

不均衡変異導入法を利用した産業用酵母の育種事例

矢野駿太郎

筆者らは、微生物育種の原点にある突然変異誘発方法の質に注目した不均衡変異導入法と、さまざまな発酵産業の現場で培われてきたスクリーニング技術を基盤に、産業用微生物の育種を行っている。

不均衡変異導入法とは、DNA複製における複製エラーの校正機能を人為的に抑制することで、細胞を自在に突然変異率の高い状態（ミューテーター）にし、DNA複製に伴って誘発・蓄積される突然変異を利用した育種技術である。DNA複製は正確無比ではなく、リーディング鎖よりラギング鎖の方が複製エラーを起こしやすいとされている。そこで、ラギング鎖の複製エラー頻度をさらに上げることができる改良型ポリメラーゼ（*pol δ mut*）を開発し、突然変異率を高めたのである（図1）。

周知の通り、紫外線や化学変異原などによる外的な突然変異誘発は、細胞全体への物理的損傷を伴うため、細胞毒性との兼ね合いから変異率を一定以上高めることができない。これに対し、不均衡変異導入法は、高い変異率を保った状態でありながら、低い細胞毒性しか示さないため、変異が多く蓄積され幅広い突然変異種が得られる。この変異ライブラリーを用い、薬剤ストレス条件下、および生理的ストレス条件下などでスクリーニングを行うことにより、短期間で目的の形質を獲得した株を単離することができる。

これまでに高い突然変異率を得ることに成功した実績として、酵母、糸状菌、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌、植物、植物細胞、動物、動物細胞があげられる。形

質転換系があり（なければ構築し）、POL δ がクローニングできれば、基本的にはあらゆる生物に対して適応が可能である。

不均衡変異導入法を利用した育種は、遺伝子組換え技術の対極にある技術ではない。遺伝子組換え体をさらにミューテーター化し、導入した遺伝子の機能が最大限発揮されるようにゲノム全体を最適化することにも数多く成功している。筆者らは、不均衡変異導入法を利用した変異育種によって、微生物の持つ力を余すことなく引き出し、微生物を用いたものづくり産業に貢献してゆくことを目指している。

はじめに、不均衡変異導入法を用いてどのようなことが可能であるか、酵母を用いた育種事例を紹介する。

耐性付与の育種事例

産業用酵母は、低pH、高pH、高浸透圧、高温などという過酷な培養条件下においても高い物質生産能を維持することが必要とされている。時には有機溶媒を含む培地においても、その能力を十分に発揮するよう求められる場合がある。そこで、親株では生育すらできない過酷な条件下においても生育が可能となる株が得られるか、不均衡変異導入法を用いて求める株の取得を試みた。ここでは高pH耐性株、有機溶媒耐性株の取得について紹介する（その他のユニークな耐性株も多く取得しているが、割愛させて頂く）。

Saccharomyces cerevisiae へ改良型ポリメラーゼ（*pol δ*

不均衡変異導入時におけるDNA複製の模式図

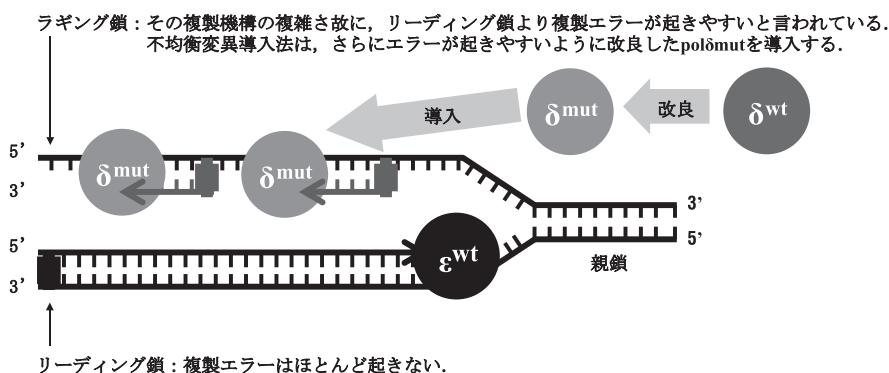


図1. 不均衡変異導入法. DNA複製機構を利用して突然変異を導入する。

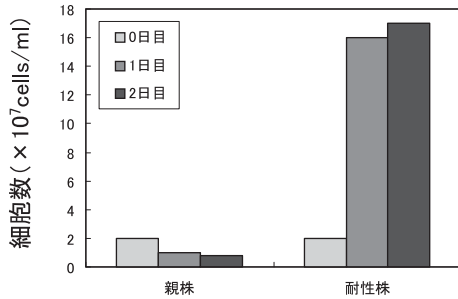


図2. pH9.8における増殖. 耐性株は速やかな増殖が可能である.

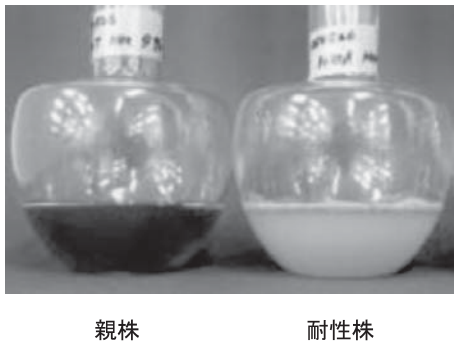


図3. ヘキサン4%における増殖. 耐性株は増殖し培地が白濁しているのがわかる.

mut) 遺伝子を導入し、ミューテーターとした。その後、培地のpHを徐々に高くしていき、その中で生育が良好な株を選抜していった。最終的には、親株ではまったく生育できないpH9.8の培地においても生育が可能な株を得ることができた(図2)。同様にして、ヘキサン4%を含む培地においても、生育ができる株の取得に成功した(図3)。

不均衡変異導入法では、これら極端な環境の耐性株を容易に取得できることから、産業応用に非常に強みがある育種技術と考えている。今後、バイオマス糖液からのエタノール生産や高付加価値物質の生産は必ず必要となるため、バイオマス糖液に含まれる発酵阻害物質に対する耐性を持つ微生物の存在が重要となる。不均衡変異導入法は、これら有望株を得るために必要な技術となるであろう。

バイオエタノール生産用酵母の育種事例

筆者らは、微生物の自社開発として、バイオエタノール生産用酵母を取り扱っている。以下に紹介する酵母は、個々が有するバイオマスにさらに適応させる形で共同開発が可能であるので、興味をお持ちの方は、是非声をかけて頂きたい。

ご存知の通り、石油代替エネルギーとしてバイオエタ

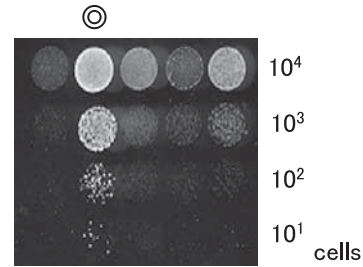


図4. 40°Cにおける増殖. 選抜した株◎は40°Cにおいても増殖が良好である.

ノールが注目されている。原料を食料と競合させない理由から、木質系バイオマスや草本系バイオマスからのエタノール生産が必要となっている。これらバイオマスを糖化し、六炭糖と五炭糖を含む糖液を調製し、六炭糖からだけでなく、五炭糖からもエタノールを生産させる試みが多く、産業の協力によって着々と進行している。しかし、それぞれの分野において、課題がいくつかあがっている。微生物によるエタノール生産の分野においては、六炭糖と五炭糖を含むバイオマスの糖液から、効率よくエタノールを生産することは、非常に難しい課題の一つである。

バイオマス糖液には、発酵阻害物質が多く含まれており、これら阻害物質に対する耐性を持たない微生物を選抜してしまうと、六炭糖の発酵ですら難しい場合がある。六炭糖と五炭糖の両糖から効率よくエタノール生産ができる微生物を得るには、その親株を慎重に選び、育種を行わなければならない。そこで筆者らは、当社で保有するエタノール生産用酵母 (*S. cerevisiae*) の中から、エタノール生産性が高く、40°Cにおいても一晩で十分な増殖が可能である、いわゆるタフな株の選抜を行った(図4)。

S. cerevisiae は、六炭糖からのエタノール生産性は十分であるが、五炭糖であるキシロースからのエタノール生産性はないため、初めに *Pichia stipitis* のキシロース代謝遺伝子 (XYL1, XYL2, XKS1) を導入し、キシロース資化性を与えた。これらの遺伝子を導入するだけではキシロースからのエタノール生産性は十分でないと言われており、実際にそうであった。グルコース8%とキシロース4%の混合培地において、48時間発酵させてもキシロースが残存していた。そこで、キシロースからエタノール生産への代謝に係る酵素関連に変異が入った株が選抜できるようなスクリーニング系をいくつか開発し、繰り返しスクリーニングを継続し、徐々にキシロースからのエタノール生産性を向上させていった。

最終的には、グルコース8%とキシロース4%の混合培地において、21時間程度で両糖を完全に資化し、十

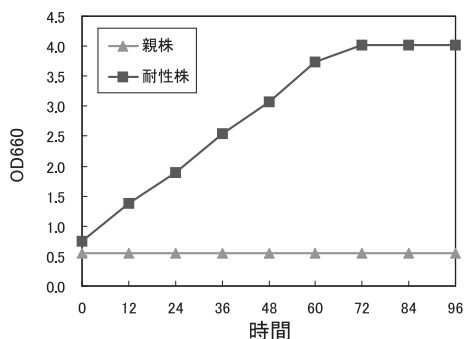


図5. 発酵阻害物質耐性株の取得

分量のエタノール生産ができる株を取得することに成功した。この株をXynoと名づけ、次にバイオマス糖液に含まれる発酵阻害物質に対する耐性を獲得させる育種を行った。

バイオマス糖液を調製し、親株では増殖できない濃度まで阻害物質を数種加え、この糖液に対して増殖可能となる株を育種したところ、目的の株を取得することができた(図5)。

次に、非組換え体を用いたバイオエタノール生産用酵母の育種事例を紹介する。前述のXynoは、日本以外の諸外国においてその引き合いは非常に強く、共同開発が進行中である。しかし、組換え体であるがゆえに、日本では少し敬遠されてしまう。そこで日本向けに非組換え体微生物を用いた開発に取りかかった。親株となる微生物を野外からスクリーニングすることから始めた。

高いエタノール生産性を持ち、六炭糖からだけでなく五炭糖からもエタノール生産が可能であり、高温や低pHに耐性がある微生物の選抜を試みた。これらすべての条件を満たす微生物を得ることはできたが(図6)、五炭糖であるキシロースからのエタノール生産性が非常に弱く、すべての条件を十分に満たしているわけではなかった。キシロースの資化性は高かったため、得られた微生物を親株として、キシロースからのエタノール生産性を高める育種を進めることとした。なお、rDNAの塩基配列から*Pichia*系の微生物であることはわかっている。

通常であれば、POL δをクローニングし、改良型に改良し、細胞に導入するのであるが、改良型pol δ mutを利用しなくとも、不均衡変異導入法と同じ効果が得られる変異カクテルの開発に成功していたため、変異カクテルを用いて育種を始めた。

Xynoの育種と同様にして(もちろん遺伝子は一切導入せず)、キシロースからのエタノール生産が向上するスクリーニングを継続していった。予想していたことで

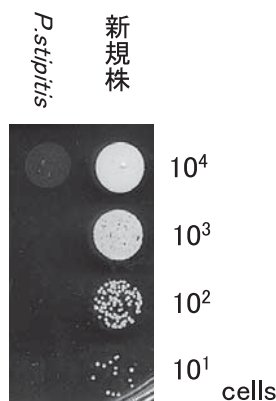


図6. キシロース培地における増殖。新規に取得した株は40°Cにおいても増殖が良好である。それに対して*P. stipitis*はまったく増殖できない。

あるが、Xynoの場合と同じように有効であるスクリーニング系がある一方で、どちらかにのみ有効なスクリーニング系があり、微生物育種を行う上での面白さを実感した。最終的には、グルコース8%とキシロース4%の混合培地から十分量のエタノール生産が可能である株を得ることができた。

バイオマス糖液は原料や糖化方法によってその特徴がさまざまであるため、個々の糖液に対して微生物を適応させなければ、高い生産性が得られないことがわかってきた。原料や糖化方法を変えた数種の糖液を用意し、育種した株数種を用い発酵させてみたが、どの糖液に対しても高い生産性を示す株はなく、それぞれの糖液に適応させた株が最も高い生産性を示した。今後、バイオマスはさまざまなものへと広がっていき、糖化方法も多種多様となるであろう。それに伴い、個々の糖液に対して高い生産性が発揮できるような株の改良は必要になってくる。そんな時代へ向けて、当社としては、今まで以上に育種技術に磨きをかけ、どんな糖液に対しても求める性能が示せるようにしていきたい。

最後に

不均衡変異導入法は、ラギング鎖に対して積極的に変異を導入する技術であり、その意義は、当社の創業者であり、かつ最高科学顧問である古澤満の著書「不均衡進化論(筑摩書房)」に詳細が記載されているので参照されたい。

本発表の一部には、独立行政法人科学技術振興機構(JST)の助成金によって得られた結果が含まれている。