

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26850067

研究課題名（和文）メタゲノム由来高機能 β -グルコシダーゼの解析と応用

研究課題名（英文）Analysis and applications of metagenomic high-performance beta-glucosidases

研究代表者

松沢 智彦（Matsuzawa, Tomohiko）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10711971

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：環境中の微生物に由来するメタゲノムライブラリーから、高い生成物阻害耐性や熱安定性を有する高機能 β -グルコシダーゼを複数単離することに成功した。高機能 β -グルコシダーゼの酵素学的な諸性質の解析やリグノセルロース系バイオマスの糖化反応への利用の検討によって、単離した酵素が酵素学的にユニークであり、かつリグノセルロース系バイオマスの糖化反応に有用であることが明らかになった。また、高機能 β -グルコシダーゼへの変異導入試験によって熱安定性の改善や糖転移メカニズムの解析を進めることができた。

研究成果の概要（英文）：Novel β -glucosidases, which showed tolerance to product-inhibition and high temperature, were isolated from environmental metagenomes. A novel β -glucosidase showed unique enzymatic properties and had positive effects on the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. In addition, thermostability of the β -glucosidase was improved by site-directed mutagenesis.

研究分野：酵素科学

キーワード：メタゲノム β -グルコシダーゼ バイオマス 酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) バイオマスの糖化反応のボトルネックとなる生成物阻害

植物由来のリグノセルロース系バイオマスの有効活用にはその酵素変換が重要である。リグノセルロース系バイオマスの酵素分解(糖化反応)には糸状菌が生産するセルラーゼが広く利用されているが、リグノセルロース系バイオマスの分解によって生じる単糖やオリゴ糖はセルラーゼの働きを阻害することが知られていた。例えば、リグノセルロース系バイオマスの糖化反応において重要なセロピオヒドロラーゼはその反応産物であるセロピオースによって阻害されることが知られている。本研究において対象としている β -グルコシダーゼはセロピオースなどをグルコース(単糖)へ分解する酵素であり、本酵素がセロピオースなどを分解することによってリグノセルロース系バイオマスの糖化反応が促進される。しかし、 β -グルコシダーゼもまたその反応産物であるグルコースによって阻害されることが知られている(生成物阻害)。この β -グルコシダーゼの生成物阻害はリグノセルロース系バイオマスの糖化反応全体のボトルネックになりうる重要な問題であり、これまでに生成物阻害耐性を有する β -グルコシダーゼの探索が試みられてきた。

(2) メタゲノム法による新規酵素の単離

環境中には多種多様な微生物が数多存在している。微生物は多くの有用な酵素を生産しており、これまでに様々な酵素が微生物から単離された。しかし、環境中に存在する微生物の大部分は実験室において培養することが困難な微生物(難培養微生物)であり、その遺伝子資源はこれまで手付かずであった。メタゲノム法は環境中の微生物から人為的な培養を介さずにゲノムDNAを抽出し、遺伝子資源として利用する方法である。メタゲノム法は利用可能な微生物遺伝子資源の幅を大きく広げ、新しい有用酵素・高機能酵素の発見に繋がると期待されている。

2. 研究の目的

本研究はメタゲノム法を駆使することによって生成物阻害耐性や高い熱安定性などの優れた性質を有する高機能 β -グルコシダーゼを単離すること、また、それら高機能 β -グルコシダーゼの解析によって生成物阻害耐性メカニズムや熱安定化メカニズムなどを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) メタゲノム法による高機能 β -グルコシダーゼの単離

まず初めに、メタゲノムDNAを利用したファンクショナルスクリーニングによって生成物阻害耐性を有する β -グルコシダーゼの単離を試みた。具体的には、まず、土壌由来

メタゲノムDNAを大腸菌に導入したメタゲノムライブラリー(約10万クローン)から、多数の β -グルコシダーゼ活性を有するクローン(メタゲノムDNAによって β -グルコシダーゼ遺伝子を獲得した大腸菌クローン)を取得し、メタゲノム β -グルコシダーゼライブラリーを作成した。このメタゲノム β -グルコシダーゼライブラリーを使用し、高濃度のグルコース(生成物)存在下においても活性を有する β -グルコシダーゼ(生成物阻害耐性 β -グルコシダーゼ)や熱安定性に優れた β -グルコシダーゼ(耐熱性 β -グルコシダーゼ)などの高機能 β -グルコシダーゼのスクリーニングを行った。本スクリーニングによって得られた高機能 β -グルコシダーゼを有する大腸菌からメタゲノム由来DNAを抽出し、その次世代シーケンス解析によって高機能 β -グルコシダーゼをコードする遺伝子を同定した(図1)。

