

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 4月18日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380197

研究課題名（和文）セルロースの酵素分解を促進する細菌由来黄色色素の構造と機能および合成遺伝子の探求

研究課題名（英文）Studies on structure and function of bacterial yellow affinity substance capable of enhancing enzymatic degradation of cellulose and its gene.

研究代表者

粟冠 和郎（SAKKA KAZUO）

三重大学・大学院生物資源学研究科・教授

研究者番号：20154031

研究成果の概要（和文）：*Clostridium thermocellum* ATCC 27405 株の菌体よりアセトンで抽出した黄色色素を微結晶性セルロース（フナセル）に吸着させ、各種セルラーゼに対する感受性を調べた。その結果、同菌株由来のセルロソームに対しては、未処理のフナセルに比べて約3倍の分解性を示した。また、3種類のセルラーゼとキメラ骨格タンパク質からなるミニセルロソームに対しても約2.5倍の分解性を示した。黄色色素がセルラーゼの分解力を高めることを示した初めての研究例で、今回の発見は極めて重要である。

研究成果の概要（英文）：Yellow affinity substance (YAS) extracted from cells of *Clostridium thermocellum* strain ATCC 27405 using acetone as the extracting solvent was adsorbed to microcrystalline cellulose (Funacel) and its digestibility was examined using some cellulase preparations. YAS-adsorbed Funacel was about 3-folds more efficiently degraded by cellulosome prepared from the culture supernatant of *C. thermocellum* ATCC 27405 than non-treated Funacel was. In addition, YAS-adsorbed Funacel was 2.5-folds more susceptible to mini-cellulosome constructed from three cellulases and a chimeric scaffolding protein than non-treated Funacel. This is the first study showing that YAS has an ability to enhance susceptibility of cellulose to cellulolytic enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：*Clostridium thermocellum*、黄色色素、セルラーゼ、セルロソーム、セルロース分解

1. 研究開始当初の背景

化石燃料の過剰使用に基づく地球温暖化の問題は、人類が直面している最大の問題であり、世界各国における植物性バイオマス利用の研究を促進している。国内外において、

木質系バイオマスからのエタノール生産の研究プロジェクトが進行しているが、分解・糖化は硫酸に頼っている。そのため、次世代技術として硫酸を使用しない酵素糖化法の開発が求められている。セルロースの分解に

は加水分解酵素（セルラーゼなど）が中心的役割を果たすのは当然であるが、糸状菌においてはデヒドロゲナーゼなどが重要な役割を果たすことが示唆されている。一方、強力なセルロース分解能を有する嫌気性細菌が「黄色色素」を生成することはしばしば観察されており、セルロース分解力との関連性が強く示唆されていた。セルロース系バイオマスの酵素分解の効率化を考えると、個々のセルラーゼ分子やセルロソームの構造の概略が明らかにされつつある現在、**加水分解酵素以外**のセルロース分解を促進する成分（黄色色素）の構造と機能の解明は極めて重要であると考えられた。

2. 研究の目的

セルロース分解性嫌気性細菌を代表的とする *Clostridium thermocellum* の生成する黄色色素の機能を明らかにするとともに、その構造を明らかにすることを目的とした。さらに、黄色色素の生合成機構について遺伝学的手法を用いて解明することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 黄色色素抽出と黄色色素を吸着させた酵素反応用基質の調製は次のように行った。*C. thermocellum* ATCC 27405 株をフナセル（微結晶性セルロース、フナコシ）を炭素源とする GS 改変培地（500 ml）で 60°C、5-6 日間培養した。培養液を 8,000 rpm、4°C、15 分間、遠心することにより集菌した。0.1% となるように還元剤を添加した 10ml のエタノールを加え良く攪拌した。8,000 rpm、4°C、15 分間遠心し、沈殿を回収した。沈殿にアセトン 10 ml を加え良く攪拌した。8,000 rpm、4°C、15 分間遠心し、その上清を黄色色素画分とした。

黄色色素画分に 0.1 g のフナセルを加え混合した後、さらに 0.1% の還元剤を添加したミリ Q 水 40 ml を加えた後、5,000 rpm、4°C、15 分間遠心した。沈殿したフナセルに、0.1% となるように還元剤を添加した 200 mM Bis-tris Propane 緩衝液（pH 7.0）4 ml に懸濁した。これを黄色色素吸着基質とした。

(2) セルロソームは、*C. thermocellum* ATCC 27405 株の培養上清を限外濾過により濃縮することにより得た。また、糸状菌由来のセルラーゼとして、*Trichoderma longibrachiatum* 由来のエンドグルカナーゼ EGII（Megazyme）と *Trichoderma* sp. 由来のセロビオヒドロラーゼ CBHI（Megazyme）を使用した。

(3) ミニセルロソームの構築は次のように行った。*C. thermocellum* 由来のタイプ I コヘシンとタイプ II コヘシン、および *Clostridium josui* 由来のコヘシンを用い、

さらに *C. thermocellum* 由来のファミリー-3 の糖質結合モジュール（CBM3）を組み合わせてキメラ骨格タンパク質を作製した。具体的には各コヘシンと CBM3 をコードする領域をそれぞれ発現ベクターに挿入したものを作製し、それぞれのプラスミドを制限酵素により切断し、再連結する操作を繰り返すことにより、キメラ骨格タンパク質をコードする遺伝子を作製出来るように設計した。本研究では、N 末端側から CBM3、*C. josui* コヘシン、タイプ II コヘシン、タイプ I コヘシンの順に連結したキメラ骨格タンパク質（mCip7L）を用いた。

一方、*C. thermocellum* 由来の Type I コヘシンと Type II ドックリン、および *C. josui* 由来のドックリンを融合するためのベクターを、pET-28a の *Hind*III と *Xho*I 部位の間に各ドックリン領域を挿入することにより作製した。残った制限酵素部位に目的とするセルラーゼ遺伝子を、読み枠を合わせて挿入すれば、セルラーゼの C 末端側にドックリンが付加される。C 末端に His タグが存在するので Ni-アフィニティーカラムにより精製が可能である。

(4) コヘシンとドックリンの結合の定量的解析は BIAcore システムを用いた。コヘシンをセンサーチップに固定化し、ドックリンをアナライトとして用いて解析した。定性的な解析は native affinity PAGE により行った。

4. 研究成果

(1) コヘシンとドックリンの結合性の解析
ミニセルロソームを作製するに当たり、コヘシンとドックリンの結合性が重要であるため、*C. thermocellum* および *C. josui* 由来の幾つかのコヘシンとドックリンの結合性を、BIAcore を用いて調べた。*C. thermocellum* 由来エンドグルカナーゼ CelJ 由来のドックリンは、*C. thermocellum* と *C. josui* のドックリンの中間的なアミノ酸配列を持つが、CelJ ドックリンは、親和性の強さには差はあるものの、両菌由来の骨格タンパク質中のコヘシンと結合することが判明した。したがって、CelJ ドックリンはキメラセルラーゼの作製には使用できない。同様に *C. thermocellum* 由来キシラナーゼ XynA および XynC 由来のドックリンの、*C. thermocellum* と *C. josui* 由来のコヘシンに対する親和性を調べた。その結果 XynC のドックリンは *C. thermocellum* 由来のコヘシンのみに特異的に結合したが、XynA のドックリンは *C. josui* 由来のコヘシンにも結合することが分かった。両ドックリンに突然変異を導入して結合特性の変化を調べたが、両者ではその挙動に違いが見られた。XynA のドックリンもキメラセルラーゼの作製には使用できないと結論された。

(2) ミニセルロゾームの構築とセルロース分解力の検討

N末端側から CBM3、*C. josui* コヘシン、タイプ II コヘシン、タイプ I コヘシンの順に連結したキメラ骨格タンパク質 (mCip7L) を構築した。一方、セルラーゼとして、*C. thermocellum* 由来の Cel9K のドックリンを *C. josui* タイプに置換したもの、Cel8A のドックリンをタイプ II に置換したもの、天然型 Cbh9A の 3 種類を用いた。これらの成分を用いてミニセルロゾームを作製し、フナセルに対する分解活性を測定した。各成分とミニセルロゾームの模式図を図 1 に示す。

