



培養法とメタゲノム法を駆使した糖質分解酵素の探索

香川大学農学部 松 沢 智 彦

はじめに

糖質、特に植物が合成する多糖類は地球上に最も豊富に存在する生物由来資源の一つであり、多糖類はそれを構成する単糖の種類や結合様式によって多種多様である。微生物はこの多糖類を分解することで炭素源・エネルギー源を獲得しており、複雑な構造の多糖類を作用機序の異なる様々な酵素を駆使することによって分解している。多糖類を分解するために微生物が生産する酵素は多様性に富んでおり、多糖類の分解の作法(使用する酵素の種類やその組み合わせ方)は微生物毎に異なる。

筆者らは、これまでに培養法とメタゲノム法によって糖質を分解するユニークな酵素や酵素間の協調的關係性、またこれらの酵素を駆使した糸状菌の緻密な多糖類分解システムの全体像(の一端)を明らかにしてきたので、以下にその概要を紹介する。

1. 培養法による麹菌のキシログルカン分解酵素の探索

培養法では、微生物の培養液や菌体から特定の活性を有する酵素を分離・精製することで酵素を同定する。筆者らは従来の手法に対してトランスクリプトーム解析を取り入れることにより、多糖類分解における酵素間の協調的關係性を発見した。

筆者らは麹菌 *Aspergillus oryzae* が生産するイソプリメベロース生成酵素をコードする遺伝子 (IpeA と命名) の同定した¹⁾。イソプリメベロース生成酵素 IpeA はキシログルカン(陸上植物の細胞壁や種子に含まれている複雑な側鎖構造を有する多糖類)に由来するオリゴ糖の非還元末端からイソプリメベロース(グルコースとキシロースから成る 2糖)を遊離するユニークな酵素であり(図1)、側鎖構造を有するキシログルカンオリゴ糖に適応した基質認識機構を有する酵素であった^{2,3)}。また、IpeA をコードする遺伝子の発現はキシログルカンオリゴ糖の存在下において劇的に誘導されることを見出した。*A. oryzae* において、IpeA と同様にキシログルカンオリゴ糖存在下において発現が誘導される遺伝子をトランスクリプトーム解析や RT-PCR 等によって探索したところ、2つの酵素(β -ガラクトシダーゼ LacA と α -キシロシダーゼ AxyA)を見出した。 β -ガラクトシダーゼ LacA はキシログルカンオリゴ糖の側鎖に結合しているガラクトース残基を遊離させることで、イソプリメベロース生成酵素 IpeA と協調的にキシログルカンオリゴ糖を分解することが明らかになった⁴⁾。また、もう一方の α -キシロシダーゼ AxyA は、IpeA によって生成されたイソプリメベロースを細胞内においてグルコースとキシロースに分解する酵素であった⁵⁾。

これらの酵素以外にも、麹菌がキシログルカン分解するために生産しているいくつかの分解酵素を同定した。キシログルカン特異的エンド β -1,4-グルカナーゼ (Xeg5A 及び Xeg12A) はキシログルカンの主鎖を切断し、キシログルカンをオリゴ糖

