

令和元年6月17日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07365

研究課題名(和文) ゲノム解読に基づく新規抗生物質生産放線菌の開発によるリグノセルロースの高度資源化

研究課題名(英文) Development of novel antibiotic-producing streptomycetes based on genome analysis for effective conversion of lignocellulose

研究代表者

春日 和 (Kasuga, Kano)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：40315594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、LC(リグノセルロース)を原材料として抗生物質発酵生産が可能な放線菌の育種開発を目指して、セルロース及びキシランの高分解活性を示し、抗生物質の異種生産が可能な放線菌 *Streptomyces galbus* Y2944 を選抜した。本菌株のゲノム解読を行い、セルラーゼ10種、キシラン主鎖分解酵素11種、キシラン側鎖分解酵素10種の遺伝子を見出し、特にキシラン分解遺伝子群の多さと多様性がLC高資化能に関連すると示唆された。抗生物質異種生産の成功例はあるものの、形質転換しにくいことから、本菌は宿主とするのではなく他宿主のための有用なLC分解遺伝子源としての利用が望ましいと結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Streptomyces*属放線菌由来のLC分解に関する酵素の生化学的特徴や構造解析の報告例は多いが、放線菌のLC資化能自体に着目した研究例は少ない。本研究はその着眼でY2944を単離し、この菌株が豊富で多様なLC資化関連遺伝子を有すること、抗生物質の異種生産が可能であることを提示した。これら遺伝子は将来的に産業や学術研究への可能性を秘めた遺伝資源であり、有用なセルロース資化性放線菌宿主(当研究室保有)の宿主としての能力の向上を可能にできる。また、LCを原料とした抗生物質の異種生産に関する研究例はほとんどないため、将来的な技術確立のための基盤研究としての意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We screened for a highly cellulose- and xylan-decomposing streptomycete capable of producing antibiotics heterologously by introducing their biosynthetic genes, for the purpose of breeding of strains that can ferment antibiotics from lignocellulose (LC) as a raw material, to obtain *Streptomyces galbus* Y2944. The genome analysis of this strain revealed genes encoding 11 cellulases, 10 xylanases, and 10 xylan-debranching enzymes, suggesting that the abundance and diversity in xylan-decomposing genes are related to LC high utilization. Despite of successful heterologous production of an antibiotic, it was concluded that the application of our strain would be the useful gene source responsible for effective LC decomposition in other hosts rather than a genetic host, due to the difficulty in the transformation.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Streptomyces属放線菌 リグノセルロース 抗生物質生産

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

[背景] 植物バイオマスはセルロース、キシランを含むヘミセルロース、およびリグニンから構成されるリグノセルロース (LC)を豊富に含むが、有効に利用されておらず、その有効利用は大きな課題となっている。自然界の LC 資化性微生物は、種々の LC 分解関連酵素を協力的に作用させて LC を分解する。抗生物質生産菌として利用されている *Streptomyces* 属放線菌でも、セルロースやキシランを分解する菌株が数例報告され[1]、一部の分解酵素について報告されているが、分解の全体像は明らかにされていない。また、リグニン分解放線菌も報告されているがその資化の仕組みは明らかではない。

[先行研究] 申請者らはセルロース高度資化菌を利用した有用物質生産（バイオリファイナリー）を目指し、研究室保有の放線菌株コレクションからセルロース高分解能を有する *Streptomyces thermocarboxyus* C42 を選抜し、そのセルラーゼ分解系遺伝子を解析した[2]。また、C42 に抗生物質カスガマイシン(KSM)の生合成遺伝子群[3]を導入し、稲わらや木綿、一部木材粉末からの KSM 生産に成功した。しかしこの遺伝子導入株はスギ心材部粉末からは KSM を生産せず、LC 素材を原料とした物質生産においては LC の高度資化が鍵になると考えられた。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、【基礎研究】優れたLC資化能をもつ*Streptomyces* 放線菌株を新たに選抜して、当該菌株によるLC分解を遺伝学的・酵素学的に明らかにするとともに、【応用研究】この菌株を宿主として、あるいはそのLC分解遺伝子群を導入した菌株による、有用物質生産系を新規に確立することを目的とした。そのため、当初、

