

研究ノート

線形加速器で得られたセルラーゼ生産株における高増殖性と高セルロース分解性の双方の特性を保持する株の分離

外山 英男

発酵利用学研究室

2010年10月20日受付; 2011年1月25日受理

Isolation of the strain which has both higher growing ability and higher cellulose degrading ability in the cellulase producing fungal strain obtained by using a linear accelerator

Hideo Toyama

Laboratory of Utilization of Fermentation, Minami Kyushu University,
Miyazaki 880-0032, Japan

Received October 20, 2010; Accepted January 25, 2011

Construction and isolation of the strain which has both higher growing ability and higher cellulose hydrolyzing ability were attempted in a cellulolytic fungus, *Trichoderma reesei* QM 9414, obtained by using a linear accelerator. The target strain was selected among colchicine-treated swollen conidia using the double-layer selection medium. When the concentration of the selection substrate was 2.0% (w/v), the strain which has both higher growing ability and higher cellulose degrading ability could be selected.

Key words: colchicine, *Trichoderma reesei*, cellulase, cellulose, polyploid.

緒 言

トリコデルマは食品加工用セルラーゼを工業的に生産するのに古くから広く使用されている¹⁾。近年、バイオマス利用としてセルロースからエタノールを製造する際にもセルラーゼが利用されている²⁾。現在のバイオ燃料のボトルネックの一つは糖化用酵素が高価格であることが挙げられ、そのためセルラーゼ生産菌の生産性を向上させる研究が広くなされている³⁾。米国のラトガース大学では薬剤処理によって*Trichoderma reesei* RUT C-30株を開発している⁴⁾。また、米国陸軍ナティック研究所ではすでに20年以上前に野生株である*T. reesei* QM6a株より線形加速器を用いてセルラーゼ高生産株、*T. reesei* QM 9414株を開発している⁵⁾。

著者は、これまでにトリコデルマの同質倍数体の構築や高増殖株の選択に成功し、これらの手法を用いて上記のRUT C-30株の増殖力とセルロース分解力をさらに向上させることに成功した⁶⁾。今回は線形加速器を用いて得られたセルラーゼ高生産株、*T. reesei* QM9414株に上記の手法を用いて、高増殖性と高セルロース分解性の双方の特質を保持する株を分離することを試みた。

方 法

菌株と培地

モデル株として*Trichoderma reesei* QM9414 (IFO 31329)を使用した。この株はポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地上で26℃で培養し、4℃で保存した。膨潤化用培地として、100ml三角フラスコに、グルコース0.5g、ペプトン0.25gを含む50mlのマンデルス培地を加えて使用した (pH 6.0)⁷⁾。コルヒチン処理用培地として、50ml三角フラスコに、グルコース0.25g、ペプトン0.13g、コルヒチン0.025gを含む25mlのマンデルス培地を加えて使用した (pH 7.0)。選択培地として、1.0ないし2.0g微結晶セルロース (選択基質) (Merck, 薄層クロマトグラフィー用)、2.0g寒天 (BD)、0.5gペプトン (BD)、0.1ml Triton X-100 (和光)を含む下層培地100mlに分生子を加えてよく攪拌し、4℃で固化させた後、同組成、同量の上層培地を重層後4℃で固化して使用した。セルロース分解力試験用培地としては、1.0% (w/v) 微結晶セルロース、1.5%寒天、0.5%ペプトン、0.1% (v/v) Triton X-100を含むマンデルス培地を使用した (pH 5.0)。酵素生産用液体培地としては、100ml三角フラスコに0.5g微結晶セル

コースと0.25gペプトンを含むマンデルス培地50mlを加えて使用した。

コルヒチン処理法

PDA培地上に菌体を2mm四方置いて26℃で10日間培養した。緑色分生子が着生後、これを滅菌蒸留水に懸濁させ、ガラスフィルター3G-2でろ過して菌体を除去後、デシケーター中で乾燥させた。乾燥緑色成熟分生子を膨潤化用液体培地に加え、26℃で5時間回転振盪培養（160rpm）を行い、分生子を膨潤化させた。膨潤分生子を遠心分離で収集後、コルヒチン処理用液体培地に加え26℃で7日間静置培養した。

