

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21612002

研究課題名（和文）*Trichoderma reesei* のセロビオース代謝経路の解明研究課題名（英文）Elucidation of cellobiose metabolic pathway in *Trichoderma reesei*

研究代表者

岡田 宏文（OKADA HIROFUMI）

長岡技術科学大学・工学部・准教授

研究者番号：70233343

研究成果の概要（和文）：

セルラーゼ高生産菌 *Trichoderma reesei* は、セルロースを唯一の炭素源として培養したときに、細胞外に Cel3A を、細胞内に Cel1A および Cel3C を発現していることがわかっている。本研究では、これら3種のβ-グルコシダーゼ(BGL)の生理的役割を明らかにするため、各酵素を異種発現させ、酵素学的性質を明らかにするとともに、各酵素遺伝子欠損株を作成し、欠損株のセルロースまたはセロビオース生育時のセルラーゼ活性や、BGL活性を調べた。その結果、Cel3A および Cel3C は、pNP-Glc 分解活性がセロビオース活性よりも高いのに対し、Cel1A はその逆であった。欠損株のセルロースまたはセロビオース培養の結果から、それぞれの欠損株の細胞外および細胞内の BGL 活性は、各酵素の基質特異性を反映するものであった。さらに Cel1A が、セロビオースの代謝に関わっている BGL であり、3種 BGL は、セルラーゼの誘導には直接関わっていないと考えられた。セロビオース培養時には、Cel3A 以外の BGL が分泌発現していると推定された。

研究成果の概要（英文）：

Trichoderma reesei, which is well known to produce large amount of cellulases, expresses three β-glucosidases (BGLs), one of which is secreted Cel3A and the other are intracellular Cel1A and Cel3C, when grown on cellulose. To elucidate the physiological roles of these BGLs, we investigated the enzymatic properties of the recombinant enzymes produced by heterologous hosts. Furthermore, we constructed the deficient mutants of the corresponding BGL genes and characterized the amount of biomass and the cellulase and BGL activities of the mutants when grown on cellulose or cellobiose. The results demonstrated that Cel3A and Cel3C preferred pNP-Glc to cellobiose as the substrate, whereas Cel1A had higher activity for cellobiose than that for pNP-Glc. The intracellular and extracellular BGL activities of the mutants reflected the substrate specificity of the respective enzymes. We assumed that Cel1A plays the key role in cellobiose metabolism and the BGLs would not directly involve in cellulase induction. When *T. reesei* is grown on cellobiose, the other BGL(s) besides Cel3A seems to be expressed and secreted.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：バイオマスエネルギー

キーワード：遺伝子，応用微生物，菌類，酵素，バイオマス

1. 研究開始当初の背景

セルラーゼ高生産菌 *Trichoderma reesei* は、10種のβ-グルコシダーゼ(BGL)遺伝子を持ち、セルロース生育時には、そのうち3種が発現していることがわかってきた。1種は細胞外発現 Cel3A (BGL I)であり、残りの2種は、細胞内発現 Cel1A (BGL II)および Cel3C である。これら BGL のうち、細胞外 Cel3A は、他のセルラーゼによってセルロースが分解されて生じたセロビオースを主とするセロオリゴ糖の分解に関わっていると考えられていた。細胞内 Cel1A および Cel3C は、Cel3A によって分解されずに細胞内に輸送されたセロビオースから糖転移反応によってセルラーゼの誘導物質、ソホロースを生産していると推定されていた (図1)。

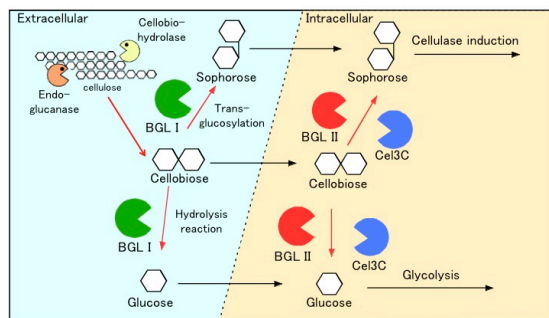


図1 推定セルロース代謝経路

2. 研究の目的

T. reesei が、セルロース生育時に生産する3種 BGL(Cel3A, Cel1A および Cel3C)の生理的役割を明らかにし、セロビオース代謝経路を解明することで、*T. reesei* のセルラーゼ生産能力の向上および *T. reesei* セルラーゼの糖化能力の向上のための知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Cel3A, Cel1A および Cel3C の異種宿主発現および酵素学的性質の解明

