

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820396

研究課題名(和文)セルロースの前処理機能を融合した新たな機能性セルラーゼの創製

研究課題名(英文)Development of novel cellulases fused with crystal-disrupting protein

研究代表者

中島 一紀(Nakashima, Kazunori)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50540358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エンドグルカナーゼCelDと、セルロース結晶破壊機能を有するエクспанシンExpを融合した融合酵素Exp-CeID, Exp-GS3-CeID, Exp-GS6-CeIDを作製した。ExpをCeIDに融合することにより、セルロースへの吸着性が大幅に増加した。非結晶セルロースの分解実験では、CeIDに比べ、Exp-CeIDの分解率は低下したが、Exp-GS3-CeIDとExp-GS6-CeIDの分解率は増大し、分解活性にはリンカーが重要であることが示された。さらに、結晶化度の異なるセルロースを用いて分解性を調査した結果、高結晶化度のセルロースに対してはExp-GS3-CeIDが有効であった。

研究成果の概要(英文)：We constructed novel fusion enzymes consisting of *Bacillus subtilis* expansin EXLX1 and *Clostridium thermocellum* endoglucanase CeID. These two components are directly fused, or fused using flexible glycine-serine peptide linkers (GGGGS, GS linker) with different lengths: a triplicate (GGGGS)3 linker (GS3) and a sextuple (GGGGS)6 linker (GS6), resulting in fusion enzymes EXLX1-CeID, EXLX1-GS3-CeID and EXLX1-GS6-CeID. The binding ability and digestibility of these fusion enzymes towards a series of cellulose substrates with different crystallinity index (CrI) was examined. Fused with EXLX1, CeID showed higher binding ability to various kinds of cellulose. In the degradation of cellulose, EXLX1-GS3-CeID exhibited the highest degradation activity among the fusion enzymes examined, suggesting that linker length between the two proteins has a significant impact on the activity of the fusion enzyme. EXLX1-GS3-CeID was found to function more effectively towards higher crystalline celluloses.

研究分野：生物反応工学

キーワード：バイオマス分解 前処理 融合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

稲わらや廃木材などのセルロース系バイオマスは、酵素分解によって燃料や化成品の原料となるグルコースに変換できることから、再生可能資源として注目されている。しかし、セルロースは強固な結晶構造をとるため、酵素が吸着しにくく、分解効率が低い点が問題となる。

2. 研究の目的

本研究では、セルロースに吸着し非結晶化する機能性タンパク質である *Bacillus subtilis* 由来のエクспанシン (Exp) に着目し、これを *Clostridium thermocellum* 由来のセルロース分解酵素 (CelD) と融合することで、セルロースの非結晶化と分解を同時に進行させる新規機能性酵素の開発に取り組んだ (Fig.1)。Exp と CelD からなる数種の融合酵素を作製し、セルロースに対する吸着特性、および結晶化度の異なるセルロースの分解性を調査した。

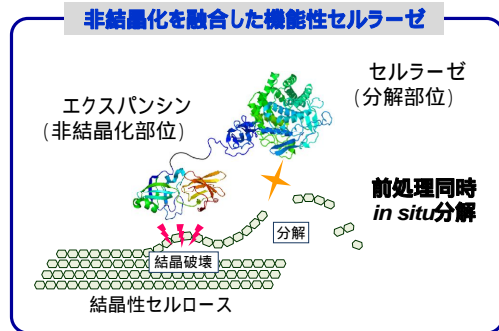


Fig.1 本研究のアプローチ

3. 研究の方法

融合酵素は、Exp と CelD を直接つなぎ合わせた Exp-CelD と、フレキシブルな GS リンカーを 3 つあるいは 6 つ挿入した Exp-GS3-CelD、および Exp-GS6-CelD を作製した。

作製した各酵素を用いてセルロースへの吸着実験と分解実験を行った。基質は、Avicel をリン酸処理して作製した結晶化度の異なるセルロース (CrI=13.7, 57.6, 74.0%) を使用した。所定時間毎に採取した反応液を遠心分離した後、上清に含まれるタンパク質濃度をブラッドフォード法により定量することで吸着率を、グルコースおよびセロビオース濃度を HPLC-ELSD により分析することでセルロースの分解率を算出した。

