

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K11710

研究課題名（和文）無尽蔵の海藻バイオマスを原料とする革新的バイオプロダクト生産プラットフォーム構築

研究課題名（英文）Development of an innovative platform for bio-products utilizing inexhaustible macroalgal biomass

研究代表者

岡崎 文美 (OKAZAKI, Fumiyoshi)

三重大学・生物資源学研究所・准教授

研究者番号：80545228

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、海藻特有の多糖である β -1,3-キシランから有用化学品を生産するためのプラットフォームの構築を目的とした。まず、耐熱性 β -1,3-キシラン分解酵素群を用いた海藻バイオマスからの効率的キシロース生産技術を構築した。次いで、新たに糖化効率に優れた3種類の新規 β -1,3-キシラン糖化酵素群をヒト腸内細菌のゲノム配列中から見出した。それら酵素群を用いた細胞表層工学技術により β -1,3-キシラン資化性 *Halomonas elongata* を創製した。これを基盤として、今後、海藻資源中の未利用糖質である β -1,3-キシランからの有用物質生産技術の発展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

β -1,3-キシランは紅藻類および緑藻類の細胞壁にのみ存在する海藻特有の多糖である。その有効利用には産業利用に耐え得る加水分解酵素が必要となるが、これまでに十分な触媒効率と安定性を有する酵素は報告されていなかった。本研究では申請者らがこれまでに開発した耐熱性酵素に加え、新たにヒト腸内細菌から高効率な酵素群を見出した。これら酵素を糖化技術および細胞表層提示工学技術に応用することにより、 β -1,3-キシランから有用化学品を生産するためのプラットフォームを構築した。これにより未利用資源である海藻 β -1,3-キシランの利活用の進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a platform for the production of valuable chemicals from β -1,3-xylan, a unique polysaccharide found in seaweed.

First, a method was developed to efficiently produce xylose from seaweed biomass by using thermostable enzymes that hydrolyze β -1,3-xylan. Next, three novel β -1,3-xylan degrading enzymes with high efficiency were identified and characterized from the genome sequence of human gut bacteria. These enzymes were then used to engineer *Halomonas elongata* to use β -1,3-xylan through cell-surface engineering technology.

Further development of this platform technology is expected to efficiently produce valuable chemicals from β -1,3-xylan, a carbohydrate found in seaweeds that has not yet been utilized.

研究分野：微生物工学

キーワード： β -1,3-キシラナーゼ β -1,3-キシラン 海藻バイオマス イチイスタ 細胞表層工学技術 統合バイオプロセス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

β -1,3-キシランは、紅藻類および緑藻類の細胞壁にのみ存在する海藻特有の多糖である。食用海藻では、海苔の原料である紅藻アマノリ類、ウミブドウとして流通している緑藻クビレズタなどに含まれている。また、地中海を中心に大繁茂し、海洋生物を死滅させるなど沿岸生態系の破壊を引き起こしている変異型イチイズタの細胞壁にも存在する。変異型イチイズタは、イチイズタ (*Caulerpa taxifolia*) の変異種であり“キラー海藻”とも呼ばれている。地中海を中心に大繁茂し、海洋生物を死滅させるなど沿岸生態系の破壊を引き起こしており、国際自然保護連合の“侵略的外来種 100 種”に選定されている有害海藻である。変異型は野生型よりも強い繁殖力を持ち、小さな断片からも素早い再生が可能であることから、これまでに効果的な対策が見出されておらず、除去後の藻体は焼却されており有効利用されていない。イチイズタは、緑藻イワズタ属に分類される海藻であり、細胞壁骨格多糖は β -1,3-キシランである。これらの海藻加工残渣および有害海藻の細胞壁中の β -1,3-キシランを利用した有用物質生産は、地球環境保全の観点からの重要な技術となり得る。それには産業利用に耐え得る加水分解酵素が必要となるが、これまでに十分な触媒効率と安定性を有する酵素は発見されていなかった。そのため、研究開始当初において β -1,3-キシランは未利用資源のままであった。

