

原子間力顕微鏡による酵母細胞表層セルラーゼの局在評価

猪熊健太郎¹・竹中 武蔵²・荻野 千秋²・蓮沼 誠久¹・近藤 昭彦^{1*}

はじめに

現在、石油などの限りある化石資源への依存から脱却し、持続可能な低炭素循環型社会を実現するという観点から、再生可能なバイオマス資源からバイオ燃料や化学製品を生産する技術が注目を集めている。バイオ燃料の一種であるバイオエタノールは、現在は主に糖質あるいはデンプン質を多く含むトウモロコシやサトウキビ、テンサイ（砂糖ダイコン）などの農作物を原料として生産され、ガソリンの代替燃料もしくは混合燃料として利用されている。一方で、これらの原料作物には食糧・飼料としての需要もあることから、バイオエタノール生産により耕地面積の競合が生じ、穀物価格の高騰を招くことも懸念されている。そのため、食糧と競合せず、安定供給が可能な非可食バイオマス、たとえば、稲わら・バガス（サトウキビ搾汁後の残渣）・間伐材などの草本系・木質系のバイオマス（セルロース系バイオマス）が、次世代のバイオエタノール原料として注目されている¹⁾。

セルロース系バイオマスは、無数の水素結合により結晶性の安定した構造を有するセルロースと、それを取り囲むように存在するヘミセルロース、さらにそれらの外層に沈着するリグニンから成る複雑かつ強固な構造を有している。そのため、セルロース系バイオマスをグルコースなどの微生物が利用可能な糖に分解（糖化）するには、化学処理、熱処理などの前処理に加えて、多種類かつ大量の酵素（セルラーゼ・ヘミセルラーゼ）が必要になり、この酵素コストが、経済性の良い次世代バイオエタノール製造プロセス構築の大きな妨げとなっている。

この問題を解決するため、筆者らは、微生物の細胞表

層に酵素などの機能性タンパク質を集積する細胞表層工学技術を用いて、細胞表層にセルラーゼなどの酵素を固定・提示された酵母の開発を行っている。本稿では、細胞表層工学技術を用いたセルラーゼ表層提示酵母の概略と、その改良に向けた細胞表層の新しい評価法の開発について紹介する。

細胞表層工学技術の概要

細胞表層工学技術では、まず、セルラーゼなどの標的酵素にGPIアンカーリングドメインと呼ばれる領域を融合させたタンパクをコードする遺伝子カセットを構築する。この遺伝子カセットを酵母に導入、発現させると、標的酵素は酵母の細胞膜の外まで輸送された後、GPIアンカーと呼ばれる構造を介して酵母の細胞壁のグルカン鎖に共有結合し、細胞表層に固定・提示される（図1）。これにより酵母細胞を、表面に酵素活性を有し、かつ回収・再利用が可能な生物触媒（whole-cell biocatalyst）として使用することが可能となる。

セルラーゼ表層提示酵母

筆者らは、この細胞表層工学技術を用いて、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞表層にβ-グルコシダーゼ（BGL）、エンドグルカナナーゼ（EG）、セロビオヒドロラーゼ（CBH）IおよびCBH IIの4種類のセルラーゼを提示した株を構築し、前処理稲わらからのエタノール生産に必要な酵素の使用量を大幅に削減することに成功している²⁾。

一方、この技術の改良を進めるなかで、筆者らは、セルラーゼに融合させるGPIアンカーリングドメインに *S. cerevisiae* 由来の Sed1 を使用することで、従来用いられてきた *S. cerevisiae* 由来の Sag1（α-アグルチニン）のGPIアンカーリングドメインを使用した場合に比べて酵母の表層セルラーゼ活性が大きく向上することを明らかにした³⁾。また、この効果は、セロビオースなどのオリゴ糖を基質とするBGLよりも、長鎖の不溶性セルロースを基質とするEGに対して特に顕著であった（図2）。このことから、使用するGPIアンカーリングドメインによって、標的酵素の細胞壁における局在、特に、細胞壁の最外層からの距離（深さ）が異なり、それによって不

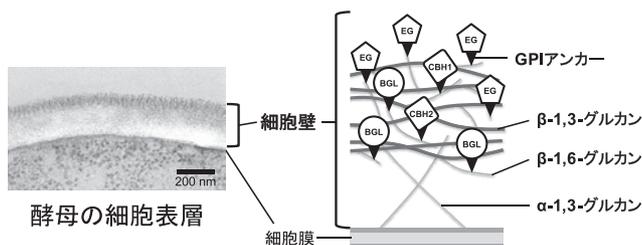


図1. GPIアンカーを介した酵母細胞表層へのセルラーゼの提示

*著者紹介 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科（教授） E-mail: akondo@kobe-u.ac.jp
¹神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科、²神戸大学大学院理工学研究科応用化学専攻

