

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5590140号  
(P5590140)

(45) 発行日 平成26年9月17日(2014.9.17)

(24) 登録日 平成26年8月8日(2014.8.8)

|              |       |           |         |       |       |
|--------------|-------|-----------|---------|-------|-------|
| (51) Int.Cl. |       | F I       |         |       |       |
| C 1 2 P      | 7/06  | (2006.01) | C 1 2 P | 7/06  | Z N A |
| C 1 2 N      | 1/19  | (2006.01) | C 1 2 N | 1/19  |       |
| C 1 2 N      | 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N | 15/00 | A     |

請求項の数 4 (全 11 頁)

|               |                              |           |                                     |
|---------------|------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2012-542764 (P2012-542764) | (73) 特許権者 | 000003207<br>トヨタ自動車株式会社             |
| (86) (22) 出願日 | 平成22年11月11日(2010.11.11)      |           | 愛知県豊田市トヨタ町1番地                       |
| (86) 国際出願番号   | PCT/JP2010/070076            | (74) 代理人  | 100091096<br>弁理士 平木 祐輔              |
| (87) 国際公開番号   | W02012/063344                | (74) 代理人  | 100118773<br>弁理士 藤田 節               |
| (87) 国際公開日    | 平成24年5月18日(2012.5.18)        | (72) 発明者  | 大西 徹<br>愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内   |
| 審査請求日         | 平成24年12月10日(2012.12.10)      | (72) 発明者  | 富永 詠美子<br>愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え酵母を用いたエタノールの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

キシロース代謝能を有する酵母を酢酸含有溶液に好気条件下にて接触させる工程と、その後、キシロース含有培地にて当該酵母を培養してエタノール発酵を行う工程とを有するエタノールの製造方法。

【請求項2】

上記酵母は、キシロース代謝関連遺伝子が導入された組換え酵母であることを特徴とする請求項1記載のエタノールの製造方法。

【請求項3】

上記キシロース代謝関連遺伝子は、キシロースリダクターゼ遺伝子、キシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子及びキシロキナーゼ遺伝子であることを特徴とする請求項2記載のエタノールの製造方法。

【請求項4】

上記酢酸含有溶液は、酵母用培地に酢酸を添加した組成であることを特徴とする請求項1記載のエタノールの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、キシロース代謝能を有する組換え酵母を用いたエタノールの製造方法に関する

る。

【背景技術】

【0002】

セルロース系バイオマスは、エタノール等の有用なアルコールや有機酸の原料として有効に利用されている。セルロース系バイオマスを利用したエタノール製造において、エタノール生産量を向上させるため、基質として5単糖のキシロースを利用できる酵母が開発されている。例えば、特許文献1は、*Pichia stipitis*由来のキシロースリダクターゼ遺伝子及びキシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子と*S. cerevisiae*由来のキシロキナーゼ遺伝子を染色体に組み込んだ酵母を開示している。

【0003】

また、非特許文献1及び2には、酢酸を含有する発酵培地でキシロース代謝能を付与した酵母を培養すると、キシロース発酵速度が低下することが記載されている。さらに、非特許文献3には、キシロース発酵能を付与された酵母及びキシロース発酵速度が向上した変異株が記載されている。

【0004】

しかしながら、キシロース代謝能を有する酵母に対して、キシロース代謝能を向上させるような技術は知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2009-195220号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】FEMS Yeast Research, vol. 9, 2009, 358-364

【非特許文献2】Enzyme and Microbial Technology 33, 2003, 786-792

【非特許文献3】Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009, 84:37-53

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、特に、キシロース代謝能を有する酵母におけるキシロース代謝能を向上させることで、エタノールの生産性を向上させる技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記目的を達成するため、本発明者らが鋭意検討した結果、キシロース代謝能を有する酵母を酢酸含有溶液に接触させる処理を行うことで、当該酵母のキシロース代謝能が飛躍的に向上することを見だし、本発明を完成するに至った。

【0009】

本発明は以下を包含する。

【0010】

(1) キシロース代謝能を有する酵母を酢酸含有溶液に浸漬する工程と、その後、キシロース含有培地にて当該酵母を培養してエタノール発酵を行う工程とを有するエタノールの製造方法。

