

第16回 NAIST 産学連携フォーラム



バイオエタノール生産用酵母の 開発と課題

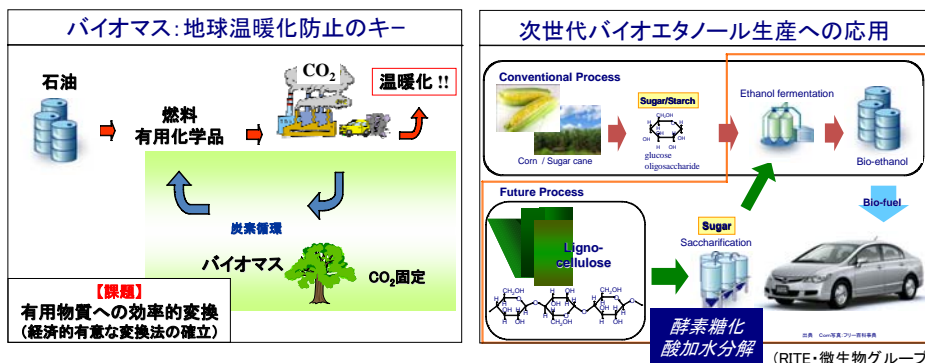
2007年9月6日

バイオサイエンス研究科
細胞機能学講座
高木 博史



バイオエタノールの現状

バイオマス → 糖 → エタノール発酵(バイオエタノール)



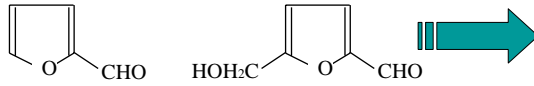
<原料> 農林産物由来の未利用バイオマス

- 現状** サトウキビ、トウモロコシなどの糖質、デンプン
- 近い将来** ソフトバイオマス(トウモロコシの芯、稲わらなどセルロース主体)
- 将来** ハードバイオマス(建築廃材、間伐材などリグニン主体)

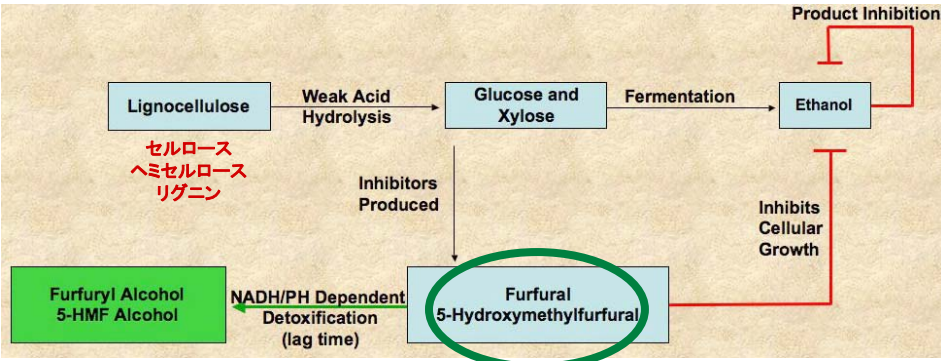
バイオエタノールの課題(酵母)

1) 生育阻害物質(フルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラール)の除去

- ・リグノセルロースの弱加水分解により、グルコースやキシロースとともに生成
- ・酸化ストレス(ミトコンドリア膜、液胞膜、クロマチン、細胞骨格の損傷)を誘導

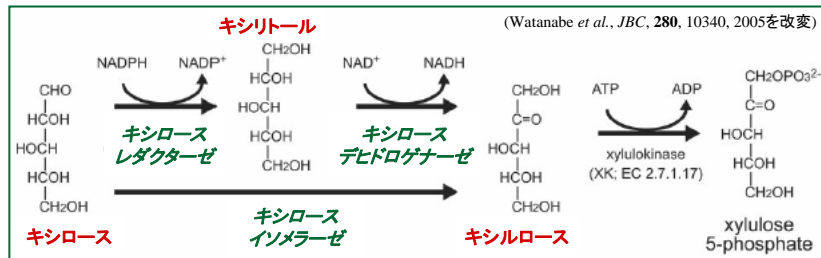


酸化ストレス耐性 !!



(Gorsich *et al.*, YGMB Meeting, Princeton, USA, 2006)

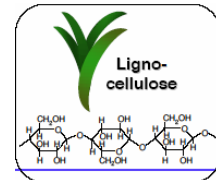
2) キシロース(リグノセルロース中のペントースの主成分) 資化能の付与



他の微生物酵素の酵母での発現 !!

3) セルロース(リグノセルロースの主成分) 分解能の向上

- ・実際に使用できる酵素はほとんどない(Novozyme, Genencor)
- ・現在、最も効率良く分解するのはシロアリ(termite)由来酵素



セルラーゼの探索、機能改変、酵母での発現 !!

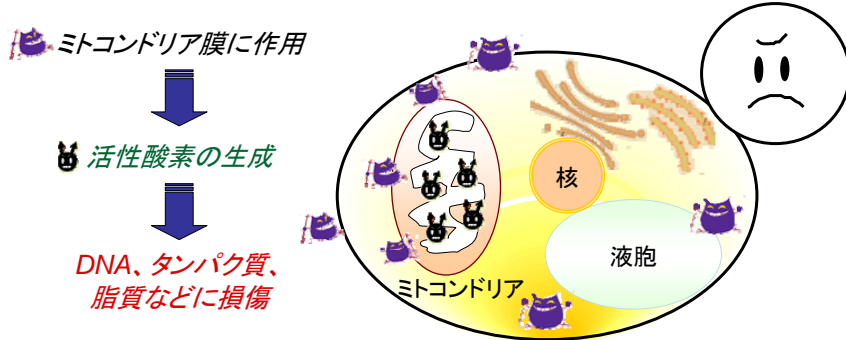
4) エタノール生産能の強化 ➡ <清酒酵母> エタノール濃度約20%

毒性 タンパク質や膜にダメージ

- ・細胞内タンパク質(酵素)の変性
- ・生体膜の流動性上昇、透過性増加

ストレス **細胞死**

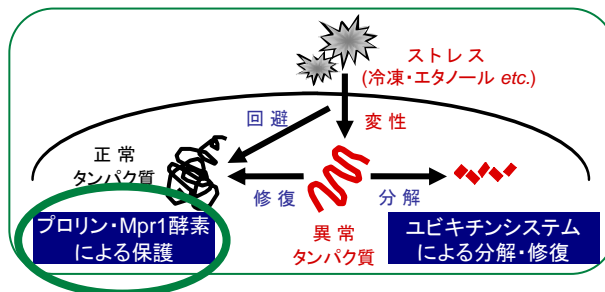
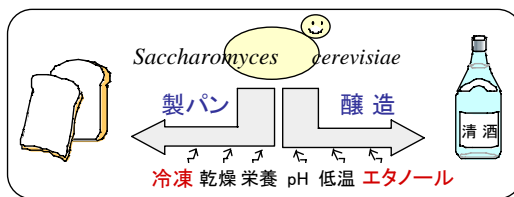
- ・細胞の増殖を阻害
- ・細胞の生存率を阻害
- ・発酵力を阻害



➡ **エタノールストレス耐性、酸化ストレス耐性!!**

私たちの研究テーマ

酵母の発酵環境は過酷なストレス ➡ 酵母の発酵生産力に限界

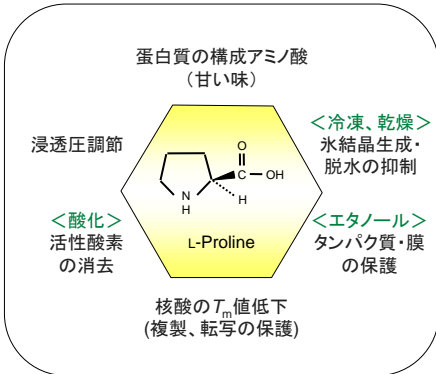


酵母の新しいストレス耐性機構!!

