

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：83705

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23780343

研究課題名（和文） リグニン分解酵素の固体培養生産システムの開発

研究課題名（英文） Development of a system to produce lignin-degrading enzymes by solid-state fermentation

研究代表者

上辻 久敏（KAMITSUJI HISATOSHI）

岐阜県森林研究所・研究員

研究者番号：90455527

研究成果の概要（和文）：

固体培養における酵素の生産能力で選定した菌株を用いて、リグニン分解酵素の生産系について検討した。選定した菌株のリグニン分解酵素の生産量を高める因子が数種判明し、固体培養におけるリグニン分解酵素の生産量を高めることができた。また、選定した菌株により生産されるリグニン分解酵素の精製を試み、部分精製段階では、多機能型のリグニン分解酵素である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Lignin-degrading enzyme producing system was examined using strains that were chosen according to the enzyme production capacity in solid-state fermentation. As a result, several factors in the chosen strains were found to increase the production of lignin-degrading enzyme. Therefore, we succeeded in increasing the production of lignin-degrading enzyme in solid-state fermentation. At the partial purification step during purification of the lignin-degrading enzyme produced by the chosen strains, it was suggested that the enzyme might be multifunctional.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：バイオマス、白色腐朽菌、リグニン分解酵素、固体培養

## 1. 研究開始当初の背景

キノコの中でも白色腐朽菌と呼ばれるキノコは、木質バイオマス中のセルロースなど糖質を残し、リグニンを選択的に分解できる。木質バイオマス由来の糖質を発酵源としたエタノールの製造に関して、リグニンは、木質利用の妨げとなる成分であることから、リグニンを効率良く分解する方法の開発が要望されている。また、リグニンは、ビスフェノールなどの環境汚染物質などと構造が類似しており、白色腐朽菌のリグニン分解機構

は様々な芳香族化合物の分解に利用できる可能性が示されてきている。

現在、白色腐朽菌による木質バイオマスのリグニン分解処理を実用化する際、長い処理時間を要することが問題となっている。白色腐朽菌のリグニン分解は、菌体外で行われることから、リグニン分解関連因子を特定し、人工的に分解系を再構築することができれば、菌の遅い生育とリグニン分解因子生産から切り離すことができ、リグニン分解の効率を格段に上昇させることが可能と考えられ

る。しかし、白色腐朽菌のリグニン分解酵素は、一般的に生産性が低くまた長い培養期間を要するなどの問題点があるため、大量生産系が確立されていない。その原因として、白色腐朽菌では、細菌のように菌株の酵素生産能力を向上させる方法が確立されていないことがあげられる。

酵素の生産調節に関して、研究代表者は、白色腐朽菌ヒラタケのリグニン分解酵素が、窒素源濃度やマンガンを介して転写の段階で調節されていることや、酵素の基質でもあるマンガンなどの物質が酵素の安定化にも寄与していることを明らかにしてきた。しかし、単一のタンパク質の発現解析では、発現機構の全体像を理解することが難しい。そこで全ゲノム配列が解読された白色腐朽菌での SAGE 法を用いた網羅的な発現解析がはじめられている。発現解析の結果を基に高発現しているタンパク質の制御領域（プロモーター）につなぎ替えて、酵素の大量生産などを狙った形質転換系の開発が行われている。形質転換における遺伝子導入を確認するマーカー遺伝子の構築、導入遺伝子の発現に成功しているが、根本的な菌株の性質を遺伝子導入で自由に変える技術は確立されていない。

## 2. 研究の目的

白色腐朽菌による酵素生産の研究は以前から行われてきたが、いずれも生産効率は低かった。そこで、遺伝子導入による形質転換の研究が行われ始めたが、産業利用される高機能な菌株の作出には至っていない。これまで研究されてきた菌株の能力を上げるのではなく、酵素の大量生産系の開発に適した酵素生産能力の高い宿主菌株の選抜が必要であると考えた。そこで、リグニン分解系の開発をめざし、律速段階の1つと考えられる酵素の大量生産に適した菌株の選定に取り組んだ。

