

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07718

研究課題名(和文)糸状菌セルラーゼの誘導・生産機構の改良に向けた基盤研究

研究課題名(英文)Elucidation of cellulase induction and production mechanisms in a filamentous fungus.

研究代表者

野崎 功一 (Nozaki, Kouichi)

信州大学・学術研究院工学系・准教授

研究者番号：10313834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ソホロース合成に関与する $\alpha$ -グルコシダーゼであるCel1Aの発現量を増加させることで、セルラーゼの生産量を約2倍に増加させることに成功した。Cel1Aの発現量が多くなるとセルラーゼの生産量は減少することから、発現量の適切な調節が必要であることを明らかにした。一方、ソホロース分解酵素であるCel3Bを欠損させることで、セルラーゼ生産量を増加させることに成功した。さらに、糖質トランスポーターCrt1の過剰発現により、セルラーゼ生産量は約1.7倍に増加した。Crt1の過剰発現株と欠損株の解析結果から、Crt1はCel1Aとセルラーゼの正の転写因子Xyr1の発現に必須であることを初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

産業的に有用なセルラーゼ生産菌であるTrichoderma reeseiにおけるセルラーゼの誘導発現メカニズムの一部を明らかにした。これを利用することで、高性能なセルラーゼを安価に生産することが可能になると予想される。また、糖質トランスポーターが糖輸送だけでなくセルラーゼの誘導にも必須であることを初めて明らかにした。これは、糸状菌の酵素の誘導発現において新たな発見であり、学術的に重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)： To increase the cellulase production in Trichoderma reesei, we tried to adjust the expression levels of sophose producing and degrading enzymes and sugar-transporter which involved in cellobiose uptake. The increase of Cel1A expression resulted in increase of the cellulase production. However, the remarkable increase of Cel1A caused the decrease of cellulase production. These suggested that the suitable control of Cel1A expression might be important for increase of the cellulase production. On the other hand, it was found that Cel3B deletion mutant produced cellulase twice as compared to that of the parent strain.

Moreover, the Crt1 overexpression mutant produced the cellulase 1.7 times higher. From the results of the overexpression and the deletion mutants of Crt1, it was firstly discovered that Crt1 was essential to expression of Cel1A and the transcription factor Xyr1.

研究分野：応用微生物学

キーワード：セルラーゼ誘導 バイオマス利用

## 1. 研究開始当初の背景

セルロース系バイオマスの有効利用において、糖化に使用するセルラーゼを大量にかつ安価に生産することは重要な課題である。セルラーゼ高生産菌である *T. reesei* は、セルロースを培地に添加することによってセルラーゼを誘導し生産する。しかし、セルロースは水に不溶なため、培養液の攪拌効率を著しく低下させるとともに、生産した酵素がセルロースに吸着し損失が生じる。一方、可溶性のソホロース ( $\beta$ -1,2-グルコビオース) を誘導剤に用いると、わずか 1 mM の濃度でもセルロースを用いた時と同量のセルラーゼを生産することが可能であり、上記の問題を解決することが可能となる。

しかしながら、ソホロースは高価な希少糖であり、培地成分として使用することは不可能である。そこで、本菌が持つソホロースの自己合成能力に着目し、その合成と分解経路を制御することによってセルラーゼの生産量を増加させる研究戦略を計画した。

ソホロースは、*T. reesei* の  $\beta$ -グルコシダーゼ (BGL) の糖転移反応によって合成されることがわかっている。申請者は、これまでに本菌に存在する 9 種類の BGL 組換え酵素を作製し、それぞれの糖転移反応によるソホロース合成能力を評価してきた。その結果、セロビオースがドナー、グルコースがアクセプターとなり種々の結合位置が異なる二糖が合成されることや、細胞内 BGL (Cel1A) が特に高い変換効率 (13%) でソホロースを合成することを明らかにしてきた。さらに、Cel1A 遺伝子を破壊することで、セルラーゼ生産時期に遅れが生じ、生産量が劇的に低下することも見出した。これらは、Cel1A が誘導物質であるソホロース合成に関与する酵素であることを強く支持する結果である。