【0011】

(2) 上記酵母は、キシロース代謝関連遺伝子が導入された組換え酵母であることを特徴とする(1)記載のエタノールの製造方法。

【0012】

(3) 上記キシロース代謝関連遺伝子は、キシロースリダクターゼ遺伝子、キシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子及びキシロキナーゼ遺伝子であることを特徴とする(2)記載のエタノールの製造方法。

10

20

30

40

50

## 【0013】

(4) 上記酵母を酢酸含有溶液に浸漬する際、好気条件とすることを特徴とする(1)記載のエタノールの製造方法。

## 【0014】

(5) 上記酢酸含有溶液は、酵母用培地に酢酸を添加した組成であることを特徴とする(1)記載のエタノールの製造方法。

## 【発明の効果】

## 【0015】

本発明に係るエタノールの製造方法によれば、キシロース代謝能を有する酵母におけるキシロース代謝能を向上させることができ、その結果、エタノールの生産性が大幅に向上する。本発明に係るエタノールの製造方法を利用することにより、例えば木質系バイオマスを利用して、エタノールを低コストに生産することができる。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0016】

【図1】XYL1、XYL2、XKS1遺伝子過剰発現・GRE3遺伝子破壊用DNA断片を用いた組換えを模式的に示す図である。

【図2】発酵試験後、エタノール濃度を分析した結果を示す特性図である。

【図3】発酵試験後、キシロース濃度を分析した結果を示す特性図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0017】

以下、本発明を図面及び実施例を用いてより詳細に説明する。

20

## 【0018】

本発明に係るエタノールの製造方法は、キシロース代謝能を有する組換え酵母により培地に含まれるキシロースからエタノールを合成する方法であり、当該組換え酵母を酢酸含有溶液に接触させる処理工程を含む。当該工程を経ることにより組換え酵母におけるキシロース代謝能が大幅に向上することになり、エタノールの生産性が大幅に向上する。

## 【0019】

## &lt;組換え酵母&gt;

本発明に係るエタノールの製造方法に使用される組換え酵母は、少なくともキシロース代謝関連遺伝子がゲノムに導入されている。この組換え酵母は、培地中に含まれるキシロースを資化してエタノールを生産することができる。なお、培地中に含まれるキシロースとは、キシロースを構成糖とするキシランやヘミセルロース等を糖化するプロセスによって得られたものでも良いし、培地に含まれるキシランやヘミセルロース等が糖化酵素により糖化されることで培地に供給されるものであってもよい。後者の場合は、所謂、同時糖化発酵の系を意味する。

30

## 【0020】

キシロース代謝関連遺伝子とは、キシロースをキシリトールに変換するキシロースリダクターゼをコードするキシロースリダクターゼ遺伝子、キシリトールをキシルロースに変換するキシリトールデヒドロゲナーゼをコードするキシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子及びキシルロースをリン酸化してキシルロース5-リン酸を生成するキシルロキナーゼをコードするキシルロキナーゼ遺伝子を含む意味である。なお、キシルロキナーゼにより生成されたキシルロース5-リン酸は、ペントースリン酸経路に入り代謝されることとなる。

40

## 【0021】

酵母ゲノムに導入されるキシロース代謝関連遺伝子としては、特に限定されないが、*Pichia stipitis*由来のキシロースリダクターゼ遺伝子及びキシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子、*Saccharomyces cerevisiae*由来のキシルロキナーゼ遺伝子を挙げることができる(Eliasson A. et al., Appl. Environ. Microbiol., 66:3381-3386及びToivari MN et al., Metab. Eng. 3:236-249参照)。その他にも、キシロースリダクターゼ遺伝子としては、*Candida tropicalis*や*Candida prapsilosis*由来のキシロースリダクターゼ遺伝子を利用することができる。キシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子としては、*Candida tropical*

50

isやCandida prapsilosis由来のキシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を利用することができる。キシロキナーゼ遺伝子としては、Pichia stipitis由来のキシロキナーゼ遺伝子を利用することもできる。なお、ストレプトマイセスムリナスクラスター由来のキシロイソメラーゼ遺伝子等を利用することもできる。

【0022】

また、本発明に係るエタノールの製造方法に使用される組換え酵母は、上述したキシロース代謝関連遺伝子の他に、グルコース等の糖代謝に関与する遺伝子を導入した物であっても良い。一例として組換え酵母は、 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子を導入することで $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を有する酵母であることが好ましい。

