

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月10日現在

機関番号：32704

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00661

研究課題名(和文) 廃ゴム分解微生物のスクリーニングおよび分解メカニズムの解明

研究課題名(英文) Screening of waste rubber degrading microorganisms and analysis of its degradation mechanism

研究代表者

清水 由巳 (Shimizu, Yumi)

関東学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：50725124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： ゴムを資化する真菌の分離、同定を行った。ゴムラテックス培地で生育旺盛な4菌株、ブナシメジ、*Polyporus arularius*、*Phanerochaete* sp.、*C. aurantitingens* を得た。ブナシメジ、*Phanerochaete* sp.、*C. aurantitingens*のゴム分解物の構造を調べたところ、ゴム平均分子量の減少、ゴム分解物の構造に新たなCHO、OHの出現、ベンゼン環の除去を確認した。

ブナシメジのゴムラテックス培地での培養時には、リグニン分解酵素群のいくつかをコードする遺伝子が多く発現し、これらの酵素がゴム分解に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブナシメジ、*Polyporus arularius*、*Phanerochaete* sp.、*C. aurantitingens*をゴム分解菌として得た。特にブナシメジは食用キノコであり、将来産業利用する際、取り扱い易さが期待できる。これら菌株によるスチレン-ブタジエンゴム分解により、ベンゼン環の除去を確認できた。ゴム構造中の特定部位の分解は、廃ゴムの原型加工への応用に期待できる。

ブナシメジのゴムラテックス培地培養時に、発現量の多くなるリグニン分解酵素をコードする遺伝子、機能未知の遺伝子を見出した。これら遺伝子産物の中には、ゴム分解に関与する新規酵素が含まれている可能性が高い。

研究成果の概要(英文)： We isolated and identified fungi utilizing rubber as a carbon source. We obtained 4 strains which grow sharply on rubber latex medium, *Hypsizygus marmoreus*, *Polyporus arularius*, *Phanerochaete* sp., and *C. aurantitingens*. When the chemical structures of rubber degradation products of *H. marmoreus*, *Phanerochaete* sp., and *C. aurantitingens* were examined, we confirmed the decrease in rubber average molecular weight, the appearance of new CHO and OH in the structure of rubber degradation products and the removal of benzene ring from SBR.

It was suggested that genes encoding some of lignin-degrading enzymes are highly expressed while *H. marmoreus* is growing on a rubber latex medium, and that these enzymes are involved in rubber degradation.

研究分野：真菌学、分子生物学、分類学

キーワード：ゴム分解 担子菌 白色腐朽菌 リグニン分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本の新ゴム消費量は世界第4位であり、ゴム工業での消費量は1,393,200トンであった(2014年日本ゴム工業会、国際ゴム研究会)。その後も消費量は維持されている。消費されたゴム製品は廃棄される。これら使用済みの廃ゴム処理方法は、主に燃料利用であり、ついで原型加工利用、輸出、その他である。近年、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おり、廃ゴムの原型加工利用による有効なリサイクルが望まれている。

他方、ゴム製品製造過程では、天然ゴム、合成ゴム生産過程で多量の廃ゴムが放出されており、天然ゴムの生産国であるタイ国、インドネシアなどでは廃ゴムを含む廃棄物の処理が問題となっている(福田、2015)。ゴム製品は、天然ゴム、合成ゴム、合成樹脂を様々な割合で配合させ用いられる。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、廃ゴムの原型加工利用を困難にしている。これまで、天然ゴムを分解する微生物として、*Nocardia* 属や *Xanthohomonas* 属、*Gordonia* 属などの放線菌が分離されてきた(Linos, et al., 2000)。合成ゴムに関しては、スチレン-ブタジエンゴムを分解する *Enterobacter cloacae* などが分離されている(笈木、株式会社東和コーポレーション)。しかしながら、分解速度が非常に遅く、人工的な分解系の研究はほとんど進んでいない(榎、2007、2014)。

このような背景のもと、我々は、次の点から真菌類に注目した。

難分解性物質リグニンを分解する真菌類が知られており、その一種、*Ceriporiopsis subvermispora* は架橋した天然ゴムを分解する(Enoki et al., 1999)。

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。

以上のような特性から、我々は、合成ゴムなどの難分解性物質を効率的に分解できる微生物として真菌類に着目し、ゴム分解菌の探索を行うこととした。

2. 研究の目的

ゴム分解性のある真菌の分離、真菌の同定、ゴム分解酵素の同定、遺伝子の同定と、分解作用機構の解明を目的とした。特に、合成ゴムラテックスや架橋したゴムを分解する微生物の報告はほとんどないことから、合成ゴム、架橋ゴムを分解する微生物の分離とそれらの分解作用機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

