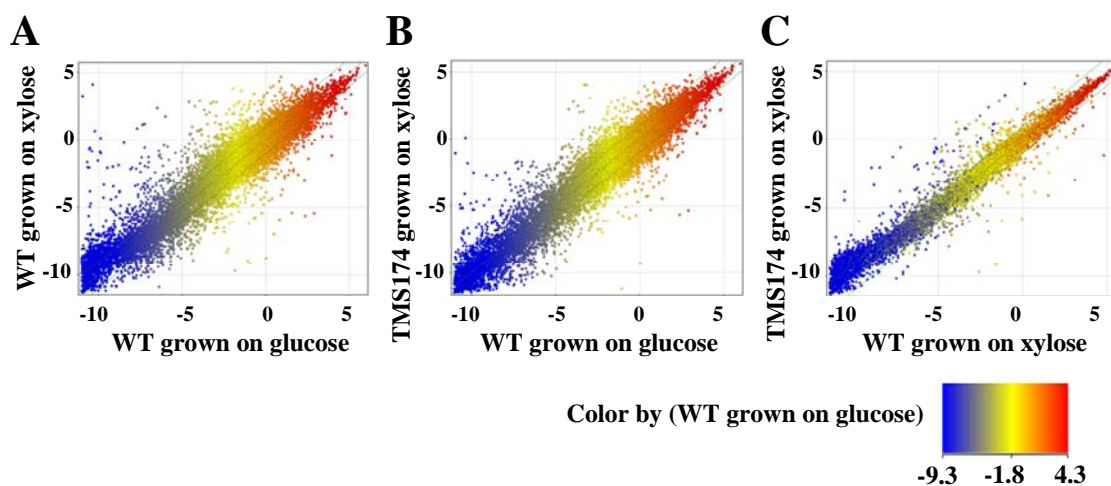


Fig. 3-4 Scatter Plot of Microarray Data.

Panels are scatter plots for comparing wild type strain grown on glucose versus wild type grown xylose (A), wild type grown on glucose versus TMS174 grown on xylose (B) and wild type grown on xylose versus TMS174 grown on xylose (C). Data are normalized intensities.

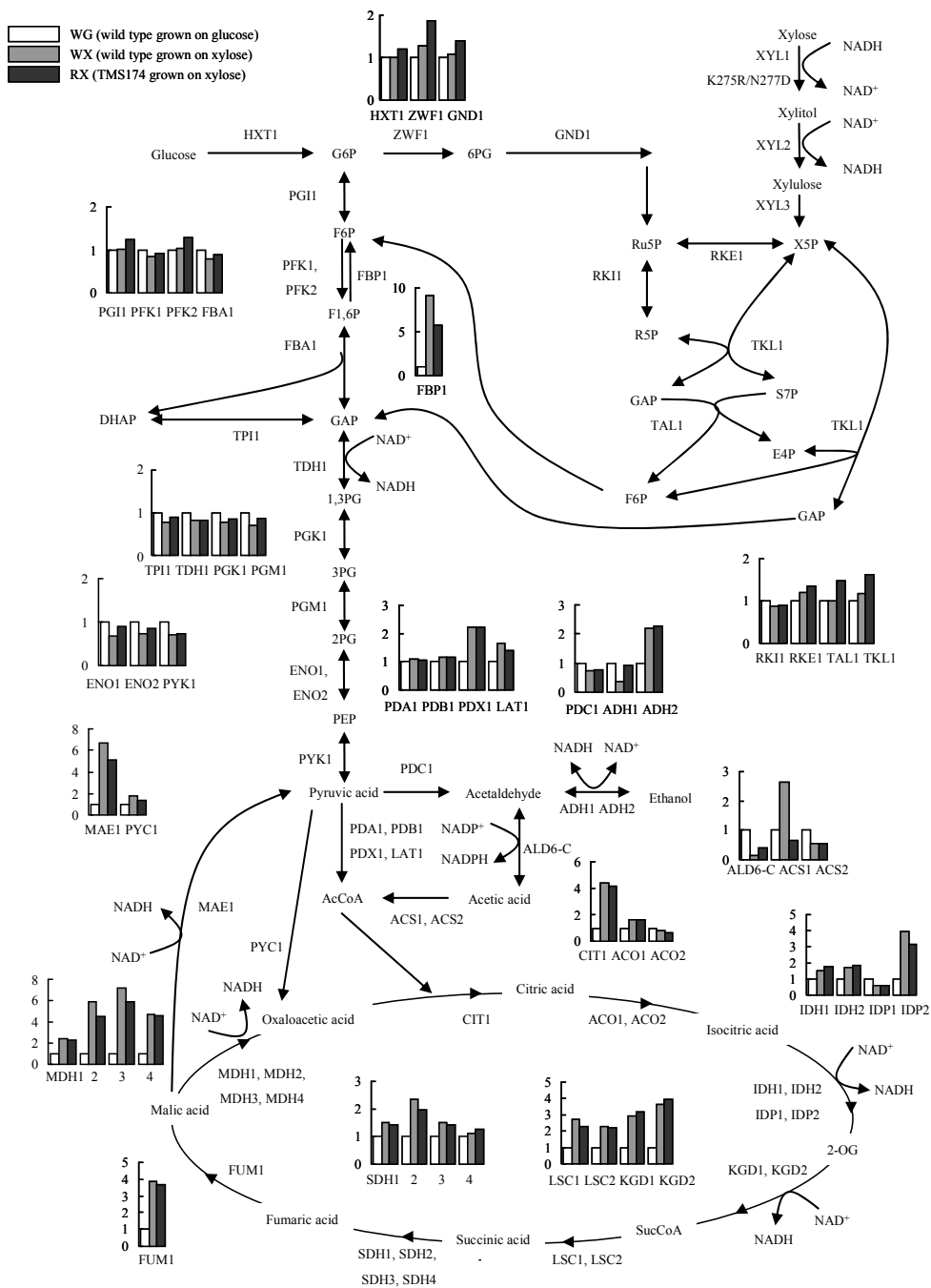


Fig. 3-5 Gene expression involved in central carbon metabolism.

Expression data obtained for a wild type strain grown on glucose, and for a wild type strain and TMS174 grown on xylose are shown as bars from left to right, respectively. *C. utilis* gene names were assigned based on homology to *S. cerevisiae* and *Candida albicans*. Transcript levels are shown as expression ratios to wild type grown on glucose. Data are means for 2 to 3 independent samples (see Fig. 3-1 legend).

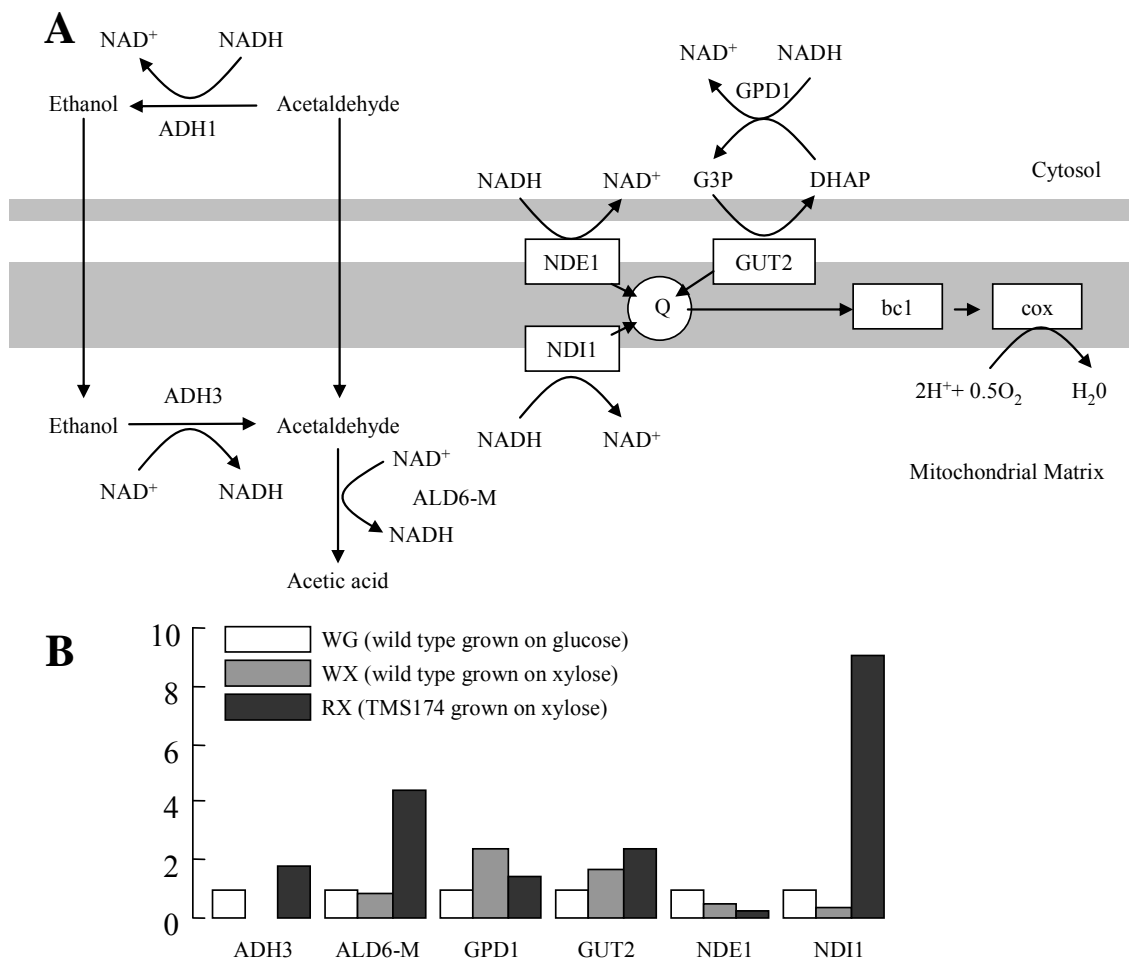


Fig. 3-6 A scheme for respiratory chain enzymes (A) and expression data for genes involved in NADH/ NAD⁺ cycling (B).

Data obtained for a wild type and TMS174 grown on xylose are shown as bars from left to right, respectively. Transcript levels are shown as expression ratios to wild type grown on glucose. Data are means for 2 to 3 independent samples (see Fig. 3-1 legend). Abbreviations: G3P, glycerol-3-phosphate; bc1, *bc1* complex; cox, cytochrome *c* oxidase. *C. utilis* gene names were assigned based on homology to *S. cerevisiae* and *C. albicans*.

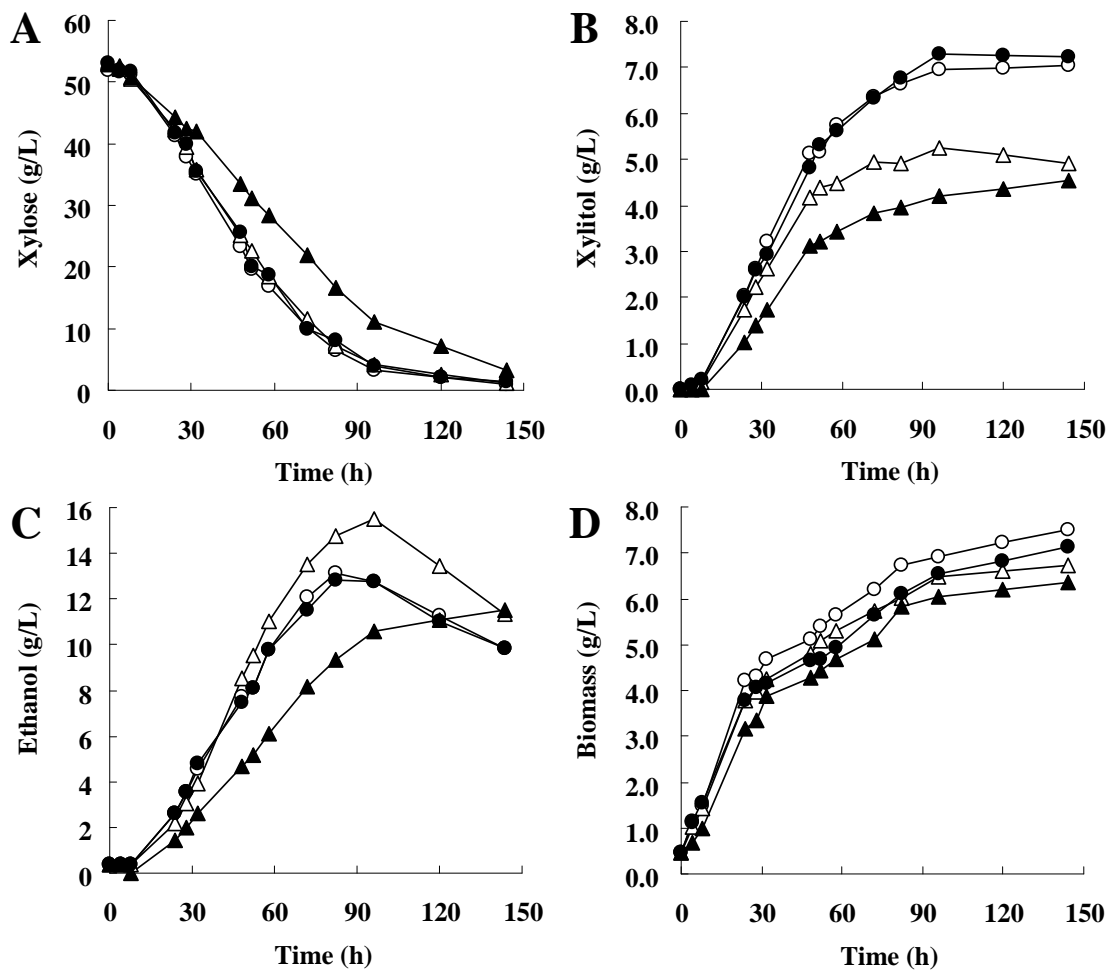


Fig. 3-7 Ethanol fermentation by recombinant *C. utilis* strains in YPX5 medium (50 g/L xylose).

Panels A, B, C and D show results for xylose consumption, xylitol accumulation, ethanol production and biomass production, respectively. Data are means for three independent fermentations with error bars indicating SD values. Symbols: TM174/empty (closed circles), TMS174/*TDH1* (open circles), TMS174/*ADH1* (open triangles) and TMS174/*ADH2* (closed triangles).

