

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292049

研究課題名(和文)セルロースの酵素分解を促進する黄色色素の促進機構の解明および新規黄色色素の単離

研究課題名(英文) Study on the mechanism by which yellow substance increases enzymatic cellulose degradation and isolation of novel yellow substance

研究代表者

粟冠 和郎 (SAKKA, Kazuo)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：20154031

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)：セルロースを炭素源とする培地で培養した *Ruminiclostridium thermocellum* 菌体から抽出した黄色色素はカロテノイドであると予想された。*R. josui* から黄色色素が抽出された。前者の黄色色素を吸着したセルロースは対照セルロースに比べ、*R. thermocellum* 及び *R. josui* のセルロソームにより効率的に分解された。*R. josui* の黄色色素を吸着したセルロースは *R. josui* 酵素により効率的に分解されたが *R. thermocellum* 酵素による分解高効は低かった。これらの結果は、両菌由来の黄色色素が異なる機構でセルロース分解を高めることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Yellow substance was extracted with acetone from *Ruminiclostridium thermocellum* cells anaerobically grown on microcrystalline cellulose (Funacel) as the carbon source, purified, and expected to be a carotenoid-like compound by structural analysis. Yellow substance was also extracted from *Ruminiclostridium josui* cells with 1-propanol but not acetone. *R. thermocellum* yellow substance-adsorbed cellulose was efficiently hydrolyzed by not only *R. thermocellum* cellulosome but also *R. josui* cellulosome. On the other hand, *R. josui* yellow substance-adsorbed cellulose was efficiently hydrolyzed by *R. josui* cellulosome but not *R. thermocellum* cellulosome. These results suggest that the mechanisms by which cellulose degradability is enhanced are different and dependent on the origins of yellow substances.

研究分野：微生物学

キーワード：黄色色素 セルロース 分解 *Ruminiclostridium* セルロソーム

### 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の抑制の観点から再生可能資源の有効活用は必須であり、セルロース系バイオマスは、食料と競合しない点で再生可能エネルギー資源として優れている。微生物によるセルロース分解において、嫌気性細菌のセルロース分解系では、多種類のセルラーゼが酵素複合体(セルロソーム)を形成するのが特長である。古くからセルロソーム形成性嫌気性細菌の一つである *Ruminiclostridium thermocellum*(旧 *Clostridium thermocellum*) が培養上清にセルロースに親和性のある黄色色素(Yellow Affinity Substance, YAS)を生産することは知られていたが、研究代表者らは、*R. thermocellum* 菌体より抽出した黄色色素を微結晶セルロースに吸着させると、*R. thermocellum* 由来のセルロソーム及び *R. thermocellum* 由来の骨格タンパク質とセルラーゼからなる酵素複合体による分解性が高まることを見出した。すなわち、セルロース性バイオマスの酵素分解におけるセルラーゼコストの低減や反応装置の小型化の可能性から、黄色色素の重要性が示唆されていた。

### 2. 研究の目的

上記の黄色色素の重要性を踏まえて、本研究は、*R. thermocellum* 由来の黄色色素の化学構造の決定、黄色色素のセルロース分解促進機構の解明、*R. thermocellum* 以外のセルロース分解菌からの黄色色素の単離と構造解析、*R. thermocellum* 由来の黄色色素と構造の類似した天然化合物または合成化合物の *Clostridium* および糸状菌由来のセルロース分解活性の促進効果の検討、天然バイオマス(リグノセルロース)分解への黄色色素の応用、を目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) *R. thermocellum* の培養と黄色色素の調製

*R. thermocellum* ATCC27405 株を嫌氣的に調製した GS 培地 [炭素源はフナセル(微結晶セルロース)]を用いて 60 °C でフナセルがほぼ分解されるまで培養した。

#### (2) 黄色色素の精製と構造解析

培養液を高速遠心分離に供し、上清と沈殿物(菌体)とに分離した。菌体にエタノールを加えて抽出し、エタノール抽出物を得た。沈殿物にアセトンを加えて抽出した。アセトン抽出物を高速液体クロマトグラフィーにより、逆相シリカゲルカラムを用いて分離した。溶出溶媒には、アセトニトリルと 0.1%ギ酸水溶液のグラジエントを用いた。また、薄層クロマトグラフィー(TLC)及び LH-20ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる分画を試みた。得られた精製物を NMR により解析した。

