

## 養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名：前田 浩

2. 養成カリキュラム名：産業生物ゲノム遺伝子及びタンパク質の網羅的解析手法の開発と産業利用

3. 養成カリキュラムの達成状況

以下に養成カリキュラムの各セクションについて順を追って記す。またカリキュラムの進捗状況としては、平成12年度国際共同研究提案公募事業 (NEDO)「バイオマス分解酵素遺伝子発現モニタリングデバイスの開発」により作製した麹菌 cDNA マイクロアレイを用い、カリキュラムは一応の成果を収めており、産業界への還元といった意味でも評価を得ていると思われる。

1) 各種環境下におけるタンパク質発現応答の解析

これまでに、平成12年度国際共同研究提案公募事業 (NEDO) により作製した麹菌 cDNA マイクロアレイを用い、バイオマス分解関連酵素遺伝子群の発現解析を進めてきた。その結果については「4. 成果」として以下に具体的に記すが、対外的発表として“Transcriptional Analysis of Genes for Energy Catabolism and Hydrolytic Enzymes in the Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae* Using cDNA Microarrays and Expressed Sequence Tags (ESTs)” のタイトルにて論文化し、*Applied Microbiology and Biotechnology* に受理された。

また上記のバイオマス分解に次いで、生分解性プラスチック存在下における麹菌の生分解性プラスチック分解関連酵素・タンパク質遺伝子群の解析を進め、その分解関連酵素・タンパク質遺伝子の同定が終わり特許出願終了後、学会発表等を行なっている。

2) ゲノムとの照会

上記「1) 各種環境下におけるタンパク質発現応答の解析」に並行して、難分解性物質の一種である生分解性プラスチックの麹菌による分解を試みてきた。これまでの成果として直接分解を行う酵素タンパク質とそれに関与する両親媒性タンパク質をそれぞれ見出している。さらに私は麹菌ゲノムデータベースを用い、麹菌ゲノム中に新たに2種の生分解性プラスチック分解酵素類似体遺伝子を見出し、それらについてもタンパク質レベルでの解析まで進んでいる。これらの内容は以下の特許出願(「微生物によるプラスチックの分解を利用した有用物質の製造方法」(特願 2002-308884)) の追加事項として実施例に加えている。

3) ゲノム-タンパク質カタログの作製

生分解性プラスチックを唯一の炭素源とした麹菌培養を実施し、分泌タンパク質を網羅的に解析しカタログ化を試みている。その結果、生分解性プラスチックを唯一の炭素源とする培養時に特異的に発現している新規の機能未知な生分解性プラスチックの分解に関わるタンパク質を見出すことができ、麹菌ゲノム中よりこのタンパク質をコードする遺伝子を見出している。このタンパク質及び遺伝子についても以下の特許出願の追加事項として実施例に加えている。今後引き続き、生分解性プラスチック資化時に特異的に発現しているタンパク質の解析を進め、そのカタログ化を実施する予定である。

## 4. 成果

### 1) 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) におけるバイオマスを培養基質として用いた固相培養時のバイオマス分解関連酵素遺伝子群のモニタリングとその利用

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は発酵産業において広く用いられている産業微生物のひとつである。この麹菌は約 8,000 遺伝子を有していると考えられるが、産業利用されているのは未だ 1% 程度であり、多数の有用酵素遺伝子群が潜在的に未利用のままである。加えて、日本の発酵化学産業、特に麹菌を用いた酵素生産においては、小麦フスマ等を用いた固相培養がその高度生産に有効であるとされてきた経緯がある。しかしながら、その有用酵素遺伝子群の発現機構については未だ経験に基づいた最適化が図られているに過ぎず、さらに麹菌の基本代謝経路 (解糖系、TCA サイクル等) を構成する酵素遺伝子の発現様式についても未だ不明な点が多いのも事実である。今後、麹菌の高度利用を目指すには、個別遺伝子利用から、ゲノム遺伝子全体の利用への移行が必須となる。このような背景から、麹菌の全ゲノム配列の解読、ならびに ESTs (expressed sequence tags) 解析が産官学コンソーシアムにより推し進められてきた。その過程で我々は麹菌 EST データベースを基に選択された 2070 種の cDNA が搭載された麹菌 cDNA マイクロアレイを作製してきた。本研究ではこの麹菌 cDNA マイクロアレイを用い、固相培養時の遺伝子発現を網羅的にモニタリングすることで、産業上有用な酵素遺伝子群の発現の最適化を図ることを目的としている。

