

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 21 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21612009

研究課題名（和文）セルロース糖化を促進するタンパク質の開発

研究課題名（英文）Engineering of a protein that enhances cellulose saccharification

研究代表者

竹田 匠 (Takeda, Takumi)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主任研究員

研究者番号：80423036

研究成果の概要（和文）：

植物組織（キュウリ胚軸）の伸展性を増加させるタンパク質（S-Protein）がカタツムリから部分精製された。このタンパク質のペプチド解析を行った後、cDNA の単離に成功した。麹菌をにより調製したリコンビナントタンパク質はβ-グルカンの加水分解は触媒しないが、糖鎖分解酵素の加水分解作用を促進することが明らかとなった。これらの結果は、A がβ-グルカンの分子間に形成されている結合を切断することにより、糖鎖分解酵素の作用が促進されたと推察された。

研究成果の概要（英文）：

A protein (S-protein) that increased the cell wall extensibility was partially purified from Roman snail. The internal peptide sequences were determined and its cDNA was cloned. Recombinant protein produced by *Aspergillus oryzae* showed no hydrolytic activity but to enhance β-glucan hydrolysis that was catalyzed by cell wall-degrading enzymes. The results suggest that the S-Protein, expansin-like protein, loosen the interaction between β-glucans, which was more susceptible to cell wall-degrading enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：バイオマスエネルギー

科研費の分科・細目：バイオマスエネルギー

キーワード：セルロース、糖化、エクспанシン

1. 研究開始当初の背景

バイオエタノールはガソリンの代替エネルギーとして利用が求められていた。特に、非食部である植物の茎葉に含まれる糖鎖を用いてバイオエタノールを効率良く製造する技術の開発が必須であった。この過程において、糖鎖をグルコースに変換（糖化）する酵素製造に多くのコストが必要となっていた

ため、酵素活性の高い、生産量の多い酵素製造技術の確立がバイオエタノール製造の低コスト化につながると考えられた。

2. 研究の目的

植物由来の糖鎖を効率的な分解によるグルコース生産を達成するため、酵素活性が高く、生産性の良い酵素を製造することが必

要である。カタツムリ由来のタンパク質 (S-Protein) はエクспанシンに見られるような植物組織の伸展性を増加させる作用が認められていた。また、S-Protein は糖鎖に対する加水分解を触媒しないが、セルラーゼなどの加水分解作用を促進することが分かっていた。そこで、カタツムリ由来の糖鎖分解を促進するタンパク質を同定することを研究目的とした。また、微生物由来の分解酵素を調製し、カタツムリ由来のタンパク質の効果を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) カタツムリ由来タンパク質の DNA 単離およびリコンビナントタンパク質の作製

引張試験によりカタツムリ由来の S-Protein が植物組織の伸展性を増加させることが明らかとなっていた。さらに、ペプチド解析により部分的アミノ酸配列が同定されていた。そこで、これらのデータをもとにカタツムリ由来の S-Protein をコードしている遺伝子を単離することとした。遺伝子の単離は、得られたペプチド配列から DNA プライマーを合成し、PCRにより行った。また、単離した遺伝子を麹菌やベンサミアーナに導入し、リコンビナントタンパク質を得た。

(2) 他の分解酵素の単離およびリコンビナントタンパク質の単離

植物由来の糖鎖をグルコースに分解する酵素標品としてトリコデルマ由来の酵素を利用することとした。しかし、トリコデルマ由来の酵素はβ-グルコシダーゼ活性およびエンド-1, 4-β-グルカナーゼが低いため、これらの酵素活性を増強する必要があった。そこで、いもち病菌由来のβ-グルコシダーゼ遺伝子をトリコデルマに導入すること、およびトリコデルマ由来のエンド-1, 4-β-グルカナーゼを添加することにより酵素活性を増強した。

4. 研究成果

(1) 細胞壁の伸展性を増加させるカタツムリ由来タンパク質の DNA クローニング

カタツムリ由来のタンパク質のペプチド配列から DNA プライマーを合成し、PCRにより DNA を単離した。その結果、1, 437bp のコード領域を持つ遺伝子の単離に成功した。このタンパク質は Glucoside hydrolase family (GH) 9 に属し、他のエンド-1, 4-β-グルカナーゼと高い相同性を示した。次に、この遺伝子を麹菌に導入し、リコンビナントタンパク質を作製した。このタンパク質の作用についてはあとで述べる。

