

# キノコやカビの酵素探索からの或る考察

紙野 圭

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) 産業連携推進課  
〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8

## Obstacles found in investigation of fungal & mushroom enzymes

Kei Kamino

Biological Resource Center (NBRC), National Institute of Technology and Evaluation  
2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan

### 1. はじめに

産業面でキノコやカビに期待したいことのひとつとして分解者としての能力があります。非可食バイオマス利用の機運の高まりをきっかけに、それら微生物のゲノム情報の収集は進められ、また新規な分解関連酵素が特定されるなどといった基礎的な情報の蓄積は着実に進んでいます。第二世代バイオエタノール生産技術の開発は最終コーナーにさしかかった感がありますが、同時に非可食バイオマスから化成品利用への流れを加速する研究開発の機運が高まっています。一方で、キノコやカビの培養や、それらの酵素や機能性物質の探索、それらの遺伝子の異種発現や育種改良などといった技術には相変わらず難しいことが残されています。本稿では、第二世代バイオエタノール生産技術開発の一貫として行った有用糖化酵素探索を例にその現状について考えます。

### 2. 第二世代バイオエタノールに関わる技術開発

第一世代バイオエタノールは基本的にはお酒作りと同じプロセスで生産されます。農作物可食部を分解して糖を作り（糖化）、それを酵母で発酵させてエタノールを得ます。この技術は実用化されており、ブラジルや米国、中国などで盛んに生産されています。また、我が国の石油産業はブラジルより第一世代のバイオエタノールを輸入しています。但し我が国での生産は、食料との競合などの問題から想定されていません。第二世代バイオエタノールは私達が食料として利用できない非可食バイオマスあるいはバイオマス非可食部を利用したエタノール生産で、我が国では最も直近に実

用化できるバイオエネルギー技術のひとつとして2008年より重点的にその技術開発が進められてきました。非可食バイオマスは木や草のリグノセルロース系バイオマスを指し、農作物残渣などの非可食部とあわせてカーボンニュートラルな原料とされます。大きな課題とされるのが、この主成分であるセルロースを効率よく糖化して発酵可能な糖を得る技術で、一般的には前処理と糖化处理の二段階で進められます。バイオエタノール生産プロセスとしては、糖化处理と発酵を連続して進める並行複発酵などのいくつかのオプションがありますが、いずれにせよ第二世代バイオエタノールの技術で克服しなければならない大きなハードルは、効率的なリグノセルロースの糖化にあります。糖化のコストと投入エネルギーの両面が十分に低減できれば、エタノールに限らず、石油から作られる化成品原料の置き換えの流れも加速されることとなります。これらバイオリファイナリー全体の鍵を握るのがリグノセルロースの効率的な糖化技術なのです。

### 3. リグノセルロース糖化の特殊性

リグノセルロース糖化にはカビの酵素系が用いられるのが一般的です。最終的にエタノールを作るにせよ化成品原料を作るにせよ、その値段が高くては実際には意味はありません。エタノールや化成品原料は安くなければならないからです。そのためには、酵素系による反応効率を上げ、かつ酵素系の生産コストを抑えることが必要です。その技術課題の難しさは、基質と酵素それぞれの特異性に起因します。まず原料(基質)としてのリグノセルロースについてですが、この物質には一般にセルロースが半量、残る半量にヘミセルロースやリグニンが多く含まれています。セルロース

とヘミセルロースは多糖質、リグニン芳香環が重合したポリマーです。これらの中で特にセルロースには特殊な面があります(図1)。セルロースはグルコースのみが重合した、化学構造的に単純な直鎖状のポリマーです。グルコースがbeta-1,4結合で重合しているために、ひとつのセルロース分子の形は直線状です。糖には多くの水酸基があり、単糖としてのグルコースはもちろん高濃度で水に溶けます。しかし実際には、グルコースユニットが7つ程度繋がったセロオリゴ糖でさえも水には溶けません。その理由は、分子の形が直線状で枝分かれもない単純なものなので、分子同士が多数パッキングして自己集合するためです。すなわち結晶化してしまうのです(天然セルロースには結晶した領域と、結晶化していない領域(非晶領域)が混在しており、それが機械的な強さ(しなやかさ)にも関係しています)。糖化における基質側の問題点のひとつは、セルロース分子が結晶化するという特殊さにあり、これが分解(糖化)を難しくしているひとつの理由です。もう一点の難しさは、実際の基質が純粋なセルロースではないということです。リグノセルロースは、元々は生きた植物の細胞壁です。細胞壁はセルロース結晶が集まっただけのものでは決してありません。セルロース結晶とセルロース結晶の間をヘミセルロースやペクチン、そしてリグニンなどが階層的に

