ミニレビュー

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 69, No. 3, pp. 369~372, 1995]

カビのペクチン分解酵素遺伝子群†

北本 則行, 塚 越 規 弘*

(愛知県食品工業技術センター, *名古屋大学農学部)

はじめに

ペクチンは、植物細胞の中間ラメラ及び第1細胞壁の主要な構成多糖類で、部分的にメチルエステル化されたD-ガラクトuron酸が α -1, 4結合をした直鎖構造をとり、L-ラムノースが主鎖中に、またL-アラビノース、D-ガラクトース及びD-キシロースなどの中性糖が側鎖中にそれぞれ見いだされ、極めて複雑な構造を示す。カビのペクチン分解酵素は、果汁の清澄化・濾過性の改善や野菜・果実のピューレ製造など食品の製造加工の面からと植物組織軟化・腐敗という病原性の面からの研究が多くなされてきた。カビ由来の主要なペクチン分解酵素は、1)ペクチンまたはペクチン酸の α -1, 4結合を加水分解作用で切断するポリガラクトuronナーゼ、2) β -脱離反応により糖鎖を分解するペクチンリアーゼとペクチン酸リアーゼ、3)ペクチンのメチルエステルを加水分解するペクチンメチルエステラーゼに現在分類されている。最近、これらの酵素遺伝子のクローニング、遺伝子構造の解析、遺伝子発現制御機構解明などが急速に展開されている。

1. ポリガラクトuronナーゼ(polygalacturonase: PG)

PGは、*Aspergillus niger*より3種類⁽¹⁻³⁾そして*Aspergillus oryzae*⁽⁴⁾、*Aspergillus tubigensis*⁽⁵⁾及び*Cochliobolus carbonum*⁽⁶⁾よりそれぞれ1種類の遺伝子がクローニングされ塩基配列が決定されている。これら6種類のPGのなかで、*A. niger pgaII*と*A. tubigensis pgaII*は非常に類似しており、DNAレベルで83%、アミノ酸レベルで94%の一致がみられる。他のPG

についても成熟蛋白質はいずれも約335アミノ酸からなり、そのアミノ酸配列は約60%と高い相同性がみられる。また、*Colletotrichum lindemuthianum*と*Sclerotinia sclerotiorum*とからPGが精製されそのN末端アミノ酸配列が決定されている⁽⁷⁾が、いずれも他のカビのPGとよく似ている。カビのPGと他の生物起源のPGとのアミノ酸配列を比較すると相同性は約30%とあまり高くないが、保存性の高い領域が認められる(図1)。この領域には活性発現に必須と考えられているhis残基やカルボキシル基をもったAsp残基が存在しており、活性発現や基質との結合に重要な役割を果たしているものと考えられる。

カビは真核生物であり、その遺伝子中にはイントロンが通常存在している。これらPG遺伝子の場合も1個から3個のイントロンが存在する。*Aspergillus*属カビのPG遺伝子は、*A. niger pgaC*遺伝子のイントロンBに相当する位置にいずれもイントロンを保持している(図2a)。また*A. oryzae* PG遺伝子と*A. niger pgaI*遺伝子は同じ位置にイントロンが存在しており、これらのイントロンは*A. niger pgaC*遺伝子のイントロンAおよびBに相当する。一方、*C. carbonum* PGNI遺伝子には*A. niger pgaII*遺伝子及び*A. tubigensis pgaII*遺伝子と同様に1個のイントロンしか存在せず、その位置も異なっている。

*A. niger pgaII*遺伝子については、5'非翻訳領域を部分的に欠失させる方法によって高発現に必要な領域の決定が行われている⁽⁸⁾。-799から-576の223bpが高発現に必要で、そのなかには*Saccharomyces cerevisiae* CYC1遺伝子のUAS2の塩基配列と非常によく一致した配列が存在している(図3)。これと類似した配列は、*A. niger pgaI*、*pgaC*及び*A. tubigensis pgaII*の各遺伝子においても見いだされている。興味深いことにこの配列は*A. oryzae* タカアミラーゼA遺伝子において発現制御の重要な役割を演じているCCAATボックス

† Fungal Pectin Degrading Enzyme Genes.

Noriyuki KITAMOTO and Norihiro TSUKAGOSHI*

(Food Research Institute, Aichi Prefectural Government, Nagoya 451, * Department of Applied Biological Sciences, School of Agriculture, Nagoya University, Nagoya 464)

