



宮崎大学学術情報リポジトリ

University of Miyazaki Academic Repository

バイオマスからの燃料エタノール生産を目的とした
遺伝子組換え酵母の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 太田, 一良 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10458/5711

バイオマスからの燃料エタノール生産を目的とした 遺伝子組換え酵母の開発

Construction of Recombinant Yeasts for Producing Fuel Ethanol from Biomass

代表研究者 宮崎大学 農学部 教授 太田 一良

A yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* strain ATCC 20524 produces an extracellular acidophilic xylanase with an optimum pH of 2.0. The 34 amino acid prepro-signal peptide of the *A. pullulans* xylanase gene (*xynI*) product expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* directed the efficient secretion of 178 mg of active xylanase per liter of the culture medium. The three-dimensional model and mutational analysis of the *xynI* gene product showed that Asp-73 and Glu-157 residues located at the upper and lower edges of the active site cleft, respectively, play a significant role in its low pH optimum. Another extracellular xylanase was purified from the culture supernatant of the *A. pullulans*. The xylanase gene (*xynII*) encoded a 26-amino acid signal peptide and a 335-amino acid mature protein. The *xynII* 5'-noncoding region had two consensus binding sites (5'-GCCARG-3') for the transcription factor PacC mediating pH regulation. Quantitative real-time PCR analysis revealed that the transcription levels at pH 6.0 and pH 8.0 were 8-fold and 22-fold higher than that at pH 2.7, respectively.

1. 緒言

燃料エタノール生産のためのバイオマス資源の主流は、グルコースなどの六炭糖を主体とする余剰農作物（コムギ、サトウキビ、ビートなど）由来の糖質やデンプン質である。しかし余剰農作物が極めて少ない我が国の実情を考えると、間伐材、製材加工残材、建築廃材などの食糧と競合しないセルロース系バイオマスを活用することがエネルギーおよび環境問題解決の観点から重要である。キシランは、単子葉植物などの細胞壁中のヘミセルロースの主成分で、キシロースが β -1,4-キシロピラノシド結合した構造を主鎖とし、その側鎖にアラビノースやグルクロン酸を含む。本研究では、不完全菌 *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524株を用いて、キシラン分解酵素キシラナーゼの精製とコードする遺伝子のクローニングおよび酵母における発現と分泌を行った。その研究成果を以下に記述する。

2. 好酸性キシラナーゼの機能解析

2-1. シグナル・ペプチドの配列と分泌能

A. pullulans ATCC 20524株の培養ろ液を濃縮後、その粗酵素液を2種類のカラムクロマトグラフィーに供し、キシラナーゼを電気泳動的に単一に精製した。本酵素は、分子量24,000のエンド型に作用するキシラナーゼであった。また、最適pHが2.0と非常に低く、pH安定性もpH 1.0から10まで安定であり、好酸性と高いpH安定性を示す新規な酵素であった。本酵素はGlycosyl Hydrolase (GH)ファミリーIIに属し、その34アミ

ノ酸からなる長いシグナル・ペプチドは2段階のプロセッシングを受けて分泌されるプレプロ配列であることが示唆された(Fig. 1)。本研究では起源の異なるシグナル配列の酵素タンパク質分泌能について比較するため、本酵素をコードする遺伝子(*xynI*)のシグナル配列を酵母*Pichia pastoris*のホスファターゼおよび分泌能が高い酵母*Saccharomyces cerevisiae*の α -ファクター由来の配列に置換した2種類を作製した。*xynI*自身のシグナル配列とシグナル配列が異なる2種のキシラナーゼ遺伝子をそれぞれ*P. pastoris* GS115株の染色体上のアルコール酸化酵素遺伝子AOX1由来のプロモーターの下流に組み込み、各遺伝子発現と発現した酵素タンパク質の分泌量を比較した。その結果、菌体の増殖は全て同様であったが、本酵素由来のシグナル配列と α -ファクターの分泌量は同程度でホスファターゼ由来のシグナル配列の約2倍高い分泌量があった。さらに本酵素本来の分泌シグナルによって分泌させた成熟タンパク質のN末端アミノ酸配列を解析した結果、分泌シグナルはエンドペプチダーゼの認識部位で正確に切断されていた。これらの事実より、本酵素のシグナル配列は*P. pastoris*の小胞体で認識され、プロセッシングにより酵素を効率よく細胞外へ分泌していることが推察された。本酵素のシグナル配列は α -ファクターと比較して、半分以下のサイズであるにも拘わらず、高い分泌能を示したことから、広く他起源の有用酵素の発現と分泌においても応用が可能であると考えられた。

