

令和元年6月21日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08116

研究課題名(和文)低温糖化・低温発酵システム構築に向けた低温適応性新規糖質分解酵素に関する研究

研究課題名(英文) Study on cold-adapted carbohydrate hydrolases according to the construction of simultaneous saccharification and fermentation process

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミミズ由来のマンナン分解酵素の低温活性を向上させるために、塩橋に着目し構造と機能の解析を行った。塩橋を弱めることで、熱安定性を維持しながら低温活性を向上させた。さらに微生物由来の酵素と低温活性を比較したところ、ミミズ由来の変異酵素の方が比活性の高いことを明らかにした。本酵素は低温下で利用する上で優位性を有していた。

低温適応性生デンプン分解酵素(Ef-AmyI, Ef-AmyII)の構造と機能の解析を行った。Ef-AmyIとEf-AmyIIは、高いアミノ酸配列の相同性(89%)を有している。しかしながら、基質特異性をはじめ性質が異なっていたので、まずEf-AmyIの高次構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究期間内に実施した研究及び成果：ミミズ由来のマンナン分解酵素の低温活性を向上させるために、塩橋に着目し構造と機能に関する研究を行った。塩橋を弱めることで低温活性を向上させるとともに、熱に安定な変異酵素を得ることに成功した。次にシマミミズ由来の2種類の生デンプン分解酵素を酵母を用いて異種宿主発現に成功した。さらにアミラーゼIの高次構造を明らかにした。

学術的意義や社会的意義：低温適応酵素の構造と機能を明らかにすれば、糖化プロセスにエネルギーを必要としないことからCO<sub>2</sub>ガスの排出量が減少する。低炭素社会構築に向けて今後さらに研究を進展させることは学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：It revealed that the structure of Ef-Man is similar to that of the cold-active mannanase (Ca-Man) from *Cryptopygus antarcticus*. However, the optimum temperatures of Ef-Man and Ca-Man were 60 °C and 35 °C each other. The weakening of salt bridge is one of the methods by which high flexibility and catalytic efficiency can be conferred on cold-active enzymes at lower temperatures, but the weakening of salt bridge causes a decrease in thermostability. It is reported that the weakening of salt bridge can change property of enzymes. However, there is no report about the weakening of salt bridge. In this study, we applied site-directed mutagenesis combined with rational design to generate a cold-adapted enzyme with improved thermostability and catalytic efficiency at lower temperatures. We found the structure and function of the salt bridge weakening mutant Ef-Man (R302K). The specific activity of R302K was higher than that of WT at lower temperature.

研究分野：環境生化学

キーワード：低温適応酵素 糖質分解酵素 塩橋 X線結晶構造解析 バイオ燃料 連続糖化発酵法

# 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### エネルギー生産の問題点

我が国は、化石燃料への依存度が高く、燃焼後に排出する大量の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(アルコール協会ハンドブック, 技報堂出版)。22世紀に向けて化石燃料に依存しない低炭素社会を構築するためには、低温糖化・低温発酵する技術の開発が望まれる。現在、デンプンの糖化には耐熱性酵素が用いられている。また、木質バイオマスの糖化には微生物由来のセルラーゼ(最適作用温度が60~70°C)が用いられているが、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。

### ミミズ由来の低温適応性糖質分解酵素

ミミズからこれまでに生デンプン分解酵素を単離・精製し、その性質を明らかにしている(Ueda et al., Comp. Biochem. Physiol. B 150: 125-30, 2008, ScienceDirect Top 25 Hottest Article in 2008)。この酵素は、既存の微生物由来の酵素より低温条件での比活性が高いことから低温・酸性条件下(25°C, pH 5.0)で生デンプンを効率よく分解でき、その分解産物から酵母を用いたエタノールの生産にも成功している。また、ミミズには低温・酸性条件下でセルロースに対して高い活性を示すセルラーゼ(CMCase)が存在することを見出している (Ueda et al., Comp. Biochem. Physiol. B 157: 26-32, 2010, ScienceDirect Top 25 Hottest Article in 2010)。カビ由来の酵素は60~70°Cで最大活性(5.2~6.2 units/mg protein)を示すが、低温下では著しく活性が低下する。一方、ミミズ由来の酵素は40°Cで最大活性(7.2 units/mg protein)を示し、20°Cでも最大活性の40%以上の活性を保持している。すなわち、ミミズ由来の酵素はカビ由来の酵素より20~30°C 低温側で糖化できることを示している。これより投入熱エネルギーを節約できるとともに生産コストも下げることができる。ミミズの持つ低温環境下で有機物を効率よく分解する能力に学ぶことで、低温糖化・低温発酵システムの構築が可能であると考えている。