第4章 *Candida utilis*によるキシロースからの乳酸生産

第1節 序論

ポリ乳酸は、植物資源から生産することが可能であることに加え、ポリコハク酸ブチルやポリヒドロキシ酪酸のように自然界で分解され得るため、環境循環型プラスチックとして注目を集めている(73)。また、ポリ乳酸はガラス転移温度が室温以上であるため、他のグリーンプラスチックと比較しても強度や透明性が高いという特徴がある。そのため、ポリスチレン樹脂やPET樹脂の代替として期待されている。ポリ乳酸ボトルとPETボトルを比較すると、ガスバリア性、特に水蒸気バリア性が乏しいため、現段階で飲料ボトル等への展開は難しいとされている。しかし、耐熱性や耐衝撃性などについては、近年の技術進歩で解決されつつある。一例を挙げると、高光学純度のL-乳酸とD-乳酸のステレオコンプレックス型ポリ乳酸は融点や強度が向上することが知られており、高い強度や安定性が要求される用途においても使用可能であると言われている(73)。

こうしたポリ乳酸を汎用プラスチックとして大量生産するためには、そのモノマーユニットである高光学純度の乳酸を低コストで供給する必要がある。乳酸の発酵生産については乳酸菌や*Rhizopus oryzae*のような好気性糸状菌を用いるプロセスが一般的である(74-76)。しかしながら、乳酸菌の生産する乳酸はあまり光学純度が高くない場合が多く、増殖にホエーやコーンステーパーリカーなどの天然栄養源を必要とするという欠点がある(74, 75)。さらに耐酸性も低いことから、培養に際して厳密なpH制御が必要となる。*R. oryzae*の培養では、エタノールなどの副生を抑制するために溶存酸素を高く維持する必要があることから、操作が煩雑になるという問題がある(76)。そのため、本来乳酸をあまり生産しない微生物を代謝改変することによって、こうした課題を克服しようとする研究が精力的に行われている(77, 78)。酵母を宿主とした例としては、*S. cerevisiae*や*Kluyveromyces lactis*を用いる例が報告さ

れている(79-81)。酵母は極めて高い効率でエタノールを生産するため、乳酸を生産するよう改変する場合、エタノールの副生を抑制することが必須である。Ishidaらは、エタノール生産の鍵酵素である3つのピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子(*PDC*)のうち、2つが破壊され、かつ*Bos taurus*由来の乳酸脱水素酵素遺伝子(*L-LDH*)が導入された*S. cerevisiae*株を構築した(79)。この組換え株は、100 g/Lのグルコースを含む培地から高光学純度のL-乳酸を82.3 g/L 生産した。エタノールの副生量は2.8 g/L と低く、高い収率での乳酸の生産が実現された。しかし、*PDC*の破壊は重篤な糖消費速度の低下を引き起こし、この生産には192 時間を要した。*K. lactis*を用いた例においても同様であり(80, 81)、これら酵母株において十分な発酵速度で高収率を達成するためには課題があった。

バイオプラスチックにおいても、食料と競合しない原料からの生産は重要である。一部の乳酸菌や*R. oryzae*はキシロースから乳酸を生産することができるものの、収率や発酵速度は十分ではない(76)。また、前述したように多くの酵母はキシロースを利用することができない。乳酸生産とキシロース発酵という2つの課題が解決困難であるためか、これまでに*S. cerevisiae*を用いてキシロースから乳酸を生産したという報告はない。Ilmenらは、キシロース発酵性酵母である*P. stipitis*に*Lactobacillus helveticus*由来の*L-LDH*を導入することで酵母種によるキシロースからの乳酸生産を初めて達成した(82)。その組換え*P. stipitis*株はグルコース、キシロースのいずれからも乳酸を生産したが、*PDC*が破壊されていないためにエタノールの生産も認められ、乳酸の収率は約50%であった。また、乳酸生産速度、キシロース消費速度も低く、101 g/Lのキシロースを完全に消費するのに147時間を要した。

著者の所属する研究機関では、これまでに遺伝子改変した*C. utilis*を用いることで、グルコースから極めて高い効率でL-乳酸を生産することに成功している(83)。

*Cre-loxP*システムを用いて*PDC1*の完全欠損株を構築し、*B. taurus*由来の*L-LDH*が導

入された組換え株を構築した。この*pdcl*破壊株はそれほど重篤な増殖性の低下を示さず、109 g/Lグルコースを含む培地で103g/Lの高光学純度のL-乳酸を33時間で生産した。この時、エタノール生産量も検出限界以下まで低下していた。しかしながら、この*C. utilis*株はキシロースから乳酸を生産することはできなかった。そこで本章では、キシロースからL-乳酸を生産する*C. utilis*株の構築に着手した。

第2節 材料と方法

1. 使用菌株

乳酸生産能が付与された組換え株として*C. utilis* Pj0957株を用いた(83)。本株は*PDC1*が欠損し、*B. taurus*由来*LDH*が*PDC1*座に2コピー導入されている。キシロース発酵能を付与するための親株として、Pj0957株から得られたマーカフリー株を用いた。構築した*C. utilis*株はTable 4-1に示した。プラスミド増幅用の大腸菌宿主については第1章に記載した。

2. 培地

- YPD2培地：酵母基本増殖用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、20 g/Lグルコース

固体培地には終濃度20 g/Lのアガーを添加した。形質転換体の選抜には終濃度600 mg/LとなるようにHygを添加した培地を用いた。

- YPD5培地：酵母発酵試験前培養用、酵素活性測定用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lグルコース

- YPX5培地：酵母発酵試験前培養用、酵素活性測定用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lキシロース

- YPX10C培地：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、100 g/Lキシロース、45 g/L炭酸カルシウム

・ ビール仕込粕糖化液：酵母発酵試験用培地

ビール仕込粕は、キリンビール株式会社(Yokohama, Japan)より分譲を受けた。ビール仕込粕糖化液は、希硫酸/酵素法によって調製した。100 g/Lビール仕込粕を0.6 N硫酸で90°C、3時間処理し、5 N水酸化ナトリウムでpH 5.0となるように中和した。その後、市販セルラーゼNS50010およびNS50013 (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark)により、50°C、24時間糖化を行った。得られた糖化液に終濃度45 g/Lとなるように炭酸カルシウムを添加し、発酵試験用の培地とした。

・ LB培地：大腸菌用培地

10 g/Lトリプトン、5 g/L酵母エキス、10 g/L塩化ナトリウム

固体培地には終濃度15 g/Lのアガーを添加した。形質転換体の培養には終濃度100 mg/Lとなるようにアンピシリンを添加した培地を用いた。

3. プラスミド

・ pVT164 : *CsheXYL1-CsheXYL2-PsXYL3*発現ベクター

・ pVT168 : *mCsheXYL1 (K275R/N277D)-CsheXYL2-PsXYL3*発現ベクター

各発現ベクターの構築については第 1 章に記載した。pVT164 は、*CsheXR*、*CsheXDH*、*PsXK* をコードする *CsheXYL1*、*CsheXYL2*、*PsXYL3* の発現ベクターである。pVT168 は pVT164 の *CsheXR* 遺伝子が NADH 要求型の変異体(*CsheXR* K275R/N277D)遺伝子に置き換わっている。本実験で使用したプラスミドは Table 4-1 に示した。

4. *C. utilis*の形質転換

*C. utilis*の形質転換の試料として、*NotI/ApaI*で処理されたプラスミドDNAを用い

た。形質転換は第1章に記載した方法に従って実施した。

5. 粗酵素液の調製と酵素活性測定

第1章に記載した方法に従って実施した。

6. 発酵試験

OD₆₀₀の測定には、GeneQuant 1300 spectrophotometer (GE Healthcare, England, UK)を用いた。特に記載がない場合、前培養としてYPD2培地で30°C、24時間好気培養した菌体を用いた。30 mLの発酵用培地を入れた100 mL容の三角フラスコを用いて、初発OD₆₀₀ = 10、30°C、100 rpmで培養を行い、培養上清の生産物濃度、キシロース濃度を分析した。なお、OD₆₀₀ = 1の培養液は、1 Lの培養液あたり約0.46 gの乾燥菌体を含んでいる。

7. 分析方法

キシロース、キシリトール、エタノールの定量は、第1章に記載した方法に従って実施した。L-乳酸の定量はBiochemistry Analyzer YSI-2700 system (YSI Inc. YellowSpring, OH)、D-乳酸の定量はF-kit (JK International, Tokyo, Japan)のプロトコールに従って行った。

8. 塩基配列番号

CsheXYL1、*CsheXYL2*、*PsXYL3*の塩基配列登録番号は第1章に記載した。

第3節 結果

1. 異種キシロース代謝酵素を発現する乳酸生産株の構築

全て野生型のキシロース代謝酵素遺伝子が導入された乳酸生産株を TMS195 株、補酵素要求性が NADH 型に変換された CsheXR K275R/N277D を含む酵素群が導入された株を TMS196 株とした。Table 4-2 に示したように、異種キシロース代謝酵素を発現する株は、キシロース培地で培養したコントロール株と比較して極めて高い XR、XDH、XK 活性を示した。TMS196 株においては、TMS195 株と比較して NADH 存在下での XR 活性が向上していたが、NADPH 存在下では低下していた。また、YPX5 培地での増殖は、それぞれの組換え株において大きな差は認められなかった (data not shown)。

2. 組換え株によるキシロースからの乳酸生産

異種キシロース代謝酵素群の導入および補酵素要求性が NADH 型に変換された XR の導入がキシロースからの L-乳酸生産に与える影響を解析するために、YPX10C 培地での L-乳酸生産能を評価した。異種のキシロース代謝酵素が導入された TMS195 株、TMS196 株では、コントロール株と比較してキシロースの消費速度が大きく向上しており、それに伴い、L-乳酸生産も大きく向上した (Fig. 4-1)。培養 75 時間後、コントロール株では L-乳酸がわずか 2.9 g/L しか生産されなかったのに対し、TMS195 株では 43.8 g/L が生産された。しかしながら、TMS195 株においては多量のキシリトールも副生していた (25.4 g/L)。一方、TMS196 株は XR の補酵素要求性の変換によってキシリトールの副生が大きく低下しており (3.8 g/L)、L-乳酸生産は 67.2 g/L まで向上していた。これらの結果は、キシロースの還元反応、キシリトールの脱水素反応において NAD^+ をリサイクルすることがキシロースからの L-乳酸の生産においても極めて重要であることを示唆するものである。また、これらの組換え株において、エタノール、酢酸、グリセロール、D-乳酸はそれぞれ検出限界以下であり、得られた L-乳酸の光学純度は 99.9% 以上だった。

3. 乳酸生産のための培養最適化

TMS196 株のキシロースからの L-乳酸生産を改善するために、最適な発酵条件を調査した。最初に、発酵における温度の影響を検討した。30℃、35℃、40℃で発酵試験を実施したところ、35℃で最も高い L-乳酸の生産性を示した。40℃では 30℃より高い収率を示したが、生産速度は低かった(Table 4-3)。

L-乳酸生産量を改善する他の方法として、前培養の炭素源に注目した。YPD5 培地もしくは YPX5 培地で前培養した菌体を用いて 35℃で発酵試験を実施したところ、YPX5 培地で前培養をしたときの方が、YPD5 培地で前培養したときよりも 32% L-乳酸生産量が高かった(Table 4-3)。しかしながら、各培地間で L-乳酸収率に変化は見られなかった。

C. utilis は *S. cerevisiae* とは異なりクラブツリー効果陰性酵母であることから、糖によって呼吸が抑制されないことが知られている(8)。従って、厳密な好気条件では効率的な菌体増殖が可能である。そこで、次に高密度培養による L-乳酸生産について検討した。初発 OD₆₀₀ を 20 に設定した条件で、L-乳酸の収率は極めて増加した。本条件では、105 g/L のキシロースから 93.9 g/L の L-乳酸を培養 43 時間で生産した (Table 4-3)。発酵前に 6.8 だった pH は 3.9 に低下していた。その際にエタノール、グリセロール、酢酸の顕著な蓄積は認められなかった。

4. ビール仕込粕糖化液からのL-乳酸生産

最後に、非可食系バイオマスのモデルとして、ビール仕込粕糖化液を用いて発酵試験を行った。ビール仕込粕は、ビール製造において麦汁を得る際に生じる麦粕であり、18%がセルロース、29%がアラビノキシランによって構成される草本系バイオマスである。このビール仕込粕を希硫酸と市販セルラーゼ処理することによって

得られたビール仕込粕糖化液は、25.8 g/L グルコース、20.5 g/L キシロース、10.3 g/L アラビノースを含んでいた。構築したキシロース発酵性乳酸生産 *C. utilis* 株を用いて発酵試験を実施したところ、培養72時間でビール仕込粕糖化液から36.0 g/L のL-乳酸を生産された(Fig. 4-2)。この時、消費した糖に対するL-乳酸収率は77.7%だった。このように、*C. utilis* は実験室用の培地だけでなく、実際のバイオマスからも効率的に乳酸を生産できることが明らかになった。

第4節 考察

著者が知る限り、本章の取り組みは、酵母種でエタノールやキシリトールの副生を抑え、乳酸の高生産を達成した初めての報告である。本研究によって、補酵素要求性が NADH 型に変換された *CsheXR* と *CsheXDH*、*PsXK* を導入することにより、キシロースから乳酸をも高生産できることが明らかになった。また、培養条件を検討することにより *TMS196* 株は最終的に培養 43 時間で 105 g/L のキシロースから 93.9 g/L の L-乳酸を生産することが明らかになった。

CsheXR の補酵素要求性の変換は、エタノールだけでなく L-乳酸を生産するように遺伝子改変された酵母株においても、乳酸の生産性向上とキシリトール蓄積量低下に有効であった(Fig. 4-1)。著者は第 1 章で、*CsheXR* K275R/N277D、*CsheXDH*、*PsXK* を 1 コピーずつ野生株に導入した場合、そのキシロースからのエタノール収率は充分ではなかったことを示した。本章における大きな疑問の 1 つは、第 1 章と同じベクターを使用しているにも関わらず、乳酸生産株に導入した場合、構築株のキシロースからの乳酸収率が極めて高いのはなぜか、ということである。キシロースからのエタノール生産の場合、細胞内の補酵素バランスが適正に保たれるためには、*XR* と *XDH*、また *GAPDH* と *ADH* の反応において補酵素がリサイクルされる必要がある。しかし、第 3 章で示したように、*ADH* の逆反応はこのリサイクルを

乱す要因となり得る。一方、乳酸生産の場合は、*PDC1* が破壊されているため、ADH の代わりに LDH が NAD^+ の再酸化に関わる。使用している LDH はピルビン酸に高い親和性を有していることが報告されており、LDH の逆反応は起こりにくいと予想される(84)。また、生産された L-乳酸は細胞外で乳酸塩を形成する。培地の pH が中性に近い環境では、細胞外へ一度排出された乳酸が再度細胞内に取り込まれるためにトランスポーターを介する必要があるため、こうした取り込みの反応が LDH 逆反応の律速となる可能性がある(85)。さらに、内在性の乳酸資化酵素(*CYB2*)はその反応に NAD^+ ではなくシトクロム b2 を利用するため、その発現は細胞内 NADH/NAD^+ 比に与える影響は少ないと考えられる(86)。これらの要因により、乳酸生産時には乳酸からピルビン酸を生産する反応が極めて起こりにくい環境となっていることが予想される。多くの酸化還元反応は可逆反応である。従って、細胞内 NADH/NAD^+ 比を適正に保ちつつ、目的物質の高生産を達成するためには、意図しない逆反応を抑制することも重要かもしれない。

