

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660142

研究課題名(和文) バイオフィトンで捉える木質生分解とスペクトル解析

研究課題名(英文) Observing the biodegradation of wood via biophotons and spectroscopic analyses

研究代表者

西村 裕志(Nishimura, Hiroshi)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：50553989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：木材腐朽菌は、自然界において、木質成分の主要な分解者である。特に難分解性のリグニンの分解機構は重要な課題である。これまでリグニン分解酵素、メディエーターによる研究、分解化合物の同定による研究が行われてきた。しかしながら、木材腐朽菌が木質成分を分解するアクティビティをリアルタイムにモニタリングする手段は限られていた。本研究では分解時に生じる微弱なバイオフィトンを可視化、イメージングし、経時的に追跡した。また生分解時に生じる二次代謝産物について分光学的解析を行った。このように、本研究は木材腐朽菌による木質成分の分解機構を動的に捉える新しい展開につながった。

研究成果の概要(英文)：Wood-rotting fungi are the major decomposers of wood components in nature. Especially the decomposition mechanism of persistent lignin is a critical issue. Previous studies about lignin-degrading enzymes, mediators, and the identification of degraded compounds have been conducted. However, it is hard to monitor the real activity of wood-rotting fungi in site. In this study, we visualized weak biophotons and imaged the time course behavior of fungi. Spectroscopic analysis was also performed on secondary metabolites produced during the biodegradation. This research paves the way to a new development that dynamically observes the degradation mechanism of wood components by wood-rotting fungi.

研究分野：木質生分解学

キーワード：biomass lignin biophoton fungi wood biodegradation

## 1. 研究開始当初の背景

自然界において木質の分解は木材腐朽菌が担っている。特に難分解性の芳香族天然高分子であるリグニンの主要な分解者は白色腐朽性の担子菌類である。これまで木材腐朽菌のリグニン生分解機構の解析は、リグニン分解酵素の反応・機能解析を中心に行われてきた。分子レベルの理解については、基質としてリグニンモデル化合物あるいは抽出リグニンをを用いた研究が多く行われている。一方で木材そのものを基質とした場合、リグニン分解酵素のみでは必ずしも分解活性が高くないことが知られている。研究代表者らは菌体外に分泌する二次代謝物の役割についても研究を進め、菌体外二次代謝物の過酸化反応を介したリグニン分解系を提案している。木材そのものをを用いたリグニン分解機構に関する研究は、基質の重量減少、木質組成の変化、分解生成物の分析が多く行われてきた。しかしながら、木材腐朽菌そのものが木質を生分解する現場を可視化する方法がないため、微生物自体がどのようなタイミングで分解しているのか、分解アクティビティーにおける局在性の有無を観測することは困難であった。そこで本研究課題では、木質分解時に生じる微弱な化学発光を可視化、イメージングし、十分に解明されていないバイオフィオンを捉えること、またその分子種を質量分析法や NMR 法によって解析することを目的とした。

バイオフィオン(生物フォトン)は、一般に生物による代謝や生化学反応により生じるため、検出には外部エネルギーによる励起は必要ない。この微弱な化学発光は光電子増倍管(PMT)を検出器としたフォトンカウンティング法によって捉えることができる。バイオフィオンは生物発光 (bioluminescence) と呼ばれる現象であり、生化学反応によるエネルギーにより分子が励起状態となり、これが基

底状態に戻る際に生じるフォトン(光子)に由来する場合と、励起分子からのエネルギーによって共存する蛍光分子等が励起され、この分子が基底状態に戻る際に生じるフォトン(光子)に由来して発光する場合がある。

木質の生分解とバイオフィオン生成に関する知見は少ないが、バイオフィオンの観察実験系を確立し、分解時に生じる菌体外代謝物の分析と合わせて木材腐朽機構に関する新しい知見を得ることを目的とする。

## 2. 研究の目的

自然界における主な木材分解者である木材腐朽菌のリグニン分解機構に関する基礎知見について、生分解の現場の観察とその現場にある分子種の同定を目的として、バイオフィオンイメージングによる生分解活動の実時間モニタリング、質量分析法や NMR 法による生分解の現場で生じる分子種分析を行う。これにより、木質の生分解過程を観測、理解する新しい方法論を提案する。

