

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32704

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12389

研究課題名(和文) 菌類を利用した新規なゴム分解酵素の探索から有機化学的手法を用いた解析への構築

研究課題名(英文) Search for new rubber-degrading enzymes produced by fungi and analysis using organic chemical methods

研究代表者

清水 由巳 (Shimizu, Yumi)

関東学院大学・理工学部・教授

研究者番号：50725124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： ゴム資化真菌2菌種を用い、ゴム培地で菌を培養時に発現量が多かつ細胞外分泌シグナルペプチド配列をもつ遺伝子を検索した。その結果、*H. marmoreus* では 27 遺伝子、*Phanerochaete sp.* では 30 遺伝子同定した。これら遺伝子を担子菌酵母に導入した。酵母でタンパク質合成させ細胞外へ分泌させて、タンパク質調整の簡便化を試みた。

菌作用後のゴム試料の構造解析より、SBRに水酸基が付加されること、IRの断片化が起こることを確認した。細胞外分泌性のリパーゼを産生する酵母の細胞外分泌性リパーゼの一部アミノ酸配列を決定した。このアミノ酸配列をコードする3遺伝子を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SBR、IRの合成ゴムを分解する白色腐朽菌を2菌種得た。これらの菌を応用すれば、環境負荷の少ない廃ゴム処理方法を見出せる可能性がある。また、SBRとIRの分解物の同定を現在試みている。分解物の分子量は100以上のものであり、構造式が明らかになれば加工利用する方法も具体化する。

低温でも活性があり、細胞外分泌性のリパーゼの同定を試みた。本酵素をコードすると予想される遺伝子を3遺伝子まで絞りこんだ。本酵素は脂質を分解することを確認しているが、ゴム分解への関与が明らかになれば、低い温度でも酵素活性が高いため、油による海洋汚染の浄化はもちろん、海洋プラスチック汚染に対応できることが期待される。

研究成果の概要(英文)： (1) Two rubber assimilation fungi were used. We searched for genes with a particularly high expression level and a signal peptide sequence when these fungi were cultured in a rubber medium. As a result, 27 genes were identified in *H. marmoreus* and 30 genes were identified in *Phanerochaete sp.* These genes were introduced into basidiomycete yeast. Protein sample preparation was simplified by having yeast synthesize the protein and secrete it extracellularly. (2) From the structural analysis of the rubber sample, SBR or IR which were treated by these fungi, it was confirmed that a hydroxyl group was added to SBR and IR fragmentation occurred. (3) The amino acid sequence of a part of the extracellular lipase of yeast that produces extracellular lipase was determined. Three genes encoding this amino acid sequence were obtained.

研究分野：微生物学

キーワード：白色腐朽菌 ゴム分解 遺伝子クローニング

1. 研究開始当初の背景

海洋プラスチック汚染は世界的な環境問題として認識され、2022 年現在もその供給源となるプラスチック廃棄物のリサイクル推進と、自然界への流出を防ぐ対策の強化がなされている(2016 年ダボス会議)。海洋プラスチック汚染の原因となるプラスチック廃棄物供給源は、毎年 1230 万トン陸から海に流れ込むプラスチック廃棄物である (Eunomia, 2016)。廃プラスチック類には、合成樹脂くず、合成繊維くず、合成ゴムくず(廃タイヤを含む)など合成高分子系化合物が含まれる。これら廃プラスチック類は、2016 年では日本で 899 万トン廃棄されており(一般社団法人プラスチック循環利用協会)、その中でも廃タイヤは、103.4 万トンを占めていた。

廃ゴムは、90% 以上がリサイクルされるが熱利用が主である。しかしながら、地球温暖化対策と自然界の物質循環に適合する社会の構築が求められていること、合成ゴム原料の約 70% がナフサを出発原料とする化学製品であり、石油への依存度が高いことなどの理由から、原型加工利用による有効で、環境負荷の少ないリサイクル技術、分解技術の開発が必要であった。

このような背景のもと、我々は、環境負荷の少ない微生物由来の酵素によるリサイクル法、分解技術を開発し、循環型社会の形成に貢献することを今現在でも最終目的とし、2016 年から今現在も研究を続けている。

