

原著論文(通常論文)

好熱性コラーゲン分解酵素生産菌 *Thermobifida* sp. 4-2-1 株の分離とキャラクタリゼーション

**Isolation and Characterization of a Thermophilic Bacterium Producing Collagenolytic Enzyme,
Thermobifida sp. Strain 4-2-1**

大野 正博^{1,2}, 山口 晴彦², 高橋 征司², 中山 亨^{2*}
MASAHIRO OHNO, HARUHIKO YAMAGUCHI, SEIJI TAKAHASHI and TORU NAKAYAMA

¹ 福島県ハイテクプラザ 研究開発部 〒963-0215 郡山市待池台1-12

² 東北大学大学院工学研究科 バイオ工学専攻 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-11

*TEL: 022-795-7270 FAX: 022-795-7270

*E-mail: nakayama@seika.che.tohoku.ac.jp

¹ Fukushima Technology Centre, 1-12 Machiikeidai, Koriyama 963-0215, Japan

² Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, 6-6-11 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

(原稿受付 2008年7月7日／原稿受理 2008年10月1日)

Composting of biomaterials generally proceeds under thermophilic and slightly alkaline conditions. To enzymatically accelerate decomposition of collagen-based materials, such as jellyfish, during composting, we screened bacterial strains that produce thermostable collagenolytic activity with optimum pH at alkaline region. The best producer of such activity, strain 4-2-1, was a thermostable actinomycete, which was identified as a strain of the genus *Thermobifida* on the basis of 16S rDNA sequence and cell-wall amino-acid composition. This is the first example of *Thermobifida* strain producing a collagenolytic activity. The collagenolytic activity was produced in the culture supernatant of the actinomycete and displayed the maximum at pH 8.5 and 80°C. Proteolytic degradation of type I collagen and jellyfish could be efficiently attained by incubation of these materials with culture supernatant of the strain at 70°C for 1 h and 40 h, respectively. These results suggest that strain 4-2-1 may serve as an efficient catalyst for composting or bioprocessing of collagen-based biomaterials.

Key words: bioprocess, compost, collagenolytic enzyme, thermophilic, *Thermobifida* sp.

キーワード: バイオプロセス, コンポスト, コラーゲン分解酵素, 好熱性, *Thermobifida* 属

1. 緒 言

コラーゲンは皮膚や骨、軟骨、腱、血管壁など動物の主要構造タンパク質であり、哺乳動物が持つタンパク質では最も含有量が高い。細胞増殖や分化にも深く関係し研究の歴史は古く、現在では化粧品や健康補助食品への利用も多い。一方、畜肉加工場や水産加工場では大量のコラーゲン含有廃棄物が排出されているが、そのほとんどは利用されずに焼却などにより廃棄処分されている。その廃棄物をバイオプロセスにより発酵分解しコンポスト化するにはコラーゲンを速やかに分解する必要があるが、コラーゲンは強固な線維構造をもつため一般的なタンパク分解酵素は直接作用することができない。コラーゲンに直接作用し特異的に分解する酵素はコラゲナーゼと呼ばれ、動物体内のコラーゲン代謝に関連した研究や病原菌由来の酵素として研究がなされてきた^{3-6,11,17,18)}。

微生物による発酵分解プロセスでは発酵熱により発酵物が高温になる上、発酵生成物によりpHが変動する。

バイオプロセスへの利用を目的として、Tsuruokaらは酸性域でのコンポスト化へ利用する目的で仙台市の土壤から酸性に至適pHを持つ耐熱性コラーゲン分解酵素生産菌を分離し¹³⁾、酵素の立体構造解析を行った¹⁹⁾。また、Okamotoらは土壤中から至適pHが中性域であり至適温度が60°Cであるコラーゲン分解酵素を生産する細菌を分離した⁹⁾。最近では、Uesugiらが土壤中から分離した*Streptomyces omiyaensis*により分泌される酵素のコラーゲン分解性について報告した¹⁴⁾。深海からコラーゲン分解酵素の探索も試みられており、Kurataらは好アルカリ性のコラーゲン分解酵素生産菌を分離し、*Alkalimonas*属の新種であるとした²⁾。また、Yanagawaらはクラゲを分解する目的で、海浜堆積物から至適温度中温・至適pH中性のコラーゲン分解酵素を生産する細菌を分離し、*Brachybacterium*属であると同定した¹⁶⁾。一般的なコンポスト化装置において、有機性廃棄物を発酵分解させた際にはアミン類の生成により発酵物pH環境が弱アルカリ域で推移することが多い。そこで、至適

