# 特集:極限環境で働くタンパク質の特徴と利用

# 糖質加水分解酵素の耐アルカリ性機構の解明と 耐アルカリ性の向上

# 中 村 聡

キシラナーゼは多糖キシランの加水分解酵素であり,主として糖質加水分解酵素(GH) ファミリー10および11に分布する.キシラナーゼの産業応用を考えた場合,アルカリ性 かつ高温条件下で高活性を示す酵素が望まれる.本稿では,キシラナーゼの分類と触媒機 構について概説する.また,GHファミリー11に属する好アルカリ性微生物由来耐アル カリ性キシラナーゼを取り上げ,タンパク質工学的手法による耐アルカリ性機構の解明と 耐アルカリ性のさらなる向上について解説する.さらに,GHファミリー10に属する超 好熱性細菌由来耐熱性キシラナーゼの耐アルカリ性向上に向けた進化分子工学的研究を紹 介する.

### 1. はじめに

植物の細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、ペクチ ンなどの多糖類、さらにはリグニンから構成される. ヘミ セルロースは植物細胞壁からアルカリ性水溶液で抽出され る多糖混合物の総称であり、セルロースやペクチン以外の 細胞壁構成多糖を指す. β-1,4-キシラン(キシラン)はヘ ミセルロースの中で最も豊富に存在する多糖であり、D-キ シロースがβ-1,4 結合を介して連なった主構造をとる. キ シランのβ-1,4 結合を加水分解し、キシロースおよびキシ ロオリゴ糖を生成する酵素がβ-1,4-キシラナーゼ(キシラ ナーゼ; EC3.2.1.8)である. 近年、キシラナーゼの各種 産業への応用が注目を集めている<sup>1~3)</sup>. たとえば、キシラ ンの加水分解により得られるキシロオリゴ糖は、低カロ リーの人工甘味料、腸内細菌群を活性化する健康食品、さ らには化粧品の保湿成分として食品・化粧品産業で広く用 いられるに至っている.また,キシラナーゼはパルプ漂白 補助剤として製紙産業においても利用されている.すなわ ち,パルプの製造工程では,木材を強アルカリ性条件下で 煮沸することで,着色原因物質であるリグニンを除去す る.ついで,塩素漂白を行うが,その際,有害物質のダイオ キシン類が生じてしまう.漂白前のパルプにキシラナーゼ を作用させ,リグニン周囲のキシランを加水分解すること で,リグニンの洗い出し効果が高まり,結果として塩素の 使用量が低減できるという原理である.それ以外にも,小 麦粉の改質(製パン業),家畜飼料の消化性向上(畜産業) など,キシラナーゼの応用可能な産業分野は拡大の一途を たどりつつある.一般にキシランなどの多糖類はアルカリ 性や高温の条件において水に溶けやすくなることから,産 業応用を考えた場合,アルカリ性かつ高温条件下で高活性 を示すキシラナーゼが有利であることは論を待たない.

キシラナーゼは多くの細菌や糸状菌などによって生産される<sup>1,2)</sup>.現在までに報告されているキシラナーゼの多く は、反応至適 pH を酸性から中性領域に有する.このこと は、微生物の多くが酸性から中性の pH でよく生育するこ とと相関している.一方、好アルカリ性微生物由来のキシ ラナーゼの中には酸性からアルカリ性まで広い作用 pH 範 囲をもつものもあるが、アルカリ性領域に反応の至適を有 する酵素は知られていなかった<sup>4)</sup>.また、好熱性微生物が

東京工業大学大学院生命理工学研究科生物プロセス専攻 (〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259-J2-13)

Alkalitolerant mechanism and improvement of alkalitolerancy of glycoside hydrolases

Satoshi Nakamura (Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology, 4259–J2–13 Nagatsuta-cho, Midoriku, Yokohama 226–8501, Japan)

生産するキシラナーゼは一般に高い反応至適温度を有する 二つの酸性 が、アルカリ性において活性をもつものは報告されていな ち、二つの い.本稿では、好アルカリ性微生物由来アルカリキシラ 内部で互い

ナーゼの耐アルカリ性機構の解明と耐アルカリ性のさらな る向上について概説する.さらに,好熱性微生物由来耐熱 性キシラナーゼへの耐アルカリ性付与に向けた最近の研究 成果について紹介する.