A

Apm XynI	1	MKFFATIAALVVAAVAAPVAEADAEASSPMLIERAGPGGI	40
		pre-region Δ pro-region ▲	
Ap XynA	1	MKFFATIAALVVGAVAAPVAEAEAEASSPMLIERAGPGGI	40
Ang XynI	1	MKVTAAFAGLLVTAFAAPVPE-----PVLVSRS--AGI	31
Ak XynC	1	MKVTAASAGLLGHAFAPVPO-----PVLVSRS--AGI	31
		** . * : * . * : * . * * * . : * : * : * : * : . * *	

B

Apm XynI	137	LGTV V SDGATYTV C T DERV N EPSITGTSTFKQYWSVRQTK	170
Ap XynA	137	LGTVCSDGATYTVYTDTRTNQPSITGTSTFKQYWSVRQTK	170
Ang XynI	125	LGTVYSDGSTYQVCTDTRTNEPSITGTSTFTQYFSVREST	164
Ak XynC	125	LGTVYSDGSTYQVCTDTRTNEPSITGTSTFTQYFSVREST	164
		* * * * * * * : * * * * * * . * : * * * * * * * * . * * : * * * : . .	

Fig. 1. Alignment of N-terminal (A) and internal (B) amino acid sequences of *A. pullulans* var. *melanigenum* XynI and homologous xylanases. Apm, *A. pullulans* var. *melanigenum*; Ap, *A. pullulans*; Ang, *A. niger*; Ak, *A. kawachii*. The boxed residues in XynI indicate the sites for targeted mutagenesis to be used in this study.

2-2. 好酸性の機能解析

pH 2という極めて低いpHで最大活性を示すキシラナーゼの好酸性に関与するアミノ酸残基を解析するため、Recombinant PCR法により、分泌シグナルを含むキシラナーゼ前駆体をコードする遺伝子 *xynI* の野生型cDNAにD73NまたはE153T/E157Qの部位特異的変異を導入した。これら変異cDNAを発現ベクター-pPIC3.5に挿入し、

*P. pastoris*の染色体上に組み込んだ。各組換え体酵母はメタノールによるプロモーター活性の誘導によって、菌体外に著量のキシラナーゼを分泌した。変異体酵素の解析から、好酸性に関与する73番目のアスパラギン酸と157番目のグルタミン酸およびそれらの立体構造上の位置を特定した(Fig. 2)。

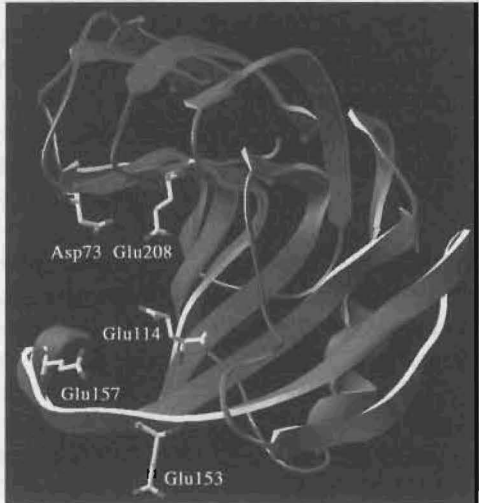


Fig. 2. Hypothetical 3D structure proposed for *A. pullulans* XynI protein. The ribbon diagram was created on the basis of its homology with the structures of *Aspergillus* xylanases using the Swiss-Model server and DeepView software.

