

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380100

研究課題名(和文) 白色腐朽菌が産生する疎水性分子代謝制御因子の構造機能・生合成系解析

研究課題名(英文) Analytical studies on functions and biosynthesis of metabolism-controlling hydrophobic factors produced by white rot fungus

研究代表者

渡邊 隆司 (WATANABE TAKASHI)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：80201200

研究成果の概要(和文)：

セルロースを残してリグニンを高選択的に分解する木材腐朽性担子菌 *Ceriporiopsis subvermispota* の産生する両親媒性代謝物の構造解析と機能解析を行った。その結果、本菌が粘質性 β -1,3 グルカンであるシースを産生する条件下で、新規なバイオサーファクタントやこれまでに報告例のない側鎖構造をもつ両親媒性ジカルボン酸を産生することを見いだした。また、リグニン分解が促進される木材腐朽条件で、両親媒性脂質関連代謝物の産生が増大する現象を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We analyzed structure and functions of amphipathic metabolites produced by a selective white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*, and found that this fungus secretes novel biosurfactants and amphipathic dicarboxylic acids with a new side chain structure, under the conditions producing slimy sheath composed of β -1,3 glucan. We also elucidated that production of the amphipathic compounds was increased under the wood rotting conditions which promote lignin biodegradation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：バイオマスの微生物分解

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：バイオサーファクタント、白色腐朽菌、リグニン、バイオマス、脂質過酸化、代謝物

1. 研究開始当初の背景

白色腐朽菌は、木材中のリグニンを単独で

無機化できる唯一の微生物として、これまでリグニン分解に関する膨大な研究が行われ

てきた。しかしながら、水のある環境下で疎水性のリグニンが酵素や代謝物と如何に接触して認識されるかについての知見は非常に乏しく、この鍵物質は同定されていない。また、分解された疎水性リグニンフラグメントの菌体内への取り込み機構についても、ほとんど明らかにされていない。本研究では、白色腐朽のブラックスポットであるこの点に正面から取り組み、水と疎水性分子の界面を活性化する鍵代謝物を同定して、その機能と生合成系を明らかにし、白色腐朽菌によるリグニン分解能強化のための新しい分子基盤を構築する。

これまで、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 培養系に、合成界面活性剤を添加すると、リグニン分解が促進された事例が報告されている。また、マンガンペルオキシダーゼのリグニンモデル化合物分解において、合成界面活性剤を添加すると分解が促進されることが示されている。このように、芳香族疎水性化合物であるリグニンフラグメントが水のある環境下で酵素と反応し、分解フラグメントを菌体に取り込むためには、界面活性をもった代謝物を分泌して疎水性分子を可溶化する必要があると推定されてきたが、白色腐朽菌はもとより、木材腐朽菌類一般についても、この機能を担う両親媒性代謝物、バイオサーファクタントを単離し、その機能を明らかにした例はない。

2. 研究の目的

本研究では、白色腐朽菌が産生する両親媒性物質の構造やリグニン分解における役割について分子レベルで解析する。即ち、白色腐朽菌によるリグニン分解において、水のある環境下で疎水性高分子リグニンの分解と、疎水性リグニンフラグメントの取り込みの鍵となるバイオサーファクタントを同定し、その構造機能相関を明らかにするとともに、生合成系や機能に関する知見を得る。これまでに、選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* が産生する鉄のレドックス反応を抑制する新規代謝物セリポリック酸を単離同定し、そのフェントン反応によるセルロース分解抑制作用を解明した。この分子は、水に溶けない疎水性代謝物であることから、両親媒性代謝物と協調して、菌体外のラジカル反応を制御すると予想される。このため、バイオサーファクタントとセリポリック酸の相互作用を解析する。

3. 研究の方法

4週間、28°Cで液体培養した *C. subvermispora* 菌体から sheath のみを抽出した後、3日間透析を行い、凍結乾燥した。得られた sheath を構成糖分析、メチル化分析、NMR 測定に供した。sheath の構成糖分析は、

