

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380089

研究課題名(和文) 未利用バイオマスの完全酵素糖化を目指した β -グリカナーゼ新規アッセイ法の開発

研究課題名(英文) Development of novel assay of beta-glycanases for complete enzymatic saccharification of unused biomass

研究代表者

五十嵐 圭日子 (IGARASHI, Kiyohiko)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：80345181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：セルロースやキチンは未利用バイオマスの主成分であり、食料と競合しない次世代の炭素源として有効利用が望まれている。これらは、 β -グリコシド結合を有する不溶性多糖であることを共通の特徴として有していることから、いかに β -グリコシド加水分解酵素を固液界面で効率良く働かせるかが、未利用バイオマスを高効率に変換するための鍵であると言える。

本研究では、固液界面における糸状菌由来のセルラーゼの挙動、細菌由来のセルラーゼおよびキチナーゼなどの β -グリカナーゼの挙動を高速原子間力顕微鏡を用いて定性的・定量的に評価し、未利用バイオマスの糖化という次世代の生化学的プロセスを高効率化するためのストラテジーを構築した。

研究成果の概要(英文)：Cellulose and chitin are the main components of unused biomass, and effective utilization of these materials is expected as source of carbon of the next generation without competition with food. Considering the polysaccharides share the common feature consisting with beta-linked glycosides, it is the key to utilize the unused biomass how to control degrading enzymes efficiently at a solid/liquid interface.

In the present research, the behavior of beta-glycanase such as cellulase from filamentous fungi and cellulase and chitinase from bacteria was observed qualitatively and quantitatively at a solid/liquid interface by high-speed atomic force microscopy, and a strategy for the effective hydrolysis of unused biomass using a biochemical process was built.

研究分野：糖質関連酵素学

キーワード：バイオマス β -グリカナーゼ セルラーゼ キチナーゼ

1. 研究開始当初の背景

昨今、地球温暖化や原油価格の高騰という社会情勢を受けて、バイオマスの利用に大きな注目が集まっているが、食物との競合を避けるためには穀物由来のバイオマスではなく、セルロースやキチンを主成分とする未利用バイオマスの有効利用が望まれている。セルロースは、植物細胞壁成分中の約50%を占める多糖であり、地球上では年間 10^{10} ~ 10^{11} トンが光合成によって生産されている天然で最も豊富に存在する有機物である。また、キチンは主に無脊椎動物の体表を覆うムコ多糖で、セルロースに次いで賦存量の多い有機物であると考えられているため、これら未利用バイオマスに含まれる多糖をより高度に利用するための手法開発が強く望まれている。

セルロースとキチンは、 β -グリコシド結合からなる主鎖を有する不溶性多糖であり、さらに未利用バイオマス中で、これら多糖は「構造多糖」として力学的な強度を発揮するため、澱粉を代表とする「貯蔵多糖」とは異なる性質を有すると言える。しかしながら、バイオマス利用を考える上で、これら構造多糖が有する力学的な強度は大きなデメリットであり、特にこれら多糖のほとんどが水に不溶性であることが、 β -グリコシド結合を加水分解するための大きな障壁となっている。一方で、近年の生化学および分子生物学の進展に伴って、これら「構造多糖」を栄養源として成長できる微生物が生産する酵素を利用する生化学的プロセスが注目されつつある。このプロセスでは、より穏和な条件で特異的な反応を進行させることができ、環境負荷を軽減させながら未利用バイオマスを原料とした有用物質の生産が可能となることから、これら多糖の分解酵素である β -グリカナナーゼを利用することが、今後重要となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、様々な未利用バイオマスの分解に関与する β -グリカナナーゼにその研究対象を広げ、高速原子間力顕微鏡を用いた一分子観察に供する。さらに、一分子観察で得られた結果を画像解析によって定量化するとともに、生化学的実験結果と照らし合わせ、セルロースやキチンなどの不溶性多糖が、酵素によって分解されるメカニズムを明らかにする。生態系における分解者と位置づけられる微生物が、様々なバイオマスを二酸化炭素にまで代謝する過程では、必ず酵素による可溶化というステップが含まれていることを考えると、本研究結果はセルラーゼやキチナーゼがどのように不溶性多糖を分解するかという基礎的な知見にと

