

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20760538

研究課題名（和文）バイオエタノールの効率的生産を目指したスーパー酵母の育種

研究課題名（英文）Breeding of yeast for efficient bio-ethanol production

研究代表者

仁宮 一章（NINOMIYA KAZUAKI）

金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教

研究者番号：10379125

研究成果の概要（和文）：セルラーゼ高発現酵母を選抜育種するために、細胞表層に発現したセルラーゼの酵素量を蛍光免疫染色で蛍光強度に置き換えることにより、Fluorescence-activated cell sorter (FACS)を用いて、セルラーゼ高発現株を蛍光強度の高い細胞集団として、変異酵母ライブラリーから high-throughput に分取した。その結果、親株 MT8-1III 株のセルラーゼ活性が  $1.6 \times 10^{-3}$  U/OD unit であったのに対し、選抜された酵母集団のセルラーゼ活性は  $5.2 \times 10^{-3}$  U/OD unit へ向上させることができた。

研究成果の概要（英文）：By using immunocytochemistry and fluorescent activated cell sorter (FACS), yeast population highly expressing cellulase on the cell surface was enriched from the mutant population prepared by irradiation with carbon ion beams (220 MeV  $^{12}\text{C}^{5+}$ , 100 Gy). The cellulase activity of selected yeasts was  $5.2 \times 10^{-3}$  U/OD unit, whereas cellulase activity of parental strain was  $1.6 \times 10^{-3}$  U/OD unit.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオエタノール、酵母、酵素発現、FACS、転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

近年、非食用バイオマスであるセルロースを原料としたエタノール発酵生産への関心が高まっている。セルロース糖化酵素であるセルラーゼを発現する酵母を用いた“セルロースからの直接エタノール発酵生産”では、酵母のセルラーゼ発現量が生産コストを下げるための律速段階の1つとされている。

従来、ストレス耐性株など酵母の効率的な育種には、ある特定少数の遺伝子に的を絞って、その発現量を調節する方法 (Systematic approach) や、薬剤や UV などを用いてゲノムへランダム変異を導入し、目的表現型の選抜を行う方法 (Random approach) が報告されている。

セルロース系バイオマスからのエタノール生産におけるコストを低減するため、スーパー酵母の育種を行う；すなわち、セルロースからエタノールへのbio-conversionにおける律速段階である「細胞表層のセルロース糖化酵素発現量」や「エタノールストレスに対する耐性」の劇的な向上を目的とする。スーパー酵母の育種には、大規模な遺伝子発現を制御する機能をもつタンパク質 (基本転写因子) の遺伝子 *spt15* に着目し、Error prone PCRと High-throughput screening技術、そしてGene shufflingといった進化工学的手法を用いて *spt15* 遺伝子配列を合目的的に改変する。

## 2. 研究の目的

2008年度は、大規模な遺伝子発現を制御する機能をもつタンパク質 (基本転写因子: GTF) の遺伝子 *spt15* に対して、進化工学的手法であるランダム変異と DNA shuffling を応用させることにより、遺伝子発現プロファイル全体 (代謝ネットワーク) を進化させる育種法 (進化代謝工学) の構築に向け、その基礎的検討を行った。

2009年度は、調整した変異酵母ライブラリーからセルラーゼ高発現酵母を選抜育種するために、細胞表層に発現したセルラーゼの酵素量を蛍光免疫染色で蛍光強度に置き換えることにより、Fluorescence-activated cell sorter (FACS) を用いてセルラーゼ高発現株を蛍光強度の高い細胞集団として high-throughput に分取することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3.1. 使用菌株および培地

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 株ならびに、3種のセルラーゼ endoglucanase II (EGII)、cellobiohydrazase II (CBHII) ならびに  $\beta$ -glucosidase を細胞表層に発現した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1/pEG23u31H6/pFCBH2w3/pBG211 株<sup>1)</sup>

(MT8-1III 株) を用いた。酵母の培養は YPD 培地もしくは SD 培地を用い 30°C で行なった。また、クローニングホストには大腸菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  株を用いた。大腸菌の培養は LB 培地 (必要に応じアンピシリン添加) を用いて 37°C で行なった。

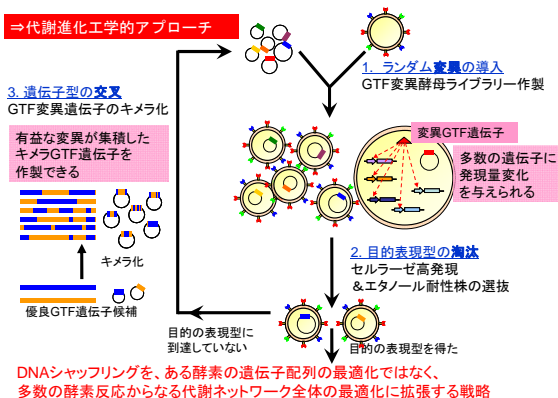


Fig. 1 Strategy for yeast improvement by evolutionary metabolic engineering

### 3.2. GTF 変異酵母ライブラリーの作製

まず、GTF 遺伝子の PCR クローニングを行なった。 *S. cerevisiae* MT8-1 株から抽出したゲノム DNA を鋳型に、 *spt15* 遺伝子および上流 800 bp プロモーター領域を PCR 増幅し、さらに overlap extension PCR で連結した。この遺伝子断片を YCp 大腸菌/酵母シャトルベクター p415ADH<sup>2)</sup> へと *NheI* と *SaI* サイトを用いてサブクローニングすることにより、コントロールベクター p415-P-*spt15* を得た。

次に、変異 GTF 遺伝子ライブラリーを作製するため、作製した p415-P-*spt15* を鋳型として *spt15* 遺伝子領域をターゲットとして Error prone PCR を行なった。Error prone PCR は、通常より dTTP, dCTP, Mg<sup>2+</sup>濃度を増加させた条件で行なった<sup>3)</sup>。また、MnCl<sub>2</sub>濃度の影響を 0~1 mM で検討した。得られた Error prone PCR 産物は、*NheI* と *SaI* サイトを用いて p415-P-*spt15* へとサブクローニングした。 *spt15* 遺伝子に対する変異導入の有は、DNA シーケンシングを行なうことにより確認した。

GTF 変異遺伝子ライブラリーを大腸菌から抽出し、酵母 *S. cerevisiae* MT8-1/III 株へ酢酸リチウム法で導入した。

### 3.3. 重イオンビーム変異酵母ライブラリーの作製

MT8-1III 株に炭素イオン (220 MeV <sup>12</sup>C<sup>5+</sup>) を線量 100 Gy で照射し (以下、重イオンビーム照射)、変異株集団を調製した。

### 3.4. 蛍光免疫染色および FACS

酵母表層のセルラーゼ分子の量を蛍光量

として評価するため、EGII ならびに CBHII のタグとして融合発現させた RGSHis<sub>6</sub> および FLAG に対する一次抗体、それぞれの一次抗体に特異的な Alexa Fluor 488 (FITC) および R-phycoerythrin (PE) 標識二次抗体を用いて二重染色を行った。蛍光免疫染色を行った酵母株は、FACS を用いて蛍光強度を測定し、FITC ならびに PE の蛍光強度の高い細胞集団を目的株として cell sorting を行なった。

### 3.5. セルラーゼ活性測定

酵母表層の EGII ならびに CBHII の総括のセルラーゼ活性を、カルボキシメチルセルロース (CMC) を基質として測定した。CMC が加水分解されることにより生じる還元末端の増加速度を 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 法を用いて測定し、セルラーゼ活性として評価した。1 min で 1 μmol の還元末端を生じる酵素活性を 1 U、また、波長 600 nm における濁度 OD<sub>600</sub> = 10 の酵母細胞懸濁液 1 ml を 1 OD unit と定義し、酵母細胞の持つセルラーゼ活性を U/OD unit で表した。

## 4. 研究成果

### 4.1. 使用菌株および培地

MnCl<sub>2</sub> 濃度が Error prone PCR に及ぼす影響を検討したところ、0-1.0 mM では目的の PCR 産物が得られたが、それ以上の MnCl<sub>2</sub> では得られなかった。一方、変異 GTF 遺伝子ライブラリー作製については、MnCl<sub>2</sub> を 1.0mM で得られた PCR 産物ではクローンが得られず、MnCl<sub>2</sub> 濃度が 0~0.1mM の場合でクローンが得られる結果となった。これは 1.0mM の MnCl<sub>2</sub> は PCR 反応には阻害を示さなかったが、その後のサブクローニング操作において何らかの阻害を示したためと考えられる。

今回、作製した変異 GTF 遺伝子ライブラリーのサイズは 2×10<sup>4</sup> クローンであった。DNA シーケンシングの結果、得られたライブラリーの変異導入率は約 3.2/kbp であった。この結果から、今回ターゲットとした *spt15* 遺伝子 (730 bp) に対して約 2.3 個のアミノ酸置換が起こっていると考えられる。以上、GTF 遺伝子 *spt15* に変異が導入された GTF 変異ライブラリーを作製することができた。

### 4.2. GTF 変異酵母ライブラリーの作製

Figure 1A に親株である MT8-1III 株の蛍光免疫染色の結果を示す。FITC ならびに PE の蛍光強度 (EGII ならびに CBHII の発現量に相当) の相対値が 10<sup>4</sup> 以上の領域 (P4 領域) に分布する細胞は全体の 1.6% であった。一方、Fig. 1B には、親株 MT8-1III 株に対して「重イオンビーム照射による変異導入」と「FACS による P4 領域の細胞集団の選抜」を行なった酵母の蛍光免疫染色の結果を示す。P4 領域

に存在する細胞は全体の 6.9% に増加することが分かった。

親株 MT8-1III 株と、重イオン変異と P4 領域の選抜を行なった酵母について、セルラーゼ活性を測定した。その結果、親株 MT8-1III 株のセルラーゼ活性が 1.6×10<sup>-3</sup> U/OD unit であったのに対し、選抜された酵母集団のセルラーゼ活性は 5.2×10<sup>-3</sup> U/OD unit へ向上していることが分かった。

### 参考文献

- 1) Y. Fujita et al., Appl. Environ. Microbiol., 68, 5136-5141 (2002)
- 2) D. Mumberg et al., Gene, 156, 119-122 (1995).
- 3) P. C. Cirino et al., Method in Molecular Biology, 231, 3-9 (2003).

