

麹菌由来のヘミセルロース側鎖分解酵素とアラビノース結合モジュールとのキメラ酵素の特性

山形大学 農学部 生物資源学科 小関卓也

【はじめに】

未利用植物バイオマスの再資源化の観点から細胞壁分解を効率よく行う研究開発が進められており、様々なセルラーゼおよびヘミセルラーゼが見出されている。特に、ヘミセルロースの主要成分のキシランはキシロース主鎖の他に、アラビノース、フェルラ酸、アセチル基等が側鎖に結合している。そのため、主鎖を加水分解する 1,4- β -キシラナーゼ、 β -キシロシダーゼのみならずアクセサリー酵素と呼ばれる α -L-アラビノフラノシダーゼ、フェルロイルエステラーゼ、アセチルキシランエステラーゼ等の側鎖加水分解酵素がキシランの効率的分解には必要とされる。一方、セルラーゼおよびヘミセルラーゼの中には触媒モジュールとセルロース結合ドメインなどの炭水化物結合モジュールとから構成されるモジュラー酵素が存在し、炭水化物結合モジュールは基質に結合し、酵素の触媒効率を高める役割があると考えられている。糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 54 に分類される α -L-アラビノフラノシダーゼの構造は N 末端側の触媒ドメインと C 末端側のアラビノース結合ドメインとからなることが 麹菌 *Aspergillus kawachi* NBRC4308 株由来の酵素タンパク質 (AkAbf54) の X 線結晶構造解析により明らかにされた¹⁾。また、アラビノース結合ドメイン (AkCBM42) はヘミセルロース側鎖のアラビノフラノースに特異的に結合し、アラビノフラノースの加水分解に寄与する新規な炭水化物結合モジュール (CBM42) として分類された²⁾。AkCBM42 を他のヘミセルロース側鎖分解酵素に連結しキメラ酵素によって触媒効率の向上から側鎖の分解率を増強し、その結果として、ヘミセルロース全体の酵素分解を向上させることを目的とした。

【方法】

(1) ヘミセルロース側鎖分解酵素と AkCBM42 とのキメラ酵素の造成

A. awamori NBRC4033 株由来フェルロイルエステラーゼ遺伝子と AkCBM42 (Gly336-Ser499) をコードする遺伝子とのキメラ酵素遺伝子を PCR 法により構築し、酵母 *Pichia pastoris* により発現させキメラ酵素を取得した。

(2) キメラ酵素 (AwFaeA-CBM42) の特性およびヘミセルロース分解効率の検証

キメラ酵素のキシラン結合活性 キメラタンパク質のキシランへの結合はアラビノース含量が高く、また、フェルラ酸も含まれる不溶性小麦アラビノキシラン (Megazyme) 用いて行った。50mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に 4% の基質と AwFaeA-CBM42 あるいは AwFaeA を添加し、2 時間保持後遠心により上清画分と沈殿画分を回収し、さらに沈殿画分は洗浄後 SDS を加え煮沸し遠心により上清画分を回収した。それぞれの回収した画分は SDS-PAGE で解析した。

フェルラ酸加水分解活性に及ぼす影響 50mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に 1% の前記基質を混合し、37°C で AwFaeA-CBM42 あるいは AwFaeA を作用させ、遊離したフェルラ酸を HPLC で測定し、その経時変化を調べた。

キシラン分解に及ぼす影響 50mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に 1% の前記基質を混合し、基質は 37°C で AkAbf54、AkAbf54+AwFaeA-CBM42 あるいは AkAbf54+AwFaeA で前処理した。また、酵素無添加をコントロールとした。基質を洗浄後 *Thermomyces lanuginosus* 由来のキシラナーゼを作用させ、生成する還元糖量をジニトロサリチル酸法で測定し、その経時変化を調べた。

【結果及び考察】

AwFaeA-CBM42 の発現および精製 *P. pastoris* 培養上清中のエステラーゼ活性は野生型 AwFaeA と同程度を示し、培養上清から陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。

SDS-PAGE より AwFaeA-CBM42 の分子量は 53,000 で、AwFaeA の 35,000 より大きく、また、抗 AwFaeA 抗体および抗 AkAbf54 抗体を用いたウェスタン解析によりキメラ酵素タンパク質が確認された。

AwFaeA-CBM42 のキシランへの結合 AwFaeA はほとんどがアラビノキシラン非結合画分から確認されたが、AwFaeA-CBM42 はアラビノキシラン結合画分から顕著なタンパク質バンドが見いだされ、アラビノキシランへの結合性が増大した。CBM42 がアラビノキシラン側鎖のアラビノースに結合し、結合性が増大したと考えられ、キメラタンパク質でも CBM42 が機能していると示唆された。

フェルラ酸加水分解活性に及ぼす影響 AwFaeA-CBM42 では反応開始とともに高いフェルラ酸遊離活性を示し、12 時間後には野生型に対して比活性で約 3 倍高いフェルラ酸遊離活性を示した。CBM42 によるキシランのアラビノース側鎖への結合により AwFaeA の触媒効率が高まったこと、また、CBM42 の結合定数はこれまで報告されている CBM と比べ低く、基質から解離し易いことも要因の一つと考えられる。

キシラン分解に及ぼす影響 α -L-アラビノフラノシダーゼおよびフェルロイルエステラーゼにより前処理した基質では前処理なしの基質に比べて、反応開始 24 時間以降キシラナーゼによる分解が顕著に高まった。これは前処理なしの基質ではキシラナーゼによる分解は反応初期には十分作用するものの徐々に側鎖による立体障害を受け、キシラナーゼによる分解が限定されてしまうが、前処理を施した基質ではキシラナーゼによる分解が進むことを示唆している。また、キシランは主鎖を分解する酵素のみでは 50% 程度の分解率であるが、側鎖分解酵素との併用により分解率は 100% に近づくことが報告されており³⁾、本結果はこれを裏付けるものである。

AkAbf54+AwFaeA-CBM42 あるいは AkAbf54+AwFaeA により前処理した基質とを比較した場合、キシラナーゼによる分解は反応初期においてキメラ酵素を用いた方が高い傾向が見られたものの、反応後期では違いはほとんどなくなった。これはキメラ酵素を用いた場合フェルラ酸の分解率が高まり、AkAbf54 による脱アラビノースが進み、キシラナーゼによる反応初期の分解率が向上したと考えられた。

【おわりに】

本研究の開発目標は、ヘミセルロース側鎖の分解を効率的に行うことで、未利用植物バイオマスの酵素分解処理の基盤技術を確認することにある。CBM42 はキシラン側鎖の分解に効果的に働くツールとなる可能性が示唆され、本研究をとおしてバイオエタノール製造等における原料利用率の向上に寄与することが期待される。

【参考論文】

- 1) Miyanaga, A., Koseki, T., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H. and Fushinobu, S. (2004) Crystal structure of a family 54 α -L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. *J. Biol. Chem.* 279, 44907-44914.
- 2) Miyanaga, A., Koseki, T., Miwa, Y., Mese, Y., Nakamura, S., Kuno, A., Hirabayashi, J., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H. and Fushinobu, S. (2006) The family 42 carbohydrate-binding module of family 54 α -L-arabinofuranosidase specifically binds the arabinofuranose side chain of hemicellulose. *Biochem. J.* 399, 503-511.
- 3) de Vries, R. P., Kester H. C. M., Poulse, C. H., Benen, J. A. E. and Visser, J. (2000) Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 327, 401-410.