

カビの酵素高生産能を利用した 環境調和型工業プロセス技術の基盤研究

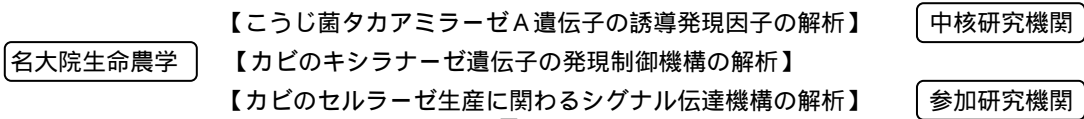
(平成 12 年度～平成 14 年度)

研究の概要・目標	諸外国等の現状	研究進展・成果がもたらす利点
<p>1. 何を目標しているのか カビは酵母などの微生物と異なり、多様な酵素を大量に生産する能力(酵母の千倍以上)を備えているが、高等な微生物であるカビの遺伝子組換えは難しく、同じ微生物でも酵母などに比べて研究開発は進んでいない。本研究では、<u>カビの生産する環境浄化関連酵素を利用した環境調和型工業プロセス技術</u>について研究開発し、地域産業へ導入するものである。愛知県地域における全国一の工業生産を背景にした高い生産技術力について、新たに環境調和型技術の導入を図り、将来に渡る全国一のものづくり地域としての基盤形成を目指す。</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px 0;"> <p>3年後の目標： カビにおける酵素生産制御機構を解明し、<u>環境浄化関連酵素の効率的な生産技術</u>を確立する。 カビの酵素を利用した<u>環境調和型工業プロセス技術</u>を開発し、醸造業、化学工業、繊維工業、家具製造業、プラスチック製造業へ導入する。 バイオエレクトロニクス技術等の新産業創出のシーズを提供する。</p> </div> <p>2. 何を研究しているのか (1)カビの遺伝子発現制御機構を解析し、<u>カビにおける酵素の効率的な生産技術</u>を確立する。 (2)カビの生産する酵素を利用した<u>環境調和型工業プロセス技術</u>を確立する。</p> <p>3. 何が新しいのか カビの強力な酵素生産性を利用して<u>環境浄化関連酵素の効率的な生産技術</u>を確立し、カビ酵素を活用した環境負荷軽減のための工業プロセスを開発する。</p>	<p>現状及び我が国の水準 (1)カビにおけるアミラーゼやセルラーゼなどの各種有用酵素遺伝子発現制御に関する研究はヨーロッパを中心に精力的に行われている。現在、名古屋大学を中心とする国内外の研究機関が協力していくつかの転写促進因子や誘導発現因子を明らかにしつつある。 カビを用いた有用たんぱく質高生産系の開発に関する研究もヨーロッパを中心に Aspergillus 属カビ及び Trichoderma 属カビについて取り組まれている。こうじ菌を用いた有用たんぱく質高生産系は愛知県食品工業技術センターを始めとする国内外の研究機関で開発され、各種酵素の高生産に成功している。 (2)キシラナーゼを利用したパルプ漂白など酵素を活用した環境調和型工業プロセスは重要視されているが、その開発は緒に付いたばかりである。合成繊維の表面加工処理に伴うアルカリ廃液の減量に向けたわが国におけるポリエステル分解酵素の利用は新しい試みである。また、産業廃棄物として問題になっている醤油粕の低減化に向けた研究は愛知県食品工業技術センターを中心に国内の研究機関が取り組んでいる。 (3)有害な揮発性有機化合物や内分泌攪乱物質の分解は国内外の研究機関において Pseudomonas 属細菌、Sphingomonas 属細菌あるいは担子菌 Phanerochaete sordida や Coriolus versicolor 等を用いて取り組まれているが、酵素を用いた分解技術はまだ実用化されていない。また、これらの物質の検出・測定を目的としたバイオセンサも実用化されていない。</p>	<p>波及効果 (1)本研究で開発された新規の酵素生産技術は、酵素製造業における生産性の向上に貢献する。また、産業用酵素の低価格化は酵素利用産業の発展に大きく貢献する。 (2)本研究で開発されるカビの酵素を利用した環境調和型工業プロセス技術は、醸造などの食品工業のみならず化学工業、繊維工業、家具製造業、プラスチック製造業など幅広い産業分野における地域の環境浄化及び環境保全に大きく貢献する。 (3)本研究で開発されるカビの酵素を利用した環境調和型工業プロセスは、酵素使用によるエネルギーの節約に伴う環境コストの削減が期待でき、環境アセスメント等を目指した環境創造型新産業の創出にもつながる。</p>