3. GHファミリー10に属するキシラナーゼ

3-1. 酵素の精製と遺伝子クローニング

キシランを炭素源とし、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を含む液体培地(100 ml)にて本菌株を30℃で5日間回転とう培養した。その培養ろ液から分子量35,000、活性の至適pHが6.0のキシラナーゼを精製した。本酵素はGHファミリー10に属する特徴的な基質特異性を示した(Table 1)。精製酵素のN末端と内部アミノ酸配列をもとにプライマーを作成し、染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。その増幅断片(650 bp)をプローブとして染色体DNAからキシラナーゼをコードする遺伝子 $xynII$ を含む9.0 kbpのEcoRI断片をクローニングした。さらにサブクローニングした3.8 kbpのXbaI-KpnI断片の塩基配列を決定した。3.8 kbp断片中の $xynII$ 遺伝子は26アミノ酸残基の分泌シグナルを含む361残基からなるタンパク質をコードした。成熟タンパク質の推定分子量は37,344 Da、等電点は8.4であった。

Table 1 Substrate specificity of GH family 10 xylanase from *A. pullulans*

Substrate	Specific activity (U/mg)
Oat spelt xylan	29.5
Birch wood xylan	35.0
Carboxymethyl cellulose	N.D
pNP- β -D-cellobioside	0.23
pNP- β -D-xylopyranoside	0.02
pNP- β -L-arabinofuranoside	< 0.01
pNP, p-nitrophenyl.	
N.D, Not detected.	

3-2. 培養pHによるキシラナーゼ遺伝子 $xynII$ の発現調節

本酵素は培養のpHを中性付近に調節した際に培養液中に分泌された。本*A. pullulans*キシラナーゼ遺伝子 $xynII$ のプロモーター領域において、糸状菌*Aspergillus nidulans*で報告されている環境pHに应答する転写因子PacCが結合するためのコンセンサス配列5'-GCCARG-3'の存在を初めて見出した。 $xynII$ の発現量をリアルタイムPCRにより定量した結果、 $xynIII$ はpH 6.0および8.0の緩衝液で増殖した菌体では、pH緩衝液を用いない場合(pH 3.0)に比較してそれぞれ43倍および22倍高く発現した。この結果は、転写因子PacCに類似し

た制御タンパク質が $xynII$ の転写制御に関与している可能性を示唆した。

4. 結論

不完全菌*A. pullulans* ATCC 20524株より酵素化学的諸性質と遺伝子発現の制御機構が異なる2種の新たなキシラナーゼを精製した。これらのキシラナーゼは、その一次構造の特徴からGHファミリー10および11に属し、それぞれ好熱性および好酸性という工業的に有用な特徴を有した。それぞれの酵素をコードする遺伝子をクローニングし、酵母*P. pastoris*により発現させた。本研究でクローニングしたキシラナーゼ遺伝子はバイオマスからのエタノール生産へ応用できる可能性が示唆された。

5. 今後の展望

*A. pullulans*由来の好酸性キシラナーゼの長い分泌シグナルは、その特徴的な配列に起因して酵母はもとよりグラム陰性細菌である大腸菌においてもキシラナーゼを菌体外に分泌させる機能を有する事を発見した。現在、高いエタノール耐性を示す*Saccharomyces*酵母およびエタノール発酵性大腸菌KO11株にキシラナーゼ遺伝子を導入するための基盤研究を実施している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、協力を頂いた森山聡、田中秀典をはじめとする当研究室のメンバーに謝意を表する。

発表論文

- 1) H. Tanaka, T. Okuno, M. Muguruma, and K. Ohta, Acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans*: efficient expression and secretion in *Pichia pastoris* and mutational analysis. *J. Biosci. Bioeng.*, 98, 338-343 (2004)
- 2) H. Tanaka, M. Muguruma, and K. Ohta, Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and characterization of the encoding gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, 202-211 (2006)