

バイオマスの生分解を促進する試み

大宮邦雄・河津 哲*・孫 嘉琳・木村哲哉・荻田修一**・粟冠和郎

三重大学生物資源学部応用微生物学研究室・王子製紙(株) 森林資源研究所

**三重大学遺伝子実験施設

Acceleration of Fibrous Biomass Degradation by Bacterial Enzymes

Kunio OHMIYA, Tetsu KAWAZU*, Jialin SUN, Tetsuya KIMURA, Shuichi KARITA**
and Kazuo SAKKA

Applied Microbiology, Mie University School of Bioresources, Kamihama-cho, Tsu, 514

*Oji Paper Co., Ltd., Forestry Research Institute, Nobono-cho, Kameyama, Mie 519-02

**Center for Molecular Biology and Genetics, Mie University, Kamihama-cho, Tsu, 514 Japan

Summary

Since biomass photosynthesized from CO₂ and H₂O is one of the most predominant storage sites of solar energy, its effective utilization will be essential to overcome the shortage of foods and energy in future. Relaxation of biomass tissue is focused to enhance solubilization by expressing fiber-degrading enzyme genes in plants.

A xylanase gene from *Clostridium thermocellum* was highly expressed in tobacco plant (4%) without apparent defects in the growth. Another xylanase from *Clostridium stercorarium* was also expressed well in tobacco suspension cells and degraded the host's insoluble cell wall fraction.

A cellulase from a rumen bacterium expressed in tobacco suspension cells promoted protoplast formation efficiency of the transgenic cells. A thermostable (1, 3-1, 4)- β -glucanase gene was expressed in the grains of transformed barley after modifying codon usage.

The results obtained from these enzyme expressions in plants suggest the relaxation of plant tissue which may enhance solubilization of tough biomass.

Key words : Fibrous biomass, cellulase, xylanase, *Clostridium*, rumen bacteria

炭酸ガスと水から光合成される植物繊維成分は太陽エネルギーの貯蔵庫とも考えられる。したがって、植物繊維成分の有効利用が将来の食資源やエネルギー不足の一助になることは、これら繊維を低分子化すればグルコースその他の糖が得られることから十分理解できる。この観点に基づいてセルラーゼ関連酵素による未利用バイ

オマスの分解可溶化が種々試みられている。しかし、これらの多くは難分解性であるため、その効率化が模索されている。とりわけ、分解能の高いセルラーゼの探索とそれらの効率的な生産法の改良が今日でも営々と続けられ、新しい酵素の特性が次々と明らかにされている。これに加えて、最近ではこれら繊維分解酵素の酵素遺伝子が250種以上もクローニングされ、これを利用して酵素蛋白質や微生物の機能改良が遺伝子組換え技術を用いて種々試みられており、この学問分野の進展には目を見張

るものがある¹⁻²⁾。それにも関わらず、十分満足できるバイオマス利用法が確立されているとはいいがたい。この最大の原因は、植物組織の構造的な堅固さにある。この点へのアプローチは、強酸による溶解、ボールミルの磨砕、高温高圧による爆砕などが検討され、かなりの成果が得られている。これとは別に、最近、この植物組織の「ゆるみ」をめざし植物繊維分解酵素遺伝子の植物体への組込みに関する研究がされ始めたので、2, 3 紹介する。これらの研究を通じて、バイオマスの「生合成の過程」に「生分解要因(セルラーゼ関連酵素)」を導入することにより堅固な植物組織に「ゆるみ」を引き起こさせ、これがバイオマスの可溶化利用の効率化に繋がる可能性を論議したい。

1. タバコ細胞におけるキシラナーゼの発現

生合成機能を持つすべての生命体(バイオマス)は生分解機能をも備えており、この2つの機能がどちらに偏っているかによって、生育期、成熟期、及び衰退期に見られるごとき生育曲線を描く。個々のバイオマスによってその曲線のかたちは異なるので、異質のバイオマスが存在する。もし、生合成機能の盛んな時期に生分解機能を高めるような操作を加えたらバイオマスの特性はどのように変化するのか? この様な変異の導入をバイオマス利用上の観点から検討している例はあまり見られない。

