

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580118

研究課題名(和文) 未利用資源のセルロース系バイオマスを発酵原料とした有用物質生産のための基盤研究

研究課題名(英文) Basic studies on the utilization of cellulosic biomass, unexploited natural resources, as fermentation raw materials, for the production of industrially useful products

研究代表者

小嶋 郁夫 (Kojima, Ikuo)

秋田県立大学・生物資源科学部・理事

研究者番号：90315581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：天然に豊富に存在する未利用資源のセルロース系バイオマスを原料に抗生物質を生産できる放線菌を育種する目的で、土壌よりセルラーゼ高分泌性のストレプトミセス属放線菌C42株を分離した。本株が有する9種全てのセルラーゼ遺伝子群を利用して放線菌用セルラーゼ発現ベクターを作成した。本ベクターを導入したセルラーゼ非分泌性放線菌はセルラーゼ分泌性に転換したが、C42株と異なりセルロースやろ紙を消化できなかった。また、別の放線菌より単離した酵素遺伝子群を利用してセルロースのセルラーゼ分解で生じるセロビオースを利用可能に導く発現ベクターも作成した。今後、これらベクター内の遺伝子群の発現の強化などの改良を進める。

研究成果の概要(英文)：In order to breed streptomycetes that can produce antibiotics using cellulosic biomass as fermentation raw materials, we isolated highly cellulolytic Streptomyces strain C42 from soils. We constructed a gene expression cassette harboring all the nine cellulase genes that the strain carries to create a cellulase expression vector for streptomycetes. Non cellulolytic streptomycete transformed with the vector secreted cellulases but failed to degrade cellulose and filter paper in contrast to the C42 strain. We also isolated five genes encoding enzymes related to utilization of cellobiose, a final product of cellulose digested by cellulase, from another streptomycete to construct a cellobiose-utilizing expression vector. The results on the cellulase expression suggested that it is crucial to enhance the expression levels of the cellulase genes to generate vectors which enable streptomycetes to induce the degradation of cellulolytic materials for the fermentative production of antibiotics.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用微生物学

キーワード：抗生物質生産 バイオマス 放線菌

1. 研究開始当初の背景

Streptomyces 属放線菌は天然の土壌などより分離され、種々の生理活性を示す抗生物質や有用酵素群などの高付加価値物質を生産する菌が頻度高く見出される。これまで、これら産業上有用な物質の工業レベルの発酵生産には蔗糖蜜や植物由来の油などが用いられてきたが、生産コスト低減のため、常に安価な発酵原料が求められている。

有用物質を生産する放線菌は、多くが土壌から分離されたに関わらず、天然に広く存在するセルロースやヘミセルロース系物質の資化能が低く十分に利用できない。しかし、一般の *Streptomyces* 属放線菌にはセルロースなどの資化性菌が存在し、また、これらは分解・資化に関連する複数の酵素群を有していることがゲノム解析で判ってきた。

本研究開始時には、放線菌のセルロースなどの資化能を有用物質の生産放線菌に付与して、セルロース系物質を発酵原料に利用する研究はなされていなかった。一方、我々はセルロース系物質の資化性放線菌を複数分離し、これらの1株に抗稲いもち病用抗生物質カスガマイシン(KSM)の生合成遺伝子群を導入すると、稲わらやスギ材木粉などを発酵原料にKSMを生産させることに成功した。すなわち、セルロース系物質に対して適切な分解酵素類があれば、これらより抗生物質の生産が可能であることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究は、セルロース・ヘミセルロースなど多量の多糖類を含むにも関わらず有効利用されていない稲わら・籾殻や建築廃材・林地残材などの木質バイオマス(CB)を原料として、抗生物質などの有用物質を生産できる放線菌を育種して、CBの発酵原料化を進めるための基盤研究を目的とした。

すなわち、CB資化性の放線菌からCB資化能に関わるセルラーゼ遺伝子群などの分離；これら遺伝子群の発現カセット構築と放線菌用CB資化誘導ベクターの作成；さらに、構築したベクターをCB資化性の乏しい抗生物質の生産放線菌群に導入・発現させてCBを発酵原料とした抗生物質生産をめざした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

土壌より分離したCB資化性でセルラーゼ高分泌性の *Streptomyces* 属放線菌の *S. thermocarboxydus* C42 (以下、C42株)および *S. argenteolus* M178 (以下、M178株)をセルラーゼ(推定)遺伝子群の分離源とした。