【0023】

ここで $\alpha$ -グルコシダーゼ活性とは、糖の $\alpha$ -グリコシド結合を加水分解する反応を触媒する活性を意味する。すなわち、 $\alpha$ -グルコシダーゼは、セロビオース等のセロオリゴ糖をグルコースに分解することができる。 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子は、細胞表面提示型遺伝子として導入されることが好ましい。ここで、細胞表面提示型遺伝子とは、当該遺伝子がコードするタンパク質が細胞の表面にディスプレイされるように発現するように改変された遺伝子である。例えば、細胞表面提示型 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子とは、 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子と細胞表面局在タンパク質遺伝子とを融合した遺伝子である。細胞表面局在タンパク質とは、酵母の細胞表面に固定され、細胞表面に存在するタンパク質をいう。例えば、凝集性タンパク質である $\alpha$ -または $\alpha$ -アグルチニン、FLOタンパク質などが挙げられる。一般に細胞表面局在タンパク質は、N末端側に分泌シグナル配列及びC末端側にGPIアンカー付着認識シグナルを有している。分泌シグナルを有する点では分泌性タンパク質と共通しているが、細胞表面局在タンパク質はGPIアンカーを介して細胞膜に固定されて輸送される点が分泌性タンパク質と異なる。細胞表面局在タンパク質は、細胞膜通過の際、GPIアンカー付着認識シグナル配列が選択的に切断され、新たに突出したC末端部分でGPIアンカーと結合して細胞膜に固定される。その後ホスファチジルイノシトール依存性ホスホリパーゼC (PI-PLC) によりGPIアンカーの根元部分が切断される。ついで、細胞膜から切り離されたタンパク質は細胞壁に組み込まれて細胞表面に固定され、細胞表面に局在する(例えば、特開2006-174767号公報参照)。

【0024】

$\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子としては、特に限定されないが、例えば、Aspergillus aculeatus由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子(Murai et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:4857-4861)を挙げることができる。その他にも、 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子としては、Aspergillus oryzae由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子、Clostridium cellulovorans由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子及びSaccharomycopsis fibuligera由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子等を利用することができる。

【0025】

<組換え酵母の作製>

上述したキシロース代謝関連遺伝子を宿主となる酵母ゲノムに導入することにより、本発明に使用できる組換え酵母を作製することができる。宿主として用いることができる酵母としては、特に限定するものではないがCandida Shehatae、Pichia stipitis、Pachysohlen tannophilus、Saccharomyces cerevisiae及びSchizosaccharomyces pombeなどの酵母が挙げられ、特にSaccharomyces cerevisiaeが好ましい。また、酵母としては、実験面での利便性のために使われる実験株でも良いし、実用面での有用性のために使われている工業株(実用株)でも良い。工業株としては、例えば、ワイン、清酒や焼酎作りに用いられる酵母株を挙げることができる。

【0026】

また、宿主となる酵母としては、ホモタリック性を有する酵母を使用することが好ましい。特開2009-34036号公報に開示される手法によれば、ホモタリック性を有する酵母を利用することで、簡便にゲノムへの多コピー遺伝子導入が可能となる。ホモタリック性を有する酵母とは、ホモタリックな酵母と同義である。ホモタリック性を有する酵

10

20

30

40

50

母としては、特に限定されず、如何なる酵母をも使用することができる。ホモタリック性を有する酵母としては、*Saccharomyces cerevisiae* OC-2株 (NBRC2260) を挙げることができるが、これに限定されるものではない。その他にもホモタリック性を有する酵母としては、アルコール酵母 (台研396号、NBRC0216) (出典:「アルコール酵母の諸特性」酒研会報、No37、p18-22(1998.8))、ブラジルと沖縄で分離したエタノール生産酵母 (出典:「ブラジルと沖縄で分離した*Saccharomyces cerevisiae*野生株の遺伝学的性質」日本農芸化学会誌、Vol.65、No.4、p759-762(1991.4))及び180 (出典「アルコール発酵力の強い酵母のスクリーニング」日本醸造協会誌、Vol.82、No.6、p439-443(1987.6)) を挙げることができる。また、ヘテロタリックな表現型を示す酵母においても、HO遺伝子を発現可能に導入することによってホモタリック性を有する酵母として使用することができる。すなわち、本発明において、ホモタリック性を有する酵母とは、HO遺伝子を発現可能に導入された酵母も含む意味である。

