

イヌリン分解酵素の遺伝子解析と オリゴ糖生産への応用

(研究課題番号 10660312)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 太田 一良
(宮崎大学農学部助教授)

は し が き

イヌリンは、 β -2,1結合によるD-フルクトースの重合度30~40の直鎖状ポリマーで、還元末端にグルコース1分子がスクロース型の結合をしている。天然には、チコリの根茎やダリア、キクイモなどの塊茎に貯蔵性多糖として存在し、それらの乾燥重量の約80%を占めている。特にキクイモ (*Helianthus tuberosus* L.) は、気候に対する適応性が極めて大であり、寒冷な地方にも適し、また病害に対しても強いため、至る所に栽培できる未利用生物資源である。微生物由来のイヌリン分解酵素イヌリナーゼは、通常誘導的に産生されるエキソ型イヌリナーゼ (EC 3.2.1.80) であり、イヌリン分子の非還元末端から順次フルクトース単位で切断する。研究分担者は、エキソ型とともに、エンド型イヌリナーゼ (EC 3.2.1.7) を菌体外に構成的に産生する新規な黒麹菌 *Aspergillus niger* No. 12 株を発見した。さらに、この細胞外エンド型イヌリナーゼを初めて結晶化し、その作用様式を明らかにした。以来、エンド型イヌリナーゼの存在は糸状菌 *Chrysosporium pannorum*、*Penicillium purpurogenum* および *Aspergillus ficuum* に報告されているのみである。当研究室では、*A. niger* No. 12 株からエンド型イヌリナーゼ活性が一層増強された変異株 *A. niger* No. 817 を取得し、イヌリンからの燃料エタノールの発酵生産および低カロリー甘味料としてのフルクトース・シロップの連続生産に応用し、顕著な成績を得た。最近、当研究室では、エンド型イヌリナーゼ生産菌として新たに *Penicillium* sp. TN-88 株を分離し、その精製酵素について酵素化学的諸性質を明らかにした。これらのエンド型イヌリナーゼは、共通してイヌリン内部のフルクトフラノシド結合を切断し、重合度3~5のイヌロオリゴ糖を生成する。近年、イヌリンは、成人病予防のための機能性イヌロオリゴ糖生産の安価な原料として注目を集めている。

これまでの研究成果を踏まえて、本研究では、次の研究成果を得た。

- 1) *A. niger* No.12 株のゲノムDNAから2個の重複したエンド型イヌリナーゼ遺伝子 (*inuA*と*inuB*) をクローニングし、塩基配列を決定した。
- 2) *A. niger* No.12株エンド型イヌリナーゼ遺伝子をコードする2コピーの重複遺伝子の内、*inuB*のみに転写が認められ、*inuA*は偽遺伝子であると考察した。
- 3) *Penicillium* sp. TN-88 株のゲノムおよびcDNAからエンド型イヌリナーゼ遺伝子 (*inuC*) をクローニングし、塩基配列を決定した。

研究組織

研究代表者 太 田 一 良 (宮崎大学農学部助教授)
研究分担者 中 村 豊 彦 (宮崎大学農学部教授)

研究経費

平成10年度	2,200千円
平成11年度	1,400千円
計	3,600千円

研究発表

ア. 学会誌等

Ohta, K., Akimoto, H., Matsuda, S., Toshimitsu, D., and Nakamura, T.,
Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes from
Aspergillus niger,
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 62 (9), 1731-1738 (1998).

Akimoto, H., Kushima, T., and Nakamura, T., and Ohta, K.,
Transcriptional analysis of two endoinulinase genes *inuA* and *inuB* in
Aspergillus niger,
Journal of Bioscience and Bioengineering, 88 (6), 599-604 (1999).

Zaita, N., Fukushige, T., Tokuda, M., Ohta, K., and Nakamura, T.,
Preparation and enzymatic properties of *Aspergillus niger*
endo-inulinase immobilized onto various polysaccharide supports,
Food Science and Technology Research, 6 (1), 1-6 (2000).

イ. 口頭発表

太田一良、秋元秀俊、松田周作、中村豊彦、*Aspergillus niger* エンド型
イヌリナーゼをコードする遺伝子は重複して存在する、日本農芸化学会西日本支
部大会講演要旨、p.23 (1998).

