

Corticium rolfii セロビオハイドロラーゼ遺伝子のクローニング (第一報)

八十川大輔 佐藤香織* 中川良二 池田隆幸 長島浩二

Cloning of a Gene Coding for Cellobiohydrolase from *Corticium rolfii* (Part I)

Daisuke YASOKAWA, Kaori SATOH, Ryoji NAKAGAWA, Takayuki IKEDA and Koji NAGASHIMA

To detect and clone a cellobiohydrolase (CBH) gene of *Corticium rolfii*, synthetic oligonucleotide primers were designed on the basis of the homology among known CBH fungi genes and submitted to a Polymerase Chain Reaction (PCR). The PCR amplified a DNA fragment of about 210 base pairs which was then cloned and sequenced.

The nucleotide sequence (215 base pairs long) exhibited high homology to the CBH genes of the subject fungi and contained a putative intron sequence. The amino acid sequence deduced from the PCR product showed about 60% homology to the CBH of the subject fungi. When a carefully controlled genomic southern hybridization of *C. rolfii* was performed using the PCR product as a probe, one or two bands were detected.

酵素は反応条件が穏和で、エネルギー投入量が少なく副生成物の除去等の煩雑な行程を低減できる有用な加工手段である。また、「バイオ云々」と呼ばれる分野での切り札的存在であり、更にその重要性を増しつつある。食品加工の分野でも高付加価値化、高品質化の目的で使用されている事例が多いが、酵素製剤自体の価格が高くコストの上昇を招くことが多い。

遺伝子組換えでは、宿主細胞に目的とする酵素遺伝子を大量に導入し、且つその転写頻度を上昇させることにより、生産性を飛躍的に上昇させることが可能である。また適切な宿主細胞を選択することにより酵素の精製ステップを簡素化し、生産コストを下げることも可能である。

筆者らは、食品加工分野でのセルラーゼの幅広い利用を目指し、今までに強力なグルコアミラーゼ生産菌として知られている担子菌 *C. rolfii* の生産するセルラーゼ及びグルカナナーゼの精製を行いその性質の一部を明らかにしてきた。この報告では、既知セロビオハイドロラーゼ (CBH) 遺伝子間で保存性の高い領域からプライマー

を設計し、本菌のゲノム DNA を鋳型として polymerase chain reaction (PCR) を行った。増幅産物の塩基配列を決定するとともに、他菌株 CBH とのアミノ酸配列レベルでの相同性を検討した。

実験方法

1. 供試菌とその培養

実験に使用したセルラーゼ生産菌株は *Corticium rolfii* AHU 9627 (北海道大学農学部応用菌学講座より分与) である。形質転換の際の宿主菌には *Escherichia coli* XL-1 Blue 株を使用した。*C. rolfii* の培養はポテト・デキストロース培地 (Difco Laboratories) を使用し、30°C, 150 rpm で5日間培養した。

2. DNA の調製

培養後の菌体を遠心分離により回収し、ガーゼに包んで 0.5% NaCl 溶液で菌体を洗浄した。凍結乾燥後、菌体 1g を乳鉢ですり潰し 18 ml の抽出バッファー (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 3.3% SDS) に懸濁した。30分間室温で攪拌後、フェノールクロロホルム-イソ

* 酪農学園大学酪農学部食品科学科応用微生物学研究室
現(株)パイオニアフーズ (〒044-01 虻田郡京極町字京極 138-1)

アミルアルコール (25:24:1) 18 ml を加え 10 分間穏やかに混和した。3 M 酢酸カリウム (pH 5.2) を 1.8 ml 加え、更に 30 分間攪拌した。10,000 rpm, 15 分間, 4°C で遠心し、上清再度フェノールクロロホルム-イソアミルアルコールで抽出し、同様に遠心した。上清に等量のイソプロパノールを加えて 10 分間静置し、DNA をガラス棒で巻き取り、70%エタノールで洗浄した。エタノールを除去して 3~4 分間風乾後、TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 5 ml に溶解した。