## 2. 研究の目的

バイオエネルギー生産のためにミミズ由来の酵素を利用するための研究を行う。ミミズ由来の低温適応酵素に着目し、低温・酸性条件下で植物バイオマスを分解できる酵素遺伝子のクローニングと異種宿主発現を行う。さらに、それらの酵素の構造と機能の解析および低温糖化・低温発酵法を用いたバイオエタノール生産システムの構築を目指す。

## 3. 研究の方法

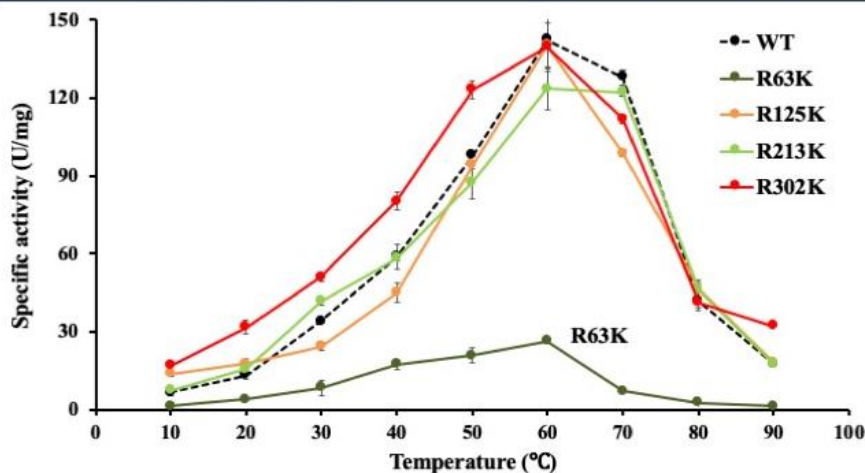
ミミズ由来の低温適応性新規糖質分解酵素の構造と機能ならびに低温糖化・低温発酵システム構築に向けて以下のように研究を計画する。ミミズ由来の植物バイオマス分解酵素遺伝子のクローニングを行い、高発現系を構築する。ミミズ由来の植物バイオマス分解酵素の構造と機能の解析を行う。また、低温環境下で糖化能力を向上させた変異型酵素を創製する。最終的には複合酵素カクテルを調製し、低温糖化・低温発酵システムの構築に向けた研究を行う。

## 4. 研究成果

低温糖化・低温発酵システム構築に向けてミミズ由来の低温適応性新規糖質分解酵素に関する研究を行った。

(1)ミミズ由来のマンナン分解酵素の低温活性を向上させるために、塩橋に着目し構造と機能の解析を行った。これまでに、ミミズ由来のマンナン分解酵素(Ef-Man)は好冷性酵素である南極トビムシ(*Cryptopygus antarcticus*)由来マンナーゼ(Ca-Man)と構造が似ていることを明らかにしている。しかしながら、Ef-Man(最適温度60°C)はCa-Man(最適温度35°C)に比べ低温活性が低く、この違いは構造

図1 温度依存性 (比活性)



のわずかな違いに起因していると考え、タンパク質の構造の安定化に寄与している塩橋に着目した。これまでに塩橋を消失させることで低温活性が向上するという報告は存在するが、塩橋を弱めた際の影

響についての報告はほとんど存在しない。そこで、Ef-Man に存在する塩橋を弱めることによる低温活性を向上させるための研究を行った。部位特異的変異導入法を用いて塩橋を弱めた4種類の変異酵

素

(R63K, R125K, R213K, R302K)を作製した。野生型(WT)と変異酵素4種類の低温活性を比較したところ、変異酵素の一つ(R302K)がWTよりも高活性を有することを明らかにした(図1)。さらに、R302Kは熱処理に対して安定なことも明らかにした。これより、塩橋を弱めるという方法

