

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15251

研究課題名(和文) 高等菌類が保有する植物・動物性多糖のホスホリラーゼ依存型糖代謝機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of phosphorylase-dependent metabolisms of plant and animal polysaccharides in higher fungi

研究代表者

知久 和寛 (Chiku, Kazuhiro)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・講師

研究者番号：30711618

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)：高等菌類であるキノコは、地球上の生態系における炭素循環システムの維持に大きく貢献しており、植物性・動物性多糖の代謝機能に優れた微生物種の一つである。キノコはこれら多糖を効率的に分解・資化するための多様な糖関連酵素を保有しているものの、特にその細胞内代謝に関わる酵素についてはあまり解析が進められていない。

本研究において、キノコが保有する植物性・動物性多糖の細胞内代謝に関与する多様な糖質分解酵素群を発見することができ、その系統学的分類や基質特異性などの新しい学術的知見を蓄積することが出来た。本研究成果は、高等真菌類におけるユニークな代謝機構を理解するための基盤になっていくだろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは多くの細菌種より新規ホスホリラーゼを発見している。この発見は微生物が自然環境下で生存競争に勝ち残るために、多糖・オリゴ糖をエネルギー獲得に向けて効率良く代謝する、ホスホリラーゼ依存型代謝系の存在を示唆するものである。本研究は高等菌類であるキノコにおいて初めて、その代謝系を解明することを目的にしたことに学術的意義がある。

特にキノコにおいては植物性・動物性多糖の細胞内代謝系に関与する多様な酵素群の存在は示唆されつつも、十分な解析が進められていない。本研究成果は、高等真菌類であるキノコが保有するユニークな糖代謝機構を解明するための、重要な学術的知見の一つになっていくだろう。

研究成果の概要(英文)：Mushrooms, which are higher fungi, contribute significantly to the maintenance of the carbon cycle system in the earth's ecosystems, and are one of the microbial species with excellent metabolic functions of plant and animal polysaccharides. Although mushrooms possess a variety of carbohydrate-related enzymes for efficient degradation and metabolism of these polysaccharides, the enzymes involved in their intracellular metabolism have not been well analyzed. In this study, we were able to discover various carbohydrate-related enzymes involved in the intracellular metabolism of plant and animal polysaccharides possessed by mushrooms, and to accumulate new academic knowledges on their systematic classifications and substrate specificities. Our results will provide a base for understanding the unique metabolic systems in higher fungi.

研究分野：応用微生物学、酵素化学、糖質科学

キーワード：微生物酵素 高等真菌 キノコ オリゴ糖 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キノコは担子菌門および子囊菌門に属する高等菌類であり、森の分解者として、地球上の生態系における炭素循環システムを維持するのに大きく貢献している微生物種の一つである。自然界に存在する代表的な多糖であるデンプン、セルロース、キチンなどの植物性・動物性多糖の分解能および資化能に長けており、その資化に関わる多様な酵素群をもつ。また多糖・オリゴ糖の合成能にも長けており、 β -グルカンやマンナンなどの細胞外多糖やトレハロースなどの貯蓄性オリゴ糖、キノコ表面に見られるヌメリ成分である無数の糖鎖を配した糖タンパク質を効率的に生産することが知られている。

このように、多種多様な多糖・オリゴ糖を資化・生合成できるキノコであるが、それら糖代謝を効率的とするために多様な糖質分解酵素を保有している。その代謝時の鍵タンパク質として、申請者は複数種のキノコから植物性・動物性多糖の分解産物であるマルトオリゴ糖、セロオリゴ糖、キチンオリゴ糖などの細胞内分解に関与する新規な糖質分解酵素群を複数発見している。これら糖質分解酵素群がキノコの効率的な糖代謝を可能としていることが予想されているものの、特に植物性・動物性多糖の分解産物の細胞内代謝に関与する酵素群の系統学的分類や基質認識機構や反応メカニズムなどの学術的知見が十分に得られていない状況であった。

さらに見出された糖質分解酵素群の一つとして、加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)も見出された。ホスホリラーゼは、無機リン酸存在下で多糖・オリゴ糖のグリコシド結合を非還元末端側から順次加リン酸分解し、糖 1-リン酸を遊離する酵素である(図1)。