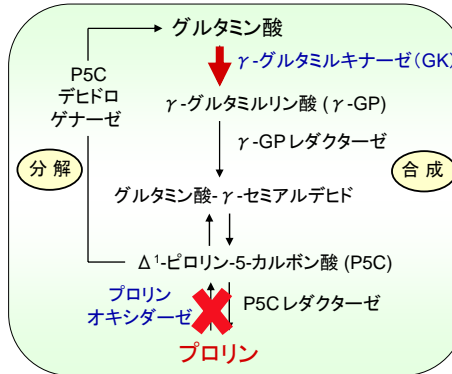
① プロリン

<植物、細菌> 乾燥や塩ストレスに応答し、浸透圧調節物質として機能
 <酵母> 生理機能や代謝調節機構は不明な点が多い

プロリンの生理機能

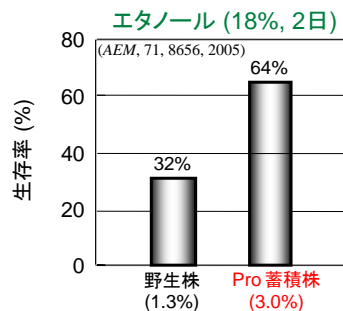
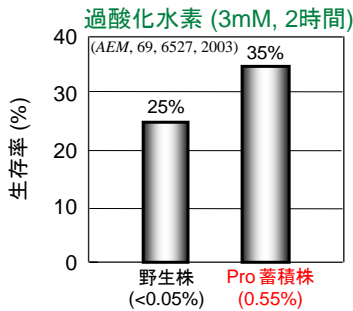
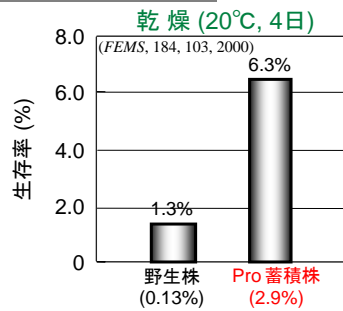
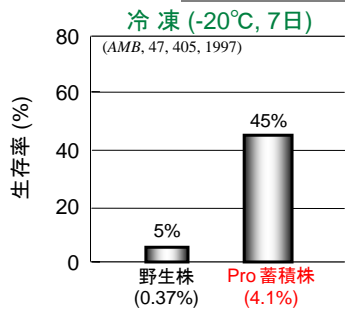


プロリンの代謝調節機構



プロリン蓄積変異株の分離 !!

プロリンの細胞保護効果

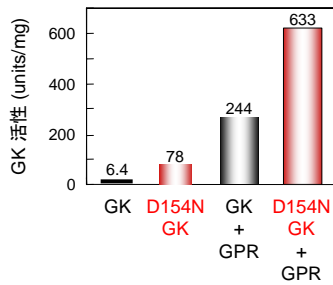


プロリンの過剰合成機構

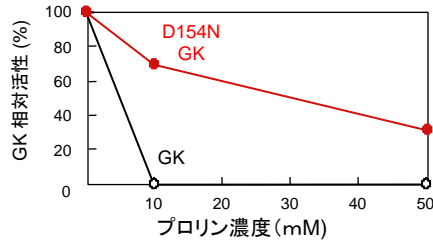


プロリン蓄積変異株の解析 \rightarrow GK遺伝子に変異 (Asp154Asn)

酵素活性



プロリンによるフィードバック阻害



酵母の γ -グルタミルキナーゼ (GK)

- ・GPR存在下で活性が発現
- ・プロリンによるフィードバック阻害

\Rightarrow プロリン合成量を制御

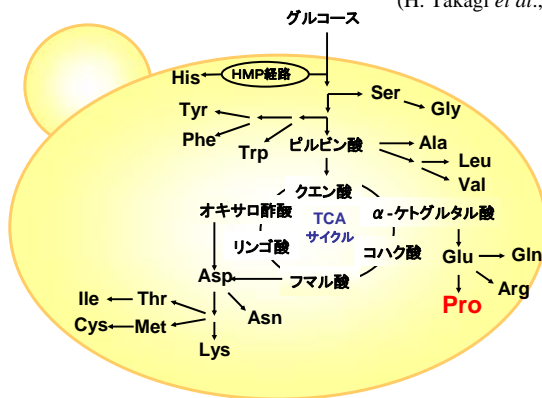
Asp154Asn 変異型 GK

- ・フィードバック阻害感受性の低下 !!
- ・触媒活性、熱安定性の向上 !!

\Rightarrow プロリンの過剰合成 !!

