

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 9 月 6 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K12631

研究課題名(和文) 分子レベルでのゴムの再生に挑戦 ～「ゴム再生菌」の創出と最適化～

研究課題名(英文) Expression of prenyltransferase gene in rubber degrading actinomycete

研究代表者

笠井 大輔 (Kasai, Daisuke)

長岡技術科学大学・工学研究科・准教授

研究者番号：80452085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：天然ゴムは、タイヤや一般工業用品など広い分野で利用される不可欠な資源であり、その全てを輸入に頼っている上、昨今の世界的ゴム需要の増大による価格の高騰と将来的な供給量不足が懸念されている。本研究では、微生物によるゴム廃棄物の再資源化技術の確立を目指して、細胞外でゴムを低分子化ゴム(イソプレンオリゴマー)へと変換するゴム分解菌の解析を行った。さらに、ゴム分解菌によりゴムから生産したイソプレンを重合することでゴムを再生させることを目指して、イソプレン重合活性を持つプレニルトランスフェラーゼの発現系の構築を行なった。

研究成果の概要(英文)：Natural rubber from *H. brasiliensis* is used industrially for tires, seismic isolation rubbers, and medical gloves. The waste of these products have been treated by combustion or landfill processes, which are hazardous to the environment. It is required to find alternative treatment process for rubber waste. In the present study, the characterization of the rubber degradation mechanism of natural rubber degrading actinomycete and the expression of prenyltransferase which has the activity to polymerize isoprene unit, in the rubber degrader were carried out, in order to establish alternative recycle system for rubber waste. When the prenyltransferase gene from *Gordonia* which was cloned to pNC9503 was introduced into the cells of the rubber degrader, the expression of the gene was found. Further improvement of the gene expression will be needed to develop the recycle system for rubber waste using the rubber degrading actinomycete.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ゴム分解細菌 プレニルトランスフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

天然ゴムは、タイヤや一般工業用品など広い分野で利用される不可欠な資源であり、その全てを輸入に頼っている。加えて、昨今の世界的ゴム需要の増大による価格の高騰と将来的な供給量不足が懸念されている。また化石資源を原料とする合成ゴムの需要も増大している。さらには、増加が予想されるゴム廃棄物の処理による環境負荷が懸念されている。以上の観点から、安定したゴム資源の供給において高い環境調和性を実現するためのゴム廃棄物のリサイクルシステムの確立は早急に取り組むべき課題である。

我々が発見したゴム分解菌は、分泌型のゴム分解酵素を持ち、細胞外でゴムを低分子化ゴム(イソプレンオリゴマー)へと変換する【Enz Microb Technol, 49(6-7), 526-531, 2011】。これは、燃焼や化学処理等の従来法では不可能なゴムの基本骨格(機能性)を保持したままの分解(=低分子化)を可能とする。その一方で、植物のイソプレン重合酵素は、イソプレンオリゴマーを重合し、ポリマー化できる【Eur J Biochem, 270, 4671-4680, 2003】。これらの機能を融合させることにより、分子レベルでのゴムの再生が実現できると考えられる。

2. 研究の目的

ゴム分解菌である *Nocardia* sp. NBRC15532 株は、細胞外でゴムを低分子化ゴム(イソプレンオリゴマー)へと変換することが明らかとなっている。これは、燃焼や化学処理等の従来法では不可能なゴムの基本骨格であるイソプレン骨格を保持したままの分解、つまり低分子化を可能とする。一方、植物や一部の細菌で知られているイソプレン重合酵素(*cis*-プレニルトランスフェラーゼ)はイソプレンの重合活性を示すことから、*cis*-プレニルトランスフェラーゼ遺伝子(*cpt*)を *Nocardia* sp. NBRC15532 株で発現させることで、細胞外でのゴムの低分子化と細胞内でのイソプレンの重合が可能となると考えた。つまり、ゴム廃棄物の再資源化に繋がると考えられた。本研究では、分子レベルでのゴム再生系の確立を目指して、*cpt* 遺伝子を効率的に発現する *Nocardia* sp. NBRC15532 株を作出するために、NBRC15532 株のゴム分解遺伝子の特定と *cpt* 遺伝子発現系の構築を行った。

