

安定同位体標識法を用いたセルラーゼ糖質結合モジュールとリグニン間相互作用のNMRによる解析

○徳永有希¹、大城理志¹、永田崇²、近藤敬子²、西村裕志¹、片平正人²、渡辺隆司¹
(¹京都大学生存圏研究所、²京都大学エネルギー理工学研究所)



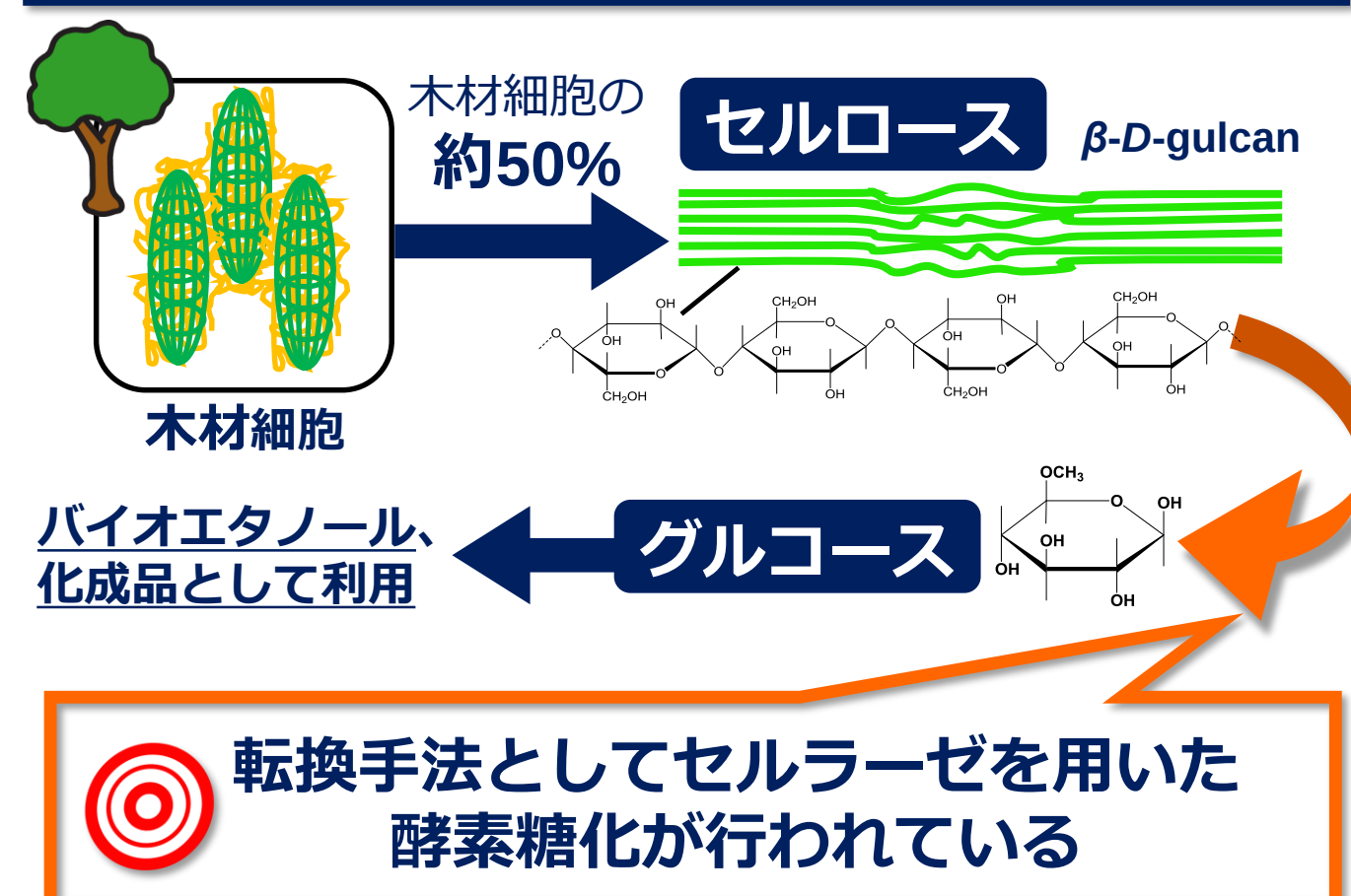
研究概要

効率的なリグノセルロース資源の酵素糖化にはセルラーゼ-リグニン相互作用に関する正確な理解が不可欠となる。特にセルラーゼの糖質結合モジュール(CBM)がセルロースやリグニンに対する吸着に大きく影響することが知られているが、その詳細な吸着メカニズムは明らかにされていない。本研究では糸状菌 *Trichoderma reesei* のセロビオヒドロラーゼ(Cel7A)のCBM1とリグニンとの分子間相互作用を解析することを目的として、CBM1を大腸菌BL21(DE3)株を用いて発現および精製し¹H-¹⁵N HSQC NMR法にてリグニンとの分子間相互作用解析を行った。SDS-PAGEおよびMALDI-TOF-MSの結果から高純度のCBM1の精製が達成できたことが示された。¹H-¹⁵N HSQCではCBM1にスギまたはユーカリMWLを添加した際の化学シフトの変化量からMWLとの相互作用に関与しているアミノ酸残基が示された。

背景・目的

① 研究の背景

セルロース資源のグルコースへの転換
は化石資源に依存しない持続的社會を実現するうえで重要である。



② 問題点・解決方策

しかし、木材中に20-30%含まれるリグニンが
× セルロースへのアクセシビリティを物理的に阻害する
× セルラーゼと吸着し糖化を阻害する
→ 糖化効率の低下

その吸着メカニズムは詳細にはわかっておらず
リグニン-セルラーゼ間相互作用の正確な理解が効率的な酵素糖化には不可欠である。

③ 研究の目的

リグニン-セルラーゼ間相互作用においては**糖質結合モジュール (CBM) が特に重要**
→ セルラーゼの吸着量を増加させる
→ セルロースだけでなくリグニンにも優先的に吸着する
Palonen, H., et al *Biotechnology* (2004), 107,65-72

糖質結合モジュール (CBM)

本研究の目的
Trichoderma reesei のセロビオヒドロラーゼ (Cel7A) のCBM1とリグニンとの分子間相互作用についてアミノ酸残基レベルでの理解を目指す
→ 安定同位体標識法を用いてNMRにより解析

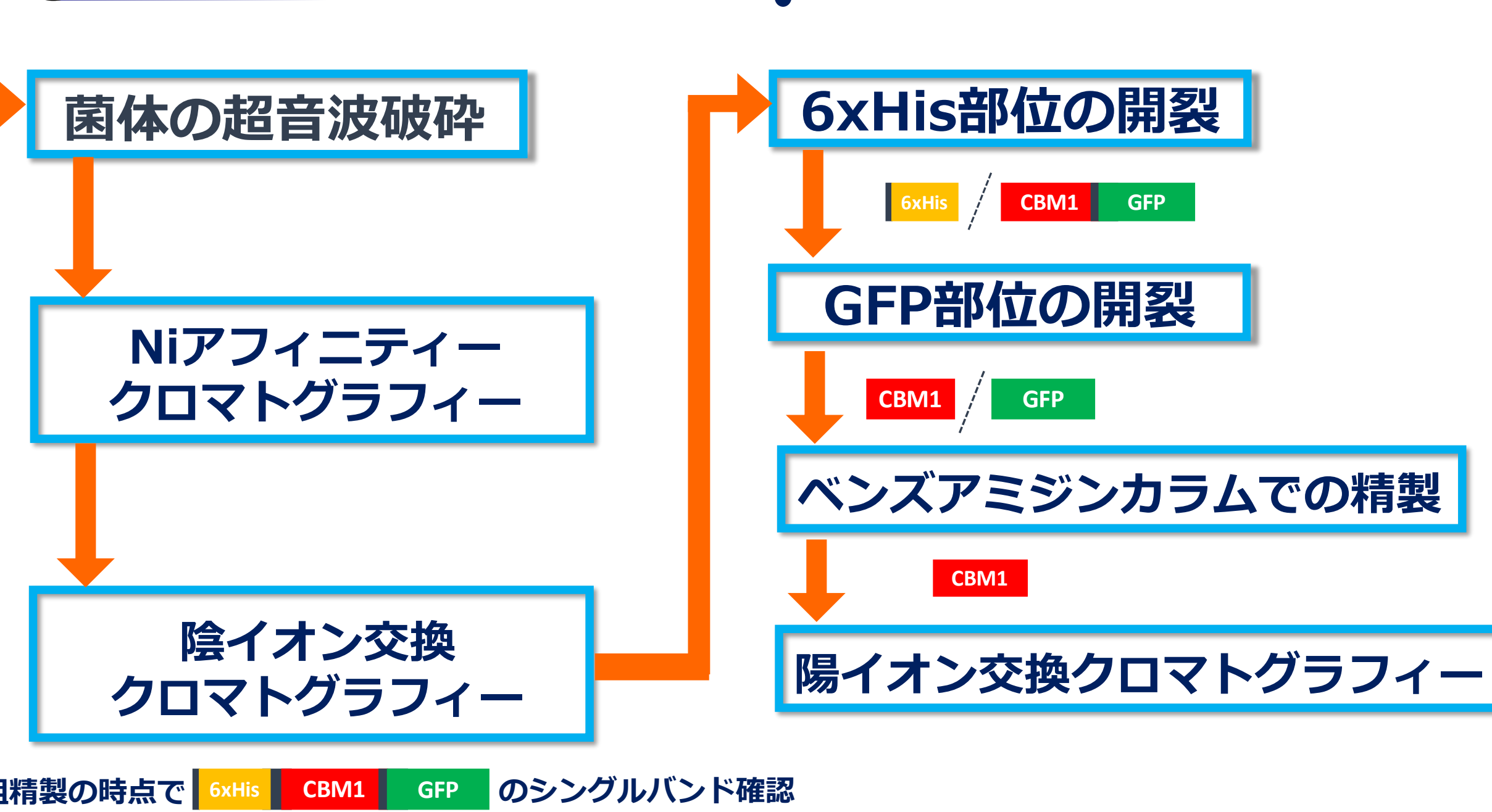
¹⁵Nラベル化CBM1の発現・精製

Trichoderma reesei のCel7AのCBM1を大腸菌BL21(DE3)を用いて¹⁵Nラベル体として発現・精製し、性状確認を行った

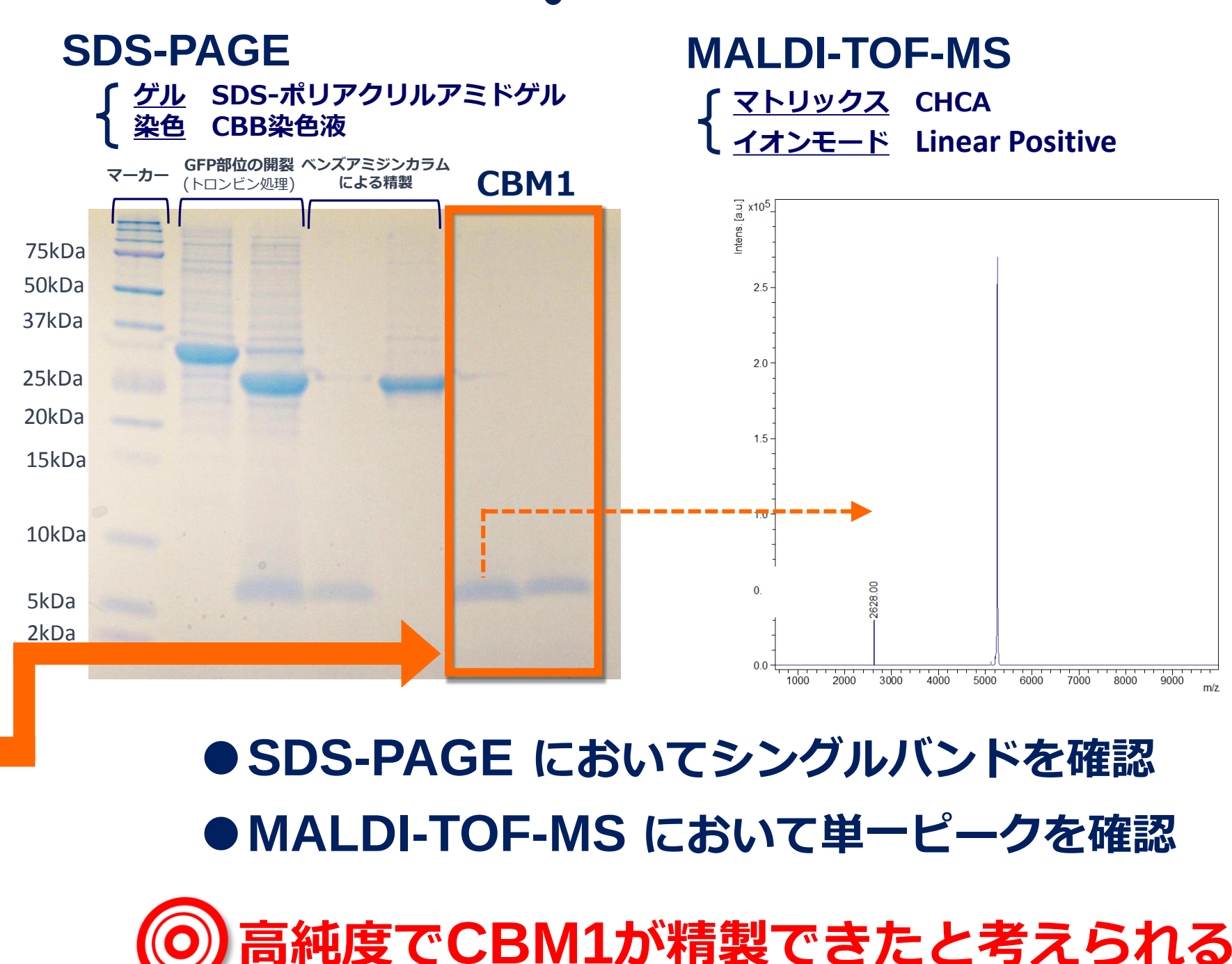
① ¹⁵Nラベル化CBM1の発現



② ¹⁵Nラベル化CBM1の精製



③ 性状確認



CBM1-リグニン間の相互作用解析

¹⁵Nラベル化CBM1のHSQCを測定後、リグニン (MWL) を加え再度HSQCを測定。化学シフトの変化量から、CBM1のリグニンとの相互作用部位を考察した。

① 解析手法

サンプル調整

		最終濃度
● ¹⁵ Nラベル化 CBM1 (20 mM クエン酸 pH5.0)	225 μ l	20 μ M
● 2 mM DSS	2.5 μ l	20 μ M
● D ₂ O	22.5 μ l	
Total	250.0 μ l	

上記CBM1サンプルに以下の基質を5 μ lずつ加え、基質が計25 μ lになるまで滴定実験を行った。

基質1: d6-DMSO

d6-DMSO (コントロール)		
総添加量 (μ l)	必要添加量 (μ l)	基質最終濃度 (μ M)
5	5	-
10	5	-
15	5	-
20	5	-
25	5	-

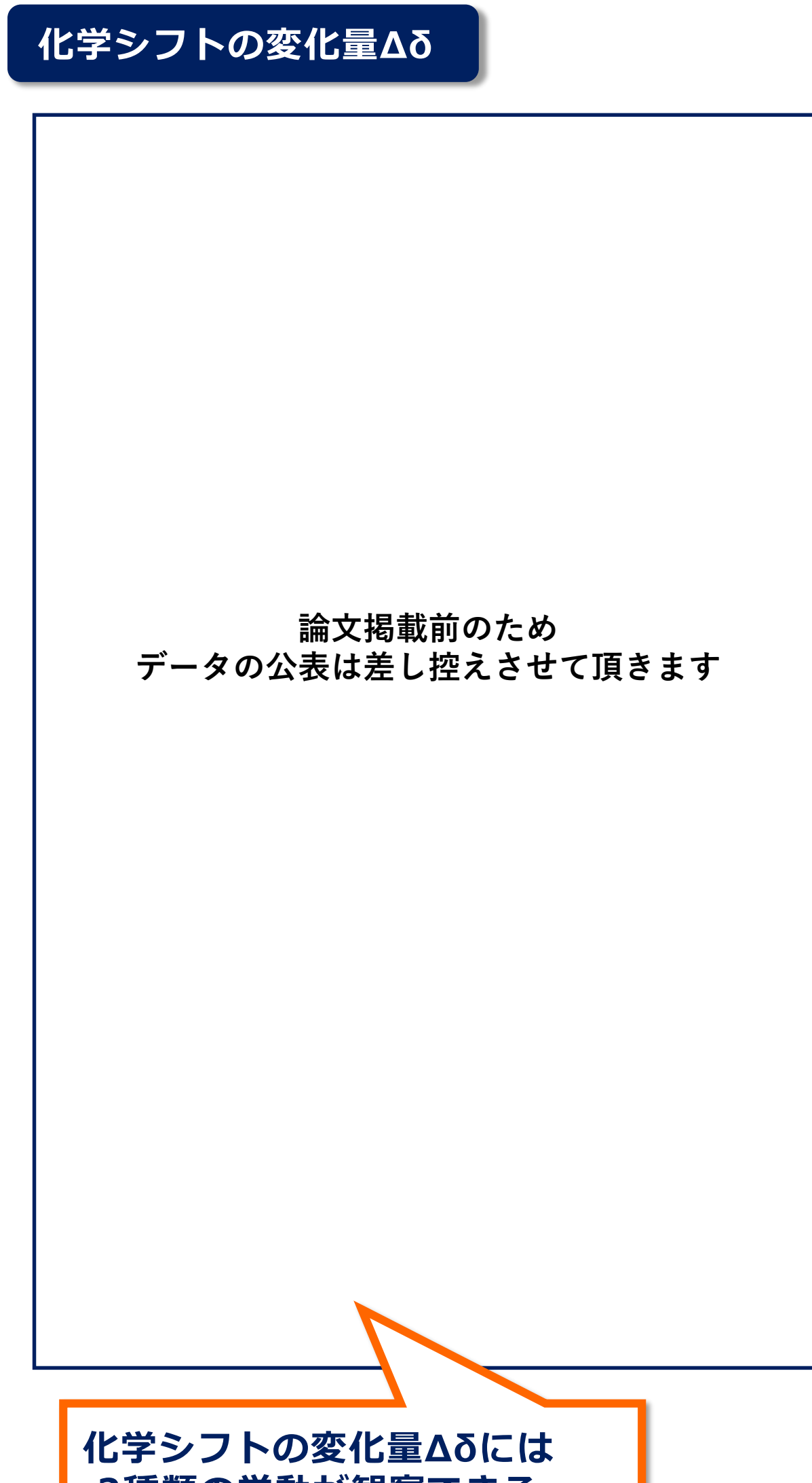
結果を②に記載

基質2: スギMWLおよびユーカリMWL

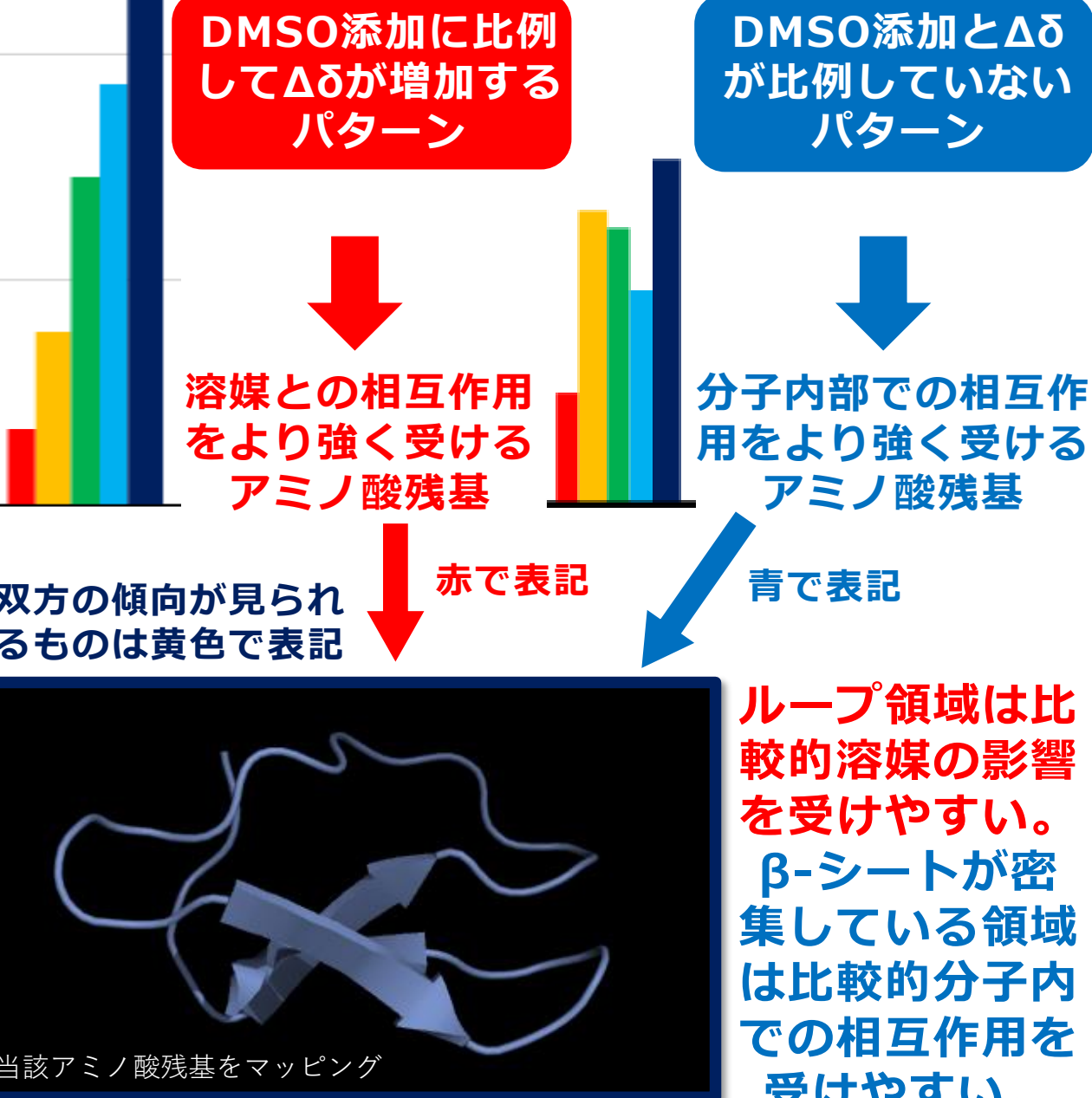
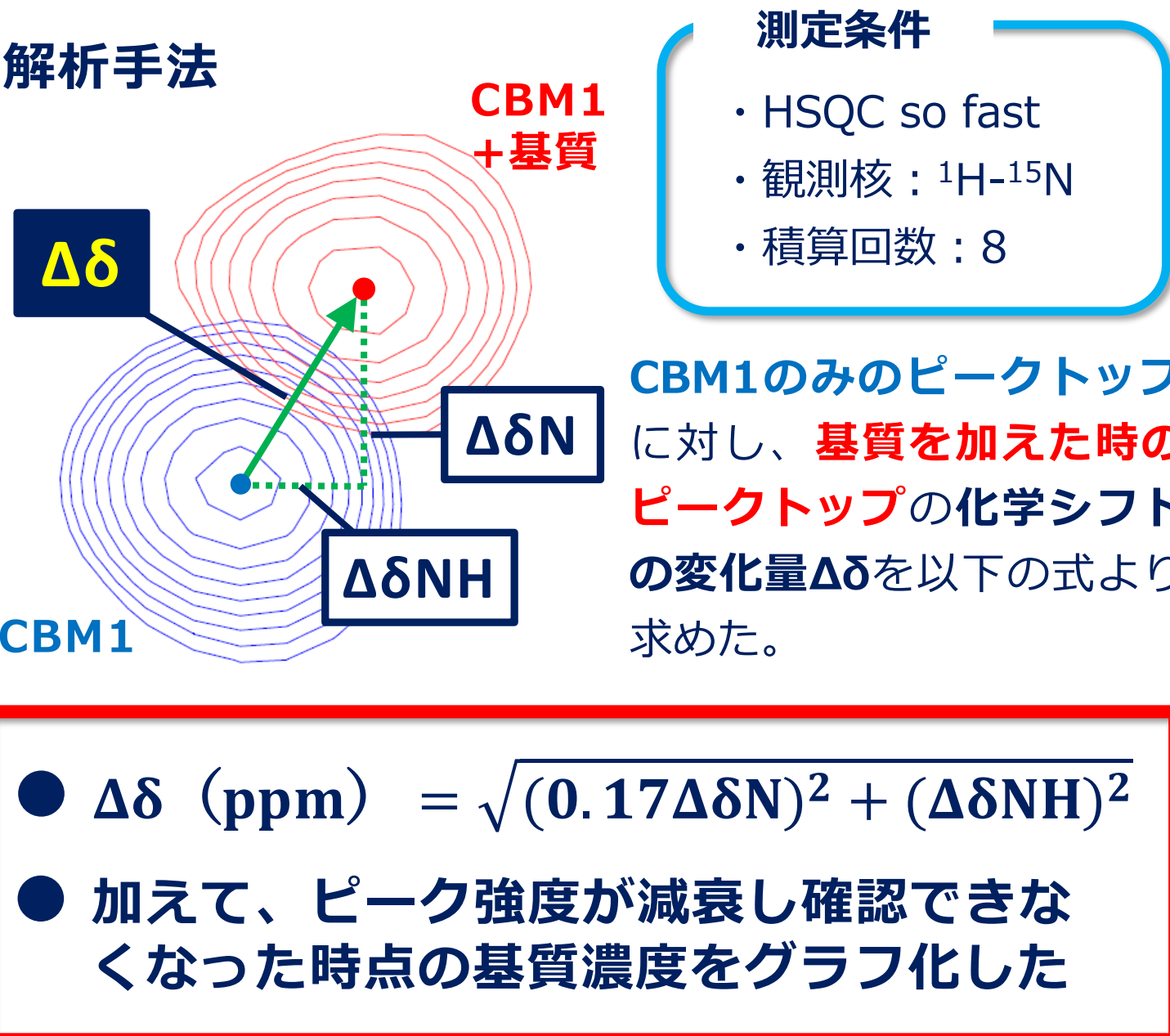
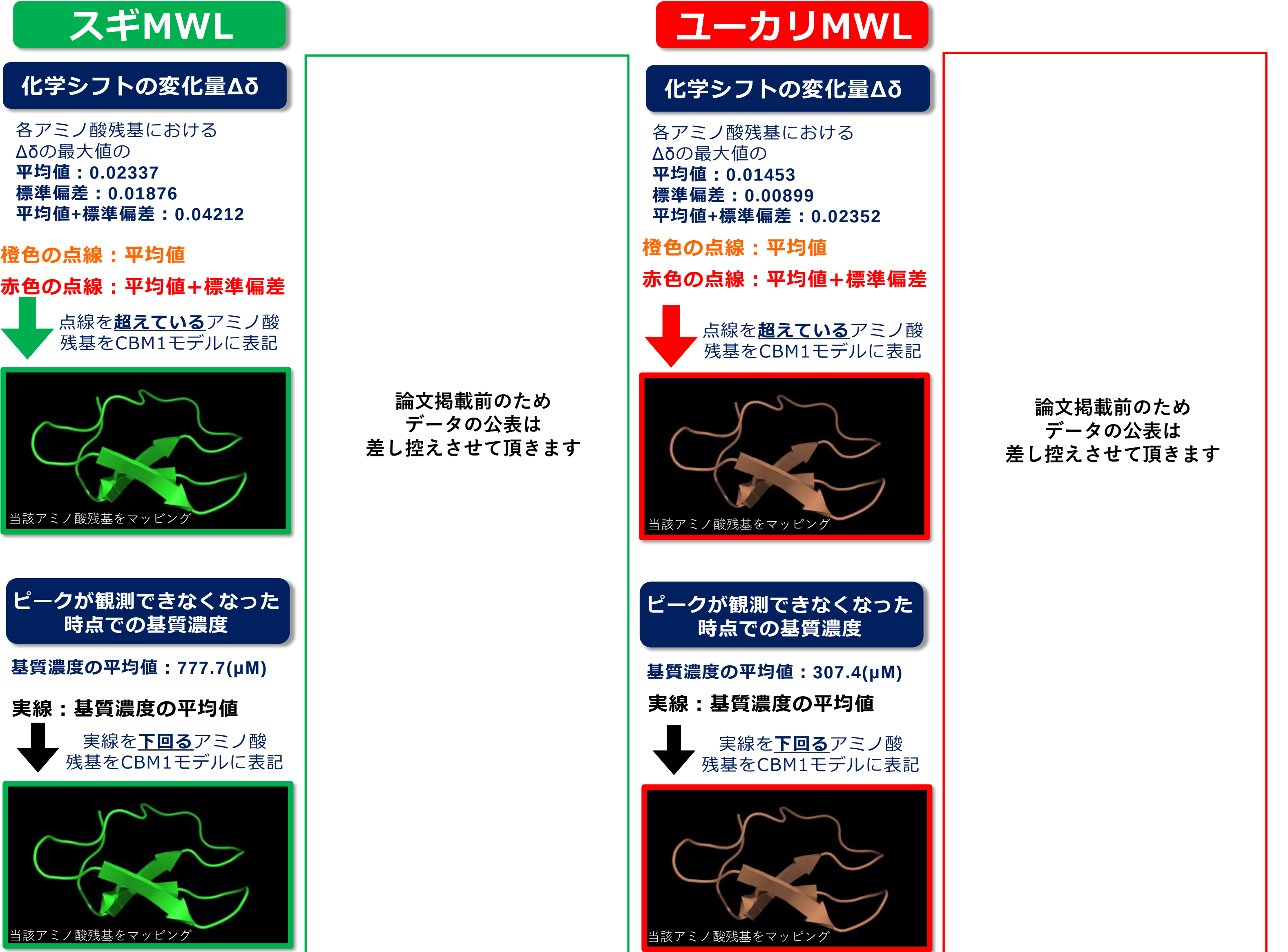
スギMWL (d6-DMSOに溶解)			ユーカリMWL (d6-DMSOに溶解)		
総添加量 (μ l)	必要添加量 (μ l)	基質最終濃度 (μ M)	総添加量 (μ l)	必要添加量 (μ l)	基質最終濃度 (μ M)
5	5	20	5	5	20
10	5	100	10	5	100
15	5	400	15	5	400
20	5	600	20	5	600
25	5	1000	25	5	1000

スギ、ユーカリMWLともに結果を③に記載

② 溶媒との相互作用



③ CBM1-リグニン間相互作用の解析



◎ 上記の解析結果より、CBM1-リグニン間の相互作用部位を考察