清田直幸、立川朋久、秋元秀俊、串間隆志、太田一良、中村豊彦、
Penicillium sp. TN-88株由来エンド型イヌリナーゼ遺伝子のクローニング、
日本農芸化学会誌（講演要旨集）、73、26 (1999).

秋元秀俊、串間隆志、太田一良、中村豊彦、*Aspergillus niger* エンド型イヌリ
ナーゼ遺伝子 *inuA* と機能および *inuB* の上流領域のクローニングと構造解析、
日本農芸化学会誌（講演要旨集）、73、26 (1999).

秋元秀俊、串間隆志、太田一良、中村豊彦、*Aspergillus niger* エンド型
イヌリナーゼ遺伝子は重複により偽遺伝子 *inuA* と機能をもつ *inuB* へと進化し
た、日本農芸化学会西日本支部大会講演要旨、p.31 (1999).

清田直幸、秋元秀俊、串間隆志、太田一良、中村豊彦、*Penicillium* sp.
TN-88株エンド型イヌリナーゼをコードするゲノムDNAとcDNAのクローニ
ング、日本農芸化学会西日本支部大会講演要旨、p.32 (1999).

太田一良、秋元秀俊、清田直幸、串間隆志、太田一良、中村豊彦、糸状菌
エンド型イヌリナーゼの一次構造と分子進化、日本農芸化学会誌（講演要旨
集）、74、234 (2000).

研究成果の概要

1. 研究目的

本研究では、黒麹菌 *A. niger* No.12株のゲノムDNAから2つの重複したエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuA* および *inuB* をそれぞれ *EcoRI* 断片としてクローニングし、構造解析を行った。これらの1,548 bpのOpen reading frame (ORF) を含む断片には、いずれも約45 bpの上流領域が存在するのみであったので、それぞれ遺伝子のさらに上流領域のクローニングと構造解析を行った。また、*inuA* および *inuB* 遺伝子について、発現の有無について転写レベル検討した。一方、当研究室にはエンド型イヌリナーゼ生産菌として糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88株を保有する。¹⁾ TN-88株はイヌリン内部の β -2,1-フルクトフラノシド結合を切断し、主にイヌロトリオースを生成するエンド型イヌリナーゼを誘導的に産生する。このTN-88株由来エンド型イヌリナーゼの構造解析を目的として、ゲノムDNAとcDNAをクローニングし、プロモーター領域及びコード領域の構造を明らかにした。更に推定アミノ酸配列の解析から分子系統樹を作成し、その分子進化についても考察した。

2. 研究方法

(1) *A. niger* No.12 株をフルクトースを炭素源とする液体培地を用いて30℃で5日間振とう培養した。この培養ろ液から細胞外エンド型イヌリナーゼをDEAE-セルロフィンA-500 (生化学工業) およびQ-セファロースHP (Pharmacia LKB) によるカラム・クロマトグラフィーで電気泳動的に単一に精製した。本酵素の内部アミノ酸配列を決定するために、精製酵素をリシルエンドペプチダーゼ (和光純薬)、ブロムシアン (和光純薬)、又はV8プロテアーゼ (Promega) で切断後、ペプチドをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。分離されたペプチドはPVDF膜 (Millipore) にブロッティングし、そのアミノ酸配列をプロテイン・シークエンサー (Perkin Elmer, 476A) で決定した。その内部アミノ酸配列を基にオリゴヌク

レオチドを合成し、Polymerase Chain Reaction (PCR)のプライマーとした。一方、*A. niger* No.12 株からゲノムDNAを調製し、PCRの鋳型とした。PCRは、耐熱性DNAポリメラーゼAmpliTaq (Perkin Elmer) を用い、パーキン・エルマー model 2400 上で行った。増幅されたDNA断片はアガロース・ゲル電気泳動後、ゲルから切り出しWizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) を用いて単離した。この断片をベクターpCRII (TA Cloning Kit, Invitrogen) にクローニングし、塩基配列を決定した。このPCR産物をジゴキシゲニン (DIG、ベーリンガー・マンハイム) でランダム・プライマー法により標識し、エンド型イヌリナーゼに特異的なプローブとして以下のハイブリダイゼーションに用いた。塩基配列は、ダイデオキシシーケンス法で決定し、データを遺伝子解析ソフト GENETYX-MAC で解析した。エンド型イヌリナーゼ遺伝子を保有する組換え大腸菌は、IPTGを含むLB培地で培養後、菌体を超音波破砕機 (トミー精工、model UR-200P) で破砕した。100,000 x gで1時間超遠心後、上澄液のイヌリンおよびスクロース分解活性を測定した。

