Rhizopus グルコアミラーゼ遺伝子の酵母での 発現とその応用について

吉栖 肇*, 芦刈俊彦*, 中村規尚*, 國崎伸一**,
田中良和*, 木内直子*, 柴野裕次*

Expression of *Rhizopus* Glucoamylase Gene in Yeast and Its Application

Hajime YOSHIKUNI*, Toshihiko ASHIKARI*, Norihisa NAKAMURA*,
Shin-ichi KUNISAKI**, Yoshikazu TANAKA*, Naoko KIUCHI* and Yuji SHIBANO*

* Laboratories of Applied Microbiology,

** Research Laboratories of Alcoholic Beverages and Fermentation Technologies,
Research Center, Suntory Ltd.

(1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618, Japan)

Rhizopus glucoamylase gene was cloned, sequenced and expressed in yeast. After improvement of the promoters, yeast strains, vectors and carbon sources, upto 13 U/ml of glucoamylase was secreted. This means that about 8% of the total yeast protein was secreted as glucoamylase. The study of the structure and function relationship of this glucoamylase suggested that the glucoamylase consisted of two domains; adsorptive domain and catalytic domain. By using the resultant recombinant yeast strain, alcoholic fermentation of starchy materials was also achieved.

1. はじめに

Rhizopus グルコアミラーゼはそのすぐれた酵素化学的性質により、ブドウ糖製造、醸造工業などの澱粉質原料を利用する諸工業において使用されている。これまで、澱粉質原料からエタノールを生産する場合には、酵母によるアルコール発酵に先だって、澱粉を発酵性糖に変換するための糖化工程が必要であった。このたび、澱粉質原料から直接エタノールを生産しうる酵母の育種を目的として、*Rhizopus* グルコアミラーゼ遺伝子のクローニングと、酵母への導入を試みた結果、澱粉を唯一の炭素源として生育し、エタノールを生産する酵母を育種することができた。また、グルコアミラーゼを酵母に安定に高発現させる工夫、グルコアミラーゼの構造と機能の関

係についても得られた知見を述べたい。

2. クローニングと酵母での発現^{1,2)}

精製グルコアミラーゼのアミノ酸配列を部分的に決定し、それに対応するオリゴヌクレオチドを合成した。このオリゴヌクレオチドをプローブとして *Rhizopus* 染色体 DNA ライブラリーから、染色体グルコアミラーゼ遺伝子を得た。この遺伝子を酵母に導入したところ、遺伝子の転写は認められたが、グルコアミラーゼ蛋白も活性も認められず、翻訳されていないと推察された。そこで、*Rhizopus* の cDNA ライブラリーから、染色体グルコアミラーゼ遺伝子をプローブとすることにより、グルコアミラーゼ cDNA を取得した。両遺伝子の塩基配列を比較したところ、染色体グルコアミラーゼ遺伝子には 4 カ所の短いイントロンがあること、グルコアミラーゼ cDNA は完全長でなく N 末端に相当する部分を欠損していることがわかった。また、*Rhizopus* グルコアミラーゼは 604 残基のアミノ酸からなり、うち N 末端のメチ

* サントリー(株)研究センター 応用微生物研究所 (618 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1)

** サントリー(株)研究センター 酒類研究所 (618 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1)

図 1. 用いたプラスミドの制限酵素地図

オニン残基から 25 残基は分泌のためのシグナルペプチドであることも判明した。そこで、両遺伝子から 5' 非翻訳領域を含み、完全長で、しかもイントロンのないグルコアミラーゼ遺伝子を構築した。この遺伝子を YEp 型ベクターにつなぎ、酵母 XS-30-2B に導入したところ、形質転換酵母培養上清中に約 0.005 U/ml のグルコアミラーゼ活性が認められた。このことは、*Rhizopus* 由来のプロモーターおよび分泌のためのシグナルペプチドが酵母という異種の生物中でも機能することを示唆したものである。この形質転換酵母は、1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%糊化可溶性澱粉を含む、澱粉を炭素源とした培地で良好に生育し、しかも、澱粉からエタノールを直接生成した。

