

令和元年6月11日現在

機関番号：13102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05639

研究課題名（和文）廃棄ゴムからプラスチックへの直接変換：ハイブリッド型微生物変換系の開発と高効率化

研究課題名（英文）Direct conversion from waste rubber to plastic: Development of hybrid microbial conversion system

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） 15,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、微生物を用いた廃棄ゴムからのプラスチック生産技術の開発を目指して、ゴムを強力に分解する細菌“E1株”とゴム分解時にプラスチックを生合成する細菌“NS21株”の機能解析を行った。その結果、本来、誘導的に発現するE1株のゴム分解遺伝子を構成的に発現させることでE1株のゴム分解能を強化できることが明らかとなった。また、NS21株のゴムからプラスチックへの変換に関わる一連の遺伝子群を推定した。以上の成果は、廃棄ゴムをプラスチックとして再生する資源循環技術の基盤構築に貢献すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果を基盤として微生物を用いたゴム変換技術が確立されれば、これまで燃焼や埋立てによって処理されていた廃棄物の再資源化が可能となる。それは、将来的に増加が懸念されているゴム廃棄物による環境負荷の低減に貢献するだけでなく、既存のプラスチック製品を代替することで、枯渇が危惧されている化石資源からの脱却が可能となる。さらには、ゴム自体の付加価値が高まることで、我が国の主要産業の一つであるゴム・タイヤ産業の収益安定化ならびに持続的発展に寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Here, we characterized *Nocardia* sp. strain E1 and *Rhizobacter gummiphilus* NS21, which are able to grow on natural rubber. The rubber degrading genes, *lcp* was identified in E1. When the *lcp* gene that is expressed by a constitutive promoter was introduced into strain E1, the enhancement of the rubber degradation was observed. It is suggested that the constitutive expression of *lcp* is effective for the rubber degradation ability. When purified *Lcp* was added into the reaction mixture including rubber and the cells of E1, the rubber degradation activity was increased. It is suggested that *Lcp* is directly involved in the rubber degradation in vitro. The transcriptome analysis of strain NS21 revealed that the genes including the transformation of natural rubber to polyhydroxyalkanoate, are found in the genome. We consider that the results are important for development of recycling system for waste natural-rubber product.

研究分野：応用微生物学

キーワード：天然ゴム ポリヒドロキシアルカン酸 *Nocardia*属 *Rhizobacter*属

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ポリイソプレンを主成分とする天然ゴムならびに合成ゴムは、広範な分野で利用される不可欠な資源である。東京商品取引所の試算によると、近年の世界的な経済成長に伴う急速なゴム需要の拡大が予想されている。将来的には、それらの廃棄物が増大すると考えられるが、廃棄ゴム処理の大部分は焼却や埋立てに頼っているのが現状である。つまり、それらの処理による温室効果ガスの排出や環境負荷の増加が懸念される。従って、廃棄ゴムの削減と処理プロセスの革新は地球規模で早急に取り組むべき課題の一つと考えられる。

これまでにポリイソプレンゴムを資化する幾つかの細菌とその酵素が発見され、ゴムの分解経路が推定されてきた<sup>(1)</sup>。我々が単離したゴム分解菌”*Rhizobacter gummiphilus* NS21 株”は、ゴム分解時に細胞内にバイオプラスチック(ポリヒドロキシアルカン酸;PHA)を生産する。また”*Nocardia* sp. E1 株”は、強力なゴム分解能を持ち、酸素の供給のみでラテックスグローブや合成ゴムを分解する。これら複数のゴム分解菌の能力を組み合わせ、廃棄ゴムの処理に応用することができれば、環境負荷の低減につながるだけでなく、廃棄物から有価物を生産する再資源化システムの構築にも貢献できると期待される。しかし、微生物機能を用いた廃棄ゴム処理を実現するためには、*Nocardia* sp. E1 株のゴム分解能のさらなる強化や、*R. gummiphilus* NS21 株のゴムから PHA への変換経路とその変換に関わる遺伝子の特定などの課題を解決する必要がある。これらを解決することで、新たな廃棄ゴム処理システムの確立に貢献できると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、E1 株のゴム分解能の強化と NS21 株のゴムから PHA への変換系解明を行うことで、廃棄ゴムを原料としたバイオプラスチック生産システムの確立につながる基礎的知見を得ることを目的とした。さらに、ゴム変換効率の最適化を目指して、ゴム分解遺伝子の発現に関わる転写制御機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

