

黒麹菌細胞壁多糖ニゲランの分子量制御システムの解明と発酵生産系の確立

上地 敬子
琉球大学 農学部

研究の目的

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* 等, *Nigri* 節に分類される *Aspergillus* 属糸状菌は窒素源飢餓条件下で α -1,3-/ α -1,4-グルコシド結合を交互に繰り返す構造を持つニゲランという細胞壁多糖を生産する。我々は *A. luchuensis* のニゲラン合成酵素遺伝子 (*nisA*) を同定し, さらに *nisA* に隣接する α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子 (*agtC*) と機能未知遺伝子 (*gnsA*) を破壊することでニゲラン生産量とその分子量に影響することを報告した¹⁾。本研究では *agtC* と *gnsA* の両遺伝子がニゲランの分子量変化に与える事象について組換え酵素として発現させ, 酵素化学的に検証することを目的とした。また, 近年プラスチックの代替品として多糖を原料にしたバイオマスベースプラスチックが注目されている。これまでに *nisA* を導入した *A. oryzae nisA* 過剰発現株で発酵生産させたニゲランをエステル誘導体化し, これを用いたバイオマスベースプラスチック原料としての利用性について研究を進めてきた²⁾。本研究では構成的に *nisA* を高発現するニゲラン高生産株の取得, そしてより高分子量のニゲランを生産可能な株の造成を目的とした。

方法

1. ニゲラン分子量を制御する *AgtC* および *GnsA* の機能解析

A. luchuensis のニゲラン合成遺伝子クラスターに含まれる α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子 (*agtC*) と機能未知遺伝子 (*gnsA*) 領域を PCR で増幅し, 麹菌発現系あるいは大腸菌発現系を用いて組換え酵素として異種発現させた。精製した両組換え酵素をニゲラン, デンプン, α -1,3-グルカン等の各種 α -グルカンと反応させ, サイズ排除クロマトグラフィーで各種グルカンの分子量を分析した。また *rAgtC* は酸加水分解により調製したニゲランオリゴ糖と反応させて, 各種分析により生産物の構造解析を試みた。

2. 麹菌を用いたニゲラン発酵生産系の確立

黄麹菌 *A. oryzae* の解糖系で特に高発現する改良型エノラーゼプロモーター (*P_{enoA142}*) と *A. luchuensis nisA* のプロモーターを置換し, *nisA* を構成的に発現する *A. luchuensis* 形質転換株を取得した。また *A. oryzae* の α -1,3-グルカン合成酵素 (AG) 遺伝子破壊株 (AG Δ) と AG および細胞外マトリックス多糖ガラクトサミノガラクトン (GAG) の合成酵素遺伝子破壊株 (AG-GAG Δ) を宿主として, 麹菌高発現用ベク

ターpNEN142 と *nisA* を連結したプラスミドで形質転換を行った。得られた各種 *nisA* 過剰発現株のニゲラン生産量とその分子量について検討を行った。

結果

1. ニゲラン分子量を制御する *AgtC* および *GnsA* の機能解析

麹菌発現系あるいは大腸菌発現系を用いて異種発現させた *rAgtC* と *rGnsA* を精製し、ニゲランと作用させた後、サイズ排除クロマトグラフィーでニゲラン分子量の変化を分析した。その結果、*rAgtC* とニゲランを作用させた場合はニゲランの低分子化が確認された。一方、*rGnsA* と反応させた場合はニゲランの分子量に変化はなかった。*rAgtC* と *rGnsA* を併せてニゲランと反応させた場合は、*rAgtC* 単独の時と同様にニゲランの低分子化が確認された。先行研究では *A. luchuensis* Δ *gnsA* 株 (*AgtC* が機能する) はニゲランの分子量が高分子化と低分子化したのに対して、 Δ *agtC* 株 (*GnsA* が機能する) ではニゲランの分子量が一定であった。これは本研究で得られた *rAgtC* がニゲランを低分子化させることや *rGnsA* がニゲランの分子量に影響しない結果を支持すると考えられる。なお、先行研究と異なり *rAgtC* の作用によるニゲランの高分子化は観察されなかった。続いて、デンプンや α -1,3-グルカンと *rAgtC* と *rGnsA* を反応させたが分子量は変化しなかった。よって少なくとも *rAgtC* は各種 α -グルカンのうち、ニゲラン特異的に作用することが示唆された。

既知の α -グルカノトランスフェラーゼ (*Agt*) は主に α -1,4-グルコシド結合に作用することが知られている³⁾。本研究では *rAgtC* がニゲランの α -1,4-と α -1,3-グルコシド結合のどちらに作用するか明らかにするためにニゲランを酸加水分解して調製したニゲランオリゴ糖混合液と *rAgtC* を反応させた。その結果、*rAgtC* は推定重合度 6 以下のニゲランオリゴ糖には作用せず、推定重合度 6 以上のニゲランオリゴ糖を加水分解した。得られた生産物を分取し、各種分析による構造解析を進めている。

2. 麹菌を用いたニゲラン発酵生産系の確立

A. luchuensis 親株とプロモーターを置換した *A. luchuensis nisA* 過剰発現株のニゲラン生産量を比較した結果、*nisA* 過剰発現株は親株の約 2 倍量のニゲランを生産することが明らかとなった。また先行研究で取得した *A. oryzae niaD300* を宿主とした *nisA* 過剰発現株と比較した結果、本研究で取得した *AG* Δ 株および *AG-GAG* Δ 株を宿主とした *nisA* 過剰発現株はその 2~3 倍量のニゲランを生産することが分かった。*nisA* と α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の相同性が高いことや両多糖の構成糖がグルコースであること等から、ニゲランと α -1,3-グルカンの合成基質 (おそらく UDP-グルコース) は同じであると予想している。 α -1,3-グルカンを合成する *A. oryzae niaD300* 株を宿主とした *nisA* 過剰発現株と比較して、 α -1,3-グルカンを合成しない *A. oryzae AG* Δ 株 *nisA* 過剰発現株はニゲラン合成に利用できる基質の量が増えるため、結果的にニゲラン生産量が増加したと推測される。

得られたニゲランの分子量をサイズ排除クロマトグラフィーで分析した結果、*A. oryzae* AG-GAG Δ 株を宿主とした *nisA* 過剰発現株のニゲラン分子量が一番大きく、次いで *A. oryzae* niaD300 株、*A. oryzae* AG Δ 株、*A. luchuensis nisA* 過剰発現株、*A. luchuensis* 親株の順となった。

結論

ニゲラン合成研究は他の糸状菌細胞壁多糖の合成研究と比較して立ち遅れている。本研究で実施したニゲラン合成関連酵素の機能解析によりニゲラン合成機構を理解することに繋がる基礎的な知見を得ることが出来た。今後もニゲラン合成関連酵素とその遺伝子の研究を幅広く進め、糸状菌におけるニゲラン生産の意義の解明を目指したい。

A. oryzae nisA 過剰発現株を用いることで *A. luchuensis* 野生株と比較してニゲラン収量の増加と培養期間の短縮化が実現した。さらに本研究で、より高分子量のニゲランを生産する *nisA* 過剰発現株を取得できたことは今後のニゲランエステル誘導体を利用したバイオマスベースプラスチック化研究の進展に繋がることが期待される。

文献

- 1) Uechi, K., Yaguchi, H., Tokashiki, J., Taira, T., and Mizutani, O. (2021) Identification of genes involved in the synthesis of the fungal cell wall component nigeran and regulation of its polymerization in *Aspergillus luchuensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**(21): e0114421.
- 2) Togo, A., Uechi, K., Mizutani, O., Kimura, S., and Iwata T. (2021) Synthesis and characterization of α -1,3-*alt*- α -1,4-glucan (nigeran) ester derivatives. *Polymer* **214**: 123343.
- 3) Kaaij, R. M. van der *et al.*, (2007) Two novel, putatively cell wall-associated and glycosylphosphatidylinositol-anchored α -glucanotransferase enzymes of *Aspergillus niger*. *Eukaryot. Cell* **6**(7): 1178-88.