

■ 研究課題名

伝統的醗酵産業を再生する革新的で安全なバイオプロセスの開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① 醗造微生物を用いた表層提示バイオプロセスの構築
（◎近藤 昭彦／国立大学法人神戸大学）
- ② 醗造微生物からの新規機能性遺伝子の単離と機能解析
（秦 洋二／月桂冠株式会社）
- ③ ハイスループット技術を利用した醗造微生物機能の向上
（植田 充美／国立大学法人京都大学）
- ④ バイオプロセスのプラント設計とプロセスの最適化
（野田 秀夫／関西化学機械製作株式会社）
- ⑤ プロダクト評価と市場ニーズ調査
（田中 久志／三栄源エフ・エフ・アイ株式会社）

■ 研究の目的

醗造微生物である麹菌や酵母のゲノム情報を用い有用な酵素群を単離するとともに、麹菌や酵母の細胞表層提示システムの基盤を完成させ、機能性食品素材を自由に製造できるバイオコンバージョンシステムを構築し、様々な機能性食品素材を市場に提供する。本プロセスの目的は、①既存の機能性素材をより安価に製造し、広く市場を拡大する、②既存の方法では生産できない機能性物質をバイオコンバージョンによって製造し、市場を創出する、である。そして、目標機能性食品素材として、市場性などの観点から6品目（機能性糖質2品目、機能性ペプチド3品目、機能性脂質1品目）を選定し、そのうち少なくとも3品目に関してはプロセス構築の基盤を完成させることを目指す。

■ 主要な成果

- ① 麹菌がもつ有用タンパク質（ β -グルコシダーゼ、リパーゼ、ペプチダーゼ、ペプチドリガーゼ、ペプチドシンセターゼ等）遺伝子を短期間にクローニングするため、独自の麹菌ゲノム配列データベースを構築し、ORF 構造がはっきりとした遺伝子を優先度の高いものから順に、イントロンを除いてクローニングして配列確認を行なう効率良い手法を構築した（図1）。この手法により、全部で45個の遺伝子（新規遺伝子34個、既知遺伝子11個）をクローニングし、それらの細胞表層提示や菌体内発現に成功した。
- ② 実用酵母細胞表層提示基盤技術として、目的遺伝子をホモ型で酵母ゲノムに導入する、あるいは欠損させる技術として「High-Efficiency Loss of Heterozygosity (HELOH) 法」を開発する（図2）とともに、酵母の主要な液胞プロテアーゼであるプロテイナーゼA（PrA）活性がほぼゼロの「プロテアーゼレス株」の作製に成功した。
- ③ 酵母における細胞表層提示技術のプロセス化を目指し、醗造微生物の機能探索・機能向上の強力な支援技術として、2次元マイクロキャピラリーカラムナノ HPLC と質量分析の共役システム、細胞表層提示酵母マイクロチップシステム（図3）、という二つの「ハイスループットスクリーニング（HTS）システム」を開発した。また、これらの HTS システムを用いて、酵素の高機能化を行うことに成功した。
- ④ 清酒酵母において効率よく目的酵素を細胞表層提示できるシステムの開発に成功した。提示用のアンカーとしては、 α -アグルチニンおよび Flo1 蛋白質を用いた系を開発した（図4）。
- ⑤ 麹菌において効率よく目的酵素を細胞表層提示できるシステムの開発に成功した。提示用のアンカーとしては、麹菌由来の GPI アンカー型の蛋白質（MP1）および酵母のキチン結

合蛋白質（CBM）を用いたシステムを開発した（図 5）。

- ⑥β-グルコシダーゼ表層提示酵母による大豆イソフラボンアグリコン生産プロセス、クチナーゼ表層提示酵母による乳製品系フレーバー生産プロセス、CGTase 表層提示酵母を用いた γ-シクロデキストリン生産プロセスについては、反応特性や生産プロセスに関する基盤データの取得に成功した。すなわち、当初目指した 3 品目についてのプロセス構築の基盤を完成させることに成功したといえる。特にイソフラボンアグリコン生産プロセスについては、生産のためのプロセスフローを確立した（図 6）。
- ⑦細胞表層提示酵母による生産プロセスに加えて、β-グルコシダーゼ、クチナーゼについては、麹菌における大量分泌生産系を確立した。分泌酵素による機能性食品素材製造を検討し、これらの麹菌由来酵素が市販酵素より高い生産性を示すことを明らかにした。
- ⑧イソフラボンアグリコンおよび酵素フレーバーに関しては、バイオプロセスで得られた食品素材の特性評価および最終食品の検討を行った。また、大豆イソフラボンアグリコンについては、食品安全委員会の安全性評価基準を参考にして、必要と考えられる試験を実施し、安全性を確認した。