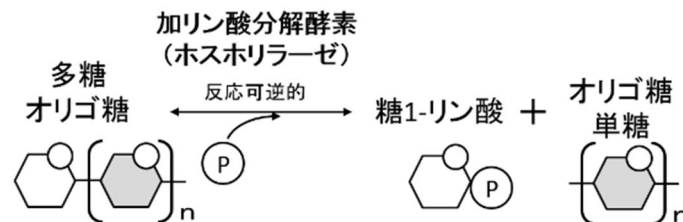


図1. 加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)による反応

ホスホリラーゼが関与する糖代謝機構は、既知の糖質加水分解酵素による単糖化と ATP 消費を伴うキナーゼによるリン酸化経路に比べ、単糖の資化や多糖・オリゴ糖の生合成に必要な糖 1-リン酸の生成過程において ATP 消費が削減されるため、効率的であると考えられている。その効率的なエネルギー消費を特徴とするホスホリラーゼ依存型代謝は、限られた栄養源や生息圏を確保するための微生物独自の生存戦略として機能しているが、十分な学術的知見の蓄積があるとは言い難い。申請者らは、これまで動物の腸内深部や植物体内環境に生息する嫌気性細菌がエネルギー効率的に優位と考えられるホスホリラーゼ依存型代謝機構を保有することを示唆してきたが、高度な糖代謝機能を保有する高等菌類であるキノコもまたこれら代謝機構に関連した酵素群を有していることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、キノコが保有する効率的な細胞内糖代謝を可能とする糖質分解酵素群の諸性質を明らかにすることで、これら酵素が関与する新規代謝機構の全貌を明らかにすることである。具体的には、申請者がキノコの菌糸体細胞内成分より見出した、植物性・動物性多糖の分解産物であるマルトオリゴ糖、セロオリゴ糖、キチンオリゴ糖などの細胞内分解に寄与する新規酵素群の性状や構造を解明するとともに、その糖代謝機構に関与するタンパク質群や遺伝子群を同定し機能解析することで、これら酵素が関与する細胞内糖代謝機構の生理的機能を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) キノコの酵素生産培養

保有しているキノコライブラリーのうち、食用や薬用とされている比較的培養しやすい菌株やゲノム DNA 配列の解読が完了したもしくは進行中である菌種を中心に、ポテトブドウ糖寒天培地上に植菌し、25°Cで二週間ほど前培養した。寒天培地上に生育した菌糸体のコロニーの外周付近を、滅菌したコルクボーラーを用いて直径 1.0 cm 系で 3 か所採取し、セロハンフィルムを貼り付けたポテトブドウ糖寒天培地や各種炭素源(マルトオリゴ糖, セロオリゴ糖, キチンオリゴ糖など)を添加した合成寒天培地上に植菌後、25°Cで 2~3 週間酵素生産培養を行った。培養後、菌体を培地から、セロハンフィルムごとピンセットで剥がすことで集菌した。

集菌した菌体は、海砂とエチレンジアミン四酢酸を含む緩衝液に混和し、氷冷した乳鉢上で乳棒を用いて液状になるまでよく磨り潰した。菌体の破碎を顕微鏡観察で確認した後、その破碎溶液を遠沈管にいれ、遠心分離を行った。菌体の細胞抽出液を含む上清液を回収後、硫酸アンモニウムを用いた塩析によりタンパク質を濃縮し、その後透析フィルムを用いることにより脱塩を行った後に酵素活性の確認に用いた。

(2) ホスホリラーゼ逆反応活性や糖転移活性の確認方法

得られたタンパク質濃縮液を、10 mM の糖受容体基質(単糖であるグルコース, マンノース, ガラクトース, フルクトース, *N*-アセチルグルコサミン, グルコン酸, グルクロン酸などやオリゴ糖であるトレハロース, マルトース, スクロース, ラクトースなど)と 10 mM の糖与体(α -もしくは β -グルコース 1-リン酸などの糖 1 リン酸もしくはオリゴ糖)を含む反応系にて、30°Cで 1 時間反応させた。なおブランクとしては、タンパク質濃縮液の代わり緩衝液を添加した。反応後、TLC シリカゲルプレート上に各種反応液を 1 μ L ずつアプライし十分乾燥させ、展開液として 80%アセトニトリルを用いた展開層に入れ、3 回展開させた。展開後は十分乾燥させた後、アニスアルデヒド/酢酸/硫酸/エタノール発色液に浸し、オープントスターを用いて TLC 上にスポットが見えるまで十分に加熱した。

(3) キノコ由来新規糖質関連酵素の抽出および精製

キノコの細胞内成分中より見出されたホスホリラーゼ活性や糖転移活性に関与するタンパク質の酵素化学的性質と一次構造を決定するために、中高压液体クロマトグラフィーシステム AKTApriime plus (旧 GE ヘルスケアライフサイエンス社製, 現 Cytiva 社)(本申請研究で購入)に各種カラムクロマトグラフィーを接続し酵素の精製を検討した。

