

平成21年6月22日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580115

研究課題名（和文） セルロース加水分解反応における超耐熱性セルラーゼのシナジー効果

研究課題名（英文） Synergy effect of the hyperthermophilic cellulases in the cellulose hydrolysis reaction.

研究代表者 石川 一彦 Ishikawa Kazuhiko

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門、主任研究員

研究者番号：90356436

研究成果の概要：

高温下で糖化反応が可能な超耐熱性エンド型セルラーゼ酵素および超耐熱性βグルコシダーゼ酵素をゲノム情報から選択し、その反応性と基質特異性を調べた。さらに、これら酵素の立体構造解析にも成功し、触媒部位の情報および酵素反応が停止するメカニズムを解明した。これら酵素の反応条件を整えることで、そのシナジー効果を解析し、セルロースを完全糖化（糖化効率100%）可能な加水分解系を構築することに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2200000	660000	2860000
2008年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3600000	1080000	4680000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：バイオマス、エネルギー、セルロース、アーケア、酵素

1. 研究開始当初の背景

アーケアは、原始の地球上に誕生した最も古くかつ原始的な生物である。現在、それら超耐熱性酵素の基礎研究、および、それらを有効に利用するための研究が進展している。その中でも、特に糖質加水分解酵素セルラーゼは、産業応用面からも極めて重要なものである。セルロースは太古から地球上に最も大量に存在する木質系バイオマスであるが、現在、その有効な活用方法は開発されていない。一方、京都議定書の発効により、木質系バイ

オマスからエタノールを製造するための様々なプロジェクトが立ち上がっている。木質系バイオマスからのエタノール製造工程において、技術的に最も困難な部分は、セルラーゼによる、木材の結晶セルロースの可溶化（オリゴ糖化）およびグルコース化工程である。

2. 研究の目的

申請者が開発したアーケア由来の超耐熱性エンド型セルラーゼは95℃以上の高温

でも長時間安定で、さらに結晶性セルロースを加水分解する活性を持つため、高温処理工程が必須の木材糖化工程での使用が可能になっている。これらの酵素を有効に利用して、そのシナジー効果により、セルロースの完全糖化技術を構築する。

3. 研究の方法

超耐熱性セルラーゼ酵素をゲノム情報から探索し、その機能解析を行う。触媒部位のみを抽出してそのタンパク質結晶を作成しx線による構造解析を行う。セルラーゼ酵素のシナジー効果を解析することで、酵素反応効率の向上を目指す。具体的にはタンパク質工学的手法による酵素機能の向上、種々のセルラーゼ酵素の組み合わせによる酵素反応の効率化を行う。

4. 研究成果

高温下で糖化反応が可能な超耐熱性エンド型セルラーゼ酵素および超耐熱性βグルコシダーゼ酵素をゲノム情報から見出すことに成功した。さらに、その反応性と基質特異性を調べた。また、これら酵素の立体構造解析にも成功し、触媒部位の情報および酵素反応が停止するメカニズムおよび阻害剤の結合部位を解明した。これら酵素の反応条件を整えることで、そのシナジー効果を解析し、タンパク質工学的手法を用いてセルロースを完全糖化(糖化効率100%)可能な加水分解系を構築することに成功した。

超耐熱性セルロース加水分解酵素

絶対嫌気性超好熱性アーキアの一つである *Pyrococcus horikoshii* は、1992年、沖縄近海の熱水鉱床から海底調査潜水艇により採取された。最適生育温度は100度、嫌気条件下で生育する。製品評価技術基盤機構において *P. horikoshii* のゲノム情報が解読され、このゲノム情報から、セルロースの加工およびセルロース加水分解に有効な酵素であるセルラーゼ酵素(グルコース間のβ-1,4グルコシド結合を加水分解する)の探索を行った。その結果、セルロースの加水分解に関与すると思われる遺伝子が2種類見出された。1つはエンド型セルロース加水分解酵素エンド型セルラーゼ(PH1171)と、もう1つはエキソ型セルロース加水分解酵素ベータグルコシダーゼ(PH0366)である。アーキアの生育環境にセルロースがどの程度存在するかについてはよく分かっていないが、この2種類の酵素遺伝子の存在は、この環境下における *P. horikoshii* によるセルロース資源の利用を示唆するものである。