## 2. キシラナーゼの分類と触媒機構

キシラナーゼを含む糖質加水分解酵素は、触媒ドメイン のアミノ酸配列の相同性に基づき 115 の糖質加水分解酵素 (GH) ファミリーに分類されている (http://www.cazy.org/ fam/acc\_GH.html). キシラナーゼは六つの GH ファミリー に分布しているが、GHファミリー10および11に属する ものが大部分である. これら二つの GH ファミリーに属す るキシラナーゼの間にはアミノ酸配列上の相同性はなく, 分子量や等電点なども異なっている(表1). GHファミ リー10キシラナーゼの触媒ドメインの分子量はGHファ ミリー11より大きく,酸性の等電点をもつ.一方,GH ファミリー11キシラナーゼは、等電点により酸性および 塩基性の二つのグループに分けられる.現在までに1,000 を超えるキシラナーゼのアミノ酸配列がタンパク質データ ベースに登録されているが、GHファミリー10および11 キシラナーゼはおよそ3:2の割合で分布している.これ までに、数多くのキシラナーゼについてX線結晶構造解 析が行われ, 現時点で GH ファミリー 10 および 11 合わせ て200種類余りの立体構造が報告されるに至っている (http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/). 両 GHファミリーに属する酵素の基本構造骨格は互いに異 なっており, GH ファミリー 10 キシラナーゼは  $(β/α)_{s}$ バ レル構造をとるのに対し、GHファミリー11キシラナー ゼはβ-ジェリーロール構造をとる.加水分解反応が進行 する触媒部位はクレフトとよばれるが, GH ファミリー10 キシラナーゼに比べ, GH ファミリー11 キシラナーゼは 深いクレフトを有する(後述,図2および7を参照).触 媒ドメインのみからなるシングルドメイン酵素の性質比較 において, 概して GH ファミリー11 よりも GH ファミ リー10キシラナーゼの方が高い耐熱性を有するものが多 いが、これは上述した基本構造骨格の違いに起因している のかもしれない.

GHファミリー10および11キシラナーゼは、いずれも

二つの酸性アミノ酸が関与する触媒機構をとる<sup>3,4)</sup>. すなわ ち、二つの酸性アミノ酸の側鎖カルボキシル基はクレフト 内部で互いに向かい合って存在し、そのうちの片方が一般 酸/塩基触媒として働き、もう一方が求核剤ならびに反応 中間体のオキソカルボニウムイオンの安定化に機能する (図1).反応の前後において基質である糖の還元末端のア ノマー型が変わらないことから、この反応機構はリテイニ ング機構とよばれる、リテイニング機構においては、一般 酸/塩基触媒として働くカルボキシル基は少なくとも反応 直前までプロトンを保持し続けることが必要となる. GH ファミリー 10 および 11 キシラナーゼにおいては、二つの 触媒残基はいずれもグルタミン酸が司る. 遊離型グルタミ ン酸の側鎖カルボキシル基の pKaは pH 4 程度であるから, 反応の至適を中性付近に有するキシラナーゼにおいても、 一般酸/塩基触媒残基の側鎖カルボキシル基のpKaはかな り高まっていることになる.従って、キシラナーゼの作用 pHのアルカリ性側は、一般酸/塩基触媒残基側鎖カルボキ シル基の pK。で規定されるものと考えられる.