3. 研究の方法

3-1. ゴム分解遺伝子の特定

1) ゴムの存在下または非存在下で培養したゴム分解菌 *Nocardia* sp. NBRC15532 株から遺伝子転写産物を調製し、DNA シークエンサーを用いた RNA シークエンス解析により遺伝子の発現量変化を網羅的に解析した。両条件の比較から、ゴムの存在下で特異的に発現が増大する遺伝子、すなわちゴム代謝に関わると考えられる遺伝子を限定

した。さらに、既に解読しているゴム分解菌の全ゲノム DNA 配列と照合することで目的遺伝子の塩基配列を特定した。

2) 上記 1) で推定した遺伝子が、真にゴム分解に関与するかを明らかにするために、CRISPR-Cas9 システムを利用してインフレームでの遺伝子欠失を行った。得られた遺伝子欠失株候補の全 DNA を鋳型に PCR を行うことで、目的遺伝子が欠失されたことを確認した。さらに、破壊した遺伝子のゴム分解への関与を明らかにするために、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)分析により破壊株のポリイソプレン分解能を評価した。

3) 特定したゴム分解遺伝子がコードする酵素が直接ゴム分解に関与するかを明らかにするために、大腸菌を宿主として生産させた当該遺伝子産物を精製した。得られた精製酵素を用いて、天然ゴムの分解能を評価した。本酵素は、ゴムに酸素を添加し開裂すると考えられるため、酸素消費活性と指標として分解能を評価した。さらに FT-IR 分析を用いて反応産物の推定を行なった。

3-2. *cis*-プレニルトランスフェラーゼ発現プラスミドの作製とゴム分解菌への導入

*Gordonia* 属の *cis*-プレニルトランスフェラーゼ遺伝子(*cpt* 遺伝子)をプラスミド pNC9503 に導入し、*Nocardia* sp. NBRC15532 株にエレクトロポレーション法により導入した。導入した遺伝子の発現を定量 PCR 解析により調べた。

4. 研究成果

4-1. ゴム分解遺伝子の特定

1) ゴム分解菌 *Nocardia* sp. NBRC15532 株のゴム分解遺伝子を特定するために、ゴム

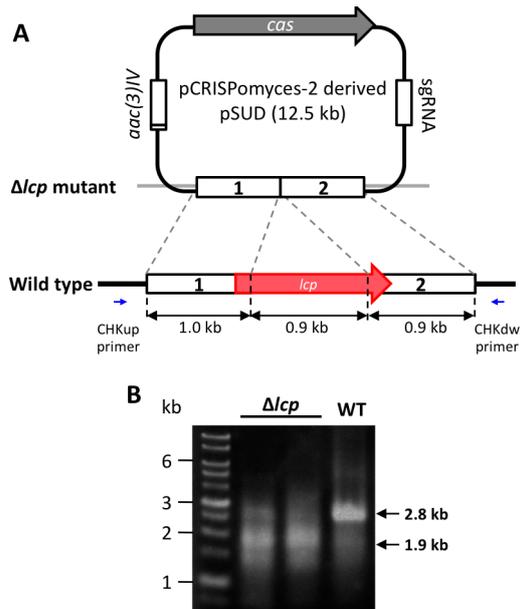


図 1. NBRC15532 株の *lcp* 破壊. (A) 破壊用プラスミド. (B) PCR による遺伝子欠失の確認. (A) の CHKup および CHKdw プライマーペアを用いて野生株と *lcp* 欠失株の全 DNA を鋳型に行った PCR 結果.

の存在下または非存在下で培養した NBRC15532 株から全 RNA を調製した。得られた RNA 試料を逆転写し、シークエンズライブラリーを作製した後、DNA シークエンス解析を行った。その結果、ゴム存在下での培養時に 545 遺伝子で 2 倍以上の発現量の増大が観察された。なお、発現量の増大が認められた遺伝子には細胞外においてゴムの初発分解に関与すると考えられるオキシゲナーゼをコードする *lcp* 遺伝子(ゴム培養時に 3.4 倍の発現量増大)が含まれていたことから、NBRC15532 株のゴムの初発分解には、*lcp* 遺伝子が関与することが強く示唆された。

