

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580481

研究課題名(和文) ミミズ由来の新規低温適応性糖質加水分解酵素の構造と機能の解析とその利用

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of novel cold-adapted carbohydrate hydrolases from *Eisenia fetida* and application of their enzymes

研究代表者

上田 光宏 (ueda, mitsuhiro)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：50254438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミミズ由来の糖質分解酵素遺伝子のクローニング並びに異種宿主発現を行った。セルラーゼに関してはエンド型セルラーゼ遺伝子(EF-EG2)を酵母で発現させ、精製を行った。精製した組換え型EF-EG2は低温活性を有していた。また、X線結晶構造解析よりEF-EG2の構造を明らかにしている。本酵素は構造既知の低温適応酵素同様、分子表面が負電荷に富んでいることから、低温適応性との関連が示唆された。その他の糖質分解酵素についても構造と機能を明らかにするための研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：The present study identified a cold adapted cellulase named endo-1,4-beta-glucanase (EF-EG2) from the earthworm *Eisenia fetida*. The gene was cloned in the cold-shock expression vector and functionally expressed in *Escherichia coli*. The gene consists of 1368 bp encoding 456 amino acid residues. Purified recombinant EF-EG2 hydrolyzed soluble cellulose (carboxymethyl cellulose), but not insoluble (powdered cellulose) or crystalline (Avicel) cellulose substrates. The enzyme exhibited significant activity at 10°C (38% of the activity at optimal 40°C) and was stable at pH 5.0-9.0, with an optimum pH of 5.5. This new cold-adapted cellulase could potentially improve the cost effectiveness of biofuel production. The overall structure of EF-EG2 has an (alpha/alpha)₆ barrel fold which contains a putative active site cleft and a negatively charged surface. This structural information helps us understand the catalytic and cold adaptation mechanisms of EF-EG2.

研究分野：生物資源利用学

キーワード：糖質分解酵素 低温適応性 ミミズ キチナーゼ アミラーゼ X線結晶構造解析 セルラーゼ

1. 研究開始当初の背景

脱リグニン化された植物バイオマスは、高温の酸あるいは耐熱性の酵素を用いて高温条件下で糖化が行われている。糖化工程に必要な熱エネルギーは主に化石燃料(重油)が用いられている。コスト高になるとともに CO₂ の排出量も期待されるほど削減できていない。化石燃料に依存しない社会を構築するための方法の一つとして、バイオマス資源を用いた燃料生産が考えられる。バイオマス資源を用いて低温糖化・低温発酵 (Simultaneous Saccharification and Fermentation: SSF) する技術の開発が望まれる。低温条件下で糖化することができれば、加熱するためのエネルギーを節約できるだけでなく、SSF により高濃度のエタノール生産が可能となる。現在、デンプンの糖化には耐熱性の酵素が用いられている。また、木質バイオマスの糖化には微生物由来のセルラーゼ (最適温度 60~70) が用いられているが、効率よく分解する酵素が存在しないのが現状である。

2. 研究の目的

これまでの酵素の短所を補うとともに工業的にも利用できる酵素のスクリーニングを行ったところ、デンプンやセルロースに対する分解能が高く、低温活性を有する酵素がミミズに存在することを明らかにした。本研究では、ミミズ由来の酵素を用いた SSF プロセス構築に向けた研究を行うこととした。

3. 研究の方法

ミミズ由来の低温適応性を有する糖質分解酵素をクローニングし異種宿主を用いた発現を行った mRNA から cDNA を調製し、cDNA クローニングを行った。発現宿主には *Pichia pastoris* を用いた分泌発現を行った。発現した酵素を各種カラムトグラフィーにより精製し、性質を調べた。さらに構造と機能を明らかにするために X 線結晶構造解析を行った。

4. 研究成果

ミミズ由来の糖質分解酵素遺伝子のクローニング並びに発現に成功した。セルラーゼに関しては、エンド型セルラーゼ遺伝子 (EF-EG2) を酵母で発現させ、精製を行った。精製した EF-EG2 は低温活性を有していた。また、X 線結晶構造解析により EF-EG2 の構造を明らかにした。本酵素は構造既知の低温適応酵素と同様、分子表面が負電荷に富んでいたことから低温適応性との関連が示唆された。生デンプン分解酵素に関しても、 α -アミラーゼ遺伝子を酵母で発現させ、精製を行った。本酵素の性質を明らかにしたところ、低温活性を有していた。研究室レベルでは、SSF プロセスを用いて生デンプンからエタノールを生産できることを明らかにした。

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 3 件)

1. Cloning and expression of the cold-adapted endo-1,4-beta-glucanase gene from *Eisenia fetida*. Mitsuhiro Ueda, Akihiro Ito, Masami Nakazawa, Kazutaka Miyatake, Minoru Sakaguchi, Kuniyo Inouye. Carbohydrate polymers 101,511-516, 2014.
2. Crystal structure of endo-1,4-beta-glucanase from *Eisenia fetida*. Takao Arimori, Akihiro Ito, Masami Nakazawa, Mitsuhiro Ueda, Taro Tamada. J. Synchrotron Rad. 20, 884-889, 2013.
3. Crystal structure of the catalytic domain of a novel glycohydrolase family 23 chitinase from *Ralstonia* sp. A-471 reveals a unique arrangement of the catalytic residue for inverting chitin hydrolysis. Takao Arimori, Noriko Kawamoto, Shoko Shinya, Nobuo Okazaki, Masami nakazawa, Kazutaka Miyatake, Tamo Fukamizo, Mitsuhiro Ueda, Taro Tamada. J. Biol. Chem. 288,18696-18706, 2013.