# GHファミリー11アルカリキシラナーゼの耐アルカ リ性機構の解明と耐アルカリ性のさらなる向上

筆者らは、日本国内の土壌より、キシラナーゼ生産菌で ある好アルカリ性細菌 Bacillus sp. 41M-1 株を分離した<sup>4</sup>. 41M-1 株が分泌生産するキシラナーゼ(キシラナーゼJ) は、アルカリ性領域(pH 9.0)に反応の至適を有する耐(好) アルカリ性の酵素であった.本酵素は、GHファミリー11 に属する触媒ドメインおよび糖質結合モジュール(CBM) ファミリー36に属するキシラン結合ドメイン(XBD)か らなるマルチドメイン構造をとる<sup>4,5)</sup>.これまでに、キシラ ナーゼJ遺伝子の大腸菌における発現が行われ、タンパク 質工学的手法による触媒残基の同定が試みられた.その結 果、キシラナーゼJの一般酸/塩基触媒残基はGlu183、そ して求核剤残基はGlu93であることが推察された<sup>4)</sup>.キシラ ナーゼJはアルカリ性条件下においても高活性を示すこと から、本酵素のGlu183 側鎖カルボキシル基は中性酵素に比 べてさらに高い pK。値を有しているものと考えられた.

最近,筆者らはX線結晶構造解析による組換えキシラ ナーゼJの立体構造の決定に成功した(PDB ID:2DCK,2 DCJ).これまでに,触媒ドメインと糖質結合モジュール の立体構造を別々に解析した報告は多々あるが,完全長の マルチドメインキシラナーゼの立体構造を決定した例は少

表1 GHファミリー 10 および 11 キシラナーゼの触媒ドメインの性質比較

GHファミリー	平均分子量	平均等電点(pI)	基本構造骨格	触媒機構	酸/塩基触媒残基	求核剤残基
10	37,000	рН 5.7	$(\beta/\alpha)_{s}$	リテイニング	Glu	Glu
11	21,000	рН 5.0, 9.5	β-ジェリーロール	リテイニング	Glu	Glu



図1 GHファミリー10および11キシラナーゼの触媒機構(リテイニング機構) GHファミリー10および11キシラナーゼにおいては、二つの酸性アミノ酸の側 鎖カルボキシル基がクレフト内部で向かい合って存在する.片方が一般酸/塩基 触媒として働き、もう一方が求核剤ならびに反応中間体のオキソカルボニウムイ オンの安定化に機能する.加水分解反応の前後で糖の還元末端のアノマー型が変 わらないことから、リテイニング機構とよばれる.リテイニング機構において は、酸/塩基触媒残基の側鎖カルボキシル基のpK。は高まっている.

ない.キシラナーゼJの触媒ドメイン領域は,GHファミ リー11キシラナーゼに保存されているβ-ジェリーロール 構造をとり、2枚のβシートが重なることでクレフトを形 成していた(図2).以後、キシラナーゼJの触媒ドメイ ン領域のみから構成される欠失型酵素をΔXBDとよぶ. これまでに立体構造が明らかにされたファミリー11キシ ラナーゼについて、触媒ドメイン中に存在する塩橋の比較 を行った.ここでは、反応至適pHに応じ、アルカリキシ ラナーゼ、中性キシラナーゼおよび酸性キシラナーゼに分 類することとし、立体構造上、同じ位置に存在する塩橋を 横に並べて示した.キシラナーゼJ(ΔXBD)を含むアル カリキシラナーゼおよび一部の中性キシラナーゼには、他 の中性および酸性キシラナーゼには存在しない塩橋が存在 することが明らかとなった(**表**2).これらの特徴的塩橋 はクレフト内部でネットワークを形成していることから, キシラナーゼJの触媒活性,ひいては耐アルカリ性に直接 影響を及ぼしている可能性が考えられた.

そこで、キシラナーゼJの耐アルカリ性に対するこれら 特徴的塩橋の関与を調べることにした.すなわち、キシラ ナーゼJのクレフト内部において特徴的塩橋を形成してい る酸性アミノ酸(Asp14, Glu16およびGlu177)および塩 基性アミノ酸(Arg48, Lys51およびLys52)をそれぞれ 中性アミノ酸(Asn ないしGln)へ置換することで、特徴 的塩橋を破壊した変異型酵素を調製した.その際、触媒ド メイン領域のみからなるΔXBDを基盤として用いた(XBD 領域を欠失することで、反応の至適はpH 8.5となる). 反応 pH 依存性を調べた結果,大部分の変異型酵素におい て、反応至適 pH の酸性側へのシフトが観察された<sup>60</sup>(図

アルカリキシラナーゼ		中性キシラナーゼ			酸性キシラナーゼ	
Bacillus sp. 41M-1 ΔXBD	Bacillus agaradhaerens Xyn11	Bacillus subtilis Xyn11X	Dictyoglomus thermophilum XynB	<i>Streptmyces</i> sp. S38 Xyn1	Aspergillus kawachii XynC	Aspergillus niger XYLA I
His10-Asp11	His11-Asp12	His12-Asp13				
Asp14-Lys51 Glu16-Arg48 Glu16-Lys52 Arg48-Glu177	Asp15-Lys52 Glu17-Arg49 Glu17-Lys53 Arg49-Glu178	Asp16-Lys53 Glu18-Arg49 Glu18-Lys53 Arg49-Glu177	Glu16-Arg47			
Glu177-Lys52	Glu178-Lys53	Glu177-Lys53	Asp173-Lys51			
Glu55-Lys135	Glu56-Lys136		Arg63-Asp114			
His59-Glu166	His60-Glu167	His60-Glu166		Arg58-Asp156		
Glu93-Arg128	Glu94-Arg129	Glu94-Arg128	Glu90-Arg125	0		
Asp98-Arg128	Asp99-Arg129	Asp99-Arg151	Glu95-Arg148	Glu87-Arg121	Glu84-Arg138	Glu84-Arg138
Asp98-Arg147	Asp99-Arg148	Asp99-Arg147	Glu95-Arg144 Glu95-His158	Asp92-Arg144 Asp92-Arg140	Glu84-Arg134 Glu84-His148	Glu84-Arg134 Glu84-His148
Lys111-Glu125	Arg105-Asp123 Lys111-Glu125	Arg105-Asp122 Lys111-Glu125	Arg101-Asp119	Arg98-Asp115		
•	Glu126-Lys142	Glu125-Lys141	Arg122-Asp138		Asp104-Arg138	Asp104-Arg138
Asp117-Arg151	Asp117-Arg152	Asp117-Arg151	Asp114-Arg148	Asp110-Arg144	Asp104-Arg134 Asp104-His148	Asp104-Arg134 Asp104-His148
Asp117-His161	Asp118-His162	Asp117-His161	Asp114-His158	Asp110-His154	Arg115-Asp114 Arg115-Glu118	Arg115-Asp114 Arg115-Glu118

表2 GHファミリー11キシラナーゼに存在する塩橋の比較

塩橋を形成している酸性アミノ酸および塩基性アミノ酸をハイフンで結んで示した.また,アルカリキシラナーゼおよび一部 の中性キシラナーゼにおいて,クレフト内部でネットワークを形成している塩橋を四角枠で囲んだ.



図2 キシラナーゼJ触媒ドメイン領域の立体構造(A)および クレフト内部に存在する特徴的塩橋(B)

塩橋を形成している酸性アミノ酸(Asp14, Glu16 および Glu 177)ならびに塩基性アミノ酸(Arg48, Lys51 および Lys52)を, 触媒残基(Glu93 および Glu183)とともに示した.

3).このことから、クレフト内部に存在するこれらの特徴 的塩橋は、本酵素の耐アルカリ性に重要な役割を果たして いることが明らかとなった.先にキシラナーゼJの一般 酸/塩基触媒残基 Glu183 の側鎖カルボキシル基はたいへん 高い pK<sub>a</sub> 値を有している可能性を指摘したが、これらの特 徴的塩橋はアルカリ性環境において Glu183 側鎖カルボキ シル基の pK。値を高く保つために機能しているのかもしれ ない.その機構としてはクレフト内部の微細構造の安定化 や水素結合ネットワークの強化などが考えられるが,詳細 は不明である.

