

担子菌 *Irpex lacteus* のセルラーゼ遺伝子のクローニングとセルロース分解機構の解明

岡崎光雄、神田鷹久、下坂誠、林田信明、小平律子、濱田奈保子、布施直樹
信州大学繊維学部応用生物科学科、信州大学工学部物質工学科、信州大学遺伝子実験施設

1. 緒言

セルラーゼは様々な分野における重要な工業用酵素であるとともに、地球上最大のバイオマスであるセルロースを分解することが可能な酵素として、食糧問題及び環境問題の面からも注目されている。

一方セルラーゼの酵素学的研究は古くから行われ、その分解様式の違いから様々な説が提唱されてきたが、現在では“エンドーエキソ”説が主流となっている。セルラーゼは作用様式の異なる数種の酵素成分からなる複合酵素系を形成しており、その酵素系には主に3種のセルラーゼ成分、エンド型セルラーゼ [1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4.]、エキソ型セルラーゼ [1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91.]、 β -glucosidase [EC 3.2.1.21.] が存在し、これら3成分の相乗作用のもとにセルロースは最終的にグルコースにまで分解されると考えられている。

これまでに様々な生物種由来のセルラーゼの研究が行われ、セルロースを分解する微生物は非常に広く分布していることがわかっているが、我々が研究している *Irpex lacteus* のように結晶性セルロースを完全分解できる微生物は比較的限られている。*I. lacteus* は、担子菌門帽菌類サルノコシカケ目に属し、和名ウスバタケという (Fig. 1)。

2. 実験方法

I. lacteus の酵素製剤ドリセラーゼ (協和醗酵工業株式会社) より、エキソ型セルラーゼ (Ex-2) を精製し、以前に精製した Ex-1 と比較した。また、精製した Ex-1 と Ex-2 をプロテアーゼ V8 で分解し、それぞれの N 末端のアミノ酸配列を分析した。さらに、Ex-2 の遺伝子 (*cel2*) をクローニングして、その ORF より全アミノ酸配列を明らかにした。

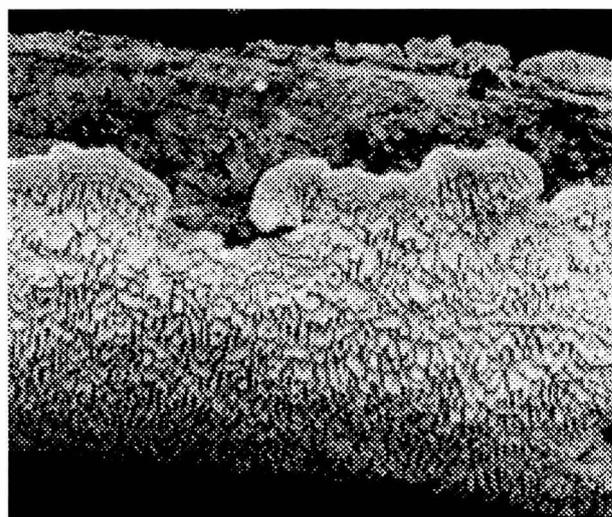


Fig. 1 Photograph of *Irpex lacteus*

3. 結果と考察

精製された Ex-2 と Ex-1 の性質 (分子量、糖含量、pH 安定性、pI) を比較したものを Table 1 に示す。Ex-2 の分子量が 56,000、糖含量が 4.0%、Ex-1 の分子量が 53,000、糖含量が 2.0% で両者は非常に良く似た性質を示したが、Ex-2 のほうが広範囲の pH 領域で安定性が高い、という違いが見られた。Ex-2 をコードしていると思われる遺伝子 (*cel2*) のアミノ酸配列と Ex-1 及び Ex-2 の部分アミノ酸配列とを比較したところ一致したことから、Ex-1 と Ex-2 は同一遺伝子 (*cel2*) 産物だが糖鎖が異なる酵素と推定された (Fig. 2)。

Fig. 3 に *cel2* 遺伝子と他種セルラーゼ遺伝子とのホモロジーの図を示す。このホモロジーから、Ex-1 及び Ex-2 は糖加水分解酵素ファミリー 7 に属することが示唆された。

Fig. 4 には *cel2* 遺伝子の構造模式図を示す。

Table 1 Comparison of enzymatic properties of Ex-2 and Ex-1.