Cel3A および Cel1A は、大腸菌を宿主として発現に成功し、等電点沈殿法またはカラムクロマトグラフィーにより精製酵素を得た。Cel3C は、酵母(*Schizosaccharomyces pombe* および *Pichia pastoris*)を宿主として発現させた。

組換え酵素の基質特異性を pNP-Glc およびセロビオースを基質として分解活性

(pNPGase 活性およびセロビアーゼ活性)を求めることにより調べた。精製酵素が得られた Cel3A および Cel1A については、至適

反応 pH や pH および温度安定性などその他の酵素学的性質を調べた。

(2) Cel3A, Cel1A および Cel3C 遺伝子欠損株の作成およびそれら欠損株の性質解明

Cel3A 遺伝子は *amdS* 遺伝子, Cel1A および Cel3C 遺伝子は *pyr4* 遺伝子に置き換えることにより、それぞれの酵素遺伝子欠損株を作成した。各欠損株と野生株を 1%セルロース, 0.3%または 1%セロビオースで培養し、細胞外の CMCase 活性および pNP-Lac 分解活性 (pNPLase 活性), 細胞内外の pNPGase 活性およびセロビアーゼ活性, および細胞内外のタンパク質定量を行った。

4. 研究成果

(1) Cel3A, Cel1A および Cel3C の異種宿主発現

Cel3A は、*bgl1* cDNA を組み込んだ pET15b の大腸菌 Rosetta-gami B 形質転換体を用いて 20°C で培養することで発現させた。菌体を Bugbuster で溶解後、等電点沈殿で精製した。精製酵素の分子量は 72kDa であった。

Cel1A は、*bgl2* cDNA を組み込んだ pET22b の大腸菌 Rosetta-gami B 形質転換体を用いて 37°C で培養することで発現させた。菌体を Bugbuster で溶解し、遠心後の上清を陽イオンクロマトグラフィーおよび疎水性クロマトグラフィーにより精製した。精製酵素の分子量は、52kDa であった。

Cel3C は、大腸菌を宿主として発現を試みたが、活性型として発現しなかったため、酵母 *S. pombe* および *P. pastoris* を宿主として発現させた。いずれの宿主でも発現量が少なく、部分精製標品しか得られなかった。

(2) 組換え Cel3A, Cel1A および Cel3C の基質特異性

3種 BGL のセロビオースおよび pNP-Glc に対する活性を調べたところ、表1のようになった。

表1 3種 BGL の基質特異性

Enzyme	Specific activity (U/mg)		Cellobiase / pNPGase
	Cellobiase	pNPGase	
BGL I (Cel3A)	19	68	0.28
BGL II (Cel1A)	54	5.0	11
Cel3C*	4.3	11	0.39

* Partial purification

Cel3A および Cel3C は、pNPGase 活性の方が、セロビアーゼ活性よりも高かった。一

方, Cel1A は, その逆でセロビオースに対する活性の方が高かった。それぞれの属する GH ファミリー酵素の特徴かも知れない。

(3) 組換え Cel3A および Cel1A の酵素学的性質

精製標品として得られた Cel3A および Cel1A の至適反応 pH, pH および温度安定性を調べた。至適反応 pH は, Cel3A が pH5 であり, Cel1A が, pH6 であった。pH 安定性は, Cel3A が pH4.0–6.0 (30 分保温, 80% 以上活性維持) であったのに対し, Cel1A は pH6.5 で 90% 活性維持であった。温度安定性は, Cel3A が pH5.0, 30 分保温で 60°C までほぼ 100% 活性が維持されたのに対し, Cel1A は pH6.5, 1 時間保温で 30°C まで 80% の残存活性であった。以上の結果, 菌体内酵素である Cel1A は, 分泌酵素である Cel3A に比べて pH および温度安定性が低いことが明らかとなった。

(4) Cel3A, Cel1A および Cel3C 遺伝子欠損株の作成

それぞれの BGL 遺伝子上流プロモーター領域と下流ターミネーター領域の間に Cel3A の場合は, アセトアミダーゼ遺伝子 (*amdS*) を, Cel1A と Cel3C の場合は, オロチジン 5'-リン酸脱炭酸酵素遺伝子 (*pyr4*) を挿入した DNA 断片を作成し, Cel3A は *T. reesei* QM9414 株を, Cel1A および Cel3C は *T. reesei* QM9414 *pyr4::amdS* 株を形質転換することにより相同組換えで各 BGL 遺伝子が欠損した *T. reesei* 変異体を作成した。