次に、特徴的塩橋を形成するアミノ酸残基のうち、塩基 性アミノ酸のLys51 およびLys52 をより塩基性度の高い Arg へ置換することで、特徴的塩橋の強化を試みた. Lys 51 を Arg に置換した変異型酵素  $\Delta$  XBD<sub>K51R</sub> においては、反 応の至適が野生型∆XBDのpH 8.5からpH 9.0へとアル カリ性側にシフトしていた<sup>7</sup>(図 4). いくつかの GH ファ ミリー11に属する酸性および中性キシラナーゼにおいて も、タンパク質工学の手法により反応至適 pH をアルカリ 性側にシフトさせた例が報告されているが<sup>8~10)</sup>,アルカリ 酵素の反応至適 pH をさらにアルカリシフトさせたのは本 研究が初めてである.一方、 $\Delta XBD_{K51R}$ とは対照的に、 Lys52をArgに置換した Δ XBD<sub>K52R</sub>ではアルカリ性領域で の活性低下が観察された(図4参照). Lys52の Arg への 置換により局所的な立体障害が生じ、結果として塩橋ネッ トワークが崩れてしまった可能性も考えられる. 今後,特 徴的塩橋を破壊・強化した変異型酵素の詳細な立体構造解



図3 野生型∆XBD および特徴的塩橋を破壊した変異型酵素の反応 pH 依存性 キシラナーゼJの触媒ドメイン領域のみからなる欠失型酵素∆XBD を基盤とし、クレフト内部に存在する 特徴的塩橋を破壊した大部分の変異型酵素において、反応至適 pH の酸性側へのシフトが観察された.



反応pH

図4 野生型 Δ XBD,特徴的塩橋を強化した変異型酵素および分子表面に Arg を導入した 変異型酵素の反応 pH 依存性

キシラナーゼ J の触媒ドメイン領域のみからなる欠失型酵素 $\Delta$ XBD を基盤とし、クレフト 内部に存在する特徴的塩橋を強化した変異型酵素 $\Delta$ XBD<sub>K5IR</sub>,およびクレフト外部の分子表 面に Arg を導入した変異型酵素 $\Delta$ XBD<sub>R5</sub>において、反応至適 pH のアルカリシフトが観察さ れた.また、特徴的塩橋の強化と分子表面への Arg の導入は、耐アルカリ性の向上に互い に相加的に働いた.

析を行うことで、キシラナーゼJの特徴的塩橋と耐アルカ リ性機構との関連を明確に示すことが可能となろう.

強アルカリ性条件において高活性を示すある種のアルカ リセリンプロテアーゼは,通常のアルカリセリンプロテ アーゼに比して,分子表面により多くのArgおよび親水 性無電荷アミノ酸をもち,Lysおよび負電荷アミノ酸は少 ないという<sup>III</sup>. これまでに, *Trichoderma reesei*由来 GH ファミリー11キシラナーゼIIについて, クレフト外部の 分子表面 (Ser/Thr 表面とよばれる領域) に過剰の Arg を 導入した変異型酵素が構築された<sup>III</sup>. Ser/Thr 表面に五つ の Arg を導入した変異型酵素においては, 野生型では pH 5~6 にあった反応の至適が, pH 6~7 へとアルカリシフ



図5 キシラナーゼJ触媒ドメイン領域の立体構造およびArg 残基導入部位

Arg を導入した Ser/Thr 表面上の五つのアミノ酸(Ser26, Thr 34, Asn74, Asn76 および Asn192) を,特徴的塩橋を形成する 塩基性アミノ酸 Lys51 とともに示した.