- 1) *Nocardia* sp. E1 株のゴム分解能強化を目指したゴム分解遺伝子の解析
- 2) *R. gummiphilus* NS21 株のゴムから PHA への変換に関わる遺伝子の特定
- 3) 新規ゴム分解細菌のゴム分解機構の解明

## 4. 研究成果

- 1) *Nocardia* sp. E1 株のゴム分解能強化を目指したゴム分解遺伝子の解析

ゴム分解細菌 *Nocardia* sp. E1 株のゴム分解能の強化を目的として、ゴム分解関連遺伝子の同定を行った。ゴム存在下における誘導条件またはゴム非存在下での非誘導条件で培養した細胞からそれぞれ遺伝子転写産物を調製し、次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンス解析により遺伝子の転写量を網羅的に定量することで発現量が増大した遺伝子を探索した。その結果、ゴム生育時において特異的に転写誘導される 121 個の遺伝子を特定した。その中には、ゴムの初発分解に関与する細胞外オキシゲナーゼ (*Lcp*)をコードする遺伝子や、細胞内でのゴム代謝に関わると考えられるβ酸化経路に関わる酵素遺伝子が含まれており、転写誘導性の観点からこれら遺伝子が E1 株のゴム分解に関与することが強く示唆された。

E1 株のゴム分解能強化を目的として、ゲノム解析により同定したゴム分解遺伝子 (*lcp*)を含むプラスミド DNA を導入した E1 株組換え体を作成した。得られた *lcp* 相補株では、*lcp* 遺伝子が構成的プロモーターによって発現される。栄養培地で培養した *lcp* 相補株の培養菌体を用いて、液体中でのラテックスグローブの分解を調べた結果、野生株と比較して早期の段階での分解が観察された(図 1)。これは、誘導が必要な *lcp* 遺伝子の発現が構成的になされ

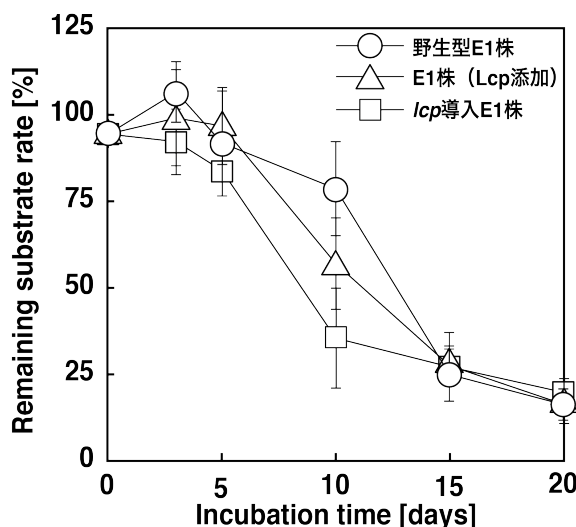


図 1. *lcp* 導入株および *Lcp* 添加時の野生型 E1 株のラテックスグローブ分解能.

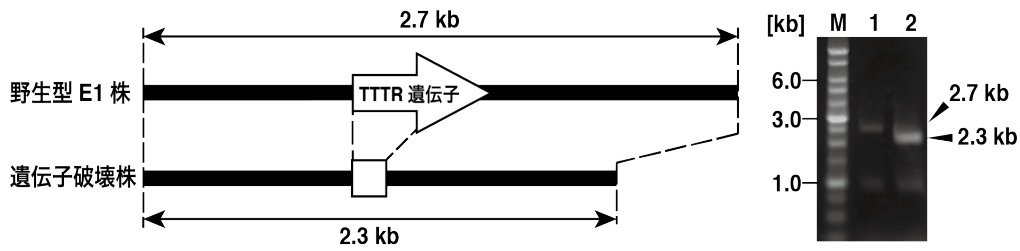


図 2. TTTR 遺伝子破壊株作製と PCR による破壊の確認. 左: TTTR 遺伝子欠損領域を示す. 右: PCR 増幅による遺伝子欠損の確認結果. M: 分子量マーカー、1: 野生型 E1 株 DNA、2: TTTR 遺伝子破壊株 DNA.