4. 研究成果

Fig.2 に大腸菌により作製した各酵素の SDS-PAGE を示す。各酵素の分子量に対応する位置にそれぞれ単一バンドが検出され、Exp (23 kDa)、CelD (62 kDa)、および融合酵素 Exp-CelD (85 kDa)、Exp-GS3-CelD (86 kDa)、Exp-GS6-CelD (87 kDa) の発現と精製を確認した。

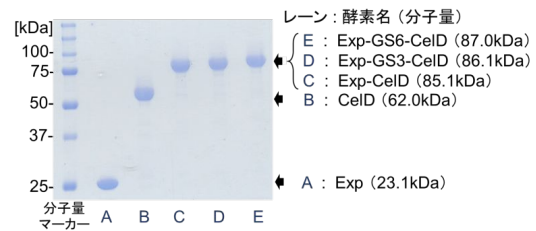
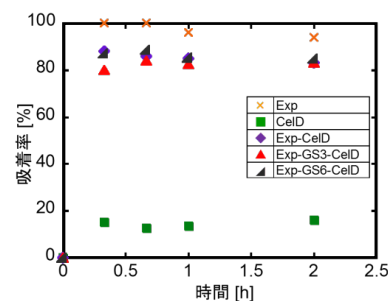


Fig.2 作製したタンパク質の SDS-PAGE

Fig.3 に種々の結晶化度のセルロースに対する酵素吸着率を示す。非結晶セルロース (結晶化度=13.7) では、セルロース吸着性タンパク質である Exp の吸着率は 2 時間で 94% であった。一方で、セルロース分解酵素 CelD の吸着率は 16% と低かったが、Exp 融合酵素はいずれも 80% 程度まで増大した。さらに、結晶セルロース (結晶化度=80.3) でも同様に、CelD に比べ Exp 融合酵素の吸着率は非常に高かった。したがって、Exp を融合することで、結晶および非結晶セルロースのいずれに対しても CelD の吸着性が增大することが分かった。また、吸着性に関してリンカーの有無や長さは大きな影響を持たないことが示された。

(a) 非結晶セルロース (結晶化度=13.7)



(b) 結晶セルロース (結晶化度=80.3)

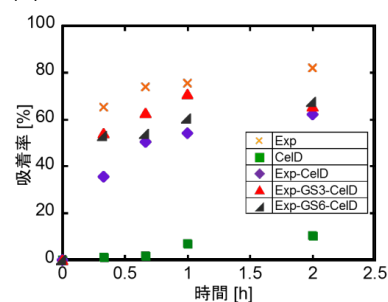


Fig.3 各セルロースへの吸着挙動

Fig.4 に非結晶セルロースの分解率の経時変化を示す。CelD と比較して、Exp を直接つなぎ合わせた Exp-CelD の分解率は低下した。一方、GS リンカーを挿入して Exp を融合した Exp-GS3-CelD と Exp-GS6-CelD の分解率は増大した。また、Exp と CelD を連結せずに共添加した系 (Exp + CelD) の分解率は CelD と同程度であった。以上のことから、リンカーを挿入して Exp を融合することで、CelD のセルロース分解活性を向上することができると考えられる。

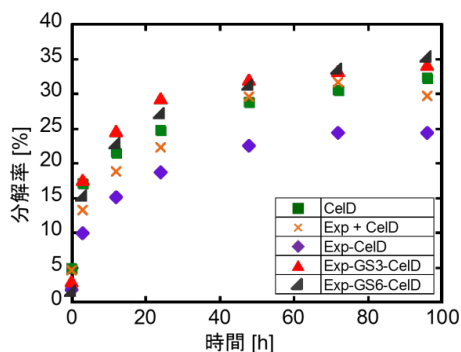


Fig.4 各酵素の分解挙動
基質：非結晶セルロース (CrI=13.7)