どまらず、未利用バイオマスの高効率糖化、新規生分解性材料の創出、地球規模での炭素循環の見積りとといった、循環型社会の構築やグリーンイノベーションの推進に寄与すると考えている。

3. 研究の方法

(1) セロビオヒドロラーゼ II (CBHII) の観察
担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー6 に属するセロビオヒドロラーゼ (CBH) II (*PcCel6A*) をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* によって異宿主発現し、得られた酵素による結晶性セルロース分解能を調べた。更に高速原子間力顕微鏡 (High-Speed Atomic Force Microscopy: HS-AFM) を用いて一分子観察を行った。得られた動画を画像解析し、分子の動きを定量的に解析した。

(2) GH ファミリー7 に属するセロビオヒドロラーゼのプロセッシビティ比較
HS-AFM を用いて子囊菌 *Trichoderma reesei* および *P. chrysosporium* 由来 GH ファミリー7CBH (*TrCel7A*, *PcCel7C*, *PcCel7D*) の一分子観察を行い、それぞれの酵素の反応の連続性 (プロセッシビティ) と移動速度の比較を行った。

(3) 細菌由来セルラーゼ遺伝子のクローニングと一分子観察
セルロース分解性放線菌 *Cellulomonas fimi* 由来 GH ファミリー6 (*CfCel6A*, *CfCel6B*)、9 (*CfCel9A*)、および 48 (*CfCel48A*) に属するセルラーゼの遺伝子をクローニングし、大腸菌による異宿主発現系を構築した。得られた酵素をカラムクロマトグラフィーによって精製し、セルロース分解性を評価するとともに HS-AFM による一分子観察を行った。

(3) GH ファミリー18 に属するキチナーゼの一分子観察

キチン分解性細菌 *Serratia marcescens* 由来 GH ファミリー18 キチナーゼ (*ChiA* および *ChiB*) を、大腸菌を宿主として発現させ、カラムクロマトグラフィーによって精製した後、結晶キチン分解の様子を HS-AFM を用いて一分子観察を行った。

4. 研究成果

(1) セロビオヒドロラーゼ II (CBHII) の観察
P. pastoris によって生産された *PcCel6A* による結晶性セルロースの分解活性は、*TrCel7A* と比較して高いことが知られていた¹が HS-AFM を用いた観察では、分子像を得ることができなかった。しかしな

がら HS-AFM 観察中の反応液には明らかなセロビオースの生成が検出されたことから、本酵素は非プロセッシブまたは極めて低いプロセッシビティを有する酵素であることが推察された。

(2) GH ファミリー7 に属するセロビオヒドロラーゼのプロセッシビティ比較

HS-AFM を用いて *TrCel7A*^{2,3}、*PcCel7C* および *PcCel7D* の一分子観察を行い、それぞれの酵素のプロセッシビティと移動速度を比較したところ表 1 のようになった。

表 1 糸状菌由来 GH ファミリー7 のプロセッシビティと移動速度の比較

	Averaged velocity (nm/s)	Half-life processivity
<i>PcCel7C</i>	14.7 ± 9.1	19.9
<i>PcCel7D</i>	9.4 ± 3.7	20.3
<i>TrCel7A</i>	6.8 ± 3.5	23.6

本結果は、プロセッシビティが高い（一度基質を掴んだらなかなか離さない）と移動速度が遅くなる、すなわちプロセッシビティと移動速度の間にはトレードオフの関係が成り立つことを示した（図 1）。

