

# グルコアミラーゼ生産酵母の育種とでんぷん直接発酵

サントリー（株）基礎研究所 柴野裕次

## 1. はじめに

穀類を原料とするアルコールの生産は、基本的には粉碎→蒸煮→糖化→発酵→蒸留の5つの工程からなる。筆者らは長年にわたってアルコール発酵技術の改良に取り組んできたが、その中で、上記の諸工程のうち蒸煮工程の全くいらぬ無蒸煮発酵法の開発を行なった。この方法は、でんぷん質原料を蒸煮することなしに生のままで糖化・発酵させる方法であり、省エネルギー的であるのみならず、でんぷんの糊化による粘度の上昇がないために、高濃度の仕込みが可能となった。

しかし、この無蒸煮発酵法でも糖化酵素剤が必要であり、この酵素剤のコストをできるだけ低減することが望まれていた。アルコール発酵酵母はグルコースなどの単糖やオリゴ糖を資化することはできるが、でんぷんを資化できないため、でんぷん質原料からアルコールを生産する場合、でんぷんを酵素剤によってグルコースに分解する糖化工程が必要であり、このグルコースを酵母がアルコールに変換する。従って、でんぷん質原料からのアルコール発酵生産は、糖化工程のいらぬ糖質原料からのアルコール生産に比較して、どうしてもコスト高になるという問題点があった。ここに、無蒸煮発酵法に必要な糖化酵素を酵母自身が生産する、いわゆるでんぷん直接発酵酵母の育種が望まれることになった。筆者らは、遺伝子組換え技術によって、グルコアミラーゼ遺伝子を酵母に導入、発現させ、上記でんぷん直接発酵酵母の分子育種に成功したので、その結果について紹介したい。

## 2. グルコアミラーゼ遺伝子

グルコアミラーゼはでんぷんの $\alpha$ -1, 4結合を非還元末端より逐次分解し、グルコースを遊離する酵素で、種々の生物から分離されている。工業的に広く用いられているのは、糸状菌 *Aspergillus* と *Rhizopus* 起源の酵素であるが、生でんぷん糖化力の強いグルコアミラーゼを分泌する *Rhizopus sp.* をグルコアミラーゼの遺伝子源とした。

まず *Rhizopus* の孢子から調製した染色体DNAを用い、遺伝子ライブラリーを作製した。このライブラリーから目的のグルコアミラーゼ遺伝子を持つクローンを選択するために、グルコアミラーゼのアミノ酸配列の一部を決定し、これに対応する14 merの合成オリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングした。その結果、染色体DNA由来のグルコアミラーゼ遺伝子をクローン化することができた。しかしこの遺伝子は、アミノ酸配列に翻訳されないイントロンを含むため、酵母菌体内では発現させることができなかった。そこで、この染色体DNA由来のグルコアミラーゼ遺伝子をプローブとして、*Rhizopus* の mRNA から調製した cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、cDNA 由来のグルコアミラーゼ遺伝子をクローン化することができた。両遺伝子の塩基配列を比較したところ、cDNA由来のグルコアミラーゼ遺伝子にはN末端に対応する約150 bpが欠失していることがわかったので、これら両グルコアミラーゼ遺伝子から、イントロンを除いた酵母内で発現可能な遺伝子を試験管内組換えにより構築した。

グルコアミラーゼ遺伝子の全塩基配列を決定した結果、*Rhizopus* のグルコアミラーゼ遺伝子は、25アミノ酸残基のシグナルペプチドを含む604個のアミノ酸からなる分子量65,000のタンパク質をコードすることがわかった。また、この構造

遺伝子中には 70 bp 程度のイントロンが 4 箇所にも存在することも明らかになった。

### 3. グルコアミラーゼ分泌酵母

このようににして構築したグルコアミラーゼ遺伝子を YEp 型ベクターに接続して酵母内に導入したところ、形質転換酵母はでんぷんを唯一炭素源とする培地で良く成育し、グルコアミラーゼを分泌してでんぷんから直接アルコールを生産した。この形質転換酵母のグルコアミラーゼ分泌量は 0.005 u/ml (1 u は 37°C、1 分間に 1  $\mu$  mole のグルコースを遊離する活性を示す) であった。このことは、*Rhizopus* のプロモーターおよびシグナルペプチドが、酵母中でも機能することを示している。ついで、高力価グルコアミラーゼ分泌酵母の育種について、以下のような検討を行なった。

