

令和 4 年 4 月 30 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21861

研究課題名（和文）ゴムを食べる細菌がゴムを作る：分子レベルでの有機性廃棄物リサイクルへの挑戦

研究課題名（英文）Natural rubber utilizing bacteria make natural rubber: the challenge of recycling organic waste at the molecular level

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、*Nocardia* sp. E1株を用いた天然ゴム再生産系の確立を目指して、天然ゴム代謝経路において不明であった中間代謝物（オリゴイソプレンアルデヒド：OIA）の分解に関するアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）遺伝子の単離と解析を行なった。その結果、構成的に発現し、NAD+に親和性が高いALDH（aldH）が、5つのイソプレンからなるOIAを特異的に酸化することが示された。aldHの破壊によってIR生育能とOIA分解能が顕著に低下したことから、本遺伝子がE1株のOIA分解に重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で特定したALDHは、特定のOIAを脂肪酸（多価不飽和脂肪酸）へと変換する。多価不飽和脂肪酸は、界面活性剤や潤滑油、バイオディーゼル燃料などに利用可能であることから、LcpとALDHの2つの酵素を大量生産し、それらの酵素反応を利用した天然ゴム変換系を確立することによって、天然ゴム資源を原料として脂肪酸等の有価物を生産できるシステムの構築につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Here, we aimed to establish a natural rubber reproduction system using the *Nocardia* sp. E1 strain, and aldehyde dehydrogenase (ALDH) involved in the degradation of an intermediate metabolite (oligoisoprenealdehyde: OIA) that was unknown in the natural rubber metabolic pathway. As a result, it was shown that ALDH (aldH), which is constitutively expressed and has a high affinity for NAD<sup>+</sup>, specifically oxidizes OIA consisting of 3 to 5 isoprenes. The disruption of aldH markedly reduced the growth ability on IR and OIA degradation activity, indicating that this gene is important for OIA degradation of this strain.

研究分野：環境微生物学、応用微生物学

キーワード：アルデヒドデヒドロゲナーゼ 天然ゴム ポリイソプレン

## 1. 研究開始当初の背景

ゴムには植物や真菌から生成される poly(*cis*-1,4-isoprene)が基本構造の天然ゴムと、ナフサ等の化石資源を原料として人工的に合成されるイソプレンゴム (IR)は、弾性力や収縮力などの適切な特性を提供するためのポリマー鎖の架橋が行われ、医療用手袋やホース、タイヤなどの工業製品に利用されている (Posadas et al. 2016; Chittella et al. 2021)。現状、天然ゴムと合成ゴムの消費に伴う廃棄物量は膨大であり、焼却や埋め立てによる従来の廃棄ゴム処理では高エネルギー消費や温室効果ガスの大量放出、製品に含まれている添加物の流出によって土壌、水質が汚染されることが問題となっている (Holst et al. 1998; Adhikari et al. 2000; Stevenson et al. 2008)。この課題を解決するために、近年では天然ゴム分解能を持つ細菌を利用した廃棄ゴム処理技術の研究が進められている (Bode et al. 2001; Stevenson et al. 2008)。天然ゴム分解菌を利用した廃棄ゴム処理では、従来の処理方法と比較してエネルギー消費量や温室効果ガス排出量の減少などの利点がある (Romine et al. 1998)。

天然ゴム分解菌 *Nocardia farcinica* NBRC15532 株は、IR を炭素源として資化し良好に生育する。NBRC15532 株は、IR 代謝時に誘導される poly(*cis*-1,4-isoprene)分解酵素遺伝子 (*lcp* ホモログ; Locus tag; NF2\_RS04895)を1つ保持している。しかし、天然ゴム分解菌 *Streptomyces* sp. K30 株において *Lcp* によって低分子化されたオリゴイソプレンアルデヒドの酸化分解に関与する *oxiBA* のホモログは見出されていない。*Gordonia polyisoprenivorans* VH2 株では、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)が、*oxiBA* 遺伝子産物の代替として機能していることが推定されていることから、NBRC15532 株においても VH2 株と同様に ALDH がオリゴイソプレンアルデヒドの酸化に関与していると推察されているが、その詳細は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

