

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23603002

研究課題名(和文)高精度比較ゲノム解析を用いた糸状菌のタンパク質分泌生産メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of protein secreting mechanisms of filamentous fungi by the comparative genomic analysis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、トリコデルマ・リーセイのセルラーゼ生産系をモデルとして糸状菌におけるタンパク質分泌生産メカニズムに関する知見を得ることを目的としている。野生株から取得されたセルラーゼ高生産変異株系統樹を対象として、ゲノム配列の比較解析を行い、各変異株において変異が生じていた遺伝子を明らかにした。数種の遺伝子の破壊および変異復帰解析の結果、炭素源異化抑制に関する転写調節因子Cre1、菌体内β-グルコシダーゼの転写活性化因子BglR、菌体内の主要なβ-グルコシダーゼであるBGLIIをコードする遺伝子の変異がトリコデルマ・リーセイのセルラーゼ生産能の向上をもたらしたことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei* secretes a tremendous amount of proteins and almost all of these proteins are cellulases and hemicellulases. Therefore, *T. reesei* is an ideal model organism to understand protein secretion mechanism of filamentous fungi. The goal of this study is to understand cellulase production mechanisms of *T. reesei* through comparative genomic analysis of a cellulase hyper-producing mutant lineage developed in Japan. After sequencing the genome of *T. reesei* mutants, by a Next-Generation Sequencer, a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified. We focused on three mutated genes which are cre1 encoding the carbon catabolite repressor, bglR encoding transcriptional activator of intracellular beta-glucosidase, and bgl2 encoding major intracellular beta-glucosidase BGLII. From gene disruption and complementation of mutated nucleotide, these SNPs were found to be responsible for increased cellulase production.

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：糸状菌 比較ゲノム解析 セルロース セルラーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

近年、地球温暖化問題および原油価格の高騰から、セルロース系バイオマスから糖生産し、工業用原料へと変換するバイオリファイナリーという産業の創成が期待されている。糸状菌トリコデルマ・リーセイは、既存の微生物の中で最もセルロース分解能力の高い微生物として知られており、セルロースを炭素源としてセルラーゼを大量に分泌生産する。その産業上の有用性から 30 年以上も昔から世界中で UV 照射、NTG 処理等の古典的な変異導入方法によってセルラーゼ活性が高められた菌株の取得が進められてきた。また、2005 年には野生株 QM6a についてその全ゲノム配列の解読がほぼ終了し、一般公開されている (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>)。日本において独自に開発された変異株は高いセルラーゼ生産性を示すとともに、微生物の中では最高レベルのタンパク質分泌量を発揮する。これらの変異株がどのような要因で(どのようなゲノム上の変異で)セルラーゼ活性が高められたのかは全く不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では野生株 QM6a の全ゲノム配列を対象とした比較ゲノム解析を行い、変異株間で生じた一塩基多型 (SNP : Single Nucleotide Polymorphism) を有する遺伝子を同定し、SNP が遺伝子機能に与える影響の解析を行うことを目的としている。遺伝子機能は菌株の表現型として説明できるという観点から、日本の系統樹について、生育・形態、分泌タンパク質生産能力、炭素源の代謝能力、酵素活性、セルラーゼ誘導生産性を網羅的に解析し、SNP 変異点と表現型との相関解析を明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

*T. reesei* QM6a を親株として得られた世界標準株である QM9414 株および QM9414 株から得られた日本型変異株 6 株のゲノム DNA 配列について次世代シーケンサー SOLiD を用いて塩基配列を決定し、QM6a のゲノム DNA 配列に対してマッピングした。また、遺伝子のコード領域、上流領域 (1 kbp)、下流領域 (0.5 kbp) に生じた SNP をデータベース化した。

SNP が生じた遺伝子について、転写・翻訳後のタンパク質にアミノ酸変異が生じるものについて、相同組換えによって変異を回復させた株、もしくは遺伝子を破壊した株を構築し、それらの株のセルラーゼ生産性を解析することによって変異が生じていた遺伝子の機能解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) *T. reesei* 変異株系統樹の比較ゲノム解析