2. 研究の目的

廃タイヤや廃ゴムの多くは、天然ゴム、合成ゴム、合成樹脂を様々に配合させている。また、ゴムは強度と弾力性を得るために、加硫し鎖状のゴム分子を結合させるが、架橋様式も硫黄架橋、パーオキサイト架橋、複合系と複数である。このようなゴムの構造の複雑さが、他の廃プラスチック類と比較し、廃ゴムの自然界での完全分解、あるいは原型加工利用を困難にしている。そこで、我々は、白色腐朽菌の 1 種、*Ceriporiopsis subvermispora* が架橋した天然ゴムを分解するとの報告があること (Sato, 2005)、真菌類は様々なタイプのリパーゼを産生し、ダイオキシン類、ホルボールエステルなどを分解することなどから、真菌類、特に白色腐朽菌によるゴム分解について着目した。ゴム分解菌は、放線菌などいくつか分離されているが、ゴム分解酵素の同定やゴム分解メカニズムの解明までを行った報告は少ない。そこで、本申請の研究期間内では、ゴム資化真菌、あるいは新規リパーゼ産生酵母菌からゴム分解酵素をコードする遺伝子の同定を試み、得られた酵素の作用機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

ゴム分解候補株である、*Phanerochaete* sp.、*H. marmoreus* を用いた。また、ゴム分解関連遺伝子を遺伝子導入するために、担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* を用いた。リパーゼをコードする遺伝子のクローニングには *Wicherhamomyces psychrolipolyticus* を用いた。プラスミドの調製には大腸菌 NEB10-beta (NEB) 株を用いた。

(2) ゴム分解関連遺伝子のクローニングについて

ゴム分解候補株を炭素源としてグルコースあるいはゴムを添加した培地で培養し、発現する遺伝子群の転写量比較をトランスクリプトーム解析により行い、ゴム添加培地で多く発現する遺伝子群を同定した。次に、その配列情報から細胞外分泌タンパク質と予想されるものと、それ

以外のタンパク質に分類した。細胞外タンパク質は、ゴムに直接作用するゴム分解酵素である可能性が高いため、これらタンパク質をコードする遺伝子から機能解析を行った。まずは *H. marmoreus* について遺伝子のクローニングを行った。遺伝子のクローニングには、ヒスチジン残基 7 個 (His タグ) をコードする DNA オリゴマーを PCR 産物の 3'末端側に付加するため、His タグを付加したプライマーセットを設計し、*H. marmoreus* の gDNA を鋳型とし PCR 増幅することによりゴム分解関連遺伝子断片を得た。この遺伝子断片を *C. neoformans* 用発現ベクターにつなぎ合わせ、ゴム分解関連遺伝子の *C. neoformans* 用遺伝子挿入カセットを作製した。作製した遺伝子導入カセットを *C. neoformans* に形質転換し、形質転換体を得た。

(3) ゴム分解関連酵素ラッカーゼ活性測定

H. marmoreus のラッカーゼ遺伝子を導入した *C. neoformans* の形質転換体を用いて、ラッカーゼ活性を測定した。液体培地で菌体を培養後、培養液をチューブに移し、遠心後、得られた上清を粗酵素液として用いた。基質にはグアイアコールを用い、反応時間 10 分間における、グアイアコールの酸化物を 465 nm における吸光度を測定することにより検出した。タンパク量は Nano Drop Lite (Thermo Fisher Scientific) (280 nm) で測定した。

(4) ゴム分解物の構造解析

H. marmoreus と分離株 *Phanerochaete* sp. の 2 菌株を使用した。Yeast extract を 0.1% 含む YNB w/o amino acid and ammonium sulfate 液体培地に、スクアレン (Wako)、Solanesol (東京化成工業)、Farnesyl Acetate (東京化成工業)、合成ポリイソプレン (LIP-30) (Kuraray)、SBR、加硫ゴムをそれぞれ加えた培地を用いた。植菌後、25 °C、1 週間、あるいは 2 週間培養を行った。培養液からのイソプレンオリゴマーの抽出は、菌体を除去後、ジエチルエーテルと石油エーテルを使用した。抽出物から溶媒を除去後、回収量を測定し、ジクロロメタンで溶解後、TLC により抽出物の検出を行った。展開溶媒にはジクロロメタンを用いた。抽出物のおおよその分子量は SEC-HPLC により測定した。また構造解析は、ゲル浸透クロマトグラフィー、フーリエ変換赤外分光分析、核磁気共鳴分光法により行った。固形ゴムについては、培養液から固形ゴムと菌体を取り除いたのち、ジエチルエーテルと石油エーテルを使用して抽出した。抽出物から溶媒を除去後、TLC により抽出物の検出とゲル浸透クロマトグラフィー、フーリエ変換赤外分光分析、核磁気共鳴分光法を用いた抽出物の構造解析を行った。