キシロースでの前培養はキシロースからのL-乳酸生産速度を増加させたが、L-乳酸収率は増加させなかった(Table 4-3)。導入したキシロース代謝酵素の活性は、キシロース培地とグルコース培地で変化がなかった(Table 4-2)。従って、これは内在性代謝経路のキシロースへの馴化が要因と考えられる。例えば、*C. utilis* をグルコースもしくはキシロースを炭素源として培養した際には、それぞれの培地でキシロース低親和性トランスポーターと高親和性トランスポーターが発現することが報告されている(61)。従って、炭素源としてキシロースを含む培地で前培養することで、キシローストランスポーター等の内在性遺伝子の発現が変化し、予めキシロース利用に適した代謝変化が起こったことで、本培養時間が短縮されたものと考えられる。

C. utilis は酵母種の中でも最も高い呼吸活性を有しており(8)、その特性を利用した高密度培養による様々な物質の高生産が報告されている。これまで報告されてい

る高密度培養では、グルタチオンや異種タンパク質など、菌体の好気増殖に依存する細胞内物質の生産がほとんどである(15, 16, 87)。本章の取り組みでは、高密度培養により、キシロースからの乳酸生産収率を高めることに成功した(Table 4-3)。乳酸のような代謝物の高生産も可能であったのは、*C. utilis* の増殖フェイズと発酵フェイズが溶存酸素量で容易に制御可能であったことに起因すると考えられる。

TMS196 株は、ビール仕込粕から 77.7%の収率で L-乳酸を生産した(Fig. 4-2)。しかしながら、その生産速度は合成培地を用いた場合と比較しても、明らかに低下していた。その要因の 1 つとして、発酵阻害物質の存在が挙げられる。本章で採用した希硫酸による前処理法では、フルフラールや酢酸などの様々な発酵阻害物質が生産されることが報告されている(88, 89)。さらに、中和後に発生する 0.6 M の硫酸塩もまた発酵に影響を与えていると考えられる。こうした草本系バイオマスを効率的に利用するためには、最適な菌株の育種に加え、適切な前処理方法の検討も必要であると考えられる。

著者の研究により、*C. utilis*を用いてキシロースから極めて高い収率でL-乳酸を生産することが可能となった。最終株であるTMS196株のパフォーマンスは、Ilemenらの報告と比較して、約3倍の発酵速度、約1.5倍の収率である。乳酸菌群の中にもキシロースから乳酸を生産できるものは存在するが、酵母は低pH耐性を持つという強みがある。例えば、*C. utilis*はpHが3.4に保たれた最小培地(100 g/Lのグルコース、6.7 g/Lのyeast nitrogen base)で初期OD₆₀₀ = 0.1とし培養を開始した条件においても、70.8%の収率でL-乳酸を生産することが可能であった。本章での結果は、酵母の持つ有用性を示し、さらなる組換え酵母の利用に大きな期待を抱かせるものと考えられる。

Table 4-1 Strains and plasmids of *C. utilis* used in this study.

| Plasmids and strains | Relevant features | Reference or source |
|----------------------|---|---------------------|
| <i>C. utilis</i> | | |
| Pj0957 | NBRC0988 <i>pdclΔ4::L-LDH</i> | 83 |
| TMS195 | Pj0957 <i>URA3::CsheXYL1-CsheXYL2-PsXYL3</i> | This work |
| TMS196 | Pj0957 <i>URA3::mCsheXYL1 (K275R/N277D)-CsheXYL2-PsXYL3</i> | This work |
| Plasmids | | |
| pVT164 | <i>TDH1pr-CsheXYL1-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-CsheXYL2-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | Chapter 1 |
| pVT168 | <i>TDH1pr-mCsheXYL1 (K275R/N277D)-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-CsheXYL2-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-PsXYL3-PGK1tr</i> | Chapter 1 |

Table 4-2 Activities of XR, XDH and XK in cell extracts obtained from recombinant *C. utilis* strains.

| Strain | Medium | XR (U/mg protein) | | XDH (U/mg protein) | XK (U/mg protein) |
|--------|--------|-------------------|-------------|-----------------------|----------------------|
| | | NADH | NADPH | | |
| Pj0957 | YPD5 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.18 ± 0.01 |
| | YPX5 | 0.00 ± 0.00 | 0.04 ± 0.00 | 0.07 ± 0.01 | 0.19 ± 0.02 |
| TMS195 | YPD5 | 0.44 ± 0.02 | 0.61 ± 0.06 | 2.55 ± 0.28 | 0.33 ± 0.02 |
| | YPX5 | 0.45 ± 0.02 | 0.55 ± 0.06 | 2.74 ± 0.33 | 0.39 ± 0.03 |
| TMS196 | YPD5 | 0.67 ± 0.03 | 0.19 ± 0.03 | 2.91 ± 0.13 | 0.32 ± 0.02 |
| | YPX5 | 0.71 ± 0.05 | 0.18 ± 0.01 | 3.11 ± 0.22 | 0.37 ± 0.09 |

Each enzyme activity was measured in extracts from log growth phase cells (24-h samples). Data are mean values ± SD for three independent experiments.

Table 4-3 Effect of cell and culture conditions on the production of L-lactic acid from xylose using TMS196.

| Medium of preculture | Temperature | Initial OD ₆₀₀ | L-Lactic acid produced (g/L) | Xylose consumed (g/L) | Yield (g/g consumed xylose) | L-Lactic acid production rate (g/L/h) |
|----------------------|-------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| YPD5 | 30°C | 10 | 35.6 ± 1.4 | 53.9 ± 0.7 | 0.69 ± 0.16 | 0.89 ± 0.06 |
| YPD5 | 35°C | 10 | 55.0 ± 2.1 | 70.5 ± 0.9 | 0.78 ± 0.14 | 1.22 ± 0.04 |
| YPD5 | 40°C | 10 | 20.8 ± 2.1 | 28.9 ± 0.9 | 0.72 ± 0.12 | 0.53 ± 0.02 |
| YPX5 | 35°C | 10 | 66.7 ± 1.4 | 84.1 ± 2.1 | 0.79 ± 0.13 | 1.62 ± 0.11 |
| YPX5 | 35°C | 20 | 93.9 ± 1.5 | 103.2 ± 1.9 | 0.91 ± 0.13 | 2.18 ± 0.13 |

YPD5 or YPX5 was used as the pre-culture medium. Xylose consumption, and L-lactic acid concentrations and yields were measured after 43-h batch fermentations. Data are mean values ± SD for three independent experiments.

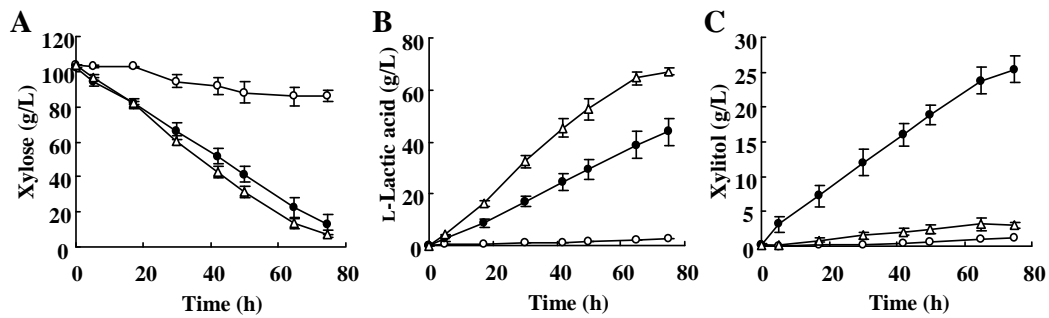


Fig. 4-1 L-Lactic acid production from xylose using recombinant *C. utilis* strains in YPX10C medium.

Concentrations of xylose (A), L-lactic acid (B) and xylitol (C) in fermentation are shown. Symbols: opened circles, Pj0957; closed circles, TMS195; opened triangles, TMS196. Data are mean values from three independent fermentation experiments. Error bars indicate SD values.

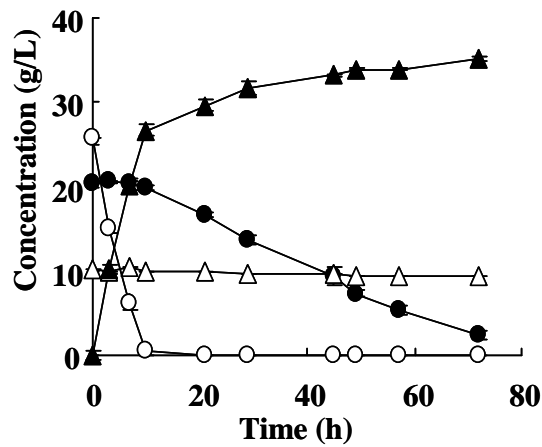


Fig. 4-2 L-Lactic acid production by recombinant *C. utilis* TMS196 strain in the spent grains hydrolysate.

Symbols: opened circles, glucose; closed circles, xylose; opened triangles, arabinose; closed triangles, L-lactic acid. Data are mean values from three independent fermentation experiments. Error bars indicate SD values.

第5章 *Candida utilis*によるイソプロパノール生産

第1節 序論

イソプロパノールは、微生物によって生産できる最も単純な2級アルコールの1つである。イソプロパノールは脱水反応によりプロピレンへと変換できることから、溶剤だけでなく、ポリプロピレンを原料としたプラスチック製品の基幹物質としても利用価値がある。バイオマスからの溶剤生産は、19世紀初頭に実施されたことがある。ある種のクロストリジウム属細菌は、アセトン、ブタノール、エタノールを同時に生産する(90)。このとき生産されるアセトンは、細胞内のアセチル CoA を原料としている(91-93)。アセチル CoA は、アセチル CoA アセチル基転移酵素 (ACoAAT、*C. utilis* では *ERG10* にコードされる)により、アセトアセチル CoA に変換され、次にアセトアセチル CoA 転移酵素(ACoAT、*Clostridium acetobutylicum* では *ctfAB* にコードされる)により、アセト酢酸に変換される。アセト酢酸はアセト酢酸脱炭酸酵素(ADC、*Clostridium beijerinckii* では *adc* にコードされる)によってアセトンに変換される。これらの中でも *C. beijerinckii* などある菌種においては、さらに2級アルコール脱水素酵素(SADH、*C. beijerinckii* では *sash* にコードされる)により、アセトンはイソプロパノールにまで還元される(94)。Chen らは 52 種のクロストリジウム属細菌の中で、*C. beijerinckii* が最も多量の 1.8 g/L のイソプロパノールを生産することを報告した(95)。しかしながら、これらの細菌は酪酸やアセトン、ブタノール、エタノールなど様々な副産物を同時に生産する(90)ため、高純度のイソプロパノールを生産するためには厳密な精製の工程が必要となるという課題があった。こうした課題を克服するために、組換え大腸菌を用いたイソプロパノール生産が Hanai ら、Jojima らによって報告された(96, 97)。この時作製された組換え株はそれぞれ 4.9 g/L、14 g/L のイソプロパノールを生産し、それぞれの収率は 43%、51% であった。また、Inokuma らは、組換え大腸菌のイソプロパノール生産の最適化を

実施し、ガスストリッピング再生システムを用いた半回分培養により 143 g/L のイソプロパノールが生産できたと報告している(98)。

S. cerevisiae を含め、これまで酵母でイソプロパノールを生産した報告はなされていない。*C. utilis* は呼吸活性に優れていることから、著者は、この酵母株はエタノールの副生を押さえつつ、高いイソプロパノール生産性を達成できるポテンシャルを有していると考えた。そこで、本章では、*C. utilis* を用いてグルコースからイソプロパノールを生産する代謝工学を実施した。

第2節 材料と方法

1. 使用菌株

C. utilis 野生株としてATCC15239株を用いた。それ以外の*C. utilis*株については、Table 5-1に示した。第1章に記載した大腸菌をプラスミド構築用宿主として用いた。

2. 培地

- YPD2培地：酵母基本増殖用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、20 g/Lグルコース

固体培地には終濃度20 g/Lのアガーを添加した。必要に応じて形質転換体の選抜に終濃度600 mg/L Hyg、200 mg/L ジェネティシン(G418)、60 mg/L Cyhをそれぞれ添加した培地を用いた。

- YPD10培地：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、100 g/Lグルコース

- YPD10C培地：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、100 g/Lグルコース、40 g/L炭酸カルシウム

- YPD5C培地：酵母発酵試験用培地

20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、50 g/Lグルコース、40 g/L炭酸カルシウム
半回分培養試験においては、48時間おきに3回、終濃度50 g/Lとなるように固体グル
ルコースを添加した。

・ LB培地：大腸菌用培地

10 g/Lトリプトン、5 g/L酵母エキス、10 g/L塩化ナトリウム
固体培地には終濃度15 g/Lのアガーを添加した。形質転換体の選抜には終濃度100
mg/Lとなるようにアンピシリンを添加した培地を用いた。

3. プラスミド

プラスミド構築のための基本的な実験方法は、第1章に記載した方法に従って実
施した。使用したプライマーはTable 5-2に、構築したプラスミドはTable 5-1に示し
た。

・ pVT239 : *LYS2*座組込み型ベクター

*LYS2*上流 (-994から+380) および下流 (+1441から+2768) 配列は、*C. utilis*のゲノ
ムDNAを鋳型として、TM-168/TM-169およびTM-170/TM-171のプライマーセットを
用いてそれぞれ増幅した。増幅した2つのDNA断片を混合し、TM-168/TM-171のプ
ライマーセットを用いてオーバーラップPCRを行い、得られたPCR産物を
pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) にクローニングした。*XhoI*処理に
よって得られた*LYS2*配列を含む約2.7 kbpのDNA断片を、pUC119 (TakaraBio) の*SalI*
サイトにクローニングし、pVT202とした。G418耐性遺伝子カセットは、pCU595(19)
を鋳型として、TM-115/TM-116プライマーセットを用いて増幅した。得られたPCR
産物を*SpeI*および*ClaI*処理した後、同制限酵素で処理したpVT202にクローニングし、
pVT239とした。pVT239は*LYS2*上流配列、*SpeI*サイト、G418耐性遺伝子カセット、

*LYS2*下流配列をこの順番で有している。

- ・ pVT92-ctfAB : *URA3*座組込み型*ctfA*、*ctfB*発現ベクター
- ・ VT239-*adc-sadh* : *LYS2* 座組込み型 *adc*、*sadh* 発現ベクター

イソプロパノール生産に関わる *C. acetobutylicum ctfA*、*ctfB*、*C. beijerinckii adc*、*sadh* は、*Pichia jadinii* のコドン使用頻度を基に TakaraBio 社に全合成を依頼した(*C. utilis* は *P. jadinii* アナモルフとされている)。コドン使用頻度は、Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)を参照した。納品されたプラスミドから、*XbaI/BamHI* 処理により、*ctfA*、*ctfB*、*adc*、*sadh* の DNA 断片を回収した後、同制限酵素で処理した pVT92(第1章)にクローン化し、pVT92-*ctfA*、pVT92-*ctfB*、pVT92-*adc*、pVT92-*sadh* を作製した。pVT92-*ctfB* を *NheI/SpeI* 処理して得られた *ctfB* 発現カセットを含む DNA 断片を *SpeI* 処理した pVT92-*ctfA* にクローン化し、pVT92-*ctfAB* を作製した。また、pVT92-*sadh* を *NheI/SpeI* 処理して得られた *sadh* 発現カセットを含む DNA 断片を *SpeI* 処理した pVT92-*adc* にクローン化し、pVT92-*adc-sadh* を作製した。pVT92-*adc-sadh* を *NheI/SpeI* 処理して得られた *adc* 発現カセットと *sadh* 発現カセットを含む DNA 断片を *SpeI* 処理した pVT239 にクローン化して VT239-*adc-sadh* とした。

