

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14773

研究課題名(和文) リグニン結合性ペプチド配列を組み込んだ人工酵素合成と酵素デリバリーシステムの構築

研究課題名(英文) Development of artificial enzymes bearing lignin-binding peptide sequence and their delivery system

研究代表者

渡邊 隆司 (Watanabe, Takashi)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：80201200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リグニン親和性12-merペプチドをタンデムダイマー化することにより、モノマーのペプチドと比較して約10倍高い親和性をもつことを示した。ペプチドは、リグニンと混合させることにより、FTIR二次微分スペクトルが大きく変化し、リグニンとの相互作用によりペプチドのコンフォーメーションが変化することが明らかとなった。また、リグニン結合性ダイマーペプチド配列を担子菌のラッカーゼに連結させた融合タンパクを発現し、単離リグニンと木材のマイクロ波水熱反応物と反応させた結果、リグニン結合性ペプチド配列を組み込むことにより、リグニンとの反応性が上昇し、低分子フラグメントが増えることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The binding behavior of a 12-mer peptide and its tandem dimer to lignin was analyzed. The tandem dimerization increased affinity to lignin by around 10 times. The tandem dimer significantly changed its conformation upon addition of the lignin to have a 10-times higher affinity than the 12-mer peptide. Laccase bearing the tandem dimer peptide was expressed, and reacted to woody biomass pretreated by microwave hot water treatment. It was found that the incorporation of lignin-binding peptide increased the reactivity to lignin and gave higher amount of low molecular mass fragments.

研究分野：バイオマス変換

キーワード：リグニン ペプチド ラッカーゼ バイオリファイナリー バイオマス リグニン分解酵素

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化や化石資源の枯渇問題を背景として、リグノセルロースから燃料や化学品、材料を統合的に生産するバイオリファイナリー創成の必要性が増大している。リグノセルロースのバイオリファイナリーでは、細胞壁多糖であるセルロースやヘミセルロースの利用とリグニンの高付加価値利用の双方を両立させるプロセス開発が必要であり、このためにはリグノセルロースからの高選択的・高効率なリグニン分解法を確立することが必要である。高選択的・高効率なリグニン分解を達成するためには、リグニン親和性分子を触媒や酵素に担持させて基質との親和性を高めることが有効と考えられる。

2. 研究の目的

リグニンを特異的に認識する新規のリグニン分解触媒の開発に向け、これまでに木材から単離したリグニンに対し親和性を示すペプチド配列をファージディスプレイ法によって選抜した。本研究では、リグニンに対し、より親和性の高い分子を得ることを目的として、ペプチド配列を二重に連結したタンデムダイマーペプチドを合成する。また、ペプチドを利用したリグニン分解触媒の合理的な設計において、ペプチドとリグニンの相互作用様式を理解することが重要であるため、本研究ではリグニンに結合した際のペプチドの構造変化についても解析する。さらに、タンデムダイマーペプチドを連結した担子菌由来のラッカーゼを発現し、前処理バイオマスや単離リグニンに対する反応性を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

表面プラズモン共鳴 (SPR) によるペプチド-milled wood lignin 間の親和性測定

スギまたはユーカリから抽出した milled wood lignin (MWL) を、物理吸着法によって SPR センサーチップ上に固定化した。異なる濃度のリグニン親和性ペプチドをセンサーチップに送液し、各ペプチド濃度に対するペプチドの結合量から、ペプチドと MWL 間の親和性を算出した。

リグニン親和性ペプチドの円偏光二色性 (CD) スペクトル

リグニン親和性ペプチドをリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、190 nm-250 nm の CD を測定した。CD スペクトルの波形からペプチドの二次構造を推定した。

MWL 添加時におけるペプチドのフーリエ変換赤外 (FTIR) スペクトルの測定

スギまたはユーカリ由来 MWL と混合させた時のリグニン親和性ペプチドの IR スペクトルを測定した。ペプチド結合の C=O 伸縮振動に由来する Amide I 領域 (1600-1700 cm⁻¹) について、二次微分スペクトルを取得し、MWL

