

氏名	山田 亮祐
所属機関	大阪府立大学 大学院工学研究科
研究題目	油脂生産酵母による木質系バイオマス由来糖からのバイオディーゼル燃料生産法の開発

1. 研究の目的

地球温暖化や石油資源の枯渇という問題を解決し、持続的に循環可能な社会を形成するため、バイオマス資源から作られるバイオ燃料が世界中で利用されている。特に、軽油代替バイオ燃料であるバイオディーゼル燃料 (BDF) は、欧州や米国などで大量に生産、消費されている。しかし、日本では BDF の生産量、消費量は非常に少なく、普及が大幅に遅れている。従って、BDF を安価かつ安定的に生産する技術の開発が急務となっている。

BDF とは、主に、油脂とメタノールとのエステル交換反応によって作られる脂肪酸メチルエステルのことを指す。米国における BDF 生産では、原料である大豆油脂の生産コストが約 80% を占めている。従って、BDF を安価に生産するためには、原料油脂を安価に調達することが最も重要である。しかし、日本は国土が狭く油脂植物を栽培し、大量の油脂を、安価かつ安定的に得ることが非常に困難である。

近年、油脂を生産する方法として、グルコースや糖蜜を原料として、油脂生産酵母を培養し、その酵母から抽出される微生物油脂が注目されている。しかし、地球上に豊富に存在し、未利用となっている、木質系バイオマス由来の五炭糖であるキシロースを原料とした研究例は非常に少ない。これまでに、グルコースを原料とし、細胞あたりの油脂含率が 50% を越える油脂生産酵母が報告されている。これは、油脂植物である菜種の約 35%、大豆の約 20% という油脂含率と比較して非常に高い値である。また、油脂生産に要する日数も、油脂植物の 6~12 ヶ月に対して、1~10 日程度と非常に短い。さらに、酵母は高密度に培養できるため、必要な土地面積が小さく、気温、降水量や土壌などの影響も受けにくい。従って、油脂生産酵母を用いれば、短時間で、大量の油脂を、安価かつ安定的に生産することが可能になると期待できる。

そこで、本研究では、油脂生産酵母による木質系バイオマス由来糖からのバイオディーゼル燃料生産を実現するため、以下の 2 点について検討を行った。

[1] 突然変異誘発法によるキシロースからの油脂高生産性酵母の育種

[2] 酵母由来油脂の BDF への変換

2. 研究の内容(手法、経過、評価など)

[1] 突然変異誘発法による油脂高生産性酵母の育種

キシロースから油脂を生産可能な油脂生産酵母の報告例は非常に少ない。そこで、Biological Resource Center, NITE (NBRC) より油脂生産酵母 *Cryptococcus curvatus* NBRC1159、0732、*Lipomyces starkeyi* NBRC10381、10384、10385、10377、*Rhodosporidium toruloides* NBRC1637、10033、0559、0880、8766、および *Rhodotorula glutinis* NBRC0415、1125、0695、0389 を取得し、YPX 培地 (10 g/L Yeast Extract、20 g/L Peptone、20 g/L Xylose) で 72 時間培養したときの細胞増殖の程度を示す OD₆₀₀ を測定した (図 1)。図 1 より各種属から培養 72 時間の OD₆₀₀ が最も高い *C. curvatus* NBRC 0732、*L. starkeyi* NBRC 10384、*R. toruloides* NBRC 10033、*R. glutinis* NBRC 0415 を選択し、YPX 培地における油脂濃度の経時変化を測定した (図 2)。図 2 より、*C. curvatus* NBRC 0732 を、また、過去の研究においてグルコースからの高い油脂生産性を示した *R. toruloides* NBRC 8766 3-11 を UV を照射し、変異を誘発させる酵母として選抜した。

選抜した 2 株に対して、UV を照射することで突然変異を導入し、油脂合成阻害剤であるセルレニン を 10~320 μM 含む YPX 培地でスクリーニングを行うことで、セルレニン耐性油脂高生産変異酵母 *C. curvatus* NBRC 0732 3-43、*C. curvatus* NBRC 0732 3-51、*R. toruloides* NBRC 8766 3-11 1-92、および *R. toruloides* NBRC 8766 3-11 2-53 を取得した。