(5) 各 BGL 遺伝子欠損株の 1% Avicel (結晶セルロース) 培養

各 BGL 遺伝子欠損株 [Δ cel3a (Δ bgl1), Δ cel1a (Δ bgl2), Δ cel3c] を, 1% Avicel を唯一の炭素源として培養し, 培養時間に対する CMCase および pNPLase 活性 (図 2), pNPGase 活性 (図 3), セロビアーゼ活性 (図 4) およびタンパク質量 (図 5) を測定した。

CMCase 活性, pNPLase 活性はそれぞれエンドグルカナーゼ (EG) 活性, セロビオハイドロラーゼ I (CBH I) 活性を示し, セルラーゼ活性の指標となる。

野生株 QM9414, Δ cel3a(Δ bgl1), Δ cel3c は両酵素活性ともに 48h 培養後から活性が上昇し, ほぼ同等の値を示したのに対し, Δ cel1a(Δ bgl2) は, 両酵素活性とも 96h 培養後に活性が出現した後ゆっくりと活性が上昇し, 他の変異株の活性値には達せず一定となった (図 2)。この傾向は, 図 5 に示す細胞のタンパク質量と一致しており, *cel1a(bgl2)* の欠損が, 生育に影響していることを示している。

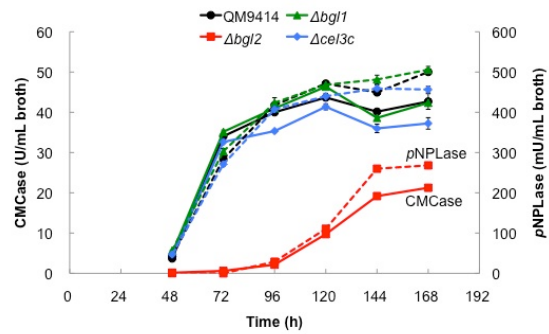


図 2 CMCase, pNPLase 活性 (1% Avicel 培養)

図 3 に pNPGase 活性を示した。細胞外 pNPGase 活性 (実線) は, QM9414 と Δ cel3c がほぼ同等であるのに対し, Δ cel3a(Δ bgl1) は, 活性は低かった。Cel3A(BGL I) が細胞外 pNPGase 活性の大半を担っているためと考えられる。 Δ cel1a(Δ bgl2) はセルラーゼ活性と同様遅れて活性が上昇した。細胞内 pNPGase 活性 (点線) は, QM9414 と Δ cel3a(Δ bgl1) がほぼ等しく, Δ cel3c は, 低下した。 Δ cel1a(Δ bgl2) は, 遅れて活性が表れている。

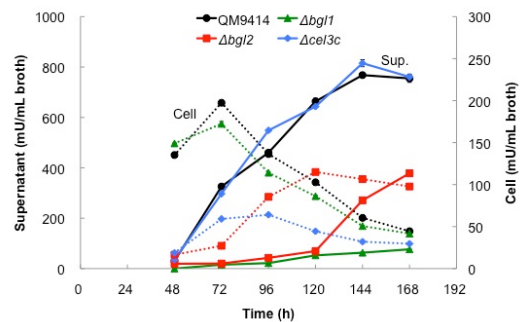


図 3 pNPGase 活性 (1% Avicel 培養)

図 4 にセロビアーゼ活性を示した。細胞外セロビアーゼ活性 (実線) は, すべての株で pNPGase 活性と同様な傾向を示した。細胞内セロビアーゼ活性 (点線) は, Δ cel1a(Δ bgl2) のみ大幅に減少した。

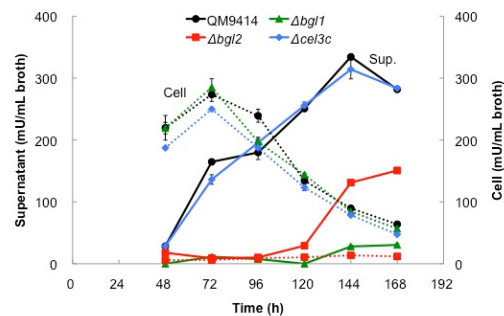


図 4 セロビアーゼ活性 (1% Avicel 培養)

図5にタンパク質量を示した。細胞外タンパク質量(実線)は、セルラーゼ活性と同様の傾向を示し、 Δ cel1a(Δ bgl2)のみ遅れて上昇した。細胞内タンパク質量(点線)は、48-120h 培養までは、他の株に比べて Δ cel1a(Δ bgl2)が減少した。

