様　式　C－19、F－19、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 27 年　 5 月 27 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：24380055

研究課題名（和文）酵素による難分解性ポリマーの分解・除去・加工技術の開発

研究課題名（英文）Development of a technology to degrade, remove or process persistent proteins with enzymes

研究代表者
金谷　茂則（KANAYA, SHIGENORI）

大阪大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：30273585

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,800,000円

研究成果の概要（和文）：PETを分解するLC-cutinaseの結晶構造を決定した。ついで、LC-cutinaseと異常プリオンを分解する２つのプロテアーゼ（Tk-subtilisinとTk-SP）の構造に基づき変異を導入することによりこれらの酵素の高機能化を検討した。その結果、安定性の向上したLC-cutinase変異体、成熟化速度の向上したTk-subtilisin変異体、EDTA存在下でも安定なTk-SP変異体を構築することに成功した。また、メタゲノム法により枝葉コンポストから２つの耐熱性セルラーゼを単離し、その結晶構造を決定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：The crystal structure of LC-cutinase with PET-degrading activity was determined. Then, the mutations were introduced into LC-cutinase and two proteases (Tk-subtilisin and Tk-SP) with abnormal prion-degrading activity based on their structures to improve their enzymatic properties. As a result, the LC-cutinase derivative with enhanced stability, the Tk-subtilisin derivative with increased maturation rate, and the Tk-SP derivative with high stability in the presence of EDTA were constructed. In addition, two thermostable cellulases were isolated from leaf-branch compost by a metagenomic approach and their crystal structures were determined.

研究分野：生化学

キーワード：クチナーゼ　ポリエステル　サチライシン　プリオン　カルシウム結合部位　メタゲノム　X線結晶構造解析　セルラーゼ

１．研究開始当初の背景
PET（ポリエチレンテレフタレート）は難分解ポリマーで、安価で耐久性に優れていることから、PET ボトル、合成繊維（ポリエステル）、包装容器として大量に製造消費され、廃棄されている。しかし、これらの廃棄物は埋立、焼却処理されるので、環境汚染、地球温暖化、石油資源枯渇を引き起こす。また、ポリエステルの改質加工処理は高温、強アルカリ条件下で行われるので、環境に負荷がかかる。異常型プリオンおよびその凝集物であるプリオン線維も難分解ポリマーで、精密医療器具等に付着するとプリオン病の二次感染を引き起こす。従って、これらの難分解性ポリマーを酵素により分解・除去・加工する技術の開発が望まれている。酵素は、特異性が高く、温和な条件下でも働くので、酵素により難分解性ポリマーを分解・除去・加工することができれば、環境への負荷も軽減され、地球温暖化や石油資源枯渇を防ぐことができると期待される。これまで、PET や異常型プリオンを分解する酵素の存在は報告されているが、いずれも活性が弱い、安定性が低い、収量が低いなどの理由で産業化には至っていない。一方、植物細胞壁の主成分であるセルロースも難分解ポリマーであるが、セルラーゼを用いて工業的な規模でグルコースに転換する糖化技術の開発が進められている。しかし、糖化にかかるコスト削減のために、活性の高い耐熱性セルラーゼの単離が望まれている。

LC-cutinase は万博記念公園の枝葉コンポストからメタゲノム法により単離された新規クチナーゼで、炭素鎖長の短い脂肪酸エステルやクチンだけでなく、生分解プラスチックや PET も良く分解する。特に、その PET 分解能はこれまで報告されているクチナーゼの中では一番高いので、PET の分解やポリエステルの表面加工などへの産業利用が期待されている。しかし、その PET 分解能は高いといっても 12 mg/h/mg enzyme 程度で、産業的に利用するためにはその活性や安定性を大きく向上させる必要がある。しかし、LC-cutinase の結晶構造は決定されておらず、変異導入による機能改変もなされていない。Tk-subtilisin は超好熱古細菌 ***Thermococcus kodakarensis*** 由来サチライシンで、非常に耐熱性が高く、SDS 存在下 100°C で異常プリオンを効率よく分解する。従って、Tk-subtilisin は医療器具などに付着した異常プリオンを分解して二次感染を防ぐための洗浄剤としての利用が期待されている。しかし、Tk-subtilisin は成熟化に高温処理を必要とするためその製造にはコストがかかる。また、Tk-subtilisin は Ca^{2+}イオンをフォールディングに必要とするためキレート剤存在下では失活する。Tk-SP は ***T. kodakarensis*** 由来の別のサチライシンで Tk-subtilisin 同様非常に耐熱性は高い。しかし、Tk-SP は Tk-subtilisin と異なり Ca^{2+}イオンをフォールディングに必要としないので、キレート剤存在下でも失活しない。従って、Tk-SP も異常プリオンを分解する洗浄剤としての利用が期待される。しかし、Tk-SP が異常プリオンを分解するかどうかはまだ分かっていない。また、Tk-SP は Ca^{2+}イオンを安定化に必要とするためキレート剤存在下では大きく不安定化する。耐熱性セルラーゼは好熱菌からいくつか単離されている。しかし、枝葉コンポストから新規耐熱性セルラーゼが得られるかどうかはまだ分かっていない。

