

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：34315
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K05803
 研究課題名(和文) -1,3-グルカン含有生分解性複合樹脂ならびにその再資源化に資する酵素の開発
 研究課題名(英文) Development of bio-degradative composite resin containing alpha-1,3-glucan and enzyme for its recycling
 研究代表者
 若山 守(WAKAYAMA, MAMORU)
 立命館大学・生命科学部・教授
 研究者番号：70240455
 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)：和文： -1,3-グルカンはグルコースが -1,3-結合をした多糖で、口腔内の虫歯菌の棲家あるいはカビやキノコの細胞壁に存在する多糖である。身近に存在している割にはこれまであまり研究されてこなかった多糖であるが、近年注目されはじめ、徐々に研究報告が増えて来ている。我々は、虫歯菌の酵素をもちいて -1,3-グルカンの効率的合成法を確立するとともに -1,3-グルカンを分解する酵素の立体構造を世界に先駆けて解明した。本研究では、 -1,3-グルカンを部分的にカルボキシメチル修飾した機能性生分解性ポリマーの合成とその特性評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 持続可能な社会の構築を目指して様々な取り組みが行われている。我々の周りは石油を原料とする難分解性プラスチックで満ち溢れ、それが生態系の維持を脅かしていることから、これらの石油由来のプラスチックを使用しない取り組みが進みつつある。一方で生分解性プラスチックの需要は高まっており、本研究対象である alpha-1,3-グルカンも微生物酵素によって分解可能なポリマーであり、そのカルボキシメチル誘導体も酵素分解、微生物分解が可能な環境にやさしい素材としての利用が期待できる。特に、その分解に関わる酵素の研究について、その立体構造を世界に先駆けて解明したことは本研究成果の重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Alpha-1,3-glucan, alpha-1,3-linked homopolymer of glucose, is the main component of extracellular polysaccharides synthesized from sucrose from *Streptococcus mutans*, bacteria found in tooth cavities and the cell wall component of some filamentous fungi. There have been little reports on synthesis and degradation of this glucan. Application of alpha-1,3-glucan has recently been received increased attention. We have developed enzymatic synthesis of alpha-1,3-glucan by using glycosyltransferase I from oral *Streptococcus mutans* and clarified three-dimensional structure of alpha-1,3-glucanases which are responsible for degradation of alpha-1,3-glucan first in the world. In this study, we prepared partially carboxymethylated alpha-1,3-glucan with biodegradative property and performed characteristic analysis.

研究分野：応用微生物学、酵素工学

キーワード：alpha-1,3-グルカン alpha-1,3-glucanase 生分解性樹脂 X-線結晶構造解析 機能性 カルボキシメチル化

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

-1,3-グルカン、う蝕生細菌が生産する多糖の主成分として、また、カビやキノコの細胞壁を構成する多糖類に含まれるとして知られている。セルロースやキチンなどの多糖は、さまざまな応用研究が行われている一方で、-1,3-グルカンの応用研究はほとんど行われていない状況であった。機能性樹脂としての可能性を追求する報告が出始めたのは、ごく最近になってからである。-1,3-グルカンの性質として生分解性を有することは、再資源化を行なう上で大きなメリットとなる。一方、-1,3-グルカン加水分解酵素として-1,3-グルカナーゼが知られているが、PubMed 検索では国内外合わせて 27 報が抽出されるのみで、その研究は基礎、応用の両面で全く遅れていた。プラスチック製品不使用の流れが加速するなか、再資源化しやすい代替生分解性樹脂の開発が注目されるようになり、新たな素材として-1,3-グルカンも漸く機能性樹脂の素材として注目され始めるようになったが、その報告例はまだ僅かである。また、その分解に関わる-1,3-グルカナーゼの構造と機能に関するアプローチは皆無であり、基質である多糖認識や触媒反応メカニズムに関する研究報告はなく、その結果、産業利用も遅れている現状にある。

2. 研究の目的

-1,3-グルカン含有する新規の生分解性複合樹脂開発の可能性を追求するとともに、未だ解明されていない本酵素の多糖認識の構造的基盤および触媒反応メカニズムを解明し、-1,3-グルカン含有樹脂の再資源化へ本酵素を利用する足がかりを構築することが本研究課題の核心である。-1,3-グルカン含有する生分解性複合樹脂を開発することで-1,3-グルカンの新たな利用法を開拓すること、同時に、開発した樹脂の再資源化を効率良く行なうため、-1,3-グルカンの分解酵素である-1,3-グルカナーゼの構造解析に基づく高機能化を行なう。すなわち、生分解性新規樹脂開発とその再資源化用酵素の開発をセットで行なうことを目的としている。

