

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07383

研究課題名(和文)放線菌由来セルラーゼの結晶性基質の効率的分解に関わる機構解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of efficient degradation of crystalline substrate by cellulases from Actinomycetes

研究代表者

内山 拓 (Uchiyama, Taku)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：70450658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：「バイオリファイナリー」の実現に向けて、その鍵を握る酵素糖化の効率を高めることを目標とし、セルラーゼの効率的な結晶性セルロース分解に関わる酵素反応メカニズムを解明することを試みた。具体的には放線菌由来のセルラーゼSaCel6Bの生化学実験、高速原子間力顕微鏡観察、タンパク質結晶構造解析を通じて、そのようなメカニズムの解明を試みた。実験や観察の結果、セルラーゼSaCel6Bの効率的な結晶性セルロース分解に関わるアミノ酸残基2つを見出し、これらの重要性を明らかにした。このようなアミノ酸残基の情報を用いて、糖化効率の高いセルラーゼの発見や、糖化効率の高い新規セルラーゼの合成を試みる事が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Toward to the realization of “Biorefinery”, we aimed to increase the efficiency of enzymatic saccharification, and attempted to elucidate the enzymatic reaction mechanism involved in cellulases efficient crystalline cellulose degradation. Specifically, we attempted to elucidate such a mechanism through the biochemical experiment, HS-AFM observation, and protein crystal structure analysis of cellulase SaCel6B derived from Actinomycetes. As a result of experiments and observations, we found two amino acid residues involved in efficient crystalline cellulose degradation of cellulase SaCel6B and clarified the importance of these residues. Based on information of such amino acid residues, it could be possible to try to discover cellulases with highly saccharification efficiency or synthesize novel cellulases with high efficiency of saccharification.

研究分野：酵素利用学

キーワード：Cellulase Processivity HS-AFM

1. 研究開始当初の背景

再生可能なバイオマス資源から燃料や化成品の生産を試みる、いわゆる「バイオリファイナリー」の実現に向けた研究が、喫緊の研究課題として世界的に推進されている。「バイオリファイナリー」のフローは、(1) 育種した草本・木質系バイオマスを回収し、(2) これらを C5, C6 糖単位まで分解する (前処理プロセス)。つぎに (3) 微生物による発酵で、C5, C6 糖を低級アルコール、低級脂肪酸、アミノ酸などに変換する。そしてこれらを (4) ピルディングブロックとし、触媒化学的手法を用いて、燃料や汎用化成品、高付加価値製品に変換する。現在 (2) の前処理プロセスは 2 段階でおこなわれており、1 段階目はバイオマスの分子集合構造を変化させるための物理的・化学的処理であり、2 段階目は構造変化を起こした多糖 (主に結晶性セルロース) を酵素によって C5, C6 糖単位まで分解させる処理、いわゆる酵素糖化となっている。酵素糖化はバイオテクノロジーの応用による改善が見込まれ、大きなブレイクスルーが期待されている。近年、商業的な酵素糖化で用いられるカビ由来セルラーゼ TrCel7A の結晶性セルロース分解反応が、高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) で明らかにされ、これがプロセッシブな分解反応であることが明らかにされた。プロセッシブな分解反応とは、セルラーゼが結晶性セルロースを構成するグルコースポリマーから脱離せず、逐次的に加水分解を進める酵素反応のことである。このようにセルラーゼのプロセッシブな分解反応の詳細を明らかにすることができれば、酵素糖化の効率改善につながると期待できる。一方で、明らかとなったプロセッシブな分解反応は、結晶性セルロースを構成するグルコースポリマーの、還元末端側から非還元末端方向へ進む分解反応のみであった。結晶性セルロース分解に関わるセルラーゼの中には逆方向に進むプロセッシブな分解反応もあるとされているが、これらの詳細は明らかにされていなかった。