2) *lcp* 遺伝子が NBRC15532 株のゴム分解に関与するかを明らかにするために、本遺伝子の遺伝子破壊を行なった。CRISPR-Cas9 システムを含む pCRISPOmyces-2 ベクターに *lcp* 内部に位置するスペーサー配列 (5'-CACCAAGCGAGTCTTGACGC-3')、並びに相同組換えに使用する *lcp* 上流及び下流配列を挿入した (図 1)。*lcp* 欠失株のポリイソプレン分解能を評価するために、野生株と *lcp* 欠失株の培養菌体を用いてポリイソプレンを基質に 37°C で反応を行った。反応 20 日後の試料を抽出し、残存するイソプレンの分子量を GPC で分析した結果、野生株反応液では、ポリイソプレンの低分子化が観察された (図 2)。その一方で、*lcp* 欠失株では、反応開始時と同等の分子量を示すピークが観察されたことから、ポリイソプレンの分解能を欠損していることが示された (図 2)。以上の結果から、*lcp* 遺伝子が NBRC15532 株のポリイソプレン分解に必須であることが強く示唆された。

3) *lcp* 遺伝子産物の機能を明らかにするために、ヒスチジンタグを付加した本遺伝子 (*lcp-his*) を大腸菌で発現させ、得られた Lcp-His 酵素を Ni-アフィニティカラムで精製した (図 3)。得られた精製酵素とポリイ

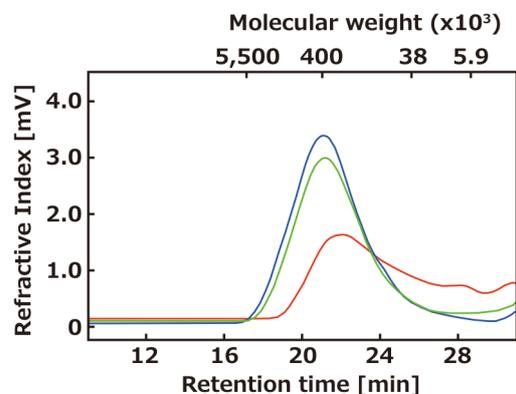


図 2. GPC 分析による野生株及び *lcp* 欠失株のポリイソプレン分解能の評価。青：反応開始時。赤：反応 16 時間後 (野生株)。緑：反応 16 時間後 (*lcp* 欠失株)。反応液を全抽出し、残存するポリイソプレンの分子量を GPC で分析した。

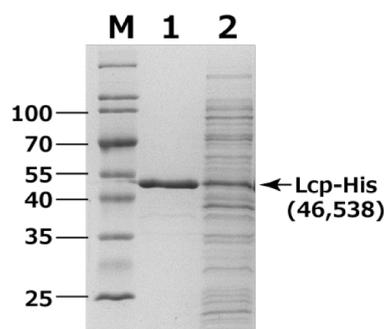


図 3. NBRC15532 株 *lcp* 遺伝子産物の精製。レーン M, 分子量マーカー。レーン 1, 精製 Lcp-His (2 µg)。レーン 2, *lcp-his* 組換え大腸菌の細胞抽出液 (10 µg)。Lcp-His がほぼ単一に精製されたことが確認された。

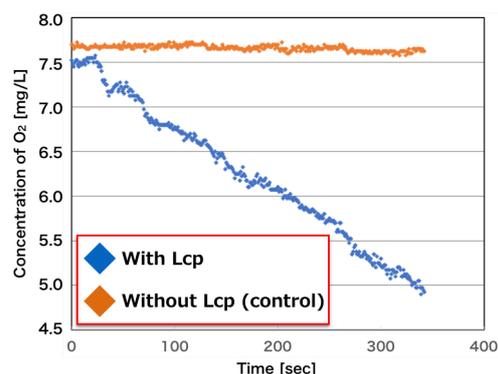


図 4. Lcp-His によるポリイソプレン分解時における酸素消費活性。基質溶液に 10 µg の酵素を添加した 2 ml の系で反応させ、酸素濃度を経時的に測定した。

ソプレンを反応させた際の酸素消費を測定した結果、時間の経過とともに酸素濃度の現象が観察された (図 4)。この結果から、Lcp は酸素を添加することポリイソプレンを分解することが示唆された。

