

担子菌セルラーゼの高発現系の構築とセルロース分解機構の 解明および高分解機能セルラーゼの分子創製 -エキソ型セルラーゼ II(Ex-2)の精製と遺伝子解析-

○岡崎光雄, 小平律子, 下坂 誠, 林田信明*, 神田鷹久**, 天野良彦**
信州大学繊維学部応用生物科学科, *信州大学遺伝子実験施設,
**信州大学工学部物質工学科

1. 緒言

セルロースは地球上に豊富に存在する再生可能なバイオマスである。酵素セルラーゼを用いて、セルロースを構成単位であるグルコースにまで分解できれば、食糧やエネルギー生産への利用が可能である。本研究では、担子菌 *Irpex lacteus* が有する強力なセルロース分解能に注目し、1) セルラーゼ酵素群の性質を明らかにする、2) 各酵素遺伝子をクローニングし、その構造と発現調節機構を解明する、3) 各遺伝子を酵母などの宿主で大量発現させることにより単一酵素を得て、各酵素の相乗作用によるセルロース分解機構を解明する、4) タンパク工学的的手法により、高機能なセルロース分解能をもった新規酵素を創製する、ことを目的とした。今回は、*I. lacteus* の酵素製剤である Driselase より精製した新たなエキソ型セルラーゼ(Ex-2)の性質と遺伝子のクローニングについて報告する。

2. 実験方法

エキソ型セルラーゼ(Ex-2)は、Driselase を酵素源として、6段階のカラムクロマトグラフィー操作により電気泳動的に単一のバンドとなるまで精製した。エキソ型セルラーゼ遺伝子のクローニングのために、*I. lacteus* 株より調製した染色体 DNA を制限酵素 *Sau* 3AI で部分消化した断片を、ファージベクター λ DASHIII に挿入しゲノムライブラリーを作成した。このライブラリーから、*Trichoderma reesei* 由来の cellobiohydrolase 遺伝子(*cbhI*)をプローブに用いて、プラークハイブリダイゼーションによりエキソ型セルラーゼ遺伝子を選抜した。Ex-2 遺伝子の転写産物は、各種炭素源を用いた *I. lacteus* 培養菌体から調製した全 RNA に対するノーザンハイブリダイゼーション法により解析した。

3. 結果と考察

酵素製剤 Driselase より新たなエキソ型セルラーゼ(Ex-2, 分子量 56,000)を精製した。既に精製を完了したエキソ型セルラーゼ(Ex-1, 分子量 53,000)と酵素学的な性質を比較したところ、Ex-2 が示す反応至適 pH, 反応至適温度, 熱安定性, 基質特異性などの性質は、Ex-1 とほぼ同一であった。しかし、Ex-2 は Ex-1 に比べて糖含量が高く、また、pH 安定性も高かった(Table 1, Table 2)。各種基質を用いた反応生成物の分析から、Ex-1, Ex-2 は β -1,4-グルカンを非還元末端からエキソ型にセロピオース単位で分解する cellobiohydrolase であることが確認できた。

Table 1. Comparison of enzymatic properties of Ex-2 and Ex-1

| Purified enzyme | Ex-2 | Ex-1 |
|------------------------------------|---------|---------|
| Mw | 56000 | 53000 |
| Opt. pH ^a | 5.0 | 5.0 |
| pH stability ^a (85%) | 3.0-9.0 | 3.0-5.0 |
| Opt. temp. ^a | 50°C | 50°C |
| Temp. stability ^a (80%) | <50°C | <50°C |
| Sugar content | 4.0% | 2.0% |
| pI | 4.8 | 4.5 |

^a Avicel was used as the substrate.

Table 2. Specific activities of Ex-2 and Ex-1 on various cellulosic substrates

| Substrate | Specific activity (U/mg) ^a | |
|--------------------------------|---------------------------------------|------|
| | Ex-2 | Ex-1 |
| CMC ^b | 25.5 | 26.0 |
| Avicel ^b | 21.1 | 20.9 |
| BC ^b | 15.1 | 14.5 |
| PNPL ^c | 27.3 | 27.1 |
| PNPG ₂ ^c | 34.0 | 33.2 |

^a Specific activities were defined as activity U/mg of enzyme.

^b One unit was defined as the amount of CMC-, Avicel- or bacterial cellulose (BC)-saccharification activity which produces reducing power equivalent to 1.0 μ mol of β -D-glucose per min.

^c One unit was defined as the amount of enzyme activity which releases 1.0 μ mol *p*-nitrophenol per min.

約 50,000 プラークのゲノムライブラリーから、*T. reesei cbhl* 遺伝子をプローブにして 24 個の陽性クローンを選抜した。各クローンが保持するゲノム DNA 断片を分析したところ 3 つのグループ (*cel 1*, *cel 2*, *cel 3*) に分類できた。このうち *cel 2* より決定した塩基配列が、Ex-1, Ex-2 精製酵素から解読した部分アミノ酸配列をコードし得る配列と一致したため、この *cel 2* 遺伝子について詳細な解析を行った。

Cel 2 遺伝子のオープンリーディングフレームは 523 アミノ酸残基から成り、2カ所のイントロンで分断されていた。また、N 末端には 18 アミノ酸残基からなるシグナル配列の存在が予測された。成熟タンパク質は、N 末端側から、触媒ドメイン、リンカー領域、セルロース結合ドメイン (CBD) から構成されるマルチドメイン構造を有していた (Fig. 1)。また、触媒ドメインのアミノ酸配列は、他の糸状菌由来エキソ型セルラーゼ (family 7 に分類される) と高い相同性を示した。Ex-1, Ex-2 のペプチドマッピングの結果、*cel 2* 遺伝子は Ex-1, Ex-2 の両者をコードする遺伝子であることが明らかになった。

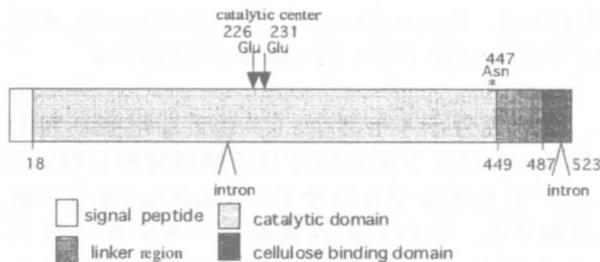


Fig. 1 The deduced domain structure of *cel2*

ノーザンハイブリダイゼーションにより *cel 2* 遺伝子転写産物の解析を行った結果、*cel 2* 遺伝子の発現は Avicel やリン酸膨潤セルロースなどのセルロース系基質を炭素源とした場合に誘導され、グルコースやフラクトースによって抑制されることが明らかとなった (Fig. 2)。

今後は、他の 2 つの *cel* 遺伝子について解析するとともに、*cel 2* 遺伝子を酵母や大腸菌に導入してセルラーゼの高発現系を確立し、さらにタンパク工学的手法により高い機能を持つセルラーゼの創製を目指したい。

4. 結論

I. lacteus の酵素製剤 Driselase より新たなエキソ型セルラーゼ (Ex-2) を精製し、その性質を調べた。Ex-2 は既に精製した Ex-1 と類似した性質を示したが、Ex-1 と比べて糖含量が高く pH 安定性も高かった。*I. lacteus* のゲノムライブラリーより、3 種のエキソ形セルラーゼ遺伝

子をクローニングし、そのうちの 1 つ (*cel 2*) が Ex-1, Ex-2 の両者をコードする事を明らかにした。また、*cel 2* 遺伝子の転写は、セルロース系の基質によって誘導され、グルコースやフラクトースにより抑制された。

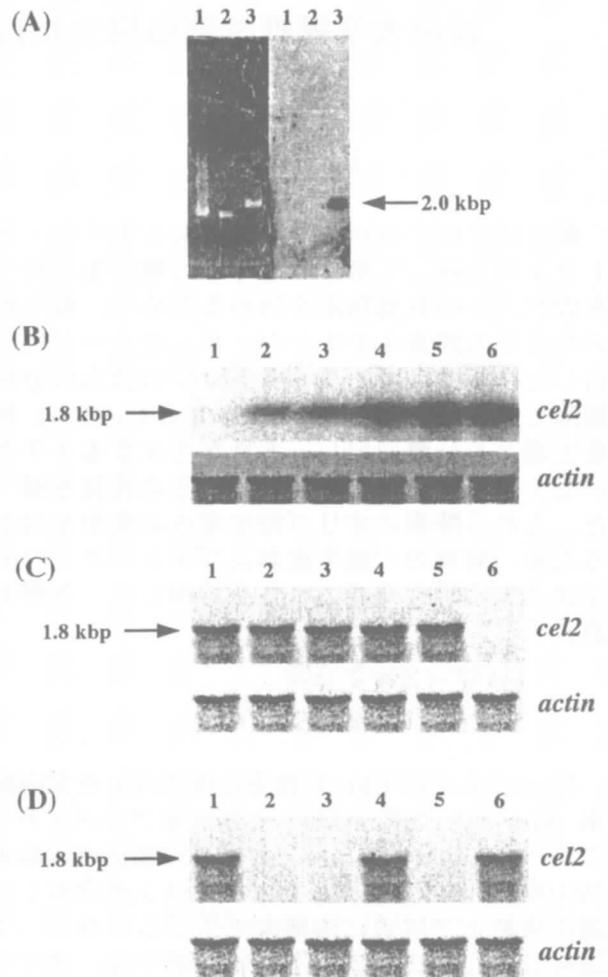


FIG. 2. (A) Southern blotting for testing probe specificity. Lane 1: *cell1* genomic DNA; lane 2: *cel3* genomic DNA; lane 3: 2.0-kbp *SacI-PstI* fragment of *cel2* probes. Left panel: agarose electrophoresis; right panel: autoradiography. (B) Accumulation of *cel2* mRNA in Avicel-grown *I. lacteus* cultures. *I. lacteus* cultures were grown in 1% (w/v) Avicel medium for 1 d (lane 1), 3 d (lane 2), 5 d (lane 3), 8 d (lane 4), 11 d (lane 5) and 14 d (lane 6) and analyzed for the presence of *cel2* transcripts. (C) Northern blot analysis of *cel2* gene transcript induced by various cellulosic substrates. *I. lacteus* cultures were grown for 11 d on various cellulosic substrates 1% (w/v) medium (lane 1: CMC, lane 2: Avicel, lane 3: bacterial cellulose, lane 4: cotton, lane 5: phosphoric acid-swollen cotton) and lane 6: glucose medium; mycelium was harvested and analyzed for the presence of *cel2* transcripts. After hybridization with the *SacI-PstI* fragment of *cel2* as a probe, the filters were rehybridized with a *T. reesei* actin probe, *act1* (15). (D) Various carbon sources were added to 11-d Avicel-grown *I. lacteus* cultures to a final concentration of 1% (w/v) in the medium. Lane 1: control (Avicel medium); lane 2: fructose; lane 3: glucose; lane 4: glycerol; lane 5: lactose; and lane 6: mannitol. Mycelia were harvested 40 h after the addition and RNAs were analyzed by Northern hybridization.