研究申請者は放線菌 *Cellulomonas fimi* 由来セルラーゼ、CfCel6B の HS-AFM 観察をおこない、世界で初めて非還元末端から還元末端方向へグルコースポリマーを逐次的に加水分解するタイプのプロセッシブな分解反応の可視化に成功した。次に分解反応のより詳細な機構解明に向け、CfCel6B の X 線結晶構造解析を試みようと考えたが、当該酵素は 85 kDa と比較的大きな酵素であり、また酵素のモジュール構造が 5 つ程度と複雑であったため、構造解析のためにはそれぞれを分割して解析する必要があると考えられた。一方でプロセッシブな分解反応を進めるとされるセルラーゼの中で、すべてのモジュールがそろった野生型酵素での結晶構造は解かれたものがない。そこで研究申請者は、CfCel6B 同様に非還元末端から還元末端方向へグルコースポリマーを逐次的に加水分解するセ

ルラーゼで、且つすべてのモジュールがそろった形でのタンパク質結晶化が望めそうなセルラーゼをデータベース上にて検索した。その結果、放線菌 *Streptomyces avermitilis* 由来セルラーゼ、SaCel6B がその候補として見いだされた。SaCel6B は 57 kDa と CfCel6B よりもサイズが小さく、活性中心を含むモジュール (活性ドメイン) とセルロース特異的吸着能を司るモジュール (基質吸着ドメイン) のそろった、野生型酵素での構造解析がおこなえる可能性が考えられた。また SaCel6B を異宿主発現させ HS-AFM 観察をおこなったところ、CfCel6B 同様のプロセッシブな分解反応を示した。そこで研究提案の段階では、SaCel6B の野生型酵素の他、活性中心を破壊した変異酵素、プロセッシブな分解反応に関わる芳香族アミノ酸残基を置換した変異酵素、セルロースへの特異的吸着に関わると予測された芳香族アミノ酸残基を置換した変異酵素を作製し、それぞれの生化学的データ・HS-AFM を用いた一分子統計解析データ、また野生型酵素の X 線結晶構造解析データを多角的に比較・検討し、プロセッシブな分解反応の詳細を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

「バイオリファイナリー」の実現に向けて、その鍵を握る酵素糖化の効率を高めることを目標として、セルラーゼの効率的な結晶性セルロース分解に関わる酵素反応メカニズムを解明することを試みた。このような反応メカニズムは、プロセッシブな分解反応と呼ばれ、セルラーゼが結晶性セルロースを構成するグルコースポリマーから脱離せず、逐次的に加水分解を進める酵素反応であると説明されている。本研究の目的は、結晶性セルロース分解に関わるセルラーゼの生化学的データと、HS-AFM を用いた一分子統計解析データ・X 線結晶構造解析データを多角的に比較・検討し、プロセッシブな分解反応の詳細を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

3.1. SaCel6B の酵素精製と変異酵素の作製

SaCel6B の野生型・変異型酵素の精製については、*Brevibacillus choshinensis* を宿主とした大量発現系を構築した。精製については酵素のセルロースへの特異的吸着能を利用したアフィニティークロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーの組合せにより、SDS-PAGE 上でタンパク質が単一バンドになるまでの精製に成功した。変異酵素は下記の 6 種類を作製した。(1) 活性中心のアスパラギン酸残基をアスパラギンに置換した、不活性化酵素を作製した。(2) プロセッシブな分解反応に重要な働きをすると予測される芳香族アミノ酸残基を、アラニンに置換した変異酵素を作製した。SaCel6B は

