



助教
前田 一行

共同研究者
玉川大学農学部
特任助教
中嶋 佑一

経歴
2013年 明治大学大学院農学研究科
博士後期課程修了 博士（農学）
2013-16年 名古屋大学大学院生命農学研究科 研究員
2016-18年 明治大学 研究・知財戦略機構 研究推進員
2018-21年 同学 農学部 助教
2021-22年 同学 研究・知財戦略機構 特任講師
2022年- 現職

食用かび ベネナータムの分子育種による穀類廃材からの 機能性成分の効率的な可溶化に向けた研究

1 研究の背景と目的

Fusarium venenatum（ベネナータム）は欧米を中心に消費される代替肉「Quorn™ mycoprotein」の製造に用いられる食経験の豊富な糸状菌（食用かび）である。本菌はアジアの発酵食を支える麹菌やテンペ菌などのように、他の食品資材と組み合わせて発酵生産に用いられる他の食用かびとは異なり、豊富なタンパク質の生産能を活かして、単独で培養されたものが加工食品として生産・消費されている。そのため、実際ベネナータムを他の食用かびのように他の発酵基質と共に培養した研究事例はほとんど見当たらない。

そこで研究代表者らは本菌の新たな可能性を探求するため、ベネナータムの新規発酵食の創製に向けた研究に着手し、ベネナータムを発酵させる食品資材として、利用機会の限られた農業副産物（穀類廃材）の1つである小麦ふすまを用いることにした。小麦ふすま中には、そのままでは利用が困難な不溶性の食物繊維が重量あたり 30~40%程度含まれており、この高重合度の食物繊維の中には、低分子化させる事で初めて機能性を持つような有用成分が豊富に含まれている。すなわち、この植物細胞壁に由来する不溶性の食物繊維にベネナータムが持つ細胞壁分解酵素を作用させることで、両者の発酵物から健康に役立つ食の機能性成分を可溶化させる技術の確立へとつながることが期待される。

研究を進めるにあたり、ふすま中の不溶性食物繊維の約 70%を占め、多様な食の機能性成分を内包するアラビノキシラン²⁾を基質とする分解酵素「xylanase」とその発現制御に関わる「転写因子 XlnR/Xyr1/Xlr1」に着目した。同タンパク質は 各種 *Aspergillus* 属菌やベネナータムの近縁種にあたる *F. graminearum* などの糸状菌において、現在までに多数の研究報告がな

されている^{3),4)}。この転写因子の機能を改変し、細胞壁分解酵素の発現パターンを変化させることが出来れば、アラビノキシランからの食の機能性成分の取得に大きく役に立つ可能性がある。ベネナータムには、同オルソログ遺伝子である *FvXyr1* 遺伝子が保存されているが、同遺伝子がコードする FvXyr1p タンパク質の機能は現状、明らかになっていない。そこで本研究では、FvXyr1p の機能改変株の作出に向けた前段階の研究として、同タンパク質をコードする *FvXyr1* 遺伝子の破壊株や高発現株を作出・解析し、その機能の一端を明らかにすると共に、これらの組換え体(分子育種系統)を小麦ふすま培地中で培養する発酵試験に取り組み、食の機能性成分の効率的な取得の可能性について模索した。

