

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580179

研究課題名（和文）グルクロナン分解酵素を利用したグルクロン酸の新規生産システムの構築

研究課題名（英文）Development of a novel system for the production of glucuronic acid by using glucuronan degrading enzymes

研究代表者

羽生 直人（HABU NAOTO）

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10292575

研究成果の概要（和文）：

デンプンおよびカードランなどのグルカン類を TEMPO 触媒酸化することによって得られるグルクロナン（ポリグルクロン酸）と、これに作用する加水分解酵素とを組み合わせることによって、有用物質であるグルクロン酸を効率的に生産する新規プロセスを構築することを目的として検討した。酸化カードラン（カーデュロン酸）分解菌として *Paenibacillus* sp. EH621 株の単離・同定に成功した。本菌からはカーデュロン酸に特異的に作用し、グルクロン酸を生産する加水分解酵素が得られた。

研究成果の概要（英文）：

A novel system for the production of glucuronic acid by using the combination of TEMPO-mediated oxidation of glucans, such as starch and curdlan, and glucuronan degrading enzymes was investigated. A bacterial strain, having the ability to degrade (1→3)-β-polyglucuronate was isolated from soil, and identified as *Paenibacillus* sp. Hydrolytic enzyme activity, which was highly specific to (1→3)-β-polyglucuronate, was detected in the cell-free extract.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：グルクロナン，酵素，微生物，グルクロン酸，TEMPO 触媒酸化，カードラン，カーデュロン酸

1. 研究開始当初の背景

セルロースやデンプンなどのグルカン類に、TEMPO (2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl radical) 触媒酸化を適用すると、グルコース残基の第一級水酸基 (-CH₂OH) が選択的にカルボキシル基 (-COO-) に変換され、酸性多糖類であるグルクロナン (ポリグルクロン酸) が得られる。すなわち、セルロースはセロウロン酸 (β -1,4-グルクロナン) に、デンプンはアミロウロン酸 (α -1,4-グルクロナン) に、そしてカードラン (β -1,3-グルカン) は酸化カードラン (β -1,3-グルクロナン) にそれぞれほぼ 100% の収率で変換される。

これまでの研究では、セロウロン酸やアミロウロン酸の生分解機構を明らかにしてきた。はじめに、セロウロン酸が良好な生分解性を有しており、自然界にはセロウロン酸分解能力を持つ微生物が豊富に存在することを明らかにし (Kato, Habu 他; *Cellulose*, 9, 75-81 (2002)), 約 20 種のセロウロン酸分解菌を単離した。得られた分解菌の一つである *Brevundimonas* 属細菌 SH203 株について詳しく調べたところ、セロウロン酸分解に関与している酵素は、 β -脱離型反応によってグリコシド結合を切断するリアーゼであることが判明した (Konno, Habu 他; *Carbohydrate Polymers*, 64, 589-596 (2006), Konno, Habu 他; *Cellulose*, 15, 453-463 (2008)). また、糸状菌 *Trichoderma reesei* もセロウロン酸リアーゼを産生していることを示し、その酵素性状および結晶構造を明らかにした (Konno, Habu 他; *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 101-107 (2009), Konno, Habu 他; *FEBS Letters*, 583(8), 1323-1326 (2009)).

一方、 α -1,4 結合を有するアミロウロン酸について検討したところ、上記のセロウロン酸分解菌はアミロウロン酸を分解することができなかったため、新たにアミロウロン酸分解菌のスクリーニングを実施した。その結果、栃木県内の土壌から *Paenibacillus* sp. TH501b 株の単離・同定に成功した。さらに、本菌株によるアミロウロン酸の分解に関与している酵素は、リアーゼではなく α -1,4-グルクロニダーゼであることを明らかにした (Ihashi, Habu 他; *Carbohydrate Polymers*, 77, 59-64 (2009)). アミロウロン酸にこの酵素を作用させると、アミロウロン酸分子鎖の末端からエクソ型に加水分解反応が進行して、モノマー成分であるグルクロン酸を生成した。このことから、本酵素はグルクロン酸の生産に有効であることを示した (羽生他; 特許公開 2009-165415)。しかしながら、本酵素によるアミロウロン酸からグルクロン酸への変換収率は、実用レベルから見ると必ずしも充分であるとは云えな

