

公益財団法人 立松財団 御中

様式 2021A1,A2,B

2021年 07月 06日

所属: 三重大学

氏名: 市川俊輔



2020 年度 助成

研究 終了 報告書

※ゴシック文字で記入下さい。

研究テーマ	バイオリファイナリーに向けた細菌のセルロース系バイオマス糖化メカニズムの解明
研究の結果	<p>① セルロース分解細菌の MV 生産とセルロース分解活性に対する機能 申請者は、<i>C. thermocellum</i> が培養液中に小胞状の構造物 (Membrane vesicle: MV) を放出していることを確認した。<i>C. thermocellum</i> はセルロース分解酵素複合体「セルロソーム」を構築することで、セルロースを効率よく分解することが知られているが、申請者はセルロソームが MV 表面に局在していることを発見した。細菌のセルロース分解能と MV 機能の関係は、これまで全く明らかになっていなかった。細菌由来界面活性化合物サーファクテンは、MV の破砕効果を有する。また超音波処理は生体膜を破砕するのに利用される。これら破砕処理後に MV の構造が破壊されることを、電子顕微鏡によって確認した。MV 破砕処理前後の結晶セルロース・可溶性セルロースの分解活性を比較することで、MV 構造のセルロース分解活性への寄与を明らかにした。</p> <p>② MV 中の化合物の細胞間コミュニケーションに対する機能 細胞間のコミュニケーションは、<i>C. thermocellum</i> のセルロース分解活性にとって重要だと予想される。細菌の放出する脂質二重層膜からなる小胞は、タンパク質・核酸・シグナル伝達化合物などの様々な分子を運ぶことによって、細胞間コミュニケーション・遺伝子水平伝搬・定着性・病原性などに寄与する。申請者は、破砕処理した MV を添加することにより、<i>C. thermocellum</i> の増殖速度を大きく向上できることを明らかにした。また <i>C. thermocellum</i> 増殖促進作用について、モデル土壌細菌 <i>Bacillus subtilis</i> 由来 MV でも観察された。<i>B. subtilis</i> 遺伝子欠損株ライブラリを用いることで、特に <i>yxeJ</i> 遺伝子欠損変異体は <i>C. thermocellum</i> 増殖促進作用を失っていることを明らかにした。<i>C. thermocellum</i> MV 破砕処理前後で検出される化合物、また <i>B. subtilis</i> 野生株と <i>yxeJ</i> 欠損株の培養液中の化合物を比較することで (メタボローム解析)、<i>C. thermocellum</i> 増殖促進作用のある候補化合物を明らかにした。</p> <p>③ セルロース分解酵素のイオン液体に対する安定性と分解活性の抜本的な向上効果 セルロース分子は互いに会合して結晶構造を構築しているため、酵素分解反応の効率は悪い。結晶セルロースの粉末を、イオン液体のひとつ 1-Ethyl-3-methylimidazolium Acetate (EMIMAc) に添加して加熱溶解し、水に添加することで、その結晶構造を壊すことができる。イオン液体処理したセルロースの酵素分解反応性は大きく向上することが知られているが、一方で残存イオン液体が酵素分子の働きも阻害してしまうことが問題になっている。本研究においても、市販セルロース分解酵素剤 Celluclast は 10-30%イオン液体存在条件では、そのセルロース分解活性が大きく減少してしまうことを確認した。一般的に、耐熱性の高い酵素の安定性は高い傾向にある。本研究で着目している細菌 <i>C. thermocellum</i> が生産するセルロース分解酵素は高い耐熱性 (最適温度 60°C) を持っていることも特徴的である。<i>C. thermocellum</i> 培養液から回収したセルロース分解酵素は、イオン液体 10-30%残存状況でむしろセルロース分解活性が向上していることを明らかにした。10%イオン液体残存条件において、市販セルロース酵素でのセルロース分解活性向上効果は認められなかった。一方で、<i>C. thermocellum</i> 培養液から回収したセルロース分解酵素のセルロース分解活性は約 15 倍向上することが明らかになった。同様にイオン液体処理した粉碎トウモロコシ葉の、<i>C. thermocellum</i> 由来セルロース分解酵素の分解活性は約 140 倍向上した。以上の通り、<i>C. thermocellum</i> セルロース分解酵素はイオン液体中で安定であり、イオン液体処理セルロース系バイオマスの分解活性を抜本的に向上できることを明らかにした。</p>
研究発表 (実績)	Metabolome analysis of constituents in membrane vesicles for <i>Clostridium thermocellum</i> growth stimulation. Shunsuke Ichikawa, Yoichiro Tsuge, Shuichi Karita. Microorganisms. 9: 593. 2021.