

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4月30日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580376

研究課題名（和文） 異担子菌酵母を宿主とする担子菌キノコ由来リグニン分解酵素の大量生産系の確立

研究課題名（英文） Heterologous expression and large-scale production of basidiomycetous lignin-degrading enzyme in heterobasidiomycetous yeast

研究代表者

麻田 恭彦（ASADA YSAUHIKO）

香川大学・農学部・教授

研究者番号：70151032

研究成果の概要（和文）：食用担子菌キノコ *Grifola frondosa*（マイタケ）が、種々の合成色素に対する脱色活性や難分解性環境汚染物質であるビスフェノールAの分解活性といった有用性を示すラッカーゼ（リグニン分解酵素の一種）を生産することが明らかとなった。異担子菌酵母 *Rhodospiridium toruloides* の形質転換系を構築して、本菌を宿主とするラッカーゼの生産を試みたが、ラッカーゼを生産する形質転換株は取得できなかった。しかし、メタノール酵母 *Pichia pastoris* を宿主とする発現系において、組換えラッカーゼの生産に成功した。

研究成果の概要（英文）：It was found that *Grifola frondosa* produces a laccase (one of lignin-degrading enzymes), which is effective for decolorizing of synthetic dyes and degrading of bisphenol A (recalcitrant environmental pollutant having an endocrine-disrupting effect). The transformation system of heterobasidiomycetous yeast *Rhodospiridium toruloides* was established using electroporation technique. The attempt of heterologous expression of laccase cDNA in *R. toruloides* as a host was unsuccessful, however, it was found that *Pichia pastoris* transformed with the laccase cDNA of *G. frondosa* produced a recombinant laccase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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・リグニン分解酵素・ラッカーゼ・担子菌キノコ・異担子菌酵母

1. 研究開始当初の背景

白色腐朽菌と称される一群の担子菌キノコが特異的に生産するリグニン分解酵素は、種々の応用面（木質系バイオマス資源の有効

利用や環境浄化など）が期待される極めて有用性の高い酵素である。しかしながら、担子菌キノコの生育速度・酵素生産能の低さ並びにリグニン分解酵素の異種宿主における発

現の困難さなどの問題が産業面での実用化における障害となっている。そこで、報告者は特徴的な生活環を有する異担子菌酵母、*Rhodosporidium toruloides* に着目した。本菌は担子菌キノコと同じ担子菌類に属しながら、一倍体期には酵母状単細胞の形態で旺盛に生育する。この特性は、遺伝子工学的手法を用いる担子菌キノコ由来のリグニン分解酵素の大量生産における宿主としての本菌の優位性を示すものであることが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 高い有用性を示す担子菌キノコ由来リグニン分解酵素を選抜して解析すること、(2) 異担子菌酵母、*R. toruloides* を対象として、未だ確立されていない本菌の形質転換系を確立すること、(3) その系を用いて、組換えリグニン分解酵素を大量生産し、生産された組換え酵素の有効利用に関する基盤的知見を得ることを当初の目的とした。

3. 研究の方法

本研究には、*Rhodosporidium toruloides* NBRC 10512 株を用いた。エレクトロポレーションには、Gene Pulser Xcell (バイオラッド) を用いた。ラッカーゼ活性は、2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) を用いて常法に従って測定した。

本研究は、以下の項目に分けて実施した。詳細は研究成果の項に併記する。

- (1) 高い有用性を示す担子菌キノコ由来リグニン分解酵素の選抜と解析
- (2) 異担子菌酵母、*R. toruloides* を対象とする形質転換系の確立
- (3) その系を用いる組換えリグニン分解酵素の大量生産、並びに、生産された組換え酵素の解析

4. 研究成果

(1) 高い有用性を示す担子菌キノコ由来リグニン分解酵素の選抜と解析

Grifola frondosa (マイタケ) は国内で広く栽培されている重要な食用キノコであるが、そのリグニン分解酵素に関しては、ほとんど知見が得られていなかった。そこで、*G. frondosa* AM-1 株を用いて検討したところ、本菌が複数のラッカーゼ (リグニン分解酵素の一種) アイソザイムを菌体外に分泌生産することが明らかとなった。その内の主要アイソザイム Lac1 を均一に精製して、諸性質の解析を行った。その結果、本酵素は広い基質

