

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6月10日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580090

研究課題名（和文） セルロース系バイオマスの完全酵素糖化を目指したセルラーゼの高機能化

研究課題名（英文） FUNCTIONAL IMPROVEMNET OF CELLULASES AIMED FOR ENZYMATI
DEGRADATION AND SACCHARIFICATION OF CELLULOSIC BIOMASS

研究代表者

川口 剛司（KAWAGUCHI TAKASHI）

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70195056

研究成果の概要（和文）：糸状菌 *Aspergillus aculeatus* の生産するセルラーゼ成分の中で最も植物性バイオマスの酵素糖化に有用な β -グルコシダーゼ1の改良を図った。まず、セルロース結合ドメインを付与したところ、不溶性セルロースに対する活性が向上した。一方、基質結合部位付近のアミノ酸をランダムに置換した変異体ライブラリの中から生産物であるグルコースによる阻害が大幅に低減した変異酵素を取得することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We performed to improve the β -glucosidase 1 which was the most useful enzyme among cellulase components produced by a filamentous fungus, *Aspergillus aculeatus*, for the saccharification of cellulosic biomass. Firstly, the activity against insoluble cellulose of relatively high molecular mass was raised by adding the cellulose-binding domain. Secondary, a mutant enzyme with drastically lowered product inhibition by glucose was successfully isolated after the screening of a random mutagenesis library on amino acid residues around the substrate-binding site.

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 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物利用学

1. 研究開始当初の背景

(1) バイオマスの有効利用と問題点：爆発的な人口増加や人類の生活様式の変化によって食糧、エネルギー、地球温暖化、環境汚染等の地球規模の問題が顕在化しつつある。植物体の主成分であるセルロース系バイオマスは生物圏において最も大量に存在する有機物であり太陽が存在する限り再生産されることから、食飼料やエネルギーさらには環

境問題を解決するための資源として期待されている。特に現在は地球温暖化などの環境問題を重視した燃料エタノールなどのカーボンニュートラルなエネルギー物質への変換に焦点があてられている。しかし、石油は化学工業の基幹化合物の供給源としての役割も大きく、それが枯渇すると現在の化石燃料を基盤とした産業形態事態が成り立たなくなるとは明白である。したがって将来的に

石油に代わる工業原料が必要であり、バイオマスからの糖生産は、食飼料・食品や化学工業原料の生産に必要な技術として非常に重要になる（バイオリファイナリ）。しかしながら、セルロース系バイオマスはセルロースが強固な結晶構造をとっていることに加えて、ヘミセルロースやリグニンが複雑に絡み合った構造を有しているため、極めて安定な物質である。現在は硫酸などによる酸加水分解によってバイオマスから糖を生産しているが、より環境への負荷が少ないセルラーゼによる酵素糖化が期待されている。酵素によるバイオマス分解には機能の異なる酵素成分が協奏的に作用することが必要であるが、現在の酵素の能力が充分ではないため大量のセルラーゼ剤が必要でありそのコストが工業化を困難にしている。これらを克服するためには、短時間にバイオマスを分解できる強力なセルラーゼ剤を安価に供給することが必須である。それには、セルラーゼ剤の安価な大量製造法の開発だけでは限界があり、同時に個々のセルラーゼ成分の機能を強化することが求められている。

(2) 糸状菌 *Aspergillus aculeatus* のセルラーゼ：糸状菌 *Trichoderma* 属のセルラーゼ剤は現在でも最強と言われており最も実用化に近いところに位置するが、単糖生成力が弱い、ヘミセルラーゼ活性が弱いなどの欠点が当初から指摘されていた。そこで、*Trichoderma* のセルラーゼ剤と顕著に相乗作用を示すセルラーゼ生産菌を検索し 30 年以上前に土壌から分離されたのが *A. aculeatus* である。その後の研究によって *A. aculeatus* セルラーゼ剤の高いヘミセルラーゼ活性と強い単糖生成力が *Trichoderma* のセルラーゼと相乗作用を示す主要な要因であることが明らかにされた。そのうち、高い単糖生成力の原因となっているのは β -グルコシダーゼ 1 (BGL1) の優れた性質によるところが大きい。BGL1 はこれまでに見出された同様の酵素の中でもセロビオースに対して最も高い比活性を示すとともに、可溶性の短鎖セロオリゴ糖だけでなく長鎖の不溶性のセロオリゴ糖にも活性を示し、さらに GH3 に属する酵素でありながら糖転移活性をほとんど示さないというバイオマス糖化において優れた性質を備えていることが明らかになった。しかし、実用化のためには活性が充分とは言えず、また生産物であるグルコースで阻害されるという欠点があり、実用化するためにはさらなる機能強化、改良が必須である。

