

次世代バイオロジー

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は「バイオロジー」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、新規な次世代型バイオロジーを利用した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) ゲノム編集法を使用したクエン酸高生産糸状菌 *Aspergillus lacticoffeatus* WU-2020 におけるマイコトキシン生合成遺伝子クラスター欠失株の作製

クエン酸は食品、飲料、医薬品など幅広い分野で利用されており、2024 年度には、*Aspergillus section Nigri* に属する糸状菌によって年間 280 万トン以上が工業的に発酵生産されている。しかし、一部の工業用生産株から、ヒトに有害なマイコトキシンの一種であるオクラトキシンおよびフモニシンの産生例が報告されている。そのため、使用菌株のマイコトキシン産生能を評価し、安全性を確認することが極めて重要である。演者らが保有する。

Aspergillus lacticoffeatus WU-2020 は、供与糖に対して 70% 以上 (wt/wt) の収率でクエン酸を生産する工業利用が期待される糸状菌である一方で、本株はオクラトキシンおよびフモニシンの生合成遺伝子クラスターを完全な形で保持していることが明らかとなった(Fig.1)。そこで本研究では、より安全なクエン酸生産株の育種を目的とし、WU-2020 株においてこれらのマイコトキシン生合成遺伝子クラスターを欠失させた株の作製を行った。

供試菌として、*A. lacticoffeatus* WU-2020 を使用した。本菌株は、固体培養に適したクエン酸高生産糸状菌であり、供与糖当たり 70% (wt/wt) 以上の収率でクエン酸を生産する工業利用が期待される糸状菌である。一方で、本菌株は、オクラトキシンおよびフモニシンの生合成遺伝子クラスターの完全長を保有しているため、安全性の担保が不可欠である。

Fig. 2 (A) (B) に示すスキームの通り、WU-2020 株を宿主としてオクラトキシンおよびフモニシンの生合成遺伝子クラスターの欠失を目的とした形質転換を行った。オクラトキシンおよびフモニシンの生合成遺伝子クラスター両端に位置する遺伝子をターゲットとして Cas9 リボヌクレオプロテイン (RNP) を合成した。RNP は、外来遺伝子を用いずにゲノム編集を行うことができるため、得られる形質転換体は、非組換え体として取得できる。プロトプラスト-PEG 法により、RNP を用いて生合成遺伝子クラスターの両端に位置する遺伝子を切断し、その切断末端同士を非相同末

端結合 (NHEJ) で結合することによって両クラスターを大規模に欠失させた。

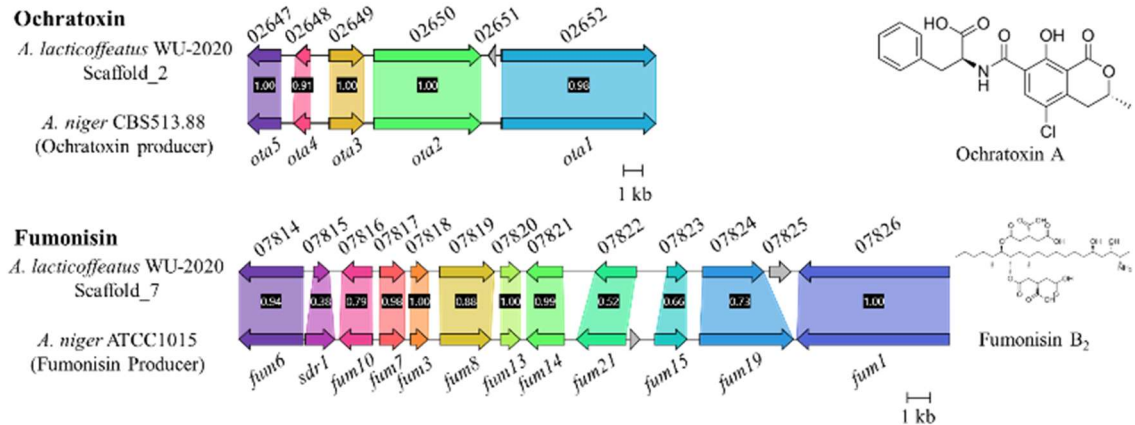


Fig. 1. Mapping of mycotoxin biosynthetic gene clusters in *A. lacticoffeatus* WU-2020.

