

機関番号： 35409
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20580147
 研究課題名(和文) デンプン糖化工程の効率化をめざした枝切り酵素の構造機能解析と機能改変
 研究課題名(英文) Analyses of molecular structures and functional relationships of starch debranching enzymes aiming to improve industrial starch saccharification processes
 研究代表者 岩本 博行
 (福山大学・生命工学部・教授)
 研究者番号： 90213321

研究成果の概要(和文)：

澱粉枝切り酵素とは、アミロペクチンやグリコーゲンなどの分岐鎖を特異的に加水分解する酵素で、澱粉糖化工業などに利用される産業的に重要な酵素である。本研究では、食品加工プロセスによく用いられる数種の澱粉枝切り酵素の立体構造と機能の関係を明らかにし、工業的な加工プロセスに最適な酵素を設計することを目的とした。その結果、酵素の活性中心に位置する可動ループ上のアミノ酸残基に変異を加えることにより、反応速度と熱安定性が向上した産業的に価値の高い変異酵素を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：

Starch-debranching enzymes catalyze the hydrolysis of the α -1,6-glycosidic linkage of α -glucans such as amylopectin, glycogen and pullulan, and are used in an industrial starch saccharification process. These enzymes classified into two groups, pullulanase and isoamylase based on the substrate specificities. In this project, we aimed to clarify the mechanism of substrate specificity and design industrially valuable enzyme. We first solved the crystal structure of *Bacillus subtilis* pullulanase, and compared the crystal structures and amino acid sequences of several starch-debranching enzymes. Then we introduced mutations into active sites of *Klebsiella pullulanase* and found some mutants in which Gly residues located on flexible loop in the vicinity of active site are replaced by Ala or Pro showed higher activity toward amylopectin and improved thermostability than wild type enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 平成20年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 平成21年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 平成22年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野： 農学
科研費の分科・細目： 農芸化学・食品科学
キーワード： 食品酵素

1. 研究開始当初の背景

デンプン枝切り酵素は、その基質特異性によりイソアミラーゼとプルラナーゼに2分される。前者はアミロペクチンとグリコーゲンをよく加水分解しプルランに作用しづらいのに対し、後者は β -リミットデキストリンやプルラン、アミロペクチンをよく加水分解し、グリコーゲンにはほとんど作用できない。デンプン糖化工業においては、耐熱性の高い *Bacillus* 由来プルラナーゼが多く使われ、アミロペクチンに対する反応性が高い *Pseudomonas* 由来イソアミラーゼも一部に用いられる。デンプン枝切り酵素は、デンプン糖化以外にも醸造など食品製造・加工工程にしばしば利用される。

このようなデンプン枝切り酵素の基質認識機構を究明し、新たに好ましい基質特異性を持つ酵素を設計するためには、多くのデンプン枝切り酵素の3次元立体構造と酵素遺伝子の発現系が必要である。デンプン枝切り酵素の立体構造については、まず *Pseudomonas amyloclavata* 由来イソアミラーゼの構造 (Katsuya *et al.*) が明らかにされ、次いで申請者らが *Klebsiella pneumoniae* 由来プルラナーゼ (Mikami, Iwamoto, *et al.*) および *Bacillus* 由来プルラナーゼ (Mikami, Malle, *et al.*) の結晶構造を明らかにした。また申請者らは、これら微生物由来枝切り酵素群の大腸菌による発現系を構築した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、澱粉枝切り酵素の構造-機能相関を明らかにすることにより基質特異性を自在に操作し、食品加工やその他の加工工程に最適化した酵素を設計することにある。

このような研究課題を遂行するためには、基質特異性と起源の異なる多くの枝切り酵素の発現系の構築と立体構造情報の収集が不可欠である。プルラナーゼについては、

Klebsiella 由来の酵素ではその両方が揃っているが、産業用途で主に使われる *Bacillus* 由来の酵素では、申請当時まだ立体構造が正式に解かれていなかったため、実際に産業利用される *Bacillus* 由来酵素の立体構造解析に取り組んだ。一方イソアミラーゼについては、産業利用されている *Pseudomonas* 由来酵素の発現系が得られていなかったため、本酵素の発現系構築を目指した。一方微生物酵素に比べて研究が遅れている植物由来枝切り酵素については、イネ由来プルラナーゼとイソアミラーゼについて、X線結晶構造および機能解析を行う事をめざした (京都大学：三上文三教授、秋田県立大学：中村保典教授との共同研究)。

このようにして得られた基質特異性の異なる各種枝切り酵素の構造情報を比較することにより、基質特異性を発現する構造論的背景を明らかにし、産業利用価値の高い酵素を創製することを本研究プロジェクトの目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的は数種のデンプン枝切り酵素を比較することにより、基質特異性発現機構を明らかにし、産業利用につなげようとするものである。この目的のために、以下に示す方法で研究を行った。

(1) 発現系の構築

各種生物由来澱粉枝切り酵素の構造-機能研究を進めるため、*Klebsiella* および *Bacillus* 由来プルラナーゼ遺伝子を pColdベクターなどに連結し、大腸菌による異宿主発現系を構築した。*Pseudomonas* 由来イソアミラーゼについては、大腸菌による大量発現系の構築が困難であるが、これにも挑戦した。植物由来澱粉枝切り酵素については、秋田県立大学と共同で大腸菌による発現系の構築

を行った。

(2)立体構造の解析

微生物由来デンプン枝切り酵素の構造解析については、産業目的で使用されている *Bacillus* 由来プルラーゼの構造解析を試みた。*Bacillus* 由来プルラーゼは、すでに研究代表者らによって結晶構造が明らかにされた *Klebsiella* 由来プルラーゼに比べて分子量が小さい。本酵素は澱粉糖化工業などで産業利用されている酵素であり、立体構造情報をより直接的に産業利用に結びつけやすい。

(3)変異酵素の作成と評価

構造機能情報をもとに、デンプン枝切り酵素の基質認識機構を解析した。この目的のため、立体構造情報から基質特異性発現に関与すると推定される部位に変異を導入した変異酵素を作成し、その機能解析と産業用酵素としての評価を行った。変異を導入した部位は、分岐鎖の分岐部分から2番目のグルコースを結合するサブサイト-2、およびサブサイト+2のグルコース残基とスタッキング相互作用するトリプトファン残基、さらにこの残基が含まれるフレキシブルループである。作成した変異酵素については、各種基質に対する反応速度パラメータを測定するとともに、工業的な澱粉糖化工程に近い条件（高基質濃度、高温）での酵素性能についても評価を行った。

4. 研究成果

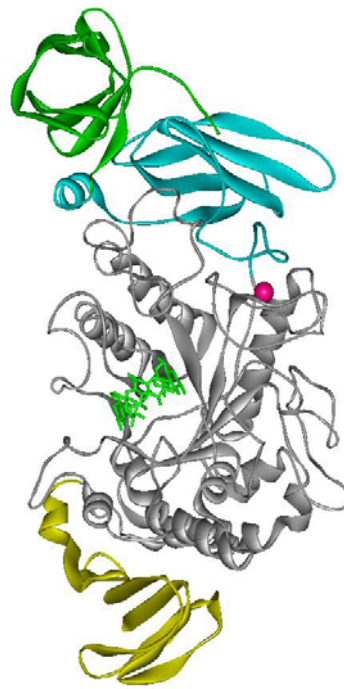
(1)発現系の構築

Klebsiella および *Bacillus* 由来プルラーゼ遺伝子については、pCold ベクターを用いた大量発現系を構築した。イネ胚乳由来プルラーゼ及びイソアミラーゼ3については、秋田県立大学のグループが pET ベクターを用いた大量発現系を構築した。*Pseudomonas* 由来イソアミラーゼについては、

大腸菌を宿主とする様々な発現ベクターを試したが、酵素遺伝子の発現は確認できなかった。

(2)立体構造の解析

Bacillus subtilis 由来プルラーゼについては、京都大学の三上文三教授と共同でアポ酵素および基質アナログ複合体（ α -サイクロデキストリンほか）のX線結晶構造を明らかにした。本酵素より分子量が大きい、実際に産業利用されている *Bacillus* 由来プルラーゼについては、良質の結晶を得る事ができなかった。またイネ胚乳由来のプルラーゼ及びイソアミラーゼ3についても、同様に良質の結晶を得る事ができなかった。



Bacillus subtilis 由来プルラーゼのX線結晶構造

(3)変異酵素の作成と評価

①フレキシブルループ上に存在する Trp727 の役割

Klebsiella 由来プルラーゼとマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース複合体のX線結晶構造解析結果から、Trp727残基がサブサイト+2のグルコース残基と

スタッキング相互作用することにより、フレキシブルループのコンホメーションが open 構造から closed 構造へと変化し、触媒残基である Glu725 が触媒位置に約 4.4 Å 移動して活性を発現すると推定された。そこでこの Trp727 を、スタッキング相互作用が著しく弱くなると予想される Phe、およびスタッキング相互作用が起こらない Ala に置換した変異酵素を作成して反応速度パラメータを測定した結果、W727F 変異酵素では kcat が約 100 分の 1 に、W727A 変異酵素では約 2000 分の 1 に減少した。一方、Km 値には著しい変化は見られなかった。

②フレキシブルループ構造の役割

基質特異性の異なるプルラナーゼとイソアミラーゼについて、フレキシブルループに相当する部分のアミノ酸配列を比較したところ、プルラナーゼでは触媒残基である Glu725 の両隣に Gly (Gly724 および Gly726) が保存されているのに対して、イソアミラーゼでは Ala、Ala または Ala、Pro の組み合わせが多く、Gly、Gly 型は存在しなかった。そこでこの部分のアミノ酸配列が基質特異性に関与しているのではないかと考え、プルラナーゼの Gly 残基を Ala や Pro に置換した変異酵素を作成したところ、Gly726 を Pro や Ala に置換したもの (G726A、G726P) では基質特異性がややイソアミラーゼ型に変化する事がわかった。