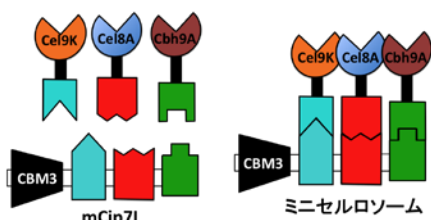


図 1. キメラセルラーゼ、キメラ骨格タンパク質およびミニセルロゾームの模式図

セルラーゼ成分とキメラ骨格タンパク質を混合した時の活性を図 2 に示す。酵素単独の場合に比べ、骨格タンパク質を加えることにより酵素活性は増加しており、複合体形成が酵素活性の増強に有意義であることを示す。また、ミニセルロゾーム形成の際 mCip7L の代わりに、CBM3 を欠く骨格タンパク質 (mCip7N) を使用すると、反応初期には反応は進むが、すぐに頭打ちになる。一方、mCip7L を使用した場合、長時間にわたり分解反応は持続した (図 3)。CbhA の中でも CBM3 が存在することから、この結果は、骨格タンパク質中の CBM3 の存在がセルロース分解において重要な役割を持つことを示唆する。

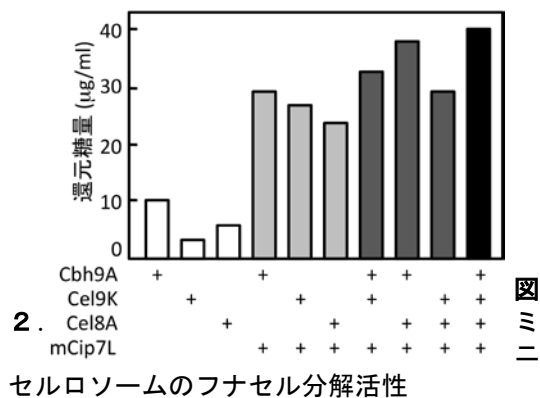


図 2. ミニセルロゾームのフナセル分解活性

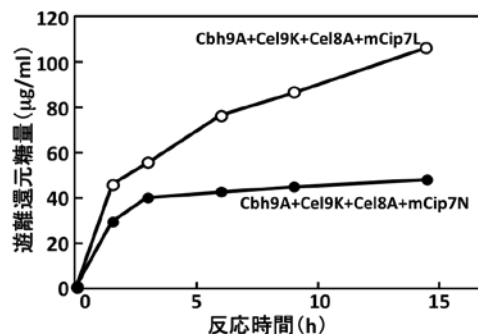


図 3. ミニセルロゾームにおける CBM3 の影響

(3) セルロース分解における黄色色素の機能

黄色色素を *C. thermocellum* ATCC 27405 株より抽出し、微結晶性セルロース (フナセル) に吸着させた。対照として抽出溶媒として用いたアセトンを用いて同様の処理を行ったセルロースを用いた。これらのセルロースに対して *C. thermocellum* ATCC 27405 より調製したセルロゾーム、前項で用いたミニセルロゾーム、さらに mCip7L を含まないセルラーゼ混合液を作用させ、遊離する還元糖を測定することにより相対活性を求めた (図 4)。その結果、天然セルロゾームの場合には、黄色色素の吸着により、2.5 倍以上の分解速度を示した。同様に、ミニセルロゾームを用いた場合にも、黄色色素の吸着により約 2.5 倍の分解促進が見られた。一方、複合体を形成していないセルラーゼ混合物の場合には、促進効果は低く、約 1.5 倍にとどまった。*T. reesei* など好気性糸状菌のセルロース分解系では、酵素複合体は作らない点で、嫌気性細菌のセルロース分解系とは異なっている。糸状菌由来のセロビオヒドロラーゼ CBHI とエンドグルカナーゼ EGII のセルロース分解活性に対する、黄色色素の効果を調べた。図 5 に示すように、EGII によるセルロース分解は、黄色色素により約 1.5 倍高められたが、CBHI に対しては、黄色色素は阻害的に働いた。黄色色素を生産しない突然変異株を取得し、その株から黄色色素の抽出操作を行ったが、分解性を高める作用は認められなかった。この結果は、セルロースの分解性を高めているのが、黄色色素自身であることを示している。

黄色色素のセルロース分解に対する効果はこれまで全く報告されておらず、今回得られた結果は、極めて新規性が高いものであり、バイオマス分解における役割は大きい。

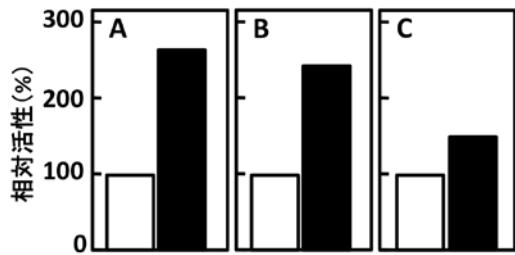


図4. セルロソーム(A)、ミニセルロソーム(B)および酵素混合物(C)のセルロース分解活性に与える黄色色素の影響
□, アセトン処理セルロース; ■, 黄色色素処理セルロース