覆って細胞壁となります。本来は秩序だったものですが、それを砕いて圧力をかけて熱したり、酸やアルカリの中で煮たりという前処理を施したものが糖化のための基質です。前処理はリグニンやヘミセルロースを除くことが本来の大きな目的ですが、その結果セルロースの周囲に、非セルロース成分が秩序無く残ってへばりついたものとなってしまいます。純粋なセルロース結晶ではないこの状態が糖化を難しくするもうひとつの理由です。つまり、結晶性セルロースを主として、所々にヘミセルロースやリグニンがへばりついた固体がリグノセルロース糖化基質の実態で、これが効率的な糖化が難しいひとつの根本理由です。

次に酵素の特殊性についてです。リグノセルロースは、ひとつの酵素だけではほとんど糖化されません。複数の酵素が同時にアタックすることが求められます。すなわち糖化に使われる酵素とは酵素系であるということがもうひとつの特殊性です。本来ひとつの酵素はひとつの化学反応を触媒します。セルロース分子のbeta-1,4結合を切るのは基本的にはひとつの反応ですので、ひとつの酵素で十分なはずですが、先に述べた結晶化するという(物理状態のヘテロさ)から、異なる作用機構を有する酵素が作用しなければセルロース結晶は実際には糖化されません。また前述の通りにセルロース結晶の周囲にはヘミセルロースや

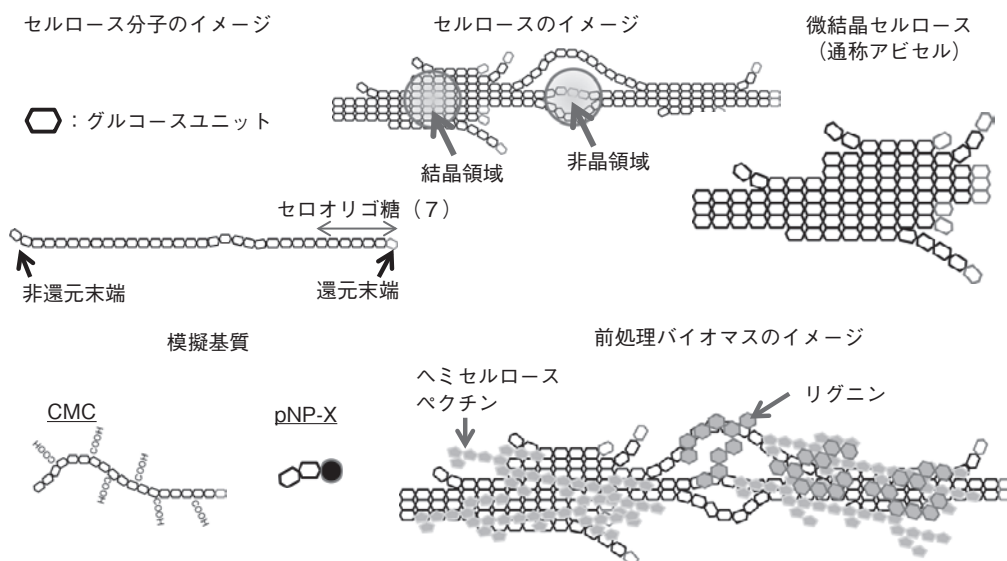


図1 非可食バイオマス糖化に用いられる基質のイメージ

酵素学的解析に用いられる人工基質や様々なセルロース基質と、バイオリファイナリーに用いられる前処理済みバイオマスはそれぞれに異なるものです。セルロース一分子は、水溶液中ではこの状態で存在できません。それは分子鎖間で速やかに水素結合等を形成するため、自己集合、結晶化するためです。単純な化学構造がゆえになせるわざと言えます。

リグニンがこびりついています。これらはセルロースとは異なる化学構造ですので、それぞれを分解する酵素が必要です。このように、異なる作用機構や触媒能を有する複数の酵素の混合物が糖化酵素の実態で、その相乗作用で糖化は進みます。従来酵素の研究は水に溶けた基質に対する単一の酵素の作用として解析・評価されてきましたので、糖化酵素のようなヘテロな固体基質に作用する混合酵素系というものは非常に研究のハードルが高いということになります。これが酵素側の難しさです。

また酵素糖化のためには、実際にはなんらかのバイオマス前処理が必要です。例えば、加圧熱水処理、酸あるいはアルカリ処理、爆砕処理、機械的な微粉砕（解繊）処理などの化学・物理・機械的な処理が一般に用いられますが、ここで大きなエネルギーを投入して二酸化炭素を多く排出してしまえばカーボンニュートラルの観点で意味がありませんし、環境負荷の大きな廃液では、その廃液処理にコストが大きくなってしまいます。これら前処理技術も第二世代バイオエタノール生産では重要な技術です。実際には、バイオマスの種類、前処理の種類と条件、酵素系の3つが絡み合ってきますので、コストや二酸化炭素排出の観点で有用な技術とするには、多岐にわたる分野を包括するようなプロジェクト体制を取ることが必要であったと言えます。