P. horikoshii 由来のエキソ型セルロース

加水分解酵素ベータグルコシダーゼ(BGLPh)は、構造機能解析から膜結合性の酵素でセルロースには作用しないが、セロビオース(2分子のグルコースがβ-1,4グルコシド結合したオリゴ糖)をグルコースに加水分解することが報告されている。一方、*P. horikoshii* 由来のエンド型セルラーゼ(EGPh)のN末端にシグナル配列(赤文字)、さらに、C末端に膜結合と思われる配列(青文字)の存在が確認され、本酵素も分泌型で膜結合酵素であることが示唆された。そこで、本酵素の機能解析を開始した。本酵素遺伝子には、膜結合領域、および、別のタンパク質を発現させるSD配列の存在が確認されたことから、これらの遺伝子を改変することにより、本酵素の発現・調製に成功した。本酵素の機能解析の結果、本酵素は、アビセルおよびカルボキシメチルセルロース等、高分子セルロースに作用するエンド型セルラーゼ活性を示し、至適温度は100度を超え、95℃まで変性しないことが分かった。

EGPhの結晶構造解析を行った。本酵素は、エタノール溶液集で良好な結晶を形成した(図1)。さらに構造解析の結果本酵素はTIMバレル構造を示し(図2)。その基質結合部位の同定にも成功し(図3)。

