

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850226

研究課題名(和文) 深海由来の新奇セルロース分解菌が生産するセルラーゼの特異性を探る

研究課題名(英文) Genetic and biochemical characterization of cellulases from novel deep-sea cellulolytic bacteria

研究代表者

内村 康祐 (Uchimura, Kohsuke)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・技術副主事

研究者番号：70416006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：深海由来のセルラーゼ生産菌について酵素の機能解析を行った。セルラーゼは生産菌の培養液から直接精製したものや、ゲノム解析から得た遺伝子情報をもとに大腸菌を形質転換し生産された酵素を用いた。それぞれの酵素の性質を調べた結果、深海環境に近い低温下、弱アルカリ性付近、食塩の存在下で良好に(リン酸膨潤)セルロースを分解した。酵素の分子量が大きいことも特徴の一つであり、糖鎖を有する酵素や特異なセルロース結合様部位を個有するようなセルラーゼも見出され、深海環境においては陸生由来の酵素とは明らかに異なるセルラーゼを生産する新奇な細菌が生息していることが判った。

研究成果の概要(英文)：We have investigated cellulases from deep-sea cellulolytic bacteria. Cellulases used were purified from a culture broth of a deep-sea bacterium or produced by recombinant *Escherichia coli* harboring cellulase gene(s) derived from genome analysis. Each cellulase degraded cellulose or acid swollen cellulose well under low temperature, weak alkaline region, and the presence of NaCl, nearly like a deep-sea environment. One of the distinguished characters of these cellulases was their higher molecular weights. They were attributed to a glycoprotein or enzyme possessing several unique cellulose-binding domain. Thus, it revealed that the novel cellulolytic bacteria dwelling in deep-sea produce clearly different cellulases from those of terrestrial microorganisms.

研究分野：酵素

キーワード：セルラーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) セルロース系のバイオマスは地球上で最大のバイオマスである。この難分解性のセルロースを高効率でグルコースに返還する技術はセルロース系のバイオエタノール生産のような循環型の物質生産プロセスを確立するために必須である。しかしながら既存のセルラーゼを利用した酵素加水分解では反応速度が遅く、新たな高活性セルラーゼが求められていた。

(2) 研究チームでは高活性セルラーゼを生産する有用細菌を分離する為に極微細なセルロース繊維からなるナノファイバーセルロース平板を用いた画期的なスクリーニング法を開発した。この手法を用いて、光の届かない暗黒の深海底の泥から細菌のスクリーニングを行い、16S rRNA 解析で近縁種と90%程度の相同性しか示さない極めて新規性の高い細菌を複数単離し、新手法の有用性が実証された(文献①、②)。

2. 研究の目的

(1) 深海のセルロースについて考えてみると海洋表層で渦鞭毛藻などのプランクトンなどによって生産されたものや、海中を漂うオタマボヤがセルロースマイクロフィブリルで構成されたハウスと言われる餌の捕獲ネットを破棄したものであると考えられる。これらは沈降の間に生分解を受ける。そこで無定形や結晶性の低いドメインなどが優先的に利用された結果、海の底に到達したセルロースは絶対量が少ないのに加えて分解されにくい結晶性の割合が高いと予想された。深海底にはこれら海洋性とも言えるセルロースを効率的に利用する分解者が必ず存在するはずである。そして、深海という特殊な環境からナノファイバーセルロース平板を用いて単離した新規なセルロース分解細菌が分解者の役割をしており、これらが生産するセルロース分解酵素は既知の陸上由来の酵素とは異なる可能性が期待された。

(2) 本研究課題では深海という特殊環境に適応したセルロース分解細菌がどのようなセルラーゼを生産し、どのような機能を保持しているか明らかにすると共に、深海環境への適応のために陸上由来の細菌が生産する酵素と比較してどういった特異性を有しているか基礎的知見を取得する。その為に酵素の分子生物学的特性の解析及び酵素化学的キャラクタリゼーションを行う。その結果から発展的及び応用的研究を目指す。

3. 研究の方法

(1) 目的達成のために単離した新規セルロース分解菌である GE09 株及び TYM08 株を研究対象として用いた。本来はこの菌株を培養して培養液及び菌体から直接酵素を取得して精製後に詳細な解析をする事が望まし

いが、どちらも液体培養が困難であった。そこで培養条件の最適化を試みた。

(2) 予備検討で実施した次世代 DNA シーケンサーを用いた GE09 株及び TYM08 株のドラフトシーケンスの解析結果を利用してセルロース類を分解する酵素の遺伝子を予測した。さらに既存のセルロース分解酵素と比較して極めて新規性の高い酵素を保持していた場合は既知のセルラーゼの情報を用いての遺伝子予測が難しい。そこでショットガン法によりセルラーゼ遺伝子の直接的なクローニングを行い、組換え株から酵素発現株の取得及びその酵素の解析を行う計画であった。

