

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 4 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580362

研究課題名（和文） セルロース結合モジュールを利用したバイオマス酵素糖化

研究課題名（英文）

Saccharification of biomass with enzymes fused to carbohydrate-binding modules

研究代表者

苅田 修一 (Shuichi KARITA)

三重大学・大学院地域イノベーション学研究所・教授

研究者番号：90233999

研究成果の概要（和文）：

ファミリー3、17、28、44に属するセルロース結合モジュールについて、その結合特性をマクロアレイ法、等温滴定熱量計、ラングミュア等温式による解析などで行った。また、これらの植物細胞壁での結合部位を確認するために、蛍光タンパク質との融合タンパク質を作成し、蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、これらのセルロース結合モジュールは、植物細胞壁で異なる部分を認識することを示した。また、糖質加水分解酵素ファミリー5の触媒ドメインに、セルロース結合モジュールを融合した酵素を作成し、その基質特異性を検討したところ、これらの酵素の特異性が結合モジュールの特異性に影響することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Cellulose-binding modules, family 3, 17, 28, and 44, were characterized with the macro-array method, isothermal titration calorimetry, and Langmuir isotherm analysis. To determine binding-sites on plant cell wall, these cellulose-binding modules were fused to a fluorescent protein. Fluorescent fused cellulose-binding modules bound to different parts of plant cell wall and discriminated cell-types of plant tissues. These results indicated that cellulose-binding modules can recognize a different structure on plant cell walls, whereas these modules have similar binding specificities. A catalytic domain belonging to glycoside hydrolase family 5 was fused to cellulose-binding modules. These artificial enzymes showed their activities were influenced by fused modules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：糖質結合モジュール、等温滴定熱量計、セルラーゼ、セルロース結合モジュール、バイオマス糖化

1. 研究開始当初の背景

植物バイオマスの効率的な糖化が、バイオマス利用のひとつの方法として望まれている。現在は、市販の糸状菌由来の酵素製剤が主に使用されている。しかしながら、その効率も、まだまだ、改善の余地があるとされている。我々は、これまでに、細菌由来の分解酵素について研究を行ってきた。細菌由来のバイオマス分解酵素には、糸状菌の酵素と異なり、構造や特異性の異なった数多くのセルロース結合モジュールが存在していることが知られている。糸状菌由来の酵素には、ファミリー1に属するセルロース結合モジュールしか存在しないが、細菌由来の酵素には、少なくとも14の構造の異なるファミリーのセルロース結合モジュールが存在している。

2. 研究の目的

本研究は、細菌のバイオマス分解酵素が、構造異なるセルロース結合モジュールをもっていることに着目し、これらのバイオマスに対する結合特性を解析することで、生物学的な意義を明らかにする。また、その意義を利用して、植物バイオマスの酵素分解において、従来の酵素（糸状菌由来）と異なる場所に酵素を集める、あるいは結合特性の異なるセルロース結合モジュールをもつ融合酵素を新規に構築する。これらの酵素と従来の酵素との相乗効果を確認することにより、植物バイオマスの酵素糖化を促進することを目的とした。

3. 研究の方法

セルロース結合モジュール遺伝子を嫌気性セルロース分解細菌、*Clostridium josui*、*Clostridium thermoCELLUM*、*Ruminococcus albus*のゲノムDNAを鋳型として、PCR法により増幅し、これらを発現ベクターに挿入することにより、発現系を構築した。

また、セルロース結合モジュール遺伝子を蛍光タンパク質と融合することで、結合モジュールをもつ蛍光タンパク質を大腸菌で発現させた。

さらに、セルロース結合モジュール遺伝子を触媒活性のあるセルラーゼに融合することで、結合モジュールをもつ酵素タンパク質を大腸菌で発現させた。

これら大腸菌で発現させたタンパク質について、ヒスチジンタグを利用したNiキレート樹脂により精製を行い実験に供した。

精製したセルロース結合モジュールと基質との結合特性を、マクロアレイ法、等温滴定量熱計、ラングミュア等温解析法により解

析した。

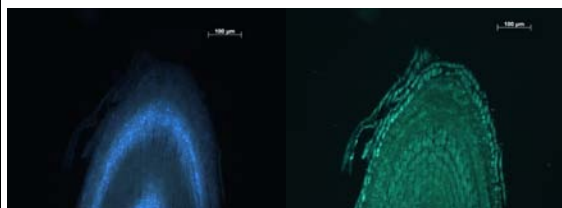
蛍光タンパク質との融合タンパク質を使った植物細胞壁での結合位置については、蛍光顕微鏡（本課題にて購入）により観察を行った。

酵素活性測定は、ジニトロサルチル酸法による還元糖生成量の定量により行った。

4. 研究成果

セルロース結合モジュールの基質結合の特性につき、細菌由来のファミリーの異なるモジュールについて解析を行った。ファミリー17と28について、詳細な検討を行ったところ、両結合モジュールとも、結合する基質の特異性は似ており、可溶性基質への結合定数もほぼ等しいものであったが、ファミリー17の結合は、28に比べて発熱量が少なく、疎水的な結合が、より大きく寄与していると予想した。この二つのセルロース結合モジュールの結合特性について、論文を投稿し、掲載された。この他、ファミリー3及びファミリー44のセルロース結合モジュールについて、詳細な結合特性について検討を行い学会で発表してきた。現在、これらのうち、ファミリー3のセルロース結合モジュールの詳細な結合特性について、投稿準備中である。

セルロース結合モジュールの結合部位を観察するために蛍光タンパク質との融合タンパク質を作成した。これらを用いて、植物細胞壁の切片での結合を蛍光顕微鏡で観察した。ファミリー17と28のセルロース結合モジュールでの比較では、これら二つのモジュールは上記のように、似た結合特異性を示すにも関わらず、実際の植物細胞壁の切片では、異なる部位に結合することが明らかになった。さらに、サツマイモの根の切片から、単に細胞壁の部分だけでなく、結合する細胞そのものに結合特異性があることを見いだした。これについては、論文投稿し、掲載された（図1）。



ファミリー17

ファミリー28

図1、ファミリー17と28の細胞による結合の違い。

触媒モジュールとして、糖質加水分解酵素ファミリー5に属する酵素を選択し、*C. thermoCELLUM*のゲノムからクローニングした。この触媒ドメインに、ファミリー3、6、

11 の異なるファミリーに属するセルロース結合モジュールを連結し、人工セルラーゼを作成した。

これらを用いてその酵素特性を検討したところ、融合するセルロース結合モジュールの特異性に従い、酵素の基質特異性に影響することがわかった。市販酵素にこれらの酵素を加えて活性を評価したが、観察できるような相乗効果を確認することはできなかった。基質の前処理などの課題が明らかとなった。

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 3 件)

① Araki, Y., Karita, S., Tsuchiya, T., Kondo, M., Goto, M., Family 17 and 28 carbohydrate-binding modules discriminate different cell wall sites in sweet potato roots. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74: 802-805 (2010) (査読有り)

② 苅田修一 セルラーゼの話題 機能研究会誌、47: 51-58 (2009). (査読なし)

③ Araki, Y., Karita, S., Tanaka, A., Kondo, M., Goto, M., Characterization of family 17 and family 28 carbohydrate-binding modules from *Clostridium josui* Cel5A. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73: 1028-1032 (2009) (査読有り)

[学会発表] (計 26 件)

1. 市川俊輔、苅田修一、*Clostridium josui* 由来糖質結合モジュールの結合特性 日本農芸化学会 2011 年度大会 平成 23 年 3 月 26 日 京都女子大学
2. 吉田充希、苅田修一、糖質結合モジュールを融合した人工セルラーゼの酵素特性 日本農芸化学会 2011 年度大会 平成 23 年 3 月 26 日 京都女子大学
3. 市川俊輔、苅田修一、Characterization of family 3 carbohydrate-binding module from *Clostridium josui*. 第 33 回日本分子生物学会 平成 22 年 12 月 10 日 神戸国際展示場
4. 荒木裕子、苅田修一、等温滴定熱量計による糖質結合モジュールの特性解析 第 33 回日本分子生物学会 平成 22 年

