

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12263

研究課題名（和文）原生生物テトラヒメナによる新規セルロース分解系の構築

研究課題名（英文）Construction of a novel cellulolysis system utilizing Tetrahymena

研究代表者

遠藤 浩（Endoh, Hiroshi）

金沢大学・自然システム学系・准教授

研究者番号：20272932

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：テトラヒメナを用いて外来遺伝子の発現ベクターの開発・改良を行った。このベクターは、1）耐性遺伝子が入ったスクリーニング用カセット、2）システインプロテアーゼの分泌シグナルを組み込んだ発現カセット、3）相同組換えのための導入遺伝子座の周辺配列、からなる。このベクターに、シロアリ腸内共生鞭毛虫由来の4種のセルラーゼ遺伝子の発現誘導・分泌後、セルラーゼ活性を測定した。新ベクターでは、以前のベクターに比べ、EG5、EG7両方で10～50倍程度の活性が検出され、リグニンエステラーゼであるCip2-likeに関して、若干の作用が認められた。CBHについては、これまでのところ活性は検出できていない。

研究成果の概要（英文）：Construction of a novel transformation vector for expressing and secreting foreign cellulase genes in the ciliate Tetrahymena thermopile. This vector consists of 3 separate parts: 1) a cassette carrying drug resistant gene for screening after bombardment, 2) an expression cassette with a secretion signal derived from Tetrahymena cysteine protease 4 gene, 3) flanking sequences at both sides of beta-tubulin gene for homologous recombination. Introducing 4 different genes (endoglucanase (EG) 5 and 7, cellobiohydrolase (CBH) and lignin esterase Cip2-like) from the termite symbiotic protists for cellulolysis into the vector, their activities were measured after induction of gene expression and subsequent secretion outside cells, respectively. EG5 and 7 were efficiently expressed, showing strong activity. Lignin esterase Cip2-like activity was slightly detected. No CBH activity has been confirmed, suggesting difficult folding due to the complicated protein structure.

研究分野：進化原生生物学

キーワード：テトラヒメナ 分泌ベクター シロアリ腸内共生鞭毛虫 エンドグルカナーゼ セロビオヒドラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化や化石燃料の枯渇など様々な問題をめぐり、持続可能なクリーンエネルギーが注目されている。石油や石炭、天然ガスなどの化石燃料の代わりにバイオマス由来のバイオ燃料には、とりわけ大きな関心もたれている。

現在、効率的なセルラーゼを精製するにあたり、糸状菌の一種であるトリコデルマ菌由来のセルラーゼが一般的に用いられている。トリコデルマ菌はセルラーゼをはじめとする多種類のタンパク質を大量に分泌することが知られている。これらの遺伝子を大腸菌や酵母、コウジカビ等に導入し発現させた系では、活性が低くセルラーゼ生産を工業的に実用化できず、トリコデルマ菌から直接精製しているのが現状である。この問題はタンパク質のフォールディングが難しいことが原因と考えられている。

一方、高いセルロース分解能力をもつ生物としてシロアリが知られている。シロアリは家屋などの材木を食べる害虫として知られているが、自然界では高いセルロース分解能力をもち、炭素循環に寄与する重要な分解者である。シロアリは腸内に様々な原生生物ベン毛虫類を共生させており、主にそれらの生物群の働きによって木材を分解している。しかしこれらベン毛虫類はミトコンドリアを欠くなどの理由により培養が難しく、工業的な利用は現在のところ困難である。

## 2. 研究の目的

原生生物纖毛虫類テトラヒメナはゲノムがすべて解明されているモデル生物であり、外来遺伝子発現のための宿主として理想的な性質を持っている。そのため大腸菌や酵母等の菌類に代わる宿主として期待されている生物である。一方、下等シロアリは嫌気的環境である後腸内に十数種の原生生物・ベン毛虫類を共生させており、摂食した木材を自

身と共生鞭毛虫のセルラーゼによる二重の消化システムにより分解している。しかし共生ベン毛虫類はミトコンドリアをもたないため、嫌気環境下でしか生存できず、培養系も確立されていない。そこで、シロアリと共生ベン毛虫由来のセルロース分解関連遺伝子群をテトラヒメナに導入して分泌させ、好気条件下での高効率な新規セルロース分解系の構築を試みる。

下等シロアリは、摂食した木材を非常に効率良く分解する生物として注目され、世界中で研究が盛んに行なわれている生物である。下等シロアリは嫌気的環境である腸内に共生するベン毛虫と協調して木材を分解している。まずシロアリが咀嚼により木材を断片化し、セルロースと結合しているリグニンを大まかに除去する。次に唾液腺で分泌されるシロアリ自身のセルラーゼが前腸で作用することにより、セルロースを部分分解する。この部分分解されたセルロースが後腸に運ばれると、共生ベン毛虫の体内に取り込まれてグルコースまで分解される。このことは、共生鞭毛虫がセルロース分解の主要な役割を果たしていることを意味する。この消化システムにより、シロアリは摂食した木材のおよそ 80%以上を分解することができる自然界でも珍しい生物であり、このシステムが現在注目されている。しかし、共生ベン毛虫はミトコンドリアを持たず、好気的環境下では生存することができない。また、共生によって遺伝子の水平伝播 (LGT) が起こり、生存に必須な遺伝子の多くを失っている可能性がある。これらのことが共生ベン毛虫の培養を困難にしている。

