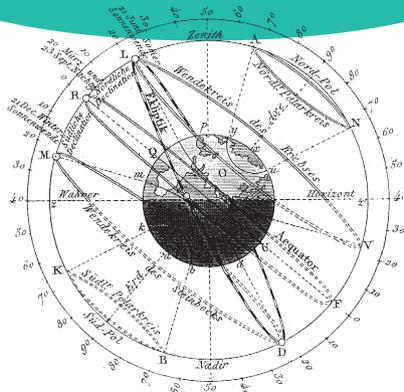


## 【解説】



【2018年農芸化学女性研究者賞】

# 海洋微生物からの有用機能の探索とその応用 生活や環境保全に微生物酵素を役立てる

大田ゆかり

太陽光エネルギーが利用可能な地球表層では、光合成一次生産を基軸とする豊かな生命圏が維持されている。海洋表層で生産された有機物に加え、陸域有機物の一部も海洋沿岸や河川を通じて海域に流入して混ざり合う。海域表層の有機物の大部分は、浅海でさまざまな生物代謝を受けながら短いターンオーバーでリサイクルされ、その一部が残渣として海底に堆積する<sup>(1)</sup>。海底の残渣に依存した従属栄養型の微生物の中には多くの生物では処理しきれない難分解性有機物を何らかの形で利用する機能をもつことが期待される。そこで、われわれは深海を含むさまざまな海域から難分解性有機物を分解する細菌や酵素を探索し、その利用法の提案を行ってきた<sup>(2,3)</sup>。

## 海藻多糖分解酵素の利用

### 1. アガラーゼ

アガロース（寒天）は、テングサやオゴノリなどの紅藻類の細胞壁成分であり、D-ガラクトースと3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースが $\alpha$ -1,3、 $\beta$ -1,4結合で交互につながっ

たヘテロ多糖であり、多くの微生物にとっては難分解性有機物の一つである。アガロースをオリゴ糖サイズにまで切断して得られる「寒天オリゴ糖」には、さまざまな優れた生理的機能があることが報告されている<sup>(4)</sup>ことから、われわれはアガロース切断酵素（アガラーゼ）を深海由来細菌より探索した。その結果、アガロースの $\alpha$ -1,3結合を切断してアガロオリゴ糖を生産する酵素「 $\alpha$ -アガラーゼ」、 $\beta$ -1,4結合を切断して、ネオアガロオリゴ2,4,6糖をそれぞれ生成する複数の「 $\beta$ -アガラーゼ」を取得した。そのうちの一つ、*Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94<sup>T</sup>株に由来する $\beta$ -アガラーゼはとりわけ高い耐熱性をもっていた<sup>(5)</sup>。現在、本酵素は遺伝子試薬メーカーから遺伝子研究用試薬として販売されている。本アガラーゼは、アガロースゲル電気泳動で分離したDNA断片の回収に利用することができる。あらかじめ加温溶解したゲルにアガラーゼを混ぜるだけという簡便な操作で、ゲルは不可逆的に可溶化される。特に高分子DNAを損傷することなく効率良く回収ができる点（160 kbまで確認済み）、実験操作で発生するプラスチックごみを最小限に抑えられる点、有毒試薬を使用しない点で、従前の使い捨ての精製カラムと変性剤を併用する

Screening and Development of Biological Functions of Marine Microbes: Application of Microbial Enzymes to Our Life and Environment  
Yukari OHTA, 国立研究開発法人海洋研究開発機構 (JAMSTEC)

## ◇◇◇ コラム ◇◇◇

私たちは普段からたくさんの酵素のお世話になっています。体の中で働く酵素が私たちの生命活動を支えているのはもちろんですが、産業用の酵素のさまざまなとしては、食品、洗剤、医薬・診断、研究用などが主要な市場を占めています。酵素は、物質が別の物質へと変換されるのに必要な活性化エネルギーを通常10万分～数億分の1も下げて反応を加速する触媒です。その仕組みはとても巧妙にできています。ただ、酵素が万能かと言うとそうではありません。酵素は基本的にはタンパク質でできており、タンパク質はアミノ酸がつながってできています。タンパク質の熱や変性剤に対する強度や反応速度には限界があります。そこで考えられる一つの打開策が、酵素や微生物を使った生物学的方法である「バイオテクノロジー」と化学触媒法や熱などの物理的方法を組み合わせることです。この技術分野は「ホワイトバイオテクノロジー」と呼ばれ、各手法の長所を組み合わせた環境負荷の少ない技術として期待されています。たとえば、私たちの研究グループでは、存在量が多いにもかかわらず有効利用が進んでない再生可能資源である植物バイオマス中のリグニンを原料として、

有用な低分子芳香族化合物を酵素で取り出す研究を行っています。つづいて、取り出した化合物に対して有機合成化学を適用して、バイオの力だけでは作り出せない新しい化合物を作り出そうとしています。

一方、これまでのバイオの限界を超えた優れた機能を酵素や生物そのものに発揮にさせるためにはどうしたら良いのでしょうか？ まず、酵素や生物の限界を決めている要因をしっかりと理解することが必要と考えられます。たとえば、生物が利用するタンパク質を構成するアミノ酸の種類が約20種類と限られていること、その組成は炭素、酸素、水素、硫黄などの元素に限られていること、これらは水の存在する環境でしか安定に機能しないことなどが挙げられます。現存の生物機能の多くは、DNAからRNAへの転写、RNAからタンパク質への翻訳、すなわちセントラルドグマで作られ出されますが、現存の生物機能を超越するために、これを改変していく試みがすでに始まっています。これらの研究や技術の開発には多くの困難や倫理的問題が予想されますが、これらの研究開発が冷静かつ大胆に進んでいくことで次のブレークスルーが生み出されることに大いに期待をしています。

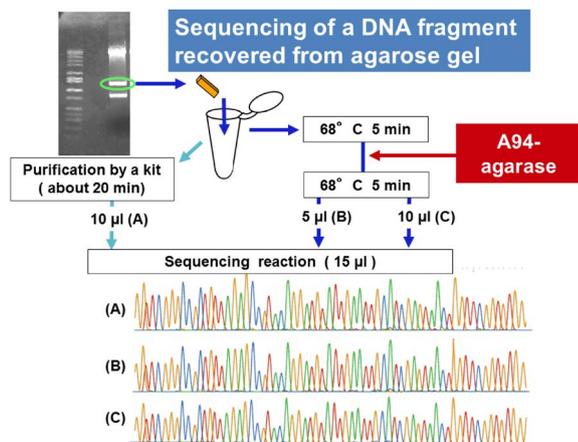


図1 ■ アガラーゼを用いたアガロースゲルからのDNA断片の回収とその利用

手法よりも優れている。回収したDNA断片は、そのまま次の実験に用いることができることから、さまざまな研究機関における遺伝子機能解析・配列解析に活用いただいている（図1）。

## 2. カラギーナーゼ

世界的に古くから食品の増粘剤やゲル化剤として使用される紅藻類の細胞壁多糖にカラギーナンがある。カラ

ギーナンの特徴は硫酸基をもっている点にあり、その構成糖の硫酸基置換パターンに基づき、カップ、イオタ、ラムダ型の3タイプに大別される<sup>(6)</sup>。それぞれの物理的性質が大きく異なっているため、用途に応じて使い分けがなされている。カラギーナンは、原料藻の品種や採取地、生育段階によって、その置換パターンが多種多様に変化する。このため、いわゆるカラギーナンという名称で市場に流通している物は、実際には非常にヘテロな高分子構造を有しており、精密な構造解析は困難である。そこでわれわれは酵素の“基質特異性”を生かした分析手法の開発に取り組んだ。カラギーナン分析手法の確立には、主要な3タイプのカラギーナンそれぞれに対して各構造を厳密に区別して認識する機能、すなわち高精度の基質特異性をもつカラギーナン分解酵素3種を利用できることが鍵であった。われわれは、その3種の酵素を新規性と多様性の高い深海域の細菌から取得することに成功し、つづいてこれら3種の酵素を利用した未知カラギーナンの分析法も開発した<sup>(7)</sup>。本手法は、これまで分析が困難であった飲食品中のカラギーナンの検出・組成分析に極めて有効であった。

これまで、ほとんどの海藻多糖分解酵素は研究室での使用に限定されていたが、現在は地球環境保全へ貢献

するための産業利用技術の開発に期待が寄せられている。地球温暖化や海洋酸性化などの要因である人為的CO<sub>2</sub>の増大につながる化石資源の使用を断ち切るため、太陽光エネルギーで形成された植物バイオマスの体系的利用技術の開発が精力的に行われている。これらを背景として、海洋大型藻類が再生可能原料として注目されるに従い、多様な海藻多糖を分解する優れた微生物や酵素の必要性も急速に増している<sup>(8)</sup>。

### リグニン分解酵素の利用

陸域の植物には主要成分としてリグニンが含まれており、その構造的特性から生物分解が著しく困難な物質と位置づけられる。セルロースに次ぐ第2位の存在量を持ち、地球最大の再生可能な芳香族化合物資源であるとされる。再生可能資源である植物バイオマスを利用しようとするとき、それらのすべての成分を無駄なく利用することが重要である。リグニンは構造が複雑であるため、さまざまな化学品などの有価物に変換できる可能性をもっている。しかしその反面、構造の正確な理解や制御が困難であり、さらに生成物の分離精製にも大きなコストがかかるという難点をもっている。これらを克服するため、植物のリグニンを遺伝子操作によって改変して利用効率を上げる試みや、さまざまな触媒を使った化学的・生物学的手法が開発されている<sup>(9)</sup>。

われわれは、海洋微生物の酵素群を使ったリグニンを原料とする芳香族化合物の生産を実現するため、まず海域からリグニン関連芳香族代謝細菌の分離を試みた。分離源として、駿河湾海底から回収された沈木を選び(図2)、種々のオガクズを人工海水に混ぜ、海底の沈木を模した培地を用いて、本沈木に生息する微生物を培養した<sup>(10)</sup>。また、沖縄県南西諸島海溝に沈設、約1年半後に無人探査機「かいこう7000II」で回収された木材、加えて東北沖深度約5,000mに生息するシロウリガイコロニー付近から「しんかい6500」を使って採取された底泥(図3)からも、同様にリグニン関連芳香族代謝微生物の分離を試みた。ここで単離した細菌に対し、*p*-クマール酸(*p*-coumaric acid)、フェルラ酸(ferulic acid)などのリグニンに関連する芳香族モノマーを基質として、これらを代謝する能力の有無を調べたところ、被検菌株のうちの約4割の株に代謝活性が検出された。これらの微生物の分類学的位置を、16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列に基づき調べたところ、それらのすべてがデータベースに登録された基準株の配列とは異なっており(97~99%の一致性)、各分離株は相互に異なる16S



図2 ■ 穿孔性二枚貝による侵食が進んだ海底沈木



図3 ■ 「しんかい6500」を使った深海底泥の採取

リボソームRNA遺伝子配列をもつ微生物であることがわかった。海域から分離される微生物は陸域で検出される微生物と共通するものも多く存在するが、海洋固有種と位置づけられる微生物も存在した。

単離微生物のうち、*Bacillus*属細菌の代謝物をガスクロマトグラフィーで調べたところ、*p*-クマール酸・フェルラ酸などのフェノール酸からの脱炭酸反応を触媒しており、両化合物に由来するヒドロキシスチレン誘導体を生成していることがわかった。ヒドロキシスチレン誘導体はバイオベースプラスチックの原料としても期待される。

南西諸島海溝に人工的に沈設した木材からは、*Sulfotobacter*属細菌や*Shewanella*属細菌などが分離された。*Sulfotobacter*属細菌は $\alpha$ -プロテオバクテリア門に属する海洋性細菌であり、海洋の炭素や硫黄循環に重要な役割を担う菌、海洋石油汚染域に高頻度で出現する菌としても知られている。上記探索で単離した*Sulfotobacter*属細菌のドラフトゲノム解析を行ったところ、細菌による芳香族化合物代謝の鍵化合物とされるプロトカテク酸(*protocatechuic acid*)の芳香環開裂とその下流代謝の

遺伝子クラスターを検出した。

*Shewanella*属細菌は $\gamma$ -プロテオバクテリア門に属する海洋性細菌であり、細胞膜シトクロームを介して細胞外に電子を出す機能があることで注目されており、発電菌や重金属還元菌、あるいは環境汚染物質（アゾ色素や多環芳香族など）の分解菌として、それらの代謝機構解明や利活用を目指した精力的な研究が行われている。多くの細菌がリグニンに由来する芳香族化合物を酸化分解することが多いのに対し、*Shewanella*属分離株は1分子のフェルラ酸に2つの水素原子を添加する還元代謝を有していた。

*Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis*属細菌などから形成される“スフィンゴモナド”と呼ばれる細菌群は、芳香環を含む難分解性公害物質分解菌として注目されてきた<sup>(11)</sup>。上記探索の過程で単離した*Novosphingobium* MBES04株は、多様な芳

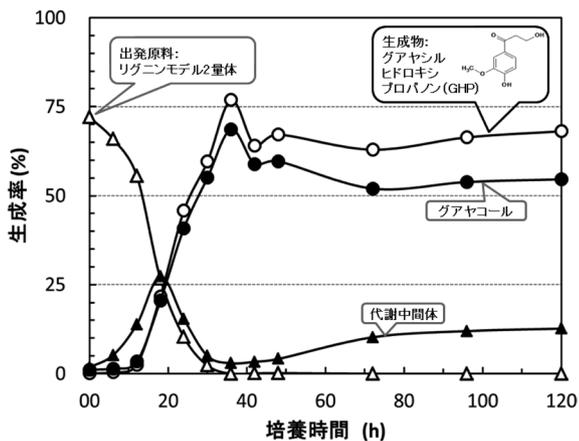


図4 ■ *Novosphingobium* 単離株によるリグニンモデルダイマーのモノマーへの変換

香族モノマー代謝能をもつにとどまらず、guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl etherなどのリグニンモデルダイマー中の $\beta$ -O-4結合を開裂し、モノマーへ変換する能力を有していた(図4)。 $\beta$ -O-4結合はリグニンを構成するモノマー間の最主要結合であり、リグニン変換の重要なターゲットである。MBES04株のゲノムにコードされる遺伝子配列を利用して、 $\beta$ -O-4結合開裂酵素5種を組換え生産し、これらの酵素をワンポットでスギやユーカリから抽出したミルドウッドリグニン(MWL)に作用させることにより、MWLからフェニルプロパン構造を有する芳香族モノマーを生産することに成功した<sup>(12, 13)</sup>(図5)。

フェニルプロパン系化合物は、工業分野においては、香水、香料、精油、殺菌剤、麻酔薬、抗酸化剤などの医薬品や機能性食品およびそれらの合成中間体となる有用な化合物群である。そこでわれわれは上記芳香族モノマーを基幹低分子化合物としてリグニンの有効利用に寄与する可能性を探るために、前述の酵素反応で生産可能な芳香族モノマーの1種であるguaiacylhydroxypropanone (GHP)から誘導可能な化合物の合成について検討を行った(図6)。これまでに、新規な各種ポリマー、たとえば、エポキシ樹脂、ポリカーボネート樹脂、アクリレート樹脂、ポリウレタン、アリアル系オリゴマー、レジストなどの光感受性組成物の製造原料として有望な化合物への誘導化にも成功した。

現在、木材から環境調和型プロセスを経て芳香族モノマーを生産し、さらに新素材「スーパーウルシ」へとつなげるという新しいリグニン有効利用技術の確立に向けて、さらなる研究を展開している。

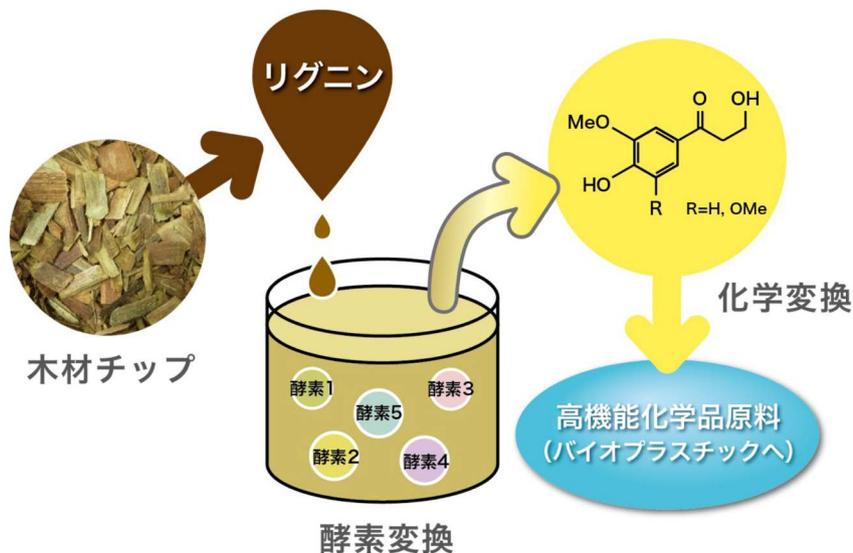


図5 ■ ミルドウッドリグニンからの芳香族モノマーの生産

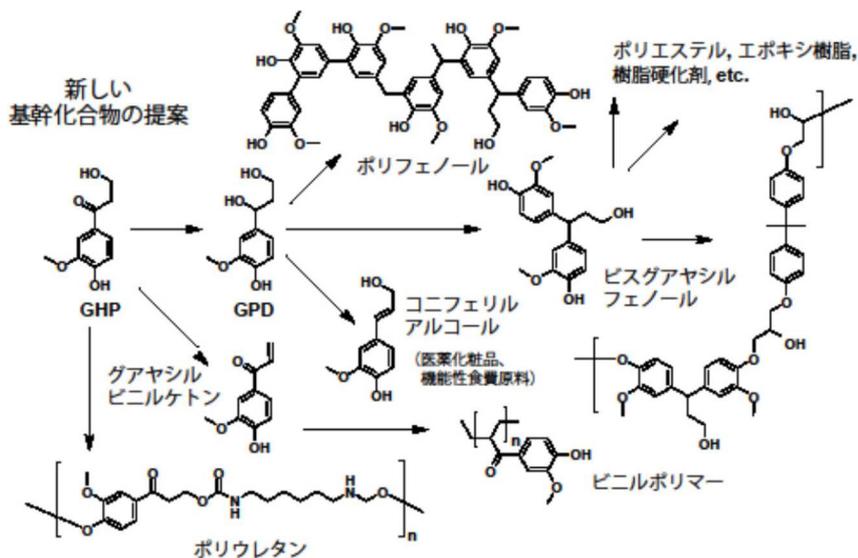


図6 ■ 芳香族モノマー (GHP: グアヤシルヒドロキシプロパノン) からバイオプラスチックへの展開

### 海底下微生物を使ったバイオマス変換

大陸沿岸域の有機物に富む堆積物に生息する膨大な数の嫌気性微生物群集の代謝活動は、地質学的な時間をかけ、地球表層と内部をつなぐ元素循環に重要な役割を果たしている。しかし、その個々の微生物の生理・代謝機能やゲノム進化、生態系が地球環境に果たしてきた役割などについては、いまだ未解明の部分が多い。

地球深部探査船「ちきゅう」を用いた国際深海掘削計画 (International Ocean Discovery Program) 第337次研究航海「下北八戸沖石炭層生命圏掘削調査」の成果によって、海底下深部に埋没した未熟性の石炭 (褐炭) 層から、嫌気バイオリクターを用いて集積培養されたメタン生成を伴う微生物群集は、最終的に余分な栄養源を加えることなく、石炭層に嫌気水を添加するだけで、微生物の増殖とメタン生成することが確認されている<sup>(14)</sup>。

地球最強のリグニン分解生物と考えられている白色腐朽菌は生育やリグニン分解に酸素を必須としており、嫌気環境ではそのいずれも行うことができない。嫌気環境でのリグニンの分解速度は著しく遅いとされ、これまで研究の対象とされることはほとんどなかった。しかし一部の先駆的な研究においては、海底下微生物群集が、リグニン由来芳香族モノマーのメトキシ基を炭素源として、酢酸を生成する可能性や土壌微生物群集が芳香族モノマーを原料として、酢酸を中間体とするメタン生成代謝ネットワークを有すること<sup>(15)</sup>などが議論されている。酢酸生成微生物のマーカー酵素として、ホルミルテトラ葉酸合成酵素が挙げられる。興味深いことに、好気性の $\alpha$ -プロテオバクテリウム門に属する *Sphingomonas* 属細菌が行う芳香族モノマーメトキシ基からの脱メチル反応

には、同酵素が関与することが報告されている<sup>(16)</sup>。さらに、そのほかの硫酸還元能やメチル基資化能をもつ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ -プロテオバクテリア門細菌の保有する一部の酵素においても、酢酸生成アーキアのもつ同酵素群との高い類似性が見いだされている<sup>(17)</sup>。

われわれは最近、上述の嫌気バイオリクター集積微生物群集を用いて、好気から嫌気環境へ変化する条件の下、リグニンモデル2量体化合物メトキシ基からの非常に迅速な脱メチル化が起きることを観察した。また近年われわれが深海沈木から単離した、リグニン主要結合を還元開裂する MBES04 株は好気条件下で生育するものの、リグニン主要結合の開裂においては還元型グルタチオンを水素供給源とする還元開裂を行う。本開裂反応は正味の物質の出入りを伴わない点で、酸素添加を基本とするリグニンパーオキシダーゼなどによる酸化リグニン変換とは異なっている。

### 組換えタンパク質高生産系の開発

われわれは酵素の探索・開発と並行して、酵素利用に重要な技術として *Bacillus* 属細菌を宿主とする組換えタンパク質高生産システムの開発を行ってきた。プラスミドに挿入した目的遺伝子の発現調節には極限環境や海域から分離した細菌のゲノム配列の一部を活用した。目的遺伝子上流に *Bacillus* sp. strain JAMB-750 のマンナーゼ遺伝子のプロモーター配列、下流に *Thalassomoas* sp. strain A33 のアガラーゼ遺伝子のターミネーター配列を配置し、これにランダムな変異を多重に加えていくことで、効率的な組換えタンパク質分泌生産を実現することができた<sup>(18)</sup>。通常組換えタンパク質生産には、プ

ラスミド上の目的遺伝子を安定に保持するために、同プラスミドに抗生物質耐性遺伝子を連結し、微生物培養培地には抗生物質を添加する。この方法を大規模に産業利用する場合には、抗生物質や抗生物質耐性遺伝子の環境への拡散を厳重に防ぐ設備が必須となり、大きな生産コスト増となる。そこで、われわれは生育必須遺伝子の一つとして、宿主自身もつトリプトファン-tRNA合成遺伝子をプラスミド上に配置し、同遺伝子を宿主染色体から欠損させた宿主ベクター系を新たに開発した。この系では培地中に抗生物質添加は不要であり、栄養を制限することなく、安価な培地で高密度培養と組換えタンパク質の高生産が可能であった。

### おわりに

難分解性有機物を分解する酵素をはじめとする優れた生物機能は、海域や海底下を含めた地球の至る所に存在する。全地球には未培養の多くの微生物が存在する。さらに単離した菌株を育種するさまざまな手法は目覚ましい速度で進展している。今後の微生物機能の探索・開発にさらなる大きな発展を期待したい。

### 文献

- 1) C. L. Follett, D. J. Repeta, D. H. Rothman, L. Xu & C. Santinelli: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 16706 (2014).
- 2) 秦田勇二, 小西正朗, 大田ゆかり: “極限環境生物の産業展開”, シーエムシー出版, 2012, p. 190.
- 3) 秦田勇二, 能木裕一, 大田ゆかり: “酵素利用技術体系”, エヌ・ティー・エス出版, 2010, p. 250.
- 4) 有賀 修, 岡本直樹, 井上貴由, 久保 元, 森山浩憲: *応用糖質科学*, **2**, 142 (2012).
- 5) Y. Ohta, Y. Nogi, M. Miyazaki, Z. Li, Y. Hatada, S. Ito & K. Horikoshi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1073 (2004).
- 6) F. van de Velde, S. H. Knutsen, A. I. Usov, H. S. Rollema & A. S. Cerezo: *Trends Food Sci. Technol.*, **13**, 73 (2002).

- 7) 秦田勇二, 大田ゆかり: 公益財団法人アサヒグループ学術振興財団—研究助成報告, **22**, 23 (2008).
- 8) K. A. Jung, S. R. Lim, Y. Kim & J. M. Park: *Bioresour. Technol.*, **135**, 182 (2013).
- 9) A. J. Ragauskas, G. T. Beckham, M. J. Biddy, R. Chandra, F. Chen, M. F. Davis, B. H. Davison, R. A. Dixon, P. Gilna, M. Keller *et al.*: *Science*, **344**, 1246843 (2014).
- 10) Y. Ohta, S. Nishi, T. Haga, T. Tsubouchi, R. Hasegawa, M. Konishi, Y. Nagano, Y. Tsuruwaka, Y. Shimane, K. Mori *et al.*: *Open J. Mar. Sci.*, **2**, 177 (2012).
- 11) A. Stolz: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 793 (2009).
- 12) Y. Ohta, S. Nishi, R. Hasegawa & Y. Hatada: *Sci. Rep.*, **5**, 15105 (2015).
- 13) Y. Ohta, R. Hasegawa, K. Kurosawa, A. Maeda, T. Koizumi, H. Nishimura, H. Okada, C. Qu, K. Saito, T. Watanabe *et al.*: *ChemSusChem*, **10**, 425 (2017).
- 14) H. Imachi, K. Aoi, E. Tasumi, Y. Saito, Y. Yamanaka, Y. Saito, T. Yamaguchi, H. Tomaru, R. Takeuchi, Y. Morono *et al.*: *ISME J.*, **5**, 1751 (2011).
- 15) M. A. Lever, B. Verena, Y. Heuer, Y. Morono, N. Masui, F. Schmidt, M. J. Alperin, F. Inagaki, K. U. Hinrichs & A. Teske: *Geomicrobiol. J.*, **27**, 183 (2010).
- 16) T. Abe, E. Masai, K. Miyauchi, Y. Katayama & M. Fukuda: *J. Bacteriol.*, **187**, 2030 (2005).
- 17) M. A. Lever: *FEMS Microbiol. Ecol.*, **84**, 1 (2013).
- 18) 秦田勇二, 大田ゆかり, 日高祐子, 中村信之, 特許第5126879号, 新規DNA断片およびそれを含む組換えベクター, それらによって形質転換された形質転換体, ならびにそれらの利用

### プロフィール



大田 ゆかり (Yukari OHTA)

<略歴>1993年広島大学大学院医学系研究科分子薬学専攻博士課程単位取得退学/2005年工学博士取得/2007年JAMSTEC 研究員/2016年同グループリーダー代理, 現在に至る<研究テーマと抱負>難分解性有機物に対する海洋微生物代謝の理解とその利活用<趣味>散歩, 料理<所属研究室ホームページ><http://www.jamstec.go.jp/rcmb/j/>

Copyright © 2019 公益社団法人日本農芸化学会  
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.57.167