### 基礎研究

- (1) LC 高度資化放線菌の新規選抜および分解能評価
- (2) ゲノム解読によるLC分解遺伝子群の網羅的探索
- (3) LC分解遺伝子の発現解析
- (4) LC分解遺伝子産物の強制発現及び活性評価

### 応用研究

- (5) LC高度資化放線菌の宿主開発と有用物質生産系の確立
- (6) 「抗生物質生産放線菌+LC分解遺伝子群」による有用物質生産系の開発

について検討することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 菌株の遺伝子操作

組換え DNA 実験は、大腸菌 JM109 のほか、*Streptomyces lividans* TK21、*S. thermocarboxyus* C42 を宿主とする系で行った。大腸菌の遺伝子操作は Sambrook ら[4]の、*Streptomyces* 属放線菌の遺伝子操作は Kieser らの成書[5]に従って行い、必要な分子生物学実験用の試薬および酵素類は、タカラバイオ社、東洋紡製のものを使用した。PCR プライマーとして使用したオリゴ DNA は北海道システムサイエンス社で合成し、シークエンシング実験は秋田県立大学のバイオテクノロジーセンターにて行った。

### (2) LC分解関連酵素活性の測定

カルボキシメチルセルロース(CMC)アッセイは、セルラーゼ活性の強弱の判定に行った。セルラーゼ活性の測定は、CMC、リン酸膨潤セルロース(PASC)、ろ紙セルロース(FP)を基質とし、バイオインダストリー協会により示された活性測定法に準じ、ジニトロサリチル酸(DNS)法によって測定した[2]。キシラン分解活性は、市販のブナ材、カバ材、もしくはトウモロコシ由来のキシランを基質として、セルラーゼと同様に測定した。反応はすべて3連で行った。

### (3) KSM発酵試験と分析

本研究では抗生物質の異種生産系のモデル系として、分離したLC高度資化放線菌にKSM生合成プラスミドpKSM109[3]を導入してKSM生産を調べた。pKSM109を導入した形質転換株を、グルコース、アビセル、スギ木粉末、セルロースナノファイバー2種(A, B)、キシラン（ブナ材）をそれぞれ炭素源(1.0%)として添加した半合成のMY培地20 mL(100 mL三角フラスコ)で、28℃で10日間、180 rpmの回転振盪培養を行った(3連)。この培養上清について、KSM生産量、セルラーゼ活性、キシラン分解活性を測定した。KSMはHPLC(イオン対分析)により測定した。培養上清中のセルラーゼ活性とキシラン分解活性は、PASCとブナ材キシランを各々基質として、測定した。

### (4) ゲノム解読と遺伝子の探索

ゲノム解読はタカラバイオ社に依頼し、Y2944のゲノムDNAの抽出、15 kb以上のDNAから構成されるライブラリーの作製、PacBio *RSII*によるシークエンシング、アセンブリーを実施した。さらに原核遺伝子予測により、得られた配列に含まれる遺伝子の読み枠を推定した。

上記により得られた候補遺伝子について、LC資化関連遺伝子群を探索するため、CAZyデータベース(<http://www.cazy.org>)に登録されているセルロースおよびキシランの分解に関与する酵素群や、NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)のGenBankに登録されている既知のLC資化

関連遺伝子群の産物のアミノ酸配列をクエリとして、推定アミノ酸配列データからLocal BLASTによりLC資化関連遺伝子の候補を探索し、見出された候補についてさらに保存ドメイン解析を行った。