糖質加水分解酵素ファミリー 6 (GH6) に属しているが、GH6 セルラーゼで、結晶性セルロース分解性に優れたものは+4 サブサイトを形成する芳香族アミノ酸残基が保存されていることが知られている。またこの残基をアラニンに置換すると、結晶性セルロース分解活性が著しく低下し、当該アミノ酸残基がプロセッシブな分解反応に重要であることが示唆されていた。そこで+4 サブサイトをアラニンに置換した変異酵素を作製した。SaCel6B は+6 サブサイトを形成すると予測される芳香族アミノ酸残基を保持しており、こちらをアラニンに置換した変異酵素も作製した。(3) SaCel6B の、結晶性セルロースに対する特異的吸着能に関わると予測された、セルロース吸着ドメイン上の芳香族アミノ酸残基をアラニンに置換した変異酵素を作製した。SaCel6B のセルロース吸着ドメインは、そのアミノ酸相同性によって炭化水素吸着モジュールファミリー 2 (CBM2) に帰属し、そして CBM2 は2つから3つの芳香族アミノ酸残基が結晶性基質の特異的吸着に関わることが報告されている。相同性検索および構造予測によって SaCel6B CBM2 の、セルロース特異的吸着に関わる3つの芳香族アミノ酸残基を特定し、これらアラニンに置換した。このように野生型酵素および6種類の変異酵素を準備し、それぞれの結晶性セルロース、水溶性セルロースに対する分解活性と、結晶性セルロースに対する吸着活性を測定した。

3.2. HS-AFM 観察と一分子統計解析

HS-AFM 観察により、野生型及び変異酵素が結晶性セルロース分解時にプロセッシブな分解反応を示すか観察した。HS-AFM 観察は、連携研究者である金沢大学理工研究領域数物科学系に所属しておられた内橋貴之准教授の元でおこなわれた。統計解析の手法は、研究提案者の所属研究室で確立された手法を用いた。野生型酵素および5種類の変異酵素の、結晶性セルロースに対するプロセッシブな分解反応の観察と、野生型酵素の一分子統計解析をおこなった。また、SaCel6B と同じ GH6 セルラーゼである CfCel6B と、TrCel7A の混合時における結晶性セルロースに対するプロセッシブな分解反応の観察と、それぞれの一分子統計解析もおこなった。

3.3. SaCel6B の X 線結晶構造解析

SaCel6B の大量発現系の構築とタンパク精製の条件を決定した後、タンパク質結晶化キットを用いて結晶化条件を検討した。SaCel6B 全体での結晶化が困難だった場合は、タンパク質のアミノ基末端側に存在するセルロース吸着ドメインを欠落させた、活性ドメインだけの結晶化を目指すこととした。活性ドメインのみの X 線結晶構造では、GH6 セルラーゼでは8種類の解析結果があり、これらが参考になると考えられた。

4. 研究成果

はじめに SaCel6B 野生型酵素について、そのセルラーゼ活性の至適温度と至適 pH を求めた。不溶性基質であるリン酸膨潤セルロース (PASC) を用いて実験をおこなった結果、至適温度は 61 度であり、至適 pH は 5.5 であることが明らかとなった。また水溶性セルロースや不溶性基質である PASC および結晶性セルロースに対する分解活性及び吸着能を確認し、不溶性セルロース分解時に主にオリゴ糖 2 糖を分解生成物として生じることなどから、SaCel6B はエキソ型の酵素反応をおこなうセルラーゼである事を明らかにした。次に野生型酵素と各種変異酵素の水溶性セルロースや PASC および結晶性セルロースに対する分解活性、結晶性セルロースに対する吸着能を比較した。変異酵素は、(1) 活性中心をアミノ酸置換し不活化した変異酵素、(2) プロセッシブな分解反応を示すために重要とされる2つの芳香族アミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した変異酵素、(3) 基質吸着に関わると考えられる3つの芳香族アミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した変異酵素の6種類を用いた。実験の結果、水溶性基質に対する分解活性は、野生型酵素と基質吸着に関わる残基を置換した変異酵素間において差が認められなかった。一方で、野生型酵素とプロセッシビティに関わる残基を置換した変異酵素間においては、変異酵素側で野生型と比較して 1.2 ~ 1.4 倍程度活性が上昇することが明らかとなった。次に野生型酵素と各種変異酵素の PASC および結晶性セルロースに対する分解活性を比較した。結晶性セルロースに対する分解活性は野生型酵素がもっとも強く、プロセッシビティに関わる残基を置換した変異酵素では野生型と比較してそれぞれ 0.5 倍、0.1 倍に低下した。基質吸着に関わる残基を置換した変異酵素ではそれぞれが 0.1 倍に低下した。一方で PASC に対する分解活性は、プロセッシビティに関わる残基を置換した変異酵素では野生型と比較してそれぞれ 1.1 倍、1.4 倍に上昇した。基質吸着に関わる残基を置換した変異酵素では野生型と同程度であった。不活化酵素では全ての基質に対して活性を認めることはできなかった。結晶性セルロースに対する吸着能については、基質吸着に関わる残基を置換した変異酵素で吸着能が低下したが、これら以外の変異は吸着に対する影響が確認されなかった。以上の実験結果から、プロセッシビティに関わると予測された2つの芳香族アミノ酸残基および、基質吸着に関わると予測された3つの芳香族アミノ酸残基について、予測の妥当性が明らかとなった。

