

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660081

研究課題名(和文)セルロース分解ボトルネックを回避する -グルコシダーゼの開発

研究課題名(英文)Development of new beta-glucosidase activated with its catalytic product

研究代表者

森 春英 (MORI, HARUhide)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80241363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌由来 グルコシダーゼはグルコースにより顕著に活性化される。様々な基質および単糖などを用いた詳細な速度論的解析等により、活性化はグルコースに限らず他の単糖および短鎖の基質自身でも起こること、活性化はkcatの増加に伴うものであり、Kmの低下は確認されないを明らかにした。単糖の遠位サブサイトへの結合による基質の非生産的結合抑制と解釈された。関与するアミノ酸残基に基づき活性化型 グルコシダーゼの推定が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Enhancement of activity of beta-glucosidase from Streptomyces sp. with the product glucose was investigated.. Kinetics analyses with various substrates and monosaccharides revealed that the activation is caused not only glucose but also other monosaccharides as well as even short-chain substrates with solely drastic increase in kcat. The monosaccharides, partially occupying the far side of substrate binding site from the catalytic site, prevent the short-chain substrates from binding in the non-productive fashion. Based on possible amino acid residues associated to the monosaccharide binding, candidate beta-glucosidases equipped with the activation feature can be selected.

研究分野：応用生物化学

キーワード： -グルコシダーゼ バイオマス糖化 酵素活性化 反応機構

1. 研究開始当初の背景

人類の活動は地球レベルの環境に影響を与えるに至り、今や人類そして地球上のすべての生命の生存を脅かそうとしている。地球環境に高負荷を与えている主要な要因は化石資源の使用である。化石燃料由来 CO₂ の空気中への放出が光合成による CO₂ 固定を大きく上回った結果、産業革命以前 280ppm だった CO₂ 濃度は現在 400ppm 近くに達し、2100 年には 960ppm にも達すると予測されている。これに伴い、顕著な気候変動そして深刻な食糧不足が近未来の現実として予測されている。

解決策の一つが、化石資源代替としてバイオマスの利用である。地中埋蔵炭素を掘り起こして空気中に放出せずに、現在光合成で固定された炭素分だけを使用するので空気中 CO₂ 濃度を上げない。カーボンニュートラルとなる。特に 2000 年以降バイオマス利用エネルギー政策 (バイオマス・ニッポン等) が進められ、様々な技術が開発されてきた。

最も資源量豊富な結晶性セルロースの糖化 (加水分解) は、酸糖化と酵素糖化がある。酸糖化は確立された技術であるが、過分解の問題に加え、装置の腐食や廃水処理への対応が避けられない事から、酵素糖化が注目されている。酵素糖化は、基本的に常温常圧で反応できるため加熱不要で過分解も起こさない。しかしながら反応性が低いことが問題となっている。セルロースが結晶性であり、またかなり低重合度の分解物でも水溶性が低い等の基質側の問題に加え、分解酵素側にも大きな問題がある。

セルロースは D-グルコースを構成糖として、これが 1-4 結合した直鎖ポリマーである。セルロース分解には活性 3 種、すなわちエンドグルカナーゼ (EG)、セロピオヒドロラーゼ (CBH)、 β -グルコシダーゼ (Bgl) が用いられる。CBH が結晶性セルロースに結合ドメインを介して結合して、セルロース鎖上を動いて末端から 2 糖セロピオースを次々と遊離する。EG は CBH と相乗的に作用して、セルロース鎖をランダムに水解する。Bgl は 2 糖やオリゴ糖を単糖 (すなわちグルコース) にまで加水分解する。セルロースの酵素糖化では、これら 3 種の活性が反応液においてセルロースに順次作用して、低重合化してグルコースにまで分解したい。

ところが、最終段階を担う Bgl は一般に生成物グルコースにより強く阻害され、生成物グルコースの蓄積に伴い活性が顕著に低下する。その結果、酵素糖化反応液において 2 糖セロピオースが分解されずに蓄積して CBH 活性を阻害する。これが、セルロースの酵素糖化の低速度・低収率の主要な原因となっている。

2. 研究の目的

以上のように、セルロースの酵素糖化はバイオマス利用推進上重要な地位を占めており、

生成物による酵素の活性阻害の解消は推進すべき重要な課題である。

近年、グルコースによる阻害が起こらないグルコース耐性 Bgl が少数報告されている。本研究では、そのような酵素の一つ放線菌 *Streptomyces* に由来する β -グルコシダーゼ St1Bgl3 に注目した。St1Bgl3 はグルコースに阻害されないばかりか、グルコースにより活性化が報告されている。

本研究は、この St1Bgl3 のグルコースによる活性化のメカニズムの詳細について酵素化学的研究を行い、バイオマス酵素糖化の主要問題点解決にインパクトとなる展開を与えることを目的として実施した。

