



太田一良 (農学部)

要旨

カビの一種 *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* ATCC 20524 株は活性の至適 pH が 2.0 である好酸性キシラナーゼを産生する。今年度は、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* GS115 株による本酵素の発現と分泌を目的とした。キシランを炭素源とする液体培地で増殖させた本キシラナーゼ生産菌株の培養菌体から mRNA を調製した。この mRNA から、RT-PCR によりキシラナーゼをコードする cDNA を合成した。シグナル配列がそれぞれ本酵素自身のもの、*Saccharomyces cerevisiae* の  $\alpha$ -ファクター、*P. pastoris* の PHO1 となるようにキシラナーゼ cDNA を染色体組込み型の 3 種の分泌発現ベクター pPIC3.5、pPIC9、および pHIL-S1 (インビトロゲン社) に挿入し、*P. pastoris* を形質転換した。これら形質転換体を 30°C でメタノールにより遺伝子の発現を誘導しながら液体培養で増殖させた結果、細胞外にキシラナーゼを効率よく分泌した。

1. はじめに

宮崎を含む南九州で盛んなサツマイモや麦を原料とした焼酎の製造において、廃棄物として排出される焼酎蒸留廃液 (焼酎粕) の処理法の確立が、焼酎業界において希求されている。処理法として、乾燥後の焼却、メタン発酵による代替エネルギーへの変換、肥料や家畜飼料への変換などが一部実施されている。焼酎粕の主成分は植物繊維であり、セルロースの他、キシランを主体とするヘミセルロースが含まれる。セルロースは、グルコースが  $\beta$ -1,4 結合を介して直鎖状に結合したホモポリマーであるのに対し、キシランはキシロースが  $\beta$ -1,4-キシロピラノシド結合を主体に構成され、アラビノースなどからなる側鎖をもつ多糖である (図 1)。焼酎醸造に用いられる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や麹菌 *Aspergillus kawachi* では、この植物繊維を分解するセルラーゼやキシラナーゼの活性が低いため分解が困難であり、もろみの粘度を高める原因になっている。植物繊維を分解し、その粘度を低下できれば、高濃度仕込みが可能となり、エタノール生産性の向上も期待できる。

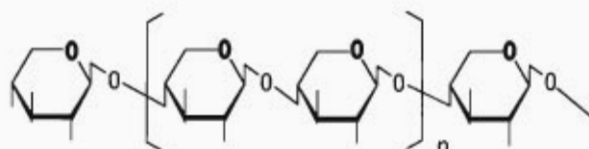


図 1. キシランの構造

カビの一種 *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* は黒酵母とも呼ばれ、細胞は酵母型と糸状の二形性を示す。昨年度は、焼酎粕の減量化を目的として難分解性の多糖キシランを5単糖キシロースまで分解する酵素キシラナーゼを、この *A. pullulans* var. *melanigenum* の培養液から分離精製した。<sup>1)</sup> 本酵素は、活性の最適 pH が極めて酸性側の 2 に存在する好酸性キシラナーゼであることを明らかにした。また、本酵素をコードする遺伝子 *xynI* をクローニングし、塩基配列を決定した。また、遺伝子から推定されるキシラナーゼ前駆体自身のもつシグナル配列を含む *xynI* 遺伝子の cDNA を導入することにより、実験室用酵母 *S. cerevisiae* INVScI 株およびメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* GS115 株での同酵素の分泌が認められた。分泌タンパク質である本酵素の前駆体はその N 末端にシグナル配列と呼ばれる分泌のための疎水性ペプチド鎖をもっている。このシグナル・ペプチドは 34 アミノ酸残基からなるプレプロ配列をもち、小胞体膜通過の際、2 段階のプロセッシングを受けて 187 アミノ酸残基からなる成熟タンパク質として分泌されたものと考えられる。