(5) 天然、非天然のエステルを分解するリパーゼ遺伝子の同定

細胞外分泌性のリパーゼを産生する *W. psychrolipolyticus* を用い、細胞外分泌性リパーゼの抽出と精製を行った。得られたタンパク質は、ペプチドシーケンスを用い、N 末端側 9 アミノ酸配列の決定をおこなった。他方、*W. psychrolipolyticus* の細胞を培養し、gDNA を抽出精製後、全ゲノム配列を決定した。全ゲノムシーケンシングは株式会社マクロジェン・ジャパンに依頼した。パン酵母を用いた *W. psychrolipolyticus* 由来の L001235 遺伝子 (目的のリパーゼをコードしていると予想される遺伝子 L001235) 産物の合成のために、パン酵母用ベクター pYES2 を用いた。制限酵素 *EcoRI* で消化した pYES2 DNA 断片と L001235 遺伝子断片をシームレスクローニング法により連結後、大腸菌に形質転換した。大腸菌からのプラスミド DNA の抽出はアルカリ SDS 法を用いた。パン酵母への L001235 遺伝子を含む pYES2 プラスミドの形質転換は、酢酸リチウム法を用いた。

4 . 研究成果

H. marmoreus によるゴム分解に関する遺伝子のクローニング

ゴムラテックス添加培地とグルコース添加培地を用い、*H. marmoreus* を培養し、トランスク

リプトーム解析を行った結果から、グルコース培地培養と比較し、ゴムラテックス培地培養で多く発現している 150 遺伝子を選び出した。その中から、分泌性タンパク質の特徴的なアミノ酸配列を有するタンパク質を、signalP を用いて検索した結果、24 遺伝子が該当した。また、リグニン分解酵素群の Laccase、Versatile peroxidase、Peroxidase、Aldehyde oxidase、Alcohol oxidase、Glucose oxidase をコードする遺伝子がゴムラテックス添加培地培養で多く発現しており、一部の遺伝子については分泌性タンパク質で保存されている配列を含んでいた。*Phanerochaete* sp. では 30 遺伝子をゴム分解関連遺伝子として選出した。これらの遺伝子について解析を進めた。まずは、遺伝情報がある *H. marmoreus* について解析を進めた。これら遺伝子産物の機能について調べるためには、大量に遺伝子産物が必要となるが、*H. marmoreus* は、液体培地を用いた大量の菌体調整が酵母や大腸菌と比較し困難である。そこで、*H. marmoreus* の遺伝子を大腸菌、あるいは酵母に導入し、これら微生物に *H. marmoreus* の遺伝子産物を合成させることを試みた。また、*H. marmoreus* の細胞外分泌性タンパク質に着目していることから、*H. marmoreus* と同じ担子菌酵母 *C. neoformans* のホストベクター系を用いた。この系を用いることにより、大腸菌やパン酵母を用いるよりも cDNA を合成しなくても、直接、*H. marmoreus* のゲノム DNA を *C. neoformans* の細胞内に導入し、*C. neoformans* の RNA プロセシング機能により成熟 mRNA が合成されることが期待でき、また、*C. neoformans* の細胞内物質輸送機能により、*H. marmoreus* の遺伝子産物が細胞外に分泌されることが、期待できた。

H. marmoreus のゲノム DNA を鋳型とし Laccase、Versatile peroxidase、Peroxidase、Aldehyde oxidase、Alcohol oxidase、Glucose oxidase をコードする遺伝子を PCR 法を用いて増幅すると同時に PCR 産物に His-tag 配列を付加した。得られた His-tag 配列付き PCR 産物は、*C. neoformans* 用発現ベクターにつなげ、それを用いて *C. neoformans* 野生株への遺伝子導入を行った。その結果、*C. neoformans* 野生株と比較し、約 5.6 倍高いラッカーゼ活性を示す形質転換体 3 個を獲得した。また、*H. marmoreus* の Glucose oxidase 遺伝子を *C. neoformans* 野生株に導入した形質転換体 4 個を獲得した。この方法により、*H. marmoreus* の遺伝子を酵母に導入し、*H. marmoreus* のタンパク質を酵母 *C. neoformans* に合成させ、さらには培養上清中に分泌させることが可能であることが判明した。今後は、これら形質転換体が目的のタンパク質を合成することをさらに確認するために、培養上清からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットング法を用いてヒスチジンタグを検出する必要があるが、この酵母 *C. neoformans* を用いた *H. marmoreus* 遺伝子産物合成法は、*H. marmoreus* 由来のタンパク質の大量調製への利用が期待できる。

