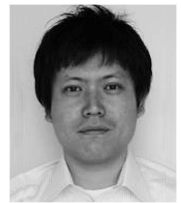


糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* による植物バイオマス糖化技術の研究

産業技術総合研究所 機能化学研究部門 藤井達也

はじめに

近年、地球温暖化など環境問題の解決に向けて、バイオテクノロジーや生物資源を活用した持続可能な循環型の経済社会（バイオエコノミー社会）の構築が期待されている。植物バイオマス（以下、バイオマス）は、カーボンニュートラルという特性を持つことから、数十年前からエネルギーや化学品の原料としての利用が検討されてきた。バイオマスは多糖であるリグノセルロースを主成分としているため、糖化処理によってグルコースなどの単糖にまで分解することで、微生物による発酵プロセスの原料として利用することができる。バイオマスを糖化する手法のひとつに、糖化酵素による分解（酵素糖化法）が挙げられる。酵素糖化法は、硫酸による加水分解などの化学プロセスに比べ、環境負荷が小さい、過分解が起こらないので収率が高い、低温で処理することが可能といった利点がある。一方、処理コストの低減が大きな課題であり、より効率よく糖化するための酵素の開発が求められてきた。

糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* は、1982年に通商産業省工業技術院（現産業技術総合研究所）によって単離された糖化酵素生産菌である¹⁾。本菌は、紫外線や化学変異剤を用いた変異処理によって、糖化酵素の生産性が向上した変異株が開発され、家畜飼料の前処理用酵素の生産に用いられるなど、産業利用に至った微生物である。一方で、本菌の遺伝子組換え技術が未成熟であったため、より高度な変異に必要な分子レベルでの解析（糖化酵素の生産メカニズムや反応機構など）を実施することが課題となっていた。

本研究では、本菌の遺伝子組換え基盤技術を構築し、糖化酵素の遺伝子発現メカニズムや高次構造の解析を行うことで、本菌の産業利用の拡大に成功した。以下にその概要を紹介する。

1. 遺伝子組換え基盤技術の開発

筆者らは、代表的な糖化酵素生産菌として知られる *Trichoderma reesei* と比べて、本菌の糖化性能が高いことを見出した（図1）²⁾。このことから、本菌が糖化酵素の供給源として有望であることが示された。しかし、上述の通り、本菌を遺伝子レベルで改変するための技術開発が遅れており、遺伝子組換え基盤技術の開発が喫緊の課題となっていた。

そこで筆者らは、全ゲノム情報を取得し、形質転換系の構築、*ligD* 遺伝子の破壊による相同組換え効率の向上、生育マーカー遺伝子を繰り返し利用するためのマーカーリサイクル技術の構築といった一連の遺伝子組換え基盤技術を整備した³⁻⁵⁾。これにより、本菌の効率的な遺伝子組換えを可能とした。なお、ゲノム情報を解析した結果、これまで *Acremonium* 属と考えられていた本菌が *Talaromyces* 属であることが明らかとなった⁶⁾。

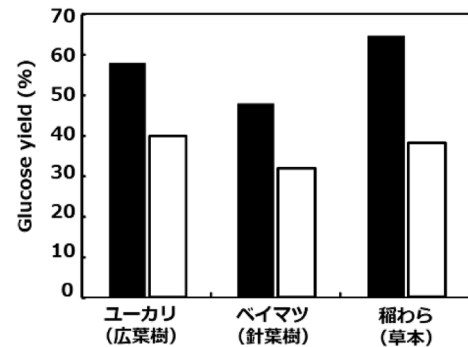


図1. *T. cellulolyticus* と *T. reesei* のバイオマス糖化性能の比較
黒： *T. cellulolyticus*, 白： *T. reesei*
同タンパク量の酵素を添加し、24時間反応後のグルコース性成立を示す。

2. 糖化酵素遺伝子の発現制御メカニズムの解析

糸状菌の糖化酵素遺伝子の発現制御については、*Trichoderma* 属や *Aspergillus* 属などで解析が進んでおり、数多くの転写因子が寄与していることが知られている。また、転写因子を改変することにより、糖化酵素の生産性が向上したという報告もある。しかし、本菌においては転写因子に関する知見が皆無であった。そこで筆者らは、本菌の糖化酵素遺伝子の発現に関わる転写因子の同定、およびその改変による糖化酵素生産性の向上を試みた。まず初めに、全ゲノム情報を活用し、既知の転写因子に相同性を示す遺伝子、および糖化酵素の生産条件下で高発現していた転写因子の遺伝子を20個取得した。次に取得した遺伝子の破壊株を作製し、各遺伝子の機能を解析した。その結果、解析した転写因子は、他の糸状菌と同様の機能を有する XlnR・CreA・Hap complex・ClrB (グループ1)、本菌では糖化酵素遺伝子の発現を誘導するが他の糸状菌では抑制または関与しない Ace1・Ctf1B (グループ2)、本菌では発現に関わらないが他の糸状菌では誘導する ClbR・BglR・LaeA・McmA (グループ3)、の3つに分類できることを示した（図2）⁷⁻¹²⁾。本結果は、本菌が他の糸状菌とは異なるメカニズムで発現を制御していることを示唆している。特にグループ2に関しては新規な機能をもつ転写因子であることを示しており、現在、更なる解析を進めている。また、XlnR および ClrB の過剰発現、もしくは CreA を破壊することにより、糖化酵素の生産性の向上にも成功した^{7, 11, 12)}。これらの成果は企業共同研究に展開しており、酵素生産性の向上に成功したほか⁹⁾（特許6518107号）、バイオ燃料生産への商業利用が検討されている。

3. 糖化酵素の解析と機能改変

通常、バイオマス糖化性能を持つ微生物は、セルロースやヘミセルロースなどの強固な結合を分解するために複数の酵素を

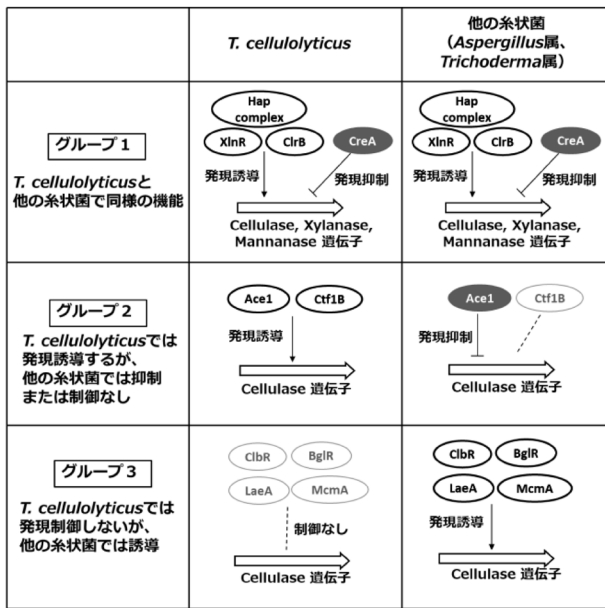


図2. *T. cellulolyticus* の糖化酵素遺伝子の発現を制御する転写因子群

菌体外に分泌している。本菌の場合も、培養上清に多種多様な糖化酵素が含まれている。そして、各糖化酵素の特性が類似しているため、特定の酵素を精製して反応機構を解析することが困難である。そこで筆者らは、本菌がデンプンを炭素源とする培地中で糖化酵素を生産しないという性質を利用し、デンプン存在下で特定の酵素のみを生産するためのシステムを開発した。すなわち、デンプン誘導型のプロモーターを用いたタンパク質生産システムを構築することで¹³⁾、糖化酵素群の生産を抑制しつつ目的とする酵素を特異的に生産させることを可能とした。これにより、各糖化酵素を容易に精製できるようになり、酵素学的な機能解析や、高次構造情報を活用した精密反応機構の解析を進め、キシラン側鎖の認識システムに特徴をもつ新たなキシラナーゼの発見などに至った¹⁴⁾。また、一連の成果は、各酵素の耐熱性・安定性を向上させる研究へと展開した。産業利用の観点からは、家畜用飼料の前処理に重要な酵素群の同定およびこれらの酵素群を高生産する株の開発に貢献した(特開2020-184937)。このように、筆者らは、糖化酵素生産菌の特性を巧みに利用したタンパク質生産システムを開発し、さらに酵素の構造・機能解析や改良を進めることで、多くの研究成果を得ることができた。

おわりに

本研究は、転写因子群の体系的なグループ分けや新規な酵素反応機構の発見といった基礎研究の成果だけでなく、企業連携による技術の産業利用へと波及した。引き続き、本菌の研究開発に取り組み、将来的なバイオマス利用技術の産業化に尽力し

たい。ただし、本研究で取り組んだ酵素糖化技術は、バイオマス利用技術を産業化するための要素技術の1つに過ぎない。今後、原料の安定供給から、各工程のプロセスエンジニアリング、コスト試算やLCA、実用化後の製品のマーケティングなど、農芸化学の枠を越えて様々な事象を考慮していく必要があるだろう。各分野の専門家と常に議論しながら研究開発に取り組み、バイオエコノミー社会の実現に貢献できれば幸いである。

(引用文献)

- 1) Yamanobe T., Mitsuishi Y., and Takasaki Y. *Agric. Biol. Chem.* 51, 65-74 (1987).
- 2) Fujii T, Fang X, Inoue H, Murakami K, Sawayama S. *Biotechnol. Biofuels.* 2:24., (2009)
- 3) Fujii T, Iwata K, Murakami K, Yano S, Sawayama S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 245-249, (2012)
- 4) Fujii T, Koike K, Yano S, Sawayama S, Inoue H. *Genome Announcements.* 3(1), (2015)
- 5) Fujii T, Inoue H, Ishikawa K, Hoshino T. *Appl Biochem Biotechnol.* 183(4), 1516-1525, (2017)
- 6) Fujii T, Hoshino T, Inoue H, Yano S. *FEMS Microbiol. Letters.* 351, 32-42, (2014)
- 7) Fujii T, Inoue H, Ishikawa K. *AMB Express.* 3, 73, (2013)
- 8) Fujii T, Inoue H, Ishikawa K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1564-1567, (2014)
- 9) Fujii T, Inoue H, Ishikawa K. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 3218-3229, (2015)
- 10) Fujii T, Matsushika A. *Appl Biochem Biotechnol.* 190(4), 1360-1370, (2020)
- 11) Okuda N#, Fujii T#, Inoue H, Ishikawa K, Hoshino T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80(10), 2065-2068, (2016) #Contributed equally
- 12) Fujii T, Inoue H, Matsushika A. *Appl Biochem Biotechnol.* 193(10), 3163-3172, (2020)
- 13) Inoue H, Fujii T, Yoshimi M, Taylor LE, Decker SR, Kishishita S, Nakabayashi M, Ishikawa K. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 823-830, (2013)
- 14) Nakamichi Y#, Fujii T#, Fouquet T, Matsushika A, Inoue H. *Appl Environ Microbiol.* 85(22): e01442-19, (2019) #Contributed equally

謝辞 本研究は、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 機能化学研究部門(旧 バイオマスリファイナリー研究センター、バイオマス研究センター)で行われたものです。本研究へ携わる機会を与えていただくとともに、本奨励賞にご推薦いただきました澤山茂樹先生(京都大学教授)に心より感謝申し上げます。また、学部生・大学院生時代に微生物研究の基礎をご指導いただきました高谷直樹先生(筑波大学教授)に深く御礼申し上げます。ここでは全ての方を書ききれませんが、本研究成果は、井上宏之様、森田友岳様を始めとする産業技術総合研究所の多くの方々、および共同研究先の皆様のご協力により得られました。ご協力いただいた全ての方に深く感謝の意を表します。