

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	酸化還元系制御細菌による海洋バイオマスからの実用的エタノール生産
研究機関・部局・職名	京都大学・農学研究科・助教
氏名	河井 重幸

【研究目的】

【背景】

近年、国内外で海洋バイオマス、とりわけ生育速度が高く、巨大な藻体を形成する褐藻類に注目が集まっている。しかし、中性多糖(構成単糖はグルコース)を主たる成分とする陸上バイオマスと異なり、褐藻類は難分解性の酸性多糖(アルギン酸：構成単糖はウロン酸)を主成分(アルギン酸含量は褐藻類の30~60% [乾燥重量あたり]、セルロース含量は僅か10%程度)とするため、かかる難分解性酸性多糖をエタノールに変換する新技術の確立が急務である。

課題担当者所属の研究室において世界で初めて発見されたスフィンゴモナス属細菌 A1 株(以下 A1 株)は、アルギン酸を強力に代謝する。この代謝系を利用した海洋バイオマスからのエタノール生産システムが、当研究室で検討された(Takeda et al. Energy Environ. Sci. 2011: 4, 2575-2581)。本システムは、アルギン酸からエタノールを高生産する、現在では世界で唯三つの系の内の一つである(他の系は米国のグループによる、大腸菌および出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした系：各々 Science 2012: 335, 308-313, Nature 2014: 505, 239-243 ; ただし後者は後述するアルギン酸分解物 DEH を出発原料とする)。A1 株のアルギン酸代謝能ならびにエタノール生産能を高めることなどによる、実用的な「海洋バイオマスからのエタノール生産技術」の確立は、グリーン・イノベーションの中核技術として、さらには海洋国家・科学立国日本のエネルギー獲得手段として重要である。

A1 株において、アルギン酸は、アルギン酸分解物 DEH (4-デオキシ-L-エリスロ-5-ヘキソセウロース ウロン酸) を還元する NADPH 型 DEH レダクターゼによる還元反応ならびに Entner-Doudoroff 経路に類似の反応により、ピルビン酸を経由してピルビン酸脱炭酸酵素(PDC)およびアルコール脱水素酵素(ADH)のはたらきでエタノールへと変換される。ただし、PDC および ADH 両遺伝子は *Zymomonas mobilis* 由来の遺伝子である。本代謝系の問題点として、少なくとも以下の二点が考えられた。(A) NADP(H) のリサイクルが非効率であり、エタノール生産性向上の大きな律速になっている。(B) エタノール耐性能が酵母ほど高くない。

一方で、海洋バイオマス(褐藻類)はアルギン酸の他に、著量のマンニトールも含む(季節によるが乾燥藻体の30%程度)。マンニトールはグルコースよりも余分に還元された化合物であるため、その代謝過程では酸化還元のアンバランスが生じる。マンニトールを原料としたエタノールや有用物質生産例は殆ど無い。アルギン酸およびマンニトールからもエタノールや他の有用物質を生産できれば、海洋バイオマスの更なる総合的利用が可能になる。

【研究期間内に明らかにし、また達成する内容】

海洋バイオマスからの、エタノール生産性 A1 株や特殊な酵母を用いた実用的なエタノールなどの有用物質の大量生産法を確立するために、以下の(1)～(6)を実施する。

- (1) A1 株の乳酸(不要な反応副産物)の生成系の遮断。
- (2) NAD(H)のみで稼動するアルギン酸からのエタノール合成系の構築。
- (3) A1 株の NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化。
- (4) 培養工学的解析による実用的バイオエネルギー生産系の確立。
- (5) A1 株のエタノール耐性能強化。
- (6) 酵母によるアルギン酸からのエタノール生産および海洋バイオマスの総合的利活用。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

本研究課題は研究代表者らが発見していた体腔形成細菌 (Sphingomonas 属) A1 株の持つ海洋バイオマスの主成分ポリウロン酸からのアルコール発酵能の向上を目標にしたもので、6つの実施項目から構成されている。

研究の進展は、必ずしも当初の計画通りには進展せず、方針変更を余儀なくされた点もあるが、困難に直面した段階でも、詳細な解析を加えつつ困難を克服する努力を粘り強く進めたことがうかがわれる。当初想定していたアルコール発酵 Sphingomonas 属細菌を用いたアルギン酸からの実用的なアルコール生産という目的は果たせてはいないが、下記に示すように、新しい発見を含む、数多くのすぐれた成果を上げている。