一方、纖毛虫テトラヒメナは自由生活性型のモデル生物であり、大量培養も含めて培養は容易である。遺伝子のノックアウトや外来遺伝子の導入法もすでに確立されている。テトラヒメナの総遺伝子数は約 28,000 とヒトの遺伝子数より多く、多種多様なタンパク質

のフォールディングや糖鎖付加などの修飾能力を保持している。本研究では、1) テトラヒメナ用の分泌ベクターの構築が第一である。2) そのベクターにシロアリの共生ベン毛虫由来の複数のセルラーゼ関連遺伝子を組み込む。それらを用いてシロアリ由来のセルロース分解遺伝子群をテトラヒメナに導入し、好気条件下での高効率な新規セルロース分解系を構築することが目標である。トリコデルマ菌に代表される菌類とは異なった特性をもつ原生生物の潜在能力をセルロース分解に利用できないか検討する。

### 3. 研究の方法

#### 1) テトラヒメナによる高効率な発現・分泌系の構築

テトラヒメナは、6種類のシステインプロテアーゼを細胞外へ分泌することが知られている。このうち、システインプロテアーゼ4 (CysP4) の細胞外分泌シグナル (140 アミノ酸) の下流にセルラーゼ関連遺伝子を組み込む形でベクターの作成を行った。このベクターは、1) ネオマイシン耐性遺伝子 (*Neo<sup>R</sup>*) の入ったスクリーニング用カセット、2) システインプロテアーゼ4由来のプロモーター (CypP4p) カドミウム誘導性メタロチオネイン1プロモーター (MTT1p) または常時発現型大サブユニット・リボソームタンパク質2のプロモーター (Rpl2p) のいずれかの下流にシステインプロテアーゼ (CysP4) の分泌シグナル (140 アミノ酸) を組み込んだ発現カセット (分泌シグナルの下流にセルラーゼ遺伝子を組み込む) および3) 相同組換えのための導入遺伝子座 (ミオシン13遺伝子 *Myo13*、または チューブリン1遺伝子 *BTU1*) の上流・下流周辺配列 (~1.4 kb) からなる3つのユニットからなる。プロモーターは、他の高発現型プロモーターと容易に交換できるようなコンストラクトに改変してある。また、強力なヒストン H3

プロモーターの下流にテトラヒメナ用にコドン最適化したパロモマイシン耐性遺伝子を組み込み、スクリーニングが容易になるような構成にした。

2) セルラーゼ関連遺伝子のコドンの最適化  
数種のシロアリ、および共生鞭毛虫のセルラーゼがこれまで100種類以上クローニングされているが、活性が確認されているのはオオシロアリ共生鞭毛虫由来の一種のみである (理研 守屋繁春氏)。活性の高い遺伝子をスクリーニングするために、遺伝子の人工合成が不可欠であり、エンドグルカナーゼ2種 (EG5, EG7) セロピオヒドラーゼ (CBH) リグニンエステラーゼである Cip-2-like 遺伝子等を人工合成し、コドンの最適化を行った後、ベクターに組み込んだ。パーティクルガンを用いてDNAを結合させた金粒子をテトラヒメナ大核内に打ち込んだ。パロモマイシンによるスクリーニング後、細胞外液を酵素票品とし、EGとCBHそれぞれの基質 (カルボキシメチルセルロース CMC とセルロース微結晶懸濁液) を用いて、活性の測定を行った。Cip-2-like 遺伝子の活性測定は、間接的にを行った。EG5を分泌するテトラヒメナとCip2-likeを発現する細胞外液を等量ずつ混合し、バガス (搾汁残渣) を基質として、前者の単独培養時の外液と比べてセルロース分解活性が上昇するかどうかで活性の有無を判定した。

### 4. 研究成果

#### 1) 構築したベクターのスクリーニングと導入遺伝子座

導入遺伝子座として、前述したミオシン13遺伝子座 (*Myo13*) と チューブリン1 (*BTU1*) 遺伝子座の両方にベクターを導入した。

テトラヒメナの大核には、平均して50コピーの遺伝子が存在する (擬似50倍体)。導入遺伝子座として使用した *Myo13* 遺伝子座に組み込まれた導入配列は、そのコピー数を増

やしたが、2ヶ月に渡るスクリーニングの後でも野生型の *Myo13* はすべて置換されなかった（すべて置換されれば、抗生物質の投与が必要なくなり、安価に培養ができる）。このことは、*Myo13* 遺伝子は生存に必須なハウスキーパー遺伝子であることを示唆しており、導入遺伝子座としては不適當であることが明らかになった。一方、*BTU1* 遺伝子座に組み込んだ場合には、最速2週間程度で全ての野生型遺伝子が導入ベクターと置換された。*BTU1* 遺伝子を破壊すると、*BTU2* 遺伝子が発現して補償することが知られており、*BTU1* 遺伝子の KO は容易であり、導入遺伝子座としては最適であると結論づけた。