pH が弱アルカリ域であり、かつ高温に耐性を持つコラーゲン分解酵素を取得することを目的とし、その生産菌を各種環境中から検索した。

2. 材料及び方法

2.1. 微生物及び培養条件

環境中や有機性廃棄物発酵処理物から、好気条件下70°CでGY寒天培地⁸⁾（1.5% Bacto Gelatin, 0.01% Bacto Yeast Extract, 0.85% NaCl, 0.5% KH₂PO₄, 0.001% MgSO₄·7H₂O, 1.5%寒天; pH 8.5）に生育する好熱性微生物を多数分離した。これら分離株を培養するため、GY培地を改変したGY改変培地（1.5% Bacto Gelatin, 0.5% Bacto Yeast Extract, 1.0% Bacto Peptone, 0.85% NaCl, 0.5% KH₂PO₄, 0.001% MgSO₄·7H₂O; pH 8.5），あるいはNutrient Broth培地にさらに酵母エキスを加えたNB改変培地（0.5% Bacto Yeast Extract, 0.5%肉エキス, 1.0% Bacto Peptone, 0.5% NaCl; pH 8.5）を用いて振盪培養（170 rpm）を行った。培養する際には、培地に1白金耳植菌して前培養した後、対数増殖期の培養物から本培養培地に1/500量植菌した。*Thermobifida fusca* NBRC 14071^T株及び*Thermobifida alba* NBRC 15853^T株は（独）製品評価技術基盤機構から購入し、NB改変培地を用いて分離株と同様に培養を行った。

Bacto Yeast Extract, Bacto Peptone 及び Bacto GelatinはBecton, Dickinson and Company社から購入した。その他の試薬は、特に指定しない限り和光純薬工業（株）より特級グレードを購入して用いた。

2.2. 分離微生物の分類同定

取得した微生物の分類同定を、16S rRNAをコードするDNA（16S rDNA）の塩基配列相同性を指標として以下の方法で実施した。PrepMan Ultra Reagent（Applied Biosystems社製）を用いて、分離株のゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型とし、16S rDNA用のプライマーを使用して16S rDNA遺伝子を增幅した。PCRプライマーとしては9F（5'-GTGTTTGATCCTGGCT-CAG-3'）、339F（5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'）、785F（5'-GGATTAGATAACCCTGGTAGTC-3'）、1099F（5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'）、1510R（5'-GGCTAC-CTTGTACGA-3'）、1242R（5'-CCATTGTAGCACGT-GT-3'）、802R（5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'）、536R（5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'）を使用した⁷⁾。PCR増幅産物の塩基配列をCEQTM2000XL DNA Analysis System（Beckman Coulter社製）を用いて解析し、BLAST¹¹⁾による相同検索結果から微生物を分類同定した。微生物細胞壁ペプチドグリカンの精製と精製試料の分析は、内田¹⁵⁾及び鈴木¹²⁾の手法に従い、高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。

2.3. コラーゲン基質分解試験

コラーゲン分解活性の測定のために、アゾ色素結合性のコラーゲン粉末であるAzocoll（Calbiochem社製）を基質として使用した。Azocoll 25 mg, 4 mM Tris-HCl(pH 8.5), Tween 80 2.5 mg, 適宜希釀した培養上清を混合し、最終液量が2.5 mlとなる反応溶液組成とした。

あらかじめ反応温度で保持しておいた反応溶液に酵素溶液を加え、反応を開始した。指定しない限り60分間インキュベートした後、直ちに反応液を氷冷するとともに1 M酢酸バッファー（pH 4.5）を5 ml加え反応を停止させた。コラーゲン分解活性は、反応後の上清の540 nmにおける吸光度の増加（dA₅₄₀）から見積もり、1分間にAzocoll 1 μgを分解する酵素量を1 Unitとした。

また、I型コラーゲンの分解試験ではウシアキレス腱由来コラーゲン（Sigma-Aldrich社製、Collagen from bovine achilles tendon）を基質として用い、基質2 mgに対し培養上清0.5 mlを加え分解の様子を目視で観察した。ブランクでは、培養上清の代わりに未使用の培地を加えた。

クラゲを基質とした分解試験では、一般に食用として流通している塩蔵クラゲ（見永物産株式会社製）をもとにクラゲ基質を調製した。すなわち、塩蔵クラゲを蒸留水で数回洗浄し、0.8%の食塩水に一晩浸漬した後、3 mm角のステンレスメッシュで水切りしクラゲ基質とした。クラゲ基質1 gに対し培養上清5 mlを作用させ、固形物分解の様子を目視で観察した。ブランクにおいては、培養上清の代わりに未使用の培地を加えた。

