

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580091

研究課題名（和文）糸状菌由来ペクチン分解酵素群の網羅的機能解析

研究課題名（英文）Comprehensive functional analysis of fungal pectin-degrading enzymes

研究代表者

阪本 龍司（SAKAMOTO TATSUJI）

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10275282

研究成果の概要（和文）：食品加工産業から発生する非可食部分（未利用バイオマス）を原料として、高付加価値物質を生産することは、資源循環型社会を構築する上で重要な課題の一つである。本研究では未利用バイオマス中の主要成分であるペクチンに焦点を絞り、カビによる効率的な分解メカニズムを明らかにすることを目的とした。ペクチンは非常に複雑な構造を持つ多糖であり、その分解には多数の酵素が必要である。本研究では 30 種類のペクチン分解酵素の詳細な性質を決定した。

研究成果の概要（英文）：An important component of a recycling-based society is the production of high-value-added substances from unutilized biomass, such as non-edible food parts generated by the food processing industries. The present study focused on pectin, a major unutilized biomass, and its efficient degradation by fungi. Because of pectin's complex structure, a number of enzymes are required for its degradation. Thirty pectinolytic enzymes were characterized in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物酵素、バイオマス、ペクチン

1. 研究開始当初の背景

食品加工産業から発生する甜菜粕などの非可食部分は、木質系バイオマスと比較して、セルロース含量が低く、ペクチンとヘミセルロース含量が高いことが特徴である。未利用バイオマスを原料とした高付加価値物質生産において、分解ステップが重要となるが、植物細胞壁糖鎖は複雑に絡み合った複合高分子を形成しているため、生分解性は低く、

このことが効率的なバイオマス利用の障害の一因となっている。一方、植物腐敗菌は種々の分解酵素を分泌生産し、それらの相乗的作用により植物細胞壁を効率良く分解している。微生物の持つ精巧な植物組織崩壊能力を *in vitro* で実現させるためには、微生物が自然界で行っている細胞壁分解様式を解明する必要がある。本研究では細胞壁中で最も複雑な糖鎖構造を有するペクチンに焦

点を絞り、その分解に関与する酵素の同定と詳細な反応特性、およびペクチン分解におけるそれらの相乗作用を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

ペクチンはホモガラクトクロナン (HG) 領域とラムノガラクトクロナン (RG) 領域から構成される高分子多糖であり、メタノール、酢酸、キシロース、アラビナン、アラビノガラクトタン、フェルラ酸などで修飾を受ける。さらにフェルラ酸同士がダイマーを形成することで、ペクチンは高分子化し、細胞壁に物理的強度が与えられる。このような複雑な構造を有するペクチンの分解には反応特性の異なる様々な酵素が必要となる。

甜菜粕はペクチン含量が高く (乾燥重量 25-30%)、排出量も多い (世界で約 230 万トン/年) ことから、本研究ではその高度利用化を目指し、甜菜粕を実験材料として使用した。研究代表者は本研究より以前に甜菜粕高分解菌として *Penicillium chrysogenum* 31B 株を単離しており、本菌培養上澄で甜菜粕を処理すると、甜菜ペクチン中の 90%以上のラムノース、アラビノース、ガラクトース、フェルラ酸、ガラクトクロン酸を可溶性成分として遊離させることができ、本菌はペクチンの効率的分解に必要な酵素群を保有していることが予想されていた。

一方、2008年に *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 株のゲノム配列が解読され、本ゲノム中の 54 遺伝子がペクチン分解酵素をコードしていることが推定された。このことよりペクチン分解には予想以上に多くの酵素が関与することを示唆された。また、*Penicillium* 属の近縁種である *Aspergillus* 属のゲノム解析からも膨大なペクチン分解酵素の存在が示唆されていた。本研究では、*P. chrysogenum* が保持する全 54 遺伝子を大腸菌および酵母において異種発現させ、組換えタンパク質の詳細な機能解析を行うことで、ペクチン分解機構に関する新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 株のゲノム配列が解読され、本ゲノム中に 54 個のペクチン分解関連酵素をコードしている遺伝子が存在することが予想された。代表研究者が保有している *P. chrysogenum* 31B 株を遺伝子供給源とし、ゲノム情報を利用して、上記全遺伝子群を RT-PCR により獲得した。高発現ベクターに連結した各遺伝子を大腸菌および酵母に導入し、組換えタンパク質を生産させ、アフィニティーカラムなどにより精製した。次に、精製クローン化タンパク質の各種ペクチン系基質に対する特異性を検

