

## セルラーゼ表層提示型発現酵母を用いたセロビオース生産

都築 正男<sup>\*1)</sup>, 大橋 正孝<sup>\*1)</sup>, 清水 浩美<sup>\*1)</sup>, 近藤 昭彦<sup>\*2)</sup>

### Cellobiose Production Using Yeast Expressed Cellulase on the Cell Surface

TSUDUKI Masao<sup>\*1)</sup>, OHASHI Masataka<sup>\*1)</sup>, SHIMIZU Hiromi<sup>\*1)</sup>, KONDO Akihiko<sup>\*2)</sup>

糸状菌のセルラーゼを酵母の細胞表層に提示させて発現させ、セルロース系素材からセロビオースの生成を試みた。糸状菌のエンドグルカナーゼ遺伝子及びセルビオヒドロラーゼ遺伝子を酵母に導入し、細胞の表層で発現させた。今回作成した酵母では、エンドグルカナーゼ、セルビオヒドロラーゼの活性を示し、酵母を酵素担体のように利用することで、セロビオースを生成させた。さらにセルロース系素材の一例として紙粉を用いて、作成した酵母によりセロビオースの生成を行った。

#### 1. 緒言

近年、化石資源の枯渇への懸念や石油価格の高騰等によってエネルギー問題に関心が払われ、さらに廃棄物の削減や地球温暖化防止等環境問題に対しても関心が持たれている。石油に代わってバイオマスの利用が注目され、バイオマスからエネルギーや化成品を製造する技術はバイオリファイナリーと呼ばれている。バイオリファイナリーの原料は近年、食糧と競合しないセルロースを主な成分とする原料が注目されている。しかし、セルロースを主成分とする植物細胞の細胞壁は、セルロースとリグニンが複合体を形成しており、糖化が困難で、高活性のセルラーゼの開発や前処理技術の開発が世界中で行われている。我が国でも、様々な研究開発が行われており、その一つである京都大学大学院農学研究科・植田充美教授、神戸大学自然科学系先端融合研究環・近藤昭彦教授らによるタンパク質の細胞表層提示技術<sup>1)2)</sup>を用いて本研究を行った。この技術は、細胞壁にある GPI アンカータンパク質と目的のタンパク質を融合し、微生物で発現させて目的のタンパク質を細胞の表層に提示する技術である。この技術を用いて様々な酵素を細胞の表層に提示することで、バイオマスから最終生成物を 1 反応槽で生産することが可能となる。

既報<sup>3)</sup>ではバイオエタノールの生産に関して報告したが、燃料として用いることが想定されており、ガソリン価格と同等以下の価格での販売を念頭に低コストの生産が必須である。一方ファインケミカルなどの機能性素材は付加価値が高く、エタノールのように生産コストを切り詰める必要がないと考えられる。

そこで本研究では、機能性をもつ糖であるセロビオースの生成を行った。セロビオースは、ショ糖の半分以下の甘みを持つ難消化性の低カロリー素材であり、低う蝕性、整腸作用、脂質代謝改善などの機能がある。今回、効率的なセロビオースの生成を目指し、細胞表層提示技術でセルラ

ーゼを提示した酵母を用いた反応を試みた。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 菌株及び培地

形質転換宿主として出芽酵母 *S. cerevisiae* YPH499 株、UV 処理で URA3 遺伝子に突然変異を導入した K701 株(日本醸造協会)及び奈良八重桜酵母<sup>4)</sup>、K7UT-1 株及び K7UT-1T 株(独)酒類総合研究所より分譲<sup>5)</sup>を使用した。形質転換体は要求するアミノ酸(60 mg/L アデニン, 20 mg/L ヒスチジン, 30 mg/L リジン, 60 mg/L ロイシン, 40 mg/L トリプトファン, 20 mg/L ウラシル: トリプトファン・ウラシルは選抜マーカーの必要に応じ除いた)を加えた SD 培地(6.7 g/L yeast nitrogen base w/o amino acid(Difco), 20 g/L グルコース, 20 g/L 寒天)で選抜した。

