

# 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

発酵を利用したものづくりは、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。発酵の生化学プロセスやその実用化を研究する学問を「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ものづくり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) クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L におけるクエン酸輸送体の高発現によるクエン酸生産性の向上

クエン酸は爽快な酸味を有する有機酸であり、食品や飲料、医薬品などその用途は多岐に渡る。現在、そのすべてが *Aspergillus section Nigri* に属する糸状菌による発酵によって生産されている。当該菌群に属する糸状菌として当研究室が保有する *A. tubingensis* WU-2223L は、高濃度の糖を供給することで 50% (w/w) の高収率でクエン酸を生産するクエン酸高生産糸状菌である。クエン酸の生産過程において、Fig. 1 に示すように、当研究室では「輸送系」が重要であることを明らかにしている。さらに、クエン酸の輸送機構の解明とその機能改変によるクエン酸の高生産の可能性が示唆されている。WU-2223L 株には、クエン酸輸送体としてミトコンドリア膜輸送体が 2 つ (*cocA*, *ctpA*)、細胞膜輸送体が 1 つ (*cexA*) 存在している。本研究では、これらの輸送体遺伝子をゲノム編集によって高発現させることにより、WU-2223L 株を凌駕するクエン酸高生産菌を取得することを目的とした。

親株として、クエン酸生産糸状菌である *A. tubingensis* WU-2223L を使用した。また、WU-2223L 株から非相同末端結合に関与する遺伝子 *kueA* をノックアウトした DKL-2P 株をゲノム編集の宿主として使用した。大腸菌 *Escherichia coli* JM109 を宿主とした形質転換により、CRISPR/Cas9 システムのガイド RNA (gRNA) 発現プラスミドおよび輸送体遺伝子高発現カセット搭載プラスミド (ノックインドナー) の作製を行った。gRNA は、オキサロ酢酸加水分解酵素遺伝子 *oahA* を標的としており、当該遺伝子座に *tefl* プロモーターに連結した輸送体遺伝子高発現カセットと、ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA* が挿入されることを意図した。プロトプラスト-PEG 法により、高発現カセットおよび *ptrA* 遺伝子の挿入に起因するピリチアミン耐性を有する株を単離して PCR、および転写解析に供することで、各輸送体遺伝子高発現株の候補株において高発現カセットの挿入の確認を行い、ゲノム編集操作が目的とするゲノム座位に行われたかどうかを確認した。

取得した高発現株をクエン酸生産試験に供した。ミトコンドリア膜輸送体遺伝子それぞれを単独で高発現させた場合、*cocA* 高発現株 (ECOCA 株) のクエン酸生産量は 68.4 g/L であり、*ctpA* 高発現株 (ECTPA 株) は 71.3 g/L であった。いずれも親株である WU-2223L 株と比較してクエン酸生産量の増加が見られたが、増加幅は小さく、両者間で同程度の増加に止まった。また、グルコース消費については、消費量、速度ともに WU-2223L 株と同程度であった。一方、*cexA+cocA* 二重高発現株 (ECEXACOCA 株) のクエン酸生産量は 79.5 g/L、*cexA+ctpA* 二重高発現株 (ECEXACTPA 株) は 65.7 g/L が最大であり、かつどちらの高発現株も 10 日目で最大生産量に到達した。よって、WU-2223L 株と比較して、生産量と生産速度の両者が増大し、とくに *cexA* と *cocA* の相乗効果が大きくクエン酸生産に寄与することを明らかにした。さらに、ECEXACOCA 株では、8 日目以降のグルコース消費に加速が見られ、10 日目に全てのグルコースを消費したことから、クエン酸生産だけでなく糖消費についても増強が見られた。なお、12 日目にクエン酸生産量が低下しているのは、主要な炭素源であるグルコースが消費されたことで、排出したクエン酸が資化されたためであると考えられる。したがって、ミトコンドリア膜輸送体は CEXA と互いに協調し、とくに COCA がクエン酸発酵におけるクエン酸の排出に強く寄与していることを明らかにした。一方で CTPA ではその寄与が小さいことが明らかとなった。