3. 高発現と安定性の向上

1) プロモーターの改変³⁾

目的の蛋白質を高発現させるに際して、その蛋白質遺伝子を強力なプロモーターの下流につなぎ、コピー数の多いベクターに入れることが一般に検討される。酵母における最も強力なプロモーターの一つであるグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター (P_{GAP}) と、コピー数の多い YEp 型ベクターを用いて検討した。図 1 に示した pYGA2269 を酵母に導入したところ、形質転換酵母のグルコアミラーゼの分泌量は、約 0.2 U/ml と、前述のカビ由来のプロモーターの場合に比べて約 40 倍程度上昇した。一方、細胞あたりのコピー数が 1 だとされる YCp 型ベクターを用いた pYGA195 (図 1) を酵母に導入した場合の分泌量は約 0.5 U/ml であった。これは、転写の段階でグルコアミラーゼ mRNA が多く合成されてもグルコアミラーゼの高発現には必ずしも結びつかないこと、すなわち、この場合の高発現の律速段階は転写以後の過程にあることを示唆しているものと考えられた。

2) 宿主酵母の改良⁴⁾

以上の実験は、宿主酵母として遺伝解析用酵母 XS-

30-2B 株を用いて行ったが、この酵母は実用酵母に比べて、増殖能や発酵能において劣るため宿主を変更することを試みた。保存菌株から選択した 2 倍体酵母を孢子形成させ 1 倍体としたのち、XS-30-2B 株と交配・分離を繰り返し、1 倍体で *trp 1* の栄養要求マーカーをもち、しかも発酵能の高い G1315 株を得た。G1315 株に、pYGA2269、pYGA195 を導入したところ、分泌生産されるグルコアミラーゼ量は、おおよそ 0.5、1 U/ml となった。これは、XS-30-2B 株を宿主とした場合の 2 倍程度の生産量であり、グルコアミラーゼの生産や発酵には G1315 株のほうが適していることがわかった。

3) 染色体への組み込み⁴⁾

グルコアミラーゼの安定した分泌生産にはプラスミドが安定に保持されることが必要である。選択圧をかけた条件 (トリプトファンを含まない培地) で約 10 世代培養したあとの pYGA195、pYGA2269 の保持率はおおよそ 75、70% であった。安定性を向上させるために、グルコアミラーゼ遺伝子の酵母染色体への組み込みを検討した。pYGA195_x で G1315 株を形質転換し、形質転換酵母をトリプトファンを含まない培地と含む培地での培養を 3 回繰り返した。pYGA195_x は不安定で脱落しやすいので、この操作によりトリプトファン合成能の回復したクローンは、その染色体中に pYGA195_x が組み込まれていると考えられた。このようにして得た組み込み型形質転換酵母のグルコアミラーゼ分泌量は、組み込みの生じた位置やコピー数により異なり G5315-1 株で 5.2 U/ml、G5315-2 株で 1.0 U/ml、G5315-3 株で 10 U/ml であった。プラスミドによる形質転換株と比べ、組み込み型形質転換株のほうがグルコアミラーゼの生産性は高いことが認められた。これら 3 種の組み込み型形質転換株を用い、澱粉培地でのアルコール発酵を検討したところ、G5315-2 株が最も成績が良好であった。この試験結果から、グルコアミラーゼの高い生産性が必ずしも、澱粉直接発酵能の強さに結びつくわけではないことが示された。

詳細については省略するが、G5315-1 株のホモ 2 倍体

である GD5701 株は 8 U/ml, G5315-2 株のホモ 2 倍体である GD5702 株は 2 U/ml のグルコアミラーゼを分泌生産した。発酵試験の結果は GD5702 株のほうが良好であった。