10

## 【0027】

なかでも、*Saccharomyces cerevisiae* OC-2株は、従来ワイン醸造の場面で利用されてきた安全性を確認されている菌株であるため好ましい。また、*Saccharomyces cerevisiae* OC-2株は、後述する実施例で示したように、高糖濃度の条件下におけるプロモーター活性が優れた菌株であるため好ましい。特に*Saccharomyces cerevisiae* OC-2株は、高糖濃度条件においてピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子 (PDC1) のプロモーター活性が優れているため好ましい。

## 【0028】

20

また、導入する遺伝子のプロモーターとしては、特に限定されないが、例えばグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (TDH3) のプロモーター、3-ホスホグリセレートキナーゼ遺伝子 (PGK1) のプロモーター、高浸透圧応答7遺伝子 (HOR7) のプロモーターなどが利用可能である。なかでもピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子 (PDC1) のプロモーターが下流の目的遺伝子を高発現させる能力が高いために好ましい。

## 【0029】

すなわち、上述した遺伝子は、発現を制御するプロモーターやその他の発現制御領域とともに酵母のゲノムに導入してもよい。または、上述した遺伝子は、宿主となる酵母のゲノムに本来的に存在する遺伝子のプロモーターやその他の発現制御領域により発現制御されるように導入してもよい。

30

## 【0030】

また、上述した遺伝子を導入する方法としては、酵母の形質転換方法として知られている従来公知のいかなる手法をも適用することができる。具体的には、例えば、例えば、エレクトロポレーション法 “Meth. Enzym., 194, p182 (1990)”、スフェロプラスト法 “Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 p1929(1978)”、酢酸リチウム法 “J.Bacteriology, 153, p163(1983)”、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 p1929 (1978)、Methods in yeast genetics, 2000 Edition: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manualなどに記載の方法で実施可能であるが、これに限定されない。

## 【0031】

<エタノール製造>

40

以上で説明した組換え酵母を使用してエタノールを製造する際には、キシロース含有培地にてエタノール発酵培養を行う前に、当該組換え酵母を酢酸含有溶液に接触させる処理を行う。ここで、酢酸含有溶液は、酢酸水溶液、酢酸を含有する液体培地のいずれでも良い。酢酸水溶液は、酢酸を水に溶解することでして得られる。また、酢酸を含有する液体培地は、SD培地、YPD培地、YPAD培地、YM培地といった酵母用の培地に酢酸を添加することで調整できる。ここで、酢酸含有溶液に含まれる酢酸濃度は、特に限定されないが、例えば1~20g/l、好ましくは2~10g/l、より好ましくは3~5g/lである。酢酸含有溶液に含まれる酢酸濃度が上記範囲を下回る場合、上記組換え酵母におけるキシロース代謝能を顕著に向上できない虞がある。また、酢酸含有溶液に含まれる酢酸濃度が上記範囲を上回る場合、上記組換え酵母の生育を阻害する虞がある。

50

## 【0032】

また、組換え酵母を酢酸含有溶液に接触させる処理は、特に限定されないが、例えば1時間以上、好ましくは3時間以上、より好ましくは10時間以上とする。組換え酵母と酢酸含有溶液との接触時間が上記範囲を下回る場合、上記組換え酵母におけるキシロース代謝能を顕著に向上できない虞がある。

## 【0033】

さらに、組換え酵母を酢酸含有溶液に接触させる処理は、酢酸含有溶液に組換え酵母を投入した状態で攪拌しても良いし、振盪しても良い。また、組換え酵母を酢酸含有溶液に接触させる際、溶液温度を例えば20～40、好ましくは25～37、より好ましくは28～35とする。

10

## 【0034】

特に、組換え酵母を酢酸含有溶液に接触させる処理は、酢酸含有溶液として酢酸を含有する液体培地を使用し、好気条件下で行うことが好ましい。この場合、組換え酵母が酢酸含有溶液に接触することでキシロース代謝能が向上すると共に、増殖によりエタノール発酵に適した菌体量を確保することができる。