#### (3) 黄色色素を吸着させた基質の調製

*R. thermocellum* を炭素源としてフナセルを含む培地で増殖した菌体からアセトンを用いて黄色色素を抽出した。同様に培養した *R. josui* 菌体からは 1-プロパノールを用いて抽出した。抽出液にフナセルまたは稲わら破砕物を加えよく混合したのち水を加え混合し、遠心分離により沈殿物を回収した。沈殿物に 100 mM Tris-マレイン酸緩衝液(pH 6.0)を加えて懸濁したのち 80 °C で保存した。これを黄色色素を吸着させた基質として使用した。

#### (4) 酵素の調製

##### セルロソーム含有画分の調製

*R. thermocellum* ATCC27405 株または *Ruminiclostridium josui* JCM17888 株を、フナセルを炭素源とする GS 培地で接種し、フナセルがほぼ完全に分解されるまで培養した。遠心分離によって得られた上清を限外濾過により濃縮しセルロソーム含有画分とした。

##### 組換えセルラーゼ及び酵素複合体の調製

*R. josui* ゲノムより骨格タンパク質 RjCipA、セルラーゼ RjCel5B、キシラナーゼ RjXyn10C 及びアラビノキシランアラビノフラノヒドロラーゼ RjAxx43B をクローン化し、大腸菌を用いて発現させた。タンパク質のモジュラー構造を図 1 に示す。

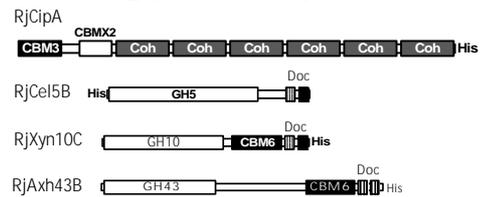


図 1. 発現させたタンパク質のモジュラー構造の模式図

#### (5) 酵素活性の測定法

フナセルなどの基質懸濁液に酵素溶液を加え、各酵素の至適温度で反応を行わせた後、生じた還元糖量をソモギー・ネルソン法または DNS 法で測定した。

#### (6) *R. josui* JCM17888 株のゲノム解析

*R. josui* JCM17888 株のゲノムの塩基配列のデータを次世代シーケンサーを用いて取得し、DNA データベースとの比較でアノテーションを行った。

#### (7) *R. thermocellum* ATCC27405 株の RNA-seq 解析

*R. thermocellum* ATCC27405 株と黄色色素を生産しない変異株をフナセルを炭素源として培養し、mRNA を調製した後、cDNA を合成した。PCR 増幅した後、次世代シーケンサー Illumina HiSeq を用いて、Paired-End 法 100 塩基読み取りにより塩基配列データを取得した。*R. thermocellum* ATCC27405 の配列へ

のマッピング処理を行い、FPKM 値に基づく各遺伝子ごとの発現量を算出した。

(8) *R. josui* JCM17888 株への遺伝子導入法  
*R. josui* JCM17888 株細胞を嫌氣的に培養・集菌し、嫌気グローブボックス内でエレクトロポレーションを行った。

(9) その他の方法

フナセル表面の形状は走査型電子顕微鏡（日立 Miniscope TM-1000）、粒度分布は粒子径分布測定装置（マイクロトラック MT3000）、結晶化度は試料水平型多目的 X 線回析装置（リガク Ultima IV）を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) *R. thermocellum* の黄色色素の分離と構造解析

逆相シリカゲルカラムを用いて分離した黄色色素のスペクトルには 500 nm 付近に吸収を示す微量ピークが認められ、その吸収帯と形状から、カロテノイド系色素の可能性が考えられた。薄層クロマトグラフィー（TLC）により分離条件の検討を行ったところ、黄色スポットに加えて、淡赤色、褐色のスポットも検出された。TLC 上では、黄色成分の分離は良好と認められたが、展開後の TLC を室温に放置すると、数時間で黄色スポットは褐色に変化した。これは、黄色成分がシリカゲル上で不安定であることを示唆したことから、LH-20 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる分画を検討し、塩化メチレンとメタノールの混合溶媒により溶出することで、黄色を損なうことなく、黄色成分のフラクションを得ることを見出した。カロテノイドは空気酸化されやすいことから、黄色フラクションをアルゴンガスで置換した上で、窒素ガススプレーにより溶媒を除去したところ、肉眼上はほぼ黄色の物質を得ることができた。その物質を重クロロホルムに溶解し、NMR 解析に供した。プロトン NMR スペクトルでは、高磁場から中磁場にかけて不明瞭な広幅化したピークが認められ、精製が不十分であることが示唆された。一方で、低磁場には 5 から 7 ppm 付近にかけて複数の分裂したプロトンが認められ、複数の不飽和結合の存在が示唆され、本色素成分がカロテノイドとの予測と矛盾しない結果を得た。しかし、カーボン NMR を得るには物質量が不足であり、詳細な構造解析には至らなかった。

(2) 黄色色素の吸着によるフナセルの変化

黄色色素を吸着させたフナセルの表面の形状、フナセルの粒度分布および結晶化度を対照の資料と比較して物理的な手法で観察した。しかし、いずれの方法においても、今回行った手法の分解能では、両者の間に違いは見られなかった。より精度の高い方法での解析が必要であると考えられる。

(3) 黄色色素によるセルロースおよび天然バイオマスの酵素分解の促進

*R. thermocellum* および *R. josui* 菌体より黄色色素を抽出し、それぞれフナセルに吸着させた。それを基質として、*R. thermocellum* または *R. josui* の培養上清から調製したセルロソーム画分を作用させた。分解活性を黄色色素を吸着していない対照の活性を 100% として相対値で示した（図 2）。*R. thermocellum* の黄色色素を吸着させたフナセルに対しては、*R. thermocellum* および *R. josui* どちらの酵素も対照に比べ高い値を示した。一方、*R. josui* の黄色色素を吸着させたフナセルに対しては、*R. josui* の酵素は高い分解活性を示したが、*R. thermocellum* の酵素は逆に低い活性を示した。この結果は、黄色色素と酵素の間には相性があること、両菌由来の黄色色素が異なる機構でセルロース分解を高めることを示唆した。

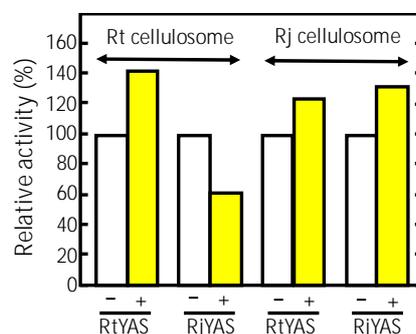


図 2 . フナセルの酵素分解に及ぼす *R. thermocellum* および *R. josui* 由来の黄色色素の影響

同様の実験を *R. josui* 由来のセルラーゼ RjCel5B 単独または RjCel5B と RjCipA の複合体を用いて行った。図 3 A に示すように、RjCel5B 単独および RjCel5B と RjCipA の複合体の酵素活性は黄色色素により高められた。また、RjCel5B の分解活性は RjCipA と複合体を形成することにより飛躍的に高められることが示された。さらに、天然バイオマスである稲わらに対する、*R. thermocellum* の分解活性も黄色色素が高めることが明らかになった（図 3 B）。

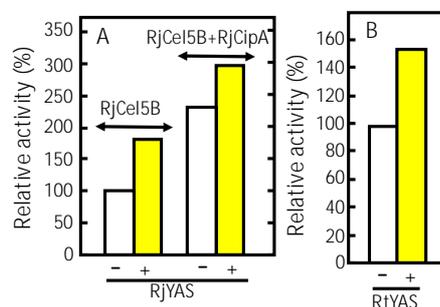


図 3 . RjCel5B および RjCel5B-RjCipA 複合体によるフナセル分解 (A) と *R. thermocellum* のセルロソーム画分による稲わら分解 (B) に及ぼす黄色色素の影響

天然バイオマスは、セルロースの他、ヘミセルロースやリグニンから構成されていること、セルロース分解性嫌気性細菌のセルロソーム中にはヘミセルラーゼも含まれることから、黄色色素の機能を調べるためには、セルラーゼのみではなく、ヘミセルラーゼやそれらの複合体の機能を明らかにすることが必要であることが示唆された。