プロリン蓄積清酒酵母の作製と評価

(H. Takagi et al., Appl. Environ. Microbiol., 71, 8656, 2005)

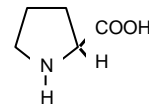


清酒の味

アミノ酸、有機酸の組成に大きな影響を受ける

味の多様化

アミノ酸の組成や生成量に特徴をもつ酵母の育種が重要



清酒の製造環境

酵母は、エタノール、低温、浸透圧、偏栄養などのストレスを受ける

有用機能が制限

プロリン

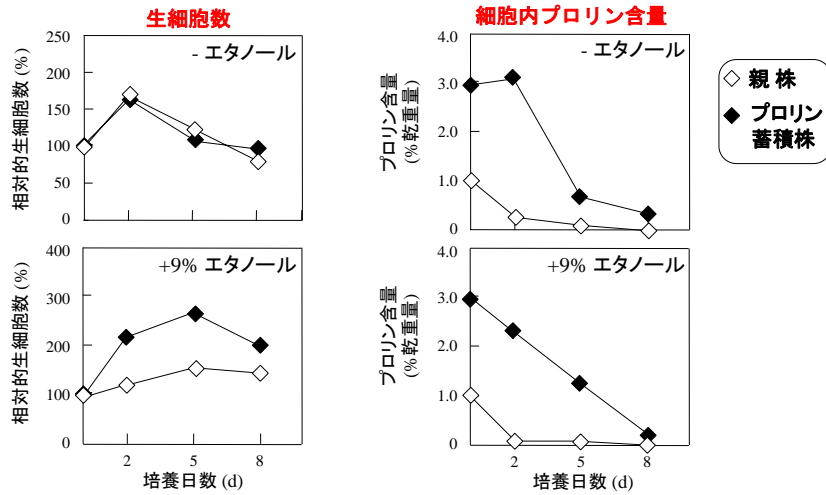
- ・エタノールストレスから酵母を保護
- ・呈味的に「甘い」アミノ酸

エタノールストレスにおけるプロリンの効果

完全培地で前培養
(30°C, 2日)

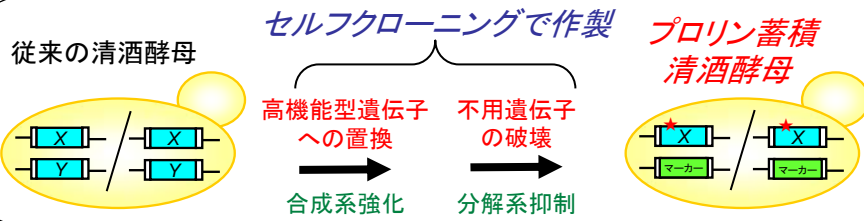


エタノール含有最少培地で培養(15°C, 8日, 静置)

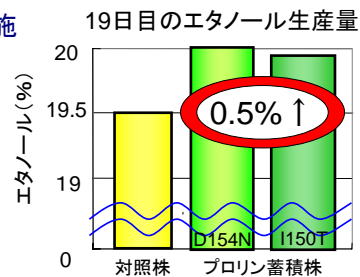
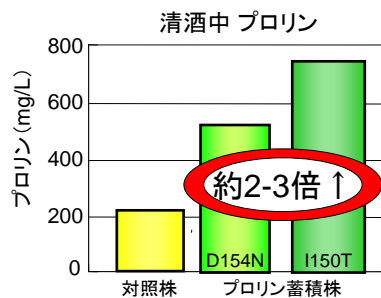


プロリンはエタノールによる酵母の生存率低下を抑える

実用化可能な清酒酵母の開発



プロリン蓄積株を作製、清酒小仕込試験を実施



・醸造期間の短縮？
・高濃度アルコールの生産？

① プロリン

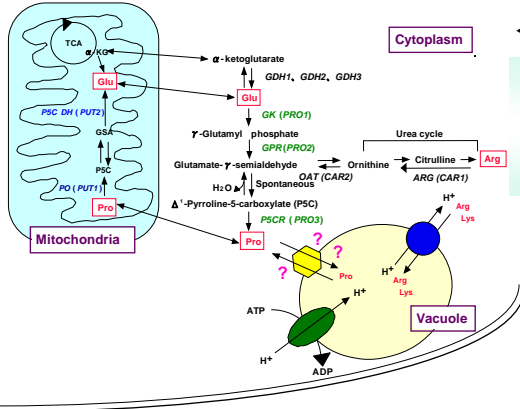
Appl. Microbiol. Biotechnol., **47**, 405, 1997; *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 103, 2000;
Appl. Environ. Microbiol., **69**, 212, 2003; **69**, 6527, 2003; **71**, 8656, 2005; **73**, 4011, 2007;
J. Biosci. Bioeng., **94**, 2002; **100**, 538, 2005; **103**, 277, 2007; etc.