研究体制

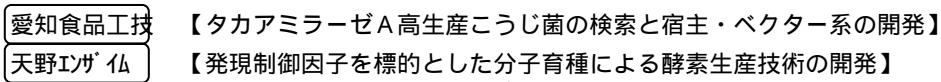
カビの環境に应答した酵素生産に関する基礎研究

カビ酵素の生産制御に関する基礎研究



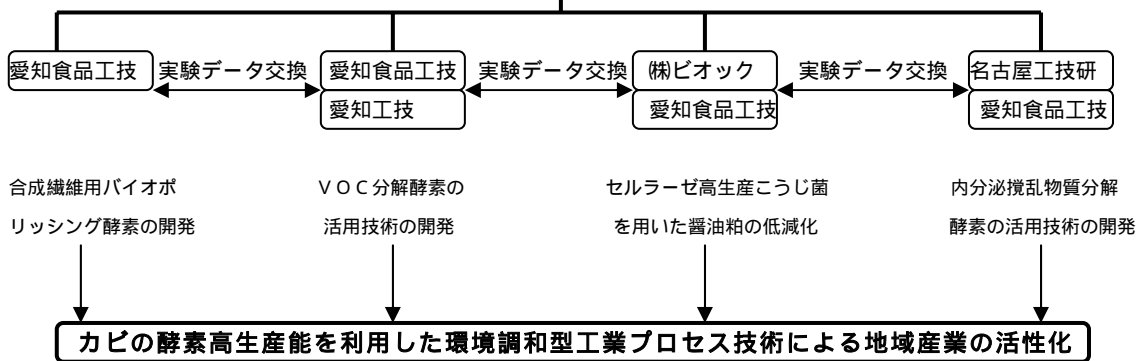
実験データの提供

環境浄化関連酵素の大量生産方法の確立

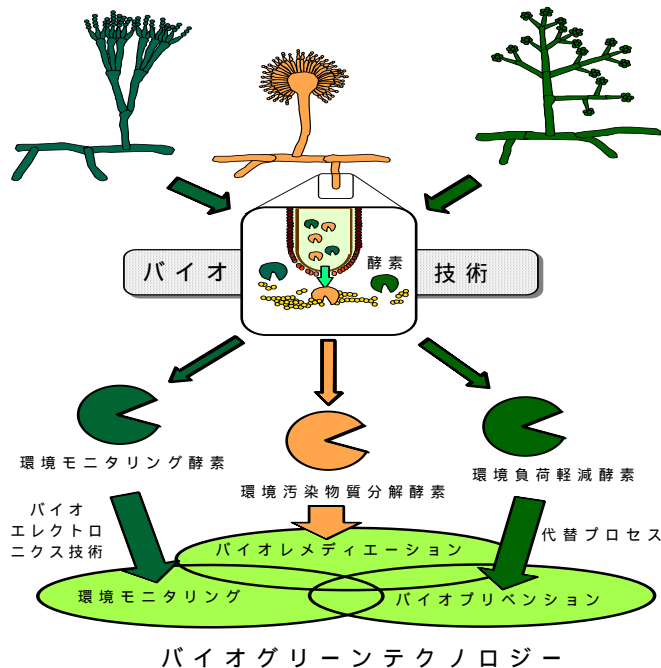


宿主ベクター系の提供 ↔ 最適化のための実験データの交換

環境負荷軽減酵素及び環境浄化酵素のこうじ菌による大量生産と利用技術の確立 (環境調和型工業プロセス技術への応用)



研究内容



所用経費

(単位：千円)

研究項目	担当機関等	研究担当者	所要経費			
			12年度	13年度	14年度	合計
(1) 酵母タカアミラーゼA遺伝子誘導発現因子の解析	名古屋大学 大学院生命農 学研究科	教授 塚越規弘	16,598	15,774	16,065	48,437
(2) カビのキシラーゼ遺伝子の発現抑制機構の解析	名古屋大学 大学院生命農 学研究科	助手 加藤雅士	9,686	8,031	8,365	26,082
(3) カビのセルラーゼA生産に関わるシグナル伝達機構の解析	名古屋大学 大学院生命農 学研究科	助教授 小林哲夫	7,689	7,745	7,865	23,299
(4) タカアミラーゼA高生産酵母の検索と宿主・ベクター系の開発	愛知県産業技 術研究所 食品工業技術セ ンター	主任研究員 北本則行	7,739	12,631	9,542	29,912
(5) 発現制御因子を標的とした分子育種による酵素生産技術の開発	天野エンサイム株 式会社岐阜研 究所	所長兼研究 部長 小出芳直	10,101	6,974	7,000	24,075
(6) 合成繊維用バイオポリッシング酵素の開発	愛知県産業技 術研究所 尾張繊維技術セ ンター	技師 茶谷悦司	12,621	10,372	10,300	33,293
(7) VOC分解酵素の活用技術の開発	愛知県産業技 術研究所 食品工業技術セ ンター	技師 森川豊	4,852	6,772	8,000	19,574
(8) セルラーゼA高生産酵母を用いた醤油粕の低減化	株式会社 ピオック	研究室室長 和久豊	6,524	7,724	6,248	20,496
(9) 内分泌攪乱物質分解酵素の活用技術の開発	独立行政法人 産業技術総合 研究所中部セン ター	主任研究員 斉藤隆雄	4,834	5,760	5,895	16,489
(10) 事務局	財団		2,358	1,463	1,835	5,656
所要経費 (合計)			83,002	83,196	81,115	247,313

研究成果の概要

総括

本地域先導研究では、カビが効率良く生産するアミラーゼ、キシラーゼ、セルラーゼなどの遺伝子の発現制御機構について転写制御因子の面から詳細に解析し、その成果をカビに備わる優れたタンパク質分泌能と一体化させて、エコザイムを安価に且つ大量に生産する技術を確立し、各種エコザイムを環境浄化・保全へ利用する技術の開発・確立のための基盤研究を行った。

個別課題ごとの概要

1) 基礎研究部門

1-1) 麹菌タカアミラーゼA 遺伝子の誘導発現因子の解析 : タカアミラーゼA 遺伝子の誘導剤イソマルトースからの誘導シグナルが転写誘導因子 AmyR へ伝達される過程についてイソマルトース合成酵素遺伝子破壊株や AmyR の機能ドメインを解析した。AmyR の核移行について GFP との融合タンパク質を構築して解析した結果、AmyR の N 末端側に核移行シグナルが存在し、イソマルトースからの誘導シグナルを感知して核内へ移行することを明らかにした。また、AmyR の C 末端側にはイソマルトースからの誘導シグナルを認識するドメインが存在することも明らかにした。

1-2) カビのキシラーゼ遺伝子の発現制御機構の解析 : キシラーゼ遺伝子の転写誘導因子 XlnR の DNA 結合配列を解明し、これら配列の *in vivo* での機能を解析した。XlnR はキシランのみならずセルロースからの誘導シグナルを認識してキシラン及びセルロース分解系遺伝子群の誘導発現を仲介することを明らかにした。セルロースからの誘導シグナルを XlnR が感知できることは新規な知見となった。さらに、XlnR の高親和性結合配列を利用した高プロモーターベクターの構築にも成功した。

