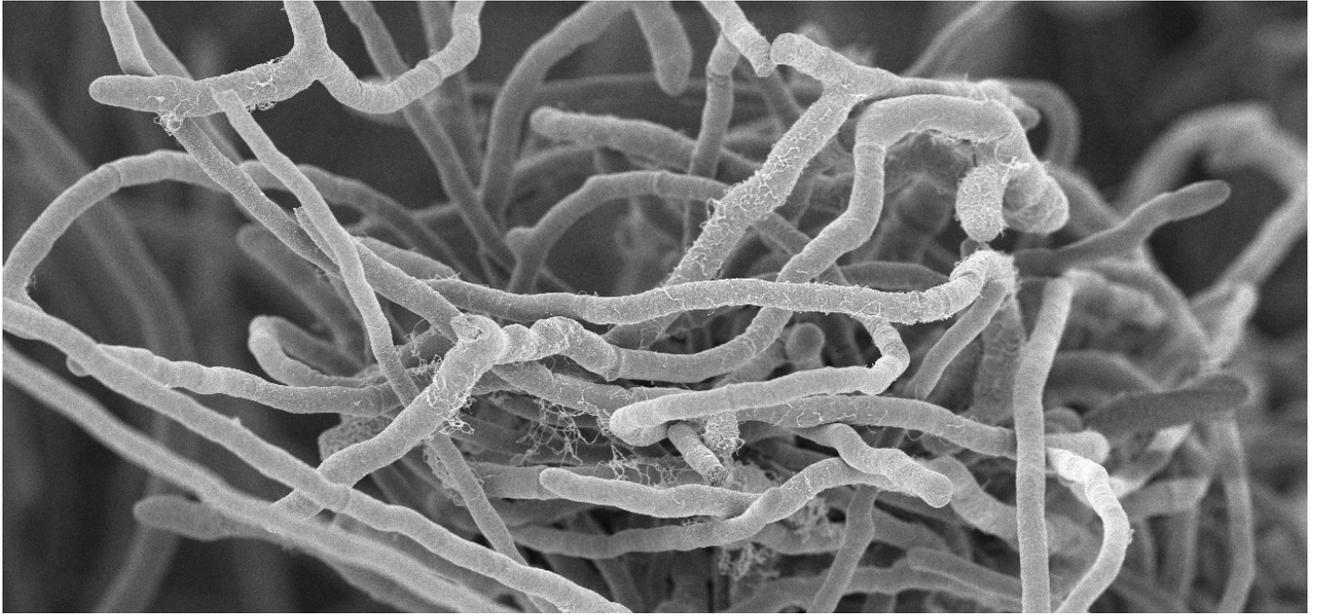


糸状菌 *Trichoderma reesei* の研究



糸状菌 *Trichoderma reesei* は、木質バイオマスを完全分解するために必要な糖質加水分解酵素を全て分泌生産することが可能です。*T. reesei* のタンパク質分泌能は微生物の中でも極めて高く、分泌タンパク質のおよそ 80% が糖質加水分解酵素 (セルラーゼ、ヘミセルラーゼ) です。この有用な能力を利用して、木質バイオマスからの有用物質生産を目指し、本菌の酵素生産機構について解析を行っております。