酵母解糖系の酵素の 1 つであるグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) のプロモーター、ターミネーターを利用したグルコアミラーゼの高発現をまず検討した(表-1)。GAPDH は構成的に発現する酵素で、酵母全タンパク質の 5 % 以上にも達することが知られている。YEp 型の多コピーベクター pYGA2269 によって、GAPDH のプロモーター、ターミネーターの制御下にグルコアミラーゼ遺伝子を発現させたところ 0.2 u/ml のグルコアミラーゼ分泌生産することがわかった。さらにセントロメアを含む YCp 型のベクター pYGA195 によって形質転換された酵母は 0.5 u/ml のグルコアミラーゼを生産し、当初より約 100 倍の生産量増大が認められた。

表-1 各種形質転換酵母の性質

菌株	プラスミド	コピー数	宿主	グルコアミラーゼ 活性 (u/ml)	アルコール 生産量(%)
G-2910	pYGA2069	30-50	G-1901	0.005	-
G-2901	pYGA2269	30-50	G-1901	0.2	-
G-3901	pYGA195	1	G-1901	0.5	-
G-2315	pYGA2269	30-50	EH13-15	0.5	3.8
G-3315	pYGA195	1	EH13-15	0.9	12.8
G-5315-1	組込み型	>2	EH13-15	7.6	7.2
G-5315-2	組込み型	1	EH13-15	1.5	13.0
1-TRP	組込み型	1	EH13-15	1.2	12.5
2-TRP	組込み型	2	EH13-15	2.8	13.3
3-TRP	組込み型	3	EH13-15	3.8	12.3
5-TRP	組込み型	5	EH13-15	6.0	11.5

次に、さらに高発現を目指して、宿主の選抜、改良を行ない、EH13-15 株を得た。この株を pYGA2269 および pYGA195 で形質転換したところ、各々 0.5 u/ml, 0.9 u/ml と前述の遺伝研究用酵母 (G-1901 株) を宿主とした場合の約 2 倍のグルコアミラーゼを生産することがわかった(表-1)。さらに、グルコアミラーゼ遺伝子を酵母染色体 DNA 中に組み込んだ形質転換酵母を育種してグルコアミラー

ゼ分泌量を比較検討した。YRp 型ベクターを用いて得られた組み込み型の形質転換酵母 G-5315-1, G-5315-2 では、各々、7.6 u/ml, 1.5 u/ml のグルコアミラーゼが生産されていた(表-1)。7.6 u/ml の分泌量は、*Rhizopus* 由来のプロモーターをそのまま用いた YEp 型ベクターによる形質転換体(G-2910株)の分泌量(0.005 u/ml)の約 1500 倍に相当する。また、菌株の育種、改良と共に培養条件も検討し、グルコアミラーゼの生産量を 13 u/ml にまで増加させることができた。

#### 4. 穀類の直接発酵

育種した種々の組換え体酵母を用い、粉碎トウモロコシを原料とした無蒸煮発酵法により、コルペンスケールでのアルコールの生産量(アルコール発酵能)の比較を行なった(表-1)。プラスミドによる形質転換酵母の場合、コピー数が 1 で安定な YCp 型ベクター pYGA195 で形質転換された株は、12.8% のアルコールを生産したが、多コピーの YEp 型ベクター pYGA2269 による形質転換体は、3.8% とアルコール発酵能が著しく低いという結果を得た。

グルコアミラーゼ遺伝子を染色体 DNA に組み込んだ形質転換体についても、生でんぷんからのアルコール発酵能を検討した。この形質転換体のグルコアミラーゼ分泌量はグルコアミラーゼ遺伝子のコピー数に比例して増加することがわかっているが、グルコアミラーゼ生産能の高い株が必ずしも高い発酵能を示すとは限らないことが示された(表-1)。細胞あたりのグルコアミラーゼ遺伝子のコピー数が 1 ないし 2 であるものが、生でんぷんからのアルコール発酵能が最も高く、それ以上コピー数が増加してもアルコール発酵能は逆に低下することがわかった。このようにグルコアミラーゼ生産量とアルコール発酵能が比例しないのは、グルコアミラーゼの過剰生産が酵母の増殖や代謝に影響を及ぼしたためと考えられる。最も発酵能の高い G-5315-2 株では、発酵開始後 120 時間で約 13% のアルコールを生成したが、この値は酵素剤を添加する従来法に比較して、約 95% の効率であった。

トウモロコシ以外のでんぷん質原料であるキャサバ、甘藷を用いた場合にも、低温蒸煮法によって、グルコアミラーゼ酵素剤を全く使用することなく、良好な発酵成績が得られた。

#### 5. おわりに

以上、グルコアミラーゼ遺伝子を用いた生でんぷん直接発酵酵母の分子育種とその応用について、これまで得られた知見を示した。近い将来、でんぷん質原料を用いる革新的アルコール発酵技術として工業的に利用されるものと期待している。