

糸状菌由来の樹木成分分解に関わる新規酵素の網羅的探索とそれらの機能解析

志水 元亨
名城大学 農学部

研究の目的

これまでに、数多くのセルロース、ヘミセルロース分解酵素およびいくつかのリグニン分解酵素が見出され植物バイオマス分解への応用が試みられている。しかしながら、特にヘミセルロース分解酵素やリグニン分解酵素を用いたヘミセルロースおよびリグニンの分解効率はまだ高くはない。これは、セルロースと比較して、ヘミセルロースやリグニンの構造が複雑であり、分解には多種類の酵素が必要なためとも考えられている。また、これまでに報告されている種々の樹木成分分解に関わる酵素とアミノ酸配列レベルで全く相同性を有さない未知の樹木成分分解酵素がまだまだ多数存在していると考えられる。

本研究では、プロテオミクスの手法を基盤にして、既知の多糖およびリグニン分解に関与する酵素などとアミノ酸配列レベルで相同性がない新規樹木成分分解酵素を発見することを試みた。

実験

Microcrystalline cellulose (MCC)、Carboxymethyl cellulose (CMC)、Chitin、Xylan、Glucomannan (GlcM)、Galactomannan (GalM)のみを炭素源として生育させた糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞外タンパク質のプロテオーム解析（セクレトーム解析）を行った。培養ろ液から TCA/アセトン沈殿によりタンパク質を回収した。トリプシン処理後、LC-MS/MS（ハイブリッド四重極-オービトラップ質量分析計）にて解析した。また、セクレトーム解析で同定されたシグナルペプチドを持つ、すでに機能が明らかになっているタンパク質（多糖分解に関与する酵素を含む）とアミノ酸配列レベルで相同性がない機能未知タンパク質 (HP) について、大腸菌、メタノール資化酵母および *A. nidulans* を用いて生産させ機能を解析した。

結果

MCC、CMC、Chitin、Xylan、GlcM、GalMのみを炭素源として生育させた際に *A. nidulans* が細胞外に分泌するタンパク質についてセクレトーム解析を行った。MCC、CMC、chitin を炭素源にして生育させたものと比較して、Xylan、GlcM、GalM を炭素源にした場合、多種類のタンパク質が生産されていた。総数で 578

種のタンパク質が同定され、そのうちの 82 種が、機能が分かっている酵素などとアミノ酸配列レベルで全く相同性を有さず、かつシグナル配列（セルラーゼなどの細胞外酵素が有する）を持つ機能未知タンパク質（HP）であった（図 1）。

同定された HP の中から、30 種の HP (HP1-30) を選抜し、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* または大腸菌で異種発現させた。そのなかで、*P. pastoris* で生産させた組換え HP1 を精製し、種々の多糖を基質にして反応させたところ、HP1 が rhamnogalacturonan I (RGI) に対して分解活性を有することがわかった。RGI および RGI を構成する多糖である α -1,5-arabinan、arabinogalactan、 β -1,4-galactan および、シロイズナズナ種子から調製した側鎖のない rhamnogalacturonan (At-RG) をそれぞれ基質にして酵素活性を測定したところ RGI、RG 主鎖を含む β -1,4-galactan および At-RG において反応産物が検出された（図 2）。

さらに、MALDI-TOF-MS による分析から、不飽和結合を含む RG (Δ GR) オリゴ糖のピークが検出された（データ未掲載）。また、At-RG を基質にした場合、235 nm における不飽和結合由来の吸収が増加した（データ未掲載）。以上のことから、HP1 によって RG が Δ GR オリゴ糖に変換されていることが示された。HP1 は、CAZy に登録されている全ての Polysaccharide Lyase (PL) ファミリーに属さない新規の rhamnogalacturonan lyase であることが明らかになった。

結論

これまで我々は、本研究と同様の戦略で、既知の β -mannanase とはアミノ酸配列レベルで全く相同性を有さない新規 β -mannanase Man134A を発見し、新しい GH ファミリー134 を創設した¹⁾⁻³⁾。また、既知の PL1 ファミリーではあるが、熱安定性が優れた pectate lyase なども見出している⁴⁾。

現在も研究を続けているが、GH134 の β -mannanase、新規な RG lyase を含め 3 種の新規ファミリーに属する樹木成分分解酵素を見出しており、糸状菌にはまだまだ発見されていないものが多数存在することが考えられる。今後、新規酵素の探索を続けながら、見出した新規酵素の立体構造および生理学的意義を明らかにする。

参考文献

- 1) Shimizu, M. *et al.* (2015) Novel β -1,4-mannanase belonging to a new glycoside hydrolase family in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **290**: 27914-27927, 2015
- 2) Sakai, K. *et al.* (2017) Biochemical characterization of thermostable β -1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**: 3237-3245, 2017
- 3) Sakai, K. *et al.* (2018) Characterization of pH-tolerant and thermostable GH 134

β -1,4-mannanase SsGH134 possessing carbohydrate binding module 10. *J. Biosci. Bioeng.* **125**: 287-294.