#### (4) *R. josui* 由来のセルラーゼとヘミセルラーゼ複合体の機能解析

セルラーゼ RjCel5B と骨格タンパク質 RjCipA を調製し、6:0、6:1、6:3 および 6:6 の割合で混合し、複合体を形成させ、フナセルおよび稲わら粉砕物に作用させた。図 4 に示すように、RjCel5B 単独に比べ RjCipA との複合体形成により、フナセルおよび稲わら粉砕物に対する分解活性は飛躍的に高められた。これは、骨格タンパク質に存在する糖質結合モジュールの効果と考えられた。RjCel5B と RjCipA の比率が 6:1 と 6:6 の複合体の活性を比較すると 6:6 複合体の方が高いことから、セルラーゼが近接して存在することにより、酵素活性が高められる効果は本酵素では見られなかった。同様の実験をキシランナーゼ RjXyn10C について小麦アラビノキシランと稲わら粉砕物を基質として行ったところ、RjCipA の CBM がキシランに親和性を持たないことから、CBM の効果は見られず、逆に活性が低下する負の CBM 効果が観察された。

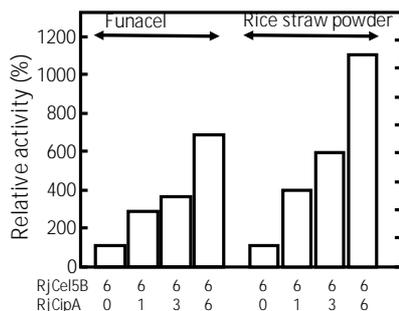


図 4 .RjCel5B と RjCipA との複合体のセルロース分解活性

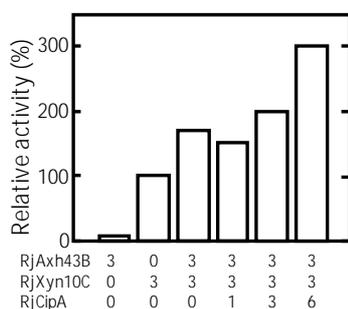


図 5 . RjAxh43A、RjXyn10C および RjCipA の複合体の稲わら粉砕物分解活性

アラビノキシランアラビノフラノヒドロラーゼ RjAxh43B、キシランナーゼ RjXyn10C および RjCipA から構成される酵素複合体の稲わ

ら粉砕物分解活性について調べた。図 5 に示すように、RjAxh43B と RjXyn10C を混合することで相乗効果が観察された。さらに、両酵素を複合体化することで活性はさらに増強された。3:3:6 複合体において最も高い活性が得られたが、天然のセルロソームではヘミセルラーゼの存在比は低いことから、3:3:6 複合体の活性が高かったことは妥当であると考えられる。

#### (5) *R. josui* のゲノム解析

*R. josui* のゲノム解析を行った結果、完全な配列決定には至らなかったが、1つのコンティグ (4,470,969 bp) とした。ゲノム上には、89 の糖質分解酵素遺伝子、5 の多糖リナーゼ遺伝子、19 の糖質エステラーゼ遺伝子および 27 の糖質転移酵素遺伝子の存在が予想され、本菌がバイオマス分解に優れた能力を持つことが裏付けられた。*R. thermocellum* の黄色色素の構造解析から、本物質はカロテノイド類似物質と予想されたが、*R. josui* 中にはこれまでに報告されているカロテノイド合成酵素遺伝子に相同性のある遺伝子は見出されなかった。また、*R. thermocellum* ATCC27405 株のゲノム配列中にもカロテノイド合成酵素遺伝子は見られなかった。一方、ポリケチド合成酵素遺伝子が、*R. josui* ゲノム中に多数見出されたことから、*R. josui* の黄色色素がポリケチド関連物質である可能性も考えられる。*R. thermocellum* のゲノム中には、ポリケチド合成酵素遺伝子は1つしかコードされておらず、*R. thermocellum* と *R. josui* では異なる性質の黄色色素を生産する可能性がある。*R. thermocellum* の黄色色素はアセトンにより抽出されるが、*R. josui* の黄色色素はアセトンでは抽出されないことから、構造的にも異なっている可能性が示唆された。

#### (6) *R. thermocellum* ATCC27405 株の RNA-seq 解析

*R. thermocellum* ATCC27405 株と親株に由来する白色株をセルロースを炭素源として培養し、両者で発現している遺伝子を RNA-seq の手法で解析した。その結果、親株で高発現している遺伝子として2つの糖質キナーゼ遺伝子が同定され、白色株で高発現している遺伝子として8遺伝子が同定されたが、黄色色素の合成とは関連が明確にはならなかった。

