

## 多糖類利用に向けたセルロース分解性昆虫共生細菌の発見および それらが産出する糖質分解酵素の機能・構造解析

大橋 慧介<sup>1</sup>, 堀 千明<sup>2</sup>, 高須賀 太一<sup>1,3,4</sup>

### 1. はじめに

ストレプトミセス属放線菌は10億年前を起源として長い年月をかけさまざまな生態系に適応することにより多くの種が派生し、現在同定されている全細菌16,000種の5%にのぼるほど多様性に富んだ属へと進化を遂げたとされている<sup>1)</sup>。本菌は強固な細胞壁を持つグラム陽性細菌であり、糸状に生育することが形態的な特徴としてあげられる。これまでストレプトミセス属放線菌に関する研究では、本放線菌が生産する二次代謝産物が抗生物質として利用できることが注目されてきた<sup>2)</sup>。実際に、1928年にペニシリンが抗生物質として初めて発見されて以降、現在まで数千種類以上の抗生物質が発見されているが、その大部分はストレプトミセス属細菌に由来する。このように抗生物質生産菌として研究されているストレプトミセス属放線菌のほとんどは土壌などの環境から単離されてきたが、最近では本放線菌の一部が植物を食害する昆虫と共生関係にあることが明らかになった<sup>1,3)</sup>。このような昆虫共生型のストレプトミセス属放線菌は、昆虫とともに共進化を遂げることで高い植物バイオマス分解能力を獲得したと考えら

れ、この分解能力を植物バイオマス利用技術へと応用することが期待されている。本稿では、我々が関わってきた植物食害性昆虫に共生しているストレプトミセス属放線菌が保有するバイオマス分解能力と、それに寄与すると考えられる糖質分解酵素について概説する。

### 2. 昆虫共生型ストレプトミセス属放線菌のセルロース分解能と比較ゲノム解析

現在持続型社会の構築を目指し、石油の代替資源である生物由来のバイオマス資源からエタノールやポリマーといったバイオリファイナリー製品を生産することが望まれている。陸上バイオマスであるセルロースやヘミセルロースおよび海洋バイオマスである $\beta$ -1,3-グルカンなど、地球上において存在量の多いバイオマスの多くは多糖類であり、そこから発酵可能糖である単糖へと分解する過程が必要となる。そこで、自然界で効率的に多糖類を分解する菌類によって菌体外に分泌されるセルラーゼやヘミセルラーゼといった加水分解酵素の研究が進められてきた。本研究ではより効率的なバイオマス分解を達成しうる酵素カクテルの取得を目標に、多様性に富むストレプトミセス属放線菌に着目して多糖類分解能を保有する株をスクリーニングすることから始めた。

さまざまな環境から単離された新種を含む1141種のストレプトミセス属放線菌について16SリボソームRNA配列を用いて系統樹解析を行った<sup>4)</sup>。その結果を基に系統樹全体を網羅するように223種を選抜し、高純度のセルロースであるろ紙を単一炭素源とした培地で培養したところ、29種において高いセルロース分解能力が確認できた(図1)。このうち高いろ紙分解能力が確認された25種が集約された系統樹のクレイド(グループIとIII)に着目したところ、これらグループに属するストレプトミセスのほとんどが昆虫共生細菌であった。したがって、グループIとIIIに属する昆虫共生型のストレプトミセスは非共生型を含むその他のストレプトミセスとは異なる進化を通して高いセルロース分解能力を獲得したことが強く示唆された。また、分解対象であるセルロースはヘミセルロースとともに植物に多く含まれるため、これらストレプトミセスはセルロース分解だけでなく、ヘミセルロースについても

<sup>1</sup>北海道大学国際食資源大学院(〒060-8587 札幌市北区北9条西9丁目)

<sup>2</sup>北海道大学工学研究院(〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目)

<sup>3</sup>北海道大学農学研究院(〒060-8587 札幌市北区北9条西9丁目)

<sup>4</sup>北海道大学国際連携研究教育局GI-CoRE(〒060-0815 札幌市北区北15条西8丁目)

**Discovery of the novel insect-symbiont cellulolytic microbes and biochemical analyses of their enzymes to enhance polysaccharide deconstruction technology**

Keisuke Ohashi<sup>1</sup>, Chiaki Hori<sup>2</sup> and Taichi Takasuka<sup>1,3,4</sup> (<sup>1</sup>Graduate School for Global Food Resources, Hokkaido University, Sapporo, West 9 North 9 Kita-ward, Sapporo city, Hokkaido 060-8587, <sup>2</sup>Research Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo, West 8 North 13 Kita-ward, Sapporo city, Hokkaido 060-8628, <sup>3</sup>Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, West 9 North 9 Kita-ward, Sapporo city, Hokkaido 060-8589, <sup>4</sup>Global Institute for Collaborative Research and Education, Hokkaido University, Sapporo, West 8 North 15 Kita-ward, Sapporo city, 060-0815)  
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890739

© 2017 公益社団法人日本生化学会

分解能力が高いと予測された。そこで、グループIとIIIに分類された9種のストレプトミセスの分泌タンパク質中のヘミセルロース分解酵素活性を測定し、高い活性を示すことを明らかにした。さらに、高いセルロース分解能力が確認できたストレプトミセスを含む152種のゲノム情報比較解析から、グループIとIIIストレプトミセス属放線菌はその他のものに比べ、セルラーゼやヘミセルラーゼの一つであるキシランナーゼといった多糖成分の分解に関わる糖質加水分解酵素 (glycoside hydrolase : GH) や糖質酸化酵素をコードする遺伝子を2倍以上多く保持することを明らかにした。つまり、昆虫共生ストレプトミセス属放線菌は、ゲノム上に多くの多糖成分分解酵素遺伝子を得ることで、高いセルロースおよびヘミセルロース分解能力を獲得したと考えられた<sup>4,5)</sup>。

次に、グループIとIIIに属する五つのストレプトミセスおよびコントロール株として非共生ストレプトミセスである *Streptomyces griseus* および *S. flavogriseus* について遺伝子発現プロファイル解析した。その結果、グルコース培地と比較してセルロース培地において、糖質分解酵素をコードしている遺伝子群の優位な上方発現が前者の5種においてのみ確認できた。これら遺伝子の発現メカニズムについて調べるため各遺伝子配列のプロモーター領域である上流配列を解析した結果、セルロース分解能を持つ放線菌ではLac-IリプレッサーのホモログであるCebRリプレッサー転写因子と結合する14塩基対のパリンドローム配列 (TGGGAGCGCTCCCA) がコントロール種と比較して多く確認された。CebRリプレッサーは、セルロースの分解産物存在下で発現が抑制されることが知られており、セロビオースや他の低分子オリゴ糖の存在に対応して下流のセルロース分解酵素遺伝子の発現を上方制御することが先行研究によって報告されている<sup>6)</sup>。実際にこの配列を欠損させたストレプトミセスでは、セロビオースやオリゴ糖非存在下にも関わらず恒常的に一連のセルロース分解酵素群を発現・分泌した<sup>4)</sup>。したがって高い分解能を持つストレプトミセス属放線菌は進化の過程でGH遺伝子上流にCebR結合サイトを多く保持するようになったと予測された。すなわち、CebR結合サイトの数を指標にセルロース分解能を予測することが可能となると考えられる。

### 3. キバチに共生するストレプトミセス属放線菌の糖質分解特性

上記の高い木質成分分解能力を持つ共生ストレプトミセス属放線菌のうち、木材食害性昆虫であるノクチリオキバチ (*Sirex noctilio*) 共生細菌 *S. sp. SirexAA-E* (図1, グループI) (以下 *SirexAA-E*) に着目し (図2), 詳細なセルロースおよびヘミセルロースに対する分解活性ならびに

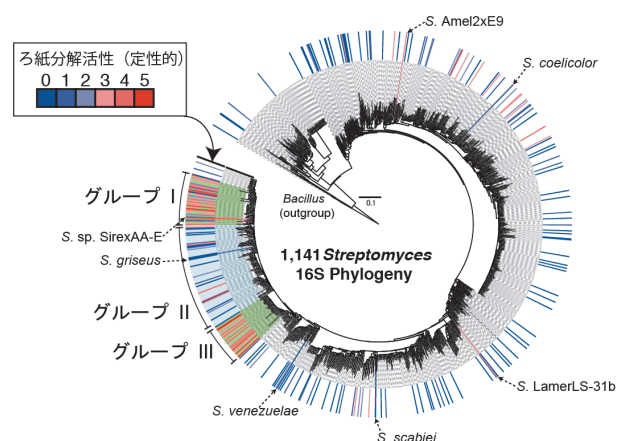
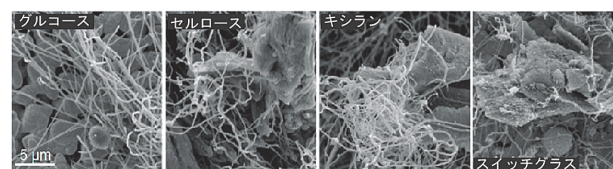


図1 1141種のストレプトミセス属放線菌の16S rRNA分子進化系統樹および223種について行った紙分解活性結果を示す。

#### 単一炭素源下における培養 (SEM)



#### 分泌タンパク質のプロテーム解析

タンパク質ファミリー	推定機能	グルコース	セルロース	キシラン	スイッチグラス
GH6	還元末端セロビオヒドロラーゼ	0	3965	8	3330
GH48	非還元末端セロビオヒドロラーゼ	0	1296	0	577
GH5	マンナーゼ	2	624	0	185
AA10	LPMO	0	564	29	493
GH5	エンドグルカナーゼ	0	156	0	92
GH10	エンドキシランナーゼ	0	90	778	118
CE4	アセチルキシランエステラーゼ	0	87	938	94
-	カタラーゼ	0	83	30	50
GH74	エンドグルカナーゼ	0	83	0	29
GH11	エンドキシランナーゼ	0	67	649	165
-	ABC輸送タンパク質	67	53	60	55
-	バクテリオフェリチン	0	32	42	32
PL3	ペクチンリアーゼ	0	26	14	226
-	機能未知タンパク質	0	23	135	34
GH9	エンドグルカナーゼ	0	21	0	342

図2 *SirexAA-E*をグルコース、セルロース、キシラン、スイッチグラスを単一炭素源として培養した際の走査型電子顕微鏡写真(上)と培養上清プロテオームの結果(下)を示す。分泌タンパク質のプロテオーム解析によって検出されたタンパク質を、セルロース培養上清中におけるペプチドカウントの多い順にソートした。

遺伝子発現応答を調べた<sup>7,8)</sup>。まず、セルロースやキシランを炭素源基質とし生育した *SirexAA-E* の培養上清のセルロース、キシラン、マンナンに対する分解比活性を測定した。その際に、*Trichoderma reesei* Rut-C30株由来の商業用粗酵素抽出液 (Spezyme CP, DUPONT USA) を比較対象とした。その結果、*SirexAA-E* のセルロース培養上清に認められたセルロース分解比活性はSpezyme CPに比し40%の比活性を示した一方で、キシラン培養上清およびセルロー



ス培養上清のキシランおよびマンナンに対する比活性は Spezyme CPと比較し、それぞれ20~30%ほど高い活性を示した。SirexAA-Eが野生株であることを考慮すると、本菌の持つセルロースやヘミセルロースの高い分解能力は、遺伝子組換え等の技術を用いることで、さらに向上させることができると予想される。次に培養上清の高い糖質分解活性に寄与する酵素を明らかにするため、プロテオーム解析により分泌タンパク質を網羅的に同定した(図2)。プロテオーム解析用サンプルは、グルコースとセルロース、キシランあるいは植物バイオマスであるスイッチグラスを単一炭素源とした培地で生育した培養上清を用いた。セルロース培養上清中において検出されたスペクトルの上位5種は、GH6に属する還元末端セロビオヒドロラーゼ(CBH)と非還元末端GH48に属するCBH,  $\beta$ -マンナーゼ(GH5), GH5エンドグルカナーゼ(EG), 多糖モノオキシゲナーゼ(LPMO)と同定され、全スペクトルの85%以上に相当した。GH48 CBHとGH6 CBHはそれぞれセルロースの還元末端および非還元末端からセロビオースを切り出し、セルロース鎖の真ん中を切断するEGやLPMOと相乗的にセルロースを分解するとされている。また、 $\beta$ -マンナーゼは針葉樹に豊富なヘミセルロースを分解するのだが、これは*S. noctilio*が松を食害する事実と一致する。さらに、セルロースを主成分とするスイッチグラス培養上清中の上位5種もセルロース培地と同様の結果が得られた一方で、キシラン培養上清のプロテオーム解析の結果は異なるものであった。本結果は、SirexAA-Eが培地中の炭素源

に対して特異的な遺伝子応答を行っていることを示唆した。同培養条件下で生育したSirexAA-Eについて全遺伝子発現プロファイル解析を行ったところ、プロテオーム解析で分泌されていたタンパク質の遺伝子上方発現、およびそれらの遺伝子上流にCebR転写因子結合部位が確認された。

以上の全分泌タンパク質プロテオームや全遺伝子発現解析結果をもとに、SirexAA-Eにおいて高いバイオマス分解能力の鍵となるタンパク質の生化学的解析を行った。一例として、SACTE\_2871 遺伝子産物について組換え酵素を調製し、機能解析および結晶構造解析を行ったところ、本酵素はイントラジオールジオキシゲナーゼ触媒ドメインとCBMドメインを保持し、モノリグノール生合成経路の前駆体の一つであるカフェオイル-CoAをO<sub>2</sub>依存に開裂することを明らかにした<sup>9)</sup>。他方、グルコサミンの重合した多糖類であるキトサンを加水分解するキトサナーゼ(GH46) SACTE\_5457 遺伝子産物<sup>10)</sup>や上記の $\beta$ -マンナーゼ(SACTE\_2347 遺伝子産物)<sup>11)</sup>についても同様に酵素機能を明らかにし、セルロースを酸化的に分解するSACTE\_3159 遺伝子産物(LPMO)については進化の過程で獲得した基質特異性について報告している<sup>12)</sup>。

#### 4. SirexAA-E由来のSacteLam55のラミナリン分解特性

SirexAA-Eの分泌する酵素の中でも筆者らが特に注目した酵素がラミナリン分解酵素、SacteLam55A (GH55)で

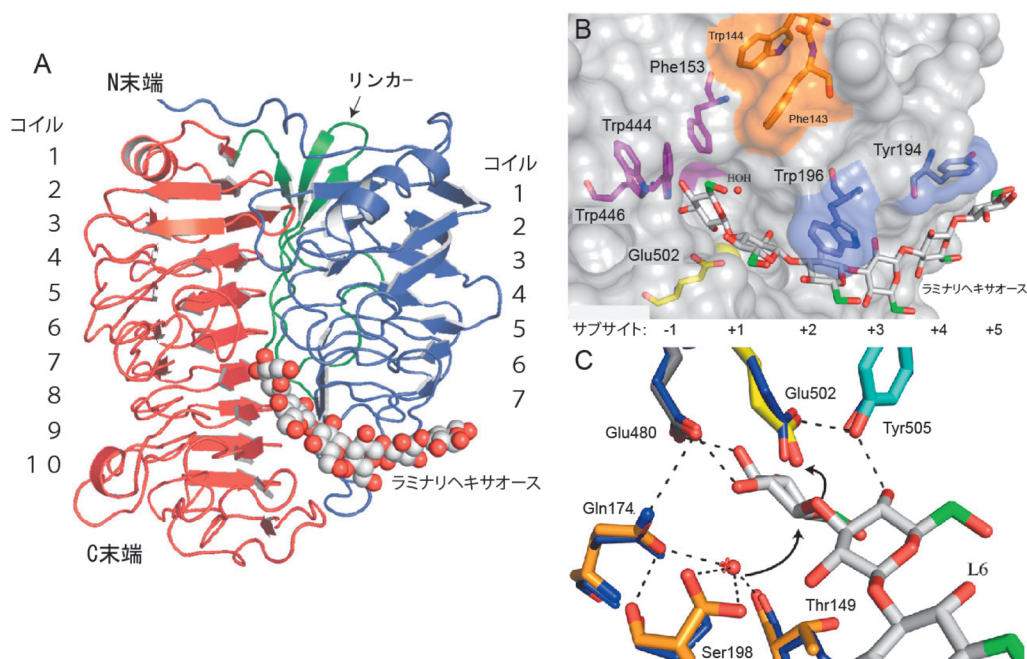


図3 SacteLam55Aのラミナリヘキサオース(L6)基質結合構造全体構造(A)、基質結合領域(B)およびプロトンリレーとGlu502によるアノマー反転型作用機序(C)を示す。

ある。ラミナリンは我々日本人にとってなじみの深いコンブ (*Laminaria*) の主要成分であり、 $\beta$ -1,3結合と $\beta$ -1,6結合のグルコースユニットから構成される多糖類である。SirexAA-Eが本酵素を分泌する理由として、キバチ共生環境において $\beta$ -1,3-グルカンを細胞壁に持つ真菌類のコンタミを防ぐためではないかと推測された。GH55酵素については、担子菌 *Phanerochaete* 由来の PcLam55A について触媒機能 (アノマー反転型) および結晶構造が報告されていたが<sup>13)</sup>、細菌由来の GH55 ファミリーについて詳細な報告はなかった。そこで、SacteLam55A を大腸菌大量発現系によって調製し、結晶構造および、生化学的手法を用いた機能解析を実施した<sup>14)</sup>。本酵素の構造については、野生型タンパク質に加え PcLam55A において示唆された触媒アミノ酸残基の変異タンパク質 (SacteLam55A E502A) と四つの基質 [グルコース、ラミナリトリオース (L3)、ラミナリテトラオース (L4)、ラミナリヘキサオース (L6)] との酵素基質複合体の結晶構造を明らかにした。全体構造は、リンカー領域 (Leu258–His306) でつながった N 末端 (Ala58–Leu257) および C 末端 (Gly307–Pro605) の二つの  $\beta$ -helical ドメインから構成され、N 末端および C 末端ドメインはそれぞれ 7 回転の  $\beta$ -helical コイルと 10 回転  $\beta$ -helical コイルから構成されていた (図 3A)。また酵素と基質 (L6) の複合体の結晶構造から、サブサイトを有する基質結合クレフトが両ドメインにはさまれた領域に存在することを明らかにした (図 3B)。加えて芳香環を持つ 3 個のアミノ酸残基 (Phe153, Trp444, Trp446) が基質結合クレフトの片端を物理的に塞いでいるため、基質の結合は一方からのみに制限されており、ラミナリンの還元末端から分解することが予想された。さらに基質との結合領域において、-1 サブサイトに位置するグルコースにおいて 6 位の酸素を除くすべての酸素原子が C 末端ドメイン上のアミノ酸残基 (Trp444, Trp446, Asp449, Glu480) と少なくとも一つ以上の水素結合 (3 Å 以内) を形成していた。これらアミノ酸は、本酵素が属する GH55 ファミリーのタンパク質にて高く保存されていた。+1 サブサイトについては、N 末端ドメイン上の Thr149 および Gln217 により配位され、+2 サブサイトは Gln217 による水素結合と Trp196 によるスタッキング相互作用が確認された。これらアミノ酸は細菌由来の同ファミリー間においてのみ高く保存されていた。+3, +4, +5 サブサイトについては、基質との結合に寄与していると考えられるアミノ酸残基はほとんど存在せず、唯一 Tyr194 が +5 サブサイトのスタッキング相互作用に関与していることが予想された。

次に SacteLam55A の触媒機能を解明するために野生型酵素の結晶構造をもとに、活性に関与すると予測された 6 種のアミノ酸を変異させた組換えタンパク質を作製し、野生型タンパク質とともに反応速度パラメーターを決定し

た。+1 サブサイトから 5 Å 以内に存在するカルボキシ基を持つアミノ酸残基 3 個 (Asp449, Glu480, Glu502) の変異体のうち、それぞれアラニンまたはグルタミンに置換したアミノ酸変異体において触媒機能の消失が確認できた。この結果から Glu502 は基質との距離が 2.3 Å であり、基質アノマー酸素に相互作用できることから、catalytic acid (触媒酸) と推測された。しかしながら、アノマー反転型酵素に必須な catalytic base (触媒塩基) となるアミノ酸残基は立体構造上では確認できなかった。したがって一般的な塩基触媒と水分子を介した求核攻撃ではなく、+1 サブサイトの C1 位グルコースから 3.4 Å 以内に位置する五つのアミノ酸残基 (Thr149, Gln174, Ser198, Glu480, Tyr505) および水分子を介した以下のプロトンリレーによって求核攻撃を引き起こしている可能性が考えられた (図 3C)。すなわち、Gln174 と Ser198 および Thr149 により活性中心に配置された水分子の活性化によって、基質のアノマー炭素に対して求核攻撃が生じ、脱離したアノマー酸素は Glu502 の触媒作用によりプロトンが付加されると推測された。この際に Glu480 は、Gln174 が寄与する水素結合を安定化する役割を担っている可能性が考えられた。これらのことは、Glu480 アミノ酸変異体において機能が完全に消失したことや、Gln174 と Asp449, Tyr505 変異体の触媒反応効率が大きく低下したことも一致する。本結果から、SacteLam55A がラミナリン直鎖を還元末端から加水分解する  $\beta$ -1,3-グルカンナーゼであること、触媒作用にプロトンリレーおよび触媒酸残基 (Glu502) が関与していることを明らかにした。

## 5. おわりに

これまでに記述したように、一部の昆虫共生型のストレプトミセスは、糖質分解に優れていることが明らかになってきた。その対象となる糖質はセルロースやヘミセルロースだけでなく、キチンや $\beta$ -1,3-グルカン等の他の多糖類を含むことから、生産される分解酵素は陸上および海洋バイオマスの分解利用に幅広く応用できる可能性がある。特に $\beta$ -1,3-グルカン分解については SacteLam55A が、酵素の調製が容易であること、そして幅広い至適反応条件において高い比活性を示すことなどから、実用性に適した酵素といえる。したがって、SacteLam55A とアルギン酸分解酵素等の酵素との組み合わせによって、ラミナリンを多く含む海藻の糖化利用につながるのではないかと期待している。また、SirexAA-E が生産する菌体外粗酵素液は非常に高いバイオマス分解活性があり、遺伝子組換え技術を用いて総分泌タンパク質量の向上や分泌プロテアーゼの除去等を試みることにより、多糖類の糖化効率の向上が期待される。さらに、上述した高いセルロース分解活性を示した放線菌種

29種類を対象として、分泌タンパク質プロテオーム解析を通じた新規バイオマス分解酵素の探索を引き続き行っている。

## 謝辞

本研究成果は、米国ウィスコンシン大学Madison校農学部生化学学科Brian G. Fox教授、同微生物学科Cameron R. Currie教授、米国ウィスコンシン大学Oshkosh校化学学科Christopher M. Bianchetti教授、およびProteovista社（ウィスコンシン州、米国）Adam J. Book博士との共同研究によりなされました。心より感謝致します。

## 文 献

- 1) Lewin, G.R., Carlos, C., Chevette, M.G., Horn, H.A., McDonald, B.R., Stankey, R.J., Fox, B.G., & Currie, C.R. (2016) *Annu. Rev. Microbiol.*, **70**, 235–254.
- 2) Seipke, R.F., Kaltenpoth, M., & Hutchings, M.I. (2012) *FEMS Microbiol.*, **36**, 862–876.
- 3) Khan, S.T., Komaki, H., Motohashi, K., Kozono, I., Mukai, A., Takagi, M., & Shin-ya, K. (2011) *Environ. Microbiol.*, **13**, 391–403.
- 4) Book, A.J., Lewin, G.R., McDonald, B.R., Takasuka, T.E., Wendt-Pienkowski, E., Doering, D.T., Suh, S., Raffa, K.F., Fox, B.G., & Currie, C.R. (2016) *PLoS Biol.*, **14**, e1002475.
- 5) Book, A.J., Lewin, G.R., McDonald, B.R., Takasuka, T.E., Doering, D.T., Adams, A.S., Blodgett, J.A.V., Clardy, J., Raffa, K.F., Fox, B.G., & Currie, C.R. (2014) *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 4692–4701.
- 6) Marushima, K., Ohnishi, Y., & Horinouchi, S. (2009) *J. Bacteriol.*, **191**, 5930–5940.
- 7) Adams, A.S., Jordan, M.S., Adams, S.M., Suen, G., Goodwin, L.A., Davenport, K.W., Currie, C.R., & Raffa, K.F. (2011) *ISME J.*, **5**, 1323–1331.
- 8) Takasuka, T.E., Book, A.J., Lewin, G.R., Currie, C.R., & Fox, B.G. (2013) *Sci. Rep.*, **3**, 1030.
- 9) Biahchetti, C.M., Harman, C.H., Takasuka, T.E., Hura, G.L., Dyer, K., & Fox, B.G. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 18574–18587.
- 10) Takasuka, T.E., Bianchetti, C.M., Tobimatsu, Y., Bergeman, L.F., Ralph, J., & Fox, B.G. (2014) *Proteins*, **82**, 1245–1257.
- 11) Takasuka, T.E., Acheson, J.F., Bianchetti, C.M., Prom, B.M., Bergeman, L.F., Book, A.J., Currie, C.R., & Fox, B.G. (2014) *PLoS One*, **9**, e94166.
- 12) Book, A.J., Yennamalli, R.M., Takasuka, T.E., Currie, C.R., Phillips, G.N. Jr., & Fox, B.G. (2014) *Biotechnol. Biofuels*, **7**, 109.
- 13) Ishida, T., Fushinobu, S., Kawai, R., Kitaoka, M., Igarashi, K., & Samejima, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 10100–10109.
- 14) Bianchetti, C.M., Takasuka, T.E., Deutsch, S., Udell, H.S., Yik, E.J., Bergeman, L.F., & Fox, B.G. (2015) *J. Biol. Chem.*, **290**, 11819–11832.

## 著者寸描

### ●大橋 慧介（おおはし けいすけ）

北海道大学大学院国際食資源学院修士課程1年。

■略歴 2017年北海道大学水産学部卒業。現在に至る。

■研究テーマと抱負 世界で活躍できる研究者を目指して、日々研究に取り組んでいます。

■趣味 釣り、ゴルフ。

### ●堀 千明（ほり ちあき）

北海道大学大学院工学研究院応用化学部門バイオ分子工学研究室助教。博士。

■略歴 2012年東京大学大学院農学生命科学研究科博士過程修了。同年米国農務省林産研究所（JSPS特別研究員）。13年理化学研究所（JSPS特別研究員PD）。15年北海道大学大学院農学研究大学院特別研究員。16年北海道大学大学院工学研究院応用化学科助教。現在に至る。

■研究テーマと抱負 菌類による植物の分解機構を明らかにすることから、植物バイオマスの利用技術の開発を行っています。

■趣味 子育て、温泉。

### ●高須賀 太一（たかすか たいち）

北海道大学大学院農学研究大学院連携部門ゲノム生化学研究室助教。博士。

■略歴 2009年米国パデュー大学理学部生化学学科博士課程修了。同年米国ウィスコンシン大学生化学部門ポスドク、米国エネルギー省GLBRCバイオマス分解部門研究員（兼任）。14年北海道大学大学院農学研究大学院テニユア・トラック助教。現在に至る。

■研究テーマと抱負 研究室始動から3年目、研究活動と教育活動に邁進します。

■ウェブサイト [http://www.agr.hokudai.ac.jp/Takasuka/index\\_en.html](http://www.agr.hokudai.ac.jp/Takasuka/index_en.html)

■趣味 喫茶店へ行くこと。