

## 2-2 組換え技術による高機能糖化酵素の構築

小笠原 渉

*Trichoderma reesei*は、菌体外酵素を大量に生産する能力として微生物最大である60–100 g/L-培養液以上の数値を示す。生産する菌体外タンパク質のほとんどがリグノセルロース分解酵素であることから、最強のセルロース系バイオマス分解微生物と言われている。*T. reesei*と呼ばれる微生物はすべて野生株QM6aを親株としている(図1)。*T. reesei*は、親株QM6aから世界中の系統樹へと分岐し、各国独自の選抜法によって開発がなされている。日本においては、「新燃料油開発技術研究組合」(以下、RAPAD)が、第二次オイルショック後の1980年に設立され、石油9社、発酵4社、プラント7社、化学3社の計23社が7ヵ年計画のバイオマス利活用研究を目的とした大型国家プロジェクトを推進した。この中で、日本型*T. reesei*系統株が作製された。我々は、研究機関として唯一この系統樹のすべてを保有しており、この日本型系統樹をより進化させるためにセルラーゼ高生産変異株PC-3-7株を親株とした研究を20年以上にわたって続けてきた。NEDOプロジェクトにおいても、この系統樹を基に菌株開発を進めた。

*T. reesei*のセルロース分解には、セロビオハイドラーゼ(CBH)、エンドグルカナーゼ(EG)および $\beta$ -グル

コシダーゼ(BGL)が相乗的に作用し、効率的にグルコースを生産するとされている。しかし、*T. reesei*のBGL活性は、CBHやEG活性に比べて弱く、通常の生育ではセロビオースを中心としたセロオリゴ糖を生産し、効率的に菌体内に取り込み、菌体内BGLによってグルコースまで分解がなされるシステムを有している。すなわち、*T. reesei*は、グルコースだけではなく、セロオリゴ糖を取り込むことで生育することが可能であり、菌体外BGL活性は高活性である必要がない。そのため、*T. reesei*が生産する酵素においては、必ずしもグルコース生産に最適化されたシステムとなっておらず、バイオマス糖化プロセスにはBGLの強化が初期の開発ターゲットとなる。このBGL強化の戦略において、他のBGL生産菌を培養し高活性なBGLを取得して、*T. reesei*酵素に添加する手法(通称 カクテル化酵素)も考えられるが、実プロセスにおいては、酵素のオンサイト生産が想定されており、コスト面、プラントのハンドリングの面から、1種の微生物によって最適なCBH、EGおよびBGLを生産し、効率的にグルコースを生産するプロセスの構築が次世代型の糖化プロセスとなると考えている。

我々は、長年、*T. reesei*セルラーゼ遺伝子誘導発現制

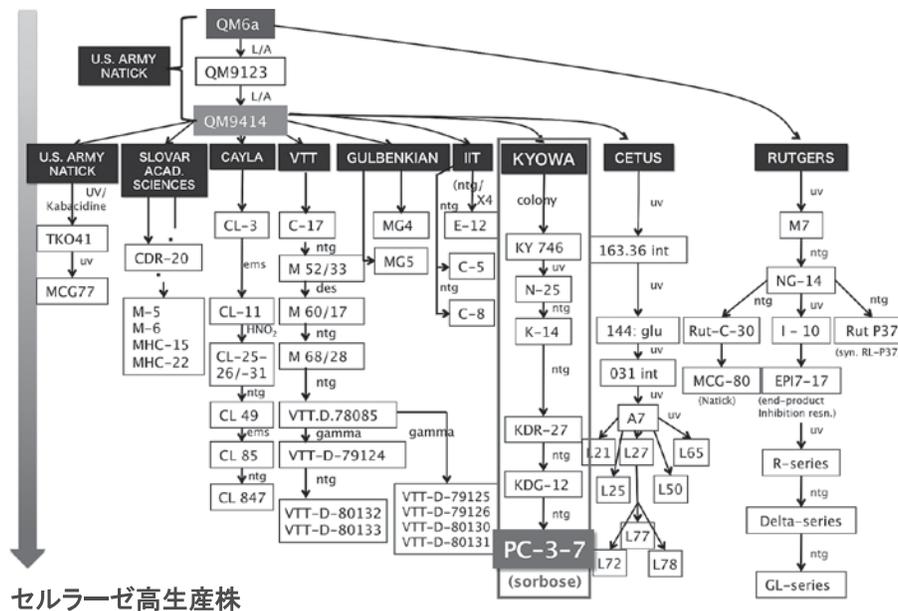


図1. 全世界における*T. reesei*の系統樹



表1. 糖化率80%に必要な酵素量 (mg/g-バイオマス)

バイオマス (前処理法)	WT	JN11	JN11H	JN12	JN13	JN13H
稲わら (NaOH)	29	7.4	5.0	7.8	4.6	3.8
エリアンサス (NaOH)	22	3.7	2.9	3.5	2.8	2.5
エリアンサス (希硫酸)		4.0			4.5	5.2
ユーカリ (水熱)	35	4.2	4.8	4.8	4.3	4.6
スギ (爆砕)		12	15	17	15	16

JN1XH: キシラン添加培養

BGL活性の高い酵素である。また、キシラナーゼ活性に寄与するGH10およびGH11酵素を含んでおり、特にGH10のバイオマス分解への寄与は本プロジェクトで明らかとされ、XYN IIIを生産可能な日本型系統樹のポテンシャルを最大限に酵素開発に活かすことができた。第一世代の高機能糖化酵素は、JN11, 12, 13シリーズとして日本の各プロジェクトに供給可能となり、高く評価されている。表1から明らかなように、これらの酵素は、すべての前処理バイオマスにオールラウンドでは無く、JN11は硫酸処理、水熱処理、爆砕処理に適しており、JN13Hは、アルカリ処理に適している。このように、

それぞれ特有の前処理バイオマスの構成成分、構造を効率的に分解する高機能糖化酵素の適化は必要であり、今後重要な開発の目標となろう。

現在、我々はJN11~13に次のターゲットを組込んだJN21~24を開発し、酵素使用量をさらに減少させることに成功している。このようにNEDOプロジェクトにおいて、高機能糖化酵素JNシリーズ開発は日本独自のノウハウと地道な効果の積み重ねによって進められてきた。現在、高機能糖化酵素開発に加えて、*T. reesei*のセルラーゼ誘導発現制御機構、糖トランスポーター、タンパク質生産メカニズムなどの研究成果の蓄積を、高機能糖化酵素を安価に高生産する*T. reesei*の開発に注ぎこみ、日本独自の菌株開発も進めている。

## 文 献

- 1) Xu, J. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 370 (2000).
- 2) Ogasawara, W. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 995 (2006).
- 3) Furukawa, T. *et al.*, *Fungal. Genet. Biol.*, **45**, 1094 (2008).
- 4) Nitta, M. *et al.*, *Fungal. Genet. Biol.*, **49**, 388 (2012).
- 5) Rahman, Z. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 899 (2009).
- 6) Rahman, Z. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1083 (2009).
- 7) Nakazawa, H. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 92 (2012).
- 8) Kawai, T. *et al.*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 1741 (2012).