

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05785

研究課題名(和文)セルロースの酵素分解を促進する新規タンパク質の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the novel protein that promotes enzymatic degradation of cellulose

研究代表者

野崎 功一 (Nozaki, Kouichi)

信州大学・学術研究院工学系・准教授

研究者番号：10313834

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)：セルロースの酵素分解を促進する新規タンパク質Cip1(Cellulose induced protein 1)の機能解明を行った。Cip1は本菌が生産するLPM09Aの活性を1.6倍に促進した。これにより、セルラーゼなどの加水分解酵素が作用しやすくなり、セルロース分解を促進していることが推定された。Cip1タンパク質表面のクレフト内に存在する3つのアミノ酸残基が反応促進に必須であり、CBM1の存在により活性促進効果は増加することを明らかにした。Cip1遺伝子破壊株のセルロース分解活性は、親株に比較して12%低下した。しかし、Cip1を添加することで分解活性は回復し、親株を上回るまでに増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、セルロース分解酵素の活性を促進する新規なタンパク質Cip1の機能を明らかにすることができた。Cip1がLPM09Aの分解能力が促進することで、セルラーゼなどの加水分解酵素の反応が相乗的に促進されていることを明らかにした。市販セルラーゼ製剤においてもCip1を添加することで、その分解力を向上できる可能性が期待された。

研究成果の概要(英文)：It was elucidated the function of a novel protein, Cip1 (Cellulose induced protein 1), which promotes the enzymatic degradation of cellulose. Cip1 promoted the activity of LPM09A produced by *Trichoderma reesei*. It was presumed that this facilitates the action of hydrolytic enzymes such as cellulase, promoting cellulose degradation. We clarified that three amino acid residues present in the cleft of the Cip1 protein surface are essential for promoting the reaction, and that the presence of CBM1 increases the activity-promoting effect. The cellulolytic activity of the Cip1 gene disruption strain was reduced by 12% compared to the parent strain. However, by adding Cip1, the degradation activity was recovered and increased to exceed that of the parent strain.

研究分野：酵素化学

キーワード：Cip1 *Trichoderma reesei* LPMO Cellulose degradation Cellulase

1. 研究開始当初の背景

セルラーゼ生産菌 *Trichoderma reesei* が分泌する Cip1 (Cellulose induced protein 1) は、セルラーゼとともに誘導発現する機能未知のタンパク質である。これまで、申請者は市販セルラーゼ製剤に Cip1 を加えることで、セルロースの分解率が増加する現象を発見した。Cip1 は単独でセルロースを分解することではなく、Cip1 の前処理によってもセルロースの酵素分解率は増加しない。つまり、Cip1 とセルロース分解酵素が共存するときだけにその効果が現れる新規な現象を発見した。このような独特な機能をもつタンパク質の報告はなく、その機能解明は学術的に有用な知見になるとともに、セルロース系バイオマスの有効利用を進めるために貢献できることが期待される。

2. 研究の目的

- ① Cip1 がセルロース分解を促進するメカニズムを明らかにするために、*T. reesei* 由来の各種セルロース分解酵素に対する Cip1 の添加効果を調査する。これにより、Cip1 が反応を促進するセルロース分解酵素を特定する。
- ② Cip1 が反応を促進した酵素 (LPMO9A) については、Cip1 が LPMO の反応に重要な Reducing agent や過酸化水素に及ぼす影響について調査する。また、Cip1 の Carbohydrate-binding module family 1 (CBM1) の役割を調査するとともに、反応促進に関与するアミノ酸残基の特定を行う。
- ③ Cip1 の生化学的な役割を解明するために、*T. reesei* における Cip1 遺伝子破壊株を作製し、Cip1 が菌の生育に及ぼす影響や破壊株が生産するセルロース分解酵素の分解能力を調査する。

3. 研究の方法

各種セルロース分解酵素に対する分解の促進効果は、精製した各種酵素に Cip1 を添加し、セルロースの分解率を DNS 法で測定することで評価した。

反応を促進した LPMO9A については、各種 Reducing agent やカタラーゼ存在下で Cip1 の添加効果を調査した。また、アミノ酸変異もしくは CBM1 を欠損した変異型 Cip1 を作製し、その影響を調査した。

Cip1 遺伝子破壊株は、Cip1 遺伝子上に薬剤耐性遺伝子を挿入することで作製した。遺伝子破壊株をセルロースを含む培地で培養し、生産される各種セルロース分解酵素の量と分解能力を親株と比較した。

4. 研究成果

① 各種セルロース分解酵素に対する Cip1 の添加効果

遺伝子組換えで作製した Cip1 を本菌が生産する主要なセルロース分解酵素に添加して分解率を調査した。エキソ型セルラーゼ (Cel7A, Cel6A), エンド型セルラーゼ (Cel7B, Cel5A, Cel45A) および β -グルコシダーゼ (Cel3A) のいずれも Cip1 の添加によって分解率は変化しなかった。一方、セルロース酸化分解酵素 (LPMO9A) では、反応 24 時間で分解率が 1.6 倍に増加することを見出した。以上の結果から、Cip1 は LPMO9A の反応を促進することが明らかとなり、それによってセルロースの断片化が進行し、セルラーゼの反応も相乗的に増加することが予想され