#### (7) *R. josui* の遺伝子導入系の確立

遺伝子破壊等を可能にするため、宿主・ベクター系の構築を行った。細菌形質転換の阻害要因として制限酵素が考えられたため、その検出を試みた結果、制限酵素の存在が確認された。ファージ DNA やプラスミド DNA の切断パターンから、MboI や Sau3AI と同じ配列 (GATC) を認識していると予想された。種々の検討の結果、*R. josui* の制限酵素 Rjoi は、

Dam メチラーゼで修飾された A を持つ DNA の GATC を認識し、A と T の間を切断し、平滑末端を生じることが判明した。*R. josui* ゲノム中に *Rjoi* をコードすると予想される遺伝子を見出したが、その遺伝子の開始コドンは一般的な ATG ではなく ATA であった。ATA を ATG に変異させた遺伝子を大腸菌に導入したところ、*dam*-株のみで形質転換体が生じたことから、本遺伝子が *Rjoi* をコードしていると結論した。したがって、*R. josui* の形質転換には大腸菌 *dam*-株より調製したプラスミドを使用した。エレクトロポレーションの条件などを検討した結果、エリスロマイシンまたはチアムフェニコールに対する耐性を選択マーカーとして *Clostridium perfringens* 用に作られたプラスミド pJIR751 の導入に成功した。さらに、pJIR751 を基に *RjCipA* 遺伝子上流のプロモーターを持つ発現ベクターを作製し、これに *RjCel48A* 遺伝子を連結し、*R. josui* に導入したところ、目的タンパク質の発現が確認されたことから、任意の遺伝子を破壊することが可能となった。

#### 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)

Taku Orita, Makiko Sakka, Tetsuya Kimura, and Kazuo Sakka Recombinant cellulolytic or xylanolytic complex comprising the full-length scaffolding protein *RjCipA* and cellulase *RjCel5B* or xylanase *RjXyn10C* of *Ruminiclostridium josui*, *Enzyme and Microbial Technology*, 査読有, 97 巻, 2017, 63-70 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.10.021>

[学会発表](計 8 件)

粟冠 真紀子、粟冠 和郎 他、*Ruminiclostridium josui* の *RjCel5B* または *RjXyn10C* と全長骨格タンパク質との複合体形成と活性の比較、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 18 日、京都女子大学(京都府・京都市)

粟冠 真紀子、粟冠 和郎 他、*Ruminiclostridium josui* のゲノム情報に基づくキシラナーゼの解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学(岡山県・岡山市)

Makiko Sakka, Kazuo Sakka 他, Development of a host-vector system in *Ruminiclostridium josui*, formerly *Clostridium josui*, *Mie Bioforum 2014 - Lignocellulose Degradation and Biorefinery*, 2014 年 11 月 18 日, 合歡の郷ホテル&リゾート(三重県・志摩市)

Makiko Sakka, Kazuo Sakka 他, Effect of yellow affinity substance on cellulolytic activity of *Ruminiclostridium thermocellum* (formerly *Clostridium thermocellum*) cellulosome and related enzymes, *Mie Bioforum 2014 - Lignocellulose Degradation and Biorefinery*, 2014 年 11 月 18 日, 合歡の郷ホテル&リゾート(三重県・志摩市)

粟冠 真紀子、粟冠 和郎 他、嫌気性細菌の生産する黄色色素(YAS)とセルラーゼ活性に関する研究、日本農芸化学会中部支部第 168 回例会、2013 年 10 月 12 日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

[図書](計 1 件)

Makiko Sakka, Kazuo Sakka 他, *Unipacs Co., Ltd., Lignocellulose Degradation and Biorefinery*, 2015, 350 (70-74)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

粟冠 和郎 (SAKKA, Kazuo)  
三重大学・大学院生物資源学研究所・教授  
研究者番号: 20154031

(2)研究分担者

粟冠 真紀子 (SAKKA, Makiko)  
三重大学・大学院生物資源学研究所・学術  
研究員  
研究者番号: 00422882

研究分担者

五十嵐 康弘 (IGARASHI Yasuhiro)  
富山県立大学・工学部・教授  
研究者番号: 20285159

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )