

平成 26 年度
環境研究総合推進費補助金 研究事業
総合研究報告書

微生物を利用した地域バイオマスキノコ廃菌床からの
化学工業原料生産システムの開発
(3K123008)

平成 27 年 3 月

新潟薬科大学 高久 洋暁

補助事業名 環境研究総合推進費補助金研究事業（平成 24 年度～平成 26 年度）

所管 環境省

国庫補助金 41,156,000 円（複数年度の総計）

研究課題名 微生物を利用した地域バイオマスキノコ廃菌床からの化学工業原料生産システムの開発

研究期間 平成 24 年 6 月 8 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者名 高久洋暁（新潟薬科大学）

研究分担者 小笠原渉（長岡技術科学大学）
山崎晴丈（新潟薬科大学）
志田洋介（長岡技術科学大学）

目次

総合研究報告書概要	1
本文	
1. 研究背景と目的	13
1.1 研究背景	13
1.2 研究目的	18
2. 研究方法	19
2.1 環境低負荷型糖生産システムの開発（オールバイオプロセス）	19
2.1.1 マイタケ菌のゲノム解析と遺伝子組み換え系の確立	19
2.1.2 マイタケ菌の前処理能力強化	22
2.1.3 生物的前処理に最適な糖化酵素開発	23
2.2 廃菌床糖化溶液からの DOI 発酵高生産組換え大腸菌の開発	34
2.2.1 進化工学的変化による高活性型 DOI 合成酵素の取得・利用	34
2.2.2 DOI 合成酵素の高安定化	40
2.2.3 DOI 合成酵素基質グルコース-6-P(G6P)の蓄積速度の強化	40
2.2.4 DOI 低感受性・耐酸性 DOI 生産宿主の取得・利用	41
2.2.5 培養工学的 DOI 発酵生産	44
3. 結果と考察	46
3.1 環境低負荷型糖生産システムの開発（オールバイオプロセス）	46
3.1.1 マイタケ菌のゲノム解析と遺伝子組み換え系の確立	46
3.1.2 マイタケ菌の前処理能力強化	55
3.1.3 生物的前処理に最適な糖化酵素開発	56
3.2 廃菌床糖化溶液からの DOI 発酵高生産組換え大腸菌の開発	78
3.2.1 進化工学的変化による高活性型 DOI 合成酵素の取得・利用	78
3.2.2 DOI 合成酵素の高安定化	83
3.2.3 DOI 合成酵素基質グルコース-6-P(G6P)の蓄積速度の強化	84
3.2.4 DOI 低感受性・耐酸性 DOI 生産宿主の取得・利用	85
3.2.5 培養工学的 DOI 発酵生産	92
4. 結論	110
5. 参考文献	111
6. 研究発表	113
論文発表	
学会等発表	
※「国民との科学・技術対話」の実施	
7. 知的財産権の取得状況	115
8. 研究概要図	116
9. 英文概要	117

環境研究総合推進費補助金 研究事業 総合研究報告書概要

研究課題名：微生物を利用した地域バイオマスキノコ廃菌床からの化学工業原料生産システムの
開発

研究番号：3K123008

国庫補助金清算所要額：41,156,000 円（複数年度の総計）

研究期間：平成 24 年 6 月 8 日～平成 27 年 3 月 31 日

研究代表者名：高久洋暁（新潟薬科大学）

研究分担者：小笠原渉（長岡技術科学大学）、山崎晴丈（新潟薬科大学）、
志田洋介（長岡技術科学大学）

研究目的

石油を原料とし、エネルギーを大量消費するプロセス（石油リファイナリー）は、経済的豊かさと高利便性の生活を支えてきたが、その反面、化石資源枯渇、地球温暖化、ダイオキシン類による環境汚染など地球的規模の問題を引き起こしている。そのため、カーボンニュートラルで再生可能なバイオマスを用いた環境低負荷のエネルギー・環境調和型循環産業システムによる物質生産、すなわち微生物を利用したバイオプロセスによる生産システム（バイオリファイナリー）への早期転換が必要である。本研究は、今まで化石資源から生産されていた芳香族化合物を、食料と競合しない非可食バイオマスのキノコ廃菌床から微生物を利用し、環境に優しい全く新しい技術で合成し、持続可能な循環型社会を築いていくことを目的としている。

研究方法

1. 環境低負荷型糖生産システムの開発（オールバイオプロセス）

1.1 マイタケ菌ドラフトゲノムデータベースの構築

G. frondosa M1 株を材料として、次世代シーケンサーを使用してゲノム配列決定を行った。また、得られた塩基配列データを研究共同機関である（株）雪国まいたけのデータベースと共にアセンブルし、推定遺伝子領域の予測は、次世代シーケンサープラットフォーム用に開発された複数の解析プログラムを用いて行った。

1.2 マイタケ用カスタムマイクロアレイチップの開発

マイタケ用カスタムマイクロアレイの開発及び構築は、本研究プロジェクトで構築されたマイタケ菌のゲノムデータベースを利用することで行った。

1.3 マイタケのマイクロアレイ解析

各保管期間におけるマイタケ廃菌床から RNA を抽出し、上記マイクロアレイチップを用いて網羅的発現解析を行った。

1.4 リグニン分解能力強化菌株スクリーニング系の開発および突然変異導入系の確立

リグニン分解能力強化菌株スクリーニング系の確立には、2, 2'-アゾビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) ニアンモニウム (ABTS) などの基質の分解に由来する呈色を指標に酵素活性検出能の評価を行った。また、変異導入細胞分離法は、物理的菌糸切断法およびプロトプラスト化法を検討し、突然変異導入は、異なる強度で紫外線を照射した後の菌体生存率を評価することで行った。

1.5 廃菌床酵素糖化促進因子の解析

3ヶ月間生物的前処理を行った廃菌床粉末に酵素（セルラーゼ）を加え、50°C、pH 5.0 の条件下で糖化反応を行い、糖化率を比較評価した。糖化促進因子のスクリーニングには、市販のリグニン分解酵素およびヘミセルロース分解酵素を添加酵素として使用した。また、廃菌床粉末にリグニン分解酵素処理もしくはアルカリ処理を施してから糖化反応を行った。廃菌床に含まれているリグニン分解酵素を明らかにするために、廃菌床の抽出液を用いて、各種リグニン分解酵素活性測定用基質を用いて酵素活性の測定を行った。

1.6 トリコデルマ・リーセイにおけるリグニン分解酵素の高発現

上記項目 1.3 で明らかになった廃菌床保管中に発現していると明らかになったリグニン分解酵素およびトリコデルマ・リーセイ内在性のリグニン分解酵素を、強力なプロモーターである *cbh1* プロモーターの支配下で発現させる組み換え株を構築した。これら組み換え株のリグニン分解能力の解析および遺伝子発現解析を行った。

2. 廃菌床糖化溶液からの DOI 発酵高生産組換え大腸菌の開発（新潟薬大）

2.1 変異型 DOI 合成酵素遺伝子ライブラリーの構築

野生型 DOI 合成酵素 (*btrC*) 遺伝子をテンプレートとして、 Mn^{2+} 存在下で PCR を行い、野生型 DOI 合成酵素 (*btrC*) 遺伝子にランダムに変異を導入した。ランダム変異導入条件は、0.25 mM Mn^{2+} または 0.5 mM Mn^{2+} 存在下で PCR を行った。得られた PCR 反応物をフェノクロロホルム処理、エタノール沈殿後、制限酵素処理し、プラスミド ($\Delta P_I/pLEX$) に挿入後、大腸菌に導入し、変異型 DOI 合成酵素遺伝子ライブラリーを構築した。

2.2 高活性型 DOI 合成酵素のスクリーニング

変異型 DOI 合成酵素遺伝子ライブラリーをグルコース-6-リン酸高蓄積株 GI724 Δpgi 株に導入し、得られたクローンをディープウェルプレート 96well 丸底で 30°C、24 時間振とうし、前培養を行った。続いて、前培養液を培地の入ったディープウェルプレート 96well 丸底に植菌し、30°C で 15 時間振とうし、本培養を行った。培養後、培養上清を回収し、DOI の生産性を検証した (1 次スクリーニング)。1 次スクリーニングの結果得られた候補株を試験管で前培養を行い、その後、三角フラスコを利用して、本培

養を行った。本培養では、初期濁度が OD600 = 0.1 になるように植菌後、30°C で培養し、培養開始後 0, 12, 24, 36 時間の菌体濁度、グルコース濃度、DOI 濃度の測定を行った (2 次スクリーニング)。2 次スクリーニングで得られた候補株のプラスミドをグルコース-6-リン酸超高蓄積株 GI724 Δpzp 株に導入し、形質転換体を得、試験管で前培養を行い、その後、三角フラスコを利用して、本培養を行った。30°C、120 rpm で回転振盪培養し、OD600 が 0.5 付近になった時点で 50% Glucose を 2 ml (最終濃度 2%) 加え、この時間を 0 h として 12 h ごとにサンプリングした。

2.3 培養液中の DOI、グルコース、キシロース、グリセロール、マンニトール、フルクトース濃度の測定

DOI の定量は、培養液上清 10 μ l と滅菌水 90 μ l、HPLC 用のメタノールを混合したあと、10 mg / ml NBHA 溶液を 10 μ l 加えた。その後、60°C で 1 時間恒温し、遠心エバポレーターで乾固させ、DOI の誘導化を行った。誘導化 DOI を HPLC 分析システム (利用カラム : Shin-pack XR ODS (Shimazu)、検出器 : UV-VIS 送水器) を利用して検出、定量を行った。また、グルコース、キシロース、グリセロール、マンニトール、フルクトースの定量は、D-Glucose (GOPOD) Assay Kit (Megazyme)、D-Xylose Assay Kit (Megazyme)、Glycerol Assay Kit (Megazyme)、D-Mannitol/L-Arabitol Assay Kit (Megazyme)、D-Fructose/D-Glucose Assay Kit (Megazyme) を、それぞれ利用した。

2.4 組換え蛋白質の生産・精製

組換え蛋白質生産用プラスミドを大腸菌 DH5 α に形質転換した。形質転換体を LB/Amp 培地 3 ml に植菌し、37°C で 18 時間振とう培養した (前培養)。前培養液を LB/Amp 培地 50 ml に OD₆₀₀ = 0.01 となるように植菌し、37°C で振とう培養し、菌体濁度が OD₆₀₀ = 0.5~0.6 となったら、最終濃度 0.25 mM となるように IPTG を添加し、さらに 37°C で 3 時間から 4 時間振とう培養した。培養後、菌体を回収し、Lysis Buffer で懸濁後、超音波破砕機で菌体を破砕した。破砕後、上清を回収し、Ni-NTA アガロースを利用して、アフィニティー精製を行うことにより、組換え蛋白質を精製した。

2.5 *in vitro* DOI 合成酵素活性測定

反応液中 (50 mM Tris-HCl (pH 7.7)、0.2 mM CoCl₂、10 mM グルコース-6-リン酸、5 mM β -NAD⁺) で 30°C、30 分反応を行い、DOI 濃度を測定した。

2.6 DOI 耐性 (低感受性)・感受性遺伝子獲得へ向けたスクリーニング

Keio collection 3,823 株について、培養温度 : 30°C、培地 : 6% DOI 含有 LB 液体培地、DOI 耐性・感受性評価培養時間: 12 時間の条件下でスクリーニングを実施した (1 次スクリーニング)。1 次スクリーニングで得られた DOI 耐性候補株 (4 株) 及び DOI 感受性候補株 (6 株) について 2 次スクリーニングを実施した。2 次スクリーニングでは、各候補株を DOI 非含有及び 6% DOI 含有 LB 液体培地で培養し、経時的な増殖の変化を測定した。

2.7 ジャーファーマンター培養における DOI 生産培養法

生育炭素源を加えた RM 培地 40 ml で、DOI 生産組換え大腸菌 ($\Delta pzp/btrC$) を 30°C、130 rpm で OD₆₀₀

=3~3.5 になるまで前培養した。3 L ジャーファーマンターに 2×YT または HNS 培地を入れ、オートクレーブ滅菌後、Glc、各生育炭素源を添加し、抗生物質として Amp（最終濃度 100 µg/ml）、消泡剤としてアデカノール（最終濃度 130 nl/ml）を添加した。前培養液を全量投入し、2 N HCl または 14% NH₃ で pH 調整後、各温度、各攪拌速度で培養した。経時的にサンプリングを行い、菌体濁度、DOI 生産量及び糖濃度の経時的变化を測定した。

結果と考察

1. 環境低負荷型糖生産システムの開発（オールバイオプロセス）

1.1 マイタケ菌のゲノム解析と遺伝子組換え系の確立

1.1.1 マイタケ菌ドラフトゲノムデータベースの構築

マイタケ菌の菌株改良および高度利用に向けた研究基盤整備の一環として、マイタケ全ゲノム配列の解読を行った。マイタケ菌の全ゲノム配列解読は、研究協力機関の（株）雪国まいたけにおいて先行解析が実施され、同社保有のドラフトゲノムデータベースに対して本研究により得られたゲノム解読データを統合する形でデータ処理を行った結果、すでに得られていたものと同様の結果となり、最高精度のドラフトゲノムデータであり、本データベースは一般的な高精度担子菌ゲノムデータベースと同等の情報量を有する高精度データベースであると判断された。

1.1.2 マイタケ用カスタムマイクロアレイチップの開発

3.1.1.1 で構築したマイタケ菌ゲノムデータベースを使用してマイタケ用カスタムマイクロアレイ解析プラットフォームの開発を行った。マイクロアレイチップの開発にあたり、推定遺伝子領域情報の抽出、オリゴヌクレオチドプローブの設計を行い、合計 43,803 個の 60-mer オリゴヌクレオチドプローブを搭載した、プローブ搭載率は 100%のマイクロアレイチップを構築した。

1.1.3 廃菌床保管中におけるマイタケ菌の網羅的遺伝子発現解析

DNA マイクロアレイ手法を用いて廃菌保管 0、30、60、90 日における廃菌床中のマイタケ菌の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、保管処理中に特異的に高発現する遺伝子群を特定した。その多くがリグニン分解酵素、糖質加水分解酵素をコードする遺伝子であり、特に 2 つの manganese peroxidase (MnP) コード遺伝子が保管処理によって高発現していた。糖質加水分解酵素ではヘミセルロースの側鎖やペクチンを分解する酵素が高発現していることが明らかとなった。廃菌床内に分泌される酵素の解析で保管処理中の CMCase、Xylanase 活性は検出することができなかったことから廃菌床内のセルロース分解はほとんど行われずリグニン、ヘミセルロースを積極的分解していることでバイオマス前処理効果がもたらされていることが示唆された。

1.2 マイタケ菌の前処理能力強化

1.2.1 マイタケ リグニン分解能力強化株スクリーニング条件の設定

マイタケ菌の生物的前処理能力の強化を行うために、リグニン分解強化菌株の取得を目的とした変異株スクリーニング条件の決定を行い、高浸透圧培養条件下でのプレート培養および 2, 2'-アゾビス (3-エ

チルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) ニアンモニウム (ABTS) を基質としたプレートアッセイ系を組み合わせることで、リグニン分解能力強化株取得に最適なハイスループットスクリーニング系を構築した。

1.2.2 紫外線照射を用いたマイタケ菌への突然変異導入系の確立

変異導入実験においては、いかにして単一の変異導入細胞核に由来する変異体を分離・取得するかが高効率変異導入のポイントとなるため、変異導入細胞の分離法の検討を行った結果、プロトプラスト化が効果的であった。次に分離した細胞を対象に紫外線照射条件の最適化を行い、マイタケ変異導入実験系を確立した。

1.3 生物的前処理済み廃菌床に最適な糖化酵素開発

1.3.1 セルラーゼによる廃菌床糖化系へのリグニン分解酵素添加の影響

生物的前処理を施した廃菌床の糖化には、リグニン分解酵素やヘミセルラーゼの添加が効果的であった。また、アルカリ処理にて廃菌床のリグニンを除去したところ、本開発の目標値である 80% の糖化率を達成することができた。これは、生物学的前処理ではリグニンの除去が不完全であることを示しており、強力な前処理用酵素の開発が必要であることを示している。前処理関連酵素をバイオマス糖化へ応用するためマイタケ菌リグニン分解酵素をセルラーゼ高生産菌トリコデルマ・リーセイで発現させ、バイオマス前処理および糖化能を持つ株の構築を試みた。その結果リグニン分解酵素遺伝子が組み込まれた *T. reesei* 株の取得に成功した。qRT-PCR によって異種遺伝子が転写されていることを確認したが、リグニン分解活性値が低かったことから転写以降の段階で問題が生じていることが示唆された。培養条件検討の結果、Laccase 発現 *T. reesei* において Cu 添加が培養上清中の Laccase 活性値を増加させることを見出した。

2. 廃菌床糖化溶液からの DOI 発酵高生産組換え大腸菌の開発 (新潟薬大)

2.1 進化工学的改変による高活性型 DOI 合成酵素の取得・利用

構築した変異型 DOI 合成酵素遺伝子ライブラリーを導入した形質転換体 1107 株について、1 次スクリーニング、2 次スクリーニングを実施し、DOI 生産性向上に関与する部位を 6 カ所 (E23, L143, L214, S230, W293, M346) 同定した。特に DOI 生産性への効果が大きかった W293R について調査した結果、総合的に酵素の能力を示す K_{cat}/K_m 値が、変異型 DOI 合成酵素 W293R の方が野生型 DOI 合成酵素よりも 1.56 倍程度大きな値を示した。次に、DOI 生産性の上昇が大きかった 2 つの変異型 DOI 合成酵素 L214M、W293R、さらには、2 つの単独の変異を組み合わせた L214M/W293R をコードする遺伝子を、グルコース-6-リン酸高蓄積株 Δpzp 株に導入して 3 次スクリーニングを行った。 $\Delta pzp/L214M$ 株、 $\Delta pzp/W293R$ 株、 $\Delta pzp/L214M/W293R$ 株の DOI 生産性は、 $\Delta pzp/WT$ 株よりもそれぞれ約 1.1 倍、約 1.2 倍、約 1.3 倍と高くなった。次に *in vitro* DOI 合成酵素活性測定法を利用して、高 DOI 生産性を示す変異型 DOI 合成酵素の比較検討を行った。野生型 (WT) 及び変異型 DOI 合成酵素 L214M、W293R、L214M/W293R の酵素は、His タグが付加した組換え蛋白質として生産・精製した。*in vitro* DOI 合成酵素活性測定の結果、WT と比較して、L214M は約 1.3 倍、W293R と L214M/W293R は約 1.5 倍の DOI 合成酵素活性を示した。これらの酵素が有する DOI 合成酵素活性の上昇が、上記した DOI 生産性の上昇に繋がっていることが考えられる。本項目において、高活性型 DOI 合成酵素 L214M、W293R、L214M/W293R の獲得に成功した。

2.2 DOI 合成酵素の高安定化

DOI 合成酵素は、ホモ二量体又は、DOI 合成酵素結合蛋白質 BtrC2 とヘテロ二量体を形成することが知られている。二量体を形成することによる DOI 合成酵素活性の安定化を考え、*in vitro* DOI 合成酵素 assay 系で評価を行った結果、ヘテロ二量体は、高濃度 DOI 存在下における活性の低下をある程度抑えるが、DOI 合成酵素単量体よりも DOI 合成活性が大きく低下することが分かった。すなわち、ヘテロ二量体を利用する DOI 合成システムは、短時間で DOI 発酵生産するためには、不適合であると判断し、組換え大腸菌体内では、DOI 合成酵素のみ多量発現させることとした。

2.3 DOI 合成酵素基質グルコース-6-P (G6P) の蓄積速度の強化

グルコースの取り込みに関与する ptsG 蛋白質の抑制因子である Mlc 蛋白質をコードする *mlc* 遺伝子を破壊した GI724 Δ pzp Δ mlc 株を作製し、その DOI 合成酵素の基質である G6P の蓄積速度向上、さらには DOI 生産性について検討を行った。その結果、*mlc* 遺伝子の欠失は、DOI の原料となるグルコース濃度が培地中で高い状態にあっても、ある程度適応することができ、初発のグルコース濃度を高くしたい場合には、GI724 Δ pzp Δ mlc 株の利用は有効であることが明らかとなった。

2.4 DOI 耐性（低感受性）・耐酸性 DOI 生産宿主の取得・利用

組換え大腸菌による DOI 発酵生産の実用化を考慮すると、5%以上、さらには 10%の DOI 含有培養液の生産への必要性が考えられる。しかしながら、本研究で利用している DOI 生産宿主の大腸菌 GI724 Δ PZP は、2% DOI を含む培地において、その生育が半分程度阻害され、また、4% DOI を含む培地においては生育が完全に阻害された。培養液中に高濃度の DOI を生産・蓄積させるためには、DOI 耐性株、少なくとも DOI 低感受性株の開発が必要であった。大腸菌の全遺伝子破壊株コレクションを利用し、DOI 耐性・感受性関連遺伝子の探索を行った。大腸菌遺伝子破壊株 (3,823 株) の 6%DOI 含有培地における DOI 感受性試験 (1 次スクリーニング) を実施した。破壊株コレクションの野生株 BW25113 の DOI 非含有培地の増殖を指標 (100%) とし、①6% DOI 含有培地の増殖が 80%以上の株、及び DOI 非含有と 6%DOI 含有培地の増殖差が 10%以下の株を DOI 耐性候補株として 3 株選出し、②6% DOI 含有培地の増殖が 20%以下の株、及び DOI 非含有と 6%DOI 含有培地の増殖差が 90%以上の株を DOI 感受性候補株として 6 株選出した (BW25113 の 6% DOI 含有培地の増殖は 50%)。各条件で選出した株の 2 次スクリーニングを実施した結果、DOI 耐性候補株として Δ argO 株、DOI 感受性候補株として Δ rffC 株、 Δ gor 株を見出した。また、各遺伝子の機能確認のため、argO 遺伝子欠失株を作製し、評価培養を行ったところ、DOI 耐性を示したことから、argO 遺伝子は、DOI 耐性（低感受性）に関連する遺伝子であると同定した。また、rffC 遺伝子及び gor 遺伝子においても得られた破壊株の遺伝子上を PCR で、該当遺伝子が欠失していることを確認したことから、rffC 遺伝子及び gor 遺伝子は、DOI 感受性に関与する遺伝子であると同定した。

2.5 培養工学的 DOI 発酵生産

DOI を生産する大腸菌の生育可能範囲における詳細な DOI 安定性について調べた。温度 4, 20, 35, 50°C, pH 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 の条件下で DOI の安定性を評価した結果、大腸菌の生育温度 (20, 35°C) では、培養液中の DOI 安定性を考慮すると、pH 5.0 条件付近の DOI 発酵生産が適していると考えられた。次

に、上記結果を考慮し、培養温度 (27, 30, 33, 37°C) 及び pH (pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) 条件を維持しながら、フラスコレベルで DOI 生産性を検討した結果、温度 27, 30, 33°C, pH 5.5, 6.0 条件時の DOI 生産性が至適であった (36 時間で培地中の 3% グルコースを全て DOI に変換)。フラスコ培養の結果を考慮し、ジャーファーメンターで温度、pH だけでなく攪拌速度、通気量なども検討した結果、33°C, pH 6.0, 450 rpm, 5 L/min, 生育炭素源マンニトール, 初期グルコース濃度 3% 条件が至適 DOI 生産培養条件であった (効率はフラスコ培養時と同様)。次にジャーファーメンターで初期グルコース濃度を 5% まで増加させたときの至適 DOI 生産培養条件を検討した結果、30°C, pH 6.0, 1000 rpm, 5 L/min, HNS 培地, 生育炭素源マンニトール, 初期グルコース濃度 5% の条件において、41.5 g/L/36 h を達成し、これまでに我々が報告していた 29.5 g/L/60 h の DOI 発酵生産効率 (DOI 生産量、発酵生産時間) を大幅に改善することができた。さらに、流加培養法により DOI 発酵生産を検討した結果、116.0 g/L/60 h の DOI 発酵生産効率を達成することができた。

環境政策への貢献

1. 環境低負荷型糖生産システム

本技術の廃菌床ハイスピード生物的前処理は、これまでの物理的、化学的前処理に対して、設備投資、エネルギーコストから有利であり、小規模な地産地消型のバイオマス利活用プロセスとして非常に有効である。また、リグニン・セルロース・ヘミセルロース同時分解プロセスは、世界屈指のセルラーゼ産生微生物トリコデルマ・リーセイにヘミセルロース、リグニン分解酵素遺伝子を組み込み、産生された酵素により、リグニン・セルロース・ヘミセルロース同時分解を行う (図 1)。また、酵素により分解されたリグニンを回収すると、エネルギー変換効率が高いリグニンをバイオマスボイラーの燃料としての利用、リグニンを原料とする化学品原料開発の研究へとつながる可能性がある。

原料となるバイオマスには、環境条件による年次変動あるいは季節変動、世界情勢による安定的な確保の問題、さらに食糧自給率の低い日本では食料との競合による問題を解決しなければならない。このような背景を考慮し、本技術の開発原料はキノコ廃菌床をバイオマスとして利用する。廃菌床は、多くのセルロース、ヘミセルロース (約 60%) を含み、年間を通じて、新潟県のある会社では、約 200t/日以上コンスタントに排出され、さらに運搬収集の必要性がなく、集積されている優秀な非可食

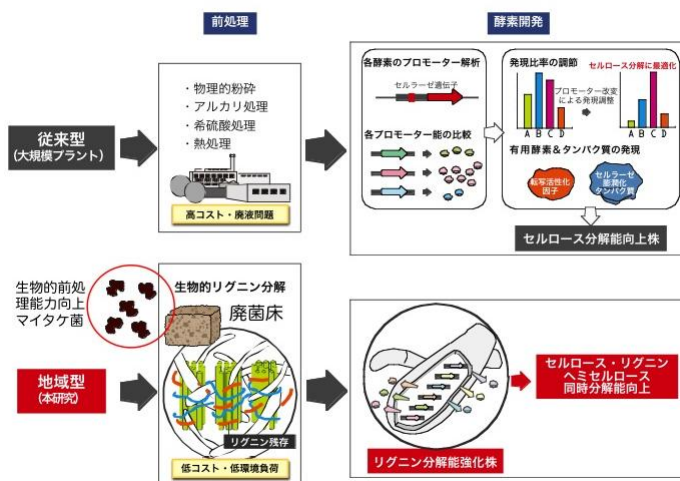


図 1 環境低負荷型糖生産システムの開発

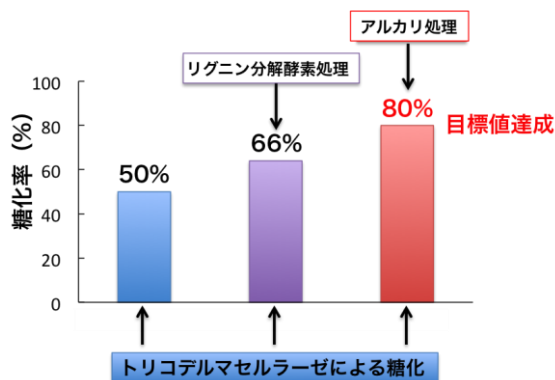


図 2 リグニン除去が廃菌床糖化に与える効果

バイオマスであることから、現在の日本において事業化に結びつけることのできる最有力のバイオマス資源であると考えられる。このキノコ廃菌床を従来の物理的、化学的前処理法と比較して設備投資、排水処理、エネルギーコスト的に有利な生物学的前処理システムを行い、酵素糖化を阻害する難分解性リグニン除去を効率的に行う(図1)。生物学的前処理された廃菌床をリグニン分解酵素で処理し、酵素糖化を行うと従来よりも効率的に投下を行うことができた。さらにアルカリ処理を施した場合で本研究開発の目標値である80%の糖化を達成することができた(図2)。このことから、廃菌床からの脱リグニンが重要であることが示され、①キノコ(マイタケ菌)の廃菌床における生態解析、②生物学的前処理能力を高めたキノコ(マイタケ菌)と③リグニン分解能力を持たせた糸状菌(トリコデルマ)の糖化酵素を組み合わせたオールバイオプロセス開発を目指す本研究の意義は大きいといえる(図3)。

①について、マイタケ菌のゲノム塩基配列を解読し、少なくとも16000の遺伝子が存在することを明らかにした。その情報を元にDNAマイクロアレイチップを開発して生物学的前処理が行われている間の廃菌床中のマイタケの全遺伝子発現状況を解析した。それとともに、廃菌床に含まれるリグニン分解酵素の活性を調査し、前処理に有効なりグニン分解酵素を同定することができた(図4,5)。

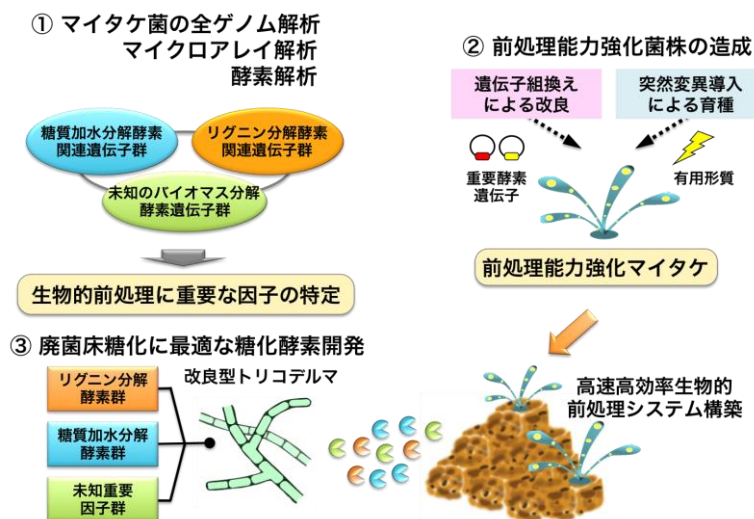


図3 本研究の開発内容



図4 廃菌床の経時的変化

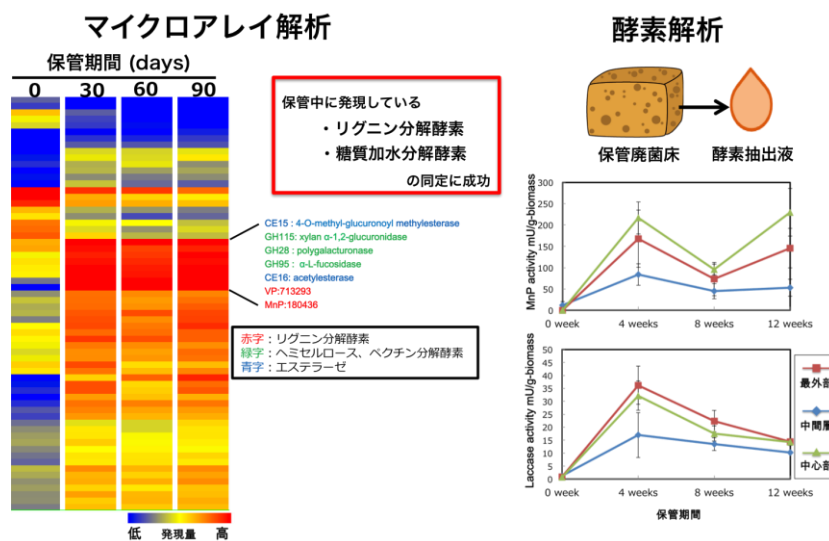


図5 生物学的前処理中の廃菌床における酵素の発現

②では、マイタケ菌の生物学的前処理能力を向上させるために、紫外線照射による変異育種を行った。

前処理能力はリグニン分解能力を反映させていると思われたため、リグニン分解能力を指標としたスクリーニング系を確立した。この手法は、リグニン分解能力を有するキノコ類の改良にも応用できると考えられる (図6)。

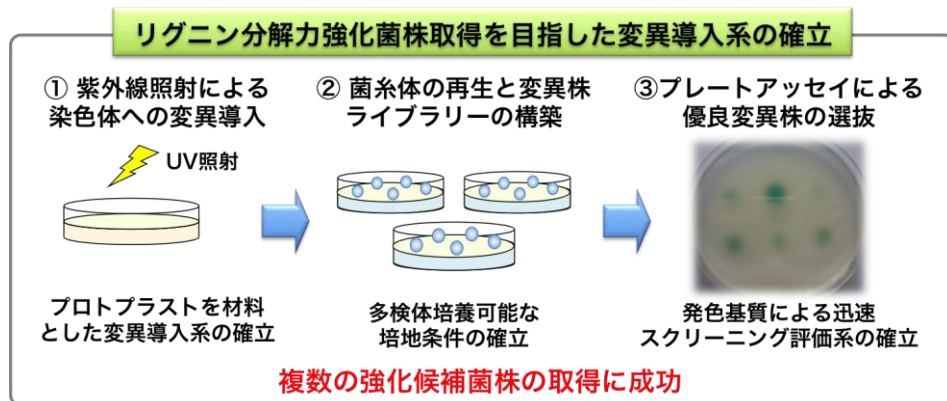


図6 リグニン分解能力強化を目指した変異導入-スクリーニング系の開発

③では、①で明らかになったマイタケ菌が廃菌床中で生産しているリグニン分解酵素の遺伝子を糖化酵素生産菌であるトリコデルマ・リーセイに組み込み、糖化酵素とともにリグ

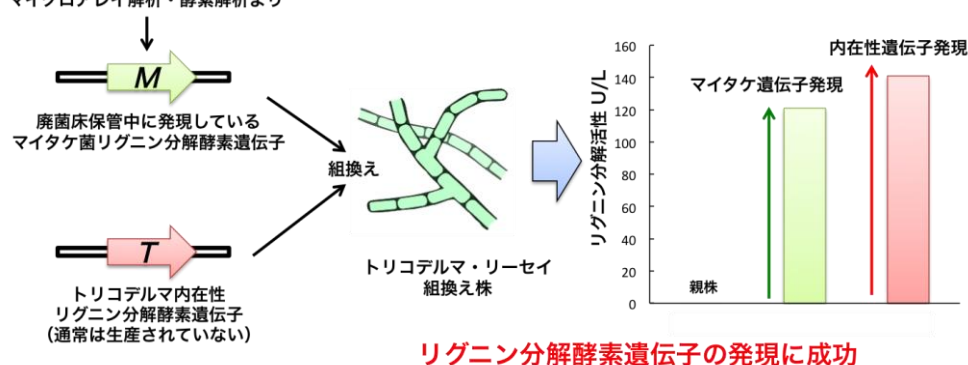


図7 リグニン分解能を有する組換えトリコデルマ・リーセイ

ニン分解酵素を生産させる新たな糖化酵素生産菌の構築を行った。また、トリコデルマ・リーセイ自体もリグニン分解酵素を有していたため、同種における高生産化を目指した。その結果、親株のトリコデルマ・リーセイからは検出できないリグニン分解活性を示す菌株の造成に成功した (図7)。本菌はキノコ廃菌床だけでなく、リグニンを多分に含む木材バイオマスを効率的に糖化できる可能性を秘めており、その有用性が期待できる。

2. 芳香族化合物前駆体 2-デオキシ-シロ-イノソース(DOI)の発酵生産

2-デオキシ-シロ-イノソース(DOI)は、医薬・農薬、酸化抑制剤や香料等の各種有用化学品の合成のための非常に重要な中間原料である。DOIは、芳香族化合物である2価フェノール(酸化防止剤、タイヤゴム接着剤、美白剤などの化学工業原料)に簡単に変換することができる物質である。本技術は、化学合成が困難であった有用物質 DOI を、糖を原料とし、代謝工学的に改変した組換え大腸菌を利用して、低環境負荷

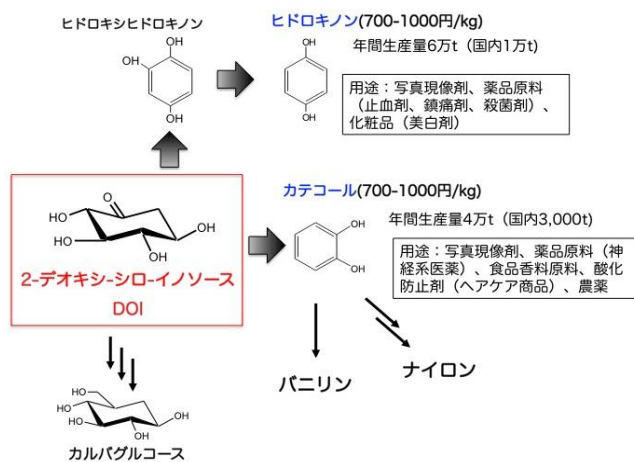


図8 DOIの有機合成変換

型のバイオプロセスにより生産する技術である。

炭素六員環骨格を持つキラルな化合物である 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI) は、医薬・農薬、酸化抑制剤や香料等の各種有用化学品の合成のための非常に重要な中間原料である。DOI は図 8 に示すように簡単に 2 価フェノール (酸化防止剤、タイヤゴム接着剤、美白剤などの化学工業原料) に変換することができる。さらには、擬似糖カルバグルコースにも変換ができ、用途の広い中間原料であるが、化学合成が難しいため、これまで大量に得られなかった。1999 年に共同研究先の東京工業大学の柿沼らが見いだしたグルコースを炭素六員環化合物である DOI に閉環する反応を触媒する酵素

(DOI 合成酵素、BtrC) の発見により、大量生産が可能となった。さらに我々は、①高価な誘導物質を必要とせず、培養初期から後期にかけて継続的にプロモーターが働く遺伝子高発現システム開発、②DOI の原材料であるグルコースを大腸菌の生育のためではなく、優先的に DOI 合成に利用できるように、糖代謝経路を遺伝子工学的に改変して構築した新規代謝システムの開発 (グルコースは大腸菌内に取り込まれるとグルコース-6-リン酸 (G6P) に変換された後、3 つの経路により利用されるが、これらの経路に関する酵素遺伝子を破壊し、生育させるためにマンニトール、グリセロール、キシロースなどの単糖を利用させ、G6P を DOI 合成酵素のみが利用できるシステム (図 9)) を行い、ジャーファメンターを利用して、至適条件下で DOI 発酵生産を実施したとき、回分培養で 41.5 g/L/36 h を達成した。さらに、流加培養法においては、116.0 g/L/60 h を達成した。本研究で得られたキノコ廃菌床糖化液 (グルコース 1.90% に対して、キシロース 0.39%) は、グルコース含有量が多いが、生育炭素源として考慮していたキシロース含量は低かった。すなわち、DOI 発酵生産時に他の生育炭素源が必要になる。本研究で利用した DOI 生産組換え大腸菌は、グリセロールの資化性が非常に良く、高 DOI 生産性が見出されていることから、バイオディーゼル製造工程で生じるグリセロール廃液の活用が考えられる。すなわち、キノコ廃菌床の活用とバイオディーゼル製造工程で生じるグリセロール廃液の活用の二重利活用により、大きく環境負荷低減へ貢献できる技術である。

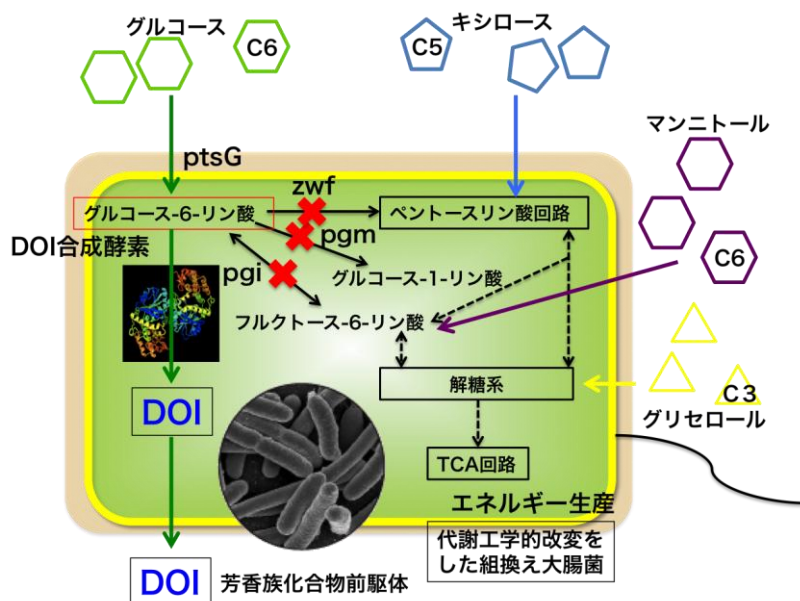


図 9 代謝工学的改変をした組換え大腸菌による DOI の発酵生産

研究成果の実現可能性

キノコ工場から排出される廃菌床は、量の安定的確保、輸送コストが不要、マイタケ菌による生物的前処理など、国内において、バイオマス利活用研究のポテンシャルとして、極めて優位な条件を備えている。また、バイオディーゼル燃料の普及に伴い、その製造時に副生するグリセロール廃液の活用も問題視されている。本技術の環境低負荷型糖生産システムは、これまでの物理的、化学的前処理に対して、

設備投資、エネルギーコストから有利であり、小規模な地産地消型のバイオマス利活用プロセスとして非常に有効であるため、生物学的処理の強化に必要なリグニン分解酵素含むセルラーゼ酵素カクテルをトリコデルマ・リーセイに産生させ、廃菌床の糖化効率を上昇させることにより実現性は高まると考えている。また、本研究で得られた廃菌床糖化液は、DOI 発酵生産の原料として利用できたが、DOI 発酵生産組換え大腸菌の生育或いは糖の取り込みを阻害した。すなわち、糖化液中に含まれる阻害物質の除去が今後の一つの課題となる。また、得られた糖の濃度も約 2%と低濃度であったため、廃菌床糖化液の膜による濃縮と阻害物質除去の検討により、廃菌床からの高効率 DOI 発酵生産が可能になると考えている。生育炭素源として利用可能なグリセロール廃液中にも生育阻害物質が混在する可能性があるため、膜濃縮・分離システムの導入が実現性を大きく加速化させると考えている。

結論

環境低負荷型糖生産システムの開発において、構築したマイタケ菌ゲノムデータベースおよびそれを活用して開発したマイクロアレイチップを用いることで、マイタケ菌の全遺伝子の網羅的遺伝子発現解析を行うことができるようになり、マイタケ菌の今後の研究開発を行う上での基盤を構築することができた。DNA マイクロアレイ解析および廃菌床の酵素活性の解析よりマイタケ菌は廃菌床保管処理中、ヘミセルロース側鎖、ペクチンを炭素源として使用し、リグニン分解酵素を分泌して積極的にリグニン分解することで廃菌床の前処理効果をもたらしていると結論付けた。

突然変異育種によるマイタケ菌のバイオマス前処理能力強化株を取得するため、マイタケ菌のリグニン分解能力を指標としたスクリーニング法を開発し、プレートアッセイによる変異株の選抜法を確立した。この方法を駆使して、紫外線照射による変異処理を行ったマイタケ菌株の中から、リグニン分解能力が向上したと考えられる菌株の取得に成功した。

廃菌床の効率的な糖化にはさらなるリグニン除去が必要であることが明らかとなり、アルカリ処理によってリグニンを除去した廃菌床を基質とすることで本開発の目的である 80%糖化を達成することができた。生物的前処理に必要であると考えられるリグニン分解酵素をトリコデルマ・リーセイに組み込んだところ、数種の酵素の発現に成功した。しかし、その発現量はわずかのものであった。今後、さらなる改良を行うことで、廃菌床の効果的な生物的前処理が可能な酵素標品を生産するトリコデルマ・リーセイ株の開発が期待でき、セルラーゼ酵素カクテルへ添加することで廃菌床糖化効率の改善が期待される。

芳香族化合物前駆体 2-デオキシ-シロ-イノソース(DOI)の発酵生産において、①DOI 生産性を向上させる高活性型 DOI 合成酵素 L214M、W293R、L214M/W293R の取得、②培養液中に高濃度の DOI の蓄積を可能とする $\Delta argO$ 株の取得、③回分培養法では、41.5 g/L/36 h の DOI 発酵生産効率を示す培養条件の確立、また、流加培養法では、116.0 g/L/60 h の DOI 発酵生産効率を示す培養条件を確立した（試薬レベル）。しかしながら、廃菌床糖化液を原料とした DOI の発酵生産では、生育、糖の取り込み阻害が生じ、DOI 生産効率が減少した。これらは、廃菌床糖化液中に含まれる夾雑物の影響によると考えられ、上記したリグニン分解能が向上したセルラーゼ酵素カクテルによる廃菌床糖化効率の向上と共に、膜を利用した糖濃縮及び生育・糖取り込み阻害の起因と考えられる夾雑物の除去のステップを導入することにより、廃菌床からの DOI の発酵生産の効率化に繋がると考えられる。また、本研究で開発した DOI 生産組換え大腸菌は、グリセロールの資化性が高く、DOI の発酵生産効率が良かったことから、生育のために

利用する炭素源として、廃菌床に少ししか含まれないキシロースの他に、バイオディーゼル製造工程において副生するグリセロール廃液を利活用することにより、より環境負荷低減に貢献する技術へと繋がることを期待できる。

1. 研究背景と目的

1.1 研究背景

20 世紀に入り石炭や石油等の化石資源を利用した産業は飛躍的に発展し、私達の生活に大きな恩恵をもたらしてきた。プラスチックや洗剤など私達の日常生活において身近な製品の多くは、化石資源を原料、燃料として製造されている。特に石油化学工業により生産されている製品は、原油（ナフサ）を分留し、得られたエチレンやフェノール類などを原料とし、エネルギーを大量消費するプロセス（石油リファイナリー）で生産されている。しかし、従来の化石資源から化学製品を製造する化学工業プロセスでは、有限である化石資源の枯渇とそれに伴う石油価格の高騰、多量の二酸化炭素の排出による地球温暖化、ダイオキシン・環境ホルモンによる環境汚染など、地球的規模の問題が生じている。2013 年 9 月に公表された気候変動に関する政府間パネル（IPCC）の報告によると、世界の温室効果ガスの排出量は、工業化以降人間活動により増加しており、1 年あたりの二酸化炭素の排出量は 2011 年に 1990 年の水準から 54% 増加したとされている (1)。また、2013 年度（平成 25 年度）の我が国の温室効果ガスの総排出量は、13 億 9,500 万 t(CO₂ 換算) であり、前年度の総排出量 (13 億 7,300 万 t) と比べると、1.6% (2,200 万 t) 増加したとされる。これは、東日本大震災以降、原子力発電から賄っていたエネルギーを化石燃料に代替したことによる影響と推察される。このように数字的にも非常に緊急性の高い課題であると考えられる。国際的な取り組みとして、2014 年 12 月に開催された COP20 においては、①主に COP21 で議論し、採択するための 2015 年合意文書案を策定すること、②2020 年以降の各国の排出削減目標を提示する際に、どのような情報を提供するかを定めること、③2020 年までの各国の排出削減目標の引き上げについて検討すること、④先進国から途上国への資金支援の見通しを明らかにすることの 4 つの論点について議論された (2)。COP において、先導的な立場にいる日本は、温室効果ガスの排出削減目標を提示すると同時に本格的に始動しなければいけない国際的な位置にいる。すなわち、日

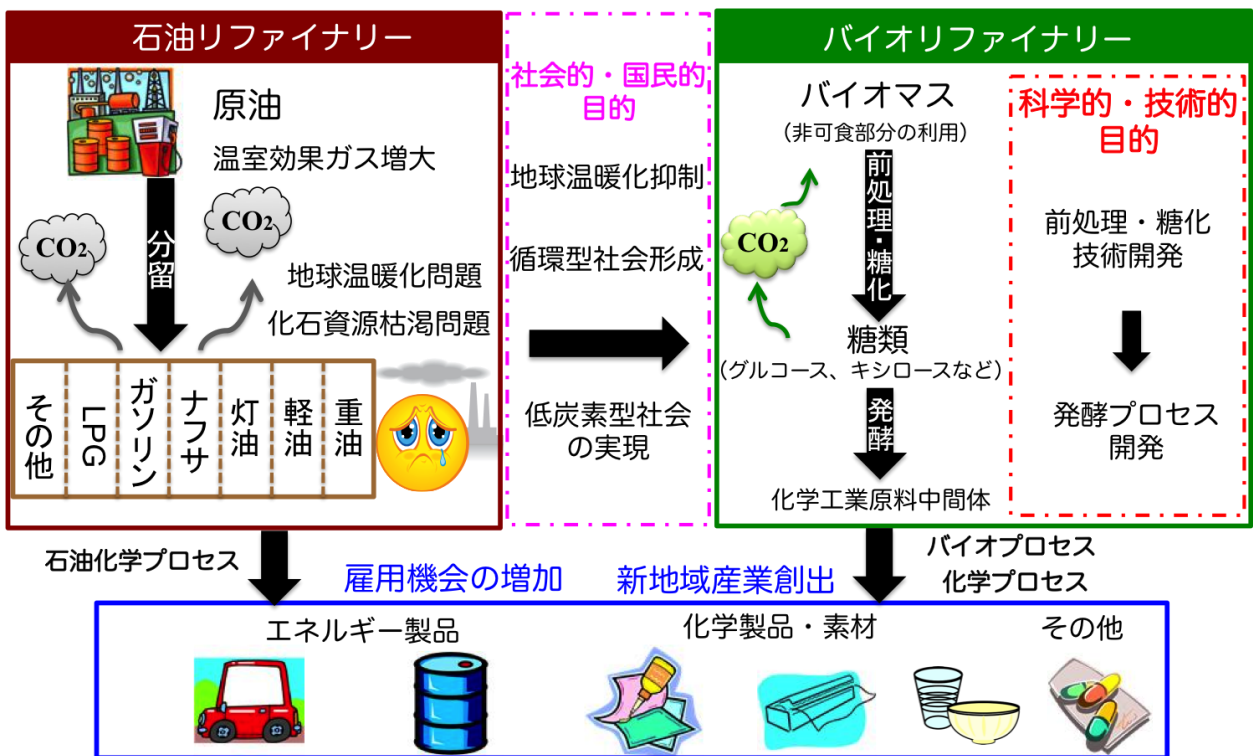


図 1.1 石油リファイナリーからバイオリファイナリーへのパラダイムシフト

本にとって低炭素技術の革新の必要性は急務である。そのため、カーボンニュートラルで再生可能なバイオマスを用いた環境低負荷のエネルギー・環境調和型循環産業システムによる物質生産、すなわち微生物を利用したバイオプロセスによる生産システム（バイオリファインリー）への早期転換を行い、持続可能な低炭素型社会構築が必要である（図 1.1）。

このような背景のもと、カーボンニュートラルで、食料と競合のないセルロース系バイオマスを原料とし、石油から合成される化成品、又は代換品への生産システムの開発研究が勢力的に行われており、本研究の研究分担者である小笠原と志田は、これまでに勢力的にセルロース系バイオマスの糖化研究を行っている。セルロース系バイオマスは、種類および前処理手法によって基質組成が大きく異なる。そのため、効率的分解には、その組成に最適な酵素種類、成分比率で酵素生産可能な微生物の開発が必要である（図 1.2）。

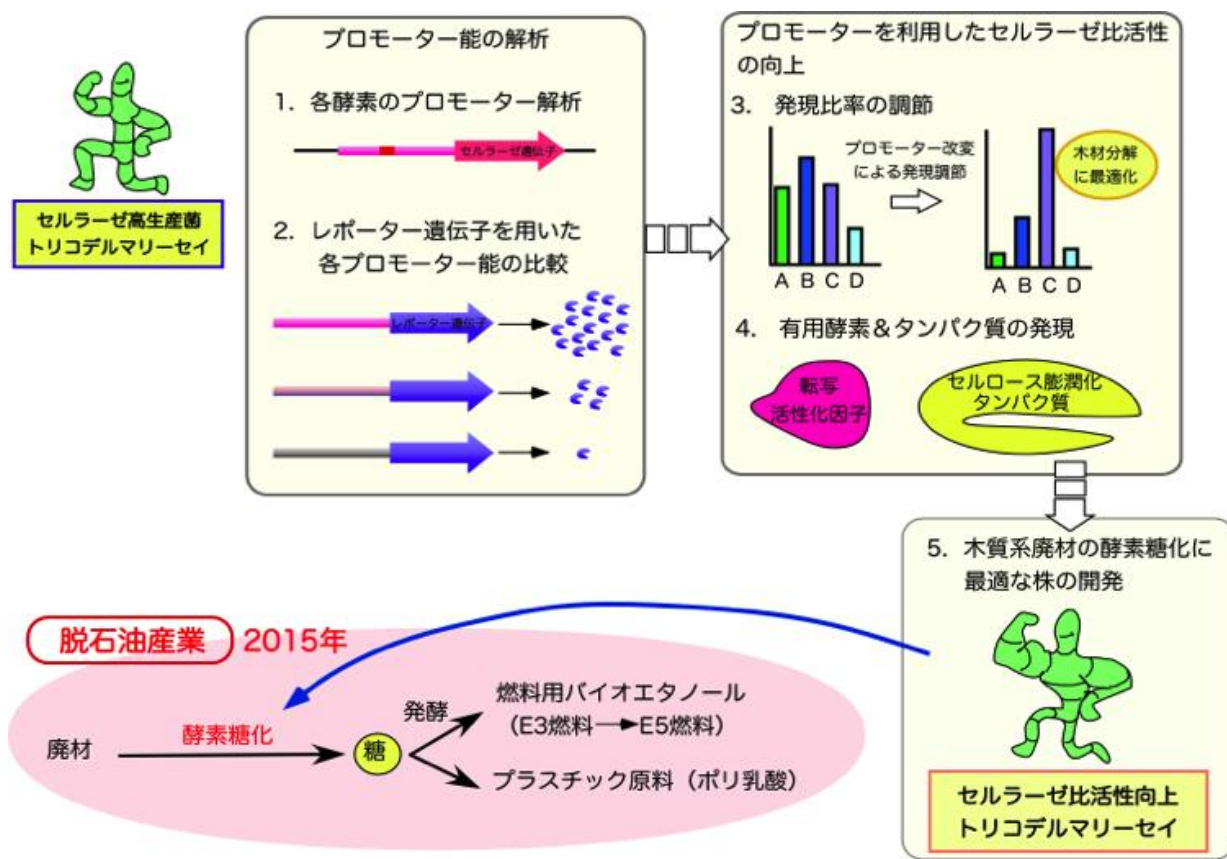


図 1.2 セルロース系バイオマスに関する糖化研究

糸状菌トリコデルマ・リーセイは、既存の微生物の中で最もセルロース分解能力の高い微生物として知られており、セルロースを炭素源としてセルラーゼを大量に分泌生産する。その産業上の有用性から世界各国の研究機関でさまざまな変異株が開発され、2006年には野生株のゲノム配列が公開された。小笠原は、セルロース高分解微生物として知られるトリコデルマ・リーセイのプロモーター解析を行い、各セルラーゼを制御するシスおよびトランス因子を明らかにした。最適プロモーターを利用あるいは新規プロモーターを人工的に作り出すことで、最適酵素種類、成分比率で酵素生産可能な菌株の開発に成功し、結晶性セルロース分解能を 2.5 倍向上させることに成功した（図 1.3）。