## 2. 研究の目的

*T. reesei* においてセルラーゼの生産量を増加させることを目的として、その誘導物質であるソホロースの合成や分解に関与する酵素ならびにソホロース合成の基質となるセロビオースの取り込みに関係するトランスポーターの発現量を制御することで、セルラーゼ生産量に及ぼす影響を調査した。これらを総合的に考察することによって、本菌のセルラーゼ誘導発現メカニズムを明らかにすることを試みた。

## 3. 研究の方法

### ① Cel1A 過剰発現株の作製と評価

ソホロース合成酵素である Cel1A の発現量を増加させることでセルラーゼ生産量の向上を目指す。得られた変異株について各種セルラーゼの生産時期と生産量に及ぼす影響を調査した。

### ② 変異型 Cel1A 過剰発現株の作製と評価

触媒特性が向上した変異型 Cel1A を発現させた変異株を作製しセルラーゼ生産能を評価した。

### ③ ソホロース分解酵素 (Cel3B) 欠損株の作製と評価

Cel3B 遺伝子の破壊を行い、ソホロース分解量を抑制することでセルラーゼ生産性の向上を目指す。

### ④ 糖質トランスポーター Crt1 の過剰発現によるセルラーゼ活性の増大

糖転移反応によるソホロース合成量は、基質セロビオース (G2) の濃度に依存して高くなることがわかっている。本菌の糖質トランスポーター (Crt1) を過剰発現させて、細胞内におけるソホロースの合成量を増加させ、セルラーゼ生産性の向上を目指す。また、Crt1 遺伝子破壊株を作製し、本菌のセルロース生産における Crt1 の役割を調査した。

#### 4. 研究成果

##### ① Cel1A 過剰発現株の作製と評価

Cel1A 遺伝子のコピー数を増やすことにより、その過剰発現を試みた。過剰発現株はいずれも親株と比較して細胞内 BGL 活性が高くなり、その活性は培養後期まで続いた (図 1)。また、Cel1A 遺伝子のコピー数の差によって、BGL 活性が異なる複数の株が得られた。細胞内 BGL 活性が比較的低い株ではセルラーゼ生産量が最大約 2 倍に増加し、BGL 活性が高い株では親株よりもセルラーゼ活性が低下した (図 1)。これは、Cel1A の過剰発現によってソホロース合成量が変化したためと考えられるが、高い Cel1A 発現量では加水分解によりグルコースが生産され、カタボライト抑制によってセルラーゼの生産が抑制されることが推定された。一方、ソホロース合成能力が高い変異型 Cel1A を過剰発現させたところ、同様の結果が得られ、酵素間による差は確認できなかった。これは、変異型 Cel1A は Cel1A よりも加水分解活性が高く、ソホロース合成よりも加水分解に寄与したことが原因と推定された。結論として、Cel1A の過剰発現によりソホロース合成量を増加させるためには、その発現量を適切に調節することが重要であることがわかった。

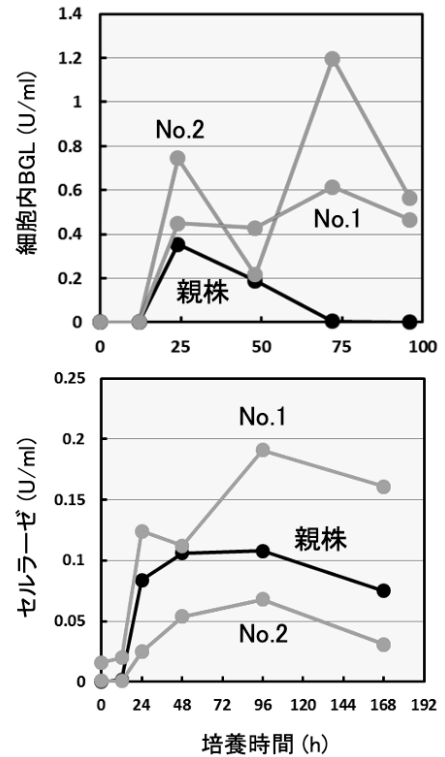


図 1 Cel1A 過剰発現株におけるセルラーゼの生産量

誘導物質合成酵素である Cel1A の過剰発現株 2 株を調査した。

上：細胞内 BGL 活性，下：セルラーゼ活性

##### ② 変異型 Cel1A 過剰発現株の作製と評価

ソホロース合成能力を増加させた変異型 Cel1A を使用して、その過剰発現株を作製した。通常株およびカタボライト抑制株の両方で変異型 Cel1A を発現させたところ、セルラーゼの生産量は、①の結果と同様に発現量に強く影響を受けることがわかった。このことから、セルラーゼ生産量の頭打ちは、グルコースの蓄積によるカタボライト抑制ではないことがわかった。変異型 Cel1A は糖転移反応よりも加水分解能力が高いことから、ソホロースの合成蓄積量が十分でないことが原因であると推定された。

