



バイオマス糖化酵素製造技術を基にした都市型バイオリファイナリーの実現

柴田, 望

(Degree)

博士 (科学技術イノベーション)

(Date of Degree)

2022-03-25

(Date of Publication)

2023-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8384号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008384>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

バイオマス糖化酵素製造技術を基にした 都市型バイオリファインリーの実現

2022年1月

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科

柴田 望

1 序論.....	3
1-1 バイオリファイナリーに関する社会的背景.....	3
1-2 非可食バイオリファイナリーの実現にむけた技術的課題.....	6
1-3 本研究の目的	7
1-4 本論文の構成	7
1-5 参考文献および引用.....	8
2 新規キシラナーゼ PspXyn10 の発見と糖化酵素への応用.....	10
2-1 背景.....	10
2-2 材料と方法.....	12
2-3 結果と考察.....	20
2-4 本章のまとめ	32
2-5 参考文献および引用.....	33
3 α チューブリン遺伝子破壊株を用いたグルコースからの効率的な糖化酵素生産	36
3-1 背景.....	36
3-2 材料と方法.....	37
3-3 結果と考察.....	42
3-4 本章のまとめ	60
3-5 参考文献および引用.....	60
4 日本におけるバイオリファイナリーの現状と実装に向けたプロトタイピング	63
4-1 日本におけるバイオリファイナリーの普及の重要性と課題.....	63
4-2 日本における古紙や一般ごみを用いたバイオリファイナリーの可能性調査.....	64
4-3 都市廃棄物に関する関連団体へのヒアリング	66
4-4 都市廃棄物をターゲットとしたバイオリファイナリーのプロトタイピング	69
4-5 まとめ	72
4-6 参考文献および引用.....	73
5 イノベーションアイデア	75
5-1 新規事業立ち上げを通じて解決したい課題.....	75
5-2 本事業を進める上での技術的ブレークスルー	75
5-3 コアとなるイノベーションアイデア	76
5-4 本事業の意義	79
5-5 参考文献および引用.....	80
6 事業戦略.....	81
6-1 事業の概要.....	81
6-2 事業の価値と優位性の確認（環境分析）	81
6-3 事業の概要（ビジネスモデル）	90
6-4 事業の競争優位のポイント.....	93

6-5 事業戦略のまとめ	95
6-6 参考文献および引用.....	96
7 技術戦略.....	98
7-1 技術の概要	98
7-2 事業に必要な技術ポートフォリオ	99
7-3 事業展開を想定した技術開発の方向性と、開発ロードマップ.....	101
7-4 技術戦略まとめ.....	104
7-5 参考文献および引用.....	104
8 知財戦略.....	106
8-1 現状における知財の構成	106
8-2 糖製造関連技術に関する特許クリアランス.....	108
8-3 他社の特許解析.....	108
8-4 今後の知財構築の方針と計画	111
9 財務戦略.....	112
9-1 事業の財務性	112
9-2 収益の見込み	112
9-3 DCF 法を用いた事業価値の算出	113
9-4 収益性の改善に向けた今後の取り組み.....	114
9-5 財務戦略のまとめと今後の方針.....	114
9-6 参考文献および引用.....	115
10 結論	116
謝辞.....	120

1 序論

本章では、非可食バイオリファイナリーに関する本論文の意義を明らかにする。1-1 では、脱石化に向けた世界的な動きとバイオリファイナリーの普及に関する社会的背景について記す。1-2 では本研究分野における学術的背景について概観する。1-3 にて本研究の目的を述べ、1-4 にて本論文の構成について述べる。

1-1 バイオリファイナリーに関する社会的背景

(1) 脱石化に向けた世界的な動きとバイオエコノミー、バイオリファイナリー

地球規模の温暖化、気候変動問題に対処することを目的に、国際社会が一体となって脱炭素社会構築に取り組むための世界的な目標設定や規制が実施され始めている。

1995 年から国連気候変動枠組条約締約国会議（COP）が毎年開催されており、温室効果ガス排出量削減に向けて精力的な議論が行われてきている。2015 年 12 月に実施された COP21 においては、2020 年以降の温室効果ガス排出削減等のための国際的な枠組みとして「パリ協定」が採択された¹。パリ協定では世界共通の長期目標として、世界の平均気温上昇を産業革命以前に比べて 2°C より十分低く保つ（2°C 目標）とともに、1.5°C に抑える努力を追求すること（1.5°C 目標）が示され、主要排出国を含む全ての国が削減目標を提出することを合意することで、国際社会が共通目標をもって脱炭素社会の構築を目指すことが策定された。

国連においても、国連加盟 193 国が 2016 年から 2030 年にかけて達成する目標として SDGs を掲げている²。SDGs の第 13 項には「気候変動に具体的な対策を」が定められており、国連加盟国内においても脱炭素社会への具体的なアプローチが望まれている。

また、温室効果ガス削減に向けた試みは欧州において特に活発であり、EU では Renewable energy directive (RED) II を掲げ³、2030 年までの EU 全体のエネルギー消費における再生可能エネルギー源の目標を 32% に設定し、脱炭素社会に向け脱石化、再生可能エネルギーの利用推進を積極的に進めている。

こういった脱石化への世界的な流れの中で、バイオエコノミーが着目されている。バイオエコノミーとは、バイオマスやバイオテクノロジーを活用しながら、合わせて経済成長の実現を目指す経済活動全般を指し、2009 年に OECD（経済協力開発機構）により提唱されたものである⁴。このバイオエコノミー自体が“化石資源に依存しない持続型の社会システム”とも言われ⁵、パリ協定や SDGs の目指す像と一致していることから、欧米や中等主要国などにおいてバイオエコノミーを成長戦略の中心に据えられ始めている。バイオエコノミー市場は農業、工業、健康に大別され、このバイオエコノミーにおける工業分野はバイオリファイナリーとも呼ばれる。バイオリファイナリー（バイオマスリファイナリー）は、様々なバイオマスから異なるバイオ化成品を生産するコンセプトであり、オイルリファイナリーに代わる新たな産業として期待されている（図 1-1）。

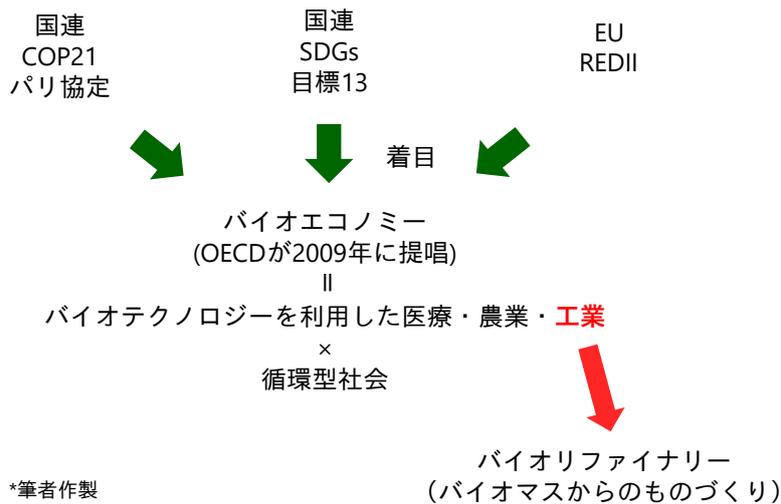
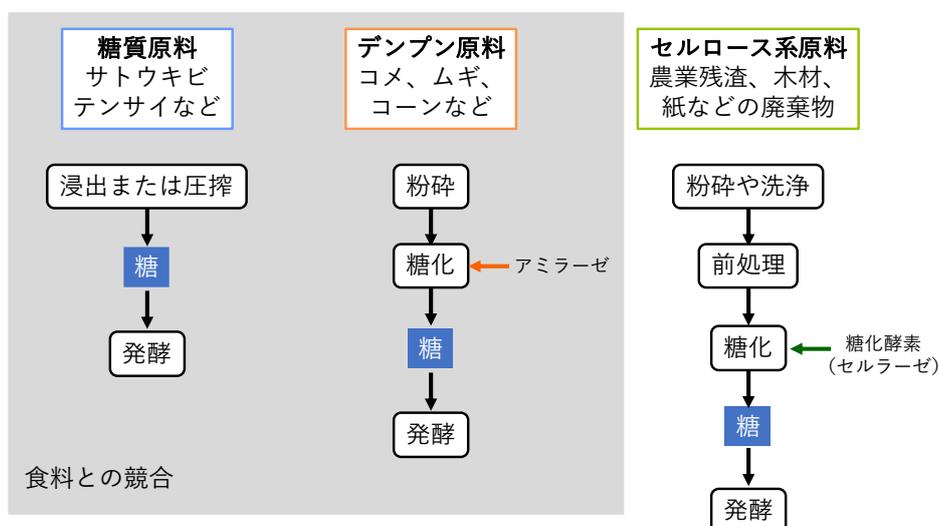


図 1-1 バイオエコノミーとバイオリファイナリーの関係性

バイオマスからのものづくりとなるバイオリファイナリーの原料は、サトウキビやテンサイなどの糖質原料、コメやコーンなどのデンプン原料、農業残渣や木材、紙などの廃棄物などのセルロース系原料に分けられる⁶ (図 1-2)。このうち、糖質原料は浸出や圧搾のみで、デンプン原料はアミラーゼ処理のみで糖として利用可能となることから、バイオリファイナリー原料として広く利用されている。しかしながら、糖質原料、デンプン原料は食糧であり、バイオリファイナリー原料として用いることで食糧との競合が生じ問題となっている。実際、バイオ燃料としてコーンやサトウキビが利用されることにより、これらの価格は大きく上昇していると考えられており、2000年代の世界の食料価格の上昇のうち 20%~40%が、バイオ燃料への転用が原因であると考えられている⁷。これに対し、セルロース系原料は食糧との競合が起こらない点で注目されているが、セルロース自体の強固な構造のため、糖質原料やデンプン原料と比較して前処理が必要であり、またセルラーゼなどの糖化酵素が多く必要であるため、コストの面で普及が遅れている。



*参考文献6を参考に筆者作製

図 1-2 バイオリファイナリー原料とその利用までのフロー

(2) 世界におけるバイオリファイナリーの現状と課題

バイオエコノミーに最も積極的に取り組んでいるのは EU である。EU においては、バイオエコノミーに向け、様々なケミカルスを化石資源ではなく植物バイオマスから製造する試みを実施されてきている。EU における糖やデンプンから作られた燃料用バイオエタノールの製造量は約 360 万トン（2018 年）、エタノールを除くバイオベース化成品の製造量は約 50 万トン（2016 年）と試算されている⁸。このように、バイオリファイナリーの分野においては、様々な化成品の製造検討が実施されてはいるものの、その製造規模はバイオ燃料としてのバイオエタノールが最も多くを占めている。

バイオエタノールに目を向けると、EU よりも北米・南米において製造量が多い。バイオエタノールは 2020 年に全世界で年間 8,779 万トンの製造が行われており、北米で 4,158 万トン、南米で 2,800 万トン、ヨーロッパ・中東・アフリカで 580 万トン、APEC では 1,230 万トンの製造が行われている⁹。これに対し、日本においては約 1 万トン（2015 年）しか生産が行われてない（図 1-3）¹⁰。

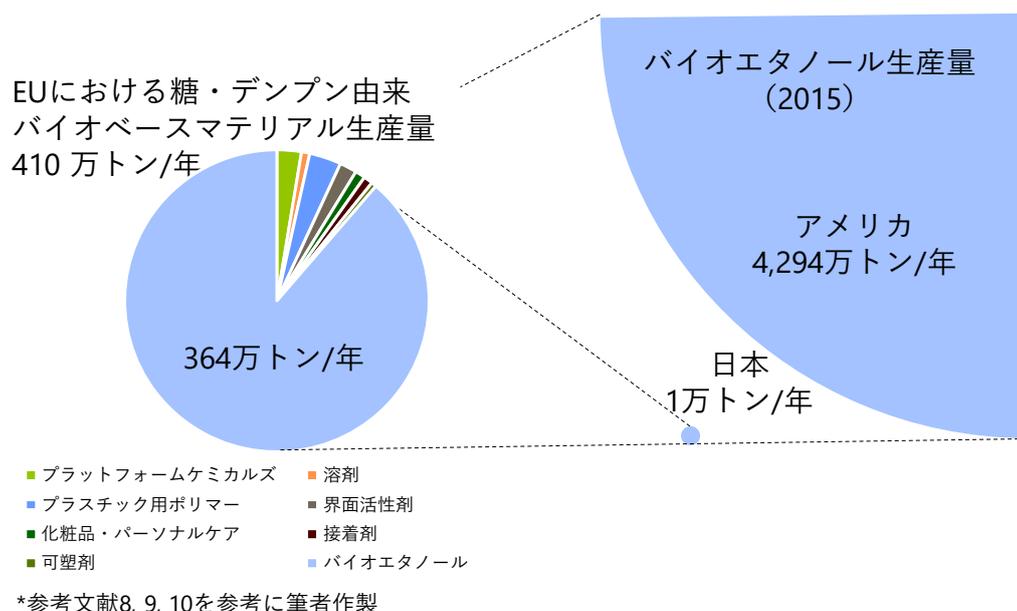


図 1-3 バイオベースマテリアルやバイオエタノールの各国における生産量

バイオエタノールの原料について見ると、コーンやサトウキビなどのデンプン原料、糖質原料から作られた 1st generation ethanol（1G エタノール）は 2020 年度においては 8,654 万トン製造されており、全バイオエタノールの製造量の実に 98.8%を占めている⁹。この 1G エタノールは食糧危機の観点から問題視されており、農業廃棄物などのセルロース原料から作られる 2nd generation ethanol（cellulosic ethanol、2G エタノール）が ESG の観点から期待されている。しかしながら、1G エタノールよりも高コストとなることが足かせとなり、2020 年度においてもその製造量は 60 万トン程度に留まっている⁹。

2G エタノールについては、ブラジルでは Raizen や GranBio がサトウキビバガスを、アメリカでは Poet-DSM がコーンストーバーを、EU では Clariant が麦わらなどを原料として用い、パイロット～商用設備での製造が行われている。ここに示したように、2G エタノールは農業廃棄物を原料として用い、農業廃棄物が集積されている農作地近郊の製糖工場やコーン加工工場などの近くに併設される形で製造されている。これは、大量に入手可能な安価セルロース源が工場に集積される農業系廃棄物であることに起因すると考えられる。このことは、2G エタノールの製造拠点は農場の近くに限定されることに繋がり、その後のエタノールの利用を考えると、農作地帯から実使用現場にエタノールを輸送する必要性が生じている。

(3) 農業系廃棄物以外のセルロース系廃棄物からのバイオ変換

農業廃棄物以外のセルロース系バイオマスとしては、エネルギー作物、産業廃棄物、都市廃棄物などが挙げられる。エネルギー作物とは、エタノールなどに変換することを目的に栽培される植物で、ミスカンザスやスイッチグラスなどの生育が早い作物などが挙げられる。産業廃棄物としては、間伐材、木粉、廃パルプ、木材など、都市廃棄物としては一般廃棄物、コンポスト、紙・段ボールなどが挙げられる。これらのうち、一般廃棄物や食品加工残渣などについては既に2G エタノールへの変換が考えられているが、これらを用いた商用設備は現在のところ見当たらない(表 1-1)¹¹。ただし、積水化学が LanzaTech と共同開発した可燃性ゴミのガス化を通じてエタノールを製造する技術が 2025 年商用稼働を目指した検討が進められている¹²。

表 1-1 セルロース系廃棄物の分類と利用

	バイオマス種	商業・実証プラント
農業廃棄物	木材残渣 バガス コーンストーバー 稲わら 麦わら	開発段階 Raizenなど Quad County Corn Processorsなど Beta Renewablesなど logenなど
産業廃棄物	紙くず コーヒー粕	なし なし
食品廃棄物	家庭ごみと食品加工残渣	St1: Etanolixなど
一般廃棄物	汚泥 家畜糞尿	Enerkem Alberta Biofuelsなど Calgren Ethanol Biogesterなど

*参考文献14を参考に筆者作製

1-2 非可食バイオリファイナリーの実現にむけた技術的課題

バイオリファイナリーにおいて最大の課題はコストである。バイオエタノールをはじめとするバイオリファイナリー製品の普及には既存のオイルリファイナリー製品と同価格帯にまでコストを下げて供給していくことが必要となる。また、食糧と競合しないセルロース系原料から作る非可食バイオリファイナリーを達成していくためには、セルロースを効率的に分解し安価に製品を

製造していく必要がある。

非可食原料とされるセルロース系バイオマスはセルロースを主原料とし、キシランなどのヘミセルロースやリグニンによって構成されている。セルロースはグルコースが β -1,4 結合で繋がった直鎖状のポリマーが結晶を形成した構造をとっている。セルロース系バイオマスでは、この結晶性セルロースを、キシロースやアラビノースなどのヘテロポリマーであるヘミセルロースと、フェノール系芳香族のヘテロポリマーであるリグニンが取り囲む、非常に強固な構造を持っている。これらを分解する方法としては、濃硫酸を用いた化学法と、前処理した後に糖化酵素によって分解する酵素法などが挙げられるが、環境負荷などの観点から酵素法が主流となっている。基質の前処理には、水熱処理、酸処理、アルカリ処理などがよく用いられる。酸処理や水熱処理は、ヘミセルロースを分解することを目的としており、アルカリ処理はリグニンを溶解・分離することを目的として実施する。いずれの方法においても、強固なセルロース系バイオマスの構造の一部を除去することによって、その後の糖化酵素の反応性が大きく向上する。しかしながら、前処理を実施した後の基質であっても、一般的なデンプン系基質の酵素処理と比較し、セルロースの強固な構造の分解のために多量の糖化酵素が必要となるため、現在においてもバイオエタノールの製造コストにおける糖化酵素の占める割合は 15.3%であり、52.6%を占める原料に次いで多い値となっている¹³。糖化酵素を多く使用すれば、より糖化が進むことで原料コストの低減に繋がるが、糖化酵素の使用量が多くなり酵素コストが高くなる。逆に酵素使用量を減らすと原料を利用しきることができず、原料コストが高くなる。そこで、原料コスト、酵素コストの両方を削減していくため、糖化酵素の性能向上、および、糖化酵素の安価生産が望まれている。

1-3 本研究の目的

本研究の目的は、非可食バイオリファイナリーの推進に向け、非可食原料であるセルロース系バイオマスを高効率で分解する酵素の開発、および糖化酵素の生産技術開発を通じて、非可食バイオリファイナリーのコストに関する課題解決を試み、非可食原料からのバイオリファイナリーを加速させることである。また、非可食バイオリファイナリーの実装に向けた調査を行い、その実現に向けて、事業、技術、知財、財務の観点から戦略構築を行うことである。

1-4 本論文の構成

本論文は全 10 章で構成される。

第 1 章では、本研究に関わるバイオリファイナリーに関する社会的、学術的背景について述べ、本論文の意義を述べる。

第 2 章では、技術的ブレークスルーの 1 つである糖化酵素の酵素性能向上を目指した研究として、新規糖化酵素 PspXyn10 の発見と本酵素を配合した糖化酵素製剤の開発について述べる。第 2 章は次の学術論文からなる。

SHIBATA Nozomu *et al.*: A novel GH10 xylanase from *Penicillium* sp. accelerates saccharification of alkaline-pretreated bagasse by an enzyme from recombinant *Trichoderma reesei* expressing *Aspergillus* β -glucosidase. *Biotechnology for Biofuels*, 10:278, 2017

第3章では、もう1つの技術的ブレークスルーである糖化酵素の安価生産を目指した研究として、 α チューブリン遺伝子破壊株を用いた安価炭素源を用いた糖化酵素生産技術の開発について述べる。第3章は次の論文からなる。

SHIBATA Nozomu *et al.*: Disruption of alpha-tubulin releases carbon catabolite repression and enhances enzyme production in *Trichoderma reesei* even in the presence of glucose. *Biotechnology for Biofuels*, 14:39, 2021

第4章では、日本におけるバイオリファイナリーの重要性、および課題について述べた上で、関連団体へのヒアリング、および第2章、第3章で述べた糖化酵素に関する技術的ブレークスルーを用いたプロトタイピングについて記す。

第5章では、イノベーションアイデアについて述べる。具体的には、糖化酵素に関わる技術的ブレークスルーを用いて、第4章で解決すべき課題として設定した「日本におけるバイオリファイナリーの遅れ」についてその根本的な問題解決を図れないかについて検討を行い、都市型バイオリファイナリーという形で実現していくためのイノベーションアイデアを立案した。

第6章では、事業戦略について述べる。具体的には、環境分析、競合分析などを行い、それらを基に都市型バイオリファイナリーの実現していくためビジネスモデルを検討した。更に提案した事業について、外部環境分析、内部環境分析を通じて事業の競争優位性を評価した。

第7章では、技術戦略について述べる。具体的には、現在保有している技術プラットフォームの整理を行い、事業実施に必要な技術の抽出を行った。その上で、事業展開を想定した上での技術開発の方向性と技術開発ロードマップを策定した。

第8章では、知財戦略について述べる。具体的には、自社が保有する知財ポートフォリオを整理し、自社の知財の観点からの競争優位性を解析した。また特許調査を通じ、事業の実施可能性について解析を行った。更に、競合他社の知財解析の結果も交え、今後の知財戦略について立案した。

第9章では、財務戦略について述べる。具体的には、事業実施に関わる財務分析を行い、また事業計画に沿った財務計画の立案を行った。また、財務計画をもとに事業価値の評価を行い、より有利に事業を進めていく上での財務戦略の立案を行った。

第10章では、本研究の成果を簡潔にまとめた上で、本研究の波及効果について述べる。

1-5 参考文献および引用

- ¹ UNFCCC, Adoption of the Paris Agreement, FCCC/CP/2015/L.9/REv.1. Dec. 12th 2015 (2015) .
- ² United Nations United Nations Transforming Our World: the 2030 Agenda for Sustainable Development, A/RES/70/1 (2015)
- ³ European Commission, Renewable Energy Directive II, 2018/2001/EC (2018)
- ⁴ Arundel A and Sawaya D, The Bioeconomy to 2030. Designing a Policy Agenda, ed by R. Holden Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France (2009).
- ⁵ Aguilar A, *et. al.* Bioeconomy for Sustainable Development. *Biotechnology Journal*.

- 14:1800638 (2019)
- ⁶ 近藤昭彦ら, セルロース系バイオエタノール製造技術-食料クライシス回避のために, エヌ・ティー・エス (2010)
 - ⁷ Rosegrant MW, Biofuels and grain prices: Impacts and policy responses, International Food Polycy Research Institute (2008)
 - ⁸ 持続可能なバイオマス資源と高付加価値化を目指す世界のバイオエコノミー市場最前線, 富士経済 (2019)
 - ⁹ BIOETHANOL MARKET GLOBAL FORECAST TO 2025, MarketsandMarkets (2021)
 - ¹⁰ 株式会社三菱総合研究所, 平成28年度石油産業体制等調査研究 (バイオ燃料を中心とした我が国の燃料政策のあり方に関する調査) (バイオエタノール関連) 報告書 (2017)
 - ¹¹ Nair RB, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ. Bioethanol Production From Agricultural and Municipal Wastes. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Elsevier; 2017;157–90
 - ¹² 「“ごみ”を“エタノール”に変換する技術の事業化を目的に合併会社を設立」積水化学, 2020年4月16日 (https://www.sekisui.co.jp/news/2020/1348992_36493.html)
 - ¹³ Global Cellulosic Ethanol Market Research Report 2016, QYR Chemical & Material Research Center (2016)

2 新規キシラナーゼ PspXyn10 の発見と糖化酵素への応用

2-1 背景

植物などのセルロース系バイオマスには、細胞壁を構成するセルロースとヘミセルロースが多く含まれており、これらは地球上で最も豊富に存在する多糖類である。このバイオマスを利用することは、石油化学製品に依存した大量消費・大量廃棄の社会構造を打破し、持続可能な社会を構築するために重要である。そこで、これらの多糖類を出発原料として糖類を生産し、微生物発酵によってバイオ燃料やバイオベースの汎用化学品、付加価値製品へと変換するバイオリファイナリーが世界的に進められている¹⁴。これらの多糖類を発酵可能な糖類まで分解する方法として、セルラーゼやヘミセルラーゼなどで構成される複合酵素である糖化酵素による糖化反応が知られている。このように、糖化酵素はセルロース系バイオマスを利用していく上でのキーマテリアルであり、糖化酵素、特にセルラーゼの市場は 2025 年には約 8 億ドルに達すると予測されている¹⁵。糖化酵素は様々な微生物によって生産されるが、その中でも *Trichoderma* 属、*Penicillium* 属、*Aspergillus* 属などの糸状菌が多種多様な糖化酵素を産生することが知られている¹⁶。

セルラーゼは、セロビオヒドロラーゼ (CBH、EC 3.2.1.91)、エンド- β -1,4-グルカナーゼ (EG、EC 3.2.1.4)、 β -グルコシダーゼ (BGL、EC 3.2.1.21) の 3 種類に大別される。CBH は、セルロースの結晶部をエキソ型に分解することでセロビオースを遊離させ、EG はセルロースの非晶部をエンド型に切断する。BGL は、CBH や EG の働きによって生じるセロビオースやセロオリゴ糖をグルコースにまで変換する。また、Lytic Polysaccharide Monooxygenases (LPMO) も、酸化反応によってセルロースの結晶部を切断することでセルロースの分解を促進することが知られている¹⁷。

ヘミセルラーゼは、エンド- β -1,4-キシラナーゼ (XYN、EC 3.2.1.8)、 β -キシロシダーゼ (BXL、3.2.1.37)、その他のアクセサリー酵素に分類される。XYN は、ヘミセルロースの主鎖であるキシランをエンド型に分解し、BXL は XYN によって生じるキシロオリゴ糖からキシロースを遊離させる。 α -N-アラビノフラノシダーゼ (ABF、3.2.1.55)、フェルロイルエステラーゼ (FAE、3.1.1.73)、アセチルキシランエステラーゼ (AXE、3.1.1.72) などのアクセサリー酵素は、ヘミセルロースの側鎖を切断することでヘミセルロースの分解を促進する。

セルロース系バイオマスの酵素加水分解では、結晶性セルロースがヘミセルロースやリグニンに囲まれた複雑な構造をしていることや、セルラーゼが最終生成物の阻害を受けることから、多量のセルラーゼが必要となる¹⁸。セルロース系バイオマスを経済的に糖化するためには、原料と酵素の両方のコストを削減し、酵素糖化の性能を向上させることが求められる¹⁹。

植物バイオマスは結晶構造を有するセルロースの周辺をヘミセルロースとリグニンが覆う強固な構造を有しており、このバイオマスを糖化酵素によって糖へと変換するためには、一般的には強力な前処理と、大量の糖化酵素を用いる必要があることが知られている。バイオエタノールに関する経済性分析によると、現在においても酵素コストの更なる低減化が求められている。こういった背景のもの、糖化工程に使用する酵素量を減らすことを目指した糖化酵素の性能向上に関する研究と、糖化酵素の価格自体を下げることを目指した、酵素の安価製造に関する研究の両方が進められている。

糖化酵素の研究においては、最も研究されているセルロース分解菌の 1 つである *Trichoderma reesei* が多く用いられており、この菌が生産する酵素を用いることでセルロースをグルコースにまで分解できることが知られている²⁰。また、この菌の最大の特徴はその高い酵素生産性であり、市販されている糖化酵素の生産菌としても用いられている。このように、*T. reesei* は酵素的性能面、酵素生産能力の両面で優れているという産業上の有用性から、これまでに世界中において酵素、菌株の両面から研究が盛んに行われている。中でも変異育種による酵素生産性の向上は古くから行われてきており、アメリカにおいては高分泌型変異体として RUT-C30 株が、日本では PC-3-7 株が取得されてきている。

セルロース系バイオマスを安価に糖へと変換するためには、酵素の高機能化、すなわちバイオマスをより少量の酵素で分解することが可能な酵素の開発が重要となる。*T. reesei* が生産する糖化酵素についても、酵素の高機能化を目指した試みがなされている。*T. reesei* が生産する酵素は、CBH と EG の両方の活性が高いものの、BGL 活性が低いことが報告されている²¹。BGL 活性が低いと、CBH などによって生じたセロビオースがグルコースにまで分解されず蓄積し、このセロビオースが CBH の生成物阻害を引き起こしてしまい、その結果、バイオマス変換効率が低下することが知られている^{22,23}。この問題を解決するために、BGL を強化する検討がなされており^{24,25}、Zhang らは *T. reesei* が元々保有する BGL1 を強化しており、また Wang らは、*Aspergillus niger* 由来の BGL1 (AnBGL1) を異種発現させた株を構築し、生産酵素が高い紙分解活性を有することを確認している。また、中澤らは *A. aculeatus* 由来の BGL1 (AaBGL1) を *T. reesei* PC-3-7 株に対して、それぞれ *xyn3*、*cbh1*、*egl1* プロモーターにて発現することで、AaBGL1 の発現強度が異なる 3 種の株として X3AB1、C1AB1、E1AB1 株を構築した^{26,27}。これらの株をセルロースとキシランを炭素源として培養することで、それぞれ JN11H、JN12H、JN13H と呼ぶ酵素製剤を製造し酵素的性能の評価を行った結果、JN11H と JN13H は PC-3-7 由来の酵素製剤の 5 分の 1 以下の投与量で、アルカリ処理稲わらを含む様々な基質に対して同等の糖化効率を示したことを報告している^{27,28}。このような研究の結果、糖化のための酵素の投与量は削減されてきているが、それでもなおバイオマス由来糖やバイオエタノールの製造コストに占める酵素コストの割合は依然として高い²⁹。

バイオマス由来糖やバイオエタノールを安価に製造していくためには、糖化の対象となる基質として廃棄物や副産物として生じるバイオマスを利用していくことが重要となる。農業系廃棄物としては、稲わら、麦わら、コーンストーカー、バガスなどが候補として考えられている。この中でもアジア圏においては、稲わらとバガスが多く発生している。バガスはサトウキビから砂糖を含む果汁の抽出後残渣であり、世界では毎年約 2 億 7,900 万トンのサトウキビ残渣（サトウキビバガスおよび葉）が発生していると報告されている³⁰。

本研究では、中澤らが開発した *T. reesei* PC-3-7 株に対し *A. aculeatus* 由来の BGL を導入した菌株、およびこれらの菌が生産する糖化酵素製剤について更なる研究を実施し、これらの酵素の高機能化について実施した。具体的には、アジア圏での発生量が多いバガスをアルカリ処理した基質をモデル基質とし、この基質に対して、*A. aculeatus* 由来 BGL を発現する *T. reesei* が生産する酵素製剤と相乗効果を示す新規バイオマス分解酵素のスクリーニングを行った。その結果、

Penicillium sp. KSM-F532 から Glycoside hydrolase family 10 (GH10) に属する新規キシラーナーゼ PspXyn10 を発見した。更に、この PspXyn10 を発現する *T. reesei* を構築し、この菌株から調製した酵素を JN11H および JN13H と比較し、その性能を評価した。

2-2 材料と方法

(1) 菌株と材料

本研究で使用した菌株を表 2-1 に示した。*T. reesei* PC-3-7 (ATCC 66589) は、協和発酵バイオ株式会社から入手した。*T. reesei* X3AB1、X3AB1 Δ pyr4 (uracil auxotroph)、E1AB1 は、長岡技術科学大学の小笠原教授よりご提供頂いた。これらの菌株はポテトデキストロース寒天 (PDA、Difco Laboratories) プレート上で培養することで維持した。

糖化試験用の基質には、アルカリ処理したバガスを使用した。処理には 50 L リアクター (KMJ-501 MGU、ミツワフロンテック) を用い、沖縄で採取したサトウキビバガス 3 kg に対して 3 L の 1% (w/v; 体積当たりの重量) 水酸化ナトリウム水溶液を加え、120°C で 20 分間処理した。前処理したバガスは、536 × g で 5 分間遠心分離することでスラリーを回収し、pH が中性になるまで水道水で洗浄した。基質の組成は、LAP (Laboratory Analytical Procedure)³¹に従って以下のように実施した。2 段階の酸加水分解を行い、得られたグルコース、キシロース、マンノース、ガラクトース、アラビノース、セロビオースについては、Asahipak NH2P-50 4E 4.6 mm × 250 mm (Shodex) を用い HPLC (Prominence、島津製作所) にて分析した²⁶。その結果、アルカリ処理バガスの組成はセルロースが 51 wt%、ヘミセルロースが 28 wt%、リグニンが 7.8 wt%、灰分が 2.2 wt%であった。なお、本基質および成分情報は、小林良則氏 (バイオインダストリー協会) よりご提供頂いた。

また、*T. reesei* の Xyn3 (TrXyn3) は、矢追克郎氏 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) からご提供頂いた。TrXyn3 は *Pichia pastoris* で生産し、精製されたものを用いた³²。

表 2-1 使用した菌株

菌株	genotype	酵素製剤*
PC-3-7	野生型	
X3AB1	<i>amdS</i> ⁺ , <i>xyn3p::aabg1</i> , Δ <i>xyn3::aabg1</i>	JN11H
E1AB1	<i>amdS</i> ⁺ , <i>eg1p::aabg1</i>	JN13H
X3AB1 Δ pyr4	<i>amdS</i> ⁺ , <i>xyn3p::aabg1</i> , Δ <i>xyn3::aabg1</i> , Δ <i>pyr4</i>	
C1PX10	<i>amdS</i> ⁺ , <i>cbh1p::pspxyn10</i> , Δ <i>cbh1::pspxyn10</i>	
X2PX10	<i>amdS</i> ⁺ , <i>xyn3p::aabg1</i> , Δ <i>xyn3::aabg1</i> , <i>xyn2p::pspxyn10</i>	JNK25H

*10% (w/v) の微結晶セルロースと 2% (w/v) のビーチウッドキシランを含む培地で培養して得られた培養上清を各酵素製剤とした

(2) 酵素の生産

酵素生産のための前培養では、500 mL の三角フラスコに入れた 1% (w/v) のグルコースを含む 50 mL の基本培地³³ (0.14% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2% (w/v) KH_2PO_4 、0.03% (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.03% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% (w/v) ポリペプトン、0.05% (w/v) 酵母エキス、0.1% (w/v) Tween 80、0.1% (w/v) trace element solution、50 mM 酒石酸ナトリウムバッファー (pH 4.0)) に、各菌株の胞子を 10^7 個ずつ接種した。ここで用いた trace element solution は以下のように調製した：100 mL の蒸留水に対して、6 mg H_3BO_3 、26 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、100 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、40 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、8 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、200 mg ZnCl_2 を溶解した。胞子数は、血球計数器を用いて計数した。前培養は 220 rpm、28°C で 2 日間振盪しながら行った。本培養には 250 mL 容ジャーファーマンター Bio Jr.8 (バイオット) を用いた。培地には基本培地 100 mL に対して 10% (w/v) 微結晶セルロースと 2% (w/v) ビーチウッドキシラン (東京化成工業) を加えたものを用い、前培養液 10 mL を接種することで開始した。本培養は 28°C で行い、培地 100 mL に対して 50 mL/min の速度 (0.5 vvm) で空気を通気し、3 ppm の溶存酸素濃度となるよう攪拌にて制御した。pH は、アンモニア水 (5% w/v) を用いて 4.5 に制御した。4 日間の培養後、 $10,000 \times g$ で 20 分間の遠心分離し、上清を 0.20 μm のフィルター (13CP020AN、ADVANTEC) でろ過することで菌体を除去した。この培養上清を酵素製剤として用いた。酵素製剤 JN11H、JN13H および JNK25H は、それぞれ *T. reesei* X3AB1、E1AB1 および X2PX10 株を培養して調製した。培養実験は 3 回の独立した実験として実施した。

(3) バイオマス分解酵素を生産する糸状菌の分離

糸状菌は日本の栃木県にて採取した土壌サンプルから以下の方法で分離した。少量の土壌を滅菌水に懸濁し、分離用培地 (0.5% (w/v) 粉末セルロース (KC フロック W-50、日本製紙)、0.2% (w/v) KH_2PO_4 、0.03% (w/v) 尿素、0.15% (w/v)、酵母エキス、0.25% (w/v) ポリペプトン、0.03% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.03% (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.14% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2.0% (w/v) 寒天、0.002% (w/v) コンゴレッド、0.01% (w/v) クロラムフェニコール) に播種して、28°C で 5 日間培養した。その後、コロニーを採取し、PDA プレートに画線してシングルコロニーを分離した。分離した糸状菌は、1.0% (w/v) 微結晶セルロースと 0.5% (w/v) ビーチウッドキシランを含む 50 mL の基本培地に接種し、500 mL 容三角フラスコにて 220 rpm で振とうしながら 28°C で 5 日間培養した。培養液は $15,000 \times g$ で 10 分間、4°C で遠心分離し、上清を 0.20 μm のメンブレンフィルター (13CP020AN、ADVANTEC) でろ過することで菌体を除去した。その後、pH 5.0 における微結晶セルロースの加水分解活性を指標に、約 110 株のバイオマス分解酵素産生糸状菌を分離した。

(4) バイオマスの糖化

アルカリ処理バガスを経糖化基質として使用した。糖化は 9 mL 容スクリー管 (No. 3、マルエム) を使用した。反応は 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中に乾燥重量換算で 5% w/v となるようにアルカリ処理バガスを加え、そこに実験に合わせて 1.0~2.1 mg-protein/dry-バイオマ

ス (以下 mg/g-バイオマスと記載) となるように酵素を添加して行った。この際の酵素の濃度は、Bradford 法にて測定したものを使用した。Bradford 法は、Quick Start プロテインアッセイ (Bio-Rad) を用いウシ γ グロブリンを標準に用いて測定した。糖化反応は 50°C で 150 rpm にて振とうしながら 72 時間行った。反応後の糖液は 0.20 μm のメンブレンフィルター (13CP020AN、ADVANTEC) でろ過後、多機能バイオセンサ BF-7 (王子計測機器) を用いてグルコースとキシロースの濃度を測定した。バイオマスからのグルコース、キシロースの収率は以下のように計算した。

$$\text{セルロース糖化率 (\%)} = (\text{遊離グルコース量}) \times (162 / 180) / (\text{基質中セルロース量}) \times 100$$

$$\text{キシラン糖化率 (\%)} = (\text{遊離キシロース量}) \times (132 / 150) / (\text{基質中キシラン量}) \times 100$$

実験は 3 回の独立した実験として行い、データは平均値 \pm 標準偏差で示し、Student の t 検定によって p 値が 0.05 未満の場合は統計的に有意であると判断した。

(5) 系統樹解析による菌の同定

KSM-F532 のゲノム DNA は、菌体を物理破碎後、改変 Marmur 法³⁴により抽出した。PCR による増幅は puReTaq Ready-To-Go PCR beads (Amersham Biosciences) を用いて行い、その後 ITS1、5.8S、ITS2 を含む核内リボソーム内転写スペーサー (ITS) 領域の塩基配列を決定した。得られた配列は ChromasPro 1.42 (Technelysium Pty, Ltd.) を用いてアSEMBルし、マルチプルアラインメントには ClustalW³⁵を用いた。その後、MEGA ver.3.1³⁶を用いて、Kimura の 2 パラメータモデルを用いた Neighbor-Joining (NJ) ツリーを構築し、枝の信頼性を評価するために 1000 回のブートストラップサンプリングを行った³⁷。ギャップのある位置や塩基配列が不確かな領域は、系統解析から除外した。これらの DNA 抽出、PCR 増幅、DNA シークエンス、分子系統解析の方法は、株式会社テクノスルガ・ラボが実施した。

(6) SDS-PAGE 分析

培養上清の SDS-PAGE には、AnykD Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels (Bio-Rad) を用いた。泳動は 200 V で 35 分間行い、その後 ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad) を用いて撮影した。タンパク質バンドの分子量は、Image Lab ソフトウェア (Bio-Rad) を用いて推定した。分子量マーカーとして、5 μL の PrecisionPlus Protein Unstained Standard (Bio-Rad) を使用した。特に断りのない限り、各ウェルに 3 μg のタンパク質量となるように泳動を行った。

(7) KSM-F532 株が生産するバイオマス分解酵素の分画

KSM-F532 の培養上清は、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにて分画を行った。HPLC には PLC-561 システム (GL サイエンス) を、カラムには TSKgel G2000SW カラム (21.5 mm \times 300 mm、東ソー) を用いた。10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を用いて 4 mL/min の流速で 5 mg のタンパク質を分離し、UV-VIS 検出器 MU 701 (GL サイエンス) を用いて 280 nm でモニタリングした。分画した各フラクションは SDS-PAGE にて分析した。各フラクションのうち 8 μL を SDS-PAGE 分析に用い、残りは Amicon Ultra-4 3K 遠心フィルタユニット (Merck Millipore) を用いて

濃縮した後にバイオマスの糖化試験に使用した。

(8) 質量分析 (MS) によるタンパク質の同定

KSM-F532 株が生産したタンパク質 8 µg を SDS-PAGE にて分離し、Bio-Safe Coomassie stain (Bio-Rad) で染色した。染色したゲルから分離したバンドを切り出し、トリプシンで消化した後、ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, Inc.) を用いて、リフレクターモード、正極性で TOF/TOF MS 分析を行った。トリプシン消化、TOF/TOF MS 解析、*de novo* 配列解析は、イデア・コンサルタンツ株式会社プロフェニックス事業部が実施した。

(9) RNA-Seq

トータル RNA の抽出は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用い、メーカーのプロトコルに従って行った。得られたトータル RNA は、TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina) を用いて次世代シーケンスライブラリーとした。ライブラリーは、MiSeq プラットフォーム (Illumina) を用いて解析を行った。得られた配列情報は、CLC Genomics Workbench (Qiagen) を用いて、デフォルトの設定でフィルター、アセンブルを実施し、アセンブルによって得られたコンティグは NCBI の Non-redundant protein sequences (nr) に対して BlastX で解析することで類似の配列を解析した。

(10) キシラナーゼのマルチプルアラインメントと系統樹の解析

PspXyn10 のオルソログのアミノ酸配列は NCBI のデータベースから入手した。アラインメントは Genetyx Version 12 ソフトウェア (Genetyx) 上で ClustalW2³⁸ を用いて作成した。アミノ酸配列の系統樹は、Genetyx Version 12 ソフトウェア (Genetyx) を用いて、1000 回のブートストラップサンプリングを行った NJ 法を用いて作成した。

(11) *pspxyn10* 発現カセットの構築

PCR プライマーを表 2-2 に示した。PCR によって増幅されたフラグメントは、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) で反応させることでプラスミドとして合成した。プラスミド、プライマーペア、およびプラスミドの構築に使用したテンプレートを表 2-3 に示した。

表 2-2 使用した PCR プライマー

プライマー名	プライマー配列
Swal <i>cbh1</i> F	5' CTAGAGTATTTAAATGAGCGGCCGAAGACGG 3'
Swal <i>cbh1</i> R	5' TGCAGGTATTTAAATACCTTATGACAAGAGCT 3'
Swal pUC F	5' ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT 3'
Swal pUC R	5' ATTTAAATACTCTAGAGGATCCCCGGGT 3'
<i>amdS</i> F	5' TGCGCACATCATTGGATAGG 3'
<i>amdS</i> R	5' TGCGCACTGGAAACGCAACC 3'
<i>cbh1-amdS</i> F	5' CGTTTCCAGTGCGCAGACCGTCACAAGGGACGCAA 3'
<i>cbh1-amdS</i> R	5' CCAATGATGTGCGCACTCGGCTACGTTGTCATCGT 3'
<i>Pcbh1</i> R	5' GATGCGCAGTCCGCGGTTGA 3'
<i>Tcbh1</i> F	5' TAAAGCTCCGTGGCGAAAGCG 3'
<i>Pcbh1-pspxyn</i> F	5' CGCGGACTGCGCATCATGGTTTGCTTGTCTACCAA 3'
<i>pspxyn-Tcbh1</i> R	5' CGCCACGGAGCTTTAAAGACATTGCGAGTACCAAG 3'
Swal <i>xyn2</i> F	5' CTAGAGTATTTAAATTACAAGTCTCCTCTTTC 3'
Swal <i>xyn2</i> R	5' TGCAGGTATTTAAATTCACGCCTACGCTCCCAA 3'
Swal <i>pyr4</i> F	5' CTAGAGTATTTAAATGCCTCTTCTTTGTGCTTTTCT 3'
Swal <i>pyr4</i> R	5' TGCAGGTATTTAAATATATGGAAGCTGATATCGTCG 3'
<i>xyn2-pyr4</i> F	5' ACAACGAGAAAAGAAGACCCTGGGGCAGGTTGCA 3'
<i>xyn2-pyr4</i> R	5' ATATCTGGTGGATCTAGGGGGCTCTTCTTTTGTGA 3'
<i>pyr4</i> F	5' TTCTTTTCTCGTTGTCTCACTCT 3'
<i>pyr4</i> R	5' AGATCCACCAGATATGTCAGGA 3'
<i>Pxyn2</i> R	5' GTTGATGTCTTCTTGCTTCA 3'
<i>Txyn2</i> F	5' TAAAGGGGGCTCTTCTTTTG 3'
<i>Pxyn2-pspxyn</i> F	5' CAAGAAGACATCAACATGGTTTGCTTGTCTACCAA 3'
<i>pspxyn-Txyn2</i> R	5' GAAGAGCCCCCTTTAAAGACATTGCGAGTACCAAG 3'

