

研究ノート

セルロース分解性糸状菌 *Trichoderma reesei* QM9414 における
低温倍数化処理による微結晶セルロース分解力の向上

外山英男

発酵利用学研究室

2011年10月13日受付; 2012年1月26日受理

Enhancement of micro-crystalline cellulose degrading ability by
autopolyploidization under lower temperature conditions in the
cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* QM9414

Hideo Toyama

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

Received October 13, 2011; Accepted January 26, 2012

When the mycelial mat of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* QM 9414 was autopolyploidized under lower temperature conditions, most nuclei were autopolyploidized without collapse of autopolyploid nuclei in the mycelia. The strains with higher degrading ability of micro-crystalline cellulose could be selected using the double-layer selection medium containing micro-crystalline cellulose out of the conidia generated on such treated-mycelia. When those selected strains were incubated on the solid medium containing micro-crystalline cellulose at 26°C followed by heating at 50°C, the solid medium (white) became semi-transparent. These phenomena were not seen in the original strain.

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

緒言

セルロース分解性糸状菌, トリコデルマは食品加工や繊維処理用の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⁾.

しかし, 酵素を用いた加工におけるボトルネックの一つは酵素が高価であることが挙げられ, そのためセルラーゼの生産性を向上させる研究が広くなされている²⁾.

著者は, これまでにトリコデルマの同質倍数体の構築法や高増殖株の選択法の開発を行い, それらの手法を用いて *T. reesei* RUT C-30 株や *T. reesei* QM9414 株の増殖力やセルロース分解力を向上させることに成功した³⁻⁶⁾. 今回は米国 Natick 研究所が開発したセルラーゼ高生産株, *T. reesei* QM9414 株の微結晶セルロース分解力に着

目し, これをさらに増大させることを試みた⁷⁾.

方法

菌株と培地

この実験にはモデル株として *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°C で培養し, 4°C で保存した. 倍数化用培地として, 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 (pH7.0).

選択用分生子調製用培地としては, 1.0% (w/v) 微結晶セルロース, 1.5% (w/v) 寒天, 0.5% (w/v) 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 (pH5.0)。

選択培地として、2.0 g 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), 2.0 g 寒天 (BD), 0.5 g ペプトン (BD), 0.1 ml 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。微結晶セルロース分解力評価用培地としては、1.0% 微結晶セルロース, 1.5% 寒天, 0.5% ペプトン, 0.1% Triton X-100 を含むマンデルス培地を使用した (pH5.0)。酵素生産用液体培地としては、100ml 三角フラスコに 0.5g 微結晶セルロースと 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。遺伝安定性試験用培地としては、PDA 培地を使用した。

低温倍数化法

PDA 培地上に菌体を 2 mm 四方置いて 26℃で 7 日間培養してコロニーを形成させ、コロニー上の分生子を除去後、5 mm × 10 mm の大きさの菌体を切り取り、倍数化用培地に加え、8℃で 14 日間静置した。

選択用分生子の調製

選択用分生子調製用培地上に、低温倍数化処理した菌体 2mm 四方を置いて 26℃で 10 日間培養して緑色成熟分生子を着生させた。分生子は滅菌蒸留水中に懸濁し、ガラスフィルター 3G-3 でろ過して菌糸を除去後、遠心分離 (5510 xg) を行って分生子を収集し、この分生子を選択に使用した。

選択法

低温倍数化処理菌体由来の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。

固体培地上での微結晶セルロース分解力評価法

菌体 2 mm 四方を微結晶セルロース分解力評価用培地上に載せ 26℃で 10 日間培養した。次に、培地を恒温培養器中で 50℃で 48 時間加熱し、培地中の微結晶セルロースの分解の有無を観察した。

酵素活性測定法

0.5 g のアビセル, CMC-Na, あるいはサリシンを 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 50 ml に加えて基質として使用した。酵素液 2 ml と基質 4 ml を試験管に加え、45 度に傾けて 50℃で往復振盪機 (125 stroke/min) を用いて 1 時間反応させた。アビセル懸濁液を加えた試験管は 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。還元糖量より培養液 1ml あたりの酵素活性を算出し、1IU 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。液体培養中に培地中に生成したタンパクの定量はプロテインアッセイラピッドキットワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて行った。菌体重量は、菌体をアルミカップに乗せて 80℃で 24 時間乾燥後、秤量して算出した。

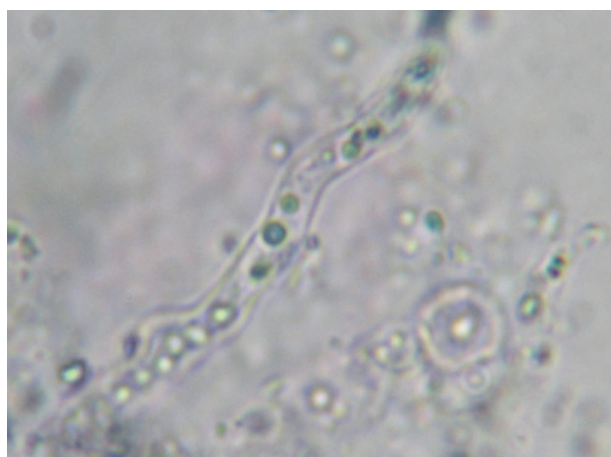


図1. 低温倍数化処理前後の菌体中の核状況

上: 低温倍数化処理前, 下: 低温倍数化処理後 菌体中の核はギームザ染色液で染色した。

核染色法

菌体 2 mm 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、顕微鏡観察を行ない顕微鏡写真撮影も行った。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

低温倍数化

T. reesei QM 9414 株の菌体を倍数化用培地に加え、8℃で 14 日間静置培養し、ゆっくりと倍数化を行った。培養後、図1に示すように、菌体を核染色すると大型の核、すなわち倍数核が多数存在しているのが確認できた。

選択

低温倍数化処理菌体由来の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。培養 5 日目から選択培地上層表面にコロニーが出現し、

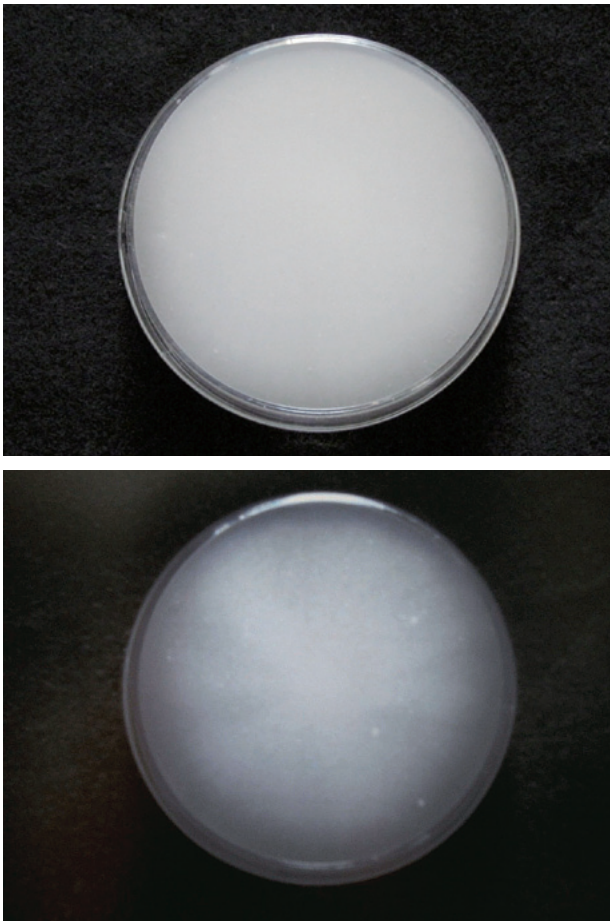


図2. 菌体を培養した微結晶セルロース含有培地を 50°C で加熱した際の培地中の微結晶セルロースの分解状況

上: 元株, 下: 6 株 元株と 6 株の菌体を微結晶セルロース含有培地上で 26°C, 10 日間培養後, 50°C で 48 時間加熱し, 培地中の微結晶セルロースの分解状況を観察した。

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、直径が大きいものを 9 個分離し、それらを 1 株から 9 株と呼ぶことにした。これらの株は PDA 培地上で培養後、保存した。

固体培地上でのセルロース分解力評価

元株と 1～9 株の菌体 2 mm 四方を評価用寒天培地上に置き、26°C で 10 日間培養後、培地を 50°C で 48 時間加熱した。加熱後、図 2 の元株と 6 株のように、どの選択株でも寒天培地中の微結晶セルロースが分解されて半透明化したが、元株ではそのような結果は得られなかった。培地の半透明化度が最も高かった 6 株をその後の実験に使用した。

酵素活性と生成タンパク量測定

元株ないし 6 株の菌体 3mm 四方を酵素生産用液体培地に加え、26°C で 7 日間回転振盪培養 (160 rpm) 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。酵素液のセルロース分解活性、生成タンパク量それに生成菌体量を測定した。その結果、

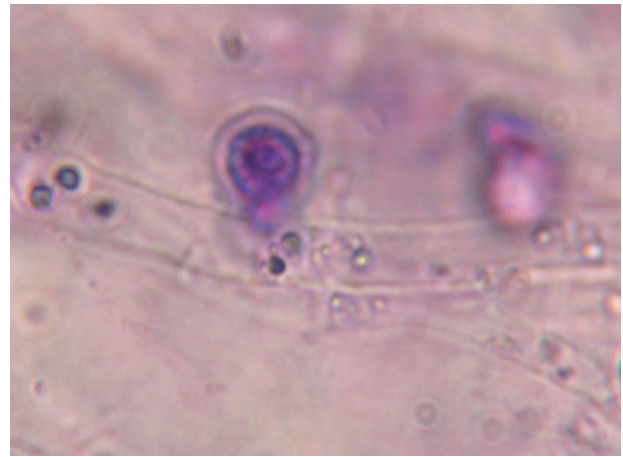


図3. 6 株の菌体中の核状況
菌体中の核はギムザ染色液で染色した。

表1. セルロース加水分解活性測定結果

6 株	Avicel	CMC-Na	Salicin (IU/ml)
4 日目	54	145	23
5 日目	107	146	29
6 日目	113	137	44
7 日目	117	139	47
QM9414 株	Avicel	CMC-Na	Salicin (IU/ml)
4 日目	27	66	3
5 日目	84	142	18
6 日目	75	139	22
7 日目	69	125	20