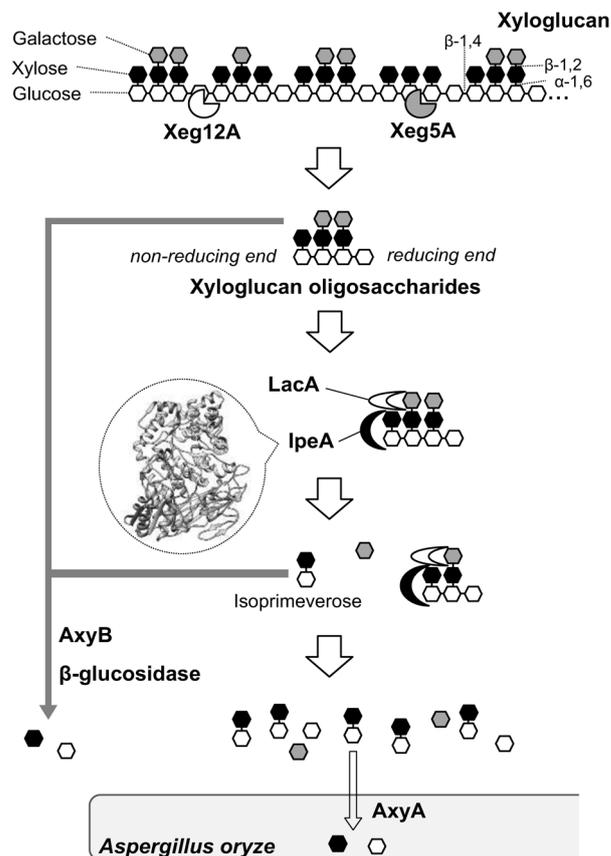


図1. 麹菌のキシログルカン分解酵素

化するが、両酵素はキシログルカンの切断部位が異なっている⁶⁾。細胞外 α -キシロシダーゼ (AxyB) は分泌シグナル配列を有する細胞外酵素であり、細胞外でイソプリメベロースやキシログルカンオリゴ糖のキシロース側鎖の遊離に関与していることが示唆された⁷⁾(図1)。

以上の研究から、麹菌は複雑な側鎖構造を有するキシログルカン分解のために作用機序(進化起源)の異なる複数の酵素を同調的に生産しており、これらの酵素が協調的に働くことでキシログルカンの分解が成し遂げられることが明らかになった⁸⁾。培養法は酵素のみでなく微生物の解析(トランスクリプトーム解析等の微生物視点での解析)も併用できることが最大のメリットであり、これにより、新規酵素の発見に加えて、従来の手法では見過ごされてきた『酵素間の協調的關係性(酵素システムにおける役割)』も明らかにできることが示唆された。

2. メタゲノム法を駆使した糖質分解酵素の探索

培養法の最大の課題は(現状では)『培養できる微生物が限られている』ことである。環境中には数多の微生物が存在しているが、実験室において培養できるのは(環境によっても大きく異なるが)存在する微生物の1%未満であり、大多数は難培

養・未培養微生物である。これらの難培養・未培養微生物はそもそも培養法を利用するためのスタートラインに立つことすら困難である。

メタゲノム法では環境中の微生物から培養を介さずに直接DNAを抽出するため、難培養・未培養微生物を含む微生物集団全体を遺伝子資源として利用することができる。メタゲノム法による酵素探索にもさまざまなアプローチがあり、例えば、環境中から抽出したDNAをシーケンス解析し、その配列情報から*in silico*で目的の酵素活性を有する(と推定される)酵素遺伝子を探査する方法や、環境中から抽出したDNAを断片化して大腸菌などの異種宿主に導入し、酵素の機能を指標に探索する方法などがあり、これまでに様々な環境に由来するメタゲノムから多くの新規酵素が単離されている⁹⁾。

断片化したメタゲノムDNAを大腸菌に導入した『メタゲノムライブラリー』を使用したスクリーニングによって、筆者らはこれまでに、植物由来バイオマスの分解において糸状菌セルラーゼとシナジー効果のある糖質分解酵素¹⁰⁾やカルシウムイオンによって劇的に活性化される糖質分解酵素¹¹⁾、既知の酵素とは少し異なった基質特異性を有する糖質分解酵素¹²⁾を単離した。また、メタゲノムから単離したユニークな酵素のX線結晶構造解析から、カルシウムイオンで酵素が活性化するメカニズム¹³⁾や酵素複合体の分子間相互作用による基質認識メカニズム¹⁴⁾、糖転移反応メカニズム¹⁵⁾、1つの酵素が複数の異なる糖質を認識するメカニズム¹⁶⁾など、ユニークな酵素の構造と機能の相関(ユニークさの分子機構)を明らかにした。

おわりに

メタゲノム法にも、①異種宿主における発現が難しい遺伝子は機能性を指標にしたスクリーニングが困難、②環境中で存在比率の少ない遺伝子の単離には工夫が必要、などの弱点がある。培養法とメタゲノム法の得手不得手を理解し、これらを相互補完的に組み合わせることで、微生物が進化の過程で獲得した複雑な多糖類分解システムの全容の解明とその応用(植物資源の酵素変換による利活用など)を目指し、また、農芸化学を下支えする酵素学的知見の提供を目指して、今後の研究を展開していきたい。

(引用文献)

- 1) Matsuzawa T et al. (2016) Identification of the gene encoding isoprimeverose-producing oligoxyloglucan hydrolase in *Aspergillus oryzae*. **J. Biol. Chem.** 291: 5080–5087.
- 2) Matsuzawa T et al. (2019) Crystal structure and substrate recognition mechanism of *Aspergillus oryzae* isoprimeverose-producing enzyme. **J. Struct. Biol.** 205: 84–90.
- 3) Matsuzawa T et al. (2022) Structural basis for the catalytic mechanism of the glycoside hydrolase family 3 isoprimeverose-producing oligoxyloglucan hydrolase from *Aspergillus oryzae*. **FEBS Lett.** 596: 1944–1954.
- 4) Matsuzawa T et al. (2019) Cooperation between β -galactosidase and an isoprimeverose-producing oligoxyloglucan hydrolase is key for xyloglucan degradation in *Aspergillus oryzae*. **FEBS J.** 286: 3182–3193.

- 5) Matsuzawa T et al. (2020) Identification and characterization of α -xylosidase involved in xyloglucan degradation in *Aspergillus oryzae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 104: 201–210.
- 6) Matsuzawa T et al. (2020) Identification and characterization of two xyloglucan-specific endo-1,4-glucanases in *Aspergillus oryzae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 104: 8761–8773.
- 7) Matsuzawa T et al. (2022) Characterization of an extracellular α -xylosidase involved in xyloglucan degradation in *Aspergillus oryzae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 106: 675–687.
- 8) Matsuzawa T et al. (2021) Enzymatic degradation of xyloglucans by *Aspergillus* species: a comparative view of this genus. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 105: 2701–2711.
- 9) Matsuzawa T (2019) The metagenome approach: A new resource for glycosidases. **Trends Glycosci. Glycotechol.**, 31: 15–20.
- 10) Matsuzawa T and Yaoi K (2017) Screening, identification, and characterization of a novel saccharide-stimulated β -glycosidase from a soil metagenomic library. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 101: 633–646.
- 11) Matsuzawa T et al. (2015) Screening, identification, and characterization of a GH43 family β -xylosidase/ α -arabinofuranosidase from a compost microbial metagenome. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 99: 8943–8954.
- 12) Matsuzawa T et al. (2016) Screening, identification, and characterization of α -xylosidase from a soil metagenome. **J. Biosci. Bioeng.**, 122: 393–399.
- 13) Matsuzawa T et al. (2017) Crystal structure of metagenomic β -xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase activated by calcium. **J. Biochem.**, 162:173–181.
- 14) Nakamichi Y et al. (2022) Crystal structure of glycoside hydrolase family 31 α -xylosidase from a soil metagenome. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 86: 855–864.
- 15) Matsuzawa T et al. (2016) Crystal structure and identification of a key amino acid for glucose tolerance, substrate specificity, and transglycosylation activity of metagenomic β -glucosidase Td2F2. **FEBS J.**, 283: 2340–2353.
- 16) Matsuzawa T et al. (2022) Crystal structure of metagenomic β -glycosidase MeBglD2 in complex with various saccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 106: 4539–4551.

謝辞 本研究は香川大学農学部および産業技術総合研究所生物プロセス研究部門において行われたものです。糖質分解酵素の世界に招いていただいた矢追克郎先生(産業技術総合研究所)、酵素の結晶構造解析で本研究をお支え頂きました渡邊真宏先生・中道優介先生(産業技術総合研究所)、藤本 瑞先生(農業・食品産業技術総合研究機構)、伏信進矢先生(東京大学)、メタゲノム解析をご指導頂きました末永 光先生・木村信忠先生(産業技術総合研究所)、麹菌の研究において多くのご助言を賜りました五味勝也先生・新谷尚弘先生・渡部 昭先生(東北大学)、日々の研究遂行と研究室運営にご支援とご助言を賜りました櫻庭春彦先生・田淵光昭先生・田中直孝先生(香川大学)、また、共同研究者の皆様にも深く御礼申し上げます。最後に、これまでご指導を賜り、また、本奨励賞にご推薦くださいました竹川 薫先生(九州大学)に厚く御礼申し上げます。