菌作用後のゴム試料と培養液から回収したエーテル抽出物の構造解析

本研究で用いる *H. marmoreus* と分離株 *Phanerochaete* sp. のゴム分解には、複数の酵素の関与が予想される。さらに、*H. marmoreus* と分離株 *Phanerochaete* sp. では資化できるゴムの種類が異なることが分かっている。このように菌種の違いや、酵素の違いによりゴムへの作用がこととなるため、まずは菌種の違いによるポリイソプレンの影響について検討した。また、用いるポリイソブレンについては、分解物を容易に検出できるよう、スクアレン、Solanesol、Farnesyl Acetate、合成ポリイソブレン (LIP-30) を用いて、*H. marmoreus* と *Phanerochaete* sp. をそれぞれ作用させ、分解物を SEC-HPLC により測定した。分子量が 28000 である LIP-30 に *H. marmoreus* を作用させた場合、分子量が約 170 以下の物質が検出された。他方、*Phanerochaete* sp. を作用させた場合では、分子量が約 300 の物質のみ検出された。また、スクアレン、Farnesyl Acetate、Solanesol、それぞれについて *H. marmoreus* を作用させた場合、低分子の物質が検出されたが、*Phanerochaete* sp. を作用させた場合は、低分子の物質を検出できなかった。回収で

きた分解物については、FT-IR を用いて、構造解析を試みたが、菌作用のポリイソプレンサンプルで、新たなピークを検出することはできなかった。これらの結果から、*H. marmoreus* と *Phanerochaete* sp. ではポリイソプレンの分解方法が異なること、さらに *Phanerochaete* sp. と比較し *H. marmoreus* の方が、ポリイソプレンの種類に関わらず分解能が高いことが明らかになった。しかしながら、どのような構造変化が起こったのかは、今回の方法では明らかにすることができなかった。

次に、SBR を用い、*H. marmoreus* と分離株 *Phanerochaete* sp. をそれぞれ作用させ、分解物の解析を行った。SEC-HPLC の結果、菌未作用の SBR では、保持時間が 13.2 分から 14 分にピークがあり、分子量約 1000 から 2000 の範囲の SBR が含まれていることを確認した。*H. marmoreus* の培養液回収物からは 保持時間 16 分辺りで最大のピークがみられ、分子量約 40 ほどの物質を検出した。これは植菌していない培地からのジエチルエーテル抽出物のクロマトグラムではみられないピークであった。さらに、*Phanerochaete* sp. 培養液回収物の SEC 解析で保持時間 14.6 分辺りで最大のピークがみられ、分子量約 260 ほどの物質を検出した。植菌していない培地を用いたクロマトグラムと比較し、検出ピークは右にシフトしていた。菌処理後の固形 SBR を回収し、FT-IR、NMR による解析を行った。その結果、ゴムの構造に新たに水酸基が出現することが分かり、菌が SBR の構造に変化を起こしたことを明らかにした。