4) Gene dosage 効果

染色体の特定部位に目的遺伝子を組み込む方法を用い、グルコアミラーゼ遺伝子のコピー数と、グルコアミラーゼの分泌量の関係を検討した。グルコアミラーゼ遺伝子のコピー数が細胞あたり、1, 2, 3, 5 の場合の分泌量は、おのおの 1.2, 2.8, 3.8, 6.0 U/ml となり、少なくともこの程度のコピー数までは明確な gene dosage 効果がみられた。しかし、コピー数が 10 を超えるような

図 2. 炭素源によるグルコアミラーゼ分泌量の差異

培地は、2%ペプトン、1%酵母エキス、2%炭素源である。1Uは、37°Cで1分間に1 μ molのグルコースを糊化可溶性澱粉から生成する酵素量である。

プラスミドではかえって分泌量が低下しているの、グルコアミラーゼの分泌生産にはコピー数以外の要因も重要であると考えられた。

5) 炭素源の検討⁴⁾

種々の炭素源を用いて形質転換体を培養した場合のグルコアミラーゼ分泌量を比較したところ、図2のような結果が得られた。ガラクトースやマルトースを炭素源とした場合に高い分泌量が認められた。グリセロールやエタノールを炭素源とした場合でも、グルコースを炭素源とした場合と同程度の分泌量がみられた。

以上のような改良を重ねた結果、グルコアミラーゼの分泌量は、当初の *Rhizopus* 由来のプロモーターをそのまま用いた場合の 0.005 U/ml から、現在のところ、13 U/ml と 2,600 倍上昇させることができた。グルコアミラーゼの比活性を 40 U/mg とすれば、菌体蛋白の約 8% 程度がグルコアミラーゼとして分泌されたことになる。

4. 組み換え酵母による発酵⁵⁾

組み換え酵母 (GD5702 株, G5315-2 株) を用いた澱粉質原料からのアルコール発酵の結果を簡単に紹介したい。両株間には、発酵成績に関してはほとんど差は認められなかった。低温蒸煮仕込発酵⁶⁾では、トウモロコシ、キャッサバ、カンショを原料とした場合、グルコアミラーゼ酵素剤を使用した際の発酵歩合を 100 とすると、おのおの 97, 100, 96 であり、トウモロコシを原料とした

図 3. トウモロコシを原料とした無蒸煮仕込発酵

RFE は、グルコアミラーゼ酵素剤を使用したときの発酵歩合を 100 としたときの発酵歩合。

	G-5315-2	GD-5702
Alcohol	13.0%	13.1%
RFE*	94.1%	94.8%
pH	4.30	4.30
Total Acid	3.9ml	3.9ml
RDS**	0.25%	0.23%

RFE*: Relative Fermentation Efficiency

RDS**: Residual Direct Sugar

場合の無蒸煮仕込発酵⁶⁾では、同様に、95であった。発酵の一例を図3に示した。

5. グルコアミラーゼの構造と機能

1) 多形とドメイン構造

Rhizopus グルコアミラーゼは分子量の異なる3分子種 Gluc 1 (分子量 74,000), Gluc 2 (分子量 58,600), Gluc 3 (分子量 61,400) からなり, Gluc 2, Gluc 3 は, Gluc 1 がプロテアーゼにより限定分解を受けて, その N 末端部分を失い, 生じるとされている⁷⁾. また, 限定分解により切除される分子量 14,000 のポリペプチドには, 活性はないが, 澱粉への吸着能があることも知られている⁸⁾. *Rhizopus* グルコアミラーゼ遺伝子の塩基配列から予測される一次構造⁹⁾と高橋らのデータ^{6,7)}を合わせて考えると, Gluc 2 は, 開始コドンのコードするメチオニン残基から 159 番目のグルタミン酸残基を, Gluc 3 は 110 番目か 116 番目のリジン残基を N 末端とすると推測できる²⁾.

これら3種類のグルコアミラーゼのうち, Gluc 1 のみが澱粉に対する吸着能をもち, Gluc 2, Gluc 3 は吸着能をもたないことが知られている^{9,10)}. 3分子種とも糊化可溶性澱粉には同程度によく作用するが, 強い生澱粉分解能をもつのは Gluc 1 のみであることから, 澱粉への吸着能を欠くと生澱粉分解能が低下することが示唆される. 以上のことから, Gluc 1 の N 末端部分に澱粉への吸着にかかわる部分が, C 末端部分には澱粉の分解を触媒する部分があり, *Rhizopus* グルコアミラーゼ分子は二つの機能的に異なる部分からなると考えられた^{9,10)}.