2. 研究方法

1) *FvXyr1* 遺伝子破壊株・高発現株の作出と培養試験

まず、*FvXyr1* 遺伝子 (*FVRRES_08928*) とその周辺配列の情報を NCBI のゲノムデータベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=fusarium+venenatum>) から取得した。そして先行研究の手法に従って、同遺伝子の破壊ベクターと高発現(過剰発現)ベクターを構築した^{5),6)}。各々のベクターを野生型のベネナータムのプロトプラストに導入し、Hygromycin B もしくは G418 を選抜マーカーとして用いて、組換え候補株を選抜・取得した。ベネナータムの各種系統(野生株、*FvXyr1* 遺伝子破壊株 (*FvΔxyr1* 株)、高発現候補株)の細胞壁分解酵素能を評価するため、分生子懸濁液を調製後、RBB-xylan⁷⁾ またはカルボキシメチルセルロース(CMC)を唯一炭素源として含む Czapeck Dox (CD) 寒天培地上に植菌し、25°Cで 48 時間培養した。培養後、生育菌糸の周囲に形成される無色の領域(halo)の有無や大きさをもとに xylanase 活性(RBB-xylan) もしくは CMCase 活性(CMC 培地を 0.1% Congo Red で染色後、0.8M NaCl で脱染した)を検出・評価した。続いて、FvXyr1p が炭素源の資化に及ぼす影響を調査するため、1%^{w/v} の異なる炭素源 (glucose, xylose, arabinose, beechwood 由来 xylan)を含む CD 寒天培地上に、野生株または *FvΔxyr1* 株の分生子懸濁液を植菌し、25°Cで培養を行った。培養開始から 48 時間後以降、24 時間毎に菌叢直径を計測した。また、各種系統を 1%^{w/v} の corn core 由来 xylan を含む CD 液体培地に植菌し、25°Cで 48 時間培養を行った。培養液から培養上清と培養菌糸を回収し、培養上清中のタンパク質濃度を Bradford 法で測定すると共に、*p*-nitrophenol 結合型の発色性基質を用いて細胞壁分解酵素 (β -xylosidase, β -glucosidase, cellobiohydrolase) の活性を測定した⁸⁾。測定結果をもとに、酵素反応の単位時間・タンパク質量あたりの *p*-nitrophenol の遊離量を各種酵素活性として算出・比較した。また、回収した培養菌糸から total RNA を抽出してノーザンブロット解析を行い、*FvXyr1* 遺伝子の発現量を比較した。

2) 小麦ふすま培養法と細胞壁分解酵素遺伝子の発現解析

ベネナータム各種系統の分生子懸濁液を小麦ふすま培地に植菌し、25°C、暗条件下で 10 日間培養した。ふすま培地中に分泌された細胞壁分解酵素を抽出するため、1/2 量の培地を量り取り、12.5 mL の 20 mM Tris-HCl (pH7.5) を添加・混和後、150 メッシュのナイロン

フィルターで濾過して活性測定サンプルを得た。上述の手法に基づき、サンプル中の各種細胞壁分解酵素活性を算出・比較した。次に、残余分のふすま培地から既報文献の手法を参考に total RNA を抽出後、cDNA を合成した⁹⁾。この cDNA を鋳型として *FvXyr1* 遺伝子、及び細胞壁分解酵素をコードする 3 種類の遺伝子 (*FVRRES_12656*, *01957*, *06813*) について qRT-PCR 解析を行った。実験には *FvUbc* 遺伝子 (*FVRRES_10169*) を内在性のコントロールとして利用し、比較 Ct 法により野生株の遺伝子発現量との比較解析を行った。

3. 結果および考察

1) *FvXyr1p* の機能解析

FvXyr1p の機能の一端を明らかにするため、同遺伝子破壊株と高発現株の作出を試みた。結果、*FvΔxyr1* 株 (2 株) と高発現候補株 (5 株) を取得した。取得した組換え体を halo assay に供した結果、*FvΔxyr1* 株は RBB-xylan 培地上で halo が形成されず、xylanase 活性の消失が確認された。また、CMC プレート上では野生株と同じ大きさの halo の形成が確認でき、

FvXyr1p は CMC 分解酵素の生産制御には影響しないと考えられた。一方、高発現候補株では RBB-xylan プレート上で野生株と同等、あるいは僅かに halo のサイズが拡大し、CMC プレート上の halo サイズは野生株と同様であった (図 1)。次に、*FvXyr1p* の炭素源の資化能への影響を調べるため、

異なる炭素源を添加した培地上で野生株と *FvΔxyr1* 株を生育させ、菌糸生育への影響を評価した。その結果、xylose と xylan を含む培地上において、*FvΔxyr1* 株は野生株と比べて明らかな生育の遅延が認められた (図 2)。この結果は近縁種の *F. graminearum* において報告された研究結果と一致しており⁴⁾、ベネナータムにおいても xylose の資化に関わるペントース代謝経路酵素遺伝子の発現制御の一端を *FvXyr1p* が担っていることが明らかとなった。

