

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 29 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

① アッセイ系の構築 (H29年4月からH30年3月)

H29年度はH28年度に構築したアッセイ系(呈色試薬を用いたアッセイ系)をアレイ型人工細胞デバイス(研究開発課題2A(東京大学))に適応させ、スクリーニングシステムを確立する。

② 高活性酵素のスクリーニング (H29年4月からH30年3月)

H29年度はセルラーゼに関しては 10^7 程度の変異酵素の作製と、野生型よりも5%比活性の高い変異酵素を作出する。 β -グルコシダーゼに関してはpH5.0、 50°C において24時間後に50%の活性が残存する変異酵素を作出する。また千葉大学(研究開発課題2H)と連携し、統計力学理論計算法により予測された耐熱化 β -グルコシダーゼの性能評価をおこなう。

③ バイオマス糖化酵素の実用評価

実施内容2の高活性酵素のスクリーニングによって作出された酵素を ~ 1 グラム程度生産し、 ~ 100 グラム相当の実バイオマスを用いて糖化試験をおこなう。

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

①-A:セルラーゼ 呈色試薬を用いたアッセイ系は不適であった為、新規にセロビオース脱水素酵素(CDH)と既報の蛍光基質(研究開発課題2E(東京大学))により調製を複合させたアッセイ系を考案した。しかし基質の人工細胞デバイスへの固定化条件が難しくデバイスの適用は難航している。

①-B: β -グルコシダーゼ

蛍光基質を用いることでスクリーニングへの人工細胞デバイスの使用は可能である事が確認されたが、使用には一定の条件が必要である事が判明した。

② 高活性酵素のスクリーニング

②-A:セルラーゼ ①のとおり、アッセイ系の構築が難航しているため人工細胞デバイスを用いたセルラーゼのスクリーニングは実現していない。次善策として、従来型の変異酵素スクリーニングを行い、 10^5 程度の変異酵素ライブラリー作製が完了している。

②-B: β -グルコシダーゼ 人工細胞デバイスでのスクリーニングに適合したベース酵素の探索を行ったが、適合する酵素種は見つからなかった。また研究開発課題2H(千葉大学)より提案された変異型 β -グルコシダーゼの作製と解析を実施したが期待された機能向上効果は得られなかった。

③ バイオマス糖化酵素の実用評価

②における変異酵素の取得次第、H30年度に実施する。

2-2 成果

① アッセイ系の構築

①-A:セルラーゼ H28年度に構築した呈色試薬を用いるアッセイ系を人工細胞デバイスにて使用するin vitro酵素発現システム(PUREflex®)と組み合わせた結果、呈色試薬がPUREflex®の機能を阻害する作用が有る事が明らかになり本アッセイ系は人工細胞デバイス上では使用できない事が明らか

になった。そこでセロビオース脱水素酵素 CDH と既報の蛍光基質 Q3HMRG(研究開発課題 2E(東京大学)により調製)を組み合わせたアッセイ系を新規に考案した。CDH+Q3HMRG を用いたアッセイ系は連続的、および非侵襲的にセルラーゼ活性を測定可能であったが、基質となるセルロースを人工細胞デバイスにて使用するフェムトリットルスケールの反応場うまく固定化する事が出来ずセルラーゼのスクリーニングに対する人工細胞デバイスの適用は難航している。

①-B:β-グルコシダーゼ 課題 2E で開発された蛍光基質を用い、人工細胞デバイス上での β-グルコシダーゼ活性の検出を確認した結果、PUREflex®上で発現が可能な酵素、および中性 pH 領域でも活性を有する酵素であれば適用が可能である事が確認された。

② 高活性酵素のスクリーニング

②-A:セルラーゼ 上述の通り、人工細胞デバイスを用いたセルラーゼのスクリーニングはアッセイ系構築の問題から難航している。そこで従来型の変異酵素スクリーニング法として Phi29 ポリメラーゼ+酵母 *Pichia pastoris* を用いた変異酵素ライブラリーの構築と 96-well プレート上でのアッセイによりセルラーゼのスクリーニングを行う事とした。本年度までに変異酵素ライブラリーの構築は完了しており、10⁵程度のライブラリーが得られている。

②-B:β-グルコシダーゼ 人工細胞デバイス上での β-グルコシダーゼのスクリーニングを目的としてベースとなる酵素種の探索を行った。その結果、本研究で目的とする”人工細胞デバイスに適用可能な酵素”かつ”プラントレベルでの使用に適応した分泌発現生産可能な酵素”は見つからなかった(詳細は 2-3 項にて記述する)。また課題 2H (千葉大学)より統計力学理論計算法を用いて提案された推定耐熱化 β-グルコシダーゼに関して、酵素の調製および耐熱性の確認を行った。しかしながら変異酵素の耐熱性は野生型と比較して変化なく、耐熱化 β-グルコシダーゼの取得は出来なかった。

2-3 新たな課題など

A:セルラーゼ セルラーゼの基質となるセルロースは水不溶性の固体であり、およそ直方体状の異方性を有している。一方、人工細胞デバイスで用いるチャンバーは半球状の形状を有している為、この形状の差がセルロースを人工細胞デバイス上に固定化できない原因だと考えられる。またセルロースは鋼鉄と同程度の強度を有し加工が困難である事、一度溶剤に溶解し再生されたセルロースは天然のセルロースとは異なる構造を有しセルラーゼの振る舞いに変化してしまう事から、本課題の解決には微細なセルロースの構造をどのように加工するか、検討が必要である。打開策のアイデア出し及び予備検討を行う。

B: β-グルコシダーゼ 本研究計画では作製した変異酵素をプラントレベルの試験に適用することを目標としている。その為にはプロセスコストの問題から組換えタンパク質発現系は菌体外への分泌発現可能なシステムを選択する必要がある、大腸菌発現系等は不適である。一方、人工細胞デバイス上で用いるタンパク質発現系は利用可能性の問題から大腸菌由来の酵素群を使用した製品を用いるほかない。一般的に真核生物由来の酵素を原核生物由来の発現系で生産する事は困難である為、この発現系に関する差異が障壁となっている。また一般に糖質加水分解酵素は弱酸性条件下に至適 pH を有するが、人工細胞デバイスでは中性域で操作を行う必要がある、微弱になった活性をどのように追跡

するかという課題も存在する。そこで、プラントでの適用条件に則した方針で酵素開発を進めるため酵母を使ったスクリーニングを検討する。

3. アウトリーチ活動報告

東京大学農学部において、高校生を対象とした酵素化学実験・機器の紹介、および本研究開発を含むバイオマス関連酵素に関する講義を計2件実施した。