セロピオース(Ceb)資化関連遺伝子群の単離には、ゲノム解読により本遺伝子群を有していることが判明した *S. coelicolor* M145株

(以下、M145株)を使用した。さらに、Ceb遺伝子群の発現用宿主には、ゲノム解析により関連酵素群を持たないことが判ったKSM生産菌 *S. kasugaensis* を用いた。

セルラーゼ(推定)遺伝子群の発現などの宿主には、*S. lividans* TK21 (以下、TK21株)および *S. avermitilis* SUKA1 (以下、SUKA1株)を用いた。

(2) セルラーゼ(推定)遺伝子群の単離と命名

C42株およびM178株より以下の方法によりセルラーゼ(推定)遺伝子群を分離した。
ショットガンクローニング

カルボキシメチルセルロース(CMC)は赤色素のコンゴレッドにより染色されるが、セルラーゼにより分解されると染色されない。そこで、この特性を利用したアッセイ法により、TK21株を宿主として、放線菌/大腸菌シャトルベクターpWBM1を用いて、C42株およびM178株のゲノムDNAからセルラーゼ遺伝子群のショットガンクローニングを行った。

ゲノム情報の利用

C42株およびM178株のゲノム解析より得られた塩基・アミノ酸配列について、BLAST、PfamおよびCAZyなどの検索を利用してセルラーゼ(推定)遺伝子群の予測を行い、PCR法により分離した。

単離遺伝子群の分類と命名

単離遺伝子群は、推定アミノ酸配列を基にCAZyによる糖加水分解酵素(GH)ファミリー(GH5, 6, 9, 12, 48)に分類して命名した。

(3) セルラーゼ(推定)遺伝子群およびCeb資化関連遺伝子群の単離と発現

セルラーゼ(推定)遺伝子群などの単離は、適宜設計したプライマーによりPCR増幅後、大腸菌の遺伝子操作系を用いて行った。また単離遺伝子群の発現には、放線菌染色体組込み型ベクター(pTYM19, pKU460など)により宿主(TK21株, SUKA1株)に導入して検討した。

(4) セルラーゼ活性の測定

セルラーゼ活性の測定は以下の方法で行った。

0.5% CMCを含む寒天培地で測定

セルラーゼ(推定)遺伝子の発現の有無は、TK21株を宿主とした形質転換株の培養液上清についてCMC含有の寒天培地にて検討した。すなわち、寒天培地のウェルに上清を注入して一晚拡散させて、寒天表面を0.1%コンゴレッド染色と1M NaClによる脱染色を行い、CMC分解により生じた透明円の有無にて判定した。

CMC, 結晶性セルロース(Avicel)およびろ紙を基質とした活性測定

常法に従い, セルラーゼ活性測定の代表的基質である CMC, Avicel およびろ紙について, TK21 株の導入株の培養上清などの酵素液について分解活性を測定した。基質を含む緩衝液中で一定時間, 一定温度で反応後, 分解により生じた還元糖を 3,5-dinitrosalicylic acid と反応させてニトロ基の還元により発色させ, 分光光度計にて A₅₄₀ を測定して還元糖量を定量し, 酵素活性を算出した。

(5) Ceb 資化関連遺伝子群の単離

セルラーゼ類とともに CB 資化に必要な Ceb 資化遺伝子群 *cebEFG-bglC/msiK* は, M145 株より PCR 法により単離して発現カセットを作成し, *S. kasugaensis* を宿主として遺伝子群の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) C42 株のセルラーゼ(推定)遺伝子群の単離と解析

ゲノム DNA からショットガンクローニングにより 2 遺伝子(*cel5A*, *cel9A*)を単離した。さらに, C42 株のゲノム解析より, これら 2 遺伝子のほかに 7 種のセルラーゼ(推定)遺伝子群を見出し, PCR 増幅により単離した。これら 9 遺伝子群は, 5 種の GH ファミリー(GH5, 6, 9, 12, 48)に分類された。

通常, セルラーゼ(*cel*)遺伝子はセルロースがセルラーゼ分解により生じる二糖のセロピオース(Ceb)により発現が誘導される。この発現誘導の原因となる CebR タンパクの結合部位は CebR ボックスと呼ばれ, *cel* 遺伝子群の上流域に位置する。この CebR ボックスの有無についてもまとめた(表 1)。

表 1. C42 株から見出された(推定)セルラーゼ遺伝子群

GH	遺伝子	CebR box	アミノ酸
GH5	<i>cel5A</i>	-	372
	<i>cel5B</i>	+	545
GH6	<i>cel6A</i>	+	575
	<i>cel6B</i>	-	367
	<i>cel6C</i>	-	343
GH9	<i>cel9A</i>	+	747
GH12	<i>cel12A</i>	+	379
	<i>cel12B</i>	-	237
GH48	<i>cel48A</i>	+	971