討した。ペクチンは複雑な構造をもつ高分子多糖であり、詳細な基質特異性解析を遂行するためには様々なタイプのペクチン系基質を調製する必要がある。本研究では甜菜ペクチンを初発原料として、基質特異性が既知のクローン化酵素を組み合わせて処理することにより目的の基質を調製した。上記で得られた組換えタンパク質および基質を用いて、網羅的な反応特性 (基質特異性や分解様式など) を高性能陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC) や NMR 等により解析した。

4. 研究成果

本研究課題では、優れたペクチン分解能を有する *P. chrysogenum* によるペクチン分解機構を明らかにする目的で、本ゲノム中に存在する 54 個の推定ペクチン分解系遺伝子 (アラビナン分解系 17 種、ガラクトタン分解系 8 種、RG 分解系 11 種、HG 分解系 11 種、エステラーゼ系 7 種) の詳細な機能解析を目指した。24 年度終了時まで全遺伝子のクローニングを行い、そのうち 30 種のタンパク質については反応特性解析を完了した。

(1) 推定アラビナン分解系遺伝子 (17 種)

アラビノフラノシダーゼ (ABF)、エンドアラビナーゼ、エキソアラビナーゼの計 12 種の機能解析を完了した。

① ABF : 9 種の推定遺伝子の中、7 種の機能解析を完了した。構造既知の種々の糖質に対する反応特性を HPAEC や NMR などにより解析した結果、(1)直鎖アラビノオリゴ糖特異的酵素 (ABF51C)、(2)分岐アラビノオリゴ糖特異的酵素 (ABF43B)、(3)ABF とキシロシダーゼ活性を併せ持つバイファンクショナル酵素 (ABF43D)、(4)分岐アラビナン特異的酵素 (ABF43A)、(5)アラビノキシラン特異的酵素 (AXS5)、(6, 7)多糖とオリゴ糖の両方に作用する酵素 (AFQ1, AFS1)、であり、それぞれ異なる基質特性を有することが明らかとなった。

多糖に作用する枝きり酵素については、側鎖結合位特異性を NMR により解析した。分岐アラビナンやアラビノキシランにおいて、アラビノース側鎖は 2 位あるいは 3 位でシングル置換するタイプと、2 位および 3 位でダブル置換するタイプがある。ABF43A、AXS5、AFQ1 の 3 酵素は分岐アラビナンやアラビノキシラン中のシングル置換アラビノースを、AFS1 は両基質中のシングル置換およびダブル置換アラビノースの両方を遊離させることを証明した。

上記 7 種の ABF の遺伝子発現プロファイル解析より、5 種 (ABF43A, ABF43B, ABF51C, AFQ1, AFS1) はアラビノースで強く発現誘導が認められ、これらはペクチン分解に関与する遺伝

子であることが示唆された。また、残る 2 種 (ABF43D, AXS5) はキシロースで誘導され、アラビノキシラン分解に関与することが予想された。

② エンドアラビナーゼ: 7 種の推定遺伝子の中、4 種の機能解析を完了した。解析した 4 酵素は、温度特性に違いはあるものの、いずれの酵素も直鎖アラビナンを最適の基質とし、主要反応産物はアラビノビオースおよびトリオースであった。分岐アラビナンに対する分解活性は著しく低く、酵素の基質への接近は側鎖アラビノースで妨害されていることが示唆された。

③ エキソアラビナーゼ: ゲノム中に 1 種のみが存在する本酵素は、直鎖アラビナンを非還元末端からビオース単位で遊離させる酵素であった。

④ 相乗効果: 分岐アラビナンおよび甜菜由来アルカリ抽出ペクチンを基質として用い、エンドアラビナーゼと ABF を同時に作用させることにより、両基質中の全アラビノースを単糖として遊離させることに成功した。

(2) 推定ガラクトン分解系遺伝子 (8 種)

β -ガラクトシダーゼ、エンド- β -1, 4-ガラクトナーゼ、エキソ- β -1, 4-ガラクトナーゼの計 5 種の機能解析を完了した。

① β -ガラクトシダーゼ: 6 種の推定遺伝子の中、4 種 (PcBGAL2B, PcBGAL35A, PcBGAL35B, PcGALX35C) の機能解析を完了した。

PcBGAL2B は β -ガラクトシダーゼと高い相同性を有するタンパク質であるが、*p*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド分解活性は認められず、 β -グルクロニダーゼ活性の高い酵素であった。

