

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05173

研究課題名(和文) 草食性陸ガニのリグニンバイオマス分解プロセスの解明とその応用

研究課題名(英文) Lignin degrading activities of herbivorous land crabs

研究代表者

三宅 克英 (Miyake, Katsuhide)

名城大学・理工学部・教授

研究者番号：90252254

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)：海岸林のアカテガニやクロベンケイガニなどの陸ガニ類は、バイオマス分解者として、海と森の間の物質循環に大きな役割を果たしている。本研究では、これまで省みられることのなかった陸ガニ類のリグニンバイオマス分解能力を解析、同定、抽出し、生物工学的な応用を可能にすることを目的としている。本研究の結果、1)陸ガニ類の中腸腺のRNA-seqを実施し、リグニンを含むバイオマス分解活性を担う酵素遺伝子群を発見した、2)陸ガニ類のラッカーゼ活性とパーオキシダーゼ活性について草食性との強い関連性を明らかにした、3)特に重要と思われるラッカーゼとパーオキシダーゼを大腸菌で発現させ、酵素活性を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、バイオマス分解酵素の新規供給源を開拓する研究であり、その対象として草食性陸ガニ類を選択したものである。分解をめざすバイオマス構成因子として、非常に分解の難しいとされるリグニンを選択している。本研究結果では、草食性陸ガニ類から、強いリグニン分解活性を検出できており、またその遺伝子群の単離にも成功した。大腸菌等での生物工学的な生産は十分ではないが、改善できれば、リグニン分解酵素として新しい選択肢を提示できる。

研究成果の概要(英文)：Chiromantes haematocheir and C. dehaani are herbivorous land crabs that live in Japanese maritime forests. They often eat decayed wood and fallen or green leaves. Herbivorous land crabs are thought to degrade plant biomass. Plant biomass consists of three major components: cellulose, hemicellulose, and lignin. Among these components, lignin is refractory organic substance. These crabs seem to express lignin degradation enzymes endogenously. In this study, we sequenced and assembled C. haematocheir and C. dehaani midgut gland transcriptomes. Genes encoding putative enzymes involved in the degradation of biopolymers, such as lignin and cellulose were identified, and their expressions and activities were characterized. Here, we report an analysis of the laccase and peroxidase genes showing the highest expression level in the midgut gland of the land crabs. The properties of laccase and peroxidase showing highest expression and its involvement in plant biomass degradation were studied.

研究分野：環境生物学

キーワード：リグニン 陸ガニ ラッカーゼ パーオキシダーゼ 植食性

1. 研究開始当初の背景

天然の原生林と海が接した海岸林に生息するアカテガニやクロベンケイガニなどの陸ガニ類は、海岸森林バイオマスの分解者として、海と森間の物質循環に大きな役割を果たしている(図1)。森林バイオマスは、木や落ち葉などからなっており、これを食料とするアカテガニやクロベンケイガニは、セルロース、リグニン、ヘミセルロースなど、草本系や木質系のバイオマスの