２．研究の目的
（１）LC-cutinase の結晶構造を決定し、活性部位や基質結合部位に変異を導入することにより LC-cutinase の活性や安定性を向上させる。
（２）LC-cutinase のポリエステル繊維加工適性を評価することにより、LC-cutinase の新たな利用法を開発する。
（３）Tk-subtilisin のプロペプチドに変異を導入することにより、Tk-subtilisin の成熟化速度を向上させる。
（４）Tk-SP のカルシウム結合部位に変異を導入することにより、Tk-SP のキレート剤存在下における安定性を向上させる。
（５）Tk-SP の異常プリオン分解能を解析することにより、Tk-SP の新たな利用法を開発する。
（６）新規耐熱性セルラーゼを枝葉コンポストから単離する。

３．研究の方法
（１）LC-cutinase の高機能化
①LC-cutinase の結晶構造解析
LC-cutinase を PelB シグナル配列との融合タンパク質として大腸菌で発現させると LC-cutinase は菌体外に分泌される。この LC-cutinase を精製した後、結晶化を行い、分解能の良い結晶が得られたなら分子置換法により結晶構造を決定する。
②変異導入による高機能化
結晶構造を決定することにより基質結合部位が同定されたなら、基質結合部位を広げる変異やその疎水性を高める変異を導入したり、基質結合部位に飽和変異を導入したりすることにより、活性や安定性の向上した変異体を取得する。
（２）LC-cutinase の新たな利用法の開発
染色加工試験用ポリエステル白布を LC-cutinaseで処理した後、ポリエステル白布の減量率、染色堅牢度、染色性、光沢性、吸水性、拡散性、強度を測定するとともに、ポリエステル繊維表面の外観変化を電子顕微鏡で観察することにより、LC-cutinaseのポリエステル繊維加工適性を評価する。
（３）Tk-subtilisin の成熟化速度の向上
Tk-subtilisin は Pro-Tk-subtilisin からプロペプチドの自己分解により成熟化するが、

プロペプチドはTk-subtilisinに強く結合し、非常に安定で分解されにくいので、80°C以上の高温でないと効率よく成熟化しない。そこで、プロペプチドに変異を導入することにより、成熟化速度が向上し、その結果80°Cより低い温度でも効率良く成熟化する変異体を構築する。

（４）Tk-SPの安定化

Tk-SP はサチライシンドメインとβジェリーロールドメインから成る。Tk-SP には２個の Ca^{2+}イオン（Ca1 と Ca2）が結合しているが、いずれもβジェリーロールドメインに結合している。これらの Ca^{2+}イオンは活性には必要ないが、高い耐熱性には必要である。そこで、これらの Ca^{2+}結合部位に変異を導入することにより、キレート剤存在下でも高い安定性を維持する変異体を構築する。

（５）Tk-SPの新たな利用法の開発

Tk-SPはTk-subtilisin同様耐熱性が高いだけでなく、SDS、尿素、Triton X-100 等で処理してもほとんど活性を失わず、広い pH 範囲で安定である。Tk-SP の新たな利用法を開発するために、通常のプロテアーゼでは分解されにくい異常型プリオンタンパク質の分解を検討する。

（６）新規耐熱性セルラーゼの単離

万博記念公園では選定した枝葉を集めてコンポスト化しているが、枝葉の主成分はセルロースであることと、コンポスト内部の温度は 70-80°Cに上昇することから、このコンポストは耐熱性セルラーゼを分泌する好熱菌の宝庫と考えられる。そこで、この枝葉コンポストからメタゲノム法により新規耐熱性セルラーゼを単離し、その結晶構造を決定するとともに、諸特性を解析する。