3. 研究の方法

(1) 組換え酵素試料の調製:

St1Bgl3 酵素タンパク質は放線菌培養菌体抽出液から精製されるが、生産量は極めて少ない。大きい培養スケールを必要とし、かつ誘導剤として用いるセロピオースが大量に必要である。加えて、抽出液には St1Bgl3 以外の β -グルコシダーゼに由来する活性が多量に存在する。p-nitrophenyl D-glucoside を基質としたアッセイ系において St1Bgl3 が占める活性は 1/100 程度しかない。従って、St1Bgl3 自体の追跡は容易ではない。精密なイオン交換カラムクロマトグラフィーを行うことにより初めて検出が可能となる。以上の様なことから、本研究では St1Bgl3 のネイティブ酵素に代えて、組換え酵素の生産系を確立した上で、組換え酵素を用いた解析を行うこととした。

組換え酵素生産では、大腸菌を宿主として使用した。誘導条件等は、一般的手法に従って行った。超音波処理により菌体を破碎し、抽出液を調製した。精製は主としてイオン交換カラムクロマトグラフィーを用いた。すなわち、無細胞抽出液をまず pH 6.5 条件下で DEAE-Toyoperar1 カラムに、続いて pH 7.6 条件下で Resource Q カラムに吸着させ、いずれも NaCl 直線濃度勾配により溶出させた。活性画分を、最後に Sephacryl S-100 HR カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行った。以上により、大腸菌培養液 1 L から数 mg の精製酵素標品の調製が可能となった。精製酵素は、p-nitrophenyl glucoside に対してネイティブ酵素と同等の比活性を示した。

(2) グルコースおよび各種単糖存在による反応速度に対する影響の詳細解析:

基質を p-nitrophenyl β -glucoside とし、グルコース存在下における反応速度 (p-nitrophenol 遊離速度) を解析し、ネイティブ酵素と比較した。加えて、以下について検討を行った。すなわち、

各種 p-nitrophenyl 化糖を基質とし、グルコースおよびその他の各種単糖存在による p-nitrophenol 遊離速度への影響の解析:

基質として, p-nitrophenyl -glucoside の他, -D-fucoside, および -D-galactoside を用いた. 添加単糖として D-グルコース, D-ガラクトース, D-キシロース, D-マンノース 他多数を用いて試験を行った.

ここではまず, 基質濃度を 5mM (ただし -D-galactoside は 20 mM) に固定し, 単糖の濃度を 0~0.4M とした時の反応速度を解析した. 次に, 基質濃度も変化させ, 共存単糖およびその濃度の変化に伴う反応速度の変化を Lineweaver-Burk プロット上において解析した.

ラミナリオリゴ糖に対する活性測定

基質をラミナリオリゴ糖(1-3 結合のグルコースオリゴマー)としてグルコース遊離速度を測定した. 基質濃度(0.5~6.25mM)に依存した速度変化および Michaelis Menten 式からの逸脱を Lineweaver-Burk プロットを用いて解析した.

糖転移生成物の解析

単糖存在により活性化が観察される条件下において, 生成している糖質の分析を行った. すなわち, 単糖存在により, 基質 p-nitrophenyl 化糖質が加水分解ではなく糖転移反応により p-nitrophenol が遊離しているか否かを, 転移糖の有無および定量解析により分析した. 分析には速度測定条件下での反応試料を HPAEC-PAD によって解析した. 本分析では, 生成 p-nitrophenol 濃度に対して 1/10 倍濃度の糖を十分に分析でき, すなわち主要反応が糖転移反応である場合, 転移糖が明確に検出・定量可能な分析法であるが, 転移糖は確認されなかった. ラミナリオリゴ糖の反応生成物についても同様に転移糖の明確な生成は確認されなかった.

(3) 酵素標品タンパク質のオリゴマー化の分析:

精製酵素標品を電気泳動法により解析した. 解析には SDS-PAGE, ブルーネイティブ PAGE, および通常のネイティブ PAGE(高 pH)を行った. タンパク質染色を行うとともに, ネイティブ PAGE では活性染色を行った. 活性染色には 4-methylumbelliferyl -glucoside を用いて生成した 4MU を紫外光下蛍光により検出した.

