

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K15956

研究課題名（和文）深海由来微生物のセルロース分解機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of cellulose degradation mechanisms in deep-sea microorganisms.

研究代表者

立岡 美夏子 (Tachioka, Mikako)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋機能利用部門(生命理工学センター)・研究員

研究者番号：70835967

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、結晶性セルロースの分解活性を超高感度に検出・定量する手法（Surface Pitting Observation Technology, SPOT）を開発し、深海から新規なセルロース分解菌を分離した。プロテオバクテリアに属する *Marinagarivorans cellulosilyticus* GE09株の培養実験とゲノム解析により、この菌がセルロース系バイオマス分解に特化していることが示唆された。特に、結晶性セルロース分解に関与するセロビオヒドロラーゼ遺伝子に新規なドメイン構造が見出された。本研究により、深海がセルロース分解酵素探索の有望な資源であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、セルロースが難分解であるため高感度かつ迅速な検出が困難であった点を新規手法開発によって解決し、深海微生物資源からの酵素探索に応用した点である。光合成が起こらない深海はこれまでセルロース分解酵素の探索の場として注目されてこなかったが、本研究により、貧栄養の深海には独自の酵素でセルロースを分解する微生物が存在することが明らかになった。また、提案した超高感度検出法SPOTは、さまざまな難分解性ポリマーの活性測定や微生物・酵素探索に適用可能であり、天然高分子の効率的変換やプラスチック汚染の解決にも貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a method called Surface Pitting Observation Technology (SPOT), which enables the ultra-sensitive detection and quantification of crystalline cellulose degradation activity. Using this method, we isolated a novel cellulose-degrading bacterium from the deep sea. Cultivation experiments and genome analysis of the strain *Marinagarivorans cellulosilyticus* GE09, which belongs to the γ -Proteobacteria, suggested that this bacterium is specialized in the degradation of cellulose-based biomass. Notably, the genome analysis revealed that the cellobiohydrolase gene, which is involved in crystalline cellulose degradation, possesses a highly novel domain structure. This study highlights that the deep sea is a promising resource for the exploration of cellulose-degrading enzymes.

研究分野：木質科学

キーワード：セルラーゼ 深海 バクテリア セルロース 分解

1. 研究開始当初の背景

セルロースは地球上に最も豊富に存在する有機物であるが、水に不溶で非常に安定な結晶構造をとることから、セルロースを分解して栄養源にできる生物はごく一部に限られている。陸上ではキノコやカビが強力な分解者として位置づけられている他、草食動物のルーメン細菌が非常に効率的な酵素複合体を作ることもよく知られている。生物によってそれぞれ分解戦略は異なっており、生育環境の違いを反映したセルロース分解システムの多様性が見出される。

海洋の95%を占める深海は、生命活動による炭素の代謝が行われる地球最大の領域のひとつであり、地球規模の炭素循環を考える上で非常に重要な領域である。光が届かず光合成が行われない深海では、浅海から沈降する物質の中で分解されずに残った「難分解物」をエネルギー源にした生態系が広がっていると考えられているが、実際にどのような有機物が分解を受けているのかは明らかになっていない。セルロースの絶対的な存在量や難分解性を考慮すると、セルロースは深海までたどり着く有機物の多くを占めることが推測される。しかしながら、深海はアクセスが容易ではないことに加え、**高圧・低温・貧栄養**といった**極限環境**に生息する微生物は培養が困難であることも多い。したがって、深海でのセルロース分解に関してはほとんど報告されておらず、**実際に深海でセルロースが資化されているのか**を含めて詳細な検討が必要な状況にある。**貧栄養下の深海ではむしろ難分解性のセルロースを積極的にエネルギー源とする微生物が存在する可能性が高いのではないかと**考えられるが、深海においてセルロース分解を担う微生物についてはほとんど知られておらず、またその微生物がどのような戦略で分解を行っているのかは分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、独自のスクリーニング手法を用いて深海からセルロース分解菌を見出し、生産する糖質関連酵素を精査することでそのセルロース分解メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

