

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25660139

研究課題名(和文)セルラーゼ表層環境の人為的改変による高性能糖化酵素の開発

研究課題名(英文)Development of high performance saccharification enzymes by artificial modification of surface environment of cellulase

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) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：バイオマス中のセルロースの糖化では、共存するリグニンがセルラーゼに吸着して酵素の失活を起すことが酵素使用量の低減を阻む大きな要因となっている。本研究では、セルラーゼの表層環境を人為的に改変し、リグニンへの非生産的吸着を抑制したスーパー糖化酵素開発のための新戦略を打ち立てることを目的とし、糸状菌由来の3つのエンドグルカナーゼを発現して、各酵素間のリグニンへの親和性に与える影響や、CBMの欠損と糖鎖切断がリグニンと酵素の親和性に与える影響を解析した。

研究成果の概要(英文)：In enzymatic saccharification of cellulosic biomass, it is necessary to decrease the dosage of cellulase. However, it is known that lignin is bound to the cellulase during the saccharification, and inactivates the enzyme. In this research, we modified surface environment of the enzyme to establish the methodology to develop the high performance cellulase having suppressed absorptivity to lignin. We expressed three endoglucanase, EG1, EG2 and EG3 from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastris*, and analyzed effects of depletion of CBM and carbohydrate chains of the enzymes on the absorptivity to the lignin.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林圏科学・木質科学

キーワード：木質バイオマス セルラーゼ リグニン バイオリファイナリー

1. 研究開始当初の背景

石油リファイナリーから、セルロース系バイオリファイナリーへの変革が世界的に希求されている。バイオマスの糖化発酵によるバイオエタノールの生産では、セルラーゼの投入量を極力減らすことがプロセスのコスト競争力を高めるために必須であり、世界中でセルラーゼ開発競争が行われている。セルラーゼの反応性を高めるために、バイオマスの前処理物に最適化した酵素カクテルの構築、個別の酵素の触媒活性の増強の他、リグニンへの非生産的な吸着の軽減が必要である。リグニンへの非生産的な吸着については、その重要性はまだ十分認識されておらず、リグニンのポリペプチド鎖への吸着機構はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

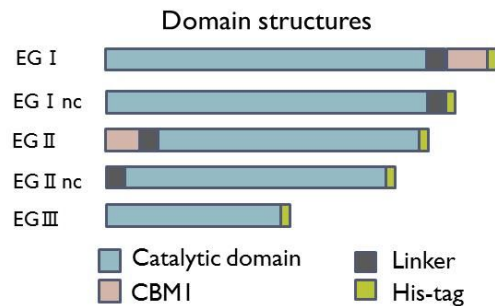
本研究では、セルラーゼの糖質結合モジュールの欠損や糖鎖のトリミングなどにより、酵素表層環境を人為的に改変し、この酵素表層環境の改変にタンパクのリグニンへの非生産的吸着を制御できることを示し、スーパー糖化酵素開発の新戦略を打ち立てることを目的とした。即ち、工業的に重要な糸状菌 *Trichoderma reesei* の主要なエンドグルカナーゼを発現し、表層環境の改変が与えるリグニンへの親和性に与える影響を明らかにすることを目的とした。また、低分子リグニンとセルラーゼの複合体形成についても解析した。

3. 研究の方法

*Trichoderma reesei* の エンドグルカナーゼ 1 (EG1)、 CBM 欠損 EG1 (触媒ドメイン + リンカー、EG1-CDL)、 エンドグルカナーゼ 2 (EG2)、 CBM 欠損 EG2 (EG2-CDL)、 エンドグルカナーゼ 3 (EG3)を、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を宿主として組換え酵素を発現させた後、Ni-NTA カラムにより精製した。組換え酵素は、BMGY 培地にメタノールを加えることで誘導生産した。Ni-NTA カラムの溶出は、2M imidazole を含む pH7.0 のリン酸 buffer を用いた。精製した酵素について、リグニンとの親和性を水晶振動子マイクロバランス(QCM)を用いて測定した。QCM の金プレートへのリグニンの吸着は、物理吸着法を用いた。また、N 結合型糖タンパク質から高マンノース型オリゴ糖、ハイブリッド型オリゴ糖、複合型オリゴ糖の一番内側の GlucNAc 残基とアスパラギン残基の間を切断するグリコシダーゼである PNGaseF を用いて、糖鎖の切断を行い、リグニンとの親和性に与える影響を解析した。リグニンは、スギとユーカリからミルドウッドリグニン(MWL)を精製し、使用した。さらに、バクテリア由来のセルラーゼ触媒ドメインや CBM とリグニン二量体モデルとの複合体形成を、FT-ICR-MS により解析した。

4. 研究成果

*P. pastoris* で発現させた *T. reesei* の 5 種類の組換え酵素はすべて活性型として精製することに成功した。EG1 と EG2 は、糖質結合モジュール(CBM)をもつため、CBM を欠損した組換えタンパクも調製した。発現した EG2 の SDS-PAGE による解析結果を図 2 に示した。CBM 欠損による分子量の違いが電気泳動からも明確に示された。また、精製した EG1 と EG3 の SDS-PAGE を図 3 に示した。精製酵素は、糖鎖の影響により、バンドがスミアになった。水晶振動子マイクロバランス(QCM)を用いて解析した結果、CBM1 を欠損させると、EG2 はリグニン親和性が大きく低下するが、EG1 はその影響が小さいことを示した。ユーカリリグニン、スギリグニン双方とも同じ傾向を示した。また、表層環境改変のため、糖鎖をグリコシダーゼ PNGaseF で切断し、その影響を評価した。セルラーゼの PNGaseF 処理により EG1 の分子