しかし、この開発は物理的、化学的に処理する従来型の前処理バイオマスを想定して開発した研究である。世界的にみて化学、物理的前処理の設備投資、排水処理、エネルギーコストが問題となっている。特に、バイオマス資源が乏しい日本においては、小規模な地産地消型のプラント建設が必要であるため、前処理技術の簡素化は必須である。小笠原らは、(株) 雪国まいたけと共同で廃菌床の糖化研究を進めてきた。その結果、マイタケ収穫後の廃菌床を3ヶ月保管することで、マイタケ菌の菌糸が生育し、廃菌床のリグニン成分を分解することで、その後のセルラーゼによる酵素糖化効率を向上させる「生物的前処理」を見いだしている。しかし、大量の廃菌床を3ヶ月間保管することはスペース、管理の点から、より短期間で処理可能なプロセス開発が実用化には必要である。

また、本研究の研究代表者の高久と研究分担者の山崎は、これまで勢力的に微生物を利用した糖からの化成品原料の発酵生産の研究を行ってきた。炭素六員環骨格を持つキラルな化合物である 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI) は、医薬・農薬、酸化抑制剤や香料等の各種有用化学品の合成のための非常に重要な中間原料である。DOIは図 1.4 に示すように簡単にカテコールやヒドロキノンなどの2価フェノールやヒドロキシヒドロキノン (1,2,4-トリヒドロキシベンゼン) に変換することができる(3,4)。カテコールは神経系医薬品などの原料、食品香料原料、ヘアケア商品などの酸化防止剤などに使用され、年間約4万t(日本国内約3千t)、ヒドロキノン止血剤、鎮痛剤等の原料、美白剤等の化粧品に使用され、年間約6万t(日本国内約1万t)生産され、世界的に需要の高い物質である。さらには、擬似糖カルバグルコースにも変換ができ、用途の広い中間原料であるが、化学合成が難しいため、これまで大量に得られなかった。東京工業大学の柿沼らは、多数の臨床医学的に重要な化学療法剤である2-デオキシストレプタミン含有アミノグリコシド系抗生物質の生合成過程に関与する酵素の1つに、初発の糖質を炭素環化する酵素を発見した(図 1.5)。ブチロシン生産菌 *Bacillus circulans* SANK72073 より精製されたこの酵素は、グルコース-6-リン酸を原料として多段階の反応を触媒し、最終的に DOI を生成した。その後、*B. circulans* よりその DOI 合成酵素遺伝子(グルコース-6-リン酸を DOI に変換する反応を触媒する酵素をコードする *btrC*) がクローニングされ、大腸菌内でその遺伝子を発現、精製することで組換え DOI 合成酵素を大量に得ることが可能になった。試験管内で、グルコースを ATP の存在下でヘキソキナーゼと組換え DOI 合成酵素により炭素環化すべくこれらをワンポットで反応したところ、効率よく直接 DOI を合成できたが、非常に高いコストが採算された。高久らは、平成14年度から柿沼らと共同でバイオマス由来のグルコースから工業技術開発の研究を開始した。グルコースを原料とし、DOI の生産条件の検討から始め、DOI 合成酵素活性を持つ組換え大腸菌株を作製し、1g/L の収率で DOI が得られることを確認した。

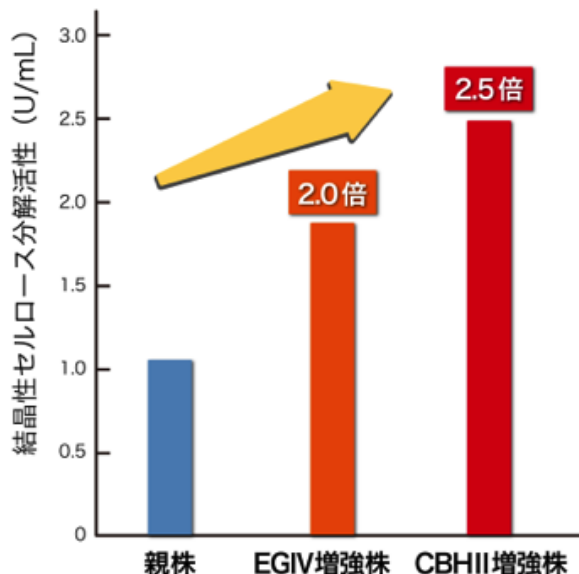


図 1.3 プロモーター利用によるセルロース分解活性向上

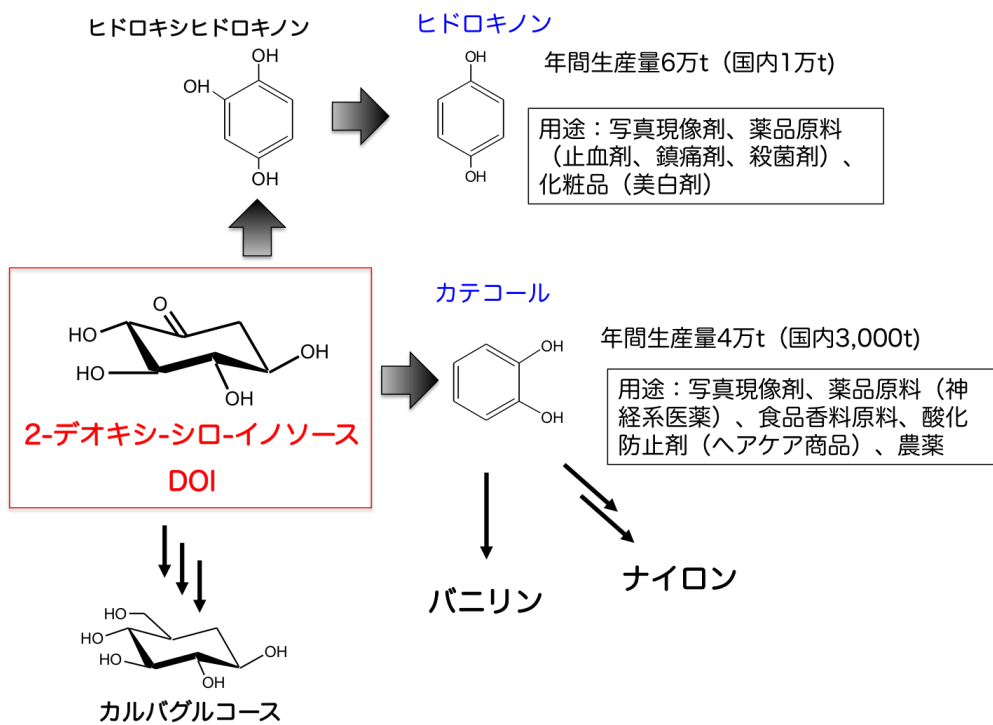


図 1.4 DOI の有機合成変換

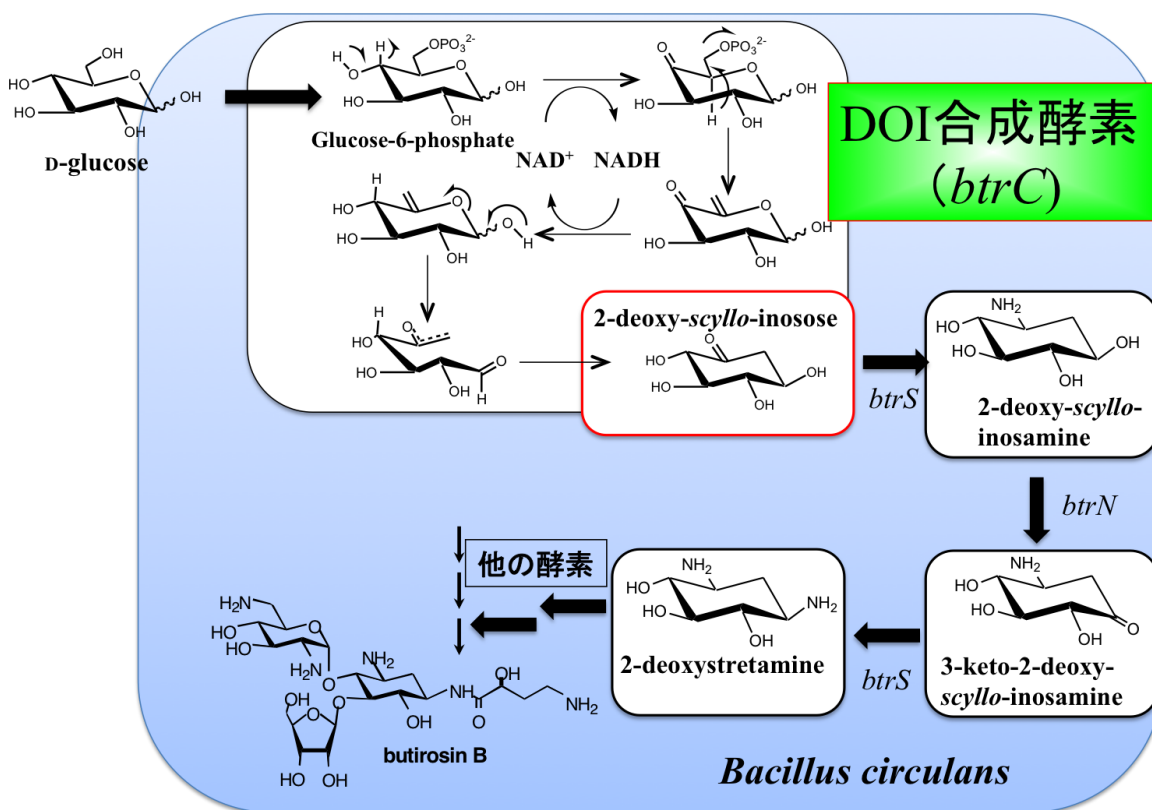


図 1.5 *Bacillus circulans* における Butirosin B 生合成経路

次に、高価な誘導物質を必要とせず、培養初期から後期にかけて継続的にプロモーターが働く遺伝子高発現システムの開発を行った。栄養増殖期に発現する *gapA* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A をコードする遺伝子) プロモーターと定常期発現プロモーターである *gadA* (glutamic acid decarboxylase の δ サブユニットをコードする遺伝子) プロモーターを同時に利用したところ、栄養増殖期から定常期後期まで恒常的に発現可能なシステムの構築に成功した。さらに、*gadA* 転写活性にネガティブに働くと考えられる領域 (転写開始点から 85-166 塩基上流) を欠失させたことにより対数増殖期から定常期まで恒常的に高発現をする改変型 *gadA* プロモーターの開発にも成功し、対数増殖期に高発現する *gapA* プロモーターと組み合わせた制御下で、DOI 合成酵素遺伝子である *btrC* を恒常的に高発現させるベクターを構築した。これにより、人為的な発現誘導を行うこともせずに、常に遺伝子を大腸菌体内で高発現するシステムの構築に成功した(5)。

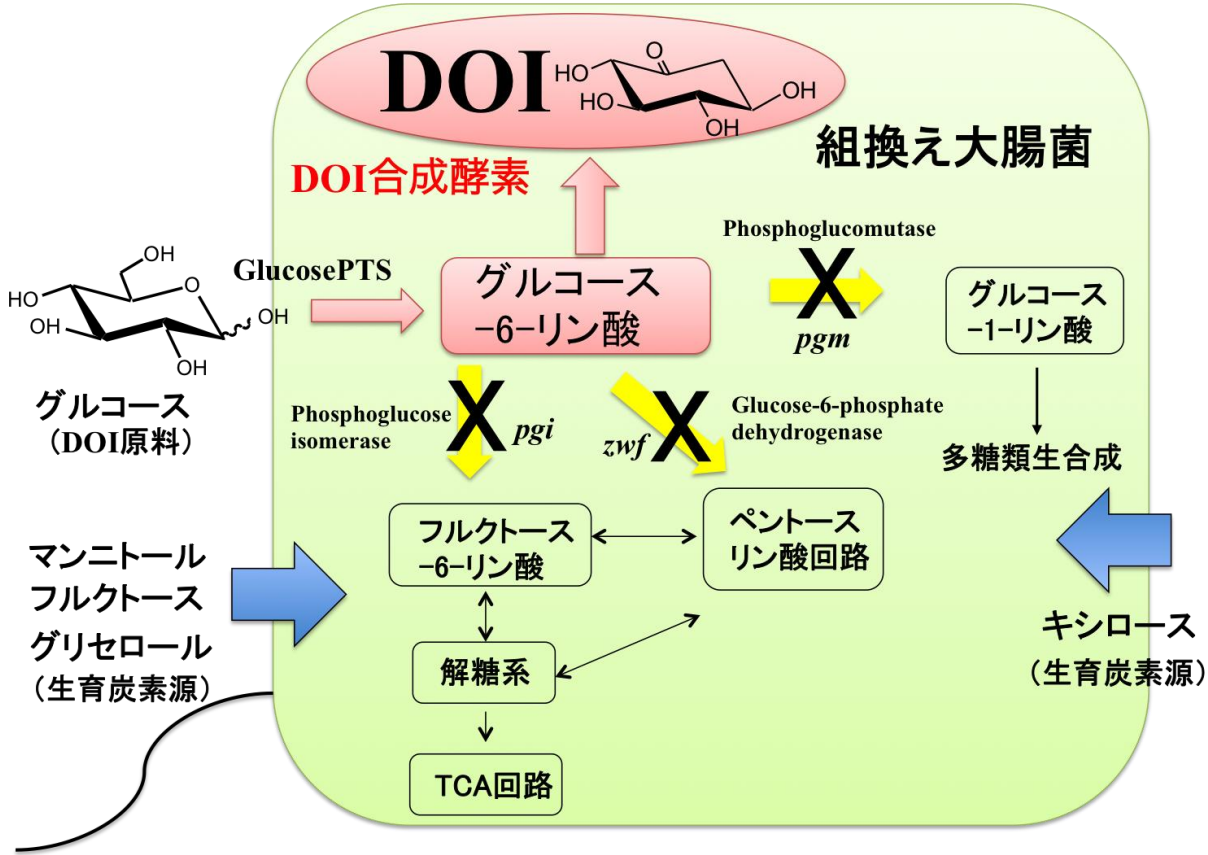


図 1.6 代謝工学的改変をした組換え DOI 高生産大腸菌

また、DOI 合成酵素の基質である G-6-P は、解糖系ホスホグルコースイソメラーゼ (*pgi* 遺伝子)、ペントースリン酸経路に向かうグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (*zwf* 遺伝子)、多糖生合成経路に向かうホスホグルコムターゼ (*pgm* 遺伝子) の基質である。すなわち、大腸菌に DOI 合成酵素遺伝子を導入すると、4つの酵素による G-6-P の競合が起こることが予想された。そこで、大腸菌が元来有する3つの G-6-P 代謝経路を、それぞれの経路に相当する遺伝子を破壊することにより遮断し、G-6-P を DOI 合成酵素に優先的に利用させる代謝経路改変は DOI 高生産に繋がると考えた。これらの経路に関する酵素遺伝子を破壊した $\Delta pgi \Delta zwf \Delta pgm$ 株を作製し、さらに生育させるために、マンニトール、グリセロール、キシロースを利用させ、G6P を DOI 合成酵素のみが利用できるシステムを構築した (図 1.6)。フラスコ

培養（30°C, pH6.0）の結果、ほぼ 100%の効率でグルコースを DOI に変換し、60 時間で 29.5 g/L の発酵生産に成功した(5)。

1.2 研究目的

低炭素技術の原料となるバイオマスは、環境条件による年次変動、季節変動、世界情勢問題を克服できる安定供給性を持ち、さらに食糧自給率の低い日本では食料と非競合でなければならない。このような背景を考慮し、本研究では、新潟県の全国 2 位のキノコ生産量を支える（株）雪国まいたけの廃菌床を地域バイオマスとして利用する。廃菌床は、セルロース、ヘミセルロースを多く含み、年間を通じて 230 t/日（13 万 t/年）一定に排出・集積されているので、今の日本で事業化に直結できる最有力の非可食バイオマスである。この廃菌床を、

①マイタケ菌の生物的前処理能力を最大限強化し、高効率な前処理プロセスを構築する。前処理産物をセルロース高分解微生物トリコデルマ・リーセイの改良・利用で、リグニン、セルロース、ヘミセルロースを同時分解してグルコース、キシロースを生成する。前処理、酵素糖化の全てがバイオプロセスで構築され、従来の物理的、化学的前処理より設備投資、排水処理、エネルギーコスト的に有利な環境低負荷型のオールバイオプロセス糖生産システムを構築する。

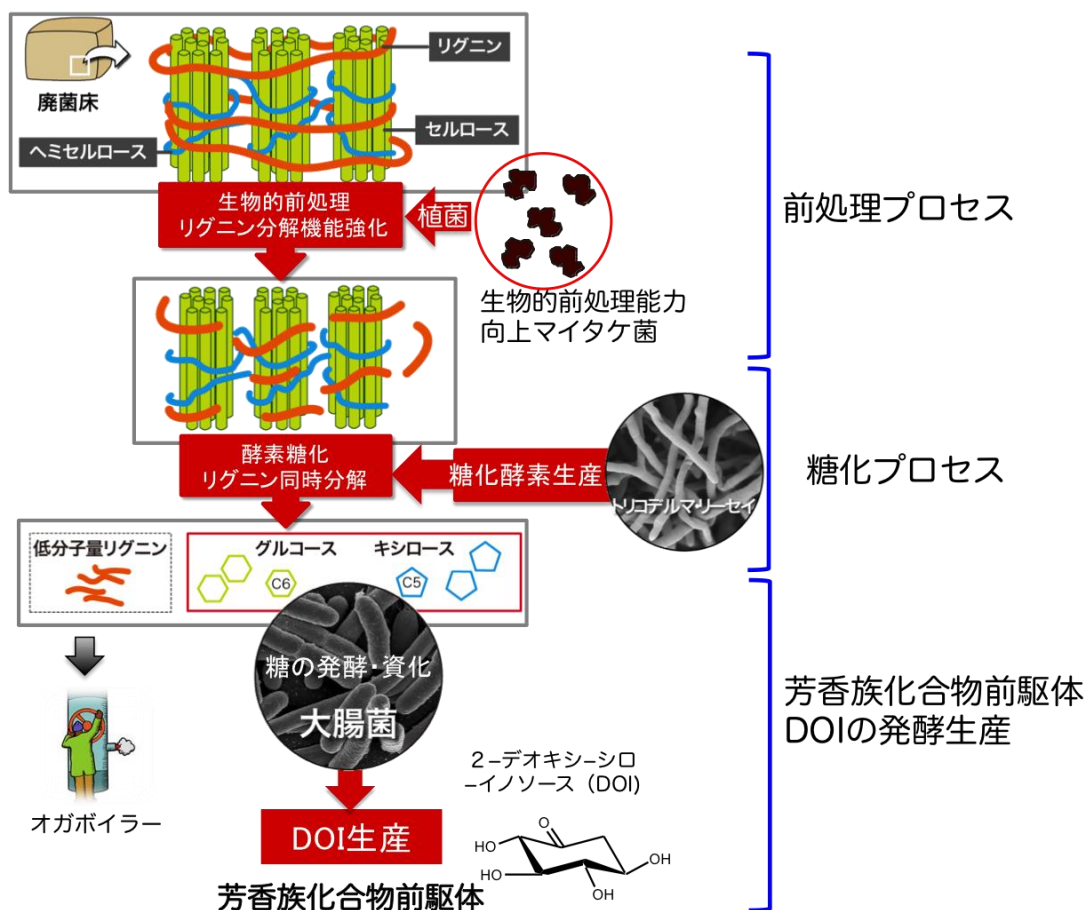


図 1.7 低炭素社会構築へ向けた非可食バイオマスからの芳香族化合物前駆体の生産

②得られたグルコースは、代謝工学的に改変された組換え大腸菌によりほぼ 100% 効率で化学工業原料中間体の 2-デオキシ-シロ-イノソース (DOI) に変換し、キシロースはその組換え大腸菌の生育炭素源として利用する。すなわち、セルロース、ヘミセルロース画分から得られた糖は、無駄なく利用される (図 1.7)。

本研究は、上記目的を達成するために、大きく 2 つの研究項目

- (1) 環境低負荷型糖生産システムの開発 (オールバイオプロセス)
- (2) 廃菌床糖化溶液からの DOI 発酵高生産組換え大腸菌の開発

で構成し、実施した。また、本研究は、非可食バイオマスから今まで石油から生産されていた付加価値の高い化成品原料を生産する技術であり、石油リファイナリーからバイオリファイナリーへのパラダイムシフトによる持続型低炭素社会の構築、地球環境問題に貢献することができる。

2. 研究方法

2.1 環境低負荷型糖生産システムの開発 (オールバイオプロセス)

2.1.1 マイタケ菌のゲノム解析と遺伝子組み換え系の確立

2.1.1.1 使用した菌株と保存方法

本実験ではいずれも株式会社雪国まいたけより提供されたマイタケ菌 *Grifola frondosa* の菌株を使用した。二核菌糸体 (Dikaryotic strain) は市販品種で食用として栽培されるマイタケ M51 号を使用した。一核菌糸体 (Monokaryotic strain) は M51 株から単離された Gf-M1 株を使用した。マイクロアレイ解析等、菌床を用いた実験には子実体形成能を有する二核菌糸体 (M-51 号) を使用した。

菌株は PDA プレート培地上で 25°C、4 週間培養し、4°C で保存した。また、長期間の保存は、コルクボーラー (直径 7 mm) で PDA プレート培地ごと採取した菌糸を 20% グリセロール、0.9% NaCl 中で -80°C にて保存した。

2.1.1.2 *G. frondosa* 用培地組成

G. frondosa 菌床

G. frondosa 菌床は基材として 0.5-2.0 mm に破碎した広葉樹材 (ブナ) を使用し、とうもろこしふすまを基材と 9:1 の割合になるように添加し作成されている。この菌床に *G. frondosa* を植菌し、食用として出荷可能な子実体が形成された状態の菌床を株式会社雪国まいたけより提供された。各菌床は同一時期に作成、植菌されたものを用いた。

G. frondosa 液体培地 (YMG 培地)

下記の表 2.1 の組成で培地を調製したのち、オートクレーブにて 120°C、20 分間殺菌処理して使用した。

表 2.1 *G. frondosa* 液体培地組成

試薬名	最終濃度
Bacto™ Yeast extract (Difco)	0.4%
Malt extract (Difco)	1.0%
Glucose (ナカライテスク)	0.4%

Potato dextrose agar (PDA)

Bacto™ potato dextrose agar (Difco) を終濃度 3.9%になるように純水に溶解し、オートクレーブにて 120°C、20 分間殺菌処理した。その後、クリーンベンチ内で滅菌済みシャーレに注ぎ、完全に固まったことを確認したのち使用した。

2.1.1.3 *G. frondosa* 廃菌床の保管処理

雪国まいたけより提供された菌床から子実体を取り除き、菌床は通気弁付きポリプロピレン製バッグに移し保管処理を開始した。子実体を取り除いた日を保管 0 日とし、湿度制御は行わず 25°C に設定したインキュベーター内で設定期間まで保管を行った。

2.1.1.4 *G. frondosa* 廃菌床からの試料調製

酵素抽出、total RNA 抽出は図 2.1 に示したように廃菌床の 3 か所から試料採取した。最外部を Out: O、中間部を Relatively Centre : RC、中心部を Centre : C としてそれぞれ解析した。

- ① 廃菌床の各場所から 7.5 g の試料を採取し、50 mL のマロン酸 Na 緩衝液 (50 mM, pH 4.5) に懸濁した
- ② 懸濁液を氷水中で一定速度で 15 min 攪拌し、菌床を含む抽出液はミラクロス (Calbiochem) で濾過したのち、ろ液を 12,000 × g, 15min, 4°C で遠心し上清を酵素抽出液として解析に使用した。

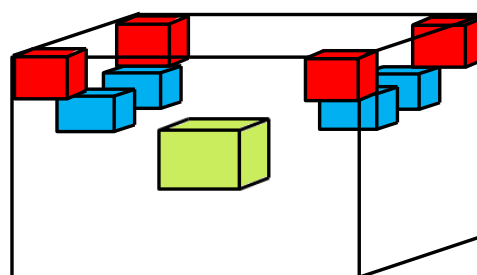


図 2.1 廃菌床からの試料採取場所

2.1.1.5 マイタケ菌からのゲノム DNA 抽出

- ① *G. frondosa* 菌糸を YMG 培地で培養し、約 100 mg をマルチビーズショッカー用の 2 mL チューブに採取し、メタルコーンを入れた。
- ② チューブごと液体窒素で急速凍結した。
- ③ チューブをマルチビーズショッカー (安井機械) に装着し、1700 回転で 10 秒間破碎処理を行った。
- ④ チューブを取り出し、破碎された菌体を 500 μL の抽出バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 1% SDS) でよく懸濁した。
- ⑤ 150 μL の PA 溶液 (3M CH₃COOK, 2M CH₃COOH) を加え、よく混ぜたのち 4°C で 14000 rpm、5 min 遠心分離を行った。
- ⑥ 上清を新たなマイクロチューブに回収し、等量のフェノール/クロロホルム/イソamilアルコール (ナカライテスク) を加え、よく混ぜたのち 4°C で 14000 rpm、5 min 遠心分離を行った。
- ⑦ 上清をあらたなチューブに回収した (中間層がなくなるまで⑥-⑦の操作を繰り返した)。
- ⑧ 等量のイソプロパノール (ナカライテスク) を加え、よく混ぜたのち 4°C で 14000 rpm、5 min 遠心分離を行った。
- ⑨ 上清を捨て、70%エタノール (ナカライテスク) を加え、4°C で 14000 rpm、5 min 遠心分離を行った。
- ⑩ 上清を捨て、沈殿を 500 μL の TE バッファーに溶解し 5 μL の RNase 溶液を加えた。

- ⑪ 37°Cで30分保温したのち、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを500 µL加えてよく混ぜたのち4°Cで14000 rpm、5 min 遠心分離を行った。
- ⑫ 上清を新たなチューブに回収した。
- ⑬ 50 µLの3M酢酸ナトリウム溶液、500 µLのイソプロパノールを加えてよく混ぜたのち4°Cで14000 rpm、5 min 遠心分離を行った。
- ⑭ 上清を捨て、70%エタノール（ナカライテスク）を加え、4°Cで14000 rpm、5 min 遠心分離を行った。
- ⑮ 上清を捨て、沈殿を適量のTEバッファーに溶解した。

2.1.1.6 マイタケ菌のゲノム解析

G. frondosa M1株の染色体DNAを材料として、次世代シーケンサー (Roche 454 GS FLX titanium) を使用してゲノム配列決定を行った。また、得られた塩基配列データを研究共同機関である(株)雪国まいたけのデータベースと共にアセンブルした。推定遺伝子領域の予測は、次世代シーケンサープラットフォーム用に開発された複数の解析プログラムを用いて行った。

2.1.1.7 マイタケ菌からの total RNA 抽出および cDNA 合成

RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い、説明書に従って乳鉢で細かくすり潰した廃菌床サンプルから total RNA の抽出を行った。cDNA の合成は、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用い、付属の説明書に従った。

2.1.1.8 マイタケ菌のカスタムマイクロアレイチップの作成

マイタケ菌 M51 株のゲノム情報を基に、Agilent 社が提供するマイクロアレイデザインソフト eArray を用い、マイタケ全推定遺伝子(約16000)を搭載したカスタムマイクロアレイをデザインした。プローブ長は60-merで1遺伝子あたり2-3プローブが対応するように計43,808プローブを設計しマイクロチップ基板上へ配置した。解析は1アレイに対し1サンプルをハイブリダイゼーションさせる1色法を用いた。2.1.1.7で得られたRNAからのcDNAおよびcRNA合成、マイクロアレイチップへのハイブリダイゼーションはAgilentの説明書に従った。データの解析にはマイクロアレイデータ解析ソフト Gene Spring ver. 12.6 (Agilent Technology) を用いた。

2.1.1.9 定量的 real-time PCR (qRT-PCR)

qRT-PCRには、LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) および Light Cycler 480 システム (Roche) を用い、その説明書に従って行った。また、各遺伝子に特異的なプライマーは、T_m値が60-65°C、増幅産物長さが80 - 150 bpになるように設定し Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) ソフトウェアを用いて設計した。作成したプライマーを表2.2に示した。

表 2.2 qRT-PCR に用いたプライマー

GeneSymbol	Gene ID	Primer	Sequence (5'→3')
<i>vpl2-V</i>	713293	qPCR0713293Fw	CACGACGCTATTGGATTCTCTC
		qPCR0713293Rv	ATGTTGGCGTGGAAGTTGG
<i>mnp3A</i>	180436	qPCR0180436Fw	CTTCTTCGACACCCAGTTCTTC
		qPCR0180436Rv	TCAACTTCGCCTTGTTTCC
<i>vpl2-L</i>	25314840	qPCR25314840Fw	ACCTCCAGGCGAATTTGTTC
		qPCR25314840Rv	TGGCATCGTGGAAAGTAAGG
<i>fio1</i>	431474	qPCR0431474Fw	TTCTGCACACGAACAACACC
		qPCR0431474Rv	GGAAACGTCAGGCAAAACAC
<i>vpl2-Mn</i>	1306909	qPCR1306909Fw	CAAGTGGTTCGACGTTCTGG
		qPCR1306909Rv	AAACAGCATCGGGGAGAAAC
<i>mnp3B</i>	190517	qPCR0190517Fw	TTGACACCATCACCAGCATC
		qPCR0190517Rv	AGCGACCGAGTGAGAAGAAAG
<i>lcc31</i>	713160	qPCR0713160Fw	TTACCCGACAGGCAACAACCTC
		qPCR0713160Rv	CGCAGGACAAAGACACCAATC
<i>glo</i>	431479	qPCR0431479Fw	CAACTTCTGGGAGGACGTTTG
		qPCR0431479Rv	ACAACCACCGAACTCTGCAC
<i>cdh1A</i>	20212195	qPCR20212195Fw	TTACCGCGGATGCAAATCTC
		qPCR20212195Rv	ATTGCGAGAAACAGCCGAAC
<i>cdh1B</i>	21512770	qPCR21512770Fw	CTGCTCCATCGTCATCTTCATC
		qPCR21512770Rv	CATGTCTCGGAAGCAACGAG
<i>act1</i>	24314302	qPCR Gf actin 1Fw	AAGAGCTATGAGTTGCCCGATG
		qPCR Gf actin 1Rv	AATGCGGGCTGGAAAAGAG

2.1.2 マイタケ菌の前処理能力強化

2.1.2.1 マイタケ菌糸の培養

- ① 保存スラント、または平板上の気中菌糸を白金線で少量掻き取り、液体培地に植菌した。
- ② 2週間静置培養。培養中は1日に2回ほどフラスコを振って攪拌し、気中菌糸が発達しないようにした。
- ③ 滅菌したホモジナイザーで菌糸を粉碎し、菌糸懸濁液 1 mL を 50 mL の液体培地に植菌した。
- ④ 1週間静置培養。培養中は1日に2回ほどフラスコを振って攪拌し、気中菌糸が発達しないようにした。

2.1.2.2 プロトプラストの調製

- ① ミラクロスを用いて培養液を濾過し、菌糸を回収した。
- ② 菌糸を脱イオン水で数回洗浄した。
- ③ 菌糸を 0.5 M マンニトールを含むマレイン酸-NaOH 緩衝液で数回洗浄した。
- ④ 菌糸を滅菌済み試験管に移し、湿重量を測定した。
- ⑤ 濾過滅菌しておいたプロトプラスト化酵素液（マレイン酸-NaOH 緩衝液 (pH5.6)、0.5M マンニトール、1% セルラーゼオノヅカ RS (ヤクルト)、0.1% Yatalase (TAKARA)) を菌糸湿重量 0.1 g に対して 1 mL 添加した。
- ⑥ 20°C-30°C で 2-4 時間振盪した。

- ⑦ 酵素反応液を一部採取し、血球計算盤でプロトプラスト数を計測。プロトプラスト数が少ない場合は反応時間を延長した。
- ⑧ ブフナー漏斗型グルスフィルターG2 で濾過し、未消化の菌体を除去した。
- ⑨ ろ液を 3000rpm、4℃、5min の条件で遠心分離した。
- ⑩ 沈殿したプロトプラストを 0.5 M マンニトール、マレイン酸-NaOH 緩衝液で懸濁した。
- ⑪ ⑨、⑩をもう一度繰り返し、最終的にプロトプラストを 1 mL の緩衝液で懸濁した。
- ⑫ プロトプラスト懸濁液中のプロトプラスト数を血球計算盤で計測した。

2.1.1.2.3 UV 照射による変異導入

- ① 5×10^5 個のプロトプラストに対して紫外線を照射した (120 μ J, 24 sec)。
- ② プロトプラストを 0.5 M マンニトールと 0.1% 硫酸マグネシウムを含む復帰培地に播いた。
- ③ トップアガーを重層して 1 週間程度培養し、再生したコロニーを単離して PDA プレート培地に植え継いだ。

2.1.3 生物的前処理に最適な糖化酵素開発

2.1.3.1 使用した菌株と保存方法

本研究では遺伝子組み換え実験およびバイオマス糖化実験には世界的標準株である *T. reesei* QM9414 株およびセルラーゼ高生産変異株である PC-3-7 を使用した。QM9414 株および QM9414 を親株として作成した遺伝子組換え株は、PDA プレート培地で培養して分生子を着生させた。分生子は 10% グリセロールを含む生理食塩水で懸濁し、孢子懸濁液として -80℃ で保存した。

T. reesei の遺伝子組換え用 DNA 断片を作成するための DNA 増幅用として大腸菌 DH5 α を使用した。

2.1.3.2 使用した培地

T. reesei 用液体培地

下記の表 2.3 の組成で培地を調製したのち、オートクレーブにて 120℃、20 分間殺菌処理して使用した。

表 2.3 *T. reesei* 用液体培地組成

試薬名	最終濃度
炭素源	下記参照*
硫酸アンモニウム (ナカライテスク)	0.14%
リン酸二水素カリウム	0.2%
塩化カルシウム二水和物	0.03%
硫酸マグネシウム七水和物	0.03%
ペプトン (Difco)	0.1%
イーストエキス (Difco)	0.05%
Tween80 (和光純薬)	0.1%
Trace element (下記表 2.4 参照)	0.1%
酒石酸緩衝液	50 mM

*炭素源としてそれぞれ 0.3% glucose 又は 1.0% Avicel を用いた。リグニン分解酵素遺伝子形質転換体の培養条件検討には 0.5 mM の FeSO₄、MnSO₄、CuSO₄、CaCl₂、0.05 %ヘモグロビン（豚由来）を用いた。

表 2.4 Trace element 組成

試薬名	最終濃度
ホウ酸（ナカライテスク）	0.006%
七モリブデン酸六アンモニウム四水和物（和光純薬）	0.026%
塩化鉄（Ⅲ）（和光純薬）	0.1%
塩化銅五水和物（和光純薬）	0.4%
塩化マンガン四水和物（和光純薬）	0.008%
塩化亜鉛（和光純薬）	0.2%

T. reesei 用最少培地

下記の表 2.5 の組成で培地を調製したのち、オートクレーブにて 120℃、20 分間殺菌処理して使用した。

表 2.5 *T. reesei* 用最少培地組成

試薬名	最終濃度
炭素源	下記参照*
硫酸アンモニウム（ナカライテスク）	0.5%
リン酸二水素カリウム（ナカライテスク）	1.5%
硫酸マグネシウム（ナカライテスク）	0.06%
塩化カルシウム二水和物（ナカライテスク）	0.06%
硫酸鉄七水和物（和光純薬）	0.0005%
硫酸マンガン一水和物（和光純薬）	0.00016%
硫酸亜鉛七水和物（和光純薬）	0.00014%
塩化コバルト（和光純薬）	0.0002%

*プレート培養には上記に炭素源として 2% agar および 1% の glucose を添加した。

リグニン分解酵素遺伝子組み換え体のスクリーニング用培地は最少寒天培地に 0.1 % cellobiose を加え、オートクレーブ後、ラッカーゼの呈色基質としてフィルター滅菌した 7 mM のタンニン酸を 20 % になるよう加えた。ペルオキダーゼ発現株はフィルター滅菌した 4 % レマゾールブリリアントブルー R (RBRR) 溶液を培地の 4 % になるよう加えた。

2.1.3.3 *T. reesei* の形質転換

- ① *T. reesei* 孢子 (1×10^7 個) を液体培地に植菌し、28℃、220rpm、20～24 hr. の条件で振盪培養した。
- ② ミラクロスを敷き詰めたプフナー漏斗で吸引濾過した。
- ③ 菌糸を滅菌超純水で洗浄後、余分な水分を除いた。
- ④ Yatalase solution (Yatalase (TAKARA) in A2 buffer (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8)、1.2 M 硫酸マグネシウム (ナカライテスク))) 10～30 ml に菌糸を入れた。
- ⑤ 30℃で 2 時間 70 rpm で浸透しながら保温した。

- ⑥ ガラスろ過器 P100 (SIBATA) で吸引ろ過した。
- ⑦ ろ液と等量の D buffer (100 mM Tris-HCl (pH7.0)、0.6 M ソルビトール (ナカライテスク)) を穏やかに重層した。
- ⑧ 4000 x g, 15min, 4°C で遠心分離し、中間層を新たなチューブに回収した。
- ⑨ B2 buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1.0 M ソルビトール (ナカライテスク)) 5~10 ml を添加した。
- ⑩ 2500rpm, 15min, 4°C で遠心分離し、沈殿となったプロトプラストを B2 buffer で懸濁した。
- ⑪ ⑨~⑩をもう一度行った。
- ⑫ 沈殿を C buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM 塩化カルシウム (ナカライテスク)、1.0 M ソルビトール (ナカライテスク)) 1 mL で懸濁した。
- ⑬ トーマの血球計数盤を用いてプロトプラスト数を計数し、 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 個プロトプラスト / 200 μ l になるように C buffer で調整するした。
- ⑭ プロトプラスト懸濁液に DNA 断片 (10~20 μ g) 添加した。
- ⑮ PEG buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5)、50 mM 塩化カルシウム (ナカライテスク)、25% ポリエチレングリコール 6000 (ナカライテスク)) を 50 μ l 添加し、氷上で 20 min 静置した。
- ⑯ PEG buffer を 2 ml 添加し、室温で 5 min 静置した。
- ⑰ C buffer 4mL 添加し、2000 rpm, 15 min, 室温で遠心分離した。
- ⑱ プロトプラストを C buffer 1 ml で懸濁した。
- ⑲ 200 μ l ずつ選択培地にまき、45 °C で保温したトップアガロース 5ml を重層した。
- ⑳ 28°C で 14~21 日間培養した。

2.1.3.4 *T. reesei* にコドン使用頻度を最適化した遺伝子の人工合成

G. frondosa の CDS 情報をかずさ DNA 研究所の Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) 上の *Hypocrea jecorina* (*T. reesei* の完全世代) コドン使用頻度に最適化し人工合成した(フナコシ)。人工合成された遺伝子は pUC 系プラスミドに挿入した。

2.1.3.5 *T. reesei* 形質転換用 DNA 断片の構築

T. reesei 用 *G. frondosa* リグニン分解酵素発現カセットは当研究室で作成され *cbh1* 高発現用プラスミド (*cbh1* プロモーターおよび 5' 上流領域、*cbh1* ターミネーターおよび 3' 下流領域を含みアセトアミド資化性遺伝子 *amdS* をマーカーとして構築されたプラスミド) を基本構造として用いて構築した(図 2.2)。CBHI (セロビオハイドrolラーゼ I) コード遺伝子 *cbh1* は *T. reesei* セルラーゼ遺伝子の中で最も高い発現量を示し、結晶性セルロース(Avicel)を炭素源としてセルラーゼ誘導培養した際にアクチン遺伝子 (*act1*) 約 100 倍の遺伝子転写量を示す。その転写を支配している *cbh1* プロモーターは極めて強力である。

人工合成遺伝子は 6×His タグ配列が導入遺伝子の終止コドン前に付加されるよう設計したプライマーで増幅した。また本実験におけるシグナル配列は各発現遺伝子由来 (*G. frondosa* 由来) の配列を用いた。形質転換時は発現カセットを KpnI と EcoRI で消化して切り出した。

また、*T. reesei* 内在性リグニン分解酵素発現の際は、*T. reesei* ゲノムから目的遺伝子を In-Fusion Primer を用いて増幅し、増幅産物を *cbh1* プライマー発現プラスミドに導入した。*T. reesei* 内在性リグニン分解

酵素においても各遺伝子のシグナル配列を使用し、終止コドン前に 6×His tag が付加されるようにプライマーを設計した。形質転換時は発現カセットを XbaI と EcoRI で消化して切り出した (図 2.3)。

プラスミド構築に使用したプライマー配列を表 2.6、2.7、2.8 に示す。

表 2.6 *cbh1* vector inverse PCR 用プライマー

プライマー名	配列 (5'→3')
<i>cbh1</i> vector prom	GATGCGCAGTCCGCGGTTGACTATTG
<i>cbh1</i> vector term	ACTAGTGCTCCGTGGCGAAAGCCT

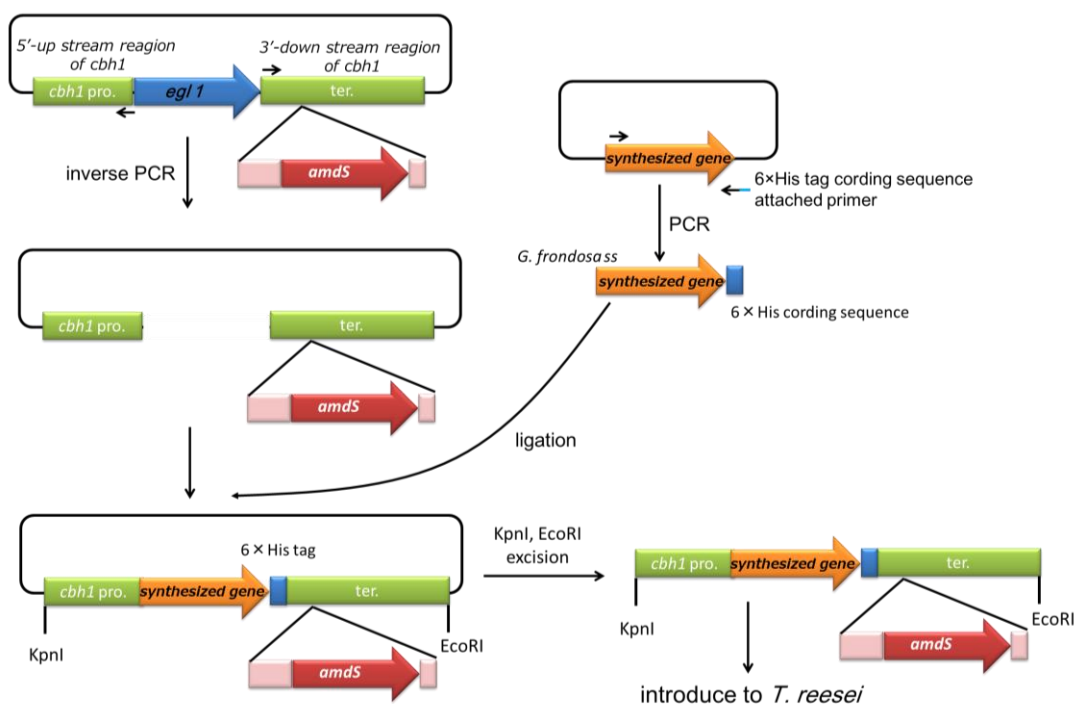


図 2.2 *T. reesei* 用 *G. frondosa* リグニン分解酵素発現カセットの構築

表 2.7 *G. frondosa* リグニン分解酵素発現用ベクター構築用プライマー

遺伝子名	プライマー名	配列 (5'→3')
vpl2-V	vpl2-V-Fw-Sig-new	ATGTCCTTCAAGTCCATCTTCGC
	vpl2-V-Fw-new	GTCCCATCCCCAGAG
	vpl2-V-Rv-His-new	TTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAGAAGGGGGTACTGGGGCA
MnP3-A	MnP3-A-Fw-Sig-new	ATGGCGTTCAAGACCCTCG
	MnP3-A-Fw-new	GCGCTTATCCGACGGGT
	MnP3-A-Rv-His-new	TTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGCGGCGCTACGG

表 2.8 *T. reesei* 内在性リグニン分解酵素発現プラスミド構築に使用したプライマー

アノテーション	protein ID	プライマー名	配列 (5'→3')
Laccase	54239 (TAA)	Lac54239Fw_IF	CGCGGACTGCGCATCATGGCGCGGTTGTATGTG
		Lac54239Rv_IF	CCACGGAGCACTAGTTTACAAGCCCATATCCAGAT
		Lac54239Rv His	GTGGTGGTGGTGGTGGTGCAAGCCCATATCCAGATACTT TTG
	124079 (TAG)	Lac124079Fw_IF	CGCGGACTGCGCATCATGAGTCGTTTTGCGTGGGT
		Lac124079Rv_IF	CCACGGAGCACTAGTCTAAGAACAAGCATTGTTGGTGT TACG
		Lac124079Rv His	GTGGTGGTGGTGGTGGTGAGAACAAGCATTGTTGGTGT TACG
	102820 (TGA)	Lac102820Fw_IF	CGCGGACTGCGCATCATGAACAGCTTCACGCGGC
		Lac102820Rv_IF	CCACGGAGCACTAGTTCAGCTTCTCAGAGCTGCAGCT
		Lac102820Rv His	GTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTTCTCAGAGCTGCAGCTCC
GLO	124282 (TGA)	124282Fw_IF	CGCGGACTGCGCATCATGAAGCCCTCTCCGGTGGC
		124282Rv_IF	CCACGGAGCACTAGTTCAAACACCGGGAGTCGTAAAGC C
		124282Rv His	GTGGTGGTGGTGGTGGTGAACACCGGGAGTCGTAAAGC C
GO	22915 (TGA)	22915Fw_IF	CGCGGACTGCGCATCATGGTACCTTCAAGGAGAATCCTC G
		22915Rv_IF	CCACGGAGCACTAGTTCACAAACCACTGCGATCGCC
		22915Rv His	GTGGTGGTGGTGGTGGTGCAAACCACTGCGATCGCCAA
cbh1vect or 終止 コドン 導入		cbh1_ter_inv_TA A	TAAACTAGTGCTCCGTGGCGAAAGC
		cbh1_ter_inv_TG A	TGAACTAGTGCTCCGTGGCGAAAGC
		cbh1_ter_inv_TA G	TAGACTAGTGCTCCGTGGCGAAAGC

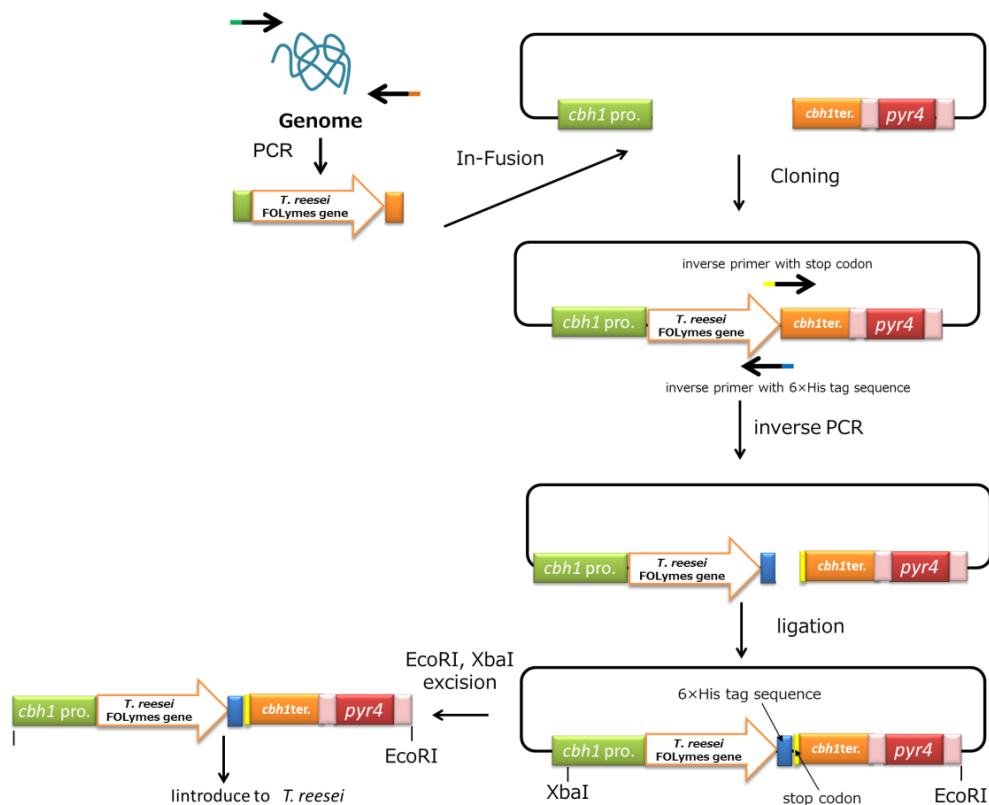


図 2.3 *T. reesei* 内在性リグニン分解酵素発現カセットの構築
(*cbh1*terminater は In-Fusion の相同配列を示すため異なる色で示した)

2.1.3.6 DNA のシーケンシング

シーケンシング反應用 DTCS Kit (BECKMAN)およびマルチキャピラリーDNA 解析システム CEQ2000TMXL DNA Analysis System (BECKMAN)を用いて行った。また、使用したシーケンシングプライマーは、seq-cbh1U2 (5'-GCACTGAACAGGCAAAAGATTGAGTTG-3'), seq-cbh1dr (5'-GTCATGATACGGGCTCACCAAGA-3')である。

2.1.3.7 *T. reesei* からのゲノム DNA 抽出

項目 2.1.1.5 マイタケ菌からのゲノム DNA の抽出と同様の方法で行った。

2.1.3.8 サザン解析

AlkPhos direct Labelling and CDP-star Detection System (GE Healthcare) を用いて、その取扱い説明書に従って行った。

2.1.3.9 *T. reesei* からの RNA 抽出

① 各条件で回収した菌糸 50 mg を液体窒素で凍結しマイクロチューブに入れた。

- ② 700 μ L の水飽和フェノールを添加した。
- ③ 700 μ L の TES を添加した。
- ④ ジルコニアビーズを 500 mg 添加した。
- ⑤ 65°C で 15 分間激しく振盪した。
- ⑥ 氷上で 2 分間静置した。
- ⑦ 15000 rpm、10 min、4°C で遠心分離した。
- ⑧ 上清 200 μ L を新しいチューブに回収し、TRISOL LS を 750 μ L 添加した。
- ⑨ 激しく攪拌し、室温で 5 分静置した。
- ⑩ 200 μ L のクロロホルムを添加した。
- ⑪ よく混ぜたのち、15000 rpm、5 min、4°C で遠心分離した。
- ⑫ 上清 600 μ L を新しいチューブに回収し、360 μ L のエタノールを添加した。
- ⑬ RNA spin Mini (GE ヘルスケア) のシリカカラムにて精製した。

2.1.3.10 *T. reesei* RNA からの cDNA 合成および qRT-PCR

cDNA 合成は、Transcriptional First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用い、付属の説明書に従った。qRT-PCR は、LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) および Light Cycler 480 システムを用いて行った。また、各遺伝子増幅用のプライマーは以下の表 2.9 に示した。

表 2.9 *T. reesei* qRT-PCR 用プライマー

遺伝子名	プライマー名	配列 (5'→3')
Vpl2-V	qPCR Vpl2-V Fw	AGACGAACTTTCCGCCAAC
	qPCR Vpl2-V Rv	CTGGATCAAGTCGCCAAAAG
Vpl2-L	qPCR Vpl2-L Fw	CGAACTTTCACGCCAACATC
	qPCR Vpl2-L Rv	TGAAGTCCCCAAATGACACC
Vpl2-Mn	qPCR Vpl2-Mn Fw	TCGCGGAAATCGAGACTAAC
	qPCR Vpl2-Mn Rv	ACCGGCAAACCTGGATGAAG
MnP3B	qPCR MnP3B Fw	AACCAAGCCAGCTCCAATC
	qPCR MnP3B Rv	CACTTCAGAGCAATCCACCATC
LCC31	qPCR LCC31 Fw	GCACAATGCTCAAGACAACG
	qPCR LCC31 Rv	AACAAAAGCAGGTCCGTCAG
54239	qPCR 54239 Fw	TCTACGGCCCCATTTTCATC
	qPCR 54239 Rv	ATCATGGCAGCAACATCGAG
<i>cbh1</i>	qPCR <i>cbh1</i> Fw	CTTGGCAACGAGTTCTCTT
	qPCR <i>cbh1</i> Rv	TGTTGGTGGGATACTTGCT
<i>cbh2</i>	qPCR <i>cbh2</i> Fw	CGTCAAATTGTCGTGGAA
	qPCR <i>cbh2</i> Rv	ACTGAGCATTGGCACACTT
<i>egl1</i>	qPCR <i>egl1</i> Fw	CGGCTACAAAAGCTACTACG

遺伝子名	プライマー名	配列 (5'→3')
	qPCR egl1 Rv	CTGGTACTTGCGGGTGAT
<i>xyn1</i>	qPCR xyn1 Fw	GGTTGGACGACTGGATCT
	qPCR xyn1 Rv	GGTTGTCCTCCATGATGTAG
<i>act1</i>	qPCR act1 Fw	AATACCGCGCTCACGTCTTC
	qPCR act1 Rv	TCGTCTCGTTGCTGGATCTC

2.1.3.11 廃菌床糖化実験

5 % バイオマス(90 日保管廃菌床)、5 mg セルラーゼ/g-バイオマス、50 mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)を 2 mL の反応系、50°Cで反応させ 24 時間と 48 時間でサンプリングを行った。セルラーゼは PC-3-7 培養上清を用いた。

糖化反応におけるセルラーゼへの添加効果を解析するために市販の各種酵素を 2.5 mg/g-バイオマスで添加した。使用した酵素は *Rhus vernicifera* 由来 Laccase、*Phanerochaete chrysosporium* 由来 *manganese peroxidase*、*Aspergillus niger* 由来 Hemicellulase (いずれも sigma)を用いた。

2.1.3.12 Laccase プレート活性測定

0.1 % ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))、1 % p-ヒドロキシ安息香酸、1 % Agarose、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を含んだ寒天培地上に培養上清をスポットし、Laccase 活性によって観察される緑色の呈色を観察した。

2.1.3.13 タンパク質定量方法

Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit (BIO-RAD)を用いて説明書に従って行った。検量線は Bovine Gamma Globulin (BGG)を基準として作成し、試料のタンパク質濃度を算出した。

2.1.3.14 SDS-PAGE

Molecular Cloning 4th edition (Green MR and Sambrook J, 2012) に従って行った。銀染色は銀染色 MS キット(Wako)を用いプロトコールに従った。

2.1.3.15 CMCase 活性測定

50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) に融解した 1% carboxymethyl cellulose (CMC) を基質として 50°Cで反応を行い、生成した還元糖を Somogyi-Nelson 法により測定した。反応 1 分間に 1 μmol の還元末端を遊離する酵素量を 1 U とした。

2.1.3.16 Somogyi-Nelson 法による還元糖の定量

- ① CMC 分解反応液 500 μL に Somogyi 液*を 500 μL 加え、よく混ぜたのち 15 分間煮沸した。
- ② 氷上で 5 分以上冷却した。
- ③ 500 μL の Nelson 液**を加え、よく混ぜたのち 1 mL の純水を添加した。
- ④ 3000 rpm、25°C、10 分間遠心分離した。

