

Trichoderma reeseiにおけるセルラーゼ誘導・生産メカニズムの解明 β-グルコシダーゼの役割について

誌名	応用糖質科学：日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	野崎,功一 郭,博洋 畠中,理志 Biely,P. 天野,良彦
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	6巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 96-102
発行年月	2016年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat





Function of β -Glucosidases in Cellulase Induction of *Trichoderma reesei**

Trichoderma reesei におけるセルラーゼ誘導・生産メカニズムの解明

— β -グルコシダーゼの役割について—*

(2016年2月9日受付；2016年2月18日採択)

野崎功一^{1,2,**}, 郭 博洋¹, 畠中理志², Peter Biely³,
天野良彦^{1,2}

(のざき こういち, かく はくよう, はたなか さとし, ぴーたー びーりー,
あまの よしひこ)

Kouichi Nozaki,^{1,2,**} Boyang Guo,¹ Satoshi Hatanaka,² Peter Biely³ and
Yoshihiko Amano^{1,2}

¹ 信州大学大学院総合工学系研究科
380-8553 長野市若里 4-17-1

² 信州大学大学院理工学系研究科
380-8553 長野市若里 4-17-1

¹ Department of Bioscience and Textile Technology, Interdisciplinary Graduate School of
Science and Technology, Shinshu University
4-17-1 Wakasato, Nagano 380-8553, Japan

² Department of Engineering, Graduate School of Science and Technology, Shinshu University
4-17-1 Wakasato, Nagano 380-8553, Japan

³ Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences
842 38 Bratislava, Czechoslovakia, Slovakia

要旨：セルラーゼの高生産菌である *Trichoderma reesei* のセルラーゼ誘導物質の1つにソホロースがある。ソホロースは、本菌の β -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示唆されている。*T. reesei* のゲノムには、10種類のBGL遺伝子が存在することが示唆されており、これらの異種発現系を大腸菌と麹菌で構築した。10種類の組換え酵素のうち9種類がBGL活性を示し、その酵素化学的性質を明らかにした。セロビオースを基質として、糖転移能力を評価したところ、Cel1A, Cel3A, Cel3B および Cel3E に転移生成物が認められ、特に Cel1A は約10%の高い変換率でソホロースを合成した。一方、*T. reesei* における Cel1A 遺伝子の破壊は、セルラーゼおよびセルラーゼの正の転写因子の発現時期を遅らせることから、Cel1A はセルラーゼの誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、Cel1A の活性部位近傍のアミノ酸2残基に変異を導入し、Glc 感受性と熱安定性を改善することに成功した。また、同時に比活性の増加 (2.4 倍) と Glc 活性化 (50 mM Glc 存在時に 1.8 倍) を獲得させることに成功した。この変異型 Cel1A を利用することにより、セルラーゼ生産量を増大させた *T. reesei* の作出が期待される。

キーワード：セルラーゼ誘導, β -グルコシダーゼ, *Trichoderma reesei****

1. セルラーゼ誘導物質ソホロースの発見と β -グルコシダーゼ

ソホロース (2-O- β -D-glucopyranosyl-D-glucopyranose) が *T. reesei* の強力なセルラーゼ誘導物質であることは、M. Mandels 博士らによって発見報告された¹⁾。彼らは、本菌を D-グルコース (Glc) を炭素源とする培地で培養した場合、Glc が消費された後に急速にセルラーゼ活性が増加する現象を見出した。そして、培地成分として使用した Glc

試薬の中からセルラーゼ誘導に関与する物質を単離し、不純物として含まれていたソホロースが誘導物質であることを明らかにした。本菌のセルラーゼ誘導物質として、ソホロースの他にもいくつかの糖質が知られている。例えば、ゲンチオビオース (6-O- β -D-glucopyranosyl-D-glucopyranose)²⁾、ラクトース³⁾、L-ソルボース⁴⁾、セロビオノ-1,5-ラクトン⁵⁾やセロオリゴ糖⁶⁾などである。しかし、ソホロースのセルラーゼ誘導能力は、これらに比較して著しく高いことが知られている⁹⁾。一方、本菌のBGLの糖転移反応に

* 本原稿は、日本応用糖質学会平成27年度大会応用糖質科学シンポジウムで一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 026-269-5396, Fax. 026-269-5394, E-mail: knoza@shinshu-u.ac.jp)

