

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03090

研究課題名(和文) 低炭素社会構築に向けた低温適応性新規糖質分解酵素の高機能化とその利用

研究課題名(英文) High functionality and application of cold-adapted carbohydrate hydrolases toward construction of a low-carbon society

研究代表者

上田 光宏 (Ueda, Mitsuhiro)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：50254438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：シマミズ由来の低温適応性糖質分解酵素の構造と機能とその利用に関する研究を行ってきた。低温側の活性を向上させるために酵素タンパク質の塩橋並びに表面電荷に着目し、変異酵素の創製を行ってきた。塩橋に関しては、これまでに塩橋を弱めることで低温活性が向上するとともに熱安定性を保持した変異酵素(マンナーゼ)の取得に成功している。表面電荷に着目した研究も行ったところ、低温活性だけでなく、広い温度範囲で比活性の向上したセルラーゼの取得にも成功している(特許出願中)。さらに、塩橋を新たに導入することで、野生型より熱安定性の向上した生デンプン分解酵素(Amy II)の作製にも成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国は、化石燃料への依存度が高く、燃焼後に排出される大量のCO<sub>2</sub>ガスが地球環境に負荷をかけている。このような背景を基にバイオマス資源からのエネルギーの生産が求められている。現在、植物バイオマスの糖化は、高温の酸あるいは耐熱性酵素を用いて高温条件下で糖化が行われている。糖化過程に必要な熱エネルギーは化石燃料が用いられていることからCO<sub>2</sub>ガスも期待されるほど削減できず、またコスト高となっている。化石燃料に依存しない脱炭素社会を構築するためには、低温で糖化し、低温でアルコールを発酵する(低温糖化・低温発酵)技術の開発が必要である。ミミズ由来の低温適応酵素はこのシステムへの応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：We have been studying the structure and function of cold-adaptive carbohydrate hydrolases from *Eisenia fetida*. To improve the activity at low temperatures, we have focused on the salt bridges and surface charges of the enzyme proteins and have created mutant enzymes. For the salt bridges, we have succeeded in obtaining a mutant enzyme (mannanase: Ef-Man) with improved low-temperature activity and thermal stability by weakening the salt bridges. For the surface charge, we have also succeeded in obtaining cellulase with improved specific activity over a wide temperature range. Furthermore, we have succeeded in producing a raw-starch degrading enzyme (Amy II) with improved thermostability compared to the wild type.

研究分野：環境農学

キーワード：ミミズ 低温適応酵素 バイオマス 糖質分解酵素 熱安定性向上 セルラーゼ アミラーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は、化石燃料への依存度が高く、燃焼後に排出される大量の CO<sub>2</sub> ガスが地球環境に負荷をかけている。このような背景を基にバイオマス資源からのエネルギーの生産が求められている。現在、植物バイオマスの糖化は、国内・国外ともに高温の酸あるいは耐熱性酵素を用いて高温条件下で糖化が行われている。糖化過程に必要な熱エネルギーは化石燃料(重油)が用いられていることから CO<sub>2</sub> ガスも期待されるほど削減できず、またコスト高となっている。化石燃料に依存しない低炭素社会を構築するためには、低温で糖化し、低温でアルコールを発酵する(低温糖化・低温発酵)技術の開発が望まれる。一般にアルコール生産に用いられる酵母は *Saccharomyces cerevisiae* で最適生育温度は 25~30 である。現在、デンプンの糖化には耐熱性酵素を用いて 90 付近で糖化が行われている。また、木質バイオマスの糖化には前処理後(高温条件下での酸処理等)、微生物由来のセルラーゼ(最適作用温度が 60~70 )が用いられているが、低温下(25~30 )では活性が低下し、効率よく分解する酵素が存在しないのが現状である。そこで、これまでの酵素の性質の弱点を補うとともに、工業的にも利用できる酵素のスクリーニングを行ったところ、デンプンやセルロースに対する分解能が高く、低温活性を有する酵素がミミズに存在することを明らかにした(A novel cold-adapted cellulase complex from *Eisenia fetida*: characterization of a multienzyme complex with carboxymethylcellulase, beta-glucosidase, beta-1,3 glucanase, and beta-xylosidase. Ueda M. et al., Comp. Biochem. Physiol. B 157: 26-32, 2010)。本研究では、構造機能相関を理解し、その知見に基づいて効果的に改変を施すことにより、機能性を向上させた酵素を創製することを目指す。さらに、ミミズ由来の低温適応性新規糖質分解酵素を低炭素社会構築に向けてエネルギー生産だけでなく、工業利用することを目指して研究を行う。低温適応性新規糖質分解酵素に関する研究は低炭素社会を構築する上で貢献できるテーマである。