(3) 予測した遺伝子情報を元に宿主に大腸菌を用いた組換え酵素の発現系の構築を行った。この組換え酵素と培養の最適化後に得られたネイティブな酵素を用いてセルラーゼの諸性質の分析及び機能の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 予備検討で実施した次世代 DNA シーケンサーによるドラフトシーケンスの解析結果をより詳細に精査した。その結果、GE09 及び TYM08 株の双方に新規性の高いセルロース類分解酵素と予想される多くの遺伝子配列の取得に成功した(図1)。

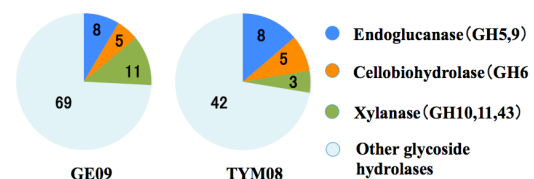


図1 多様なセルロース類分解酵素

これらの遺伝子の中には、興味深い事に翻訳予測後のタンパク質の分子量が 100kDa をこえるような遺伝子が複数含まれていた。また一部からは共通の小さな機能ドメインと予測される領域を複数持つ配列も発見された。さらに、セルロース類分解酵素に限らず他のタンパク質などからも同様にこの領域が見つかった。

(2) 得られた遺伝子配列と既知のセルラーゼの情報を用いてアミノ酸配列のシーケンスアラインメントを実施した。その結果、陸上由来のセルラーゼの研究結果から判明しているセルロースの加水分解に重要な役割を果たす触媒部位のプロトンドナーであるアミノ酸のアスパラギン酸残基が深海由来の酵素でも同様に保存されている事が判明した。しかしながら、一方でいくつかの酵素ではアスパラギン酸残基がグリシンやアスパラギン残基に置換されている事が明らかになった。

(3) 引き続き取得した遺伝子配列を元に液

体培養が極めて困難な GE09 株に関して大腸菌を用いた組換え酵素発現系の構築を行った。それぞれの遺伝子を T7 系の発現ベクターに導入し *E.coli* BL21(DE3)を形質転換し組換え酵素の発現を実施した。しかしここでインクルージョンボディの形成が大きな問題となった。IPTG 濃度の増減、添加のタイミング、添加時の温度調整など発現条件の検討も実施したが、インクルージョンボディの形成を低下させる事はできず酵素を可溶性画分で回収することが不可能であった。

そこで他の発現系を検討した結果、タカラバイオ社の pCold ベクターを用いた低温での発現誘導でいくつかの目的酵素が可溶性画分で回収可能となった。得られた組換え酵素は融合した His-tag と Ni との親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーにて精製を行った。

(4) 本研究で当初予定していたショットガン法によるセルラーゼ遺伝子のクローニングに関しては実施しなかった。この計画は制限酵素で切断したゲノム DNA を pUC18 ベクターなどに導入し *E.coli* を形質転換した後、培養して溶解斑の形成などからセルラーゼ発現株を取得し遺伝子解析のみからでは困難な極めて新規なセルラーゼの発見を試みるものであった。しかしながら (3) の研究結果から本手法においてもインクルージョンボディ形成の可能性が高かったことから実施を見送った。

(5) TYM08 株に関しては GE09 株と比較して僅かながらに液体培養が可能であった。そこで培養条件の最適化を行った。リン酸緩衝液及びダイゴ人工海水 SP をベースの培養液に少量の Sigma Cell など加えて 80 rpm 程度の低振盪で 3 日間種培養した後、5 日間本培養することで僅かながらに菌体を回収できる程度まで培養することに成功した。

(6) TYM08 株の培養菌体及び培養上清からセルロースを分解する酵素の取得及び精製を試みた。精製の諸条件検討の結果、得られたセルラーゼファミリーの 1 つであるエンドグルカナーゼは精製段階で常に極めて薄い Triton X-100 が必要であるという特性が明らかになった。界面活性剤の添加を行わなければ精製が不可能なことからこのセルラーゼは発現後に何かに付着している形でセルロースに作用している可能性が示唆された。そこで、この酵素を電気泳動後に Shiff base を用いた PAS 染色を行った。その結果、粗精製した酵素は赤紫色を呈色しグリコプロテインである事が予想された。さらに、この酵素の組換え株を新たに構築し得られた酵素とネイティブな酵素を SDS-PAGE で比較した結果、組換え酵素はかなりの分子量低下が認められた。これは、組換え酵素にはネイティブな酵素と違い糖鎖の付与が行われていないからと考えられた。これらの結果か