Clostridium thermocellum 由来のキシラナーゼ遺

伝子 (*xynZ*) をタバコ植物体 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) に *Agrobacterium tumefaciens* の組換え系を用いて組込んだ研究をまず紹介する³⁾。このキシラナーゼ (*XynZ*) は特異的にキシランを分解する酵素で、セルラーゼ活性を全く有していない耐熱酵素である⁴⁾。したがって、本酵素で処理すれば、植物繊維のセルロース含量を高めることができる。また、70°C付近で最大活性を示すので常温での相対活性は1/4以下と低い。このため、植物体内でこの遺伝子を発現させてもそのキシラン分解活性はさほど高くなく、その発現量が多くても植物体の生育には影響しないことが期待される。この判断に基づいて、*XynZ* の遺伝子 (*xynZ*) のタバコでの発現が試みられている。*xynZ* は2500塩基対(bp)からなり、90kDの蛋白質をコードしている(Fig. 1)⁵⁾。このうちC末端側の1000bpが活性発現に必要であることがトランシェーション解析で判明したので、この領域のみをPCR法で増幅した。これ(*txynZ*)をカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモータの下流に、また *A. tumefaciens* 由来のオクトピン合成酵素遺伝子のターミネータの上流につないだ。さらに、プロテアーゼインヒビターII蛋白質のシグナルペプチド(31アミノ酸)をキシラナーゼのN末端側に融合することにより細胞間隙に分泌する機能を与え、プロテアーゼの多い細胞内環境から細胞間隙に移行させ、外来蛋白質の安定発現を目的とする遺伝子構築を行った。この構築遺伝

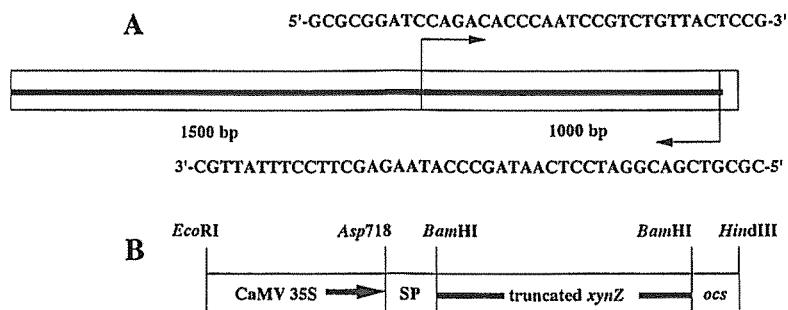


Fig. 1. Structure of the expression construct coding for a truncated version of the XynZ protein of *C. thermocellum*. (A) The complete *xynZ* coding region of plasmid pCT1200 is presented. The C-terminal region of the *xynZ* gene, encompassed by arrows, was amplified by PCR using the oligonucleotides indicated. (B) The amplified product was cloned between the CaMV 35S promoter and the *ocs* terminating region of vector pBinAR using *Bam* HI restriction sites. The signal sequence of the proteinase inhibitor II was inserted in front of the *xynZ* coding region which is marked by a black bar.

子をアグロバクテリウム法⁶⁾でタバコ植物体に導入した。形質転換植物体中に確かに *xynZ* が転写されていることを、放射線ラベルした *xynZ* DNA 断片をプローブとしてタバコより抽出した mRNA にハイブリダイズさせることにより確認している。こうして得られたタバコ形質転換体の葉を pH5.4 の酢酸緩衝液に浸し、減圧下に置くと XynZ が浸出してくるので目的酵素を安定簡便に抽出できる。この酵素はキシランを良く分解し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンに基づく蛋白濃度測定によると、この生成蛋白量は全蛋白の約 4% を占めていることが判明した。この様な大量キシラナーゼの発現にも関わらず、形質転換植物体から抽出したヘミセルロースの糖組成や含量には有意差は認められなかった。その原因としては、1) 植物体が生育する温度は XynZ の最適温度とはかけ離れて低いために作用しないのか、2) 本酵素が、基質に接触できないような構造上の難しさが植物細胞の中に見られるのか、3) キシランは分解されているのかも知れないが、双子葉植物であるタバコにおけるキシラン含量が極めて少ないために、変化として検出できないのかも知れない。この点については、イネ科単子葉植物のキシラン含量がキシログ