添加によるペプチドの構造変化について解析した。

ペプチドを結合したラッカーゼの反応性解析

タンデムダイマーペプチドを担子菌 *Trametes versicolor* のラッカーゼの N 末端および C 末端に連結させた遺伝子を、*Pichia pastoris* の発現ベクター (pPICZA) に組み込み、アルコールオキシダーゼ 1 (AOX1) プロモーター制御下で組換えラッカーゼを生産した。メタノールによる組換え酵素の発現誘導後、培養上清を回収し、疎水性相互作用クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて組換え酵素を精製した。リグニンとの親和性が強化された組換え酵素と native 型酵素を、木材のマイクロ波水熱反応物や単離リグニンと反応させた。リグニンとの反応物は、GPC により分子量分布を解析した。また、有機溶媒抽出し、GCMS で分解物を解析した。

4. 研究成果

リグノセルロースのバイオリファイナリーにおいては、高選択的・高効率なリグニン分解法の確立が必要である。本研究では、リグニンに対し親和性の高い分子を得ることを目的として、リグニン親和性 12-mer ペプチドを連結したタンデムダイマーペプチドを設計し、これらのペプチドとリグニンの相互作用を解析するとともに、タンデムダイマーペプチドを組み込んだラッカーゼを発現し、その反応性を解析した。SPR によって、ペプチドとスギ由来 MWL (CMWL) およびユーカリ由来 MWL (EMWL) の親和性測定を行った結果、タンデムダイマー化したペプチドはモノマーのペプチドと比較して約 10 倍高い親和性をもつことを明らかにした (図 1、表 1)。また、リンカー残基として、グリシンおよび 6-アミノカプロン酸を用いた 2 種類のタンデムダイマーペプチド間で MWL に対する親和性を比較したが、リンカー残基の違いによるペプチドのリグニン親和性への影響は見られなかった。タンデムペプチドを連結した組換え酵素の設計を考慮し、以降の研究ではグリシンをリンカー残基としたタンデムダイマーペプチド配列を用いることとした。

表 1. リグニン親和性ペプチドの配列とリグニンに対する親和性

Peptide	Sequence	Dissociation constant (K_D) [M]	
		CMWL	EMWL
C416	HFPSPIFQRHSH	1.47×10^{-4}	1.32×10^{-4}
C416dimer_1	HFPSPIFQRHSHGHFSP PIFQRHSH	1.01×10^{-5}	1.07×10^{-5}
C416dimer_2	HFPSPIFQRHSH-*6AA- HFPSPIFQRHSH	1.00×10^{-5}	8.68×10^{-6}