らネイティブなエンドグルカナーゼは糖鎖を持つグリコプロテインである可能性が強く示唆された (図 2)。

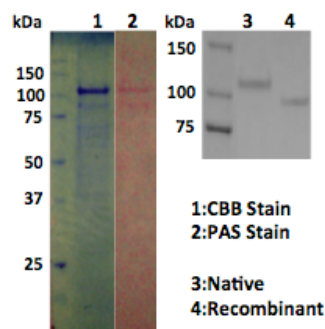


図2 PAS染色での呈色と組換え酵素の分子量低下

(7) セルロース分解が確認された GE09 株の組換え酵素の中からセルラーゼファミリーの 1 つであるセロビオハイドrolラーゼの解析を行った。予備検討でも確認されていた C 末側の機能未知領域に関してのみを大腸菌を宿主に His-tag を融合した組換えタンパク質として発現してセルロースへの結合作用を確認した。その結果、セルロース溶液と混合したこの組換えタンパク質を SDS-PAGE で確認したところ、セルロース溶液に海水を加えた条件下で静置した溶液中の上澄みはネガコンなどと比較してタンパク質濃度の低下が確認された。このことから海水依存的な組換えタンパク質のセルロースへの結合が示唆された (図 3)。



図3 セルロースへの結合

(8) GE09 株のセロビオハイドrolラーゼ及び TYM08 株のエンドグルカナーゼに関してリン酸膨潤セルロースを基質とし、酵素化学的キャラクタリゼーションを行った。その結果、セロビオハイドrolラーゼは pH8 近傍に最適 pH を保持し pH9 程度までは良好に反応する弱アルカリ酵素であった。また温度に関しては 15°C 程度が最適反応温度であるが 4°C からでも活性が十分に認められ 30°C では活性が確認されなかった。TYM08 株のエンドグルカナーゼに関しても pH 及び温度ともに GE09 株のセロビオハイドrolラーゼと共通の傾向が見られ、弱アルカリ酵素で低温まで活性が確認された。さらに両株の酵素共に NaCl を反応溶液に加える事で 2 倍程度の比活性の上昇が認められた。

(9) 本研究のまとめとして、研究課題でターゲットとした深海環境由来の GE09 株及び TYM08 株のセルラーゼは深海環境に比較的

近い低温下、弱アルカリ性、NaCl の存在下などで良好にリン酸膨潤セルロースを分解したが、これは深海という特殊な環境に適応する為に極めて妥当な結果であると考えられる。一方で 100kDa を超えるような酵素の分子量としては大きいセルラーゼが複数ある事が特徴の一つとして見えてきた。これに関しては明確な理由を研究期間内で明らかにする事はできなかった。しかしながら特定の配列をセルラーゼ内に複数持つことが発見され、この配列は他の加水分解酵素からも見つかった。BLAST などの結果からも、基質との直接的な関係性は認められないドメインと予測されるが、このドメインをタンパク質内に保持している酵素は分子量が大きくなっている傾向が認められた。また、やはり未知のドメインと予想される領域に関して海水依存的にセルロースとの結合を示唆する結果も得られた。以上の事から深海という特殊な環境に適応する為に、セルラーゼのみに限らず様々な酵素のこのようなドメインが機能している可能性が示唆される結果となった。今後はこのようなドメインの詳細な機能やそれぞれの相互作用を明らかにする事で、より具体的な深海環境中でのセルロース分解の一端が明らかになるのではないかと予想する。そしてこの事は研究背景でもある難分解性のセルロースバイオマスを高効率でグルコースに返還する循環型の物質生産プロセスへの間接的な貢献に繋がると期待する。

さらに全く予想していなかった事に糖鎖を有すると示唆される酵素が発見された。セルラーゼで糖鎖を有するものは過去に報告されているが細菌由来のものは極めて珍しい、またその報告は陸上由来の酵素である(文献③、④)。TYM08 株のエンドグルカナーゼは深海に適応する為に糖鎖が必要なのか具体的には明らかにできていないが、おそらく糖鎖を利用して菌体細胞にセルラーゼを結合させ、深海底のセルロースと結合することで、効率的なセルロース分解に寄与しているのではないかと予想される。さらに深海と陸上での環境適応の違いという意味以外にもこの酵素は細菌由来の極めて新規なグリコプロテイン型のエンドグルカナーゼとして非常に有意義であり興味深いと考えられる。

以上のことから GE09 株や TYM08 株を含めて深海環境においては、セルロース類を分解する陸上由来の既知の細菌とは異なる新奇な細菌が生息していることが明らかになった。またその細菌が生産するセルラーゼは深海環境中のセルロースに対応するために特異的な機能を有している可能性が高いことが明らかになった。

<引用文献>

- ① S. Deguchi et al., Soft Matter, 3, 1170-1175(2007)

- ② M.Tsudome et al. Appl.Environ.Microbiol.,75, 4616-4619(2009)
③ E.Ong et al., J Bacteriol, 176, 999-1008(1994)
④ P.Beguin et al., Eur. J.Biochem.,87, 525-531(1978)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内村 康祐 (Uchimura, Kohsuke)
国立研究開発法人海洋研究開発機構
海洋生命理工学研究開発センター・技術副
主事
研究者番号：70416006

(2) 研究協力者

出口 茂 (Deguchi, Shigeru)
小林 徹 (Kobayashi, Tohru)
高木 善弘 (Takaki, Yoshihiro)
津留 美紀子 (Tsudome, Mikiko)