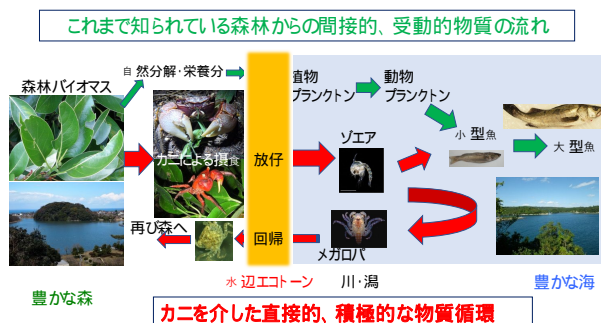


図1 陸ガニを介した森・川・海の物質循環

主要成分を効率的に分解、吸収するシステムを持っていることが予想された。バイオマス有効利用のために陸ガニのシステムが有用かもしれない。特にリグニンを効率的に分解できれば、セルロース、ヘミセルロースという植物バイオマスの有効成分の抽出が容易になるだけでなく、リグニン由来の分解産物の有効利用も可能になる。研究開始当初の草食性甲殻類の研究では、セルロースやヘミセルロースを分解する酵素群については報告があり(J. Comp. Physiol. B 177, 269-286 (2007))、これがカニの草食生態に寄与しているものと考えられていたが、草食性の強さとの相関は不明であった(J. Comp. Physiol. B. 184, 449-468.)。また本課題のテーマである難分解性のリグニンの分解活性については全く研究が進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究は、1) このアカテガニ、クロベンケイガニの消化管系に着目し、リグニン分解能力を中心としたバイオマス分解活性の全容(酵素や共生菌)を明らかにすること、2) 陸ガニから得られた生物資源(酵素、遺伝子、共生細菌群など)を用いて *in vitro* でリグノセルロース及びキチンバイオマス有効利用システムを構築することを目的としている。リグニンを効率的に分解できれば、セルロース、ヘミセルロースという植物バイオマスの有効成分の抽出が容易になるだけでなく、リグニン由来の分解産物の有効利用も可能になる。キチンバイオマスからは食品や医薬品原材料の供給が期待できる。環境保全上、陸ガニ本体を多量に利用することは好ましくないため、3) の *in vitro* のシステム構築は重要である。

3. 研究の方法

(1) リグニン分解活性の測定

酵素活性測定に使用する基質としてはリグニン類縁体のグアヤコールと2,6-ジメトキシフェノール(2,6-DMP)を用意した(各4 mM)。前者はパーオキシダーゼ活性に、後者はラッカーゼ活性に使用した。パーオキシダーゼ活性は1 mM 過酸化水素を酸化剤として添加した。2,6-DMPの酸化は470 nmの、グアヤコールの酸化は465 nmの吸光度の経時的増加量で評価した(図2)。

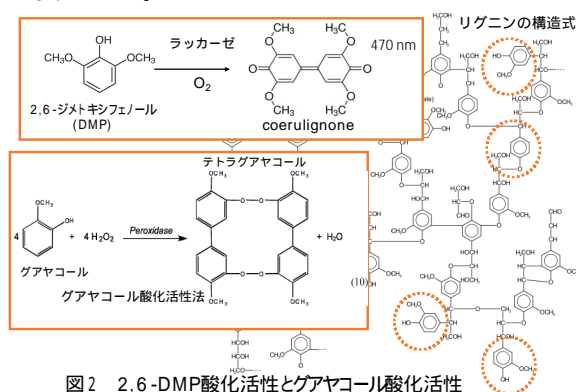


図2 2,6-DMP酸化活性とグアヤコール酸化活性

(2) アカテガニ、クロベンケイガニ中腸腺のRNA-seq

脱皮中のアカテガニと通常のアカテガニ、グアヤコール酸化活性の強いクロベンケイガニと弱いクロベンケイガニの中腸腺から QIAGEN RNeasy mini kit を用いて全 RNA を調製し、RNA-seq を行った。次世代シーケンスは Illumina HiSeq 2500 で行い、得られた転写産物のアノテーションは BLAST で行った。得られたデータセットからラッカーゼとパーオキシダーゼ及びキチナ

ーゼを探索した。

(3) 大腸菌での発現及び活性確認

RNA-seq により明らかになったラッカーゼ遺伝子とパーオキシダーゼ遺伝子を、C 末端側に His-tag が融合する形で大腸菌発現用ベクター pETBlue-2 に連結し、大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。発現確認は抗 His-tag 抗体 (和光) を用いたウェスタンブロッティングで行った。精製は HisTALON カラム (タカラバイオ) で行った。

