

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580153

研究課題名(和文) カイコウオオソコエビが持つ新規セルラーゼの遺伝子解析とその工学的利用

研究課題名(英文) Application and genetical investigation of novel cellulase produced by *Hirondellea gigas*

研究代表者

小林 英城 (Kobayashi, Hideki)

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・主任研究員

研究者番号：40399564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マリアナ海溝チャレンジャー海淵に生息するカイコウオオソコエビは新規セルラーゼを保持するが、生物多様性に関する条約の成立により、工学利用が困難となった。そこで伊豆小笠原海溝を調査した結果、底部に生息するヨコエビも同様のセルラーゼを保持することがわかった。伊豆小笠原海溝から採取したヨコエビより全RNAを抽出し、次世代シーケンサーにて塩基配列を決定した。その塩基配列よりセルラーゼの配列を検索した結果、7本の候補を見出した。しかし、同配列をcDNAからPCR増幅を試みたが成功に至らず、情報学的な交雑が予想された。

研究成果の概要(英文)：Hirondellea gigas in the Challenger Deep has novel cellulase, however, its application is difficult because of Convention on Biological Diversity. Therefore, I researched amphipods in the Izu-Ogasawara Trench, and found that they have the cellulase same properties as H. gigas. I extracted total RNA from the amphipod from the Izu-Ogasawara Trench, and obtained RNA sequence data using Next Generation Sequencer. I found seven sequences related with cellulase in the RNA sequence data. I tried PCR amplification of cellulase genes from cDNA, however, I cannot obtain the same sequence as seven cellulase candidates. Therefore, there would be some mistakes in the assembling of sequence data.

研究分野：分子生物学

キーワード：セルラーゼ ヨコエビ 深海 RNA

1. 研究開始当初の背景

1997年に海洋研究開発機構の前身である海洋科学技術センターにおいて、無人探査機「かいこう」によりマリアナ海溝チャレンジャー海淵の世界最深部(深度 10,900 m)の探索が行われた。その結果、魚類は観察されず、小型のセンジュナマコと非常に多くのカイコウオオソコエビ(*Hirondellea gigas*)が棲息していることが明らかとなった。これまで、深度 7,000 m 以深では魚類が発見されていないこと、さらにチャレンジャー海淵の底泥に含まれる有機炭素は数 ppm/1 g 乾燥土壌と非常に低いことから、カイコウオオソコエビが何を栄養源として棲息しているのか、不明であった。そこでカイコウオオソコエビの生態を解析するため、まずその消化酵素について検討を行った。その結果、セルラーゼを始め、アミラーゼ、キシラナーゼ、マンナーゼ等の植物性多糖類分解酵素の活性が認められた(図1)。セルロースは地球上において最大のバイオマスであることから、我々はカイコウオオソコエビのセルラーゼに注目した。

2. 研究の目的

2009年7月にマリアナ海溝チャレンジャー海淵世界最深部(11°22.11'N, 142°25.86'E, 深度:10,897 m)に生息するカイコウオオソコエビから得られたセルラーゼは、セルロースを分解し、グルコースとセロピオースを生産する他に類を見ない新規セルラーゼである。本セルラーゼの性質を利用し、難分解性のため工業利用が困難であったセルロースからグルコースを生産することで、バイオエタノールや新しい発酵食品の開発等産業的な応用が期待できる。そこで、本研究では本セルラーゼ遺伝子の単離を行い、その遺伝子配列を決定し、産業応用のための高発現系を構築するとともに、本セルラーゼを利用したグルコース生産システムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

カイコウオオソコエビから精製したセルラーゼから部分アミノ酸配列を取得し、その配列から PCR プライマーを設計した。また、カイコウオオソコエビから RNA および DNA を抽出し、これをテンプレートとして、目的セルラーゼ遺伝子の増幅を行なった。RNA およびゲノム DNA の抽出には凍結個体を破碎後、RNeasy Lipid Tissue kit (QIAGEN) および DNAiso (TAKARA) をそれぞれ用いた。増幅した遺伝子断片はクローニングを行い、目的断片の塩基配列を決定した。PCR 増幅が成功しなかった場合、抽出した RNA またはゲノム DNA の全塩基配列決定を行い、セルラーゼ関連の遺伝子配列を検索した。なお、全 RNA 配列決定は、Illumina HiSeq2000 を用いた。また全ゲノム DNA 配列の決定は、PacBio RSII を用いた。見出したセルラーゼ遺伝子より、PCR