*N. farcinica* NBRC15532 株では、*Lcp* により poly(*cis*-1,4-isoprene)がオリゴイソプレンアルデヒドへと低分子化されることが明らかとなっているが、オリゴイソプレンアルデヒドの分解に関与する遺伝子と酵素は明らかにされていない。本研究では、天然ゴム分解菌の分解機構の全容を解明し酵素機能を用いた廃棄ゴム再資源化技術の開発を目指して、NBRC15532 株のオリゴイソプレンアルデヒド分解に関わる遺伝子と酵素の機能を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 推定 ALDH のオリゴイソプレンアルデヒド酸化活性

各遺伝子の異種宿主発現には、pColdI プラスミドを用いて、ヒスチジンタグを融合した目的遺伝子をコールドショック遺伝子 (*cspA*)プロモーターの制御下で発現させた。目的ヒスチジンタグ融合タンパク質を精製するために、AKTA start (GE Healthcare)を用いた。流速は 1 ml/min で行い、精製カラムはコバルトイオンを充填している 1 ml 容量の HiTrap™ TALON crude (GE Healthcare)カラムを用いた。200 mM リン酸緩衝液で平衡化したカラムに細胞抽出液を添加後、5 mM imidazole を含む同緩衝液で 20 カラム容量分洗浄した。その後、5~500 mM imidazole でグラジエントをかけて 20 カラム容量分溶出した。獲得した溶出画分は、Amicon Ultra-15 30K (Merck Millipore)を用いて限外ろ過した。

### ALDH 活性の測定

オリゴイソプレンアルデヒドに対する ALDH 活性の評価は、Vivod らの方法 (Vivod et al. 2017) に従い、酵素反応後に酸化型 2,6-dichlorophenolindophenol (ox.) (DCPIP)と酸化型 phenazine methosulfate (ox.) (PMS)を加えることによる酸化還元反応を利用し、副生成物である NADH の生産性を算出する

ことで行なった。NBRC15532 株由来の Lcp (終濃度 20 µg/ml) と 0.8% (v/v) IR (PSS-pio800) を含む 200 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) を 1 時間、30°C で反応させ、基質となるオリゴイソプレナルデヒドを生成した。上記反応溶液 500 µl、精製 ALDH (終濃度 50 µg/mL)、NAD<sup>+</sup> または NADP<sup>+</sup> (終濃度 0.5 mM)、及び 200 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) を含む 1 ml の反応系で 30°C、1 時間反応させた。反応終了後に、酸化型 DCPIP (終濃度 60 µM) と酸化型 PMS (終濃度 20 µM) を添加し、酸化型 DCPIP に由来する 600 nm 吸収波長を測定することで NADH の生産を評価した。また反応産物の同定には LC-MS 分析を用いた。

#### ALDH 遺伝子の転写量解析

遺伝子の転写量を解析するために NBRC15532 株の全 RNA を調製し、ABI Step One real time PCR system (Applied Biosystems) を用いた定量 RT-PCR 解析を行なった。

#### 遺伝子破壊株の解析

遺伝子破壊には相同組換えを利用した遺伝子置換法を用いた。また遺伝子破壊の確認はコロニー PCR により行なった。NBRC15532 株と各遺伝子破壊株をそれぞれ 100 ml の PYM 液体培地に植菌し、3 日間前培養した。前培養液を集菌し、0.9% (w/v) NaCl で 2 回洗浄後、10 mg の湿菌体を 0.125% (w/v) の IR を含む 100 ml の W 液体培地に植菌し、37°C、160 rpm で培養した。経時的に培養液をサンプリングし、分光光度計を用いて OD<sub>600</sub> を測定し、生育能を調査した。得られた培養液からペントタンを用いて抽出を行い、残存する IR の分子量を GPC により分析した。また細胞抽出液を調製し、「ALDH 活性の測定」と同様にオリゴイソプレナルデヒドに対する酸化活性を評価した。