一方, *Rhizopus* グルコアミラーゼの二次構造は図4のようになると予想された¹¹⁾. プロテアーゼにより切除される吸着にかかわると考えられる部分には α らせん構造がなく, 触媒にかかわると考えられる部分には α らせん構造が存在するとみられた. したがって, グルコアミラーゼ分子の高次構造は, N 末端側と C 末端側で大きく異なっている可能性がある. *Rhizopus* グルコアミラーゼ分子は, 構造的にも機能的にも異なる二つのドメインからなり, N 末端側ドメインは澱粉分子への吸着を, C 末端側ドメインは澱粉分子の分解をつかさどっており, 二つのドメインをプロテアーゼにより比較的切断されやすいペプチドが結びつけていると考えられた^{9,11)}.

2) 吸着ドメインの解析¹²⁾

N 末端側のドメインについて, 組み換え DNA の手法を用いて解析した. 方法の詳細は省略するが, DNA を順次分解する酵素 Bal 31 を用いて, 吸着ドメインに対

図4. グルコアミラーゼの予想二次構造

数字はN末端からの残基数. 下向きの矢印はシグナルペプチドの, 上向き矢印は Gluc 2 のプロセッシングサイト.

応する DNA 塩基配列中にさまざまな長さの欠失をもったグルコアミラーゼ遺伝子を構築した. これを酵母に導入して, 吸着ドメインに欠失をもつ種々のグルコアミラーゼを調製した. 各欠失酵素について, 生澱粉と糊化可溶性澱粉の分解能を測定し, 分解能の比を R/S 値とした. 前述のように, 澱粉吸着能を欠くと, 生澱粉分解能が弱くなるので, この R/S 値は澱粉吸着能を反映していると考えられる. 図5に結果をまとめて示した. わずか 20 残基程度の短い欠失 (図5の 502 グルコアミラーゼ) であっても, R/S 値は Gluc 1 の 70 % 程度になり, 吸着ドメインを完全に欠く 2271 グルコアミラーゼでは 1/3 程度に低下した. 以上は, 吸着ドメインが N 末端側にあるとする考えを支持する結果だが, より微細な検討が必要と思われる.

また, 遺伝子工学的手法を用いて, 吸着ドメインを二つ N 末端にタンデムにもつグルコアミラーゼ (2272 グルコアミラーゼ) を酵母に生産させた. 2272 グルコアミラーゼ, 2269 グルコアミラーゼ (Gluc 1 に相当), 2271 グルコアミラーゼを生澱粉と糊化可溶性澱粉に対し作用さ

図 5. 欠失解析の結果

Natural グルコアミラーゼは、2269 グルコアミラーゼ、Gluc 1 と同義である。欠失グルコアミラーゼの分泌量の程度も示した。一般に、欠失グルコアミラーゼの分泌量は小さくなる傾向がある。

図 6. グルコアミラーゼの澱粉分解活性

2269 グルコアミラーゼ (吸着ドメイン 1 個),
 2271 グルコアミラーゼ (吸着ドメインなし),
 2272 グルコアミラーゼ (吸着ドメイン 2 個) の糊化可溶性澱粉および生澱粉分解活性を比べた。

せたときの結果を図 6 に示した。分子量の差異を考慮すれば、分子あたりの糊化可溶性澱粉分解能において、3 種のグルコアミラーゼには大差ないように思われる。生澱粉分解能については、2271 グルコアミラーゼのみが低いことがわかる。吸着ドメインの位置や数に工夫をこらせば生澱粉をよりよく分解するグルコアミラーゼを創製できるかもしれない。