日本において開発されたトリコデルマ・リ

ーセイの各変異株 (野生株 QM6a に変異を導入することで得られた世界標準株を親株として継代変異育種された N-25、K14、KDG-12、PC-3-7、PCD-10、CDU-11) について次世代シーケンサーで得られたリードを QM6a のゲノムにマッピングした結果を表 1 に示した。

表 1 各変異株のシーケンサーデータのマッピング結果

	QM9414	N-25	K14	KDG-12	PC-3-7	PCD10	CDU-11
reference covered (%)	98.9	99.1	97.3	99.1	99	94.9	99.1
base coverage	x48.2	x61.6	x30.0	x61.0	x52.5	x39.7	x72.0

平均リード深は x30.0 ~ x72.0 であり、QM6a の全ゲノムに対し 97.3 ~ 99.1% のカバー率であった (表 1)。ここで SNP に着目すると野生株 QM6a から CDU-11 まで 2000 以上の SNP 候補が見いだされた。このうち、3 以上のリードにカバーされ、かつ塩基置換率が 66% より高いものを SNP としたとき、各株において見出された SNP の数を表 2 に示した。

表 2 QM6a に対して SNP が生じていた塩基の数

	QM9414	N-25	K14	KDG-12	PC-3-7	PCD10	CDU-11
All	123	357	191	402	260	230	443
CDS	20	33	45	70	76	75	113
AA substitution	15	20	34	46	52	53	79
Intron	11	20	13	27	22	18	29
Promoter	32	46	51	67	60	62	95
Terminator	22	28	25	42	40	33	53

variant base coverage >= 3, variant base frequency > 66%

SNP が生じていた遺伝子について、転写・翻訳されたのちのタンパク質のアミノ酸配列が変異しているものが存在した。これらの遺伝子とその推定の機能に基づいて分類した。大半の遺伝子の機能は未知であったが、遺伝子の転写をコントロールする転写調節因子や種々の酵素、その他の機能性タンパク質をコードしている遺伝子が見出されたため、セルラーゼ高生産変異株において、これらのタンパク質の機能低下および機能欠損がセルラーゼの高生産性をもたらしている可能性が考えられた。

#### (2) 変異遺伝子の破壊・復帰解析

SNP が生じていた遺伝子のうち、セルラーゼ生産に関わると推定されるものが見出された。そこで、それらの変異を復帰させる、もしくは遺伝子を破壊することで変異の影響を解析した。PC-3-7 株は、L-ソルボースによるセルラーゼ誘導能およびセロビオースによるセルラーゼ生産性が強化されているという特徴を有する。そこで、PC-3-7 の表現型がどのような変異によって獲得されたのかについて解析を進めた。

### cre1

cre1は、グルコース存在下でセルラーゼ遺伝子を含む様々な2次代謝経路に関わる遺伝子の発現を抑制する因子 CRE1 をコードしている遺伝子である。PC-3-7株において cre1 に SNP が存在しており、その影響により DNA 結合領域の1アミノ酸が変異 (Thr → Pro) している。ゲルシフト解析において、変異 CRE1 が既知の DNA (セルラーゼ遺伝子上流配列に存在する CRE1 結合コンセンサス配列) に結合できなかったことから、本 SNP によって生じたアミノ酸変異は CRE1 の機能に極めて大きな影響を与えていることが明らかとなった。さらに、*in vivo* においてこの変異がどのような影響をもたらしたのかを PC-3-7 株、cre1 復帰株 (PCWcre1)、cre1 破壊株 (PC cre1) の3株を構築することで評価した。cre1 復帰株は、親株の cre1 遺伝子を PC-3-7 の cre1 と入れ替えることで構築した。また、cre1 破壊株は cre1 遺伝子内に選択マーカー遺伝子を挿入することによって構築した。これら3株のグルコース存在下でのセルラーゼ誘導性を解析した結果、PC-3-7 株は PCWcre1 株と比較し、グルコースによるカタボライトリプレッションが大きく解除されていた。また、PC cre1 株においては、より強くカタボライトリプレッションが解除されていたことから、1アミノ酸が変異した CRE1 が菌体内である程度機能していることが示唆された (図1)。