+, 上流域に存在; -, 存在しない

(2) M178 株のセルラーゼ(推定)遺伝子群の単離と解析

C42 株と同様に, ゲノム DNA からショットガンクローニングにより 2 遺伝子(*cel5A*, *cel12B*)を単離した。さらに, M178 株のゲノム

解析より, これら 2 遺伝子のほかに 8 種のセルラーゼ(推定)遺伝子群を見出し, PCR 増幅により単離した。これらは, C42 株由来遺伝子と同様に 5 種の GH ファミリーに分類され, 上流域の CebR ボックスの有無とともにまとめた(表 2)。

表 2. M178 株から見出された(推定)セルラーゼ遺伝子群

GH	遺伝子	CebR box	アミノ酸
GH5	<i>cel5A</i>	+	459
	<i>cel5B</i>	+	549
	<i>cel5C</i>	+	452
GH6	<i>cel6A</i>	+	587
	<i>cel6B</i>	-	339
	<i>cel6C</i>	-	373
GH9	<i>cel9A</i>	+	886
GH12	<i>cel12A</i>	-	235
	<i>cel12B</i>	+	267
GH48	<i>cel48A</i>	+	983

+, 上流域に存在; -, 存在しない

(3) C42 株のセルラーゼ(推定)遺伝子群の発現

9 遺伝子群について RT-PCR により発現を検討した。5 遺伝子(*cel5B*, *cel6A*, *cel9A*, *cel12A*, *cel48A*)の上流域に CebR ボックスが存在し(表 1), CebR を介した Ceb による発現誘導が示唆された。そこで, グルコース(Glc)および Ceb を単一炭素源として培養した菌体から RNA を抽出して発現を検討した。

その結果, いずれの遺伝子も C42 株で発現しており CebR 下流の 5 遺伝子は全てが, Glc に比べて Ceb 培養による発現量が有意に高くなることが判った。すなわち, これら 5 遺伝子は Ceb により発現が誘導されることが強く示唆された。

すなわち, C42 株の *cel* 遺伝子群は, 恒常的に発現している遺伝子群と, セルロースなどの存在により CebR を介して誘導的に発現する遺伝子群に分かれることが示唆された。

(4) C42 株のセルラーゼ(推定)遺伝子群のセルラーゼ活性の発現

さらに, 9 遺伝子群について放線菌用の発現ベクター pKU460 の高発現プロモーター *PrpsJ* の下流に挿入し, TK21 株に導入した。これら導入株について液体培養を行い, 得られた培養上清について, CMC 分解 (CMCase) 活性およびろ紙分解 (FPase)活性を検討した。反応は 37 および 50 にて行った。

その結果, 2 遺伝子が CMCase 活性; 8 遺伝子が FPase 活性を誘導し, *Cel5A* は

両方の活性を示した(表 3)。

表 3. C42 株の遺伝子産物によるセルロースの分解様式

遺伝子産物	CMCase	FPase
Cel5A	+	+
Cel5B	-	-
Cel6A	-	±
Cel6B	-	+
Cel6C	-	+
Cel9A	+	-
Cel12A	-	+
Cel12B	-	+
Cel48A	-	+

+, 有意な活性; ±, 有意な傾向の活性
-, 活性なし

すなわち, これら遺伝子群を全て用いた発現カセットはセルラーゼ活性発現による CB 資化能誘導に有用であることが強く示唆された。

(5)M178 株のセルラーゼ(推定)遺伝子群のセルラーゼ活性の発現

C42 株由来遺伝子と同様に, M178 株由来の 10 遺伝子群について発現ベクター pKU460 の *PrpsJ* の下流に挿入し, TK21 株に導入して, これら導入株の液体培養上清についてセルラーゼ活性を測定した。CMCase および FPase 活性に加え, Avicel 分解 (Avicelase) 活性を検討した。反応は 37 °C にて行った。

その結果, *cel5A* と *cel12B* は CMCase と FPase 活性; *cel9A* は CMCase と Avicelase 活性; *cel6C* と *cel12A* は Avicelase 活性; を誘導したが, 5 遺伝子(*cel5B*, *cel5C*, *cel6A*, *cel6B*, *cel48A*) については, いずれの活性をも明確に誘導しなかった(表 4)。このように, M178 株の遺伝子群について, 活性発現が不明なものが残されており今後の詳細な検討を予定している。