RNase A を最終濃度 10 µg/µl となるように加え、37°C, 1 時間加温して RNA を分解後、SDS を最終濃度 0.5%, Proteinase K を 100 µg/ml となるように加え、37°C, 1 時間加温した。NaCl と CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide) をそれぞれ最終濃度 0.7 M, 及び 1% となるように加え、65°C で 10 分間加温した。等量のクロロホルムを加えて穏やかに混和後、15,000 rpm, 5 分間、室温で遠心した。上清をフェノールクロロホルム-イソアミルアルコール抽出し、エタノール沈殿を行い、70%エタノールで洗浄後、3~4 分間風乾して TE バッファー 1 ml に溶解した。

3. PCR (Polymerase Chain Reaction) 反応

プライマーの合成は固相化学合成法 (β シアノエチルアミダイド法) により行った。PCR 反応は定法¹⁾に従い、変性は 93°C, 1 分, アニーリングは 37, 42, または 50°C, 2 分, 伸長反応は 72°C, 2 分で 30 サイクル行った。

4. 塩基配列の決定

塩基配列は ABI 社の Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit を用い、ABI 373 A DNA シーケンサーにより決定した。遺伝子の解析は紳帝人システムテクノロジーの GeneWorks Release 2.0 を用いて行った。

5. サザンハイブリダイゼーション

Boehringer Mannheim 社の DIG DNA Labeling Kit を用いてプローブの標識を行い、定法¹⁾に従ってハイブリダイゼーションを行った。シグナルの検出は Boehringer Mannheim 社の DIG Luminescent Detection Kit を用いて行った。

結果および考察

1. CBH 遺伝子断片のクローニング

CBH 遺伝子のクローニングを行うため、GeneWorks Release 2.0 ソフトウェアを使って既知糸状菌 CBH 遺伝子間でホモロジーの高い配列を見だし (Fig.1), GECBHF-1 (20 mer), GECBHF-2 (20 mer), GECBHR

-1 (20 mer), GECBDF-1 (15 mer), 及び GECBDR-1 (15 mer) 5 種類のプライマーを合成した (Fig.2)。プライマーの組み合わせは GECBHF-1/GECBHR-1, GECBHF-2/GECBHR-1, GECBDF-1/GECBDR-1 の 3 通りとし、どの組み合わせもアニーリング温度を 37°C, 42°C, 及び 50°C の 3 通りに設定し、*C. rolfii* のゲノム DNA をテンプレートとして PCR を行った。その結果を Fig.3 に示した。上記 3 組のプライマーにより合成される目的の PCR 産物の大きさを *Trichoderma viride* CBH 遺伝子から推定すると、プライマー-GECBHF-1/GECBHR-1 で 177 bp, GECBHF-2/GECBHR-1 で 168 bp, GECBDF-1/GECBDR-1 で 96 bp となる。

プライマー-GECBHF-1/GECBHR-1 (レーン 2; 37°C, 3; 42°C, 及び 4; 50°C) では 37°C と 42°C とで約 230 bp のバンドが検出されたが (レーン 2 及び 3), 50°C では明瞭なバンドは検出されなかった (レーン 4)。プライマー-GECBHF-2/GECBHR-1 (レーン 5, 6, 及び 7) では全アニーリング温度で約 160 bp, 約 210 bp のバンドが検出され、37°C, 42°C で更に約 270 bp のバンドが検出された。プライマー-GECBDF-1/GECBDR-1 (レーン 8, 9, 及び 10) では多くの増幅産物が検出された。

これらのことを考えあわせて、アニーリング条件の厳しい 50°C で明瞭なバンドが検出され、かつ予想される大きさに近いレーン 7 の約 210 bp のバンドが CBH 遺伝子である可能性が最も高いと判断し、電気泳動後 GENE CLEAN II kit (Bio 101 社) を用いて DNA を回収した。

