

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850127

研究課題名(和文) ナノファイバーセルロースを基質としたセルラーゼ活性の超高感度可視化計測

研究課題名(英文) Ultra-sensitive assay of cellulase activity using nanofibrous cellulose

研究代表者

津留 美紀子 (TSUDOME, Mikiko)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・技術主事

研究者番号：60399574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ナノファイバー構造のセルロース表面に、インクジェット技術を用いてセルラーゼ溶液を数十pL滴下すると、加水分解に伴って基板表面に凹みが形成される。研究代表者は、加水分解で生じる凹みの体積を3Dコンフォーカル顕微鏡を用いて精密に経時測定することにより、セルロースの酵素分解速度を超高感度に測定する手法を確立した。さらにゼラチンゲルを基質に用いて、プロテアーゼ活性を測定することにも成功した。酵素活性測定は反応生成物を定量するのが一般的である。本手法は、基質の加水分解に伴う体積変化を指標として酵素活性測定する新手法であり、これまで困難であった水に不溶な基質の酵素加水分解の高感度測定に広く応用可能である。

研究成果の概要(英文)：An ultra-sensitive assay for measuring cellulase activity has been developed by using nanofibrous cellulose combined with inkjet patterning and 3D laser profilometry. When several dozen pico-liters of a cellulase solution was inkjet-deposited on the surface of nanofibrous cellulose, a pit was formed upon enzymatic hydrolysis. 3D laser profilometry was successfully employed to accurately measure the volume of the pit as a function of time and quantify enzymatic hydrolysis rate of cellulose with ultra-high sensitivity. The same method was also applied for assaying the activity of proteases by using hydrogels of gelatin as substrates. Enzymatic activity has been assayed by quantifying accumulation of end products. In contrast, the new method measures the volume loss of the water-insoluble substrate upon hydrolysis, and can be applied to study enzymatic hydrolysis of a broad range of water-insoluble substrates.

研究分野：生物学

キーワード：ナノファイバーセルロース セルラーゼ プロテアーゼ ゼラチン ハイスループット 酵素活性測定

### 1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁の主成分であるセルロースは地球上に最も豊富に存在するバイオマスである。近年、再生可能資源の有効利用に対する関心が高まり、セルロースを糖化して得られたグルコースからバイオエタノールやバイオプラスチックなどの物質を生産する技術が注目されている。環境への負荷等を考えると、酵素加水分解によるセルロースの糖化が望ましいが、既存のセルラーゼでは反応が遅くコストもかかるため、既存酵素の改変とともに、環境中の微生物から新しいセルラーゼを探索する試みが進められている。後者においては微生物が生産するセルラーゼの活性を高感度かつハイスループットに検出する手法が必要とされるが、水に不溶で難分解性のセルロースの酵素加水分解反応を迅速かつ高感度に測定するのは困難であった。研究代表者は、これまでにナノファイバーセルロース多孔質体を培地担体とする、セルロース分解菌スクリーニング法を確立している。ナノファイバーセルロース培地でセルロース分解菌を培養すると、増殖に伴いセルラーゼを分泌し、その結果ナノファイバーセルロース表面が溶解し凹みが見れる (Fig. 1. B)。セルロース分解能を持たない菌が作る凸型コロニー (Fig. 1. A) との形状の違いを判別することが容易であり、実際にこの手法を用いて複数の新奇セルロース分解菌の分離に成功している。

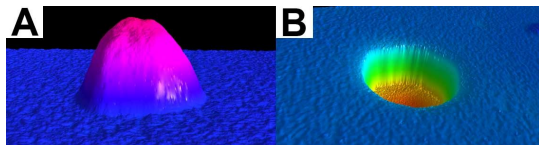


Fig. 1 ナノファイバーセルロース培地で培養した微生物コロニー形状の3D像比較。A) セルロース分解能を持たない大腸菌の凸型コロニー B) セルロース分解菌の凹型コロニー

### 2. 研究の目的

既存のセルラーゼ活性測定法では、基質であるセルロースを酵素加水分解し得られる分解産物濃度を定量する手法が一般的である。しかしながら、セルロースは水に不溶でかつ不定形であり、酵素反応が長時間要するなど、従来法では十分な感度が得られず、真のセルラーゼ反応速度を計測することが困難であった。研究代表者は、比表面積増大により酵素加水分解効率が向上するナノファイバーセルロースの特性に注目した。セルラーゼと作用すると、ナノファイバーセルロースは加水分解が進み、3次元ネットワーク構造が破壊されることで体積が減少していくことを確認している。そこで、セルロースが酵素加水分解で消失する体積量を精密かつリアルタイムで測定しセルロース分解量に換算する、つまり基質の反応量を直接定量できる全く新しいセルラーゼ活性測定法を確立することを目的とした。酵素改変やスクリーニング実験への展開に必要なハイスループット

な酵素活性測定法を考慮し、インクジェット技術を用いて極微量の酵素溶液を均一に滴下する測定手法の確立を目指した。また、再現性の向上や、測定時間の短縮など、新手法の測定精度を詳細に解析するため、セルロース同様に不溶な基質にゼラチンのナノファイバー材料を採用した、ゼラチンゲル/プロテアーゼ活性測定法の検討も進めた。