[学会発表](計 27 件)

1. シマミミズ (*Eisenia fetida*) 由来のキチナーゼ遺伝子のクローニングと異種宿主発現, 上田光宏, 塩山岳志, 中澤昌美, 阪本龍司, 坂口実, 2015 年度日本キチン・キトサン学会大会, 2015 年 8 月 20~21 日, 東海大学熊本キャンパス, 熊本.
2. *Ralstonia* sp. A-471 由来の新奇キチナーゼのキチンバインディングドメインの役割, 櫻井俊輔, 中澤昌美, 阪本龍司, 玉田太郎, 深田はるみ, 上田光宏, 2015 年度日本キチン・キトサン学会大会, 2015 年 8 月 20~21 日, 東海大学熊本キャンパス, 熊本.
3. カサゴ胃由来のキチナーゼの大腸菌による発現, 松永, 柿崎博美, 池田愛, 福島, 上田光宏, 松宮政弘, 2015 年度日本キチン・キトサン学会大会, 2015 年 8 月 20~21 日, 東海大学熊本キャンパス, 熊本.
4. Cloning and expression of chitinase gene from *Eisenia fetida*, Ueda Mitsuhiro, Shioyama Takashi, Nakazawa Masami, Sakamoto Tatsuji, Sakaguchi Minoru, ICC/ EUC/ HIS 2015, 30 Aug- 2 Sep, 2015, Münster, Germany.
5. GH19 キチナーゼとしては異常に高い分子量をもつ *Aeromonas* キチナーゼの構造と機能, 河本大毅, 西平知世, 大沼貴之, 上田光宏, 深溝 慶, 2015 年度日本農芸化学学会大会 2015

年 3 月 26~3 月 29 日, 岡山大学津島キャンパス, 岡山 .

6. *Aeromonas* sp. No. 10S-24 由来 Family GH 19 キチナーゼの触媒ドメインの構造と機能, 西平知世, 大沼貴之, 上田光宏, 深溝 慶, 2014 年度日本キチン・キトサン学会大会, 2014 年 8 月 7~8 日, 順天堂大学本郷キャンパス, 東京 .

7. シマミミズ (*Eisenia fetida*) 由来のキチナーゼ遺伝子のクローニングと異種発現, 塩山岳志, 中澤昌美, 阪本龍司, 坂口実, 上田光宏, 2014 年度日本キチン・キトサン学会大会, 2014 年 8 月 7~8 日, 順天堂大学本郷キャンパス, 東京 .

8. シマミミズ (*Eisenia fetida*) 由来 -1,3-グルカナーゼ遺伝子のクローニングと異種宿主発現, 小根森雄太, 中澤昌美, 阪本龍司, 坂口実, 上田光宏, 2014 年度日本キチン・キトサン学会大会, 2014 年 8 月 7~8 日, 順天堂大学本郷キャンパス, 東京 .

9. マツタケ菌系の香气成分生成, 楠田瑞穂, 寺下隆夫, 上田光宏, 食品酵素化学研究会第 14 回学術講演会, 2014 年 8 月 30 日, 大阪府立大学 I-site 難波, 大阪 .

10. 冬虫夏草 (クモタケ) 由来のプロテアーゼに関する研究, 上田光宏, 山本直美, 中澤昌美, 楠田瑞穂, 大内謙二, 井上國世, 食品酵素化学研究会第 14 回学術講演会, 2014 年 8 月 30 日, 大阪府立大学 I-site 難波, 大阪 .

11. コナサナギタケ (*Paecilomyces farinosus*) 由来のプロテアーゼの精製・性質と遺伝子クローニング, 上田光宏, 森本和樹, 中澤昌美, 阪本龍司, 楠田瑞穂, 坂口実, 大内謙二, 日本きのこ学会 25 周年記念大会, 2014 年 9 月 10~12 日, 京都大学, 京都 .

12. 冬虫夏草由来のプロテアーゼに関する研究, 上田光宏, 2014 年度日本菌学会西日本支部大会, 2014 年 11 月 8 日, 大阪府立大学 I-site 難波, 大阪 .

13. アミスギタケの子実体形成に及ぼすアミノ酸の添加効果, 楠田瑞穂・上田光宏・白坂憲章・寺下隆夫, 2014 年度日本菌学会第 58 回大会, 2014 年 6 月 13~15 日, サイエンス

ヒルズ小松, 石川県 .

14. 低温適応能を有する糖質分解酵素の構造と機能の解析, 上田光宏, 飯島藤十郎記念食品科学振興財団_第 26 回学術講演会_招待講演, 2013 年 11 月 22 日, 学士会館, 東京 .

