

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580492

研究課題名(和文)植物細胞壁の酵素分解におけるキシログルカン分解酵素の作用機構の解明と利用

研究課題名(英文)The analysis of the mode of action of xyloglucan-degrading enzymes

研究代表者

矢追 克郎 (Yaoi, Katsuro)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：70344132

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)：植物細胞壁の主要なヘミセルロースであるキシログルカンを分解する酵素について詳細な解析を行った。1,4グルカン主鎖を分解するキシログルカナーゼや、側鎖を分解するキシロシダーゼやガラクトシダーゼのクローニングと性状解析を行った。これらの酵素の植物細胞壁の分解における効果を解析した結果、キシログルカナーゼはセルラーゼ製剤のセルロース系バイオマス分解に対して添加効果を示した。

また、キシログルカナーゼの活性中心に変異を導入することによって、作用機序の異なる変異型酵素の作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Xyloglucan is a major hemicellulose found in plant cell wall. In this study, various xyloglucan-degrading enzymes were analyzed in detail. Xyloglucanases that cleave -1,4 glucan backbone chains, and -xylosidase and -galactosidase, that cleave the side chain, were cloned, identified and characterized. The analysis of the effect of those enzymes on the degradation of plant cell walls revealed that xyloglucanases showed an additive effect on the cellulosic biomass-degradation of by the cellulases.

Furthermore, by introducing site-directed mutations into the active center of the xyloglucanase it was successfully produced different types of enzymes that have different mode of actions.

研究分野：応用微生物学

キーワード：キシログルカン 植物細胞壁 バイオマス キシログルカナーゼ ヘミセルロース ヘミセルラーゼ  
キシログルカン分解酵素

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁の最も主要な構成物質はセルロースであり、酵素分解にはセルラーゼがメインプレーヤーとして機能する。しかし、植物細胞壁中のセルロースは、多様で複雑な構造の「ヘミセルロース」(セルロース以外の植物細胞壁構成多糖の総称)と相互作用して存在するため、ヘミセルロースを分解する様々な酵素が必要になる。これまでは、ヘミセルロースの中でも存在量の多い「キシラン」が主に注目され、キシラン分解酵素(キシラーゼ)の研究が盛んに進められてきた。しかし、近年はキシラーゼ以外にも多種多様な酵素が重要である事が明らかになってきた。その中でも「キシログルカン」は、その存在量の少なさから従来は軽視されていたが、セルロースと構造が似ており、細胞壁中で非常に強く相互作用しているため、植物細胞壁の酵素分解に非常に重要である事が示唆され始めている。

キシログルカンとは、植物細胞壁のヘミセルロースの一種であり、細胞壁主要成分のセルロースと密接に相互作用して存在している。キシログルカンを構成するのは、グルコース、キシロース、ガラクトース、フコース、アラビノースなどであるが、主要骨格はグルコースが  $\beta$ -1,4 グルコシド結合で多数結合した  $\beta$ -1,4 グルカン主鎖(これはセルロースと同じ構造)であり、この主鎖にキシロースが  $\alpha$ -1,6 キシロシド結合で高頻度に分岐結合した構造を基本とする。これまでに、各種キシログルカン分解酵素の探索や構造・機能相関について研究をすすめ、既知の酵素とは全く作用の異なる新規酵素「オリゴキシログルカン還元末端特異的セロピオヒドラーゼ」の発見(Yaoi & Mitsuishi 2002、EC3.2.1.150 として新規登録)、ユニークな酵素である「イソプリメペロース生成酵素」の世界初の遺伝子クローニング(特願2007-041115)キシログルカン分解酵素関連ファミリー(糖質加水分解酵素ファミリー74)で初の立体構造解析(Yaoi et.al. 2004)、構造・機能相関の解明(Yaoi et.al.2007、Yaoi et.al.2009)等に成功してきた(図1)。しかし、そもそも微生物はキシログルカンを分解して資化するために、あるいは病原微生物が感染の第一段階として細胞壁の分解を行うために、各種酵素を産生しているが、植物細胞壁の分解に関する、それらの役割については、全くと言って良いほど研究が進んでおらず、不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

植物細胞壁に存在する複雑な構造のキシログルカンを分解するためには、多種多様な作用機構のキシログルカン分解酵素が活躍する。しかし、キシログルカンに関する注目が集まりだしたのがごく最近であるため、それらの大部分について研究はほとんど進んでいない。これまでの我々の研究をはじめとした、いくつかの解析例で、酵素がどのようにキシログルカンを認識し、分解するのかが少しずつ明らかになり始めている段階である。したがって、まずは多様な微生物由来酵素のクローニングを行い、自然界で微生物がどのような種類のキシログルカンを用いて、植物細胞壁分解に挑んでいるのかを理解する必要がある。そして、それら酵素の作用機構の解明が必要である。さらに、それらの酵素群が植物細胞壁の分解の際に、どのような作用機序で働いているのかを明らかにする。これには、従来のように純粋なキシログルカンを基質として用いる酵素学的性状解析だけでなく、実際に植物細胞壁成分を用いた解析も必要である。微生物がどのような仕組みで植物細胞壁の分解を行っているのかを理解し、植物細胞壁由来セルロース系バイオマスの酵素分解における利用法にも知見が得られると期待される。また、解析した構造・機能相関の情報や、明らかにした分解メカニズムの情報は、天然型酵素を、より効率的に植物細胞壁を分解出来るような性質を向上させるような機能変化のために重要な知見が得られと思われる。