72% 硫酸で sheath を加水分解後、2% 水素化ホウ素ナトリウムで還元し、無水酢酸およびピリジンでアセチル化した。得られたアルジトールアセテートを GC 分析に供した。メチル化分析は、箱守法を用いた。DMSO に溶解した sheath を、メチルスルフィニルカルバニオンおよびヨウ化メチルでメチル化し、2 M トリフルオロ酢酸で加水分解した。さらに、0.5 M 水素化ホウ素ナトリウムで還元した後、無水酢酸でアセチル化したメチル化アルジトールアセテートを GC/MS に供した。NMR 測定は、HMQC および同核種 J 分解 NMR を行った。*C. subvermispora* から sheath を分離し、sheath 中に含まれる代謝物を抽出後、LC-MS、NMR などで解析した。また、同菌を添加物が異なる条件で木粉培養し、有機溶媒可溶化物を抽出して、LC-MS、GC-MS で分析した。

4. 研究成果

sheath の主成分は、構成糖分析から D-グルコースを 96% 含む多糖であると決定した (表 1)。糖鎖の結合様式を明らかにするために箱守法メチル化分析を用いたところ、1,3-glucan の主鎖に 1,6 および 1,2 結合のグルコース側鎖を有していることがわかった。また、NMR スペクトルの J 値から、グルコシド結合は、すべて β 型であることが明らかとなった (図 1)。また、sheath 中に含まれる両親媒性物質を分離し、構造解析を行い、本菌がセレプロシドを産生することを明らかにした。さらに、アルキルおよびアルケニルイタコン酸である ceriporic acid の新規な酸化誘導体を見いだした。この代謝物を同定するため、ceriporic acid エポキシドの NaBD₄ 還元 in vitro で物を調製し、培養物から単離した代謝物との LCMS 解析により、その構造を決定をした (図 2)。

表 1 *C. subvermispora* の sheath の構成糖

composition (%)	
Glucose	96.0
Galactose	1.3
Mannose	1.2
Xylose	0.8
Arabinose	0.3
Rhamnose	0.4

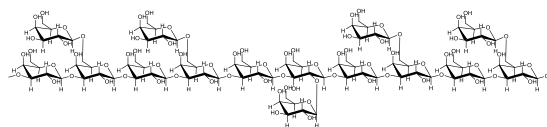


図 1 *C. subvermispora* の sheath の構造

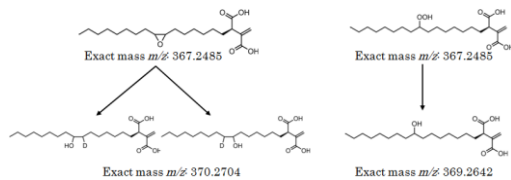


図2 ceriporic acid 酸化体 (エポキシドとヒドロペルオキシド) の NaBD_4 による還元反応

また、本研究では、リグニン分解の選択性に影響を与える因子を明らかにし、その因子を変化させた異なる条件で木材腐朽を行い、代謝物の変化を LCMS で解析した。その結果、リグニン分解が促進される条件で ceriporic acid やその他の脂質関連代謝物の産生量が增大することを見いだした。

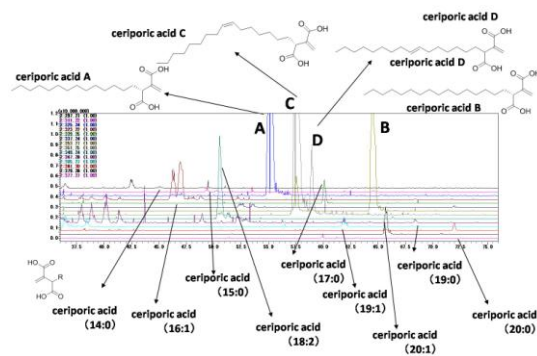


図3 *C. subvermisporea* が産生するシース中の ceriporic acid 誘導体

さらに、側鎖構造の異なる多数の ceriporic acid 誘導体が sheath 中に産生されることを見いだした (図3)。

ceriporic acid は、親水性のカルボキシル基2つと疎水性の側鎖をもつ両親媒性物質である。本研究により ceriporic acid が腐朽中に酸化反応を受けて親水性を増大させることが明らかとなった。また、本菌が代表的な両親媒性物質であるセレプロシドを腐朽中に産生することを初めて明らかにした。さらに、重合度の異なる新規な両親媒性物質を本菌が産生することを見いだした。

