

## 麹菌 *Aspergillus* sp. のペクチナーゼ及びセルラーゼに関する研究 (第2報)

佐野一成・江藤 勸・萩尾 隆\*・久米 堯\*・森口光暲\*\*

食品工業部・\*うすき生物科学研究所・\*\*大分大学工学部

### Characterization of pectinases and cellulases derived from *Aspergillus* sp. (2nd report)

Kazunari SANO, Susumu ETO, Takashi HAGIO\*, Takashi KUME\*, Mitsuaki MORIGUCHI\*\*

Food Science & Technology Div. \*Usuki Bio Research Center \*\*Faculty of Engineering, Oita Univ.

#### 要 旨

醤油麹菌・焼酎麹菌の遺伝子組換えによる改良育種に関する基礎的知見を得るために、*Aspergillus* 属の融合株であるPM菌を対象として研究を行った。ペクチナーゼ及びセルラーゼ活性を有する酵素タンパク質について、各種クロマトグラフィーにより分離・精製を進めるとともに、培養条件についても検討したところ、培養条件により酵素の発現・分泌が影響を受けていることが示唆された。また、酵素遺伝子のクローニングを目的としたcDNAライブラリの作成に着手し、0.5~3kbpの遺伝子断片が挿入された、 $1.0 \times 10^6$ のサイズのライブラリを得た。

#### 1. はじめに

近年、バイオテクノロジーに対する需要は県内の様々な産業分野で高まってきている。当県の主要な食品産業である味噌・醤油、酒類製造業等においても、高品質・高付加価値の製品開発や製造工程の合理化、廃棄物の減量化などに対応できる微生物の実用化が望まれている。

伝統的に醸造食品の製造に用いられてきた麹菌 (*Aspergillus* sp.) は多くの有用な酵素、有機酸等を菌体外に分泌することが知られており、それらの工業生産にも広く利用されている。このような背景もあって、麹菌の遺伝子や生産するタンパク質に関する研究も広く行われており、*A. nidurante* については全ゲノム配列の解析も報告されている。本研究で対象とするペクチナーゼ、セルラーゼは、植物細胞の強固な細胞壁の構成成分であるペクチン質やセルロースを分解する酵素で、この作用により植物組織の強度を低下させることができる。これにより、もろみの粘度の低下、ペクチン、セルロースの分解産物自体を含め、従来未利用であった植物組織内部の炭素源の資化等が期待される。

PM菌は *Aspergillus* 属の融合株で、強い植物組織崩壊活性を有していることが確認されており、いくつかの酵素活性の強さ、酵素分泌量は親株のそれを上回っていた。細胞融合により得られた融合株が親株より強い活性を有することはまれで、当初の目的に添わない性質が現れることもあり、このことが遺伝子組換えによる改良が行われるようになった一因でもある。そこで、本研究では、PM菌が高い活性を示すようになった原因を解明し、醸造用麹菌に応用する技術の確立を目的とし、その基礎となる知見の収集を試みることにした。

#### 2. 方 法

##### 2.1 菌株

うすき生物科学研究所が所有するPM菌を用いた。

PM菌は *A. niger* IF031125 株と *A. oryzae* UF05888 株の細胞融合により取得された融合株である。

##### 2.2 PM菌の培養

フスマ粉末に大豆煮汁とペクチン或いはセルロースを添加した培地に、予め調製した麦麹を接種して30°Cで培養した。液体培養については Czapek-Yeast Extract 培地に大豆煮汁を添加し、30°Cで振盪培養した。

##### 2.3 酵素タンパク質の分離・精製

フスマ麹を酢酸緩衝液(pH5.0)に懸濁、攪拌したのち、遠心分離して麹抽出液を得た。この麹抽出液を限外ろ過により濃縮したのち、緩衝液を置換して粗酵素液を得た。粗酵素液をカラムに供し、溶出液を分取した。酵素活性測定により活性画分を追跡し、回収した画分をさらにカラムに供して精製を行った。

酵素活性の測定は、ペクチン或いはカルボキシメチルセルロース(CMC)を基質として、酵素反応によって生じた還元糖量を、Somogyi-Nelson法によって測定することにより行った。ペクチナーゼ活性については粘度低下を測定する方法も併用した。

##### 2.4 cDNAライブラリの作成

培養したPM菌体を液体窒素で凍結・粉碎し、Acid Phenol Guanidium Chloroform (APGC)法によりtotal RNAを抽出した。mRNAの精製はOligo dT-30 Super (Loche Diagnostics社製)を用いて行った。mRNAからのcDNAの合成、ベクターへの連結はZAP cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製)を用いて行った。また、パッケージングにはGigapackIII Gold packaging extract

