

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760612

研究課題名（和文） セルラーゼ・ヘミセルラーゼ超分子複合体の無細胞合成と試験管内再構成

研究課題名（英文） Cell-free synthesis and *in vitro* reconstitution of cellulase/hemicellulases supramolecular complex

研究代表者

平野 展孝（HIRANO NOBUTAKA）

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：10409089

研究成果の概要（和文）：

好熱性嫌気性細菌 *Clostridium thermoCELLUM* 由来セルラーゼ・ヘミセルラーゼ超分子複合体（セルロソーム）は結晶性セルロースに対して高い糖化活性を示す。本研究では、無細胞合成セルロソーム因子から試験管内再構成した *C. thermoCELLUM* 超分子セルロソームの糖化活性の解析を行った。その結果、骨格蛋白中のセルロソーム結合部ドメイン（コヘシン）の個数が多くなるに従って結晶性セルロースに対する糖化活性が上昇することが明らかとなった。また、堆肥メタゲノムから4種類のコヘシン遺伝子の単離に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Cellulase/hemicellulases supramolecular complex (cellulosome) from thermophilic anaerobe *Clostridium thermoCELLUM* shows a high saccharification activity for crystalline cellulose. In this study, we analyzed the saccharification activity of the *C. thermoCELLUM* supramolecular cellulosome, which is *in vitro* reconstituted from cell-free synthesized cellulosomal components. As a result, it was revealed that the saccharification activity for crystalline cellulose increased along with an increase in the number of cellulosome-binding domains (cohesins) in the scaffolding protein. Furthermore, we successfully isolated four cohesin genes from a compost metagenome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：生物機能工学

1. 研究開始当初の背景

近年の環境・エネルギー分野における持続可能な低炭素社会の実現は、人類共通の責務であり、中でもバイオマスは環境中の炭素循環量に対して中立なエネルギー源として地球温暖化防止に貢献すると期待されている。しかし、エネルギー源と食物資源の競合が社会問題化している昨今、食用デンプン系バイオマスから、非食用セルロース系バイオマスへ

のバイオエタノール原料の転換が急務とされており、セルロース分解酵素の高生産化・高活性化研究が世界中で行われている。

嫌気性細菌が生産するセルラーゼ・ヘミセルラーゼ超分子複合体（セルロソーム）は、結晶性固体セルロースに対して高い分解活性を示すことが知られており、近年、リグノセルロース系バイオマス（草質・木質バイオマス）からのバイオエタノール生産工程への

応用が期待されている。嫌気性細菌細胞表面に提示されるセルロソームは、骨格蛋白質内のコヘシン・ドメインと、多種多様な糖質分解酵素のC末端領域に存在するドックリン・ドメインが、微生物種特異的に結合した分子量数百万の超分子複合体である。

好熱性嫌気性細菌 *Clostridium thermoCELLUM* が生産するセルロソームは、現在主に研究されている糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来セルラーゼと比較して、酵素の生産性に劣るが、約 1/50 の蛋白質量で同等の結晶性固体セルロース分解活性を示すとされており、高分解活性の発現には、超分子複合体形成が必須であることが示されている (*J. Bacteriol.* (2008) 190, 4321-4327.)。しかし、全長骨格蛋白質 CipA (194 kDa) の人為的合成が困難なため、超分子セルロソームの試験管内再構成に成功した報告例は存在せず、高分解活性を発揮する機構の詳細は不明である。*C. thermoCELLUM* の場合、ゲノム上に計 86 種のセルロソーム構成遺伝子が存在しており、酵素因子のC末端領域に存在する Type-I ドックリン・ドメインが、一次骨格 CipA に 9 個存在する Type-I コヘシン・ドメインと結合することで、合計 9 個の酵素因子を提示するセルロソーム (分子量: 250~650 万) を形成する。次に、一次骨格 CipA のC末端に存在する Type-II ドックリン・ドメインが、二次骨格 Cthe0736 又は 01pB に 7 個存在する Type-II コヘシン・ドメインと結合することで、合計 63 個の酵素因子を提示する巨大なポリセルロソームを形成する。セルロソームは、その構成因子の多様さ故に蛋白質工学が困難な対象であるが、強力な結晶性セルロース糖化能力から、近年、アメリカ・エネルギー省主導のバイオマス酵素糖化研究においても研究対象として大きく取り上げられるに至っている。

2. 研究の目的

現在、セルロソームの蛋白質工学分野では、2~3 種の微生物種由来結合部領域を用いてキメラ蛋白質を構築し、比較的小さな複合体 (ミニセルロソーム) を形成する系が報告されている (*J. Biol. Chem.* (2001) 276, 21257-21261., *J. Biol. Chem.* (2002) 277, 49621-49630., *J. Biol. Chem.* (2005) 280, 16325-16334.)。しかし、ミニセルロソームの結晶性固体セルロース分解活性は、天然の超分子セルロソームに比べて 1/5~1/10 と低いため、本来の超分子構造での蛋白質工学が望まれている。しかし、従来の大腸菌発現系では、比較的サイズが小さく、限られた種類の構成因子でしか人工セルロソームを形成出来ていないため、現時点で超分子セルロソームの試験管内再構成に成功した報告例は存在しない。また、多種類の糖質分解酵素を