2. 研究の目的

A. aculeatus の生産するセルラーゼ成分の中でセルロース性バイオマスの酵素糖化に最も優れている BGL1 を改良しセルロース性

バイオマスの酵素糖化に資する酵素を創出する。

(1) デンプン加水分解におけるグルコアミラーゼに相当するいわばグルコセルラーゼの創出を目指して、より長鎖のアモルファスセルロースに対する活性を向上させる。

(2) BGL1 の使用量を少なくすることを目的に、セロビオースに対する比活性を向上させる。

(3) 単糖生成力を増強させるとともにセルロース性バイオマス糖化の初期段階の主役であるセロビオハイドrolラーゼ (CBH) を阻害するセロビオースの蓄積を抑えることによって糖化に要する時間を短縮することを目的に、生産物であるグルコースによる阻害を軽減した改良酵素を作出する。

3. 研究の方法

(1) BGL1 のアモルファスセルロースに対する活性の向上：不溶性基質に作用する CBH はセルロース鎖に結合するセルロース結合ドメイン (CBD) を持っているが、BGL1 にはない。BGL1 は他の BGL とは異なりもともと長鎖の不溶性セルロースに対して低いながらも活性を持っていることからそのポテンシャルがあると考えられる。その能力を高めるために、BGL1 に CBD を付与することを考えた。具体的には、BGL1 の N 末端側に CBHII 由来の CBD (CBD_{CBHII}) を付与したもので、C 末端側に CBHI 由来の CBD (CBD_{CBHI})、N、C 末端両方に同様に付与したものの 3 種類の改変 BGL1 を作製し、不溶性であるアルカリ膨潤セルロースを基質としたときの親和性および比活性を評価した。

(2) セロビオース活性の向上：セルロース性バイオマスの糖化には最終段階のセロビオース分解が最も重要であるという観点から、オリゴ糖への活性を犠牲にしてもセロビオースへの活性の向上を目指して計画した。本研究期間中に BGL1 の X 線結晶構造解析が行われて立体構造が明らかになり、基質結合部位に関する情報が取得できたことから、次の 3 種の戦略を立てた。① サブサイト+2 を側鎖の大きなアミノ酸に置換することによって塞ぎセロビオースのサブサイト+1、+2 への非生産的結合を妨げてサブサイト-1、+1 への生産的結合を促進する。② サブサイト+1 のグルコース残基との新たな水素結合を形成させるようなアミノ酸に変換し親和性の向上を図る。③ サブサイト+1 のグルコース残基とのスタッキング相互作用を示す Y511 を他の芳香族アミノ酸に置換する。以上 15 種類の改変 BGL1 を作製し性能を評価した。

(3) グルコースによる阻害の軽減：立体構造から基質と相互作用する距離に存在する全てのアミノ酸残基について saturation mutagenesis ライブラリを構築し、それらからグルコースによる阻害が軽減した変異酵素を探索した。

4. 研究成果

(1) 作製した3種の改変 BGL1 の pNP-glucopyranoside, サリシン, セロビオースに対する比活性は野生型 BGL1 と変わらなかったことから, CBD の付与による可溶性基質への影響はないものと考えられる(データ示さず)。一方, 不溶性であるアルカリ膨潤セルロースに対する親和性はCBHI由来のCBD, CBHII由来のCBD, 両CBDを付与した順で強くなったが, 予想に反して活性はCBHI由来のCBDを付与したBGL1が最も高く, 親和性と全く逆になった(表1)。この理由として, 酵素のセルロース分子上の移動のしやすさが関係している可能性があるが, 詳細は不明である。いずれにしても, グルコセルラーゼと呼べないまでも野生型に比べて飛躍的に不溶性基質に対する活性が向上した改変酵素の創製に成功した。

(表1) CBD を付与した BGL1 の不溶性基質に対する親和性と活性比較

| 酵素 | K_m ($\times 10^6 M^{-1}$) | 活性比 |
|--|-----------------------------------|------|
| BGL1 | — | 1.00 |
| BGL1-CBD _{CBHI} | 6.0 | 22.2 |
| CBD _{CBHII} -BGL1 | 9.2 | 15.0 |
| CBD _{CBHI} -BGL1-CBD _{CBHII} | 59 | 13.1 |

(2) サブサイト+2を塞ぐ目的でA203V, I, T, N, DおよびT304V, I, Nの8種類, サブサイト+1のグルコース残基との新規な水素結合形成を目的にF305Q, E, R, K, Yの5種類, サブサイト+1のグルコース残基とのスタッキング相互作用を示すY511を他の芳香族アミノ酸に置換したY511F, Wの2種類の合計15種類の改変BGL1を作製し精製酵素を用いてセロビオースを基質として評価したが, 野生型を超える活性を示すものを得ることができなかった。しかし, 活性中心付近のアミノ酸残基を置換したことから, グルコースによる阻害を調べた結果, A203N, T304V, T304I, T304N変異体では若干緩和したことが明らかとなり, さらにそれらを組み合わせた二重変異体では野生型に比べ10 mM程度阻害が緩和された(表2)。これらの変異型酵素の活性は野生型と比べて大きな変化は認められず, 高機能化という観点では有用な酵素を創製できたと考えられる。

(表2) 変異型酵素のグルコースによる阻害

| 変異型 | IC ₅₀ |
|-------------|------------------|
| WT BGL1 | 38.9 ± 1.3 |
| A203N | 43.6 ± 0.9 |
| T304V | 44.8 ± 1.7 |
| T304I | 41.9 ± 1.6 |
| T304N | 43.0 ± 0.04 |
| A203N/T304V | 53.3 ± 2.9 |
| A203N/T304I | 51.3 ± 0.6 |
| A203N/T304N | 53.0 ± 0.5 |

(3) 基質と相互作用できる距離にあるアミノ酸残基として, F199, R200, Q201, V202, A203, E204, A205, G301, D302, I303, A304, F305の12種類を選択し, それぞれについて saturation mutagenesis ライブラリを構築した。それらからグルコースに対するIC₅₀が顕著に向上した変異酵素を探索した結果, Q201ライブラリから1株取得することに成功した。本変異酵素のIC₅₀は野生株が約0.7%に対して約1.9%であり大幅な阻害の軽減が認められた。変異点を特定したところ, Q201がYに変化していることが明らかになった。現在本変異酵素の比活性や基質特異性などの性質を調べているところである。

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7件)

- ① Suzuki, K., Sumitani, J., Nam, Y.-W., Nishimaki, T., Tani, S., Wakagi, T., Kawaguchi, T., Fushinobu, S.: Crystal structure of glycoside hydrolase family 3 beta-glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*. *Biochemical Journal*, 452, 211-221 (2013). 査読有り
- ② Kunitake, E., Tani, S., Sumitani, J., Kawaguchi, T.: A novel transcriptional regulator, ClbR, controls the cellobiose- and cellulose-responsive induction of cellulase and xylanase genes regulated by two distinct signaling pathways in *Aspergillus aculeatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 2017-2028 (2013). 査読有り
- ③ Tani, S., Tsuji, A., Kunitake, E., Sumitani, J., Kawaguchi, T.: Reversible impairment of the *ku80* gene by a recyclable marker in *Aspergillus aculeatus*. *AMB Express*, doi:10.1186/2191-0855-3-4 (2013). 査読有り

- 読有り
- ④ Kawai, T., Nakazawa, H., Ida, N., Okada, H., Tani, S., Sumitani, J., Kawaguchi, T., Ogasawara, W., Morikawa, Y., Kobayashi, Y.: Analysis of the saccharification capability of high-functional cellulase JN11 for various pretreated biomasses through a comparison with commercially available counterparts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 9, 1741-1749 (2012). 査読有り
- ⑤ Tani, S., Kanamasa, S., Arai, M., Sumitani, J., Kawaguchi, T.: XlnR-independent signaling pathway regulates both cellulase and xylanase genes in response to cellobiose in *Aspergillus aculeatus*. *Current Genetics*, 58, 93-104 (2012). 査読有り
- ⑥ Nakazawa, H., Kawai, T., Ida, N., Shida, Y., Kobayashi, Y., Okada, H., Tani, S., Sumitani, J., Kawaguchi, T., Morikawa, Y., Ogasawara, W.: Construction of a recombinant *Trichoderma reesei* strain expressing *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 for efficient biomass conversion. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 92-99 (2012). 査読有り
- ⑦ Kunitake, E., Kanamasa, S., Tani, S., Sumitani, J., Kawaguchi, T.: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus aculeatus* for insertional mutagenesis. *AMB Express*, doi:10.1186/2191-0855-1-46 (2011). 査読有り
- [学会発表] (計8件)
- ① 馬場祐太郎:「*Aspergillus aculeatus* 由来 β -グルコシダーゼ 1 の基質特異性について」, 2013 年日本農芸化学会大会, 2013 年 3 月 26 日 (宮城)。
- ② 馬場祐太郎:「*Aspergillus aculeatus* 由来 β -グルコシダーゼ 1 (BGL1) の酵素反応速度論的解析」, 第 26 回セルラーゼ研究会, 2012 年 5 月 25 日 (茨城)。
- ③ 馬場祐太郎:「*Aspergillus aculeatus* 由来 β -グルコシダーゼ 1 のセロオリゴ糖分解能について」, 2012 年日本農芸化学会大会, 2012 年 3 月 24 日 (京都)。
- ④ 馬場祐太郎:「*Aspergillus aculeatus* 由来 β -グルコシダーゼ 1 (BGL1) のセロビアーゼ活性の向上」, 第 25 回セルラーゼ研究会, 2011 年 10 月 15 日 (茨城)。

- ⑤ 川口剛司:「*Aspergillus aculeatus* のセルラーゼ」, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011 年 6 月 8 日 (大阪)。
- ⑥ 馬場祐太郎:「*Aspergillus aculeatus* 由来 β -グルコシダーゼ 1 (BGL1) の N 型糖鎖欠損 variant の作製と解析」, 第 24 回セルラーゼ研究会, 2010 年 11 月 19 日 (広島)。
- ⑦ 鈴木健太郎:「*Aspergillus aculeatus* 由来 β -グルコシダーゼ 1 の X 線結晶構造解析」, 第 24 回セルラーゼ研究会, 2010 年 7 月 23 日 (茨城)。
- ⑧ 馬場祐太郎:「*Aspergillus aculeatus* 由来 β -グルコシダーゼ 1 (BGL1) の N 型糖鎖欠損 variant の作製と解析」, 第 24 回セルラーゼ研究会, 2010 年 7 月 23 日 (茨城)。

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 新規セルラーゼ
 発明者: 炭谷順一, 谷修治, 川口剛司
 権利者: 公立大学法人大阪府立大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2010-99291 (特開 2011-223962)
 出願年月日: 2010 年 4 月 22 日
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ:
<http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/AM/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 剛司 (KAWAGUCHI TAKASHI)
 大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
 研究者番号: 10264813

(2) 研究分担者

炭谷 順一 (SUMITANI JUN-ICHI)
 大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
 研究者番号: 10264813
 谷 修治 (TANI SHUJI)
 大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教 (現講師)
 研究者番号: 80405357