回収した DNA 断片をベクター-pCRII (Invitrogen 社) に連結し、このプラスミドで大腸菌 XL-1 Blue 株を形質転換した。アンピシリン耐性コロニーからランダムに 6 個選択し、それぞれプラスミドを調製した。これらのプラスミドを *EcoRI* で切断し、6 個中 4 個に予想される大きさのインサートを確認した (データ省略)。これらプラスミドを pCG 1, pCG 2, pCG 3, 及び pCG 4 と命名し、そのインサートの塩基配列を決定した。

2. 塩基配列の決定

塩基配列は ABI 社の Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて、dideoxy 法 (サンガー法) により決定した²⁾。その結果、上記 4 種のプラスミド中の PCR 産物の塩基配列は同一であったので、この塩基配列を *Humicola grisea*, *Trichoderma viride*, *Penicillium janthinellum*, 及び *Phanerochaete chrysosporium* の塩基配列と比較したところ高い相同性を示した (Fig. 4)。またこの配列には他の 4 つの糸状菌 CBH 遺伝子に

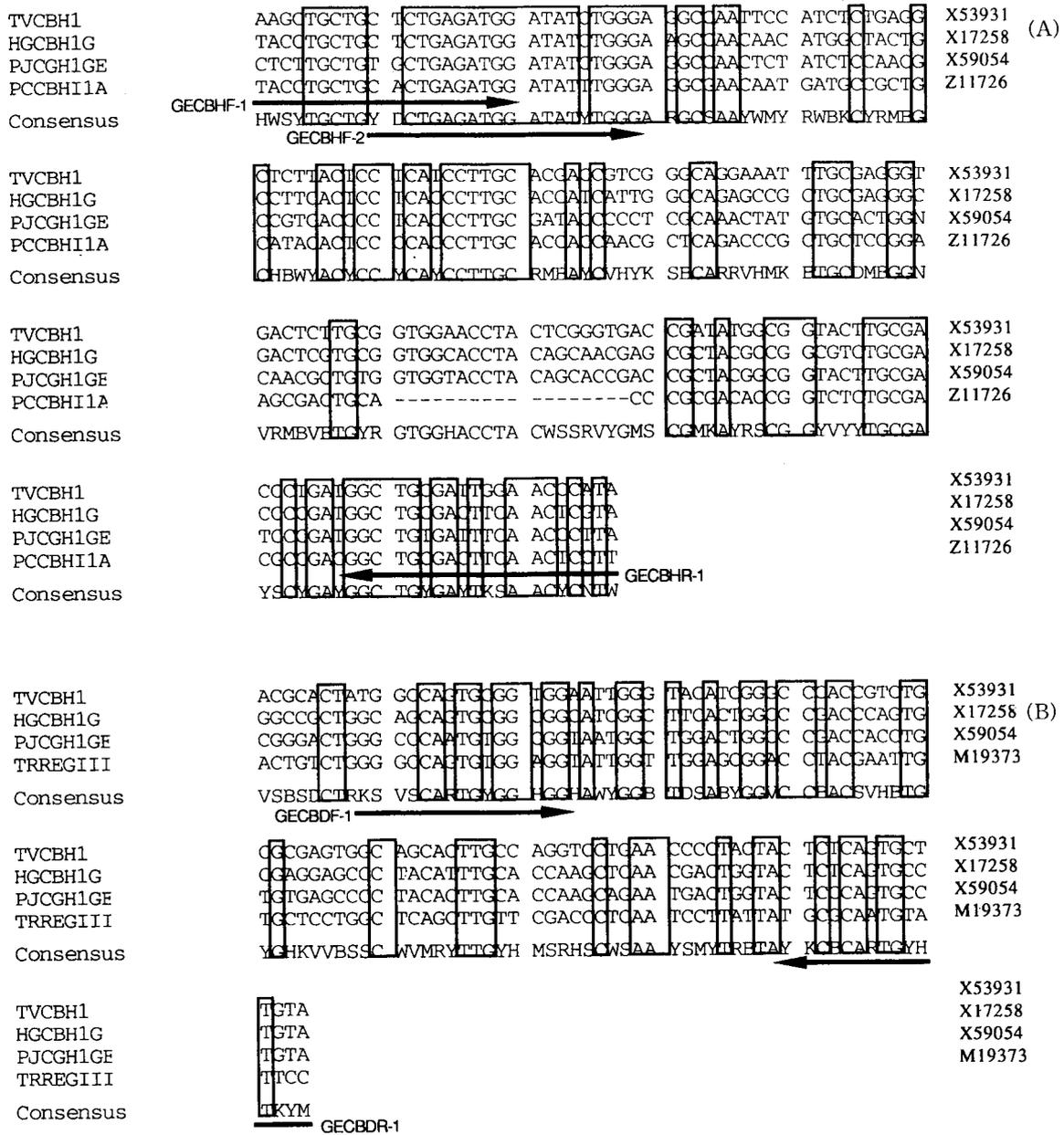


Fig.1 Nucleotide sequence alignment of known CBH genes of fungi

Shaded boxes indicate conserved nucleotides. Arrows represent regions used for the design of oligonucleotide primers. Panel (A) shows GECBHF-1, GECBHF-2, and GECBHR-1. Panel (B) shows GECBDF-1 and GECBDR-1. TVCBH, HGCBH, PJCGH, and PCCBH represent the CBH genes of *Trichoderma viride* (X53931), *Humicola grisea* (X17258), *Penicillium janthinellum* (X59054), and *Phanerochaete chrysosporium* (Z11726), respectively, while TRREG represents *Trichoderma reesei* endoglucanase (M19373).

1. GECBDF-1 15mer
5'-GGG (C/G) CAGTG (C/T) GG (C/T) GG