プライマーを設計し、ゲノム DNA または RNA から合成した cDNA ライブラリーからクローニングを試みた。しかし、カイコウオオソコエビが生息するチャレンジャー海淵は、ミクロネシアの排他的経済水域 (EEZ) だった。これは、「**生物の多様性に関する条約の遺伝資源の取得の機会及びその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分に関する名古屋議定書 (通称:名古屋議定書)**」に則り、工学的な利用が困難となった。名古屋議定書は、2014年に発効され、過去に採取された生物および遺伝子資源に対しても有効とされた。2009年にチャレンジャー海淵で採取されたカイコウオオソコエビもまた、規制の対象に含まれた。そこで、日本の EEZ 内に位置する超深海域でのヨコエビ採取を試みた。日本の EEZ に位置する伊豆小笠原海溝深部 (32° 12.5766N, 142° 08.0411E, 深度:9,400 m) に生息する超深海性ヨコエビを採取し、その消化酵素について検討した。消化酵素の検出は基質が分解すると脱色するハローアッセイを用いた。また、酵素の分解産物は、薄層クロマトグラフィーを用いて、対照との移動度から同定した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

【実験結果】マリアナ海溝チャレンジャー海淵由来のカイコウオオソコエビの代わりに、日本の EEZ 内に位置する伊豆小笠原海溝深部(深度約 9,400 m)にて、ヨコエビの採取を試み、同様のセルラーゼを保持するかどうかを検討した。その結果、小笠原海溝からも超深海性のヨコエビの採取に成功した。また、小笠原海溝由来のヨコエビもチャレンジャー海淵で採取したカイコウオオソコエビと同様にアミラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、ペクチナーゼ、マンナーゼという多くの植物性多糖分解酵素を消化酵素として持っていた(図1)。

そこで、伊豆小笠原海溝から採取したヨコエビからセルラーゼを精製し、その反応分解物を TLC にて検討した。その結果、チャレンジャー海淵由来のカイコウオオソコエビのセルラーゼと同様にセルロースを分解してグルコースとセロピオースを生産するセルラーゼだった(図2)。したがって、小笠原海溝由来のヨコエビは、カイコウオオソコエビと同様の性質を示すセルラーゼを持っていることがわかった。以上より、今回採取に成功した小笠原海溝由来の超深海性ヨコエビを用いて、セルラーゼ遺伝子の取得を行うこととした。

小笠原海溝由来のヨコエビのセルラーゼ遺伝子を取得するために、全 RNA を抽出し次世代シーケンサーによる塩基配列決定を 2 回行った。1 回目の全塩基配列データには、セルラーゼ関連の配列は存在しなかった。2 回目の塩基配列データからは 8 本のセルラーゼ関連配列が存在した(表1)。

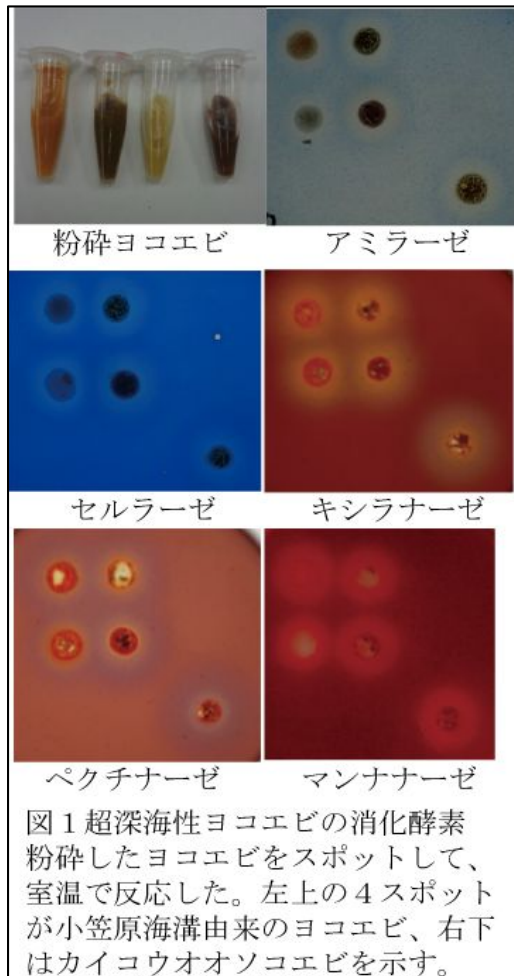


図1 超深海性ヨコエビの消化酵素
粉碎したヨコエビをスポットして、
室温で反応した。左上の4スポット
が小笠原海溝由来のヨコエビ、右下
はカイコウオオソコエビを示す。