PcBGAL35A は β -1, 4 および β -1, 3 ガラクトオリゴ糖に対して分解活性が認められたが、 β -1, 6 結合に対する活性は微弱であった。また、本酵素は本研究で獲得した 3 種の β -ガラクトシダーゼの中で唯一 RG に結合するガラクトオリゴ糖に高活性を示し、ユニークな触媒能をもつ酵素であることが明らかとなった。

PcBGAL35B は β -1, 3、 β -1, 4、 β -1, 6 ガラクトオリゴ糖の全てに対して分解活性を示した。しかしながら、上記の結合位をもつ多糖には全く作用せず、典型的な β -ガラクトシダーゼであると結論づけた。

PcGALX35C は *p*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドに対する活性は微弱であり、 β -1, 3/1, 6 ガラクトオリゴ糖には全く活性を示さず、 β -1, 4-ガラクトオリゴ糖および β -1, 4-ガラクトンに特異的に作用して、ガラ

クトースを遊離させるエキソ型酵素であった。また、上記 PcBGAL35A とは異なり、RG に結合するガラクトオリゴ糖には全く活性を示さなかった。このような触媒活性をもつ酵素の遺伝子クローニングは微生物起源では初めての報告例である。

② エンド- β -1, 4-ガラクトナーゼ: ゲノム中に 1 種のみが存在する本酵素は、 β -1, 4-ガラクトンを経路型に分解し、最終産物としてガラクトースおよびガラクトビオースを蓄積した。

③ 相乗効果: エンドガラクトナーゼと 3 種の β -ガラクトシダーゼを用いて、ルビンガラクトン分解における相乗効果を検討した。その結果、エキソガラクトナーゼ活性をもつ PcGALX35C とエンドガラクトナーゼを共存させた場合に最も高い相乗効果が認められ、基質を速やかに完全分解することができた。

(3) 推定 RG 分解系遺伝子 (11 種)

RG はラムノース (Rha) とガラクトチュロン酸 (GalA) の α -1, 2/1, 4-結合の繰り返し構造を主鎖とし、ガラクトンやアラビナン、フェルラ酸が側鎖として結合している。また、RG 主鎖中の GalA 残基は部分的にアセチル化されている。RG 主鎖に作用すると推定されるエンド-RG リアーゼ、エキソ-RG リアーゼ、不飽和 RG ハイドロラーゼ、 α -ラムノシダーゼの計 6 種の機能解析を完了した。

① エンド-RG リアーゼ: 3 種の推定遺伝子の中、2 種 (PcRGL4A, PcRGL4C) の機能解析を行った。

PcRGL4A: *P. chrysogenum* 31B 株の培養上清中で主要な RG 分解酵素である。RG に本酵素を作用させたところ、反応液の 235 nm における吸光度が経時的に増加したことから、本酵素は脱離反応を触媒することが判明した。また、その時の基質の分子量変化をゲル濾過により分析したところ、反応初期において分子量が大きく減少したことからエンド型酵素であることが示唆された。以上のことから、本酵素はエンド-RG リアーゼであると判断した。なお、本酵素にポリガラクトチュロン酸分解活性は認められなかった。細菌由来の RG リアーゼは活性発現にカルシウムイオンが必須であるが、本酵素の場合は活性を増大させるものの、必須ではなかった。また、基質である RG 中のアセチル基や側鎖アラビナンを部分分解することにより本酵素の酵素活性は増大した。

PcRGL4C: RG 分解活性は検出できているが、詳細な酵素学的性質については現在解析中である。

② エキソ-RG リアーゼ (PcRGLX) : 本酵素については、*P. chrysogenum* 31B 株の培養上清を酵素源として、RG からの二糖 (不飽和 GalA-Rha) 遊離活性を指標として酵素精製を行った。続いて、LC/IT/TOF MS/MS 分析と *P. chrysogenum* のゲノム情報を基にプライマーを作成し、遺伝子を獲得した。アミノ酸配列解析より、既存の Polysaccharide Lyase とは相同性が低く、新規性の高い酵素である可能性が示唆された。RG を基質とした場合、本酵素は上記の二糖を主生成物とするエキソ型酵素であり、ガラクトース側鎖バイパス活性を有した。また、PcRGLX は RG 多糖よりオリゴ糖に高活性を示し、さらにエンド-RG リアーゼ (PcRGL4A) と相乗効果が確認されたことから、本菌において RG は PcRGL4A と PcRGLX の作用により効率よく二糖にまで分解されるものと推定した。真核生物由来のエキソ型酵素は初めての報告例である。