表 2-3 使用したプラスミド、及びプラスミドの構築に使用したテンプレートとプライマー

プラスミド	テンプレート	Fw プライマー	Rv プライマー
pUC- <i>cbh1</i>	gDNA of PC-3-7	Swal <i>cbh1</i> F	Swal <i>cbh1</i> R
	pUC118	Swal pUC F	Swal pUC R
pUC- <i>cbh1-amdS</i>	pUC- <i>cbh1</i>	<i>cbh1-amdS</i> F	<i>cbh1-amdS</i> R
	pUC- <i>amdS</i>	<i>amdS</i> F	<i>amdS</i> R
pUC- <i>Pcbh1-pspxyn10-amdS</i>	pUC- <i>cbh1-amdS</i>	<i>Tcbh1</i> F	<i>Pcbh1</i> R
	cDNA of KSM-F532	<i>Pcbh1-pspxyn</i> F	<i>pspxyn-Tcbh1</i> R
pUC- <i>xyn2</i>	gDNA of PC-3-7	Swal <i>xyn2</i> F	Swal <i>xyn2</i> R
	pUC118	Swal pUC F	Swal pUC R
pUC- <i>xyn2-pyr4</i>	pUC- <i>xyn2</i>	<i>xyn2-pyr4</i> F	<i>xyn2-pyr4</i> R
	gDNA of PC-3-7	<i>pyr4</i> F	<i>pyr4</i> R
pUC- <i>Pxyn2-pspxyn10-pyr4</i>	pUC- <i>xyn2-pyr4</i>	<i>Txyn2</i> F	<i>Pxyn2</i> R
	cDNA of KSM-F532	<i>Pxyn2-pspxyn</i> F	<i>pspxyn-Txyn2</i> R

pUC-Pcbh1-pspxyn10-amdS の構築

T. reesei PC-3-7 のゲノム DNA を鋳型とし、*T. reesei cbh1* のプロモーター、ORF、ターミネーター、および 3'側の隣接配列を PCR にて増幅した。この際、プライマーには Swal *cbh1* F および Swal *cbh1* R を用いた。また、pUC118 (タカラバイオ) を鋳型として、プライマー-Swal pUC F および Swal pUC R を用いてインバース PCR を行うことでベクター断片を増幅し、*cbh1* の断片と In-Fusion HD Cloning Kit を用いて In-Fusion 反応させることで pUC-*cbh1* を得た。

A. nidulans のアセトアミダーゼ遺伝子をコードする *amdS* マーカーは、pUC-*amdS* を鋳型とし、プライマーの *amdS* F および *amdS* R を用いて PCR することで取得した³⁹。プラスミド pUC-*amdS* は、長岡技術科学大学の小笠原教授よりご提供頂いた。また、pUC-*cbh1* を鋳型としてプライマー *cbh1-amdS* F および *cbh1-amdS* R を用いて増幅したフラグメントと *amdS* フラグメントを In-Fusion 反応で融合させることで、pUC-*cbh1-amdS* を取得した。

pUC-*cbh1-amdS* を鋳型とし、プライマー-Pcbh1 R と Tcbh1 F を用いて増幅した断片と、KSM-F532 の cDNA ライブラリーを鋳型としてプライマー-Pcbh1-pspxyn F と pspxyn-Tcbh1 R を用いて増幅した pspxyn10 cDNA を In-Fusion 反応で融合させることで、pUC-Pcbh1-pspxyn10-amdS を取得した。

pUC-Pxyn2-pspxyn10-amdS の構築

T. reesei PC-3-7 のゲノム DNA を鋳型とし、*T. reesei xyn2* のプロモーター、ORF、ターミネーター、および 3'側の隣接配列を PCR にて増幅した。この際、プライマーには Swal *xyn2* F および Swal *xyn2* R を用いた。また、pUC118 を鋳型として、プライマー-Swal pUC F および Swal pUC R を用いてインバース PCR を行うことでベクター断片を増幅し、*xyn2* の断片と In-Fusion 反応させることで pUC-*xyn2* を得た。

PC-3-7 のゲノム DNA を鋳型とし、プライマー-pyr4 F および pyr4 R を用いて増幅した pyr4 断片と、pUC-*xyn2* を鋳型とし、プライマー-xyn2-pyr4 F および xyn2-pyr4 R を用いて増幅した *xyn2* ベクター断片を In-Fusion 反応させることで pUC-*xyn2-pyr4* を得た。

pUC-*xyn2-pyr4* を鋳型とし、プライマー-Pxyn2 R と Txyn2 F を用いて増幅した *xyn2-pyr4* ベクター断片と、KSM-F532 の cDNA ライブラリーを鋳型とし、プライマー-Pxyn2-pspxyn F と pspxyn-Txyn2 R を用いて増幅した pspxyn10 cDNA 断片を In-Fusion 反応させることで pUC-Pxyn2-pspxyn10-pyr4 を取得した。

(12) *T. reesei* の形質転換

T. reesei の形質転換は、プロトプラスト-PEG 法³⁹を用いて行った。この際、プロトプラスト作製用酵素として、Novozyme 234 (Novozymes) の代わりに Yatalase (タカラバイオ) を使用した。形質転換したプロトプラストは pyr4 をマーカーとして用いる場合には形質転換培地 (2.0% (w/v) グルコース、18.27% (w/v) ソルビトール、0.5% (w/v) (NH₄)₂SO₄、0.2% (w/v) CaCl₂、0.06% (w/v) MgSO₄、0.21% (w/v) CsCl、0.1% (w/v) Trace element solution、100 mM KH₂PO₄ バッファー (pH

5.5)) に植菌した。*amdS* をマーカーとして用いる際には $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の代わりに 0.06% (w/v) アセトアミドを含む形質転換用培地を使用した。ここで用いた trace element solution は、100 mL の蒸留水に対して 500 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、200 mg CoCl_2 、160 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、140 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を溶解したものをを用いた。28°C で 2 週間培養した後、生育したコロニーを選択プレート (ソルビトールを含まない各形質転換培地) に 28°C で数日間ストリークしてシングルコロニーを分離する操作を 2 回行い、その後シングルコロニーを PDA プレートに移し、28°C で 1 週間、胞子を形成させた。形質転換の可否は、KOD FX Neo (東洋紡) を用いたコロニー PCR によって確認した。コロニー PCR はメーカーのプロトコルに従って行った。

(13) 酵素活性測定

キシラナーゼ活性は、キシランから遊離する還元糖量をアッセイすることで測定した。還元糖量は、Miller の 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 法に従って決定した⁴⁰。キシラナーゼ活性は、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で最終濃度 1.0% (w/v) のビーチウッドキシラン (Megazyme) を用いて、50°C で 5 分間反応させて測定した。反応は 0.5 mL のスケールで行い、同量の DNS 試薬を加えることで反応を停止させた。その後、反応溶液を 5 分間煮沸し、540 nm の吸光度を測定した。キシロース換算で 1 分間に 1 μmol の還元糖を生成する酵素量を 1 U とした。実験は 3 回の独立した実験として実施し、データは平均値 \pm 標準偏差で示した。

合成基質に対する酵素活性は、*p*-ニトロフェニルキシロビオシド (Megazyme) から遊離する *p*-ニトロフェノール量をアッセイすることで測定した。50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で最終濃度 1 mM *p*-ニトロフェニルキシロビオシド (Megazyme) となるようにし、酵素を添加後 50°C で 5 分間反応させた。この際反応は 0.5 mL で行い、同量の 1 M Na_2CO_3 を加えて反応を停止させた。遊離した *p*-ニトロフェノール量は、420 nm の吸光度を測定することで測定した。基質から 1 分間に 1 μmol の *p*-ニトロフェノールが生成する酵素量を 1 U と定義した。

(14) PspXyn10 の精製

PspXyn10 は、*pspxyn10* を組換えた形質転換体 C1PX10 の培養液から精製した。培地には 1.0% (w/v) の微結晶セルロースと 0.5% (w/v) のビーチウッドキシランを含む基本培地を用いた。50 mL/500 mL 容三角フラスコに C1PX10 を植菌し、220 rpm、28°C で振とうしながら 5 日間培養した。その後、培養液を $15,000 \times g$ で 10 分間遠心し、得られた上清を 0.20 μm のメンブレンフィルター (13CP020AN、ADVANTEC) で濾過することで酵素液とした。その後、得られた酵素液から HPLC PLC-561 システム (GL サイエンス) を用いた陰イオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィーを組み合わせることで PspXyn10 を精製した。この際、精製操作はすべて 4°C で行った。陰イオン交換クロマトグラフィーは POROS HQ 20 μm カラム (4.6 mm \times 100 mm、Applied Biosystems) を用いて実施した。カラムを 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した後、酵素液を適用し、溶離液には 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を 1 mL/min の流速で流し、開始から 10 分間で 0 M NaCl \Rightarrow 0.8 M NaCl となるよう線形のグラジエントをかけた。その後、0.8 M NaCl を含

む 10 mM Tris-HCl 緩衝液を 5 分間流すことで吸着した成分を洗い流した。検出は、UV-VIS 検出器 MU701 (GL サイエンス) を用い、280 nm の吸光度をモニタリングすることで行った。分画された画分についてはキシラナーゼ活性を測定し、活性を含む画分については濃縮、脱塩し、Amicon Ultra-15 3K 遠心フィルタユニット (Merck Millipore) を用いて 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) にバッファー置換した。

陰イオン交換クロマトグラフィーで得られた濃縮画分については、TSKgel G2000SW カラム (21.5 mm × 300 mm、東ソー) を用いてサイズ排除クロマトグラフィーに供した。カラムを 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で洗浄した後、濃縮画分をアプライし、溶離液として 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を 4 mL/min の流速で流すことでタンパク質を分画した。分画された画分についてはキシラナーゼ活性を測定し、活性を含む画分については濃縮し、4°C で保存した。精製したキシラナーゼ活性を有するタンパク質が PspXyn10 であることを確認するために、得られた画分を SDS-PAGE にかけてサイズの確認を行った。

(15) PspXyn10 の酵素学的特性

キシラナーゼ活性の最適温度は、基質に 1.0% (w/v) のビーチウッドキシランを用いて測定した。反応は 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で、酵素濃度 1 mg/L となるように希釈して行った。反応は 30°C~90°C の温度で 5 分間行った。

キシラナーゼ活性の最適 pH は、適切な緩衝液 (pH 3.0~pH 5.5 では 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0~pH 7.0 では 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液) 中で、酵素濃度 1 mg/L となるように希釈して行った。反応は 50°C で 5 分間行った。

熱安定性は、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で、酵素濃度 1 mg/L となるように希釈し、30°C~90°C の範囲の温度で 10 分間加熱した酵素液を用いた。加熱した酵素液に基質を添加し、50°C で 5 分間反応させることで、キシラナーゼの残存活性を定量した。

速度論解析については、5 種類の濃度に調整したビーチウッドキシラン (0.5 g/L~8.0 g/L) を用いて、45°C で反応させることで求めた。反応は 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で、酵素濃度 1 mg/L となるように希釈して行った。適切な時間間隔 (1、2、3、5、8 分) で DNS 試薬を添加して酵素反応を停止させ、還元糖生成の初期速度を測定した。実験は 3 回の独立した実験として行った。反応速度の逆数を、対応する基質濃度の逆数に対してプロットし、Lineweaver-Burk プロットの線形回帰分析により、速度論的パラメータを得た。

(16) PspXyn10 の限定的なプロテオリシスによる PspXyn10ΔCBM1 の調製

限定的プロテオリシスにはパパイン (0.5 units/g、和光純薬工業) を用いた。50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 中に、0.1 mg/mL PspXyn10、0.3 mg パパインとなるように調製し、35°C で 2 時間パパインと反応させることで、PspXyn10 の限定的なプロテオリシスを行った。パパインで消化された PspXyn10 は、微結晶セルロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、未反応の PspXyn10 と分離した。この分離工程は、室温で行った。300 mg の微結晶セルロー

スを空の Micro Bio-Spin クロマトグラフィーカラム (Bio-Rad) に充填し、カラムに 1 mL の 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を加えて、 $1,000 \times g$ で 1 分間遠心することでカラムの洗浄を行った。その後、パパインと反応させた PspXyn10 溶液 500 μ L をロードし、 $1,000 \times g$ で 1 分間遠心して、フロースルーを非セルロース吸着画分として回収した。その後、1 M NaCl を含む 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 500 μ L をロードし、 $1,000 \times g$ で 1 分間遠心する工程を 4 回繰り返して、カラムを洗浄した。その後、0.5 mL の Milli-Q 水をロードし、 $1,000 \times g$ で 1 分間の遠心する操作を 3 回行い、全量をまとめてセルロース吸着画分とした。非吸着画分が PspXyn10 Δ CBM であり、吸着画分が PspXyn10 であることを確認するために、これらの画分を SDS-PAGE、キシラナーゼ活性測定、セルロース吸着アッセイに供した。

(17) セルロースの吸着アッセイ

実験は 2 mL のマイクロチューブを用い、1.0 mL の反応系で実施した。50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に対して、5.0 % (w/v) の微結晶セルロース (Avicel PH 101、Sigma-Aldrich) を添加したものと添加していないものを用意し、それぞれに 5 μ g のタンパク質と加え、150 rpm で振とうしながら 50°C で 30 分間インキュベートした。その後、 $10,000 \times g$ で 10 分間、室温で遠心分離して上清を分離し、それぞれのキシラナーゼ活性を測定した。セルロースへの吸着率は、以下の方法で計算した。

セルロース吸着率 (%) = $100 - (\text{セルロースありサンプルの上清のキシラナーゼ活性} / \text{セルロースなしサンプルの上清のキシラナーゼ活性}) \times 100$

吸着実験は 3 回の独立した実験として行い、平均値を示した。

2-3 結果と考察

(1) 各種酵素製剤のアルカリ処理バガスの糖化検討

T. reesei X3AB1 株および E1AB1 株を培養することで得られた酵素製剤 JN11H、JN13H に関してアルカリ処理バガスの糖化性を評価した。各酵素を使用して pH 5.0、50°C で 72 時間糖化を行った。この際、酵素量は 1.0 または 2.0 mg/g-バイオマスで糖化した (図 2-1)。JN11H で処理した際のセルロースとキシランの糖化率はそれぞれ $43 \pm 1\%$ と $46 \pm 1\%$ (1.0 mg/g-バイオマス)、 $73 \pm 1\%$ と $68 \pm 1\%$ (2.0 mg/g-バイオマス) であった。これに対し、JN13H で処理した際はセルロースとキシランの糖化率は、それぞれ $43 \pm 1\%$ と $49 \pm 0\%$ (1.0 mg/g-バイオマス)、 $69 \pm 1\%$ と $70 \pm 2\%$ (2.0 mg/g-バイオマス) であり、いずれの条件においても JN11H と JN13H の間でセルロース糖化率、キシラン糖化率について有意な差は確認できなかった ($p > 0.05$)。

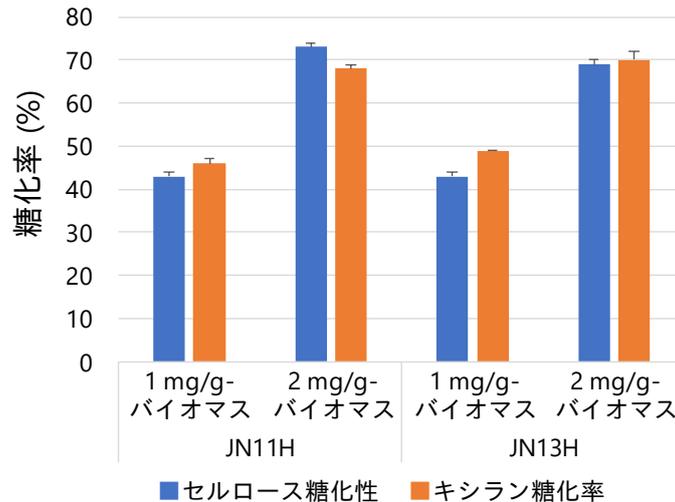


図 2-1 JN11H、JN13H によるアルカリ処理バガスの糖化

糖化は 5% (w/v) のアルカリ処理バガスを用いて、pH 5.0、50°C で 72 時間行った。青はセルロースの糖化率、オレンジはキシランの糖化率を示した。3 回の独立した実験として行い、平均値とエラーバーに標準偏差を示した。

JN11H と JN13H の大きな違いは TrXyn3 の有無であり、JN13H の方が水酸化ナトリウムで処理した稲わらなどのアルカリ処理バイオマスへの使用に適していることが報告されている²⁷。TrXyn3 は GH ファミリー 10 (GH10) に属し、JN11H と JN13H に共通して含まれる *T. reesei* XYN1 (TrXyn1) と XYN2 (TrXyn2) は GH11 に属している⁴¹。GH11 のキシラナーゼはアラビノキシラン骨格の非置換領域を切断するのに対し、GH10 のキシラナーゼは修飾された領域を切断することが報告されている⁴²。中澤らによると、JN13H がアルカリ処理稲わらに対して高い糖化効率を示す理由として、TrXyn1 と TrXyn2 では分解できない領域を TrXyn3 が分解することができ、それらのキシランが除去されることで、分解可能なセルロースが新たに露出することに起因するのではないかと予想している。しかしながら、アルカリ処理バガスにおいては、JN11H と JN13H において糖化性能に大きな違いは確認されなかった。この結果から、アルカリ処理稲わらと比較し、アルカリ処理バガスには TrXyn3 が特異的に分解するキシランの含有量が少ないことが予想された。以上から、アルカリ処理バガスの糖化効率を高めるためには、JN11H 酵素製剤と相乗効果を示す新たな酵素を探索する必要があると考えられた。

(2) *Penicillium* sp. KSM-F532 株の分離

新規糖化酵素の探索を行うことを目的に、栃木県で採取した土壌サンプルから、バイオマス分解酵素を産生する糸状菌の分離を行った。分離された糸状菌はセルロースとキシランを含む基本培地にて培養し、培養液中で再現性よくセルラーゼを生産する糖化酵素生産糸状菌を約 110 株取得した。これらの菌株が生産するバイオマス分解酵素を含む培養液は、バイオマス糖化試験に使用した。

JN11H (1.0 mg/g-バイオマス) に対して各培養液 (0.2 mg/g-バイオマス) を添加してバイオマスの糖化試験を行った。その結果、KSM-F532 株の培養液において JN11H との高い相乗効果が確

認められた。JN11Hのみを使用した場合、セルロースとキシランの糖化率は $42 \pm 3\%$ と $43 \pm 1\%$ (1.0 mg/g-バイオマス)、 $46 \pm 4\%$ と $46 \pm 3\%$ (1.2 mg/g-バイオマス) であったが、JN11H (1.0 mg/g-バイオマス) に対して KSM-F532 株の培養液 (0.2 mg/g-バイオマス) を添加して糖化した場合、セルロースとキシランの糖化率は、それぞれ $60 \pm 2\%$ と $58 \pm 1\%$ となり、JN11H のみ 1.2 mg/g-バイオマスで使用した場合と比較して有意に糖化率が向上した ($p < 0.05$)。

KSM-F532 株は、ITS-5.8S rDNA 領域の塩基配列解析を通じた系統解析を行った。その結果、KSM-F532 株の ITS-5.8S rDNA (Accession No. LC315644) は、*Penicillium sclerotiorum* JCM 22742 株のものと最もよく一致した (95.4%の同一性) ことから、KSM-F532 株は *Penicillium* sp. と同定された。

(3) KSM-F532 からのバイオマス分解酵素の分取と同定

Penicillium sp. KSM-F532 株の培養上清をサイズ排除カラムクロマトグラフィーで分画し (図 2-2(a))、得られた画分を濃縮した。各画分の SDS-PAGE 分析結果を図 2-2(b)に示した。得られた全ての画分を、アルカリ処理バガスの糖化に供した。酵素糖化は、JN11H (1.0 mg/g-バイオマス) に対して各フラクション (0.1 mg/g-バイオマス) を添加したものをを用いて行った。フラクション 20 および 21 を加えた際に、JN11H 単独で処理した際よりも非常に高い糖化効果が確認された (図 2-2(c))。フラクション 20 と 21 には約 55 kDa のタンパク質が共通して存在していたことから、このタンパク質についての質量分析によるタンパク質同定を行った。その結果、LYNDYNLESAGAK、NHLTNVVTHYK、YAWDVVNEGLNDDGTYR という 3 つの内部 AA 配列が決定され、これらの配列は GH ファミリー10 (GH10) のキシラナーゼと高い同一性を持っていたことから、約 55 kDa のタンパク質は GH10 に属する酵素と考えられた。そこで、この 55 kDa のタンパク質を PspXyn10 と命名した。

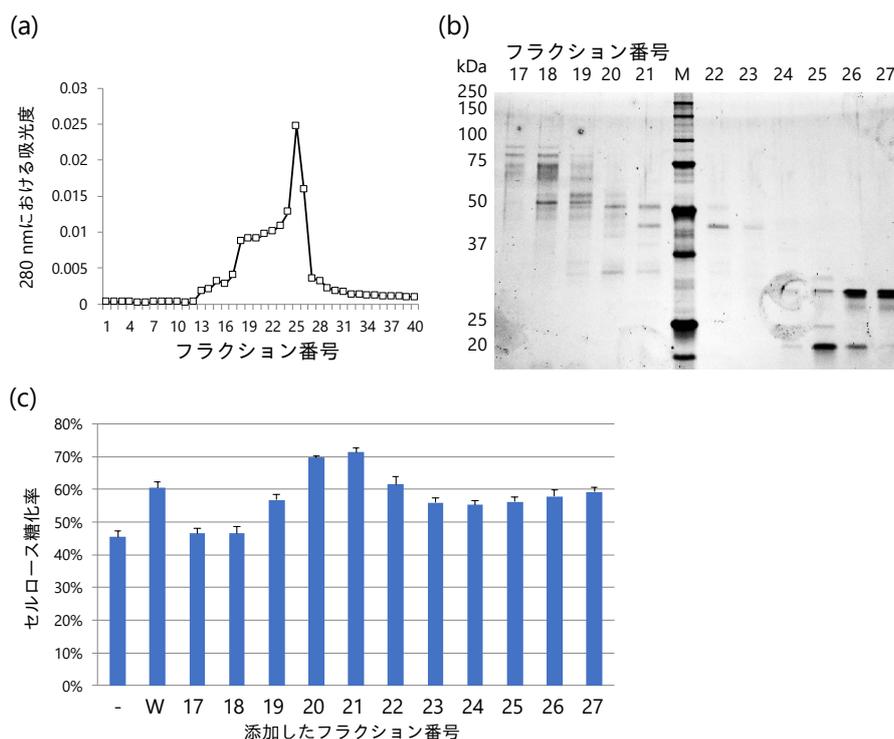


図 2-2 KSM-F532 株が生産した培養上清の分画と各フラクシオンの糖化性

(a) KSM-F532 培養上清のゲルろ過クロマトグラフィーによる溶出プロファイル。(b) 各フラクシオンの SDS-PAGE。フラクシオン 17~27 のみを記載。M：マーカー。(c) JN11H (1.0 mg/g-バイオマス) と各フラクシオン (0.1 mg/g-バイオマス) の混合物を用いたアルカリ処理バガスのセルロース糖化率。3 回の独立した実験として行った平均値と、エラーバーとして標準偏差を示した。-：JN11H のみ、W：分画前の KSM-F532 の培養液を添加。

(4) cDNA 解析による PspXyn10 の完全長の同定

PspXyn10 のアミノ酸配列の全長を明らかにするために、RNA-Seq を用いた cDNA 配列の解析を行った。KSM-F532 株からトータル RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて解析を行ったところ、*pspxyn10* 遺伝子の cDNA 配列全長 (1215 bp、404 アミノ酸をコード) が明らかとなった (図 2-3)。この cDNA 配列は GenBank に寄託されている (Accession No.: LC315645)。

予想されたアミノ酸配列を用いて SignalP プログラムによりシグナル配列の解析を行ったところ、Ser22 と Ala23 の間にシグナル配列切断部位があることが予測された。また、NCBI Conserved Domain Search を用いて PspXyn10 の成熟配列を解析したところ、N 末端から順に、GH10 ファミリー酵素の触媒ドメイン (Leu25~Leu336) と Carbohydrate binding module family 1 (CBM1) ドメイン (Lys372~Leu404) の 2 つのドメインからなるモジュール型酵素であることがわかった。PspXyn10 の成熟アミノ酸配列と NCBI データベースに登録されているタンパク質の配列との比較を行ったところ、*Penicillium brasilianum* (OOQ87260) のキシラナーゼは PspXyn10 と 84% の同一性を持ち、*P. subrubescens* (OKO90312)、*P. antarcticum* (OQD79351)、*Rasamsonia emersonii* CBS 393.64 (XP_013330999) のキシラナーゼはそれぞれ 79%、77%、77% の同一性を持っていた。以上から、本酵素は公開されている配列に対して最大でも 84% 以上の同一性しか示さず、CBM1 を有する新規性の高い GH10 のキシラナーゼであることが明らかとなった。

このようなモジュール構造 (GH10+CBM1) は、公開データベース情報中では *Penicillium*、*Talaromyces*、*Aspergillus* をはじめとするいくつかの糸状菌に確認されたが、この構造は広く保存されてはいなかった。CBM1 ドメインを持つ糸状菌由来キシラーゼとして最も研究されているものの一つは、*Talaromyces cellulolyticus* (GAM37231)由来の xyl10A であり、PspXyn10 はこのキシラーゼと 67%の同一性を持っていた⁴³。

推定シグナルペプチドを含まない PspXyn10 の予測分子量は 40,521 Da であり、SDS-PAGE で推定された 55 kDa の分子サイズよりも小さかった。リンカーと CBM1 ドメインを持つ真菌由来セルラーゼでは、リンカー領域が O 型糖鎖によって高度に修飾されることが報告されており⁴⁴、PspXyn10 でも同様に修飾されていると考えられた。

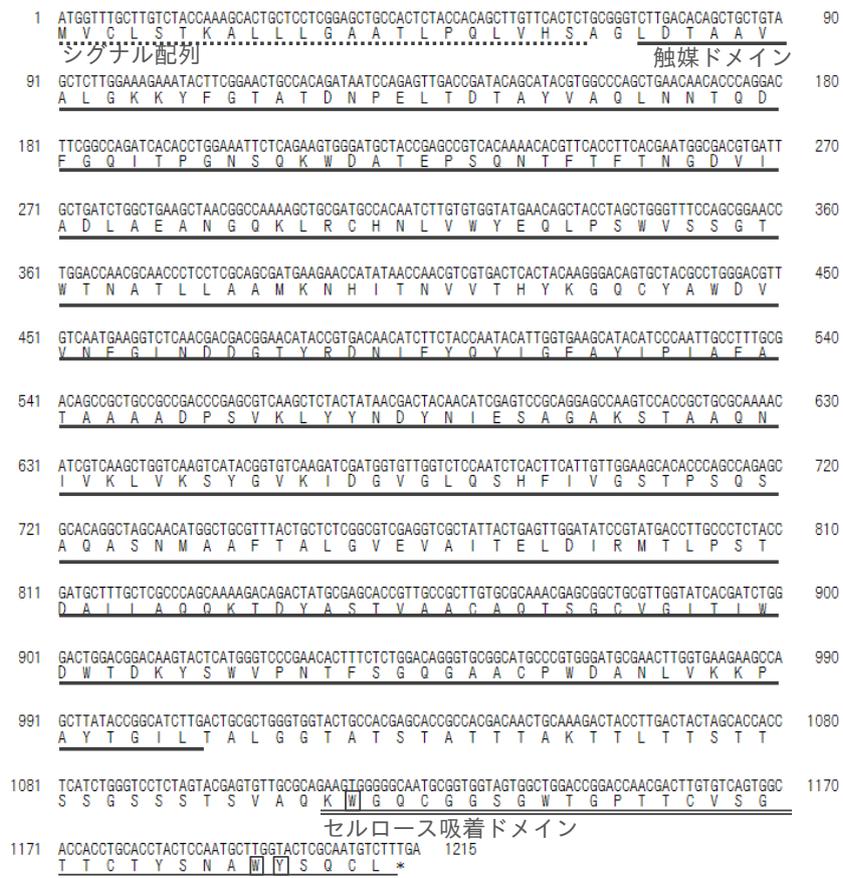


図 2-3 *pspxyn10* の cDNA の塩基配列と推定アミノ酸配列

推定のシグナルペプチド、触媒ドメイン、セルロース結合ドメイン (CBM1) を示した。

(5) PspXyn10 のクローニング、発現、精製

PspXyn10 が KSM-F532 株由来の有効な酵素成分であることを確認することを目的に、異種発現検討を実施した。KSM-F532 株の cDNA から *pspxyn10* 遺伝子を PCR にて増幅し、*cbh1* プロモーターの下流に連結したプラスミド pUC-P*cbh1-pspxyn10-amdS* を構築し、*T. reesei* PC-3-7 株に対して形質転換した。*cbh1* 領域に *pspxyn10* が導入された相同組換え形質転換体をコロニー PCR 解析により選抜し得られた形質転換体を C1PX10 と命名した。この株を培養して得られた上清を SDS-

PAGE で分析したところ、60 kDa の CBH1 タンパク質バンドが消失し、新たに約 55 kDa のバンドが新たに出現することが確認された (図 2-4)。これは、KSM-F532 株の培養上清中の PspXyn10 の分子量とほぼ一致した。

C1PX10 の培養液はイオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーにて分画を行った。得られた精製酵素は、SDS-PAGE にてシングルバンドとなるまで分画できていることを確認した (図 2-4)。

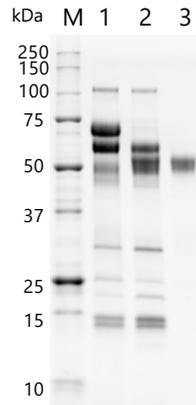


図 2-4 精製 PspXyn10 の SDS-PAGE

SDS-PAGE は 3 μ g のタンパク質をロードした。レーンはそれぞれ M：マーカー、1：PC-3-7 株由来の酵素製剤、2：C1PX10 株由来の酵素製剤、3：精製後の PspXyn10。

(6) PspXyn10 の酵素学的特性

精製した PspXyn10 を用い、酵素学的特性を評価した。最適温度について解析を行った結果、PspXyn10 の最適温度は 75°C であった (図 2-5(a))。また、PspXyn10 の耐熱性についても評価したところ (図 2-5(b))、65°C においても 80%以上のキシラナーゼ活性が維持された。糖化酵素は 50°C 以上の温度にて長期間反応させるという性質上、糖化酵素の耐熱性は重要である。実際、安定性の向上により長時間にわたって酵素活性が維持されることで、糖化に必要な酵素の量が減少することが報告されている^{45,46}。しかし、これまでに報告された真菌由来のキシラナーゼはほとんどが中温性であり、好熱性の真菌キシラナーゼは報告例がほとんどない。*Bispora* sp.のキシラナーゼである Xyn10C においては 80°C で最適活性を示すことが報告されており、これが真菌由来のキシラナーゼで最も高い値であった^{45,47}。PspXyn10 は、*Bispora* sp.由来の Xyn10C に近い至適温度を示し、高温での糖化に適した酵素であると考えられた。

PspXyn10 の活性に対する pH の影響について解析を行った (図 2-5(c))。PspXyn10 の至適 pH は 4.5 であり、pH 3.0 から pH 6.5 の間のキシラナーゼ活性は、pH 4.5 の場合の 50%以上であった。*T. reesei* 由来の酵素製剤は一般的に pH 5.0 付近で使用されるため、PspXyn10 はそれらと併用するのに適していることが示された。

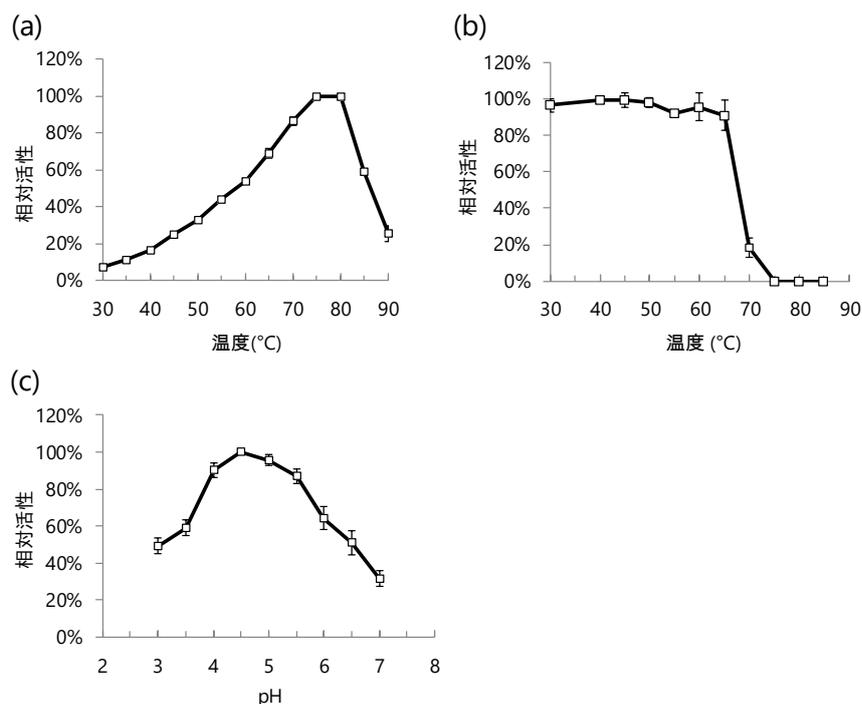


図 2-5 精製 PspXyn10 の酵素特性

(a) PspXyn10 のキシラナーゼ活性に対する反応温度の影響、(b) PspXyn10 の耐熱性、(c) PspXyn10 のキシラナーゼ活性に対する pH の影響

PspXyn10 の速度論解析として K_m および V_{max} を解析した。基質にはビーチウッドキシランを用い、45°C における様々な基質濃度でのキシラナーゼ活性から Lineweaver-Burk プロット（二重逆数プロット）から決定した（表 2-4）。キシラナーゼの K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} 、および k_{cat}/K_m は、それぞれ 2.2 ± 0.3 mg/mL、 332 ± 29 μ mol/min/mg、 221 ± 20 /s、 102 ± 4 mL/s/mg であった。TrXyn3 のビーチウッドキシランに対する K_m と V_{max} はそれぞれ 2.02 mg/mL と 256 μ mol/min/mg であることが報告されており⁴⁸、*T. cellulolyticus* 由来の xyl10A のビーチウッドキシランに対する K_m 、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m はそれぞれ 2.51 mg/mL、232 /s、92.2 mL/s/mg であることが報告されている⁴³。これらの GH10 型キシラナーゼと比較して、PspXyn10 の速度論的パラメータは一般的な GH10 型のキシラナーゼと同程度であると考えられた。

表 2-4 PspXyn10 のビーチウッドキシランに対する速度論的パラメータ

V_{max}	50 ± 4	mg/min/mg
	332 ± 29	μ mol/min/mg
K_m	2.2 ± 0.3	mg/mL
	14.6 ± 1.8	mM
k_{cat}	221 ± 20	/s
k_{cat}/K_m	102 ± 4	/s/mg/mL

(7) 精製 PspXyn10 を用いた JN11H との相乗効果の解析

JN11H と PspXyn10 の相乗効果を確認するため、JN11H (2.0 mg/g-バイオマス) に対する精製 PspXyn10 (0.025~0.1 mg/g-バイオマス) の添加効果をアルカリ処理バガスの糖化性から評価した (図 2-6)。この際、比較として、アルカリ処理稲わらに有効な酵素であることが分かっており、また PspXyn10 と同じく GH10 に属するキシラナーゼである TrXyn3 を用いることとし、JN11H (2.0 mg/g-バイオマス) に対する TrXyn3 (0.025~0.1 mg/g-バイオマス) の添加効果についても評価を行った。JN11H のみを使用した場合、セルロースとキシランの糖化率は、それぞれ $72 \pm 1\%$ と $69 \pm 1\%$ (2.0 mg/g-バイオマス)、 $74 \pm 1\%$ と $73 \pm 1\%$ (2.1 mg/g-バイオマス) であった。これに対し、JN11H (2.0 mg/g-バイオマス) と PspXyn10 (0.1 mg/g-バイオマス) を混合して使用した場合、セルロースとキシランの糖化率はそれぞれ $97 \pm 4\%$ と $95 \pm 3\%$ であり、JN11H のみを用いて同じ酵素量で糖化した際と比べて有意に糖化率が向上した ($p < 0.05$)。したがって、PspXyn10 は JN11H に対して高い相乗効果を有することが確認された。以上から、KSM-F532 株が生産するバイオマス分解酵素中で、JN11H との相乗効果を示した成分は PspXyn10 が主であると推定された。

一方、TrXyn3 (0.1 mg/g-バイオマス) を JN11H (2.0 mg/g-バイオマス) に添加した場合、セルロースとキシランの糖化率はそれぞれ $80 \pm 1\%$ と $80 \pm 1\%$ であり、TrXyn3 を添加した際のセルロース糖化率は、同量の PspXyn10 を JN11H に対して添加した場合と比較して有意に低かった ($p < 0.05$)。

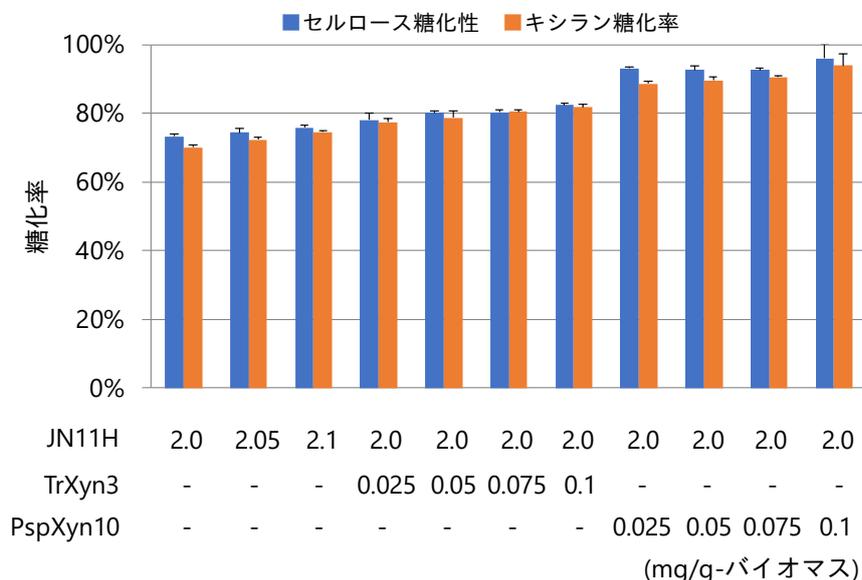


図 2-6 JN11H と TrXyn3 または PspXyn10 の組合せによるアルカリ処理バガスの糖化

糖化は 5% (w/v) のアルカリ処理バガスを用いて、pH 5.0、50°C で 72 時間行った。各酵素の添加量は各バーの下部に示した。青はセルロースの糖化率、オレンジはキシランの糖化率を示した。3 回の独立した実験として行い、平均値とエラーバーに標準偏差を示した。

さらに、PspXyn10 と TrXyn3 の間での相乗効果の有無を確認するために、JN11H、精製 PspXyn10、TrXyn3 の 3 種の酵素を混合し、アルカリ処理バガスの糖化試験を行った (図 2-7)。この際、PspXyn10 と TrXyn3 の総量が 0.1 mg/g-バイオマス、JN11H が 2.0 mg/g-バイオマスとなるように混合して評価を行った。図 2-7 に示すように、PspXyn10 の含有量の増加に伴いセルロースとキシランの糖化率が増加する傾向が確認され、その糖化率は図 2-6 に示した PspXyn10 を JN11H に添加したものとほぼ同等であった。この結果から、PspXyn10 と TrXyn3 の間には相乗効果がないことが示唆され、TrXyn3 が分解可能なキシランは PspXyn10 でも分解可能であることが示唆された。

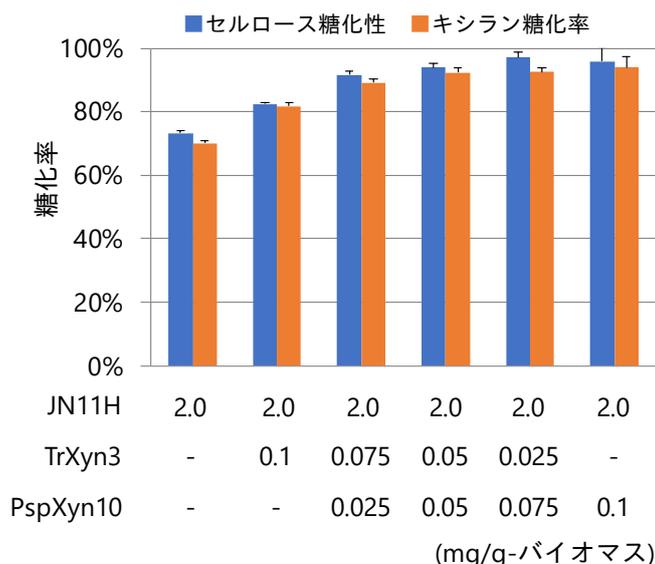


図 2-7 JN11H、TrXyn3、PspXyn10 の 3 種の組合せによるアルカリ処理バガスの糖化

糖化は 5% (w/v) のアルカリ処理バガスを用いて、pH 5.0、50°C で 72 時間行った。各酵素の添加量は各バーの下部に示した。青はセルロースの糖化率、オレンジはキシランの糖化率を示した。3 回の独立した実験として行い、平均値とエラーバーに標準偏差を示した。

(8) 糖化時における CBM1 ドメインの重要性の評価

これまでの検討で PspXyn10 と TrXyn3 において JN11H への相乗効果の面で大きな違いがあることが確認された。PspXyn10 と TrXyn3 の大きな違いとしては、前者が CBM1 ドメインを持つものに対し、後者は持たないことが挙げられる。そこで、糖化における CBM1 ドメインの重要性を検討することを目的に、CBM1 ドメインを持たない PspXyn10 を構築し糖化性の評価を実施した。

T. reesei 由来の CBH1 は、プロテアーゼであるパパインを用いた限定的なプロテオリシスにより、触媒ドメインとセルロース結合ドメインに分解されることが報告されている⁴⁹。そこで、CBM1 ドメインが除去された PspXyn10ΔCBM を得るために、PspXyn10 の限定的なプロテオリシスを検討した。PspXyn10 とパパインを混合して反応させ、その後セルロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーでセルロース吸着画分と非吸着画分を分離した。セルロースカラムに Milli-Q 水を入れることでセルロース吸着画分についても回収を行い、吸着画分、非吸着画分ともに濃縮を行った。非セルロース吸着画分は、SDS-PAGE で 50 kDa のシングルバンドを示した (図

2-8(a)。セルロース吸着画分には、PspXyn10 と同じ大きさの 55 kDa のタンパク質しか含まれていなかった。この結果から、非吸着画分には主に PspXyn10 Δ CBM が含まれ、セルロース吸着画分には PspXyn10 が含まれていることが示唆された。吸着画分と非吸着画分のビーチウッドキシランに対する比活性を評価した結果、それぞれ 315 ± 5 と 388 ± 17 U/mg-protein であった (図 2-8(b))。この結果から、PspXyn10 Δ CBM は PspXyn10 よりも可溶性キシランに対する比活性が向上していることがわかった。さらに、PspXyn10 および PspXyn10 Δ CBM をセルロース吸着アッセイに供した。その結果、この条件では PspXyn10 の約 70% が結晶性セルロース (Avicel PH-101、アビセル) に結合するものの、PspXyn10 Δ CBM はほとんど結合しないことが示された (図 2-8(c))。これらの結果から、PspXyn10 Δ CBM は、キシラナーゼ活性は維持しているが、セルロース結合力を喪失していることが示された。

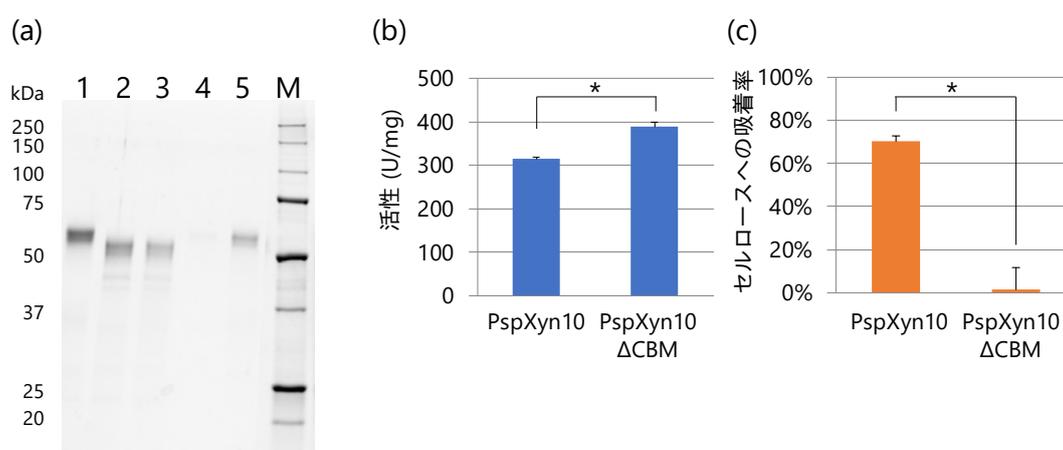


図 2-8 PspXyn10 Δ CBM の特性評価

(a) 限定的なプロテオリシス後の PspXyn10 の SDS-PAGE。レーン 1：精製 PspXyn10、2、3：非吸着画分、4、5：セルロース吸着画分、M：マーカー。(b) PspXyn10 および PspXyn10 Δ CBM のビーチウッドキシランに対するキシラナーゼ活性。3 回の独立した実験として行い、平均値とエラーバーとして標準偏差を示した。統計的有意性は、Student の t 検定で判定した ($*p < 0.05$) (c) PspXyn10 および PspXyn10 Δ CBM の微結晶セルロースへの吸着率。3 回の独立した実験として行った平均値とエラーバーとして標準偏差を示した。統計的有意性は、Student の t 検定で判定した ($*p < 0.05$)

CBM1 ドメインの重要性を評価するため、JN11H に対する PspXyn10、または PspXyn10 Δ CBM の添加効果を、アルカリ処理バガスの糖化性から評価した。JN11H のみを 1.0 mg/g-バイオマスで糖化した際の糖化率が $69 \pm 4\%$ であったのに対し、PspXyn10 0.1 mg/g-バイオマスをも更に添加した場合には、セルロースの糖化率は $92 \pm 2\%$ となり、有意にセルロース糖化率が向上した ($p < 0.05$)。これに対し、PspXyn10 Δ CBM 0.1 mg/g-バイオマスを追加した場合にはセルロースの糖化率は $84 \pm 1\%$ であり、セルロース糖化率は PspXyn10 の添加時と比較して有意に低かった ($p < 0.05$ 、図 2-9)。この結果から、CBM1 ドメインの喪失により PspXyn10 の糖化性能は有意に減少した ($p < 0.05$)。このことは、キシラナーゼ PspXyn10 のセルロース吸着性が、この酵素が示す高い糖化活性の理由の一つであることを示していると考えられた。