2. 研究の目的

β -1,3-キシランは、キシロースが β -1,3 結合したホモポリマーであり、陸上植物細胞壁に含まれる β -1,4-キシランとは構造が異なる (図 1)。その酵素分解には β -1,3-キシロオリゴ糖を生成するエンド型の β -1,3-キシラナーゼ (1,3- β -D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.32) およびオリゴ糖に作用しキシロースを生成するエキソ型の β -1,3-キシロシダーゼ (1,3- β -D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.72) が必要となる。しかしながら、これまでに数種類の海洋性細菌由来酵素が報告されているのみで、ほとんどの酵素の耐熱温度は 40°C 以下と低く、産業利用には不適であった。特に既知の β -1,3-キシロシダーゼはホモ 4 量体であり耐熱温度は 30°C 以下と不安定であった。このため β -1,3-キシランからの物質生産は実用化されていない。

そこで本研究では、海藻バイオマスから様々な高付加価値化学品を生産するためのプラットフォームの構築を目的とした。具体的には、無尽蔵に増殖し沿岸生態系の破壊を引き起こしている有害海藻である変異型イチイズタをバイオマス源として、その細胞壁の主要構成多糖である β -1,3-キシランからグルタチオンやエクトイン等の高付加価値化学品を生産する新たな技術開発を目指した。変異型イチイズタを有効利用することが出来れば、これは“無尽蔵の海藻バイオマス”となり、有害海藻による環境問題の解決のみならず、化石資源依存型社会から循環型社会への産業構造の変革に寄与する技術となり得る。

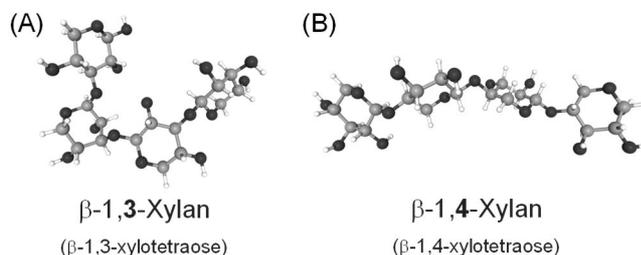


図 1. β -1,3-キシラン(A)および β -1,4-キシラン(B)

3. 研究の方法

はじめに海藻バイオマスに含まれる β -1,3-キシランの酵素糖化手法を開発し、次いで細胞表面工学技術を用いた酵素生産および糖化、発酵をワンステップで効率良く行う統合バイオプロセス

スの確立を試みた。

酵素糖化においては、産業利用に適する触媒効率と安定性を有する β -1,3-キシラン分解酵素の開発を目的として、超好熱性海洋細菌 *Thermotoga neapolitana* 由来の β -1,3-キシラナーゼおよび β -キシロシダーゼの酵素化学的諸性質を解析し、両酵素による酵素糖化条件の最適化を行った。

細胞表層工学技術を用いた統合バイオプロセスの確立においては、生産宿主に好塩性細菌 *Halomonas elongata* を用いた。本細菌は好塩性のグラム陰性細菌であり、0.3~21%という広範な塩濃度条件下での生育が可能であることから、塩濃度が高い海藻バイオマスの糖化に最適である。塩ストレス適応機構としてエクトイン等の適合溶質と称される水溶性の機能性分子を菌体内に蓄積する。細胞表層に提示する酵素には、我々が新たに見出したヒト腸内細菌由来の β -1,3-キシラン分解酵素を用いた。

4. 研究成果

4-1. 耐熱性酵素を用いた酵素糖化

これまでに我々は超好熱性海洋細菌 *Thermotoga neapolitana* 由来の耐熱性 β -1,3-キシラナーゼ *TnXyn26A* の性質を明らかにしている。その遺伝子の下流に存在する推定 β -キシロシダーゼ (*TnXlo3A*) をコードする遺伝子を大腸菌で発現し、その酵素化学的性質を解析した。その結果、本酵素 *TnXlo3A* は、 β -1,3-キシロオリゴ糖および β -1,4-キシロオリゴ糖に特異的に作用してキシロースを生じたことから、 β -1,3-キシロシダーゼ (EC 3.2.1.72) 活性および β -1,4-キシロシダーゼ (EC 3.2.1.37) 活性を有することが明らかとなった。本酵素の至適 pH は 6.0 付近、至適温度は 87.5 °C 付近であり、高い耐熱性を示した。

