

バイオリファイナリー産業創生を目指した糸状菌 *Trichoderma reesei* の菌株改良

長岡技術科学大学 生物系 小笠原 渉

1. 研究目的

現在、地球温暖化、原油価格高騰、食料危機などの問題からバイオ燃料が注目されている。しかし、近年、話題になっているバイオ燃料（第一世代）は、トウモロコシ、米、サトウキビを原料にしており、食物との競合が問題となってきた。本研究では、食物と競合しないセルロース系バイオマス（木質系、草本系）を原料とした、次世代型バイオ燃料の開発を目指す。微生物（糸状菌）を改良することで実用可能な高効率糖化システムを開発することを目的として研究を進めている（図1）（参考文献参照）。このプロセスを利用し、バイオ燃料生産のみならず、現在の原油を原料とした「石油産業」から、セルロース系バイオマスを原料にした「バイオリファイナリー産業」への転換を目指す。

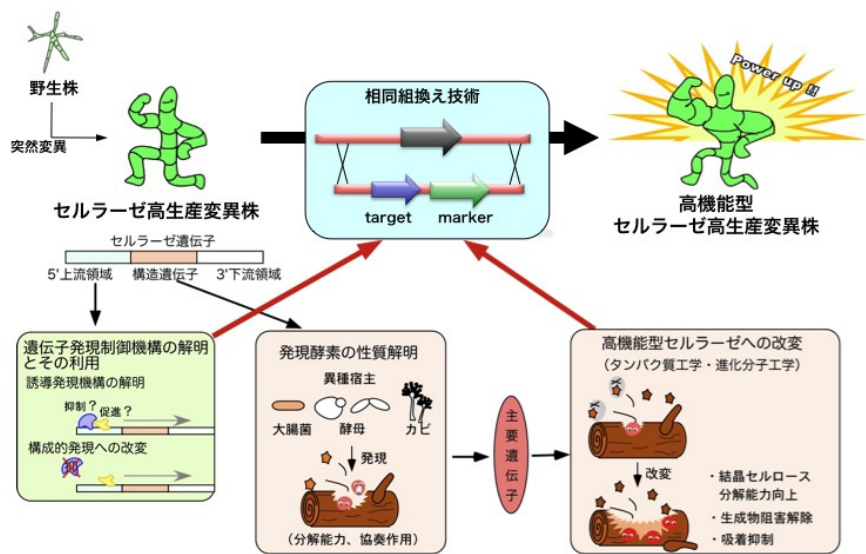


図1 本研究における糸状菌の改良法

2. *T. reesei* セルラーゼ

セルロース系バイオマスの実用化には、現状ではカビ類の利用に限定される。その理由は、バイオマスを完全に糖化できる種々のセルラーゼやヘミセルラーゼを生産すること、およびそれらの分泌生産量が非常に多いことである。その中でも *T. reesei* は研究の歴史が長く、セルラーゼ高生産変異株が世界で造成され、そのゲノム配列も決定され、遺伝子組換え技術を利用した菌株改良も行われつつあること

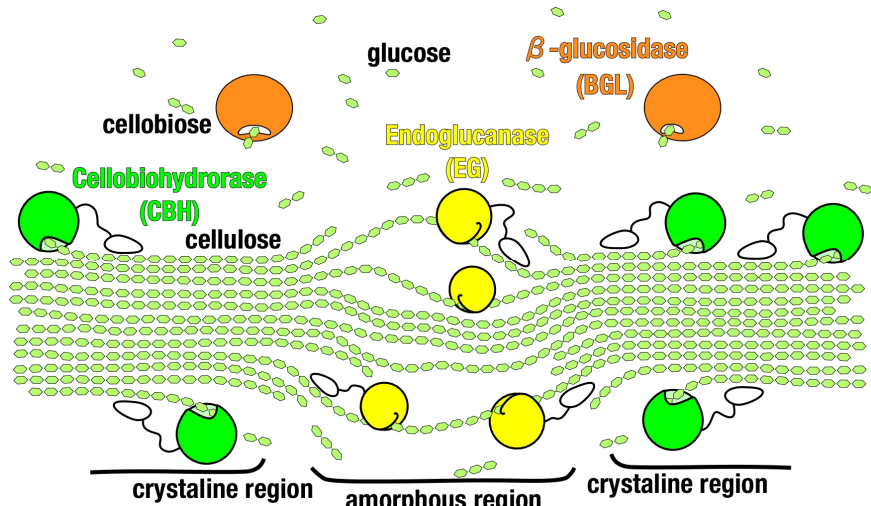


図2 セルロース分解モデル

ことから、当面は *T. reesei* のセルラーゼを用いた酵素糖化の実用化が想定されている。

T. reesei のセルラーゼは、セルロースの末端からセロビオースを遊離するセロビオヒドロラーゼ (CBH)、セルロース鎖をランダムに切断するエンドグルカナーゼ (EG)、およびセロビオースやセロオリゴ糖の非還元末端からグルコースを遊離するβ-グルコシダーゼ (BGL) の3種類の酵素が含まれる。これらの3種類のセルラーゼが協奏して結晶セルロースを効率よく分解すると推定されているが、その詳細は充分解明されていない（図2）。

3. 研究成果

1) *T. reesei* セルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子プロモーター評価と最適プロモーターの選抜

CBH Iは、総分泌タンパク質(60 g/L)の約60%を占めており、*cbh1*プロモーターは微生物最強のプロモーターとされている。このことから、*cbh1*プロモーターを利用したセルラーゼ以外の有用タンパク質発現が試みられてきた。近年、*cbh1*プロモーターを利用したセルラーゼ遺伝子発現も試みられているが、*cbh1* 遺伝子破壊 (*cbh1* 配座での相同組換え株) および転写調節因子のタイトレーション (非相同組換えによる *cbh1* のマルチコピー導入株) によって、CBH Iの発現量が消失あるいは減少し、トータルでのセルラーゼ活性が減少することが報告されている。この結果は、セルラーゼ活性の増強を目指した *T. reesei* 株の開発には、発現量が多く、セルロース分解に重要な酵素の遺伝子 (*cbh1*, *cbh2*) プロモーターの利用が必ずしも最適ではないことを示している。

我々は、相同組換えによる各遺伝子破壊のセルラーゼ活性に与える影響を評価した。その結果、*cbh1*、*cbh2*の破壊で活性が大きく低下し *egl1* の破壊では若干低下していたが、*egl3* および *xyn3* 破壊は影響しないことを明らかにした。この結果から、有用タンパク質の *T. reesei* における発現には *egl1*、*egl3* および *xyn3* のプロモーターが利用できると判断した。特に、*xyn3* のプロモーターはタンパク質発現能力も十分であるため有用性は高い。*xyn3* は PC-3-7 株でのみ発現するため、欧米の研究開発に対してアドバンテージがある。

2) セルラーゼ・キシラナーゼ遺伝子プロモーターを用いた最適比率でのセルラーゼ遺伝子の発現

T. reesei の β -グルコシダーゼ活性の低さを改良するために、*egl3* および *xyn3* のプロモーターを用いて、 β -グルコシダーゼ I 遺伝子 (*bgl1*) の発現カセットを構築し、*T. reesei* PC-3-7 株の形質転換を行った。*egl3*プロモーターを用いた形質転換体 (E3B1) は β -グルコシダーゼ活性が約4倍まで向上していた (図3)。さらに、*xyn3*プロモーターを用いた形質転換体 (X3B1) の場合には約7.5倍もの活性の向上が観察された。また、濾紙分解活性も向上していた。生産されるタンパク質量がほとんど変化していないことから、他のセルラーゼ遺伝子に対する *bgl1* の発現比率を変化させることでセルラーゼ活性の向上に成功した。

微粉碎スギの糖化試験を行った結果、改変株は PC-3-7 株に比べて高い糖化能力を示した。生成糖の HPLC 分析からは、PC-3-7 株ではセロトリオースやセロビオースが分解されずに残存しているのに対して改変株はそれらが完全に分解されていることが明らかになった。これにより、実際の植物バイオマスの糖化に有効な株の構築に成功したと考えられる。

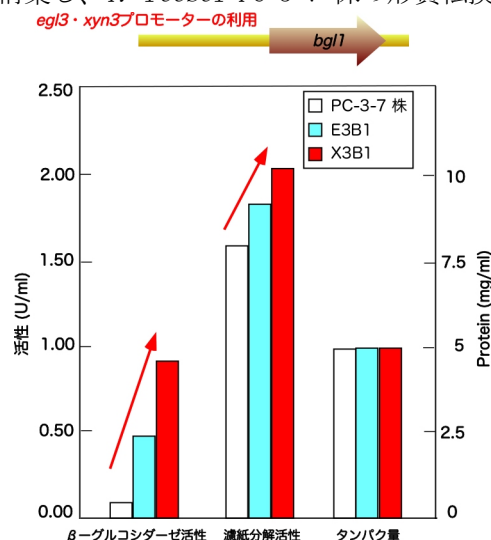


図3 セルラーゼ遺伝子の発現比率

4. 関連論文

- 1) Application of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular β -glucosidase I, *Biosci., Biotech., Bioch.* (2009) (in press)
- 2) Evaluation and characterization of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 899-908 (2009)
- 3) Identification of the *cis*-acting elements involved in regulation of xylanase III gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7, *Fungal Gent. Biol.*, 45, 1094-1102, (2008)
- 4) Functional analysis of the *egl3* upstream region in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78, 515-524, (2008)
- 5) Cloning, functional expression and promoter analysis of xylanase III from *Trichoderma reesei*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 995-1003, (2006)