3) *Aspergillus* グルコアミラーゼとの比較

Asp. niger^{13,14)} と *Asp. awamori*¹⁵⁾ のグルコアミラーゼのアミノ酸配列はすでに知られており、両者は同一であるとされている。*Asp. niger* グルコアミラーゼの多形の原因については、i) mRNA の 2 通りのプロセッシング¹³⁾, ii) C 末端部分ポリペプチドのプロテアーゼによる切除¹⁶⁾ の 2 説が考えられている。*Aspergillus* グルコアミラーゼの場合には N 末端側が触媒ドメイン、C 末端側が吸着ドメインと考えられており^{11,17)}, *Rhizopus* グルコアミラーゼとは両ドメインの順序が逆転している。触媒ドメイン間の一次構造には相同性が認められたが、吸着ドメイン間には明確な相同性は認められなかった¹¹⁾。

6. おわりに

今後、より完全な生澱粉発酵酵母の育種とその実用化

を社会情勢を考慮しながら進めていきたいと考えている。同時に、グルコアミラーゼの構造と機能の関係についての研究から、サブサイトや活性中心に関する知見が得られ、プロテイン・エンジニアリングによるグルコアミラーゼの改良も可能になると期待している。

文 献

- 1) T. ASHIKARI, N. NAKAMURA, Y. TANAKA, N. KIUCHI, Y. SHIBANO, T. TANAKA, T. AMACHI and H. YOSHIKUMI: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2521 (1985).
- 2) T. ASHIKARI, N. NAKAMURA, Y. TANAKA, N. KIUCHI, Y. SHIBANO, T. TANAKA, T. AMACHI and H. YOSHIKUMI: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 957 (1986).
- 3) 芦刈俊彦, 中村規尚, 田中良和, 木内直子, 柴野裕次, 天知輝夫, 吉栖 肇: 日本農芸化学会昭和 60 年年度大会要旨集, p. 41 (1985).
- 4) 芦刈俊彦, 國崎伸一, 中村規尚, 田中良和, 木内直子, 柴野裕次, 天知輝夫, 吉栖 肇: 日本農芸化学会昭和 61 年年度大会要旨集, p. 37 (1986).
- 5) 國崎伸一, 須田幹夫, 古賀邦正, 松元信也, 芦刈俊彦, 柴野裕次, 天知輝夫, 吉栖 肇: 日本農芸化学会昭和 61 年年度大会要旨集, p. 38 (1986).
- 6) 國崎伸一, 松元信也: 澱粉科学, **32**, 152 (1985).
- 7) T. TAKAHASHI, Y. TSUCHIDA and M. IRIE: *J. Biochem.*, **84**, 1183 (1978).
- 8) T. TAKAHASHI, Y. TSUCHIDA and M. IRIE: *J. Biochem.*, **92**, 1623 (1982).
- 9) Y. TANAKA, T. ASHIKARI, N. NAKAMURA, N. KIUCHI, Y. SHIBANO, T. AMACHI and H. YOSHIKUMI: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1737 (1986).
- 10) T. TAKAHASHI, K. KATO, T. IKEGAMI and M. IRIE: *J. Biochem.*, **98**, 663 (1985).
- 11) Y. TANAKA, T. ASHIKARI, N. NAKAMURA, N. KIUCHI, Y. SHIBANO, T. AMACHI and H. YOSHIKUMI: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 965 (1986).
- 12) 田中良和, 芦刈俊彦, 中村規尚, 木内直子, 柴野裕次, 天知輝夫, 吉栖 肇: 日本農芸化学会昭和 61 年年度大会要旨集, p. 37 (1986).
- 13) E. BOEL, I. HJORT, B. SVENSSON, F. NORRIS, K. E. NORRIS and N. P. FILL: *EMBO J.*, **3**, 1097 (1984).
- 14) B. SVENSSON, K. LARSEN, I. SVENDSEN and E. BOEL: *Carlsberg Res. Commun.*, **48**, 529 (1983).
- 15) J. H. NUNBERG, J. H. MEADE, G. COLE, F. C. LAWYER, P. MACABE, V. SCHWERCKART, R. TAL, V. P. WITTMAN, J. E. FLATGAARD and M. A. INNIS: *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 2306 (1984).
- 16) B. SVENSSON, K. LARSEN and A. GUNNARSSON: *Eur. J. Biochem.*, **154**, 497 (1986).
- 17) B. SVENSSON, A. J. CLARKE and I. B. SVENDSEN: *Carlsberg Res. Commun.*, **51**, 61 (1986).