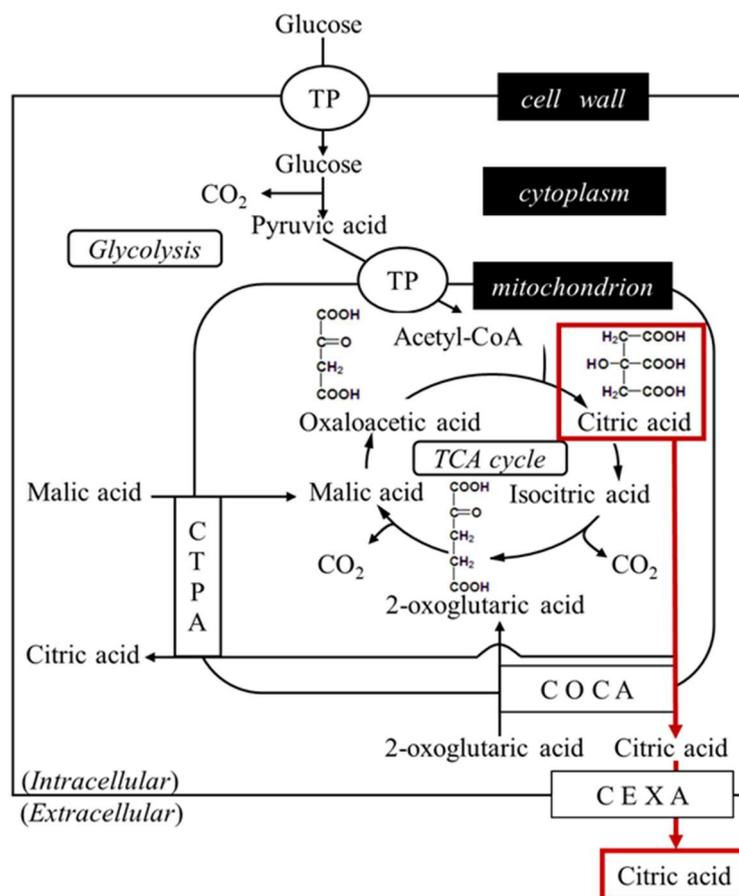


Fig. 1 *Aspergillus section Nigri*におけるクエン酸生産に関与する推定代謝経路  
CEXA, クエン酸輸送体, COCA, クエン酸-2-オキソグルタル酸シャトル輸送体,  
CTPA, クエン酸-リンゴ酸シャトル輸送体, TP, 膜輸送体.

(2) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA を用いた alkyl  $\alpha$ -D-glucopyranosides の選択的かつ高収率生産と分離精製法の確立

*Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA (EC 3.2.1.20) は、マルトースを糖供与体の基質とし、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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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)。

Ethyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside ( $\alpha$ -EG) は、グルコースの 1 位の炭素にエトキシ基 (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O-) が  $\alpha$  結合した非還元性化合物である。日本酒(清酒)やみりんなどに検出され、日本酒には平均 4.7 g/L の  $\alpha$ -EG が含まれている。 $\alpha$ -EG 単独では甘味と温和な苦味、他の食材との共用ではコク味をする。さらに、肌への塗布や経口摂取により、角質細胞分化促進による整肌作用や繊維芽細胞の誘導による保湿作用を示す。さらに、長鎖のアルキル基を持つ alkyl D-glucopyranosides (AGs) は疎水性と親水性の両方の性質を持つ両親媒性化合物で高い起泡性および泡安定性を示し、*n*-オクチル D-グルコシド、*n*-デシル D-グルコシドは、高い臨界ミセル濃度(critical micelle concentration, CMC)、低刺激性、低毒性、易分解性の特長がある生分解性界面活性剤として知られている (榊原敏之, 油化学, **39**(7), 451-458 (1990))。とくに、*n*-オクチル  $\beta$ -D-グルコシドは膜タンパク質の可溶化剤(生化学用試薬)としての用途がある。*n*-ヘキシル D-グルコシドは血圧降下作用を示すことが報告されている。