### 4. 研究成果

#### 推定 ALDH のオリゴイソプレナルデヒド酸化活性

オリゴイソプレナルデヒドに対して酸化活性を示す ALDH を限定するために、アミノ酸配列相同性からゲノムデータより推定した 14 個の ALDH 遺伝子を *E. coli* BL21(DE3) 株を宿主として発現させた。組換え体の細胞抽出液から各遺伝子産物をコバルトイオン充填カラムによって精製した結果、目的の遺伝子産物がほぼ単一に精製された。各 ALDH のオリゴイソプレナルデヒドに対する酸化活性を評価した結果、NF2\_RS00945、NF2\_RS14000、及び NF2\_RS14385 の 3 つの遺伝子産物

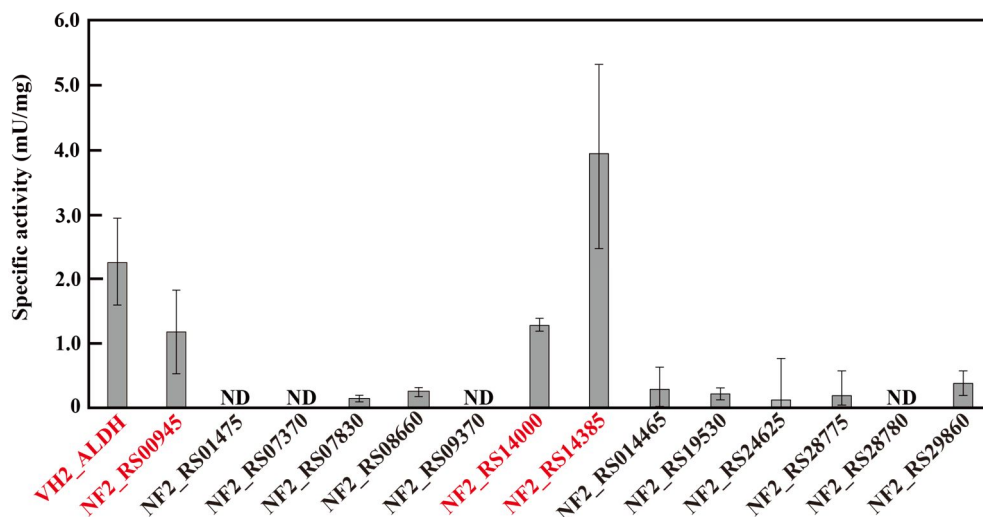


Fig. 1. 推定の ALDH 遺伝子産物のオリゴイソプレナルデヒド酸化活性。0.8% (v/v) の IR 標準物質の PSS-pio800 と Lcp (20 µg/ml) を 1 時間反応後、精製 ALDH (50 µg/ml) と NAD<sup>+</sup> (0.5 mM) を添加し、更に 1 時間反応。ネガティブコントロールとして ALDH 非添加、ポジティブコントロールとして VH2 株由来 ALDH (VH2\_ALDH) を用いた。ND; Not determined. 測定はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した。エラーバーはその標準偏差を示す。

を用いた場合において、有意な酸化活性が検出された (Fig. 1)。これらの比活性は、オリゴイソプレナルデヒドに対する酸化活性が確認されている *G. polysoprenivorans* VH2 株の ALDH の活性と同程度であったことから、NF2\_RS00945、NF2\_RS14000、NF2\_RS14385 の 3 個の ALDH 遺伝子が NBRC15532 株のオリゴイソプレナルデヒド分解に関与している可能性が示唆された。また、補酵素依存性の調査から、NF2\_RS00945 は NADP<sup>+</sup>に、NF2\_RS14000 は NAD<sup>+</sup>に、NF2\_RS14385 は NAD<sup>+</sup> 及び NADP<sup>+</sup>に親和性が高い ALDH であることが示唆された。

### ALDH によるオリゴイソプレナルデヒド酸化分解産物の同定

NF2\_RS00945、NF2\_RS14000、NF2\_RS14385 遺伝子産物によるオリゴイソプレナルデヒドの反応産物を特定するために、各 ALDH とオリゴイソプレナルデヒドの反応産物の分子量を LC-MS によって分析した。反応の前後でオリゴイソプレナルデヒドと反応産物である脂肪酸のイオン ([M+H]<sup>+</sup>)の分子量 (*m/z*)を抽出した結果、各 ALDH は *n* = 3~5 のオリゴイソプレナルデヒドを特異的に酸化し、相当するイソプレン数のオリゴイソプレン脂肪酸に変換することが示された。