これまで深海のセルロース分解菌が探索されなかった要因のひとつとして、セルロースが難分解であるため、セルロース分解活性の高感度、かつ迅速な検出が困難であった点がある。そこで本研究では、まずセルロース分解をナノファイバゲル表面の穴の生成によって高感度に検出する新規手法を開発し、深海からのセルロース分解菌の分離へ適用することとした(図1)。具体的には、下記項目を検討した。

- (1) セルロース分解の超高感度活性測定法の開発
- (2) 深海由来株の分離と培養条件の検討
- (3) 微生物ゲノムの解析による分泌酵素の精査

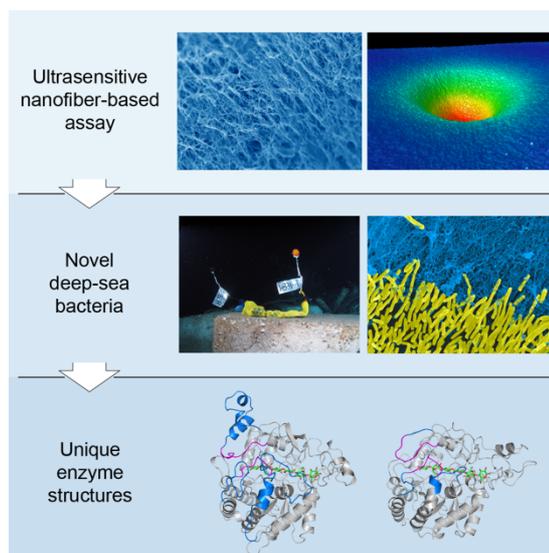


図1.深海由来セルラーゼの探索の方法

4. 研究成果

(1) セルロース分解の超高感度活性測定法 (Surface Pitting Observation Technology) の開発

本手法ではナノファイバー化したセルロースゲルマトリクスが酵素により分解される体積減少を直接測定することによって、ナノグラムレベルの超高感度のセルロース分解活性の定量を可能とした。具体的には、インクジェット技術を用いた酵素のピコリットルレベルでの精密な滴下制御と、3Dレーザー顕微鏡による非侵襲の立体形状変化の観察法を組み合わせた手法を開発した(図2)。本手法は*iScience*誌に発表した後、*STARProtocols*誌に掲載の招待を受け、プロトコルとしても発表した。

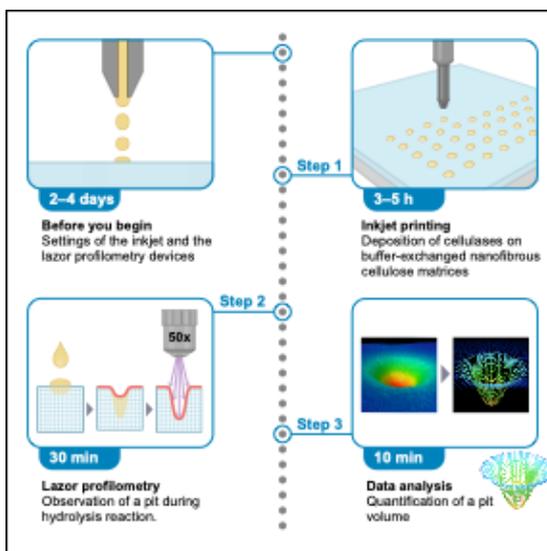


図 2. 超高感度セルロース分解活性検出法

(2) 深海由来の新規セルロース分解菌の分離

上記の手法によって深海から新規性の高いセルロース分解菌を分離した。Gammaproteobacteria綱のCellvibrionaceae目に属する微生物のうち、*Marinagarivorans*属のGE09株について詳細に調べ、*M. cellulosilyticus*と命名して新種登録を行った(図3)。本菌は鞭毛を持つ運動性を持つ菌であり、ナノファイバー化セルロースを分解しながら増殖する様子も観察した。本菌は海洋性の多糖(キチン、アガー等)を資化することはできず、セロビオースやセルロースを主なエネルギー源とすることが明らかとなった。詳細は*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*にて報告している。