### 2. 研究の目的

これまでに、ミミズ由来の低温適応性糖質分解酵素は微生物由来の酵素より低温側(20~30 付近)で、高い活性を有することを明らかにしてきた。さらに、X線結晶構造解析より、酵素タンパク質表面は酸性アミノ酸が優位に存在し、負電荷を帯びていることを報告している(Crystal structure of endo-1,4-beta-glucanase from *Eisenia fetida*. Arimori T., Ueda M., Tamada T. et al., J. Synchrotron Radiation. 20, 1-6, 2013)。この酵素タンパク質表面が負電荷を帯びているのは低温適応性酵素の構造上の特徴である。本研究においては、これまでに得られた構造と機能に関する研究成果を基に低温適応酵素のバイオエネルギー生産や工業分野への利用を目指して研究を進展させる。現在、以下に示す内容を明らかにするための研究を行っている。低温適応性酵素の低温活性をより向上させることができれば、酵素反応の効率が向上するので、処理時間を短縮することができる。これまでに、マンナン分解酵素を用いて低温活性を向上させることに成功している(低温活性が改善された酵素及びその製造方法:特願 2017-219234, 発明者:玉田太郎, 平野 優, 上田光宏)。そこで、マンナン分解酵素以外の糖質分解酵素においても低温活性をより向上させるための研究を行い、低温活性の向上した酵素シリーズをラインナップさせる。さらに、様々な植物由来バイオマス基質に対して反応効率の良い酵素を創製できれば、生産性や製造コストを削減できる。本研究では、植物バイオマスの構造に応じて酵素を人為的に改変することにより、反応効率の良い酵素の創製を目指す。

### 3. 研究の方法

#### ・低温下でも高活性を有する酵素の構造と機能の解析

ミミズ由来の糖質分解酵素の低温活性をより向上させるために塩橋を弱めた変異酵素を作製し、変異酵素の構造と機能の解析を行う。また、酵素の表面電荷に着目し、変異酵素を作製し、変異酵素の構造と機能の解析を行う。具体的には、研究分担者の玉田による酵素の構造解析データから酵素表面付近に存在する塩橋の中から変異を導入するアミノ酸残基(アルギニン残基, リジン残基)を特定する。次に酵素の表面電荷に着目し変異酵素を作製し、酵素の構造と機能相関を調べる。さらに、低温下における活性が向上した変異酵素によるバイオマスエネルギー生産や工業利用に向けた実験を行う。

#### ・構造の類似する2種類のアミラーゼ(AmyI 及び AmyII)の構造機能相関

シマミミズには2種類のアミラーゼ(AmyI と AmyII)が存在することを明らかにしている。この2種類のアミラーゼは、89%という高いアミノ酸配列の相同性を有するが、基質特異性や分解様式は異なる。反応特性と構造の機能相関については、明らかにされていない。両酵素を特徴付ける重要な構造が存在していると推測された。そこで、両酵素間で構造の異なる部分を見出し、反応特性との相関について調べる。

### 4. 研究成果

・ミミズ由来低温適応性セルラーゼの機能性向上に関する研究

Ef-EG2 の塩橋ならびに表面電荷に着目し、様々な変異酵素を作製した。構造情報を基に新たに塩橋を導入する変異酵素の作製を行った。変異酵素の最適作用温度は野生酵素同様 40 で、低温(10 )から高温(50 )側までの幅広い温度域で比活性が2~2.5 倍になった。さらに、変異酵素は野生酵素と同様の高い熱安定性を示した。

産業利用を目指して研究されている真菌由来セルラーゼより低温下で高い比活性を有する事を明らかにした(特許出願中)。

・ミミズ由来低温適応性アミラーゼの機能性向上に関する研究

AmyII に変異を導入し、低温活性や不溶性デンプンに対する高活性を保持しながら、熱に対して安定性の高い酵素の創製を試みた。AmyII に既に存在する塩橋を強化したり、新たに塩橋を導入する変異を行った。4 つの変異酵素の内、変異酵素 1 は野生酵素の最適温度より高温側で高い活性が見られた。さらに、熱安定性を調べたところ、変異酵素 1 は 30~50 での熱安定性が大きく向上していた。次に基質特異性を調べたところ、変異酵素 1 は野生型 AmyII と同様に不溶性デンプンに対して活性を示したことから、本来の基質特異性を保持していることが分かった。これより、低温活性と不溶性デンプンへの高活性を保持しつつ、熱安定性の高い変異酵素の創製に成功した。

・構造の類似する2種類のアミラーゼの構造と機能に関する研究

まず、グリシンリッチループを欠損させた AmyI を作製し、その変異酵素(AmyI Loop)の基質特異性や分解様式を調べた。その結果、AmyI Loop でもアミロースやアミロペクチンに対する基質特異性に変化は見られなかった。次にマルトオリゴ糖に対する分解様式を調べたところ、マルトペンタオースやマルトテトラオースを基質にして作用させると、AmyI Loop では切断位置にばらつきが生じることが見出された。これより、グリシンリッチループは AmyI 活性部位への基質結合を補助する役割を果たしていることが示唆された。