1-3) カビのセルラーゼ生産に関わるシグナル伝達機構の解析 : *eg1A* 遺伝子のプロモーター解析から転写促進因子 Hap complex 及びその結合配列 CCAAT が転写促進に機能していることを示した。また、プロモーターデリション解析や変異導入解析から転写誘導に関与するシスエレメントの同定を試みたが、極めて複雑で明瞭な結果を挙げるに至らなかった。

2) 開発研究部門

2-1) タカアミラーゼA 高生産麹菌の検索と宿主・ベクター系の開発 : タカアミラーゼA 高生産麹菌を分離し、本菌を宿主にした異種遺伝子産物の生産に必須となる形質転換系を確立した。組み換え体エコザイム生産において大量に生産されるアミラーゼは夾雑タンパク質となるので、タカアミラーゼA 遺伝子の破壊株を作出した。さらに、酵素生産性の増大を目的に *creA*, *areA* 遺伝子破壊株やプロテアーゼ遺伝子破壊株を作出した。これらの育種株を宿主にラッカーゼ、リパーゼD、アルコール酸化酵素の生産を行った。

2-2) 発現制御因子を標的とした分子育種による酵素生産技術の開発 : 転写促進因子 Hap complex および転写誘導因子 AmyR の結合配列を利用して、より強力なプロモーターを構築することを目的として、タカアミラーゼA 遺伝子のプロモーター上にこれらのシスエレメントを導入し、極めて効率の高い人工プロモーターを構築した。このプロモーターを利用し約 10g/L のタカアミラーゼA の高生産に成功した。さらに、3g/L のラッカーゼ生産に成功し、6L の培養から 17g のラッカーゼを調製して合成繊維の表面加工に使用した。一方、リパーゼC および D の生産はそれぞれ 0.5g/L、0.1g/L 程度であった。

3) 応用研究部門

3-1) 合成繊維用バイオポリッシング酵素の開発 : 1、2 年度に解析したリパーゼ、ラッカーゼの表面加工への使用条件を検討した。リパーゼD とラッカーゼを併用することで PET 繊維表面が大きく変化し、吸水性が改良された。また、PET/羊毛混紡生地にも使用可能であり、酵素剤の利用に新しい面を開くことに成功した。

3-2) VOC 分解酵素の活用技術の開発 : 1、2 年度までに分離したホルムアルデヒド耐性カビからホルムアルデヒド酸化活性を有するアルコール酸化酵素を多孔体に固定したフィルターを構築してフィルターの性能を評価した。通気ガス中のホルムアルデヒドを 90% 以上分解できることが示された。また、ホルムアルデヒド検出用バイオセンサーの構築も行った。

3-3) セルラーゼ高生産麹菌を用いた醤油粕の低減化 : 各種セルラーゼ遺伝子を導入した麹菌を作出し、醤油粕の減少率を評価した結果、セルラーゼD が最も効果が高く、醤油の液量当たり約 20% 醤油粕が減少した。さらに、セルラーゼ遺伝子やペクチン分解酵素遺伝子で形質転換した様々な形質転換体を組み合わせる試みをした結果、セルラーゼD とセルラーゼE 遺伝子の形質転換体で醤油粕をさらに軽減することに成功した。醤油粕には多量のタンパク質が残存していることからセルラーゼD 遺伝子形質転換体とプロテアーゼを併用することで 33% もの醤油粕を減少させることに成功した。また、副次的なメリットとして過速度が改善され、醤油の圧搾工程が効率化された。

3-4) 内分泌攪乱物質分解酵素の活用技術の開発 : 1、2 年度までに分離したラッカーゼの中でビスフェノールA も分解可能な酵素の酵素学的特性を解析した。本酵素で処理したビスフェノールA の分解産物には全く内分泌攪乱活性が無いことを明らかにした。次に、ビスフェノールA を吸着剤で固相抽出した後ラッカーゼで処理をする分解・除去システムの開発を試みたが、成果をあげるに至らなかった。