<i>A. oryzae</i>	177	GHNTDAFDVGSSTYINIDGATVYNQDDCLAINS--G-S---HITFTNGYCDGGHGLSIGSVG-GR	234
<i>A. niger</i> pgaI	182	GHNTDGFDISESTGVYISGATVKNQDDCLAINS--G--E--SISFTGGTCSGGHGLSIGSVG-GR	239
<i>A. niger</i> pgaII	176	GHNTDAFDVGNVGVNIIKPWVHNQDDCLAVNS--G--E--NIWFTGGTCIGGHGLSIGSVG-DR	233
<i>A. niger</i> pgaC	196	AANTDGFDIGESTYITITGAEIYNQDDCVAINS--G--E--NIYFSAAVCSGGHGLSIGSVG-GR	253
<i>A. tubigensis</i>	176	GHNTDAFDVGNVGVNIIKPWVHNQDDCLAINS--G--E--NIWFTSGTCIGGHGLSIGSVG-DR	233
<i>C. carbonum</i>	178	AHNTDAFDIGSSSGITISNANIKNQDDCVAINS--G-S---DIHVTNCQCSGGHGVSIGSVG-DR	236
<i>E. carotovora</i>	224	ARNTDGDIPMSSKNITIAHSNISTGDDNVAIKAYKGRSETRNISILHNEFGTGHGMSIGS----E	284
<i>P. solanacearum</i>	280	VKNTDGFDFGQSTNVVLAYSINTGDDHVAVKASSGP--TRNLLFAHNEFYHGLSIGS----E	338
Tomato	245	SPNTDGVHVSNTQYIQISDTIIGTGDDCISIVS--G-SQ--NVQATNITCGPGHGIGSLGSGN	304

*** ** *

<i>A. oryzae</i>	235	SDNTVEDVTISNSKV---VNSQNGVRIKTVYDATGTVSNVKFEDITLSGITKYGLIVEQDYENG	295
<i>A. niger</i> pgaI	240	DDNTVKNVITISDSTV---SNSANGVRIKTIYKETGDVSEITYSNIQLSGITDYGIVIEQDYENG	300
<i>A. niger</i> pgaII	234	SNNVVKNVITIEHSTV---SSENAVRIKTIISGATGSVSEITYSNIVMSGISDYGVVQQDYEDG	294
<i>A. niger</i> pgaC	254	DDNTVKNVTFYDVNV---LKSQQAIRIKTIYGTGSVSEVYHEIAFSDATDYGIVIEQNYDDT	314
<i>A. tubigensis</i>	234	SNNVVKNVITIEHSTV---SSENAVRIKTVSGATGSVSEITYSNIVMSGISDYGVVQQDYEDG	294
<i>C. carbonum</i>	236	KDNTVKGVVSGTTI---ANSDNGVRIKTIISGATGSVSDITYENITLKNIAKYGIVIEQDYENG	296
<i>E. carotovora</i>	285	T-MGVYNVTVDLLIM---TGTNGLRIKSDKSAAGVNVGVRYSNVVMKNVAK-PIVIDTVYEKK	343
<i>P. solanacearum</i>	339	TNTGVSNMLVTDLTMDGNDSSAGNGLRIKSDASRGKVTNIVYDGCIMRNVE-PLVDFPFYSSV	402
Tomato	305	SEAYVSNVTVNEAKI---IGAENGRIKTWQGGSGQASNIKFLNVEMQDVK-YPIIIDQNYCDR	364

* *** *

図 1 各種 PG 蛋白質にみられる相同性の高い領域

図 2 *Aspergillus* 属 PG 遺伝子及び PL 遺伝子のイントロン存在位置の比較 (a) PG 遺伝子 (b) PL 遺伝子

近傍の配列⁽⁹⁾ともよく一致している。一方, *A. niger* pga 各遺伝子と *C. carbonum* PGNI 遺伝子の 5' 非翻訳領域に CCCTGA 配列が少なくとも 1 個存在しているが, その機能は不明ではある。

2. ペクチンリアーゼ (pectin lyase : PL) 及びペクチン酸リアーゼ (pectate lyase : PAL)

PL は, *A. niger* より 3 種類⁽¹⁰⁻¹²⁾ そして *A. ory-*

zae⁽¹³⁾ より 1 種類の遺伝子がクローニングされ塩基配列が決定されている。これら 4 種類の PL のなかで, *A. niger pelB* と *A. oryzae* PL はより類似性が高く, そのアミノ酸配列は 78% の相同性を示す。他の PL も約 380 アミノ酸からなり, そのアミノ酸配列は約 65% と比較的高い相同性がみられる。これら 4 種類の PL 蛋白質では N 末端側アミノ酸配列はほとんど一致しているが, C 末端側アミノ酸配列 (*A. niger pelA* 蛋白質の

CYC1(UAS2UP)		GAGCGTTGATTGGTGGATCAAGC	
		** ***** * **	
<i>A. niger</i> pgaII	-639	GACCGTTCATTGGTGGAACTAGC	-617
<i>A. tubigensis</i> pgaII	-632	AATCATTTCATTGGTGGAAATTTGC	-610
<i>A. niger</i> pgaI	-206	CCTCCATTATTGGTGGAAAGACC	-228
<i>A. niger</i> pgaC	-359	AGGTAATCATTGGTGGAGATAAC	-381
pga consensus		TYATTGGTGGGA	
yeast consensus		TNATTGGT	

図3 *Aspergillus* 属 PG 遺伝子 5' 非翻訳領域の保存配列と酵母 CYC 1 遺伝子 UAS 2 の比較

306-372 アミノ酸部分に相当する領域)は異なっており、この変化がこれら PL の性質(基質特異性, 至適 pH など)に影響を与えていると考えられる。

PL 遺伝子は1または4個のイントロンを保持している(図2b)。 *A. oryzae* PL 遺伝子は1個のイントロンしか存在せず、このイントロンは *A. niger pel* 各遺伝子においても保存されている。一方、 *A. niger pel* 各遺伝子に見られる4個は、その位置が保存されている傾向がある。