##### 2.2 プラスミド

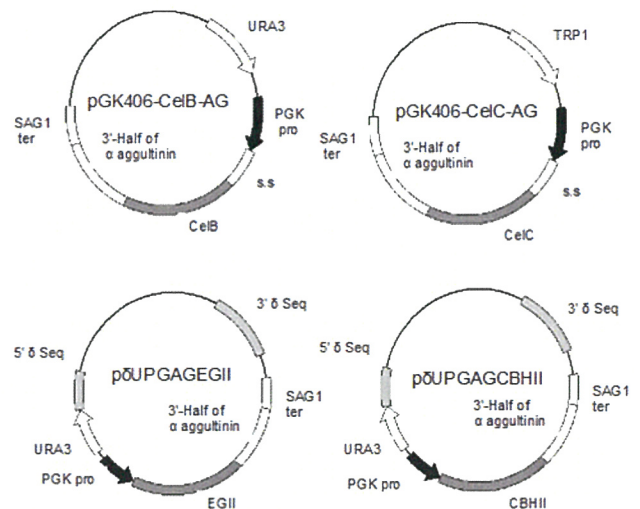


図 1 セルラーゼの細胞表層提示型発現プラスミド

\*1) バイオ・食品グループ \*2) 神戸大学自然科学系先端融合研究環

酵母の細胞表層に提示するためのプラスミドは, pGK406-AG<sup>6)</sup> に挿入した *A. oryzae* RIB40 株のエンドグルカナーゼ CelB 遺伝子<sup>7)</sup> (pGK406-CelB-AG), pGK404-AG に挿入したセロビオヒドラーゼ CelC 遺伝子<sup>8)</sup> (pGK404-CelC-AG) を用いた<sup>3)</sup>. さらに,  $\delta$  インテグレーション法で細胞表層提示するためのプラスミドは, 神戸大学近藤昭彦教授より提供頂いた *Trichoderma reesei* のエンドセルラーゼ遺伝子 EGII (p $\delta$ UPGAGEGII) 及びセルビオヒドラーゼ遺伝子 CBHII (p $\delta$ UPGAGCBHII) を用いた<sup>9)</sup> (図 1).

## 2.3 酵母の形質転換

pGK406-CelB-AG, pGK404-CelC-AG は *EcoRV* で切断し, 直鎖状にした. 直鎖状にした pGK406-CelB-AG 及び pGK404-CelC-AG で順次, 酢酸リチウム法により YPH499 株と K7UT-1 株を形質転換し, ウラシル及びトリプトファンを除いた SD 培地で選抜し, それぞれ CelB/CelC/YPH499, CelB/CelC/K7UT-1 と名付けた.

p $\delta$ UPGAGEGII, p $\delta$ UPGAGCBHII は *AscI* で切断し, 直鎖状にした. 直鎖状にした p $\delta$ UPGAGEGII, p $\delta$ UPGAGCBHII で, 酢酸リチウム法により K701 株, 奈良八重桜酵母及び K7UT-1T 株を形質転換し, ウラシルを除いた SD 培地で選抜し, それぞれ EGII/CBHII/K701, EGII/CBHII/奈良八重桜酵母, EGII/CBHII/K7UT-1T と名付けた. 生じた形質転換体は, 酵素活性の確認後, 発酵試験に用いた.

## 2.4 酵素活性

YPDA 培地 (10 g/L 酵母エキス, 20 g/L ペプトン, 20 g/L グルコース, 60 mg/L アデニン) で培養した菌液を遠心分離で集菌し, 蒸留水で洗浄後, 1 mL の蒸留水に懸濁した菌液を使用した.

セルラーゼ活性はカルボキシメチルセルロース (CMC) の加水分解により決定した. 100 mM 酢酸緩衝液で pH4.0 に調製した 10 g/L の CMC に, 等量の 100 mM 酢酸緩衝液で pH4.0 に調製した菌液を加え, 45°C で 48 時間インキュベートした. 反応液は遠心分離した上清を用いて, ソモギーネルソン法で還元糖を定量して酵素活性を決定した.

