

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 16 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22612001
 研究課題名（和文） ソフトバイオマス完全糖化を目指したデザイナーブルセルロソームの基盤研究
 研究課題名（英文） Study of designer cellulosome for complete saccharification of soft-biomass
 研究代表者
 三宅 英雄（MIYAKE HIDEO）
 三重大学・大学院生物資源学研究科・助教
 研究者番号： 50362364

研究成果の概要（和文）：

*Clostridium cellulovorans*のセルロソームを再構築するために必要な酵素を探索するために、多糖類に対するプロテオーム解析を行った。この結果、既知のセルロース分解関連酵素だけでなく機能未知のタンパク質も検出した。新規足場タンパク質であるCbpB、プロテオーム解析から同定したセルロソームな酵素10種をサブクローニングし、セルロソームの再構築を行った。

研究成果の概要（英文）：

Proteome analysis of the *Clostridium cellulovorans* after culture in various carbon sources demonstrated to find enzymes which are necessary to reconstruct a cellulosome. Not only several carbohydrate enzymes but also proteins of unknown function were detected. Genomic DNA coding for scaffolding protein cbpB and 10 cellulosomal enzymes were detected by proteome analysis were subcloned in order to express and produce the recombinant protein to reconstruct a cellulosome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：バイオマスエネルギー

キーワード：cellulosome, *Clostridium cellulovorans*, proteome

1. 研究開始当初の背景

中国を始めとするアジア地域の急速な経済的発展に伴い、世界の食料需給の不安定化、資源・環境問題の顕在化が懸念されている。さらに、地球の温暖化、化石資源の枯渇などの様々な環境問題の解決に向けた国際社会の取組が重要であるとともに、我が国は2050年までに1990年度比で25%の温室効果ガス（CO₂）削減の目標を達成するため、積極的

な貢献が求められている。農林水産研究基本計画においても、地球温暖化に対応する研究開発として、バイオマスからのバイオ燃料やマテリアル利用などの環境分野における技術革新が求められている。バイオマス利活用の技術革新は、持続的な低炭素社会の実現に貢献するだけでなく、地域の活性化や雇用にもつながる。さらにバイオマス利活用の増大は、これまでの食料等の生産の枠を超え、耕

作放棄地の活用を通じて食料安全保障にも資するなど、農林水産業の新たな領域を開拓するものである。このような背景から、化石燃料依存の化学産業は微生物などの生体触媒を用いたホワイトバイオテクノロジー産業への技術革新を迫られている。ガソリンに代わる燃料としてアメリカやブラジルを中心に“バイオエタノール”が急速に普及し始めているが、使用するバイオマスがデンプン質や糖質などの食料であるため食料問題と競合している。そのため農作物の残渣や廃材などを利用したセルロース質からの“第二世代のバイオ燃料”の生産などバイオリファイナリー確立の基盤形成が急務となっている。

セルロースは難分解性の高分子多糖で、堅固な結晶構造を取っているため、既存のセルラーゼでは分解効率が悪く、セルロース系バイオマスの高効率糖化法の技術革新を求められている。一方、ある種の嫌気性微生物には、これらの分子多糖を非常に効率よく分解できる「セルロゾーム」と呼ばれる酵素複合体を分泌・生産する。最近の分子生物学、生化学等の技術を駆使した解析により、セルロゾームは足場タンパク質をベースに多数の多糖分解酵素が結合した構造を取り、これら複数の酵素が共役することで非常に高い多糖分解活性を示すことが明らかにされている。また一方、セルロゾームはこれまでの報告で、工業的によく使用される好気性糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼ等に比較して、重量当たりで1桁以上高いセルロースの分解活性を示すことが知られている。しかしながら、セルロゾームの分子機構やバイオマスに対する作用機構はまだ十分に解明されていない。

セルロース系バイオマスからのバイオ燃料の生産において、製造コストが高い点が問題となっている。なぜなら既存の技術では、前処理、糖化、発酵を別々で行わなければならないからである。次世代のバイオ燃料生産をはじめとしたバイオリファイナリーにおいて、「前処理→糖化→発酵」のプロセスを統合する（Consolidated Bio-Processing : CBP）における技術開発が求められている。その理由は、CBPによる費用対効果は酵素による加水分解反応の向上よりも10倍以上コストを下げることで可能であると言われている。以上のことから、セルロゾームの分子機構や様々なソフトバイオマスに対する作用機構を解明することがソフトバイオマス完全糖化を行う上で重要である。さらにそれらの情報を用いることでバイオ燃料を生産する微生物に各バイオマスに適したセルロゾームをデザインすることでCBPが可能となり、持続可能な低炭素社会の実現に貢献する。

