

Short Report

リグノセルロース分解性新規放線菌株の単離

木材粉末を主要炭素源とした培養におけるセルラーゼ活性の分泌

春日和¹, 小嶋郁夫¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

我々は、リグノセルロースの有効活用をめざして、木材粉末を原料として抗生物質を発酵生産可能な放線菌株の育種を行っている。そのため本研究では、セルロースの高分解能をもち、かつ抗生物質生産遺伝子群を導入可能な放線菌株の単離を行った。まず秋田県内外の土壌試料から、1,350 株の放線菌を単離した。スギ木材粉末を主要炭素源とする W-broth 液体培地で菌株を個々に培養し、カルボキシメチルセルロース (CMC) 分解アッセイにより培養上清に分泌されたセルラーゼ活性を評価した。選抜された菌株についてろ紙分解活性 (Fpase) を調べ、これまでに研究対象としていた *Streptomyces thermocarboxydus* C42 より高分解活性を示す 5 株を選抜した。これら 5 株は 16S rDNA の塩基配列より、すべて *Streptomyces* 属放線菌であることが明らかになった。5 株のプロトプラストを作製し、PEG 法による放線菌染色体組込み型ベクターの導入を試したところ、Y810 と Y1826 の 2 株でプラスミドの導入に成功し、これら 2 株はリグノセルロースから抗生物質を生産するための遺伝子宿主として有望だと示された。

キーワード: 放線菌, セルラーゼ, リグノセルロース

リグノセルロース (LC) はセルロース系バイオマスの主成分であり、セルロース、ヘミセルロース、リグニンが含まれ、これらが強固に結合している (近藤ら, 2012)。LC は稲作により生じる籾殻や稲わら、木材伐採時に生じる林地残材などに含まれ、国内外に大量に賦存している (近藤ら, 2012)。これらはセルロースなどの多糖類を多く含んでいるが、糖類の資源としては有効利用されていない。近年、LC を原料としても、バイオエタノールなどの燃料製造や化学物質などを製造するバイオリファイナリー技術の開発が展開されているが、セルロース系材料の前処理や糖化が高コストであることが経済的な問題点となっている。この問題を克服するためには、低コストもしくは高付加価値で LC を有効利用した物質生産を実現可能とする新たな技術開発が重要である。

自然界では、種々の LC 分解微生物が分解酵素を協力的に作用させることにより LC を分解している。最も代表的な LC 分解微生物は真菌類であり、特に

白色腐朽菌、褐色腐朽菌など担子菌類による LC 分解については古くから詳細に研究されている (近藤ら, 2012; Kanda et al., 1978; Tien & Kirk, 1983)。また、*Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) はセルラーゼ生産菌として世界中で利用されている糸状菌であり、この菌によるセルロース分解系は最も研究が進んでいる (近藤ら, 2012; Martinez et al., 2008)。また、原核微生物である放線菌群においても *Thermobifida* 属や *Cellulomonas* 属放線菌によるセルロース分解の研究が進んでおり、これら微生物のセルラーゼについては酵素学的研究やゲノム解読を伴った遺伝学的研究が進展している (Wilson, 1992, 2004; Gilkes et al., 1984)。一方、抗生物質の生産菌として広く産業利用されている *Streptomyces* 属放線菌でも、これらの一部が LC 分解能をもつことが知られ、セルラーゼやヘミセルロース分解酵素であるキシラナーゼが報告されている (Théberge et al., 1992; Walter & Schrempf, 1995; Wittmann et al., 1995; Morosoli et al., 1986)。特に

分解されにくいリグニンについても, *Streptomyces viridosporus* T7A の分泌性ペルオキシダーゼ系により分解されることが明らかにされ, 近年, この菌株のゲノムが解読されている (Davis et al., 2013). しかしながら, *Streptomyces* 属放線菌による LC 分解の全体像はほとんど明らかにされていない.