3. 研究の方法

(1) キシログルカン分解酵素のクローニングと性状解析

キシログルカンはヘテロな構成糖からなる複雑な構造なので、これを分解する酵素も多様である。 $\beta$ -1,4 グルカン主鎖を分解する酵素(キシログルカナナーゼ)については、分解様式がエキソ型とエンド型に分けられる。エンド型については、さらにエンドディソシエイティブ型、エンドプロセッシブ型が存在し(図2)、酵素によって多種多様な分解様式であり植物細胞壁分解の際の効果も異なっている。様々な分解様式のキシログルカナナーゼを取りそろえ、作用機序の比較を行うことが重要である。また、キシログルカン分解には側鎖に作用する酵素も必要であり(側鎖構造が主鎖の分解を阻害するため、側鎖のトリミングが必要)、存在する側鎖構造に対応する酵素(キシロシダーゼ、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼなど)のクローニングを行う。これらの各種酵素は大腸菌等を宿主とした異種宿主発現を行い、基質特異性、分解様式、立体構造解析等を行う。

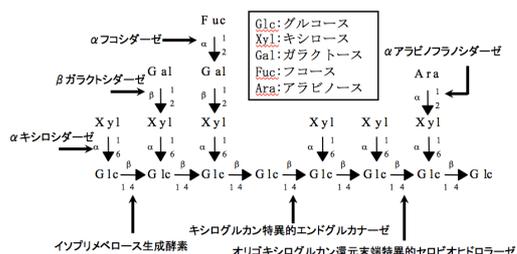


図1.キシログルカンの構造と様々な分解酵素

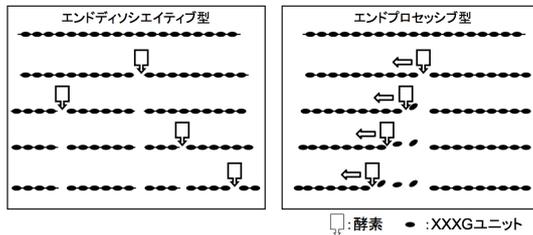


図2 キシログルカナーゼの2種類の分解様式

### (2) 植物細胞壁の酵素分解への効果

自然界では、酵素は単独ではなく、他のタイプの酵素と共同作業で細胞壁を分解しており、酵素同士の組み合わせによる相乗効果を解析することは非常に重要である。そこで、組換え型酵素として取りそろえた各種酵素について、セルロース系バイオマスなど実際の植物細胞壁分解に対する効果を評価する。植物細胞壁の酵素分解に、どのような酵素が必要なのかを同定し、どのような酵素の組み合わせが相乗効果が高いのか、等が明らかになる。

### (3) 酵素の機能改変

これまでで明らかになった知見を基に、人為的改変の可能性についても検討する。立体構造情報をもとにして、活性中心への部位特異的変異の導入などを行い、機能改変を試みる。

## 4. 研究成果

### (1) キシログルカン分解酵素のクローニングと性状解析

主鎖を分解する酵素であるキシログルカナーゼについては、分解様式がエキソ型、エンド型、エンドプロセッシブ型など多様なメカニズムが存在する。エキソ型では還元末端を認識するオリゴキシログルカン還元末端特異的セロビオヒドロラーゼや (Yaoi & Mitsuishi 2002)、非還元末端に作用するイソプリメベロース生成酵素 (Yaoi & Miyazaki 2012) が知られており、クローニングや詳細な性状解析が完了した。エンド型の酵素について、特に *Paenibacillus* 由来の GH74 キシログルカナーゼ (XEG74) について詳細な解析を行った。XEG74 については、X線結晶構造解析による立体構造の解明も試みたが、結晶化には成功したものの、構造解析は途中段階である。平行して、構造既知の情報をもとにしたホモロジーモデリングを行い、作用機構と立体構造との相関解析を行った。その結果、作用機序に重要なアミノ酸残基の特定に成功した。

また、キシログルカンの側鎖構造は、キシロースが 1,4 グルカン主鎖に 1,6 結合し、そのキシロースに更にガラクトースなどが結合している構造を基本としているが、側鎖構造を切断する酵素として、ガラクトシダーゼを 6 種類、キシロシダーゼを 2 種類クローニングした。大腸菌による異種宿主発現