量が低下することを SDS-PAGE で示した(図 4)。

図 1 発現した *T. reesei* エンドグルカナーゼのドメイン構造

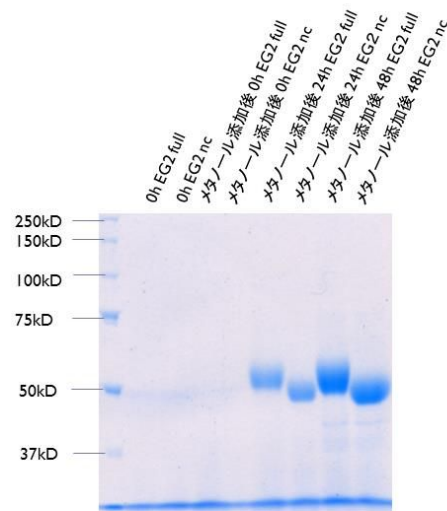


図 2 *Pichia pastoris* による *T. reesei* EG2 の発現

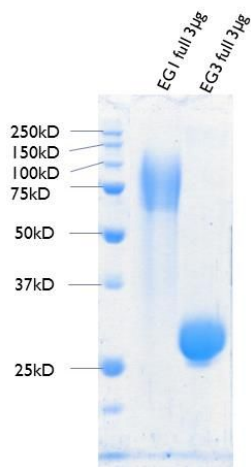


図 3 精製した *T. reesei* EG1 と EG3 の SDS-PAGE

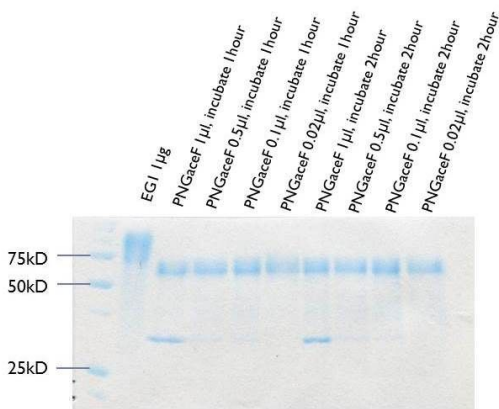


図 4 異なる酵素量で糖鎖切断した *T. reesei* EG1 の SDS-PAGE

一方、糖鎖の少ない EG2 と EG3 は PNGaseF による分子量低下が明瞭でないため、EG1 の糖鎖切断前と後について、水晶振動子マイクロバランス(QCM)を用いてリグニンへの親和性が変化するかどうかを解析した。その結果、糖鎖切断により、EG1 の結合解離定数が約 3 倍大きくなることを示した。従って、EG1 については、N 型糖鎖をもつ方が、リグニンとの親和性が高い結果が得られた。このように、セルラーゼの表層環境を改変することにより、リグニンとの親和性は変化する。このため、タンパク質ドメインの欠損や修飾を行い、リグニンの吸着性を低減させることは可能であるが、糖鎖の影響や CBM 欠損の影響は、それぞれの酵素により異なるため、それぞれのタンパク質や糖鎖の構造と修飾の影響を詳細に解析して、オーダーメイドの修飾酵素を開発することが必要である。この構造とリグニン吸着性の相関に関する研究蓄積により、糖化阻害を受けにくいタンパク質開発の戦略が明確化するものと期待され

る。セルラーゼの触媒ドメインや CBM と複数分子のリグニン二量体モデルが複合体を形成することを FT-ICR-MS により明らかにした。セルラーゼは、不溶性高分子リグニンに吸着するのみでなく、低分子リグニン分解物にも吸着する。このため、バイオマス糖化酵素の設計では、高分子リグニンのみでなく、糖化プロセスで共存する低分子リグニン分解物に対する吸着や活性低下の影響を解析する必要がある。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

吉岡康一、高田理江、渡辺隆司、ESI-FT-ICR MS によるリグノセルロース骨格構造モデルとセルラーゼとの複合体形成解析、第 58 回リグニン討論会、高松市、サンポートホール高松、平成 25 年 11 月 12 日-13 日

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 65 回日本生物工学会大会、生物工学シンポジウム、デザインバイオマス学とスマート発酵工学・植物育種研究と発酵工学研究のコラボレーション、広島市、広島国際会議場、平成 25 年 9 月 19 日

渡辺隆司、持続的社会的構築を目指したバイオマスのバイオ燃料・機能性物質への変換、東京電機大学総合研究所 新分野開拓研究 第 1 回シンポジウム「地域に密着したスマートエネルギーへの取組」、東京、東京電機大学、平成 25 年 6 月 29 日

吉岡康一、高田理江、水野里江、渡辺隆司、FT-ICR MS によるセルラーゼのリグノセルロース骨格構造モデルとの複合体形成解析、第 27 回セルラーゼ研究会、茨城県稲敷郡美浦村花王株式会社霞ヶ浦研修所、平成 25 年 7 月 12 日-13 日

〔図書〕(計 1 件)

Takashi Watanabe, "Introduction: Potential of Cellulosic Ethanol", In Lignocellulose Conversion, Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production, Chapter 1; Vincenza Faraco Ed.; Springer: New York, 2013, pp.1-20 (DOI: 10.1007/978-3-642-37861-4\_1)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

バイオリファイナ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