まず、麹菌の基本代謝経路を構成する酵素遺伝子群の発現様式を、グルコース存在下 (AC condition) と非存在下 (AN condition) で液体培養し比較解析した。その結果、*Saccharomyces cerevisiae* や *Trichoderma reesei* などでは TCA サイクルが抑制されるようなグルコース存在下で、麹菌は解糖系とそれに続く TCA サイクルが同時に発動することを明らかにした。

次いで、麹菌の固相培養時の遺伝子発現をモニタリングした。本研究では発酵基質として、小麦フスマ、米ヌカ、大豆オカラの 3 種を選択した。これら 3 種は日本の食品産業において恒常的に産出される産業廃棄物でもあるが、固相培養基質として今後利用価値が高まるであろうバイオマスとしての一面をも有する。本研究において、この 3 種におけるバイオマス分解関連酵素遺伝子およびタンパク質分解酵素遺伝子などの産業上有用な酵素遺伝子群の発現をモニタリングしたところ、液体培養に比して、総じて発現量の増加が確認された。特に小麦フスマを用いた固相培養時に最も高い発現量を示した。さらに液体培養時に比べ小麦フスマ固相培養時に麹菌の基本代謝経路は最も低く抑えられていた。このことから、セルロースやヘミセルロースを主体とする多糖類を多く含むバイオマスを用いた固相培養では、グルコースの菌体内への取り込みが制御され、基本代謝経路が抑制され、その結果カタボライト抑制が解除されることにより有用酵素遺伝子群の発現量が向上したと示唆された。これは網羅的な遺伝子発現解析を行ったことで、産業上有効とされてきた固相培養における酵素生産を系統的に明らかにしたものである。

上記成果について、“Transcriptional Analysis of Genes for Energy Catabolism and Hydrolytic Enzymes in the Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae* Using cDNA Microarrays and Expressed Sequence Tags (ESTs)” のタイトルにて論文化し、*Applied Microbiology and Biotechnology* に受理された。

### 2) 麹菌を用いた生分解性プラスチックリサイクルシステムの構築に向けて

現在、廃棄石油化学系プラスチックの焼却による炭酸ガスまたはダイオキシン類の発生などが問題視されており、その配慮として生分解性プラスチックが開発され、その流通量も増加傾向にある。しかし現状の生分解性プラスチックの分解技術は、土壌中における微生物による水と二酸化炭素への単純な分解を前提としており、このまま需要が増加した場合、土壌中での分解だけでは分解用地の確保、分解にかかる時間などの新たな問題が顕在化することが予想される。また生分解性プラスチックは生産コスト

が従来のプラスチックと比較して高く何らかのコスト回収技術の開発が求められているのが現状である。

そこで我々は生分解性プラスチックを微生物の発酵基質として捉え、付加価値を持つ有用物質（酵素・医薬品など）の生産に転換する、新規な分解・物質生産が可能なリサイクルシステムの構築を最終的な目的とした。

微生物種は、世界的にその安全性が認められていること、高い物質生産能が確認されていること、平成12年度国際共同研究提案公募事業（NEDO）により作製した麹菌 cDNA マイクロアレイを利用することで発現遺伝子の網羅的解析が可能であることなどの利点より、麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を選択した。麹菌による生分解性プラスチック (PBS; Poly butylenes succinate) の分解が PBS 乳化液を含むプレート上での消化円の形成、液体培養における濁度の低下により認められた。そこで生分解性プラスチック分解に関わる遺伝子（タンパク質）を明らかにするために、我々が既に試作していた麹菌 cDNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現様式を解析した。その結果 PBS を唯一の炭素源として麹菌を液体培養した時にのみ発現量が増大する遺伝子が二種見出された。一つは機能未知遺伝子であったが、一つは *Aspergillus nidulans* のハイドロフォピン RodA に相同性が高いタンパク質をコードしていた (RodA-like protein; RoIA と命名)。このハイドロフォピンは糸状菌や担子菌において、その細胞壁に存在する両親媒性タンパク質で、糸状菌においては固相培養時などの気中菌糸、分生子にその存在が確認されている。本来液体培養時には殆ど発現しないハイドロフォピンが何故過剰発現しているのだろうか?現在我々は、PBS のような疎水性基質を分解・資化する際に麹菌の菌糸が PBS に吸着するために、細胞壁に両親媒性タンパク質であるハイドロフォピンを、その疎水性領域を基質側に向けて局在させていると考えている。

