

機関番号 : 11301

研究種目 : 基盤研究 (B)

研究期間 : 2008 ~ 2010

課題番号 : 20380175

研究課題名 (和文) カビ両親媒性蛋白質群を介した固体表面への分解酵素群濃縮の網羅的解析

研究課題名 (英文) Comprehensive study of fungal biosurfactant proteins that recruit polymer-degrading enzymes onto solid polymer-surfaces

研究代表者

阿部 敬悦 (ABE KEIETSU)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号 : 50312624

研究成果の概要 (和文) :

セルロース及びケラチンを固体基質として、麹菌産生の固体吸着蛋白質を探索し、新奇界面活性蛋白質 2 種を見出した。それら 2 種を麹菌で発現・精製し固体粒子に結合させ、その粒子にリクルートされる酵素として Xylanase (XynF3) を見出した。相互作用解析では、それら二種は XynF3 と弱く相互作用した。また既知の界面活性蛋白質 RolA も両固体基質に結合したので、RolA と酵素の相互作用部位も解析した。

研究成果の概要 (英文) :

When the industrial fungus *Aspergillus oryzae* was grown on cellulose and keratin as solid polymer substrates, two small bio-surfactant proteins ($M_w < 20$ kDa) that were attached to the solid surfaces were isolated. Two genes encoding the two proteins were cloned and highly expressed in *A. oryzae*. The two purified bio-surfactant proteins attached to the surface of cellulose recruited xylanase F3 (XynF3) which lacks a carbohydrate binding domain. In vitro, molecular interaction analysis revealed the two proteins immobilized on the solid surfaces possessed dissociation constants $K_D \approx 10 \mu M$ order to XynF3. We also analyzed interaction of esterase with another surfactant protein RolA attached to the two solid materials.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野 : 農学

科研費の分科・細目 : 境界農学・環境農学

キーワード : バイオマス・固体醗酵・界面活性蛋白質・hydrophobin

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物感染糸状菌の固体高分子分解能から発展した日本独自の固体発酵 : 糸状菌は、天然に百万種以上存在すると考えられており、優れた固体高分子分解能により陸圏の物質循環に重要な役割を果たしている。糸状菌

には、被害をもたらす動植物感染菌や醸造・醗酵に用いられる産業菌が存在する。日本において千年以上に渡り醸造に用いられてきた麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、穀類固形物 (米・麦・大豆) を基質として培養され、固形物の分解に適している。その形質は祖先

の植物感染菌に由来すると考えられている。(2)植物感染菌のワックス分解から麴菌固体醗酵を利用した生分解性プラスチック分解へ：糸状菌は植物感染において、植物表面に存在するワックスエステル層を分解した後、下層組織に侵襲する。植物ワックスは固形ポリエステルである。我々は、植物感染糸状菌のワックスエステル分解に着目し、麴菌による生分解性プラスチック（生プラ）の分解の研究を行ってきた。プラスチックは国内で年間 1500 万トン生産される必需資材であるが、使用量が膨大になるに従い廃棄物による環境問題を惹起している。解決策の一つとして、生プラの開発が進められ転換が図られているが、転換が進んだ場合、土中での分解は現実的には不可能であり、高速・高密度で積極的に分解するシステムが必要となる。現在主流の土中分解・焼却は、生プラを二酸化炭素と水に分解するのみで価値回収は行われない。我々は、麴菌の固体分解能と、全国に存在する膨大な麴菌培養インフラに着目し、麴菌による生プラの高速・高効率分解と原料となるモノマー回収が可能なバイオケミカルリサイクル技術の開発を目指して基盤から工業化までの研究開発を行っている(図書 1)。(3)新規固体高分子分解機構の発見-界面活性タンパク質による分解酵素の固体表面への濃縮：これ迄の生プラ分解研究は分解酵素に関する研究が中心であり、分解を促進する他のタンパク質因子に関する知見は殆ど知られていない。我々はこれ迄に、自作麴菌 DNA マイクロアレイを利用して、生プラを培養基質として誘導される分解酵素及び、酵素とは別のタンパク質性プラスチック分解促進因子の探索を行った。その結果、(i)麴菌が生プラ固体表面に生育する際に特異に複数の両親媒性タンパク質群（ヒドロフォビン RolA [Takahashi T et al. *Mol. Microbiol.* 57:1780-1798, 2005] 及び新規タンパク質 HsbA [Ohtaki S et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:2407-2413, 2006]) を産生することを見出した。(ii)それら両親媒性タンパク質が菌体より分泌され、疎水固体表面に吸着してコンフォメーションが変化した後に分解酵素クチナーゼ CutL1 を特異的にリクルートし、プラスチック固体表面に分解酵素を濃縮することで分解を促進するという、全く新規の分解促進機構を初めて見出した (Takahashi T et al. *Mol. Microbiol.* 57:1780-1798, 2005)。さらに (iii) RolA は N-末端側の His 残基と酵素 CutL1 の分子表面の 6 個の酸性アミノ酸残基が RolA-CutL1 の相互

