

## 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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570128

研究課題名（和文） 不溶性セルロース分解をめざした耐熱性人工酵素創製に関する基盤研究

研究課題名（英文） Development of an artificial hyperthermophilic cellulase toward a hydrolysis of crystalline cellulose.

研究代表者

上垣 浩一（UEGAKI KOICHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長

研究者番号：00356544

研究成果の概要（和文）：好熱菌由来セルラーゼ触媒ドメインにセルロース結合能を付加すべくリンカーを介して他の好熱菌由来のキチン吸着ドメインをC末端に融合させた耐熱性人工セルラーゼを創製する際に考慮する必要のあるパラメーター（リンカー長の最適化、吸着ドメインの多重化による活性向上効果等）を調べ、リンカー長には最適な長さがあること、吸着ドメインの多重化の効果は結晶性基質かアモルファス基質かで異なる事、N末に融合した場合の最適なリンカー長はC末の場合と異なることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The artificial hyperthermophilic cellulase was created by adding a hyperthermophilic carbohydrate-binding module (CBM) of chitinase from *P. furiosus* to the C-terminal region of hyperthermophilic cellulase of *P. horikoshii*. In this project, the effect of linker lengths that connect CBM and cellulase and duplicated effect of CBM on the cellulase activity were examined. The result of linker length effect showed the cellulase activity depended on the linker length and the maximum activity (twice to the wild cellulase) was obtained at the optimum linker length. The result of CBM duplicated effect showed that the duplicate effect depended on the substrate configuration. In addition, when CBM was added to the N-terminal of the cellulase, the effect of length of linker on the cellulase activity was different from the result of C-terminal case.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：タンパク質

1. 研究開始当初の背景  
超好熱菌から膜結合型の耐熱性セルラーゼの遺伝子が発見され、結晶性のセルロースを分解できることが明らかにされた (Kashima et

al., *Extremophiles* 2005, 9, 37)。この酵素のポテンシャルの高さに着目した本研究代表者らはこのセルラーゼの高機能化に取り組み、このセルラーゼの膜結合ドメインを耐熱性キ

チナーゼの持つ基質結合ドメインと置き換えることによりその活性を2倍以上に増強したセルラーゼの開発に成功した(kang et al., *Extremophiles* 2007, 11, 251)。Pyrococcus furiosus 由来のキチナーゼが持つ基質吸着ドメインを使う理由は①本ドメインが耐熱性を有するだけでなく、セルロースに対しても親和性を有する性質を持つ事が判った(Nakamura et al., *J. Mol. Biol.* 208, 381, 670)。②好熱菌からは基質結合ドメインを持つセルラーゼはまだ発見されていないため、本ドメインの諸性質を考慮すれば代用として十分機能できると考えたためである。研究代表者らが事前に開発した融合酵素では遺伝子構築のやりやすさ等から超耐熱性セルラーゼのC末に5残基程度のリンカー長で、たまたま融合させているが、十分な根拠を持って行ったものではない。一方で一般的な糖質分解酵素は基質吸着ドメインを失うと不溶性基質に対する分解活性が一桁程度低下することが知られている。これが意味する所は我々が開発した人工融合酵素は最大限の基質分解活性を発揮していないのではないかと不安である。そこで人工酵素の機能を最大限発揮させるため両ドメインの配置とドメイン間をつなぐリンカーに着目しその長さ、アミノ酸配列の影響を調べ融合酵素のさらなる高機能化を目指す。

## 2. 研究の目的

近年、トウモロコシ等、食物の持つ糖を利用した発酵法でのアルコール生産が注目を集めている。しかし食料品を利用する限り、食糧問題とエネルギー生産のバランスをどう調整するかという問題が必然的に生じてくる。そこで食料品と競合しない木質系バイオマス(廃材等)を利用し、糖を生産することができればバイオマス利用促進に大きな弾みをつけることができる。そのためには硬い結晶構造を持つセルロースを主成分とする木質系バイオマスを高速で分解することの出来る、強力なセルラーゼの開発が渴望されている。そこで研究代表者らは木質バイオマスの酵素的分解に利用可能な有用超耐熱性セルラーゼを開発する事を目標に、Pyrococcus horikoshii 由来の超耐熱性セルラーゼと他の好熱性アーケア由来の糖分解酵素が持つ基質吸着ドメインと融合化を行い、不溶性基質に強い活性を持たせた高機能化研究を行ってきた。本研究ではこの融合酵素の更なる高機能化のため以下の3点が酵素活性に与える影響を明らかにする。①2つのドメイン間(基質吸着ドメインと触媒ドメイン)のリンカー長②吸着ドメインの多重化の効果③基質結合ドメインの挿入場所(N末かC末か)が酵素活性にどれだけ影響を与えるかを明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