取得した 1091 株の候補株に対し、生合成遺伝子クラスターの全長を増幅するようなプライマーペアで PCR を行って確認した。生合成遺伝子クラスターが残存している場合、PCR ポリメラーゼの増幅限界のため、バンドは確認されず、一方でクラスターが全損したときのみ、目的の長さの PCR 産物が確認される (Fig. 2 (C))。取得した両生合成遺伝子クラスター欠失株を WU-2020-Shin1 と命名し、以降の解析に使用する。

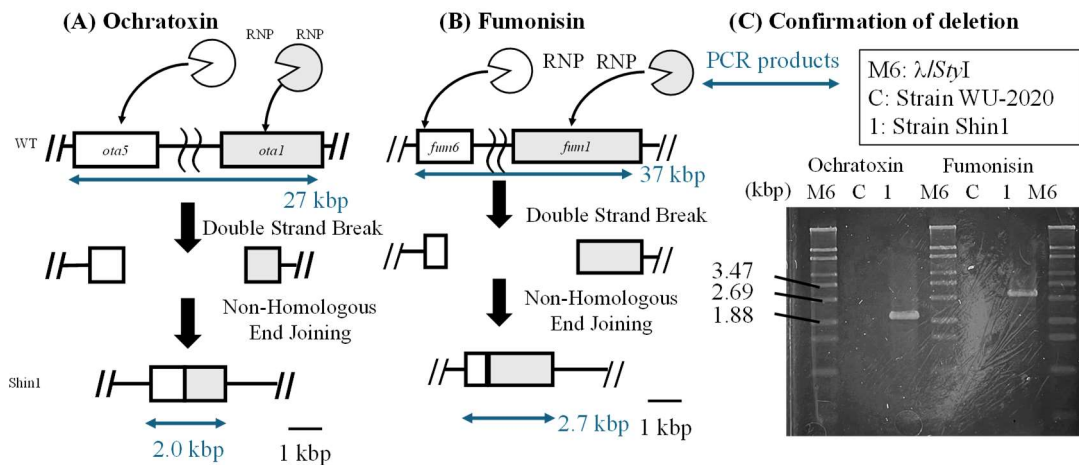


Fig. 2. Scheme for deletion of mycotoxin-biosynthetic gene clusters. (A) Deletion of ochratoxin biosynthetic gene cluster, (B) fumonisin biosynthetic gene cluster transformed with RNPs and (C) agarose gel electrophoresis of PCR products to confirm the deletion.

WU-2020-Shin1 株のマイコトキシン非産生を確認するために、培養液を LC-MS/MS 解析に供した。マイコトキシンの産生量は、培地組成によって変化することが知られているため、最少培地 (CD)、クエン酸生産培地 (SS)、完全培地 (YPM) の 3 種類における培養液を分析した。培養液を抗体精製カラムで 10 倍濃縮し、LC-MS/MS で分析することでマイコトキシンの産生量を定量した。Table 1 に野生株と WU-2020-Shin1 株のオクラトキシンおよびフモニシンの産生量を示す。

いずれの培地においても、野生株はオクラトキシンおよびフモニシンを産生するのに対し、WU-2020-Shin1 株は、全ての培地においてオクラトキシンおよびフモニシンが検出限界の 1 $\mu\text{g/L}$ 未満であった。特筆すべき点は、YPM 培地において、野生株ではオクラトキシン A が $10^4 \mu\text{g/L}$ 産生していたのに対し、WU-2020-Shin1 株では、検出下限 1 $\mu\text{g/L}$ 未満になっていることである。

