

令和元年6月7日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14879

研究課題名(和文) シロアリセルラーゼの新規発現系の開発とその利用

研究課題名(英文) Development of a novel system for expression of termite cellulases and its application

研究代表者

有岡 学 (Arioka, Manabu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：20242159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：オオシロアリ共生原生生物が持つセロビオヒドロラーゼの麹菌を用いた生産を試みた。A. aculeatus由来のbeta-グルコシダーゼ(BG)と共発現させたとこ、共発現させない場合に比べ多く生産が認められた。材食性ゴキブリ由来BGであるPaBG1b、A. fumigatus由来グルクロン酸エステラーゼAfGE、およびシロアリ共生原生生物由来マンナーゼの生産も行い、PaBG1bとAfGEがともに高い比活性を示すこと、マンナーゼのサブサイト-5付近のTrp残基の重要性を明らかにした。また、タカサゴシロアリ共生細菌由来キシラナーゼが既知酵素に比べて20倍高い触媒効率を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オオシロアリ共生原生生物由来セロビオヒドロラーゼEuCBHについては活性の確認には至らなかったが、本研究で新たに取得したbeta-グルコシダーゼPaBG1b、グルクロン酸エステラーゼAfGE、キシラナーゼNtSymX11については従来の酵素よりも高い比活性を有する酵素であることがわかり、今後期待されるバイオマス分解系構築において有力な候補であることを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：The expression of EuCBH, a cellobiohydrolase from a termite symbiotic protist, was attempted. When the enzyme was expressed in A. oryzae expressing AaBGL1, a beta-glucosidase (BG) from A. aculeatus, increased production was observed compared to the control strain not expressing AaBGL1. The expression of PaBG1b, a BG from wood-eating cockroach, fungal glucuronoyl esterases (GEs), and mannanases from termite symbiotic protists was also conducted. As results, PaBG1b and an A. fumigatus GE were shown to display higher catalytic efficiency than known enzymes. The importance of Trp residue located near the subsite -5 for the affinity to the substrate was also elucidated. Next, the expression and characterization of NtSymX11, an endoxylanase originated from a symbiotic bacterium in the gut of higher termite, were conducted. It was shown that the variants possessing the catalytic domain display 20-times higher catalytic performance compared to another endoxylanase with similar structure.

研究分野：応用微生物学

キーワード：シロアリ 共生微生物 糸状菌 セロビオヒドロラーゼ キシラナーゼ マンナーゼ グルクロン酸 エステラーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、米国やブラジルを中心にトウモロコシやサトウキビ等からバイオエタノールが生産されている。しかし、それら可食性の作物を燃料生産に利用することは食糧としての利用との競合を招き、食糧価格を高騰させる要因となりうる。この問題の解決には食糧と競合しないセルロース系バイオマスからのエタノール生産、いわゆる第二世代バイオエタノール生産の技術の確立が不可欠である。シロアリは亜熱帯から熱帯にかけて生息し、森林における腐植連鎖系において重要な位置を占める生物であり、高効率に植物バイオマスを利用することができる。例えば効率の良い種ではほぼ 100%近いセルロースやヘミセルロースが資化され、リグニンのみが排泄されると言われている。このことはシロアリが優れた植物バイオマス分解システムを持つことを意味する。

申請者はシロアリ自身およびその腸内に共生する原生生物が持つ遺伝子資源の利用を目指し、それらが持つバイオマス分解酵素の「性能」の解析を行ってきた。その過程でエンドグルカナーゼが従来から知られている糸状菌および細菌由来の酵素に比べはるかに高い比活性を持つこと (Appl. Biochem. Biotechnol. 160, 1168 (2010); Biosci. Biotechnol. Biochem. 74, 1680 (2010); Appl. Biochem. Biotechnol. 169, 1910 (2013))、また $\beta$ -グルコシダーゼが、生成物であるグルコースによる阻害を受けにくい、バイオマス糖化に適したユニークな性質を持つこと (Appl. Microbiol. Biotechnol. 89, 1761 (2011); Appl. Environ. Microbiol. 78, 4288 (2012)) 等を明らかにしてきた。一方、シロアリ消化系でのセルロース分解の最重要因子である共生原生生物由来のセロビオヒドロラーゼ (Cellobiohydrolase; CBH) については、その発現が困難であり、手が付けられていなかった。

そうした中、申請者は偶然に、オオシロアリ共生原生生物が持つ CBH である EuCBH を、糸状菌 *Aspergillus aculeatus* 由来の $\beta$ -グルコシダーゼ I (AaBGL1) を発現する麹菌 *Aspergillus oryzae* に導入すると、その生産が認められるようになることを見出した。本研究ではこの知見を利用し、取得できた EuCBH の解析を進めるとともに、他のシロアリ・共生原生生物由来、また糸状菌由来バイオマス分解酵素の探索・解析も併行して進め、それらを用いたバイオマス分解系構築への応用を目指した。