我々の研究室ではこれまでに, セルロース系バイオマスの高度再資源化を目標として, 腐植酸やセルロースを分解可能な 1,000 株以上の放線菌株を分離し, この菌株コレクションよりセルロースを高度に資化できる *Streptomyces thermocarboxydus* C42 を選抜した. C42 株は glycoside hydrolase (GH) family 5 に属する *cel5Ac*, GH9 に属する *cel9Ac* などのセルラーゼ遺伝子をもつことが明らかにされている (Tomotsune et al., 2014). また, 高付加価値物質の発酵生産系樹立を意図して, C42 に *Streptomyces kasugaensis* 由来の抗生物質カスガマイシン (KSM) の生合成に必要な *kas* 遺伝子群 (Kojima et al., 2006) を導入したところ, アビセル (微結晶性セルロース) や, 稲わら, スギなどの木粉末を主要炭素源として KSM の生産に成功した. これより, C42 は遺伝子発現用宿主として用いて, LC を主要原料とした抗生物質を発酵生産が可能であることが示された. しかしながら, この遺伝子導入株では, 木材粉末の樹種や部材により KSM 生産効率に差が認められ, その影響の低い菌株が望まれた.

本研究では, 木材粉末の樹種や部材にかかわらず高い LC 分解活性を示し, 遺伝子導入により種々の木材粉末を原料として抗生物質を発酵生産可能な放線菌株の単離・選抜を目的とした. そのため, 土壌試料から数多くの放線菌株を単離し, このコレクションから木材粉末での生育とセルラーゼ活性の分泌を指標として LC のうちセルロース高分解放線菌を新たに単離した. さらに, 単離した放線菌株に遺伝子導入が可能であるか検討した.

材料と方法

放線菌の単離と培養条件

放線菌の分離では, HV 寒天培地 (Hayakawa and Nonomura, 1987), CS 寒天培地 (微結晶セルロース

(Merck), 5.0 g/L; Bacto-yeast extract (DIFCO), 0.50 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 g/L; KCl, 1.7 g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.50 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.50 g/L; CaCO_3 , 0.02 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L; 寒天粉末, 15.0 g/L; pH7.0), ISP2 寒天培地 (Kieser et al., 2000) を用い, これらにはシクロヘキシミド (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ナイスタチン (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), トリメトプリム (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ナリジクス酸 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を適宜添加した. 平板培養は 30°C にて一週間静置して行った.

LC 資化能の試験では, W-broth 液体培地 (スギ木材粉末, 1.0 g/L; Bacto-yeast extract (DIFCO), 0.10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.6 g/L; KCl, 1.7 g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.25 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L; CaCO_3 , 0.1 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L; pH6.9) を用いた. この培地 2 mL を直径 7 mm のガラスビーズ一個とともに 16.5 mm 径短試験管に入れて滅菌し, 培養に用いた. 培養は 30°C で, 120 strokes/min の往復振盪で 5 日間行った. スギ木材粉末は, 本学システム科学技術学部機械知能システム学科の高橋武彦准教授より提供された, 平均 30 μm のものを用いた (Takahashi et al., 2014).

セルロース資化性放線菌 *Streptomyces thermocarboxydus* C42 および *S. argenteolus* M178 は W-broth を用いて, もしくは前報に述べたように培養した (Tomotsune et al., 2014).

DNA 操作と放線菌の形質転換

大腸菌 JM109 と SCS110 は DNA 操作の宿主として用いた (Sambrook et al., 1989). JM109 とその形質転換体は 37°C で, SCS110 とその形質転換体は 30°C で, LB 培地を用いて培養した. 放線菌染色体組込み型ベクター pTYM19 は東京大学の尾仲宏康教授より分譲していただいた (Onaka et al., 2003). 放線菌の形質転換は, 成書 (Kieser et al., 2000) に従って, プロトプラストに大腸菌 SCS110 の形質転換体から調製した低メチル化 DNA 試料を導入した.

PCR は *LA Taq* DNA polymerase with GC buffer (タカラバイオ) を用いて行った. 16S rDNA の増幅には, 16S rDNA の特異的プライマーを用いた (Tomotsune et al., 2014).

