

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 年度～2010 年度

課題番号：20580071

研究課題名（和文） 麹菌由来キシラン分解エステラーゼの構造・機能の解明

研究課題名（英文） Structural and functional analyses of xylan-degrading esterases from koji-mold

研究代表者

小関 卓也 (KOSEKI TAKUYA)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：70372191

研究成果の概要（和文）：次世代のバイオエタノール開発のための未利用植物バイオマスの分解に寄与するエステラーゼの構造と機能を明らかにすることを目的とした。*A. oryzae* ゲノム情報を基盤とした新規フェルラ酸エステラーゼの特徴付けを行い、また、フェルラ酸エステラーゼとアラビノース結合モジュールとのキメラ酵素を造成し、その特性を解析した。さらに、本研究の過程でパラベンエステラーゼが糸状菌では初めて明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study we report the relationship between structure and function of the esterases involved in the degradation of plant cell wall. Based on the *Aspergillus oryzae* genomic database, we characterized a novel ferulic acid esterase and a chimeric enzyme comprising ferulic acid esterase and family 42 carbohydrate-binding module. Moreover, we characterized a novel *A. oryzae* esterase that hydrolyzes 4-hydroxybenzoic acid esters.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：植物バイオマス、ヘミセルロース、フェルラ酸エステラーゼ、麹菌、*Aspergillus oryzae*

1. 研究開始当初の背景

ヘミセルロースの主要なアラビノキシランは側鎖が非常に複雑で、その分解酵素も主鎖を加水分解するエンド及びエキソ型のキシラナーゼに加えて、 α -L-アラビノフラノシダーゼ、 α -グルクロニダーゼ、アセチルキシランエステラーゼ、フェルラ酸エステラーゼなどアクセサリー酵素と呼ばれる側鎖を加水分解する酵素が必要とされている。フェルラ

酸はまた、細胞壁中でヘミセルロース・リグニン間などの架橋を形成し、細胞壁の機能に重要な働きをしている。一方、麹菌は多様な酵素を生産し、酵素の宝庫と言われており、麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノムデータベースには植物細胞壁分解エステラーゼと相同性を有する ORF が複数存在するが、酵素タンパク質としての報告はない。

2. 研究の目的

植物細胞壁の側鎖分解酵素（アクセサリー酵素）はこれまであまり注目されず、主鎖を分解する酵素が主に解析されてきた。側鎖構成成分のフェルラ酸は抗酸化性や血圧降下を有することが知られており、フェルラ酸エステラーゼはバイオマスの高度利用、再資源化、および健康食品素材の開発などに期待されている。*A. oryzae*にはゲノム情報により、他の *Aspergillus* 属のフェルラ酸エステラーゼと若干の相同性を持つが、機能が未同定な遺伝子が複数存在する。タンニン酸加水分解酵素タンナーゼなどもフェルラ酸エステラーゼと若干の相同性を有する。本研究では新規なエステル分解酵素相同遺伝子の異種発現系による発現、リコンビナント酵素の性質などを解析し、特に、フェノール酸のエステル分解酵素の構造機能相関を明らかにする。その情報からジフェルラ酸エステルを高度に分解するエステラーゼの創成を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *A. oryzae* の typeC フェルラ酸エステラーゼ様遺伝子をコードするタンパク質の発現と解析

A. oryzae のゲノムデータベースでは *A. niger* および *Talaromyces stipitatus* の typeC フェルラ酸エステラーゼ (AniFAEC および TsFAEC) と 50% 程度の相同性を有する ORF が数個存在し、これらは *A. nidulans* の AndFAEB と 50% 程度の相同性があり、それぞれの遺伝子を酵母 *Pichia pastoris* での発現を試みる。本発現系では酵母 α -factor のシグナル配列を利用した菌体外発現系で行った。発現したタンパク質は HPLC により精製し、精製したリコンビナント酵素を用いて、酵素の特徴付けを行った。特に、それぞれのリコンビナント酵素のフェノール酸エステルに対する基質特異性について詳細な解析を行った。

(2) フェルラ酸エステラーゼとアラビノース結合モジュールとのキメラ酵素のキシラン分解に及ぼす影響

Aspergillus kawachii の α -L-アラビノフラノシダーゼ C 末端に見出されたキシラン側鎖のアラビノフラノースに特異的に結合する新規なアラビノース結合モジュール (AkCBM42) を *A. awamori* フェルラ酸エステラーゼに融合させたキメラ酵素を造成し、未利用植物バイオマスの効率的酵素分解を行うことを目的とした。*A. awamori* NBRC4033 株由来フェルラ酸エステラーゼ遺伝子と AkCBM42 (G1y336-Ser499) をコードする遺伝子とのキメラ酵素遺伝子を PCR 法により構築し、酵母 *Pichia pastoris* により発現させキ