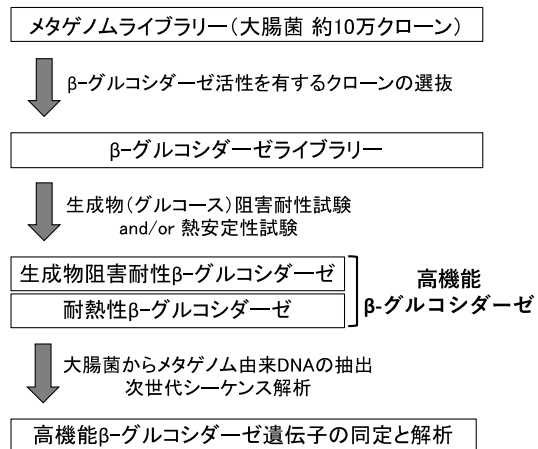


図1 高機能 β -グルコシダーゼの探索手順

(2) メタゲノム由来高機能 β -グルコシダーゼの解析

次に、高機能 β -グルコシダーゼをコードする遺伝子を大腸菌において過剰発現し、高機能 β -グルコシダーゼの精製を行った。精製した高機能 β -グルコシダーゼを用いてその酵素学的諸性質の解析やリグノセルロース系バイオマスの糖化反応への利用の検討、また、結晶構造解析などを行った。

(3) メタゲノム由来高機能 β -グルコシダーゼの改良

さらに、先述のメタゲノム由来高機能 β -グルコシダーゼの解析によって得られた知見を利用し、部位特異的変異導入によって高機能 β -グルコシダーゼのさらなる高機能化を試みた。

また、先述の新規高機能 β -グルコシダーゼのスクリーニングとその解析と並行して、既存の β -グルコシダーゼの解析も進め、 β -グルコシダーゼの糖転移メカニズムや基質認識メカニズムの解明も試みた。

4. 研究成果

(1) メタゲノム由来高機能 α -グルコシダーゼの単離と解析

メタゲノム DNA を利用したファンクショナルスクリーニングによって生成物阻害耐性を有する α -グルコシダーゼを複数単離することに成功した。その中でも特に生成物阻害耐性が優れた高機能 α -グルコシダーゼ (MeBgID2 と命名) に関して、詳細な解析を進めた。本酵素はそのアミノ酸配列から Glycoside hydrolase family 1 (GH1) に属していると予想された。MeBgID2 の基質特異性解析の結果から、本酵素は α -グルコシダーゼ活性だけでなく、強い α -ガラクトシダーゼ活性および α -フコシダーゼ活性を有しており、また、弱いながら α -キシロシダーゼ活性や α -グルコシダーゼ活性も有していることが明らかになった。本酵素の *p*-nitrophenyl (*p*NP)- α -D-glucopyranoside への活性 (*p*NP の遊離量) はグルコースやキシロース、マルトースなどの添加によって劇的に上昇した。

また、MeBgID2 をトリコデルマ属糸状菌由来セルラーゼと共にリグノセルロース系バイオマス (アルカリ処理を施した稲わら) へ作用させたところ、トリコデルマ属糸状菌由来セルラーゼのみの場合に比べ、MeBgID2 の添加によって糖化反応の効率が有意に向上することが明らかになった。糖化反応産物の分析の結果、トリコデルマ属糸状菌由来セルラーゼのみの場合ではセロピオースなどのセロオリゴ糖が残存しているのに対し、トリコデルマ属糸状菌由来セルラーゼに MeBgID2 を添加した場合は、セロオリゴ糖の分解が促進され、より効率的にグルコースが生産されていることが明らかになった。

MeBgID2 以外にも、生成物阻害耐性を有する α -グルコシダーゼや熱安定性を有する α -グルコシダーゼをメタゲノムライブラリーから単離しており、また、それらの高機能 α -グルコシダーゼをコードする遺伝子の同定にも成功している。複数の高機能 α -グルコシダーゼを獲得したことによって、その比較解析が可能になった。また、基質特異性などの酵素学的解析によってそれらの酵素が異なった基質特異性などを有していることも明らかになった。

(2) メタゲノム由来高機能 α -グルコシダーゼの熱安定性の改善

MeBgID2 はユニークな基質特異性や添加糖への応答性を有しており、リグノセルロース系バイオマスの糖化反応を促進する有用な酵素であるが、熱安定性が高くないという改良すべき点もあった。そこで次に、MeBgID2 の熱安定性を向上させるための研究を進めた。まず、MeBgID2 の X 線結晶構造解析を行い、本酵素の立体構造を明らかにした。MeBgID2 の立体構造およびアミノ酸配列を好熱性細菌由来の熱安定性が優れた酵素の立

体構造およびアミノ酸配列と比較し、MeBgID2 において熱安定性の向上に寄与すると予想されるアミノ酸残基を予測した。熱安定性に寄与すると予想された複数のアミノ酸残基に対して部位特異的変異を導入した変異 MeBgID2 を複数種類作成し、それらの熱安定性試験を行った。その結果、3 つの熱安定性向上に寄与するアミノ酸残基 (His8、Asn59 および Gly295) の特定に成功し、これらのアミノ酸残基に変異を導入することによって MeBgID2 の熱安定性を向上させることに成功した。

