

# 《*Caldicellulosiruptor bescii* 分泌タンパク質のセルロース糖化機能解析》

筑波大学大学院 生命環境科学研究科 先端農業技術科学専攻

博士 (農学) 学位論文 《新開 (金房) 純代》

## 論 文 の 要 約

セルロース系バイオマスは、バイオ燃料生産など広い分野での利用が期待され、細菌や糸状菌に由来するセルラーゼによる酵素糖化法の研究が進められている。本研究では従来研究されてきたものとは異なる分子構造を持つセルラーゼを分泌する *Caldicellulosiruptor bescii* に着目し、セルロース系バイオマス糖化の効率化に資することを目的に、細胞外分泌タンパク質のセルロース糖化機能解析を行った。温泉で発見された *C. bescii* DSM6725 株は、至適増殖温度が 72-80°C であり、最も高温で結晶性セルロースやセルロース系バイオマスを分解する嫌気性高度好熱細菌である。同一分子内に 2 つの触媒部位を持つマルチドメインセルラーゼを有し、分子内相乗効果により強力な繊維分解活性を示すことが想定される。しかし、*C. bescii* が分泌する繊維分解関連タンパク質の特性評価はこれまで CelA および Cel9B/Man5A でしか行われておらず、菌体外粗酵素液の酵素活性に関する特性評価は検討されていない。そこで本論文は *C. bescii* が細胞外に分泌するタンパク質のセルラーゼ活性とその特性評価、セルラーゼ活性を示さないタンパク質の機能を解析した。

第 2 章ではまず基質にセロビオースを用いた培養上清を濃縮することで *C. bescii* 粗酵素液を調製した。次に粗酵素液の基礎的な性質の解明を試みた。16 種の基質に対する分解活性を調べた結果、粗酵素液はローカストビーンガム、リケナン、オートスペルトキシラン、ビーチウッドキシラン分解活性が高く、ヘミセルロース分解活性が高いことが示された。カルボキシメチルセルロース、キシラン (可溶性基質) アビセル、チモシー (不溶性基質) を用いた至適 pH 評価の結果、粗酵素液の至適 pH は 5.0-6.0 であることが明らかとなった。また、粗酵素液の至適温度は可溶性基質で 85-95°C、不溶性基質で 75°C であることが明らかとなった。また、従来の酵素糖化法で用いられている *Trichoderma reesei* 粗酵素液との酵素活性をアビセル、チモシー、稲ワラを基質として比較した結果、*T. reesei* 粗酵素液よりもタンパク質比活性値が 2 倍高いことを明らかにした。また、薄層クロマトグラフィーを用いてアビセルからの生成物分析を行った結果、*C. bescii* 粗酵素液はセロビオースへの分解効率が高いがグルコースへの分解効率が低く、*T. reesei* 粗酵素液よりも  $\beta$ -グルコシダーゼ活性が弱いことが示された。

第 3 章では本菌が高活性を示した理由を明らかにするために粗酵素液内繊維分解関連タンパク質の解明を試みた。酵素電気泳動法の結果より、粗酵素液内の分子量 160kDa 以上のタンパク質はセルロース分解活性を示し、160kDa 以下のタンパク質は

セルロース分解活性を示さないことを明らかにした。さらに、MALDI-TOF MS を用いた質量分析法により 16 種のタンパク質を確認し、その内 4 種のマルチドメインセルラーゼと 3 種の細胞外基質結合タンパク質 (SBP) が存在することを明らかにした。4 種のマルチドメインセルラーゼは、セルロース分解活性が認められた 160kDa 以上の SDS-PAGE による電気泳動のバンドと対応し、既に特性が明らかになっている CelA、Cel9B/Man5A および、未だ特性が明らかになっていない CelE、CelF であることを確認した。3 種の SBP はセルロース分解活性が認められなかった 160kDa 以下のバンドと対応し、SBP44、SBP50、SBP60 であることを確認した。このように本菌の粗酵素液には複数の触媒部位を有するマルチドメインセルラーゼおよび SBP が存在し、これらの相乗効果により効率的にセルロースを分解することが示唆された。

第 4 章では粗酵素液によるセルロースの加水分解過程を透過型電子顕微鏡と原子間力顕微鏡を用いて観察し、セルロース表面構造の変化および酵素局在から本菌の繊維分解機構の解明を試みた。その結果、加水分解時にセルロースが粘着性を帯び凝集および膨潤化することを示した。また、粗酵素液の AFM 画像には、1-2nm 程度の粒子が観察された。観察された粒子は第 3 章で存在を確認したマルチドメインセルラーゼ CelA、Cel9B/Man5A、CelE、CelF および細胞外基質結合タンパク質 SBP44、SBP50、SBP60 を含むと考えられるが、その特定および局在の解明には至らなかった。AFM 画像データ解析の結果、*C. bescii* 粗酵素液内に含まれるタンパク質の粒径は約 0.5-2.25nm であることが明らかとなった。また、粗酵素液と反応させたセルロース高が 1.2nm 増加し、粗酵素液に含まれるタンパク質のセルロース表面への吸着およびセルロース間の凝集・膨潤化が示唆された。

*C. bescii* は生育が遅く、嫌気性高度好熱細菌であるため増殖には高温での嫌気培養が必要となり培養条件が制限される。第 5 章では *C. bescii* の繊維分解関連タンパク質の機能を分子レベルで明らかにするために、第 3 章において存在を確認したマルチドメインセルラーゼおよび SBP の大腸菌を用いた発現系の構築を試みた。まず、大腸菌内発現ベクター pET-28b(+), ペリプラズム空間発現ベクター pET-27b(+), 低温発現ベクター pColdI を用い、6 種のマルチドメインセルラーゼ (CelA、CelB、Cel9B/Man5A、CelD、CelE、CelF) および 4 種の SBP (SBP44、SBP50、SBP56、SBP60) を発現する遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを作製した。タンパク質の発現を確認した結果、pET-28b(+) で Cel9B/Man5A のわずかな発現および CelD、SBP44、SBP56 の発現が、pET-27b(+) で SBP60 のわずかな発現が、pColdI で SBP50 の発現が認められた。すなわち、*C. bescii* の繊維分解関連タンパク質 CelD、SBP44、SBP50、SBP56 の発現系を構築した。

第 6 章では発現が認められた SBP44、SBP50、SBP56 を大量発現させ、その機能解析を試みた。低圧アフィニティークロマトグラフィーによる精製・濃縮を行った結果、22-25mg/mL の SBP が得られた。*C. bescii* 分泌総タンパク質濃度 (150-200 $\mu$ g/mL) と

比較すると目的タンパク質は 100 倍濃度に濃縮でき、SBP44、SBP50、SBP56 の大量発現法を確立した。これらのタンパク質の基質結合特異性を評価したところ、SBP44 はキシラン、チモシー、リン酸膨潤化セルロース (PASC) の順に、SBP50 は PASC、チモシー、キシランの順に、SBP56 はキシラン、PASC、チモシーの順に高いタンパク質結合量を示した。このことにより、SBP ごとに基質結合特異性が異なることが示され、特にキシランへの結合量が他の基質に比べ高いことを明らかにした。第 2 章において粗酵素液は高いキシランナーゼ活性を示したことから、加水分解活性を持たない SBP がキシランへ選択的に結合し、マルチドメインセルラーゼによる加水分解を補助することで高い酵素活性を発揮することが推察された。

本研究では、高い酵素活性を有する *C. bescii* 分泌タンパク質の酵素糖化機能の一端が解明された。しかし、マルチドメインセルラーゼのクローニングと大量発現は技術的に困難であり、今後の課題として残された。