## 3. 研究の方法

木材腐朽菌として、白色腐朽菌、選択的的白色腐朽菌、褐色腐朽菌から代表的な菌種を選んだ。具体的には白色腐朽菌として、*Schizophyllum commune* (スエヒロタケ)、*Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ)、*Phanerochaete chrysosporium* (マクカワタケ属)、*Ceriporiopsis subvermispota* (セルロースを残してリグニンを高選択的に分解する選択的的白色腐朽菌)、褐色腐朽菌として *Gloeophyllum trabeum* (キチリメンタケ) を用いた。

測定用の寒天培地を作製し、これにブナ木片を設置した。この培地上に木材腐朽菌を接種し、培養を行った。培養中に経時的に可視光、化学発光イメージング(フォトンカウンティング)を行い、データを取得した。

それぞれの菌株の他、2種の菌株の対峙培養を行い、バイオフィオン生成について観測デ

ータを取得した。バイオフォトンの起源について考察をすすめるため、脂質過酸化反応について蛍光トラップ法を組み合わせたイメージング、分泌二次代謝物についてLC-MS、インフュージョン高分解能質量分析による構造解析を行った。一部の代謝物については精製後 NMR による構造解析を行った。特徴的な脂質代謝物の酸化・過酸化反応がバイオフォトン生成に寄与している可能性が考えられた。そこで、安定同位体 ( $^{13}\text{C}$  標識グルコース) を炭素源として培養を行い、標識二次代謝物を抽出、精製することで  $^{13}\text{C}$  標識代謝物を得た。これを木質分解培地に添加し、経時的な変化を NMR 法 (2D-HSQC) により解析した。

#### 4. 研究成果

木材腐朽菌を培養プレート上において木板とともに培養し経時的な変化をバイオフォトン検出によるフォトンイメージングにより取得した。この際、測定条件、温度調整などを行い安定した条件で観測を行ったが、温調により生じるアーティファクトの影響があったため、これを回避する条件検討を行い実施した。連続的な観測により腐朽過程に伴う腐朽菌のアクティビティをバイオフォトン検出によって可視化することができた。フォトンの減衰要因としては検出器までの距離、容器、温度のほか微小な水滴も寄与していることがわかった。

腐朽過程におけるバイオフォトンイメージングの連続的な取得を行う一方で、菌体外代謝物、木質構成成分の構造変化を LC-MS, NMR を用いて分析した。さらに、質量分析法によるマスイオン検出によるケミカルマッピングによる観測手法について条件検討を進め、リグニン分子のオリゴマー断片の検出に成功したことから、木質内分子の局在解析への展望が見えてきたと考えている。以上により、木質生分解反応における多面的な知見

と鍵因子の探索ツールとしての有効性について検討を行った。

バイオフォトンイメージングでは2週間にわたる培養を連続的に可視光およびバイオフォトンイメージングし、連続的な動画として取得することに成功した。木材腐朽菌の種類によって化学発光量が異なること、腐朽のフェーズによって発光位置が異なること、またある種のリズムが生じていることを見出した。

今回の測定条件においては、微生物細胞の一次代謝活動そのものによるバイオフォトン生成は菌体外における反応と比べて微弱であった。このことから本研究において観測されたバイオフォトンの起源として以下が考えられる。

- 1) 菌体外の酸化・過酸化酵素により反応した基質が励起され、これが基底状態に戻る際に生じた。基質としてはフェノール性化合物、リグニン分解物、脂質などが考えられる。
- 2) 励起された基質との反応により、芳香族性リグニン分子が励起され、これが基底状態に戻る際に生じた。
- 3) 脂質代謝物の連鎖的ラジカル生成機構(リピッドペルオキシデーション)により生じた。

これらの起源を分析するため、高分解能質量分析法による分泌代謝物の分析を行った。

安定同位体標識法を用いて培養することにより、菌糸体や菌二次代謝物由来の成分とリグニン由来の成分を区別することが容易になる。この手法により得られた二次代謝物について精密質量分析と NMR 法による解析を行った。その結果、菌体外代謝物への安定同位体の取り込みが見られ、精密質量分析および CID によるプロダクトイオンスペクトル分析(MS/MS 分析)により解析を行った。また、安定同位体標識培地を用いて培養後の菌体外低分子代謝物のプロダクトイオンスペクトル解析を行うことで生合成、代謝、分解に

関する知見が得られた。また安定同位体標識脂質代謝物を独自に別途調製し、これを培養系に添加し、NMR法(2D HSQC法)により標識代謝物の構造変化、動態観測を行い、培養過程における酸化反応を捉えることに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Nishimura, H., Yamaguchi, D., Watanabe, T., Cerebrosides, extracellular glycolipids secreted by the selective lignin-degrading fungus *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chem Phys Lipids*, 203, 1-11, 2017.
- (2) 西村 裕志, 木に学ぶ、きのこに学ぶサイエンス(総説), *生存圏研究*, 12, 11-18, 2016.

〔学会発表〕(計 17 件)

- (1) 西村 裕志, 木質バイオマスの生分解機構の解析, 第 345 回生存圏シンポジウム, 宇治市, 2017.7.
- (2) Nishimura, H., Structural analysis towards the lignocellulosic biomass conversion, The 1st International Symposium on Fuels and Energy, International Conference Center Hiroshima, Hiroshima (oral), 2017.7.
- (3) 河野孝彰, 西村 裕志, 渡辺隆司, 標識メチオニン添加による選択的的白色腐朽菌の代謝物分析, 日本木材学会大会(福岡大会), 2017.3.
- (4) Nishimura, H., Structural analyses and the bioprocesses for wood biomass conversion, Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science, Penang, Malaysia (oral), 2017.2.
- (5) 西村 裕志, 渡辺隆司, 木材表面リグニンの分子イメージング, 第 330 回生存圏シンポジウム 第 13 回持続的生存圏創成のためのエネルギー循環シンポジ

ウムーマイクロ波高度利用と先端分析化学一, 宇治市, 2017.1.

- (6) 西村 裕志, 木質バイオマスの生分解機構の解析, 第 7 回 DASH/FBAS 全国共同利用成果報告会, 宇治市, 2016.6.
- (7) 酒井洋尚, 西村裕志, 片平正人, 渡辺隆司, リグニンモデル化合物の生分解過程における挙動, 第 65 回日本木材学会大会, 東京, 182, 2015.3.
- (8) 西村裕志, 酒井洋尚, 片平正人, 渡辺隆司, 木材腐朽菌によるリグニン分解過程の解析, 第 59 回リグニン討論会, 福井, 120-121, 2014.9.
- (9) 西村裕志, 渡辺崇人, 本田与一, 渡辺隆司, 選択的リグニン分解菌 *Ceriporiopsis subvermispora* が産生するラジカル反応を統御する二次代謝物, 第 18 回日本きのこ学会, 京都, 2014.9.

[招待・依頼講演]

- (10) 西村 裕志, リグノセルロースの構造分析と環境調和型変換, バイオマス変換研究会春季講演会(第 68 回日本木材学会大会), 京都市, 2018.3. [invited]
- (11) 西村 裕志, 木質バイオマスの分子構造とマイルドな変換法, バイオマス資源の利活用に向けた化学生命研究の最前線, 高知市, 2018.3. [invited]
- (12) 西村 裕志, 溶かして知る・活かす, 木の化学, 京都大学森林科学公開講座, 宇治市, 2017.10.
- (13) 西村 裕志, 木材成分のリグニンから機能性化学品へ - 微生物に学ぶ有効活用 -, 京都大学総合博物館 2017 Lecture series - 研究の最先端 -, 京都市, 2017.6. [invited]
- (14) Nishimura, H., NMR analyses of wood cell wall structures and the biodegradation, WWSC seminar,

Göteborg, Sweden, 2016.1. [invited]

- (15) 西村 裕志, 木に学ぶ、きのこに学ぶサイエンス, 第 12 回京都大学生存圏研究所公開講演会, 宇治市, 2015.10.
- (16) Nishimura, H., Structural analysis for lignocellulosic biomass, 6th Int. Symp. Adv. Energy Sci., Kyoto, 2015.9. [invited]
- (17) Nishimura, H., Analysis of lignocellulosic biomass by solution-state NMR spectroscopy, Göteborg, Sweden, 2015.3. [invited]

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

西村 裕志, やさしい科学技術セミナー  
－ きのこに学ぶ木の食べ方, 宇治市,  
2015.10. [中高生向け科学セミナー]

ホームページ

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/lbc/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 裕志 (NISHIMURA, H.iroschi)  
京都大学・生存圏研究所・助教  
研究者番号：50553989