選択法

コルヒチン処理した膨潤分生子を下層培地に加えて4℃で固化後、上層培地を加えて4℃で固化させた。その後、26℃で培養した。培養期間中に培地表面へのコロニー出現状況を観察した。

固体培地上でのセルロース分解力試験法

菌体2mm四方をセルロース分解力試験用固体培地上に載せ26℃で10日培養した。培養後、培地を恒温培養器中で50℃で24時間加熱し、微結晶セルロースの分解の有無を観察した。

濾紙崩壊力試験法

菌体5mm四方を酵素生産用液体培地に加え、26℃で5日間、160rpmで回転振盪培養した。培養後、ガラスフィルター3G-3でろ過して菌体を除去後、ろ液を酵素液とした。菌体は80℃で24時間乾燥後、秤量して生成菌体量を算出した。酵素液5mlを加えたL字管（120cm×68cm）に1cm四方の濾紙（No. 2, ワットマン）を1枚加え、シリコ栓で栓をしたのち、モノー振盪機（TAITEC MONOD SHAKER PERSONAL-11）で50℃で振盪した。濾紙を完全に崩壊するのに要する時間をデジタルストップウォッチで計測した。振盪開始から30分間振盪後、濾紙で反応液をろ過後、反応液中の還元糖量を3,5-DNS法で測定した⁸⁾。

酵素活性測定法

0.5gのアビセルやCMC-Naやサリシンを0.1M酢酸緩衝液50mlに加えて基質として使用した。酵素液2mlと基質4mlを試験管に加え、45度に傾けて50℃で往復振盪機（125stroke/min）を用いて1時間反応させた。試験管は15分ごとに攪拌した。反応後、反応液を濾紙でろ過後、ろ液中の還元糖を3,5-DNS法で測定した。還元糖量より酵素の活性を算出した。IUは「1分間に1マイクロモルのグルコースと等量の還元糖を生成する酵素量」と定義した。

核染色法

菌体2mm四方を蒸留水を滴下したスライドグラス上に置き、ギームザ液（Merck）を滴下して圧着後、数分間放置して染色した。染色後、スライドグラス上の新鮮な蒸留水中に菌体を再懸濁させて、顕微鏡観察を行った。DAPI液（Sigma）でも菌体を染色して、蛍光

顕微鏡を用いてギームザ液で染色される部分がDAPI液でも染色されるかどうかを観察した。

結 果

コルヒチン処理

T. reesei QM 9414株の乾燥緑色成熟分生子を膨潤化用培地に加え、26℃、5時間、回転振盪培養（160rpm）を行って楕円形の分生子を球形に膨潤させた。内部には元株と同じ大きさの核が1個存在した。この膨潤分生子をコルヒチン処理用培地に加え、26℃で7日間静置培養を行った。培養後、分生子を核染色すると分生子中に大型の核、すなわち倍数核が1個存在しているのが確認できた（データ未記載）。

選択

コルヒチン処理した膨潤分生子を下層培地に加えたのち、上層培地を添加して26℃で培養を行った。選択基質濃度が1%の場合には培養4日目からコロニーが出現し、時間が経過するにつれて培地表面に様々な大きさのコロニーが形成された。選択基質濃度が2%の場合には培養5日目からコロニーが出現し、時間がたつにつれて大小のコロニーが培地表面に形成された。培地表面に生じたコロニーの中から、直径が最大のをそれぞれ1個ずつ分離し、選択基質濃度1.0%の選択培地由来の株を1a株、2.0%の選択培地由来の株を2a株とした。これらの株はPDA培地上で培養後、保存した。