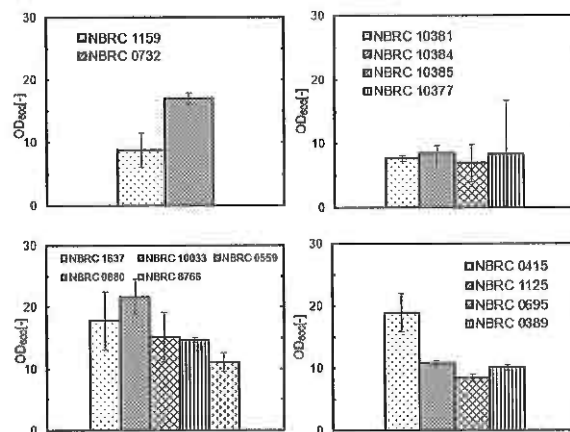


図 1 キシロースを炭素源とした油脂生産酵母の培養

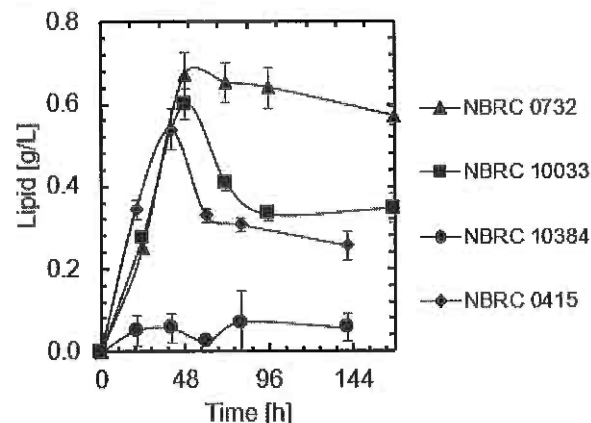


図 2 油脂濃度の経時変

2. 研究の内容(続き)(書ききれない場合には、同一形態のページを追加しても結構です)

取得したセルレニン耐性油脂高生産変異酵母 *C. curvatus* NBRC 0732 3-43、*C. curvatus* NBRC 0732 3-51 を YPX 液体培地で培養したときの油脂濃度、OD₆₀₀、キシロース濃度、キシリトール濃度の経時変化を測定した結果を図3に、*R. toruloides* NBRC 8766 3-11 1-92、*R. toruloides* NBRC 8766 3-11 2-53 の結果を図4に示す。変異株 *C. curvatus* NBRC 0732 3-43、*R. toruloides* NBRC 8766 3-11 1-92、および *R. toruloides* NBRC 8766 3-11 2-53 に関しては最大油脂濃度が元株と比較して向上することが確認された。一方で、変異株 *C. curvatus* NBRC 0732 3-51 に関しては最大油脂濃度が元株と比較して低下するという結果が得られた。*C. curvatus* では変異株の OD₆₀₀ が元株と比較して向上したが、*R. toruloides* では元株と変異株の間に明確な差異は確認されなかった。キシロースの消費速度に関しては、*C. curvatus* および *R. toruloides* 共に元株と変異株の間に明確な差異は確認されなかった。一方で、キシリトールに関しては *C. curvatus* NBRC 0732 3-51 および *R. toruloides* NBRC 8766 3-11 1-92 において、元株よりも生産量が多いことが確認された。以上の結果より、UV による突然変異導入および、油脂合成阻害剤セルレニンによるスクリーニングを行うことで、油脂生産酵母の油脂生産性を向上させることに成功した。

[2] 酵母由来油脂の BDF への変換

元株と変異株の最大油脂濃度となった培養時間において、細胞を採取し、乾燥後、細胞内の油脂を抽出し、塩酸を触媒としたメチルエステル化反応を行うことで、酵母由来油脂の BDF への変換を行った。変換した BDF に含まれる脂肪酸メチルエステル組成の分析には ZB-5HT Inferno (Phenomenex) を装着したガスクロマトグラフ質量分析計 (Shimadzu) を用いた。