一方、酵素の生産コストを抑えるためには、大量の酵素を生産する菌株を構築し、その培養条件を安価で効率の良いものとする必要があります。この点で、海外の主要酵素メーカーを含めた多くが用いているのが *Trichoderma reesei* QM9414 株から育種改良された菌株です。それら現在の工業生産株は圧倒的な酵素生産性を有していますが、バイオエタノール生産においては未だ不十分であり、その改良が必要です。一方でカビのこの酵素生産性のポテンシャルを考えると、これをバクテリアにするということは少し考え難いのが現状です。生産コストに敏感なバイオエタノールのようなケースではカビで異種発現できる遺伝子、すなわちカビやキノコから酵素を探索するという考え方が現状では適切であると言えます。

#### 4. カビやキノコの糖化酵素系

自然界でリグノセルロースを炭素循環へと繋いでいるのは微生物です。特にキノコはリグニンを含まれたリグノセルロースを完全に分解できる能力を有しています。理屈の上では、前処理リグノセルロースの糖化に

は5～6種類程度の酵素が必要であると考えられますが、一方で単純であると言われている *T. reesei* でさえも11種類以上の酵素を分泌します。微生物がそれらの酵素を分泌する場合は、バイオエタノール生産で用いられるリアクターの条件とは大きく異なっており、それら全てが工業的に必要なわけではないと思われます。ですが、一方でその能力を我々が正しく見極められていない酵素があるのも事実です。特にバイオマスの種が異なると細胞壁の構造は当然異なりますので、バイオマス種に応じた適切な酵素系を準備するためには、微生物糖化関連酵素の多様性の理解は必須であろうと思われます。自然界における、個々の微生物のそれぞれの酵素の使い方を知ることもまた重要な研究課題で、そのような知見から将来の技術を大きく飛躍させるアイデアが生まれるのかもしれませんが。

#### 5. 糖化酵素の探索

NBRC 保有のカビやキノコ 1500 株以上の汎用的なスクリーニングでは、約2割がリグノセルロース糖化の酵素系を有していました。その際には培養条件を至適化していませんでしたので、酵素生産が誘導されていなかったり、菌体の生育が不十分なケースも含まれています。汎用的なスクリーニングでは、微結晶性セルロースやカルボキシル基で化学修飾された溶解性セルロース（いわゆる CMC）に、Azo 色素等を結合させた基質を用います。培養上清に含まれる酵素による分解で、人工基質より遊離する色素を分光光度計で測定するわけです。このような汎用的な方法では、酵素系の有無を見積もることは十分可能ですが、強弱を見極めることは困難です。そのひとつの理由は、その培養上清に含まれる糖化酵素の正確な量が不明だからです。タンパク質濃度を汎用的な方法で定量することはもちろん可能ですが、カビやキノコの培養上清の場合には往々にして定量値が正しくありません。それは培養上清に含まれる非タンパク質成分による着色や菌体外多糖質などの影響によるものと思われます。また、菌体外タンパク質生産性の低い菌株の場合には限外ろ過膜などを用いた培養上清の濃縮作業が必要になりますが、実際には目詰まりするために骨の折れる作業で、想定通りにタンパク質は濃縮されないものです。高い酵素生産性を示す株で 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  程度、中程度で 100～50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、低いケースで 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下というのが経験的な菌体外酵素濃度でした。キノコの場合は、定量値だけを見ると中程度の酵素生産性を有しているかのように見えますが、実際には定量値の信用性は低く、電気



泳動によってさらに評価したところでは 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下というケースが多く見られました (図 2)。予想されることですが、キノコの菌体外酵素生産性は一般に低いと考えられます。但し、キノコの場合には培養条件というものがまったく至適条件とかけ離れているということがありますので、育種改良による伸び代には可能性はあります。 *T. reesei* QM9414 株の酵素生産性は前述の高い生産性のグループに位置づけられますが、現在の工業生産株の酵素生産性はその 100 倍以上です。つまり産業利用の上では、酵素生産性の伸び代が実際には重要であると言えます。菌体外酵素生産性の高さは生産コストに直結します。ですが、残念ながら天然株のその伸び代を見極める良い方法は今のところ一般に知られていません。