に成功し、His-Tag を用いて高純度に精製した。精製した各種組換え酵素の諸性質を解析し、キシログルカンの側鎖への作用を解析した。

### (2) 植物細胞壁の酵素分解への効果

植物細胞壁の酵素分解における効果を解析するために、バイオマス種としてはエリアンサスや稲わらを用いて実験を行った。バイオマスを粉碎し、様々な条件(アルカリ処理、酸処理、水熱処理など)で前処理を行い、既存のセルラーゼ製剤と共に作用させ、分解への効果を検討した。その結果、ある種の前処理条件下では、主鎖を分解するキシログルカナーゼが全体の分解率を向上させる添加結果が認められた(図3)。一方、側鎖を分解する酵素については、全体の分解率の顕著な向上効果は認められなかった。これは、セルラーゼと相互作用するキシログルカンを分解することが、セルラーゼによるセルロース分解の向上に寄与する一方、キシログルカンの存在量が多くは無いため側鎖分解により生成する糖は全体の生成糖量から比べて微量な為だと考えられた。

また、様々な作用様式のキシログルカナーゼについて分解向上効果を解析したが、作用様式ごとに顕著な差は認められず、作用様式と分解における役割との相関関係は不明で、今後の検討課題である。

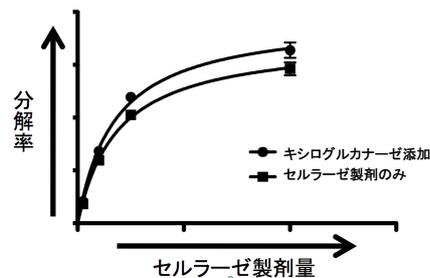


図3 セルラーゼ製剤のバイオマス分解におけるキシログルカナーゼの効果

### (3) 酵素の機能改変

*Paenibacillus* 由来のキシログルカナーゼ (XEG74) のモデリングによる立体構造情報を基にして活性中心に変異を導入した。合計で 4 種類の変異酵素を作成し、それぞれの作用機構について詳細に解析した。野生型のはエンドプロセッシブ型の作用機構であるが、2 つの変異体はキシログルカン主鎖にランダムにアタックするエンドディソシエイティブ型の作用機構に変化していることを明らかにした。また、分解途中で生成されるオリゴ糖もそれぞれの変異体で異なる事が観察され、今後の更なる解析と利用方法の開発に興味を持たれた (Matsuzawa et. al. 2014)。

<引用文献>

Katsuro Yaoi and Yasushi Mitsuishi, Purification, characterization, cloning, and expression of a novel xyloglucan-specific glycosidase, oligoxyloglucan reducing end-specific cellobiohydrolase. J. Biol. Chem., 2002; 277(50):48276-48281

Katsuro Yaoi, Hidemasa Kondo, Natsuko Noro, Mamoru Suzuki, Sakae Tsuda, and Yasushi Mitsuishi, Tandem repeat of a seven-bladed propeller domain in oligoxyloglucan reducing-end-specific cellobiohydrolase. Structure, 2004; 12(7):1209-1217.

Katsuro Yaoi, Hidemasa Kondo, Ayako Hiyoshi, Natsuko Noro, Hiroshi Sugimoto, Sakae Tsuda, Yasushi Mitsuishi, and Kentaro Miyazaki, The structural basis for the exo-mode of action in GH74 oligoxyloglucan reducing end-specific cellobiohydrolase. J. Mol. Biol., 2007; 370:53-62

Katsuro Yaoi, Hidemasa Kondo, Ayako Hiyoshi, Natsuko Noro, Hiroshi Sugimoto, Sakae Tsuda, and Kentaro Miyazaki, The crystal structure of a xyloglucan-specific endo- $\alpha$ -1,4-glucanase from *Geotrichum* sp. M128 xyloglucanase reveals a key amino acid residue for substrate specificity. FEBS. , 2009; 276(18):5094-5100

Katsuro Yaoi and Kentaro Miyazaki, Cloning and expression of isoprimeverose-producing oligoxyloglucan hydrolase from an actinomycetes species, *Oerskovia* sp. Y1. J. Appl. Glycosci, 2012; 59(2):83-88

Tomohiko Matsuzawa, Yuji Saito, and Katsuro Yaoi, Key amino acid residues for the endo-processive activity of GH74 xyloglucanase. FEBS Lett., 2014; 588(9):1731-1738

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)

Tomohiko Matsuzawa, Yuji Saito, and Katsuro Yaoi  
Key amino acid residues for the endo-processive activity of GH74 xyloglucanase  
FEBS Lett., 2014; 588(9):1731-1738  
doi:10.1016/j.febslet.2014.03.023

[学会発表](計 3 件)

松沢智彦、矢追克郎  
キシログルカナーゼ XEG74 のエンド-プロセス活性に重要なアミノ酸の特定  
日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

松沢 智彦、矢追 克郎  
Identification of key amino acid residues for the processive activity of GH74 family xyloglucanase  
Mie Bioforum 2014 , 2013 年 11 月 19 日、合歡の郷ホテル(三重県志摩市)

矢追克郎  
ヘミセルラーゼ ~キシログルカン分解酵素について~  
第27回セルラーゼ研究会、2013年7月13日、花王(株)霞ヶ浦研修所(茨城県稲敷郡)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

矢追 克郎 (YA01, Katsuro)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長  
研究者番号 : 70344132