3. 結果と考察

3.1. 好熱性コラーゲン分解酵素生産菌の分離と同定

環境中や有機性廃棄物発酵処理物から純粋分離した好熱性微生物をそれぞれGY改変培地で培養し、各培養液上清中のコラーゲン分解活性を測定した。分離株のうち、いくつかの株の培養液上清に高いコラーゲン分解活性が見られ、いずれも細胞外にコラーゲン分解酵素を分泌していることが示唆された。これらのうち、70°Cから80°Cの酵素反応温度においてコラーゲン分解活性が高かった4-2-1株について、16S rDNAの塩基配列（約1500 bp）による分類同定を試みた。その結果、4-2-1株は*T. fusca* NBRC 14071^T株と98.6%，*T. alba* NBRC 15853^T株と97.6%の相同性を示し、放線菌*Thermobifida*属に分類されると推定された（Fig. 1）。また、細胞壁アミノ酸を分析したところ、グルタミン酸、アラニン、meso-ジアミノピメリン酸が検出され、このことは*Thermobifida*属の化学分類学的特徴と合致していた。*T. fusca*を始め*Thermobifida*属はコンポスト中に一般的に存在する菌であり、好熱性セルラーゼや好熱性プロテアーゼを生産する。しかし、特異的なタンパク質であるコラーゲンを分解するという酵素活性については報告がなく、本報告は*Thermobifida*属の菌の培養液中にコラーゲン分解活性が存在するという初めての報告である。

3.2. 培養液上清のコラーゲン分解活性の消長

70°Cから80°Cにおいてコラーゲン分解活性が高かった4-2-1株について、NB改変培地を用いて50°Cで振盪培養し、培養液上清中の80°Cにおけるコラーゲン分解活性を*T. fusca* NBRC 14071^T株及び*T. alba* NBRC 15853^T株の培養液上清の活性と比較した（Fig. 2）。4-2-1株の活性は培養6日間で活性が最大になり、その後30日間にわたって徐々に減少していった。4-2-1株の乾燥菌体重量は培養4日前後で最大となり、8日後には

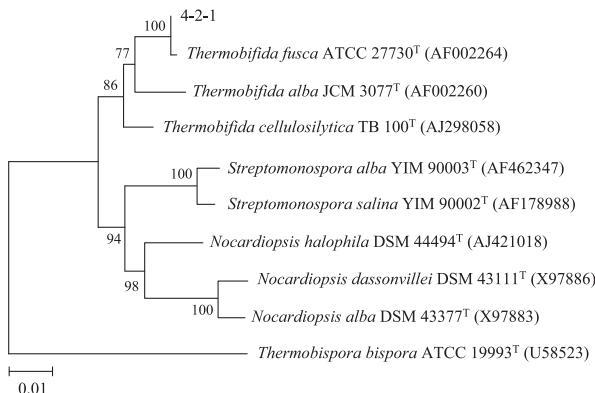


Fig. 1. Phylogenetic tree showing relationships between isolated strain, 4-2-1, and related bacteria.

The tree was constructed by the neighbour-joining method¹⁰⁾ based on full-length 16S rDNA sequences of strain 4-2-1 and related bacteria. The numbers at the branch points are bootstrap values. Nucleotide sequence accession numbers are shown in parentheses. The bar indicates 0.01 substitution per nucleotide position.

その約1/3に減少し、溶菌が進んでいると考えられたが、コラーゲン分解活性は培養8日後でも大きな低下はなかった。一方、*T. alba* NBRC 15853^T株では、培養6日間で活性が最大になり、その活性値は4-2-1株の約7倍だった。しかし、培養8日間で活性が急激に減少し、これは*T. alba* NBRC 15853^T株により生成されたプロテアーゼによりコラーゲン分解酵素が消化されたことによるものと推測する。酵素のバイオプロセスへの利用を考えると分解活性の持続性は重要な要素であり、*T. alba* NBRC 15853^T株における活性の急激な低下は応用面でデメリットとなりうる。*T. fusca* NBRC 14071^T株では培養6日間で活性が最大になり、その活性値は*T. alba* NBRC 15853^T株の約44%だったが、急激な活性の減少は見られず、バイオプロセスへの利用に有利であると考えられた。

