

糸状菌による植物バイオマス分解酵素の生産を亢進させる因子の探索・同定とその利用法の開発

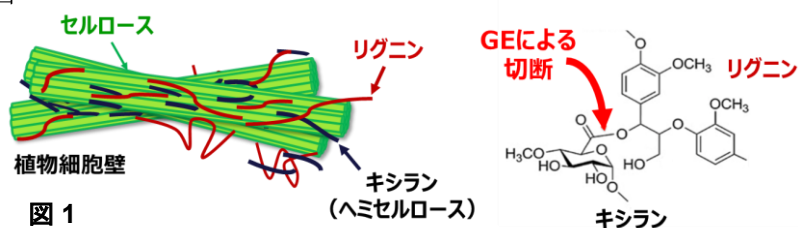
有岡 学

東京大学大学院・農学生命科学研究科・応用生命工学専攻

研究の目的

豊かな森林資源を持つ一方、化石燃料をほとんど産出しない我が国では、自然エネルギーの利用、中でも植物バイオマスの有効利用が叫ばれて久しい。しかし、依然としてその実用化へのハードルは高い。その理由の一つが、植物細胞壁を分解するために必要になる多量の酵素剤を生産するためのコストの高さである。植物の細胞壁は大きく分けてセルロース、ヘミセルロース（含キシラン）、リグニンの3成分からなるが、これらは互いに結合して強固な構造を持つため難分解性を示す。グルクロン酸エステラーゼ（glucuronoyl esterase; GE）はこのうちキシランとリグニン間の結合を切断する活

性を有し（図1）、細胞壁全体の構造を緩くすることでその分解を促進する機能を持つと考えられている。



申請者は以前からこの酵素に着目し、アカパンカビ（*Neurospora crassa*）由来のGEであるNcGEがキシラン側鎖のグルクロン酸とリグニンの結合を模した合成基質を分解する活性を持つこと¹⁾、この合成基質を用いて基質認識に関わる重要な残基の構造予測に基づく特定などを行ってきた²⁾。一方、これらと併行して*N. crassa*における植物バイオマス分解酵素の発現誘導機構の解明にも取り組んできたが、その過程でGEを高発現する株ではセルラーゼやキシラナーゼ類の遺伝子発現が亢進し、培地の酵素活性が上昇することを見出した。また*in vitro*でGEと反応させた植物細胞壁分解産物中にセルラーゼ類の発現を誘導する物質が含まれることも見出した。本研究はこうした遺伝子発現の上昇がどのような物質や情報伝達経路を介したものであるかを解析し、セルラーゼ類の発現を制御する新奇な機構を明らかにすることを目的とする。

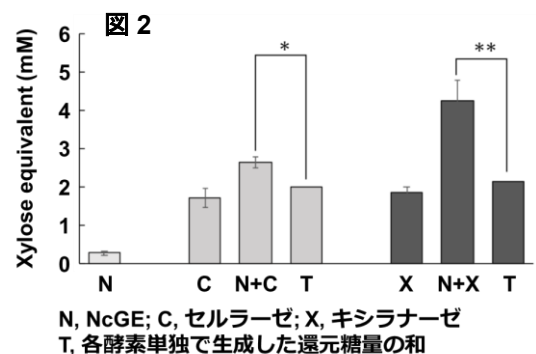
方法

NcGE 異種発現のため、NcGE 配列を *N. crassa* ゲノムより PCR で増幅し、*Komagataella phaffii* 用発現ベクターpPICZαに連結した。形質転換体を培養し、定法に従ってメタノールでの発現誘導を行った。培養1日めの上清を回収してNiカラ

ムによる精製を行い、CBB染色およびウエスタンブロットにより精製度を確認した。基質となるクワ木粉はボールミルによる破碎と粉末化处理を行ったのち 2 mm の篩を通すことで調製した。これと組換え生産した NcGE を反応させ、遠心により上清を回収し、加熱することで NcGE を不活化して培地に加えた。*N. crassa* を培養後経時的に上清をサンプリングし各種の酵素活性を測定した。NcGE を高発現する *N. crassa* 株は、NcGE 配列を構成的に強く発現を誘導する *ccg-1* プロモーターを持つベクター pMF272 に連結し、*N. crassa* に形質転換することで作製した。*N. crassa* の遺伝子破壊株は Fungal Genetic Stock Center より入手した。

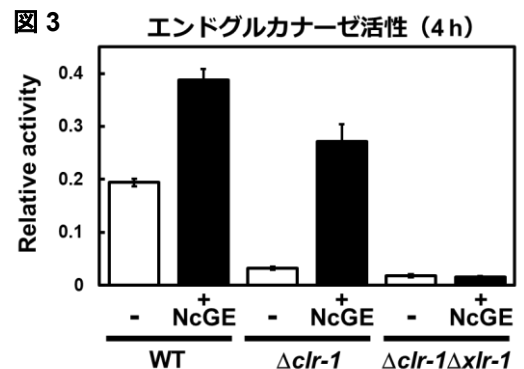
結果

NcGE の *in vitro* での作用を検討するため、まず *K. phaffii* を用いた NcGE の異種生産を行った。出芽酵母 α -ファクターのプレプロ配列の下流に NcGE 配列を連結し、形質転換により C 末端に myc と His₆ 配列を持つ NcGE 生産株を得た。定法に従いメタノールによる誘導後、上清を Ni カラムによる精製を行ったのち、抗 myc 抗体によるウエスタンブロットにより確認を行った。こうして得た NcGE、市販のセルラーゼ、およびキシラナーゼをそれぞれ単独、あるいは混合してクワ木粉と反応させ、糖の遊離に対する効果を検討した。その結果、それぞれの酵素単独の場合に比べ、NcGE とセルラーゼ、あるいは NcGE とキシラナーゼを混合することにより、より多くの還元糖が遊離すること、すなわち NcGE がセルラーゼやキシラナーゼの効果を増強することがわかった (図 2)³⁾。



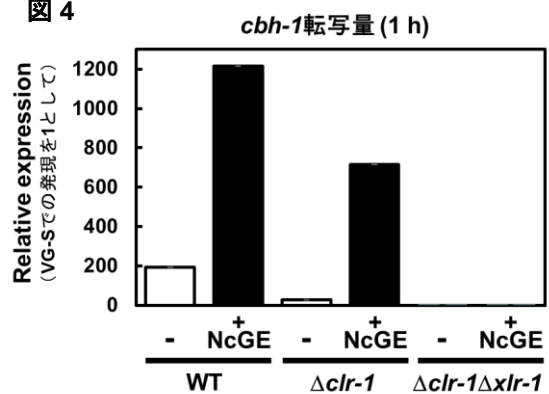
続いて NcGE の *in vivo* での働きを調べるため、*N. crassa* において恒常的に高発現することが知られている *ccg-1* プロモーター制御下で NcGE を高発現する株を作製し、クワ木粉を炭素源とする培地で培養した。その結果、培地に分泌されたセルラーゼの活性が野生株よりも上昇し、遺伝子発現も亢進することがわかった。これは、NcGE の働きで植物細胞壁から何らかの誘導物質が生産されてセルラーゼ類の発現が亢進したためではないかと考えられた。

CLR-1 は *N. crassa* においてセルラーゼの転写を司る重要な転写因子であり、その遺伝子破壊株ではセルラーゼ類の発現が低下することが知られている。クワ木粉を単一炭素源とする培地で *N. crassa* を培養したところ、 $\Delta clr-1$ 株では予想通り野生株よりも培地のエンドグルカナーゼ活性が低下していたが、そ



ここに NcGE とあらかじめ反応させたクワ木粉を添加したところ、特に培養初期において酵素活性が回復することがわかった (図 3)。主要なセルラーゼであるセロビオヒドロラーゼ遺伝子 *cbh-1* の転写量についても調べたところ、酵素活性と同様の回復が認められた (図 4)。一方、もう一つの転写因子 XLR-1 も同時に欠損させた株ではこのような効果は認められなかった。このことから、NcGE 反応物によるセルラーゼ発現の亢進の少なくとも一部は CLR-1 に依存せず XLR-1 が関与する経路を介していることが示唆された。

図 4



結論

本研究では *N. crassa* 由来の GE である NcGE の *in vitro* および *in vivo* での働きを解析し、NcGE がセルラーゼやキシラナーゼによる植物細胞壁の分解を促進する作用を持つこと、NcGE を高発現することでセルラーゼ類の発現が増強されること、さらに NcGE による植物細胞壁の分解によって生じた因子により CLR-1 に依存せず XLR-1 に依存する経路でセルラーゼの誘導が起こることを明らかにした。今後はこのセルラーゼ誘導因子を同定するとともに、それが活性化する細胞内情報伝達経路を解明し、その調節によってセルラーゼ類の生産能力を高め、酵素剤生産におけるコスト高という課題の解決につながる方策の開発を目指したいと考えている。

文献

- 1) Huynh, H.H., and Arioka, M. (2016) Functional expression and characterization of a glucuronoyl esterase from the fungus *Neurospora crassa*: identification of novel consensus sequences containing the catalytic triad. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **62**:217-224.
- 2) Huynh, H.H., Ishii, N., Matsuo, I., and Arioka, M. (2018) A novel glucuronoyl esterase from *Aspergillus fumigatus*-the role of conserved Lys residue in the preference for 4-O-methyl glucuronoyl esters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**:2191-2201.
- 3) Wang, R., and Arioka, M. (2023) Glucuronoyl esterase facilitates biomass degradation in *Neurospora crassa* by upregulating the expression of plant biomass-degrading enzymes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **68**:278-286.