### 2. 研究の目的

植物バイオマス利用技術の確立は天然資源の少ない我が国においては喫緊の課題であり、地球温暖化対策としてもますますその重要性を増している。申請者はこれまで植物バイオマスを糖化するための新たな遺伝子資源としてシロアリおよびその腸内に共生する原生生物由来のセルラーゼに着目した研究を行ってきた。本研究は最近 *A. aculeatus* 由来 $\beta$ -グルコシダーゼ (AaBGL1) と共発現させることでその生産に成功したオオシロアリ共生原生生物由来セロビオヒドロラーゼ (EuCBH) の酵素学的性質を明らかにする AaBGL1 との共発現によって EuCBH の生産が可能になった原因を明らかにする、材食性ゴキブリ由来 $\beta$ -グルコシダーゼ、糸状菌由来グルクロン酸エステラーゼ、下等シロアリ共生原生生物由来マンナーゼ、タカサゴシロアリ腸内共生細菌由来キシラーゼ、下等シロアリ腸内共生原生生物由来キシラーゼの生産、精製、および酵素学的性質の解析を行う、の 3 点を目的とした。

### 3. 研究の方法

EuCBH は C 末端に HA-His<sub>6</sub> タグを付加し、麹菌の $\alpha$ -アミラーゼ AmyB との融合タンパク質として発現させた。発現の検討は、形質転換体の菌体および培地画分のタンパク質についての抗 HA 抗体を用いたウエスタン解析により行った。他の酵素は、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris*、および大腸菌 *Escherichia coli* 等を用いて行った。キャリアを用いる場合には出芽酵母の $\alpha$ -ファクターのシグナルおよびプロ配列を用いた。精製には主に His タグを用いた。

### 4. 研究成果

EuCBH の麹菌を用いた生産を試みた。AaBGL1 と共発現させたところ、共発現させない場合に比べて多く培養上清への分泌生産が認められた。しかし、キャリアである $\alpha$ -アミラーゼが融合されたままのバンドも検出されたことから、キャリアを用いないコンストラクトでの発現も試みた。その結果、より多量の EuCBH が生産された。これらのサンプルについて、Ni-NTA 樹脂による精製を行ったのち活性測定を行ったが、対照株と比較して有意な値を示さず、生産した EuCBH が正しくフォールディングしていない可能性が考えられた。

併行して材食性ゴキブリ由来 $\beta$ -グルコシダーゼ (PaBG1b)、ヘミセルロースとリグニンの間のエステル結合を加水分解する糸状菌由来グルクロン酸エステラーゼ (GE)、およびシロアリ共生原生生物由来のマンナーゼの生産も行った。その結果、PaBG1b が高い比活性とグルコース耐性などの優れた性質を持つ酵素であること、*Aspergillus fumigatus* 由来の GE である AfGE がこれまで報告のある GE に比べ高い触媒活性を持つ酵素であることを明らかにした。また、GE について、基質であるグルクロン酸の 4-O-メチル基の認識に重要な役割を果たすと考えられる残基の同定に成功した。マンナーゼについては、サブサイト-5 付近に保存されたトリプトファン残基の変異によって *k<sub>cat</sub>* 値に大きな変化はないものの、*K<sub>m</sub>* 値が大幅に上昇すること、すなわちこの残基がサブサイト-5 における糖の認識に関わることを明らかにした。

