

草食性陸ガニ類由来リグニンバイオマス分解酵素群の解析と有効活用

三宅 克英
名城大学 理工学部

研究の目的

天然の原生林と海が接した海岸林に生息するアカテガニやクロベンケイガニ（図1）などの陸ガニ類は、海岸森林バイオマスの分解者として、海と森の間の物質循環に大きな役割を果たしている。本研究では、これまで顧みられることのなかった陸ガニ類のリグニンバイオマス分解能力を解析、同定、抽出し、生物工学的な応用を可能にすることを目的としている。本研究の内容は、1) この陸ガニ類の消化管系に着目し、リグニンを含むバイオマス分解活性の特徴を明らかにすること、2) RNA-seq などを利用して、酵素や共生細菌からなる難分解性のリグニン分解システムの全容を解明すること、3) 陸ガニから得られた生物資源を用いてリグニン分解システムを構築し、応用できるか検証すること、の三段階から成る。



アカテガニ

クロベンケイガニ

図1 葉を食べるアカテガニとクロベンケイガニ

抽出し、生物工学的な応用を可能にすることを目的としている。本研究の内容は、1) この陸ガニ類の消化管系に着目し、リグニンを含むバイオマス分解活性の特徴を明らかにすること、2) RNA-seq などを利用して、酵素や共生細菌からなる難分解性のリグニン分解システムの全容を解明すること、3) 陸ガニから得られた生物資源を用いてリグニン分解システムを構築し、応用できるか検証すること、の三段階から成る。

方法

1) リグニン分解活性の検出

以前の研究においては、リグニン分解活性として過酸化水素でグアヤコールを酸化する活性を指標としたが¹⁾、今回は 2,6-ジメトキシフェノール (2,6-DMP) を過酸化水素なしで酸化するラッカーゼ活性を指標とした。アカテガニ及びクロベンケイガニを解剖し、中腸腺、胃、腸、エラ、血液をとり、酵素液を調製した。活性は 2,6-DMP の酸化を 470 nm の吸光度の増加量で評価した。上記陸ガニは、植物性の餌及び非植物性の餌に分けて飼育した。

2) RNA-seq

脱皮中及び非脱皮中のアカテガニ中腸腺から全 RNA を調製し、RNA-seq を行った。次世代シーケンスは Illumina HiSeq 2500 で行い、得られた転写産物のアノテーションは BLAST で行った。クロベンケイガニの中腸腺からも同様の解析を行った。

3) 大腸菌での発現及び活性確認

RNA-seq により明らかになったラッカーゼ遺伝子を、C 末端側に His-tag が融合する形で大腸菌発現ベクター pETBlue-2 に連結し、大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。発現確認は抗 His-tag 抗体 (和光) を用いたウェスタンブロッティングで行った。精製は HisTALON カラム (クロンテック) で行い、活性の確認は 2,6-ジメトキシフェノール (2,6-DMP) の酸化 (470 nm の吸光度の上昇) を指標とした。

4) RT-qPCR 解析

ラッカーゼ遺伝子の発現解析を行うために、RT-PCR を行った。餌の異なるアカテガニの各臓器を採取し、全 RNA を調製した。cDNA の作製には ReverTra Ace (東洋紡) を用いた。RT-qPCR は KOD-SYBR qPCR Mix と BMSHBG0003 Real-Time PCR system (BM) を用いて行った。

結果

1) 2,6-DMP 酸化活性の検出

図 2 に示すように、植物性の餌を与えたアカテガニにのみ、強い酸化活性が認められた。活性は主に中腸腺で検出され、胃でも検出される場合があった²⁾。同様の

傾向はクロベンケイガニでも見られた。この結果は、陸ガニの植食性において、このラッカーゼ活性が重要な役割を果たしていることを示唆している。中腸腺で生産された酵素が胃などの消化管に分泌され、リグニンの消化に役立っている可能性が高い。