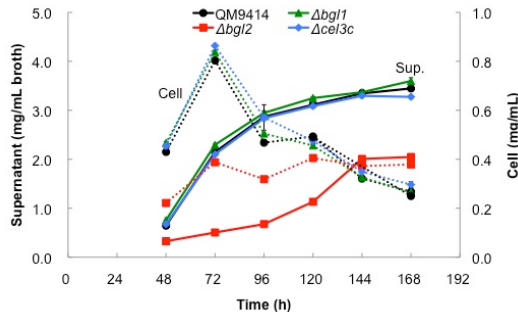


図5 タンパク質量

以上の結果をまとめると、各 BGL 遺伝子欠損株の細胞内外の pNPGase およびセロビアーゼ活性は、各 BGL の局在性および基質特異性の結果とよく一致しているといえる。

Δ cel1a(Δ bgl2)で生育の遅れが見られるが、セルラーゼの誘導が見られることから、セルロース培養時に CBH や EG によって生じたセロビオースは、細胞内に輸送され、Cel1A (BGL II)によって分解されてグルコースを生じていると考えられる。セルロースからのセロビオース代謝には、Cel3A(BGL I)および Cel3C は、関与していないと推定される。また3種 BGL いずれもセルラーゼの誘導には直接関与していないと考えられる。

(6) 各 BGL 遺伝子欠損株の 0.3%セロビオース培養

0.3%セロビオース培養時の CMCase 活性(図6), pNPGase 活性(図7)を調べた。セロビアーゼ活性は検出限界以下であった。

CMCase 活性は、1% Avicel 培養時に比べて500倍減少したが、どの株でも同等の活性値が得られた(図6)。

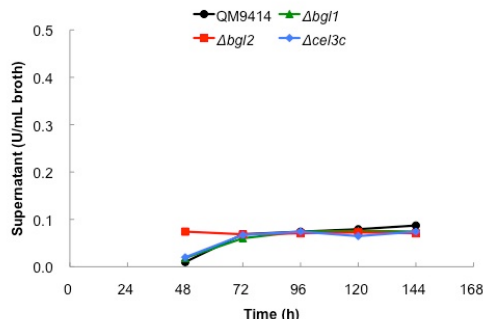


図6 CMCase 活性 (0.3%セロビオース培養)

図7に pNPGase 活性を示す。細胞外 pNPGase 活性は、QM9414 と Δ cel3c とがほぼ同等であった。それら2株に比べて Δ cel3a(Δ bgl1)と Δ cel1a(Δ bgl2)は、約3分の2の活性値であった。細胞内 pNPGase 活性は、 Δ cel3c が他の株と比べて活性がやや下がっていた。

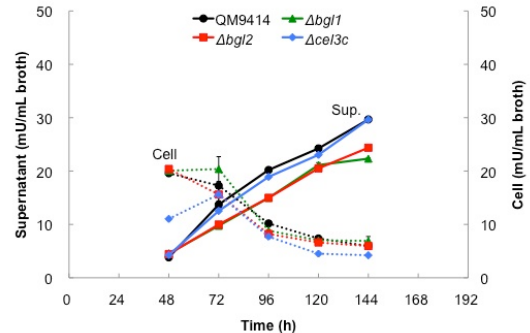


図7 pNPGase 活性 (0.3%セロビオース培養)

(7) 各 BGL 遺伝子欠損株の 1%セロビオース培養

0.3%セロビオース培養時の CMCase 活性(図8), pNPGase 活性(図9), セロビアーゼ活性(図10)を調べた。

CMCase 活性は QM9414 と Δ cel3a(Δ bgl1) に比べて Δ cel3c は約2分の1に低下していた(図8)。この原因は不明である。 Δ cel1a(Δ bgl2)の活性は低く、培養時間にかかわらずほぼ一定であった。これは、細胞外セロビオース濃度が高いため、セロビオースが分解されて生じたグルコースによる炭素源異化抑制の結果、セルラーゼの誘導が抑えられたことが原因と考えている。

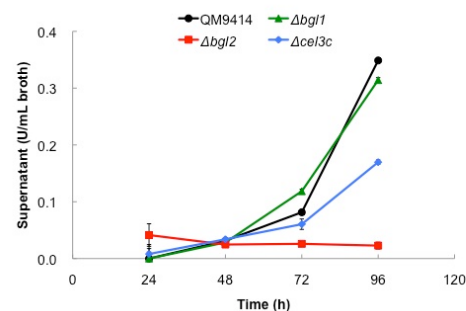


図8 CMCase 活性 (1%セロビオース培養)

図9に pNPGase 活性を示す。細胞外 pNPGase 活性(実線)は QM9414, Δ cel3c, Δ cel3a(Δ bgl1), Δ cel1a(Δ bgl2)の順に低下した。