ゴム分解菌の分離

自然界からのゴム資化真菌の分離には、Yeast Nitrogen Base w/o amino acid and ammonium sulfate、2% 寒天を含む YNB 培地に、天然ゴムラテックス、スチレン-ブタジエンゴムラテックス、ブタジエンゴムラテックス、固形スチレン-ブタジエンゴム、固形ブタジエンゴム、加硫天然ゴムの6種類のゴムを、それぞれ炭素源として添加した培地を用いた。ネガティブコントロールとして、ゴムを含まない YNB 培地を用いた。これら7種類の培地に菌を接種し、ゴムを含む YNB 培地で生育可能な菌類をスクリーニングした。

使用菌株と培養条件

国内の野外から分離した200株と、エリンギ、ブナシメジ、ヒラタケ、エノキ、シイタケなどの市販品を使用した。ゴム分解菌として報告のある *Cer. subvermispora* の使用を試みたが、

国内の菌株保存施設には保存されていなかったため、近縁種である *Ceriporiopsis aurantitogens*:TUFC 13776 を鳥取大学菌類きのこ遺伝資源研究センターから入手し、合計 206 株を用いた。

菌種の簡易同定

菌の同定は、各菌株からゲノム DNA を抽出し、28S rDNA-D1/D2 領域、ITS 領域を PCR 法により増幅し塩基配列を決定後 BLAST 検索により、既知種の遺伝子配列と 99% 以上相同性のあったものを同じ種であるとした。

ゴム分解産物の同定

ゴムを含む YNB 培地と、ゴムを含まない YNB 培地に菌を接種し、ゴムを含む YNB 培地で顕著な増殖を示した菌株（ゴム分解候補株）については、ゴム分解産物の構造解析を行った。薄相クロマトグラフィー (TLC)、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 解析、フーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR)、核磁気共鳴分光法 (NMR) により、ゴム分解による分子量の減少の測定、ゴム分解産物の構造解析を行った。菌による固形ゴムの分解物の解析は、走査型電子顕微鏡 (JEOL) により表面構造を解析した。

ゴム代謝時に関わる遺伝子群の次世代シーケンサー技術を用いた同定

ゴム分解菌を、天然ゴムラテックス添加 YNB 培地、グルコース添加 YNB 培地に植菌し、25 1 カ月培養後、菌体を回収した。回収した菌体から total RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。次世代シーケンスはユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼し、Strand-specific mRNA ライブラリーのシーケンス結果を得た。

リグニン分解酵素群の酵素活性測定

菌をラテックス平板培地、及びグルコース平板培地に植菌し、2 週間、25°C で培養した。菌培養物を、2 mL の 50 mM マロン酸緩衝液 (pH4.5) または 20mM のコハク酸緩衝液 (pH3.0) でホモジネートした。遠心分離後、上清を粗酵素液として使用した。酵素活性測定は粗酵素液 0.9 mL に反応液を 0.3 mL 加え混ぜ、270 ~ 465 nm の吸光度を測定した。タンパク量は Nano Drop Lite (Thermo Fisher Scientific) (280 nm) で測定した。

反応液及び吸光度

・マンガンペルオキシダーゼ活性測定用反応液

0.8 mM $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 1 mM H_2O_2 , 50 mM マロン酸二ナトリウム溶液 (pH4.5), A270 nm

・リグニンペルオキシダーゼ活性用反応液

16 mM ベラトリルアルコール, 20 mM コハク酸緩衝液 (pH3.0), 1 mM H_2O_2 , A315 nm

・ラッカーゼ活性測定用反応液

0.8 mM 2, 6-dimethylphenol, 20 mM コハク酸緩衝液 (pH3.0), A465 nm

酵素活性は、単位 g タンパク質当たり、1 分当たりの吸光度変化量を酵素活性値として用いた。

天然または非天然のエステルについて分解可能なリパーゼ活性を有する菌株の獲得

リパーゼ活性を有する菌株のスクリーニングリパーゼ活性の検出は、Kouker & Jaeger (1987) により考案された rhodamine B を用いたリパーゼ活性を有するバクテリアをスクリーニングする方法を改良し、コロニーの呈色反応から目的の菌を獲得した。得られた菌株を用いて、リパーゼの検出は Native PAGE によりタンパク質の分離を行った後、rhodamine B による呈色から酵素の検出を行った。

ゴム分解酵素の細胞外分泌メカニズムの解析

細胞外分泌に関与すると期待される CAP64 遺伝子産物の細胞内局在性について解析を行った。タンパク質 Cap64 と標識タンパク質 mcherry、あるいは His-tag との融合タンパク質を担子菌

