

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360342

研究課題名(和文)工業展開を指向した細胞表面提示の網羅的解析「Displome」の確立

研究課題名(英文)Development of "Displome" for industrial applications of cell surface display

研究代表者

近藤 昭彦(Akihiko, Kondo)

神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40205547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：低炭素社会の構築、エネルギー問題の解決に向け、再生可能な資源であるバイオマスの有効利用法の開発が急務である。我々は、これまで出芽酵母をメインとした細胞表面提示技術を世界に先駆けて開発してきた。本研究では、細胞表面提示技術を網羅的に解析し基盤技術として確立することを目指した。結果として、数々の有用微生物に対して細胞表面提示の基盤となるアンカータンパク質を見出し、またバイオマス資化能を付与することに成功した。さらに、それらの菌体を用いてバイオマスから有用物質を生産させることにも成功した。

研究成果の概要(英文)：The development of efficient utilization of renewable biomass resources is one of the important issues to overcome the environmental / energy problems. We have developed cell surface display system, which is a powerful tool due to endowing the biomass degrading activity on the host cells. Here, we developed comprehensive approaches to develop cell surface display applicable for other useful microorganisms. As a results, several kinds of anchor proteins have been developed and enables them to providing biomass degrading activity. In addition, using cell surface engineered microorganisms, direct production from biomass was achieved.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオリファイナリー

1. 研究開始当初の背景

低炭素社会の構築、エネルギー問題の解決に向け、再生可能な資源であるバイオマスの有効利用法の開発が急務である。バイオリファイナリーは、巨大な市場を創出して工業及び農林水産業を活性化しながら、化石資源への全面依存から脱却して低炭素社会を構築することができるグリーン・イノベーションである。このグリーン・イノベーションは、資源・エネルギー安全保障を確保するとともに、地球温暖化防止に大きく貢献する重要性の高い研究分野である。バイオベース化学品の市場は拡大が予想されており、日本の化学品をバイオベース化した場合、CO₂ 総排出量の大幅な削減が期待できるため、社会からの要請は非常に強い。バイオリファイナリーは、二酸化炭素をバイオマスとして資源化し、先端バイオ技術を駆使して再生可能なエネルギーや化学品を高効率生産する革新技术である。バイオマスとしては、食料と競合しない非可食バイオマス、セルロース系バイオマス(木材、稲わらや麦わら、エネルギー作物など)を活用する。これらセルロース系バイオマスを単糖であるグルコースにまで分解し、微生物を用いたバイオプロセスで様々な有用物質を生産できる。

バイオリファイナリーの大きな課題の一つは、セルロース糖化工程の高効率化、省エネルギー化、低コスト化、である。セルロースはその強固な構造のため、分解が難しい。セルラーゼによる酵素分解は温和であり省エネルギーであるが、添加するセルラーゼ剤のコストが高く、実用化への大きな足かせとなっている。

我々は、これまで出芽酵母をメインとした細胞表面提示技術を世界に先駆けて開発してきた。足場となるアンカータンパク質とセルラーゼなどの目的タンパク質を遺伝子レベルで融合させて発現することで、機能性タンパク質を微生物の表面に提示できる。その結果、目的タンパク質は細胞表面にその機能を保った状態で提示(固定化)され、微生物に目的の機能を付与することが可能となる。例えば、セルラーゼを提示した酵母は、エタノール発酵におけるセルラーゼ添加剤の削減、低コスト化による省エネルギープロセスの構築の基盤となる。しかし、同時に表面提示技術における課題も明確になってきた。すなわち、あらゆる場合に適用可能である汎用性の高い表面提示システムが理想的であるが、それは非常に困難である。と同時

に、アンカータンパク質や分泌シグナルを目的タンパク質や宿主微生物それぞれに対してチューニングすることで、提示するタンパク質の機能を数十倍、100倍以上に向上させることができることもわかってきた。非常に興味深いのは、その機能は必ずしも発現量に依存せず、融合されるアンカーとの組み合わせ、及び発現する場所と環境(細胞壁、細胞の内膜、該膜など)により大幅に活性が変化することが少しずつわかってきた。さらに、バイオリファイナリー技術の研究が進むにつれ、酵母に加えて大腸菌や乳酸菌、コリネ型細菌、放線菌や糸状菌などの数々の有用微生物を用いたバイオマスからの物質生産が必要とされてきたことから、微生物の高機能化を指向した網羅的解析による細胞表面提示技術の革新が今まさに必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞表面提示技術を網羅的に解析し基盤技術として確立するために「Displome (Display+ome): ディスプローム」という新しいオーム解析の概念を導入する。酵母、大腸菌などの有用微生物の細胞表面提示技術を工学的な観点から網羅することで、バイオマスからの有用物質生産に最も適した細胞表面提示技術の基盤を創製する。