白色腐朽菌の培養系をスケールアップする従来の研究では、選定時に得られた小規模な培養系における培養液当たりの酵素生産量を維持したまま培養系を拡大できない場合が多かった。この原因として、糸状菌の液体培養では菌体が沈み、培養液を循環させると菌体が切れるなど悪影響が発生し、均一系をつくるのが難しいことがあげられる。この問題を解決するために、研究代表者は、酵素の生産性に優れた菌株を固体培地から選定を行い、固体培地でリグニン分解酵素の生産能力が高い菌株を取得した。固体培地は液体培地と異なり、培地と菌体の割合を一定にすることが可能であり、菌体に悪影響を与えずにスケールアップできる可能性があると考えられる。

本研究では、白色腐朽菌の低いリグニン分

解酵素の生産性を補うべく固体培地から選定した酵素生産能力の高い菌株を用いることで、固体培地を用いたリグニン分解酵素の大量生産系の開発をめざし、固体培養系でのリグニン分解酵素の生産条件と生産された酵素を回収する試験から酵素を大量に生産する培養系を開発することが目的である。

上記の目的を達成するために、次の項目を明らかにする必要があると考えている。

①分解酵素の生産を誘導する誘導物質や酵素の補因子を培地に添加することで、酵素生産時間の短縮と酵素生産量の増大条件を試験から導き出す。

②設定された固体培養条件を用いて、培養系のスケールアップを行う。生産される酵素量を経時的にモニタリングすることで、酵素生産量と培養系の拡大の関係について明らかにし、酵素生産効率の高い培養系サイズを決定する。

③培養期間を短縮するために、培養中で時間を要する固体培地への菌糸蔓延を促進する接種方法を検討する。特に菌糸量が増加するほど酵素量も得られる傾向があり、酵素の生産性を低下させず菌糸量を短期間に確保する接種と攪拌手法を明らかにする。

④固体培地中に生産された分解酵素の解析を行い、分解酵素を効率よく抽出・濃縮する回収方法を確立する。

固体培地中に酵素を生産するシステムについて、大量の酵素が生産され、培地中に蓄積した酵素を回収取得するためには、3つの要素が存在することが重要と考えている。第一に菌株の酵素生産量が多い。次に生産された酵素の安定性が高くライフタイムが長い。最後に酵素を不活化させる因子が培地中に存在しないかまたは少量である。

本選定菌株は、選定時の固体培地中で100日間にわたり酵素生産量が増加し続ける傾向を示し、高い生産性が期待できる結果を得ていた。さらに固体培地から緩衝液を用いて回収した粗酵素液は、回収後、安定性を示した。培養系の開発に向けて必要な粗酵素の活性が維持される現象を確認しているが、この現象が、生産されている酵素本体の特性によるものであるか、酵素のライフタイムを短縮する酵素の不活化因子が培養系に少ないのか見極めて培養系を開発する必要がある。この選定菌株において発見してきた大量生産に有効な現象を理解し、活用するために選定菌株から固体培地中に生産される分解酵素の分離・精製を行う。精製酵素の安定性などの特性を明らかにすることで、酵素が失活しない原因が酵素単体の安定性に起因するのか明らかにする。また、回収した固体培地中に生産されている酵素が、リグニン分解に有効な反応性を有するいかなる種のリグニン分解酵素であるかについても明らかにしてい

く。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養条件の検討

①選定した白色腐朽菌を用いて、リグニン分解酵素の生産量を高める培地組成を検討した。培地に用いる固形有機物として木粉を基材として使用した。木粉の樹種は菌糸伸長への樹種の影響を調査し固体培地に用いる樹種を決定した。

培地に誘導物質を添加することにより、酵素生産量の増加と生産期間の短縮化を検討した。誘導物質は、酵素の安定化効果も期待でき、遺伝子レベルで酵素生産を誘導する事例が認められているマンガンや鉄を添加した。また培地への誘導物質添加時における酵素生産への培養温度の影響についても酵素活性を測定することで調査した。

②酵素生産系のスケールアップについて検討した。項目①で選定された生産量が高い培養条件で、酵素生産量を維持したまま培養スケールの拡大について検討する。また、培地から生産された酵素の抽出を行い、酵素活性を測定することで培養系における酵素生産量を評価した。