*6AA: 6-Aminocaproic acid

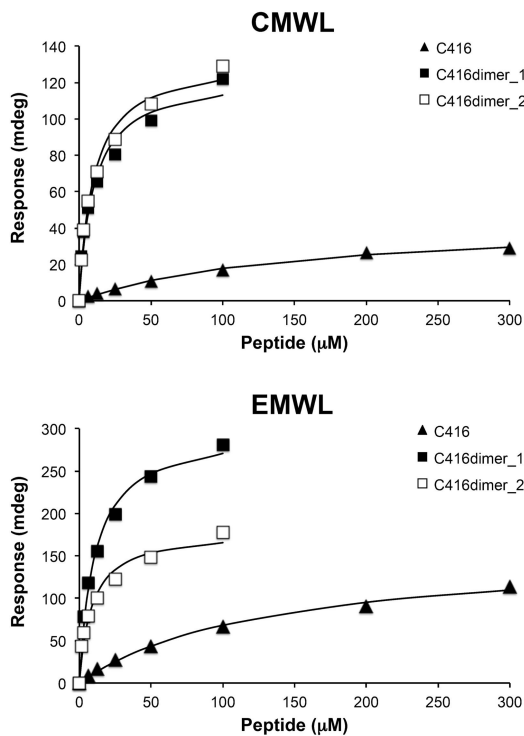


図 1. SPR 法によるペプチドと CMWL および EMWL の親和性測定

ペプチドの CD スペクトル測定では、モノマーペプチド、ダイマーペプチドとも、ランダムコイル構造をとることが示された。FTIR ではランダム構造の他、ストランド状構造もとることが示唆された (図 2)。リグニンと混合させたモノマーペプチドの FTIR 二次微分スペクトルでは、ペプチドのスペクトルが大きく変化し、リグニンとの相互作用によりペプチドのコンフォーメーションが大きな変化することが示された (図 3)。また、ペプチドのコンフォーメーションは、CMWL、EMWL 混合時にそれぞれ特異的なものへ変化することが示された (図 4)。これらの結果は、ペプチドがコンフォーメーション変化を起こして異なるリグニンを認識することを示唆するものである。

次に、リグニン結合性ダイマーペプチド配列を担子菌 *Trametes versicolor* のラッカーゼに連結させた遺伝子を、*Pichia pastoris* の発現ベクターに組み込み、組換えラッカーゼを生産した。(図 5)。リグニン結合性ペプチド配列は、ラッカーゼの N 末端および C 末端に連結し、組換えタンパクを調製した。Native 型のラッカーゼの生産量は 100-170 U/L であった。ペプチド配列を連結したラッカーゼの生産量は 30-70 U/L であった。組換えタンパクは *Pichia pastoris* の培養上清から液体クロマトグラフィー (疎水性相互作用クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー) により高純度に精製された。

