

次世代ザイモロジー

研究代表者 桐村 光太郎
(先進理工学部 応用化学科 教授)

1. 研究課題

発酵を利用した有用物質の生産は、古来より行われている発酵食品の製造のみならず、バイオテクノロジーの発展とともに医薬品製造や環境調和型の化成品製造を行うために必要不可欠な要素技術として認識されている。また、今日では SDGs の観点からも重要性を増している。発酵の生化学プロセスやその実用化を研究する学問は「ザイモロジー」と称されるようになり、産業技術のグリーン化の切り札として期待されている。本プロジェクトは、資源循環型社会の構築に資する新規な微生物発酵による有用物質生産の概念を提示しながら、その発展型と実践例を社会に向けて発信していくことを目的としている。バイオテクノロジーを駆使しながら、従来型の発酵技術や化成品生産技術とは一線を画する「理想型を追求した」生産技術体系を構築するための新規な取り組みを開始する。基礎と応用の両面からの研究展開により、新規な次世代型のザイモロジー利用有用物質技術体系を他機関に先駆けて構築する。

2. 主な研究成果

- (1) クエン酸高生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L のマイコトキシン非生産性の検証～安全な宿主としての利用

食品や飲料に酸味料として使用される基本的かつ重要な有機酸であるクエン酸（CA）は、*Aspergillus niger* を含む *Aspergillus section Nigri* に属する菌株を用いて、糖蜜やデンプンなどの炭水化物から工業的に生産されており、世界での生産量は 210 万トン/年を超えている。*Aspergillus section Nigri* 糸状菌は、①高収率のクエン酸生産、②高濃度の糖質の利用、③低 pH 耐性などの要因により、クエン酸生産に適した微生物である。しかし、一部の菌株のゲノムには、カビ毒（マイコトキシン）生合成の遺伝子クラスタが存在するため、安全性の観点からマイコトキシン生産性の有無を判別することが重要である。本研究では、研究室保有のクエン酸高生産菌 *A. tubingensis* WU-2223L のマイコトキシン生産性について検証した。

Aspergillus 属糸状菌で懸念されるマイコトキシンは、オクラトキシン、フモニシン、アフラトキシンおよびパツリンであるため、WU-2223L 株のゲノム情報（Yoshioka, I., et al., Microbiol. Resource Announce., 9, 33, e00702-20 (2020)）と代謝産物の両面からそれらの非生産性を検証した。WU-2223L 株のゲノム情報より各マイコトキシンの生合成遺伝子クラスタを探索した。Fig. に示すように、オクラトキシンとフモニシンの生合成遺伝子クラスタでは、それぞれの生産菌の有する完全長のクラスタと比べて数十 kb に渡る大規模な欠損が存在した。同時に、Fig.1 に示す当該領域の PCR 増幅をゲノム DNA に対して行い、完全長のクラスタは存在しないことを確認した。また、アフラトキシンとパツリンの生合成遺伝子クラスタでは、該当する遺伝子が存在しなかった。代謝産物の解析では、クエン酸生産培地にて培養した培養液上清を濃縮して LC/MS-MS 分析に供し、いずれのマイコトキシンも不検出（検出限界未満）であることを確認した。以上より、*A. tubingensis* WU-2223L がマイコトキシン非生産性の安全なクエン酸高生産菌であることを明らかにした。