【研究者】



佐藤 直美



平沢 大樹



Nayani Daranagama



北原 雪菜



服部 祥吾



戸嶋 修平



大給 近晃



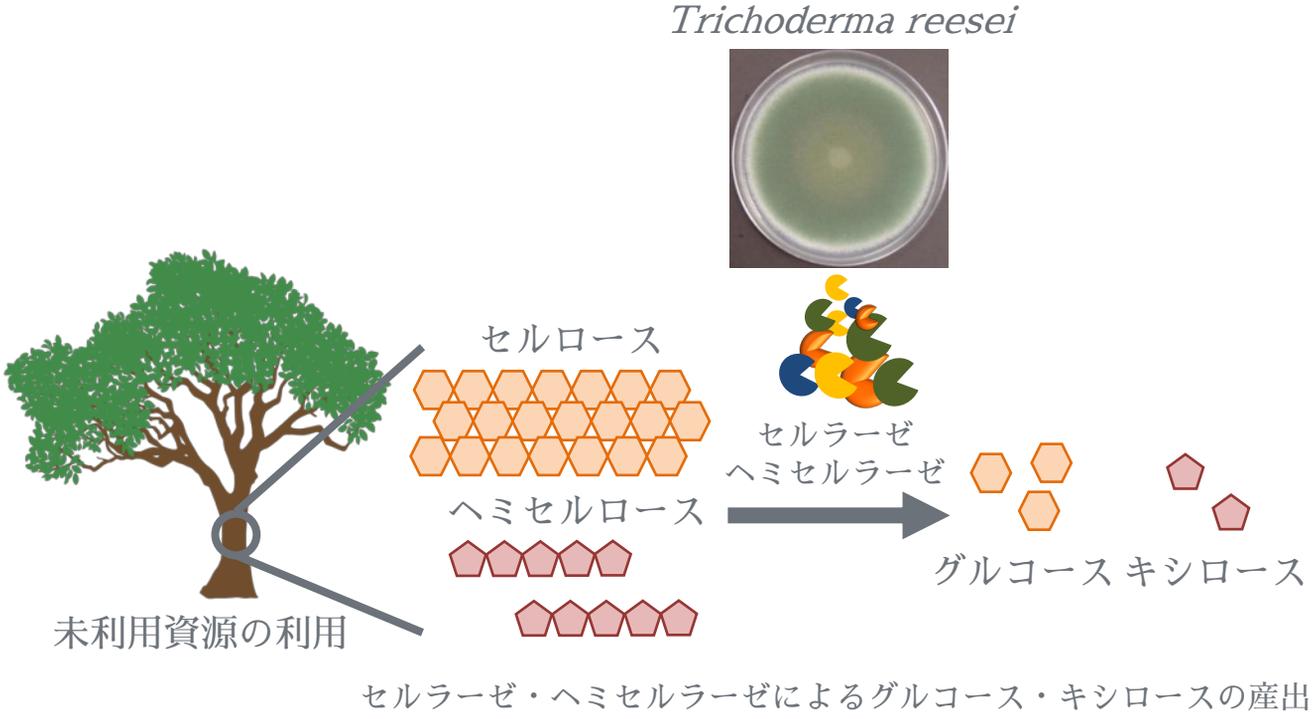
大武 侑平



井谷 綾花

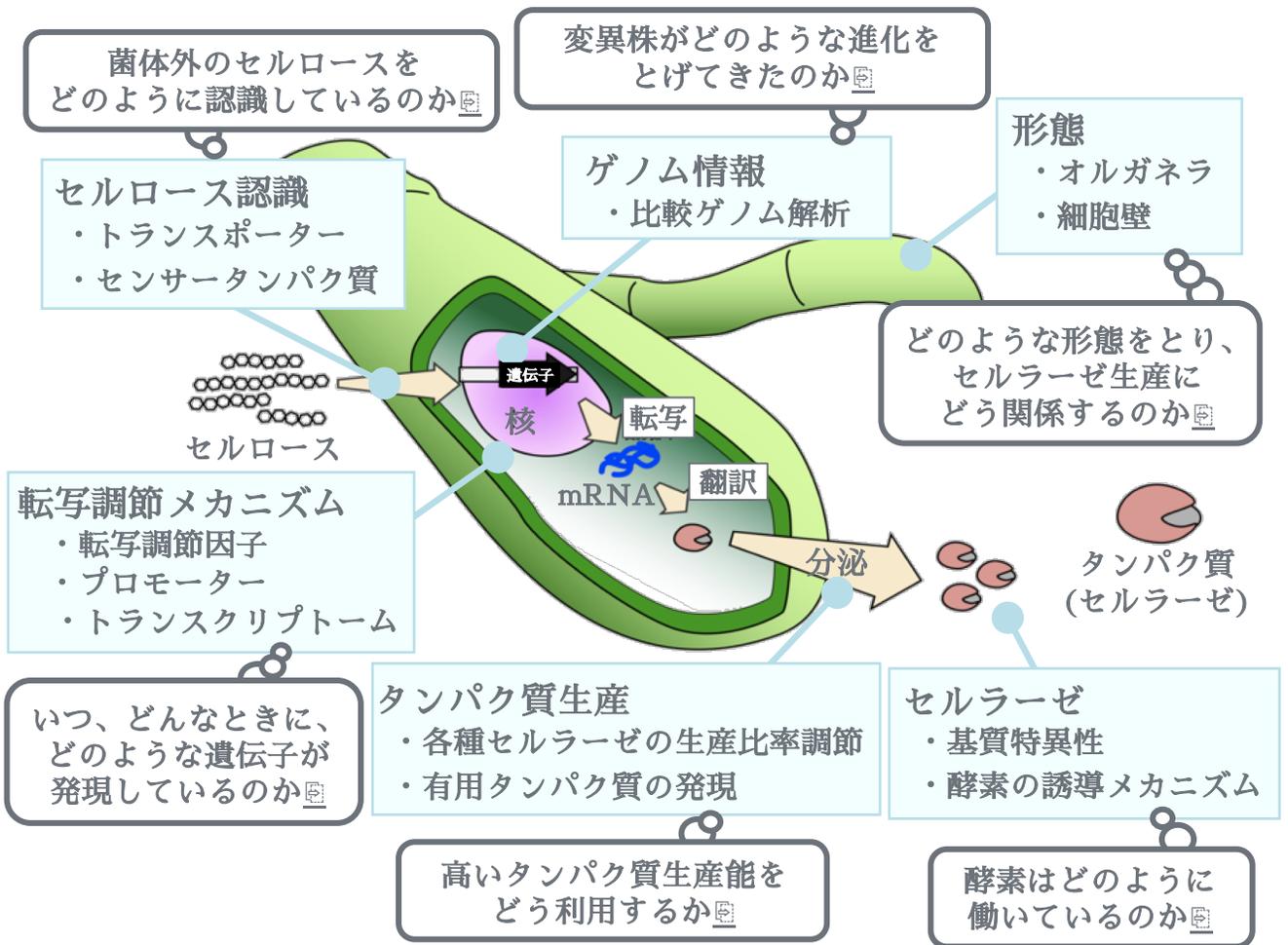
未利用資源からの有用物質生産を目指して

近年、微生物の能力を利用したモノづくりに注目が集まっています。私たちの研究室では、糸状菌の一種である *Trichoderma reesei* (トリコデルマ・リーセイ) がセルロース分解酵素 (セルラーゼ) という酵素を大量に生産して植物細胞壁成分 (セルロース) を糖まで分解する能力を持っていることに着目しました。この糸状菌は菌体外のセルロースを認識して、多種多様なセルラーゼを分泌生産することが知られています。特に、タンパク質を分泌する (菌体外にタンパク質を出す) 能力が非常に高く、微生物中で最大の分泌能力を持っています。そのため、世界中の研究者が *T. reesei* をタンパク質 (セルラーゼ) 分泌のモデル生物として、様々な研究を行っています。私たちも *T. reesei* の生き様を理解しその能力を応用することで、未利用資源からの有用物質生産の実用化を目指し研究を行っています。