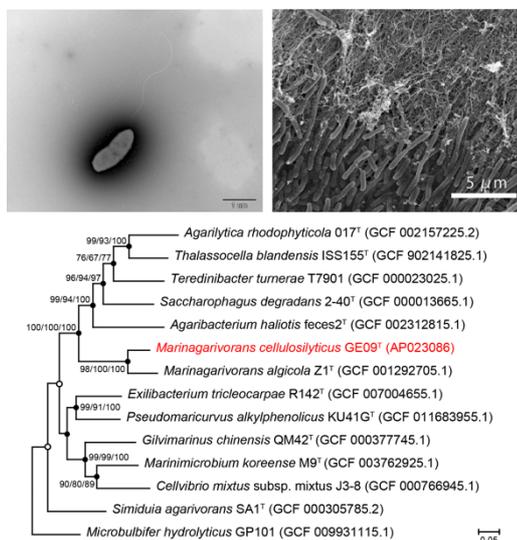


図 3. 深海から分離した新規セルロース分解菌

(3) 深海由来微生物のセルラーゼの詳細解析

M. cellulosilyticus GE09株のゲノム解析を行ったところ、分泌シグナル配列を持つ糖質関連酵素を多数有することが分かった。植物細胞壁分解に必要なセルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペクチン分解酵素がその大半を占めていた(図4A)。これは、海洋性多糖分解酵素も持つジェネラリスト型の海洋細菌とは対照的であった。さらに、主に結晶性セルロースの分解に関与すると考えられるエキソ型セルラーゼ(セロビオヒドロラーゼ)は、既知のバクテリア由来のエキソ型セルラーゼとは系統的にも大きく異なる新規セルラーゼであることも明らかとなった(図4B)。特に、触媒活性部位付近へのループ構造の付加が予測されたことから、酵素の機能性も既知酵素とは異なることが示唆された。また、これらの新規性の高いセルラーゼドメインには、既知のセルロース結合ドメインなどは見出されず、全く新しいドメイン構成を持つことも明らかとなった(図4C)。詳細は*iScience*誌にて報告している。

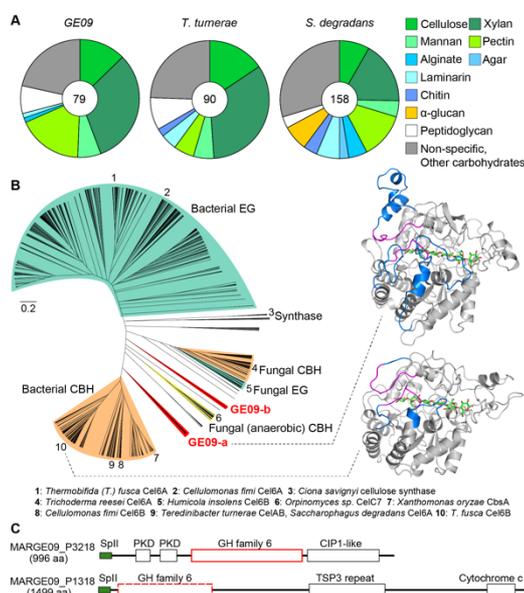


図 4. 深海由来セルラーゼの新規性

以上のように、本研究ではセルロース分解活性を超高感度に検出する手法によって、これまで困難であった深海からのセルロース分解菌の分離に成功した。深海から分離したセルロース分解菌の培養方法を確立し、詳細を調べた結果、光合成によるセルロース生産の起こらない深海から分離されたのにも関わらず、セルロース分解に特化した微生物であることが明らかになった。また、深海セルロース分解菌が持つセルラーゼの高い新規性も明らかとなった。本研究によって、深海がセルロース分解酵素を探索するための有望な資源であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsudome Mikiko, Tachioka Mikako, Miyazaki Masayuki, Uchimura Kohsuke, Tsuda Miwako, Takaki Yoshihiro, Deguchi Shigeru	4. 巻 25
2. 論文標題 An ultrasensitive nanofiber-based assay for enzymatic hydrolysis and deep-sea microbial degradation of cellulose	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104732	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Tachioka Mikako, Tsudome Mikiko, Deguchi Shigeru	4. 巻 4
2. 論文標題 Protocol for analyzing enzymatic hydrolysis of cellulose using surface pitting observation technology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2023.102066	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Tsudome Mikiko, Tachioka Mikako, Miyazaki Masayuki, Tsuda Miwako, Takaki Yoshihiro, Deguchi Shigeru	4. 巻 73
2. 論文標題 Marinagarivorans cellulolyticus sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from the deep-sea off Noma-misaki, Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005748	査読の有無 有
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 2件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 M Tachioka, M Tsudome, S Deguchi
2. 発表標題 Unlocking the cellulolytic potential in the deep sea: isolation of an unusual bacterium with a limited CAZyme repertoire
3. 学会等名 Gordon Research Conference (GRC): Carbohydrate-Active Enzymes for Glycan Conversions (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 M Tachioka, S Yamaguchi, S Deguchi, M Samejima, K Igarashi
2. 発表標題 Uncovering the Catalytic Mechanism of Inverting Cellulase CBH2 by Visualization of Hydrogens using Neutron Crystallography
3. 学会等名 The 5th International Cellulose Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 立岡美夏子、山口空、出口 茂、鮫島正浩、五十嵐圭日子
2. 発表標題 中性子構造解析で明らかにしたGH6に属するセルラーゼのアルギニンの脱プロトン化を介した反応機 構
3. 学会等名 第72回日本応用糖質科学会 応用糖質科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 立岡美夏子、津留美紀子、出口 茂
2. 発表標題 深海の α -プロテオバクテリアに特有なセルロース分解特性の解明
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 立岡美夏子、津留美紀子、出口茂
2. 発表標題 分離培養とゲノム解析から明らかになる深海セルロー ス分解菌の新奇性
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 15.0 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mikiko Tsudome, Mikako Tachioka, Shigeru Deguchi
2. 発表標題 Nanofiber-Based Ultrasensitive Assay for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose
3. 学会等名 The 51st Conference of the German Colloid Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mikako Tachioka
2. 発表標題 Discovery of unique cellulose-degrading bacteria from the deep sea: Isolation and genome analysis
3. 学会等名 Global Young Scientists Summit (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 立岡 美夏子、津留 美紀子、出口 茂
2. 発表標題 Fibrobacterota門に属する新奇な深海由来セルロース分解菌のゲノム解析
3. 学会等名 第73回日本木材学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 立岡美夏子、津留美紀子、宮崎征行、高木善弘、出口茂
2. 発表標題 深海由来新規バクテリアのセルロース分解関連酵素遺伝子の解析
3. 学会等名 第28回セルロース学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立岡美夏子、津留美紀子、宮崎征行、高木善弘、出口茂
2. 発表標題 深海由来セルロース分解菌のゲノム解析による新規酵素の探索
3. 学会等名 第70回日本応用糖質科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立岡 美夏子、津留 美紀子、磯部 紀之、高木 善弘、出口 茂
2. 発表標題 高感度セルロースグルスクリーニングによる深海由来セルラーゼの探索
3. 学会等名 第68回日本応用糖質科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 立岡美夏子、津留美紀子、出口茂	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 504
3. 書名 極限環境微生物の先端科学と社会実装最前線：3-2深海由来微生物のセルロース分解酵素の機能解析	

〔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
---------	---------