(1) マンニトール資化性を示さない出芽酵母 *S. cerevisiae* が、転写調節複合体 Tup1-Cyc8 コリプレッサーへの自然変異によりマンニトール資化能を自然に獲得することを見出し、当該能力獲得酵母(マンニトール資化性出芽酵母: MK4416 株)を用いたマンニトールからの高濃度エタノール生産が可能であることを実証したこと、マンニトール資化能獲得機序に関しては、エピジェネティックな修飾による同能獲得を示唆する結果も得たことなど、新しい発見を行った。マンニトールの更なる利活用への途を拓く画期的かつブレークスルーとなり得る成果である。

(2) 体腔形成細菌 (Sphingomonas 属) A1 株が、医薬品・化学品合成の原料として重要なピルビン酸を著量生産することを発見し、ピルビン酸生産条件を確立した。これは、アルギン酸からのエタノール以外の有用物質生産の世界で初めての発見例であ

り、アルギン酸から様々な有用化合物を生産する途を拓いたことになる。これらの本研究成果は褐藻類成分からの有用物質生産という重要分野で最先端の成果であり、学術論文の公表に加え、産業財産権 5 件を出願中である。グリーン・イノベーションにつながる優れた成果を上げたと評価できるが、実用的に活用されるまでには、克服すべき課題も少なからず残されていると見受けられる。今後のさらなる進展を期待したい。

本研究においては、海洋バイオマスの有効利用について、新たな重要な知見を多く得ているが、表題に掲げた、海洋バイオマスからの実用エタノール生産を実現できなかったことから、やや厳しい評価となった。

② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

下記 6 項目を本研究期間内の達成目標に掲げ、研究を展開した。

- (1) A1 株の乳酸(不要な反応副産物)の生成系の遮断。
- (2) NAD(H)のみで稼動するアルギン酸からのエタノール合成系の構築。
- (3) A1 株の NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化。
- (4) 培養工学的解析による実用的バイオエネルギー生産系の確立。
- (5) A1 株のエタノール耐性能強化。
- (6) 酵母によるアルギン酸からのエタノール生産および海洋バイオマスの総合的利活用。

(1)、(2)、(3)、(5)については、研究の成果に述べるように、その目標を達成したが、(5)については、目的通りエタノール耐性株を取得できたが、エタノール生産遺伝子(ADH と PDC 両遺伝子)導入により耐性能が低下するという新しい問題が残った。

一方、(4)については、その目標の達成には至らず、(6)については、6 遺伝子の導入が必要なところを、2 遺伝子の導入を達成し得ていない。

(4)の目標を達成できなかった理由としては、以下のことを考えている。

培養工学的解析は行い、毒性成分の低減法や二段階発酵という有用な知見は得られたものの、アルギン酸からの高濃度(4% w/v 以上)のエタノール生産を達成できなかった(マンニトールからは高濃度[4% w/v 以上]のエタノール生産に成功した)。したがって、「実用的」バイオエネルギー生産系の構築には至らなかった。最大の原因は、A1 株がアルギン酸代謝の過程で分泌する毒性物質への完全な対処法を確立できなかったためと考えている(pH 制御による毒性の部分的低減法は確立した)。(詳細は本調査表 2. (1)研究成果に記載)

これら、所期の目標の達成に至らなかった課題のうち、(6)については、残り 2 遺伝子の導入とその後の方針が示されているが、(5)で新たに生じた問題と(4)については、その解決方法を検討中であり、具体的な方針は示すに至っていない。

他方、**研究成果**の欄に記すように、本研究課題を遂行する過程で、当初予期していなかった優れた成果も得られている。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

(1) A1 株の乳酸生成系の遮断のエタノール生産に対する有用性を確証した。目的は、達成された。

(2) NAD(H)のみで稼動するエタノール合成系構築のために、タンパク質工学的手法による高活性の NADH 依存性 A1-R 取得を試みたが困難であった。そこで、海洋細菌由来 A1-R ホモログである新規酵素 CA-R が NADH 型 DEH レダクターゼであることを明らかにし、精製酵素の性質を明らかにした。さらに、予期せぬことに A1 株に NADH 型 DEH レダクターゼを新たに見出し、その精製酵素の性質を決定した。A1 株の細胞内 NAD(P)H 濃度を決定したところ、本新規レダクターゼによる NADH 依存反応の進行が示され、結果的に NADH 依存型エタノール生産系が構築された。これにより目標が達成され、次への研究展開に必須の重要な成果(新規 NADH 型 DEH レダクターゼの特定)も得られた。