かった。そこで、グルクロナン分解菌のスクリーニングを改めて実施し、より強力な加水分解酵素を新たに見出し、グルクロン酸への変換収率を改善・向上させることができれば、新規なグルクロン酸生産プロセスの構築につながることを考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

有用物質であるグルクロン酸を効率的に生産するために、以下の 2 段階から成る新規生産プロセスを構築することを目的とした。すなわち、①セルロースやデンプンなどの天然グルカン類を TEMPO 触媒酸化することによってそれぞれのグルクロナンに変換し、②これに分解菌の産生する加水分解酵素 (グルクロニダーゼおよびグルクロナーゼ) を作用させることによってグルクロン酸を効率的に生成する (図 1)。本報告では、②について、特にカードラン (β -1,3-グルカン) の TEMPO 酸化反応によって得られる酸化カードラン (カーデュロン酸, β -1,3-グルクロナン) を基質として分解菌のスクリーニングを実施し、グルクロン酸生産に適した酵素を獲得することを目的とした検討について報告する。

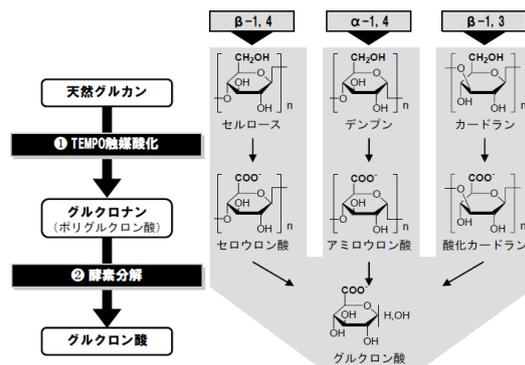


図 1 新しいグルクロン酸生産プロセス

3. 研究の方法

(1) カーデュロン酸分解菌の単離および同定

本研究に用いた菌の培養には、カーデュロン酸を炭素源とする液体培地 (0.82 g/L (NH₄)₂SO₄, 1.6 g/L K₂HPO₄, 0.4 g/L KH₂PO₄, 0.2 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.025 g/L CaCl₂·2H₂O, 0.0023 g/L FeCl₃·6H₂O, 0.1 g/L yeast extract and 5.0 g/L カーデュロン酸, pH 7.0) および LB 培地 (10 g/L tryptone, 5.0 g/L yeast extract および 5.0 g/L NaCl, pH 7.0) を用いた。培養は、好気的条件・30°C で振とう培養 (120 rpm) で行った。寒天培地の場合は、20 g/L の寒天をそれぞれに加えた。

栃木県および静岡県の各地から、土壌サン

ブルを採取し、微生物の供給源とした。各土壌サンプル (1 g) を蒸留水に懸濁させた後、上澄み 0.5 mL をカーデュロン酸液体培地 (10 mL, 試験管中) に加えた。植菌した試験管は振とう培養し (30°C, 120 rpm), 集積培養を行った。得られた培養液をカーデュロン酸寒天培地に塗布し, 3 日間培養した。その中でコロニー生成能の高かった菌株を 4 株単離した。

これらの単離株をカーデュロン酸液体培地で所定時間培養し, 菌体培養液を遠心分離して得られた上澄みの全炭素量 (TC) を測定 (TOC-VCSN, Shimadzu Co., Japan) した。TC の減少が最も顕著であった菌株である EH621 の 16S rRNA をコードする遺伝子の塩基配列を調べ, DDBJ/GeneBank/EMBL データベースに登録した (Accession No. AB765931)。また, 配列の相同性を, BLAST を用いて, DNA データベース中の配列と比較することで菌の同定を行った。その結果, EH621 株は *Paenibacillus* sp. と同定された。