3. 研究の方法

<令和元年>

- 1,3-グルカンおよびその他生分解性ポリマーを組み合わせた複合樹脂の合成
Streptococcus mutans 由来のグルコシル基転移酵素(GTF-1)遺伝子を大腸菌 Rosetta-gami B (DE3)にクローニングした高発現系により GTF-1 を大量調製する。-1,3-グルカン直接熱可塑性のあるポリ-L-乳酸やポリ-L-カプロラクタム等と複合体化し、熱可塑性あるいは熱硬化性を付与した生分解性複合樹脂を作製する。

- 1,3-グルカナーゼの触媒・基質結合メカニズムの解明

Paenibacillus glycanilyticus HF11 由来の 2 種類の -1,3-グルカナーゼ(AgIFH1 と AgIFH2)のうち AgIFH1 の触媒ドメイン構造解析の基本データを報告し、現在、AgIFH2 と糖質結合ドメインの解析を進めている。アミノ酸置換(D331A, D354A, D355A)を施した変異酵素の触媒特性評価と-1,3-ニゲロオリゴ糖(4糖)との複合体結晶の構造解析を行う。

<令和2年>

- 調製した-1,3-グルカン含有生分解性複合樹脂について、GPCによる分子量測定、FT-IRによる構造解析、スパイラルフロー計測による熱可塑性測定・熱硬化性測定およびSEM形態観察の物性試験および、吸水性試験、官能基(カルボキシメチル基などのイオン交換基等)導入試験を実施する。

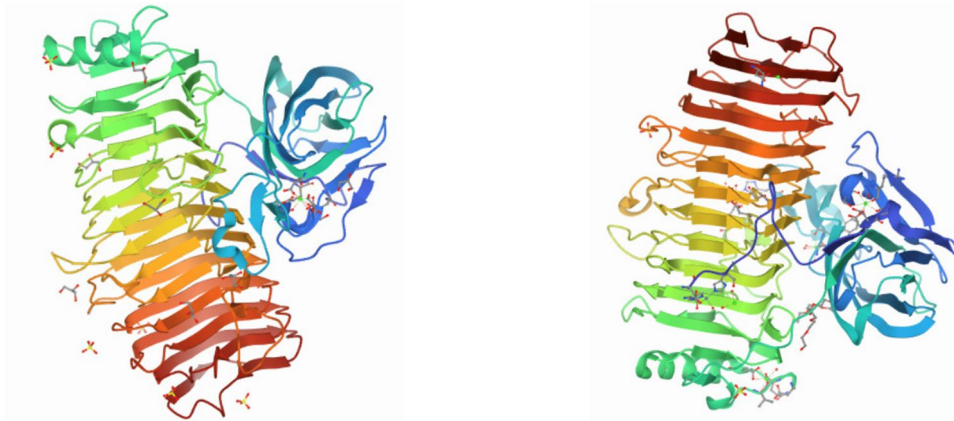
- 基質認識・結合ドメインに高度に保存されているトリプトファン、フェニルアラニン等の芳香族アミノ酸残基に部位特異的変異を導入する。作製した変異体の基質認識・結合機能を水晶発振子マイクロバランス法等により分析する。

<令和3年>

- 1,3-グルカン含有生分解性複合樹脂に対する触媒能ならびに基質結合能を強化した変異酵素の作製と触媒・基質結合能の評価を行い、-1,3-グルカナーゼを利用した効率再資源化の総合評価を実施する。

4. 研究成果

<令和元年> 本年度は、*Streptococcus mutans* 由来のグルコシル基転移酵素(GTF-1)遺伝子を操作することにより、組換え GTF-1 の生産性を向上させることに成功した。その結果、-1,3-グルカンの収率も最高で 40 倍に高めることが可能となり、生分解性複合樹脂の合成検討に進むことが可能となった。一方、調製した生分解性複合樹脂の再資源化を可能とする -1,3-グルカナーゼに関して、新規 -1,3-グルカナーゼを見出し、諸性質を明らかにするとともに、大腸菌における高発現系の構築を行った。また、-1,3-グルカナーゼとしては初めてとなる X-線結晶構造解析を行い、2 種類の -1,3-グルカナーゼの触媒ユニットの立体構造を明らかにした(図 1)。

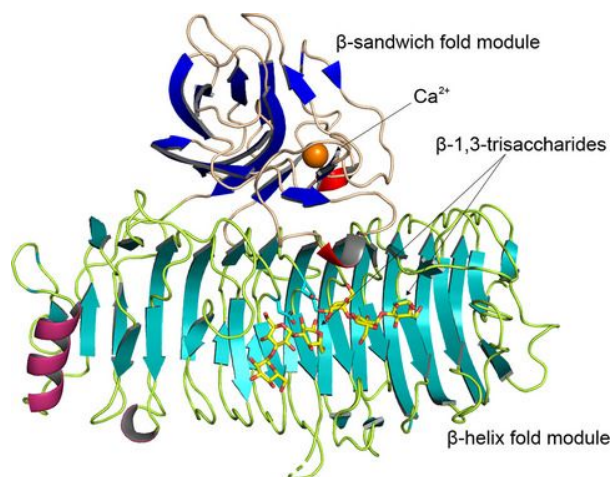


3D structure of CatAgl-FH1

3D structure of CatAgl-KA

(図 1)

<令和2年> 本年度は、本研究課題の目的の1つである -1,3-グルカンの高機能化の1つとしてのカルボキシメチル化樹脂の作製と修飾樹脂の特性解析を行った。一方、調製した生分解性複合樹脂の再資源化を可能とする -1,3-グルカナーゼに関して、新規耐熱性 -1,3-グルカナーゼとして見出し *Streptomyces thermodiastaticus* 由来 -1,3-グルカナーゼの大腸菌における高発現系の構築を行うとともに、耐熱性 -1,3-グルカナーゼとしては初めて X-線結晶構造解析を行い、耐熱性 -1,3-グルカナーゼの触媒ユニットの立体構造を明らかにした(図 2)。

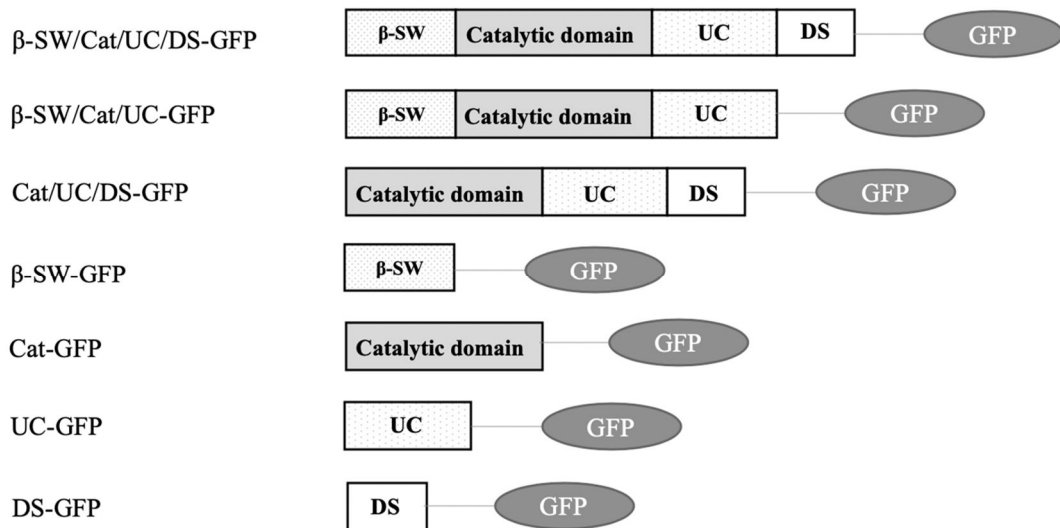


3D structure of Agl-ST1

(図 2)

<令和3年> 本年度は、調製した生分解性複合樹脂の再資源化を可能とする -1,3-グルカナーゼとして見出した、耐熱性菌 *Streptomyces thermodiastaticus* 由来 -1,3-グルカナーゼの