#### (5) 遺伝子の強制発現系の構築と遺伝子産物の精製

セルラーゼ及びキシラナーゼは菌体外酵素でありN末端にはシグナル配列を含んでいるため、すべてC末にHisタグを付加した組換えタンパク質となるようにし、さらに5'末端には開始コドンに合わせたNdeI部位、C末端側にはXbaI部位のタグを付加したPCRプライマーを設計した。KOD酵素(東洋紡)で増幅させたDNA断片をpKU460(北里大学の池田教授による)に連結して発現ベクターを構築し、これを放線菌宿主TK21またはC42に導入した。組換え株をTSB培地で培養し、培養上清中に分泌された組換えタンパク質を、HisTrap FF Crude(GEヘルスケア)を用いてアフィニティー精製した。タンパク質の定量は、ウシ血清アルブミンを標準としてビシンコニン酸法により行った。SDS-PAGEによるタンパク質の分離検出は成書[6]に従って行い、ウエスタンブロッティングによるHisタグ付加タンパク質の検出はマウス抗His-Tag抗体(Sigma Aldrich)を用いて検出を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) LC 高度資化放線菌の新規選抜および分解能評価

スギ木材粉末を主要炭素源として研究室保有の 1,350 の放線菌株を培養し、培養上清に分泌されたセルラーゼ活性を CMC 分解アッセイにより評価して、活性が強い *Streptomyces* 属放線菌株 11 株を選抜した。これら 11 株を再度同培地にて 3 連で培養し、培養上清中の総セルラーゼ活性および総キシラナーゼ活性を測定し、セルロース分解の基準株とした C42 株のものと比較した。その結果、C42 に比べて、*Streptomyces galbus* Y2944 と Y3042、および *Streptomyces achromogenes* Y2939 は両活性が顕著に高く、これらを LC 高度資化性放線菌として選抜した(表 1)。

また、これら 3 株については、リグニン分解酵素として知られるペルオキシダーゼ活性、また、リグニン代謝に関連するプロトカテク酸の資化能のいずれも見出すことはできなかった。

表 1 単離した放線菌による LC 分解活性

菌株	セルラーゼ活性(mU/mL)	キシラン分解活性 (mU/mL)
<i>S. achromogenes</i> Y2939	3.50 ± 0.40	1,100 ± 50
<i>S. galbus</i> Y2944	4.67 ± 0.42	2,090 ± 40
<i>S. galbus</i> Y3042	3.57 ± 0.39	1,120 ± 30
<i>S. thermocarboxydus</i> C42	2.46 ± 0.28	590 ± 52

#### (2) LC 高度資化放線菌の宿主開発と有用物質生産系の確立

選抜した LC 高度資化性放線菌の 3 株は、抗菌物質生産用培地(オートミール液体培地と GSSY 培地)で 1 週間振盪培養し、培養液のアルコール抽出液を *Pseudomonas fluorescens* IFO15334 を被験菌とするバイオアッセイに供したが、この系では抗菌活性物質を生産しないことがわかった。

本研究では抗生物質 KSM 生合成プラスミド pKSM109 を用いた KSM の異種生産系を用い、抗生物質生産プラスミドの導入による抗生物質の異種生産が可能か検討した。まず各放線菌株をプロトプラスチ化して pKSM109 の導入実験を行ったところ、Y2944 株のみでプラスミド導入株が得られた。ただし、本株は C42 及び他の遺伝子導入宿主に比べても形質転換しにくい株であることが判明した。

Y2944 の pKSM109 導入株(Y2944/109)について各種セルロース系基質を原料とした KSM 生産実験を行った(図 1)。ここでは、比較対照としてセルロース高度資化菌 C42 の形質転換体(C42/109)、セルロース分解能が低い *S. lividans* TK21 の形質転換体(TK21/109)を用いた。Y2944/109 は他 2 株に比べて、この条件では KSM 生産が高い

