

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02132

研究課題名(和文) 微生物のオリゴ糖を介した環境認識

研究課題名(英文) Environmental-recognition of microorganisms through oligosaccharides

研究代表者

松沢 智彦 (Tomohiko, Matsuzawa)

香川大学・農学部・助教

研究者番号：10711971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：麹菌 *Aspergillus oryzae* において、キシログルカンおよびキシログルカンオリゴ糖の分解に重要な酵素(イソプリメペロース生成酵素、 β -ガラクトシダーゼ、2つの β -キシロシダーゼ、2つのキシログルカン特異的 β -1,4-グルカナーゼ)の同定と解析を実施した。これらの酵素のいくつかはキシログルカンオリゴ糖存在下においてその遺伝子の発現が誘導され、協調的にキシログルカンおよびキシログルカンオリゴ糖を分解していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麹菌は醸造産業において重要な微生物であり、多糖類やタンパク質を分解するために様々な酵素を生産している。キシログルカンは植物の細胞壁や種子に含まれている複雑な側鎖構造を有する多糖類であり、本研究では、麹菌がこのキシログルカンやキシログルカン由来オリゴ糖を分解する酵素群を明らかにした。麹菌はこれらの酵素を分解対象の基質やその分解物が存在する場合に積極的に生産し、これらの酵素を協調的に基質に作用させることによって巧みにキシログルカンを分解している。このことは、麹菌にはまだ認知されていない分解能力(酵素)とそれを引き出すためのきっかけ(誘導物質)があることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Xyloglucan/xyloglucan-oligosaccharide degradation-related enzymes, such as isoprimeverose-producing oligoxyloglucan hydrolase, β -galactosidase, extracellular- and intracellular- β -xylosidases and xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanases, were identified and characterized in *Aspergillus oryzae*. The gene expressions of some of these glycoside hydrolases were induced in the presence of xyloglucan-oligosaccharides and these enzymes hydrolyzed xyloglucan/xyloglucan-oligosaccharides cooperatively.

研究分野：酵素学

キーワード：酵素 糖質 麹菌 微生物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多糖類は地球上に最も豊富に存在する生物資源であり、構造的多様性に富んでいる。微生物は複雑な構造の多糖類を分解するために様々な酵素を生産している。微生物にとって、どのような多糖類が外界に存在しているかを認識し、それを適切に分解・利用できるか否かは栄養源確保という生存戦略において極めて重要である。多糖類を酵素で分解する際には、多糖類の構造を部分的に保存した多種多様なオリゴ糖が生成され、微生物はこのオリゴ糖を認識してその分解に必要な糖質分解酵素を生産していることが報告されている。しかし、どのように微生物がオリゴ糖を認識し、遺伝子の発現を制御し、そして、どのような酵素を生産して多糖・オリゴ糖を分解しているのかは未解明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、醸造産業等において重要な麹菌 *Aspergillus oryzae* をモデル生物として使用し、麹菌がどのようなオリゴ糖に反応してどのような遺伝子の発現を変動させているのか、また、どのような酵素を生産して環境に適応しているのか、その分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、麹菌においてどのような遺伝子の発現がオリゴ糖や単糖によって誘導もしくは抑制されるかを、トランスクリプトーム解析によって網羅的に明らかにする。次に、オリゴ糖によって発現が誘導される遺伝子や酵素を解析する。また、オリゴ糖によって誘導される遺伝子の発現制御機構を明らかにすることによって、微生物がオリゴ糖を介して、どのように環境に適応しているのかを明らかにする。

4. 研究成果

植物の細胞壁や種子に含まれている多糖類「キシログルカン(α -1,4-グルカン主鎖にキシロースなどから構成される側鎖が付加した多糖類)」を微生物の酵素で部分分解し、キシログルカンオリゴ糖 (Glc₄Xyl₃, Glc₄Xyl₃Gal₁, Glc₄Xyl₃Gal₂ など) を調製した。当該キシログルカンオリゴ糖やその他の糖質(グルコースやキシロースなど)を添加した培地において麹菌を培養し、RNAを抽出した。抽出したRNAのトランスクリプトーム解析によって、キシログルカンオリゴ糖によって誘導される遺伝子、グルコースによって誘導・抑制される遺伝子、キシロースによって誘導される遺伝子、糖質の枯渇によって誘導される遺伝子などを網羅的に解析した。