Trichoderma reesei の生き様を理解し、利用するために

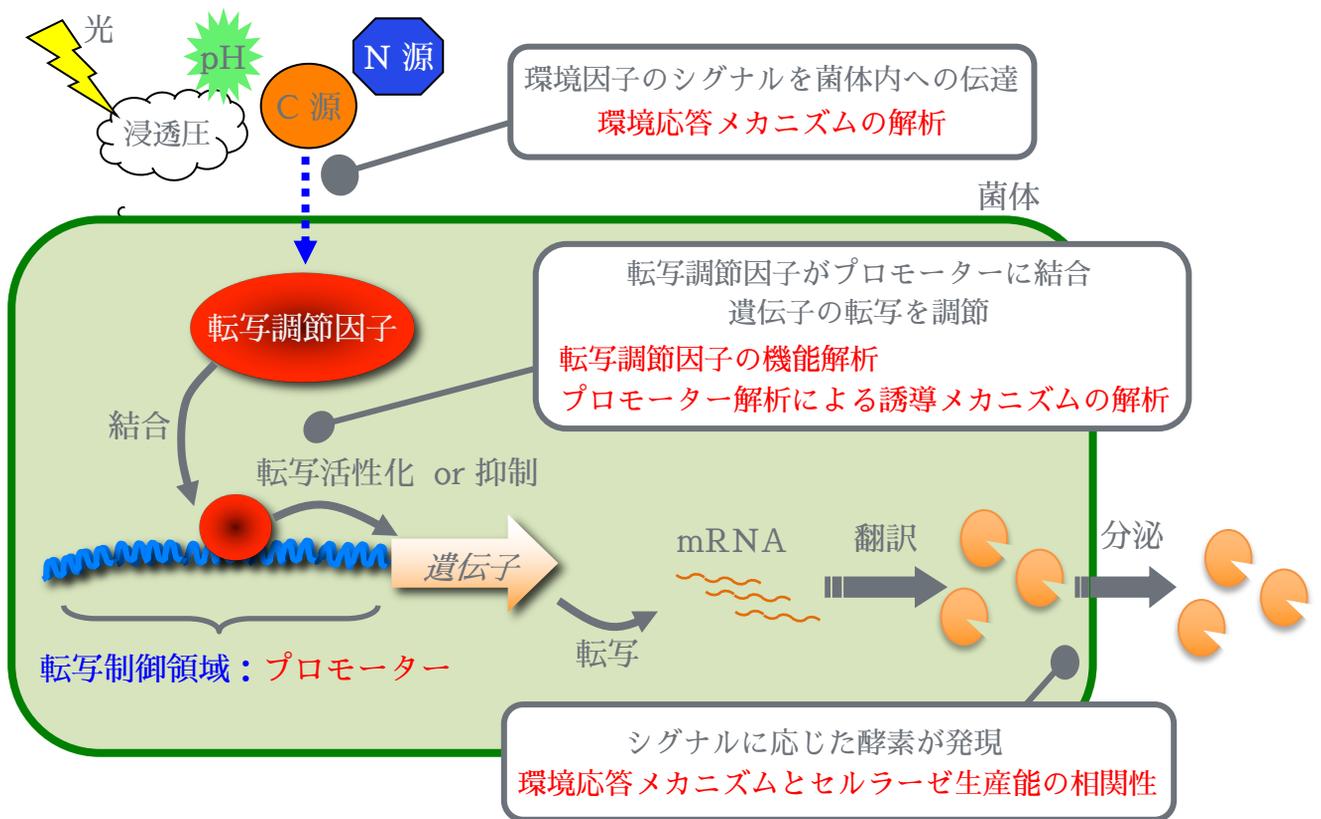
T. reesei は、菌体外に唯一の炭素源としてセルロースやその分解産物が存在するときのみ、多量のセルラーゼ・ヘミセルラーゼを生産することが知られています。これまでにセルラーゼ生産制御機構について様々な解析が行われており、複数の制御タンパク質の関与が明らかとなっっています。しかしながら、その全容は未だ明らかになっていません。我々はこの生産制御機構を明らかにすることを目的として、誘導物質の取り込み・シグナル伝達経路から、セルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子のプロモーター上での遺伝子発現制御機構までを対象に幅広く研究を行っています。



当研究室にて注力している領域

セルラーゼ生産メカニズムの解析

生物は数多くの遺伝子を持っており、その数は大腸菌では4,000個以上、ヒトでは2万数千個に及びます。*T. reesei*も9,129個もの遺伝子を保持しています。しかし、生物は全ての遺伝子を常に使っているわけではなく、必要な時に必要な遺伝子を発現させ、利用します。遺伝子発現には、転写、転写後プロセッシング、RNA輸送、翻訳など複数のステップがあります。*T. reesei*は約200種類のセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子を持っており、特定の条件下で発現が制御されています。これらの制御メカニズムの理解は*T. reesei*のセルラーゼを産業利用するにあたって重要です。