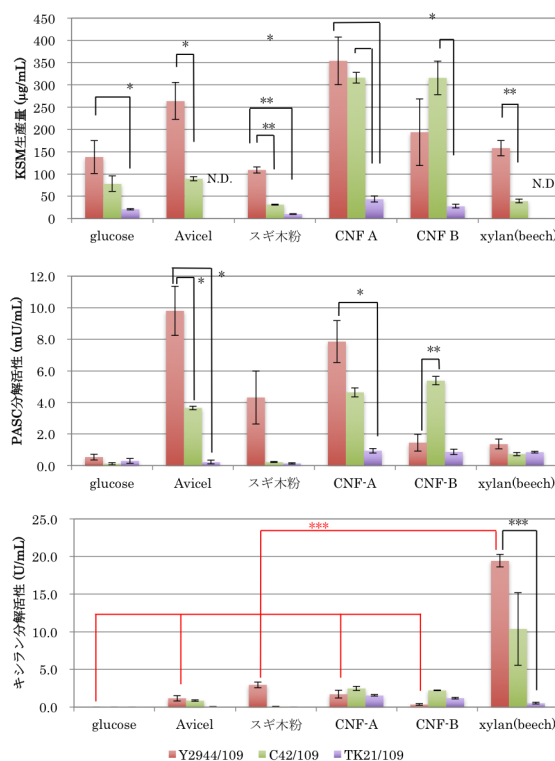


図 1 Y2944 形質転換体による KSM 生産

N.D., not detected; \*, p<0.05; \*\*, p<0.01.

傾向が見られ、特にアビセルとスギ木材粉末、キシランでは顕著であった。これはアビセル及びスギ木粉末の培養でのセルラーゼ活性(PASC 分解活性)や、キシラン培養でのキシラン分解活性の高さと相関しており、これら素材を原料とした物質生産では Y2944 が優位であると考えられた。一方、セルロースナノファイバー2種の培養では Y2944 と C42 の間に KSM 生産量に差は見られず、これを原料とした場合には両株に優劣はつけられなかった。

### (3) ゲノム解読による LC 分解遺伝子群の網羅的探索

最も高いセルロース及びキシラン分解活性を示した Y2944 のゲノム解読を行い、LC 高度資化能を担う遺伝子系を明らかにすることにした。Y2944 のゲノム解読には他の放線菌同様に、ポリケチドや非リボソームペプチドの生合成遺伝子群など数多くの繰返し配列が含まれると予想されたため、これを克服可能な Pac Bio RSII システムを採用しゲノム解読を進めた(タカラバイオ社に依頼した)。これまでに Y2944 のゲノムは 3 コンティグにアSEMBL され(計 8.80 Mb)、最大のものは 7.93 Mb の線状 DNA であった。さらに遺伝子予測を行ったところ、最大 9,989 のタンパク質コード遺伝子、6 つの rRNA オペロン、67 tRNA 遺伝子を見出した。

見出された推定遺伝子の中から、BLAST 解析と Pfam 解析を組合せて各種糖加水分解酵素(GH)ファミリーに属する LC 分解関連遺伝子を探索し、セルロース資化に関連すると予測される 10 のセルラーゼ遺伝子と 2 つのセロビオース資化オペロン、ヘミセルロースの資化に関連すると予測されるキシランナーゼ 11 種、キシラン側鎖分解酵素 10 種、及びキシログルカナーゼ 1 種の遺伝子を見出した(図 2)。これまでに当研究室で解析を進めたセルロース資化性放線菌 *S. thermocarboxyodus* C42 のセルラーゼ・キシランナーゼ遺伝子群と比較すると、GH5 family に属するセルラーゼ遺伝子、GH10 および GH30 family に属するキシランナーゼ遺伝子、GH43 family に属するアラビノフラノシダーゼ遺伝子などの遺伝子数が多く、これらの遺伝子産物が Y2944 において高いセルラーゼ活性・キシランナーゼ活性をもたらした可能性が高い。そのため、これら遺伝子の発現を解析して LC 資化との関連を明らかにする必要があり、個々の遺伝子産物の機能に関しても明らかにする必要もある。

