

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660052

研究課題名(和文) シロアリ共生原生生物が持つユニークなヘミセルロース分解関連酵素群の性質の解明

研究課題名(英文) Production and characterization of unique hemicellulose-degrading enzymes obtained from the symbiotic protists of termites

研究代表者

有岡 学 (Arioka, Manabu)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：20242159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シロアリ腸内原生生物由来のGHF26に属するマンナーゼRsMan26A、B、CおよびHの発現・精製・性質の検討を行った。各種基質に対する活性を検討した結果、興味深いことにHは直鎖マンナンやオリゴマンナンからマンノピオースを生成するマンノピオヒドロラーゼであることがわかった。またCのX線結晶構造解析から本酵素が典型的な(beta/alpha)₈ TIMバレル構造を持ち、活性中心付近においてマンノースを特異的に認識する残基などを有することがわかった。サブサイト-5から-2にかけてはグルコマンノオリゴ糖が結合しており、これがグルコマンナンに対し高い活性を示す理由であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：GHF26 mannanases named RsMan26A, B, C, and H found in the symbiotic protists of termites were heterologously produced, purified, and characterized in this study. Subsequently the substrate specificities of these enzymes were analyzed. Interestingly, RsMan26H was found to display endo-processive mannobiohydrolase activity producing mannobiose from oligo- and polysaccharides. The crystal structure of RsMan26C demonstrated that the enzyme has the typical (beta/alpha)₈ TIM barrel structure. RsMan26C complexed with gluco-manno-oligosaccharide(s) explained its specificities for glucose and mannose at subsites -5 and -2, respectively, in addition to accommodation of both glucose and mannose at subsites -3 and -4.

研究分野：微生物学

キーワード：マンナーゼ シロアリ共生原生生物 ヘミセルロース

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など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生み、食糧価格を高騰させる要因となりうる。この問題の解決のため、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ための技術の確立が求められている。

2. 研究の目的

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。本研究では、従来ほとんど手を付けられて来なかった原生生物由来のヘミセルロース分解に関わる酵素群の微生物生産を行い、生産した各酵素の「性能」を生化学的に解析し、またその構造的特徴を明らかにする。加えて、それらを利用したバイオマス糖化システムの構築を試みる。また、共生原生生物由来のセロビオヒドロラーゼの生産も試みる。

3. 研究の方法

各マンナーゼの生産は *P. pastoris* KM71H 株を宿主として行った。生産に用いたプラスミドは GAP プロモーターあるいは AOX1 プロモーター制御下で N 末端に myc タグと His6 タグが付加された成熟体 RsMan26C (X=A、B、C または H) が菌体外に分泌されるように構築されている。AOX1 プロモーターを用いた場合にはメタノール添加による発現の誘導を行った。精製は 6×His タグを用いた Ni²⁺ カラムによって行い、必要に応じてイオン交換クロマトグラフィーや疎水性クロマトグラフィーを行った。酵素反応の基質にはマンノオリゴ糖、天然のマンナン基質である直鎖マンナン、Locust bean gum (LBG)、グルコマンナン、グアーガム等を用いた。解析は主として薄層クロマトグラフィーにより行い、場合によっては高速液体クロマトグラフィーも用いた。RsMan26C の X 線結晶構造解析では精製 RsMan26C を用いてシッティングドロップ法により結晶の取得を行い、分子置換法により位相を決定した。さらに精密化して分解能 1.3 Å、R_{work}/R_{free} = 17/19% で最終構造とした。また、本来のネイティブ構造に加え、グルコマンナンの加水分解産物 (グルコマンノオリゴ糖) との共結晶構造も得た。オオシロアリ由来のセロビオヒドロラーゼ EuCBH の生産には麹菌 *A. oryzae* を用いた。

4. 研究成果

ヤマトシロアリ腸内原生生物由来マンナーゼ RsMan26C の発現と精製を行い、様々な基質に対する分解活性を調べた。その結果、

RsMan26C は 4 糖以上のマンノオリゴ糖、直鎖マンナン及び不溶性の結晶性マンナンをランダムに分解した。また、ガラクトマンナンとグルコマンナンに対しては直鎖マンナンの 2 倍を超える高い比活性を示した。RsMan26C はその活性部位においてガラクトース側鎖を許容しやすく、マンノースとグルコースのヘテロ多糖を基質として認識できる緩やかな基質特異性を持つことが示唆された。

続いて RsMan26C の X 線結晶構造解析を行った。精製 RsMan26C を用いてシッティングドロップ法により結晶の取得を行い、分子置換法により位相を決定し、精密化して分解能 1.3 Å、R_{work}/R_{free} = 17/19% で最終構造とした。また、本来のネイティブ構造に加え、グルコマンナンの加水分解産物 (グルコマンノオリゴ糖) との共結晶構造も得た。RsMan26C の全体構造 (ネイティブ構造) は典型的な (β/α)₈ TIM バレルで、他の GH26 ファミリー同様に、活性中心残基やサブサイト-1 においてマンノースを特異的に認識する残基などが保存されていた (図 1)。



図 1 RsMan26C の全体構造

一方、グルコマンノオリゴ糖との共結晶構造では、活性部位のサブサイト-5 から-2 にかけてグルコマンノオリゴ糖が結合していた (図 2)。サブサイト-2 にはマンノースのみが結合していたのに対して、サブサイト-4 と-3 にはマンノースとグルコースの両方が、サブサイト-5 にはグルコースのみが結合していた。特にサブサイト-3 では、Arg-126 と、酸化されたメチオニン (SME85) がグルコースの特異的な認識にそれぞれ関与していることが示唆された。以上の結果から、RsMan26C はサブサイト-5、-4、-3 においてグルコースを許容または認識できることが示唆され、このことは RsMan26C がグルコマンナンに対し高い活性を示す理由であると考えられた。

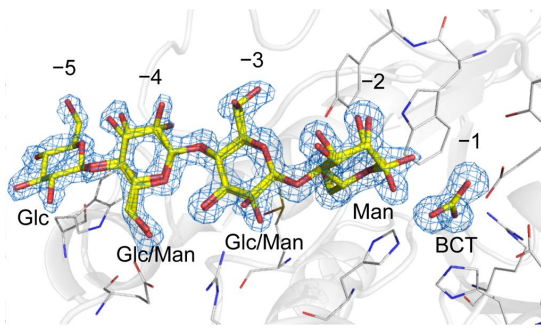


図2 RsMan26C とグルコマンノオリゴ糖の複合体の構造

次いでヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* の後腸に共生する原生物群からクローニングされた 2 種類のマンナーゼ (RsMan26A および RsMan26B) はいずれも糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase: GH) ファミリーの GH26 に属している。本研究ではその機能解析を目的として、*P. pastoris* KM71H 株を宿主とした異種生産を行った。生産に用いたプラスミドは、GAP プロモーター制御下で N 末端に myc タグと His6 タグが付加された成熟体 RsMan26X (X=A または B) が菌体外に分泌されるように構築されている。培養上清のマンナーゼ活性を検討した結果、どちらも活性が認められた。精製酵素を用いて酵素学的性質を解析したところ、両酵素とも低 pH (3.0 ~ 5.0) において高い活性を示した。マンノオリゴ糖との反応産物を薄層クロマトグラフィーにより解析したところ、RsMan26A は 6 糖以上の鎖長のマンノオリゴ糖を、RsMan26B は 4 糖以上の鎖長のマンノオリゴ糖を基質とすることが分かった。また、天然のマンナン基質である直鎖マンナン、Locust bean gum (LBG)、グルコマンナン、グアーガムとの反応性を比較したところ、RsMan26A は LBG に対して最も高い活性を示し、RsMan26B はグルコマンナンに対して最も高い活性を示した。

EuCBH の生産は alpha-amylase をキャリアに用いて行った。両者の分離のため Kex2 様プロテアーゼの認識配列を挿入した。また、検出と精製のため HA-His6 タグを C 末端に付加した。発現プラスミドを麹菌に形質転換し、得られた形質転換体の培養上清を濃縮して Ni²⁺カラムによる精製を行った。その結果、目的の大きさのタンパク質の生産が確認された。

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 4 件)

Heterologous expression and characterization of a glycoside hydrolase family 45 endo-beta-1,4-glucohydrolase from a symbiotic protist of the lower termite,

Reticulitermes speratus.

Otagiri M, Lopez CM, Kitamoto K, Arioka M, Kudo T, Moriya S

Appl Biochem Biotechnol 169, 1910-1918 (2013)

doi: 10.1007/s12010-012-9992-1

A novel glucose-tolerant beta-glucosidase from the salivary gland of the termite *Nasutitermes takasagoensis*.

Uchima CA, Tokuda G, Watanabe H, Kitamoto K, Arioka M

J Gen Appl Microbiol 59, 141-145 (2013)

Structural and Biochemical Analyses of Glycoside Hydrolase Family 26 beta-Mannanase from a Symbiotic Protist of the Termite *Reticulitermes speratus*.

Tsukagoshi H, Nakamura A, Ishida T, Touhara KK, Otagiri M, Moriya S, Samejima M, Igarashi K, Fushinobu S, Kitamoto K, Arioka M

J. Biol. Chem. 289, 10843-10852 (2014)

doi: 10.1074/jbc.M114.555383

The GH26 beta-mannanase RsMan26H from a symbiotic protist of the termite *Reticulitermes speratus* is an endo-processive mannanohydrolase: heterologous expression and characterization.

Tsukagoshi H, Nakamura A, Ishida T, Otagiri M, Moriya S, Samejima M, Igarashi K, Kitamoto K, Arioka M

Biochem. Biophys. Res. Commun. 452,

520-525 (2014)

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.103

〔学会発表〕(計 4 件)

シロアリ共生原生物由来バイオマス分解酵素の異種生産と解析

小泉 博比古, 塚越 光, 小田切 正人, 守屋 繁春, 北本 勝ひこ, 有岡 学

2015 年 3 月 28 日

日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山大学)

麹菌 *A. oryzae* を用いたシロアリ腸内共生原生物由来セロビオヒドロラーゼの生産

北本 真理奈, 川田 純毅, 丸山 潤一, 小田切 正人, 守屋 繁春, 有岡 学

2015 年 11 月 20 日

第 15 回糸状菌コンファレンス (東京都府中市)

麹菌 *A. oryzae* を宿主としたシロアリ腸内共生原生物由来セロビオヒドロラーゼの生産

北本 真理奈, 川田 純毅, 丸山 潤一, 小田切 正人, 守屋 繁春, 有岡 学

2016 年 3 月 28 日

日本農芸化学会 2016 年度大会（札幌）

Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of an imidazole sensitive beta-glucosidase from the gregarious wood-feeding cockroach *Panesthia angustipennis*

Yihai Li, Gaku Arakawa, Gaku Tokuda, Hirofumi Watanabe, Manabu Arioka

2016 年 3 月 28 日

日本農芸化学会 2016 年度大会（札幌）

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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・

准教授

研究者番号：20242159

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：