天然に存在する  $\alpha$ -AGs の多くは  $\beta$  型である。また、Koenigs-Knorr 反応や、Mukaiyama-Suzuki 反応では、 $\beta$ -AGs が優先的に合成され、 $\alpha$ -AGs の選択的生産は困難である。また、ethyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside ( $\alpha$ -EG) や *n*-butyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside などの短鎖のアルキル基から生成する  $\alpha$ -AGs については、酵素的な反応による合成例は数件が報告されている。しかし、いずれの方法でも合成量が少ないこと、またはオリゴ糖が副生することが課題となり、長鎖  $\alpha$ -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  $\alpha$ -AGs、特に長鎖  $\alpha$ -AGs の合成法の開発に期待が寄せられている。本研究では、 $\alpha$ -AGs の酵素的生産を目的として、*Xanthomonas 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。

本酵素 XgtA を用いて、アルキル基の炭素数 2~10 (アルキル鎖 C2-C10) の直鎖アルコールに対する糖転移反応を実施し、各アルコールに対応する  $\alpha$ -AGs の合成を確認した。とくに、エタノール (C2) および *n*-オクタノール (C8) に対する糖転移反応の生成物について LC-MS および NMR 分析を行い、 $\alpha$ -EG および *n*-オクチル  $\alpha$ -D-グルコシド ( $\alpha$ -OG) 選択的合成を確認した。最適反応条件下で、80 時間で 37.5 g/L の  $\alpha$ -EG の選択的生産が可能となり、消費マルトース当たりのモル収率は 43.0 %であった。さらに、96 時間で 71.1 g/L の  $\alpha$ -OG の選択的生産が可能となり、消費マルトース当たりのモル収率は 65.0 %であった。以上のように、XgtA を利用した反応で C2-C10 の  $\alpha$ -AGs の選択的合成および高収率生産を達成した。

さらなる  $\alpha$ -AGs の生産量向上を目指し検討を重ね、マルトースからの糖供与後に生成するグルコースによる糖転移反応の阻害、すなわち  $\alpha$ -AGs の生産抑制を確認した。そこで、グルコース異性化酵素 (グルコースイソメラーゼ, GI) との共用により、糖転移反応とともに生成するグルコースをフルクトースに変換し、糖転移反応の阻害の軽減することで  $\alpha$ -AGs の生産量向上を図った (Fig. 2 参照)。XgtA に GI を添加した 2 酵素法による  $\alpha$ -EG 生産の反応条件の最適化により、100 時間で 54.1 g/L の  $\alpha$ -EG の選択的生産が可能となり、消費マルトース当たりのモル収率は 40.0 %であった。 $\alpha$ -EG の生産量は、GI 無添加の場合 (37.5 g/L) の 1.44 倍となった。生成物全体を  $\alpha$ -EG 含有糖シロップ

と考えれば、GIによりグルコースがフルクトースに転化されていることから、甘味度が増大し、ハチミツ様の甘味を示すようになったことは意義深い。同様に、 $\alpha$ -OGについてもGIの共用による2酵素法の反応条件の最適化により、96時間で105 g/Lの $\alpha$ -OGの選択的生産が可能となり、消費マルトース当たりのモル収率は62.8%であった。 $\alpha$ -OGの生産量は、GI無添加の場合(71.1 g/L)の1.48倍となった。