酵母 *P. pastoris* は、その優れた酵素分泌能から各種の有用酵素の発現と分泌のための宿主として近年利用されている。<sup>2)</sup> 目的タンパク質を酵母において大量に分泌させようとする際は、効率のよいシグナル配列を N 末端にもつことが必須であると考えられる。本年度は、*A. pullulans* var. *melanigenum* キシラナーゼ前駆体のもつシグナル配列の分泌能の評価を目的とする。

## 2. 研究方法

### (1) 菌株

本研究で使用した *A. pullulans* var. *melanigenum* ATCC 20524 株は、藤井 昇らにより分離されたものである。<sup>3)</sup> 遺伝子発現と分泌のための 3 種のベクター・プラスミド pPIC3.5、pPIC9、および pHIL-S1 と宿主としての *P. pastoris* GS115 (*his4*) 株はインビトロゲン社より購入した。

### (2) 全 RNA の抽出と mRNA の精製

本菌株はキシランを炭素源とした時のみキシラナーゼを生産する。したがって、キシランを炭素源とする液体培地を用いて 30℃ で 3 日間振とう培養した *A. pullulans* var. *melanigenum* ATCC 20524 の培養液を 1.5 ml 容エッペンドルフ・チューブ 6 本に各 1 ml ずつ分取した。室温で 2 分間遠心 (9,000 rpm) し、上清をデカンテーションで捨て、更に培養液を 1 ml ずつ加え同様の操作を行った。この菌体を ISOGEN (和光純薬) 1 ml に溶解させ、室温で 5 分間静置した。その後、クロロホルムを 0.2 ml ずつ加えた後、15 秒間激しく攪拌し、2 分間静置した。これを 4℃ で 15 分間遠心 (15,000 rpm) した後、エタノール沈殿を行った。ペレットを風乾させ、蒸留水 60  $\mu$  l 加え溶解し、これらを一つにまとめた。mRNA はオリゴdT カラムを通過させて調製した。

### (3) キシラナーゼ遺伝子 cDNA の合成

mRNA 溶液に MMLV reverse transcriptase を加え、この溶液を 42℃ で 1 時間 30 分インキュベートして First strand cDNA を合成した。この First strand cDNA を鋳型として PCR

によりキシラナーゼをコードするcDNAを合成した。図2に使用した一对のプライマーの配列を示す。

1) *PHO1*遺伝子のコードするシグナル配列との融合タンパク質

センス鎖：5' -CCGGAATTTCGCCGGCCCCGGGTGGCATCAACTAC-3' (*EcoRI*部位を含む)

アンチセンス鎖：5' -TCCCCCGGGGGATGACATCTAAGAGACAGTAACGCT-3' (*SmaI*部位を含む)

2)  $\alpha$ -ファクターのシグナル配列との融合タンパク質

センス鎖：*PHO1*で用いたものと同じもの

アンチセンス鎖：5' -CGGAATTTCGCTGACATCTAAGAGACAGTAACGCT-3' (*EcoRI*部位を含む)。

3) 本酵素自身のシグナル配列を含む前駆体

センス鎖：5' -CCGGAATTTCGGAACATGAAGTTCTTCGCCACTATT-3' (*EcoRI*部位を含む)

アンチセンス鎖： $\alpha$ -ファクターのアンチセンスと同じもの

図2. キシラナーゼ遺伝子増幅のためのPCRプライマーの塩基配列

(4) 分泌発現ベクターの構築

染色体組込み型の分泌発現用ベクターはいずれもアルコール酸化酵素遺伝子 *AOX1* プロモーターとターミネーター、および選択標識として *HIS4* 遺伝子をもつ。さらに、pHIL-S1 と pPIC9 は、それぞれ *P. pastoris* 由来のホスファターゼ遺伝子 *PHO1* と *S. cerevisiae* 由来 ( $\alpha$  型半数体細胞) のペプチド性の性フェロモンである  $\alpha$ -ファクターのシグナル配列を含む (図1)。この発現ベクターの *AOX1* プロモーターの下流に成熟タンパク質コード領域を挿入した。分泌シグナルを含む本酵素前駆体をコードする cDNA は、シグナル配列を含まないベクター pPIC3.5 に挿入した。