これら *Aspergillus* 属 PL 各遺伝子にも上で述べた PG 遺伝子の場合と同様に5'非翻訳領域にはいずれも CCCTGA 配列が少なくとも1個存在している。それ故この配列はペクチンによる誘導発現に何らかの役割を演じているかもしれない。

PAL は、 *Aspergillus nidulans*⁽¹⁴⁾ 及び *Fusarium solani*⁽¹⁵⁾ よりそれぞれ1種類の遺伝子がクローニングされている。 *F. solani pelA* 遺伝子は塩基配列が決定され、3個のイントロンが存在している。一方、 *A. nidulans pelA* 遺伝子の塩基配列は決定されていないが、cDNA と染色体 DNA との長さの比較より少なくとも2個のイントロンが存在していると推測されている。

F. solani pelA 蛋白質は242アミノ酸から構成され、先に述べた *Aspergillus* 属各 PL 蛋白質に比べて小さく、アミノ酸配列の相同性も20-25%と低い。 *Erwinia* 属細菌の PAL 蛋白質には6カ所の保存性の高い領域が存在しているが、カビの PL および PAL 蛋白質にもこれらの領域が保存されており、これらの領域は活性発現に必要と考えられる。

3. ペクチンメチルエステラーゼ (pectin methyl esterase : PME)

PME は、 *A. niger*⁽¹⁶⁾ より1種類の遺伝子がクローニングされ塩基配列が決定されている。 *A. niger pmeA* 遺伝子には6個という多数のイントロンが存在している。 *A. niger pmeA* 蛋白質は314アミノ酸から構成され、他の生物起源の PME 蛋白質と25-30%アミノ酸配列の相同性を示す。 PME 蛋白質においても6カ所の保存性の高い領域が存在しており、これらの領域が活性発現に必要と考えられる。

カビのペクチン分解酵素遺伝子群について述べたきたが、1つの特徴として PG 遺伝子や PL 遺伝子はファミリーを形成している。しかし、これらの遺伝子群についてその発現制御機構の知見はごく限られたものである。例えば、 PG 遺伝子及び PL 遺伝子は *A. niger* において誘導的に発現制御されるが、これらの遺伝子を *A. nidulans* において発現させるとグルコースを含む非誘導条件下でも構造的に発現するなど、その発現調節機構は今後の興味ある研究課題である。

- (1) H.J.D. Bussink, K.B. Brouwer, L.H. de Graaff, H.C.M. Kester, and J. Visser : *Curr. Genet.*, **20**, 301-307 (1991).
- (2) H.J.D. Bussink, H.C.M. Kester, and J. Visser : *FEBS Lett.*, **273**, 127-230 (1990).
- (3) H.J.D. Bussink, F.P. Buxton, B.A. Fraaye, L.H. de Graaff, and J. Visser : *Eur. J. Biochem.*, **208**, 83-90 (1992).
- (4) N. Kitamoto, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya, and N. Tsukagoshi : *FEMS Microbiol. Lett.*, **111**, 37-42 (1993).
- (5) H.J.D. Bussink, F.P. Buxton, and J. Visser : *Curr. Genet.*, **19**, 467-474 (1991).

- (6) J.S. Scott-Craig, D.G. Panaccione, F. Cervone, and J.D. Wailon : *Plant Cell*, **2**, 1191—1200
 - (7) J.P.R. Keon and G. Waksman : *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2522—2528 (1990).
 - (8) H.J.D. Bussink, J.P.T.W. van den Hombergh, P.R.L.A. van den IJssel, and J. Visser : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 324—329 (1992).
 - (9) O. Nagata, T. Takashima, M. Tanaka, and N. Tsukagoshi : *Mol. Gen. Genet.*, **217**, 251—260 (1993).
 - (10) M.A. Kusters-van Someren, J.A.M. Harmsen, H.C.M. Kester, and J. Visser : *Curr. Gent.*, **20**, 293—299 (1991).
 - (11) M. Kusters-van Someren, M. Flipphi, L. de Graaff, H. van den Broeck, H. Kester, A. Hinnen, and J. Visser : *Mol. Gen. Genet.*, **234**, 113—120 (1992).
 - (12) C. Gysler, J.A.M. Harmsen, H.C.M. Kester, J. Visser, and J. Heim : *Gene*, **89**, 101—108 (1990).
 - (13) 北本則行, 柴山たえ, 木村哲哉, 鬼頭幸男 : 農化, **68**, 335 (1994).
 - (14) R.A. Dean and W.E. Timberlake : *Plant Cell*, **1**, 275—284 (1989).
 - (15) Luis Gonzalez-Candelas and P.E. Kolattukudy : *J. Bacteriol.*, **174**, 6343—6349 (1992).
 - (16) N.Q. Khanh, E. Ruttkowski, K. Leidinger, H. Albrecht and M. Gottschalk : *Gene*, **106**, 71—77 (1991).
-