作用に関係することを明らかにした。また、(iv)両親媒性タンパク質のうち RolA は、プラスチック表面に吸着した状態で水平方向へ可動性を持つという全く新しい物理化学的性質を発見した (Takahashi T et al. *Mol. Microbiol.* 57:1780-1798, 2005)。現在、CutL1 及び RolA の二重高発現組み換え麴菌を造成して、生プラ分解系のスケールアップも行っている。以上、我々の見出した界面活性タンパク質を介した固体表面への酵素の濃縮機構は、固体高分子の酵素分解の新たな反応機構を提示している。現在、ヒドロフォビン RolA と酵素 CutL1 をモデル系として固相表面への酵素リクルート機構の分子メカニズムを詳細に解析している。

一方、これまでヒドロフォビン類は糸状菌や担子菌(キノコ)が気中において形態形成する際に細胞を被覆する分泌型の両親媒性のタンパク質群としてのみ知られており、我々の発見したような機能及び物理化学的性質は全く知られていなかった。

2. 研究の目的

生物個体の表層は疎水性固相ポリエステルのみならず多糖・タンパク質・脂質などの複合マテリアルであることから（特に結晶性の高い固体表面は、程度の差はあるが疎水部分が空気側（外界）に面することが多い）、固相表面で複数の酵素が反応して分解すると考えられる。一方、糸状菌・担子菌に界面活性タンパク質ヒドロフォビンが広範に分布することから、ヒドロフォビンが多様な酵素を固相表面にリクルートする可能性が推論され、予備検討を行った結果 RolA を介してエステラーゼ CutL1 のみならず、リパーゼ、プロテアーゼがリクルートされることが示唆された。そこで、本研究の目的は、糸状菌ヒドロフォビン類がリクルートする酵素種の多様性をトランスクリプトーム及びプロテオーム的手法により探索すること、および界面活性タンパク質による酵素リクルート機構の解析とする。天然における固相表面反応の多様性が示されれば、天然の複合固体基質の分解反応を制御する新技術の基盤となる。

3. 研究の方法

(1)生物固体基質に高い生育を示し、ヒドロフォビン RolA が発見された産業菌の麴菌を材料に、生育固体基質として多糖（セルロース）、硬質タンパク質（ケラチン）を用いた。供試菌選択の理由は以下の 3 点である。

①〇麴菌は、申請者がこれ迄にヒドロフォ

ビン Ro1A と新規タンパク質 HsbA が固相表面でクチナーゼ CutL1 をリクルートすることを発見した菌である。

- ② □ 麹菌はゲノム解析が完了しており、遺伝子及びタンパク質の参照が容易である。
- ③ □ 我々は、麹菌ゲノム解析から麹菌 DNA マイクロアレイ (12,000 遺伝子) の作製と利用実績がある。特に麹菌ハイドロフォビン Ro1A の生プラ上での誘導を DNA マイクロアレイ解析により見出した。

(2) 分泌生産される固体基質吸着タンパク質 (界面活性タンパク質) 及び酵素種を、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により推定した。

(3) 同様に二次元電気泳動によるプロテオーム解析により同定した。

(4) 同定された固体表面吸着タンパク質遺伝子を cloning し、組み換え体を生産・精製して、標的微粒子上に吸着させたビーズを作製した。再度、各基質で生産される酵素類のビーズへの吸着を確認して、界面活性タンパク質-相互作用酵素種の組合せを決定した。組合せが同定された分子種は、分子間相互作用解析装置 QCM を用いて、相互作用 kinetics の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 酵素をリクルートする界面活性タンパク質の探索：セルロースの 1 種であるアビセルを基質として麹菌 (AoXln 高発現株) を、硬蛋白質として精製ケラチンを基質として麹菌 RIB40 株を生育させて、転写解析と吸着タンパク質の抽出解析を行った。固体基質に生育させた麹菌菌体よりの mRNA の抽出および固体基質に吸着したタンパク質の抽出法の開発を行った。セルロースについては、mRNA の抽出も可能であり DNA マイクロアレイを用いた転写解析を行った。固体表面からは SDS 抽出によるタンパク質回収に成功した。セルロース表面からの回収タンパク質にはセルラーゼ類の他に、機能未知の分子量 2 万以下の候補タンパク質が複数見出された。金沢工業大学と (独) 製品評価技術基盤機構において MASS 解析を行って、セルロース結合タンパク質として、複数の β -1,4-グルカナーゼ、 β -1,4-グルコシダーゼ類に加えて、既知界面活性タンパク質 Ro1A, HsbA と機能未知の分子量 2 万以下のセルロース結合タンパク質 2 種 (0334 と 0357) を同定した。一方、ケラチン結合タンパク質としては、Ro1A と HsbA およ

び複数のプロテアーゼ類が見出された。そのため、以下、新奇セルロース結合タンパク質について解析を進めた。

(2) セルロース結合タンパク質の機能解析：麹菌 RIB40- Δ ligD 株を用いて、0334 及び 0357 の遺伝子破壊株を作出した。その結果、両破壊株をアビセル含有最少寒天培地に生育させると親株に比較してセルロース分解能が低下していた。

(3) セルロース結合タンパク質とキシラナーゼの相互作用解析：0334 と 0357 タンパク質がセルロース分解に関与することが遺伝学的に示唆されたので、それら 2 種のタンパク質を麹菌で高発現して、限外濾過 (30kDa > 目的タンパク質 > 5kDa) にて精製を行った。それら精製 0334 および 0357 をアビセルに吸着させた後に、そのタンパク質被覆セルロースにリクルートされる AoXlnR 高発現株培養液中の酵素として、多糖結合ドメインを持たない Xylanase F3 (XynF3) を同定した。金工大・佐野が作製した XynF3 高発現麹菌より XynF3 を精製し、別途精製した 0334・0357 精製蛋白質を用いて、Quartz Crystal Microbalance 装置 (QCM) にて相互作用解析を行った。結果、固体表面に結合した 0334 及び 0357 は XynF3 とは、解離定数 $K_D \approx 10 \mu\text{M}$ 程度で弱い相互作用することが明らかになった (図 1)。

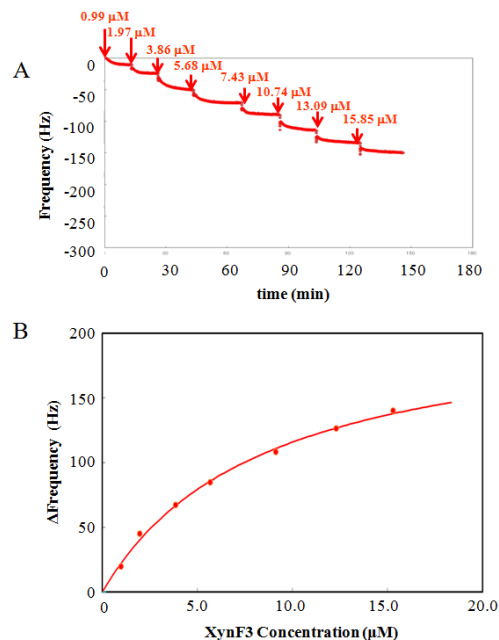


図 1. QCM による界面活性タンパク質 0334 (電極固定) と可溶性 XynF3 の相互作用解析 (pH7.0) (A) 0334 をマウントしたセンサー電極を 500 μl の 15mM リン酸緩衝液の入ったチャンバーに浸漬し、可溶性 XynF3 を段

階的に添加して、振動数の減少を観察した。(B) A で観察したデータを Langmur の等温吸着曲線にフィッティングして、 $K_D=10, 62 \pm 5.59 \mu M (n=4)$ を得た。

(4) 界面活性タンパク質 RoIA と酵素の相互作用の機構解析：一方、従来のポリエステルに加え、セルロース、ケラチンにおいても、疎水性固体に結合する蛋白質として既に我々が同定していた RoIA や HsbA が結合し得るタンパク質であることが示された。RoIA, HsbA が汎用性のある固体結合蛋白質であることが明らかになったので、RoIA とエステラーゼ CutL1 をモデルに、界面活性タンパク質と酵素の相互作用部位について変異体を用いて詳細に解析し、両者の相互作用が静電相互作用に依存することを明らかにした(図 2)。その結果、RoIA 末端の正静電荷を有する His32, Lys34 と、CutL1 分子表面の 3 種の負電荷アミノ酸 Glu31, Asp142, Asp171 が相互作用に必要であることが明らかになった。変異により K_D 値が増大し、CutL1 の三重変異体では RoIA と相互作用し得ないほどに K_D 値が増大した。