任意の配置で骨格蛋白質上に配置するには、多種多様な微生物種由来の結合部遺伝子が必要である。

本研究では、上記現状を踏まえ、超分子セルロソームの試験管内再構成と機能解析を目標として、PCR 断片から直接的に蛋白質合成が可能であり、高分子量蛋白質の合成にも適している小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を用いて、*C. thermoCELLUM* NBRC103400 (ATCC27405) 株由来セルロソーム構成因子群の構成因子群の多検体無細胞合成を行い、これまで構築不可能であった超分子セルロソームの試験管内再構成と、複合体形成によって生じるセルロース分解活性への寄与を解析することを目的とした。

また、任意の配置・組み合わせで各種セルラーゼ・ヘミセルラーゼを超分子セルロソーム上に提示出来るシステムの開発を最終目標として、様々なセルラーゼ生産性微生物の存在が予測される各種堆肥メタゲノムから、多種多様な微生物種由来のセルロソーム結合部遺伝子群の探索・収集を目的とした。

3. 研究の方法

本研究で対象とするセルロソーム生産性好熱性嫌気性細菌 *C. thermoCELLUM* NBRC103400 (ATCC27405) 株は、既にゲノム解析が終了しており、ゲノム上に計 86 個のセルロソーム構成遺伝子が確認されている。本研究では、これらの情報をもとに、PCR 断片から直接的にハイスループット多検体合成が可能であり、高分子量蛋白質の合成に適している小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を用いて、セルロソーム構成因子群の透析法による無細胞合成、並びに超分子セルロソームの試験管内再構成を行い、各種セルロース基質 (カルボキシメチルセルロース (CMC)、リン酸膨潤セルロース (PASC)、微結晶性セルロース (Avicel)) 分解活性に対するセルロソーム化 (複合体形成) の影響を解析した。セルロソームを構成するセルラーゼとして、Avicel を単一炭素源に本菌株を培養した際に高発現される 12 種類の構成因子 (エキソグルカナーゼ 3 種 (CbhA, CelK, CelS)、エンドグルカナーゼ 7 種 (CelA, CelB, CelF, CelQ, CelR, CelT, Cthe0821)、ヘミセルラーゼ 1 種 (XynA)、セリンプロテアーゼ・インヒビター 1 種 (Serpin)) (*PLoS ONE* (2009) 4, e5271.) を選択し、小麦胚芽無細胞合成系による無細胞合成・精製を行った。また同様に、全長一次骨格 CipA (CBM3 ドメイン 1 個と Type-I コヘシン・ドメイン 9 個) (194 kDa)、並びに欠失型一次骨格 ΔCipA (CBM3 ドメイン 1 個と Type-I コヘシン・ドメイン 2 個) (54 kDa) の無細胞合成・精製を行った。得られた構成因子群を用いて、カルシウムイオン存在下、試験管内においてセルロソームの複合体形成を行った。

セルロソームは、各種セルラーゼ・ヘミセルラーゼ群と骨格蛋白質が微生物種特異的に結合するため、複数の微生物種由来結合部遺伝子を用いることで、各種セルラーゼ・ヘミセルラーゼを任意の配置で骨格蛋白質上に提示出来ることが知られている。本研究では、多種多様なセルラーゼ生産性微生物の存在が予想される各種堆肥5種類から抽出したDNA(堆肥メタゲノム)を遺伝子プールとして、様々なセルロソーム結合部遺伝子群の探索・収集を行った。具体的には、計8種類の微生物(*Clostridium thermocellum*、*Clostridium cellulolyticum*、*Clostridium josui*、*Clostridium cellulovorans*、*Clostridium acetobutylicum*、*Bacteroides cellulosolvens*、*Acetivibrio cellulolyticus*、*Ruminococcus flavefaciens*)由来セルロソーム結合部遺伝子群を標的として設計したプライマーと、異なるバイオマスから製造される計5種類の堆肥(腐葉土(枯葉由来)、バーク堆肥(樹皮由来)、ピートモス(泥炭由来)、牛糞堆肥(牛糞由来)、鶏糞堆肥(鶏糞由来))から抽出したメタゲノムDNAを用いて、セルロソーム結合部遺伝子群のPCR法による増幅、及び塩基配列決定を行った。

4. 研究成果

セルロソームを構成するセルラーゼとして、微結晶性セルロース(Avicel)を単一炭素源に本菌株を培養した際に高発現される12種類の構成因子(エキソグルカナーゼ3種(CbhA, CelK, CelS)、エンドグルカナーゼ7種(CelA, CelB, CelF, CelQ, CelR, CelT, Cthe0821)、ヘミセルラーゼ1種(XynA)、セリンプロテアーゼ・インヒビター1種(Serpin)の小麦胚芽無細胞合成系による無細胞合成・精製を行った。また同様の手法で、全長一次骨格CipA(CBM3ドメイン1個とType-Iコヘシン・ドメイン9個)(194kDa)、並びに欠失型一次骨格 Δ CipA(CBM3ドメイン1個とType-Iコヘシン・ドメイン2個)(54kDa)の無細胞合成・精製を行った。全長一次骨格CipAの合成・精製は蛋白質サイズ並びにC末タグに対するウェスタン・ブロッティングによって確認し、得られた構成因子群からのセルロソーム複合体の形成は、ゲルシフト・アッセイによって確認した。