12 月 10 日 神戸国際展示場

5. 荒木裕子、近藤誠、後藤正和、田中晶善、苅田修一、タイプ B、C の糖質結合モジュールの結合特性 第 46 回熱測定討論会 平成 22 年 9 月 28 日 三重大学
6. 蟹江美佐、苅田修一、Cel44A の基質に対する親和力と酵素活性 第 24 回セルラーゼ研究会 平成 22 年 7 月 23 日 花王霞ヶ浦研修所
7. 市川俊輔、苅田修一、*Clostridium josui* CBM3 の結合特性 第 24 回セルラーゼ研究会 平成 22 年 7 月 23 日 花王霞ヶ浦研修所
8. 苅田修一、繊維分解性酵素タンパク質と糖質の相互作用 第 9 回バイオテクノロジー国際会議 平成 22 年 6 月 30 日 東京ビックサイト
9. 市川俊輔、苅田修一、糖質結合モジュールの吸着等温解析 日本農芸化学会 2010 年度大会 平成 22 年 3 月 28 日 東京大学
10. 蟹江美佐、苅田修一、田中晶善、セルラーゼ触媒部位と基質との結合親和力の測定 日本農芸化学会 2010 年度大会 平成 22 年 3 月 28 日 東京大学
11. 加戸悠、苅田修一、近藤誠、後藤正和、ファミリー 44 糖質結合モジュールの基質結合特性 日本農芸化学会 2010 年度大会 平成 22 年 3 月 28 日 東京大学
12. 苅田修一、森田純一、東加奈子、近藤誠、後藤正和、*Ruminococcus albus* F40 株からのセルロース分解酵素 日本農芸化学会 2010 年度大会 平成 22 年 3 月 28 日 東京大学
13. 荒木裕子、市ノ瀬仁美、金子哲、矢追克郎、苅田修一、Cel44A のキシロオリゴ糖に対するサブサイト結合エネルギーの決定 日本農芸化学会 2010 年度大会 平成 22 年 3 月 28 日 東京大学
14. 蟹江美佐、苅田修一、The interaction between cellooligosaccharides and the cellulase catalytic domain. 第 32 回日本分子生物学会大会 平成 21 年 12 月 9 日 パシフィコ横浜
15. 市川俊輔、苅田修一、The adsorption isotherm analysis of the binding of

- carbohydrate-binding modules. 第 32 回日本分子生物学会大会 平成 21 年 12 月 9 日 パシフィコ横浜
16. 菟田修一、荒木裕子、土屋亨、Carbohydrate-binding modules can recognize different types of plant cell wall. 第 32 回日本分子生物学会大会 平成 21 年 12 月 9 日 パシフィコ横浜
17. 菟田修一、植物細胞壁の糖化に威力を發揮する糖質結合モジュール 第 12 回けいはんな新産業創出交流センターシーズフォーラム 平成 21 年 7 月 23 日 大阪中之島センター
18. 荒木裕子、土屋亨、菟田修一、タイプ B CBM の植物細胞壁認識部位の違い 第 23 回セルラーゼ研究会 平成 21 年 6 月 19 日 花王霞ヶ浦研修所
19. 市川俊輔、菟田修一、吸着等温式を利用した CBM の結合様式 第 23 回セルラーゼ研究会 平成 21 年 6 月 19 日 花王霞ヶ浦研修所
20. 蟹江美佐、菟田修一、セルラーゼ触媒部位における基質結合親和力 第 23 回セルラーゼ研究会 平成 21 年 6 月 19 日 花王霞ヶ浦研修所
21. 森田純一、菟田修一、*Ruminococcus albus* のセルロース分解 第 23 回セルラーゼ研究会 平成 21 年 6 月 19 日 花王霞ヶ浦研修所
22. 荒木裕子、菟田修一、近藤誠、後藤正和、田中晶善、糖質結合モジュールファミリー 17 と 28 の結合特性、日本農芸化学会 2009 年度大会 平成 21 年 3 月 28 日 福岡マリンメッセ
23. 蟹江美佐、菟田修一、田中晶善、酵素触媒部位と基質との結合親和力の評価、日本農芸化学会 2009 年度大会 平成 21 年 3 月 28 日 福岡マリンメッセ
24. 菟田修一、セルラーゼの話題、第 47 回機能紙研究会大会 平成 20 年 11 月 20 日 名古屋今池ガスホール
25. 荒木裕子、菟田修一、田中晶善、後藤正和、CBM17/28 と CBM17、CBM28 の特性比較、セルラーゼ研究会第 22 回大会 平成 20 年 7 月 28 日 花王霞ヶ浦研修所
26. 蟹江美佐、菟田修一、北郷悠、栗冠和郎、田中晶善、後藤正和、酵素クレフトへの基質親和力の評価、セルラーゼ研究会第 22 回大会 平成 20 年 7 月 28 日 花王霞ヶ浦研修所

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.mie-u.ac.jp/~karita/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菟田 修一 (Shuichi KARITA)

三重大学・大学院地域イノベーション学
研究科・教授

研究者番号：90233999

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：