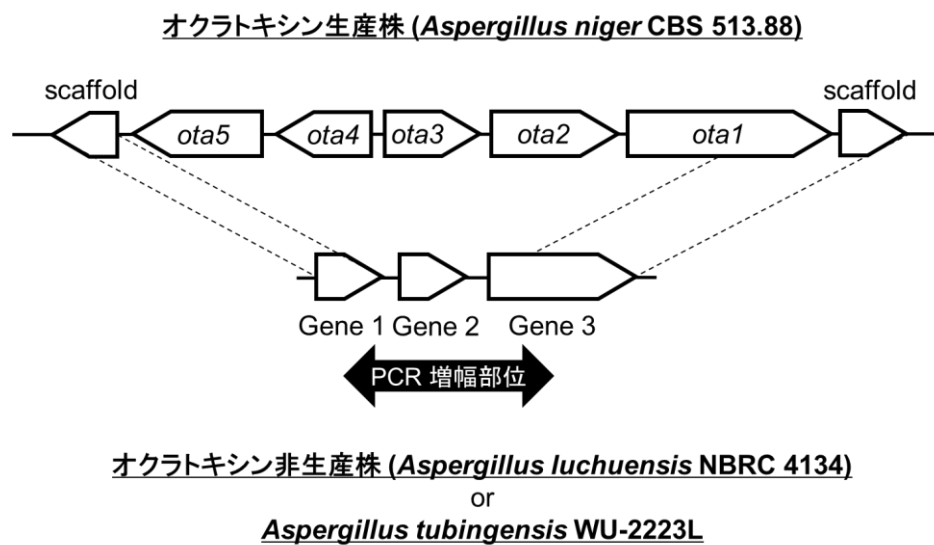


Fig. 1 *A. tubingensis* WU-2223L マイコトキシンの生合成遺伝子クラスタ
 $ota1\sim5$: オクラトキシン生合成遺伝子クラスタ

(2) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA による alkyl α -D-glucopyranosides の酵素的生産

Xanthomonas campestris WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA (EC 3.2.1.20) は、マルトースをグルコース供与体の基質とし、アルコール性、フェノール性のヒドロキシ基をもつ糖受容体の基質に対して選択的に α -グルコシル化を行い、配糖体合成を可能とする。また、普遍的な α -glucosidase と異なり、XgtA は糖類に対するグルコース転移反応を触媒せず、オリゴ糖を副生しない特長がある。この特長を利用し、これまでに XgtA を用いて l-menthol や hydroquinone の α -D-glucopyranoside を選択的に合成することに成功している (H. Nakagawa, et al., J. Biosci. Bioeng., 89, 138-144 (2000)、他)。Alkylglucosides には整肌作用や保湿作用、抗菌作用などが認められており、alkyl α -D-glucopyranosides (α -AGs) は有用化合物として期待されている。さらに、長鎖のアルキル基から生成する α -AGs、特に n-octyl α -D-glucopyranoside (α -OG) と n-decyl α -D-glucopyranoside (α -DG)、は高い臨界ミセル濃度 (critical micelle concentration, CMC) 低毒性および生分解性有しているため、界面活性剤としての用途も期待できる。AGs は Koenigs-Knorr 反応や、Mukaiyama-Suzuki 反応などにより合成が可能であるが、 β -AGs が優先的に合成され、 α -AGs の選択的生産は困難である。また、ethyl α -D-glucopyranoside (α -EG) や n-butyl α -D-glucopyranoside などの短鎖のアルキル基から生成する α -AGs については、酵素的な反応による合成例はいくつか報告されたが、いずれの方法でも、低収量、またはオリゴ糖の副生が課題となり、さらに、長鎖 α -AGs の選択的な合成法は未だに確立されてなかった。そのため、酵素による α -AGs、特に長鎖 α -AGs の合成法の開発に期待が寄せられている。本研究では、 α -AGs の酵素的生産を目的として、*X. campestris* WU-9701 由来のグルコース転移酵素 XgtA を用いた反応について検討した。

これまでに、XgtA を用いて、マルトースをグルコース供与体とした、 α -EG の効率生産に成功している。本研究では、マルトースをグルコース供与体とした、C3- C10 の直鎖アルコール (1-propanol から 1-decanol) を受容体としたグルコース転移反応を行った。得られた生成物については、HPLC

および LC-MS 分析により、C3- C10 の直鎖アルコールに対応する α -AGs の酵素的合成が可能なことを確認した。反応後溶液の分析により、マルトトリオースなどのオリゴ糖の副生がないことも確認した。さらに、本研究では n-octyl α -D-glucopyranoside (α -OG)の酵素的生産について注目し、 α -OG の経時変化を調べた。45 °C、96 h の反応で著量の α -OG の生産に成功した（論文未発表のため数値を省略）。また、反応生成物のグルコースによる阻害を低減するために、glucose isomerase (EC 5.3.1.5, GI) を添加し、XgtA と GI の二酵素系反応を用い、 α -OG の合成を検討した。その結果、当該反応条件では、96 h の反応でさらに著量の α -OG 生産を達成した（数値を省略）。以上より、XgtA を利用した α -AGs の選択的生産が可能なことを明らかにした。