菌体を 26°C で 4-7 日間回転振盪培養し、ろ液中の酵素活性を測定した。還元糖定量には DNS 法を使用した。

表2. 生成タンパク量と生成菌体量の定量結果

6 株	生成タンパク量 (μg/ml)	生成菌体量 (mg)
4 日目	217	430
5 日目	329	409
6 日目	322	363
7 日目	273	346
QM9414 株	生成タンパク量 (μg/ml)	生成菌体量 (mg)
4 日目	126	281
5 日目	175	239
6 日目	217	265
7 日目	147	245

菌体を 26°C で 4-7 日間回転振盪培養し、ろ液中の生成タンパク量を Protein Assay Rapid Kit Wako (和光) で定量した。生成菌体量は、アルミカップに菌体を入れ、80°C で 24 時間乾燥後、秤量して算出した。

表 1 と表 2 に示すように、6 株の培養液 1ml あたりの各酵素活性は他の株よりも向上しており、生成タンパク量も増加していた。

遺伝状況観察

6株の菌体を核染色して核状況を観察した。その結果、図3に示すように、6株の菌体中には元株の核より直径の大きな核、すなわち倍数核が存在し、微小核は見られなかった。

遺伝安定性試験

元株と6株の菌体2mm四方を遺伝安定性試験用培地上に置き、26℃で4週間培養して扇状セクターの形成の有無を観察したが、扇状セクターの形成は見られなかった。

考察

まず、低温で倍数化する意義について検討した。これまでの文献に示すように、26℃で倍数化処理を行うと、微小核の形成が起こる。これは倍数核の崩壊によると考えられ、これに分裂速度が関与していると推測した。そこで、核分裂が緩慢となる低温下で倍数化処理を行うと、倍数核の崩壊が抑制され、その結果、微小核の形成も抑制されると仮定して実験を行ったが、結果は仮定を裏付けるものであった。すなわち、核分裂が緩慢となる低温下で倍数化処理を行うと、倍数核の崩壊を抑制でき、その結果、微小核は見られず、菌体中のほとんどの核が倍数核となったと考えられた。

次に、6株が微結晶セルロース含有培地を半透明化した理由について検討を行った。トリコデルマセルラーゼの至適温度は50℃前後と報告されている。この温度で加熱すると、培地中に集積したセルラーゼは培地中の微結晶セルロースと反応して、これを分解し、白色であった微結晶セルロース含有培地を半透明化すると考えられる。6株の場合には、微結晶セルロース含有培地を半透明化させるに足る量のセルラーゼが生産されていたが、元株の場合にはそれだけのセルラーゼは生産されていなかったと考えられた。

最後に、6株の遺伝状況について検討した。6株の菌体中の核の大半を倍数核が占め、微小核はほとんど存在せず、倍数体の状態にあると考えられた。この遺伝状況による強勢効果や増殖性の向上により、セルラーゼ生産量が増大し、微結晶セルロース含有培地を半透明化したと考えられた。6株の酵素活性、生成タンパク量それに菌体量が元株よりも増大していたこともこの考えを裏付ける。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こ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、低温下で倍数化処理を行うと、セルラーゼ高生産株、*T. reesei* QM9414株の菌体中の核のほとんどを倍数化することが可能となり、その結果として、セルラーゼ生産量が増大すると結論した。

要旨

セルロース分解性糸状菌、*Trichoderma reesei* QM 9414株の菌体を低温下で倍数化すると、菌体中の核のほとんどが安定に倍数化された。この倍数化処理菌体由来の分生子の中から、微結晶セルロース含有重層選択培地で、微結晶セルロース分解力が向上した株を選択することができた。それらの選択株は微結晶セルロース含有寒天培地上で培養後、50℃で加熱すると、白色の微結晶セルロース含有寒天培地を半透明化した。このような現象は元株では見られなかった。

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**: 13909-13914.
- 2) Jiang, X., Geng, A., He, N. and Li, Q. (2011) New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. *J. Biosci. Bioeng.* **111**: 121-127.
- 3) Toyama, H. and Toyama, N. (1999) Construction of cellulase hyperproducing strains derived from polyploids of *Trichoderma reesei*. *Microbios.* **100**: 7-18.
- 4) Toyama, H., Yamagishi, N. and Toyama, N. (2002) Rapid selection system of strains with higher avicel degrading ability in a cellulolytic fungus, *Trichoderma*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98**: 257-263.
- 5) 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**: 23-28.
- 6) 外山英男 (2010) 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 南九大研報 **41A**: 85-89.
- 7) Reese, E. T. (1976) History of the cellulase program at the U.S. army Natick Development Center. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* (6) : 9-20.
- 8) Mandels, M. and Sternberg, D. (1976) Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.* **54**: 267-286.
- 9) Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.