

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21750112

研究課題名（和文）結晶性セルロース特異ペプチドの探索とセルラーゼ反応システムへの展開

研究課題名（英文）Identification of cellulose-binding peptides and its application for cellulase reaction

研究代表者

松野 寿生（MATSUNO HISAO）

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：50376696

研究成果の概要（和文）：

ランダムペプチドライブラリーからセルロース表面に特異的に結合するペプチド配列のスクリーニングを実施した。ランダムペプチドライブラリーは、大腸菌を宿主とするM13繊維状バクテリオファージのコートタンパク質上に提示された直鎖7および12残基の短鎖ペプチドライブラリーを使用した。スクリーニングの標的として微結晶セルロース粒子アビセルを用いた。アフィニティ選択時における選択圧（アフィニティ、洗浄、溶出、の各段階におけるpH、反応時間、溶出溶媒の極性）の検討を繰返し、ファージの濃縮を試みた。濃縮ファージの標的結合能は、酵素標識免疫法により評価し、適当回数バイオパニングの後、標的結合性ファージが得られたことから、ファージのクローニング、遺伝子配列決定を行いペプチドのアミノ酸配列を同定した。ファージディスプレイ法を適用したスクリーニングにより7残基ペプチドでは、9種類のセルロース結合性ペプチド配列の同定に成功した。Fmoc固相化学合成法によりペプチドを調製し、ペプチドレベルでのセルロース表面に対する結合能評価から、ペプチドは2種類とも、セルロース表面の結晶領域よりもアモルファス領域により強く結合する可能性が高いことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Phage libraries displaying random and linear hepta/dedecapeptides were applied to crystalline cellulose. Binding affinities of obtained phage clones were quantitatively analyzed by enzymelinked immunosorbent assays (ELISAs). Clones were obtained with greater apparent affinity constants than those of the library, suggesting the isolation of cellulose-binding peptides with characteristic sequences. Furthermore, synthetic peptides with identify sequences showed the affinity constant, which was determined by high performance liquid chromatography, 10^5 - 10^6 mol/L corresponding to that of natural protein from cellulose binding domain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,110,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,510,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：高分子化学

科研費の分科・細目：ナノテク・材料

キーワード：生体関連高分子、ペプチド、セルロース、表面吸着、高分子表面

1. 研究開始当初の背景

カーボンニュートラルかつ再生可能なバイオマス、とりわけ木質草本の主成分であるリグノセルロース系バイオマス由来のバイオ燃料の生産が強く希求されている。これはバイオ燃料が単にエネルギー不足の問題を解決するのみならず、現在世界中のエネルギーの大半を占めている石油・天然ガス・石炭等の化石資源を代替することで、炭酸ガス排出量の削減に寄与できることから環境問題への貢献も期待できることによる。しかしながら、エネルギー生産を目的とするバイオマス利用はデンプン系バイオマスに限られており、結果的に食料の高騰・不足を誘引するジレンマに陥っている。木質の主成分は、単純直鎖構造のセルロース、分岐構造を有するヘミセルロース、およびリグニンから構成されている。このいずれもがエタノール等のアルコール生産のための原料と成りえるが、本研究では、天然に最も多く存在するセルロースに着目した。実用化が検討されているバイオエタノール生産システムは次の三段階、すなわち(1)未利用の木質草本を原材料に調製された木材チップから上記主要三成分を取り出す前処理、(2)セルロース、ヘミセルロースから微生物発酵可能な単糖への糖化プロセス、(3)単糖を原料とする微生物発酵プロセス、を主要工程とする。酵素を用いる糖化プロセスの生分解法は、原材料の現地調達および現地生産可能なバイオ燃料製造プロセスとして導入しやすいが、現状では50%に満たない低収率が問題となっている。この原因は、セルロースが結晶構造を有しており、また糖化反応の最終段階まで固液反応(セルオリゴ糖の溶解度が低い)であることによる。セルラーゼは複数の酵素群で形成されており、セルロース鎖末端から結晶領域に作用するセロビオヒドロラーゼ(CBH)、アモルファス領域にランダムに作用するエンドグルカナーゼ(EG)、セルオリゴ糖の非還元末端からグルコースを遊離するβ-グルコシダーゼ(BGL)が含まれる。糖化プロセスの効率化を達成するためにはとりわけ結晶性セルロースを加水分解できるCBHの活性向上を図ることが重要と考えられる。糸状菌 *Trichoderma reesei*(以下 *T. reesei*)由来のセルラーゼ群には、2種類の異なるCBHが含まれており、酵素学的解析のみならず立体構造解析も進んでいることから、酵素改変の対象として最も妥当な酵素と考えられる。*T. reesei*由来CBH(Cel 7A)は、セルロース結合モジュール(CBM)と触媒ドメイン(CD)がリンカーでつながれた特徴的な立体構造を有する(右図)。これまでに、遺伝子工学的手法によりCDの活性中心アミノ酸に変異を施した変異体が調製され、加水分解メカニズムの解析が進め

られている。しかしながら、酵素反応における至適pHや至適温度の改変には成功した研究は数例あるものの(例えば、*J. Mol. Biol.* 2004, 333, 817)、活性自体の向上に成功した報告は無い。一方、基質セルロースの結晶に工夫を施すことでセルラーゼによる加水分解効率の向上を達成した興味深い報告があり、これらの研究は、セルラーゼのCDではなくCBMをセルロース結晶多形に合わせてエンジニアリングすることで、酵素自体の活性向上を図れる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

