

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580490

研究課題名(和文) バイオマス利用に向けた高セルロース分解性の好熱細菌による繊維分解・糖化過程の研究

研究課題名(英文) Study of plant-fiber decomposition by a cellulolytic thermophile for utilization of cellulosic biomass

研究代表者

横山 浩 (Yokoyama, Hiroshi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所畜産環境研究領域・主任研究員

研究者番号：40391370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：Caldicellulosiruptor bescii (C. bescii)は、微生物の中で最も高温で結晶性セルロースを分解できる嫌気性高度好熱細菌である。C. besciiセルラーゼ系の結晶性セルロースと稲ワラに対する分解活性はトリコデルマ由来酵素よりもおよそ2倍高いことを明らかにした。新規のセルロース・ヘミセルロース結合タンパク質ファミリーPWBPを同定した。組換えPWBP49, PWBP57, PWBP65タンパク質を調整して生化学的活性を解析した。その結果、これらタンパク質は植物細胞壁に最も高い結合親和性を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Caldicellulosiruptor bescii (C. bescii) is the most thermophilic bacterium that can degrade crystalline cellulose. Experiments using microcrystalline cellulose and native timothy grass showed that the cellulose system of C. bescii decomposes them more than double as compared to the most common enzyme system prepared from Trichoderma species. A new protein family, PWBP (plant cell wall-binding protein), was identified in the C. bescii cellulose system. The recombinant PWBP49, PWBP57, and PWBP65, prepared from E. coli, showed the highest binding affinities to native plant cell walls among insoluble polysaccharides tested.

研究分野：環境微生物学

キーワード：バイオマス セルラーゼ 好熱菌

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化に対する懸念から、リグノセルロース系バイオマス利用への注目が高まっている。持続可能な社会構築に向けてバイオマス利用技術の開発は重要である。リグノセルロース系バイオマスの利用では、酵素による安価な分解法の開発が必要である。しかし、強固な結晶構造のために、未だに十分な分解法は確立されていない。

2. 研究の目的

微生物の中で最も高温で結晶性セルロースを分解できる嫌気性高度好熱細菌 *Caldicellulosiruptor bescii* (*C. bescii*) の細胞外分泌型セルラーゼ系を分子生物学的に解明することにより、これまでにない高活性なセルロース分解酵素の調製に向けた基礎技術を開発する。

3. 研究の方法

1) *C. bescii* を嫌気培養 (75 °C) して、細胞外に分泌されたタンパク質を遠心分離法で回収した。その画分を硫酸沈殿で濃縮 (*C. bescii* 細胞外分泌型セルラーゼ系) して、実験に用いた。

2) *C. bescii* 細胞外分泌型セルラーゼ系を SDS-PAGE で分離後、バンドを切り出した。トリプシン処理した後、MALDI TOF MAS でマルチドメインセルラーゼ遺伝子を同定した。

3) トリコデルマとの活性比較では、市販の *T. reesei* 由来酵素 (セルクラスト、シグマ) を使用した。

4) 組換えタンパク質の調整では、pET28b (大腸菌内発現系) または pColdI (大腸菌低温発現系) に組み込み発現系を構築した。それらを宿主に遺伝子導入してタンパク質の発現を行った。宿主細胞を回収、破碎、熱処理後 (75°C, 20 min)、SDS-PAGE 法でタンパク質発現を解析した。

5) 不溶性および水溶性多糖類に対する結合活性を Pull Down 法または Affinity Gel 法で解析した。結合特性をさらに定量的に解析するために不溶性多糖類とオリゴ糖に対する結合を Depletion Binding Isotherm 法および Isothermal Titration Calorimetry (ITC) 法でそれぞれ解析して、 $K_d$  などの熱力学的パラメータを決定した。

6) 8 種類の結晶化キット (Hampton と QIAGEN) を用いて結晶化条件を検討した。得られた結晶を高エネ研 (KEK) の放射高施設 (PF) で X 線を照射して、反射データセットを取得した。

