

称号及び氏名 博士（応用生命科学） 馬場 祐太郎

学位授与の日付 平成27年3月31日

論文名 *Aspergillus aculeatus* 由来  $\beta$ -glucosidase 1 の生化学的解析  
及び活性が向上した変異酵素の取得

論文審査委員 主査 川口 剛司  
副査 片岡 道彦  
副査 阪本 龍司  
副査 炭谷 順一

## 論文要旨

### 緒言

セルロース性バイオマスを加水分解することで得られる単糖のグルコース（Glc）は、バイオエタノールを始めとする様々な有機化合物を発酵生産するための出発物質であるため、世界中に豊富に存在する再生可能な資源としてバイオマスを有効利用することが化石資源の枯渇対策の一つとして検討されてきた。糸状菌 *Trichoderma reesei* はセルロース分解酵素群の生産量が極めて多く、バイオマス糖化はそれらを用いた酵素糖化法で行うことが検討されている。しかし *T. reesei* 由来セルラーゼ剤には  $\beta$ -グルコシダーゼ活性が低いという欠点があり、本酵素剤を用いたセルロース性バイオマスの糖化液中に二糖であるセロビオース（C2）が蓄積する結果となる。C2 はセルラーゼに対して生成物阻害を引き起こすため、*T. reesei* のセルラーゼのみで植物バイオマスを完全に分解することは困難であった。当研究グループでは以前、*T. reesei* のセルラーゼと協調的に作用するセルラーゼ・ヘミセルラーゼ生産菌として *Aspergillus aculeatus* No. F-50 株を単離した。本菌が生産する酵素群の中で、特に  $\beta$ -グルコシダーゼ 1（AaBGL1）が相乗作用に大きく寄与することがわかっている。糖質加水分解

酵素ファミリー (GH) 3 に属する AaBGL1 はセロオリゴ糖に対する比活性が極めて高く、糖転移産物もほとんど生成しないため、単糖生成力が高い。これらのことから AaBGL1 はバイオマスの糖化効率を向上させるための重要な酵素であると位置づけられている。しかし現在でも糖化効率の改善が求められているため、我々は AaBGL1 の C2 に対する加水分解活性を向上させることで、*T. reesei* のセルラーゼの糖化効率の改善に役立つ変異酵素の取得を目指した。

AaBGL1 は 2013 年に立体構造解析が行われており、活性部位に対する部位特異的なアプローチが可能となった。そこで第一章ではまず、AaBGL1 において現在までに扱われていなかった、基質特異性の解析を中心とした生化学的な解析を行った。第二章では、第一章で得られた結果と立体構造情報を元にした site-saturation mutagenesis により、C2 に対する活性が向上した変異酵素のスクリーニングを実行した。第三章ではそこで得られた変異酵素を詳細に解析して、取得した変異アミノ酸に関して考察した。

## 第一章

### A. *aculeatus* 由来 b-glucosidase 1 の生化学的解析

部位特異的変異を導入するにあたり、まずは wild-type AaBGL1 (WT) の基質特異性と基質認識に関与するアミノ酸を予測する必要があると考えた。GH3 に属する BGL は  $\beta$ -グルコオリゴ糖に対する基質特異性やドメイン数などが多様であるが立体構造解析は進んでおらず、構造と機能の相関がほとんど得られていない。一方で AaBGL1 の生化学的な性質はセロオリゴ糖や各種セルロースに対する比活性が調べられたのみである。このような背景から、始めに AaBGL1 の各種オリゴ糖に対する基質特異性を酵素反応速度論的に詳細に調べることで AaBGL1 のサブサイト構造に関する情報を得ることを試みた。まず *p*-nitrophenyl グリコシドを用いてグルコシドに極めて高い特異性を有していることを確認した。次に  $\beta$ -グルコオリゴ糖に対するカイネティックパラメータを測定した。その結果、二糖では C2 < ゲンチオビオース (G2) < ラミナリビオース (L2) の順に触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) が上昇し、C2 に対する反応性が他の  $\beta$ -グルコ二糖と比較して低いことが明らかとなった。セロオリゴ糖に関しては C3 に対して  $K_m$  が劇的に低下して  $k_{cat}$  が上昇し、C4, C5 も C3 と同程度のパラメータを示した。以上の結果から AaBGL1 はセロオリゴ糖に対して -1, +1 サブサイトに加えて +2 サブサイトが存在することが強く示唆された。一方でラミナリオリゴ糖に対しては L3 を最大として鎖長依存的に  $k_{cat}/K_m$  が低下したため、L4 以上のラミナリオリゴ糖ではサブサイト構造に適合せず、立体障害が起きている可能性が考えられた。それに対して C4 以上のセロオリゴ糖では還元末端側が酵素の外側に突き出している可能性が示唆され、C3 と同等の反応性を保持していることが考えられた。また以上の結果から +1 サブサイトの基質特異性を変化させる、あるいはセ