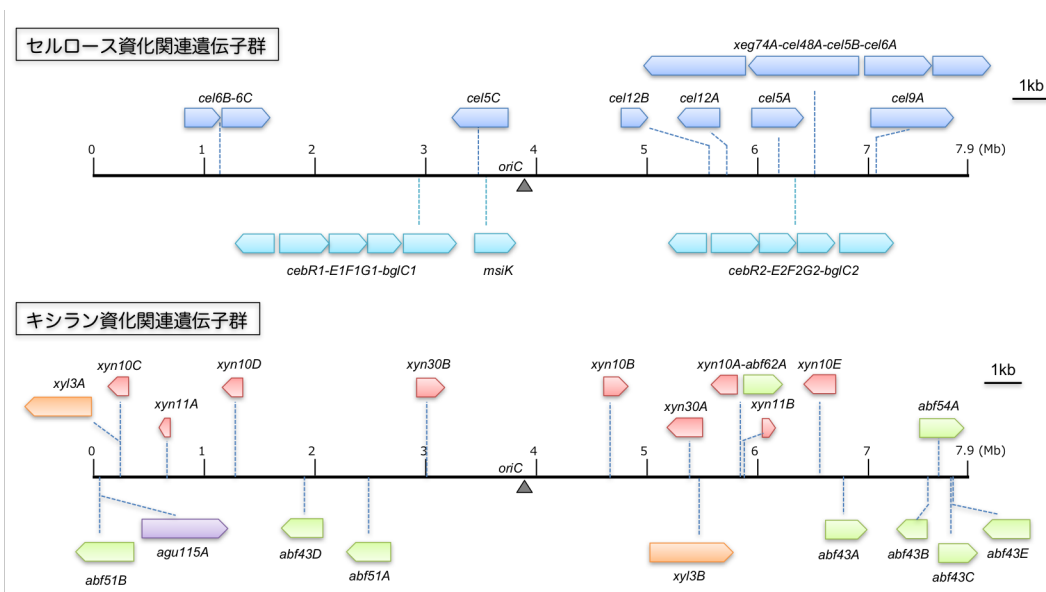


図 2 Y2944 ゲノムより見出された LC 資化関連遺伝子群

LC 資化関連遺伝子はすべて 7.9 Mb のコンティグ 1 上に見出された。*cel*, セルラーゼ遺伝子; *xeg*, キシログルカナーゼ遺伝子; *ceb*, *msiK*, セロビオース資化関連遺伝子; *bgl*, β-グルコシダーゼ遺伝子; *xyn*, キシランナーゼ遺伝子; *abf*, α-アラビノフラノシダーゼ遺伝子; *agu*, α-グルクロニダーゼ遺伝子; *xyl*, β-キシロシダーゼ遺伝子。

### (4) 遺伝子産物の強制発現と機能の解析

上記のように、Y2944 は C42 に比べて GH5 セルラーゼおよび G10 キシランナーゼ遺伝子の数が多い、また、これらは遺伝子産物の推定構造という点でも、C42 には見られないものが含まれていた。そこで、本研究ではまずこれら遺伝子群の強制発現を行った。

GH5 ファミリーのセルラーゼ遺伝子 3 種(*cel5A-cel5C*)を His タグ付加組み換えタンパク質として、*S. lividans* TK21 または *S. thermocarboxyodus* C42 を宿主として強制発現させ、各遺伝子産物を回収・精製した。Cel5A と Cel5C は PASC に加えて CMC に対しても活性を示し PASC からの主要生成物がセロビオース(Cel5A)、グルコース(Cel5C)であることから典型的なエンド型酵素であると判明した。一方、Cel5B は CMC に対しては活性を示さなかったが、PASC からはセロテトラオース、セロトリオース、セロビオースを生成したため、他酵素とは異なるタイプのエンド型酵素であると考えられた(表 2)。

表 2. 組換えセルラーゼによる PASC の分解

組換え酵素	生成糖量( $\mu\text{mol}/\mu\text{mol protein}$ )			
	glucose	cellobiose	cellotriose	cellotetraose
Cel5A	0.52	1.9	0.60	ND
Cel5B	ND	0.25	0.27	0.10
Cel5C	7.5	2.5	0.12	ND

ND, not detected.