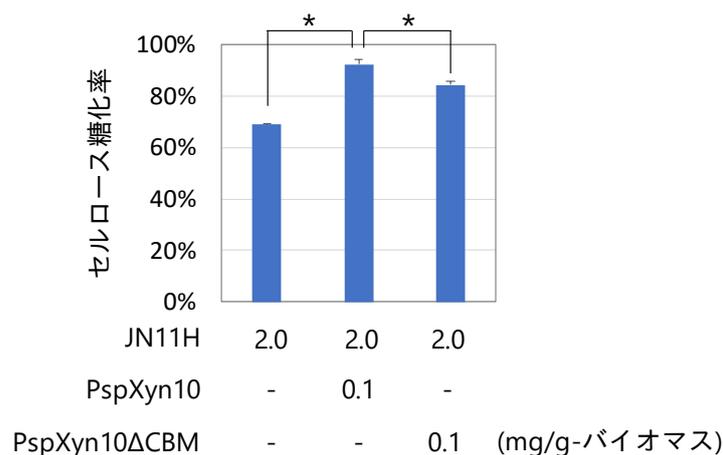


図 2-9 PspXyn10 と PspXyn10ΔCBM のセルロース糖化性への影響

糖化は 5% (w/v) のアルカリ処理バガスを用いて、pH 5.0、50°C で 72 時間行った。各酵素の添加量は各バーの下部に示した。3 回の独立した実験として行った平均値とエラーバーに標準偏差を示した。統計的有意性は、Student の t 検定で判定した (* $p < 0.05$)

今回の結果から、PspXyn10 はアルカリ処理バガスの糖化を促進するが、PspXyn10ΔCBM は PspXyn10 と比較して可溶性キシランに対する活性は増加するものの、セルロースへの吸着性の喪失に伴い、アルカリ処理バガスへの糖化促進効果が低下することが明らかになった。これらの結果から、PspXyn10 がアルカリ処理したバガスの糖化を促進するためには、CBM1 によるセルロースへと吸着すること自体が重要であることがわかった。糸状菌セルラーゼにおける CBM1 の重要性については多くの研究が報告されており、CBM1 を除去すると可溶性基質に対するセルラーゼ活性は低下しないにもかかわらず、不溶性基質に対するセルラーゼ活性は大きく低下することが報告されている^{50,51,52}。さらに、CBH における CBM1 はセルロースの連続的な加水分解を助けることが示唆されている⁵³。しかし、糸状菌由来キシラナーゼについては CBM1 を持つキシラナーゼ自体が珍しく、井上らによってのみセルロースの糖化におけるキシラナーゼの CBM1 の重要性が報告されている⁴³。井上らは、糸状菌キシラナーゼの CBM1 の機能として、不溶性の多糖類表面の有効な酵素濃度を高め、触媒ドメインを基質に標的化することを示唆している。今回の研究においては、TrXyn3 を JN11H に添加した場合、セルロースの糖化率は約 80%で飽和したが、PspXyn10 を JN11H に少量添加した場合、セルロースの糖化率は 90%以上に増加した (図 2-6)。さらに、TrXyn3 と PspXyn10 の間に相乗効果は見られなかった (図 2-7)。これらの結果から、アルカリ処理バガスには、セルラーゼによるセルロースの分解を阻害しているキシランが含まれており、このキシランは TrXyn3 では分解されにくい、PspXyn10 では分解可能であると考えられた。リグノセルロース系バイオマス中のキシランは、セルロースと密接に結合している場合とゆるやかに 3 次元構造を形成している場合があると考えられている⁵³。さらに、一般的なキシラナーゼで分解できるのはゆるやかに結合している部分のみであり、セルロースと密接に結合しているキシランは酵素による加水分解後も残存することが報告されている⁵⁴。また、強固にセルロースに吸着したキシランはセルラーゼによるセルロースの分解を阻害することも報告されている

^{54,55,56}。これらの先行研究と我々の研究から、PspXyn10 はセルロースに強固に結合しているキシランを除去することで糖化効率を促進している可能性があり、このキシランを効率よく除去するためには CBM1 によるセルロース表面への吸着が重要であると考えられた。今回の結果では、PspXyn10 の CBM1 は高糖化性を維持するのに重要であることが明らかとなったが、実際に PspXyn10 が CBM1 を介してどのように糖化効率を向上させるのかについて理解するには、さらなる研究が必要であると考えられた。

(9) PspXyn10 を含む酵素製剤生産菌の構築と評価

セルロース系バイオマスから糖やバイオエタノールを経済的に生産するためには、1 つの菌株を培養するだけで酵素製剤を生産できることが望ましい。そこで、PspXyn10 を含む糖化酵素製剤を生産可能な菌株の構築を行った。

キシラン誘導性高発現プロモーターである *xyn2* プロモーターと *pspxyn10* の cDNA を連結した発現カセット *Pxyn2-pspxyn10* を構築し *T. reesei* X3AB1 Δ pyr4 株へと形質転換を行うことで、X2PX10 と名付けた形質転換体を取得した。この X2PX10 株を 250 mL 容ジャーファーマンターで 4 日間培養することで、JN11H に対して PspXyn10 を更に発現させた酵素製剤である JNK25H を調製した。

PspXyn10 の含有量を解析することを目的に、JNK25H を SDS-PAGE にて分析したが、JNK25H 中に含まれる別のセルラーゼ成分 (EG2) と PspXyn10 の分子量が類似していることから、SDS-PAGE での PspXyn10 の含有量の解析できなかつた。そこで、合成基質 *p*-nitrophenyl xylobioside (pNPX2) に対する精製 PspXyn10、JN11H および JNK25H の酵素活性の比較による PspXyn10 含有量の解析を行った。精製 PspXyn10、JN11H、JNK25H の pNPX2 に対する活性は、それぞれ 361 ± 7 、 0.8 ± 0.1 、 18 ± 1 U/mg であったことから、JNK25H 製剤 1 mg 中に PspXyn10 が約 0.05 mg 含まれていることが推定された。

JNK25H の 1.0 または 2.0 mg/g-バイオマスを用いて、アルカリ処理バガスの糖化性の評価を行った。セルロースとキシランの糖化率は、それぞれ $70 \pm 3\%$ と $60 \pm 1\%$ (1.0 mg/g-バイオマス)、 $90 \pm 3\%$ と $81 \pm 3\%$ (2.0 mg/g-バイオマス) であった。各酵素製剤を用いた場合のセルロースとキシランの糖化率を表 2-5 にまとめた。JN11H および JN13H と比較して、JNK25H は高いセルロースとキシランの糖化率を示し、JNK25H を使用した場合、酵素投与量は JN11H または JN13H の約半分に減らすことができた。この結果から、JNK25H という酵素は、アルカリ処理したバガスの糖化に適しており、X2PX10 という菌株を用いることで、バイオマスからの糖やバイオエタノールの生産を低コストで行うことができると考えられた。

表 2-5 各酵素製剤を用いたアルカリ処理バガスの糖化

酵素製剤	糖化率			
	1 mg/g-バイオマス		2 mg/g-バイオマス	
	セルロース	キシラン	セルロース	キシラン
JN11H	43 ± 1%	46 ± 1%	73 ± 1%	68 ± 1%
JN13H	43 ± 1%	49 ± 0%	69 ± 1%	70 ± 2%
JNK25H	70 ± 3%	60 ± 1%	90 ± 3%	81 ± 3%

2-4 本章のまとめ

セルロース系バイオマスから糖やバイオエタノールを経済的に生産するためには、新規酵素の探索を行った結果、アルカリ処理バガスを基質として用いた際に大きくセルロースの糖化率を向上させることができるキシラナーゼ PspXyn10 を見出した。本酵素は耐熱性が高く、セルロース吸着ドメインである CBM1 を有することが特徴であった。また、CBM1 を限定的なプロテアーゼ処理により除いた PspXyn10 を構築し評価した結果、セルロース糖化性が低下したことから、本酵素はセルロースへと吸着することを介してセルロースの糖化性を大きく向上させていることが明らかとなった。更に、本酵素を含む糖化酵素製剤を生産可能な菌株を構築し、培養して得られた酵素液を用いて糖化を行った結果、本酵素を含まない製剤と比較して飛躍的にアルカリ処理バガスの糖化性が向上することを確認することができた。この結果から、PspXyn10 を酵素製剤に含有させることで、より経済的なセルロース系バイオマスからの糖生産、バイオエタノール生産が実現できると考えられた。

本研究内では、アルカリ処理バガスを題材として検討した。アルカリ処理は主にセルロース系バイオマスからリグニンを溶出させる前処理方法であり、処理後にはセルロース、ヘミセルロースはほとんど含量が変化せずリグニン含量が大きく低下するという特徴がある。逆に、水熱処理や酸処理を用いた場合には、ヘミセルロースが溶解、分解するため、処理後の基質にはセルロースとリグニンが主成分として含まれるようになる。特に強い酸処理を施すと、ヘミセルロースは過分解するほどまで分解・除去される。しかしながら、強い酸処理は環境負荷、コストの負荷が大きく、現在はヘミセルロースが少量残存する水熱処理、弱い酸処理が主流となってきている。

今回発見した PspXyn10 はキシラナーゼでありヘミセルロースに作用する酵素であることから、基質中にヘミセルロースが含まれるアルカリ処理はもちろん、少量のヘミセルロースが残る水熱や弱い酸処理基質などにも効果を発揮すると考えられた。また紙パルプの製造時にはクラフト蒸解といったアルカリ処理を経てリグニンを除去し白色にしていくことから、紙パルプや古紙といった基質に対しても本酵素は有効に働くと考えられた。ここで挙げた前処理基質や原料については現在も主要なバイオリファイナリー原料として考えられていることから、非可食原料からのバイオリファイナリーに対して PspXyn10 は大きく貢献できるのではないかと考えられた。

2-5 参考文献および引用

- 14 Kamm B, Kamm M. Biorefineries--multi product processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007;105:175–204.
- 15 Nagesh M. Industrial Enzymes Market by Type (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases, Other Types), Source, Application (Food & Beverages, Feed, Bioethanol, Detergents, Pulp & Paper, Textiles & Leather, Wastewater Treatment, Other Applications), Form, and Region - Global Forecast to 2026. *MarketsandMarkets*; 2020.
- 16 Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008;35:377–391.
- 17 Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sørlie M, et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science.* 2010;330:219–222.
- 18 Mansfield SD, Mooney C, Saddler JN. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol Prog.* 1999;15:804–16.
- 19 Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;69:627–42.
- 20 Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87:787–99.
- 21 Saloheimo M, Kuja-Panula J, Ylösmäki E, Ward M, Penttilä M. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGLII (Cel1A). *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:4546–53.
- 22 Du F, Wolger E, Wallace L, Liu A, Kaper T, Kelemen B. Determination of product inhibition of CBH1, CBH2, and EG1 using a novel cellulase activity assay. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010;161:313–7.
- 23 Murphy L, Bohlin C, Baumann MJ, Olsen SN, Sørensen TH, Anderson L, et al. Product inhibition of five *Hypocrea jecorina* cellulases. *Enzyme Microb Technol.* 2013;52:163–9.
- 24 Zhang J, Zhong Y, Zhao X, Wang T. Development of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* strain with enhanced β -glucosidase and filter paper activity using strong artificial cellobiohydrolase 1 promoter. *Bioresour Technol.* 2010;101:9815–18.
- 25 Wang B, Xia L. High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei*. *Bioresour Technol.* 2011;102:4568–72.
- 26 Nakazawa H, Kawai T, Ida N, Shida Y, Kobayashi Y, Okada H, et al. Construction of a recombinant *Trichoderma reesei* strain expressing *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 for efficient biomass conversion. *Biotechnol Bioeng.* 2012;109:92–9.
- 27 Nakazawa H, Kawai T, Ida N, Shida Y, Shioya K, Kobayashi Y, et al. A high performance *Trichoderma reesei* strain that reveals the importance of xylanase III in cellulosic biomass conversion. *Enzyme Microb Technol.* 2016;82:89–95.
- 28 Kawai T, Nakazawa H, Ida N, Okada H, Tani S, Sumitani J, et al. Analysis of the saccharification capability of high-functional cellulase JN11 for various pretreated biomasses through a comparison with commercially available counterparts. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2012;39:1741–49.
- 29 Lynd LR, Liang X, Biddy MJ, Allee A, Cai H, Foust T, et al. Cellulosic ethanol: status and innovation. *Curr Opin Biotechnol.* 2017;45:202–11.
- 30 Chandel AK, da Silva SS, Carvalho W, Singh OV. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. *J Chem Technol Biotechnol.* 2012;87:11–20.

- ³¹ Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Technical Report NREL/TP-510-42618. In Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory; 2012.
- ³² Matsuzawa T, Kaneko S, Yaoi K. Improvement of thermostability and activity of *Trichoderma reesei* endo-xylanase Xyn III on insoluble substrates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100:8043–51.
- ³³ Kawamori M, Morikawa Y, Takasawa S. Induction and production of cellulases by L-sorbose in *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1986;24:449–53.
- ³⁴ Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol*. 1961;3:208–18.
- ³⁵ Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673–80.
- ³⁶ Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 2004;5:150–63.
- ³⁷ Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;39:783–91.
- ³⁸ Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947–8.
- ³⁹ Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, Salminen E, Knowles J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*. 1987;61:155–64.
- ⁴⁰ Miller GL. Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*. 1959;31:426–8.
- ⁴¹ Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:D233–238.
- ⁴² Biely P, Vršanská M, Tenkanen M, Kluepfel D. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J Biotechnol*. 1997;57:151–66.
- ⁴³ Inoue H, Kishishita S, Kumagai A, Kataoka M, Fujii T, Ishikawa K. Contribution of a family 1 carbohydrate-binding module in thermostable glycoside hydrolase 10 xylanase from *Talaromyces cellulolyticus* toward synergistic enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8:77.
- ⁴⁴ Harrison MJ, Nouwens AS, Jardine DR, Zachara NE, Gooley AA, Nevalainen H, et al. Modified glycosylation of cellobiohydrolase I from a high cellulase-producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. *Eur J Biochem*. 1998;256:119–27.
- ⁴⁵ Yeoman CJ, Han Y, Dodd D, Schroeder CM, Mackie RI, Cann IKO. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Adv Appl Microbiol*. 2010;70:1–55.
- ⁴⁶ Heinzelman P, Snow CD, Wu I, Nguyen C, Villalobos A, Govindarajan S, et al. A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:5610–5.
- ⁴⁷ Luo H, Li J, Yang J, Wang H, Yang Y, Huang H, et al. A thermophilic and acid stable family-10 xylanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. *Extremophiles*. 2009;13:849–57.
- ⁴⁸ Xu J, Takakuwa N, Nogawa M, Okada H, Morikawa Y. A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998;49:718–24.
- ⁴⁹ Van Tilbeurgh H, Tomme P, Claeysens M, Bhikhabhai R, Pettersson G. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett*. 1986;204:223–7.
- ⁵⁰ Ståhlberg J, Johansson G, Pettersson G. A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose

- based on the two-domain structure of cellobiohydrolase I. *Nat Biotech.* 1991;9:286–90.
- ⁵¹ Srisodsuk M, Lehtiö J, Linder M, Margolles-clark E, Reinikainen T, Teeri TT. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I with an endoglucanase cellulose-binding domain: action on bacterial microcrystalline cellulose. *J Biotechnol.* 1997;57:49–57.
- ⁵² Reinikainen T, Teleman O, Teeri TT. Effects of pH and high ionic strength on the adsorption and activity of native and mutated cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Proteins.* 1995;22:392–403.
- ⁵³ Ding S-Y, Himmel ME. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *J Agric Food Chem.* 2006;54:597–606.
- ⁵⁴ Penttilä PA, Várnai A, Pere J, Tammelin T, Salmén L, Siika-aho M, et al. Xylan as limiting factor in enzymatic hydrolysis of nanocellulose. *Bioresour Technol.* 2013;129:135–41.
- ⁵⁵ Selig MJ, Thygesen LG, Felby C, Master ER. Debranching of soluble wheat arabinoxylan dramatically enhances recalcitrant binding to cellulose. *Biotechnol Lett.* 2015;37:633–41.
- ⁵⁶ Zhang J, Tang M, Viikari L. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. *Bioresour Technol.* 2012;121:8–12.

3 α チューブリン遺伝子破壊株を用いたグルコースからの効率的な糖化酵素生産

3-1 背景

セルロース系バイオマスの主要な構成成分であるセルロースとヘミセルロースは、高等植物の細胞壁成分として CO₂ を固定して生産されるもので、地球上で最も豊富に存在する多糖類であり、脱石化を目指した循環型社会の構築を目指す上で、これらの効率的な利用が求められている。これらの多糖類はセルラーゼやヘミセルラーゼなどの糖化酵素で分解することで糖に変換できることから、この糖化酵素の生産菌として知られる *T. reesei* については、その酵素生産機構について多くの研究がなされている^{57,58,59,60}。

T. reesei は、Schuster らや Bischof らによってレビューされているように、糖化酵素を生産するためには、セルロース、セロビオース、ソフォロースなどの誘導物質が必要であり、これらを含む培地で培養することで、セルロースをグルコースにまで変換可能な複数のセルラーゼを生産することができる。*T. reesei* のセルラーゼおよびヘミセルラーゼ遺伝子は、転写活性化因子 (Xyr1、Ace2、Ace3) と抑制因子 (Ace1、Cre1) によって制御されている^{61,62,63,64,65}。Cre1 は、カーボンカタボライト抑制 (CCR) の制御因子として知られる。*T. reesei* をグルコースを含む培地で培養すると、容易に利用可能なグルコースの資化を優先させるため、Cre1 がセルラーゼとヘミセルラーゼの遺伝子発現を抑制し、セルラーゼの生産量が低下することが知られている。糖化酵素を過剰に分泌する突然変異体として知られる *T. reesei* RUT-C30 株は、変異育種の過程で *cre1* 遺伝子の一部が欠損し、グルコースを含む培地でのセルラーゼおよびヘミセルラーゼの生産性が親株 QM6a よりも高くなっている^{66,67}。同様に、日本で変異育種されてきた PC-3-7 株は、グルコースを含む寒天プレート上でもセルラーゼを生産できる変異体として取得されてきており、同様に *cre1* 変異による機能欠失が起こっていることが確認されている^{33,68}。この *cre1* 欠損株では、グルコース存在下で *cbh1* などのセルラーゼ遺伝子が発現していることが確認されているが⁶⁹、実際にはグルコース濃度依存的にセルラーゼ生産量が激減していくことが報告されており⁷⁰、*cre1* 欠損株を用いても、グルコースの高濃度存在下では糖化酵素生産が抑制されていることが示唆されている。こういったカタボライト抑制の対策として、グルコースを含む糖液を流加するフェドバッチ培養を用い、培地中のグルコース濃度を低く抑えながら糖液を供給することで、グルコースによる酵素生産の抑制を防ぐことができる^{71,72}。しかし、この方法では、培地中のグルコースの蓄積を避けるために糖液の流量を正確に制御する必要があるため、より安定的かつ安価な酵素生産を達成していく上で、*cre1* 欠損株よりも更に CCR に耐性のある菌株構築が望まれている。

チューブリンは真核生物において微小管や中心体を形成するタンパク質として知られる。チューブリンには α -チューブリンと β -チューブリンが含まれ、これらはヘテロ二量体を形成した上で重合してプロトフィラメントを形成する。そしてプロトフィラメントが管状構造に結合することで微小管が形成され、有糸分裂といった細胞の活動の中で重要な役割を果たしている⁷³。Zhao らは真菌における α 、 β -チューブリンの系統解析を行い、真菌が保有するチューブリンを α_1 、 α_2 、 α_3 、 β_1 、 β_2 に分類した⁷⁴。 α_1 -チューブリンは全ての真菌が保有するのに対し、 α_2 -チューブリンは子囊菌類 (Saccharomycetes と Taphrinomycotina を除く) のみが保有し、 α_3 は一部の担子菌のみ

が保有していた。 β チューブリンに関しては β_1 が全ての真菌類に存在し、 β_2 は担子菌類と *Yarrowia lipolytica* のみが保有していた。糸状菌におけるチューブリンの機能については *A. nidulans* の 2 つの α -チューブリン、TubA (α_1 , XP_657920.1) と TubB (α_2 , XP_680839.1) について機能解析がなされている⁷⁵。TubA は核分裂に、TubB は発芽に関与していると考えられており、*A. nidulans* から *tubB* 遺伝子を欠失させても栄養成長や無性生殖には影響がなかったが、有性生殖が発生しなくなることから、*tubB* 遺伝子は有性生殖に必須であると考えられた⁷⁶。その後、*A. nidulans* のゲノム解析がなされ、TubA と TubB の他に更に 2 つの α_2 -チューブリン (計 3 つの α_2 -チューブリン) を保有することが分かっており、他のチューブリンにも別の機能があることが予想される。また、*T. reesei* についてもゲノム解析の結果、 α_1 を 1 つ、 α_2 を 1 つ、 β_1 を 2 つ保有していることが分かっている。

本研究では、これまでの研究で構築されてきた *T. reesei* PC-3-7 に対して *A. aculeatus* 由来の BGL を 3 種のプロモーターにて発現させた 3 種の組換え株について、そのタンパク質生産量を評価したところ、2 つの株でタンパク質生産量が減少する中で、E1AB1 株でのみ分泌タンパク質量が増加するということが明らかとした。そこで E1AB1 株について更なる解析を行ったところ、 α -チューブリンをコードする遺伝子が破壊されていることが明らかとなった。そこで、 α -チューブリン破壊株を再構築し、様々な条件でのタンパク質生産性評価やその際の糖消費速度解析、トランスクリプトーム解析などを実施した結果、 α -チューブリン破壊株において、*cre1* 欠損株から更に CCR が解除されていることが明らかになった。本研究は *T. reesei* において、チューブリンの新たな機能を提唱するとともに、この遺伝子破壊を通じて CCR を克服し、セルラーゼ生産量を増加させた初めての報告である。

3-2 材料と方法

(1) 使用菌株

本研究で使用した菌株を表 3-1 に示した。これらの菌株はポテトデキストロース寒天 (PDA、Difco Laboratories) プレート上で培養することで維持した。

表 3-1 使用した菌株

菌株	説明、genotype	参考文献
PC-3-7 (ATCC 65589)	酵素高生産変異体	33
X3AB1	<i>amdS</i> ⁺ , Δ <i>xyn3</i> :: <i>xyn3p-aabgl1</i>	26
C1AB1	<i>amdS</i> ⁺ , <i>cbh1p-aabgl1</i>	27
E1AB1	<i>amdS</i> ⁺ , <i>egl1p-aabgl1</i>	27
PC-3-7 Δ <i>tubB</i>	<i>amdS</i> ⁺ , Δ <i>tubB</i>	本研究
PC-3-7 Δ <i>tubB</i> :: <i>Pegl1-aabgl1</i>	<i>amdS</i> ⁺ , Δ <i>tubB</i> :: <i>egl1p-aabgl1</i>	本研究

(2) 酵素の生産

酵素生産のための前培養では、500 mL の三角フラスコに入れた 1% (w/v) のグルコースを含む

50 mL の基本培地³³ (0.14% (w/v) (NH₄)₂SO₄、0.2% (w/v) KH₂PO₄、0.03% (w/v) CaCl₂·2H₂O、0.03% (w/v) MgSO₄·7H₂O、0.1% (w/v) ポリペプトン、0.05% (w/v) 酵母エキス、0.1% (w/v) Tween 80、0.1% (w/v) trace element solution、50 mM 酒石酸ナトリウムバッファー (pH 4.0)) に、各菌株の胞子を 5 × 10⁵ 個ずつ接種した。ここで用いた trace element solution は以下のように調製した：100 mL の蒸留水に対して、6 mg H₃BO₃、26 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O、100 mg FeCl₃·6H₂O、40 mg CuSO₄·5H₂O、8 mg MnCl₂·4H₂O、200 mg ZnCl₂ を溶解した。また、胞子数は TC20 全自動セルカウンター (Bio-Rad) を用いて測定した。前培養は 220 rpm、28°C で 2 日間振盪しながら行った。

本培養には、全容 2 L 培養装置 BMZ-01KP2: 以下 2L ジャー (バイオット) を使用した。初期投入培地量は 1 L とした。本培養には、基本培地に対して 10% (w/v) の結晶性セルロース (Avicel PH-101、アビセル) を含有する本培養培地 1 と 10% (w/v) の結晶性セルロースと 2.5% (w/v) のグルコースを含有する本培養培地 2 を使用した。培養は、培地量の 10% の前培養液を植菌し、28°C、溶存酸素濃度 3 ppm、通気量 0.5 vvm、pH 4.5、攪拌数は溶存酸素濃度に応じて可変となる条件にて行った。また pH 調整には 10% アンモニア水を使用した。培養開始から 24 時間ごとに培養液を採取し、20,000 × g で 5 分間遠心分離した上清を 0.20 μm のメンブレンフィルター (13CP020AN、ADVANTEC) を用いてろ過することで菌体を除去した培養液として 4°C で保管した。窒素源としても利用されるアンモニア水の自動供給が止まった後のサンプリングのタイミングを培養の終点とした。回収した培養液中の酵素濃度は Bradford 法にて測定した。Bradford 法は、Quick Start プロテインアッセイ (Bio-Rad) を用いウシ γ グロブリンを標準として測定した。培養実験は 3 回の独立した実験として実施し、Student の *t* 検定によって *p* 値が 0.05 未満の場合は統計的に有意であると判断した。

(3) プレートでの観察

tubB 遺伝子破壊株の形態を調べるために組換え体と親株のプレート上でのコロニーサイズを測定した。PDA プレート上にて 30°C で 4 日間培養し、1 つのコロニーの直径を測定した。コロニーサイズは Student の *t* 検定を用いて比較した。

(4) 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

SEM に供するサンプルは、既報の方法に基づいて作成し⁷⁷に若干の修正を加えた。*T. reesei* を 500 mL の三角フラスコにて、1% (w/v) のグルコースを含む 50 mL の基本培地にて 1 日間、または 1% (w/v) の結晶性セルロースを含む基本培地にて 3 日間、28°C で 250 rpm の振とう培養した。得られた菌糸は、2% (v/v) のグルタルアルデヒドを含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) 中で固定した。固定後の撮影は、花市電子顕微鏡技術研究所が行った。SEM 画像解析のために、70 個の細胞を無作為に選び、ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて細胞の長辺、短辺の長さを測定した。この際、長辺は隔壁から隔壁までの長さを測定した。細胞の長辺、短辺の長さ、比率 (長辺 / 短辺) について測定し、Student の *t* 検定を用いて比較した。

(5) 菌体増殖の解析

酵素生産の際と同様の方法で前培養液を調製した。本培養は 1% (w/v) のグルコースを含む 50 mL の基本培地を含む 500 mL の三角フラスコに対して 5 mL の前培養液を植菌し、220 rpm、28°C で 24 時間振とうしながら行った。適宜 2 mL の培養液を回収し、 $20,000 \times g$ で 5 分間遠心した。その後、上清については 0.20 μm のメンブレンフィルター (13CP020AN、ADVANTEC) にてろ過したものを糖分析に用い、沈殿については 1 mL の蒸留水で 2 回洗浄後に湿潤細胞重量を測定した。

(6) 糖分析

グルコース、キシロース、セロビオースの濃度測定は HPLC を用いた。LaChrom Elite HPLC System (日立ハイテク) を用い、ICSep-ION-300 カラム (東京化成工業) にて分離を行った。分離はイソクラティック溶離で行い、溶離液に 5 mM H_2SO_4 を用いて、0.5 mL/min にて 30 分で行った。

(7) SDS-PAGE

2-2(6) と同等の方法で行った。

(8) インバース PCR 法による挿入カセットの遺伝子座の同定

ゲノム DNA は、Seiboth らのプロトコルを修正したものを用いて抽出・精製した⁷⁸。ゲノム DNA は制限酵素 XbaI および XhoI (Thermo Fisher Scientific) で処理し、Ligation High (東洋紡) を用いてセルフライゲーションさせた。セルフライゲーションさせた DNA を鋳型とし、PrimeSTAR Max (タカラバイオ) を用いて PCR による増幅を行った。増幅断片は pUC118 (タカラバイオ) にクローニングし、挿入された断片の配列を解析した。

(9) *tubB* 遺伝子欠失株の構築

PCR に使用したプライマーを表 3-2 に示した。PCR によって増幅されたフラグメントは、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) で反応させることでプラスミドとして合成した。プラスミド、プライマーペア、およびプラスミドの構築に使用したテンプレートを表 3-3 に示した。得られたプラスミドは制限酵素 *Swa*I によって線状化した後、2-2(12) と同様の手法で形質転換した。

表 3-2 使用した PCR プライマー

プライマー名	プライマー配列
swal <i>tubB</i> F	5' CTAGAGTATTTAAATTTTCGCCTTAGCGGTTCCAT 3'
swal <i>tubB</i> R	5' TGCAGGTATTTAAATTTGGTTCTTGGTTTGGAGGG 3'
swal pUC F	5' ATTTAAATACCTGCAGGCATGCAAGCTT 3'
swal pUC R	5' ATTTAAATACTCTAGAGGATCCCCGGGT 3'
<i>tubBback-amdS</i> F	5' CGTTTCCAGTGCGCAAAGTACCGCGCGCTTGACAA 3'
<i>tubBfront-amdS</i> R	5' CCAATGATGTGCGCATCTGGGAAATGTTCTTTGGC 3'
<i>amdS</i> F	5' TGCGCACATCATTGGATAGG 3'
<i>amdS</i> R	5' TGCGCACTGGAAACGCAACC 3'
<i>tubBfront-Pegl1</i> F	5' AGAACATTTCCCAGATTTCCAGCAATGCGTGGCGTT 3'
<i>tubBfront</i> R	5' TCTGGGAAATGTTCTTTGGCAATA 3'
Primer1	5' TTAATACTCGGCAGTCTCGTCAG 3'
Primer2	5' TCAAAGACCTACTGAACCCG 3'
Primer3	5' ATGAGAGGCGAGGTCAGTGT 3'
Primer4	5' TTTTCGCCTTAGCGGTTCCAT 3'

表 3-3 使用したプラスミド、及びプラスミドの構築に使用したテンプレートとプライマー

プラスミド	テンプレート	Fw プライマー	Rv プライマー
pUC- <i>tubB</i>	gDNA of PC-3-7	swal <i>tubB</i> F	swal <i>tubB</i> R
	pUC118	swal pUC F	swal pUC R
pUC- Δ <i>tubB-amdS</i>	pUC- <i>tubB</i>	<i>tubBback-amdS</i> F	<i>tubBfront-amdS</i> R
	pUC- <i>amdS</i>	<i>amdS</i> F	<i>amdS</i> R
pUC- Δ <i>tubB-Pegl1-aabgl1-amdS</i>	gDNA of E1AB1	<i>tubBfront-Pegl1</i> F	<i>amdS</i> R
	pUC- <i>tubB</i>	<i>tubBback-amdS</i> F	<i>tubBfront</i> R

pUC- Δ *tubB-amdS* の構築

T. reesei PC-3-7 のゲノム DNA を鋳型とし、*T. reesei tubB* のプロモーター、ORF、ターミネーター、および 3'側の隣接配列を PCR にて増幅した。この際、プライマーには swal *tubB* F および swal *tubB* R を用いた。また、pUC118 (タカラバイオ) を鋳型として、プライマーswal pUC F および swal pUC R を用いてインバース PCR を行うことでベクター断片を増幅し、*tubB* の断片と In-Fusion HD Cloning Kit を用いて In-Fusion 反応させることで pUC-*tubB* を得た。

A. nidulans のアセトアミダーゼ遺伝子をコードする *amdS* マーカーは、pUC-*amdS* を鋳型とし、プライマーの *amdS* F および *amdS* R を用いて PCR することで取得した。また、pUC-*tubB* を鋳型としてプライマー*tubBback-amdS* F および *tubBfront-amdS* R を用いて増幅したフラグメントと *amdS* フラグメントを In-Fusion 反応で融合させることで、pUC- Δ *tubB-amdS* を取得した。

pUC- Δ *tubB-Pegl1-aabgl1-amdS* の構築

T. reesei PC-3-7 のゲノム DNA を鋳型とし、*T. reesei egl1* のプロモーター、ORF、ターミネーター、および 3'側の隣接配列を PCR にて増幅した。この際、プライマーには *tubBfront-Pegl1* F およ

び *amdS*R を用いた。また、pUC-*tubB* を鋳型として、プライマー *tubB*back-*amdS*F および *tubB*front R を用いてインバース PCR を行うことでベクター断片を増幅し、*egl2* の断片と In-Fusion 反応させることで pUC- Δ *tubB*-*Pegl1-aabgl1-amdS* を得た。

(10) 酵素活性測定

セルラーゼ活性としては、BGL の酵素活性として pNPGase、CBH1 の活性として pNPLase、EG の活性として CMCase を測定した。ヘミセルラーゼ活性としては、BXL の酵素活性として pNPXase、XYN の活性として pNPX2ase とキシラナーゼ活性を測定した。合成基質に対する酵素活性は、1 mM の *p*-ニトロフェニルグルコピラノシド (pNPG、Sigma-aldrich)、*p*-ニトロフェニルラクトシド (pNPL、Sigma-aldrich)、*p*-ニトロフェニルキシロシド (pNPX、Sigma-aldrich) *p*-ニトロフェニルキシロピオシド (pNPX2、Megazyme) をそれぞれ基質として用い、各基質が分解された際に放出される *p*-ニトロフェノールを定量することで測定した。反応は 50 mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中で 50°C にて 10 分間行った。反応は 0.1 mL のスケールで行った。反応は、等量の 0.4 M NaHCO₃ を加えて停止させた。*p*-ニトロフェノールは 420 nm の吸光度を測定することで定量し、基質から 1 分間に 1 μ mol の *p*-ニトロフェノールを生成する酵素活性を 1 U とした。CMCase およびキシラナーゼ活性は 1% (w/v) のカルボキシメチルセルロース (東京化成工業) または 1% (w/v) のビーチウッドキシラン (東京化成) を基質として用い、DNS 法によって還元糖量を測定した⁴⁰。反応は 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中にて行い、50°C で 10 分間させた。反応は 0.1 mL のスケールで行った。反応は等量の DNS 試薬を加え、100°C で 5 分間加熱することで停止させた。その後、540 nm の吸光度から還元糖量を測定した。グルコース換算で 1 分間に 1 μ mol の還元糖量を生成する酵素量を 1 U とした。

(11) RNA-seq

培養液からミラクロス (メルクミリポア) にて菌糸をろ過し、得られた菌糸は滅菌した蒸留水にて洗浄した。得られた菌糸は、-80°C で凍結後、マルチビーズショッカーにてメタルコーンを用い 1,700 rpm にて 10 秒破碎した。その後、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) のマニュアルに従って Total RNA を抽出した。得られた Total RNA は TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina) によって処理し、MiSeq (Illumina) によって RNA-seq を行った。得られた配列データは CLC Genomics Workbench を用いて、クオリティフィルター、RNA-seq、転写量として RPKM (Reads per kilo base per million mapped reads) の計算を行った。クオリティフィルターされたリードを用い Ensembl Fungi database⁷⁹より取得した *T. reesei* QM6a cds sequences に対してデフォルトの設定で RNA-seq 解析を実施した。RNA-seq 解析は 24 サンプル (=2 株 \times 2 点 \times 2 条件 \times 3 回の独立した実験) のデータを用い 9,115 の cds に対して raw count matrix を作製し、RPKM を算出した。

(12) DEG 解析

発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Gene: DEG) 解析は正規化された raw count matrix を

用い R (ver. 3.6.1)⁸⁰と DESeq2 package⁸¹を用いて行った。 q 値 (調整済み p 値、adjusted p -value) < 0.01 となる遺伝子を DEG として判定した。

(13) GO エンリッチメント解析

GO (Gene Ontology) エンリッチメント解析は、R (ver. 3.6.1) と DEG における遺伝子長の偏りを調整できる Wallenius の非中央超幾何分布をベースとする GOseq package⁸²を用いて実施した。この際使用したコードについては、5-1 に示した。各遺伝子に対応する GO のアノテーションは JGI database⁸³より取得した。 p 値 < 0.01 となる GO については、DEG 中において有意に濃縮されていると判定した。

(14) 糖消費速度解析

T. reesei の培養は、500 mL の三角フラスコに入れた 1% (w/v) のグルコースを含む 50 mL の基本培地に対して 5×10^5 個胞子を植菌し、28°C、220 rpm にて 48 時間振とう培養を行った。その後、終濃度 0.2% となるように、グルコース、キシロース、セロビオース、グルコース+セロビオースを添加し、振とう培養を継続した。添加後は適宜サンプリングを行い、培養上清中の各糖濃度を HPLC にて測定した。

3-3 結果と考察

(1) Aabgl1 高発現組換え株の酵素生産性評価

A. aculeatus 由来の *bgl1* 遺伝子 (*aabgl1*) をそれぞれ *xyn3*、*cbh1*、*egl1* プロモーターの制御下で高発現させた組換え株 X3AB1、C1AB1、E1AB1 の 3 種について培養し、BGL の高発現が *T. reesei* の糖化酵素生産に及ぼす影響を評価した。なお、使用した X3AB1 株では、*xyn3* 遺伝子座に *aabgl1* 発現カセットが相同組換えされているが、C1AB1 株および E1AB1 株については、*aabgl1* カセットが非相同的にゲノム中に挿入されている。

これらの菌株は、炭素源として 10% (w/v) の結晶性セルロースと 2% (w/v) のビーチウッドキシランを含有する基本培地を用い、2L ジャーにて酵素生産培養を行った。その結果を図 3-1 に示した。X1AB1 では 14.7 g/L、C1AB1 は 15.1 g/L の酵素が生産され、PC-3-7 の酵素生産量 (16.0 g/L、 $p < 0.05$) よりも生産性が低下した。これに対し、E1AB1 では 17.4 g/L の酵素が生産され、PC-3-7 の生産性よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。

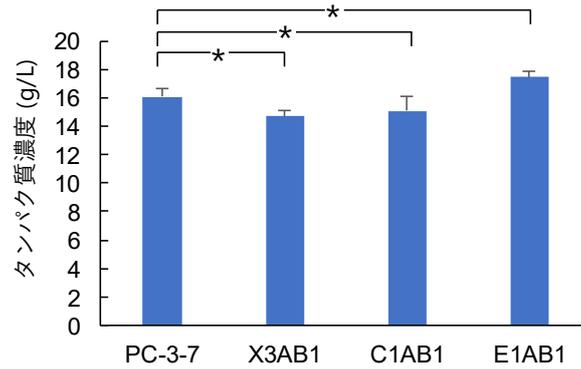


図 3-1 PC-3-7 と *aabgl1* 組換え株の酵素生産性

10% (w/v)の微結晶セルロースと2% (w/v)のビーチウッドキシランを炭素源として用いて酵素生産を行った。データは3回の独立した実験として取得し、平均 ± 標準偏差で示した。統計的有意性は、Student の *t* 検定で判定した (**p* < 0.05)

(2) E1AB1 株における *aabgl1* 発現カセットの導入部位の特定

E1AB1 株における酵素生産性が向上した理由を解析することを目的に、インバース PCR 法を用いた *aabgl1* 発現カセットの挿入遺伝子座の特定を行った。その結果、図 3-2 に示すように、 α -チューブリン B をコードする遺伝子 (gene ID: 120830、以下 *tubB*) がノックアウトされる形で *aabgl1* 発現カセットが挿入されていた (図 3-2(a))。

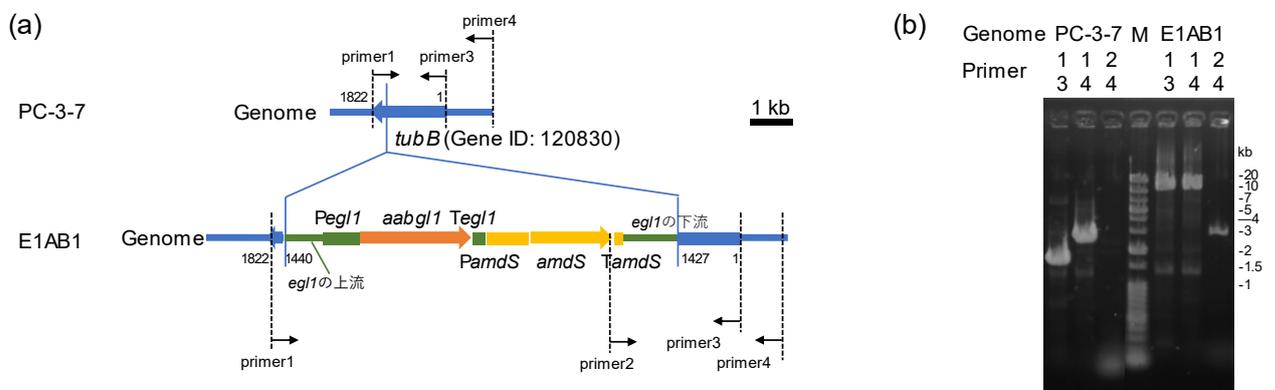


図 3-2 E1AB1 株における *aabgl1* 発現カセットの挿入箇所解析

(a) PC-3-7 と E1AB1 における *tubB* 遺伝子座周辺のゲノムマップ。矢印は遺伝子とその転写方向を、四角はプロモーター領域、ターミネーター領域を示し、青、緑、黄、オレンジはそれぞれ *tubB*、*egl1*、*amdS*、*aabgl1* に起因する配列であることを示した。挿入個所の決定に用いたプライマーのアニーリング箇所については黒矢印で示した。
 (b) PCR による挿入箇所の同定。各レーンの上部には、鋳型として使用したゲノムと使用したプライマーを示した。M: マーカー (Gene Ladder Wide 2、ニッポンジーン)

上記の挿入箇所を確認することを目的に、PCR によるチェックを行った。*tubB* のオープンリーディングフレーム (ORF) 全長について PCR で増幅を行ったところ PC-3-7 のゲノムからは全長サイズが増幅されたのに対し E1AB1 のゲノムからは *aabgl1* 発現カセットが挿入された *tubB* の ORF のサイズの PCR 断片の増幅が確認された (図 3-2(b))。また、*aabgl1* 発現カセット中の *amdS* が

らゲノム上の *tubB* の上流までの PCR 増幅については E1AB1 でのみ認められた。以上から、*aabgl1* 発現カセットは *tubB* 遺伝子中に挿入されていることが示された。これらの結果から、E1AB1 株の高い酵素生産性は、*tubB* 遺伝子のノックアウトに関係していると考えられた。

α -チューブリンは β -チューブリンと重合して微小管を形成しており、またゲノム解析の結果、*T. reesei* には 2 つの α -チューブリン遺伝子 (gene ID : 120789 および 120830) が存在することがわかっている⁷⁴。微小管は真核生物の細胞骨格の主要な構成要素であり、有糸分裂などの多くの必須の細胞プロセスにて機能しているが⁷³、E1AB1 株では成長速度やグルコース消費速度の低下といった細胞増殖への影響は観察されなかった (図 3-3)。

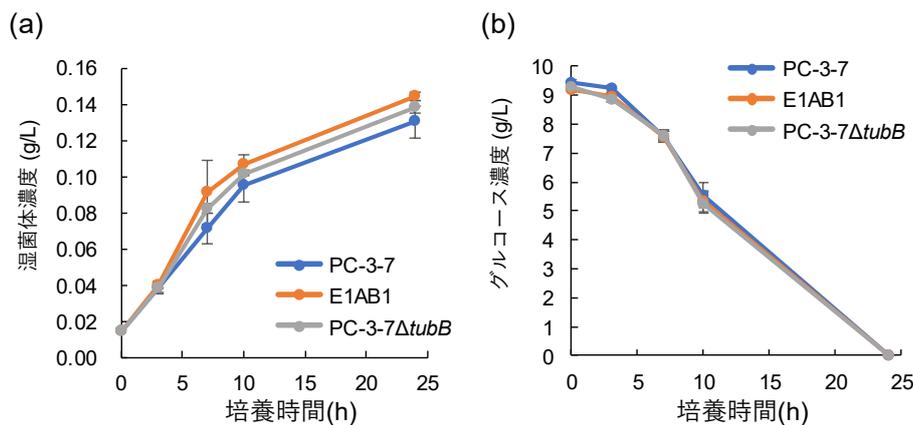


図 3-3 PC-3-7、E1AB1、PC-3-7 Δ *tubB* のグルコース培地中での菌体増殖とグルコース消費

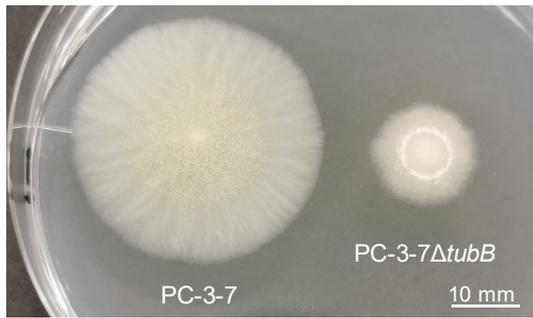
(a) 湿菌体濃度、(b) 培養液中のグルコース濃度。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均 \pm 標準偏差を示した。

(3) *tubB* 遺伝子欠失株の構築

E1AB1 株の酵素高生産性が *tubB* 遺伝子破壊による影響かを調べるため *tubB* 遺伝子の欠失株を構築した。PC-3-7 株に対して、pUC- Δ *tubB*-*amdS* を形質転換することで、*tubB* 遺伝子の ORF を *amdS* マーカーで置換した株として PC-3-7 Δ *tubB* を構築した。また、PC-3-7 株に対して、pUC- Δ *tubB*-*Pegl1*-*aabgl1*-*amdS* を形質転換することで、*tubB* 遺伝子の ORF を欠失させつつ *egl1* プロモーターで *aabgl1* を高発現させた株として、PC-3-7 Δ *tubB*::*Pegl1*-*aabgl1* を構築した。

tubB 遺伝子の欠損が菌の形態に及ぼす影響を観察するため、PDA プレート上における PC-3-7 および PC-3-7 Δ *tubB* の生育速度、および形状の観察を行った。PDA プレート上の菌糸の形態を図 3-4(a)に、コロニーサイズの経時変化を図 3-4(b)に示した。PC-3-7 Δ *tubB* の上でのコロニーの広がる速度は PC-3-7 よりも遅かった。しかし、液体培地中での湿菌体重量については PC-3-7 と PC-3-7 Δ *tubB* においては大差がなかった (図 3-3)。