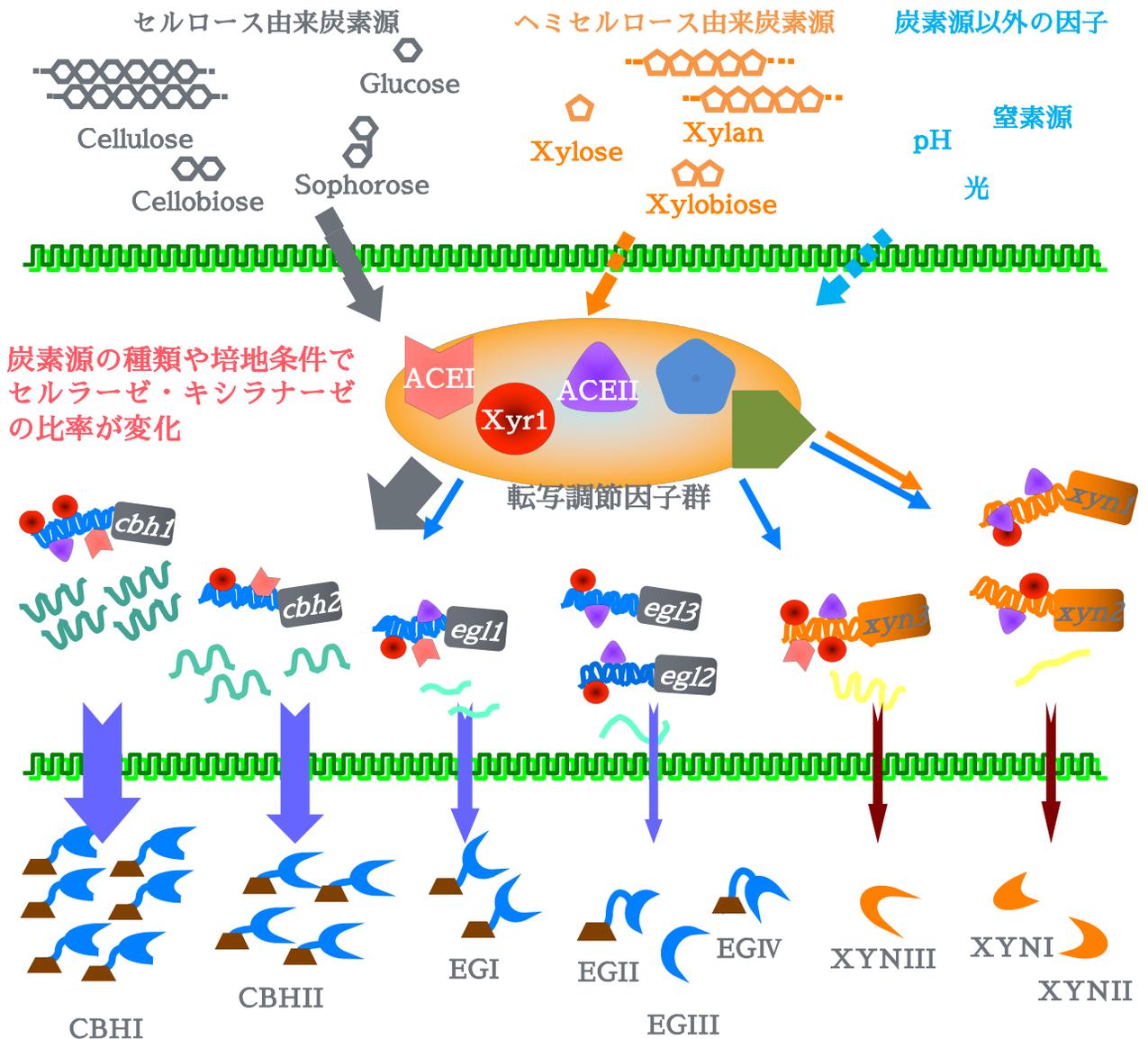
誘導発現の仕組み

本研究室では、セルラーゼ生産メカニズムの解析の解明を目指して、大きく分けて2つの方向からアプローチしています。

- セルラーゼ転写制御メカニズムの解析
- セルロース認識メカニズムの解析

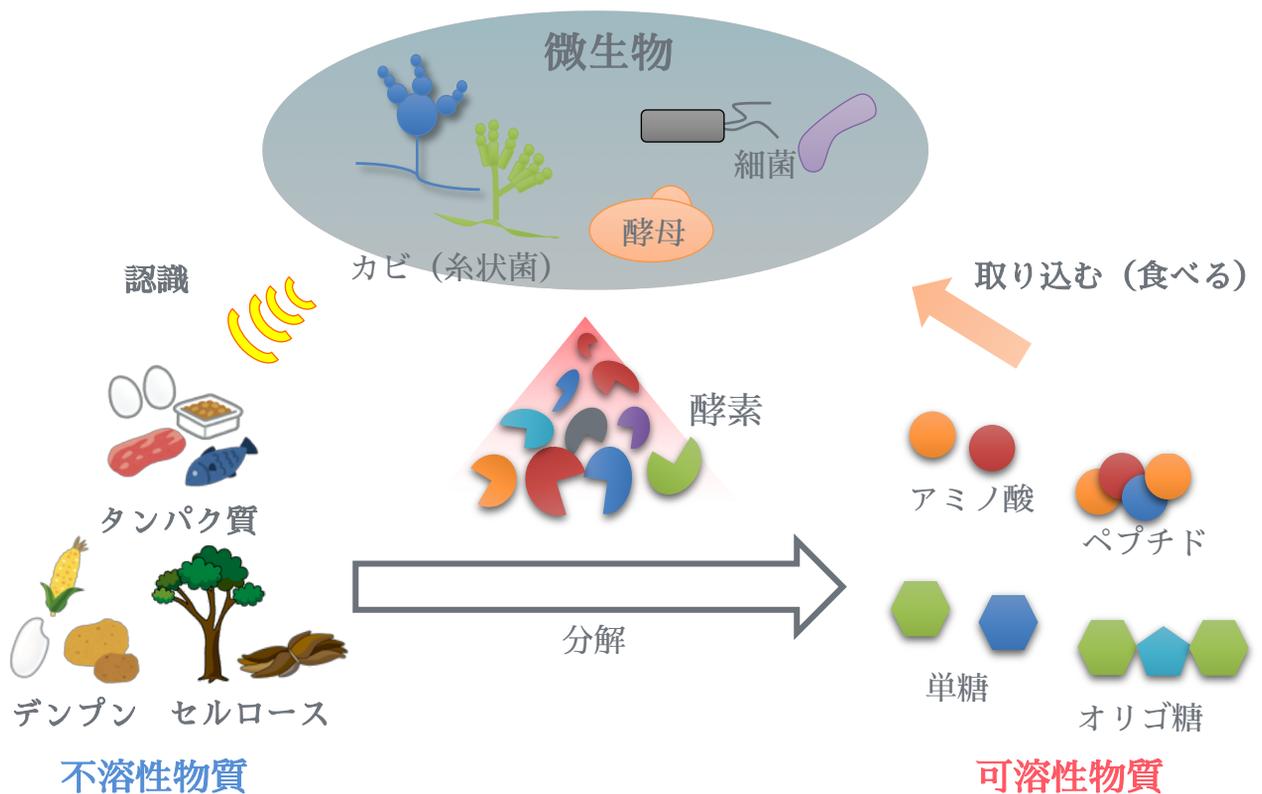
セルラーゼ転写制御メカニズムの解析

転写はタンパク質生産の第一ステップであり、また制御の中心でもあります。そのため、転写制御はほとんどすべての生物現象にとって非常に重要な役割を果たしています。*T. reesei* のセルラーゼ発現も転写レベルで制御されており、複数の転写調節因子によって複雑な制御を受けています。酵素量は遺伝子発現の制御によって決まりますが、様々な転写調節因子が同定されており、多因子が関与しているためにその機構は非常に複雑です。代謝制御を理解するためには、転写調節因子の一つ一つの機能に加え、複数の転写調節因子が働く機構を同時に考えると共に、それらに制御される代謝経路の全体像を明確にする事が重要です。転写制御メカニズムが明らかになれば、木材の組成に合わせたセルラーゼの比率を調製することが可能で、より効率的な酵素生産が実現できます。



セルロース認識メカニズムの解析

人間が食べ物を食べると胃酸を分泌するように、微生物も菌体外の物質、状況を認識して様々な応答を行います。菌体内に取り込まれた物質の認識メカニズムは、様々な微生物および物質で解明されてきています。一方で、直接的に菌体内に取り込むことのできない昆虫や植物(不溶性物質)を認識する微生物も存在します。菌体外の不溶性物質を認識した微生物は生育や酵素生産を行うため、不溶性物質を分解する酵素分泌を誘導します。しかし、これら微生物はどのようにして菌体外の状況を認識しているかは未だ完全には理解されていません。*T. reesei*も菌体外のセルロース(不溶性)を認識し、セルラーゼ遺伝子の発現を活性化します。我々はこの認識メカニズムを明らかにすることで、セルラーゼ生産能の向上だけでなく、微生物の不溶性基質の認識メカニズムの解明を目指しています。



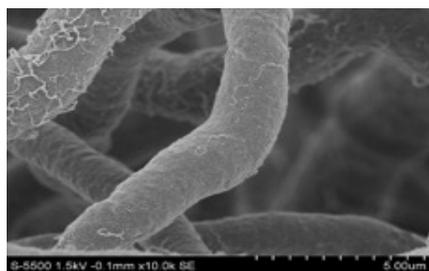
不溶性物質の認識による酵素生産

形態学的観点からのセルラーゼ生産機構の解析

糸状菌の特徴はタンパク質高分泌能だけではなく、その『形』にあります。しかし、これまでに形態とタンパク質生産の関係性は理解が進んでいません。*T. reesei* を電子顕微鏡で観察すると、セルラーゼ生産時に菌糸の表面に繊維状の物質を生産することが観察されています。この現象は他の糸状菌でもタンパク質生産時に観察されており、私たちはこの特徴的な形態と糸状菌の高いタンパク質分泌能力に密接な関係があると考え、研究を行っています。

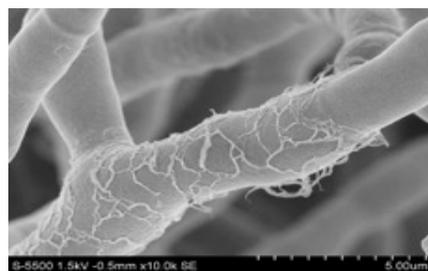
走査型電子顕微鏡 (SEM)

QM9414

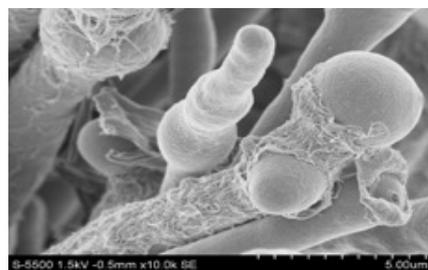
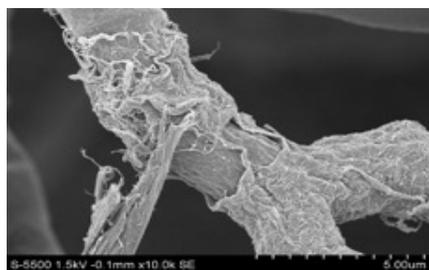


グルコース培養
(セルラーゼ非生産)

PC-3-7

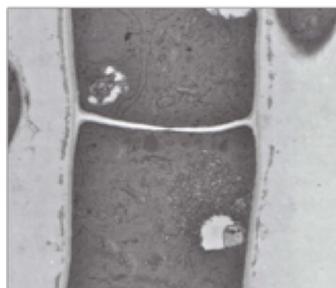


セルロース培養
(セルラーゼ生産)



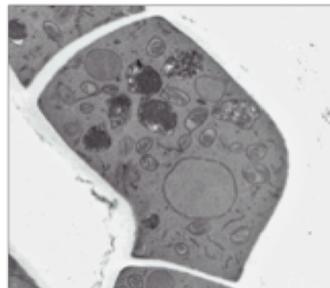
透過型電子顕微鏡 (TEM)

QM9414

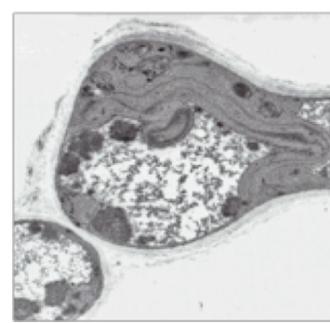
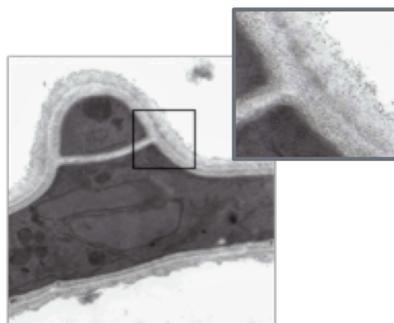


グルコース培養
(セルラーゼ非生産)

PC-3-7

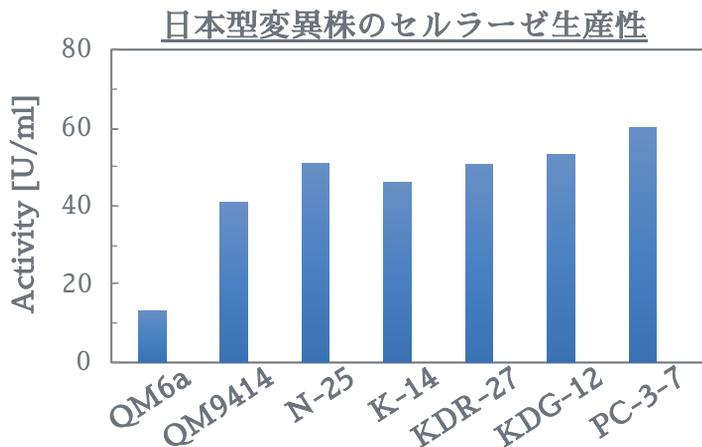


セルロース培養
(セルラーゼ生産)



日本型変異株におけるセルラーゼ高生産化メカニズムの解析

これまでに、潜在的な産業的利用価値の高さから、突然変異導入により世界中で数多くの *T. reesei* セルラーゼ高生産変異株が造成されてきました。しかし、それぞれの変異株について、ゲノム中の変異点とセルラーゼ高生産化との関連は明らかになっていません。当研究室では、日本で独自に開発された一連の *T. reesei* 高生産変異株の系統菌株を保有しています。



これら変異株のゲノム配列や表現型の違いを明らかにし、異なる菌株同士で比較することにより、「どのような変異が、セルラーゼの生産性を高めるといふ表現型をもたらしたのか？」という根本的かつ重要な鍵となる知見を得ることができます。さらに、ほとんどの変異株は QM9414 と呼ばれる *T. reesei* の標準株より造成されています。ゆえに、日本型変異株で明らかとなった有用な変異点は他国の菌株にも応用することが可能であり、非常に重要度の高い研究であります。

遺伝子工学的手法を用いたスーパー菌株の開発

T. reesei は、高いセルラーゼ生産能を持つことから、世界中でUV照射や化学物質処理によるセルラーゼ生産を向上させた変異株の作製が盛んに行われてきました。しかし、突然変異による菌株改良ではこれ以上のセルラーゼの大幅な増産はできないと予想されています。そのため、セルロース分解効率の向上には新たなアプローチが必要です。当研究室では、研究によって明らかとなったセルラーゼ生産制御メカニズムの知見や高生産化に寄与するゲノム中の変異点などを遺伝子組換え技術を用いて *T. reesei* に導入することで、これまでにない『スーパー菌株』の開発を行っています。

酵素発現量の調節による組成最適化

有用酵素 & タンパク質の発現

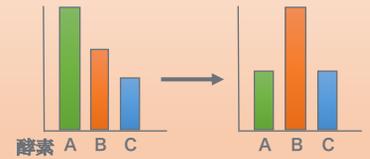


異種セルラーゼ・キシラナーゼ



セルロース膨潤化タンパク質

酵素発現量の調節による組成最適化



環境応答メカニズムの応用
プロモーターの改変

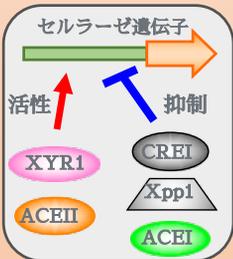
各バイオマスに最適化



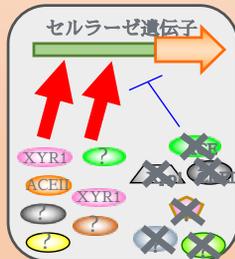
セルラーゼ高生産菌
Trichoderma reesei

転写制御メカニズムを利用したセルラーゼ生産能の向上

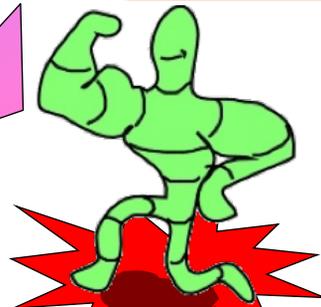
セルラーゼ生産



活性化因子の過剰発現
抑制因子の破壊



による生産能増強



セルラーゼ活性向上
Trichoderma reesei

高機能糖化酵素生産菌株の造成ストラテジー

【共同研究機関】

- 花王株式会社^⑤
- 産業技術総合研究所^⑤
(生物プロセス研究部門 バイオデザイン研究グループ^⑤)
- 九州大学 農学研究院^⑤
(生命機能科学部門 生物機能分子化学講座 遺伝子制御学分野^⑤)
- 総合画像研究支援^⑤
- 酒類総合研究所^⑤
- Hanoi University of Science and Technology^⑤ (ベトナム)
(Fermentation Technology Lab.^⑤)

【受賞】

- Nayani Daranagama さん (D2、スリランカ出身) が第31回セルラーゼ研究会にて優秀ポスター賞 第三等を受賞
平成29年7月8日に長野県で行われた第31回セルラーゼ研究会にてD2 NayaniさんがTrASPと呼ばれるプロテアーゼの転写制御に関する報告で優秀ポスター賞を受賞されました。
- 平沢大樹さん (D1、旭川高専出身) が 4th International GIGAKU Conference にて Best Poster Award を受賞^⑤
平成27年6月20日に長岡技術科学大学で行われた 4th International GIGAKU Conferenceにて 平沢さんがpH依存的なセルラーゼ生産機構に関する報告でBest Poster Award を受賞されました。

【メディア掲載】

- 遺伝子組換えを用いて木質バイオマスの分解を高効率に行う酵素の開発に成功
日経産業新聞(2010年10月13日)および日経産業新聞(2010年10月20日)、新潟日報(2012年3月17日)に、*T. reesei* を遺伝子組換え技術により改良し、非食用植物の分解効率が従来の5倍を示す酵素の開発に成功したとして、掲載されました。

【コンタクト】



小笠原研究室

〒940-2188

新潟県長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学 生物棟

Tel: 0258-47-9429

E-mail: owataru@vos.nagaokaut.ac.jp

代表： 小笠原 渉