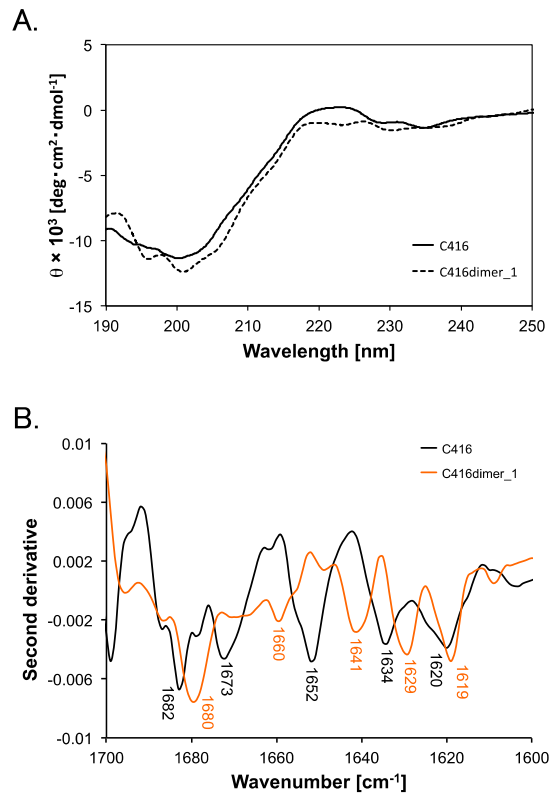


図 2. リグニン親和性ペプチドの CD スペクトルと FTIR 二次微分スペクトル

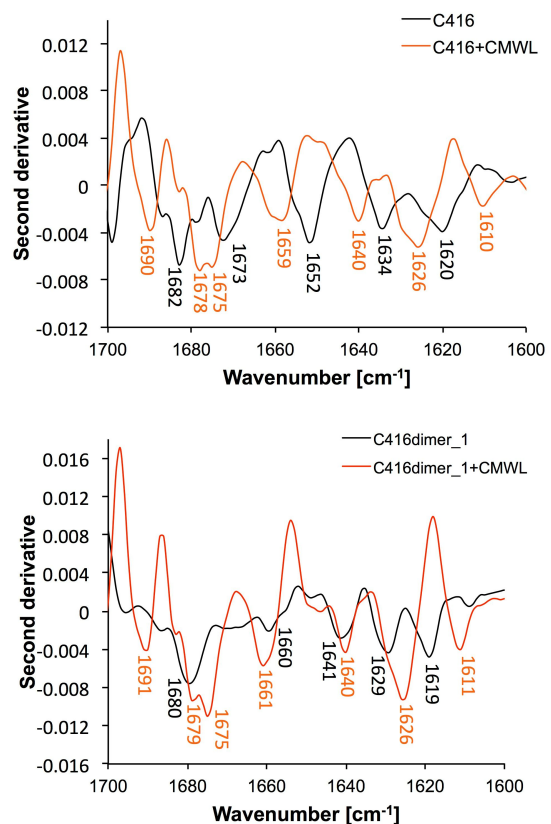


図 3. リグニン存在下におけるペプチドの FTIR 二次微分スペクトル

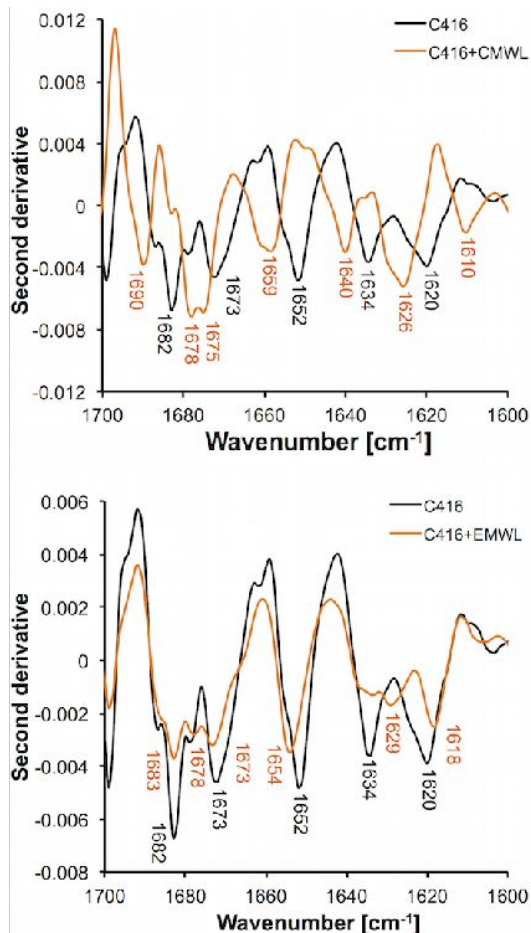


図 4. スギ由来リグニンおよびユーカリ由来リグニン存在下におけるペプチドの FTIR 二次微分スペクトルの比較

リグニンとの親和性が強化された組換え酵素と native 型酵素を、単離リグニンと木材のマイクロ波水熱反応物と反応させた結果、リグニン結合性ペプチド配列を組み込むことにより、前処理バイオマス中のリグニンとの反応性が上昇し、リグニン由来低分子フラグメントが増えることを明らかにした。

また、反応物を有機溶媒抽出し、GCMS で分解物を解析した結果、リグニンモノマーユニットの減少とキノン類の生成が確認された。現在、ペプチドを連結した酵素と Native 型酵素間で、反応物中のリグニンモノマーユニット、ダイマーユニット、キノン類の生成と減少を比較している。

以上の結果をもとに、ペプチドの連結によりリグニン親和性を強化した酵素の反応性について評価を行っている。また、セルロース分解酵素によるリグノセルロースの糖化反応においても、ペプチドを連結したラッカーゼによるリグニン分解反応が有効であることを検証している。