増殖力比較試験

元株と選択株の菌体2mm四方をPDA培地上に置いて26℃で7日間培養しコロニーを形成させた。コロニー直径と培養時間より菌糸伸長率を算出した。

その結果、表1のように1%選択株と2%選択株は共に元株よりも増殖性が良好であった。

固体培地でのセルロース分解試験

元株、1a株、2a株の菌体2mm四方を試験用寒天培地に置き、26℃で10日間培養した。培養後、培地を50℃で24時間加熱した。加熱後、図1に示すように2a株ではコロニー周辺に透明域が形成されたり、微結晶セルロースが部分的に分解されて「むら」が形成されたが、元株と1a株ではそのような結果は得られなかった。

濾紙崩壊試験

元株、1a株、2a株の菌体5mm四方を酵素生産用液体培地に加え、26℃で5日間回転振盪培養（160rpm）を行い、培養液を濾紙でろ過して菌体を除去し、ろ液を酵素液として使用した。各株の濾紙崩壊時間を計測後、反応液を濾紙でろ過して、ろ液中の還元糖量を測定した。その結果、表2に示すように、2a株は元株や1a株よりも早く濾紙を崩壊した。また、2a株の反応液中の還元糖量が最も多かった。

酵素活性測定

表1. 寒天培地上での増殖率比較結果

	最大コロニー径 (mm)	菌糸伸長率 (mm/h)
元株	50	0.29
1a株	56	0.33
2a株	58	0.35

菌体2 mm四方をPDA培地上に置いて、26℃、7日間培養後、コロニー直径をデジタルノギスで計測した。1検体あたり、PDAプレートに3枚使用し最も大形のコロニーを計測した。

表2. 濾紙崩壊力と生成還元糖量

	濾紙崩壊時間 (min)	生成還元糖量 (mg/ml)
9414株	15	0.56
2a株	10	0.77

濾紙崩壊力は、1cm四方の濾紙をL字管に入れ、50℃でモノー振盪し、完全崩壊までの時間を計測して評価した。反応液をワットマン濾紙No.2でろ過後、ろ液中の還元糖量を3, 5-DNS液を用いて定量した。

濾紙崩壊試験に用いた酵素液のセルロース分解活性と生成タンパク量を測定した。その結果、表3に示すように、2a株の各酵素活性は他の株よりも向上していた。また、2a株の生成タンパク量も増加していた。

菌体の核状況観察

元株、1a株、2a株の菌体を核染色して核状況を観察した。その結果、図2に示すように、2a株の菌体中には大型の倍数核が多数存在することが判明した。1a株の菌体中にも倍数核が存在したが、その割合は2a株より少なかった。

遺伝安定性試験

元株と2a株の菌体2 mm四方を遺伝安定性試験用培地上に置き、26℃で4週間培養して扇上セクターの形成の有無を観察した。しかしながら、培養中、扇状セクターの形成は見られなかった。

考 察

まず、50℃で加熱すると2a株で微結晶セルロースに「むら」が生じる点について検討した。トリコデルマ

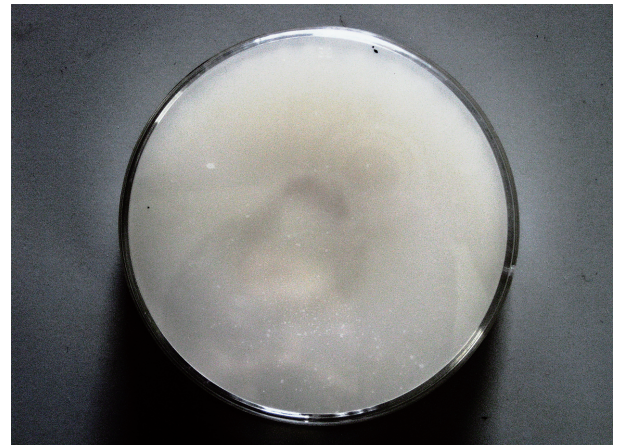
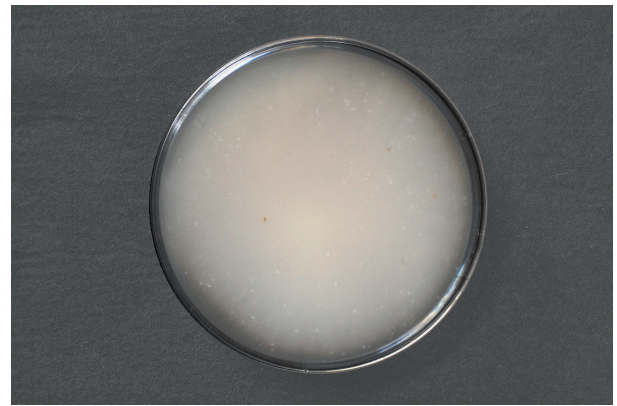


図1. 固体培地上でのセルロース分解力評価

菌体を微結晶セルロース含有寒天培地上に置いて26℃で10日間培養後、50℃で24時間加熱した。上: 元株, 下: 2a株

セルラーゼの至適温度は50℃前後と報告されているので⁹⁾、この温度で加熱されて、生産されたセルラーゼが培地中の微結晶セルロースと反応して、これを分解し、そのあとが「むら」になったと考えられた。元株と1a株では「むら」が生じなかったのは微結晶セルロースの分解が余り顕著でなかったためと考えられた。おそらく元株と1a株から生産されたセルラーゼ量は培地中の微結晶セルロースをむらが生じるほど分解するには不十分であったと考えられた。

次に、選択基質濃度が1%の時は高増殖性のみを示す株が選択され、選択基質濃度が2%以上となると高増殖性とセルロース高分解性の双方の特質を保持する株が選択されるようになる点について検討した。ま

表3. 2a株のセルロース加水分解酵素活性と生成タンパク量

	微結晶セルロース	CMC-Na	サリシン	タンパク量
		加水分解活性 (IU)		(mg/ml)
元株	52	75	10	2.7
2a株	60	88	17	3.5

菌体を26℃、5日間、回転振盪培養後、ろ液中の酵素活性とタンパク量を測定した。還元糖定量にはDNS法、タンパク定量にはProtein Assay Rapid Kit wakoを使用した。

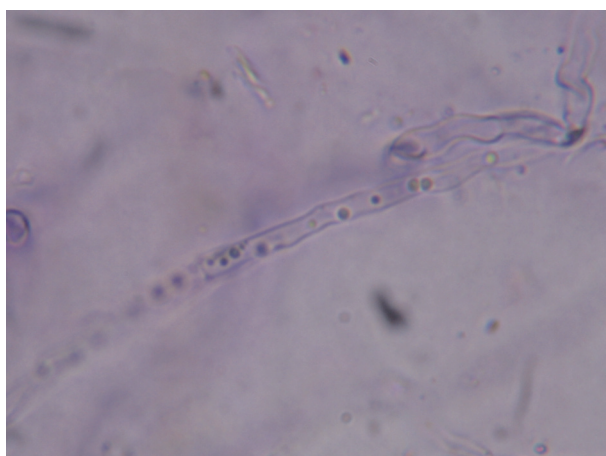
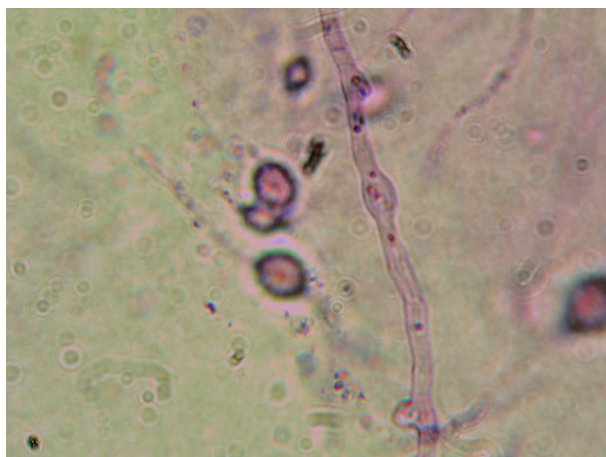