ていることに起因すると考えられる。以上の結果から、*lcp* 遺伝子を構成的に発現させることにより E1 株のゴム分解能を向上できることが明らかとなった。

E1 株のラテックスグロブ分解における Lcp 酵素の役割を明確にするため、野生株を摂取した 20 ml のラテックスグロブ反応液に 1 mg の精製 Lcp 酵素を添加した条件で、ラテックスグロブの分解を観察した。その結果、構成的に *lcp* 遺伝子を発現させた場合と同様にラテックスグロブ分解の開始が早まることが確認された(図 1)。以上の結果から、Lcp が存在することでラテックスグロブ分解が促進される、つまりラテックスグロブ分解に Lcp が直接関与することが強く示唆された。

これまでに、E1 株における *lcp* 遺伝子の発現制御機構は明らかにされていない。*lcp* 遺伝子の転写制御機構の解明を目的として、転写制御に関わる因子の探索を行った。最近、ゴム分解菌である *Gordonia polyisoprenivorans* において TetR 型転写制御因子 (TTTR) がゴム分解遺伝子の転写に関与することが示唆された<sup>(2)</sup>。また、ゴム分解性放線菌として知られる *Actinoplanes* 属や *Streptomyces* 属でも、ゴム分解遺伝子の近傍に TTTR をコードする遺伝子の存在が認められている。E1 株でも同様に *lcp* 遺伝子の下流に TTTR 遺伝子が見出されたことから、TTTR が *lcp* 遺伝子の転写制御に関与する可能性を考え、当該遺伝子の破壊株を作製した(図 2)。得られた破壊株の *lcp* 転写誘導性を評価した結果、野生株との差異は観察されなかった。以上の結果から、E1 株の *lcp* 遺伝子転写制御には本遺伝子以外の未同定の遺伝子が関与すると考えられた。今後、E1 株のゴム分解能強化を目指して、*lcp* 遺伝子の転写制御に関わる因子を特定する必要がある。

## 2) *R. gummiphilus* NS21 株のゴムから PHA への変換に関わる遺伝子の特定

ゴム分解時に細胞内にポリマー原料となりうる PHA の蓄積が観察された *R. gummiphilus* NS21 株のゴム分解関連遺伝子を突き止めるため、ゴム存在下における誘導条件またはゴム非存在下での非誘導条件で培養した細胞から遺伝子転写産物を調製し、次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンス解