(5) *P. pastoris* の形質転換

ジーンパルサーII (バイオ-ラッド社) を用いて以下に示す方法で電気穿孔法 (エレクトロポレーション) によりこれら3種の組換えプラスミドを、*P. pastoris* に導入した。精製プラスミドを *SacI* で一晩処理した。これを65°C、30分間インキュベートし、制限酵素を失活させ、CIA処理、エタノール沈殿、リンスを行い20 mlのTE Bufferに懸濁し線状化DNAとした。また、100 ml容三角フラスコに10  $\mu$  lのYPD培地を準備し、*P. pastoris* GS115を1白金耳量植菌し30°Cで25時間培養した。これを500 ml容三角フラスコにYPD培地125 mlを準備したものに20 ml植菌し、30°Cで17時間培養しOD<sub>600</sub>1.6まで培養した。この菌体を4°C、1,500×gで5分間遠心し、ペレットを125 mlの滅菌冷水に再懸濁した。この細胞懸濁液を同条件で遠心・回収し、5 mlの滅菌冷水に再懸濁した。

これを50 ml容遠心管に移し、同条件で遠心・回収し0.25 mlの1 M滅菌冷ソルビトールに再懸濁した。この培養菌体80  $\mu$ lと線状化した DNA 10  $\mu$ lを氷冷した0.1 cmキューベットに入れ、5分間氷上でインキュベートした。これを電圧0.55 kV、キャパシタンス25  $\mu$ F、抵抗400 ohmsに設定しエレクトロポレーションを行った。電気パルスをかいた直後に1 M滅菌冷ソルビトールを1 ml加え酵母を分散させた。この100  $\mu$ lをMDプレート培地に塗布し、30°Cで48時間培養を行った。これよりコロニーを選別し、グリセロール・ストックした。