- ⑤ 上清の波長 520 nm を測定した。
- ⑥ D-グルコースを還元糖のスタンダードとして作製した検量線より生成還元糖量を算出した。

***Somogyi 液 I**

- ① 無水硫酸ナトリウム 144 g を熱水 400 mL に溶解
- ② 酒石酸ナトリウムカリウム四水和物 12 g、炭酸ナトリウム 24 g、炭酸水素ナトリウム 16 g を 400 mL 以下の熱水に溶解
- ③ ①と②を混合し、800 mL にメスアップ

***Somogyi 液 II**

- ①無水硫酸ナトリウム 36 g、硫酸銅五水和物 4 g を熱水に溶解し、200 mL にメスアップした。

***Somogyi 液 I と II を 4 : 1 で混合して Somogyi 液とした。**

****Nelson 液**

- ① 熱水に七モリブデン酸六アンモニウム四水和物 50 g を溶解した。
- ② 50°Cまで放冷した。
- ③ 硫酸 42 mL 添加した。
- ④ 40°Cまで放冷した。
- ⑤ 予め 50 mL の純水に溶解しておいた 6 g ヒ酸水素ナトリウムを全量添加した。
- ⑥ 遮光瓶で保存した。

2.1.3.17 Xylanase 活性測定

xylan 基質溶液は beechwood (ブナ)由来 xylan を 3%(w/v)になるように量り取り適当量の水を加え、沸騰水中で 3 分間保温しながら攪拌し可能な限り溶解させた。その後水でメスアップし、遠心して得られた上清を 3% xylan 溶液として用いた。

反応は 50 mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)、50°Cで行った。反応停止には反応系の 1/10 量の NaOH を加え生成したキシロースは DNS 法によって測定した。反応 1 分間に 1 μ mol のキシロースを遊離する酵素量を 1 U とした。

2.1.3.18 DNS 法による還元糖の定量

- ① Xylan 分解液 200 μ L に DNS 液*を 400 μ L 添加し、氷上に静置した。
- ② 室温に戻した。
- ③ 5 分煮沸した。
- ④ 純水を 1.8 mL 添加した。
- ⑤ 室温で 10 分静置した。
- ⑥ 波長 540 nm を測定した。
- ⑦ D-グルコースを還元糖のスタンダードとして作製した検量線より生成還元糖量を算出した。

***DNS 液**

0.5 M NaOH 240 mL にジニトロサリチル酸 1.5 g、酒石酸ナトリウムカリウム 4 水和物 90 g を溶解し、300 mL にメスアップした。

2.1.3.19 Cellobiase 活性測定

cellobiase 活性測定は 100 mM 酢酸バッファー(pH 5.0) 中で 20 mM cellobiose を基質として 50°C で反応させ、生成グルコース量を Glucose C II Kit (Wako)を用いて測定した。D-グルコースをスタンダードとして作製した検量線より生成グルコース量を算出した。反応 1 分間に 1 μmol の cellobiose を加水分解する酵素量を 1 U とした。

2.1.3.20 Laccase 活性測定

Laccase や他のリグニン分解酵素は温度調節機能付き分光光度計 日立 U-2000 を使用して酵素によって酸化された基質の吸光度上昇を測定することで算出した。反応液はキュベット内で混合し、そのまま反応させ吸光度の上昇を計測した。Laccase 活性は 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) または ABTS (2-2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)を基質として用いた。

2.1.3.20.1 2,6-DMP を用いた方法

- ① 0.5 mL 酵素抽出液、0.5 mL 50mM マロン酸 Na バッファー(pH 4.5)をキュベット内で混合した。
- ② 60°C で 5 min 保温した。
- ③ 0.5 mL 3 mM 2,6-DMP 添加した。
- ④ 60°C 15 min 470 nm の吸光度を測定した。
- ⑤ 吸光度増加から酸化された基質量を計算し活性を算出した。

反応 1 分間で 1 μmol の 2,6-DMP 酸化に必要な酵素量を 1 U とした。

$$U/L = (\Delta A_{470} \times V \times 10^6) / (\epsilon \times \text{min} \times E)$$

ϵ : モル吸光計数 ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) V : 反応系の総量 (L) E : 酵素液量 (L)

min : 反応時間 (min)

2.1.3.20.2 ABTS を用いた方法

- ① 850 μL 50 mM 酢酸バッファー (pH4.5)、100 μL 10mM ABTS をキュベット内で混合した。
- ② 60°C で 5 min 保温した。
- ③ 50 μL 酵素液添加した。
- ④ 60°C 1 min 420 nm の吸光度を測定した。
- ⑤ 吸光度増加から酸化された基質量を計算し活性を算出した。

1 分間の反応で 1 μmol の ABTS 酸化に必要な酵素量を 1 U とした。

$$U/L = (\Delta A_{420} \times V \times 10^6) / (\epsilon \times \text{min} \times E)$$

V : 反応系の総量 (L) E : 酵素液量 (L) min : 反応時間 (min)

菌床抽出酵素液以外のラッカーゼ活性はより鋭敏な呈色試薬である ABTS を基質として用いた。

2.1.3.21 MnP 活性測定

- ① 0.5 mL 酵素液、0.25 mL 6 mM MnSO₄ キュベット内で混合した。
- ② 60°C 5 min 保温した。
- ③ 3 mM 2,6-DMP を 0.5 mL 添加した。
- ④ 1.2 mM H₂O₂ を 0.25 mL 添加 (反応開始) した。
- ⑤ 60°C 1 min 470 nm 吸光度を測定した。
- ⑥ 吸光度増加から酸化された基質量を計算し活性を算出した。

菌床抽出酵素液の場合ラッカーゼと同一基質を使用しているためラッカーゼによる吸光度上昇を差し引いて MnP 活性を求めた。菌床抽出酵素液以外は活性に応じて反応時間を延ばし、1 分当たりの吸光度上昇を算出した。

$$U/L = (\Delta A_{470} \times V \times 10^6) / (\epsilon \times \text{min} \times E)$$

ϵ : モル吸光計数 ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) V : 反応系の総量 (L) E : 酵素液量 (L)

min : 反応時間 (min)

ΔA_{470} : ラッカーゼ活性測定で求めた吸光度の上昇を MnP による測定値から差し引いた

2.1.3.22 LiP 活性測定

lignin peroxidase 活性は終濃度が 16 mM のベラトリルアルコール、50 mM 酒石酸 Na バッファー (pH3.0)、0.4 mM H₂O₂ および試料からなる総量 1.5 mL の反応系で 37°C で 310 nm における吸光度増加を測定し、生成物のベラトリルアルデヒドのモル吸光係数 $9,3000 M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて酵素活性を算出した。

2.2 廃菌床糖化溶液からの DOI 発酵高生産組換え大腸菌の開発

2.2.1 進化工学的改変による高活性型 DOI 合成酵素の取得・利用

2.2.1.1 DOI の定量

2.2.1.1.1 DOI のオキシム化

DOI は紫外可視検出が困難であり、水溶液中ではヒドロ型とケト型の 2 つのフォームをとることから、ケト型を *ortho*-4- Nitrobenzylhydroxylamine Hydrochloride 溶液 (以下、NBHA) (TCI-ACE) で誘導化後、HPLC で分離し、紫外可視検出を行う。フラスコ培養では 40 mg/ml、ジャーファーメンター培養では 55 mg/ml の NBHA 溶液を調製して使用した。

- ① 1.5 ml チューブに、DW 90 μ l、HPLC 用 Methanol (Wako) 100 μ l、培養上清 10 μ l、NBHA 20 μ l を入れボルテックスし、スピンドウンした。
- ② 60°C で 1 h オキシム化反応した。
- ③ 室温で 5 min 静置し、ボルテックスしてスピンドウンした。
- ④ 55°C の条件下で、減圧濃縮遠心機 (EYELA Centrifugal Evaporator CVE-3100) によりサンプルを乾固した。

2.2.1.1.2 HPLC による DOI 量の測定

使用機器

オートサンプラ	SIL-20AHT (SHIMADZU)
オンライン脱気ユニット	D6U-20A ₃ (SHIMADZU)

UV-VIS 送出器	SPD-20A (SHIMADZU)
送液ユニット	LC-20AD (SHIMADZU)
カラムオープン	CTO-20A (SHIMADZU)
超音波洗浄器	AU-25C (Aiwa)
使用カラム	Kinetex 2.6u XB-C18 100A (Phenomenex)

測定条件

溶離液	15% Methanol 水溶液
流速	0.7 ml/min
オープン温度	40°C
波長	262 nm

- ① 乾固させたサンプルに HPLC 用 Methanol 200 μ l を加え、超音波でサンプルを溶解した。
- ② 超音波洗浄器でサンプルを 5 min 脱気処理した。
- ③ 15,000 rpm (Max) で 2 min 遠心した。
- ④ 上清を 2 μ l、HPLC にインジェクトした。

2.2.1.2 Glucose の定量方法

D-Glucose (GOPOD) Assay Kit (Megazyme) の手順に従い、測定した。

- ① サンプルを DW で 100 倍に希釈した。
- ② 1.5 ml チューブに、GOPOD 375 μ l、DW 15 μ l、サンプル 10 μ l を入れ懸濁し、スピンドウンした。
- ③ 45°C で 20 min インキュベートした。
- ④ 常温になるまで静置し、再度懸濁してスピンドウンした。
- ⑤ 96 穴マイクロプレート (CORNING) に 300 μ l 入れ、プレートリーダー (TECAN) を用いて吸光度 510 nm で測定した。

2.2.1.3 Mannitol の定量方法

D-Mannitol/L-Arabitol Assay Kit (Megazyme) の手順に従い、測定した。

- ① サンプルを DW で 100 倍に希釈した。
- ② 96 穴マイクロプレートに、DW 200 μ l、サンプル 10 μ l、Buffer 10 μ l、NAD⁺ 10 μ l を入れ、マイクロプレートミキサー (SCINICS) で懸濁した。
- ③ 室温で 2 min 静置した。
- ④ ManDH 2 μ l を加え、マイクロプレートミキサーで懸濁した。
- ⑤ 室温で 5 min 静置した。
- ⑥ プレートリーダーを用いて吸光度 340 nm で測定した。

2.2.1.4 OD の測定方法

サンプルを 10 倍～200 倍まで状況にあわせて希釈し、菌体濁度を分光光度計 Ultrospec 6300 pro (Amersham Biosciences) を用いて OD600 を測定した。希釈は DW で行った。

2.2.1.5 大腸菌のエレクトロポレーション法による形質転換

2.2.1.5.1 エレクトロポレーション用コンピテントセルの作製

- ① 500 ml バッフルフラスコに LB 培地 50 ml を入れ、抗生物質として Zeocin (最終濃度 20 $\mu\text{g/ml}$), Kanamycin (最終濃度 20 $\mu\text{g/ml}$), Streptomycin (最終濃度 20 $\mu\text{g/ml}$) を添加した。
- ② 大腸菌を植菌し、37°C, 120 rpm で 18 h 培養した。
- ③ 新しい 500 ml バッフルフラスコに LB 培地 50 ml を入れ、初期 OD₆₀₀=0.1 になるように植菌し、37°C, 120 rpm で OD₆₀₀=0.6 辺りになるまで 3 h 程培養した。
- ④ クリーンベンチであらかじめ冷やしておいた 50 ml チューブに移し、2,000 g、15 min 遠心した。
- ⑤ ice cold DW 50 ml で 3 回、2,000 g、15 min 遠心し、洗浄した。
- ⑥ ice cold 10% Gly 50 ml で 2 回、2,000 G、15 min 遠心し、洗浄した。
- ⑦ 最後の遠心後、上清をきれいに捨て 200 μl の 10% Gly で懸濁した。
- ⑧ 20 μl ずつ 1.5 ml チューブに分注し、-80°C で保存した。

2.2.1.5.2 エレクトロポレーションによる形質転換

使用機器

Gene Pulser Xcell (BIO-RAD)

1 mm Cuvette (BIO-RAD)

エレクトロポレーションの条件

Voltage 1,800 V

Capacitance 25 μF

Resistance 200 Ω

- ① エレクトロポレーション用コンピテントセル 20 μl にプラスミド 1 μl を加え軽くピペッティングした。
- ② あらかじめ冷やしておいたキュベットに全量移し、氷中で 5 min インキュベートした。
- ③ Gene Pulser Xcell のポッドにキュベットを入れ、電気パルスを与えたら、すかさず LB 培地 980 μl 入れ、37°C で 45 min インキュベートした。
- ④ 最終濃度が 2,000 倍になるように希釈し、LB/Amp (100 $\mu\text{g/ml}$) プレートに 100 μl プレーティングし、30°C で 24 h 静置培養した。

2.2.1.6 大腸菌の塩化カルシウム法による形質転換

2.2.1.6.1 ケミカルコンピテントセルの作製

- ① グリセロールストックされた GI724 Δpzp 株を LB 培地 5 ml に植菌し、37°Cで一晩振蕩培養した。
- ② 一晩振蕩培養した前培養液を SOB 培地 200 ml (500 ml 羽根付きフラスコ)に OD600 が 0.1 になるよ

うに植菌し、16°Cで培養した。

- ③ OD600 が 0.3-0.7 になった時点で回収、フラスコを氷上で 15 min 冷却した。
- ④ 冷却した培養液を 50 ml チューブ 4 本へ移し、2,000 G で 5min 遠心後、上清をのぞき TB (OD600=0.3 なら 3 ml、0.5 なら 4 ml、0.7 なら 5 ml)を加え、緩やかに懸濁した。
- ⑤ 4 本のチューブを 1 本にまとめ、2,000 G で 5 min 遠心、上清を除いた後、TB(OD600=0.3 なら 3 ml、0.5~0.7 なら 4 ml)を加え緩やかに懸濁した。
- ⑥ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Wako)を 7%になるように加え、氷上で 10 min 放置した。冷却した 1.5 ml チューブに 100 μ l ずつ分注し、-80°Cで保存した。

2.2.1.6.2 ケミカルコンピテントセルへの形質転換

- ① 氷上で融解させたケミカルコンピテントセル(GI724 Δ prz 株) 100 μ l に Plasmid を 0.2 μ l 加えた。
- ② 軽くピペッティングし、氷中で 10 min 静置した。
- ③ 42°Cで 1 min ヒートショックを行い、すぐに氷中に戻し、2 min 放置した。
- ④ SOB 培地を 900 μ l 加え、37°Cで 45 min 振とう培養した。
- ⑤ RM プレート(2% Casamino Acids (DIFCO), 1 mM MgCl₂, M9 Salts (15% Na₂HPO₄·12H₂O (Wako), 3% KH₂PO₄ (Wako), 1% NH₄Cl (Wako), 0.5% NaCl (Wako)), Ampicilim 100 μ g/ml、Kanamycin 20 μ g/ml、Streptomycin 20 μ g/ml、Zeocin 20 μ g/ml) に滅菌蒸留水 (DW) で 10 倍希釈した培養液を 100 μ l 塗布し 30°Cで 24 h 静置培養した。

2.2.1.7 変異遺伝子ライブラリーの構築

- ① P_Lプロモーターを取り除いた pLEX plasmid (Invitrogen) に gadA プロモーターを結合させたプラスミド (Δ P_L/pLEX) を作製した。
- ② 野生型 DOI 合成酵素 (btrC) 遺伝子をテンプレートとして、Mn²⁺存在下で PCR を行い、野生型 DOI 合成酵素 (btrC) 遺伝子にランダムに変異を導入した。ランダム変異導入条件は、0.25mM Mn²⁺または 0.5mM Mn²⁺存在下で PCR を行った。

10×PCR buffer (70 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl(pH 8.3))

10×dNTPs (2 mM dGTP, 2 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP) EX taq polymerase (TAKARA)

PCR 条件 : 94°C 2 m 30 s, (94°C 20 s, 50°C 25 s, 72°C 1 m 10 s) × 30, 72°C 3 m

- ③ 得られた PCR 反応物をフェノール/クロロホルムで処理し、遠心後、上清をエタノール沈殿して、DNA 画分を回収した。
- ④ Δ P_L/pLEX と DNA 断片を結合させ、ケミカルコンピテントセルへ形質転換し、変異株ライブラリーを構築した。

2.2.1.8 1次スクリーニング

- ① 変異型 DOI 合成酵素遺伝子ライブラリーをグルコース-6-リン酸高蓄積株

GI724 Δ pgi* [F, λ ,lacI^q,lacPL8,ampC::PtrpC1,mcrA,mcrB,INV(rnnD-rnnE), Δ pgi::Km^r] 株にエレクトロポレーション法で形質転換した。

- ② 得られたクローンをディープウェルプレート 96well 丸底で、30°Cで24 時間振とうし、前培養を行った。
- ③ 前培養液を培地の入ったディープウェルプレート 96well 丸底に植菌し、30°Cで15 時間振とうし、本培養を行った。培養後、培養上清を回収し、DOI の生産性を検証した。

2.2.1.9 2次スクリーニング

- ① 1次スクリーニングの結果得られた候補株を、試験管で前培養を行った。
- ② 本培養は、初期濁度が OD600=0.1 になるように三角フラスコに植菌後、30°Cで培養し、培養開始後 0, 12, 24, 36 時間の菌体濁度、グルコース濃度、DOI 濃度の測定を行った。

2.2.1.10 3次スクリーニング

- ① 氷上で融解させたケミカルコンピテントセル (GI724 Δ prp [F, λ ,lacI^q,lacPL8,ampC::PtrpC1,mcrA,mcrB,INV(rnnD-rnnE), Δ pgi::Km^r, Δ zwf::Zeo^r, Δ pgm::Spm^r]株) 100 μ l に2次スクリーニングより得られた候補株の有する Plasmid を 0.2 μ l 加えた。
- ② 軽くピペッティングし、氷中で 10 min 静置。
- ③ 42°Cで 1 min ヒートショックを行い、すぐに氷中に戻し、2 min 放置した。
- ④ SOB 培地を 900 μ l 加え、37°Cで 45 min 振蕩培養した。
- ⑤ RM プレート (Amp 100 μ g/ml、KM 20 μ g/ml、SM 20 μ g/ml、Zeo 20 μ g/ml)に滅菌蒸留水(DW)で 10 倍希釈した培養液を 100 μ l 塗布し 30°Cで 24 h 静置培養した。
- ⑥ 試験管に RMM (Amp 100 μ g/ml、KM 20 μ g/ml、SM 20 μ g/ml、Zeo 20 μ g/ml) 3 ml を分注し、滅菌済みの爪楊枝で培養プレートからシングルコロニーをつつき、植菌した。
- ⑦ 30°Cで 24 h、170 rpm で振蕩培養した。
- ⑧ 500 ml のバッフルフラスコに 2 \times YT 培地 (3次スクリーニング用) を 48 ml 分注した。
- ⑨ 前培養液の菌体濁度を測定し、本培培地に加える菌体量が OD600=0.1 となるよう計算した培養液量を 1.5 ml チューブに分注し、2,000 G で 5 min 遠心した。
- ⑩ 遠心後に上清を取り除き、バッフルフラスコに分注した本培培地で懸濁し培地に加えた。
- ⑪ 30°C、120 rpm で回転振蕩培養し、OD600 が 0.5 付近になった時点で 50% Glucose を 2 ml (最終濃度 2%) 加え、この時間を 0 h として 12 h ごとにサンプリングした。

2.2.1.11 His-Tag 組換え蛋白質の生産・精製

- ① 試験管に LB/Amp 培地 (200 μ g/ml) 3 ml を分注し、プレートからシングルコロニーを爪楊枝でつつき植菌、37°Cで 12 h-14 h 振蕩培養した。
- ② 培養液を初期 OD600=0.1 になるように計算し、バッフルフラスコに分注した 50 ml LB/Amp 培地に直接植菌した。
- ③ 37°Cで回転振蕩培養し、OD600=0.5-0.6 になった時点で 1 M IPTG を 25 μ l (最終濃度 0.5 mM) 添加し、さらに 4 h 培養した。

- ④ 培養液を 50 ml チューブに移し、4,000 g で 5 min 遠心した。
※ここからはすべて氷中で操作した。
- ⑤ 上清を捨て、Lysis Buffer (50 mM Phosphate Buffer (pH7.7), 300 mM NaCl, 0.2 mM CoCl₂ · 6H₂O) を 10 ml 加え Vortex し、4,000 g で 5 min 遠心した。
- ⑥ 上清を捨て、Lysis Buffer を 10 ml 加え Vortex した後、超音波ホモジナイザー(EYELA VC-750)で菌体破砕した。

※破砕条件

Amplitude	: 30%
Timer	: 30 sec
Pulser	: ON 1 sec OFF 1 sec

- ⑦ 10,000 G で 10 min 遠心し、上清を 15 ml チューブに移した。
- ⑧ Ni-NTA Agarose (QIAGEN)を 1 サンプルにつき 50 μl 量 (Lysis Buffer で洗浄前の原液換算量) 加え、氷中に寝かせ、2 h 緩やかに shaking した。
- ⑨ 1,000 g で 1 min 遠心し、アスピレーターを用いて 1 ml 程度まで上清を除いた。
- ⑩ 沈殿した Ni-NTA Agarose と上清を懸濁し、1.5 ml チューブに移した。
- ⑪ 1,000 g で 1 min 遠心し、上清を捨て Wash Buffer (50 mM Phosphate Buffer (pH7.7), 30 mM Imidazole (nacalai tesque), 0.2 mM CoCl₂ · 6H₂O) を 800 μl 加えた。
- ⑫ 軽くピペティングし、1,000 G で 1 min 遠心した。
- ⑬ 上清を綺麗に取り除き、Elution Buffer (50 mM Phosphate Buffer (pH7.7), 200 mM Imidazole (nacalai tesque), 0.2 mM CoCl₂ · 6H₂O) を 400 μl 加えた。
- ⑭ 軽く混和し、5 min 放置した。
- ⑮ 10,000 g で 2 min 遠心後、上清を新しい 1.5 ml チューブへ移した。

2.2.1.12 *in vitro* DOI 合成酵素活性測定

- ① 氷中で、BtrC 酵素反応液を以下の系で調整した。

反応系

G6P Buffer (100 mM Phosphate Buffer (pH7.7), 0.4 mM CoCl ₂ · 6H ₂ O)	10 μl
G6P Solution (0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20 mM)	10 μl
50 mM β-NAD ⁺	10 μl
精製 BtrC 酵素	X μl (10 μg)
Elution Buffer (2.2.1.11 記載)	70-X μl
計	100 μl

- ② 調整したサンプルを 46°C で 5 min 反応させ、素早く氷中に戻した。
- ③ 1.5 ml チューブへ滅菌蒸留水(DW) 50 μl、BtrC 酵素反応液 50 μl、Methanol (HPLC grade) (Wako)100 μl、NBHA (10 mg/ml) 20 μl を入れ Vortex した。
- ④ 60°C でオキシム化反応を 1 h 行い、減圧濃縮遠心機 (EYELA Centrifugal Evaporator CVE-3100)により

乾固させた。

- ⑤ 乾固させたサンプルに Methanol を 200 μ l 加え、超音波破碎により溶解させた。
- ⑥ 15,000 rpm で 3 min 遠心後、上清 120 μ l をバイアルに移し、HPLC により DOI を定量し、DOI 合成酵素活性、また Lineweaver-Burk plot で K_m 、 K_{cat} を算出した。

2.2.2 DOI 合成酵素の高安定化

2.2.2.1 組換え蛋白質の生産・精製

- ① btrC 蛋白質、btrC2 蛋白質生産用プラスミドを大腸菌 DH5 α に形質転換した。
- ② 以下、2.2.1.11 His-Tag 組換え蛋白質の生産・精製を参照。

2.2.2.2 *in vitro* DOI 合成酵素活性測定

2.2.1.12 *in vitro* DOI 合成酵素活性測定を参照。

2.2.3 DOI 合成酵素基質グルコース-6-P (G6P) の蓄積速度の強化

DOI、グルコース、マンニトール、菌体濁度の測定及び定量は、2.2.1.1-2.2.1.3 を参照。

2.2.3.1 グルコース-6-リン酸測定

- ① 培養液を OD₆₀₀=1.4 になるように DW で希釈し、1 ml を 1.5 ml チューブへ移した。
- ② Max で 2 min 遠心して上清を捨てた。
- ③ DW で wash し、Max で 2 min 遠心した(3 回繰り返した)。
- ④ Pellet に DW100 μ l を入れた。
- ⑤ チューブを氷上に移し、5M HClO₄ を 50 μ l 入れ懸濁した。
- ⑥ 2.5M K₂CO₃ を 100 μ l 入れ懸濁した。
- ⑦ Max で 10 min 冷却遠心を行い、上清を assay に用いた。
- ⑧ Assay を行うため、上清 80 μ l と G6P 測定 buffer (0.15M ニトリロトリエタノールアミン塩酸塩 buffer(pH.7.6), 100mM KCl, 10mM MgSO₄, 2mM NADP) 160 μ l を混合した。
- ⑨ 0.15 mg/ml グルコース-6-リン酸脱水素酵素を 10 μ l 入れ、37°C で 20 min 反応させた。
- ⑩ Ultrospec 6300 pro UV/Visible Spectrophotometer (Amerham Biosciences) で OD 450 nm を測定した。

2.2.3.2 DOI 生産試験培養

- ① 試験管に RMM 培地 3 ml を入れ、グリセロールストックから植菌した。30°C で 24 h 培養し、これを前培養とした。
- ② 2×YT 培地 50ml (500ml バッフル) に OD₆₀₀=0.1 になるよう計算し、必要な前培養液量を 1.5 ml チューブに移した。
- ③ 2,000 g で 10 min 遠心した後、上清を除去して 2×YT 培地 50 ml に植菌した。
- ④ 植菌した培養液から 1.2 ml 採取する。これを 0 h のサンプルとし、72 h まで 12 h ごとにサンプリングを行った。
- ⑤ 菌体測定はそれぞれの時間でサンプルを採取した後すぐに行った。

- ⑥ G6P 測定用とウェスタン用サンプルの調整のため、培養液 1.2 ml から新しい 1.5 ml チューブに 500 μ l を移した。
- ⑦ 残り 700 μ l を菌体測定終了後に採取したサンプルを 15,000 rpm で 5 min 遠心した。
- ⑧ DOI 測定用に上清 400 μ l を別のチューブへ移し、1N HCl で pH を 3 前後になるように加え、4°C で保存する。マンニトール測定用に上清 200 μ l を別のチューブへ移し、-20°C で冷凍保存した。

2.2.4 DOI 低感受性・耐酸性 DOI 生産宿主の取得・利用

2.2.4.1 DOI の精製

- ① DOI 含有培養上清液をフィルターペーパーで吸引濾過した。
- ② 陽イオン交換カラム (アンバーライト 200CT、オルガノ株式会社)、陰イオン交換カラム (アンバーライト IRA96SB、オルガノ株式会社) を繋げ、吸引濾過をした DOI 含有培養上清を通液させ、分画し、DOI 含有フラクションを回収した。
- ③ DOI 含有フラクションはウォーターバスを 40°C に設定したロータリーエバポレーターを使用し 200 mL 程度になるまで減圧蒸留を行った。
- ④ 濃縮したフラクションを -20°C で凍結させ、凍結乾燥機を使用して水分が完全に無くなるまで濃縮を行った。
- ⑤ 濃縮 DOI の重量に対し 1.2 倍量の methanol (以下 MeOH と略す) を加え、濃縮 DOI を溶解させた。
- ⑥ ウォーターバスを 70°C 程度に設定し、DOI/MeOH 溶液を加温しながら MeOH の 7 倍量の ethanol (以下 EtOH と略す) を 7 mL/min で添加しながら攪拌を行った。
- ⑦ EtOH を添加後、攪拌しながら 1 日常温で放冷し、DOI の結晶化を行った。
- ⑧ 粗結晶 DOI をフィルターペーパーで吸引濾過した。
- ⑨ 粗結晶 DOI を凍結乾燥機 (-40°C、19.4 Pa) で 24 h 凍結乾燥させた。
- ⑩ 結晶 DOI の純度測定を行った (HPLC による DOI の定量)。

2.2.4.2 大腸菌の対数増殖期における DOI による増殖阻害の検討

- ① BW25113 株 (Keio collection の野生株) のフリーズストックからマイクロスパーテルを用いて LB 固体培地に植菌し、30°C で一晚、静置培養を行った。
- ② LB 液体培地 1 mL が入った試験管に前日植菌したプレートから BW25113 株を爪楊枝で植菌し、30°C で 120 rpm、24 h 振盪培養 (往復振とう培養機照射式 TA-100L、高崎科学器械株式会社) を行った (前培養)。
- ③ 前培養液を 10 倍希釈し、分光光度計 (UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 6300、Amersham Biosciences) を用いて濁度 OD600 を測定した。
- ④ LB 液体培地及び LB/0-6% DOI 含有液体培地 1 mL が入った試験管に前培養液を初期 OD600=0.1 になるように添加し、30°C で 120 rpm、8 h 振盪培養を行った。
- ⑤ 培養開始から 8 h まで 1 h 毎に分光光度計を用いて濁度 OD600 を測定し、培養 3 h-7 h の比増殖速度を算出した。

《比増殖速度の算出方法》

比増殖速度の公式： $\mu = \ln (X/X_0) / t-t_0$

μ =比増殖速度、 X =細胞濃度、 t =時間

DOI 非含有培地において培養開始 3 h の菌体濁度が 1.21、7 h の菌体濁度が 4.66 であった時の比増殖速度は、約 0.34 [$\mu = \ln(4.66/1.21) / 7 - 3 = 0.337\dots$] となる。

2.2.4.3 DOI 及び糖濃度、浸透圧による増殖阻害の関係性の検討

- ① BW25113 株をフリーズストックから LB 固体培地にミクロスパーテルを用いて植菌し、30°C で一晩、静置培養を行った。
- ② LB 液体培地 1 mL が入った深型 96 穴プレート (2.0 ml Pre-Sterilized 96 Square Well Deep Well Plate、Axygen) に前日に植菌したプレートから BW25113 株のシングルコロニーを爪楊枝で植菌した後、CO₂ 透過性シール (greiner bio-one、型番：67051) で蓋をし、30°C で 1,600 rpm、24 h 振盪培養 (invitroshaker Mix-EVR、TAITEC) を行った (前培養)。
- ③ 前培養液を 10 倍希釈し、マイクロプレートリーダー (infinite M200、TECAN) を用いて OD600 の測定を行った。
- ④ LB/0-6% DOI 含有液体培地、LB/0-6% Glc 含有液体培地、LB/0-12.7% スクロース含有液体培地 1 ml が入った試験管に前培養液を初期 OD600=0.1 になるように添加し、30°C で 120 rpm、24 h 振盪培養を行った。
- ⑤ 培養開始から 24 h 後にマイクロプレートリーダーを用いて OD600 の測定を行った。

《スクロース濃度の計算例》

浸透圧の公式： $\pi = CRT$

C=容量モル濃度、R=気体定数、T=絶対温度

DOI の分子量は 162、スクロースの分子量は 342 である。 π は C に比例するので、DOI 6% 溶液と同じ浸透圧を有するスクロース溶液は、12.7% ($342 \times 6 / 162 = 12.66\dots$) となる。

2.2.4.4 DOI が大腸菌に与える増殖阻害作用の検討

大腸菌の対数増殖期における DOI による増殖阻害の検討 (2.2.4.3) の①～③まで同様の方法で行った。

- ④ LB 液体培地及び LB/0-6% DOI 含有液体培地 1 ml が入った試験管に前培養液を初期 OD600=0.1 になるように添加し、30°C で 120 rpm、48 h 振盪培養を行った。
- ⑤ 培養開始から 48 h まで 12 h 毎に滅菌済みの 1.5 ml チューブに 10 μ l、無菌の 1.5 ml チューブに 40 μ l のサンプリングを行い、10 μ l の培養液で分光光度計を用いて濁度 OD600 を測定した。
- ⑥ 40 μ l の培養液を OD600=1.0 になるよう調製した後、10⁶ 倍まで 10 倍ずつ希釈を行った。
- ⑦ 細胞懸濁液一種につき LB 固体培地 3 枚に 100 μ l ずつプレーティングし、30°C、15 h 静置培養を行った。
- ⑧ 生育したコロニーを計測し、生菌率を求めた。

2.2.4.5 DOI 耐性及び DOI 感受性関連候補遺伝子のスクリーニングシステムの構築

- ① BW25113 株をフリーズストックから LB 固体培地にミクロスパーテルを用いて植菌し、30°C で一晩、静置培養を行った。
- ② LB 液体培地 1 ml が入った深型 96 穴プレートに前日に植菌したプレートから BW25113 株のシング

ルコロニーを爪楊枝で植菌した後、CO₂透過性シールで蓋をし、30°Cで1,600 rpm、24 h 振盪培養を行った（前培養）。

- ③ 前培養液を10倍希釈し、マイクロプレートリーダーを用いてOD600の測定を行った。
- ④ LB/0-6% DOI含有液体培地1 mlが入った試験管に前培養液を初期OD600=0.1になるように添加し、30°Cで120 rpm、24 h 振盪培養を行った。
- ⑤ 培養開始から24 hまで6 h毎にマイクロプレートリーダーを用いてOD600の測定を行った。

2.2.4.6 Keio collection を利用した DOI 耐性及び DOI 感受性関連候補遺伝子の1次スクリーニング

- ① BW25113 株 (Keio collection の野生株) のフリーズストックからマイクロスパーテルを用いて LB 固体培地に植菌をし、30°Cで一晩、静置培養を行った。
- ② Keio collection のフリーズストックから96ピンプレート (stem) を用いて LB/Km (20 µg/ml) 固体培地に植菌をし、30°Cで一晩、静置培養を行った。
- ③ LB 液体培地1 mlが入った深型96穴プレートに前日に植菌したプレートから BW25113 株及び破壊株を爪楊枝で植菌をした後、CO₂透過性シールで蓋をし、30°Cで1,600 rpm、24 h 振盪培養を行った（前培養）。
- ④ 前培養液を10倍希釈し、マイクロプレートリーダーを用いて濁度 OD600 を測定した。
- ⑤ LB 液体培地又は LB/6% DOI 含有液体培地1 mlが入った試験管に前培養液を初期 OD600=0.1 になるように添加し、30°Cで120 rpm、12 h 振盪培養を行った。
- ⑥ 培養開始から12 h後にマイクロプレートリーダーを用いて濁度 OD600 を測定した。LB/DOI 0%培地における野生型株の生育に対し LB/DOI 6%培地での生育が80%以上の生育を示した株を DOI 耐性とし、LB/DOI 0%培地における野生型株の生育に対し LB/DOI 6%培地での生育が20%以下の生育を示した株を DOI 感受性とした。

2.2.4.7 1次スクリーニングで選抜した DOI 耐性及び DOI 感受性関連候補遺伝子欠失株の2次スクリーニング

- ① BW25113 株及び1次スクリーニングで選出した破壊株のフリーズストックからマイクロスパーテルを用いて、BW25113 株は LB 固体培地に、1次スクリーニングで選出した候補株 (10 株) 及び *rffC* とオペロンを形成している遺伝子の欠失株 (11 株) は LB/Km (20 µg/ml) 固体培地に、植菌して30°Cで一晩、静置培養を行った。
- ② LB 液体培地1 mlが入った深型96穴プレートに前日植菌したプレートから BW25113 株及び破壊株を爪楊枝で植菌をした後、CO₂透過性シールで蓋をし、30°Cで1,600 rpm、24 h 振盪培養を行った（前培養）。
- ③ 前培養液を10倍希釈し、分光光度計を用いて濁度 OD600 を測定した。
- ④ LB 液体培地及び LB/6% DOI 含有液体培地1 mlが入った試験管に前培養液を初期 OD600=0.1 になるように添加し、30°Cで120 rpm、24 h 振盪培養を行った。
- ⑤ 培養開始から24 hまで6 h毎に分光光度計を用いて濁度 OD600 を測定した。

2.2.4.8 酸感受性試験培養

酸に対する感受性を調査する大腸菌株を試験管に入れ、前々培養、前培養後、OD₆₀₀=0.1 になるように前培養液を加え、本培養を 30°C の条件下で行った。また、培地の作製には、McIlvaine buffer 緩衝液を利用し、pH=4.5、5.0、5.5、6.0 の培地を作製した。培養開始から 0、24、48 時間にサンプリングを行い、OD₆₀₀ の測定、pH 測定を行った。

2.2.5 培養工学的 DOI 発酵生産

DOI、グルコース、マンニトール、菌体濁度の測定及び定量は、2.2.1.1-2.2.1.3 を参照。

2.2.5.1 DOI の pH 及び温度安定性試験

- ① 1.5 ml チューブに、pH を 3.0、5.0、7.0、9.0 に調整した McIlvaine buffer が溶媒の 2×YT 培地をそれぞれ 210 µl ずつ入れた。
- ② 10% に調製した DOI 溶液を 90 µl ずつ入れ、最終濃度を 3% にした。
- ③ 4、20、35、50°C でそれぞれインキュベートした。
- ④ 経時的にサンプリングをし、DOI 量を定量し、残存率を計算した。

2.2.5.2 フラスコ培養における DOI 生産培養方法

- ① 試験管に RMM 培地 3 ml を入れ、抗生物質として Amp (最終濃度 100 µg/ml)、Zeo (最終濃度 20 µg/ml)、Km (最終濃度 20 µg/ml)、Spm (最終濃度 20 µg/ml) を添加した。
- ② グリセロールストックからミクロスパーテル 1 さじ分植菌した。
- ③ 30°C、200 rpm/min で 20 h 振とう培養し、この培養液を前培養液とした。
- ④ 500 ml バッフルフラスコに 3% Glc、4% Man を含む 2×YT 培地 50 ml を入れ、1 N HCl または 1 N NaOH で pH を調整した。
- ⑤ 抗生物質として Amp (最終濃度 100 µg/ml) を添加した。
- ⑥ 前培養液を初期 OD₆₀₀=0.1 になるように植菌し、各温度、120 rpm で培養した。経時的にサンプリングを行い、pH を調整後、菌体濁度、DOI 生産量及び糖濃度の経時的变化を測定した。

2.2.5.3 ジャーファーマンター培養における DOI 生産培養方法 (回分培養)

- ① 200 ml バッフルフラスコに各生育炭素源を添加した RM 培地 40 ml を入れ、抗生物質として Amp (最終濃度 100 µg/ml)、Zeo (最終濃度 20 µg/ml)、Km (最終濃度 20 µg/ml)、Spm (最終濃度 20 µg/ml) を添加した。
- ② グリセロールストックからミクロスパーテル 2 さじ分植菌した。
- ③ 30°C、130 rpm で OD₆₀₀=3~3.5 になるまで培養し、この培養液を前培養液とした。
- ④ 3 L ジャーファーマンターに 2×YT または HNS 培地を入れ、オートクレーブ滅菌後、Glc、各生育炭素源を添加し、抗生物質として Amp (最終濃度 100 µg/ml)、消泡剤としてアデカノール (最終濃度 130 nl/ml) を添加した。
- ⑤ 前培養液を全量投入し、2 N HCl または 14% NH₃ で pH 調整後、各温度、各攪拌速度で培養した。
- ⑥ 経時的にサンプリングを行い、菌体濁度、DOI 生産量及び糖濃度の経時的变化を測定した。

2.2.5.4 ジャーファーマンター培養における DOI 生産培養方法（流加培養）

前培養液は、2.2.5.3 の①～③と同様である。

- ② 本培養培地（3% Yeast extract、0.2% K_2HPO_4 、0.2% KH_2PO_4 、0.2% $(NH_4)_2SO_4$ 、0.2% $MgSO_4$ 、0.01% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、アンピシリン 100 $\mu g/ml$ ）に前培養液を投入した。
- ③ 流加培地（250 g Glucose, 250 g Glycerol, 30 g Yeast extract, 470 g H_2O ）を 0.3 g/min で流加した。

2.2.5.5 Glycerol の定量方法

Glycerol Assay Kit (Megazyme) の手順に従い、測定した。

- ① サンプルを DW で 100 倍に希釈した。
- ② 96 穴マイクロプレートに、DW 200 μl 、サンプル 10 μl 、NADH/ATP/PEP buffer 20 μl 、PK/L-LDH 2 μl を入れ、マイクロプレートミキサーで懸濁した。
- ③ 室温で 4 min 静置した。
- ④ GK 2 μl を加え、マイクロプレートミキサーで懸濁した。
- ⑤ 室温で 6 min 静置した。
- ⑥ プレートリーダーを用いて吸光度 340 nm で測定した。

2.2.5.6 Fructose の定量方法

D-Fructose/D-Glucose Assay Kit (Megazyme) の手順に従い、測定した。

- ① サンプルを DW で 100 倍に希釈した。
- ② 96 穴マイクロプレートに、DW 160 μl 、サンプル 3 μl 、Reagent 1 40 μl を入れ、マイクロプレートミキサーで懸濁した。
- ③ 室温で 3 min 静置した。
- ④ Reagent 2 20 μl を加え、マイクロプレートミキサーで懸濁した。
- ⑤ 室温で 5 min 静置した。
- ⑥ Reagent 3 20 μl を加え、マイクロプレートミキサーで懸濁した。
- ⑦ 室温で 10 min 静置した。
- ⑧ プレートリーダーを用いて吸光度 340 nm で測定した。

2.2.5.7 Xylose の定量方法

D-Xylose Assay Kit (Megazyme) の手順に従い、測定した。

- ① サンプルを DW で 100 倍に希釈した。
- ② 96 穴マイクロプレートに、DW 200 μl 、サンプル 10 μl 、Buffer 40 μl 、 NAD^+ /ATP 40 μl 、Hexokinase 2 μl を入れ、マイクロプレートミキサーで懸濁した。
- ③ 室温で 4 min 静置した。
- ④ XDH/XMR 5 μl を加え、マイクロプレートミキサーで懸濁した。
- ⑤ 室温で 6 min 静置した。
- ⑥ プレートリーダーを用いて吸光度 340 nm で測定した。

3. 結果と考察

3.1 環境低負荷型糖生産システムの開発 (オールバイオプロセス)

3.1.1 マイタケ菌のゲノム解析と遺伝子組換え系の確立

3.1.1.1 マイタケ菌ドラフトゲノムデータベースの構築

マイタケ菌の菌株改良および高度利用に向けた研究基盤整備の一環として、マイタケ全ゲノム配列の解読を行った。マイタケ菌の全ゲノム配列解読は、研究協力機関の(株)雪国まいたけにおいて先行解析が実施され、同社保有のドラフトゲノムデータベースに対して本研究により得られたゲノム解読データを統合する形でデータ処理を行った結果、すでに得られていたものと同様の結果となり、最高精度のドラフトゲノムデータであり、本データベースは一般的な高精度担子菌ゲノムデータベースと同等の情報量を有する高精度データベースであると判断された。今後このデータベースを本研究課題の研究基盤として利用し、各種研究開発を実施することにした。

3.1.1.2 マイタケ用カスタムマイクロアレイチップの開発

項目 3.1.1.1 で構築したマイタケ菌ゲノムデータベースを使用してマイタケ用カスタムマイクロアレイ解析プラットフォームの開発を行った。マイクロアレイチップの開発にあたり、推定遺伝子領域情報の抽出、オリゴヌクレオチドプローブの設計を行い、合計 43,803 個の 60-mer オリゴヌクレオチドプローブを搭載した、プローブ搭載率は 100%のマイクロアレイチップを構築した。

3.1.1.3 マイタケ廃菌床保管処理中における DNA マイクロアレイ解析

3.1.1.3.1 バイオマス前処理効果の確認

実際に保管処理を行った廃菌床を *T. reesei* QM9414 培養上清を用いて糖化実験を行った。糖化率はホロセルロース量からの還元糖生成量で算出した。72 h 糖化した結果、保管前の糖化率は 27.7 %であったが 12 週間保管後には 56.4 %まで改善され、実際に廃菌床保管処理によりバイオマス前処理が行われていることを確認した (図 3.1)。

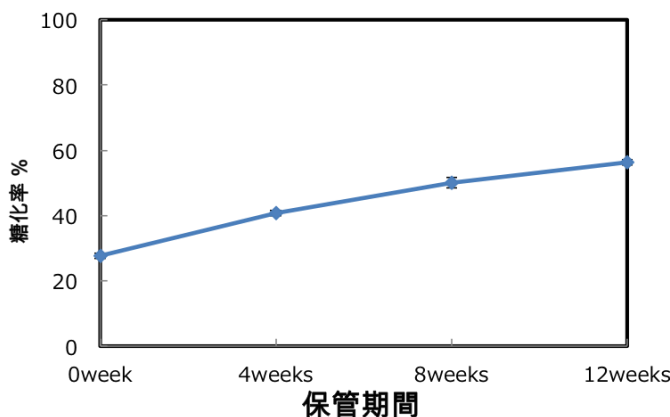


図 3.1 各保管期間における廃菌床糖化率

3.1.1.3.2 廃菌床保管処理中における DNA マイクロアレイ解析

子実体収穫後のマイタケ菌床をすぐに通気弁付きポリプロピレン製バッグに移し、30、60、90 日間保管した。保管処理なし (保管 0 日) は子実体収穫直後に試料を採取し RNA を抽出した。各保管期間に各採取場所 (最外層 : O、中間層 : RC、中心部 : C) の廃菌床から抽出した高純度 RNA サンプルを用い DNA マイクロアレイ解析を行った。得られた全遺伝子発現データについて、異なる保管期間条件間の比較を行うために 75 パーセントイルシフトノーマライゼーション法を用いて正規化を行い、遺伝子発現のデータ分布を box-whisker

plot (箱ひげ図) 解析により検証した。箱の大きさや中央値の大きなずれがないことからデータの分布がほぼ一様であることを確認した(図 3.2)。

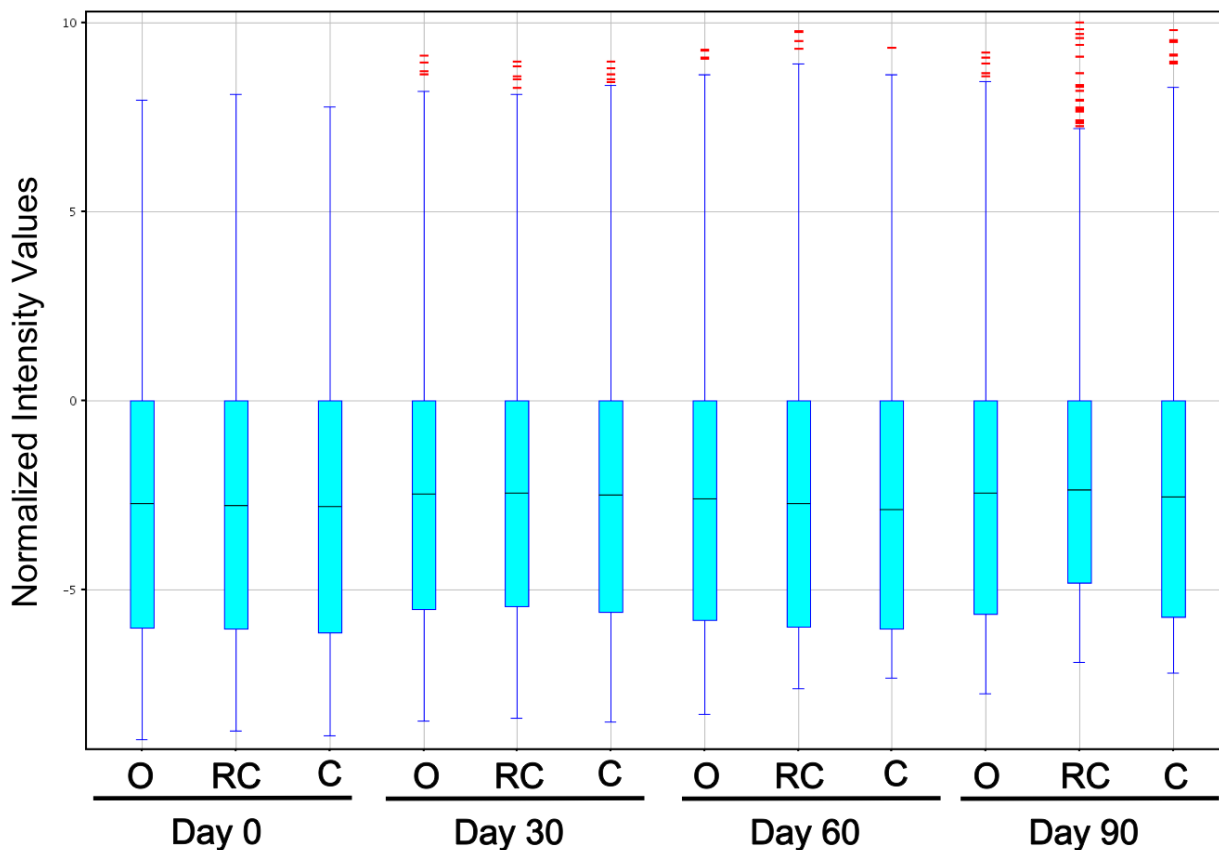


図 3.2 正規化した各マイクロアレイデータの box-whisker plot 解析

約 16000 のマイタケ全遺伝子のうちアレイチップのプロブ設計が困難であった遺伝子、発現が検出されなかった遺伝子を除く 15557 遺伝子の発現挙動を階層クラスタリング解析した (図 3.3)。得られたヒートマップは発現強度が低いものほど青色、発現強度が高いものほど赤色で示されている。遺伝子発現挙動は保管前と保管後においてより大きな差が観察されたが各保管期間のサンプル採取箇所(最外層:O、中間部:RC、中心部:C)において目立った挙動の違いは観察されなかった。そのため保管期間ごとの解析には廃菌床の中心であるサンプル採取場所 C のデータを使用して比較することにした。

サンプル採取場所 C の 0 日保管(0C)と 30 日保管の遺伝子発現挙動で 5 倍以上の発現強度差があったものを抽出したところ 576 遺伝子が抽出された。その遺伝子群の階層クラスタリング結果を図 3.4 に示す。その結果、廃菌床の保管処理中に発現挙動が大きく変化する遺伝子群 Cluster A と Cluster B を見出した。Cluster A には 111 遺伝子が含まれ保管処理中に最も高発現していた。Cluster B は 180 遺伝子から成り、保管 0 日で発現していない遺伝子が保管により高い発現を示していた。これらの Cluster A、B に属し各期間において高発現する上位 10 個の遺伝子の推定機能を表 3.1、3.2 に示した。

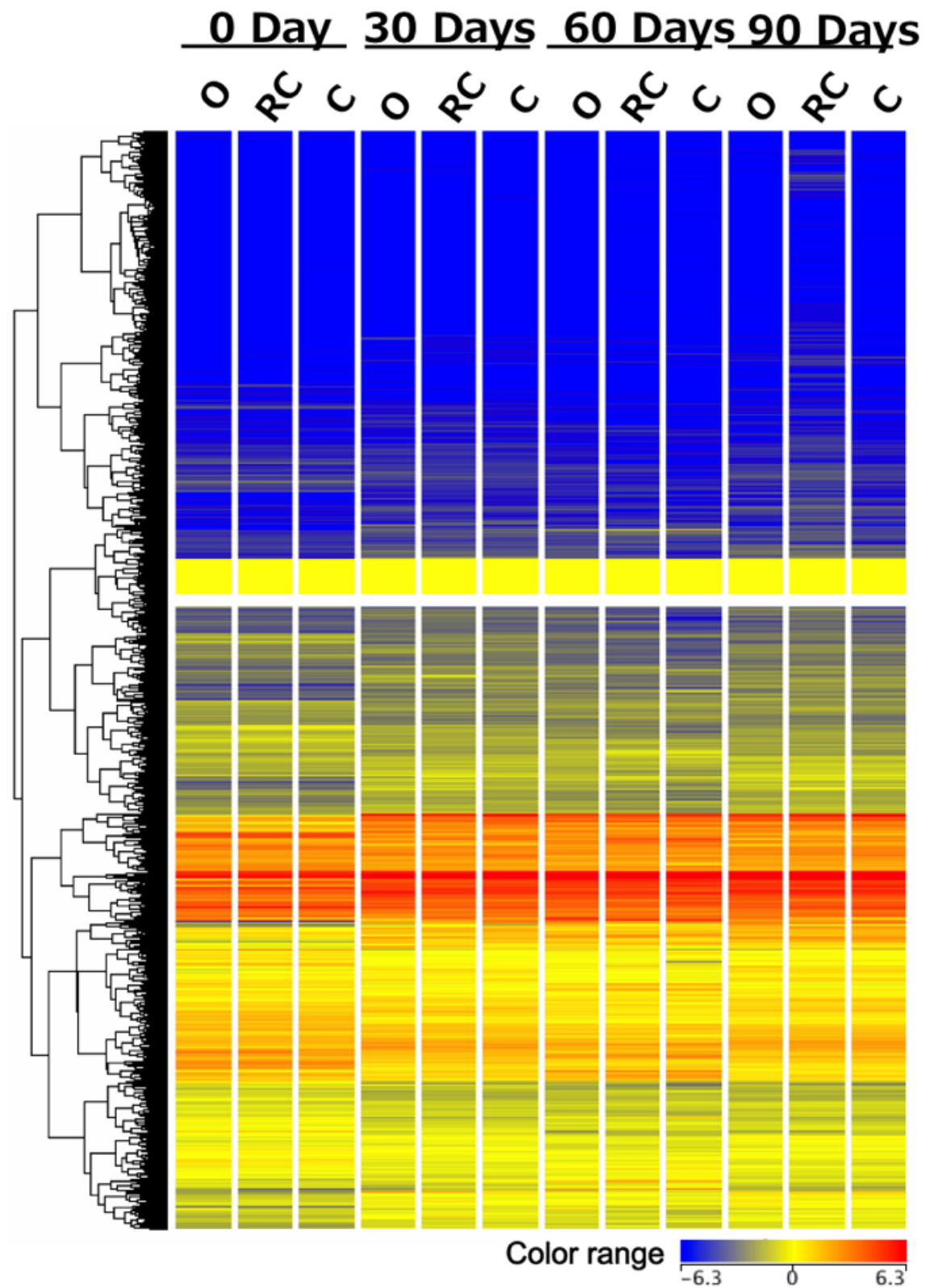


図 3.3 マイクロアレイによる全遺伝子の発現挙動に基づいた階層クラスタリング解析
青→赤になるほど高発現している遺伝子を示す

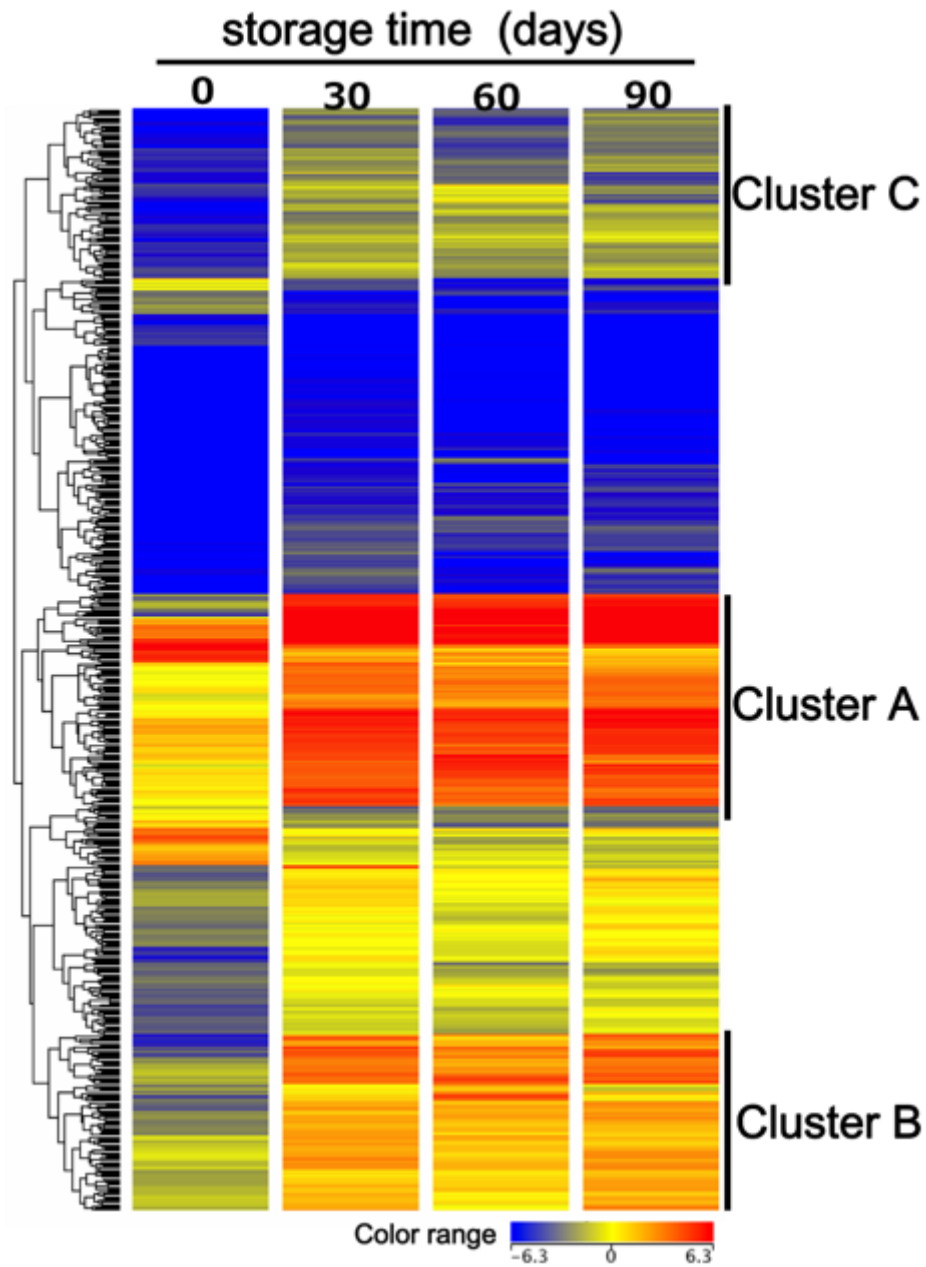


図 3.4 保管前と 30 日保管後の廃菌床中のマイタケ菌で 5 倍以上発現量が異なる遺伝子の階層クラスタリング解析

表 3.1 Cluster A に属し各保管期間で発現量が高い上位 10 遺伝子

Order of Expression Intensity in Cluster A				
storage time (days)				
0				
30				
60				
90				
1	AA9 (formerly GH61)	Lectin	Lectin	Lectin
2	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	nad-dependent formate dehydrogenase	nad-dependent formate dehydrogenase	nad-dependent formate dehydrogenase
3	AA9 (formerly GH61)	FOly LO2 versatile peroxidase	FOly LO2 manganese peroxidase	aspartic peptidase a1
4	nad-dependent formate dehydrogenase	aspartic peptidase a1	FOly LO2 versatile peroxidase	FOly LO2 manganese peroxidase
5	uricase (urate oxidase)	FOly LO2 manganese peroxidase	aspartic peptidase a1	FOly LO2 manganese peroxidase
6	aspartic peptidase a1	aspartic peptidase a1	aspartic peptidase a1	aspartic peptidase a1
7	serine carboxypeptidase	oxalate decarboxylase	CAZy CEI5 4-O-methyl-glucuronoyl methyltransferase	aspartic peptidase a1
8	udp-glucose dehydrogenase	hexose transporter	oxalate decarboxylase	hexose transporter
9	CAZy GH45 beta-1,4-endoglucanase	aspartic peptidase a1	gpr1 family protein	glutathione s-transferase
10	exopolysphatase	d-lactonohydrolase-like protein	hexose transporter	CAZy CEI5 4-O-methyl-glucuronoyl methyltransferase