メラ酵素を取得した。培養上清中に分泌されたキメラ酵素を精製し、精製酵素を用いてキシラン分解特性等を調べた。

(3) 糸状菌由来の新規パラベンエステラーゼの同定

フェルラ酸エステラーゼは同じく糸状菌タンナーゼ (EC 3.1.1.20) とアミノ酸レベルでそれほど高くはないものの類似性があり、同じファミリーに分類されている。タンナーゼは茶飲料やワインの混濁防止に欠かせない酵素である。*Aspergillus oryzae* のゲノム情報から上記フェルラ酸エステラーゼやタンナーゼの活性中心であるセリン残基近傍のモチーフが一致した遺伝子配列を見いだした。この遺伝子配列は *A. niger* など他の糸状菌にも類似配列が存在し、アミノ酸配列全体の相同性はフェルラ酸エステラーゼやタンナーゼとは 20% 程度と機能的に別個な酵素の可能性が示唆された。そこで、この遺伝子のクローン化と高生産が期待できる *Pichia pastoris* によるリコンビナント酵素の取得、リコンビナント酵素の特性解析を行った。

4. 研究成果

(1) *A. oryzae* 由来 2 つのフェルラ酸エステラーゼの特徴付け

フェルラ酸エステラーゼは、フェルラ酸メチル (MFA)、*p*-クマール酸メチル (MpCA)、カフェ酸メチル (MCA) およびシナピン酸メチル (MSA) に対する特異性で分類されてきた。タイプ A 酵素は MCA は分解せず、MSA に対し高い活性を示すこと、タイプ B 酵素は MSA は分解せず、MpCA および MCA に対し高い活性を示すこと、タイプ C およびタイプ D 酵素は広い特異性を示すことで分類され、また、タイプ A およびタイプ D 酵素はヘミセルロース架橋を形成している二量体フェルラ酸の遊離能があることでも分類されている。しかしながら、その後、アミノ酸配列はタイプ C に類似しているものの、MSA が分解できない酵素がいくつか報告された。*A. oryzae* ゲノム情報を基にタイプ C 酵素のアミノ酸配列に相同性のある 2 つの遺伝子 (*AofaeB* および *AofaeC*) をクローニングし、酵素機能を解析した。その結果、*AofaeB* の基質特異性はタイプ B 酵素のように MSA を分解できなかったが、*AofaeC* は MSA を分解し、アミノ酸配列は類似しているものの、その基質特異性は異なることが分かった。また、両酵素は *A. oryzae* のタンナーゼと類似しているが、タンナーゼ活性はなく、しかしながら、既知のクロロゲン酸エステラーゼとの類似性はなかったものの、クロロゲン酸 (カフェオイルキナ酸) に対する特異性を示した。

(2) フェルラ酸エステラーゼとアラビノース

結合モジュールとのキメラ酵素のキシラン分解に及ぼす影響

①AwFaeA-CBM42の発現および精製

P. pastoris 培養上清中のエステラーゼ活性は野生型 AwFaeA と同程度を示し、培養上清から陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。SDS-PAGE より AwFaeA-CBM42 の分子量は 53,000 で、AwFaeA の 35,000 より大きく、また、抗 AwFaeA 抗体および抗 AkAbf54 抗体を用いたウェスタン解析によりキメラ酵素タンパク質が確認された。

②AwFaeA-CBM42のキシランへの結合

AwFaeA はほとんどがアラビノキシラン非結合画分から確認されたが、AwFaeA-CBM42 はアラビノキシラン結合画分に顕著なバンドが見いだされ、アラビノキシランへの結合性が増大した。CBM42 がアラビノキシラン側鎖のアラビノースに結合し、結合性が増大したと考えられ、キメラタンパク質でも CBM42 が機能していると示唆された。

③フェルラ酸加水分解活性に及ぼす影響

AwFaeA-CBM42 では反応開始とともに高いフェルラ酸遊離活性を示し、12 時間後には野生型に対して比活性で約 3 倍高いフェルラ酸遊離活性を示した。CBM42 によるキシランのアラビノース側鎖への結合により AwFaeA の触媒効率が高まったこと、また、CBM42 の結合定数はこれまで報告されている CBM と比べ低く、基質から解離し易いことも要因の一つと考えられる。

④キシラン分解に及ぼす影響

α -L-アラビノフラノシダーゼおよびフェルロイルエステラーゼにより前処理した基質では前処理なしの基質に比べて、反応後期からキシラナーゼによる分解が高まった。これは前処理なしの基質ではキシラナーゼによる分解は反応初期には十分作用するものの徐々に側鎖による立体障害を受け、キシラナーゼによる分解が限定されてしまうが、前処理を施した基質ではキシラナーゼによる分解が進むことを示唆している。また、キシランは主鎖を分解する酵素のみでは 50% 程度の分解率であるが、側鎖分解酵素との併用により分解率は 100% に近づくことが報告されており、本結果はこれを裏付けるものである。AkAbf54+AwFaeA-CBM42 あるいは AkAbf54+AwFaeA により前処理した基質とを比較した場合、キシラナーゼによる分解は反応初期においてキメラ酵素を用いた方が高い傾向が見られたものの、反応後期では違いはほとんどなくなった。これはキメラ酵素を用いた場合フェルラ酸の分解率が高まり、AkAbf54 による脱アラビノースが進み、キシラナーゼによる反応初期の分解率が向上したと考えられた。

(3) 糸状菌由来の新規パラベンエステラーゼの同定

Aspergillus oryzae のゲノム情報からフェルラ酸エステラーゼやタンナーゼの活性中心であるセリン残基近傍のモチーフが一致した遺伝子配列を見いだした。この遺伝子配列は *A. niger* など他の糸状菌にも類似配列が存在し、アミノ酸配列全体の相同性はフェルラ酸エステラーゼやタンナーゼとは 20% 程度と機能的に別個な酵素の可能性が示唆された。そこで、この遺伝子のクローン化と高生産が期待できる *Pichia pastoris* によるリコンビナント酵素の取得、リコンビナント酵素の特性解析を行った。その結果、基質特異性はフェルラ酸エステラーゼ基質、タンナーゼ基質には活性を示さず、4-ヒドロキシ安息香酸エチル、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル、4-ヒドロキシ安息香酸ブチルに対して活性を示した。これらはパラベンと称され、抗菌剤として食品、日用品、化粧品等に配合されている。糸状菌由来のパラベンエステラーゼは初めて見出され、本酵素は AoPrbA と命名した。パラベンからアシル基が加水分解された 4-ヒドロキシ安息香酸は抗菌性が無くなり、パラベン加水分解酵素はパラベンの抗菌性に対して微生物の防御機構の一つと考えられた。

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 21 件)

① Koseki T., Mihara K., Murayama T., Shiono Y., A novel *Aspergillus oryzae* esterase that hydrolyzes 4-hydroxybenzoic acid esters. FEBS Lett., 584, 4032-4036 (2010), 査読有

② Fazary A.E., Hamad H.A., Lee J.C., Koseki T., Lee C.K., Ju Y.H., Expression of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* in *Escherichia coli*: Characterization and crystal studies of the recombinant enzyme. Int. J. Biol. Macromol., 46, 440-444 (2010), 査読有

③ Shiono Y., Yokoi M., Koseki T., Murayama T., Aburai N., Kimura K., Allantopyron A, a new α -pyron metabolite with potent cytotoxicity from an endophytic fungus *Allantophomopsis lycopodina* KS-97. J. Antibiot., 63, 251-253 (2010), 査読有

④ Hatakeyama, T., Koseki, T., Murayama, T., Shiono, Y., Eremophilane sesquiterpenes from the endophyte *Microdiplodia* sp. KS 75-1 and revision of the stereochemistries of phomadecalins C and D. Phytochemistry Lett., 3, 148-151 (2010), 査読有

⑤ Ardiansyah, Shirakawa, H., Sugita, Y., Koseki, T., Komai, M., Anti-metabolic syndrome effects of adenosine ingestion in stroke-prone

spontaneously hypertensive rats fed a high fat diet. *Br. J. Nutr.*, 46, 440-444 (2010), 査読有

⑥ Koseki T., Mochizuki K., Kisara H., Miyana A., Fushinobu S., Murayama T., Shiono Y., Characterization of a chimeric enzyme comprising feruloyl esterase and family 42 carbohydrate-binding module. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86, 155-161 (2010), 査読有

⑦ Koseki T., Fushinobu S., Ardiansyah, Shirakawa H., Komai M., Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 803-810 (2009), 査読有

⑧ Koseki T., Hori A., Seki S., Murayama T., Shiono Y., Characterization of two distinct feruloyl esterases, AoFaeB and AoFaeC, from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83, 689-696 (2009), 査読有