(4) カニ臓器サンプルの調製

アカテガニ及びクロベンケイガニを解剖し、中腸腺、胃、腸、エラ、血液をとり、粗酵素液及び RNeasy mini kit を用いて全 RNA を調製した (図 3)。遺伝子の発現解析を行うために、RT-PCR を行った。cDNA の作製には ReverTra Ace (東洋紡) を用いた。RT-qPCR は KOD-SYBR qPCR Mix と BMSHBG0003 Real-Time PCR system (BM) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) アカテガニ及びクロベンケイガニの RNA-seq

アカテガニ及びクロベンケイガニの中腸腺を対象とした RNA-seq のデータから、リグニン分解に関連すると思われる酵素であるラッカーゼとパーオキシダーゼを探索した。アカテガニからは 11 種類のラッカーゼ遺伝子、22 種類のパーオキシダーゼ遺伝子、クロベンケイガニからは 6 種類のラッカーゼ遺伝子、24 種類のパーオキシダーゼ遺伝子が検出された。両方のカニのどの酵素に関しても、1 種類の遺伝子の発現量が全体の大半を占めており (90%以上)、重要と考えられる。アカテガニで発現量が最大だったラッカーゼは、クロベンケイガニでも最大であった (アカテガニ: 24131 遺伝子、クロベンケイガニ: 65040 遺伝子)。パーオキシダーゼで発現量が最大だったものはグルタチオンパーオキシダーゼであり (アカテガニ: 26384 遺伝子、クロベンケイガニ: 67691 遺伝子)、グアヤコール酸化活性の強い個体においては約 4 倍の発現量になっていることも確認された。このことはグアヤコール酸化活性がこの酵素によって担われている可能性を示唆していた。

また、リグニン分解関連酵素とは別に、キチナーゼ遺伝子の探索もアカテガニにおいて行い、脱皮直後のカニにおいて発現量が昂進しているキチナーゼ遺伝子を発見した (29294 遺伝子)。キチナーゼ遺伝子は 22 種類検出されたが、この 29294 遺伝子が、通常のカニにおいては 87%、脱皮直後のカニにおいては 98% の発現量を占めることも判明した。非常に重要な役割を担っていることが予想される。この遺伝子にコードされる酵素は、多くのキチナーゼと同様にファミリー 18 の糖質分解酵素に分類され、C 末領域にキチン結合ドメインを有していた。キトトリオキシダーゼという名前からも連想されるように、エキソ型の酵素と考えられ、応用的に重要な結晶性キチン分解能を有している可能性が高い。本研究においては、上記リグニン分解関連酵素の解析を優先したために、これ以上のキチナーゼの解析は行っていないが、今後酵素生産、活性解析等を行って行きたいと考えている。

(2) アカテガニ及びクロベンケイガニのリグニン類縁体酸化活性

研究開始時点において、非常に強いグアヤコール酸化活性 (パーオキシダーゼ活性) は全てのクロベンケイガニとアカテガニの一部のメスの中腸腺から検出できていた。この活性と今回 RNA-seq で検出された遺伝子の関係については、ある程度の推測が可能である。グアヤコール酸化活性の強いクロベンケイガニと弱いクロベンケイガニでは、強いカニの方が 67691 グルタチオンパーオキシダーゼ遺伝子の発現量が明確に昂進されている。グルタチオンパーオキシダーゼがリグニン分解に寄与するという過去の報告はないが、この酵素が植食性に重要な役割を果たしている可能性がある。

本研究では、新たにアカテガニにおけるラッカーゼ活性の解析を行った。図3に示すように、植物性の餌を与えたアカテガニにのみ、強いラッカーゼ活性が認められた。活性は主に中腸腺で検出され、胃でも検出される場合があった。同様の傾向はクロベンケイガニでも見られた。この結果は、陸ガニの植食性において、このラッカーゼ活性が重要な役割を果たしていることを示唆している。中腸腺で生産された酵素が胃などの消化管に分泌され、リグニンの消化に役立っている可能性が高い。この活性は、RNA-seqにおいて最大発現量を示した 24131 遺伝子(アカテガニ)や 65040 遺伝子(クロベンケイガニ)によって担われているものと予想している。

