

新規有用物質生産に資する麹菌酵素ライブラリーの構築と利用

松沢 智彦

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

(現所属：香川大学 農学部)

研究の目的

微生物は糖質加水分解酵素やプロテアーゼ、リパーゼなど様々な酵素を生体高分子（多糖類やタンパク質等）を分解・資化するために生産している。例えば、産業的に重要な麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノムには 300 を超える推定糖質加水分解酵素がコードされている。しかし、これらの多くは未だ機能が未解明である。我々はこれまでにキシログルカン（植物の細胞壁や種子に含まれている多糖類）の分解に重要なイソプリメベロース生成酵素¹や β -ガラクトシダーゼ²を見出し、その酵素学的解析を行った。アミノ酸配列から酵素の機能を予測することはある程度可能であるが、その酵素の真の機能を明らかにするためには実際に酵素を *in vitro* において解析することが必須である。

本研究では、有用な新奇酵素を探索するために、麹菌の推定分泌タンパク質の発現ライブラリーを構築した。

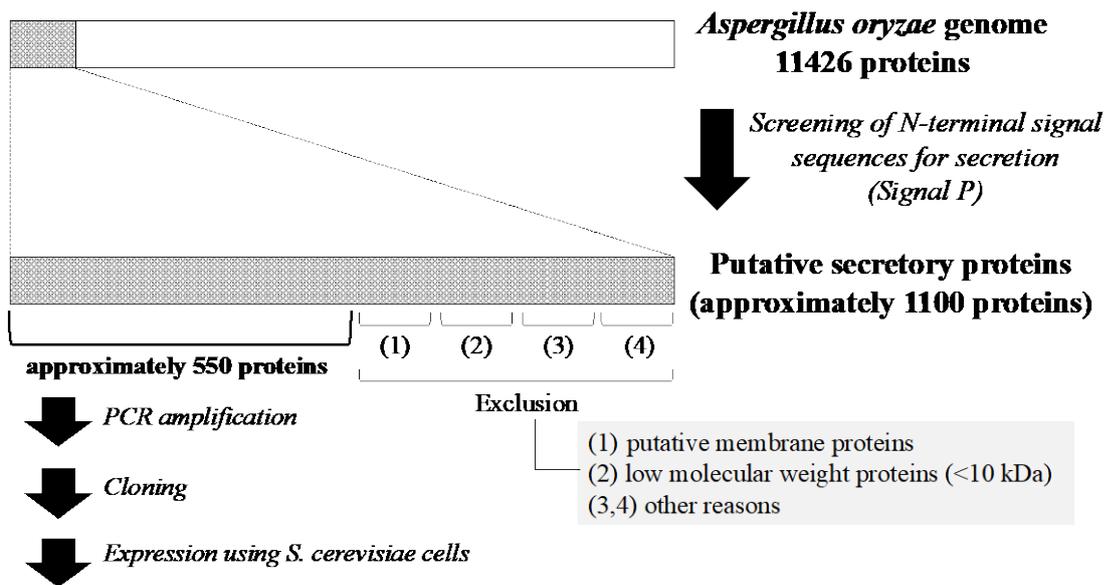
方法

麹菌のゲノムにコードされている約 11000 のタンパク質の中から、SignalP プログラム (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)^{3,4} を用いて N 末端に分泌シグナルを有する推定分泌タンパク質の探索を行った。また、推定分泌タンパク質が膜貫通ヘリックスを有するか否かを TMHMM サーバによって解析した。

推定分泌タンパク質をコードする遺伝子から、分泌シグナルを除いた DNA 領域を混合 cDNA を鋳型にして PCR 法によって増幅した。混合 cDNA は麹菌を様々な条件で培養後に抽出したトータル RNA から合成した。PCR 法によって増幅した DNA 断片は *TDH3* プロモーター、 α -ファクターの分泌シグナルおよび *TDH3* ターミネーターを含む出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 2-micron プラスミドベクターにクローニングした。クローニングする DNA 断片は α -ファクターの分泌シグナルの下流にフレームが合う様に挿入し、融合タンパク質として出芽酵母において発現させた。

結果

麹菌のゲノムから、N 末端に分泌シグナル配列を有する約 1100 の推定分泌タンパク質を見出した。この推定分泌タンパク質から、複数回膜貫通領域を有するタンパク質などを除外し、約 550 のタンパク質に絞り込んだ。次に、当該遺伝子の cDNA からの PCR 増幅とクローニングを試み、約 520 遺伝子を増幅し、約 500 遺伝子をクローニングした (図 1)。

