ヘミセルロース系バイオエタノール生産に向けたキシロースイソメラーゼのメタゲノムからの探索

岡村好子 [1]・寺原　猛 [1]・Dini Nurdiani[1]・武広夏樹 [2]・濱本勇磨 [1]・竹山春子 [1,2]

[1] 早稲田大学大学院先進理工学研究科, [2] 東京農工大学大学院工学研究科

〒162-8480　新宿区若松町２−２　早稲田大学先端生命医科学センター

電話: 03-5369-7326　Fax: 03-5369-7326

E-mail: yoshiko_okamura@aoni.waseda.jp

セルラーゼの改良や代謝改変によるセルロース資化能を得た組み換え酵母の作出により、セルロース系バイオエタノール生産は実用化に向けて次段階の技術開発フェーズに移行しつつある。一方、バイオマスの４分の１程度を占めるヘミセルロース資化能の付与は、バイオマスからバイオエタノールへの高効率変換を目指すために、今後の大きな課題である。細菌型代謝は、キシロースイソメラーゼ（XI）のみを付与することでペントースリン酸経路に入れることが可能だが酵母内で機能しない例がほとんどであった。そこで本研究では、広く XI 遺伝子を得るため、多様な特徴を有する酵素が取得されているメタゲノムを分離源とし、新規 XI の分離を目的とした。

1.　はじめに

化石燃料の代替えとしてカーボンニュートラルなエネルギー生産を急ぐあまり、酵母が発酵可能なデンプンを原料としたためにバイオエタノールと食料との競合が危惧された。これを回避するために非可食部分を原料とする第二世代バイオエタノール生産技術が求められ、現在、セルロース系バイオマスを先に糖化する前処理段階で投入するセルラーゼの改良や代謝改変によるセルロース資化能を得た組み換え酵母の作出に至り、実用化に向けて生産過程の効率化・安価供給といった次段階の技術開発フェーズに移行しつつある。

ヘミセルロース系バイオマスは前処理の糖化段階で六炭糖と五炭糖に分離され、現状では六炭糖からの発酵は高効率に進む一方、五炭糖の発酵には課題がいくつかある。*Saccharomyces cerevisiae* が五炭糖発酵経路を保持していない故、主要構成糖であるキシロースの代謝を *Pichia stipitis* のキシロースリダクターゼ (XR)、キシリトールデヒドロゲナーゼ (XDH) の 2 ステップを導入しキシルロースまで変換することによって、*S. cerevisiae* 自身のキシルロキナーゼ (XK)がキシルロース５リン酸に変換することができ、ペントースリン酸経路に合流することができる[1]。しかしながら NADPH/NAD のバランスが崩れ XR の生成物キシリトールが体内に蓄積して発酵阻害が生じてしまう[2]。細菌型代謝経路はキシロースからキシルロースへの変換をキシロースイソメラーゼ (XI)の１ステップで行うことから、数々の菌株からクローニングし酵母に導入した報告があるが、そのほとんどが発現･発酵に至らず、活性を示した報告は３件である[3,4,5]。

当研究室では、微生物のユニークな代謝能力に注目し、基礎研究を行ってきた。近年、生きているが培養ができない細菌 (viable, but nonculturable (VBNC) bacteria)の存在が明らかになり[6]、微生物の 1%未満、海洋では 0.1%未満が培養確立株であることから、99%を上回る未利用な遺伝子ソース、メタゲノムにアクセスする手法を開発し、これまでもユニークな酵素や機能遺伝子を報告してきた [7,8]。

そこで本研究は、土壌メタゲノムに潜む XI の多様性に注目し、酵母内で発現可能な遺伝子探索を行った。

2.　方法および結果

(1) XI の系統解析

GenBank に登録されている XI 遺伝子(*xylA*) 112 種のアミノ酸配列を抽出し、ClustalW によりマルチプルアライメントし系統樹を作製した。その結果を図１に示す。アライメントの結果、反応中心の高度保存領域はすべての配列に、補欠金属結合部位の保存配列は 70%の配列に見られ、大きく分けて 2 グループに分かれることが示された。酵母内での活性が報告された３件とわずかながら活性を示した *Bacteroides, Xantomonas* をあてはめると、特定のクレードに集中した。また上述で大別した２グループの両者に分布した。

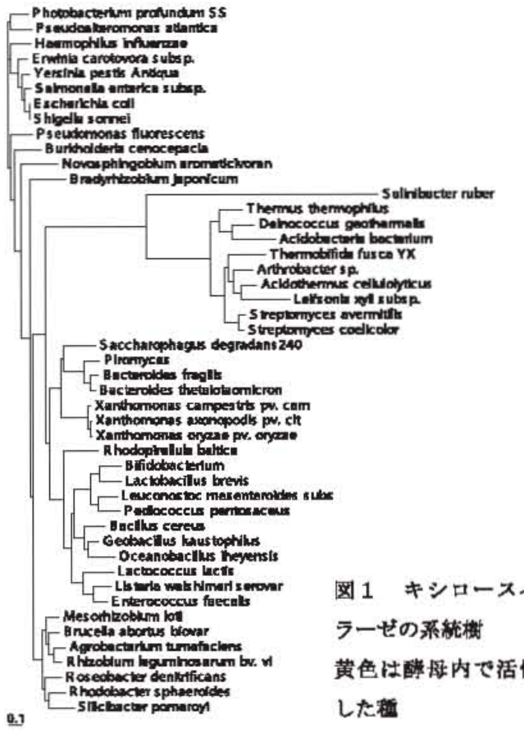

図１　キシロースイソメラーゼの系統樹
黄色は酵母内で活性を示した種

(2) 土壌メタゲノム中の XI の多様性評価

すべての配列に見られる高度保存領域７残基に forward primer, 70%のグループは補欠金属結合部位の保存配列の８残基､30%のグループは基質結合部位７残基にそれぞれ reverse primer を縮重プライマーとしてデザインし、土壌から抽出したメタゲノムに対してそれぞれのプライマーセットで PCR 行い、配列を決定した。系統解析の結果、新規配列の *xylA* を多量に含んでいることが明らかになった(図 2)。

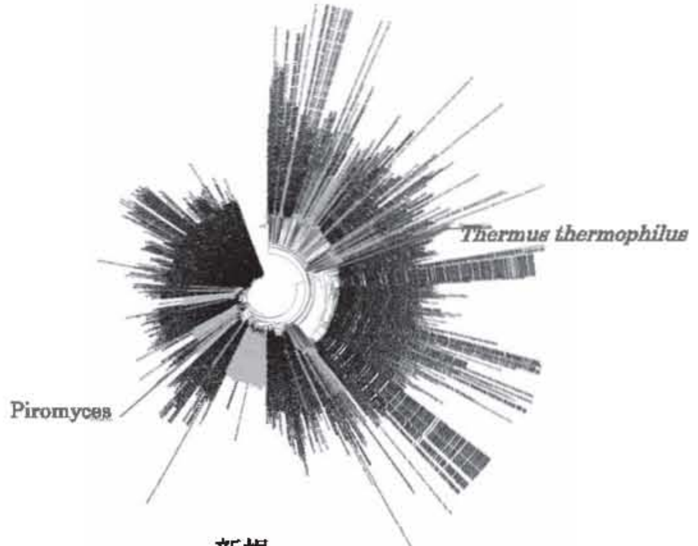

図２　土壌中の *xylA* の多様性
青字：土壌メタゲノム
黒字：リファレンス

(3) マリンメタゲノムデータベースからの配列スクリーニング

当研究室では、構築したカイメン共在バクテリアのメタゲノムライブラリーの全クローンの挿入配列の両端をワンパスシークエンスし、ORF 予測、アノテーションを行った情報をクローン情報としてデータベースを構築している。*xylA* 配列で相同性検索した結果、４クローンがヒットした。挿入配列を詳しく解析した結果、遺伝子途中で切断されたクローンが３件、のこりは完全長が保存されていたばかりでなく、XK 遺伝子(*xylB*)とオペロンを形成したまま分離できた。この配列は酵母内で活性を示した報告例の１つ *Thermus thermophilus* のクレードに系統分類され、30%の少数派の配列を保持していた。大腸菌 *ΔxylA* に導入し活性を確認した。

3．今後の展望

現在、活性ベーススクリーニングの検討も同時に行っており、従来の大腸菌をホストとするライブラリーによるスクリーニングでは、酵母内発現型を評価するのに時間を要している。そこで酵母内評価用のカセットベクターを構築し、メタゲノム配列を連結して陽性スクリーニングを行う系を開発し、得られた陽性クローンについて解析を行っている。この方法が機能すれば、多量の新規配列を評価できるツールとなり、高活性酵素獲得への可能性が広がると期待している。

参考文献

[1] Eliasson et al., Appl. Environ. Microbiol. 66, 3381. (2000)
[2] Kotter et al., Curr. Genet. 18, 493. (1990)
[3]Walfridsson et al., Appl. Environ. Microbiol. 62, 4648. (1996)
[4]Kuyper et al., FEMS Yeast Res. 5, 399. (2005)
[5]Brat et al., Appl. Environ. Microbiol. 75, 2304. (2009)
[6] Xu et al., Microb. Ecol., 8, 313. (1982)
[7] Okamura et al., Mar. Biotechnolol. 12, 395. (2010)
[8]竹山・岡村、シーエムシー　(印刷中)