

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07734

研究課題名(和文)新規GHファミリー134に属する酵素の機能・構造解析および生理学的役割の解明

研究課題名(英文)characterization of glycoside hydrolase 134 family mannanase

研究代表者

志水 元亨 (Shimizu, Motoyuki)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：20423535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、麹菌 *Aspergillus oryzae* が生産するGH134に属する α -マンナーゼ AoMan134Aの詳細な機能および構造を明らかにすることを目指した。その結果、AoMan134Aは、これまで分かっている α -マンナーゼと大きく異なったリゾチーム型の立体構造を有しており、ユニークな基質特異性を有していた。また、GH134は特に植物病原性の糸状菌および放線菌の一部に分布していることから、それらの遺伝子破壊株を作製し、植物病原性とGH134に属する酵素の関係について解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AoMan134Aは、熱安定性を有する既知の α -マンナーゼと同等もしくはそれ以上の高い熱安定性を持ち、中性からアルカリ性においてpH安定性を有していた。現在産業利用されている既存の α -マンナーゼと比較して、高い熱安定性および効率的なマンノオリゴ糖生産能を有していることから、AoMan134Aは機能性マンノオリゴ糖の生産に適していると考えられ、マンノオリゴ糖を含む(食品)産業での応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the enzymatic function and structure of α -1,4-mannanase AoMan134A from *Aspergillus oryzae*. Recombinant AoMan134A was prepared, and the reaction products from galactose-free α -mannan generated by the enzyme were analyzed. AoMan134A released mannobiose (M2), mannotriose (M3), and mannotetraose (M4) but not mannopentaose (M5) or higher manno-oligosaccharides when galactose-free α -mannan was the substrate. AoMan134A had high catalytic efficiency (kcat/Km) towards M6 compared with the endo- α -1,4-mannanase Man5C and notably converted M6 to M2, M3, and M4, with M3 being the predominant reaction product. We also revealed that AoMan134A had lysozyme-like structure with two active-site amino acid residues.

研究分野：応用微生物学、酵素学

キーワード： α -1,4-mannanase AoMan134 α -mannan GH 134 mannooligosaccharide *Aspergillus oryzae*

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

β -マンナン(グルコマンナンおよびガラクトマンナン)は針葉樹、グアーガムやコーヒー豆などの様々な植物に含まれる多糖で自然界に多く存在する未利用のバイオマスの一つであることから、バイオリファイナリーなどの産業分野で期待されている。これまでに研究代表者らは、 β -マンナンを唯一の炭素源として糸状菌 *Aspergillus nidulans* を生育させた際に、Glycoside Hydrolase 5 (GH5) ファミリーに属する既知のマンナン分解酵素(β -マンナナーゼ; 40-50 kDa、アミノ酸の配列から現在既知の β -マンナナーゼは GH5、GH26 および GH113 に分類されている) AnMan5A, C, D と同様に細胞外に多量に分泌される低分子量 (18 kDa) の機能未知タンパク質を同定した。このタンパク質は、機能が分かっているタンパク質(GH5 および GH26 に属する β -マンナナーゼを含む)とアミノ酸配列レベルで全く相同性を有しておらず、推定される機能ドメインも含まれていなかった。ネイティブおよびリコンビナントタンパク質を用いた解析から、この機能未知タンパク質が新規の β -マンナナーゼ (Man134A) であることを明らかにし、GH134 ファミリーを新設した。

GH134 に属するタンパク質は植物病原菌を含む糸状菌および放線菌の一部にのみ分布しており、*A. nidulans* と同じ *Aspergillus* 属糸状菌である *A. niger* のゲノムには GH134 に属する遺伝子はコードされていなかった。一方、麴菌 *A. oryzae* のゲノムには Man134A と高い相同性を有する遺伝子が 3 種類存在していた。麴菌 *A. oryzae* や黒麴菌 *A. niger* は、長年の食経験や科学的な知見などから、アメリカ食品医薬品局 (FDA) からも安全性が認められている糸状菌である。