４．研究成果

（１）LC-cutinaseの高機能化

①LC-cutinaseの結晶構造を 1.5 Å の分解能で決定した（図１）。その結果、LC-cutinase

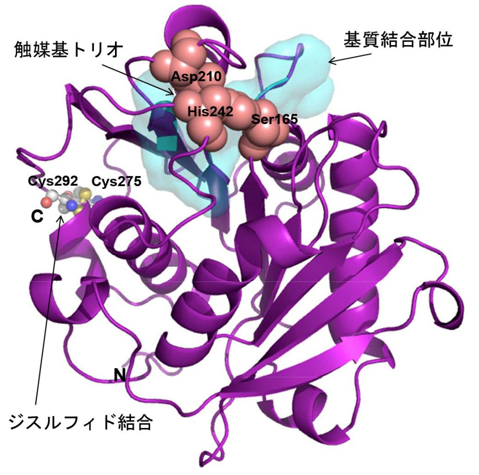

図１　LC-cutinaseの結晶構造

は、10本のαヘリックスと分子中央部の１枚の大きなβシートを形成する９本のβ鎖から成ること、C末端領域に分子内ジスルフィド結合（Cys275-Cys292）を一つもつこと、Ser165、Asp210、His242が活性部位を形成すること、Tyr95、Phe125、Tyr127、Met166、Trp190、Val212、Phe243が基質結合部位を形成することを明らかにした。また、LC-cutinaseは変性温度が86°Cと高く、変性速度も極めて遅い安定な酵素であることを明らかにした。さらに、分子内ジスルフィド結合を形成するCys275とCys292を両方ともAla に置換した変異体の安定性を解析することにより、このジスルフィド結合は平衡論的にも速度論的にもLC-cutinaseの耐熱化に寄与することを明らかにした。

②LC-cutinase の基質結合部位の入口を広げる変異体 Y95A と疎水性を高める変異体 Y95F を構築し、その活性や安定性を解析することにより、いずれの変異体も活性は向上しなかったが、Y95F の安定性が大きく向上することを明らかにした。また、LC-cutinase の基質結合部位を形成する７残基の疎水性アミノ酸のうち、Trp190、Val212、Phe243 に同時に飽和変異を導入し、基質の分解に伴い形成されるハローの大きさを指標に活性の向上した変異体をスクリーニングした。その結果、活性の向上した変異体は得らなかったが、LC-cutinase が活性を示すためには 190 番目のアミノ酸はTrp、Tyr、Pheなどの芳香族アミノ酸でなければならないこと、LC-cutinase が高い活性を示すためには 212 番目のアミノ酸はVal、Leu、Ileなどの長鎖脂肪族アミノ酸でなければならないことを明らかにした。さらに、LC-cutinase の活性の至適温度が50°Cと低いのは、活性部位が局所的に不安定化しているためで、PEG や長鎖の基質が結合すると活性部位は安定化し、活性の至適温度も向上することを明らかにした。

（２）LC-cutinaseの新たな利用法の開発

染色加工試験用ポリエステル白布をLC-cutinaseで処理した後、電子顕微鏡により線維表面を観察した結果、LC-cutinaseにより繊維表面のPETオリゴマーが除去され、繊維表面がきれいになることが分かった（図２）。

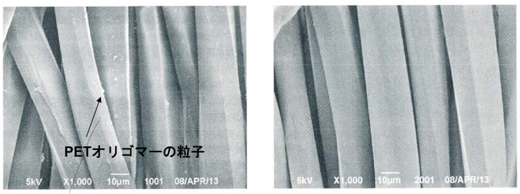

図２　酵素処理（右）および未処理（左）ポリエステル白布のSEM写真

（３）Tk-subtilisinの成熟化速度の向上

プロペプチドドメインに変異を導入した２つのPro-Tk-subtilisin変異体（F17H、L69P）がいずれも野生型酵素より速く成熟化することを明らかにした。また、これらの変異体の成熟化速度が向上したのは、L69P の場合はプロペプチドの阻害活性の低下により、F17H の場合はプロペプチドの安定性の低下により、プロペプチドが分解されやすくなったためであることを明らかにした。