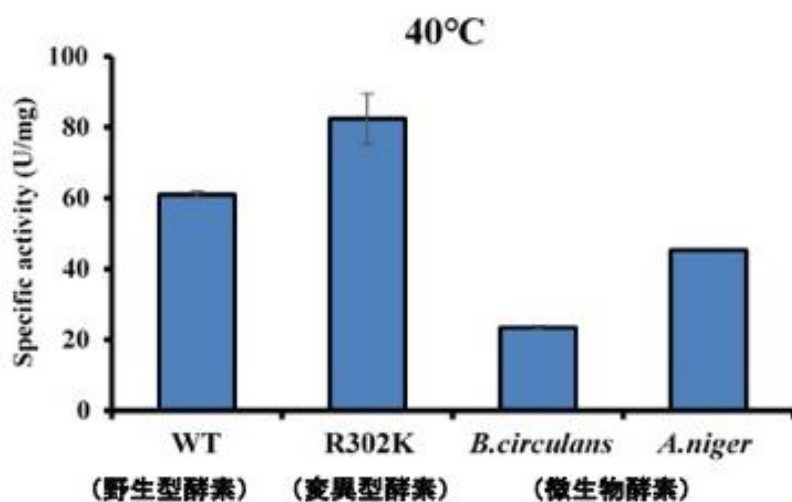


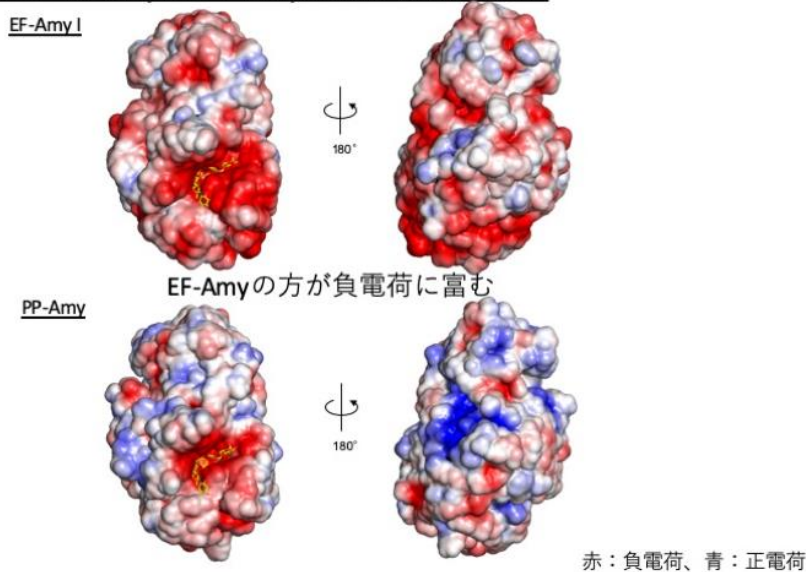
図2 各種酵素の比活性の比較

は熱安定性を維持しながら低温活性を向上させることが明らかとなった。さらに、他の微生物由来のマンナーゼと低温活性(30°C)の比較を行ったところ、ミミズ由来の変異酵素の方が2~4倍比活性の高いことが明らかとなった(図2)。本酵素は低温下で利用する上で優位性を有することを明らかにした。

(2)ミミズ由来の低温適応性生デンプン分解酵素の構造と機能の解析に関する研究を行った。ミミズには2種類の生デンプン分解酵素(Ef-AmyIとEf-AmyII)が存在している。Ef-AmyIとEf-AmyII は各種デンプン基質(アミロースやアミロペクチン)に対する特異性が異なっていることや分解産物の組成が異なっていることを明らかにしている。この基質に対する特異性をはじめ性質の違いを明らかにするために構造と機能に関する研究を行った。2種類の生デンプン分解酵素遺伝子(Ef-AmyI, Ef-AmyII)をクローニングし、異種宿主発現系を用いて酵素

を高発現させた。これらの2種類の生デンプン分解酵素は低温・酸性条件下で高活性を示した。さらに～15%のアルコール存在下でも高い活性を示した。これより、本酵素は連続糖化発酵法によるバイオエタノール

図3. EF-Amy IとPP-Amyの比較（表面電荷）



生産に利用できることを明らかにした。生デンプン分解酵素(Ef-AmyI)の結晶構造を明らかにしたところ、GH Family 13に属する動物由来のPp-Amy (PDB:1PIG)と構造の類似性が見られた(図3)。また、ミズミズ由来のセルラーゼ同様、酵素表面電荷がマイナスに富んでいることが明らかとなった。低温適応性との関連が示唆された。さらに、Ef-Amy IIに