(a)



(b)

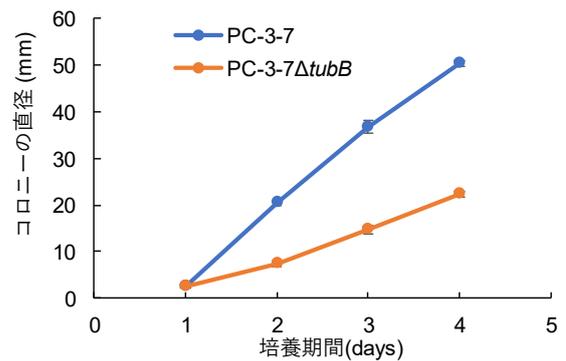


図 3-4 PC-3-7 および PC-3-7ΔtubB のコロニー形態

(a) PDA プレート上にて 30°C で 3 日間培養した際の PC-3-7 および PC-3-7ΔtubB のコロニー、(b) PDA プレート上でのコロニーの直径の経時変化。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均 ± 標準偏差を示した。

続いて、グルコースまたはセルロースを含む液体培地で培養した際の PC-3-7ΔtubB の菌糸の形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて PC-3-7 と比較した (図 3-5)。グルコースを炭素源とした液体培地で培養した PC-3-7 と PC-3-7ΔtubB については、SEM 画像において明確な違いは観察されなかった (図 3-5(a)、(b))。しかし、セルロースを炭素源とした液体培地で培養した場合、PC-3-7ΔtubB の SEM 画像において丸みを帯びた菌糸が頻繁に観察された (図 3-5(c)、(d))。そこで、各 SEM 画像からランダムに選んだ 70 個の細胞の長辺と短辺の平均値を表 3-4 に示した。グルコースで培養した PC-3-7ΔtubB の細胞の長辺は PC-3-7 よりも長かった。セルロースで培養した際には、PC-3-7ΔtubB の細胞の短辺は PC-3-7 よりも有意に大きかった。また、長辺/短辺については、PC-3-7ΔtubB の長辺/短辺がグルコースで培養した場合には PC-3-7 よりも有意に大きく、セルロースで培養した場合は有意に小さかった。これらの結果から、液体培養を行った際には tubB 遺伝子欠損株はグルコースで培養した際にはより長い形態をとるが、セルロースを炭素源とした培養する際には丸みを帯びた形態をとることがわかり、tubB の遺伝子破壊は液体培養時には菌体増殖にはほとんど影響を及ぼさないが、細胞形態には影響を及んでいることが示唆された。

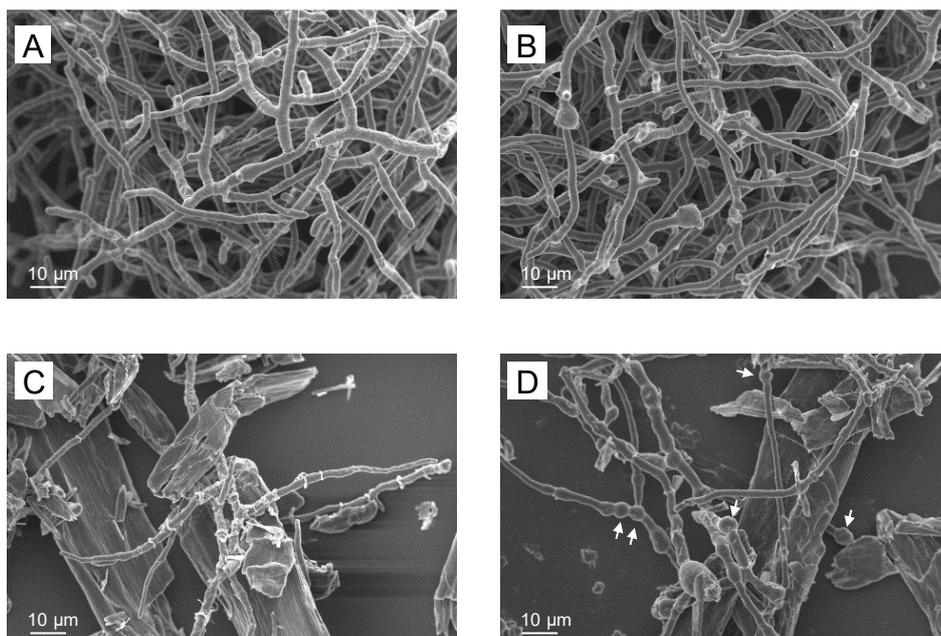


図 3-5 PC-3-7 および PC-3-7 Δ tubB の SEM 画像

1% (w/v)グルコースを含む液体培地で 1 日間 (A および B) または 1% (w/v)セルロースを含む液体培地で 3 日間 (C および D) 培養した際の PC-3-7 (A および C) および PC-3-7 Δ tubB (B および D) 菌糸体の SEM 画像。D における白矢印は丸みを帯びた菌糸を示す。

表 3-4 PC-3-7、PC-3-7 Δ tubB の形態学的特徴

	グルコース含有培地		セルロース含有培地	
	PC-3-7	PC-3-7 Δ tubB	PC-3-7	PC-3-7 Δ tubB
細胞の長辺 (μm)	12.0 \pm 5.3*	16.9 \pm 8.4*	11.4 \pm 4.0	11.2 \pm 5.7
細胞の短辺 (μm)	2.5 \pm 0.5	2.3 \pm 0.4	2.1 \pm 0.4*	3.2 \pm 1.0*
長辺/短辺	4.9 \pm 2.2*	7.7 \pm 4.1*	5.6 \pm 2.1*	4.0 \pm 2.7*

*は、同じ培地条件の株間で t 検定によって $p < 0.01$ で有意差であることを意味する。

(4) tubB 遺伝子欠失株の酵素生産性、およびグルコースの酵素生産への影響

作製した *tubB* 欠失株を用い、10% (w/v)のセルロースと 2% (w/v)のキシランを炭素源として用い培養を行い、酵素生産性を比較した (図 3-6)。酵素生産性の経時変化を図 3-6(a)に、培養終了時点での酵素生産性を図 3-6(b)に示した。*tubB* 遺伝子欠失株の酵素生産性は 17.4 g/L~19.5 g/L であり、親株である PC-3-7 の 16.0 g/L と比較して有意に高い酵素生産性を示した。この中でも PC-3-7 Δ tubB が最も生産性を示した。また、E1AB1 と PC-3-7 Δ tubB::*Pegl1-aabgl1* の培養は 120 時間で終了したが、PC-3-7 と PC-3-7 Δ tubB では 144 時間を要した。これらの違いは AaBGL を発現させているかどうかであることから、AaBGL 高発現株においては、誘導物質のセルロースが早期に消費され、結果的に酵素生産期間が短くなると考えられた。

また、*tubB* 遺伝子欠失株においては、酵素生産速度が PC-3-7 よりも高かった。これらの結果から、*tubB* 遺伝子の欠失は、酵素生産量と酵素生産速度の両面で向上することがわかった。

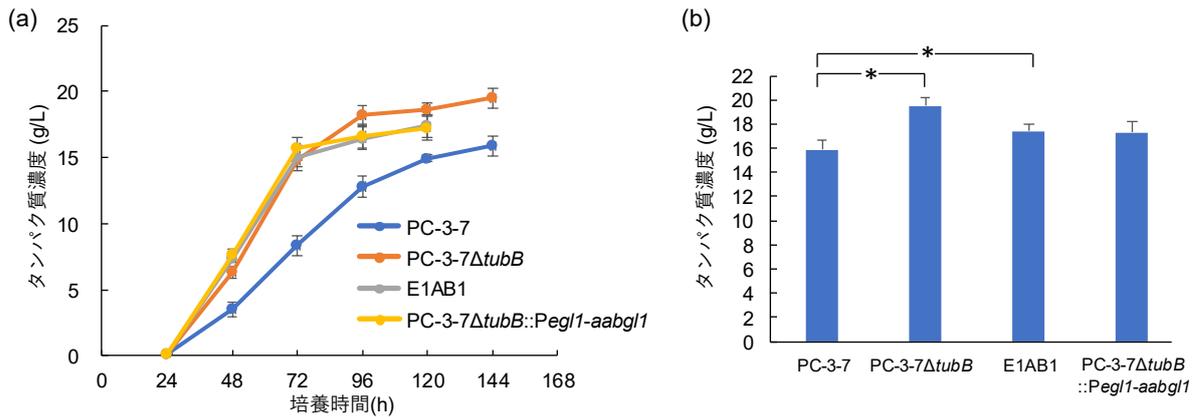


図 3-6 *tubB* 欠損株と PC-3-7 との酵素生産性の比較

(a) 10% (w/v)の結晶性セルロースと 2% (w/v)のビーチウッドキシランを炭素源として用いて際のタンパク質濃度の経時変化、(b) 培養終了時のタンパク質濃度。データは3回の独立した実験として実施し平均 ± 標準偏差として示した。統計的有意性は Student の *t* 検定で判定した (* $p < 0.05$)。

AaBGL 高発現株においては AaBGL が培地中に多量に分泌生産されているため、炭素源かつ誘導物質として用いたセルロースからグルコースが遊離しやすくなっていると考えられた。3-3(1)において、X3AB1、C1AB1 の2株においては酵素生産性が低下していたが、この要因として AaBGL の高発現によるグルコース遊離量の上昇に伴ってカタボライト抑制が引き起こされたと考えた。そこで、*tubB* 遺伝子欠失株の評価においては、セルロースでの培養時の生産性評価だけでなく、グルコース存在下における酵素生産性評価についても実施した。

PC-3-7 と PC-3-7Δ*tubB* について、10% (w/v)結晶性セルロースのみ、または 10% (w/v)結晶性セルロース + 2.5% (w/v)グルコースの2条件で培養評価を行った。2L ジャーで 120 時間培養し酵素生産性を評価した。結果を図 3-7 に示した。(a)、(c)、(e)には結晶性セルロースのみで培養した際の、(b)、(d)、(f)には結晶性セルロースとグルコースを用いて培養した際の、酵素生産性、培養時の排気 CO₂ 濃度推移、上清中のグルコースとセロビオース濃度を示した。それぞれの図から読み取れることを以下に示した。

(a)結晶性セルロースのみで培養した際の酵素生産性では、PC-3-7Δ*tubB* では約 15 g/L の生産性を示し、PC-3-7 における約 7 g/L よりも有意に高い生産性を示した。(b)の結晶性セルロースとグルコースを用いたで培養した際の酵素生産性では、PC-3-7Δ*tubB* においては結晶性セルロースのみで培養した際と比較し、酵素生産性の低下がほとんど確認されないのに対し、PC-3-7 においては大きく生産性が低下する傾向が確認された。

T. reesei においてはカタボライト抑制に関与し、グルコース存在下においてセルラーゼ類の転写を抑制する転写因子である Cre1 が知られているが、PC-3-7 においては変異育種の過程で Cre1 に変異が導入されており、カタボライト抑制はほとんど解除されていることが Porciuncula らによって報告されている⁶⁸。実際、Porciuncula らによると、PC-3-7 から変異型の *cre1* 遺伝子を更に完全欠損させても、生産性が若干向上する程度であり、変異により機能はほぼ失われていることが報告されている。しかしながら、今回の結果から、PC-3-7 では 2.5%のグルコースが存在する条

件で、大きく酵素生産性が低下したことから、グルコースによるカタボライト抑制は完全な解除には至っていないと考えられた。また、*T. reesei* の工業生産株として利用されている RUT-C30 株については、その変異育種の過程で Cre1 が欠損していることが知られている。Li らはこの株に対して β グルコシダーゼを導入した変異株 SEU-7 株を用い、グルコース存在下における酵素生産性を評価しているが、1%のグルコースによって培養液中の酵素活性が大きく低下することを報告している⁷⁰。このことから、一般的に Cre1 の機能欠失や破壊のみでカタボライト抑制が解消されることが報告されているが、グルコースによる酵素生産性の低下については解消していないと考えられた。これに対し、PC-3-7 Δ tubB においては 2.5%のグルコース存在下においても、酵素生産性がほとんど低下することなく生産が可能であることから、グルコースに対する耐性を獲得していることが示唆された。

(c)の結晶性セルロースのみで培養した際の排気中 CO₂ 濃度の変化を見た場合、PC-3-7 Δ tubB の方が PC-3-7 よりも高い値を維持する傾向が確認された。結晶性セルロースのみで培養した際には、排気 CO₂ はセルロースの分解速度とほぼ一致すると考えられることから、排気 CO₂ が高く推移する PC-3-7 Δ tubB の方がよりセルロースを早く分解し、糖として利用できていると考えられた。

(e)の上清中のグルコース、セロビオース濃度について見ると、培養 24 時間までは、PC-3-7 で 4.5 g/L、PC-3-7 Δ tubB で 2.8 g/L 程度のセロビオースが蓄積していた。このことから培養 24 時間までは菌体が消費するセロビオース量よりもセルロースから遊離するセロビオース量の方が多い状態であることが示唆された。また、PC-3-7 の方が多くのセロビオースを蓄積していたが、排気 CO₂ が低かった。ここから、PC-3-7 は 24 時間時点では十分に生育できておらず、セロビオースを資化しきれていないことが示唆された。

(d)結晶性セルロースとグルコースで培養した際の排気中 CO₂ 濃度の変化では、(c)と異なり、PC-3-7 の方が高速で排気 CO₂ が上昇する傾向が確認された。その後 22 時間程度で急激に排気 CO₂ が低下し、再度上昇していく様子が確認された。これに対し、PC-3-7 Δ tubB では PC-3-7 よりも排気 CO₂ がゆっくりと上昇し、28 時間を過ぎて徐々に排気 CO₂ が減少していった。以上から、PC-3-7 と PC-3-7 Δ tubB ではグルコース存在下での糖の消費挙動が大きく異なることが明らかとなった。

(f)結晶性セルロースとグルコースで培養した際の上清中の糖組成を見ると、興味深いことに培養 24 時間時点で両株ともほとんどグルコースは消費しきっており、28 時間以降では上清中にグルコースはほぼ検出されなかった。それにも関わらず、PC-3-7 は 48 時間以降もほとんど酵素生産がされなかった。また PC-3-7 においてセロビオースは排気 CO₂ のピーク以降に検出されはじめ、培養 60 時間においても上清中に残存していた。これに対し、PC-3-7 Δ tubB ではグルコースを消費しきっていない培養 24 時間時点で 3.6 g/L のセロビオースが検出された。これらの結果から、結晶性セルロースとグルコースで培養した際には、PC-3-7 ではグルコースを高速で消費し、その後グルコースが枯渇してからセルラーゼが生産され、それに伴ってセロビオースが遊離し始めるもその後酵素生産が継続されないと考えられた。また培養 22 時間における排気 CO₂ の急激な低下は、グルコースが枯渇し、消費する炭素源がセルロース由来の糖に切り替わったからと考えられた。これに対し、PC-3-7 Δ tubB ではグルコースが残存している間にもセルラーゼが生産され、

これに伴ってセロビオースが蓄積しており、グルコースが枯渇した後もセロビオースにスムーズに炭素源の切り替えが行われたことから、排気 CO₂ の急激な低下は生じなかったと考えられた。

以上の結果から、PC-3-7 Δ tubB においてはグルコース存在下でもセルラーゼ生産していることが示唆され、このことはカタボライト抑制が更に緩和していることを意味していると考えられた。

PC-3-7 と PC-3-7 Δ tubB において酵素生産性に大きな差が確認されたことから、作られた酵素の活性自体に変化がないかを確認することを目的に、培養上清の酵素活性、および SDS-PAGE による組成解析を実施した。具体的には、培養 120 時間後に培養上清中のセルラーゼ (pNPGase、pNPLase、CMCase) およびヘミセルラーゼ (pNPXase、pNPX2ase、キシラナーゼ) 活性を測定した。培養液あたりの酵素活性を図 3-8(a)に、タンパク質量あたりの比活性を図 3-8(b)に、培養上清の SDS-PAGE 図 3-8(c)、(d)に示した。

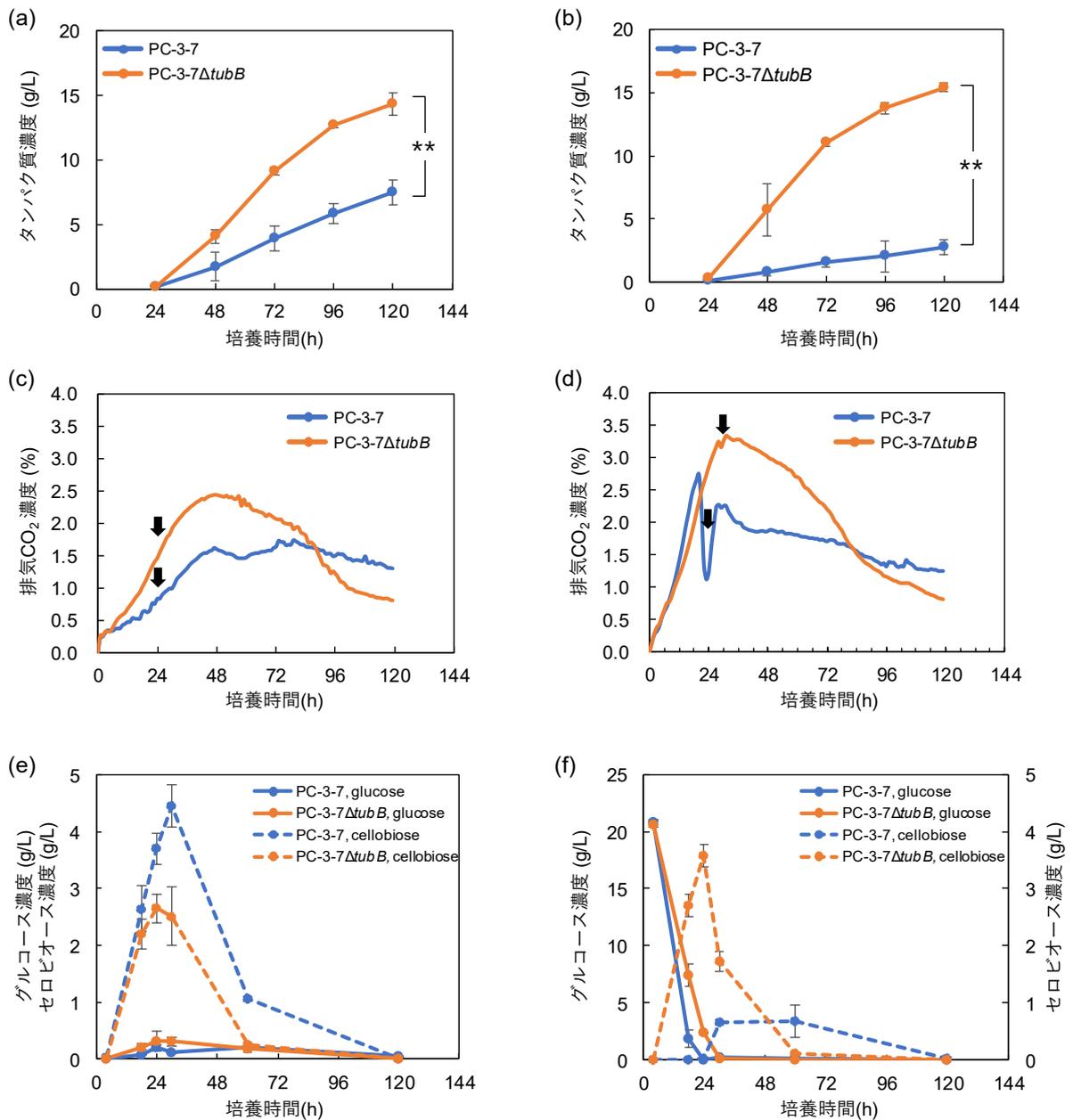


図 3-7 PC-3-7、PC-3-7ΔtubB の酵素生産性、排気 CO₂、糖消費速度の比較

10% (w/v)結晶性セルロースを炭素源として培養した場合の(a)タンパク質濃度、(c)排気ガス中の CO₂濃度、(e)培養液中のグルコースとセロビオースの濃度。10% (w/v)結晶性セルロースと 2.5% (w/v)グルコースを炭素源として培養した場合の(b) タンパク質濃度、(d)排気ガス中の CO₂濃度、(f)培養液中のグルコースとセロビオースの濃度。青線は PC-3-7、オレンジ線は PC-3-7ΔtubB を示す。(e)、(f)においては、実線はグルコース、破線はセロビオース濃度を示す。データは 3 回の独立した実験として取得し平均 ± 標準偏差で示した。統計的有意性は Student の *t* 検定により判定した (** *p* < 0.01)。(c)、(e)の黒矢印は、RNA-seq 解析のために菌体を回収した時間を示す。

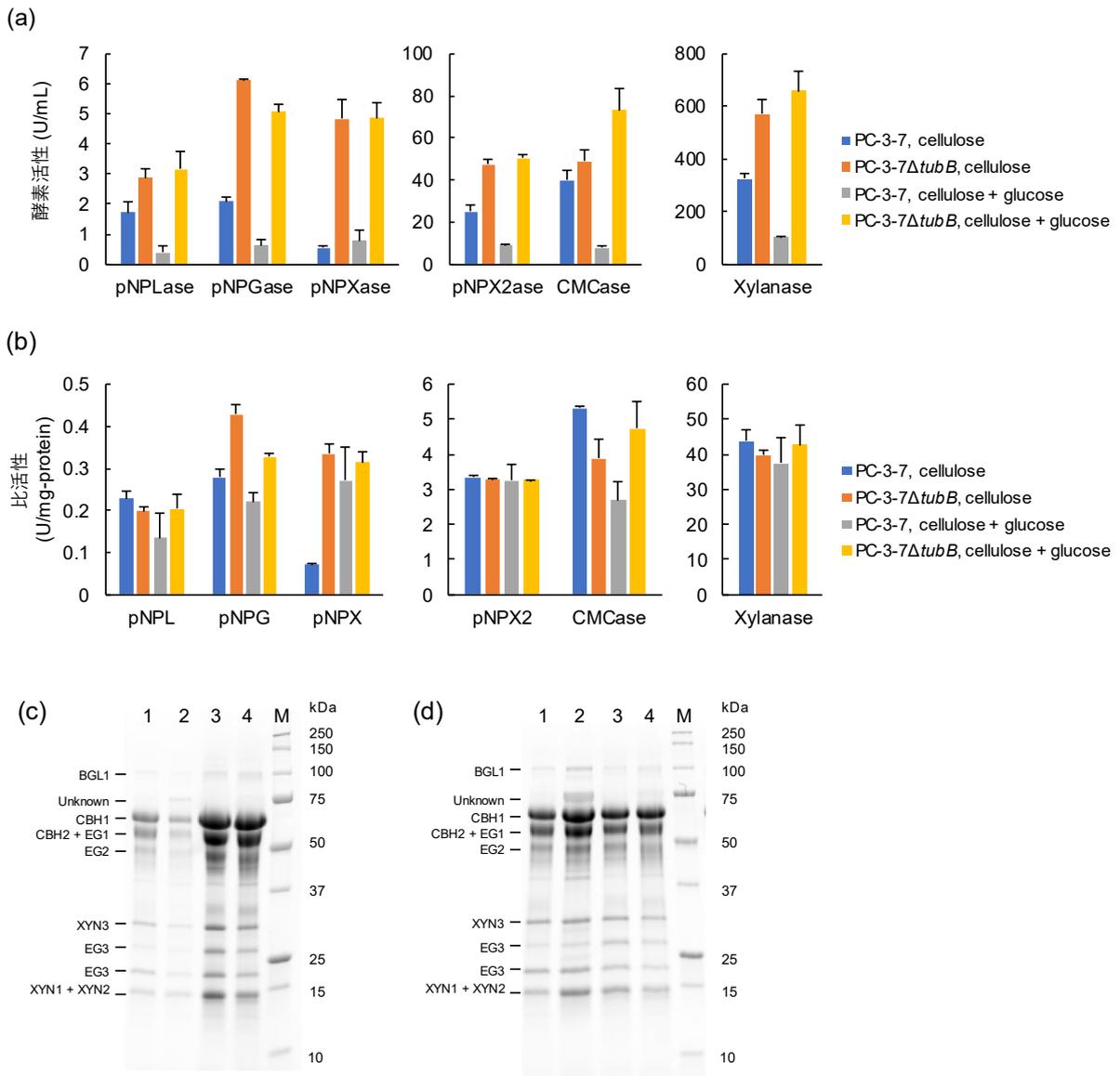


図 3-8 培養液中の酵素活性、SDS-PAGE

PC-3-7 および PC-3-7Δ*tubB* をセルロース、またはセルロース + グルコースを炭素源として培養した際の 120 時間培養後の培養上清中における (a) 培養液当たりの酵素活性、(b) タンパク質量当たりの酵素活性、(c) 培養液量合わせでの SDS-PAGE、(d) タンパク質量合わせでの SDS-PAGE の結果。酵素活性はセルロース分解酵素として pNPGase (BGL 活性)、pNPLase (CBH1 活性)、CMCase (EG 活性)、ヘミセルロース分解酵素活性として pNPXase (BXL 活性)、pNPX2ase およびキシラナーゼ (XYN 活性) を測定した。SDS-PAGE では (c) では 1 μL の培養液を、(d) では 5 μg のタンパク質をロードした。レーンは、M: マーカー、1: セルロースで培養した PC-3-7、2: セルロースとグルコースで培養した PC-3-7、3: セルロースで培養した PC-3-7Δ*tubB*、4: セルロースとグルコースで培養した PC-3-7Δ*tubB*。

培養液あたりの酵素活性は、培養 120 時間時点での酵素生産量 (図 3-7(a)、(b)) と一致して増減していた。この結果は、比活性 (図 3-8(b)) が、培養に使用した炭素源によらずほぼ同じ値を示していることから確認された。以上から、PC-3-7Δ*tubB* は PC-3-7 と比較して糖化酵素としての酵素生産性が向上していると考えられた。図 3-8(c)、(d) に示した SDS-PAGE から、PC-3-7Δ*tubB* で

は、培地中へのグルコースの有無による酵素の組成の違いは確認されなかった。一方、PC-3-7では、グルコースの添加により、酵素生産性が低下するとともに、約 75 kDa の未知のタンパク質の産生が確認された。

(5) PC-3-7 と PC-3-7 Δ tubB の転写挙動解析

PC-3-7 と PC-3-7 Δ tubB の転写挙動の差を解析することを目的に、結晶性セルロースのみ、結晶性セルロース+グルコースでの培養時の初期と酵素生産期における RNA-seq を実施した。PC-3-7 株、PC-3-7 Δ tubB それぞれについて、培養 24 時間（ただし PC-3-7 Δ tubB については培養フェーズを合わせるため排気 CO₂ ピーク直後の 30 時間：図 3-7(d)の矢印の位置を使用）、培養 48 時間の菌体を採取し RNA-seq を実施した。それぞれ 3 回の独立した実験として実施し、正規化された遺伝子発現量として RPKM (reads per kilobase per million) を算出した。それぞれのサンプルについては、(菌株名)_(培養時間)_(C: セルロースのみ or C+G: セルロース+グルコース)_で表記した。

表 3-5 には各サンプルにおける *T. reesei* のチューブリンの遺伝子発現量を示した。今回削除した *tubB* (Gene ID: 120830) については、PC-3-7 では 50~100 程度の RPKM を示したが PC-3-7 Δ tubB ではいずれの条件でも 0 であったことから、適切に遺伝子削除ができていていると考えられた。他のチューブリンと発現量を比較すると、Gene ID 122886 と 120789 の α 、 β -チューブリンが同程度で高発現していることから、これらが細胞分裂に利用されるチューブリンであると推測された。また Gene ID 21742 の β -チューブリンの発現量は *tubB* と同程度であり、TubB はこの β チューブリンと協働して微小管形成されている可能性が示唆された。

表 3-5 チューブリン遺伝子の発現量

Gene ID	Gene name	PC-3-7_	Δ tubB_						
		24h_C	24h_C	24h_C+G	24h_C+G	48h_C	48h_C	48h_C+G	48h_C+G
122886	tubulin beta chain 2	230	241	260	345	260	176	440	216
120789	tubulin alpha chain 2	194	168	180	299	260	169	409	181
21742	tubulin beta chain 1	82	55	59	82	106	52	167	46
104790	tubulin gamma chain	8	7	11	13	8	6	16	7
120830	tubulin alpha chain 1(<i>tubB</i>)	49	0	60	0	79	0	119	0

Zhao らは、菌類に保存されるチューブリンの配列の系統解析を行い、 α 、 β チューブリンをそれぞれ α_1 、 α_2 、 α_3 、 β_1 、 β_2 に分類できることを報告している⁷⁴。これによると、*T. reesei* は α_1 と α_2 を一つずつ有し、TubB は α_2 に分類される。この α_2 はサッカロミセス綱とタフリナ菌亜門を除く子囊菌門においてのみ存在し、*Rhizopus* などの接合菌類などは所有していない。チューブリンに関して最も研究がなされている糸状菌である *A. nidulans* においては α_2 を 3 種保有することが報告されているが、今回の *T. reesei* での例のように、 α_2 -チューブリンが酵素生産に関与する知見は報告例がなく、 α_2 -チューブリンに関する新たな機能が今回の研究で見出されたと考えられた。

図 3-9 には高発現していた主要な CAZymes (Carbohydrate-Active enZymes: 糖質関連酵素) の RPKM の比較を示した。PC-3-7、PC-3-7 Δ tubB とともに *cbh1*、*cbh2*、*egl7*、*egl3*、*xyn2*、*egl2*、*xyn3*

といった主要なセルラーゼ、キシラナーゼが高発現という傾向が確認されたが、PC-3-7についてはグルコースを含む培地での培養時にはこれらの転写量は大きく低下していた。特に培養 24 時間よりも 48 時間で大きく低下しており、グルコースが枯渇し、セロビオースが蓄積している状況においても各種酵素の転写誘導が正常に行われていないことが示唆された。これに対し、PC-3-7 $\Delta tubB$ ではグルコース含有培地での培養 30 時間、48 時間後において PC-3-7 の結晶性セルロース培養と同等かそれ以上の転写量を示していた。このことから、PC-3-7 $\Delta tubB$ においてはグルコースの存在に関わらず適切に誘導状態を維持できていることが示唆された。

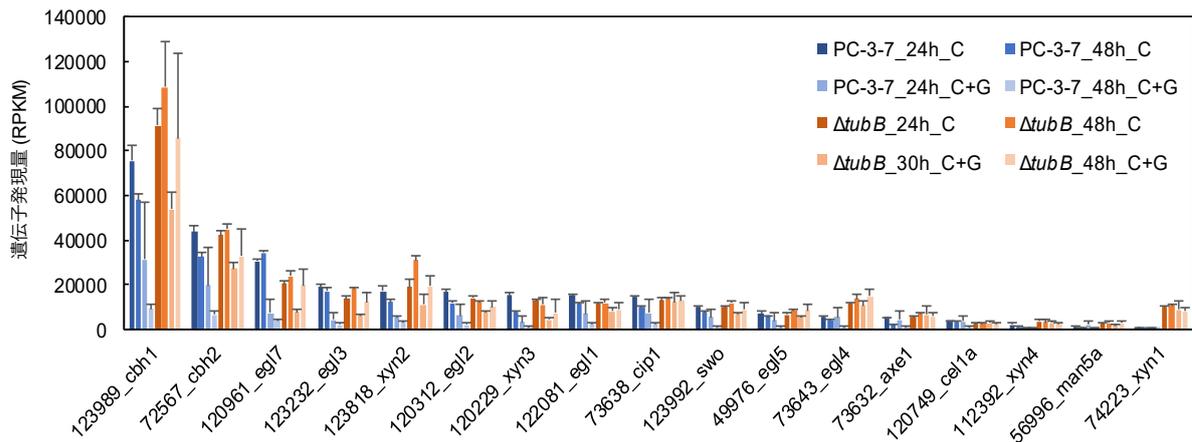


図 3-9 PC-3-7 および PC-3-7 $\Delta tubB$ における主要な CAZymes の遺伝子発現量

青色のバーは PC-3-7、オレンジ色のバーは PC-3-7 $\Delta tubB$ を示す。C はセルロースで培養したもの、C+G はセルロースとグルコースで培養したもの。データは 3 回の独立した実験として取得し、平均 \pm 標準偏差で示した。

PC-3-7、PC-3-7 $\Delta tubB$ 間での CAZymes の発現挙動を比較すると、PC-3-7 $\Delta tubB$ においては *xyn2*、*egl4*、*axe1*、*xyn4*、*xyn1* が高発現していることが確認された。*egl4* を除くこれらの遺伝子は全てヘミセルラーゼであり、セルロースを炭素源として培養しているにも関わらず、PC-3-7 $\Delta tubB$ では高発現していた。特に *xyn1* については、PC-3-7 ではほとんど発現していない（セルロース培養 48 時間で RPKM: 71）にも関わらず、PC-3-7 $\Delta tubB$ ではどの条件でも高発現していた（セルロース培養 48 時間で RPKM: 10,787）。*tubB* はグルコース存在下における酵素生産だけでなく、CAZymes、特にヘミセルラーゼ関連の発現制御に関与している可能性が示唆された。

図 3-10 にはセルロース培養とセルロース+グルコース培養を行った際の培養 48 時間における全 ORF のスキャッタープロット分析結果を示した。(a)には PC-3-7、(b)には PC-3-7 $\Delta tubB$ の結果を示した。相関係数 R の二乗は PC-3-7 で 0.3568 と低く、グルコースを含む培地で培養した際には、完全にグルコース存在下を消費し終えた後であっても菌体内の転写状態は大きく変化しており、正常な酵素生産状態にないことを示していると考えられた。これに対し、PC-3-7 $\Delta tubB$ では $R^2 = 0.9763$ と非常に高い値を示しており、グルコースの有無に影響されず酵素生産状態を維持していることが示唆された。

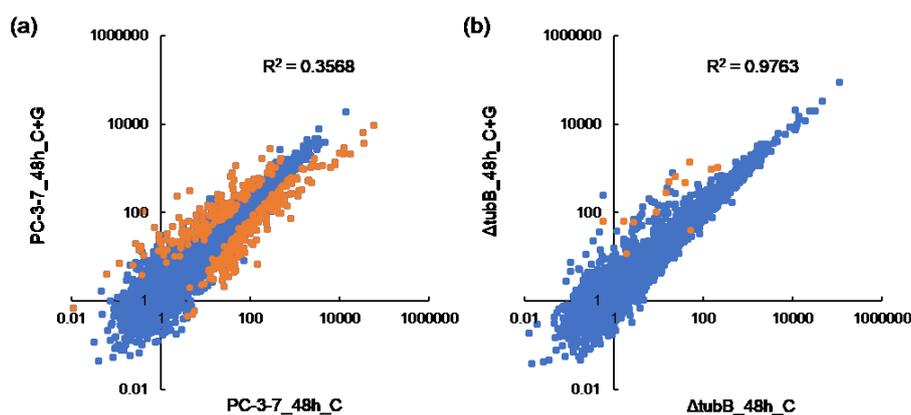


図 3-10 遺伝子プロファイルのスカッタープロット

(a)PC-3-7_48h_C と PC-3-7_48h_C+G、(b)ΔtubB_48h_C と ΔtubB_48h_C+G の遺伝子発現プロファイルのスカッタープロット。x 軸と y 軸は、各 CDS の RPKM 値を示す。DESeq 解析で同定された DEG はオレンジ色でハイライトした。

(6) PC-3-7 と PC-3-7ΔtubB 間における DEG 解析

PC-3-7 と PC-3-7ΔtubB における転写挙動の変化を、統計的に解析することを目的に、発現変動解析 (Differential Expressed Genes analysis、DEG 解析) を実施した。DEG 解析は統計解析ソフト R と DESeq2 パッケージを用いて行った。この際、ΔtubB による影響を評価するために、両株において安定的に酵素生産ができていると考えられる PC-3-7_48h_C と ΔtubB_48h_C の 2 条件で比較を行った。

DEG 解析を行った結果、 q 値 (調整済み p 値、adjusted p -value) < 0.01 となる DEG が 744 個得られた。このうち 478 個については PC-3-7ΔtubB において高発現、266 個については低発現であった。DEG に含まれた CAZymes を表 3-6 に示した。表 3-6 には、各 Gene ID、遺伝子名、コードする酵素のファミリー、転写量とその倍率変化、FDR (False Discovery Rate) を示した。DEG に含まれる CAZymes は 74 個あり、うち 57 個において PC-3-7ΔtubB で高発現を示した。DEG には *cbh1*、2、*egl4*、5、6 といったセルラーゼが含まれており、PC-3-7ΔtubB ではセルラーゼ発現が強化されていることが確認された。また alpha-glucuronidase (gene ID: 72526 ; *aguA*)、alpha-D-galactosidase (72704)、acetyl xylan esterase (54219、73632 ; *axe1*)、xylanases (*xyn1*、2、3、4、5)、pectinase (103049)などのヘミセルラーゼが多く含まれた。これらのヘミセルラーゼの多くはセルロースにより誘導されることが報告されていない遺伝子であることから、TubB は様々な CAZymes の発現に関与していると考えられた。

表 3-6 PC-3-7 Δ tubB において有意に発現が変化していた CAZymes

遺伝子ID	遺伝子名	酵素ファミリー	RPKM		RPKMの発現差(Log ₂)	FDR	遺伝子ID	遺伝子名	酵素ファミリー	RPKM		RPKMの発現差(Log ₂)	FDR
			PC-3-7_48h_C	Δ tubB_48h_C						PC-3-7_48h_C	Δ tubB_48h_C		
72526	<i>aguA</i>	GH67	57	545	3.25	2.2E-70	73638	<i>cip1</i>	-	9718	13449	0.47	3.6E-10
72704		GH27	26	232	3.14	6.1E-59	49976	<i>egl5</i>	GH45	6039	8492	0.49	1.1E-09
73643	<i>egl4</i>	GH61	4003	13683	1.77	3.1E-54	49081	<i>egl6, cel74a</i>	GH74	1164	1716	0.56	2.5E-09
54219		CE5	8	339	5.40	8.2E-50	82227	<i>cel3c</i>	GH3	76	133	0.82	4.5E-08
73632	<i>axe1</i>	CE5	2248	6899	1.62	5.7E-38	81598	<i>chi18-7</i>	GH18	125	27	-2.24	1.1E-07
69944		GH31	15	98	2.75	6.7E-38	73256		GH81	0	9	5.18	3.6E-07
46816	<i>cel3d</i>	GH3	25	107	2.12	8.3E-38	120229	<i>xyn3</i>	GH10	7612	11118	0.55	4.9E-07
123456		GH65	9	60	2.68	2.5E-37	112140		GH28	28	53	0.91	6.4E-07
123940	<i>cip2</i>	CE15	662	1864	1.49	5.2E-34	60085		GH31	3	12	1.81	2.9E-06
111849	<i>xyn4</i>	GH30	620	1969	1.67	4.6E-32	77299		GH2	32	53	0.71	3.8E-06
123818	<i>xyn2</i>	GH11	12173	31079	1.35	6.1E-32	3739		GH43	136	171	0.33	5.0E-06
121127	<i>bxl1</i>	GH3	569	1407	1.31	3.4E-28	57128		GH13	33	9	-1.85	1.0E-05
56996	<i>man5a</i>	GH5	758	2748	1.86	3.2E-25	123232	<i>egl3</i>	GH12	16963	18535	0.13	1.7E-05
55319		GH54	8	60	2.86	3.9E-22	82616	<i>egl8, cel5b</i>	GH5	61	81	0.41	2.5E-05
103049	<i>pec2</i>	GH28	3	52	4.04	3.8E-20	123368		GH13	130	42	-1.62	3.1E-05
57857		GH2	26	68	1.37	1.1E-19	59689		GH2	8	1	-3.80	4.2E-05
108671		GH3	38	111	1.53	1.2E-19	120312	<i>egl2, cel5a</i>	GH5	11797	12657	0.10	4.2E-05
5836		GH2	19	51	1.43	3.1E-17	44214	<i>axe2</i>	CE5	84	21	-1.98	4.4E-05
69276		GH30	435	895	1.04	2.2E-16	77284		GH12	86	129	0.59	5.3E-05
27395		GH76	17	66	1.95	4.1E-16	75036		GH63	41	12	-1.76	9.6E-05
58282		CE9	19	46	1.25	1.0E-14	67844		GH76	89	156	0.81	1.1E-04
23346	<i>nag2</i>	GH20	121	23	-2.41	8.0E-14	59082	<i>chi18-1</i>	GH18	20	1	-4.52	1.5E-04
76210		GH62	232	415	0.84	9.1E-14	104797	<i>cel3f</i>	GH3	23	33	0.53	1.8E-04
58802		GH95	1	17	4.73	1.1E-13	122511		GH16	110	33	-1.75	2.3E-04
123989	<i>cbh1</i>	GH7	57811	108728	0.91	2.3E-13	60635		GH92	6	0	-6.38	3.1E-04
112392		GH11	1410	3264	1.21	3.8E-13	79921		GH92	11	2	-2.82	4.7E-04
76672	<i>cel3a</i>	GH3	143	330	1.20	4.6E-12	72488		GH95	9	14	0.67	7.0E-04
74198		GH92	3	16	2.33	7.3E-12	72339	<i>chi18-9</i>	GH18	3	7	1.16	8.4E-04
123538	<i>gel1</i>	GH72	208	31	-2.74	3.2E-11	122081	<i>egl1</i>	GH7	11506	11918	0.05	1.4E-03
72567	<i>cbh2</i>	GH6	32395	44940	0.47	1.3E-10	124016		GH36	18	4	-2.05	2.1E-03
120873		GH71	52	92	0.83	1.5E-10	55802		GH76	323	319	-0.02	2.6E-03
74223	<i>xyn1</i>	GH11	71	10787	7.24	3.5E-10	65333		GH15	30	8	-1.82	3.1E-03
							65380		GH47	54	61	0.18	4.4E-03

これまでは、セルラーゼ生産時における PC-3-7 と PC-3-7 Δ tubB における転写挙動の比較を行うことを目的に PC-3-7_48h_C と Δ tubB_48h_C の 2 条件で比較を行ったが、 Δ tubB による普遍的な変化を抽出することを目的に、セルロース 24h_C、24h_C+G (ただし Δ tubB は 30h)、48h_C、48h_C+G の各条件における PC-3-7 と PC-3-7 Δ tubB の転写データを用いてそれぞれ DEG 解析を行い、4 条件で共通して確認された DEG を抽出した。この際、DEG は q 値 < 0.05 で有意に差があるものとした。全 47 個の共通した DEG が得られたが、転写が低いもの (全条件での最大の RPKM < 50) を除いた 31 個について、その遺伝子名、説明、 q 値の平均値、各条件における RPKM の最大値と最小値を表 3-7 に示した。

最も変化していたものは GH65 の ID 123456 であったが、GH65 は α , α -trehalase または maltose phosphorylase など α グリコシド結合をもつ糖類に作用するホスホリラーゼを含むファミリーであった。次いで、*xyn1* の高発現、*tubB* の削除が抽出された。表 3-7 中にて、CAZymes を緑地で示した。ほとんどの糖質関連酵素が *tubB* 破壊株において高発現している様子が確認されたが、ここで示されたものの中には主要なセルラーゼは含まれていなかったことから、*tubB* の遺伝子破壊は CAZymes の中でもセルラーゼよりヘミセルラーゼ、特にマイナーなヘミセルラーゼ *xyn1* を除くに特に大きな影響を及ぼしていると考えられた。

表 3-7 全ての条件において PC-3-7 Δ tubB で有意に発現が変化していた遺伝子

遺伝子番号_genbank番号_annotation	説明	q 値の平均値	変動	RPKM	
				最大	最小
TRIREDRAFT_123456_EGR45658_glycoside_hydrolase_family_65	GH65	3.4E-14	UP	192	6
TRIREDRAFT_74223_EGR52985_glycoside_hydrolase_family_11	<i>xynI</i>	8.6E-11	UP	10,787	8
TRIREDRAFT_120830_EGR50979_tubulin_alpha_chain_1	<i>tubB</i>	8.4E-10	DOWN	119	0
TRIREDRAFT_54962_EGR52329_iron_permease-like_protein	iron_permease	2.0E-09	DOWN	331	6
TRIREDRAFT_68122_EGR45462_predicted_protein	Permease of the major facilitator superfamily	1.2E-08	UP	172	11
TRIREDRAFT_57857_EGR50872_glycoside_hydrolase_family_2	GH2	5.2E-06	UP	156	21
TRIREDRAFT_82105_EGR44624_predicted_protein	ATP-binding cassette transporter ABC1	7.1E-06	UP	387	69
TRIREDRAFT_72704_EGR44740_glycoside_hydrolase_family_27	Alpha-D-galactosidase	1.1E-05	UP	386	9
TRIREDRAFT_61293_EGR49144_predicted_protein	acetylcholinesterase	4.6E-05	UP	94	1
TRIREDRAFT_102820_EGR52860_ferroxidase-like_protein	Putative multicopperoxidase	6.3E-05	DOWN	262	2
TRIREDRAFT_54219_EGR53049_carbohydrate_esterase_family_5	AXE	1.4E-04	UP	339	4
TRIREDRAFT_112247_EGR44430_beta-isopropylmalate_dehydrogenase	beta-isopropylmalate dehydrogenase	3.9E-04	UP	66	1
TRIREDRAFT_22251_EGR49012_predicted_protein	Mitochondrial carnitine-acylcarnitine carrier protein	1.2E-03	UP	199	38
TRIREDRAFT_120008_EGR51871_GMC_oxidoreductase	GMC oxidoreductase	1.2E-03	DOWN	69	1
TRIREDRAFT_55999_EGR51814_predicted_protein	Alpha-galactosidase	1.9E-03	UP	216	25
TRIREDRAFT_64448_EGR47357_predicted_protein		2.3E-03	DOWN	64	3
TRIREDRAFT_5836_EGR44772_glycoside_hydrolase_family_2	beta-mannosidase	2.8E-03	UP	54	3
TRIREDRAFT_58772_EGR50124_predicted_protein	Trichothecene C-15 hydroxylase	4.3E-03	DOWN	54	2
TRIREDRAFT_121166_EGR49758_delta(24)-sterol_C-methyltransferase	delta(24) sterol C-methyltransferase	5.2E-03	DOWN	208	65
TRIREDRAFT_124293_EGR44056_predicted_protein		5.3E-03	DOWN	442	32
TRIREDRAFT_119902_EGR52538_predicted_protein		5.3E-03	DOWN	161	1
TRIREDRAFT_68230_EGR45393_5-oxo-L-prolinase	5-oxo-L-prolinase	5.6E-03	UP	90	8
TRIREDRAFT_124065_EGR44617_predicted_protein	Phenazine biosynthesis protein	6.3E-03	DOWN	330	39
TRIREDRAFT_72612_EGR51393_acetylmithine_deacetylase	acetylmithine deacetylase	7.0E-03	DOWN	211	114
TRIREDRAFT_76366_EGR50387_predicted_protein	FMN-linked oxidoreductase	7.2E-03	DOWN	65	1
TRIREDRAFT_103012_EGR52963_predicted_protein	TauD-domain-containing protein	7.6E-03	UP	1,929	9
TRIREDRAFT_112392_EGR44310_glycoside_hydrolase_family_18	GH18	8.5E-03	UP	3,347	250
TRIREDRAFT_82145_EGR44684_predicted_protein	GDP-fucose transporter (Putative) Goldi	9.8E-03	UP	72	9
TRIREDRAFT_44230_EGR52925_predicted_protein		9.9E-03	DOWN	2,237	20
TRIREDRAFT_123538_EGR45532_glycoside_hydrolase_family_72	GH72	1.2E-02	DOWN	445	7
TRIREDRAFT_68924_EGR45034_predicted_protein	Putative methyltransferase	1.4E-02	DOWN	778	0

