

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780289

研究課題名（和文） 海洋性糸状菌が生産するセルラーゼの耐塩・耐熱性機構の解明

研究課題名（英文） Insight into salt- and thermo-stability of endoglucanase from marine fungus.

研究代表者

水野 正浩 (MIZUNO MASAHIRO)

信州大学・工学部・助教

研究者番号：60432168

研究成果の概要（和文）：海洋環境に生息する微生物から単離したセルロース分解酵素は、耐塩性や温度に対する安定性があり、バイオマスの酵素分解に役立つことが期待されている。本研究では、これらの性質が酵素タンパク質の表面に位置する電荷を帯びたアミノ酸に起因することが示唆された。特に、pH6付近では、熱をかけた際にタンパク質の構造が壊れても、温度を下げた時に構造が再び形成されて酵素活性が復活する巻き戻りが起こり易いことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：It is expected that cellulose degrading enzyme prepared from marine fungus, which has salt- and thermo-stability, is to be useful in enzymatic degradation of cellulosic biomass. In this research, it was suggested that these properties were caused by charged amino acids located at protein surface. Especially, the pH range of 6 to 8 is favorable for protein refolding after temperature-induced unfolding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：セルラーゼ・バイオマス・耐熱性

1. 研究開始当初の背景

化石資源の枯渇または地球温暖化という世界的に取り組むべき問題の中で、バイオマス資源の有効利用方法の開発は重要な課題である。特に、セルロース系バイオマスは、エネルギー利用のみならず、種々のバイオリファイナリー原料になりえることから、特に注目を集めている。このセルロース系バイオマスの酵素糖化には、基質となるバイオマスの前処理が不可欠であり、現在、アルカリ処

理や水熱処理が大きな効果を示すことが様々な研究から明らかにされている。一方、こうした前処理後には、酵素が作用できるような条件に戻す必要がある。現在、酵素製剤の開発は酵素の力価を上げることに中心に進められているが、耐塩性や耐熱性などの特徴を活かす開発は少ない。今後のバイオマスの前処理法の展開、及びバイオマス自体が種々の物質を含む混合物であることを考えると、耐熱性及び金属塩やイオン液体等に対

する耐性を有するセルラーゼの開発、研究が必要になると考えられる。

2. 研究の目的

海洋性糸状菌の一種である *Pestalotiopsis* sp. AN-7 は、セルロースを含む培地で培養を行うと、菌体外に幾つかのセルロース分解酵素を分泌することが、明らかになっている。その中の一成分である、 β -1,4-エンドグルカナーゼ (Cel15A) は、耐塩性・耐熱性を有することが明らかとなっているが、そのメカニズムは不明である。セルロース分解酵素はバイオマス分解におけるキー酵素であり、酵素反応時の環境に耐える酵素の選抜が必要である。本酵素の有する耐塩性・耐熱性の機構を明らかにすることができれば、既存の酵素の分子改変をはじめ、様々な点で活用することが可能であると考えられる。本研究では、X線結晶構造解析により Cel15A の立体構造を明らかにすると同時に、遺伝子工学的手法を組み合わせ、耐塩性・耐熱性のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵素の精製・活性測定

組換え麹菌 *Aspergillus oryzae* の培養液から、90% 飽和硫酸アンモニウムでタンパク質を沈殿させた後、陰イオン交換カラム (DEAE-TOYOPEARL 及び Q Sepharose HP) 及びゲル濾過カラム (Sephacryl S-200) によって精製を行った。

酵素活性は、カルボキシメチルセルロース (CMC)、微結晶性セルロース (Avicel)、リン酸膨潤セルロース (PASC)、不溶性セロオリゴ糖 (ICOS)、バクテリアセルロース (BC)、キシランを基質に用い、酵素反応によって生じる生成還元糖量を Somogyi-Nelson 法によって測定した。タンパク質量測定は、Bradford 法により牛血清アルブミンを標準物質として行った。