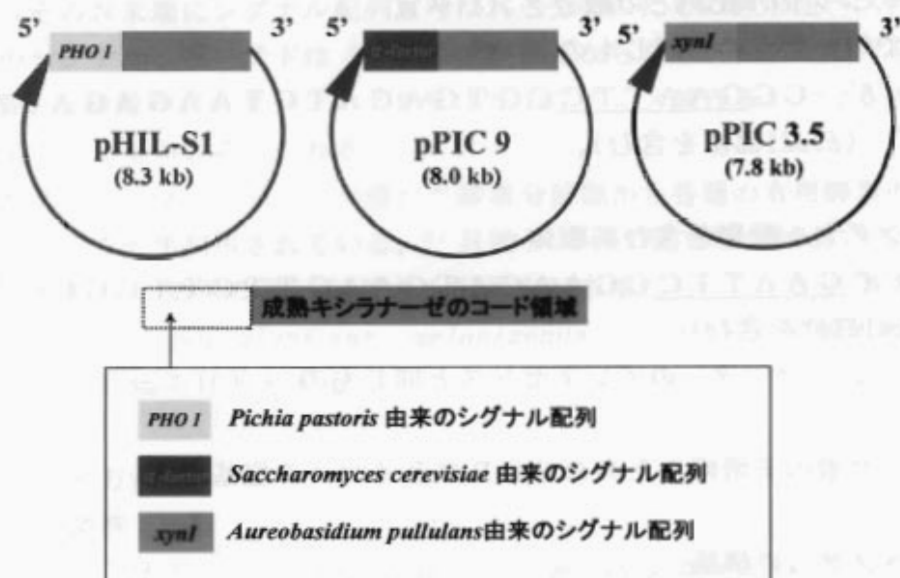


図3. *Pichia pastoris*による発現と分泌のためのベクターの構築

#### (5) キシラナーゼ活性の測定法

供試酵素液0.1 mlをフラクション・チューブに採り、45°Cに設定した振盪恒温槽 (Water Bath Shaker MM-10, TAITEC)であらかじめ5分間加温した。それに1.0 % (w/v) 基質懸濁液0.1 mlを加え、30分間で往復振盪 (80 strokes/min)しながら反応させた。その後、速やかにジニトロサリチル酸試薬0.6 mlを加えて反応を停止させ、沸騰水中で5分間加熱発色後、直ちに氷冷した。これを蒸留水で5 mlの定容とし、生成した還元糖量を500 nm (島津分光光度計UV-1200, 島津製作所)における反応液の吸光度から求める比色定量法を行った。ブランクは、同様の試験管に供試酵素液0.1 mlをとり、ジニトロサリチル酸試薬0.6 mlを加えたのち1.0 %基質懸濁液0.1 mlを加えたものとした。標準曲線はキシロース (和光純薬)を生成還元糖として100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000  $\mu$ g/mlを含む検液を調製し、ジニトロサリチル酸法により500 nmにおける吸光度を測定することにより作成した。キシランに対する酵素単位の表示法は、酵素液1 mlあたり1分間に1  $\mu$ molの還元糖 (キシロースとして計算する)を生成する酵素量を、1 unit (単位)とした。

### 3. 結果と考察

*HIS4* 形質転換体として取得した3種の異なるシグナル配列をもつ組換え酵母をそれぞれ、1% (w/v) 不溶性キシランを含む寒天培地に植菌した。メタノールでアルコール酸化酵素のプロモーターをもつ *xynI* 遺伝子の発現を誘導しながら 30°C で5日間培養した。キシラナーゼ前駆体と  $\alpha$ -ファクターのシグナル配列で分泌された組換え酵素において同程度の大きさのクリア・ゾーンが検出された (図4)。また、ホスファターゼ遺伝子 *PHO1* 由来のシグナル配列においても小さいながらクリア・ゾーンが認められた。



図4. 組換え酵母 *Pichia pastoris* GS115 によるキシラナーゼの発現と分泌  
 培地組成 (/liter) : イーストニトロゲンベース (YNB、アミノ酸非含有) 13.4 g, 寒天 15 g, キシラン (beachwood) 10 g, ビオチン 0.4 mg, カザミノ酸 10 g, メタノール 5 ml (pH 4.0)

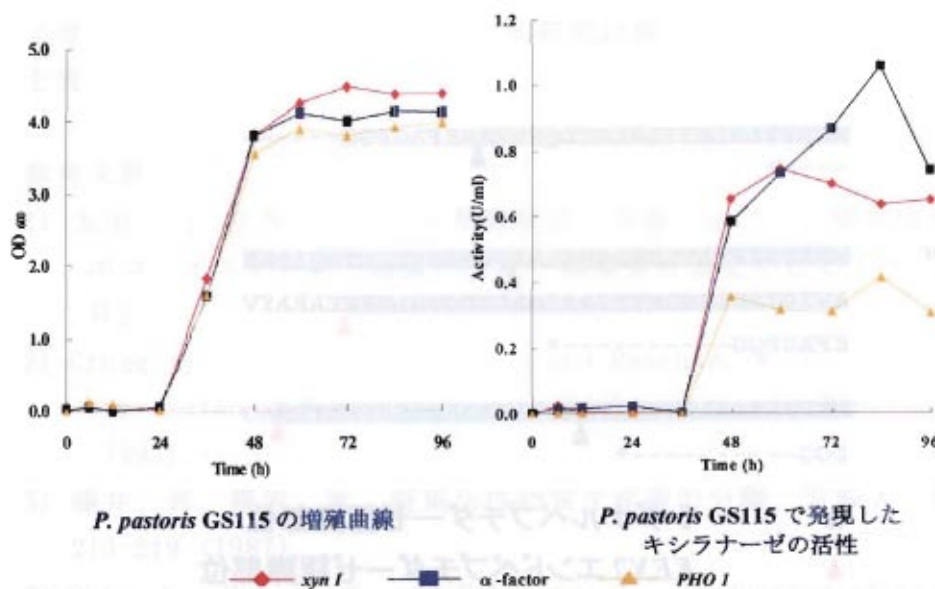


図5. 組換え体酵母 *Pichia pastoris* GS115 の増殖と細胞外キシラナーゼの生産  
 培地組成 (/liter) : YNB (アミノ酸非含有) 13.4 g, 1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 100 ml, ビオチン 0.4 mg, カザミノ酸 10 g, メタノール 20 ml

図4に示すようにプレート上で増殖した *PHO1* のシグナル配列をもつ組換え体酵母のコロニー・サイズが他の二つに比べて小さいことから、増殖の程度がクリア・ゾーンの大きさに影響しているとも考えられた。したがって、次いで液体培養による組換え体酵母の増殖と酵素分泌量を比較するための実験を行った(図5)。3種の形質転換体を液体培地に植菌し、メタノールで誘導しながら 30℃で4日間振とう培養した。経時的に菌体量 (OD<sub>600</sub>) と培養液中のキシラナーゼ活性を調べた。その結果、これら3種の株は良好な増殖を示し、3種の形質転換体の間に大きな差が認められなかった。しかし、細胞外のキシラナーゼ活性においては、本酵素自身のシグナル配列をもつ形質転換体は  $\alpha$ -ファクターのシグナル配列をもつそれと同程度の高い活性すなわち分泌能をもち、*PHO1* のシグナル配列の約2倍高い活性が見られた。このように、本酵素自身のシグナル配列は、*P. pastoris* の小胞体で認識され、プロセッシングにより効率よく分泌されることが推察された。

図6に分泌ベクター上の各遺伝子でコードされる起源の異なる3種のシグナル・ペプチドのアミノ酸配列を1文字表記にて示す。*PHO1* はアミノ酸22残基からなるシグナル配列をもち、シグナルペプチダーゼで切断される部位がアラニン(A)の後に存在する。高い分泌能を示すことで分泌ベクターによく用いられる  $\alpha$ -ファクターはアミノ酸66残基からなる長いプレプロ配列をもつシグナル配列で、シグナルペプチダーゼ認識部位であるアラニンの後で切断され、*KEX2* エンドペプチダーゼ認識部位であるアルギニン(R)の後で2回目の切断を受ける。本キシラナーゼ遺伝子自身のアミノ酸34残基からなるシグナル配列もまたプレプロ配列をもち、シグナルペプチダーゼ認識部位アラニンの後に *KEX2* エンドペプチダーゼ認識部位がアルギニンの後に存在する。このように、プレプロ配列を持つ長いシグナル・ペプチドをもつ酵素が効率よく分泌されることが推察される。