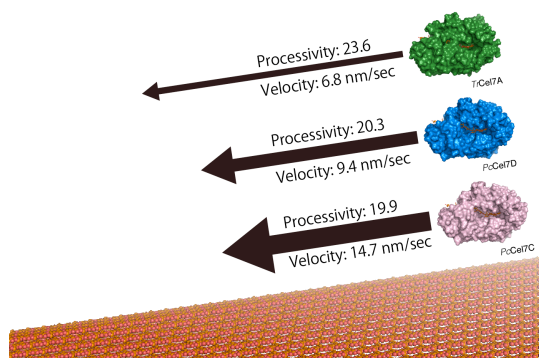


図 1 糸状菌における Cel7 の比較模式図

(3) 細菌由来セルラーゼ遺伝子のクローニングと一分子観察

高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用いて、4つのセルラーゼが結晶性セルロース（セルロース III₁型）表面上において連続的にセルロース鎖を加水分解するかを観察した。その結果、*CfCel16B* と *CfCel148A* についてはプロセッシブな分解反応の可視化に成功したが、*CfCel16A* および *CfCel19A* では観察されなかった。次に各セルラーゼのカルボキシメチルセルロースの加水分解に伴う粘度低下を測定し、それぞれをエンド型とエキソ型に分類した。*CfCel16A* および *CfCel19A* では酵素の添加

後、急激な粘度低下が観察されたが（エンド型）、*CfCel16B* と *CfCel148A* では著しい粘度低下は観察されなかった（エキソ型）。次に各セルラーゼの、3種の結晶性セルロース（アビセル、セルロース I₀型、セルロース III₁型）及びアモルファスセルロース（リン酸膨潤セルロース）に対する分解活性（酵素活性で生じた可溶性糖の総量）を比較した。興味深いことにアビセルの分解に関しては *CfCel16A* が、セルロース III₁型の分解に関しては *CfCel16B* が、セルロース I₀型の分解に関しては *CfCel19A* が、各セルラーゼの中で最も高い活性を示した。一方で *CfCel148A* はアモルファスセルロースに対する活性は認められるが、結晶性セルロースに対しては微弱な活性しか示さなかった。

(3) GH ファミリー18 に属するキチナーゼの一分子観察

S. marcescens は、糖質加水分解酵素ファミリー18に属する結晶性キチン分解酵素を2種類生産する（ChiA と ChiB）ことが知られており、両酵素の結晶構造などの解析から、この二つの酵素が逆方向のプロセッシビティを持つことが推測されている。そこで、結晶性が非常に高いことが知られているサツマハオリムシ由来のβキチンを基質として、ChiA および ChiB の一分子観察を *TrCel7A* と同様高速原子間力顕微鏡を用いて行った。始めに二つの酵素をそれぞれ単独で作用させて、酵素の挙動を解析したところ、どちらの酵素も結晶性キチンの表面を一方方向に動く様子が観察された。βキチンは平行鎖構造を有する結晶であることから、両酵素ともにキチン分子鎖をプロセッシブに分解することが確認された。次に ChiA と ChiB をシーケンシャルに投入し、同様に一分子観察を行ったところ、二つの酵素がそれぞれ反対方向に動いている様子が観察された。反対方向に動く酵素が互いにぶつかる様子も観察された。これらの結果は、生化学的および構造学的結果から推定された両酵素の分子挙動を直接確認した世界初の結果となった（図 2）。

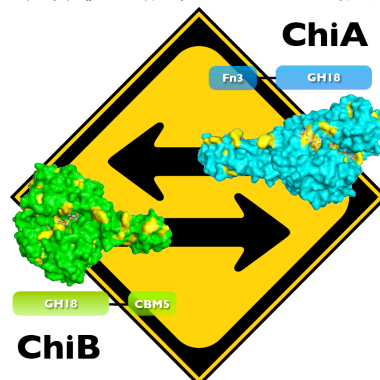


図 2 ChiA および ChiB の双方向の加水分解模式図

参考論文

- ① Igarashi, K., Maruyama, M., Nakamura, A., Ishida, T., Wada, M., and Samejima, M., *J. Appl. Glycosci.* 59: 105-110 (2012)
- ② Igarashi, K., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Penttilä, M., and Samejima, M., *J. Biol. Chem.* 284:36186-36190 (2009)
- ③ Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Okamoto, T., Penttilä, M., Ando, T., and Samejima, M., *Science* 333: 1279-1282 (2011)
- ④ Igarashi, K., Uchihashi, T., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Penttilä, M., Ando, T., Samejima, M., *Methods Enzymol.* 510:169-182 (2012)