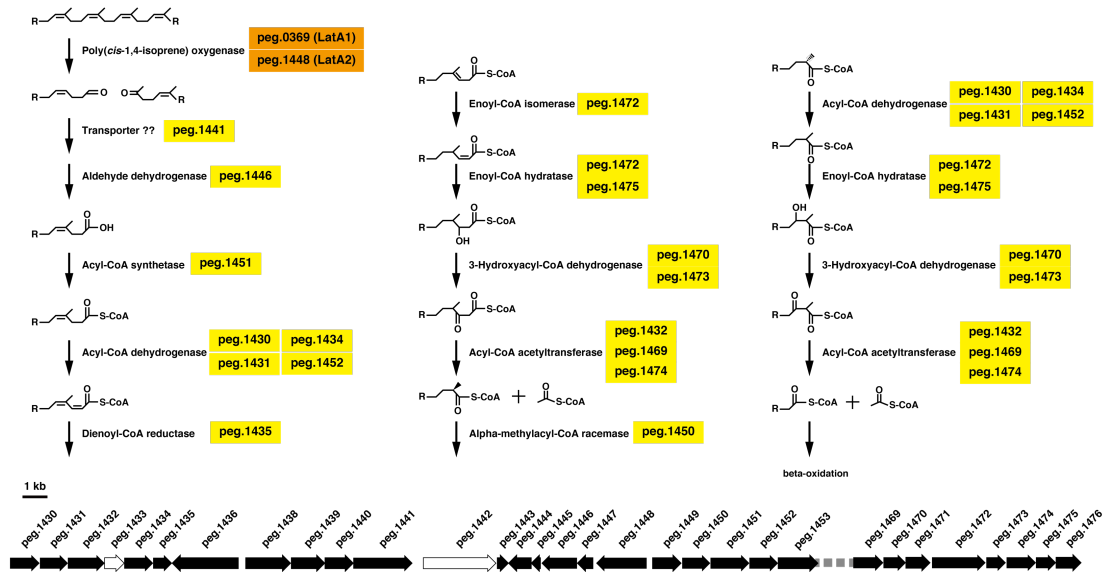


図 3. NS21 株の推定ポリイソプレンゴム代謝経路とその遺伝子群. ゴムで誘導された遺伝子は黒矢印で示した.

析による遺伝子発現量の網羅的解析を行なった。その結果、ゴム存在下の誘導条件において特異的に発現上昇する96個の遺伝子を特定した。それらの中には、ゴムの初発分解に関与する2つの細胞外ゴム分解酵素遺伝子 (*latA1* 及び *latA2*) や、ゴムの低分子化産物の代謝に働くと考えられる酵素遺伝子が含まれていた(図3)。それらの転写誘導性の観点から、これら遺伝子が NS21 株のゴム分解に関与することが強く示唆された。ゴム初発分解に関わる *latA2* 遺伝子の近傍には、転写制御因子をコードする遺伝子が見出されており、*latA2* の転写誘導に関与する可能性が考えられた。

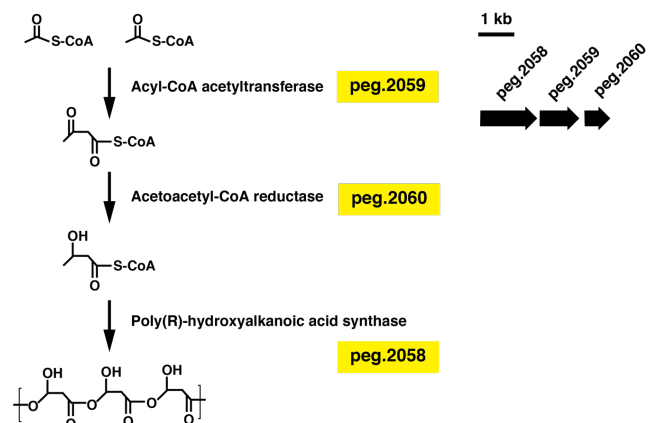


図4. NS21 株の Acyl-CoA からポリヒドロキシ酪酸への推定変換経路とその遺伝子群。

さらに、PHA 生合成に関わる遺伝子をゲノム解析により探索したところ、ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) 生産菌 *Cupriavidus necator* H16 株の Acyl-CoA から PHB への変換に関わる *phaABC* 遺伝子<sup>(3)</sup> のホモログが見出され、NS21 株の PHA 生合成に関与すると推察された (図4)。

