

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07664

研究課題名(和文)セルロソーム生産菌の多糖類認識・応答による酵素発現最適化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism for optimization of enzyme expression by recognizing and responding to polysaccharides in cellulosome-producing bacteria

研究代表者

黒田 浩一 (Kuroda, Kouichi)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：30432339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：C. cellulovorans は培養上清中の植物細胞壁多糖に応じて多糖分解酵素や多糖代謝酵素の発現を最適化することで、これを効率よく分解・代謝できる。しかし、その機構は未だ明らかになっていない。本研究では、本菌をグルコース、セルロース、キシラン、ガラクトマンナン、ペクチンを炭素源として培養し、各炭素源間で比較プロテオーム解析を経時的に行い、多糖の検知や発現様式の変化に関わるタンパク質群を探索した。その結果、培養時間の経過とともに菌体表面のセルロソームが培地上清中に分泌されること、分泌プロテアーゼとセルロソームマルプロテアーゼインヒビターが協調的に発現して植物から保護していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C. cellulovoransは菌体外に酵素複合体セルロソームを生産し、多糖類の種類に応じて酵素群を最適化しており、多様な環境下で生存するための巧妙な機構を有する。研究成果は本菌がどのような機構で酵素群を分泌生産して効率的な多糖分解を行っているのかという基本的な分解・生存戦略の解明に大きく貢献することができる。また、本菌は多糖類の種類に合わせて最適な糖質分解酵素群を分泌するため、得られたバイオマス分解戦略についての知見を基に、自然に学ぶ形で他の有用微生物に本微生物の分解戦略を導入できれば、広範な非可食バイオマス多糖類を原料として高効率な有用物質生産を行うといった産業面での貢献にもつながる。

研究成果の概要(英文)：C. cellulovorans can efficiently degrade and metabolize polysaccharides in plant cell wall by optimizing the expression of polysaccharide-degrading enzymes and polysaccharide-metabolizing enzymes according to the kinds of polysaccharide in the culture supernatant. However, the mechanism has not been elucidated. In this study, C. cellulovorans was cultured using glucose, cellulose, xylan, galactomannan and pectin as a carbon source, and comparative proteome analysis was performed between each carbon source to identify the proteins related to polysaccharide detection and changes in and expression patterns of the enzymes. As a result, it was suggested that cellulosome on the cell surface was secreted into the culture medium supernatant with longer cultivation time, and that the secretory proteases and the cellulosomal protease inhibitors were cooperatively expressed for protection from plants.

研究分野：応用微生物学

キーワード：応用微生物 発現制御 シグナル伝達 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

近年、石油に依存した社会からの脱却に向け、非可食バイオマスからの有用物質生産技術の開発が急務になってきている。特に難分解性の非可食バイオマスの利用が進めば、大きな貢献が期待できる。中でもセルロース系バイオマスは地球上に最も豊富に存在する再生可能資源であり、これを原料として有用物質生産を行う際には、前処理、糖化、発酵などのプロセスを必要とするが、高効率な生産を行うための決定的な手法は未だ確立できていない。特に糖化においては、セルロース系バイオマスを構成する複数の多糖類を単糖に変換するため多数の酵素種を必要とし、コスト高の主な原因となっている。したがって微生物による安価で効率的な糖化の実現は生産効率の向上にむけた重要課題である。

自然界の中でも *Clostridium cellulovorans* は、バイオマスを構成する様々な多糖類を高効率に分解・代謝することができる微生物である。大きな特徴として、菌体外に「セルロソーム」と呼ばれる複数種の酵素からなる複合体を形成し、セルロース系バイオマスを高効率に直接分解できる点が挙げられる。セルロソームはコヘシンドックリンといったドメイン間相互作用を介して足場タンパク質の上に酵素タンパク質が集積することで形成され、酵素間の近接効果により効率的に多糖類を分解する(図1)。さらに本微生物は、環境中に存在する多糖類に応じて生産する酵素群の種類を最適化させていることが示唆されており、これによって様々なバイオマスに柔軟に対応できていると考えられる。しかし、生産する酵素群の種類や量を最適化する機構についてはまだ明らかになっていない。以上のように本微生物は広範な非可食バイオマスを有効利用する上で有用な特徴を有しており、本研究において多糖類の認識・応答による酵素発現の最適化機構を明らかにすることができれば、本微生物のバイオマス分解戦略についての理解を深め、非可食バイオマスの効率的な有効利用にもつながる重要な知見になると期待される。