③ 不飽和 RG ハイドロラーゼ : 2 種の推定遺伝子の中、1 種 (PcURH105A) の機能解析を行った。PcURH105A はシグナルペプチドがなく、菌体内酵素と推定されるが、本酵素はエキソ-RG リアーゼ (PcRGLX) により生成する二糖 (不飽和 GalA-Rha) を特異的に加水分解した。なお、本酵素は非還元末端に不飽和 GalA を有する種々のオリゴ糖には活性を示さなかった。真核生物由来の不飽和 RG ハイドロラーゼはこれまでに報告例はなく、カビによるペクチン分解における新たな知見を得ることができた。本菌ゲノム中には菌体外酵素と推定される別の不飽和 RG ハイドロラーゼ (PcURH105B) も存在するが、本酵素の機能については現在解析中である。

以上①~③の結果より、*P. chrysogenum* において、RG 多糖はエンド型およびエキソ型 RG リアーゼの相乗作用により二糖 (不飽和 GalA-Rha) まで分解され、続いて菌体内で PcURH105A により糖化されるものと推定した。

④ α -ラムノシダーゼ : 本酵素群は非還元末端に存在する Rha 残基を加水分解する酵素の総称であるが、RG 末端の Rha 残基を遊離させる酵素は RG ラムノハイドロラーゼ (RGH) と命名されている。現在までに RGH のクローニングの報告例はない。本研究においては GH78 に属するラムノシダーゼをターゲットとして組換え RGH の獲得を試みたが、現在まで本活性を有するタンパク質は得られていない。しかしながら、*P. chrysogenum* 31B 株の培養上清中に RGH の存在を確認しており、本酵素の精製を現在進めている。

(4) 推定 HG 分解系遺伝子 (11 種)

ペクテートリアーゼ 1 種、ペクチンリアーゼ 2 種の計 3 種の機能解析を完了した。

① ペクテートリアーゼ : 3 種の推定遺伝子の中、1 種 (PcPEL3) の機能解析を行った。

本酵素の最適反応条件は 50°C、pH10 であり、好アルカリ性酵素であった。活性にはカルシウムイオンが必須であり、多くの 2 価の金属イオンで阻害された。ポリガラクトuron酸を基質とした時、反応最終産物はテトラオースおよびペンタオースであった。また、一般にペクテートリアーゼ活性は、基質の GalA 残基のメトキシ化度と反比例することが知られているが、本酵素はメトキシ化度にあまり影響を受けなかった。

② ペクチンリアーゼ : 3 種の推定遺伝子の中、2 種 (PcPNL1, PcPNL3) の機能解析を行った。

メトキシ化度の異なるペクチンに対する特異性を検討した結果、両酵素ともに高メトキシ化ペクチン (95% : HMP) に最大活性を示した。また、両酵素ともに HMP を基質にした時、最終産物はトリオースであった。

その他、HG 分解酵素としてエンド-ポリガラクトuronナーゼ (1 種) とエキソポリガラクトuronナーゼ (4 種) の存在が推定されているが、これらについては未だ活性のある組換え酵素が獲得できていない。

(5) 推定エステラーゼ系遺伝子 (7 種)

フェルラ酸エステラーゼと RG アセチルエステラーゼの計 4 種の機能解析を完了した。

① フェルラ酸エステラーゼ : 2 種 (PcFAE1, PcFAE2) の組換え酵素を獲得し、反応特性を解析した。フェルラ酸は植物細胞壁中に存在するポリフェノールであり、ペクチン中ではアラビノースの 2 位またはガラクトースの 6 位でエステル結合し、ヘミセルロース (アラビノキシラン) 中ではアラビノースの 5 位に結合している。さらにフェルラ酸は架橋重合することで細胞壁に強度を与えており、バイオマス分解に重要な酵素と考えられている。本研究では構造既知の 5 種のフェルロイルオリゴ糖を甜菜粕および小麦フスマから単離し、これらに対する特異性解析を行った。PcFAE1 はペクチンおよびヘミセルロース由来の全てのタイプの基質に作用し、フェルラ酸を遊離させたが、PcFAE2 はヘミセルロースタイプを選択的に分解した。

② RG アセチルエステラーゼ : 3 種の推定遺伝子の中、2 種 (PcRGACE1, PcRGACE2) の機能解析を完了した。両酵素はともに p-ニトロフェニル酢酸だけでなく、甜菜由来水溶性ペクチンに作用し、いずれも全酢酸量の約 20% を遊離した。ペクチン中には RG だけでなく、HG 中の GalA 残基もアセチル化されているた