（４）Tk-SPの安定化

Tk-SP のβジェリーロールドメインには２個の Ca^{2+}イオン（Ca1 と Ca2）が結合する（図３）。

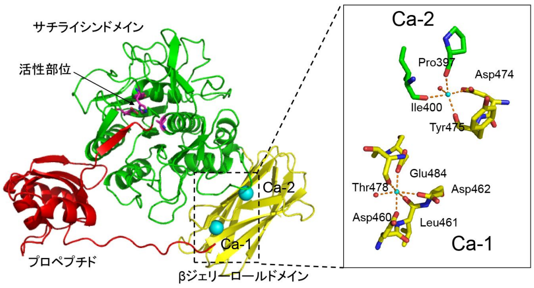

図3 Tk-SPのカルシウム結合部位

活性中心変異体 Tk-S359A を用いて解析することにより、これらの Ca^{2+}結合部位の片方に Asp→Ala 変異を導入すると EDTA 存在下でも EDTA 非存在下でも Tk-S359A の安定性は向上すること、両方に導入すると Tk-S359A の安定性はわずかに低下するが、EDTA 存在下でもその安定性を維持することを見いだした。つまり、EDTA 存在下では、変異体は Tk-S359A より 26℃も安定であった。また、Tk-SP に同様の変異を導入すると、活性はほとんど変化しないが、EDTA 存在下における安定性は著しく向上することを明らかにした。

（５）Tk-SP の新たな利用法の開発

Tk-SP が、プリオン病に感染したマウスの脳ホモジネート中の異常プリオンを分解することを明らかにした（図４）。また、分解条件を検討することにより、異常プリオンは、SDS 非存在下でも、0.02 mg/mL の Tk-SP と 100℃で 1 時間インキュベーションすることにより完全に分解されることを確認した。さらに、Tk-SP は既存のプリオン分解酵素である Prionzyme より非常に高いプリオン分解活性を有することを明らかにした。

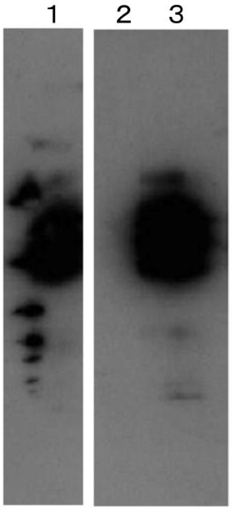

図4 プリオン分解試験

1. 異常型プリオン蛋白質
2. Tk-SP分解物
3. 1% SDS処理

（６）新規耐熱性セルラーゼの単離

枝葉コンポストから抽出したメタゲノムを用いて遺伝子ライブラリーを構築し、CM セルロースを含むプレート上でハローを形成するコロニーをスクリーニングすることにより、10 種類の新規セルラーゼ遺伝子をクローニングすることに成功した。これらの遺伝子がコードするセルラーゼのうち、N 末端にフレキシブルリンカー（FL）を持つ LC-CelA と Ig-like ドメインを持つ LC-CelG の諸特性を解析した。その結果、LC-CelA も LC-CelG も極めて耐熱性の高いセルラーゼであることを明らかにした（活性の至適温度はそれぞれ 90℃と 70℃）。またこれらの結晶構造を決定することにより、LC-CelA の構造（図５）は *Rhodothermus marinus* 由来 Cel12A（RmCel12A）の構造と、LC-CelG の構造（図６）は *Clostridium thermocellum* 由来 CelD（CtCelD）の構造と良く似ていることを明らかにした。さらに、FLがLC-CelA の安定性に寄与すること、Ig-like ドメインが LC-CelG の安定性、活性、フォールディングに寄与することを明らかにした。