3. 研究の方法

現状では、出芽酵母が最も細胞表面提示系の開発が進んでいる。そこで本研究では、出芽酵母以外の有用微生物における細胞表面提示系の開発を行った。分裂酵母、*Corynebacterium glutamicum*、について表面提示系の構築とそれらを用いたバイオマス分解能評価、そして物質生産の可能性について検討した。

それぞれの宿主において、バイオマス分解酵素である BGL をレポーターとし、アンカータンパク質のスクリーニングを行った。アンカータンパク質としては、細胞膜表面に局在すると予想されるタンパク質に着目し、それらに上記のレポータータンパク質を融合させたベクターを構築し、それぞれの宿主で発現させた。1次スクリーニングとしてプレート上での BGL 活性を評価しそれらの結果をもとに、活性のあるものについて培養を行い、pNPG などの合成基質を用いて大量的に評価した。さらに、セロピオースを単一炭素源として用いた場合増殖能の評価及び、キシロシダーゼなど他の酵素を

用いた表層提示系についても同様の検討を行った。

4. 研究成果

分裂酵母では、出芽酵母で発現実績のある *Aspergillus aculeatus* 由来の BGL を用い、細胞膜表層に局在すると予想されるタンパク質と連結させて発現させた。プレート上でのスクリーニングを行ったところ、SPBC21D10.06c-BGL, SPBC947.04-BGL, SPBC19C7.05-BGL, SPBC359.04c-BGL の 4 つのアンカータンパク質を用いた場合にかっ性が認められた。これらの活性を PNPG で評価したところ、図 1 のように、培養上清に比べて菌体表層に活性を持つことが示された。

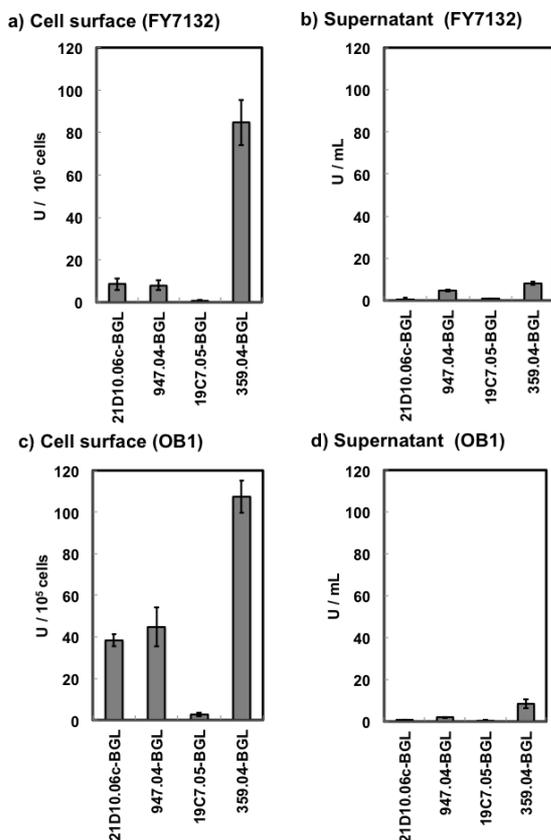


図 1: BGL 活性の評価 a) 菌体表層, b) 培養上清

続いて、これら BGL 提示酵母を用いてセロビオースを単一炭素源として増殖能を評価した。最小培地 EMM を用いて、菌体数を直接測定することで評価を行った結果を図 2 に示す。図 2 より、アンカータンパク質によって増殖能に差が見られ、SPBC947.04-BGL, SPBC359.04c-BGL、の 2 つを用いたときにセロビオースを炭素源として効率よく増殖した。図 1 と比較すると、増殖能と酵素活性には必ずしも相関があるとはいえない、という可能性が