トしていた. また, 当該変異型酵素の反応至適温度は, 野 生型酵素に比して5℃高まっていた.そこで筆者らは、キ シラナーゼJのクレフト外部分子表面に Arg を導入するこ とで,耐アルカリ性のさらなる向上を試みた.T. reesei 由 来キシラナーゼ II の例に倣い、 △ XBD の Ser/Thr 表面に 五つの Arg を導入した変異型酵素 Δ XBD<sub>R5</sub> (Ser26, Thr34, Asn74, Asn76 および Asn192 をいずれも Arg に置換;図 5) においては、反応至適 pH がアルカリ性側へシフトし ていた<sup>6,7)</sup> (図4参照).また、クレフト外部の分子表面へ の Arg の導入およびクレフト内部に存在する特徴的塩橋 の強化(Lys51のArgへの置換)を組み合わせた変異型酵 素ΔXBD<sub>R5/K51R</sub>においては,野生型酵素では pH 8.5 にあっ た反応の至適が、pH 9.5 にまでシフトすることが明らか となった<sup>7)</sup> (図4参照). さらに,変異型酵素ΔXBD<sub>R5</sub>およ び∆XBD<sub>в5/K51R</sub>の比活性は野生型酵素の1/2程度にまで低 下していたものの、反応至適温度の向上が認められた、以 上より、クレフト外部の分子表面への Arg の導入は、クレ フト内部に存在する特徴的塩橋の強化とは独立して、キシ ラナーゼJの耐アルカリ性の向上に互いに相加的に働くこ とが明らかとなった.キシラナーゼ」の耐アルカリ性機構 に不明な点は残されているものの、本酵素の耐アルカリ性 のさらなる向上へ向け大きな一歩を踏み出したといえよ う.

## GHファミリー 10 耐熱性キシラナーゼの 耐アルカリ性向上の試み

超好熱性細菌 Thermotoga maritima MSB8 株はGHファ ミリー 10 に属する二つのキシラナーゼ(キシラナーゼA および B)を生産する<sup>12)</sup>.キシラナーゼA は糖質結合モ

ジュールなどの付加ドメインをもつマルチドメイン構造を とるのに対し、キシラナーゼBは触媒ドメインのみから なるシングルドメイン酵素である.筆者らは,T. maritima MSB8株のゲノム情報<sup>13</sup>に基づきキシラナーゼB遺伝子を PCR 増幅し、その大腸菌での発現を行った<sup>14)</sup>. 組換えキシ ラナーゼBの性質を調べた結果、反応至適温度は100~ 110<sup>℃</sup> であることがわかった.また,キシラナーゼBは pH 3.0~9.0 の広い範囲で安定であったが、反応の至適は pH 6.0 であり、アルカリ性では活性が大きく低下するこ とがわかった(後述図6参照).さらに、タンパク質工学 的検討により、本酵素の触媒残基は Glu135 および Glu241 であることが明らかとなった. 産業応用上, アルカリ性か つ高温条件下で高活性を示すキシラナーゼが有利であるこ とは、本項の冒頭で述べたとおりである. そこで筆者ら は、すでに超高度の耐熱性を獲得している T. maritima MSB8 株由来 GH ファミリー 10 キシラナーゼ B の耐アル カリ性化を試みた.

本研究を開始した当時,キシラナーゼBの立体構造に 関する情報はなかったため、進化分子工学の手法を用いる こととした. すなわち,変異導入条件での PCR によりキ シラナーゼB遺伝子にランダム変異を導入して増幅した 後, ライブラリーを作製し, 各クローンについてキシラ ナーゼ活性を評価した.変異導入率が 0.30% のライブラ リーから 27,000 株のスクリーニングを行った結果,野生 型キシラナーゼBに比してアルカリ性での相対活性が向 上したと思われる変異型酵素 (変異体1)を生産するクロー ンが得られた<sup>14</sup>. 変異体1は三重変異体で, Asn15のTyr, Tyr35のPhe, そして Asn92の Asp への置換を含む. そこ で、Asn15、Tyr35 および Asn92 に単独の変異をもつ変異 型酵素をそれぞれ調製し,変異体1とともに反応 pH 依存 性を調べた. その結果,変異体1 (XynTB<sub>Mutant 1</sub>) および Asn 92をAspに置換した変異型酵素 XynTB<sub>N92D</sub>では,野生型 キシラナーゼ B (XynTB) に比して比活性が向上していた<sup>14)</sup> (図 6). また、中性での活性に対するアルカリ性での相対 活性を比較した場合,変異体1および変異型酵素 XynTB<sub>N92D</sub>においてはアルカリ性での相対活性も向上して いることがわかった.