Table 1. Mycotoxin productivity by strain WU-2020 and WU-2020-Shin1 cultured with typical media

| Medium | Mycotoxin | Productivity of strain WU-2020 (<i>och⁺ fum⁺</i>) ($\mu\text{g/L}$) | Productivity of strain WU-2020-Shin1 ($\Delta\text{och}\Delta\text{fum}$) ($\mu\text{g/L}$) |
|--------|--|---|---|
| CD | Ochratoxin A | 219 | Not detected |
| | Fumonisin B ₁ , B ₂ , B ₃ | 2.05, 1.06, 1.01 | Not detected |
| SS | Ochratoxin A | 37.2 | Not detected |
| | Fumonisin B ₁ , B ₂ , B ₃ | 1.15, 0.815, 0.890 | Not detected |
| YPM | Ochratoxin A | 1.04×10^4 | Not detected |
| | Fumonisin B ₁ , B ₂ , B ₃ | 1.71, 0.907, 0.972 | Not detected |

Abbreviations: CD, Minimal medium; SS, Citric acid production medium; YPM, Complete medium.

Not detected means less than the limits of detection (LOD): 1 $\mu\text{g/L}$ for ochratoxins (OTA and OTB) and 1 $\mu\text{g/L}$ for FBs (FB₁, FB₂, and FB₃), respectively.

(2) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA を利用した α -glucosylglycerol の生産

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 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、マルトトリオース等の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)。

α -glucosylglycerol (α GG) は、glycerol のヒドロキシ基に glucose が結合した化合物で、日本酒やみりんなどの発酵製品に検出されている。甘味やうま味があり、保湿性があることから、利用が期待されている。しかし、一例として日本酒 (清酒) 中の含有量は約 0.5%(w/v) と低く、高収量での生産法の開発が望まれている。 α GG には 1-*O*- α GG と 2-*O*- α GG の異性体が存在する。本研究では、Fig. 3 に示すように、XgtA を利用して maltose と glycerol を基質とした α GG、とくに 1-*O*- α GG の高収量生産のための最適反応条件を決定した。

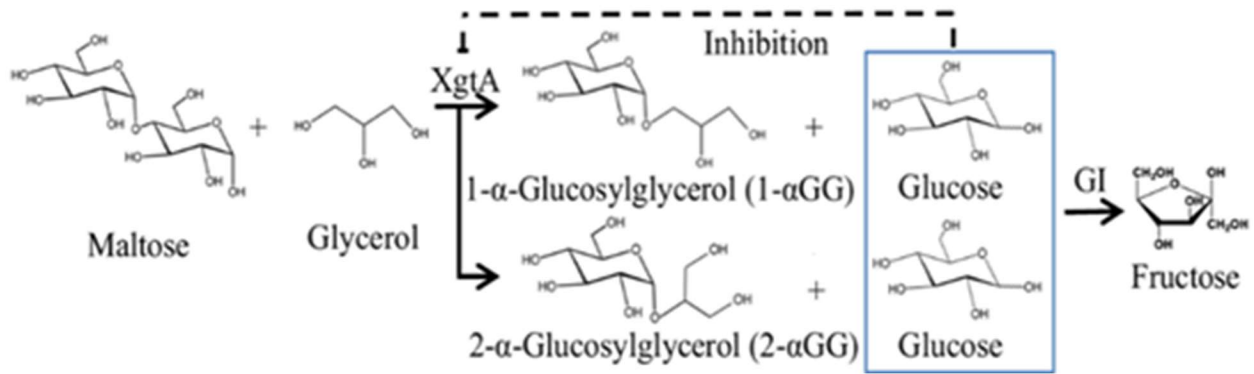


Fig. 3. Synthesis of α-Glucosylglycerol by XgtA and glucose isomerase (GI) from maltose and glycerol.