ロオリゴ糖に対する +2 サブサイトを消失させることで C2 分解活性を向上できる可能性を見出した。

## 第二章 AaBGL1 のセロビオースに対する活性の向上を目指した部位特異的飽和変異導入によるスクリーニング

第一章の結果から +1, +2 サブサイトをターゲットした変異導入を計画した。そこで AaBGL1 の立体構造情報を元に + 側サブサイトを構成すると予想される, 分子表面に露出した 13 アミノ酸をターゲットとして選択し, site-saturation mutagenesis による変異ライブラリからのスクリーニングを試みることにした。スクリーニングに用いる宿主には, 全てのアミノ酸置換を網羅するために数百個の形質転換体を容易に取得しうる *S. cerevisiae* DC5 株を選択した。基質には 2.7 mM C2 と 1.5 mM pNP-Glc を用いて *S. cerevisiae* の培養上清と反応させ, どちらか, あるいは両方の基質に対する活性が WT と比較して上昇した変異酵素を候補として選抜した。13 の変異酵素ライブラリから約 7000 の変異酵素をスクリーニングした結果, 3 種類の変異ライブラリから 9 種類の変異酵素 (E69G, E69M, E69R, E69S, E69V, Q201E, S436R, S436T, S436V) を得た。

## 第三章 変異酵素の機能解析

第二章で得た 9 種類の変異酵素を *A. oryzae* を宿主として異種発現させ, 精製酵素を用いて評価したところ, 6 種類の変異酵素に関して WT に対してポジティブな結果を得た。E69V, E69M, Q201E 変異酵素は C2 に対する  $K_m$  が低下し, Q201E に関しては  $K_m$  の低下に加えて  $k_{cat}$  が増加していた。一方で E69S, S436T, S436V は  $K_m$ ,  $k_{cat}$  に関しては WT に対してポジティブな結果は得られなかったものの, 10 mM よりも高い濃度の C2 を基質とした時の Glc 生成速度が増加していた。E69M と E69V, S436T と S436V は各々類似した性質を示したため, E69M, E69S, Q201E, S436V の 4 種類に絞って二重, 三重変異酵素を作製した。その結果, E69M と Q201E を組合せる変異では Q201E の性質のみが反映され, 更には高濃度の C2 を基質とした際には反応性が低いという結果を得た。一方で E69S, Q201E, S436V を組合せた変異酵素では各々のポジティブな性質が相加的に反映される結果を得た。従って E69S, Q201E, S436V について詳細な解析を行った。

### ・Q201E

まず始めに Q201E がサブサイト構造や基質特異性に与える影響を調べたところ, 基質に対する親和性はほぼ変化させずに G2, L2 に対する  $k_{cat}$  が低下し, C3, C4 に対する  $k_{cat}$  が増加していた。続いて Q201N, Q201D を作製して C2 に対する反応性を調べたところ, 両変異酵素において WT よりも C2 に対する反応性が低下したことから, C2 に対する反応性が向上するには Q201E における E201 の側鎖の長さ

カルボキシル基の存在の両方が重要であることが明らかとなった。E201 が C2 の加水分解に与える影響を調べるために、C2 加水分解における pH プロファイルを WT と比較した。その結果、酸性 pH 側で Q201E 変異酵素の  $k_{cat}$  が一定して高かった。また pH 5–6.5 で急激に  $k_{cat}$  が減少して WT とほぼ同等の値を示し、さらに高い pH 領域では WT と同じ傾向を示して減少した。この結果から Q201E における E201 の解離していないカルボキシル基が酸塩基触媒に対してポジティブに作用していることが示唆された。一方で  $K_m$  に関しては pH 7.0 に近づくにつれて両酵素の  $K_m$  が近づく傾向を示したため、本実験の結果から E201 側鎖の解離状態が C2 に対する親和性に与える影響は議論できなかった。

#### ・E69S, S436V

これらの変異酵素は C3, C4 に対する反応性が WT と同等であり、+2 サブサイトにおける基質との相互作用が低下した変異ではないことが明らかとなった。そのため高濃度 C2 加水分解時にこれらの変異酵素の Glc 生成速度が WT と比較して増加する原因として、糖転移反応に影響を与えていることが示唆された。そこで 100 mM C2 の加水分解の経時変化を HPAEC-PAD を用いて追跡し、糖転移産物と考えられる三糖の検出と定量を試みた。その結果、WT でも反応初期に C3 と同様の保持時間にごく微量の三糖と推測される糖転移産物 (TG) が検出できたが、E69S, S436V 変異酵素ではその最大生成量が減少していた。この結果から、E69S と S436V 変異酵素は TG の合成、あるいは分解速度に影響を与える変異であることが示唆された。

## 総括

本研究では現在 *T. reesei* のセルラーゼに添加する BGL として最も効果的と考えられている AaBGL1 について生化学的に詳細な解析を行った。そこで得られたカイネティクスと立体構造のデータを基にした site-saturation mutagenesis により、C2 に対する比活性が向上した変異酵素を得ることに成功し、中でも相加的な影響が確認できた E69S, Q201E, S436V の 3 種類のアミノ酸について機能解析を行うことができた。今後本研究の成果が更なる機能改変に役立つことを期待する。

## 審査結果の要旨

化石資源の枯渇や地球温暖化への対策としてバイオマス資源からエネルギー源や有用化学品を製造するバイオリファイナリ技術の開発が進められている。植物性バイオマスを利用するには、まず植物体の主成分である多糖を分解して単糖を生成する必要があるが、環境に優しい酵素糖化法が注目されている。現在、糸状菌 *Trichoderma* 属のセルラーゼ剤が最強とされているが、不溶性セルロースの可溶化を指標に育種されてきたために、単糖生成力が乏しいという欠点が指摘されている。そのため、糖化液中に蓄積した二糖であるセロビオース (C2) がセルラーゼの生成物阻害を引き起こすために糖化系全体に影響を及ぼし単糖までの完全糖化は困難であった。*A. aculeatus* は *Trichoderma* 属のセルラーゼ剤と相乗作用を示すセルラーゼ生産菌として分離された糸状菌であり、生産する酵素群の中で特に糖質分解酵素ファミリー 3 (GH3) に属する  $\beta$ -グルコシダーゼ 1 (AaBGL1) が相乗作用に大きく寄与していることが分かっている。AaBGL1 はセロオリゴ糖に対する比活性が高く、糖転移活性がほとんど認められないため単糖生成力が極めて高い酵素であり、バイオマスの糖化効率を向上させるための重要な酵素と位置づけられているがさらなる酵素の改良が求められている。

AaBGL1 は 2013 年に立体構造が明らかにされており、活性部位に対して部位特異的なアプローチが可能となった。立体構造情報に加えて、本申請論文では AaBGL1 の基質特異性を中心とした詳細な酵素学的性質の解析で得られた知見を基に C2 に対する活性が向上した変異酵素を取得することを目的に展開された。

第 1 章では、AaBGL1 の様々な基質に対するカイネティックパラメータを求めることにより、基質特異性と基質認識に関与するアミノ酸を予測した。まず、 $\beta$ -グルコ二糖を基質としたときの比較では、C2 < ゲンチオビオース (G2) < ラミナリビオース (L2) の順に  $k_{cat}/K_m$  が高いことから、C2 に対する反応性が最も低いことが明らかとなった。セロオリゴ糖に関しては、C3 以上で劇的に  $K_m$  が低下したことからセロオリゴ糖に対して -1, +1 サブサイトに加えて +2 サブサイトが存在することが強く示唆された。一方、ラミナリオリゴ糖については L3 を最大として鎖長依存的に  $k_{cat}/K_m$  が低下したため、L4 以上では立体障害が起きている可能性が考えられた。以上の結果から、+1 サブサイトの基質特異性を変化させる、あるいは +2 サブサイトを消失させることで C2 分解活性を向上できる可能性を見いだした。

第 2 章では、立体構造情報を基にプラス側サブサイトを構成すると予想される分子表面に露出した 13 アミノ酸をターゲットとして飽和変異を導入し活性の向上した変異酵素を取得した。*S. cerevisiae* DC5 を宿主として 13 種の変異ライブラリを構築し、培養上清の 2.7 mM C2 と 1.5 mM pNP-Glc に対する活性が WT と比較して上昇した株を候補として選抜した。その結果、3 種のライブラリから 9 種類の変異酵素 (E69G,

E69M, E69R, E69S, E69V, Q201E, S436R, S436T, S436V) を得た。

第3章では、得られた9種類の変異酵素を *A. oryzae* を宿主として発現し、精製酵素を用いて評価した。E69V, E69M, Q201E 変異酵素は C2 に対する  $K_m$  が低下し、Q201E ではそれに加えて  $k_{cat}$  が上昇した。一方、E69S, S436T, S436V は  $K_m$ ,  $k_{cat}$  に関しては WT に対する向上は見られなかったが、10 mM 以上の高濃度 C2 を基質としたときの Glc 生成速度が上昇していた。この中で類似した性質を示すものを除いて、E69M, E69S, Q201E, S436V に絞り二重、三重変異酵素を作製した。その結果、E69S, Q201E, S436V の変異効果は相加的であることが示唆された。作製した変異酵素の中で最も高い触媒効率を示した E69M/Q201E は WT の約 2.9 倍であり、バイオマス酵素糖化実現に有望な酵素の取得に成功した。さらに、これらの変異がサブサイト構造や基質特異性、グルコース生成速度に与える影響について詳細に解析し、その要因について酵素学的に考察をしている。

本申請論文は、機能向上した変異 AaBGL1 の取得の成功だけでなく、サブサイト構造や基質特異性に関する重要な結果を得ている。したがってこれらの成果はバイオマスの酵素糖化といった応用分野のみならず GH3 BGL に関する新たな知見を与えるものであり、応用微生物学、応用酵素学分野に大きく貢献するものである。よって、最終試験の結果と併せて、博士(応用生命科学)の学位を授与することを適当と認める。