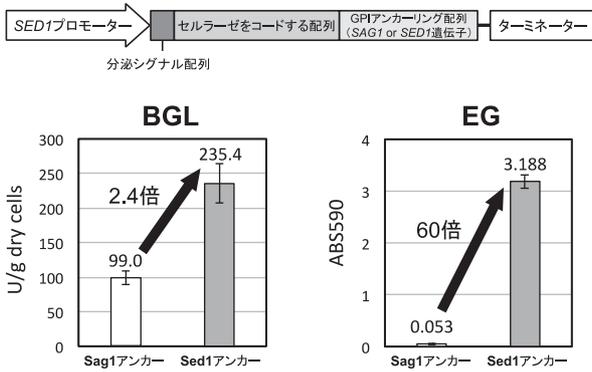


図2. GPIアンカーリングドメインの違いによるBGLおよびEGの細胞表層活性の変化

溶性セルロースに対する接触のしやすさに違いが生じている可能性が示唆された。

原子間力顕微鏡 (AFM) による細胞表層の評価

標的酵素の細胞壁における局在の違いを評価するために、筆者らは、原子間力顕微鏡 (atomic force microscope; AFM) を用いた評価法を開発した。AFMは、カンチレバーと呼ばれるきわめて細い探針を、対象の表面をなぞるように動かして観察する走査型プローブ顕微鏡の一種であり、セルロースナノファイバーなどのナノ材料の表面観察に広く利用されている。また、液中での測定が行えることから、細胞などを生きたまま・分子の活性が維持されたまま観察することが可能である。

AFMは細胞表面の形状の観察には優れているが、そのままではEGのような酵素を特異的に観察・検出することはできない。一方で、カンチレバーの先端に特定の物質を化学修飾し、観察対象に対して接近、離脱させることで、その物質と観察対象との相互作用力を数十pN単位で計測できることが知られている⁴⁾ (図3)。

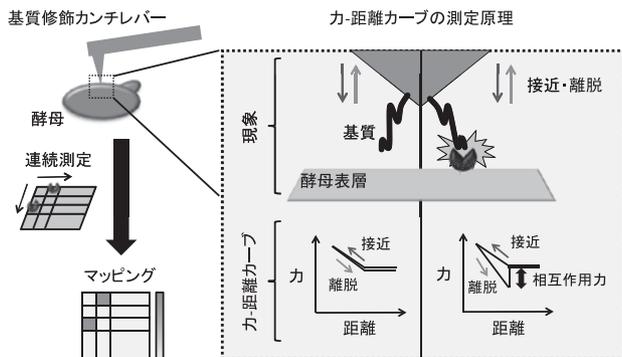


図3. 基質修飾カンチレバーを用いた標的酵素との相互作用力の特異的検出

筆者らはこれまでに、カンチレバーの先端にリガンドを化学修飾したAFMを用いて、酵母の細胞膜受容体を検出する技術の開発に成功している⁵⁾。今回はこの技術に応用し、カンチレバー先端にEGの基質となるメチルセルロースを化学修飾することで、酵母の細胞表層に提示されたEGのセルロース結合モジュール (cellulose binding module; CBM) との間に働く相互作用力の検出を試みた。

EGの特異的検出とマッピング解析

YPD培地で48時間好気培養した酵母の細胞を回収・洗浄し、アガロースゲルを用いて試料台に固定し、AFMを用いて酵母細胞の形態を観察した(図4A)。次に、観察された細胞の中から成熟した細胞を選択し、その表面の1 μm四方の範囲を縦・横にそれぞれ64分割した計4096点に対し、メチルセルロースを化学修飾したカンチレバーを用いて連続的に相互作用力測定を実施した。

各計測点で測定された相互作用力の大きさを色の濃さで表し、マッピングした結果を図4Bに示す。EGを表層提示していないコントロール株 (BY-403株) では、メチルセルロースとの相互作用力を示すシグナルがほとんど検出されなかった。一方、EGを表層提示している株 (BY-EG-SS株およびBY-EG-SA株) では、相互作用力を示すシグナルが多数検出された。これらの結果から、細胞表層に存在するEGを特異的に検出できることが確認された。また、Sed1のアンカーリングドメインを使用した株 (BY-EG-SS株) では、Sag1のアンカーリングドメインを使用した株 (BY-EG-SA株) に比べてシグナルの数が大幅に増加しており、Sed1のアンカーリング

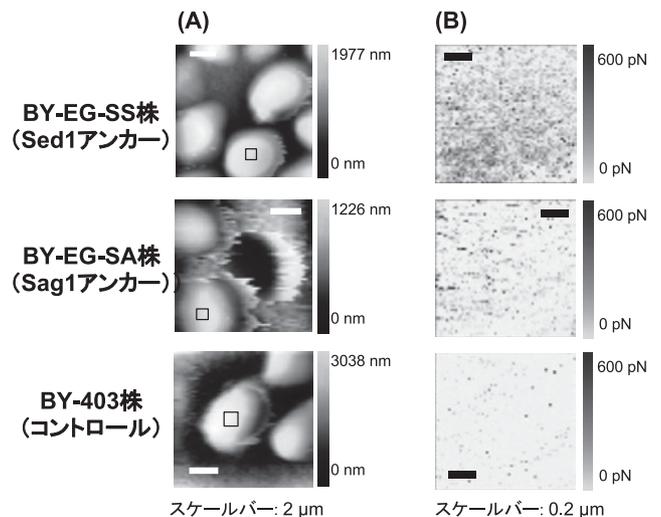


図4. AFMによる酵母細胞の形態観察 (A)、細胞表層EGの特異的検出およびマッピング解析 (B)

ドメインを使用することで、EGのCBMがセルロースに対して作用しやすくなっていることが示された(投稿中)。この結果は、細胞表層のEGの活性測定の結果ともよく一致していた。

深さ方向の局在解析の可能性

上述のマッピング解析により、EGのCBMとセルロースとの相互作用力の強さが、融合させるアンカーリングドメインによって変化することは確認できた。しかしながら、このマッピング解析では、計算の簡略化のために各計測点の力-距離カーブの形状を無視して相互作用力を算出したため、細胞壁の深さ方向の局在に関する情報は含まれていなかった。

そこで筆者らは、BY-EG-SS株のマッピング解析において強い相互作用力が検出された計測点の力-距離カーブのデータをより詳細に分析した。その結果、EGのCBMとセルロースとの結合が破断したことを示すピークが、細胞膜付近から120~150 nmの距離で見られることが分かった(図5)。*S. cerevisiae*の細胞壁の厚さは

およそ100~200 nmであり⁶⁾、この結果は、Sed1のアンカーリングドメインと融合したEGが細胞壁の最外層近くに多く局在していることを示していると考えられることができる。現在、この評価技術の確立に向けて、さらなる検討を進めている。

今後の展望

筆者らはこれまで、京都大学の植田充美教授らのグループとともに、細胞表層工学技術を用いた表層提示酵母の開発・改良を進めてきた。そのなかで、表層提示された酵素の局在は、主にGFPなどの蛍光タンパク質を用いて評価されてきた。しかしながら、波長400~600 nmの蛍光を用いた評価では、標的酵素が細胞表層に局在していることは確認できても、厚さ100~200 nmの細胞壁のどこに、どれだけ局在しているかを知ることは困難であった。本稿で紹介したAFMを用いた評価法により、酵母の細胞壁における標的酵素の2次元局在を数十nm単位で評価することが可能となり、さらに力-距離カーブの形状を分析することで、細胞壁の深さ方向も含めた3次元局在の評価も可能であることが示唆された。今後、この技術により、使用するアンカーリングドメインによる酵素の局在の違いが詳細に解明されれば、各酵素をその役割に適した位置(深さ)に効率的に局在させることができるようになり、限りある細胞壁のキャパシティをより有効に活用した表層提示酵母の構築が可能になると期待される。

文 献

- 1) 蓮沼誠久ら：ケミカルエンジニアリング, **56**, 5 (2011).
- 2) Liu, Z. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 24550 (2016).
- 3) Inokuma, K. *et al.*: *Biotechnol. Biofuels*, **7**, 8 (2014).
- 4) Noy, A. *et al.*: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15**, 710 (2011).
- 5) Takenaka, M. *et al.*: *Nanoscale*, **7**, 4956 (2015).
- 6) Dupres, V. *et al.*: *ACS Nano*, **4**, 5498 (2010).

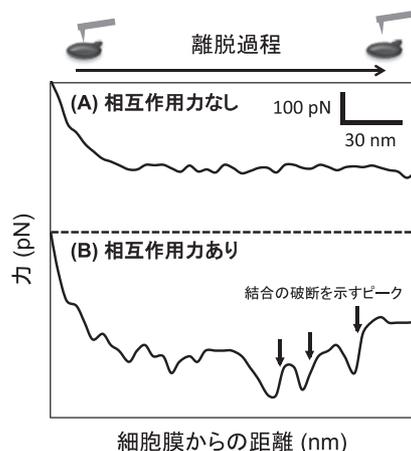


図5. 細胞表層からのカンチレバー離脱過程における力-距離カーブ。(A)は相互作用力が検出されなかった計測点、(B)は強い相互作用力が検出された計測点の力-距離カーブを示す。