糖質分解酵素のリンカー部分の役割を調べた論文はほとんど発表されていない。従って触媒ドメインと基質吸着ドメインを連結した融合酵素の開発に着手する際には一般論としてドメイン間をつなぐリンカーの効果・役割を知っておくことが重要な知見である。そこで本研究方法ではリンカーの長さや吸着ドメインの多重化、基質結合ドメインの融合場所によってセルロース分解活性がどの程度影響を受けるのかを明らかにする。方法としては各変異体を遺伝子工学的に作製し、リン酸膨潤アビセル(セルロース)を基質としてソモギーネルソン法を利用して書く変異体の活性測定を行い各変異体間での活性の違いを明らかにする。

## 4. 研究成果

研究代表者は好熱菌由来セルラーゼ触媒ドメインにセルロース結合能を有する他の好熱菌由来のキチナーゼ結合ドメインを融合させた耐熱性人工セルラーゼを創製し、より基質に作用する人工酵素の研究開発を行ってきた。本研究では更なる高機能化を目指し、セルラーゼのC末端に吸着ドメインを融合させる際の両ドメインを繋ぐリンカー長(0-70残基)を変えた変異体を作製してその酵素活性を調べた。その結果、リンカー長により活性の違いがあり、リンカー長が20アミノ酸程度の時に最大の活性増加(2倍)が見られた。次に基質吸着ドメインを多重化させてセルロース結合能をより強めた変異体を作製し多重化の効果を結晶性とアモルファスセルロースの2種の基質に対して調べた。その結果、結晶性セルロースを基質として用いた場合、基質吸着ドメインを2個導入した変異酵素において最大の活性増加が見られ、その活性は野生型の約3倍強まで増加した。一方、リン酸膨潤セルロースを基質に用いた場合、基質吸着ドメインが1個の時に最大となり、数を増やすと逆に活性の低下が見られた。この理由を明らかにするため基質吸着ドメインを多重化させる時のリンカー長の最適化の再検討を行い結晶セルロースに対する高活性は維持したままリン酸膨潤セルロース分解活性を約2倍あげることができる最適なリンカー長を突き止めた。また吸着ドメインを本セルラーゼのN末端へ融合させたときにはリンカー長が長くなるほど活性が上昇していき調べた長さの最長(50アミノ酸)で基質の形状にかかわらず約2倍の活性増加が見られた。本研究の成果より吸着ドメインを利用した融合酵素を創製する際には融合場所により活性が影響を受けること、リンカー長の長さを最適化する必要性、多重化は基質に対して効果が異なる事が明らかとなり融合酵素開発に対する重要な知見を得ることができた。

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 10 件)

① 峯昇平、中村努、上垣浩一、遺伝子探索による耐熱性キチン分解酵素の開発、化学と生物、査読有、50 巻、2012、702-703

[http://www.jsbba.or.jp/pub/journal\\_kasei/kasei\\_contents/vol50\\_10\\_2012.html](http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/kasei_contents/vol50_10_2012.html)

② Mine, S., Ikegami, T., Kawasaki, K., Nakamura, T., Uegaki, K., Expression, refolding, and purification of active diacyltolchitobiose deacetylase from *Pyrococcus horikoshii*, *Protein Expr Purif.* 査読有, Vol. 84, No. 2, 2012, pp. 265-269

DOI: 10.1016/j.pep.2012.06.002.

③ Matsumura, H., Kusaka, N., Nakamura, T., Tanaka, N., Sagegami, K., Uegaki, K., Inoue, T., Mukai, Y., Crystal structure of the N-terminal domain of the yeast general corepressor Tup1p and its functional implications *J. Biol. Chem.* 査読有, Vol. 287, No. 32, 2012, pp. 26528-26538

DOI: 10.1074/jbc.M112.369652.

