

研究報告書

「セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の集積・近接化による協働作用の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 平野 展孝

1. 研究のねらい

持続可能な低炭素社会の実現は、近年の科学技術における最重要課題の一つである。中でも、再生可能資源であるバイオマス为原料としたバイオ燃料・化成品の発酵生産分野では、可食用デンプン系バイオマスから食糧と競合しない非食用リグノセルロース系バイオマスへの原料転換が急務とされている。リグノセルロース系植物バイオマスから微生物発酵原料(単糖)を得る際の生物系処理ではセルロース/ヘミセルロース分解酵素(糖化酵素)が用いられるが、植物バイオマスでは糖化対象であるセルロース/ヘミセルロース画分が、より強固な高分子リグニンで覆われていることから、セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の協働作用に着目した複合酵素システムの構築が重要と考えられる。本研究では、多種多様な糖質加水分解酵素が骨格蛋白質上に集積・近接化することで酵素活性間に強い相乗効果が生じる好熱嫌気性細菌由来セルロース/ヘミセルロース分解酵素複合体(セルロソーム)を対象に酵素組成—糖化活性相関の解析を行い、その蛋白質工学として、セルロソーム複合体中への異種酵素の導入やセルロソーム酵素組成の改変、及び、セルロソーム複合体の構造構築原理を利用したセルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の集積・近接化による協働作用の創出を目的とした研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

セルロソームとは、嫌気性細菌の細胞表層に提示される、多種多様な糖質加水分解酵素が、長大な骨格蛋白質に結合した分子量数百万の巨大酵素複合体である。

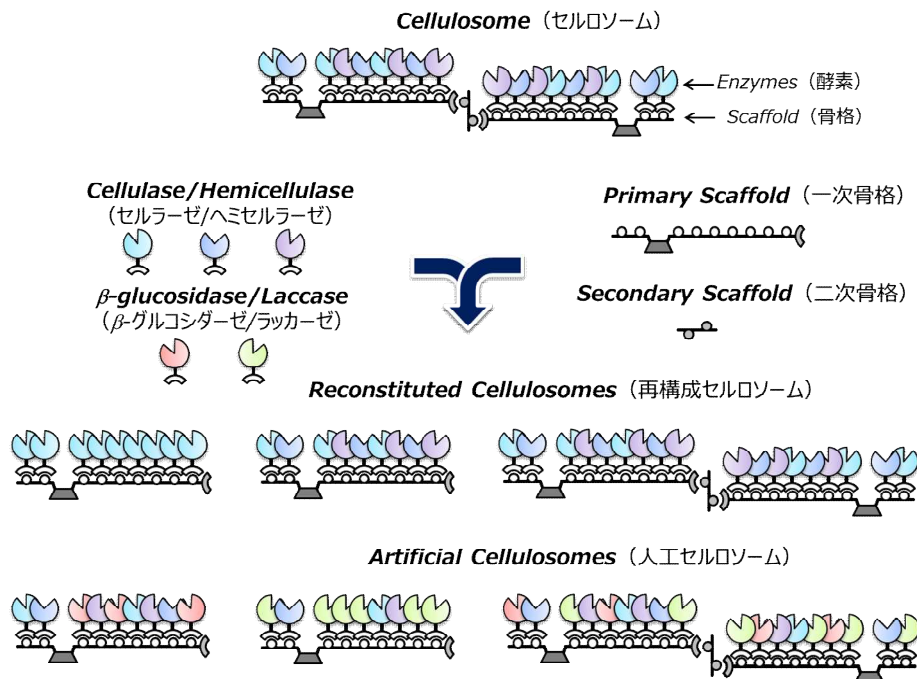
本研究では、高分子量蛋白質の多検体合成に適した小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を用いて、好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* 由来セルロソームの全長骨格蛋白質と 40 種類のセルロソーム酵素因子の多検体合成と、任意酵素組成の再構成セルロソームを用いて、セルロソーム酵素組成—糖化活性相関の解析を行い、複合体中に含まれる酵素種の多様性が、効率的な基質分解に対して極めて重要であることを明らかにした。

また、植物バイオマス分解活性の改善を目的としたセルロソームの蛋白質工学を行い、セルロソーム中に本来存在しないセロビオース分解酵素(β -グルコシダーゼ)を複合体化することで、 β -グルコシダーゼの添加量を大幅に低減出来ることや、植物バイオマス分解に対して天然型セルロソームの酵素組成よりも適した酵素組成が存在するを見出した。

また、セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素の協働作用の創出を目的として、好

熱好気性細菌由来セルラーゼ/キシラナーゼ/ラッカーゼをセルロソーム骨格上へ集積・近接化したハイブリッド型酵素複合体の構築を行い、植物バイオマス分解に対する最適酵素比率と様々な複合体形成様式を検討した結果、糖化酵素(セルラーゼ/キシラナーゼ)とラッカーゼを骨格上に集積・近接化させることで、リグニン含量の多少に関わらず、植物バイオマス(稲ワラ並びにスギ粉末)分解活性を上昇させることに成功した。

(2) 詳細



再構成セルロソームを用いた酵素組成—糖化活性相関の解析と 異種酵素の複合体化による人工セルロソームの構築

1. セルロソームの酵素組成—糖化活性相関

・一次骨格複合体の解析

好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* 由来セルロソームでは、一次骨格蛋白質に酵素 9 個が結合することで、一次骨格複合体が形成される。

一次骨格複合体の酵素組成—糖化活性相関を解析するため、一次骨格蛋白質とセルロソームの酵素因子 40 種類の多検体無細胞合成と、天然型セルロソームの酵素組成を参考に、酵素の種類を段階的に増やした複合体の試験管内再構成を行い、各種セルロースと植物バイオマス(脱リグニン処理済稲ワラ)の分解活性を測定した。

まず、天然型セルロソームに多く含まれる主要酵素 3 種類と、全長一次骨格(酵素 9 個提示)を用いて、様々な酵素・骨格比率における複合体形成の解析と、各種セルロースに対する複合体の分解活性を測定した。その結果、全長一次骨格から成るセルロソーム複合体の化学量論的複合体形成の証明に成功し、一次骨格上に過不足無く酵素が提示された際に最

も高い結晶性セルロース分解活性が発揮されることを明らかにした(論文発表 1)。

また、無細胞合成系によって全長酵素因子の調製に成功したセルロソームの最大酵素因子の機能解析を行い、複数の触媒ドメインと基質結合ドメインから成る全長酵素因子の基質特異性を明らかにした(論文発表 2)。

次に、異なる炭素源(結晶性セルロースと脱リグニン処理済バイオマス)で培養された際の天然型セルロソームの酵素組成を参考に、酵素組成の異なる複合体の試験管内再構成を行い、結晶性セルロースと脱リグニン処理済稲ワラの分解活性を比較した。その結果、天然型セルロソームの酵素組成は、培養時に炭素源として用いた基質の分解に適しており、酵素種の多様性は、いずれの基質分解に対しても重要である結果を得た。また、結晶性セルロースよりも多様な糖質で構成される稲ワラの分解に対しては、酵素種の多様性がより重要となる結果を得た(学会発表 2)。

・二次骨格複合体の解析

C. thermocellum 由来セルロソームでは、酵素9個から成る一次骨格複合体が二次骨格蛋白質に複数個結合することで、更に高分子量の二次骨格複合体が形成される。

二次骨格複合体の機能を解析するため、二次骨格蛋白質 3 種類(一次骨格複合体が 1 個・2 個・7 個結合)の無細胞合成と、二次骨格複合体の試験管内再構成を行い、結晶性セルロース分解活性を測定した。その結果、二次骨格を介した複合体化は、一次骨格を介した複合体化と異なり、結晶性セルロース分解活性に寄与しない結果を得た(学会発表 4)。

2. セルロソームの蛋白質工学

・ β -グルコシダーゼを含有する人工セルロソームの構築

天然型セルロソームには、セルロースの分解生成物(セロビオース)を、更に分解する酵素活性が存在しないため、基質分解時にはセロビオースによる生成物阻害を受ける。

セルロソームの糖化活性を改善するため、好熱嫌気性細菌由来セロビオース分解酵素(β -グルコシダーゼ)を、セルロソーム複体内に様々な比率で導入した際の結晶性セルロース分解活性を測定した。その結果、 β -グルコシダーゼを複合体化していない場合と比較して、複合体化した場合は、大幅に少ない β -グルコシダーゼ活性量(U)で同等の結晶性セルロース分解活性が発揮出来ることを見出した(学会発表 5)。

・酵素組成を改変した人工セルロソームの構築

脱リグニン処理済バイオマスを炭素源に培養・生産された天然型セルロソームの酵素組成よりも、脱リグニン処理済稲ワラ分解に適した酵素組成が存在するかを検討するため、基質特異性が同定されている酵素因子 30 種類を用いて、天然型セルロソームと大きく異なる酵素組成の人工セルロソームの構築を行い、稲ワラ分解活性を測定した。その結果、セルロース分解酵素に対してヘミセルロース分解酵素を過剰に含む酵素組成で再構成した場合、天然型セルロソームの酵素組成で再構成した複合体よりも、稲ワラ分解活性が上昇する結果を得た。

・セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の協働作用の創出

セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群から成る複合酵素システムを構築するため、糖質加水分解酵素であるセルロース/ヘミセルロース分解酵素(セルラーゼ/キシラナーゼ)と、酸化還元酵素であるリグニン分解酵素(ラッカーゼ)の植物バイオマス分解に対する協働作用の検討を行った。

本来、嫌氣的(還元的)条件下で作用するセルロソーム構成セルロース/ヘミセルロース分解酵素と、好氣的(酸化的)条件下で作用するリグニン分解酵素(ラッカーゼ)では、双方の酵素活性を同時に維持できる条件設定が困難であったため、好氣的(酸化的)条件下で作用する好熱好氣性細菌由来セルラーゼ/キシラナーゼ/ラッカーゼをセルロソーム骨格上に集積したハイブリッド型酵素複合体の構築を行い、脱リグニン処理済稲ワラの分解活性を測定した。

まず、糖化酵素(セルラーゼ/キシラナーゼ)を用いて、複合体内の最適酵素比率を検討した結果、セルラーゼに対してキシラナーゼを過剰に集積する方が、稲ワラ分解活性が上昇する結果を得た(学会発表 3)。次に、ラッカーゼの最適酵素比率を検討した結果、糖化酵素の添加量によって、ラッカーゼの最適酵素比率が大きく異なることを見出した。これらの結果を踏まえ、様々な複合体形成様式の検討を行った結果、糖化酵素とラッカーゼを骨格上に集積・近接化させることで、稲ワラ分解活性を上昇させることに成功した(学会発表 1)。また、ラッカーゼに加え、好熱性セロビオース分解酵素(β -グルコシダーゼ)や好熱性キシロオリゴ糖分解酵素(β -キシロシダーゼ)に対しても同様の検討を行った結果、稲ワラ分解活性を上昇させることに成功した。これらの知見を基に、稲ワラよりも更にリグニン含量の高いスギ粉末の分解を検討した結果、リグニン含量に大きな違いがあるにも関わらず、稲ワラ分解に対する改善率と同程度の改善を得ることに成功した。

3. 今後の展開

セルロソームの酵素組成—糖化活性相関解析と蛋白質工学を通して、セルロソーム複合体を構成する酵素種の多様性が、多様な糖質から構成される植物バイオマスの分解に重要であること、また、天然型セルロソームと異なる人工的な酵素組成によって、植物バイオマス分解活性が更に上昇する可能性を見出した。今後は、これらの知見を基に、本研究を通して調製した酵素 40 種類と骨格蛋白質を用いて、各種脱リグニン処理済バイオマスの分解に最適化した人工セルロソームの構築に取り組む。

また、セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素群の協働作用の創出に関しては、これらの酵素比率や、セルロース/ヘミセルロース分解酵素(糖化酵素)の集積・近接化が、植物バイオマス分解活性の向上に重要であることを見出した。今後は、植物バイオマス分解活性の更なる改善に向けて、酵素種の多様性を増加させると共に、将来的な実用化の可能性を検証するため、スケールアップと酵素コスト削減に向けた酵素複合体の大量調製と再利用についての検討を行う。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

セルロソームの基礎研究においては、無細胞合成系で調製した全長骨格を用いて、セルロソーム複合体の化学量論的複合体形成や、骨格上に過不足無く酵素が提示された際に最大の酵素活性を示すことを証明し、AEM 誌の“Spotlight”に選出された(論文発表 1)。また、酵素の種類を段階的に増やしたセルロソーム複合体の試験管内再構成からは、基質分解に対する酵素種の多様性の重要性など、セルロソームに関する幾つかのコンセプトの証明にも成功し、当該研究分野において一定の成果と評価を得たと考えられる。

セルロソームの蛋白質工学においては、植物バイオマス分解に対して天然型セルロソームの酵素組成よりも適した酵素組成が存在する可能性や、本来、セルロソーム中に存在しない異種酵素(セロビオース分解酵素・リグニン分解酵素)を様々な酵素比率・複合体形成様式で集積・近接化させることで、酵素使用量の低減や、植物バイオマス分解活性を向上する上での基盤となる様々な知見を得た。今後は、本研究で得た知見の実用化の可能性を検証するため、スケールアップや酵素コスト削減に向けた酵素複合体の大量調製や再利用などの研究が必要と考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

平野氏は、本研究で、セルロソーム複合体を再構成し、セルロース、ヘミセルロース、リグニンを分解する効率の良い系を確立することを目的とした。研究の過程で、多くの酵素の無細胞系での発現、セルロソームへの再構成など、セルロソーム活用のための基礎的な知見を得て、それが従来の微生物セルロソームより効率的にバイオマスを分解することを示した。またリグニン分解にはラッカーゼの存在が重要であり、糖化酵素とラッカーゼを同一セルロソーム骨格上に集積・近接化させることで稲わらのみならず、リグニンを含有するスギ粉末の分解活性を上昇させることに成功した。こうした生化学的な研究を着実にやってきたことは評価される。将来こうした技術を実用化するためには、長期的な展望に立って、研究を進めてほしい。実バイオマスをそのまま構成成分に分解できる酵素化学的な技術が開発されれば、バイオマスの利活用はいつそう進展することになる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hirano, K., Nihei, S., Hasegawa, H., Haruki, M., and Hirano, N.
Stoichiometric Assembly of the Cellulosome Generates Maximum Synergy for the Degradation of Crystalline Cellulose, as Revealed by *In Vitro* Reconstitution of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome.
Appl. Environ. Microbiol. (2015) 81, 4756-4766.
“Spotlight” of the Volume 81, Issue 14.

2. Hirano, N., Hasegawa, H., Nihei, S., and Haruki, M.
Cell-Free Protein Synthesis and Substrate Specificity of Full-Length Endoglucanase CelJ (Cel9D-Cel44A), the Largest Multi-Enzyme Subunit of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome.
FEMS Microbiol. Lett. (2013) 344, 25-30.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 好熱性セルラーゼ/ヘミセルラーゼ/ラッカーゼによるバイオマス分解酵素複合体の構築
篠田 優¹, 本田 紘樹¹, 黒崎 正浩¹, 白澤 智行¹, 平野 勝紹¹, 春木 満¹, 平野 展孝^{1,2}
(¹日大・工・生命応化, ²JST・PRESTO)
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会
2015 年 12 月 2 日 神戸ポートアイランド
2. *Clostridium thermocellum* セルロソームの試験管内再構成
平野 勝紹¹, 那須 涼介¹, 田中 清志¹, 二瓶 哲¹, 篠田 優¹, 春木 満¹, 平野 展孝^{1,2}
(¹日大・工・生命応化, ²JST・PRESTO)
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会
2015 年 12 月 1 日 神戸ポートアイランド
3. *Thermobifida fusca* 由来糖質分解酵素から成る人工セルロソームによるバイオマス分解
篠田 優¹, 本田 紘樹¹, 草野 大貴¹, 黒崎 正浩¹, 平野 勝紹¹, 春木 満¹, 平野 展孝^{1,2}
(¹日大・工・生命応化, ²JST・PRESTO)
2015 年度日本農芸化学会
2015 年 3 月 27 日 岡山大学
4. *Clostridium thermocellum* 由来セルロソーム二次骨格の機能解析
平野 勝紹¹, 高橋 祐介¹, 田中 清志¹, 二瓶 哲¹, 白澤 智行¹, 長谷川 裕樹¹, 篠田 優¹, 春木 満¹, 平野 展孝^{1,2}
(¹日大・工・生命応化, ²JST・PRESTO)
2015 年度日本農芸化学会

2015年3月27日 岡山大学

5. β -グルコシダーゼを含有する *Clostridium thermocellum* セルロソームの試験管内再構成
平野 勝紹¹, 古内 正紀¹, 鈴木 優也¹, 二瓶 哲¹, 春木 満¹, 平野 展孝^{1,2}
(¹日大・工・生命応化, ²JST・PRESTO)
2014年度日本農芸化学会
2014年3月29日 明治大学

招待・依頼講演

1. 植物バイオマス分解酵素複合体の再構成
平野 展孝^{1,2}
(¹日大・工・生命応化, ²JST・PRESTO)
平成26年度化学系学協会東北大会 生体分子セッション
2014年9月20日 山形大学工学部

総説・解説

1. 駕籠に乗る人、担ぐ人、そのまた草鞋を作る人
平野 展孝
生物工学会誌 (2014) 92, 305.

報道発表

1. 福島民友新聞
「環境、健康 活用図る」
2015年2月17日
2. 日経産業新聞
「植物成分、糖に効率分解」
2012年12月14日

展示発表

1. 第10回 再生可能エネルギー世界展示会 Renewable Energy 2015 Exhibition
2015年7月29日-7月31日 東京ビッグサイト
2. REIF ふくしま 2014 ふくしま復興・再生可能エネルギー産業フェア 2014
「科学技術によるグリーン・イノベーションの創出と東日本大震災からの復興・再生に向けて」



2014年12月3-4日 ビックパレットふくしま

3. 第9回 再生可能エネルギー世界展示会 Grand Renewable Energy 2014 Exhibition
2014年7月30日-8月1日 東京ビッグサイト
4. REIF ふくしま 2013 ふくしま復興・再生可能エネルギー産業フェア 2013
「科学技術によるグリーン・イノベーションの創出と東日本大震災からの復興・再生に向けて」
2013年11月6-7日 ビックパレットふくしま
5. REIF ふくしま 2012 ふくしま復興・再生可能エネルギー産業フェア 2012
「科学技術によるグリーン・イノベーションの創出と東日本大震災からの復興・再生に向けて」
2012年11月7-8日 ビックパレットふくしま