GH10 ファミリーに属するキシラナーゼ遺伝子群については、これまでに *xyn10A* の発現系を構築することができ、組換え *Xyn10A* からはカバ材キシランを基質としてキシラナーゼ活性を検出した。一方、*xyn10C* 及び *xyn10D* については強制発現系を構築したものの、カバキシランおよびトウモロコシ由来キシランを基質として活性を検出することができなかつた。これらの基質ではそれぞれキシラン主鎖にメチルグルクロン酸、アラビノース、アセチル基などの側鎖が結合しており、一般に GH10 ファミリーのキシラナーゼはこれら側鎖置換のない部分の鎖を切断することが知られている。従って今後、他の適切な基質を用い、もしくは側鎖残基を除去する酵素との共存下で、組換えタンパク質の活性を評価する必要がある。

一方、*xyn10A-xyn10D* を推定プロモーター領域とともにクローン化して C42 に導入したところ、これら組換え体はキシランを主要炭素源とした培養において、有意に高いキシラン分解活性の発現誘導が見られた (表 3)。従って、これら遺伝子が Y2944 における高いキシラン分解能に寄与している可能性は高いと考えられる。

表 3. キシラナーゼ遺伝子の導入とキシラン分解活性の発現 (mU/mg タンパク質)(n=3)

培養基質	導入遺伝子				
	empty	<i>xyn10A</i>	<i>xyn10B</i>	<i>xyn10C</i>	<i>xyn10D</i>
キシラン	36 $\pm$ 11	399 $\pm$ 46	453 $\pm$ 14	308 $\pm$ 24	332 $\pm$ 37
キシロース	42 $\pm$ 5	42 $\pm$ 13	62 $\pm$ 17	30 $\pm$ 11	28 $\pm$ 5

## (5) 結論

本研究では、研究室保有の放線菌群から LC 資化性が高い *Streptomyces galbus* Y2944 を選抜し、本菌株が高いセルロース及びキシラン分解能を示すことを示した。ゲノム解読を実施し、本菌株がセルラーゼ、キシラナーゼ、アラビノフラノシダーゼなど多くの LC 資化関連遺伝子群を有することを明らかにした。一部のセルラーゼ遺伝子に関しては強制発現系を構築してその機能を明らかにし、キシラナーゼ遺伝子の一部については Y2944 におけるキシラン分解活性に寄与していることが示唆された。また、本菌株は遺伝子導入宿主としては扱いにくいことが判明したものの、抗生物質 KSM の生産遺伝子群の導入により KSM の異種生産が可能であった。

本研究では当初目的の実験項目のうち、LC 資化関連遺伝子群の発現解析など実施できなかった研究課題もあった。今後は未実施の研究項目を補い、本菌株の LC 資化関連遺伝子群の遺伝子資源としての優位性を明らかにし、将来的には人類に貢献できる産業基盤の育成につなげていきたい。

- [1] 近藤昭彦、天野良彦、田丸浩(2012) バイオマス分解酵素研究の最前線 (シーエムシー出版)
- [2] Tomotsune *et al.* (2014) *Int. J. Soc. Mater. Eng. Resour.* 20: 213–218.
- [3] Kausga *et al.* (2017) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101:4259–4268.
- [4] Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- [5] Kieser *et al.* (2002) *Practical Streptomyces Genetics* (John Innes Centre)
- [6] 岡崎雅人、宮崎香(2004) タンパク質実験ノート 第 3 版 (羊土社)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

佐藤亜美、日比野竜肅、櫻田浩平、牟田口祐太、春日和、小嶋郁夫  
セルロース資化性放線菌を用いたセルロース系バイオマスからのカスガマイシン生産  
日本放線菌学会 2018 年度大会 (2018 年 9 月 12 日)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名： 小嶋 郁夫  
ローマ字氏名： **Kojima Ikuo**  
所属研究機関名： 秋田県立大学  
部局名： 生物資源科学部  
職名： 教授  
研究者番号（8桁）： 90315581

研究分担者氏名： 牟田口 祐太  
ローマ字氏名： **Mutaguchi Yuta**  
所属研究機関名： 秋田県立大学  
部局名： 生物資源科学部  
職名： 助教  
研究者番号（8桁）： 30724314

研究分担者氏名： 志村 洋一郎  
ローマ字氏名： **Shimura Yoichiro**  
所属研究機関名： 秋田県立大学  
部局名： 生物資源科学部  
職名： 助教  
研究者番号（8桁）： 60333920

### (2)研究協力者

研究協力者氏名： 池田 治生  
ローマ字氏名： **Ikeda Haruo**

研究協力者氏名： 石川 淳  
ローマ字氏名： **Ishikawa Jun**

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。