

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580476

研究課題名(和文) セルラーゼ触媒モジュールの基質との親和性を評価する

研究課題名(英文) Substrate binding affinities of catalytic modules from cellulases

研究代表者

苅田 修一 (Karita, Shuichi)

三重大学・地域イノベーション学研究科・教授

研究者番号：90233999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：セルロース分解酵素の触媒の基質親和性について検討した。セルロース分解細菌に由来する Cel5A、Cel5B、Cel5E の三つの触媒に変異を導入して活性を失った酵素タンパク質の結合特性を分析した。その結果、同じファミリーのセルラーゼであっても、セルロースの形態の違いにより、結合量に差が生じた。酸膨潤セルロースへの結合量は、Cel5B>Cel5A>Cel5E の順番であったが、ボールミルドセルロースに対しては、Cel5E>Cel5A>Cel5B の順であった。同じエンドグルカナーゼに属する酵素でも、その触媒がもつ基質親和性は、基質形態で異なっていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Microorganisms produce multiple cellulases for degradation of biomass. Substrate affinities of these cellulolytic enzymes were examined. Three catalytic modules of enzymes, Cel5A, Cel5B, and Cel5E from *Clostridium thermocellum* were mutated to lose catalytic activities. Mutated proteins were tested for binding affinities of cellulosic substrates. Binding capacity to acid-swollen cellulose was Cel5B > Cel5A > Cel5E, whereas that to ball-milled cellulose was Cel5E>Cel5A>Cel5B. These enzymes are endoglucanases, however, substrate affinities of these catalytic modules depend on morphology of cellulosic substrates.

研究分野：応用微生物学

キーワード：セルラーゼ バイオマス 糖化 基質親和性

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁を分解する微生物は、数多くの加水分解酵素を有しており、これらの複数の酵素を発現することにより植物細胞壁に含まれる多糖類を分解している。なぜ、このように数多くの酵素を有しているのかは明らかではない。

これらの加水分解酵素は「触媒モジュール」と「糖質結合モジュール」から構成されている。植物細胞壁を構成する多糖類は、水に不溶であるために、これらを分解する酵素は、基質である多糖類を認識する「糖質結合モジュール」を持っている。

微生物は構造の異なる「糖質結合モジュール」を数多くもっており、植物細胞壁の異なる部分を認識して結合している。一方、「触媒モジュール」においても、構造のよく似た同一ファミリーに属する複数の酵素を、微生物は発現しており、なぜ、同じような酵素を複数利用しているのかは不明である。

「糖質結合モジュール」においては、似たような結合定数をもつものの、結合する部位や特異性が大きくことなっている。「触媒モジュール」にも、同じセルラーゼでありながら、セルロースへの結合の特異性があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、酵素の触媒モジュールが、どのような基質に対して親和性を持ち、どのような親和力で基質を認識しているかを明らかにする。糖質結合モジュールの特性だけでなく、触媒本来の特異性を明らかにすることで、微生物はなぜ複数の酵素が必要なのかについて考える情報を提供する。

3. 研究の方法

- セルラーゼ触媒モジュールの一般酸塩基触媒残基であるグルタミン酸を、グルタミンに換える部位特異的変異を導入した。

- 変異導入にした遺伝子を発現プラスミド pQE30 に導入し、大腸菌で発現した。発現したタンパク質を本研究費により導入した Profinia タンパク質精製システムを使用して高度に精製した。

- 不溶性基質に対する結合試験-精製した変異酵素タンパク質を使用して、種々の不溶性基質に結合試験を行った。結合試験において、結合しなかったタンパク質量から結合タンパク質量を算出し、Langmuir の等温吸着線により、結合定数を求めた。

- 可溶性基質に対する結合試験-セロヘキサオースを基質として、等温滴定熱量計により、結合時に生じる熱量を測定して、結合定数を算出した。

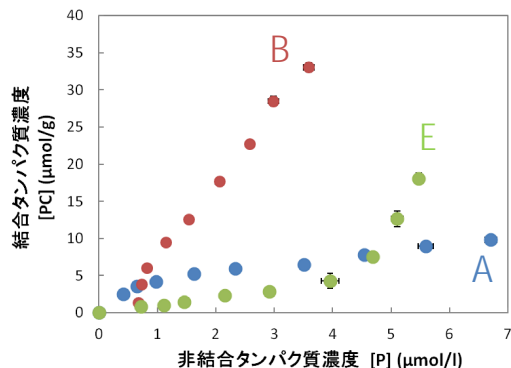
- 結合部位を特定するために、変異触媒モジュールと蛍光タンパク質の融合タンパク質

