

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：84431

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06027・19K21164

研究課題名（和文）広範な基質認識を示すバイオマス糖化用アクセサリ酵素の作出

研究課題名（英文）Development of multiple glycosyl hydrolase for biomass degradation

研究代表者

大橋 博之（Ohashi, Hiroyuki）

地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・研究員

研究者番号：10826184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：X線結晶構造が解析されていないタンパク質の熱安定性と、基質特異性の同時改変を行った。ダイコン由来アラビノフラノシダーゼをモデルタンパク質とし、データベースに登録されているタンパク質構造と比較することで、酵素の予測3Dモデルを構築した。このモデルを使用して分子モデリングを行うことで、改変のターゲットとなるアミノ酸残基を決定した。アミノ酸残基の置換や挿入といった改変を加え、評価を行ったところ、バイオマスから2種類の糖を遊離することが可能な、熱安定性の向上した酵素を取得することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

X線結晶構造が得られていない場合、酵素活性部位の部位特異的改変は困難な場合が多い。特に、バイオマス分解に関わる酵素は、有用な活性を持っていても熱に不安定なものが多く、産業用酵素としての利用が困難なものが多い。また、バイオマスの分解に必要なが、発見されていない酵素もある。本研究により、分子モデリング技術の利用により、結晶構造が未知なものに関しても、熱安定性の改善や新たな基質特異性を素材となる酵素に付与できることが示された。これにより、バイオマス産業用酵素の開発促進が期待される。

研究成果の概要（英文）：X-ray crystallographic information is the most important and powerful tool for site-specific modification of proteins. However, the X-ray crystal structure of many proteins has not been obtained yet. In recent years, protein databases have been developed and it has become possible to construct predictive structures of proteins with high accuracy. In this study, we used arabinofuranosidase from radish as a model for a structure-unknown protein and attempted to simultaneously modify its thermal stability and substrate properties. As a result, an enzyme that could hydrolyze multiple sugars with improved thermal stability was obtained. In this study, it was shown that it is possible to generate enzymes with an added function by applying molecular modeling techniques to proteins without a crystal structure.

研究分野：酵素工学

キーワード：酵素機能改変 植物細胞壁 多糖分解酵素 アラビノフラノシダーゼ バイオマス分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁は、セルロースを基本骨格とし、ヘミセルロースやペクチンといったマトリックス多糖類で充填されている。バイオマス糖化工程の効率化には、セルラーゼのセルロースへのアクセス向上が重要であるが、酵素は細胞壁内部への浸潤性が低い。そのため、化学的・物理的な処理や、各種アクセサリー酵素によるマトリックス多糖類の分解による糖化効率の向上が計られる。マトリックス多糖類分解酵素は市販されているものも多いが、酵素の供給に高いコストが必要である。複数の基質特異性を有する酵素を作出することは、使用する酵素の種類を減少させる目的だけでなく、酵素活性を相互に補完することによる糖化効率の向上も期待できる。近年、機能ドメイン周辺の結晶構造解析結果を基に、グルコース及びキシロースを認識する加水分解活性が付与された *T. reesei* 由来キシロシダーゼの作出が報告される (Z. Q. Beck *et al.* 2017) など、複数の基質特異性を有するバイオマス分解酵素の研究が活発になりつつある。

酵素の機能改変として、ランダムに変異を導入したのち、目的機能を持つ酵素をスクリーニングする手法や、X線結晶構造を用いたシミュレーションに基づき部位特異的変異を導入する手法が用いられてきた。結晶構造が解明されていない場合、改変のターゲットとなるアミノ酸残基を決定することは困難である。近年ではタンパク質データベースが充実し、ホモロジーモデリングなどによる予測 3D 構造の構築が可能となりつつある。

本研究は、結晶構造が未知な大根由来アラビノフラノシダーゼ (RsAraf1) をモデルタンパクとし、分子モデリング技術を用いることで、熱安定性と複数の糖に対する加水分解活性を同時に付与する。予測立体構造を用いて部位特異的改変を行い、複数の機能を酵素に付与するという、バイオマス糖化酵素の新規改変アプローチを創出する。

2. 研究の目的

本研究は、マルチな基質特異性と温度安定性を有するヘミセルロース分解酵素の作出を目的とする。バイオリファイナー技術の初期段階に必須な植物細胞壁多糖類の糖化に使用可能な、マルチな基質特異性を有する糖質加水分解酵素の開発技術を得る。

3. 研究の方法

(1) RsAraf1 の立体構造予測モデルの作成

RsAraf1 と相同性の高いタンパク質をリファレンスタンパクとし、分子モデリングツール (BioVIA Discovery Studio: DS2018) を用いたホモロジーモデリング法により、RsAraf1 の予測立体構造の構築を行う。構築した予測立体構造は、Verify-3D、ERRAT2、PROCHECK などのサーバーを用いて品質チェックを行い、最適なモデルを構築する。(なお、構築したモデルは、*in silico* RsAraf1 と呼ぶ)