■ 公表した主な特許と論文

- ①特願 2005-212327： 新規 β-グルコシダーゼ、及びその利用： 月桂冠株式会社
- ②特願 2008-165781： 微生物の表層に親和性を持つキチン結合ドメインを用いた表層提示技術： 国立大学法人神戸大学、関西化学機械製作株式会社
- ③Kaya, M., *et al.* Aglycones production from isoflavone conjugates by display of β-glucosidase from *Aspergillus oryzae* on yeast cell surface, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79, 51-60 (2008).
- ④Adachi, T., *et al.* Construction of an *Aspergillus oryzae* cell-surface display system using the putative GPI-anchored protein, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81, 711-719 (2008).

■ 今後の展開方向

- ①開発した機能性食品製造プロセスの事業化に向けた検討を行う。
- ②開発した清酒酵母細胞表層提示システムや麹菌細胞表層提示システムは、幅広い領域のバイオコンバージョンに適用可能なスーパー微生物を創出するコア技術となり、幅広く利用できるものと期待される。近年、バイオリファイナリー（バイオプロセスによる燃料や化学品生産）が強く求められているが、こうした領域でも広範囲な展開を目指す。
- ③整備した麹菌の有用酵素遺伝子のライブラリーについて、安心・安全な組換え微生物構築のための遺伝子資源（リソース）として幅広い利用を目指す。
- ④表層提示技術を駆使し、目的とする形質を高速にスクリーニングする HTS システムを開発したが、各種有用酵素の機能改変・向上や新機能創出への広範囲な展開を目指す。
- ⑤安全な発酵醸造微生物の遺伝子組換え技術を用いることにより、反応効率の向上、コスト低減、開発期間の短縮などが期待される。実用化を進めるためにも、遺伝子組換えに対する正しいリスク評価の確立を目指す。

■ 問い合わせ先

- ①清酒酵母および麹菌細胞表層提示システム：国立大学法人神戸大学（078-803-6196）
- ②麹菌の有用酵素遺伝子ライブラリーおよび清酒酵母・麹菌宿主ベクターシステム：月桂冠株式会社（075-623-2130）
- ③HTS システム：国立大学法人京都大学（075-753-6110）
- ④機能性食品素材製造プロセス：関西化学機械製作株式会社（06-6419-7121）

