

〈一般研究課題〉 草食性陸ガニを用いた新規リグニンバイオマス分解
システムの開発

助成研究者 名城大学 三宅 克英



草食性陸ガニを用いた新規リグニンバイオマス分解 システムの開発

三宅 克英
(名城大学)

Lignin degradation enzymes from herbivorous land crabs, *Chiromantes haematocheir* and *Chiromantes dehaani*

Katsuhide Miyake
(Meijo University)

Abstract :

Herbivorous land crabs such as *Chiromantes haematocheir* and *C. dehaani* show biomass degrading activities. We focused on lignin-degradation enzymes of the land crabs. We recently discovered that lignin-degradation activities were enhanced by feeding plant materials to the crabs. In this study, we performed RNA-seq analysis to detect lignin-degrading enzymes. A *de novo* transcriptome assembly in the midgut glands of *C. dehaani* crabs eating normal and plant foods was constructed using RNA sequencing. In total, 220,107 unigenes with an average length of 501 bp and an N50 value of 593 bp were assembled, of which 46,604 contigs were annotated using BLASTx search against the NCBI database. Among the all unigenes, 9,683 genes are up-regulated and 12,012 genes are down-regulated in the land crab raised by plant foods. We selected 116422-hemocyanin gene and 121457-chorion peroxidase gene as candidate genes for lignin-degradation enzymes from the up-regulated genes. Since the 116422 transcript did not have its N-terminal half, 5'-RACE method was performed to obtain the upstream region. The 121457-chorion peroxidase was produced in *Escherichia coli* and the activity was assayed. We were not able to detect the peroxidase activity of the 121457 enzyme. Probably, this is due to some problem in protein folding in *E. coli*. We will try ectopic expression of the candidate genes in *Pichia pastoris*.

1. はじめに

天然の原生林と海が直接的に接した海岸林には豊かな生態系が広がっている。昔から漁業に従事する人たちの間では、海岸林が魚を引きつけるという言い伝えもあり、こうした森林は「魚つき林」とも呼ばれてきた。森林と海は生態的につながっている。ここで生息する陸ガニ類は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(図1)。本研究では、日本の代表的な草食性陸ガニであるクロベンケイガニ(図2)を研究対象としてとりあげ、これまで省みられることのなかった陸ガニのバイオマス分解能力、特に難分解性のリグニン分解能力を同定、抽出し、生物工学的な応用を可能にすることをめざす。森林バイオマスは、木や落ち葉などからなっており、これを食料とする陸ガニは、セルロース、リグニン、ヘミセルロースなど、草根系や木質系のバイオマスの主要成分を効率的に分解、吸収するシステムを持っている。これまでの生態観察から、このカニは落ち葉のような柔らかいバイオマスだけでなく、固い木片も食料にしており、バイオマス有効利用のボトルネックとなっている難分解性のリグニンに対する強い分解能力も持っている」と期待された。これまでの研究でクロベンケイガニ