上記のマイクロアレイの結果、直接分解に関わる酵素遺伝子の発現は認められなかった（後になって分かったことだが、目的遺伝子はアレイチップ上に搭載されていなかった）。そこで PBS 乳化液を含む培地で麹菌を培養した培養上清から PBS 分解酵素を精製することとした。各種カラムクロマトグラフィーにより最終的に電気泳動的に 21.6 kDa の均一なバンドを示す酵素が精製された。この内部配列 AQLGFEQAVS に相当する配列を検索したところ、既知のクチナーゼ (CutL1) であることが示された。クチナーゼは植物の表層（クチクラ層）にあるクチンを分解する酵素として、植物病原菌から分離されたエステラーゼに分類される酵素である。本酵素の諸性質を詳細に検討した。また現在、汎用性の高いプラスチック分解酵素が求められており、そのニーズに応える為の指針の抽出を目的に、本酵素の基質特異性を検討し、それらを総合して酵素とポリエステル酵素-基質の関係を検討した。また麹菌ゲノムから ORF を含む領域を抽出し、それを用いた麹菌での相同組換え高発現株を作製した。またニーズに応える別のアプローチとして、麹菌のゲノム遺伝子情報を基に麹菌より新たな類似酵素を見出し、その酵素の特異性を知ることで、アプリケーションとしての酵素のバリエーションを増やすこととした。その結果麹菌ゲノム遺伝子中より新たに2種の類似酵素をコードする遺伝子を見出し、その高発現株の作製及び、酵素タンパク質の精製を進め、現在の所本カリキュラムにおいて3種の生分解性プラスチック分解酵素を得ることができた。

最後に、生分解性プラスチックリサイクルシステムの構築に向けて、ハイドロフォピンとクチナーゼの共高発現株を作製した。これは麹菌が吸着因子としてのハイドロフォピン RoIA を介してプラスチック表面に菌糸を吸着させ、続いてクチナーゼを分泌することでプラスチックを分解・資化していることが示唆されてきたからである。その結果、この共高発現株は野生株に比して、有意にプラスチックを分解した。

上記成果について、発明の名称「微生物によるプラスチックの分解を利用した有用物質の製造方法」として特許出願を行った。

## 5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)

Transcriptional Analysis of Genes for Energy Catabolism and Hydrolytic Enzymes in the Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae* Using cDNA Microarrays and Expressed Sequence Tags (ESTs)

In press *Applied Microbiology and Biotechnology* (2004)

### ABSTRACT

*Aspergillus oryzae* is a fungus used extensively in the fermentation industry. We constructed cDNA microarrays comprising 2070 highly expressed cDNAs selected from the ~6000 non-redundant expressed sequence tags (ESTs) in the *A. oryzae* EST database (<http://www.aist.go.jp/RIODB/ffdb/index.html>). Using the cDNA microarrays, we analyzed the gene expression profiles of *A. oryzae* cells grown under the glucose-rich (AC) and glucose-depleted (AN) liquid culture conditions that were used during the construction of the EST database. The sets of genes identified by the cDNA microarray as highly expressed under each culture condition agreed well with the highly redundant ESTs obtained under the same conditions. In particular, transcription levels of most catabolic genes of the glycolytic pathway (EMP) and tricarboxylic acid cycle (TCA) were higher under AC than AN conditions, suggesting that *A. oryzae* uses both EMP and TCA for glucose metabolism under AC conditions. We further studied the gene expression of hydrolytic enzymes and those of energy catabolism by using three industrial solid-phase biomass media, including wheat-bran. The wheat-bran culture gave the richest gene expression profile of the hydrolytic enzymes and the lowest expression levels of the catabolic genes (EMP, TCA) among the three media. The low expression levels of catabolic genes in the wheat-bran culture may release catabolite repression, consequently leading to the rich expression profiles of the hydrolytic enzymes.

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

日本農芸化学会 2003 年度大会 (平成 15 年 4 月 1 日 ~ 4 月 3 日) にて代表発表

タイトル: 麹菌の産生する生分解性プラスチック分解酵素の性質検討と高発現株の作製

講演要旨:

【目的】廃棄石油化学系プラスチックは、その燃焼処理による炭酸ガス、ダイオキシン類の発生などが問題視されている。その配慮として生分解性プラスチックが開発され、流通量も増加傾向にあるが、現状の分解技術は、土壌中における微生物による単純な分解を前提としている。また生分解性プラスチックは生産コストが高く、何らかの回収技術も求められている。そこで我々は生分解性プラスチックを微生物の発酵基質として捉え、新規な分解・物質生産が可能なりサイクルシステムを構築することを最終目標としている。

【結果】微生物種は、その安全性、高い物質生産能を有する利点より、麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を選択した。唯一の炭素源として PBS (polybutylene succinate) を用いた麹菌液体培養の培養上清中に PBS 分解活性を見出し、PBS 分解酵素を精製し、その諸性質を検討した。また麹菌ゲノムから ORF を含む領域を抽出し、それを用いた麹菌での相同組換え高発現について併せて報告する。