- ・ *ACS1*、*ACS2*、*ALD6-C*、*ERG10* の多コピー組込み型ベクター

アセチルCoA合成酵素1、アセチルCoA合成酵素2、アセトアルデヒド脱水素酵素、アセチルCoAアセチル基転移酵素 をコードする遺伝子 (*ACS1*、*ACS2*、*ALD6-C*、*ERG10*) のDNA断片は、*C. utilis*ゲノムDNAを鋳型としたPCRによって増幅した。それぞれの増幅には、TM-376/TM-377、TM-376/TM-377、TM-385/TM-386、TM-235/TM-236のプライマーセットを用いた。pCU155は*TDH1pr*、*TDH1tr*、*Cyh*耐

性遺伝子カセットを有する*URA3*座を標的とした多コピー組込み型ベクターである(15、第2章、第3章)。得られた*ACS1*、*ACS2*、*ALD6-C*、*ERG10*のDNA断片を*XbaI/BamHI*処理したpCU155にそれぞれクローニングし、pCU155-*ACS1*、pCU155-*ACS2*、pCU155-*ALD6-C*、pCU155-*ERG10*とした。

4. *C. utilis*の形質転換と菌株構築

形質転換は第1章に記載した方法に従って実施した。*C. utilis* ATCC15239株の*PDC1*の破壊は、*Cre-loxP*システムを用いたIkushimaらの方法(19)に従って行った。イソプロパノール生産に関わる遺伝子がクローン化されたpVT92-ctfAB、VT239-*adc-sadh*をそれぞれ*BglIII*もしくは*NotI*で消化した後、*C. utilis* ATCC15239株、あるいはその*pdcl*破壊株の形質転換に使用した。

内在性遺伝子過剰発現のために、pCU155-*ACS1*、pCU155-*ACS2*、pCU155-*ALD6-C*、pCU155-*ERG10*はそれぞれ*BglIII*で消化した後、イソプロパノール生産株(TMS272株)の形質転換に使用した。

*ACS2*と*ERG10*を同時に過剰発現する株の構築には、カクテルマルチコピー導入法(第2章)を用いた。*BglIII*で消化したpCU155-*ACS2*、pCU155-*ERG10*を1:1のモル比で混合し、*C. utilis*イソプロパノール生産株(TMS272株)を形質転換した。適宜回復培養を行った後、*Cyh*を含む選択培地に塗布して、30°Cで3日間培養を行った。形質転換プールより得られた40クローンの推定組換え株をYPD2培地で30°C、24時間好気培養した。100 µLの前培養液を5 mLのYPD10C培地(ガラス試験管)に接種し、30°C、120 rpmで振とう培養した。培養72時間後のイソプロパノール濃度を分析し、最も生産性が高い株を選抜した。

5. 導入コピー数の定量

第2章に記載した方法に従い、組換え体に導入されたそれぞれの遺伝子コピー数を Real-time PCR で定量した。導入された総コピー数を定量するために、TM-435/TM-436 のプライマーセットを用いて、各発現カセットをドライブしている *TDH1tr* 配列を増幅した。また、*ACS2* と *ERG10* の導入コピー数を定量するために、TM-478/TM-479 と TM423/TM-424 のプライマーセットをそれぞれ用いた。各組換え体ゲノム上のコピー数は、ATCC15239 株が2倍体であると仮定して算出した。

6. 粗酵素液の調整と酵素活性測定

粗酵素液の調製は、第1章に記載した方法に従って実施した。ピルビン酸脱炭酸酵素(PDC)、アセトアルデヒド脱水素酵素(ALDH)、アセチル CoA 合成酵素(ACS)、アセチル CoA アセチル基転移酵素(ACoAAT)の活性測定は、過去の報告に従って行った(99–102)。30°Cで起こる NAD(P)H の酸化、もしくは NAD(P)の還元を 340 nm の吸光変化として Molecular Devices VERSAmax Plate Reader (Molecular Devices, Crawley, West Sussex, UK)でモニターした。1 酵素単位(1 Unit)は、1 分間に 1 μmol の NAD(P)H を酸化あるいは還元する酵素量と定義した。タンパク質濃度はウシ血清アルブミン(Sigma)を標準物質として用いた Bradford 法(36)で測定し、単位タンパク質量あたりの比活性(Unit/mg-protein)として算出した。

7. 発酵試験

OD₆₀₀の測定には、GeneQuant 1300 spectrophotometer (GE Healthcare, England, UK)を用いた。YPD2培地で30°C、24時間好気培養した菌体を回収し、発酵試験用培地で遠心洗浄した。発酵試験は80 mLの発酵試験用培地を入れた300 mL容の三角フラスコを用い、初発OD₆₀₀ = 1、30°C、120 rpmで行い、培養上清の生産物濃度、キシロース濃度、菌体量を分析した。なお、OD₆₀₀ = 1の培養液は、1 Lの培養液あたり

約0.46 gの乾燥菌体を含んでいる。半回分培養では、YPD5C培養液に終濃度50 g/Lとなるように固形グルコースを48時間おきに3回添加した。

8. 分析方法

グルコース、酢酸、グリセロールの定量は、第1章に記載した方法に従って実施した。イソプロパノール、エタノールはTurbo Matrix HS (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いたガスクロマトグラフィー (GC-2010 Plus, Shimadzu) を用いて定量を行った。

9. 塩基配列番号

ctfA、*ctfB*、*adc*、*sadh*、*ACS1*、*ACS2*、*ACT1*、*ALD6-C*、*ERG10*、*LYS2* の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide database において、AB641123、AB641124、AB641125、AB641126、AB641819、AB641820、AB682755、AB641821、AB641827、AB641828 として登録されている。

第3節 結果

1. イソプロパノール生産経路が導入された酵母株の構築

グルコースからのイソプロパノール生産のためにデザインした*C. utilis*の推定代謝経路を、Fig. 5-1に示す。*C. acetobutylicum* ATCC 824株由来の*ctfA*、*ctfB*、および*C. beijerinckii* NRRL B593株由来の*adc*、*sadh*を導入することでイソプロパノール生産性*C. utilis* TMS272株を構築した。TMS272株は、培養44時間後に最大で0.21 g/Lのイソプロパノールを生産した(Fig. 5-2B)。一方で、ベクターコントロールTMSI-01株ではイソプロパノールは生産されなかった(Fig. 5-2A)。この結果は、TMS272株において、導入したイソプロパノール合成に関わる酵素遺伝子の発現が成功したことを示している。TMS272株はこの時、6.3 g/Lの酢酸を蓄積しており、これはコント

ロール株の1.6 g/Lより多かった。また、培養68時間後のTMS272株とコントロール株の培養液のpHは、それぞれ4.3と5.2であった。酢酸以外に有機酸の蓄積が確認されなかったことから、TMS272株培養液のpHの低下は、酢酸の蓄積によるものと考えられた。

2. 中和条件下でのイソプロパノール生産

TMS272株培養液のpHが低かったため、次に炭酸カルシウム中和によりpHコントロールを実施した条件下でのイソプロパノール生産について検討した。その結果、非中和条件と比較して、より多くのイソプロパノールが生産された。TMS272株によって生産されたイソプロパノール濃度は、生産されたエタノールが完全に消費されるまで増加し続け、培養113時間後に1.2 g/Lに達した (Fig. 5-3A)。その際の培地のpHは5.2だった。これらの結果は、培地の酸性化がTMS272株のイソプロパノール生産性を低下させていることを示している。すなわち、培地の低pH化に付随して起こる細胞内の酸性化がイソプロパノール生産に悪影響を及ぼしている可能性が考えられる。

3. ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子破壊の影響

エタノールの副生を低下させるため、エタノール生産の鍵酵素であるピルビン酸脱炭酸酵素をコードする *PDC1* の破壊を試みた。引用文献 83 および第 4 章の結果から、*C. utilis* において *PDC1* の破壊はエタノール生産能の欠失を引き起こすことが明らかになっている。Cre-loxP システムを用いて *C. utilis* ATCC15239 株の *PDC1* を破壊したところ、2 度の遺伝子置換により染色体上の遺伝子が完全に欠損した (data not shown)。この結果は、ATCC15239 株が 2 倍体であることを示唆するものである。また、細胞抽出液の PDC 活性を測定したところ、野生株の PDC 活性が 1.18

± 0.09 U/mg であったのに対して、*pdcl* 破壊株では検出限界以下であった。これらの結果を基に、次に *pdcl* 破壊株を用いてイソプロパノール生産を検討した。

pdcl 破壊株にイソプロパノール合成に関わる 4 つの遺伝子が導入された TMS290 株はエタノールを全く生産しなかったが、代わりにグリセロールが高蓄積し、最大のイソプロパノール生産量は 0.87 g/L に留まった(Fig. 5-3B)。また、グルコースの消費速度およびイソプロパノールの生産速度においても、インタクトの *PDC1* を有する TMS272 株よりも低下していた。これらの結果は、*C. utilis* 組換え株のイソプロパノール生産では、PDC による代謝フラックスが重要であることを示唆するものである。

4. 内在性遺伝子の過剰発現の影響

TMS272 株によるイソプロパノール生産は、エタノールを消費している間増加し続けた。そこで、アセトアセチル CoA 供給を高めて、高レベルのイソプロパノール生産を達成するために、著者はエタノール資化経路とアセトアセチル CoA 合成に関わる ACoAAT (*ERG10* にコードされる)に注目した。エタノールは、*ADH1/ADH2* にコードされる ADH、*ALD6-C* にコードされる ALDH、*ACS1/ACS2* にコードされる ACS によって、アセチル CoA へと変換される。*ADH1* と *ADH2* は、呼吸増殖下で高発現していることが報告されている(53)。そこで、*ALD6-C*、*ACS1*、*ACS2*、*ERG10* を高発現させるために、pCU155(15)をベースとしてマルチコピー導入ベクターを構築した。構築したベクターをそれぞれ TMS272 株に導入し、4 種の組換えプールを作製した。*C. utilis* ATCC15239 株は 2 倍体と想定され、2 つの *URA3* 座を有している。1 つの *URA3* 座はイソプロパノール生産に関わる遺伝子の導入により破壊されているため、pCU155 にクローン化された遺伝子はもう一方の *URA3* 座に一点組換えによりタンデムに組み込まれる。各組換えプールから得られた 1 つのコロニーに

ついて定量 PCR を実施した結果、導入した遺伝子が 5 から 8 コピーがそれぞれの染色体に組み込まれていることが見出された(Table 5-3)。遺伝子導入により組換え株の酵素活性が増加していることを確認するために、細胞抽出液の酵素活性を測定した。その結果、*ACS1*、*ACS2*、*ALD6-C*、*ERG10* の過剰発現により、対応する酵素の活性がそれぞれ、3.9 倍、4.5 倍、44.7 倍、22.2 倍に増加した(Table 5-3)。

構築した各種過剰発現株のイソプロパノール生産量を Table 5-4 に示した。*ACS1*、*ACS2*、*ERG10* の過剰発現により、イソプロパノール生産量はそれぞれ 2.5 倍、2.7 倍、2.2 倍に増加した。また、これらの株における酢酸蓄積量は、TMS272 株と比較して低下していた。一方、*ALD6-C* 過剰発現株のイソプロパノール生産量は大きく減少し、多量の酢酸を蓄積した。

5. *ACS2* と *ERG10* の同時過剰発現の影響

ACS あるいは *ACoAAT* のそれぞれの過剰発現はイソプロパノール生産量を増加させたので、次に *ACS2* と *ERG10* の同時過剰発現について検討した。*ACS2* を過剰発現している組換え株は、*ACS1* を過剰発現している組換え株と比較して、有意に多くのイソプロパノールを生産した(Table 5-4)。また、*S. cerevisiae* において、*ACS1p* は *ACS2p* と異なり、グルコース誘導的に分解を受けることが報告されている(103)。これらの知見を基に、同時過剰発現の実験には *ACS2* を選択した。

ACS2 と *ERG10* の発現カセットをカクテルマルチコピー導入して得られた組換えプール中の 40 株で、最もイソプロパノール生産性が高い株として TMS411 株を選抜した。TMS411 株は 3 コピーの *ACS2* と 6 コピーの *ERG10* を有していた。本酵母株と TMS272 株とを比較するとイソプロパノール生産量は 11.9 倍に増加し、酢酸蓄積量は 10 分の 1 までに低下していた(Table 5-3, 5-4)。また、*ACS* と *ACoAAT* の酵素活性は、それぞれ 3.5 倍、15.7 倍に増加していた(Table 5-3)。これらの結果から、

ACS2 と *ERG10* の同時過剰発現は、*C. utilis* のイソプロパノール生産を相乗的に増加させることが明らかになった。

6. 半回分培養によるイソプロパノール生産

TMS411 株のイソプロパノール生産のポテンシャルを評価するために、半回分培養によるイソプロパノール生産を実施した。YPD5C 培地に TMS411 株を接種し、培養 48 時間おきに終濃度 50 g/L となるように固形グルコースを 3 回添加したところ、培養 196 時間後に最大で 27.2 g/L のイソプロパノールを生産することに成功した (Fig. 5-4)。1 mol のグルコースから 1 mol のイソプロパノールが生産されることを理論最大収量とした場合、イソプロパノール収率は 41.5% だった。酢酸とグリセロールの蓄積量は、それぞれ 1.2 g/L、0.01 g/L であった。

第4節 考察

著者が知る限り、本章の取り組みは酵母種でイソプロパノールを生産した初の報告である。本研究により、*C. utilis* 組換え株において、ACS と ACoAAT の同時過剰発現がイソプロパノールの効率的生産に寄与することが明らかとなり、その最終株である TMS411 株は、培養 196 時間で 27.2 g/L、収率 41.5% でイソプロパノールを生産した。この生産量は、今まで報告されている自然界のイソプロパノール生産菌のパフォーマンスを上回るものであった。

イソプロパノール生産速度はグルコース消費後に増加し、イソプロパノール濃度はエタノールが完全に消費し尽くされるまで増加した (Fig. 5-3A)。また、エタノール資化のエッセンシャル酵素であるアセチル CoA 合成酵素(104)をコードする *ACS1* および *ACS2* の過剰発現は、イソプロパノール生産向上に寄与した (Table 5-4)。これらの結果は、*C. utilis* 組換え株はエタノールからイソプロパノールを生産する能力