<これまでの成果>

★ **プロリンにストレス保護機能を発見**
 異常タンパク質の生成を回避?

<冷凍> 氷結晶生成・脱水の抑制
 <エタノール> タンパク質・膜の保護
 <酸化> ROSの消去
 <浸透圧> 浸透圧の上昇

★ **プロリンの蓄積とストレス耐性(冷凍、エタノール、酸化)の向上に成功**
 合成系の強化(プロリン蓄積変異株) + 分解系の遮断



<今後の方針>

- ・プロリンの生理機能の解明
- ・プロリンの代謝調節機構の解明
- ・ γ -グルタミルキナーゼの高機能化

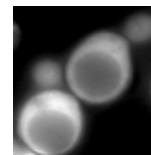
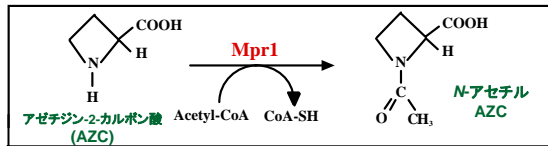


プロリン蓄積酵母の作製
 バイオエタノール生産性の評価

② アセチル化酵素 Mpr1

プロリンアナログ AZC の解毒酵素

(sigma 1278b genes for proline-analogue resistance)



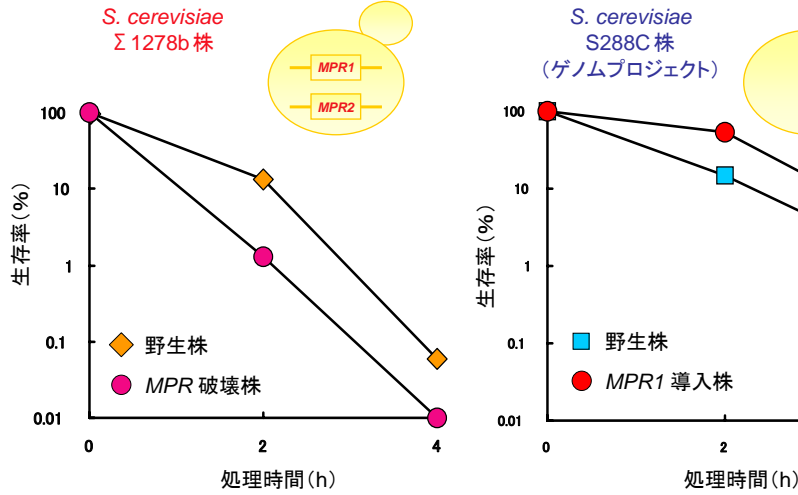
J. Bacteriol., **182**, 4249, 2000; *J. Biol. Chem.*, **276**, 41998, 2001;
Yeast, **19**, 1437, 2002; *J. Biochem.*, **133**, 67, 2003 etc.

	10	20	30	40	50	60
MPR1	MDAESIEWKLTANLRNGPTFFQPLADSIEPLQFKLIGSDTVATAFPVFDTKYIPDSLINY					
ppr1	-----MKDPNTIPPWRCTDFNAWCIAVDKSTNVKNKEELLST					
Spa MPR1	MDAECIEWKSTANLHNGPAFFQPLTDSIEPLQFKLIGSNTLATAFPVFDTKYIPDSLINY					
	70	80	90	100	110	
MPR1	LFKLFNLEIESGKTYPQLHSLTKQGFNLNWFHSAVVVLQTDK-----FIQDNQDWS					
ppr1	LTYFINYEIEMGQTYPIDIKMTRNEAEDFFPKFCTVICVPESETSPAPDLATASIDWKT					
Spa MPR1	VFSLFMIEIESGKTYPQLDVLTKQEFLLKYWFHSAFIVLQTDK-----YIEDNQDWS					
	120	130	140	150	160	170
MPR1	VLLGTFYIKPNYAPRCSHNCNAGFLVNGAHRGQKVGYRLAQVYLNWAPLLGKYKYSIFNLV					
ppr1	SLLGAFYIKPNYPGRCSHICNCGFLVSPSHRSKIGRNLANAYLYFAPRIGFKSSVFNLV					
Spa MPR1	VLLGTFYIKPNYAPRCSHNCNAGFLVNS*TRGQKIGYRLAQVYLNWAPLLGKYKYSIFNLV					
	***	*	*	*	*	*
	180	190	200	210	220	