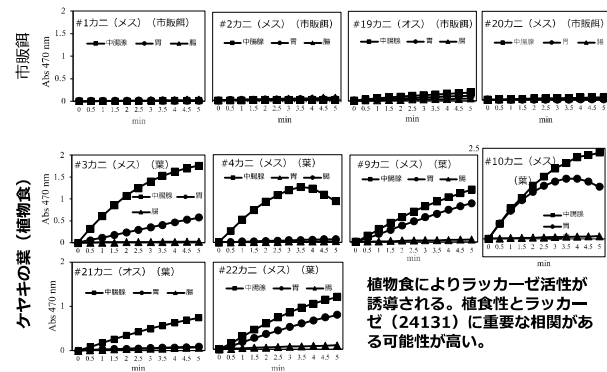


図3 植物食によるアカテガニラッカーゼ反応の増強

(3) アカテガニでのラッカーゼの転写解析

24131 ラッカーゼの発現について、RT-PCR 法で解析したところ、臓器別の発現では、中腸腺での発現が最も多く、次いで血液という結果となった。胃、腸、エラからの発現はほとんど見られなかった(図4)。血液での発現は中腸腺の10分の一程度であり、中腸腺での発現がほとんどであることがわかる。この結果は、中腸腺で生産されたラッカーゼが消化管等に分泌されて、消化等に利用されていることを示していた。また、カニの餌の種類による 24131 ラッカーゼの発現については、図3で明らかになったような植物食による顕著な増強は観察されなかった。このことは、ラッカーゼ活性の植物食による増強は、転写レベルではなく、翻訳レベルあるいは翻訳後修飾レベル、もしくは酵素の切断等による活性化などによって引き起こされていることを示している。

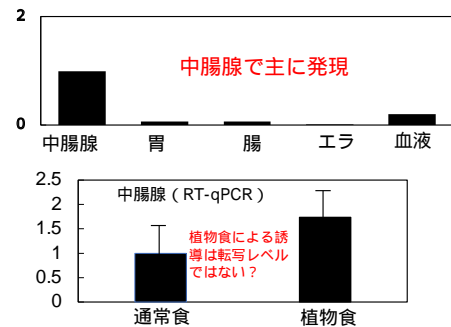


図4 24131ラッカーゼの転写

(4) ラッカーゼとグルタチオンパーオキシダーゼの大腸菌での生産

陸ガニのリグニン分解において重要な機能を担っている可能性があるラッカーゼとグルタチオンパーオキシダーゼを大腸菌で生産、精製して活性を評価した。ラッカーゼに関してはアカテガニ由来の 24131 とクロベンケイガニ由来 65040 の酵素を、グルタチオンパーオキシダーゼについてはアカテガニ由来 26384 酵素を評価した。図5に示すように大腸菌ではラッカーゼの生産は

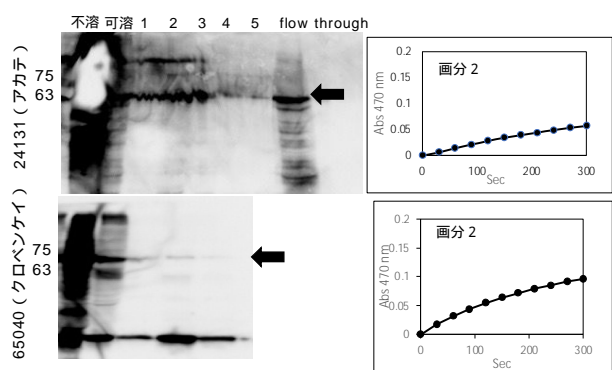


図5 ラッカーゼの精製と酵素反応

大半が不溶性の封入体となってしまったが、一部は可溶化されており、精製も可能であった。また 2,6-DMP 酸化活性も弱いながら検出できた。活性はクロベンケイガニの酵素の方が強そうである。これは植食性の強さの違いと矛盾しない。この酵素の構造から予想されることとして、N末の抑制ドメインの存在がある。ラッカーゼと同様の銅結合酸化酵素であるヘモシアニンにおいては、N末領域が活性を抑制しているという報告がある。陸ガニのラッカーゼにおいても抑制ドメインの必須アミノ酸であるフェニルアラニンが良く保存されているので、有望である(図6)。今後はこのN末ドメインを除去したラッカーゼを作成し、活性を確認する。十分