(2) 上述のように*A. niger* No.12株はそのゲノム上に重複したエンド型イヌリナーゼ遺伝子*inuA*と*inuB*を保有する。*inuA*と*inuB*に特異的なDNAプローブを両遺伝子間でホモロジーが認められないそれぞれの3'非コード領域を基に作成した。イヌリン、フルクトース、またはグルコースを炭素源とする本菌株の液体培養後の菌体からそれぞれポリ(A)+RNAを調製した。各mRNAからReverse Transcription (RT)-PCRで、本酵素をコードする完全長cDNAを増幅した。

(3) *Penicillium* sp. TN-88株エンド型イヌリナーゼのN末端アミノ酸配列¹⁾と既報のエンド型イヌリナーゼに保存されたアミノ酸配列を基に一組のプライマーを作成し、PCRによりゲノムDNAから本酵素遺伝子の一部を含む621 bpの断片を増幅した。これをDIG標識し、*Penicillium* sp. TN-88株エンド型イヌリナーゼ遺伝子に特異的

なプローブとした。このプローブとゲノムDNAのサザン・ハイブリダイゼーションを行ったところ、3.0-kbp *Bam*HI断片とハイブリダイズした。この断片をプラスミドpUC18にライゲーション後、大腸菌JM109を形質転換しゲノムDNAライブラリーを作成した。このライブラリーからコロニー・ハイブリダイゼーションを行い、得られたクローンをサブクローニングし、構造遺伝子(ORF)の一部と上流領域を含む *Sph*I-*Bam*HI断片(1.4 kbp)を得た。この塩基配列を基にプライマーを作成し、TN-88株よりmRNAを調製し、5'および3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法により、完全長のエンド型イヌリナーゼcDNAを合成した。得られたcDNAの塩基配列を基にプライマーを作成し、ゲノムDNAを鋳型にしてPCRで本酵素遺伝子のコード領域を増幅した。DDBJ (DNA Data Bank of Japan) のデータ・ベースから相同性の高いアミノ酸配列を検索し、Clustal Wでアラインメントを行い、これをもとにNeighbor-Joining法により分子系統樹を作成した。

3. 研究成果

(1) *A. niger* No.12株エンド型イヌリナーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列
エンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuA* と *inuB* をそれぞれ含む1.8 kbp *Eco*RI-*Kpn*I断片と2.5 kbp *Eco*RI-*Hinc*II断片をクローニングし、全塩基配列を決定した。いずれのDNA断片にも516個のアミノ酸をコードするエンド型イヌリナーゼ遺伝子のORFが存在した。両遺伝子間には、23個のヌクレオチドの置換が存在したが、アミノ酸レベルでは8個が相違した。本遺伝子には介在配列は認められず、23個のアミノ酸配列からなる疎水性のシグナル・ペプチドが存した。成熟酵素のN末端グルタミンは環化し、ピログルタミン酸に変化したことにより、ブロックされたことが推定された。したがって、ピログルタミルアミノペプチダーゼ (ベーリンガー・マンハイム) でピログルタミン酸を除去した酵素タンパク質のN末端アミノ酸配列を

決定した。このアミノ酸配列は、塩基配列からの推定アミノ酸配列のSer-25から Asp-37に一致した。また、成熟酵素には2個のシステイン残基が存在し、6ヶ所の N-グリコシド型糖鎖結合可能部位 (N-X-T/S) が推定された。また、本酵素遺伝子を導入した大腸菌の無細胞抽出液でイヌリナーゼ活性が認められ、またスクロース分解活性は検出されなかった。また、細胞外には、イヌリナーゼ活性は検出されなかった。さらに、既報の糸状菌 *P. purpurogenum* 起源の同酵素²⁾ と73%の相同性を示した。

(2) *A. niger* No.12株エンド型イヌリナーゼ遺伝子由来の転写産物の解析

イヌリン、フルクトース、またはグルコースのいずれの炭素源で増殖した菌体の mRNAから調製したcDNAも *inuB* に特異的なプローブとのみハイブリダイズし、*inuA* 由来のcDNAは検出されなかった。本菌株のゲノムDNAから両遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、塩基配列を決定した。*inuB* 遺伝子上流に4ヶ所の転写開始点、翻訳開始コドンの116 bp上流にTATAボックス (TATATA) が認められた。*inuB* 転写産物のポリ(A)付加部位は、翻訳終止コドンの94~297 bp下流に多数存在した。

(3) *Penicillium* sp. TN-88株エンド型イヌリナーゼのクローニングと構造解析

Penicillium sp. TN-88株エンド型イヌリナーゼのアミノ酸配列¹⁾ を基にプライマーを作成し、PCRによりゲノムDNAから本酵素遺伝子の一部を含む621 bpの断片を増幅した。これをDIG標識しエンド型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブとした。このプローブとゲノムDNAを用いて、サザン・ハイブリダイゼーションを行った結果、3.0-kbp *Bam* HI断片、8.0-kbp *Xba* I断片、または7.0-kbp *Kpn* I断片とのみハイブリダイズした。このことから *Penicillium* sp. TN-88株が生産するエンド型イヌリナーゼをコードしている遺伝子 *inuC* は、本菌株の染色体DNA上に1コピー存在することが示唆された。*inuC* 遺伝子の塩基配列から1,545 bpのORFが推定された。

ゲノムDNAとcDNAとの比較から、ORFはイントロンを含まず、N末端アミノ酸25残基からなるシグナル・ペプチドと490残基の成熟酵素をコードした。成熟酵素は3個のシステイン残基と10ヶ所のN-グリコシド型糖鎖結合可能部位を含み、推定分子量は52,944 Daであった。また、上流領域に3ヶ所の転写開始点、TATAボックス、CCAAT配列が認められ、プロモーター領域が推定された。本酵素の推定アミノ酸配列は、*P. purpurogenum* 起源の同酵素²⁾と85%、*A. niger* No.12株起源の同酵素と72%の相同性を示した。

4. 考察

本研究で*A. niger* No.12株に見出したエンド型イヌリナーゼをコードする2コピーの遺伝子の内、*inuB*のみに転写が認められた。この結果は、精製酵素の部分アミノ酸配列が*inuB*遺伝子産物に対応するアミノ酸配列と一致したことから支持される。本実験条件では発現しなかった*inuA*遺伝子については、特定の環境でのみ発現する遺伝子あるいは進化の過程で機能を失った偽遺伝子であると考察した。*A. niger* No.12株のゲノムに存在する2個のエンド型イヌリナーゼ遺伝子と同じように、麹菌*Aspergillus oryzae*³⁾と*Aspergillus awamori*⁴⁾にそれぞれ3および2コピーの α -アミラーゼ遺伝子が重複して存在することが報告されている。最近、Uhmら⁵⁾が*Aspergillus ficuum* (ATCC 16882)からエンド型イヌリナーゼをコードする遺伝子*inu2*をクロニングし、その塩基配列を決定した。*A. ficuum*の*inu2*を含む2.3-kbp *KpnI*断片は、本菌株の*inuA*の2.3-kbp *KpnI*断片と同一であった。

Aspergillus 属と*Penicillium* 属に由来する本酵素遺伝子は共通してイントロンを含まず、推定アミノ酸配列は β -fructofuranosidase motif (MNDPNG)のAspがGlu-43に置換した構造を特徴とした。また、ホモロジー検索からGlu-43とともにGlu-233の活性への関与が示唆された。インベルターゼ、レバナーゼ、およびイヌ

リナーゼは、基質特異性が相違するにも拘わらず、その一次構造に高い相同性を示す β -fructofuranosidase family を構成する。上記familyに属する各酵素のアミノ酸配列を基に系統樹（図1）を作成したところ、糸状菌のみに存在が知られているエンド型イヌリナーゼは他のフルクトフラノシダーゼとは別のクラスターを形成した。遺伝距離は、酵母のエキソ型イヌリナーゼやインベルターゼよりも細菌のレバナナーゼに近いことから、その起源は細菌のレバナナーゼ遺伝子に近いものと考察した。