Ca<sup>2+</sup>イオン結合部位が存在し、分子の構造安定性に寄与すると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

① Mitsuhiro Ueda, Yu Hirano, Hiroaki Fukuhara, Yuki Naka, Masami Nakazawa, Tatsuji Sakamoto, Taro Tamada, Gene cloning, expression and X-ray crystallographic analysis of a beta-Mannanase from *Eisenia fetida*. *Enzyme and Microbial Technology*, 査読有り, 117, 2018, 15-22. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.05.014>

② Alireza Arastoo, Masami Nakazawa, Tatsuji Sakamoto, Hitoshi Kobayashi, Kenji Ouchi, Satoshi, Inatomi, Mitsuhiro Ueda, Changes of trehalose content and trehalose-degrading activity during fruit-body formation and autolysis in *Pleurotus* sp. *Mycoscience*, 査読有り, 59, 2018, 479-482.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.05.002>

③ Mitsuhiro Ueda, Yuta Konemori, Masami Nakazawa, Tatsuji Sakamoto, Minoru Sakaguchi, Heterologous expression and characterization of a cold-adapted endo-1,4-β-glucanase gene from *Bellamyia chinensis laeta*. 査読有り, *Process Biochemistry*, 74, 2018, 28-34.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.008>

④ Mitsuhiro Ueda, Takashi Shioyama, Kei Nakadoi, Masami Nakazawa, Tatsuji Sakamoto, Takeo Iwamoto, Minoru Sakaguchi, Cloning and Expression of a Chitinase Gene from *Eisenia fetida*, 査読有り, 104, 2017, 1648-1655. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.140>

⑤ 櫻井俊輔, 中澤昌美, 阪本龍司, 深田はるみ, 上田光宏, 好熱性細菌 *Ralstonia* sp. A-471 由来新奇 GH Family 23 キチナーゼ C に含まれる CBM Family 12 キチン結合ドメインの解析, キチン・キトサン研究, 査読有り, 23, 1-7, 2017 年

⑥ 上田光宏, 森本和樹, 楠田瑞穂, 中澤昌美, 阪本龍司, 坂口実, 小林仁, 大内謙二, 稲富聡, コナサナギタケ *Paecilomyces farinosus* 由来のセリンエンドペプチダーゼの精製と性質. 査読有り, 日本きのこ学会, 25, 2017, 2017-10.

[学会発表](計18件)

① 柄本佳奈, 平野優, 中澤昌美, 阪本龍司, 玉田太郎, 上田光宏, シマミズ (*Eisenia fetida*) 由来二種の生デンプン分解酵素の機能解析, 第3回次世代生物研究会, 2018 年