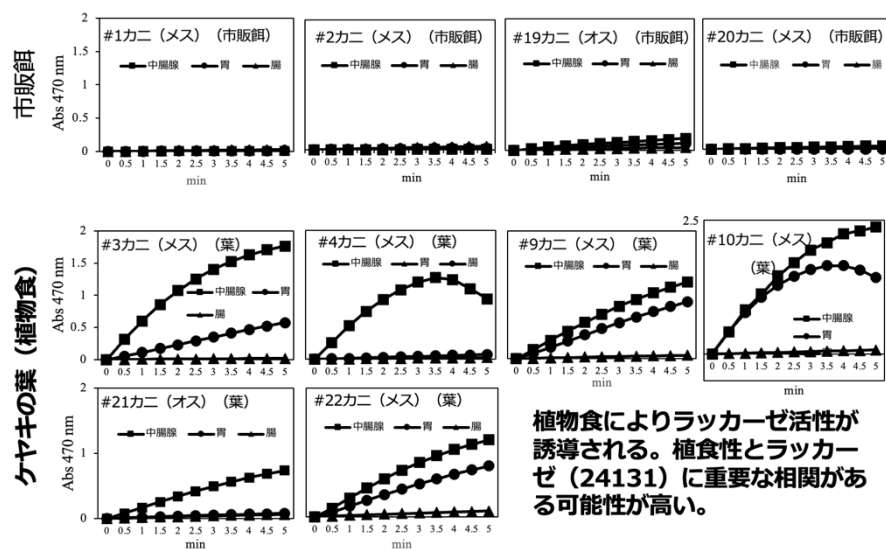


図 2 植物食によるアカテガニラッカーゼ反応の増強

アカテガニを植物食と通常食で 1 ヶ月間飼育し、解剖後、2,6-DMP 酸化活性を調べた。4 mM の 2,6-DMP と各粗酵素液を 5 分間反応させ、1 分ごとに 470 nm の吸光度を測定した。

2) 陸ガニ中腸腺の RNA-seq

アカテガニとクロベンケイガニの中腸腺の RNA から RNA-seq 解析を行ったところ、複数のラッカーゼ遺伝子の存在を検出することができた。しかし、代表的なリグニン分解酵素であるリグニンパーオキシダーゼやマンガンパーオキシダーゼは発見できなかった。両方のガニとも発現している主要ラッカーゼは同じであり、それぞれ 24131 ラッカーゼ、65040 ラッカーゼと命名した。このラッカーゼは、全ラッカーゼ発現量の 95% 以上を占めており、重要な役割を果たしているものと思われる。

3) ラッカーゼの構造解析

24131 ラッカーゼは multicopper oxidase ファミリーの一員であり、C 末側に銅結合ドメインを持っている。613 アミノ酸から成る分子量 67.7 kDa の蛋白質であ

り、N末側にはシグナル配列を有している。分泌蛋白質であり、中腸腺細胞で生産された後、消化管に分泌されることが推定される。

4) 24131 ラッカーゼの生産

アカテガニ由来 24131 ラッカーゼを His-tag 融合蛋白質として生産して、精製を試みた。現在のところ 100 ml 培養から 70 µg 程度の精製蛋白質しか取得できていない。この精製ラッカーゼの活性を調べてみたところ、大腸菌培養時に銅を添加した場合にのみ、2,6-DMP 酸化活性を示すことが明らかになった。今後、使用する大腸菌の変更、昆虫細胞生産系を用いて大量調製を試みる予定である。

5) 24131 ラッカーゼ遺伝子発現解析

24131 ラッカーゼの発現について、RT-PCR 法で解析したところ、臓器別の発現では、中腸腺での発現が最も多く、次いで血液という結果となった。胃、腸、エラからの発現はほとんど見られなかった。血液での発現は中腸腺の 10 分の一程度であり、中腸腺での発現がほとんどであることがわかる。この結果は、中腸腺で生産されたラッカーゼが消化管等に分泌されて、消化等に利用されていることを示していた。また、カニの餌の種類による 24131 ラッカーゼの発現については、1) で明らかになったような植物食による顕著な増強は観察されなかった。このことは、ラッカーゼ活性の植物食による増強は、転写レベルではなく、翻訳レベルあるいは翻訳後修飾レベル、もしくは酵素の切断等による活性化などによって引き起こされていることを示している。

結論

本研究により、草食性陸ガニであるアカテガニおよびクロベンケイガニから、リグニン分解に関与すると推定されるラッカーゼを発見し、活性を確認することができた。このラッカーゼは発現量も非常に多く、重要な役割を果たしているものと考えられる。実際にバイオマス中のリグニン分解に効くかどうかは未確認であるが、今後確認していく予定である。今後の応用のためには大量調製が必要であり、真核生物用コドンに最適化した大腸菌や、S-S 結合形成を改善した大腸菌、または昆虫細胞発現系を試してみたい。

文献

- 1) Miyake, K. *et al.* (2019) Guaiacol oxidation activity of herbivorous land crabs, *Chiromantes haematocheir* and *Chiromantes dehaani*. *J. Biosci. Bioeng.* **128**: 316-322.
- 2) Miyake, K. and Baba Y. (2022) *De novo* transcriptome assembly of the midgut glands of herbivorous land crabs, *Chiromantes haematocheir*, and identification of laccase genes involved in lignin degradation. *J. Comp. Physiol. B* **192**: 247-261.