2. 研究の目的

C. cellulovorans のセルロゾームは、大小異なる4種類のセルロゾームクラスター（HbpA, CbpA, CbpB, CbpC）が存在する。セルロゾームを構築できる酵素群は他の *Clostridium* 属より少なかったが、ノンセルロゾーム（分泌型の加水分解酵素や多糖類リアーゼ）は、合計61種と *C. thermocellum* の約4倍あり、その多くはヘミセルラーゼであった。このことから、*C. cellulovorans* は、ノンセルロゾームを使ってバイオマスに含まれるヘミセルロースを分解することでセルロースやヘミセルロースを露出させる。さらに、バイオマスに応じて他の *Clostridium* 属よりかもシンプルな組み合わせからなるセルロゾームを構成することで効率よくバイオマスを糖化すると考えられる。従って、セルロゾームに関しては、セルロゾームを生産する *Clostridium* 属の中で一番少ないセルロゾームな酵素の組み合わせの中からバイオマスに応じたそれらの組み合わせを決定することができる。また分泌型のヘミセルラーゼを多数保持していることから、セルロゾーム、ノンセルロゾームを詳細にプロテオーム解析することで、各バイオマスに対してどのような酵素群が構成されているかを決定し、セルロゾームの分子構築機構を明らかにする。

またバイオ燃料の生産において、「前処理→糖化→発酵」のプロセスを統合するCBPにおける技術開発が求められている。リグノセルロースは、糖類としてはセルロース成分であるグルコース等のC6糖とヘミセルロース成分からのキシロースやアラビノース等のC5糖がある。酵母などはC5糖の利用機能を保持しておらず、C5糖を効率よく発酵できる微生物が求められている。また、米国ではバイオエタノールに続き、バイオブタノールの研究に着手している。ブタノールはガソリンと比べエネルギー密度が85%であることから、エタノールより高い燃費効率が得られる。さらにバイオエタノールでは利用できなかった既存のパイプライン等の供給設備も、バイオブタノールではそのまま使用することが出来るといった利点もある。そこで、C5糖の代謝経路がすでに備わっており、エタノールよりもエネルギー効率のよいブタノール生産菌である *Clostridium acetobutylicum* に着目し、セルロゾームの機能を賦与することで糖化能を有したブタノール生産菌の開発を目指す。

3. 研究の方法

プロテオーム解析を行うにあたり、まず *C. cellulovorans* の培養条件や培地地上清からのセルロゾームの回収精製条件などについて、検討を行った。セルロゾーム生産量が多

い定常期まで培養してからセルロソームの精製を行うが、その際に培養時間と細胞生育に関する情報(生育曲線)が必要である。しかし、通常の微生物とは異なり培養液中で細胞が凝集してしまうため、濁度による測定が不可能であった。そこで細胞の生産する ATP を指標とし、ATP 量を測定することによって生育を調べた。また同時に、培養液中に残存する糖濃度を HPLC により定量し、細胞量と基質濃度との相関を調べることによって、定常期であることを判断した。

培地上清からのセルロソームの精製については、セルロースへの結合性を利用してセルロースとともに沈殿させた後、界面活性剤や加温により効率的にセルロームを分離する条件を検討した。また、精製したセルロソームを酵素消化(トリプシン処理)して断片化し、LC-MS/MS で分離同定するにあたり、LC 部に用いるカラムの検討を行った。セロビオース、キシラン、アビセルなどの基本多糖類を炭素源とした培地にて、定常期まで *C. cellulovorans* を生育させ、上記にて決定した精製条件によって培養液からセルロソームを精製した。精製したセルロソームを酵素消化により断片化し、モノリス型ロングキャピラリーカラムを用いた高性能 HPLC による分離と MS/MS によって、セルロソーム構成タンパク質を網羅的に同定した。