次に高等シロアリであるタカサゴシロアリ腸内共生細菌由来のキシラーゼ NtSymX11、下

等シロアリ *Coptotermes formosanus* の腸内に共生する原生生物由来のキシラナーゼである CfXyn11-3A の生産および機能解析を行った。NtSymX11 は触媒ドメイン以外に糖質結合モジュール CBM36 を 2 個持つが、様々なコンストラクトを作製して大腸菌で生産したところ、触媒ドメインを持つコンストラクトではキシラン特異的な分解活性が認められ、比活性や安定性の解析から、同じドメイン構造を持つ既知酵素に比べて 20 倍高い触媒効率を示すことがわかった。また、CBM36 は酵素の熱や pH に対する安定性を低下させるが、触媒効率を上昇させること、Ca<sup>2+</sup> が不溶性基質に対する分解活性を上昇させることがわかった。一方、CfXyn11-3A はこれまで上記シロアリの腸由来抽出物から精製されており、高い比活性を持つことがわかってきたが、微量しか得られていなかったため、今回組換えタンパク質としての生産を試みた。Trigger factor を付加して低温で発現誘導したところ、可溶性画分への生産に成功した。精製タンパク質を用いて活性を測定したところ、本酵素がブナ由来キシランを分解するキシラナーゼ活性を示すこと、生成物がキシロトリオース等であることがわかった。しかし比活性はシロアリ腸抽出物由来の酵素に比べかなり低いことがわかった。この原因が大腸菌菌体内でのフォールディングエラーである可能性を考え、出芽酵母を用いた発現を行った。発現には分泌タンパク質である  $\alpha$ -ファクターのシグナルおよびプロ配列をキャリアに用いた。しかし、生産された CfXyn11-3A の大部分は不溶性画分に認められ、微量生産された可溶性タンパク質を用いても活性の検出には至らなかった。しかし、不溶化したタンパク質が後期ゴルジ体でのプロ配列の切断を受けていることが示唆され、不溶化が小胞体ではなく、ゴルジ体以降のオルガネラで起こるといふ、これまでの常識とは異なる知見が得られた。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

Huynh, H.H. and Arioka, M.

Functional expression and characterization of a glucuronoyl esterase from the fungus *Neurospora crassa*: identification of novel consensus sequences containing the catalytic triad.

J. Gen. Appl. Microbiol. 62, 217-224 (2016) 査読有

Li, Y., Arakawa, G., Tokuda, G., Watanabe, H., and Arioka, M.

Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from the xylophagous cockroach *Panesthia angustipennis spadica* displaying high specific activity for cellobiose.

Enzyme Microb. Technol. 97, 104-113 (2017) 査読有

doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.11.004

Hsu, Y., Koizumi, H., Otagiri, M., Moriya, S., and Arioka, M.

Trp residue at subsite -5 plays a critical role in the substrate binding of two protistan GH26  $\beta$ -mannanases from a termite hindgut.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 1737-1747 (2018) 査読有

doi: 10.1007/s00253-017-8726-2

Huynh, H.H., Ishii, N., Matsuo, I., and Arioka, M.

A novel glucuronoyl esterase from *Aspergillus fumigatus*-the role of conserved Lys residue in the preference for 4-*O*-methyl glucuronoyl esters.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 2191-2201 (2018) 査読有

doi: 10.1007/s00253-018-8739-5

Kitamoto, M., Tokuda, G., Watanabe, H., and Arioka, M.

Characterization of CBM36-containing GH11 endoxylanase NtSymX11 from the hindgut metagenome of higher termite *Nasutitermes takasagoensis* displaying prominent catalytic activity.

Carbohydr. Res. 474, 1-7 (2019) 査読有

doi: 10.1016/j.carres.2019.01.003

[ 学会発表 ] ( 計 8 件 )

Yunhan Hsu, Hirohiko Koizumi, Masato Otagiri, Shigeharu Moriya, Manabu Arioka

Heterologous expression and characterization of GH26  $\beta$ -mannanases from a symbiotic protist community of the termite *Reticulitermes speratus*

日本農芸化学会 2017 年度大会

Hiep Hung Huynh, Manabu Arioka

Functional expression and characterization of fungal glucuronoyl esterases

日本農芸化学会 2017 年度大会

Characterization of a glucuronoyl esterase (GE) from *Aspergillus fumigatus*: the role of Lys209 in the preference of 4-*O*-methyl group in the substrate

Hung Hiep Huynh, Nozomi Ishii, Ichiro Matsuo, Manabu Arioka  
第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス

北本真理奈、徳田岳、渡辺裕文、有岡学  
シロアリ腸内共生細菌由来 GH11 キシラナーゼの生産と機能解析  
日本農芸化学会 2018 年度大会

有岡 学  
シロアリおよび糸状菌由来の植物バイオマス分解酵素の性質解明とそれらを利用したバイオマス分解系構築の試み  
(公財)発酵研究所 第 12 回助成研究報告会(2018 年)

Minh Trang PHAM, Gaku TOKUDA, Hirofumi WATANABE, Minoru YOSHIDA, Manabu ARIOKA  
Heterologous production and analysis of cellular responses to the expression of GH11 xylanase from a symbiotic protist in the lower termite  
日本農芸化学会 2019 年度大会

Yunhan HSU, Minoru YOSHIDA, Manabu ARIOKA  
A study on the enzymatic properties and physiological functions of mannan-degrading enzymes in *Neurospora crassa*  
日本農芸化学会 2019 年度大会

Ruijie WANG, Hiep Hung HUYNH, Minoru YOSHIDA, Manabu ARIOKA  
Analysis on the physiological function of glucuronoyl esterase (GE) in the model filamentous fungus *Neurospora crassa*  
日本農芸化学会 2019 年度大会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。