細胞内 pNPGase 活性(点線)は QM9414 と Δ cel3a(Δ bgl1) に比べて Δ cel1a(Δ bgl2) と Δ cel3c は約2分の1であった。

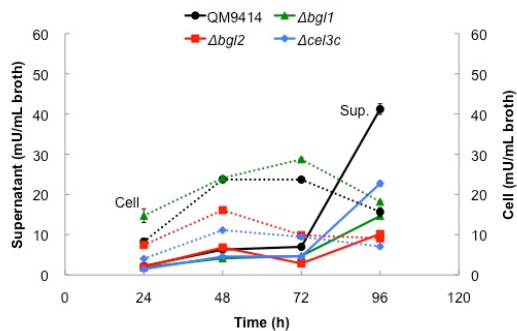


図9 pNPGase 活性 (1%セロビオース培養)

図10にセロビアーゼ活性を示す。細胞外セロビアーゼ活性(実線)は、細胞外pNPGase活性と同様 QM9414, Δcel3c, Δcel3a(Δbgl1), Δcel1a(Δbgl2)の順に低下した。細胞内セロビアーゼ活性(点線)は、Δcel1a(Δbgl2)のみが他の株に比べて大きく減少した。細胞内セロビアーゼ活性は Cel1A(BGL II)が担っていることがこの結果からもわかる。

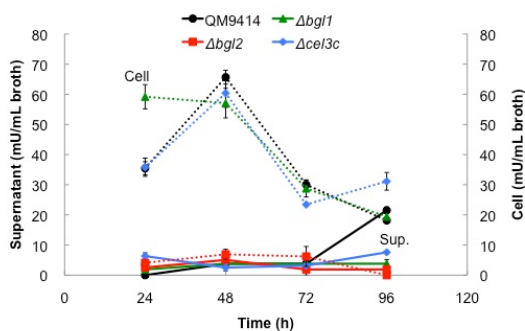


図10 セロビアーゼ活性 (1%セロビオース培養)

以上の結果から、*T. reesei*のセロビオース代謝経路は、図11の様に推察される。

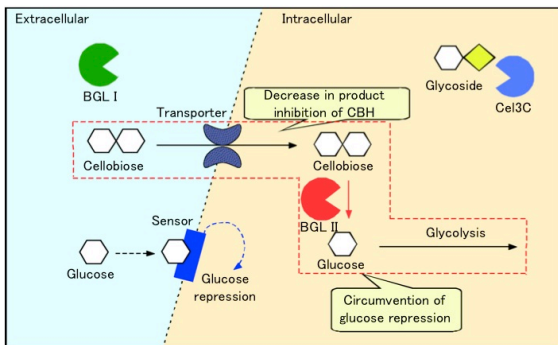


図11 *T. reesei* 推定セロビオース代謝経路

セロビオースは、セロビオーストランスポーターによって細胞外から細胞内に輸送され、細胞内の Cel1A (BGL II)によって分解され、グルコースとなり、代謝される。この際、Cel3A(BGL I)と Cel3C は、セロビオース代

謝に関わっていないと考えられる。セロビオースを細胞内に輸送した後に分解する意味の1つは、CBHの生成物阻害の緩和のためであろう。もう1つは、細胞外グルコースによるセルラーゼ発現の炭素源異化抑制を回避するためと想定している。培地中のグルコースによるセルラーゼ発現の炭素源異化抑制は、*T. reesei*においてよく知られている。炭素源異化抑制のグルコースセンサーは細胞外に向いており、細胞内でのグルコースの生成は、感知しないものと思われる。

この仮説を証明するためには、トランスポーターの同定および培地に過剰の BGL を添加した時のセルラーゼの誘導性を調べる必要がある。

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)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計2件)

- ① 鈴木尊久, 長戸拓也, 齋藤勇司, 小松光子, 落合伸廣, 中澤光, 小笠原 渉, 岡田宏文, *Trichoderma reesei* 由来3種β-グルコシダーゼの生理的役割の解明, 2011年セルラーゼ研究会第25回大会 P7
- ② 鈴木尊久, 長戸拓也, 齋藤勇司, 小松光子, 落合伸廣, 中澤光, 小笠原 渉, 岡田宏文, *Trichoderma reesei* 3種β-グルコシダーゼの生理的役割, 日本農芸化学会2012年度大会

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://bio.nagaokaut.ac.jp/~okada/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 宏文 (OKADA HIROFUMI)

長岡技術科学大学・工学部・准教授

研究者番号: 70233343

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小笠原 渉 (OGASAWARA WATARU)

長岡技術科学大学・工学部・准教授

研究者番号: 40292172