■ 研究成果の具体的図表

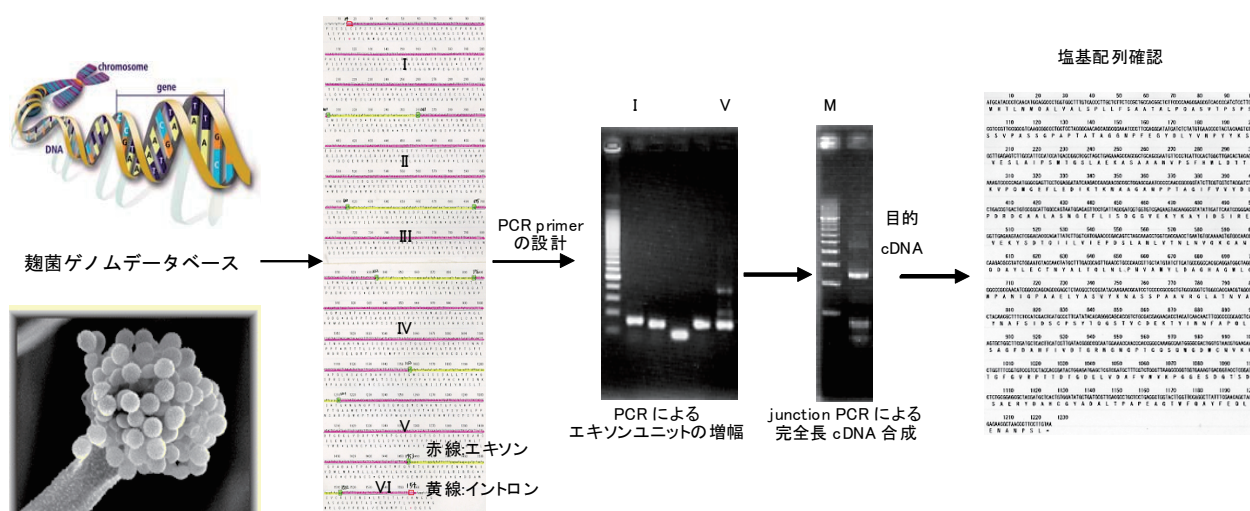


図 1 麹菌ゲノムからの目的酵素遺伝子 (cDNA) 取得方法

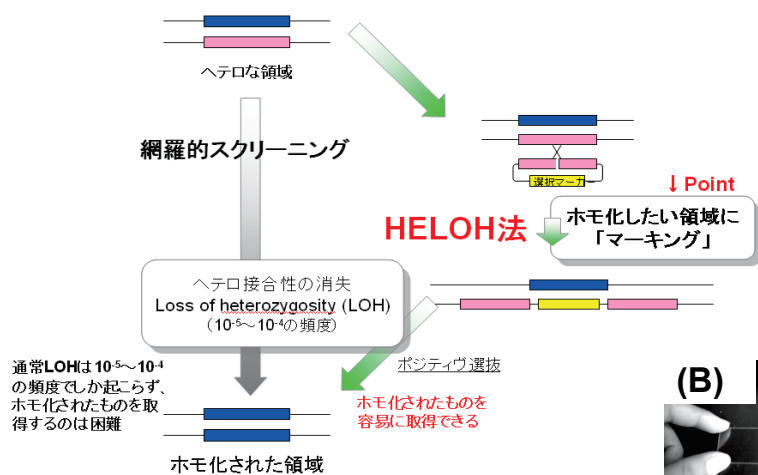


図 2 HELOH 法概要



図 3 2次元マイクロキャピラリーカラムナノ HPLC と質量分析計の共役システム (A)、および細胞表面提示酵母マイクロチップシステム(B)