これまでの検討結果から、種々の CAZymes の高発現が確認されたが、その他にどのような機能に関する遺伝子群が変化したかを統計的に解析することを目的に、GO (Gene Ontology) エンリッチメント解析を行った。GO エンリッチメント解析とは、全ての CDS (ここでは *T. reesei* の全 CDS 9,115 種) に付与されている GO の存在比率が、DEG (ここでは PC-3-7_48h_C と Δ tubB_48h_C との間の 744 の DEG) において大きく変化したものを抽出する解析である。GO エンリッチメント解析については、R と Goseq パッケージを用いて行った。

GO エンリッチメント解析結果を表 3-8 に示した。緑地で糖質関連酵素、またはセルラーゼに関わるものを示し、青地でトランスポーターに関するものを示した。*p* 値が低いもの、すなわち DEG 中に高頻度で検出された GO のうちその半分以上が糖質関連酵素と糖質トランスポーターであることが明らかとなった。このことから、*tubB* の破壊は、CAZymes の発現挙動の変化だけでなく、その糖の取り込み機能にも大きな影響があると考えられた。項目ごとに見ると、GO:0004553 (hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds)については、DEG 判定 40 種のうち 36 種で高発現、4 種で低発現となっていた。GO:0030248 (cellulose binding)については 11 種全て、GO:0005576 (extracellular region)については 17 種中 15 種が高発現であったことから、菌体外に生産されるタンパク質のほとんど、セルロース吸着酵素については全てが PC Δ tubB で高発現していることが分かった。また、GO:0004567 (beta-mannosidase activity)、GO:0006012 (galactose metabolic process)、GO:0008733 (L-arabinose isomerase activity)、GO:0004034 (aldose 1-epimerase activity)などの糖質の資化に関わる遺伝子群が濃縮されていたが、興味深いことに、炭素源はセルロースを用いており、これらの糖は培地中に含まれていない。このことから、*tubB* の破壊は種々

のマイナーなヘミセルラーゼの発現誘導だけでなく、その資化経路にまで影響を及ぼしていることが示唆された。

表 3-8 PC-3-7Δ*tubB* で有意に発現が変化していた GO

	p値	DEGの数	遺伝子の数	GOの定義
GO:0005975	3.04E-17	56	141	carbohydrate metabolic process
GO:0004553	4.65E-16	40	83	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
GO:0006810	9.99E-12	88	350	transport
GO:0016020	4.33E-10	88	379	membrane
GO:0030248	2.01E-08	11	14	cellulose binding
GO:0016021	3.25E-08	83	386	integral component of membrane
GO:0005576	3.99E-08	17	35	extracellular region
GO:0008152	6.69E-08	101	515	metabolic process
GO:0006865	6.73E-08	20	44	amino acid transport
GO:0016491	1.16E-06	88	452	oxidoreductase activity
GO:0005351	4.21E-06	21	59	carbohydrate:proton symporter activity
GO:0005215	5.97E-06	56	251	transporter activity
GO:0008643	1.08E-05	19	53	carbohydrate transport
GO:0008733	1.25E-05	18	49	L-arabinose isomerase activity
GO:0006526	8.11E-05	6	8	arginine biosynthetic process
GO:0004567	1.65E-04	5	6	beta-mannosidase activity
GO:0006520	2.66E-04	11	28	cellular amino acid metabolic process
GO:0003824	4.73E-04	71	402	catalytic activity
GO:0008810	1.31E-03	3	3	cellulase activity
GO:0004034	1.68E-03	3	3	aldose 1-epimerase activity
GO:0004084	1.84E-03	3	3	branched-chain-amino-acid transaminase activity
GO:0006012	2.59E-03	4	6	galactose metabolic process
GO:0005375	2.73E-03	3	4	copper ion transmembrane transporter activity
GO:0008652	2.89E-03	4	6	cellular amino acid biosynthetic process
GO:0008422	2.98E-03	6	13	beta-glucosidase activity
GO:0006465	3.09E-03	3	4	signal peptide processing
GO:0006096	4.26E-03	6	14	glycolytic process
GO:0004040	4.66E-03	6	14	amidase activity
GO:0000105	4.80E-03	4	7	histidine biosynthetic process
GO:0016597	5.31E-03	4	7	amino acid binding
GO:0006807	6.65E-03	7	20	nitrogen compound metabolic process

糖のトランスポーターの GO が多く検出されたことから、DEG に含まれる糖のトランスポーターについてのみを抽出したものを表 3-9 に示した。表 3-9 には、Gene ID、機能解析済みのものは遺伝名、発現量、発現量の変化、FDR を示した。最も変化量が多かったものは Tr69957 であり、これは Nogueira らによってセロビオース、マンノース、キシロースのトランスポーターとして機能解析されたもので⁸⁴、約 75 倍に高発現していた。また、セロビオースとソホロースのトランスポーターであり、セルラーゼ生産シグナルとして機能することが知られる *crt1*^{85,86}、ペントースのトランスポーターである *str1*⁸⁷、ラクトーストランスポーターである TR79202⁸⁸などが PCΔ*tubB* において非常に高発現であった。特に *crt1* については、近年になってセロビオーストランスポーターとして機能することが報告されており、Tr69957 と *crt1* といったセロビオーストランスポーターの高発現がセロビオースの取り込み速度に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

表 3-9 PC-3-7 Δ tubB で有意に発現が変化していたトランスポーター遺伝子

遺伝子ID	遺伝子名	RPKM		RPKMの 発現差(Log ₂)	FDR
		PC-3-7_48h_C	Δ tubB_48h_C		
69957	<i>Tr69957</i>	2	156	6.15	2.0E-43
46819		6	80	3.79	2.3E-39
56684		103	305	1.57	4.2E-32
50894	<i>str1</i>	818	1561	0.93	2.1E-21
5656		10	51	2.29	2.5E-18
3405	<i>crt1</i>	1,980	4,142	1.06	1.6E-15
50618		36	75	1.05	5.0E-12
48444		7	24	1.82	3.4E-10
121482	<i>str2</i>	2	129	6.11	5.8E-10
65191		1	17	4.85	1.7E-09
79202	<i>TR79202</i>	1,217	1,925	0.66	4.2E-09
106330		60	93	0.63	1.6E-08
77517	<i>TR77517</i>	77	135	0.80	3.5E-07
80091		3	14	2.04	7.8E-07
69901		0	14	5.24	7.9E-07
68812		26	3	-3.24	1.1E-06
81670		92	114	0.31	1.5E-06
53903		1	9	3.35	4.6E-06
57088		20	31	0.65	1.1E-04
60945		109	35	-1.64	1.8E-04
81659		14	0	-6.42	2.6E-04
122013		171	61	-1.48	3.3E-04
77785		61	72	0.23	1.9E-03

(7) PC-3-7 と PC-3-7 Δ tubB 間における糖取り込み速度の解析

転写量解析の結果などから、*tubB* 破壊によって糖の取り込みに違いが生じている可能性が考えられた。そこで、グルコースで生育させた培養液に対して、各糖の終濃度が 0.2% となるようにグルコース、キシロース、セロビオース、グルコース+セロビオースを添加した後の糖の消費挙動を解析した。

図 3-11 に糖取り込み速度解析結果を示した。(a)にはグルコース添加後の上清中の濃度を示したが、0.2%のグルコースは両株において 2 時間程度でほぼ全量が菌体内に取り込まれた (約 1 g/L/hr)。(b)にはキシロース添加後の上清中の濃度を示した。キシロースの取り込み速度はグルコースと比較すると遅く、培養 4 時間程度でほぼ取り込まれた (約 0.5 g/L/hr)。また両株においてほぼ同速度で取り込まれた。(c)にはセロビオース添加後の上清中の濃度を示した。セロビオースの取り込み速度は PC-3-7 Δ tubB でとても早く、その速度はグルコースと同等の約 1 g/L/hr であった。また上清中には微量のグルコースが検出されたが、培養上清中には BGL 活性 (*p*-nitrophenyl glucosidase 活性) が検出されなかったこと (data not shown) から、そのほとんどはセロビオースとして取り込まれていると予想された。これに対し、PC-3-7 での取り込み速度はキシロース以下で、約 0.4 g/L/hr 程度であった。(d)では、グルコースとセロビオースの両方を添加後の上清中の各糖濃度を示した。グルコースの消費速度は PC-3-7 の方が早く、その速度はグルコースのみと同様の約 1 g/L/hr であったが、PC-3-7 Δ tubB においては若干の速度低下が見られ、約 0.8 g/L/hr であった。セロビオースでは PC-3-7 では添加後 1 時間目まではほとんど取り込まれず、その後約

0.3 g/L/hr で取り込まれたが、PC-3-7 $\Delta tubB$ においては、約 1 g/L/hr 程度で取り込まれ、培養 4 時間後には検出されなかった。興味深いことに、PC-3-7 $\Delta tubB$ においてはグルコースとセロビオースが同時に減少していく様子が確認された。

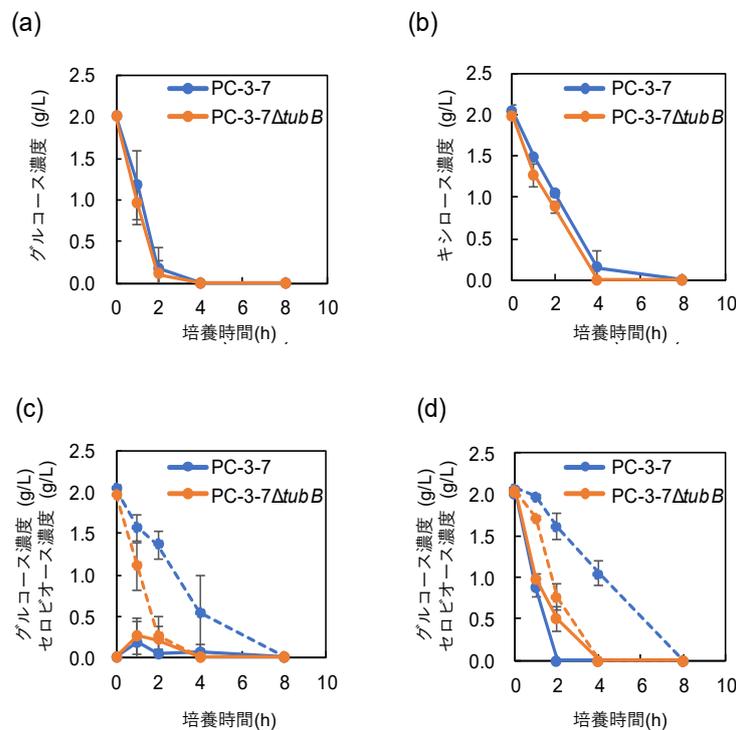


図 3-11 PC-3-7 and PC-3-7 $\Delta tubB$ における糖消費速度の比較

青線は PC-3-7、オレンジ線は PC-3-7 $\Delta tubB$ を示す。(a) 0.2% (w/v) グルコースを添加した後のグルコース濃度。(b) 0.2% (w/v) キシロースを添加した後のキシロース濃度。(c) 0.2% (w/v) セロビオース添加後の上清中のグルコース濃度 (実線)、セロビオース濃度 (破線)。(d) 0.2% (w/v) グルコースと 0.2% (w/v) セロビオースを添加した後の上清中のグルコース濃度 (実線)、セロビオース濃度 (破線) データは 3 回の独立した実験として行い、平均 \pm 標準偏差で示した。

一般的には、グルコースとそれ以外の糖が同時に存在すると、カタボライト抑制によりグルコースの資化が優先され、それ以外の糖の取り込みや消費を抑制される。しかし、PC-3-7 においてはカタボライト抑制に関わる Cre1 に変異が導入されており、これに伴いカタボライト抑制は解消しているとされている。しかしながら、図 3-11 の結果を見ると、PC-3-7 ではグルコースとセロビオースの両方が存在する条件においては明確にグルコースを優先的に消費しており、カタボライト抑制の完全な解消には至っていないと考えられた。これに対し、PC-3-7 $\Delta tubB$ においてはグルコース存在下においてもセロビオースの取り込みが行われており、またその速度は PC-3-7 よりも早いことが確認された。また、図 3-7(c) のセルロース培養時において、PC-3-7 $\Delta tubB$ では排気中 CO₂ 濃度が高い状態、すなわちセルロースを分解し大量のセロビオースを遊離・資化している状態においても上清中セロビオース濃度が PC-3-7 よりも低く維持されることは、この株のセロビオース取り込みが早い特徴を示していると考えられた。また、同様に図 3-7(d) でセルロース+グルコースでの培養時に、PC-3-7 で見られた排気 CO₂ 濃度の急激な低下が PC-3-7 $\Delta tubB$ では見られ

ないことは、グルコース存在下においても、セロビオースの同時消費を行っており（ただし、遊離速度の方が早く上清中には蓄積している）、グルコース枯渇後にも速やかにセロビオース資化に切り替えることが可能であったことに起因していると考えられた。

以上の結果から、PC-3-7 $\Delta tubB$ のフェノタイプの一つとして、セロビオースの取り込み速度が速いことと、またグルコース存在下においてもその取り込み速度が低下しないこと、すなわちカタボライト抑制がPC-3-7株よりも緩和されていることが特徴として挙げられた。

3-4 本章のまとめ

本検討は、*aabgl1* 高発現株の培養評価をきっかけに E1AB1 株だけが酵素生産性が向上していることを見出し、E1AB1 株の解析を通じて *tubB* 遺伝子破壊を通じて酵素生産性が向上していたことを見出した。そこで、*tubB* 遺伝子破壊の影響を精査するため、*tubB* 遺伝子破壊株の培養特性、転写解析、またその結果をもとに糖取り込み速度解析などを行った。その結果、*tubB* 遺伝子破壊株においては、カタボライト抑制が親株よりも緩和しており、グルコース存在下においてもセロビオースを取り込み可能で、かつその速度が速いことが明らかとなった。これらの特性は、酵素を高生産させる際に行う、グルコースを流加するフェドバッチ培養系と相性が良く、グルコースを多く流加したとしても、セルロースから遊離するセロビオースを効率的に取り込むことができ、誘導状態を維持することに役立つことが予想された。

カタボライト抑制については、論文情報や他社特許情報などから、RUT-C30 株において Cre1 が欠損したことによってカタボライト抑制に関する課題は解決されたものとして取り扱われている。しかしながら、論文情報や今回の結果からも、Cre1 欠損のみでのカタボライト抑制解除は不完全であり、グルコース存在下での酵素生産性低下は解決していない。本検討以外においても Cre1 欠損以外によるカタボライト抑制の更なる解除や、グルコース耐性の向上を目指した検討は実施されてはいるが、特定の遺伝子破壊による達成例は報告がなされていない。このことから、Cre1 以外を介した更なるグルコース耐性の向上技術としての *tubB* 遺伝子破壊は、グルコース流加などを行う酵素の実生産プロセスにおいてより安価な酵素生産を達成に繋がり、より経済的なセルロース系バイオマスからの糖生産、バイオエタノール生産に貢献できると考えられた。

3-5 参考文献および引用

- ⁵⁷ Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). Nature Biotechnol. 2008;26:553–60.
- ⁵⁸ Brady SK, Sreelatha S, Feng Y, Chundawat SPS, Lang MJ. Cellobiohydrolase 1 from *Trichoderma reesei* degrades cellulose in single cellobiose steps. Nature Commun. 2015;6:10149.
- ⁵⁹ Castro L dos S, Pedersoli WR, Antoniêto ACC, Steindorff AS, Silva-Rocha R, Martinez-Rossi NM, et al. Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. Biotechnol. Biofuels. 2014;7:41.

- ⁶⁰ Kubicek CP, Mikus M, Schuster A, Schmoll M, Seiboth B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol. Biofuels*. 2009;2:19.
- ⁶¹ Stricker AR, Grosstessner-Hain K, Würleitner E, Mach RL. Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryotic Cell* 2006;5:2128–37.
- ⁶² Aro N, Ilmén M, Saloheimo A, Penttilä M. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69:56–65.
- ⁶³ Aro N, Saloheimo A, Ilmén M, Penttilä M. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* 2001;276:24309–14.
- ⁶⁴ Häkkinen M, Valkonen MJ, Westerholm-Parvinen A, Aro N, Arvas M, Vitikainen M, et al. Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. *Biotechnol. Biofuels* 2014;7:14.
- ⁶⁵ Strauss J, Mach RL, Zeilinger S, Hartler G, Stöffler G, Wolschek M, et al. CreI, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. *FEBS Letters* 1995;376:103–7.
- ⁶⁶ Montenecourt, BS, Eveleigh DE. Screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. *Hydrolysis of cellulose: Mechanisms of enzymatic and acid catalysis*. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY; 1979. p. 289–301.
- ⁶⁷ Nakari-Setälä T, Paloheimo M, Kallio J, Vehmaanperä J, Penttilä M, Saloheimo M. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75:4853–60
- ⁶⁸ Porciuncula J de O, Furukawa T, Mori K, Shida Y, Hirakawa H, Tashiro K, et al. Single nucleotide polymorphism analysis of a *Trichoderma reesei* hyper-cellulolytic mutant developed in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013;77:534–43
- ⁶⁹ Ilmén M, Thrane C, Penttilä M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: Isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Molec. Gen. Genet.* 1996;251:451–60.
- ⁷⁰ Li C, Lin F, Zhou L, Qin L, Li B, Zhou Z, et al. Cellulase hyper-production by *Trichoderma reesei* mutant SEU-7 on lactose. *Biotechnol. Biofuels* 2017;10:228.
- ⁷¹ Jourdier E, Cohen C, Poughon L, Larroche C, Monot F, Chaabane FB. Cellulase activity mapping of *Trichoderma reesei* cultivated in sugar mixtures under fed-batch conditions. *Biotechnol. Biofuels* 2013;6:79.
- ⁷² Li Y, Liu C, Bai F, Zhao X. Overproduction of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C30 through batch-feeding of synthesized low-cost sugar mixture. *Bioresour. Technol.* 2016;216:503–10.
- ⁷³ Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997;13:83–117.
- ⁷⁴ Zhao Z, Liu H, Luo Y, Zhou S, An L, Wang C, et al. Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. *Sci. Rep.* 2014;4:6746.
- ⁷⁵ Doshi P, Bossie CA, Doonan JH, Mays GS, Morris NR. Two α -tubulin genes of *Aspergillus nidulans* encode divergent proteins. *Molec. Gen. Genet.* 1991;225:129–41.
- ⁷⁶ Kirk KE, Morris NR. Either alpha-tubulin isogene product is sufficient for microtubule function during all stages of growth and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biochem.* 1993;13:4465–76.
- ⁷⁷ Nykänen M, Birch D, Peterson R, Yu H, Kautto L, Gryshyna A, et al. Ultrastructural features of

- the early secretory pathway in *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 2016;62:455–65.
- ⁷⁸ Seiboth B, Hartl L, Pail M, Fekete E, Karaffa L, Kubicek CP. The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on d-galactose. *Mol. Microbiol.* 2004;51:1015–25.
- ⁷⁹ *Trichoderma reesei* – EnsemblGenomes, https://fungi.ensembl.org/Trichoderma_reesei/Info/Index/
- ⁸⁰ R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- ⁸¹ Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15:550.
- ⁸² Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* 2010;11:R14.
- ⁸³ *Trichoderma reesei* v2.0, MycoCosm, JGI, <http://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>
- ⁸⁴ Nogueira KMV, de Paula RG, Antoniêto ACC, dos Reis TF, Carraro CB, Silva AC, et al. Characterization of a novel sugar transporter involved in sugarcane bagasse degradation in *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Biofuels* 2018;11:84.
- ⁸⁵ Zhang W, Kou Y, Xu J, Cao Y, Zhao G, Shao J, et al. Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 2013;288:32861–32872.
- ⁸⁶ Havukainen S, Valkonen M, Koivuranta K, Landowski CP. Studies on sugar transporter CRT1 reveal new characteristics that are critical for cellulase induction in *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Biofuels* 2020;13:158.
- ⁸⁷ Huang Z-B, Chen X-Z, Qin L-N, Wu H-Q, Su X-Y, Dong Z-Y. A novel major facilitator transporter TrSTR1 is essential for pentose utilization and involved in xylanase induction in *Trichoderma reesei*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;460:663–9.
- ⁸⁸ Porciuncula J de O, Furukawa T, Shida Y, Mori K, Kuhara S, Morikawa Y, et al. Identification of major facilitator transporters involved in cellulase production during lactose culture of *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013;77:1014–22.

4 日本におけるバイオリファイナリーの現状と実装に向けたプロトタイピング

本章では、本論文のテーマである「都市型バイオリファイナリーの実現」を掲げるに至った背景などについて述べる。4-1 にて日本におけるバイオリファイナリーの重要性、課題について述べ、4-2 にて日本でのバイオリファイナリーに適した原料候補としての都市廃棄物に関する調査について述べる。4-3 では、都市廃棄物利用に関して、業界団体へとヒアリングを行った結果について述べる。更に、4-4 では2章、3章で述べた技術的ブレークスルーの都市廃棄物への適応性を評価したプロトタイピングについて述べる。

4-1 日本におけるバイオリファイナリーの普及の重要性と課題

現在、日本においては1-1 にて示したように、バイオエタノールすらもほとんど製造されていない状況（約1万トン/年の生産量）にある。しかしながら、世界的な脱炭素社会に向けた潮流の中、日本国内におけるバイオリファイナリー産業を発展させていくことは、①バイオエコノミー市場への追随、②国産の低LCA原料の獲得、③サプライチェーンの国内化、などの理由でますます重要となっていくと考えられる。以下にそれぞれについて説明する。

①のバイオエコノミー市場への追随については、日本が世界的な脱炭素の流れに乗り遅れない意味で重要となる。国内における脱炭素の推進という環境的な側面だけでなく、2020年に5,868億米ドル、2025年には8,677億米ドルに成長すると予測されている世界のバイオリファイナリー市場に取り残されないという経済的な側面からも重要と考えられる⁸⁹。

②については、LCAの視点で考えた場合、バイオリファイナリー原料の国内調達は今後重要度が増してくると考えられる。本論文の執筆者が所属する花王株式会社（以下、花王）は、2009年に環境宣言⁹⁰を発表し、原材料調達から生産、物流、販売、使用、廃棄までの製品が関わるライフサイクル全体を通じて環境負荷軽減を推進していくことを掲げている。2019年には、気候変動、高齢化社会、資源枯渇、海洋プラスチックといった社会的課題解決に向け、持続可能な暮らしを「Kirei Lifestyle」と定義し、それを実現するためESG戦略「Kirei Lifestyle Plan」を策定・発表している⁹¹。さらに、この「Kirei Lifestyle」の達成に向け2021年に「脱炭素」の目標を策定し⁹²、事業活動に伴い排出されるCO₂を2040年までにカーボンゼロ、2050年までにカーボンネガティブを目指すことを掲げている。

花王以外においても、国内企業においてカーボンニュートラルに向けた目標が設定されてきている。これらの目標の達成には、再生エネルギーの利用に加え、低LCA原料の調達なしには達成できない。この低LCAを達成していく上で、低LCA原料である廃棄物原料の利用が重要となる。また、LCA視点で見た場合、原料を海外から調達する場合には、輸送にかかるCO₂排出が問題となる。つまり、環境負荷の小さい国内原料を用いた、日本における非可食バイオリファイナリーの普及が重要となってくると考えられる。

③のサプライチェーンの国内化については、コロナ禍において新たに生じた重要性であると考えられる。新型コロナウイルスの影響により、海外でのロックダウンなどによる操業停止の影響により原料調達ができないことが問題化している。また、コンテナ不足に端を発した海上輸送費

の高騰も問題となっている。このような状況下において、様々な国を経由したサプライチェーン自体のリスクが高まってきており、国内で完結するサプライチェーンの構築が相対的に重要となってきた。こういった背景のもと、バイオリファイナリー原料の国内における確保は経済的な安全保障の観点からも重要となると考えられる。

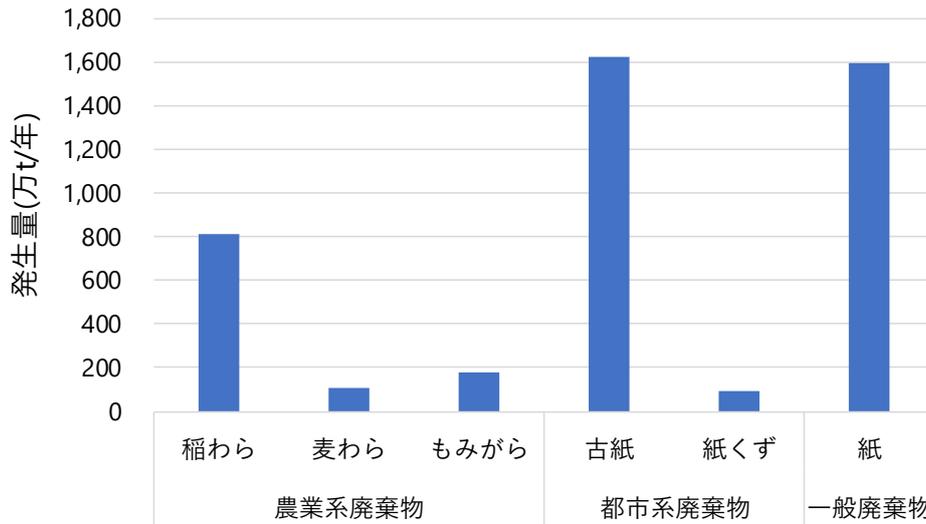
以上のような様々な理由から、日本におけるバイオリファイナリーの普及は今後重要度が増すと考えられた。しかしながら、冒頭でも述べたように日本においてはバイオリファイナリー製品として最も普及しているバイオエタノールであってもほとんど製造されていない状況にある。日本国内においては、バイオ燃料用 1G エタノール、2G エタノールはほぼ全て海外からの輸入品が利用されており、国内では、北海道および新潟にある 3 社の企業でのみ製造されている⁹³。北海道バイオエタノール（株）では余剰甜菜・規格外小麦を、オエノンホールディングス（株）と JA 全農（新潟）ではバイオ燃料用米を原料に 1G バイオエタノールを製造している。しかしながら、この 1G エタノールの製造コストは約 200 円/L と非常に高価である⁹⁴。また、2G エタノールに目を向けると稲わらからのバイオエタノール製造が NEDO などで行われてきたが、設備の減価償却費、および、工場で使用するエネルギーを含まない形でも稲わらからのエタノール製造コストは 85.2 円/L となっており⁹⁵、市場流通価格と比較しても非常に高価となってしまうことが想定される。これらのように、日本で 1G エタノールが安価に製造できない理由は、日本国内において大規模農業が行われているものが稲作に限られ、また米の製造コストも米国と比較し 3 倍、中国と比較し 10 倍かかることに起因すると考えられる⁹⁶。同様に、稲わらからの 2G エタノール製造についても、他国と比較し農業規模が小さい（農家平均経営規模：日本 3.0 ha、米国 179.7 ha、EU 16.6 ha、豪州 4442.9 ha）ため⁹⁷、稲わらの収集量が少なくなり、結果的に製造規模が小さくなることや収集コストがかかることで製造コストが高くなってしまっていると考えられる。

以上をまとめると、日本でバイオリファイナリーを実施していくためには、可食原料から実施するには農業規模が小さく原料が高価となり、非可食原料から実施するには、最も多く利用される農業系廃棄物が集約されておらず、収集コストが高くなり高価となってしまうことが原因であると考えられた。そこで、農業系廃棄物以外の有望な非可食原料の探索を行うため、日本で発生する他のセルロース系廃棄物について更なる調査を実施した。

4-2 日本における古紙や一般ごみを用いたバイオリファイナリーの可能性調査

(1) 日本におけるバイオマス賦存量とその利用状況

4-1 にて、日本においては農業規模が小さく、農業系廃棄物の集積量が少ないということを述べた。環境省の調査によると農業系廃棄物を代表する稲わら、麦わら、もみがらの 2017 年度における発生量は総計で 1,100 万 t/年とされる。これに対し、産業廃棄物や都市廃棄物（一般廃棄物など）に目を向けると、日本において廃棄される古紙は 1,600 万 t/年、一般廃棄物中の紙の排出量は 1,600 万トン/年以上に上り⁹⁸、特に一般廃棄物の発生量としては世界でも有数の一般廃棄物の発生量を誇る⁹⁹（図 4-1）。



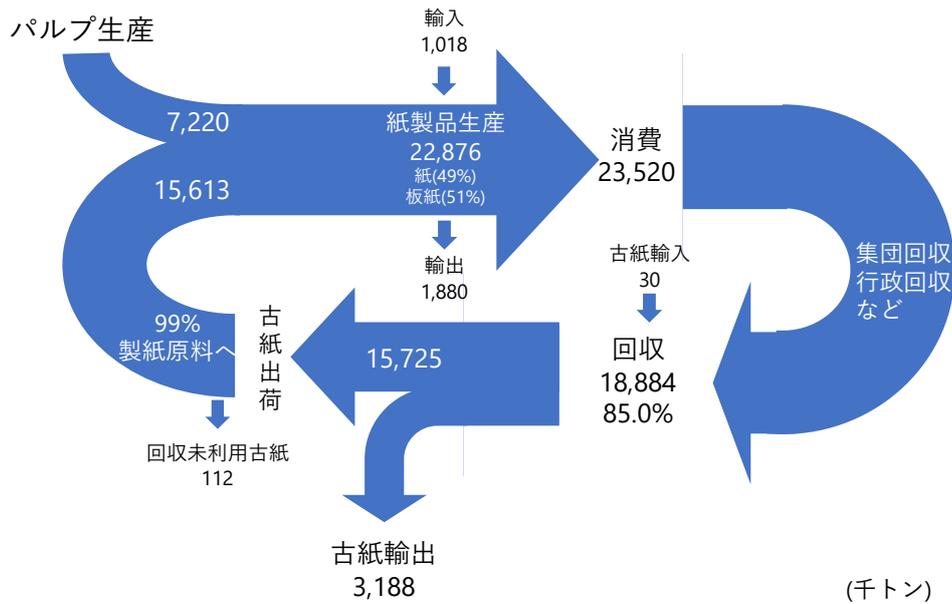
*参考文献98を参考に筆者作製

図 4-1 日本におけるセルロース系廃棄物の発生量

日本においては古紙は分別・収集インフラが整備されており、そのリサイクル率は約 80%¹⁰⁰と高く維持されている。これに対し、一般廃棄物については、焼却を通じたサーマルリサイクルが全体の約 74%を占めており、他国と比較しても圧倒的に焼却処分が多く、マテリアルリサイクル率は 20%に満たない¹⁰¹。一般廃棄物は、東京都内では 4,600 トン/日の可燃ごみが収集されており、うち 40%以上を紙ごみが占めている¹⁰²。日立造船はこの一般ごみに着目し、一般ごみに含まれる紙ごみからのエタノール製造についてパイロットスケールでの検証を実施してきている¹⁰³。

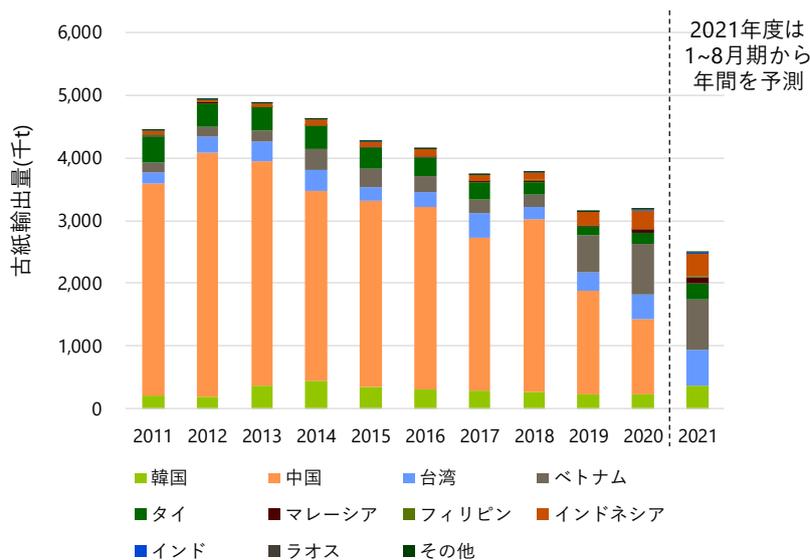
更に、古紙に関してはリサイクルの状況について調査を実施し、2020 年度における詳細な古紙の利用状況を図 4-2 に示した^{104,105,106}。2020 年度においては、紙は 23,520 千トン消費され、うち 18,884 千トンが回収されている。うち、15,725 千トンが古紙問屋から国内へ出荷され、99%が製紙原料として再利用されている。紙製品製造量のうち約 2/3 が古紙由来、1/3 がバージンパルプ由来となっている。また、回収した古紙のうち、約 17%の 3,188 千トンが輸出されている。古紙の輸出量の推移を図 4-3 に示した。また、2021 年度については 1~8 月期の実績を 1.5 倍することで 2021 年度の予測値として記載した。2012 年から古紙輸出量は減少傾向にあり、2018 年には最大の輸出先の中国の輸出量が減少、更に 2021 年度から中国の廃棄物輸入の全面禁止が始まり大幅な輸出量の減少が見込まれている¹⁰⁷。

以上から、古紙については輸出量の減少に伴う国内での古紙滞留量の増加が見込まれ、一般ごみ中の紙ごみなどについてはほぼ焼却されるのみとなっていることが分かった。また、利用が難しいと考えられる一般ごみについては日立造船のように既に利用する技術開発が行われていることもあり、これらの都市部を中心に発生する廃棄物、都市廃棄物が非可食バイオリファイナリーの原料として有望である可能性が示唆された。



*参考文献104, 105, 106を参考に筆者作製

図 4-2 日本における古紙利用状況 (2020 年度)



*参考文献104, 105, 106を参考に筆者作製

図 4-3 古紙の輸出国と輸出货量

4-3 都市廃棄物に関する関連団体へのヒアリング

日本における非可食バイオリファイナリーの推進する上で、古紙や一般ごみといった都市廃棄物については賦存量が多く、また既に収集インフラが整備されていることから都市廃棄物は非可食バイオリファイナリー原料として有望であると考えられた。また、古紙については中国の輸入禁止に伴う大幅な輸出量の減少が見込まれており、国内への古紙の滞留による価格下落のリスクを抱えていることも明らかとなった。

そこで、国内で入手可能な非可食バイオリファイナリー原料候補として考えられる古紙・一般

廃棄物について、その発生状況、取り巻く環境、利用状況の実態をより深く調査することを目的に、収集された古紙を取り扱う古紙リサイクル団体、古紙を購入し再生紙へと変換する製紙企業、既に一般ごみ中の紙ごみを利用したエタノール製造を検討している企業へのヒアリングを実施した。

(1) 古紙リサイクル団体へのヒアリング

古紙リサイクルの実状を把握すべく、古紙リサイクル団体へのヒアリングを行った。古紙に関しては、回収量のうち 10%程度が輸出に回っているが、その輸出量は中国の廃棄物輸入の禁止に伴い 2021 年度から大幅な減少傾向にある¹⁰⁷。中国への輸出分はベトナム、インドネシアといった東南アジアへの輸出にシフトしているが補いきれず、更にコロナなどによる紙の消費量の減少の影響も重なり、2019 年と比較し一部の古紙価格は大きく下落し、輸出を中心とした団体は縮小を余儀なくされている。

古紙は新聞、段ボール、雑誌、紙パック、雑紙（ミックスペーパー）などに分類され、それぞれで価格が設定され取引がなされているが、これらに汚れの残った紙パックや、レシートなどの感熱紙といった禁忌品と呼ばれるものが混ざるとリサイクルに支障をきたすため、禁忌品が混ざったものは適正価格帯よりも安価でしか取引されなくなる。このため、禁忌品が混ざらない形で分別することが古紙問屋としては重要となる。禁忌品は一定の割合で混ざってくるため、リサイクル上の問題となっている。

古紙は供給過多であり、国内で使いきれない古紙を輸出している。東南アジアでは古紙原料不足であり、雑誌、雑紙、段ボールなどはニーズが高いが、雑紙、すなわちミックス古紙については、2021 年中にベトナム・韓国が輸入を禁止するため¹⁰⁸、日本で発生する古紙を使いきれない状況が加速していくと考えられる。古紙価格の下落は製紙原料としての古紙リサイクルの流れ自体を悪くする恐れがあるため、バイオリファイナリー用途への古紙の活用が進むことは業界としてニーズとして存在すると考えられる。

(2) 製紙会社へのヒアリング

製紙会社におけるバージンパルプ・古紙の取り扱い、製紙会社の現状を把握するため、ヒアリングを行った。

<製紙会社での古紙リサイクルについて>

古紙はリサイクル工程で細かい繊維、無機物、インク分が減少し、固形分として 80%~90%がリサイクルされている。古紙中の無機物は由来の紙により大きく異なり、カレンダーなどは約 60%、コピー紙だと約 5%程度の炭酸カルシウムなどが含まれる。製紙工場内で発生する損紙（場内損紙：成形時の端っこなど）は再度パルパーで解いて場内で紙に戻すため、無駄なく利用されている。

<再生されていない紙について>

紙の用途は Write（書く用）、Wrap（包装用）、Waste（衛生用紙：ティッシュ、紙コップ、食品

包装など)の3Wと呼ばれ、この中のWasteは再利用に全く回らず、一般廃棄物として焼却されている。

(3) 一般ごみからの物質生産を検討する企業へのヒアリング

一般ごみからの物質生産の検証を企業に対し、一般ごみの利用、およびその課題についてのヒアリングを行った。

<一般ごみをターゲットとする理由>

農業系廃棄物などの他原料と比較して一般ごみの利点は、収集ルートが確立され、そのコストは既に税金で賄われており、リグニンが少なく、全国に集積施設が多く存在している点である。

<一般ごみからの製造について>

一般ごみの前処理は破碎し分別を行うのみであり、紙ごみの回収率は90%弱程度に上る。生ごみが含まれる点は、一度熱を掛けての殺菌処理を施すことで対処している。

一般ごみの収集量は、神戸だと1日400トン程度であり、原料のロットぶれの影響は、重量物と軽量物の比率を維持することで対処可能である。一般ゴミからの物質生産は海外でもほとんど実施されていない。

(4) ヒアリングから得られた考察

回収古紙は、国内市場において供給過多となっており、実際に古紙価格の下落が起こり、事業からの撤退や縮小が始まっていることが確認された。このため、古紙リサイクルの流れを維持するためには、自治体からの助成の増額が必要となるような状況が伺えた。また、東南アジアへの輸出の拡大が期待されるものの、今後も廃棄物輸入の禁止が進むことが予測され、回収古紙の利用に関する需給バランスの崩れが続くことが示唆された。

回収古紙を再生する製紙企業へのヒアリングを行った結果、回収古紙は非常に高効率に再生紙に利用されており、製紙企業内では余った古紙などは生じ得ないことが確認された。このことから、古紙を利用する場合は、製紙企業ではなく古紙問屋との連携が必要であると考えられた。回収されていない紙としては衛生用紙、一般ごみ中の紙がやはり多く、回収古紙以外では衛生用紙をいかに焼却処分に回さずに利用していくかがポイントであると考えられた。

一般ごみの利用については、比較的簡便な分別装置を用いることで、家庭から回収されるゴミからの物質生産が可能となることが分かった。しかしながら、自治体の既存回収設備への酵素の提供の形としては、オンサイト酵素製造では規模・コスト・運用上難しいと考えられた。

以上から、回収網が確立されており、現在供給過多が生じてそのシステム維持が難しくなっている古紙の利用が喫緊の課題であると考えられ、古紙の利用を一つの目的と据えて事業を進めていくことが日本における非可食バイオリファイナリーを考える上での視点として重要であると考えられた。

4-4 都市廃棄物をターゲットとしたバイオリファイナリーのプロトタイピング

ヒアリングの結果、古紙や一般ごみなどの都市廃棄物については、国内におけるバイオリファイナリー原料として有望であることが確認できた。そこで、2章、3章で開発してきた技術的ブレークスルーが、都市廃棄物へと適用可能かを検証することを目的に、各種プロトタイピングを行った。

(1) 古紙原料に対する PspXyn10 の有効性評価

古紙は様々なパルプ原料が混ざったものである。そこで、由来の異なるパルプ原料に対し、PspXyn10 の有効性評価を実施した。

試験は 2-2(4) に従って実施し、酵素には JN13H を 1.0 mg/g-バイオマス、または JN13H 1.0 mg/g-バイオマスに対して精製 PspXyn10 を 0.1 mg/g-バイオマス添加して実施した。結果は JN13H のみを用いた際のセルロース糖化率に対する相対比として記載した (図 4-4)。その結果、PspXyn10 はアルカリ処理バガスのみでなく、針葉樹パルプ、広葉樹パルプ、草本パルプの全てにおいて 30%以上のセルロース糖化性向上効果が確認された。酵素使用量が 1.1 倍に対し、糖化性が 1.3 倍以上に向上していることから、PspXyn10 は古紙に含まれるパルプを基質とした場合においても糖化性を大きく向上させ、安価な糖製造、ケミカルス製造へと繋げることができることが確認された。

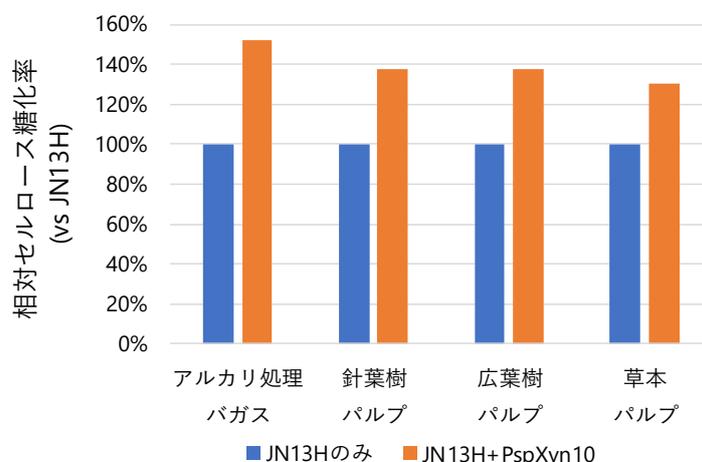


図 4-4 様々なパルプに対する PspXyn10 の有効性評価

JN13H 1.0 mg/g-バイオマス、または JN13H 1.0 mg/g-バイオマス + PspXyn10 0.1 mg/g-バイオマスの濃度で用いて各種基質を糖化した際のセルロース糖化率。JN13H のみを用いて糖化した際のセルロース糖化率を 100%とした相対値として示した。

(2) 古紙由来糖液の製造検討

続いて、古紙を糖化して得られるグルコース含有糖液を用いて糖化酵素生産が可能かどうか、また古紙由来糖液を用いて他のケミカルス生産が可能かどうかを検証することを目的に、古紙由来糖液の製造検討を実施した。本検討ではモデル古紙としてシュレッダー紙(オフィスペーパー)を基質として使用し、ジャーフェメンターを用いた糖化検討を行った。

調製した糖化酵素を用い、酵素濃度 10 mg/g-基質にて古紙の糖化試験を行った。5%を超える基質濃度条件においては繊維が解繊するため攪拌困難となったことから、5%以上においては低濃度の古紙を糖化し攪拌が可能となった後に、更に基質を追加する形で最終的な基質濃度まで調整を行った。糖化後、遠心分離により残渣を除去し、膜にて粒子を除去した。得られた膜ろ過済み糖液については、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮を行った。その結果、糖液として膜ろ過済み糖液として約 4 L から濃縮後糖液 (BRIX^a 45.5) を約 300 mL を得た (図 4-5)。