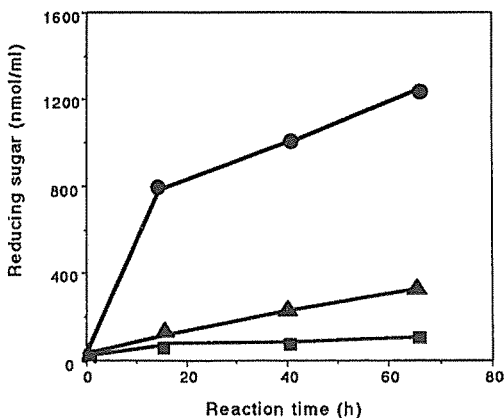


Fig. 2. The XynB-containing extracts (0.22U, 20ml) of BY2 transformants (7mg) were incubated with 2.3% raw barley straw suspended in the phosphate buffer (pH6.5, 20ml, 0.1ml) at 60°C. The enzymatic activities were shown as reducing sugar (nmol/ml). XynB-BY2 at 60°C (●), non-transformant BY2 at 37°C (▲) and 60°C (■).

リカンに比べて17倍も多いのに対して、双子葉植物ではヘミセルロースの20%に過ぎない⁷⁾ことを考えれば、双子葉植物に属するタバコで *xynZ* を発現させても直接的な影響が現れないことは当然なことかも知れない。

著者ら⁸⁾も、*C. stercorarium* 由来のキシラナーゼ遺伝子 (*xynB*) をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータとノパリン合成酵素遺伝子のターミネータにはさみ、エレクトロポレーション法によりタバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow 2: BY2 細胞) に導入し発現させた。形質転換処理後のタバコのプロトプラストをビーズ型寒天培養法で培養し、形質転換細胞由来のカルスをカナマイシンで一次選抜し、さらにその中よりキシラナーゼ活性の高いカルスを2次選抜し、活性を測定したところ Table 1. に示すような高い活性を持つ形質転換株 B1-11 を得ることができた。超音波処理により培養細胞から抽出した生成酵素 (XynB) の量は上記の SDS・ポリアクリルアミド電気泳動法による計算では、やはり全蛋白の4~5%に及ぶ大量発現となった。この抽出処理による上清画分である粗酵素液を洗浄した沈殿画分 (基質) と再混合し 60°C で15時間反応することにより、自己消化活性を確認した。その活性は弱く、かなりの長時間にわたる反応時間を必要とした (Fig. 2)。しかし、タバコ培養細胞に組

TABLE 1. Activity of XynB from BY2 transformants.

BY2 transformant	B1-11	B1-19	B1-21	B3-2	B3-5
Total activity (units)	1.4	0.66	0.28	0.16	0.18
Specific activity (U/mg)	55	24	13	11	13

Intracellular fraction from 20 mg of one month old calli were extracted with 0.2 ml extraction buffer (pH6.5, 20mM phosphate). The xylanase activity was measured by 10 min incubation at 60°C.

TABLE 2. XynB activity in the extracellular and intracellular fractions of the BY2 transformant B1-11 culture.

Cultivation period (days)	Total activity (units) (A)	Extracellular activity(B), (B/A)%	Intracellular activity(C), (C/A)%
4	759	411 54.2	348 45.8
10	1948	1115 57.2	834 42.8
14	3600	1405 39.0	2195 61.0

込まれた微生物由来の遺伝子産物が植物細胞壁成分を分解可溶化することをインビトロ実験ではあるが確認できたことから、細菌キシラナーゼ遺伝子の植物への導入が、その生育に決定的な悪影響を与えることなしに、植物組織に緩みを誘起できる手がかりが得られたものと考えている。もしそうだとすれば、栽培中は野生株と同程度の構造強度を持ち、かつ消化性を高めた牧草の育種に応用できよう。