### 3. 研究の方法

#### (1) ナノファイバーセルロース/セルラーゼ活性測定法

市販の結晶セルロース粉末(比表面積 1.8 m<sup>2</sup>/g)をチオシアン酸カルシウムの飽和水溶液に加熱溶解した後、室温まで冷却・ゲル化させた。次にメタノールと水で洗浄し塩を除去することで、直径数十 nm のナノファイバー状結晶性セルロース(結晶化度 45%、比表面積 223.2 m<sup>2</sup>/g) からなる多孔質体を調製した。酢酸緩衝液(0.1 M, pH 5.8) を含浸させたナノファイバーセルロース表面にピエゾインクジェット式極微量分注装置(LaboJet-500Bio、株式会社マイクロジェット)を用いて 10mg/mL セルラーゼ(メイセラゼ、株式会社明治製菓)を 10pL/dot 吐出するようピエゾ駆動条件を調整後、20~100pL ずつナノファイバーセルロース基板表面に滴下した。酵素加水分解に伴いナノファイバーセルロース表面に現れる凹みは、表面形状を詳細に計測可能な形状測定レーザーマイクロSCOPE(VK-9700、キーエンス社)を用いて精密に計測した。

#### (2) ゼラチンゲル/プロテアーゼ反応実験方法

0.1M リン酸緩衝液(pH7.5)に混和した 20% ゼラチン(Type A, Sigma-aldrich 社)を加熱溶解後、冷却することでゼラチンゲルを得た。2mg/mL Proteinase K (Sigma-aldrich 社)を、ピエゾインクジェット式極微量分注装置で 10pL/dot 吐出するピエゾ駆動条件を検討後、ゼラチンゲル表面に 30~120pL 滴下し、顕微鏡ステージに取り付けた加冷温プレート(TP-CHS, 株式会社東海ヒット)でゼラチンゲルを 5~25°C の範囲で温度を一定に保ちながら、高速スキャン可能なハイブリッドカラーコンフォーカルマイクロSCOPE(Optelics Hybrid C3-JH、レーザテック株式会社)を用いてゼラチン表面に形成する凹み形状を精密に計測した。

#### (3) 凹み形状解析

凹み形状解析は、ナノスケール3D画像処理ソフトウェアSPIP™(イメージメトリジ社・デンマーク)を用いて、基板の傾き補正後、体積測定など3次元形状解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ナノファイバーセルロース/セルラーゼ活性測定法の確立

インクジェット式極微量分注装置を用いてセルラーゼ溶液を等量滴下すると、ナノファイバーセルロース表面が溶解して均一な凹みを形成した(Fig. 2)。

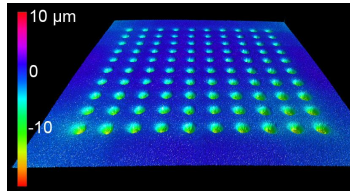


Fig. 2 インクジェット微量滴下装置でセルラーゼを滴下後、ナノファイバーセルロース表面に形成した凹みの 3D 像。凹みの間隔は 200 $\mu\text{m}$

この凹みは酵素反応に伴って時間経過とともに成長することを確認した (Fig. 3)。この凹みの体積はナノファイバーセルロースの 3次元ネットワークが加水分解され消失した量を示すことから、凹みの体積と反応時間の相関を検証したところ、比例関係が得られた。凹みの体積からセルロース分解量に試算すると、30 分の酵素反応で数 ng の微量な分解量で推移しており、本手法は超高感度に酵素活性を定量できることが示唆された (Fig. 4)。今回用いたナノファイバーセルロースは、構造特性から微視的に密度にばらつきがあり、実験の再現性精度をさらに向上させる必要が有る。そこで凹み計測の短縮化、他のナノファイバー材料への応用などを中心に解析する実験系の構築が必要であった。

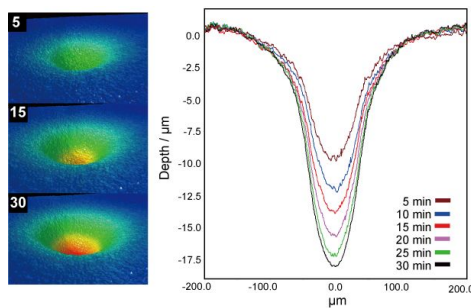


Fig. 3 ナノファイバーセルロース表面で展開する凹み成長の 3D 像と断面図

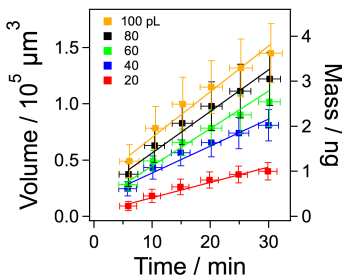


Fig. 4 酵素反応時間に伴う凹みの体積成長測定。反応温度は室温。

(2) ゼラチンゲル/プロテアーゼ活性測定法の確立

そこで、ファイバー密度が密で均一な構造を持つナノファイバーゼラチンゲルに注目し、ゼラチンゲルを基質に用いたプロテアーゼ実験系を構築することで、新手法の検証を行った。プロテアーゼをゼラチンゲル表面に滴下すると、ナノファイバーセルロース/セルラーゼ実験系と同様に、酵素反応の進行とともに、表面が溶解し均一な凹みを形成した。高速スキャンが可能な 3D コンフォーカル顕微鏡を用いて凹みを経時計測すると、一度に 4 箇所凹みを 20 秒の速さで計測できることから、凹み体積の精度が向上した (Fig. 5)。反応時間 10 分程度で、凹み体積から換算したゼラチン分解量は数~数十 ng で推移しており、体積増減も非常に再現性のある凹み成長であった。(Fig. 6)