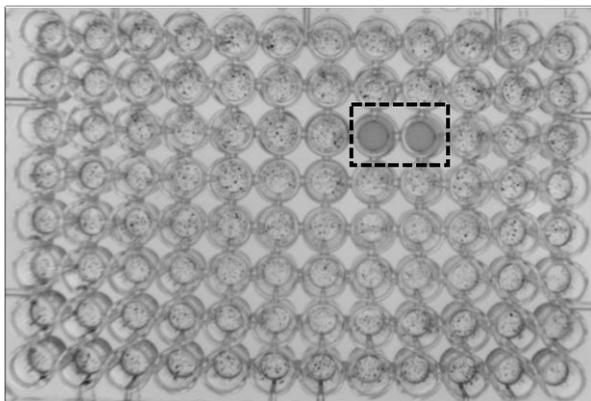


Enzymatic activity assay

図 1. 麹菌分泌タンパク質ライブラリーの作成と評価手順について

次に、これらの麹菌の推定分泌タンパク質をクローニングしたプラスミドベクターを出芽酵母に導入した。当該出芽酵母を 96 ウェルプレートで培養し、その培養上清を酵素活性の測定に使用した。酵素活性の測定は不溶性基質 (AZCL-Xyloglucan, AZCL-Xylan, AZCL-Arabinoxylan) および可溶性基質 (*p*-nirtophenyl [*p*NP] β -D-glucopyranoside, *p*NP β -D-galactopyranoside, *p*NP β -D-xylopyranoside, *p*NP α -D-glucopyranoside, *p*NP α -D-xylopyranoside, *p*NP α -L-arabinopyranoside, *p*NP α -L-fucopyranoside, *p*NP α -L-rhamnopyranoside) をそれぞれエンド型およびエキソ型糖質加水分解酵素の基質として使用した。酵素活性測定の結果、いくつかのウェルにおいて基質の分解が確認され (図 2)、多糖類もしくはオリゴ糖の分解に関与する遺伝子が本ライブラリーに含まれていることが明らかになった。

A



B

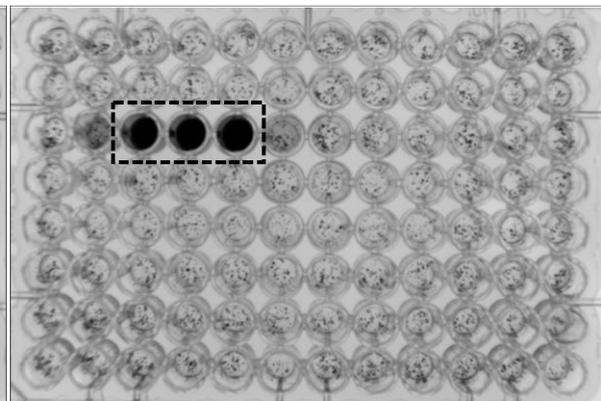


図 2. 不溶性基質を用いたエンド型糖質分解酵素の探索 麹菌分泌タンパク質ライブラリーを導入した出芽酵母の培養上清を AZCL-Xyloglucan (A) もしくは AZCL-Xylan (B)と反応させた。これらの基質に対して活性が確認されたウェルを破線で囲んでいる。

結論

本研究において、麹菌の分泌タンパク質を発現するライブラリーを構築し、本ライブラリーを用いて新奇酵素の探索を行った。本ライブラリーはタンパク質の探索に有用であると考えられるが、また本ライブラリーは「質」と「網羅性」の 2 点で課題があると考えている。今後、この課題の克服とさらなる酵素探索を進める予定である。

文献

- 1) Matsuzawa, T., Mitsuishi, Y., Kameyama, A., Yaoi, K. (2016) Identification of the gene encoding isoprimeverose-producing oligoxyloglucan hydrolase in *Aspergillus oryzae*. *J. Biol. Chem.* **291**:5080-5087.
- 2) Matsuzawa, T., Watanabe, M., Kameda, T., Kameyama, A., Yaoi, K. (2019) Cooperation between β -galactosidase and an isoprimeverose-producing oligoxyloglucan hydrolase is key for xyloglucan degradation in *Aspergillus oryzae*. *FEBS J.* **286**:3182-3193.
- 3) Almagro Armenteros, J.J. *et al.* (2019) SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* **37**:420-423.
- 4) Umemura, M. (2020) Peptides derived from Kex2-processed repeat proteins are widely distributed and highly diverse in the Fungi kingdom. *Fungal. Biol. Biotechnol.* **7**:11.