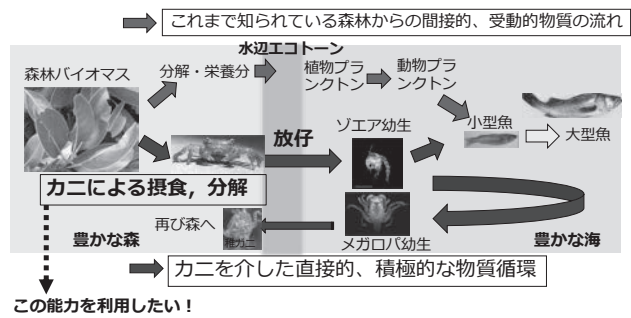


図1 草食性陸ガニを介した森・海(河口)の物質循環



図2 クロベンケイガニ

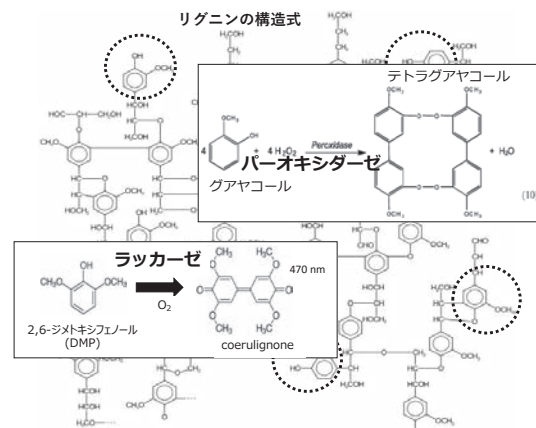


図3 ラッカーゼとパーオキシダーゼ活性評価

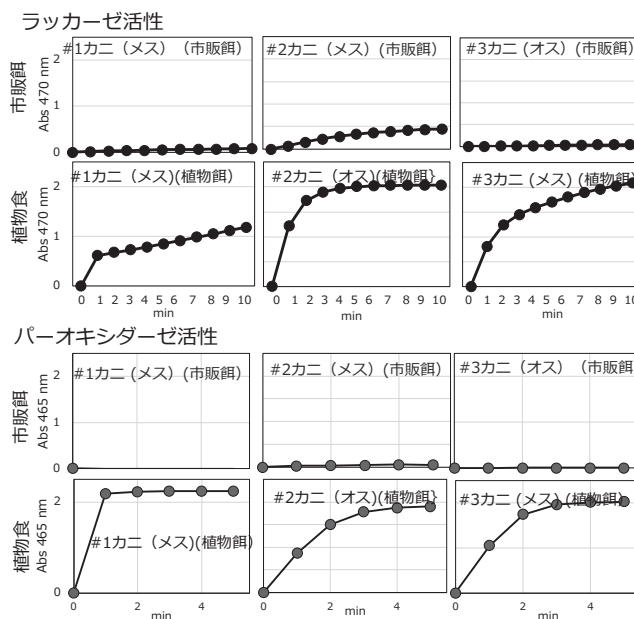


図4 植物食による陸ガニリグニン分解活性の増強

の中腸腺(いわゆるカニ味噌)から、強力なラッカーゼ活性(2,6-ジメトキシフェノール(DMP)酸化活性)とリグニンパーオキシダーゼ活性(グアヤコール酸化活性)(図3)を検出しており、これらの活性が植物食で飼育されたカニで増強されることもわかってきた(図4)^{1, 2)}。2,6-DMPもグアヤコールもリグニン構造の構成単位である。

本研究では、上記リグニン分解活性を担う酵素遺伝子を同定するために、クロ

ベンケイガニを市販餌と植物餌で飼育し、そこから回収した中腸腺のRNA-seqを行い、発現が促進される遺伝子の中から、ラッカーゼ遺伝子とパーオキシダーゼ遺伝子の探索を行った。また、グアヤコールパーオキシダーゼについては酵素の精製も試みた。

2. 試料および実験方法

2.1 クロベンケイガニの飼育、RNAの精製及び酵素原液の調製

メスのクロベンケイガニを1匹ずつ、市販のザリガニのエサ(キョーリン)(通常餌)とケヤキの葉(植物餌)のみを与えて1ヶ月間飼育した。これらのカニからRNAを精製するために、氷上に静置し、仮死状態にした後、解剖し、中腸腺を取り出した。中腸腺をRNA protect reagent (Qiagen)で処理し、安定化した。RNAの回収はRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて行った。約30 mgの組織から、114 µg/ml(通常餌)、312 µg/ml(植物餌)のtotal RNAを50 µl回収することができた。

酵素精製用には、クロベンケイガニ10匹を植物餌で飼育し、解剖した。中腸腺を集め、5 mlのPBSで懸濁し、ポッター型ホミジナイザーでホモジナイズした。10000 x gで遠心後、上清を回収して酵素精製原液とした。

2.2 RNA-seq

調製したtotal RNAを、GENEWIZ biotechnology co. LTDへ送付し、RNA品質の確認後、Illumina社のシーケンサーを用いてRNA-seqを行った。得られた配列データを元にトランスクリプトーム解析を行った。植物餌で発現量が促進している遺伝子の中から、リグニン分解に関連しそうな遺伝子を探索した。

2.3 標的遺伝子の増幅と発現ベクターの構築

選択した遺伝子を取得するために、調製したtotal RNAからcDNAを作製した。cDNAの合成はReverTra Ace (東洋紡)を用いて行った。選択した遺伝子を増幅するためのプライマーを作製し、cDNAから遺伝子の増幅を行った。PCRにはKOD plus Neo (東洋紡)を用いた。増幅した遺伝子は大腸菌発現用ベクター pETBlue-2に導入した。pETBlue-2は、制限酵素BamHIとHindIIIで切断したものを用い、結合にはNEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs Japan Inc.)を用いた。

ヘモシアニン遺伝子(116422)については、N末半分領域が欠損していたので、5'-RACE法を用いて、上流部分の単離、解析を行った。5'-RACEでは、5'-Full RACE Core Set (Takara bio)を使用した。

2.4 遺伝子産物の生産と活性

構築した発現用ベクターを大腸菌BL21 (DE3)、Rosetta-gami 2 (DE3)に導入した。酵素の生産は抗His-tag抗体を用いたwestern blottingにより検証し、活性を測定した。

2.5 リグニン分解酵素の精製

酵素の探索のために、遺伝子探索だけでなく、酵素の精製も試みた。酵素原液を出発材料として陰イオン交換(HiTrap Q HP, Cytiva)、ゲル濾過(HiPrep 16/60 Sepacryl S-200 HR, Cytiva)、陰イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap Q HP)を行い、酵素の部分精製を行った。最後の陰イオン交換クロマトグラフィーで回収した活性画分をSDS-PAGEにかけ、PVDFメンブレン (Immobilon-P, メルクミリポア)に転写した後、染色液(EzStain AQua MEM, ATTO)で染色し、

出現したバンドを切り出し、N末端アミノ酸配列解析に供した(北海道システム・サイエンス)。

3. 実験結果

3.1 RNA-seq解析結果

次世代シーケンサーでのクロベンケイガニ中腸腺由来全RNAの塩基配列解析結果の概要を表1に示す。831

表1 RNA-seqの概要

Type	Sequences	Bases	Min	Max	Average	N50	(A+T)%	(C+G)%
All_Contig	8313123	438607286	25	21478	52.76	48	53.37	46.63
All_Unigene	220107	110375731	201	21393	501.46	593	54.55	45.45

万のcontigが生成され、22万のUnigeneにまとめられた。Unigeneの平均鎖長は501 bpとなった。

表2 Unigeneのannotation

Total	Total annotated	Nr	COG	Swissprot
220107	46604	45794	19142	18503

220107 個 の Unigene を、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Nr database (Non-Redundant Protein Database), European Bioinformatics Institute (EBI)のSwissProt database, NCBI の COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins) database で 検 索 し た 結 果、46604 個 の Unigeneの機能が明らかとなった(表2)。発現量の解析は、FPKM (Fragment Per Kilo bases per Million reads)値で判定した。220107のUnigeneの中で、植物餌で発現増強が見られた遺伝子は9683個、発現減少が見られた遺伝子は12012個だった(図5)。



図5 植物餌で変化のあった遺伝子数

3.2 リグニン分解酵素候補遺伝子の選択

植物餌で発現増強が見られた9683個の遺伝子の中から、リグニン分解酵素の候補を探索した。ラッカーゼの候補としては、ヘモシアニン遺伝子に着目し、グアヤコールパーオキシダーゼの候補としてはチヨリオンパーオキシダーゼに着目した。ヘモシアニンは、甲殻類におけるヘモグロビンに相当するタンパク質であるが、フェ

ノールオキシダーゼのファミリーに属しており、ダンゴムシ等のヘモシアニンはラッカーゼ活性を示すことが報告されている³⁾。本研究では、116422という転写産物がヘモシアニンに相同性を示し、植物餌で500倍以上の増強を示すことが判明した(図6)。しかし、

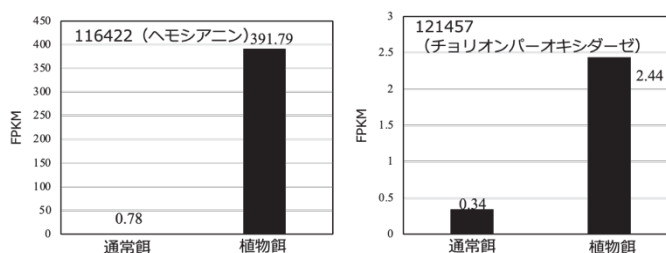


図6 選択遺伝子の植物餌での増強

この遺伝子産物はN末半分ほどを欠損していたため、5' RACE法を用いて、上流部分の単離を試みた。一方、チヨリオンパーオキシダーゼは、基質としてグアヤコールを過酸化水素で酸化できることが報告されており、候補遺伝子として適していると判断した⁴⁾。パーオキシダーゼ遺伝子としては、グルタチオンパーオキシダーゼの発現量が非常に多く観察されたが、分子量や酵素の性質から候補としなかった。今回選択した121457という転写産物は、植物餌で約7倍に増強されている(図

6)。ヘモシアニンと違い、ほぼ全長の遺伝子産物が検出されている。

3.3 チョリオンパーオキシダーゼ遺伝子の増幅と発現ベクターの構築、酵素の生産

全長に近い遺伝子産物が得られたチョリオンパーオキシダーゼの推定構造を示す(図7)。構造予測はNCBIのBLASTで行った。この遺伝子産物には、パーオキシダーゼの活性に重要な部位をすべて含んでいるものと思われる。図

に示されているように動物のパーオキシダーゼに特有の構造が保存されている(An_peroxidase)。ここ

には示さないがN

末側約30アミノ酸を欠損していたが、この領域はタンパク質の分泌に必要なシグナル領域であったため、このまま遺伝子の増幅を行うこととした。大腸菌での酵素生産を行うために、pETBlue-2ベクターに導入を行った。遺伝子の導入には、NEBuilder HiFi DNA Assembly master mix (NEB)を用いるため、NEBuilderソフトウェアでプライマーを設計し、PCR増幅に用いた。増幅は植物餌で飼育したクロベンケイガニ中腸腺由来のcDNAから行った。約2 kbの増幅断片をpETBlue-2に結合し、発現用大腸菌BL21 (DE3)とRosetta-gami 2 (DE3)に導

入した。121457の大腸菌での発現、精製の結果を図8に示す。酵素はHis-tag融合タンパク質として発現した。BL21 (DE3)では、ほとんど発現していなかったが、Rosetta-gami 2 (DE3)では強い発現が観察された。Rosetta-gami 2 (DE3)では、真核生物用コ

ドンも翻訳できるように改変されており、このことが発現に寄与した可能性が高い。121457-チョリオンパーオキシダーゼ遺伝子内のコドン使用頻度が通常の大腸菌での生産