「麹菌の産生する生分解性プラスチック分解酵素の基質特異性」

平成 15 年度 日本生物工学会大会にて代表発表

第 55 回 日本生物工学会大会 (平成 15 年 9 月 16 日 ~ 18 日) にて代表発表

タイトル: 麹菌の産生する生分解性プラスチック分解酵素の基質特異性

講演要旨:

廃棄石油化学系プラスチックは、その焼却処理による炭酸ガス、ダイオキシン類の発生などが問題視

されている。その対策として生分解性プラスチックが開発された。しかし生分解性プラスチックは生産コストが高く、土壌中での単純な分解ではコストが回収できないことが流通量増加への課題となっている。そこで我々は生分解性プラスチックを微生物の発酵基質として利用し、コスト回収が可能な大規模リサイクルシステムを構築することを目標とし研究を進めている。

本システムでは、安全性・高い物質生産能を有し、さらに大規模産業インフラが存在する麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を中核としており、我々は麹菌の生産する生分解性プラスチック分解酵素の研究を行ってきた。これまでに生分解性プラスチックの一つである PBS (polybutylene succinate) を唯一の炭素源とする麹菌培養上清中より PBS 分解酵素の精製、諸性質の検討を行い、前年度日本生物工学会にて報告した。現在、汎用性の高いプラスチック分解酵素が求められており、そのニーズに応える為の指針の抽出を目的に、本酵素の基質特異性を種々検討したので報告する。

第4回 日本農芸化学会東北支部 若手シンポジウム (平成15年10月11日~12日) において

講師として招待講演

タイトル：醸造に学ぶ生分解性プラスチックリサイクル

講演要旨：

### 1. はじめに

日本におけるプラスチックの生産量は、2001年で約1,400万トンであり、その殆どが(1,000万トン超)が廃棄プラスチックとして排出され、おもに焼却処理されている。またプラスチックの主流である石油化学系プラスチックは安価で且つ安定性・加工性に優れているため今後も大量に生産・消費されていくと考えられる。しかし、その原料となる石油資源の枯渇や、焼却処理による炭酸ガスやダイオキシンの自然界への放出などが問題視されており、その配慮として生分解性プラスチックが開発され、その流通量も増加傾向にある。しかし現状の生分解性プラスチックの分解技術は、土壌中における微生物による水と二酸化炭素への単純な分解を前提としており、このまま需要が増加した場合、土壌中での分解だけでは分解用地の確保、分解にかかる時間などの新たな問題が顕在化することが予想される。また生分解性プラスチックは生産コストが従来のプラスチックと比較して高く何らかのコスト回収技術も求められているのが現状である。

そこで我々は生分解性プラスチックをただ単に分解するのではなく、生分解性プラスチックを微生物の発酵基質として捉え、付加価値を持つ有用物質(酵素・医薬品など)の生産に転換する、新規な分解・物質生産が可能なりサイクルシステムの構築を最終的な目的としている。

### 2. なぜ麹菌なのか?

生分解性プラスチックは微生物によって分解されるという特徴を有するものであるが、分解時の問題点となっているのは、やはり、生分解性プラスチックが疎水性の高い固体であるということである。そこで思い浮かべて頂きたいのが、植物(リンゴ、稲など)に付着している微生物の殆どが糸状菌であること、その感染先の植物体はクチクラ層と呼ばれる脂肪酸ポリエステルからなる疎水性の表面を持つということ。即ち植物などの疎水表面に生える糸状菌にはプラスチックに接触し、分解・資化する能力を有することが示唆された。

また麹菌は、日本で古くから発酵産業に利用されているが、その殆ど全てが固形物(米、麦、大豆等)を原料として培養されており、固形物の分解に最も適した微生物であるといえる。さらに麹菌は世界的にもその安全性が認められている微生物でもある。そして日本には長年培われた発酵生産技術が確立しており、麹菌培養装置をも既に有している。これは今後期待される大規模分解処理システムの構築へのアドバンテージとなる。

そして時を同じくして、麹菌全ゲノム解析が日本で行われ、完了している。また麹菌遺伝子操作技術、組換え技術等も確立している。よって我々の目的とする生分解性プラスチック・リサイクルシステムの核となる微生物の条件に最も適したのが麹菌であった。