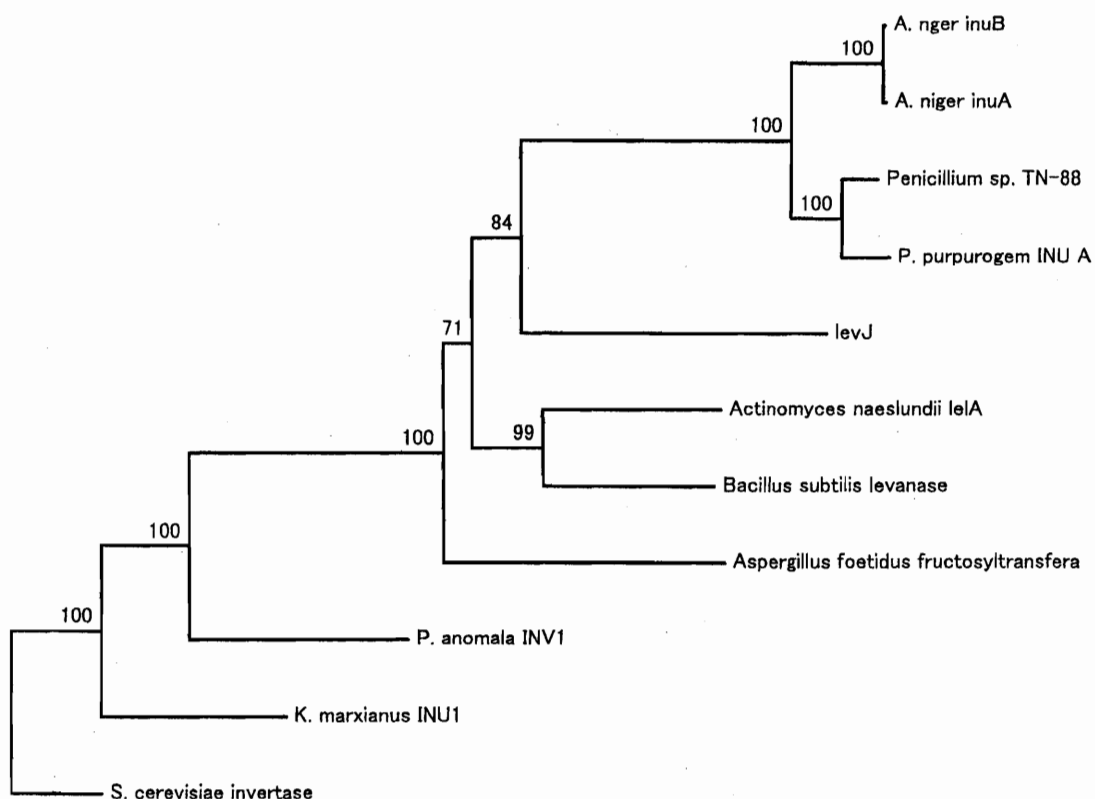


図1 エンド型イヌリナーゼと他の β -フルクトフラノシダーゼの分子系統樹

5. 引用文献

- 1) T. Nakamura, A. Shitara, S. Matsuda, T. Matsuo, M. Suiko, and K. Ohta, Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **84** (4), 313-318 (1997).
- 2) S. Onodera, T. Murakami, H. Ito, H. Mori, H. Matsui, M. Honma, S. Chiba, and N. Shiomi, Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNA and gene encoding *endo*-inulinase from *Penicillium purpurogenum*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **60** (11), 1780-1785 (1996).
- 3) S. Wirsal, A. Lachmund, G. Wildhardt, and E. Ruttkowski, Three α -amylase genes of *Aspergillus oryzae* exhibit identical intron-exon organization, *Molecular Microbiology*, **3** (1), 3-14 (1989).
- 4) D.R. Korman, F.T. Bayliss, C.C. Barnett, C.L. Carmona, K.H. Kodama, T.J. Royer, S.A. Thompson, M. Ward, L.J. Wilson, and R.M. Berka, Cloning, characterization, and expression of two α -amylase genes of *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Current Genetics*, **17**, 203-212 (1990).
- 5) T.B. Uhm, K.-S. Chae, D.W. Lee, H.-S. Kim, J.-P. Cassart, and J. Vandenhoute, Cloning and nucleotide sequence of the endoinulinase-encoding gene, *inu2*, from *Aspergillus ficuum*, *Biotechnology Letters*, **20** (8), 809-812 (1998).