(2) 変異導入部位の決定

熱安定性の向上は、ジスルフィド結合の導入により行う。導入箇所 (アミノ酸残基のシステインへの置換) は、DS2018 の予測ツールを用いて決定する。基質認識の改変には、基質結合部位の決定が必要である。そこでまず、DS2018 を用い、*in silico* RsAraf1 と候補基質 (アラビノフラノース) をドッキングシミュレーションすることで基質認識部位の決定を行う。基質認識に関わるアミノ酸は、リファレンスタンパク質の酵素活性部位と、*in silico* RsAraf1 の予測基質結合部位の比較を参考に決定する。

(3) 機能改変 RsAraf1 の発現・酵素学的解析

RsAraf1 や機能改変 RsAraf1 は、*Pichia pastoris* 発現系を使用して取得する。部位特異的変異導入法 (PCR 酵素を用いたコドン置き換え) により、(2) で決定した変異導入部位のコドンを置換し、改変 RsAraf1 の発現ベクターを作製する。未改変/改変 RsAraf1 は、培地中に分泌発現させ、培養上清を精製して入手する。酵素学的解析は、T. Kotake *et al.* 2006 の酵素反応条件に倣い、各種 *p*-ニトロフェノール-糖に対する酵素活性を測定する。基質特異性、至適 pH、基質特異性、熱安定性などの諸性質を測定し、作出した酵素を評価する。

(4) 細胞壁マトリックス多糖類に対する分解活性の評価

機能改変 RsAraf1 のバイオマス分解活性の評価は、ヘミセルロースのサブクラスターであるアラビノキシランとアラビノガラクトンを用い、遊離された単糖を測定することで評価する。遊離した単糖は、2-アミノピリジン標識や 3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン (PMP) 標識した後、高速液体クロマトグラフかキャピラリー電気泳動装置による分離により検出し、単糖の定性分析や相対定量分析を行うことで、分解活性の評価を行う。

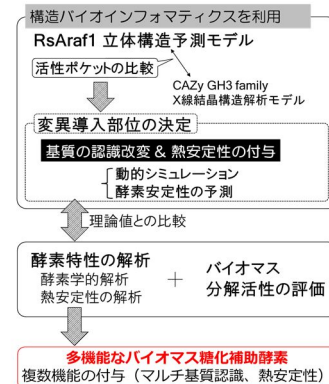


Fig.1 本研究の概要

4. 研究成果

(1) RsAraf1 の立体構造予測モデルの作成

まず、予測シグナル配列を除いた RsAraf1 (RsAraf1-dS) のアミノ酸配列の相同性検索を行った。相同性検索には、タンパク質データバンク (PDB) に結晶構造が登録されているタンパク質を対象として行った。さらに、Carbohydrate Active enZyme (CAZy) で RsAraf1 と同じグループ (糖加水分解酵素ファミリー3: GH3) に属しているものに絞り、系統樹解析を行った。その結果、*Trichoderma reesei* キシロシダーゼ (PDB number: 5AE6) と RsAraf1-dS の相同性が最も高いことが分かった。そこで、分子モデリングツール (BIOVIA Discovery Studio: DS2018) を用い、ホモロジーモデリング法による RsAraf1-dS の予測立体構造 (*in silico* RsAraf1) の構築を行った (Fig. 2)。構築した *in silico* RsAraf1 は、DOPE スコア、MOLPDF スコア、Ramachandran プロットの値を参考に選択し、Verify-3D、ERRAT2、PROCHECK サーバーを用いたクオリティチェックを行った。その結果、構築したモデルは後の変異導入部位の予測に使用するのに充分だと判断した。

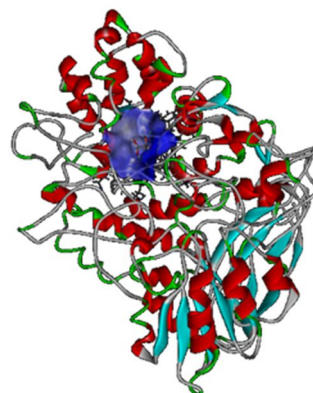


Fig.2 RsAraf1-dS の予測構造

(2) 変異導入部位の決定

まず、酵素活性にかかわるアミノ酸の予測を行った。酵素活性ポケットの予測は、CHARMm minimization protocol を用いて構造最適化を行ったチオアラビノフラノシド-1,5-ガラクトピラノースを基質とし、リガンドドッキングシミュレーションを用いて行った。スルフィド結合を形成する硫黄原子と相互作用するアミノ酸残基や、アラビノフラノースの分子認識に関わるアミノ酸残基は、リガンドドッキングスコアと原子間距離、使用したリファレンスタンパク質の酵素活性部位情報を参考に決定した。