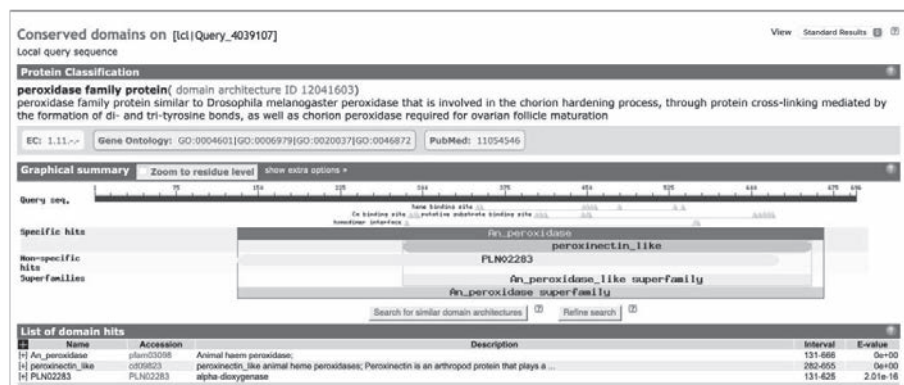


図7 121457チョリオンパーオキシダーゼの構造予測

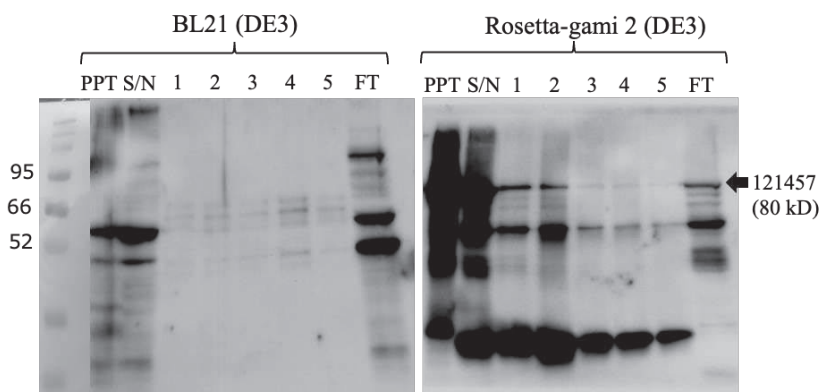


図8 121457-チョリオンパーオキシダーゼの大腸菌での生産

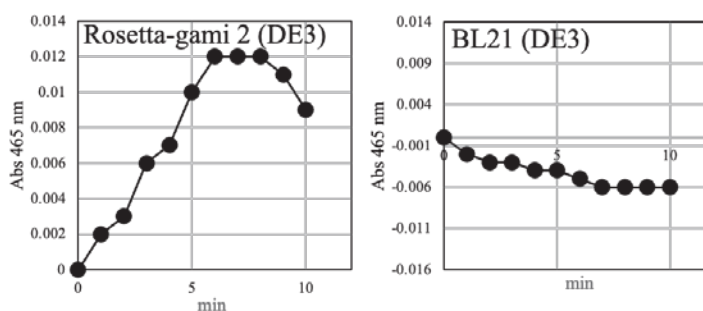


図9 大腸菌で生産した121457チョリオンパーオキシダーゼの活性

には適していないのだろう。また、同株はタンパク質のS-S結合形成が促進されるようにも改変されており、タンパク質の折りたたみが促進された可能性もある。しかし、図にも示しているように、不溶性画分(PPT)に半分以上のタンパク質が存在しており、折りたたみが上手くいっているようには見えない。活性を測定したところ、Rosetta-gami 2 (DE3)で生産した酵素からは、非常に弱い活性のみが検出された(図9)。やはり酵素の折りたたみの問題がある可能性が高い。今後、この酵素については酵母*Pichia pastoris*での生産を試みる予定である。酵母はカニと同様に真核生物であり、真核生物由来酵素の折りたたみには適しているかもしれない。実際、我々の他の研究では、カニのキチナーゼの活性は大腸菌での生産物ではなく、*Pichia pastoris*での生産においてのみ検出されることが判明している⁵⁾。

3.4 ヘモシアニン遺伝子の解析

RNA-seqで検出された116422-ヘモシアニン遺伝子は、植物餌で発現量が500倍以上に増強されていたが、全長の遺伝子産物ではなく、N末半分くらいの領域が欠損していた。

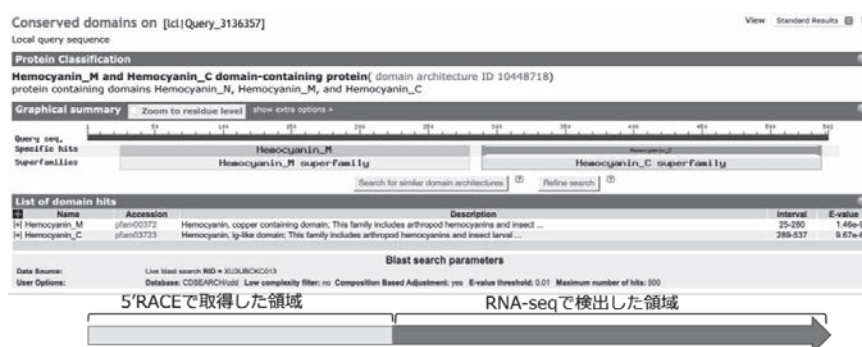


図10 116422ヘモシアニン遺伝子の5'RACEと構造予測

5'RACE法により、N

末領域の取得に成功した(図10)。全長の遺伝子はまだ取得できておらず、図に示すようにMドメインとCドメインのみを含む遺伝子産物であり、N末端のNドメイン領域は含んでいない。しかし、過去の報告によると、Nドメインはラッカーゼ活性に対して抑制的に機能するため³⁾、活性発現にはMとCドメインで十分であり、今回はこの遺伝子産物でヘモシアニンの生産を行うこととした。今後大腸菌と酵母*Pichia pastoris*で生産を行い、活性の検出を試みる予定である。

3.5 グアヤコールパーオキシダーゼの精製

グアヤコールパーオキシダーゼ活性の精製の結果を図11に示す。最初の陰イオン交換クロマト

グラフィーでは、ラッカーゼ活性とグアヤコールパーオキシダーゼ活性を指標とした。ラッカーゼ活性は幅広い領域に分布しており、複数の酵素の存在が示唆された。一方、グアヤコールパーオキシダーゼは1つの鋭いピークが観察されたため、この活性部分を次のゲル濾過クロマトグラフィーに供した。ゲル濾過での活性画分を2回目の陰イオ