表1に示すように、*C. curvatus* NBRC 0732 では元株と比較して、2種の変異株ではリノール酸の割合が減少し、オレイン酸の割合が増加した。また、表2に示すように、*R. toruloides* NBRC 8766 3-11 では元株と比較して変異株 *R. toruloides* NBRC 8766 3-11 1-92 ではリノール酸の割合が増加し、オレイン酸の割合が減少した。一方で、変異株 *R. toruloides* NBRC 8766 3-11 2-53 ではリノール酸の割合が減少し、オレイン酸の割合が増加した。いずれの変異酵母も元株と比較してリノール酸とオレイン酸以外の脂肪酸の割合に大きな差異は確認されなかった。以上の結果より、酵母由来油脂を BDF へと変換することに成功した。

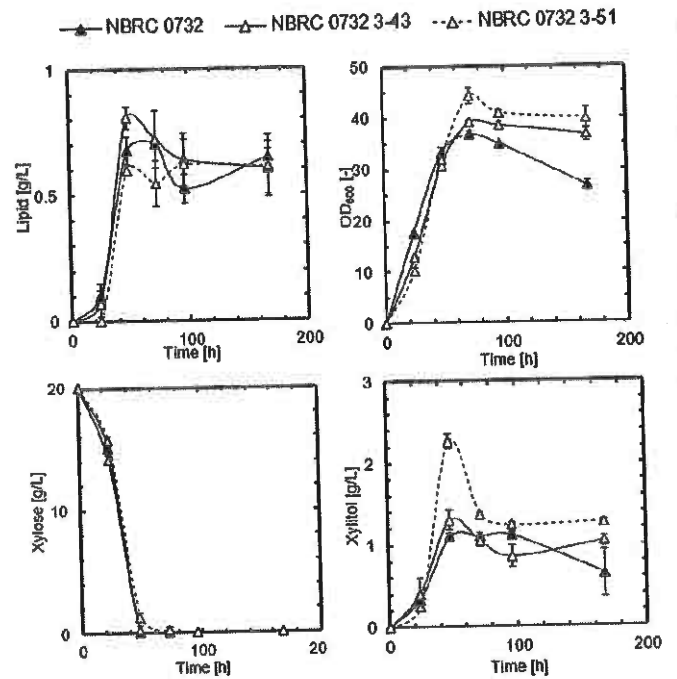


図3 突然変異 *C. curvatus* のキシロースからの油脂生産

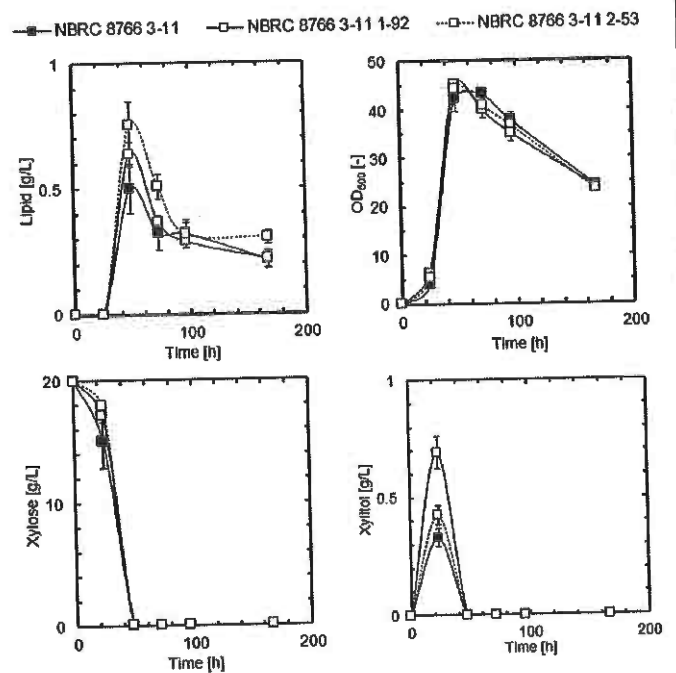


図4 突然変異 *R. toruloides* のキシロースからの油脂生産

表1 酵母由来油脂から生産した BDF の脂肪酸メチルエステル組成

Fatty acid methyl ester (wt%)	<i>C. curvatus</i>			<i>R. toruloides</i>		
	NBRC 0732	NBRC 0732 3-43	NBRC 0732 3-51	NBRC 8766 3-11	NBRC 8766 3-11 1-92	NBRC 8766 3-11 2-53
Myristic acid	28.2	27.1	24.0	18.4	17.2	13.9
Palmitic acid	8.1	9.3	10.4	15.5	11.6	14.3
Linoleic acid	35.1	23.5	30.9	25.6	35.4	20.7
Oleic acid	20.0	27.3	25.0	33.0	29.4	43.3
Stearic acid	8.6	12.8	9.7	7.6	6.4	7.8