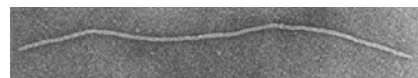
本研究では、(1)セルロース表面を特異認識し結合するペプチドをファージディスプレイ法を用いて探索し、(2)特異ペプチドによるセルロース生分解システムを高効率化することを目的とした。セルロース結晶多形特異的なペプチド配列を明らかにし、さらに結合特性解析によりCBMのセルロース認識メカニズムの理解の手がかりとする。次いで同定されたペプチドを用いた結晶性セルロースの生分解効率向上を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

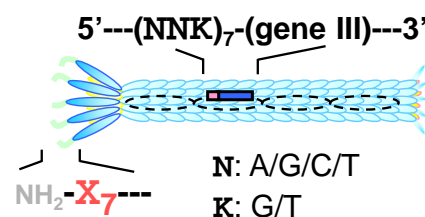
セルロース表面に特異的に結合するペプチド配列を、ランダムペプチドライブラリーからスクリーニングした。ランダムペプチドライブラリーは、大腸菌を宿主とするバクテリオファージ(M13 繊維状ファージ)のコートタンパク質上に提示する形で作製した。ペプチド構造としては、直鎖(7-12残基)、またはシステイン残基のジスルフィド結合を利用した環状ペプチドとした(下図)。標的として、微結晶セルロース粒子 Avicel(市販品)を用い、アフィニティ選択により特異的に結合するファージを濃縮した。選択圧(①

M13バクテリオファージ

(6.5 nm × 900 nm, 14 MDa)

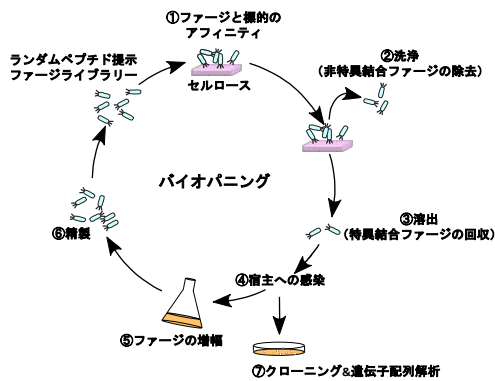


ランダムヘプタペプチド提示ファージ



Diversity : $20^7 = 1.28 \times 10^9$

標的とのアフィニティ、②洗浄、③溶出、の各段階における pH、塩濃度、反応時間、溶出溶媒の極性を検討しながらファージの濃縮操作（バイオパニング）を繰り返した。濃縮ファージの標的結合能は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法により評価し、適当回数のバイオパニングの後、標的結合性ファージが得られた段階で、ファージのクローニング、遺伝子配列決定を行い、Avicel 結合性ペプチドのアミノ酸配列を同定した。



4. 研究成果

ファージディスプレイ法を適用したスクリーニングにより 7 残基ペプチドでは、9 種類のセルロース結合性ペプチド配列の同定に成功した。25 °C におけるクローン化ファージのアビセルに対する見かけの結合定数は、およそ 10^9 - 10^{10} M^{-1} のオーダーであり、濃縮していないライブラリーファージと比較して一桁大きい値を示すことが分かった。より見かけの結合定数の大きい 2 種類の配列について、Fmoc 固相化学合成法によりペプチドを調製し、ペプチドレベルでのセルロース表面に対する結合能を評価した。結合能評価は、ペプチド-セルロース反応液上清に残存するペプチド量を HPLC により定量し、反応仕込み量との差分から結合量を算出する手法で行った。調製したペプチドは 2 種類とも、セルロース表面の結晶領域よりもアモルファス領域により強く結合する可能性が高いことが示唆された。詳細な結合解析により、その結合定数は、およそ 10^5 - 10^6 M^{-1} のオーダーであった。これは、天然のセルラーゼに含まれる CBM の結合定数と同等かそれ以上の大きさであった。

また、12 残基ペプチドライブラリーからは、以下表の 10 種類のセルロース結合性ペプチド配列の同定に成功した。これらペプチドも、結晶性セルロースに対し、 10^5 - 10^6 M^{-1} オーダーの結合定数を示したが、興味深いことに、結晶多形によりその結合定数が著しく変わった。

クローン	同定配列
3-4-04	QGWPQLPPADS
3-4-01	ASITHFKSGKSH
3-4-03	VSRHQSWHPHDL
3-4-13	TQANAFSPAPRV
3-4-05	ALHHTTNVPRPA
3-4-06	WAETWPLAQRPP
3-4-09	TSADNRWSPTTL
3-4-11	NHHHQPLARNQS
3-4-12	TPEGTFSRHSLA
3-4-15	SPLLTQTFRYTS

これらペプチドを所定量添加下、セルラーゼによるセルロース加水分解反応を行ったところ、反応効率が数倍増加する条件を見出した。しかしながら、再現性の観点において、同条件下で反応を行っても、反応が促進されるケースとそうでないケースとがあることから、条件の絞り込みが極めて難しい反応であると考えられた。今後、条件の最適化を達成することで、セルラーゼ反応の反応促進剤として、当該ペプチドの適用が可能になると期待できる。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ①松野寿生、芹澤武、セルロース結晶表面の特異なセルフクリーニング活性、第 19 回バイオ高分子シンポジウム、平成 21 年 7 月 30 日、東京大学
- ②松野寿生、金井健太郎、芹澤武、高結晶性セルロース特異結合ペプチドの探索と特性評価、第 58 回高分子討論会、平成 21 年 9 月 17 日、熊本大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 寿生 (MATSUNO HISAO)
九州大学・准教授
研究者番号：50736696

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：