*** Key words: cellulase induction, β -glucosidase, *Trichoderma reesei*

よって、ソホロースが合成できるという論文がいくつか存在する⁶⁾。また、デオキシノジリマイシンの添加によってBGL活性を阻害すると、セルラーゼ誘導が阻害される実験結果⁹⁾から、BGLによってソホロースが合成され、セルラーゼ誘導を引き起こすという流れが推定できる。ソホロースが*T. reesei*のセルラーゼを誘導することは、誰もが認める事実であるが、それが真の、つまり天然の酵素誘導物質であることを証明することは困難であり、未だにその真偽は明らかにされていない。セルラーゼ生産量を増大させるために、酵素誘導物質であるソホロースを本菌の培地に添加することは得策である。しかし、天然に存在するソホロースの存在量は極微量であり、試薬としても非常に高価な化合物である。従って、ソホロースをそのまま誘導物質として使用することは現実的ではない。

これら状況を踏まえて、我々は本菌のソホロース合成能力(BGLによる糖転移反応)に着目した。遺伝子工学的手法によってこの能力を増強すれば、ソホロースの合成量ならびにセルラーゼの誘導・生産量が増加するはずである。しかし、本菌には複数のBGL遺伝子の存在が確認されている。これらアイソザイムの数が、ソホロース合成酵素の特定と合成機構の解明を困難にしてきた。

2. BGL アイソザイム

T. reesei genome database v.2.0 (<http://genome.jgipsf.org/Trire2/Trire2.home.html>)によると、本菌にはBGLアイソザイムが10種類存在することが推定されており、そのうちGH (Glycoside hydrolase family) 1に属する酵素は2種類(Cel1AおよびCel1B)、GH3に属する酵素は8種類(Cel3A, Cel3B, Cel3C, Cel3D, Cel3E, Cel3F, Cel3G, Cel3H)存在する^{9,10)}。しかし、これらの中で酵素化学的性質が解明されているものは、Cel1AとCel3Aだけである。Cel3Aは唯一の分泌型BGLであることが確認されており、セルラーゼと同様にセルロース培養で誘導される¹⁰⁾。一方、Cel1AはBGLの中で最も発現量が多く、細胞内に存在する酵素である⁹⁾。全BGLアイソザイムのソホロース合成能力を評価するために、異種発現系を構築し、組換え酵素の精製を行った。Cel1A, Cel1B, Cel3CおよびCel3D以外の6種類のBGLは、細胞外分泌に携わるシグナルペプチド、もしくは細胞内オルガネラへ移行を司るトランジットの存在が予想されたため、それらの塩基配列を麹菌由来Taka-amylase A由来のシグナルペプチドの配列と置換して麹菌発現ベクターを構築した。2種類のGH1 BGLは、大腸菌を宿主として発現し、Cel3CとCel3Dは全長のcDNAを麹菌発現ベクターに連結して発現系を構築した。結果として、麹菌で発現させた全てのBGL (GH3, 8種類)を培養液中に確認することができた。Cel3CとCel3Dは細胞内への発現が予想されたが、長期間(10日以上)の培養では細胞外に漏出し、生産量は少ないものの培養上清から回収することができた。また、大部分の組換え酵素

は、*p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (pNPG1) およびセロビオース (G2) に対する加水分解活性を示したが、Cel3Hはタンパク質の発現は確認できたものの、pNPG1, G2に対する分解活性は存在せず、セロオリゴ糖およびキシロオリゴ糖に対する分解活性も認められなかった。これらの結果から、Cel3HはBGLではないと判断し、これ以降の実験から除外した。

3. BGL のソホロース合成能力

9種類のBGLアイソザイムを得たことで、それらのソホロース合成能力を評価することが可能となった。精製したBGLアイソザイムの基質特異性と酵素化学的性質を表1に示す。各酵素のpNPG1とG2に対する反応性を比較すると、両基質にほぼ同じ比活性を示すCel3A, Cel3BおよびCel3EのAグループ、G2よりもpNPG1に高い比活性を示すCel3C, Cel3D, Cel3F, Cel3GおよびCel1BのBグループ、およびG2に高い活性を示すCel1Aに大別できる。Aグループの酵素は、長鎖のセロオリゴ糖や結合位置が異なるグルコ二糖に対する比活性が高く、エキソ-β-グルカナーゼ様の作用特性¹¹⁾を示した。一方、Bグループは細胞内BGLを含み、配糖体に高い活性を持つアリルグルコシダーゼであり、Cel1AはG2分解に特異的なセロビアーゼであると推定された。

これら基質特異性が異なるBGLの糖転移能力は、セルラーゼの主生成物であり、かつソホロース合成の基質と考えられるG2 (10%, 100 mg)を用いて評価した。9種類のBGLのうち、転移生成物が確認できたのはCel3A, Cel3B, Cel3EおよびCel1Aだけであった(図1(a))。いずれの酵素も、基質G2と加水分解生成物のGlcの他に、糖転移生成物と推定される二糖類を中心としたオリゴ糖が観察された。これら二糖類は、供与体基質であるG2から加水分解生成物であるGlc(受容体基質)に転移反応が進行して生成することが予想された(図1(b))。次に、基質特