3. 研究の結論、今後の課題

[研究の結論]

本研究では、油脂生産酵母に UV を照射し、突然変異誘発を行い、油脂生産阻害剤であるセルレニンへの耐性酵母を取得した。取得した突然変異酵母のキシロースからの油脂生産特性を表 2 に示す。*C. curvatus* NBRC 0732 3-43 では、元株 *C. curvatus* NBRC 0732 と比較して、最大油脂生産量が 16% 向上し、最大油脂生産速度が 73% 向上した。一方で、*R. toruloides* NBRC 8766 3-11 2-53 では、元株 *R. toruloides* NBRC 8766 と比較して、最大油脂生産量が 50% 向上し、最大油脂生産速度が 51% 向上した。以上の結果から、UV による突然変異導入により、セルレニン耐性を有する酵母を取得することにより、元株よりもキシロースからの油脂生産量および生産速度が向上した油脂高生産酵母を育種することに成功した。

また、油脂性酵母由来の油脂を塩酸により BDF へと変換し、その脂肪酸メチルエステル組成を分析した。BDF の原料として広く用いられている各種油脂作物に含まれる脂肪酸の組成を表 3 に示す。ミリスチン酸、リノレン酸、およびオレイン酸を主要な成分とする酵母由来油脂から生産した BDF の組成は、ミリスチン酸を主要成分とするココナッツ、リノレン酸を主要成分とするひまわりや大豆、およびオレイン酸を主要成分とするパームや菜種などの BDF 用油脂作物の脂肪酸組成に類似している。

従って、酵母由来油脂から生産される BDF は油脂作物から生産される BDF と同等の燃料特性を有しているものと考えられる。以上の結果から、酵母由来油脂から BDF としての使用に適した脂肪酸メチルエステルを生産することに成功した。

表 2 突然変異酵母の油脂生産特性

Strain	Maximum lipid production [g/L]	Maximum lipid production Time [h]	Maximum lipid production rate [mg/L/h]
NBRC 0732	0.70±0.003	72	9.7
NBRC 0732 3-43	0.81±0.044	48	16.8
NBRC 8766 3-11	0.50±0.097	48	10.4
NBRC 8766 3-11 2-53	0.75±0.094	48	15.7

表 3 BDF 用油脂作物の脂肪酸組成

Fatty acid (wt%)	Coconut	Sunflower	Soybean	Palm	Rape
Laurate acid	54.4	-	-	0.1	-
Myristic acid	21.4	-	-	0.7	-
Palmitic acid	10.6	6.2	11.3	36.7	4.9
Palmitoleate acid	0.2	0.1	0.1	0.1	-
Linoleic acid	5.3	63.1	53	8.6	20.4
Oleic acid	6.4	25.2	24.9	46.1	33
Stearic acid	1.7	3.7	3.6	6.6	1.6

[今後の課題]

本研究では、油脂生産酵母に UV を照射して突然変異を誘発することで、油脂性酵母の油脂生産性を向上させることに成功した。しかし、油脂生産性が向上した原因については明らかとなっていない。既往の研究では、*R. toruloides* を油脂生産量が多い培地条件で培養した所、油脂生産量が少ない培地条件で培養した場合と比較して 42 種類の遺伝子の発現量が増加したことが報告されている (Zhu Z. et al., A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. Nat Commun. 2012;3:1112.)。従って、本研究で得られた油脂高生産変異酵母の油脂生産時の遺伝子発現量を、既報の 42 種類の遺伝子を中心に測定することにより、油脂生産性が向上したメカニズムが解明できると考えられる。油脂生産性の向上に寄与する複数の遺伝子が特定できれば、遺伝子組換え技術により、それらの遺伝子を高発現させることにより、さらに油脂生産性を向上させることが期待される。