た。

② LPMO に対する Cip1 の添加効果

LPMO9A に Cip1 を添加したときの反応生成物をイオンクロマトで分析した (図 1)。Cip1 の添加により、セロオリゴ糖, C-1 位および C-4 位酸化セロオリゴ糖の量が増加していた。このことから, Cip1 は LPMO の反応生成物に作用しているのではなく, LPMO の反応を促進していることが明らかになった。

また, LPMO の反応において各種 Reducing agent を使用したときの Cip1 への影

響を調査した。Cip1 の添加によって, アスコルビン酸では 1.6 倍に分解率が增加し, ガレートでは 2 倍, カテキンでは 1.1 倍, ジメトキシフェノールでは 1.1 倍といずれの化合物でも分解率の増加が確認できた。このことは, Cip1 が Reducing agent に作用して反応を促進している可能性が低いことを示唆している。一方, LPMO の反応には過酸化水素の濃度が強く影響する。Cip1 と LPMO の反応系内に 0.4 mM の過酸化水素を添加したとき, 分解率は 20% まで低下したものの, Cip1 の添加効果は同様に認められた。また, カタラーゼを添加して生成する過酸化水素を除去したところ, 分解率は約 2 倍に増加したが, Cip1 の添加効果は同様に確認できた。これらの結果は, Cip1 は過酸化水素の生成や除去に関与していないことを示唆する結果であった。以上の結果をまとめると, Cip1 は LPMO の反応因子ではなく LPMO 分子に作用してその反応を促進している可能性が考えられた。

さらに, Cip1 の CBM1 欠損体と酵素表面クレフト近傍に存在する 3 種類のアミノ酸残基 (R100, Q104, D116) をそれぞれアラニンに置換した変異体を作製し (図 2), LPMO の反応促進効果を調査した。CBM1 欠損体のセルロース吸着能は消失し, その反応促進効果は Cip1 の約 50% まで減少した。一方, いずれのアミノ酸変異体も LPMO に対する添加効果が消失し, これらすべてのアミノ酸残基が Cip1 の機能発現に必須であることがわかった。

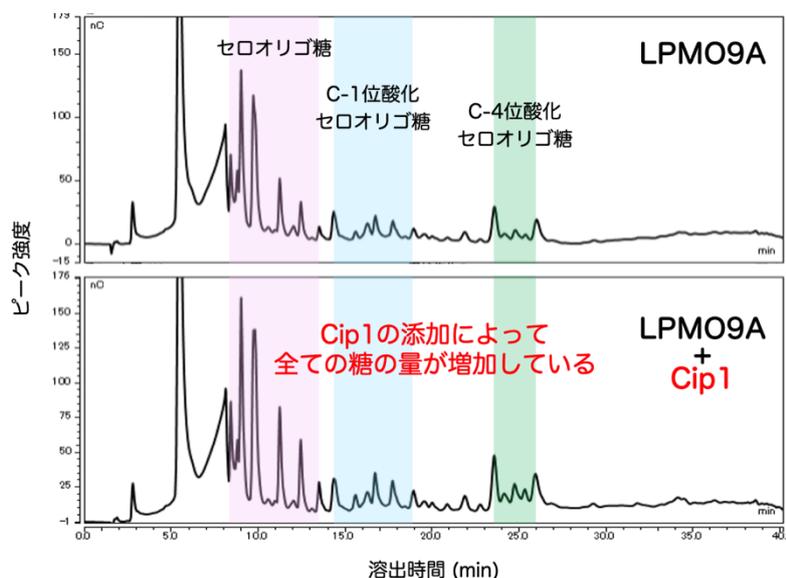


図 1 イオンクロマトによる LPMO9A の反応生成物の解析

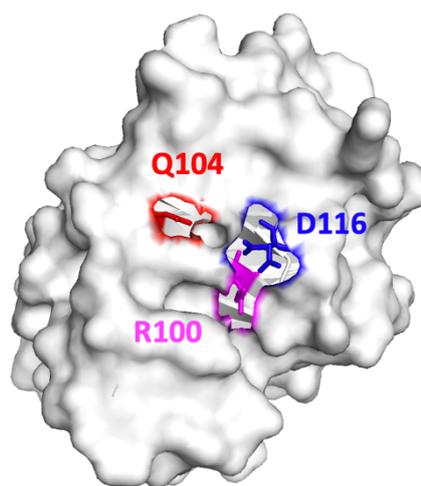


図 2 Cip1 の立体構造 (コアドメイン)

③ Cip1 遺伝子破壊株の作製とその性質

Cip1 遺伝子破壊株を作製し, その性質を親株と比較することで本菌における Cip1 の生化学的な役割を調査した。遺伝子破壊株はグルコース, セロビオースおよびカルボキシメチルセルロー