### 3) 新規ゴム分解細菌のゴム分解機構の解明

廃棄ゴムの変換技術確立に利用できるゴム分解菌の情報取得を目指して、ゴム分解菌のスクリーニングを行い、希少放線菌 *Actinoplanes* sp. OR16 株を得た。ゲノム解析により OR16 株のゴム分解遺伝子を探索した結果、本株は、他の放線菌のゴム分解への関与が知られている *lcp* のホモログを3つ (*lcp1*, *lcp2*, *lcp3*) 有することが明らかとなった。これらの遺伝子産物が真にゴム分解に関わるかどうかを明らかにするために、各遺伝子を実験室で発現させ、遺伝子産物を精製した。各精製 Lcp を用いて天然ゴムを基質とした際の比活性を測定した。なお、Lcp は基質に酸素を添加するオキシゲナーゼであることから、比活性は反応液中の溶存酸素の消費量を測定することで算出した。その結果、*Lcp1*, *Lcp2*, *Lcp3* の比活性は、それぞれ 4.02, 1.17, 0.22 U/mg であることが明らかとなった。さらに各遺伝子の転写誘導性を評価した結果、それぞれの転写はゴム存在下で 22.2, 17.1, 335 倍に増大した (図5)。酵素活性の観点から、*Lcp1* がゴム分解に主要な役割を果たしていると考えられたが、最も比活性が低い *Lcp3* をコードする遺伝子の転写は、誘導性、転写量ともに他の *lcp* 遺伝子と比較して顕著に高かったことから、3つ全ての *lcp* 遺伝子が OR16 株のゴム低分子化に重要な役割を担うと考えられた。

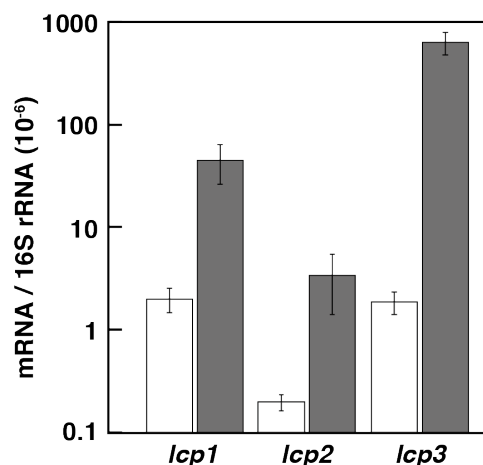


図5. OR16 株の *lcp* 遺伝子の転写誘導性評価. ゴム非存在下 (白)、ゴム存在下 (灰) で培養した際の各遺伝子の転写量を定量的 PCR 解析により測定した。

### <引用文献>

- Rose et al., Biodegradation of natural rubber and related compounds: Recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6): 2803-2812, 2005
- Oetermann et al., LcpR<sub>VH2</sub> regulating the expression of latex-clearing proteins in *Gordonia polyisoprenivorans* VH2. *Microbiology* 165: 343-354, 2019
- Nawrath et al., Plant polymers for biodegradable plastics: Cellulose, starch and polyhydroxyalkanoates. *Mol. Breed.*, 1(2): 105-122, 1995

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計11件) (全て査読あり)

1. Complete genome sequence of natural rubber-degrading, gram-negative bacterium, *Rhizobacter gummiphilus* strain NS21<sup>T</sup>. Linh, D.V., Gibu, N., Tabata, M., Imai, S., Hosoyama, A., Yamazoe, A., Kasai, D., Fukuda M. *Biotechnol. Rep.* 2019. doi:10.1016/j.btre.2019.e00332. Epub ahead of print
2. 2,3-Dihydroxybenzoate *meta*-cleavage pathway is involved in *o*-phthalate utilization in *Pseudomonas* sp. strain PTH10. Kasai, D., Iwasaki T, Nagai K, Araki N, Nishi T, Fukuda M. *Sci. Rep.* 4;9(1):1253, 2019. doi:10.1038/s41598-018-38077-2
3. Characterization and functional expression of a rubber degradation gene of a *Nocardia* degrader from a rubber-processing factory. Linh, D.V., Huong, N.L., Tabata, M., Imai, S., Iijima, S., Kasai, D., Anh, T.K., Fukuda, M. *J. Biosci. Bioeng.* 123(4), 412-418, 2017. doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.11.012
4. Identification of natural rubber degradation gene in *Rhizobacter gummiphilus* NS21. Kasai, D., Imai, S., Asano, S., Tabata, M., Iijima, S., Kamimura, N., Masai, E, Fukuda, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81(3), 614-620, 2017. doi.org/10.1080/09168451.2016.1263147
5. A bacterial aromatic aldehyde dehydrogenase critical for the efficient catabolism of syringaldehyde. Kamimura, N., Goto, T., Takahashi, K., Kasai, D., Otsuka, Y., Nakamura, M., Katayama, Y., Fukuda, M., Masai, E. *Sci. Rep.* 7, 44422, 2017. doi: 10.1038/srep44422