2. タバコ細胞におけるセルラーゼの発現

上記 *xynB* 遺伝子の場合と同様の方法で、*Rumino-coccus albus* のセルラーゼ遺伝子 (*eg I*) をタバコ発現ベクターに組み込み (Fig. 3), エレクトロポレーション法でタバコ BY2 細胞を形質転換した⁹⁾。形質転換に使用した導入遺伝子のうち、シグナルペプチドよりさらに N 末端側の 15 個のアミノ酸相当を切り取った *Ce-del* 遺伝子¹⁰⁾ がもっとも強く BY2 細胞で発現した。この酵素蛋白質はそのほとんどが細胞内にとどまっていたが、分子量的変化は認められず、タバコプロテアーゼによる分解は受けていないと考えている。発現蛋白量は全蛋白の 0.1% で、前述のキシラナーゼに比べると 1/40 以下

という低濃度ではあったが、この活性は非形質転換細胞 (対照細胞) の持つセルラーゼ活性の 30 倍にも相当した。また、BY2 細胞壁に対するこのセルラーゼの分解活性はキシラナーゼの場合の 3 倍以上も高い分解能を發揮した。これらの結果は、セルラーゼ遺伝子をタバコ培養細胞で発現させることにより、細胞壁の主成分であるセルロースを分解するチャンスが高まったことを示唆する。換言すれば自己消化能が高まったことを示唆している。ところで、本実験で用いたセルラーゼ遺伝子には分泌シグナルを付けていないので細胞質外への輸送機能を持たないため、生成された遺伝子産物は細胞膜内にとどまる可能性が高い。しかし、実際に形質転換細胞を寒天上に培養してみるとカルスから一部セルラーゼが漏出している。したがって、発現したセルラーゼが全く細胞壁から隔離されているとはいいがたい結果となっている。このため、細胞壁形成がセルラーゼの影響を受けていると言わざるを得ない。形質転換細胞の生育は対照細胞よりもわずかに遅いように思える。(Fig. 4)。また、この遺伝子を持つ培養細胞に、プロトプラスト形成用セルラーゼその他の酵素を作用させる (Fig. 5) と、対照細胞に比べて明らかにプロトプラスト形成速度が大きくなって

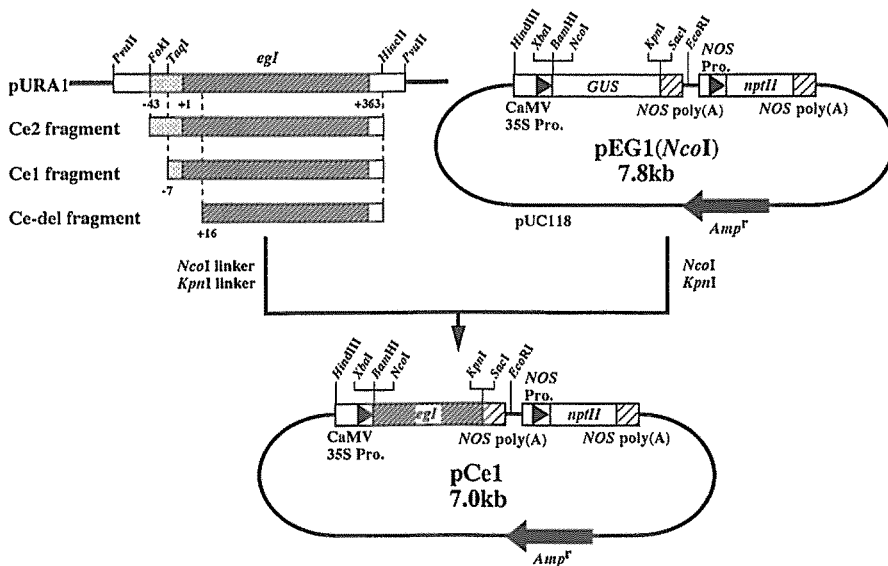


Fig. 3. Structures of the introduced *eg I* and its derivatives. The shaded boxes represent the region encoding the mature enzyme and the dotted boxes the region encoding the EgI signal sequence. Numbers refer to amino acid residues.