(2) Cel15A の結晶化

精製 Cel15A は、10mg/ml まで濃縮した後、ハンギンクドロップ蒸気拡散法により 20°C で結晶化を行った。

(3) Cel15A の変異型酵素の作製

触媒残基特定のための部位特異的変異導入は、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて行った。

(4) pH 及び温度に対する諸性質

至適反応温度は pH 4.0 において、30°C から 70°C の範囲で変化させて 10 分間酵素反応

を行った。至適反応 pH は 3 から 10 の範囲で変化させ、反応温度 40°C で還元糖量を測定した。好塩性の解析では、終濃度で 0 から 2.0 mol/l の NaCl を添加し、40°C、pH4.0 の条件で酵素反応を行い、DNS 法により生成還元糖量を測定した。また温度及び pH 安定性は、温度や pH を組み合わせた処理条件にて酵素溶液をインキュベーションした後、40°C、pH4.0 の反応条件で活性測定を行うことで決定した。温度安定性としては、30°C から 100°C について、pH4.0 または 7.5 の条件下で 30 分処理した。なお 30°C 以上の熱処理を行った場合は、処理後 10 分間の氷冷を行った後酵素反応に用いた。pH 安定性としては、pH3 から 11 について、4°C の条件下で 24 時間処理した。

4. 研究成果

(1) 酵素の諸性質

Cel15A は陰イオン交換及びゲル濾過カラムによって、34kDa 付近に電気泳動的に単一なバンドになるまで精製された (図 1)。

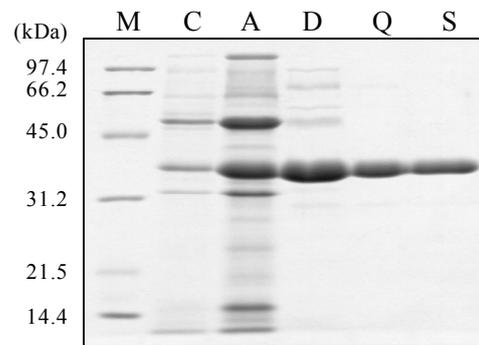


図 1 精製時の SDS-PAGE

M, 分子量マーカー; C, 粗酵素液; A, 硫酸アンモニウム沈殿後; D, DEAE-Toyopearl 650M; Q, Q Sepharose HP; S, Sephacryl S-200

rCel15A は CMC に対して最も高い比活性値 31.6 U/ml を示し、それ以外では PASC、ICOS、Avicel、BC の順で活性が低くなった。これは結晶性の高い基質ほど反応性が低いことを示している。また、キシランに対しては活性を示さなかった (表 1)。

表 1 rCel15A の基質特異性

基質	比活性 (U/mg)	相対活性 (%)
CMC	8.53×10	100
PASC	1.75×10	24.4
ICOS	9.39	13.1
Avicel	1.15×10^{-2}	1.60×10^{-2}
BC	2.35×10^{-3}	3.27×10^{-3}
Xylan	N.D.	N.D.

(2) Cel5A の結晶化

初期スクリーニングキットを用いて、結晶化条件の検討を行った結果、10mg/ml Cel5A 及び、100mM 塩化マグネシウム、15% 2-プロパノール、50mM HEPES (pH7.5) において、針状の微結晶が得られた。

(3) 触媒残基の決定

Cel5A が分類される glycoside hydrolase family 5 の他のエンドグルカナーゼとの一次構造の相同性より、保存性の高い2つの酸性アミノ酸残基 (Glu152 及び Glu259) に着目し、部位特異的変異導入を行った。作製した E152Q 及び E259Q はいずれも、カルボキシメチルセルロース (CMC) に対する比活性は、野生型の 0.41% 及び 0.048% にまで著しく低下した。以上の結果より、Cel5A においては両残基が触媒残基であることが強く示唆された。

(4) pH 及び温度に対する諸性質

本酵素の pH に対する特性を調べた結果、pH2.5 から 10.5 の間で 80% 以上の活性を保持しており、非常に幅広い pH 安定性を有していた。また、pH4.0 において最も高い活性を示した (図 2)。