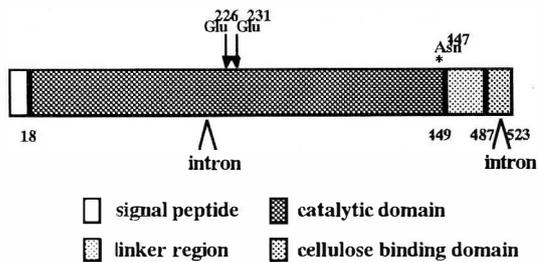
purified enzyme	Ex-2	Ex-1
Mw	56,000	53,000
Opt.pH ^{a)}	5.0	5.0
pH stability ^{a)}	3.0~9.0	3.0~7.0
	85%	70%
Opt.temp. ^{a)}	50°C	50°C
Temp. stability ^{a)}	<50°C	<50°C
	80%	80%
Sugar content	4.0%	2.0%
pl	4.8	4.5

a) Avicel was used as substrate.

I. lacteus CEL 2

11	SFLAIAHQGVQVSTVQAEHPSLPSKCTASGCTTSSTSVVLDANW	55
	Ex-1, Ex-2 (1) NQPSLPSQKXTAXG	
151	PCGLNGAVYLSQMDGGVSRPINTAGAKVGIYCDSDCPRDIK	195
	(2) EQXGGVSKFPTTAGAKYGT	
221	GTCCSEMJIWEANSVAAAYTTHCISVNOOTRCTSADCGGG	260
	(3) ANSVAAAYTPXPSVNGQT	
271	DGCDFNSFRMSDOTFLGKGLTVDTSRKFTVITVTFISDDGT	310
	(4) SDOTFLGKGLTVXT	
381	VLALS.WDHAANMLWLDSDYPTADASNPGVARGTCPTT	420
	(5) LWLXXDYPTXA	
441	IKWGDLNSTFTGLTTPSGSSSPSS	465
	N-glycosylation site	

Fig. 2 Comparison of amino acid sequence deduced from *cel2* gene with the partial amino acid sequence determined from the purified Ex-1 and Ex-2



Two Glu residues in catalytic center are marked by arrows. * indicates a putative N-glycosylation site.