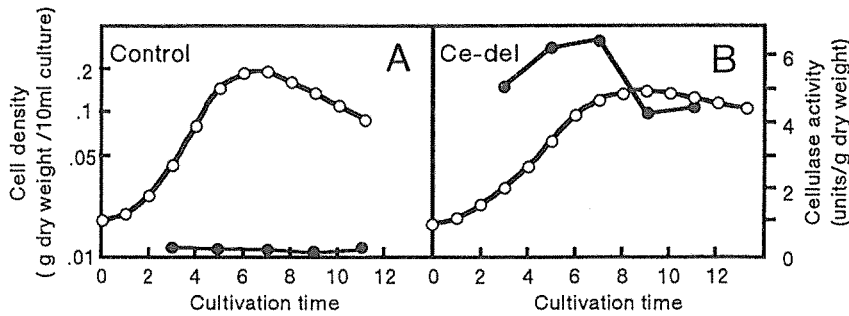


Fig. 4. Time courses of cellulase activity (closed circles) and cell density (open circles). A : non-transformed cells, B : Ce-del.

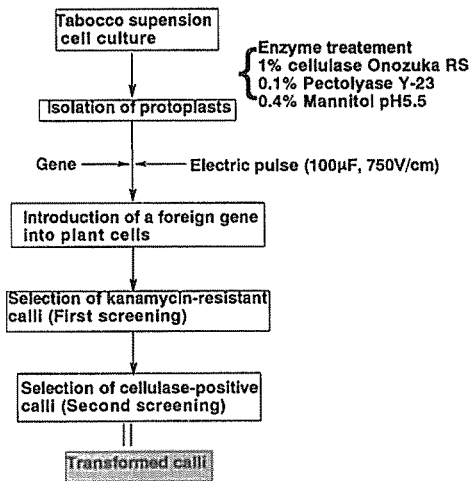


Fig. 5. Creation of cellulase-positive transformants from tobacco suspension cells.

ることがわかる (Fig. 6)。これらのことは、細胞壁に何らかの「緩み」が生じた結果、細胞壁形成に時間がかかるのか、あるいは細胞壁構成ユニットが細胞膜を通過する以前に細胞質内に蓄積された発現セルラーゼにより分解の危険に曝されるために増殖が遅くなったり、あるいは、酵素作用を受けやすい細胞壁構造に変化していることが考えられる。

これとは別に、*R. albus* 由来の別のエンドグルカナナーゼ遺伝子 (*egIV*) に *C. thermocellum* 由来のキシラナーゼ遺伝子の CBD (セルロース結合ドメイン) をコードしている領域を導入したキメラ遺伝子 (*egIV-CBD*) を大腸菌で発現させてキメラ酵素 (EGIV-CBD) を生

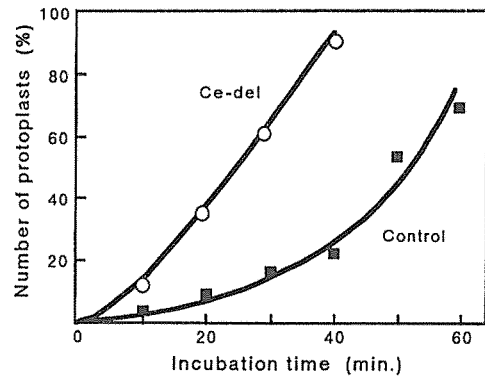


Fig. 6. Time course of protoplast formation from a cellulase positive transformant. Control : non-transformed tobacco suspension cells. Ce-del : the cells producing Egl without 15 amino acids at N-terminal.