特異性を示すこと、pH 4 から 10 までの広範囲に亘って安定であり、60°C-60 分間の加熱処理でも活性を失わないことから安定性に優れた酵素であることが明らかとなった。さらに本酵素は種々の合成色素 (アゾ色素、ジアゾ色素、トリフェニルメタン色素、アントラキノン色素、複素環式色素) の脱色活性 (図 1, 2) や難分解性環境汚染物質である 2,2'-ビス (ヒドロキシフェニル) プロパン (ビスフェノール A、内分泌攪乱物質) の分解活性 (図 3) を有することが判明した。これらの活性は、レドックスメディエーターとして知られる 1-Hydroxybenzotriazole (HBT) を反応液に添加することにより促進されることも明らかとなった (図 1~3)。ビスフェノール A の Lac1 分解産物の同定をガスクロマトグラフィー質量分析により行った結果、主要産物が 4-イソプロペニルフェノールであることが判明した。以上の結果は、本酵素の応用面における高い有用性を示すものである。

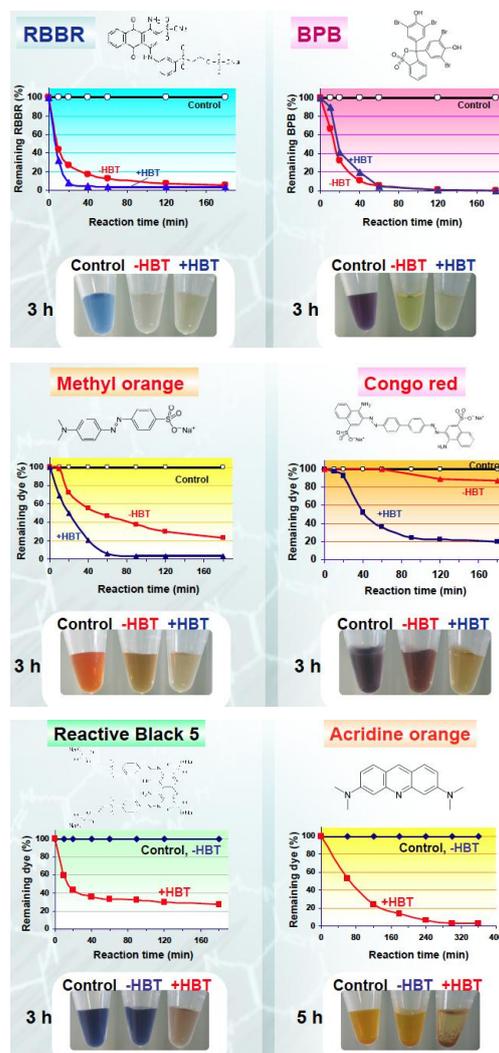


図 1 Lac1 による各種合成色素の脱色

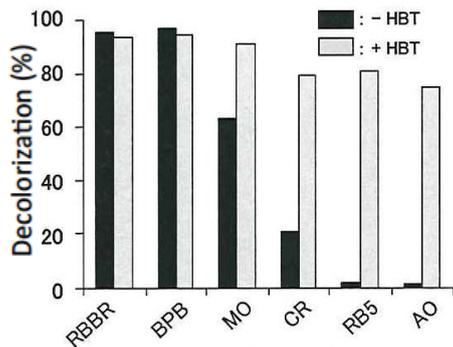


図2 Lac1による各種合成色素の脱色率

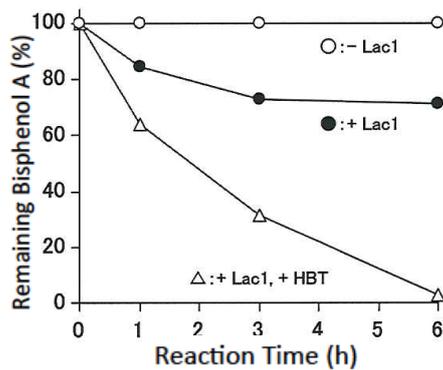


図3 Lac1によるビスフェノールAの分解

また、タイ国チェンマイ大学との共同研究により、タイ国で分離された担子菌である *Trametes polyzona* WR710-1 株が菌体外に分泌生産するラッカーゼについても同様の解析を行った。

(2) 異担子菌酵母、*R. toruloides* を対象とする形質転換系の確立

未確立であった本菌の形質転換系に関する検討を行った。まず、本菌を対象とする組込み型形質転換ベクター (図4、pRtGhph1、マーカー：ハイグロマイシン耐性遺伝子) を構築し、本菌を宿主とする形質転換系の諸条件について検討を行った。その結果、通常のプロトプラスト-PEG法により本ベクターを *R. toruloides* に導入するとハイグロマイシン耐性となった形質転換株が得られたことから、本ベクターの有効性が確認された (図5)。また、PCR法により、ハイグロマイシン耐性遺伝子が本菌の染色体に挿入されたことが判明した。ベクター導入法としてエレクトロポレーション法とプロトプラスト-PEG法を比較すると、前者の方がより高い形質転換効率を得られ、さらに形質転換株がコロニーとして出現するまでの培養日数が短いことが明らかとなった。また、ベクターを直鎖状にして用いる方がより高い形質転換効率を得られることが認められた。エレクト