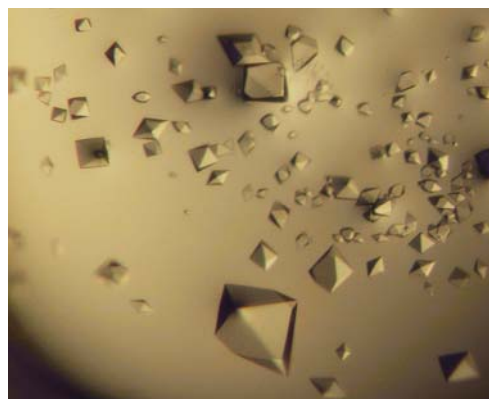


図1、*P. horikoshii* 由来のエンド型セルラーゼの結晶。

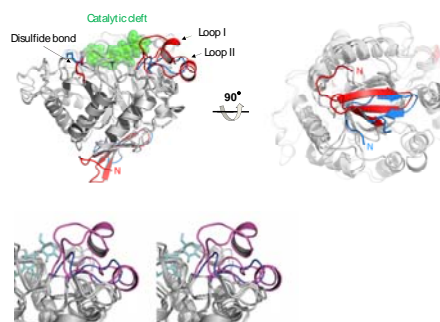


図2、EGPhの結晶構造図、既存のエンド型セルラーゼとの重ね合わせ。赤でEGPh

に特異な構造を示す。

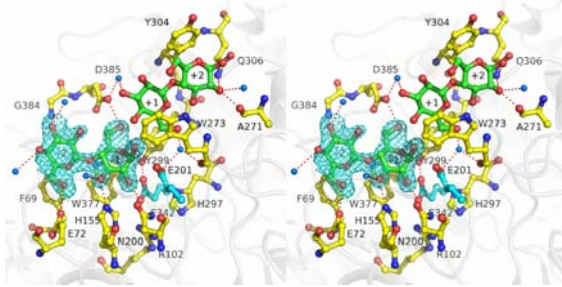


図2、EGPh活性部位構造のステレオ図。

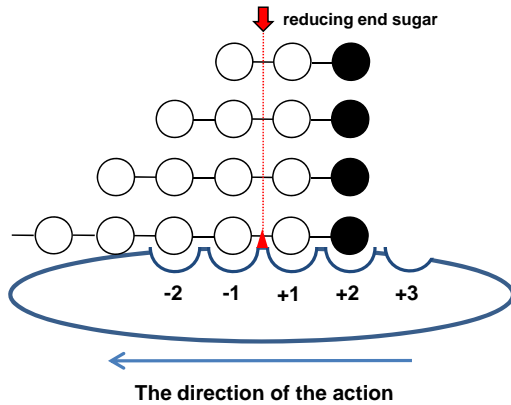


図3、EGPhの加水分解反応パターンの模式図○グルコース、●；還元性末端グルコース

セルロースを基質としてEGPhの生成物解析を行った結果、主生成物はセロビオース（セロビオース85%、グルコース15%）であり、還元性末端から連続的にセロビオースを遊離していく活性が確認された（図3）。さらに構造解析実験の結果から、本酵素の主生成物であるセロビオースが本酵素に強く結合していることが分かった。さらに、本酵素におけるセロビオース結合部位を全て同定することができた。この結合部位は活性部位近傍に存在する。そこで、セロビオースの結合部位をタンパク質工学的な手法で改変し、セロビオースが結合しない（阻害反応が解除された）変異体酵素を調製し、その機能解析を行った。しかし、この変異導入により、大きな活性低下が見られたために、この手法を断念した。

エキソ型セルロース加水分解酵素の探索

EGPhの生成物阻害剤であるセロビオースを加水分解する酵素の探索を行った。*P. horikoshii*のゲノム情報から、エキソ型セルロース加水分解酵素ベータグルコシダーゼ（BGLPh）を単離し、その基質特異性を調べた。その結果、セロビオースを高効率で加水分解するが、その他のオリゴ糖

には作用しないことがわかった。すなわち本酵素（EGPhとBGLPh）を組み合わせることで、セルロースの完全糖化反応が可能であることが示唆された。しかし、EGPhが膜結合性であることから、この酵素を産業応用することが困難であることがわかった。新たな酵素の探索を行った。*P. furiosus*のゲノム情報から同様の酵素群を見出した。本酵素群のクローニングおよび機能解析の結果、1種類のBGL（BGLPf）に基質特異性が広いものが見出された。機能解析の結果、BGLPfは、2-6量対のオリゴ糖に作用する超耐熱性酵素であることが分かった。結晶構造解析の結果、本酵素は4量体構造を示し。さらに超耐熱性の性質を示すことから、EGPhと共存させることで、高濃度のセルロースを完全に糖化（グルコースへの変換効率100%）することが証明された（図4）。（特許出願中）

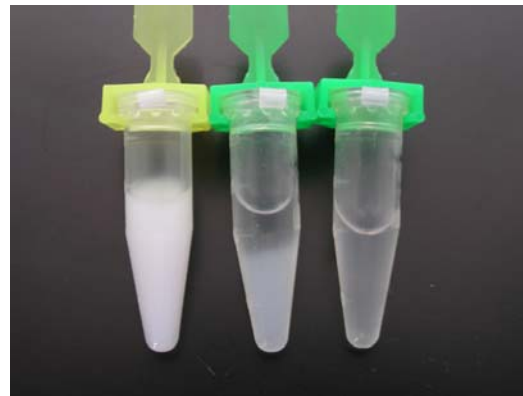


図4、セルロースの糖化反応（85度）
左から、セルロース1%、セルロース1%+EGPh、セルロース1%+EGPh+BGLPf

まとめ

以上の結果から、高濃度のセルロースを高温下、高効率で完全糖化（グルコース化）する。2種類の酵素が得られた。さらに、本酵素の構造解析にも成功した。これらの酵素系を用いることで、セルロース系バイオマスの高効率糖化反応が可能になる。今後の課題として、本酵素群の効率化およびこの酵素を利用したリアクター開発、さらには、本酵素系にマッチしたバイオマス前処理技術の開発が望まれる。

(3) 連携研究者

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)

① Kim Han-Woo、三野光識、石川一彦
Crystallization and preliminary X-ray analysis of endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*
Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications pp1169 ~ 1171 (2008)
査読あり

[学会発表] (計 2 件)

① Kim Han-Woo、石川一彦
Pyrococcus horikoshii 由来超耐熱性エンド型セルラーゼの機能解析,
日本農芸化学会大会 (2009)

② Kim Han-Woo、石川一彦
Functional and Structural Analysis of Hyperthermostable Cellulase from Archaea *Pyrococcus horikoshii*,
The Korean Society for Microbiology and Biotechnology (2008)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 1 件)
Kim Han-Woo、石川一彦、セルロースの糖化方法, 特願 2008-125355 (H20/05/13)

○ 取得状況 (計 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者

石川 一彦 Ishikawa Kazuhiko

独立行政法人産業技術総合研究所・セル
エンジニアリング研究部門、主任研究員
研究者番号: 90356436

(2) 研究分担者