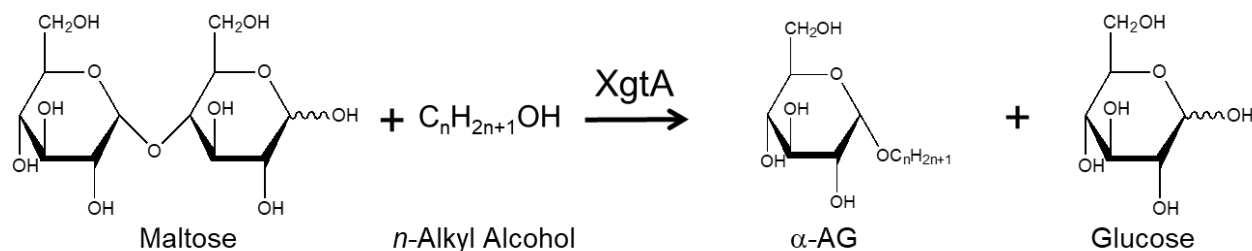


Fig. 2 XgtA による alkyl α -D-glucopyranosides の酵素的合成

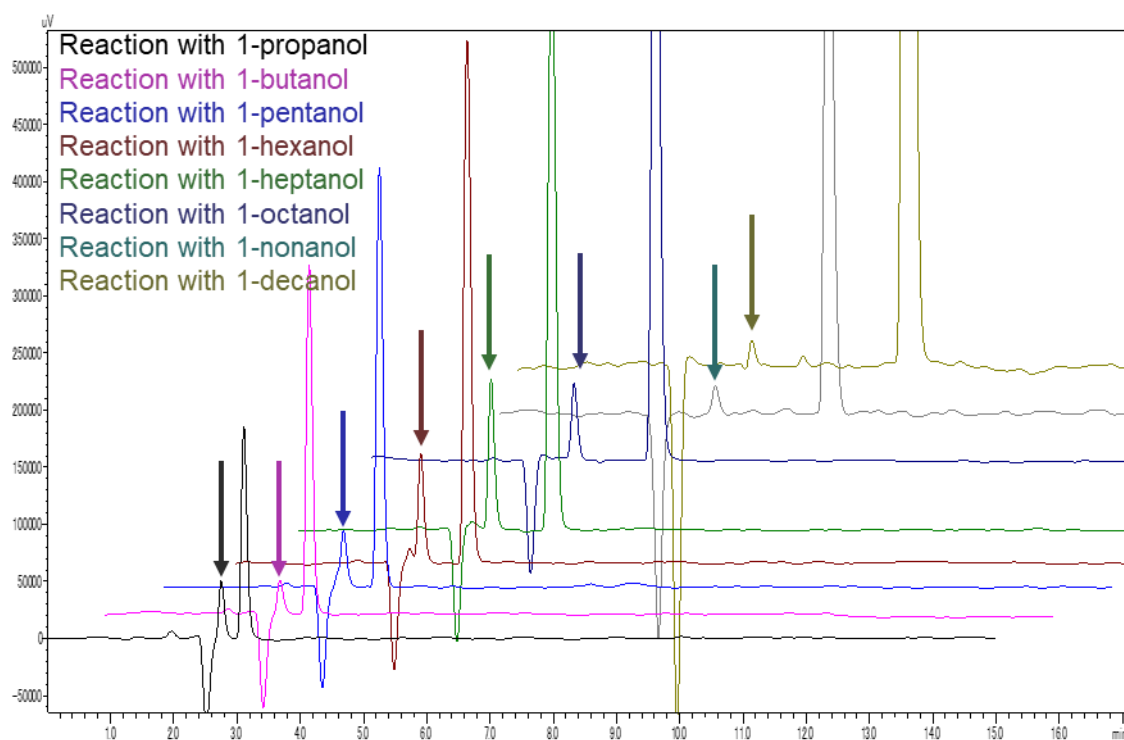


Fig. 3 XgtA により合成した alkyl α -D-glucopyranosides の HPLC 分析
矢印：基質となる各種アルコールからの生成物（alkyl α -D-glucopyranosides）

3. 共同研究者

木野 邦器（先進理工学部・応用化学科・教授）

石井 義孝（理工学研究所・次世代サイモロジー研究プロジェクト・招聘研究員）

吉岡 育哲（理工学研究所・次世代サイモロジー研究プロジェクト・招聘研究員）

4. 研究業績

4.1 学術論文

- (1) Rapid and marker-free gene replacement in citric acid-producing *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L by the CRISPR/Cas9 system-based genome editing technique using DNA fragments encoding sgRNAs, I. Yoshioka, K. Kirimura, *J. Biosci. Bioeng.*, **131** (6), 579-588 (2021) <https://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.01.011>