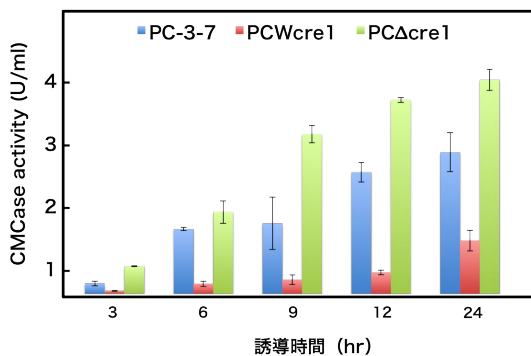


図1 休止菌体を用いたセルラーゼ誘導試験  
炭素源：ソホロース (誘導物質) 250 μg/mL  
グルコース 3000 μg/mL

cre1 SNP の大きな影響は、プレート培養において顕著に現れた。以前に行われたトリコデルマ・リーセイの菌株改良における初めの大きな難題は「1プレートに大腸菌のように菌のコロニーを形成させるか」ということであった。そのため、菌糸が広がらない変異株の取得がなされてきた。PC-3-7 と PCWcre1 は1塩基の違いのみであるが、図2に示すようにコロニー成長に大きな違いが見られた。このことより、CRE1 の変異はセルラーゼ生産だけでなく、コロニーの形態にも影響を与えて

いることが明らかとなった。

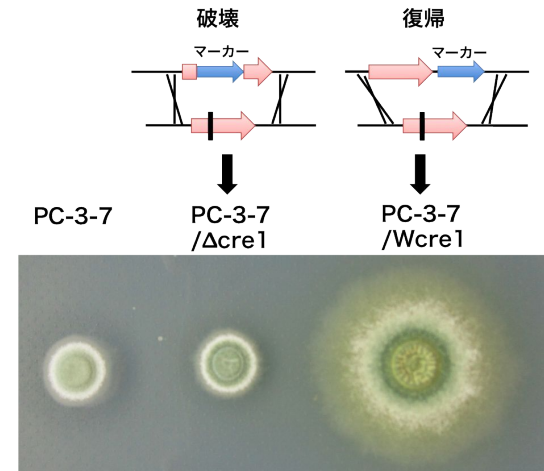


図2 CRE1 の変異がコロニーサイズに与える影響

### bglr

PC-3-7株において、これまでに知られている転写因子とは異なる転写因子をコードする遺伝子に SNP が生じていた。この転写因子は、麹菌より見出された  $\alpha$ -アミラーゼを正に制御する転写調節因子 AmyR と相同性を示した。AmyR は、マルトースの存在下においてアミラーゼ系酵素遺伝子の転写活性化に必要な転写因子であり、相同性のあった Zn2Cys6 タイプの Zinc finger motif の新規転写因子はトリコデルマ・リーセイにおいても重要な役割を担う可能性が期待された。また、トリコデルマ・リーセイがセルラーゼ生産菌であることを考慮にいと、セルロースの分解産物の一つであるセロピオース (グルコースが  $\beta$ -1,4-結合した2糖) に応答する転写調節因子ではないかと考えられた。そこで、bglr の SNP がセルラーゼの生産性にどのような影響をもたらしたのかを PC-3-7 株、bglr の変異復帰株 (PCWbglr)、bglr 破壊株 (PC bglr) の3株間で評価した。その結果、セロピオース培養において、PCWbglr 株が PC-3-7 株および PC bglr 株と比較し、セルラーゼ活性が1/3程度まで低下していた。さらに、転写レベルの解析で PCWbglr がセロピオース存在下において菌体内の  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子発現量が増加していた。このことから、BglR はセロピオース (もしくはセロオリゴ糖) 存在下において、菌体内  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子の転写を活性化する因子と推定された。前述の「セロピオース培養において、PCWbglr 株が PC-3-7 株および PC bglr 株と比較し、セルラーゼ活性が1/3程度まで低下した」という結果は、セロピオースによって BglR を介して菌体内  $\alpha$ -グルコシダーゼが誘導生産され、その酵素によって菌体内でセロピオースがグルコースに分解されることでカタボライトリプレッションが引き起こっていると推察された。