ロポレーションの最適パルス条件は「0.2 cm キュベット、2.35kV/cm、50 μ F、500 Ω 」であり、その時の形質転換効率は、約6形質転換株/ μ g DNAであった。以上の結果から、*R. toruloides* を宿主とする形質転換実験が可能となった。

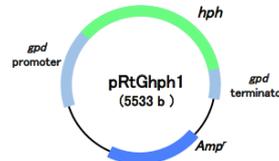


図4 構築した形質転換ベクター

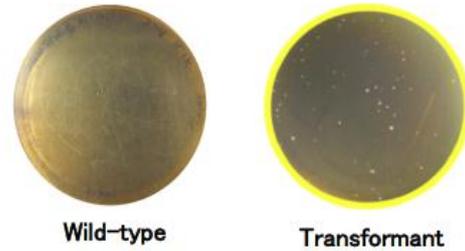


図5 ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株

(3) 異種宿主による組換え Lac1 の生産とその解析

① Lac1 をコードする cDNA のクローニングと解析

Lac1 の N-末端アミノ酸配列を解析し、GIGPVTDLHIVNADI であることを明らかとした。また、他の担子菌由来ラッカーゼのアミノ酸配列のアライメント解析から高度保存アミノ酸配列領域を見出した。これらのアミノ酸配列情報に従って作成したプライマーを用いる RT-PCR 法、およびその後の RACE 法によって、ORF 全長を含む Lac1 cDNA (*lac1*) のクローニングと解析を行った (accession no. AB643664)。その結果、*lac1* が 21 アミノ酸残基から構成されるシグナルペプチドを含む 520 アミノ酸残基をコードする ORF を有することや 8 箇所の糖鎖付加サイトが存在することなどが明らかとなった。

② *R. toruloides* を宿主とする組換え Lac1 の生産

異種タンパク質の大量生産を可能とするためには、高発現プロモーターを付与したベクター (高発現ベクター) の構築が必須である。グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素遺伝子 (GPD) 遺伝子は一般に構成的高発現が予想され、そのプロモーター領域は多くの宿主を対象とする高発現ベクターの構築に利用されている。そこで、本菌の同遺伝子のクローニングと解析を行った。次いで、正確性の高い PrimeSTAR MAX DNA Polymerase (Takara Bio) を用いる PCR により、GPD 遺

伝子のプロモーター領域 (1381 bp) とターミネーター領域 (325 bp)、および *lac1* の ORF 領域 (1563 bp) を増幅し、Gene Art Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen) を用いるオーバーラップ PCR 法によって、*lac1* の ORF 領域が GPD 遺伝子のプロモーター領域とターミネーター領域間に挿入された *lac1* 発現ベクター pRTG1ac1 を構築した (図 6)。さらに、シグナル配列コード領域を削除した *lac1* ORF 領域 (1500 bp) が同様に挿入された pRTG1ac2 も構築した。pRTG1ac1 と pRTG1ac2 の塩基配列の解析結果から、塩基配列にミスが生じていないことを確認した。

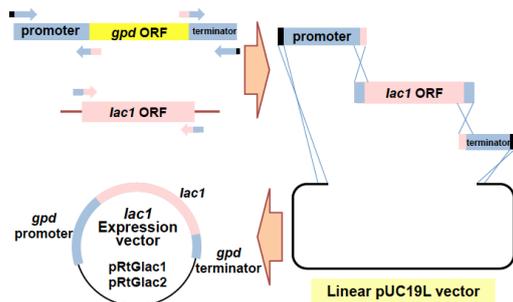


図 6 *lac1* 発現ベクターの構築 (宿主: *R. toruloides*)

これらの発現ベクターと pRTGhph1 をエレクトロポレーション法により *R. toruloides* に共形質転換したところ、多数の *lac1* が導入された形質転換株が得られた。得られた形質転換株を種々の条件 (銅を含有する培地など) で培養して、菌体内および菌体外のラッカーゼ活性を測定したが、どの形質転換株においてもラッカーゼ活性は認められなかった。小麦胚芽抽出液を用いる無細胞系タンパク質合成によるラッカーゼ生産を試みたところ、ラッカーゼタンパク質の合成は認められたものの、活性は認められなかった。以上の結果とラッカーゼが銅含有酵素であることから、*R. toruloides* を宿主とする *lac1* 発現においては、タンパク質合成過程における銅の取込に障害があり、活性を有するラッカーゼ生産に至らなかったことが推測された。

③ メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を宿主とする組換え Lac1 の生産

宿主をメタノール資化性酵母 *P. pastoris* に変えて、*lac1* の発現を試みた。本実験には、EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen) を用い、基本的にはそのプロトコールに従って操作を行った。まず、*P. pastoris* の発現ベクター pPICZ A のアルコール酸化酵素遺伝子 (*AOX1*) プロモーターの下流にシグナル配列領域を含む全長 *lac1* ORF を挿入した *lac1* 発現ベクター pPICZ A/Lac1

を構築した。さらに、*lac1* のシグナル配列領域を *Saccharomyces cerevisiae* の α -ファクターのシグナル配列領域に置換した *lac1* 発現ベクター pPICZ A/*lac1* も構築した (図 7)。これらの発現ベクターをエレクトロポレーション法により *P. pastoris* に導入したところ、どちらのベクターの導入においても、菌体外に組換え Lac1 (rLac1) を分泌生産する形質転換株が取得できた。*lac1* のシグナル配列領域を含む pPICZ A/*lac1* を導入した形質転換株において、pPICZ A/*lac1* を導入した形質転換株よりも、より高いラッカーゼ活性が認められた。pPICZ A/Lac1 を導入した形質転換株を種々の濃度の CuSO₄ を添加した培地を用いて培養を行い、培地中のラッカーゼ活性を測定したところ、添加した CuSO₄ の濃度に依存してラッカーゼ活性が上昇することが明らかとなった (図 8)。

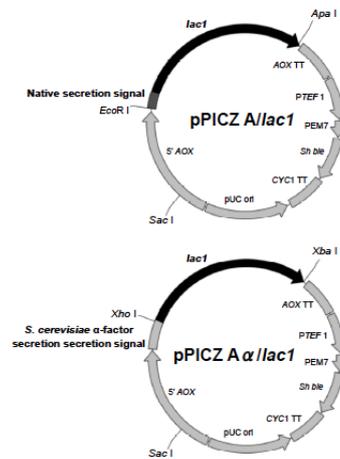


図 7 構築した *lac1* 発現ベクター (宿主: *P. pastoris*)

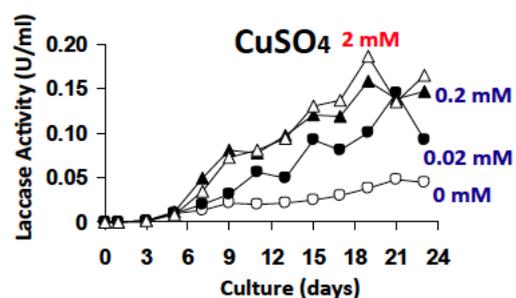


図 8 rLac1 の生産 (CuSO₄ 濃度が rLac1 の生産におよぼす影響)

生産された rLac1 を均一に精製して、その諸性質を解析した。その結果、rLac1 は Lac1 よりも酸性域 pH と熱に対する安定性に優れていることが明らかとなった (図 9)。これは rLac1 には、Lac1 よりも高度に糖鎖付加が起こった [Lac1 と rLac1 の Peptide:N-Glycosidase F (PNGase、New England Bio

Labs) 処理から算出された N 結合型糖鎖部分の推定分子量 : Lac1;11 kDa、rLac1;35 kDa] ことに起因するものと推測された(図 10)。また、rLac1 は Lac1 と同様に種々の合成色素の脱色活性を有することが明らかとなった(図 11)。以上のように、rLac1 の有用性が実証された。