が高いことを示唆している。この仮説を検証するために、25 g/L エタノールを唯一の炭素源とする培地でイソプロパノール生産を実施したところ、53.4%の収率でイソプロパノールが生産された。この結果は、50 g/L グルコースを基質として用いたときの結果、43.2%よりわずかに高かった。クロストリジウム属細菌を用いた ABE 発酵において、エタノールは重大な副産物として認識されているが、今回の知見を配慮すると、本章で構築された *C. utilis* 組換え株においては生産中間体として扱うことの方が適切なのかもしれない。

エタノールが酢酸に変換される時、ADH と ALDH の反応によりそれぞれ 1 mol の NADH と NADPH が発生する(Fig. 5-1)。さらに SADH はアセトンを経由してイソプロパノールに変換するために NADPH を利用する(Fig. 5-1)。この一連の反応で生じた過剰な NADH は、呼吸鎖で再酸化されると考えられる。*C. utilis* はクラブツリー効果陰性酵母に属しており、酵母種の中では最も高い呼吸活性を有する(8)。そのため本酵母はエタノールからイソプロパノールを生産するうえで最も望ましい宿主の1つであると考えられる。

ACoAAT は 2 mol のアセチル CoA から脱炭酸を伴わない縮合反応によりアセトアセチル CoA を生産するが、この反応は可逆反応である。一般的に、ACoAAT による反応はアセトアセチル CoA 合成よりアセトアセチル CoA チオリシスの方が起こりやすいことが知られている(105)。従って、ACS2 と *ERG10* 同時過剰発現によるイソプロパノール生産の相乗的増加(Table 5-4)は、ACS2 過剰発現によりアセチル CoA 生産量が増加し、ACoAAT による平衡反応がアセトアセチル CoA 合成側に傾き、より多くのアセトアセチル CoA が供給されたことに起因すると考えられる。

C. utilis 組換え株のイソプロパノール生産において、酢酸の蓄積は重篤な問題であった (Fig. 5-2B)。酢酸蓄積の要因の 1 つは、酵素活性のインバランスである。TMS411 株、TMSI-01 株(ベクターコントロール株)、TMS272 株、*ALD6-C* を過剰発

現した株の ALDH/ACS 比はそれぞれ 0.17、0.35、0.48、30.6 であり、これは酢酸の蓄積量と相関がある (Table 5-3, 5-4)。つまり、過剰に蓄積する酢酸量を減らすためには、酢酸を代謝する酵素である ACS の活性が重要であると考えられる。ACS は細菌からヒトまで多くの生物に存在し、アセチル化/脱アセチル化を介した複雑な翻訳後制御系によってその活性が制御されている(106, 107)。さらなるイソプロパノール生産性の向上のためには、ACS 酵素のタンパク質工学的改変にも興味を持たれる。

Table 5-1 Strains and plasmids of *C. utilis* used in this study.

| Strains | Relevant features | Source |
|-------------------------|---|------------|
| <i>C. utilis</i> | | |
| ATCC15239 | Wild type | ATCC |
| TMS-pdc | ATCC15239 <i>pdc1Δ2</i> | This study |
| TMSI-01 | ATCC15239 <i>URA3</i> : pVT92, <i>LYS2</i> : pVT239 | This study |
| TMS272 | ATCC15239 <i>URA3</i> : pVT92- <i>ctfA-ctfB</i> , <i>LYS2</i> : pVT239- <i>adc-sadh</i> | This study |
| TMS290 | TMS-pdc <i>URA3</i> : pVT92- <i>ctfA-ctfB</i> , <i>LYS2</i> : pVT239- <i>adc-sadh</i> | This study |
| TMS342 | TMS272 <i>URA3</i> : pCU155- <i>ACS1</i> (multicopy integration) | This study |
| TMS343 | TMS272 <i>URA3</i> : pCU155- <i>ACS2</i> (multicopy integration) | This study |
| TMS346 | TMS272 <i>URA3</i> : pCU155- <i>ALD6-C</i> (multicopy integration) | This study |
| TMS350 | TMS272 <i>URA3</i> : pCU155- <i>ERG10</i> (multicopy integration) | This study |
| TMS411 | TMS272 <i>URA3</i> : pCU155- <i>ACS2</i> , pCU155- <i>ERG10</i> (cocktail multicopy integration) | This study |
| Plasmids | | |
| pCU119 | Cloning vector | TakaraBio |
| pVT92 | <i>C. utilis</i> integration plasmid; <i>TDH1pr-PGK1tr</i> , Hyg ^R marker, integration at <i>URA3</i> locus | Chapter 1 |
| pVT239 | <i>C. utilis</i> integration plasmid; G418 ^R marker, integration at <i>LYS2</i> locus | This work |
| pVT92-ctfAB | <i>TDH1pr-ctfA-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-ctfB-PGK1tr</i> , Hyg ^R cassette | This work |
| pVT239- <i>adc-sadh</i> | <i>TDH1pr-<i>adc</i>-PGK1tr</i> , <i>TDH1pr-<i>sadh</i>-PGK1tr</i> , G418 ^R cassette | This work |
| pCU155 | <i>C. utilis</i> multicopy integration plasmid; <i>TDH1pr-TDH1tr</i> , Cyh ^R marker, integration at <i>URA3</i> allele | 15 |
| pCU155- <i>ACS1</i> | <i>TDH1pr-ACS1-TDH1tr</i> , Cyh ^R cassette | This work |
| pCU155- <i>ACS2</i> | <i>TDH1pr-ACS2-TDH1tr</i> , Cyh ^R cassette | This work |
| pCU155- <i>ALD6-C</i> | <i>TDH1pr-ALD6-C-TDH1tr</i> , Cyh ^R cassette | This work |
| pCU155- <i>ERG10</i> | <i>TDH1pr-ERG10-TDH1tr</i> , Cyh ^R cassette | This work |

Table 5-2 PCR primers used in this study.

| Name | Sequence (5' to 3') | Experiment (amplified DNA fragment) ¹⁾ |
|--------|---|---|
| TM-168 | GCGGCCGCCGCTCCAGTGTATCTCAGAGTAAAGACTCG | A (<i>LYS2</i> upstream) |
| TM-169 | ATCGATGGCATACTAGTTCGTCATAGTCAACCGCCTTGGAGGC | A (<i>LYS2</i> upstream) |
| TM-170 | CGAACTAGTGTATGCCATCGATGGTGCCCAACTGCTTGTTCCAAC | A (<i>LYS2</i> downstream) |
| TM-171 | CTCGAGGGCGGCCGATACGGTCAACCTCCTTAGCAAATGCCTTG | A (<i>LYS2</i> downstream) |
| TM-115 | AGCTGACTAGTAAGCTTCGTACGCTGCAGGTCG | A (G418 ^R marker) |
| TM-116 | AGAAGTATCGATCTCTAGTGGATCTG | A (G418 ^R marker) |
| TM-374 | CTAGTCTAGATGCCAGAAGCTACTTTGAAGTCG | B (<i>ACS1</i>) |
| TM-375 | CGCGGATCCTCATTCTTGCTCTTGACAGCACTG | B (<i>ACS1</i>) |
| TM-378 | CTAGTCTAGATGCCTAATCACAAAGTTGTGCAC | B (<i>ACS2</i>) |
| TM-379 | CGCGGATCCTCACTTCTTAATCAAGTTGAAGTAC | B (<i>ACS2</i>) |
| TM-384 | CTAGTCTAGATGACATCCTTTAACAGAGCACC | B (<i>ALD6-C</i>) |
| TM-385 | CGCGGATCCTCATTTCAGTCTCTCAATTTGATTC | B (<i>ALD6-C</i>) |
| TM-235 | CTAGTCTAGATGTCTGAAAACAGCGCTTATATTG | B (<i>ERG10</i>) |
| TM-236 | CGCGGATCCTTACAAGATAACGTGCTCAGAA | B (<i>ERG10</i>) |
| TM-435 | TCAATGTAGGGGAGAAGCCTTG | C (<i>TDH1</i> terminator) |
| TM-436 | ACGTAACGTCAGACAGGCACAC | C (<i>TDH1</i> terminator) |
| TM-478 | TCCATTTGCTGGTCCAAAGAC | C (<i>ACS2</i>) |
| TM-479 | CTCCCAATTGGTCAGCTTCATT | C (<i>ACS2</i>) |
| TM-423 | TGCCAGAATCTTGGTCACTTG | C (<i>ERG10</i>) |
| TM-424 | AAAACCATGGAAGAAGCACCAC | C (<i>ERG10</i>) |

¹⁾A, construction of pVT239; B, construction of expression vectors based on pCU155; C, real-time PCR analysis.

Table 5-3 Copy number of the integrated genes and corresponding enzyme activities in the engineered strains.

| Strain | Copy number of the integrated gene | | | Specific activity (U/mg-protein) | | |
|---|------------------------------------|----------------------------|--------------|----------------------------------|-------------|-------------|
| | <i>ALD6-C</i> | <i>ACS1</i> or <i>ACS2</i> | <i>ERG10</i> | ALDH | ACS | ACoAAT |
| TMSI-01 (WT/pVT92-empty, pVT239-empty) | 0 | 0 | 0 | 0.042±0.002 | 0.119±0.011 | 0.233±0.017 |
| TMS272 (WT/pVT92-ctfAB, pVT239- <i>adc-sadh</i>) | 0 | 0 | 0 | 0.052±0.003 | 0.087±0.006 | 0.235±0.030 |
| TMS346 (TMS272/pUC155-ALD6-C) | 5 | 0 | 0 | 2.333±0.198 | 0.076±0.002 | 0.195±0.014 |
| TMS342 (TMS272/pUC155-ACS1) | 0 | 6 | 0 | 0.058±0.009 | 0.340±0.022 | 0.205±0.031 |
| TMS343 (TMS272/pUC155-ACS2) | 0 | 6 | 0 | 0.055±0.002 | 0.387±0.034 | 0.215±0.029 |
| TMS350 (TMS272/pUC155-ERG10) | 0 | 0 | 8 | 0.056±0.002 | 0.090±0.005 | 5.211±0.456 |
| TMS411 (TMS272/pUC155-ACS2, pCU155-ERG10) | 0 | 3 | 6 | 0.067±0.004 | 0.312±0.034 | 3.689±0.191 |

Enzyme activities were measured in extracts from stationary-phase cells (24-h samples). Data are means ± SD for three independent experiments.

Table 5-4 Effect of gene overexpression on production of isopropanol in *C. utilis*.

| Strain | Isopropanol production (g/L) | Acetate production (g/L) |
|---|------------------------------|--------------------------|
| TMSI-01 (WT/pVT92-empty, pVT239-empty) | 0.00 ± 0.00 | 0.93 ± 0.08 |
| TMS272 (WT/pVT92-ctfAB, pVT239- <i>adc-sadh</i>) | 0.82 ± 0.09 | 7.63 ± 0.71 |
| TMS346 (TMS272/pCU155-ALD6-C) | 0.02 ± 0.00 | 37.99 ± 2.15 |
| TMS342 (TMS272/pCU155-ACS1) | 1.99 ± 0.21 | 5.08 ± 0.68 |
| TMS343 (TMS272/pCU155-ACS2) | 2.20 ± 0.32 | 4.04 ± 0.46 |
| TMS350 (TMS272/pCU155-ERG10) | 1.81 ± 0.03 | 5.51 ± 0.38 |
| TMS411 (TMS272/pCU155-ACS2, pCU155-ERG10) | 9.52 ± 0.32 | 0.77 ± 0.05 |

Isopropanol and acetic acid were measured after 52 h of batch fermentation. Data are means ± SD for three independent experiments.

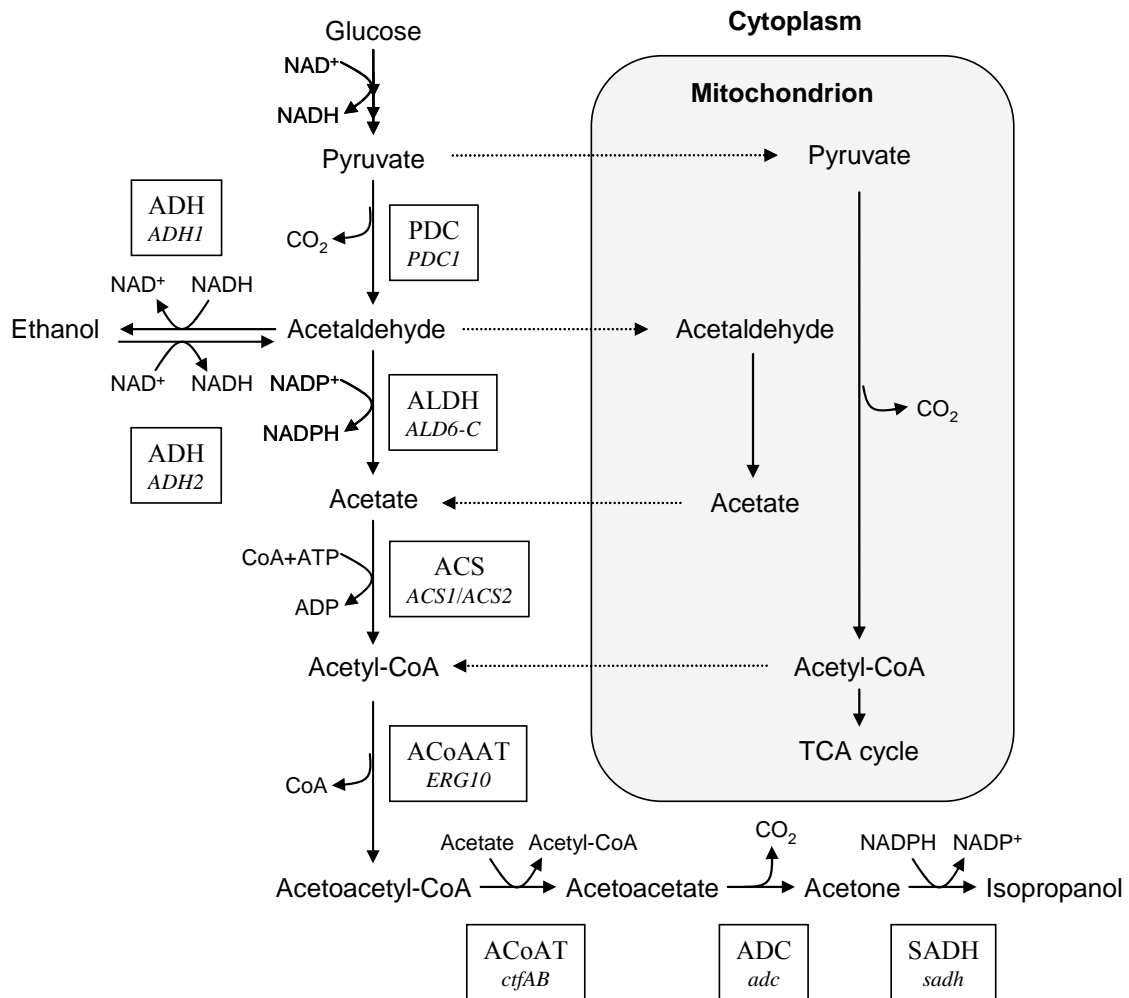


Fig. 5-1 Engineered metabolic pathway for the production of isopropanol in yeast.