### 3. 麹菌による生分解性プラスチック分解

#### 3.1 プラスチック表面吸着因子(バイオサーファクタント RoIA)の発現

研究材料に用いる生分解性プラスチックとしては、農業用マルチフィルム等に既に用いられているポ

リブチレンサクシネート (PBS) を選択した。この PBS の乳化液を用いて麹菌を培養した際、プレート培養でのハローの形成、液体培養での濁度の低下から、麹菌が PBS を分解し資化する能力を有していることが確認された。そこで生分解性プラスチック分解に関わる遺伝子 (タンパク質) を明らかにするために、我々が既に試作していた麹菌 cDNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現様式を解析した。その結果 PBS を唯一の炭素源として麹菌を液体培養した時にのみ発現量が增大する遺伝子が二種見出された。一つは機能未知遺伝子であったが、一つは *Aspergillus nidulans* のハイドロフォピン RodA に相同性が高いタンパク質をコードしていた (RodA-like protein; RoIA と命名)。このハイドロフォピンは糸状菌や担子菌において、その細胞壁に存在する両親媒性タンパク質で、糸状菌においては固相培養時などの気中菌糸、分生子にその存在が確認されている。本来液体培養時には殆ど発現しないハイドロフォピンが何故過剰発現しているのだろうか?現在我々は、PBS のような疎水性基質を分解・資化する際に麹菌の菌糸が PBS に吸着するために、細胞壁に両親媒性タンパク質であるハイドロフォピンを、その疎水性領域を基質側に向けて局在させていると考えている。

### 3.2 麹菌の産生する生分解性プラスチック分解酵素

前述のマイクロアレイの結果、直接分解に関わる酵素遺伝子の発現は認められなかった (後になって分かったことだが、目的遺伝子はアレイチップ上に搭載されていなかった)。そこで PBS 乳化液を含む培地で麹菌を培養した培養上清から PBS 分解酵素を精製することとした。各種カラムクロマトグラフィーにより最終的に電気泳動的に 21.6 kDa の均一なバンドを示す酵素が精製された。この内部配列 AQLFEQAVS に相当する配列を検索したところ、既知のクチナーゼ (CutL1) であることが示された。クチナーゼは植物の表層 (クチクラ層) にあるクチンを分解する酵素として、植物病原菌から分離されたエステラーゼに分類される酵素である。

### 4. 生分解性プラスチックリサイクルシステムの構築に向けて

麹菌が吸着因子としてのハイドロフォピン RoIA を介してプラスチック表面に菌糸を吸着させ、続いてクチナーゼを分泌することでプラスチックを分解・資化していることが示唆されてきた。そこでハイドロフォピンとクチナーゼの高発現株を作製した。この高発現株は野生株に比して、有意にプラスチックを分解し、ハイドロフォピンを高発現させることで菌糸のプラスチック表面上での生育が確認された。ここで思い出されるのは醸造における「麹」である。醸造において基質となる米などをより効率的に分解する技術として、固相培養による「麹」の段階での酵素生産、それに続く「醪」の段階での高密度酵素分解が長年の経験から培われてきた。よって、ハイドロフォピンを介した「プラスチック麹」の作製、クチナーゼに適した条件での「プラスチック醪」とその場面でのプラスチック分解である。また元来、麹菌は固相培養時に多種・多量のタンパク質を分泌することが知られており、この醸造技術を踏襲することで、もう一つの目的でもあるコスト回収のための有用物質生産も図れると考えている。

日本農芸化学会 2004 年度大会 (平成 16 年 3 月 28 日~31 日) にて代表発表

「麹菌のクチナーゼホモログ (CutB) の遺伝子構造と生分解性プラスチック分解活性」

講演要旨:

【目的】我々はこれまでに生分解性プラスチックの一つである polybutylene succinate (PBS) を効率よく分解する酵素として麹菌のクチナーゼ (CutL1) を単離・精製し、その酵素学的諸性質を明らかにした。今回、さらに麹菌から CutL1 に相同性の高いホモログ遺伝子を単離したので、その構造および生分解性プラスチックの分解活性等について検討した。【結果】単離した *cutL1* ホモログ遺伝子 (*cutB*) の塩基配列から、N 末側の約 200 アミノ酸は CutL1 と 80% の高い相同性を示したが、C 末端側にセリンが連続して存在する配列が付加されていることが推定された。*cutB* を高発現用プロモーターに連結して麹菌 *A. oryzae* NS4 株に導入したところ、形質転換株は親株に比べて PBS 単一 C 源培地での生育が旺盛で大きくクリアな消化円を形成した。液体培養上清の SDS-PAGE の結果、30 kDa 付近にバンドが認められ、セリンリッチな配列が付加された形で生産されていた。

(3) 特許等の出願件数  
2件