## bg12

トリコデルマ・リーセイは、菌体外、菌体外に10種の $\alpha$ -グルコシダーゼを生産すると推定されている。その中で、菌体外に存在する $\alpha$ -グルコシダーゼIは、セロオリゴ糖(セロピオースが中心)からグルコースを生産する中心的な酵素として考えられている。また、菌体内においては、最も発現量の高い $\alpha$ -グルコシダーゼ(BGLII)が取り込んだセロオリゴ糖を分解していると考えられていた。SNP解析の結果、PC-3-7株においてBGLIIをコードする遺伝子(*bg12*)に変異が見出された。PC-3-7株、*bg12*変異復帰株(PCW*bg12*)、*bg12*破壊株(PC *bg12*)の3株を構築し、解析した結果、菌体内 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性はPC-3-7株およびPC *bg12*株で低く、PCW*bg12*株においてその約4倍の値を示した。また、BGLIIは高濃度のセロピオース条件で、ソフォロースを生産する糖転移活性を示すことが知られているが、その活性はPC-3-7株とPCW*bg12*株のみで確認された。以上のことから、*bg12*におけるSNPは、分解活性を失うものの、糖転移活性は残存するような変異であることが示唆された。また、PCW*bg12*はPC-3-7株よりもセルラーゼの生産性が低かった。このことから、PC-3-7では菌体内で変異型BGLIIの糖転移活性によってセルラーゼの誘導物質が生産され、蓄積することでセルラーゼの生産性を向上させているのではないかと考えられた。そこで、PC-3-7の6世代前の親株であり、世界標準株でもあるQM9414株の*bg12*にPC-3-7と同様の変異を導入するとどのような影響があるのか興味を持たれた。QM9414株の*bg12*に変異を導入した株(QMS*bg12*)および*bg12*破壊株(QM $\Delta$ *bg12*)を構築し、結晶性セルロースを炭素源として培養した。その結果、QMS*bg12*株およびQM $\Delta$ *bg12*株の菌体内 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性はQM9414から著しく低下していたが、QMS*bg12*株の糖転移活性は失われていなかった。さらに、QMS*bg12*はPC-3-7とほぼ同等のセルラーゼ生産性を示した(図3)。このことからBGLIIのもつ糖転移活性は、セルラーゼ誘導生産に非常に重要であることが強く示唆された。また、菌体内でセロオリゴ糖がすみやかに分解されて生じたグルコースによる炭素源異化抑制によって、セルラーゼ生産が抑制されているのではないかと推測された。

## PCD-10株の比較ゲノム解析

これまで、セロピオースやソルボースを炭素源とした時に標準株であるQM9414株と比べて極めて高いセルラーゼ生産性を示すPC-3-7株に特に着目して解析を進めてきた。PC-3-7株から取得されたPCD-10株はフラスコレベルでのセルラーゼ生産性はPC-3-7とほぼ変わらないのに対し、大規模培養を行った際には高いセルラーゼ生産性を示す。PCD-10株の全ゲノム配列とQM6aとの比較ゲ

ノム解析から見出されたSNPのうち、アミノ酸変異をもたらす変異が生じていた遺伝子は少なくとも3つ存在することが明らかとなった。これら遺伝子の変異の影響を解析するための遺伝子破壊用および変異復帰用のDNA断片を構築した。

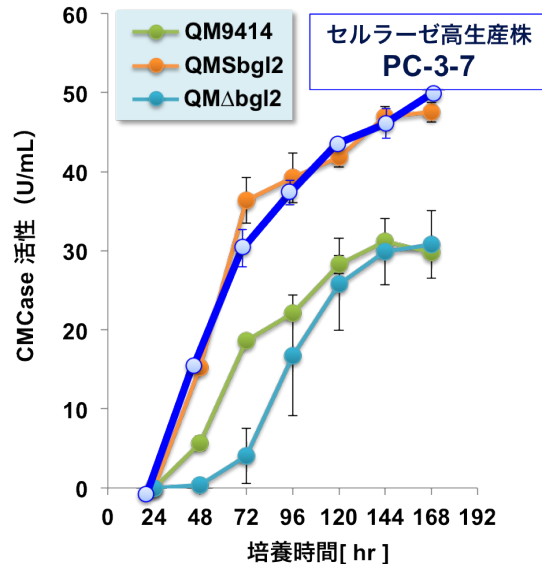


図3 QM9414株において*bg12*の変異がセルラーゼ生産に与える影響(炭素源を結晶性セルロースとしたセルラーゼ生産培養)

## pHがセルラーゼ生産に与える影響

トリコデルマ・リーセイにおいてセルラーゼの生産は培養時のpHに影響を受けることが明らかとなっている。種々のpH条件下における各変異体のセルラーゼ生産性を解析したところ、標準株においては高いpH条件になるにつれて酵素生産性が低下する傾向が観察された。それに対して、セルラーゼ高生産変異株は高pH条件におけるセルラーゼ生産性を維持していた。この表現型は、標準株の次の世代であるN25株から観察されたため、N25株で生じた変異はpH応答性に影響を与えていると考えられた。N25株と標準株に生じたSNPを比較した結果、コードするアミノ酸の変異をもたらす遺伝子は少なくとも3つ存在することが明らかとなった。

## 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2件)

Porciuncula JD., Furukawa T., Mori K., Shida Y., Hirakawa H., Tashiro K., Kuhara S., Nakagawa S., Morikawa Y., Ogasawara W., Single Nucleotide Polymorphism Analysis of a *Trichoderma reesei* Hyper-Cellulolytic Mutant Developed in Japan, *Bioscience*,

*Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有、Vol.77、No.3、2013、534-543、DOI:10.1271/bbb.120794

Nitta M., Furukawa T., Shida Y., Mori K., Kuhara S., Morikawa Y., Ogasawara W., A new Zn(II)(2)Cys(6)-type transcription factor BglR regulates  $\alpha$ -glucosidase expression in *Trichoderma reesei*, *Fungal Genetics and Biology*, 査読有、Vol.49、2012、388-397、DOI:10.1016/j.fgb.2012.02.009

〔学会発表〕(計15件)

平沢 大樹、塩屋 幸樹、志田 洋介、小笠原 涉、*Trichoderma reesei* における pH 依存的セルラーゼ・ヘミセルラーゼの生産制御機構の解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 27 日～2014 年 3 月 30 日、明治大学

小笠原 涉、日本型セルロース高分解微生物トリコデルマ・リーセイの Dry ラボを基にした Wet ラボ、第 65 回日本生物工学会大会(招待講演)、2013 年 9 月 18 日～2013 年 9 月 20 日、広島国際会議場

志田 洋介、吉田 理奈、通野 和人、山口 香織、小笠原 涉、比較ゲノム解析に基づく *Trichoderma reesei* における bgl2 の一塩基変異の解析、第 27 回セルラーゼ研究会、2013 年 7 月 12 日～2013 年 7 月 13 日、花王霞ヶ浦研修所

塩屋 幸樹、平沢 大樹、田原 伸悟、志田 洋介、小笠原 涉、*Trichoderma reesei* における pH 依存的セルラーゼ・ヘミセルラーゼ発現生産の網羅的解析、第 27 回セルラーゼ研究会、2013 年 7 月 12 日～2013 年 7 月 13 日、花王霞ヶ浦研修所

志田 洋介、Juliano de Oliveira Porciuncula、新田 美貴子、山口 香織、平川 英樹、森 一樹、久原 哲、小笠原 涉、セルラーゼ高生産系状菌 *Trichoderma reesei* 変異株系統樹の比較ゲノム解析、第 7 回日本ゲノム微生物学会、2013 年 3 月 8 日～2013 年 3 月 10 日、長浜バイオ大学

志田 洋介、山口 香織、新田 美貴子、森 一樹、平川 英樹、久原 哲、小笠原 涉、*Trichoderma reesei* セルラーゼ高生産変異株における bgl2 変異の影響、第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2012 年 11 月 12 日～2012 年 11 月 13 日、ウインクあいち

山口 香織、志田 洋介、新田 美貴子、森 一樹、平川 英樹、久原 哲、小笠原 涉、菌体内  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子の SNP が *Trichoderma reesei* セルラーゼ高生産変異株に与える影響、日本農芸化学会関東支部 2012 年度大会、2012 年 10 月 27 日～2012 年 10 月 28 日、新潟薬科大学