赤：リグニン分解酵素 緑：ヘミセルロース、ペクチン分解酵素 青：エステラーゼ

表 3.2 Cluster B に属し各保管期間で発現量が高い上位 10 遺伝子

Order of Expression Intensity in Cluster B			
storage time (days)			
30			
60			
90			
1	lipase i	short chain dehydrogenase	FOly LO2 manganese peroxidase
2	CAZy GH29 α-fucosidase	CAZy CE08 pectin methyltransferase	lipase i
3	FOly LO2 manganese peroxidase	lipase i	CAZy GH29 α-fucosidase
4	FOly LO2 manganese peroxidase	FOly LO2 manganese peroxidase	CAZy CE08 pectin methyltransferase
5	CAZy CE08 pectin methyltransferase	CAZy GH10 β-1,4-endoxylanase	FOly LO2 manganese peroxidase
6	CAZy GH27 α-galactosidase	CAZy GH35 β-galactosidase	FOly LO2 manganese peroxidase
7	CAZy GH31 α-xylosidase	CAZy GH29 α-fucosidase	FOly LO2 manganese peroxidase
8	CAZy GH35 β-galactosidase	CAZy GH27 α-galactosidase	CAZy GH31 α-xylosidase
9	CAZy GH10 beta-1,4-endoxylanase	HYP hydrophobin HGFI	CAZy GH10 β-1,4-endoxylanase
10	endonuclease exonuclease phosphatase	CAZy GH31 α-xylosidase	twin-arginine translocation pathway signal

赤：リグニン分解酵素 緑：ヘミセルロース、ペクチン分解酵素 青：エステラーゼ

Cluster B の保管 0 日の遺伝子は発現していなかったので表 3.2 から除外した。表 3.1 に示した Cluster A において保管処理中に共通して高発現している遺伝子には Lectin、nad-dependent formate dehydrogenase (ギ酸デヒドロゲナーゼ) をコードする遺伝子の他にリグニン分解酵素 versatile peroxidase, manganese peroxidase をコードしていた。そのほか、糖質関連酵素(CAZy)の carbohydrate esterase (CE)ファミリーに属する CE15 も 60 日と 90 日において高発現する 10 遺伝子に含まれていた。Cluster B においては lipase 等、脂質分解に関する遺伝子の他、酸化還元酵素、CAZymes、FOLymes が見られた。Cluster B に分類された遺伝子はヘミセスローズ側鎖、ペクチンを分解する酵素がほとんどであった。30 日で高発現していた GH35 (β -galactosidase)、GH31 (α -xylosidase etc..), GH29 (α -fucosidase)、GH27 (α -galactosidase) は保管 60 日では 30-40 % 発現強度が低下し、90 日で再び 30 日と同等またはそれ以上の発現強度を示した。

図 3.4 に示した全 576 遺伝子のうちアノテーション情報が付いていた遺伝子は 194 遺伝子ありその内 FOLy または CAZy のアノテーション情報を持つ遺伝子は 64 遺伝子存在した。解析可能な遺伝子のうち 33% が FOLy または CAZy であったことからこれらに絞った発現挙動解析を行った (図 3.5)。中心部の 0 日保管と 30 日保管を比較し 5 倍量以上発現が変動した FOLy と CAZy をコードする遺伝子の階層クラスタリング結果および 0C と 30C における高発現遺伝子 10 個を表 3.3、3.4 に示す。

表 3.3 保管前 0 日において高発現する CAZyme、FOLyme コード遺伝子
高発現順上位 10 遺伝子 (30 日 < 5 fold)

0 day storage			
Gene ID	Family	Putative activity	
1 773582	CAZy AA9	lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs)	
2 773570	CAZy AA9	lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs)	
3 894661	CAZy GH45	β -1,4-endoglucanase	
4 1538882	CAZy GH18	chitinase	
5 1428313	CAZy GH18	chitinase	
6 1609517	CAZy AA9	lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs)	
7 1418216	CAZy GH115	α -glucuronidase	
8 1306928	CAZy CE15	4-O-methyl-glucuronoyl methylesterase	
9 20212195	FOLy LO3	cellobiose dehydrogenase	
10 1307362	CAZy GH18	chitinase	

表 3.4 保管 30 日において高発現する CAZyme、FOLyme コード遺伝子
高発現順上位 10 遺伝子 (0 日 < 5 fold)

30 day storage			
Gene ID	Family	Putative activity	
1 713293	FOLy LO2	versatile peroxidase	
2 180436	FOLy LO2	manganese peroxidase	
3 1306928	CAZy CE15	4-O-methyl-glucuronoyl methylesterase	
4 24014124	CAZy GH03	β -glucosidase	
5 22012983	CAZy CE16	acetyesterase	
6 1418216	CAZy GH115	α -glucuronidase	
7 20212064	CAZy GH95	α -1,2-L-fucosidase	
8 1035723	CAZy GH28	polygaracturonase	
9 773582	CAZy AA9	lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs)	
10 24314417	CAZy GH03	β -glucosidase	

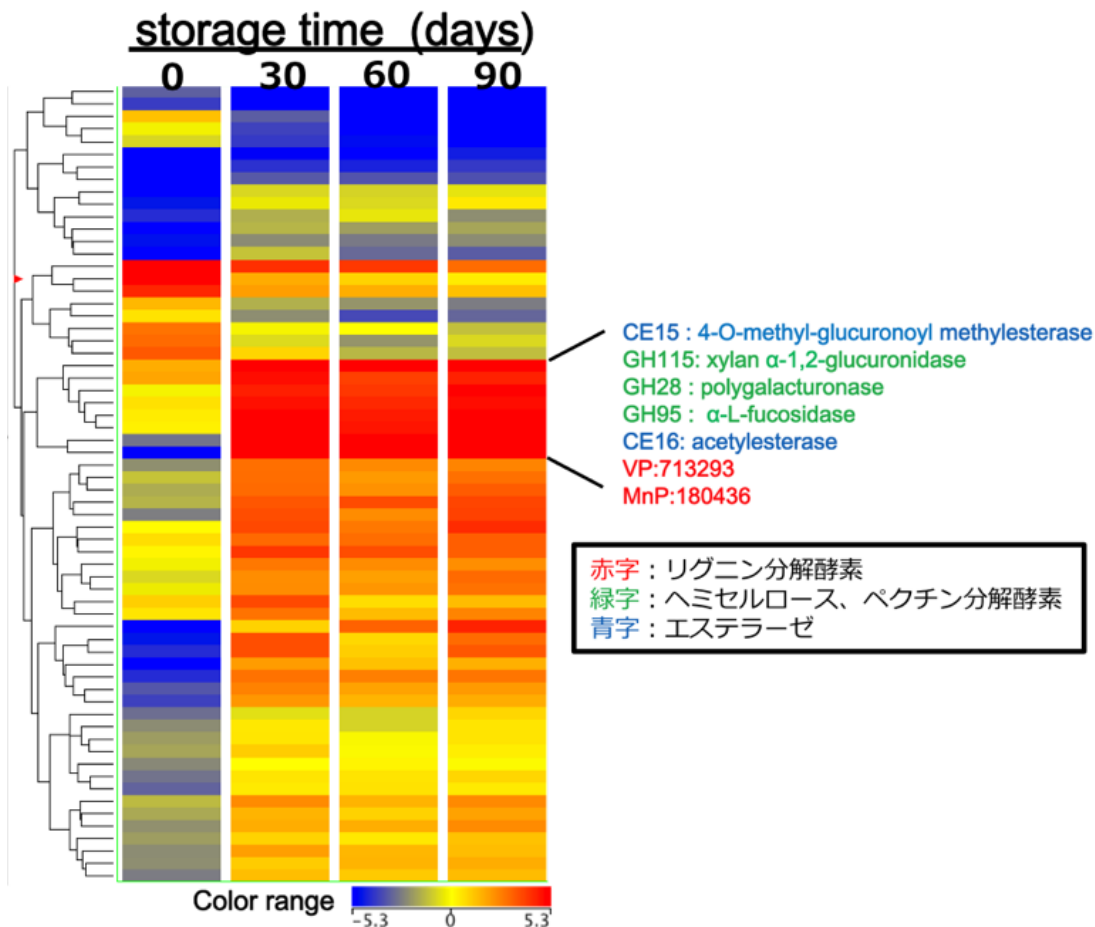


図 3.5 保管前と 30 日保管後の廃菌床中のマイタケ菌で 5 倍以上発現が異なる FOLymes、CAZymes コード遺伝子の階層クラスタリング解析

その結果、保管処理特異的に高発現すると考えられる FOLymes および CAZymes が抽出された。versatile peroxidase および manganese peroxidase をコードする遺伝子は保管処理中常に高発現しており(図 3.5、図 3.6)マイタケの主要リグニン分解酵素であることが示唆された。また、リグニン分解を補助する LDA family に属する酵素の遺伝子もリグニン分解酵素遺伝子同様の発現挙動を示すことが明らかになった(図 3.6)。高発現していた 713293、180436 以外にも複数の MnP の遺伝子発現が確認され、保管期間によって発現挙動が異なっていることが観察された。約半数の FOLymes 遺伝子は保管期間においても転写活性化されておらず、保管処理中のリグニン分解システムでは発現しない酵素の存在が示唆された。

CAZyme について保管処理中に高発現する遺伝子はペクチン分解、ヘミセルロース側鎖分解、リグニンとヘミセルロースのエステル結合を切断する酵素が多く観察された(図 3.7)。 *G. frondosa* は *T. reesei* の主要なセルラーゼである *cbh1* と同じ GH7 に属する酵素の遺伝子を有しているが全ての期間において発現していなかった(図 3.8)。遺伝子発現の観点から、主要なセルラーゼは EG と AA9 とであると考えられ、複数の EG、AA9 どの期間においても強く発現していた。以上より、 *T. reesei* の様な協調的なセルラーゼによるセルロース分解を行っていないことが示唆された。

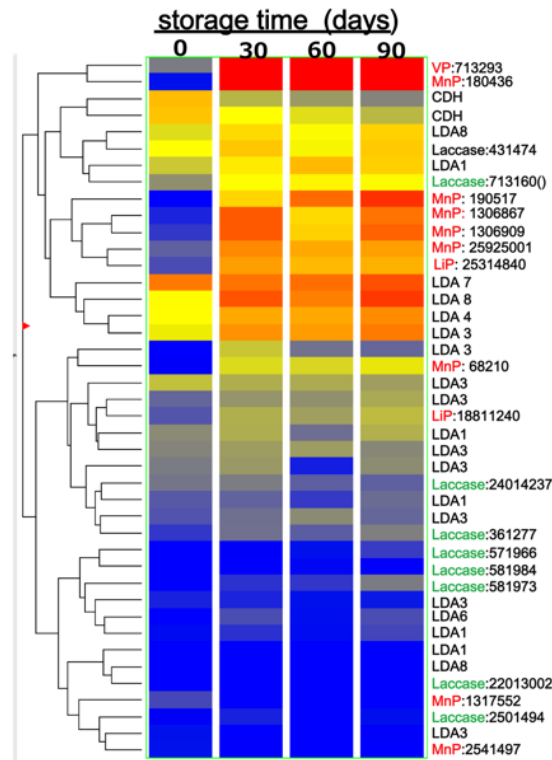


図 3.6 FOLy 遺伝子の発現挙動 (LO1:緑字、LO2:赤字)

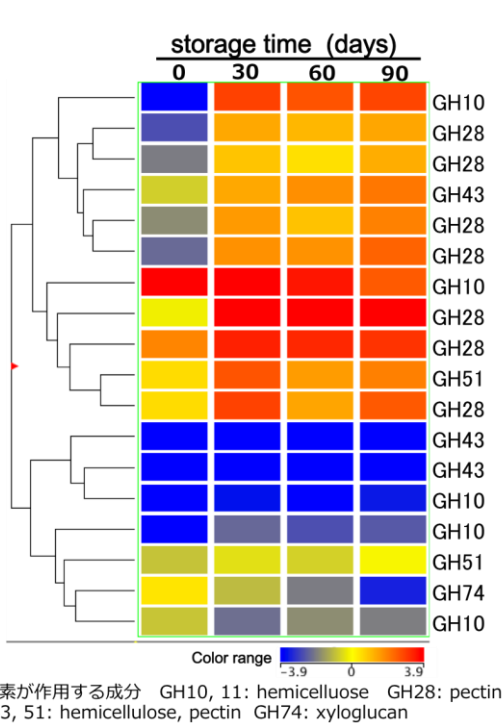


図 3.7 ヘミセルロース、ペクチン分解酵素遺伝子の発現挙動

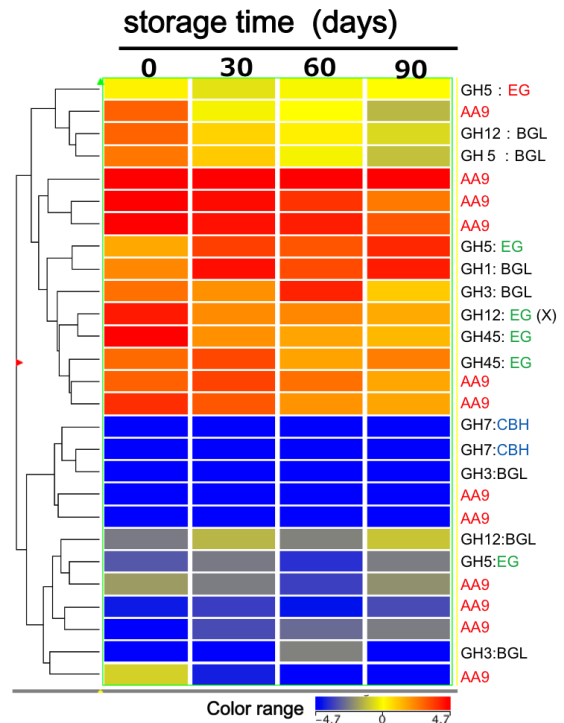


図 3.8 セルラーゼ(CBH、EG、BGL、LMPO(AA9))の遺伝子発現挙動 (X):キシログルカン特異的

DNA マイクロアレイ解析によってバイオマスの生物的前処理効果に関与が疑われるタンパク質遺伝子の発現を解析したところ、FOLymes、CAZymes 遺伝子以外にも多くの遺伝子が特異的に発現していることが明らかとなった。表 3.1 に示した遺伝子で、保管前と比較し最も発現量が変化した Lectin は生理機能に関しての研究が少なく、Lectin が果たす役割は不明である。Lectin はガラクトースに関連する糖を特異的に認識し結合する糖結合タンパク質である。バイオマス分解への関与も考えられるが、倉橋らはマイタケ栽培中において発現しているレクチン遺伝子が原基(子実体の基礎部分)形成を促す芽だし操作によって発現が強く抑制されることを報告し、Lectin が菌糸伸長に関与することを示唆した(6)。本研究は子実体を取り除いた後の菌床を対象としているが、廃菌床からもう一度子実体を形成させることは可能であり、他の研究者からも報告されている(7)。以上のことから、*G. frondosa* は再び子実体を形成させようと菌糸を成長させようとしていることが考えられた。また、保管処理中高発現していた遺伝子として、ギ酸デヒドロゲナーゼと保管前には発現していなかったシュウ酸デカルボキシラーゼの発現挙動が検出された(表 3.1)。担子菌類は培地中にシュウ酸などの有機酸を多量に分泌することが知られている。シュウ酸は MnP によって酸化された Mn^{3+} のキレーターとなり拡散性の低分子酸化剤としてリグニンのフェノール性ユニットを酸化する。また、シュウ酸と Mn^{3+} が反応すると高い還元力を持つギ酸ラジカルを生じ、このギ酸ラジカルが酸素を還元してリグニンを分解しうる反応性の高いスーパーオキシド($O_2 \cdot^-$)を発生させリグニン分解を促進していると考えられている。しかし、*P. chrysosporium* は低濃度のシュウ酸は MnP 活性を促進させるが、高濃度のシュウ酸は MnP 活性を低下させるという報告(8)がされているため、*G. frondosa* はシュウ酸デカルボキシラーゼの働きにより培地中のシュウ酸の濃度をコントロールすることで Mn^{3+} やラジカルの制御を行っている可能性が示唆された。シュウ酸の分解はシュウ酸デカルボキシラーゼとギ酸デヒドロゲナーゼによって二酸化炭素まで分解される。ギ酸デヒドロゲナーゼがギ酸を分解する過程において二酸化炭素を生産するとともに NAD^+ を $NADH$ に還元し電子伝達系に必要なエネルギーを生み出すことから、効率の良いリグニン分解とエネルギー獲得系を有していることが考えられた。表 3.2 で比較的高い発現を示していた lipase i もリグニン分解に関与していることが推察される。MnP は不飽和脂肪酸の存在下で非フェノール性リグニンモデルを分解することが報告されている。リパーゼの活性により遊離脂肪酸が生成され連鎖的に続く脂質酸化で生じるラジカルが MnP によるリグニン分解を補助している可能性がある。LiP 活性を持たない *G. frondosa* は MnP とこれらのラジカル制御系を駆使して高分子リグニンを分解していると考えられる。また、lipase i と同じく Cluster B に分類され保管処理中に発現量が増加する twin-arginine translocation pathway signal をコードする遺伝子にも興味もたれた。twin-arginine translocation pathway (tat 経路)は植物やバクテリアなどで見られる分泌経路で通常の general secretion pathway (sec 経路)とは異なる分泌機構を持つ。sec 経路では細胞膜上にある sec 系分泌装置の細かい穴をタンパク質がほどけた状態で輸送され、細胞外に分泌されてから立体構造を取るのに対して tat 経路は細胞内で立体構造を取ったタンパク質が立体構造を保持したまま細胞外へと輸送される。細菌であるが *Streptomyces ipomoea* の Laccase をコードする遺伝子は tat 分泌シグナルを持っていることが報告されており(9)、*G. frondosa* の複数の MnP および Laccase のシグナル配列に tat シグナル配列特有の連続するアルギニン残基-RR-が存在したため tat シグナル検索システム TatP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>)で検索したがいずれの遺伝子からも tat 分泌シグナルは検出されなかった。リグニン分解酵素と tat 経路の関連は見いだせなかったが発現挙動の観点から廃菌床保管処理中には通常と異なるタンパク分泌経路も働いていることが示唆された。表 3.1 の Cluster A で高発現している複数の菌体外 peptidase が見いださ

れた。木質中のタンパク質だけでなく、自身が生産したタンパク質を分解することで窒素源を再利用し、栄養源確保のための酵素を分泌していることが考えられた。木材は炭素に比べて窒素源が非常に限られているため、窒素源の確保は非常に重要である。

3.1.2 マイタケ菌の前処理能力強化

3.1.2.1 マイタケ リグニン分解能力強化株スクリーニング条件の設定

マイタケ菌の生物的前処理能力の強化を行うために、リグニン分解強化菌株の取得を目的とした変異株スクリーニング条件の決定を行い、高浸透圧培養条件下でのプレート培養および 2, 2'-アゾビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) ニアンモニウム (ABTS) を基質としたプレートアッセイ系を組み合わせることで、リグニン分解能力強化株取得に最適なハイスループットスクリーニング系を構築した。

3.1.2.2 突然変異導入によるマイタケ菌の改良

3.1.2.2.1 紫外線照射を用いたマイタケ菌への突然変異導入系の確立

変異導入実験

においては、いかにして単一の変異導入細胞核に由来する変異体を分離・取得するかが高効率変異導入のポイントとなるため、変異導入細胞の分離法の検討を行った結果、プロトプラスト化が効果的であっ

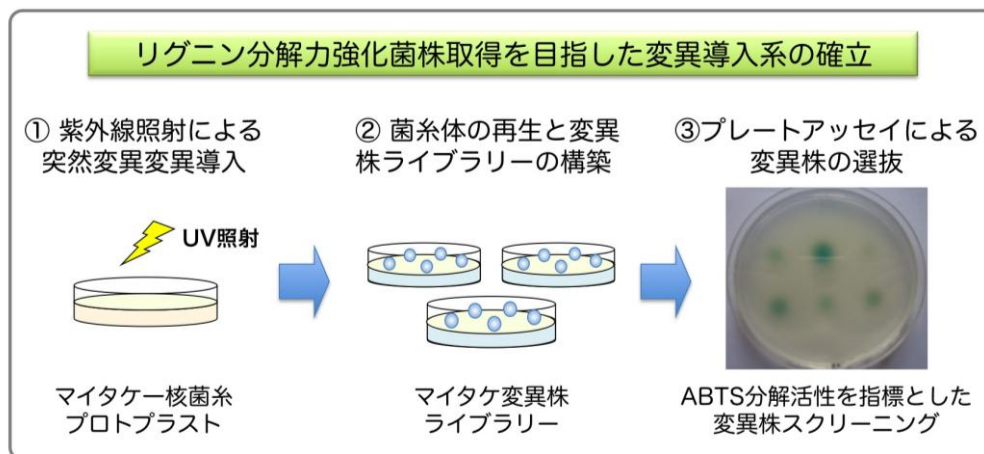


図 3.9 リグニン分解力強化株取得に向けた変異株造成システム

た。次に分離した細胞を対象に紫外線照射条件の最適化を行い、マイタケ変異導入実験系を確立した (図 3.9)

3.1.2.2.2 マイタケ リグニン分解能力強化変異株の取得

マイタケ菌のプロトプラストに対して紫外線を照射し、生物的前処理能力としてのリグニン分解活性を強化された変異株の取得を試みた。変異処理後に生育した株について 2, 2'-アゾビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) ニアンモニウム (ABTS) を基質としたプレートアッセイ系で評価した。その結果、親株 (WT) に対して ABTS の分解によって生じる呈色が強化されたと考えられる株の取得に

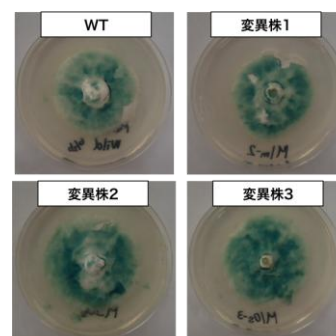


図 3.10 マイタケ菌変異株のプレートアッセイ

成功した (図 3.10)。

3.1.2.2.3 液体培養条件下におけるマイタケ菌の菌体外酵素生産プロファイルの解析

マイタケ菌二核菌糸体および一核菌糸体を様々な培養条件下で培養し、SDS-PAGE 解析に供したところ、二核菌糸体と一核菌糸体間で菌体外タンパク質の生産性および生産パターンに顕著な違いが観察され、特に二核菌糸体が高い菌体外タンパク質生産量を示した (図 3.11)。今後、一核菌糸体を基準株として優良菌株を変異造成した後に二核菌糸の再生を行うことで、さらなるリグニン分解能力の強化を行える可能性が示唆された。

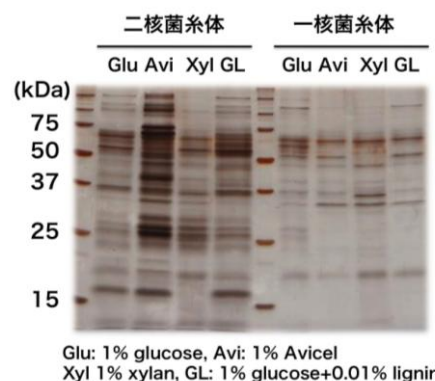


図 3.11 マイタケ菌の細胞核状態と液体培養条件下での菌体外タンパク質生産性

3.1.3 生物的前処理済み廃菌床に最適な糖化酵素開発 (新規ハイブリッド培養プロセス)

3.1.3.1 セルラーゼによる廃菌床糖化系へのリグニン分解酵素添加の影響

T. reesei PC-3-7 株の培養上清を用い、保管処理済み廃菌床の糖化実験を行った (図 3.12)。リグニン分解酵素と *T. reesei* のセルラーゼが相乗的に働くことで糖化率が改善されるかどうかを判断するため、市販のリグニン分解酵素を酵素糖化系へと添加した。その他に、ヘミセルラーゼの添加についてもリグニン分解酵素が糖化に与える効果と比較するために検討を行った (図 3.12)。その結果、セルラーゼのみの control と比較し、Laccase、MnP を添加することで還元糖生成量が増加したため、リグニン分解酵素を *T. reesei* で発現させた際に糖化効率の改善が期待された。ヘミセルラーゼ添加と MnP 添加の効果は同程度であり、リグニンやヘミセルロースが保管後においてもセルラーゼのアクセシビリティを制限していることが示唆された。

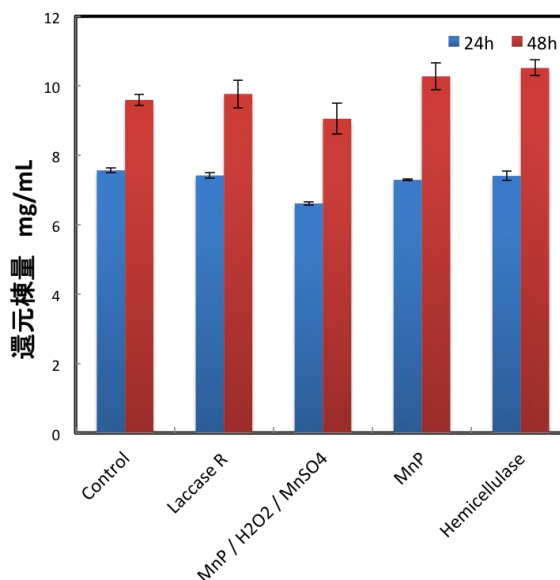


図 3.12 セルラーゼによる廃菌床糖化への酵素添加効果

- Control: *Trichoderma reesei* PC-3-7
- Laccase R: Laccase from *Rhus vernicifera*
- MnP : MnP from *Phanerochaete chrysosporium*
- Hemicellulase: from *Aspergillus niger*

3.1.3.2 廃菌床中に分泌される酵素活性の解析

項目 3.1.1.3 において、廃菌床保管処理中における全遺伝子の発現挙動、特にリグニン分解酵素、糖質加水分解酵素の発現挙動について明らかにした。本項目では、廃菌床保管処理中に分泌されるタンパク質とマイクロアレイの遺伝子発現解析との相関性を評価する為、保管 0、4、8、12 週でサンプリングをして解析した。マイクロアレイ解析と同じサンプリング場所の廃菌床をマロン酸バッファーで抽出し、得られた抽出液のタンパク質量、セルラーゼ活性、リグニン分解酵素活性を解析した。解析は各保管期間 3 つの菌床を用いて行った。保管 12 週目のみ廃菌床の一つにコンタミネーションが発生したため 2 検体での解析を行った。

保管 0 日におけるサンプル採取場所 O、RC、C を比較すると C: 中心部が最も分泌タンパク量が多かった。また、菌床中心部において菌床 1 g あたり *G. frondosa* 分泌タンパクは 1.03 mg (保管 0 週)、0.64 mg (保管 4 週)、0.38 mg (保管 8 週)、0.28 mg (保管 12 週) と減少した(図 3.13)。この減少パターンは各サンプリング部位で同じであった。セルラーゼ活性は可溶性セルロースを基質とした CMCase 活性、キシラナーゼ活性、セロビアーゼ活性の測定を行った(図 3.14)。CMCase およびキシラナーゼ活性は保管 0 日で最も高い活性を示したが保管処理により急激に活性が減少し、タンパク質量と同様に C が最も活性が高く RC、O と外層へとなるにつれ活性が低下した。セロビアーゼ(β -グルコシダーゼ)活性は活性測定の実験時間を長時間反応させたが活性は検出されなかった。リグニン分解酵素は 2,6-DMP を基質として MnP 活性および Laccase 活性を測定した(図 3.15)。

保管 0 週において MnP、Laccase 活性はそれぞれ C において 0.13U/ g-biomass、0.7 U/g-biomass とわずかしこ検出されなかったが保管処理期間中に劇的に活性が上昇した。MnP 活性は保管 4 週に高い活性を示した後、保管 8 週目にはいったん活性が低下、保管 12 週に再び保管 4 週目と同程度もしくはそれ以上の活性を示した。最も活性が高かった場所は C であり、菌床 1 g あたりの活性値は保管 0 週から順に 0.13 U (0 週)、216 U (4 週)、95 U (8 週)、229 U (12 週) であった。Laccase

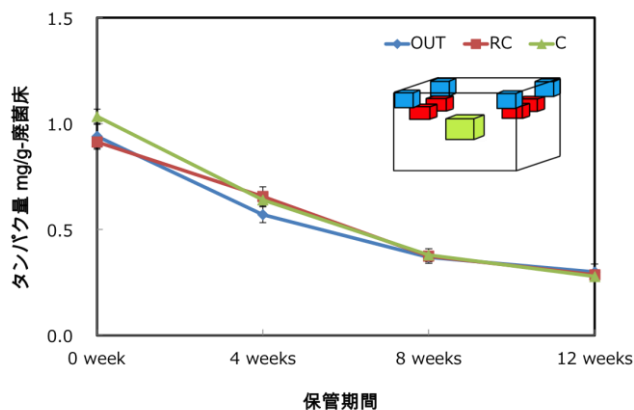


図 3.13 菌床 1g 当たりの分泌タンパク量の経時変化

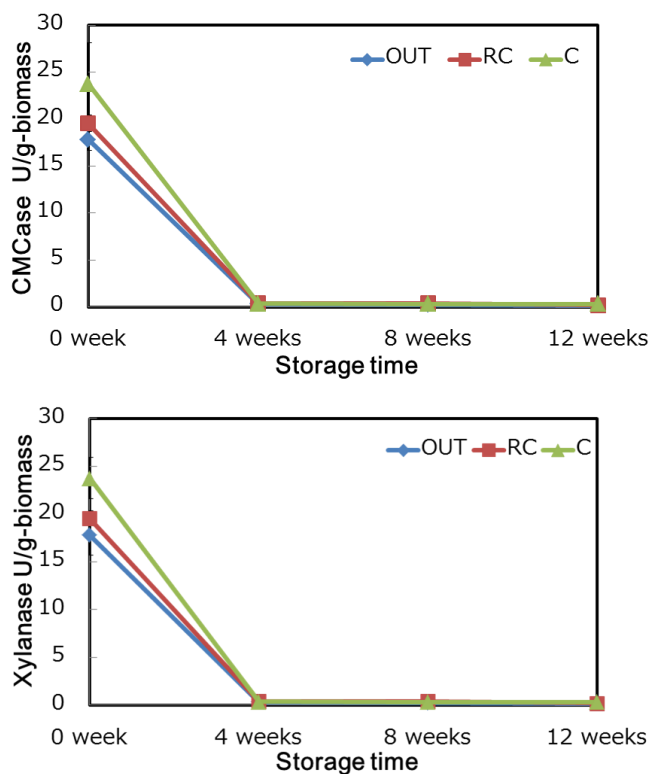


図 3.14 菌床 1g 当たりのセルラーゼ活性
(上)CMCase 活性、(下)Xylanase 活性

に関しても保管0週ではわずかな活性しか検出できなかったが保管処理により4週目に最高の活性が観測され保管期間とともに徐々に活性が減少した。最も活性が高かったのはRCであり活性は(1 gの菌床あたり)0.85 U (0週)、36.2 U (4週)、22.4 U (8週)、14.4 U (12週)であった。また、マイクロアレイ解析ではVP、LiPをコードする遺伝子の発現が確認されていたにも関わらず廃菌床酵素抽出にはLiP活性を検出することができなかった。MnP、VP、LiPは同じClass II ペルオキシダーゼでよく似たアミノ酸配列をしているためアノテーション情報が間違っている可能性が考えられた。そこで、LiPとVPの特徴であり、高い酸化還元電位を持つ基質分解に必要な酵素表面の基質結合部位であるTrp残基と、VPとMnPが持つMn結合サイトを確認することでアノテーション情報が正しいかどうか確認した。VP:713293、LiP: 25314840のアミノ酸配列をBlast検索し、再解析したところ*P. chrysosporium* LiPのW171の様にVP、LiPに共通で保存されている酵素表面のTyr残基を171残基付近に見出すことができなかった。また、Mn結合サイトが存在し、検索にトップヒットした遺伝子がMnPであったため、ゲノムのアノテーション情報の推定機能をMnPに改めた。

酵素抽出液のSDS-PAGEによって廃菌床保管処理中におけるマイタケの酵素分泌パターンを解析した(図3.16)。ゲノムデータから*G. frondosa*のMnPはどのアイソザイムも約40 kDa、Laccase (fio1)は約50-60 kDaの分子量が予想された。LCC31は*G. frondosa*液体培養で最も分泌されている分子量71 kDaのラッカーゼLac1(10)とN末端配列が一致した。図3.1.16AのSDS-PAGEの泳動バンドパターンを見ると保管前と4、8、12週保管処理したものとで大きな違いが見られた。保管処理中を施したサンプルは保管前と比較し、37-50 kD付近に複数の強いバンドがみられ、MnPアイソザイムである可能性が示唆された。また、保管前で観察された25-37 kDaの間のバンドが保管処理中はほとんど観察されなかった。マイクロアレイの解析から糖に吸着する機能を持つタンパク質であるレクチンが発現しており、バイオマスに吸着しているタンパク質の存在が考えられたため、一度酵素を抽出した廃菌床を洗浄し、再び1 M NaClを添加したマロン酸バッファーで抽出した。その結果、保管前には38 kDa付近に薄くみられていたバンドが保管期間においては明確なバンドとして38、26、17 kDa付近に3本確認することができ、26 kDa付近のバンドはNaClを加えない抽出酵素液のSDS-PAGEの泳動図では確認することができなかった(図3.16B)。サンプル採取場所Cにおける1 M NaClで抽出した酵素分泌液のタンパク質濃度の経時変化は保管0週から0、0.27、0.20、0.17 mg/g-biomassと保管4週目から減少する傾向が観察された。NaClを加えて抽出した酵素液は、保管0週のサンプルでわずかなCMCase活性を検出することができたが、セルラーゼ活性、

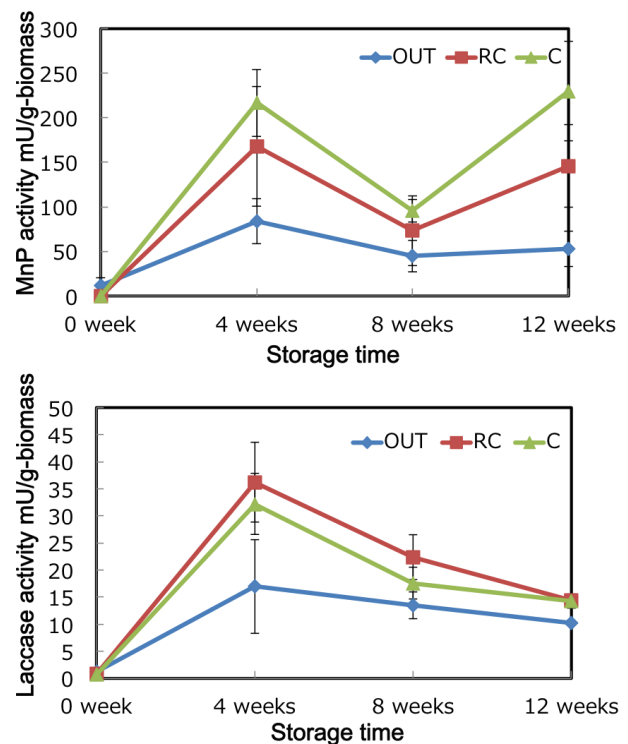


図 3.15 菌床 1 g あたりのリグニン分解酵素活性 (上) MnP 活性、(下) Laccase 活性の経時変化 (共に 2,6-DMP を基質として使用)

リグニン分解酵素活性は検出されなかった。保管4週目の酵素抽出液の Laccase Zymogram の結果から1つのバンドが確認され、少なくとも1つの Laccase を廃菌床内に分泌していることが判明した(図 3.16C)。

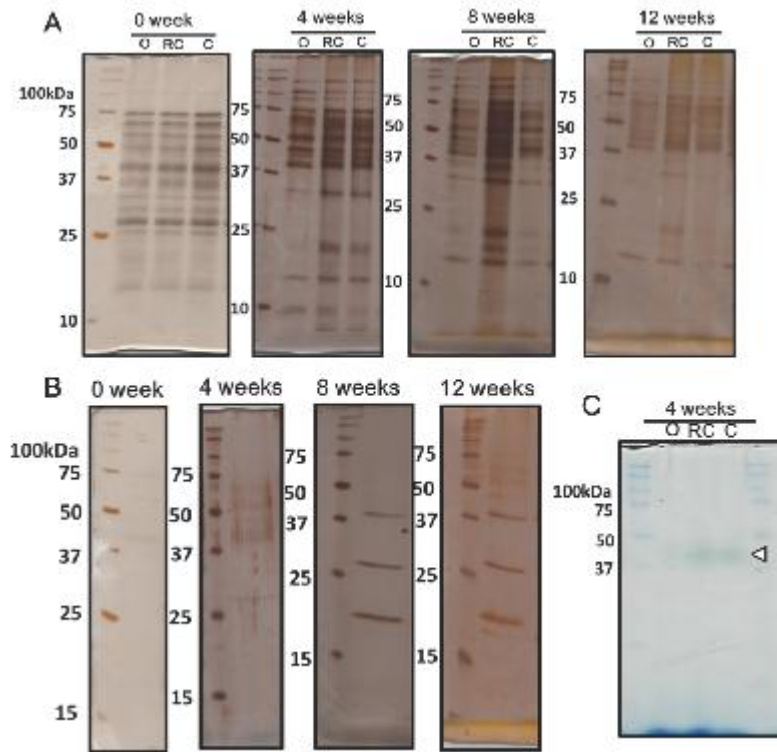


図 3.16 廃菌床酵素抽出液の SDS-PAGE

A:各保管期間の酵素抽出液の SDS-PAGE 銀染色 B: 酵素抽出後の菌床に 1 M NaCl を加えたバッファで抽出した酵素抽出液の SDS-PAGE 銀染色 C: 保管4週目の酵素抽出液の native-PAGE Laccase 活性染色

3.1.3.3 廃菌床保管処理中におけるリグニン分解遺伝子の qRT-PCR 解析
マイクロアレイの解析結果から保管処理中の発現が顕著であったリグニン分解酵素遺伝子を選抜し、各保管期間における発現量を定量して比較するため qRT-PCR 解析を行った。MnP

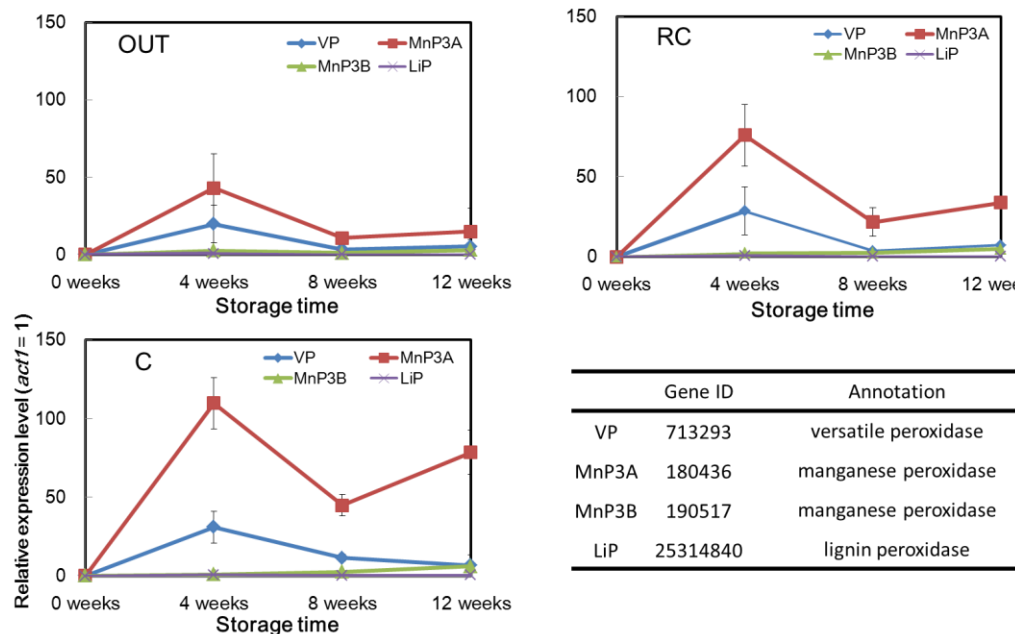


図 3.17 保管処理における MnP 遺伝子の相対転写量の経時変化

遺伝子は

Gene

ID713293

(VP) 、

180436

(Mn3A)、

190517

(Mn3B)、

25314840

(LiP) に

関

して解析

した。その

結果、マイ

クロアレイ

の結果と一致し

て 713293

(VP) 、

180436 (MnP)が保管処理中に著しく高く発現していることが明らかとなった。190517 (Mn3B) は *act1* 比で 0.001-0.02 ほどしか発現していなかったためグラフに載せていない。Mn3B は保管が進むにつれ発現量(*act1*=1)が 0.00487 (0 週)、0.94 (4 週)、2.57 (8 週)、6.01 (12 週)と上昇していった。

LiP は VP、Mn3A と同様の挙動を示したが 4 週目の 0.7(*act1* 比)が最高の転写量であった。サンプル採取場所では C で最も発現量が高く RC、O と続き、遺伝子発現挙動は酵素活性の局在と一致する結果となった。各遺伝子とも発現量が最も高かった C のは保管 4 週目であり、ハウスキーピング遺伝子である *act1* と比較し VP: 31.1 倍、Mn3A: 109.8 倍、Mn3B: 0.94 倍、LiP: 0.7 倍の発現量を示した (図 3.17)。

Laccase に関してはマイクロアレイ解析で発現が確認された 431474 (*fi01*)、713160 (LCC31) に関して qRT PCR 解析を行った(図 3.17)。また、リグニン分解酵素と共にバイオマス糖化へ応用するため(第 3 章)、LDA3 に属する glyoxal oxidase-like protein (GLO)に関しても解析した。Laccase に関しては保管処理中における MnP ほどの発現量は検出されず *act1* 発現量の 1/3 程度であった。Laccase 遺伝子はサンプル採取場所で異なる発現挙動を示した(図 3.18)。*fi01* 遺伝子は O で最も発現しており内層になるにつれて低い発現量であった。それに対して、LCC31 遺伝子は C で最も発現し外層になるにつれて低い発現であった。保管期間中の遺伝子発量の推移に関しても C と RC において MnP と異なる結果を示した。MnP 遺伝子では保管 4 週目に高い発現量を示した後、保管 8 週目に発現低下が観察されたが Laccase では 8 週目においても大きな発現量の低下は観察されなかった。GLO は保管処理前には発現していなかったが保管処理によりある程度の発現量増加がみられ H₂O₂ を LO2 のペルオキシダーゼに供給していることが示唆された。

主なセルラーゼの発現解析 (図 3.8) から *G. frondosa* の主要なセルラーゼは EG と AA9 であることが示唆された。CBH 遺伝子は保管 0 日において発現していないことから、CMCase で検出した活性は主に EG 活性であったと考えられる。なぜなら EG と同じく保管 0 日で発現していた AA9 は酸化的にセルロー

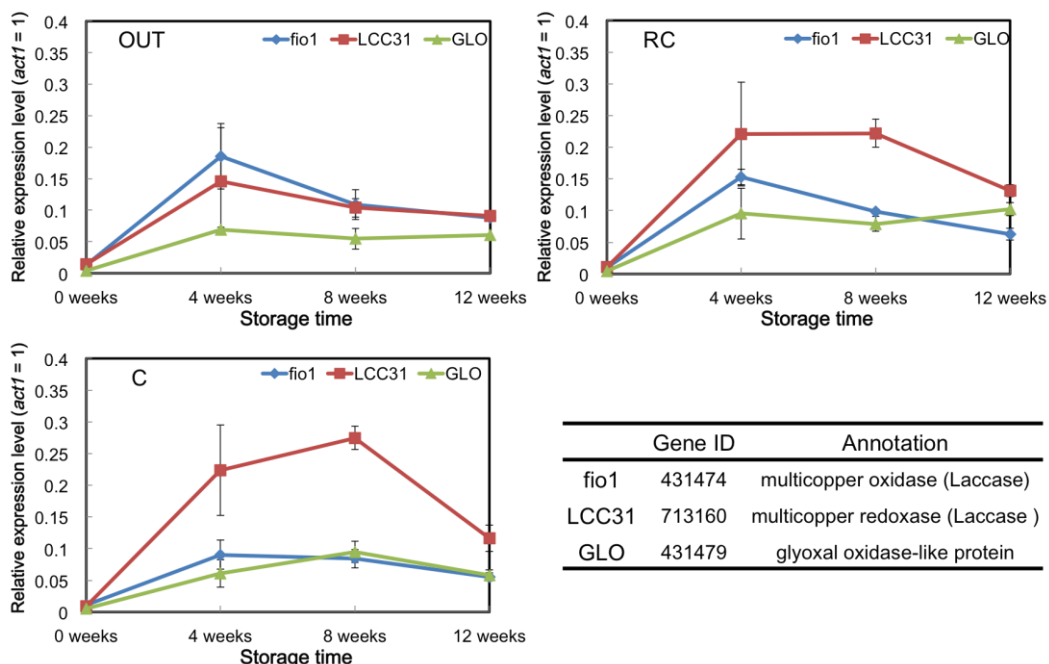


図 3.18 保管処理における Laccase 遺伝子と LDA 遺伝子の相対転写量の経時変化

スを酸化して結晶部位を分解するがセルロースに対する活性をほとんど示さないとされており、効率的な酸化反応には電子供与体が必要と推測されているためである。保管中にも EG、AA9 遺伝子は発現していたが活性が検出できなかったことから保管処理中は AA9 が主に働いていたと思われる。この EG と AA9 の働きにより菌床のセルロースマイクロフィブリルの非晶部分、還元末端を増加させセルラーゼが作用しやすい環境を作り出していると考えられる。AA9 はセルロース結晶領域だけでなくヘミセルロース、特にキシログルカン主鎖を分解する(11) ことが報告されているため *G. frondosa* の木材分解において複数の役割を持っていると思われる。選択的的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis suvermispora* においてセロビオハイドロラーゼ(CBH)活性を持つがエンドグルカナーゼ(EG)活性より低いことが知られている。*G. frondosa* の遺伝子発現解析からも同様の傾向が観察され、CBH と EG による協調的なセルロース分解が行われなためバイオマスとしての廃菌床のセルロース量を大きく減少させなかったことが推測できる。次に、保管処理中にヘミセルロースおよびペクチン分解酵素が高発現していたことも前処理に大きく関与していることが推測される。図 3.1.5 で高発現していた GH115 (α -1,2 glucuronidase)、GH95(α -1,2 fucosidase)はそれぞれグルクロノキシラン側鎖である 4-O-メチルグルクロン酸、キシログルカン側鎖である α -L-fucose を分解する。さらに図 3.1.4 に示した Cluster B に分類された遺伝子の多くがヘミセルロース、ペクチン分解酵素であったことから廃菌床保管処理中 *G. frondosa* はペクチンおよびヘミセルロースを分解して炭素源を獲得していることが考えられた。また、保管処理中 Xylanase 活性が検出できなかったことから保管処理中は Xylan 主鎖の分解はあまり行われていないことも示唆された。ヘミセルロース側鎖、ペクチン分解酵素活性は CMCcase、Xylanase の活性測定法では検出することができない。よって、CMCase、Xylanase 活性が検出できなかったことはヘミセルロースの側鎖を資化している可能性を支持する結果となった。リグニン分解酵素においては 180436 と 713293 の 2 つの MnP が保管処理中、常に高発現していたことからこれらが主要なリグニン分解酵素であることが示唆された。またリグニン分解補助酵素(LDA)も MnP と同様に保管処理中に発現量を増加させた。マイクロアレイ結果から MnP と LDA が協調的に働き効率的なリグニン分解がなされていることが判明した。遺伝子発現解析、酵素解析から保管処理によって、*G. frondosa* リグニン分解システムが働きだしたと考えられるが保管処理中 FOLymes 遺伝子は約半数しか発現していなかった。環境に応じて、複数所有する MnP、Laccase アイソザイムを使い分けていることが示唆された。リグニン分解酵素は廃菌床保管 30 日と 90 日で盛んに発現し、60 日には発現が低下していることが判明した。保管 30 日と 90 日の遺伝子発現挙動の類似性は O、RC、C のどの部位も同様に観察された。また、この挙動はリグニン分解酵素の活性の局在および qRT-PCR で見られた挙動と一致している。このことから、30 日で積極的にリグニン分解を行い、セルロースやヘミセルロースへアクセスする経路を確保したため、60 日においてはリグニン分解酵素生産を低下させたのではないかと考えられる。または、リグニン分解で生じたラジカルを制御するためにリグニン分解酵素の生産を抑制した可能性もある。廃菌床の 3 か所 (O、RC、C) からサンプリングを行った理由は、廃菌床の外層は堅い菌糸が層を形成しており菌床中心部と遺伝子の発現が異なることが予想されたためである。また、菌床の外層(O)と菌床内部(C)では通気性が異なると思われ、反応に酸素を利用するラッカーゼの活性、転写等に関係すると考えたためである。廃菌床抽出酵素液のラッカーゼ活性測定結果では RC が C よりも高い活性を示した。解析の結果、リグニン分解酵素の局在やサンプリング場所で発現が異なる Laccase 遺伝子が存在していた。最も含水率が高いと推定される廃菌床の中心部:C では Laccase 遺伝子の中で LCC31 が最も発現量が高かった。C より外層の RC、O では LCC31 ではなく別の Laccase 遺伝子 fio1 が最も高い発現量を示し

た。液体培養で最も発現する *G. frondosa* の Laccase は LCC31 であり、菌糸周辺の水分量や酸素濃度の環境が Laccase の発現にも関与している可能性が考えられた。

3.1.3.4 マイタケ廃菌床の効果的な糖化法

項目 3.1.2 において保管処理を施したマイタケ廃菌床にはリグニン分解酵素、糖質加水分解酵素が含まれていることが明らかとなった。そこで、廃菌床からの抽出液を用いて廃菌床の糖化処理の前処理（リグニン除去）を行えば効率的に糖化反応を行うことができると考えられた。保管処理済み廃菌床に対して抽出酵素を用いて処理したのち、洗浄してセルラーゼを投入した。その後 48 時間反応させたあとの糖化率を測定した。その結果、廃菌床を抽出して得られた酵素液による前処理だけでは糖化率の大きな改善に至らなかった（図 3.19）。また、洗浄処理だけでも糖化率の向上がもたらされた。以上のことから保管処理を施した廃菌床にはリグニン分解産物が残留しており、*T. reesei* のセルラーゼによる糖化反応を阻害している可能性が考えられた。また、廃菌床に含まれている酵素は（マイタケ菌が生育する上では十分量であるかもしれないが）効率的な糖化を行う上では不十分であることが示唆された。そこで、保管処理済み廃菌床に含まれているリグニンおよびリグニン分解産物を除去するために廃菌床を 0.5 M NaOH で処理して残存リグニンを除去したのち、*T. reesei* のセルラーゼで糖化試験を行った。その結果、酵素濃度 20 mg/g-廃菌床の条件で 72 時間反応させることによって本研究開発の目標値である 80% の糖化率に達することができた(図 3.20)。このことから、マイタケ菌のリグニン分解酵素を強化する、もしくは *T. reesei* においてリグニン分解酵素を大量に生産させるといった手段で効率的な廃菌床の糖化ができると考えられた。