4. 研究成果

*C. bescii* セルラーゼ系を SDS-PAGE と MAS で解析したところ GH5, 9, 10, 44, 48 と CBM3 から構成される 4 つのマルチドメインセルラーゼが主成分であることが分かった。*C. bescii* セルラーゼ系の様々な基質に対する分

解活性を決定した (表 1)。*C. bescii* セルラーゼ系は様々な高分子多糖類を分解できることが分かった。

表 1 *C. bescii* セルラーゼ系の分解活性

Substrate	mU/mg-protein Average (S.D.)
Lichenan	2572.4 (0.1)
Xylan from Oat spelt	2246.4 (18.0)
Xylan from Beechwood	2212.5 (30.0)
CMC	1017.0 (9.9)
Acid-swollen Cellulose	607.7 (18.0)
Filter paper	58.9 (0.7)
Avicel	38.1 (1.0)
Timothy	32.6 (0.9)
Rice straw	27.5 (2.2)
Mannan	N. D.
Wheat starch	N. D.
Chitin	N. D.
Pectin	N. D.
Dextran	N. D.

*C. bescii* セルラーゼ系とトリコデルマ由来セルラーゼの結晶性セルロース (Avicel)、チモシー牧草、稲ワラ (10 g/L) に対する分解活性を比較したところ、*C. bescii* セルラーゼはおよそ 2.0~2.5 高い活性があることが分かった (図 1 と 2)。

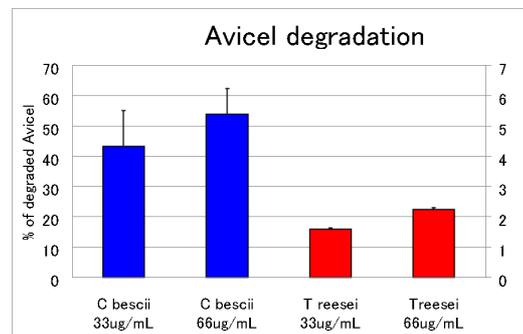


図 1 結晶性セルロースに対する分解活性の比較

新規のセルロース・ヘミセルロース結合タンパク質ファミリー PWBP (plant cell wall-binding protein) を *C. bescii* セルラーゼ系から同定した (図 3)。遺伝子組み換えタンパク質 PWBP49, PWBP57, PWBP65 を作成・

精製して生化学的活性を解析した。その結果、PWBP49 は xylan, Avicel, PASC, rice straw, timothy grass, mannan, arabinoxylan, xyloglucan に結合できることが分かった。さらに PWBP49 は、様々な oligosaccharide にも結合できることが判明し、その中でも xylobiose に最も高い結合親和性を示す。