さらに、精製酵素とポリイソプレンを 37°C にて 16 時間反応させた結果、ポリイソプレンの分解が観察された。反応後の液中に残った凝集物を FT-IR で分析した結果、アルデヒドの存在を示すピークが観察された (図 5)。以上の結果から、Lcp はポリイソプレン分解に直接関与し、イソプレン鎖に酸素を添加することでポリイソプレンをアルデヒドを含むイソプレンオリゴマーへと分解することが示唆された (図 6)。

#### 4-2. *cis*-プレニルトランスフェラーゼ発現プラスミドの作製とゴム分解菌への導入：

ゴム分解菌でイソプレン重合活性を示す *cis*-プレニルトランスフェラーゼを発現させるために、本酵素をコードすると考えられる *cpt* 遺伝子をクローニングした。823 bp からなり、273 アミノ酸をコードする *Gordonia* 属由来の *cpt* 遺伝子 (図 7) を PCR により増幅し、プラスミドベクターに挿入した。得られたプラスミドを NBRC15532 株に導入した結果、数十コロニーの形質転換体候補を得た。複数の候補の培養菌体から全 RNA を調製し、*cpt* 遺伝子の内部領域に特異的なプラ

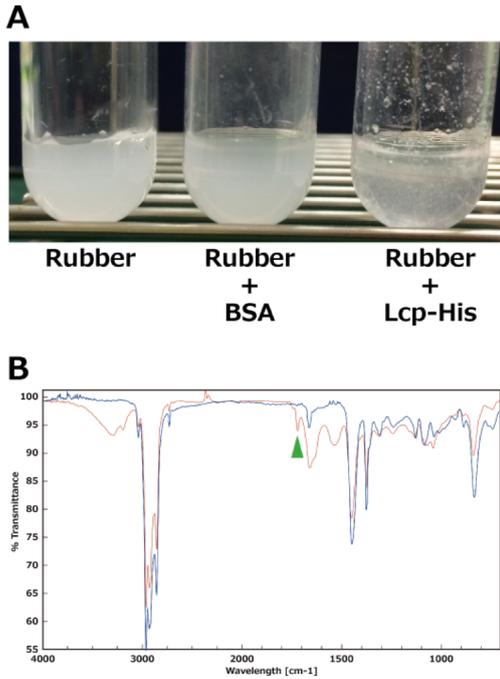


図 5. Lcp-His によるポリイソプレン分解能. (A) ポリイソプレンと Lcp-His (10 μg)または BSA (10 μg)を添加し、37°C で 16 時間反応させた結果. ゴムの分解が観察された. (B) FT-IR 分析結果. 青: 反応開始時. 赤: 反応 16 時間後における結果. 緑矢印: アルデヒド由来するピーク.

イマーを用いて定量 PCR 解析を行った. その結果、*cpt* 遺伝子の転写が観察されたことから、本組換え体において *cpt* 遺伝子が発現していることが示唆された.

得られた組換え体の生育菌体または超音波破碎により調製した細胞抽出液を用いてイソプレンの重合活性を TLC 分析により調べたが、顕著な重合能の検出には至らなかった. 今後、異なるプロモーターを含む別の発現系を用いるか、*cpt* 遺伝子を NBRC15532 株ゲノム中に組込むことで安定的な発現系を構築する必要があることが明らかとなった.