2) エンドグルカナーゼ EG5 および EG7 活性  
システインプロテアーゼ由来プロモーターを用いたベクター (pTtSec-EG5-CysPp、導入遺伝子座もシステインプロテアーゼ遺伝子座) に比べて、*MTT1* プロモーターに置換したベクター (pTtSec2-EG5-MTT1p) では、10～50 倍程度の EG 活性が検出され、改良型ベクターは分泌、活性の発現に十分な能力をもつことが確認された (Fig. 1)。

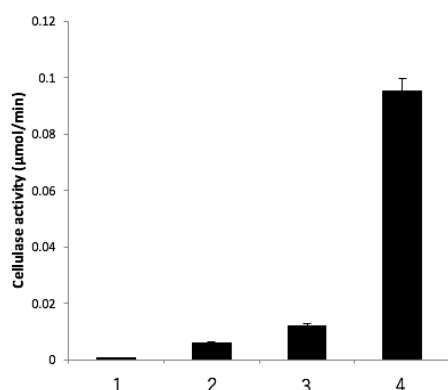


Fig. 1. エンドグルカナーゼ (EG5) 活性

1. 対照、野生型、定常期
2. 組換え体、システインプロテアーゼプロモーター、定常期
3. 組換え体、システインプロテアーゼプロモーター、対数増殖期
4. 組換え体、メタロチオネイン1プロモーター、定常期

ここでは示していないが、*rp12p* プロモーターを使用した場合 (pTtSec3-EG5-Rp12p) も高い活性が得られた。EG7 についても同様に高い活性が確認された。このことは、原生生物纖毛虫に属すテトラヒメナが、外来タンパク

質の発現系として、大きなポテンシャルをもっていることを示唆し、新しい物質生産生物になる可能性を示したと言える。

### 3) Cip2-like 活性

シロアリ共生ベン毛虫由来の Cip2-like はトリコデルマ菌で見つかった Cip2 のホモログであるようだ。Cip2 は植物細胞壁の構成物であるヘミセルロースの一種であるグルクロノキシランとリグニンの間のエステル結合を加水分解するグルクロノイルエステラーゼである可能性がある。そのため、リグニンを含んだバイオマス基質を用いてセルラーゼとともに反応させると、セルラーゼがセルロースへアプローチしやすくなり、セルラーゼの活性を上昇させる可能性を検証した。

Cip2-like の活性検出のために、EG5 発現細胞と Cip2-like 発現細胞を 1:1 で混合し、EG5 発現細胞のみの場合の EG 活性をサトウキビ由来のバガス (搾汁残渣) を基質として、比較した。しかしながら、有意な活性の上昇は見られなかった。そこで、EG 発現細胞の培養液 (EG 活性を含む) に、Cip2-like 発現細胞の培養液を 10 倍濃縮して加え、活性を測定した。この場合には、EG 活性は対照群と比べて約 1.3 倍に上昇した (統計的有意差あり)。活性は低いものの Cip2-like のエステラーゼ活性を確認することができた。しかし、工業化へ至るレベルには程遠いのが現状である。

### 4) セロビオヒドラーゼ (CBH) の活性

セロビオヒドラーゼについては、残念ながら活性は検出されなかった。CBH の C 末端にはセルロース結合部位があり、N 末端側はトンネル構造を形成し、そこには切断の活性中心がある。配列を見ると、CBH の N 末端には、シグナルペプチドと思われる 14 または 20 個の疎水性アミノ酸が多い領域がある。この配

列が立体構造に何らかの影響を与えている可能性を考慮し、それら 14 または 20 アミノ酸の配列を取り除いたバージョンを用いて再度形質転換し、活性を測定した。しかしながら、やはり活性は検出されなかった。トリコデルマ菌由来の CBH も同様に、異種発現には成功していない。おそらく CBH の複雑な立体構造が異なる種での発現を困難にしているのであろう。

最後に、分泌シグナル配列の C 末端と CBH 遺伝子の N 末端の間には、ベクター構築のための制限酵素部位 (Bam HI) がある。この配列が余分な 2 アミノ酸を CBH の N 末端に付加している可能性がある。上述したように、少数の余分なアミノ酸が立体構造に干渉している可能性を否定できない。そこで、分泌シグナル側の C 末端を 1-3 アミノ酸削り、本来の CBH の N 末端で切断されるようなコンストラクトを構築中である。まだ結果が出ていないが、科研費の交付期間は終了しているが、今後この問題を検証する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 1 件) 海老原 哲男, 増田 光平, 遠藤 浩, 仁宮 一章, 小田切 正人, 守屋 繁

繊維毛虫テトラヒメナを用いたセルラーゼ生産ベクターの確立

第 68 回日本生物工学会大会、富山国際会議場、2016 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 浩 (ENDOHI Hiroshi)

金沢大学・理工研究域・自然システム学系  
准教授

研究者番号: 20272932