### ALDH 遺伝子の転写量解析

NF2\_RS00945、NF2\_RS14000、NF2\_RS14385 遺伝子の転写誘導性を評価するために、IR の存在または非存在下で培養した NBRC15532 株から調製した total RNA を用いて定量 RT-PCR 解析を行った。その結果、IR 誘導条件での各 ALDH 遺伝子の転写量は IR 非誘導条件と比較して NF2\_RS00945 で 337 倍、NF2\_RS14385 で 95 倍であることが示された。一方、NF2\_RS14000 は IR 誘導条件下での有意な転写誘導は観察されず、構成的に転写されていることが示唆された。しかし、NF2\_RS14000 の転写量は、他の 2 つの遺伝子と比較して IR 非誘導、誘導の両条件において高い値を示した。特に IR 誘導時における NF2\_RS14000 の転写量は、NF2\_RS00945 の 15,000 倍、NF2\_RS14385 の 20,000 倍であった。

### 遺伝子破壊株の機能解析

NF2\_RS00945、NF2\_RS14000、及び NF2\_RS14385 遺伝子の IR 代謝への関与を明確にするために、相同組換えを利用した遺伝子置換法によって各 ALDH 遺伝子破壊株を作製した。得られた遺伝子破壊株の IR 上での生育能を比較するために、0.125% (w/v) の IR を炭素源とした W 培地で培養した結果、 $\Delta$ 14000 株で生育の低下が観察された (Fig. 2A)。各二重破壊株では、 $\Delta$ 00945\_14000 株及び  $\Delta$ 14000\_14385 株で、さらにそれら遺伝子の三重破壊株で同様に生育の遅れが認められた (Fig. 2B and C)。一方、 $\Delta$ 00945 株、 $\Delta$ 14385 株、および  $\Delta$ 00945\_14385 株では生育の低下が観察されなかったことから、NF2\_RS14000 が IR 代謝において主要な役割を持つことが示唆された。

各遺伝子破壊株の IR 分解能を評価するために、培養液に残存する IR の分子量を GPC 分析に

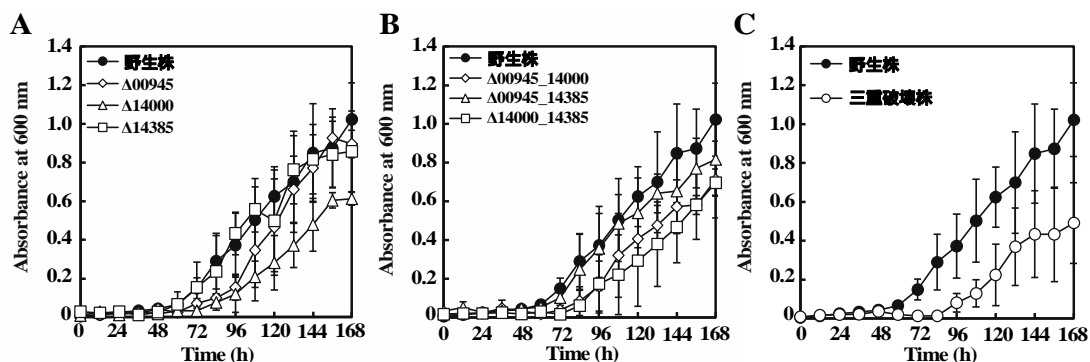


Fig. 2. NBRC15532 株 (野生株)と各 ALDH 遺伝子破壊株の IR 上での生育評価。0.125% (w/v) IR を含む W 液体培地で培養。A; 単一破壊株。B; 二重破壊株。C; 三重破壊株。測定はそれぞれ 4 回ずつ行いその平均値を示した。エラーバーはその標準偏差を示した。

より評価した。その結果、各遺伝子の破壊による IR の低分子化への影響は限定的であると考えられた。推定アミノ酸配列から、ALDH は細胞内で機能していると考えられていることから、細胞外での IR の低分子化には各 ALDH 遺伝子の破壊は影響しないと結論づけた。