【質問】

鹿児島大農 檜作

1. 酵母で生成したグルコアミラーゼでジャガイモ澱粉を分解した場合, 100 % グルコースに分解するでしょうか. 約 80 % で止まりますか.
2. N末端からどのくらいのアミノ酸が澱粒吸着部位でしょうか. その部位のアミノ酸組成の特徴はありますか.

【答】

1. ジャガイモ澱粉については未検討です. 酵母の生産した組み換えグルコアミラーゼには, 他のアミラーゼ活性がないはずですので, 明確な結果が出ると思います.
2. 約 130 残基で実際にはもっと短いと考えています. セリン, スレオニン残基が多いのが特徴ですが, それらの役割についてはまだわかりません.

【質問】

福山大工 山本

組み換え酵母の生産するグルコアミラーゼの種々の澱粉分解限度についてはまだ調べていないようですが, 生澱粉を直接発酵させた場合の発酵率はどうかでしようか.

【答】

精製生澱粉ではやっていませんが, 原料を粉碎しただけのモロミを発酵させた成績は調べました. 本文を参照してください.

【質問】

熊本工大 上田

GI, GII, GIII が, それぞれのアミラーゼ遺伝子からつくられるのでしょうか. それとも GI ができたのち, プロテアーゼで修飾され, GII, GIII ができるのでしようか.

【答】

Rhizopus グルコアミラーゼの場合には, プロテアーゼの修飾により, 多形を生じると考えられています.

【質問】

食品総研 高野

プラスミドを用いた物質生産では抗生物質やアミノ酸要求性等の選択圧がなければ保持されない. 染色体へ組み込んだ場合, 選択圧がなくても安定に保持されるか. もしそうであれば特殊な培地を使わずにすむので工業的には有効であろう. しかし, 一方で安全性の問題も出てくる. コストの面も含めてお考えをお聞かせください.

【答】

実際の物質生産では選択圧をかけるのは, コスト的に難しいことも多いだろう. 組み込ませた場合, 安定性がきわめて大きくなるので, 選択圧をかける必要がなく, 工業的に好都合であると考えられる. 安全性についてはケースバイケースだが, この場合は, 生産している物質

がグルコアミラーゼだし、*Endomycopsis* のようにアミラーゼを生産する酵母も自然界に存在することから問題ないと思われる。関係省庁の指導に従いたい。ただ、プラスミドの状態でも低い頻度ではあるが、染色体への組み込みが起こっていることを付け加えたい。

【コメント】

星薬科大 高橋

私たちは *Rhizopus* 属の 1 菌株の酵素原末 (Gluczyme) より、3 種のグルコアミラーゼ (Gluc 1, Gluc 2, Gluc 3) を分離精製すると同時に、主成分グルコアミラーゼ (Gluc 1) の N 末端に対応する不活性なフラグメント 2 種 (Fr. H, Fr. L) を得ている。これらフラグメント (約 15,000 ダルトン) は生澱粉と吸着し、その吸着能は Gluc

1 の吸着能にほぼ匹敵するもので、Gluc 1 の吸着能は N 末端ペプチド部位に担われていると考えている。今回、酵母で発現された吸着ドメインを欠く *Rhizopus* グルコアミラーゼの結果からも吸着部位の存在が裏付けられたいへん興味深く思っている。

【答】

高橋先生とわれわれのアプローチの仕方は異なるわけですが、同じような結論に至ったことは興味深く思っています。グルコアミラーゼの構造と機能の関係を明らかにするためには、蛋白質レベルでの研究と DNA レベルでの研究が補い合っていく必要があると思います。