示唆された。また、もう一つの可能性として用いている基質が異なる (pNPG とセロビオース) という可能性が考えられた。

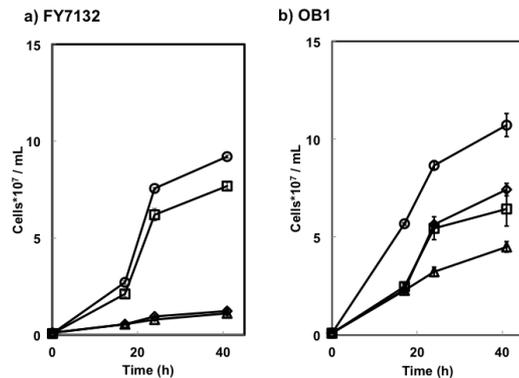


図 2: BGL 提示酵母を用いたセロビオースからの増殖

さらに、これらの菌体を用いてセロビオースからエタノール生産が可能かどうかについて検証した。その結果を図 3 に示す。

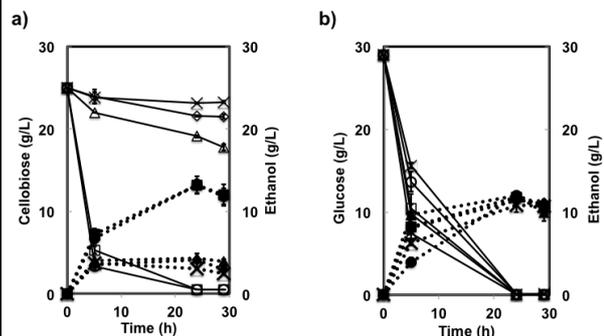


図 3: BGL 提示酵母を用いたエタノール発酵 a) セロビオースを単一炭素源として用いた場合 b) グルコースを単一炭素源として用いた場合

図 3 より、BGL 提示酵母においては、セロビオースを時間とともに消費し、その結果エタノールを生産させることに成功した。また、これらの酵母をグルコースを炭素源として用いてエタノール発酵を行ったところ、いずれの菌株においてもグルコースを消費し、エタノールを生産していた。これより、表層提示は菌体に特に影響を与えないことが示された。

並行して、*Corynebacterium glutamicum* (コリネ菌) においても同様の検討を行った。コリネ菌においては、活性を持つ BGL をスクリーニングするところから始めた。様々な微生物由来の BGL をコリネ菌に導入し、その BGL 活性をスクリーニングしたところ、いくつかの BGL について活性をも

つものを見出した(図4)。

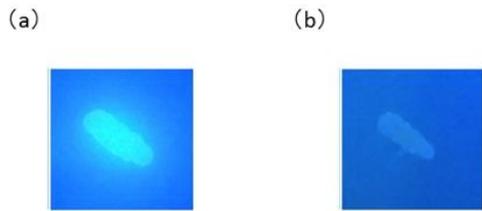
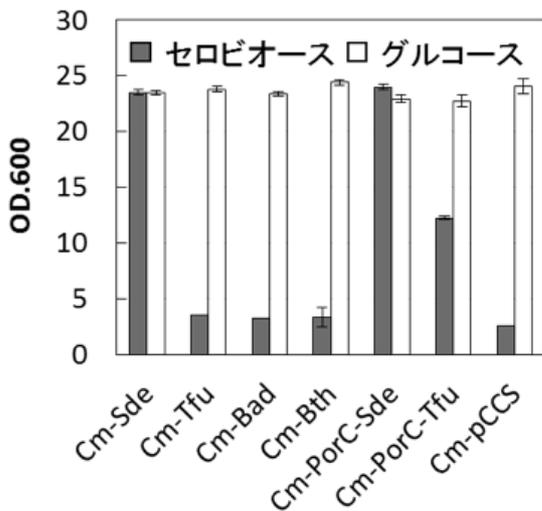


図4：プレート上でのBGLスクリーニング

これらを同様にセロビオース及びグルコースでの増殖を評価したところ、図5のような結果が得られた。これと、*S. degradans* 由来のBGLが最も活性が高く、セロビオースを炭素源として効率よく増殖した。続いて、これまでに当研究グループで開発してきたアンカータンパク質 Porin を用いてこのBGLを表層提示させたところ、やはりセロビオースを炭素源として非常によく増殖することがわかった。

