機能性オリゴ糖産生を目指したデータ駆動型キシラナーゼの開発

国立研究開発法人産業技術総合研究所 機能化学研究部門　渡邊 真宏

【略歴】
2009 年 横浜市立大学大学院 国際総合科学研究科 博士課程修了、博士(理学)学位取得
2009 年 理化学研究所 放射光科学総合研究センター 米倉生体機構研究室 特別研究員
2013 年 産業技術総合研究所 バイオマスリファイナリー研究センター 特別研究員(2013.4～ 研究員)
2015 年 同 機能化学研究部門 研究員、(2016.10～ 主任研究員)、この間 2019 年 カリフォルニア大学デービス校 客員研究員(現在に至る)

糖質分解酵素キシラナーゼは、バイオマスの糖化(キシランの分解)をはじめ、パルプ漂白、飼料加工、食品加工分野など幅広い分野で利用されている。また、昨今の健康志向の高まりによるプロバイオティクス素材の重要性が増す中、キシロオリゴ糖の生産用酵素として利用が期待されている。そのキシロオリゴ糖は、キシロース鎖が 2～10 糖連結したポリマーからなり、各種オリゴ糖の中で最も高いプレバイオティクス効果を示すことが知られている。キシロオリゴ糖の中でも、特にキシロビオースとキシロトリオースはビフィズス菌増殖活性を持つ他、化粧品添加物などの機能性素材として今後需要の拡大が見込まれるオリゴ糖である。このような中、我々のグループが見出したセルラーゼ高発現生産菌 *Talaromyces cellulolyticus* の GH family 11 キシラナーゼ(XylC)[1][2]は、キシランに対する高い分解活性を有しており、キシロオリゴ糖の生産酵素として有望である。しかし、当該酵素はキシロビオースやキシロトリオースを選択的に産生できないことに加え、酵素反応の時間経過と共に単糖であるキシロースが蓄積してしまうことが課題であった(図 1)。また、酵素の熱安定性が低く、酵素の長時間使用が困難であることから、耐熱性の向上が求められていた。

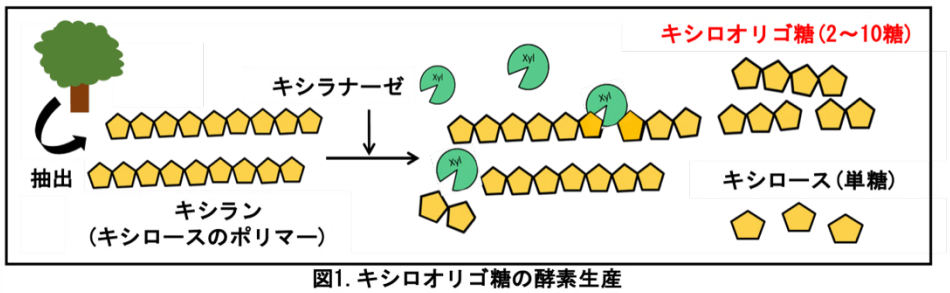

図1. キシロオリゴ糖の酵素生産

立体構造に基づくキシラナーゼの機能改変

我々は、キシロビオース及びキシロトリオースの高純度産生を目指し、X 線結晶構造解析をベースに XylC の耐熱化及び基質特異性を改変した。耐熱化は当該酵素の N 末領域にジスルフィド結合等を導入することにより、比活性を低下させることなく熱安定性を向上することができた(58→80.5℃)[3]。また、当該酵素による前処理後バガスを使った糖化実験では、糖化効率が改善され不純物を含む実バイオマスでも酵素が機能することを確認した[4]。一方の基質特異性の改変については、XylC とキシロオリゴ糖の複合体モデルをベースに触媒残基である 2 つのグルタミン酸周辺のアミノ酸に対して、水素結合や疎水性相互作用の付加や消失のための変異を導入した。この改変 XylC を用いて市販キシランに対する反応分解物を HPLC 分析した結果、最終的にキシロース生成量が約半分(1.27→0.6 g/L)にまで低下した一方、キシロトリオース生成量を約 10 倍(0.23→2.52 g/L)向上させることができた(キシロビオースは野生型とほぼ同量(1.3→1.2 g/L))[5]。しかし、キシロース含量がプロダクト全体のおよそ 10%を占めており、更なる酵素改変が必要である。

今後の展望

酵素反応後のキシロースの蓄積を更に抑えるため、計算化学により基質特異性の改変を試みる(図 2)。具体的には、耐熱 Xyl1C の結晶構造と分子力場計算により得られたリガンド(キシロオリゴ糖)を用いて(図 2(1))、酵素-リガンドのドッキングシミュレーションを実施する(同(2))。次に、耐熱 Xyl1C の活性中心周辺の全アミノ酸に対して各々20 種類の変異を導入した複合体モデルを計算する。得られた複合体モデルについては、統計解析により立体構造やリガンド結合エネルギーが安定な複合体モデルをランキングし、上位モデルを抽出する(同(3))。その後、選定されたアミノ酸配列(変異体)について Wet 評価を実施し、目的の改変酵素を取得する。また、これと並行して、ターゲットのキシロビオースもしくはキシロトリオースを選択的に産生する新たなキシラナーゼを探索していきたいと考えている。

上記のようなデータ駆動型の酵素改変は、本研究の糖質分解酵素にのみならず、酵素全般で応用が可能である。今後は、立体構造、計算化学並びに統計解析を上手く組み合わせることで、これまで困難であった酵素反応を可能にする酵素デザインを展開していきたい。

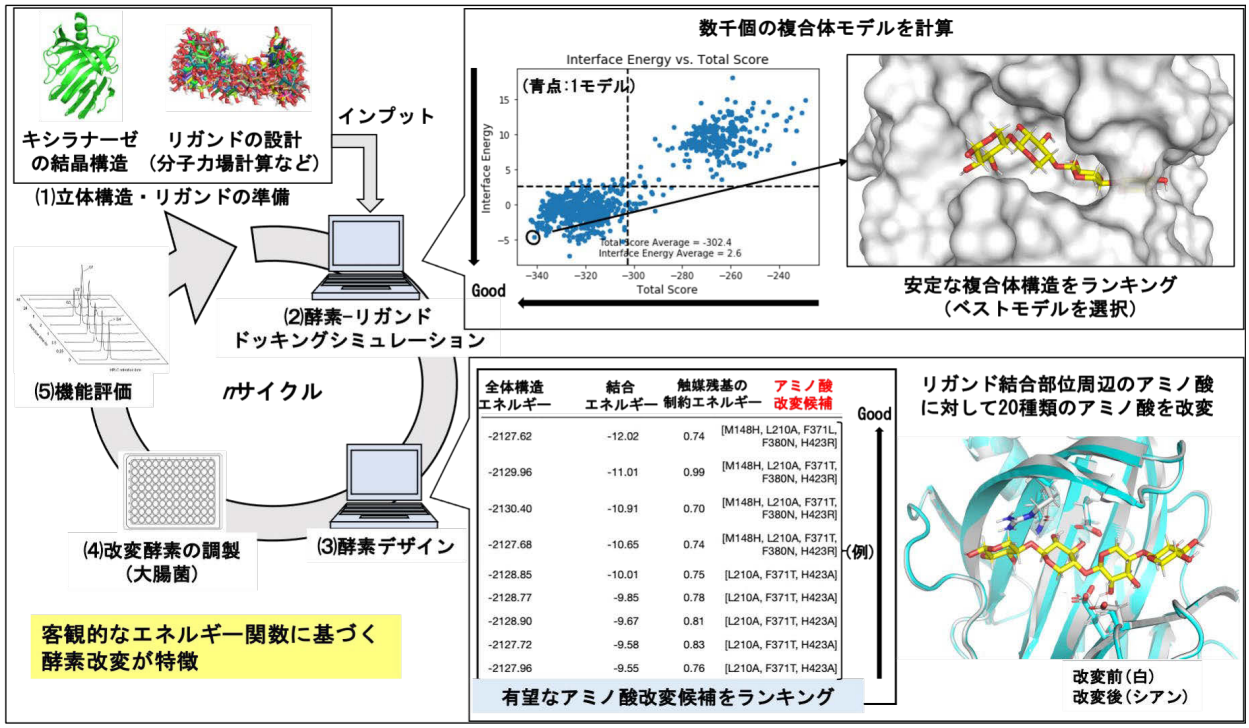

図2. データ駆動型酵素開発の流れ

[1] Watanabe, M. *et al.* (2014) *AMB Express.* 4:27.
[2] Kataoka, M. *et al.* (2014) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174:1599-1612.
[3] Watanabe, M. *et al.* (2016) *Biochemistry* 55:4399-4409.
[4] 石川 一彦, 渡邊 真宏 他 特許6689487号.
[5] 渡邊 真宏 他 特願2018-527249.