次に、Avicelを単一炭素源に本菌株を培養した際の発現量(*PLoS ONE* (2009) 4, e5271.)を参考に混合調製した上記12種類の構成因子の混合溶液(終濃度=0.02 μ g/ μ l)と、様々な濃度の全長一次骨格CipA(194kDa)(CBM3ドメイン1個とType-Iコヘシン・ドメイン9個)、及び欠失型一次骨格 Δ CipA(54kDa)(CBM3ドメイン1個とType-Iコヘシン・ドメイン2個)を混合して再構成したセ

ルロソームのAvicel分解活性を、55°C・24時間の条件で測定した。その結果、全長一次骨格の場合は、構成因子:CipA=1:1/9~1:1/18、欠失型一次骨格の場合は、構成因子: Δ CipA=1:1/2前後(いずれもType-Iドックリン:Type-Iコヘシン=1:1~1:1/2前後)のモル比で混合した際に、Avicel分解活性が最も上昇する結果が得られた。これらの結果から、糖質分解酵素が一次骨格蛋白質CipA上に過不足無く提示されるときに、酵素活性に対して最大の近接相乗効果が生じることが示された。

また、最もAvicel分解活性が上昇する構成比のセルロソーム複合体(構成因子:CipA=1:1/15、構成因子: Δ CipA=1:1/2.4)を用いて、各種セルロース基質(カルボキシメチルセルロース(CMC)、リン酸膨潤セルロース(PASC)、微結晶性セルロース(Avicel))を対象に、酵素量と生成物が比例する反応時間での分解活性の測定を行った。その結果、可溶性基質であるCMCの分解活性に対しては、複合体形成の寄与はほとんど認められなかったが、PASC分解活性に対しては、 Δ CipAとの複合体形成ではほとんど上昇が見られなかったが、CipAとの複合体形成では約3倍程度の上昇が見られた。また、Avicel分解活性に対しては、 Δ CipAとの複合体形成で約3倍程度、CipAとの複合体形成で約11倍程度の上昇が見られた。これらの結果から、骨格蛋白質中のコヘシン・ドメインの個数が多くなる程(より高分子量の超分子複合体を形成する程)、より結晶性が高い固体セルロースに対する分解活性が上昇する傾向にあることが示された。この傾向は、*C. thermocellum*が生産する天然型セルロソームの分解活性の傾向をよく反映している(*J. Bacteriol.* (2008) 190, 4321-4327.)。

計5種類の堆肥メタゲノムを遺伝子プールとして、様々なセルロソーム結合部遺伝子群の探索・収集を行った結果、計2種類の堆肥メタゲノムDNA(腐葉土(枯葉由来)、バーク堆肥(樹皮由来))を鋳型として、様々な微生物種由来セルロソーム結合部遺伝子増幅用プライマーを用いたPCRを行った際に、計4種類のコヘシン・ドメイン遺伝子(約500bp)の増幅が認められた。増幅DNA断片の塩基配列を決定した結果、*Clostridium thermocellum* Type-Iコヘシン・ドメイン、*Clostridium josui* Type-Iコヘシン・ドメイン、*Bacteroides cellulosolvens* Type-Iコヘシン・ドメイン、*Bacteroides cellulosolvens* Type-IIコヘシン・ドメインに極めて近縁(アミノ酸配列の相同性が95%以上)な計4種類の遺伝子配列が得られた。これらの結果から、セルロソーム生産性微生物が堆肥中にも広く分布していることが示唆された。現在、堆肥メタゲノムから得られ

た上記セルロソーム結合部ドメインの結合特異性の確認を行っている。

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) 平野 展孝 草質・木質(リグノセルロース)系バイオマスからのバイオエタノール生産における現状と課題 福島の進路 342, 27-30. 査読無

[学会発表] (計3件)

1) 二瓶 哲、富塚 俊平、長谷川 裕樹、平野 展孝、春木 満 (日大・工・生命応化) *Clostridium thermoCELLUM*由来セルロソームの無細胞合成と試験管内再構成 2012年度日本農芸化学会(2012年3月24日 京都)

2) 長谷川 裕樹、中山 真吾、平野 展孝、春木 満(日大・工・生命応化) *Clostridium thermoCELLUM*由来セルロソーム構成セルラーゼ CelJ (Cel19D-Cel144A)の無細胞合成と機能解析 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会(2010年12月7日 神戸)

3) 平野 展孝 (日大・工・生命応化) 無細胞蛋白質合成系を用いた蛋白質・酵素の研究 2012年度化学系学協会東北大会 若手シンポジウム(2010年9月25日 岩手)

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 展孝 (HIRANO NOBUTAKA)

日本大学・工学部・准教授

研究者番号: 10409089