(3) A1 株の NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化のため、NADP 合成酵素(大腸菌由来 YfjB)、NADPH 合成酵素(出芽酵母由来 POS5)、さらには NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ(大腸菌由来 udhA)、NADPH 再生系(*Burkholderia stabilis* 由来 NADPH 型ギ酸デヒドロゲナーゼ mutBstFDH)、NADH 再生系(*Micobacterium vaccae* 由来 NADH 型ギ酸デヒドロゲナーゼ Mcfdh)、および上記 CA-R 各遺伝子を A1 株のコドンに最適化した上で A1 株プロモーター sph2987sp に連結し、エタノール生産性 A1 株へ導入した。これにより、再生系では培養系にギ酸を共存させるなどして、NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化を行った(代謝工学的強化という目標は達成された)。しかしエタノール増産には至らなかった。他方、酸化還元制御に重要な NAD や NADP の合成系の研究を推進した結果、ヒトミトコンドリア NADP 合成酵素の発見や同酵素への新規機能賦与、NAD 合成系や酸素応答、酸化ストレス応答、関連酵素の基質認識に関する知見など関連分野においても顕著な成果が得られた。

(4) A1 株のエタノール生産性に対する、エタノール生産遺伝子のコドンの最適化、オリゴアルギン酸、培地各成分、鉄など金属 18 成分、ビタミンなど 20 成分各々の影響を徹底的に調べたが、エタノールの生産性の増大には至らなかった。他方、実験室スケールにおけるエタノール生産過程の解析を行ったところ、培地中に細胞の生育およびエタノール発酵を阻害する毒性因子が分泌されることが示された(次頁 図 1)。アルギン酸からのエタノール生産過程で培地中に分泌される毒性因子を特定すべくメタボローム解析などを行った。毒性因子の除去に関しては、イオン交換体を用いた阻害成分の除去にある程度成功したが、高濃度エタノールの生産には至らなかったため、実用的バイオエネルギー生産系の確立という目標の達成には至らなかった。しかし、ブレークスルーとなり得る知見(pH 制御による毒性因子の弱毒化法)を得ることができた。かかる pH 制御が後述する酵母 NBRC0259-3 株とエタノール生産性 A1 株を用いた二段階発酵によるアルギン酸とマンニトールからのエタノール生産に顕著

に有効であった。また、メタボローム解析は、後述するアルギン酸からのピルビン酸生産の発見という新しい成果につながった。ジャーファーマンターを用いたスケールアップ(2 L)も進め、エタノール生産反応の酸素要求性ならびに至適酸素供給量も明らかにした。このように、グリーン・イノベーションの推進に不可欠なアルギン酸からのエタノール生産に関して、重要な一定の成果が得られた。

(5) 高濃度(5.1% v/v [4% w/v])エタノール耐性 A1 株 MK4315 株を得ることができた。目的は達成された。ただし、本耐性株にエタノール生産遺伝子(PDC および ADH 両遺伝子)を導入するとエタノール耐性が低下するという新しい問題に直面した。ADH 遺伝子の A1 株への導入および同酵素の高発現によるアセトアルデヒドの除去を試みたが、エタノール生産能とエタノール耐性の向上には至らなかった。