ADH, alcohol dehydrogenase (encoded by *ADH1* and *ADH2* in *C. utilis*); PDC, pyruvate decarboxylase (encoded by *PDC1* in *C. utilis*); ACS, acetyl-CoA synthetase (encoded by *ACS1* and *ACS2* in *C. utilis*); ALDH, acetaldehyde dehydrogenase (encoded by *ALD6-C* in *C. utilis*); ACoAAT, acetyl-CoA acetyltransferase (encoded by *ERG10* in *C. utilis*); ACoAT, acetoacetyl-CoA transferase (encoded by *ctfAB* in *C. acetobutylicum*); ADC, acetoacetate decarboxylase (encoded by *adc* in *C. acetobutylicum*); SADH, primary-secondary alcohol dehydrogenase (encoded by *sadh* in *C. beijerinckii*). Yeast genes are shown in upper case italics; bacterial genes in lower case italics.

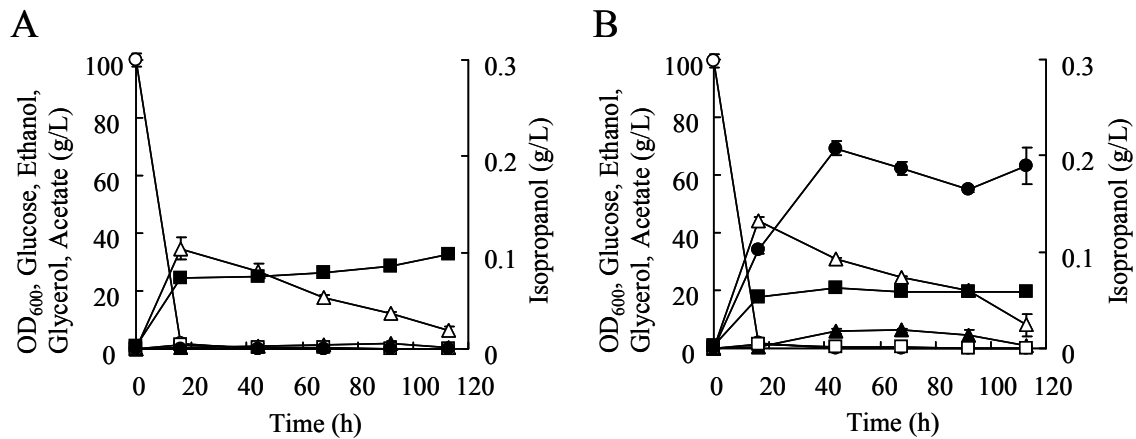


Fig. 5-2 Production of isopropanol by recombinant *C. utilis* strains in YPD10.

Panels A and B show results for vector-only control strain TMSI-01 and TMS272, respectively. Symbols: glucose (opened circles), isopropanol (closed circles), ethanol (opened triangles), acetate (closed triangles), glycerol (opened squares) and OD₆₀₀ (closed squares). Data are means for three independent fermentation experiments; error bars indicate SD values.

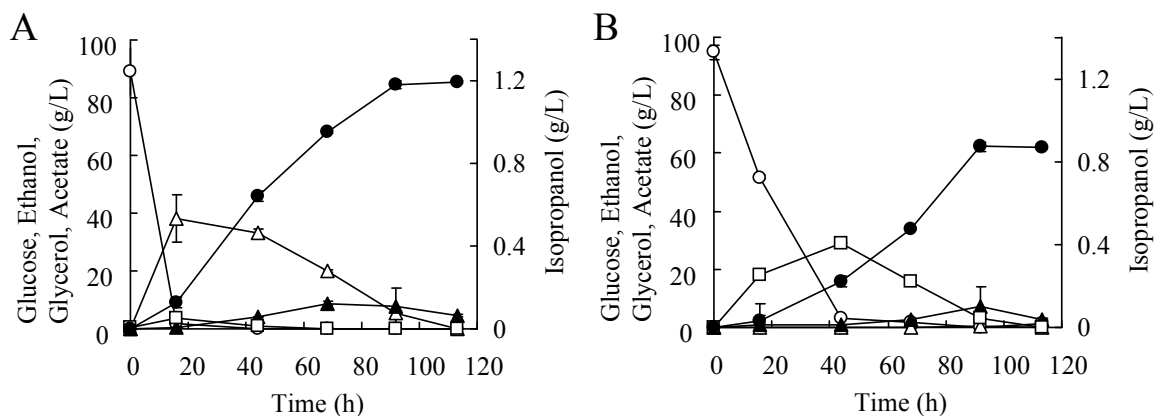


Fig. 5-3 Production of isopropanol by recombinant *C. utilis* strains under neutralizing conditions.

Panels A and B show results for TMS272 and TMS290, respectively. Symbols: glucose (opened circles), isopropanol (closed circles), ethanol (opened triangles), acetate (closed triangles) and glycerol (opened squares). Data are means for three independent fermentation experiments; error bars indicate SD values.

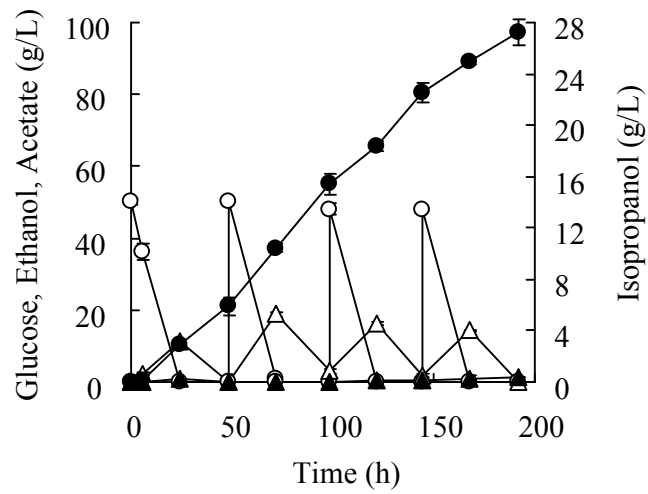


Fig. 5-4 Isopropanol production by a recombinant *C. utilis* strain overexpressing both *ACS2* and *ERG10* in glucose fed-batch culture.

YPD5C was inoculated with cells and 50 g/L of glucose were added at 48 h intervals. The total amount of added glucose was 200 g/L. Symbols: glucose (opened circles), isopropanol (closed circles), ethanol (opened triangles), acetate (closed triangles). Data are means for three independent fermentation experiments with error bars indicating SD values.

総合討論

本論文では、*C. utilis*にキシロース発酵能を付与するとともに(第1章)、その代謝酵素量比の最適化(第2章)、細胞内代謝の解析(第3章)、キシロースからのL-乳酸生産(第4章)、グルコースからのイソプロパノール生産(第5章)に取り組んだ。本研究を踏まえた上で、本論文の締めくくりとして、近年発展が目覚ましいバイオリファイナリー研究の知見を総括して3つの視点から討論を行う。

1. 糖の取り込み

本論文で構築された *C. utilis* 株では、酵母のキシロース利用において長年の課題とされてきた「グルコースとキシロースの同時利用」が達成されていない。導入されたキシロース代謝酵素は構成的プロモーターで高発現させていることから、2つの糖が同時に利用されない理由として、キシロースの取り込みに問題がある可能性が考えられる。*S. cerevisiae* においては、キシロースの取り込みに関わるトランスポーターについて詳細な検討がなされている。Hamacher らは、異種のキシロース代謝経路が導入された *S. cerevisiae* 株において、18種類のヘキソーストランスポーター遺伝子(*HXT1-17*, *GAL2*)と比較的基質特異性の広い4つの糖トランスポーター遺伝子(*STL1*, *AGT1*, *MPH2*, *MPH3*)の破壊株を作製し、培養試験に供したところ、キシロース培地で増殖できなくなったことを報告した(108)。さらに、この22遺伝子破壊株に1つずつトランスポーターを再導入してキシロース培地での増殖を解析したところ、*S. cerevisiae* のキシロース取り込みには、*HXT4*、*HXT5*、*HXT7*、*GAL2* いずれかの導入が必要であることが明らかになった。見出されたトランスポーターは、いずれも 1 mM 前後の K_m^{Glc} を示すヘキソーストランスポーターであった (109)。この結果は、*S. cerevisiae* によるキシロースの取り込みがグルコーストランスポーターの基質特異性の緩さに依存していることを示している。組換え *S. cerevisiae* の

キシロース取り込みの K_m が 100 mM 以上であったことから (110)、酵母においてグルコースとキシロースが同時に消費されないのは、グルコースによる競争阻害に起因している可能性がある。従って、キシロースを優先的に消費する *S. cerevisiae* 株を構築するためには、キシロースに親和性の高いトランスポーターが必要であると考えられる。結晶構造解析の結果から、ヘキソーストランスポーターの中央孔には複数の芳香族アミノ酸が並んでいることが明らかになっており、こうした”greasy pore”を形成するための芳香族アミノ酸は、基質の認識および取り込みに必須であることが報告されている (111, 112)。ヘキソーストランスポーターがグルコースのような 6 単糖と高い親和性を示すのは、こうした芳香族アミノ酸の 6 員環がグルコースと相補的な結合を形成するためであるという仮説も提唱されている (故・笠原道弘 帝京大学教授 私信)。酵母内在性のヘキソーストランスポーターにとって、5 単糖であるキシロースはそもそも取り込みにくい基質なのかもしれない。*C. utilis* のキシローストランスポーターについては十分な研究がなされていないが、*S. cerevisiae* と同様の課題を有していることが想定される。酵母においてキシロース/グルコースの同時取り込みを実現するためには、キシロース特異的な異種キシローストランスポーターを探索することが有意義であろう。

2. 酵素の性能と代謝バランス

バイオリファイナリー基幹物質生産菌の代謝解析をする中で、特定の酵素の逆反応が代謝律速の鍵となるケースが幾つか認められた。例えば、著者は第 1 章で、TMS174 株のキシロースからのエタノール生産は、エタノールの添加によって抑制されることを示した (Fig. 1-6)。また、第 3 章では、キシロースで培養した TMS174 株では、*ADH2* が高発現することにより、アセトアルデヒド→エタノールの逆反応が亢進している可能性を示した (Fig. 3-5, 3-7)。これらの結果は、エタノールが蓄積

した TMS174 株において、エタノール酸化の代謝フラックスが向上したことにより、キシロースからのエタノール生産性が低下した可能性を示している。従って、よりアセトアルデヒドに親和性が高い異種 ADH を導入すれば、内在性 *ADH1* を過剰発現するよりさらにキシロースからのエタノール生産性を向上させることができるかもしれない。また、第 5 章では、ACS と ACoAAT をコードする遺伝子の過剰発現が *C. utilis* のイソプロパノール生産を相乗的に増加させることを明らかにした。この相乗効果に寄与したのは、アセチル CoA の供給量を増加させることで ACoAAT の平衡反応をアセトアセチル CoA 合成側に傾けたことであると考察した。この例においても、よりアセチル CoA に親和性の高い ACoAAT を用いることがイソプロパノールのさらなる生産性向上に効果があると期待される。Okamura らは、アセチル CoA とマロニル CoA よりアセトアセチル CoA を合成する新たな ACoAAT を発見し、さらにこの酵素ではアセトアセチル CoA チオリシスが起こりにくいことを報告した(105)。このように、実用化を目指したさらなる高生産菌育種のためには、性能の高い酵素を探索し、育種に利用することが必要であると考えられる。物質生産のパフォーマンスは究極的には代謝酵素の性能に依存するのかもしれない。

強力な酵素が必要な一方で、著者は本論文の全ての章において、物質生産における細胞内酸化還元バランスの重要性について論じた。しかし、適正な代謝バランス、酸化還元バランスとは果たしてどのようなバランスであるのだろうか。大腸菌の変異株を用いたマルチオミクス解析の結果、タンパク質生産、遺伝子発現と比較して、代謝物はロバスト性を有していることが報告されている(113)。環境変化が起こったとき、生物は遺伝子発現/タンパク質生産を変化させることで増殖の律速となる基質の供給量を増加させ、増殖レベルを最大化するように応答すること、代謝ネットワークそのものが構造上の冗長性(遺伝子の重複、バイパス経路)を有していることが、こうした代謝物のロバスト性を生んでいると考えられている。*C. utilis* 野生株

はキシロース培地で増殖できるが発酵はできない。著者は、第1章でこの原因について考察を行った。しかし、第3章で実施したメタボローム解析の結果、グルコースまたはキシロースを炭素源として培養した *C. utilis* 野生株の細胞内 ATP 濃度、CE-TOF MS の解析結果から算出した NADH/NAD⁺比、NADPH/NADP⁺比は同程度であった(Fig. 3-2, Fig. 3-3)。一方で、キシロースを発酵するように育種した株においては、NADH/NAD⁺比、NADPH/NADP⁺比の増加が確認された。*C. utilis* が有する「キシロースからエタノールを生産しない」という表現型は、*C. utilis* がキシロース培地で細胞内重要代謝物濃度を適正に保つために重要な形質だったのかもしれない。従って、我々が物質生産宿主として求める代謝バランスは、微生物が生物として求める適正な代謝バランスと必ずしも同じではないことを留意しなくてはならない。

3. 代謝反応の場

酵母は細菌と異なり、オルガネラを有することから、目的物質までの代謝反応は、細胞質だけでなくミトコンドリアや小胞体でも行われることがある。その場合、オルガネラ間での基質の輸送が律速となる可能性が考えられる。特に出芽酵母において、ミトコンドリアで生産されたアセチル CoA が細胞質に輸送されるシステムは、未だ明らかにされていない(114)。アセチル CoA は、単独でミトコンドリア内膜を通過することができない。真核生物では、ミトコンドリア内アセチル CoA が細胞質に輸送されるシステムとして、下記に示す2つのシャトルシステムが知られている。1つ目は、クエン酸合成酵素(CS)/ATP-クエン酸リアーゼ(ACL)シャトルである。ミトコンドリア内のアセチル CoA はミトコンドリア内でCSによりクエン酸に変換され、細胞質に輸送された後、細胞質に存在する ACL によりアセチル CoA に再生される。しかし、*S. cerevisiae* や *C. utilis* を含む多くの酵母から ACL 活性は検出されず、また ACL をコードする遺伝子も見出されていない(115)。2つ目は、カルニ

チンシャトルである。ミトコンドリア内のアセチル CoA は、ミトコンドリア局在型カルニチンアセチルトランスフェラーゼ(CAT)によってアセチルカルニチンに変換され、細胞質に輸送された後、細胞質局在型 CAT でアセチル CoA に再生される。しかし、このシャトルシステムは本来、細胞質のアセチル CoA をミトコンドリアに輸送するシステムであり、酵母でこの逆反応が起こるということが確かめられた例はない(114)。*S. cerevisiae* では、*PDC* を完全に欠損した場合、エタノール培地では増殖可能であるが、グルコース培地では増殖できないことが報告されている(114)。これは、*S. cerevisiae* がミトコンドリア内のアセチル CoA を細胞質に輸送するシステムを有していないか、その活性が極めて弱いために、脂肪酸の基質となる細胞質アセチル CoA が供給できないことが原因であると考えられている。*C. utilis* は *PDC* を完全に欠損してもグルコース培地で増殖可能であることから、ミトコンドリア内のアセチル CoA を細胞質に輸送するシステムを有していると考えられる。しかし、*pdcl* 破壊株を宿主としたイソプロパノール生産株のパフォーマンスは低かったことから、その輸送能は高くはない可能性が考えられる。