次いで、*TnXyn26A* と *TnXlo3A* の組合せにより、海藻特有の多糖である β -1,3-キシランの糖化を試みた。イチイズタおよびクビレズタの葉状体を乾燥粉碎し、精製水に懸濁した溶液を基質とし、*TnXyn26A* と *TnXlo3A* を同時に作用させた結果、キシロースが遊離した (図 2)。反応 12 時間後のイチイズタおよびクビレズタ中の β -1,3-キシランの糖化率は、それぞれ約 80% および約 20% であり、乾燥破碎のみの簡便な前処理で、酵素糖化が可能であることが明らかになった。このことから、海藻未利用資源中の β -1,3-キシランを高活性な耐熱性酵素で糖化することによりキシロースを生産し、キシロース発酵による高付加価値化学品の生産が可能であることが示された。

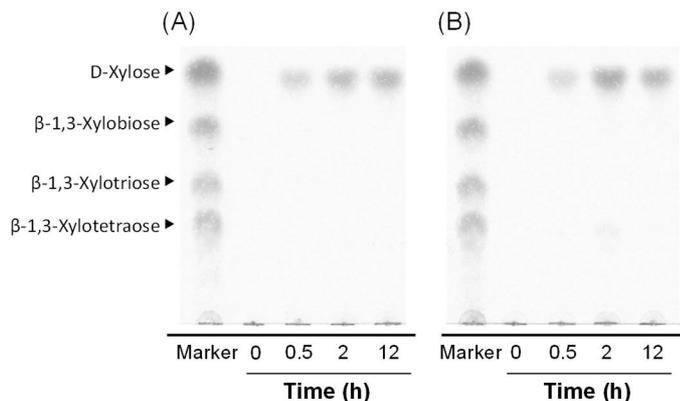


図2. イチイズタ(A)およびクビレズタ(B)の酵素糖化

4-2. 細胞表層工学技術を用いた統合バイオプロセス

海藻バイオマスは高塩・高含水バイオマスであることから、キシロース資化性に優れた好塩性細菌 *Halomonas elongata* を物質生産宿主に用いた。細胞表層工学技術を用いて *H. elongata* 細胞表層に β -1,3-キシラン分解酵素を提示することにより、酵素生産および糖化、発酵をワンステップで効率良く行う統合バイオプロセスの確立を試みた。*H. elongata* の至適生育温度は 37 °C 付近であることから、細胞表層に提示する酵素は中温菌由来の酵素が適している。しかしながら、前述のとおり β -1,3-キシラン分解酵素は数種類の海洋性細菌由来酵素が報告されているのみであ

り、特にエキソ型の β -1,3-キシロシダーゼに至っては 2 酵素が報告されているに過ぎず、それら酵素はホモ 4 量体であり耐熱温度は 30 °C 以下と不安定であり、細胞表面提示には適さない。そのため、はじめに安定かつ高活性な β -1,3-キシラン分解酵素を新たに探索した。その結果、ヒト腸内細菌由来の β -1,3-キシラン分解酵素群を見出した。これらは 2 種類の β -1,3-キシラーゼおよび 1 種類の β -1,3-キシロシダーゼから構成され、これら 3 種の酵素の働きで、効率的に β -1,3-キシランを分解していることが明らかになった。特に β -1,3-キシロシダーゼは、既報の酵素と比較して安定かつ高活性な酵素であった。本酵素は単量体であり、至適反応温度は 35 °C 付近であり 40 °C 付近までの熱安定性を示した。また、触媒効率 k_{cat}/K_m は既報酵素の 15 ~ 149 倍の高い値を示した。

これまでに報告がない単量体かつ安定な β -1,3-キシロシダーゼを得たことにより、 β -1,3-キシラン分解酵素群の細胞表面提示が可能となった。そのため、細胞表面工学技術による β -1,3-キシラン資化性 *H. elongata* の創製を試みた (図 3)。細胞表面提示のアンカータンパク質には *H. elongata* 由来の外膜局在性リポタンパク質 P5 を用いた。P5、目的酵素およびヘマグルチニン (HA) タグを連結した融合タンパク質をコードする遺伝子を構築し、三親接合と相同組換えにより目的遺伝子を *H. elongata* ゲノムに導入した。その結果、*H. elongata* ゲノムへの目的遺伝子の組込により、融合タンパク質が酵素活性を保持した状態で発現していることが確認された。

今後は、耐熱性酵素による酵素糖化および細胞表面工学技術により創製した β -1,3-キシラン資化性 *H. elongata* を組合せ、海藻バイオマス中の β -1,3-キシランからの高付加価値化学品の発酵生産条件を最適化することにより、新たなバイオプロダクト生産プラットフォームとしての発展が期待される。

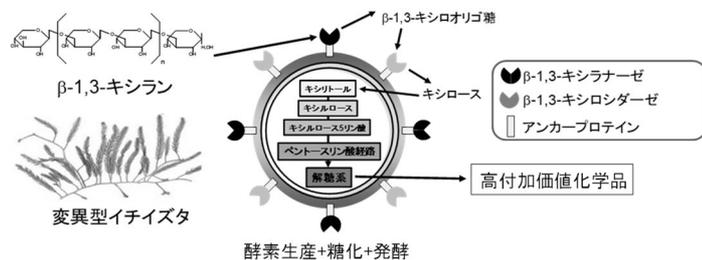


図3. 細胞表面工学技術による β -1,3-キシラン資化性好塩性細菌 *Halomonas elongata* の創製

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 堀 沙那恵, 岡崎 文美	4. 巻 1
2. 論文標題 ヒト腸内細菌Bacteroides cellulosilyticusによる海藻多糖 -1,3-キシランの資化機構 - 分泌型 - 1,3-キシラナーゼの機能解析 -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 第73回 日本生物工学会大会 トピックス集	6. 最初と最後の頁 16-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Sanae HORI, Fumiyoshi OKAZAKI
2. 発表標題 Identification and characterization of Xyn26B, a highly active -1,3- xylanase from the human gut bacterium Bacteroides cellulosilyticus
3. 学会等名 The 28th Tri-U International Joint Seminar and Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sanae HORI, Fumiyoshi OKAZAKI
2. 発表標題 Identification and characterization of a -1,3-xylanase from the human gut bacterium Bacteroides cellulosilyticus
3. 学会等名 2021 Sakura-Bio Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀 沙那恵, 岡崎 文美
2. 発表標題 ヒト腸内細菌Bacteroides cellulosilyticus由来 -1,3-キシラナーゼBcXyn26Aの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第190回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長縄 真以, 岡崎 文美
2. 発表標題 ヒト腸内細菌Bacteroides cellulosilyticus由来 -1,3-キシロシダーゼBcXI043Hの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第190回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀 沙那恵, 岡崎 文美
2. 発表標題 ヒト腸内細菌Bacteroides cellulosilyticusによる海藻多糖 -1,3-キシランの資化機構 - 分泌型 -1,3-キシラナーゼの機能解析 -
3. 学会等名 第73回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長縄 真以, 岡崎 文美
2. 発表標題 ヒト腸内細菌Bacteroides cellulosilyticusによる海藻多糖 -1,3-キシランの資化機構 - 菌体内 -1,3-キシロシダーゼの機能解析 -
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷口 瑞季, 工藤 基徳, 荻野 千秋, 近藤 昭彦, 田丸 浩, 青木 恭彦, 岡崎 文美
2. 発表標題 好冷性海洋細菌が産生する -1,3-キシラナーゼの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部 第187回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口 瑞季, 工藤 基徳, 荻野 千秋, 近藤 昭彦, 田丸 浩, 青木 恭彦, 岡崎 文美
2. 発表標題 好冷性海洋細菌Psychroflexus torquis由来 -1,3-キシラナーゼの -1,3-キシロオリゴ糖に対する作用性
3. 学会等名 日本生物工学会 生物工学若手研究者の集い 第三回オンラインセミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口瑞季, 工藤基徳, 荻野千秋, 近藤昭彦, 田丸浩, 青木恭彦, 岡崎文美
2. 発表標題 好冷性海洋細菌Psychroflexus torquis由来 -1,3-キシラナーゼの酵素化学的諸性質
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuki TANIGUCHI, Motonori KUDOU, Chiaki OGINO, Akihiko KONDO, Yutaka TAMARU, Takahiko AOKI, Fumiyoshi OKAZAKI
2. 発表標題 Biochemical characterization of a psychrophilic -1,3-xylanase from Antarctic sea-ice bacterium, Psychroflexus torquis
3. 学会等名 2019 Sakura-Bio Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀 沙那恵, 岡崎 文美
2. 発表標題 ヒト腸内細菌が有する -1,3-キシラナーゼ遺伝子の探索および酵素機能解析
3. 学会等名 日本生物工学会 生物工学若手研究者の集い 夏のオンラインセミナー2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	原 清敬 (HARA Kiyotaka) (40434378)	静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授 (23803)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	石井 純 (ISHII Jun) (40512546)	神戸大学・先端バイオ工学研究センター・准教授 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------