波及効果、発展方向、改善点等

現在の産業構造は、人口の増加と生活の高度化から生産システムの効率化が図られた結果、環境への高負荷を生じ

深刻な環境問題へと発展してしまっている。環境問題は産業や社会構造と密接に関連しており、政治、経済、社会、科学などあらゆる手段を総合して当たらねばならない社会的に極めて要請の高い問題となっている。本研究はバイオ技術（バイオグリーンテクノロジー）を駆使して、地域産業との関連から、醸造業、繊維工業、家具製造業、プラスチック製造業で問題になっている環境負荷物質や環境汚染物質を低減化あるいは除去して環境保全を図り、また、新しい酵素生産法及び酵素利用技術の開発・確立を通して、地域ひいては全国的な産業技術の高度化に貢献することを目的として計画された。

愛知県の1)繊維工業は全国1位にランクされ、合成繊維（ポリエステル）の表面加工処理に大量のアルカリ溶液が使用され、廃液として環境に放出され環境汚染の一因となっている。本県ではアルカリ処理に代わる酵素処理技術の開発により環境負荷を軽減することが大いに待たれている。また、天然繊維と合成繊維の混紡物はアルカリ処理が不可能であり、混紡物の特異的な酵素処理法の開発から新しいタイプの繊維を製造することが考えられる。この酵素処理技術は、環境負荷の軽減に貢献するのみならず新規な環境調和型工業プロセスの創出に繋がりとその経済効果は高いと期待される。2)醸造業は全国2位にランクされ、産業廃棄物として問題になっている醤油粕の低減化に向けたセルラーゼ遺伝子の利用技術の開発は醤油粕を減量できると同時に原材料の利用効率の向上に繋がる。また、セルロースから生成するグルコースを利用した新しい風味の醤油を製造できる可能性もある。セルラーゼD遺伝子を導入したこうじ菌を利用することから、醤油粕全体の約25%に相当する2~3万トンの醤油粕を軽減可能であると同時に醤油の圧搾性が改善され、醤油製造工程における時間と労力を最も必要とする圧搾工程の効率化に繋がりとその経済的メリットは大きい。3)家具製造業は全国1位にランクされ、シックハウス症候群の原因物質といわれるホルムアルデヒドなどが多量に使用している。ホルムアルデヒド分解酵素生産菌を自然界に検索し、0.5%とい高濃度のホルムアルデヒドに耐性なカビの分離に成功している。このような高耐性株は排水処理などに直接利用可能となる。また、この過程で、アルコール酸化酵素でホルムアルデヒドを効率良く蟻酸へ酸化する酵素を発見し、本酵素を使用したホルムアルデヒド分解フィルターの構築に成功した。本フィルターの実用化実験からシックハウス症の軽減用フィルターとして市販されることが期待される。4)プラスチック樹脂の原料であるビスフェノールAなど内分泌攪乱物質の環境への放出を防止することを目的として、ビスフェノールA分解酵素生産菌を分離したが、本酵素の利用技術の開発が遅れており、今後の利用技術の確立が待たれている。

本研究では、カビにおける遺伝子発現制御に関する最新の分子生物学的知見ならびに研究成果を従来の遺伝学的育種技術や培養技術と一体化させ、カビを宿主とした効率的なエコザイムの大量生産技術の開発に成功し、酵素を利用した環境浄化バイオ技術に新たな道を拓いた。酵素の実用化には、酵素を安価にしかも大量に生産することが必須である。開発部門で開発した宿主・ベクター系の改良すべき点を改善し、すべてのエコザイム生産に汎用できるシステムを構築し、エコザイムの経済的大量生産を実現し、エコザイムの低価格化により酵素利用産業を活性化するとともに環境保全に大きく貢献することが期待される。

今後は、これら酵素の実用化に向けての経済的な大量生産法の確立が必須となる。また、酵素の実用的な利用技術の確立を急がねばならないだろう。

最後に、基礎研究部門はカビの遺伝子発現制御機構の分子生物学的解析を世界の研究者と情報交換を密にしつつ研究してきているが、欧米の研究レベルを凌駕できるよう更なる努力が必要であろう。本研究においては、タカアミラーゼA遺伝子の転写制御因子の研究成果を新しい人工プロモーターの構築や遺伝子発現能の向上した菌株の分離に応用したりして開発部門の研究に大きな貢献をしている。さらには、キシラーゼ、セルラーゼ遺伝子へと研究の幅を拡大させており、新しい遺伝子制御機構の解明とその利用から、より高効率な遺伝子発現系が構築されると予想され、今後とも新しい可能性を考慮した研究を継続する必要がある。