産した¹³⁾。このキメラ酵素をタバコ培養細胞壁画分に作用させたところ、Fig. 7 に示すとおり EGIV の約 5 倍高い活性を示した。このことは基質結合領域 CBD を触媒領域に導入することにより、触媒ドメインが不溶性基質との接触頻度が高まり、分解速度が上がったものと考えられ、基質濃度が高い状態で酵素反応を進めることになり、この種の遺伝子組換えに基づくドメインシャッフリングにより、不溶性基質に作用する酵素機能を著しく高めることに成功した¹³⁾。

さらに *A. tumefaciens* を用いる形質転換系 (Fig. 8) でタバコ葉のディスクに *R. albus* の *egI* を導入し、形質転換タバコ植物体を育種した。外来セルラーゼの発

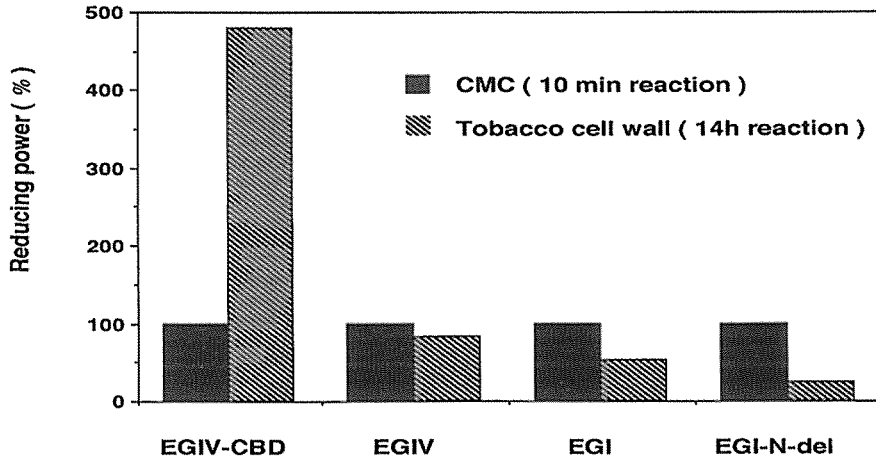


Fig. 7. Degradation of tobacco cell wall by cellulases. Cellulases from extracts of recombinant *E. coli* were incubated for 10 min and 14 hours with CMC and powdered tobacco cells at 37°C. It shows that CBD enhances enzymatic activity on the raw tobacco cell wall.

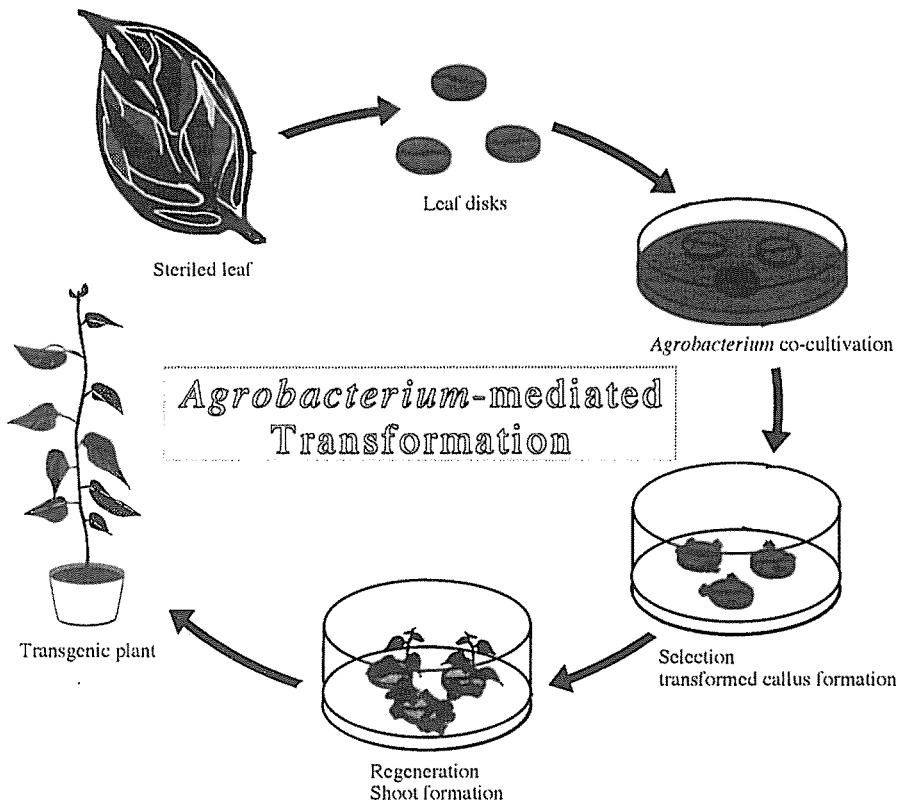


Fig. 8. Schematic procedure of *Agrobacterium*-mediated tobacco transformation.

