

2023 年度 杉山産業化学研究所助成報告書

「セロデキストリンホスホリラーゼ等のグルカン分解酵素の逆反応を用いた

長鎖 β -1,4-グルカン鎖合成系の開発」

東京大学大学院農学生命科学研究科 砂川 直輝

1. 背景及び目的

植物細胞壁の主要成分であるセルロースは植物細胞壁の力学強度を担う主要成分の一つであり、材料として広く用いられている天然高分子である。セルロースは植物を主とする生物中のセルロース合成酵素によって、糖ヌクレオチドを基質として重合されるが、重合後のセルロース構成分子がどの様にしてセルロース繊維へと形態形成していくかについては未だ明らかになっていない。これらセルロースの形成機構を明らかにする為にこれまで様々な研究が行われてきているが、セルロース合成酵素は膜タンパク質複合体であることから、人工的に多量のセルロースを酵素合成する事は未だ困難である。そこで本研究ではセルロースと同じ分子構造を有するセロデキストリンの加リン酸分解酵素（CDP）の逆反応を活用し、高分子量のセルロース分子の酵素合成法確立を試みた。

2. 実験方法

2-1. CDP 安定変異体の確立

利用に際して *Clostridium thermocellum* 由来の CDP 酵素（CtCDP_wt）は保存安定性が乏しい事が明らかになった為、CDP の分子表面に存在するジスルフィド結合の形成に関与しないシステイン残基を全てセリン残基に置換した変異体（CtCDP_CS）を考案し、時間経過に伴う活性および構造評価を実施した。

2-2. 改変 CDP 酵素を用いた有機溶媒環境中でのセルロース合成反応の検討

2-1.にて構築した CDP 安定変異体（CtCDP_CS）に対して有機溶媒中での安定性を付与する為、凍結乾燥酵素の調製を行った。またこの際にスクロース、トレハロース、グリセロール等の添加剤の使用を検討した。有機溶媒中での酵素活性の有無はセロオリゴ糖を基質とした分解による評価により実施した。有機溶媒としては過去にセルロースの GPC 分析などで使用実績があるジメチルスルホキシド（DMSO）、アセトニトリル（ACN）、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルアセトアミド（DMAc）等の水溶性有機溶媒、及びこれらと水を混ぜた混合溶媒において検討を実施した。分解活性が確認された条件において、セロビオースとグルコース-1-リン酸（G1P）を用いたセルロース合成反応を試みた。

3. 結果及び考察

3-1. CDP 安定変異体の確立

活性測定により、調製後 6 週間が経過した C α CDP_wt 酵素は触媒活性が 1/5 程度に低下する事を明らかにした。また動的光散乱(DLS)測定の結果からは、6 週間経過後の C α CDP_wt 精製酵素溶液中には半径が 100 倍程度に拡大した凝集物と思われる散乱体の生成が確認された。一方、システイン残基の変異体である C α CDP_CS 酵素ではこれらの活性低下や散乱体の生成が抑制されていた事から、C α CDP_wt における保存中の活性低下は酵素表面に存在するジスルフィド結合に関与していないフリーのシステイン残基が、酵素分子間で作用する事で意図しない凝集が生じ、これにより活性が低下するモデルが示唆された。加えて構造解析の結果からは、C α CDP_CS 上の C372S と C625S の 2 か所のアミノ酸変異において、野生型からの運動性の低下が確認された。この事から C α CDP_CS における安定性の向上は分子間作用だけではなく、分子内における安定性向上の影響による可能性が示唆された。

3-2. 改変 CDP 酵素を用いた有機溶媒環境中でのセルロース合成反応の検討

セロオリゴ糖を基質として用いた分解活性での評価により、凍結乾燥法により調製した C α CDP_CS は凍結乾燥時の添加剤の有無に関わらず用いた水溶性有機溶媒中での活性を保持する事が確認された。

一方で CDP によるセルロース合成反応の基質となる G1P の有機溶媒への溶解性が低く、高い有機溶媒濃度条件下での合成反応を検出する事は出来なかった。今後は、より適切な溶媒条件の調整や、糖合成活性の強い CDP の活用、異なる反応機序を有する酵素の適用等を含め検討を行い、セルロースの形成機構の理解へと繋げていきたいと考えている。

4. 成果報告

1. Kuga Tomohiro, Naoki Sunagawa, and Kiyohiko Igarashi. "Effect of Free Cysteine Residues to Serine Mutation on Cellodextrin Phosphorylase." *Journal of Applied Glycoscience* 71, no. 2 (2024): 37-46.
2. 砂川 直輝, 久我 友大, 今井 友也, 五十嵐 圭日子. “セロデキストリンホスホリラーゼにより合成されたセルロース II 型結晶の酵素分解特性” P061 セルロース学会第 30 回年次大会, 2023 年 9 月
3. 砂川 直輝. “バイオ有機素材の宇宙リサイクルシステム開発” シンポジウム「宇宙でのモノ創り」 北海道大学 2023 年 12 月

謝辞

杉山産業化学研究所研究助成により有機溶媒環境下での糖分解反応系の構築、および糖合成反応系構築に向けた基盤を築く事が出来ました。多大なるご支援を戴き、心より御礼申し上げます。