③培養期間を短縮するために、現在、律速段階と考えられる培養系の拡大に適した選定菌株の接種条件を検討する。菌糸接種後に攪拌を行い酵素生産量により条件を探索した。

④培養系の検討で生産されている酵素について分離精製を行い、生産されているリグニン分解酵素種を把握するために、酵素の性質について高分子色素を用いて検討した。

#### (2) 固体培地からの酵素回収条件の検討

##### ①抽出条件の検討

項目(1)の②で得られた培養後の固体培地からの酵素抽出における酵素の抽出量へのpHの影響について抽出された粗酵素液の酵素活性を測定することで調査した。抽出時のpHは、抽出率だけでなく酵素活性の維持にも影響すると考えられることから、拡大した培養系で得られた粗酵素のpH安定性について、抽出後の粗酵素液に残存する酵素活性を測定した。抽出液に含まれるリグニン分解酵素の不活化の傾向について把握していくことで酵素を安定的に抽出し回収する条件の設定を目的に試験した。

##### ②濃縮条件の検討

酵素の濃縮に関しては、低温条件下で限外濾過を用いた濃縮を行うことが多いが、本培養系において生産されるリグニン分解酵素は、温度に対して比較的安定である可能性が確認され、エバポレーターを用いた減圧濃縮について検討した。濃縮後の残存活性から減圧濃縮時における失活への加温の影響を調査した。

当初計画どおりに進まない場合の対応として培養系のスケールアップについて計画はスケールアップの問題点が抽出された場合は、培養系の拡大にこだわらず、拡大できた最大の固体培地で個数を増やすことにより培養容量を確保して、回収条件についての試験を行う計画であった。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養条件の検討

①固体培養に用いる基材に関して、菌糸の伸長からヒノキ等の針葉樹では生育が悪くブナやコナラ等の広葉樹が適していると判断し試験には、広葉樹を用いた。培養温度に対する酵素生産と菌糸成長の関係を試験した結果、菌糸の生育については25~30℃で菌糸伸長が早いことが判明したが、酵素生産量は、培養温度20から25℃で高かった。培養温度20℃と25℃の2点の培養条件下でマンガンと鉄の添加濃度の影響について試験した。その結果、マンガンや鉄を添加することで酵素の生産量が上昇する培養条件が多く認められた。培養期間を短縮する効果としては、培地添加物を添加していない時に培養100日目に検出された酵素量を65日目に得ることができ培養期間を短縮できた。培地添加物としては、鉄よりもマンガンを追加した条件で酵素生産量が高い条件が多く存在した。また、培養温度を25℃にしてマンガンや鉄を追加することで培養温度20℃よりも酵素の生産量が增大する傾向が認められた。酵素生産は、培養65日目では、0.5mMマンガンを追加した条件が最も高く、培養95日目になると1mMマンガン添加条件が最も高かった。選定菌株の固体培養においてマンガンや鉄を追加することで得られる酵素量が增大し、添加による酵素生産量を増大する効果は培養温度を25℃にすることで高まり選定菌株の酵素生産を高めるために添加物質と培養温度の組合せが重要であることがわかった。

②20gから200gに培養系を10倍拡大して、酵素生産を検討した。培地から抽出されてきた粗酵素液に関して、50日目では培地中に生産された全酵素量は4.5培に増加したが、培地重量当たりの酵素量は45%に減少した。10倍の培養系で80日まで培養期間を延長することで、20gの培養で65日目に生産された酵素量と比較して培地重量当たりの酵素量は90%となり、培地中に生産された全酵素量は、培地拡大率に近い9倍に上昇した。さらに培地を3000gに拡大して培養すると65日目の培地重量当たりの生産量は減少したが、培地中に生産された全酵素量は20gの培養系の62倍に高まった。生産された酵素量はグアヤコールを基質とした酵素活性の測定法で58400ユニットであった。培養系を拡大することにより培地から得られる全酵素量は上昇した

が、培地当たりの酵素生産量を維持しながら拡大するには添加物と温度条件だけでは培養期間を延長する必要があると考えられる。③200gに拡大した培養系で、培地を接種時に攪拌することでの培養期間の短縮効果について培養80日目まで検討した結果、攪拌無しの培養条件と比較すると培養50日で得られる酵素量が1.75倍に増大した。培養65日でも攪拌することで酵素量が高まる傾向がみられたが、培養80日では、攪拌の有無による酵素の生産量に差は認められず、攪拌が酵素生産量の増加に有効な培養期間が存在していることがわかった。

④弱陰イオン交換カラムを用いて固体培養で生産されているリグニン分解酵素の分離精製を行った。部分精製した酵素について、リグニンと類似の高分子色素への反応性を調査したところ、マンガン依存性の反応性だけでなくマンガン非依存的に直接的に高分子色素に作用して脱色できることが認められた。選定した菌株の生産するリグニン分解酵素が、高分子に直接的に作用できる多機能型のリグニン分解酵素である可能性が示唆された。

## (2) 回収方法の検討

①固体培地からリグニン分解酵素の抽出に用いる抽出液の酵素回収へのpHの影響について検討した。pH 2.5~8.0の範囲でそれぞれ調整した抽出液を用いて酵素を抽出した結果、どのpHにおいても酵素が抽出された。固体培地から抽出された酵素量は、pH 4.0~5.5で他のpHよりもわずかに高い値が得られた。

粗酵素液の残存活性を回収7日後に調査したところ、調査したすべてのpH領域で80%以上の残存活性を示し、酸性から中性のpH領域で急激な失活は認められなかった。測定値ではpH 4.0と4.5でわずかに残存活性が高かった。室温にて遮光条件下1000時間維持した場合においても7日後に測定した残存活性から、変化がないかまたはわずかな活性の減少しか認められず、抽出した粗酵素液の酵素活性はpH依存的な失活が認められず安定していた。安定域が広いことは利用の面で有益な特性であると考えられる。

②エバポレーターを用いたリグニン分解酵素の減圧濃縮への加熱温度の影響を調査した結果、40~85℃までの温度域で減圧濃縮を用いて容量を5分の1まで濃縮したが酵素活性の低下は認められなかった。加温した減圧濃縮で4℃での限外濾過濃縮と同様の酵素活性を維持した濃縮効果を得ることができた。70℃以上の加温をして減圧濃縮することで、濃縮効率を格段に高めることができる可能性がある。

産業利用を目指した研究では、短期間に大

量の酵素が取得でき、生産後の酵素の処理に有利な方法を選択する必要がある。この点から生産された酵素の取り扱いが簡便である液体培地を用いて研究が行われている場合が多いが、白色腐朽菌では液体培養の大量生産系が確立されていない。試験に用いた選定菌株が3000gの固体培地中に生産する分解酵素の生産系は、シイタケ菌床栽培に用いられる菌床ブロックと同様のサイズである。岐阜県内に数千以上の菌床ブロックを半年間以上栽培管理している生産者は多数存在する。生産されたリグニン分解酵素の単価がシイタケの代替となりうる試算ができれば、3000gの固体培地を数万個培養することは現状の技術で十分可能であると考えられる。今後さらなる培養系のスケールアップを目指すのではなく、培養個数で生産量が高めるのが現実的であると考えられる。また、固体培地から酵素の取扱いの不便さを解消できる安定性を有している点にも本研究の独創性があると考えている。本研究課題の結果を基に、安定性の高い多機能型酵素を大量に得ることが実現できれば、生産量が少なく検討できなかった様々な産業利用に向けた多機能型酵素の応用研究の進展に貢献できる。リグニン分解酵素の安定性を高める構造モデリングの観点からも重要な知見を得ることができる可能性がある。将来的には木質バイオマスの有効利用に貢献でき、地球温暖化防止、邱炭素社会の構築への貢献が可能となる技術開発につながりうると考える。

## 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)

[学会発表] (計1件)

上辻久敏、水谷和人

岐阜県で分離された *Phellinus linteus* PL-1 株によるリグニン分解酵素の生産

日本きのこ学会第16回大会 2012年9月6日、東京

[その他]

ホームページ等

岐阜県森林研究所ホームページ

(<http://www.forest.rd.pref.gifu.lg.jp>)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上辻 久敏 (KAMITSUJI HISATOSHI)

岐阜県森林研究所・森林資源部・研究員  
研究者番号：90455527