表 4. M178 株の(推定)セルラーゼ遺伝子産物によるセルロース分解様式

産物	CMCase	Avicelase	FPase
Cel5A	+	-	+
Cel5B	-	-	-
Cel5C	-	-	-
Cel6A	-	-	-
Cel6B	-	-	-
Cel6C	-	+	-
Cel9A	+	+	-
Cel12A	-	+	-
Cel12B	+	-	+
Cel48A	-	-	-

+, 活性あり; -, 活性なし

(6)M145 株の Ceb 資化関連遺伝子群の単離と発現カセットの構築

放線菌では, セルラーゼは菌体外に分泌され, 環境中のセルロースを分解して Ceb を生じる。菌体外の Ceb は, 特異的輸送タンパク(CebEFG)と ATP 結合タンパク質(MsiK)により, 膜を通過して菌体内に取り込まれ, β -グルコシダーゼ(BglC)によりグルコースへと分解されて代謝される。M145 株ゲノム上で, *cebEFG* と *bglC* は *ceb* オペロンを形成し, *msiK* はこれとは単独に存在している。そこで, *ceb* オペロンと *msiK* を別個に PCR により固有のプロモーターを含んで増幅し, さらに両端を制限酵素 *Xba*I の切断部位に設計した発現カセット(6.3 kb)を構築し(図 1), 染色体組込型ベクターに挿入して, pBOM15(14.0 kb)を得た。

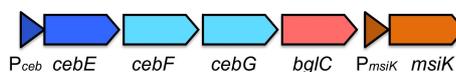


図 1. Ceb 資化性誘導カセット

KSM 生産菌の *S. kasugaensis* は, ゲノム情報から *ceb* オペロンを持たず, 実際に Ceb を単一炭素源として生育できない。そこで, 本菌株に pBOM15 を導入したところ, 導入株は Ceb を単一炭素源とした寒天培地上で十分に生育することが判った。すなわち, 構築した Ceb 資化関連遺伝子群の発現カセットは放線菌内で有効には働き, Ceb 資化能を誘導できることが判った。したがって, pBOM15 は Ceb 資化誘導ベクターである。

(7)C42 株のセルラーゼ遺伝子群による発現カセット構築

C42 株の 9 種のセルラーゼ遺伝子群と, そのうちの *cel48A* とオペロンを形成しているキシログルカナーゼ遺伝子 *xeg74A* を含む 10 遺伝子群よりなる発現カセット(17.0 kb)を構築した(図 2)。キシログルカナーゼは, キシログルカンの 1,4-グルカン骨格を加水分解する酵素である。

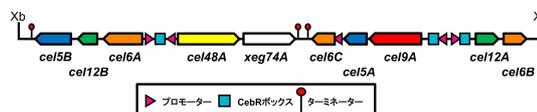


図 2. セルラーゼ発現カセット

Xb; *Xba*I 切断部位

本発現カセットの構築に際して, 各遺伝子の C42 株ゲノム中での分布・配置を参考に, 各遺伝子群の固有プロモーター配列とともに単離し, CebR ボックスを上流域に有する遺伝子群は, 本ボックスとともに再

度単離した。したがって、研究成果(3)で述べたように、本発現カセット内の遺伝子群は異種放線菌においても C42 株内と同様に、恒常的に発現する遺伝子群と CB が分解されて生じる Ceb により CebR を介して発現が誘導される遺伝子群から構成されることになる。

また、本発現カセットの両端は制限酵素 XbaI の切断部位としていることから、本カセットは XbaI 処理により切り出すことが可能であり、種々のベクターの XbaI 部位に挿入できる特徴がある。

構築した発現カセットを放線菌の染色体組込み型ベクター-pTYM19 に挿入して、pBOM51 (23.7 kb)を構築した。

(8)pBOM51 の放線菌への導入によるセルラーゼおよび CB 資化能の誘導

SUKA1 株は、ゲノム情報より Ceb 資化関連遺伝子群を有し、予備実験から Ceb を単一炭素源として生育できるが、セルラーゼ類を殆ど分泌しないことが判った。

そこで、構築した pBOM51 を SUKA1 株に導入し、CMCase および FPase 活性の分泌誘導などについて検討を行った。

その結果、pBOM51 導入株の培養上清にはコントロール株に比べて、有意に CMCase および FPase 活性が検出された。

一方、CMC、Avicel およびろ紙をそれぞれ単一炭素源として液体培地で培養したところ、pBOM51 導入株は CMC でのみ生育した。遺伝子源である C42 株は同一培養条件で、CMC、Avicel およびろ紙のいずれの炭素源でも生育できる。

したがって、pBOM51 はセルラーゼ誘導は可能であるが CB 誘導には不十分のベクターであることが判った。

(9)成果の総括

以上のように、本研究で構築した C42 株由来のセルラーゼ遺伝子群よりなる発現カセットを挿入した発現ベクター(pBOM51)は、異種放線菌においてセルラーゼ活性を誘導し、CMC 資化能を誘導することはできたが、Avicel およびろ紙に対する資化能を誘導するには不十分であることが判った。

おそらく、これらセルロース系基質に対して C42 株と同レベルの資化能を誘導するには、今回構築したセルラーゼ発現カセット内の遺伝子群の発現強化や、Ceb 資化誘導ベクターを同時に導入するなどの検討が必要であると思われる。

さらに改良したセルラーゼ発現ベクターや Ceb 資化誘導ベクターを作成して目的とする抗生物質生産放線菌に導入・発現させることにより、KSM 生合成遺伝子群を導入・発現させた C42 株と同様に CB を発酵原料と

した抗生物質生産が可能になるとと思われる。

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)

Tomotsune, K., Kasuga, K., Tsuchida, M., Agematsu, H., Ikeda, H., Ishikawa, J., Kojima, I. “Cloning and sequence analysis of cellulase genes from streptomycetes and heterologous expression in *Streptomyces lividans*.” The Proceeding of the Seventh International Conference on Materials and Engineering for Resources 2013 AKITA. 査読有, 1, 2013, 342-346.

Tomotsune, K., Kasuga, K., Tsuchida, M., Agematsu, H., Ikeda, H., Ishikawa, J., Kojima, I. “Cloning and sequence analysis of the cellulase genes isolated from two cellulolytic streptomycetes and their heterologous expression in *Streptomyces lividans*.” Int. J. Soc. Mater. Eng. Resour., 査読有, 20, 2, 2014 (2014 年 10 月発行予定)

[学会発表](計6件)

友常久実子, 春日和, 小林正之, 池田治生, 石川淳, 小嶋郁夫 『セルラーゼ高分泌性放線菌 *Streptomyces thermocarboxydus* C42 ゲノムに見出された推定セルラーゼ遺伝子群の発現解析および発現タンパク質によるセルロース分解』日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 29 日, 川崎市

春日和, 日景真紀, 安達紗由香, 友常久実子, 志村洋一郎, 小林正之, 石川淳, 池田治生, 小嶋郁夫 『セルラーゼ高分泌性放線菌 *Streptomyces argenteolus* M178 株由来のセルラーゼ遺伝子群の解析』日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 29 日, 川崎市

友常久実子, 春日和, 小林正之, 池田治生, 石川淳, 小嶋郁夫 『セルロース分解性放線菌 *Streptomyces thermocarboxydus* C42 ゲノムに見出されたセルラーゼ推定遺伝子群の異種発現によるセルロース分解様式および遺伝子発現解析』2013 年度日本放線菌学会大会, 2013 年 9 月 5-6 日, 広島市

友常久実子, 土田美帆, 春日和, 小林正之, 上松仁, 池田治生, 石川淳, 小嶋郁夫

『セルロース分泌性放線菌 *Streptomyces* 属放線菌からのセルラーゼ遺伝子群の単離・解析および異種放線菌と大腸菌における発現』日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 26 日, 仙台市

友常久実子, 土田美帆, 春日和, 小林正之, 上松仁, 池田治生, 小嶋郁夫

『*Streptomyces* 属放線菌からのセルロース分解酵素遺伝子群の単離と解析』日本農芸化学会東北支部 147 回大会, 2012 年 10 月 26 日, 弘前市

友常久実子, 土田美帆, 春日和, 小林正之, 上松仁, 池田治生, 小嶋郁夫 『セルロース系バイオマスを原料とした抗生物質生産をめざした *Streptomyces* 属放線菌のセルロース分解酵素遺伝子群の解析』2012 年度日本放線菌学会大会, 2012 年 9 月 6 日, 府中市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 郁夫 (KOJIMA, Ikuo)
秋田県立大学・理事
研究者番号: 90315581

(2) 研究分担者

春日 和 (KASUGA, Kanou)
秋田県立大学・生物資源科学部・助教
(平成 26 年 4 月より准教授)
研究者番号: 40315594

上松 仁 (AGEMATUS, Hitoshi)
秋田工業高等専門学校・物質工学科・教授
研究者番号: 20435407

(3) 連携研究者

池田 治生 (IKEDA, Haruo)
北里大学・北里生命研究所・教授
研究者番号: 9015632

石川 淳 (ISHIKAWA, Jun)
国立感染症研究所・真菌部・抗生物質室・室長
研究者番号: 40202957