

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007年度～2008年度

課題番号：19688016

研究課題名（和文）糖酸化酵素を用いたセルラーゼ活性のリアルタイムモニタリング

研究課題名（英文）Real-time monitoring of cellulase activity using sugar oxidase

研究代表者

五十嵐 圭日子（IGARASHI KIYOHICO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80345181

研究成果の概要：本研究では、糖酸化酵素による活性検出法の感度の高さを利用し、これらの酵素に酸化還元電極を組み合わせることで、これまでの光学的手法では活性検出が不可能であった固体基質に対する酵素活性を、リアルタイムにモニタリングする手法を開発することを目的とした。2007年度は、メディエーターを用いた間接法によって、酸化還元電極を用いたセルラーゼ活性のリアルタイムモニタリングに成功し、さらに2008年度はメディエーターを介さない直説法によるセルラーゼ活性の測定にも成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
平成20年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
年度			
総計	17,700,000	5,310,000	23,010,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：バイオマス

1. 研究開始当初の背景

セルロースは、植物細胞壁成分中の約 50% を占める多糖であり、天然で最も豊富に存在する有機物である。地球上では年間 10^{10} - 10^{11} トンが光合成によって生産されているという報告があるが、利用されているのはごく一部であり、用途もほとんどが紙や建材といった繊維（fiber）としての利用にとどまっている。しかしながら、CO₂ 削減や原油高といった社会的背景を受けて、セルロース系バイオマスの高度利用が望まれており、バイオエタノール生産やバイオリファイナリーといったセルロースの新しい利用への期待が高ま

っている。

セルロースは、重合度が 10^3 - 10^4 程度のグルコース（ブドウ糖）のホモポリマーであり、その化学組成はデンプンと全く同じである。しかしながら、その溶解性はデンプンと比較してきわめて低く、重合度が 7 以上になるとほとんど水に溶解しなくなることが知られている。したがって、セルロース加水分解酵素（セルラーゼ）によってセルロースが加水分解されて可溶化するという一連の反応は、固液界面で進行する反応であると言える。しかしながら、いまだに固体セルロースの分解機構が明らかとなっていないのは、固液界面

における酵素反応を高感度にモニタリングする手法が確立されていないことが主な原因であると言える。

2. 研究の目的

本研究では、糖酸化酵素による活性検出法の感度の高さを利用し、さらにこれらの酵素に酸化還元電極を組み合わせることで、これまでの光学的手法では活性検出が不可能であった固体基質に対する酵素活性を、リアルタイムにモニタリングする手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

木材腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産するセロピオース脱水素酵素 (CDH) を大量に生産・精製し実験に供した。はじめにフェリシアン化カリウムを電子受容体として、結晶性セルロース (セルロース I および III₁) の *Trichoderma* 菌由来セルラーゼ製剤より精製して得られた糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー7 セロピオヒドロラーゼ I (*TrCel17A*) による分解を、電気化学アナライザーによってモニターした。また、*Ph. chrysosporium* からクローニングされたアルドース 1-エピメラーゼ (*PcA1EA* および *PcA1EB*) を組み合わせて *Ph. chrysosporium* 由来 GH ファミリー6 セロピオヒドロラーゼ (*PcCel16A*) および GH ファミリー45 に属するエンドグルカナーゼ (*PcCel145A*) の活性測定も試みた。さらに、組み換え CDH を炭素微粒子とともに炭素電極表面に固定化し、電極-CDH 間の電子伝達を確認するとともに、さらにセロピオースを基質としたときに触媒電流が観察されることを調べた。また、セロピオースの代わりに非晶性セルロース (リン酸膨潤セルロース) および結晶性セルロース (アビセル) と CBHI を添加し、本酵素が各セルロースを分解する際に生成されるセロピオースを、セロピオース脱水素酵素を固定化した電極によって直接測定することを試みた。

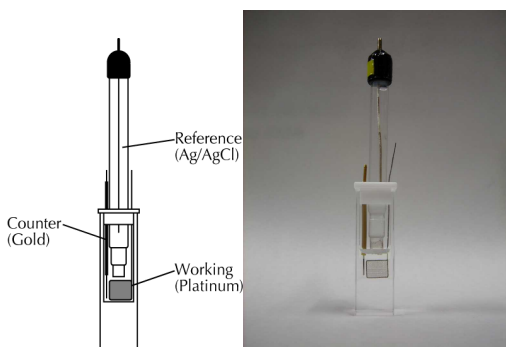


図 1 間接法によるセルラーゼ活性検出のための電気化学セル

4. 研究成果

本研究では、CDH を用いて電気化学的にセルラーゼ活性を測定するために、はじめに図 1 に示したようなセルを用い、間接法によるセルラーゼ活性の測定を試みた。

CDH とセロピオース存在下でフェリシアン化カリウムの還元を上述の電気化学セルにおける吸光度の変化から確認するとともに、反応液中の電圧を 0.5V に固定してセロピオースの酸化を電気化学的にモニターしたところ、電流値の変化量としてセロピオースの酸化をモニターすることができた。そこでセロピオースの代わりに種々のセルロースと *TrCel17A* を添加したところ、セルロースの分解性に応じた電流値が観察され、それぞれの電力量からセルラーゼ活性をモニターすることに成功した (図 2)。

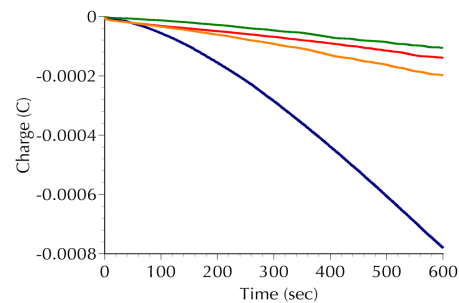


図 2 *TrCel17A* による種々セルロース基質加水分解活性の CDH によるモニタリング。赤：セルロース I、緑：セルロース I、青：セルロース III₁、橙：セルロース I

次に立体反転型セルラーゼの活性検出をするためにセロピオースを基質とすることができる A1E を組み合わせることを試みた。*Pi. pastoris* によって異宿主発現された 2 種類の A1E (*PcA1EA*, *PcA1EB*) を用いて立体反転型であることが知られている *PcCel16A* の活性を、カルボキシメチルセルロース (CMC) を基質とし、チトクローム *c* を CDH の電子受容体とした反応系でモニタリングした。その結果図 3 に示すように *PcA1EA* が含まれる反応系においてのみ *PcCel16A* の活性を測定することができた。これは *PcA1EA* がセロピオースを基質として利用できるのに対して、*PcA1EB* はセロピオースと反応できないことが原因であると考えられた。さらに *Ph. chrysosporium* 由来 GH ファミリー45 に属するエンドグルカナーゼ (*PcCel145A*) に関しても同様に活性測定を行ったところ、*PcCel16A* の時と同様 *PcA1EA* を含む反応系で CMC の加水分解、アノマー水酸基の反転、および CDH による生成糖の還元末端の酸化をモニターすることに成功し、立体反転型の酵素の場合もセルラーゼ活性をリアルタイムに測定することが可能となった。

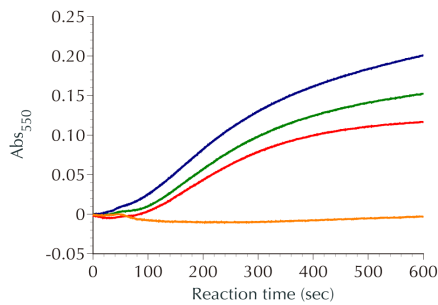


図3 A1Eを添加したときのPcCel6Aのリアルタイムモニタリング。赤：A1E 10 μ M、緑：PcA1E 20 μ M、青：A1E 30 μ M、橙：PcA1EB

最後にCDHを炭素微粒子とともに炭素電極表面に固定化し、CDH固定化電極を用いてセルラーゼ(TrCel7A)活性の測定を試みた。微結晶セルロースおよび非晶性セルロースの双方でセルラーゼの活性に伴う電流値が計測された(図4)。

以上の結果より、本研究においてセルラーゼ活性をリアルタイムにモニタリングすることが可能になり、固液界面における酵素活性の経時変化を観察するための有用な手法が開発できたといえる。

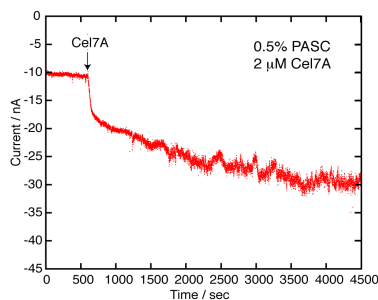


図4 CDH固定化電極を用いたセルラーゼ活性の測定

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

Nijikken, Y., Tsukada, T., Igarashi, K., Samejima, M., Wakagi, T., Shoun, H., and Fushinobu, S., Crystal structure of intracellular family 1 α -glucosidase BGL1A from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Lett.* **581**:1514-1520 (2007)

Igarashi, K., Wada, M., Samejima, M., Activation of crystalline cellulose to cellulose III₁ results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase, *FEBS J.* **274**:1785-1792 (2007)

Ishida, T., Yaoi, K., Hiyoshi, A., Igarashi, K., and Samejima, M., Substrate recognition by glycoside hydrolase family 74 xyloglucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS J.* **274**:5727-5736 (2007)

Tsukada, T., Igarashi, K., Fushinobu, S., and Samejima, M., Role of subsite +1 residues in pH dependence and catalytic activity of the glycoside hydrolase family 1 α -glucosidase BGL1A from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Biotechnol. Bioeng.* **99**:1295-1302 (2007)

Igarashi, K., Ishida, T., Hori, C., and Samejima, M., Characterization of endoglucanase belonging to new subfamily of glycoside hydrolase family 45 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:5628-5634 (2008)

Fujita, K., Nakamura, N., Igarashi, K., Samejima, M., and Ohno, H., Hydrated ionic liquid: choline dihydrogen phosphate as a biocatalysis medium of cellobiose dehydrogenase, *Green Chem.* **11**:351-354

〔学会発表〕(計10件)

Igarashi, K., Wada, M., Samejima, M., Surface density of cellobiohydrolase on crystalline celluloses, International Conference of Biotechnology in Pulp and Paper Industry, 2007年6月12日, 米国ウィスコンシン州

五十嵐圭日子, 石田卓也, 和田昌久, 鮫島正浩 「担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 Cel6A の反応特」セルロース学会第14回年次大会, 2007年7月20日, 静岡

Igarashi, K., Wada, M., Samejima, M., Activation of crystalline cellulose to cellulose III₁ results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase, Gordon Research Conference, 2007年7月31日, 米国ニューハンプシャー州

五十嵐圭日子, 和田昌久, 鮫島正浩, 松村洋寿, 中村暢文, 大野弘幸 「セロピオース脱水素酵素によるセルラーゼ活性のリアルタイムモニタリング」第57回木材学会広島大会, 2007年8月10日, 広島

五十嵐圭日子、石田卓也、和田昌久、鮫島正浩「担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 GH ファミリー-6 セロビオヒドロラーゼによる高結晶性セルロースの分解」応用糖質科学会平成 19 年度大会、2007 年 8 月 30 日、神奈川
Igarashi, K., Wada, M., Samejima, M., Surface density of cellobiohydrolase on crystalline celluloses: a critical parameter to evaluate enzymatic kinetics at a solid-liquid interface, International Cellulose Conference, 2007 年 10 月 23 日、東京

五十嵐圭日子、石田卓也、塚田剛士、鮫島正浩「セロビオース脱水素酵素によるセルラーゼ活性のリアルタイムモニタリング(II): アルドース 1-エピメラーゼを組み合わせた立体反転型酵素の活性測定」第 58 回日本木材学会、2008 年 3 月 18 日、茨城

松村洋寿、五十嵐圭日子、鮫島正浩、中村暢文、大野弘幸「セロビオース脱水素酵素電極を用いたセルラーゼ活性のリアルタイムモニタリング」第 59 回日本木材学会大会、2008 年 3 月 16 日、長野
松村洋寿、五十嵐圭日子、鮫島正浩、中村暢文、大野弘幸「担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する

五十嵐圭日子、石田卓也、堀千明、平石正男、岡本道子、鮫島正浩「糖質加水分解酵素ファミリー-45 に属するエンドグルカナーゼ」第 59 回日本木材学会大会、2008 年 3 月 15 日、長野

〔図書〕(計 1 件)

五十嵐圭日子、和田昌久、鮫島正浩「セルロース利用技術の最先端」シーエムシー出版(2008)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

エンドグルカナーゼ活性を有する新規タンパク質、その DNA、及びそれらの利用 五十嵐圭日子、鮫島正浩 特願 2008-185219

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

2007 年 7 月 平成 18 年度セルロース学会奨励賞「固液界面におけるセルラーゼの反応速度論的解析」受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 圭日子 (IGARASHI KIYOHIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：80345181

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし