

博士論文

糖資源再生のための効率的糖化技術に関する研究  
(Study on Effective Cellulose Saccharification  
Technology for Glucose Resource Recycling)

鹿児島大学 大学院理工学研究科

博士後期課程 システム情報科学専攻

村岡 仁

# 目次

	Page
要旨	4
<b>第 1 章 バイオエタノール作製技術の特徴およびその技術課題（序論）</b>	<b>7 - 18</b>
1-1 小序論	
1-2 糖を資源としたバイオエタノール技術	
1-3 セルロース由来の糖を資源としたバイオエタノール技術	
1-4 小括	
1-5 引用文献	
<b>第 2 章 前処理技術としての磁性イオン液体の作製と評価</b>	<b>19 - 33</b>
2-1 小序論	
2-2 材料と方法	
2-3 結果と考察	
2-4 小括	
2-5 引用文献	
<b>第 3 章 ファージディスプレイ法を用いた変異CBMの作製と評価</b>	<b>34 - 64</b>
3-1 小序論	
3-2 材料と方法	
3-3 結果と考察	
3-4 小括	

3-5 引用文献

**第 4 章 遺伝子工学的手法によるタンデム化CBMの作製と評価** **65 - 80**

4-1 小序論

4-2 材料と方法

4-3 結果と考察

4-4 小括

4-5 引用文献

**第 5 章 CNTによる複合化したセルラーゼの作製とその評価** **81 - 89**

5-1 小序論

5-2 材料と方法

5-3 結果と考察

5-4 小括

5-5 引用文献

**第 6 章 総括** **90 - 95**

発表文献リスト **96**

謝辞 **97 - 98**

## 要旨

本研究は、糖資源再生のための効率的糖化技術に関するものである。具体的には、近年再生エネルギーとして注目されているバイオエタノールの効率的な産生を実施するため、糖資源としてセルロースを用い、効率的な前処理と糖化技術を開発することを目標とした。糖資源の代表的なものとしては、トウモロコシやサトウキビといった可食系の糖がある。しかしながら再生エネルギーへ変換することを考えると、可食系糖を資源とすれば食物と競合するという問題が発生する。セルロース由来のバイオエタノール技術は近年、環境負荷低減が可能な石油代替エネルギーとして注目されている。そこ本研究では、非可食系の糖資源であるセルロースに注目した。セルロースは木材やイナワラ、食用として利用されない茎や葉に多く含有されることから豊富に存在するが、その構造の堅さからセルロース由来のバイオエタノール技術はいまだ発展途上にある。その技術課題は、前処理および糖化にある。

当該課題に対して、化学的および生化学的な手法を考案し、それぞれの手法について検証した。化学的な手法としては、イオン液体の利用を示した。イオン液体は穏和な条件でセルロースを非結晶化することが報告されており、バイオエタノールの製造効率を向上させる前処理および糖化技術として注目されている。その一方で、イオン液体自体の製造コストが高いことや環境への影響が未知であることが課題となっている。そこで、磁石で回収し再利用することを目的とし、磁性を有した新規のイオン液体を作製し、その特性、非結晶化効率、および回収効率について評価した。

生物学的な手法としては、セルロースを非結晶化する酵素（セルラーゼ）の

改変を試みた。具体的には、糸状菌*Trichoderma reesei*に由来するセルラーゼの一つであるCellobiohydrolases II (CBH II) のCellulose Binding Module (CBM) タンパク質を用いて、2つの取組みを実施した。一つは、ファージディスプレイ法によりCBM変異体タンパク質を提示したファージライブラリを作製し、バイオパニングによりセルロースへの結合力が向上したCBM変異体タンパク質の選択を実施した。そして、結合力が及ぼすセルロースの非結晶化への影響について評価した。もう一つは、遺伝子工学的な手法でCBMを2つ連結したタンデム型のCBMを作製し、その機能について確認した。これらの結果、CBM変異体タンパク質を提示したファージライブラリからはセルロースに対する結合力の高いCBM変異体タンパク質が得られなかった。一方で、遺伝子工学的手法にてタンデム化したCBMタンパク質は、アビディティ効果により単独のCBMタンパク質に対して結合力が向上することが確認された。その結合力の向上によりセルロースの非結晶化が促進することは確認できなかったが、CBMタンパク質もしくはタンデム化CBMタンパク質を加えることによって、酵素（セルラーゼ）のセルロース糖化効率を向上できることを確認した。

さらに、セルロースの糖化を向上する取組みとして、セルラーゼの複合体を作製し、糖化効率の向上について確認した。セルラーゼは大きく分類される三種類の酵素が協奏的に働くことにより、セルロースを分解（糖化）し、グルコースを産生することが知られている。ここでは、セルラーゼの複合体を形成するためにカーボンナノチューブ (CNT) を用い、CNT上へセルラーゼを吸着固定した。CNT複合体によりセルロースを糖化したところ、複合体を形成していないセルラーゼに対して糖化効率がおよそ2倍向上したことから、簡単な手法により複合体を形成することで糖化効率を向上できることを示した。

まとめると、磁性を有した新規のイオン液体である[*cmmim*] $\text{FeCl}_4$

(1-carboxymethyl-3-methylimidazolium FeCl<sub>4</sub>) はセルロースの非結晶能力を有し、さらに磁性体により回収できることが確認された。また、遺伝子工学的に作製したCBMタンパク質は連結（タンデム化）することでセルロースへの結合力を向上することが確認された。CBMタンパク質もしくは結合力の向上したタンデム化CBMタンパク質を酵素（セルラーゼ）と混合することで、セルロースの糖化を促進できることを示した。さらには、セルラーゼを簡単な方法により複合体化することで、糖化効率を向上できることを示した。これらの技術は産業利用上、バイオエタノール産生コスト低減に役立つと考えられる。

# 第 1 章

## バイオエタノール作製技術の特徴およびその技術課題

### 1-1 小序論

近年、CO<sub>2</sub>濃度の上昇により地球の気温の上昇や各地の熱帯化、海水面の上昇などといった環境問題が発生している（図1）。その原因の一つとして、化石燃料の消費が挙げられており、世界的な石油使用量の増加からも環境負荷となっていることが見てとれる（図2）。石油は近代化社会には必要不可欠なものであり、多くの国が近代化を目指す中、今後その使用量が急速に減少することは考えにくい。また、その用途は電気や暖房などの熱源や輸送機関などの動力源だけでなく化成品の原料などにも広く使用されているため、代替技術の一つひとつ創り出し置き換えることで使用量を減らすことは容易ではない。そこで、

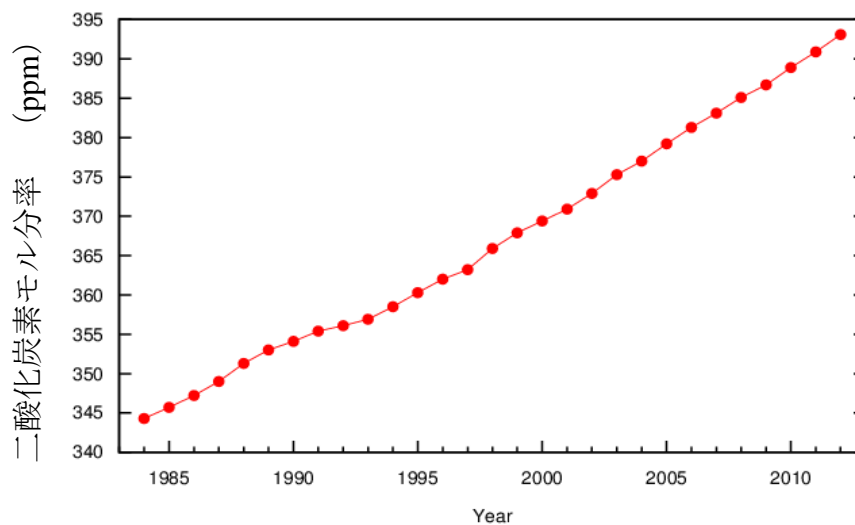


図1. 世界の平均二酸化炭素モル分率。1900年後半から単調増加を示し、地球温暖化の原因の一つとされている。

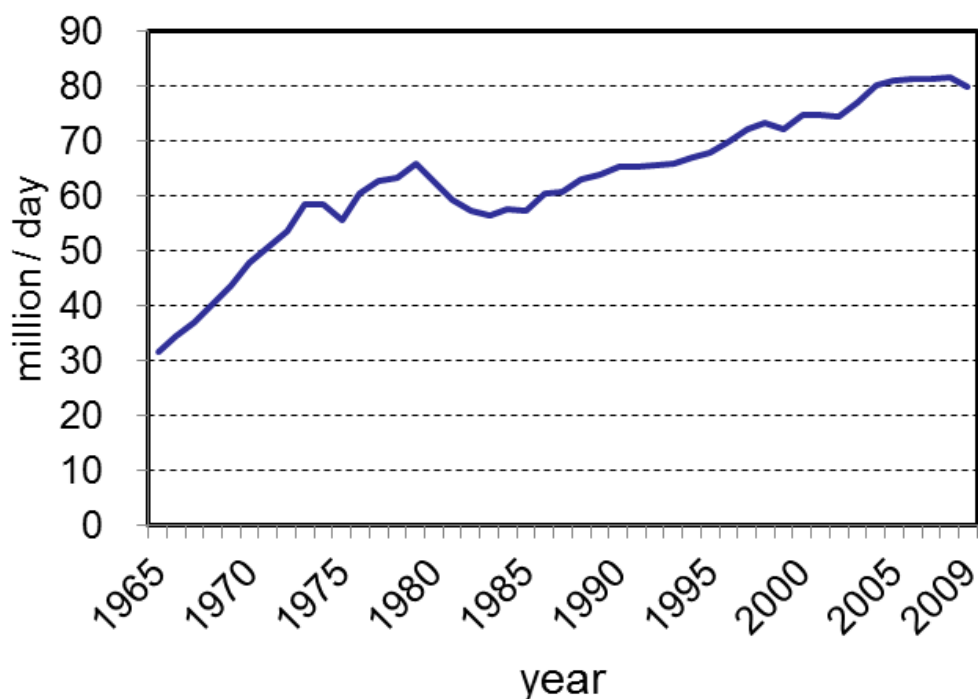


図2. 世界の石油使用量。1900年後半以降，単調増加を示す。地球温暖化が問題視され始めて以降も，使用量が増加している。

石油の化学的特長を有した化合物を産生することができれば，今までの技術を大きく変更することなく，石油依存的な社会から開放されると考えられるが，CO<sub>2</sub>の増加という問題はやはり解決することができない。

このような状況の下，バイオ燃料が注目されている。バイオ燃料は，炭化水素を主成分とする石油と同様に扱うことが可能で，石油代替として注目を集めている。バイオ燃料の一つの大きなメリットは，CO<sub>2</sub>を吸収する植物や植物由来の油を原料とすることにある。石油は百万年以上の長い時間を経て，土中において自然がつくりだしたものである。そのため，一度使用してしまうと人為的に作製することは事実上困難であり，CO<sub>2</sub>を生み出し続けることとなる。しかしながら，バイオ燃料はCO<sub>2</sub>を吸収する植物に由来することから，環境負荷がすくないエネルギー源であると考えられている。特にバイオエタノールは，石油の代替エネルギーとして2000年代半ばからにわかに動きが活発化し，世界的に市



場が拡大する兆しを見せている。2012年のバイオ燃料市場は数百億円の見込みであるが、現在の自動車燃料市場が十兆円前後であることを考えると、将来は数千億円ほどの市場に成長する可能性が十分にある。また、動力源としてだけでなく、循環型の熱源や化成品としても注目され、その市場はさらに大きなものになると考えられる。これらのことから、バイオエタノールは環境負荷へ配慮した石油代替品として大きな可能性を秘めている。

## 1-2 糖を資源としたバイオエタノール技術

バイオエタノールは、トウモロコシやサトウキビといったCO<sub>2</sub>を吸収して育つ植物を原料とするため、CO<sub>2</sub>排出を低減できる石油代替エネルギーとして注目を集めている。しかし、これらの植物の利用は食物との競合という新たな問題を秘めている。

バイオエタノールの原料のひとつであるトウモロコシでは、アメリカが主要生産国である。アメリカのブッシュ元大統領は、2006年1月の一般教書演説で、アメリカは石油依存からの脱却を言及した。そこで石油燃料代替としてエタノールの拡大を表明したことをきっかけに、アメリカ中西部の穀倉地帯でエタノールの生産工場の新設が進み、トウモロコシの作付けが高水準となった。しかし、このようなトウモロコシの生産急拡大による他の穀物の縮小や、エタノール向け需要増しに伴うトウモロコシ相場の高騰などが、社会的な問題として指摘されるようになった。2007年初頭におけるトウモロコシの価格はそれまでのおよそ倍にまで高騰した。さらに、トウモロコシは食料としてのみならず家畜の飼料としても大きな割合を占めるため、食肉や乳製品といった商品もトウモロコシの価格の上昇と共に値上がりし、やがて小麦や米のような他の穀物の価格へも影響すると考えられる。

一方でサトウキビの主要生産国であるブラジルでも同様に、バイオエタノール生産量が増加している。2000年に106億リットルであったブラジルのバイオエタノール生産量は、2007年以降は270億リットルを超えるなど、およそ2.5倍に拡大している。フレックス車（FFV：Flex Fuel Vehicle）といったガソリンとエタノールが混合可能な車が普及し、国を挙げてバイオエタノールの生産、利用が推し進められている。しかしながら、サトウキビも先に述べたトウモロコシと同様に食物との競合問題は避けられない。バイオエタノール生産拡大によるサトウキビ栽培の作地拡大が、アマゾンの森林伐採に少なからず影響を与えているとの指摘もある。

いずれにおいても近年、石油燃料の高騰が原因となり、農産物を食料としての価値からエネルギー資源の価値へシフトする政策によって、エタノールの生産増大が新たな食物との競合を生み、安定した価格を維持できないといった問題が生じている。

そこで近年では、木材などの非植物であるセルロース由来の糖を資源とする次世代のバイオエタノールが注目されている。セルロースもスターチと同様にグルコースのポリペプチドである。スターチは、 $\alpha$ グルコースがグリコシド結合するため、らせん状かつ所々分岐を有する構造をしている。この構造によりスターチは結晶性を有さず、水に可溶で酵素（アミラーゼ）の分解を受けやすく、グルコースまで糖化されやすい性質を持つ。一方でセルロースは、 $\beta$ グルコースがグリコシド結合しており、その構造は直鎖的なポリペプチドである。そのため隣り合うセルロースポリペプチドは互いに水素結合し結晶性を有した構造を形成することで、水に不溶で強固な構造となる。次世代バイオエタノールでは、この結晶性を有するセルロースを原料とする。

次世代バイオエタノール技術では、セルロースの結晶性を解す技術が重要と

なる。すなわち、結晶セルロースの水素結合を効率的に切断し可溶性セルロース（非結晶性セルロース）を生成する技術（前処理技術），および非結晶性セルロースを酵素（セルラーゼ）により効率的に糖化しグルコースに変換する技術（糖化技術）が注目されている。米国エネルギー庁のNational Renewable Energy Laboratory（NREL）の報告によると，生産コストの抑制に効果がある技術として，糖化技術の開発（酵素開発）であり，さらに前処理技術の開発をすることでよりバイオエタノール作製プロセスのコスト削減が可能とされている<sup>1</sup>（図3）。他の報告においても，連続併行複発酵システムの有用性が示唆されている<sup>2,3,4</sup>。

上述のとおり，次世代バイオエタノール技術は未だ発展途上にある。スターチ由来の糖を原料とするバイオエタノールは現在，石油価格と同程度で販売され，技術的にも商業的にも成熟している一方で，次世代バイオエタノールが同程度のコストで生産されるには，前述の前処理および糖化技術の向上を達成する必要がある。

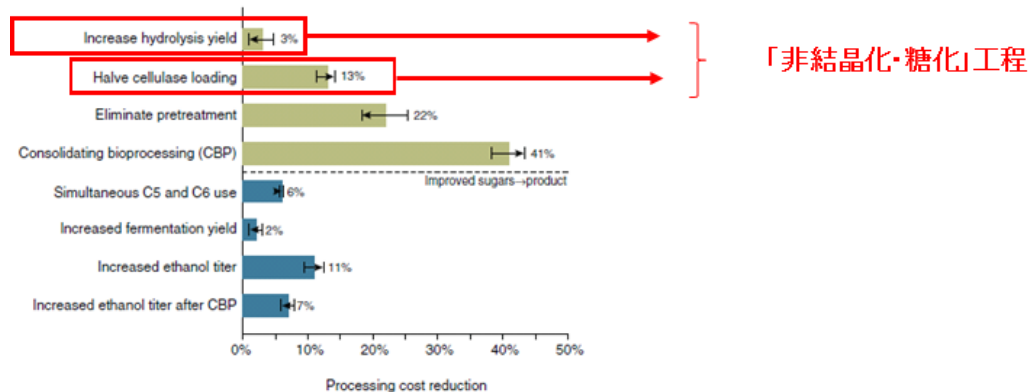


図3 NRELが試算した書く要素技術開発によるコスト削減効率

各プロセスのコスト削減効果で比較すると，前処理および酵素効率が第一目，第二目に開発効果が高いとされている。

### 1-3 セルロース由来の糖を資源としたバイオエタノール技術

次世代バイオエタノール技術の発達により、バイオエタノールは、真に環境にやさしい液体燃料として注目されると考えられる。しかしながら、セルロース由来の次世代バイオエタノール技術は未だ発展途上であり、トウモロコシやサトウキビといったスターチ由来のバイオエタノール技術ほど技術的にも経済的にも成熟していない。これは、バイオエタノールを作製する過程で必要となる糖への分解（前処理、糖化处理）が容易ではないことに起因する。この原因

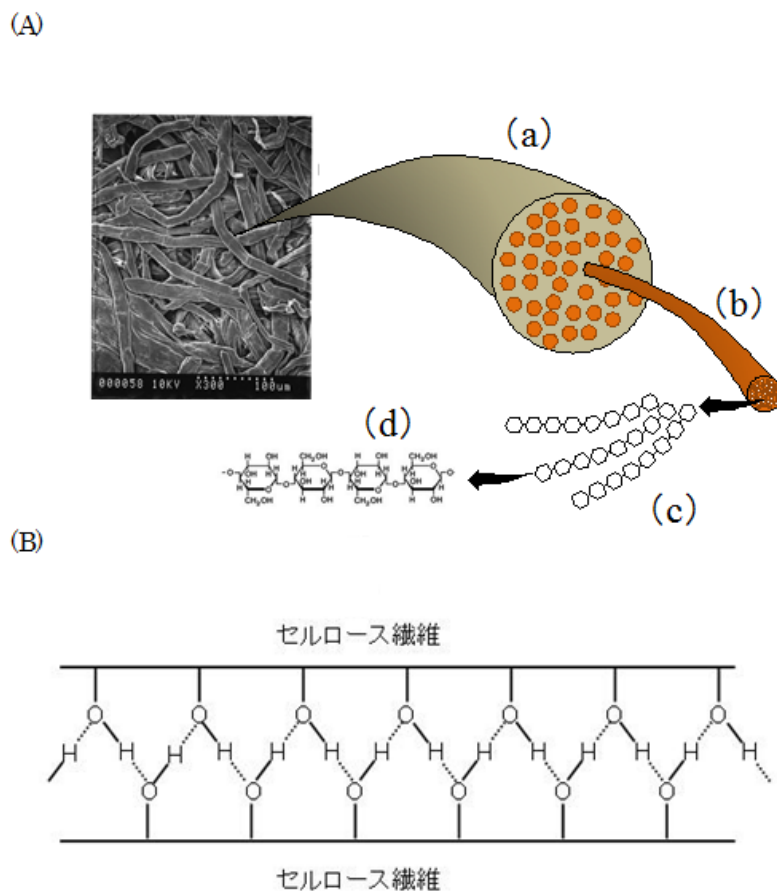


図4 セルロース繊維 (A) とセルロース繊維間の水素結合 (B)。セルロース繊維 (a) , セルロース繊維のマクロフィブリル (b) , マクロフィブリルを構成するミクロフィブリル (c) , ミクロフィブリルを構成するセルロース鎖 (d)。

は、セルロースの「堅さ」にある。セルロースは $\beta$ -グルコースが1位と4位でグリコシド結合した直鎖を形成し、さらに直鎖が相互に水素結合することで束になった構造をとることで、水に不溶となりその堅さを保持する（図4）。

セルロースの持つ堅さを解すには大きなエネルギーを投入する必要がある、その前処理技術について表1にまとめた。その技術は大きく分類すると、物理的方法と化学的方法に分けられる<sup>5,6</sup>。代表的な物理的方法としては、熱水法、超臨界水法、超臨界アセトン法、マイクロ波加熱法、破碎法といったものがある。これらの特徴として、処理時に過剰なエネルギーを投入する必要があるが、多くの方法が水中での処理を可能とするため、バイオエタノール作製プロセスにおいて使用することが多い酵素や酵母といった水中で処理をする必要がある工程への影響が少ない利点がある。一方、化学的方法には酸やアルカリ分解法がある。これらは製紙技術でも広く用いられる手法で、酸もしくはアルカリ触媒による分解で水素結合やグリコシド結合を切断する。物理的な手法に比べて処理時に投入するエネルギーは低いと考えられるが、中和するための薬剤や副産物である塩の処理に問題がある。

近年技術開発が進む中、新たな方法としてイオン液体を用いた前処理・糖化技術が注目されている。イオン液体は、塩のみで構成され常温常圧下において液体であるという性質を持つ。その性質から水や溶媒につぐ、第3の液体とも言われている。そのイオン液体が、比較的温和な条件下において結晶性セルロースを非結晶化し、さらに糖化工程におけるセルラーゼ酵素活性への影響が少ないことが報告されている<sup>7,8</sup>。

水溶性のイオン液体を用いると、水により希釈することで酵素活性が阻害されることはない。しかし一方で、イオン液体の生産にはコストがかかることや環境への影響が未知であることなど課題もある。このように、セルロース由来

のバイオエタノールでは、前処理・糖化技術を中心に未だ開発途上であるが、これら技術の課題を克服することで、石油エネルギーに依存しない環境へ配慮したバイオエタノールを作製することが可能となる。

表1 前処理技術に関する比較表

技術名	化学処理法				物理的処理法			
	イオン液体法	酸分解法	アルカリ分解法	熱水法	超臨界水法	超臨界アセトン法	マイクロ波加熱法 ※他方式との組み合わせ	破砕法
処理概要	セルロースやリグニンがイオン液体に溶けることを利用して、非結晶状態にする。	75%程度の濃い硫酸を使い、木粉を30～40℃の低温下で力強くこねる方法	耐熱耐圧の容器に入れ、アルカリを加え、170～180℃で数時間煮る	NRELプロセス : 下記条件下で前処理を実施。 後処理としてスラリーをろ過及びろ液に消石灰を添加(中和処理)	水を密閉容器の中で374℃以上に加熱し、218気圧以上にすると反応性がとても高くなり、難分解性の有機物を分解することが出来る。	水の代わりにアセトンの使用。	誘電損失により、マイクロ波が物質に吸収され、エネルギーが熱になることによる加熱である	粉碎機(ボールミル等)で数μm(マイクロメートル)～数十μmまで粉碎すること
条件(原料)	100℃以下、60分間 (Cellulose)	30～40℃、数時間 75%wtH2SO4	170～180℃、数時間	190℃、2分間 1.1%wtH2SO4 (Corn stover)	200-320度 (Cellulose, JST F0250A)	—	—	
セルロース可溶化率(%)	～12 (1-methyl-3-ethylimidazolium)	(～100)	(～100)	8	84 (305℃、30秒)	—	—	
短所	1) コスト高 理由: 生産量が少ない。 →回収要(添加剤添加による沈殿回収など)	1) 中和処理必要 2) 酵素阻害分解物発生	1) 中和処理必要 2) 酵素阻害分解物発生	1) コスト高 理由: 反応器にハステロイなどの高価耐食材料を用いる必要。 2) 中和処理必要。 3) 酵素阻害分解物発生	1) コスト高 理由: 臨界温度では反応器圧力が22.1MPa以上必要であり、大規模プラントでは困難。 2) 酵素阻害分解物発生	1) コスト高 2) 酵素阻害分解物発生 3) 危険	1) コスト高 理由: 大きな動力が必要	
長所	1) 温和な条件 2) 特別な設備不要	1) リグニン除去不要。 2) ブドウ糖にすることが出来る。	1) 既存の紙製造プラントを利用可能 2) アルカリリ回収容易	1) 処理時間が短時間	1) 処理時間が短時間	1) 処理時間が短時間 (通常外部加熱処理時間の1/10～1/1000)	1) 化学薬品を未使用	

#### 1-4 小括

石油の代替として、トウモロコシやサトウキビといった食物と競合する糖由来のバイオエタノールが主流である中、食物と競合しないセルロース由来の糖を原料とした次世代バイオエタノール作製に技術がシフトしていることを述べた。しかしながら、セルロース由来の糖を原料とする次世代セルロース技術ではセルロースの堅さを解すための前処理・糖化处理が重要であることから、様々な技術が存在していることを示した。近年注目されているイオン液体について触れ、穏和な条件下で結晶性セルロースを非結晶化しグルコースへ糖化する技術が、石油エネルギーに依存しない環境へ配慮したバイオエタノールを作製することには必要であることに言及した。



## 1-5 引用文献

1. Lynd, L. R., Laser, M. S., Bransby, D., Dale, B. E., Davison, B., Hamilton, R., ... Wyman, C. E. (2008). How biotech can transform biofuels. *Nat Biotech*, 26(2), 169–172.
2. Moukamnerd, C., Kino-oka, M., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., Harashima, S., ... Katakura, Y. (2010). Ethanol production from biomass by repetitive solid-state fed-batch fermentation with continuous recovery of ethanol. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(1), 87–94.
3. Okuda, N., Ninomiya, K., Katakura, Y., & Shioya, S. (2008). Strategies for Reducing Supplemental Medium Cost in Bioethanol Production from Waste House Wood Hydrolysate by Ethanogenic *Escherichia coli*: Inoculum Size Increase and Coculture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(2), 90–96.
4. Okuda, N., Soneura, M., Ninomiya, K., Katakura, Y., & Shioya, S. (2008). Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(2), 128–133.
5. Yi Zheng, Zhongli Pan, R. Z. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agric & Biol Eng*, 2(3), 51-68.
6. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686.
7. Swatloski, R. P., Spear, S. K., Holbrey, J. D., & Rogers, R. D. (2002). Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 124(18),

4974–4975.

8. Kamiya, N., Matsushita, Y., Hanaki, M., Nakashima, K., Narita, M., Goto, M., & Takahashi, H. (2008). Enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous-ionic liquid media. *Biotechnology Letters*, *30*(6), 1037–1040.

## 第 2 章

### 前処理技術としての磁性イオン液体の作製と評価

#### 2-1 小序論

前章においてセルロース由来の糖原料<sup>1</sup>から迅速かつ低コストでグルコース化するためには、セルロースの非結晶化が必要であることを示した。非結晶化効率を向上する取り組みは種々報告されてきているが<sup>2</sup>、本章では化学的手法による非結晶化について検討を実施した。

化学的手法の中で近年注目されているのはイオン液体を用いた方法である。イオン液体とは、常温常圧下において液体状態で存在する塩であり、水でも有機溶媒でもない第三の液体として注目される一連の化合物の総称である。基本的にカチオンには、イミダゾリウム塩類・ピリジニウム塩類などのアンモニウム系、ホスホニウム系イオンなどがあり、アニオンには塩化物イオンや臭化物イオン、トリフラートといったハロゲン系、ヘキサフルオロホスフェートといったリン系、テトラフェニルボレートといったホウ素系などがある。これらを組み合わせることで、多種多様な構造や性質を合成できる。これまでに種々のイオン液体が作製され、その特性や機能が報告されてきた。例えば、

1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphatesや1-butyl-3-methylimidazolium

nitrate<sup>3</sup>などがある。イオン液体に関する技術開発が行われる中、たとえば、

1-butyl-3-methylimidazolium chlorideや1-allyl-3-methylimidazolium chlorideのよう

な高機能化したイオン液体をバイオマスの前処理（セルロースの非結晶化）に利

用する取り組みが注目されている<sup>4,5,6,7,14,15,16</sup>。

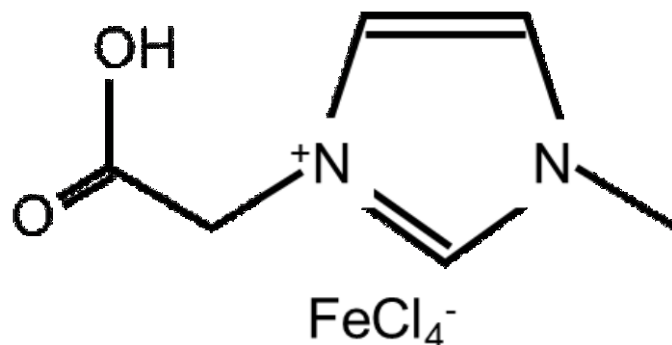


図1 磁性を有したイオン液体。カチオンはアルキル基を有するイミダゾリウムにカルボキシメチル基を付与している。アニオンは磁性を有する  $\text{FeCl}_4^-$  である。

また一方で、イオン液体がセルラーゼ活性へ与える影響やエタノール発酵における酵母への影響があることがわかっている。我々の評価によれば、培養液中に 10 % のイオン液体が存在すると、酵母の増殖が阻害されることがわかった（第 62 回日本木材学会大会（2012/3）「蛍光標識イオン液体含有培地で育成した酵母細胞の観察」より）。これらの問題を解決する一つのアイデアとして、酵素や酵母を投入する以前にイオン液体を回収し、再利用する方法が考えられる。たとえば、シリカゲルへの固定<sup>8</sup>や層液分離<sup>9</sup>などによる回収方法が研究されている。しかしながら、いずれの手法も未だ開発途上にある。

しかしながら、イオン液体は作製コストが高く実用化には未だ開発途上である。

本章では、イオン液体を回収しリユースすることで前処理コストを低減することを目的とし、磁性体<sup>10,11</sup>によって回収できる新規の磁性イオン液体を作製し、その特性と非結晶化能力を実証した。さらには糖化能力を評価した。具体的には、磁性イオン液体として 1-carboxymethyl-3-methylimidazolium  $\text{FeCl}_4^-$  を合成し（図 1），その構造特性と機能評価を行った。

## 2-2 材料と方法

## 磁性イオン液体の作製

クロロ酢酸は東京化成工業株式会社より購入した。FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, N-methylimidazole, n-chloroethanol, acetonitrile, ethyl acetate は和光純薬工業株式会社より購入した。全ての試薬は分析用を使用し、実験時には精製せずに使用した。原料に用いた非結晶性セルロースは、Sigma-Aldrich 社より購入した Avicel PH-101 を用いた。

本研究にて報告する新規の磁性イオン液体 ([cmmim]FeCl<sub>4</sub>) は、2つのステップを経て合成した<sup>12</sup>。図2にその合成過程を示した。まず初めに、1-carboxymethyl-3-methylimidazolium chloride ([cmmim] Cl) を合成した。N-methylimidazole と monochloroacetic acid を無水アセトニトリル中で室温にて6時間攪拌しながら反応させた後、再結晶化することにより白色固体の [cmmim] Cl を得た (収率: 57.0%)。次に、合成した [cmmim] Cl と六水和塩化鉄 (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) を、無溶媒状態で室温にて、1:1 のモル比で混合することで濃褐色液体の [cmmim]FeCl<sub>4</sub> を得た<sup>10</sup>。

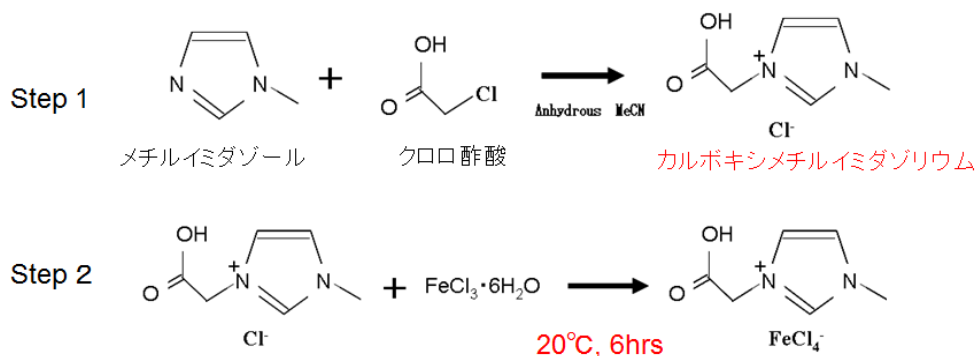


図2 磁性イオン液体の作製方法。N-methylimidazole と monochloroacetic acid を無水アセトニトリル中で反応させ、その後、再結晶化させた。さらに、6水和塩化鉄 (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) と、無溶媒状態で室温にて混合した。

## 磁性イオン液体の特性評価

我々の作製した磁性イオン液体の構造特性について、以下4種類の方法を用

いて確認した。すなわち、吸収波長分析、近赤外ラマン分光測定、NMR 測定、超伝導量子干渉素子による測定を行った。

イオン液体の陽イオン構造を特定するために、吸収波長分析を行った。測定装置は JASCO 社製の紫外可視分光光度計 (V-630) を用いた。アセトニトリルによって 10 倍希釈した磁性イオン液体を 1 mL に調製し、測定には光路長 10 mm のガラス製キュベットを用いた。測定波長は 446 nm を用いた。ブランク測定として、アセトニトリルのみを測定した。コントロールには [cmmim]Cl を用いた。

イオン液体の構造を特定するために、フーリエ変換赤外ラマン分光測定を行った。測定装置は JASCO 社製の FT/IR-6000 を用いた。Q-switched Nd:YAG レーザーの基本波 (1064 nm, 10 kHz, 100 ns) を励起光とし、試料への入射光に対して 90 度方向の散乱光を分光器で波長分解し、分光器としてノッチフィルタシングルモノクロメータを用いて、液体窒素冷却 1024 ch CCD 検出器を用いて検出した。400 - 3150  $\text{cm}^{-1}$  範囲で測定した。コントロールには [cmmim]Cl を用いた。

イオン液体の陽イオン構造とその純度を測定するために、NMR (Nuclear Magnetic Resonance) 測定を行った。測定装置には JEOL RESONANCE 社製の ECX400 を用いた。D<sub>2</sub>O を溶媒とし、分析は <sup>1</sup>H NMR にて行った。コントロールには [cmmim]Cl を用いた。

イオン液体の磁性特性を測定するために、超伝導量子干渉素子 (Superconducting quantum interference device: SQUID) を搭載した高感度磁束測定を行った。測定装置は Quantum Design 社製の MPMS-7 を用いた。-10,000 から 10,000 Oe の磁場を印加し、測定時の温度は 273 K. とした。コントロールのサンプルには [cmmim]Cl を用いた。

## 磁性イオン液体の回収効率

磁石による磁性イオン液体の吸引

ネオジウム磁石（半径 23 mm，中心磁束密度 0.55 T）を用いた。3 mL の純粋が入ったガラス瓶の底に 1 mL のイオン液体を静置し，ガラス瓶の外から磁石を近づけ，その様子をデジタルカメラにより撮影した。また，446 nm の吸収波長を測定することにより，吸光イオン液体を水へ分散させた後，磁石により回収した際の回収率を評価した。

### 磁性イオン液体によるセルロースの非結晶化評価

イオン液体による結晶性セルロースの非晶度を測定するため，X 線回折 (X-ray diffraction, XRD) を行った。測定装置にはリガク社製の Ultima IV を用いた。異なる量の結晶性セルロース (0, 2, 5 and 10 mg) をイオン液体 (102 mg) にて非結晶化処理をした。処理時間は 1 時間とし，処理温度は 80°C とした。室温まで放冷後，1 ml の 200 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を加え，セルロースを再生させた。結晶性セルロース及び上記の再生セルロースの結晶状態を測定した。

### 磁性イオン液体で非結晶化したセルロースを用いた糖化評価

セルロースを糖化するために，セルラーゼ酵素を用いた。セルラーゼは *Trichoderma reesei* ATCC 26921 由来を Sigma-Ardrich 社 (C8546) より購入した (4 units/mg)。糖化処理の方法を以下に示す。イオン液体で処理したセルロースを，1 mL の 10 mM クエン酸バッファ (pH 5.0) を用いて 3 回洗浄し，その後 12 時間凍結乾燥した。5 mg の凍結乾燥後のセルロースを，10 mg のセルラーゼ酵素を用いて糖化処理した。バッファは 10 mM クエン酸溶液を用い，処理温度は 37 °C，処理時間は 6 時間とした。処理後に上清を回収し，上清中に含まれるグルコース量を酵素法 (グルコースアッセイキット，フナコシ社) にて定量した。イオン液体のコントロールには，一般的にセルロースを非結晶化する際に利用される

1-ethyl-3-methylimidazolium acetate (BASF社) を用いた。

## 2-3 結果と考察

### [cmmim]FeCl<sub>4</sub>の合成

本研究にて合成した化合物は室温において濃褐色液体状態であり，図 3 (b)

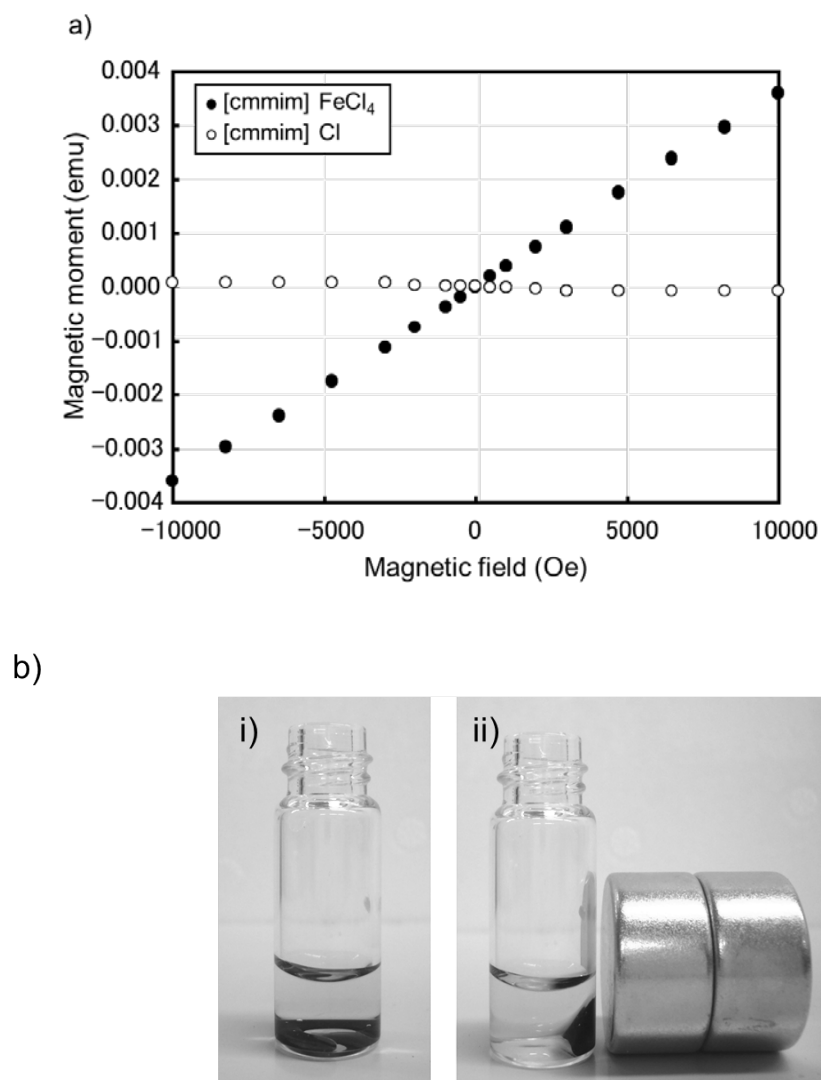


図 3 SQUID による磁性の評価

SQUID による磁化率の測定 (a) 水中に静置したイオン液体 (a) と磁石により引き寄せられたイオン液体 (b)。



で示したように磁石に引き寄せることができた。

また、SQUID 法による磁束密度の測定から、本磁性イオン液体が磁性を有することが確認された (図 3 (a))。

一方、この化合物は吸光度測定において 530 nm 付近に吸収極大を有しており (図 4)、さらにそのラマンスペクトルには  $330\text{ cm}^{-1}$  に  $\text{FeCl}_4^-$  帰属されるバンドがあることから、アニオンが  $\text{FeCl}_4^-$  であることを確認した (図 5)。

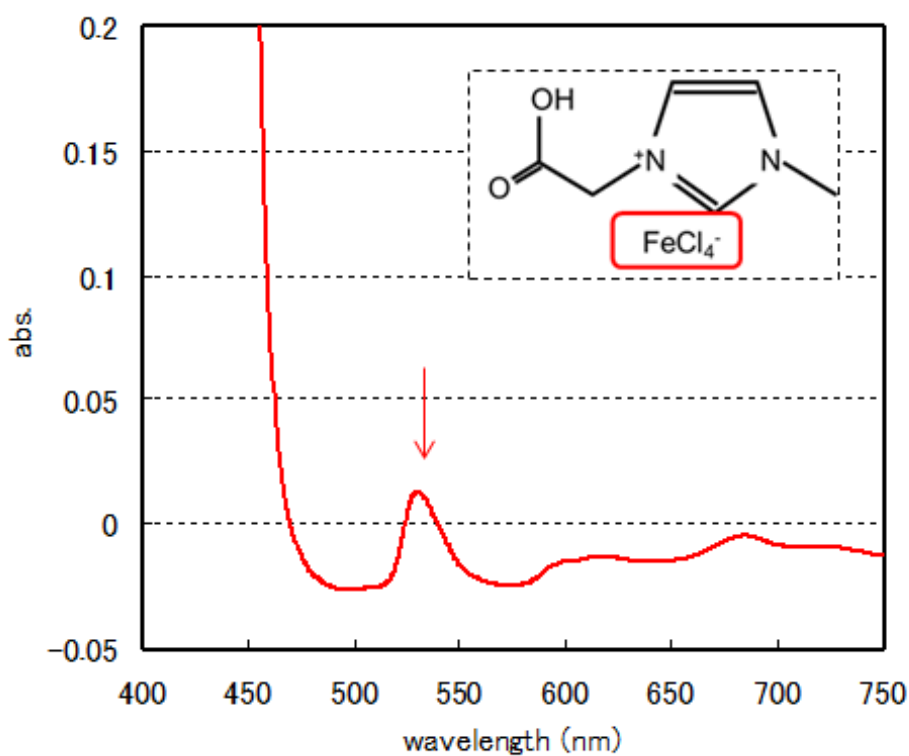


図 4 合成したイオン液体の吸光度測定。矢印はアニオンに含まれる  $\text{Fe}^{3+}$  に依存する 530 nm 付近。

また  $400 - 1600\text{ cm}^{-1}$  領域のラマンスペクトルが最初に合成した  $[\text{cmmim}]\text{Cl}$  の液体のラマンスペクトルと比較すると非常によく似ていることからカチオンが  $[\text{cmmim}]^+$  であることを確認した。さらに、NMR 測定 ( $^1\text{H}$  NMR spectrum, NMR sp3.78 s (3H,  $\text{CH}_3$ ); 4.95 s (2H,  $\text{CH}_2$ ); 7.34 (1H, CH); 7.35 (1H, CH); 8.46 (1H, CH)) から、合成物が  $[\text{cmmim}]\text{FeCl}_4$  であると同定した。

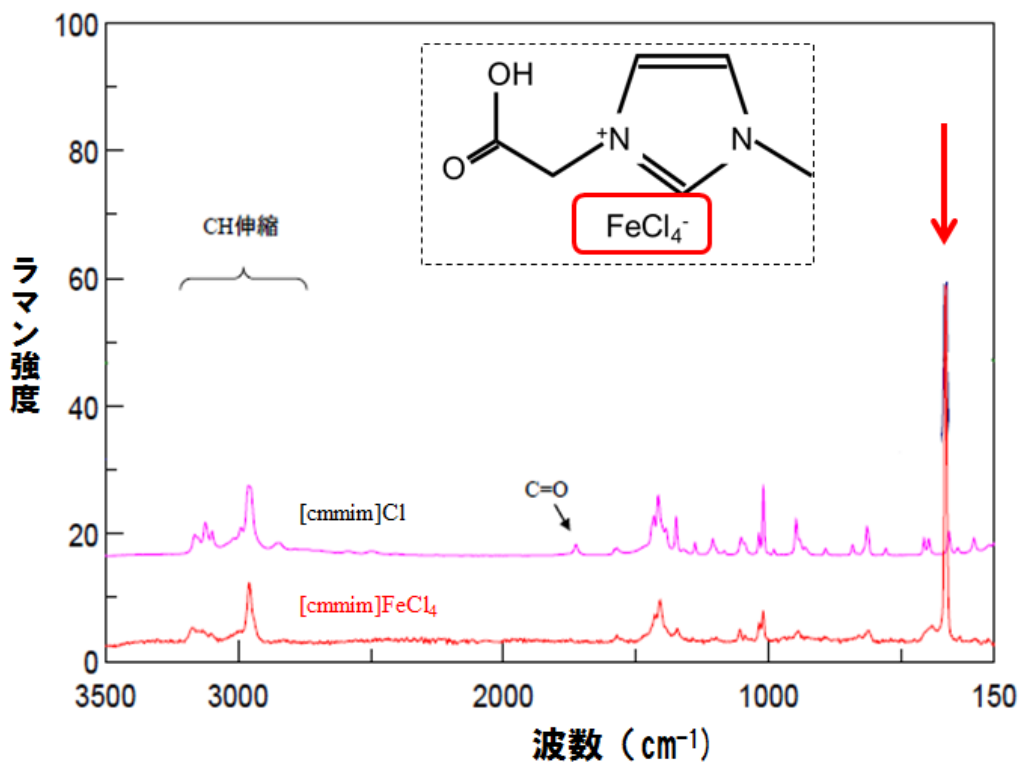


図5 ラマンスペクトル測定によるイオン液体構造の確認。[cmmim]Clのラマンスペクトル (a) と、本研究にて合成した[cmmim]FeCl<sub>4</sub> (b) のラマンスペクトル。矢印は FeCl<sub>4</sub> に特徴的な 330cm<sup>-1</sup> のピークを示す。

### [cmmim]FeCl<sub>4</sub> によるセルロース溶解性の評価

結晶性セルロースを[cmmim]FeCl<sub>4</sub> で溶解した後の再生セルロースの結晶性をX線回折により解析した結果、再生セルロースでは、結晶性セルロースが有する特徴的なピーク(2θ = 22.6°および 19.0°)が減少していることがわかった(図6 (b))。このことから、再生セルロースではアモルファス状態、つまり結晶性が崩れていることを確認した。

上記ピークの結晶化指数度(CI)を比較するために、イオン液体中に重量割合で10wt%, 5wt%, 2wt%の結晶性セルロースを混合し処理した<sup>13</sup>。比較したところ、イオン液体で処理された再生セルロース(10wt%)は、イオン液体で処理されていない結晶性セルロースに比べて、74%となっていた。また、再生セルロース(5wt%)では68%、再生セルロース(2wt%)では31%となり、イオン液体で処理する際に混合する結晶性セルロースの割合が低いほどCIの割合がさがり、つまり非結晶化度が向上することがわかった。

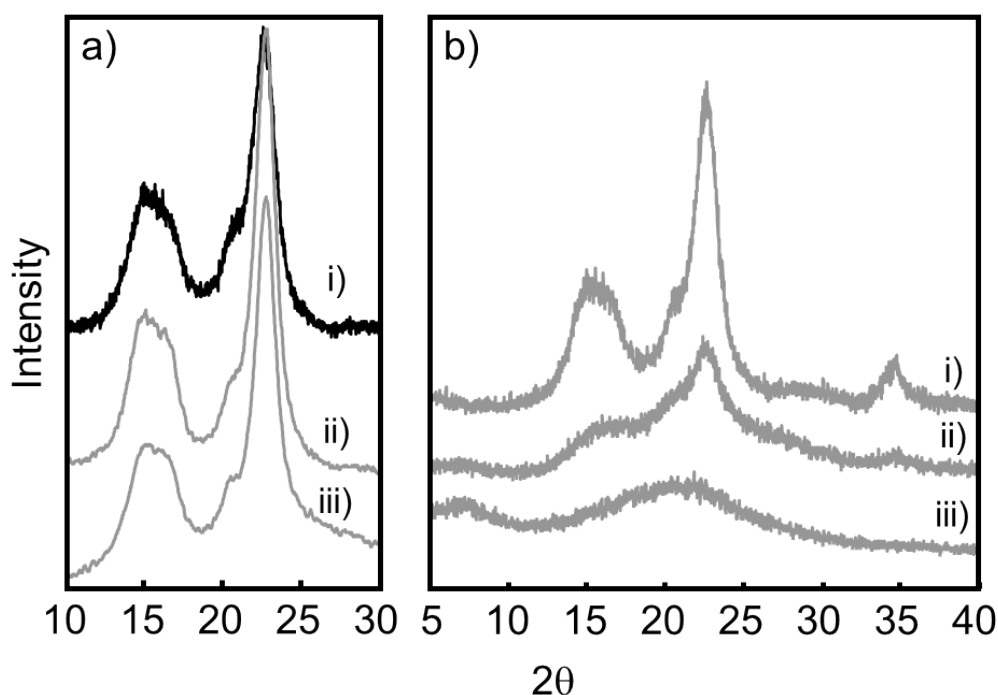
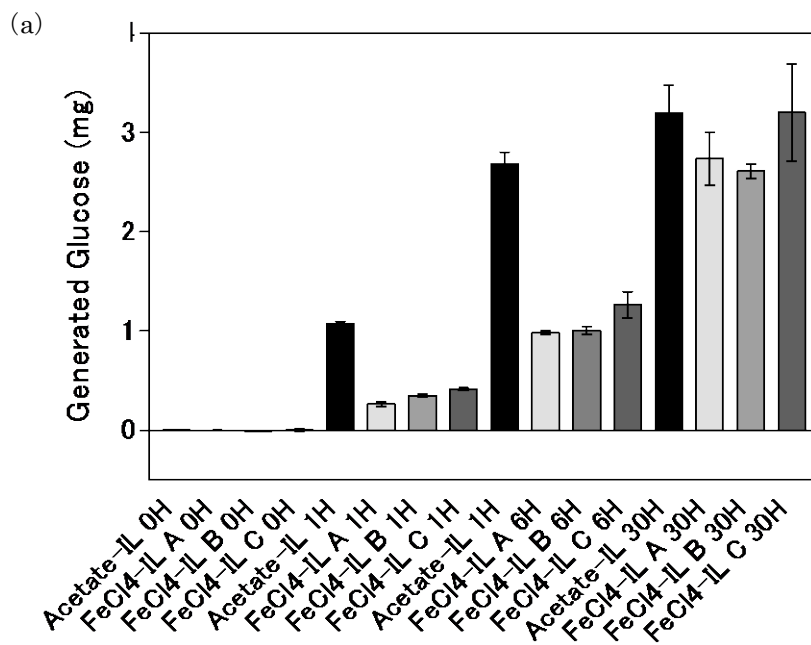


図6 XRDによるセルロースの非結晶化の評価。結晶セルロースのXRD(a-i)。比較として用いた[bmim]FeCl<sub>4</sub>により非結晶化されたセルロースのXRD;セルロース5wt%を処理した場合(a-ii)と2wt%を処理した場合(a-iii)。本研究で作製した[cmim]FeCl<sub>4</sub>により非結晶化されたセルロースのXRD;セルロース10wt%を処理した場合(b-i)と5wt%を処理した場合(a-ii)と10wt%を処理した場合(a-ii)。

一方で、比較としてイオン液体[bmim]FeCl<sub>4</sub>で処理した場合77%となり、本イオン液体はこのイオン液体より非結晶化能力が高いことがわかった。

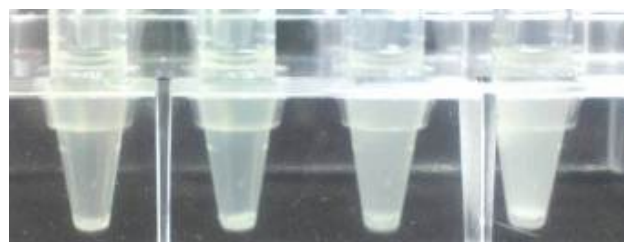
## 非結晶化されたセルロースを用いた産生グルコースの評価

非結晶化したセルロースを用いることで糖化プロセスが進行することを確認するために、セルラーゼを用いて産生されるグルコース量を測定した。測定方



(b)

### 30 時間セルラーゼ処理後の反応液



Acetate-IL 10%    FeCl4-IL A (2%)    FeCl4-IL B (5%)    FeCl4-IL C (10%)

図 7 イオン液体により非結晶化されたセルロースを酵素で糖化したときのグルコース生成量 (a) とセルラーゼ処理 30 時間後の反応溶液 (b)。

法として、酵素法を用いたグルコースアッセイキット (Funakoshi 社) を用いた。イオン液体の非結晶化能力を計測するため、イオン液体に対するセルロースの量を 2w/v%, 5w/v%, 10w/v% として処理した。

図 7 に示すように、[cmmim]FeCl<sub>4</sub> により非結晶化されたセルラーゼからグルコースが産生されていることが確認された。糖化開始から 6 時間後のグルコース量を Acetate-IL と比較すると、約 4 割程度の産生量であった。一方で、糖化開始から 30 時間後では最終の生成グルコース量が変わらなかった。

しかしながら、図 7 で示す 30 時間処理後の反応溶液の写真では、イオン液体に対するセルロースの量を 2w/v%, 5w/v%, 10w/v% とした場合、明らかにその濁度に違いがみられた。

濁度が低いほどセルロースが糖化されていると考えられるため、生成グルコース量に違いが現れるはずである。これは、イオン液体が非結晶化する作用機序が異なることで、我々の作製したイオン液体では最終生成物であるグルコースまで糖化されずに、セロビオースなど中間生成物の状態で糖化が止まってしまっていることが考えられる。

### 水に溶解したイオン液体の磁石による回収評価

水に分散したイオン液体を磁石により回収できれば、イオン液体をリユースすることが可能となる。そこで、分散させたイオン液体を磁石により回収し、その回収効率を計測した。吸収波長 466 nm のピークで比較すると、水層に残るイオン液体の量と磁石により回収された量を比較すると、約 80% が水層に存在することが確認された。つまり、約 20% だけが、磁石により回収されたことになる。この回収率は十分ではないが、今後イオン液体のさらなる構造設計により改善されると考えられる。

## 2-4 小括

セルロースを非結晶化する一つの手法として、新規の磁性イオン液体 1-carboxymethyl-3-methylimidazolium FeCl<sub>4</sub> を作製した。吸収波長，ラマン分光，NMRにより分析した結果，目的のイオン液体が作製されていることが確認された。イオン液体によるセルロースの非結晶化をX線回折により確認した結果，非結晶化できていることが確認されたが，処理をするセルロースの量が増加すると，非結晶化効率が下がることがわかった。

さらに，非結晶化セルロースをセルラーゼにより糖化することでグルコースが産生されることが確認された。

最後に，水に溶解したイオン液体を磁石により回収し，その回収効率を確認したところ，約20%の回収効率であることが確認された。

## 2-5 引用文献

1. Sims, R. E. H., Mabee, W., Saddler, J. N., & Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource technology*, *101*(6), 1570–80.
2. Zhu, S., Wu, Y., Chen, Q., Yu, Z., Wang, C., Jin, S., ... Wu, G. (2006). Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. *Green Chem.*, *8*(4), 325–327.
3. Macchiagodena, M., Gontrani, L., Ramondo, F., Triolo, A., & Caminiti, R. (2011). Liquid structure of 1-alkyl-3-methylimidazolium-hexafluorophosphates by wide angle x-ray and neutron scattering and molecular dynamics. *The Journal of chemical physics*, *134*(11), 114521.
4. Swatloski, R. P., Spear, S. K., Holbrey, J. D., & Rogers, R. D. (2002). Dissolution of Cellose with Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, *124*(18), 4974–4975.
5. Shill, K., Padmanabhan, S., Xin, Q., Prausnitz, J. M., Clark, D. S., & Blanch, H. W. (2011). Ionic liquid pretreatment of cellulosic biomass: enzymatic hydrolysis and ionic liquid recycle. *Biotechnology and bioengineering*, *108*(3), 511–20.
6. Taya, P. M., Moniruzzaman, M., Nakashima, K., Kamiya, N., & Goto, M. (2010). Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal*, *48*(3), 295–314.
7. Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, *29*(6), 675–685.

8. Sasaki, T., Tada, M., Zhong, C., Kume, T., & Iwasawa, Y. (2008). Immobilized metal ion-containing ionic liquids: Preparation, structure and catalytic performances in Kharasch addition reaction and Suzuki cross-coupling reactions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 279(2), 200–209.
9. Fukumoto, K., Yoshizawa, M., & Ohno, H. (2005). Room Temperature Ionic Liquids from 20 Natural Amino Acids. *Journal of the American Chemical Society*, 127(8), 2398–2399.
10. Hayashi, S., & Hamaguchi, H. (2004). Discovery of a Magnetic Ionic Liquid [bmim]FeCl<sub>4</sub>. *Chemistry Letters*, 33(12), 1590–1591.
11. F. Makaev, E. Styngach, V. Muntyanu, S Pogrebnoi, Z. Rybkovskaya, and A. Barba, *Russ. J. Org. Chem.*, 43, 10, 1512 (2007).
12. S. Yeon, K. Kim, S Choi, H. Lee, H. S. Kim and H. Kim, *Electrochim. Acta*, 50, 5399 (2005).
13. Nelson, M. L., & O'Connor, R. T. (1964). Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. *Journal of Applied Polymer Science*, 8(3), 1325–1341.
14. Tan, H. T., Lee, K. T., & Mohamed, A. R. (2011). Pretreatment of lignocellulosic palm biomass using a solvent-ionic liquid [BMIM]Cl for glucose recovery: An optimisation study using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1862–1868.
15. Ohno, H., & Fukaya, Y. (2009). Task Specific Ionic Liquids for Cellulose Technology. *Chemistry Letters*, 38(1), 2–7.



16. Vitz, J., Erdmenger, T., Haensch, C., & Schubert, U. S. (2009). Extended dissolution studies of cellulose in imidazolium based ionic liquids. *Green Chemistry*, 11(3), 417.

## 第 3 章

### ファージディスプレイ法を用いた変異CBMの作製と評価

#### 3-1 小序論

セルロースは、植物細胞壁成分中の約50%を示す多糖であり、天然で最も豊富に存在する有機物である。地球上では年間  $10^{10}$  -  $10^{11}$  トンが光合成によって生産されていると報告されているが、利用されているのはごく一部であり、用途もほとんどが紙や建材といった繊維(fiber)としての利用にとどまっている。近年は、CO<sub>2</sub>削減や原油高といった社会的背景を受けて、セルロース系バイオマスを利用したバイオエタノールの生産やバイオリファイナリーといったセルロースの新しい利用への期待が高まっている。セルロースは重合度が  $10^3$  -  $10^4$  程度のグルコース（ブドウ糖）のホモポリマーであり、その化学組成はデンプンとまったく同じであるが、その大きな重合度のためセルロースは結晶性を示し、容易には加水分解が進行しない。したがって、セルロースを工業的に利用するためには、まず結晶性セルロースを加水分解して単糖にする糖化過程が必須となる。

本研究では、この糖化過程において利用できる、結晶性セルロースに対し高い加水分解効率を有するセルラーゼの開発を目標に、セルラーゼの一種であるセロビオヒドロラーゼ(CBH)が有するセルロース結合モジュール (CBM) の改変を試みる。セルラーゼは大きく分類して3つの酵素から成り立ち、協奏的にセルロースへ働くことで糖化を行っていると考えられている。すなわち、結晶性セルロース鎖中に存在するアモルファス状セルロースをランダムに切断するエンドグルカナーゼ (EG) , セルロースの末端からセロビオースを遊離するセロビオヒドロラーゼ (CBH) , およびセロビオースやセロオリゴ糖の非還

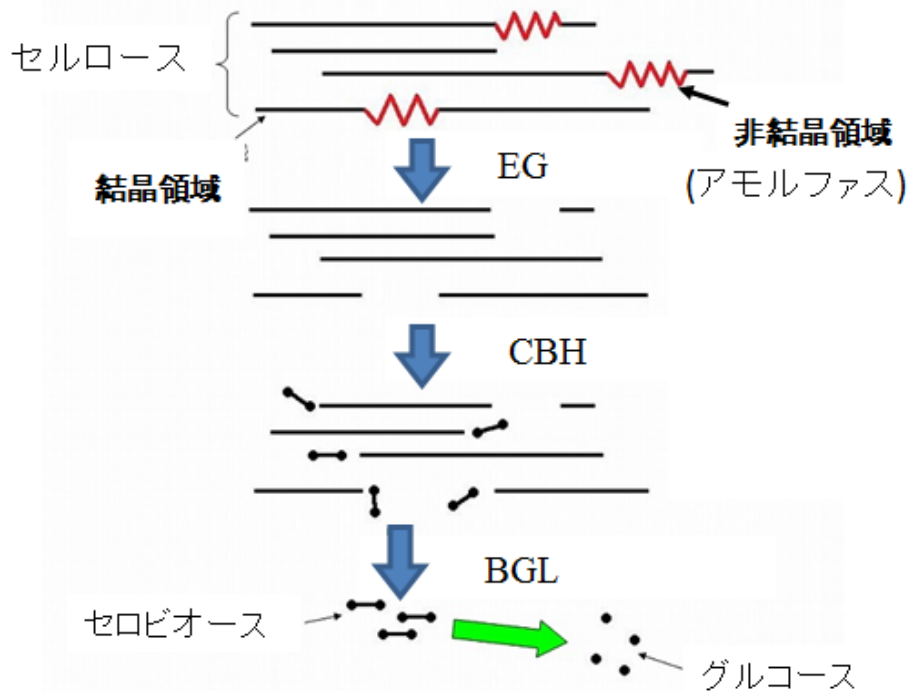


図1. セルラーゼの協奏的な糖化プロセス

セルラーゼは大きく分類して3つの酵素から成り立ち、協奏的にセルロースへ働くことで糖化を行っていると考えられている。セルロースの末端からセロビオースを遊離するセロビオヒドロラーゼ (CBH)、セルロース鎖をランダムに切断するエンドグルカナーゼ (EG)、およびセロビオースやセロオリゴ糖の非還元末端からグルコースを遊離する $\beta$ -グルコシダーゼ (BGL)。

元末端からグルコースを遊離する $\beta$ -グルコシダーゼ (BGL) である。まず、EGが結晶性セルロースのアモルファス (非結晶部) を分解し、CBHがその分解された末端からセロビオース (二糖) にまで分解する。最後にBGLがグルコースに分解する (図1)。中でもCBHは、大きく2つの部位、即ち、触媒モジュール (CD)とCBMからなるが、セルロースを糖化する際にまずCBMの作用によりセルロースへ吸着し、次に CDの活性によりセルロースを加水分解する(図2)<sup>1</sup>。

CBMにはその構造からA, B, Cの3つのタイプに分類されている<sup>2</sup>。タイプAは、結晶性セルロースにのみ結合し、その構造はセルロースの結晶面に結合す

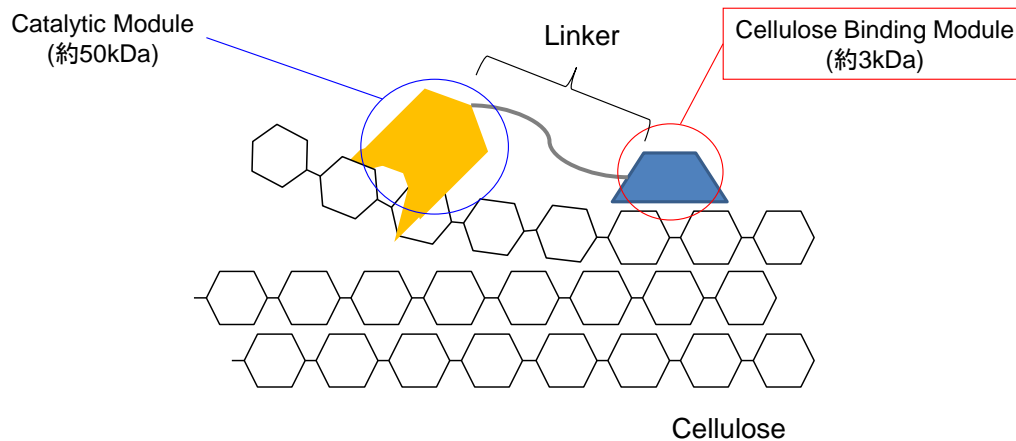


図2 一般的なCBHの構造モデル。

触媒部位（約50kDa）とセルロース結合部位（約3kDa）がリンカーによってつながっている。

るため一部が平面となっている（図3（a））。タイプBは、結晶性が崩れモノマーとなったセルロースの側面に結合し、その構造は鞍型となっている（図1（b））。タイプCは、モノマーとなったセルロースの末端に結合し、その構造は一部が窪んだキャップ型となっている（図1（c））。一般的に、糖化におけるCBMの役割は触媒部位がセルロースによりアクセスするようにセルロースへ吸着する役割をはたしている。高速AFMを用いた観察によると、CBMを有するCBHは結晶性セルロースの表面を遊走していることから、結晶性セルロース表面を分解しながら移動していることが報告されている<sup>3</sup>。また、CBMを有するセルラーゼが木綿の表面をほぐすこと<sup>4</sup>や、CBMを遺伝子工学的に酵素活性部位と結合することで、セルロースの糖化がより進行することが報告されている<sup>5</sup>。しかしながら、CBMの結合力が及ぼす非結晶化への影響はわかっていない。CBM変異体ライブラリーのバイオパニングにより、高結合力を有する変異体を獲得する取組みを実施した報告があるが、非結晶性への影響について調べられた報告は少ない。一方で、CBHには、CBMがN末端側に存在するCBH IとC末端側に存在するCBH II

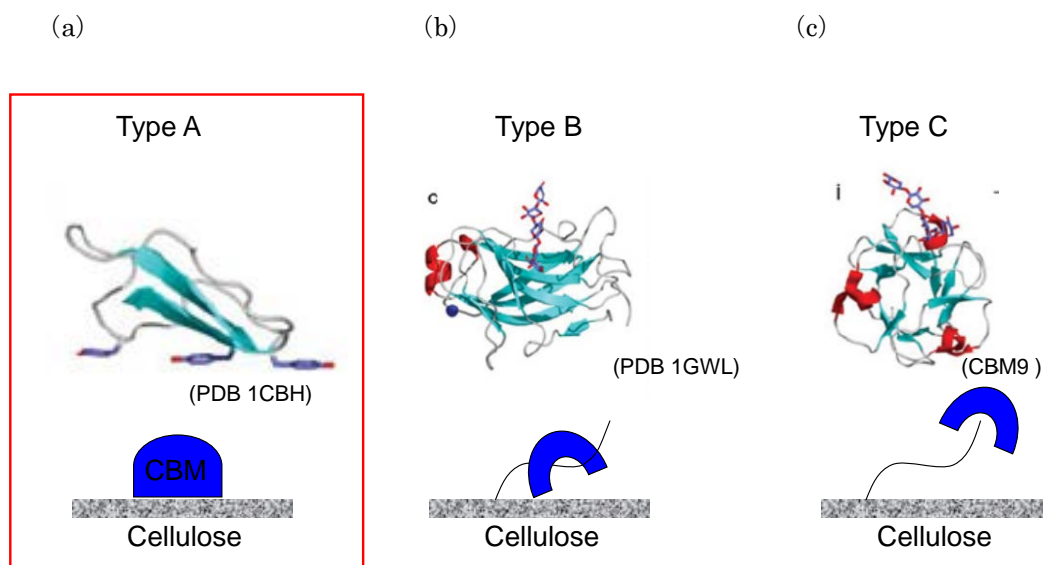


図3 CBMはその構造と機能によって3つのタイプに分類される。平面構造を有し結晶性セルロース表面に結合するタイプA (a)，鞍型構造を有しセルロース鎖の側面に結合するタイプB (b)，キャップ構造を有しセルロース鎖の末端に結合するタイプC (c)。

が存在するが、既報ではそのほとんどがCBH IのCBMについてであり、本研究で用いたCBH IIのCBMに関する報告は数が少ない。

そこで本研究では、CBH IIのCBMのセルロースへの吸着能力と結晶性セルロースの非結晶化およびそれに伴う糖化との関係性を明らかにすることを目指す。具体的には、タイプAの構造を有するCBMの遺伝子において三次元構造を考慮してランダムに変異を導入し、ファージディスプレイ法を用いて構築したライブラリーから、バイオパニングにより高結合のCBMを選択した。

### 3-2 材料と方法

#### CBMの配列および遺伝子

*Trichoderma reesei* (ATCC No. 56765, *Trichoderma reesei* Simmons, anamorph) は、セルラーゼを産生する糸状菌であり<sup>6</sup>、セルロースを用いたバイオマス資源の糖化工程では頻繁に利用されている。そこで、この*Trichoderma reesei*由来のセロビオハイドロラーゼ II (CBHII : protein\_id="AAA34210.1") が有するCBMのアミノ酸配列を、クローニングに用いた(図4)。

```
MIVGILTTLATLATLAASVPLEERQACSSVWGQCGGQNWSGPTCCASGST
CVYSNDYYSQCLPGAASSSSSTRAASTTSRVSPPTTSRSSSATPPPGSTTT
RVPPVGSATATYSGNPFVGVTPWANAYYASEVSSLAIPSLTGAMATAAAAV
AKVPSFMWLDLTKTPLMEQTLADIRTKNGGNYAGQFVVYDLPDRDCA
ALASNGEYSIADGGVAKYKNYIDTIRQIVVEYSDIRTLVIEPDSLNLVTLNLG
TPKCANAQSAYLECYAVTQLNLPNVAMYLDAGHAGWLGWPANQDPAAQ
LFANVYKNASSPRALRGLATNVANYNGWNITSPPSYTQGNVYNEKLYIHAI
GPLLANHGWSNAFFITDQGRSGKQPTGQQQWGDWCNVIGTGFGIRPSAN
TGDSLDSFVWVKPGGECGDTSDSSAPRFDSHCALPDALQPAPQAGAWF
QAYFVQLLTNANPSFL
```

Red color: Cellulose Binding Module

図 4 *Trichoderma reesei* 由来のセロビオハイドロラーゼ II (CBHII : protein\_id="AAA34210.1") が有するCBMの遺伝子。

## ファージディスプレイ法

1985年のSmithらの研究<sup>7</sup>に端を発するファージディスプレイ法は、繊維状ファージの表層にペプチドやタンパク質を提示する技術である。これは、アフィニティ精製の要領で固相化抗原に結合する、抗原特異的な抗体DNAクローンを選別(バイオパンニング)することによって、免疫系における分子進化の過程をまねたものである。この手法では、巨大なサイズのライブラリを簡便に扱うことが可能であり、バイオパンニングを繰り返すことによって高親和性抗体を

選別することが可能である。動物の免疫システムに依存せずに短期間で抗原特異的な抗体の選別ができる，得られた抗体の遺伝子操作が容易であるなどの特徴があり，ヒト抗体を作製する技術として広く用いられている。

ファージディスプレイ法でよく用いられる繊維状ファージ(図5)は，環状の一本鎖ゲノムDNA（約6.4kb）をもち，それが繊維状の細長い筒状の殻（直径7nm，長さ900～2000nm）に覆われている。ファージ表面へ外来タンパク質を提示させる方法として，ほとんどのコートタンパク質上に発現するベクターが開発されているが，実際に発現効率が良好で最もよく用いられているのは，g3p（gene 3 protein）あるいはg8p（gene 8 protein）のN末端に融合タンパク質として，発現提示させる方法である。

M13 phage

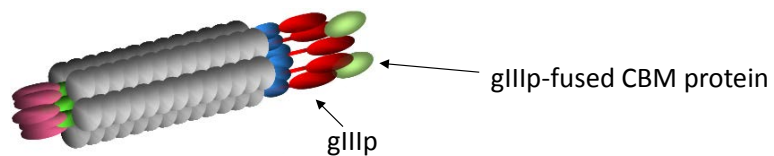


図5 繊維状ファージ

コートタンパク質の一つであるgIIIpのN末端に目的のCBMタンパク質を融合して，提示する。

#### ファージディスプレイ用ベクター

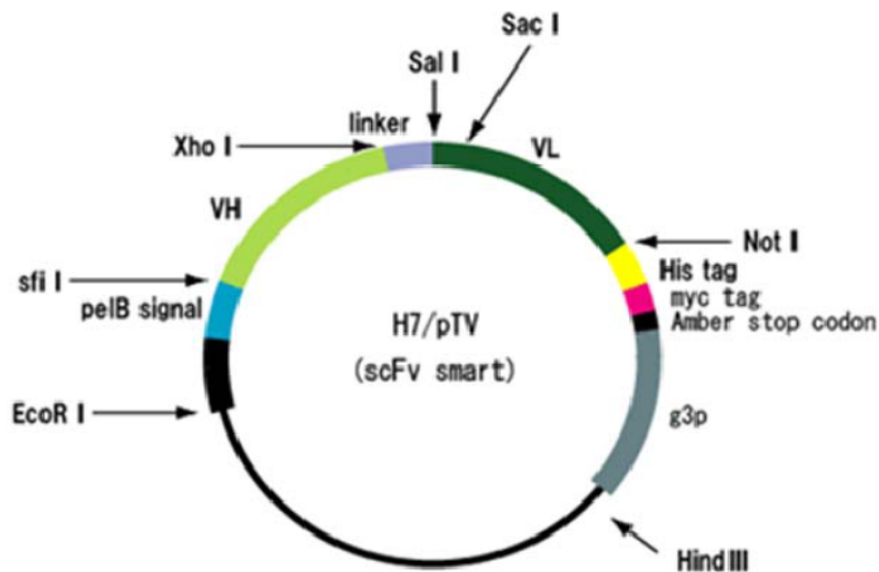


図6 フェージミドベクターH7/pTVベクターの構造。N末端側には *pelB* シグナル配列を有し、目的遺伝子のC末端側には His タグおよび *myc* タグを有する。また、C末端側には *g3p* コートタンパク質が融合する。*Sfi*I および *Not*I にて制限酵素処理し、CBM 遺伝子を挿入した。

フェージミドベクターとして、伊東研究室所有の H7/pTVベクターを使用した。構造の概略を図6に示す。このフェージミドベクターは、導入された外来遺伝子をフェージコートタンパク質の *g III p* に融合した形でフェージ上に発現させることが可能であり、また提示される蛋白質を 1-2個に限定することができ、アビディティ効果を抑えた評価が可能である。調製したフェージミドベクターを Amber変異を持つ TG-1株に形質転換し、Helperフェージの重感染により、フェージを回収することで、目的の CBMと *g3p*とが融合した状態でフェージ上に発現することが可能である。ベクター増幅用の菌株として TOP10 (インビトロジェン社) を使用した。遺伝子導入クローニングコンピテント細胞として、Z-Competent Cell (Funakoshi, TG-1株) を使用した。



## CBMファージ提示用ベクターの構築

ファージディスプレイ用のCBMおよびCBM変異導入遺伝子については、大腸菌発現用にコドンを最適化し、IDT社に合成依頼を行い調製した。DNAの配列からアミノ酸配列への翻訳における遺伝暗号コドンは、生物種によって大きく偏っていることは知られており、これはコドンの方言ともよばれている。大腸菌と糸状菌である*T.reesei*の場合も同じアミノ酸でも、使用されるコドンが異なっており、この違いによってたんぱく質の発現に影響を与えることが考えられる。そこで、糸状菌のCBH IIのアミノ酸配列を変えずに、DNA配列を大腸菌型に最適化した遺伝子设计了。CBH IIのCBMタンパク質の領域までの遺伝子のコドンが最適化され、3'末端には、His タグが付加された。

合成遺伝子をテンプレートとし、PCR法によりDNA断片化した。図7に用いたプライマーとPCR条件を示す。遺伝子増幅用ポリメラーゼとして、PrimeStar Max (タカラバイオ社)を使用した。増幅した遺伝子の H7/pTVベクターへの導入は

(a)

F; 5'- ctgctcctcgcGGCCCAGCCGGCCATGGCTcaagcctgtt - 3'

R; 5'- tgatgatgtgcgccgcaaggcattgtgagtaata - 3'

(b)

回数	Temp (°C)	時間(sec)
1	94	60
30	98	10
	55	5
	72	5
1	4	-

図7 フォワード用プライマー(F)には制限酵素サイト *SfiI*, リバース用プライマー(R)には制限酵素サイト *NotI* を挿入した(a)。PCRの温度条件(b)。

制限酵素サイト *Sfi* I, *Not* I (タカラバイオ社) を用い、ライゲーションは Infusion(Clontech社)を用いて行った。制限酵素処理の条件は、ベクターおよび DNA断片を約200 ng, 制限酵素 1  $\mu$ Lずつ, 10x バッファーを2  $\mu$ Lにて総量20  $\mu$ L を37  $^{\circ}$ C, 2 時間とした。ライゲーション後, 大腸菌ホストとしてDH5 $\alpha$  (タカラバイオ社) を用い, ヒートショックにより形質転換した。ヒートショック条件は, DH5 $\alpha$ 大腸菌45  $\mu$ Lに対し, Infusion混合液を5  $\mu$ L混合し, 5 分間氷上静置した後, 42  $^{\circ}$ Cにて45 秒間ヒートショックを施し, 2 分間氷上静置した。その後, SOC培地450  $\mu$ L混合し, 37  $^{\circ}$ Cにて30 分間回復培養した。回復培養後, 100  $\mu$ L を100  $\mu$ g/mlアンピシリン LB培地プレートへ塗布し, 一晚37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートすることでコロニーを獲得した。

回数	Temp ( $^{\circ}$ C)	時間(sec)
1	94	120
30	94	30
	50	30
	72	60
1	4	-

図8 コロニーpcrの条件。

単コロニー化した大腸菌株DH5 $\alpha$ をコロニーPCRにより目的 CBM遺伝子断片の挿入を確認した。図8にコロニーPCRの条件を示す, 形質転換が確認された大腸菌株DH5 $\alpha$ を100  $\mu$ g/mlアンピシリン LB培地にコロニーを移植し, 一晚37  $^{\circ}$ Cにて培養後, ミニプレップ (キアゲン社) によりプラスミド抽出した。図9に構築したCBMファージミドベクターを示す。

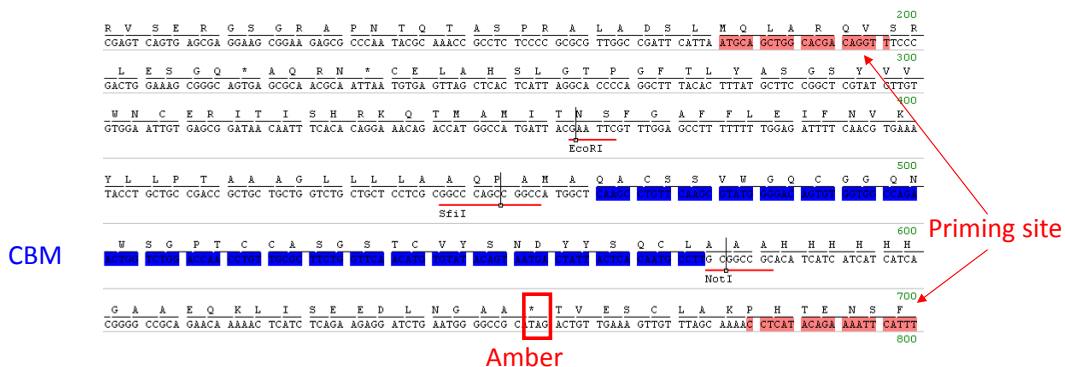
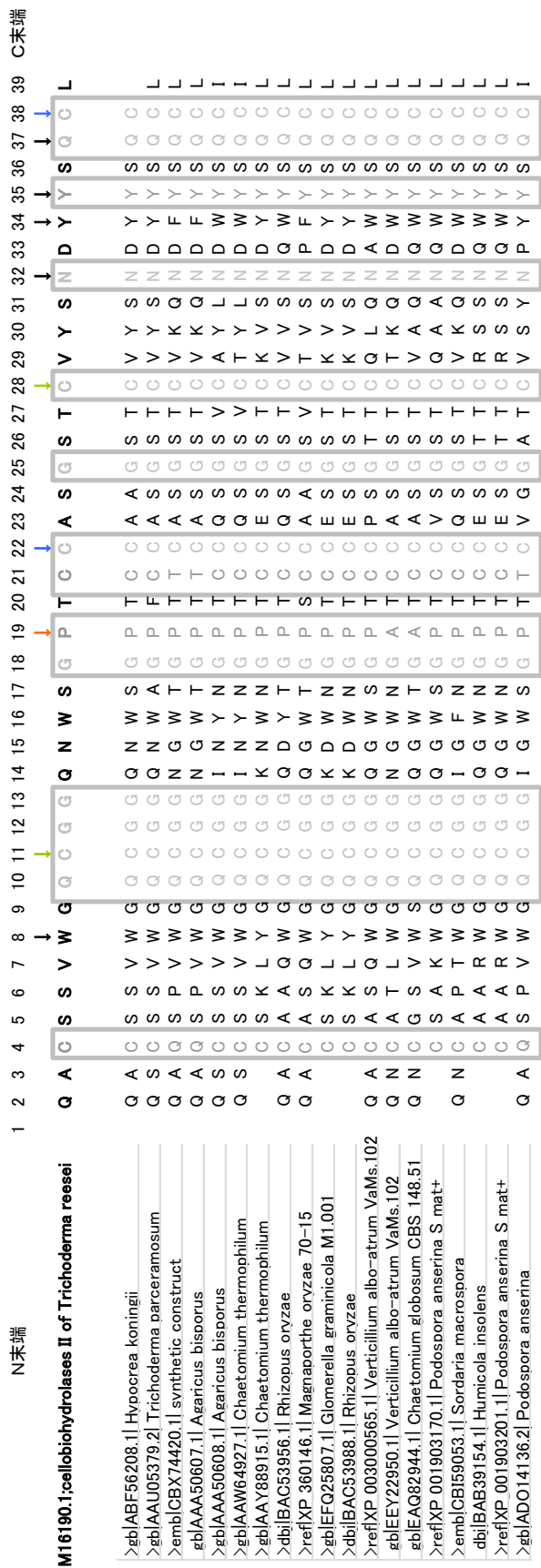


図9 フェージミドベクターに挿入されたCBM配列。制限酵素サイト *SfiI* と *NotI* の間に目的のCBM遺伝子が挿入されている。また、アンバーストップコドンも挿入されている。

### CBMライブラリーフェージ提示用ベクターの構築

フェージディスプレイ用のCBM変異導入遺伝子を以下の方法によりデザインした。まずタイプAであるCBMを持つCBH (protein\_id="AAA34210.1") をテンプレートとして、CBMについてBLAST検索を実施した。その結果を図10に示す。この結果から、変異に自由度がある残基とない残基に分類した。具体的には、図9の灰色字で示す残基に自由度がないことが確認された。また、報告によると残基11, 22, 28, 38ではC-C結合を形成し、残基19は平面構造を形成するのに重要であり、残基8, 34, 35はセルロースを形成するグルコースと結合するのに必要なトリプトファンとチロシンであることが知られている<sup>8</sup>。これらの報およびMOEによる三次元立体構造を考慮することにより、最終的に図11に示すデザインでCBM配列に変異を導入した。北海道システム・サイエンス社に合成依頼を行い調製した。各遺伝子に導入する変異の割合は、元の遺伝子を70%、残りの遺伝子を各10%となるように合成した。これは、変異導入箇所が多い分（全体の60.5%）、各遺伝子での変異は抑えることによりできる限り高確率に目的変異体を獲得できるようにしたためである。

- ↓: Glucoseとの結合に寄与
- ↓: C-C結合を形成
- ↓: C-C結合を形成
- ↓: flat surface形成に寄与



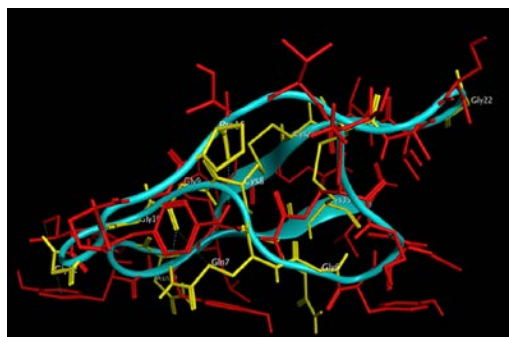
合計92個

保存されている領域

図 10 CBM の配列と BLAST によるホモロジー検索。グルコースとの結合に寄与する遺伝子を黒矢印、構造に寄与するシステイン結合する遺伝子を黄緑および青色矢印、タイプ A の CBM 構造に特徴的な平面構造に寄与する遺伝子を橙色矢印で示す。3 つの beta シートから成り、4 つのターンを持つ。

### 赤字が変異導入箇所

N末端 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 C末端  
CBM配列 Q A C S S V W G Q C G G Q N W S G P T C C A S G S T C V Y S N D Y Y S Q C L



Yellow: Important frame for the structure  
Red: Mutated amino acids

図 11 CBM の立体構造と変異導入箇所。

合成した変異遺伝子群をテンプレートとし、PCR法によりDNA断片化した。図12に使用したプライマーと条件を示した。遺伝子増幅用ポリメラーゼとして、Gene Taq (日本ジーン社) 使用した。増幅した遺伝子の H7/pTVベクターへの導入は 制限酵素サイト *Sfi* I, *Not* I (タカラバイオ社) を用い、ライゲーション反応は Infusion HD cloning kit (タカラバイオ社) を用いた。制限酵素処理の条件は、ベクターおよび DNA断片を約200 ng, 酵素 1  $\mu$ L, 10x バッファーを2 uLにて総量 20  $\mu$ Lを50  $^{\circ}$ C, 2 時間とした。ライゲーション条件は、50  $^{\circ}$ C, 15 分とした。ライゲーション後、発現用大腸菌Z-Competent Cell (Funakoshi, TG-1株) を用いエレクトロポレーション法により形質導入した。エレクトロポレーションの条件は、DH5 $\alpha$ 大腸菌45  $\mu$ Lに対し、ライゲーション混合液を 5  $\mu$ L混合し、2 分間氷上静置した後、エレクトロポレーション装置 (MicroPulser, BioRad社) を用いて形質導入し、SOC培地450  $\mu$ L混合した後、37  $^{\circ}$ Cにて 30 分間回復培養した。回復培養後、全量を100  $\mu$ g/mlアンピシリン LB培地プレートへ塗布し、一晚37  $^{\circ}$ Cにてインキュベートすることでコロニーを獲得した。一回の形質導入で約

(a) 5'-TTTTTTTTTGCCCGAGCCGGCCATGGCT-3'  
5'- ATGATGATGATGTGCGGCCGC -3'

(b)

回数	Temp (°C)	時間(sec)
1	94	120
15	94	30
	58	30
	72	30
1	72	5min
1	4	-

図 12 フェージライブラリー構築のためのプライマー (a) と pcr 条件 (b)。

$10^7$  /mlのコロニーが得られたことから、10 回のエレクトロポレーションにより、約 $10^8$  /mLのライブラリーを得た。

### セルロース結合性CBMフェージライブラリーの構築

#### CBM提示フェージおよびCBM変異体提示フェージの調製

抽出したプラスミドを発現株である、Z-Competent Cell (Funakoshi, TG-1株)へ形質転換し、単クローン化した。前述同様、ヒートショックにより実施した。形質転換が確認された大腸菌株TG-1を 100  $\mu$ g/mlアンピシリン、 50  $\mu$ g/mlカナマイシン 2YT培地 (2YT-AK) 5 mLにて一晩前培養した。100 mLの2YT-AGへ前培養液 1mlを入れ、O.D.600 nm = 0.5になるまで30 °Cにて揺動培養し、大腸菌数に対して 5 倍数のフェージ (M13KO7) を感染させた。感染後、30 °Cにて 30 分間静置し、さらに 30 分間揺動した。20% PEG6000, 25 M NaCl溶液を体積ボリュームで 1/4 量にてフェージを沈降させ回収した。沈降したフェージを PBSへ

溶解し、ファージ溶液とした。濃度は、改めて大腸菌株TG-1に感染させそのタイターを測定することにより、 $2.6 \times 10^7$  phage/mLと確定した。

ファージ上への発現を確認するため、ELISA法を用いた。まず、 $1.0 \times 10^{10}$  phage/mlに希釈したファージ溶液 50  $\mu$ l/wellを ELISAプレートへコートした。室温にて 1時間インキュベートした後、PBS (0.05% tween20)にて3回ウォッシュした。次に、5% Skim Milk 50  $\mu$ L/wellにてブロッキングした。室温にて 1 時間インキュベートした後、PBS (tween20)にて3回ウォッシュした。 Anti-His-tag monoclonal antibody HRP direct T (MBL社) を10,000 倍希釈にて反応した。室温にて 1時間インキュベートした後、PBS (0.05% tween20)にて3回ウォッシュした。発色には、ELISA用発色基質キット (Funakoshi社) を用い、発現を定性的に確認した。

### **CBM提示ファージおよびCBM変異体提示ファージのレスキュー**

CBMおよびCBM変異体が組み込まれた大腸菌株TG-1を2TYAG (2TY medium, 100  $\mu$ g/ml ampicillin, 2% glucose) 3ml に植菌・培養 (30  $^{\circ}$ C, overnight) した後、log-phaseの菌体(O.D.600 = 0.8)に、ヘルパーファージ (M13KO7, m.o.i = 5) を重感染させた (37  $^{\circ}$ C, 30min stand, 37  $^{\circ}$ C, 30 min shake)。感染後、菌体を遠心分離し、上清を捨て、ヘルパーファージが感染した大腸菌ペレットを、2TYAK (2TY medium, 100  $\mu$ g/ml ampicillin, 25  $\mu$ g/ml kanamycin) 3ml で懸濁し、30  $^{\circ}$ Cで12 時間培養した。培養液を遠心分離し、上清に遊離したファージ溶液を回収後、PEG / NaClを0.2vol%加えて、4  $^{\circ}$ Cで12 時間、沈降反応を行った。その後、遠心分離し、ファージペレットをPBSで懸濁した。

### **パンニング**

一般的なバイオパニングの方法では標的タンパク質をイムノチューブもしくは

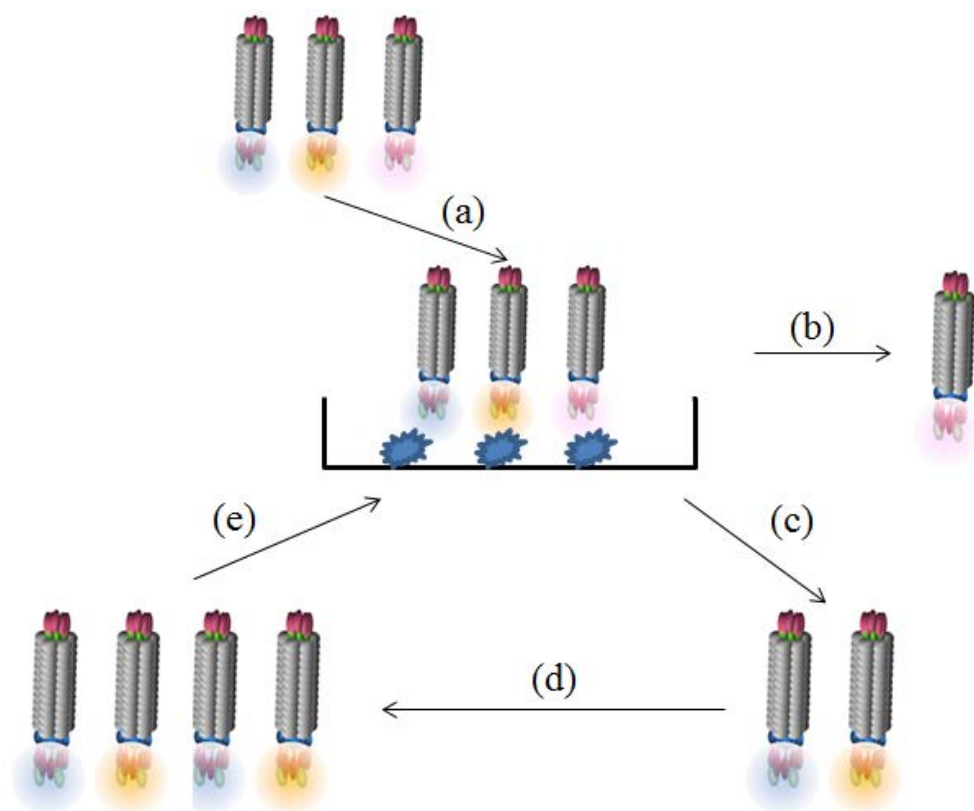


図 13 一般的なバイオパニング法。ファージライブラリを構築し、標的タンパク質をコートしたプレートで反応させる工程(a), 洗浄による非特異的なファージを除去する工程(b), 特異的に結合したファージを溶出する工程(c), ファージを増殖する工程(d), さらに特異的なファージを選別するためにバイオパニング繰り返す工程(e)からなる。



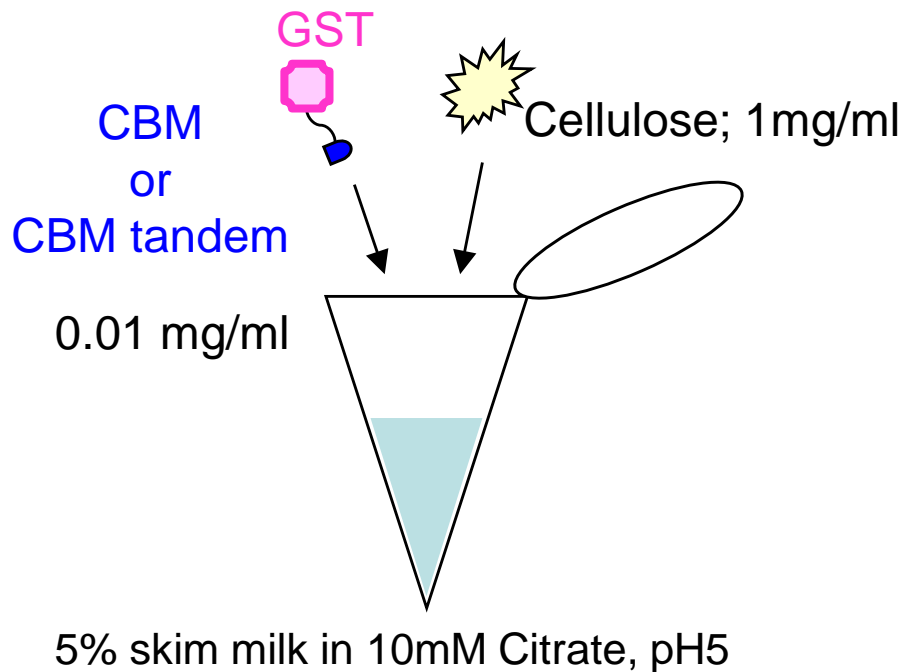


図 14 1.5mL チューブを用いたバイオパニング法。図 13 における工程(a)では水に不溶な結晶性セルロースをプレートにコートすることが出来ないため、チューブ中にて反応させ、遠心により Bound/Free 分離を行う。

はプラスチックプレートにコートするが（図13），結晶性セルロースは水に不溶でありプラスチックプレートへコートすることができないため，1.5mLチューブを用いてバイオパニングを実施した（図14）。すなわち，10mMクエン酸バッファ（pH5.0）へ拡散させた1 mg/mL結晶性セルロース1 mLをチューブへ入れ，遠心した後上清を捨てることで1 mgの結晶性セルロースをチューブ内に準備した。そこへ5% skim Milk (10 mMクエン酸バッファ)で $1.0 \times 10^{10}$  phage/mLに調製したCBM変異体提示ファージライブラリを1 mL混入させ，室温にて1時間反応させた。

反応液からphageと反応した結晶性セルロースを遠心回収した。洗浄は0.5% Tween20が入ったPBSで十分攪拌することにより実施し，phageと結合した結晶性セルロースを遠心回収した。洗浄は5回実施した(洗浄条件は後述)。不要なphage

を取り除いた後、特異的なphageが反応した結晶性セルロースを大腸菌TG1に感染させ増幅した。この操作を3回行うことで結晶性セルロースに特異的なCBM変異体提示phageを濃縮した。

### 3-3 結果と考察

#### ファージ上への CBM の提示確認

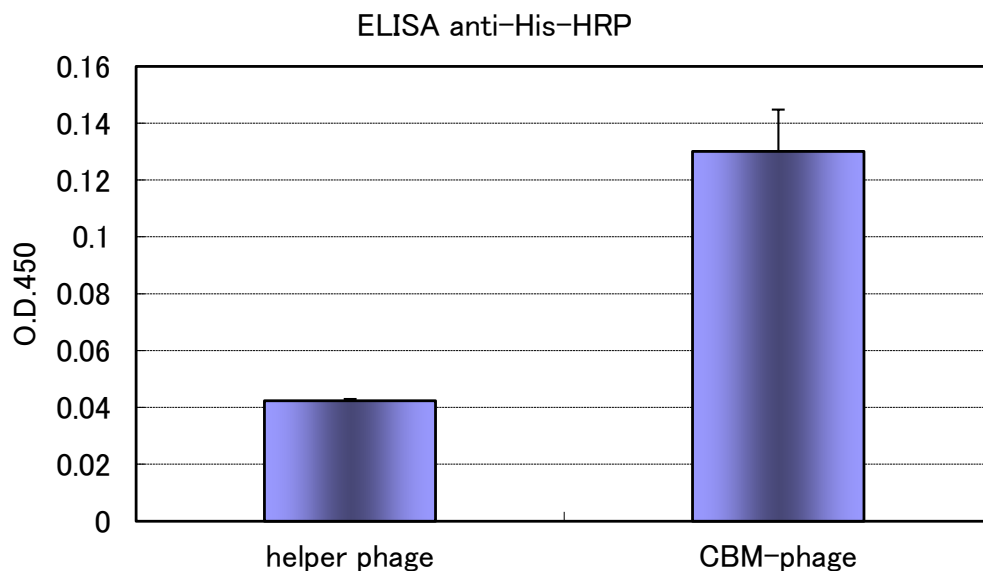


図 15 His タグを用いたファージ上への CBM の提示確認用 ELISA 評価

CBM を pTV118 に導入したファージミドベクターを、大腸菌 TG1 に形質転換後、ヘルパーファージ ( M13KO7 ) を重感染させ、ファージを生成させた。得られたファージを PEG (ポエチレングリコール) 沈殿によって回収し、ファージ表面への CBM の提示を、CBM の C 末端側へ配置した His タグに結合する抗 His 抗体で確認した。その結果を図 15 に示す。コントロールで用いた VHH 抗体 (伊東研究室所有) を提示するファージほどは反応がなかったものの、提示し

ていないヘルパーファージに比べ明らかに高い反応が見られた事から、CBM-His 分子が、ファージ表面に提示されていることが分かった。

### CBM 提示ファージを用いた洗浄条件の検討と評価系の構築

CBM を提示したファージのセルロースに対する結合能評価系を構築するために3つの評価系を評価した。

まず、市販の濾紙を用い、CBM 提示ファージ溶液をスポッティングし、洗浄後、結合したファージを抗ファージ抗体で検出することを試みた。結果を図 16 に示す。図 16 は濾紙に対する CBM 提示ファージの結合評価法の試験 (A) に各スポットにアプライしたサンプル名を示す。(B) 左は、WhatmanNo42 の濾紙、右は、アドバンテック製、定性濾紙 No2 を用いた結果を示す。濾紙に (A) で示されたファージ溶液をスポッティング後、3回 PBS にて洗浄を行い、抗 M13 ファージ-HRP コンジュゲートを反応させ、化学発光試薬にて検出を行った。

図 16 の結果からは、CBM 提示ファージとコントロールの VHH 提示ファージ、あるいはヘルパーファージとの間に明確な違いが見られず、CBM 提示ファージが濾紙に結合するということを明確に言えるものではなかった。しかし、興味深いのは、CBM 提示ファージの場合は、スポットの中心が染色されファージがスポット位置から拡散されていないのに対し、コントロールの VHH 提示ファージ、あるいはヘルパーファージでは、染色が拡散した外側の領域が染色され広がっているように見える。このことは、CBM 提示ファージがセルロースと結合することによって、外に広がりにくくなったことを示唆している。しかしながら、本手法では明確な評価が困難であることから、このファージの結合能に関しては、次の方法さらに検証した。

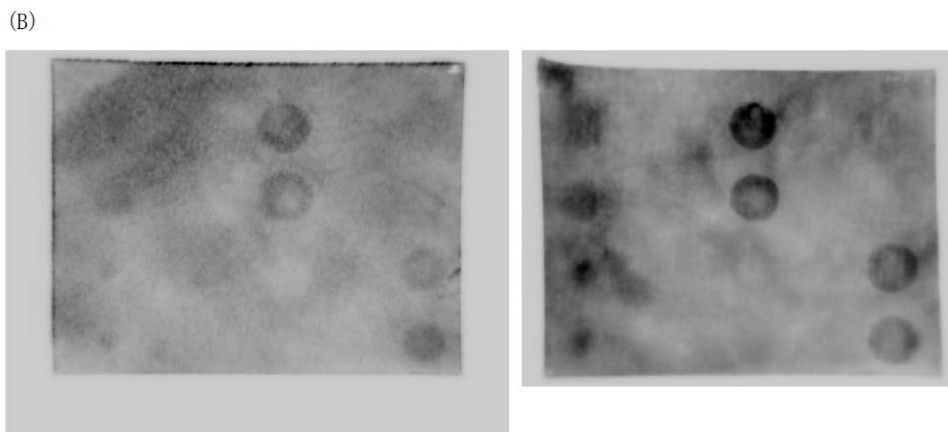
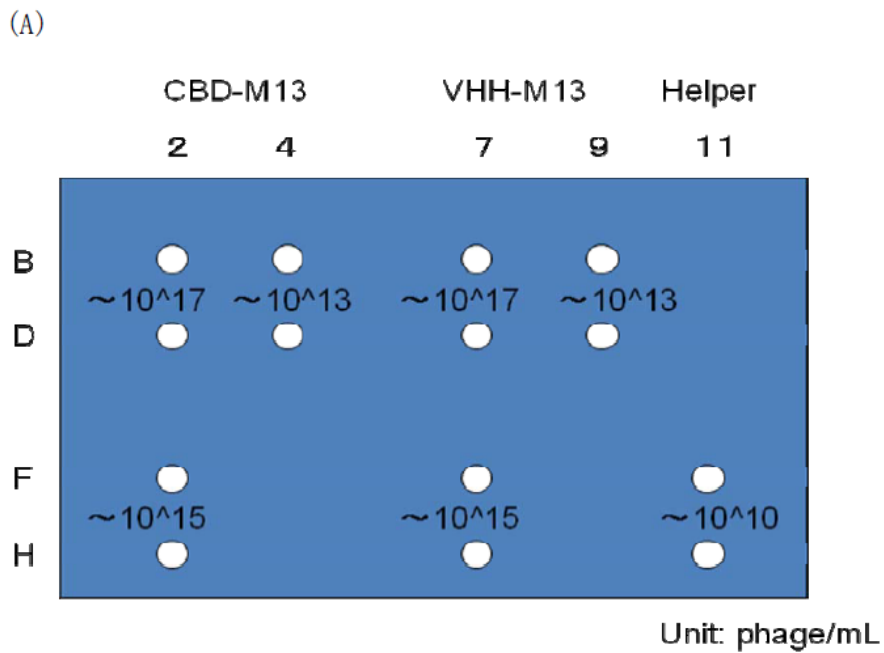


図 16 は濾紙に対する CBM 提示ファージの結合評価法の試験 (A) WhatmanNo42 の濾紙 (左) , アドバンテック製, 定性濾紙 No2 (右) (B)。

まず, 前述の TG-1 への感染を利用したタイター測定による方法である。その結果を図 17 に示す。CBM 提示ファージでは 3, 5, 10 回の洗浄でもそのタイターが減少しなかったが, コントロールとして用いた VHH 提示ファージでは洗浄

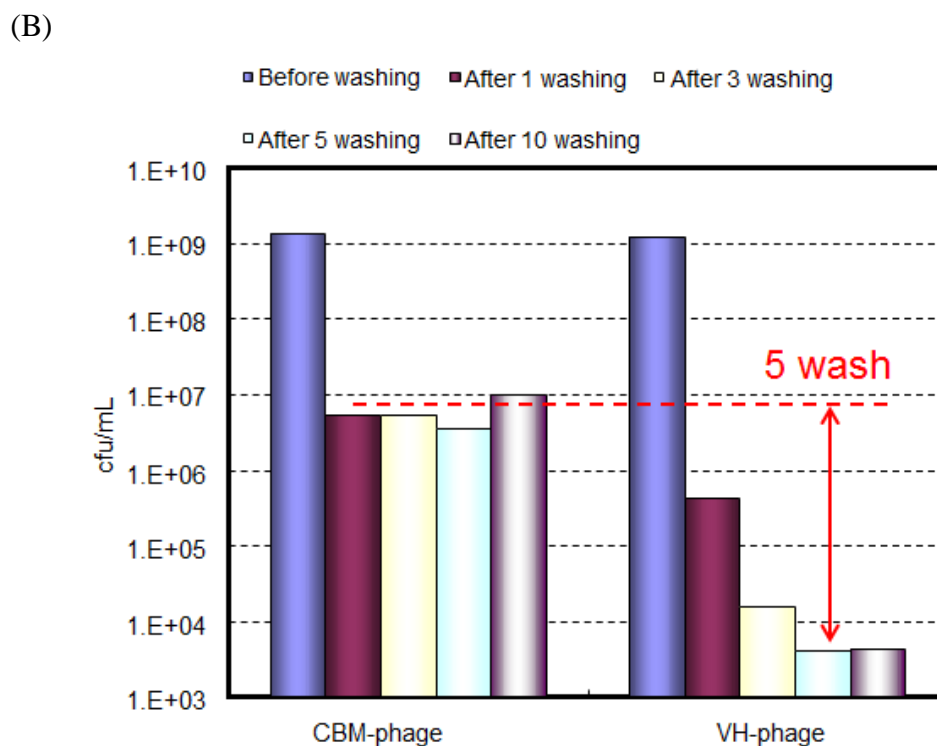
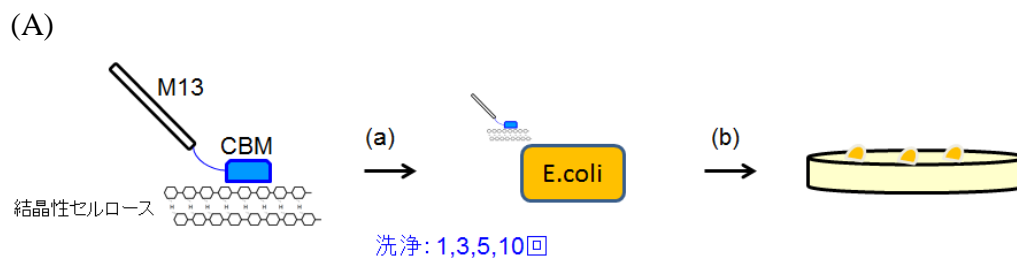


図 17 タイターによる CBM 結合評価方法(A)と洗浄条件の検討結果(B)。CBM を提示したファージを結晶性セルロースと結合させた後、洗浄する(a)。洗浄回数は 1,3,5 および 10 回とする。結合したファージは溶出作業をせず、そのまま大腸菌へ感染し、プレート培地上でコロニーを形成させる(b)。

回数に応じてタイターが減少した。5 回と 10 回においてその差が見られなくなったことから、洗浄回数は 5 回が妥当とした。

次に、ELISA 評価系としてフィルタープレート (ミリポア社) を活用した。評価系の概要を図 18 に示す。1.5mL チューブを活用した洗浄ではその数が増えると手間および時間がかかる。そこでまず、フィルターを 5 % Silk Milk (0.5 %

Tween20, PBS)を入れて1時間室温にてブロッキングをした後吸引にて液体を分離除去した。次に、1.5mL チューブにて1時間室温にて反応した結晶性セルロースおよびCBM 提示ファージの混合液を入れ、液体を分離除去した。さらに、洗浄としてPBS (0.5% Tween20)を5倍の体積量入れ、吸引することで不要なファージを分離除去した。フィルタープレート裏面をテープ (3M 社) でとめることで穴をふさぎ、プレート上で anti-His-tag 抗体による ELISA 反応を実施した。反応液は8連ピペットを使用して透明なプレートへ移した後、O.D.450nmにて吸光測定した。

フィルター上でのELISA評価方法

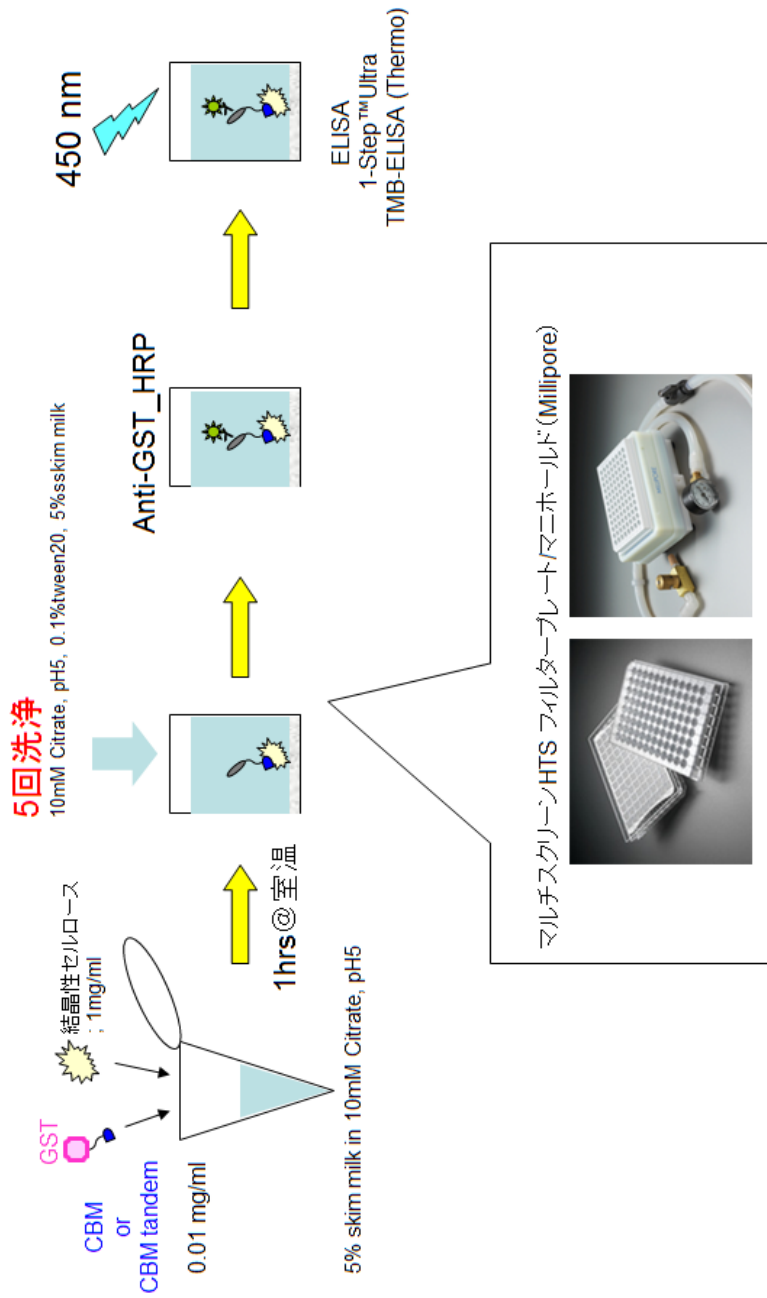
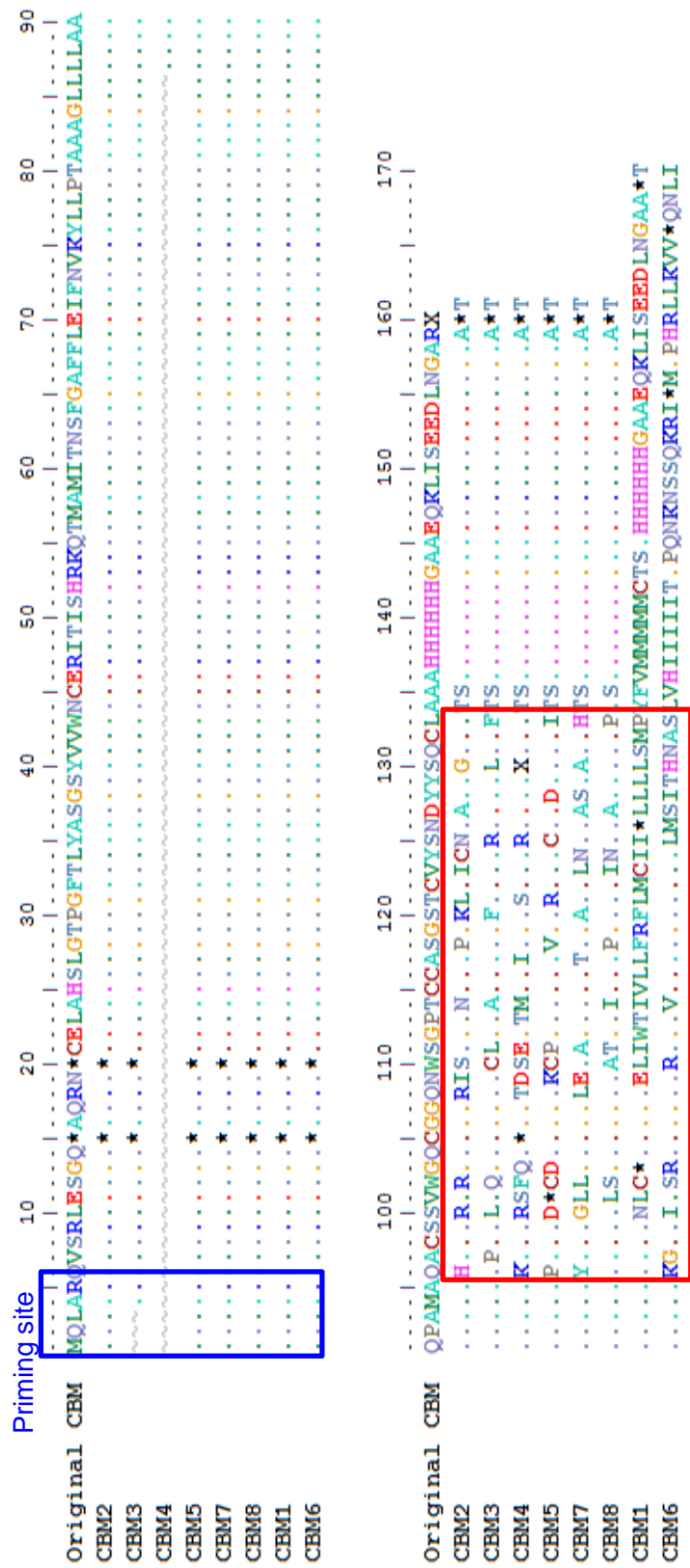


図 18 フィルタープレート (ミリポア社) を活用した ELISA 評価系。結晶性セルロースは水に不溶であるため、プレートにコートする一般的な ELISA 法が使えない。そこで、1.5mL チューブとフィルタープレートを用いて反応と洗浄工程を実施し、透明プレート上で吸光測定した。

### 高結合能を有する CBM 変異体提示ファージライブラリーの獲得

まず、CBM 変異体ライブラリーの変異導入を確認するために、TG-1 株へ感染させコロニーを形成した後、各コロニーのシークエンスを解読した（図 19）。ライブラリー変異を導入した CBM ライブラリーからバイオパニングを 3 回実施することにより、より結合する CBM 変異体をセレクションした。図 20 に洗浄条件を 5 回、3 回、1 回としたときの 3 度のバイオパニングによるタイターを示す。いずれも 2 度のバイオパニングによりタイターが上がっていることが確認されたが、3 度目のバイオパニングでは下がる結果となった。より詳細を確認するため各バイオパニングで得られた CBM 変異体のアミノ酸配列を解読した（図 21）。5 回の洗浄、つまりより厳しい条件でのバイオパニングでは、CBM と同じ配列の CBM がエンリッチされた。そこで、3 回、1 回の洗浄とより緩やかな条件にした時の配列を確認したところ、やはり多くの配列が CBM と同じものであることがわかった。3 度目のバイオパニングで得られた変異体についてその変異箇所と変異アミノ酸の構造上の位置を確認した結果を図 22 に示す。N 末端から 6 番のセリンがアスパラギン、14 番目のグルタミンがヒスチジン、27 番目のセリンがトレオニン、36 番目のセリンがシステインに置き換わった変異体を得られていることがわかった。これらの変異体 3 種類について、ファージ ELISA 法にて結晶性セルロースへの結合力を確認したところ（図 23）、CBM より結合力を保持する変異体は存在せず、構造上結合力には影響のない箇所であることが確認された。





※ストップコドンが入ったもの(CBM4, 5, 1)、余分な塩基が挿入されたもの(CBM1, 6)が含まれる

図19 ライブラリーのシークエンス解析。赤枠内にCBM配列の位置を示す。途中にストップコドンが入ったものや余分な塩基が挿入されたものが含まれるため、実質  $1.3 \times 10^7/\text{mL}$  のライブラリであることを確認した。10回エレクション法で大腸菌に形質転換した。

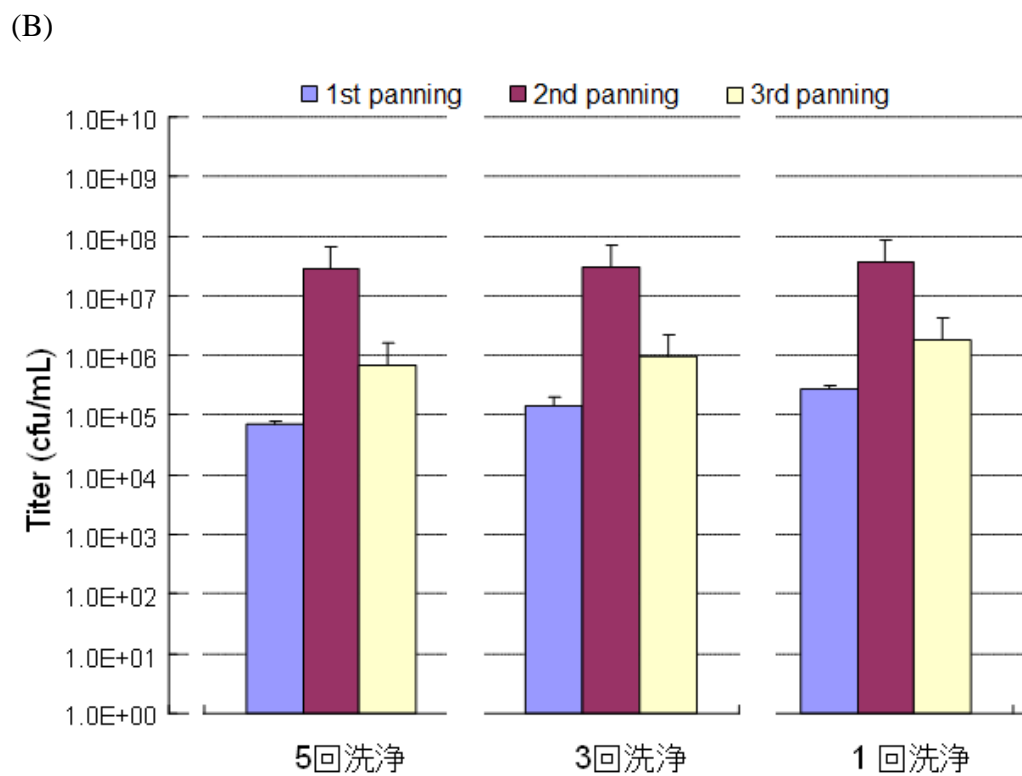
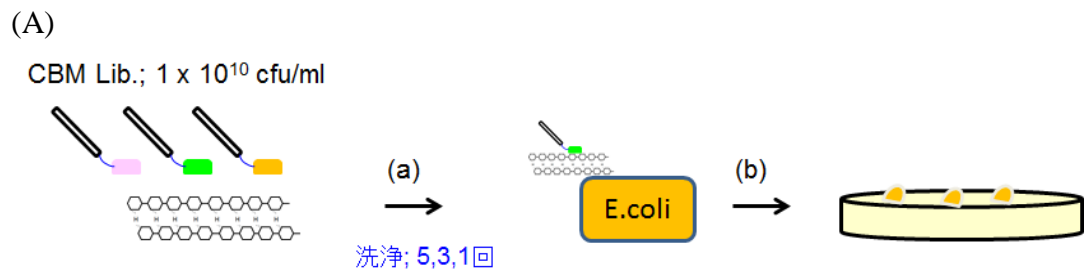


図 20 タイター測定によるライブラリをバイオパニングする方法(A)と洗浄条件を 5 回, 3 回, 1 回としたときの 3 度のバイオパニングによるタイター測定結果(B)。洗浄回数を 5, 3, 1 回とすることで選択条件を変更し(a), 大腸菌に感染することでタイターを測定した(b)。

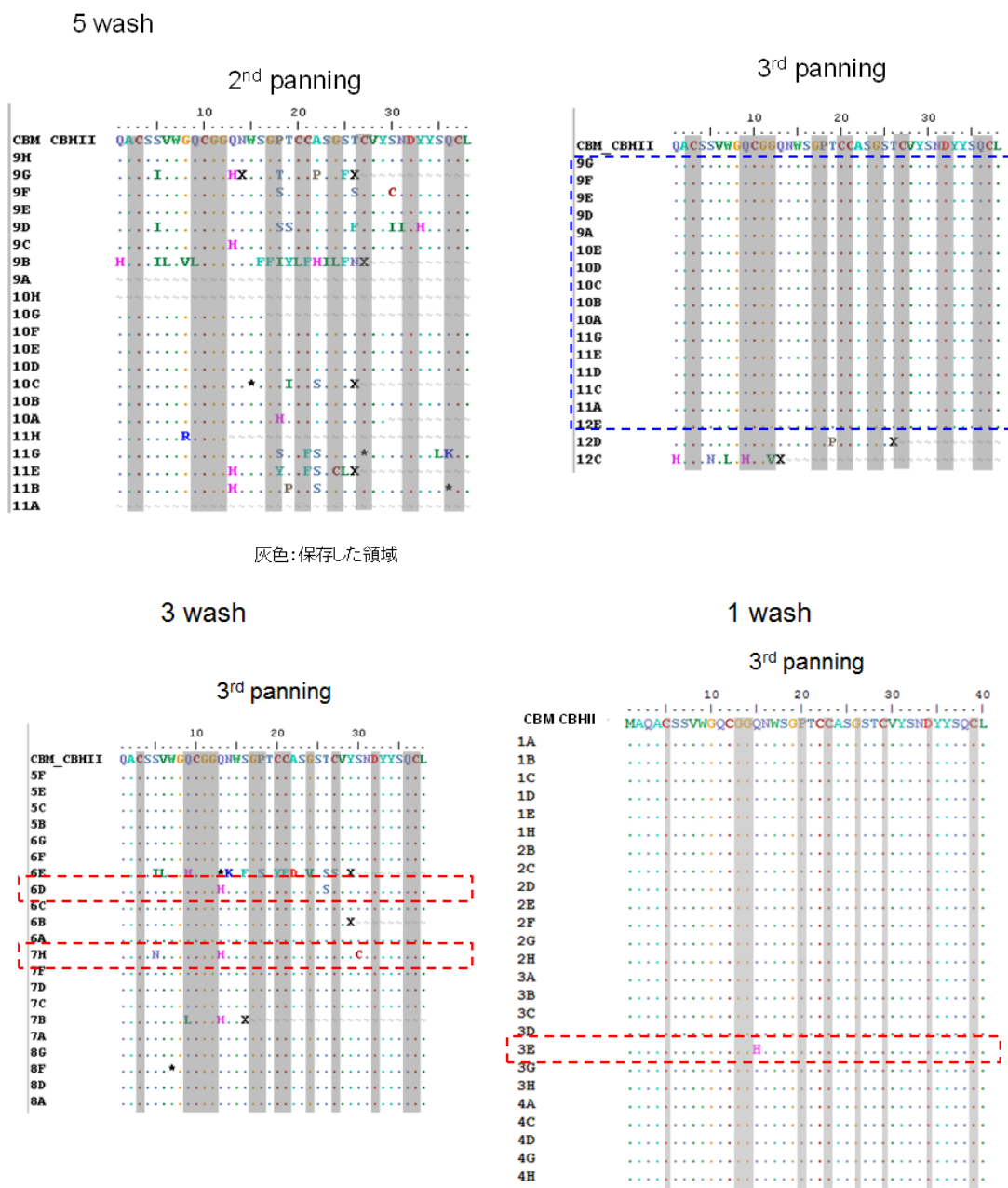
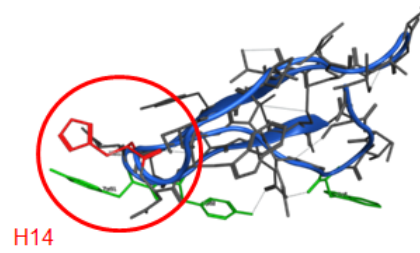
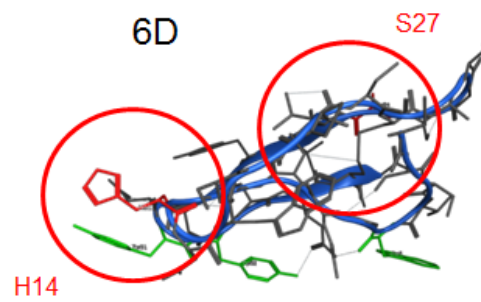


図 21 洗浄条件 5 回のときの 2 回目および 3 回目のパニング時 (a) , 洗浄条件 3 回および 1 回のときの 3 回目のパニング時 (b) で獲得された CBM 変異体のシーケンス解析。

3E



6D



7H

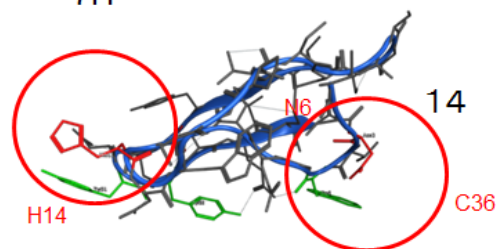


図 22 MOE を利用した選択された配列の 3D 構造の表示。CBM の表面にある 14 番目のグルタミンがヒスチジン(3E, 6D, 7H), 27 番目のトレオニンがセリン(6D), 6 番目のセリンがアスパラギン, 36 番目のセリンがシステイン(7H)に代わっている。

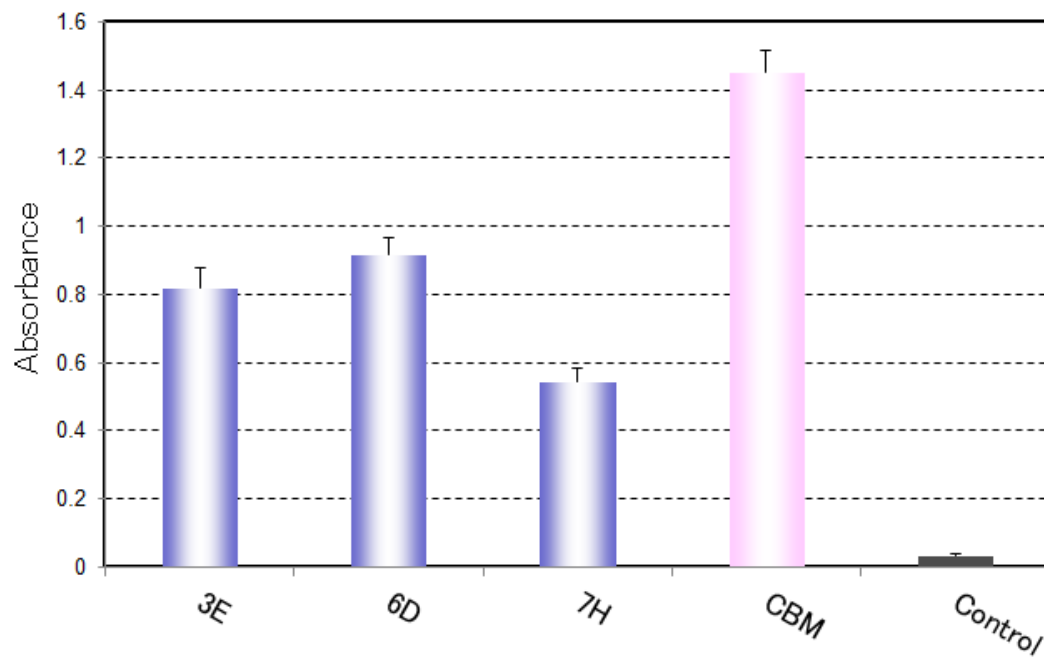


図 23 ELISA による結合評価。1.0 x 10<sup>10</sup> cfu/ml に調整した CBM 変異体ファージと CBM 提示ファージを結晶性セルロースと結合させ、anti-M13 抗体を介して、HRP の過酸化水素の還元と色素の酸化による吸光測定を行った。

### 3-4 小括

CBM提示ファージを用いた洗浄回数の評価により、5回の洗浄によりその結合能力を評価できる系を確立した。その評価系を用いて、 $10^{10}$ 乗のCBM変異体ファージライブラリーをバイオパニングしたところ、5回洗浄では3回のバイオパニングで得られたすべてのクローンがCBMの配列と同じであることがアミノ酸解析から確認された。3回もしくは1回の洗浄では3度のバイオパニングにより3種類の変異体を得られたが、いずれの変異体もCBM以上の結晶性セルロースへの結合力を示すものが得られなかった。

### 3-5 引用文献

1. Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D. B., & Karplus, P. A. (1997). Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nature Structural Biology*, 4(10), 810–818.
2. Boraston, A., Bolam, D., Gilbert, H., & Davies, G. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J*, 382, 769–81.
3. Igarashi, K., Koivula, A., Wada, M., Kimura, S., Penttilä, M., & Samejima, M. (2009). High Speed Atomic Force Microscopy Visualizes Processive Movement of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I on Crystalline Cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 284(52), 36186–36190.
4. Hoshino, E., Sasaki, Y., Okazaki, M., Nisizawa, K., & Kanda, T. (1993). Mode of Action of Exo- and Endo-Type Cellulases from *Irpex lacteus* in the Hydrolysis of Cellulose with Different Crystallinities. *Journal of Biochemistry*, 114 (2), 230–235.
5. Fierobe, H.-P., Mechaly, A., Tardif, C., Belaich, A., Lamed, R., Shoham, Y., ... Bayer, E. A. (2001). Design and Production of Active Cellulosome Chimeras: SELECTIVE INCORPORATION OF DOCKERIN-CONTAINING ENZYMES INTO DEFINED FUNCTIONAL COMPLEXES. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (24), 21257–21261.
6. Bhikhabhai, R., & Pettersson, L. G. (1984). The cellulolytic enzymes of *Trichoderma reesei* as a system of homologous proteins: Cyanogen bromide peptides and partial sequence of endoglucanase {II}. *{FEBS} Letters*, 167(2), 301–308.

7. Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4705), 1315–7.
8. Linder, M., Mattinen, M. L., Kontteli, M., Lindeberg, G., Ståhlberg, J., Drakenberg, T., ... Annala, A. (1995). Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 4(6), 1056–64.



## 第 4 章

### 遺伝子工学的手法によるタンデム化CBMの作製と評価

#### 4-1 小序論

CBMタンパク質の結晶性セルロースへの結合力を向上するアプローチとしては、前章での取り組みのように単独のCBMの変異体を獲得する手法の他、CBMたんぱく質を複数連結してそのアビディティ効果を利用する方法も考えられる。アビディティ効果は、抗体分野ではよく知られた効果である。抗体分子は2つの同じ結合部位をもっており（図1）、結合部位が近いことから、抗原に対する親和性は1つの結合部位のみの場合に比べて高い。このような親和性または結合力の向上をアビディティ（avidity）効果

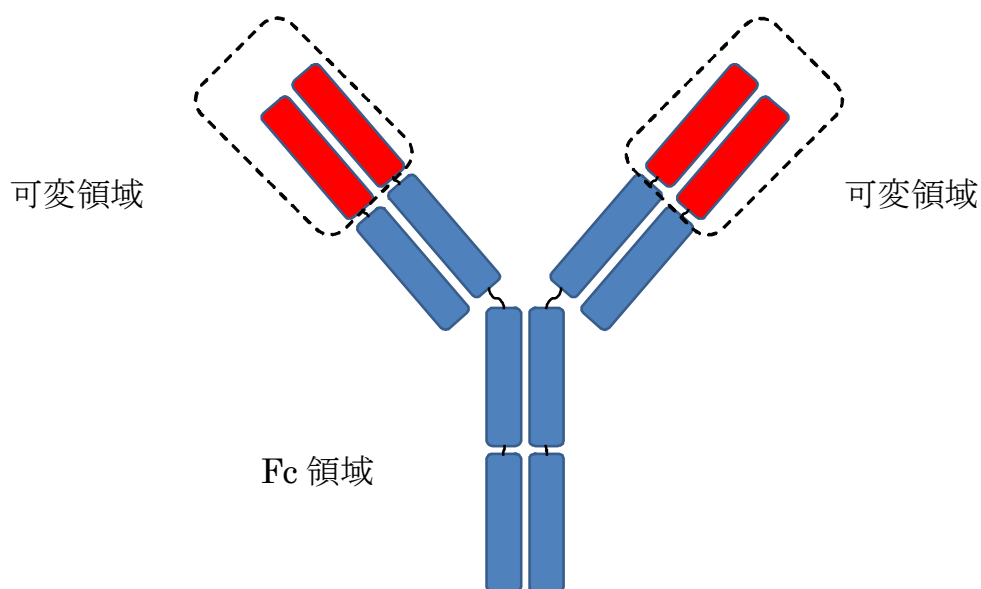


図1 抗体 IgG1 の構造

結合部位（可変領域）を2箇所所有し、アビディティ効果により抗原に結合する。

とよぶ<sup>1</sup>。この効果を利用して、抗体のFc部位をタンデム化し、タンデム化FcとFc部に結合するたんぱく質の結合力を向上させ、抗体の活性を向上させた報告がなされている。一方、CBMたんぱく質の結晶性セルロースに対する結合力は $2.02 \times 10^6$ 乗との報告があり、一般的な結合力に比べると非常に低い<sup>2</sup>。そのような低い結合力でも酵素活性を向上させた報告がされている<sup>3</sup>。酵素を連結し複合体化することで単体の酵素よりも活性が向上する。

そこで本章では、二つのCBMたんぱく質を連結したタンデム化CBMたんぱく質を作製し、その結合力と非結晶化能力を検証した。CBMたんぱく質の作製については、遺伝子工学的にタンデム化した配列を作製し、発現の容易性から大腸菌によるたんぱく質の発現系を構築した。また、非結晶化能力は、タンデム化CBMで結晶性セルロースを処理した後、セルラーゼ酵素により糖化し産生したグルコース量を定量することで評価した。

## 4-2 材料と方法

### タンデム化CBMの遺伝子配列の作製

CBMたんぱく質遺伝子は、大腸菌での組換えたんぱく質産生用に塩基配列を最適化し、MBL社（名古屋）に依頼して合成した(図2)。CBMたんぱく質の分子量は約5kDa、タンデム化しても約10kDaと小さい。また、2つのS-S結合が隣り合うS-S同士の結合ではなく、クロスした構造を有することからタンパク質の折り畳みが特殊で可溶性発現が容易ではないことが予想された<sup>4</sup> (図3)。また、CBMたんぱく質は糸状菌由来であり、糸状菌は真核生物である。一方、発現用大腸菌は原核生物であるため、大腸菌では発現されないことが予想される。そこで、

```

Orig-TreeseiCBHII-mRNA 1:-----ATGATTGTCGGCATTCTCACCACGCTGGCTACGCTGGCCACTCGC 47
CBM-Ecoli-Opt          1:GGCCCAGCCGGCCATGATTGTTGGAATTTGACAACACTAGCAACCCTTGCTACCTTAGC 60
                        ***** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * **
                        MetIleValGlyIleLeuThrThrLeuAlaThrLeuAlaThrLeuAl

Orig-TreeseiCBHII-mRNA 48:AGCTAGTGTGCCTCTAGAGGAGCGGCAAGCTTGCTCAAGCGTCTGGGGCCAATGTGGTGG 107
CBM-Ecoli-Opt          61:AGCATCCGTGCCACTAGAGGAAAGACAAGCCTGTTCAAGCGTATGGGGACAGTGTGGTGG 120
                        ***  ***** ***** * ***** ** ***** ** *****
                        aAlaSerValProLeuGluGluArgGlnAlaCysSerSerValTrpGlyGlnCysGlyGI

Orig-TreeseiCBHII-mRNA 108:CCAGAATTGGTCGGGTCGCACTTGTGTGCTTCGGAAGCACATGCGTCTACTCCAACGA 167
CBM-Ecoli-Opt          121:CCAGAACTGGTCTGGACCAACCTGTTGCGCTTCTGGTTCAACATGTGTATACAGTAATGA 180
                        ***** ***** ** ** * ** * ** ***** ** ***** ** **
                        yGlnAsnTrpSerGlyProThrCysCysAlaSerGlySerThrCysValTyrSerAsnAs

Orig-TreeseiCBHII-mRNA 168:CTATTACTCCCAGTGTCTTCCCGGCGCTGCAAGCTCAAGCTCGTCCAC          215
CBM-Ecoli-Opt          181:CTATTACTCACAATGCCTTCCCGGTGCTGCATCTTCTCAGCGGCCGC          228
                        ***** ** ** ***** ***** ** ** **
                        pTyrTyrSerGlnCysLeuProGlyAlaAlaSerSerSerAlaAla

```

図2 T. ressei の CBM の DNA 配列（上段）と大腸菌発現用に最適化デザインされた配列（中段）ただし、CBM 領域のアミノ酸配列をピンク色で示した。

可溶性確認とその確認の容易性を鑑み、可溶性タグを有する発現用ベクターを選定した。また、CBMの結合能力評価には十分な発現量が必要であるため、発現プロモータについても考慮した。そこで発現用ベクターとしては、gIIIpタンパク質をタグとしてC末端側に付与することができる伊東研究室所有のファージ

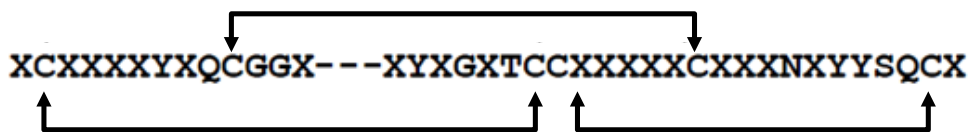


図3 CBM のアミノ酸配列パターンと S-S 結合の部位

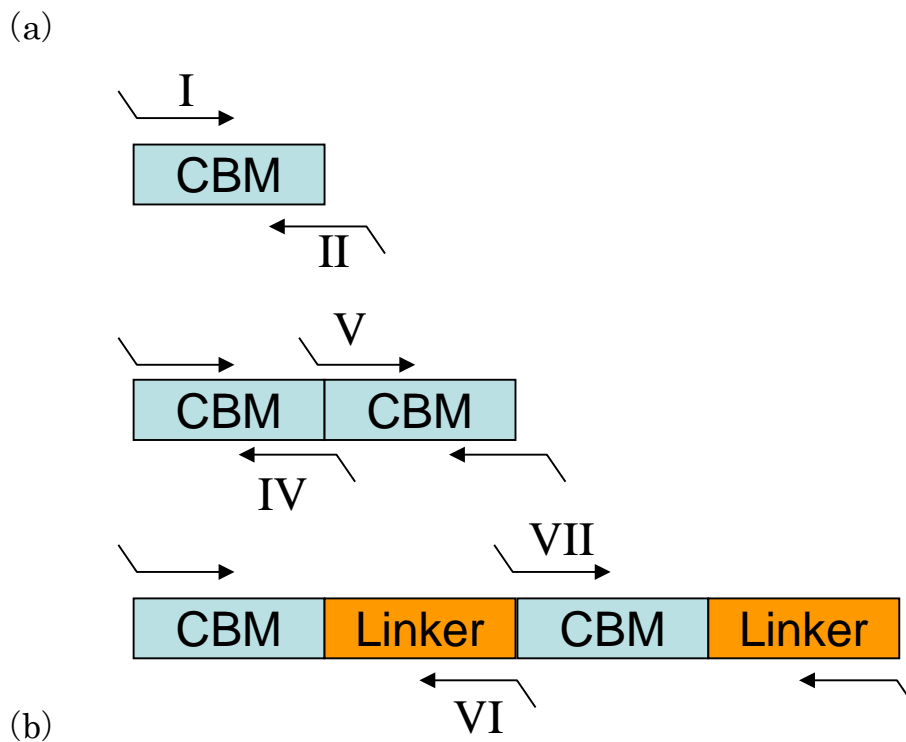
ミドベクター(pTV118), タンパク質の強力な発現プロモータとして知られるT7プロモータを有するpET15b(メルクミリポア社), 可溶性タグとして知られるGST (Glutathione S-transferase)-tagをN末端側に付与することができるpGEX4-3 (GEヘルスケア・ジャパン社)を選定した。

PCR法によりCBM遺伝子を発現用ベクターへ導入した。各発現用ベクターにおけるプライマーおよびPCR条件を図3に示す。発現用ベクターへのライゲーションにはInfusion HD Cloning kit(タカラバイオ社)を用いた。制限酵素処理の条件は、ベクターおよび DNA断片を酵素 1 $\mu$ L, 目的DNAを1 $\mu$ g, 10xBuffer 2  $\mu$ Lを蒸留水にて総量 20  $\mu$ Lに調整し, 50 $^{\circ}$ C, 2時間とした。ライゲーションはInfusion Cloning kitを用い, 条件は5x Infusion酵素 2  $\mu$ L, 線状化ベクター2  $\mu$ L, インサート1  $\mu$ Lを蒸留水にて総量 10  $\mu$ Lに調整し, 50 $^{\circ}$ C, 15分とした。

#### 大腸菌によるタンデム化CBMたんぱく質の発現系の検討

まず, CBM遺伝子をプライマーで増殖し, 増殖したDNA断片をさらにPCRにて連結することでタンデム化されたCBMのDNAを作製した。デザインおよびプライマーを図4に示す。CBMタンパク質を発現するために, 発現用ベクターに適した株を選択した。まずは, 単独でのCBMの発現を確認するためにpTV118ベクターに対してBL21 Competent Cell (メルクミリポア社)を選択した。

pTV118ベクターに対してはZ-Competent Cell (Funakoshi, TG-1株) を選択した。一般にファージミドベクターを利用した際, ストップコドンとしてアンバー(TAG)がマルチクローニングサイト(MCS)の直後に挿入されているが, サプレッサー変異株であるTG-1株ではアンバーストップコドンはチロシンとして読まれ, 繊維状ファージのコートタンパク質の一つであるgIIIpタンパク質と融合した状態で目的タンパク質は発現する。これを利用しCBMとgIIIpタンパク質が融



## Primers

IV: gcttgagcaagcttgaagacactgggagta

V: tactcccagtgcttcaagcttgctcaagc

VI: gcttgagcaagcttgtccgactggaggtac

VII: gtacctccagtcggacaagcttgctcaagc

図4 タンデム化 CBM のデザイン (a) とプライマー (b)

合した状態で発現させることで、CBMの発現確認および可溶性タンパク質として獲得することを考えた。

pGEX4-3ベクター(GE ヘルスケア社)に対しては、Rosetta-gami 2 competent cell(メルクミリポア社)を選択した。当該メーカー情報によると、Rosetta-gami 2株は、Rosetta株とOrigami株の双方の特性を有している。Rosetta株は7種のレアコドン (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, CGG, GGA) に対応するtRNAを有し大腸菌内でほとんど使用されないコドンをもつ真核生物タンパク質の発現を促進するように設計されている。一方で、Origami株はチオレドキシニンリダクターゼ (trxB) とグルタチオンリダクターゼ (gor) に変異をもち、細胞質でのジスルフィド結合形成を大幅に向上させることができ、タンパク質フォールディングが可能となるように設計されている。CBMの立体構造は2つのS-S結合がクロスする構造を有するために、大腸菌でのクローニングでは折りたたみが困難であることが予想されることから本菌株をもちいた。

それぞれの菌株へプラスミドベクターを形質導入するためのプライマーと

(a)

Forward primer

5'- ctgctcctcgcGGCCCAGCCGGCCATGGCTcaagcctgtt -

Reverse primer

5'- tgatgatgtgcgccgcaaggcattgtgagtaata -3'

(b)

1 cyc;	94C;	1 min
30 cycs;	98C;	10 sec
	55C;	5 sec
	72C;	10 sec

図5 タンパク質発現に用いたプライマー (a) と PCR 条件 (b)

回数	Temp (°C)	時間(sec)
1	94	120
30	94	30
	50	30
	72	60
1	4	-

図6 コロニーPCRの条件

PCR条件を図5に示す。また、形質導入方法としてヒートショック法を用いた。ヒートショック条件は、DH5 $\alpha$  45 $\mu$ Lに対し、Infusion混合液を 5 $\mu$ L混合し、5分間氷上静置した後、42°Cにて 45秒間ヒートショックを施し、2分間氷上静置した。その後、SOC培地 450 $\mu$ L混合し、37°Cにて 30分間回復培養した。回復培養後、100 $\mu$ Lを 100 $\mu$ g/mlアンピシリン LB培地プレートへ塗布し、一晩37°Cにてインキュベートすることでコロニーを獲得した。

単コロニー化した大腸菌株をコロニーPCRにより目的 CBM遺伝子断片の挿入を確認した図6にコロニーPCRの条件を示す。

#### コールド・オスモティック・ショック法による発現量の確認

発現量を確認するために、培養液のペリプラズム分画およびサイトゾル分画をコールド・オスモティック・ショック法により回収し、各分画をウェスタンブロット法によりバンドを確認した(図7)。形質導入が確認された大腸菌株を100 $\mu$ g/mlアンピシリン LB培地3 mLにコロニーを移植し、一晩37°Cにてプレカルチャーした。プレカルチャー(30  $\mu$ L)を2YTAG (3 mL)に加え、37 °Cにて約1時間半培養した(O.D.600 = 0.8)。次に、1 mM IPTGを加え、15分間37°Cにて培養

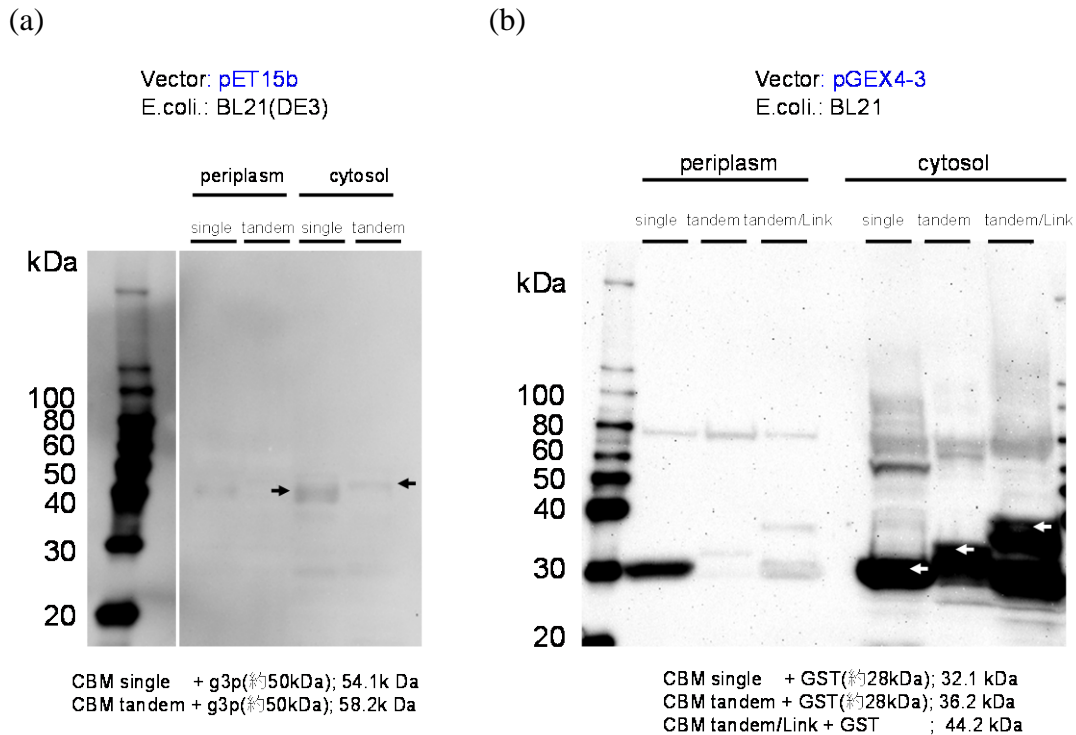


図7 ウェスタンブロット法による各タンパク質の発現量の確認。pET15b ベクターによる gIIIp タンパク質と融合した CBM タンパク質およびタンデム化 CBM タンパク質の His タグの検出 (a) と pGEX4-3 ベクターを用いた GST タグの検出 (b)

した。培養時間（二日間もしくは約16時間）は、適宜培養温度(16, 25, 30℃)に応じて決定した。まず、培養液を 4℃にて遠心(1500 G × 10分間)することで上清を回収した(Sup.)。次に、1xTES buffer(30 μL)を菌体に加えてタッピングにより溶解し、さらに1/5xTES Buffer(49.5 μl)を加えた。十分に溶解した後、氷上：にて30分間静置した。その後、4℃にて遠心(1500 G × 10 min)することで、上清を回収した(periplasm)。さらに、沈殿物へPBS (150 μl) を加え溶解し、10分間加熱処理(98 °C)した (cytosol)。

### タンパク質分画の回収

Rosetta-gami 2 competent cellを用いたタンパク質の発現系では、細胞質でのタ



ンパク質フォールディングが可能であるため、超音波により大腸菌細胞膜を破碎し、タンパク質を回収することとした。形質導入が確認された大腸菌株を 100 µg/mlアンピシリン LB培地3 mLにコロニーを移植し、一晩37

°Cにてプレカルチャーした。プレカルチャー(30 µL)を2YTAG (1 L)に加え、37 °Cにて約3時間培養した(O.D.600 = 0.8)。次に1 mM IPTGを加え、15分間37°Cにて培養したあと、16 °Cの温度にて2日間培養した。

遠心(8,000 rpm x 10分間)にて大腸菌を回収し、上清を捨てた。大腸菌体をPBS(10 mL)3回洗浄し、最終的にPBS(10 mL)に懸濁した大腸菌体を氷上にて超音波ホモジナイザー(日本エマソン社)を用いて破碎した。

### タンパク質の精製

タンパク質は、各タンパク質へ付与したタグを利用したビーズにて精製した。His タグにはニッケルビーズ、GST タグには Glutathione Sepharose ビーズ(GE ヘルスケア・ジャパン社)を用いた。超音波破碎した後、遠心(12,000rpm x 30 分間)して回収した上清にビーズを入れ、室温にて1時間揺らしながら反応した。GST Bulk kit (GE ヘルスケア・ジャパン社)に添付のカラムを用い、自由落下にてカラムにビーズを回収した。10 倍ボリュームの PBS(pH 7.4)によりビーズを洗浄し、1.2mL の溶出バッファー(50 mM Tris-HCl, 10 mM reduced glutathione, pH 8.0 )を入れゆっくり溶出した。

### タンパク質の確認

目的のタンパク質が産生されていることをウェスタンブロット法により確認した(図8)。GSTタグ(約26kDa)、GST-CBM単独(約31kDa)、GST-タンデム化CBM(約36kDa)、GST-リンカーを含むタンデム化CBM(約41kDa)に相当するサイズのバンドが検出されたことから、これらのタンパク質が産生され

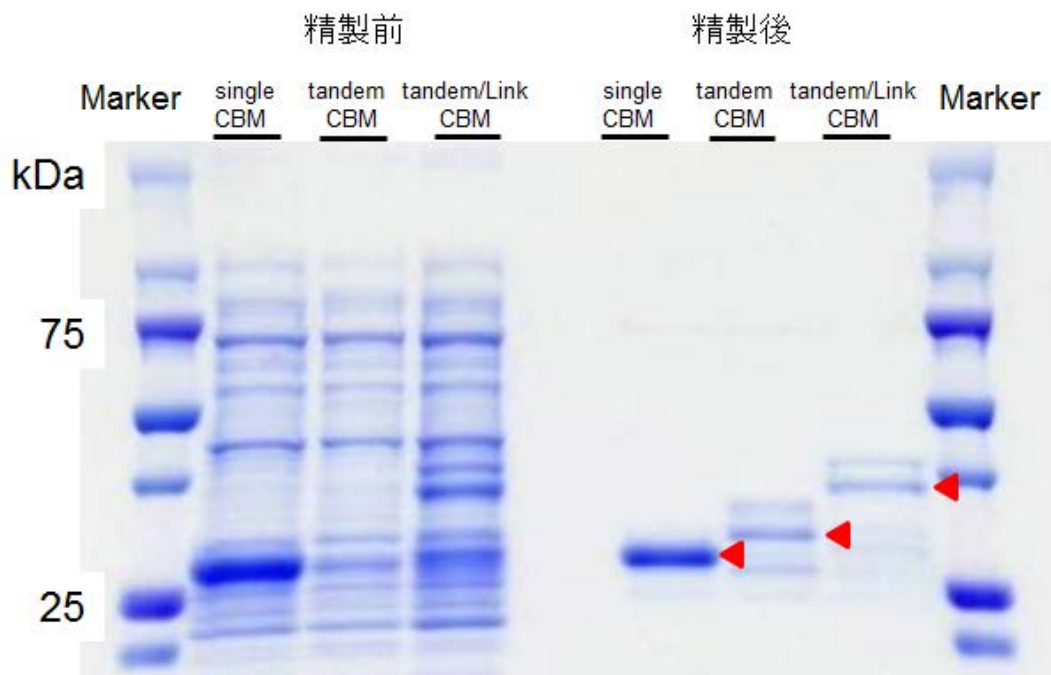


図8 グルタチオンビーズによる GST 融合たんぱく質の精製を示す SDS-PAGE。精製前（左）と精製後（右）。

ていると判断した。図8は、ビーズを用いたアフィニティ精製後のSDS-PAGEの結果を示す。目的のバンド以外が減少していることから、不要タンパク質の除去が確認された。

精製後の溶液の吸光度を測定してそれぞれのタンパク質の産生量を定量したところ、GST-CBM単独が2.6 mg/mL、GST-タンデム化CBMが0.7 mg/mL、GST-リンカーを含むタンデム化CBMが1.7 mg/mLであった。

#### 4-3 結果と考察

##### セルロースへの結合力の評価

結晶性セルロースへの結合力を評価するために、1.5mLチューブ内で各CBMと反応させELISA法の原理を用いて450nmの波長における吸光度を測定した(図9)。結晶性セルロースは0.1mgとした。反応させたCBM単独、タンデム化CBM、リンカー付タンデム化CBMの量はそれぞれ0.1mg, 0.05mg, 0.05mgとした。タンデム化CBMはCBMあることから、その量は二分の一とした。タンデム化CBMはCBM単独に比べて結合量が倍以上であることから、結合力が向上していることが確認された。また、リンカー付タンデム化CBMについても結合力が向上してい

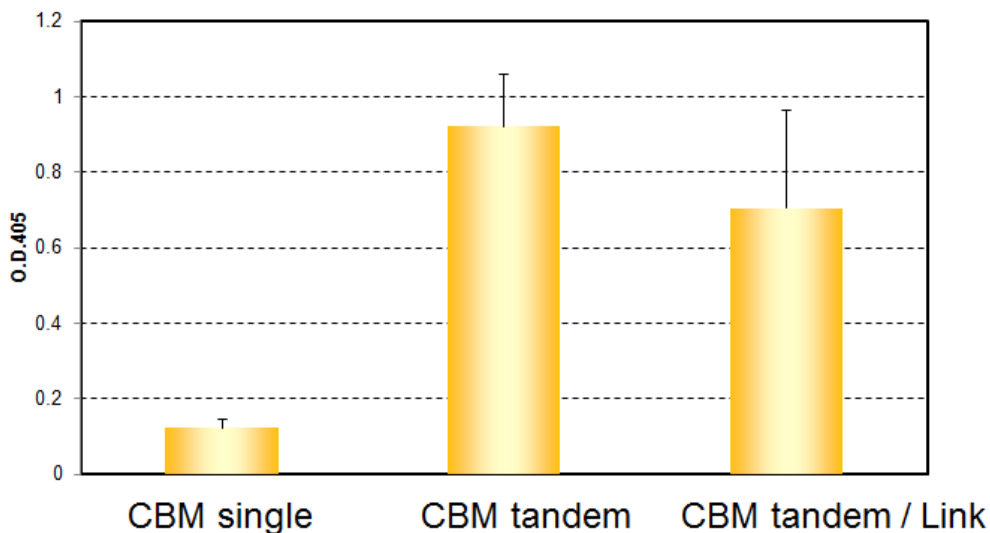


図9 ELISA法による結晶性セルロースと各GST融合CBMタンパク質の相互作用

ることが確認された。リンカー付タンデム化CBMではタンデム化CBMに対して結合力が低い傾向である。これは、リンカーの揺らぎが大きいため、アフィニティの低いCBMのアビディティがリンカーを含まないタンデム化CBMより低くなったことによると考えられる。

#### タンデム化CBMのセルロース非結晶化の評価

CBMの結合力の向上による非結晶化能力を評価するため、セルラーゼ（シグマアルドリッチ社）とCBMを混合し結晶性セルロースを糖化することによるグルコースの産生量を測定した（図10）。グルコースはGlucose Assay kit（Funakoshi社）で定量した。結晶性セルロースは0.5 mgとした。反応させたCBM単独，タンデム化CBMの量はそれぞれ0.1 mg, 0.05 mgとした。反応時間は24時間とした。Control（CBMタンパク質を含まない場合）に対して，CBMタンパク質を含む反応液では産生されるグルコース量が増加していることから，CBMタンパク質が結晶性セルロースへ結合することにより非結晶化が進行し，セルラーゼとセルロースファイバーの接触確率が増加することにより糖化が促進されたと考えられる。しかしながら，CBMタンパク質単独と結合力が増加したタンデム化CBMタンパク質ではグルコースの産生量に違いが見られなかった。CBMタンパク質単

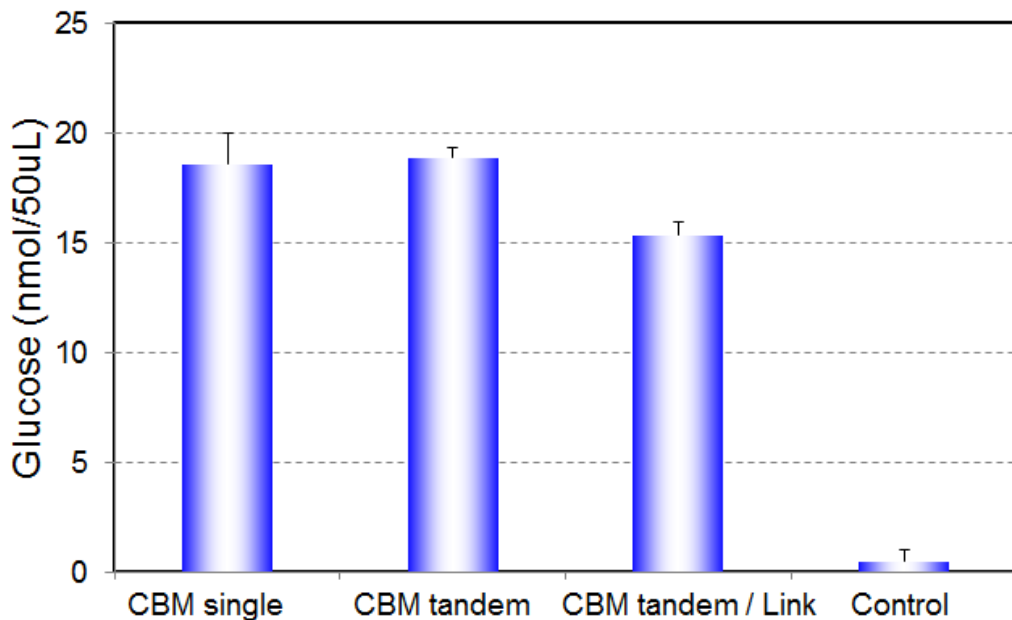


図 10 結晶性セルロースを各 GST 融合 CBM たんぱく質とセルラーゼの混合液により 24 時間糖化して産生されたグルコース量

独の結合力 ( $K_a$ ) は約 $10^6$ と低くセルラーゼの活性に比べて非結晶化する速度が遅いため、非結晶化される前にセルラーゼによる糖化が進んだことが原因と考えられた。そこで、まずCBMによる非結晶化処理を24時間実施した後、セルラーゼを加えて糖化(24時間)した(図11)。前述の図10と同様にcontrolに対してCBMタンパク質で非結晶化処理した場合は産生されるグルコース量が増加していたが、CBMタンパク質単独に対してタンデム化CBMタンパク質では、結合力で認められたほどの向上がグルコース量の増加として認められなかった。このことから、非結晶化が結合力だけでは促進できず、触媒活性部位との協奏作用を含むメカニズムを考える必要があると考えられる。

以上のことから、CBMタンパク質を添加することでセルラーゼ結晶性セルロースの非結晶化が進み糖化効率が向上することが示唆されたが、結合力向上に

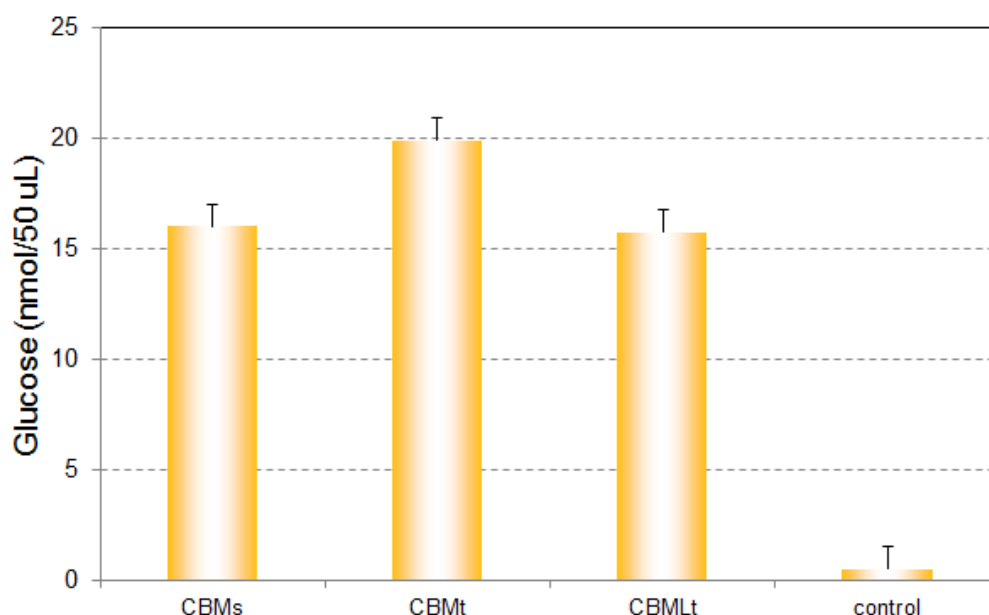


図 11 結晶性セルロースを各 GST 融合 CBM たんぱく質と 24 時間反応した後、セルラーゼで 24 時間糖化して産生されたグルコース量

よる糖化向上には至らなかった。

#### 4-4 小括

CBMの結合力を向上する方法として、CBMを2つ結合したタンデム化CBMを作製した。タンデム化CBMは、CBM単独と比較して結晶性セルロースへの結合力が向上することが確認された。一方、CBMタンパク質を混在させた場合、セルラーゼの糖化効率の向上が認められた。しかしながら、結晶性セルロースへの親和性が向上したタンデム化CBMにおける糖化効率の向上は認められなかった。このことから、CBMタンパク質単独による非結晶化、つまり、CBMタンパク質が結合することにより非結晶化されたセルロースが再び水素結合することなく、結晶性セルロースが糖化されるメカニズムが示唆される結果となった。

#### 4-5 引用文献

1. Oda, M., & Azuma, T. (2000). Reevaluation of stoichiometry and affinity/avidity in interactions between anti-hapten antibodies and mono- or multi-valent antigens. *Molecular immunology*, 37(18), 1111–22.
2. Nagy, T., Simpson, P., Williamson, M. P., Hazlewood, G. P., Gilbert, H. J., & Orosz, L. (1998). All three surface tryptophans in Type {IIa} cellulose binding domains play a pivotal role in binding both soluble and insoluble ligands. *{FEBS} Letters*, 429(3), 312–316.
3. Nordon, R. E., Craig, S. J., & Foong, F. C. (2009). Molecular engineering of the cellulosome complex for affinity and bioenergy applications. *Biotechnology letters*, 31(4), 465–76.
4. Lehtiö, J. (2001). Functional studies and engineering of family 1 carbohydrate-binding modules. *Bioteknologi*. Retrieved from <http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2:8989>.



## 第 5 章

### CNT による複合化したセルラーゼの作製とその評価

#### 5-1 小序論

地球温暖化の抑制策の一つとしてバイオマスの利活用が注目されている。その主たる活用用途であるバイオエタノール製造方法においては、セルロースを利用した技術が数多く報告されている。しかし、セルロースは水素結合で強固に結合した難分解性の高分子であり、酵素による分解速度は非常に遅く、これがセルロース利用の大きな障壁となっている。セルロース分解酵素(セルラーゼ)は、エンドグルカナーゼ(EG), セロビオヒドロラーゼ(CBH),  $\beta$ -グルコシダーゼ(BGL)に大きく分類され、これら三者が協奏的に働くことによってセルロースが効率的に分解される。エキソグルコシダーゼがセルロース上の非結晶領域(アモルファス領域)を分解して末端を生成し、セロビオヒドロラーゼがその末端からセロビオース(二糖)単位に分解する。最後に、エンドグルコシダーゼがグルコースに分解する。近年、セルロース分解性細菌から産生されるセルロソーム構造を利用した報告がなされている<sup>1,2,3,4</sup>。また、酵母表層へ酵素を提示し、効率的に糖化を促す報告もなされている<sup>5,6</sup>。これらの報告によると、複数のセルラーゼが局所的に集約した構造をとり、協奏的な働きによって単独のセルラーゼよりも効率的にセルロースを分解することが示唆されている。

そこで、我々はセルロソーム構造を簡易的に再現でき工業利用へ活用することを目的とし、蛋白質への吸着力と比表面積の大きさに着目することで、セルラーゼの担体としてカーボンナノチューブ(CNT; Carbon Nano Tube)を選択した(図1)。セルロースの構造は直鎖上のポリマーであるため、基材もアスペクト

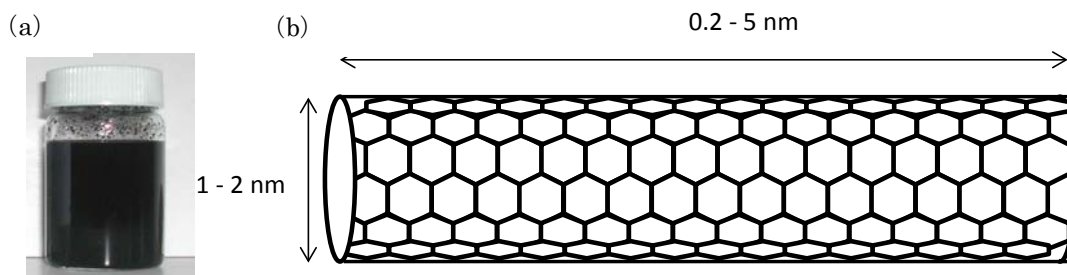


図1 カーボンナノチューブ

分散剤とともに水中に分散状態にある CNT (a) とその構造 (b)。

比が高い構造であると反応効率も良いと考えられる。そこでCNTの特性である高アスペクト比かつ高疎水吸着性を利用した。CNTは、直径が数ナノメートルであり長さが数マイクロメートルとミクロに細長い高いアスペクト比を有する。また、CNTは水と親和性を有しにくく、超疎水性を有することで知られている。CNTを用いてセルラーゼを複合化し局所領域にて協奏作用が働けば、反応液中にフリーで3つの酵素が存在する場合に比べて、単位時間当たりの糖化効率が向上すると考えられる (図2)<sup>7</sup>。

本章では、CNTへ吸着させたセルラーゼによりセルロースを分解し、産生され

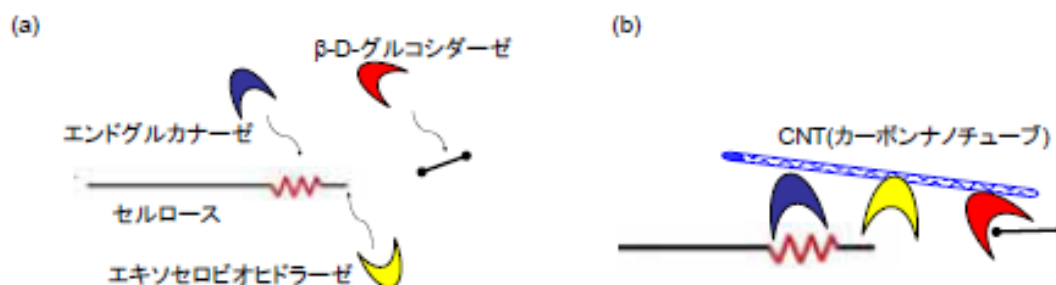


図2 複合体形成による糖化効率向上へのアプローチ

CNTが無い場合 (a) に比べ、CNTへセルラーゼが吸着した場合 (b) , 反応場での近接効果により糖化効率が向上すると考えられる。

たグルコース量を測定することにより，その活性を評価した。

## 5-2 材料と方法

### セルラーゼの CNT への固定法

セルラーゼは，C8546(Sigma-Aldrich 社)を使用した。CNT は，単層カーボンナノチューブ(KH-chemicals 社)を使用した。セルラーゼは反応溶液(10 mM Citrate Buffer, pH 5.0)に 2 mg/mL で溶解し，0.45  $\mu\text{m}$  フィルタ(ミニザルトハイフロー，ザルトリウス社)を通した。CNT は反応溶液に 20 vol.%で攪拌溶解した。セルラーゼは，一晚室温にて回転攪拌することにより CNT へ担持させた。

### セルラーゼ固定化 CNT によるセルロース糖化方法

結晶性セルロースとして，Avicel (PH-101, Sigma-Aldrich 社)を使用した。Avicel を反応溶液に 2 mg/mL で溶解し，セルラーゼを吸着させた CNT 含有の反応溶液と 1:1 の体積比で混合した。混合した反応溶液を，1 時間 37 度にて回転攪拌した。

攪拌後，混合溶液を 98 度，30 分間で熱処理し，セルラーゼを失活させた。熱処理した混合溶液を遠心し，さらに上清を 0.22  $\mu\text{m}$  フィルタ(ミリポア社)に通した。フィルタ分離した溶液を回収し測定に用いた。

### HPLCを用いた産生グルコース量の測定

高速液体クロマトグラフィ(HPLC)により産生したグルコース量を測定した。分析カラムはTSK-GEL G-Oligo-PW (粒子径 7  $\mu\text{m}$ , 7.8 mmI.D. x 30 cm, 東ソー社)を用いた。HPLC装置(島津製作所)の示差屈折率検出器(RID-10A, 島津製作所)を用いて，溶液中に含まれるグルコース量を測定した。測定は，50  $\mu\text{L}$ の溶液を

用いた。溶媒はミリQ水を用いた。標準サンプルは500倍希釈した2%グルコースを用い、50  $\mu$ Lを測定した。

### 5-3 結果と考察

ランダムに疎水結合させたCNTにランダムに疎水結合したセルラーゼ複合体では、基材に固定化しないセルラーゼに比べて糖化量が向上した (図3)。セルラーゼの複合体を形成することにより、糖化量が2.5倍向上することが確認され

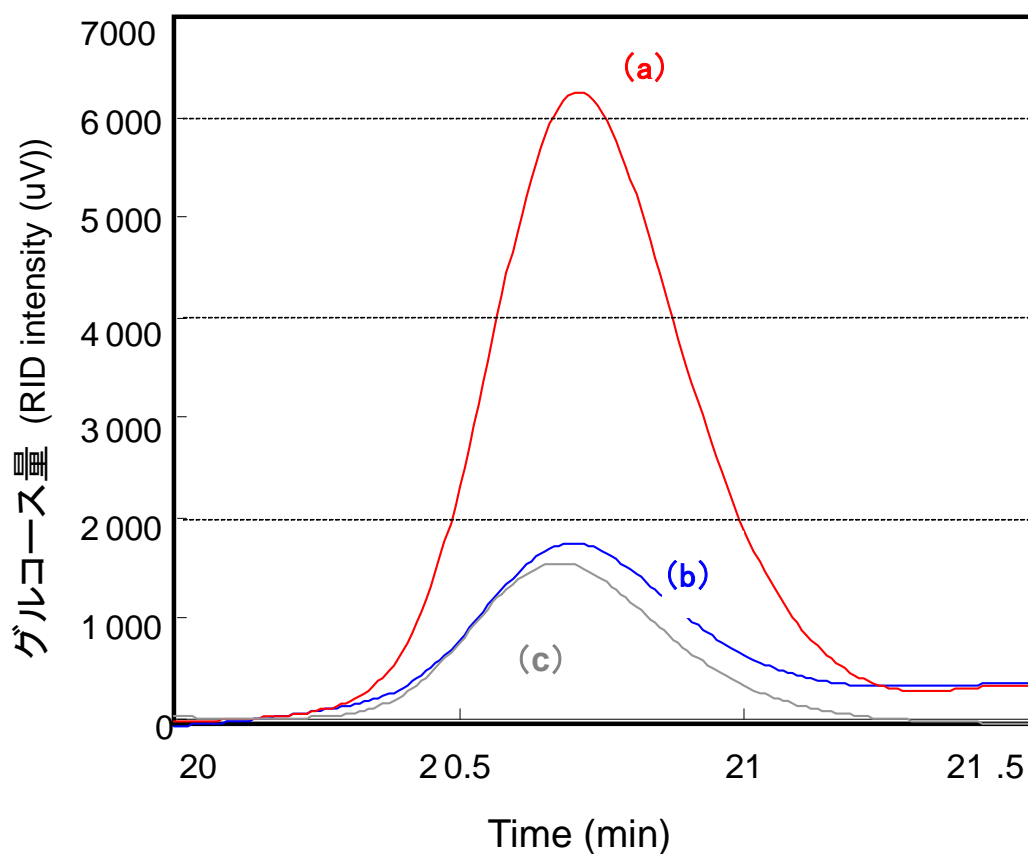


図3 CNT複合体セルラーゼ (a) とセルラーゼ (b) による結晶性セルロースを糖化して産生されたグルコース量の比較 (HPLC)。0.22 $\mu$ molのグルコース (c)

た。

CNT に吸着固定しているセルラーゼ量を見積もるために、SDS-PAGE 法を実施した (図 4)。CNT とセルラーゼの混合液から CNT 分画のみを泳動したときのバンド強度 ( (a) の I) と上清分画を泳動したときのバンド強度 ( (b) の I) を 256 階調で数値化し比較したところ、CNT に吸着固定されている量は、混合液に含まれるセルラーゼ量のおよそ 10 % しか CNT 上に存在していないことがわかった。従って、CNT 上へのセルラーゼ固定量を増加することができれば、より効率のよい糖化プロセスを構築できると考えられる。また、本検討では、3 種類のセルラーゼが全て混合された状態で CNT に吸着固定されている。吸着固定されている 3 種類のセルラーゼの配列や配向、分量比を制御することができ

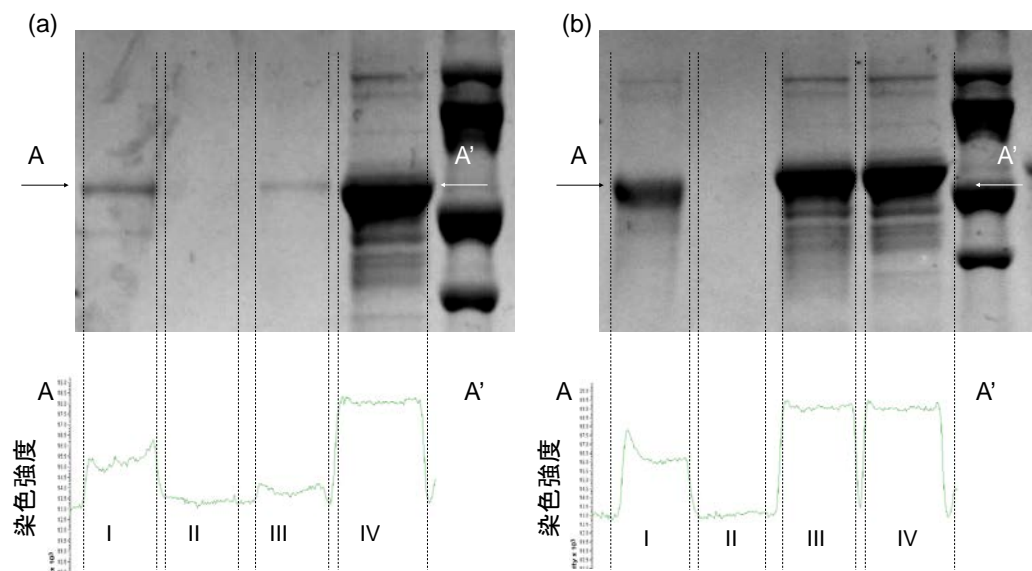


図 4 SDS-PAGE 法による CNT に吸着固定されたセルラーゼ量の確認。  
CNT とセルラーゼの混合液から CNT 分画のみを流したときのバンドとその染色強度 (a) と上清分画を流したときのバンドとその染色強度 (b)。CNT とセルラーゼ混合液 (I) , CNT のみ (II) , セルラーゼのみ (III) , 0.01mg のセルラーゼ (IV) 。

ればより効率の高い糖化が実施できると考えられる。

最後に複合体セルラーゼは磁石により回収できることが確認され（図5），リユースできることが示唆された。しかしながら，精製されたCNTは磁性を持つことはなく，磁石で回収できないはずである。CNTを大量生産する方法として，CCVD法（chemical vapor deposition）がある。これは，高温にした金属などの触媒粒子に，炭化水素ガスを反応させて生成する方法である。可能性としては，触媒として用いられたマグネシウムなどの金属物質の混入により，上述のような磁性を帯びたことが考えられる。

これらのことから，セルラーゼを直線状の基材を用いて複合化することで，セルラーゼの協奏作用が局所的に働き，直鎖上のセルロースを効率的に糖化することができることが分かった。



図6 磁石によりCNT混合溶液が吸引される様子

図5 磁石により CNT セルラーゼ混合溶液内の CNT の吸着  
8% CNT のみ(a)では吸着されないが，セルラーゼとの混合液(b)では吸着される。

#### 5-4 小括

前処理および糖化効率を向上するための技術について実施，評価した。市販のセルラーゼの糖化効率を向上する取り組みとして，CNTを基材としたセルラーゼ複合体を作製し評価した。CNTを基材としてセルラーゼ複合体を作製し，グルコース量をHPLCにより評価したところ，糖化効率の向上が確認された。

## 5-5 引用文献

1. Fierobe, H. P., Mechaly, A., Tardif, C., Belaich, A., Lamed, R., Shoham, Y., Bayer, E. A. (2001). Design and production of active cellulosome chimeras. Selective incorporation of dockerin-containing enzymes into defined functional complexes. *The Journal of biological chemistry*, 276(24), 21257–61.
2. Morais, Sarah, Barak, Y., Caspi, J., Hadar, Y., Lamed, R., Shoham, Y., ... Bayer, E. A. (2010). Contribution of a xylan-binding module to the degradation of a complex cellulosic substrate by designer cellulosomes. *Applied and environmental microbiology*, 76(12), 3787–96.
3. Caspi, J., Barak, Y., Haimovitz, R., Gilary, H., Irwin, D. C., Lamed, R., ... Bayer, E. A. (2010). Thermobifida fusca exoglucanase Cel6B is incompatible with the cellulosomal mode in contrast to endoglucanase Cel6A. *Systems and synthetic biology*, 4(3), 193–201.
4. Fierobe, H. P., Mechaly, A., Tardif, C., Belaich, A., Lamed, R., Shoham, Y., ... Bayer, E. A. (2001). Design and production of active cellulosome chimeras. Selective incorporation of dockerin-containing enzymes into defined functional complexes. *The Journal of biological chemistry*, 276(24), 21257–61.s
5. Ueda, M., & Tanaka, A. (2000). Cell surface engineering of yeast: Construction of arming yeast with biocatalyst. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(2), 125–136.
6. Shigechi, H., Koh, J., Fujita, Y., Matsumoto, T., Bito, Y., Ueda, M., ... Kondo, A. (2004). Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and alpha-amylase. *Applied and environmental microbiology*, 70(8), 5037–40.



7. Cang-Rong, J. T., & Pastorin, G. (2009). The influence of carbon nanotubes on enzyme activity and structure: investigation of different immobilization procedures through enzyme kinetics and circular dichroism studies. *Nanotechnology*, 20(25), 255102.

## 第 6 章

### 総括

第一章では、バイオエタノール生産の経済的および技術的な背景とその主な技術となるスターチ由来の糖を原料としたバイオエタノールの課題、セルロース由来の糖を原料としたバイオエタノールの必要性とその課題、バイオエタノール技術における課題について言及した。

CO<sub>2</sub>濃度の上昇により、地球の気温の上昇や各地の熱帯化、海水面の上昇などといった環境問題が発生していることから、化石燃料を使用したエネルギー生産が見直され始め、CO<sub>2</sub>排出を低減する次世代のエネルギー源の創生が火急の問題となっている。バイオエタノールは、サトウキビやトウモロコシといったCO<sub>2</sub>を吸収して育つ植物を原料とするため、CO<sub>2</sub>排出を低減できる石油代替エネルギーとして注目を集めている。しかしながら、農作物のスターチ由来の糖資源は食物と競合し、安定した価格の維持が困難である。

そこで、木材などの非食物であるセルロース由来の糖を資源とする次世代のバイオエタノールが近年注目されている。セルロースもスターチと同様にグルコースのポリペプチドである。スターチは $\alpha$ グルコースがグリコシド結合するため、らせん状かつ所々分岐を有する構造をしている。らせん状かつ分岐を有する構造のおかげで、水に可溶で酵素（アミラーゼ）の分解を受けやすく、グルコースへ糖化されやすい性質を持つ。一方、セルロースは $\beta$ グルコースがグリコシド結合しており、その構造は直鎖的である。直鎖性のため隣り合うセルロースポリペプチドは互いに水素結合し、水に溶けにくい強固な構造を有している。セルロースを原料とする次世代バイオエタノールでは2つの技術、つまり、水

に不溶のセルロース（結晶セルロース）の水素結合を効率的に切断し可溶性セルロース（非結晶性セルロース）を生成する技術（前処理技術），および非結晶性セルロースを酵素（セルラーゼ）により糖化し効率的にグルコースに変換する技術（糖化技術）が注目されている。

米国エネルギー庁の報告によると，糖化技術の開発により最も生産コストを抑えることができ，さらに，前処理技術の開発によってより生産コストを抑えることができると試算されている。スターチ由来の糖を原料とするバイオエタノールは現在，ブラジルや北米において多く生産されている。特にブラジルでは石油価格と同程度で販売され，国内ではバイオエタノールを含有したガソリンで走行可能な自動車を使用されている。しかしながら，セルロース由来の糖を資源とするセルロースでは，同程度のコストで生産することが未だできてはいない。その原因は前述の前処理および糖化するプロセスの低コスト化に課題があるためである。

第二章では，前述の課題である前処理技術として化学的なアプローチの一つとして，イオン液体によるセルロースの非結晶化と磁石による回収する取組みについて検討した。その結果，磁性を有したイオン液体がセルロースを非結晶化することができ，さらに磁石により回収できることが確認された。

セルロース由来の糖原料から迅速かつ低コストでグルコース化するためには，セルロースの非結晶化が必要である。その方法としては物理的に処理する方法と化学的な方法がある。生産するエネルギー効率を鑑みると，化学的な方法がより適していると考えられる。化学的な方法の中でも，近年注目されているのがイオン液体である。

しかしながら，イオン液体の課題は作製コストが高いことにある。イオン液体を回収しリユースすることで，コストを下げられると考えた。一方で，システ

ム全体を鑑みると、イオン液体がセルラーゼ活性へ与える影響やエタノール発酵における酵母への影響があることがわかっている。筆者らの評価によると、培養液中に10%のイオン液体が存在すると、酵母の増殖が阻害されることがわかった（第62回日本木材学会大会（2012/3）「蛍光標識イオン液体含有培地で育成した酵母細胞の観察」より）。

そこで、磁石により回収できる磁性を持つイオン液体を作製し、さらにセルロースを非結晶化できるイオン液体の構造を作製し評価したところ、セルロースの非結晶化が確認され、磁石によりイオン液体を回収できることがわかった。

これらのことから、磁性を有するイオン液体は、磁石により回収することでイオン液体をリサイクルすること、およびイオン液体を反応溶液から除去することが可能となるため、バイオエタノール生産工程における低コスト化およびバイオエタノールの生産能力の向上に寄与することが期待でき、産業応用上有機義であることが確認された。

第三章では、変異を導入した **CBM** ライブラリーから、より結合力の強い **CBM** 変異体をセレクションしたところ、ネイティブと同じ配列の **CBM** がエンリッチされた。ネイティブと異なる配列の **CBM** 変異体をファージ表層に提示させ結晶性セルロースとの相互作用を **ELISA** にて評価したところ、ネイティブの **CBM** より結合力が弱く、目的とした **CBM** 変異体ではないことがわかった。

前章において、セルロースに対する **CBM** の結合力を上げると、セルロースの非結晶化が促進されることがわかったことから、**CBM** 単独での結合力を上げることでより非結晶化を促進できると考えた。ファージディスプレイを利用したパニング法は、ランダムに変異を導入した **CBM** をファージ表層に提示させ、セルロースに結合するファージ以外を洗浄して、結合力の高い変異 **CBM** を提示したファージのみ回収することに適している。

水に不溶であるセルロースがターゲットであるため、イムノチューブなどへの固定化が困難である。そこでまず、評価系、パニング方法とその洗浄条件について検討を行った。

第四章では、セロビオヒドロラーゼIIが有するセルロース結合モジュール (CBM; Cellulose Binding Module) を遺伝子工学的に連結させることでセルロースへの結合力を高め、その結果、セルロースの非結晶化を促進できることを確認した。

CBM を有するセルラーゼが木綿の表面の非結晶化を促進することが報告されている。また、CBM を遺伝子工学的に酵素活性部位へ結合することで、よりセルロースの非結晶化が進むという報告がある。これらのことから、CBM のセルロースへの結合力を強めることでセルロースの水素結合をより切断し、非結晶化を促進することができると考えた。そこで、CBM を連結した CBM タンデムモジュールを遺伝子工学的に作製し評価した。

第五章では、セルラーゼの複合体化による糖化能力の向上の取組みを実施した。その結果、複合体化しないセルラーゼに対して、単位糖化量が2.5倍向上することが確認された。

複合体形成のためにセルラーゼを固定化するための基材が必要であるが、本研究ではカーボンナノチューブ(CNT; Carbon Nano Tube)を用いた。セルロースの構造は直鎖上のポリマーであるため、基材もアスペクト比が高い構造であると反応効率も良いと考えられる。そこでCNTの特性である高アスペクト比かつ高疎水吸着性を利用した。CNTは、直径が数ナノメートルであり長さが数マイクロメートルとマイクロに細長い高いアスペクト比を有する。また、CNTは水と親和性を有しにくく、超疎水性を有することで知られている。

また、セルラーゼは主に3種類の性質が異なる酵素のカクテルであり、これら

酵素の協奏作用によりセルロースがグルコースに糖化されていると言われている。3種類の酵素とはすなわち、エキソグルコシダーゼとセロビオヒドロラーゼ、エンドグルコシダーゼである。エキソグルコシダーゼがセルロース上の非結晶領域（アモルファス領域）を分解して末端を生成し、セロビオヒドロラーゼがその末端からセロビオース（二糖）単位に分解する。最後に、エンドグルコシダーゼがグルコースに分解する。

これらセルラーゼを複合化し局所領域にて協奏作用が働けば、反応液中にフリーで3つの酵素が存在する場合に比べて、単位時間当たりの糖化効率が向上すると考えられる。ランダムに疎水結合させたCNTにランダムに疎水結合したセルラーゼ複合体では、基材に固定化しないセルラーゼに比べて糖化量が向上し、ポリスチレンビーズに比べても糖化量が向上した。このことから、セルラーゼを直線状の基材を用いて複合化することで、セルラーゼの協奏作用が局所的に働き、直鎖上のセルロースを効率的に糖化することができることが分かった。

以上のことから、セルロース由来の糖資源を活用したバイオエタノール技術では前処理技術および糖化技術が重要であること、CNTを用いたセルラーゼ複合体を形成することにより糖化効率が向上すること、磁性化したイオン液体を用いることによりセルロースの非結晶化が可能でありかつ磁石による回収が可能であること、CBMを連結することでセルロースへの結合力を向上することができ非結晶化を促進できることが確認された。より強い結合力を有したCBM変異体を獲得するためにファージディスプレイ法およびバイオパニングを実施したが、ネイティブのCBMがエンリッチされることが確認された。

これらの取組みにより，より低コストな前処理および糖化が可能となることが示唆され，石油に代わる再生資源エネルギーとしてのバイオエタノール技術に役立つと考えられる。

## 発表文献リスト

主論文

著 者 Jin Muraoka , Noriho Kamiya, Yuji Ito

論文題目 「 Preparation and evaluation of cellulose-dissolving magnetic ionic liquid」

2013 年 3 月 Journal of Molecular Liquids, Vol. 182, pp.76-78

学会報告

平成 24 年度繊維学会年次大会 2012/6

「カーボンナノチューブを利用したセルラーゼ活性の向上」

第 62 回日本木材学会大会 2012/3

「蛍光標識イオン液体含有培地で育成した酵母細胞の観察」

第59回応用物理学会 2012/3

「Dissolution of Cellulose with the magnetic ionic liquid 」



## 謝辞

本研究を進めるにあたり多くの方々に御世話になりました。まずは、ここに深く感謝の意を表します。

本研究は、鹿児島大学大学院理工学研究科システム科学専攻（伊東研究室）にて行われた研究であり、本論文は私が本研究室に在籍した平成23年度から平成25年度の研究成果をまとめたものです。研究活動全般にわたり格別なる御指導と御高配を賜りました鹿児島大学大学院理工学研究科教授 伊東祐二先生には、甚大なる謝意を表します。

私が3年間で博士論文をまとめることができたのは、先生のお人柄の良さのみならず、研究者としての考え方や面白さを常に私に示してくださり、私の遅々として進まぬ研究に辛抱強く付き合い、公私共にお付き合いくださったからに他なりません。伊東研究室での経験を糧に、今後も研究者として、また企業人として人の役に立っていく所存です。

貴重な御教示を賜りました鹿児島大学大学院理工学研究科教授 内海俊樹先生および隅田泰生先生、九州大学大学院工学研究院応用化学部門教授 神谷典穂先生、ならびに鹿児島大学大学院理工学研究科准教授 有馬一成先生に心より感謝申し上げます。ご多忙な先生方からご指導やご助言を賜ることができたおかげで、研究に対する姿勢、実験での精密さが改善され、本論文の完成度が高まりました。本当にありがとうございました。

研究活動においては、パナソニック株式会社 R&D本部 デバイスソリューションセンター ライフマテリアルグループ グループマネージャー 吉岡俊彦様、プロジェクトリーダー 下野健様、恩師 中山浩様には、大切な業務が

あるにもかかわらずこのような機会を与えていただき、さらに多大なる御支援を頂戴しました。大変感謝しております。

学生生活においては、伊東研究室の第一期生として幸いにも多数の同級生たち、後輩たちとの出会いに恵まれ、大いなる刺激と笑いを提供してもらいました。皆様には感謝しております。共に過ごした日々が有意義であったと、将来また語り合うことを楽しみにしております。ありがとうございました。

最後になりましたが、博士課程に進学する機会を与えてくださり、ありとあらゆる場面で私を温かく見守り続けてくれた両親および家族に深く感謝いたします。

ここに重ねて厚く謝意を表し、謝辞といたします。

平成26年3月

村岡 仁