

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289293

研究課題名(和文) バイオマスの違いを認識してセルロソームタンパク質個々がゲノムから選別発現する機構

研究課題名(英文) Elucidation of the recognition mechanisms in Clostridium cellulovorans

研究代表者

植田 充美 (Ueda, Mitsuyoshi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90183201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：絶対嫌気性菌 Clostridium cellulovorans はセルロースやヘミセルロースといった多糖類を効率よく分解できる。このメカニズムとしては、(1)細胞表層にセルロソームという巨大な酵素複合体を形成する；(2)ノンセルロソーマル酵素と呼ばれる分泌型の糖質分解酵素群を生産しセルロソーム上の酵素群と共役させている；(3)種々の多糖類を認識し分泌する糖質分解酵素群を最適化している、の3つがあげられる。これまで全ゲノム解析の結果を基にしたプロテオーム解析によって、本微生物が種々の多糖を認識し、分泌の糖質分解酵素群を最適化する分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：An anaerobic bacterium Clostridium cellulovorans produces a large extracellular enzyme complex called cellulosome and a number of non-cellulosomal proteins. Each component plays an important role on efficient degradation of various biomass-substrates. We performed intracellular and extracellular time-course proteome analyses with xylan in which C. cellulovorans changed profile of proteins significantly. C. cellulovorans proteins were successfully identified, and these profiles changed dependent on each culture time. Comparison of the intracellular and extracellular protein profiles indicated that C. cellulovorans adapted each profile of proteins in response to residues of xylan. Furthermore, we clarified the production of some key proteins, which involve in substrate degradation and metabolism.

研究分野：応用生物科学

キーワード：バイオマス 分子認識 基質認識 転写制御

## 様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

セルロース系バイオマスの前処理として、これまでの物理的・化学的手法のうち、酵素処理法が現在の主流の技術であるが、これに、勝るものとして、「微生物前処理法」が注目を集め始めている。これは、セルロース系バイオマスのセルロースやヘミセルロースを完全分解・糖化するというエネルギー・コスト・環境保全の面から「未来型の革新的前処理法」として世界からの期待が大きい。自然界では、*Clostridium* 属微生物群がバイオマス分解の最前線で活動しており、アメリカエネルギー庁 (DOE) もこの微生物群すべてのゲノム完全解析制覇を目論んで国家プロジェクトを着々と進めている。*Clostridium* 属微生物群は、その多くは、細胞表層に木材チップなどを直接分解できる各種セルラーゼ・ヘミセルラーゼの超複合体であるセルロソームを生産し、そのセルロソームには、これまで述べてきた複雑で化学連携するすべての酵素群を操作することなく、ほとんどすべてが内在し、その微生物がバイオマスを分解して生育するための前処理をしているのである。

我々は、このセルロソームにおいて、もっとも進化した型、すなわち、ソフトバイオマスのセルロースやヘミセルロースの完全分解・糖化能力のあるセルロソームをもつ *Clostridium cellulovorans* のゲノムの完全解析を、この微生物の専門家であるアメリカ・カリフォルニア大学デービス校の R. H. Doi 教授の支援と、さらに、住友商事の資金援助をうけて、アメリカに先駆けて完成させた。この成果により、ソフトバイオマスの完全分解・糖化能力のあるセルロソームの全貌を世界で初めて明らかにするとともに、特許化 (特願 2009-100117) にも成功した。実際この微生物を用いることにより、まだ予備的ではあるが、いわゆる、革新的微生物前処理法として、稲わらや古紙を裁断したものをこの微生物と混ぜて貯留するだけで、直接、完全分解・糖化できることを実証した。この *Clostridium cellulovorans* および、そのゲノム解析から合成生物学的につく

られるアーミング細胞による前処理法は、石油に替わってセルロースからエネルギーだけでなく現在の化成品のすべてを産出する 井戸を掘り当てたも同然であり、セルロースの前処理法として、エネルギーやコスト収支、さらに、環境に負担をかけない点からも革新的な手法となる。

### 2. 研究の目的

*Clostridium* 属微生物群は、細胞表層に木材チップなどを直接分解できる各種セルラーゼなどの酵素の超複合体であるセルロソームを持つところから、アメリカエネルギー庁 (DOE) もこの微生物群すべてのゲノム完全解析制覇を目論んで国家プロジェクトを進めている。我々は、このセルロソームの中でも、もっとも機能進化したものと考えられるセルロソームをもつ *Clostridium cellulovorans* のゲノムの完全解析を、アメリカに先駆けて完成させ、我々の開発してきた細胞表層工学技術と共役させて、特許化 (特願 2009-100117) にも成功した。その研究過程で、セルロソームを構成する実働酵素タンパク質は9種あるが、しかし、その候補遺伝子は53種存在することを見出した。我々の開発してきたモノリスカラムによるフォーカストプロテオーム解析を活用すると、この9種の酵素タンパク質個々が「バイオマスの種類により変化する」ことや、「時間とともに変化する」という興味深い事実を発見した。微生物がバイオマスを分解して生育するための未来型バイオマス前処理としてのこの素晴らしい自然の、そして生物の叡智に注目して、この実働9種のタンパク質のゲノム53種からの選別発現の分子機構の解析と応用を目的とする。