(2) 粗酵素液の調製

LB 培地で前培養した菌体を 100 mL のカーデュロン酸液体培地で培養し, 10 mL ずつ毎日サンプリングした。菌体は 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で 3 回洗浄した後, 3 mL の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁させた。これを 20 kHz で 5 分間, 氷冷しながら超音波破碎 (UD-201 Ultra Sonic Disruptor, Tomy Seiko Co., Japan) し, 遠心分離によって得られた無細胞抽出液を菌体内粗酵素とした。

(3) 酵素活性測定

酵素活性の測定は, グリコシド結合の切断で増加する糖の還元末端量を Somogyi-Nelson 法で定量することによって行った。酵素活性 1 U は 1 分間にグルクロン酸ナトリウム 1 µg に相当する還元末端基量の増加を触媒する酵素量と定義した。

(4) 酵素反応生成物の分析

2% (w/v) カーデュロン酸 1.5 mL および酵素 1.5 mL (15 U 分) をインキュベート (26°C, 100 rpm) してカーデュロン酸分解反応を行った。反応液を経時的にサンプリングし, ただちに -25°C で凍結させて反応を停止した。

得られた酵素反応生成物を分析するために, 薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。酵素反応液 10 µL (反応開始時のカーデュロン酸 100 µg 相当) を Silicagel 60F254 (Merck Co., Germany) にスポットした。モノマー標品としてグルクロン酸 50 ng も同時にスポットした。展開溶媒として 1-ブタノール:酢酸:蒸留水=3:2:2 を用いた。展

開後のプレートは 10%硫酸を含むエタノールに浸し, 130°C で加熱して反応生成物を発色させた。

酵素反応生成物の分子量分布を確認するために, サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 測定を行った。カラムは Shodex SB-802.5 HQ (8 mm × 30 cm) を用いた。0.1 M の塩化ナトリウム水溶液を溶離液とし, 0.1%濃度になるように, 凍結サンプルを溶解した。溶出パターンは, 屈折率 (RI) 検出器によって検出した。

4. 研究成果

(1) カーデュロン酸分解菌の単離および同定

先行研究において, セロウロン酸やアミロウロン酸といったポリグルクロン酸を分解できる菌株が単離・同定されている。しかしながら, これらの菌はカーデュロン酸を栄養源として生育出来ないことが分かった。そこで, 様々な場所の土壌サンプルを採取し, カーデュロン酸を分解できる菌を新たにスクリーニングし, 単離した。その中でもカーデュロン酸寒天培地上にコロニー生成能の高い菌株を選抜し, EH602a, EH602b, EH621 および EH622 と命名した。これら 4 株をカーデュロン酸液体培地で 3 日間培養し, 培養液中の全炭素量 (TC) の経時変化を確認した。その結果, 菌株によって減少の程度やパターンに差異は認められるものの, 全ての菌株で培養液中の TC 減少がはっきりと確認できた。これらの結果から, カーデュロン酸を炭素源として生育できる微生物が自然界に比較的豊富に存在することが示された。カーデュロン酸は TEMPO 触媒酸化によってカードランから人工的に調製された物質であるにもかかわらず, 生分解性を有する材料であることが明らかとなった。EH621 株は, 比較した 4 株のうち, 培養中の TC 減少速度が最も大きかったため, カーデュロン酸分解能が最も優れた菌株であると考え, 以後この菌株を用いて検討を進めた。

(2) *Paenibacillus* sp. EH621 株のカーデュロン酸分解酵素

様々な条件 (培養培地組成, 培養時間, 培養 pH) を変えて *Paenibacillus* sp. EH621 株を培養し, 粗酵素を調製した。最適な培養 pH は 7.6 であった。また, 前培養には LB 培地を用いることで, 十分に菌体量を増やすことが出来た。LB 培地で 1 日前培養した後, 菌体細胞を遠心分離によって集め, カーデュロン酸液体培地に植菌して 1~4 日培養し, 得られた菌体から調製した粗酵素の酵素活性を測定したところ, 培養 3 日目の菌体から最も高い酵素活性が得られた。

粗酵素中のヒドロラーゼ活性の基質特異

性を調べた結果、 α -1,4-ポリグルクロン酸(アミロロン酸)、 β -1,4-ポリグルクロン酸(セロロン酸)、アルギン酸、ヒアルロン酸、デンプンおよびカードランに対しては全く活性がなく、ペクチンに対してわずかな活性(カーデュロン酸に対して約8%)が認められただけで、本酵素がカーデュロン酸に対して非常に基質特異性の高いことが明らかとなった。

(3) 粗酵素による分解反応生成物の分析

カーデュロン酸を粗酵素と共にインキュベートし、得られた分解反応生成物を TLC および SEC を用いて分析した。図 2 に酵素分解物の TLC のパターンを示す。酵素による分解反応時間が長くなるのにしたがって、カーデュロン酸の構成モノマーであるグルクロン酸やそのダイマー、オリゴマーが生成していることが分かる。培養時間の増加に伴って、反応中に生成するグルクロン酸の量が増加していることも確認された。

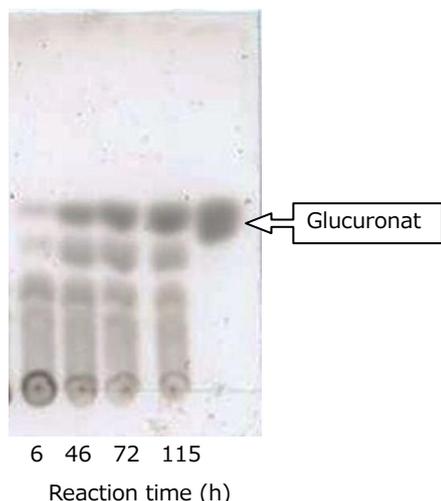


図 2 ヒドロラーゼによるカーデュロン酸分解反応生成物の経時変化 (TLC)

酵素分解反応物を SEC 分析に供したところ、オリジナルのカーデュロン酸のピークは、酵素処理時間が長くなるのに伴って経時的に低分子側にシフトすることが認められた。また、グルクロン酸由来と思われるモノマーのピーク面積が増大していった。さらに、カーデュロン酸分解の中間生成物(オリゴマーや大マーなど)の存在も確認された。

これらの結果から、*Paenibacillus* sp. EH621 株はエンド型にカーデュロン酸を分解する加水分解酵素を生産することが明らかとなった。カーデュロン酸の酵素分解物中には、主として、構成モノマーであるグルクロン酸が得られた。さらに、比較的初期の処理時間からモノマーであるグルクロン酸の生成が確認できたことから、粗酵素液中には、

エクソ型酵素の存在している可能性も示唆された。これらのエンドおよびエクソ型の加水分解酵素が協奏的に働くことによって、カーデュロン酸が効率的に分解されてグルクロン酸が生成していると考えられる。

本菌株が産生する加水分解酵素の生産条件や反応条件をより詳細に最適化することによって、TEMPO 酸化多糖類からのグルクロン酸生産の新規プロセスへの適用が可能になるものと期待された。

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 1 件)

- Erika Watanabe, Naoto Habu, Akira Isogai, Biodegradation of (1→3)- β -polyglucuronate prepared by TEMPO-mediated oxidation, *Carbohydrate Polymers*, 査読あり, **96**, 314-319, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.081>

[学会発表] (計 2 件)

- ① 渡邊絵里香, 磯貝 明, 羽生直人, 田村直之, 藤澤秀次, β -1,3-ポリグルクロン酸の化学安定性解析, セルロース学会第 19 回年次大会, 名古屋, 2012
- ② 渡邊絵里香, 磯貝 明, 羽生直人, カージュロン酸分解菌の単離とその分解酵素の性質, セルロース学会第 18 回年次大会, 長野, 2011

6. 研究組織

(1)研究代表者

羽生 直人 (HABU NAOTO)

研究者番号 : 10292575