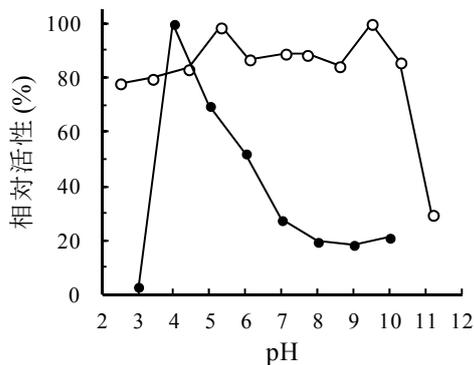


図 2 pH による影響

●, 至適 pH; ○, pH 安定性

次に、温度に対する特性を調べた結果を図 3 に示した。pH4.0 で酵素活性を測定した結果、至適反応温度は 55°C で、各温度で 30 分処理した後の残存活性を測定した温度安定性では、30°C から 50°C で 80% 以上の活性を保持したものの、60°C 以上では完全に失活した。一方、熱処理時の pH を精製時と同じ pH7.5 にし、同様に熱処理を行った結果、70°C 以下で 90%、100°C でも 50% ほどの活性を維持する結果になった。

そこで、rCel5A の温度安定性に及ぼす pH の影響を調べるために、各 pH で 60°C、30 分の熱処理を行った後、残存活性を測定した。pH6.0 において最も高い残存活性を示し、至

適 pH である 4.0 では、ほとんど残存活性を示さなかった (図 4)。以上の結果より、rCel5A は pH 環境によって、タンパク質の構造の安定化が大きく変化することが示唆された。

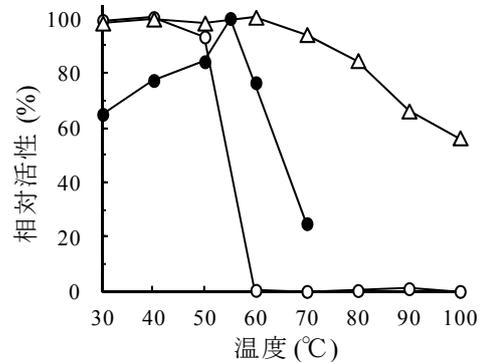


図 3 温度による影響

●, 至適温度; ○, 温度安定性 (pH4.0); △, 温度安定性 (pH7.5)

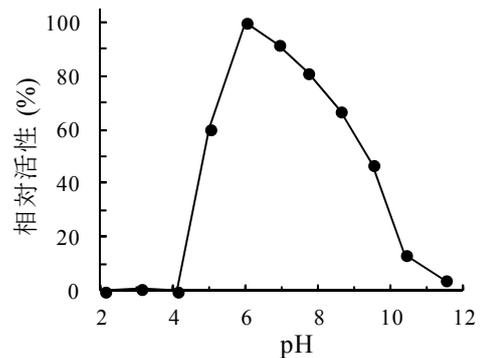


図 4 温度による影響

●, 至適温度; ○, 温度安定性 (pH4.0); △, 温度安定性 (pH7.5)

最も安定性の高かった pH6 において、30°C から 100°C までの温度において、経時的な残存活性変化を測定した結果が図 5 である。70°C 以下では、2 時間の保温を行っても 80% 以上の活性が保持された。また、90°C においても約 30% の活性が保持された。rCel5A の至適反応温度は 50°C であるので、それ以上の温度では rCel5A は立体構造の変性を起こして不活性化していると考えられる。しかし、変性時の pH が 6 から弱アルカリ領域の場合、立体構造の巻き戻りが起こり、酵素活性が残存すると考えられる。

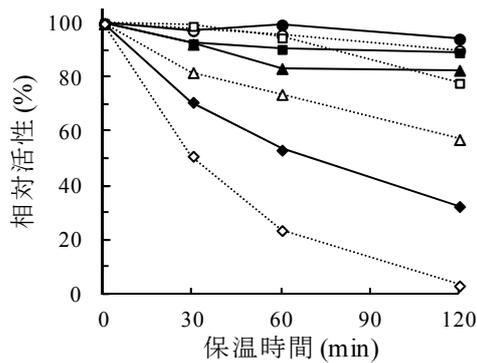


図5 pH6における rCel5A の温度安定性
●, 30°C; ○, 40°C; ■, 50°C; □, 60°C;
▲, 70°C; △, 80°C; ◆, 90°C; ◇, 100°C