- ②中 裕規, 平野 優, 中澤昌美, 阪本龍司, 玉田太郎, 上田光宏, *Eisenia fetida* 由来マンナーゼ活性に及ぼす塩橋の影響について, 第 3 回次世代生物研究会, 2018 年
- ③Hitomi Tachimura, Kei Nakadoi, Shunsuke Sakurai, M. Nakazawa, T. Sakamoto, Mitsuhiro Ueda, Synergic effect of LPMO during the hydrolysis of the crystalline chitin by chitinase A from *Paenibacillus* sp. 第 14 回キチン・キトサン国際学会 第 12 回アジア太平洋キチン・キトサンシンポジウム, 2018 年
- ④Y. Naka, Y. Hirano, M. Nakazawa, T. Sakamoto, T. Tamada, M. Ueda (中裕規君: Student Poster Award を受賞), Structural and functional analysis of carbohydrate hydrolases from *Eisenia fetida*. 第 14 回キチン・キトサン国際学会 第 12 回アジア太平洋キチン・キトサンシンポジウム, 2018 年
- ⑤ 玉田太郎, 平野優, 中裕規, 上田光宏, Improving the low-temperature activity of  $\alpha$ -mannanase based on its structural information. AsCA2018/CRYSTAL32, ポスター(国際), 2018 年
- ⑥ 玉田太郎, 平野優, 中裕規, 上田光宏, *Eisenia fetida* 由来酵素の構造安定性と低温活性の相関, 平成 30 年度日本結晶学会年会, ポスター(国内), 2018 年
- ⑦ 玉田太郎, 平野優, 中裕規, 上田光宏, *Eisenia fetida* 由来酵素の構造安定性と低温活性の相関, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, ポスター(国内), 2018 年
- ⑧中 裕規, 平野 優, 中澤昌美, 阪本龍司, 玉田太郎, 上田光宏, *Eisenia fetida* 由来マンナーゼ活性に及ぼす塩橋の影響について(口頭発表にセレクトされる)2017 年度生命科学系学会合同年次大会
- ⑨平野 優, 有木真吾, 中裕規, 上田光宏, 玉田太郎, シマミズ由来生デンプン分解酵素の低温活性保持機構, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会
- ⑩中 裕規, 平野 優, 中澤昌美, 阪本龍司, 玉田太郎, 上田光宏, *Eisenia fetida* 由来マンナーゼ活性に及ぼす塩橋の影響について, 第 2 回次世代生物研究会, 2017 年度
- ⑪上田光宏, 低温適応性を有する生デンプン分解酵素のバイオエタノール生産並びに食品製造・加工への利用に関する研究, 第 2 回次世代生物研究会(シンポジウム), 2017 年度
- ⑫ 上田光宏, ミズ由来低温活性を有する生デンプン分解酵素の発見とバイオエタノール生産並びに食品製造・加工への利用, 第 2 回大学教授達と語る 産学共同研究 新商品開発のポイント 一般社団法人機能性健康米協会 2017 年 7 月
- ⑬Mitsuhiro Ueda, Effect of LPMO during the hydrolysis of the crystalline chitin by chitinase A from *Paenibacillus* sp. 13th EUCHIS / 8th SIAQ Conference 2017 年 5 月 31 日
- ⑭平野優, 福原宏章, 有木真吾, 上田光宏, 玉田太郎, シマミズ由来  $\alpha$ -アミラーゼと  $\beta$ -マンナーゼの結晶構造解析, 日本結晶学会平成28年度大会 2016 年 11 月 17 日
- ⑮平野 優, 福原宏章, 有木真吾, 中裕規, 上田光宏, 玉田太郎, シマミズ由来  $\alpha$ -アミラーゼと  $\beta$ -マンナーゼの結晶構造解析, 2016年度日本結晶学会大会 2016 年 11 月 17 日
- ⑯上田光宏, ミズに学ぶバイオ燃料生産, 積水化学 自然に学ぶものづくりフォーラム 2016 2016 年 10 月 14 日
- ⑰Mitsuhiro UEDA, Cloning and expression of chitin hydrolyzing enzyme genes from *Eisenia fetida*. 11TH ASIA PACIFIC CHITIN AND CHITOSAN SYMPOSIUM & 5TH INDIAN CHITIN AND CHITOSAN SOCIETY SYMPOSIUM 2016 年 9 月 28 日
- ⑱中土井啓, 中澤昌美, 阪本龍司, 尾形善之, 坂口実, 上田光宏, ミズ(*Eisenia fetida*)由来のキチン分解関連酵素遺伝子のクローニングと異種宿主発現, 日本キチン・キトサン学会大会 2016 年 8 月 8 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 2 件)

名称: 低温活性が改善された酵素及びその作成方法

発明者: 玉田太郎, 平野 優, 上田光宏

権利者: 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構(QST)

種類: 特許

番号:特願 2017-219234  
出願年:2017年11月14日  
国内外の別:国内

名称: デンプン分解酵素, それをコードする核酸, 及びその利用  
発明者:上田光宏, 若山祥夫

権利者:大阪府立大学, 株式会社らいむ

種類:特許  
番号:特願 2017-170907  
出願年:2017年9月6日  
国内外の別:国内

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

上田光宏の Reseachmap <https://researchmap.jp/read0043892/>

玉田太郎の Reseachmap <https://researchmap.jp/read0208855/>

次世代生物研究会 <https://sites.google.com/site/jisedaiseibutukenkyuukai/>

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構\_玉田先生のホームページ

<https://www.qst.go.jp/site/taka/2183.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:玉田太郎

ローマ字氏名: Tamada taro

所属研究機関名:国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構(QST)

部局名:量子生命科学領域 構造生物学研究グループ

職名:上席研究員(定常)

研究者番号(8桁):50391248

### (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。