な活性が観察できれば、応用実験に供することができる。

一方、グルタチオンパーオキシダーゼについてであるが、精製はほとんどできていないが、グアヤコール活性は検出された。十分量精製ができれば活性増強に期待ができる結果である。この酵素は活性部位がセ

レノシステインであり、カニ由来酵素の大腸菌におけるこの残基の導入効率は低いはずである(図6)。これを解決するためには、カニに近い昆虫細胞での生産が有効かもしれない。

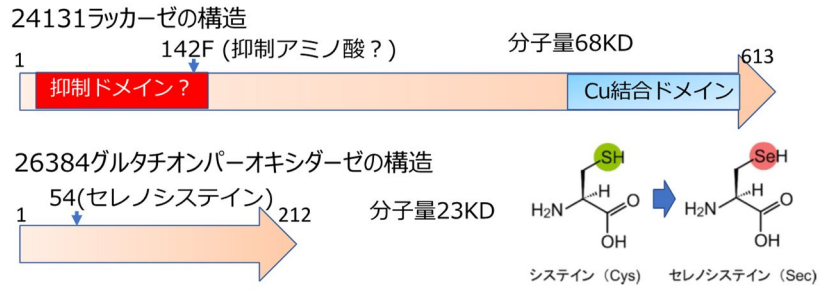


図6 陸ガニ内在性ラッカーゼ及びグアヤコールパーオキシダーゼの構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katsuhide Miyake, Kaori Ura, Shinnosuke Chida, Yoshiki Ueda, Yasunori Baba, Takasei Kusube, Seiji Yanai	4. 巻 128
2. 論文標題 Guaiacol oxidation activity of herbivorous land crabs, <i>Chiromantes haematocheir</i> and <i>Chiromantes dehaani</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 316-322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2019.02.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyake Katsuhide, Baba Yasunori	4. 巻 192
2. 論文標題 De novo transcriptome assembly of the midgut glands of herbivorous land crabs, <i>Chiromantes haematocheir</i> , and identification of laccase genes involved in lignin degradation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Physiology B	6. 最初と最後の頁 247 ~ 261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00360-021-01424-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三宅克英、安部 水葉、小川 晃史、下村 真司、坂本 大樹、馬場 保徳
2. 発表標題 草食性陸ガニのリグニン類縁体酸化酵素群の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅 克英、久世 悠登、八神 陽一、小野内 健人、馬場 保徳
2. 発表標題 草食性陸ガニによるリグニン含有バイオマス分解の可能性について
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（福岡）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場保徳, 後藤暢宏, 楠部孝誠, 河井重幸, 三宅克英
2. 発表標題 木喰いガニ消化管の微生物群集構造解析ーリグニン・セルロース分解機序の解明ー
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場保徳, 後藤暢宏, 楠部孝誠, 河井重幸, 三宅克英
2. 発表標題 陸生カニ消化管のセルロース・リグニン分解機序の解明とメタン発酵前処理への応用
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い夏のセミナー2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅克英・小野内健人・八神陽一・久世悠登・馬場保徳
2. 発表標題 草食性陸ガニのリグニン類分解活性の解析
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会（大阪）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅克英、永倉佑真
2. 発表標題 脱皮に関連した陸ガニ由来キチナーゼの解析
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 三宅克英, 永倉佑真
2. 発表標題 草食性陸ガニの生産するリグニン酸化酵素
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
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

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