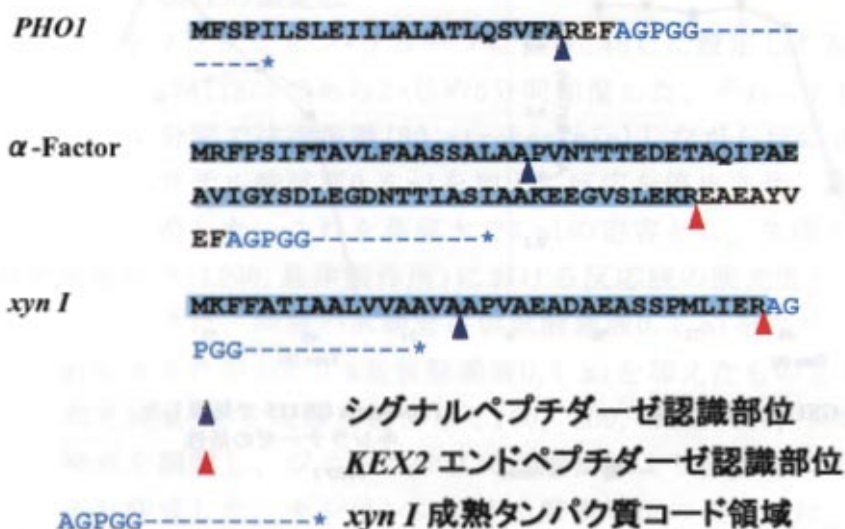


図6. *P. pastoris* によるキシラナーゼ分泌のためのシグナル配列とプロセッシング部位

#### 4. 今後の計画

遺伝子組換え酵母で焼酎粕中の植物繊維を分解しようとする場合、強力なプロモーターにより分解酵素の発現量を上げるとともに効率のよいシグナル配列で分泌量を増大させることが必須の課題である。焼酎酵母において糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼ遺伝子が発現した報告がなされている。<sup>5)</sup> しかし、知る限りでは、キシラナーゼを焼酎酵母に導入し、発現と分泌を行った報告はない。本研究により高活性でしかも好酸性のキシラナーゼを大量に分泌する焼酎酵母が開発できれば、焼酎粕の減量化に貢献できる。本研究では、キシラナーゼ前駆体のプレプロ構造をもつシグナル配列が酵母細胞内の小器官において正常に機能していることが示唆された。焼酎酵母は、実験室株と異なり野生型の2倍体であり、栄養要求性などの遺伝標識をもたない。最終年度である来年度は、これまでの知見を踏まえ、当研究室に保有するアルコール耐性の高い焼酎酵母 *S. cerevisiae* No.1200 株<sup>4)</sup> にオーレオバシジン抵抗性遺伝子を標識としてもつ酵母インテグレーション・ベクター pAU101 (宝酒造)<sup>6)</sup> により、本キシラナーゼ遺伝子 *xynI* の cDNA を酵母染色体上に導入し、キシラナーゼを分泌する焼酎酵母の創製を目指す。また、このキシラナーゼ前駆体のシグナル配列を用いれば、セルラーゼなど他の多糖分解酵素の焼酎酵母による分泌にも利用できるものと思われる。一方では、キシランの分解産物であるキシロースから遺伝子組換え酵母によるエタノール発酵が試みられているが、エタノール生産性が極めて低いのが現状である。併せて、キシロースをエタノールに変換する微生物の探索と開発も今後の重要な課題である。

#### 謝辞

*A. pullulans* var. *melanigenum* ATCC 20524 株を恵与いただき、また有益な助言を賜りました元 宮崎大学農学部教授 藤井 昇先生 (現 聖ウルスラ短期大学教授) に厚くお礼申し上げます。また、本研究に協力いただいた当研究室の学生諸君に謝意を表します。

#### 参考文献

- 1) 太田一良、新規アルコール発酵酵母の育種へ向けて、研究成果報告書「地域産業とエコサイエンス」～循環の世紀－循環型社会をめざして～、p.17-21 (平成14年3月)
- 2) Cregg, J. M., Vedvick, T. S., and Raschke, W. C., Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 11, 905-910 (1993).
- 3) 藤井 昇、篠原 智、凝集活性物質生産菌の分離、宮崎大学農学部研究報告、34, 213-219 (1987).
- 4) Ohta, K., Hamada, S. and Nakamura, T., Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 729~733 (1993).

- 5) 中村俊悟、伊東祐二、杉村和久、セルロース分解酵母の創製、平成 11 年度日本生物工学会大会講演要旨集、p. 344 (1999).
- 6) Hashida-Okada, T., Ogawa, A., Kato, I., and Takesako, K., Transformation system for prototrophic industrial yeasts using the *AUR1* gene as a dominant selection marker. FEBS Letters, 425, 117-122 (1998).