申請者は次世代シーケンサーにより *C. cellulovorans* のゲノムを解読し(*J Bacteriol*, 192: 901-902, 2010)、さらに培地上清中から回収したタンパク質について定量プロテオーム解析を行ってきた。多糖類の種類に応じて実際に菌体外で生産される多糖類分解関連酵素群を網羅的に定量した結果、*C. cellulovorans* は様々な炭素源中の多糖類を分解・資化する際、生産する酵素群をダイナミックに変化させていることを明らかにしてきた。すなわち、炭素源の種類に関係なく恒常的に生産されるもの(メジャー酵素)、および炭素源特異的に生産されるもの(スペシャリスト酵素)を同定した(*Appl Environ Microbiol*, 79: 6576-6584, 2013; *AMB Express*, 5: 2, 2015)。

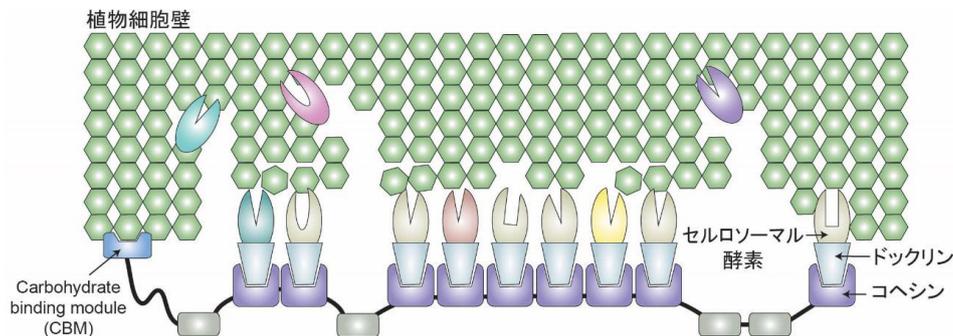


図1 セルロソームの模式図

2. 研究の目的

申請者は上記のように、多糖類の種類に応じて生産する酵素群を変化させていることを明らかにしてきたが、多糖類の種類に応じて生産する酵素群を変化させる際、*C. cellulovorans* がどのように多糖類を認識して応答し、遺伝子の転写・発現を制御しているのかという分子機構(図2)については未知の領域であった。そこで本研究では、様々な多糖類に対して培養し、経時的に培地中のタンパク質、細胞内タンパク質を抽出して定量プロテオーム解析を行うことにより、このような多糖類に応答した一連の情報伝達・転写制御機構の全体像を分子レベルで明らかにすることによって、*C. cellulovorans* によるバイオマス分解戦略を理解することを目的とした。

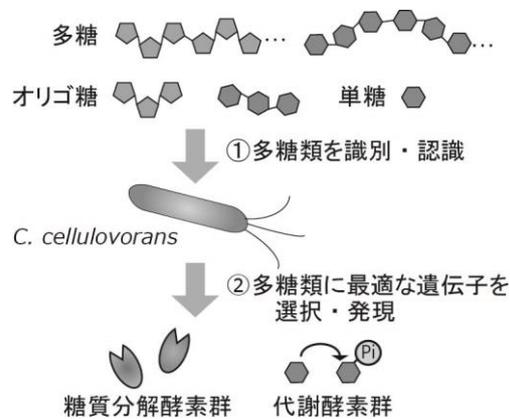


図2 本研究にて解明を試みる多糖類認識と下流遺伝子の発現最適化

3. 研究の方法

(1) *C. cellulovorans* では効率よく機能する宿主ベクター系が存在しておらず、遺伝子破壊や過剰発現など遺伝学的手法を用いることができない。このことが転写制御など細胞内制御機構の解明が十分に進展していない要因の一つになっていたため、本微生物における宿主ベクター系の確立を試みた。

