



Metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of useful compounds from renewable resources.

徳弘, 健郎

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4593

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004593>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 徳弘 健郎
博士の専攻分野の名称 博士（工学）
学 位 記 番 号 博い第 4593 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of useful
compounds from renewable resources. (酵母を用いた代
謝工学的手法による再生可能資源からの有用物質生産)

審 査 委 員

主 査 教 授 近藤 昭彦
教 授 福田 秀樹
教 授 上田 裕清

(氏名： 徳弘健郎 NO. 1)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、古代から酒の醸造やパンの製造などに用いられてきた人類とは深い関わりのある微生物である。また、人間に対して安全で、大規模な醸造技術が既に確立されているため工業利用が容易である。近年の遺伝子組換え技術の進展に伴い、*S. cerevisiae* はアルコールやパン酵母の製造以外にも様々な有用物質生産に用いることが出来ることが示されてきた。本研究では、*S. cerevisiae* に有用物質の生産能力を付与し、代謝工学的手法を用いてその生産性を高めることを目的とした。

代謝工学とは、合理的な代謝設計と遺伝子工学による改良により微生物による有用物質生産性を高めていく手法である。代謝工学の対象は、

- 1) 生産物質の拡大、
- 2) 生産性・収率の向上と副反応産物の低減、
- 3) 基質範囲の拡大、
- 4) 菌株特性の改良によるプロセス効率向上、

に分類される。本研究では、第1章でプレニルアルコール、第2、3章で乳酸を生産させることにより生産物質を拡大し、第2章では生産物質(乳酸)の収率向上と副産物(エタノール)低減に取り組んだ。さらに、第3、4章では、酵母の細胞表層工学を応用することにより、食料と競合しないバイオマス由来セルロースを発酵基質として利用できるようにして基質の範囲を拡大する検討を行った。

(第1章) 本研究で生産を行った有用物質の一つはプレニルアルコールの一種であるゲラニルゲラニオール (GGOH) である。この化合物は、イソプレノイド骨格をもつ二次代謝化合物であり、香料やビタミン A, E などの製薬原料として価値が高い。現在行われている化学合成法では力価の低いラセミ体混合物しか生産できないが、微生物を用いた発酵法を開発すれば力価の高い光学活性体 (*all-E* 体) のみの生産が可能となると期待されている。GGOH は、イソプレノイド生合成経路の中間代謝物であるゲラニルゲラニル2リン酸 (GGPP) が脱リン酸化された化合物であり、脂溶性の二次代謝物であるため高生産には困難が予想された。これまでの研究で、GGPP 合成酵素遺伝子 *BTS1* の過剰発現により GGOH が生産されることが分かっていた。本研究では GGOH 生産を促進するために GGPP を脱リン酸するのに適したホスファターゼ遺伝子を探索した。その結果、酵母のジアシルグリセロールリン酸ホスファターゼ (*DPPI*) 遺伝子が GGOH の生産性が向上させることを見いだした。その際、*DPPI* 遺伝子と

BTS1 遺伝子を個別に同時発現させた場合より、両遺伝子の融合遺伝子を発現させた方が、より大きな増産効果が得られた。この融合遺伝子とプレニルニリン酸生合成経路上の律速遺伝子の発現を同時に強化することにより、試験管レベルで 280 mg/l のプレニルアルコールを生産することに成功した。10L 容のジャー培養によるスケールアップ試験ではグルコースおよびエタノールフィードを制御することにより最大 3.3 g/L (菌体含量 70.9 mg/g dry cell, 炭素転換率 1.65 % w/w) の GGOH 生産に成功した。プレニルアルコールのような脂溶性の二次代謝物質を微生物に大量生産させた例は少ないが、例えば同じイソプレノイド生合成経路の下流にある物質であるカロテノイド (リコペン) を組換え酵母で生産させた場合の生産量 (菌体含量) が 7.8 mg/g であったことが報告されており、上記の生産量は非常に高いレベルであるといえる。

(第2章) 本研究で生産を行ったもう一つの有用物質はポリ乳酸の原料である乳酸である。植物由来の糖質から作られたポリ乳酸はカーボンニュートラルなプラスチックであり、石油資源から作られるプラスチックの代替物質として期待されている。酵母は元々ほとんど乳酸を生産しないが、乳酸脱水素酵素 (LDH) を発現させると乳酸を生産できるようになることが知られている。しかし、酵母の代謝はエタノール生産に強く傾いているため、エタノールの生産を抑制して乳酸の生産収率を向上させることが課題であった。従来、エタノール生産を抑制するためにピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) を破壊することが行われてきた。3つの PDC 遺伝子 (*PDC1*, *PDC5*, *PDC6*) のうち主要遺伝子である *PDC1* を破壊し、6コピーの LDH 遺伝子を導入した場合、乳酸の収率は 68%であった。*PDC1* と *PDC5* を同時に破壊すると乳酸収率は 81%まで向上したが、増殖速度と乳酸生産速度の大幅な遅延がみられることが分かっていた。そこで本研究では *PDC1* 遺伝子破壊と同時に、アルコール脱水素酵素 (*ADH1*) 遺伝子の破壊を試みたところ、乳酸の生産速度をあまり低下させずに対糖収率を向上させ、副産物のエタノールを大幅に低減させることに成功した。ジャー培養による検討で通気条件が乳酸生産性に大きな影響を及ぼすことを明らかにし、通気量を増やすと乳酸生産速度は向上するが乳酸収率が低下することを見いだした。通気量を最適化した場合の乳酸収率は 75%まで向上した。

(第3章) 近年、バイオエタノールや乳酸などが発酵法により大量に生産されるようになり、食料価格が高騰するなどの問題が起こっている。食料と競合しない廃棄バイオマス由来のセルロースを原料とすることができればこのような問題を解決できる。しかし酵母はセルロース分解酵素 (セルラーゼ) を持たないためセルロースを直接資化する

(氏名： 徳弘健郎 No. 3)

ことが出来ない。そこで細胞表層工学を利用することにより乳酸生産酵母の細胞表層にセルラーゼを生産させることにより、セルロースから乳酸を直接生産させるための研究を行った。セルロースのセルラーゼによる主要な分解産物はセロビオースであり、セロビオースはセルラーゼのキーマルターゼであるセロビオヒドロラーゼ (CBH) の活性を阻害することが知られている。そこで最初に、セロビオースをグルコースに分解するβ-グルコシダーゼ (BGL) を乳酸生産酵母の細胞表層に生産させることを試みた。工業利用を想定すると、安定性の高い染色体組み込み型ベクター (YIp) を用いて BGL 遺伝子を酵母に導入することが必要である。しかし、YIp で十分な BGL 発現量を達成した例は報告されていなかった。そこで本研究では YIp で発現プロモータを最適化することにより BGL を安定的に高発現することに成功した。作製した BGL 高発現酵母のセロビオースからの乳酸生産速度は、グルコースからの場合と同等の速度であり、十分な BGL 発現量が達成された。さらに、高分子のセルロースを分解させるためにエンドグルカナーゼおよびセロビオヒドロラーゼを発現させることにより、アモルファスセルロースからの乳酸生産が可能であることを示した。

(第4章) 第3章に引き続き、乳酸生産酵母に2種類の BGL、2種類のエンドグルカナーゼ (EG) および2種類の CBH の計6種類のセルラーゼ遺伝子を YIp を用いて導入した。BGL、EG、CBH の相乗効果によりセルラーゼ活性が向上し、非晶性セルロースから直接乳酸生産を行うことに成功した。

以上のように、酵母の代謝工学的改変による有用物質生産性の向上と、バイオマス利用技術について有用な研究成果が得られている。

氏名	徳弘 健郎		
論文 題目	Metabolic engineering of the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> for efficient production of useful compounds from renewable resources. 酵母を用いた代謝工学的手法による再生可能資源からの有用物質生産		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	近藤 昭彦
	副 査	教授	福田 秀樹
	副 査	教授	上田 裕清*
	副 査		

要 旨

本学位論文の第1章ではビタミン A, E などの製薬原料として価値が高いイソプレノイド誘導体であるゲラニルゲラニオール (GGOH) の酵母による高生産を試みている。本研究では、ジアシルグリセロールリン酸ホスファターゼ (DPP1) 遺伝子が GGOH 生産性向上に有用であることを新たに見出し、さらに DPP1 を、GGPP 合成酵素遺伝子 *BTS1* との融合タンパクとして発現することによる大きな増産効果を見出している。また、この融合遺伝子と他の律速遺伝子を、遺伝的に安定なゲノムインテグレーション法により発現強化して工業利用可能な株を作成した。この株はジャー培養によるスケールアップ試験で最大 3.3 g/L という既存の研究に比べても高いレベルの GGOH 生産に成功している。以上のように、融合遺伝子の代謝工学への応用と工業利用を目指した菌株改良の結果、脂溶性の二次代謝物質という生産困難な物質を g/L オーダーで生産したことは高く評価できる。

第2章では、カーボンニュートラルなプラスチックとして期待されているポリ乳酸の原料である乳酸の酵母での生産に取り組んでいる。元来酵母の代謝はエタノール生産に強く傾いているため、エタノールの生産を抑制して乳酸の生産率を向上させることが課題となっていた。従来、エタノール生産を抑制するためにピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子 *PDC1* と *PDC5* を同時に破壊すると乳酸収率は 81% まで向上するが、増殖速度と乳酸生産速度の大幅な遅延がみられ、工業利用には適さないことがわかってきた。本研究では *PDC1* 遺伝子破壊と同時に、アルコール脱水素酵素 (ADH1) 遺伝子の破壊を試みたところ、乳酸の生産速度をあまり低下させずに対糖収率を向上させ、副産物のエタノールを低減させることに成功している。またジャー培養による検討で通気条件が乳酸生産性に大きな影響を及ぼすことを明らかにし、通気量を増やすと乳酸生産速度は向上するが乳酸収率が低下するを見出し、乳酸収率を 75% まで向上することに成功している。

第3、4章では、食料と競合しない廃棄バイオマス由来のセルロースを乳酸発酵の原料とすることを目的として、乳酸生産酵母の細胞表層にセルラーゼを生産させて、セルロースから乳酸を直接生産させるための研究を行っている。第3章ではβ-グルコシダーゼ (BGL) を、工業利用に適した安定性の高い染色体組み込み型ベクター (YIp) を用いて乳酸生産酵母の細胞表層に安定的に高発現することに成功している。作製した BGL 高発現酵母のセロビオースからの乳酸生産速度は、グルコースからの場合と同等の速度であり、十分な BGL 発現量が達成されたと評価できる。さらに、第4章では、高分子のセルロースを分解させるために6種類のセルラーゼの同時発現に成功し、アモルファスセルロースからの乳酸生産が可能であることを示しており、産業上の有用性が示されたと考えられる。

本研究は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に有用物質の生産能力を付与し、代謝工学的手法を用いてその生産性を高めることを目的とした研究であり、1次代謝物および2次代謝物の高生産に関する代謝工学的な技術について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の徳弘健郎は、博士 (工学) の学位を得る資格があると認める。