なぜ、酵母には Mpr1 が存在するのか？

*N-acetyltransferase スーパーファミリーのモチーフに保存されている残基

熱ショック処理後の細胞生存率

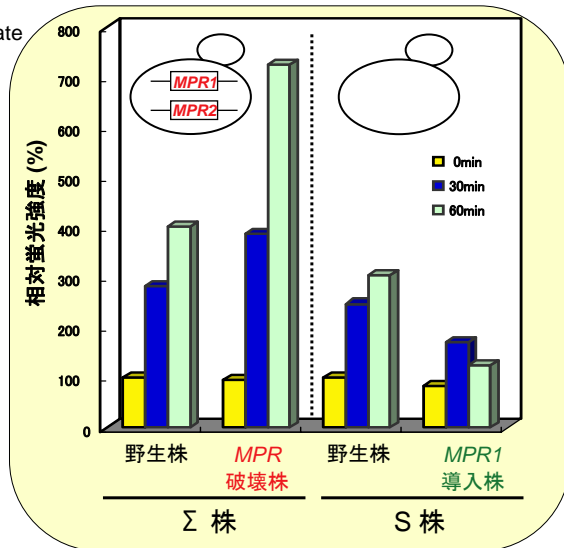
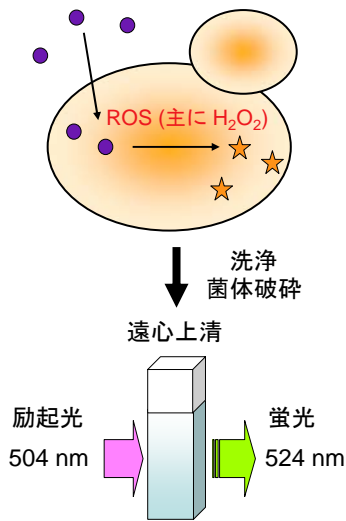


Mpr1 は酸化ストレスから酵母を防御する

(M. Nomura and H. Takagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12616, 2004)

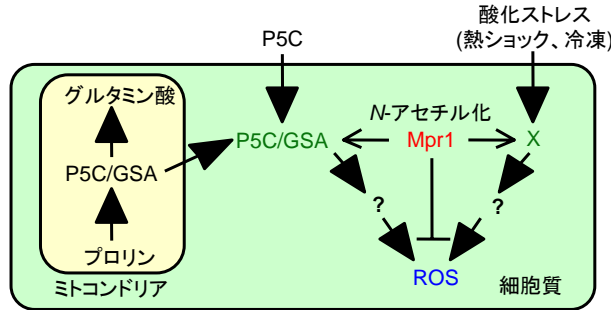
熱ショック処理後の細胞内の活性酸素種 (ROS) レベル

<酸化プローブ>
2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)



Mpr1 は細胞内 ROS レベルを減少させる

Mpr1 酵素による抗酸化メカニズムモデル



(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 12616, 2004)

★「抗酸化酵素」による ROS の解毒システム

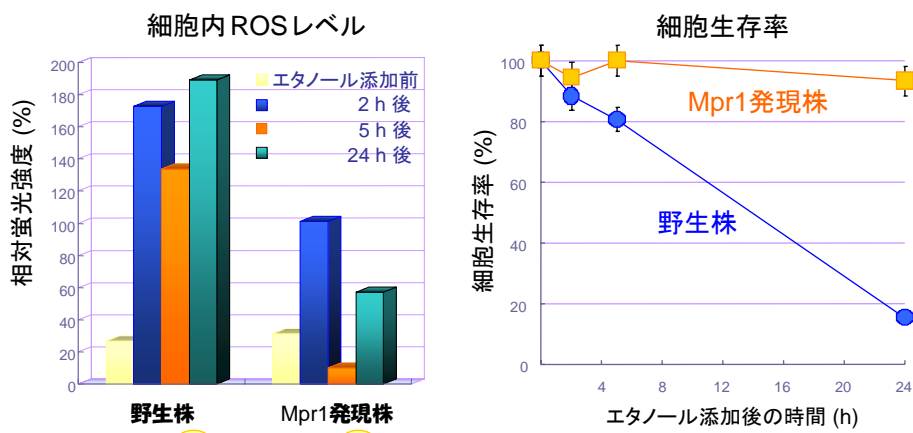
スーパーオキシジスムターゼ : $2O_2^{\bullet} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
 カタラーゼ : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
 グルタチオンパーオキシダーゼ : $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$
 (チオレドキシン、チトクローム C パーオキシダーゼ)