を作成し、蛍光顕微鏡化で、植物細胞切片での結合部位を観察した。

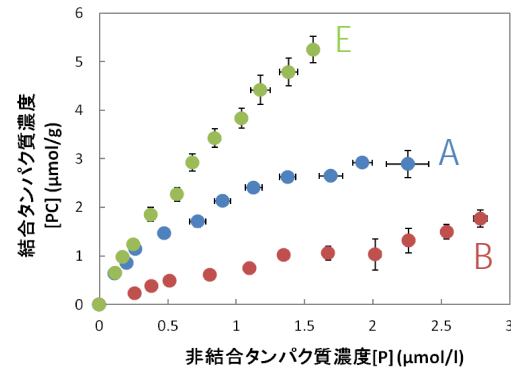
4. 研究成果

嫌気性好熱セルロース分解細菌 *Clostridium thermoCELLUM* には、ゲノム上に少なくとも 11 種類の糖質関連加水分解酵素ファミリー 5 (GH5) に属する酵素がある。これに着目して、これらの触媒モジュールの結合特性の解析を行った。

Cel15A、Cel15B、Cel15E の 3 つは、容易に発現できたので、この 3 つのセルラーゼについて結合試験を行った。酸膨潤セルロースに対する結合試験において、Cel15B 及び Cel15E は結合飽和することができなかった。これは高濃度のタンパク質溶液で、タンパク質同士の会合が生じたためと考えた。ポールミルドセルロースにおいても同様に Cel15B において飽和がみられなかった。しかしながら、結合量において、明らかに 3 つの触媒モジュールは異なる結合量を示し、酸膨潤セルロースに対する結合量は、Cel15B>Cel15A>Cel15E の順であった(図 1)。一方、ポールミルドセルロースに対する結合量は、Cel15E>Cel15A>Cel15B の順であった。同じようなセルロース基質に対しても結合量が大きく異なることが明らかになった(図 2)



各酵素の0.05%ASCに対する結合量
図 1、酸膨潤セルロースへの結合の違い



各酵素の0.1%BMCに対する結合量
Cel15B>Cel15A>Cel15E の順であった。

図 2、ポールミルドセルロースへの結合量
Cel15E>Cel15A>Cel15B の順であった。

これらの基質への結合飽和が見られた

Cel5A に対して Langmuier の等温吸着曲線から結合定数を求めたところ、酸膨潤セルロースに対して、 $8.18 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、ボールミルドセルロースに対して、 $2.26 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ という値を示した(表1)。この値は、糖質結合モジュールの結合定数の値に匹敵しており、触媒モジュール単独でも、酵素活性を発揮するために十分な親和性を不溶性セルロースにもつことがわかった。

表1、Cel5E の結合定数

	$K_a(\text{M}^{-1})$	[PC]max!($\mu\text{mol/g}^{-1}$)
0.05%IASC	8.18×10^5	9.66
0.1%IBMC	2.26×10^6	3.13

一方、同様な実験を行った Cel44A については、ボールミルドセルロースに対して K_a 値 $9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ であり、同じセルラーゼでも親和性に大きな違いがあることが明らかとなった。

等温滴定熱量計によりセロヘキサオースとの親和力を測定したところ、Cel5A>Cel5E>Cel5B の順で、親和力が高かった。Cel5A の結合定数は、 $1.81 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ で、可溶性セロオリゴ糖に対しても、糖質結合モジュールに匹敵する結合定数を示した(図3、表2)。Cel5A と Cel5E は類似の発熱量を示したため、サブサイトでの結合様式が似ていると考えられたが、Cel5B は、結合定数が小さいだけでなく、発熱量が小さいので、疎水性相互作用が結合に貢献する割合が高いと推定した。

