

ハイブリッドナノセルロソーム：セルロース結合モジュールの 多価化デザインによるセルラーゼ高機能化設計

中澤 光・金 渡明・松山 崇・石田 亘広・池内 暁紀・熊谷 泉・梅津 光央
東北大学 大学院工学研究科 バイオ工学専攻, 豊田中央研究所

〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-11

E-mail: mitsuo@kuma.che.tohoku.ac.jp

Home Page: <http://www.che.tohoku.ac.jp/~kuma/index.htm>

構造生物学は、蛋白質の構造と機能を 3 次構造単位のマジュールで理解することを可能とした。我々は、それらマジュールのサイズ領域が「ナノ」であることに着目し、蛋白質の 3 次構造断片や有機・無機ナノ材を積木マジュールと捉え、積木細工の発想でそれらマジュールを融合させて高機能なデバイス素子进行設計する方法論を研究している。本研究では、この手法をマジュール酵素である糖化酵素セルラーゼに应用し、次世代の環境調和型エネルギー資源であるセルロースから低環境負荷かつ効率的に糖化できるハイブリッドナノセルロソームの開発を行った。

1. はじめに

構造生物学の発展により、ドメイン単位での蛋白質の立体構造解析が比較的容易になり、年数万件のペースでデータが蓄積されている。一方、ナノテクノロジーの分野では、様々な有機・無機素材が蛋白質ドメインと同じ数~十 nm レベルのサイズまでダウンサイズ化している。そこで我々は、機能を持つ蛋白質ドメインやナノ素材を積木マジュールと捉え、それらマジュールを積木細工の発想でボトムアップに融合させることで、利用目的に特化して高機能なハイブリッドナノ蛋白質を設計している。

その中で、我々が注目している蛋白質に糖化酵素セルラーゼがある。セルラーゼは、セルロースを加水分解する触媒ドメイン(CD)とセルロース結合機能を持つマジュール(CBM)が構造・機能的に独立しているマジュール酵素であり、酵素が積極的に固相基質表面に局在化することによって、CD に対する実質基質濃度を向上させて、加水分解反応を促進させている。さらに、一部のルーメンバクテリアでは、CBM を持つ巨大な骨格蛋白質に機能の異なった複数の CD が結合してセルロソームと呼ばれる巨大複合体を形成し、セルロースを効率的に糖化している。そこで我々は、近年、CD と CBM をマジュール別に発現調製した後、ナノ粒子を核として 3 次元的にヘテロクラスター化することによって、セルロースの加水分解反応を飛躍的に向上させた

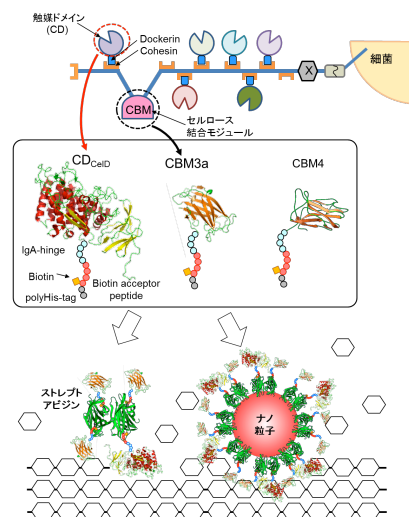


図 1. ハイブリッドナノセルロソーム設計

ハイブリッドナノセルロソームの設計を行っている[1]。

本研究では、セルロソーム中の CD, CBM を多量体蛋白質やナノ粒子表面へ再編成することによって、CD の触媒機能を飛躍的に向上させると共に、CBM とクラスター構造フォーマットの相関を検討した(図 1)[2]。

2. 解析データおよび方法

ハイブリッドナノセルロソームの作製

CD は、エンド型活性を持つ、*Clostridium thermocellum* 由来セルロソーム中にある エンドグルカナーゼ D(CelD)の CD(CD_{CelD})を用い、CBM は、同じセルロソ

ーム由来のCBM3aもしくは*Cellulomonas fimi*由来エンドグルカナーゼのCBM (CBM4)を用いた。各々のモジュールのC末端には、抗体分子中のヒンジ領域を結ぶ硬直なIgAリンカー配列を介してビオチン化タグを融合したモジュールとして大腸菌で発現調製し、ストレプトアビジンもしくはストレプトアビジン修飾CdSeナノ粒子(粒子径20 nm, ビオチン結合サイト数30個)と混合することによって、ビオチン-アビジン相互作用を介して、CD_{CelD}とCBMをクラスター化させた(図1)。

3. 結果と考察

(1) セルロソーム成分モジュールから構築したハイブリッドナノセルロソーム

まず、ビオチン化CD_{CelD}とCBM3aをストレプトアビジンと様々な比率で混合させて作製したハイブリッドナノセルロソームの活性を、リン酸膨潤セルロースを基質として測定した(図2a)。その結果、クラスター中のCBM存在比が増加するにつれて触媒活性が向上し、CD1分子換算での還元糖生産量が遊離CD_{CelD}と比較して最大5.5倍に向上した。一方、ストレプトアビジン修飾ナノ粒子を核とした場合は、ストレプトアビジンの場合と同様にクラスター中のCBM存在比が増加するにつれて触媒活性は向上したが、ストレプトアビジンを核としたハイブリッドナノセルロソームよりは、活性の向上率は低かった(図2b)。これより、CDとCBMを3次元的に再編成させることによって活性を飛躍的に向上させ得るが、クラスター構造によってその向上率は変化することが示された。

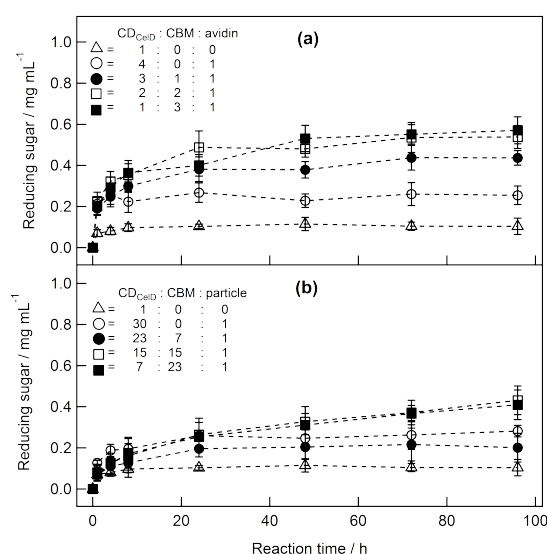


図2. CD_{CelD}とCBM3aより作製したハイブリッドナノセルロソーム

(2) セルロース結合モジュールの機能特性がハイブリッドナノセルロソームに与える影響

次に、CBM3aの代わりに*Cellulomonas fimi*由来のCBM4を用いて、ハイブリッドナノセルロソームを作製した。その結果、CBM3aを用いた場合と同様に、CBM比率が増加するにつれて、CD_{CelD}の触媒活性が増加していったが、CBM3aを用いた場合と異なり、ナノ粒子を核としたクラスター構造の方が、活性を向上化し、その結果、遊離CD_{CelD}と比較して最大7.5倍に向上した(図3)。よって、CBM3aとCBM4の機能面での相違は現在分析中であるが、CDの活性向上にはCBMの機能とクラスター構造間の相関を考慮しなければならないことが示された。

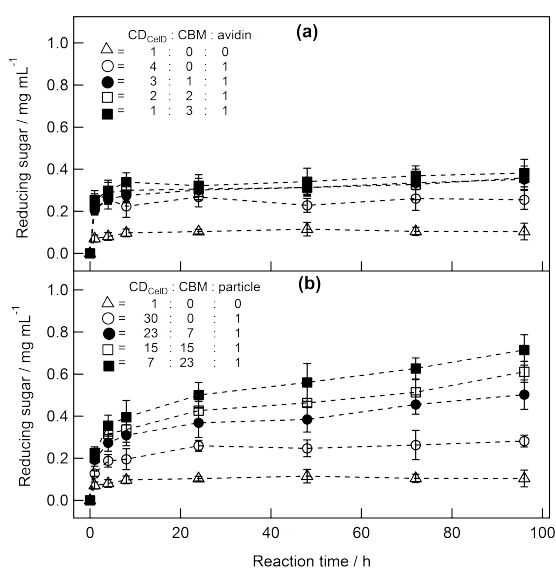


図3. CD_{CelD}とCBM4より作製したハイブリッドナノセルロソーム

4. 今後の展望

モジュール構造を持つセルラーゼやセルロソームは、積木モジュールのアセンブリ設計によって酵素機能を様々なデザインできる可能性を持っており、ナノ材を骨格とした集積化は、高機能化だけでなく、高価格体質である蛋白質の一部を低価格な材質で補えるという点で意義がある。今後、ナノ粒子に磁性粒子を用いることによって、酵素の回収システムも取り入れていきたい。

参考文献

- [1] Kim D-M, *et al.*: Small, 7, 656-664 (2011)
- [2] Kim D-M, *et al.*: Catal. Sci. Technol., 2, 499-503 (2012)