#### 遺伝子破壊株のオリゴイソプレナルデヒドに対する酸化活性

NF2\_RS00945、NF2\_RS14000、NF2\_RS14385 のオリゴイソプレナルデヒド分解への関与を明確にするために、野生株と各遺伝子破壊株の細胞抽出液 (タンパク質量 1 mg) のオリゴイソプレナルデヒドに対する ALDH 活性を NAD<sup>+</sup> の存在下で評価した。その結果、 $\Delta$ 14000 株のオリゴイソプレナルデヒド酸化活性は、野生株の活性の約 40% であることが示された。さらに、 $\Delta$ 00945\_14000 株、 $\Delta$ 14000\_14385 株、及び三重破壊株の活性もそれぞれ野生株の 40% であった。一方、 $\Delta$ 00945 株、 $\Delta$ 14385 株、及び  $\Delta$ 00945\_14385 株の活性は、野生株の活性と比較して顕著な差異は認められなかったことから、NAD<sup>+</sup> 存在下におけるオリゴイソプレナルデヒド分解には主に NF2\_RS14000 が関与していることが強く示唆された。一方で、NADP<sup>+</sup> を補酵素とした際の各破壊株のオリゴイソプレナルデヒド分解活性を評価した結果、 $\Delta$ 14385 株、 $\Delta$ 00945\_14385 株、14000\_14385 株、及び三重破壊株の活性は、野生株の活性の 50~60% であることが示された。 $\Delta$ 00945 株及び  $\Delta$ 14000 株の活性は野生株と同等であったことから、NADP<sup>+</sup> を補酵素とした場合は NF2\_RS14385 が主に機能する可能性が考えられた。

#### 引用文献

- Adhikari. B, D. De, S. Maiti. 2000. Reclamation and recycling of waste rubber. *Progress in Polymer Science*, 25, pp. 909-948.
- Bode. H. B, Kerkhoff. K, Jendrossek. D. 2001. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Biomacromolecules* 2(1):295-303.
- Chittella. H, Yoon. LW, Ramarad. S, Lai. ZW. 2021. Rubber waste management: A review on methods, mechanism, and prospects. *Polymer Degradation and Stability*. Dec;194.109761.
- Holst. O, Stenberg. B, Christiansson. M. 1998. Biotechnological possibilities for waste tyre rubber treatment. *Biodegradation* 9:301-310.
- Posadas. P, Gonzalez-Jimenez. A, Valentin. J. L. 2016. Natural rubber: Properties, behavior and uses, *Nat. Rubber Prop. Behav. Appl.* 1-24.
- Romine. A. R, Romine. F. M. 1998. Rubber cycle: a bioprocess for surface modification of waste tyre rubber. *Polymer degradation and Stability*. 59. 353-358.
- Stevenson. K, Stallwood. B, Hrrt. A.G. 2008. Tire rubber recycling and bioremediation: a review *Bioremediation Journal*, 12, pp. 1-11

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nguyen Lan Huong, Nguyen Hoang Dung, Tran P. Thao, Nghiem Thi Thuong, Nguyen Thi Thanh, Dao Viet Linh, Phan Trung Nghia, To Anh Kim, Hatamoto Masashi, Yamaguchi Takashi, Kasai Daisuke, Fukuda Masao	4. 巻 31
2. 論文標題 Biodegradation of natural rubber and deproteinized natural rubber by enrichment bacterial consortia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biodegradation	6. 最初と最後の頁 303 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10532-020-09911-0	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 該当する

1. 著者名 Gibu Namiko, Arata Tomoka, Kuboki Saya, Linh Dao Viet, Fukuda Masao, Steinbuchel Alexander, Kasai Daisuke	4. 巻 104
2. 論文標題 Characterization of the genes responsible for rubber degradation in Actinoplanes sp. strain OR16	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 7367 ~ 7376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10700-1	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 該当する

1. 著者名 Gibu Namiko, Linh Dao Viet, Suzuki Natsuhei, Thuy Ngan Nguyen Thi, Fukuda Masao, Anh To Kim, Huong Nguyen Lan, Kasai Daisuke	4. 巻 133
2. 論文標題 Identification and transcriptional analysis of poly(cis-1,4-isoprene) degradation gene in Rhodococcus sp. strain RDE2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 452 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2022.01.013	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------