

講演番号：4C26a06

講演日時：3月20日 10:35～ C校舎 26会場

遺伝子組み換え麹菌培養上清カクテルを用いた希少糖高生産プロセスの開発

Bioconversion of rare sugar using enzyme cocktail prepared from genetically engineered *Aspergillus oryzae* cultures

○若井 暁¹、浅井 菜々実¹、荻野 千秋²、堤 浩子³、秦 洋二³、松沢 智彦⁴、矢追 克郎⁴、近藤 昭彦¹ (¹神戸大院イノベ、²神戸大院工、³月桂冠総研、⁴産総研生物プロセス)

○Satoshi WAKAI¹, Nanami ASAI¹, Chiaki OGINO², Hiroko TSUTSUMI³, Yoji HATA³, Tomohiko MATSUZAWA⁴, Katsuro YAOI⁴, Akihiko KONDO¹ (¹Grad. Schol. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., ²Grad. Schol. Engin., Kobe Univ., ³Gekkeikan Co., Ltd., ⁴AIST)

機能性オリゴ糖は、整腸作用および血清脂質改善効果、過酸化脂質上昇抑制効果、免疫賦活活性などの種々の生体調節機能が見出されており、近年、生活習慣病等の予防効果があるとして期待されている。機能性オリゴ糖様の働きをすることが示唆されているイソプリメベロースは、キシロースがグルコースに α -1,6結合した二糖であり、キシログルカン为原料として複数の酵素処理を経て、最終的にイソプリメベロース生産酵素 (IPase) を用いて生産することが可能である。現在、IPase 以外にイソプリメベロースを生産する酵素は知られていない。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が IPase 活性を持つことは既に知られており、黄麹菌の持つ GH3 酵素の一つが IPase であることを Matsuzawa らが発見しているが、*Pichia pastoris* を用いた発現系での酵素生産性は 7 mg/L であった (J. Biol. Chem. 2016)。本研究では、この IPase をコードすると推定される遺伝子の高発現および発現酵素によるイソプリメベロース生産を目指した。

麹菌でのマルチコピー遺伝子導入法である Co-transformation により複数の形質転換体を取得し、培養上清の分泌生産性の高い物を一株選抜した。本株は 3%GPY 培地、30°C で 7 日間培養後、培養上清に約 0.5~0.7 g/L のタンパク質を分泌発現した。発現宿主を *P. pastoris* から *A. oryzae* に変更することで、酵素生産性は 70~100 倍上昇した。培養上清を用いてキシログルカンオリゴ糖の分解試験を行った結果、イソプリメベロースの生産が確認された。しかし、本培養上清だけでは、タマリンド種子キシログルカンからイソプリメベロースを生産することは出来なかった。

我々は、これまでに co-transformation 時のコピー数多形とプロモーター強度を加味することでセルラーゼ活性を 40 倍に高めたセルラーゼ高発現麹菌の構築に成功している。そこで、IPase 高発現株とセルラーゼ高発現株の培養上清を混合したカクテルを調製し、タマリンド種子キシログルカンからのイソプリメベロースの直接生産を検討した。その結果、培養上清カクテルを用いた 60°C、1 時間の反応で、5 g/L のキシログルカンから 1 g/L のイソプリメベロースの生産に成功した。

現在、イソプリメベロースは、約 16,000 円/50 mg (試薬グレード) で販売されており、本プロセスを用いると約 30 万円相当の希少糖を一時間で生産することが可能である。今後、IPase とセルラーゼの共・強発現株を作成し、より簡略された生産プロセスを構築すると共に、本希少糖の追加の機能性についても検討を進める予定である。

rare sugar, *Aspergillus oryzae*, cellulase

発表責任者：若井暁 (wakaists@pegasus.kobe-u.ac.jp)