現による植物体の生育その他の見かけ上の変化は認められなかった。この形質転換タバコの葉茎を傷つけた至る所で発現蛋白セルラーゼがにじみでてくることを確認している。このことは、組織あるいは細胞の破壊によって、閉じこめられていた導入遺伝子産物が漏出することを意味している。この手法を牧草や飼料用植物などのバイオマスに応用すれば、バイオマス自身に多量のセルラーゼを細胞内に閉じこめられることになる。そしてこれが反芻動物の咀嚼によって、あるいはサイレージ用に細切断片化されるとセルラーゼが漏出することになり、植物体の外部からもセルロース成分が分解される機会を持つことになる。難分解性の繊維質の可溶化促進にとって極めて効果的な手法であると思っている。これによって粗飼料消化速度が高まり、家畜の肥育期間を短縮したり、未利用バイオマスの飼料化が進めば、畜産業における経済効果は計り知れないものがある。

3. 小麦 (barley) における (1, 3-1, 4) β -グルカナーゼの発現¹³⁾

小麦 (*Hordeum vulgare* L.) に含まれる (1, 3-1, 4) β -グルカナーゼは胚芽細胞壁に特に多く含まれ、発芽に必要な貯蔵成分のスムーズな移動のために分解可溶化される必要がある。さらに、飼料の消化性を高め、醸造用麦芽の調整にも、この分解が大きく影響する。そこで *Bacillus amyloliquefaciens* と *B. macerans* のハイブリッド耐熱性 (1, 3-1, 4) β -グルカナーゼ遺伝子を構築し、さらに小麦での遺伝子翻訳効率を考慮して、その 66% のコドンを変更して導入遺伝子を構築した。この改変グルカナーゼ遺伝子を PEG 法でビール小麦アリュールロン (粒状タンパク質) 細胞に由来するプロトプラストに導入したところ、大腸菌における産物に比べ 3 個の糖鎖による修飾を受ける酵素として一過性発現した。一方、形質転換植物体の作成に当たっては、未成熟胚に目的遺伝子をパーティクルガンで打ち込んだ。選抜されたカルスは、サイトカイニンを含む植物体誘導用培地において約 2 週間暗所で生育させた後、ホルモン・フリー培地の明所に移植した。さらに再分化した植物体が一定の大きさに達したところで路地に移植した。

この形質転換小麦では、外観は野生株に比べ特に変化が認められなかったが、活性染色法やウエスタンブロッティング法でやはり糖鎖の付いた目的酵素が生成されて

いることが確認されている。この場合の発現蛋白質は数値として示されていないが、ウエスタンブロッティングで検出しているところから推定すると、我々が示した約 0.1% 付近の低い発現量であろう。やはり、セルラーゼはキシラナーゼに比べて格段に発現量が少ないようである。言い換えれば、発現量の多い形質転換細胞は増殖できず、スクリーニングできないのかも知れない。このためか、セルラーゼの植物体での発現に関する報告は極めて少ない。一方、使用コドン小麦のそれに合わせなかった場合には、遺伝子の存在は PCR 法で確認できても蛋白への翻訳は行われていなかった。宿主生物の使用コドンに導入遺伝子のそれを合わせる事が如何に重要かを示している。これらの結果から、小麦種子の水浸漬に続く発芽の過程でこの耐熱性酵素が発現し、麦芽の焙煎時にも失活せずに胚芽細胞壁を分解できれば、ビール製造収率の改善にも繋がることを本論文¹³⁾の著者らは期待している。

上記のように、微生物由来の植物繊維分解酵素の植物体への導入実験例はまだ少ないが、これらの組換えタバコの育種によって、①キシラナーゼの大量発現が見られたことから、植物による他の酵素の生産の可能性が開け、②キシランの分解除去により白色度の高いパルプ生産が可能になる。③発現セルラーゼによるタバコ細胞壁分解の確認により、分解されやすいバイオマスの育種の可能性が大きくなり、牧草に応用できれば、その経済効果は極めて大きい。④しかし、セルラーゼの発現量がキシラナーゼのそれに比べて少ないことは植物細胞壁の合成と関連があるのか？⑤バイオマス収穫後に、これら分解系遺伝子を発現させるか？など、新たな問題と夢が湧きでている。

引用文献

1. K. SHIMADA, S. KARITA, K. SAKKA and K. OHMIYA (1994) Cellulases, xylanases and their genes from bacteria. p.395-429. "Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications" (ed). Y. MUROOKA and T. IMANAKA, Marcel Dekker, Inc.
2. K. SHIMADA, S. HOSHINO, K. OHMIYA, K. SAKKA, Y. KOBAYASHI and S. KARITA (1994) Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degra-

- dition. Uni Publishers Co., Ltd.
3. K. HELBERS, I.WILKE and U.SONNEWALD. (1995) A thermostable xylanase from *Clostridium thermocellum* expressed at high levels in the apoplast of transgenic tobacco has no detrimental effects and is easily purified. *Bio/Technol.*, 13 : 63-66.
 4. O.GREPINET, M.C.CHEBROU and P.BEGUIN. (1988) Purification of *Clostridium thermocellum* xylanase Z expressed in *Escherichia coli* and identification of the corresponding product in the culture medium of *C. thermocellum*. *J.Bacteriol.* 170 : 4576-4581.
 5. O.GREPINET, M.C.CHEBROU and P.BEGUIN. (1988) Nucleotide sequence and deletion analysis of the xylanase gene (*xynZ*) of *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 170 : 4582-4588.
 6. R.DEBLAERE, B.BYTEBIER, H. de GREVE, F.M. DEBROECK, J.SCHELL, M.van MONTAGU, J. LEEMANNS (1985) Efficient octopine Ti-plasmid derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res.* 13 : 4777-4788.
 7. S.ROSAHL,R.SCHMIDT, J.SCHELL and L.WILLMITZER. (1987) Expression of a tuber-specific storage protein in transgenic tobacco plants : demonstration of an esterase activity. *EMBO J.* 6 : 1155-1159.
 8. J.SUN, T.KAWAZU, T.KIMURA, K.SAKKA and K.OHMIYA. (1996) Highly expression of xylanase B gene from *Clostridium stercoararium* in tobacco cells. *J. Ferment. Biotechnol.* submitted
 9. T.KAWAZU, T.OHTA, K.ITO, M.SHIBATA, T. KIMURA, K.SAKKA, and K.OHMIYA. (1996) Expression of a *Ruminococcus albus* cellulase gene in tobacco suspension cells. *J.Ferment. Biotechnol.* 82 (2) : 205-209.
 10. K.OHMIYA, H.DEGUCHI and S.SHIMIZU. (1991) Modification of the properties of a *Ruminococcus albus* endo-1, 4- β -glucanase by the gene truncation. *J.Bacteriol.* 173 (2) : 636-641.
 11. S.KARITA, K.SAKKA and K.OHMIYA. (1996) Cellulose-binding domains confer an enhanced activity against insoluble cellulose to *Ruminococcus albus* endoglucanase IV. *J. Ferment. Bioeng.* 81 (6) : 555-558
 12. G.TAKADA, S.KARITA, A.TAKEUCHI, Md.M. AHSAN, T.KIMURA, K.SAKKA and K.OHMIYA (1996). Specific adsorption of *Clostridium stercoararium* xylanase to amorphous cellulose and its desorption by cellobiose. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 (7) : 1183-1185.
 13. L.G.JENSEN, O.OLSEN, O.COPS, N.WOLF, K.K. THOMSEN and D.von WETTSTEIN. (1996) Transgenic barley expressing a protein-engineered, thermostable (1, 3 - 1, 4) - β -glucanase during germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 3487-3491.