その後,筆者らは組換えキシラナーゼB(野生型)のX 線結晶構造解析を行い,その立体構造を明らかにした<sup>15</sup> (PDB ID:1VBR,1VBU).これまでに報告されているキ シラナーゼの中で最も高い反応至適温度をもつ本酵素の結 晶構造が解かれたことにより,超高度耐熱機構の解明が期 待されよう.キシラナーゼBは,GHファミリー10キシ ラナーゼに保存されている(β/α)<sub>8</sub>バレル構造をとること がわかった(図7).そこで,変異体1で認められたアミ ノ酸置換部位を,キシラナーゼBの立体構造にあてはめ て示した.変異体1に含まれる三つの変異箇所のうち,



図6 野生型キシラナーゼB (XynTB),変異体1 (XynTB<sub>Mutant 1</sub>) および変異型酵素 XynTB<sub>NNDD</sub>の反応 pH 依存性

進化分子工学的手法により得られた変異体1および変異型酵素 XynTB<sub>NODD</sub>は,野生型キシラナーゼBに比して比活性が向上していた.また,中性での活性に対するアルカリ性での相対活性も,野生型キシラナーゼBに比して向上していることがわかった.



図7 キシラナーゼBの立体構造および変異体1で見出された 変異箇所

変異体1で見出された三つの変異箇所 (Asn15, Tyr35 および Asn92)を, 触媒残基 (Glu135 および Glu241) とともに示した.

Asn15 および Tyr35 はクレフト外側の,あまり加水分解反応に関与できない位置に存在する.一方で,Asn92 はクレフト内部に存在し,二つの触媒残基(Glu135 および Glu241)に隣接している.Asn92 の側鎖と触媒残基との直接的・間接的な相互作用が比活性と耐アルカリ性の向上をもたらしたものと考えられるが,その詳細は不明であり,変異型酵素 XynTB<sub>N92D</sub> の立体構造解析が待たれるところである.

今後は、XynTB<sub>N92D</sub>をベースとして進化分子工学的検討 を繰り返すことで、耐アルカリ性がさらに大きく向上した 変異型酵素の取得が可能となろう.その際、キシラナーゼ Bの立体構造情報が有力な武器となる.立体構造に基づき 変異導入箇所をある程度限定することで、耐アルカリ性化 にまったく無関係と思われる箇所に変異が導入されたク ローンをライブラリーから排除できるため、より効率的な スクリーニングが可能になると期待される.一方、最近に なって、GHファミリー 10 に属する二つのアルカリキシ ラナーゼの結晶構造が解かれた<sup>16,17)</sup>.GHファミリー 10 ア ルカリキシラナーゼに特徴的な構造を*T. maritima* MSB8 株由来キシラナーゼBに導入することによっても、本酵 素の耐アルカリ性向上が可能になるものと期待されよう.

## 5. おわりに

アルカリ性かつ高温の条件下で高活性を示すキシラナー ゼの取得は、産業応用上、たいへん有意義である.また、 キシラナーゼの耐アルカリ性機構の解明は学術的にも大き な価値があると考えられる.本稿では、もともと耐アルカ リ性を有する好アルカリ性微生物由来 GH ファミリー11 キシラナーゼ、ならびにすでに超高度の耐熱性を獲得して いる超好熱性微生物由来 GH ファミリー10キシラナーゼ に注目し、それらの耐アルカリ性の向上を目指した筆者ら の研究成果について駆け足で紹介した.現時点でキシラ ナーゼの耐アルカリ性機構の完全解明までには至っていな いが、キシラナーゼの反応至適 pH を自由自在に操作でき る時代はすぐそこまで来ているといえよう.