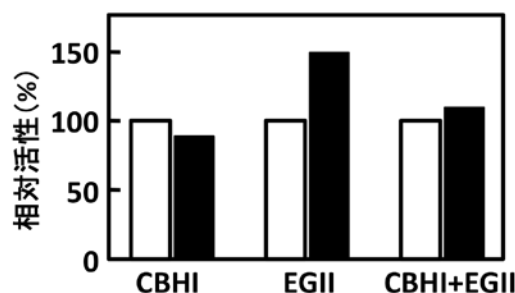


図5. 糸状菌セルラーゼの活性に与える黄色色素の影響

(4) その他

Halocynthia 由来の結晶性セルロースに黄色色素を結合させ、その表面を原子間力顕微鏡で観察した(図6)。しかし、対照として用いた、アセトン処理した試料との明瞭な違いは観察されず、黄色色素の吸着が、セルロースの結晶構造を大きく変化させている可能性は低いと思われる。

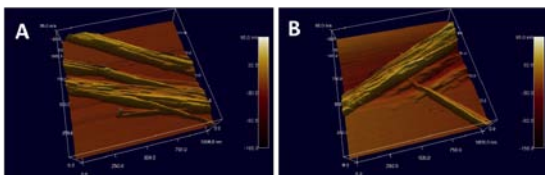


図6. 原子間力顕微鏡によるアセトン処理セルロース(A)と黄色色素吸着セルロースの観察

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2件)

- ① Kazutaka Sakka, Yuka Sugihara, Sadanari Jindou, Makiko Sakka, Minoru

Inagaki, Kazuo Sakka and Tetsuya Kimura, Analysis of cohesin-dockerin interactions using mutant dockerin proteins, FEMS Microbiol. Lett., 査読有, vol. 314, 2011, pp.75-80.

- ② Kazutaka Sakka, Yuka Kishino, Yuka Sugihara, Sadanari Jindou, Makiko Sakka, Minoru Inagaki, Tetsuya Kimura and Kazuo Sakka, Unusual binding properties of the dockerin module of *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelJ (Cel19D-Cel144A), FEMS Microbiol. Lett., 査読有, vol. 300, 2009, pp.249-255.

[学会発表] (計5件)

- ① 吉田和生、粟冠真紀子、木村哲哉、粟冠和郎、人工ミニセルロソームにおけるファミリー3のCBMの機能解析、セルラーゼ研究会、花王(株)霞ヶ浦研修所、2011年10月15日
② 吉田和生、粟冠真紀子、木村哲哉、粟冠和郎、人工セルロソームの構築と機能解析、日本農芸化学会2011年度大会、京都女子大学(京都市)、2011年3月26日
③ 小林崇也、粟冠真紀子、木村哲哉、粟冠和郎、*Clostridium josui* Cel19Aの酵素特性解析と多酵素複合体への利用、酵素工学研究会第64回研究会、東京大学山上会館(東京都)、2010年11月19日
④ 米澤優希、粟冠真紀子、木村哲哉、粟冠和郎、キメラ骨格タンパクを利用した人工セルロソームの構築、酵素工学研究会第64回研究会、東京大学山上会館(東京都)、2010年11月19日
⑤ 小林崇也、粟冠真紀子、木村哲哉、粟冠和郎、キメラ骨格タンパク質とミニセルロソームの構築、第61回日本生物工学会大会、名古屋大学、2009年9月24日

[図書] (計1件)

粟冠和郎、幸田勝典、人工セルロソームの構築と酵母での発現、バイオマス分解研究の最前線、pp.190-195、シーエムシー出版、2012年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

粟冠 和郎 (SAKKA KAZUO)

三重大学・大学院生物資源学研究所・教授
研究者番号：20154031

(2) 研究分担者

栗冠 真紀子 (SAKKA MAKIKO)
三重大学・大学院生物資源学研究科・研究
員

研究者番号：00422882

(3) 連携研究者
()

研究者番号：