3.3. コラーゲン分解活性の反応温度依存性と反応pH依存性

4-2-1株について、GY改変培地を用いて60°Cで12日間培養し、培養上清中のpH 8.5におけるコラーゲン分解活性の反応温度依存性を測定した。また、*T. alba* NBRC 15853^Tについて、NB改変培地を用いて50°Cで3日間培養を行い、培養上清中のpH 8.5におけるコラーゲン分解活性の反応温度依存性を測定し、4-2-1株と比較した(Fig. 3)。*T. alba* NBRC 15853^Tにおいては至適温度が70°C付近であるのに対し、4-2-1株では80°C付近と高かった。一般に、至適温度の高い酵素は温度安定性や保存安定性が高い傾向があるとされており、本酵素の安定性が高いことが期待された。

また、4-2-1株及び*T. alba* NBRC 15853^T株について、80°Cでの反応pH依存性をFig. 4に示す。*T. alba* NBRC 15853^T株では、NB改変培地を用いて50°Cで3日間培養を行った培養液上清中のpH依存性を調べたところ、至適pHは6.6付近だった。一方、4-2-1株ではNB改変培地を用いて60°Cで12日間培養を行った培養

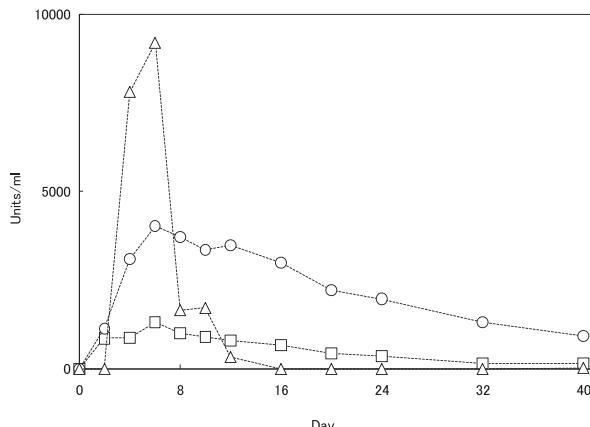


Fig. 2. Time course of production of collagenolytic activity in culture supernatant of *Thermobifida* strains.

The collagenolytic activity was determined at 80°C and pH 8.5 using Azocoll as a substrate as described in the text. The activities in culture supernatant of strain 4-2-1 (□), *Thermobifida fusca* NBRC 14071^T (○), and *Thermobifida alba* NBRC 15853^T (△) are shown. Values are means of duplicate determinations.

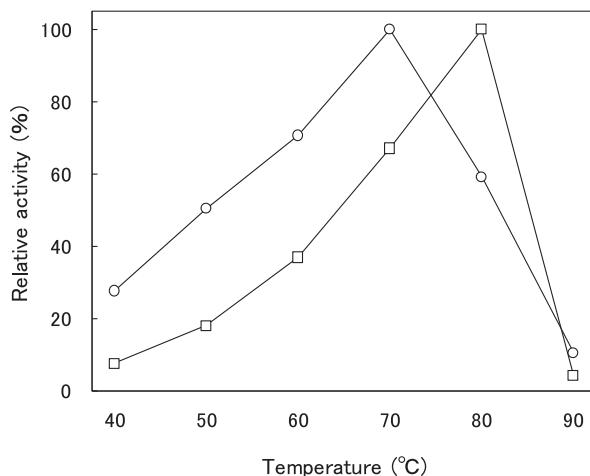


Fig. 3. Effect of temperature on collagenolytic activity in culture supernatant of strain 4-2-1 and *Thermobifida alba*. The collagenolytic activity was determined at pH 8.5 using Azocoll as a substrate as described in the text. □, strain 4-2-1; ○, *Thermobifida alba* NBRC 15853^T.

液上清中の至適pHは7.6から8.7の領域にあり、*T. alba* NBRC 15853^T株と比較して高かった。一般に、有機性廃棄物を発酵分解させた際にはアミン類の生成により発酵物のpHが8前後の弱アルカリ域で推移することが多い。4-2-1株の培養液のコラーゲン分解活性の至適pHは、有機性廃棄物発酵分解環境と合致する弱アルカリ域であり、発酵分解システムへの利用が期待できる。

3.4. I型コラーゲン及びクラゲ基質に対する分解活性

4-2-1株について、NB改変培地を用いて60°Cで8日間培養し、その培養上清を各基質に混合して分解状態を目視で観察した。コラーゲンはその形状と機能によって20種類以上の型に分類されているが、そのうち最も代表的なI型コラーゲンに対する分解活性