研究成果公表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国内	15 件	13 件	106 件	134 件
国際	30 件	0 件	18 件	48 件
合 計	45 件	13 件	124 件	182 件

(2) 特許等出願件数

9 件 (うち国内 9 件、国外 0 件)

(3) 受賞等

1 件 (うち国内 1 件、国外 0 件)

1. 加藤雅士：農芸化学奨励賞, 2003.3.31

(4) 主な原著論文による発表の内訳

国内誌

(1) N. Tsukagoshi, T. Kobayashi and M. Kato:

「Regulation of the amyolytic and (hemi-) cellulolytic genes in aspergilli」

J. Gen. Appl. Microbiol., 47, 1-19, (2001)

(2) N. Kitamoto, S. Yoshino-Yasuda, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi:

「Sequence analysis and overexpression of a pectin lyase gene (pel1) from *Aspergillus oryzae* KBN616」

Biosci. Biotechnol. Biochem., 65, 209-212, (2001)

国外誌

(1) N. Kato, Y. Murakoshi, M. Kato, T. Kobayashi and N. Tsukagoshi:

「Isomaltose formed by α -glucosidases triggers amylase induction in *Aspergillus nidulans*」

Curr. Genet., 42, 43-50, (2002)

(2) J. Marui, N. Kitamoto, M. Kato, T. Kobayashi and N. Tsukagoshi:

「Transcriptional activator, AoXlnR, mediates cellulose-inductive expression of the xylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus oryzae*」

FEBS Letters, 528, 279-282, (2002)

(5)主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor	サブテーマ1	サブテーマ2	サブテーマ3	サブテーマ4	サブテーマ5	サブテーマ6	サブテーマ7	サブテーマ8	サブテーマ9	合計
Biosci. Biotechnol.	0.968	3	1	0	1	0	1	0	0	3	9
Biochem	0.512	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
J. Gen. Appl. Microbiol.	2.472	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Mol. Gen. Genet.	1.885	4	1	0	0	0	0	0	0	0	5
Curr. Genet.	2.894	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Fungal Genet. Biology.	3.644	2	2	0	0	0	0	0	0	0	4
FEBS Lett.	3.688	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Appl. Environ. Microbiol.	2.112	1	2	0	0	0	0	0	0	0	3
Biochim. Biophys. Acta	0.915	2	2	0	0	0	0	0	0	1	5
Biotechnol. Lett.	0.531	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Microbiol. Res.	1.151	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Lett. Appl. Microbiol.	0.865	0	0	0	1	0	1	0	0	1	3
J. Biosci. Bioeng.	1.806	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
FEMS Lett.	不明	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Environ. Sci. Enantiomer	1.417	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
DNA Sequence	0.594	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Recent Res. Devel. Agricultural & Biological Chem.	不明	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
J. Am. Oil Chem. Soc. Enzyme Microb. Tech.	1.299	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	1.506	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

サブテーマ1 こうじ菌タカアミラーゼA 遺伝子の誘導発現因子の解析

サブテーマ2 カビのキシラナーゼ遺伝子の発現制御機構の解析

サブテーマ3 カビのセルラーゼ生産に関わるシグナル伝達機構の解析

サブテーマ4 タカアミラーゼA 高生産こうじ菌の検索と宿主 ベクター系の開発

サブテーマ5 発現制御因子を標的とした分子育種による酵素生産技術の開発

サブテーマ6 合成繊維用バイオポリッシング酵素の開発

サブテーマ7 VOC 分解酵素の活用技術の開発

サブテーマ8 セルラーゼ高生産こうじ菌を用いた醤油粕の低減化

サブテーマ9 内分泌攪乱物質分解酵素の活用技術の開発