2. 研究の目的

本研究は、FDA からも安全性が認められている麴菌 *A. oryzae* が生産する GH134 に属する β -マンナナーゼ AoMan134A の詳細な機能および立体構造を明らかにすることを目的とした。また、GH134 は特に植物病原性の糸状菌および放線菌の一部に分布していることから、それらの遺伝子破壊株を作製し、植物病原性と GH134 に属する酵素の関係について解析した。

3. 研究の方法

リコンビナント AoMan134A を大量に生産するための宿主にメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いた。pPicZa-A ベクターの KpnI と NotI 部位の間 AoMan134 遺伝子を挿入した。構築したプラスミドはエレクトロポレーション法を用いて *P. pastoris* に導入した。*P. pastoris* によって生産されたリコンビナント AoMan134A は精製し、 β -マンナンおよびその他の多糖類(セルロース、キシラン、キチンなど)と反応させた後、TLC、MALDI-TOF-MS および HPLC にて反応生成物を分析することで、基質特異性を解析した。また、蒸気拡散法にて AoMan134A を結晶化させ X 線結晶構造解析を行った。

トマトの病原菌である *Fusarium* 属糸状菌のゲノムにコードされる Man134 オルソログ遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、宿主に対する感染や病原性に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

AoMan134A は、鎖長 2 (マンノビオース: M_2) ~ 鎖長 6 (マンノヘキサオース: M_6) のマンノオリゴ糖を基質にした場合、マンノテトラオース (M_4) 以下を加水分解できないこと、 M_6 および β -マンナンを基質にした際 M_3 が主要な生成物であり、単糖であるマンノースが全く生成されないことが明らかになった。また、GH5 の Man5C と比較して、 M_6 に対する AoMan134A の k_{cat}/K_m 値が 20 倍高いこともわかった。

さらに、AoMan134A と GH5 に属する AnMan5C の熱安定性を検討した。0~90°C で 15 分間インキュベートした後、グルコマンナンを基質にして β -マンナナーゼ活性を測定したところ、AnMan5C に比べて AoMan134A は高い熱安定性を有していた。90°C で 15 分間インキュベートした場合、AnMan5C の β -マンナナーゼ活性は検出されないのに対して、AoMan134A では 60% の活性が残存していた。以上から、AoMan134A は、熱安定性を有する既知の β -マンナナーゼと同等もしくはそれ以上の熱安定性を有していることがわかった。さらに、AoMan134A は、中性からアルカリ性において高い pH 安定性を有していた。現在産業利用されている既存の β -マンナナーゼに比べて、熱安定性および効率的なマンノオリゴ糖生産能を有していることから、マンノオリゴ糖を含む食品製造に適していると考えられる(図 1)。近い将来、コーヒーなど食品産業をはじめ、様々な β -マンナンやマンノオリゴ糖を含む食品の製造における利用が期待される。また、AoMan134A は、これまで分かっている β -マンナナーゼと大きく異なった基質認識部位を持つ立体構造を有していると考えられた。