(4) 酵素タンパク質の N 末端アミノ酸配列の分析

酵素の N 末端アミノ酸配列情報を得るために、精製した酵素を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に、PVDF 膜上に転写した。その後転写したタンパク質はポンソーS(シグマ社製)を用いて染色後、PVDF 膜上の目的タンパク質を含むバンドごとハサミで切り出した。その後、プロテインシークエンサーPPSQ-21A(島津社製)を用いて、N 末端アミノ酸配列情報を取得した。

4. 研究成果

(1) 各種キノコを培養した後の細胞内成分における酵素活性の確認

キノコの保有菌約 150 株をポテトブドウ糖寒天培地上で 2~3 週間生育させた。そのうち生育

が良好であった 46 菌株を，ポテトブドウ糖寒天培地もしくは各種炭素源を添加した合成寒天培地上にセロハンフィルムを貼り付けた後に植菌し，2~3 週間培養した。ポテトブドウ糖液体培地や炭素源として含む合成液体培地による培養法も検討したが，キノコの生育が不十分であったり回収できるタンパク質量が低かったりしたことから，回収できるタンパク質量が比較的高くなる傾向にあったセロハンフィルムを貼り付けた寒天培地を用いた固体培養法を適用した。

培養後，回収した菌体を金属プロテアーゼ阻害剤として EDTA を含む緩衝液と混和し，海砂を用いて乳鉢上で菌体を良くすり潰した。菌体が十分に破碎されたかは，顕微鏡を観察することで確認した。なおホモジナイザーを用いた破碎法も検討したが，20,000 rpm で 30 分間処理後も菌糸体構造が顕微鏡で観察されたため，海砂を用いた破碎法を適用することにした。

遠心分離により菌体残さを除去した後，得られた細胞内成分抽出液を 70% 飽和硫酸アンモニウム濃度にする事でタンパク質を沈殿させ，さらに透析することでタンパク質濃縮液を取得した。また，タンパク質安定化剤として，グリセロールや酸化防止剤である 2-メルカプトエタノールの添加も試みたが，これら安定化剤がのちに行う TLC を用いたオリゴ糖合成活性の確認を阻害したため，本研究では使用しなかった。

各種キノコの細胞内成分のタンパク質濃縮液を用いて，糖供与体基質として α -グルコース 1-リン酸を，さらに糖受容体基質として 12 種類の単糖・オリゴ糖を用いて，ホスホリラーゼ逆反応活性(図 1 中の右から左への反応)や糖転移活性を，TLC シリカゲルプレートを用いて確認した。ある培養したキノコから抽出したタンパク質濃縮液より糖受容体としてマルトースに反応し，三糖と思われるオリゴ糖の生産能を TLC 上で確認できた。三糖と思われるオリゴ糖をゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて精製し，核磁気共鳴装置で構造解析した結果，主生成物としてマルトトリオースを含むことが確認された。

糖供与体として α -グルコース 1-リン酸を生成する基質認識性の異なったホスホリラーゼは現在 11 種類が報告されているが，マルトースにのみ特異的に反応するホスホリラーゼは報告例がない。今後これらキノコ(その中で最も高い活性が見られた食用キノコをキノコ A とし，以下の結果に記述した)が産生する酵素の性状についてタンパク質精製などを経て詳細に調べていく必要があると考え，酵素の精製を検討した。

(2) キノコ A からのマルトースへの糖転移反応を示す酵素の精製条件の検討

キノコ A をポテトデキストロス寒天培地上で 22 日間培養し菌体を回収後，凍結乾燥したものから粗酵素溶液を調製した。粗酵素を陰イオンクロマトグラフィー，疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー，限外ろ過膜を用いた分画により，分子量 50,000 から 100,000 の部分酵素タンパク質を取得した。また精製した酵素は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後，プロテインシークエンサーを用いて，N 末端アミノ酸配列情報を取得した。

(3) キノコ A からのマルトースへの糖転移反応を示す酵素の酵素活性の評価

次に，キノコ A から取得した部分精製酵素を用いて各種糖類に対する反応性を調べた(図 2)。細胞内成分のタンパク質濃縮液を用いた際と同様に，マルトースに強い糖転移活性が見られ，三糖と四糖のマルトオリゴ糖が生成した。他にも α 1,2 結合をもつコージビオースや α 1,3 結合をもつニゲロースに対しても加水分解活性が見られさらに弱く糖転移活性も見られた。 α 1, α 1 結合をもつトレハロースや α 1,6 結合をもつイソマルトース，メチル- α , β -グルコシド，ソホロース・ラミナリビオース・セロビオース・ゲンチオビオースなどの β -グルコシド類，単糖のグルコースに対しては加水分解活性も糖転移活性も確認できなかった。またスクロース(グルコピラノース-