本トランスクリプトーム解析によって、キシログルカンオリゴ糖存在下に様々な遺伝子、例えば推定糖質加水分解酵素遺伝子や推定トランスポーター遺伝子などの発現が誘導されていることが明らかになった。その中に、糖質加水分解酵素ファミリー(GH)35に属する酵素(LacA)とGH31に属する推定酵素(AxyAと命名)を見出した。そこで、これらの酵素を異種宿主発現によって調製し、その機能を解析した。

LacAは β -ガラクトシダーゼであり、ラクトースをガラクトースとグルコースに分解することができる。これに加えて、LacAはキシログルカンオリゴ糖の側鎖に付加しているガラクトースを遊離する活性も有しており、その活性はラクトースへの活性と比較して約7倍高いことが明らかになった。本酵素がキシログルカンオリゴ糖に効率的に作用するためには、同じくキシログルカンオリゴ糖によって発現が誘導されるイソプリメベロース生成酵素(IpeA: キシログルカンオリゴ糖の非還元末端側からイソプリメベロースを遊離する酵素)によるキシログルカンオリゴ糖の非還元末端のイソプリメベロースユニットの除去が必要であること、また、IpeAがキシログルカンオリゴ糖を分解するためにもLacAによるキシロース側鎖に付加したガラクトースの遊離が必要であることが明らかになった(下記図を参照)。IpeAとLacAは共にそのN末端側に分泌シグナルを有する細胞外酵素であり、キシログルカンオリゴ糖をその非還元末端側から協調的に分解し、キシログルカンオリゴ糖をイソプリメベロース(グルコースとキシロースから成る二糖)とガラクトースに分解する。

IpeAはGH3に属しており、キシログルカンオリゴ糖の非還元末端のイソプリメベロースユニット(グルコース主鎖とキシロース側鎖)を厳密に認識して切断・遊離するユニークな酵素である。本酵素のX線結晶構造解析によって、IpeAが基質のイソプリメベロースユニットを認識するメカニズムを明らかにすることができた。IpeAは β -グルコシダーゼとアミノ酸配列と立体構造が似ており、主鎖グルコースを認識する機構は β -グルコシダーゼとほとんど同じであるが、キシロース側鎖を認識するための特徴的なサブサイトを有していることが明らかになった。変異導入試験によって、このキシロース側鎖の認識を担うサブサイトを構成するアミノ酸残基がIpeAの活性に必須であること、また、IpeAが進化の過程において β -グルコシダーゼと同一の起源から出現したと可能性が高いことが示された。

次に、LacAやIpeAと同様に、キシログルカンオリゴ糖存在下において発現が誘導されるAxyAを異種宿主発現によって調製し、その機能を解明した。その結果、AxyAは β -キシロシダ