(Stratagene 社製) を用いた。

### 3. 結果

#### 3.1 ペクチナーゼの分離・精製

抽出した粗酵素液を 10mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH5.0) で平衡化した CM-TOYOPEARL カラムに供し、吸着した画分を NaCl 濃度勾配により溶出した (Fig.1)。カラムに吸着しなかった画分と塩濃度勾配の画分に複数の活性画分が見出された。このうち塩濃度勾配の前半部分に溶出した画分を回収し、Butyl-TOYOPEARL カラムに供し、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  の濃度勾配で溶出したところ、Fig.2 のような溶出パターンになった。その他の画分についても精製を進めたが、いずれの場合も精製を進めるにしたがって酵素活性の低下が見られた。また、培養のロットによって溶出パターンが異なり、再現性に乏しいという傾向が見られた。

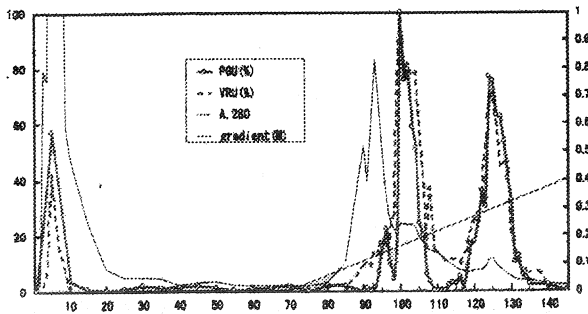


Fig.1 CM-TOYOPEARL カラムの溶出パターン

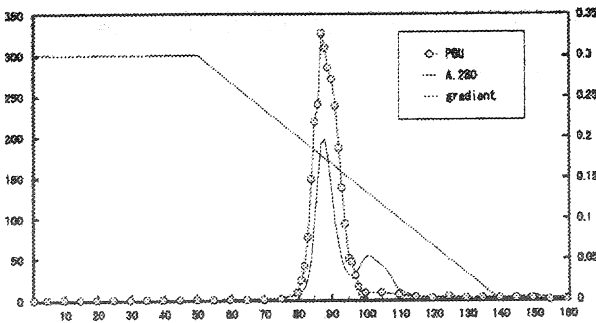


Fig.2 Butyl-TOYOPEARL カラムの溶出パターン

#### 3.2 セルラーゼの分離・精製

抽出した粗酵素液を 10mM リン酸緩衝液 (pH6.8) で平衡化した SuperQ-TOYOPEARL カラムに供し、吸着画分を NaCl 濃度勾配により溶出した (Fig.3)。活性測定の結果、最も高い吸光度のピークが見られる位置に溶出した画分に、より高いセルラーゼ活性が確認された。この画分を回収し、FPLC システムを用いて MonoQ カラムによるクロマトグラフィーに供した (Fig.4)。精製量が少なく、詳しい解析はできていないが、下線部の画分にセルラーゼ活性が含まれていると思われる。また、前述のペクチナーゼの分離・精製の際と同様に、培養ロットによって溶出パターンが異なりと

いう傾向が見られた。

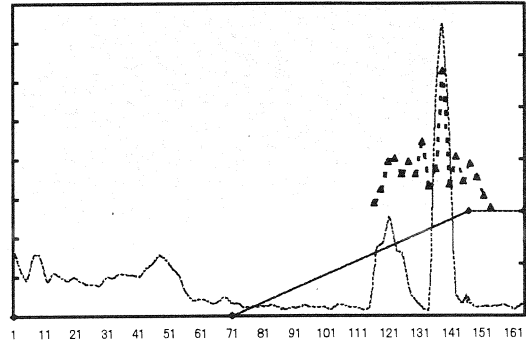


Fig.3 SuperQ-TOYOPEARL カラムの溶出パターン

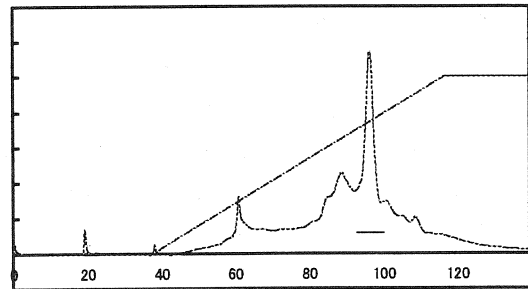


Fig.4 MonoQ カラムの溶出パターン

#### 3.3 cDNA ライブラリの作成

凍結破砕した P.M 菌体より、APGC 法にて RNA を抽出し、つづいて mRNA の精製を行った。Total RNA 約 1mg から約 30 $\mu\text{g}$  の mRNA を得た (Fig.5)。