## 2.5 セロビオース生成試験

YPDA 培地 5 mL で 24 時間, 30°C で振盪培養した形質転換体の前培養液を, 250 mL の YPDA 培地に加え, 48 時間 30°C で振盪培養した. 培養液を 3000rpm で遠心分離して細胞を集め, 蒸留水で洗浄後, 蒸留水に懸濁し, OD<sub>600</sub>=100 に調製したものを菌液として用いた.

炭素源としてリン酸膨潤セルロース (PASC)<sup>10)</sup> 及び前処理 (ヘミセルラーゼで 2 時間処理) 後の紙粉を使用した. 反応液は, 1×YP 培地 (10 g/L 酵母エキス, 20 g/L ペプトン), 0~2% グルコース, 1% PASC または 3% 紙粉, 菌液

(OD<sub>600</sub>=20), 0.5 g/L 二亜硫酸カリウムとし, 30°C または 50°C で 192 時間, 反応させた.

反応液は経時的に抜き取り, 遠心分離後の上清を糖の定量に用いた. 定量は次の条件で ACQUITY UPLC システム (Waters 社製) により行った: カラム: ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1×100mm, 1.7  $\mu$ m ID), 流速: 0.12ml/min, カラムオープン: 35°C, 検出器: ELSD (Gain: 200, 圧力: 40psi, Drift tube temp.: 40°C, ネブライザー: 冷却), 溶離液: 30~80% アセトニトリル/0.2% TEA, 分析時間: 60 分.

## 3. 結果及び考察

### 3.1 セルラーゼを細胞表層提示型で共発現させた酵母の酵素活性

エンドグルカナーゼ, セロビオヒドラーゼを発現する酵母を作成した. 形質転換体において, CMC 分解活性がいずれも認められ, CelB・CelC を発現させた酵母では対照を 1 としたときの比活性が 14~16 で, EGII・CBHII を発現させた酵母では比活性が 41~73 であった (図 2 A・B). EGII・CBHII を導入したものでは酵母の  $\delta$  配列中にセルラーゼが複数コピー導入されていると考えられるため, 高活性であった. また, 菌株の違いによるセルラーゼ活性の違いはそれほど大きくなかった.

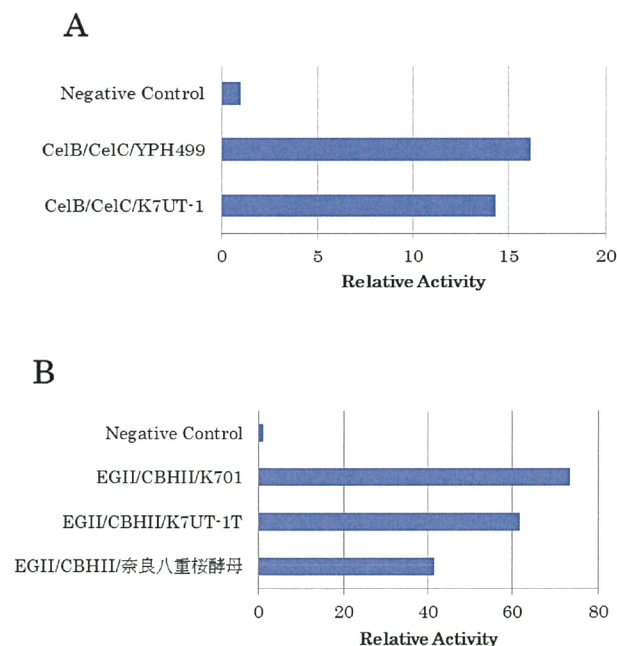


図 2 セルラーゼ表層提示型酵母の酵素活性 A; CelB, CelC の CMC 分解活性. B; EGII, CBHII の CMC 分解活性. ベクターを導入した酵母の活性を 1 としたときの比活性を示す.

セルロースはエンドグルカナーゼにより, 大まかに切断

され、セロビオヒドロラーゼでセロビオースとなる。従って、この形質転換体では2種類の酵素が酵母の細胞表面に提示されて発現しており、細胞表面でセロビオースへ変換され、培地中に蓄積するものと考えられる。

### 3.2 セルラーゼを表層提示させた酵母を用いたセロビオースの生成

CelB/CelC/YPH499を用いて、PASC (1%) からセロビオースが多く生成される条件を検討した。その結果、30℃では培地中にグルコースを1%以上加えると3日目に約530 ppmのセロビオースが生成した(図3)。これは、加えたグルコースによって酵母の増殖が起こって酵母数が増えることにより、反応液あたりのセルラーゼ活性が上昇するためであると考えられる。また、セルラーゼ活性の至適温度付近の50℃にすると、グルコースを培地に添加しなくてもさらに多くのセロビオースが生じ、2日目に約620 ppmとなった。50℃では、酵母の増殖はほとんどなく、死滅していくため、グルコースの添加は意味がなく、セロビオースの生成は初発の菌量に左右されると考えられる。

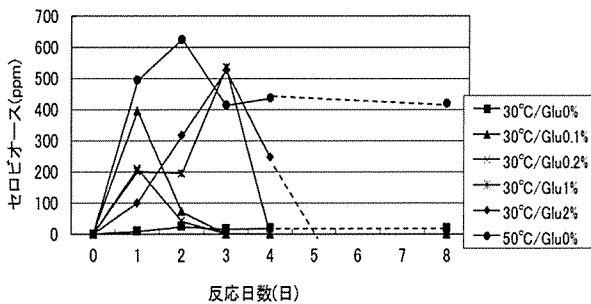


図3 反応組成及び温度によるPASCからのセロビオース生成量の影響

さらにセルラーゼ表層提示した実用酵母を用いて、50℃でPASC (1%) からセロビオースが多く生成される菌株の検討を行った。その結果、どの菌株もほぼ経時的にセロビオース量が増加し、最も多くのセロビオースが生成した菌株は、CelB/CelC/K7UT-1で4日目に約2100 ppm生じた(図4)。また、EGII/CBHII/K701では8日目にCelB/CelC/K7UT-1とほぼ同等のセロビオースが得られた。一方、EGII/CBHII/奈良八重桜酵母のセロビオース生成量は最も少なかった。以上から実バイオマスである紙粉を用いた試験にはCelB/CelC/K7UT-1を用いることとした。

紙粉は105℃で20分殺菌し、ヘミセルラーゼで2時間前処理を行い、CelB/CelC/K7UT-1を用いて発酵試験を行った。その結果、3%になるように発酵液に紙粉を添加して50℃で反応させたところ、1日目に約2100 ppmのセロビオースの生成が見られた。セロビオースは反応開始1日目が最も多く、3日目以降は30 ppm以下まで減少した(図5)。

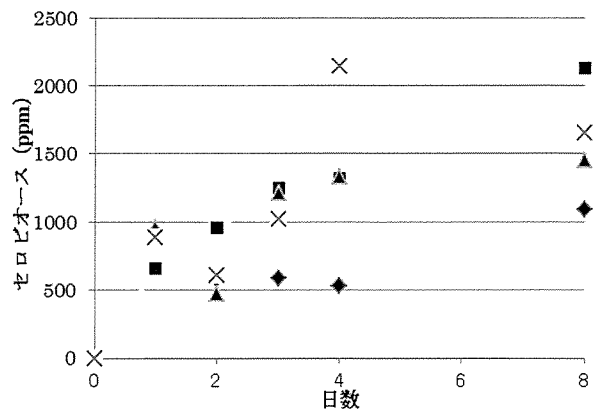


図4 セルラーゼ表層提示実用酵母によるPASCからのセロビオース生成

◆: EGII/CBHII/奈良八重桜酵母, ■: EGII/CBHII/K701, ▲: EGII/CBHII/K7UT-1T, ×: CelB/CelC/K7UT-1