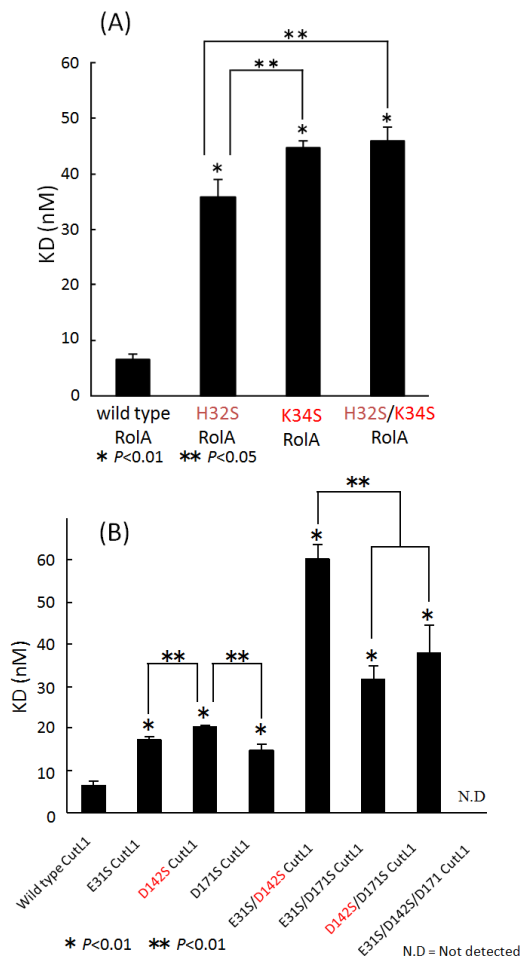


図 2. QCM 解析による界面活性タンパク質 RoIA とエステラーゼ CutL1 の相互作用に必要な

アミノ酸残基の決定(A) RoIA の H32S, K34S の単独・二重変異体の CutL1 に対する K_D 値、(B) CutL1 の E31S, D142S, D171S 単独・二重・三重変異体の RoIA に対する K_D 値

以上、本研究成果は、糸状菌の産生する複数の界面活性タンパク質が固液界面において、酵素をリクルートすることで多様な分解機能を示すことを微生物学的・生化学的に明らかにしたものである。本成果は、微生物学的には、「天然環境における高分子分解システムの新機構」を提示しており、またそのシステムを大規模高分子分解や機能性粒子として産業応用する可能性も提示しており、有意義である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- Hagiwara D., T. Mizuno, and K. Abe, Characterization of the conserved phosphorylation site in the *Aspergillus nidulans* response regulator SrrA. 査読有 *Curr. Genet.* 57: 103-114, 2011
- 阿部敬悦, 上原健二, 高橋徹, 大滝真作, 前田浩, 山形洋平, 五味勝也, 長谷川史彦, 麹菌固体発酵システムによる新規バイオプロセスへの挑戦-生分解性プラスチックのバイオケミカルリサイクル-, 日本醸造協会誌 査読無 104:10-18, 2009
- Noguchi Y, Sano M, Kanamaru K, Ko T, Takeuchi M, Kato M, Kobayashi T. Genes regulated by AoXlnR, the xylanolytic and cellulolytic transcriptional regulator, in *Aspergillus oryzae*. 査読有 *Appl Microbiol Biotechnol.* 85: 141-154, 2009

[学会発表] (計 13 件)

- Muragaki K. et al., Glu31, Asp142 and Asp171 of *Aspergillus oryzae* cutinase CutL1 are required for both interaction with hydrophobin RoIA and consequent stimulation of polyester-degradation, 26th Fungal Genetics Conference, 2011 年 3 月 15-20 日, Asilomar 米国
- 佐野元昭, 北川治恵, 阿部敬悦, 大箸信一, セルロースに吸着しているタンパク質の決定, セルロース学会, 2009 年 7 月 3 日, 北海道大学 札幌
- Abe K. et al., Novel functions of fungal biosurfactant proteins in degradation of biopolymers: *Aspergillus oryzae* hydrophobin RoIA laterally moves on hydrophobic surfaces and recruits polyesterses. Korean Fungal Genetics and Biology Conference, January 14-15, 2009, Seoul National University, Seoul Korea

他 10 件

[図書] (計 1 件)

- ① Abe K., K. Furukawa, T. Fujioka, D. Hagiwara, H. Maeda, J. Marui, O. Mizutani, T. Takahashi, A. Yoshimi, Y. Yamagata, K. Gomi, F. Hasegawa, “Novel Industrial Applications of *Aspergillus oryzae* Genomics.” *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, Chapter 10, pp. 199–227, 2010, Caister Academic Press

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.niche.tohoku.ac.jp/index.php?page=project_abe

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 敬悦 (ABE KEIETSU)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号 : 50312624

(2) 研究分担者

佐野 元明 (SANO MOTOAKI)
金沢工業大学・ゲノム生物工学研究所・
講師
研究者番号 : 80410299