4. 研究成果

(1) St1Bg13 の単糖活性化機構:

St1Bg13 は, D-グルコース濃度依存的に活性化および阻害を示す. 組換え酵素を用いてもほぼ同様の結果が得られた. すなわち, 単糖非共存下での活性に対して, 60 mM グルコース存在により 122%, 200 mM 以上で阻害を示した. 他の単糖(0-0.4 M)ではいずれも濃度に応じて活性は増加した. 試験した単糖の中ではキシロースが最大値を示し 380%, これにガラクトース 260%が続き, フコース, アロー

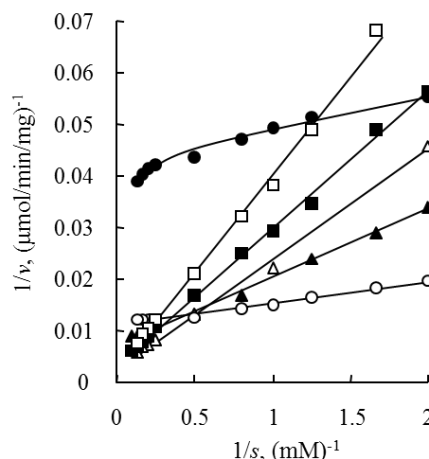
ス, L-マンノースはいずれも 150%程度までの活性化を示した. グルコース以外では阻害は認められなかった.

基質を -D-fucoside とすると, より顕著な活性化が確認された. グルコースは 80 mM 添加時に最大値 560%を示し, 更に高濃度では活性化の程度が減少しまで低下した. 他の単糖では阻害は認められず, 設定した最大濃度にて最大活性を示した. キシロースが 1600%, D-マンノースが 940%, 以下ガラクトース 610%, L-マンノース 590%, アロース 520%, フコース 310%となった.

一方, 基質を -D-galactoside (ただし, これのみ 20 mM) とすると, 60 mM キシロースで 110%を示したが, それ以上の濃度では阻害となり 75%まで, 他の糖では設定濃度いずれでも阻害となった.

基質濃度依存性解析から, 活性化の速度論的機構を解析した.

-D-fucoside を基質とすると, 単糖非共存下では, 設定基質濃度範囲内の高濃度側で明らかに Michaelis Menten 式からの逸脱が認められた. すなわち, 高濃度基質存在下では活性化が認められた. ここにグルコースを共存させると, この基質高濃度側での活性化がきれいに消え, Lineweaver-Burk プロット上のラインが, 下方方向に平行移動する. すなわち, k_{cat}/K_m に大きな変化を与えないまま k_{cat} の顕著な増大(同時に K_m も増大)した. D-グルコースの場合, これに競合阻害が加わる. すなわち, 低濃度添加では, k_{cat} (と K_m) が顕著に増加し, 高濃度グルコース存在下では, k_{cat} の変化を伴わずに K_m の増加が確認された(次図).



以上から, 本酵素 St1Bg13 の単糖活性化は, k_{cat} 依存的活性化であり, k_{cat}/K_m には大きな変化はない. 単に k_{cat} のみの増加ではないこと, K_m の増加を伴って k_{cat}/K_m に影響しない事を考慮すると, 速度論的には非生産的結合を考慮した考察が最も妥当であろう. すなわち単糖存在により基質の酵素への不適切な結合(非生産的結合)が減少し, 生産的結合を促進するという機構が考えられる.

(2) 基質による活性化と単糖結合部位:

前項では、僅かではあるが基質自身による kcat 増加も観察されていることから、p-nitrophenyl 化糖質も非生産的結合を減じ生産的結合促進することが示唆された。

基質ラミナリビオースは高濃度基質で活性化が確かに認められた。-D-フコシドと同様に、単糖存在により kcat の顕著な増加とともに、基質自身による活性化は認められなくなり Michaelis-Menten 式に従うようになる。

これに対し、基質を 3 糖ラミナリトリオースとすると、基質による明確な活性化は見られなくなり、また単糖による活性化の程度も小さくなった。更に 4 糖ラミナリテトラオースに対しては単糖は阻害を示した。

以上から、活性化に関わる単糖結合部位は、活性中心近傍にあり、2 糖基質は結合できて自らに対する活性を増加できること、また単糖結合が 4 糖の基質に対しては阻害となることを考え合わせると、単糖結合部位はサブサイト + 3 周囲であると考えられる。

(3)St1Bgl13 はオリゴマー化により不活性化する：

精製酵素標品は、SDS-PAGE により精製度は高いことが確認され、55 kDa の単一タンパク質バンドとして示された。しかしながら、ブルーネイティブ PAGE では 55 kDa の他に、165 kDa と 330 kDa にもやや強度の弱いタンパク質バンドが確認された。タンパク質の予想分子質量に基づき、単量体の他に、3 量体と 6 量体形成と判断された。ネイティブ PAGE でもタンパク質染色像では 3 本のタンパク質バンドが確認されたが、活性染色ではこのうち最も移動度の高いタンパク質のみ検出された。以上より、本酵素は 3 量体および 6 量体を形成するが、形成に伴い活性を顕著に消失すると判断された。単糖存在により、多量体が解消され単量体化による活性化の機構が想定される。ただし、全てのオリゴマーがモノマー化してもモノマーは 3 倍までは増えないことから、それ以上の活性化は本機構では説明できない。