15. マツタケ菌系成長促進物質の探索, 上田光宏, 山本政明, 中澤昌美, 楠田瑞穂, 井上國世, 寺下隆夫, 2013 年度日本菌学会西日本支部大会, 2013 年 10 月 19 日, 県立広島大学, 庄原 .

16. Cloning and expression of endo-1,4-beta-glucanase from *Eisenia fetida*. H.fukuhara, A. Ito, T. Arimori, M. Nakazawa, T. Sakamoto, S. Akazawa, T. Tamada, K. Inouye, M. Ueda, 第 27 回日本キチン・キトサンシンポジウム, 第 10 回アジア太平洋キチン・キトサンシンポジウム, 2013 年 10 月 4~8 日, 米子コンベンションセンター, 鳥取 .

17. Structural and Functional analysis of a novel Family GH-23 chitinase from thermophilic bacterium *Ralstonia* sp. A-471, M. Ueda, N. Kawamoto, M. Nakazawa, K. Miyatake, S. Nishimura, H. Fukada, T. Arimori, T. Ohnuma, T. Tamada, T. Fukamizo, 第 27 回日本キチン・キトサンシンポジウム, 第 10 回アジア太平洋キチン・キトサンシンポジウム, 2013 年 10 月 4~8 日, 米子コンベンションセンター, 鳥取 .

18. Cloning of CMCase gene from *Bellamyia chinensis* laeta, K. Kawasaki, M. Nakazawa, T. Sakamoto, M. Sakaguchi, K. Inouye, M. Ueda, 第 27 回日本キチン・キトサンシンポジウム, 第 10 回アジア太平洋キチン・キトサンシンポジウム, 2013 年 10 月 4~8 日, 米子コンベンションセンター, 鳥取 .

19. Cloning and heterologous expression of chitinase gene from *Eisenia fetida*. T.shioyama, M. Nakazawa, T. Sakamoto, S. Akazawa, K. Inouye, M. Ueda, 第 27 回日本キチン・キトサンシンポジウム, 第 10 回アジア太平洋キチ

ン・キトサンシンポジウム, 2013年10月4~8日、米子コンベンションセンター, 鳥取.

20. Cloning and expression of alpha-amylase gene from *Eisenia fetida*. Y. Yamanouchi, M. Nakazawa, T. Sakamoto, S. Akazawa, K.

Inouye, M. Ueda. 第27回日本キチン・キトサンシンポジウム, 第10回アジア太平洋キチン・キトサンシンポジウム, 2013年10月4~8日、米子コンベンションセンター, 鳥取.

21. 第1回慶北東海岸水産業活性化シンポジウム__日本におけるキチン・キトサンの利用に関する動向と展望, 2013年3月29日__ヨンドック郡民会館__韓国.

22. GHファミリー23に属する新規キチナーゼの構造生物学的研究, 有森貴夫, 川本乃理子, 新家粧子, 岡崎伸夫, 中澤昌美, 宮武和孝, 深溝慶, 上田光宏, 玉田太郎, 2013年度食品酵素化学研究会, 2013年9月2日, I-site 難波, 大阪.

23. マツタケの菌糸体の生育に関するナリンギン分解生成物とマツタケの生産する - グルコシダーゼ, 楠田瑞穂, 大沼広宜, 上田光宏, 白坂憲章, 寺下隆夫, 2013年度食品酵素化学研究会, 2013年9月2日, I-site 難波, 大阪.

24. マツタケ菌糸体生長に及ぼすミミズ抽出物の影響, 山本政明, 中澤昌美, 楠田瑞穂, 井上國世, 寺下隆夫, 上田光宏, 日本きのこ学会第17回大会, 2013年9月11~13日, 県立広島大学, 広島.

25. Functional analysis of a novel Family GH-23 chitinase from thermophilic bacterium *Ralstonia* sp. A-471. M. Ueda, N. Kawamoto, M. Nakazawa, K. Miyatake, S. Nishimura, H. Fukada, T. Arimori, T. Ohnuma, T. Tamada, T. Fukamizo. 11th International Conference of the European Chitin Society, 5-8 May, 2013, in Porto, Portugal.

26. シマミミズ由来 1, 4- -エンドグルカ

ナーゼの結晶構造解析, 有森貴夫, 伊藤彰紘, 中澤昌美, 上田光宏, 玉田太郎, 2013年度蛋白質科学会大会, 2013年6月12~14日、とりぎん文化会館, 鳥取市.

27. Crystal structure of 1, 4- -endoglucanase from *E. foetida*. T. Tamada, A. Itoh, M. Nakazawa, M. Ueda, T. Arimori, 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology, 26-29 May, 2013, Nagoya, Japan.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
低温適応性を有する新規セルロース分解酵素
http://www.iao.osakafu-u.ac.jp/ipbc/fea2010_postor/ueda.pdf

低温適応性を有するセルロース分解酵素
<http://www.kinkibio.com/seeds/images/seeds-24.pdf>

6. 研究組織
(1)研究代表者
上田 光宏 (Ueda, mitsuhiro)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号: 50254438

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：