3.1.3.5 *T. reesei* におけるリグニン分解酵素の発現

項目 3.1.3.1 – 3.1.3.3 において、マイタケ廃菌床保管処理における生物的バイオマス前処理の解析を行いリグニン分解酵素が生物的前処理に大きく関与していることが示唆された。また、廃菌床を効率的に透過するためにはさらに強力なリグニン分解活性が必要であることが示された。そこで、生物的バイオ

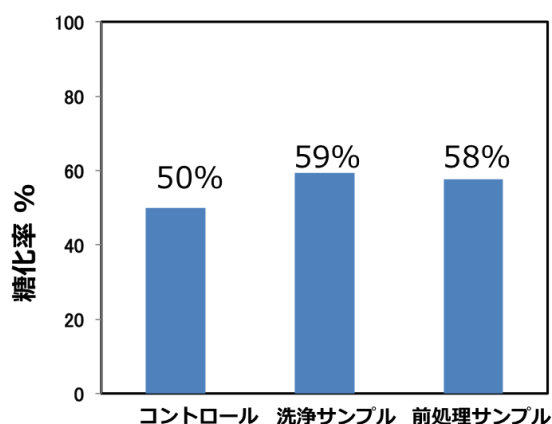


図 3.19 廃菌床抽出酵素液を用いて前処理を行った廃菌床の糖化結果

コントロール：透過処理のみ

洗浄サンプル：前処理時に酵素添加なし

前処理サンプル：廃菌床抽出酵素を用いて前処理

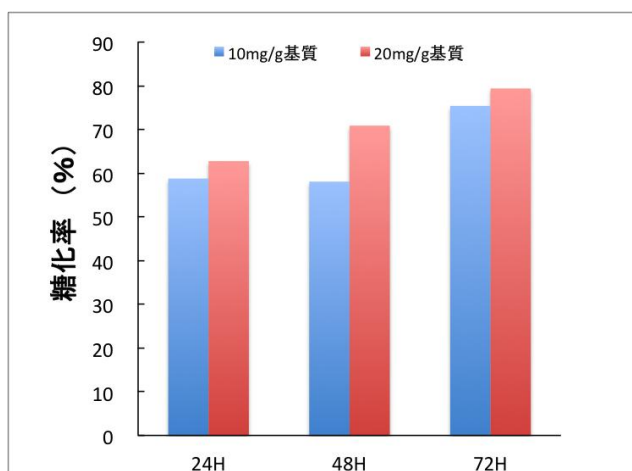


図 3.20 アルカリ処理廃菌床の糖化結果

マス前処理に關与する *G. frondosa* リグニン分解酵素をセルラーゼ高生産菌 *T. reesei* へ組み込み、バイオマス前処理能を付加した菌株の構築を目指した。一般に、リグニン分解酵素の異種宿主発現による大量生産は困難であり、糸状菌を宿主として用いても数百 mg/L の生産しか達成されていない。そのため、発現に対するストレスが比較的少なく抑えられると考えられる *T. reesei* 自身が持つリグニン分解酵素の同種発現も行った。

3.1.3.6 *T. reesei* 形質転換体の構築

プロトプラスト-PEG 法を用いて *T. reesei* QM9414 株の形質転換を行い、アセトアミドを唯一の窒素源とする選択培地で生育可能な多数の形質転換候補株の取得に成功した。候補株は導入した遺伝子が増幅されるプライマーを用いコロニーPCR によって *G. frondosa* 目的遺伝子の挿入を確認した。その結果得られた計 33 株のリグニン分解酵素遺伝子が導入された *T. reesei* QM9414 株 (表 3.5) を実験に用いた。

表 3.5 導入した遺伝子名と取得した形質転換体数

Name:Gene ID	activity	number of transformant
VP:713293	MnP	2
LiP:252314840	MnP	2
VMn:1306909	MnP	8
MnP3B: 190517	MnP	7
LCC31:713160	Laccase	14

3.1.3.7 異種宿主発現株のスクリーニング

多数の形質転換体が得られたためリグニン分解酵素の指示基質を用いてリグニン分解酵素活性付加株のスクリーニングを行った。ペルオキシダーゼ発現株は合成染料であるレマゾールブリリアントブルーR (RBBR) を 0.1%セロビオース含有最小培地に添加し、RBBR を分解によって生じるクリアゾーンの観察を行った。また、ラッカーゼ発現株はラッカーゼ活性を示すとタンニン酸が酸化され褐色を呈するバーベンダム反応によるスクリーニングを試みた。しかし、RBBR 分解では明確なクリアゾーンの形成は見られなかった。バーベンダム反応を用いたスクリーニングにおいても培地の褐色への変化は全く観察されなかった (図 3.21)。プレート上における簡易スクリーニングが行えなかったため、各形質転換候補株を 1%Avicel 培養し、培養上清のリグニン分解酵素活性測定を行った。導入したリグニン分解

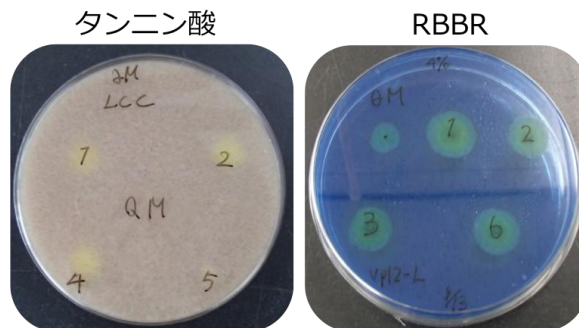


図 3.21 形質転換体の候補株スクリーニング

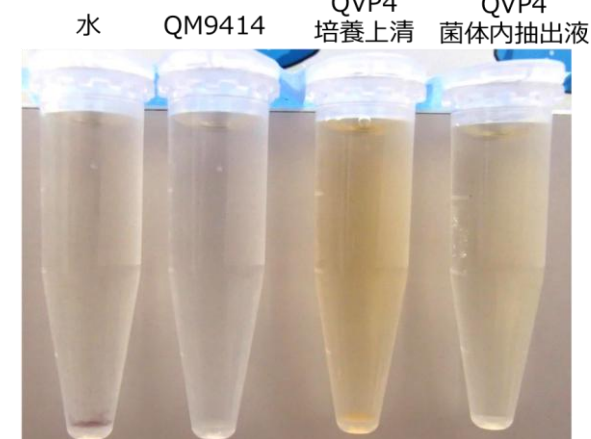


図 3.22 QVP4 の MnP 活性測定 (長時間反応)

酵素遺伝子は *cbh1* プロモーター制御下にあるため *T. reesei* のセルラーゼ誘導基質である Avicel を炭素源として培養し誘導発現させた。その結果、4 種類の MnP 遺伝子を導入した各株（計 19 株）において活性が検出できなかった。しかし、VP を発現させた QVP No.4 株(QVP4)の MnP 活性測定において活性を検出することはできなかったが 3 分間の反応中にわずかに基質の酸化による吸光度増加を示した QVP4 培養上清を活性測定と同じ反応系で数日間反応させたところ弱い呈色を示した。このことから、微弱ながら VP (MnP)を発現していることが示唆された(図 3.22)。

ラッカーゼ発現株について、培養上清を ABTS 含有寒天培地上にスポットし、長時間反応させることで 11 株がラッカーゼ活性を示すことが確認できた (図 3.23)。

そこで、ラッカーゼ活性を定量するため培養上清を 1 mL の反応系で活性測定を行った。反応温度はしばしばリグニン分解酵素の活性測定で用いられる 30℃と、セルラーゼによるバイオマス糖化温度である 50℃において活性測定を行った (図 3.24)。その結果 LCC31 発現株 No.3、No.8 (QLCC3、QLCC8)株が他の株よりも高い活性を示したため解析に用いた。解析した全ての MnP 発現株と Laccase 発現株の酵素活性の有無を表 3.6 および表 3.7 にまとめた。

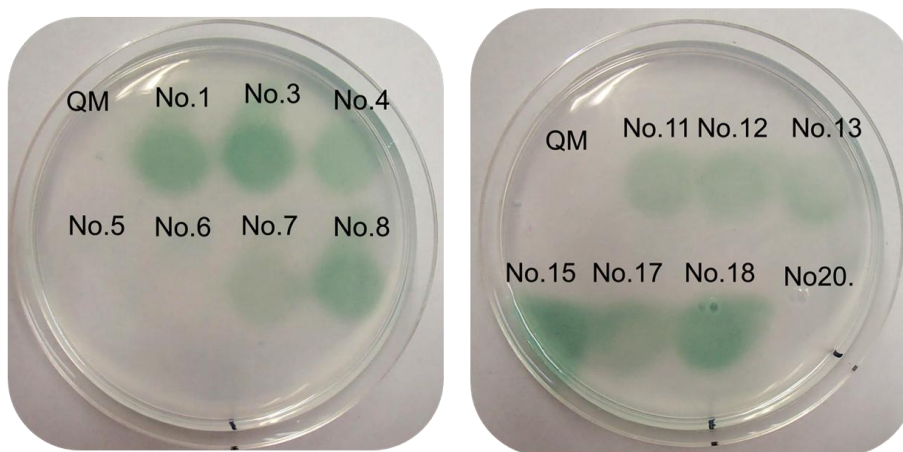


図 3.23 QLCC 培養上清をスポットした ABTS プレート

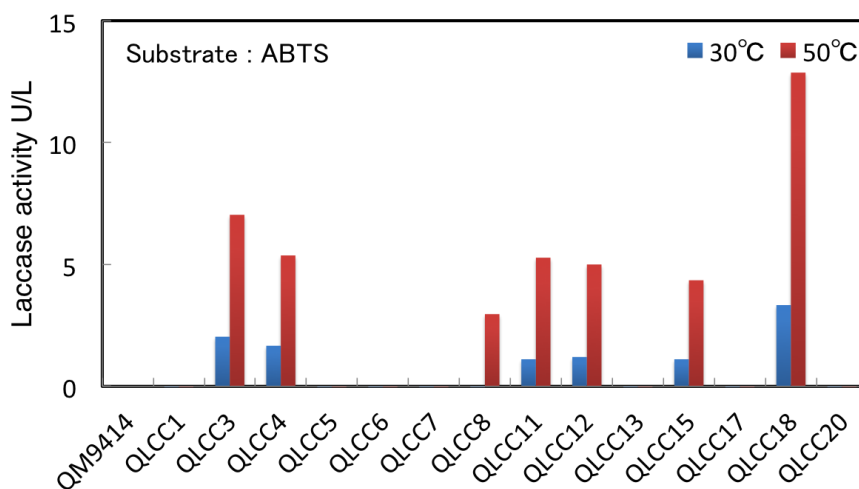


図 3.24 QLCC 株形質転換体のラッカーゼ活性

表 3.6 MnP 形質転換体の MnP 活性、発現状況

introduced <i>G. frondosa</i> Gene ID	Strain	ligninolytic enzyme activity	transcription	heterologous recombination*	southern analysis
VP (MnP): 713293	QVP1	×	○		1 copy
	QVP4	△	○	○	1 copy
LiP (MnP): 25314840	QLiP16	×	○		-
	QLiP17	×	○		-
MnP : 1306909	QVMn1	×	○		-
	QVMn2	×	○		-
	QVMn3	×	○		-
	QVMn4	×	○	○	-
	QVMn5	×	○		-
	QVMn7	×	○		-
	QVMn8	×	○	○	-
	QVMn9	×	○		-
	MnP: 190517	QMnP3B1	×	○	
QMnP3B2		×	○		-
QMnP3B3		×	○		-
QMnP3B4		×	○		-
QMnP3B5		×	○		-
QMnP3B6		×	○		-
QMnP3B7		×	○	○	-

*qRT-PCR 解析における *cbh1* の発現の有無から判断

表 3.7 Laccase 形質転換体の MnP 活性、発現状況

introduced <i>G. frondosa</i> gene ID	Strain	ligninolytic enzyme activity	transcription	heterologous recombination*	southern analysis
Laccase : 713160	QLCC1	○	○		-
	QLCC3	○	○		-
	QLCC4	○	○		-
	QLCC4	○	○		-
	QLCC5	×	○	○	-
	QLCC6	×	○	○	-
	QLCC7	○	○		-
	QLCC8	○	○		-
	QLCC11	○	○		-
	QLCC12	○	○		-
	QLCC13	○	○		-
	QLCC15	○	○		-
	QLCC17	○	○	○	-
	QLCC18	○	○		2 copy
	QLCC20	×	○	○	-

*qRT-PCR 解析における *cbh1* の発現の有無から判断

3.1.3.8 異種リグニン分解酵素遺伝子を形質転換した *T. reesei* 株のサザン解析

MnP 発現株では QVP1 とわずかながら活性が見られた QVP4 株を解析した(図 3.25)。Laccase 発現株では最も高い活性を示した QLCC18 株を解析した(図 3.26)。

QVP 株において Nsi I 消化の際、非相同組み換え株で見られる 3.9 kb のバンドが見られた QV1 は相同組み換え体であり、予想と異なるハイブリダイゼーションパターンであった QVP4 は非相同組み換え体であることが分かった。検出されたバンドの数からそれぞれ、導入遺伝子が 1 コピー導入されていることを確認した。

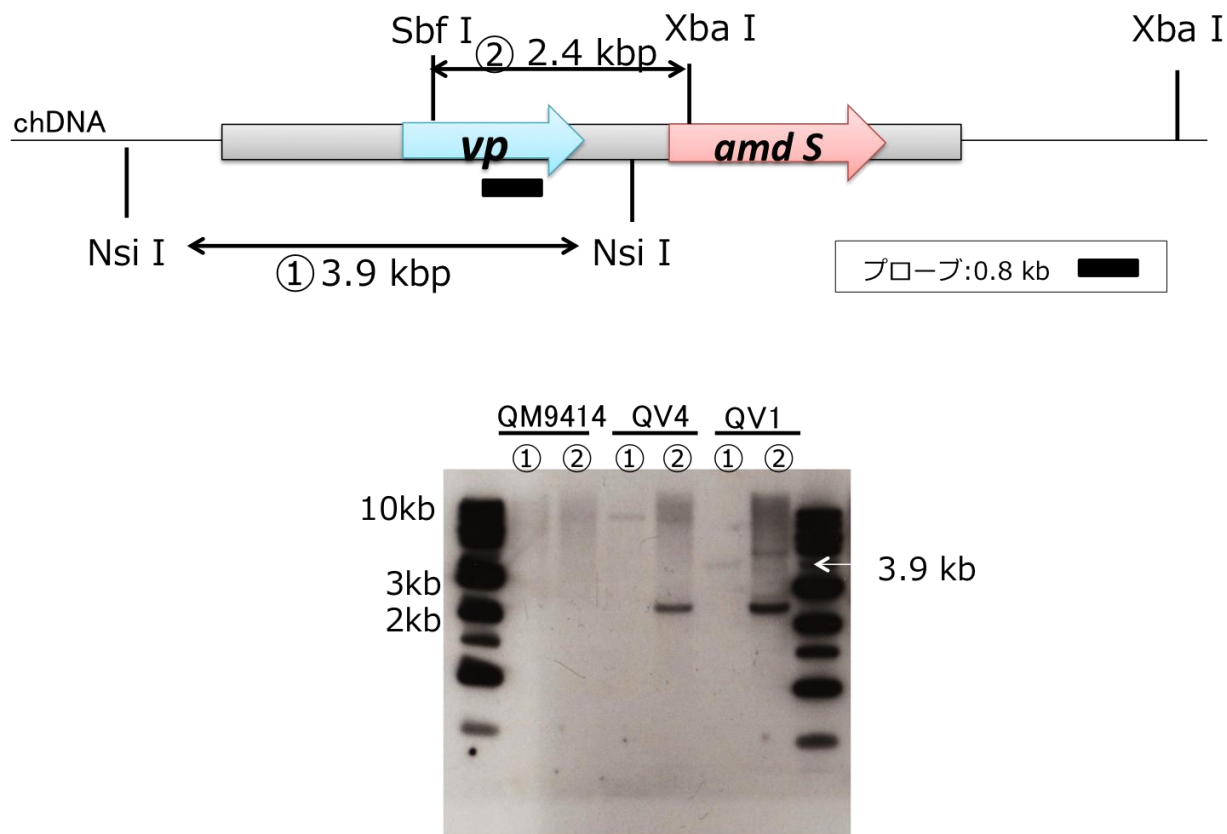


図 3.25 VP が *cbh1* と相同組換えした場合の制限酵素地図 (上) とサザン解析の結果 (下)

Laccase を発現させた QLCC18 は Xmn I で消化した際、相同組み換え体で観察されるはずの 6.8 kb より低い位置にバンドが見られた(図 3.26)。しかし、培養上清の SDS-PAGE では CBH I のバンドを欠失していたことから相同組み換え体であると予想していた。そのため、導入した発現カセットの全長ではなく、上流領域約 1 kb が抜け落ちた状態で遺伝子組み換えが起こったと考えられる。ハイブリダイズしたバンドの数から 2 コピーの導入遺伝子が組み込まれたことを確認した。

以降の培養条件検討など詳細な解析はサザン解析を行った株で行った。

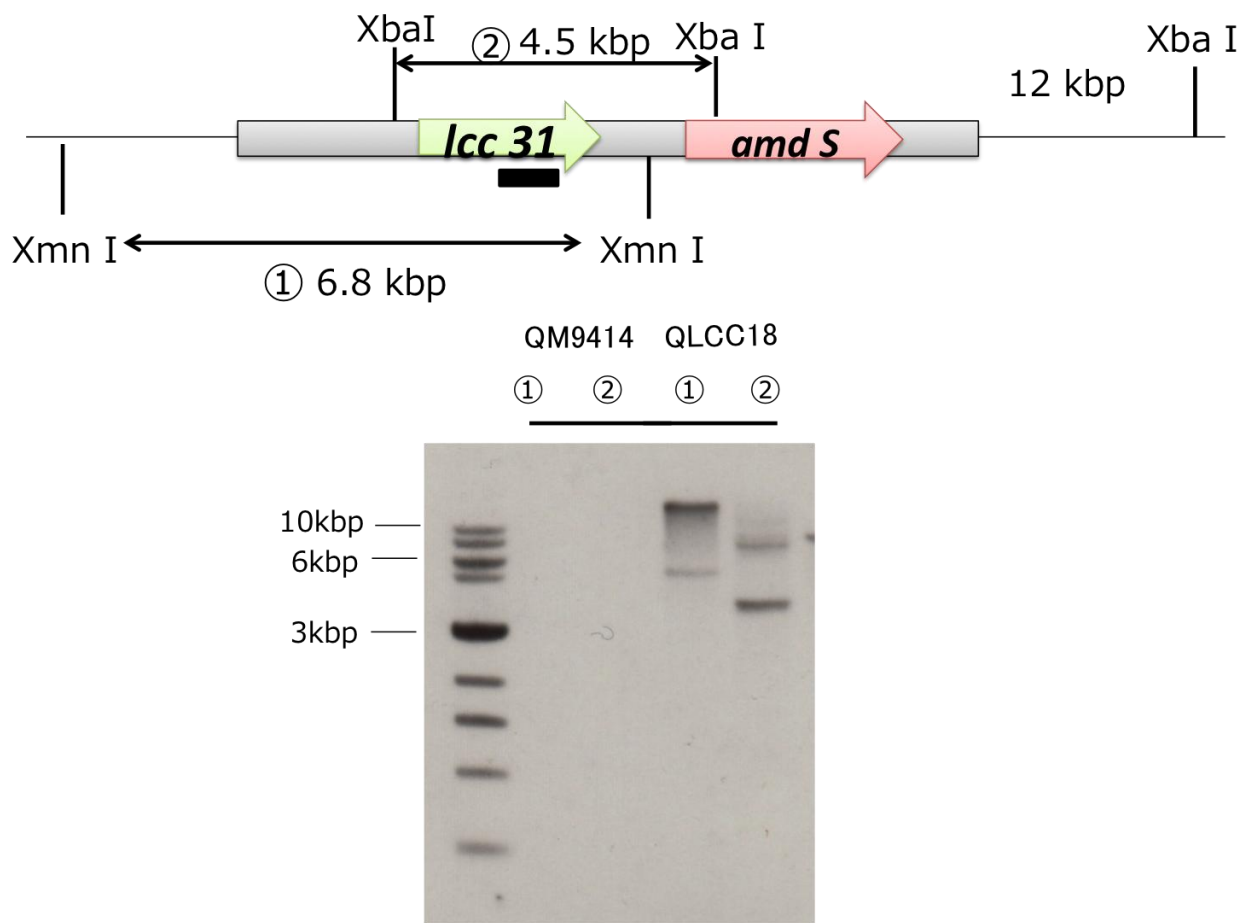


図 3.26 *LCC31* が *cbh1* と相同組換えした場合の制限酵素地図（上）とサザン解析の結果（下）

3.1.3.9 *G. frondosa* リグニン分解酵素発現株の qRT-PCR 解析

QLCC 以外の株は明確な酵素活性を示さなかったため、転写レベルで *G. frondosa* リグニン分解酵素遺伝子が発現しているのかどうか確認した。1% Avicel 培養 3 日目の菌体から RNA を抽出し、導入した *G. frondosa* リグニン分解酵素遺伝子と主要なセルラーゼ遺伝子を対象とした qRT-PCR 解析を行った。その結果、酵素活性が検出できなかった株を含め、全ての形質転換体で転写が確認された(図 3.27)。解析した 33 の発現株のうち *cbh1* の発現を示さなかった株（相同組み換え体）は 25 株、*cbh1*、導入遺伝子両方を発現していた株（非相同組み換え体）は 8 株であった。非相同組み換え体である QVMn4、QVMn8 においては他の QVMn 株よりも導入遺伝子の転写量が低く、*cbh1* の転写も wild 株で見られる発現量よりも低かった(図 3.27D)。QLCC5、QLCC20 株においては導入遺伝子の転写が相同組み換え株と比較し低い値であった(図 3.27F)。

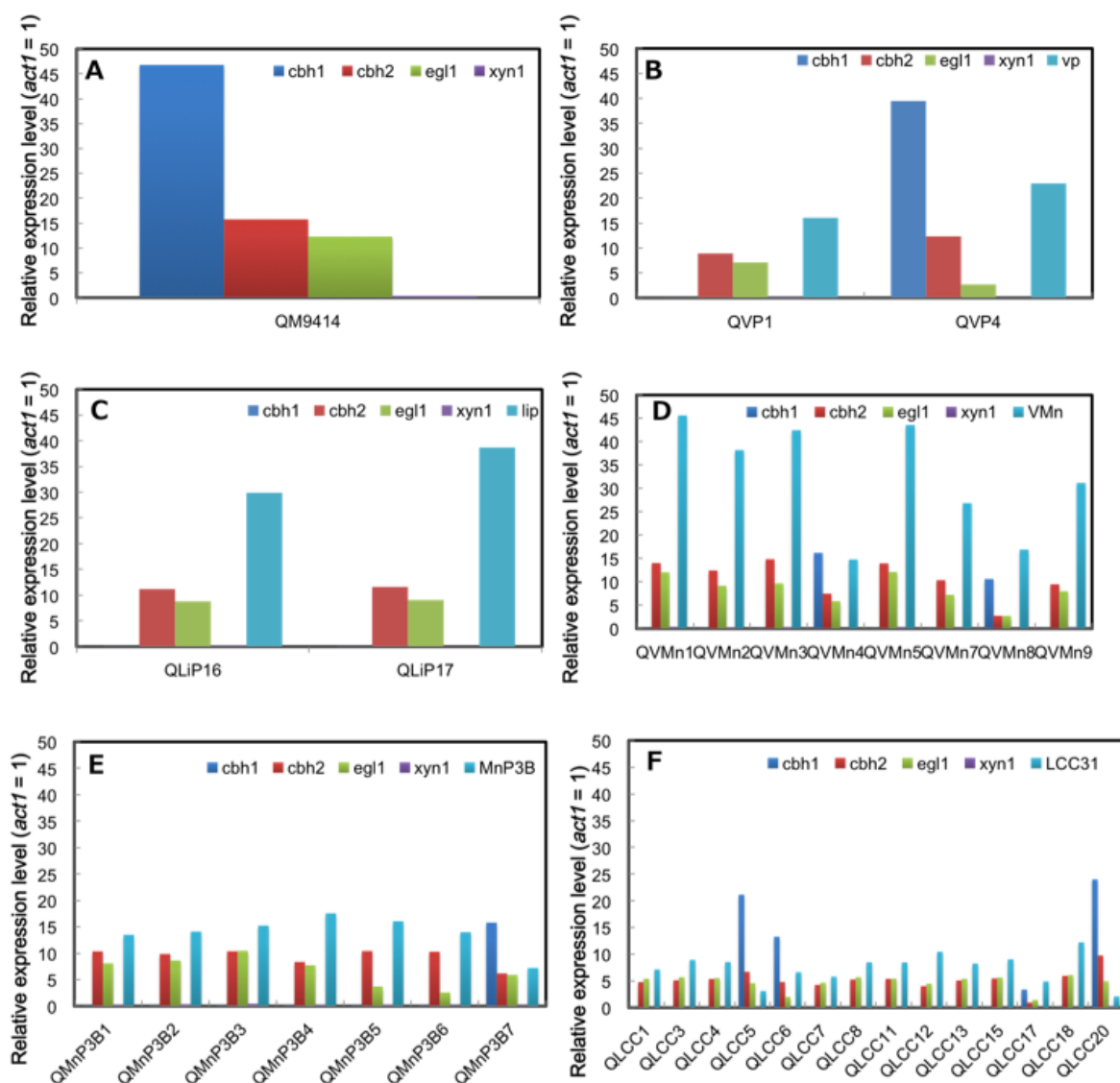


図 3.27 *T. reesei* に導入した *G. frondosa* リグニン分解酵素遺伝子の qRT-PCR 解析結果
 A:QM9414 B:VP 発現株 C:LiP 発現株 D:VMn 発現株 E:MnP3B 発現株 F:LCC 発現株

3.1.3.10 *G. frondosa* リグニン分解酵素発現 *T. reesei* 培養条件の検討

リグニン分解酵素の異種発現ではしばしば LiP、VP、MnP の補因子であるヘムを培地中に添加すると、リグニン分解酵素生産量が上昇することが知られている。本実験においては構造安定化を行う Ca などの関連因子を培地に添加し培養を行った。ラッカーゼに関しては補因子である Cu を培地に添加した。ペルオキダーゼ発現株として、わずかに MnP 活性を示した QVP4 を使用した。ラッカーゼ発現株としては他の発現株と比較し高い活性を示した相同組み換え株 QLCC18 を使用した。非同組み換え株 QVP4 に関して 1% Avicel 培地を基本として FeSO₄、MnSO₄、CaCl₂、ヘモグロビン(豚由来)を別々に添加し 5 日間の培養後、活性測定を行った。活性測定結果は 30°C、50°C において反応させたが 3 分間の測定時間中に活性は検出できなかった。SDS-PAGE においても親株との大きな違いは観察されなかった(図 3.28)。VP が

菌体外に分泌されず、菌体内に蓄積されている可能性を考慮し、菌体内 MnP 活性測定を行ったが培養上清と同様に活性は検出できなかった。

ラッカーゼ発現株 QLCC18 に関して CuSO₄ 添加した Avicel 培地で培養を行った。その培養上清の Laccase 活性測定結果を図 3.29 に示す。0.5 mM CuSO₄ を添加した培地において明らかな活性の上昇が見られた。一般に Laccase は高い温度安定性を示すため、形質転換体が *G. frondosa* 本来の立体構造と同様な Laccase を生産しているか確認するため 70℃にて活性測定を行い、安定した反応が起こっていることを観察した。測定結果は、Cu 添加なしでは 50℃で 21.0 U/L、70℃で 37.4 U/L であったが Cu 添加した培地ではそれぞれの温度で 81.3 U/L、121.2 U/L であった。銅を添加したことにより活性は 50℃で 3.88 倍に上昇した。培地への Cu 添加に関わらず 70℃でも安定した酵素反応を続け、高い活性を示したことから Laccase の構造は不完全な状態ではなく、正しい立体構造で分泌されていることが示唆された。

また、Laccase 活性測定の 1 mL の系に培地と同じ濃度になるよう CuSO₄ を添加したが活性の上昇は確認されなかった(data not shown)。このことから添加した Cu が反応に直接関与していないことが明らかとなった。他の株でも再現性を取るために別の LCC31 発現株である QLCC3 株においても培養を行い、培地に CuSO₄ を添加するとラッカーゼ活性が上昇することを確認した。

なぜ培地への Cu 添加がラ

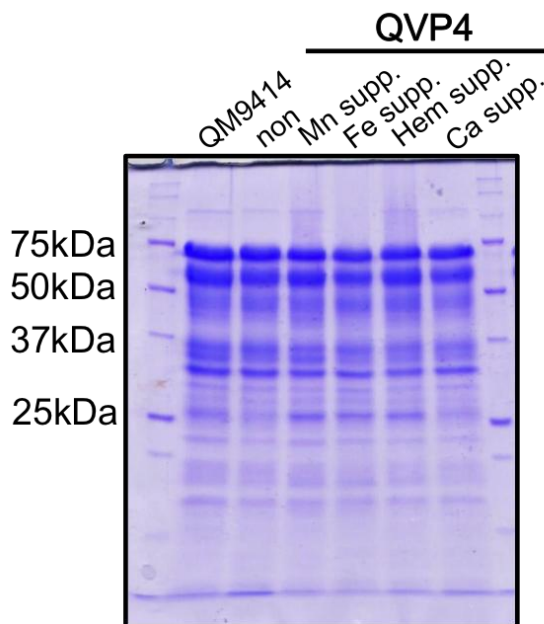


図 3.28 ペルオキシダーゼ関連物質を添加した QVP4 の 1% Avicel 培養上清の SDS-PAGE

non: 1 % Avicel, Mn supp: 1 % Avicel + 0.5 mM MnSO₄, Fe supp: 1 % Avicel + 0.5 mM FeSO₄, Hem supp: 1 % Avicel + 0.05 % Hemoglobin, Ca sup: 1 % Avicel + 0.5 mM CaCl₂

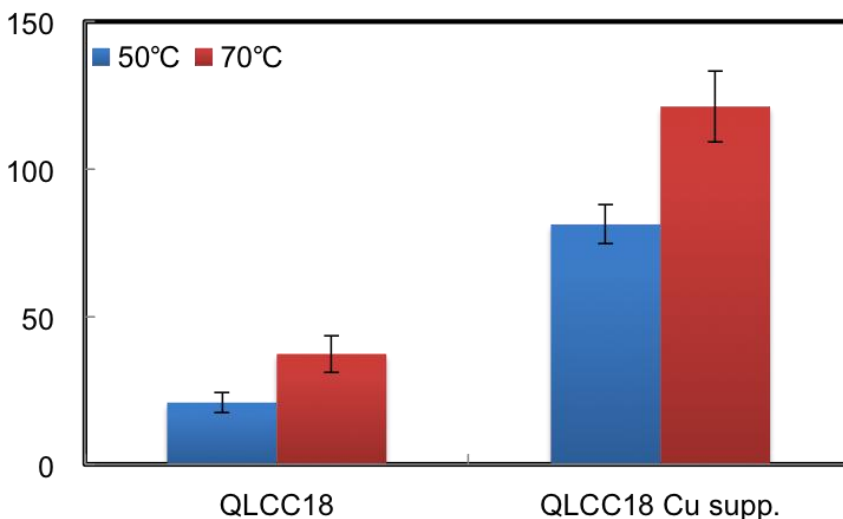


図 3.29 QLCC18 の培養上清ラッカーゼ活性測定
Cu sup.: 0.5 mM CuSO₄ を培地に添加

ッカーゼ生産に影響するのかを明らかにする為、転写段階における影響を qRT-PCR で解析した。親株である QM9414 において 1% Avicel 培地への CuSO_4 を添加した場合、*cbh1* 転写量及び他のセルラーゼ遺伝子 (*cbh1* と *egl1*) の転写量は CuSO_4 を添加していない時と比べて若干低下した(図 3.30)。

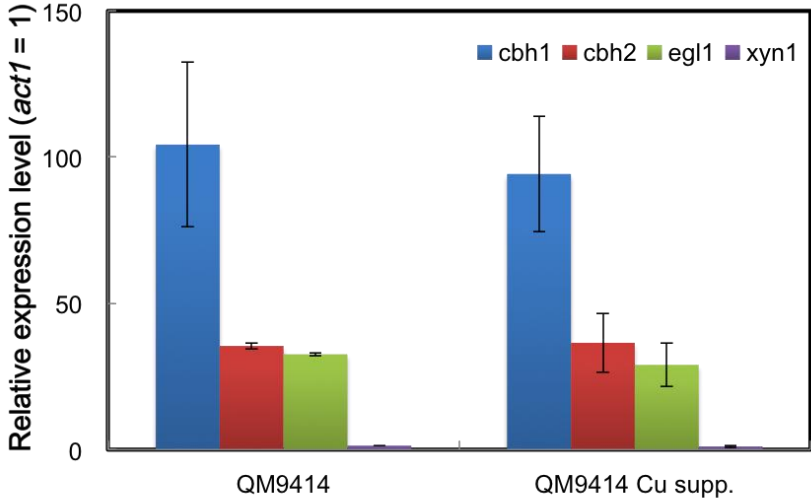


図 3.30 0.5 mM CuSO_4 添加培地におけるセルラーゼ遺伝子の転写量

転写レベルではなく、分泌系などに Cu が何らかの影響を及ぼしている可能性から CMCase、Xylanase の酵素活性測定を行った(図 3.31)。Cu 添加培養では Cu を添加しなかった 1% Avicel 培養と比較し CMCase 活性の低下が観察された。親株で Cu 添加の効果は *cbh1* 転写を活性化しなかったにも関わらず、*cbh1* プロモーター制御下にあるはずの LCC18 株の LCC31 遺伝子の転写量は増加した(図 3.32)。Cu 添加なしの培養では *act1* 比で 12.8 倍の転写量であったが Cu 添加によって 16.8 倍の転写量に増加した。

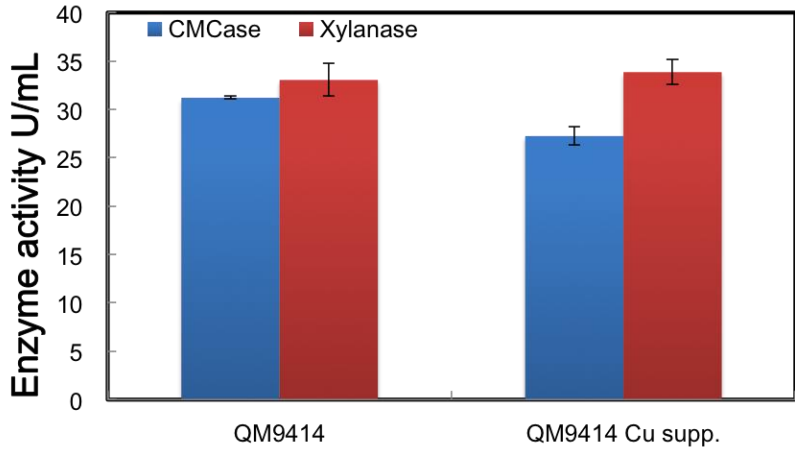


図 3.31 0.5 mM CuSO_4 添加培地におけるセルラーゼ活性への影響
Cu supp. 0.5 mM CuSO_4 を培地に添加

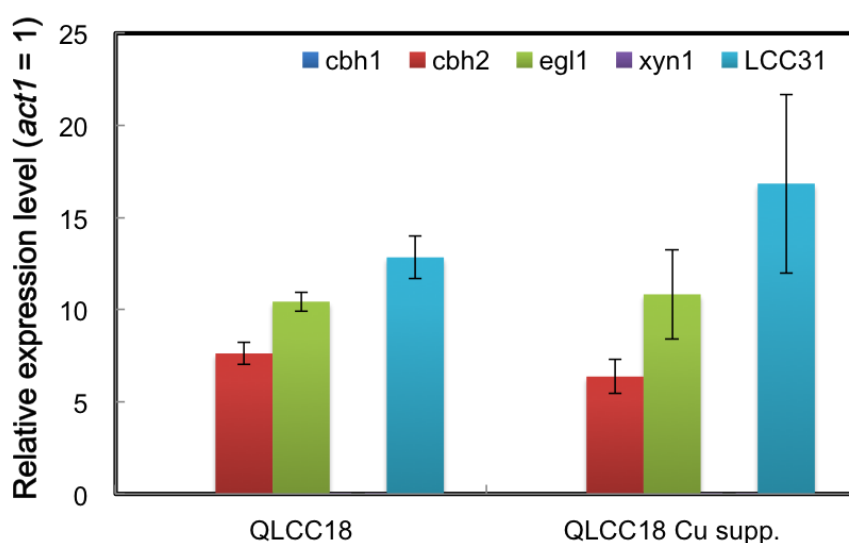


図 3.32 CuSO₄ 添加による QLCC18 株の遺伝子転写への影響
Cu supp. 0.5 mM CuSO₄ を培地に添加

3.1.3.11 *T. reesei* 内在性リグニン分解酵素の同種発現

T. reesei ゲノム中には表 3.8 に示されるリグニン分解遺伝子が存在している。しかし、これらの酵素遺伝子は種々の糖を炭素源とした培養の DNA マイクロアレイ解析結果からセルラーゼ生産条件でもほとんどの遺伝子が発現していないことが判明している(図 3.33)。そこで、*G. frondosa* 由来リグニン分解酵素の異種宿主発現よりもプロテアーゼによる分解や分泌のストレスが比較的低いと予想される同種発現によってリグニン分解能付加株の構築を試みた。表 3.8 で示した *T. reesei* 内在性の FOLy 遺伝子の

表 3.8 *T. reesei* ゲノム中のリグニン分解遺伝子

Gene ID	FOLy family	Annotation	Signal seq
122948	LO1	Candidate laccase	-
54239	LO1	Related to laccase	+
124079	LO1	Related to laccase	+
102820	LO1	Related to laccase	+
121098	LO1	Related to laccase	+
73016	LDA1	Related to aryl-alcohol oxidase	-
70910	LDA1	Related to aryl-alcohol oxidase	+
80764	LDA1	Related to aryl-alcohol oxidase	-
120008	LDA1	Related to aryl-alcohol oxidase	+
124282	LDA3	Candidate copper radical oxidase	+
22915	LDA6	Related to glucose oxidase	+
61066	LDA6	Related to glucose oxidase	+

配列をシグナル配列予測サイト Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を用いて分泌シグナル配列を検索し直したところ Gene ID 121098 (related to laccase) は分泌シグナルではなくアンカー配列であったため同種発現候補から除外した。同様に aryl alcohol oxidase 遺伝子も signal P では分泌シグナルが検出されなかったため発現候補から除外した。2つある LDA6 について 61066 は発現が確認できなかったため、わずかに発現していた 22915 を選抜した。

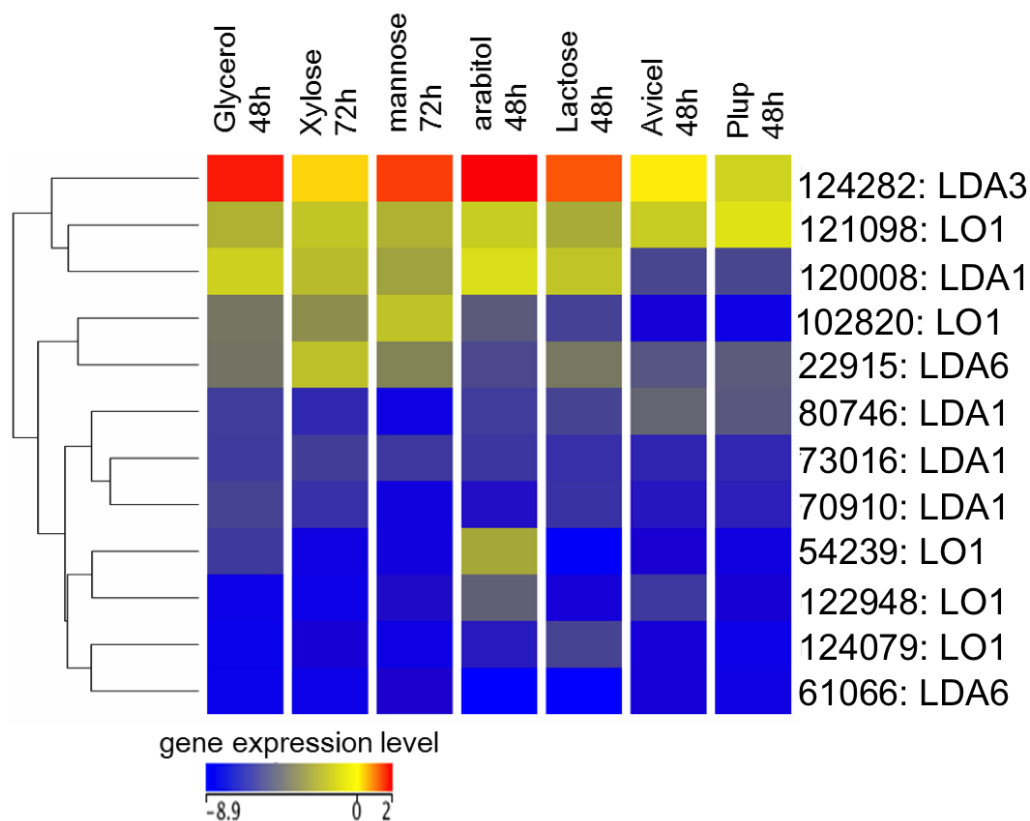


図 3.33 *T. reesei* 内在性 FOLy,mes コード遺伝子の各種炭素源培養におけるマイクロアレイ解析結果

3.1.3.12 FOLy 遺伝子高発現株の構築

G. frondosa 由来リグニン分解酵素異種宿主発現と同様に *T. reesei* でセルラーゼ遺伝子の中で最も強力な誘導性プロモーターである *cbh1* プロモーターを用い *T. reesei* FOLy 遺伝子同種発現用プラスミドを構築した。構築した全てのプラスミドを QM9414 へと導入した。

G. frondosa 異種発現と同様にアセトアミドを唯一の窒素源とする選択培地で生育する複数の株を選抜し、導入遺伝子が増幅されるようにコロニーPCRを行った。その結果 54239 (laccase)、124079 (laccase)、22915 (glucose

oxidase) が組み込まれた株の取得に成功した。102820 (laccase)、124282(glyoxal oxidase)においては形質転換候補株の構築には成功しているが本研究では解析するには至っていない。得られた 54239 (laccase)、

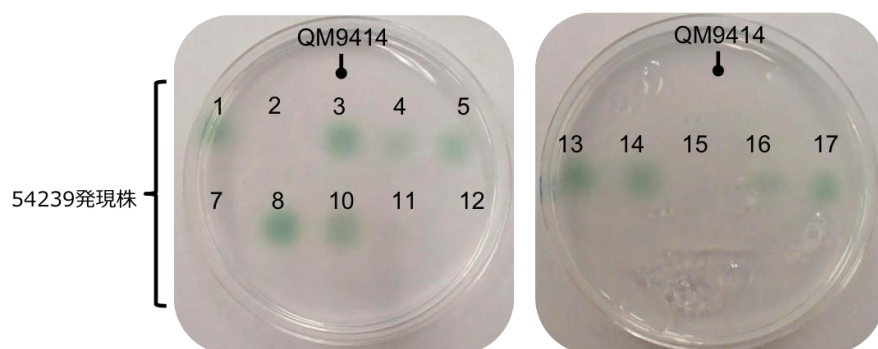


図 3.34 ABTS 含有寒天プレートにおけるラッカーゼ活性確認試験

124079 (laccase)導入株を 1% Avicel を炭素源として培養し、ABTS 含有寒天プレートで長時間反応させ Laccase 活性の確認を行った (図 3.34)。その結果、複数の株で活性が検出された。次に Laccase 活性を定量するため 1 mL 系で活性測定を行った(図 3.35)。その結果、54239-No.8 株で最も高い 35.5 U/L の活性が得られた。この株を Tlac1-8 株と名付け、後の解析に用いた。124079 に関しては液体での活性測定および ABTS 含有寒天プレート上で活性を検出することはできなかった。

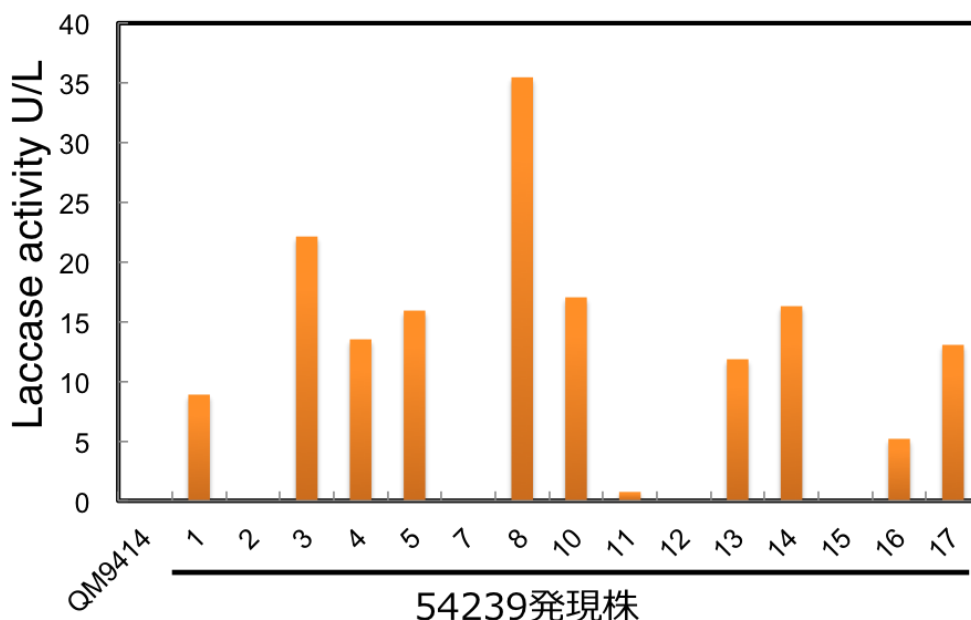


図 3.35 54239 発現株培養上清のラッカーゼ活性

3.1.3.13 *T. reesei* 内在性リグニン分解酵素発現株のサザン解析

Laccase 活性測定で他の発現株と比較し、高い Laccase 活性を示した Tlac1-8 株 (54239 発現 N0.8 株)、Tlac1-3 株 (54239 発現 N0.3 株) をサザン解析した(図 3.36)。

Tlac 株用ハイブリダイゼーションプローブは 54239 遺伝子に相補的であり、Xho I 消化した際、親株の内在性の 54239 遺伝子は 6.6 kb にバンドが見られる。Tlac1-8、1-3 株でこのバンドが確認されたため 54239 と発現カセットの相同組み換えは起こっていなかった。Tlac1-3 株のハイブリダイゼーションパターンは予想していた相同組み換え体のパターンと一致したため 1 コピー相同組み換え体であることが明らかになった。Tlac 1-8 株は *cbh1* 相同組み換えのハイブリダイゼーションパターンと一致しなかったため、非相同組み換え体であることが示唆された。ハイブリダイズしたバンドの数から 2 コピーの遺伝子が導入されていることが分かった。

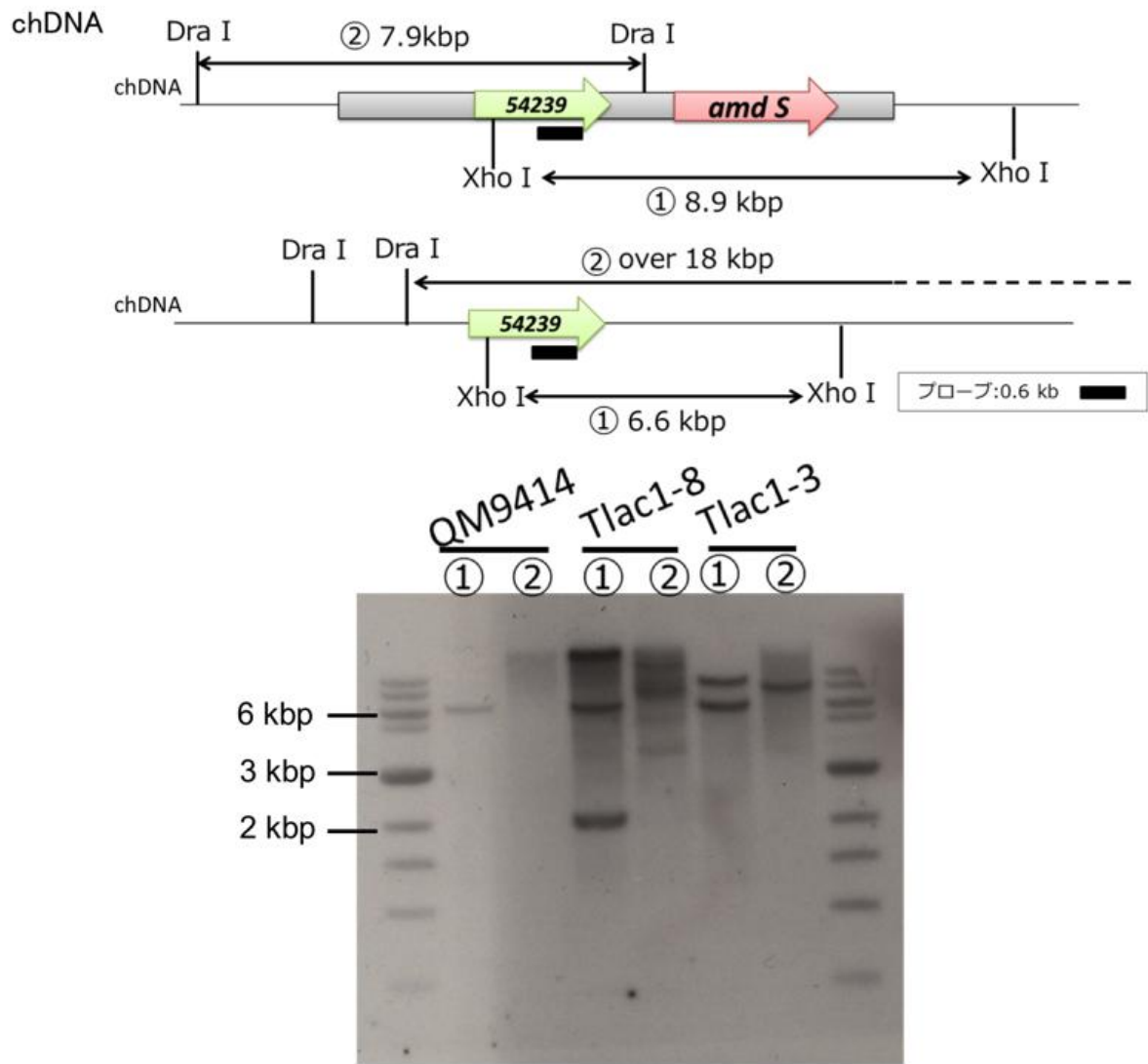


図 3.36 54239 (*Tlac*)が *cbh1* と相組み換えした場合の制限酵素マップ(上)と親株における制限酵素マップ (中央) とサザン解析結果

3.1.3.14 Tlac1-8 株の培養条件検討

G. frondosa ラッカーゼ異種発現株 QLCC8 および QLCC3 において 1% Avicel 培養に 0.5 mM CuSO₄ を添加した際、活性の上昇が見られたことから Tlac1-8 培養においても同様に添加を行った。1% Avicel 培地に Cu 添加なし、0.05 mM CuSO₄ 添加、0.5 mM CuSO₄ を添加して培養を行った。その活性測定結果を図 3.37 に示す。その結果、どの培養条件でも最も高い測定温度の 70°C で最大の活性を示した。Tlac1-8 に 1% Avicel、0.05 mM CuSO₄ 添加、0.5 mM CuSO₄ 添加した培養で最大の活性はそれぞれ 56.4 U/L、115.0 U/L、141.7 U/L であった。本添加効果実験では CuSO₄ の添加は 0.05 mM よりも 0.5 mM 添加の方がラッカーゼ生産に効果的であった。

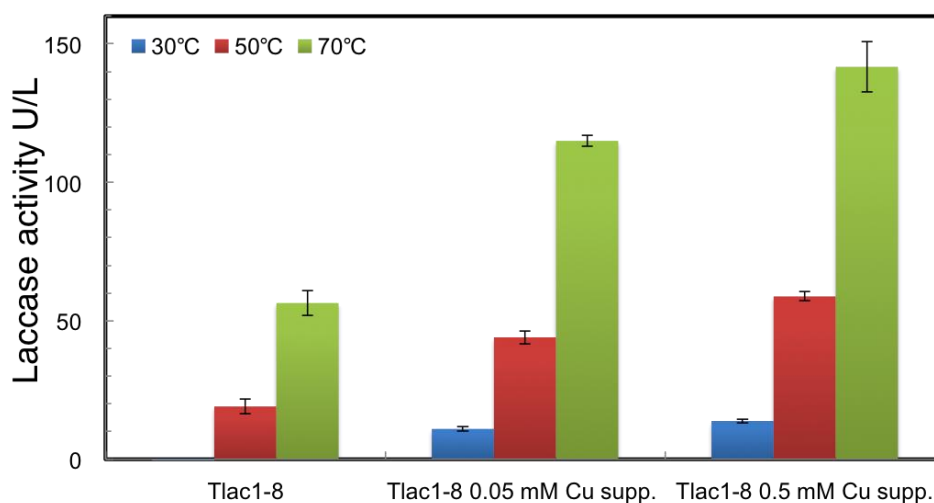


図 3.37 培地への CuSO_4 添加による Tlac1-8 株の Laccase 活性への影響

また、Cu 添加が 54239 遺伝子の転写に影響を及ぼすかどうか明らかにするため、同培養条件下で得られた RNA を qRT-PCR によって解析した(図 3.38)。その結果、54239 遺伝子の転写量が *act1* 比で 10.6 倍(添加なし) から 14.2 倍(Cu 添加) に増加していることが明らかになった。*cbh1* 転写量は Cu 添加なしでは *act1* 比で 3.2 倍であったが Cu 添加では 4.5 倍まで上昇した。