筆者らは、工業生産株の各成分酵素を置き換える有用な成分酵素を探索してきました。ここで言う有用性には、酵素としての分解の能力と、実際に使用される環境での安定性の大きく 2 つがあります。前者は酵素系の中での能力を指しますので、個々の酵素だけで解析をしても見極めることはできません。そのため、個々の成分酵素遺伝子を欠損させた工業株の培養上清に添加するなどの様々な工夫を行いながら能力を見極めていきます。

上記のように個々の酵素の善し悪し、すなわち有用性を見積もるためにはそれなりの量の酵素を準備する必要があります。そのためには大きく二手あり、対応する遺伝子をクローニングした後、汎用ホストにて異種発現させるか、元の天然の株を培養して、その培養上清から酵素を精製するかです。前者では、異種発現ホストが糖化酵素を生産していなければ、多少精製度が低くとも能力を評価できることが利点のひとつに挙げられますが、一方でクローニングから発現系構築を経て発現確認を終えるまで、その遺伝子が発現するか否かや、発現量はわかりません。発現しなかった、あるいは発現しても微量だったとなれば、目的は達せられません。一方で、後者はそれなりの酵素生産性のある株であれば、比較的短い期間内に確実に酵素を手にすることができますが、天然株の培養や酵素誘導、酵素生産性の程度によっては困難となります。つまり一長一短だと考え、後者を積極的に取り入れてきました。ですが、キノコはやはり容易ではありませんでした (これは筆者にキノコの培養に関する知識が欠けていたことが原因のひとつかもしれません)。キノコの場合は、培養、精製、評価は諦めて、酵素誘導の有無で発現している遺伝子をサブトラクションすること

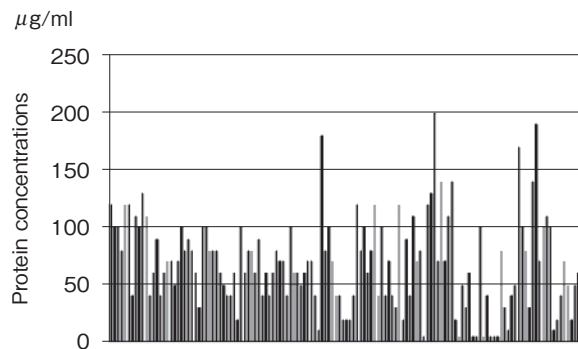


図 2 担子菌の液体培養における菌体外タンパク質生産性のイメージ。一見すると 50 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  という中程度のタンパク質生産性を示すように思われますが、電気泳動で確認したところ、概してそれ以下のタンパク質濃度でした。様々な物質の含まれる培養上清のようなサンプルでは、一般的な定量法では大きく間違ふことがあります。タンパク質濃度の測定は、ブラッドフォード法で BSA を標準物質として用いました。

で、効率的にバイオマス糖化酵素遺伝子の情報を収集し、その中から選定した遺伝子を異種発現するという戦略を取りました。発現遺伝子のサブトラクションは分子生物学的にはクラシカルな方法のひとつですが、条件を厳しくすることで効率的に遺伝子情報を得ることができました。このような方法は、多様なキノコの有用な遺伝子を選び出すには、小規模で良い方法だと感じています。

## 6. おわりに

リグノセルロース糖化の技術として残されていることのひとつがリグニンの分解です。前述の通りその能力はキノコにあります。杉などの糖化は現状でも非常に困難で、カビやキノコに倣う部分は多く残されています。一方でカビの菌体外タンパク質生産性のポテンシャルの高さは他の微生物にはないものがあります。その面で、より広い観点でカビやキノコの酵素の産業利用の可能性は開かれていると言えます。世界的には着実にカビやキノコの研究の底上げが進められていますので、今こそこれらの微生物を広い観点で研究する機であると思われます。

産業化の過程では、効率やコストを追い求めて様々な改良や工夫を重ねていきます。それは、理屈だけのドライな作業ではなく、状況ごとにあらゆる知見を総合する極めて wet な作業の繰り返しです。ここで述べた糖化酵素開発も定量的で泥臭いプロセスのひとつです。BRC は昨今のその非常に限られた人員での運

営を考えると dry な情報整理に偏りがちですが、そこに産業利用との乖離があり、知らぬ間にその溝が深まってしまうということも起こりえます。やむを得ないことではありますが、元来非常に wet な菌類の研究者としての顔が実は産業との間を埋める武器にもなると筆者は感じています。勝手ながら、ぜひ乾かないでいただきたいと願う次第です。

## 謝 辞

本発表の機会をお与えいただきました鳥取大学付属菌類きのこ遺伝資源研究センター 中桐 昭教授に感謝申し上げます。本稿で述べた研究は“バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発”および“バイオ燃料製造の有用要素技術開発”の一貫として NEDO の委託を受けて行われたものを含みます。