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)

- ① Takahito Watanabe, Saeko Tsuda, Hiroshi Nishimura, Yoichi Honda and Takashi Watanabe, Characterization of a $\Delta 12$ -fatty acid desaturase

gene from *Ceriporiopsis subvermisporea*, a selective lignin-degrading fungus, Applied Microbiology and Biotechnology, 2010 (査読有り)

- ② Hiroshi Nishimura, Kyoko Murayama, Takahito Watanabe, Yoichi Honda and Takashi Watanabe, Absolute configuration of ceriporic acids, the iron redox-silencing metabolites produced by a selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermisporea*, Chem. Phys. Lipids, 159, 2009, 77-80 (査読有り)

[学会発表] (計8件)

- ① Hiroshi Nishimura, Takahito Watanabe, Yoichi Honda and Takashi Watanabe, Structural and functional analyses of secondary metabolites involved in extracellular glucan sheath produced by *Ceriporiopsis subvermisporea*, Lignobiotech one, フランス (ランス), 2010/3/30
- ② 西村裕志, 佐々木碧, 瀬戸川雄一, 渡邊崇人, 本田与一, 渡辺隆司, 選択的的白色腐朽菌が産生するエポキシ化セリポリク酸関連代謝物の同定, 日本木材学会大会, 宮崎, 2010/3/18
- ③ 鈴木大介, 西村裕志, 吉岡康一, 渡邊崇人, 本田与一, 海田るみ, 林隆久, 高部圭司, 渡辺隆司, 選択的的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermisporea* が産生する sheath に関する研究, 日本木材学会大会, 松本, 2009/3/15
- ④ Takashi Watanabe, Microbial and microwave-assisted degradation of lignin for lignocellulosic biorefinery, Finnish-Japanese Workshop on Functional Material, フィンランド(ヘルシンキ), 2009/5/25
- ⑤ 渡辺隆司, セルロース系バイオリアファイナリーに向けてのリグニン分解系の開発, 日本応用糖質学会近畿支部大会, 2008/10/31
- ⑥ 渡辺隆司, 大橋康典, 西村裕志, 津田芽子, 月原多佳久, 渡邊崇人, 本田与一, 木質バイオリアファイナリーに向けての担子菌リグニン分解系の解析と応用, 日本農芸化学会関西支部大会, 2008/9/12
- ⑦ Hiroshi Nishimura, Kyoko Murayama, Takahito Watanabe, Yoichi Honda and Takashi Watanabe, Extracellular lipid-related metabolites, ceriporic acids produced by a selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermisporea*, Mie Bioforum 2008, Mie, 2008/9/1-5

- ⑧ Takashi Watanabe, Hiroshi Nishimura,
Saeko Tsuda, Rudianto Amirta,
Yasunori Ohashi, Masafumi
Oyadomari, Takahito Watanabe and
Yoichi Honda, Lignin Biodegradation
by Selective White Rot Fungi as a
Biotechnological Tool for
Lignocellulosic Biorefinery, Mie
Bioforum 2008, Mie, 2008/9/1-5

〔図書〕（計 2 件）

- ① 渡辺隆司、オーム社、バイオマスハンドブ
ック（第二版）、2010、523
② 渡辺隆司、エヌ・ティー・エス、セルロー
ス系バイオエタノール製造技術 ―食料ク
ライシス回避のために―、2010、396

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 隆司 (WATANABE TAKASHI)
京都大学・生存圏研究所・教授
研究者番号：80201200

(2) 研究分担者

本田 与一 (HONDA YOICHI)
京都大学・生存圏研究所・准教授
研究者番号：30362403

渡邊 崇人 (WATANABE TAKAHITO)
京都大学・生存圏研究所・助教
研究者番号：70252517