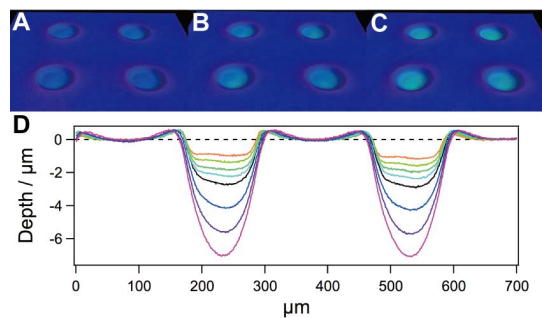


Fig. 5 インクジェット微量滴下装置でプロテアーゼ滴下後、ゼラチンゲル表面に形成した凹みの計時計測。凹み成長を 20 秒毎に測定したときの 3D 像(A-C)と凹み断面図の推移(D)

酵素反応温度と凹み形成について検証した実験では、低温条件での酵素活性測定も高感度に検出できた (Fig. 7)。しかしゼラチン温度が 30 $^{\circ}\text{C}$  を越えると、ゲルが軟化・溶解するため凹み成長の測定が困難であった。今回用いたゼラチンヒドロゲルは Proteinase K の最適反応温度 40 $^{\circ}\text{C}$  よりもゲル融点が高いため、解析は困難であることから、今後の研究では、ゲル融点温度を考慮して、プロテアーゼ最適温度に対応できる化学架橋ゼラチンを基板に用いて反応温度の関係、ゲル物性の凹み形状変化への関与について検証する。

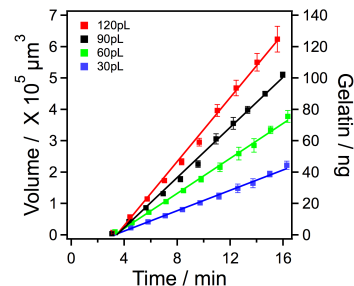


Fig. 6 酵素反応に伴うゼラチンゲル表面凹みの体積成長測定。反応温度 25 $^{\circ}\text{C}$

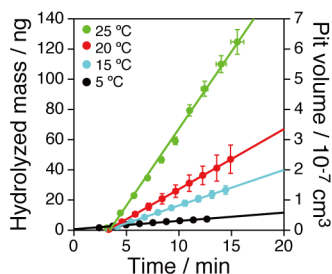


Fig. 7 酵素反応温度の違いと凹み体積成長の比較。酵素滴下量 120pL

### (3) ナノファイバー材料を用いたリアルタイム酵素活性測定

(1)(2)の結果から、基質が加水分解し消失する形状変化をリアルタイムに計測することに成功し、形状変化を指標にする高感度な酵素活性測定法を確立した。

### 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)

〔学会発表〕(計6件)

津留 美紀子、出口 茂、ナノファイバー基質表面でのピット形成を利用した酵素活性の超高感度アッセイ，日本化学会第95春季年会(2015)，日大船橋キャンパス、千葉県船橋市、2015年3月27日

Shigeru Deguchi, Mikiko Tsudome, Kohsuke Uchimura, Tohru Kobayashi, White Nanobiotechnology for Deep-Sea Bioprospecting, AsiaNano, Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju, Korea, 2014.10.29

出口 茂、津留 美紀子、内村康祐、小林徹、高分子からアプローチするバイオクレプティクス、第63回高分子討論会、長崎大学、長崎県長崎市、2014年9月25日

津留 美紀子、出口 茂、3D可視化技術を用いたセルロース酵素加水分解過程の超高感度・リアルタイムアッセイ，第63回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市、2014年5月29日

津留 美紀子、出口 茂、セルロースナノファイバーを用いた酵素分解プロセスの超高感度3D分析、第22回ポリマー材料フォーラム、タワーホール船堀、東京都江戸川区、2013年11月29日

津留 美紀子、出口 茂、ナノファイバーセルロースを用いた深海微生物資源のプロスペクティング、セルロース学会20周年次大会、京大おうばくプラザ、京都府宇治市、2013年7月19日

〔図書〕(計1件)

出口 茂、津留 美紀子、微生物の培養担

体としてのセルロースナノファイバーの利用、セルロースナノファイバーの調製、分散・複合化と製品応用(技術情報協会、東京、2015)、第7章第8節、P535(463-468)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

津留 美紀子 (TSUDOME, Mikiko)  
独立行政法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・技術主事  
研究者番号：60399574