④ Nakamura, T., Kashima, Y., Mine, S., Oku, T., Uegaki, K., Characterization and crystal structure of the thermophilic ROK hexokinase from *Thermus thermophilus*, *J. Biosci. Bioeng.* 査読有, Vol. 114, No 2, 2012, pp. 150-154.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.03.018.

⑤ Ishida, M., Shimojo, H., Hayashi, A., Kawaguchi R, Ohtani Y, Uegaki K., Nishimura Y., Nakayama, J.I., Intrinsic Nucleic Acid-Binding Activity of Chp1 Chromodomain Is Required for Heterochromatic Gene Silencing, *Mol. Cell.* 査読有, Vol. 47, No. 2, 2012, pp. 228-241

DOI: 10.1016/j.molcel.2012.05.017

⑥ Watanabe, Y., Kitamura, S., Kawasaki, K., Kato, T., Uegaki, K., Ogura, K., Ishikawa, K.. Application of a water jet system to the pretreatment of cellulose, *Biopolymers* 査読有, Vol. 95, No. 12, 2011, pp. 833-839

DOI: 10.1002/bip.21686.

⑦ Nakamura, T., Kashima, Y., Mine, S., Oku, T., Uegaki, K., Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a putative glucokinase/hexokinase from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 査読有, Vol. 67, Pt. 12, 2011, 1559-1562.

DOI: 10.1107/S1744309111041145

⑧ Hiragami-Hamada, K., Shinmyozu, K., Hamada, D., Tatsu, Y., Uegaki, K., Fujiwara S., Nakayama, J.I. N-terminal phosphorylation of HPI{alpha} promotes its chromatin binding.

*Mol Cell Biol.* 査読有, Vol. 31, No. 6, 2011, pp. 1186-1200.

DOI: 10.1128/MCB.01012-10.

⑨ Nakamura, T., Torikai, K., Uegaki, K., Morita, J., Machida, K., Suzuki, A., Kawata, Y.. Crystal structure of the cambialistic superoxide dismutase from *Aeropyrum pernix* K1--insights into the enzyme mechanism and stability. *FEBS J.* 査読有, Vol. 278, No. 4, pp. 598-609.

DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07977.x.

⑩ Tsuji, H., Nishimura, S., Inui T., Kado, Y., Ishikawa, K., Nakamura T., Uegaki, K., Kinetic and crystallographic analyses of the catalytic domain of chitinase from *Pyrococcus furiosus*--the role of conserved residues in the active site. *FEBS J.* 査読有, Vol. 277, No. 12, 2010, pp. 2683-2695

DOI: 10.1111/j.1742-464X.2010.07685.x.

[学会発表] (計 22 件)

① 星野英人、上垣浩一プロテアーゼ活性検出のための Ready-to-Go 発光試薬の高度化、LS-BT 合同研究発表会、2013 年 02 月 05 日、産業技術総合研究所 (茨城県)

② 中村努、新山真由美、森愛賀、森田潤司、上垣浩一、嫌気性古細菌ペルオキシレドキシンの結晶化と構造解析、LS-BT 合同研究発表会、2013 年 02 月 05 日、産業技術総合研究所 (茨城県)

③ 星野英人、上垣浩一、発光蛋白質のプロテアーゼ活性検出用 Ready-to-Go 試薬への応用、日本分子生物学会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場 (福岡県)

④ 赤澤陽子、高島瑞紀、Young-Ho LEE、後藤祐児、上垣浩一、萩原義久、Comprehensive analysis of heat-induced irreversible denaturation of IgG, Fab, scFV and VHh、日本分子生物学会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場 (福岡県)

⑤ 中村 努、鹿島康浩、峯昇平、奥崇、上垣浩一、Crystal structure of the thermophilic ROK hexokinase from *Thermus thermophilus*, AsCA12、2012 年 12 月 03 日、アデレードコンベンションセンター (オーストラリア)

⑥ 上垣浩一、中村努、峯昇平、佐藤孝明、森田順司、峯昇平、松井由香里、基質吸着ドメイン多重化による耐熱性人工セルラーゼ創製に関する研究、第 12 回日本蛋白質科学会、

