

新規酵母の分離とその機能の応用展開

家藤 治幸

はじめに

現在 The Yeasts 5版には、子囊菌系848種、担子菌系464種の酵母が記載されている。しかし産業的な応用に供されている酵母はわずかではない。自然界にはさまざまな能力を持ちながらほとんど手つかずの状態、多くの酵母が眠っているものと思われる。

1970年代、国税庁醸造試験所において酵母を利用した排水処理法が開発された¹⁾。筆者も80年後半よりその研究を担当することになり、*Saccharomyces cerevisiae*による遺伝子組換えが脚光を浴びている中、「雑酵母」と揶揄されながら、排水処理に役立つ酵母を対象に研究を行ってきた。

わずかではあるが当時「雑酵母」を研究対象とする研究者はいた。そのような研究者が集まり、5年前、高木正道先生を中心にnon-conventional yeastの研究会である「新産業酵母研究会」が発足されたことは、嬉しいことである。

さて、自然界から分離した酵母を対象に研究を行う場合、まずは酵母の同定を行うことが必要となる。今であれば、形態観察や生化学的、生理的性質を調べることもなく、PCRで増幅させた一部DNA配列を読むだけでもっとも近い属種の同定が簡単にできるようになったが、一昔前、酵母の同定は経験と多くの項目の検査を必要とし、専門家などのアドバイスを仰ぎながら行う作業であった。

当時、酵母の同定は「菌体外DNase」「DBB染色」「ウレアーゼ生産」「GC含量」「アルコール発酵性」により、その酵母が子囊菌系か担子菌系の判別を行うことからスタートしたが、子囊菌系と担子菌系では、染色体DNAのGC含量が50%以上か以下かという「GC含量」や「アルコール発酵能の有無」に違いがあること、また細胞壁構造にも違いがあり、子囊菌系酵母が単層であるのに対し、担子菌系酵母は多層であることなど、同じ酵母と称されながら根本的に大きな違いがあることを知ることができた。また、同定の過程で、対象となる酵母のさまざまな生化学、生理学的性質を知ることができる貴重な体験でもあった。今日では簡単に酵母の同定が行えるようになり、そのこと自体は良いことであるが、筆者の場合、

菌株のいろいろな性質を調べ、同定を行った苦勞が、酵母の応用展開を考える上で、大きなプラスになったように思う。

以下、筆者がかかわってきたいいくつかの酵母について紹介したい。

酵母による排水処理法とその酵母の能力向上

酵母にはデンプンやその他いろいろな多糖類、タンパク質、有機酸、油脂を分解資化する能力を持ったものが存在する。酵母処理法は、このような酵母の持つさまざまな有機物分解資化能力を利用する排水処理法である。その中の代表的な酵母が*Hansenula anomala* J224および*Hansenula fabianii* J640である。特に*H. anomala* J224は自己凝集性が強く、排水処理の種菌として使用されてきた²⁾。筆者らは、これら酵母の排水処理能力をさらに向上させるための研究を行ってきた(なお、*Hansenula*は現在は*Pichia*という属名を使用するのが正しいようだが、ここではなれ親しんだ旧名を使用する)。

排水処理用酵母のリン除去能力の向上 食品排水にはリンを高含有するものも多くある。酵母処理は高負荷有機物の処理を得意とするが、酵母は細胞が必要とする以上のリンを菌体内に吸収せず、その点に改善の余地があった。もし外界のリン酸濃度に関係なくリンを取り込み続ける排水処理用酵母を育種することができれば、それは従来の菌よりリン除去に優れ、高リン含有排水の処理が可能となることが期待される。そこで*H. anomala* J224および*H. fabianii* J640より、このような高リン取込酵母の育種を考えることとした。

まず、*H. anomala* J224および*H. fabianii* J640のリン酸取込みやホスファターゼ生産分泌が、外界のリン酸濃度に応じて変化し、*S. cerevisiae*とほぼ同じ挙動を示すことを見いだした。これら酵母は*S. cerevisiae*と同様に、リン酸透過酵素と酸性ホスファターゼが同じ制御系で制御されている³⁾と考えられた。そこで、外界のリン酸が多い状態下でも酸性ホスファターゼを分泌する変異酵母を取得すれば、その中にリン酸取込みポンプが駆動し続け、リンを過剰に取り込む酵母がいることが期待された。そして、高リン酸状態でも酸性ホスファターゼを分泌する変異株を数十株取得し、さらにそのリン取込み能力を

調べることで、リンを効率良く取り込むことのできる数株を取得した。高リン酸YPD培地（リン酸濃度600 ppm）での培養における菌体当たりのリン含量を測定したところ、*H. fabianii* J640の変異株は親株の3.5倍、*H. anomala* J224の変異株は親株の2.2倍のリンを含有していた⁴⁾。

これら酵母の実用性を調べるため、リンを高濃度(400 ppm程度)含むしょうちゅう粕液部を実排水として排水処理試験を行った。結果、親株の排水中のリン除去率が50%程度であったのに対し、育種株は95%以上のリンを除去していることが見いだされた。さらにリン酸のみならず、有機態のリンを除去する能力も向上していた。他の項目の処理能力に関しては従来のものと遜色はなく、リン高取込み排水処理酵母として実用が可能となった⁵⁾。

排水処理用酵母のデンプン含有排水処理能力の向上

H. fabianii J640はウイスキー蒸留廃液などの処理に有効である。本菌はアミラーゼ活性を有する。そこで本菌が分泌するアミラーゼを精製し、cDNAライブラリーよりイムノスクリーニングによりその遺伝子を取得した。*Rhizopus oryzae*グルコアミラーゼともっとも高い類似性を有するグルコアミラーゼであった⁶⁾。

本菌はそれ以外のアミラーゼ、つまり α -アミラーゼを生産しない。このことで、デンプン含量の高い排水の処理能力は十分ではなかった。そこで分子育種により、本酵母のデンプン処理能力を高めることを試みることにした。

まず、*H. fabianii* J640のorotidin-5'-phosphate decarboxylase (URA3)を欠損したウラシル要求性株J640 u-1を5-FOA耐性を指標に取得し、宿主とした。一方、本菌のゲノム遺伝子ライブラリーから、大腸菌*pyrF*欠損株のウラシル要求性を相補するURA3遺伝子を取得し、形質転換用マーカーとすることで、*H. fabianii* J640の宿主・ベクター系を開発した⁷⁾。そして、本菌グルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター、ターミネーターを利用することで、外来遺伝子を*H. fabianii* J640内で発現させるための発現ベクターpHFGE-1を構築した。

そのpHFGE-1に生デンプン分解性 α -アミラーゼ(後述の*Cryptococcus* sp. S-2由来)をコードする遺伝子を接続し、*H. fabianii* J640 u-1に導入し、 α -アミラーゼ活性を有する形質転換株HF-AAMYを取得した。結果、可溶性デンプン含有モデル排水処理試験でHF-AAMY株が親株より、より早いCOD減少を、また不溶性デンプン含有モデル排水の処理試験でも、不溶性デンプンの

分解においてHF-AAMY株が優れており、HF-AAMY株がデンプン含有排水の高い処理能力を獲得したことが示された⁸⁾。

植物繊維凝集活性酵母の分離

植物繊維質を多く含む食品工業排水の微生物処理は、一般に困難なものとなっている。繊維固形物を効率よく分離除去する方法を開発することは、このような食品排水を処理する上で重要である。特に、しょうちゅう乙類(本格しょうちゅう)の蒸留残渣(以下、蒸留廃液と呼ぶ)のうち、甘藷を原料とした芋しょうちゅう蒸留廃液は、粗繊維質を多く含み粘度が高く、しかもCODが4-5万ppmと高いため、そのまま活性汚泥法など従来の生物処理技術で処理することは困難であった。そこで筆者らは芋しょうちゅう蒸留廃液の効果的な微生物処理方法の開発を目指し、芋しょうちゅう蒸留廃液の固形物と液部の分離(固液分離)を容易にする微生物を自然界より幅広く検索した。

その結果、廃液中の固形分に強く吸着しそれらを凝集させる性質を有する酵母M111株を土壌より分離することができた。本菌は分裂と出芽によって増殖し、真菌菌糸および分節型分生子を形成するが、子嚢胞子を形成しない。しかし、ウレアーゼテスト、DBBテストおよびDNaseテストはいずれも陰性であり、さらに発酵性を有することより、子嚢菌系の酵母に該当し、また硝酸塩を利用できないことなどより*Geotrichum*属に帰属する酵母であると同定され、*Geotrichum* sp. M111と命名した。

本菌は芋しょうちゅう蒸留廃液固形物のみでなく、アビセル、口紙繊維、セルロースパウダーなどセルロースが主体の固形物を顕著に凝集させる。この凝集は、各種界面活性剤のうちSDSの存在下でのみ阻害が見られ、またproteinase Kで処理された菌体では凝集が認められなかった。これらのことより、菌体表面にセルロースに強い吸着性を有するタンパク質が存在し、その吸着作用により凝集が引き起こされることが推測される。本菌は芋しょうちゅう蒸留廃液だけでなく、パルプ廃液、野菜や果実ジュース中の植物繊維の分離など、広範囲の植物繊維の分離処理に応用可能である⁹⁾。

各種多糖分解酵素を生産分泌する酵母の分離とその性質 (図1)

先に記したように、排水処理用酵母として使用されているものにはアミラーゼ活性を有しているものがあるが、生デンプンを分解する能力のある酵母の存在は知られていなかった。また、その他多糖類分解酵素を生産分

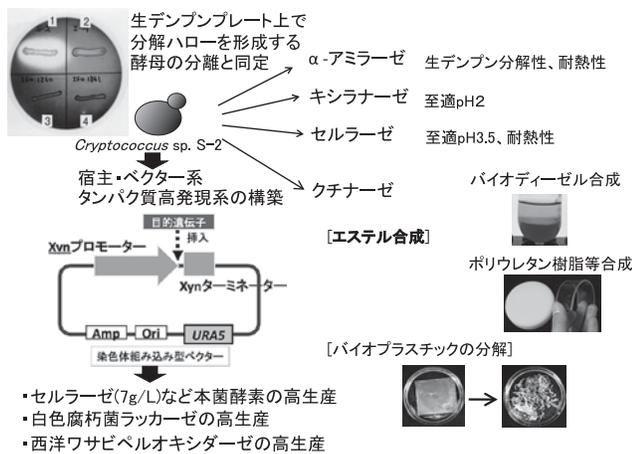


図1. 各種多糖類分解酵素を生産分泌する酵母分離とその応用展開

泌し、種々の多糖類を分解利用できる酵母が取得できれば、それらを含有するさまざまな排水の処理に有用であろう。そこで筆者らは、難分解性といわれる多糖類の分解酵素を生産分泌する新規酵母を取得することを目的に、まずは生デンブンを分解利用する能力を持った酵母を自然界より分離することを試みた。

結果、生デンブ含有プレート上で大きな分解ハローを示す酵母を1株取得することができた。この酵母は各種同定項目分析により、担子菌系酵母であり、細胞壁構成糖としてキシロースを含むことより、*Cryptococcus*属に分類される酵母であると同定され、*Cryptococcus* sp. S-2と命名した¹⁰⁾。*Cryptococcus*属には、*Cryptococcus neoformans* (*Filobasidiella neoformans*) という病原性のある酵母が知られている。しかし本酵母は*C. neoformans*のように人間の体温(37°C)で増殖することができず、また帝京大学医学部医真菌研究センターでの動物実験によって、安全な菌であることが確認された。

本菌の生産するα-アミラーゼ 本菌は生デンブ分解力をもつことより、本菌が生産するであろう生デンブ分解酵素に興味を持たれた。そこで本菌が生産分泌するアミラーゼを精製した。本アミラーゼはα-アミラーゼであり、強い生デンブ分解力を持ち、同時に生デンブに対する吸着性を有していた。また、高い温度安定性も有していた。

611アミノ酸よりなり、そのN末端より496残基までの部分は*Aspergillus oryzae*のα-アミラーゼ(タカアミラーゼ)全領域と高い相同性(49.7%)が見られ、それ以降に*A. niger*のグルコアミラーゼIのC末端領域と相同性の高い部位が存在した。このC末端部位を欠失させ

たアミラーゼの解析により、C末端部位は生デンブ吸着性、分解性、さらには耐熱性に関与していることが示された¹¹⁾。

本菌の生産するキシラーゼ 本菌はキシラン分解能を有している。キシラーゼ生産に関して、本来生産抑制的に働くD-キシロースが、本菌においては顕著な生産誘導作用を示した。本菌のキシラン分解酵素は、分子量22,000、キシランの分解様式よりエンド型キシラーゼであり、反応最適pHが2という酸性領域で強い活性を持つ酵素であった¹²⁾。

本菌の生産するセルラーゼ 本菌はセルラーゼ分解性も有している。そこで本菌が生産するセルラーゼを精製し、その性質を調べた。本酵素はエンド型セルラーゼであった。一般にセルラーゼは、中性からアルカリ性を至適pHとするものが多いが、本セルラーゼは至適pH3.5の好酸性であり、また、至適温度50°C、90°Cで45分間処理しても50%の残存活性を持つ耐熱性の酵素であった¹³⁾。

本菌の生産するクチナーゼ 本酵母は油脂を好み、きれいに食べてしまう性質も有している。その際、油脂分解酵素を生産し菌体外に分泌していた。そこで本菌の生産する油脂分解酵素を精製し、その性質を調べた¹⁴⁾。

本酵素は分子量2万程度の小さな酵素で、X線結晶構造解析やアミノ酸配列から、クチナーゼに分類される酵素と類似性の高いことがわかった。

クチンは高級脂肪酸ポリエステルである。一方、生分解性プラスチックといわれるもののほとんどはエステル結合によりポリマー化させたものであることより、本酵素にこれらプラスチックを分解させる効果のあることが期待された。そして、予想通りこれらに高い分解力を持ち、さらに、酵素による分解が困難と言われていたポリ乳酸をもよく分解した。タンパク質分解酵素であるproteinase Kがポリ乳酸をもっとも分解するとして報告されていたが、本酵素はその1/500以下の重量でproteinase Kを超える強い分解活性を示した¹⁵⁾。

一方、耐有機溶媒性の強い酵素であり、また水分が多く存在する条件においても油脂加水分解の逆反応であるエステル合成反応が強いという特徴的な性質を有していた。その性質を利用し、油脂とメタノールから、脂肪酸メチルエステルの生成を試みた。通常のリパーゼはメタノールの添加で失活しやすいため、脂肪酸のエステル化反応にはメタノールを何段にも分け添加していく方法がとられる。しかし本酵素では、油脂1モルにメタノール3~4モルを最初から加えそのまま反応させるワンステップ法で、脂肪酸メチルエステル(バイオディーゼル)

の生産ができることがわかった¹⁶⁾。さらに本酵素はポリウレタン・ポリエステル樹脂の合成にも有用であることが明らかとなっている。

本菌によるタンパク質高発現系システムの構築

Cryptococcus sp. S-2は、多様な酵素を生産し多量に菌体外に分泌する能力を持つことより、酵素の大量生産宿主として適することが期待された。さらに本菌はDNAのGC含量が60%以上の担子菌系酵母である。従来の発現系は、GC含量が40%程度の子囊菌系酵母やカビの系によるものがほとんどであり、白色腐朽菌のようなGC含量の高い酵素を大量生産することが苦手であった。たとえば、ダイオキシンの多環芳香族炭化水素を分解除去できることで環境修復用酵素として注目されている白色腐朽菌由来ラッカーゼは、従来の系では生産が困難であった。しかし、同じ担子菌系である本酵母を宿主とすれば、そのような酵素の大量生産が容易になるかもしれない。そのように考え、本菌によるURA5を選択マーカーとする宿主・ベクター系の構築、さらに本菌のキシラナーゼ遺伝子プロモーターを利用したタンパク質高発現系の構築を行った¹⁷⁾。そして、その系により本菌が生産するセルラーゼ遺伝子を高発現させ、セルラーゼを7 g/L以上生産させることに成功した。また白色腐朽菌 *Trametes versicolor* のラッカーゼについても高生産でき、従来の系では大量生産が困難であったGC含量の高い遺伝子などの高発現、高生産が可能であることが示された¹⁸⁾。それらシステム構築および改良については、本誌における94巻5号特集「物質生産系として有望な酵母」(クリプトコッカスによる西洋ワサビペルオキシダーゼの生産)にて、共同研究者の歌島、正木が紹介するので、それを参考にしていただきたい。

おわりに

Non-conventional yeast の話題提供を主とする新

産業酵母研究会は、*S. cerevisiae* や *S. pombe* のような conventional yeast にはない新規な有用性を求め、または応用微生物としてのブレイクスルーを求めようとする会である。膨大な non-conventional yeast の世界に、そうした期待に応えるものがあるものと信じている。

なお、以上に紹介した研究は、酒総研およびその前身の醸試において多くの方々とともに行ったものである。ここに改めて、研究で苦楽をともにした一人一人の方に心より感謝申し上げたい。

文 献

- 1) Yoshizawa, K.: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 389 (1978).
- 2) Saito, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1425 (1990).
- 3) Oshima, Y.: *Genes Genet. Syst.*, **72**, 323 (1997).
- 4) Watanaba, T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 331 (2008).
- 5) Watanaba, T., et al.: *Bioresour. Technol.*, **100**, 1781 (2009).
- 6) Kato, M. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 981 (2011).
- 7) Kato, M. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 621 (1997).
- 8) Kato, M., et al.: *AMB Express*, **1**, 7 (2011).
- 9) 家藤治幸ら: 日本農芸化学会誌, **68**, 33 (1994).
- 10) Iefuji, H. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2261 (1994).
- 11) Iefuji, H. et al.: *Biochem. J.*, **318**, 989 (1996).
- 12) Iefuji, H. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1331 (1996).
- 13) Thongekkaew, J. et al.: *Protein Expr. Purif.*, **60**, 140 (2008).
- 14) Kamini, N. R. et al.: *Process Biochem.*, **36**, 317 (2000).
- 15) Masaki, K. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7548 (2005).
- 16) Kamini, N. R. et al.: *Process Biochem.*, **37**, 405 (2001).
- 17) Masaki, K. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1627 (2012).
- 18) Nishibori, N. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 94 (2013).