次に HS-AFM 観察をおこなった。観察の結果、SaCel6B は結晶性セルロースの分解において、プロセッシブな分解反応をおこなうことが明らかとなった。また SaCel6B と TrCel7A の2種類を混和して観察した結果、SaCel6B のセルロース鎖分解方向性が非還元末端鎖

側から還元末端方向へと分解を進めていくものであることが明らかとなった。SaCel6B 野生型酵素の一分子統計解析をおこなった結果、当該酵素のプロセッシビティは、TrCel7A や CfCel6B と比較して 0.5 倍程度であることが明らかとなった。この実験結果は、SaCel6B の至適温度が 60 度付近であり、HS-AFM 観察時における温度 (25 度前後) と離れているために生じた差なのではないかと考察した。変異酵素のプロセッシブな分解反応の有無を観察したところ、基質吸着に関わる残基を置換した変異酵素では、実験系に野生型と比較して 10 倍量酵素を加えることで、プロセッシブな分解反応が起きていることが確認できた。プロセッシビティに関わると予測された残基を置換した 2 種の変異酵素においては、一つは 10 倍量酵素を加えることで、プロセッシブな分解反応が起きていることを確認できたが、もう一方では全く確認することができなかった。不活化酵素においてもプロセッシブな分解反応は確認されなかった。これらの実験結果は、プロセッシビティに関わると予測された 2 つの芳香族アミノ酸残基において、それぞれ関わり方の程度に差があることが明らかとなった。

HS-AFM 観察では、GH6 セルラーゼと GH7 セルラーゼの相乗効果についての解析もおこなった。セルラーゼによるセルロースのプロセッシブな分解反応の方向性は 2 つあり、それぞれの分解方向性を示すセルラーゼを 2 種混和して結晶性セルロース分解に供すると、相乗効果が生じ、分解活性が高まることが知られている。この GH6 と GH7 セルラーゼによる相乗効果の詳細に、物理化学的手法で迫ることとした。GH6 セルラーゼとして CfCel6B、GH7 セルラーゼとして TrCel7A を用いた。それぞれを混和した際のそれぞれの一分子統計解析をおこなった結果、両方で分子がセルロースから離脱しにくくなることが明らかとなり、その結果プロセッシビティの増大が生じることが明らかとなった。即ち、相乗効果とはそれぞれの酵素がセルロース表面を分解することで、それぞれの酵素がより攻撃しやすいセルロース表面を作り出しているということが明らかとなった。

SaCel6B の結晶化については、始めに市販の酵素結晶化条件探索キットを用い、SaCel6B の 2 つのドメインを含む完全な形での結晶化を試みた。SaCel6B はアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーの組合せで精製したものを使用した。3 度試みたが結晶の生成を確認することができなかったため、精製条件を以下に変更した。すなわちアフィニティークロマトグラフィーの後、イオン交換クロマトグラフィーをおこなう事とした。精製の結果、SaCel6B がダブルピークとして精製された。両方のピークを回収し、それぞれを市販の酵素結晶化条件探索キットに供した。しかしながらそれぞれにおいて結晶の生成を確認することは