(4)波及について：

グルコシダーゼは一般に生成物グルコースにより極端な阻害を受ける。St1Bgl13 はグルコースによる活性化を受け、高濃度では阻害するとはいえグルコース 0.4M 存在下 p-nitrophenyl glucoside 分解活性で 70%程度を維持する。またキシロースやマンノース存在下で顕著な活性化を示し、特に kcat の顕著な増加を示すことから、ヘミセルロース処理への応用も考えられる。

酵素の活性化メカニズムとしても特徴がある。基質結合に関与しながらも触媒中心からやや距離のある基質結合部位またはその周辺への単糖（または短鎖基質）結合に伴い、短鎖基質の非生産的結合を抑制するという大変ユニークな結論に至っている。

構造的解析は、結晶構造解析を進めているが現在の所、十分なデータが得られていない。関与するアミノ酸残基はモデル構造から想定し、変異酵素解析が進められている。

ごく最近、Cazy 分類による糖質加水分解酵素群 GH1 の グルコシダーゼについて、単糖活性化に関わるアミノ酸残基が特定された。本研究で得られた多様な情報、すなわち単糖による活性化程度の相違、使用基質によっても異なる効果など、総合的な GH1 グルコシダーゼの理解と高機能付与酵素創出に重要な知見を提供できたと考えている。

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 5 件)

(1) Ye, Y., Saburi, W., Odaka, R., Kato, K., Sakurai, N., Komoda, K., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Mori, H., and Yao, M. Structural insights into the difference in substrate recognition of two mannoside phosphorylases from two GH130 subfamilies, *FEBS Lett.*, **590**, 828-837 (2016). 査読有
DOI: 10.1002/1873-3468.12105

(2) Hua, Y., Ekkhara, W., Sansenya, S., Srisomsap, C., Roytakul, S., Saburi, W., Takeda, R., Matsuura, H., Mori, H., and Ketudat Cairns, J.R.: Identification of rice Os4Bglu13 as a α -glucosidase which hydrolyzes gibberellin A4 1-O- β -D-glucosyl ester, in addition to tuberonic acid glucoside and salicylic acid derivative glucosides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **583**, 36-46 (2015). 査読有
doi:10.1016/j.abb.2015.07.021

(3) Jang, S.J., Sato, M., Sato, K., Jitsuyama, Y., Fujino, K., Mori, H., Takahashi, R., Benitez, E.R., Liu, B., Yamada, T., and Abe, J.: A single-nucleotide polymorphism in an endo- β -glucanase gene controls seed coat permeability in soybean, *PLoS One*, **10**, e0128527 (2015). 査読有
doi.org/10.1371/journal.pone.0128527

(4) Jaito, N., Saburi, W., Odaka, R., Kido, Y., Hamura, K., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Matsui, H., and Mori, H.: Characterization of a thermophilic 4-O- β -D-mannosyl-D-glucose phosphorylase from *Rhodothermus marinus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 263-270 (2014). 査読有
doi: 10.1080/09168451.2014.882760

(5) Fujiwara, T., Saburi, W., Matsui, H., Mori, H., and Yao, M.: Structural insights into the epimerization of α -1,4-linked oligosaccharides catalyzed by cellobiose 2-epimerase, the sole enzyme epimerizing non-anomeric hydroxyl groups of unmodified sugars, *J. Biol. Chem.*, **289**, 3405-3415 (2014). 査読有
doi: 10.1074/jbc.M113.531251

〔学会発表〕(計 4 件)

Saburi, W., Fujiwara, T., Jaito, N., Muto, H., Matsui, H., Yao, M., and Mori, H.: Molecular basis for the epimerization of oligosaccharides by cellobiose 2-epimerase. 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 2015 年 5 月 10-13 日 Espoo(Finland).

武藤 洋彦, 佐分利 亘, 藤原 孝彰, 姚 閔, 森 春英: *Rhodothermus marinus* JCM9785 由来セロビオース 2-エピメラーゼの基質結合部位周辺アミノ酸残基の機能解析. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日岡山大学(岡山県・岡山市).

菅原 好美, 佐分利 亘, 谷口 沙希, 今井 亮三, 森 春英: グライコシンターゼ反応を利用したシロイヌナズナ由来 α -グルコシダーゼ Bglu15 のアグリコン特異性の解析. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日岡山大学(岡山県・岡山市).

Jaito, N., Saburi, W., Muto, H., Fujiwara, T., Yao, M., and Mori, H.: Characterization of the recombinant cellobiose 2-epimerase from *Rhodothermus marinus* and site-directed mutagenesis of the catalytic residues. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日岡山大学(岡山県・岡山市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 春英 (MORI HARUhide)

北海道大学・大学院農学研究院・教授