# 海洋微生物からの有用機能の探索とその応用

国立研究開発法人海洋研究開発機構　大　田　ゆかり

## はじめに

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，浅海で様々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．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なんらかの形で利用する機能を持つことが期待される．そこで，我々は深海を含む様々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．

## 1.　海藻多糖分解酵素の利用

### 1-1.　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有機物の１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ことから，我々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」[1]，$\beta$-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」[2-5]を取得した．そのうちの１つ，*Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94$^T$株に由来する$\beta$-アガラーゼはとりわけ高い耐熱性を持っていた．現在，本酵素は遺伝子試薬メーカーの株式会社ニッポンジーンから遺伝子研究用試薬「Thermostable $\beta$-agarase」として販売されている．本アガラーゼを用いると高分子（160 kbまで確認済み）のDNAが効率よく回収・調製できることから，さまざまな研究機関における遺伝子機能解析・配列解析に活用頂いている．

### 1-2.　カラギナーゼ

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持っている点にあり，その構成糖の硫酸基置換パターンに基づき，カッパ，イオタ，ラムダ型の３タイプに大別される．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，その置換基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．そこで我々は酵素の“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，すなわち高度の基質特異性を持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．我々は，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[6, 7]，続いてこれら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[8]．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．

## 2.　リグニン分解酵素の利用

地球温暖化や海洋酸性化等の要因である人為的$CO_2$を増大させ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開発が精力的に行われている．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付けられる．

我々はリグニンを原料とする芳香族化合物のバイオ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[9]（図1）．この探索の過程で単離した*Novosphingobium* MBES04株は，多様な芳香族モノマー代謝能を持つに留まらず，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[10]．$\beta$-*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[11]（図2左）．

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及びそれらの合成中間体となる有用な化合物群である．そこで我々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，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．これまでに，新規な各種ポリマー，例えば，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，アリール系オリゴマー，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[11]（図2右）．

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」へと繋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，更なる研究を展開している．

## 3.　組換えタンパク高生産系の開発

我々は酵素の探索・開発と並行して，酵素利用に重要な技術

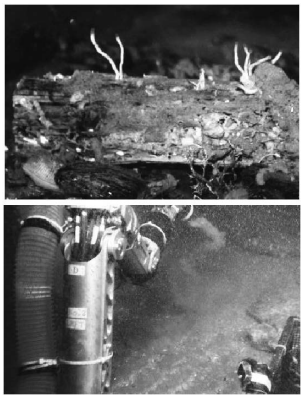

**図1.** 海域における微生物探査源（写真提供：JAMSTEC）

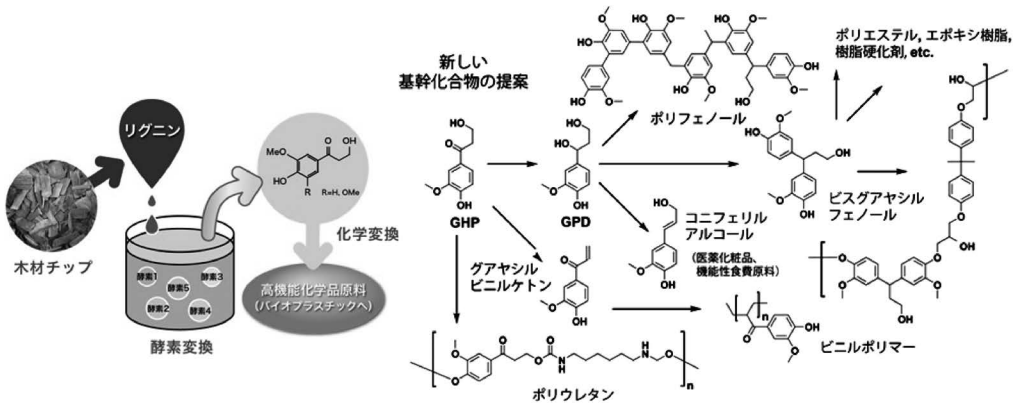


**図2.** ミルドウッドリグニンからの芳香族モノマーワンポット酵素生産（左）とバイオ化学品への展開（右）

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[12]．プラスミドに挿入した目的遺伝子の発現調節には海洋から分離した細菌のゲノム配列の一部を活用した．

通常組換えタンパク生産には，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，我々は生育必須遺伝子の１つとして，宿主自身が持つトリプトファニル t-RNA 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**

本研究により，難分解性有機物を分解する酵素を始めとする優れた生物機能が海域に存在することを示すことができた．海域や海底下を含む全地球には未培養の多くの微生物が存在することから，引き続き微生物機能の探索・開発を続け，更なる活用へと繋げて行きたい．

**（引用文献）**

1）Ohta, Y., Hatada, Y., Miyazaki, M., Nogi, Y., Ito, S., Horikoshi, K. Purification and characterization of a novel *α*-agarase from a *Thalassomonas* sp. Curr Microbiol, 50, 212–216,（2005）
2）Ohta, Y., Hatada, Y., Ito, S., Horikoshi, K. High-level expression of a neoagarobiose-producing *β*-agarase gene from Agarivorans sp. JAMB-A11 in *Bacillus subtilis* and enzymic properties of the recombinant enzyme. Biotechnol Appl Biochem, 41, 183–191,（2005）
3）Ohta, Y., Nogi, Y., Miyazaki, M., Li, Z. J., Hatada, Y., Ito, S., Horikoshi, K. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable *β*-agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94. Biosci Biotechnol Biochem, 68, 1073–1081,（2004）
4）Ohta, Y., Hatada, Y., Nogi, Y., Miyazaki, M., Li, Z., Akita, M., Hidaka, Y., Goda, S., Ito, S., Horikoshi, K. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable *β*-agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*. Appl Microbiol Biotechnol, 64, 505–514,（2004）
5）Ohta, Y., Hatada, Y., Nogi, Y., Li, Z., Ito, S., Horikoshi, K. Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 86 *β*-agarase from a deep-sea *Microbulbifer*-like isolate. Appl Microbiol Biotechnol, 66, 266–227,（2004）
6）Ohta, Y., Hatada, Y. A novel enzyme, *λ*-carrageenase, isolated from a deep-sea bacterium. J Biochem, 140, 475–481,（2006）
7）Hatada, Y., Mizuno, M., Li, Z. J., Ohta, Y. Hyper-production and characterization of the *ι*-carrageenase Useful for iota-carrageenan oligosaccharide production from a deep-sea bacterium, *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94$^{T}$, and insight into the unusual catalytic mechanism. Mar Biotech, 13, 411–422,（2011）
8）秦田勇二，大田ゆかり，食品中に含まれるカラギーナンのフィンガープリント分析法の開発．アサヒビール学術振興財団研究紀要, 22, 23–28,（2008）
9）Ohta, Y., Nishi, S., Haga, T., Tsubouchi, T., Hasegawa, R., Konishi, M., Nagano, Y., Tsuruwaka, Y., Shimane, Y., Mori, K., Usui, K., Suda, E., Tsutsui, K., Nishimoto, A., Fujiwara, Y., Maruyama, T., Hatada, Y. Screening and phylogenetic analysis of deep-sea bacteria capable of metabolizing lignin-derived aromatic compounds. Open Journal of Marine Science, 2, 177–187,（2012）
10）Ohta, Y., Nishi, S., Hasegawa, R., Hatada, Y. Combination of six enzymes of a marine *Novosphingobium* converts the stereoisomers of *β-O*-4 lignin model dimers into the respective monomers. Sci Rep, 5, 15105,（2015）
11）Ohta, Y., Hasegawa, R., Kurosawa, K., Maeda, A., Koizumi, T., Nishimura, H., Okada, H., Qu, C., Saito, K., Watanabe, T., Hatada, Y. Enzymatic specific production and chemical functionalization of phenylpropanone platform monomers from lignin. ChemSusChem, 10, 425–433,（2017）
12）特許5126879，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．

**謝　辞**　本研究を遂行するに当たり，多大なるご指導とご協力を賜りました海洋研究開発機構　秦田勇二グループリーダー（現埼玉工業大学教授），深海バイオ応用研究開発グループの皆様，井町寛之博士，稲垣史生博士，共同研究を実施下さった京都大学 渡辺隆司教授，片平正人教授，中村正治教授，西村裕志助教，芳賀拓真博士（国立科学博物館），宮本徹博士（東北大学），海洋研究開発機構研究航海にご尽力下さった皆様に深謝申し上げます．本研究の一部は，最先端・次世代研究開発支援プログラム（GS031），JST 戦略的創造研究推進事業・先端的低炭素化技術開発，科研費，京都大学生存圏研究所生存圏ミッション研究，財団法人杉山産業化学研究所より支援を頂き実施致しましたことを付記致します．