## 【0035】

酢酸含有溶液に組換え酵母を接触させた後、当該組換え酵母を酢酸含有溶液から回収し、キシロース含有培地にてエタノール発酵を行う。組換え酵母を酢酸含有溶液から回収する際には、特に限定されず、例えば遠心分離やろ過といった手法を適用することができる。組換え酵母を酢酸含有溶液から回収する際には、酢酸含有溶液を極力除去することが望ましい。エタノール発酵に使用するキシロース含有培地への酢酸含有溶液の持ち込みによる、組換え酵母の生育阻害、組換え酵母によるエタノール生産阻害を防止するためである。換言すると、組換え酵母の生育阻害、組換え酵母によるエタノール生産阻害が僅少であり、エタノール生産効率の観点から許容できる場合、所定量の酢酸含有溶液がキシロース含有培地に持ち込まれても構わない。なお、当該組換え酵母を酢酸含有溶液から回収した後、酢酸含有溶液を除去するために組換え酵母を洗浄する処理を行っても良い。

20

## 【0036】

エタノール発酵を行うキシロース含有培地とは、炭素源として少なくともキシロースを含有していれば良く、グルコース等の他の炭素源が含まれている培地であっても良い。また、エタノール発酵に利用する培地は、セルロース系バイオマスを糖化处理した後の糖化液を添加したものを使用することができる。この場合、糖化液には、セルロース系バイオマスに含まれるヘミセルロースに由来するキシロースが含まれる。

30

## 【0037】

一方、エタノール発酵に利用する培地としては、セルロース系バイオマスを含む培地であっても良い。この場合、上記組換え酵母によるエタノール発酵は、いわゆる同時糖化発酵処理となる。ここで、同時糖化発酵処理とは、セルロース系バイオマスを糖化する工程とエタノール発酵工程とを区別せずに同時に実施する処理を意味する。なお、同時糖化発酵処理に先立って、セルロース系バイオマスに対して従来公知の前処理を施しても良い。前処理としては、特に限定されないが、例えば、リグニンを微生物によって分解する処理や、セルロース系バイオマスの粉碎処理等を挙げることができる。

40

## 【0038】

いずれの培地を使用する場合でも、当該組換え酵母は、培地に含まれるキシロースを資化してエタノールを生成することができる。なお、糖化方法としては、特に限定されないが、セルラーゼやヘミセルラーゼ等のセルラーゼ製剤を利用する酵素法等を挙げることができる。セルラーゼ製剤は、セルロース鎖及びヘミセルロース鎖の分解に関与する複数の酵素を含んでおり、エンドグルカナーゼ活性、エンドキシラナーゼ活性、セロピオヒドロラーゼ活性、グルコシダーゼ活性及びキシロシダーゼ活性等の複数の活性を示す。セルラーゼ製剤としては、特に限定されないが、例えば、*Trichoderma reesei*や、*Acremonium cellulolyticus*などが生産するセルラーゼを挙げることができる。セルラーゼ製剤としては、市販されているものを使用しても良い。

50

## 【 0 0 3 9 】

同時糖化発酵処理では、セルロース系バイオマス（前処理後であってもよい）を含む培地にセルラーゼ製剤と上述した組換え微生物とを加え、所定の温度範囲で当該組換え酵母を培養する。培養温度としては特に限定されないが、エタノール発酵の効率を考慮して25～45 とすることができ、30～40 とすることが好ましい。また、培養液のpHを4～6とすることが好ましい。また、培養に際して、攪拌や振とうしてもよい。

## 【 0 0 4 0 】

本発明に係る組換え酵母を利用したエタノールの製造方法では、エタノール発酵の後、培地からエタノールを回収する。エタノールの回収方法は、特に限定されず、従来公知のいかなる方法も適用することができる。例えば、上述したエタノール発酵が終了した後、固液分離操作によってエタノールを含む液層と、組換え酵母や固形成分を含有する固層とを分離する。その後、液層に含まれるエタノールを蒸留法によって分離・精製することで、純度の高いエタノールを回収することができる。なお、エタノールの精製度は、エタノールの使用目的にあわせて適宜調整することができる。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 4 1 】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

## 【 0 0 4 2 】

## 〔 実施例 1 〕

本実施例では、キシロース資化酵母の作製のため、2倍体酵母のOC2-T株(Saitoh, S.ら、J. Ferment. Bioeng. 1996年、81巻、98-103頁)のGRE3を1コピー破壊して、XYL1、XYL2及びXKS1遺伝子を導入した。

## 【 0 0 4 3 】

XYL1、XYL2、XKS1遺伝子過剰発現・GRE3遺伝子破壊用DNA断片の作成

酵母BY4742株（Open Biosystems）のゲノムDNAを鋳型として、GRE3遺伝子とその5'上流・3'下流非翻訳領域とを含むDNA断片をPCRで増幅した。PCR用プライマーはそれぞれTB2358（5'-TGGAATATTACCGCTCGAAG-3'：配列番号1）とTB2359（5'-AAGGGGAAGGTGTGGAATC-3'：配列番号2）を使用した。なお、酵母BY4742株のDNA配列増幅のためのPCRプライマー設計は、Saccharomyces Genome DatabaseのDNA配列データを参考にした。プラスミドpUC19を鋳型として、pUC19のマルチクローニングサイトで切断されるようなpUC19全長を含む直鎖状DNA断片をPCRで増幅した。PCR用プライマーはそれぞれTB2373（5'-CACACCTCCCCCTTGATCCTCTAGAGTCGACC-3'：配列番号3）とTB2374（5'-GCGGTAATATCCAGATCCCCGGGTACCGAGCTC-3'：配列番号4）を使用した。上記二つのDNA断片をIn-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit（タカラバイオ）を用いてクローニングし、pUC19-5U\_GRE3-GRE3-3U\_GRE3と命名した。

## 【 0 0 4 4 】

pUC19-5U\_GRE3-GRE3-3U\_GRE3を鋳型として、GRE3遺伝子の5'上流・3'下流非翻訳領域とpUC19を含む領域のDNA断片と、酵母BY4742株のゲノムDNAを鋳型として、TEF1プロモーター領域を含むDNA断片、XKS1遺伝子、HIS3ターミネーター領域を含むDNA断片をPCRで増幅した。PCR用プライマーはそれぞれTB3018（5'-AACGAGGCGCGCTCTCCAGCCAGTAAAATCCA-3'：配列番号5）とTB3017（5'-GCTATGGTGTGTGGGCTTTAAAAAATTTCCAATTTTCTTTACG-3'：配列番号6）、TB2210（5'-CCCACACACCATAGCTTCAAAATG-3'：配列番号7）とTB2269（5'-TCTTTAGATTAGATTGCTATGCTTTCTTTCTAATGAGCAAG-3'：配列番号8）、TB2345（5'-AATCTAATCTAAAG AATGTTGTGTTTCAGTAATTCAGAGAC-3'：配列番号9）とTB2346（5'-CTGCGCCGCGCCGATTAGATGAGAGTCTTTTCCAGTTC-3'：配列番号10）、TB1401（5'-TGCGCCGCGCCGAGC-3'：配列番号11）とTB2683（5'-GCGCCTCGTTCAGAATGA-3'：配列番号12）を使用した。上記四つのDNA断片をIn-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kitを用いてクローニングし、pUC19-5U\_GRE3-P\_TEF1-XKS1-T\_HIS3-3U\_GRE3と命名した。

## 【 0 0 4 5 】

pUC19-5U\_GRE3-P\_TEF1-XKS1-T\_HIS3-3U\_GRE3を鋳型として、HIS3ターミネーター領域と、GRE3遺伝子の3'下流非翻訳領域の間で切断したようなプラスミド全長を含む直鎖状DNA断片と、酵母BY4742株のゲノムDNAを鋳型として、TDH2プロモーター領域を含むDNA断片と、ILV3ターミネーター領域を含むDNA断片、ピキア・スチピチスのゲノムDNAを鋳型としてXYL1遺伝子をPCRで増幅した。PCR用プライマーはそれぞれTB9020 (5'-TCCAGCCAGTAAAAATCC ATAC-3' : 配列番号 13) とTB2457 (5'-CCGTCAAGAGAGCGCGCCTCGTTCAG-3' : 配列番号 14)、TB2844 (5'-GCGCTCTCTTGACGGGTATTCTGAGCATCTTAC-3' : 配列番号 15) とTB2595 (5'-TTTGTTTTGTGTTTGTGTGTGATGAATTTAATTTG-3' : 配列番号 16)、TB2314 (5'-AACAAACAAAACA AAATGCCTTCTATTAAGTTGAAC-3' : 配列番号 17) とTB2455 (5'-GGGGCCTATAATGCATTAGACGAAG ATAGGAATCTTG-3' : 配列番号 18)、TB2456 (5'-AACAAACAAAACAAAATGCCTTCTATTAAGTTGAAC -3' : 配列番号 19) とTB3019 (5'-ATTTTACTGGCTGGAATTTCTAGATTATAATTAAGCGAC-3' : 配列番号 20) を使用した。なお、XYL1遺伝子配列増幅のためのPCRプライマー設計は、Gen eBankに登録されているピキア・スチピチスXYL1遺伝子(登録番号XM\_001385144)を参考 にした。上記四つのDNA断片をIn-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kitを用いてクローニ ングし、pUC19-5U\_GRE3-P\_TEF1-XKS1-T\_HIS3-P\_TDH2-XYL1-T\_ILV3-3U\_GRE3と命名した。

#### 【0046】

pUC19-5U\_GRE3-P\_TEF1-XKS1-T\_HIS3-P\_TDH2-XYL1-T\_ILV3-3U\_GRE3を鋳型として、ILV3ターミネーター領域と、GRE3遺伝子の3'下流非翻訳領域の間で切断したようなプラスミド全長を含む直鎖状DNA断片と、酵母BY4742株のゲノムDNAを鋳型として、PDC1プロモーター領域を含むDNA断片とILV6ターミネーター領域を含むDNA断片、ピキア・スチピチスのゲノムDNAを鋳型として、XYL2遺伝子をPCRで増幅した。PCR用プライマーはそれぞれTB2375 (5'-AGTTGCTTGACACGGTGAAGAAGGTCCAGCCAGTAAAAATCCATA-3' : 配列番号 21) とTB3021 (5'-ATTTCTAGATTATAATTAAGCGAC-3' : 配列番号 22)、TB2010 (5'-TTTGATTGATTTGACTGTGT TATTTTGC-3' : 配列番号 23) とTB2261 (5'-CCGTGTCAGCAACTATGGG-3' : 配列番号 24)、TB3022 (5'-TATAATCTACGAAATTAATAAGAAAGGTGACCGTG-3' : 配列番号 25) とTB2347 (5'-GTTAGTCTCTCGGCCTTGCG-3' : 配列番号 26)、TB2351 (5'-GGCCGAGAGACTAACTTACTCAGGGCCG TCAAT-3' : 配列番号 27) とTB2352 (5'-GTCAAATCAATCAAAATGACTGCTAACCCCTTCC-3' : 配列番号 28) を使用した。なお、XYL2遺伝子配列増幅のためのPCRプライマー設計は、GeneB ankに登録されているピキア・スチピチスXYL2遺伝子(登録番号AF127801もしくはX55392)を参考にした。上記四つのDNA断片をIn-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kitを用いてクローニングし、pUC19-5U\_GRE3-P\_TEF1-XKS1-T\_HIS3-P\_TDH2-XYL1-T\_ILV3-ILV6\_T-XYL2-PDC1\_P-3U\_GRE3と命名した。

#### 【0047】

pUC19-5U\_GRE3-P\_TEF1-XKS1-T\_HIS3-P\_TDH2-XYL1-T\_ILV3-ILV6\_T-XYL2-PDC1\_P-3U\_GRE3を鋳型とし、GRE3遺伝子の5'上流非翻訳領域からGRE3遺伝子の3'下流非翻訳領域までのDNA断片をPCRで増幅し、本断片(図1)をXYL1、XYL2、XKS1遺伝子過剰発現・GRE3遺伝子破壊株作成に用いた。

#### 【0048】

#### XYL1、XYL2、XKS1遺伝子過剰発現・GRE3遺伝子ヘテロ破壊株作製

XYL1、XYL2、XKS1遺伝子過剰発現・GRE3遺伝子破壊用DNA断片を用いて、OC2-T株をFroze n-EZ Yeast Transformation IIキット(ZYMO RESEARCH)を用いて、キット添付のプロト コールに従い、形質転換した。形質転換後、キシロースを単独炭素源としたプレートにま いて、30℃で7日間培養し、形質転換体を得た。形質転換体よりゲノムDNAを調製し、PCR 法により挿入DNA断片の外側とベクター内側のプライマーであるTB2356 (5'-TGGGGCTAAACG AGATTTGG-3' : 配列番号 29) とTB592 (5'-GAAATTTAGTATGCTGTGCTTGGG-3' : 配列番号 30) を用いて、染色体に正常に1コピー組込まれていることを確認した。

#### 【0049】

#### 発酵試験

得られた形質転換体についてYPD培地(イーストエキストラクト 10g/L、ペプトン 20g/Lグルコース20g/L)もしくは、YPD酢酸培地(イーストエキストラクト 10g/L、ペプトン

10

20

30

40

50

20g/Lグルコース20g/L、酢酸1~5g/L；アンモニアでpH5に調整)に植菌し、30℃で24時間震盪培養を行った。培養終了後、遠心分離(2000g、3分)により菌体を回収した。

【0050】

キシロース培地(キシロース60g/L、イーストエキス10g/L)、グルコース/キシロース培地(グルコース90g/L、キシロース60g/L、イーストエキス10g/L)もしくは、グルコース培地(グルコース90g/L、イーストエキス10g/L)50mlを50ml容のフラスコに入れ、菌体濃度が菌体乾燥重量0.3g/lになるように植菌し、80rpm/分(震とう幅35mm)で34~48時間発酵を行い、HPLC(LC-10A;島津製作所)でエタノールおよびキシロースの濃度を測定した。測定条件について、カラムはAminexHPX-87H(バイオラッド)、検出器は示差屈折率検出器RID-10A(島津製作所)を使用し、移動相0.01NのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、流量0.6ml/min、温度30℃で分析した。

10

【0051】

エタノール濃度の分析結果を図2に示す。図2に示すように、発酵試験の結果、キシロース培地では、酢酸無処理区と比較して培養液に酢酸3g/L以上添加した処理区について、エタノール生産速度が向上していることが明らかとなった。一方、グルコース培地では、エタノール生産速度の違いがなかった。

【0052】

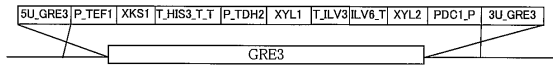
キシロース濃度の分析結果を図3に示す。図3に示すように、グルコース/キシロース培地を使用した場合、キシロースの消費速度が酢酸3g/L以上添加した処理区で向上したものの、グルコースの消費量についてはコントロールと差異がなかった。

20

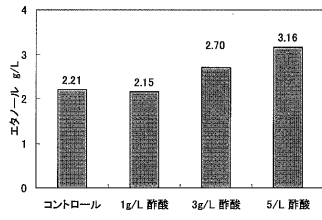
【0053】

以上の結果より、エタノール発酵工程に先立って、キシロース代謝能を有する組換え酵母を酢酸含有溶液(本実施例では酢酸を含有する液体培地)に接触させることで、当該組換え酵母におけるキシロース代謝能が大幅に向上することが明らかとなった。また、キシロース代謝能を有する組換え酵母を酢酸含有溶液に接触させても、当該組換え酵母が有するグルコース代謝能は大きく改善することはなかった。このことより、キシロース代謝能を有する組換え酵母を酢酸含有溶液に接触させた場合、当該組換え酵母における炭素源資化能力のうち、キシロース代謝能を特異的に改善できることが明らかとなった。

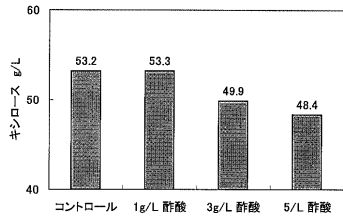
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

0005590140000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 保谷 典子  
愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内

審査官 菅原 洋平

(56)参考文献 特開2009-195220(JP,A)  
国際公開第2011/065539(WO,A1)  
特開2010-239925(JP,A)  
BELLISSIMI, E. et al., , FEMS Yeast Res, 2009年, Vol.9, pp.358-364  
SOUTO-MAIOR, A. M., Journal of Biotechnology, 2009年, Vol.143, pp.119-123  
TRAFF-BJERRE, K. L., Yeast, 2004年, Vol.21, pp.141-150

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 7/06-7/18

C12N 1/15-1/19

C12N 15/09

CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)