Fig.5 Total RNA の抽出

- 1; 固体培養菌体の RNA
- 2; 液体培養菌体の RNA
- 3; 液体培養菌体の mRNA

つづいて mRNA を鋳型として cDNA を合成し、サイズ分画後、1.5kbp 以上の大きさの cDNA 断片をベクターに連結した。市販のキットを用いてファージ粒子のパッケージングを行い、 $1.9 \times 10^6$  pfu/ml のファージを得た。ポジティブのプラークからファージ DNA を回収して PCR 法により挿入断片のサイズを検討した (Fig.6) と、0.5~3kbp の cDNA 断片が挿入されていることが確認された。得られたファージを *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>r</sup> に感染させてライブラリの増幅を行い、最終的に  $1.0 \times 10^8$  のサイズのライブラリを得た。

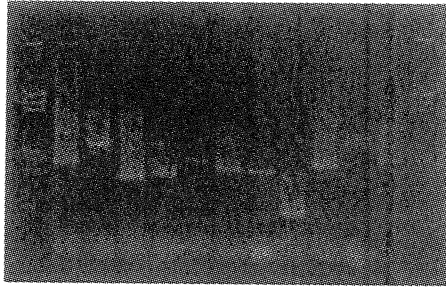


Fig.6 挿入遺伝子断片の確認

#### 4. まとめ

遺伝子組換えによる麹菌の酵素活性強化育種の確立のために、麹菌の融合株であるPM菌を対象として、遺伝子組換えに必要な知見の収集を行った。PM菌が高い植物組織崩壊能を獲得した原因としては、細胞融合により多種の酵素が発現されるようになったこと、或いは融合の過程で酵素の発現を制御する機構に何らかの変異がかかったことなどが考えられ、この機構を解明して醸造用麹菌に適用することができれば、有用な菌株の取得が期待される。

遺伝子クローニングのための情報を得るために、ペクチナーゼ及びセルラーゼ活性を有する酵素タンパク質の分離・精製を引き続き行った。フスマを基材とする固体培地でPM菌を培養後、粗酵素液を抽出してカラムクロマトグラフィーによる分離を試みたが、現段階で最終的な精製標品を得るには至っていない。また、ペクチナーゼ、セルラーゼのいずれの場合も、精製を進めるにつれて活性が低下する現象が見られた。これは、双方の酵素とも反

応性の異なる複数の酵素の協調作用により強い活性を示していたものが、精製の過程で分離されたために、見かけの活性が低下したものと考えられる。培養ロットにより溶出パターンが変動する点については、培養条件の微妙な違いにより生じていると思われる。これは、用いる培地が合成培地ではないため、培地の組成を厳密に均一化することが困難なこと、麦麹を接種するという培養方法をとっているために、培養初期の菌体量にも差が生じることなどが原因と考えられる。また、ペクチナーゼ、セルラーゼとも、定常的に発現している酵素ではなく、特定の環境で発現する誘導型の酵素であると推定される。実際に、培地にペクチンを添加すると、無添加の場合に比べて酵素の分泌量の立ち上がりに差が生じることも確認された。

さらに、将来的な遺伝子組換えへ向けての酵素遺伝子の取得を目的として、cDNAライブラリの作成に着手した。市販のキットを用いてcDNA合成、ファージへのパッケージングを行った。cDNAをサイズ分画後、1.5kbp以上の画分をベクターに連結し、PCR法により挿入遺伝子断片を確認したところ、0.5~3kbpのDNAが増幅された。最終的に得られたライブラリのサイズはおおよそ $1.0 \times 10^6$ であった。

今後は、酵素タンパク質の分離・精製を進めるとともに、今回作成したcDNAライブラリを用いて目的酵素の遺伝子を保有するクローンのスクリーニングを行うことになる。プローブの作成にあたっては、現在精製中のタンパク質のアミノ酸配列をもとに作成するほかにも、既にデータベースに登録されている、親株(*A. niger*, *A. oryzae*)の酵素遺伝子の相同性をもとに作成するという方法も可能であり、酵素の精製の進捗度によっては検討が必要になると思われる。