(2) いもち病菌由来のβ-グルコシダーゼ いもち病菌の遺伝子データベースよりβ-

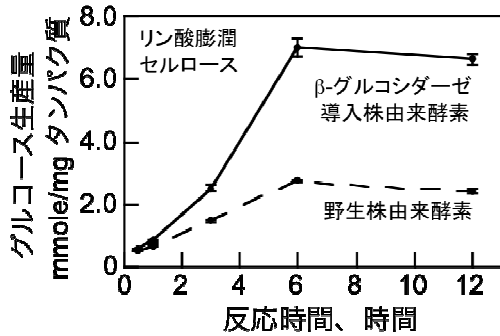
グルコシダーゼ遺伝子を抽出し、これらの遺伝子をいもち病菌に導入した。その結果、2種類のβ-グルコシダーゼ (MoCel3A, MoCel3B) のリコンビナントタンパク質の生産に成功した。MoCel3A はβ-1, 4-結合およびβ-1, 3-結合のオリゴ糖を分解し、グルコースを生産することが分かった。さらにβ-1, 3-結合のポリマー (ラミナリン) からグルコースを生産することも分かった。MoCel3B はβ-1, 3-結合のオリゴ糖を分解し、グルコースを生産することが分かった。また、黒穂病菌由来のβ-グルコシダーゼのリコンビナントタンパク質を解析した結果、β-1, 3-グルカンから特異的にグルコースを生産することが分かった。これらの結果から、トリコデルマ由来の酵素の活性を増強させるため、MoCel3A 遺伝子をトリコデルマに導入することが最善であると考えられた。

β-グルコシダーゼ活性を有するMoCel3AとMoCel3Bの基質特異性
セロビオース(cellobiose)からのグルコース生産量を相対活性100として、各基質に対するグルコース生産量を示す。

基質	結合/重合度	相対活性(%)	
		MoCel3A	MoCel3B
セロビオース	β-1,4 / 2	100.0±9.6	100.0±1.9
セロトリオース	β-1,4 / 3	98.3±5.6	125.5±6.9
セロテトラオース	β-1,4 / 4	123.0±3.4	95.9±4.7
セロペンタオース	β-1,4 / 5	124.1±4.6	63.2±4.8
セロヘキサオース	β-1,4 / 6	150.2±9.1	55.2±3.4
ラミナリビオース	β-1,3 / 2	250.3±13.6	19.1±1.0
ラミナリトリオース	β-1,3 / 3	203.6±4.5	12.0±0.4
ラミナリテトラオース	β-1,3 / 4	267.3±6.1	6.7±0.3
ラミナリペンタオース	β-1,3 / 5	280.3±11.5	4.9±0.1
ラミナリヘキサオース	β-1,3 / 6	296.6±10.0	4.0±0.3
ラミナリヘプタオース	β-1,3 / 7	314.6±24.0	3.8±0.2
ゲンチオビオース	β-1,6 / 2	66.5±1.5	8.6±0.4
リン酸膨潤セルロース	β-1,4	19.2±4.7	1.7±0.7
アスツラン	β-1,6	39.1±3.2	<1
ラミナリン	β-1,3	555.1±7.8	5.0±0.5
1,3-1,4-β-グルカン	β-1,3-1,4	208.2±9.6	<1

(3) β -グルコシダーゼを増強したトリコデルマの創出

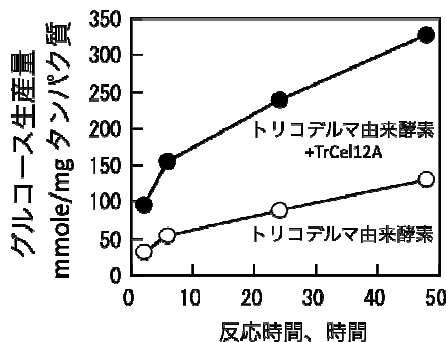
いもち病菌の β -グルコシダーゼ (MoCel13A) 遺伝子をトリコデルマに導入し、MoCel13A を発現している株を得た。この遺伝子導入トリコデルマが生産する酵素はリン酸膨潤セルロースから野生株の3-5倍のグルコース生産を示した。