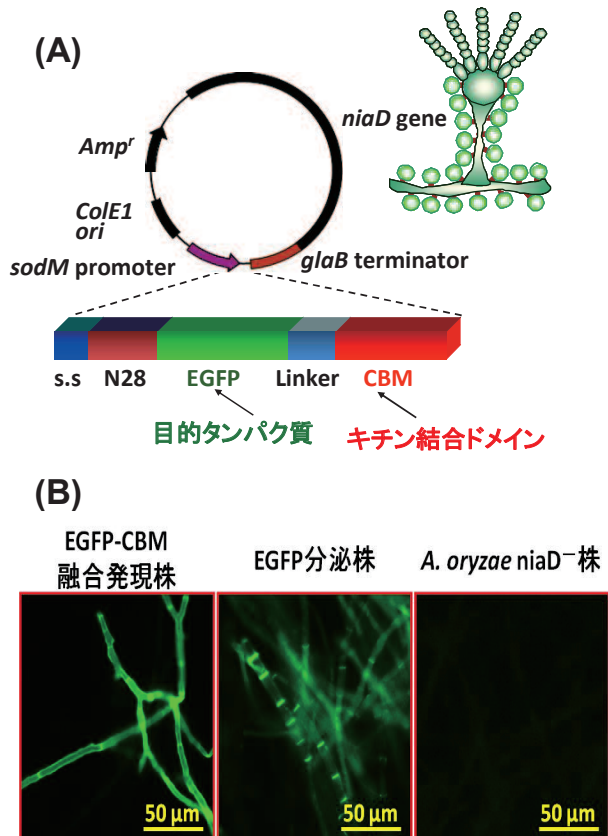
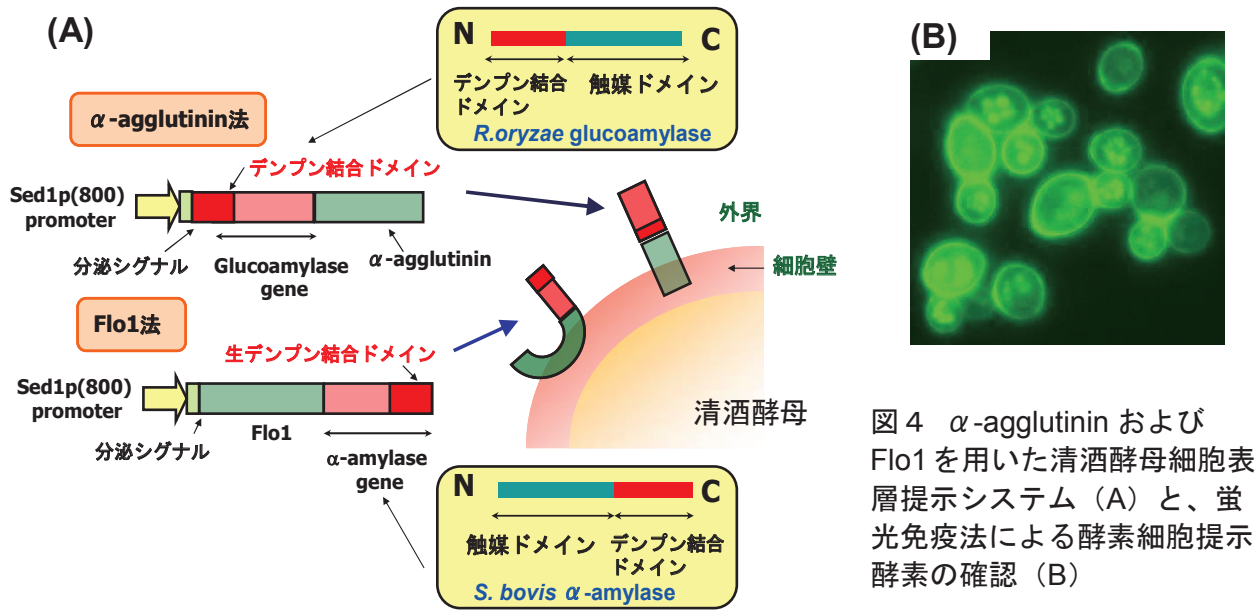


図5 CMBをアンカーに用いた麹菌細胞表面提示システム (A)、および麹菌細胞表面への目的蛋白質 (GFP) の提示確認 (B)

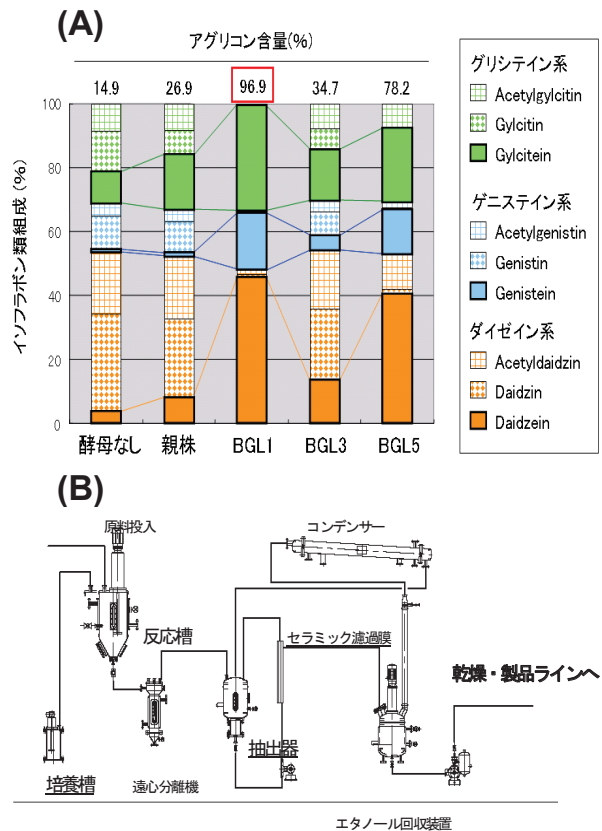


図6 麹菌 β -グルコシダーゼ(BGL1, BGL3, BGL5)細胞表面提示酵母によるイソフラボンアグリコン生産結果 (A)、および生産プロセスフロー (B)