図5：BGL発現コリネ菌を用いたセロビオース及びグルコースからの増殖



同様に、これらのBGL活性を評価したところ、増殖とほぼ相関が得られた。宿主により、表層提示した酵素の活性とその増殖は異なることが示された(図6)。また、この菌体を用いてセロビオースからリジン発酵を行ったところ、BGL提示株は効率よくセロビオースを消費し、Lysを生産していることが示された(図7)。

以上より、様々な菌体において表層提示系を構築し、網羅的解析のための基盤を得ることに成功した。今後も改良を重ねていくことで、表層提示における指針を見出すことを目指す。

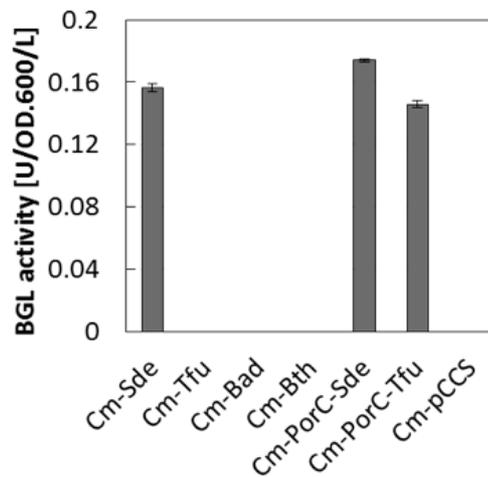


図6：BGL発現コリネ菌のBGL活性

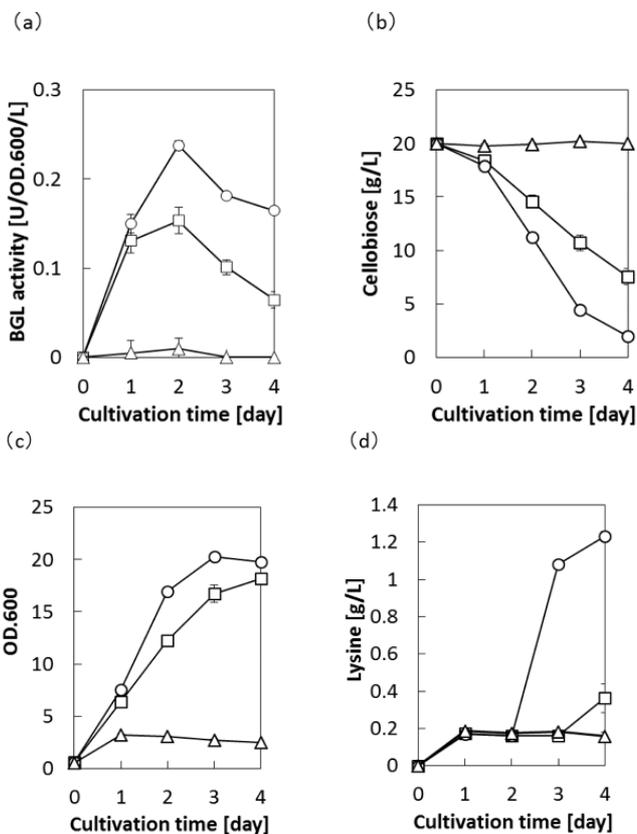


図7：BGL発現コリネ菌を用いたセロビオースからのリジン生産 a)BGL活性の経時変化、b)セロビオース濃度の経時変化 c)ODの経時変化 d)リジン濃度の経時変化 ○：BGL分泌コリネ菌、□：BGL表層提示コリネ菌、△：コントロール株

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9件)

Tanaka, T., Kondo, A. Cell surface engineering of industrial microorganisms for biorefining applications., *Biotechnology Advances*, in press

Tanaka, T., Kondo, A. (Review) (2015) Cell-surface display of enzymes by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for synthetic biology., *FEMS Yeast Research*, in press

Tanaka, T., Hirata, Y., Nakano, M., Kawabata, H., Kondo, A. (2014) Co-assimilation of cellobiose and xylooligosaccharides using *E. coli* displaying both beta-glucosidase and beta-xylosidase on its cell surface., *ACS Synthetic Biology*, 3(7), 446-453

Ikeda, N., Miyamoto, M., Adachi, N., Nakano, M., Tanaka, T., Kondo, A. (2013) Direct cadaverine production from cellobiose using beta-glucosidase displaying *Escherichia coli*., *AMB Express*, 3(1), 67