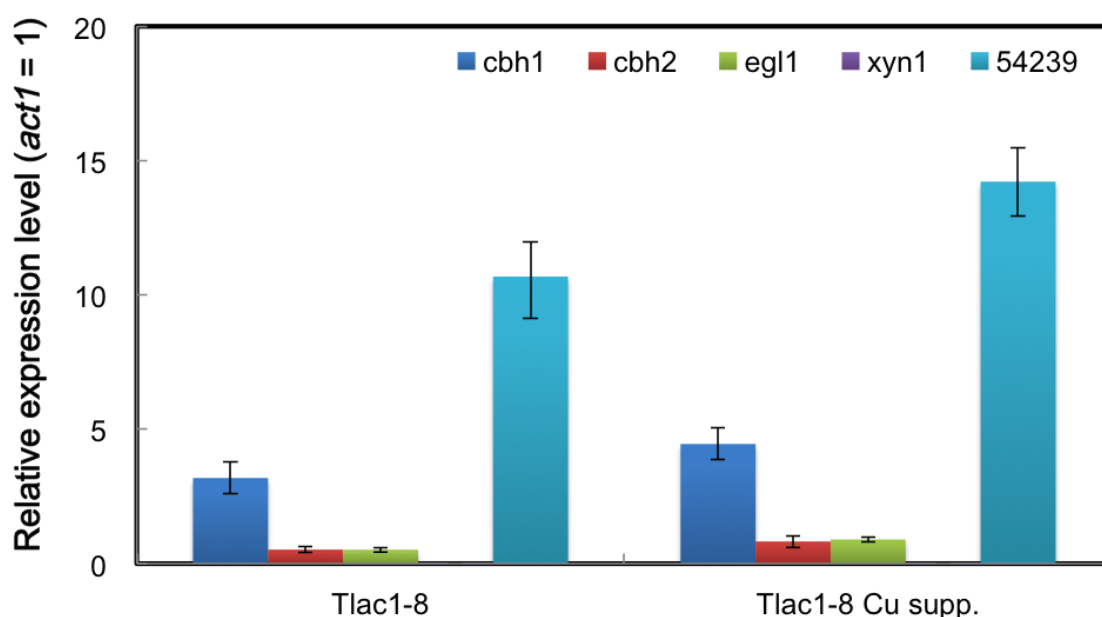


図 3.38 培地への 0.5 mM CuSO_4 添加による Tlac1-8 株 54239 遺伝子の転写への影響
Cu supp. 0.5 mM CuSO_4 を培地に添加

本研究におけるリグニン分解酵素の発現は 1L の培地中に 50-60g ものタンパク質を生産する糸状菌 *T. reesei* を宿主として、さらに *T. reesei* において最も高い発現量を誇る *cbh1* プロモーターを使用したにもかかわらず結果としてわずかなリグニン分解酵素活性を示す株しか得ることができなかった。本研究で

行った qRT-PCR 解析によって *T. reesei* に導入した *G. frondosa* リグニン分解遺伝子の転写までは問題なく行われていることが明らかとなった。そのため、今回の異種宿主発現における問題点は転写以降の段階にあると考えられ、以下の様な原因が考えられる。①プロテアーゼによる分解②補因子がアポ酵素に正しく組み込まれていない③翻訳されたタンパク質の不完全な折り畳み

まず原因①に関しては、以前の *Aspergillus niger* を宿主として *P. chrysosporium* MnP の異種宿主発現を行った報告(12)ではデンプンによって発現が強く誘導されるグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター *glaA* プロモーターを使用し、宿主には複数のプロテアーゼを欠損させた *A.niger* を用いて 100 mg/L の異種 MnP 生産を達成した。また、プロテアーゼ破壊をしていない *Aspergillus oryzae* を宿主としてデンプンやマルトースで誘導される *TAKA amylase A (amyB)* のプロモーターの支配下で発現させた *P. chrysosporium* の MnP 異種宿主発現の報告(13)では生産量が 5 mg/L ほどで前述の *A. niger* の 1/20 量よりも少なかった。このことからリグニン分解酵素の異種発現においてプロテアーゼによる影響も高活性を得られなかった原因の一つであることが示唆された。*T. reesei* においても主要な菌体外プロテアーゼ遺伝子 (*spw*) を破壊した株で異種 EG を発現した際、*spw* 非欠損株と比較して組み換え EG の生産量が改善されたため(14)、宿主のプロテアーゼ破壊は異種宿主発現に一定の効果を上げることができると考えられる。

原因②に関して、リグニン分解酵素が補因子として金属イオンを用いていることが異種における発現を妨げている可能性がある。MnP などのペルオキシダーゼはヘムを活性中心に持ち Laccase は Cu を活性中心に持っている。MnP の大腸菌、酵母、糸状菌における異種宿主発現においてしばしば培地にヘモグロビンやヘミンなど、ヘム関連物質が添加される。前述の *A. niger* における MnP 異種宿主発現株でもヘモグロビンを加えずに培養すると 5-10 mg しか MnP を生産しない。このヘム添加によって得られるペルオキシダーゼの活性は飛躍的に上昇するが、どのようにタンパク質発現に関与しているのか詳細な研究、報告はされていない。おそらく、ヘムが細胞内に取り込まれ、翻訳されたペルオキシダーゼの折り畳みの段階に関わることが予想される。このような背景から、VP (MnP):713293 を発現させた QPV4 株においてヘモグロビンや Fe を培地に添加して培養を行ったが、MnP 活性を検出することはできなかった。*T. reesei* は優れたタンパク質分泌能を持つことから不完全なタンパクが速やかに分解される可能性はあるが、ヘモグロビン添加によって VP 生産が改善されなかった理由は不明である。*T. reesei* において *Trametes sp.* の Laccase を発現させた例では、Cu を培地に添加した培養で形質転換体は培養上清中に 3620 U/L ものラッカーゼ活性を示すが、Cu を添加せず培養したところ活性は検出されなかった(15)。Larrondo らも同様に Cu 添加による *A niger*、*A nidulans* を宿主として異種発現させた Laccase 活性の上昇を報告している(16)。この報告において、Cu 添加の影響をノーザン解析およびウエスタン解析のバンド強度から考察しており、転写、翻訳レベルにおいて Cu が関与しないと結論付け、アポ酵素へ組み込む Cu の量が不足しているため Cu 添加が効果的であることを示唆した。しかし、本実験においては異種発現株 QLCC18、同種発現株 Tlac1-8 の両株において培地への Cu 添加による Laccase 遺伝子の転写量が上昇した。Cu 添加による *cbh1* への影響は親株 QM9414 では発現量の減少が見られたが Tlac1-8 株では上昇したことから Cu は *cbh1* に何らかの影響を与える可能性が示唆されたが、本研究からは転写を活性化するのか抑制するのかは判断できない。酵素活性測定時の反応系に Cu を添加しても Laccase 活性の上昇は見られないことから、Cu が培養時に何らかの働きをしていると考えられる。本実験における異種リグニン分解酵素は *T. reesei cbh1* プロモーター制御下にあるため、Cu に関連するプロモーター配列があるか検討した。担子菌の Laccase 遺伝子のプロモーター配列には MRE (Metal response element) が存在することが知られている。

MRE のコンセンサス配列-TGCRNC-は *cbh1* プロモーターの TATA box 付近には見られず TATA-box より 2.2 kb 上流に存在したが、プロモーター領域から離れすぎているため転写には関与しないと考えられた。本実験では 1 % Avicel 培養 3 日目の菌体を回収して qRT-PCR 解析を行った。しかし Cu 添加が培養前期から転写に影響しているかどうか遺伝子転写量を経時的に観察する必要がある。Cu が Laccase の折り畳みに関与する報告があるが、本研究の結果からは Cu 添加によって導入遺伝子が転写レベルで転写活性化されている可能性も示唆された。今後、Avicel 培養初期における菌体を用いた qRT-PCR、ペルオキシダーゼ発現株のヘモグロビン添加による遺伝子発現の影響を調べることで補因子添加による影響が明らかになると考えられる。過去の報告から MnP、VP、LiP などのペルオキシダーゼの異種宿主発現で酵素をより多く分泌させるには培地中へのヘモグロビンなどポルフィリンに関係した物質の添加が非常に効果的である(12, 13, 17)。今後、担子菌のリグニン分解ペルオキシダーゼを大量発現させ工業利用するには大量のヘモグロビン添加は困難であり、宿主ヘムの生合成系の強化が有効な手段となるかもしれない。しかし、Fe は過酸化剤と反応しフリーラジカルを生じることから生体内に過剰に存在すると有毒であるため、微生物は生体内の Fe 濃度を厳密に制御している。これらの理由から、工業利用のために *T. reesei* によってリグニン分解ペルオキシダーゼをセルラーゼと同レベルで分泌させるには様々な菌株改良が必要とされることが予想される。

原因③に関しては、小胞体に正しい折り畳みがされない異常たんぱく質が蓄積すると UPR(unfolded protein response)によって foldase による折り畳みや ERAD(ER-associated degradation)と呼ばれる異常たんぱく質の速やかな小胞関連分解が行われることが知られており、*cbh1* プロモーターを使用したことにより過剰の異常タンパク質が生産された可能性が考えられる。発現したタンパクのフォールディングや分泌系が追い付かず結果として活性を持ったリグニン分解酵素をほとんど分泌しなかったことが想定される。QLCC 株で qRT-PCR 解析により非相同組み換え体と判断された 4 株中 3 株は長時間反応させても Laccase 活性を検出することができなかった。この結果は、CBHI 分泌が優先され、導入した Laccase の分泌と両立できていないことが推測される。QLCC に関して Laccase 活性を示した株は全て *cbh1* との相同組み換え体であった。CBHI を欠損させると理論的には分泌経路の約 60 %が解放されることから考察すると分泌ストレスも異種タンパクの生産に大きな影響を及ぼしていると考えられる(18)。また、qRT-PCR 解析より、非相同組み換え体において遺伝子転写のタイトレーションが起きていることが示唆された。*Trametes* sp.の Laccase を *T. reesei* で発現させた Zhang らは *cbh1* プロモーターのタイトレーションを防ぐため、また glucose 培養においても異種タンパクを発現させるため *A. nidulans* 由来の構成的に発現するグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター(*gpd* promoter)を使用した。その結果得られた Laccase 活性は本研究において最高の活性を示した Tlac1-8 よりも 25.5 倍も高い活性であった。しかし、Laccase の異種宿主発現という目標はクリアすることができた。

本研究では、*T. reesei* の *cbh1* と比較し 1/4 ほどの発現量である *egl1* プロモーターの使用も予定していたが、プラスミドの構築には至らず *cbh1* プロモーターとの比較をすることができなかった。*egl1* プロモーターであれば転写のタイトレーションや分泌ストレスを軽減できた可能性も考えられる。また、宿主の選択も異種タンパク発現において考慮すべき点である。現在、世界中で研究されている *T. reesei* Rut-C30 株は wild type である QM6a を親株として繰り返し突然変異導入をすることで造成されたセルラーゼ高生産変異株である。この Rut-C30 株は小胞輸送、小胞ソーティング、ゴルジ関連小胞 ATPase など分泌に関わる酵素をコードする遺伝子が変異もしくは欠損していることが明らかとなっている(19)。これらの遺伝

子の変異もしくは欠損がセルラーゼ高生産に寄与し、タンパク質の分泌ストレスに対応していることが考えられるため、日本におけるセルラーゼ高生産変異株 PC-3-7 株などを宿主として用いることも有効かもしれない。結果において述べなかったが、PC-3-7 に *G. frondosa* の VP を形質転換した PCV1 (非相同組み換え体) は 0.7 U/L の MnP 活性を示した。MnP 遺伝子を導入した QM9414 形質転換体は 19 株中 1 株わずかに活性を示すのみであった。しかし、PCV1 では明らかな MnP 活性を認めることができ、異種宿主発現のホストとして QM9414 より優れている可能性が示唆された。シグナル配列に関しては、100 mg/L の異種リグニン分解酵素の生産に成功していたプロテアーゼ欠損 *A. niger* で *P. chrysosporium* の Mnp シグナル配列を使用しており担子菌シグナル配列が子囊菌においても十分機能していることが示された。QLCC 株は菌体外に Laccase を生産したため本実験においても担子菌 (*G. frondosa*) 由来のシグナル配列が子囊菌 (*T. reesei*) で機能することが明らかになった。

3.2 廃菌床糖化溶液からの DOI 発酵高生産組換え大腸菌の開発

3.2.1 進化工学的改変による高活性型 DOI 合成酵素の取得・利用

図 3.39, 3.40 に示すように 1 次、2 次スクリーニング系を構築した。1107 株を 1 次スクリーニングした結果、野生型よりも DOI 生産性が上昇した 24 株の候補株を得た。続いて、2 次スクリーニングを行った結果、6 株 (S230G/W293R, E200A/D202E, A143G, M346T, L214M, E23D) の候補株を得た。また、DOI 高生産性に関与する部位を特定するために、二重に変異が導入されたクローンについては、一重の変異クローン (S230G, E200A, D202E) を構築し、DOI 生産性の評価を行った。その結果、DOI 生産性向上に関与する部位を 6 カ所 (E23, L143, L214, S230, W293, M346) 同定することができた (図 3.41)。

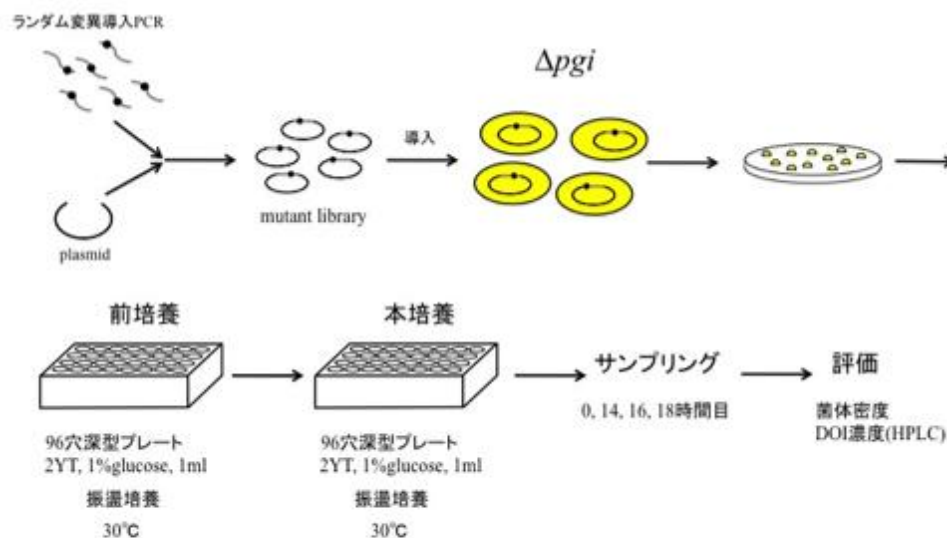


図 3.39 高活性型 DOI 合成酵素遺伝子取得の 1 次スクリーニング

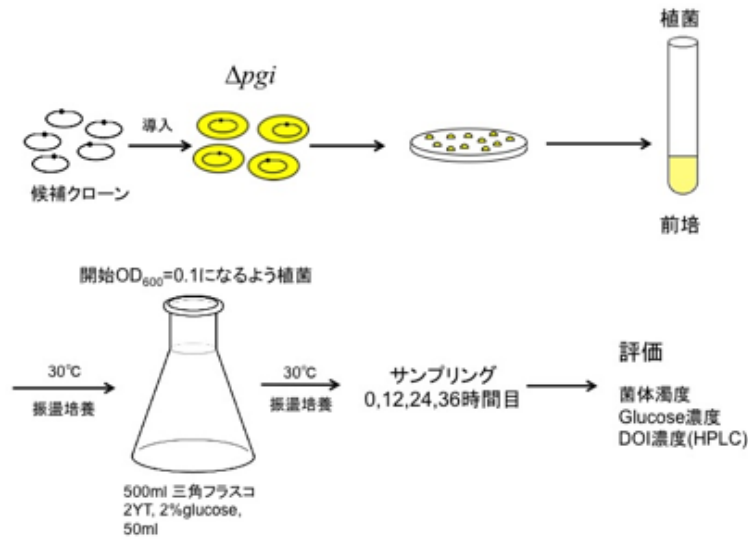


図 3.40 高活性型 DOI 合成酵素遺伝子取得の 2 次スクリーニング

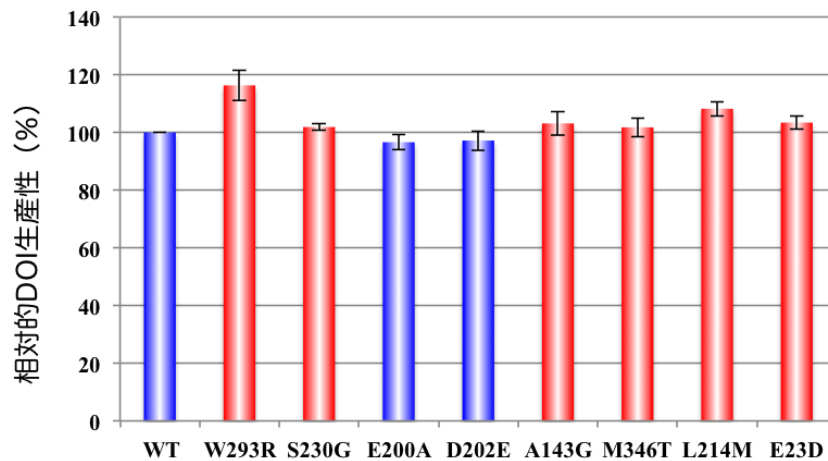


図 3.41 変異型 DOI 合成酵素の DOI 生産性比較 (培養 36 時間)

DOI 合成酵素の N 末端側に存在する E23 は、 NAD^+ 結合に関与することで知られるロスマンフォールドドメイン上にあるので、これらの部位への変異は、DOI 合成の反応に必須である NAD^+ 結合能に影響をきたしたと考えられる。また、活性部位に近い L143, L214, S230 の変異は、基質認識や変換の活性に影響を与え、ゲート付近にある M346 の変異は、基質の結合に影響を与えると推測される。W293 の部位は、ゲート、活性中心からも遠く、ロスマンフォールドドメイン上にもない。この部位の変異の DOI 生産性への効果は非常に大きかったことも重なり、非常に興味深い部位である (図 3.42)。そこで野生型 DOI 合成酵素と変異型 DOI 合成酵素 W293R の酵素特性を K_m , K_{cat} を測定し、比較検討した結果 (表 3.9)、基質親和性を示す K_m 値は、変異型 DOI 合成酵素 W293R の方が野生型 DOI 合成酵素よりも 1.1 倍程度大きい値を示したが、ほとんど変わらないことが明らかとなった。しかしながら、酵素の代謝回転能を示す K_{cat} 値は、変異型 DOI 合成酵素 W293R の方が野生型 DOI 合成酵素よりも 1.41 倍程度大きい値を示し、

代謝回転能が高いことが示され、総合的に酵素の能力を示す K_{cat}/K_m 値は、変異型 DOI 合成酵素 W293Rの方が野生型 DOI 合成酵素よりも 1.56 倍程度大きな値を示し、W293R の変異は、酵素の代謝回転に大きな影響をきたしていることが推測された。

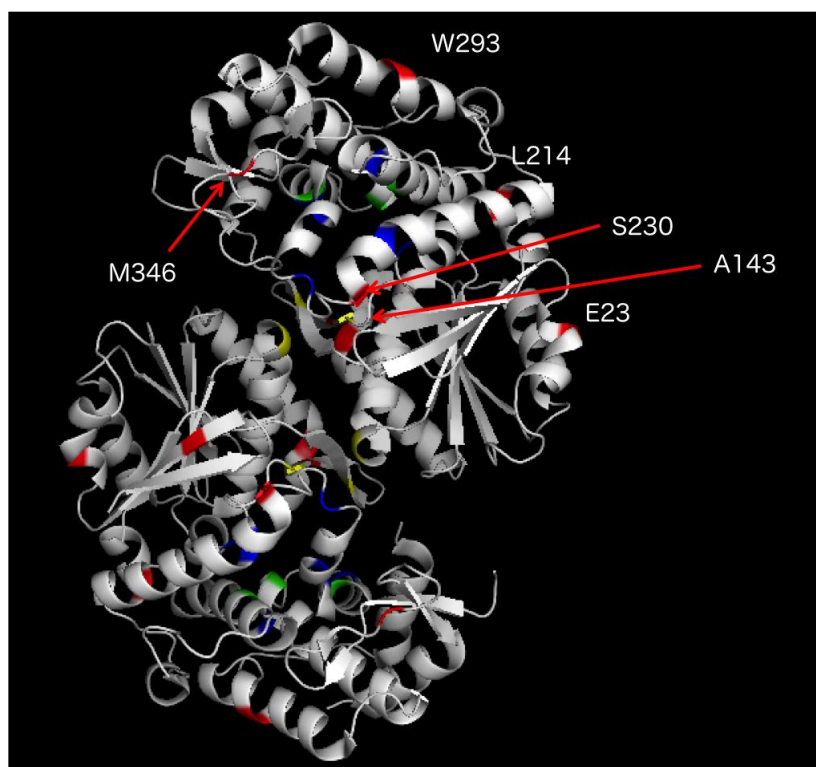


図 3.42 DOI 生産性に影響を与える DOI 合成酵素の変異部位

表 3.9 野生型 DOI 合成酵素と変異型 DOI 合成酵素の特性の比較

	K_m (M)	K_{cat} (sec^{-1})	$K_{cat}/K_m(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
野生型	1.1×10^{-3}	0.36	327
変異型 W293R	1.0×10^{-3}	0.51	510

次に DOI 生産性の上昇が大きかった 2 つの変異型 DOI 合成酵素 L214M、W293R、さらには、2 つの単独の変異を組み合わせさせた L214M/W293R をコードする遺伝子を、グルコース-6-リン酸高蓄積株 Δpzp 株に導入して 3 次スクリーニングを行った。2 次スクリーニングまでは、培地中のグルコースを DOI 発酵生産の原料及び生育の炭素源として利用するグルコース-6-リン酸蓄積株 Δpgi 株を宿主として利用していた。すなわち、グルコース-6-リン酸 (G6P) がペントースリン酸経路の酵素と DOI 合成酵素の競合により利用される状態で有り、より高活性型の DOI 合成酵素獲得が期待されるスクリーニングであった。3 次スクリーニングでは、DOI 生産宿主としての実績があり、生育炭素源としてはマンニトールを利用し、培地中に存在するグルコースを全て DOI の発酵生産に利用できるように代謝工学的に改変された Δpzp 株を利用した。これは、グルコースの生育への利用と切り離し、獲得された変異型 DOI 合成酵素の DOI 生産性のみへの寄与を評価するスクリーニングステップである。3 次スクリーニングの結果、菌体濁度の上昇とマンニトールの消費に相関が見られ、生育炭素源としてマンニトールを利用して、増殖していると考え

られた。また、これは Δpzp 株は、グルコースをG6Pへと変換した後にそのまま細胞内に蓄積し、生育に利用することが不可能な代謝工学的に改変された株であることから確認された。 Δpzp /野生型 (WT)株、 Δpzp /L214M株、 Δpzp /W293R株、 Δpzp /L214M/W293R株間の菌体濁度の上昇とマンニトールの消費速度を比較した時、大きな違いは見られなかったが、Glucose消費及びDOI生産の速度を比較した時、 Δpzp /WT株よりも他の3つの変異型DOI合成酵素遺伝子導入株のグルコース及びDOI生産速度は上昇していた(図3.43)。また、生育の上昇がほぼ止まり、生育炭素源である培地中のマンニトールが枯渇する培養開始24時間に注目すると、 Δpzp /L214M株、 Δpzp /W293R株、 Δpzp /L214M/W293R株のDOI生産性が(図3.43)、 Δpzp /WT株よりもそれぞれ約1.1倍、約1.2倍、約1.3倍と高くなっており、またこれらのDOI生産性上昇と同様に、グルコースの消費量も上昇していた(図3.43)。このときのそれぞれの菌株内のDOI合成酵素量をウエスタン解析で定量したところほぼ同一であったことから、変異型DOI合成酵素遺伝子導入株は、細胞内のG6Pを効率よくDOIへ変換しているため、野生型DOI合成酵素遺伝子導入株と比較して、培地中のグルコースを速く取り込み、G6Pに変換し、DOIの発酵生産をしていると考えられる。大腸菌のGlucoseの取り込みは、細胞内のG6Pの蓄積によってGlucoseの取り込みが抑制されるglucose PTSに制御されている。DOI合成酵素活性が高い変異型酵素は、野生型DOI合成酵素に比べて、細胞内に蓄積するG6Pを効率よく利用していくため、細胞内に蓄積するG6P量が少なくなり、効率よくグルコースも

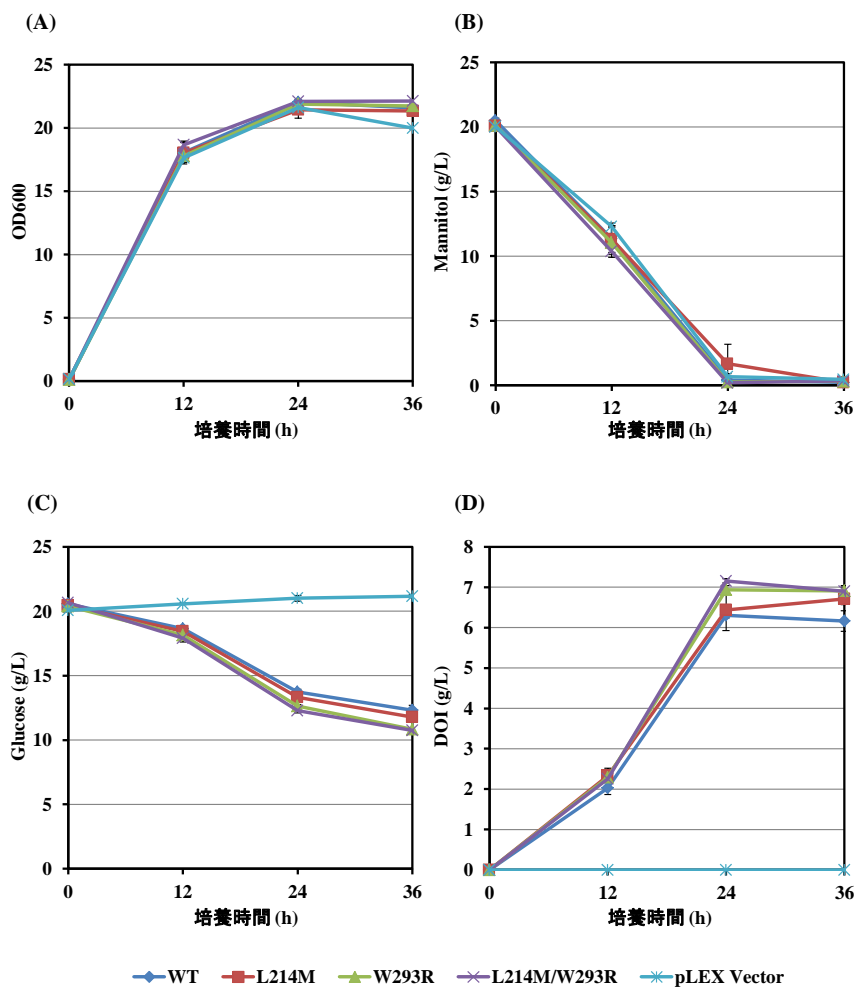


図 3.43 変異型 DOI 合成酵素の DOI 生産性への影響 (3 次スクリーニング)

取り込むことが推測される。また、WT よりも高 DOI 生産性を示した L214M と W293R を組み合わせた L214M/W293R の利用は、さらなる高 DOI 生産性を示し、相加或いは相乗的な DOI 生産性の効果が見られた。

次に *in vitro* DOI 合成酵素活性測定法を利用して、高 DOI 生産性を示す変異型 DOI 合成酵素の比較検討を行った。野生型 (WT) 及び変異型 DOI 合成酵素 L214M、W293R、L214M/W293R の酵素は、His タグが付加した組換え蛋白質として生産・精製した。*in vitro* DOI 合成酵素活性測定の結果、WT と比較して、L214M は約 1.3 倍、W293R と L214M/W293R は約 1.5 倍の DOI 合成酵素活性を示した (図 3.44)。これらの酵素が有する DOI 合成酵素活性の上昇が、図 3.43 に記載した DOI 生産性の上昇に繋がっていることが考えられる。

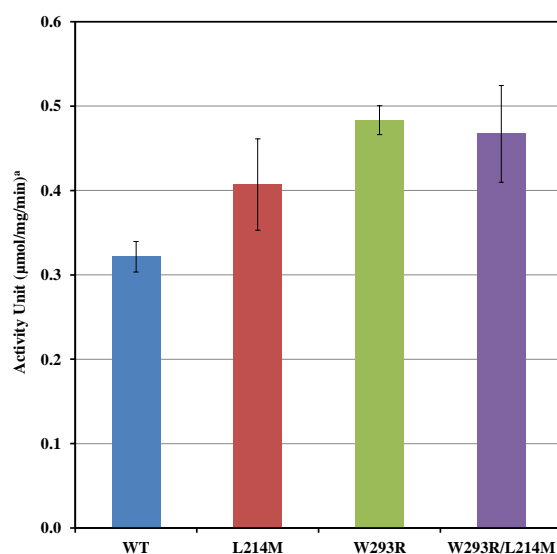


図 3.44 変異型 DOI 合成酵素の *in vitro* DOI 合成酵素活性の比較

DOI 合成酵素について結晶構造がすでに報告されており、ホモダイマー構造を有することが明らかになっている (20)。また、DOI 合成酵素は N 末端ドメインと C 末端ドメインに分けることができ、前者は NAD⁺結合ドメインとして知られるロスマンフォールドドメイン、後者はデヒドロキナ酸合成酵素に類似したドメインである。また、DOI 合成酵素の活性部位で重要なアミノ酸残基として、Arg119, Asp135, Lys141, Asp151, Glu183, Lys186, Lys225, Glu235, Glu243, His246, His250, His262 が知られている。青色で示したアミノ酸残基は基質と相互作用するもの、桃色で示したアミノ酸残基はコバルトイオンと相互作用するもの、黄色で示したアミノ酸残基は基質由来のリン酸基と相互作用を示すものである (図 3.45)。本研究で取得された DOI の高生産性を示したアミノ酸残基は赤色 (L214M) と緑色 (W293R) で示してある。L214 は、①基質 G6P と相互作用するアミノ酸残基 Lys225 と同じヘリックス上に位置すること、②立体構造上 G6P と相互作用するアミノ酸残基 Asp135 やコバルトイオンと相互作用する Glu183, His262 の近傍に位置すること、さらに L214 が G6P 側に配位しているアミノ酸残基であることから、214 番目のアミノ酸残基の置換 (L⇒M) は DOI 合成酵素と基質 G6P の相互作用に影響をきたしていると考えられる。また、これは、L214M に関する速度論的解析結果より、K_m 値が WT と比較して小さくなり、G6P との親和性が WT よりも上昇していたことから示唆される。W293 は、外側に位置するアミノ酸残基である。293 番目のアミノ酸残基の置換 (W⇒R) は、速度論的な解析の結果、代謝回転速度及び基質に対する親和性

共に向上させる効果を示したが、どのようにこの塩基性アミノ酸残基への置換が影響を与えたか、立体構造の情報からのみでは、推測が非常に困難である。今後、モデリング等による解析技術の適用が必要であると考えられる。

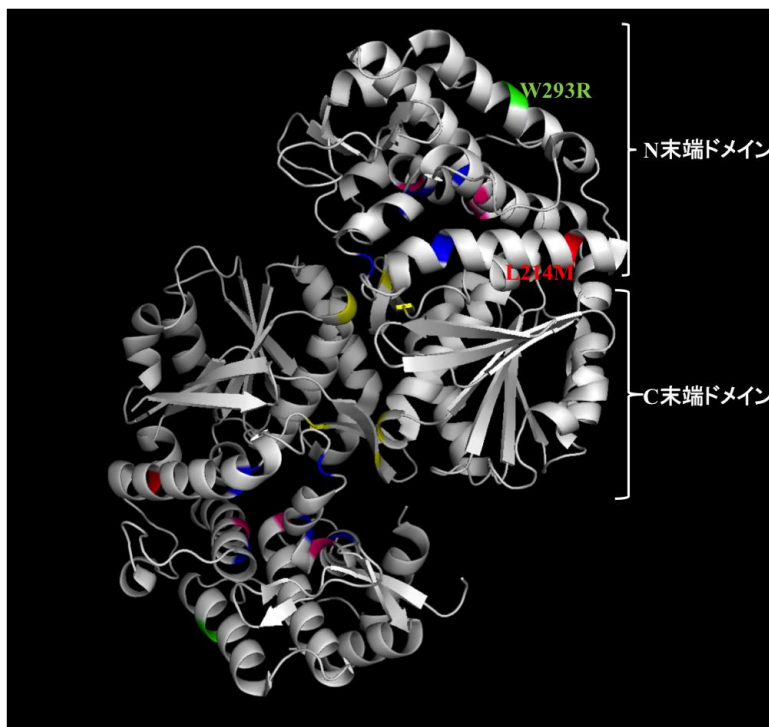


図 3.45 DOI 合成酵素の立体構造と変異部位

3.2.2 DOI 合成酵素の高安定化

図 3.46 に示すように、DOI 合成酵素は、高濃度の DOI 存在下において活性が低下することが *in vitro* DOI 合成酵素 assay の結果明らかとなった。DOI 合成酵素は、ホモ二量体又は、DOI 合成酵素結合蛋白質 BtrC2 とヘテロ二量体を形成することが知られている。二量体を形成することによる DOI 合成酵素活性の安定化を考え、*in vitro* DOI 合成酵素 assay 系で評価を行った結果、ヘテロ二量体は、高濃度 DOI 存在下における活性の低下をある程度抑えるが、DOI 合成酵素単量体よりも DOI 合成活性が大きく低下することが

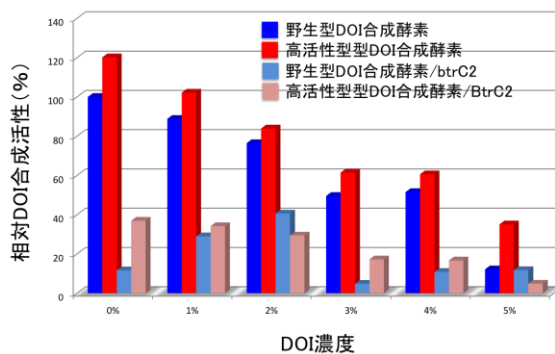


図 3.46 高濃度 DOI 存在下における DOI 合成酵素及び DOI 合成酵素複合体の活性

分かった (図 3.46)。すなわち、ヘテロ二量体を利用する DOI 合成システムは、短時間で DOI 発酵生産するためには、不適合であると判断し、この項目の開発をここで終了することとした。

3.2.3 DOI 合成酵素基質グルコース-6-P (G6P) の蓄積速度の強化

DOI 合成酵素の基質である G6P をできる限り速く、多量に大腸菌体内に蓄積させることができれば、高活性型 DOI 合成酵素の利用価値も高まり、短時間における DOI の高生産につながると考えられる。G6P を基質として利用する遺伝子を全て破壊した GI724 Δ pzp 株とさらにグルコースの取り込みに関与する ptsG 蛋白質の抑制因子である Mlc 蛋白質をコードする *mlc* 遺伝子を破壊した GI724 Δ pzp Δ mlc 株の細胞内 G6P 濃度の測定を行った。その結果、GI724 Δ pzp Δ mlc 株の細胞内 G6P 濃度は、GI724 Δ pzp 株よりも 2-3 倍高い濃度であった (図 3.47 (A))。すなわち、DOI 合成を行う宿主として優れていると考えられた。上記両株に DOI 合成酵素遺伝子を導入し、DOI の原料であるグルコース 3%、生育炭素源であるマンニトール 4% の条件下で DOI の発酵生産性試験を行った結果、DOI 生産性に違いは見られなかった (図 3.47 (B))。

グルコース濃度を 3% から 4.5% に変更した時、GI724 Δ pzp Δ mlc/btrC (DOI 合成酵素遺伝子導入) 株の DOI 生産性は、GI724 Δ pzp/btrC 株よりも向上したが、3% グルコースの場合と培養液中の DOI 濃度が変わらなかった (図 3.48)。培養液中のグルコース濃度に着目すると、GI724 Δ pzp Δ mlc/btrC 株及び GI724 Δ pzp/btrC 株を利用した DOI 発酵生産試験において、どちらの株も培養液中にグルコースを残存させていた。培養 48 時間目のグルコース消費量と DOI 生産量を考慮して DOI 変換率を算出すると約 99% であり、変換効率に関しては問題がないため、双方の株のグルコースの消費量の差が、DOI 生産量の差として検出されたと考えられる。すなわち、*mlc* 遺伝子の欠失は、培地中のグルコース濃度が高い状態にある程度適応可能とすることできると考えられる。

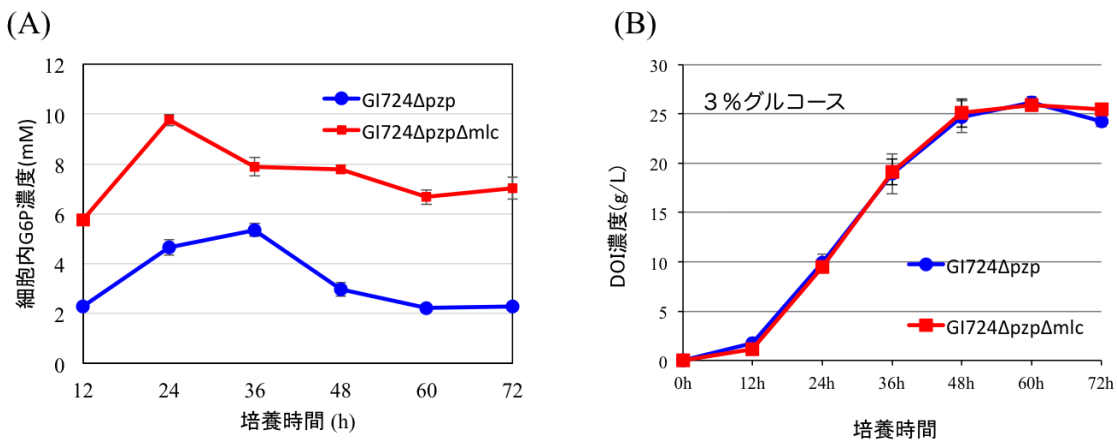


図 3.47 *mlc* 遺伝子欠失の DOI 生産への影響

(A) 大腸菌細胞内の G6P 濃度, (B) GI724 Δ pzp /btrC 株と GI724 Δ pzp Δ mlc/btrC 株の DOI 生産性

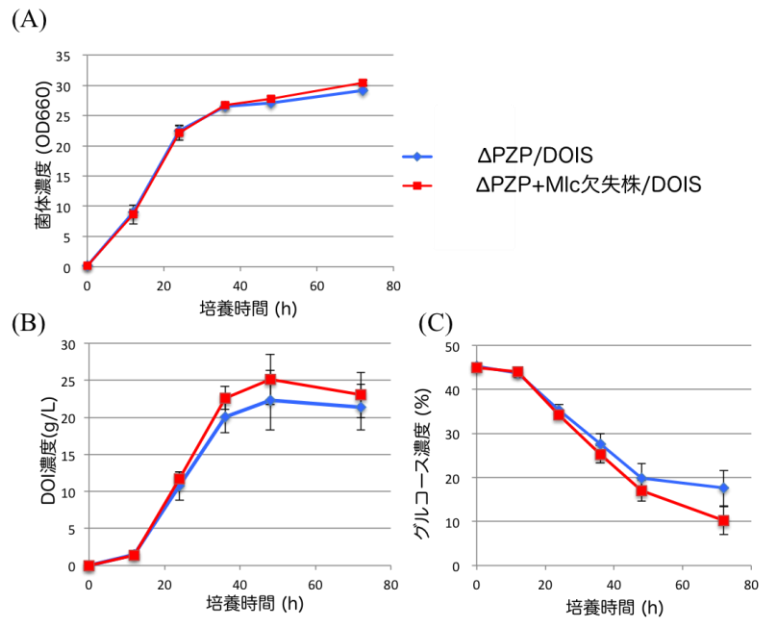


図 3.48 *mlc* 遺伝子欠失の高濃度グルコース存在下における DOI 生産性への影響
(A) 生育 (B) DOI 生産量 (C) グルコース消費量

3.2.4 DOI 耐性 (低感受性)・耐酸性 DOI 生産宿主の取得・利用

3.2.4.1 DOI の大腸菌への増殖阻害効果

組換え大腸菌による DOI 発酵生産の実用化を考慮すると、5%以上、さらには 10%の DOI 含有培養液の生産への必要性が考えられる。しかしながら、本研究で利用している DOI 生産宿主の大腸菌 GI724 ΔPZP は、2% DOI を含む培地において、その生育が半分程度阻害され、また、4% DOI を含む培地においては生育が完全に阻害された (図 3.49)。培養液中に高濃度の DOI を生産・蓄積させるためには、DOI 耐性株、少なくとも DOI 低感受性株 (以後、DOI 耐性 (低感受性) と記載する) の開発が必要であると考えられる。大腸菌の DOI に対する感受性は、図 3.49 のように株ごとに異なる。また、DOI 発酵生産培養時には、DOI 原料のグルコースと生育炭素源の 2 種類の糖存在下における培養を実施するため、カタボライト抑制効果の程度が、DOI 生産性に影響を与えることも考えられ、実際に、各々の大腸菌株により、利用しやすい生育炭素源の種類が異なることも明らかになっている (21)。さらに、バイオマス由来糖化液に含まれる様々な生育阻害物質への適応程度も大腸菌株ごとに異なることが予想される。以上のことから、①利用するバイオマス糖化液の種類、②利用する生育炭素源の種類などにより、DOI 生産宿主とするのに最適な大腸菌株が異なると考えられる。現在の DOI 生産宿主大腸菌株に自然又は人為的に突然変異を導入して DOI 耐性 (低感受性) 変異株を取得する方法は、変異株の取得に要する労力は小さいが、変異部位の特定が困難である。自然又は人為的突然変異導入法に対し、大腸菌単一遺伝子破壊株ライブラリーである Keio collection (22) を利用し、スクリーニングにより DOI 耐性 (低感受性) 変異株を取得する方法は、変異株の取得に要する労力は大きい、変異部位の特定が容易である。先に記した①、②より、DOI 生産に最適な宿主大腸菌が決定されていない現状を考えると大腸菌の DOI に対する耐性及び感受性に関与する遺伝子を同定し、各々の場面に最適な大腸菌株に適応させていくことが有効であると考

えた。そこで、Keio collection を利用し、各々の菌株における培養液中の DOI 濃度が DOI 生産性に与える影響を調べ、DOI 耐性及び感受性に関与する遺伝子を同定・解析し、DOI 耐性大腸菌株の開発を目的とした。

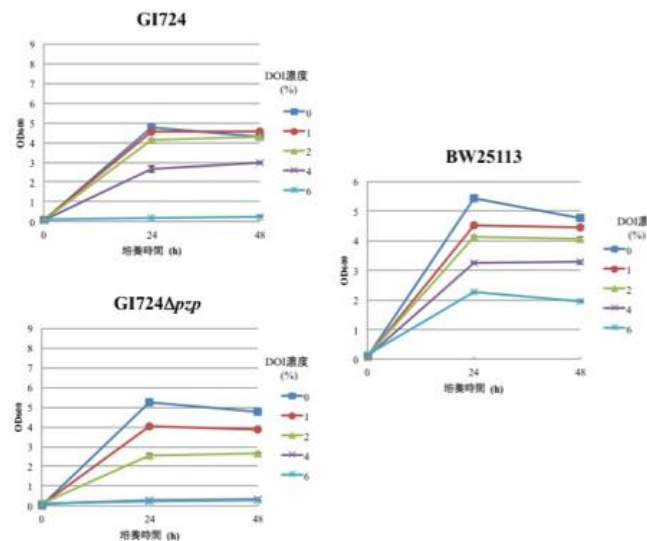


図 3.49 DOI 生産宿主大腸菌の DOI 感受性

図 3.49 に示すように、DOI 含有 LB 液体培地において、BW25113 株の増殖は DOI 濃度依存的に阻害された。高糖濃度の条件下では、高浸透圧及び代謝阻害が生じ、増殖が困難になることが知られている (23)。DOI 存在下培養における大腸菌の増殖阻害が、DOI 特異的な増殖阻害か、高糖濃度による代謝阻害及び高浸透圧により生じた増殖阻害であるかについて検討を行った。

まず、大腸菌の DOI の代謝阻害の影響について考えた。これまでに大腸菌、DOI を単一炭素源として増殖に利用できないことが本研究において確認されている。また、DOI 含有 LB 培地で大腸菌を培養したとき、培養液中の DOI 濃度はほとんど変わらないことが明らかとなっており、DOI は細胞内に取り込まれないと考えられる。すなわち、グルコースのような資化可能な糖が高濃度に存在下すると代謝阻害を引き起こし、増殖が阻害されるが、細胞内に取り込まれる可能性が低い DOI においては、代謝阻害の結果により引き起こされる増殖阻害ではないと考えられ、本現象は DOI 特異的もしくは DOI 由来の物質特異的な増殖阻害の可能性が高いと考えられた (図 3.50 (B))。

次に、浸透圧による大腸菌の増殖への影響を調べるために、各 DOI 濃度 (0, 1, 2, 4, 6%) の LB 液体培地と同じ浸透圧になるように、スクロース含有 LB 液体培地 (0, 2.1, 4.2, 8.4, 12.7%) を用いて BW25113 株を培養した。この浸透圧による増殖への影響を検討するにあたり、大腸菌 BW25113 株が資化することができないスクロースを利用した。スクロース含有 LB 液体培地における大腸菌の生育は、スクロースを含まない培地における増殖よりも良好であった (図 3.50 (C))。0% スクロース含有 LB 液体培地における増殖に対し、12.7% スクロース含有 LB 液体培地の増殖は約 21% 上昇した。以上の結果から、培地中に DOI が含まれることにより生じる大腸菌の増殖阻害は、浸透圧によるものでないと考えられる。

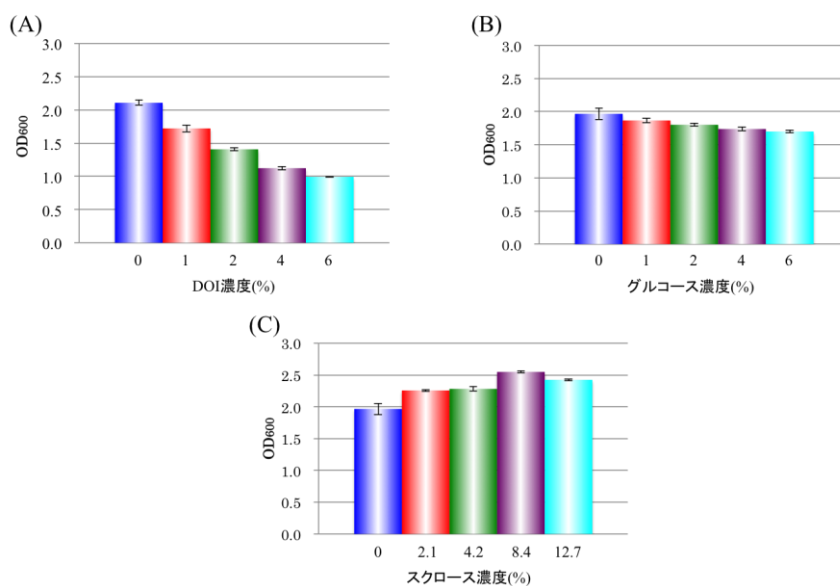


図 3.50 DOI の大腸菌への増殖阻害様式の検討

(A) 高濃度 DOI 存在下における大腸菌の増殖阻害効果、(B) 高糖濃度存在下における大腸菌の増殖阻害効果、(C) 高浸透圧条件下における大腸菌の増殖阻害効果

次に DOI が大腸菌の増殖に与える阻害作用が増殖抑制効果あるいは殺菌効果であるかを検討するために、DOI 含有 LB 液体培地における大腸菌の生菌率を調査した。図 3.51 及び表 3.10 に示すように、DOI 非含有 LB 液体培地における大腸菌の培養開始 12 時間以降の定常期、死滅期において、その生菌率は低下する。そこで、生菌率が高い 12 時間後の対数増殖期における生菌率に注目して、検討を行った結果、DOI 濃度依存的に生菌率の低下が見られた。すなわち、DOI は大腸菌に対して殺菌効果を有することが明らかとなった。

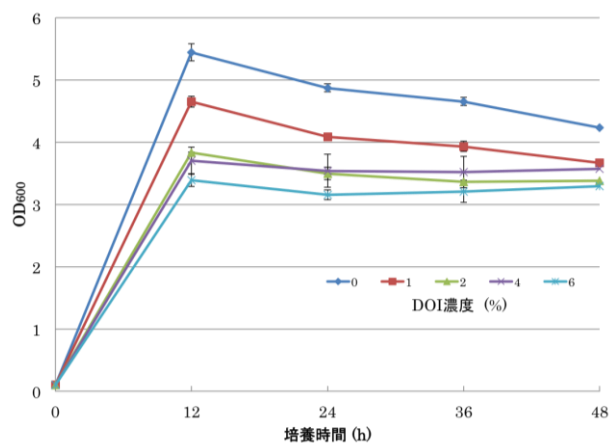


図 3.51 DOI 存在下における大腸菌の増殖曲線

表 3.10 DOI 含有 LB 液体培地を用いた培養における生菌率

培養時間 (h)	生菌率 (%)				
	DOI 0%	DOI 1%	DOI 2%	DOI 4%	DOI 6%
12	100	93	75	66	60
24	84	74	72	58	45
36	58	28	23	21	8
48	22	22	22	18	8

3.2.4.2 DOI 耐性・感受性関連遺伝子取得のための 1 次スクリーニング系の確立

3.2.4.1 により、DOI 特異的な増殖阻害が考えられた。その増殖阻害に関連する遺伝子を見出し、DOI の増殖阻害機構を明らかにすることで、DOI 耐性大腸菌変異株の獲得に繋がると考えた。そこで、大腸菌の全遺伝子破壊株コレクション (Keio collection) を用いて、DOI 耐性・感受性関連遺伝子の探索を行うこととし、DOI 耐性・感受性関連遺伝子取得のスクリーニング系の構築を試みた。

適切に DOI 感受性を評価できるタイミングを決定するために、Keio collection の野生株である BW25113 株を使用して DOI 含有 LB 液体培地 (0, 1, 2, 4, 6%) における大腸菌の経時的な増殖を調べた結果、DOI 濃度依存的に大腸菌の増殖は阻害され、培養開始から 6 時間後から観測された。①遺伝子の欠失により誘導期が長くなる変異株の DOI 耐性及び感受性の評価には、培養開始 6 時間のポイントでは困難であると考えられること、②培養開始 12 時間では、調査したすべての DOI 濃度存在下における BW25113 株の増殖は定常期に入り安定したこと、③培養開始 18 時間では、0% DOI 培地において、菌体濃度が減少し始めたことから、培養開始 12 時間において DOI 耐性及び感受性を評価することが適切であると考えた。また、スクリーニング培地中の DOI の濃度は、大腸菌の増殖が完全に阻害される濃度が望ましいとも考えられるが、スクリーニングのために準備する DOI の精製に時間を要することから、増殖阻害率が 50% を超える 6% とした。また、BW25113 株の至適培養温度範囲は 30-37°C であり、培地中の DOI の安定性を維持する観点から 30°C とした。以上から、DOI 耐性・感受性関連遺伝子の取得のための 1 次スクリーニング条件 (培養温度：30°C、培地：6% DOI 含有 LB 液体培地、DOI 耐性・感受性評価培養時間:12 時間) を決定した。

3.2.4.3 Keio collection を利用した DOI 耐性・感受性関連遺伝子取得へ向けた 1 次スクリーニング

Keio collection を利用した DOI 耐性及び DOI 感受性に関与する候補遺伝子の取得を目的として研究を行った。3.2.4.2 で決定したスクリーニング条件 (30°C、DOI 6%、12 h) で Keio collection 3,823 株の 1 次スクリーニングを行った。Keio collection の野生株である BW25113 株の DOI 非含有 LB 液体培地における増殖を指標 (100%) として、6% DOI 含有 LB 液体培地における増殖が 80% 以上を示した遺伝子破壊株を DOI 耐性 (低感受性) 候補株とし、6% DOI 含有 LB 液体培地における増殖が 20% 以下を示した遺伝子破壊株を DOI 感受性候補株とした。1 次スクリーニングの結果、DOI 感受性候補株のみ 6 株選出できた (表 3.11 及び表 3.12)。また、遺伝子の欠失が起因となり、DOI 非含有 LB 液体培地における増殖が速く、或いは遅くなったため、DOI 耐性 (低感受性) 候補株あるいは DOI 感受性候補株と選出されること、逆にされないことが予想される。そこで、DOI 非含有 LB 液体培地の増殖と 6% DOI 含有 LB 液体培地の増殖の差が 10% 以下の株を DOI 耐性 (低感受性) 候補株に加えた (表 3.13)。

表 3.11 6% DOI 含有液体培地において増殖が速い大腸菌株

破壊遺伝子名	DOI 0%の増殖 (%) (WTを100%)	DOI 6%の増殖 (%) (WTを100%)	増殖の差 (DOI0%-6%)	増殖 (当該遺伝子破壊株を100%)
- (WT)	100.00	52.41	47.59	52.41
<i>malG</i>	115.10	79.04	36.06	68.67
<i>cpdA</i>	95.11	78.78	16.33	82.83
<i>rfaC</i>	90.12	77.93	12.19	86.47
<i>ybfA</i>	92.74	77.93	14.82	84.02
<i>maeB</i>	95.74	77.37	18.38	80.81
<i>ansA</i>	111.56	77.20	34.36	69.20
<i>eutI</i>	107.86	76.73	31.13	71.14
<i>yjiP</i>	99.72	76.31	23.41	76.53
<i>dcrB</i>	97.20	76.02	21.18	78.21
<i>ymgH</i>	94.25	75.98	18.27	80.62
<i>yccK</i>	94.36	75.22	19.13	79.72
<i>yicL</i>	136.56	74.51	62.06	54.56
<i>mdoH</i>	123.75	73.59	50.16	59.46
<i>ydjL</i>	92.47	73.23	19.24	79.19
<i>parC</i>	96.95	73.23	23.72	75.53
<i>gudD</i>	96.84	72.80	24.04	75.17
<i>tyrB</i>	99.99	72.39	27.60	72.40
<i>panD</i>	124.14	72.11	52.04	58.08
<i>yjiQ</i>	123.07	71.66	51.40	58.23

表 3.12 6% DOI 含有液体培地において増殖が遅い大腸菌株

破壊遺伝子名	DOI 0%の増殖 (%) (WTを100%)	DOI 6%の増殖 (%) (WTを100%)	増殖の差 (DOI0%-6%)	増殖 (当該遺伝子破壊株を100%)
- (WT)	100.00	52.41	47.59	52.41
<i>atpH</i>	19.57	5.39	14.18	27.54
<i>atpA</i>	18.49	6.16	12.33	33.32
<i>ackA</i>	58.55	12.02	46.53	20.53
<i>rffC</i>	98.89	12.60	86.29	12.74
<i>gor</i>	96.28	17.66	78.62	18.34
<i>wzxE</i>	61.94	17.72	44.22	28.61
<i>ypfI</i>	108.01	20.03	87.98	18.54
<i>hflD</i>	83.68	20.17	63.51	24.11
<i>cyoA</i>	79.46	20.24	59.22	25.47
<i>cysH</i>	93.69	20.32	73.37	21.69
<i>wcaF</i>	69.77	20.33	49.44	29.14
<i>yhfK</i>	100.76	20.37	80.39	20.22
<i>gntY</i>	86.34	20.92	65.42	24.23
<i>rfaA</i>	77.45	20.93	56.52	27.02
<i>gloA</i>	76.16	21.54	54.63	28.28
<i>atoD</i>	81.81	21.67	60.13	26.49
<i>dadA</i>	76.55	21.89	54.66	28.60
<i>ytfA</i>	81.57	22.28	59.30	27.31
<i>ybfL</i>	76.94	22.45	54.49	29.18
<i>speB</i>	96.14	22.60	73.54	23.51

