

固相基質界面で機能する酵素集合体の設計

神谷 典穂

植物由来バイオマスの主要構成成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンは、再生可能な資源として認識され、それらを原料とした燃料・物質生産プロセス（バイオリファイナリー）の開発が進められている。リグノセルロース系バイオマスを起点とするバイオリファイナリーでは、水に不溶な原料を可溶性の（オリゴ）糖や芳香族系（小分子）化合物へと変換するプロセスの構築が必要である。しかしながら、固相基質の効率的な分解は一般的に困難であり、植物バイオマスの常温・常圧下での効率的な生物変換プロセスの構築は挑戦的課題と位置付けられている。そこで、天然の高度セルロース系バイオマス分解触媒であるセルロソームを範として、その巧みな触媒システムの理解と、機能の模倣を志向した人工セルロソームの創出が試みられている。本稿では、筆者らの取組みを交えながら、固相基質としての植物バイオマスを対象とした新たな複合酵素系の構築に向けた生体材料設計について議論する。

植物バイオマス分解システムとセルロソーム

セルロソーム¹⁾は、*Clostridium*属細菌が生存のために獲得した高度な生体触媒系である。同細菌の戦略の全体をシステムとして捉えると、セルロソームは植物バイオマスの不均一系分解反応に特化した高度な分子マシンと位置付けられる（図1）。すなわち、細胞外へ分泌された複数の異種酵素を、固相基質と細胞表層間の限られた空間に濃縮し、固液界面でのバイオマスの分解を強力に後押しする複合酵素触媒系といえる。分解過程で生じた可溶性小分子は、細胞内に取り込まれ資化されるとともに、分泌酵素種の選択の過程にも寄与することが示唆されている²⁾。

さらに、生成した還元糖の宿主細菌の細胞質内への輸送（系からの排除）は、高濃度に酵素が濃縮された空間での生成物阻害の回避に寄与する³⁾。細胞膜を隔てて構築された、この動的な植物バイオマス分解システムは、

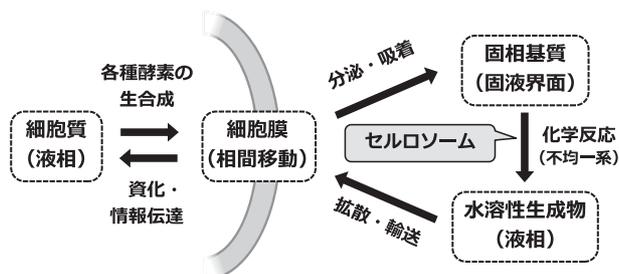


図1. バイオシステムとしてのセルロソーム系の概要

人工系で目標とすべき多くの要素技術を包含している。

動的酵素集合系としてのセルロソーム

天然セルロソームの分子マシナリーの概要を図2に示す。分子触媒系としてセルロソームを眺めると、バイオマス分解に関与する異種酵素群を、時空間的に濃縮するための足場（scaffold）となるタンパク質が配備されている。足場タンパク質上には、異種酵素分子を非共有結合的に集積するためのアダプターとなる部位が複数配置され、さらに固相基質を捉えるための結合部位を有する。この特異な分子設計が、遊離酵素の組合せを超える活性（シナジー）の発現に寄与することが示唆されている。C. *thermocellum*由来組換え足場タンパク質を用いた検討では、足場タンパク質の存在が、複数種の酵素成分による結晶性セルロース基質の加水分解効率を一桁（12倍）高めることが示されている⁴⁾。

人工セルロソーム系の構築に向けて

天然セルロソームの機能を模倣するべく、多様な人工セルロソーム系の構築が試みられている⁵⁾。既往の系では、複数の酵素を空間的に集積化することを意図したものが多く、天然セルロソームのタンパク質構造の一部を切り出したミニセルロソームや、多量体タンパク質や無機ナノ粒子を固定化のための足場として利用した例が報告されている。しかしながら、酵素が共有結合的に担体に固定化された系は、従来の固定化酵素の概念の延長線上にあり、天然セルロソームの動的な性質や特異な分子形状が十分に反映されているとは言い難い。

筆者らは、まず天然セルロソームの1次元状タンパク質集合形状を模倣するべく、DNAを足場分子とした新規人工セルロソーム系を設計した⁶⁾。PCRで調製可能な

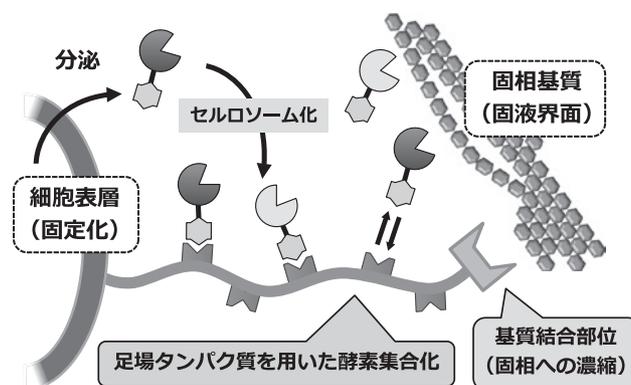


図2. 分子触媒系としてのセルロソームの概要

合成DNAを足場とすることで、足場の分子長を自由に規定できる。また、構成塩基の一部を酵素の接着点となる合成ヌクレオチドに置換することで、足場分子上に提示する酵素の分子数を制御できる。その結果、足場となるDNA上に提示する酵素の割合に応じて、結晶性セルロース基質の加水分解効率に変化することが明らかとなった。一方、足場への酵素分子の連結に際し、部位特異的・共有結合的な手法を採用したことから、酵素集合体としての性質は、それを反応系に添加する時点で一義的に決定されてしまうという制約があった。

モジュール型タンパク質集合系の構築に向けて

固相基質としての植物バイオマスは、その組成と形状において、静的にも動的にも不均一であることが、その分解反応の効率化と分析の難易度を上げている。宿主細胞の生存という究極の動的システムの中に組み込まれた天然のセルロソーム系は、基質の不均一性の経時的な変化に対しても柔軟に対応している。天然系では、1次元状の巨大なタンパク質製足場分子が、多様な酵素分子の出入りが可能な共通のテンプレートとして機能している。すなわち、複数の酵素からなる分子集合系としての

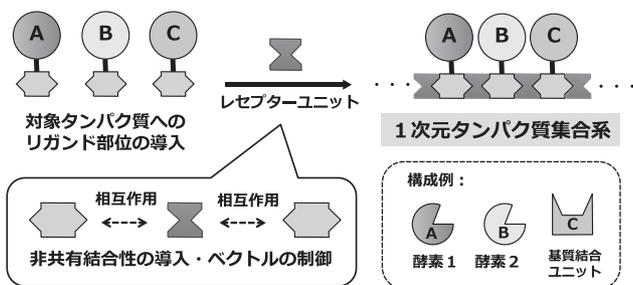
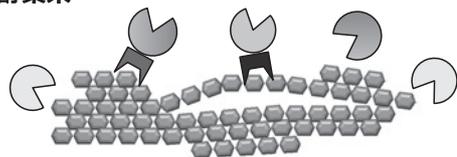


図3. 足場分子を必要としない自己集合酵素系の設計

■遊離酵素系



モジュール化 自己集合能の付与

■人工酵素集合系

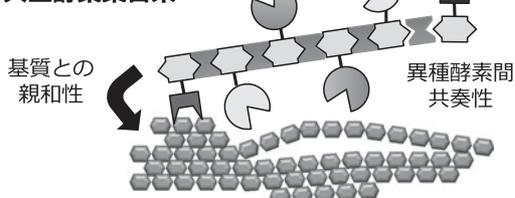


図4. 遊離酵素系と自己集合型人工セルロソーム系の比較

人工セルロソーム系の設計に際し、動的な性質の導入により、本質的な機能向上が期待される。そこで、新たな人工セルロソーム系の構築に向けた一歩として、足場分子を必要とせず、個々の機能ユニットが1次元状に自己集合するモジュール型人工セルロソーム系を設計した(図3)。

本系の構築の意図は、構成要素に分離された天然セルロソームの機能ユニットから、自発的に再構築可能な超分子型人工セルロソームを設計する点にある(図4)。ピオチン-アビジン相互作用を自己集合の駆動力として採用した概念実証モデルでは、機能ユニットとして準備した酵素触媒・基質結合ドメインの組成を変えたモジュール型酵素集合系において、遊離酵素からなる非集合系に比べ、約2.6倍の触媒活性の向上が確認された⁷⁾。

生物学の視点に立った人工生体材料の設計

宿主細胞とのシナジーを排除した試験管内の反応系では、天然のセルロソーム系を完全に再現することは困難であろう。したがって、固相基質を分解対象とする触媒系の構築にあたり、全体プロセスを俯瞰して、基質の前処理など、静的アプローチが可能な部分を最適化しつつ^{8,9)}、動的性質が寄与する部分に対して、新たな発想で化学的・工学的にアプローチする必要がある。最近、電子顕微鏡観察と画像解析を組み合わせた手法により、基質の表面形状の経時変化を指標としたセルラーゼの触媒挙動の評価が試みられている¹⁰⁾。また、大腸菌の outer membrane vesicle を足場として利用する人工セルロソーム系では、遊離酵素の23倍の基質分解活性が報告され、酵素を分泌生産する宿主とのシナジーが意識された触媒系の構築例として興味深い¹¹⁾。本稿で取り上げたセルロソーム系に限らず、生物学と工学の境界で機能する人工生体材料の設計においては、生体システム特有の柔らかさや異種分子間に働く共奏性、経時的に変化する因子への適応性を、構成論的に再現可能な生体高分子集合系の構築が鍵を握ると考えられる。

文 献

- 1) Smith and Bayer: *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **23**, 686 (2013).
- 2) Morisaka, H. *et al.*: *AMB Express*, **2**, 37 (2012).
- 3) Lynd *et al.*: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**, 506 (2002).
- 4) Krauss, J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4301 (2012).
- 5) Goncalves, G. A. L. *et al.*: *Sus. Chemical. Process.*, **2**, 19 (2014).
- 6) Mori, Y. *et al.*: *Chem. Commun.*, **49**, 6971 (2013).
- 7) Mori, Y. *et al.*: *Mol. Syst. Des. Eng.*, **1**, 66 (2016).
- 8) Kamiya, N. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1037 (2008).
- 9) Uju, *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **138**, 87 (2013).
- 10) Olsen, J. P. *et al.*: *Cellulose*, **23**, 2349 (2016).
- 11) Park, M. *et al.*: *PloS One*, **9**, e97103 (2014).