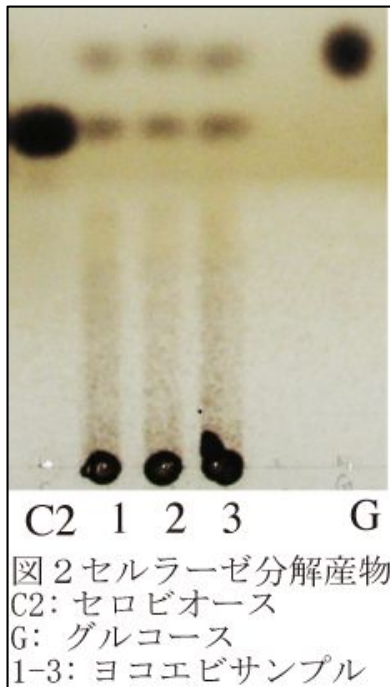


図2 セルラーゼ分解産物
C2: セロビオース
G: グルコース
1-3: ヨコエビサンプル

それぞれ Blast 検索した結果、セロビオヒドラーゼおよび 1, 4 グルカナーゼのアミノ酸配列と相同性が認められた。また、contig 85418 の E value 値が 2E-175 と最も低かつ

たが、contig 162203 のように E value 値が 3E-21 と高いものも認められた。小笠原海溝由来のヨコエビは グルコシダーゼも保持しているため、得られた配列はセルラーゼとグルコシダーゼの混合配列の可能性があった。そこで、得られたセルラーゼ関連配列が実際に存在するのか確認するため、得られたシーケンスデータを元にプライマーを作成し、RNA から作成した cDNA ライブラリーおよび抽出したゲノム DNA をテンプレートとして、PCR 増幅を試みた。2本の増幅断片が得られたが、塩基配列は RNA シーケン

表1 セルラーゼ候補遺伝子断片

contig No.	TOP Hit	E value
45882	CBH	1E-70
62175	B14G	7E-72
79200	B14G	4E-40
83367	CBH	1E-136
85418	B14G	2E-175
101105	cellulase	7E-42
147901	B14G	4E-38
162203	B14G	3E-21

CBH: cellobiohydrolase
B14G: endo-beta-1, 4-glucanase

スデータとは異なっていた。そのため、セルラーゼ遺伝子配列のクローニングに至らなかった。さらに、ゲノム DNA を抽出して次世代シーケンサーで塩基配列決定を行ったが、セルラーゼ類縁の遺伝子は含まれていなかった。多くは繰り返し配列であり、タンパク質をコードしている遺伝子配列は皆無だった。ゲノムシーケンス結果には 18SrDNA などが含まれていた。

【考察】今回、超深海性ヨコエビの RNA からセルラーゼ関連遺伝子配列が見つかった。特にセロビオヒドラーゼと相同性のある配列は、以前部分アミノ酸配列を元に PCR で取得した遺伝子と同様だった。超深海性ヨコエビのセルラーゼは、セロビオヒドラーゼが変異した酵素だと予想される。一方、セルラーゼ遺伝子の全長取得までには至らなかった。一般に超深海生物を採取した際、海上に至る過程で死亡する。その結果、RNA およびゲノム DNA の分解が進み、遺伝子配列データの取得が困難となること、その一因であると予想される。今回、未分解の RNA が取得できたが、その RNA シーケンスには多くのヒートショックプロテインが含まれていた。これは超深海性ヨコエビ採取時の減圧や温度上昇によるものと考えられるが、結果として死亡に至る過程に発現する遺伝子が反映されてしまい、消化酵素のように恒常的に生産される遺伝子配列の取得が困難になった。できれば、生息域にて、採取直後に現場固定または核酸の