志田 洋介、Juliano de Oliveira Porciuncula、新田 美貴子、山口 香織、平川 英樹、森 一樹、久原 哲、小笠原 涉、

*Trichoderma reesei* セルラーゼ高生産変異株系統樹の比較ゲノム解析、日本農芸化学会関東支部 2012 年度大会、2012 年 10 月 27 日～2012 年 10 月 28 日、新潟薬科大学

志田 洋介、山口 香織、田原 伸悟、谷口 大樹、小笠原 涉、*Trichoderma reesei* における新規転写調節因子の BglR の解析、セルラーゼ研究会第 26 回大会、2012 年 5 月 25 日～2012 年 5 月 26 日、花王霞ヶ浦保養所

山口 香織、新田 美貴子、中澤 光、志田 洋介、森川 康、森 一樹、平川 英樹、久原 哲、小笠原 涉、*Trichoderma reesei* セルラーゼ高生産株における菌体内  $\alpha$ -グルコシダーゼの解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 22 日～2012 年 3 月 26 日、京都女子大学

小笠原 涉、セルラーゼ高生産微生物の日本型系統樹進化および最新の次世代バイオ燃料開発プロジェクト研究開発、化学工学会第 44 回秋季大会(招待講演)、2012 年 9 月 19 日～2012 年 9 月 21 日、東北大学

新田 美貴子、山口 香織、志田 洋介、森 一樹、平川 英樹、久原 哲、森川 康、小笠原 涉、*Trichoderma reesei* の比較ゲノム解析に基づく新規転写因子 ClbR の機能解析、第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2011 年 11 月 16 日、東京大学

山口 香織、新田 美貴子、中澤 光、志田 洋介、森川 康、小笠原 涉、森 一樹、平川 英樹、久原 哲、*Trichoderma reesei* セルラーゼ高生産変異株の SNP 解析、第 26 回セルラーゼ研究会(招待講演)、2011 年 10 月 16 日、花王霞ヶ浦研修所

Yamaguchi K., Nitta M., Shida Y., Mori K., Hirakawa H., Kuhara S., Ogasawara W., Effect of BGL Mutation in the Cellulase Hyper-Producing Mutant of Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*, The 1st International GIGAKU Conference、2012 年 2 月 4 日、長岡技術科学大学

山口 香織、新田 美貴子、志田 洋介、森 一樹、平川 英樹、久原 哲、小笠原 涉、糸状菌のセルラーゼ高生産変異株の比較ゲノム解析、日本糖質学会、2011 年 7 月 13 日、ハイブ長岡

〔図書〕(計2件)

小笠原 涉、志田 洋介、日本農芸化学会、生物と化学 掲載 比較ゲノム解析によるセルロース分解微生物「トリコデルマ・リーセイ」日本型系統樹進化の謎の解明とさらなる進化、2012、9

小笠原 涉、他 65 名、シーエムシー出版、バイオマス分解酵素の最前線、2012、311

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：トリコデルマ属に属する微生物の変異株および該変異株の使用  
発明者：小笠原 渉、志田 洋介  
権利者：小笠原 渉、志田 洋介  
種類：特許  
番号：特願 2013-021566  
出願年月日：2013年2月6日  
国内外の別：国内

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
長岡技術科学大学 生物系 生物資源工学  
研究室ホームページ  
<http://bio.nagaokaut.ac.jp/~Ogasawara/b/>

長岡技術科学大学博士論文  
「Trichoderma reesei の形態・比較ゲノム解析に基づくセルラーゼ高生産化機構の解明」  
新田美貴子 2012年6月

長岡技術科学大学博士論文  
「Molecular Evolution of Trichoderma reesei Hypercellulolytic Mutants(Trichoderma reesei) Porciuncula Juliano 2014年3月

長岡技術科学大学修士論文  
「比較ゲノム解析による Trichoderma reesei 日本型系統樹進化の謎に迫る～bg12のSNPがセルラーゼ高生産化に与える影響～」  
山口香織 2013年3月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小笠原 渉 (Ogasawara, Wataru)  
長岡技術科学大学・生物系・准教授  
研究者番号：40292172

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：