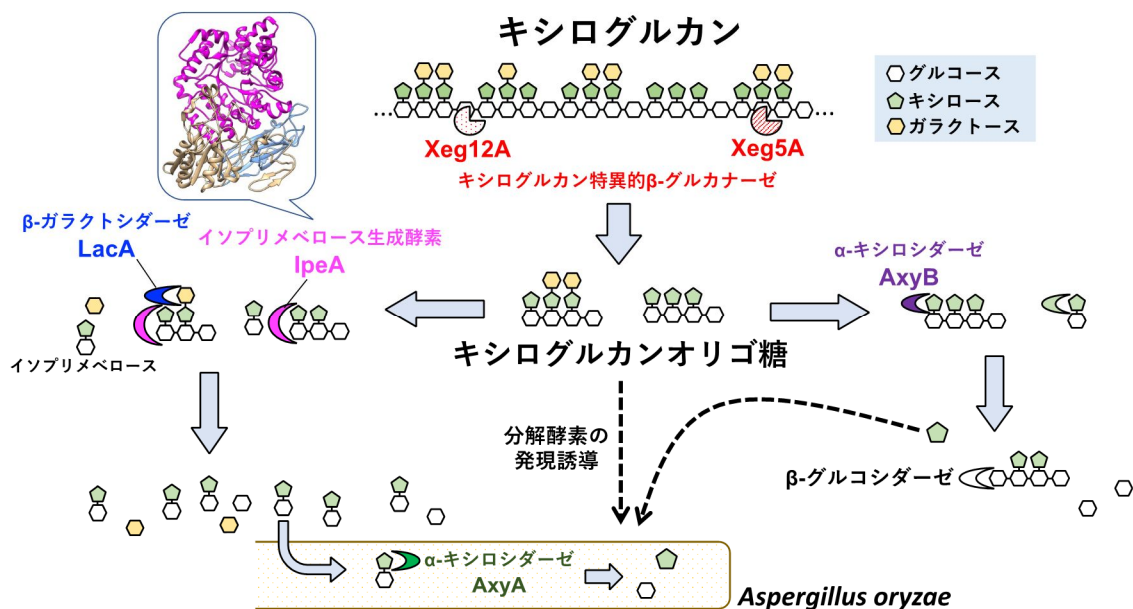
ーゼをコードしており、当該酵素によって IpeA と LacA の協調的作用によって生成されたイソプリメベロースがグルコースとキシロースに分解されることが明らかになった。AxyA は推定分泌シグナルを有さないことから、細胞内において働いている酵素であると推察される。AxyA はキシログルカンオリゴ糖からもキシロース側鎖を遊離するが、AxyA が遊離するキシロース側鎖はキシログルカンオリゴ糖主鎖の還元末端グルコースに結合したキシロース側鎖のみであり、その他のキシロース側鎖(オリゴ糖内部のキシロース側鎖)には作用できないことが明らかになった。

また、AxyA が属する GH31 ファミリーに属する他の酵素の解析を進めた結果、キシロース存在下において発現が誘導される細胞外酵素 AxyB も α -キシロシダーゼ活性を有しており、細胞外において β -グルコシダーゼと協調的にキシログルカンオリゴ糖を分解していることが示唆された。このように麹菌は複数の酵素を組み合わせることによって巧みにキシログルカンオリゴ糖を分解していること、またこれらの酵素群は遺伝子の発現レベルにおいて機能するタイミングが緻密に制御されていることが明らかになった。

キシログルカンオリゴ糖によって発現が誘導される遺伝子 (IpeA 遺伝子など) のプロモーターの解析から、プロモーターに既知の転写抑制因子や転写活性化因子が結合すると予想される配列が複数見つかかり、その発現制御機構の一端を明らかにすることができた。例えば、キシラン分解酵素 (キシラナーゼや β -キシロシダーゼ) をコードする遺伝子の発現を制御することが知られている転写調節因子 XlnR がキシログルカンオリゴ糖の分解を担う酵素の遺伝子発現も制御していることが明らかになった。

これに加えて、キシログルカンを切断してオリゴ糖化する 2 つの酵素 (Xeg5A 及び Xeg12A) の同定に成功した。Xeg5A は GH5 に、Xeg12A は GH12 に属する酵素であり、これらの酵素は共にキシログルカンに対して高い活性を有するが、その作用機序は両酵素で異なっていることを明らかにした。Xeg12A は典型的なキシログルカン特異的 β -1,4-グルカナーゼであり、キシログルカン主鎖のキシロース側鎖のない部位を特異的に切断する。これに対して、Xeg5A はキシロース側鎖のある部位も切断することが可能であり、キシログルカンからバラエティーに富んだオリゴ糖を生成する。Xeg5A の発見により、研究開始時に想定しているよりも多種多様なオリゴ糖が多糖類から生成されていることが明らかになり、そのオリゴ糖への応答と分解機構も複雑であることが示唆された。