##### ③ ソホロース分解酵素 (Cel3B) 欠損株の作製と評価

Cel3B 欠損株を作製し調査した。Cel3B 遺伝子の欠損によってセルラーゼの活性が約 2 倍に増加することを見出した (図 2)。セルラーゼ生産量の増加は、セルロースで誘導される全ての酵素について生じ、Cel3B 遺伝子の欠損は全てのセルラーゼの誘導発現を促進させる効果があることを明らかにした。また、Cel3B プロモーターを使用して他の酵素を発現させることによって、セルラーゼの生産量が増加することもわかった。これは、Cel3B プロモーターのコピー数が増加することで Cel3B 転写因子の競合が起こり、結果として Cel3B の発現量が減少

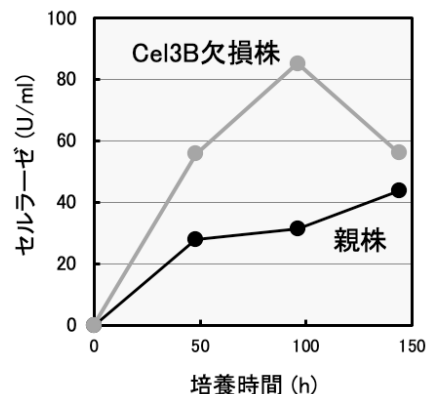


図 2 Cel3B 欠損株におけるセルラーゼの生産量

誘導物質分解酵素 Cel3B の欠損株を調査した。

したためと予想された。本手法を利用することで、セルラーゼ生産量の増加とセルロース分解におけるアクセサリ酵素の発現が同時に可能となり、各種バイオマスの分解に適した酵素剤を製造するための菌株改良を行うことが可能になると考えた。

#### ④ 糖質トランスポーターCrt1 の過剰発現によるセルラーゼ活性の増大

セルラーゼ誘導に関与している糖質トランスポーター (Crt1) を過剰発現し、セルラーゼの生産量の増加を試みた。Crt1 過剰発現株は、親株と比較してセルラーゼ活性が約 1.7 倍まで増加した (図 3)。しかし、菌のセロビオース取り込み量に顕著な差異は観察されなかった。このことは、Crt1 は糖質の取り込みに積極的に関与しているわけではなく、セルラーゼ誘導のシグナル伝達経路に重要な何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

また、Crt1 欠損株と過剰発現株のセルラーゼおよびその転写因子の発現解析を行うことで、Crt1 が Cel1A の発現に必須であることを初めて明らかにした。つまり、Crt1 が存在しない場合、Cel1A より下流のセルラーゼ誘導が全て停止し、Cel1A の正の転写因子 BglR が存在しても Cel1A が発現しないことを明らかにした。

Crt1 破壊株においてセルラーゼ誘導が停止した原因を探るために、Crt1 欠損株にソホロースを添加したが、セルラーゼ生産量の回復は生じなかった。また、セルラーゼ転写因子 Xyr1 の発現量の発現も起こらなかった。このことは、Crt1 は Cel1A だけでなく Xyr1 の発現にも関与していると考えられた。これらの結果から、Crt1 はセルラーゼ誘導に係るシグナル伝達において、Cel1A と Xyr1 の両方の発現を調節する重要な役割を果たしていることが明らかとなった (図 4)。