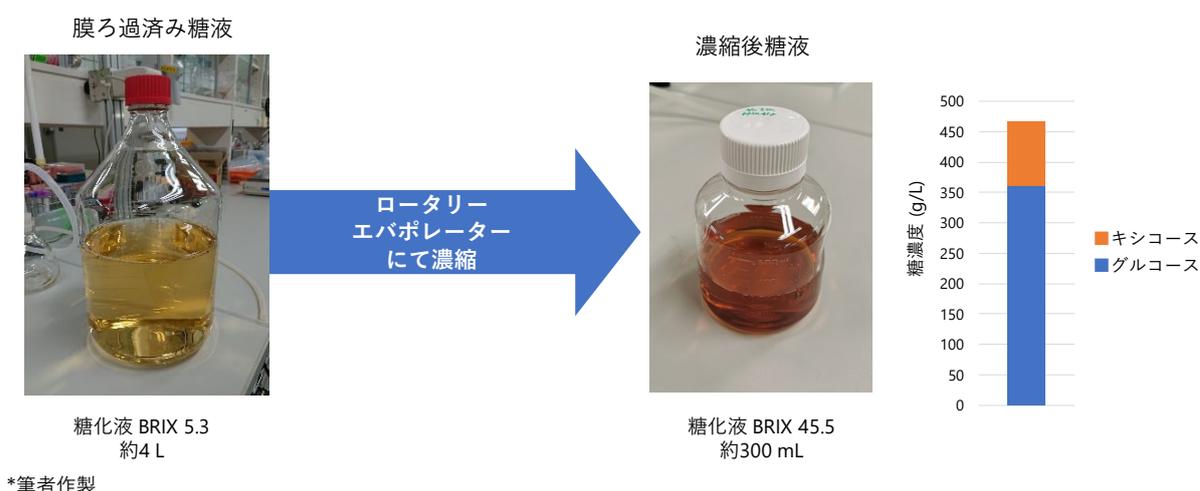


図 4-5 古紙由来糖液の製造

(3) 古紙由来糖液を用いた発酵検討

得られた古紙由来糖液を用い、糖化酵素の生産検討、および、化合物 A の発酵生産検討を実施した。糖化酵素生産については、*tubB* 遺伝子が欠損した *T. reesei* の株を用い、試薬グルコースまたは古紙由来糖液をそれぞれ用いて培養検討を行った。その結果、古紙由来糖液を用いても試薬グルコースと同程度の酵素生産が可能であり、古紙由来糖液を用いても阻害などを引き起こさずに酵素生産が可能であることを確認した。同様に、発酵生産の候補として考えられる化合物 A の生産検討についても実施したところ、試薬グルコースと同等の生産性を示した。以上から、古紙由来糖液はそのままの状態でも阻害を引き起こさず、問題なく酵素生産、発酵生産に利用可能であった (図 4-6)。

^a BRIX (ブリックス) は、食品、精糖、果実農業などで、ショ糖、果糖、ブドウ糖などの糖の含有量を示す糖度を指す。BRIX は BRIX 屈折計を用いて簡便に測定できることから糖液を取り扱う上での一般的な指標として用いられる。1 g のショ糖を含む水溶液 100 g は BRIX が 1 であり、BRIX 値は糖液濃度としておおよその質量% (% w/w)を示す。

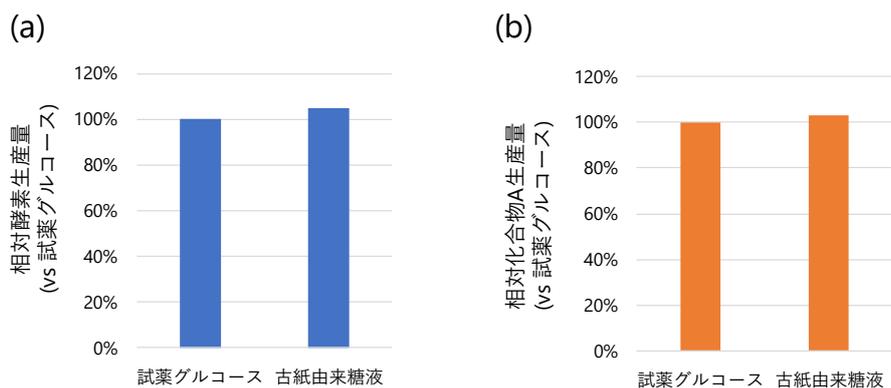


図 4-6 古紙由来糖液を用いた酵素生産・発酵評価

(a) 試薬グルコース、または古紙由来糖液を用いた際の糖化酵素生産性。試薬グルコースを用いた際の生産性を 100%とした場合の相対値として示した。(b) 試薬グルコース、または古紙由来糖液を用いた際の化合物 A の発酵生産性。試薬グルコースを用いた際の生産性を 100%とした場合の相対値として示した。

植物バイオマス由来の糖液を用いた場合には発酵生産時に阻害がよく起こることが知られているが、古紙由来糖液では阻害が確認できておらず、また培養液への着色への影響も少ないことから、他の安価糖と比較しケミカル製造用の発酵用糖液として有望であることを確認することができた。

(4) 様々な古紙を用いた糖化検討

オフィスペーパー以外の様々な古紙についても同様に糖化検討を実施した。古紙には、コピー用紙、画用紙、紙パック、紙袋、カーボン紙、食品紙製容器などを用い、シュレッダーによる裁断、粉碎機による解繊を行った後に糖化試験を行った。糖化酵素としては、PspXyn10 を含有する酵素製剤を用いた。プラスチックを含む紙パックを除き、他の基質についてはコピー用紙と同等の糖化率が確認された (図 4-7)。以上から、古紙類は適切な前処理 (裁断・解繊) を行えば問題なく酵素糖化でき、糖液製造に利用できることが確認された。また、禁忌品とされるカーボン紙、アイロンプリント紙、汚れた食品紙製容器などについてもコピー用紙の 80%以上に糖化性が確認され、糖化を行う上でこれらの禁忌品の存在は問題とならないことが確認された。このことから、禁忌品が混ざってしまったことで安価に取引せざるを得ないような古紙についても、禁忌品の混入を気にすることなく糖液製造へと利用できる可能性が示唆された。

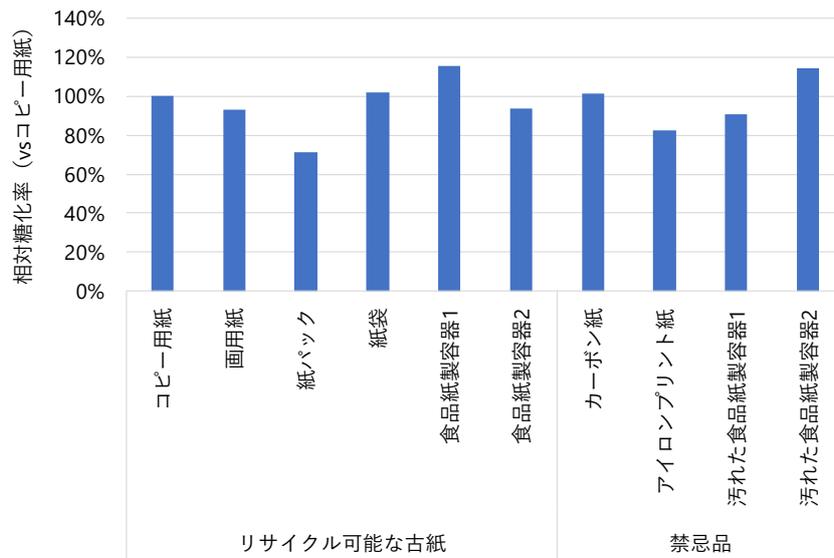


図 4-7 様々な古紙の糖化評価

コピー用紙を糖化した際のセルロース糖化率を 100%とした相対値として示した。

(5) プロトタイピングのまとめ

プロトタイピングとして、PspXyn10 のパルプ系基質への適応性、古紙由来糖液の製造検討、およびその糖液を用いた $\Delta tubB$ 株における酵素生産検討、および古紙糖液を用いた発酵試験を実施した。加えて、様々な古紙を入手し、PspXyn10 を含有する酵素製剤を用いての糖化試験についても実施した。その結果、PspXyn10 はパルプ系基質に対しても高い添加効果を示し、本酵素を含有する酵素製剤を用いることで、古紙やパルプを安価に非可食バイオリファイナリー原料として利用できることを確認することができた。また、古紙は特別な前処理なく糖化することができ、淡黄色の糖液が得られた。この糖液を用いて $\Delta tubB$ 株にて糖化酵素生産検討を実施したところ、試薬グルコースと同等の酵素生産性が確認され、古紙由来糖液を用いた酵素生産が可能であることを確認した。また、その他の発酵評価においても、試薬グルコースを用いた場合と同等の発酵生産性を示した。

以上から、古紙や一般ごみに含まれる紙ごみについては、これまでに開発してきた技術的ブレークスルーを活用することで、非可食バイオリファイナリー原料としてより安価に利用可能となることが確認された。

4-5 まとめ

本章では、環境、経済、安全保障などの側面から日本におけるバイオリファイナリーの普及の重要性について述べた。しかし、実態としては、日本においてはバイオリファイナリーの原料価格が高く、価格競争力の観点でバイオリファイナリー製品の普及が難しいことが考えられた。

そこで、最も広く利用されている農業系廃棄物ではなく、日本で収集インフラが整っている都市廃棄物に着目し、これらの利用性について業界団体へのヒアリングなどを通じて調査を行い、古紙などにおいては中国の輸入禁止などによる事業環境の変化に伴う事業性の悪化などが懸念さ

れており、バイオリファイナリー用途への古紙の利用などが望まれていることを確認することができた。

更に、2章、3章で述べた技術的ブレークスルーとしての酵素技術、酵素生産技術について、都市廃棄物への適応性を評価することを目的に、様々な古紙や紙パルプ類の糖化検討や、古紙由来糖液の製造検討、糖液を用いた酵素生産や発酵生産検討といったプロトタイピングを実施し、これまでに開発してきた技術的ブレークスルーが都市系廃棄物においても十分に適応可能であることを確認することができた。

これらの調査結果やプロトタイピングの結果をもとに、5章におけるイノベーションアイデアの提案を行った。

4-6 参考文献および引用

⁸⁹ Biorefinery Products: Global Market, BCC research (2020)

⁹⁰ 「環境宣言」花王 (<https://www.kao.com/content/dam/sites/kao/www-kao-com/jp/ja/corporate/sustainability/pdf/environmental-statement.pdf>)

⁹¹ 「Kirei Lifestyle Plan」花王, 2019年4月22日 (<https://www.kao.com/jp/corporate/news/sustainability/2019/20190422-001/>)

⁹² 「新たな「脱炭素」目標を策定」花王, 2021年5月19日 (<https://www.kao.com/jp/corporate/news/sustainability/2021/20210519-001/>)

⁹³ 農林水産省 食料産業局バイオマス循環資源課, 「バイオ燃料生産拠点確立事業について」, バイオ燃料生産拠点確立事業検証委員会 2014年2月20日 (http://www.maff.go.jp/j/biomass/b-ethanol/pdf/02_02_siryoku2.pdf)

⁹⁴ 農林水産省 食料産業局バイオマス循環資源課, 「バイオエタノール先進国と日本の取組の比較」, バイオ燃料生産拠点確立事業検証委員会, 2014年2月20日 (https://www.maff.go.jp/j/biomass/b-ethanol/pdf/02-1_siryoku2-1.pdf)

⁹⁵ 「稲わらを材料にした高効率バイオエタノール製造技術の開発」大成建設, 2014年5月30日 (https://www.taisei.co.jp/about_us/wn/2014/140530_3953.html)

⁹⁶ 農林水産省 「販売」を軸とした米システムのあり方に関する検討会, 「国産バイオ燃料の導入の更なる拡大に向けて」, 2008年1月22日 (https://www.maff.go.jp/j/study/kome_sys/14/pdf/data2-2.pdf)

⁹⁷ 農林水産省 食料・農業・農村政策審議会食糧部会, 「米をめぐる関係資料、経営規模・生産コスト等の内外比較」, 2021年2月26日 (<https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/syokuryo/210226/attach/pdf/index-36.pdf>)

⁹⁸ 環境省 環境再生・資源循環局, 「平成29年度 廃棄物の広域移動対策検討調査及び廃棄物等循環利用量実態調査報告書」 (2018)

⁹⁹ 「一般廃棄物の排出及び処理状況等について」環境省, 2021年3月30日

- (<https://www.env.go.jp/press/109290.html>)
- ¹⁰⁰ 「古紙」日本製紙連合会 (<https://www.jpa.gr.jp/states/used-paper/index.html>)
- ¹⁰¹ 「Environment at a Glance Indicator」 OECD iLibrary, (<https://www.oecd-ilibrary.org/sites/f5670a8d-en/index.html?itemId=/content/component/f5670a8d-en>)
- ¹⁰² 東京二十三区清掃一部事務組合, ごみれば 23 2021 循環型社会の形成に向けて, 2020 年 12 月
- ¹⁰³ 山田 一男, 木田 建次, 富山 茂男, 都市域廃棄物からのバイオマス二段階原燃料化システム
実証研究, 生活と環境, 2015 年 9 月号, 17-22
- ¹⁰⁴ 「日本の紙リサイクル」公益財団法人 古紙再生促進センター (<http://www.prpc.or.jp/wp-content/uploads/PAPER-RECYCLING-IN-JAPAN-Japanese.pdf>)
- ¹⁰⁵ 「2020 STATISTICS OF RECOVERED PAPER IN JAPAN (2021.4)」公益財団法人 古紙再生促進センター (<http://www.prpc.or.jp/wp-content/uploads/210414-2020-statistics-of-recovered-paper-in-Japan.pdf>)
- ¹⁰⁶ 古紙からのバイオエタノール生産とバイオエタノールによる土壌管理技術の開発, 神奈川重点実用化研究 (平成 24 年度-平成 26 年度)
- ¹⁰⁷ 「古紙輸出が急減 回収減・コンテナ不足響く、問屋も国内向け優先」日本経済新聞, 2021 年 3 月 4 日 (<https://www.nikkei.com/article/DGKKZO69627350T00C21A3QM8000/>)
- ¹⁰⁸ 「雑紙混じり「ミックス古紙」、国内滞留懸念高まる、アジアで輸入規制強化」日本経済新聞, 2021 年 7 月 27 日 (<https://www.nikkei.com/article/DGKKZO74199260W1A720C2QM8000/>)

5 イノベーションアイデア

5-1 新規事業立ち上げを通じて解決したい課題

4章の中で示した「日本におけるバイオリファイナリーの出遅れ」、「需給バランスが崩れつつある国内の都市廃棄物リサイクル産業」に加えて、1章で示した「世界的な都市系廃棄物へのバイオリファイナリーの展開の遅れ」といった課題を解決することを目指しながら循環型社会の創出を目指すことが、今回の新規事業提案の目的となる。

5-2 本事業を進める上での技術的ブレークスルー

イノベーションアイデアに関わる技術的ブレークスルーとしては、大きく分けて、「糖化酵素技術」、「酵素生産技術」、「酵素製造システム」の3つに分けられる。

「糖化酵素技術」に関するブレークスルーの1つは、2章で示した技術、すなわち、結晶性セルロースに強固に結合したキシランを分解することで効率的にセルロースを分解可能にする新規キシラナーゼ PspXyn10 となる。また、PspXyn10 以外にも、NEDO「バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業」¹⁰⁹の中で開発されてきた、高効率化・高安定性化した変異 AaBGL が挙げられる¹¹⁰。これらの酵素を配合した糖化酵素製剤を用いることで、都市廃棄物を含む様々なバイオマスの糖化を飛躍的に向上させることに成功してきている（図 5-1）。

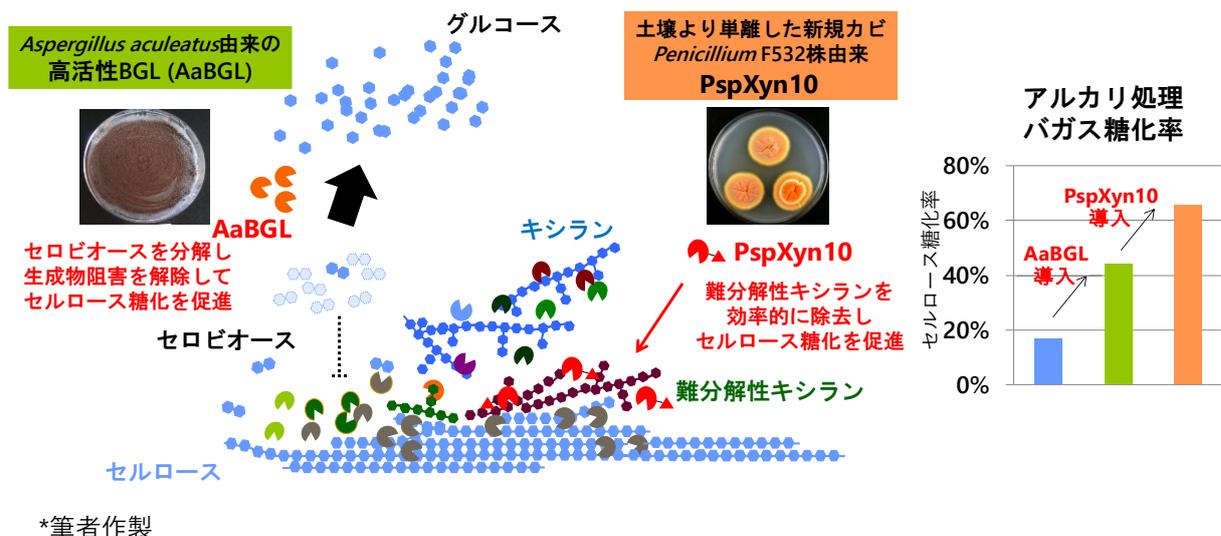


図 5-1 バイオマス糖化酵素の開発

「酵素生産技術」に関わるブレークスルーの1つは、3章で示した α -チューブリン遺伝子破壊によるカタボライト抑制の緩和を通じた、グルコースを効率的に用いた安価酵素生産技術となる（図 5-2①）。更に、糖化酵素を生産する際にセルロースやセロビオースといった高価な誘導物質を使用せず、酵素生産が可能な誘導フリー酵素製造技術についても技術構築が進んでいる（図 5-2②）。

これらの菌株の改変を通じた酵素生産技術の開発に加え、複雑な操作・新たな流加槽の設置を必要とせず酵素生産性を大きく向上させられる培養技術などについても開発を行ってきており、

簡便・かつ安価な酵素生産が可能となってきた。

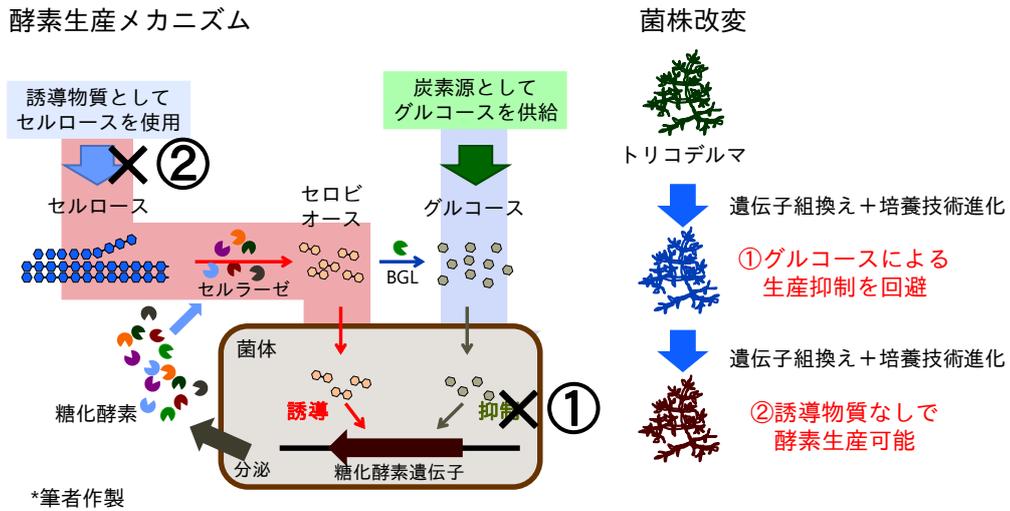


図 5-2 酵素生産技術の進化

「酵素製造システム」に関わるブレークスルーとしては、これらの糖化酵素技術と酵素生産技術を統合することによるオンサイト酵素製造技術である。オンサイト酵素製造とは、バイオマスが入手可能なサイトに併設して酵素製造を行うことで、輸送や酵素の精製、濃縮を不要とし、より安価に酵素を利用可能とする技術である（図 5-3）。これまでに、エンジ会社と連携し、オンサイト糖化酵素製造を目指した酵素生産システムの開発についても着手している。

これらの糖化酵素技術、酵素生産技術、酵素製造システムの統合により、高コストと言われるセルロース系バイオマスの糖化を、これまで以上に低コストで実施できると考えられた。

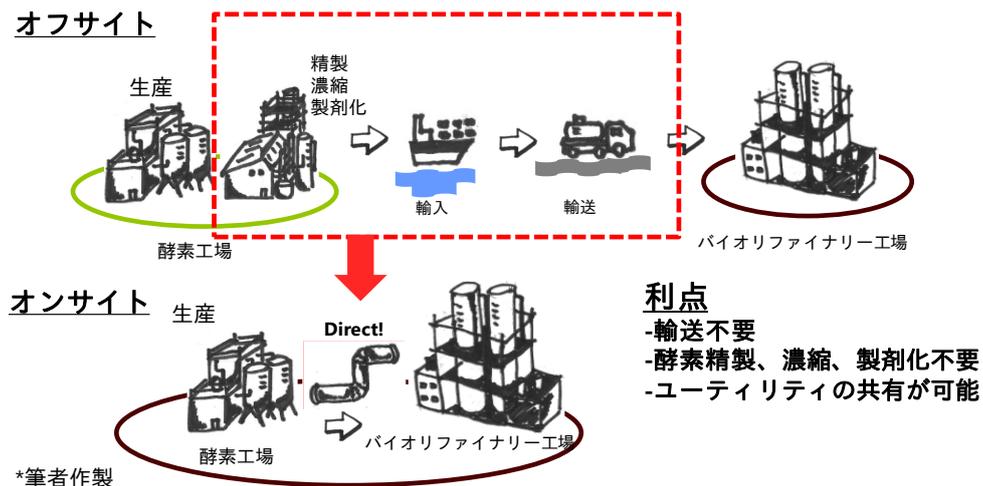


図 5-3 オフサイト酵素生産とオンサイト酵素生産

5-3 コアとなるイノベーションアイデア

現在世界で発展してきているバイオエコノミー、バイオリファイナリーは、環境問題の解決の

ための脱炭素社会を目指すことを背景に、サステナブル化、植物由来成分の利用へと進んできている。しかしながら、1-1で示したように、その生産物のほとんどが可食原料由来で構成されている。SDGsの点から見ると食糧問題の解決も必要であり、バイオ燃料への利用のためのデンプン系原料の競争、食糧の高騰などが課題となってきた。

このような背景を考えると、脱炭素を目指したモノづくりは可食原料から非可食原料からの物質生産へのシフトが必要不可欠である。それにもかかわらず、非可食由来の発酵原料、すなわち非可食糖は2021年時点で市場流通しておらず、安価・安定に非可食糖を入手できない状況が続いている。これが非可食原料でのバイオリファイナリーが発展してこない一つの原因であると考えられた。更に、日本に目を向けると、一般的に入手可能な可食糖ですら国内で自製できておらず、輸送費、関税などにより非常に高価なものとなっている（図5-4）。

そこで、「日本においてもバイオエコノミーを推進・実現させるためにはどうしたらよいか？」という問いに対し、「非可食糖が安価に供給さえできれば、日本においては高価な可食糖から自然発生的に非可食糖利用への転換が起こるのでは」というインサイトをもとに、「どうやったら非可食糖を国内で利用可能な価格まで引き下げつつ供給できるのか」というリフレームした問いへと変換した（図5-5）。すなわち、「非可食糖からの新たなバイオリファイナリーの潮流を生み出すためには、非可食糖を実際に流通させる必要性」があると考えた。

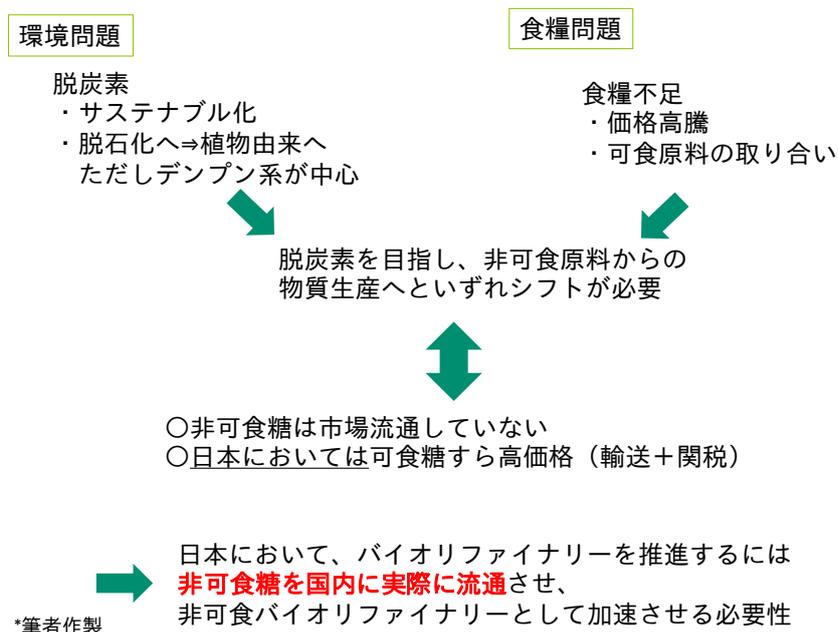


図 5-4 非可食原料からのバイオリファイナリーの必要性と現状、課題

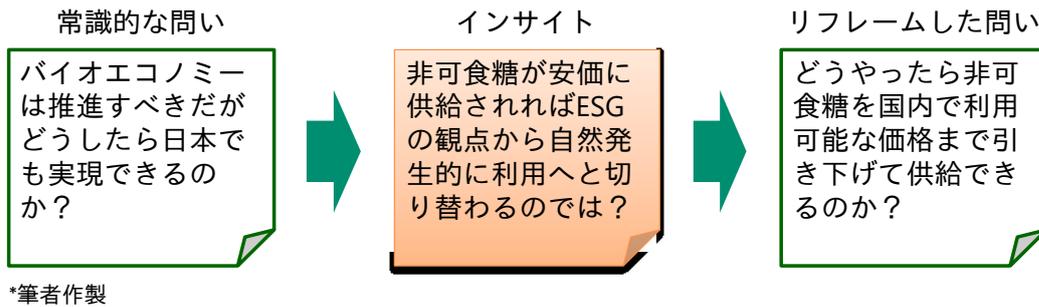


図 5-5 「バイオエコノミーの推進」のリフレームした問い

こういった背景のもと、以下のコアとなるイノベーションアイデア（図 5-6）を考案した。糖化酵素の開発と生産技術の進化という技術的ブレークスルーを組み合わせることで糖化酵素のオンサイト製造を行うことで、他社よりも優位に安価に高性能な酵素を製造でき、さらに酵素の精製、濃縮、製剤化を省略すること、輸送を行わず生産地で消費すること、ユーティリティなどを他設備と共有することにより糖化酵素を他社よりも圧倒的に安価に利用可能となる。この糖化酵素製造技術を基に、オンサイトのメリットを酵素生産だけでなく非可食糖製造と発酵生産にまで拡張して実施するというイノベーションアイデア（図 5-6 緑線の内側）を得た。更に、オンサイトでの非可食糖液を自社で利用するだけでなく、他企業にも広く供給することで、非可食糖の安価製造を達成すると同時に、非可食糖の流通を拡張するイノベーションアイデア（図 5-6 青線の内側）へと発展させた。すなわち、石油化学コンビナートが原油を中心としたコンビナートであるとする、非可食糖を原料としたバイオ化学コンビナートの構築をすることで、非可食糖の国内流通を実現できると考えた。

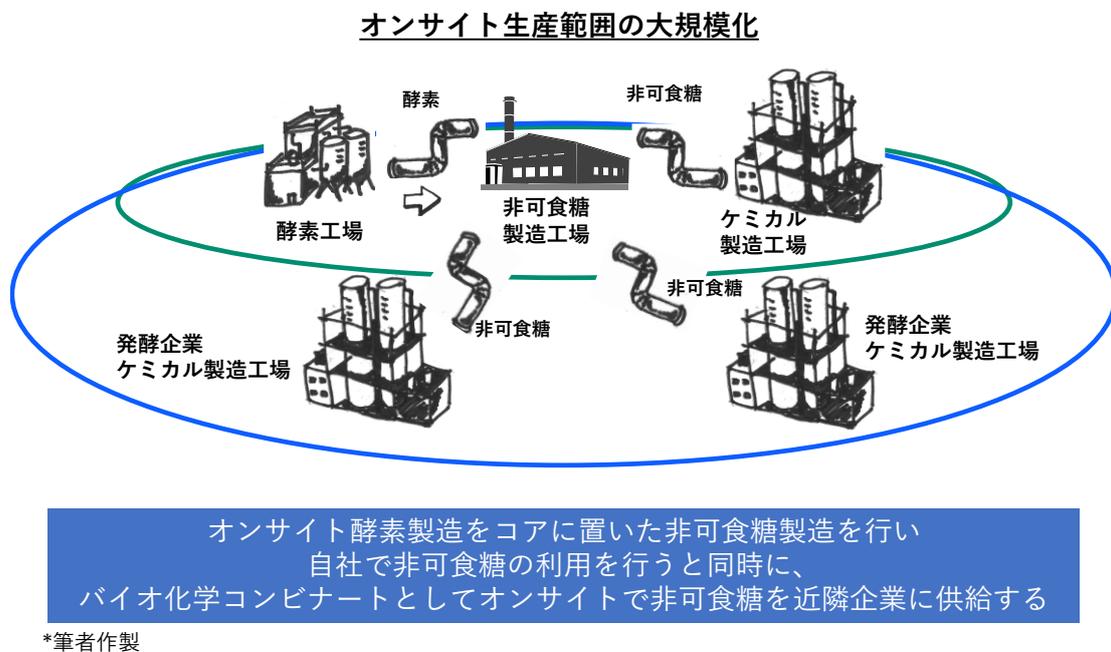


図 5-6 オンサイト生産範囲の拡張による非可食糖を原料としたバイオ化学コンビナート

バイオ化学コンビナートの設置場所は、海外を想定した場合には農業系廃棄物などが多く集積

される農業地帯が考えられるが、日本においては大量に都市部にて廃棄物が生じること、またその収集網が発展している利点を生かし、都市系廃棄物を用いて都市部近郊で化成品製造を行う「都市型のバイオリファイナリー」モデルが適していると考えた。これにより、一般的な農業廃棄物からの製造とは異なり、製品の輸送コストを最小化し、LCA に優れたバイオリファイナリーを目指せるのではないかと考えた。

これらの背景のもと、バイオマス糖化酵素のオンサイト酵素製造技術をコア技術とし、日本で発生する都市廃棄物を原料とした非可食糖を原料としたバイオリファイナリーの実現可能性を検証する。具体的な都市廃棄物のターゲットとしては、回収インフラが整っており、中国の輸入禁止により価格下落が始まっている古紙を 1st ターゲットとし、古紙からの安価糖液を製造することで、バイオ化学コンビナートとして非可食糖の供給を実施できるかについて、コスト試算などを通じ、事業性を評価する。

5-4 本事業の意義

5-3 にて、糖化酵素製造技術をコアに置き、オンサイトでの非可食糖製造を目指すことを示した。本事業を達成することの意義としては、以下が考えられた（図 5-7）。まず、都市部を中心とした新しいバイオ化学コンビナートという産業の発展が期待できる。また、古紙、製紙パルプや一般廃棄物という、今後余剰生産となることが想定されるバイオマスや未利用のバイオマスを、非可食糖を介してバイオケミカルスへと変換し利用するという新たなマテリアルサイクルの流れを創出することにより、需給バランスの健全化、サーマルリサイクル以上の有効活用などが可能となる。更に、最も期待していることとしては、非可食糖が実際に供給されることを通じ、可食糖でのモノづくりから非可食糖へのモノづくりへの転換が起こり、顧客・消費者が好んで非可食由来成分を多く含む商品を手にとれる社会へと繋がること、更には、そういったものを配合した製品でないと販売していく上で不利になる、自然発生的な非可食原料へのシフトに繋がっていくこと（環境調和型商品のデファクトスタンダード化）が期待される。

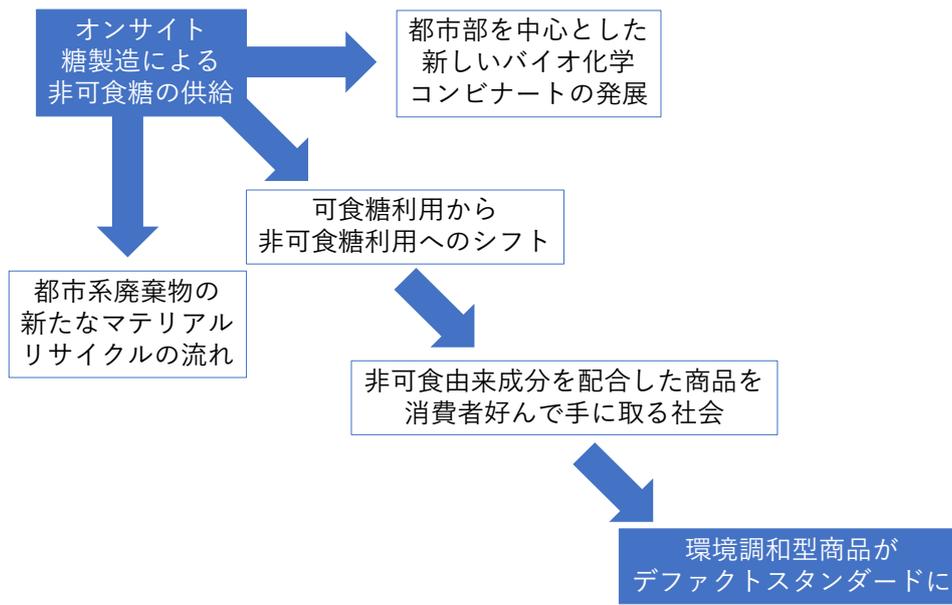


図 5-7 本事業の非可食糖の流通を通じて起こしたい変化

5-5 参考文献および引用

- ¹⁰⁹ 「バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業」事業原簿, 国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 新エネルギー部, 2017年7月19日 (<https://www.nedo.go.jp/content/100867491.pdf>)
- ¹¹⁰ 若宮汐里, 馬場祐太郎, 谷修治, 柴田望, 炭谷順一, 川口剛司. *Aspergillus aculeatus* 由来 β -glucosidase1 の植物バイオマス糖化残渣への吸着が緩和された変異酵素の獲得. 2019年度日本農芸化学会大会

6 事業戦略

本章では、実施を目指す事業の概要を述べ、その事業の価値・優位性の確認のための環境分析を行った。そして、この環境分析結果をもとに、実際の事業の全体像、およびそのビジネスモデルについて考察し、そのビジネスモデルの競争優位性の分析を行った。本章では事業を実施していく上でのビジネスモデル、すなわち製品や価値の流れについて議論し、技術開発の戦略や技術の流れについては7章の技術戦略で述べる。

6-1 事業の概要

5-4にて、本事業の意義、目的は、日本におけるバイオエコノミー、バイオリファイナリーの発展に貢献することであり、この手段として、非可食原料由来の糖を実際に国内に供給していくことを上げた。すなわち、本事業においては、これまでに開発を進めてきた糖化酵素技術（酵素技術、生産技術、オンサイト生産システム）を生かした非可食糖の製造・販売が一つの事業像となる。

非可食糖の原料としては、国内で入手可能な古紙や一般廃棄物を利用する。得られた非可食糖液は、自社で利用して非可食原料由来の化成品の製造を行い、自社製品などへの配合を通じてBtoCでの販売を目指すと同時に、BtoBでの非可食糖液の販売ビジネスを行う。この際、理想的にはバイオ化学コンビナートを形成し、同コンビナート内の企業へのパイプラインでの供給を行う。自社だけでなく、他社へも非可食糖を供給することで、非可食糖の大量製造を達成し、自社だけでなく他社へも安価に非可食糖を供給可能とすることで、日本におけるバイオリファイナリーの普及の促進に貢献する。

6-2 事業の価値と優位性の確認（環境分析）

(1) マクロ環境分析

非可食糖液の製造販売事業については、糖業界に加えて、原料となる古紙・廃棄物業界、さらにバイオエコノミー業界が関与する。そこで、各業界視点での外部環境をPEST分析により整理した（図6-1）。

<p>Politics</p> <ul style="list-style-type: none"> ・脱炭素に向けた世界的な規制、取組みの強化（パリ協定、SDGs、REDII） ・中国・東南アジアにおける廃棄物輸入規制（2021～中国、2026～ベトナムなど） ・TPPにおけるデンプン・糖類の関税の維持（デンプン・糖類はほぼ影響なし） 	<p style="text-align: right;">Economy</p> <ul style="list-style-type: none"> ・脱炭素に向けたESG投資の拡大 ・2Gバイオエタノール企業の相次ぐ倒産（Dupont、DSM×POETが撤退） ・燃料需要低下に伴う製油所のバイオ化 ・コロナ禍による輸送費の高騰・サプライチェーンの変化（世界コンテナ船平均運賃が2019年比で8倍） ・原料高・輸送費高による各種糖価格の上昇（市中価格が2016年比で約10%増）
<ul style="list-style-type: none"> ・環境対応製品へのシフト ・SDGsへの関心の高まり ・コロナ禍に伴う移動の減少（旅行、出張、通勤、海外渡航など） ・地方回帰 <p>Society</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・コロナ禍も相まったデジタル化の普及 ・合成生物学とゲノム編集の発展 ・糖化酵素が上市されるも、普及に遅れ <p style="text-align: right;">Technology</p>

*各参考文献をもとに筆者作製

図 6-1 非可食糖製造に関する PEST 分析

<Politics>

○脱炭素に向けた世界的な取組みが年々強化されている（パリ協定、SDGs、Renewable Energy Directive II: REDII など）。日本においても、これらの達成に向け、2021年10月に2030年度における排出CO₂削減目標が大幅に引き上げられている（26%減⇒46%減）¹¹¹。具体的な達成戦略は明確化されていないが、国内においても今後2030年度に向けて排出CO₂削減に向けた更なる政策が提示されると思われる。

○中国の廃棄物輸入禁止が2021年より開始されている。中国は2020年までは最大の古紙輸出先であったが2021年からは輸出ゼロとなっており、これに伴い古紙輸出量が2020年と比較し大きく減少が見込まれている。また、今後も東南アジアを中心に廃棄物輸入禁止が導入されていくことが決まっており、廃棄物、古紙の輸出に頼った業界維持は難しくなっている。

○TPPにより海外からの輸入緩和が進むが、国内に流通する可食糖についてはTPPを経ても関税は維持される見込みとなっている¹¹²。

◎Politicsに関するインサイト

世界的に脱炭素に向けた政策がとられており、日本においても追随を目指した方針決定がなされているが、脱炭素の1つの原動力となり得るバイオエコノミーの主原料となりうる穀物由来の糖類については、日本において安価に利用できる環境が整っていない。非可食糖の原料として利用可能な廃棄物に目を向けると、中国および東南アジアにおいて輸入禁止の潮流があり、今後国内で生じる廃棄物は国内で利用していく必要がある。

以上から、輸出されていた国内で発生する廃棄物は滞留する傾向が強くなること、バイオエコノミーの推進の観点から、国内での廃棄物からの非可食糖生産は重要になると考えられた。

<Economy>

○ESG 投資が活発化し¹¹³、各社も ESG を前面に掲げた企業戦略を取り始めている。花王においても、1-2 で述べたように Kirei Lifestyle Plan を掲げ、社内外からの ESG 投資を活発化させている。

○2G バイオエタノール工場が相次いで倒産・閉鎖している (Dupont@USA 30MGY Corn stover、Beta Renewables@Italy 20MGY Wheat straw、GranBio@Brazil 22GMY Sugarcane straw)。2G エタノールの想定よりも遅い普及速度、コロナ禍に伴う燃料需要の低迷が一因とされる。

○オイルリファイナーにもコロナ禍の影響が生じている。燃料需要の低迷が続いていることを機に、パリ協定や EU での規則への対応に向け、EU を中心に石油製油所をバイオリファイナー拠点 (ただし廃植物油などからのバイオディーゼルが中心) に変更する流れが生じている。仏 Total Energies (旧 Total) は Grandpuits 製油所を Zero-crude platform に転換し、航空燃料、ディーゼル、PLA 製造やプラスチックリサイクルプラントに¹¹⁴、伊 Saras の Sarroch 製油所、オーストリア OMV の Schwechat 製油所などは化石燃料と水素化処理植物油 (HVO) 製造設備が併設される形となった。なお、廃油からのバイオディーゼル製造についてはフィンランドの NESTE が進んでこれまで実施してきており、結果的に廃油の供給不足が生じ、廃油価格の上昇が進んでいる。

○コロナの影響により、コンテナ価格が大きく上昇し、世界的な輸送費の高騰が生じている。世界の主要コンテナ船航路運賃の加重平均であるフレイトス・バルチック国際コンテナ指数 (FBX)¹¹⁵は 2019 年から約 8 倍に高騰しており、サプライチェーンの国内回帰が進むと考えられる。

○輸送価格の高騰、原料価格の上昇などに伴い、国内の可食糖価格も上昇している¹¹⁶。ブドウ糖、異性化糖、水あめなどの糖の市中価格はコロナ前と比較し、およそ 10%上昇している。

◎Economy に関するインサイト

コロナのパンデミックは、コンテナ輸送価格の高騰に端を発した各種原料価格の上昇、輸送用燃料の需要低下など、経済に大きな影響を与えている。合わせて、脱炭素化について着実に進んでおり、ESG 投資の拡大に伴い、石油関連企業の脱石化の加速が著しい。

以上から、海外を含むサプライチェーン自体のリスクの増加、輸送費の上昇、輸送に係る LCA の観点から、リスクヘッジとして製造業の国内地産地消への潮流が生じうるのではないかと考えられた。

<Society>

○環境対応製品が次々と上市され、環境に配慮した製品を選択できるようになってきている。車の脱ガソリン化が進み、国内では電気自動車、水素自動車、海外では電気自動車とバイオエタノールによるガソリン代替が進んでいる。また、国内ではマイクロプラスチック問題に起因する

脱プラの流れが加速し、紙ストローの普及や、ビニール袋の無料配布禁止などが進んでいる。

○SDGs への意識の高まりが国内でも進み始めている。2021 年には国内での認知度は 50%を超え、若い世代を中心に認知度が大きく向上してきている¹¹⁷。

○コロナ禍に伴い、移動の機会が大きく減少している。これに伴い、燃料需要の低下、テレワークの普及など、大きな社会構造の変化が生じている。そういった背景もあり、出勤の必要性が低下し、東京一極集中から地方回帰が進み始めている¹¹⁸。

◎Society に関するインサイト

環境を配慮した製品、サービスが経済的に不利であっても採用されるケースが増えてきている。ただし、提供側に導入コストがかかっているものが多い。今後もこのような製品が増えていくと考えられ、いずれ消費者の環境配慮への意識は若い人も含め変わっていくと考えられる。しかしながら、環境適応性という価値が製品価格へと転嫁されることが消費者から忌避されていることを考慮すると、安価に利用可能なバイオ変換原料である非可食糖には大きなニーズが生じると考えられた。

<Technology>

○コロナ禍の影響もあり、電子マネー、電子署名、紙媒体から電子媒体へ、ウェブ会議など、デジタル化、ウェブ化が大きく進んでいる。また、コロナへの感染確認に用いられる PCR などの自動化が進み、これに伴いオートメーション技術も急激に普及が進んでいる。

○バイオエコノミーに向けた合成生物学が急激に発展している。特にグルコースからのケミカル生産に向けた代謝経路設計などが大きく進展してきており、今後糖化酵素を用いた糖製造技術はより重要度が増すと考えられる。

○セルロース原料を糖に変換する糖化酵素が上市されて 10 年以上経つが、予想よりも普及が遅れている。糖化酵素のコスト高、セルロースエタノールの市場形成の遅れなどが原因と考えられる。

◎Technology に関するインサイト

バイオ分野は、自動化と AI との相性が良く、ゲノム編集技術などの普及と相まって合成生物学が急激に発展してきており、今後はバイオ変換を通じたモノづくりが大きく普及していくと考えられる。しかしながらセルロースからのバイオ変換については酵素コストの観点からほとんど普及していない。このことから、安価な糖製造が可能となれば、非可食糖からのモノづくりへと急激にシフトする可能性が考えられた。

(2) バイオリファイナーの市場環境分析

<バイオ産業の市場>

世界におけるバイオ産業の市場規模は 2019 年に 4,364 億米ドル、2026 年には 7,157 億米ドルに成長することが予想されている¹¹⁹。うち、医薬・健康に関する部分が 60%強を占めており、バ

イオリファイナリーに関連性の深い農業・食品、工業、資源・環境などについては2019年で1,702億米ドル、2026年には2,600億米ドルが見込まれる。

日本におけるバイオ産業の市場規模は、2019年において、従来の発酵・醸造技術等を含めた広義のバイオ産業では約57兆円、遺伝子組換え技術、生体分子解析技術等の先端技術を活用した製品・サービスに限った狭義のバイオ市場でも3.6兆円の市場規模がある¹¹⁹。狭義のバイオ産業のうち、医療・健康の除いたものについては、約1.6兆円の市場規模となっている。

EUにおけるバイオベースケミカル・プラスチックの生産量は2016年において4,725キロトンであり、化石原料由来を含めた総生産量に対する割合は3.0%となっている。うち、バイオベース成品の製造量が多いものは「界面活性剤」と「塗料・コーティング剤・インク・染料」であり、それぞれ1,500、1,002キロトンであり、バイオベース製品比率は50.0%、9.7%に上る。これに対し、バイオ由来のプラットフォームケミカルズ、プラスチック用ポリマーはそれぞれ181、268キロトンの製造量しかなく、バイオ化率が0.3%~0.4%に留まっている⁸。

<バイオエタノールの市場>

バイオエタノールの市場については、2019年で432億米ドル、2025年で648億米ドルと予想されている⁹。しかしながら、セルロース系エタノール（2Gエタノール）については、2019年で2.8億米ドル、2025年には40.8億米ドルの市場規模が予想されており、シェアとしては1%未満と予測されている。2Gエタノールプラントが最も多いのは米国であるが、バイオエタノール自体の需要が少なく、1Gエタノールプラントに比べて操業コストが高いことから、2Gエタノールの生産は7億リットル程度にとどまっている⁹。

EUにおける2Gエタノールの生産については、イタリアのbeta renewableとスペインのabengoaの生産が停止したが、St1やClariantなどが積極投資を行っており、フィンランド、スロバキア、ルーマニア、ノルウェーなどで生産能力の拡張が発表されているため、2020年時点でEUでの2Gエタノールの現在の生産能力は約2億4,000万リットルとなる。ただし、実際の生産量は5,000万リットルを超えない程度と予想される⁹。

ブラジルでは、RaizenとGranBioによる2Gエタノールを生産が行われており、最大生産能力は1億2,700万リットルであるが、2019年の生産量は2,800万リットルに留まっている⁹。

◎市場環境分析に関するインサイト

バイオ産業の市場規模は拡大しており、日本国内においても非常に大きな市場となってきているが、EUの例から見えるように、バイオベースケミカル自体の普及、更には非可食原料由来ケミカルはほぼ普及が進んでいない。可食原料との競合、脱石化を想定すると、非可食原料への移行は必至と考えられ、糖製造コスト面での課題解決が進めば大きく市場構成は変わってくると予想された。

(3) 競合環境分析

本事業では、糖化酵素をオンサイト製造し、バイオマスから安価に非可食糖を製造する。そこで、糖化酵素の製造、および非可食糖の製造に関して、競合の有無、技術の方向性・強み、現在の状況を把握し、本事業が曝される競合環境を理解することを目的に、糖化酵素を製造する大手企業、非可食糖製造に関するスタートアップ企業などを調査し、各社の特徴を比較した。

<大手企業>

大手企業については、非可食糖やケミカルス製造を実施している企業は見当たらず、酵素製造を実施する企業3社について比較した（表6-1）。

表 6-1 酵素製造を実施する大手企業

企業名	Novozymes	DSM	Clariant
国	デンマーク	オランダ	スイス
売上	2,500億円(2020)	1兆670億円(2020)	4,640億円(2020)
セグメント売上	446億円 (Bioenergy)	242億円 (Innovation Center)	1,050億円 (Catalysis)
製品	糖化酵素	糖化酵素	トータルパッケージ (エタノール・糖)
技術的特徴	酵素のオフサイト製造、糖化酵素性能	酵素のオンサイト製造 (Poet-DSM)	酵素のIntegrated 生産、プロセス設計
化成品製造	なし	なし	納入先が製造（ルー マニアのみ自社？）
糖用酵素の供給源	—	DSM	Clariant
酵素製造方法	オフサイト	オフ/オンサイト	オンサイト

・Novozymes

世界一の酵素メーカー。糖化酵素のオフサイト製造を行っており、Cellic シリーズを販売している。糖化酵素はアメリカ（ネブラスカ州）にてオフサイト製造を行っている。

技術的特徴は、世界一の酵素開発総合力を活かした高性能な糖化酵素の製造と実績に裏付けられた安定供給能力である。近年になりエタノール発酵用酵母の販売も始めているが、自社での糖やケミカルス製造は行っていない。

・Clariant

スイスのスペシャリティケミカル企業。バイオマスさえあればバイオエタノール製造が可能となる Sunliquid と呼ばれるターンキー方式のパッケージビジネスを行う。Sunliquid は近年採用が相次ぎ、バイオエタノールで最も勢いのある企業と言える。

技術的特徴は、バイオマス原料から酵素を製造可能とするインテグレート製造システムに加え、

糖化酵素、前処理、精製、発酵までさまざまな技術開発を行っており、これによりターンキー方式を可能とするトータルプロセスのパッケージビジネスが可能となっている。

酵素製剤自体の販売は行っていない。また、スペシャリティケミカル企業ではあるが、自社でのエタノール製造はルーマニアの工場を除き商用レベルでは行っていない。

Clariant については、非常に特徴的なビジネルモデルを取っていることもあり、本企業の事業戦略分析を実施し、その分析結果はイノベーションストラテジー研究成果書内に記載した。

・ DSM

オランダの化学企業。アメリカのコーンエタノールの製造企業である POET と合併会社 POET-DSM を設立し、Project Liberty とコーン残渣からの 2G エタノール製造を検討してきたが、コロナ禍による燃料エタノールの需要の減少などもあり、2020 年に工場を閉鎖した¹²⁰。

技術的特徴は、他社とは異なる宿主 *Rasamsonia emersonii* を用いた酵素製造であり、その酵素は高温・低 pH で使用可能。酵母についても独自の組換え菌を有しており、糖化～発酵に必要な微生物をまとめて供給できるのが強みである。

2020 年の POET との Project Liberty の工場閉鎖を受けてか、2021 年以降に自社酵素のオフサイト提供を開始することを発表している。今後は、Novozymes に近い戦略での展開が予想される。

<スタートアップ企業>

スタートアップ企業では、非可食糖製造を目指した検討を実施している企業が複数社存在していた（表 6-2）。

表 6-2 非可食糖製造に関わるスタートアップ企業

企業名	Leaf Resources	Renmatix	American Process (GranBio)	Arbiom
国	オーストラリア	アメリカ	アメリカ (ブラジル)	アメリカ・フランス
売上	360万円(2020)	10億円(2019)	14億円(2019)	1360万円(2020)
製品	糖液製造プロセス	スペシャリティ化成品	NCC, NFC, 2G sugar, wood molasses販売	前処理ライセンス+酵素販売
技術的特徴	グリセロールを用いた前処理技術	超臨界水を用いた2G糖製造 (酵素なし)	ナノセルロースと糖の併産	リン酸前処理を用いた2G糖製造
化成品製造	納入先が製造	自社製造 (スペシャリティ)	自社製造	納入先が製造
糖用酵素の供給源	Novozymes	—	?	Arbiom
酵素製造方法	—	—	?	オフサイト

・ Leaf Resources

オーストラリアのバイオマス糖製造に関する技術を有するスタートアップ企業。技術的特徴は、

粗グリセロールと少量の硫酸を用いたバイオマス前処理技術（Glycell）。前処理後の基質は Novozymes の Cellic CTec を用いて糖化する¹²¹。

ビジネスモデルとしては、前処理プロセスの販売であり、自社での糖製造を行わない。

・ Renmatix

アメリカに本社を置く、糖製造にコア技術を置くスペシャリティケミカル企業。技術的特徴は、超臨界水を用いたバイオマスの分解技術であり、酵素を用いずに糖を製造する。得られた糖は自社で変換し、バイオマス由来を謳った高付加価値品としてブランディングして販売している。

・ American Process Inc.

