

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05815

研究課題名(和文) 糸状菌由来の新規多糖分解酵素の探索と機能・構造解析

研究課題名(英文) Rhamnogalacturonan degradation mechanism of *Aspergillus nidulans*

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： *Aspergillus nidulans* などの糸状菌は、細胞外に様々な多糖分解酵素を分泌する。ペクチンのみを炭素源にして *A. nidulans* を培養後、セクレトーム解析した結果、既知のタンパク質とアミノ酸配列レベルで全く相同性がない機能未知タンパク質 (HP) が同定された。それらの中で、機能未知の hypothetical protein 1 (HP1) について解析したところ、不飽和結合を含む RG オリゴ糖が検出されたことから HP1 は新規なラムノガラクトツロナンリアーゼ (AnRGL) であった。また、X-線構造解析から、AnRGL は  $\alpha$ -ヘリックス構造を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペクチンの分解で生じるオリゴ糖 (D-ガラクトシル- $\alpha$ -1,4-ラムノース) を炭素源として、ビフィズス菌 *Bifidobacterium infantis* と難病の偽膜性腸炎原因菌 *Clostridium difficile* を共培養したところ、*C. difficile* の増殖を抑えることが報告されており、応用研究にも波及効果が期待できる。

本研究により見出された糸状菌由来のペクチン分解酵素の利用によって、ペクチンを多く含む果皮などの未利用植物資源から新規機能性オリゴ糖を生産することが可能になり、上記のような疾病予防効果を通じて、人類の健康に貢献できる。

研究成果の概要(英文)： Hypothetical proteins (HPs) were produced by *Aspergillus nidulans* grown with pectin as a sole carbon source. Among them, we identified a novel rhamnogalacturonan (RG) lyase (AnRGL) with no similarity to any described functional proteins and no putative conserved domains. AnRGL showed significant activity toward RG, while activity toward polygalacturonic acid,  $\alpha$ -1,5-arabinan, arabinogalactan, and  $\alpha$ -1,4-galactan, which are components of pectin, were not detectable. RG degradation products by AnRGL were analyzed using MALDI-TOF-MS. RG oligosaccharides containing unsaturated bonds were identified. These results indicate that AnRGL is a novel RG lyase that belongs to a new polysaccharide lyase (PL) family. The crystal structure of AnRGL was solved at a resolution of 1.72 Å, and AnRGL is a  $\alpha$ -helix structure.

研究分野：応用微生物学

キーワード： *Aspergillus nidulans* pectin rhamnogalacturonan lyase

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物バイオマスに含まれる多糖は自然界に多く存在しており、それらを利用したバイオリファイナリーが期待されている。これまでに研究代表者らは、植物バイオマスに含まれる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、機能が分かっているタンパク質(β-マンナーゼを含む)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んでいない新規のβ-マンナーゼ (Man134A) を発見し、GH134 ファミリーを新設した。

この経験から、研究代表者らはこれまで知られていない機能や構造を持つタンパク質がまだまだ糸状菌には多数存在すると考え本研究を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、プロテオミクスの手法を用いてペクチン(図1)応答的に生産されるタンパク質を網羅的に解析することで、ペクチン分解に関与する可能性がある機能未知タンパク質(HP)を絞り込みそれらの機能を解析することを目的とした。これまでに発見されていないペクチン分解に関与する新規酵素の発見を目指した。

### 3. 研究の方法

ペクチンのみを炭素源として糸状菌 *A. nidulans* を生育させ、ペクチン(RG-I, RG-II およびそれらの側鎖を構成するそれぞれの多糖)応答的にタンパク質を生産させた。得られた細胞外タンパク質を LC-MS/MS(ハイブリッド四重極-オービトラップ質量分析計)にて網羅的に解析し、ペクチン応答的に生産された HP を選抜した(図2)。

発現量が多かった HP1 ~ HP8 のリコンビナントタンパク質を大量に生産するために、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を宿主に用いた(図2)。*hp1* ~ *hp8* を挿入し構築したプラスミドをエレクトロポレーション法にて *P. pastoris* に導入した。生産された HP1 ~ HP8 のリコンビナントタンパク質を精製し、ペクチンを構成する多糖反応させた(図2)。TLC、MALDI-TOF-MS および HPLC にて反応生成物を分析することで、酵素の基質特異性を解析した(図2)。また、蒸気拡散法にて HP1 を結晶化させ X 線結晶構造解析を行った(図2)。

*hp1* 遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、生育やペクチンの分解に及ぼす影響も解析した。