4.2 総説・著書

なし

4.3 招待講演

なし

4.4 受賞・表彰

なし

4.5 学会および社会的活動

- (1) クエン酸高生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L の育種を目的とした CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子置換法の開発, 吉岡 育哲, 桐村 光太郎, 第 73 回 (2021 年) 日本生物工学会大会 (沖縄、オンライン開催) 講演要旨集 G2H1 (0310), p. 103, 2021 年 10 月
- (2) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA の固定化および Ethyl α -D-glucopyranoside の選択的生産への応用, 曹 偉, 神戸 友美, 石井 義孝, 桐村 光太郎, 第 73 回 (2021 年) 日本生物工学会大会 (沖縄、オンライン開催) 講演要旨集 G2H4 (0113), p. 122, 2021 年 10 月
- (3) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA による alkyl α -D-glucopyranosides の酵素的生産, 曹 偉, 渡邊 理沙, 石井 義孝, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2022 年度大会 (京都) 講演要旨集 3C05-03, 2022 年 3 月
- (4) ゲノムおよび代謝産物の分析に基づくクエン酸高生産菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L のマイコトキシン非生産性の検証, 柴田 朗, 吉岡 育哲, 中川 博之, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2022 年度大会 (京都) 講演要旨集 4B02-11, 2022 年 3 月

5. 研究活動の課題と展望

昨年までに、研究室保有のクエン酸高生産菌 *A. tubingensis* WU-2223L をモデル菌株として、有用物質生産に適用する微生物細胞宿主の効率的变化を実現する「ゲノム編集」技術の利用が可能となった。しかし、一部の *Aspergillus section Nigri* 糸状菌のゲノムには、カビ毒（マイコトキシン）生合成の遺伝子クラスタが存在するため、安全性の観点からマイコトキシン生産性の有無を判別することが重要である。今年度は、*A. tubingensis* WU-2223L のマイコトキシン生産性について検証した。*A. tubingensis* WU-2223L のゲノム情報と基にした解析により、オクラトキシンとフモニシンの生合

成遺伝子クラスタには数十 kb に渡る大規模な欠損が存在することを確認した。同時に、PCR 解析により完全長のクラスタは存在しないことを確認した。また、アフラトキシンとパツリンの生合成遺伝子クラスタでは、該当する遺伝子が存在しなかった。さらに、代謝産物の解析においても、いずれのマイコトキシンも不検出（検出限界未満）であることを確認した。以上より、*A. tubingensis* WU-2223L がマイコトキシン非生産性の安全なクエン酸高生産菌であることを明らかにした。今後の展望として、安全性を確認した *A. tubingensis* WU-2223L に「ゲノム編集」技術を用いた自在な遺伝子置換により呼吸経路ならびに輸送体タンパク質に関する変異株の作製と解析を行い、マイクロ生産工場といえる「ゲノム編集」適用細胞型反応装置の開発を行う。

一方、「超生体触媒」の開発を目指し、今年度は *X. campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA による alkyl α -D-glucopyranosides (α -AGs) の酵素的生産について検討した。C3- C10 の直鎖アルコール (1-propanol から 1-decanol) を受容体としたグルコース転移反応から、それぞれのアルコールに対応する α -AGs の酵素的合成が可能であることを確認した。さらに、これらの α -AGs のうち、n-octyl α -D-glucopyranoside (α -OG) の酵素的生産について検討し、45 °C、96 h の反応で著量の α -OG の生産に成功した（数値を省略）。また、glucose isomerase (EC 5.3.1.5, GI) を添加した XgtA と GI の二酵素系反応では、96 h の反応でさらに著量の α -OG 生産を達成した（数値を省略）。今後の展望として、 α -AGs のさらなる合成量や収率向上が重要である。とくに（さらに？）、XgtA と GI の 2 酵素系の活用によって従来にない著量の生成量を達成しているので、本反応系を利用した新規かつ有用な α -glucosides の開発にも期待感がある。次年度以降は、「超生体触媒」の開発に向けて、XgtA のアミノ酸配列情報を基にしたバイオインフォマティクス解析を基盤として、反応機構の解析や機能性向上についての研究を展開する。