セルロソームの再構築に関しては、酵素サブユニットが結合する足場タンパク質である CbpA, CbpB 遺伝子をサブクローニングした。はじめに組換え体を用いてもセルロソームを再構築することが可能か調べるために、大腸菌の発現系を用いて CbpA よりも小型な CbpB の組換え体とセルロソームを形成することが可能な酵素サブユニット (EngH, EngL, ManA, ManGh26C, XynA, XynB, XynGH8, Pel1, PelA) を作製した。CbpB に関しては、糖質結合モジュールが含まれているので結晶性セルロースに対する結合力の評価を行った。セルロソームの再構築の検証は、酵素サブユニットが結合しない N 末端側にグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) が付加した融合タンパク質を調製し、GST が付加した CbpB と酵素サブユニットの結合力の有無を GST プルダウンアッセイで検証した。また CbpA, CbpB をブタノール生産菌である *C. acetobutylicum* の発現ベクターに組み込み、形質転換を行った。

4. 研究成果

ATP 生産量を測定することによって *C. cellulovorans* の培養時間と増殖期についての関連を調べることができた。また、本研究により検討を行った結果、*C. cellulovorans* が菌体外に生産するセルロームの回収精製法、及び LC-MS/MS によるプロテオーム解析条

件など、再現性良くプロテオーム解析を行う上での諸条件を決定することができた。セルロソームの回収精製では、検討を行った結果、5% CHAPS、50 mM EDTA、70°C の条件で再現性良くセルロースからセルロソームを引き剥がすことができることが分かった。

さらに LC-MS/MS 解析では、当初一般的に用いられる 15cm のカラムで分析を行ったものの、ペプチド断片の分離が不十分であり、イオンサプレッションを受けることで検出されるペプチド断片数が限定的になった結果、良好なタンパク質同定を行うことができなかった。そこで、300cm のモノリス型ロングキャピラリーカラムに変えて分析を行ったところ、ペプチド断片の分離が格段に向上し、その後のタンパク質同定においても非常に良好な結果が得られた。従来のゲルベースの分離とゲルからのタンパク質切出し・同定ではなく、LC と MS をオンラインで接続することによって、より正確なタンパク質同定が実現できたため、本分析システムは今後のタンパク質定量分析においても非常に有効であることが分かった。

実際に基本多糖類に対するセルロソームのプロテオーム解析を行った結果、アビセルやキシランといったポリマー基質の場合には、それぞれ 19 個、22 個のタンパク質が同定されており、セロビオースを基質とした時 (11 個) よりも多く酵素が生産されていることが明らかとなった(表 1)。また、各基質に対するセルロソーム構成タンパク質の内訳を見ると、セロビオースに対して同定された 11 個のタンパク質はアビセルやキシランを基質とした場合においても全て共通して同定されており、アビセルやキシランに対してはエンドグルカナーゼ、キシラナーゼ、ペプチダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペプチダーゼ、機能未知タンパク質などの、セロビオースの場合には見られなかった特徴的なタンパク質が同定された。以上のように、アビセルやキシランを基質とした場合にはそれぞれの基質に対して特徴的な酵素が同定される一方で、セロビオースを基質とした場合には、基質 3 種の全てに共通する酵素から構成されており、基質に応じたセルロソーム構成タンパク質についての知見を得ることができた。

表 1 セルロソーマルタンパク質の数

Cellulosomal enzyme	Number of identified genes by genome analysis	Number of identified proteins by proteome analysis			
		Cellobiose	Avicel	Xylan	Common in all substrates
Cellulases	16	5	6	9	5
Hemicellulases	11	5	6	7	5
Pectate lyases	2	0	2	2	0
Other proteins	24	1	5	4	1
Total	53	11	19	22	11

新規の足場タンパク質である *cbpB* 遺伝子をゲノムからサブクローニングを行い、それらの組換えタンパク質を作製した。組換え

CbpB の結晶性セルロースに対する結合力は、CbpA の糖質結合モジュールだけのものと同程度であり、その K_a 値は、0.82 M と比較的強い結合力を示した。さらに、組換え CbpB に対する抗体を作製し、ウェスタンブロット法による CbpB の検出を行った。その結果、炭素源にキシランを用いた *C. cellulovorans* の培養上清から CbpB が検出された。さらに、*C. cellulovorans* が生産するセルロソームを形成すると推定される酵素サブユニット (EngH, EngL, ManA, ManGh26C, XynA, XynB, XynGH8, Pel1, PelA) を作製し、CbpB との相互作用解析として GST プルダウンアッセイを行ったところ、XynB は CbpB に結合することが確認された。ManA に対しても同様の結果が確認されており、作製済みの他の酵素サブユニットについても現在検証を行っている。以上の結果から CbpB は、結晶性セルロースに強固に結合し、酵素サブユニットとも結合することができる。よって *C. cellulovorans* は、足場タンパク質に CbpA を含む巨大なセルロソームを構築するだけでなく、1 種類の酵素サブユニットを搭載可能な足場タンパク質である CbpB を含むセルロソームを発現することが明らかになった。現在、ブタノール生産菌である *C. acetobutylicum* に対しても *cbpA*, *cbpB* 遺伝子を組込んだ発現プラスミドを構築し、形質転換を行っ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 4 件)

- ①. Ota M., Sakuragi H., Morisaka H., Kuroda K., Miyake H., Tamaru Y., Ueda M. "Display of *Clostridium cellulovorans* xylose isomerase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* and its direct application to xylose fermentation." *Biotechnol. Prog.*, (2013) 査読有
- ②. Morisaka H., Matsui K., Tatsukami Y., Kuroda K., Miyake H., Tamaru Y., Ueda M.. "Profile of native cellulosomal proteins of *Clostridium cellulovorans* adapted to various carbon sources." *AMB Express*, 2(1),37-42 (2012) 査読有
- ③. 三宅英雄, 田丸浩 "セルロソーム生産菌 *Clostridium cellulovorans* 743B の全ゲノム解析" 三重大学大学院生物資源学研究科紀要 第 37 号, p1-9. (2011) 査読有
- ④. Tamaru Y., Miyake H., Kuroda K., Nakanishi A., Matsushima C., Doi R.

H., Ueda M. "Comparison of the mesophilic cellulosome-producing *Clostridium cellulovorans* genome with other cellulosome-related clostridial genomes." *Microbial. Biotechnology.*, 4(1), 64-73 (2011) 査読有

[学会発表] (計 17 件)

- ①. 高嶋和也、石川卓、黒田浩一、植田充美、三宅英雄 "異なる糖で培養したセルロソーム生産菌 *Clostridium cellulovorans* 743B の比較 RNA-seq 解析" 日本農芸化学会 2012 年度大会 2013 年 3 月 25 日 東北大学
 - ②. 三宅英雄、中島大地、永野彰彦、森坂裕信、黒田浩一、植田充美、田丸浩 "Clostridium cellulovorans 743B が生産する新規セルロソーム骨格タンパク質 CbpB の機能解析" 第 64 回 日本生物工学会大会 2012 年 10 月 26 日 神戸国際会議場
 - ③. MIYAKE H., NAKAJIMA D., NAGANO A., MORISAKA H., KURODA K., UEDA M., TAMARU Y. "Characterization of the cellulosomal scaffolding protein CbpB from *Clostridium cellulovorans* 743B" 2012 Clostridium International Meeting XII 24th, Sep, 2012 Nottingham Conference Centre in Nottingham, UK
 - ④. Nakajima D., Nagano A., Morisaka H., Kuroda K., Ueda M., Miyake H. "Characterization of the cellulosomal scaffolding protein CbpB from *Clostridium cellulovorans* 743B" American Society for Microbiology 17th Jun, 2012 Moscone Center in San Francisco, USA
 - ⑤. 三宅英雄、中島大地、山本康介、森坂裕信、黒田浩一、植田充美、田丸浩 "Clostridium cellulovorans 由来セルロソーム骨格タンパク質 CbpB のクローニングと発現" 第 34 回 日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 18 日 パシフィコ横浜
 - ⑥. 松井一真、森坂裕信、黒田浩一、三宅英雄、田丸浩、植田充美 "Clostridium cellulovorans のセルロソームに焦点を当てたプロテオーム解析" 第 63 回 日本生物工学会大会 2011 年 9 月 27 日 東京農工大学
- [図書] (計 3 件)
- ①. 三宅英雄、田丸浩 "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” 第1編第1章, シーエムシー出版, p50-55 (2012)
- ②. 田丸浩, 三宅英雄. “デザインブルセルロソームによるバイオマス処理技術” 「セルロース系バイオエタノール製造技術-食料クライシス回避のために- 第11章」 NTS, p119-213. (2010)
- ③. 三宅英雄. “セルロース系バイオマスからのブタノール生産” 「エコバイオリファイナリー」 シーエムシー出版, p108-113. (2010)

[その他]

ホームページ等

http://www.bio.mie-u.ac.jp/~miyake/miyakes_HP/Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 英雄 (MIYAKE HIDEO)

三重大学・大学院生物資源学研究科・助教

研究者番号: 50362364

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

黒田 浩一 (KURODA KOUICHI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 30432339