融合酵素のリンカーの長さがセルロース分解性に及ぼす影響を詳細に検討するために、結晶化度の異なる3種類のセルロース (CrI=13.7, 57.6, 74.0) の分解を CelD, Exp-GS3-CelD, Exp-GS6-CelD を用いて行った。これらの融合酵素による分解率の増減度を評価するために、CelD と各融合酵素の分解率の比を算出し、これを縦軸として Fig.5 に示した。Exp-GS3-CelD では、結晶化度の高いセルロースほど分解率の増大効果が大きいことが分かる。一方で、Exp-GS6-CelD では結晶化度の大きいセルロースほど分解率が低下した。以上より、本研究で作製した融合酵素 Exp-GS3-CelD は結晶化度が高い難分解性のセルロースに対して、より効率的に分解機能を発揮することが考えられる。

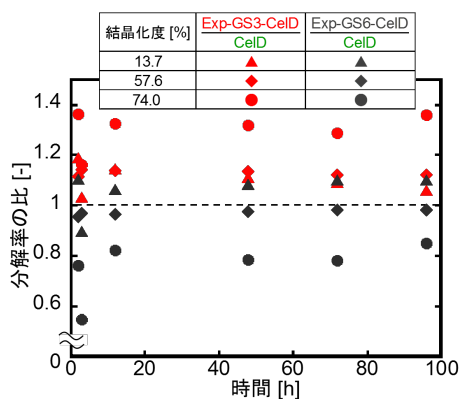


Fig.5 CelD と融合酵素の分解率の比

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. Kazunori Nakashima, Koji Endo, Naomi Shibasaki-Kitakawa and Toshikuni Yonemoto, "Fusion enzyme consisting of bacterial expansin and endoglucanase for degradation of highly crystalline cellulose" *RSC Advances*, **4**, 43815-43820 (2014) 査読有

DOI: 10.1039/c4ra05891g

2. Motonori Kudou, Yuka Kubota, Nanami Nakashima, Fumiyoshi Okazaki, Kazunori Nakashima, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo, "Improvement of enzymatic activity of β -glucosidase from *Thermotoga maritima* by 1-butyl-3-methylimidazolium acetate" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **104**, 17-22 (2014) 査読有

DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.02.013

3. Sang Youn Hwang, Kazunori Nakashima, Naoko Okai, Fumiyoshi Okazaki, Michiru Miyake, Koichi Harazono, Chiaki Ogino, and Akihiko Kondo, "Thermal Stability and Starch Degradation Profile of α -Amylase from *Streptomyces avermitilis*" *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **77**(12), 2449-2453 (2013) 査読有

DOI: 10.1271/bbb.130556

4. Kazunori Nakashima, Naomi Shibasaki-Kitakawa, Takuya Miyamoto, Masaki Kubo, Toshikuni Yonemoto, Michael L. Shuler, "Production of Human Secreted Alkaline Phosphatase in Suspension and Immobilization Cultures of Tobacco NT1 Cell" *Biochemical Engineering Journal*, **77**, 177-182 (2013) 査読有

DOI: 10.1016/j.bej.2013.06.004

[学会発表](計4件)

1. K. Nakashima, K. Endo, N. Shibasaki-Kitakawa, T. Ihara, T. Yonemoto, Construction and Degradation Properties of Fusion Enzymes Composed of Bacterial Expansin and Endoglucanase, 2014 AIChE Annual Meeting, Nov 19, 2014, Atlanta (USA)

2. 中島 一紀・遠藤 孝治・北川 尚美・米本 年邦, バクテリア由来エクспанシンとエンドグルカナーゼからなる融合酵素の作製とセルロース分解, 第66回日本生物工学会大会, 2014年9月10日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

3. 遠藤 孝治・中島 一紀・北川 尚美・米本 年邦, セルロース吸着性タンパク質を融合したセルラーゼの吸着および反応特性, 化学工学会第79年会, 2014年3月20日, 岐阜大学(岐阜県岐阜市)

4. 海老 友稀・中島 一紀・北川 尚美・米本 年邦, セルロース系バイオマスの酵素分解における超音波前処理の影響, 化学工学会 第45回秋季大会, 2013年9月18日, 岡山大学(岡山県岡山市)

〔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 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

中島 一紀 (Nakashima, Kazunori)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：50540358

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：