

2026年3月31日

2023年度 杉山産業化学研究所助成報告書

「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、細胞壁の力学強度を担うだけでなく、紙の原料や液晶ディスプレイ用フィルム材料（セルロース誘導体）として利用されるなど、生活に不可欠な素材である。セルロースは主に植物の有する合成酵素によって単糖が連続的に重合されることで生産されるが、合成酵素の不安定さや溶液中での取り扱いの困難さから、天然と同等のセルロースを人工的に合成する手法は未だ確立されていない。

このような背景から、合成酵素を用いないセルロース合成研究が多角的に進められており、申請者らもセロデキストリン加リン酸分解酵素（CDP）を活用した合成系の検討を行ってきた。しかし、CDPを用いた手法では、原料基質が水系溶媒にしか溶けない一方で、生成物であるセルロースが難溶性であるため、重合度の低いセルロースしか合成できないという課題があった。

近年、申請者らは、ヘミセルロースの一種であるキシログルカンに作用する「キシログルカンエンドトランスグルコシラーゼ（XTH）」のうち、特定の酵素がセルロースの構成成分である β -1,4-グルカン鎖に対して糖転移活性を有することを明らかにした。そこで本研究では、XTHを活用した長鎖 β -1,4-グルカン鎖合成系を構築し、セルロースの酵素合成実現に向けた知見を得ることを目的とした。

2. 結果及び考察

2-1. AtXTH3 大量発現系の構築

既報においてグルカン鎖転移活性を確認した AtXTH3 は、従来、酵母を用いた組換え生産系で調製していた。しかし、生産性が数 $\mu\text{g/L}$ -培養液程度と極めて低く、詳細な検討が困難であった。そこで本研究では、他のタンパク質ドメインとの融合タンパク質として、AtXTH3 の大量発現系の構築を試みた。酵母および大腸菌を宿主として種々の融合タグを検討した結果、数 mg/L スケールでの AtXTH3 生産が可能であることを確認した。得られた生産量は CDP と同程度であり、これにより AtXTH3 を活用した多糖合成研究の基盤が整った。



図: 生産・精製された融合タンパク質-AtXTH3 複合体

2-2. AtXTH3 酵素を用いた MLG の重合

調製した融合タンパク質 AtXTH3 の活性を評価するため、キシログルカン (XG) および混合結合型 β -グルカン (MLG : mixed-linkage (1,3;1,4)- β -D-glucan) を用いた反応を検討した。MLG は AtXTH3 の基質となり得る β -1,4-グルカン領域を持つが、セルロースとは異なり水溶性を有する。本検討では、落球式粘度計を用いて MLG と融合タンパク質 AtXTH3 を反応させ、粘度変化による活性評価を試みた。

検討の結果、調製した融合タンパク質 AtXTH3 が活性を保持していることを確認した。粘度変化の挙動において、XG を基質とした場合は粘度が低下したのに対し、MLG 単独、あるいは MLG とセロオリゴ糖が共存する条件下では粘度が増加することが判明した。一般に XTH は細胞壁内でキシログルカンを繋ぎ変え、分子を再構成する酵素と考えられている。しかし、本結果により、AtXTH3 は MLG に作用して糖鎖を伸長、あるいは水中に溶解しにくい β -1,4-グルカン領域を増加させることで、細胞壁の物性を強化する機能を持つ可能性が示唆された。

2-3. AtXTH3 酵素を用いた長鎖 β -1,4-グルカン鎖合成の検討

AtXTH3 による長鎖 β -1,4-グルカン鎖合成の可能性を検討するため、セロオリゴ糖を基質とした合成反応を評価した。既報では、セロペンタオース (G5) をドナー基質、蛍光標識されたセロテトラオース (G4) をアクセプター基質とした反応により、7 糖の蛍光標識オリゴ糖が得られることが確認されている。しかし、今回 G5 のみを単一基質として反応を行い、生成物を MALDI-TOF MS により解析したところ、糖重合物のピークは観測されなかった。次に、セロヘキサオース (G6) を単一基質として反応を行った結果、10 糖、9 糖、および 8 糖に相当する明確な重合物のピークが確認された。一方で、分解物として生じ得る 4 糖の質量範囲にはピークが見られなかった。以上の結果から、AtXTH3 は極めて強い糖転移活性を有しており、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリーに属しながらも、 β -1,4-グルカン鎖の重合において極めて有望な酵素であることが示された。一方、G6 を基質とした系では、基質の水に対する溶解度が低いため、十分な量の糖重合物を得ることが困難であった。そこで、DMSO を加えた条件下で同様の反応を試みた。その結果、重合物や G6 の加水分解物

(G4等)は検出されず、5糖(G5)のみが生成した。また、添加物濃度を減少させるとG5の生成量は低下し、再び10糖や9糖などの重合物の生成量が増加した。以上の結果から、AtXTH3は10糖程度の鎖長を持つ糖鎖に対してより強いアフィニティーを有しており、G6を基質とした場合には、重合と分解(転移を伴う再構成)が繰り返される平衡状態にある可能性が推察された。今後は、CDPによって合成された8糖(G8)など、より長鎖のオリゴ糖を基質として用いることで、さらに長鎖な β -1,4-グルカンオリゴ糖の酵素合成に取り組む予定である。

3. 論文、学会等発表

1. Kuga, T., Sunagawa, N., Kobayashi, K., Yamada, H., Imai, T., Uchihashi, T., & Igarashi, K. (2025). Enzyme-Directed Assembly of Antiparallel Cellulose II Nanocrystals: Unraveling the Mechanism Beyond Spontaneous Crystallization. JACS Au, 6(1), 154–165.
2. Kuga, T., Sunagawa, N., & Igarashi, K. (2024). Effect of Free Cysteine Residues to Serine Mutation on Cellodextrin Phosphorylase. Journal of applied glycoscience, 71(2), 37–46.
3. 砂川 直輝, 宇宙空間におけるセルロース合成., セルロース学会北海道・東北支部, 北海道・東北支部セミナー(招待講演), 2024年12月

謝辞

杉山産業化学研究所研究助成によりAtXTH3を題材とした研究基盤の醸成、および糖合成反応系構築に向けた研究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。