熱安定性は、タンパク質に本来存在しないジスルフィド結合を新たに導入することで、改善を図った。新たに導入するジスルフィド結合は、DS2018 のプログラムの 1 つである、Design Protein tools を用い、導入部位を予測した。導入するジスルフィド結合は、候補となるアミノ酸残基をシステインに置換した後、再度、ホモロジーモデリング法による予測構造の構築、リガンドドッキングを行うことでターゲットを決定した。その結果、酵素活性ポケットに影響を与えず、ジスルフィド結合を形成する 2 つのジスルフィド結合導入箇所 (195-258 位、308-339 位) が決定された。なお、195-258 に導入した RsAraf1 を、MC-HR1、308-339 に導入した RsAraf1 を、MC-HR2、2 つのジスルフィド結合を導入した RsAraf1 を MC-HR3 と呼称する。

基質特異性の改善は、基質認識に関わるアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換し、各種 1-チオ糖との結合をシミュレーションすることで、酵素認識の変化を予測した。また、酵素活性に関与するアミノ酸の近傍にアラニンを挿入し、ホモロジーモデリングによる予測構造を構築、酵素活性部位の変化をシミュレートしたところ、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトースを認識すると予測される挿入部位 (131 位と 132 位の間) が予測された。

(3) 機能改変 RsAraf1 の発現・酵素学的解析

まず、RsAraf1-dS、MC-HR1、MC-HR2、MC-HR3 を *P. pastoris* 発現系を用い、ヒスチジンタグ融合タンパク質として培地中に分泌発現させた。CBB 染色および、Anti-His tag IgG-HRP 抗体を用いたウエスタンブロットングにより培養上清を確認したところ、目的タンパク質の発現が確認できた (Fig. 3)。培養上清を硫酸沈殿後、ニッケルカラムによりアフィニティー精製し、粗精製酵素液を得た。得られた酵素液を用いて酵素活性測定を行った。

各酵素の熱安定性を確認したところ、RsAraf1-dS の残存活性が検出されなくなる 45 - 50 において、MC-HR1 ~ 3 は活性を維持していることが分かった (Fig. 4)。特に、MC-HR3 は 45 における残存活性が >75% であり、非常に高い熱安定性を示した。なお、これらの酵素の基質特異性は、RsAraf1-dS と同等だった。

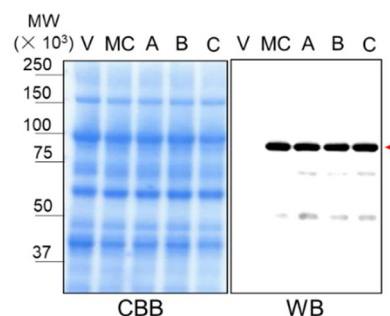


Fig.3 各変異酵素の検出結果
ウエスタンブロットング解析 (WB) には、Anti-His tag IgG-HRP 抗体を用いた。V: コントロール、MC: RsAraf1-dS、A: MC-HR1、B: MC-HR2、C: MC-HR3

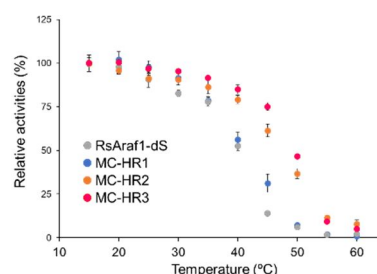


Fig.4 各変異酵素の残存活性
各温度で 30 分間インキュベートした後、30 で残存活性を測定した。15 における残存活性を 100% とし、相対活性で表している。

最も高い熱安定性を示した MC-HR3 に対し、酵素活性部位への変異導入を行った。MC-HR3 の基質認識に関わるアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換したもの (MC-HR3-CD1) と、酵素認識ポケット近傍にアラニンを挿入したもの (MC-HR3-CD2) を取得し、熱安定性と基質選択性を測定した。MC-HR3-CD1、CD2 ともに RsAraf1-dS よりも高い熱安定性を示した (Fig. 5A)。また、MC-HR3-CD1 はキシロシダーゼ活性を示し、MC-HR3-CD2 はアラビノフラノシダーゼ活性と、キシロシダーゼ活性を両方示した (Fig. 5B)。MC-HR3-CD1 の結果より、アラビノース、キシロースの認識に関