スを炭素源とする培地で親株と同等の生育速度を示した。また、セルロース培地で生産される酵素の種類と量に差はなく、Cip1 が欠損していることだけが異なっていた (図3)。遺伝子破壊株の培養液を使用して各種セルロースの分解能力を調査したところ、ろ紙および微結晶セルロースの分解力に有意の差はないものの、LPMO が作用しやすいリン酸膨潤セルロースに対してはCip1 遺伝子破壊株の分解能力が約 12%低下していることを確認した。このとき、LPMO の反応生成物である酸化セロオリゴ糖の生成量が減少しており、Cip1 が LPMO の反応を促進することを支持する結果が得られた。さらに、Cip1 遺伝子破壊株の培養液に精製した Cip1 を添加することで、そのセルロース分解力は増加し、さらに添加量を増やすことで親株以上の分解力にまで到達することが明らかになった (図4)。

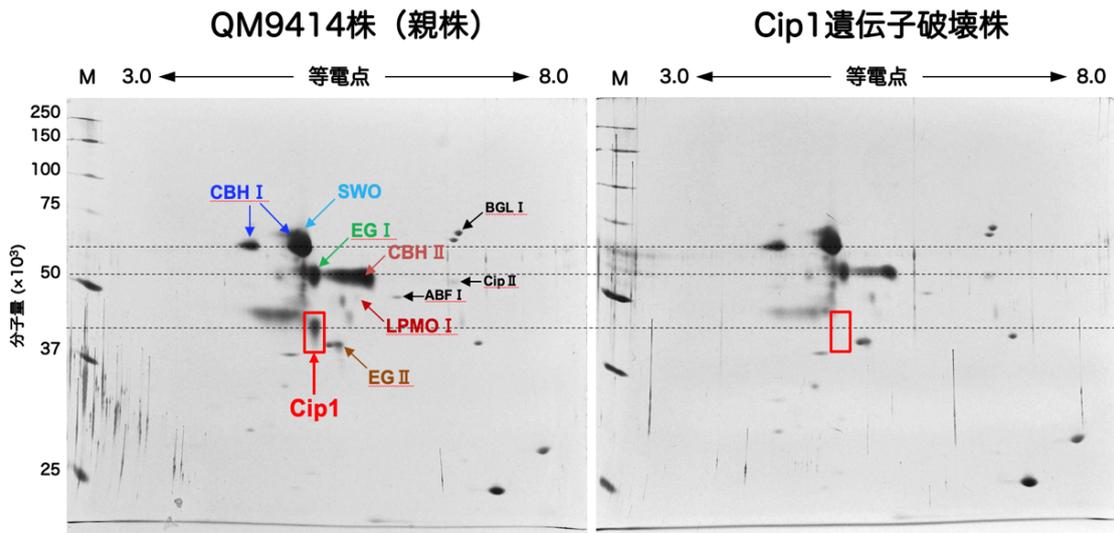


図3 二次元電気泳動による分泌タンパク質の解析

近年、セルロースの酵素分解におけるLPMOの役割が重要視されている。Cip1によってLPMO9Aの分解能力が促進されることで、セルラーゼなどの加水分解酵素の反応が相乗的に促進されることが期待される。

また、Cip1 遺伝子破壊株の培養液にCip1を添加したところ、そのセルロース分解力は親株を上回ることがわかった。このことから、市販セルラーゼ製剤においてもCip1を添加することで、その分解力を向上できる可能性が期待される。

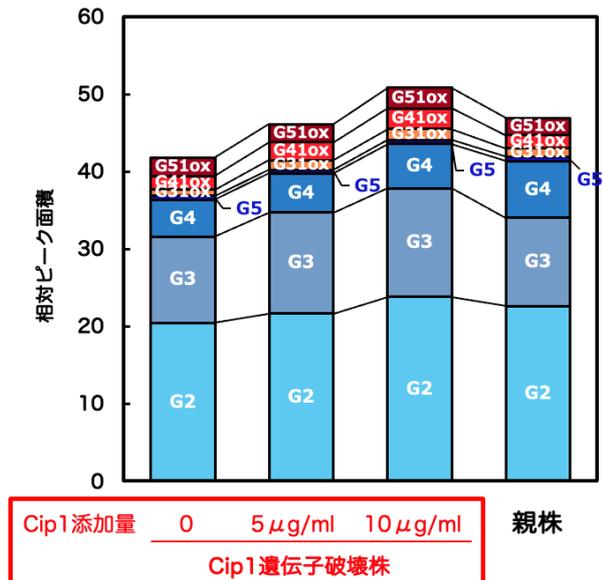


図4 Cip1 遺伝子破壊株の培養液にCip1を添加したときの反応生成物

青系色：セロオリゴ糖
赤系色：酸化セロオリゴ糖

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細川由美子, 野崎功一
2. 発表標題 セルロースで誘導発現する機能未知タンパク質Cip1の遺伝子破壊株の作製と解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川寛史, 神山 周, 野崎功一
2. 発表標題 糖質トランスホーターCDT1がTrichoderma reesei のセルラーセ生産に与える影響
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩永光喜, 野崎功一
2. 発表標題 Trichoderma reesei が生産する機能未知タンパク質Cip1の発現系構築と機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学工学部物質化学科 酵素化学研究室ホームページ
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------