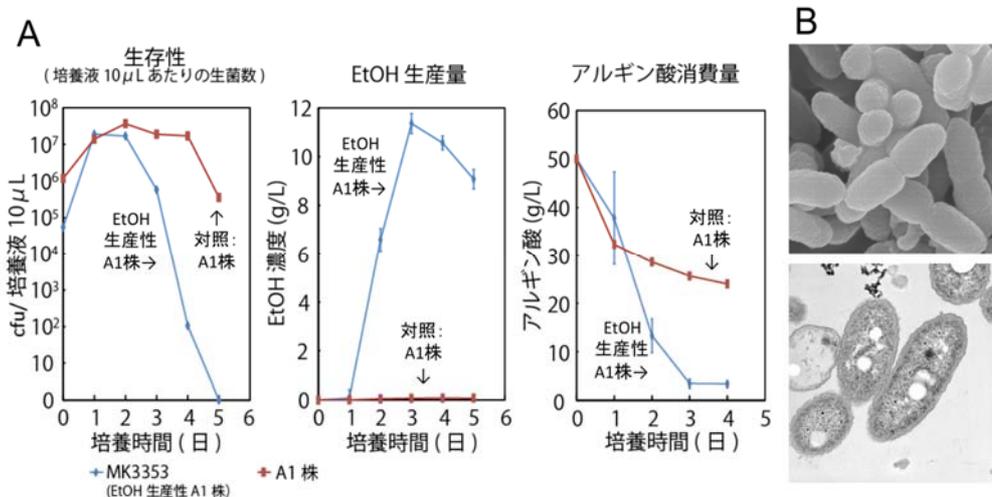


図1 エタノール生産性 A1 株によるアルギン酸からのエタノール生産と毒性物質の分泌

(A)エタノール(EtOH)生産性 A1 株は培養 3 日までアルギン酸を旺盛に消費しつつ(右)、エタノールを生産するが(中)、それ以降は生存性が激減し(死滅し:左)、エタノール生産およびアルギン酸の消費も停止する(中、右)。これは培地に分泌される毒性成分が原因であり、その弱毒化法も明らかにしている。なお、対照の A1 株(PDC と ADH 両遺伝子を持たない)はエタノールを全く生産せず(中)、アルギン酸の消費と死滅も穏やかである(右、左)。(B)培養 2 日目における、エタノールを生産中のエタノール生産性 A1 株の走査型(上)および透過型(下)電子顕微鏡写真。

(6) ① 酵母 *Saccharomyces paradoxus* NBRC0259-3 株が、これまで知られていたマンニトールからエタノールを生産する微生物 (*Pichia angophorae* と大腸菌 K011) よりも、マンニトールからエタノールを生産する上でより優良な特性を示すことを明らかにした。本成果により、マンニトールからの実用的エタノール生産への途が大きく拓けた。本成果に基づき、特許を出願した。

(6) ② *S. paradoxus* 株は遺伝子工学手法による機能向上(分子育種)において、宿主として利用できないという問題点があった(宿主ベクター系が開発されていない)。一方で、出芽酵母 *S. cerevisiae* は、宿主ベクター系が完備しておりエタノールを含む有用物質の生産系としては理想的な生物であるが、マンニトール資化性を示さない

という致命的な欠点があった。しかし本研究により、転写調節複合体 Tup1-Cyc8 コリプレッサーへの自然変異により、出芽酵母がマンニトールからエタノールを生産する能力（マンニトール資化能）を自然に獲得することを見出し、当該能力獲得酵母（マンニトール資化性出芽酵母：MK4416 株）を用いたマンニトールからの高濃度エタノール生産が可能であることを実証した。マンニトール資化能獲得機序に関しては、エピジェネティックな修飾による同能獲得を示唆する結果も得られた。これらの成果により、世界中で開発されている様々な物質生産系で、宿主として利用されている出芽酵母にマンニトール資化能を簡便に賦与することが可能になる。すなわち本成果は、マンニトールの更なる利活用への途を拓く画期的かつブレイクスルーとなり得る成果であった。

(6) ③ アルギン酸資化遺伝子群（エキソ型リアーゼ、エンド型リアーゼ、DEH レダクターゼ、キナーゼ、アルドラーゼ：出芽酵母はこれらの遺伝子を有さない）を出芽酵母型コドンに至適化した上で人工合成し、出芽酵母に導入し、エキソ型リアーゼ以外の4遺伝子の機能的発現に成功した。残りは2つの遺伝子のみである。本成果により、出芽酵母へのアルギン酸利用能の賦与に目処がついた。

(6) ④ A1 株培養液のメタボローム解析の過程で、A1 株が著量のピルビン酸（医薬品・化学品合成の原料として重要）を生産することを発見し、ピルビン酸生産条件を確立した。これにより、アルギン酸から様々な有用化合物を生産する途が拓けた。これは、アルギン酸からのエタノール以外の有用物質生産の世界で初めての発見例となった。本成果に基づき、特許を出願した。

(6) ⑤ 京都府北部で採取された褐藻類（アカモク）からのエタノール生産至適条件も検討し、アカモクを乾燥後、粉末化して、アルギン酸リアーゼを作用させることにより、褐藻類中のアルギン酸が A1 株によりエタノールに変換されること、アカモク粉末をオートクレーブすると生育阻害因子が遊離することなどが明らかとなった。コンブやワカメもエタノール生産の原料として利用できることも分かった。アカモクの糖およびメタル成分の分析も実施した。また、褐藻類（アカモク）のセルラーゼによる糖化ならびにアカモクからのアルギン酸の抽出法も検討した。エタノール生産性 A1 株と上記 MK4416 株を用いたアカモクとコンブからのエタノール生産も試みた。出芽酵母へのアルギン酸資化能の賦与に至らなかったもの、このように課題(6)全体としては、顕著な成果が得られた。

先進性・優位性・ブレイクスルーと呼べる成果

転写調節複合体 Tup1-Cyc8 コリプレッサーへの自然変異により、出芽酵母がマンニトールからエタノールを生産する能力（マンニトール資化能）を自然に獲得することを見出し、当該能力獲得酵母（マンニトール資化性出芽酵母：MK4416 株）を用いたマンニトールからの高濃度エタノール生産が可能であることを実証したこと、ならびに、A1 株が著量のピルビン酸を生産することを発見したことや、アルギン酸からのエタノール以外の有用物質生産を世界で初めて明らかにしたことは、先進性・優位性があるとともに、ブレイクスルーと言える成果である。

目的外の特筆すべき成果

酸化還元制御に重要な NAD や NADP の合成系の研究から、ヒトミトコンドリアの

NADP 合成酵素を発見したことが挙げられる。ハイインパクトジャーナル (**Nature Communications** 3:1248 doi: 10.1038/ncomms2262 (2012)) に掲載され、関連諸分野への波及効果も期待できる。本成果は、新聞や web でも広く掲載された。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

研究成果により、アルギン酸およびマンニトールからの他の有用物質の実用的生産 (バイオリファイナリー) を目指す研究が活発化すると期待される。特に、研究成果であるコリプレッサー *CYC8* への自然変異によるマンニトール利用能の付与技術は、著しく簡便に出芽酵母にマンニトール利用能を賦与する方法であるため、現在物質生産に用いられている出芽酵母に容易にマンニトール資化能を賦与できる。これにより、有望な海洋バイオマスであるマンニトールを物質生産の原料として利用することが可能になり、バイオリファイナリーの可能性を押し広げることとなることが期待される。

藻類等の海洋バイオマスは食料との競合が少なく、それを有効利用したエタノールや他の有用物質の生産はエネルギー問題や資源問題の解決への貢献が見込まれる。しかし、社会的、経済的課題の解決への具体的な貢献については、実用化を想定した経済試算等もないために判断しがたい面もある。実用化を想定した経済試算等も進め、課題があればその解決に向けた提案をすることが望まれる。

また、関連成果であるが、ミトコンドリアの NADP 合成酵素の特定は、ミトコンドリア機能のより精密な理解ならびに全生物における NADP 合成系の包括的な理解に寄与すると期待される。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究目的の達成に向けての研究計画および研究実施体制は十分に練られており、研究の過程で生じたいくつかの障害に対しても適切に対応しており、研究マネジメントは適切におこなわれていると判断される。指摘事項への対応も的確に行われている。

助成金の活用についても、適切に活用されている。

下記に示すように、研究成果の公表は積極的に行っている。社会への情報発信も、所属機関、所属学会と連携して、適切かつ活発に行われている。

雑誌論文：合計 12 件 (掲載済み、査読有 8 件、査読無 2 件、on-line 公開済み、査読有 2 件)

会議発表：合計 36 件 (専門家向け 30 件、一般向け 6 件)

図書：1 件

知的財産権：合計 5 件（いずれも出願中）

新聞掲載：合計 7 件（紙面 4 件、電子版 3 件）

国民との科学・技術対話：合計 6 件

その他の発信：

日本農芸化学会トピックス賞に 2 年連続に選定され、本件に関しては web（2 件：日本農芸化学会 HP）や新聞報道（本紙 2 紙、電子版 1 紙）で成果の発信ができた。下記（7）国民との科学・技術対話も 6 件実施し、国民に対する理解の醸成に努めた。一方、関連成果のミトコンドリア NADP 合成系の発見に関しては、研究機関で記者会見を行うなどして、web 1 件（京都大学 HP）、新聞報道（本紙 1 紙、電子版 2 紙）で成果を発信した。