⑨ Shiono Y., Nitto A., Shimanuki K., Koseki T., Murayama T., Miyakawa T., Yoshida, J., Kimura K., A new benzoxepin metabolite isolated from endophytic fungus *Phomopsis* sp. *J. Antibiot.*, 62, 533-535 (2009), 査読有

⑩ Koseki T., Mese Y., Nishibori N., Masaki K., Fujii T., Handa T., Yamane Y., Shiono Y., Murayama T., Iefuji H., Characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80, 1007-1013 (2008), 査読有

⑪ Ardiansyah, Ohsaki Y., Shirakawa H., Koseki T., Komai M., Novel effects of a single administration of ferulic acid on the regulation of blood pressure and hepatic lipid metabolic profile in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 2825-2830 (2008), 査読有

⑫ Shiono Y., Shimanuki K., Hiramatsu F., Koseki T., Murayama T., Fujisawa N., Kimura K., Pyrrospirones A and B, apoptosis inducers in HL-60 cells, from an endophytic fungus, *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 6050-6053 (2008), 査読有

〔学会発表〕(計 34 件)

① 河本かずさ, 鈴木健太郎, 伏信進矢, 若木高善, 村山哲也, 塩野義人, 小関卓也, *Aspergillus oryzae* RIB40 由来フェルラ酸エステラーゼのユニークなジスルフィド結合の役割, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011.3.26, 京都市

② 小関卓也, 見原好治, 村山哲也, 塩野義人, *Aspergillus oryzae* RIB40 由来新規パラベンエステラーゼ(AoPrbA)の特徴付け, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011.3.26, 京都市

③ 田巻大輔, 村山哲也, 塩野義人, 小関卓也,

低温性糸状菌 *Penicillium antarcticum* FH-14 株の生産する桂皮酸エステラーゼの精製と性質, 第 62 回日本生物工学会大会, 2010.10.29, 宮崎市

④ Koseki T., Feruloyl esterases: potential in grain processing, BIT's 1st Inaugural Symposium on Enzymes & Biocatalysis-2010, 2010.4.23, 上海 (招待講演)

⑤ 鈴木健太郎, 小関卓也, 小宮大, 伏信進矢, 祥雲弘文, 若木高善, 麹菌由来フェルラ酸エステラーゼの X 線結晶構造解析, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010.3.28, 東京都

⑥ 見原好治, 村山哲也, 塩野義人, 小関卓也, *Aspergillus oryzae* 由来パラベンエステル特異的加水分解酵素, 第 9 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2009.11.18, 東京都

⑦ 望月敬司, 宮永顕正, 伏信進矢, 村山哲也, 塩野義人, 小関卓也, 麹菌由来フェルロイルエステラーゼとアラビノース結合モジュールとのキメラ酵素の特性, 日本応用糖質科学会平成 21 年度大会, 2009.9.16, 弘前市

⑧ 小関卓也, 麹菌由来のヘミセルロース側鎖分解酵素とアラビノース結合モジュールとのキメラ酵素の特性, 第 10 回酵素応用シンポジウム, 2009.6.12, 名古屋市 (招待講演)

⑨ 堀茜, 関翔二, 塩野義人, 村山哲也, 小関卓也, *Aspergillus oryzae* 由来 2 つのフェルロイルエステラーゼの性質, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009.3.29, 福岡市

⑩ 小宮大, 石田卓也, 小関卓也, 伏信進矢, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 若木高善, 祥雲弘, *Aspergillus awamori* 由来アセチルキシランエステラーゼの結晶構造に基づく機能変化, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009.3.28, 福岡市

⑪ 小関卓也, 焼酎麹菌の植物バイオマス分解酵素の特性とその利用, 平成 20 年度日本生物工学会大会シンポジウム, 2008.8.27, 仙台市 (招待講演)

⑫ Koseki T., Hori, A., Murayama, T., Shiono, Y., Identification of a type-B feruloyl esterase from *Aspergillus oryzae*, 5th European Symposium on Enzymes in Grain Processing, 2008.4.1, Norwich, 英国

〔図書〕(計 1 件)

小関卓也, 伏信進矢, 麹菌由来ヘミセルラーゼの構造と機能, 分子麹菌学, 北本勝ひこ編, 日本醸造協会, 印刷中 (2011)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~yshiono/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小関 卓也 (KOSEKI TAKUYA)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：70372191

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

伏信 進矢 (FUSHINOBU SHINYA)

東京大学大学院・農学生命科学研究科・

助教

研究者番号：00302589