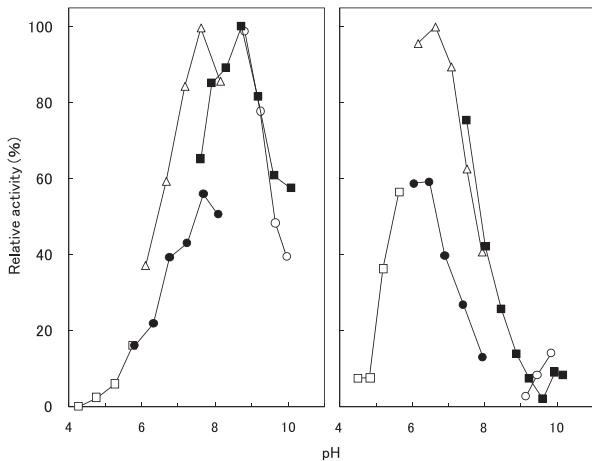


Fig. 4. Effect of pH on collagenolytic activity in culture supernatant of strain 4-2-1 (left panel) and *Thermobifida alba* NBRC15853^T (right panel).

The collagenolytic activity was determined using Azocoll as a substrate at 80°C in the following buffers (20 mM): acetic acid-sodium acetate (pH 4.4–5.7, □), sodium phosphate (pH 5.9–8.0, ●), Tris-HCl (pH 6.1–8.1, △), Glycine-NaOH (pH 7.5–10.1, ■), Na₂CO₃/NaHCO₃ (pH 9.0–9.9, ○).

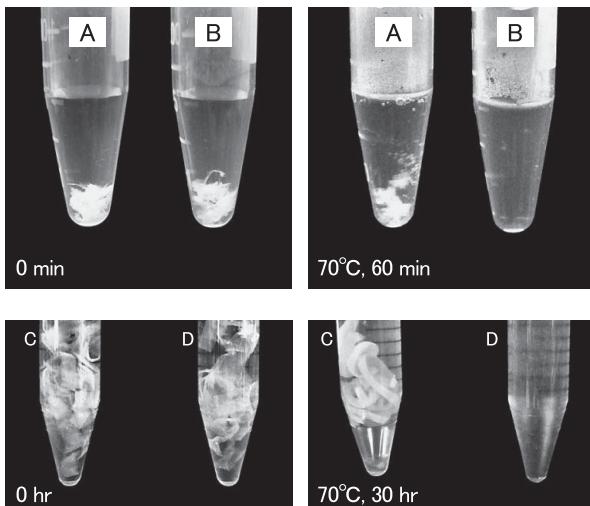


Fig. 5. Enzymatic digestion of type I collagen and jellyfish.
(Upper panels) Type I collagen, 2 mg (dry weight), was incubated with 0.5 ml of un-inoculated medium (A, used as a blank) or 0.5 ml of culture supernatant of strain 4-2-1 (B) at 70°C and pH 8.5 for 0 min (left) and 60 min (right).
(Lower panels) Jerryfish, 1 g (wet weight), was incubated with 5 ml of un-inoculated medium (C, used as a blank) or 5 ml of culture supernatant of strain 4-2-1 (D) at 70°C and pH 8.5 for 0 hr (left) and 30 hr (right).

性を観察した。ウシアキレス腱由来のI型コラーゲンに培養上清を70°Cで作用させ60分後の状態を観察したところ、プランクではほとんど固形物の量に変化が認められなかったが、培養上清を添加した区ではコラーゲン基質が確認できない状態まで分解された(Fig. 5, upper panels)。さらに、80°Cでも同様に作用させたところ、60分後には基質が確認できない程度に分解された。これらのことから、4-2-1株が生産するコラーゲン分解酵素は70°Cから80°Cの高温領域でI型コラーゲンに対

する分解活性を持つことが確認された。

そこで、次にコラーゲン含有性有機質であるクラゲを用いて分解試験を行った。I型コラーゲン分解試験と同じ培養上清を用いてクラゲ基質に対する分解試験を行ったところ、70°Cで15時間後にはクラゲ基質の分解残渣がわずかになり、30時間後には固体物が目視で確認できぬ状態まで崩壊した(Fig. 5, lower panels)。