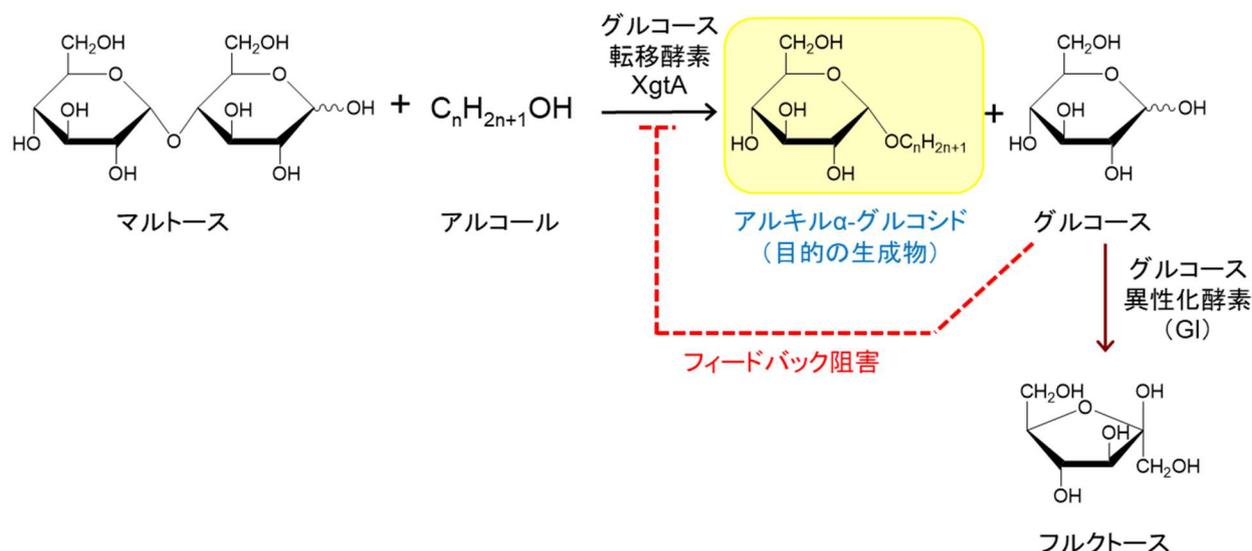


Fig. 2 XgtA とグルコース転移酵素の共用 (2 酵素法) による  $\alpha$ -AGs の選択的高生産

つぎに、合成された  $\alpha$ -AGs を高収率で単離する手法について検討した。反応液中に存在する緩衝液成分であるリン酸については、強陰イオン交換樹脂を素通りさせることで除去可能であり、回収溶液中のリン酸はマラカイトグリーンを用いた比色分析により検出限界 ( $1 \mu M$ ) 以下であることを確認した。 $\alpha$ -EG を単離する手法として、反応液に無水  $K_2CO_3$  を添加し、塩析により反応液を2相に分離し、エタノール相を回収し、エバポレーションによる溶媒 (エタノール) 除去を組み合わせた方法を確認した。本方法を用いて 30 mL の反応混合物から 0.587 g の  $\alpha$ -EG を回収率 49.5% で精製した。また、 $\alpha$ -OG については、反応液が2相であることから次のような手法で単離を行った。水相に  $Na_2SO_4$  を添加する塩析、オクタノール相抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる1-オクタノールと  $\alpha$ -OG の分離、エバポレーションによる溶媒除去を組み合わせた方法を確認した。本方法を用いて 15 mL の反応混合物から 1.10 g の  $\alpha$ -OG を回収率 75.3% で精製した。また、合成された  $\alpha$ -OG はオクタノール相と水相の両相に存在し、その分配比は(有機相、すなわちアルコール相):(水相) = 1 : 0.0304 であることを明らかにした。すなわち、合成された  $\alpha$ -OG はオクタノール相にほとんどが存在しており、塩析とシリカカラムによる精製法の確立に成功した。

### 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) Draft Genome Sequence of *Aspergillus lacticoffeatus* WU-2020, a Citric Acid Producer Suitable for Solid Culture That Belongs To *Aspergillus* Section *Nigri*, I. Yoshioka, H. Takahashi., Y. Kusuya., T. Yaguchi., A. Shibata., K. Kirimura., and A. Rokas., *Microbiol. Resour. Ann.*, **12** (1), 1-3 (2023). DOI: <https://doi.org/10.1128/mra.01093-22>
- (2) Enzymatic and Selective Production of Alkyl  $\alpha$ -D-Glucopyranosides by the  $\alpha$ -Glucosyl Transfer Enzyme derived from *Xanthomonas campestris* WU-9701, W. Cao., R. Watanabe., Y. Ishii., and K. Kirimura., *J. Biosci. Bioeng.*, **136** (5), 347–352 (2023). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2023.08.007>