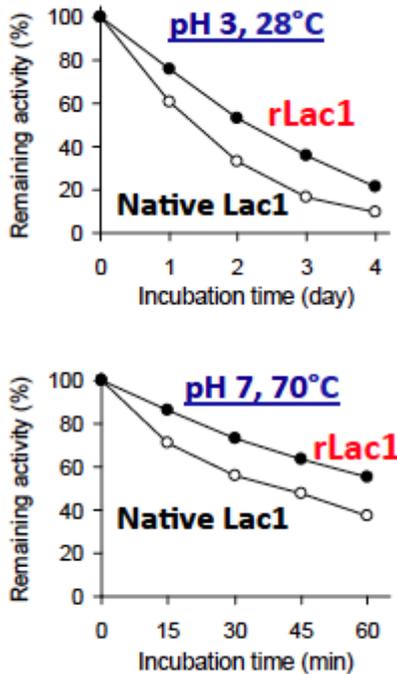


図 9 Lac1 と rLac1 における安定性の比較

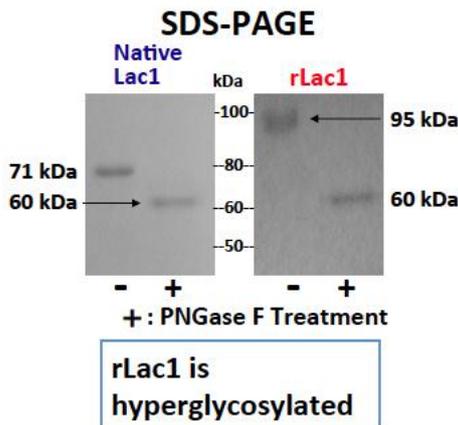


図 10 Lac1 と rLac1 における N 結合型糖鎖の分子量の比較

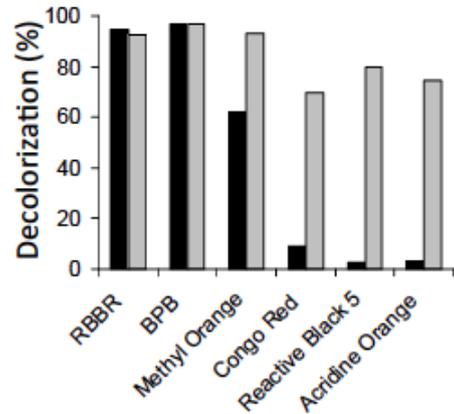


図 11 rLac1 による各種合成色素の脱色率

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 5 件)

① Chairin, T., Nitheranont, T., Watanabe, A., Asada, Y., Khanongnuch, C., and Lumyong, S.: Biodegradation of Bisphenol A and decolorization of synthetic dyes by laccase from white-rot fungus, *Trametes polyzona*, Appl. Biochem. Biotechnol., 査読有, 2013 (in press)

DOI:10.1002/jobm.2011200456

② Chairin, T., Nitheranont, T., Watanabe, A., Asada, Y., Khanongnuch, C., and Lumyong, S.: Purification and characterization of the extracellular laccase produced 1 from *Trametes polyzona* WR710-1 under solid state fermentation, J. Basic Microbiol., 査読有, 169, 539-545 (2013)

DOI:10.1007/s12010-012-9990-3

③ 渡邊 彰, 麻田恭彦: マイタケが生産するラッカーゼの有用機能, バイオサイエンスとインダストリー, 査読無, 70, 376-377 (2012).

④ Nitheranont, T., Watanabe, A., Suzuki, T., Katayama, T., and Asada, Y.:

Decolorization of synthetic dyes and biodegradation of bisphenol A by laccase from the edible mushroom, *Grifola frondosa*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 75, 1845-1847 (2011).

DOI:10.1271/bbb.110329

⑤ Nitheranont, T., Watanabe, A., and Asada, Y.: Extracellular laccase produced by an edible basidiomycetous mushroom, *Grifola frondosa*: purification and characterization, Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 75, 538-543 (2011).

DOI:10.1271/bbb.100790

〔学会発表〕(計5件)

- ①麻田恭彦、渡邊 彰：担子菌きのこにおける子実体形成とラッカーゼの関連性について、日本きのこ学会第14回ワークショップ、2012年3月2日、近畿大学会館(大阪府)
- ②山本亮輔、渡邊 彰、馬替由美、麻田恭彦：担子菌 *Flammulina velutipes* の子実体形成過程において発現するラッカーゼアイソザイムの誘導条件の解析、平成23年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会、2011年9月16日、宮崎大学
- ③山本亮輔、渡邊 彰、馬替由美、麻田恭彦：エノキタケの子実体形成過程において発現するラッカーゼの解析、2010年度日本農芸化学会中四国支部大会、2010年9月24日、香川大学
- ④川勝早智、岡田典子、渡邊 彰、麻田恭彦：異担子菌酵母 *Rhodospodium toruloides* の形質転換系の確立、2010年度日本農芸化学会中四国支部大会、2010年9月24日、香川大学
- ⑤ Thitinard Nitheranont, Akira Watanabe, Yasuhiko Asada: Molecular cloning of two laccase complementary DNAs from the cultivated mushroom *Grifola frondosa* and heterologous expression in *Pichia pastoris*. 日本きのこ学会第14回大会、2010年9月17日、東京大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

麻田 恭彦 (ASADA YASUHIKO)
香川大学・農学部・教授
研究者番号：70151032