できなかったため、2 つのドメインを含む完全な形での結晶化をあきらめ活性ドメインだけの結晶化を目指した。吸着ドメイン欠損型酵素の発現系は、野生型酵素で宿主として用いた *B. choshinensis* を利用して構築を試みた。タンパク質のアミノ基末端側に存在する基質吸着ドメインとグリシンリッチなリンカー部分を欠損させた変異酵素の DNA 配列を準備し、発現ベクターに組み込んだ。そして当該プラスミドで宿主を形質転換させたが、変異酵素の発現を確認することはできなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

M. Tachioka, N. Sugimoto, A. Nakamura, N. Sunagawa, T. Ishida, T. Uchiyama, K. Igarashi, M. Samejima. Development of simple random mutagenesis protocol for the protein expression system in *Pichia pastoris*. *Biotechnology for Biofuels*, 査読有り Vol. 9, 2016

A. Nakamura, T. Tasaki, D. Ishiwata, M. Yamamoto, Y. Okuni, A. Visootsat, M. Maximilien, H. Noji, T. Uchiyama, M. Samejima, K. Igarashi, R. Iino. Single-molecule imaging analysis of binding, processive movement, and dissociation of cellobiohydrolase *Trichoderma reesei* Cel6A and its domains on crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有り Vol. 291, 2016, pp. 22404-22413.

T. Matsuzawa, T. Jo, T. Uchiyama, J. A. Manninen, T. Arakawa, K. Miyazaki, S. Fushinobu, K. Yaoi. Crystal structure and identification of a key amino acid for glucose tolerance, substrate specificity, and transglycosylation activity of metagenomic beta-glucosidase Td2F2. *The FEBS Journal*, 査読有り Vol. 283, 2016, pp. 2340-2353.

T. Uchiyama, K. Yaoi, K. Miyazaki. Glucose-tolerant beta-glucosidase retrieved from a Kusaya gravy metagenome. *Frontiers in Microbiology*, 査読有り Vol. 6, 2015, pp. 548.

[学会発表](計 6 件)

内山拓、五十嵐圭日子、鮫島正浩、セルラーゼのプロセッシビティを中心とした機能解析、第 12 回バイオマス科学会議、2017 年 1 月 18、19 日、東京都・文京区

内山拓、内橋貴之、金子哲、中村彰彦、五十嵐圭日子、鮫島正浩、セルロース資化性放線菌 *Cellulomonas fimi* 由来セルラーゼのプロセッシビティを中心とした機能解析、日本応用糖質科学会平成28年度大会、2016年9月14～16日、広島県・福山市

内山拓、内橋貴之、金子哲、中村彰彦、石田卓也、五十嵐圭日子、鮫島正浩、放線菌由来GH6セルラーゼの結晶性基質分解機構の解析、第30回セルラーゼ研究会、2016年7月15, 16日、長野県・佐久市

内山拓、矢追克郎、宮崎健太郎、メタゲノム由来 -グルコシダーゼ Ks5A7 の性状解析、日本農芸化学会2016年度大会、2016年3月27～30日、北海道・札幌市

内山拓、矢追克郎、宮崎健太郎、メタゲノム由来 -グルコシダーゼ Ks5A7 の性状解析、第11回バイオマス科学会議、2016年1月20, 21日、新潟県・新潟市

T. Uchiyama, M. Samejima, K. Igarashi. Processive movement observation of four cellulases from cellulolytic bacteria *Cellulomonas fimi*. Gordon Research Conferences, 2015.8.2 to 7, Andover (United States).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 拓 (UCHIYAMA TAKU)

東京大学大学院農学生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：70450658

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

内橋貴之 (UCHIHASHI TAKAYUKI)

金沢大学理工研究領域数物科学系・准教授

研究者番号：30326300

石田拓也 (ISHIDA TAKUYA)

東京大学大学院農学生命科学研究科森林化学研究室・特任助教

研究者番号：10714628

(4) 研究協力者

なし