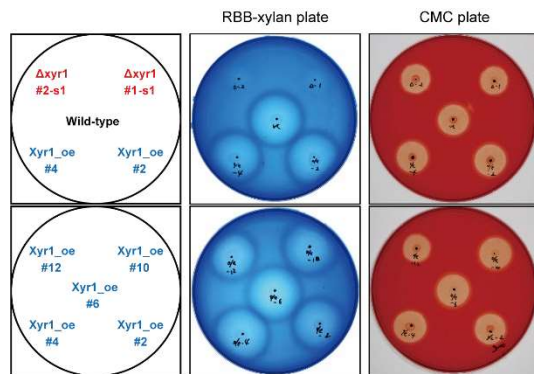


図1 Halo assay による細胞壁分解酵素活性の検出

分生子懸濁液を植菌後、25℃、48時間培養後の結果を示す。
Δxyr1: *FvXyr1* 遺伝子破壊株, Xyr1_oe: *FvXyr1* 遺伝子の高発現候補株

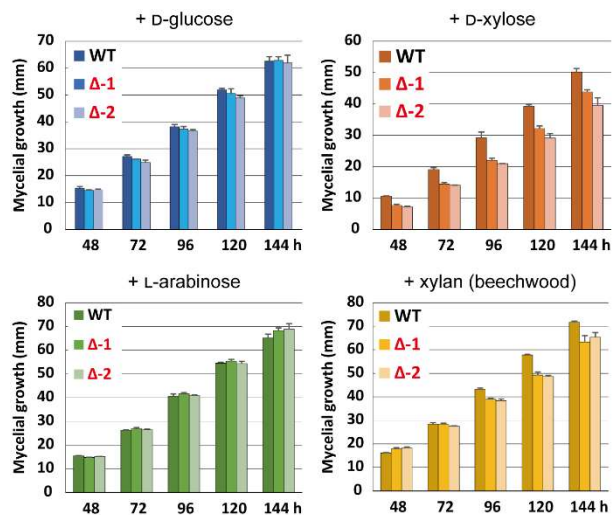


図2 炭素源の差異が菌体の生育に与える影響

分生子懸濁液を植菌後、25℃で一定時間培養後に菌叢直径を計測した (n=3)。
WT: 野生株, Δ-1: *FvΔxyr1* #1-s1 株, Δ-2: *FvΔxyr1* #2-s1 株

続いて、xylan を炭素源とする液体培地に各種系統を植菌・培養し、分泌酵素の活性評価と *FvXyr1* 遺伝子の発現レベルを比較した。解析の結果、一部の高発現候補株では、 β -xylosidase (xylanase の一種) の活性が野生株よりも上昇し、*Fv Δ xyr1* 株では、

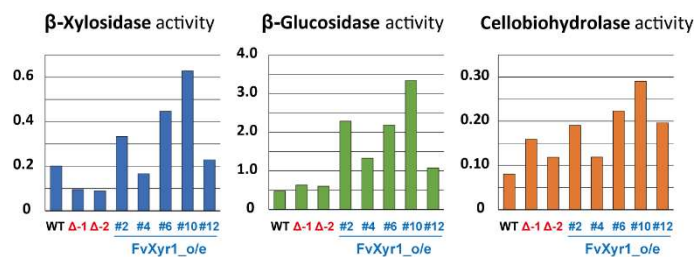


図3 Xylan 液体培地中に分泌された細胞壁分解酵素活性の株間比較

培養開始から 48 時間後に培養液を回収し、酵素活性とタンパク質濃度を測定した。各種細胞壁分解酵素活性の単位: (*p*-nitrophenol) pmol / min / μ g (of total protein) WT: 野生株, Δ -1, Δ -2: *Fv Δ xyr1* 株, oe-2 ~ #12: *FvXyr1* 遺伝子の高発現候補株

一様に減少していた。 β -glucosidase, cellobiohydrolase (いずれも cellulase の一種) についても特定の高発現候補株において、同酵素活性が上昇していた (図 3)。ノーザンブロット解析の結果、高発現候補株の *FvXyr1* 遺伝子の発現レベルは、いずれも野生株と同程度か、あるいは若干低くなる傾向が認められ、各種分解酵素活性と *FvXyr1* 遺伝子の発現レベルの間に相関性は認められなかった (図 3, 4)。今回の研究では *FvXyr1* 遺伝子の高発現株が得られなかったものの、作出した組換え体において各種分解酵素の活性に多様性が生まれることが予測されたため、以降の実験に一部の高発現候補株 (*FvXyr1*oe #2, #6 株) を供試することにした。今回、*FvXyr1* 遺伝子の高発現株を取得する際、G418 に対する耐性を指標に候補株の選抜を試みたが、同遺伝子破壊株の取得時 (hygromycin B 耐性の付与による選抜) と比較して、薬剤耐性株の取得効率が悪かった。さらに、取得した G418 耐性株を PCR 解析に供したところ、半数以上の菌株について高発現株を作出するための過剰発現プロモーターと *FvXyr1* 遺伝子の連結状態が確認できず、何らかの理由で適切な遺伝子導入株を得ることが困難であった。このため、今後は *FvXyr1* 遺伝子のプロモーター領域を過剰発現プロモーターに置換するなど、異なるアプローチを経て高発現株の取得を試みることを検討している。