酵母においてオルガネラ間の基質輸送が物質生産の制約となっているという考察は、他の報告においてもサポートされている。Matsuda らは、酵母と大腸菌を比較した代謝シミュレーション解析の結果、酵母は「オルガネラの存在による細胞のコンパートメント化」「ショートカット代謝経路の欠失」が要因で中央代謝経路の flexibility が低いことを報告した(116)。また、炭素数 3 以上のアルコール生産能をシミュレーションした結果、酵母は全てのアルコール生産能が大腸菌に劣っていた。「代謝 flexibility が低い」という酵母の欠点を克服するためにデザインされた *S. cerevisiae* 組換え株を用いたイソブタノール生産プロセスが報告されている。通常、酵母でグルコースからイソブタノールを生産する場合、①グルコースからピルビン酸の反応は細胞質で、②ピルビン酸から 2-ケトイソ吉草酸までの反応はミトコンド

リアで、③2-ケトイソ吉草酸からイソブタノールまでの反応は細胞質で行われるようにデザインする。Matsuda らは、タンパク質工学的改変を行うことで②の反応に関わる酵素群の局在を細胞質に変更した(117)。その結果、24 mg/L だったイソブタノール生産量が 64 mg/L まで増加した。一方、Avalos らは、タンパク質工学的改変を行うことで③の反応に関わる酵素群の局在をミトコンドリアに変更した(118)。その結果、279 mg/L だったイソブタノール生産量が 635 mg/L まで増加した。本論文の第 5 章で論じた *C. utilis* を用いたイソプロパノール生産においては、全ての代謝反応が細胞質で実施されるように遺伝子を過剰発現させ、その高生産を達成することに成功した。*C. utilis* におけるさらなるイソプロパノール生産性の向上のために、ピルビン酸からイソプロパノールまでの反応に関わる全ての酵素群の局在をミトコンドリアに変更する代謝工学にも興味を持たれる。

バイオリファイナリーで生産しようとしている化合物は、現在、極めて安価に原油から生産されている。従って、100%に近い収率で目的物質を生産する菌株の育種は必須である。本研究が次なる挑戦者への良き道標となり、さらなる高生産性株の育種、また、そのプロセス開発、延いては環境循環型社会の実現につながることを期待する。

引用文献

1. British Petroleum, Statistical Review of World Energy (2012; available at http://www.bp.com/assets/bp_internet/globalbp/globalbp_uk_english/reports_and_publications/statistical_energy_review_2011/STAGING/local_assets/pdf/statistical_review_of_world_energy_full_report_2012.pdf).
2. Werpy T, Petersen G, Top Value Added Chemicals From Biomass, Volume 1—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas (2004; available at <http://www.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf>).
3. 経済産業省 バイオ燃料技術革新協議会, バイオ燃料技術革新計画(案)概要 (2008; available at <http://www.enecho.meti.go.jp/policy/fuel/080404/gaiyou.pdf>).
4. 東レ株式会社 プレスリリース, 世界初「完全バイオマス原料由来ポリエチレンテレフタレート (PET) 繊維」の試作に成功 (2011; available at <http://www.toray.co.jp/news/fiber/nr111115.html>).
5. Brethauer S, Wyman CE, Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresour Technol*, 101, 4862–4874 (2010).
6. Dien BS, Cotta MA, Jeffries TW, Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, 258–266 (2003).
7. Rosenberg SL, Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms, *Enzyme Microb Technol*, 2, 185-193 (1980).
8. Deken D RH, The Crabtree effect: a regulatory system in yeast, *J Gen Microbiol*, 44, 149–156 (1966).
9. Bruinenberg PM, Bot PHM, Dijken JP, Scheffers WA, NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts, *Appl Microbiol Biotechnol*, 19, 256–260 (1984).

10. Boze H, Moulin G, Galzy P, Production of food and fodder yeasts, *Crit Rev Biotechnol*, 12, 65–86 (1992).
11. Lawford GR, Kligerman A, Williams T, Production of highquality edible protein from *Candida* yeast grown in continuous culture, *Biotechnol Bioeng* 21, 1163–1174 (1979).
12. Ichii T, Takehara S, Konno H, Ishida T, Sato H, Suzuki A, Yamazumi K, Development of a new commercial-scale airlift fermentor for rapid growth of yeast, *J Ferment Bioeng*, 75, 375–379 (1993).
13. Li Y, Wei G, Chen J, Glutathione: a review on biotechnological production, *Appl Microbiol Biotechnol*, 66, 233–242 (2004).
14. Kondo K, Saito T, Kajiwara S, Takagi M, Misawa N, A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA, *J Bacteriol*, 177, 7171–7177 (1995).
15. Kondo K, Miura Y, Sone H, Kobayashi K, Iijima H, High-level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida utilis*, *Nat Biotechnol*, 15, 453–457 (1997).
16. Miura Y, Kettoku M, Kato M, Kobayashi K, Kondo K, High level production of thermostable alpha-amylase from *Sulfolobus solfataricus* in high-cell density culture of the food yeast *Candida utilis*, *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1, 129–134 (1999).
17. Miura Y, Kondo K, Shimada H, Saito T, Nakamura K, Misawa N, Production of lycopene by the food yeast, *Candida utilis* that does not naturally synthesize carotenoid, *Biotechnol Bioeng*, 58, 306–308 (1998).
18. Miura Y, Kondo K, Saito T, Shimada H, Fraser PD, Misawa N, Production of the carotenoids lycopene, beta-carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*,

- Appl Environ Microbiol, 64, 1226–1229 (1998).
19. Ikushima S, Fujii T, Kobayashi O, Efficient gene disruption in the high-ploidy yeast *Candida utilis* using the Cre-*loxP* system, Biosci Biotechnol Biochem, 73, 879–884 (2009).
 20. Verduyn C, Van Kleef R, Frank J, Schreuder H, Van Dijken JP, Scheffers WA, Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*, Biochem J, 226, 669–677 (1985).
 21. Rizzi M, Harwart K, Erlemann O, Buithanh NA, Dellweg H, Purification and properties of the NAD⁺-xylitol-dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*, Ferment Bioeng, 67, 20–24 (1989).
 22. Deng, XX, Ho NW, Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene, Appl Biochem Biotechnol, 24-25, 193–199 (1990).
 23. Toivola A, Yarrow D, van den Bosch E, van Dijken JP, Scheffers, WA, Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts, Appl Environ Microbiol, 47, 1221–1223 (1984).
 24. Kötter P, Ciriacy M, Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, Appl Microbiol Biotechnol, 38, 776–783, (1993).
 25. Jeppsson M, Johansson B, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF, Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose, Appl Environ Microbiol, 68, 1604–1609 (2002).
 26. Jin YS, Laplaza JM, Jeffries TW, *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response, Appl Environ Microbiol, 70, 6816–6825 (2004).

27. Petschacher B, Leitgeb S, Kavanagh KL, Wilson DK, Nidetzky B, The coenzyme specificity of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) explored by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography, *Biochem J*, 385, 75–83 (2005).
28. Petschacher B, Nidetzky B, Altering the coenzyme preference of xylose reductase to favor utilization of NADH enhances ethanol yield from xylose in a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microb Cell Fact*, 7, 9 (2008).
29. Kostrzynska M, Sopher CR, Lee H, Mutational analysis of the role of the conserved lysine-270 in the *Pichia stipitis* xylose reductase, *FEMS Microbiol Lett*, 159, 107–112 (1998).
30. Watanabe S, Abu Saleh A, Pack SP, Annaluru N, Kodaki T, Makino K, Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*, *Microbiology*, 153, 3044–3054 (2007).
31. Watanabe S, Kodaki T, Makino K, Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc, *J Biol Chem*, 280, 10340–10349 (2005).
32. Matsushika A, Watanabe S, Kodaki T, Makino K, Sawayama S, Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase, *J Biosci Bioeng*, 105, 296–299 (2008).
33. Dmytruk OV, Voronovsky AY, Abbas CA, Dmytruk KV, Ishchuk OP, Sibirny AA, Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*, *FEMS Yeast Res*, 8, 165–173 (2008).

34. Dmytruk OV, Dmytruk KV, Abbas CA, Voronovsky AY, Sibirny AA, Engineering of xylose reductase and overexpression of xylitol dehydrogenase and xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*, *Microb Cell Fact*, 7, 21 (2008).
35. Ishchuk OP, Voronovsky AY, Stasyk OV, Gayda GZ, Gonchar MV, Abbas CA, Sibirny AA, Overexpression of pyruvate decarboxylase in the yeast *Hansenula polymorpha* results in increased ethanol yield in high-temperature fermentation of xylose, *FEMS Yeast Res*, 8, 1164–1174 (2008).
36. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248–254.
37. Shi NQ, Cruz J, Sherman F, Jeffries TW, SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*, *Yeast*, 19, 1203–1220 (2002).
38. Hou J, Shen Y, Li XP, Bao XM, Effect of the reversal of coenzyme specificity by expression of mutated *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Lett Appl Microbiol*, 45, 184–189 (2007).
39. Krahulec S, Klimacek M, Nidetzky B, Engineering of a matched pair of xylose reductase and xylitol dehydrogenase for xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol J*, 4, 684–694 (2009).
40. Karhumaa K, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF, Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering, *Yeast* 22, 359–368 (2005).
41. Wenger JW, Schwartz K, Sherlock G, Bulk segregant analysis by high-throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisiae*,

- PLoS Genet, 6, e1000942 (2010).
42. Jeffries TW, Jin YS, Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts, *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, 495–509 (2004).
 43. Hamacher T, Becker J, Gárdonyi M, Hahn-Hägerdal B, Boles E, Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization, *Microbiology*, 148, 2783–2788 (2002).
 44. Walfridsson M, Hallborn J, Penttilä M, Keränen S, Hahn-Hägerdal B, Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase, *Appl Environ Microbiol*, 61, 4184–4190 (1995).
 45. Sonderegger M, Schürmperli M, Sauer U, Metabolic engineering of a phosphoketolase pathway for pentose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Environ Microbiol*, 70, 2892–2897 (2007).
 46. Nissen TL, Anderlund M, Nielsen J, Villadsen J, Kielland-Brandt MC, Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool, *Yeast*, 18, 19–32 (2001).
 47. Roca C, Nielsen J, Olsson L, Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production, *Appl Environ Microbiol*, 69, 4732–4736 (2003).
 48. Walfridsson M, Anderlund M, Bao X, Hahn-Hägerdal B, Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* *XYL1* and *XYL2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilization, *Appl Microbiol Biotechnol*, 48, 218–224, (1997).
 49. Eliasson A, Hofmeyr J-HS, Pedler S, Hahn-Hägerdal B, The xylose reductase/xylytol

- dehydrogenase/xylose reductase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme Microb Technol*, 29, 288–297 (2001).
50. Jin YS, Jeffries TW, Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Biochem Biotechnol*, 105, 277–286 (2003).
 51. Karhumaa K., Fromanger R, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund, MF, High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Microbiol Biotech*, 73, 1039–1046 (2007).
 52. Yamada R, Taniguchi N, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A, Cocktail delta-integration: a novel method to construct cellulolytic enzyme expression ratio-optimized yeast strains, *Microb Cell Fact*, 9, 32 (2010).
 53. Tomita Y, Ikeo K, Tamakawa H, Gojobori T, Ikushima S, Genome and transcriptome analysis of the food-yeast *Candida utilis*, *PLoS ONE*, 7, e37226 (2012).
 54. Ha SJ, Galazka JM, Kim SR, Choi JH, Yang X, Seo JH, Glass NL, Cate JH, Jin YS, Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation, *Proc Natl Acad Sci*, 108, 504–509 (2011).
 55. Rizzi M, Erlemann P, Bui-Thanh NA, Dellweg H, Xylose fermentation by yeasts. Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 29, 148–154 (1988).
 56. Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJ, Kötter P, Luttik MA, van Dijken JP, Pronk JT, Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol Rev*, 25, 15–37 (2001).

57. Jin YS, Ni H, Laplaza JM, Jeffries TW, Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity, *Appl Environ Microbiol*, 69, 495–503 (2003).
58. Toivari MH, Aristidou A, Ruohonen L, Penttilä M, Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: importance of xylulokinase (*XKS1*) and oxygen availability, *Metab Eng*, 3, 236–249 (2001).
59. Johansson B, Christensson C, Hobley T, Hahn-Hägerdal B, Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate, *Appl Environ Microbiol*, 67, 4249–4255 (2001).
60. Sonderegger M, Jeppsson M, Hahn-Hägerdal B, Sauer U, Molecular basis for anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* on xylose, investigated by global gene expression and metabolic flux analysis, *Appl Environ Microbiol*, 70, 2307–2017 (2004).
61. Kilian SG, Prior BA, Preez JC, The kinetics and regulation of D-xylose transport in *Candida utilis*, *World J Microbiol Biotechnol*, 9, 357–360 (1993).
62. Ohnishi T, Kawaguchi K, Hagihara B, Preparation and some properties of yeast mitochondria, *J Biol Chem*, 25, 1797–1806 (1966).
63. van Dijken JP, Weusthuis RA, Pronk JT, Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 63, 343–352 (1993).
64. Wahlbom CF, Eliasson A, Hahn-Hägerdal B, Intracellular fluxes in a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cultivated anaerobically at different dilution rates and feed concentrations, *Biotechnol Bioeng*, 72, 289–296 (2001).
65. Bergdahl B, Heer D, Sauer U, Hahn-Hägerdal B, van Niel EW, Dynamic metabolomics

- differentiates between carbon and energy starvation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermenting xylose, *Biotechnol Biofuels*, 5, 34 (2012).
66. Hasunuma T, Sanda T, Yamada R, Yoshimura K, Ishii J, Kondo A, Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microb Cell Fact*, 10, 2 (2011).
 67. Jeffries TW, Grigoriev IV, Grimwood J, Laplaza JM, Aerts A, Salamov A, Schmutz J, Lindquist E, Dehal P, Shapiro H, Jin YS, Passoth V, Richardson PM, Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*, *Nat Biotechnol*, 25, 319–326 (2007).
 68. Yoshida S, Imoto J, Minato T, Oouchi R, Sugihara M, Imai T, Ishiguro T, Mizutani S, Tomita M, Soga T, Yoshimoto H, Development of bottom-fermenting *Saccharomyces* strains that produce high SO₂ levels, using integrated metabolome and transcriptome analysis, *Appl Environ Microbiol*, 74, 2787–2796 (2008).
 69. Klimacek M, Krahulec S, Sauer U, Nidetzky B, Limitations in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*, made evident through comprehensive metabolite profiling and thermodynamic analysis, *Appl Environ Microbiol*, 76, 7566–7574 (2010).
 70. Sirover MA, New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochim Biophys Acta*, 1432, 159–184 (1999).
 71. Grant CM, Quinn KA, Dawes IW, Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress, *Mol Cell Biol*, 19, 2650–2656 (1999).
 72. Shenton D, Grant CM, Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in