酵母 *Cryptococcus neoformans* の細胞内で合成させ、CAP64 の細胞内局在性を蛍光顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

ゴム分解菌のスクリーニング

自然界より分離した分離株 200 株と、市販の 6 菌株について、天然ゴムラテックス添加培地に植菌し菌の増殖を観察したところ 206 株中 21 株が生育した。これら菌株からゲノム DNA を抽出し、ITS 領域の塩基配列を用いた菌の同定を行った。その結果、7 株は子囊菌であり植物病原菌であった。他の 14 株は担子菌のハラタケ亜門に属した。これら 21 株を用いて、YNB 平板培地と天然ゴムラテックス添加培地に植菌し、菌の伸長量をゴムの有無により比較した。最も生育が良かった菌株は、*Hypsizyqus marmoreus* (ブナシメジ) で 2.46 倍、次いで *Phanerochaete* sp. 1.69 倍であった。

TLC によるゴム分解産物の検出

天然ゴムラテックス添加培地での菌糸伸長が著しかった菌株は、天然ゴムラテックスを分解し、炭素源として利用したと考えられる。そこで、天然ゴムラテックス添加培地で菌を培養後、天然ゴムラテックス分解物を回収し TLC により分解産物の検出を行った。その結果、コントロールでは検出されない特徴的なスポットが確認できた。

ゴム分解産物の構造解析

天然ゴムラテックスに、菌を作用させたゴム試料と菌を作用させていないゴム試料を用い、分子量の比較を GPC により行った。天然ゴムラテックス平均分子量は、 47.6×10^4 だったが、*Phanerochaete* sp.、ブナシメジをそれぞれ作用させた場合、平均分子量は約 1/6 から 1/7 まで減少し、 8×10^4 、 7.3×10^4 となった。他方、FT-IR 測定を行ったところ、アミスギタケを作用させた試料では、 $1,300 \text{ cm}^{-1}$ 付近に、-OH の伸縮振動と思われる新たなピークが確認され、これは、 $^1\text{H-NMR}$ 測定によっても 3.8 ppm に -OH のピークが確認された。つぎに、ブナシメジを作用させた試料では、FT-IR 測定により、 $1,750 \text{ cm}^{-1}$ 付近に、 $^1\text{H-NMR}$ 測定によっても 0.98 ppm にごくわずかではあるが -CHO のピークが確認された。これらのことから、ブナシメジ、あるいはアミスギタケによる天然ゴムラテックスの分解では、分解産物が異なっており、分解メカニズムが異なることが予想された。*Phanerochaete* sp. については現在解析を行っている。

Phanerochaete sp. による固形ゴムの分解

ゴム製品は、天然ゴム、合成ゴム、合成樹脂が用いられており、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加工が行われる。そこで、*Phanerochaete* sp. を用い、固形ゴムの資化性について検討を行った。YNB 培地に固形ゴム片を添加し、菌培養後、ゴム片を取り出し、ゴム表面を走査型電子顕微鏡により観察したところ、菌を作用させていない固形ゴムと比較し、IR, BR, SBR ではゴムの内部まで菌糸が入りゴム表面の崩壊が観察された。NR については、ゴム表面の崩壊が激しく、菌糸体を確認することはできなかった。これらのことから、*Phanerochaete* sp. は天然ゴムラテックスの分解だけでなく、固形ゴムも分解する可能性がある。

ブナシメジによるラテックス培地培養時に発現する遺伝子群の同定

ゴムラテックス添加培地、対象培地としてグルコース添加培地を用い、*H. marmoreu* あるいは *Phanerochaete* sp. を培養し、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、リグニン分解酵素群の 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いたことが判明した。また、リグニン分解酵素であるラッカーゼ、マンガンペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼの酵素活性を測定したところ、いずれの酵素においても、グルコース添加培地培養よりもゴム添加培地培養の方が高い活性値となった。これらの酵素が天然ゴムラテックスの分解に關与する可能性は大変高い。

難分解性物質分解酵素の候補としてのリパーゼのスクリーニング

日本産酵母 171 株を用い、細胞外へリパーゼを産生する菌のスクリーニングを行ったところ、39 株は、炭素源がオリーブオイルである Rhodamine B 培地で陽性であった。これらのうち 5 株は炭素源を菜種油、あるいは Triolein としても Rhodamine B 培地で陽性であり、かつ 4 での培養でも陽性であった。これら 4 株について D1/D2 領域の DNA 塩基配列を用いた系統解析の結果、2 株は 1 つのクラスターを形成し、かつ既知の配列との一致はみられなかった。生理生化学的性状試験の結果、グルコースを発酵し、炭素源資化性試験において 4 つの炭素源で *W. alni* と違いがあった。これら 2 株は同種であり新種である可能性が示唆された。また、これら 2 株について TLC により Triolein の分解生成物と思われる物質を検出できた。これらのことから、2 株は脂質分解酵素を産生する未記載種であることが期待される。さらに、低温でも活性のある酵素であった。

細胞外分泌酵素の分泌メカニズムの解析

担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* を用い、リグニン分解酵素ラッカーゼを含む細胞外分泌酵素の分泌系と *CAP64* 遺伝子産物との關与について解析を行った。*CAP64* 遺伝子欠失株を YPD 液体培地で定常期まで培養を行い、細胞形態を観察すると、液胞の体積が大きくなる場合や小胞の数の増加がみられ、酸性オルガネラ染色液キナクリンにより染色されないことが明らかとなった。*CAP64* 欠失株では野生株と比較して、対数増殖期において細胞の不分離がみられた。さらに、定常期のある細胞ではラッカーゼの活性の上昇とラッカーゼをコードする遺伝子 *LAC1* 遺伝子転写量増加がみられた。細胞外分泌酵素などの輸送は細胞内小胞輸送によるものであると知られていることから、輸送に關与する遺伝子転写量を *CAP64* 欠失株と野生株とで比較した。野生株と比較して欠失株では、それら細胞輸送に關与する遺伝子転写量に異常がみられた。そこで、*Cap64* タンパク質に蛍光タンパクを付加し、その細胞内の局在性を調べたところ、*CAP64* 遺伝子は液胞/小胞に局在していると判明した。このことは *CAP64* 遺伝子が細胞内小胞輸送に關与する可能性を示唆する結果となった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yumi Imanishi Shimizu, Reiko Tanaka, Takashi Yaguchi, Kiminori Shimizu Capsule gene *CAP64* is involved in the regulation of vacuole acidification in *Cryptococcus neoformans*.

Mycoscience 2017(58) pp45-52.

〔学会発表〕(計 11 件)

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 ラテックスゴム分解菌の探索と分解産物の検出 日本菌学会第 6 3 回大会 (2019)

佃 雅俊、川村真由、中島太郎、香西博明、清水由巳 白色腐朽菌を用いたゴム類の酵素分解挙動 マテリアルライフ学会第 23 回春季研究発表会 (2019)

清水由巳、鴨川志奈 酵母 *Cryptococcus neoformans* の莢膜合成遺伝子 *CAP64* の小胞輸送への關与 (2) 2018 年度 関東学院大学理工/建築・環境学会 研究発表講演会 (2018)

中島太郎、岩藤洸太、川村真由、青木大輝、佃雅俊、香西博明、清水由巳 担子菌類における天然ゴムラテックス分解菌の探索 2018年度関東学院大学理工/環境・建築学会研究発表講演会 (2018)

清水由巳、鴨川志奈 酵母 *Cryptococcus neoformans* の莢膜合成関連遺伝子 *CAP64* の機能解析-2 第62回日本医真菌学会総会・学術集会 (2018)

鳥越梨沙、今西(清水)由巳、清水公德 担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* の DBB 呈色反応機構の解明(2) 東京理科大学アグリ・バイオ工学研究部門公開シンポジウム 2017 (2017)

鳥越梨沙、今西(清水)由巳、清水公德 担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* の DBB 呈色反応機構の解明(1) 真菌症フォーラム 第23回学術集会 (2017)

鴨川志奈、島田有希乃、清水由巳 酵母 *Cryptococcus neoformans* の莢膜合成遺伝子 *CAP64* の小胞輸送への関与(1) 2017年度 関東学院大学理工/建築・環境学会研究発表講演会 (2017)

清水由巳、紺野裕介、富田遥介、都築勇亮 利尻産酵母を用いたリパーゼ活性菌のスクリーニング 環境微生物系学会合同大会 2017 (2017)

清水由巳、鴨川志奈 酵母 *Cryptococcus neoformans* の莢膜合成関連遺伝子 *CAP64* の機能解析-1 第61回日本医真菌学会総会・学術集会 (2017)

田中はるな、清水由巳、香西博明 天然ゴムラテックスの酵素分解 マテリアルライフ学会 第21回 春季研究発表会 (2017)

〔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〕なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：香西 博明

ローマ字氏名：Kouzai Akihiro

所属研究機関名：関東学院大学

部局名：理工学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 00272089

研究分担者氏名：清水 公德

ローマ字氏名：Shimizu Kiminori

所属研究機関名：東京理科大学

部局名：基礎工学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 40345004

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 弘喜

ローマ字氏名：Takahashi Hiroki

以上