安定的抽出のような手法が取れることが望ましい。

今回はRNAシーケンスの結果が実態と合わなかった。これは次世代シーケンサーのデータがアセンブルされる際に情報学的な交雑が起きたためと予想される。そこで、アセンブルされる前の塩基配列 (FASTAQ ファイル) を元にして、プライマーの作成を行えば、PCR増幅できると考えられる。

(2)得られた成果の国内外における位置付け

本成果は非モデル生物の分析ということもあり、生物から新規酵素等の生理活性物質の利用研究に関して、多くの問題点を提示した。その一つに「分解したRNAおよびDNAよりデータを得る手法の開発」が挙げられる。多くの非モデル生物はその増殖や育成が困難であり、また特に極限環境に生息する生物は、生存したまま捕獲することは困難である。したがって、分解したRNAでもそのシーケンスを行う際、プライマーの改変や全リード長の増大、データのアセンブリー法の改良などの手法が開発されようとしている。

超深海性のヨコエビがセルラーゼを持つことから、深海における生物の栄養源は浅海の植物プランクトン、動物プランクトン、および魚類のみならず、陸上の高等植物も含まれることが明らかとなった。深海生物の栄養源が多岐に渡ることから、より多種の生物が超深海に生息することが予想された。

(3)今後の展開

今回、RNAおよびDNAの分解により、セルラーゼ遺伝子の全長取得までには至らなかった。カイコウオオソコエビの場合、捕獲個体数は十分に確保できるため、個体の現場固定を行うことで、未分解のRNAおよびDNAが取得できると予想される。また、分解したRNAやDNAからも遺伝子情報が取得できれば、セルラーゼ遺伝子の全塩基配列が決定できるだろう。分解DNAおよびRNAの塩基配列決定技術は、現在進行形で開発が行なわれている。本セルラーゼの全塩基配列が明確になれば、分解した超深海性ヨコエビの遺伝子をテンプレートとしたPCRによる取得ではなく、遺伝子の人工合成ができるため、セルラーゼ全長遺伝子を取得できると考える。非モデル生物の遺伝子利用の代表的な一例として発展し、バイオマス分解酵素として利用できるだろう。

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 1件)

Hideki Kobayashi, Yuji Hatada, Taishi Tsubouchi, Takahiko Nagahama, Hideto Takami, The Hadal Amphipod *Hirondellea gigas* Possessing a Unique Cellulase for

Digesting Wooden Debris Buried in the Deepest Seafloor. PLoS One, 7, e42727, DOI: 10.1371/journal.pone.0042727, (2012). (査読あり)

[学会発表](計 8件)

小林英城、長濱統彦、荒井渉、高見英人、藤岡勘太郎、木戸ゆかり、超深海性ヨコエビの地理的隔離、2016年3月29日、2016年度日本農芸化学会大会「札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)」

小林英城、山濱由美、外山美奈、高久康春、荒井渉、高見英人、トランスクリプトーム解析から予想されるカイコウオオソコエビの感覚器、2015年3月19日、ブルーアース2015「東京海洋大学(東京都・港区)」

Hideki Kobayashi, Yuji Hatada, Taishi Tsubouchi, Wataru Arai, Hideto Takami, The cellulase in the deepest point on Earth. MIE Bioforum. 2014年10月20日、「合歓の郷(三重県・志摩市)」

小林英城、荒井渉、高見英人、超深海性ヨコエビが生産するセルラーゼの探索、2014年9月10日、第66回生物工学会大会「札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)」

小林英城、荒井渉、高見英人、小笠原海溝に生息する超深海性ヨコエビの消化酵素、2014年3月27日、2014年度農芸化学会大会「明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)」

小林英城、島根康弘、秦田勇二、世界最深部に生息するカイコウオオソコエビの消化酵素、2013年10月27日、第14回極限環境生物学会「明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)」

小林英城、秦田勇二、坪内泰志、高見英人、超深海性ヨコエビが生産する新規セルラーゼの精製と性質、2013年3月27日、2013年度日本農芸化学会大会、「東北大学(宮城県・仙台市)」

小林英城、秦田勇二、坪内泰志、高見英人、超深海性ヨコエビが生産する新規セルラーゼの精製と性質、2012年10月25日、第65回生物工学会大会「神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)」

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林英城 (Kobayashi, Hideki)
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・主任研究員

研究者番号: 40399564