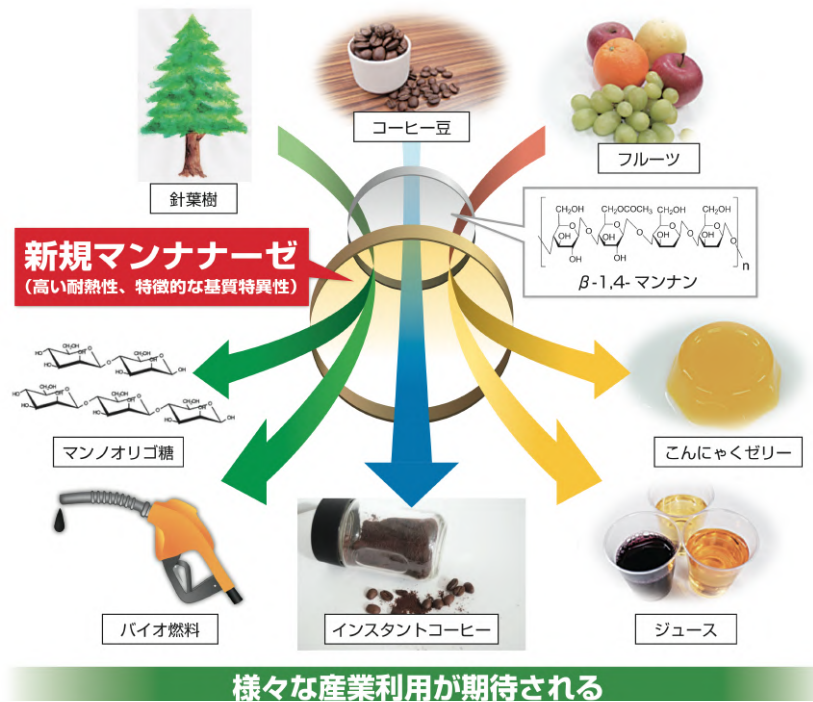


図 1. AoMan134A の産業利用

結晶化条件の検討の結果、4°C 及び 20°C で AoMan134A の結晶が得られた (図 2) 。AoMan134A の立体構造を明らかにしたところ、AoMan134A はリゾチーム型の構造で Glu67 と Asp80 が推定活性アミノ酸残基であることが分かった。それぞれのアミノ酸を Gln および Asn に置換した変異型酵素で活性が消失したことから、Glu67 と Asp80 が活性部位であることが分かった。また、AoMan134A 分子内の Cys102 と Cys139 がジスルフィド結合を形成していることが明らかになった。これは AoMan134A の熱安定性の高さに関係している可能性がある。今後これらの Cys 残基を他のアミノ酸に置換した変異型酵素を調製することで、AoMan134A の高い熱安定性に及ぼす影響を調べていく。

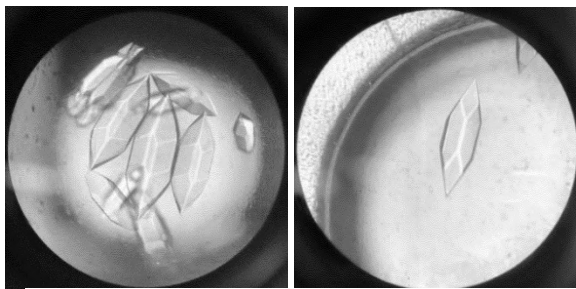


図 2. 4°C (左) 及び 20°C (右) で生成した AoMan134A の結晶

トマトの病原菌である *Fusarium* 属糸状菌のゲノムにコードされる *Man134* オルソログ遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、宿主に対する感染や病原性に及ぼす影響を解析した。トマトに対する感染において、野生株と比較して、トマトの病原菌の遺伝子破壊株では大きな違いは見られなかった。これはトマトに含まれる β -マンナン量が少ないためであると考えられた。今後は、 β -マンナンが多く含まれる蒟蒻を用いて、その病原菌である *Fusarium* 属糸状菌の遺伝子破壊株を作製して蒟蒻に対する感染の影響を解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kamijo Junya, Sakai Kiyota, Suzuki Hiromitsu, Suzuki Kengo, Kunitake Emi, Shimizu Motoyuki, Kato Masashi	4. 巻 276
2. 論文標題 Identification and characterization of a thermostable pectate lyase from <i>Aspergillus luchuensis</i> var. <i>saitoi</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 503 ~ 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2018.10.059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Kiyota, Matsuzaki Fumiko, Wise Lisa, Sakai Yu, Jindou Sadanari, Ichinose Hirofumi, Takaya Naoki, Kato Masashi, Wariishi Hiroyuki, Shimizu Motoyuki	4. 巻 84
2. 論文標題 Biochemical Characterization of CYP505D6, a Self-Sufficient Cytochrome P450 from the White-Rot Fungus <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01091-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01091-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Kiyota, Kojiya Saki, Kamijo Junya, Tanaka Yuta, Tanaka Kenta, Maebayashi Masahiro, Oh Jun-Seok, Ito Masafumi, Hori Masaru, Shimizu Motoyuki, Kato Masashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Oxygen-radical pretreatment promotes cellulose degradation by cellulolytic enzymes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biotechnology for Biofuels	6. 最初と最後の頁 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13068-017-0979-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Kiyota, Kimoto Saran, Shinzawa Yuta, Minezawa Miho, Suzuki Kengo, Jindou Sadanari, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 125
2. 論文標題 Characterization of pH-tolerant and thermostable GH 134 -1,4-mannanase SsGH134 possessing carbohydrate binding module 10 from <i>Streptomyces</i> sp. NRRL B-24484	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 287 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2017.10.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Motoyuki	4. 巻 82
2. 論文標題 NAD ⁺ /NADH homeostasis affects metabolic adaptation to hypoxia and secondary metabolite production in filamentous fungi	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 216 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1422972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Eriko, Odakura Rika, Oinuma Ken-Ichi, Shimizu Motoyuki, Masuo Shunsuke, Takaya Naoki	4. 巻 292
2. 論文標題 Sirtuin E is a fungal global transcriptional regulator that determines the transition from the primary growth to the stationary phase	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11043 ~ 11054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M116.753772	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Kiyota, Mochizuki Mai, Yamada Miyuki, Shinzawa Yuta, Minezawa Miho, Kimoto Saran, Murata Shunsuke, Kaneko Yuhei, Ishihara Saaya, Jindou Sadanari, Kobayashi Tetsuo, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 101
2. 論文標題 Biochemical characterization of thermostable -1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 3237 ~ 3245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-017-8107-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 鈴木健吾、酒井杏匠、上條順也、村田俊輔、和久豊、志水元亨、加藤雅士
2. 発表標題 Aspergillus saitoi が生産する耐熱性ペクチン分解酵素の機能解析
3. 学会等名 セルラーゼ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木本紗蘭、上條順也、酒井杏匠、村田俊輔、和久豊、志水元亨、加藤雅士
2. 発表標題 Aspergillus saitoi が生産する耐熱性ペクチン分解酵素の機能解析
3. 学会等名 日本食品科学工学会第65回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口愛彩、酒井杏匠、梶谷紗季、木島尚輝、大堀沙貴子、小栗莉奈、高須賀太一、堀千明、志水元亨、加藤雅士
2. 発表標題 糸状菌 Aspergillus nidulans が種々の多糖応答的に生産する細胞外酵素の網羅的解析
3. 学会等名 日本生物工学会 2018 年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maho Sobue, Kiyota Sakai, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato
2. 発表標題 Characterization of a new -1,4-Mannanase belonging to a Glycoside Hydrolase Family 134 Aspergillus nidulans
3. 学会等名 30th Fungal Genetics Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大堀沙貴子、酒井杏匠、梶谷紗季、山口愛彩、木島尚輝、松江渚、小栗莉奈、高須賀太一、堀千明、志水元亨、加藤雅士
2. 発表標題 糸状菌 Aspergillus nidulans のセクレトーム解析から同定された hypothetical protein の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新沢裕大、酒井杏匠、鈴木健吾、木本紗蘭、神藤定生、志水元亨、加藤雅士
2. 発表標題 新規 GH134 ファミリーに属する糖質加水分解酵素群の機能解析
3. 学会等名 セルラーゼ研究会 第31回 大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木健吾、酒井杏匠、新沢裕大、嶺澤美帆、神藤定生、前林正弘、林利哉、志水元亨、加藤雅士
2. 発表標題 -マンナーゼ Man134A 変異体の機能およびマンナンを含む食品への応用
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第64回 大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒井杏匠、糀谷紗季、鈴木健吾、高須賀太一、堀千明、鈴木裕満、松江渚、志水元亨、加藤雅士
2. 発表標題 Aspergillus nidulansのセクレトーム解析から見出された新規ガラクトサン分解酵素
3. 学会等名 第17回 糸状菌分子生物学カンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 志水元亨
2. 発表標題 プロテオミクスを基盤とした植物バイオマス分解に関わる糸状菌由来新規酵素の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saki Kojiya, Kiyota Sakai, Junya Kamijo, Kenta Tanaka, Masahiro Maebayashi, Jun-Seok Oh, Masafumi Ito, Masaru Hori, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato
2. 発表標題 Oxygen-radical pretreatment promotes cellulose degradation by cellulolytic enzymes
3. 学会等名 ISPlasma 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 育男 (Sato Ikuo) (70743102)	名古屋大学・生命農学研究科・助教 (13901)	