表 3.13 各破壊株の DOI 非含有液体培地と 6% DOI 含有液体培地の増殖の差が小さい大腸菌株

破壊遺伝子名	DOI 0%の増殖 (%) (WTを100%)	DOI 6%の増殖 (%) (WTを100%)	増殖の差 (DOI0%-6%)	増殖 (当該遺伝子破壊株を100%)
- (WT)	100.00	52.41	47.59	52.41
<i>argO</i>	52.99	48.52	4.47	91.56
<i>aspA</i>	36.21	28.97	7.24	80.01
<i>ycdH</i>	59.07	49.33	9.74	83.51
<i>cyaA</i>	62.63	51.77	10.85	82.67
<i>rffM</i>	51.77	39.91	11.86	77.09
<i>rfaC</i>	90.12	77.93	12.19	86.47
<i>atpA</i>	18.49	6.16	12.33	33.32
<i>ygfZ</i>	45.15	32.82	12.33	72.69
<i>fkpB</i>	80.88	68.24	12.64	84.37
<i>atpH</i>	19.57	5.39	14.18	27.54
<i>ygfY</i>	47.00	32.67	14.33	69.51
<i>yceK</i>	76.68	62.05	14.63	80.92
<i>ybfA</i>	92.74	77.93	14.82	84.02
<i>soxR</i>	79.04	64.04	15.00	81.02
<i>atpB</i>	42.16	26.31	15.85	62.41
<i>ybdJ</i>	87.00	70.76	16.24	81.33
<i>cpdA</i>	95.11	78.78	16.33	82.83
<i>tolB</i>	87.55	71.04	16.51	81.14
<i>ybiM</i>	58.86	42.06	16.80	71.46
<i>ugpQ</i>	81.04	63.80	17.25	78.72

3.2.4.4 1次スクリーニングで選出した各候補株における2次スクリーニング

3.2.4.3で得られたDOI耐性(低感受性)候補株 $\Delta argO$, $\Delta aspA$, $\Delta ycdH$ の3株及びDOI感受性候補株 $\Delta atpH$, $\Delta atpA$, $\Delta ackA$, $\Delta rffC$, Δgor , $\Delta wzxE$ の6株について2次スクリーニングを実施した。2次スクリーニングでは、各候補株をDOI非含有及び6% DOI含有LB液体培地で培養し、経時的な増殖の変化を測定した結果、DOI耐性(低感受性)候補株として $\Delta argO$ 株、DOI感受性候補株として $\Delta rffC$ 株、 Δgor 株を見出した(図3.52)。培養開始12時間後、 $\Delta argO$ 株のDOI非含有LB液体培地における菌体濁度と6% DOI含有LB液体培地における菌体濁度ほとんど変わらず、 $\Delta argO$ 株のDOI非含有LB液体培地の生育を100%とすると6% DOI含有LB液体培地で90%を示したことから、DOI耐性(低感受性)株として選出した(図3.52(A))。また、①DOI耐性(低感受性)株は、DOIの発酵生産に活用していくこと、②非常の多くの菌株をスクリーニングしたことから菌株の取り違えが起こる可能性を考慮し、再度、*argO*遺伝子破壊株を取得し、DOI感受性について調べた。その結果、keiocollectionの $\Delta argO$ 株同様のDOI耐性(低感受性)を示したことから、*argO*遺伝子は、DOI耐性(低感受性)に関連する遺伝子であると同定した。*argO*はアルギニン排出輸送体をコードする遺伝子であり、その排出輸送体は細胞内のアルギニンのレベルを制御し、塩基性アミノ酸であるアルギニンとリジンの間のバランスを保つのに重要であると考えられている(24)。アルギニン輸送体がDOIの取り込み等の輸送に代用されている可能性が考えられ、DOI耐性に関与している事項は、アルギニン合成系か、輸送システムかを、他のアルギニン蓄積大腸菌変異株のDOI耐性能を調べることにより、今後、明らかになると考えられる。

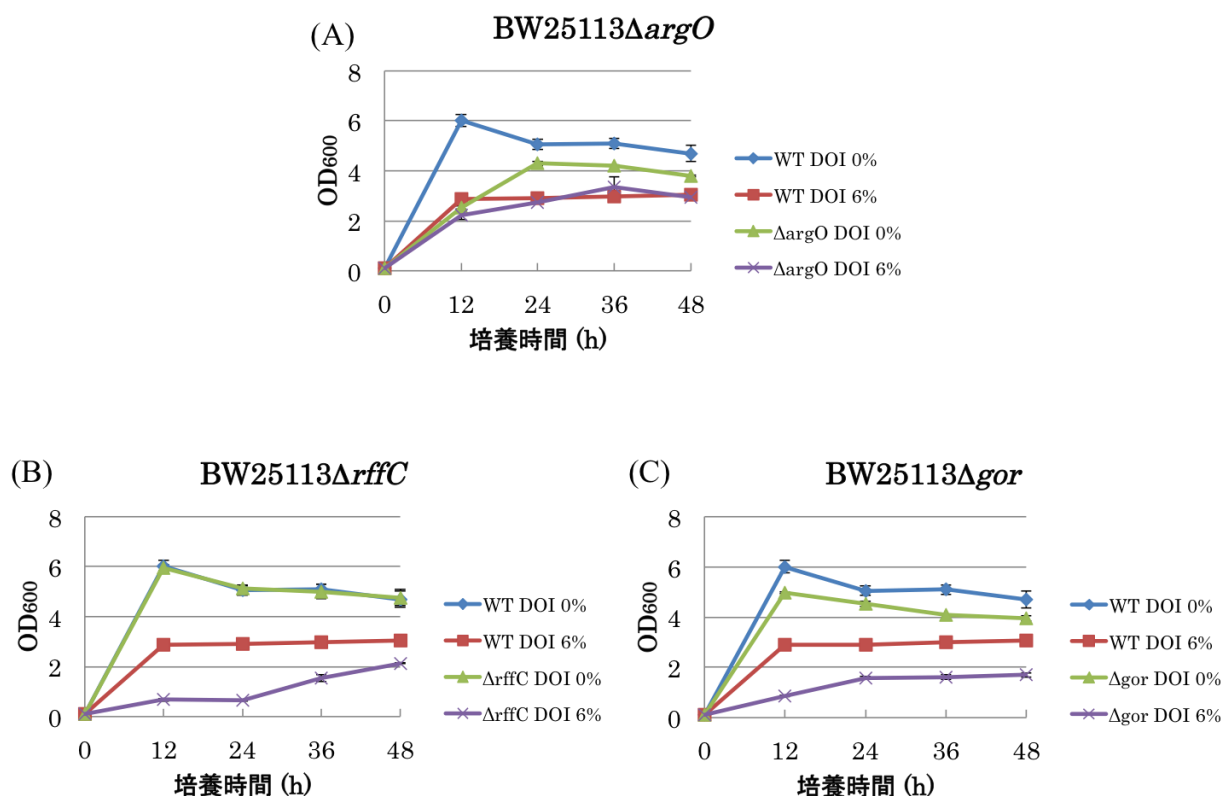


図 3.52 2次スクリーニング

(A)DOI 耐性 (低感受性) 候補株 (B)DOI 感受性候補株

培養開始 12 時間後、 Δ rffC 株の 6% DOI 含有 LB 液体培地の菌体濁度は、BW25113 株の DOI 非含有 LB 液体培地の菌体濁度の 17%を示したため (野生株の DOI 非含有 LB 液体培地の増殖を 100%とする)、 Δ rffC 株を DOI 感受性株として選出した (図 3.2.52 (B))。また、多数の菌株のスクリーニングで、菌株の取り間違いがなかったことを PCR で確認済みである。rffC は TDP フコサミンアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であり、大腸菌の外膜構成因子 LipidIII の合成に関与することが知られている (25)。大腸菌の外膜の機能に支障をきたして結果、DOI に対する感受性が上昇したのではないかと推察する。

培養開始 12 時間後、 Δ gor 株の 6% DOI 含有 LB 液体培地の菌体濁度は、BW25113 株の DOI 非含有 LB 液体培地の菌体濁度の 18%を示したため (野生株の DOI 非含有 LB 液体培地の増殖を 100%とする)、 Δ gor 株を DOI 感受性株として選出した(図 3.52 (C))。また、多数の菌株のスクリーニングで、菌株の取り間違いがなかったことを PCR で確認済みである。gor はグルタチオン還元酵素をコードする遺伝子である (26)。gor 遺伝子が欠失すると、菌体内の還元型グルタチオン量の減少し、細胞内環境が酸化型になることが予想される。この環境が DOI 感受性を上昇させている可能性が考えられる。

3.2.4.5 酸性条件における大腸菌の生育

本研究で利用している DOI 生産性大腸菌宿主株は GI724 株由来であり、その大腸菌は弱酸性条件の pH 5.0 で生育が可能であった。糖化酵素の反応条件も pH 5.0 であることから、pH 5.0 で生育可能な大腸菌宿主の構築を考慮していたが、潜在的な能力で十分であると判断し、耐酸性大腸菌取得は実施しなかった。

3.2.5 培養工学的 DOI 発酵生産

3.2.5.1 DOI の温度、pH に対する安定性

組換え大腸菌により発酵生産された DOI は培養液中に蓄積する。この DOI を精製する過程において、著しく収率や純度が低下する現象が観察されたことから、各温度、pH 条件下における培地中の DOI の化学的安定性について調べた。

各温度 (温度 4, 20, 35, 50°C) における DOI 安定性に対する pH の影響を調べた結果、4°C 条件下では、インキュベート初期から後期にかけて、高い DOI 残存率が維持され、アルカリ性条件下の pH 9.0 でも 72 時間で DOI 残存率は約 87% を示した (図 3.2.53 (A))。温度 20°C の pH 3.0, 5.0 の酸性条件下においてはインキュベート後期にかけて DOI 残存率は約 90% であり、DOI 安定性は高く維持された (図 3.2.53 (B))。しかし、温度 20°C の pH 7.0, 9.0 の中性、アルカリ性条件下においては DOI 残存率は、それぞれ約 60, 52% を示した。35°C 条件下では、20°C 条件下と比較して、どの pH 条件の場合でも DOI 残存率は大きく低下した (図 3.2.53 (C))。温度 35°C の pH 3.0 の酸性条件下においては 72 時間で DOI 残存率は約 80%、pH 9.0 のアルカリ性条件下においては 72 時間で DOI 残存率は約 18% を示した。大腸菌の至適増殖温度に近い 35°C において、DOI の不安定性が見られたことから、培養温度の決定には、DOI 安定性を考慮することが必要であると考えられる。50°C 条件下では、どの pH 条件下においても DOI 残存率は大きく低下し、安定性が 1 番高かった pH 3.0 の酸性条件下においても 72 時間で DOI 残存率は約 30% になった (図 3.2.53 (D))。さらに、pH 9.0 のアルカリ性条件下においては 72 時間で DOI 残存率はほぼ 0% であった。

以上のことから、低温条件下であれば DOI 安定性は高く維持されることが明らかとなり、高温条件下では DOI の分解が促進されるため安定性が低くなると考えられた。また、DOI 生産宿主となる大腸菌の増殖可能温度である 20, 35°C の温度条件下では、pH が中性及びアルカリ性であると DOI 安定性は非常に低くなることから、DOI 発酵生産はある程度酸性条件下で実施することが必要であると考えられる。

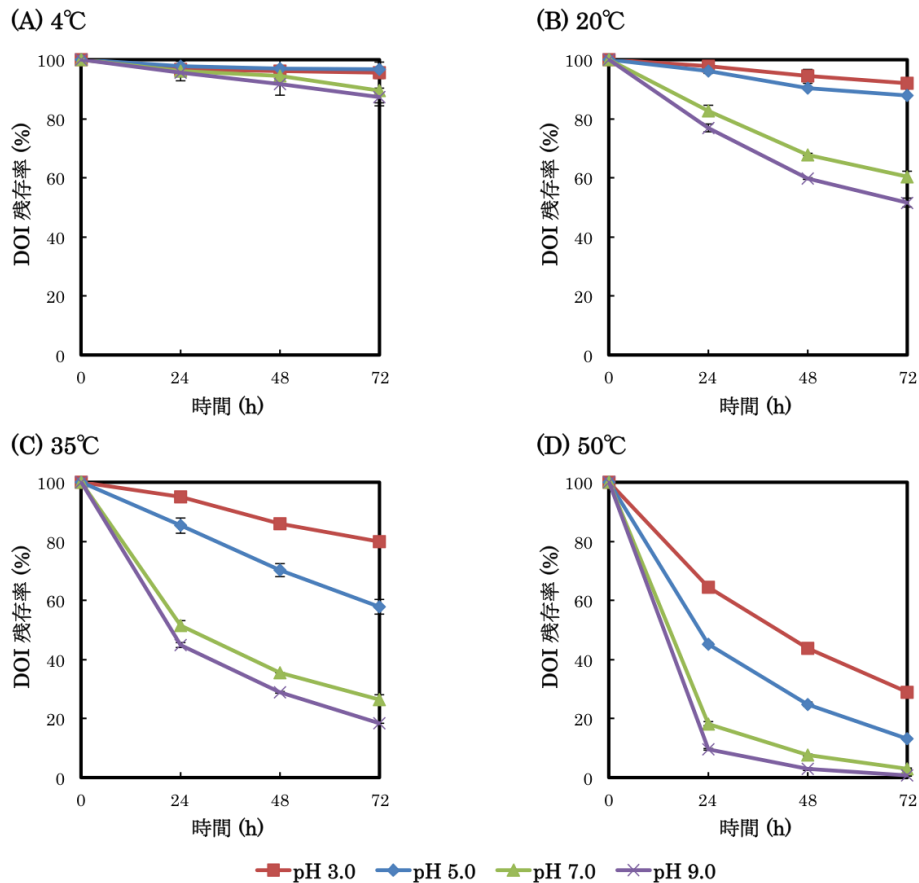


図 3.53 各温度条件下における DOI 安定性に対する pH の影響
(A) 4°C, (B) 20°C, (C) 35°C, (D) 50°C

次に、各 pH (pH 3.0, 5.0, 7.0, 9.0) 条件下における温度に対する DOI 安定性の影響を調べた。pH 3.0 の 4, 20°C の低温条件下においてはインキュベート後期 (72 時間) まで DOI 残存率は約 90% 以上と高く維持されたが、50°C の高温条件下においては DOI 残存率は約 30% まで低下した (図 3.54 (A))。pH 5.0 条件下では、pH 3.0 の場合と比較して、4°C 条件下においては DOI 残存率に差は見られなかったが、20, 35, 50°C 条件下においてはそれぞれ pH 3.0 の場合と比較して、約 4.2, 22, 17% 低下した (図 3.54 (B))。pH 7.0 条件下では、4°C 条件においても 72 時間で約 10% 分解した (図 3.54 (C))。また、pH 5.0 条件下の場合と比較して、さらに DOI 残存率の低下が見られた。pH 9.0 条件下では、pH 7.0 条件下の場合と同様な DOI 残存率の低下を示した (図 3.54 (D))。

以上のことから、pH 3.0 の酸性条件であれば、50°C のような高温条件を除き、DOI の安定性は高く維持されることが明らかとなった。しかし、pH 7.0, 9.0 の中性、アルカリ性条件下では、4°C のような低温条件を除き、DOI は不安定であることが明らかとなった。DOI はその化学構造上、アルカリ性条件下では異性化反応が起こるため、分解し易いと推測されている (27)。本実験の結果、アルカリ性条件だけでなく、中性条件においても DOI の安定性の低さが顕著に見られたことから、中性条件においても異性化反応が起こっているのではないかと考えられる。したがって、DOI の発酵生産を行う場合には、酸性条件下が適していると考えられる。

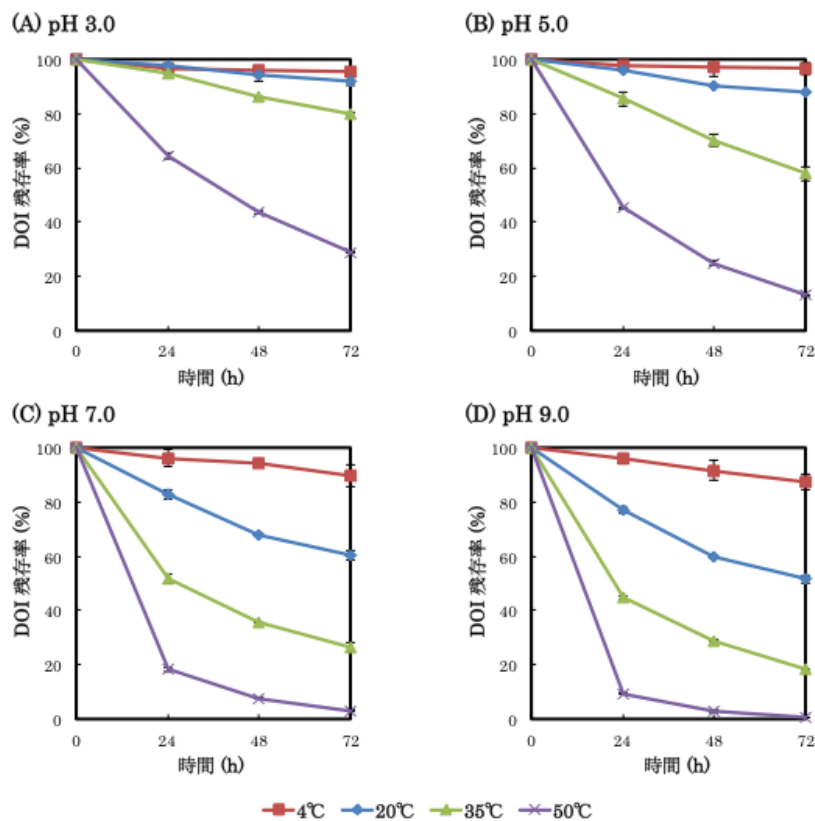


図 3.54 各 pH 条件下における DOI 安定性に対する温度の影響
(A) pH 3.0, (B) pH 5.0, (C) pH 7.0, (D) pH 9.0

以上のことから、4°C の低温条件下においても pH が中性側になるにつれて経時的に DOI の残存率は低くなることが分かった。大腸菌の至適増殖温度付近である 35°C 条件下では、72 時間で pH 3.0 においては DOI 残存率 80%、pH 5.0 においては 58% となった。大腸菌の増殖を考慮すると pH 5.0 付近で培養することが好ましいが、72 時間インキュベートすると DOI 残存率が 58% と低くなるため、DOI の発酵生産において、培養温度を 35°C からさらに下げる必要性が考えられる。また、35°C、pH 5.0 の組み合わせ条件下の 48 時間インキュベート後の DOI 残存率は 70% であることから、発酵生産時間をできる限り短縮化する必要性も考えられる。次の DOI 生産組換え大腸菌による DOI 高発酵生産条件の検討では、DOI の安定性も考慮し、35°C、pH 5.0 をベースとして検討を行うことにした。

3.2.5.2 フラスコ培養における最適 DOI 生産条件の検討

バッフルフラスコで温度、pH を詳細に設定して培養を行い、DOI 発酵生産に及ぼす温度、pH の影響について調べた。実験温度条件と pH は、上述の DOI 安定性への温度及び pH の影響の結果と宿主大腸菌の増殖を考慮して、温度を 27, 30, 33, 37°C、pH を 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 とし、各組み合わせ条件を設定した。また、DOI の基質となるグルコース (Glc) を 3%、DOI 発酵生産宿主大腸菌の生育炭素源となるマンニトール (Man) を 4% として培養を行い、経時的に菌体濁度 (OD₆₀₀)、培地中の DOI 濃度、Glc 濃度及び Man 濃度を測定した。また、培養液中の pH を維持するために、12 時間おきに pH の調整を行った。

培養温度 27℃ 条件下において、培養液を pH 5.0 に維持する培養は、他の pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0) 条件の場合と比べて DOI 生産大腸菌の増殖が悪かった (図 3.55)。これは生育炭素源である Man の消費速度が遅かったためと考えられ、この増殖速度の遅さが、Glc の消費速度及び DOI の生産速度の低下に繋がったと考えられた。pH 5.0 の条件は、DOI 生産大腸菌の増殖に適さないと考えられる。培養温度 27℃ 条件下の培養では、pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 条件下において培養 48 時間で約 30 g/L の Glc から約 27 g/L の DOI へ変換され、この時の変換効率はほぼ 100% であった。

培養温度 30℃ 条件下において、培養初期における大腸菌の増殖速度は全ての pH 条件下で同様な増殖速度を示していたが、培養開始 36 時間後あたりから菌体濁度に差が見られ始め、特に、pH 5.0 及び 7.0 の条件下で DOI 生産大腸菌の増殖の低下が見られた (図 3.56)。また、生育炭素源の Man 消費速度の減少と Glc 消費速度の減少に相関が見られた。30℃ 条件下における培養においても、27℃ 条件下における培養と同様に、pH 5.0 では、増殖速度、Man 消費速度、Glc 消費速度、DOI 生産速度が遅く、DOI 生産大腸菌の DOI 生産培養に適さないと考えられた。30℃ 条件下の培養では、pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 条件下において培養 48 時間で Glc から DOI への変換効率はほぼ 100% であった。しかし、培養 48 時間以降、pH 6.5, 7.0 条件において DOI 量の減少が見られた。これは pH が中性付近の条件であるため、DOI の異性化反応によって分解してしまったのではないかと考えられる。

培養温度 33℃ の pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 条件下において、培養開始 36 時間後に Glc を全て消費し、DOI の最大生産が見られた (図 3.57)。これは培養温度 27, 30℃ の条件下における培養と比較して、生育炭素源の Man 消費速度が上昇したため、大腸菌の増殖速度も上昇し、培養液中の DOI 生産大腸菌の濃度を上昇させた。生体触媒である DOI 生産大腸菌濃度の上昇が、Glc 消費速度の上昇、さらに DOI 生産速度の上昇を引き起こしたと考えられる。また、pH 5.5, 6.0, 6.5 条件下において、培養開始 36 時間後に Glc を全て消費し、Glc から DOI への変換効率はほぼ 100% を示した。培養温度 33℃ の条件下において、pH 5.0 の条件以外は、培養開始 36 時間以降で DOI 量の減少が見られた。これは培養温度 27, 30℃ の条件のときと比較して、DOI の分解率は大きくなっており、温度による DOI の分解の依存度が大きいと考えられ、また、pH がより中性側の条件の方の分解が速かった。

培養温度 37℃ 条件下において、培養開始 36 時間後に pH 6.0, 6.5, 7.0 条件下で、DOI の最大生産が見られた (図 3.58)。しかし、どの pH 条件下においても Glc から DOI への変換効率は 90% よりも低く、さらに pH 5.0 及び 5.5 の条件下では、DOI の基質となる Glc が消費されないため、DOI の生産性が悪くなっていた。また、DOI 最大生産が見られた培養 36 時間以降で DOI 量の減少が見られ、さらに培地中に Man が残存し、増殖が良好と言い難いことから、37℃ という培養温度条件は、本研究で利用している DOI 生産大腸菌に適していないと考えられた。

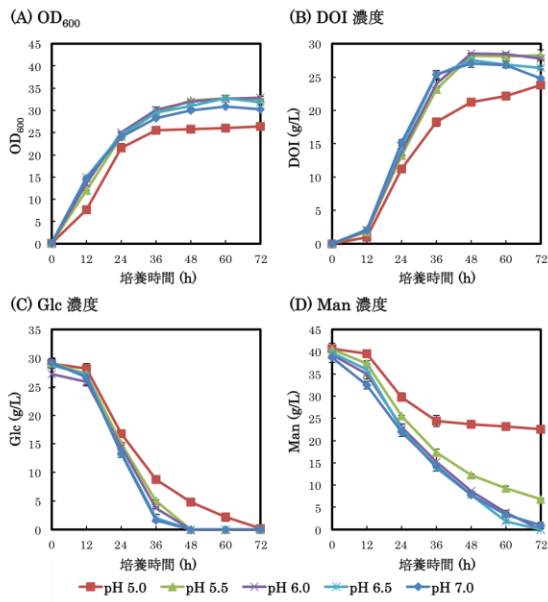


図 3.55 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への pH の影響 (27°C)

(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

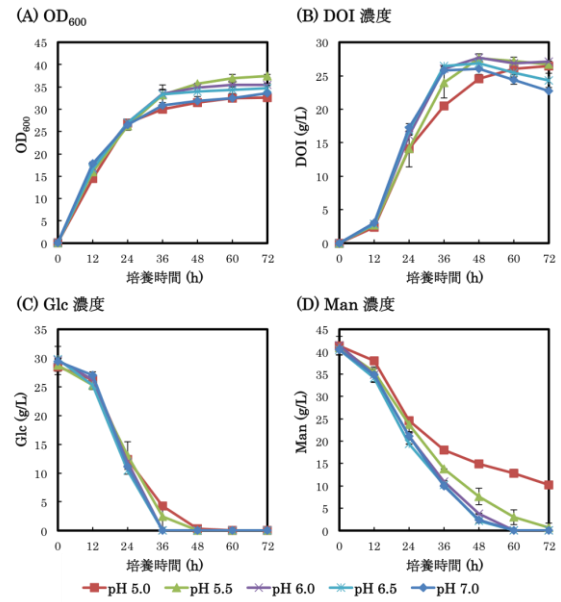


図 3.56 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への pH の影響 (30°C)

(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

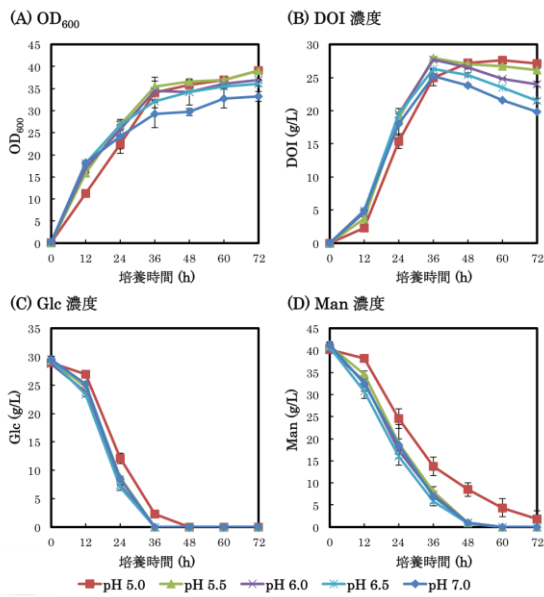


図 3.57 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への pH の影響 (33°C)

(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

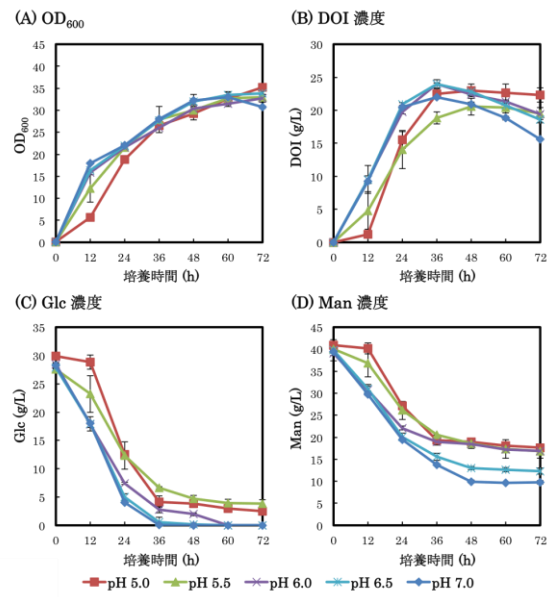


図 3.58 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への pH の影響 (37°C)

(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

次に、pH 5.0 条件下において、各温度での培養結果を見ると、Man の消費速度に大きな差が見られた (図 3.59)。33°C での培養の場合、他の温度より Man の消費速度が速く、短時間で Glc を消費し DOI 高生産性を示した。pH 5.0 の 33°C 条件下において培養 48 時間で培地中の全 Glc を消費し、Glc から DOI への変換効率はほぼ 100% であった。pH 5.0 条件下では、33°C の培養温度が適していると考えられる。

pH 5.5 の条件下において、各温度での培養結果を見ると、pH 5.0 のときと同様に培養温度 33°C のときが、増殖、DOI 生産性、Glc 及び Man の消費が良好であった (図 3.60)。27, 37°C での培養では、Man の消費が悪く、増殖も他の温度と比べて遅かった。pH 5.5 の 33°C 条件下において、培養 36 時間後培地中の全 Glc を消費し、Glc から DOI への変換効率はほぼ 100% を示し、27, 30°C 条件下においても培養 48 時間後培地中の全 Glc を消費し、Glc から DOI への変換効率はほぼ 100% を示した。37°C での培養においては、増殖、DOI 生産性、Glc 及び Man の消費の全てが他の条件 (27, 30, 33°C) と比較して悪く、pH 5.5 の 37°C 条件下は、本研究で利用している DOI 生産大腸菌に適していないと考えられた。

pH 6.0 条件下において、各温度での培養結果を見ると、33°C 条件下において培養 36 時間後で、27, 30°C 条件下においては培養 48 時間後で DOI の最大生産を示し、さらに培地中の全 Glc を消費し、Glc から DOI への変換効率はほぼ 100% を示した (図 3.61)。pH 6.0 の 33, 37°C の条件においては、培養 36 時間後以降 DOI の分解が見られた。pH 6.0 の 37°C 条件における培養では、増殖、DOI 生産性、Glc 及び Man の消費の全てが他の条件 (27, 30, 33°C) と比較して悪く、pH 6.0 の 37°C 条件下は、本研究で利用している DOI 生産大腸菌に適していないと考えられた。

pH 6.5 の条件下において、各温度での培養結果を見ると、pH 6.0 の場合と同様に 33°C 条件下において培養 36 時間後で、27, 30°C 条件下においては培養 48 時間後で DOI の最大生産を示し、さらに培地中の全 Glc を消費し、Glc から DOI への変換効率はほぼ 100% を示した (図 3.62)。しかしながら、各温度の培養で、DOI 最大生産を示した後、培養液中の DOI 量は経時的に減少した。これは pH の影響による DOI の分解が考えられ、pH 6.0 での培養の場合と比較して、さらに分解速度は速かった。すなわち、本研究で利用している DOI 生産大腸菌の DOI 発酵生産には、pH 6.5 条件は適さないと考えられる。

pH 7.0 条件下において、各温度での培養結果を見ると、27°C 条件下において培養 48 時間後で DOI の最大生産を示し、さらに培地中の全 Glc を消費し、Glc から DOI への変換効率はほぼ 100% を示した (図 3.63)。しかしながら、pH 6.5 の場合と同様に pH 7.0 条件下においても各温度の培養で、DOI 最大生産を示した後、培養液中の DOI 量は経時的に減少し、pH 6.5 での培養の場合と比べ、さらに DOI 分解速度は速かった。すなわち、本研究で利用している DOI 生産大腸菌の DOI 発酵生産には、pH 7.0 条件は適さないと考えられる。

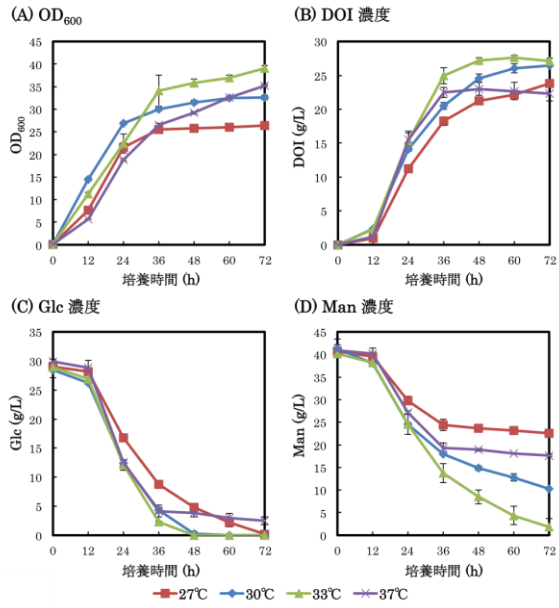


図 3.59 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への温度の影響 (pH 5.0)

(A) OD_{600} , (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

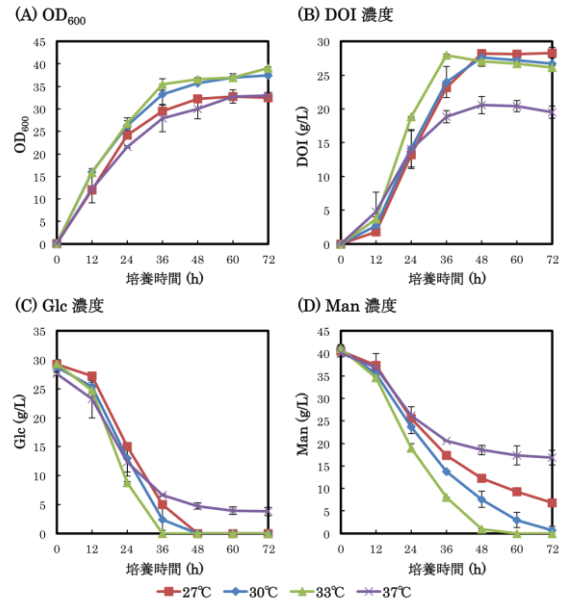


図 3.60 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への温度の影響 (pH 5.5)

(A) OD_{600} , (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

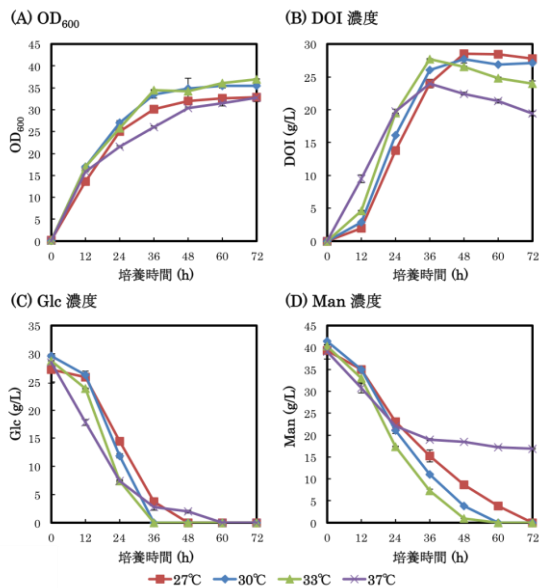


図 3.61 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への温度の影響 (pH 6.0)

(A) OD_{600} , (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

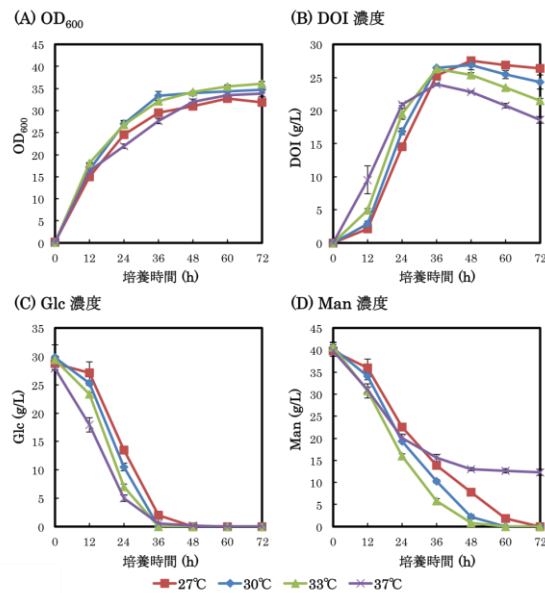


図 3.62 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への温度の影響 (pH 6.5)

(A) OD_{600} , (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

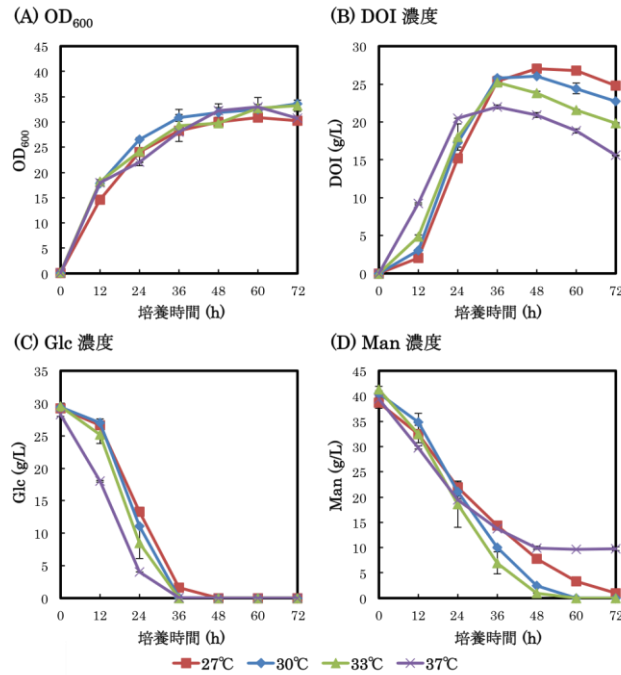


図 3.63 GI724Δpzp/btrC 株による DOI 生産への温度の影響 (pH 7.0)
 (A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

温度及び pH の各組み合わせから DOI の生産性を再度検討した。培養開始 36 時間時において、Glc から発酵生産された DOI 生産量は、30°C の pH 6.0, 6.5 及び、33°C の pH 5.5, 6.0, 6.5 条件で 26 g/L 以上の DOI を生産した。また、培養開始 36 時間時に全ての Glc を消費し、Glc から DOI への変換効率は 98% 以上と高い値を示した。pH 7.0 条件下では、30, 33°C の培養において、培養開始 36 時間時に全ての Glc を消費したが、pH 6.0, 6.5 の中性条件下に比べ DOI 生産量は低い。これは、よりアルカリ性側の条件のため培養過程で異性化反応により DOI が分解してしまったためであると考えられる。培養開始 36 時間では、30°C、pH 6.0, 6.5 及び、33°C、pH 5.5, 6.0, 6.5 の条件の中に至適 DOI 生産条件があると考えられる。培養開始 48 時間時においては、27°C の pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0、30°C の pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 及び、33°C の pH 5.0, 5.5, 6.0 の条件で 26 g/L 以上の DOI を生産した。また、これらの条件において、培養開始 48 時間時に全ての Glc を消費し、Glc から DOI への変換効率は 98% 以上を示した。しかし、33°C の条件下では、培養 36 時間から 48 時間の間に DOI の分解が見られ、特に中性付近で分解率が高かった。これは、培養液中に蓄積された DOI が時間の経過とともに、本条件で異性化が進み、分解してしまったためであると考えられる。37°C の条件下においては、pH 5.0, 5.5, 6.0 の条件で Glc は全て消費しきらず DOI 生産量も他の条件 (27, 30, 33°C) と比べて低かった。pH 6.5, 7.0 条件では、Glc を全て消費したが、DOI 生産量は他の条件 (27, 30, 33°C) と比べて低く、本条件において培養液中に蓄積された DOI の分解が促進されたと考えられる。これらの結果より、3% Glc から培養 36 時間以内に高効率で DOI を生産するためには、温度 30 または 33°C、pH 5.5, 6.0, 6.5 の間に適した条件があり、培養 48 時間以内に高効率で DOI を生産するためには、温度 27, 30, 33°C、pH 5.5, 6.0 の間に適した条件があると考えられる。大腸菌の至適増殖温度に近い 37°C では、DOI の分解の促進が考えられ、また、pH が中性及びアルカリ性条件下では、異性化反応により DOI の分解が促進されてしまうと考えられる。

したがって、ジャーファーメンターを利用した DOI 生産性の検討では、大腸菌の増殖と培養液中に蓄積された DOI の安定性の維持を考慮した条件である、培養温度 27, 30, 33°C、pH 5.5, 6.0 の条件について検討することとした。

3.2.5.3 廃菌床糖化液からの DOI 発酵生産の試み

表 3.14 キノコ廃菌床糖化処理法とその糖成分

	グルコース(%)	キシロース(%)
①生物的前処理⇒アルカリ処理⇒糖化(酢酸バッファー)	1.90	0.39
②生物的前処理⇒アルカリ処理⇒糖化(Maclvaineバッファー)	1.71	0.34
③生物的前処理⇒ハンマークラッシュ処理⇒糖化(酢酸バッファー)	0.81	0.17
④生物的前処理⇒ハンマークラッシュ処理⇒糖化(Maclvaineバッファー)	0.71	0.14

ジャーファーメンターにおける培養工学的な高効率 DOI 発酵生産の検討を実施する前に、実際のキノコ廃菌床由来の糖化液からの DOI 生産性について小スケールで検討を行った。環境低負荷型糖生産システムの開発を担当した長岡科学技術大学から提供されたキノコ廃菌床糖化液の処理方法と糖濃度を以下の表 3.14 に示す。生物的前処理後、化学的なアルカリ処理または物理的なハンマークラッシュ処理を施し、その後、トリコデルマ・リーセイ由来のセルラーゼで糖化を行った。また、組換え大腸菌を利用して、糖化液から DOI を発酵生産させることを考慮し、大腸菌の増殖阻害に関係性の深い酢酸バッファーだけでなく、Maclvaine バッファーの条件においても糖化を行った。グルコースの最終濃度 2%、キシロースの最終濃度 1.5%として DOI の発酵生産実験を行った。得られた糖化液の濃度が薄かったため、糖が足りない場合は試薬のグルコース及びキシロースを投入して補った。また、培地が 100%糖化液のもの、50%糖化液のものと同糖化液濃度を薄めながら条件検討を行った。DOI 発酵生産の結果、①アルカリ処理⇒糖化(酢酸バッファー)の糖化液 100%のときのみ、DOI 発酵生産用組換え大腸菌は生育しなかった(図 3.64)。これは、酢酸バッファーと生物的前処理とアルカリ処理の時に抽出された生育阻害物質の効果によるものであると考えられる。それ以外の前処理条件では、DOI 発酵生産用組換え大腸菌は生育可能であった。また、全体的に培地中に持ち込まれる糖化液濃度が薄くなるほど生育が良好になり、コントロールとして培養した試薬培地における大腸菌の生育よりも向上した(図 3.64)。これは各前処理条件において抽出された生育阻害物質が希釈され、その効果が小さくなったこと、さらに糖化液中に含まれる糖以外の成分によると考えられる。組換え大腸菌の DOI 生産性について検討したところ、増殖が良好であるにもかかわらず、培地中の糖化液の割合が多い場合、DOI の生産性がコントロールと比較して、大きく落ち込んでいた。また、キシロースの残量を調べてみると、培地中の糖化液の割合が多いほど多く残存していた(図 3.65)。DOI の原料であるグルコースを細胞内に取り込むためには、キシロースを消費し、ホスホエノールピルビン酸を生産して、大腸菌のグルコース取り込みのメイン系路であるグルコース PTS 経路で取り込む必要がある。生育しているにもかかわらず、あまりキシロースが消費されていないことは、培地中の酵母エキス等を利用して、生育し、生育炭素源としてキシロースを利用してないことが考えられる。すなわち、①キシロースの消費経路を強化する、②ホスホエノールピルビン酸に依存しない

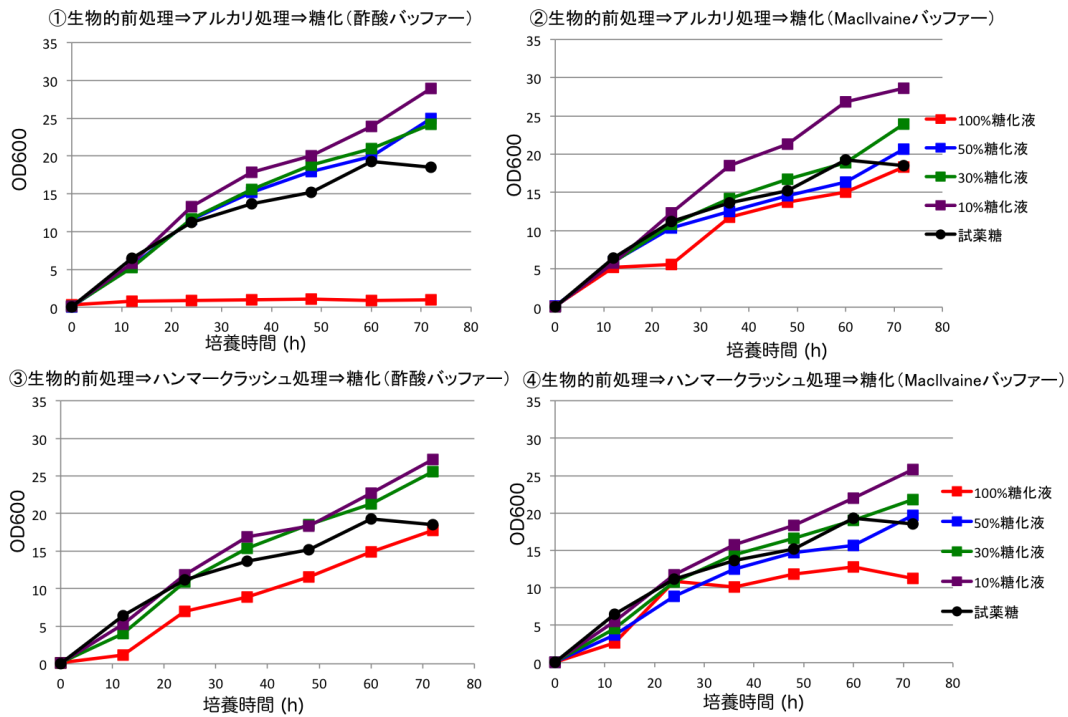


図 3.64 廃菌床糖化液からの DOI 発酵生産検討 (宿主大腸菌の生育)

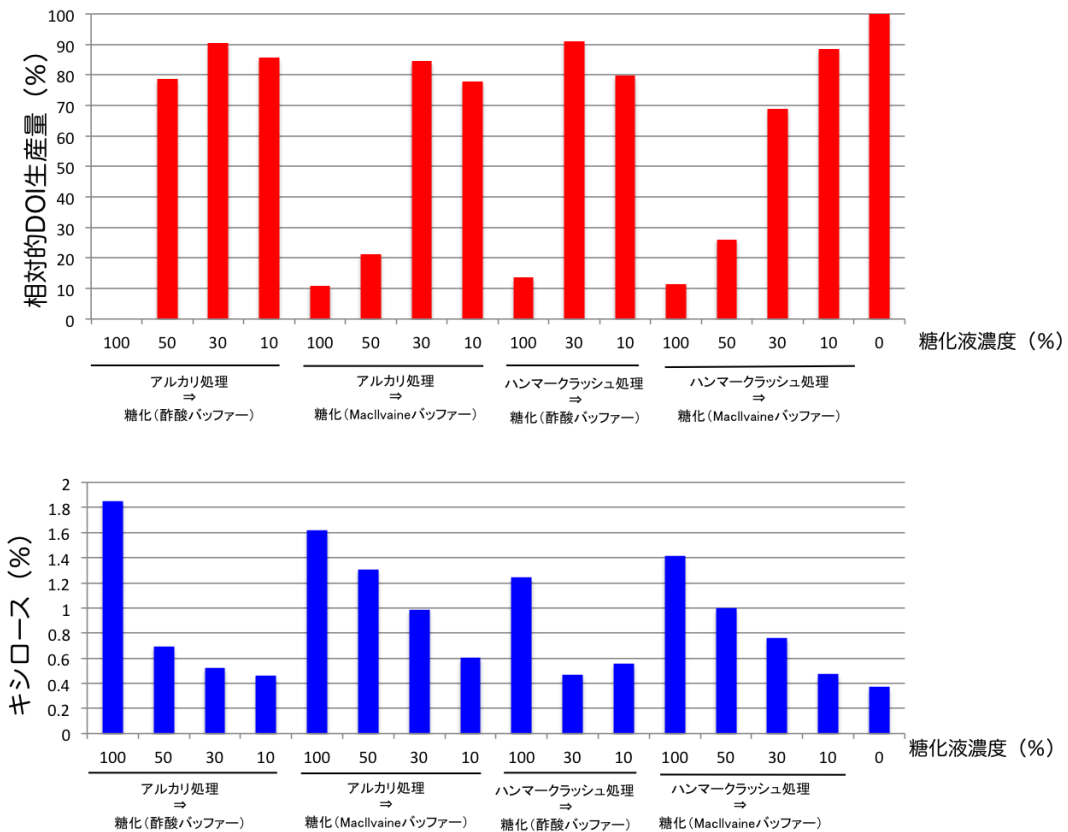


図 3.65 廃菌床糖化液からの DOI 発酵生産検討 (DOI 生産と生育炭素源の関係)

グルコースの取り込みを本 DOI 生産菌に導入することで、DOI の生産性が向上すると考えられた。具体的には、キシロースの資化経路の上流に位置する *xyl* オペロン群の発現強化、GalP, *mgIBAC*, *manXYZ* のようなグルコース PTS 以外のグルコース取り込み系路の強化、ザイモナス・モビリス由来のグルコース取り込み促進タンパク質 Gif の大腸菌への導入が挙げられる。今後、取り組む非常に大事な課題である。

3.2.5.4 ジャーファーマンター培養における最適 DOI 生産条件の検討

3.2.5.4.1 3% Glc 条件下における最適 DOI 生産条件の検討

フラスコレベルの培養における DOI 発酵生産条件の検討結果を考慮し、ジャーファーマンターを利用した DOI 発酵生産条件の検討を、温度 (27, 30, 33°C)、pH (5.5, 6.0) の条件の組み合わせで実施し、スケールアップを試みた。ジャーファーマンター培養では、攪拌速度 450 rpm、通気量 5 L/min、3% Glc、4% Man の条件に固定し、温度を 27, 30, 33°C、pH を 5.5, 6.0 にそれぞれ設定して検討を行った。

pH 5.5 条件下において、各温度での培養結果を見ると、培養初期 (12 時間後) においては、培養温度 27, 30°C で同様な増殖速度を示したが、培養中期 (24 時間以降) ではそれぞれの温度条件下において大腸菌の増殖に差が見られた (図 3.66)。温度が低い条件ほど、生育炭素源である Man の消費が遅く、増殖速度に差が出たと考えられる。培養温度 27°C 条件では、培養開始 48 時間時におよそ 18.8 g/L、培養開始 60 時間時におよそ 20.3 g/L の DOI 生産性を示し、その時の Glc 消費量からの DOI への変換効率は、それぞれおよそ 99, 92% であった。培養温度 30°C 条件では、培養開始 48 時間時におよそ 23.3 g/L、培養開始 60 時間時におよそ 24.3 g/L の DOI 生産性を示し、その時の Glc 消費量からの DOI への変換効率は、それぞれおよそ 98, 96% であった。培養温度 33°C 条件では、培養開始 48 時間時にほとんど全ての Glc を消費し、およそ 23.5 g/L の DOI 生産性を示し、Glc から DOI への変換効率はおよそ 92% であった。

pH 6.0 条件下において、各温度での培養結果を見ると、27°C 条件下において培養 48 時間で、30, 33°C 条件下においては培養 36 時間で Glc から DOI への変換効率はおよそ 99% を示した (図 3.67)。培養 24 時間を見ると、33°C での培養においては他の温度に比べて、単位時間辺りの DOI 生産速度が速いということが確認できる。培養温度 33°C の条件では、培養 36 時間後に全ての Glc を消費し DOI へと変換したが、培養 48 時間後では DOI 量は減少した。これは、温度による DOI の分解が考えられるが、より短時間で効率良く DOI を生産するためには、培養温度 33°C が適していると考えられる。これらの結果より、pH 5.5 条件では、pH 6.0 に比べ、各温度での増殖速度及び DOI 生産速度が遅かった。これは、pH の影響により大腸菌の増殖が悪くなり、培養液中の生体触媒である DOI 生産組換え大腸菌の菌数が少ないため、DOI 生産速度も遅くなったと考えられる。効率良く DOI の生産性を高めるためには、大腸菌の増殖が重要なファクターとなるため、pH 5.5 は本大腸菌宿主には適していないと考えられる。よって、3% Glc 条件下においては、33°C、pH 6.0 条件が最適であると考えられる。

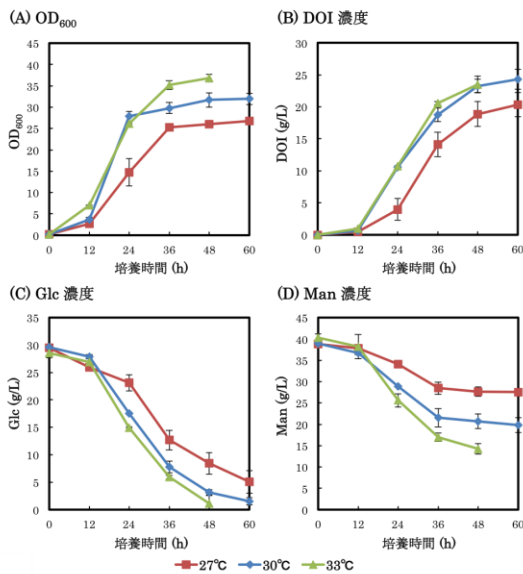


図 3.66 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への温度の影響 (pH 5.5, 450rpm, 3% Glc)

(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

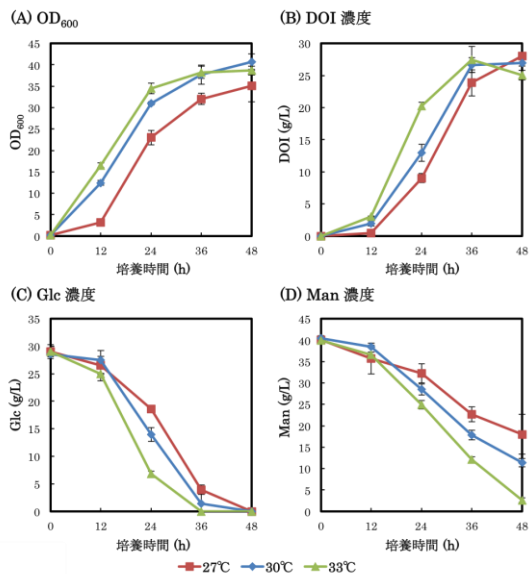


図 3.67 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への温度の影響 (pH 6.0, 450rpm, 3% Glc)

(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

3.2.5.4.2 高濃度 Glc 条件下における DOI 生産性への影響

初発に仕込む Glc の濃度が高ければ DOI の高生産にもつながると考え、初期 Glc 濃度を 5% として培養を行った (図 3.68)。まず、3% Glc 条件下で培養を行った結果を参考にして、pH 6.0、温度 30 または 33°C の条件で検討した。温度 33°C、pH 6.0 の条件では、培養 48 時間で 5% Glc を全て消費したが、このときの Glc から DOI への変換効率はおおよそ 80% であり、分解の可能性が考えられた。特に、培養中期から後期においては、DOI の原料である Glc が消費されているにもかかわらず、DOI 生産性の向上は見られなかった。温度 30°C、pH 6.0 条件下においては、培養 48 時間で、Glc がまだ残存しているが、Glc から DOI への変換効率はおおよそ 99% を示し、40 g/L の DOI 濃度の培養液の生産が可能となった。すなわち、5% Glc の高濃度 Glc 条件下における培養温度は 30°C (pH 6.0) が適していると考えられる。