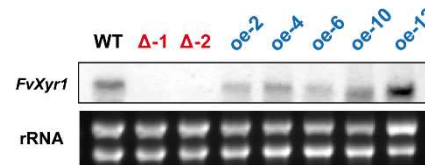


図4 Xylan 液体培地時における *FvXyr1* 遺伝子発現の株間比較 WT: 野生株, Δ -1, Δ -2: *Fv Δ xyr1* 株, oe-2 ~ oe-12: *FvXyr1* 遺伝子の高発現候補株

2) ふすま中に分泌される細胞壁分解酵素の活性と同酵素遺伝子発現量の比較解析

ベネナータムの小麦ふすま固体発酵法の確立に向けた予備実験として、各種系統を小麦ふすま培地に植菌・培養し、培地中に分泌される細胞壁分解酵素の活性と同酵素遺伝子の発現量を qRT-PCR により解析・比較した。10 日間の培養後、ふすま培地上での菌糸生育は菌



図5 各種系統のベネナータムを植菌・培養した小麦ふすまの様子

株間で大きな差は認められなかった (図 5) が、*Fv Δ xyr1* 株を植菌したふすま培地中に

分泌された分解酵素類の活性は、野生株と比較して明らかな減少が認められた (図 6A)。培養条件・活性評価の方法は一部異なるものの、この結果は近縁種の *F. graminearum* において「FgXyr1p は cellulase 活性に影響を与えない」^{4,8)} もしくは逆に「与える」¹⁰⁾ といった異なる研究報告のうち、後者と一致していた。このことから、Xyr1 タンパク質は菌種間・菌株間で細胞壁分解酵素の制御様式に多様性を生み出す可能性があると考えられた。

qRT-PCR 解析の結果、*FvΔxyr1* 株では xylanase 遺伝子 (*FVRRES_12656*) の発現レベルの減少が認められた

一方, cellulase 遺伝子については発現レベルが極端に上昇したもの (*FVRRES_01957*) と、逆にやや減少したもの (*FVRRES_06813*) に分

かれる結果となった (図 6B)。この結果は、図 6A の cellulase 活性の低下と矛盾する結果となったが、*FVRRES_01957* のコードする cellulase は近縁菌の endo-β-1,4-glucanase と高い相同性を示しており、より重合度の高い cellulase の基質を用いて活性検定を行うことで、野生株との酵素活性の差異を明確化することが出来る可能性がある。

以上の結果から、将来的に *FvXyr1p* の機能改変を通じてベネナータムの xylanase あるいは cellulase の生産様式を変化させることが期待でき、本菌を利用した穀類廃材からの機能性成分の効率的な可溶化に向けて、同タンパク質は一つの有力なターゲットになりうることを示された。今後は *FvXyr1* 遺伝子高発現株の再取得やふすま培地上における発現遺伝子の網羅的な解析を通じて、固体発酵条件の最適化を試みる予定である。

4. 謝辞

本研究の実施にあたり、ご支援を賜りましたサッポロ生物科学振興財団に心より御礼申し上げます。

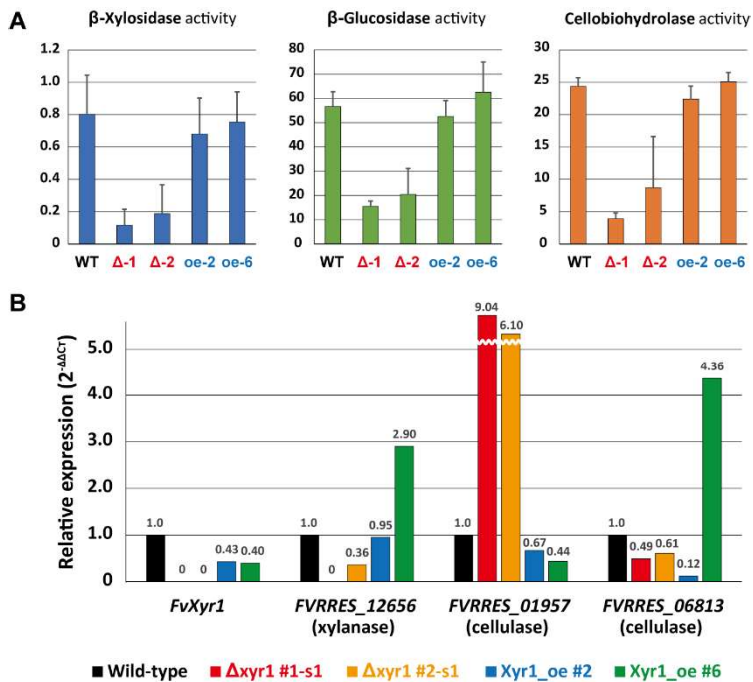


図6 ふすま中の細胞壁分解酵素の活性と同酵素遺伝子発現量の比較解析
培養 10 日後の小麦ふすま培地中に分泌された (A) 細胞壁分解酵素の活性測定 (n=3) と (B) 細胞壁分解酵素遺伝子の qRT-PCR 解析。グラフ上の数値は各遺伝子の野生株における発現量を 1 とした場合の相対値を示す。
各種細胞壁分解酵素活性の単位: (p-nitrophenol) nmol / min / μg (of total protein)
WT: 野生株, Δ-1, Δ-2: *FvΔxyr1* 株, oe-2, oe-6: *FvXyr1* 遺伝子の高発現候補株

5. 引用文献

- 1) Ahmad, M. I., Farooq, S., Alhamoud, Y., Li, C., Zhang, H. (2022) A review on mycoprotein: History, nutritional composition, production methods, and health benefits. *Trends Food Sci. Technol.* **121**: 14-29.
- 2) Izydorczyk, M. S., Biliaderis, C. G. (1995) Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* **28**: 33-48.
- 3) Noguchi, Y., Sano, M., Kanamaru, K., Ko, T., Takeuchi, M., Kato, M., Kobayashi, T. (2009) Genes regulated by AoXlnR, the xylanolytic and cellulolytic transcriptional regulator, in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**: 141-154.
- 4) Brunner, K., Lichtenauer, A. M., Kratochwill, K., Delic, M., Mach, R. L. (2007) Xyr1 regulates xylanase but not cellulase formation in the head blight fungus *Fusarium graminearum*. *Curr. Genet.* **52**: 213-220.
- 5) Maeda, K., Ohsato, S. (2017) Molecular genetic characterization of *Fusarium graminearum* genes identified as encoding a precocene II-binding protein. *JSM Mycotoxins* **67**: 1-3.
- 6) Maeda, K., Nakajima, Y., Koizumi, Y., Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Ohsato, S. (2021) Accumulation of 4-deoxy-7-hydroxytrichothecenes, but not 4,7-dihydroxytrichothecenes, in axenic culture of a transgenic nivalenol chemotype expressing the NX-type *FgTri1* gene. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 11428.
- 7) Biely, P., Mislovičová, D., Toman, R., Remazol Brilliant Blue-xylan: A soluble chromogenic substrate for xylanases. (1988) *Meth. Enzymol.* **160**: 536-541.
- 8) Klaubauf, S., Narang, H. M., Post, H., Zhou, M., Brunner, K., Mach-Aigner, A. R., Mach, R. L., Heck, A. J. R., Altelaar, A. F. M., de Vries, R. P. (2014) Similar is not the same: differences in the function of the (hemi-)cellulolytic regulator XlnR (Xlr1/Xyr1) in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* **72**: 73-81.
- 9) Maeda, K., Nakajima, Y., Tanahashi, Y., Kitou, Y., Miwa, A., Kanamaru, K., Kobayashi, T., Nishiuchi, T., Kimura, M. (2017) L-Threonine and its analogue added to autoclaved solid medium suppress trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Arch. Microbiol.* **199**: 945-952.
- 10) Paccanaro, M. C., Sella, L., Castiglioni, C., Giacomello, F., Martinez-Rocha, A. L., D'Ovidio, R., Schafer, W., Favaron, F. (2017) Synergistic effect of different plant cell wall-degrading enzymes is important for virulence of *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **30**: 886-895.