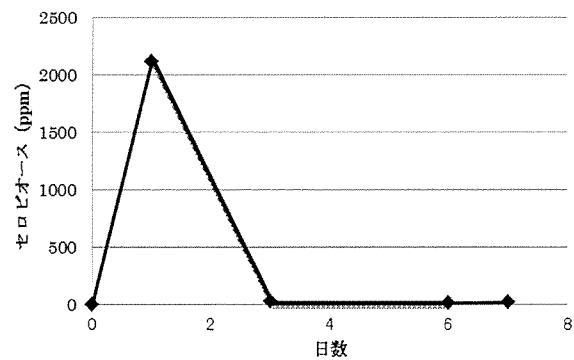


図5 セルラーゼ表層提示実用酵母による紙粉からのセロビオース生成

*A. oryzae* 及び *T. reesei* のセルラーゼを細胞表面提示型で発現させた実用酵母でセルロース系の素材からセロビオースが生成できることが示された。また、高価な酵素剤を用いず、かつ細胞を回収することで繰り返し使用でき、反応槽を変えずに1反応槽でセルロースから高付加価値素材の生産を行うためのモデルを示すことができたと考えられる。

## 4. 結言

本研究で糸状菌のセルラーゼ遺伝子2種類を酵母の細胞表面で発現させた菌株を作成し、セルロース及び紙粉からセロビオースの生成を行った。主な結果は次の通りである。  
(1) *A. oryzae*RIB40株のエンドグルカナーゼ CelB 遺伝子及びセロビオヒドロラーゼ CelC 遺伝子、または *T. reesei* でエンドグルカナーゼ EGII 遺伝子及びセロビオヒドロラーゼ CBHII 遺伝子で実用酵母を形質転換し、活性型のセルラーゼを細胞表面提示型で発現させた。

- (2) セルラーゼを細胞表層提示型で発現させた実験室酵母を用いてセロビオースの生産条件を検討し, 50°Cで反応させると最も多くのセロビオースを得ることができた.
- (3) セルラーゼを細胞表層提示型で発現させた実用酵母を用いて PASC, 紙粉を原料としてセロビオースの生成を確認した.

### 謝辞

本研究にあたり, ご指導並びにご協力いただいた神戸大学自然科学系先端融合研究環・近藤昭彦教授をはじめ, 同研究室の皆さんに深謝いたします.

### 参考文献

- 1) 植田充美, 近藤昭彦編; コンビナトリアル・バイオエンジニアリング, 化学同人, 2003
- 2) Yanase, S., Yamada, R., Kaneko, S., Noda, H., Hasunuma, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. ; *Biochem. J.*, (5), 449-455, 2010
- 3) 都築正男, 松澤一幸, 石井純, 近藤昭彦; 奈良県工業技術センター研究報告, (37), 15-19, 2011
- 4) 大橋正孝, 都築正男, 清水浩美, 松澤一幸, 藤野千代, 鈴木隆仁, 岩口伸一; 奈良県工業技術センター研究報告, (35), 35-38, 2009
- 5) Kitamoto, K., Oda, K., Gomi, K., and Takahashi, K. ; *Agric. Biol. Chem.*, (54), 2979-2987, 1990
- 6) Ishi, J., Izawa, K., Matsumura, S., Wakamura, K., Tanino, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. ; *J. Biochem.*, (145), 701-708, 2009
- 7) Kitamoto, N., Go, M., Shibayama, T., Kimura, T., Kito, Y., Ohmiya, K., and Tsukagoshi, N. ; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (46), 538-544, 1996
- 8) GenBank Accession No.AB089436; 2002
- 9) Yamada, R., Taniguchi, N., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. ; *Microb. Cell Fact.*(9), 32, 2010
- 10) Walseth, C. S. ; *Technol. Assoc. Pulp Paper Ind.* (35), 228-233, 1952