(4) NaCl による酵素活性への影響

NaCl による rCel5A の酵素活性へ影響を調べるために、酵素反応系に NaCl を添加し酵素活性の変化を測定した (図6)。対照として、担子菌 *Irpex lacteus* が生産するエンドグルカナーゼ (En-1) の組換え酵素を用いた。両酵素共に NaCl 比存在下においても酵素活性を示し、En-1 でも NaCl 添加により酵素活性が最大 20%程度増加した。一方、rCel5A では、NaCl 濃度が 0.3M の際に、最大 200%以上の酵素活性の増加が確認された。

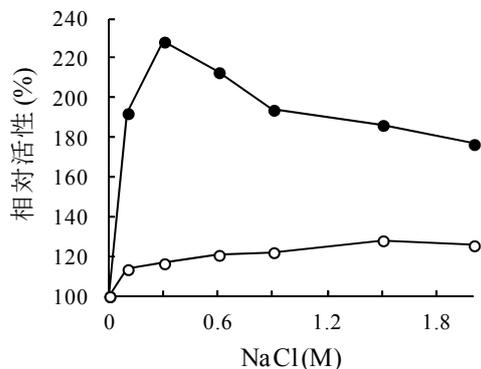


図6 NaCl による酵素活性への影響
●, r Cel5A; ○, *I. lacteus* 由来 En-1

(5) 総括

本研究は、Cel5A の耐塩・耐熱機構を解明するために、麹菌で発現させた rCel5A を用いて結晶化を行い、立体構造の決定を目指した。種々の条件検討の結果、針状の微結晶を得ることは成功したが、構造決定が可能な結晶作製には至らなかった。そこで、本酵素の温度に対する性質を別の角度から見た時に、pH によってタンパク質構造の巻き戻りに差があることを見出した。

現在までに、好熱性の糸状菌由来のエンドグルカナーゼは幾つか報告されており、*Thermoascus aurantiacus* では立体構造も既

に報告されている。中温性である担子菌類のエンドグルカナーゼも含め、性質の比較を行ったものを表2に示した。Cel5A を含む好熱性を示す酵素群では、電荷を持ったアミノ酸の含有率が、中温性酵素と比較して高いことが分かる。特に、*T. aurantiacus* の立体構造では、タンパク質表面に特に電荷アミノ酸の分布が高く、Cel5A においても同様であると推測される。こうした電荷アミノ酸の配置が、本酵素の好塩性や立体構造の巻き戻り能力、または、結晶化を妨げる要因になっているのではないかと考えられる。

また、本研究では *Pestalotiopsis* の培養液から Cel5A 以外の、複数のエキソ型のセルラーゼやβ-グルコシダーゼなどのセルロース分解酵素も新たに見出すことができた。今後も引き続き本菌が生産するこれらの酵素群に着目し、バイオマス利用に適した酵素剤の開発に資する基礎的な研究を続けていくことが大切であると考えられる。

表2 種々のエンドグルカナーゼとの性質の比較

微生物起源	CBMの有無	一次構造の相同性 (Identity/Positive) (%)	至適温度 (°C)	温度安定性 (°C)	電荷アミノ酸含有率 (%)	立体構造
<i>Pestalotiopsis</i> Cel5A	—	—	55	90	16.3	Crystal
<i>Aspergillus niger</i> EG	—	61/77	70	80	21.7	×
<i>Thermoascus aurantiacus</i> EG	—	60/75	75	80	17.3	○ (1GZ)
<i>Trichoderma reesei</i> EGII	—	32/49	60	60	13.5	○ (3QR3)
<i>Irpex lacteus</i> En-1	N末端 (CBM1)	51/65	60	60	11.8	×
<i>Trametes hirsuta</i> EG	N末端 (CBM1)	46/62	50	70	11.5	×

* Keep >50% activity after heated treatment for 60 min

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)

[学会発表] (計7件)

①水野正浩、森川祐介、野崎功一、天野良彦、*Pestalotiopsis* sp. AN-7 由来エンドグルカナーゼの pH 及び温度安定性の解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学 (京都)

②森川祐介、水野正浩、佐藤伸明、神田鷹久、野崎功一、天野良彦、*Pestalotiopsis* sp. AN-7 由来耐塩・耐熱性エンドグルカナーゼの麹菌による発現及び酵素学的諸性質の解析、2010 年 9 月 15 日、グランシップ (静岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 正浩 (MIZUNO MASAHIRO)
信州大学・工学部・助教
研究者番号：60432168