### 4.2 総説・著書

- (1) 酵素を利用した高収率アルキル  $\alpha$ -グルコシド生産法, 石井 義孝, 曹 偉, 桐村 光太郎, バイオサイエンスとインダストリー, **82** (3), (印刷中) .

### 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) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA を利用した ethyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside 高含有シロップの生産, 曹 偉, 中原 遥, 田村 佳都, 石井 義孝, 桐村 光太郎, 第 75 回 (2023 年) 日本生物工学会大会 (名古屋), 講演要旨集 1Bp04, p. 85, 2023 年 8 月.
- (2) *Cellvibrio* sp. WU-0601 細胞内に検出されるネオアガロビオース生成型  $\beta$ -アガラーゼ AgaX の諸性質, 田村 佳都, 海蔵寺 早希, 石井 義孝, 桐村 光太郎, 第 75 回 (2023 年) 日本生物工学会大会 (名古屋), 講演要旨集 1Bp04, p. 87, 2023 年 8 月.
- (3) アミノ酸配列及び部位特異的変異を用いた *Pseudomonas* sp. WU-0701 由来アコニット酸イソメラーゼの活性に必須なアミノ酸残基の特定, 小林 万稀, 石井 義孝, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2024 年度大会 (東京), 講演要旨集 2E4a10, 2024 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改変を実現する「ゲノム編集」技術の利用が可能となった。さらに、*A. tubingensis* WU-2223L のマイコトキシン生産性について、*A. tubingensis* WU-2223L のゲノム情報を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、代謝産物の解析においても、い

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。今年度は、確立したゲノム編集技術を用いて、*A. tubingensis* WU-2223L を親株として、ミトコンドリア膜局在型クエン酸輸送体遺伝子 (*cocA*, *ctpA*) の高発現株および *cexA* 遺伝子との二重高発現株を作製し、クエン酸生産量を測定した。ミトコンドリア膜輸送体は CEXA と互いに協調し、とくに COCA が強くクエン酸排出に寄与すること、CTPA はクエン酸排出への寄与が小さく、高生産条件では転写が活発で過剰排出が抑制されることを初めて明らかにした。今後の展望として、各輸送体遺伝子の発現量とクエン酸生産の関係を明らかにすることでさらなるクエン酸の高生産を目指す。異なるクエン酸輸送体の多重高発現株における輸送体間の協調関係に関する研究例は皆無であることから、本研究は工業的ないし学術的に価値が高いと考えている。

一方、「超生体触媒」の開発を目指し、今年度は *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA による alkyl  $\alpha$ -D-glucopyranosides ( $\alpha$ -AGs) の選択的かつ高収率生産、ならびに高収率な回収方法について検討した。最適条件下 60 時間の反応でマルトオリゴ糖の副生なしに 42.1 g/L の  $\alpha$ -EG の生産、96 時間で 71.1 g/L の  $\alpha$ -OG の選択的生産を達成した。さらに、XgtA が糖転移反応で生成するグルコースの阻害を受けることから、XgtA とともにグルコースイソメラーゼを共用した 2 酵素法により、 $\alpha$ -EG は 100 時間で 54.1 g/L、 $\alpha$ -OG は 96 時間で 105 g/L の選択的生産に成功した。さらに、強陰イオン交換樹脂による緩衝液成分の除去や塩析、アルコール相抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる簡便な  $\alpha$ -AGs の分離精製方法を確立した。しかし、さらなる合成量や収率向上、生成物阻害の解除、ならびに受容体の拡大などの必要性がある。XgtA の再利用法の開発も期待される。今後の展望として、「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通して、反応機構の解析や機能性向上について検討する。