め、現時点ではこれらの酵素が RG に特異的に作用するかどうかは不明である。しかしながら、ペクチンを基質としてエンド-RG リアーゼと PcRGACE2 を同時に作用させると、エンド-RG リアーゼ単独の場合と比べて、RG 分解活性が約 2 倍に増加したことから、PcRGACE2 は少なくとも RG 中のアセチル基に作用していることが明らかとなった。

③ ペクチンメチルエステラーゼ: 2 種の推定遺伝子が存在するが、これらについては未だ活性のある組換え酵素が獲得できていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1) Sakamoto T, Ishimaru M. Peculiarities and applications of galactanolytic enzymes that act on type I and II arabinogalactans. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2013) in press. DOI: 10.1007/s00253-013-4946-2. (査読有)

2) Sakamoto T, Nishimura Y, 他 3 名. Biochemical characterization of a GH53 endo- β -1,4-galactanase and a GH35 exo- β -1,4-galactanase from *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2013) 97:2895-2906. doi: 10.1007/s00253-012-4154-5. (査読有)

3) Sakamoto T, Inui M, 他 3 名. Substrate specificity and gene expression of two *Penicillium chrysogenum* α -L-arabinofuranosidases (AFQ1 and AFS1) belonging to glycoside hydrolase families 51 and 54. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2013) 97:1121-1130. doi: 10.1007/s00253-012-3978-3. (査読有)

4) Sakamoto T, Inui M, 他 6 名. Biochemical characterization and gene expression of two endo-arabinanases from *Penicillium chrysogenum* 31B. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2012) 93:1087-1096. doi: 10.1007/s00253-011-3452-7. (査読有)

5) Sogabe Y, Kitatani T, 他 9 名 10 番目. High-resolution structure of exo-arabinanase from *Penicillium chrysogenum*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* (2011) 67:415-422. doi: 10.1107/S0907444911006299. (査読有)

6) Sakamoto T, Ogura A, 他 5 名. Identification of a GH62

α -L-arabinofuranosidase specific for arabinoxylan produced by *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2011) 90:137-146. doi: 10.1007/s00253-010-2988-2. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1) 篠崎文香、*Penicillium chrysogenum* 31B 株由来の L-アラビナン特異的 α -L-アラビノフラノシダーゼ、日本応用糖質学会大会、2012 年 9 月 20 日 (東京)

2) 楠本敬文、不溶性小麦アラビノキシランの分解に適した酵素の選択、日本応用糖質学会大会、2012 年 9 月 20 日 (東京)

3) 西村勇一、*Penicillium chrysogenum* 由来 3 種の β -ガラクトシダーゼの反応特性解析、日本農芸化学学会大会、2012 年 3 月 25 日 (京都)

4) 川上拓也、*Penicillium chrysogenum* の有する 5 種の推定エンドアラビナナーゼ遺伝子の機能解析と発現様式、日本応用糖質学会大会、2011 年 9 月 28 日 (札幌)

5) 小堀洋平、中温性アラビナン分解酵素の発現・精製、日本農芸化学学会大会、2011 年 3 月 26 日 (京都)

6) 細川幸子、*Penicillium chrysogenum* 由来 3 種の α -L-アラビノフラノシダーゼの反応特性と遺伝子発現解析、日本農芸化学学会大会、2011 年 3 月 26 日 (京都)

7) 小堀洋平、中温性エンド型アラビナナーゼ (AbnS1) の構造、日本結晶学会大会、2010 年 12 月 3 日 (大阪)

8) 阪本龍司、*Penicillium chrysogenum* の有する 8 種の推定アラビノフラノシダーゼ遺伝子の機能解析と発現様式、食品酵素化学研究会第 10 回学術講演会、2010 年 9 月 4 日 (大阪)

9) 多田俊治、好冷性酵素・エンド型アラビナナーゼの構造、食品酵素化学研究会第 10 回学術講演会、2010 年 9 月 4 日 (大阪)

10) 細川幸子、*Penicillium chrysogenum* の有する 8 種の推定アラビノフラノシダーゼ遺伝子の発現プロファイルと機能解析、日本農芸化学学会関西支部例会、2010 年 7 月 4 日 (大阪)

[図書] (計 2 件)

1) 阪本龍司、シーエムシー出版、「バイオマ

ス分解酵素研究の最前線-セルラーゼ・ヘミセルラーゼを中心として-」（「ヘミセルラーゼの作用機作」の項分担）（2012）180-188

2) 阪本龍司、シーエムシー出版、「食品酵素化学の最新技術と応用 II-展開するフードプロテオミクス」（「ペクチンの構造と分解酵素」の項分担）（2011）32-42

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪本 龍司 (SAKAMOTO TATSUJI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：10275282