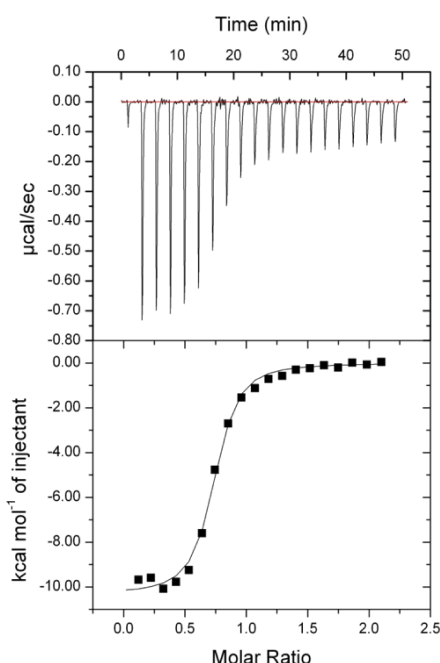


図3、等温滴定熱量計による Cel5A とセロヘキサオースとの結合熱の測定

Cel5E について、セロヘキサオースに対する結合定数が、 $1.13 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であったのに対して、セロペンタースに対する結合定数は、 $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ で、オリゴ糖の長さがひとつ短

くなるだけで、結合定数が、およそ3分の1に減少した。このことは、より長いオリゴ糖が高い親和力をもつことを示している。

同様に、ファミリー44のセルラーゼ Cel44A においても、セロヘキサオースに対する結合定数は、 $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ で、セロペンタースに対して、 $1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であり、同様に短くなることで親和力が低下することが明らかとなった。

表2、等温滴定熱量計による結合定数

	$K_a(\text{M}^{-1})$	$\Delta G^\circ(\text{kcal mol}^{-1})$	$\Delta H(\text{kcal mol}^{-1})$	$T\Delta S(\text{kcal mol}^{-1})$	n
Cel5A (E180Q)	1.81×10^6	-8.54	-10.3	-1.78	0.71
Cel5B (E130Q)	6.82×10^4	-6.60	-4.80	1.80	0.53
Cel5E (E138Q)	1.13×10^5	-6.89	-10.7	-3.77	0.66

蛍光タンパク質と融合した触媒ドメインの植物切片への結合では、糖質結合モジュールとは異なり、結合量が少なく、有意な蛍光を見ることができなかった。これらのことから、精製されたセルロース基質には糖質結合モジュールと同等に結合ができるものの天然の植物細胞壁においては、セルロース質の露出が少ないことから、触媒モジュールの結合が制限されるのではないかと考えた。このために、天然の材料を分解するためには、触媒モジュールに糖質結合モジュールがつく、モジュラー構造は、効率的な分解に不可欠なだろうと考えた。

さらに、これらの変異のない酵素の酵素活性を測定してみたところ、酸膨潤セルロースに最も結合した Cel5B よりも、Cel5E のほうが、活性が高く、酵素活性では、基質結合量と全く逆の結果となった。このことは、このような不溶性基質に対する結合性と酵素活性が一致しないことがわかった。

これらの研究から、複数存在する GH5 のセルラーゼであっても、セルロース質の基質への結合量が、セルロース材料によって異なっていることが明らかになった。同一ファミリー内であっても基質結合量、酵素活性に大きな違いがあり、それぞれ、結合しやすい基質形態が異なることが明らかとなった。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

・並河有紀、市川俊介、苅田修一、GH5 セルラーゼの触媒モジュールは異なる基質親和性をもつ。第28回セルラーゼ研究会・幕張セミナーハウス、千葉県習志野市。2014年7月11日

・並河有紀、苅田修一、糖質加水分解酵素ファミリー5セルラーゼの触媒モジュールは異なる基質親和性を持つ。第37回日本分子

生物学会年会・横浜パシフィコ、横浜市。
2014年11月26日

・並河有紀、苅田修一、須藤真子、市川俊輔。
Clostridium thermocellum 由来の糖質加水
分解酵素 GH5 触媒モジュールの基質結合特
性。日本農芸化学会 2015 年度大会。岡山大学、岡山市
2015年3月27日

〔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：
出願年月日：
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

苅田修一 (KARITA Shuichi)
三重大学・大学院地域イノベーション学研究
科・教授
研究者番号：90233999