

# 耐熱性セルラーゼを生産する耐熱性酵母の構築

鹿児島大学 農学部 生物資源化学科 玉置 尚徳

## 1. 研究の目的

化石燃料の枯渇を目前に、新たな代替燃料としてバイオエタノールが注目されている。バイオエタノールとは、サトウキビかすや廃木材、大麦、トウモロコシなどの植物性バイオマスを分解して得られるグルコースを発酵させて作るエタノールのことである。セルロースは地球上に最も多く存在する植物性バイオマスであり、バイオエタノール生産の原料として魅力ある素材である。エタノール発酵を行うためには、セルロースはグルコースまで分解される必要がある。セルロースをグルコースまで分解するには、少なくとも3種類の酵素が必要である。一つは、*endo-glucanase* であり、セルロースの $\beta$ -1,4結合を加水分解するエンド型の酵素である。二つ目は、*cellobiohydrolase* であり、セルロースの末端よりセロビオース単位で加水分解を行うエキソ型酵素である。三つ目は、 $\beta$ -*glucosidase* であり、*endo-glucanase* や *cellobiohydrolase* の作用によって生じたセロビオースやセロオリゴ糖をグルコースにまで分解する。これらの酵素は、セルラーゼと総称され多くの研究が行われるとともに様々な産業分野で利用されている。

我々は、これまでに比較的高温で機能するセルラーゼの探索を行い、*Aspergillus niger* より耐熱性の *endo-glucanase* 遺伝子をクローニングした。また、耐熱性のカビである *Thermoascus aurantiacus* が耐熱性セルラーゼを生産することを見出し、本株より *endo-glucanase*、*cellobiohydrolase*、 $\beta$ -*glucosidase* の遺伝子をクローニングし、各遺伝子を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* または *Pichia pastoris* で高発現することに成功した。

本研究においては、これら耐熱性セルラーゼ遺伝子を耐熱性酵母において高発現する株の構築を行い、本株を用いてセルロースから直接エタノール発酵を行うことのできる酵母の構築を目的として研究を行った。

## 2. 研究方法と結果

我々はこれまでに耐熱性セルラーゼの探索を行い、*Aspergillus niger* より耐熱性 *endo-glucanase* 遺伝子をクローニングし、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にて高発現に成功した (文献6)。その後、耐熱性のカビである *Thermoascus aurantiacus* を高温培養するとさまざまなセルラーゼが分泌生産されることを見出し、本株より耐熱性 *endo-glucanase* (文献5)、耐熱性 *cellobiohydrolase* (文献4) の遺伝子をクローニングし、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて分泌生産させることに成功した。これら組換え酵素は、それぞれ 70°C 2時間、あるいは 65°C 1時間のインキュベーションによって目立った活性の低下が認められないことを示した。また、両酵素の遺伝子は、*T. aurantiacus* を 50°C で培養した場合に特異的に発現されることを明らかにした。さらに、本株より遺伝子の相同性を指標として  $\beta$ -*glucosidase* 遺伝子のクローニングを行った。得られた遺伝子を酵母 *Pichia pastoris* にて発現させ、組み換え酵素を精製した。本酵素の性質を調べたところ、本酵素は有機溶媒の添加によって特異的に活性化する酵素であることが明らかとなった (文献3)。しかしながら、本酵素は耐熱性を示さなかったことから、*T. aurantiacus* を 50°C で培養した培養液より新たに耐熱性を示す  $\beta$ -*glucosidase* の精製を行った。得られた酵素のアミノ酸配列を基に遺伝子を取得した。本遺伝子は、当初 *Pichia pastoris* においては発現に成功しなかったが、出芽酵母の性フェロモンである  $\alpha$  ファクター由来の分泌シグナルを付加することで分泌生産することに成功した (文献2)。

我々はまた、耐熱性酵母として *Kluyveromyces marxianus* に着目し、NBRC (NITE Biological Resource Center) より取り寄せた複数の菌株について、耐熱性とエタノール発酵能を調べ、その結果を基に *K. marxianus* NBRC1777 株を選定した。本株について遺伝子導入の選択マーカーとして利用できる遺伝子のクローニングおよび栄養要求性変異株の構築を行い *URA3*, *LEU2*, *TRP1* の3つの遺伝子が破壊されたウラシル、ロイシン、トリプトファン要求性株を得た。その後3種類のセルラーゼ遺伝子を強力なプロモーターにつないだ高発現ベクターを構築し、*URA3*, *LEU2*, *TRP1* などの選択マーカーを用いて順次 *K. marxianus* の染色体に導入することで、3種類のセルラーゼを同時に分泌生産できる株を構築した。本株は、セロビオースを分解してエタノールを発酵することが出来たが、さらに高分子のカルボキシメチルセルロースは、資化できるものの効率の良いエタノール発酵には至らなかった (文献1)。

### 3. 本研究の意義

エタノール発酵においては、発酵熱による温度上昇が問題となることから冷却設備の導入などに費用がかかる。本研究において構築をめざす耐熱性セルラーゼを生産する耐熱性酵母を用いれば、冷却設備を必要としない設備において比較的高温で発酵を行うことができる。また、高温発酵のメリットとして雑菌によるコンタミネーションの低下や発酵速度の上昇が期待され、省エネルギープラントとして機能することが可能となる。本研究で得られた結果をさらに深化させることによって近い将来省エネ型のエタノール発酵生産システムが構築できるものと考えられる。

#### 文献

- (1) Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. Hong, J., Wang Y., Kumagai, H., and Tamaki, H. (2007) *J. Biotechnology*, 130, 114-123.
- (2) Cloning and functional expression of thermo-stable  $\beta$ -glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. Hong, J., Tamaki, H., and Kumagai, H. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 1331-1339.
- (3) Unusual hydrophobic linker region of  $\beta$ -glucosidase (BGLII) from *Thermoascus aurantiacus* are required for hyper activation by organic solvents. Hong, J., Tamaki, H., and Kumagai, H. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73 (1), 80-88.
- (4) Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. Hong, J., Tamaki, H., Yamamoto, K., and Kumagai, H. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63 (1), 42-50.
- (5) Cloning of a gene encoding thermo-stable endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. Hong, J., Tamaki, H., Yamamoto, K., and Kumagai, H. (2003) *Biotechnology Lett.* 25, 657-661
- (6) Cloning of a gene encoding a highly stable endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast. Hong, J., Tamaki, H., Akiba, S., Yamamoto, K., and Kumagai, H. (2001) *J. Bioscience and Bioeng.*, 92, 434-441.