アメリカのスタートアップ企業。技術的特徴は、糖製造技術とナノセルロース製造技術。糖製造時には、SO₂ やエタノールを用いた前処理によってバイオマスからセルロース、ヘミセルロース、リグニンを分離し、セルロースとヘミセルロースを酵素分解して糖に変換する。ナノセルロース製造時には、異なる前処理方法にて製造する。2019 年にブラジルのバイオエタノール企業 GranBio に買収された¹²²。

・ Arbiom

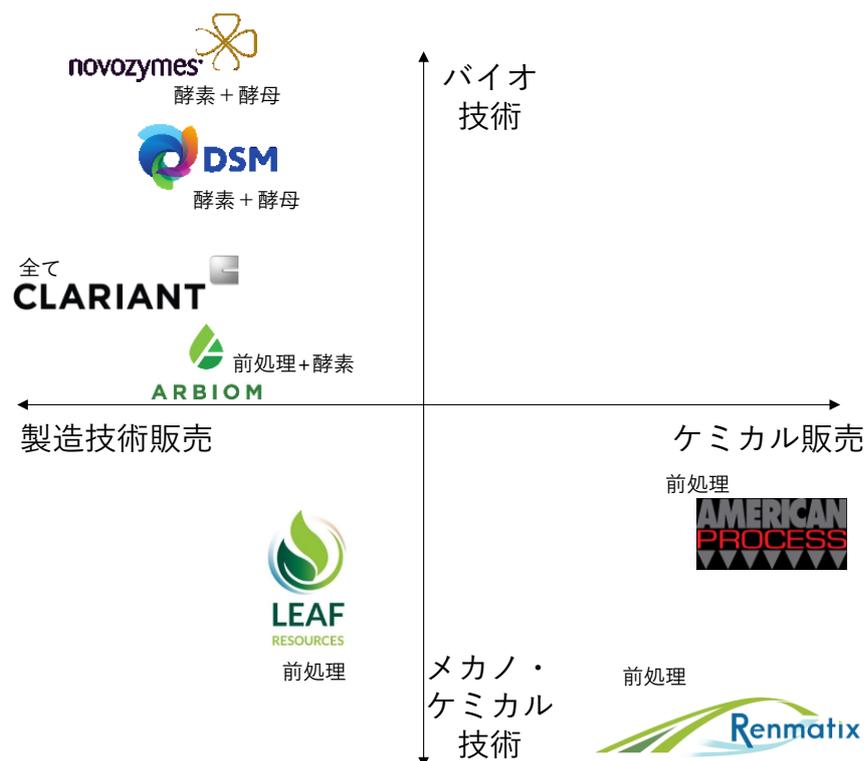
フランス・アメリカのスタートアップ企業。技術的特徴は、リン酸を用いた前処理プロセス。リン酸はセルロースを膨潤させることが知られており、リン酸を前処理で用いることで、エンドグルカナーゼ、ベータグルコシダーゼ、キシラナーゼを含む糖化酵素製剤にて糖化を行う。一般的なセロビオヒドロラーゼが多く必要な酵素製剤とは異なる製剤組成にて糖化ができることが特徴となる。

このため、ビジネスモデルとしては、前処理プロセスのライセンスアウトと、自前酵素の継続的な提供を想定している。自社でのケミカルス製造は行っていない。

◎他社環境分析に関するインサイト

上記に示した糖化酵素または糖化に関する技術を有する企業について、保有するコア技術の領域、ビジネスモデル（ケミカル販売か製造技術販売か）のポジショニングマップを作成した（図 6-2）。バイオ（ここでは糖化酵素、酵母、発酵など）をコア技術に有する企業では、セルロース糖やバイオエタノールを実際に製造する企業が見当たらなかったのに対し、ケミカル・メカノ技術を有する企業については、糖やその変換物などを販売する企業が見られた。これは、バイオ関連の企業の生産物が酵素などの高付加価値な発酵産物を販売しているため、化成品原料のような安価な糖やエタノールについては、ビジネス戦略上販売しにくい、またはケミカル製品の販売網を持たないことなどが原因ではないかと考えられた。

また、ここには示していないが、Genomatica や Amylis、Avantium といった糖から特定の化合物を製造することに特化した企業が多く存在するため、糖化酵素、糖製造、化成品製造とバイオ企業は分業化が進んでいることも考えられた。



*筆者作製

図 6-2 競合となり得る企業のポジショニングマップ

(4) 自社環境分析

花王は大きく分けてコンシューマープロダクト事業とケミカル事業を持つ化学企業である。BtoCで化粧品、ヘアケア用品、洗剤などを販売するコンシューマープロダクト事業の売上が全体の約8割を占め、残り2割のケミカル事業ではBtoBで油脂製品や機能性材料製品などを販売している¹²³。自社環境分析結果とそこから得られたインサイトについては、イノベーションストラテジー研究成果書内に記載した。



※1 為替変動の影響を除く実質増減率
 また、スキンケア・ヘアケア事業については、2020年12月期より一部の取引において売上高の認識方法を総額から純額に変更しており、その影響も除く
 ※2 ケミカル事業の売上高はセグメント間取引を含む
 ※3 売上高構成比は外部顧客に対する売上高で算出

*参考文献123より抜粋

図 6-3 花王の事業領域と売上

(5) 環境分析のまとめ

- ・日本国内における排出 CO₂ 削減目標は大幅に引き上げられており、達成のためには国内におけるバイオエコノミーの進展が必要不可欠である
- ・世界的には、バイオエコノミーへの投資が活発化し、コロナ禍にあってもその傾向は変わっていない。
- ・最も普及が進んでいるバイオエタノールについては、想定以上にセルロースからの製造コストが下がっておらず、またコロナ禍による燃料需要の減少により、想定よりも 2G エタノールの普及が大幅に遅れている。
- ・プラットフォームケミカルズ、プラスチック用ポリマーについては、バイオ化率がとても低く、これらのバイオ化がバイオエコノミーの進展のカギを握っている。
- ・大手の競合となる企業は非可食糖製造技術開発を行っているものの、自社での糖製造を考慮しておらず、また、糖製造の実施を試みている企業の多くは化学変換をコアにおいたスタートアップ企業であり、酵素をコアにおいた企業は実施していない。

6-3 事業の概要（ビジネスモデル）

(1) 目指す事業形態と全体のロードマップ

6-2 の環境分析から、非可食糖の製造に必要な酵素関係の技術について強みを有する企業が、非可食糖を実際に製造しようとしている状況は確認できなかった。このことから、バイオのコア技術である糖化酵素技術を生かしながら、オンサイトで非可食糖製造を行い、自社でのケミカル製造への利用⇒自社製品への配合と、非可食糖を他社にも販売・供給し、日本におけるバイオエコノミーを推進するというビジネスモデルは十分に、新規性、優位性があるものではないかと考え

られた。

しかしながら、実際に非可食糖製造事業を実施していくことを想定した場合、下記に示す項目の検証に期間を要することが考えられた。

①大量の原料、すなわち都市廃棄物の確保には、自治体などの協力が不可欠となる。ここに適した自治体の模索、交渉などに数年単位の時間を要する。

②非可食糖製造事業を実施するためには、糖化酵素の製造のみならず、糖の製造、原料の前処理、糖の供給などについても技術開発、導入が必要となる。岩盤技術が構築完了している糖化酵素製造と異なり、糖液の製造、原料処理については別途実証が必要となる。これらの実証期間を想定すると、糖化酵素製造と糖液製造の技術確立時期にズレが生じる。

③各技術の構築後に事業開始となると、非可食バイオリファイナリーの実装自体が遅れてしまい、結果的に日本におけるバイオリファイナリーの遅れが改善しないままとなる。

そこで、これらの期間のズレの問題を解決するために、2つの事業モデルとして、中規模のバイオマスをターゲットとした国内での「オンサイト糖化酵素製造システム外販事業」の展開を短中期的に、大規模のバイオマスをターゲットとした「非可食糖製造事業」を中長期的に実施し、事業が実施できない空白の時間を生じなくすることで、国内における非可食バイオリファイナリーの普及を連続的に推進できないかと考えた（図6-4）。

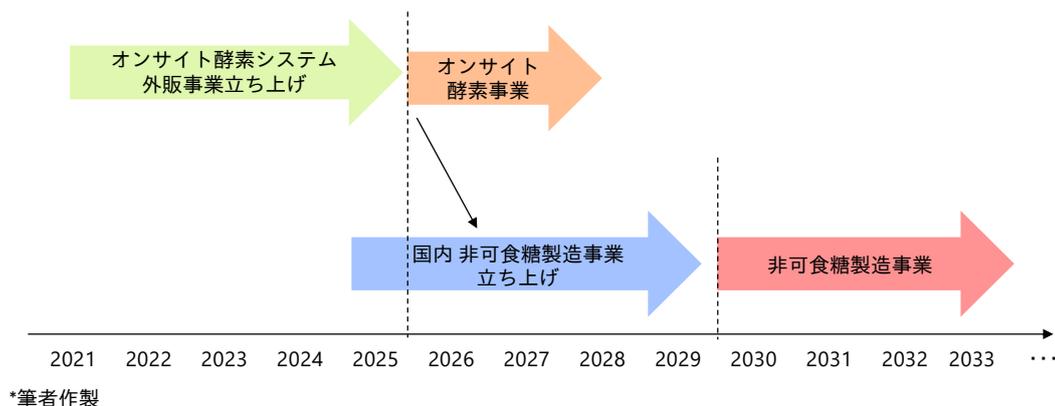


図 6-4 事業化に向けた簡易ロードマップ案

(2) オンサイト酵素システム外販事業のビジネスモデル

非可食糖製造事業を実施する前に非可食バイオリファイナリーを普及させることを目的として実施したいと考えたオンサイト酵素システム外販事業について、そのビジネスモデルをビジネスモデルキャンパス¹²⁴に整理を行い、モノ、カネ、情報の流れをビジネスモデル図解キット¹²⁵にて整理した。ビジネスモデルキャンパスの各項目に関する詳細や、ビジネスモデルの図解についてはイノベーションストラテジー研究成果書内に記載している。

(3) 非可食糖製造事業のビジネスモデル

実際に非可食糖を製造・販売し、非可食糖からのバイオリファイナリーを達成していくための

非可食糖製造事業についても、ビジネスモデルをビジネスモデルキャンバスに整理を行い、モノ、カネ、情報の流れをビジネスモデル図解キットにて整理した。ビジネスモデルキャンバスの各項目に関する詳細や、ビジネスモデルの図解、更に非可食糖を原料としたバイオ化学コンビナートにおける各企業の関係性についてはイノベーションストラテジー研究成果書内に記載している。

(4) 2 事業の関係性と時間軸

ここまでで 2 つの事業について述べたが、これらは時間軸、規模、出口などで相補するような関係で展開できると考えている。そのイメージを図 6-8 に示した。また、この 2 つの事業を実施していく上で、実施判断などの時期なども含めた詳細ロードマップを策定した。これについてはイノベーションストラテジー研究成果書に記載した。オンサイト酵素システム外販事業は、既に非可食エタノールなどの事業を考えている顧客に対し、糖化酵素の安価供給手段として提供する形を想定している。規模としては中規模のバイオマス処理量を想定し、比較的フットワーク軽く事業展開できると考えられる。これに対し、非可食製造事業は、大量のバイオマスを用い、安価に非可食糖の供給を行うことを目的とするため、必然的に投資額が大きくなり、フットワークは重くなると考えられ、その原料の収集できる箇所も大都市圏に限られると考えられる。

ここで提案する 2 事業を組み合わせることで、国内における非可食バイオリファイナリーの早期からの推進と本格的なバイオ化学コンビナート化の推進の両方を、中規模と大規模のバイオマス利用の両方を、比較的容易に事業化できるバイオエタノールと、難易度が高いその他ケミカルの両方の可能性について同時並行で進めていくことができると考えている。

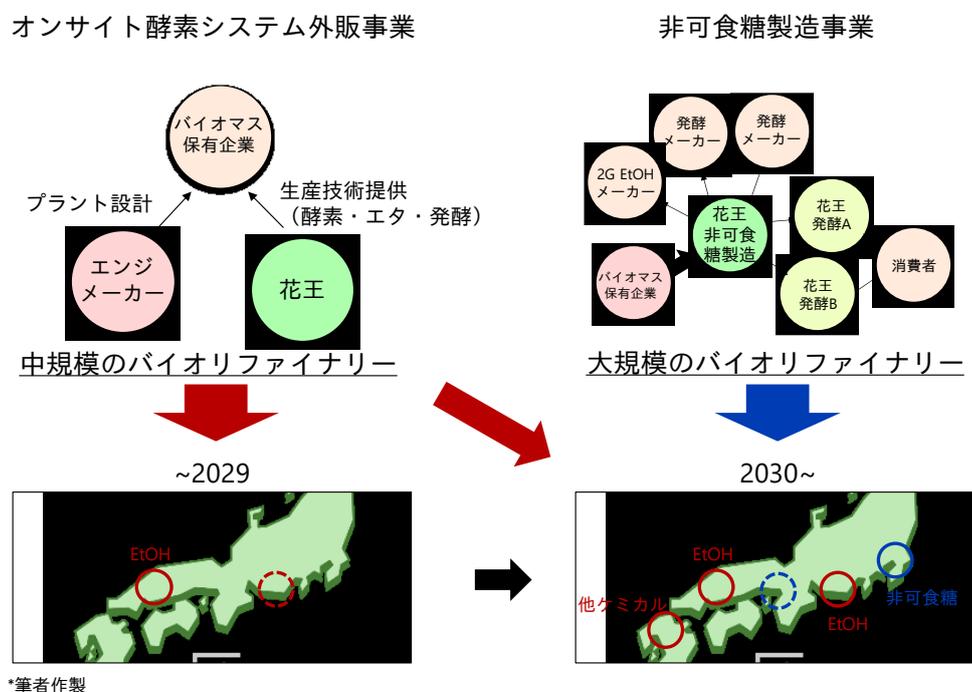


図 6-5 2 つの事業を通じて達成していきたいバイオリファイナリーの展開

将来的な環境価値を考慮した生産化合物の設定

非可食糖製造における原料としての利用を想定している古紙や一般ごみについては、その回収は自治体の補助金に依存している側面もあり、本事業を安定させて実施していくためには補助金に頼らない形での古紙、一般ごみの収集が必要となると考えられる。この点から、より安定的に需要が見込まれる環境調和型の素材への変換が望まれる。そこで、生産化合物候補について考察を行い、その詳細はイノベーションストラテジー研究成果書内に記載した。

非可食糖から作られた製品のブランドマーケティング

(3)で示したビジネスモデルでは非可食糖製造事業を大規模に実施することを通じて、安価製造を達成することで可食糖と同様に普及を目指すことを想定しているが、小規模からの普及を目指すにあたっては、非可食バイオマス由来であることを価値として認識してもらえる業界向けに非可食糖由来化成品を販売していくことが重要であると考えられる。そこで、非可食由来化成品に価値を見出せる業界について、非可食糖のブランドマーケティング方法について考察を行い、その詳細はイノベーションストラテジー研究成果書内に記載した。

6-4 事業の競争優位のポイント

事業の競争優位性を評価するために、外部環境分析として5フォース分析、ポジショニング分析、内部環境分析としてバリューチェーンおよびVRIO分析を実施した。

(1) 5フォース分析

非可食糖製造事業に関する5フォース分析を実施した結果を図6-6に示した。業界内に非可食糖製造を行う事業主がないため業界内の競争は弱く、また価格競争が必至の業界であり、新規参入には規模の経済と技術ハードルを越える必要があり新規参入は難しい。

また、代替品については、既に可食糖が存在しており、可食糖でも糖源としては良いと考える買い手にとっては買い手の交渉力を強める一因となると考えられる。しかしながら、ESG視点で非可食糖へと切り替えることを考えている場合、非可食糖の供給元がないため交渉力は弱まると考えられる。糖の原料となるバイオマス自体は多岐にわたるが、今回ターゲットと考える古紙については、国内需要が大きく減少し、さらに中国の輸入禁止に伴って需給バランスが崩れているため、売り手の交渉力は弱いと考えられる。しかしながら、日本の古紙は他国の古紙と比較し分別の質が良いという特徴があり、東南アジアにおいて古紙の需要が増えれば輸出との取り合いになる可能性があるため状況に応じて中程度まで引きあがると考えられる。

代替品としては、先述した可食糖に加えて、化学法により生産されつつある非可食糖や、CO₂直接変換技術が進むことによる基幹原料の化学製造が考えられる。いずれも酵素法での非可食糖製造よりは遅れているが、今後をウォッチしておく必要がある。

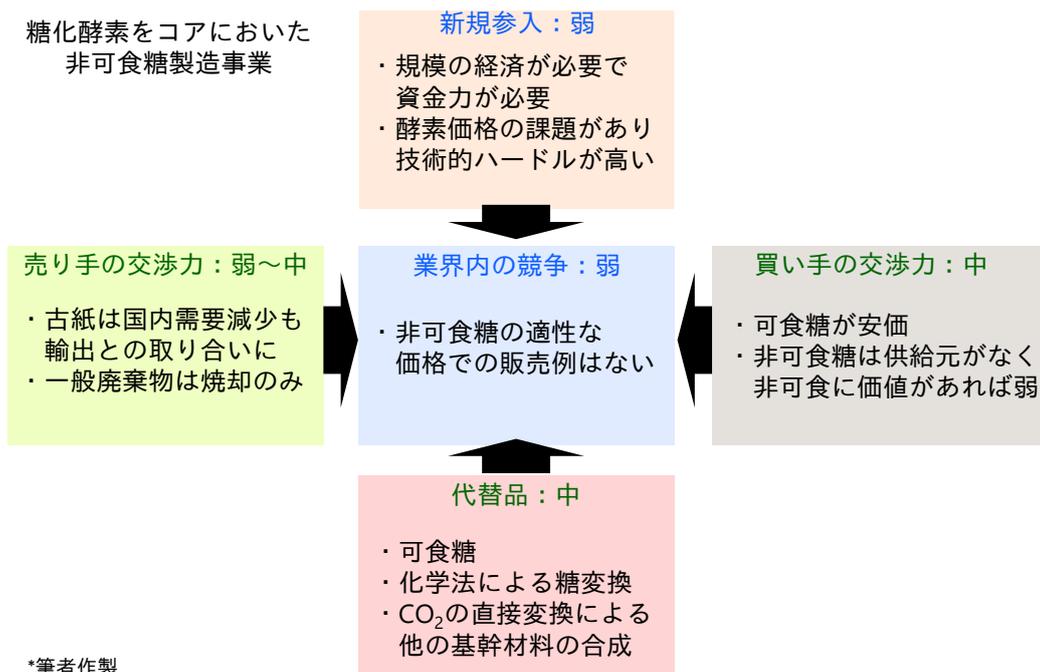


図 6-6 非可食糖製造事業の 5 フォース分析

続いて、オンサイト酵素システム外販事業に関する 5 フォース分析を実施した。その結果はイノベーションストラテジー研究成果書内に記載している。

(2) ポジショニング分析

ポジショニング分析の結果を図 6-7 に示した。非可食糖製造事業は、糖化酵素製造をコア技術として置いた事業展開を想定しており、バイオ技術によりケミカル販売を実施する右上のポジションに位置する。このポジションには競合他社がない。これは先述の通り、バイオ関連企業は、その生産物が酵素などの高付加価値な発酵産物を販売しているため、化成品原料のような安価な生産物については、ビジネス戦略上販売を実施しにくい、またはケミカル製品の販売網を持たないことなどが原因ではないかと考えられた。これに対し、花王は自社でケミカル製品を製造販売している実績があり、また自社で流通網を有していることもあり、非可食糖製造～ケミカル製造まで手掛けることは他社との競争優位を保つ上で重要なポイントとなると考えられた。

オンサイト酵素システム外販事業については、左上のポジションとなった。ポジショニング分析の詳細はイノベーションストラテジー研究成果書内に記載している。

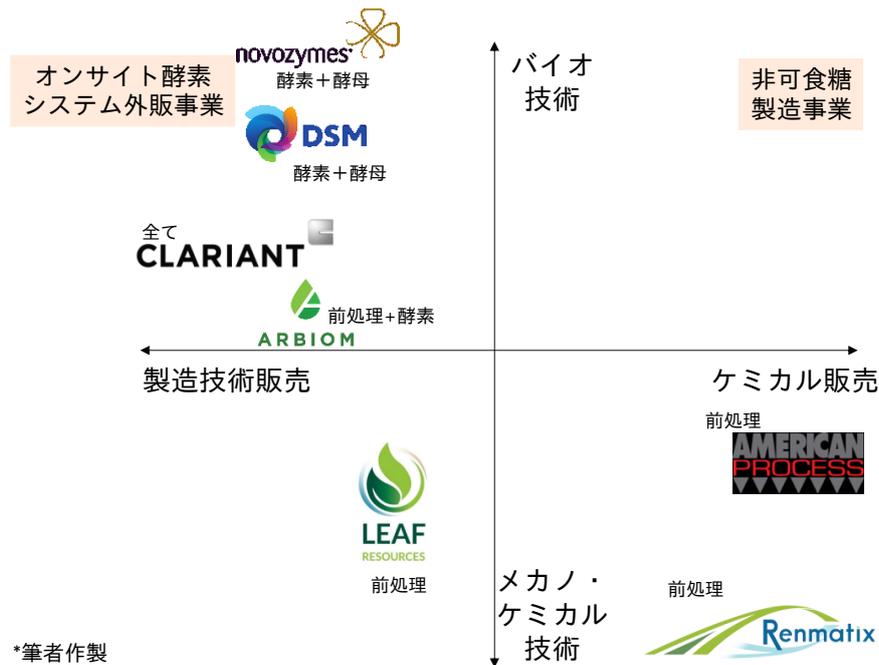


図 6-7 2 事業のポジショニングマップ

(3) 非可食糖製造事業に関わるバリューチェーン分析・VRIO 分析

自社事業分析結果を基に、非可食糖製造事業に参入した場合における既存バリューチェーンとの連結による競争優位性の評価についてバリューチェーン分析、および VRIO 分析を通じて行った。これらの分析結果の詳細はイノベーションストラテジー研究成果書内に記載している。

6-5 事業戦略のまとめ

本章では、日本におけるバイオリファイナリーの普及を推進することについても目標に含めることで、非可食糖製造事業とオンサイト酵素システム外販事業の 2 つを連続的に並行して進めていくことを提案した。またこれらの事業を実施していくにあたって、バイオリファイナリーと糖化酵素に関わる外部環境分析を行い、これらの事業を実施していく上での優位性の確認を行った。また、2 つの事業に関し、事業を進めていく上でのビジネスモデルの立案、および事業を実施していく上でのロードマップを策定した。

非可食糖製造事業は、可食糖と同等の価格帯での製造の実績がなく、調査した限りでは非可食糖の製造・販売も非可食糖を用いたケミカル生産も現在においてはほぼなされていないことが確認された。以上から、本事業を通じて非可食糖が可食糖に近い価格帯で入手可能となった場合には、可食糖を用いたケミカル生産にとって代わる可能性が十分にあり、事業性があると考えられた。また、5 フォース分析から、事業を開始後も、新規参入や代替品のリスクも少なく、可食糖の価格が非常に不安定なことを考えた場合、国内で糖を調達できる優位性などを発揮できれば長期的にも安定した事業展開が期待できるのではないかと考えられた。また、競合分析を行ったところ、類似のコア技術を有したバイオ技術保有企業が糖製造事業への展開を想定していないこと、VRIO 分析から花王では他者とは独自の流通網を有しており、糖やケミカル製造に有利なことなど

を考慮すると、技術や独自の経営資源をもって他社とは差別化した事業展開を進められると考えられた。

6-6 参考文献および引用

- 111 首相官邸 地球温暖化対策推進本部, 「日本の NDC (国が決定する貢献)」, 2021 年 10 月 22 日 (https://www.kantei.go.jp/jp/singi/ondanka/kaisai/dai48/pdf/ndc_kouken.pdf)
- 112 農林水産省 TPP 大筋合意について, 「TPP 農林水産物市場アクセス交渉の結果」環太平洋パートナーシップ (TPP) 協定に関する説明会, 2015 年 10 月 9 日 (https://www.maff.go.jp/j/kokusai/tpp/pdf/tpp_1.pdf)
- 113 「世界の ESG 投資額 35 兆ドル 2 年で 15%増」日本経済新聞, 2021 年 7 月 19 日 (<https://www.nikkei.com/article/DGXZQOUB163QV0W1A710C2000000/>)
- 114 Energy Transition: Total Is Investing More Than €500 Million To Convert Its Grandpuits Refinery Into a Zero-Crude Platform for Biofuels and Bioplastics, Total Energies, Sep. 24, 2020 (<https://www.total.com/media/news/news/energy-transition-total-investing-more-eu500-million-convert-its-grandpuits>)
- 115 フレイトス・バルチック国際コンテナ指数 (FBX) (<https://fbx.freightos.com/>)
- 116 農畜産業振興機構, 「異性化糖等糖化製品市中相場 (東京)」 (<https://www.alic.go.jp/starch/japan/data/kokunai2-1.pdf>)
- 117 「SDGs 認知率はコロナ禍を経てほぼ倍増。10代は70%超え～最新調査レポート」, 電通, 2021 年 6 月 22 日 (<https://www.dentsu-sdgs.com/article/report/2021/06/22/509/>)
- 118 「「東京じゃなくていい」コロナ・デジタル化で地方回帰!」日本経済新聞, 2021 年 7 月 19 日 (<https://www.nikkei.com/article/DGXZQOUA0671Q0W1A700C2000000/>)
- 119 経済産業省 産業構造審議会 商務流通情報分科会 バイオ小委員会 報告書「バイオテクノロジーが拓く『第五次産業革命』」, 2021 年 2 月 2 日 (<https://www.meti.go.jp/press/2020/02/20210202001/20210202001-1.pdf>)
- 120 'Project Liberty' cellulosic ethanol plant in Emmetsburg closed, RADIO IOWA, Oct. 21, 2020 (<https://www.radioiowa.com/2020/10/21/project-liberty-cellulosic-ethanol-plant-in-emmettsburg-closed/>)
- 121 Leaf Resources teams with Novozymes to boost yields of cellulosic sugar production, Biofuels Digest, Dec. 8, 2017 (<https://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2016/12/08/leaf-resources-teams-with-novozymes-to-boost-yields-of-cellulosic-sugar-production/>)
- 122 GranBio Acquires 100% Equity of the North American Biotechnology Firm American Process Inc. (API), GranBio, Mar. 3, 2019 (<http://www.granbio.com.br/press-releases/granbio-acquires-100-equity-of-the-north-american-biotechnology-firm-american-process-inc-api/>)
- 123 花王株式会社「2020 年 12 月期決算説明会」2021 年 2 月 3 日 (<https://www.kao.com/content/dam/sites/kao/www-kao-com/jp/ja/corporate/investor->

[relations/pdf/presentations-fy2020-01.pdf](#))

¹²⁴ ビジネスモデル・ジェネレーション ビジネスモデル設計書, Alex Osterwalder, 翔泳社

¹²⁵ ビジネスモデル図解キット (<https://zukai.co/products/bizgram-kit>)

7 技術戦略

本章では、2つの事業を実際に進めていくにあたって、現在保有している技術、事業実施に必要な技術を整理し、競争力を維持する上で獲得すべき技術の獲得戦略について述べる。

7-1 技術の概要

非可食糖製造事業を実施していくためには、糖化酵素に関わる技術のみならず、前処理、糖製造などの様々な技術が必要となると考えられる。事業を行う上で必要となる技術について整理しその全体像を図 7-1 に示した。

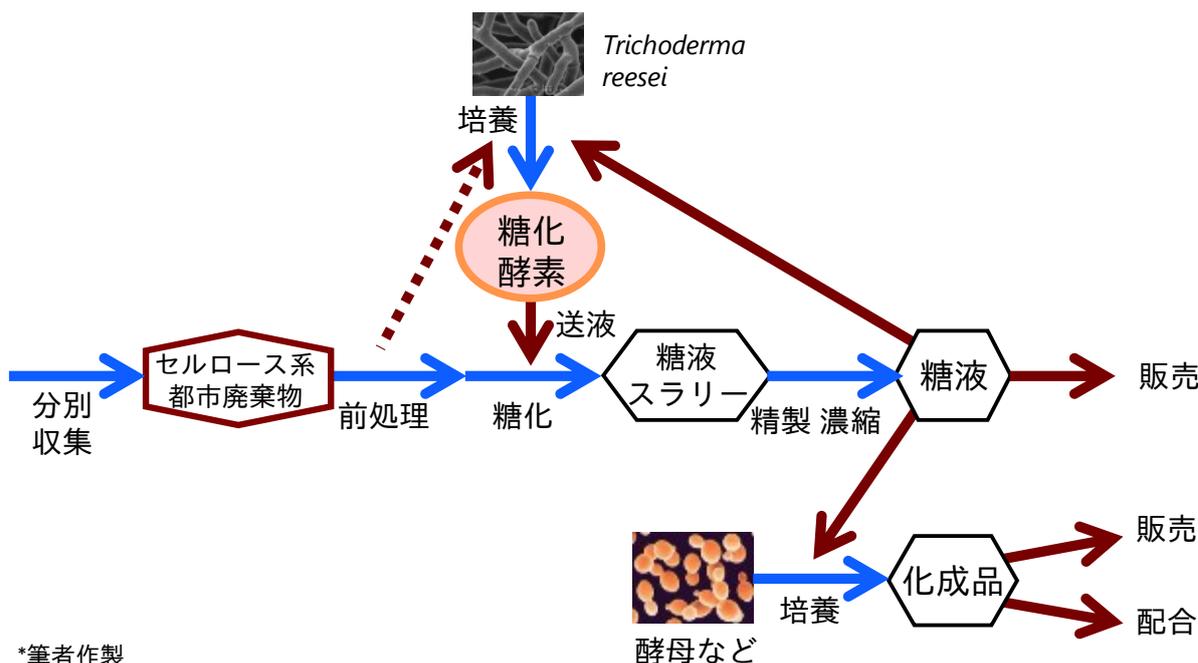


図 7-1 非可食糖製造事業に関するフローの全体像

茶矢印：物質の移動、青矢印：プロセス

分別・収集された古紙や一般廃棄物などのセルロース系都市廃棄物は、前処理後、糖化酵素と混和し糖化処理を行い糖液のスラリーへと変換する。糖液スラリーは更に精製・濃縮を経て非可食糖液とする。この糖液は、糖化酵素製造、社内発酵技術を用いた化成品製造、または BtoB での販売の3つの用途に用いる。社内で非可食糖から作られた化成品については、化成品として BtoB での販売、または社内 BtoC 製品への配合を行う。

非可食糖製造を実施する際には、糖化にかかるコスト、すなわち糖化酵素を用いた糖化工程が最も高コストになると考えられる。本事業の本質は、この糖化工程に必要な糖化酵素を安価に製造し、糖化コストの低減を図ることにより非可食糖液を安価に製造することとなる。糖化コストの低減は、自社で保有する高性能な糖化酵素、および糖化酵素の安価製造技術、さらに多用途展開を想定して大量製造された安価非可食糖を原料として用いることにより達成を目指す。非可食糖の製造には、糖化工程以外にもセルロース系廃棄物の分別・収集コスト（原料コスト+分

別コスト)、得られた糖液スラリーの精製・濃縮コストがかかる。これらの低減も結果的に糖化工程のコスト低減へと繋がると考えられる。

7-2 事業に必要な技術ポートフォリオ

続いて現在保有する糖化酵素、糖化酵素製造技術関連の技術プラットフォームを図 7-2 のように大きく分けて 4 種に整理した。



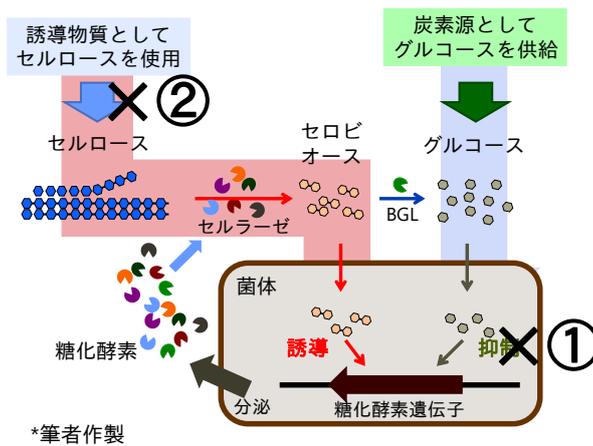
*筆者作製

図 7-2 保有・利用可能な技術プラットフォームとその要素技術

1つ目の技術プラットフォームは、糖化酵素技術である。その1つとしては、2章で示したセルロース吸着型キシラナーゼである PspXyn10 が挙げられる。この酵素を用いることでアルカリ前処理バイオマスや紙パルプなどのキシランを多く含有する基質のセルロース糖化性を大きく向上させることができる。また、他の要素技術として、セルロースをグルコースに高効率に変換する酵素 AaBGL に対し、変異を導入することで高効率化・高安定性を達成した変異 AaBGL、酵素組成調整に適した人工高発現プロモーターなどが挙げられる¹²⁶。

技術プラットフォームの2つ目は酵素生産技術であり、これはトリコデルマ属糸状菌による糖化酵素生産に関わる技術である。本菌における糖化酵素生産は図 7-3 に示したようなメカニズムで行われているが、これまでに開発してきている技術を用いることで、酵素生産を抑制するグルコースが高濃度に存在する条件下においても酵素生産が可能となってきている。この技術の1つが3章で詳細を述べたαチューブリン遺伝子破壊株を用いたグルコース存在下での酵素生産技術である。本技術と、変異育種株の利用、遺伝子改変を組み合わせることでグルコースによるカタボライト抑制の部分的な回避が可能となり、安価なグルコースを栄養源として大量に供給しても安定して酵素生産が可能となる。また、カタボライト抑制を回避しつつ簡便に酵素を高生産できる培養技術、さらには誘導物質フリーでの酵素生産技術を有している¹²⁷。

酵素生産メカニズム



*筆者作製

菌株改変

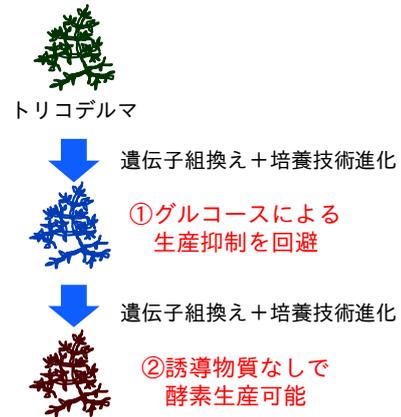


図 7-3 トリコデルマによる糖化酵素生産メカニズム (図 5-2 の再掲)

3 つ目の技術プラットフォームとしてはこれらを統合し、オンサイトでの糖化酵素製造に適した形でのプロセス設計となる。ここには、パートナーであるエンジ会社との共同開発となる部分が含まれている。難しい設備設計、培養制御を必要とせず、シンプルな原料で簡便に製造が可能な糖化酵素製造技術、そこで得られた酵素液の保管技術、また、オンサイト酵素製造に適した酵素生産プロセス設計などが含まれる。

また非可食糖製造事業の事業外とはなるが、その他の技術プラットフォームとして、多様な発酵生産技術がある。これまでに非可食バイオマス由来の糖を炭素源として用いたエタノール発酵技術、洗剤用酵素製造技術などに代表される、多様な発酵生産技術が利用可能な状況となっており、それぞれにおいて使用可能な技術基盤を保有・利用可能な状況としている。これらと非可食糖安価製造を組み合わせることで、古紙などの廃棄物から多様なケミカルへと変換していくことが可能となると考えられる。また、エタノール発酵技術などはオンサイト酵素システム外販事業の一環として、パッケージ化しての提供にも適していると考えられる。

図 7-1 に対して、保有・利用可能な技術プラットフォームを緑色で、不足している技術範囲を灰色で示したものを図 7-4 に示した。非可食糖製造事業全体から見ると、保有・利用可能な技術プラットフォームは糖化酵素のオンサイト生産と発酵生産が中心であり、セルロース系廃棄物の分別・収集、前処理、糖製造に関わる技術が不足していることが見て取れた。

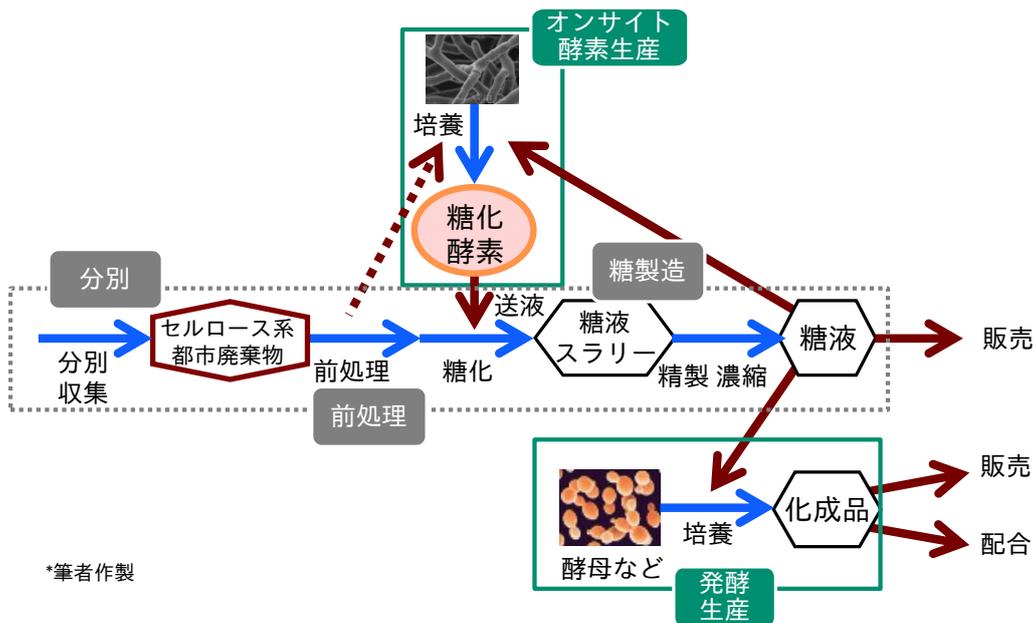


図 7-4 保有・利用可能な技術範囲と不足している技術範囲

緑色の実線の枠内：保有・利用可能な技術範囲

灰色の点線の枠内：不足している技術範囲

これらの不足している技術ポートフォリオについては、市販されている製品や他社技術の導入、または他社とのパートナーシップの締結により獲得していくことを想定している。具体的には、分別については古紙問屋や自治体とのパートナーシップによる分別・収集後の原料の獲得、前処理技術については、パルプの解繊や粉碎といった一般的な紙業界で使用される機器の利用、糖製造技術については既に糖製造について研究を実施している企業からの膜などを用いた糖精製システムの購入などにより技術ポートフォリオを揃えていくべきだと考えている。

7-3 事業展開を想定した技術開発の方向性と、開発ロードマップ

(1) 事業展開を想定した技術開発ロードマップ

非可食糖製造事業に必要と考えられた技術ポートフォリオについて、6-3(1)で示した開発ロードマップ上に時系列で示したものを図 7-5 に示した。更に、事業を実施していく上で、より競争力を高く維持し、また事業性を高められるような新規技術開発方針についても考察を行い、図 7-5 のロードマップ上に記載した。なお、オンサイト酵素システム外販事業に関してはイノベーション戦略研究報告書内に記載した。本章では事業実施上、獲得が必要不可欠な技術ポートフォリオ、不足している技術、その獲得戦略、および新規技術開発方針について述べる。