各ドメインと緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質を作製し、各ドメインの構造と基質結合能の関係を明らかにした(図3)。本研究課題の目的の1つである-1,3-グルカンの高機能化の1つとしてのカルボキシメチル(CM)化樹脂の作製と修飾樹脂の特性解析を行った。その結果、-1,3-グルカンのCM化率が最大で0.23の誘導体の合成に成功した。誘導体の熱重量分析をおこなったところ、熱分解温度は260度であった。合成した誘導体は生分解性イオン交換樹脂や抗菌性樹脂等の素材としての利用可能性が示された。



(図3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Panti N, Cherdvorapong V, Itoh T, Hibi T, Suyotha W, TYano S, Wakayama M	4. 巻 67
2. 論文標題 Functional analysis of alpha-1,3-glucanase domain structure from Streptomyces thermodiastaticus HF3-3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 85-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2020.07.003	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 該当する
1. 著者名 Cherdvorapong V, Panti N, Suyotha W, Tsuchiya Y, Toyotake Y, Yano S, Wakayama M	4. 巻 66
2. 論文標題 Prevention of oral biofilm formation and degradation of biofilm by recombinant alpha-1,3-glucanase from Streptomyces thermodiastaticus HF3-3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 256-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2019.11.003	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 該当する
1. 著者名 Itoh T, Panti N, Hayashi J, Toyotake Y, Matsui D, Yano S, Wakayama M, Hibi T	4. 巻 533
2. 論文標題 Crystal structure of the catalytic unit of thermostable GH87 alpha-1,3-glucanase from Streptomyces thermodiastaticus strain HF3-3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1170-1176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.133	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 S. Yano, W. Suyotha, N. Oruro, T. Matsui, S. Shiga, T. Itoh, T. Hibi, Y. Tanaka, M. Wakayama, K. Makabe	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structure of the catalytic unit of GH87-type -1,3-glucanase AgI-KA from Bacillus circulans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51822-5	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 該当する

1. 著者名 T. Itoh, R. Intuy, W. Suyotha, J. Hayashi, S. Yano, K. Makable, M. Wakayama, T. Hibi	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural insights into substrate recognition and catalysis by glycoside hydrolase family 87 -1,3-glucanase from <i>Paenibacillus glycanilyticus</i> FH11	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15161	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 該当する

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 小倉太一, 大垣内誠, 豊竹洋佑, 松井大亮, 若山守
2. 発表標題 -1,3-グルカンを用いた新規機能性素材の開発
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Niphawan Panti, Vipavee Cherdvorapong, Wassana Suyotha, Kazuyoshi Takagi, Shigekazu Yano, Yosuke Toyotake and Mamoru Wakayama
2. 発表標題 Domain structure and function of -1,3-Glucanase from <i>Streptomyces thermodiastaticus</i> HF3-3
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Intuy Rattanaporn, Hibi Takao, Itoh Takafumi, Suyotha Wasana, Yano, Shigekazu, Mamoru Wakayama
2. 発表標題 Characterization of catalytic -1,3-glucanase isozymes from <i>Paenibacillus glycanilyticus</i> FH11 by using <i>Brevibacillus</i> system; Essential for suppression and degradation of <i>Streptococcus mutans</i> biofilms
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamoru Wakayama, Vipavee Cherdvorapong, Yosuke Toyotake
2. 発表標題 Inhibition of Streptococcus biofilm formation and its degradation by Streptomyces -1,3-glucanases
3. 学会等名 6th World Congress and Expo on Applied Microbiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Niphawan Panti, Vipavee Cherdvorapong, Wassana Suyotha, Kazuyoshi Takagi, Shigekazu Yano, Yosuke Toyotake and Mamoru Wakayama
2. 発表標題 Structure and Function of -1,3-Glucanase from Streptomyces thermodiastaticus HF3-3
3. 学会等名 International Conference on Enzymology and Molecular Biology, Enzyme2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Intuy Rattanaporn, Hibi Takao, Itoh Takafumi, Suyotha Wasana, Yano, Shigekazu, Mamoru Wakayama
2. 発表標題 Characterization of catalytic -1,3-glucanase isozymes from Paenibacillus glycanilyticus FH11 by using Brevibacillus system; Essential for suppression and degradation of Streptococcus mutans biofilms
3. 学会等名 Biochemical and Molecular Engineering XXI (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	日比 隆雄 (HIBI TAKAO) (00285181)	福井県立大学・生物資源学部・教授 (23401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	武田 陽一 (TAKEDA YOICHI) (20423973)	立命館大学・生命科学部・教授 (34315)	

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