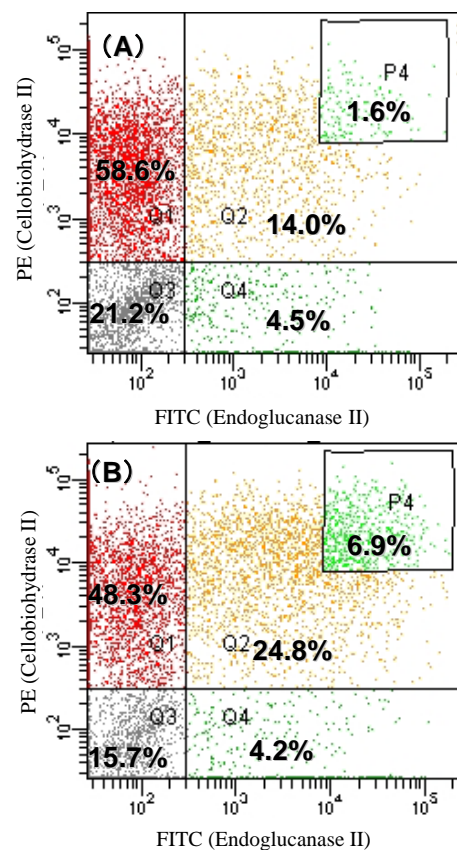


Fig. 2 Scatter plots of FITC and PE fluorescence corresponding to EGII and CBHII expression on yeast cells, respectively. (A) Parental yeast strain of MT8-1III. (B) Selected yeast from P4 region cells sorted from ion-beam irradiated MT8-1III.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. Kazuaki Ninomiya, Kazuhiro Matsuda, Takashi Kawahata, Tadashi Kanaya, Mamiko Kohno, Yoshio Katakura, Masanori Asada, Suteaki Shioya Effect of CO<sub>2</sub> concentration on the growth and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium longum* cultivated under anaerobic conditions. J. Biosci. Bioeng. 107(5) 535-7 2009 査読あり

2. Naoyuki Okuda, Mayumi Soneura, Kazuaki Ninomiya, Yoshio Katakura, S. Shioya: Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production, J. Biosci. Bioeng. 106(2) 128-33 2008 査読あり

3. Naoyuki Okuda, Kazuaki. Ninomiya, Yoshio Katakura, Suteaki Shioya: Strategies for reducing supplemental medium cost in bioethanol production from waste house wood hydrolysate by ethanologenic *Escherichia coli*: Inoculum size increase and co-culture with *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biosci. Bioeng., 105(2), 90-96 2008 査読あり

[学会発表] (計5件)

1. 仁宮一章、田中順喜、清水宣明 ケナフチップの酵素糖化に及ぼす超音波照射処理の効果 日本ソノケミストリー学会 第18回討論会 2009年10月23-24日 長岡技術科学大学 (新潟県)

2. 岸本淳平, MOUKAMNERD Churairat, 大道徹太郎, 平尾桂一, 仁宮一章, 塩谷捨明, 紀ノ岡正博, 片倉啓雄 固体連続併行複発酵によるバイオエタノールの生産 日本生物工学会 61回大会 2009年9月23-25日名古屋大学 (愛知県)

3. 片倉啓雄, 加藤真由, 仁宮一章, 近藤昭彦, 植田充美, 塩谷捨明 酵母に表層提示される糖化酵素のみかけの活性に及ぼす糖鎖修飾の影響 日本生物工学会 61回大会 2009年9月23-25日名古屋大学 (愛知県)

4. M. Churairat, 原田佳苗, 大道徹太郎, 平尾桂一, 片倉啓雄, 仁宮一章, 塩谷捨明 Ethanol production from biomass by

Consolidated Continuous Solid State Fermentation System 化学工学会 第74年会 2009年3月18-20日 横浜国立大学 (神奈川県)

5. 奥田直之, 埴浦真由美, 仁宮一章, 片倉啓雄, 塩谷捨明: *Ureibacillus thermosphaericus* を用いた木質系バイオマス加水分解液の発酵阻害物質除去 日本生物工学会 60回大会 2008年8月27-29日 東北学院大学 (宮城県)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: バイオマスを用いたアルコール又は有機酸の製造方法

発明者: 仁宮一章, 高橋憲司, 清水宣明

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特願第2009-238797

出願年月日: 2009年10月16日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁宮一章 (NINOMIYA KAZUAKI)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・

助教

研究者番号: 10379125