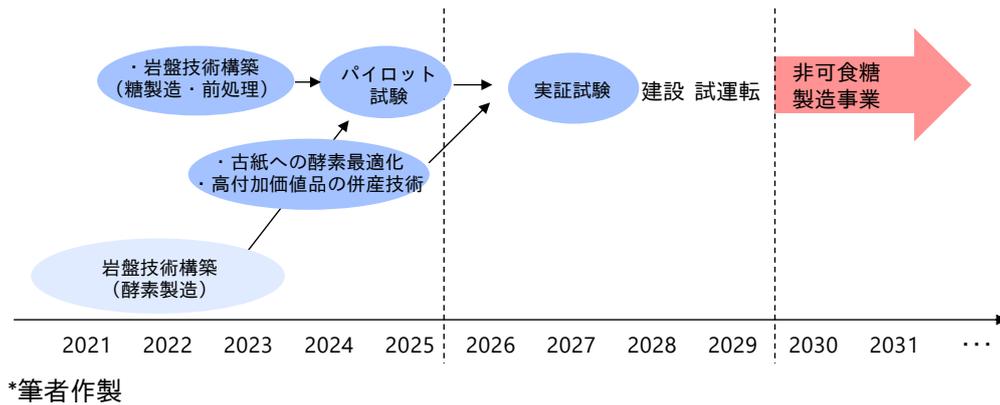


図 7-5 技術開発ロードマップ

(2) オンサイト酵素システム外販事業にむけた技術開発方針

オンサイト酵素システムの外販事業に関する技術開発方針の詳細はイノベーションストラテジー研究成果書に記載した。

(3) 非可食糖製造事業にむけた技術開発方針

非可食糖製造事業を実施するにあたって不足している要素技術としては、糖液製造技術、およびセルロース系都市廃棄物の前処理技術であり、まずは糖製造などの岩盤技術構築、前処理技術の確立、更にこれらのパイロットスケールでの検証が技術開発上必須の検討項目となる。また、糖製造事業の利益性の向上のため、古紙などの基質に向けた酵素最適化、および、糖製造時における高付加価値品の併産検討などについても検証を実施する（図 7-6）。以下に各項目について述べる。

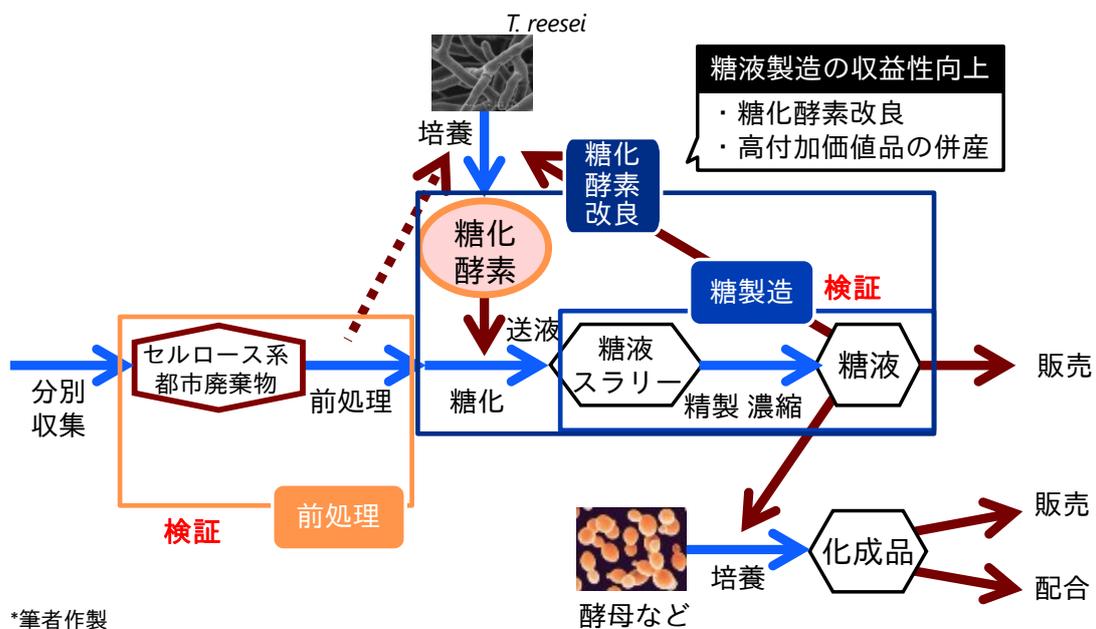


図 7-6 非可食糖製造事業の実施に必要な技術開発項目

(a) 前処理技術

前処理技術については、プロトタイピングとして検討した古紙からの糖液製造時には、オフィスペーパーをシュレッダーにかけるのみの簡易な切断処理のみで糖化を実施することができた。

セルロース系都市廃棄物は主に紙パルプ原料由来であることを生かし、木質系、草本系バイオマスに用いられるような薬剤存在下での高温での前処理を用いず、一般的な分別や古紙リサイクルで用いられる手法の組み合わせによる前処理がコスト、環境負荷の点からも適切であると考えられた。例えば、一般的なパルパー^bを用いた解繊や、日本車両製造株式会社が製造する「パルパー」と「ニーダー」の機能を持ち離解・分離が可能なニーディングパルパー¹²⁸、エプソンが開発するドライでの解繊技術¹²⁹などが適当であると考えられた。これらの中から、古紙原料の処理に実際に適した機器の選定、及び処理条件についての検証を進めていく。

(b) 糖製造技術

非可食糖製造事業の実施においても一つ重要な技術検証項目が、糖化後のスラリーを精製し糖液を製造する技術となる。ここに必要な設備の選定、および実証についても早期に検討が必要となる。

発酵用に使用可能な糖液にするには、発酵時の糖液の流加の必要性、糖液輸送コストの低減、糖自体の腐敗防止の観点などから濃縮が必要となると考えられる。腐敗防止の観点からは少なくとも BRIX が 60~65 程度まで濃縮し水分活性を低下させる必要があり、またこの程度の濃縮度が達成できれば発酵時の流加用の糖としても適用可能となると考えられる。

廃棄物からの糖製造であることを想定した場合、糖自体の精製度を高めるため、複数回の膜による精製などが望ましいと考えられる。東レはサトウキビバガスからの複数段の膜処理プロセスを通じた糖製造技術の実証検討を実施しており¹³⁰、糖液中に含まれる阻害物質などの不純物を除きつつ、低環境負荷に精製、濃縮を行う技術開発を行っている。また、Clariant は前処理バイオマスのスラリーに対して、不純物の吸着を目的に活性炭を添加して精製を行い、糖化後に固液分離した上清を単純に加熱濃縮する、比較的一般的な精製・濃縮手法が特許に記載されている¹³¹。プロトタイピングで実施した結果から、古紙由来の糖液には発酵阻害を引き起こす物質はほとんど含まれていないことが予想されることから、ここについても製糖業界で用いられる蒸発缶^cなどの一般的な濃縮手法の利用が適切と考えられた。

以上から、非可食糖製造を行う上では、膜などを用いた精製・濃縮を通じた糖製造が最も適切であると考えられるが、一般的な精製・濃縮手法も適用可能であると考えられることから、これらの糖精製技術の中からコスト視点、環境視点、得られた糖液の純度、精製度の視点などから技術選定を行っていく。

^b パルプ、古紙、損紙などを離解する機械。槽の中で回転羽根により水に渦流を起こし、その作用で離解する。

^c 蒸発による溶液の濃縮を行う装置。燃焼ガスや水蒸気を熱源とし、形式的には外部加熱式、内部加熱式に分かれ、蒸発缶を多段化した多重効用缶がある。

(c) 糖製造時における高付加価値品の併産検討

技術開発が必須である前処理技術、糖製造技術に加えて、糖製造事業自体の利益性を向上させることを目的とした「糖化酵素の性能向上検討」や、「糖製造時における高付加価値品の併産技術」についても検証を行う必要があると考えている。高付加価値品の併産に関する具体例としては、戦略的イノベーション創出プロジェクト（SIP）の中で検討されている「糖とナノセルロースの併産検討¹³²」や、先述した東レが検討を行っている「糖、オリゴ糖、ポリフェノールの併産検討（図7-7¹³³）」などが挙げられる。

この中でも、SIPの糖とナノセルロースの併産検討については、花王もSIPに参画しながら実施を進めているところであり、SIPでの開発技術がこの事業に適応可能かなどについて検証を進めていく。

ここまで示した前処理、糖製造技術、および高付加価値品の併産検討については、技術統合、実証スケールでの検証を経て、セルロース系都市廃棄物からの糖、ケミカルスの一貫製造を行うにあたっての事業性の精査を行った上で、最終的な事業実施へと進めていきたいと考えている。

7-4 技術戦略まとめ

本章では、非可食糖製造事業とオンサイト酵素システム外販事業を実施していくにあたって、現在保有している、またはパートナーシップにより実施可能な技術ポートフォリオの整理を行った。また、事業を実施していく上で不足していながら必要不可欠な技術範囲についても整理・調査を行い、パートナーシップまたは他社が開発済みのシステムの導入などにより達成していく方針、およびそのロードマップについて策定した。更に、より事業を安定して進めていく上で新たに開発すべき技術の方向性についても分析を行った。

事業を実施していく上で必須な技術ポートフォリオとして、前処理技術、糖液製造技術が挙げられた。前処理技術としては、古紙業界、製紙業界で一般的に使用されるパルパーなどの機器を用いることで実施可能と考えられた。糖液製造技術についても、一般的な固液分離設備と膜濃縮、加熱濃縮設備の利用により可能と考えられたが、糖液製造については既存の膜製造企業などが技術開発している部分が多く、これらの企業からのシステム導入、またはパートナーシップが最も効率的であると考えられた。

事業をより確度高く実施していくための技術開発として、糖液製造と並行して付加価値を有する副産物の製造技術が有望であると考えられた。後者については、既に実施を検討している部分もあり、今後本事業へと適応可能かについて検証を進めていくべきであると考えられた。

7-5 参考文献および引用

¹²⁶ 「バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業 バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発 平成25年度～平成28年度成果報告書

2018000000244」, 国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 新エネルギー部

- ¹²⁷ 新井ら, 糸状菌 *Trichoderma reesei* を用いた転写因子制御による誘導物質フリーの糖化酵素生産システム, 4H02-16, 2021 年度日本農芸化学会大会
- ¹²⁸ 「古紙原料処理設備 ニーディングパルパー」日本車輛製造株式会社 (<https://www.nsharyo.co.jp/business/papermanufact/kneadingpulper/index.html>)
- ¹²⁹ 「ドライファイバーテクノロジー」エプソン (<https://www.epson.jp/prod/smartcycle/dft.htm>)
- ¹³⁰ 「統合報告書 TORAY REPORT 2020」東レ (https://www.toray.co.jp/ir/integrated_report/)
- ¹³¹ Clariant EP2947152A1, Process for the hydrolysis of lignocellulosic material, wherein the hydrolysate is used for microbial hydrolase production
- ¹³² 戦略的イノベーション創造プログラム アグリバイオ・化学システムコンソーシアム (<http://agribioconso.cm.kyushu-u.ac.jp/project/>)
- ¹³³ 「膜利用糖化プロセスのタイ実証プラント竣工式開催について」東レ, 2018 年 7 月 6 日 (<https://cs2.toray.co.jp/news/toray/newsrrs01.nsf/0/259C8D39B2313DB7492582C0002CC23E?open>)

8 知財戦略

技術戦略について、さらに自社技術の知財出願、知財化状況を整理し、技術戦略の妥当性、知財の出願状況に関する方針について考察を行った。また、他社企業の特許出願状況などを解析し、事業実施の可否を考察するとともに、パートナーシップを結ぶのに適した企業などについても考察した。

8-1 現状における知財の構成

特許データベースに対し、「出願人：花王、全文：糖化」にて検索した結果、314件の特許出願が確認された。その中で、7-2に示した技術プラットフォームに合わせて、特許の出願状況、成立状況を整理したものを図8-1、8-2、8-3に示した。なお、詳細についてはイノベーションストラテジー成果書に記載した。

図8-1に示した糖化酵素技術には、技術戦略で取り上げたβグルコシダーゼ、キシラナーゼが関係する特許、およびそれらを生産させる酵素生産菌に関する知財を示した。

βグルコシダーゼ、キシラナーゼが最も多く特許出願されており、成立もしているが、これら以外にも、エンドグルカナーゼなどの糖化酵素についても出願済みや特許成立となっている。

酵素生産菌に関する特許については、酵素発現用プロモーターや酵素生産菌株自体の特許が出願されており、一部において特許成立となっている。

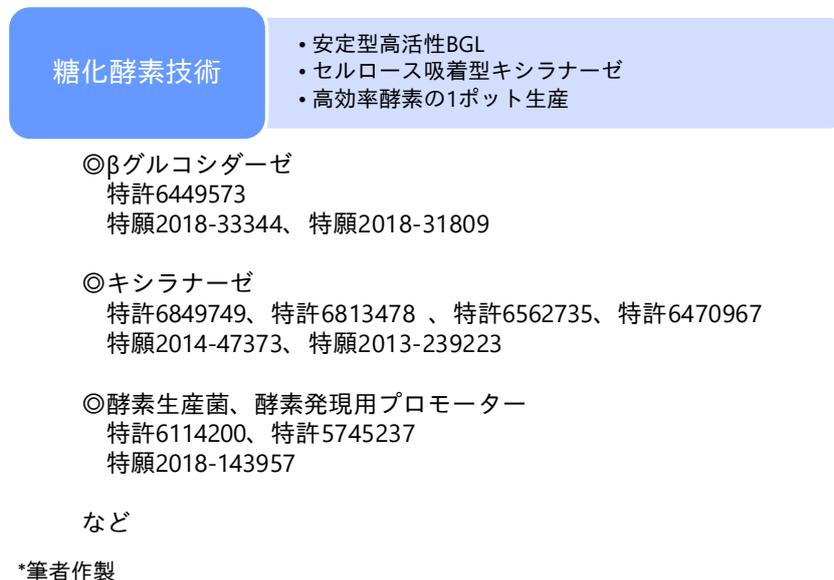


図 8-1 糖化酵素技術に関する特許出願状況

糖化酵素の生産技術に関しては、生産菌の変異株に関する特許、誘導物質不要での酵素生産に関する特許に加え、培養技術に関するものが出願されている。

生産菌の変異株に関する特許については *tubB* 遺伝子破壊を含む複数の出願がなされており、*tubB* 遺伝子破壊を含め、いくつかにおいて特許成立している。また、誘導物質フリーについては、

既に PCT 出願済みとなっている。セルラーゼの製造方法についても複数特許が出願されている。

以上から、糖化酵素技術、および糖化酵素の生産技術に関わる知財としては、国内において多く出願がなされており、多数の特許が成立している。このことから、糖化酵素に関する特許については着実に国内において知財網の構築を進んでいると考えられる。

酵素生産技術

- ・グルコース耐性強化技術
- ・カタボライト抑制回避技術
- ・誘導物質フリー培養技術

◎変異糸状菌
特許6975529： *tubB*遺伝子破壊
特許6612548、特願2020-75530
など

◎誘導物質フリー培養
PCT/JP2020/042489 など

◎セルラーゼの製造方法
特願2020-528825、特願2020-528824
特願2019-207894
など

*筆者作製

図 8-2 酵素生産技術に関する特許出願状況

最後に、製造された非可食糖を他の物質に変換する発酵生産技術については、様々な宿主を用いたグルコースからの物質変換技術を既に有しており、複数特許出願、登録されている。その中でも最も多く出願されているものは、枯草菌を用いたタンパク質の製造技術である。それ以外にも、C4 ジカルボン酸の生産技術を含め、多数の特許が出願、登録されている。

発酵生産技術

- ・洗剤用酵素製造技術
- ・C4ジカルボン酸生産技術

◎枯草菌でのタンパク質製造技術
・特許4955358など

◎C4ジカルボン酸生産技術
・特許6859086など

*筆者作製

図 8-3 発酵生産技術に関する特許出願状況

以上から、酵素製造を事業の中心において展開していく上で必要となる特許群については、多数出願、登録となっており、国内での糖化酵素製造については高い競争力を今後も維持できると考えられた。

8-2 糖製造関連技術に関する特許クリアランス

前節では、競争優位性を維持しながら本事業を展開していく上での技術の特許出願状況について述べたが、本節では本事業の技術的实施可能性を確認することを目的に、分野ごとに特許クリアランスを行った。本内容に関する詳細についてはイノベーションストラテジー研究成果書に記載した。

8-3 他社の特許解析

8-2の特許調査を通じて、本事業を展開していく上で必要となる技術範囲において、同範囲において研究開発を実施している企業や団体が複数確認された。これらの企業や団体の研究開発内容を把握することを目的に、これらの企業等の特許出願状況を解析することを通じ、こういった技術開発を目指しているかについての解析を実施することとした。

解析対象とした企業、団体は以下とし、表 8-1 に示す IPC を含む特許群について解析を実施した。

- ・ Novozymes
- ・ DuPont (Danisco、Genencor)
- ・ DSM
- ・ IFPEN
- ・ 東レ
- ・ 王子製紙

表 8-1 競合他社の特許分析に使用した IPC

IPC	説明
C12N 9/24	酵素 グリコシル化合物に作用するもの
C12N 9/42	酵素 β -1, 4 グルコシド結合に作用するもの、例. セルラーゼ
C12N 15/04	突然変異 遺伝子工学 遺伝子工学に関する DNA RNA、ベクター 菌類
C12N 15/09	組換えDNA技術
C12N 15/52	組換えDNA技術 酵素 酵素前駆体をコードする遺伝子
C12N 15/53	組換えDNA技術 酸化還元酵素
C12N 15/55	組換えDNA技術 加水分解酵素
C12N 15/56	組換えDNA技術 加水分解酵素 グリコシル化合物に作用するもの
C12P 7/06	エタノール、すなわち非飲料のものの製造
C12P 7/08	エタノール、すなわち非飲料のものの製造 副産物として 廃棄物 セルロース物質の基質からの製造
C12P 7/10	エタノール、すなわち非飲料のものの製造 セルロース物質を含む基質からの製造
C12P 19/02	単糖類の製造
C12P 19/14	糖類の製造 カルボヒドラーゼの作用による製造、例. α -アミラーゼによるもの
C12P 19/18	糖類の製造 グリコシルトランスフェラーゼの作用による製造
C12P 21/00	ペプチド 蛋白質の製造
B09B 3/00	固体廃棄物の破壊あるいは固体廃棄物の有用物化もしくは無害化
C13K 1/02	ぶどう糖 ぶどう糖含有シロップ セルロース物質の糖化によるもの
C13K 1/04	ぶどう糖 ぶどう糖含有シロップ セルロース物質の糖化によるもの 精製

(1) Novozymes

最大の特許件数はグルカナナーゼに関する特許であり、500 件以上、2012 年だけでも 73 件もの

特許が出願されていた。Novozymes の特許出願数は年間で約 100~150 件程度であることを考えると、グルカナーゼ、すなわちセルラーゼやアミラーゼが当時の Novozymes の酵素開発における主戦場であったと考えられた。また、特許は、新規酵素、改変酵素、酵素組成物、酵素の使用方法に関する特許がほとんどを占め、酵素を販売する企業として、酵素探索・酵素改良・酵素の新規用途展開に向けた研究開発がなされていると考えられた。

最もグルカナーゼに関する特許が多く出願されていた 2012 年においては、セルラーゼ 43 件に対して、アミラーゼ 21 件であったが、セルラーゼに関する出願は 2012-2013 年がピークであり、2015 年にはセルラーゼ 10 件、アミラーゼ（プルラナーゼ含）12 件とアミラーゼに関する特許の方が多くなり、2018 年までその傾向が続いていた。また、興味深いことに、近年になりアミラーゼを発現させた酵母に関する特許が多く出願されていた。Novozymes は 2018 年より Innova というエタノール発酵用酵母事業を始めており、現在は 2G エタノールよりも、コーンからの 1G（または全粒粉を用い 1.5G とも）エタノール製造に力を入れていることが伺えた。

(2) DuPont (Danisco、Genencor)

Novozymes と同様、グルカナーゼに関する特許が多くを占めるが、その出願数が最も多い 2013 年時点で、アミラーゼに関する出願の方がセルラーゼよりも多く、Novozymes よりも先に 1G へとシフトし始めていたことが伺えた。興味深いことに、2014 年以降はセルラーゼ (C12Y302/01004) が 4 件しかないのに対し、 α アミラーゼ (C12Y302/01001) が 17 件も出願されており、明確に 2G 用酵素から 1G 用に注力していることが見て取れた。なお、2019 年に 2G エタノールからの撤退を表明し、既に技術を Sustainable Technology Corporation に売却しているため、DuPont では糖化酵素関連の技術開発は今後行われないと考えられた。

(3) DSM

Novozymes や DuPont と異なり、DSM は酵素に関する特許は比較的少なかった。セルロースを基質とする技術開発は 2009 年以降に出願が多くなり、2019 年にも継続的に出願されていた。出願傾向は、新規酵素よりは、酵素組成物、発酵用酵母、糖化方法などが多かった。特に酵母や酵母の資化経路に関わる酵素に関する特許出願が多く、Novozymes よりも先に酵母と酵素の両方を手掛けていた事業戦略を色濃く反映している技術戦略・知財戦略が見て取れた。

(4) IFPEN

IFP Énergies nouvelles はフランスの公的な研究・訓練センターで、エネルギーに関する基盤研究などを実施している。糖化酵素に関する研究は 2005 年頃から特許が出願され、2012 年に最も多く出願されていた。特許の出願傾向はエタノールの製造、オリゴ糖の製造、糖化方法などの製法特許だけでなく、酵素や酵素組成物、酵素の製造方法といった酵素に関する特許、更に前処理方法と多岐にわたる研究がなされていることが伺えた。

特徴的なのが、トリコデルマを用いた酵素の製造方法に関する特許が多く出願されていることで、少なくとも 10 件以上の特許が確認された。Novozymes や DuPont のなどは、酵素製造に関

する特許は比較的少なく、製造法の特許はノウハウ化している部分が多いと予想されるが、IFPENは企業ではないこともあり、製造法についても広く出願していると予想された。

(5) 東レ

東レは糖の精製に用いられる膜を開発している企業であり、糖液の製造方法に関する特許が50件程度出願されていた。その多くは膜を使用した精製プロセスを用いており、特許4770987では「セルロース含有バイオマスを加水分解し、得られた糖水溶液をNF濾過膜および／またはRO膜に通じて濾過して、非透過側から精製糖液を回収し発酵阻害物質を除去する方法」が基本特許として成立していた。また2015年以降には、キシロオリゴ糖の製造方法などを出願、知財化しており、得られる糖液の高付加価値化を目指した検討がなされていた。

糖液の製造方法に関する特許は、2011~2015年を中心に38件出願されており、それ以降はほとんど出願されていなかった。これに対し、トリコデルマを用いたタンパク質製造技術に関しては、2017年に2件、2019年に4件の特許出願がなされており、2017年以降にトリコデルマでの酵素製造についても実施を試みていることが伺えた。2017年の特許では、キシロオリゴ糖の製造に向けた生産菌株開発であったが、2019年の特許では生産性向上に向けた検討が多く含まれており、上記キシロオリゴ糖の製造に向けた菌株開発と酵素製造技術開発が進められていると考えられた。

(6) 王子製紙

王子製紙は自社で紙パルプ原料を保有する企業であり、糖化システムとして20件、糖液の製造方法として13件と、エタノールの製造方法として25件と、糖液製造、エタノール製造に向けた特許が多く出願されていた。また、東レと同様、キシロオリゴ糖の製造方法なども出願がなされていた。糖液の製造方法としては、東レと同様、膜を用い限外ろ過による酵素の再回収を行っていた。

(7) 競合他社の特許解析まとめ

特許解析の結果から、酵素に関する最大手であるNovozymesやDuPontに関しては、予想外に糖化酵素に関する特許出願が大きく減少傾向にあり、Novozymesは1Gや1.5Gエタノール製造に向けた酵素開発にシフトしている様子が、DuPontは酵素開発から撤退が伺えた。DSMについては、現在も特許出願が多くなされていた。また、IFPENは研究期間でありながら酵素製造に関する特許を多く出願しており、その特許のクレームの広さからしばしば異議申立てされていた。東レは、糖化システム、糖製造技術に関する特許出願が多かった。東レは膜製造を行っているだけでなく、バイオマスからの糖製造技術開発、トリコデルマを用いた酵素製造と手広く技術開発を実施していた。王子製紙についても糖製造の特許が多いが、酵素自体に関する特許出願はなかった。

8-4 今後の知財構築の方針と計画

本章では自社が保有する知財のポートフォリオ、および関連する他社が保有する知財のポートフォリオについて解析を行った。これらの情報を基に知財戦略をまとめ、イノベーションストラテジー研究成果書に記載した。

自社で保有する知財は酵素関連に特許が集中しており、糖化酵素自体、またその製造技術においては競争力の高い知財を獲得できている。このことから、糖化酵素の排他性について十分に高い状態を維持できると考えられる。これに対し、糖の製造、精製についてはほぼ知財を取得していない。糖の精製、製造に関しては、一般的なプロセスとして膜精製、加熱濃縮が知られているが、糖製造を実際に進めていく上ではこの分野における将来的な知財の確保が望ましい。早期立ち上げを目指した場合には、先行する企業との協業や糖精製設備の導入が選択肢となると考えられた。

9 財務戦略

9-1 事業の財務性

非可食糖製造事業については非可食糖の製造コストを、オンサイト酵素システム外販事業については酵素製造コストについて、それぞれに仮定を置いた上で概算を行い、それに基づいて財務性の評価を行った。なお、本節に関する詳細についてはイノベーションストラテジー研究成果書に記載した。

(1) 非可食糖製造に関する財務性

古紙からの非可食糖製造事業に関する採算性を解析することを目的に製造コストの概算を行った。非可食糖の製造コスト試算を行う上で、5章で実施したプロトタイプングでの結果などを参考にして原料情報、設備情報、糖化条件、酵素製造条件などの前提条件設定を設定し、試算を行った。設備価格については、NRELによる炭化水素燃料製造のフィジビリティスタディ¹³⁴、バイオエタノール製造のフィジビリティスタディ¹³⁵に記載の情報を参考に計算した。また、酵素生産に使用する炭素源としては、本プロセスで最終的に得られる非可食糖を原料とし、またその価格は最終的な試算で得られた非可食糖の製造原価となるように設定した。

非可食糖を製造コストの試算の結果、現在市販されている可食糖由来の水あめなどと比較して、より安価に非可食糖を製造できることが確認された。

(2) オンサイト酵素システム外販事業に関する財務性

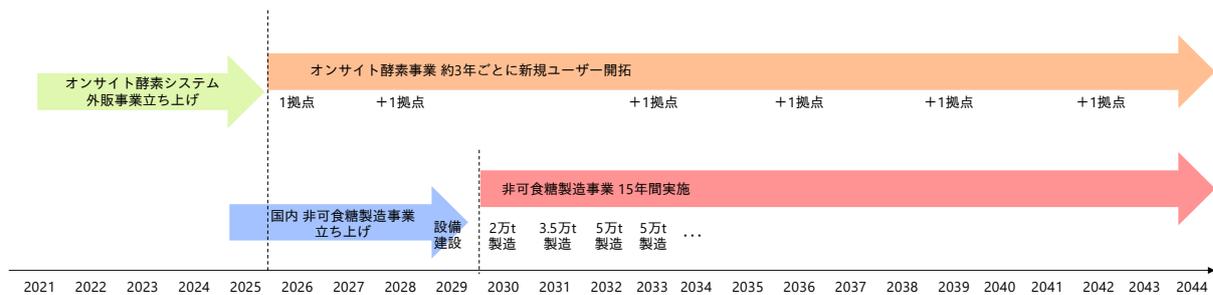
オンサイト酵素製造システムの外販事業についても財務性を解析した。基本的には(1)の糖化酵素設備と同様に試算を行ったが、培養に使用する炭素源について、市販の糖液を用いる形で試算を行った。糖化酵素の市販価格については、Liuらの文献の最も現実的なケースとして記載されている23.3 USドル/kgを日本円（1ドル=105~115円）に換算して算出した¹³⁶。

オンサイト酵素製造システムを通じた酵素製造コストの試算の結果、ある一定の酵素製造規模以上であれば、糖化酵素の市販酵素価格帯よりも大きく安価に製造できることが確認された。

9-2 収益の見込み

(1) 事業計画と製造販売の仮想スケジュール

事業計画については、6-3(1)にて述べたように、オンサイト酵素システム外販事業については、2025年に販売先企業に設備導入、2026年以降に製造開始を、非可食糖製造事業については、2029年に設備の建設、2030年より非可食糖の製造・販売と仮想スケジュールを立てた。この仮想スケジュールをもとに、それ以降の仮の製造・販売スケジュールを立てた。図9-1に示したように、オンサイト酵素製造事業を3年ごとに新規ユーザー開拓を進めながら、自社非可食糖製造事業を開始し、15年間（~2044年まで）糖製造を実施する案をベースに、財務諸表の作成を行うこととした。



オンサイト事業：酵素製造設備を2026, 2028, 2033, 2036, 2039, 2042で計6拠点導入

非可食糖事業：2029年に5万t/yの製造設備を建設
2030年2万tから、徐々に製造量を増やし、2032年から2044年まで5万t製造

*筆者作製

図 9-1 各事業の製造・販売スケジュール案

オンサイト酵素システム外販事業については、2026、2028、2033、2036、2039、2042年から各拠点においてシステム導入を行い、酵素製造を開始する案とした。2030年前後に非可食糖製造事業の立ち上げと重なることから、この時期を除き約2~3年ごとに新規ユーザー獲得が進められたという仮定とした。また、非可食糖製造事業については、5万トン/年の非可食糖製造設備について2029年に建設を行い、2030年は40%の稼働率、2031年には70%、2032年から2044年まで稼働率100%となるような仮定とした。

(2) 収益の見込み

非可食糖製造事業、オンサイト酵素システム外販事業の両方について収益の見込みを計算した。これらの詳細についてはイノベーションストラテジー研究成果書に記載した。

また、2事業を統合した際の収益見込みを計算したところ、2035年（非可食糖製造事業を開始し6年目）に投資額の回収が可能であると予想された。

9-3 DCF法を用いた事業価値の算出

9-2の収益の見込みの計算結果を用い、DCF法による事業価値の算出を行った。DCF法による算出に用いる加重平均資本コスト（WACC）の算出方法などについては、イノベーションストラテジー研究成果書に記載した。

非可食糖事業、オンサイト酵素システム外販事業を2044年まで実施すると仮定し、これらの各事業の2021年時点での事業価値を得られたWACC（この際、リスクフリーレートを1%と仮定）を割引率として計算を行った。その結果、事業価値は非可食糖製造事業として約35億円、オンサイト酵素システム外販事業として約4億円、全体として約39億円であった。以上から、本事業は十分に価値を創出できる事業であると考えられた。また、本事業は段階的な展開を想定しており、オンサイト酵素事業にてオンサイト酵素の可能性を確認しつつ、さらに非可食糖製造へと展開し、日本におけるバイオエコノミー市場の形成を促し、将来的にバイオエコノミー市場の拡大が見込めるのであればそれに合わせ、糖化酵素のコア技術を用い更に非可食糖製造事業の拡大へと進め

ていけるという、オプションを複数設けている。このことから、リアル・オプションという観点からはオプション価値が付与され、事業価値が更に高まりうるとも考えられた。

9-4 収益性の改善に向けた今後の取り組み

9-2、9-3の結果から、事業価値としてはプラスであり、企業として本事業を実施する意義を確認することができた。そこで、更なる事業の価値の向上を目指すことを考え、非可食糖製造価格に影響を及ぼす因子の感度分析を実施し、収益性の改善の見込みについて評価した。

原料古紙の使用量、古紙買取価格、減価償却年数、糖化時の酵素使用量、糖化率などをそれぞれ変動因子として用い、どの因子を変化させることが非可食糖製造価格に大きなインパクトを与えるかについて解析を行った。本分析の詳細はイノベーションストラテジー研究成果書に記載した。

感度分析の結果、酵素使用量の低減よりも、酵素使用量を増やしてでも糖化率を向上させ、原料を効率的に利用することが重要であることが明らかとなった。また試算の結果、この方針をとる場合には、古紙買取価格の変動が収益性に影響しにくいように働くことも明らかとなった。この考え方は、原料による影響をできる限り少なくし、非可食糖製造価格をできる限り安定させるという意味で重要であると考えられた。

9-5 財務戦略のまとめと今後の方針

本章では非可食糖製造事業、オンサイト酵素システム外販事業に分けて、各事業の財務性および収益の見込みについて解析を行った。さらに、得られた解析結果をもとに感度分析を行い、財務の観点から、事業をより安全に進めていくために、どういったことを実施していくべきかについて考察した。本章で得られた解析結果、および考察を以下にまとめた。

- ・非可食糖製造事業については、市販されている可食糖よりも安価に非可食糖を製造できる可能性が確認できた。

- ・オンサイト酵素システム外販事業については、ある一定規模の酵素製造が実施できれば、十分に顧客側にも導入メリットがあることが確認された。

- ・非可食糖製造事業とオンサイト酵素システム外販事業を想定したスケジュールにて実施を進められた場合、2035年（非可食糖事業開始後6年目）には投資額の回収ができ、投資額を含んで黒字へと転換できることを確認した。

- ・非可食糖事業・オンサイト酵素システム外販事業についての事業価値をDCF法にて算出した結果、事業価値としては2021年換算で35億円相当の価値となることが確認され、実施していく上で一定の価値を創出できる事業であると考えられた。

- ・非可食糖製造コストに対する感度分析を行った結果、糖化時の酵素使用量を増やしてでも糖化率を向上させ、原料を効率的に利用することが、収益性、事業の安定性の面で重要であることが確認された。

9-6 参考文献および引用

- ¹³⁴ Process Design and Economics for the Conversion of Lignocellulosic Biomass to Hydrocarbon Fuels and Coproducts: 2018 Biochemical Design Case Update, R. Davis, *et. al.* Technical Report NREL/TP-5100-71949 November 2018
- ¹³⁵ Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol, D. Humbird, *et. al.* Technical Report NREL/TP-5100-47764 May 2011
- ¹³⁶ Liu G, Zhang J, Bao J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2016;39:133–40.

10 結論

持続可能な社会の構築に向け、バイオエコノミーにおける工業分野であるバイオリファイナリーの発展が期待されている。海外においては、着実にバイオリファイナリーの普及が進んできている。これに対し、日本においては高い原料コストが原因となりバイオリファイナリーの普及が遅れており、世界的なバイオエコノミーへのシフトの潮流から日本が取り残されてしまう可能性がある。また、現在のバイオリファイナリーの原料の中心はデンプン系の基質であり、SDGsの観点から食糧と競合しない資源としてのセルロース系バイオマスを通じた非可食バイオリファイナリーの普及が望まれている。このセルロース系バイオマスは強固な構造を有するため、多量の糖化酵素が必要となり高コストとなることが課題とされており、糖化酵素の性能向上、および、糖化酵素の安価生産が望まれている。

本研究では、セルロース系バイオマスを安価に糖へと変換する技術を構築することを目的に、バイオマスを高効率で分解する酵素として新規酵素 PspXyn10 を探索により発見し、本酵素を配合した糖化酵素製剤の開発に成功した。開発した酵素製剤は、PspXyn10 を配合しない酵素と比較し、半量の酵素使用量で同等のアルカリ処理バガスの糖化性を示したことから、バイオマスの糖化に必要な酵素量を大きく低減させることが可能となった。

また、糖化酵素の生産技術開発についても実施し、 α チューブリン遺伝子破壊株を用いることで一般的な酵素生産培地条件下において、酵素生産性、酵素生産速度が大きく向上することを見出した。また、本遺伝子破壊の効果を経験的な分析を通じて解析を行った結果、 α チューブリン遺伝子の破壊により、グルコースによるカタボライト抑制が緩和しており、グルコース存在下においても高い生産性を発揮できる形質を獲得していることが明らかとなった。 α チューブリン遺伝子破壊という技術を用いることで、酵素生産性、酵素生産速度を向上させることができるだけでなく、工業生産時に用いられるグルコースの流加培養系において、本技術の効果であるカタボライト抑制の緩和が更なる高生産性、安定生産へと繋がることが期待され、糖化酵素の更なる安価製造が可能となる。

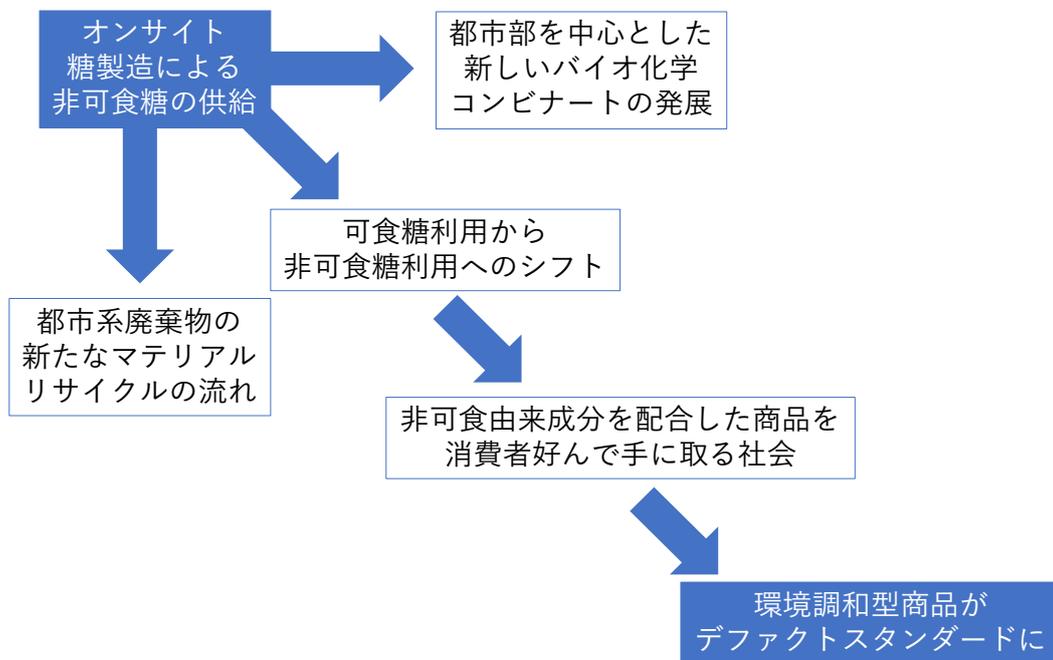
更に、本研究では、これらの糖化酵素に関わる技術を用い、他国と比べて後れを取っている日本のバイオリファイナリーについて、その根本的な問題解決を図れないかについて検討を実施した。その中で、「日本においてもバイオエコノミーを推進・実現させるためにはどうしたらよいか？」という問いに対し、「非可食糖が安価に供給さえできれば、日本においては自然発生的に非可食糖利用への転換が起こるのでは」というインサイトをもとに問いをリフレームし、「どうやったら非可食糖を国内で利用可能な価格まで引き下げつつ供給できるのか」すなわち、「非可食糖からの新たなバイオリファイナリーの潮流を生み出すためには、非可食糖を実際に流通させることが必要」と考えた。

このリフレームした問いに対し、これまでに開発してきた技術を組み合わせた「糖化酵素技術および糖化酵素のオンサイト製造技術」という技術的ブレークスルーを組み合わせることで、イノベーションアイデアとして「オンサイトを酵素生産だけでなく糖製造と発酵生産にまで拡張し、オンサイトでの非可食糖液供給を基盤としたバイオ化学コンビナートの構築をすることによる、

非可食糖の国内流通と利用の実現」を考えた。また、これに適した原料として、都市部で発生する都市廃棄物が適切であると考えた。以上から、実施形態としては「都市廃棄物を用いた非可食糖製造事業」とし、これについて各種戦略の構築を実施した。

このイノベーションアイデアに対し、事業、技術、知財、財務の4つの視点から分析し、戦略構築を実施した結果、更なる糖化酵素性能の向上と、技術的パートナーシップの拡張、または技術導入を図ることによって非可食糖製造事業は高い競争力を維持した事業として実施可能であると考えられた。

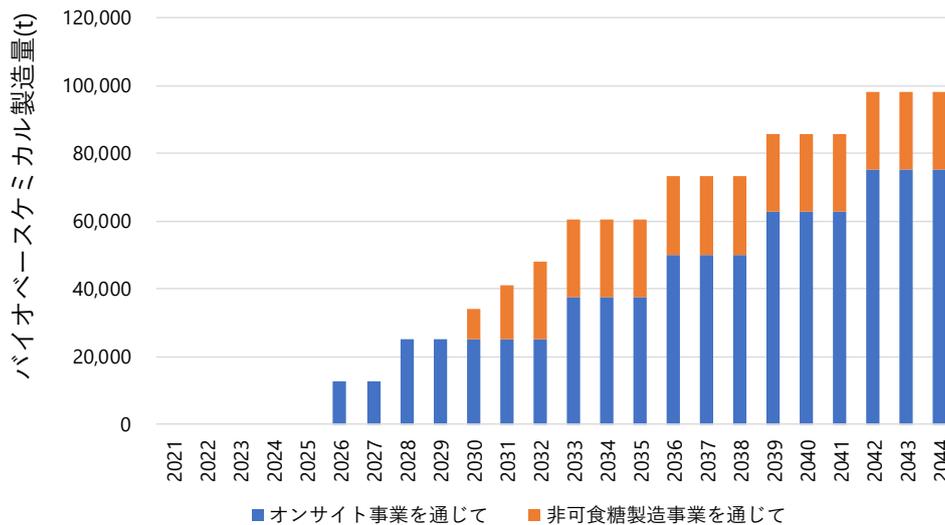
本事業の実施を通じて起こしたい変化について、図 10-1 に示した（図 5-7 の再掲）。本事業を通じた社会的インパクトとしては、大きく分けて3つあると考えている。1つ目としては、バイオ化学コンビナートという新しい産業地帯の発展。2つ目は、燃やすだけ、輸出するだけとなりつつある都市廃棄物の新たなマテリアルリサイクルの流れの構築。3つ目は、非可食由来ケミカルの製品配合を通じた、環境調和型社会への変容である。



*筆者作製

図 10-1 本事業の非可食糖の流通を通じて起こしたい変化（図 5-7 の再掲）

今回の事業案が仮に 9-2 に示した事業計画通りに実施できた場合、また、オンサイト酵素システム外販事業の供給先がエタノールまたは非可食糖を経由してバイオベースケミカルを製造できた場合、図 10-2 に示すような形で日本国内でのバイオベースケミカルが普及していくこととなる（バイオベースケミカルは、非可食糖 1 トンから 0.5 トン生産できると仮定：プラットフォームケミカルズの糖からの変換率の平均程度）。



*筆者作製

図 10-2 本事業を通じて製造される非可食糖由来バイオベースケミカル

2つの事業を通じて製造可能となる（自社および酵素供給先での製造の合算値）バイオベースケミカルの生産量は年間7万トン以上に上ることになるが、この量はEUにおけるデンブンプン由来バイオベースケミカル（燃料用バイオエタノールを除く）の年間約45万トンと比べると5分の1程度となり、まだまだ低い水準であると考えられる。しかしながら、日本におけるバイオエタノールの製造量が年間約1万トンであることを考えると、日本におけるバイオリファイナリーの推進加速という点では重要な転換点となりうるのではないかと考えられる。

2つ目の社会的インパクトとしては、古紙や一般廃棄物の利用価値の向上となる。古紙の多くは中国へと輸出されてきているが、2021年より中国が輸入禁止の政策をとったことから、本来輸出に回るはずだった古紙は余剰となっている。また、原料となるパルプについても、オフィスでの紙の利用量の低下などに伴い、パルプ自体が余剰となりつつある。古紙は古紙にしかリサイクルされず、古紙が余剰となると古紙の価格の下落が生じる。古紙の価格の下落は、古紙回収の維持を困難とさせることから、バイオリファイナリーという出口を新たに作ることは古紙回収システムの安定化にも重要となると考えられる。

また紙はWrite（情報紙）、Wrap（包装紙）、Wipe & Waste（家庭紙）が主要な用途とされ、このうちリサイクルに回されているのはWriteとWrapのみで、家庭紙については一般廃棄物として焼却されておりサーマルリサイクルのみとなる。この家庭紙はセルロース源として非常に膨大な量を占めているため、本非可食糖製造事業の最終的なゴールの一つである一般廃棄物からの非可食糖製造は未利用資源の再利用という点で大きなインパクトとなると考えられる。現在のところ一般廃棄物の利用については、積水化学や日立造船が実施しているが、まだ実証レベルである。都市部であればどこでも発生し、どこでも利用可能な資源であることから、いずれは本事業の延長として一般廃棄物の利用にまで拡張を進めていきたい。

3つ目の社会的インパクトとしては、環境調和型製品がデファクトスタンダードとなるような

社会の変容を加速させることに繋がることである。非可食資源から作られた原料が配合された製品が当たり前となると、競合他社も参入せざるを得なくなり、いずれ SDGs に配慮した環境調和型製品が一般化すると考えられる。花王は原料から製品まで製造を行っている企業だからこそ、非可食資源由来の原料を配合した製品展開が実施可能であると考えられることから、本事業の可能性について更に精査していきたい。

謝辞

本論文の主査を引き受けて頂きました神戸大学 蓮沼誠久教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたりご指導とご鞭撻を賜りました、神戸大学 幸田徹教授、山本一彦教授、尾崎弘之教授、吉田健一教授、近藤昭彦教授に心より御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として、ご指導、ご助言、ご協力いただきました長岡技術科学大学 小笠原涉教授、志田洋介准教授、花王株式会社 瀧村靖氏、萩原浩氏、五十嵐一暁氏、掛下大視氏、末次真梨氏に深く感謝申し上げます。

本研究に使用した酵素をご提供いただきました産業技術総合研究所 矢追克郎博士、基質をご提供いただきました一般財団法人バイオインダストリー協会 小林良則博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり日頃より有益なご議論ご助言をいただきました花王株式会社 高橋史員氏、新井俊陽氏、前田紘弥氏、一瀬桜子氏、林孟宜氏に感謝いたします。

本研究の一部は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託業務において実施したものです。

最後に、本論文の作成にあたり、応援し支えてくれた家族の祐美、雪花、千颯に心から感謝します。

神戸大学博士論文

「バイオマス糖化酵素製造技術を基にした都市型バイオリファインリーの実現」全 120 頁

提出日 2022 年 1 月 26 日

本博士論文が神戸大学機関リポジトリ Kernel にて掲載される場合、掲載登録日（公開日）はリポジトリの該当ページ上に掲載されます。

©柴田 望

本論文の内容の一部あるいは全部を無断で複製・転載・翻訳することを禁じます。