表1. *T. reesei* BGL アイソザイムの性質と各種基質に対する比活性

BGL	Protein ID ^a	分子量 ^b (×10 ³)	至適 pH	比活性 (U/mg) ^c	
				pNPG1	G2
Cel3A	76,672	88	4.5	41 ± 1.70	17 ± 0.31
Cel3B	121,735	108	3.5	36 ± 1.20	33 ± 3.60
Cel3E	76,227	104	5.0	6.5 ± 0.08	8.6 ± 0.14
Cel3C	82,227	100	6.0	110 ± 5.10	0.32 ± 0.03
Cel3D	46,816	90	6.0	35 ± 1.60	0.06 ± 0.01
Cel3F	104,797	130	4.0	12 ± 1.60	1.3 ± 0.07
Cel3G	47,268	120	4.5	29 ± 1.70	0.79 ± 0.04
Cel1B	22,197	58	5.5	0.48 ± 0.22	0.14 ± 0.06
Cel1A	120,749	55	6.5	2.9 ± 0.71	25 ± 0.85

^a*T. reesei* genome database v.2.0におけるID。 ^bSDS-PAGEの結果から推定した。 ^c1.25 mM pNPG1またはG2, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) および適当量のBGLからなる反応液 (0.4 mL)を30°Cで反応させた。酵素活性1 unitは、1分間に1 μmolの基質を分解する酵素量とした。

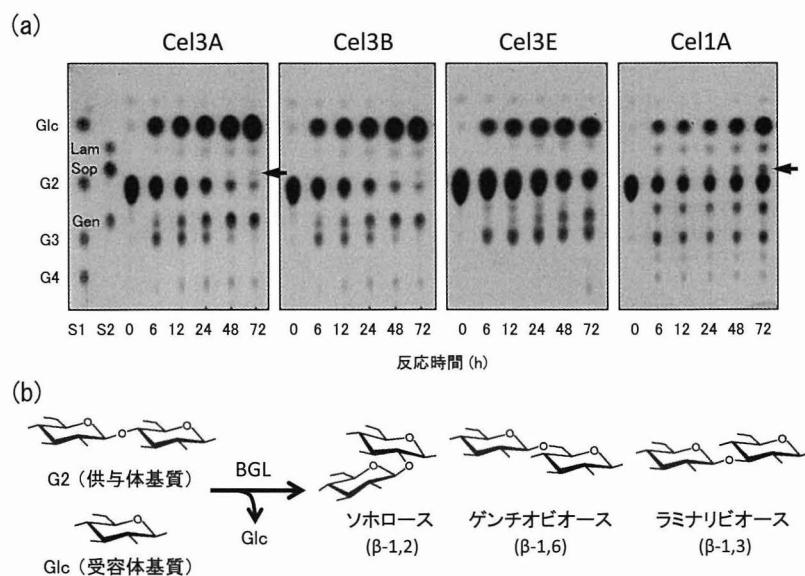


図1. Cel3A, Cel3B, Cel3E および Cel1A による糖転移生成物

(a) 薄層クロマトグラフィーによる糖転移生成物の解析. 10% G2, 50 μ g BGL および 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) からなる反応液 (1 mL) を 30°C で反応させた. S1 と S2, スタンダード糖質; Glc~G4, グルコース~セロテオラオース; Sop, ソホロース; Lam, ラミナリビオース; Gen, ゲンチオビオース. 矢印はソホロースを示す. (b) 糖転移反応による各種グルコ二糖の合成機構.

異性や G2 に対する比活性が異なるこれら BGL の糖転移能力を評価するために, G2 が転移生成物に変換された割合 (変換率) を算出した (図2). これら4種類の BGL に共通して, 最も多く蓄積した生成物はセロトリオースであった. 一方, 結合位置が異なる二糖類の蓄積量に関しては酵素によって特異性が異なり, Cel3A, Cel3B および Cel3E においてはゲンチオビオースが優位に蓄積され, Cel1A においてはソホロースとラミナリビオース (3-O- β -D-glucopyranosyl-D-glucopyranose) の蓄積が認められた. 特に, ソホロースの蓄積は Cel1A において顕著に認められ, 反応時間約 12 時間以降において変換率 10% 前後で一定となった. このときの G2 分解率は約 50% (50 mg) であり, 生成したソホロース量は約 5 mg にも達した. 糖転移反応が認められた BGL に共通する性質は, いずれも供与体基質 G2 に対する比活性が pNPG1 よりも高いことや, 蓄積された二糖に対する k_{cat} 値は, 他の二糖類の値よりも低く, 二次的な加水分解を受けにくいことであった. これらの性質は, Cel1A とソホロースの間に顕著に認められ, Cel1A はソホロースの蓄積に有利な性質を持つことが証明された. 一般的に, GH1 に属する BGL は GH3 BGL に比較して, Glc 阻害を受けにくい (Glc 耐性がある) ことが知られている¹²⁾. Cel1A の Glc 耐性も, 他の3つの BGL に比較して明らかに高いことがわかった. 転移反応は受容体基質 (Glc) 濃度が高いときに促進されることから, Glc 耐性が高い BGL は, 受容体基質 (Glc) 濃度を高く設定できるため, 有利に反応を進行できると考えられた. これら複数の要因から, Cel1A は特異的にソホロースを合成できると考えられた. 一方, BGL による Glc の縮合反応によって, ソホロースを合成する経路が考えられる. 20% Glc (200 mg) を基質として糖縮合能力を調査したが, Cel3A