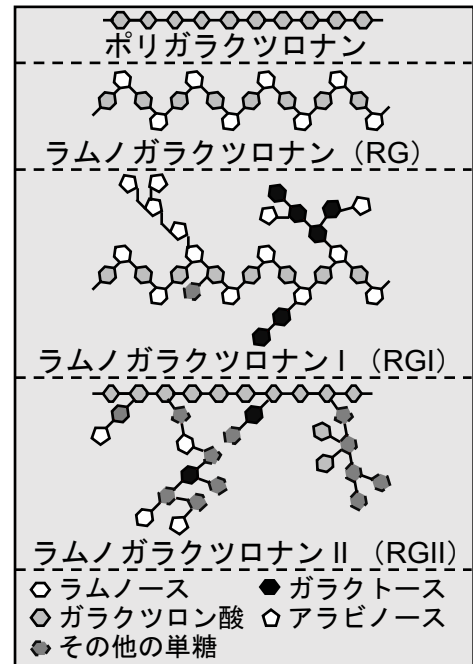


図1 ペクチンを構成する多糖

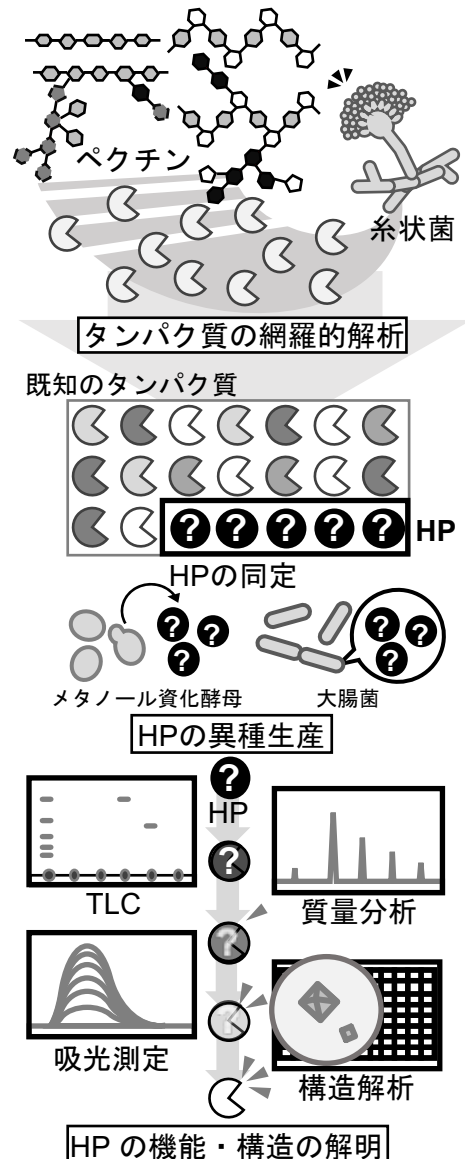


図2 研究方法

#### 4. 研究成果

ペクチンのみを炭素源にして *A. nidulans* を培養後、セクレトーム解析した結果、既知のタンパク質とアミノ酸配列レベルで全く相同性がない機能未知タンパク質 (HP) が多数同定された。それらの中で、機能未知の HP1 について、ペクチンの構成多糖と反応させたところラムノガラクトツロナン (RG) に作用した。反応産物を解析したところ、不飽和結合を含む RG オリゴ糖が検出されたことから HP1 は新規なラムノガラクトツロナンリアーゼ (AnRGL) であった(図3)。

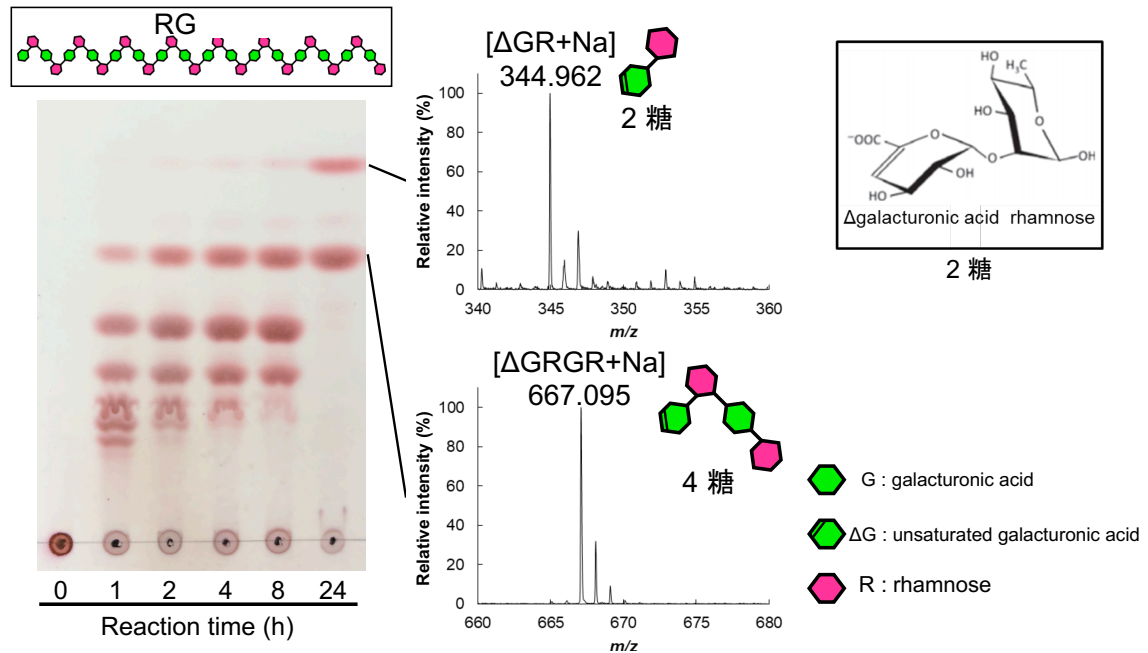


図3 HP1 によるラムノガラクトツロナン (RG) の分解

また、野生株および AnRGL の遺伝子破壊株 ( $\Delta$ AnRGL 株) を RG のみを炭素源にして培養後、得られた細胞外面分と RG を反応させた。その結果、 $\Delta$ AnRGL 株では RG オリゴ糖が検出されなかったことから、AnRGL は、主要なエンド型の RG 分解酵素であることが明らかになった。さらに、セクレトーム解析により同定された GH105 に分類される unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase (AnURH) は AnRGL の分解産物である不飽和 RG オリゴ糖を加水分解した。

以上の結果から、糸状菌 *A. nidulans* による RG 分解において、AnRGL および AnURH が中心的な役割を果たしていることが明らかになった。

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 3件）

1. 著者名 Suzuki Hiromitsu, Morishima Toshiki, Handa Atsuya, Tsukagoshi Hironaka, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 194
2. 論文標題 Biochemical Characterization of a Pectate Lyase AnPL9 from <i>Aspergillus nidulans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Biochemistry and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 5627 ~ 5643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12010-022-04036-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 -
1. 著者名 Suzuki Hiromitsu, Mori Reini, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 135
2. 論文標題 Biochemical characterization of hydroquinone hydroxylase from <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 17 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2022.10.001	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 Kato Hiroyuki, Furusawa Terumi T., Mori Reini, Suzuki Hiromitsu, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 106
2. 論文標題 Characterization of two 1,2,4-trihydroxybenzene 1,2-dioxygenases from <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 4499 ~ 4509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-022-12007-9	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 Kato Hiroyuki, Sakai Kiyota, Itoh Shou, Iwata Naoyuki, Ito Masafumi, Hori Masaru, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Enhanced Bioremediation of 4-Chlorophenol by Electrically Neutral Reactive Species Generated from Nonthermal Atmospheric-Pressure Plasma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 16197 ~ 16203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c01615	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 Nomura Ryo, Tsuzuki Sho, Kojima Takaaki, Nagasawa Mao, Sato Yusuke, Uefune Masayoshi, Baba Yasunori, Hayashi Toshiya, Nakano Hideo, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Administration of Aspergillus oryzae suppresses DSS-induced colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Chemistry: Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 100063 ~ 100063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fochms.2021.100063	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, Yamaguchi Aya, Tsutsumi Seitaro, Kawai Yuto, Tsuzuki Sho, Suzuki Hiromitsu, Jindou Sadanari, Suzuki Yoshihito, Kajimura Hisashi, Kato Masashi, Shimizu Motoyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of FsXEG12A from the cellulose-degrading ectosymbiotic fungus Fusarium spp. strain EI cultured by the ambrosia beetle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13568-020-01030-6	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 Yamashita Miharuru, Tsujikami Masaya, Murata Shunsuke, Kobayashi Tetsuo, Shimizu Motoyuki, Kato Masashi	4. 巻 145
2. 論文標題 Artificial AmyR::XlnR transcription factor induces $\alpha$ -amylase production in response to non-edible xylan-containing hemicellulosic biomass	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 109762 ~ 109762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.enzmictec.2021.109762	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 森玲香, 鈴木裕満, 加藤雅士, 志水元亨
2. 発表標題 白色腐朽担子菌 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 由来の新規 flavin-containing monooxygenase の機能・構造解析
3. 学会等名 糸状菌分子生物学カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Hiroyuki Kato, Kiyota Sakai, Shou Ito, Naoyuki Iwata, Masafumi Ito, Masaru Hori, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato
2. 発表標題	Enhanced bioremediation of 4-chlorophenol by oxygen radical treatment based on non-thermal atmospheric pressure plasma
3. 学会等名	14th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	野村亮, 都築翔, 木村公俊, 兒島孝明, 志水元亨, 加藤雅士
2. 発表標題	発酵食品に含まれる 麹菌のプレバイオティクス効果
3. 学会等名	日本農芸化学会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	H. Kato, S. Ito, K. Sakai, V. Gamaleev, M. Ito, M. Hori, M. Shimizu, M. Kato
2. 発表標題	13.Oxygen radical based on NTAP converts lignin-derived phenolics vanillin, an inhibitor of bioethanol fermentation by yeast
3. 学会等名	13th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	伊東昂希、鈴木裕満、鈴木健吾、酒井杏匠、高須賀太一、堀千明、加藤雅士、志水元亨
2. 発表標題	Aspergillus nidulans 由来新規ラムノガラクトツロナンリアーゼの機能解析
3. 学会等名	日本農芸化学会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 森島俊輝、伊東昂希、酒井杏匠、志水元亨、加藤雅士
2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus nidulans</i> が生産するペクチン酸リアーゼAnPL9の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021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	高須賀 太一  (Takasuka Taichi)  (70748409)	北海道大学・農学研究院・准教授    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------