2. GECBDR-1 15mer
5'-TA (A/C) AIGCA (T/C) TGIGAG
3. GECBHF-1 20mer
5'-LACCTGCTGCICTGAGATGG
4. GECBHF-2 20mer
5'-CICTGAGATGGATATCTGGG
5. GECBHR-1 20mer
5'-TAIG (A/G) GTTGAA (A/G) TCGCAGCC

Fig. 2 Oligonucleotide primers used in PCR experiments

These primers were designed based on the conserved sequences shown in Figure 1. "I" represents inosine. GECBDF-1, GECBDR-1, and GECBHR-1 are mixed primers.

ない 47 bp の配列が挿入されており、この挿入配列のすぐ上流と下流にイントロンのスプライシングサイトのコンセンサス配列³⁾。スプライシング供与部位のコンセンサス配列に非常に相同性の高い配列が存在することが判明し (C or A) AGGT (A or G) AGT に対して ATCGTAAAT (第 94 塩基から第 102 塩基に相当)、スプライシング受容部位のコンセンサス配列 (T or C) ≥ 1 N (C or T) AGG に対して TCTCCTAGG (第 142 塩基から第 150 塩基に相当) の配列が存在していた。またイントロンを仮定しない場合、どの読み枠にも終止コドンが出現することから第 97 塩基の G から第 149 塩基の G までの配列をイントロンと推定した。

3. アミノ酸配列のホモロジー

上記推定イントロンをスプライスした後のアミノ酸配列と既知 CBH アミノ酸配列との間でホモロジーの検討を行った (Fig. 5)。第 16 残基目のスレオニン (T) から第 20 残基目のシステイン (C) までのアミノ酸配列は 5 者間で完全に一致していた。また、タンパク質の二次構造の保持に重要であると考えられるシステインが 4 つとも 5 者間で良く保存されていたことは特筆すべきことである。スプライス後の推定アミノ酸配列は 53 アミノ酸残基で、推定イントロン配列は第 33 アミノ酸のシステインの前に存在していた。

更に、化学的類似性アミノ酸を考慮に入れてホモロジーを検討し、これらの結果を Table 1 にまとめた。同一アミノ酸でのホモロジーは平均でも約 60% と高く、化学的類似性アミノ酸も含めると平均 75% と、より高い値が得られた。また、特に *H. grisea* とは 82% という高いホ

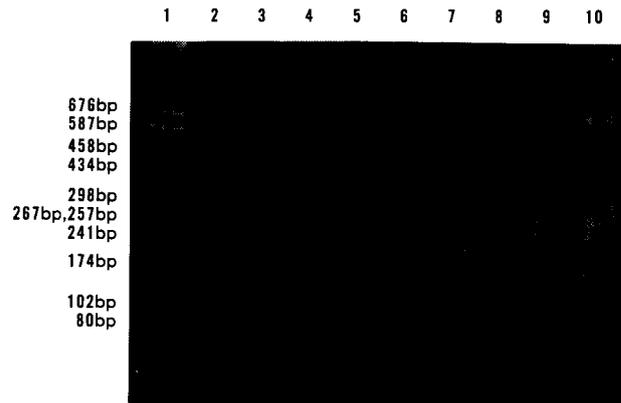


Fig. 3 Gel electrophoresis of PCR products

The PCR products were amplified with GECBHF-1/GECBHR-1 (lanes 2 to 4), GECBHF-2/GECBHR-1 (lanes 5 to 7), and GECBDF-1/GECBDR-1 (lanes 8 to 10) at annealing temperatures of 37°C (lanes 2, 5, and 8), 42°C (lanes 3, 6, and 9), and 50°C (lanes 4, 7, and 10). These products were then electrophoresed together with a molecular weight marker (lane 1) through a 3% NuSieve agarose gel.

モロジーが認められた。これらのことから我々がクローニングした DNA は *C. rolfii* の CBH 遺伝子である可能性が強く示唆された。

4. サザンハイブリダイゼーション

PCR 産物と既知 CBH 遺伝子に非常に高いホモロジーが認められたので、*C. rolfii* CBH 遺伝子の全長を取得する目的で、PCR 産物を DNA プローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。ジゴキシゲニンで標識した PCR 産物をプローブとして、DIG Luminescent Detection Kit により発光検出を行った。その結果を Fig. 6 に示した。*EcoRI* で切断したゲノム DNA では約 0.66 kbp, *HindIII* では約 0.84 kbp, *BamHI* では約 2.4 kbp, *PstI* では約 6.8 kbp, さらに *SalI* 切断では約 9.8 kbp と約 19.5 kbp の同強度の 2 本のシグナルが検出された。プローブ配列中に *SalI* 認識切断配列が無いことから、1 ゲノム中に CBH 遺伝子が 2 コピー以上存在するか、父方と母方由来の染色体 DNA に塩基配列の違いがある可能性が示唆された。

要 約

既知糸状菌 CBH 遺伝子間で保存性の高い塩基配列を基にプライマーを合成し、これを用いて *C. rolfii* のゲノム DNA をテンプレートとした PCR を行い約 210 bp の増幅産物を取得した。この増幅 DNA 断片の塩基配列を決定したところ、全長 215 bp であり、既知糸状菌 CBH