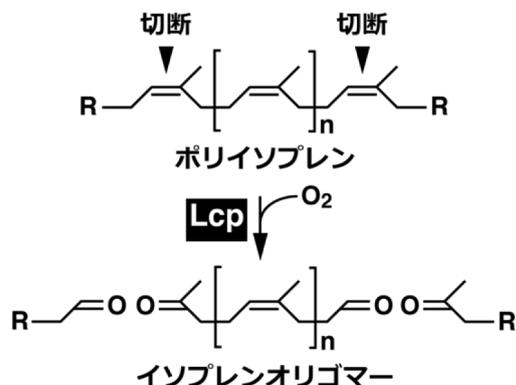


図 6. Lcp が関与する推定のポリイソプレン分解経路. Lcp による酸素添加でイソプレンが切断され、アルデヒドを含む産物が生じる.

```

ATGGCGTTGCGGCCGGTAGCTCCGCCAAGAAGCAGACCGCGCAC
M A L R P G S S A K K Q T A H
CGGGCAGTACGCTCATCCGCCCGCCGATCCCATCCAGCGGT
R A R T L I R P P D P H P S G
GCCACCCACCGAATCTGCTCCGGAGTTCGTCCTCCATCAGTC
A T P P N L P P E F V P N H V
GCCTGTGGTGGACGGCAACGGACGGTGGCCACCGACCGCGGC
A L V M D G N G R W A T D R G
CTACCCGACCGAGGGGCAAGCGCGGGGAGCGCTGTGTATG
L P R T E G H K R G E A V L M
GACACCGTGTGGGATGTATCGAGATCGGCGTGGAGTGGTGTGCG
D T V C G C I E I G V E W L S
GCGTAGCGTTCTCGACCGAAGTGGTCCGGTAGTCCCGACGAG
A Y A F S T E N W S R S P D E
GTCCGGTTCCTGATGGGGTCAACCGTACGCTGATCCGACGTCGG
V R F L M G F N R D V I R R R
CGTGACGAGATGCACGAGATGGGGTGGCGTGGCGTGGCGCGGA
R D E M H E M G V R V R W A G
CGGGCGCGCGGTGTGGCGCAGCGTCAAGGAAGTCCGAGTTC
R R P R L W R S V I K E L E V
GCCGAGAACTGACCAAGGCAACGACGTGATGACGCTGACCATG
A E E L T K D N D V M T L T M
TGCGTCACTACGGTGGACGTGCGGAGATCGCGGATCGCCGAAGG
C V N Y G G R A E I A D A A R
GAAATCGCGGGCGAGCGCGCGCGGAGATCGACCGGAAACGG
E I A R R A A A G E I D P E R
ATCACCGAGTCTCCTTCGCGGATACCTCGATGAGCCGGACATG
I T E S S F A R Y L D E P D M
CCCGACGTCGACCTGTTCTTGGTCCCTCGCGGAGCAGCGCATC
P D V D L F L R P S G E Q R I
TCCAATCTTGTCTGGCAGTGGGCTACGCCGAAATGGTGTAC
S N F L L W Q S A Y A E M V Y
CAGGAGAAGCTTTCCGATTTCGATCGCGCGACCTGTGGGGG
Q E K L F P D F D R R D L W A
GCGTGTCTGAATACGCTCACGCGACCGCGCTTCGCGCGGGTC
A C L E Y A S R D R R F G G V
AGACCCACATGA
R P T *

```

図 7. *Gordonia* 属由来 *cpt* 遺伝子の配列と推定のアミノ酸配列.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Kasai, D., Imai, S., Asano, S., Tabata, M., Iijima, S., Kamimura, N., Masai, E., Fukuda, M. Identification of Natural Rubber Degradation Gene in *Rhizobacter gummiphilus* NS21. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81 (3), 614-620. 2017.
2. Linh, D.V., Huong, N.L., Tabata, M., Imai, S., Iijima, S., Kasai, D., Anh, T.K., Fukuda, M. Characterization and functional expression of a rubber degradation gene of a *Nocardia* degrader from a rubber-processing factory. *J. Biosci. Bioeng.*, 123(4), 412-418. 2017.

[学会発表] (計 3 件)

1. 天然ゴム分解菌 *Rhizobacter gummiphilus* NS21 株のポリイソプレン代謝酵素遺伝子群の解明. 笠井大輔、今井俊輔、小黒健太、田端理朗、上村直史、政井英司、福田雅夫. 環境バイオテクノロジー学会 2016 年度大会 (広島) 2016 年 6 月 13 日~2016 年 6 月 14 日
2. Characterization of natural rubber degradation gene in *Rhizobacter gummiphilus* NS21. 笠井大輔、今井俊輔、田端理朗、上村直史、政井英司、福田雅夫. International BioFest 2016 (オーストラリア・メルボルン)

2016年10月24日～2016年10月27日

3. Characterization of natural rubber degradation gene in *Rhizobacter gummiphilus* NS21.

Dao Viet Linh、今井俊輔、田端理朗、笠井大輔、福田雅夫.

International BioFest 2016 (オーストラリア・メルボルン)

2016年10月24日～2016年10月27日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://bio.nagaokaut.ac.jp/~dkasai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 大輔 (KASAI, Daisuke)

長岡技術科学大学・技学研究院・准教授

研究者番号: 80452085