### 3. 研究の方法

近年、脱石油依存社会をめざして、非可食バイオマスからの有用物質生産に注目が集まっている。この目的を達成するため、我々が世界に先駆けて全ゲノム解析をした *Clostridium cellulovorans* に注目した。本微生物は菌体内外の酵素などのタンパク質生産を最適化することによって、バイオマスを構成するセルロース、ヘミセルロース、ペクチンなどの多様な多糖類ほぼ全てを分解・代謝することができる陸上ソフトバイオマス完全分解微生物である。その際に本微生物が細胞外の環境を認識して、必要な遺伝子を発現し、分泌酵素群を最適化する分子メカニズムの詳細はいまだ明らかになっていない。そこで、本研究ではグルコース、キシラン、ガラクトマンナン、ペクチンをそれぞれ唯一の炭素源として培養した菌体を用いて、定量プロテオミクスを行うことで、網羅的・定量的に菌体内のタンパク質群の変動を追い、これらの炭素源の認識機構に関わるタンパク質を明らかにしようと試みた。

#### (1) *C. cellulovorans* の培養

今回用いる炭素源それぞれでの *C. cellulovorans* の生育を確認するため、グルコース、キシラン、ガラクトマンナン、ペクチンで本微生物を培養し、生育曲線を得た。得られた生育曲線より、全ての炭素源において対数増殖期後期であった 36 時間を培養時間とした。

#### (2) サンプルの調製

36 時間培養した菌体を超音波により破碎して、菌体中のタンパク質を抽出した。得られたタンパク質をトリプシンでペプチド断片に消化し、それらの N 末端に比較定量のための安定同位体からなるラベル化合物を結合させた。

#### (3) nano LC-MS/MS による分析

本研究室が独自に開発した高理論段数メートル長モノリスカラム (5000 mm) を用いた nano LC-MS/MS でラベル化したペプチド断片を分離し、これらの MS/MS スペクトルを測定した。得られたスペクトルから、735 個のタンパク質を同定し、それらの定量値を得た (図 1)。

#### (4) データ解析

得られた定量値で統計解析を行い、それぞれの炭素源に特異的に生産されるタンパク質群を得た。まず、分散を経験ベイズで補正した  $t$ -test を行って、統計的に優位に変動したタンパク質を得た。続いて、多重比較の問題を回避するために  $p$ -value を Benjamin-Hochberg 法を用いて補正した。生産量の変動と  $p$ -value の関係を Volcano plot に示す (図 2)。各炭素源の認識機構に関わるタンパク質を明らかにするため、まず二成分制御系にターゲットを絞った。本微生物は二成分制御系に関わる 15 個の遺伝子クラスターを有している。このクラスターの中にキシラン、ガラクトマンナンで特異的にタンパク質の生産量が上昇した遺伝子群が存在していた。またペクチンにおいて、二成分制御系に関わっていないが、生産量が上昇している遺伝子クラスターを見出した。

### 4. 研究成果

各炭素源における分解・代謝に関わるタンパク質に着目すると、*C. cellulovorans* は菌体内部において、オリゴ糖を単糖に分解する酵素群を生産していた。また、以前の結果より、本微生物は培地上清中に主として多糖をオリゴ糖にする酵素群を分泌している。すなわち、この微生物は、多糖を資

化する際には上清中で多糖をオリゴ糖まで分解し、そのオリゴ糖を取り込むことで資化している可能性が高い。

また、キシランとガラクトマンナンにおいて生産量が上昇している遺伝子クラスターには、histidine kinase, transcriptional regulator AraC, extracellular solute-binding protein の3つが共通して含まれており、これらのタンパク質が炭素源の認識に必要であると考えられた。これらを用いて細胞外の炭素源を認識する機構は *Clostridium cellulolyticum* において知られており、同様の機構が *C. cellulovorans* に存在していることが示唆された。一方、ペクチンにおいて特異的に生産量が上昇している遺伝子クラスター中には、糖結合ドメインを持つ転写因子が存在していた。これらの転写因子をコードする遺伝子の下流にはペクチンの代謝に関わるそれぞれ異なるルートの遺伝子群が存在しており、2つの転写因子はこれらの別々のルートに属する遺伝子群を独立に制御しているのではないかと考えられた (図3)。

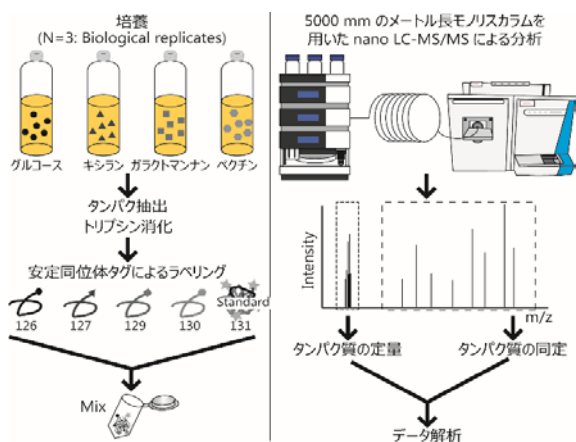


図1. プロテオーム解析のワークフロー

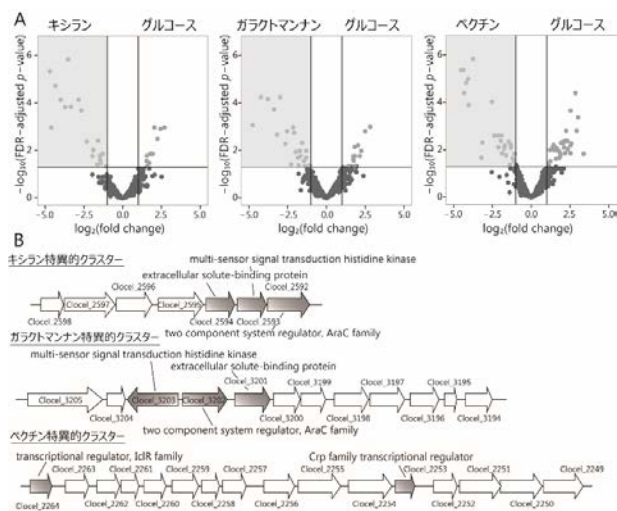


図2. A: Volcano plot による炭素源特異的なタンパク質の抽出 B: 得られた炭素源特異的な遺伝子クラスター

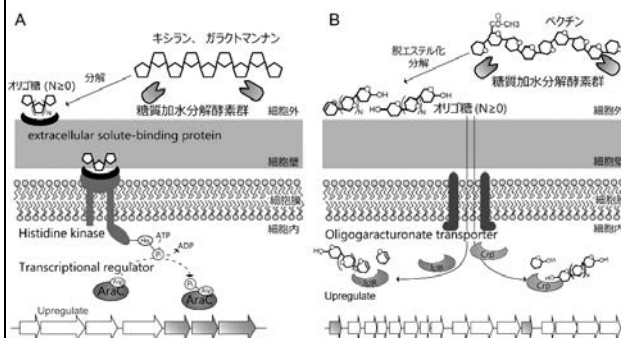


図3. A: ヘミセルロース認識モデル B: ペクチン認識モデル

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

①Nao Nishida-Aoki, Hitoshi Mori, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, "Acitivation of the mitochondrial signaling pathway in response to organic solvent stress in yeast", Current Genetics, vol. 61, No. 2, pp. 153-164, 2015 DOI 10.1007/s00294-014-0463-9

②Shunsuke Aburaya, Kohei Esaka, Hironobu Morisaka, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi

Ueda, "Elucidation of the recognition mechanisms for hemicellulose and pectin in *Clostridium cellulovorans* using intracellular quantitative proteome analysis", *AMB Express*, vol. 5, 29, 2015 DOI: 10.1186/s13568-015-0115-6

③ Toshiyuki Takagi, Takahiro Yokoi, Toshiyuki Shibata, Hironobu Morisaka, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, "Engineered yeast whole-cell biocatalyst for direct degradation of alginate from macroalgae and production of non-commercialized useful monosaccharide from alginate", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, pp.1723-1732, 2016 DOI: 10.1007/s00253-015-7035-x

[学会発表]

①植田充美 (日本農芸化学会学会賞受賞)

「細胞表層活用の基盤開拓」

日本農芸化学会、2015年3月26日(岡山大学)

②Mitsuyoshi Ueda, Toshiyuki Takagi

Construction of genome designed yeasts for direct assimilation of macroalgae by synthetic biology

Pachifichem2015, 2015.12.19(Honolulu, USA)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 充美 (UEDA, Mitsuyoshi)

京都大学大学院農学研究科・教授

研究者番号 : 90183201