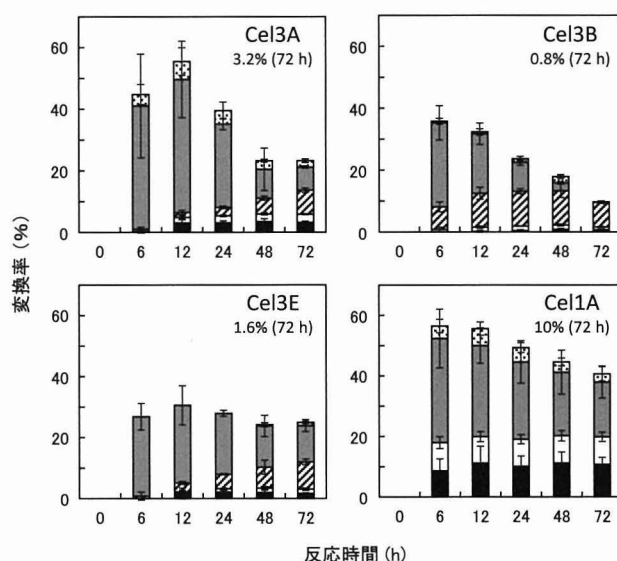


図2. BGL による糖転移生成物の組成

図1(a)に示した反応液を HPLC により分析し, 糖組成を定量した. ドット, G4; グレー, G3; 斜線, ゲンチオビオース; 白, ラミナリビオース; 黒, ソホロース. 垂直方向のバーは標準偏差を表し, 図中の数値はソホロースへの変換率を表す.

と Cel1A においてわずか 0.08 mg と 0.14 mg のソホロースが検出されただけであり, これは糖転移反応で合成された量に比較すると, 明らかに少ないことがわかった. 筆者らは, これら BGL アイソザイムの異種発現系の構築から糖転移反応能力を含めた酵素化学的性質の詳細について, 文献 13) で報告している. 興味がある方はご参照願いたい.

4. Cel1A 遺伝子の破壊によるセルラーゼ誘導への影響

T. reesei QM9414 株において, ソホロースを特異的に合

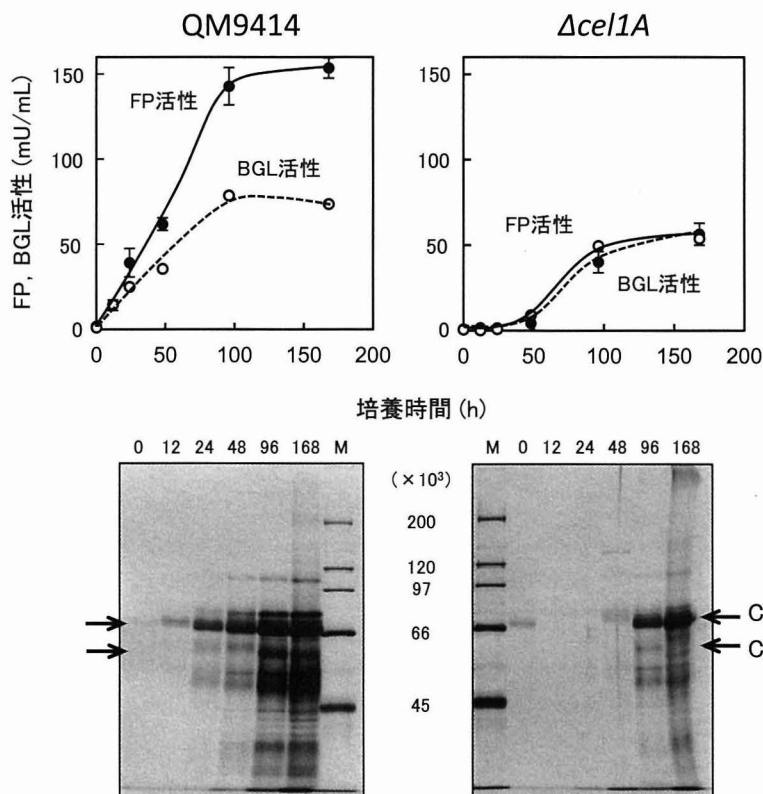


図3. *Cell1A* 遺伝子破壊株をセルロース培養したときのセルラーゼ生産時期

ソルビトールを含む培地で前培養を行い、2%セルロースを含む培地で酵素を生産させた。グラフは、培養上清のろ紙分解活性 (FP 活性) と BGL 活性である。垂直方向のバーは標準偏差を表す。下図は、培養上清を SDS-PAGE で分析したもの。M, 分子量マーカー; QM9414, 親株; $\Delta cel1A$, *Cell1A* 遺伝子破壊株。

成する *Cell1A* の遺伝子を破壊することで、セルラーゼ誘導に及ぼす影響を調査した。本菌のセルラーゼ関連遺伝子群の発現は常にほぼ同調し、共通の調節因子によって集約的に制御されていることが知られている¹⁰⁾。*Cell1A* 遺伝子の破壊によって、セルロース培養時において、これら遺伝子の発現時期が著しく遅延し、酵素の発現量が減少することを明らかにした (図3)。特に、菌体をセルロース培地に移した直後に現れる、誘導24時間以内の急激な mRNA の合成量が完全に消失した (データは示さない)。加えて、セルラーゼ関連酵素遺伝子の正の転写因子 *xyl1*¹⁴⁾ の発現量にも同様の変化が現れた。これらの結果は、*cell1A* の存在が、セルラーゼ誘導の初期に必要なことを示している。しかし、培養後期には、本遺伝子破壊株においてもセルラーゼ関連酵素の誘導・発現が確認された。このことは、本菌のセルラーゼ誘導には、*Cell1A* を介した培養初期の誘導と別の経路による培養後期の誘導が存在することを示唆している。本実験結果は、*Cell1A* が酵素誘導物質ソホロースを合成し、セルラーゼ誘導を引き起こしているという直接的な証明にはならないが、その可能性を十分に支持する結果であると考えられた。

5. アミノ酸変異による *Cell1A* の Glc 感受性および安定性の改良

Cell1A はソホロースの合成に優位な BGL であるものの、強い生成物 (Glc) 阻害を受け (1.25 mM *p*NPG1 の加水分解において $K_i = 50$ mM)、熱および pH 安定性についても他の転移反応を起こす3種類の BGL に比較して著しく低い¹⁵⁾。これら性質を改善した酵素を作出することは、将来的に *T. reesei* のセルラーゼ誘導能力を増強する上で有力な手段と成り得る。*Cell1A* と同じ GH1 に属する *Humicola insolens* の BGL (HiBGL) は、高い熱安定性 (pH 5~8 において 80% 以上の残存活性) と Glc 耐性 (相対活性 50% が得られる Glc 濃度, $IC_{50} = 400$ mM) を示し、かつ低濃度の Glc 存在下において活性化 (50 mM Glc 存在下で 1.8 倍) することが報告されている^{12,16-18)}。*Cell1A* と HiBGL のアミノ酸配列を比較すると、73% の相同性と 82% の類似性を示した。特に、2つの活性中心およびサブサイト-1 と +1 を構成するアミノ酸残基は、両酵素で完全に一致することがわかっている。一方、活性部位入口に位置するアミノ酸残基については7種類が異なり、そのうち HiBGL においては、W168, L173 および F348 が Glc と結合している構造が明らかにされている (図4)¹²⁾。このことが、HiBGL の Glc 感受性と関連があると予想し、HiBGL の構造を参考にして *Cell1A* に変異を導入し、組換え酵素を作製して酵素

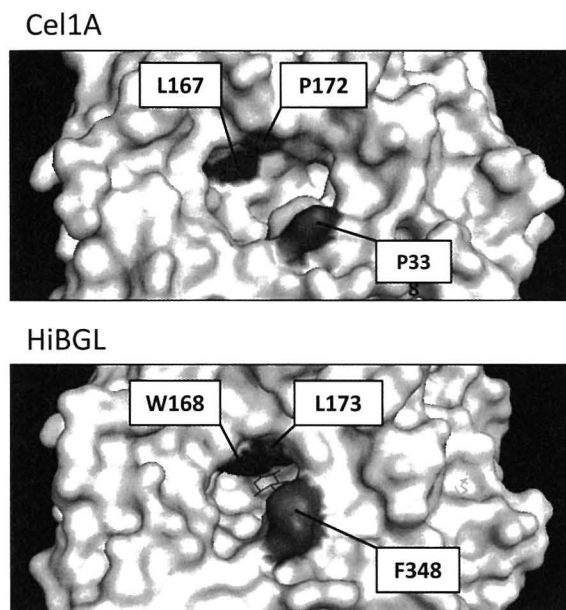


図4. Cel1A と HiBGL の活性部位入口の構造比較

Cel1A (PDB ID, 3AHY), 変異を導入した3つのアミノ酸残基を示した。HiBGL (PDB ID, 4MDP), Glc (黒のワイヤフレームで表示) と相互作用する3つのアミノ酸残基を示した。