トリコデルマ由来酵素によるグルコース生産
野生株由来酵素および β -グルコシダーゼ遺伝子を導入したトリコデルマ株由来酵素を用いて、リン酸膨潤セルロースからのグルコース生産量を示す。

(4) トリコデルマ由来のエンド-1,4- β -グルカナーゼの生産

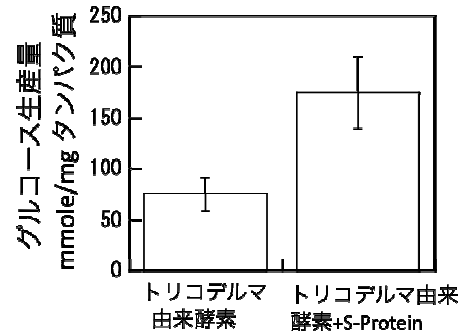
トリコデルマ由来のGH12に属するエンド-1,4- β -グルカナーゼ (TrCel12A) 遺伝子を単離し、枯草菌に導入した。その結果、セルロースやカルボキシメチルセルロース、キシログルカンなどの β -1,4-グルカン分解する活性を有することが分かった。また、セルロース分解において、野生株より約3倍のグルコース生産性を示した。



TrCel12A によるセルロース分解の促進
枯草菌において生産したTrCel12Aの添加によるリン酸膨潤セルロースからのグルコース生産量を示す。

(5) カタツムリ由来の S-Protein による糖鎖分解の促進

トリコデルマ由来の酵素標品および麹菌により生産したカタツムリ由来の S-Protein の添加による糖鎖分解を検討した。その結果、S-Protein の添加により、グルコース生産性の向上が認められた。これらの結果より、トリコデルマ由来の酵素標品を β -グルコシダーゼおよびエンド-1,4- β -グルカナーゼ、カタツムリ由来のタンパク質により増強することに成功した。



S-Protein によるセルロース分解の促進

麹菌において生産したカタツムリ由来の S-Protein の添加によるリン酸膨潤セルロースからのグルコース生産量を示す。

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 Takahashi M., Nakajima M., Nakano Y., Takeda T. Enhanced saccharification by *Trichoderma reesei* expressing a β -glucosidase from *Magnaporthe oryzae*. *J. Appl. Glycobiol.*, 59, 2012, 89-95, DOI: 10.5458/jag.jag.JAG-2011_018

② Takahashi M., Konishi T., Takeda T. Biochemical characterization of *Magnaporthe oryzae* β -glucosidases for efficient β -glucan hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91, 2011, 1073-1082, DOI: 10.1007/s00253-011-3340-1

③ Nakajima M., Yamashita T., Takahashi M., Nakano Y., Takeda T. Identification, cloning, and characterization of β -glucosidase from *Ustilago esculenta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 2011, 1989-1998, DOI: 10.1007/s00253-011-3538-2

[学会発表] (計3件)

① 高橋真智子、小西照子、竹田 匠、いも

ち病菌に由来する β -グルコシダーゼの機能解析と効率的な利用について、日本応用糖質科学会（2011）

- ②高橋真智子 高橋秀行 松村英生 寺内良平 竹田 匠, セロビオースによる活性阻害を受けないセロビオヒドロラーゼ、日本応用糖質科学会（2011）
- ③竹田 匠、いもち病菌由来細胞壁分解に関与するタンパク質の解析、日本応用糖質科学会東北支部講演会（2010）

〔図書〕（計3件）

- ① Takeda T. Polyhistidine affinity chromatography for purification and biochemical analysis of fungal cell wall-degrading enzymes. *Intech*, 2012, 177-186
DOI: 10.5772/36411
- ②竹田 匠、セルロース膨潤タンパク質（バイオマス分解酵素研究の最前線－セルラーゼ・ヘミセルラーゼを中心として－）、シーエムシー出版、2012、108-113
- ③小西照子、竹田匠、植物由来の細胞壁分解酵素（バイオマス分解酵素研究の最前線－セルラーゼ・ヘミセルラーゼを中心として－）、シーエムシー出版、2012、67-71

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/ibrcrio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 匠 (TAKEDA TAKUMI)
公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主任研究員
研究者番号：80423036