α -(1 \rightarrow 2)- β -フルクトフラノース) に対しても加水分解活性のみが確認された。これはスクロースの α -グルコピラノース部分を酵素が認識して加水分解したものと思われる。一方で、メチル- α -グルコシドについては加水分解活性も糖転移活性も確認できなかった。ただし、これら反応は糖供与体基質である α -グルコース 1-リン酸を含まない場合も進行し、無機リン酸条件下でマルトースを基質とした際に α -グルコース 1-リン酸の遊離は確認できなかった。したがって、目的酵素は α -グルコース 1-リン酸を糖転移反応の基質にすることが出来るものの、分類上は α -グルコシダーゼの一種であることが示唆された。

以上の結果より本酵素の基質認識性については、加水分解活性および糖転移活性を示す上での基質の認識性は糖供与体側のサブサイト-1 の位置に α グルコース残基があることが必須であること。糖転移反応時は糖受容体側のサブサイト+1 部分に 2 位, 3 位, そして 4 位にグルコシド結合を伴ったグルコース残基が必要であること。またサブサイト+1 側にフルクトフラノース残基があった場合は糖転移反応を触媒しないことが分かった。

本酵素のマルトースへの糖転移活性における至適 pH を測定した結果、pH 6.5 のリン酸緩衝液下でもっとも高い酵素活性を示した。また pH 5.5 から pH 8.5 の緩衝液下で安定であった。

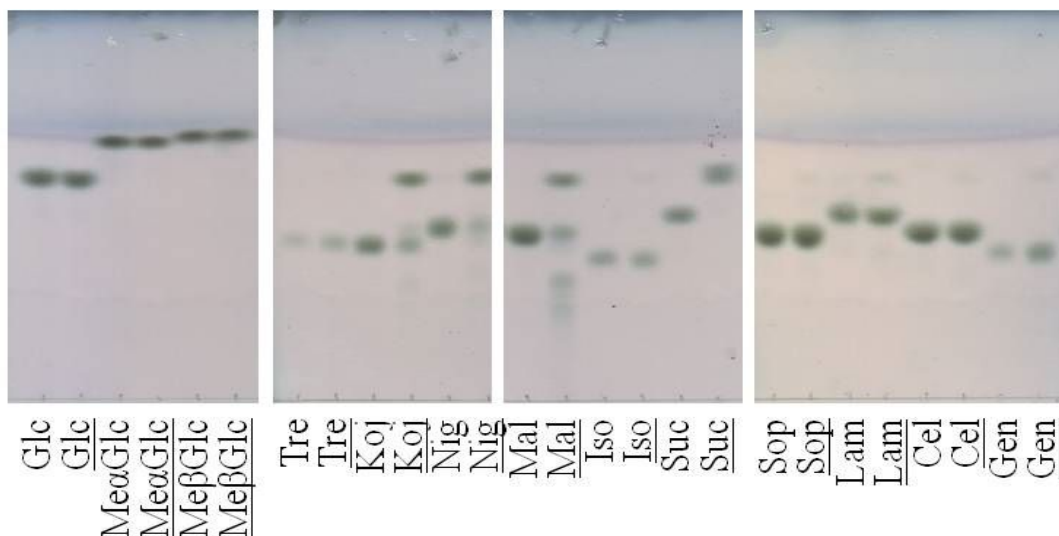


図 2 . 部分精製酵素を用いた本酵素の基質特異性の確認 (TLC 法)

各レーンは基質として用いた糖を示す。アンダーラインは酵素を添加したものを示す。

Glc, グルコース; Me α Glc; メチル α グルコシド; Me β Glc, メチル β グルコシド; Tre., トレハロース; Koj, コージビオース; Nig, ニゲロース; Mal, マルトース; Iso, イソマルトース; Suc, スクロース; Sop, ソホロース; Lam, ラミナリビオース; Cel, セロビオース; Gen, ゲンチオビオースを示す。

(4) その他のキノコ菌種から見出された酵素の評価

その他のキノコ菌種から見出されたマルトオリゴ糖, セロオリゴ糖, キチンオリゴ糖の細胞内分解に寄与するホスホリラーゼ活性や糖転移を含む新規酵素群の性状評価やそのアミノ酸配列情報についても同様に実験を進めている。

得られた配列情報を元に、大腸菌や担子菌を用いた組換え酵素の発現系の構築を進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----