セルラーゼ活性のアッセイと測定

放線菌の培養上清に含まれるセルラーゼ活性は、二段階で評価した。一次評価は、CMC アッセイにより簡易に全ての培養液を対象として行った (Teather et al., 1982; Tomotsune et al., 2014)。ここで、径 18 mm 以上の CMC 分解円が観察された試料についてのみ、二次評価としてろ紙セルロースの分解活性 (FPase) を測定し、分泌された総セルラーゼ活性として評価した。FPase の活性測定は、ジニトロサリチル酸 (DNS) 法 (近藤ら, 2012) に修正を加えて、以下のように行った。50 mM クエン酸ナトリウム塩緩衝液 (pH4.8) 400 μ L にろ紙断片 1 枚 (Whatman 定性ろ紙 No.1, 1 cm x 1 cm) を入れ、上清試料 100 μ L を添加して 37°C または 50°C で反応させ、18 時間後に DNS 試薬 900 μ L を加えて反応を停止させた。ろ紙断片を反応停止後に加えた試料を酵素反応のコントロールとした。沸騰湯浴で 10 分間反応試料を加熱して発色させ、冷却後に蒸留水 1.5 mL で希釈し、マイクロプレートリーダー (Benchmark Plus) を用いて A_{540} を測定した。グルコース標準試料 (0.0500 ~ 3.00 mg/mL) を用いて同時に加熱発色を行い、その A_{540} より検量線を作製し、反応試料において生じた還元糖量をグルコース換算で求めた。1 分間に 1 μ mol の還元糖を生成する酵素量を 1 unit としてセルラーゼ活性を算出した。

菌株の同定

放線菌の同定は、16S rDNA の塩基配列の分子系統樹に基いて行った (宮道ら, 2001)。Colony direct PCR (Tomotsune et al., 2014) により、放線菌コロニーから 16S rDNA を 4 連で増幅し、この増幅産物の塩基配列を決定した。その結果を DDBJ (<https://www.ddbj.nig.ac.jp>) の BLAST サーチ (Altschul et al., 1990) により解析して、Clustal X を用いた近隣結合法で系統樹を作製し (Thompson et al., 1997)、最も近縁の type strain との相同性を評価して同定した。

結果と考察

新規放線菌株の単離

秋田県内外で土壌試料を収集し、数日間自然乾燥させた後に粉砕し、さらに 100°C で 1 時間以上乾熱処理することで放線菌以外の微生物を殺菌した。この乾燥土壌試料を HV 寒天培地、CS 寒天培地の上に少量まき、30°C にて一週間静置培養後、生育してきた放線菌のコロニーを釣菌した。単離した菌株はさらに ISP2 寒天培地に植え継ぎ培養を行い、他の細菌が混在しないことを確認した。以上により、1,350 株の放線菌を新たに単離した。

LC 分解放線菌の選抜

LC を主要炭素源として生育できる株を選抜するため、1,350 株の放線菌株についてスギ木材粉末を主要炭素源とする液体培地で単離菌株を個々に培養し、その生育を調べ、さらに培養上清に分泌されたセルラーゼ活性を評価した。W-broth 液体培地 2 mL を入れた試験管で個々に 5 日間培養したところ、この培地では放線菌株の約 50% で菌体の生育が観察された (図 1, A)。生育の有無にかかわらず、培養上清 50 μ L を CMC アッセイに供したところ、約 8% の培養液試料から直径 18 mm 以上の大きな CMC 分解円の形成が観察された (図 1, B)。

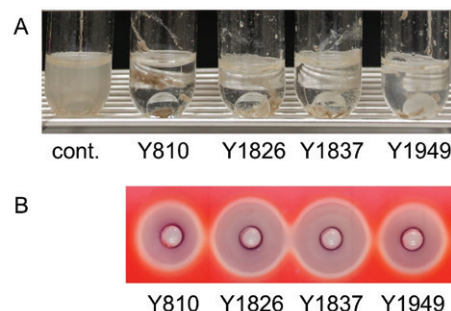


図1 W-broth での放線菌培養(A)と CMC アッセイ(B)。
cont. は未植菌の培養液である。

CMC アッセイにて大きな分解円が観察された培養上清試料について、さらに 37°C および 50°C で FPase 活性を測定した。図 2 にはその一部を示した。この結果より、Y810, Y1826, Y1837, Y1949, および Y2279 の 5 株が、これまで研究対象としてきたセルロース資化放線菌 *S. thermocarboxydus* C42 および *S. argenteolus* M178 と同等もしくはそれ以上の活性値を示すことがわかった。FPase 活性は、植物由来の

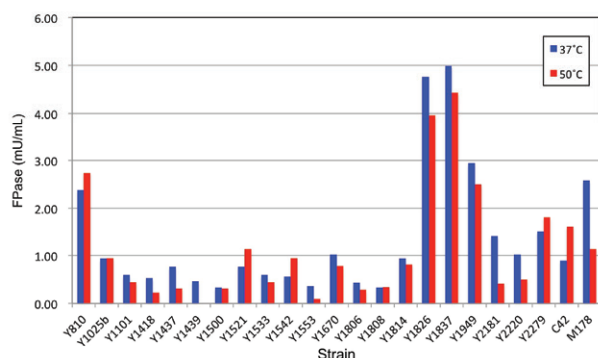


図2 放線菌セルラーゼによるろ紙分解

結晶化セルロースを分解可能な総セルラーゼ活性を表すものであり、特に 50℃での活性はセルラーゼを産業利用する可能性を示す指標となる。ここで単離した *Streptomyces* 属放線菌由来のセルラーゼは 50℃でも活性を示すことがわかったため、真菌由来の酵素群に比べて分解活性は低いものの、セルラーゼの遺伝子源として活用できると期待される。

LC 分解放線菌の同定

16S rDNA の塩基配列に基づき、Y810, Y1826, Y1837, Y1949, Y2677 の 5 株を同定した。寒天培地上の若いコロニーを鋳型とした colony direct PCR により、各株の 16S rDNA 領域を含む 1.5 kb DNA 断片を増幅し、その塩基配列を決定した（表 1）。近隣結合法による系統解析により、5 株はいずれも *Streptomyces* 属放線菌であると明らかになった。従って、これら菌株は通常の *Streptomyces* 属放線菌用のプラスミドベクターを用いた遺伝子操作が可能だと期待できる。

遺伝子導入系の確立

5 株について、*Streptomyces* 属放線菌用の染色体組込み型ベクター pTYM19 を導入可能であるか検討した。34%スクロースを含む YEME 液体培地 50 mL で各菌株を 4 日間培養し、生育した菌体を回収してプロトプラストを調製した。PEG 法により、大腸菌 SCS110 より調製した低メチル化 pTYM19 を各プロトプラストに導入したところ、Y810 と Y1826 の 2 株からは形質転換体が得られた。これら 2 菌株は C42 株と同様に物質生産に関わる生合成遺伝子群を

表 1 LC 分解放線菌の同定

Species	Strains
<i>Streptomyces murinus</i>	Y810, Y1949
<i>Streptomyces kunmingensis</i>	Y1826, Y1837, Y2677

導入可能であると期待できる。これら以外の 3 株については、プロトプラスト調製のための培養条件や再生の条件について、今後より一層検討する必要がある。

謝辞

放線菌染色体組込み型ベクター pTYM19 を分与いただいた東京大学大学院農学生命科学研究科の尾仲宏康教授、スギ木材粉末を分与いただいた本学システム科学技術学部の高橋武彦准教授に、深く感謝いたします。また、DNA 塩基配列の決定をサポートしていただいた本学バイオテクノロジーセンターの皆様にも感謝いたします。

文献

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3):403-10.
- Davis JR., Goodwin L., Teshima H., Detter C., Tapia R., Han C., Huntemann M., Wei CL., Han J., Chen A., Kyrpides N., Mavrommatis K., Szeto E., Markowitz V., Ivanova N., Mikhailova N., Ovchinnikova G., Pagani I., Pati A., Woyke T., Pitluck S., Peters L., Nolan M., Land M. and Sello JK. (2013) Genome sequence of *Streptomyces viridosporus* strain T7A ATCC 39115, a lignin-degrading actinomycete. *Genome Announc.*, 1(4). pii: e00416-13.
- Gilkes NR., Langsford ML., Kilburn DG., Miller RC. Jr, and Warren RA. (1984) Mode of action and substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. *J. Biol. Chem.*, 259(16):10455-10459.
- Hayakawa, M. and Nonomura, H. (1987) Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.*

- 65(5):501-509.
- Kanda T., Nakakubo S., Wakabayashi K., and Nisizawa K. (1978) Purification and properties of an exo-cellulase of Avicelase type from a wood-rotting fungus, *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *J. Biochem.*, 84(5):1217-1226.
- Kieser T., Bibb MJ., Buttner MJ., Chater KF. and Hopwood DA. (2000) "Practical Streptomyces genetics", The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Kojima I., Kasuga K., Kobayashi M., Tsuchiya KS. and Ikeno S. (2006) The biosynthesis of kasugamycin, an antibiotic against rice blast disease, with particular reference to the involvement of *rpoZ*, a gene encoding RNA polymerase omega subunit. *Int. J. Soc. Mater. Eng. Resour.*, 14(1-2): 28-32.
- 近藤昭彦, 天野良彦, 田丸浩 編 (2012) 『バイオマス分解酵素の最前線 -セルラーゼ・ヘミセルラーゼを中心として-』 シーエムシー出版 p1-7, p10-15, p62-66, p98-107, p114-123, p180.
- Martinez D., Berka RM., Henrissat B., Saloheimo M., Arvas M., Baker SE., Chapman J., Chertkov O., Coutinho PM., Cullen D., Danchin EG., Grigoriev IV., Harris P., Jackson M., Kubicek CP., Han CS., Ho I., Larrondo LF., de Leon AL., Magnuson JK., Merino S., Misra M., Nelson B., Putnam N., Robbertse B., Salamov AA., Schmoll M., Terry A., Thayer N., Westerholm-Parvinen A., Schoch CL., Yao J., Barabote R., Nelson MA., Detter C., Bruce D., Kuske CR., Xie G., Richardson P., Rokhsar DS., Lucas SM., Rubin EM., Dunn-Coleman N., Ward M. and Brettin TS. (2008) Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.*, 26(5):553-560. *Erratum in: Nat. Biotechnol.*, 26(10):1193.
- 宮道慎二 編 (2001) 『放線菌の分類と同定』 日本学会事務センター p83-132
- Morosoli R., Bertrand JL., Mondou F., Shareck F., and Kluepfel D. (1986) Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.*, 239(3):587-592.
- Onaka H., Taniguchi S., Ikeda H., Igarashi Y. and Furumai T. (2003) pTOYAMAcos, pTYM18, and pTYM19, actinomycete-*Escherichia coli* integrating vectors for heterologous gene expression. *J. Antibiot.* (Tokyo) 56:950-956.
- Sambrook J., Fritsch EF. and Maniatis T. (1989) "Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Takahashi T., Ito K., Ito A., Enda Y., Gochi M., Mori H. and Kobayashi J. (2014) Tandem-ring mill pulverization benefits for enzymatic saccharification of biomass. *Renewable Energy* 65:146-151.
- Teather RM. and Wood PJ. (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(4):777-80.
- Th  berge M., Lacaze P., Shareck F., Morosoli R. and Kluepfel D. (1992) Purification and characterization of an endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(3):815-820.
- Thompson JD., Gibson TJ., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins DG. (1997) The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25(24):4876-4882.
- Tien M. and Kirk TK. (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science*. 221(4611):661-663.
- Tomotsune K., Kasuga K., Tsuchida M., Shimura Y., Kobayashi M., Agematsu H., Ikeda H., Ishikawa J. and Kojima I. (2014) 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.*, 20(2): 213-218.
- Walter S. and Schrempf H. (1995) Studies of *Streptomyces reticuli cel-1* (cellulase) gene

expression in *Streptomyces* strains, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2):487-494.

Wilson DB. (1992) Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12(1-2):45-63. Review.

Wilson DB. (2004) Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. *Chem Rec.* 4(2):72-82.

Wittmann S., Shareck F., Kluepfel D. and Morosoli R. (1994) Purification and characterization of the CelB endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the encoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(5):1701-1703.

〔 平成 28 年 7 月 20 日受付 〕
〔 平成 28 年 7 月 31 日受理 〕

Isolation of novel lignocellulose-degrading actinomycete strains Secretion of cellulases in cultures containing wood powder as the major carbon source

Kano Kasuga, Ikuo Kojima

Department of Biotechnology, Faculty of Bioresources, Akita Prefectural University

We studied the molecular breeding of an actinomycete capable of fermenting an antibiotic from wood powder to use lignocellulose as a resource. We aimed to isolate highly cellulose-degrading actinomycete strains transformable with the genes responsible for antibiotic production. We isolated 1,350 actinomycete strains from soil samples originating in Akita and other prefectures. The strains were cultivated individually in W-broth liquid medium containing cedar wood powder as the major carbon source to screen for cellulase secretion into the medium using a carboxymethylcellulose-degrading assay. The screened samples were further evaluated for filter paper-degrading activity (FPases) to select five strains with a higher activity than *Streptomyces thermocarboxydus* C42, which was the only strain previously used to study cellulase degradation. The five strains belonged to the genus *Streptomyces* according to the 16S rDNA sequences. Protoplasts of the strains were prepared to test the capacity of an integration vector for *Streptomyces* sp. using the PEG method. The vector was successfully introduced into two strains, Y810 and Y1826, which are expected to be available for production of an antibiotic from lignocellulose.

Keywords: actinomycete, cellulase, lignocellulose