次に、AmyII に存在する SBS と予測される Y292 に変異を導入し、吸着性に及ぼす影響を調べた。AmyII Y292A を用いた吸着性実験より Y292 は -1,6 結合を持つ基質との結合に寄与することが示唆された。また、AmyII Y292A は野生型 AmyII よりもアミロペクチンに対して活性の低下が見られた。これより、Y292 は -1,6 結合を含む基質吸着と基質特異性に関与する事が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yu Hirano, Kana Tsukamoto, Shingo Ariki, Yuki Naka, Mitsuhiro UEDA and Taro Tamada	4. 巻 76
2. 論文標題 X-ray crystal structural studies of alpha-amylase I from Eisenia fetida	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica section B	6. 最初と最後の頁 834-844
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S2059798320010165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kana Tsukamoto, Shingo Ariki, Masami Nakazawa, Tatsuji Sakamoto, Mitsuhiro Ueda	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel cold-adapted raw-starch digesting $\alpha$ -amylases from Eisenia fetida: gene cloning, expression, and characterization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology Repors	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.btre.2021.e00662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 上田光宏, 森本和樹, 楠田瑞穂, 亀井健吾, 中澤昌美, 阪本龍司, 坂口実, 小林仁, 大内謙二, 稲富聡	4. 巻 29
2. 論文標題 コナサナギタケPaecilomyces farinosus 由来のトリブシン様セリンエンドペプチダーゼの精製と性質	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本きのこ学会誌	6. 最初と最後の頁 30-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上坂友了, 中澤昌美, 阪本龍司, 岩本武夫, 岸本通雅, 上田光宏
2. 発表標題 アミスギタケの子実体形成におけるスレオニン添加効果
3. 学会等名 第94回日本生化学大会(Web)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柄本佳奈, 平野優, 中澤昌美, 阪本龍司, 玉田太郎, 上田光宏
2. 発表標題 シマミミズ由来生デンブ分解酵素の構造機能相関
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤 楽 (学生優秀発表賞受賞), 中澤昌美, 阪本龍司, 楠田瑞穂, 石川真 梨子, 小林 仁, 大内謙二, 稲富 聡, 坂口 実, 上田光宏
2. 発表標題 ヒラタケ属(Pleurotus sp.)由来酸性トレハラーゼの 自己消化時における役割
3. 学会等名 第23回日本きのこ学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 館村仁美, 中澤昌美, 阪本龍司, 楠田瑞穂, 石川 真梨子, 原田慎嗣, 小林 仁, 大内謙二, 稲富 聡, 上田光宏
2. 発表標題 ヒラタケ属 (Pleurotus sp.) 子実体の自己消化における糖質加水分解酵素に関する研究
3. 学会等名 第23回日本きのこ学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 館村仁美, 中澤昌美, 阪本龍司, 楠田瑞穂, 石川 真梨子, 原田慎嗣, 小林 仁, 大内謙二, 稲富 聡, 上田光宏
2. 発表標題 ヒラタケ属 (Pleurotus sp.) 子実体の自己消化における糖質加水分解酵素に関する研究
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤楽, 中澤昌美, 阪本龍司, 楠田瑞穂, 石川真梨子, 原田慎嗣, 小林仁, 大内謙二, 稲富聡, 坂口実, 上田光宏
2. 発表標題 ヒラタケ属(Pleurotus sp.)由来酸性トレハラーゼの精製及びクローニング
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 館村 仁美, アラスト・アリレザ, 中澤 昌美, 阪本 龍司, 楠田 瑞穂, 小林 仁, 大内 謙二, 稲富 聡, 上田 光宏
2. 発表標題 ヒラタケ属 (Pleurotus sp.) きの子実体の自己消化におけるトレハラーゼに関する研究
3. 学会等名 日本きのこ学会第22回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤 楽, 中澤昌美, 阪本龍司, 楠田瑞穂, 小林 仁, 大内謙二, 稲富 聡, 上田光宏
2. 発表標題 ヒラタケ属(Pleurotus sp.)子実体由来酸性トレハラーゼの精製とクローニング
3. 学会等名 2019年度日本菌学会西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirano, Yu, Tsukamoto, Kana, Naka, Yuki, Ueda, Mitsuhiro, Tamada, Taro
2. 発表標題 X-ray crystal structure studies of $\alpha$ -amylase I from <i>Eisenia fetida</i>
3. 学会等名 回折構造生物学国際シンポジウム (ISDSB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山西真由, 中澤昌美, 阪本龍司, 上田光宏
2. 発表標題 シマミミズ由来NADPH-Cytochrome P450 reductaseのクローニングと異種宿主発現
3. 学会等名 第4回次世代生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田光宏
2. 発表標題 細菌由来のキチン分解酵素について
3. 学会等名 第4回次世代生物研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mitsuhiro Ueda, Kei Nakadoi, Kana Tsukamoto and Shunsuke Sakurai	4. 発行年 2020年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 15
3. 書名 Molecular Biotechnology (担当部分: Effect of LPMO on the Hydrolysis of Crystalline Chitin by Chitinase A and -N-Acetylglucosaminidase from Paenibacillus sp.)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>QST  <a href="https://www.qst.go.jp/site/iqls/22418.html">https://www.qst.go.jp/site/iqls/22418.html</a>          次世代生物研究会  <a href="https://sites.google.com/site/jisedaiseibutukenkyukai/">https://sites.google.com/site/jisedaiseibutukenkyukai/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	玉田 太郎  (Tamada Taro)  (50391248)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学 研究所・グループリーダー    (82502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関