筆者ら研究成果に関する文献は総説を中心に引用したの で、それらの引用文献も併せてご参照いただきたい.本稿 で紹介した二つのキシラナーゼのX線結晶構造解析は、 元・東京工業大学大学院生命理工学研究科の田中信夫先 生、熊坂崇先生ならびに Ihsanawati 博士との共同研究によ り行われた.また,両酵素の耐アルカリ性向上という研究 成果は,同研究科の八波利恵先生および福居俊昭先生,さ らには筆者の研究室の梅本博仁博士,月村亘氏,故・玉野 井秀典氏,天野(諸熊)千尋氏,三宅(稲見)麻由子氏, 渡邉景子氏をはじめとする多くの学生諸君の努力の賜物で ある.ここに記して感謝する.

### 文 献

- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., & Saddler, J.N. (1998) *Microbiol. Rev.*, 52, 305–317.
- Kulkarni, N., Shendye, A., & Rao, M. (1999) FEMS Microbiol. Rev., 23, 411–456.
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005) FEMS Microbiol. Rev., 29, 3–23.
- 4) Nakamura, S. (2003) Catal. Surv. Asia, 7, 157-164.
- Sakata, T., Miyakubo, H., Osada, Y., Wada, R., Takahashi, H., Yatsunami, R., Fukui, T., & Nakamura, S. (2006) *J. Appl. Glycosci.*, 53, 131–136.
- Umemoto, H., Ihsanawati, Inami, M., Yatsunami, R., Fukui, T., Kumasaka, T., Tanaka, N., & Nakamura, S. (2007) Nucleic Acids Symp. Ser., 51, 461–462.
- Umemoto, H., Ihsanawati, Inami, M., Yatsunami, R., Fukui, T., Kumasaka, T., Tanaka, N., & Nakamura, S. (2009) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 965–967.
- Torronen, A. & Rouvinen, J. (1995) *Biochemistry*, 34, 847– 856.

- Fushinobu, S., Ito, K., Konno, M., Wakagi, T., & Matsuzawa, H. (1998) Protein Eng., 11, 1121–1128.
- Turunen, O., Vuorio, M., Fenel, F., & Leisola, M. (2002) Protein Eng., 15, 141–145.
- Shirai, T., Suzuki, A., Yamane, T. Ashidaa, T., Kobayashi, T, Hitomi, J., & Ito, S. (1997) *Protein Eng.*, 10, 627–634.
- 12) Winterhalter, C. & Liebl, W. (1995) Appl. Environ. Microbiol., 61, 1810–1815.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Venter, J.C., & Fraser, C.M. (1999) Nature, 399, 323–329.
- 14) Tsukimura, W., Watanabe, K., Morokuma, C., Ihsanawati, Yatsunami, R., Fukui, T., Kumasaka, T., Tanaka, N., & Nakamura, S. (2009) in Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization (Sakka, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, M., Matsui, H., Miyake, H. & Tanaka, A. eds.), pp. 423–427, Ito Print Publishing Div., Mie.
- 15) Ihsanawati, Kumasaka, T., Kaneko, T., Morokuma, C., Yatsunami, R., Sato, T., Nakamura, S., & Tanaka, N. (2005) *Proteins*, **61**, 999–1009.
- 16) Manikandan, K., Bhardwaj, A., Gupta, N., Lokanath, N.K., Ghosh, A., Reddy, V.S., & Ramakumar, S. (2006) *Protein Sci.*, **15**, 1951–1960.
- 17) Mamo, G., Thunnissen, M., Hatti-Kaul, R., & Mattiasson, B. (2009) *Biochimie*, 91, 1187–1196.