2012年06月20日、名古屋国際会議場（愛知県）

⑦中村努、鹿島康浩、峯昇平、奥崇、上垣浩一、耐熱性ROKヘキソキナーゼの基質特異性と立体構造、第12回日本蛋白質科学会、2012年06月20日、名古屋国際会議場（愛知県）

⑧星野英人、上垣浩一、発光蛋白質バイオマス素材複合マテリアルの開発、第12回日本蛋白質科学会、2012年06月20日、名古屋国際会議場（愛知県）

⑨上垣浩一、中村努、峯昇平、佐藤孝明、森田潤司、山野裕子、不溶性セルロース分解を目指した耐熱性人工セルラーゼ創製に関する研究、健康工学研究部門研究発表会、2012年2月22日、産総研（大阪府）

⑩中村努、上垣浩一、古細菌Cambialistic SODの金属選択性と熱安定性、健康工学研究部門研究発表会、2012年2月22日、産総研（大阪府）

⑪星野英人、上垣浩一、機能性融合タンパク質材料の開発、第11回LS-BT合同研究発表会、2012年1月31日、産総研（茨城県）

⑫上垣浩一、Development of enzymes for biomass utilization、2nd International Symposium of Advanced Energy Science（招待講演）2011年9月27日、京都大学（京都）

⑬中村努、鳥養香澄、森田潤司、河田康志、上垣浩一、Crystal Structure of Archaeal Cambialistic Superoxide Dismutase、XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography、2011年8月27日、Madrid（Spain）

⑭上垣浩一、極限微生物の蛋白質を用いたバイオマス利用、第11回日本蛋白質科学会年会、2011年6月8日、ホテル阪急エキスポ（大阪府）

⑮上垣浩一、中村努、峯昇平、佐藤孝明、森田潤司、山野裕子、不溶性セルロース分解を目指した耐熱性人工セルラーゼ創製に関する研究、第11回日本蛋白質科学会年会、2011年6月7日、ホテル阪急エキスポ（大阪府）

⑯中村努、鳥養香澄、上垣浩一、森田潤司、耐熱性 cambialistic SOD の立体構造と金属イオン選択性、LS-BT 合同研究発表会、2011年02月01日、産総研（茨城県）

⑰中村努、鳥養香澄、上垣浩一、森田潤司、Aeropyrum pernix K1 由来 SOD の金属イオン配位構造、日本結晶学会 2010 年度年会、2010年12月05日、大阪大学（大阪府）

⑱中村努、鳥養香澄、上垣浩一、森田潤司、Aeropyrum pernix K1 由来 cambialistic SOD の立体構造と金属選択性、第5回産業用酵素シンポジウム、2010年11月06日、長浜バイオ大学（滋賀県）

⑲峯昇平、中村努、石川一彦、池上貴久、

上垣浩一、超好熱菌 Pyrococcus furiosus 由来キチナーゼが有するキチン結合ドメイン ChBD1 の構造解析、2010年11月06日、長浜バイオ大学（滋賀県）

⑳上垣浩一、耐熱性アーケア(Pyrococcus furiosus)由来のキチン分解酵素の構造機能とその利用、食品酵素化学研究会、2010年9月4日、大阪府立大学

㉑峯昇平、中村努、石川一彦、池上貴久、上垣浩一、超好熱菌 Pyrococcus furiosus 由来キチナーゼが有するキチン結合ドメイン ChBD1 の構造解析、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月18日、札幌コンベンションセンター（北海道）

㉒中村努、鳥養香澄、上垣浩一、森田潤司、Aeropyrum pernix K1由来スーパーオキシドデイスムターゼの立体構造解析、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月17日、札幌コンベンションセンター（北海道）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上垣 浩一 (UEGAKI KOICHI)  
産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長  
研究者番号：00356544

### (2) 研究分担者

中村 努 (NAKAMURA TSUTOMU)  
産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員  
研究者番号：10357668

### (3) 連携研究者

池上 貴久 (IKEGAMI TAKAHISA)  
大阪大学・生命機能研究科・准教授  
研究者番号：20283939