Fig. 4 Schematic representation of the deduced Ex-2 protein

1	W-----FRKAALIAFSFLAIHREGQ/GTMAENHPSLPSDKCTKSGCTTSSTSVVLDANW	55
1	W-----FRATLLAFTMAAMVREGQ/GTMAENHPTLTSKCTKSGCSNLNLCVLDANW	56
1	W-----FRRSILIA-LSLTAVLREGQ/GTMAENHPSLTSKCTKSGCSNLNLCVLDANW	55
1	W-----VQSFSLYKTAALLS-MLATSNAGQ/GTMAENHPSLTSKCTKSGCTTSSTSVVLDANW	60
1	W-----YRKLAVLISAFVLAIRASGACHLQSEHPFLTWKGS33GCTTSSTSVVLDANW	55
56	RHWLITIGYING--TQTFDASICPDG/TCAKICALIGADYSTY--GIFSGNAITDFVKGIT-	116
57	RHWLIDSYTING--TQNFDAITCPDG/TCANICALIGADYSTY--GUTSSESKIDVKGIT-	117
56	RHWLINDFTING--TQNEIDTICPDG/TCANICALIGADYSTY--GVTSEETAIDKVIKESD	117
61	RHWLVGRYTING--SGNTVRSISGTD/TCASICALIGADYSTY--GVTSESSRHWVITAS	122
56	RHWLHWSSING--DGNHSSSTLCPDN/TCAKICALIGADYSTY--RVLISGNSISIGVIGA	117
117	NVGSRYVLQDASNYQIQLLI--VEFTDVDVSNLPGGLN34LVLSMDDDGGVSRPFTV	175
118	NVGSRYVLMADDIYQIQLLI--VEFTDVDVSNLPGGLN34LVLSMDA)GGMAKYPTV	176
118	NVGSRYVLMADDNYEILNILL--VEFTDVDVSNLPGGLN34LVF3EVA)GGMS--TV	176
123	NVGSRYVLMADDNYETKIF--VEFTDVDVSNLPGGLN34LVF/SMDA)GGVSRPFTV	183
118	NVGSRYVLMASDTTYQETILL--NEESDVDVSNLPGGLN34LVF/SMDA)GGVSRPFTV	178
176	TAGAXYGT3YCD33CPROIKFIVGEAN/EGWTSSTISNSGTGNV33CGSEMDIWEANSVAAAYT	240
177	TAGAXYGT3YCD33CPROIKFIVGEAN/EGWTS--ANAGTGNV33CGSEMDIWEANSVAAAYT	239
177	TAGAXYGT3YCD33CPROIKFIVGEAN/EGWESPNVYVAGTGNV33CGSEMDIWEANSVAAAYT	241
184	TAGAXYGT3YCD33CPROIKFIVGEAN/EGWEPSTISNSGTGNV33CGSEMDIWEANSVAAAYT	248
179	TAGAXYGT3YCD33CPROIKFIVGEAN/EGWEPSSNVANTG)GGH33CGSEMDIWEANSVAAAYT	243
241	PHPCVNDTRQTSADCGDGD--DRDGVCPDGDVFN33RMD)TFLRKG--TVDFSRKFT	299
240	PHPCVNDTRQTSADCGDGD--DRDGVCPDGDVFN33RMD)TFLRKG--TVDFSRKFT	294
242	PHPCVNDTRQTSADCGDGD--DRDGVCPDGDVFN33RMD)TFLRKG--TVDFSRKFT	299
249	PHPCVNDTRQTSADCGDGD--DRDGVCPDGDVFN33RMD)TFLRKG--TVDFSRKFT	311
244	PHPCVNDTRQTSADCGDGD--DRDGVCPDGDVFN33RMD)TFLRKG--TVDFSRKFT	306
300	VITQVTSDDGTTSNIAETRRFVCD33VIVNSVNSVAGIDA VNSITDFE)TQK)AFG)TAVF	364
295	VITQVTSDDGTTSNIAETRRFVCD33VIVNSVNSVAGIDA VNSITDFE)TQK)AFG)TAVF	359
300	VITQVTSDDGTTSNIAETRRFVCD33VIVNSVNSVAGIDA VNSITDFE)TQK)AFG)TAVF	364
312	VITQVTSDDGTTSNIAETRRFVCD33VIVNSVNSVAGIDA VNSITDFE)TQK)AFG)TAVF	375
307	VITQVTSDDGTTSNIAETRRFVCD33VIVNSVNSVAGIDA VNSITDFE)TQK)AFG)TAVF	361
365	AQGGIKQVGNALVSGWVLSWDDHANNMLWLD33VPLTADANVGVARGTCTP)TSG)PQDVE	428
360	QHGGIKQVGNALVSGWVLSWDDHANNMLWLD33VPLTADANVGVARGTCTP)TSG)PQDVE	423
365	DRGGISG)G)ALVSGWVLSWDDHANNMLWLD33VPLTADANVGVARGTCTP)TSG)PQDVE	428
376	THGGISG)G)ALVSGWVLSWDDHANNMLWLD33VPLTADANVGVARGTCTP)TSG)PQDVE	439
362	DKGGIKQVGNALVSGWVLSWDDHANNMLWLD33VPLTADANVGVARGTCTP)TSG)PQDVE	425
429	SQSGATVYYSN)K)GDLVST)F)G)LT)P)G)SS)SP)SS)PAST)GSS)E)ASS)ASVPT)QSG)-----	487
424	AQSP)AVY)YSN)K)GDLVST)F)G)LT)P)G)SS)SP)SS)PAST)GSS)E)ASS)ASVPT)QSG)-----	480
429	ANAG)YQV)YSN)K)GDLVST)F)G)LT)P)G)SS)SP)SS)PAST)GSS)E)ASS)ASVPT)QSG)-----	470
440	ANVP)SVY)YSN)K)GDLVST)F)G)LT)P)G)SS)SP)SS)PAST)GSS)E)ASS)ASVPT)QSG)-----	504
426	SQSP)AVY)YSN)K)GDLVST)F)G)LT)P)G)SS)SP)SS)PAST)GSS)E)ASS)ASVPT)QSG)-----	477
488	--IVAQALGGG)SYSGAT)GV)P)Y)C)VVA)V)SQ)Y	523
481	--IVAQALGGG)SYSGAT)GV)P)Y)C)VVA)V)SQ)Y	516
475	--AQM)GGG)SYSGAT)GV)P)Y)C)VVA)V)SQ)Y	506
501	N-VA)LYG)GGG)SYSGAT)GV)P)Y)C)VVA)V)SQ)Y	540
478	--IQSHY)GGG)SYSGAT)GV)P)Y)C)VVA)V)SQ)Y	513

Fig. 3 Comparison of amino acid sequences of *I. lacteus* Ex-2, with CBHs from *P. chrysosporium*, *A. aculeatus* and *T. reesei*.

4. 結論

I. lacteus は結晶性セルロースを完全分解できる数少ない微生物の1つである。この *I. lacteus* からつくられたセルラーゼ酵素製剤より精製した Ex-2 をコードする遺伝子 *cel2* を解析した結果、*cel2* は Ex-2 だけでなく、Ex-1 をもコードする遺伝子であることが Ex-1 の部分アミノ酸配列の決定により明らかになった。

また、*cel2* 遺伝子は他種生物由来セルラーゼとのホモロジーから糖加水分解酵素ファミリー7 に属することが示唆された。*cel2* 遺伝子の構造は他種エキソ型セルラーゼによく見られる3つの構造 (catalytic domain, linker region, cellulose binding domain) から成ることが明らかになった。