Consensus	HWSYTGCTGY	DCTGAGATGG	ATATTTGGGA	CGCAAAYWMB	DWBKCYRMEG	50
		GECBHF-2				
CRCBH1 PCR	-----C	GCTGAGATGG	ATATTTGGGA	CGCAAACAAG	TACGCCGCTG	41
HGCBH1G	TACCTGCTGC	TCTGAGATGG	ATATTTGGGA	CGCAAACAAC	ATGGCTACTG	50
TVCBH1	AAGCTGCTGC	TCTGAGATGG	ATATTTGGGA	CGCAAATTC	ATCTCTGAGG	50
PJCGH1GE	CTCTTGCTGT	GCTGAGATGG	ATATTTGGGA	CGCAAACCTCT	ATCTCCAACG	50
PCCBH1A	TACCTGCTGC	ACTGAGATGG	ATATTTGGGA	CGCAAACAAT	GATGCCGCTG	50
Consensus	CHBWYACACC	MCAMCCTTGC	RVBRYYNHYK	SECARRVHMK	ETGCDMEGGN	100
CRCBH1 PCR	CCTACACTCC	TCAACCTTGC	AGCGTTTCTG	GCCAGACCCG	CTGCACTGGC	91
HGCBH1G	CCTTCACTCC	TCAACCTTGC	ACCATCATTTG	GCCAGAGCCG	CTGCCGAGGC	100
TVCBH1	CTPTTACTCC	TCAACCTTGC	ACGACCGTCG	GCCAGGAAT	TTCGAGGGT	100
PJCGH1GE	CCGTCACTCC	TCAACCTTGC	GATACCCCT	CCAAACTAT	CTGCACTGGN	100
PCCBH1A	CATACACTCC	TCAACCTTGC	ACCACCAACG	CTCAGACCCG	CTGCTCCGCA	100
Consensus	VVMBVETRHA	TTGTAGCATC	ATCATCAAGT	ATCGAGAGTA	GATTTTAACG	150
CRCBH1 PCR	ACATCCATAA	TTGTAGCATC	ATCATCAAGT	ATCGAGAGTA	GATTTTAACG	141
HGCBH1G	GACTCGTGC-	-----	-----	-----	-----	109
TVCBH1	GACTCTTGC-	-----	-----	-----	-----	109
PJCGH1GE	CAACGCTGT-	-----	-----	-----	-----	109
PCCBH1A	AGCGACTGC-	-----	-----	-----	-----	109
Consensus	TCTCCTRGKK	GHRSCMCDSD	SDVBRMSCGM	KAYRVYGGYN	HYTGCGAYVM	200
CRCBH1 PCR	TCTCCTAGGT	GCGGCGCCGG	CTCGGAGCCG	TACGATGGCT	ACTGCGACAA	191
HGCBH1G	-----GGTG	GCACCTACAG	CAACGAGCCG	TACGCCGGCG	TCTGCGACCC	153
TVCBH1	-----GGTG	GAACCTACTC	GGGTGACCGA	TATGGCGGTA	CTTGCGACCC	153
PJCGH1GE	-----GGTG	GTACCTACAG	CACCGACCCG	TACGGCGGTA	CTTGCGATCC	153
PCCBH1A	-----	-----	----ACCCG	GACACCGGTC	TCTGCGACG	135
Consensus	EGAYGGCTSY	GAMTKSAACY	CNTW			224
		GECBHR-1				
CRCBH1 PCR	CGATGGCTCC	GACTTCAACC	CGTA			215
HGCBH1G	CGATGGCTGC	GACTTCAACT	CGTA			177
TVCBH1	TGATGGCTGC	GACTTCAACC	CGTA			177
PJCGH1GE	CGATGGCTGT	GACTTCAACC	CGTA			177
PCCBH1A	CGACGGCTGC	GACTTCAACT	CGTA			159

Fig.4 Alignment of the nucleotide sequences of the PCR product and of the fungal CBH genes

The nucleotide sequence of the PCR product (CRCBH) was aligned with the sequences of the CBH genes of *T. viride* (TVCBH), *H. grisea* (HGCBH), *P. janthinellum* (PJCBH), and *P. chrysosporium* (PCCBH). Shaded boxes indicate conserved nucleotides. The arrows above the CRCBH sequence represent primers of GECBHF-2 and GECBHR-1. Arrowheads indicate exon-intron junctions.