他6件

[学会発表] (計26件)

1. 儀武菜美子, 須田大登, Dao Viet Linh, 福田雅夫, 笠井大輔. ゴム分解菌 *Actinoplanes* sp. OR16 株の完全ゲノム解読とゴム分解遺伝子の同定. 第13回日本ゲノム微生物学会年会, 東京, 2019年3月
2. 新朋香, 儀武菜美子, 須田大登, 平方悠河, 山口隆司, 黒田恭平, 笠井大輔. ゴムの添加により優占化する細菌叢の解析. 第13回日本ゲノム微生物学会年会, 東京, 2019年3月
3. Dao Viet Linh, 田端理朗, 儀武菜美子, 今井俊輔, 細山哲, 山副敦司, 福田雅夫, 笠井大輔. ゴム分解菌 *Rhizobacter gummiphilus* NS21<sup>T</sup>株の網羅的転写量解析によるゴム分解遺伝子の同定. 第13回日本ゲノム微生物学会年会, 東京, 2019年3月
4. Daito Suda, Dao Viet Linh, Masao Fukuda, Daisuke Kasai. Characterization of natural rubber degradation gene in *Rhizobacter gummiphilus* NS21. International Workshop on Biotechnology, ベトナム ハノイ, 2019年3月
5. Dao Viet Linh, Daisuke Kasai, Masao Fukuda. Functional characterization of rubber degradation enzyme genes from a *Nocardia* rubber degrader. 環境微生物系学会合同大会2017, 仙台, 2017年8月
6. Daisuke Kasai, Shunsuke Imai, Shota Asano, Michiro Tabata, So Iijima, Naofumi Kamimura, Eiji Masai, Fuminori Yoneyama, Osamu Wakisaka, Masao Fukuda. Characterization of natural rubber degradation gene in *Rhizobacter gummiphilus* NS21. The 17th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS 2016), オーストラリア メルボルン, 2016年10月
7. 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. 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. 環境バイオテクノロジー学会2016年度大会, 広島, 2016年6月
8. Dao Viet Linh, Daisuke Kasai, To Kim Anh, Nguyen Lan Huong, Masao Fukuda. Characterization of the latex-clearing protein from a *Rhodococcus* rubber degrading bacterium. 日本農芸化学会2016年度大会, 札幌, 2016年3月
9. 浅野翔太, 笠井大輔, 今井俊輔, 田端理朗, 上村直史, 政井英司, 福田雅夫. *Rhizobacter gummiphilus* NS21 株のゴム分解酵素遺伝子の異種宿主発現と解析. 日本農芸化学会2016年度大会, 札幌, 2016年3月
10. 久保木紗哉, 笠井大輔, 今井俊輔, Alexander Steinbüchel, 上村直史, 政井英司, 福田雅夫. *Actinoplanes* sp. OR16 株のゴム酸化酵素遺伝子の発現と機能解析. 環境バイオテクノロジー学会2015年度大会, 東京, 2015年6月

他16件

〔図書〕(計2件)

1. 「微生物を用いた廃棄ゴム処理技術の開発を目指して」笠井大輔、福田雅夫、バイオサイエンスとインダストリー(バイオインダストリー協会)76(6), 497-500, 2016.
2. 「ゴムを食べる微生物たち」笠井大輔、生物工学会誌 94(9), 560, 2016.

〔その他〕

ホームページ等 <http://bio.nagaokaut.ac.jp/~dkasai/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 笠井 大輔

ローマ字氏名: KASAI Daisuke

所属研究機関名: 長岡技術科学大学

部局名: 技学研究院

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 80452085

※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。