(2) *C. cellulovorans* は菌体内に作られる酵素群および分泌される酵素群の生産量を多糖類に応じて最適化させることにより、植物細胞壁構成多糖を効率よく分解・代謝することができる。これまでの研究においては、定常期まで生育させた際に生産された酵素群を回収しその量的変動を解析してきた。しかし、植物細胞壁多糖を分解・代謝する際には、*C. cellulovorans* の培養初期・中期・後期において菌体・上清タンパク質群のプロファイルが大きく異なっていると考えられる。そこで、植物細胞壁構成多糖を分解・代謝する過程で経時的に変動する代謝・分解酵素群を明らかにするために、時系列定量プロテオーム解析を行った。4種類の植物構成多糖（セルロース、キシラン、ガラクトマンナン、ペクチン）とグルコースのそれぞれを唯一の炭素源として培養した。培地には1Lあたり、各炭素源3g、Yeast extract 4g、Resazurin salt 1mg、 $K_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0.45g、 $KH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.45g、 NH_4Cl 0.3675g、NaCl 0.9g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1575g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.12g、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.85mg、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.942mg、 Na_2EDTA 5.2mg、 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.5mg、 $ZnCl_2$ 0.07mg、 H_3BO_3 0.1mg、 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.017mg、 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.024mg、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.036mgを含む。細胞の生育はLumitester PD-3とLuciPac Pen（キッコーマン）を用い、細胞内のATP濃度を測定することにより行った。ラグ期、対数増殖初期、対数増殖中期、対数増殖後期、定常期といった5つの時点で菌体を経時的にサンプリングし、菌体外に分泌されるタンパク質と菌体内タンパク質を回収した。

菌体内タンパク質は以下のように回収した。凍らせた菌体をLysis buffer (pH 7.5) に懸濁し、超音波破碎によって細胞破碎を行った。Lysis buffer (pH 7.5) は12mMデオキシコール酸、12mMラウロイルサルコシン、50mM Tris-HClを含む。得られた細胞破碎液を13,000×g、4°Cで20分間の遠心分離を行い、その上清を菌体内タンパク質溶液として得た。さらに、メタノール・クロロホルム沈殿によりタンパク質を沈殿回収した。また、上清タンパク質は培地上清を限外ろ過法により濃縮後、メタノール・クロロホルム沈殿により沈殿回収した。それぞれの炭素源で培養した菌体から抽出したタンパク質に対して、アルキル還元化、リシルエンドペプチダーゼおよびトリプシン消化によるペプチド断片化を行った。調製したペプチド断片を定量解析するため、TMT 6-plex labeling kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて安定同位体による Tandem Mass Tag (TMT) ラベリングを行った。このサンプルを490cm長、内径75μmのモノリスカラムを用いた nano LC-MS/MS システムによって定量解析した。得られたデータについて、ネットワーク解析や経時変化の解析を行い、*C. cellulovorans* の植物構成多糖への適応機構とそれに伴って発現を変動させているタンパク質のプロファイリングを行った (図3)。

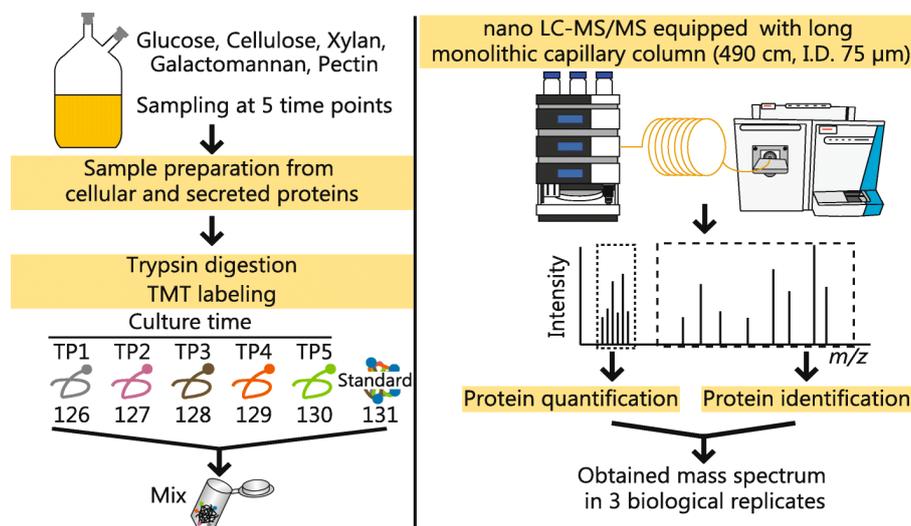


図3 定量プロテオーム解析の実験手順

4. 研究成果

(1) 全ゲノム情報を解析した結果、*C. cellulovorans* には Type I で1種、Type II で2種の制限修飾系遺伝子が存在しており、制限修飾系が実際に働いていることが示唆された。そこで実際に *C. cellulovorans* から無細胞抽出液を作製し、これを用いてプラスミド DNA を処理した後、アガロースゲル電気泳動により解析したところ、プラスミド DNA の断片化が見られた。そのため大腸菌にて *C. cellulovorans* 由来のメチルトランスフェラーゼ発現を行った。具体的には *C.*

cellulovorans のゲノム DNA を鋳型にメチルトランスフェラーゼを PCR で増幅し、大腸菌用の発現プラスミドに挿入して発現させた。これにより、プラスミド DNA を大腸菌内であらかじめメチル化しておき、*C. cellulovorans* 内に導入した際 *C. cellulovorans* の制限修飾系による切断から保護できるようにする、*in vivo* メチル化システムを構築した。