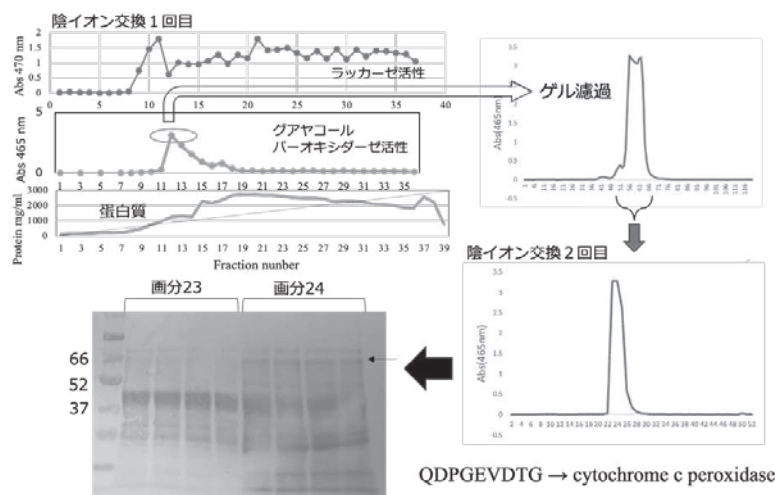


図11 グアヤコールパーオキシダーゼ活性の部分精製

ン交換クロマトグラフィーにかけ、活性画分を最終的な精製物とした。SDS-PAGEの結果、複数のバンドが観察されたが、以前の研究での活性染色の結果は、グアヤコールパーオキシダーゼは約60 kDと示されていたので、図の矢印で示したバンドをN末端アミノ酸配列解析に供した。その結果、精度は低いものの、QDPGEVDTGという配列が示された。この配列はcytochrome c peroxidaseと相同性を示した。精度が低い理由は、タンパク質量が十分ではない可能性がある。今後は精度を上げるために、より多くのカニから精製を行い、十分なタンパク質量を確保する必要がある。

4. まとめ

本研究では、新たに植物餌と通常餌で飼育したクロベンケイガニの中腸腺からRNA-seqを行い、餌の種類による遺伝子発現変化を明らかにすることができた。特に植物食によるリグニン分解活性の昂進がこの変化と強い相関関係を持っていることが期待される。今回は植物食で発現量が大きく促進された遺伝子の中から、リグニンの分解活性に寄与すると思われる複数の遺伝子を特定、単離することができた。特に116422-ヘモシアニン遺伝子は、500倍以上という顕著な増強を示しており、強いラッカーゼ活性が期待できる。今回は酵素の生産には至らなかったが、現在発現の準備が進んでおり、近い将来有用なリグニン分解酵素として応用できるものと考えている。また、121457-チョリオンパーオキシダーゼについては大腸菌での生産はできたが、強い活性の検出はできなかった。この遺伝子も、上記ヘモシアニン遺伝子も酵母*Pichia pastoris*での生産を行えば、強い活性を得られるのではないかと考えている。酵素精製の結果から示唆されたcytochrome c peroxidaseの遺伝子についても探索を行い、解析を進める予定である。将来的には、これらの分解酵素を利用して植物バイオマスの効率的分解システムの構築につなげていきたい。

参考文献

- 1) Miyake, K., Ura, K., Chida, S., Ueda, Y., Baba, Y., Kusube, T., Yanai, S.; Guaiacol oxidation activity of herbivorous land crabs, *Chiromantes haematocheir* and *Chiromantes dehaani*, J. Biosci. Bioeng., 128, 316-322 (2019)
- 2) Miyake, K. and Baba Y., *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 (2022)
- 3) Decker, H., Hellmann, N., Jaenicke, E., Lieb, B., Meissner, U. and Markl, J.; Minireview: Recent progress in hemocyanin research, Integr. Comp. Biol., 47, 631-644 (2007)
- 4) Han, Q., Li, G. and Li J.; Purification and characterization of chorion peroxidase from *Aedes aegypti* eggs, Arch. Biochem. Biophys., 378, 107-115 (2000)
- 5) Nagakura, Y., Miyake, K.; Characterization of a molting-related chitinase from a land crab, *Chiromantes haematocheir*, J. Biosci. Bioeng., in press (2025)