***Wickerhamomyces psychrolipolyticus* が産生する細胞外分泌性リパーゼ**

W. psychrolipolyticus の全ゲノム塩基配列の解析結果から、目的の細胞外分泌性リパーゼの、N 末端側 9 アミノ酸配列を含むタンパク質を検索したところ、3 種類のタンパク質がこの配列をもつことが判明した。これらのタンパク質のアミノ酸配列を用いて、それぞれ BLAST 検索を行ったが、相同性の高いアミノ酸配列は検索されなかった。次に、これら 3 種類のアミノ酸配列と、Lipase Engineering Database から検索した子嚢菌、担子菌由来のリパーゼ、エステラーゼのアミノ酸配列を用い系統解析を行った。その結果、これら 3 種類の配列は、南極大陸産酵母 *Candida antarctica* が産生する好冷性リパーゼ (CALB) を含むクレードに属することが判明した。この結果から、これら 3 種類のタンパク質は、目的のリパーゼを含んでいると期待した。これら 3 種類のタンパク質は、アミノ酸配列から分子量を求めたところ、18,731、30,284、143,556 であった。*W. psychrolipolyticus* が産生する細胞外分泌性リパーゼは、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、約 28 kDa であることが判明していたので、分子量 30,284 のタンパク質が目的とするリパーゼである可能性が高く、このタンパク質をコードする L001235 遺伝子の解析を進めた。*W. psychrolipolyticus* を用いてリパーゼ産生誘導培地での L001235 遺伝子の発現を調べた。グルコース量を制限した TGY 液体培地を用い、*W. psychrolipolyticus* を 1 日間前培養後、トリオレイン添加してリパーゼ産生を誘導させた。トリオレイン添加前後の細胞から RNA を抽出し、L001235 遺伝子の発現量を定量した。その結果、リパーゼ産生誘導時の L001235 遺伝子の発現量は、トリオレイン添加前の L001235 遺伝子の発現量の 14.7 倍であった。このことから、L001235 遺伝子はリパーゼ産生誘導時に発現する遺伝子であり、トリオレインの分解に関与する可能性があり、目的のリパーゼ遺伝子である可能性が高い。この遺伝子をパン酵母に導入しタンパク質を合成させ、機能解析を行うところまでは、期間内に達成することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 SHIMIZU Yumi, SATHO Shuma, NAKAJIMA Taro, KOUZAI Hiroaki, SHIMIZU Kiminori	4. 巻 93
2. 論文標題 Effects of White Rot Fungus <i>Physisporinus</i> sp., Isolated in Japan, on Styrene-butadiene Rubber	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NIPPON GOMU KYOKAISHI	6. 最初と最後の頁 289 ~ 292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2324/gomu.93.289	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Yumi, Konno Yusuke, Tomita Yosuke	4. 巻 70
2. 論文標題 <i>Wickerhamomyces psychrolipolyticus</i> f.a., sp. nov., a novel yeast species producing two kinds of lipases with activity at different temperatures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1158 ~ 1165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.003894	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Yumi, Sugawara Yuko	4. 巻 63
2. 論文標題 Heparinase gene homolog is essential for the DBB staining reaction in <i>Cryptococcus neoformans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Technological Researches. Society of Science and Engineering/Architecture and Environmental Design, Kanto Gakuin University.	6. 最初と最後の頁 5 ~ 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yumi Imanishi-Shimizu, Yukina Kamogawa, Yukino Shimada, Kiminori Shimizu	4. 巻 167
2. 論文標題 A capsule-associated gene of <i>Cryptococcus neoformans</i> , CAP64, is involved in pH homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mic.0.001029	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島太郎 川村真由 青木大輝 佃雅俊 高橋弘喜 香西博明 清水公德 清水由巳
2. 発表標題 ラテックスゴム分解菌の探索と分解産物の検出
3. 学会等名 第63回日本菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桶川 直実 清水 由巳
2. 発表標題 Heparinase遺伝子ホモログは Cryptococcus neoformansのDBB染色に必須である
3. 学会等名 第 63 回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上崎竜一 清水由巳
2. 発表標題 Cryptococcus neoformans 莢膜合成関連遺伝子CAP64の細胞内酸性ホメオスタシスの維持への関与
3. 学会等名 第 63 回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤脩真 中島太郎 香西博明 清水由巳
2. 発表標題 真菌のゴム資化とリグニン分解酵素との関与
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島太郎、高橋弘喜、青木大輝、香西博明、清水由巳
2. 発表標題 Hyspsizygyus marmoreusによるゴムラテックス分解に関わる酵素群の探索
3. 学会等名 2019年度関東学院大学理工/建築・環境学会研究発表講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田祐介、都築勇亮、富田遥介、清水由巳
2. 発表標題 利尻産酵母Wikerhamomyces sp. が産生する低温活性リパーゼ
3. 学会等名 2019年度関東学院大学理工/建築・環境学会研究発表講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤脩真 中島太郎 川村真由 香西博明 清水由巳
2. 発表標題 白色腐朽菌を用いた合成ゴムの酵素分解挙動
3. 学会等名 マテリアルライフ学会 第24回春季研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田祐介、清水由巳
2. 発表標題 利尻産酵母Wicherhamomyces psychrolopolyticus が産生する細胞外分泌低温活性リパーゼの精製の試み
3. 学会等名 2020年度関東学院大学理工/建築・環境学会研究発表講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 老川玲海、鈴木大貴、清水由巳
2. 発表標題 利尻産酵母 <i>W. psychrolipolyticus</i> が産生する細胞外分泌リパーゼ
3. 学会等名 2021年度関東学院大学理工/建築・環境学会研究発表講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	香西 博明 (KOUZAI HIROAKI) (00272089)	関東学院大学・理工学部・教授 (32704)	
研究分担者	清水 公徳 (SHIMIZU KIMINORI) (40345004)	東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・教授 (32660)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------