Laccase

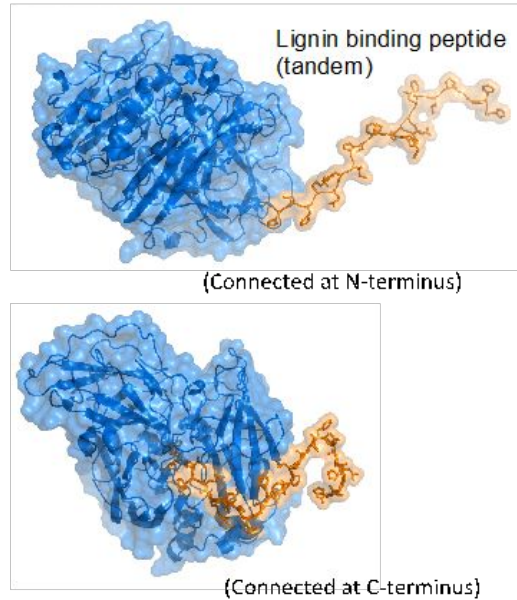


図 5. リグニン親和性ペプチド (タンデムダイマー) を付加した *Trametes versicolor* ラッカーゼのモデル構造

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 1 件)

Satoshi Oshiro, Asako Yamaguchi and Takashi Watanabe, Binding behaviour of a 12-mer peptide and its tandem dimer to gymnospermae and angiospermae lignins, *RSC Advances*, **7**, 31338 - 31341 (2017).

〔学会発表〕(計 8 件)

Takashi Watanabe, Design of catalytic conversion process for production of biofuels and chemicals from lignocellulosic biomass, The 28th annual meeting of Thai Society for Biotechnology and international conference, Natural Resources & Bio-based innovative products, Chiang Mai, Thailand, 28-30 Nov. 2016.

渡辺隆司、リグノセルロース系バイオマスからのバイオ燃料・機能化学品生産のための成分分離のデザイン、第 46 回石油・石油化学討論会 (平成 28 年 11 月 18 日、京都市)

T. Watanabe, Design of catalytic conversion process for production of biofuels and chemicals from lignocellulosic biomass, The 2nd Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science、平成 29 年 2 月 20-21 日、ベナン

T. Watanabe, A. Yamaguchi, S. Oshiro, T.

Suetomi, H. Nishimura, T. Nagata, T. Mashima, M. Katahira, K. Isozaki, H. Takaya, M. Nakamura, Analysis of molecular interaction of peptides with lignin for lignocellulosic biorefinery, LignoBiotech IV - 4th Symposium on Biotechnology applied to Lignocelluloses、平成 28 年 6 月 21 日、マドリッド

大城理志、山口亜佐子、渡辺隆司、タンデムダイマー化によるリグニン親和性ペプチドの親和性強化とリグニン認識におけるペプチドの構造変化の解析、第 67 回日本木材学会大会、平成 27 年 3 月 17-19 日、福岡市

大城理志、山口亜佐子、渡辺隆司、タンデムダイマー化した 12-mer リグニン親和性ペプチドとリグニンの相互作用解析、第 330 回生存圏シンポジウム、第 13 回 持続的生存圏創成のためのエネルギー循環シンポジウム マイクロ波高度利用と先端分析化学、第 6 回 先進素材開発解析システム (ADAM) シンポジウム マイクロ波高度利用生存圏フラッグシップ共同研究、平成 27 年 1 月 10 日、宇治市

Satoshi Oshiro, Asako Yamaguchi, Takashi Watanabe, Binding analysis between the tandem dimer of 12-mer peptide and lignin, Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science, 20-21 Feb 2017, Penang

Satoshi Oshiro, Asako Yamaguchi, Katsuhiko Isozaki, Masaharu Nakamura, Hikaru Takaya and Takashi Watanabe, Analysis of Peptide-Lignin Binding using Surface Plasmon Resonance for Lignocellulosic Biorefinery, Institute for Chemical Research International Symposium 2016 (ICRIS'16), 7-8 March 2016, Kyoto, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

バイオリファインリーのためのバイオマスの精密構造解析、酵素との相互作用解析
<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/W/LBC/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 隆司 (WATANABE Takashi)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号 : 80201200

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし