

プログラム名：「豊かで安全な社会と新しいバイオものづくりを
実現する人工細胞リアクタ」

PM名：野地 博行

プロジェクト名：「つくる」細胞デバイス

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成28年度

研究開発課題名：

バイオマス糖化用スーパー酵素の作出

研究開発機関名：

東京大学大学院農学生命科学研究科

研究開発責任者

五十嵐圭日子

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

セルロースやキチンは未利用バイオマスの主成分であり、食料と競合しない次世代の炭素源としての有効利用が望まれている。これらは、 β -グリコシド結合を有する不溶性多糖であることを共通の特徴として有しているが、 β -グリコシド加水分解酵素（セルラーゼ・キチナーゼ）の高効率化には限界が来ている。そこで本研究では、固液界面において触媒する酵素を効率化し、バイオマス糖化用スーパー酵素を作出する。

平成 28 年度は、以下の研究開発を実施する。

1. アッセイ系の構築

セルラーゼなどの酵素改変を人工細胞デバイス超並列スクリーニングシステムへ適合させるため、結晶性基質の分解を評価できるアッセイ系を構築する。酵素のアッセイ系にはミリリットルスケールの反応場が用いられるが、微小チャンバー内で反応を追跡するため、ダウンサイジングが必要となる。その前段階としてマイクロリットル程度の反応場を用いたアッセイ系の確立を狙う。

2. 高活性酵素のスクリーニング

セルラーゼに関して、 10^3 程度の変異酵素を作製する。またセルラーゼ活性によって生成されるセロオリゴ糖をグルコースへと分解する β -グルコシダーゼの改変を目的として、研究開発課題 2E（東京大学浦野教授）で開発される蛍光基質を用い、活性を蛍光の強度として計測するようなアッセイ系を構築する。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

1. アッセイ系の構築

セルラーゼアッセイ系として、マイクロリットル程度の反応場を用いたアッセイ系構築に成功した。

2. 高活性酵素のスクリーニング

セルラーゼに関して、 10^3 程度の変異酵素を作製した。また研究開発課題 2E（浦野教授）で開発された蛍光基質を用いた、 β -グルコシダーゼのアッセイ系の構築に成功した。メタノール資化性酵母を用いた新規ランダム変異導入法の開発に成功した。

2-2 成果

1. アッセイ系の構築

マイクロリットル程度のセルラーゼ活性検出系の構築に成功した。2種類のアッセイ系を構築した。一つは暗視野計測によって結晶性セルロースを可視化し、セルロースのセルラーゼによる分解に伴う輝度の低下を検出することによって、セルラーゼ活性を見積もることに成功した。もう一方は、セルラーゼ活性によって生成されるセロオリゴ糖 2糖を β -グルコシダーゼ活性によってグルコースに変換し、グルコースを検出する蛍光プローブや呈色試薬を用いる事で、セルラーゼ活性を比色定量

による検出法へと適応させた。蛍光プローブや呈色試薬などは、一般に市販されているものを使用した。

2. 高活性酵素のスクリーニング

セルラーゼに関して、 10^3 程度の変異酵素を発現する変異酵素ライブラリーを作製した。変異酵素の作製手法であるが、セルラーゼの活性クレフト内にあるアミノ酸残基の中で、同じファミリーに属するセルラーゼ間で比較的相同性の低い箇所を選抜し、それらアミノ酸残基に変異を導入することにした。一つのアミノ酸残基に対し、そのアミノ酸以外の残りの19種類にそれぞれ変異させるように設計したPCRプライマーセットを用いて、変異を導入した。

β -グルコシダーゼのアッセイ系については、研究開発課題2E（浦野教授）で開発された蛍光基質を用いて、 β -グルコシダーゼ活性を蛍光で検出する系の開発に成功した。すでに β -グルコシダーゼ活性を比色定量する為の呈色試薬や蛍光プローブは市販されているが、これらは酵素の反応場をアルカリ性に変えることで検出する手法となっている。一方で今回の実験系は、人工細胞デバイス超並列スクリーニングシステムを用いて酵素改変をおこなうことを目的としているため、チャンバー内にて酵素を無細胞発現系で発現させ、スクリーニングするような系の構築をせねばならない。即ち無細胞発現系が働くために、pHを中性付近に保持したままで β -グルコシダーゼ活性を検出する必要がある。そこで研究開発課題2E（浦野教授）でそのような蛍光プローブを開発した。そして人工細胞デバイス超並列スクリーニングシステムの微小チャンバー内において、無細胞発現系を用いて β -グルコシダーゼを発現させ、当該蛍光プローブを用いることでその活性を検出する事に成功した。

新規ランダム変異導入法の開発では、Phi29 DNA polymerase を利用して、ランダムな変異導入と変異導入遺伝子の増幅をおこない、メタノール資化性酵母を宿主とした変異酵素発現クローンライブラリーの簡易作成を可能とすることに成功した。

2-3 新たな課題など

1. アッセイ系の構築

暗視野計測を用いたセルラーゼ活性の可視化に関しては、次の様な問題点が浮上した。微小チャンバー内に結晶性セルロースを封入しようと試みたところ、繊維が長いために入らない事が明らかとなった。ソニケーションで繊維を剪断することも試みたが、長さが不揃いになる問題点があった。現在はセルロースナノ結晶を用い、これを微小チャンバー内に封入することを試みている。また市販の蛍光プローブや呈色試薬を用いたセルラーゼ活性検出法に関しては、以下の問題が浮上した。蛍光プローブに関しては無細胞発現系と反応して擬陽性となってしまうこと、呈色試薬に関しては無細胞発現系の活性を阻害してしまうことが明らかとなった。そこで現在、研究開発課題2E（浦野教授）で新たにセルラーゼ活性を検出するための蛍光基質を作製し、その導入を試みている。

2. 高活性酵素のスクリーニング

セルラーゼに関しては、形質転換体ごとに酵素の発現量が大きく変わるため、タンパク量とセルラーゼ活性の両方をプロットする必要がある。両者をハイスループットに計測・評価するための実験系を考案する必要がある。 β -グルコシダーゼについては、その熱安定性の向上を目標としているが、人工細胞デバイスにどのような加熱装置を装着するか、試行錯誤が必要である。

3. アウトリーチ活動報告

以下のセミナー、講演等において、本研究開発課題を紹介した。

- 平成 29 年 2 月 平成 28 年度 NEDO 「TSC Foresight」セミナー 「欧州におけるバイオエコノミーの状況」
- 平成 28 年 12 月 IBM mugendai[∞] 「【バイオマス】6,000 億トン「地球最後の資源」を人類はどう活用すべきか？」
- 平成 28 年 10 月 長野県立飯山高校 研究室訪問
- 平成 28 年 7 月 高校生のための金曜特別講座 「きのこカビとバイオマスと：酵素でバイオマスをとことん利用する」
- 平成 28 年 5 月 東京大学五月祭公開講座 「日本がやらずにどこがする？バイオマスの高度利用」