図2. 菌体内の核性状

菌体をギムザ染色後、顕微鏡写真撮影を行った。上: 元株, 下: 2a株

ず、選択基質濃度が1%の場合、選択層を短期間で突破するには元株と同程度のセルロース分解力と高増殖性のみで十分であったと思われる。そして、選択基質濃度が2%の場合、そのような株が選択層を短期間で突破するのは困難となり、代わりに、元株よりも向上したセルロース分解力と高増殖性を併せ持つ株が短期間で選択層を突破してきたと考えられた。

また、高増殖性やセルロース高分解性はなぜ生じたかという点について検討した。高増殖性のみを示す株の菌体にも高増殖性とセルロース高分解性の双方を保持する株の菌体にも倍数核が共通して存在していることから、高増殖性やセルロース高分解性は倍数体の存在によるものと推測される。さらに菌体中の核径の分布を比較した結果、高増殖性のみを示す株は倍数核は存在するがその割合はあまり多くなく、高増殖性とセルロース高分解性を示す株は倍数核の割合が多いことがすでに判明している。これより菌体中の倍数核の割合が高増殖性やセルロース高分解性と関与していると考えられる。したがって、高増殖性やセルロース高分解性は倍数化による強勢効果の一種と考えられる。また、2a株の酵素液中の生成タンパク量がそれほど増加していなかったのは、同様な強勢効果で増加したプロテアーゼが原因かもしれない。

最後に、2a株の遺伝状況と遺伝安定性について検討した。遺伝状況については、菌体中に倍数核が存在するが低次や高次のさまざまな倍数核も混在しているので、一種の倍数体の状態にあるが均一な遺伝状況ではないと考えられた。遺伝安定性については、PDA培地上で4週間培養しても扇状セクターが形成されなかったが、これは培養中に形質分離が起らなかったことを意味するので、少なくともこの期間内は遺伝的に安定であると考えられた。

上記の結果を総合して、線形加速器を用いて得られたセルラーゼ高生産株、*T. reesei* QM9414株のセルラーゼ生産性も増殖性と同様に改変可能であると結論した。さらに、その改変の幅ないし可能性について、薬剤処理で得られたセルラーゼ高生産株、*T. reesei* RUT C-30株との比較に関心が持たれた。

要 旨

線形加速器を用いて得られたセルロース分解性糸状菌、*Trichoderma reesei* QM 9414株において、高増殖力と高セルロース分解力の双方を保持する株の構築と分離を試みた。目的株はコルヒチン処理した膨潤分生子の中から重層選択培地を用いて選択された。選択基質濃度が2.0% (w/v) の場合、高増殖力と高セルロース分解力の双方の特性を保持する株を選択することができた。

引用文献

- 1) Seidl, V., Seibel, C., Kubicek, C.K. and Schmoll, M. (2009) Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106** (33): 13909-13914.
- 2) Shrestha, P., Khanal, S.K., Pometto, A.L. 3rd., Hans van Leeuwen, J. (2010) Ethanol production via in situ fungal saccharification and fermentation of mild alkali and steam pretreated corn fibre. *Bioresour. Technol.* **101** (22): 8698-8705.
- 3) Cianchetta, S., Galletti, S., Burzi, P.L. and Cerato, C. (2010) A novel microplate-based screening strategy to assess the cellulolytic potential of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng.* **107** (3): 461-468.
- 4) Duff, S. J., Cooper, D. G. and Fuller, O. M. (1985) Effect of colloidal materials on cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut-C30. *Appl. Environ. Microbiol.* **49** (4): 934-938.
- 5) Reese, E. T. (1976) History of the cellulase program at the U.S. army Natick Development Center. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* (6): 9-20.
- 6) Toyama, H. and Toyama, N. (2008) Rapid isolation of the *Trichoderma* strain with higher degrading ability of a filter paper and superior proliferation characteristics

- using Avicel plates and the double-layer selection medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **145** (1-3): 23-28.
- 7) Mandels, M. and Sternberg, D. (1976), Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.* **54**, 267-286.
- 8) Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- 9) Reese, E. T. and Mandels, M. (1980) Stability of the cellulase of *Trichoderma reesei* under use conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **22** (2): 323-335.