Mpr1 はこれらのバックアップシステム？
 基質 (X) は？ → N含有四員環化合物？

エタノールストレスにおける Mpr1 の効果

(X. Du and H. Takagi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1343, 2007)

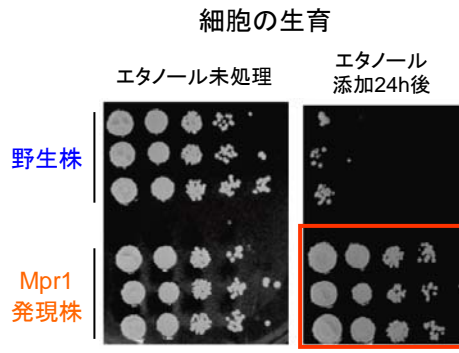
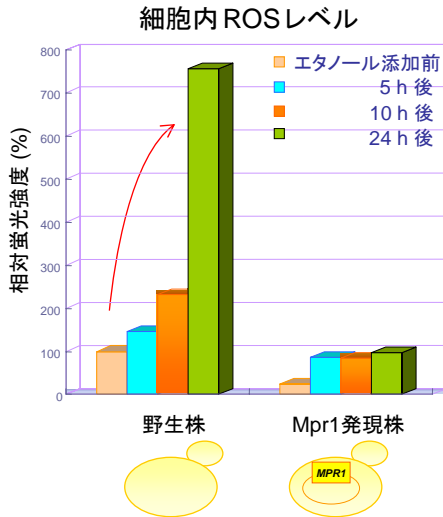


エタノールストレスにおける Mpr1

- ・ROS を減少させる
- ・細胞保護作用あり

Mpr1 発現清酒酵母の作製と評価

清酒酵母は MPR1 遺伝子を持っていない → MPR1 遺伝子を導入



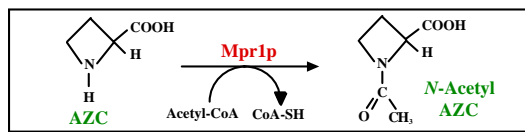
清酒酵母における Mpr1
 ・ROS を減少させる
 ・細胞保護作用あり

② アセチル化酵素 Mpr1

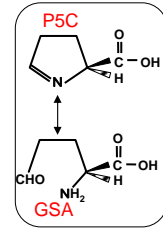
<酸化(冷凍、エタノール)> ROS 生成の抑制?

<これまでの成果>

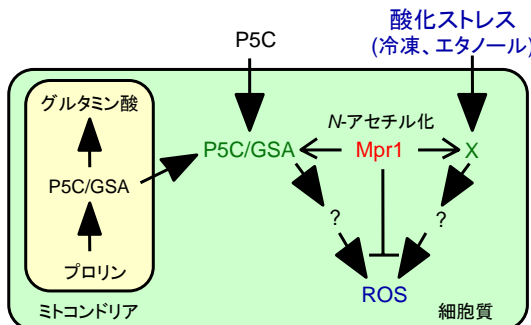
★ プロリンアナログ AZC を解毒する新規の N-アセチルトランスフェラーゼ



J. Bacteriol., **182**, 4249, 2000; *J. Biol. Chem.*, **276**, 41998, 2001; etc.



★ 細胞内の活性酸素種 (ROS) を制御し、酸化 (冷凍、エタノール) ストレスから保護



<今後の方針>

- ・生理機能の解明 (細胞内基質の同定)
- ・立体構造の解明
- ・高機能化 (触媒活性・安定性の向上)

高機能型 Mpr1 発現酵母の作製
 バイオエタノール生産性の評価

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 12616, 2004; *J. Biochem.*, **138**, 391, 2005; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1343, 2007; etc.