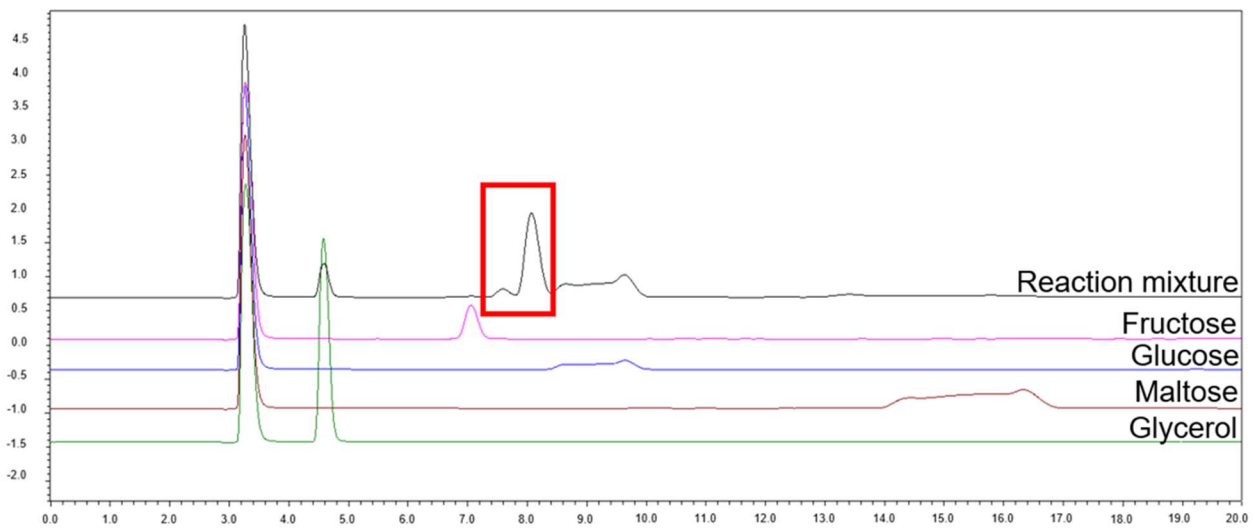


Fig. 4. HPLC analysis with DCpak PMPC.

XgtA を利用して maltose と glycerol を基質として反応を行い、HPLC により種々の分離カラムを用いて生成物の分析条件を検討した。Fig. 4 に示すように、特殊分離カラム DCpak PMPC を装着した HPLC によって、TMS 化などの前処理を必要とせず 1-*O*-αGG と 2-*O*-αGG と想定される生成物の分離を確認した。

HPLC により分離した 2 つのピークに対応する生成物を単離し、NMR 分析により立体構造を決定した。主生成物は 1-*O*-αGG、もう一方は 2-*O*-αGG であることを明らかにした。2-*O*-αGG のピーク帰属は既報文献と一致した。また、1-*O*-αGG の NMR スペクトルは本研究が初の報告例である。この結果により、DCpak PMPC を用いた HPLC 分析で、溶離液に Acetonitrile: Ultrapure water = 75:25 (v/v) を使用することで 1-*O*-αGG と 2-*O*-αGG が分離精製されたことが示された。

Fig. 5 に示すように、反応温度の影響を検討したところ、反応温度の低下に伴い 1-*O*-αGG の生産比率が増大することを明らかにした。加えて、1-*O*-αGG の生産量は GI 添加の有無に関わらず、反応温度 40 °C で最大となった。GI 非添加時の 1-*O*-αGG 生産量は 796 mM であったのに対し、GI 添加時は 1072 mM となり、GI の添加により 1-*O*-αGG 生産量が約 1.35 倍増加したことが示された。

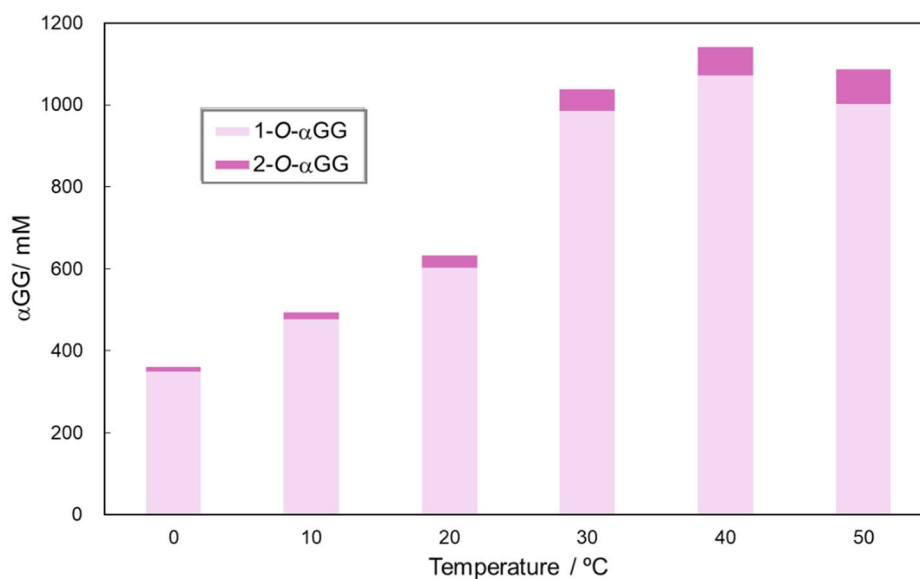


Fig. 5. Effects of temperatures on α GGs production by XgtA and GI. The reaction solution was subjected to HPLC analysis with DCpak PMPC.

1-O- α GG の高収量生産のための最適反応条件を検討し、最適条件下での α GG について検討した。XgtA に 3000 GIU の GI を併用した二酵素系反応では、40 °C、48 h で α GG の生産量は最大 1141 mM となった。また、DCpak PMPC を用いた HPLC 分析で 1-O- α GG と 2-O- α GG の生成比率は 94:6 と決定し、1-O- α GG の生産量は既往研究の中で最大である 1072 mM に達した。

以上により、NMR 分析により、反応の主生成物は 1-O- α GG であり、副生成物は 2-O- α GG であることが確認された。1-O- α GG の NMR スペクトルに関する報告は本研究が初めてである。XgtA と GI の 2 つの酵素を組み合わせることで、 α GG を選択的かつ高収率で生産するシステムの開発に成功した。48 h で 1141 mM の α GG 生産を達成した。また、40 °C 条件下で 1-O- α GG は生成物全体量の 94% を占め、その収量は 1072 mM となった。この値は酵素法による 1-O- α GG 生産量としてこれまでで最大である。また、1-O- α GG の生成比率は反応温度の低下とともに増加することが示された。

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) Oga, K., Nakagawa, H., Yoshioka, I., and Kirimura, K.: Generation of mycotoxin biosynthetic gene clusters deletion strains in the citric acid-hyperproducing *Aspergillus lacticoffeatus* WU-2020 by genome editing technique. JSM Mycotoxins. (in press, 2026).