化学的性質を調査した。結果として、上記した3種類のアミノ酸残基全てを変異した三重変異酵素 (L167W/P172L/P338F) や単一変異酵素 (L167W または P172L) よりも、二重変異酵素 (L167W/P172L) が優れた Glc 感受性を示すことを明らかにした¹³⁾。これら二重変異酵素 (変異型 Cel1A) は、HiBGL と同じように 50 mM Glc において 1.8 倍の活性化を示し、 IC_{50} の値も約 600 mM まで増加した。加えて、Glc 非存在下で pNPG1 に対する比活性が 2.4 倍まで増加した (図 5)。さらに驚くべきことに、変異型 Cel1A は、野生型 Cel1A (wt) と比較して、pH および熱安定性も飛躍的に向上していることがわかった。変異型酵素は、pH 4~9 の範囲では 4°C で 6 時間インキュベートしても 80% 以上の残存活性を示し (wt が pH 6~7)、至適温度が 50~55°C (wt が 30~40°C)、温度安定性においても pH 5.5 において 30 分インキュベートしても 50°C までは 80% 以上の活性を保持していた (wt は 40°C まで)。

Giuseppe らは、Glc 耐性を示す BGL の活性部位ポケット内部の構造を比較し、これら2種類のアミノ酸残基は Glc 耐性を持つ BGL に良く保存され、その幅や容積を制限していることを報告している。これによって、Glc が容易にサブサイトに進入するのを防ぎ、生成物阻害が起こりにくいことを想定している¹²⁾。

さらに、我々は変異型 Cel1A の Glc 活性化のメカニズムを、Glc 存在下における反応速度解析を行うことで明らかにした。これまで、BGL の G1 活性化には、糖転移反応が関与する例が報告されている¹⁹⁾。しかし、変異型 Cel1A では活性化が生じた反応条件において、優位な糖転移生成物が確認されなかった。一方、変異型 Cel1A は、基質 (pNPG1) 濃度が高いときに wt には観察されない基質阻害を引き起こすことを見出した。そこに、Glc (< 50 mM) が

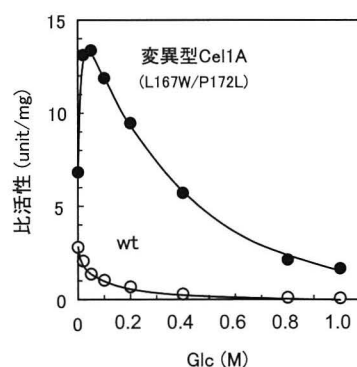


図5. wt および変異型 Cel1A の Glc 感受性

基質として 0.125 mM pNPG 1 を使用し、各濃度の Glc 存在下で、表 1 と同様の方法で活性を測定した。

存在すると基質阻害がなくなり、見かけ上の活性化が生じていることを明らかにした。つまり、L167W/P172L の変異によって基質 pNPG1 が非生産的に酵素に結合し、通常の加水分解反応を阻害している可能性が明らかとなった。この基質の結合は、おそらく同じ部位に対する Glc の結合によって回避され、結果として基質阻害がなくなるために活性化が生じると考えた。そして HiBGL においても、同様なメカニズムで Glc 活性化が生じていると推定される。一方、変異型 Cel1A の安定性の向上に関しては、予想外の結果であった。詳細は不明だが、Cel1A の安定性の低さは、変異箇所周辺の構造の不安定さが失活の主要因になっている可能性が考えられる。このように、BGL の Glc 感受性と安定性を、アミノ酸変異によって著しく改善した例は他には存在しない。これら変異型 Cel1A の詳細な研究成果に関しては、文献 15) を参照して頂きたい。

一方、変異型 Cel1A のソホロース合成能に関しては、酵素タンパク質量当たりで比較すると、wt に比較して約 10% 増加した。しかし、この値は変異型 Cel1A の比活性の増加 (2.4 倍) や Glc 活性化 (50 mM Glc 存在下で 1.8 倍) を加味すると決して高い値ではない。残念ながら、変異導入で獲得した2つの性質 (比活性の増加と Glc 活性化) は、pNPG1 を基質としたときに現れ、G2 に対しては wt とほぼ同等であった (wt, 25 U/mg; 変異型 Cel1A, 26 U/mg)。また、Glc 耐性が低い wt では、10% の G2 を完全分解することは不可能だったが (反応 6~72 時間で G2 の分解率が 50% で一定となった)、変異型 Cel1A では 24 時間で完全分解できたことから、変異型酵素によるソホロースへの変換率は wt の約 1/2 (約 5%) まで低下していることがわかった。これらの結果から、変異型 Cel1A によるソホロース合成量が増加した原因は、転移反応の頻度が増加したのではなく、Glc 耐性が増加したために反応後期まで転移反応が進行した結果であると推定した。

ソホロース合成量が増加した変異型 Cel1A を *T. reesei* で発現させると、セルラーゼ生産量が増加することが期待される。しかし、変異型酵素では、上記したようにソホロースの合成量の増加とともに G2 の分解物の Glc が大量に蓄積することが予想される。Glc の蓄積は、カタボライ

ト抑制によるセルラーゼ生産量の低下を招くことから、発現宿主としては、その抑制機構を解除した *T. reesei* 変異株の利用が必須であると考えられた。

6. ソホロースがセルラーゼ誘導物質である理由

なぜ *T. reesei* は糖転移反応で生じたソホロースをセルラーゼの誘導物質として利用しているのだろうか。これまでに報告されている本菌のセルラーゼ誘導物質に共通する性質は、いずれの化合物も本菌によって分解されにくい、もしくは吸収されにくい糖質であるということである。低濃度でも培養液中に残存する時間が長ければ、誘導物質として長時間効力を発揮し、結果として酵素生産量が増大するのは当然である。しかし、その誘導物質を、わざわざ加水分解酵素による転移反応によって生産することに、どのような生化学的な意義があるのだろうか。 *T. reesei* と同じように、加水分解酵素の糖転移生成物が酵素生産の誘導物質として作用する例がいくつか存在する。 *Penicillium purpogenum* のセルラーゼの発現には、BGLの反応で生じたゲンチオビオースが誘導物質として働き²⁰⁾、 *E. coli* の *lac* オペロンの遺伝子群は、ラクトースに β -ガラクトシダーゼが作用して生じたアロラクトース (6-*O*- β -D-galactopyranosyl-D-glucopyranose) によって誘導発現することが知られている²¹⁾。ここからは推測になるが、生物は必要とときに必要な酵素を必要量生産する。特に、 *T. reesei* はバイオマス分解に特化した様々な酵素群を生産・分泌する能力を持ち、その使い分けは実に精密に制御されていると考えられている⁹⁾。セルロースが菌体の周囲に存在するとき、まず構成的に生産されたセルラーゼが作用して G2 が生産される。 *T. reesei* の細胞外 BGL の活性は低く、多くの G2 はそのまま菌体内に吸収されると考えられる。引き続き、G2 は細胞内に存在する Cel1A によって分解され Glc を生じるが、G2 もしくは Glc 濃度が高くなると糖転移反応の頻度が高まり、ソホロースを合成する確率が高くなると考えられる。つまり、菌体の近くに十分量のセルロースがあるときにソホロースが合成され、セルラーゼが急激に誘導・生産されることが予想される。このように、菌体とセルロースの距離およびその存在量を、ソホロースの合成量によって感知し、セルラーゼの生産量を調節している可能性が考えられた。さらに、ソホロースは希少糖であり、ラミナリビオースやゲンチオビオース等と違って天然に存在する多糖の加水分解で生じる可能性が低い糖質である。従って、本菌はソホロースを特異的な誘導シグナルとして選択した可能性が高いと予想している。

謝辞

本研究の一部は「バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業 (NEDO)」の支援によって実施されました。また、本研究を遂行するにあたり、多大なご協力をいただきました研

究室のスタッフおよび学生諸君に、この場をお借りしてお礼を申し上げます。

文献

- 1) M. Mandels, F.W. Parrish and E.T. Reese: Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *J. Bacteriol.*, **83**, 400-408 (1962).
- 2) T. Nisizawa, H. Suzuki, M. Nakayama and K. Nisizawa: Inductive formation of cellulase by sophorose in *Trichoderma viride*. *J. Biochem.*, **70**, 375-385 (1971).
- 3) M. Mandels and E.T. Reese: Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.*, **79**, 816-826 (1960).
- 4) M. Nogawa, M. Goto, H. Okada and Y. Morikawa: L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.*, **38**, 329-334 (2001).
- 5) C.B. Iyayi, E.-E. Bruchmann and C.P. Kubicek: Induction of cellulase formation in *Trichoderma reesei* by cellobiono-1,5-lacton. *Arch. Microbiol.*, **151**, 326-330 (1989).
- 6) M. Saloheimo, J. Kuja-Panula, E. Ylösmäki, M. Ward and M. Penttilä: Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGLII (Cel1A). *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4546-4553 (2002).
- 7) M.P. Vaheri, M. Leisol and V. Kauppinen: Transglycosylation products of cellulase system of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Lett.*, **1**, 41-46 (1979).
- 8) C.P. Kubicek: Improvement of a conidial endoglucanase and a plasmamembrane-bound β -glucosidase in the induction of endoglucanase synthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. *Gen. Microbiol.*, **133**, 1481-1487 (1987).
- 9) M. Häkkinen, M. Arvas, M. Oja, N. Aro, M. Penttilä, M. Saloheimo and T.M. Pakula: Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates. *Microb. Cell Fact.*, **11**, 134-160 (2012).
- 10) P.K. Foreman, D. Brown, N. Dankmeyer, R. Dean, S. Diener, N.S. Dunn-Coleman, F. Goedegebuur, T.D. Houfek, G.J. England, A.S. Kelley, H.J. Meerman, T. Mitchell, C. Mitchinson, H.A. Olivares, P.J. Teunissen, J. Yao and M. Ward: Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 31988-31997 (2003).
- 11) Y. Nakatani, I.L. Lamont and J.F. Cutfield: Discovery and characterization of a distinctive exo-1,3/1,4- β -glucanase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain BB1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 6760-6768 (2010).
- 12) P.O. de Giuseppe, T. de A. Souza, F.H. Souza, L.M. Zanphorlin, C.B. Machado, R.J. Ward, J.A. Jorge, R. dos P.M. Furriel and M.T. Murakami: Structural basis for glucose tolerance in GH1 β -glucosidases. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **70**, 1631-1639 (2014).
- 13) B. Guo, N. Sato, P. Biely, Y. Amano and K. Nozaki: Comparison of catalytic properties of multiple β -glucosidases of *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (2016) in press.
- 14) A.R. Mach-Aigner, M.E. Pucher, M.G. Steiger, G.E. Bauer, S. J. Preis and R.L. Mach: Transcriptional regulation of *xyl1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6554-6562 (2008).
- 15) B. Guo, Y. Amano and K. Nozaki: Improvements in glucose sensibility and stability of *Trichoderma reesei* β -glucosidase using site-directed mutagenesis. *PLoS ONE*, **11**(1), e0147301 (2016).
- 16) C.V. Nascimento, F.H. Souza, D.C. Masui, F.A. Leone, R.M. Peralta, J.A. Jorge JA and R.P. Furriel: Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated β -D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. *J. Microbiol.*, **48**, 53-62 (2010).
- 17) F.H.M. Souza, C.V. Nascimento, J.C. Rosa, D.C. Masui, F.A. Leone and J.A. Jorge: Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Process Biochem.*, **45**, 272-278 (2010).
- 18) F.H.M. Souza, R.F. Inocentes, R.J. Ward, J.A. Jorge and R.P.

- Furriel: Glucose and xylose stimulation of a β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*: A kinetic and biophysical study. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **94**, 119–128 (2013).
- 19) T. Uchiyama, K. Miyazaki and K. Yaoi: Characterization of a novel β -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. *J. Biol. Chem.*, **288**, 18325–18334 (2013).
- 20) M. Suto and F. Tomita: Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 305–311 (2001).
- 21) R.E. Huber, G. Kurz and K. Wallenfels: A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose. *Biochemistry*, **15**, 1994–2001 (1976).

質疑応答

[質問]

東大院 五十嵐

ソホロースの「誘導」とは、誘導なのか抑制の解除なのか。

[回答]

セルラーゼ転写因子の存在によって Chromatin packaging の状態に変化を及ぼし、セルラーゼ誘導が開始されるという論文が存在します。つまり、抑制状態にあった酵素の発現が、転写因子によって解放され、誘導が生じるという内

容です。セルラーゼ誘導に関しては、ソホロースから下流、もしくは転写因子から上流のシグナル伝達に関しては様々な説が存在し、どれが有力な情報かを判断するには詳細な研究データが少なく、時期尚早と考えております。

[質問]

産総研 松沢

トリコデルマの細胞内のセロビオース濃度は、転移反応が起こるほど高いのか。

[回答]

菌体内のソホロース濃度を測定することは困難であり、これからの研究課題です。我々の実験では、1% セロビオースおよび 5 μ g の CellA (図1および2の1/10量) においても、反応3~12時間において3.6%の変換率でソホロースを合成することを確認しています。基質濃度の低下に伴って合成量は低下しますが、転移反応が消失することはないと考えています。また、細胞内 BGL は細胞膜に局在していることも報告されています。局所的に酵素や基質濃度が高ければ、ソホロースの合成量は増える可能性があります。