

コウジ菌タカアミラーゼの誘導生産に関わるイソマルトース合成酵素遺伝子の解析と応用

小林 哲夫

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

Aspergillus nidulans におけるコウジ菌タカアミラーゼ生産の最も強力な誘導物質はイソマルトースである。また、マルトースによるアミラーゼ誘導は α -グルコシダーゼ阻害剤であるカスタノスペルミンにより完全に阻害されるのに対し、イソマルトースによる誘導は阻害されない。これらから、イソマルトースがアミラーゼ誘導の真の誘導物質であり、また、マルトース誘導には糖転移活性の高い α -グルコシダーゼによるイソマルトース合成が必要であることが示唆される。そこで、*A. nidulans* よりイソマルトース合成活性を有する酵素の単離を試みた結果、強力な糖転移活性を有する新規 α -グルコシダーゼ (α -glucosidase B、AgdB) を得た。本酵素は 74 と 55 kDa の 2 つのサブユニットから構成されるヘテロ二量体タンパク質であり、位置選択的に α -1,6 グルコシド結合を形成する強力な糖転移活性を有していた。

1. イソマルトース合成酵素遺伝子 (*agdB* 遺伝子) のクローニングと塩基配列の決定

化学的に決定した両サブユニットのアミノ酸配列をもとに、*agdB* 遺伝子を含むゲノムならびに cDNA クローンを単離した。本遺伝子は 3 つの短いイントロンを含む 3,055 bp からなり、955 アミノ酸残基をコードしていた。その推定アミノ酸配列には化学的に決定した 74、55 kDa サブユニットの N 末端ならびに内部アミノ酸配列と一致する配列が含まれていた。従って、本酵素は一本のポリペプチド前駆体由来しており、プロセッシングを受けヘテロ二量体構造を有する成熟タンパク質になると考えられる。N 末端には典型的なシグナルペプチド配列が存在しており、本酵素が細胞抽出液から単離されること、糖鎖修飾を受けていることと併せて考慮すると、本酵素は細胞外酵素であり、細胞壁中に局在していると考えられる。

本酵素はグリコシルハイドロラーゼファミリー 31 に属する α -グルコシダーゼであった。しかしながら、本ファミリーのいずれの酵素とも 20-30 % の低いアミノ酸配列の同一性しか示さない。本ファミリーに属する α -グルコシダーゼの系統解析を行った結果、AgdB は他のいずれの α -グルコシダーゼとも明らかに離れた遺伝的距離を示した。よって、本酵素は系統的に新規な α -グルコシダーゼであり、真菌類の進化の初期に他の α -グルコシダーゼから分岐したと考えられる。AgdB は *A. nidulans* に特異的な酵素ではなく、*A. oryzae*、*Neurospora crassa* のゲノムデータベース上に相同配列を見いだすことができ、類似酵素は糸状菌に広く分布していると思われる。

2. イソマルトース合成酵素遺伝子破壊株のアミラーゼ誘導能の解析

agdB 遺伝子を選択マーカーである *N. crassa pyr4* 遺伝子と置換することにより、*agdB* 遺伝子破壊株を作成した。タカアミラーゼ遺伝子を導入した Δ *agdB* 株を用い、*agdB* 遺伝子破壊のアミラーゼ誘導に与える影響について検討した結果、マルトース、イソマルトースのどちらを用いた場合も、野生株に比べ 4 ~ 7 倍の大幅なアミラーゼ生産量の上昇が観察された。この結果は *A. nidulans* の主要なイソマルトース合成活性を担う *agdB* 遺伝子の欠失により、マルトースによるアミラーゼ発現誘導が損なわれるだろうという当初の予想と異なるものであり、AgdB 以外にもイソマルトース合成活性を有する α -グルコシダーゼが存在していることを示唆している。現

在までに *A. nidulans* では *agdA*、*agdB* 遺伝子の 2 種類がクローン化されている。*agdA* 遺伝子は *A. niger* α -グルコシダーゼ遺伝子のホモログである。*A. niger* α -グルコシダーゼが α -1,6 グルコシド結合選択的な糖転移活性を有していることから、*agdA* 遺伝子産物 AgdA もまたイソマルトース合成活性を有していると考えられる。そこで、*agdA* 遺伝子破壊株および *agdA*、*agdB* 二重遺伝子破壊株を作成し、それらのアミラーゼ誘導能について検討を行った。*agdA* 遺伝子単独の破壊はアミラーゼ誘導にほとんど影響を与えなかった。これに対し、二重遺伝子破壊株におけるマルトースのアミラーゼ誘導能は、完全には失われなかったものの、 $\Delta agdB$ 株に比べ大きく減少していた。以上の結果から、マルトースからのアミラーゼ誘導には特定の α -グルコシダーゼは必要でなく、AgdB や AgdA といったイソマルトース合成活性を有する複数の α -グルコシダーゼが関与していることが示唆された。

$\Delta agdB$ 株において培地に添加した誘導物質の消費速度が著しく低下していた。これは AgdB が誘導物質の分解に大きく寄与していることを示している。従って、 $\Delta agdB$ 株においてアミラーゼの高生産が引き起こされたのは、*agdB* 遺伝子の破壊によりイソマルトースが培地中に持続的に保持されたためと考えられる。マルトースによる誘導においては、誘導に必要なイソマルトースは残存する α -グルコシダーゼにより供給されると考えられる。したがって、イソマルトース量の調節によるアミラーゼの高生産という観点では、イソマルトース生合成の増強よりもその分解の抑制がより効果的である。なお、デンプンを誘導物質として使用した場合においても、 $\Delta agdB$ 株は野生株に比べアミラーゼを高生産することが確認されている。

3. イソマルトース合成酵素の希少オリゴ糖生産への応用

AgdB は 0.5 %マルトースという比較的低い基質濃度においても、基質の 50 %に相当する糖転移産物を生成する非常に強力な糖転移活性を有している。各種 α -グルコピオースからの反応生成物を TLC により解析したところ、AgdB はマルトースだけでなく、イソマルトース、ニゲロース、コージビオースなど様々な基質に対して糖転移活性を示した。イソマルトースを基質とした場合、イソマルトトリオース、イソマルトテトラオースが主糖転移産物であることから、AgdB は α -1,6 グルコシド結合を選択的に形成する酵素であると考えられる。マルトース、ニゲロース、コージビオースからはイソマルトオリゴ糖に加え、基質に α -1,6 グルコシド結合でグルコースが順次付加されたと考えられるオリゴ糖も生成した。またマルトペンタオースを基質とした際にも高分子の糖転移産物が確認されたことから、本酵素は比較的高重合度のオリゴ糖に対しても糖転移活性を示す可能性が考えられる。以上のように AgdB は多様な基質に対して強力な糖転移活性を示す酵素であることが明らかとなり、希少オリゴ糖や糖誘導体の生産への本酵素の利用が期待される。