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5件) 全て査読有り

- ① Nakamura, A., Tsukada, T., Auer, S., Furuta, T., Wada, M., Koivula, A., Igarashi, K., and Samejima, M., Tryptophan residue at active-site tunnel entrance of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A is important to initiate degradation of crystalline cellulose, *J. Biol. Chem.* 288: 13503-13510 (2013)
- ② Fukuda, S., Uchihashi, T., Iino, R., Okazaki, Y., Yoshida, M., Igarashi, K., and Ando, T., High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope, *Rev. Sci. Instr.* 84: 073706 (2013)
- ③ Nakamura, A., Watanabe, H., Ishida, T., Uchihashi, T., Wada, M., Ando, T., Igarashi, K., and Samejima, M., Trade-off between processivity and hydrolytic velocity of cellobiohydrolases at the surface of crystalline cellulose, *J. Amer. Chem. Soc.* 136: 4584-4592 (2014)
- ④ Shibafuji, Y., Nakamura, A., Uchihashi, T., Sugimoto, N., Fukuda, S., Watanabe, H., Samejima, M., Ando, A., Noji, H., Koivula, A., Igarashi, K., and Iino, R., Single-molecule imaging analysis of elementary reaction steps of *Trichoderma reesei*

cellobiohydrolase I (Cel7A) hydrolyzing crystalline cellulose I_a and III_T, *J. Biol. Chem.* 289: 14056-14065 (2014)

- ⑤ Igarashi, K., Uchihashi, T., Uchiyama, T., Sugimoto, H., Wada, M., Suzuki, K., Sakuda, S., Ando, T., Watanabe, T., and Samejima, M., Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin, *Nature Commun.* 5: 3975 (2014)

[学会発表] (計7件)

- ① 五十嵐圭 日子「プロセッシンググリコシダーゼはどうやって結晶性多糖の上を走るのか？」第3回分子モーター討論会(招待講演) 2013年07月19日~2013年07月20日(東京)
- ② 五十嵐圭 日子「微生物におけるセルロースとキチンの酵素分解戦略: 結晶性構造多糖を利用するためのヒント」第7回多糖の未来フォーラム(招待講演) 2013年11月01日~2013年11月01日(大阪)
- ③ Kiyohiko Igarashi 「Cellulases: cooperative biomass breakdown」JST-ALCA international workshop for plant cell wall engineering(招待講演) 2014年03月04日~2014年03月04日(Tokyo)
- ④ 内山拓、中村彰彦、五十嵐圭 日子、鮫島正浩、金子哲、内橋貴之「糖質加水分解酵素ファミリー6セルラーゼのプロセッシビティを中心とした機能解析」日本農芸化学会2014年度大会 2014年03月27日~2014年03月30日(東京)
- ⑤ 五十嵐圭 日子「セルロース系バイオマス分解する酵素の構造機能相関」学術振興会第169委員会 第45回研究会(招待講演) 2014年07月25日~2014年07月25日(東京)
- ⑥ Kiyohiko Igarashi 「Processivity in enzymatic degradation of crystalline polysaccharides: cellulases and chitinases」Mie Bioforum 2014(招待講演) 2014年11月18日~2014年11月21日(三重)
- ⑦ 内山拓、中村彰彦、五十嵐圭 日子、鮫島正浩、金子哲、内橋貴之「セルロース資化性放線菌 *Cellulomonas fimi* 由来のセルラーゼの性状解析」2015年度農芸化学会大会 2015年03月26日~2015年03月29日(岡山)

[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

- ① 糸状菌由来セルラーゼがセルロース分子鎖の末端を認識する機構の解明
<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2013/20130510-2.html>
- ② 結晶性セルロースの分解は、切断の「速さ」ではなく基質を掴み続ける「ねばり強さ」が重要である
<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2014/20140313-4.html>
- ③ やはりカメはウサギに勝る
<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/uto-kyo-research/research-news/the-tortoise-beats-the-hare-again/>
- ④ 分解酵素にとって結晶性キチンは双方向の高速道路だった
<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2014/20140605-1.html>
- ⑤ 高速で逆送する酵素がキチンを分解
http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash_review/newsflash/2014/06/20140609_03.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐圭日子 (IGARASHI Kiyohiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究

科・准教授

研究者番号：80345181