次に、培養温度を 30°C、初期 Glc 濃度を 6% として培養を行い、3, 5% Glc 条件のときと比較した (図 3.69)。5, 6% Glc 条件下においては、増殖に差が見られなかったが、DOI 生産性に大きな差が見られた。培養開始 48 時間後で、Glc がまだ残存しているが、5% Glc 条件下においては、Glc から DOI への変換効率はおおよそ 99% (40 g/L) を示し、6% Glc 条件下においては、Glc から DOI への変換効率はおおよそ 89% (33 g/L) を示した。また、培養開始 60 時間以降では、それぞれの条件において DOI の分解が予想された。また、DOI 生産の生体触媒となる組換え大腸菌の増殖は、初期 Glc 濃度が 5, 6% になると培養開始 24 時間以降の増殖が、初期 Glc 濃度が 3% の場合と比較して悪くなる。すなわち、初期糖濃度を抑えることで、増殖を良好にすることができると考えられる。

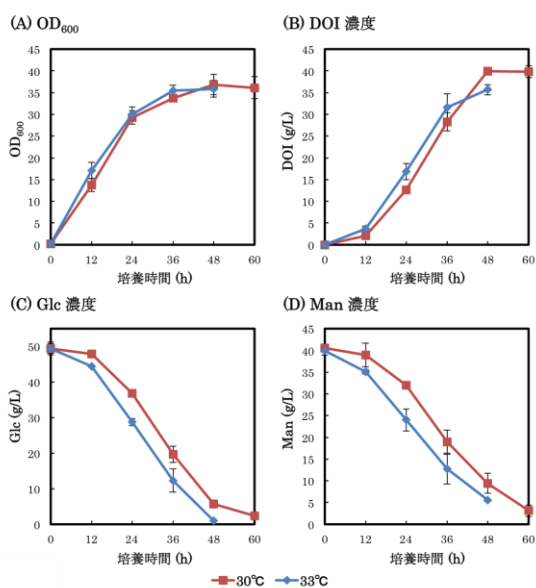


図 3.68 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への温度の影響 (pH 6.0, 450rpm, 5% Glc)
(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

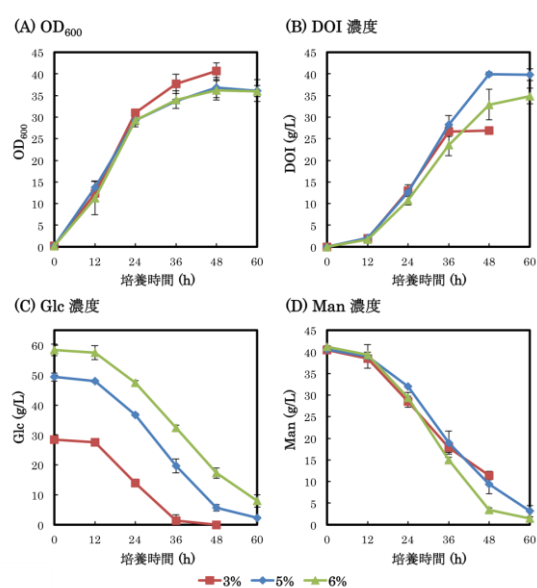


図 3.69 *GI724Δpzp/btrC* 株による DOI 生産への Glc 濃度の影響 (30°C, pH 6.0, 450rpm)
(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

以上より、本条件 (30°C、pH 6.0、450 rpm、通気量 5 L/min、2×YT 培地) のジャーファーメンター培養において DOI を高生産させるためには、初期 Glc 濃度 5% が上限であると考えられる。

3.2.5.4.3 各攪拌速度における DOI 生産性への影響

攪拌速度、通気量による溶存酸素は、微生物の培養に多大な影響を与える。本研究室で所有するジャーファーメンターの最大通気量は、5 L/min であるため、5 L/min で固定した。攪拌速度をそれぞれ 400～600 rpm まで 50 rpm おきに設定して培養を行い、各攪拌速度における DOI 生産性への影響について検討した。

攪拌速度 400 rpm における培養では、培養開始 48 時間時におよそ 28.2 g/L、培養開始 60 時間時におよそ 32 g/L の DOI 生産性を示し、Glc はまだ残存しているがその時の Glc 消費量からの DOI への変換効率は、それぞれおよそ 85, 80% であった (図 3.70)。攪拌速度 450 rpm における培養では、培養開始 48 時間時におよそ 40 g/L の最大 DOI 生産性を示しその後 DOI 生産量は上昇しなかったが、その時の Glc 消費量からの DOI への変換効率はおよそ 99% であった。攪拌速度 500 rpm における培養では、培養開始 48 時間時におよそ 35.2 g/L、培養開始 60 時間時におよそ 37 g/L の DOI 生産性を示し、その時の Glc 消費量からの DOI への変換効率は、それぞれおよそ 92, 91% であった。攪拌速度 550 rpm における培養では、培養開始 48 時間時におよそ 32.7 g/L、60 時間培養時におよそ 34 g/L の DOI 生産性を示し、その時の Glc 消費量からの DOI への変換効率は、それぞれおよそ 87, 84% であった。攪拌速度 600 rpm における培養では、48 時間培養時におよそ 32 g/L の最大 DOI を生産しその後 DOI 量の増加は見られなかったが、その時の Glc 消費量からの DOI への変換効率はおよそ 87% であった。

各攪拌速度における培養 48 時間時の DOI 生産性に注目すると、攪拌速度が速い、つまり酸素供給が高いからといって DOI の生産性に大きく影響するわけではないということが分かった。しかし、攪拌速度が速い培養ほど培養初期において生育炭素源である Man の消費速度が速く、菌体の増殖速度にも影響が出ていると考えられる。また、各攪拌速度における培養 48 時間時の Glc から DOI への変換効率に注目すると、450, 500 rpm 条件下において変換効率は、それぞれおよそ 99, 92% を示した。

以上の結果より、攪拌速度が速い条件ほど、DOI 生産性及び変換効率は減少してしまうことが分かった。これは、培養液中の溶存酸素濃度が影響し、DOI の分解が促進されている可能性があると考えられる。したがって、ジャーファーメンター培養における最適攪拌速度を 450 rpm とした。

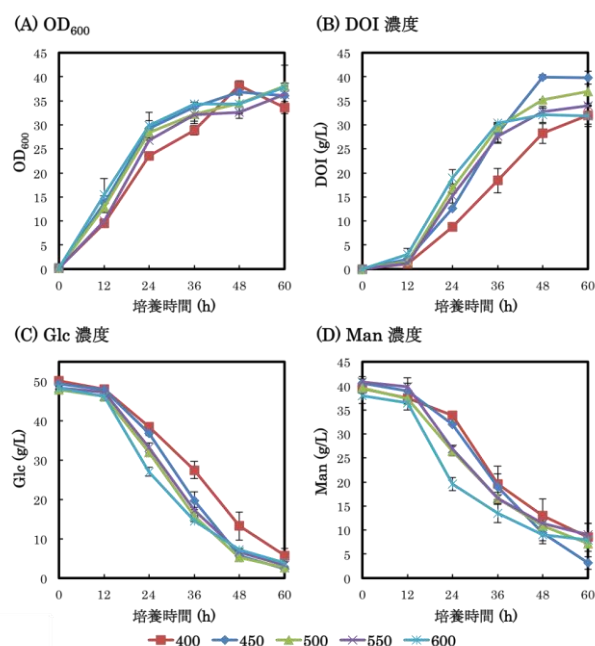


図 3.70 GI724 Δ pzp/btrC 株による DOI 生産への攪拌速度の影響(30°C, pH 6.0, 5% Glc)
(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

3.2.5.4.4 各生育炭素源における DOI 生産性への影響

本研究で用いている大腸菌株は、生育炭素源としてグルコースを利用することができないため、他の炭素源を生育炭素源として利用しなければならない。現在は、DOI 生産性組換え大腸菌が生育炭素源として良好に資化する Man を用いて DOI の高発酵のための培養を行っているが、他の炭素源であるグリセロール (Gly)、フルクトース (Fru)、キシロース (Xyl) を生育炭素源として利用した場合の DOI 生産性への影響を検討した。

培養初期においては、生育炭素源として Man, Fru を利用した場合の DOI 生産大腸菌の増殖が良く、培養中期では、生育炭素源として Gly を利用した場合の DOI 生産大腸菌の増殖が良かった (図 3.71)。しかしながら、Xyl を生育炭素源として利用した場合は、Man, Gly, Fru の場合と比較して増殖があまり良くなく、本大腸菌宿主では、他の炭素源に比べてカタボライト抑制が強いためであると推察される。DOI 生産性に関しては、Man 及び Gly を利用した発酵生産が培養開始 48 時間時におよそ 40 g/L の最大 DOI 生産性を示した (図 3.71)。その時の Glc 消費量からの DOI への変換効率は、それぞれおよそ

99% であった。生育炭素源として Fru を利用した場合の培養開始 48 時間時の DOI 生産性は、およそ 30 g/L であり、その時の Glc 消費量からの DOI への変換効率はおおよそ 98% であった。生育炭素源として Xyl を利用した場合の培養開始 48 時間時の DOI 生産性は、およそ 28.6 g/L であり、その時の Glc 消費量からの DOI への変換効率はおおよそ 95% であった。いずれの培養においても、培養 48 時間の時点で消費した Glc からの DOI 生産効率は 95% 以上と高い値を示した。しかし、短時間でより多くの DOI を高生産させるためには、より増殖速度が速く、基質である Glc を速く消費する必要がある。生育炭素源として Fru, Xyl を利用した場合では、大腸菌の増殖と Glc の消費速度が遅いため、DOI 発酵生産のための生育炭素源としては適していないと考えられる。

各生育炭素源における培養 48, 60 時間時の DOI 生産性を比較してみると、どちらの時間においても Man, Gly を生育炭素源として利用した培養の方が DOI 生産性は高いということが分かった。非可食バイオマスの Man 含有量は低いため、Man を DOI 発酵生産を行う組換え大腸菌の生育炭素源として利用することは実用性に乏しいが、廃 Gly のバイオマス利用が様々なところで試みられており、Gly を生育炭素源としての利用は、実用性が高いと考えられる。

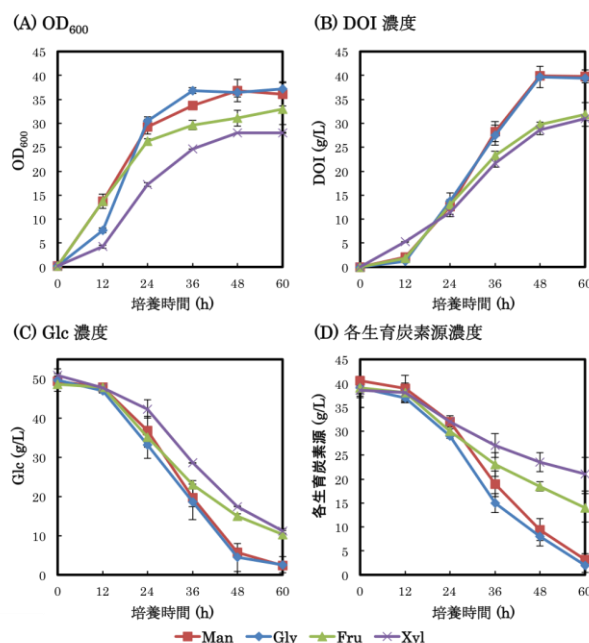


図 3.71 GI724Δpzp/btrC 株による DOI 生産への生育炭素源の影響
30°C, pH 6.0, 450 rpm, 5% Glc
(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) 各生育炭素源濃度

3.2.5.4.5 高濃度窒素源培地における DOI 生産性への影響

微生物を培養する上で、窒素源は炭素源に次ぐ栄養源であり、微生物の増殖に必要不可欠である。従来使用していた 2 × YT 培地成分の窒素源である Yeast Extract の濃度を 1% から 3% に変更した培地 (以下、HNS 培地) で培養を試みることで、大腸菌の増殖と DOI 生産性にどのように影響があるか検討した。また、HNS 培地における攪拌速度、初期 Glc 濃度の検討を行うことで、回分培養での DOI 高発酵生産を目指した。

従来の 2 × YT 培地において DOI を高生産した条件である、30°C、pH 6.0、450 rpm、通気量 5 L/min、5% Glc、4% Man の条件では、60 時間培養し、まだ培地中の Glc が残存しているがその際の DOI 生産量はおよそ 40 g/L であった (図 3.72)。窒素源濃度を高くした HNS 培地では、同じ培養条件で 48 時間培養し、ほとんど全ての培地中の Glc 及び Man を消費した。その際の DOI 生産量はおよそ 41.3 g/L であり、このときの Glc から DOI への変換効率はおよそ 93% であった。また、菌体濁度に注目すると、培養初期 (培養開始 12 時間) における大腸菌の増殖速度に差はないが、24 時間以降の培養中期から培養後期にかけて増殖速度に差が見られ始め、培養 48 時間では HNS 培地の菌体濁度は 2 × YT 培地のおよそ 2.1 倍になった。菌体濁度の上昇により、2 × YT 培地と比べ Glc 及び Man の消費速度も上昇し、短時間で DOI の高生産につながったのではないかと考えられる。

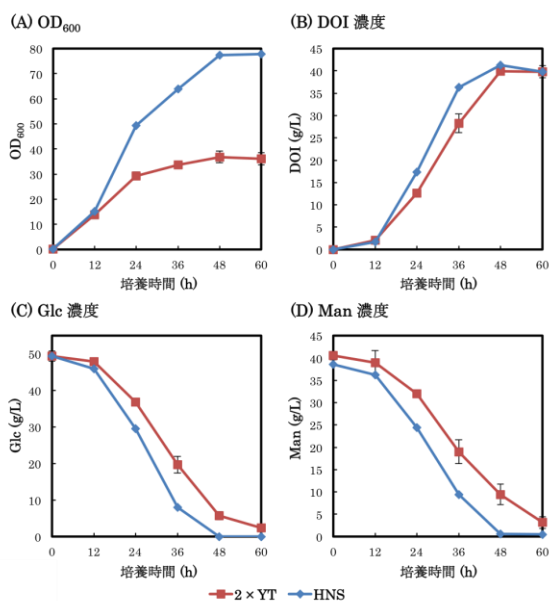


図 3.72 GI724Δpzp/btrC 株による DOI 生産への培地成分の影響

30°C, pH 6.0, 450rpm, 5% Glc

(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

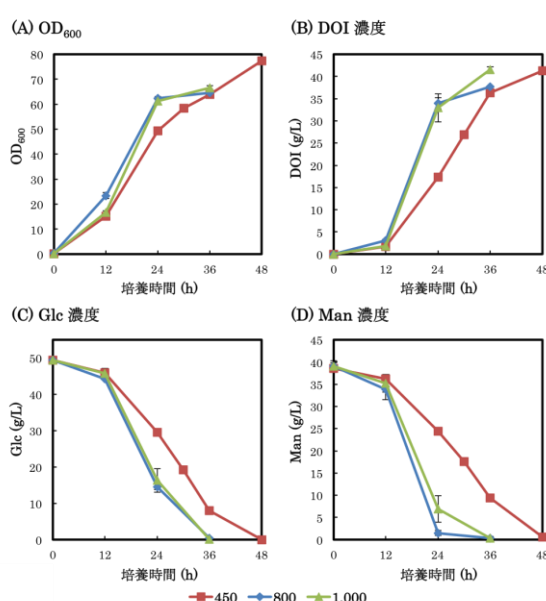


図 3.73 GI724Δpzp/btrC 株による DOI 生産への攪拌速度の影響

30°C, pH 6.0, 5% Glc, HNS medium

(A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

次に、HNS 培地を用いて攪拌速度を 800, 1,000 rpm で培養を行い、450 rpm のときと比較した (図 3.73)。800, 1,000 rpm での培養は、450 rpm での培養に比べ、大腸菌の増殖速度、DOI 生産速度、Glc 及び Man の消費速度が速かった。800, 1,000 rpm における培養では、どちらの条件も培養 36 時間時に培地中の Glc 及び Man を全て消費し、その際の DOI 生産量はそれぞれおよそ 37.7, 41.5 g/L であった。また、このときの Glc から DOI への変換効率はそれぞれおよそ 85, 94% であった。攪拌速度を速くすることで、より好氣的に大腸菌が増殖でき、短時間で DOI を高生産することが考えられた。1,000 rpm の培養については、450 rpm での培養より培養時間を 25% 短縮し、高濃度の DOI を生産することに成功した。

次に、HNS 培地を用いて 41.5 g/L/36 h の DOI 生産性を示した、攪拌速度 1,000 rpm の条件で初期 Glc 濃度を 6% として培養を行い、5% Glc 条件のときと比較した (図 3.74)。初期 Glc 濃度 6% での培養では、培養開始 36 時間後で Glc がまだ残存しているが、39.1 g/L の最大 DOI 生産性を示し、その際の Glc から DOI への変換効率はおおよそ 78% であった。それぞれの条件で培養 36 時間後に最大 DOI 生産性を示したが、6% Glc 条件では、培養 48 時間後に全ての Glc を消費し、DOI 濃度は 35.6 g/L まで減少した。その際の Glc から DOI への変換効率はおおよそ 67% であった。さらに、攪拌速度 1,000 rpm での培養は、800 rpm の培養と比べ生育炭素源である Man の消費が速かった。すなわち、初期 Glc 濃度がある一定以上あること、または生育炭素源の枯渇が、DOI の分解の促進へ繋がった可能性が考えられた。この現象は、攪拌速度を 450 rpm のときも見られた現象である。今後は、高効率 DOI 生産を維持できる回分培養可能な初期 Glc 濃度の検討、生育炭素源の Man 濃度の検討、培養液中に蓄積する DOI の影響等を考慮して、上記した可能性について検討する必要がある。

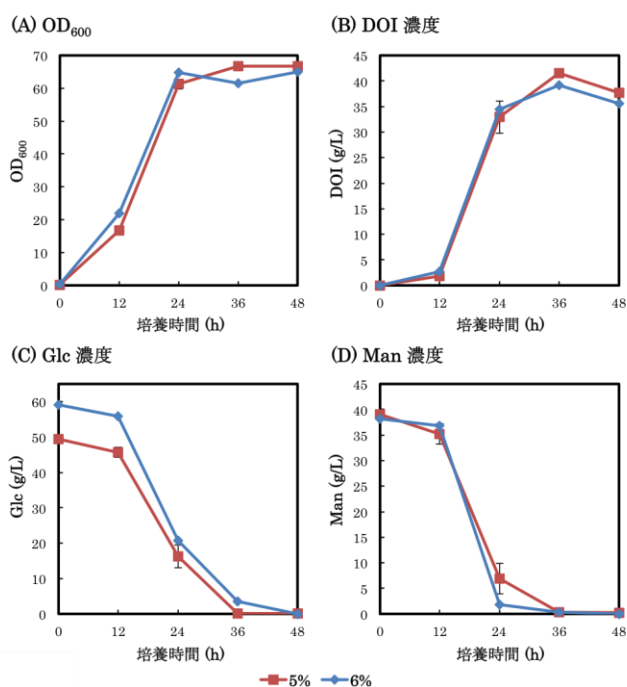


図 3.74 GI724Δpzp/btrC 株による DOI 生産への Glc 濃度の影響

30°C, pH 6.0, 5% Glc, HNS medium (A) OD₆₀₀, (B) DOI 濃度, (C) Glc 濃度, (D) Man 濃度

以上の結果より、高濃度窒素源培地によって従来の培地より大腸菌の増殖速度が上昇し、高密度の大腸菌体が培養液中に存在したことによって Glc から DOI への変換速度が上昇したと考えられる。また、攪拌速度を速くすることで、より短時間で全ての糖を消費し DOI の高生産へとつながった。しかし、初期 Glc 濃度を 6% で行った培養では DOI 生産性が低下したことから、培養条件及び培地成分のさらなる検討が必要であると考えられた。回分培養では、初期 Glc 濃度の至適濃度が決定されつつあることから、今後は、DOI を高生産するために培地中の Glc 濃度をある一定に保ちつつ Glc、Man、培地成分を流加しながら培養を行う、流加培養の必要性もあると考えられた。

3.2.5.4.6 高活性型 DOI 合成酵素を利用した流加培養法による DOI 発酵生産の試み

3.2.1 で取得した高活性型 DOI 合成酵素 W293R を導入した DOI 生産組換え大腸菌を利用して流加培養を試みた。生育炭素源としては、3.2.5.4.4 に示したように、①キシロースの資化性があまり良くなく増殖が遅いこと、②キノコ廃菌床から得られた糖化液はキシロース成分が少ないことから、廃グリセロールがバイオマス原料として注目を浴びているグリセロールを生育炭素源として実験を行った。

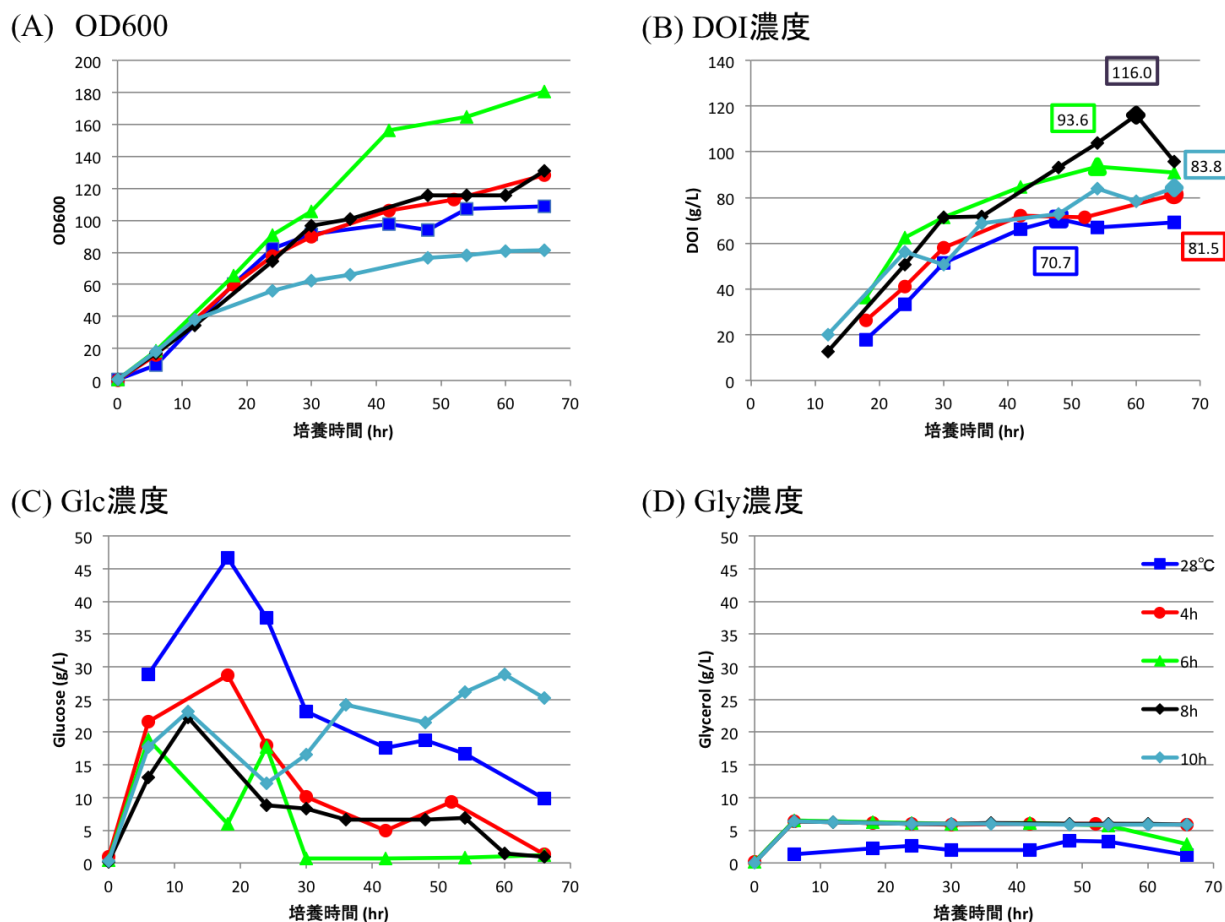


図 3.75 流加培養法による DOI の発酵生産

GI724Δpzp/W293R の高活性型 DOI 合成酵素を導入した株を利用して、本培養培地 (3% Yeast extract、0.2% K_2HPO_4 、0.2% KH_2PO_4 、0.2% $(NH_4)_2SO_4$ 、0.2% $MgSO_4$ 、0.01% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、アンピシリン 100 $\mu g/ml$) に、流加培地 (250 g Glucose, 250 g Glycerol, 30 g Yeast extract, 470 g H_2O) を 0.3 g/ml で流加し、DOI 発酵生産を行った。培養温度は、DOI の分解を考慮して 28°C とした。その結果、70.7 g/L/48 h (図 3.2.37 (B) 青線) の DOI 生産性を示した。培養液中に DOI の蓄積のない培養初期のみ、培養温度を大腸菌の生育至適温度に近い 35°C にあげ、DOI の培地中の蓄積が起こり始めたら、培養温度を 28°C に下げる温度シフトを試みた結果、35°C で 8 時間培養後、28°C に下げたときに、116.0 g/L/60 h (図 3.75 (B) 黒線) の DOI 生産性を示し、100g/L 以上の実用性の高い生産値が得られた。

4. 結論

マイタケ菌のゲノムデータベースを整備し、DNA マイクロアレイによるマイタケ菌の全遺伝子の網羅的発現解析基盤を構築することができた。開発した DNA チップを用いることでマイタケ菌床の生物学的前処理因子の特定を行い、リグニンの分解、セルロース、ヘミセルロースの分解様式を解析した。さらに、廃菌床内に分泌する酵素活性の解析から遺伝子発現との相関を調べた。その結果、リグニン分解酵素は 713293、180436 の 2 つの、MnP が高発現しており、前処理に関して最重要な酵素であると位置づけた。そして保管期間中に FOLy 遺伝子の発現量が上昇することが明らかとなり、リグニン分解酵素:LO とリグニン分解補助酵素:LDA が協調的にリグニン分解システムを構築していることが確認された。糖質関連酵素 (CAZy) に関しては、保管処理中に特異的に高発現していたのはヘミセルロース側鎖分解酵素、ペクチン分解酵素であった。これらの酵素がセルロース微小繊維を束ねる周辺の多糖類を分解するためセルロース微小繊維同士のパッキングが緩まり、糖化の際にセルラーゼが作用しやすくなると考えられた。また、遺伝子発現挙動からマイタケ菌の主要なセルラーゼは EG と AA9 であると考えられた。酵素活性の解析結果において保管処理中に CMCase 活性が検出できなかったことから保管処理中に EG はセルロースに対して積極的な分解は行っていないことが示唆された。酸化的にセルロースの結晶部分を分解する AA9 が発現していたことから、廃菌床中のセルロースにはセルラーゼが作用することができる非晶領域が増加していることが推測された。以上の DNA マイクロアレイ解析、酵素活性解析よりマイタケ菌は廃菌床保管処理中、ヘミセルロース側鎖、ペクチンを炭素源として使用し、積極的にリグニン分解していること、EG と AA9 を使用してセルロースの非晶領域を増やしていることが廃菌床前処理をもたらしていると結論付けた。

突然変異育種によるマイタケ菌のバイオマス前処理能力強化株を取得するため、マイタケ菌のリグニン分解能力を指標としたスクリーニング法を開発し、プレートアッセイによる変異株の選抜法を確立した。この方法を駆使して、紫外線照射による変異処理を行ったマイタケ菌株の中から、リグニン分解能力が向上したと考えられる菌株の取得に成功した。

生物学的前処理を施したマイタケ菌床の糖化には、セルラーゼへのリグニン分解酵素添加実験よりラッカーゼ活性が糖化率の改善をもたらすことを示した。また、マイタケ菌が廃菌床保管中に生産している酵素の量は極めて少ないと考えられたため、上記の前処理能力強化株の使用もしくはセルロース高分解性糸状菌トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) におけるリグニン分解酵素の高発現が必要であることが明らかとなった。リグニン分解能付加 *T. reesei* の構築は Laccase 遺伝子を導入した株で達成することができた。QM9414 を親株としてマイタケ菌の LCC31 遺伝子を導入した株である QLCC 株および *T. reesei* 内在性 Laccase 発現株である Tlac の培養上清中に活性を持った Laccase を分泌させることに成功し、Cu を培地中に添加すると培地中の Laccase 活性が上昇することを明らかにした。Cu 添加の影響を解析したところ本研究においてはラッカーゼ遺伝子を転写レベルで活性化していることが判明した。今後、経時的な遺伝子発現などの詳細に解析をすることで Cu 添加の影響を明らかにすることができると思われる。MnP 遺伝子を導入した *T. reesei* は全ての株で遺伝子の転写が確認されたが、明確な MnP 酵素活性を示す株を構築することはできなかった。以上のことから本研究の MnP 異種宿主発現には転写以降の段階に問題が生じていることが示唆された。廃菌床のリグニンがほぼ存在しない条件（アルカリ処理廃菌床）では、セルラーゼを用いた廃菌床の糖化率は本開発目的である 80% に達する。本開発において構築した

Laccase 発現 *T. reesei* に関してもその生産性の向上、さらなるリグニン分解能力の付与によって同様の効果が期待でき、セルラーゼ酵素カクテルへ添加することでバイオマス糖化効率の改善が期待される。

糖からの DOI 発酵生産に関する研究では、

- ① 変異型 DOI 合成酵素ライブラリーより、DOI 生産性を向上させる高活性型 DOI 合成酵素 L214M、W293R、L214M/W293R の取得に成功した。
- ② 培養液中に高濃度の DOI を生産・蓄積させるためには、DOI 耐性株、少なくとも DOI 低感受性株の開発が必要であったことから、大腸菌の全遺伝子破壊株コレクション(3,823 株)を利用し、DOI 耐性・感受性関連遺伝子の探索を行い、DOI 耐性候補株として $\Delta argO$ 株、DOI 感受性候補株として $\Delta rffC$ 株、 Δgor 株を見出した。
- ③ DOI 安定性について調べ、低温、酸性条件下で安定であることを明らかにし、その性質を考慮して、組換え大腸菌による至適 DOI 発酵生産条件の検討を行い、フラスコレベルでは、温度 27, 30, 33°C, pH 5.5, 6.0 条件下が至適 DOI 生産条件であること乱した。また、ジャーファーメンター回分培養では、30°C, pH 6.0, 1000 rpm, 5 L/min, HNS 培地, 生育炭素源マンニトール, 初期グルコース濃度 5% の条件において、41.5 g/L/36 h を達成し、これまでに我々が報告していた 29.5 g/L/60 h の DOI 発酵生産効率 (DOI 生産量、発酵生産時間) を大幅に改善することができた。さらに、流加培養法、培養温度シフト、高活性型 DOI 合成酵素の利用により、116.0 g/L/60 h の DOI 発酵生産効率を達成し、100 g/L 以上の実用性の高い生産値が得られた。

上記のように試薬を利用した DOI 発酵生産は高効率化を達成できたが、廃菌床糖化液を原料とした DOI の発酵生産では、生育、糖の取り込み阻害が生じ、DOI 生産効率が減少した。これらは、廃菌床糖化液中に含まれる夾雑物の影響によると考えられ、環境低負荷型糖生産システムの開発 (オールバイオプロセス) で記載したリグニン分解能が向上したセルラーゼ酵素カクテルによる廃菌床糖化効率の向上と共に、膜を利用した糖濃縮及び生育・糖取り込み阻害の起因と考えられる夾雑物の除去のステップを導入することにより、廃菌床からの DOI の発酵生産の効率化に繋がると考えられる。また、本研究で開発した DOI 生産組換え大腸菌は、グリセロールの資化性が高く、DOI の発酵生産効率が良かったことから、生育のために利用する炭素源として、廃菌床に少ししか含まれないキシロースの他に、バイオディーゼル製造工程において副生するグリセロール廃液を利活用することにより、より環境負荷低減に貢献する技術へと繋がることが期待できる。

5. 参考文献

- 1) Working Group I Technical Support Unit. 「Climate Change 2013 The Physical Science Basis Summary for Policymakers」. IPCC. October 2013
- 2) 国連気候変動枠組条約第 20 回締約国会議 (COP20) 京都議定書第 10 回締約国会議 (CMP10) 等の概要と評価、環境省、2014 年 12 月 14 日
- 3) Kakinuma K, Nango E, Kudo F, Matsushima Y, Eguchi T, An expeditious chemo-enzymatic route from glucose to catechol by the use of 2-deoxy-scyllo-inosose synthase, (2000), Tetrahedron Letters, 41, 1935–1938
- 4) Hansen CA, Frost JW, Deoxygenation of polyhydroxybenzenes: an alternative strategy for the benzene-free synthesis of aromatic chemicals, (2002) J Am Chem Soc., 124, 5926-7

- 5) Kogure T, Wakisaka N, Takaku H, Takagi M, Efficient production of 2-deoxy-scyllo-inosose from d-glucose by metabolically engineered recombinant *Escherichia coli*, (2007), *J Biotechnol*, 129, 502-9.
- 6) Sato M, Kurahashi A, Ezaki M, Takeda A, Uemura Y, Nishi T, Nishibori K, Fujimori F, High quality draft genome sequence analysis of the edible mushroom *Grifola frondosa*, (2013), *東京家政大学研究紀要*, 53, 17-30
- 7) Montoya S, Orrego CE, Levin L, Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake), (2012), *World J Microbiol. Biotechnol*, 28, 1533—1541
- 8) Kuang IC and Tien M, Stimulation of Mn peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation, (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90, 1242-1246
- 9) Molina-Guijarro JM, Pérez J, Muñoz-Dorado J, Guillén F, Moya R, Hernández M, Arias E, Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. (2009), *Int Microbiol.*, 12, 13-21
- 10) Nitheranont T, Watanabe A, Asada Y, Extracellular laccase produced by an edible basidiomycetous mushroom, *Grifola frondosa*: purification and characterization, (2011), *Biosci Biotechnol Biochem.*, 75, 538-543
- 11) Agger JW, Isaksen T, Várnai A, Vidal-Melgosa S, Willats WG, Ludwig R, Horn SJ, Eijsink VG, and Westereng B, Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation, (2014), *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 111, 6287-6292
- 12) Conesa A, Van Den Hondel CAMJJ, PUNT PJ, Studies on the Production of Fungal Peroxidases in *Aspergillus niger*, (2000), *Appl Environ Microbiol.*, 66, 3016-3023
- 13) Stewart P, Whitwam RE, Kersten PJ, Cullen D, Tien M, Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*, (1996), *Appl Environ Microbiol*, 62, 860-864
- 14) Zhang G, Zhu Y, Wei D, Wang W, Enhanced production of heterologous proteins by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* via disruption of the alkaline serine protease SPW combined with a pH control strategy, (2014), *Plasmid.*;71, 16-22
- 15) Zhang J, Qu Y, Xiao P, Wang X, Wang T, He F, Improved biomass saccharification by *Trichoderma reesei* through heterologous expression of lacA gene from *Trametes* sp. AH28-2, (2012), *J Biosci Bioeng*, 113, 697-703
- 16) Larrondo LF, Avila M, Salas L, Cullen D, Vicuña R, Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispota* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns, (2003), *Microbiology*, 149, 1177-82.
- 17) Cortés-Espinosa DV, Absalón ÁE, Sanchez N, Loera O, Rodríguez-Vázquez R, Fernández FJ, Heterologous Expression of Manganese Peroxidase in *Aspergillus niger* and Its Effect on Phenanthrene Removal from Soil, (2011), *J Mol Microbiol Biotechnol*, 21, 120-9
- 18) Harkki, A., Mäntylä, A., Penttilä, M., Muttilainen, S., Bühler, R., Suominen, P., et al., (1991), Genetic engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel cellulose profiles, *Enzyme Microb. Technol.* 13, 227–233
- 19) Le Crom S, Schackwitz W, Pennacchio L, Magnuson JK, Culley DE, Collett JR, Martin J, Druzhinina IS, Mathis H, Monot F, Seiboth B, Cherry B, Rey M, Berka R, Kubicek CP, Baker SE, Margeot A, Tracking the roots of

cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing, (2009), Proc Natl Acad Sci U S A.;10, 16151-16156

- 20) Nango E, Kumasaka T, Hirayama T, Tanaka N, Eguchi T, Structure of 2-deoxy-scyllo-inosose synthase, a key enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics, in complex with a mechanism-based inhibitor and NAD⁺, (2008), Proteins, 70, 517-27
- 21) 高久洋暁、脇坂直樹、高木正道、組換え大腸菌によるバイオマスからの芳香族化合物前駆体 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI)の高効率発酵生産、(2010)、酵素工学ニュース 63, 23-28
- 22) Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H, Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, (2006), 2, 2006.0008
- 23) 波多野裕美、武部聡、東慶直、 *Tanticharonia sakaeratensis* の高濃度グルコース耐性・代謝に関するプロテオーム解析、(2011)、Mem. Faculty. B. O. S. T. Kinki University, 28, 95-108
- 24) Nandineni MR, Gowrishankar J, Evidence for an arginine exporter encoded by *yggA* (*argO*) that is regulated by the LysR-type transcriptional regulator ArgP in Escherichia coli, (2004), J Bacteriol. 186, 3539-46.
- 25) Leonardi R, Roach PL, Thiamine biosynthesis in Escherichia coli: in vitro reconstitution of the thiazole synthase activity, (2004), J Biol Chem, 279, 17054-62
- 26) Davis NK, Greer S, Jones-Mortimer MC, Perham RN, Isolation and mapping of glutathione reductase-negative mutants of Escherichia coli K12, (1982), J Gen Microbiol, 128, 1631-4.
- 27) 高久洋暁、宮崎達雄、脇坂直樹、鯨坂勝美、高木正道、グリーンバイオケミストリーの最前線 第7章工業的スケールでの製造を目指した 2-deoxy-scyllo-inosose の微生物生産・精製法の開発、(2010)、シーエムシー出版、114-123

6. 研究発表

論文発表

- ① 小笠原 渉、志田 洋介、「セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* 日本型系統菌株の開発」、 「バイオマス分解関連酵素研究の最前線」、株式会社 シーエムシー出版、 p216-223(2012)
- ② 小笠原 渉、志田 洋介、「糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現機構」、 「バイオマス分解関連酵素研究の最前線」、株式会社 シーエムシー出版、 p20-26(2012)
- ③ 小笠原 渉、志田 洋介、比較ゲノム解析によるセルロース分解微生物「トリコデルマ・リーセイ」日本型系統樹進化の謎の解明とさらなる進化、化学と生物, 50(8):592-599 (2012)

学会発表

- ① 高久洋暁「組換え大腸菌によるバイオマスからの芳香族化合物前駆体の高効率発酵生産」バイオマス利活用技術に関する討論会、大阪市立大学バイオマス検討会、化学工学会バイオ部会関西・東海地区交流会、大阪市立大学、2012年12月21日
- ② 小笠原渉「比較ゲノム解析によるセルロース形バイオマス分解微生物の進化と生物戦略の探求」農学におけるバイオマス利用研究フォーラムグループ平成24年度バイオマス利用研究特論I、2012年10月26日

- ③ 小笠原渉「日本型トリコデルマ・リーセイ系統樹進化の謎とさらなる進化」JBA アルコール・バイオマス研究会講演会、東京大学大学院、2013年2月8日
- ④ 小笠原渉「比較ゲノム解析を基にしたトリコデルマ・リーセイ日本型系統樹のセルラーゼ高生産化の解明と転写制御工学を用いた新たな系統樹進化」日本農芸化学会 2013年度大会、東北大学、2013年3月27日
- ⑤ 荒学士、脇坂直樹、山崎晴丈、高木正道、高久洋暁「酵母 *Pichia pastoris* による糖からの芳香族化合物前駆体の高発酵生産」日本生物工学会、神戸、2012年10月24日
- ⑥ 岩澤裕喜、脇坂直樹、山崎晴丈、高木正道、高久洋暁「高活性型 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI)合成酵素 W293R の改変」日本農芸化学会関東支部 2012年度大会、新潟、2012年10月27日
- ⑦ 竹田美春、佐藤拓、山崎晴丈、高木正道、高久洋暁「高活性型 2-deoxy-scyllo-inosose 合成酵素の取得」日本農芸化学会関東支部 2012年度大会、新潟、2012年10月27日
- ⑧ 荒学士、脇坂直樹、山崎晴丈、高木正道、高久洋暁「酵母 *Pichia pastoris* による糖からの芳香族化合物前駆体の高発酵生産」日本農芸化学会関東支部 2012年度大会、新潟、2012年10月27日
- ⑨ 齊藤耕平、宮内大樹、中村明靖、志田洋介、小笠原渉、高橋優信、山口隆司、若山樹、今田美郎「きこの廃菌床を対象としたエネルギー回収プロセスの評価」第46回日本水環境学会年会、東京、2012年3月14日
- ⑩ 齋藤耕平、中村明靖、幡本将史、志田洋介、若山樹、今田美郎、小笠原 渉、山口隆司「セルロース系バイオマスを対象とした資源回収プロセスの開発」第42回石油・石油化学討論会、秋田、2012年10月11日
- ⑪ 岡部陽平、齊藤耕平、中村明靖、志田洋介、小笠原渉、幡本将史、山口隆司、若山樹、今田美郎「きこの廃菌床を対象とした資源・エネルギー回収プロセスに及ぼす前処理の影響」第30回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会、新潟、2012年10月30日
- ⑫ 志田洋介, Juliano de Oliveira Porciuncula, 新田美貴子, 山口香織, 平川英樹, 森 一樹, 久原 哲, 小笠原 渉「セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* 変異株系統樹の比較ゲノム解析」第7回日本ゲノム微生物学会、滋賀、2013年3月8日
- ⑬ 小笠原 渉, 志田 洋介, 森 一樹, 久原 哲「比較ゲノム解析を基にしたトリコデルマ・リーセイ日本型系統樹のセルラーゼ高生産化の解明と転写制御工学を用いた新たな系統樹進化」日本農芸化学会 2013年度大会、宮城、2013年3月27日
- ⑭ Keigo Kojima, Takanori Furukawa, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara “Analysis of Lignin Degradation System of Maitake Mushroom (*Grifola Frondosa*) for Bioconversion of Waste Mushroom Bed to Valuable Chemicals.” The 2nd International GIGAKU Conference in Nagaoka, Niigata, 22th Jun, 2013
- ⑮ 小島慧吾、古川隆紀、志田洋介、倉橋敦、下田隆史、西堀耕三、山崎晴丈、高久洋暁、小笠原渉「バイオプロセスによる脱リグニン処理を目指したマイタケ廃菌床保管処理中における網羅的遺伝子発現応答解析」生物工学会、広島、2013年9月18日
- ⑯ 志田洋介「糸状菌 *Trichoderma reesei* における糖質加水分解酵素遺伝子群の発現制御」第28回セルラーゼ研究会、千葉、2014年7月11日
- ⑰ 小笠原渉「セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現応答 総論」第28回セルラーゼ研究会、千葉、2014年7月11日

- ⑱ Keigo Kojima, Yosuke Shida, Pham Tuan Anh, To Kim Anh, Wataru Ogasawara, “Ligninolytic Enzymes Production Profiling of *Phomopsis* sp. N7.2 and Its Applications” The 3rd International GIGAKU Conference in Nagaoka, Niigata, 21th Jun, 2014

※「国民との科学・技術対話」の実施

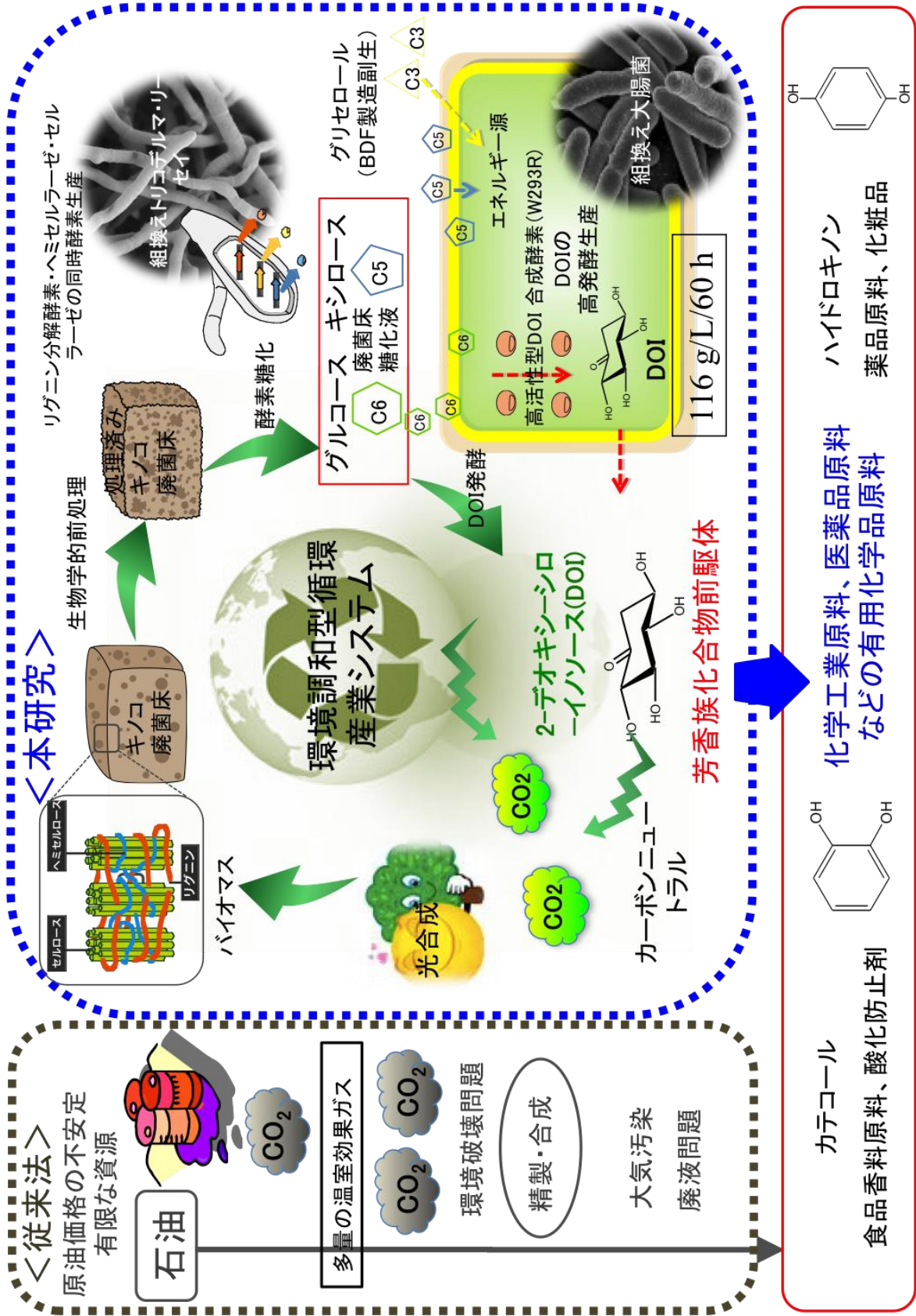
- 1) 「長岡発！低炭素社会実現のための戦略」、平成 24 年度まちなか大学講座、長岡（新潟）、2012 年 9 月 15 日。約 30 名
- 2) 「微生物の力を借りた「モノ造り」、長岡高専 アドバンスコース、2012 年 11 月 17 日。約 40 名
- 3) 「微生物の力を借りた「モノ造り」、微生物による糖からの芳香族化合物前駆体の発酵生産」朱鷺メッセ バイオマス&エネルギーExpo in 新潟、2012 年 12 月 3 日。約 300 名
- 4) 「微生物の力を借りた「モノ造り」、小山高専 技術科学フロンティア概論、2012 年 12 月 17 日。約 40 名
- 5) 「微生物の力を借りた「モノ造り」～バイオマス利活用～」、高度技術者研修、長岡（新潟）、2013 年 2 月 5 日。約 30 名
- 6) 「日本型トリコデルマ・リーセイ系統樹進化の謎とさらなる進化」JBA アルコール・バイオマス研究会講演会、東京、2013 年 2 月 8 日。約 40 名
- 7) 「地球防衛軍（微生物）の未知なるちから」、大学体験講義、2013 年 7 月 22 日、新潟県立新発田高等学校、24 名
- 8) 「地球防衛軍（微生物）の未知なるちから」、高大連携事業特別講義、2013 年 7 月 25 日、新潟県立柏崎翔洋中等教育学校、46 名
- 9) 「人類を支える小さな微生物の大きなちから」、出張講義、2014 年 6 月 18 日、新潟市立万代高等学校、40 名
- 10) 「地域資源を活用した高付加価値生産物の開発」、SSH フェスティバル、2014 年 11 月 29 日、長野県立飯山北高等学校、150 名
- 11) 「糸状菌 *Trichoderma reesei* のセルラーゼ誘導発現メカニズム」糸状菌分子生物学学会若手の会、仙台、2014 年 11 月 14 日、50 名

7. 知的財産権の取得状況

特になし

8. 研究概要図

研究概要図 微生物を利用した地域バイオマスキノコ廃菌床からの化学工業原料生産システムの開発



9. 英文概要

[Development of Microbial Conversion Technologies Related to Utilization of Waste Mushroom Bed as the Local Biomass Resources]

Lignocellulosic biomass has received much attention in recent years as renewable feedstock due to the exacerbation of energy crisis and global warming. Niigata prefecture is one of the major mushrooms producing areas in Japan, and mainly produces maitake mushroom (*Grifola frondosa*). Maitake mushroom is cultivated on the medium mainly consisting of hard wood sawdust (containing about 46% of cellulose) thus it can be used as a biomass feedstock for biorefinery. Therefore we are focusing on the use of the waste mushroom bed as excellent local biomass, and developing a bioconversion system of the biomass into valuable chemicals. This system comprises mainly two-steps of conversion: (I) hydrolysis for the production of fermentable sugars by well known cellulolytic fungi *Trichoderma reesei*, and (II) production of 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI), which is a precursor of dihydric phenol, by fermentation using recombinant *Escherichia coli*. However plant biomass has a complicated structure showing resistance to biodegradation, this bioconversion process needs pre-treatment procedure to increase saccharification efficiency. Previous studies showed that storage of waste mushroom bed after harvesting fruit bodies was an effective pretreatment for saccharification. In this process, it was revealed that the composition of lignin in the waste mushroom bed decreased. The purpose of this study are 1) to clarify which enzymes are produced by Maitake mushroom during storage of mushroom bed, 2) to create Maitake strain enhancing its pretreatment ability, 3) to develop biomass efficient pretreatment – saccharification process, 4) to utilize saccharides derived from mushroom bed for DOI production, and 5) to enhance the DOI productivity.

To analyze which enzymes are produced by *G. frondosa*, genome database was created by using next generation sequencer. In the *G. frondosa* genome, at least 16,000 genes were annotated and DNA microchip arrayed them are designed. DNA microarray analysis of gene expressed in mushroom bed from 0, 30, 60, and 90 days storage were carried out. Consequently, specifically expressed genes during storage periods were identified. Majority of them were encoding lignin degrading enzymes and carbohydrate degrading enzymes.

Mutagenize of *G. frondosa* was carried out by using UV irradiation. To screen mutant strain having enhanced lignolytic activity, enzyme assay method on plate medium was established. As a result of screening of mutated *G. frondosa* strain, 3 strains showed higher lignolytic activity than parental strain.

Enzyme addition to cellulase degradation of mushroom bed for long term storage enhanced the degree of saccharification. In addition, alkaline pretreatment made mushroom bed susceptible to degradation by cellulase, resulting in 80% of saccharification ratio. These data also imply that efficient removal of lignin component from mushroom bed brings more effective saccharification. Although enzyme amounts in mushroom bed was thought not to be enough, lignolytic enzymes highly expressed in mushroom bed were expressed in *Trichoderma reesei* which is cellulolytic fungus having potent protein production ability. Consequently, lignolytic enzymes from *G. frondosa* were successfully expressed in *T. reesei* but expression amount was faint. When endogenous lignolytic enzymes were over-expressed in *T. reesei*, laccase expressing strain was successfully constructed. To utilize enzyme preparation produced this strain, it is possible to carry out efficient saccharification of the waste mushroom bed of *G. frondosa*.

To enhance the DOI productivity, we attempted 1) improvement in the function of DOI synthase, 2) molecular breeding of DOI producing recombinant *E. coli*, 3) improvement of DOI productivity by fermentation technological method.

In the screening for DOI synthase mutants with high activity, we obtained three mutants (L214M, W293R, L214M/W293R). These mutants have the DOI synthase with high activity, which enhance the DOI productivity. These mutant enzymes may contribute enhance the DOI productivity because of shortening the culture time and acceleration of DOI production.

To conduct a practical application of DOI (DOI productivity; 100 g/L and over), DOI-resistant *E. coli* mutant is required for the high DOI accumulation in culture medium because of the sensitivity of *E. coli* against DOI. The Keio mutant collection (3,823 mutant strains) was screened for DOI-resistant and -sensitive strains in the 6% DOI containing medium. We obtained $\Delta argO$ as the DOI-resistant mutant strain and $\Delta rffC$, Δgor as the DOI-sensitive candidate mutant strain. The DOI-resistant mutant strain, $\Delta argO$, may contribute to accumulate the high concentration of DOI in the culture medium, which leads to enhance the DOI productivity.

To improve the DOI productivity by the control of temperature, pH, aeration and agitation in a jar fermentor, we firstly examined the effects of temperature (0, 20, 35, 50°C) and pH (3.0, 5.0, 7.0, 9.0) on the DOI stability. DOI is stable under low temperature and acidic conditions. Next, Considering the growth temperature conditions of DOI producing recombinant *E. coli* and the chemical property of DOI, the examination of optimal condition of DOI productivity should perform on the basis of this condition (35°C, pH 5.0). We investigated the effects of temperature (27, 30, 33, 37°C) and pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) on the DOI productivity of DOI producing recombinant *E. coli* using 500 ml baffled flasks. We were able to obtain DOI at 27 g/L under the optimum conditions (30 or 33°C, pH 6.0, almost 100% yield). Finally, We examined the DOI productivity by the control of temperature, pH, aeration and agitation in a jar fermentor. We determined the optimal batch culture condition (temperature, 30°C; pH, 6.0; agitation speed, 1,000 rpm; aeration, 5 L/min; growth carbon, mannitol; initial glucose concentration, 5%) and fed-batch culture condition [temperature, 35°C to 28°C; pH, 6.0; agitation speed, 450 rpm; aeration, 10 L/min; feeding medium (250 g Glucose, 250 g Glycerol, 30 g Yeast extract, 470 g H₂O), 0.3 g/min]. Those condition cultures indicate 41.5 g/L/36 h and 116.0 g/L/60 h of DOI productivity, respectively. Especially, fed-batch culture method may be an important contribution because the DOI productivity is over 100 g/L.

In this study, we had problems, which concentrate target sugars and remove the growth inhibitor against host *E. coli* Δpzp for DOI production. Our future research will be focused on the membrane separation technologies, which remove fermentation inhibitors and concentrate efficiently target sugars.