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) ゲノム編集法によって作製したクエン酸高生産糸状菌 *Aspergillus lacticoffeatus* WU-2020 由来マイコトキシン生合成遺伝子クラスター欠失株 Shin1 におけるマイコトキシン非産生の確認, 大賀 一輝, 吉岡 育哲, 中川 博之, 桐村 光太郎, 第 93 回日本マイコトキシン学会 (徳島), 講演要旨集 O-12, p.31, 2025 年 9 月.
- (2) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA を利用した alpha-グルコシルグリセロールの選択的生産, 鈴木 奏音, 曹 偉, 田村 佳都, 石井 義孝, 桐村 光太郎, 第 77 回日本生物工学会 (広島), 講演要旨集 p53, 1Ap06, 2025 年 9 月.
- (3) *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来寒天分解酵素 AgaX の遺伝子工学を利用した耐熱性の改良, 田村佳都, 石井義孝, 桐村光太郎, 第 77 回日本生物工学会 (広島), 講演要旨集 p54, 1Ap07, 2025 年 9 月
- (4) クエン酸高生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L を宿主とした *cexA* 高発現株における培地組成の最適化, 入江 友規, 大賀 一輝, 吉岡 育哲, 桐村 光太郎, 第 77 回日本生物工学会 (広島), 講演要旨集 p. 24, 1Ep06, 2025 年 9 月.
- (5) ゲノム編集法を利用したクエン酸高生産糸状菌 *Aspergillus lacticoffeatus* WU-2020 におけるマイコトキシン生合成遺伝子クラスター欠失株の作製, 大賀 一輝, 吉岡 育哲, 中川 博之, 桐村 光太郎, 第 77 回日本生物工学会 (広島), 講演要旨集 p. 28, 1Hp14, 2025 年 9 月
- (6) *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来寒天分解酵素 AgaX の遺伝子の同定と精製, 田村 佳都, 石井 義孝, 桐村 光太郎, 第 15 回 CSJ 化学フェスタ 2025 (東京), P9-071, 2025 年 10 月.
- (7) Purification, Characterization, and Gene Identification of Novel Agarase AgaX from *Cellvibrio* sp. WU-0601: an Intracellular β -Agarase Forming Neoagarobiose as a Final Product, Kaito Tamura, Yoshitaka Ishii, Kohtaro Kirimura, Pacifichem2025 (Hawaii), Board 078, December 2025.
- (8) クエン酸生産糸状菌におけるサイトゾル局在型クエン酸シンターゼ遺伝子(*citB*) の高発現株の作製と表現型の解析, 長江 寛輝, 大賀 一輝, 桐村 光太郎, 2026 年度日本農芸化学会 (京都), 講演要旨集 p. 43, 2B8pm03, 2026 年 3 月.

5. 研究活動の課題と展望

昨年までに、メカニズムが未だ不明であったメタノール効果について、*A. tubensis* WU-2223L において CA 産生に関連したメタノール効果とクエン酸輸出遺伝子 *cexA* の分子機能について検討した。培地へのメタノール添加により *cexA* 発現が劇的に増強されることが明らかとなった。さらに、*cexA*

を恒常的に発現させた組換え体 LhC-1 株および LhC-2 株では、メタノールの有無は CA 生産に影響がない、すなわち CA 生産はメタノール効果非依存的であることを明らかにした。以上より、メタノール非依存的に CA を過剰生産する LhC-1 株および LhC-2 株の樹立に成功した。今年度は、固体培養に適したクエン酸高生産系状菌である *Aspergillus lacticoffeatus* WU-2020 のマイコトキシン生合成遺伝子クラスターを欠失させた WU-2020-Shin1 株の作製を行った。最少培地 (CD)、クエン酸生産培地 (SS)、完全培地 (YPM) の 3 種類のいずれの培地においても、野生株はオクラトキシンおよびフモニシンを産生するのに対し、WU-2020-Shin1 株は、全ての培地においてオクラトキシンおよびフモニシンが検出限界の 1 $\mu\text{g/L}$ 未満であった。以上により、安全なクエン酸生産株の育種に成功した。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 を利用した α -glucosylglycerol の生産を行った。 α GG には 1-O- α GG と 2-O- α GG の異性体が存在するため、特殊分離カラム DCpak PMPC を装着した HPLC によって、1-O- α GG と 2-O- α GG の精製法を確立した。さらに、NMR 分析により、反応の主生成物は 1-O- α GG であり、副生成物は 2-O- α GG であることを確認した。1-O- α GG の NMR スペクトルに関する報告は本研究が初めてである。 α GG 生産については、XgtA と GI の 2 つの酵素を組み合わせることで、 α GG を選択的かつ高収率で生産するシステムの開発に成功した。48 h で 1141 mM の α GG 生産を達成し、40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下で 1-O- α GG は生成物全体量の 94% となり高収率での生産を達成した。今後の展望として、「超生体触媒」の開発に向けて、さらなる固定化技術について検討する。さらに、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。