- 4) Kamijo, J. *et al.* (2018) Identification and characterization of a thermostable pectate lyase from *Aspergillus luchuensis* var. *saitoi*. submitted.

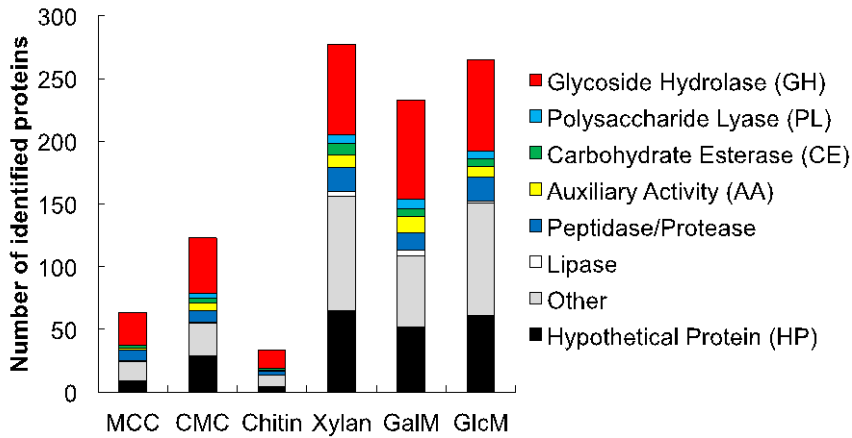


図 1. *A. nidulans* のセクレトーム解析

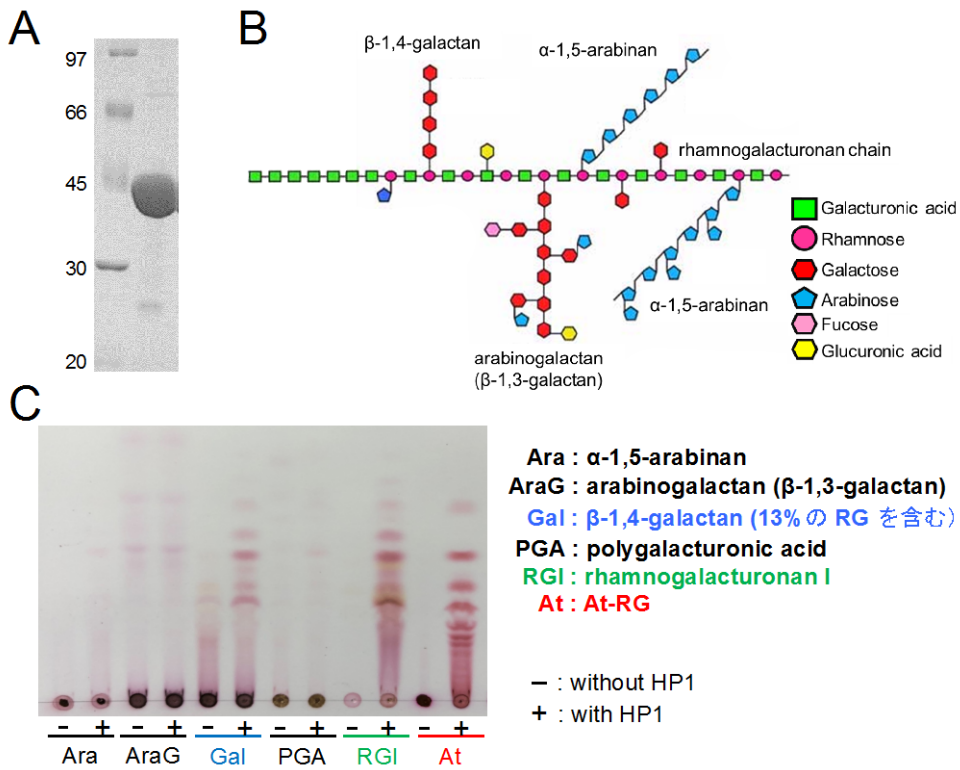


図 2. HP1 は RG 主鎖を分解する。A; HP1 の SDS- PAGE. B; RGI の構造. C; TLC による HP1 の反応産物の検出。