4-2-1株培養上清中のコラーゲン分解活性に関する以上の結果から、4-2-1株が生産する酵素が高温弱アルカリ性条件下でコラーゲン含有性有機質を分解する酵素として利用できることが示唆された。今後、4-2-1株が生産する好熱性コラーゲン分解酵素について詳細に解析し、バイオプロセスへの応用を検討する予定である。将来、本酵素がコラーゲン含有有機性廃棄物のコンポスト化に利用され、バイオマス利活用推進の一助となることを期待したい。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料の採取にご協力いただいた福島大学共生システム理工学類産業システム工学専攻の佐藤理夫教授、並びに本宮市白沢有機センターの方々に深く感謝いたします。また、研究を遂行するにあたって、実験のサポートをしていただいた福島県ハイテクプラザ臨時技能員の安藤由花さん、田平ともみさんに深く感謝いたします。

文 献

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403–410.
- Kurata, A., M. Miyazaki, T. Kobayashi, Y. Nogi, and K. Horikoshi. 2007. *Alkalimonas collagenimarinina* sp. nov., a psychrotolerant, obligate alkaliphile isolated from deep-sea sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1549–1553.
- Lund, T., and P.E. Granum. 1999. The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity. FEMS Microbiol. Lett. 178: 355–361.
- Matsushita, O., C.M. Jung, S. Katayama, J. Minami, Y. Takahashi, and A. Okabe. 1999. Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*. J. Bacteriol. 181: 923–933.
- Matsushita, O., C.M. Jung, J. Minami, S. Katayama, N. Nishi, and A. Okabe. 1998. A study of the collagen-binding domain of a 116-kDa *Clostridium histolyticum* collagenase. J. Biol. Chem. 273: 3643–3648.
- Matsushita, O., K. Yoshihara, S. Katayama, J. Minami, and A. Okabe. 1994. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. J. Bacteriol. 176: 149–156.
- 中川恭好, 川崎浩子. 2001. 16S rDNA 遺伝子の塩基配列決定法, pp. 88–117. 日本放線菌学会編, 放線菌の分類と同定. 日本学会事務センター.
- Nakayama, T., N. Tsuruoka, M. Akai, and T. Nishino. 2000. Thermostable collagenolytic activity of a novel thermophilic isolate, *Bacillus* sp. strain NTAP-1. J. Biosci. Bioeng. 89: 612–614.
- Okamoto, M., Y. Yonejima, Y. Tsujimoto, Y. Suzuki, and K. Watanabe. 2001. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus*

- sp. strain MO-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 103–108.
- 10) Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- 11) Sugahara, T., M. Ueno, Y. Goto, R. Shiraishi, M. Doi, K. Akiyama, and S. Yamauchi. 2006. Immunostimulation effect of jellyfish collagen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2131–2137.
- 12) 鈴木健一郎. 2001. 化学分類実験法, pp. 49–81. 日本放線菌学会編, 放線菌の分類と同定. 日本学会事務センター.
- 13) Tsuruoka, N., Y. Isono, O. Shida, H. Hemmi, T. Nakayama, and T. Nishino. 2003. *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1081–1084.
- 14) Uesugi, Y., J. Arima, H. Usuki, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka, 2008. Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities. *Biochim. Biophys. Acta.* 1784: 716–726.
- 15) 内田欣哉. 1982. 細胞壁, pp. 5–45. 駒形和男編, 微生物の化学分類実験法. 学会出版センター.
- 16) Yanagawa, T., T. Kawabata, Y. Ogushi, S. Kohno, K. Ozaki, K. Nagao, Y. Morikawa, T. Miyoshi, D. Hoshii, Y. Nishikawa, and T. Naganuma. 2004. Pilot system for mass degradation of jellyfish by marine bacterial enzyme. *Mar. Biotechnol.* 6 (Special Proceeding Issue), S218–S222.
- 17) Yoshihara, K., O. Matsushita, J. Minami, and A. Okabe, 1994. Cloning and nucleotide sequence analysis of the *colH* gene from *Clostridium histolyticum* encoding a collagenase and a gelatinase. *J. Bacteriol.* 176: 6489–6496.
- 18) Yu, M.S., and C.Y. Lee, 1999. Expression and characterization of the *prtV* gene encoding a collagenase from *Vibrio parahaemolyticus* in *Escherichia coli*. *Microbiology* 145: 143–150.
- 19) Wlodawer, A., M. Li, A. Gustchina, N. Tsuruoka, M. Ashida, H. Minakata, H. Oyama, K. Oda, T. Nishino, and T. Nakayama. 2004. Crystallographic and biochemical investigations of kumamolisin-As, a serine-carboxyl peptidase with collagenase activity. *J. Biol. Chem.* 279: 21500–21510.