③ループ変異酵素の産業用酵素としての性能評価

②で作成した G726P 変異酵素はアミロペクチンに対する活性が上昇したので、実用的にも優れた性質を持っているかどうか評価するため、実際の澱粉糖化工程に近い条件 (高基質濃度および高温) で酵素消化実験を行ったところ、いずれの温度でも野生型に比べてアミロペクチンに対する活性が 20~30% 高

かった。また野生型酵素に比べて熱失活する温度が 10~20°C 上昇し、基質存在下で著しい熱安定性の向上が認められた。以上の結果から、今回得られた G726P 変異酵素は、実際の澱粉糖化工程でも野生型酵素よりも高い活性と熱安定性を併せ持つ、実用的に優れた酵素である事がわかった。

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 1 件)

・Hirofumi Ujiie, Tomoko Matsutani, Hisashi Tomatsu, Ai Fujihara, Chisato Ushida, Yasuhiko Miwa, Yasutaro Fujita, Hyouta Himeno, and Akira Muto, Trans-Translation is involved in the CcpA-Dependent Tagging and Degradation of TreP in *Bacillus subtilis*, Journal of Biochemistry (査読有り), **145**, 2009, 59-66

[学会発表] (計 13 件)

1. 佐藤孝憲他 4 名、フレキシブルループに変異を導入した *Klebsiella* 由来プルラナーゼの熱安定性、日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会、2011 年 3 月 26 日 (土)、京都女子大学 (京都市)
2. Hiroyuki Iwamoto ほか 5 名、Role of Induced-fit Motion in the Active Site of *Klebsiella* Pullulanase, BMB2010, 2010/12/8(Wed), Kobe Port Island, Kobe
3. 岩本博行 ほか 5 名、デンプン糖化用枝切り酵素の基質特異性改変と耐熱化の試み、酵素工学会第 64 回講演会、2010 年 11 月 19 日 (金)、東京大学山上会館 (東京都)
4. 前野友香ほか 5 名、イネ枝切り酵素の基質特異性と役割、第 5 回 産業用酵素シンポジウム「産業利用酵素の最前線 ~タンパク質工学による機能改変酵素や極限環境微生物由来酵素の産業利用~」、2010 年 11 月 6 日 (土)、長浜バイオ大学 (長浜市)
5. 岩本博行 ほか 5 名、プルラナーゼの保存領域 3 を含むループの induced-fit motion は活性発現に必要か?、日本農芸化学会 2010 年度 (平成 22 年度) 大会 [東京]、2010 年 3 月 28 日 (日)、東京大学駒場キャンパス (東京都)
6. 前野友香ほか 5 名、イネ枝切り酵素の基質特異性と役割、日本農芸化学会中四国支部第 26 回講演会、2010 年 1 月 23 日 (土)、愛媛大学農学部 (松山市)
7. 岩本博行 ほか 4 名、*Bacillus subtilis*

str. 168 由来プルラナーゼの反応速度論的性質と立体構造、日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部、日本食品科学工学会西日本支部 2009 年度合同沖縄大会、2009 年 10 月 31 日 (土)、琉球大学農学部 (沖縄県中頭郡)

8. 岩本博行ほか 7 名、*Klebsiella* 由来プルラナーゼのサブサイト 2 に存在する Trp727 の役割、日本農芸化学会中四国支部第 24 回講演会、2009 年 5 月 23 日 (土)、くにびきメッセ (松江市)
9. 岩本博行ほか 7 名、デンブレン枝切り酵素のサブサイト -2 および +2 の役割、日本農芸化学会大会 2009 年度 (平成 21 年度) 大会、2009 年 3 月 28 日 (月)、マリンメッセ福岡 (福岡市)
10. 岩本博行ほか 5 名、プルラナーゼの基質特異性と基質特異性改変の試み、日本農芸化学会中四国支部第 23 回講演会 (例会)、2009 年 1 月 24 日 (土)、高知大学農学部 (高知市)
11. 岩本博行ほか 6 名、立体構造情報にもとづいたデンブレン枝切り酵素の基質特異性改変、酵素工学会 30 周年記念シンポジウム、2008 年 11 月 13 日 (木)、かずさアカデミアホール (木更津市)
12. 岩本博行ほか 9 名、プルラナーゼの基質特異性に関与する可能性のあるループ構造について、日本応用糖質科学会平成 20 年度大会 (第 57 回)、2008 年 9 月 18 日 (木)、琉球大学農学部・工学部 (那覇市)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 岩本 博行
(福山大学・生命工学部・教授)
研究者番号 : 90213321
- (2) 研究分担者 三輪 泰彦
(福山大学・生命工学部・教授)
研究者番号 : 00219833
- (3) 連携研究者 該当無し