本研究から明らかになった麹菌のキシログルカン分解機構は下記の通りである。



麹菌 *A. oryzae* がキシログルカンを分解するために生産している上記の酵素の多くは他の糸状菌においても保存されている。特に GH31 β -キシロシダーゼや GH35 β -ガラクトシダーゼ、GH3 イソプリメベロース生成酵素は他の *Aspergillus* 属糸状菌においても保存されている。しかし、一部の酵素は *Aspergillus* 属糸状菌の種ごとに少しずつ異なっており、例えば、*A. oryzae* には GH74 に属するキシログルカン特異的 β -グルカナーゼや還元末端特異的オリゴキシログルカンセロビオヒドロラーゼをコードする遺伝子とそのゲノム上に存在しないが、*A. nidulans* は両遺伝子を有している。このことは、同じ *Aspergillus* 属糸状菌であってもキシログルカン分解のために生産している酵素セットと分解経路が少しずつ異なること示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Matsuzawa Tomohiko, Watanabe Masahiro, Nakamichi Yusuke, Kameyama Akihiko, Kojima Naoshi, Yaoi Katsuro	4. 巻 106
2. 論文標題 Characterization of an extracellular α -xylosidase involved in xyloglucan degradation in <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 675 ~ 687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-021-11744-7	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 Nakamichi Yusuke, Matsuzawa Tomohiko, Watanabe Masahiro, Yaoi Katsuro	4. 巻 -
2. 論文標題 Crystal structure of glycoside hydrolase family 31 α -xylosidase from a soil metagenome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac058	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 Matsuzawa Tomohiko, Kameyama Akihiko, Nakamichi Yusuke, Yaoi Katsuro	4. 巻 104
2. 論文標題 Identification and characterization of two xyloglucan-specific endo-1,4-glucanases in <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 8761 ~ 8773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-020-10883-7	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 Matsuzawa Tomohiko, Watanabe Akira, Shintani Takahiro, Gomi Katsuya, Yaoi Katsuro	4. 巻 105
2. 論文標題 Enzymatic degradation of xyloglucans by <i>Aspergillus</i> species: a comparative view of this genus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2701 ~ 2711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-021-11236-8	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 Matsuzawa Tomohiko、Kameyama Akihiko、Yaoi Katsuro	4. 巻 104
2. 論文標題 Identification and characterization of -xylosidase involved in xyloglucan degradation in <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 201 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-10244-z	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 Matsuzawa Tomohiko、Watanabe Masahiro、Kameda Tomoshi、Kameyama Akihiko、Yaoi Katsuro	4. 巻 286
2. 論文標題 Cooperation between galactosidase and an isoprimeverose producing oligoxyloglucan hydrolase is key for xyloglucan degradation in <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 3182 ~ 3193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14848	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 Matsuzawa Tomohiko、Kameyama Akihiko、Yaoi Katsuro	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel isoprimeverose producing enzyme from <i>Phaeoacremonium minimum</i> is active with low concentrations of xyloglucan oligosaccharides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 92 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12549	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 Matsuzawa Tomohiko、Watanabe Masahiro、Nakamichi Yusuke、Fujimoto Zui、Yaoi Katsuro	4. 巻 205
2. 論文標題 Crystal structure and substrate recognition mechanism of <i>Aspergillus oryzae</i> isoprimeverose-producing enzyme	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Structural Biology	6. 最初と最後の頁 84 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsb.2018.11.005	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 松沢智彦	4. 巻 8
2. 論文標題 培養法とメタゲノム法によるユニークな新規糖質加水分解酵素の単離と解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 応用糖質科学	6. 最初と最後の頁 206 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松沢智彦、亀山昭彦、矢追克郎
2. 発表標題 麹菌が生産するキシログルカンの分解に重要な <i>-xylosidase</i> の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松沢智彦、矢追克郎
2. 発表標題 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> が生産するヘミセルラーゼの協調的作用
3. 学会等名 第77回 日本生物工学会 大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松沢智彦、矢追克郎
2. 発表標題 アミノ酸配列だけではわからない糖質加水分解酵素の機能とそのシナジー
3. 学会等名 第18回 糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松沢智彦、矢追克郎
2. 発表標題 キシログルカンの分解に重要な麹菌由来 -ガラクトシダーゼの解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成30年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規キシログルカナーゼ及びキシログルカンオリゴ糖の製造方法	発明者 松沢智彦、亀山昭彦、矢追克郎	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-045575	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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