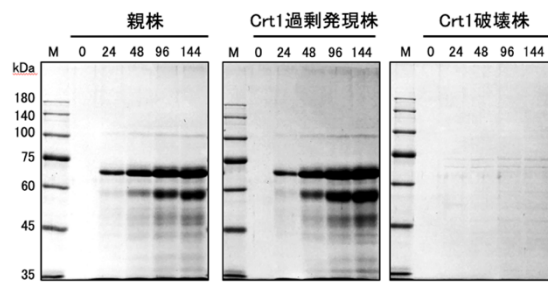
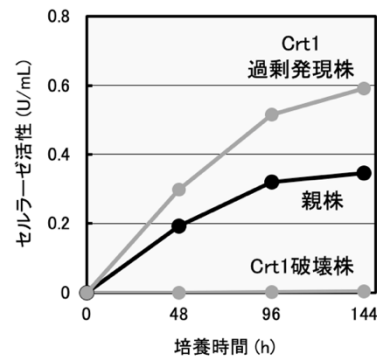


図 3 糖質トランスポーターCrt1 の過剰発現株および欠損株におけるセルラーゼ生産量

上：セルラーゼ活性，下：培養液の SDS-PAGE

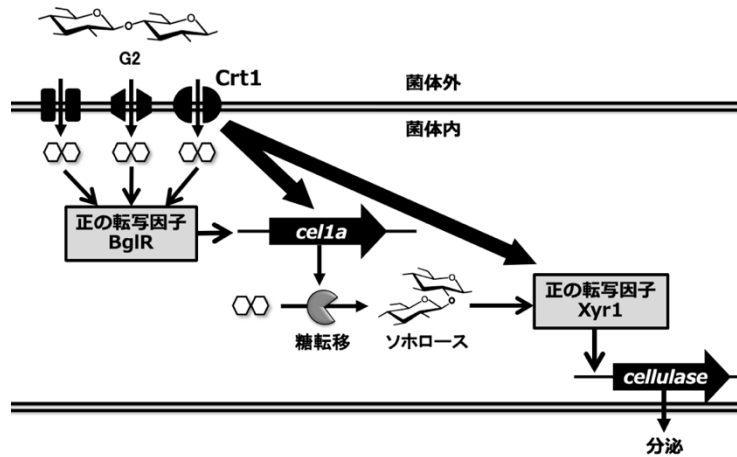


図 4 Crt1 を介したセルラーゼの誘導発現機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神山 周, 野崎功一
2. 発表標題 糖質トランスポーターCrt1がTrichoderma reesei のセルラーゼ生産に与える影響
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 渉, 野崎功一
2. 発表標題 Trichoderma reesei が生産するLPM09AとLPM09Bの性質の比較
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 正田ひかる, 野崎功一
2. 発表標題 Trichoderma reesei のセルラーゼ生産量に及ぼす細胞内 -グルコシダーゼCel3Eの影響
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神山 周, 野崎功一
2. 発表標題 Trichoderma reesei における糖質トランスポーターCrt1の過剰発現とセルラーゼ誘導発現への影響
3. 学会等名 第33回セルラーゼ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 渉, 野崎功一
2. 発表標題 LPM09AとLPM09Bのモジュール構造と酵素化学的性質の関連性
3. 学会等名 第33回セルラーゼ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 正田ひかる, 野崎功一
2. 発表標題 Trichoderma reesei におけるセルラーゼ生産とCel3Eの関連性
3. 学会等名 第33回セルラーゼ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加来孝浩, 藤野尚人, 野崎功一
2. 発表標題 各種セルラーゼ成分の吸着挙動に対する基質濃度の影響
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成30年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島抜悠大, 藤野尚人, 野崎功一
2. 発表標題 Trichoderma reesei 由来LPM09Aがセルラーゼの反応に与える影響
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成30年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加来孝浩, 藤野尚人, 野崎功一
2. 発表標題 基質濃度の違いによる各種セルラーゼ成分の吸着挙動
3. 学会等名 第32回セルラーゼ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島拔悠大, 藤野尚人, 野崎功一
2. 発表標題 Trichoderma reesei由来LPM09AがCBH Iの反応に及ぼす影響
3. 学会等名 第32回セルラーゼ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷江里, 郭 博洋, 友廣千洋, 天野良彦, 野崎功一
2. 発表標題 変異型Cel1Aの導入によるセルラーゼ生産量の調節
3. 学会等名 第31回セルラーゼ研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室のホームページ <a href="http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/research_index.html">http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/research_index.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----