(2) 経時的な定量プロテオーム解析を行うにあたり、各炭素源に対して培養した際の最適なサンプリング時間を決定した。炭素源によって生育速度が異なり、一律の時間でサンプリングした場合、*growth phase* がまちまちになってしまうのを避けるためである。グルコース、セルロース、キシラン、ガラクトマンナン、ペクチンという 5 種類の炭素源に対して *C. cellulovorans* を植菌し、その生育を調べた。その結果、図 4 のような生育曲線が得られ、グルコースに対して最も生育が早く、セルロースに対しては最も生育が遅いことが分かった。この生育曲線をもとに、ラグ期、対数増殖初期、対数増殖中期、対数増殖後期、定常期でのサンプリング時間を決定した (表 1)。

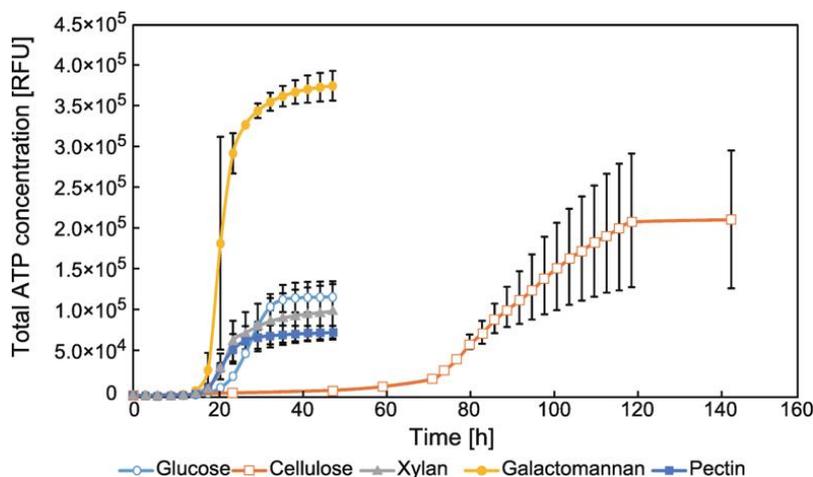


図 4 各種炭素源に対する *C. cellulovorans* の生育曲線

表 1 各炭素源に対して培養した際の各サンプリング時間

Growth phase	Time point 1 (Lag)	Time point 2 (Early log)	Time point 3 (Middle log)	Time point 4 (Late log)	Time point 5 (Stationary)
Glucose	13.5 h	21 h	24 h	30 h	39 h
Cellulose	24 h	60 h	75 h	81 h	144 h
Xylan	12 h	15 h	21 h	24 h	36 h
Galactomannan	12 h	18 h	19.5 h	21 h	27 h
Pectin	12 h	16.5 h	18 h	21 h	30 h

それぞれの炭素源により生育させた菌体内から 1895 個、培養上清から 879 個のタンパク質をそれぞれ同定することができた。さらに各炭素源に対して特異的に生産されるタンパク質を同定することができた。その中でも特に糖質分解酵素およびセルロソーム足場タンパク質に結合するセルロソーマルタンパク質に着目し、これらが各炭素源を資化する上で重要な役割を果たしていると考えられた (表 2)。これまでキシラン分解に関与していないとされていたペクチン酸リアーゼが、キシランを炭素源とした際に特異的に同定されたという予想外の知見も得られた。

また、タンパク質の経時的プロファイリングの結果、菌体タンパク質においてはセルロソームを構成するセルロソーマルタンパク質が培養時間の経過とともに減少し、分泌タンパク質においては

表 2 各炭素源特異的に生産される糖質分解酵素

Cellulose			
Accession	Description	Protein name	CAZy family [23]
Cloce1_0466	Dockerin type 1	PeeB	PL11
Cloce1_2799	Dockerin type 1	Hyp3	-
Cloce1_0981	Ig domain protein group 2 domain protein	-	CBM32
Cloce1_1367	Pullulanase, type 1	pullulanase	CBM48,GH13
Xylan			
Accession	Description	Protein name	CAZy family
Cloce1_1072	Glycoside hydrolase family 4	Alpha-galactosidases	GH4
Cloce1_1342	Carbohydrate-binding CenC domain protein	-	CBM4
Cloce1_4240	Protein of unknown function DUF1565	Pectate	PL9
Cloce1_4279	Alpha amylase catalytic region	Alpha amylase	GH13
Galactomannan			
Accession	Description	Protein name	CAZy family
Cloce1_1341	Beta-galactosidase	-	GH1
Cloce1_1947	Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	-	CBM35,GH26
Cloce1_3099	Protein of unknown function DUF291	ManGH2B	GH5,GH5,CBM23
Cloce1_3338	Hypothetical protein Cloce1_3338	-	GH113
Cloce1_4124	Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	Beta-mannanase	GH26,CBM59
Pectin			
Accession	Description	Protein name	CAZy family
Cloce1_1241	Alpha-N-arabinofuranosidase	-	GH43
Cloce1_2617	Glycosyl hydrolase family 88	-	GH88
Cloce1_2642	Pectinesterase	exopolygalacturonate	CE8,PL9
Cloce1_3075	Protein of unknown function DUF1680	-	GH127

セルロソーマルタンパク質が培養時間の経過とともに増加していることが明らかになった。これは、培養時間の経過に応じて菌体表面から *C. cellulovorans* が培養上清中にセルロソームを分泌していることを示唆した。また分泌タンパク質のネットワーク解析の結果から、分泌プロテアーゼとセルロソーマルプロテアーゼインヒビターが協調的に発現していることが明らかになった。このセルロソーマルプロテアーゼインヒビターは植物由来のプロテアーゼを阻害することが知られている。このことから培養上清で協調的に発現している分泌プロテアーゼと分泌セルロソーマルプロテアーゼインヒビターは植物のプロテアーゼや抗微生物タンパク質を・阻害することで、植物から菌体やセルロソームを防御していることが推測された (図5)。

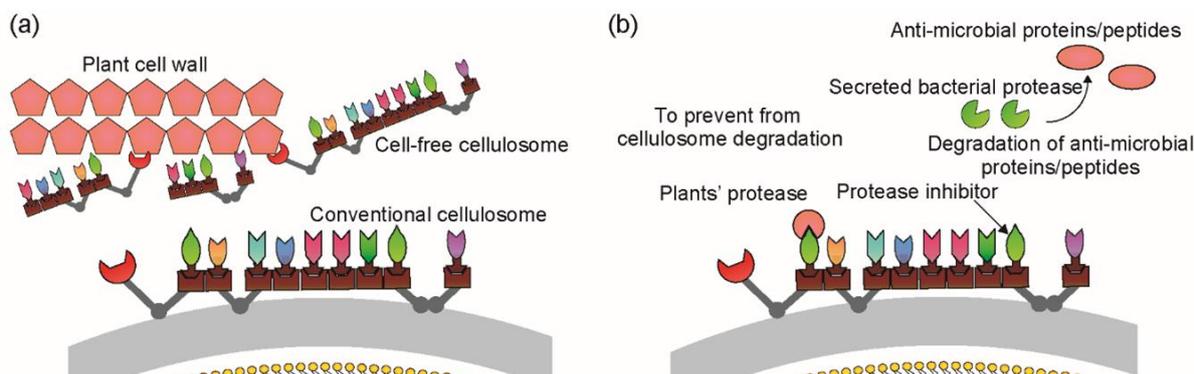


図5 (a) セルフリーセルロソームによる植物細胞壁分解 (b) 分泌プロテアーゼとプロテアーゼインヒビターの協調的発現による植物からの防御

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- ①Shunsuke Aburaya, Wataru Aoki, Kouichi Kuroda, Hiroshi Minakuchi, Mitsuyoshi Ueda, Temporal proteome dynamics of *Clostridium cellulovorans* cultured with major plant cell wall polysaccharides, BMC Microbiology, 査読有, in press

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ①Shunsuke Aburaya, Wataru Aoki, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Temporal quantitative proteome analysis reveals dynamic change of cellular and secreted protein profiles of *Clostridium cellulovorans* depending on carbon sources, Experimental Biology 2017, 2017/4/24, Chicago, IL, USA
- ②油屋駿介, 青木航, 黒田浩一, 植田充美, 経時的定量プロテオーム解析を用いた細胞内・分泌タンパク質一斉分析による *Clostridium cellulovorans* の植物構成多糖適応機構の解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018/3/17, 名城大学 (名古屋)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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、研究者個人に帰属されます。