

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550103

研究課題名(和文)植物分解に適した遺伝子組換え嫌気性細菌の作出とバイオリファイナリーへの利用

研究課題名(英文) Construction of a plant biomass-degrading recombinant anaerobic bacterium and its utilization for biorefinery

研究代表者

平野 展孝 (HIRANO, Nobutaka)

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：10409089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：セルロソームを生産する好熱嫌気性Clostridium属細菌は、セルロース系バイオマス原料とした好熱性メタン発酵槽のバイオマス分解において重要な役割を果たす。セルロソームとは、多種多様な糖質分解酵素と骨格タンパク質が結合した酵素複合体であり、セルロース分解性嫌気性細菌の細胞表面に提示される。骨格タンパク質と結合したセルロソーム構成酵素は、結晶性セルロースや植物バイオマスの様な結晶性基質の分解に相乗作用を発揮する。本研究では、バイオ燃料や化成品の発酵生産において有益な、セルロソーム中に本来存在しない酵素を発現する遺伝子組換え好熱嫌気性細菌の作出を行った。

研究成果の概要(英文)：Cellulosome-producing thermophilic anaerobic Clostridia play a pivotal role in the degradation of cellulosic biomass in a thermophilic methanogenic bioreactor. The cellulosome is a supramolecular multienzyme complex composed of a wide variety of polysaccharide-degrading enzymes and structural proteins, and displayed on the cell surface of anaerobic cellulolytic bacteria. Cellulosomal enzymes bound to the structural proteins generate synergy for the degradation of crystalline substrates, such as crystalline cellulose and plant biomass. In this study, we constructed a recombinant thermophilic anaerobic bacterium, which produces enzymes that are not naturally present in the cellulosome complex, beneficial to the fermentation of renewable bio-based fuels and chemicals.

研究分野：微生物工学

キーワード：リグノセルロース セルロソーム 糖化発酵

1. 研究開始当初の背景

再生可能資源であるバイオマスを原料としたバイオリファイナリー分野では、非食用リグノセルロースへの原料転換が急務である。リグノセルロースから微生物発酵原料(単糖)を得る際の生物系処理では糖化酵素が用いられるが、糖化対象(セルロース・ヘミセルロース)が、より難分解性のフェノール高分子(リグニン)で覆われていることから、セルロース/ヘミセルロース/リグニン分解酵素の協働作用に着目した複合酵素系の構築が重要と考えられる。本課題では、この複合酵素系の研究対象として、植物バイオマス分解酵素複合体(セルロソーム)を選定した。セルロソームとは、嫌気性細菌の細胞表面に提示される酵素複合体であり、多種多様な糖質分解酵素が集積・近接化することで強力な結晶性セルロース分解活性を発揮する。

2. 研究の目的

本研究では、強力なセルロース分解活性を示す好熱性セルロソームを生産する好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* を対象に、本来セルロソーム中に存在しない植物バイオマス分解酵素群(リグニン分解酵素とセロピオース分解酵素)の遺伝子導入を行うことで、植物バイオマスを原料とした乳酸発酵、或いはメタン発酵に利用可能な遺伝子組換え嫌気性細菌の作出を目標とした。メタン発酵では、リグニン分解酵素を分泌発現する組換え体によって、*C. thermocellum* が担う植物バイオマス糖化、及び有機酸発酵の効率が改善すれば、最終的なメタン生成量も増加すると期待される。一方、野生型 *C. thermocellum* はグルコース(単糖)を効率良く取り込めないため、セロピオース分解酵素を分泌発現する組換え体によって、植物バイオマスからグルコース(単糖)が生産できれば、乳酸発酵において、好熱性乳酸菌がグルコースを効率的に利用出来る環境が整うと期待される。

3. 研究の方法

C. thermocellum 由来セルロソームを対象に、以下の研究を行った。セルロソーム中に存在しない酵素活性として、リグニン分解酵素とセロピオース分解酵素を選定し、試験管内において、これらの酵素とセルロソームとの協働作用の検討を行い、植物バイオマス分解活性の改善を検討した。また、植物バイオマス分解活性に改善がみられた酵素を対象に、エレクトロポレーション法を用いて *C. thermocellum* への酵素遺伝子の導入を行い、遺伝子組換え体の作出、並びに組換え酵素の高発現株のスクリーニングを行った。更に、これらの酵素に分泌シグナル、及びセルロソーム骨格結合ドメインを付加した融合タンパク質を構築し、*C. thermocellum* へ遺伝子導入することで、セルロソーム中に存在しない酵素活性の酵素を分泌発現する組換え株の作出を行った。

4. 研究成果

セルロソーム中に酵素活性が存在しないリグニン分解酵素として、組換え型酵素の生産が容易且つ耐熱性の高い細菌由来ラッカーゼ(*Bacillus subtilis* 由来 CotA、*Thermus thermophilus* 由来 Lac)を選定し、試験管内において *C. thermocellum* 由来セルロソームとの協働作用の検討を行った。その結果、ラッカーゼ活性には銅イオンが必須であるが、セルロソーム活性は銅イオンによって阻害されること、酸化還元酵素であるラッカーゼの活性は還元剤によって阻害されるが、嫌気性細菌由来であるセルロソームの活性には還元剤が必須であることが分かった。また、銅イオンと還元剤のうち、一方のみを変動させて許容濃度を探索した場合、~60-80%程度の酵素活性が維持出来る条件は、ラッカーゼ及びセルロソーム共に存在したが、銅イオンと還元剤の両方を、その許容濃度に設定した場合、ラッカーゼ及びセルロソーム共に酵素活性の維持は困難であった。以上の結果より、ラッカーゼとセルロソームの併用は困難であると判断されたため、セルロソームとの併用によって植物バイオマス分解活性の改善が報告されている好熱菌由来セロピオース分解酵素(*Thermoanaerobacter brockii* 由来 β -glucosidase CgIT)を対象に、試験管内において *C. thermocellum* 由来セルロソームとの協働作用の検討を行った。その結果、脱リグニン処理済稲わらを基質とした場合、セルロソーム単独による糖化では、~40%程度の糖化率であったものが、セロピオース分解酵素の添加によって、~80%程度まで糖化率が上昇することが確認された。以上の結果から、好熱菌由来セロピオース分解酵素遺伝子を、*C. thermocellum* へ導入することとした。*C. thermocellum* 形質転換用ベクター pMU102(チアムフェニコール耐性(Tm^r))へ、*C. thermocellum* 由来グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)遺伝子の転写プロモーターとターミネーター、及び好熱菌由来セロピオース分解酵素遺伝子を導入した。この発現プラスミド(図1)をエレクトロポレーション法によって野生型 *C. thermocellum* ATCC 27405 株へ導入し、チアムフェニコール耐性の形質転換体を得た。

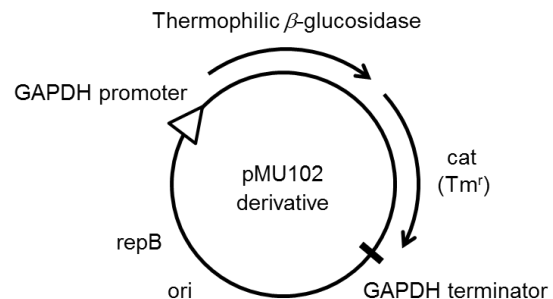


図1. セロピオース分解酵素発現プラスミド

得られた形質転換体への酵素遺伝子の導入を PCR 法によって確認した後、形質転換体の菌体破碎上清を対象に、*p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside を基質として、セロビオース分解酵素発現株のスクリーニングを行った。野生型 *C. thermocellum* ATCC 27405 株と比較して、 ~ 3 倍程度のセロビオース分解活性を示す形質転換体 (#1-3) を対象に、菌体破碎上清の活性染色を行った結果、形質転換体には、好熱菌由来セロビオース分解酵素の精製酵素と同じサイズ (52 kDa) にセロビオース分解活性を示すバンドが検出された。一方、コントロールベクター (mock) を導入した形質転換体には目的サイズに活性を示すバンドが検出されなかったため、組換え酵素の発現が確認された (図 2)。

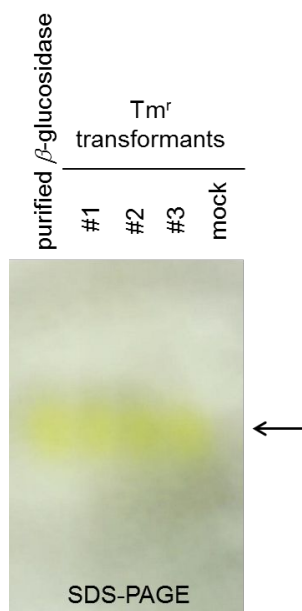


図 2. *C. thermocellum* 形質転換体の活性染色

次に、セロビオース分解酵素を菌体外へ分泌発現させるため、*C. thermocellum* 由来セルロソーム骨格タンパク質 (CipA) の菌体外分泌シグナルを付加した分泌型セロビオース分解酵素の発現プラスミド、及び、セルロソーム骨格結合ドメイン (*C. thermocellum* 由来 CelS の dockerin ドメイン) を付加した分泌型融合タンパク質の発現プラスミドを構築し、上記と同様に、エレクトロポレーション法によって *C. thermocellum* ATCC 27405 株へ導入後、チアムフェニコール耐性の形質転換体を得た。得られた形質転換体への酵素遺伝子の導入を PCR 法によって確認した後、その培養上清のセロビオース分解活性を測定したところ、菌体外分泌シグナルを付加していないセロビオース分解酵素を導入した形質転換体の培養上清と比較して、 ~ 2.5 倍程度のセロビオース分解活性が検出された。今後、更なる高分泌発現株のスクリーニングが必要と考えられる。また、セルロソーム骨格結合ドメインを付加した形質転換体から調製した

セルロソーム複合体中に、セロビオース分解活性が検出されるか確認が必要と考えられる。また、これまでの研究から、セルロソーム複合体中へセロビオース分解酵素を導入した場合、試験管内における糖化活性の検討から、セロビオース分解酵素が複合体中に導入されていない場合と比較して、より少ない酵素量で同等の糖化産物を得ることが可能であることが分かっている。しかし一方で、セルロソーム複合体中でのセロビオース分解酵素の含有量が高くなり過ぎると、複合体中のセルロース分解酵素の含量が減少するため、逆に糖化産物が減少することが分かっている。今後、転写プロモーターの種類を検討することで、植物バイオマス糖化活性に対して、最適なセロビオース分解酵素の含有量を示すセルロソーム複合体生産株の作出が必要と考えられる。

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 3 件)

1. Hirano, K., Kurosaki, M., Nihei, S., Hasegawa, H., Shinoda, S., Haruki, M., and Hirano, N.
Enzymatic Diversity of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome Is Crucial for the Degradation of Crystalline Cellulose and Plant Biomass.
Sci. Rep. 査読有、Vol. 6, 2016, p. 35709.
DOI: 10.1038/srep35709
2. Hirano, K., Nihei, S., Hasegawa, H., Haruki, M., and Hirano, N.
Stoichiometric Assembly of the Cellulosome Generates Maximum Synergy for the Degradation of Crystalline Cellulose, as Revealed by *In Vitro* Reconstitution of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome.
Appl. Environ. Microbiol. 査読有、Vol. 81, 2015, p. 4756-4766.
DOI: 10.1128/AEM.00772-15
3. 平野 展孝
駕籠に乗る人、担ぐ人、そのまた草鞋を作る人
生物工学会誌、査読有、Vol. 92, No. 6, 2014, p. 305.
DOI: 10.1128/AEM.00772-15

[学会発表] (計 6 件)

1. 黒崎 正浩, 石澤 崇昭, 篠田 優, 平野 勝紹, 高野 初美, 上田 賢志, 春木 満, 平野 展孝
好熱嫌気性細菌 *Clostridium clariflavum* 由来セルロソームの機能解析、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 3 日、神

戸ポートアイランド

2. 篠田 優, 本田 紘樹, 黒崎 正浩, 白澤 智行, 平野 勝紹, 春木 満, 平野 展孝
好熱性セルラーゼ/ヘミセルラーゼ/ラックカーゼによるバイオマス分解酵素複合体の構築、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド
3. 平野 勝紹, 那須 涼介, 田中 清志, 二瓶 哲, 篠田 優, 春木 満, 平野 展孝
Clostridium thermocellum セルロソームの試験管内再構成、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1日、神戸ポートアイランド
4. 篠田 優, 本田 紘樹, 草野 大貴, 黒崎 正浩, 平野 勝紹, 春木 満, 平野 展孝
Thermobifida fusca 由来糖質分解酵素から成る人工セルロソームによるバイオマス分解、2015年度日本農芸化学会、2015年3月27日、岡山大学
5. 平野 勝紹, 高橋 祐介, 田中 清志, 二瓶 哲, 白澤 智行, 長谷川 裕樹, 篠田 優, 春木 満, 平野 展孝
Clostridium thermocellum 由来セルロソーム二次骨格の機能解析、2015年度日本農芸化学会、2015年3月27日、岡山大学
6. 平野 展孝
植物バイオマス分解酵素複合体の再構成平成26年度化学系学協会東北大会生体分子セッション、2014年9月20日、山形大学工学部

〔その他〕

ホームページ等

日本大学生命応用化学科酵素学研究室

<http://ch.ce.nihon-u.ac.jp/~hirano/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 展孝 (HIRANO, Nobutaka)

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：10409089

(2) 連携研究者

平野 勝紹 (HIRANO, Katsuaki)

日本大学・工学部・博士研究員

研究者番号：20723753

篠田 優 (SHINODA, Suguru)

日本大学・工学部・博士研究員

研究者番号：60747666