

シュガープラットフォームを構築する環境バイオ技術： *Clostridium cellulovorans* セルロソームによるソフトバイオマス完全糖化

Environmental Biotechnology for Construction of Sugar Platform: Complete Saccharification by the *Clostridium cellulovorans* Cellulosome

山本 康介¹, 田丸 浩^{1,2,3*}
KOUSUKE YAMAMOTO and YUTAKA TAMARU

¹ 三重大学大学院生物資源学研究科 〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577

² 三重大学生命科学研究支援センター 〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577

³ 三重大学新産業創生研究拠点 〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577

* TEL & FAX: 059-231-9560

* E-mail: ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

¹ Department of Life Sciences, Mie University Graduate School of Bioresources,
1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan

² Department of Bioinformatics, Mie University Life Science Research Center, Laboratory of Applied Biotechnology,
1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan

³ Mie University Industrial Technology Innovation Institute, 1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan

キーワード: バイオマス, *Clostridium cellulovorans*, セルロソーム, 一環生産プロセス, 酵素再利用

Key words: biomass, *Clostridium cellulovorans*, cellulosome, Consolidated Bioprocessing, enzymes recycling

(原稿受付 2012年10月10日/原稿受理 2012年10月18日)

1. はじめに

世界人口の増加やそれに伴う発展途上地域での急速な工業発展のためのエネルギー需要などの増加によって、食料およびエネルギーの安定的な確保が世界的な課題となっている。さらに、2011年3月に発生した東北地方太平洋沖地震によって引き起こされた福島第一原子力発電所の事故を受け、安全でクリーンなエネルギー源確保の重要性が世界的にも強く再認識された。そして現在、上記の諸問題の解決に対する再生可能エネルギーの必要性が世間一般に浸透しだし、それに関する実際的な研究成果が求められる局面に差し掛かっている。また、2012年に資源エネルギー庁を中心とした「我が国におけるエネルギーと環境の未来に関する3つのシナリオ」において、その提示の前提には「再生可能エネルギーを最大限引き上げ、省エネルギーを進める」とある。今やバイオリファイナリーは学者の気まぐれな発想ではなく、国を挙げて優先的に取り組むべき重要テーマとなってきた。そこで本稿では、草本系(ソフトバイオマス)を中心としたセルロース系バイオマスを高効率で分解する*Clostridium cellulovorans*を用いたバイオリファイナリーへの実践的アプローチについて紹介したい。

2. *Clostridium* 属とバイオリファイナリー研究

Clostridium 属は自然界に普遍的に存在し、バイオマスの分解者として存在する種も古くから単離され、研究されてきた(表1)。それらの特徴としては、グラム陽性の嫌気性菌であり、孢子形成を行う。さらに、いくつかの種は“セルロソーム”と呼ばれる植物多糖分解活性の極めて高い酵素複合体を形成することが知られている¹⁾。ABE発酵で有名な*Clostridium acetobutylicum*をはじめとして、C5・C6糖を有用物質(アルコール類、有機酸、水素など)に発酵する種もいくつか存在することから、多くの研究者が*Clostridium* 属のバイオリファイナリーへの応用に注目した。また特に、アメリカでは多くの*Clostridium* 属ゲノムプロジェクトが行われ、その数は2002年以降のものだけで100種を超えた。このように、*Clostridium* 属における研究の国際的な競争が激化している中で、我々のグループは米国エネルギー省主導のJoint Genome Instituteに先駆けて、2010年に*C. cellulovorans*の全ゲノム解読を完了した²⁾。