- response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem J*, 374, 513–519 (2003).
73. (財)機械システム振興協会, バイオマス・プラスチックの普及を実現する技術システムの開発に関するフィージビリティスタディ報告書-要旨-(システム開発 19-F-9) (2008).
 74. Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B, Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources(1), *Enzyme Microb Technol*, 26, 87–107 (2000).
 75. Narita J, Nakahara S, Fukuda H, Kondo A, Efficient production of L-(+)-lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148, *J Biosci Bioeng*, 97, 423–425 (2004).
 76. John RP, Nampoothiri KM, Pandey A, Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives, *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 524–34 (2007).
 77. Zhou S, Causey TB, Hasona A, Shanmugam KT, Ingram LO, Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110, *Appl Environ Microbiol*, 69, 399–407 (2003).
 78. Okino S, Suda M, Fujikura K, Inui M, Yukawa H, Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation, *Appl Microbiol Biotechnol*, 78, 449–454 (2008).
 79. Ishida N, Saitoh S, Onishi T, Tokuhiko K, Nagamori E, Kitamoto K, Takahashi H, The effect of pyruvate decarboxylase gene knockout in *Saccharomyces cerevisiae* on L-lactic acid production, *Biosci Biotechnol Biochem*, 70, 1148–1153 (2006).
 80. Porro D, Bianchi MM, Brambilla L, Menghini R, Bolzani D, Carrera V, Lievens J, Liu CL, Ranzi BM, Frontali L, Alberghina L, Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts, *Appl Environ Microbiol*,

- 65, 1999, 4211–4215.
81. Bianchi MM, Brambilla L, Protani F, Liu CL, Lievense J, Porro D, Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene, *Appl Environ Microbiol*, 67, 5621–5625 (2001).
 82. Ilmen, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P. and Penttila, M, Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*, *Appl Environ Microbiol*, 73, 117-123 (2007).
 83. Ikushima S, Fujii T, Kobayashi O, Yoshida S, Yoshida A, Genetic engineering of *Candida utilis* yeast for efficient production of L-lactic acid, *Biosci Biotechnol Biochem*, 73, 1818–1824, (2009).
 84. Garvie EI, Bacterial lactate dehydrogenases, *Microbiol Rev*, 44, 106–139 (1980).
 85. Lodi T, Guiard B, Complex transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *CYB2* gene encoding cytochrome b2: *CYP1(HAPI)* activator binds to the *CYB2* upstream activation site UAS1-B2, *Mol Cell Biol* 11, 3762–3772 (1991).
 86. Casal M, Paiva S, Andrade RP, Gancedo C, Leão C, The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by *JEN1*, *J Bacteriol*, 181, 2620–2623 (1991).
 87. Liang GB, Dua GD, Chen J, A novel strategy of enhanced glutathione production in high cell density cultivation of *Candida utilis* —Cysteine addition combined with dissolved oxygen controlling, *Enzyme Microb Tech*, 42, 284–289 (2008).
 88. Fujitomi K, Sanda T, Hasunuma T, Kondo A, Deletion of the *PHO13* gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural, *Bioresour Technol*, 111, 161–166 (2012).

89. Ishii J, Yoshimura K, Hasunuma T, Kondo A, Reduction of furan derivatives by overexpressing NADH-dependent Adh1 improves ethanol fermentation using xylose as sole carbon source with *Saccharomyces cerevisiae* harboring XR-XDH pathway, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 2597–2607 (2013).
90. Dürre P, New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation, *Appl Microbiol Biotechnol*, 49, 639–648 (1998).
91. Wiesenborn DP, Rudolph FB, Papoutsakis ET, Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents, *Appl Environ Microbiol*, 54, 2717–2722 (1988).
92. Wiesenborn DP, Rudolph FB, Papoutsakis ET, Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids, *Appl Environ Microbiol*, 55, 323–329 (1989).
93. Petersen DJ, Bennett GN, Purification of acetoacetate decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and cloning of the acetoacetate decarboxylase gene in *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol*, 56, 3491–3498 (1990).
94. Ismaiel AA, Zhu CX, Colby GD, Chen JS, Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*, *J Bacteriol*, 16, 5097–5105 (1993).
95. Chen JS, Hiu SF, Acetone-butanol-isopropanol production by *Clostridium beijerinckii* (synonym, *Clostridium butylicum*), *Biotechnol Lett*, 8, 371–376 (1986).
96. Hanai T, Atsumi S, Liao JC, Engineered synthetic pathway for isopropanol production in *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol*, 73, 7814–7818 (2007).
97. Jojima T, Inui M, Yukawa H, Production of isopropanol by metabolically engineered

- Escherichia coli*, Appl Microbiol Biotechnol, 77, 1219–1224 (2008).
98. Inokuma K, Liao JC, Okamoto M, Hanai T, Improvement of isopropanol production by metabolically engineered *Escherichia coli* using gas stripping, J Biosci Bioeng, 110, 696–701 (2010).
 99. Schmitt HD, Zimmermann FK, Genetic analysis of the pyruvate decarboxylase reaction in yeast glycolysis, J Bacteriol, 151, 1146–1152 (1982).
 100. Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP, Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, Appl Environ Microbiol, 55, 468–477 (1989).
 101. Van den Berg MA, Steensma HY, ACS2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl co-enzyme A synthetase, essential for growth on glucose, Eur J Biochem, 231, 704–713 (1995).
 102. Hiser L, Basson ME, Rine J, ERG10 from *Saccharomyces cerevisiae* encodes acetoacetyl-CoA thiolase, J Biol Chem, 269, 31383–31389 (1994).
 103. De Jong-Gubbels P, van den Berg MA, Steensma HY, van Dijken JP, Pronk, JT, The *Saccharomyces cerevisiae* acetyl-coenzyme A synthetase encoded by the ACS1 gene, but not the ACS2-encoded enzyme, is subject to glucose catabolite inactivation, FEMS Microbiol Lett, 153, 75–81, (1997).
 104. De Virgilio C, Bürckert N, Barth G, Neuhaus JM, Boller T, Wiemken A, Cloning and disruption of a gene required for growth on acetate but not on ethanol: the acetyl-coenzyme A synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast, 8, 1043–1051 (1992).
 105. Okamura E, Tomita T, Sawa R, Nishiyama M, Kuzuyama T, Unprecedented acetoacetyl-coenzyme A synthesizing enzyme of the thiolase superfamily involved in

- the mevalonate pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 11265–11270 (2010).
106. Luong A, Hannah VC, Brown MS, Goldstein JL, Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins, *J Biol Chem*, 275, 26458–26466 (2000).
107. Starai VJ, Celic I, Cole RN, Boeke JD, Escalante-Semerena JC, Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine, *Science*, 298, 2390–2392 (2002).
108. Hamacher T, Becker J, Gárdonyi M, Hahn-Hägerdal B, Boles E, Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization, *Microbiology*, 148, 2783–2788 (2002).
109. Reifengerger E, Boles E, Ciriacy M, Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression, *Eur J Biochem*, 245, 324-333 (1997).
110. Gárdonyi M, Jeppsson M, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF, Hahn-Hägerdal B, Control of xylose consumption by xylose transport in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol Bioeng*, 82, 818–824 (2003).
111. Cunningham P, Afzal-Ahmed I, Naftalin RJ, Docking studies show that D-glucose and quercetin slide through the transporter GLUT1, *J Biol Chem*, 281, 5797–5803 (2006).
112. Kasahara M, Maeda M, Contribution to substrate recognition of two aromatic amino acid residues in putative transmembrane segment 10 of the yeast sugar transporters Gal2 and Hxt2, *J Biol Chem*, 273, 29106–29112 (1998).
113. Ishii N, Nakahigashi K, Baba T, Robert M, Soga T, Kanai A, Hirasawa T, Naba M., Hirai K, Hoque A, Ho PY, Kakazu Y, Sugawara K, Igarashi S, Harada S, Masuda T, Sugiyama N, Togashi T, Hasegawa M, Takai Y, Yugi K, Arakawa K, Iwata N, Toya Y,

- Nakayama Y, Nishioka T, Shimizu K, Mori H, Tomita M, Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations, *Science*, 316, 593–597 (2007).
114. Flikweert MT, Van Der Zanden L, Janssen WM, Steensma HY, Van Dijken JP, Pronk JT, Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose, *Yeast*, 12, 247-257 (1996).
115. Boulton CA, Ratledge C, Correlation of Lipid Accumulation in Yeasts with Possession of ATP: Citrate Lyase, *J Gen Microbiol*, 127, 169–176 (1981).
116. Matsuda F, Furusawa C, Kondo T, Ishii J, Shimizu H, Kondo A, Engineering strategy of yeast metabolism for higher alcohol production, *Microb Cell Fact*, 10, 70 (2011).
117. Matsuda F, Kondo T, Ida K, Tezuka H, Ishii J, Kondo A, Construction of an artificial pathway for isobutanol biosynthesis in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci Biotechnol Biochem*, 76, 2139–2141 (2012).
118. Avalos JL, Fink GR, Stephanopoulos G, Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols, *Nat Biotechnol*, 31, 335–341 (2013).

発表論文

本論文に関する著者の発表論文は下記の通りである。

○原著論文（査読あり）

1. **Tamakawa H**, Ikushima S, Yoshida S, Ethanol production from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain expressing protein-engineered xylose reductase and xylitol dehydrogenase, *Biosci Biotechnol Biochem*, 75, 1994–2000 (2011).
2. **Tamakawa H**, Ikushima S, Yoshida S, Efficient production of L-lactic acid from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain., *J Biosci Bioeng*, 113, 73–75 (2012).
3. **Tamakawa H**, Ikushima S, Yoshida S, Construction of a *Candida utilis* strain with ratio-optimized expression of xylose-metabolizing enzyme genes by cocktail multicopy integration method, *J Biosci Bioeng*, 115, 532–539 (2013).
4. **Tamakawa H**, Tomita Y, Yokoyama A, Konoeda Y, Ikushima S, Yoshida S, Metabolomic and transcriptomic analysis for rate-limiting metabolic steps in xylose utilization by recombinant *Candida utilis*, *Biosci Biotechnol Biochem*, 77, 1441–1448 (2013).
5. **Tamakawa H**, Mita T, Yokoyama A, Ikushima S, Yoshida S, Metabolic engineering of *Candida utilis* for isopropanol production, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 6231–6239 (2013).

○参考論文（査読あり）

1. Tomita Y, Ikee K, **Tamakawa H**, Gojobori T, Ikushima S, Genome and transcriptome analysis of the food-yeast *Candida utilis*, *PLoS ONE*, 7, e37226 (2012).

○総説/著書（査読なし）

1. 玉川英幸, 生嶋茂仁: 酵母 *Candida utilis* を用いた L-乳酸の発酵生産, バイオプラジャーナル, 日本バイオプラスチック協会, 38, 12-16 (2010).
2. 玉川英幸, 生嶋茂仁: トルラ酵母 *Candida utilis* を用いた L-乳酸の発酵生産, 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—, シーエムシー出版, 134-141 (2010).
3. 玉川英幸, 生嶋茂仁: トルラ酵母 *Candida utilis* を用いた乳酸の発酵生産, 植物由来ポリマー・複合材料, サイエンス&テクノロジー(株), 89-94 (2011).
4. 玉川英幸: トルラ酵母 *Candida utilis* による非可食系バイオマスからのバイオ燃料、バイオ乳酸の生産, 月刊バイオインダストリー-バイオリファイナリー最前線-, シーエムシー出版, 10-16 (2012).
5. 吉田聡, 足海洋史, 西田武央, 大澤文, 生嶋茂仁, 玉川英幸, 小林統: キリンググループの環境への取組み, 生物工学会誌, 日本生物工学会, 4, 179-183 (2012).
6. 玉川英幸: トルラ酵母 *Candida utilis* によるキシロースからのバイオ乳酸の生産, バイオサイエンスとインダストリー, バイオインダストリー協会, 70, 209-210 (2012).
7. 玉川英幸, 生嶋茂仁, 吉田聡:, バイオリファイナリーに向けた酵母物質生産系の開発, 日本生物工学会誌, 日本生物工学会, 7, 401-406 (2012).
8. 玉川英幸: Non-conventional Yeast の魅力, 日本生物工学会誌, 日本生物工学会, 7, 452 (2012).
9. 玉川英幸: トルラ酵母を用いたキシロースからのエタノール、乳酸生産, リサイクルバイオテクノロジーの最前線, シーエムシー出版, 142-149 (2013).

○特許出願

1. 西田武央, 足海洋史, 加藤優, 玉川英幸: 草本系バイオマスの前処理方法及びエタノール製造方法, 特開 2009-153442
2. 小林統, 玉川英幸: キシリトールデヒドロゲナーゼをコードする DNA, 再表 2008093847 (US7833764-B2: 米国で成立)
3. 玉川英幸, 生嶋茂仁, 此枝優希: キシロースを炭素源として使用しうる、キャンディダ・ユティリスによる物質の製造法, WO/2010/095750
4. 玉川英幸, 生嶋茂仁: 酵母におけるアセチル CoA を経由する代謝経路を利用した物質の製造法, 特願 2011-129527

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始御懇切なるご指導を賜りました東北大学農学研究科、阿部敬悦教授に深く感謝いたします。

本論文の審査にあたり、多くのご助言を頂きました東北大学大学院農学研究科、五味勝也教授、米山裕准教授、齋藤忠夫教授、原田昌彦准教授、新谷尚弘准教授、磯貝恵美子教授、金子淳准教授、渡部昭助教、安藤太助助教に感謝いたします。

学生時代、実験の手法、研究に対する哲学をご指導頂きました東北大学大学院農学研究科、神尾好是前教授、伊藤義文前教授、阿部直樹助手に感謝いたします。

本研究を遂行する機会を与えて下さった麒麟(株)基盤技術研究所所長 水谷悟博士、同副所長 吉田有人博士に感謝いたします。

研究の道を示してくださり、論文作成や実験の方針など、様々なご指導、ご助言を頂きました、麒麟(株)酒類技術研究所 小林統博士、吉田聡博士、基盤技術研究所 桐浴隆嘉博士に心から感謝いたします。特に吉田聡博士には人生の手本になっていただきました。

共に実験を行い、成果を共有させていただいた、基盤技術研究所 生嶋茂仁博士、富田康之博士、此枝優希氏、横山亜紀氏、三田登貴子氏に深く感謝いたします。特に、生嶋茂仁博士にはすべての研究に関わっていただき、多大なるご協力を頂きました。

会社での研究を公私共に支えてくださった、麒麟(株)基技術研究所、健康技術研究所、酒類技術研究所の皆様感謝いたします。

最後に、常に支えとなってくれた妻 夕紀に心から感謝いたします。