Adachi, N., Takahashi, C., Murota, N., Yamaguchi, R., Tanaka, T., Kondo, A. (2013) Direct L-lysine production from cellobiose by *Corynebacterium glutamicum* displaying beta-glucosidase on its cell surface., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7165-7172

Tanaka, T., Matsumoto, S., Yamada, M., Yamada, R., Matsuda, F., Kondo, A. (2013) Display of active beta-glucosidase on the surface of *Schizosaccharomyces pombe* cells using novel anchor proteins., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4343-4352

Soma, Y., Inokuma, K., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A., Okamoto, M., Hanai, T. (2012) Direct isopropanol production from cellobiose by engineered *Escherichia coli* using a synthetic pathway and a cell surface display system., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(1), 80-85

Tanaka, T., Yamada, R., Ogino, C., Kondo, A. (Review) (2012) Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 577-591

Yamakawa, S., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A. (2012) A number of repeated fermentations from raw starch using glucoamylase and α -amylase co-displaying *Saccharomyces cerevisiae*., *Enzyme and Microbial Technology*, 50(6-7), 343-347

〔学会発表〕(計 11件)

瀬川 将太・足立 典子・田中 勉・近藤 昭彦「BGL 提示 *Corynebacterium glutamicum* を用いたセロピオースからのジアミン生産」化学工学会第 46 回秋季大会 2014 年 9 月 17 日～19 日 九州大学

松本 拓也・秦 悠斗・田中 勉・近藤 昭彦「多機能性ペータグルコシダーゼの機能評価とその応用」化学工学会第 46 回秋季大会 2014 年 9 月 17 日～19 日 九州大学

池田 直樹, 田中 勉, 近藤 昭彦「大腸菌を用いたオリゴ糖からのカダベリン生産系の構築」第 66 回日本生物工学会大会 2014 年 9 月 9 日～11 日 札幌

小川 晃右, 松本 紗世子, 田中 勉, 近藤 昭彦「 β -グルコシターゼ提示分裂酵母を用いた乳酸生産」第 66 回日本生物工学会大会 2014 年 9 月 9 日～11 日 札幌

松本 拓也, 秦 悠斗, 田中 勉, 近藤 昭彦「多機能性ペータグルコシダーゼを用いたセルロース/ヘミセルロース様基質の糖化」第 66 回日本生物工学会大会 2014 年 9 月 9 日～11 日 札幌

Akihiko Kondo, "Design of microbial cell factories for lignocellulosic biorefinery" 10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses, 2014.9.7-10, LILLE

GRAND PALAIS (Invited lecture)

Akihiko Kondo, "Design of microbial cell factories for lignocellulosic biorefinery" Metabolic Engineering X, 2014.6.15-19, Westin Bayshore (Invited lecture)

池田 直樹・田中 勉・近藤 昭彦「グルコシダーゼ提示大腸菌を用いたセロビオースからのカダベリン生産」化学工学会第79回年会 2014年3月18日～20日 岐阜大学

Tsutomu Tanaka, "Creation of Escherichia coli Displaying both -Glucosidase and -Xylosidase on Its Cell Surface" Korea-Japan Smart Biodesign Workshop: Technology exchange for green biotechnology, 2014. 1. 21. Sendai.

Naoki Ikeda, Noriko Adachi, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondo, "Direct putrescine production from cellobiose using Escherichia coli displaying cellulase" Enzym Engineering XXII, 2013.9.22-26. Toyama

Noriko Adachi, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondo, "Direct L-lysine production from cellobiose by corynebacterium glutamicum displaying beta-glucosidase on its cell surface" Enzym Engineering XXII, 2013.9.22-26. Toyama

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 昭彦 (KONDO Akihiko)
神戸大学大学院工学研究科 教授
研究者番号：40205547

(2) 研究分担者

田中 勉 (TANAKA Tsutomu)
神戸大学大学院工学研究科 准教授
研究者番号：90436551

荻野 千秋 (OGINO Chiaki)

神戸大学大学院工学研究科 准教授
研究者番号：00313693

山田 亮祐 (YAMADA Ryosuke)

神戸大学自然科学系先端融合研究
環 助教
研究者番号：00313693

松本 拓也 (MATSUMOTO Takuya)

神戸大学自然科学系先端融合研究
環 助教
研究者番号：00313693

(3) 連携研究者

()

研究者番号：