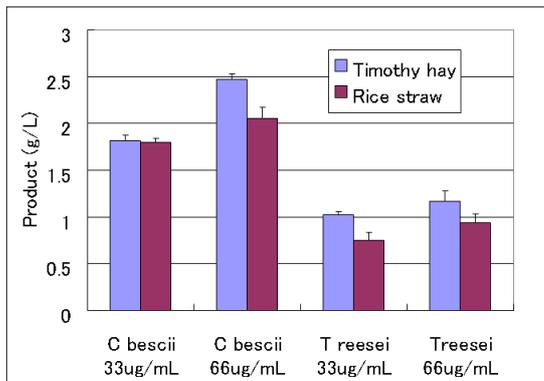


図2 牧草・稲ワラに対する分解活性比較

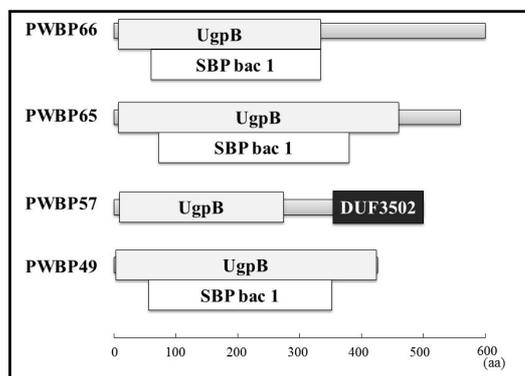


図3 新規の植物細胞壁結合タンパク質ファミリー-PWBP の模式図

PWBP57 は、不溶性多糖類に対しては非結晶性のセルロース(PASC)に最も多く結合する(図4)。しかし、結合親和性(結合定数  $K_a$ )は牧草(チモシー)細胞壁に対して最も高い値を示した。水溶性基質に対しては、ペクチンやキシランに強く結合していた。PWBP57 は、キシロオリゴ糖への結合は検出されなかったが、セロオリゴ糖への結合が観察された。

PWBP65 は、不溶性多糖類であるセルロース、マンノース、キシラン、牧草細胞壁に対して同程度に結合した(結合量)。結合親和性(結合定数  $K_a$ )は PWBP57 と同様に牧草細胞壁に対して最も高い値を示した。水溶性基質に対しては PWBP57 と類似した結合特性が認められた。PWBP65 は、キシロオリゴ糖とセロオリゴ糖の両方に結合した。

蛍光顕微鏡観察により PWBP57 と PWBP65 は実際に植物細胞壁に優先的に結合することが確認された(図5)

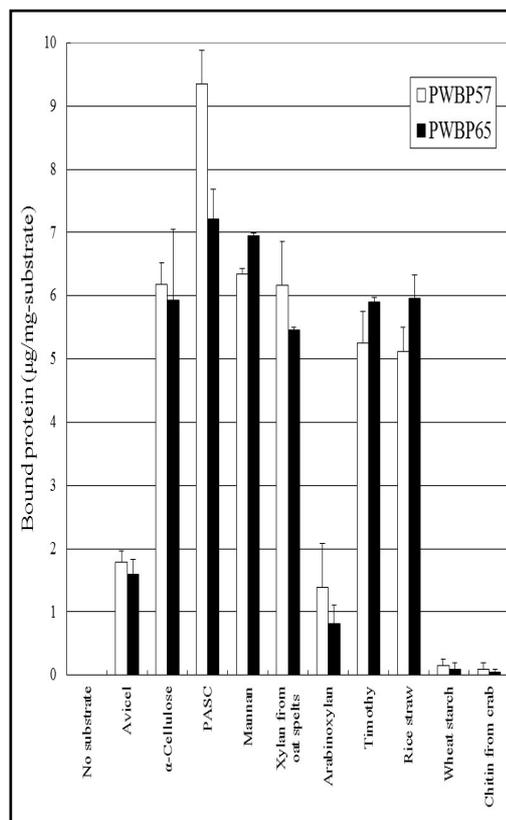


図4 PWBP57, 65 の結合活性

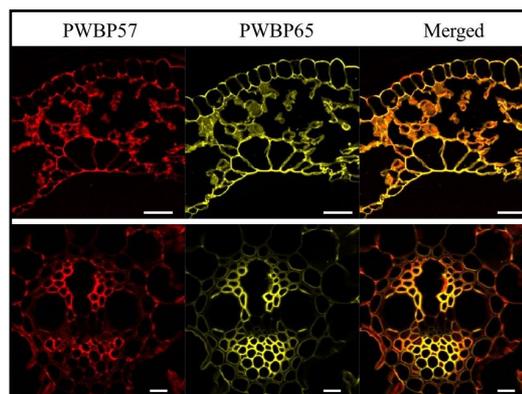


図5 蛍光顕微鏡による PWBP57, 65 の牧草組織切片への結合部位の解析

PWBP49 は、Sodium malonate で結晶化が可能であることが分かった(図6)。その結晶にX線を当てたところ、分解能 1.6Å のデータセットが得られた。

PWBP57(図7)は 0.1M Sodium citrate pH5.5, 2.2M Ammonium sulfate, PWBP65(図8)は、0.1M Sodium citrate pH6.0, 30% PEG 600 の条件で結晶が得られた。

本研究から *C. bescii* は分解酵素に加えて、これらの植物細胞壁結合タンパク質を分泌しながらバイオマスを分解していることが

明らかとなった。新規結合タンパク質の補助により *C. bescii* は高い分解活性を示す可能性が示唆された。

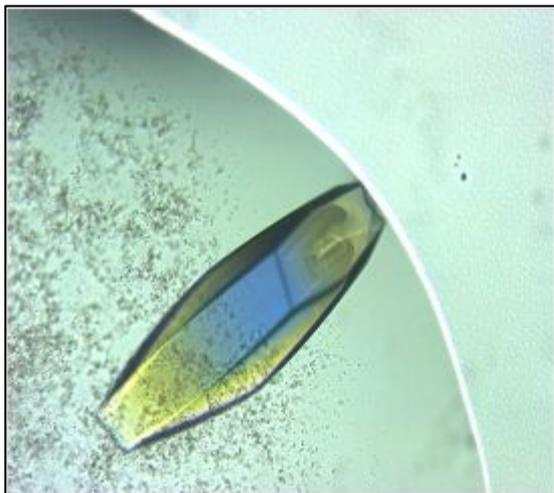


図6 PWB49の結晶

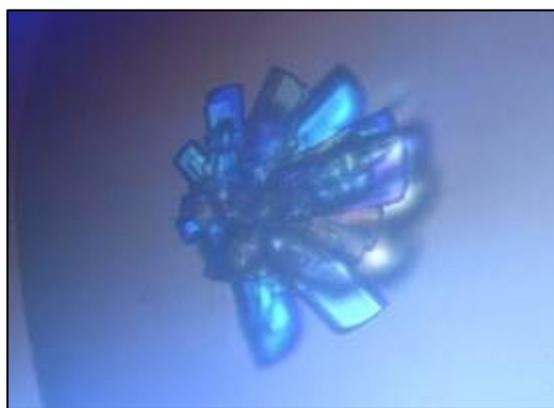


図7 PWB57の結晶

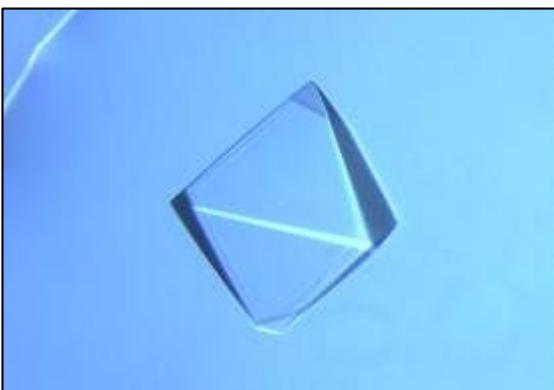


図8 PWB65の結晶

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 3 件)

Kanafusa-Shinkai S, Wakayama J, Tsukamoto K, Hayashi N, Miyazaki Y, Ohmori H, Tajima K, Yokoyama H.<sup>CA</sup>, Degradation of microcrystalline cellulose and non-pretreated plant biomass by a cell-free extracellular cellulase/hemicellulase system from the extreme thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, vol. 115, 2013, pp. 64-70

Yokoyama H, Yamashita T, Horikoshi N, Kurumizaka H, Kagawa W, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the secreted protein Athe\_0614 from *Caldicellulosiruptor bescii*, *Acta Crystallographica Section F*, 査読有, vol. 69, 2013, pp. 438-440

Yokoyama H, Yamashita T, Morioka R, Ohmori H., Extracellular secretion of non catalytic plant cell wall-binding proteins by the cellulolytic thermophile *Caldicellulosiruptor bescii*. Community analysis of hydrogen-producing extreme thermophilic aerobic microflora enriched from cow manure with five substrates, *Journal of Bacteriology*, 査読有, vol., 196, 2014, pp., 3784-3792

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

横山 浩 (YOKOYAMA HIROSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・畜産環境研究領域・主任研究員

研究者番号：40391370