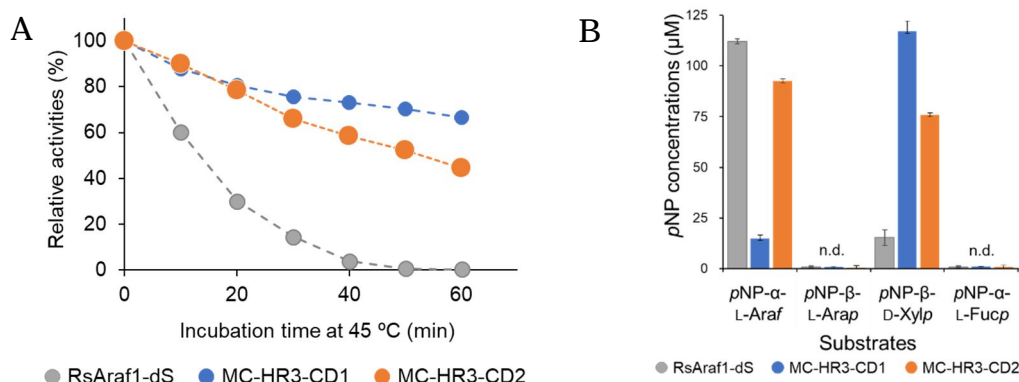


Fig.5 変異酵素の熱安定性および基質特異性
RsAraf1-dS、MC-HR3-CD1 および CD2 の 45 における残存活性の変化 (A) と基質特異性 (B)

与するアミノ酸残基を特定することができた。また、MC-HR2-CD2 の結果より、酵素活性部位近傍にアラビノースを挿入することで基質に対する特異性が低下し、複数の基質を認識可能になったと考えられた。

(4) 細胞壁マトリクス多糖類に対する分解活性の評価

分解活性の評価に先立ち、PMP 標識単糖のキャピラリー電気泳動による分離条件の検討を行った。その結果、10 mM SDS を含むホウ酸-NaOH pH 11 の溶液を電気泳動液として用い、キャピラリー温度 55 で泳動を行うことで、測定の繰り返し再現性良く測定が可能であることが分かった。この分析条件は、比較的短時間で汎用機器を用いて分離でき、省溶媒であるという点で、既存の手法よりも優位だった。

構築した単糖分析条件を用い、バイオマス分解活性を評価した。RsAraf1-dS、MC-HR3、MC-HR3-CD2 を、植物細胞壁を構成する各種多糖類に作用させ、遊離された単糖を測定した。その結果、本研究で作出した改変酵素によりキシロースやアラビノースが遊離されたため、バイオマス分解活性を維持していることが分かった。

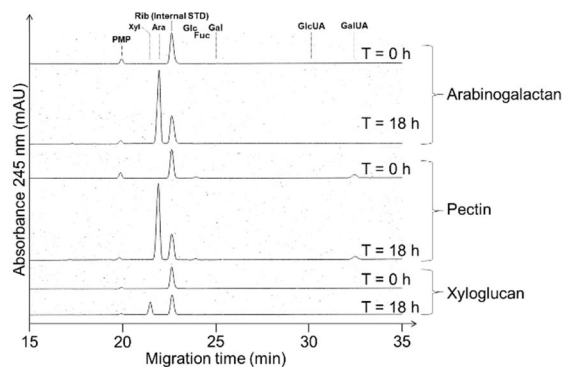


Fig.6 MC-HR3 のバイオマス分解活性

植物細胞壁を構成する多糖類に、MC-HR3 を作用させ、反応溶液中に遊離された単糖を、キャピラリー電気泳動により測定した。PMP: 3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン、Xyl: キシロース、Ara: アラビノース、Rib: リボース (インターナルスタンダード)、Glc: グルコース、Fuc: フコース、Gal: ガラクトース、GlcUA: グルクロン酸、GalUA: ガラクツロン酸

(5) まとめ

X線結晶構造が得られていない場合、酵素活性部位の部位特異的改変は困難な場合が多い。特に、バイオマス分解に関わる酵素は、有用な活性を持っていても熱に不安定なものが多く、産業用酵素としての利用が困難なものが多い。また、バイオマスの分解に必要なが、発見されていない酵素もある。本研究により、分子モデリング技術の利用により、結晶構造が未知なものに関しても、熱安定性の改善や新たな基質特異性を素材となる酵素に付与できることが示された。これにより、バイオマス産業用酵素の開発促進が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大橋博之、駒大輔、山中勇人、森芳邦彦、大本貴士
2. 発表標題 ダイコン由来アラビノフラノシダーゼの特性解析と熱安定性の付与
3. 学会等名 酵素・補酵素研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋博之、駒大輔、山中勇人、森芳邦彦、大本貴士
2. 発表標題 分子モデリング技術を活用したL-アラビノフラノシダーゼの機能改変
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----