また、熱安定性の向上した変異 MeBgID2 をトリコデルマ属糸状菌由来セルラーゼと共にリグノセルロース系バイオマスの糖化反応に使用したところ、変異を入れていない MeBgID2 を使用した場合よりも有意に糖化反応の効率が向上した。

以上の結果から、メタゲノム法を駆使した高機能酵素の探索と酵素学的解析・構造解析に基づく酵素の改変の併用によって、より有用な酵素を作出可能であることが明らかになった。

(3) メタゲノム由来 α -グルコシダーゼの糖転移メカニズムの解明

メタゲノムから単離された α -グルコシダーゼ Td2F2 は高い糖転移活性を有しており、ソフォロースやラミナリピオースなどの二糖を合成できる酵素である (引用文献)。Td2F2 は MeBgID2 と同様に GH1 に属する酵素であり、 α -グルコシダーゼ活性以外にも α -ガラクトシダーゼ活性や α -フコシダーゼ活性を有している。 α -グルコシダーゼの糖転移反応は希少なオリゴ糖を合成するために利用できる可能性があり、そのメカニズムの解明は有用な α -グルコシダーゼの開発に重要であると考えられる。

なぜ Td2F2 が高い糖転移活性を有するのかを明らかにするために、2 つのアプローチを並行して進めた。1 つは、Td2F2 へのランダム変異導入による糖転移活性が低下した変異 Td2F2 の取得とその解析による糖転移活性に重要なアミノ酸残基の特定であり、もう一つは結晶構造解析によって糖転移反応に重要な構造の特定である。2 つのアプローチを組み合わせることによって Td2F2 の糖転移反応や基質特異性に重要なアミノ酸残基を特定することに成功し、そのアミノ酸残基に変異を導入することによって糖転移反応産物が変化すること、また、基質特異性が変化することを見出した。

< 引用文献 >

Taku Uchiyama, Kentaro Miyazaki, Katsuro Yaoi (2013) Characterization of a novel β -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. Journal of Biological Chemistry 288, 18325-18334

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Tomohiko Matsuzawa, Masahiro Watanabe, Katsuro Yaoi (2017) Improved thermostability of a metagenomic glucose-tolerant β -glycosidase based on its X-ray crystal structure. Applied Microbiology and Biotechnology 101, 8353-8363 (DOI: 10.1007/s00253-017-8525-9)

Tomohiko Matsuzawa, Katsuro Yaoi (2017) Screening, identification, and characterization of a novel saccharide-stimulated β -glycosidase from a soil metagenomic library. Applied Microbiology and Biotechnology 101, 633-646 (DOI: 10.1007/s00253-016-7803-2)

Tomohiko Matsuzawa, Nobutada Kimura, Hikaru Suenaga, Katsuro Yaoi (2016) Screening, identification, and characterization of α -xylosidase from soil metagenome. Journal of Bioscience and Bioengineering 122, 393-399 (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.03.012)

Tomohiko Matsuzawa, Toshinori Jo, Taku Uchiyama, Jenny A. Manninen, Takatoshi Arakawa, Kentaro Miyazaki, Shinya Fushinobu, Katsuro Yaoi (2016) Crystal structure and identification of a key amino acid for glucose tolerance, substrate specificity, and transglycosylation activity of metagenomic β -glucosidase Td2F2. FEBS Journal 283, 2340-2353 (DOI: 10.1111/febs.13743)

〔学会発表〕(計5件)

松沢智彦 ユニークな新規糖質加水分解酵素の単離と解析 平成29年度日本応用糖質科学会東日本支部若手奨励賞受賞講演 2017年

松沢智彦、渡邊真宏、矢追克郎 メタゲノムから単離した生成物阻害耐性を有する β -グルコシダーゼの解析と高機能化 日本応用糖質科学会平成29年度大会 2017年

松沢智彦 メタゲノム由来新規酵素の探索・同定・精密解析・高機能化 2017年度生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー 2017年

松沢智彦、内山拓、城俊徳、Jenny Manninen、伏信進矢、矢追克郎 メタゲノム由来 β -グルコシダーゼTd2F2の生成物阻害耐性メカニズムの解析 日本農芸化学会2015年度大会 2015年

松沢智彦、内山拓、城俊徳、伏信進矢、矢追克郎 生成物阻害耐性 β -グルコシダーゼTd2F2の生成物阻害耐性機構の解析 日本応用糖質科学会平成26年度大会 2014年

出願状況(計1件)

名称: 生成物阻害耐性および基質阻害耐性を有する β -グルコシダーゼ、それをコードする遺伝子

発明者: 松沢智彦、渡邊真宏、矢追克郎

権利者: 国立研究開発法人 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2017-6497

出願年月日: 平成29年1月18日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松沢智彦 (MATSUZAWA Tomohiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号: 10711971