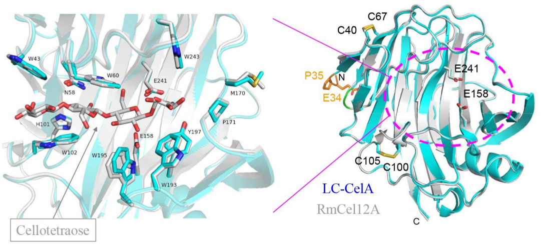

図5 LC-CelA（シアン）とRmCel12A（グレー）の結晶構造の重ね合わせ図

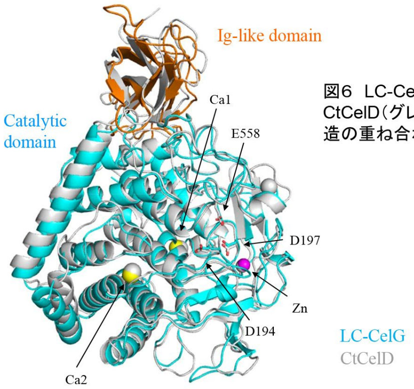

図6 LC-CelG（シアン）と CtCelD（グレー）の結晶構造の重ね合わせ図

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２５件）

① Okano, H., Kanaya, E., Ozaki, M., Angkawidjaja, C., and Kanaya, S. (2015) Structure, activity and stability of metagenome-derived glycoside hydrolase family 9 endoglucanase with an N-terminal Ig-like domain. Protein Sci. 24, 408-419. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25545469

② Sulaiman, S., You, D.-J., Kanaya, E., Koga, Y., and Kanaya, S. (2014) Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase. Biochemistry 53, 1858-1869. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2459

3046

③ Yuzaki, K., Sanda, Y., You, D.-J., Uehara, R., Koga, Y., and Kanaya, S. (2013) Increase in activation rate of Pro-Tk-subtilisin by a single nonpolar-to-polar amino acid substitution at the hydrophobic core of the propeptide domain. Protein Sci. 22, 1711-1721. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=kanaya+s%2C+yuzaki

④Uehara, R., Ueda, Y., You, D-J., Koga, Y., and Kanaya, S. (2013) Accelerated maturation of Tk-subtilisin by a Leu→Pro mutation at the C-terminus of propeptide which reduces the binding of propeptide to Tk-subtilisin. FEBS J. 280, 994-1006. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237738

⑤Uehara, R., Takeuchi, Y., Tanaka, S., Takano, K., Koga, Y., and Kanaya, S. (2012) Requirement of Ca^{2+} ions for the hyperthermostability of Tk-subtilisin from *Thermococcus kodakarensis*. Biochemistry 51, 5369-5378. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22686281

〔学会発表〕(計２５件)

① Yuichi Koga, Nami Shimizu, Akikazu Sakudo, and Shigenori Kanaya「Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from a hyper-thermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1」、59th Annual Meeting of Biophysical Society、2015年2/7-11、ボルティモア(アメリカ)

②三浦　明子、洪 遜、阿部 一勝、Tita Foophow、古賀 雄一、金谷 茂則「Ca^{2+}結合部位の変異による超好熱菌由来セリンプロテアーゼTk-SPの安定化」、第87回日本生化学会、2014年10/15-18、国立京都国際会館(京都)

③森数渉、Sintawee Sulaiman、金谷栄子、古賀雄一、金谷茂則「基質結合部位への変異導入によるLC-cutinaseの機能改変」、第36回日本分子生物会、2013年12/3-6、神戸国際会議場(神戸)

④Masashi Ozaki, Eiko kanaya, Hiroyuki Okano, Yuichi Koga, and Shigenori Kanaya「Isolation of novel cellulolytic enzymes from leaf-branch compost by a metagenomic approach」、5th Congress of the European Microbiologists (FEMS 2013)、2013年7/21-25、ライプチヒ(ドイツ)

⑤勇崎 孝太、上原　了、三田雄大、古賀 雄一、金谷 茂則「プロペプチドの改変によるTk-subtilisinの成熟化速度の促進」、第64回日本生物工学会、2012年10/23-26、神戸国際会議場(神戸)

〔産業財産権〕
○出願状況(計１件)
名称：枝葉コンポスト由来新規エステラーゼ
発明者：金谷茂則、金谷栄子、古賀雄一、高野和文、小池田聡
権利者：天野エンザイム(株)
種類：特許
番号：PCT/JP2012/050615
出願年月日：平成２５年７月９日
国内外の別：国外

６．研究組織
(1)研究代表者
金谷　茂則(KANAYA SHIGENORI)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：30273585

(2)連携研究者
古賀　雄一(KOGA YUICHI)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：30379119

クレメン　アンカウィジャヤ(CLEMENT ANGKAWIDJAJA)
大阪大学・大学院工学研究科・特任助教
研究者番号：20505987

金谷　栄子(KANAYA EIKO)
大阪大学・大学院工学研究科・特任研究員
研究者番号：80396217