

XB117

セルラーゼの分子進化技術

(豊田中研) ○今村千絵*・池内暁紀・伊藤洋一郎・高橋治雄

【はじめに】

食糧と競合しないセルロース系バイオマス为原料としたエタノール等の燃料生産は、化石資源依存型社会における地球温暖化問題やエネルギーセキュリティ対策としての寄与が期待されている。廃バイオマスを利用するためには各種分解酵素による糖化が必要であるが、セルロース系バイオマスからのエタノール等の生産コストは高く、課題の一つに糖化コストの低減が挙げられる。糖化コスト低減要素の一つに糖化酵素使用量の削減が考えられ、そのためには、酵素生産量の向上や、酵素の質の向上等が必要である。我々は、廃バイオマスを原料としたエタノール等の燃料生産を目指した酵素開発を試みている。ここでは、バイオマス分解酵素の高機能化のための手法と、それによる改変例について紹介したい。

糖化工程に用いる酵素の質としては、分解効率が高いことは勿論、酵素反応場の条件に適していることが求められる。耐熱性、耐酸性、生成物阻害回避などの性質が必要となる可能性がある。いかに多種多様な選択圧をかけてスクリーニングを行えるかが、種々の条件に適合した高機能化酵素取得のキーである。また、セルロースの分解には、最低でも数種類の酵素が必要であることから、1種類の酵素のみを高機能化するよりも、酵素カクテルとしての活性を向上させることが重要であると考えられる。

【改変手法】

酵素の改変は、1分子 PCR と無細胞タンパク質合成系を組み合わせた SIMPLEX 法^{1), 2)} (single-molecule-PCR-linked *in vitro* expression) を用い、すべてマイクロプレート上で行った。変異 DNA ライブラリーを各ウェルに構築し、大腸菌由来無細胞タンパク質合成系によりウェル中で直接タンパク質を生産し、直接酵素活性等を評価した。酵素活性測定時の条件を自由に変更できるため、目的とする選択圧下でスクリーニングを行うことが可能であり、また、数種類の酵素共存下での活性測定も可能である画期的な手法である。しかし、改変対象のバイオマス分解関連酵素はカビなどの真核生物由来のものが多く、大腸菌由来無細胞タンパク質合成系により活性型で生産できるか否かが、大きな課題の一つであった。各種シャペロンや PDI (Protein Disulfide Isomerase) などの添加により無細胞合成系を最適化した結果、真核生物由来で、ジスルフィド結合(以下、S-S 結合)を 10 個程度持つセロビオヒドロラーゼ (CBH)、エンドグルカナーゼ、beta-グルコシダーゼ (BGL) など 43 種類の

酵素のうち、39 種類の酵素において活性型での生産することに成功した。目的とする酵素反応場と同条件下でのスクリーニングが可能となり、条件にマッチした酵素の取得が期待できる系が確立できた。

【応用例】

これらの酵素のうち、これまでに乳酸生産酵母の開発を行ってきた背景もあり、まずは単糖にまで分解する BGL をターゲットとした。乳酸生産酵母の表層に提示する BGL を用い、発酵槽の環境 (30~35°C、酸性条件下) と同条件下で活性を測定しスクリーニングすることにより、乳酸生産酵母表層における活性が向上した変異体を取得することができた³⁾。

また、結晶性を含むセルロースの分解において主役となる CBH でも、無細胞タンパク質合成系で、触媒ドメインからセルロース結合ドメインまでの全長配列を活性型で生産できたことにより、スクリーニング系を確立することができた。この系を用いて、セルロース分解活性が向上した変異体を取得した。最終的には、各種変異体の有利変異を相加することにより、他のセルラーゼ 3 種類との共存下での活性が約 6.5 倍に向上した変異体の取得に成功した。現在、CBH の分解効率や安定性を向上することによって、糖化効率を向上し、酵素使用量を低減することを目指している。

【参考文献】

- 1) J. Mol. Biol., 318, 395-405 (2002)
- 2) Protein Engineering, 16, 423-428 (2003)
- 3) Proceedings of Mie Bioforum, 506-511 (2008)

*連絡先 E-mail: chiem@mosk.tytlabs.co.jp