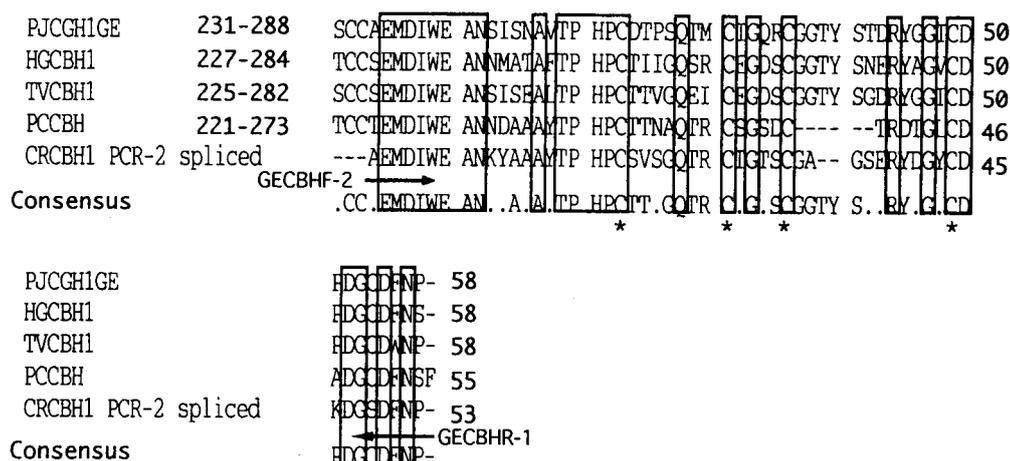


Fig.5 Deduced amino acid sequence homology of the PCR product and of the fungal CBH genes
The amino acid sequence of the PCR product (CRCBH1 PCR-2 spliced) was deduced from the spliced nucleotide sequence. Boxes indicate identical amino acids. Asterisks denote conserved cysteine residues. Small bars indicate gaps. Refer to Figure 1 for the abbreviations key.

Table 1 Percent homology of predicted amino acid sequence of the PCR product to these of fungal CBHs

	<i>P. janthinellum</i>	<i>H. grisea</i>	<i>T. viride</i>	<i>P. chrysosporium</i>	(%)
Identical	60	62	56	60	
Chemically similar	76	82	75	69	

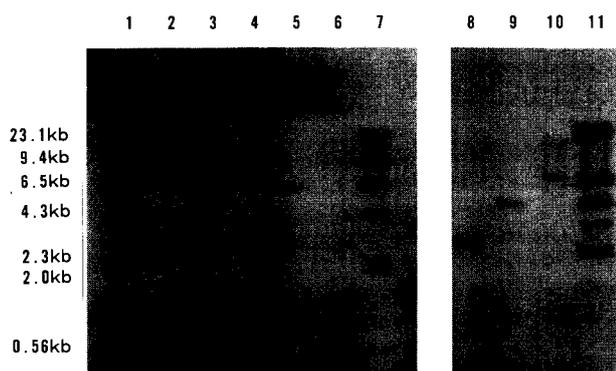


Fig.6 Southern hybridization analysis of genomic DNA of *C. rolfii*

About 4 μ g of genomic DNA of *C. rolfii* was digested with several restricting enzymes and electrophoresed on a 0.7% agarose gel (left panel) or on a 0.3% agarose gel (right panel). The DNA was then transferred to nylon membrane filter sheets and hybridized with the digoxigenin-labeled *Eco*RI fragment of pCG3. The restriction enzymes used were *Eco*RI (lane 2), *Hind*III (lane 3), *Bam*HI (lanes 4 and 8), *Pst*I (lanes 5 and 9), and *Sal*I (lanes 6 and 10). Digoxigen-labeled *Hind*III-digested λ DNA was used as size markers (lanes 1, 7, and 11). The hybridization signals were detected with the DIG Luminescent Detection Kit.

遺伝子と高いホモロジーが認められた。塩基配列中にはイントロンと推定される配列が含まれていた。推定イントロンを除いて演繹されたPCR産物の推定アミノ酸配列も既知糸状菌CBHと高いホモロジーを示し、化学的類似性を持つアミノ酸を含めたホモロジーでは、69~82%と更に高い値を示した。

このPCR産物をプローブとして *C. rolfii* 染色体DNAのサザンハイブリダイゼーションを行った結果、ゲノムDNAの *Eco*RI切断で約0.66 kbp, *Hind*IIIで約0.84 kbp, *Bam*HIで約2.4 kbp, 及び *Pst*I切断で約6.8 kbpのシグナルが検出された。また, *Sal*I切断では約9.8 kbp及び19.5 kbpの2本のシグナルが検出された。

文 献

- 1) MANIATIS, T., FRITCH, E. F. and SAMBROOK, J.: *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual 2nd edition (Cold Spring Harbor, N. Y.), (1989).
- 2) SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463 (1977).
- 3) WATSON, J. D., HOPKINS, N. H., ROBERTS, J. W., STEITS, J. A., and WEINER, A. M.: *Molecular*

Biology of the Gene, 4th edition (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.), (1987).