また、本研究では、実験用の培地成分、反応器スケール、操作条件で油脂の生産を行った。しかし既往の研究では、安価な培地成分を用いた油脂生産性の向上 (Zhao X. et al., Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. Eur J Lipid Sci Tech. 2008;110:405.)、20 L 反応器へのスケールアップ (Galafassi S. et al., Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. Bioresour Technol. 2012;111: 398.)、半回分培養による油脂生産性の向上 (Zhao X. et al., Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. J Ind Microbiol Biotechnol. 2011;38:627.) などが行われている。従って、本研究で開発した油脂高生産変異酵母を用い、安価な培地成分の検討、反応器のスケールアップの検討および操作条件の検討を行うことで、更に油脂生産性を向上させることが期待される。

4. 成果の価値(とくに判りやすく書いて下さい)

4. 1. 社会的価値

地球温暖化や石油資源の枯渇という問題を解決し、持続的に循環可能な社会を形成するため、植物などのバイオマス資源から作られるバイオ燃料、特に、軽油代替バイオ燃料であるバイオディーゼル燃料(BDF)が、世界中で利用されている。しかし、日本ではBDFの生産量、消費量は非常に少なく、普及が大幅に遅れている。従って、BDFを安価かつ安定的に生産する技術の開発が急務となっている。BDF生産では、原料である油脂の生産コストが高いため、BDFを安価に生産するためには、原料油脂を安価に調達することが重要である。しかし、日本は国土が狭く油脂植物を栽培し、大量の油脂を、安価かつ安定的に得ることが非常に困難である。そこで、本研究では、国土の狭い日本でも安定的な油脂生産が期待できる油脂生産酵母からのBDF生産を実現することを目的とした。

紫外線により油脂生産酵母に変異を導入することで、油脂生産量および生産速度が向上した油脂高生産変異酵母を育種することに成功した。さらに、酵母由来油脂からBDFを生産し、既存の油脂作物から作られるBDFと同等の性質を有していることを確認した。本成果は、油脂生産酵母によるBDF生産の実用化に向けた大きな一歩となり、持続的に循環可能な社会の形成に多大なる寄与ができるものと考えられる。

4. 2. 学術的価値

細胞内のグルコースの代謝と比較して、キシロースの代謝はより多数の酵素による複雑な多段階の反応により達成されることが知られている。また、細胞内の油脂生産には、非常に多数の酵素が複雑に関与しているため、遺伝子工学的手法により、特定の酵素の発現量を増やしても油脂生産性を変化させることは非常に困難である。本研究では、紫外線を用いた油脂生産酵母への多段階の変異導入と、油脂生産阻害剤であるセルレニンへの耐性酵母の取得により、油脂生産酵母の油脂生産性を向上させることに成功した。これは、多段階の変異導入により、油脂生産酵母が有する複数の酵素遺伝子に変異が導入され、複数の酵素の発現量や活性が変化したことが原因であると考えられる。従って、酵母への多段階の変異導入と、適切な試薬を用いたスクリーニングは、複雑な代謝経路の改変に非常に有効な手段であると考えられる。

また、本研究では、油脂高生産変異酵母の取得に成功したが、その油脂生産性向上の原因の解明には至らなかった。しかし、今後の研究において、油脂高生産変異酵母の遺伝子の発現量や酵素の生産量を網羅的に定量し、油脂生産性向上の原因が解明できれば、遺伝子工学的手法により、特定の酵素の発現量を操作することで、油脂生産性をさらに向上可能であると期待できる。

4. 3. 成果論文(本研究で得られた論文等を年代順に書いて下さい。未発表のものは公表予定を書いて下さい)

- (1) 山田亮祐, 油脂生産酵母によるバイオディーゼル燃料用油脂の生産, 月刊「化学工業」, 化学工業社, 67, 373-379 (2016)
- (2) 山内梓, 柏原朋美, 山田亮祐, 荻野博康, 突然変異導入による混合糖からの油脂高生産酵母の育種, 化学工学会 第48回秋季大会, 2016年9月(予定)
- (3) Yamada R., Yamauchi A., Kashihara T., Ogino H., Efficient lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by oleaginous yeast, Journal of Biotechnology (2016年度内投稿予定)