3. セルロース系バイオマスの特徴

稲わらやバガス、コーンストーバーなどの非食料であるセルロース系バイオマスからのバイオリファイナリーは、その主要構成成分であるセルロース、ヘミセルロース

スなどを目的生産物の前駆体である C5・C6 糖などの単糖類にまで分解する必要がある (図 1)。しかしながら、セルロース系バイオマスはそれぞれの構成成分が複雑に絡み合っており、その糖化は容易ではない。そこで微粉碎や爆砕、高圧熱水処理、酸・アルカリ処理などさまざまな前処理法が開発されてきたが、大量処理とコスト削減が問題となっている。一方、糖化に関してはバイオマスの種類はもとより、バイオマスの構成成分は季節や産地によって変動することから、それに伴って糖化用の酵素成分を調整する必要がある。我々が研究対象とする *C. cellulovorans* は、未処理の稲わらやバガスを炭素源として生育することができ、かつ、これらバイオマスを分解することができる。また、与えられたバイオマスに対応してより分解活性の高いセルロソームを構築することが知られており、上記のようなバイオマス特有の課題に対して有効である³⁾。

4. ゲノム解読が明らかにした *C. cellulovorans* の植物細胞壁分解戦略

解読したゲノム情報を詳しく解析すると、*C. cellulov-*

表 1. 自然界から単離されたセルロース分解性 *Clostridium* 属

Anaerobic (complexed or non-complexed cellulases)	
1.1. Psychrophilic/psychrotolerant	
<i>Clostridium</i> sp. PXYL1	Cattle manure
1.2. Mesophilic	
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Soil
<i>Clostridium aldrichii</i>	Wood digester
<i>Clostridium cellobioparum</i>	Soil
<i>Clostridium cellulofragmentans</i>	Soil
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Rot grass
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Wood chips
<i>Clostridium herbivorans</i>	Pig intestine
<i>Clostridium hungatei</i>	Soil
<i>Clostridium josui</i>	Comp
<i>Clostridium papyrosolvans</i>	Paper mill
1.3. Thermophilic	
<i>Clostridium thermocellum</i>	Comp, Soil

complexed cellulases, セルロソームのような酵素複合体。
non-complexed cellulases, 酵素複合体を形成しない単一酵素。
Y. Tamaru et al.: Environ. Technol. 2010

vorans 特有のバイオマス分解戦略が浮かび上がってきた。*C. cellulovorans* のゲノムサイズは約 5.1 Mbp であり、4,220 遺伝子をコードしていた。そのうち、新規の骨格タンパク質 (CbpB, CbpC) やさまざまな多糖分解関連酵素を含めて、セルロソーム関連の遺伝子数は合計 57 種類が特定された。*C. cellulovorans* のゲノムを他のセルロソーム生産 *Clostridium* 属と比較すると、ゲノムサイズが最も大きく、コードされる遺伝子数も最も多かった (表 2)⁴⁾。さらに、*C. cellulovorans* のセルロソーム関連の多糖分解酵素の遺伝子数は他のセルロソーム生産 *Clostridium* 属のそれと比べて少なく、ゲノム解読結果の予想に反していた。また、セルロソームを形成しないノンセルロソームな多糖分解酵素をコードする遺伝子が多いことが判明した (表 3)。以上のことから、*C. cellulovorans* は酵素活性の高いサブユニットを含むセルロソームと多種多様なノンセルロソーム酵素を組み合わせによって、ソフトバイオマスを高効率で分解していると考えられた。

5. プロテオーム解析から学ぶ

C. cellulovorans がセルロース系バイオマスを分解するときに選択的に生産される酵素成分を調べることによって、そのバイオマスの分解に必要な酵素を特定できると考えた。そこで我々は、生産されたセルロソームを回収・精製し、ゲノム情報をもとにプロテオーム解析を行う系を確立した。すなわち、セルロース系バイオマス (稲わら・バガス) の分解に寄与すると考えられる酵素を同定した (図 2)。この方法は *C. cellulovorans* が生育、分解するバイオマスならばどんなものにも適用可能であり、実際にバイオマスを分解するために必要な酵素成分の情報を得ることができる。以上の結果は、*C. cellulovorans* の保有する酵素群の多様性と選択的なセルロソームにおける相乗効果によって実バイオマスの分解が可能になると考えられ、ゲノム情報と連結させることで有用な酵素遺伝子のスムーズな利用を実現できる。

6. セルロソームの再利用

セルロース系バイオマスの分解に必要な糖化用酵素のコスト低減する方法として、酵素の再利用はとても有効である。セルラーゼのなかには、糖質結合モジュール

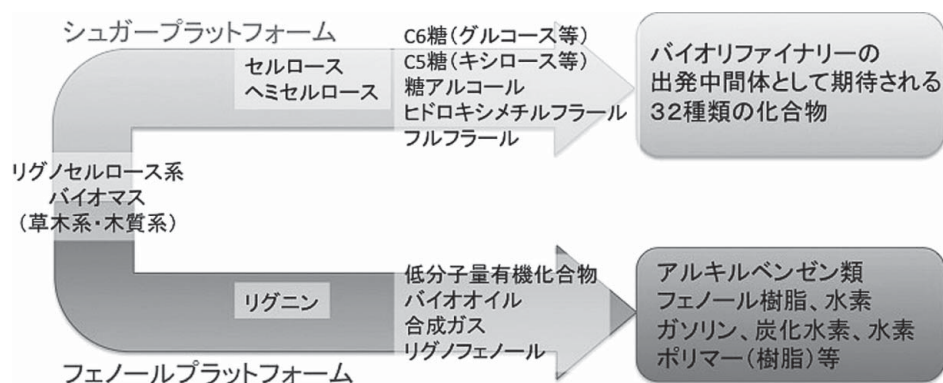


図 1. シュガープラットフォームおよびフェノールプラットフォーム

表 2. セルロソーム生産 Clostridium 属におけるゲノム情報の比較

Organism	GenBank accession No.	Genome size (Mb)	No. genes	No. cellulosomal genes	%GC
<i>C. cellulovorans</i> 743B	DF093537-DF09355	5.10	4220	57	31.1
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AE001437	3.94	3672	12	30.9
<i>C. cellulolyticum</i> H10	CP001348	4.07	3390	65	37.4
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	CP000568	3.84	3191	84	39.0

Y. Tamaru et al.: Microb. Biotechnol. 2010

表 3. セルロソーム生産 Clostridium 属における糖質分解酵素の比較

Organism	Total GHs+PLs	Cellulosomal GHs and PLs		Non-cellulosomal GHs and PLs	
		GHs	PLs	GHs	PLs
<i>C. cellulovorans</i> 743B	92 (100%)	27 (29%)	2 (2%)	53 (58%)	10 (11%)
<i>C. cellulolyticum</i> H10	89 (100%)	43 (48%)	4 (5%)	42 (47%)	0 (0%)
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	67 (100%)	49 (73%)	4 (6%)	14 (21%)	0 (0%)

GH: Glycosyl Hydrolases; PLs: Polysaccharide lyases.

Y. Tamaru et al.: Microb. Biotechnol. 2010

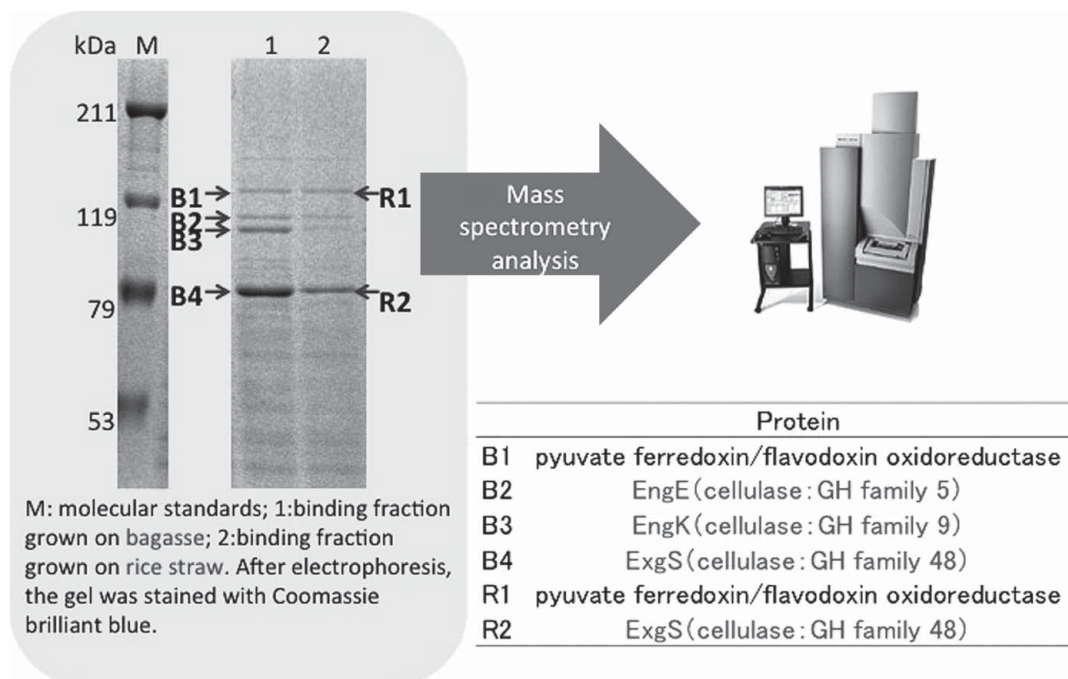


図 2. 精製セルロソームからの酵素同定

(Carbohydrate-Binding Module: CBM) を保有するものがあり、CBM を介して酵素をセルロースに吸着させて回収することが可能である。*C. cellulovorans* の場合、セルロソームは主に骨格タンパク質 CbpA を足場タンパク質として構築され、CbpA の N 末端側には CBM ファミリー 3A (CBM3A) がある (図 3)。そこで、結晶性セルロースに吸着した CbpA を回収することで、それと同時に CbpA に結合している酵素サブユニットも併せて回収することができる。古紙を用いたセルロソーム再利用試験では、培養液中のセルロソームを古紙に吸着・沈殿させ、分解したグルコースやセロビオースを含

む上清部分を回収し、さらに培地を追加することによって古紙を連続糖化することに成功した (図 4)⁹⁾。

7. おわりに

セルロース系バイオマスのバイオリファイナリーを実用的なレベルで実現するためには、バイオマスの前処理・糖化・発酵のプロセスにおける技術的ブレイクスルーが不可欠であり、その技術には多種多様なバイオマスに対応する技術開発が必要になるだろう。*C. cellulovorans* の潜在的なセルロース系バイオマス分解能力の

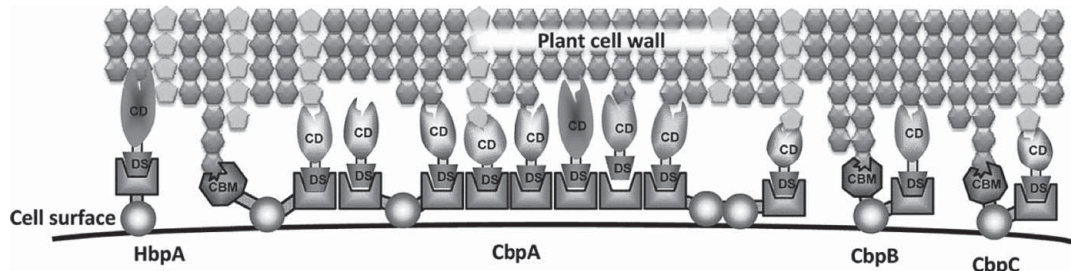


図3. *C. cellulovorans* のセルロソームの模式図 (図中の CBM は CBM ファミリー 3A を示す.)

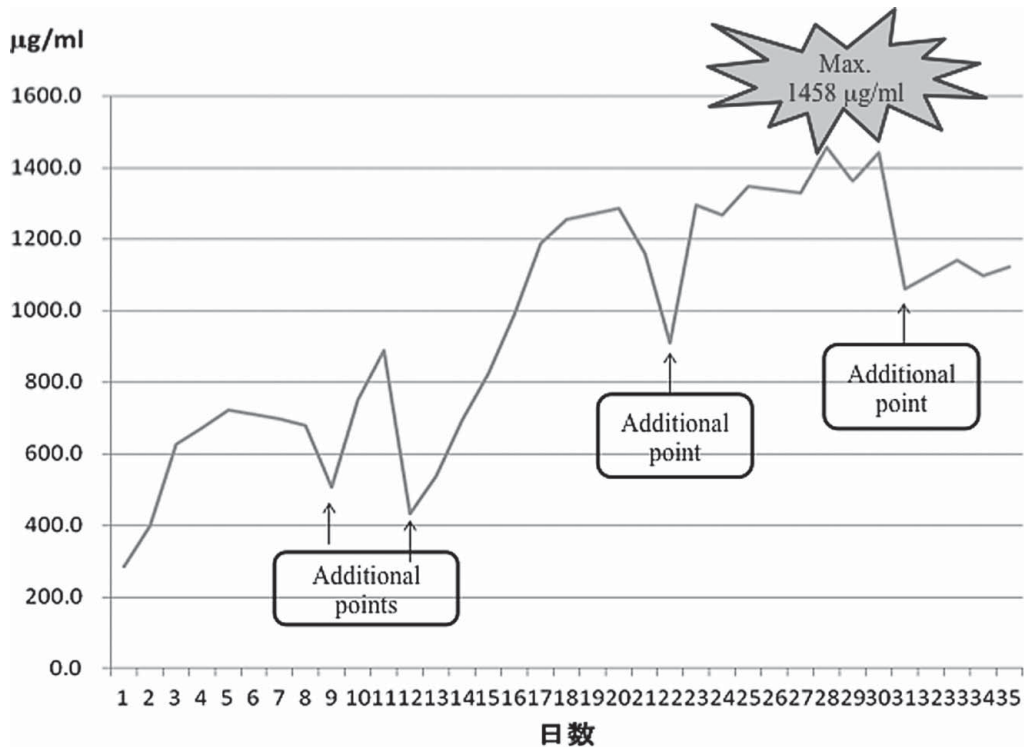


図4. 古紙を用いた *C. cellulovorans* の連続培養における培養上清中のグルコースの測定

高さは以前から注目されてきたが、ゲノム解読と実バイオマスをを用いた実践的プロセスを検証することで、その有効性を示唆するデータが次々と得られてきた。また、*C. cellulovorans* は実バイオマスの分解のみならず、代謝産物としてバイオリファイナリーで期待される多くの出発中間体を生産することも分かってきた。バイオリファイナリー研究はバイオ技術の集合体であり、*C. cellulovorans* はその各場面において大いに活用できると期待している。

文 献

- 1) Doi Roy H. and Yutaka Tamaru. 2001. The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity. Chem. Rec. 1(1): 24–32.
- 2) Tamaru Yutaka, Hideo Miyake, Kouichi Kuroda, Akihito

- Nakanishi, Yujiro Kawade, Kousuke Yamamoto, Masaaki Uemura, Yasuhiro Fujita, Roy H. Doi, and Mitsuyoshi Ueda. 2010. Genome Sequence of the Cellulosome-Producing Mesophilic Organism *Clostridium cellulovorans* 743B. J. Bacteriol. 192(3): 901–902.
- 3) Han Sung O., Hideaki Yukawa, Masayuki Inui, and Roy H. Doi. 2005. Effect of carbon source on the cellulosomal subpopulations of *Clostridium cellulovorans*. Microbiology. 151(Pt 5): 1491–1497.
- 4) Tamaru Yutaka, Hideo Miyake, Kouichi Kuroda, Akihito Nakanishi, Chiyuki Matsushima, Roy H. Doi, and Mitsuyoshi Ueda. 2010. Comparison of the mesophilic cellulosome-producing *Clostridium cellulovorans* genome with other cellulosome-related clostridial genomes. Microb. Biotechnol. 4(1): 64–73.
- 5) 川出雄二郎, 田丸 浩. 2012. 第25章 セルロソームの回収・再利用法の開発. pp.247–251. 近藤昭彦, 天野良彦, 田丸 浩監修, バイオマス分解酵素研究の最前線—セルラーゼ・ヘミセルラーゼを中心として—. シーエムシー出版.