

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660141

研究課題名(和文) 実用的除染に向けた担子菌の菌体外多糖への放射性核種の吸着・蓄積及び回収法の開発

研究課題名(英文) Developing a practical method for the adsorption, accumulation, and recovery of radionuclides using exopolysaccharides from basidiomycetes

研究代表者

渡邊 崇人 (WATANABE, Takahito)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：30362403

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)：一部の放射性核種やそれらの安定核種は重金属として環境中に残留する。その重金属と担子菌が産生する菌体外多糖(シース)には親和性があると言われている。本研究課題では、まず、約50種類の担子菌のシースの産生の有無や産生条件を調べた。特に、リグニン分解性担子菌 *Ceriporiopsis subvermispora* は、バニリン添加時にシースの高産生が認められた。また、シースの生合成系の知見を得るためにプロテオミクス的手法を用いて *C. subvermispora* のシース高産生時に発現が変化するタンパク質を100個以上同定した。一方、本菌やシースの固定化や重金属の吸着についても試みた。

研究成果の概要(英文)：Approximately 50 basidiomycete strains were tested whether they produced extracellular polysaccharides, also known as polysaccharide sheath. Some of these strains produced sheath in the presence of wood blocks and/or lignin-derived aromatic compounds. In order to investigate up-regulated and down-regulated proteins under sheath-producing conditions, moreover, fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis was applied to separate the proteins of a lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*, which produced large amounts of sheath in the presence of vanillin. Over 100 proteins were identified by peptide mass fingerprinting. Using the same fungus and its sheath, on the other hand, I tried to absorb heavy metals as a part of developing a practical method for decontamination.

研究分野：応用微生物学

キーワード：担子菌 菌体外多糖 リグニン

1. 研究開始当初の背景

福島第一原子力発電所事故による放射性物質による汚染水問題が深刻化している。汚染水に起因する土壌・地下水汚染、さらには、流出による海洋汚染が起こっている。環境中に放出された放射性同位元素(放射性核種)は、ウラン、プルトニウム、コバルト、ストロンチウム、セシウム等である。また、これらが崩壊を経て安定核種になると一部が鉛、モリブデン等の重金属として環境中に残留する。従って、汚染浄化(除染)のためには、環境中に放出された放射性同位元素や重金属の回収が必要である。

担子菌(キノコ)は、多種多様な代謝物を産生するが、培養条件に大きく依存するものの、粘性のある不溶性の菌体外多糖(シース)を産生する。このシースに重金属との親和性があることが知られている。また、リグニン分解性担子菌(白色腐朽菌)の中には、他の担子菌と比較して木材腐朽時に金属をキレートする役割を持つシュウ酸等の有機酸を大量に産生する。さらに、一部の担子菌においては、核燃料に使用されているウラン等を蓄積するという報告もある。

そこで、本研究課題では、担子菌の菌体外代謝物(シースやシュウ酸等)に注目し、特に、シースに放射性同位元素や重金属を高効率に吸着・蓄積させ、回収できる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、原発事故由来の汚染水や汚染土壌の汚染浄化(除染)のために、放射性同位元素や重金属を担子菌が産生する菌体外多糖(シース)を用いて高効率に吸着・蓄積させ、回収する方法を開発する。これにより、実用的除染技術の向上と我が国が直面する原発事故による汚染水問題等の解決の一助に貢献することが最終目的である。しかしながら、シースを産生する担子菌の種類、担子菌のシースの産生の諸条件、シースの産生量やシースの産生時に発現が誘導される酵素や遺伝子等の情報がほとんどないか、断片的であることも事実である。そこで、本研究課題としては、「(1)シースを産生する担子菌株のスクリーニング；(2)スクリーニングした担子菌株のシース高産生条件の最適化；(3)担子菌育種に向けたシース高産生時に発現が変化するタンパク質(酵素)・遺伝子の同定；(4)シース産生菌の固定化、重金属の吸着・脱着・回収法の開発」を具体的な研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者の研究室所有及び微生物保存施設(カルチャーコレクション)から分譲された担子菌株を寒天プレート(ポテトデキストロース培地、麦芽エキス培地、マツタケ培地等)に接種し、20~37°Cで寒天プレート一面に菌糸が生えるまで3日間から1ヶ

月間培養した。その後、菌糸体の生えた寒天プレートに滅菌水を加え、ラバーポリスマンにて菌糸を掻き取り、液体培地に接種した。シース産生の見極め期間として、培養期間を2週間とし、寒天培地の培養と同じ温度で培養して、シースの産生の有無を確認した。なお、今回使用した液体培地として、基本、グルコースを炭素源とする無機塩合成培地を用いた。また、今回使用した担子菌株(約50菌株)は以下の通り(括弧の数値は、属と種は分かっているが、株名が付いていない、或いは、カルチャーコレクションの番号がない株があるため菌株数で示した): *Trametes versicolor* (3), *Trametes hirsutus* (2), *Trametes vellerus* (1), *Grifola frondosa* NBRC 7040, *Grifola frondosa* NBRC 4911, *Coriolus consors* NBRC 6512, *Schizophyllum commune* NBRC 6502, *Schizophyllum commune* NBRC 30749, *Lyophyllum ulmarium* (1), *Flammulina velutipes* (1), *Pholiota nameko* (1), *Agrocybe cylindracea* (1), *Agrocybe erebia* (1), *Pleurotus ostreatus* NBRC 30776, *Pleurotus ostreatus* (5), *Pleurotus abalonus* (1), *Pleurotus citrinopileatus* (1), *Lentinus edodes* (6), *Lentinus lepideus* (2), *Coriolus brevis* (1), *Coriolus consors* NBRC 30769, *Ganoderma lucidum* NBRC 31863, *Tricholoma matsutake* NBRC 6933, *Tricholoma matsutake* NBRC 30773, *Tricholoma matsutake* NBRC 30605, *Inonotus mikadoi* NBRC 6517, *Favolus arcularius* NBRC 4959, *Lenzites* sp. (2), *Phellinus* sp. (1), *Ceriporiopsis subvermispota* ATCC 90466, *Ceriporiopsis subvermispota* ATCC 90467, *Ceriporiopsis subvermispota* ATCC 96608, *Phlebia radiata* ATCC 52891, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 34540, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 34541, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 64964, *Pycnoporus cinnabarinus* ATCC 10242。

(2) スクリーニングしたシースを(高)産生する菌株について、グルコースを炭素源とする無機塩合成培地で1週間培養し、その後、ブナ木粉、ブナ木片、リグニン由来芳香族化合物をそれぞれ添加して、さらに1週間培養を行った。次に、2週間経過時点でのシースの産生量、培養液の粘性、培養液の色、pH、菌株の成長(湿重量)を2週間グルコースを炭素源とする無機塩合成培地のみで培養した場合と比較した。

(3) グルコースを炭素源とする無機塩合成培地でリグニン分解性担子菌(白色腐朽菌) *Ceriporiopsis subvermispota* を温度 28°C 及び湿度 70% で1週間培養した。その後、リグニン由来の芳香族化合物の一つであるバニリンを終濃度 2% になるように添加し、さらに1週間培養した。培養後、培養濾液と菌体(正確には、菌体に大量のシースが付着したスライム)を濾別した。濾別したスライムを大量の水及び有機溶媒で洗浄し、シースを菌体から剥がした。菌体の水分を除去し、二次元電気泳動の等電点電気泳動で用いる

Immobiline DryStrip (GE ヘルスケア)の膨潤バッファとジリコニアビーズで菌体を破碎した。破碎後、遠心分離によって上清を回収し、粗酵素とした。トリクロロ酢酸・アセトン沈殿によってその粗酵素を精製し、精製したタンパク質を可溶化度の高い膨潤バッファで溶解後、Immobiline DryStrip を膨潤した。その膨潤した Immobiline DryStrip を用いて等電点電気泳動(一次元目)を行い、還元・アルキル化後、通常の SDS-PAGE(二次元目)を行った。

蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動においては、*C. subvermispora* をバニリン添加条件(シース高産生条件)と非添加条件でそれぞれ培養し、粗酵素を調製・精製後、タンパク質ラベル化剤(蛍光色素)IC3-OSu 及び IC5-OSu(同仁化学研究所)を用いてそれぞれ標識した。二次元電気泳動は、それぞれに標識した二種類のタンパク質を等量ずつ混合して行った。泳動後、蛍光イメージアナライザーを用いて使用した2種類の蛍光色素のそれぞれの蛍光波長でゲルイメージを異なる色で取得した。これらのゲルイメージを重ね合わせることで発現量の変化を確認した。

蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動によってバニリン添加時に誘導される、或いは、抑制されるタンパク質のスポットを切り出し、トリプシンによるゲル内消化を行った。得られたペプチドを脱塩、乾燥し、マトリックスと混合して MALDI-TO-MS による測定を行った。得られた測定データについては、*C. subvermispora* のタンパク質のデータベースを用いて Mascot 解析を行い、タンパク質の同定を行った(Peptide Mass Fingerprinting)。(4) 担子菌の固定化のために、固定化担体としてポリアクリルアミドを用いた。アクリルアミドモノマーと *N*, *N*'-メチレンビスアクリルアミドの混合溶液にシースが被覆した *C. subvermispora* やシースを除去した *C. subvermispora* を入れ、重合させた。その後、細かく砕いてカラムに充填し、簡易型のバイオリアクターを構築した。

4. 研究成果

(1) 約 50 種類の担子菌株を用いてグルコース入りの無機塩合成培地で一定期間培養した際にシースを産生するか調べた。なお、菌体外多糖の主成分は β -1,3-グルカンであることが良く知られていることから(Gutierrez et al., *Sci. Total Environ.*, **167**, 315-328, 1995), グルコースを炭素源とすれば、シースを産生。さらに、その産生量の増加が期待されると予想した。しかしながら、菌体の生育が悪く、それに付随してシースの産生が確認できない、或いは、確認しにくい株が認められた。一方で、菌体の生育とシースの産生量が必ずしもパラレルな関係ではないと判断できる株も存在した。今回用いた無機塩合成培地の成分の他に担子菌の生育やシースの産生を

増加させる(必須)成分が含まれていなかったことが原因の一つかもしれない。

安全性という観点から食用キノコも今回のシースの産生試験に利用したところ、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) やシイタケ (*Lentinus edodes*) 等はシースの産生が確認できた。しかしながら、液体培地へ接種する前の段階、すなわち、寒天プレート一面に菌糸体が生えるまでに 2 週間から 1 ヶ月以上かかる株があった。そのような菌株については、その菌株に最適な培地の検討が必要なのかもしれないが、本研究課題の目的とは異なることから、シースを産生する担子菌の候補株として不適とし、除外した。

一方、担子菌株の中でも、いわゆる木材腐朽菌が今回用いた培地においては生育が早く、その分シースの産生を比較的早く確認できた。なお、用いたグルコース入りの無機塩合成培地においては、静置培養でシースの産生を確認することができた。なお、気中菌糸が多く認められる株においては、シースの産生量が比較的少ないと判断し、振とう培養を行ったが、逆に振とう培養ではシースの産生はほとんど認められなかった。

以上の一連の培養試験及びシース産生試験の結果、生育が早く、シースの産生も早く確認できる候補株として木材腐朽菌を選択することにした。

(2) 上記の結果を踏まえ、シースの高産生条件を検討するために、約 50 種類の担子菌株の中から木材腐朽菌(リグニン分解性担子菌) *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 34541 株, *Ceriporiopsis subvermispora* ATCC 90467 株及び *Trametes versicolor* RC3 株を用いた。なお、RC3 株については、タイ北部で単離された株である(Chawachart et al., *Fungal Divers.*, **15**, 23-32, 2004)。これらの 3 菌株は、木材腐朽菌の一種である白色腐朽菌であることから、木材成分の一つであるリグニンを分解することができる。従って、グルコースを炭素源とした無機塩合成培地に木片、木粉、リグニン由来の芳香族化合物をそれぞれ添加し、生育及びシース産生量の変化を調べた。その結果、木片を入れた培地においては、*C. subvermispora* ATCC 90467 株及び *T. versicolor* RC3 株でシースの高産生が認められた。シースは木片の周辺を覆うような形で分厚く付着していた。また、これら 3 菌株の内、最も生育が早く、白色腐朽菌のモデル種である *P. chrysosporium* ATCC 34541 株では、シースの高産生は認められなかった。さらに、リグニン由来の芳香族化合物の一つであるバニリンを添加した場合、*C. subvermispora* ATCC 90467 株においては、木片を添加した場合と同様に大量のシースの産生が認められた。バニリンの添加については、*P. chrysosporium* の場合、生育阻害が報告されている(Shimizu, et al., *Proteomics*, **5**, 3919-3931, 2005)。また、*C. subvermispora* においても様々なリグニン由来の芳香族化合

物に対して生育阻害が報告されている (Sethuraman *et al.*, *Can. J. Microbiol.*, **44**, 872-885, 1998). この報告では, バニリン 1 mM でも生育の若干の阻害があるとされていたが, 今回用いたグルコースを炭素源とした無機塩合成培地においては, バニリンを 1~2 mM 添加しても生育の阻害は認められなかった. 逆に, バニリンを添加した場合の方が *C. subvermispora* の生育が無添加の場合より菌体量が 3 倍程度多いという結果が得られた.

今回, 木片やバニリン等のリグニン由来の芳香族化合物を添加することにより, シースの高産生が認められることが分かったが, 木片の場合, シース (正確には, シースと菌体の複合体, 見た目はスライム状) と木片を分離する必要があった. また, シースの高産生が認められた *C. subvermispora* ATCC 90467 株と *T. versicolor* RC3 株を比較した場合, ATCC 90467 株の方が 28°C の温和な条件下で生育が RC3 株 (熱帯産の株のため最適培養温度は 37°C 以上) よりも良好であった. さらに, 最近, *C. subvermispora* のシースの構造解析についての報告があり, 高度に枝分かれしたグルカンで, 水分だけではなく, 様々な二次代謝物等の保持に役立つ構造をしていることが強く示唆されたことから (Suzuki *et al.*, *Int. J. Bio. Macromol.*, **95**, 1210-1215, 2017), 以後, *C. subvermispora* ATCC 90467 株を用いて研究を遂行することが最適と判断した.

(3) 担子菌に限らず菌体外に多糖 (シース) を分泌する生物は多く知られている. しかしながら, その内, 特に担子菌のシース生合成系はほとんど知られていない. また, 担子菌のシース産生時にどのような遺伝子・酵素が発現しているかの知見もほとんどない. これらの知見は, 担子菌の糖代謝やシースの生合成系の分子レベルでの解明だけでなく, 今後のシース高産生菌の育種のために有用であると考えられる. そこで, 蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動法を用いてバニリン添加時 (シース高産生条件) と非添加時 (シース低産生条件) のタンパク質発現プロファイルの比較を試みた.

一般的な微生物のタンパク質抽出法や二次元電気泳動法のプロトコールでは, シースを高産生する *C. subvermispora* のタンパク質は一切抽出・解析できなかった. 理由としては, 前述したように, シースと菌体からなるスライムからシースのみを除去し, 菌体からタンパク質を抽出する方法が確立されていないためである. また, *C. subvermispora* の菌体の破碎のしにくさや二次元電気泳動の妨害物質となる代謝物のコンタミネーションが大きく影響していると考えられた. さらに, 抽出したタンパク質が可溶化しにくいという難点もあった. しかしながら, 本研究期間中にすべて克服でき (「3. 研究の方法」参照), シースを高産生

する *C. subvermispora* の細胞内タンパク質の抽出・調製, 二次元電気泳動での分離に成功した (論文投稿中).

蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動を実施し, 良好なタンパク質プロファイルを取得することができた. そのプロファイルから発現量が多いタンパク質のスポットやバニリン添加 (シース高産生条件) で発現が誘導されている, 或いは, 抑制されているスポットに対して優先的に Peptide Mass Fingerprinting を行った. その結果, 約 140 個のタンパク質を同定できた. その多くは, エネルギー生産・変換や糖代謝に関わるタンパク質 (酵素) であった. 具体的には, バニリン等の芳香族化合物分解系, 解糖系, TCA 回路, ペントースリン酸回路等であった. また, 菌体外多糖の主成分の生合成に関わると推定される酵素の発現誘導及び菌体外多糖の分解に関与すると推定される酵素の発現抑制が示唆される結果も得られた. さらに, シースの生合成との関連は不明であるが, アミノ酸や脂質の代謝, 細胞内プロセスやシグナル伝達等に関与するタンパク質 (酵素) も同定された (論文執筆中).

現段階では, *C. subvermispora* の遺伝子破壊や形質転換技術は確立していないために, シースを高産生する *C. subvermispora* の育種はできない. しかしながら, CRISPR/Cas システムのようなゲノム編集技術が今後, *C. subvermispora* においても利用できる可能性がある. 従って, シース高産生の鍵となる酵素遺伝子の高発現株や制御系遺伝子の破壊株等の構築が可能になることも十分考えられる. 従って, 本研究課題で実施した蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動をベースとしたプロテオミクスで得られる知見は, 今後有用と考えられる.

(4) 微生物が重金属イオン等を吸着する現象はバイオソープションとして知られている. また, 担子菌においては, シース等の菌体外多糖に重金属との親和性があることが知られている (Baldrian, *Enzyme Microb. Technol.*, **32**, 78-91, 2003). さらに, *C. subvermispora* 等の白色腐朽菌は, 他の担子菌と比較して木材腐朽時に代謝物として金属をキレートする役割を持つシュウ酸等の有機酸を大量に産生する (Urzua *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 68-73, 1998). 以上より, *C. subvermispora* においてバニリン添加時に大量に産生するシースやシース中に保持されている代謝物によって放射性同位元素や重金属を吸着できる可能性が考えられる.

そこで, ウランを蓄積する担子菌の報告 (Nakajima and Sakaguchi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 574-578, 1993) を参考にしてシースを高産生する *C. subvermispora* の固定化を最初に試みた. 固定化担体としてポリアクリルアミドを用いた. しかしながら, 菌体やシースがポリアクリルアミドに固定化しているのかどうかの判断ができず, 重金属

等の吸着の検討ができなかった。

次に、その原因を探る一環として Nakajima and Sakaguchi が用いた最もウランを蓄積する担子菌株 *Tricholoma conglobatum* AHU 9394 株を用いて固定化実験の再現を行うことにしたが、分譲機関より分譲できないという通達を受けたため実験が再現できなかった。なお、代替株として AHU 9394 株と同じ属であるマツタケ菌 *Tricholoma matsutake* NBRC 6933 株, *T. matsutake* NBRC 30773 株, *T. matsutake* NBRC 30605 株を用いることを考えたが、これら 3 菌株とも非常に生育が悪いが、生育するのに長時間かかったために固定化実験の再現ができなかった。

一方、バニリンを添加したグルコースを炭素源とした無機塩合成培地において、*C. subvermispora* は、大量にシースを産生するだけでなく、その培養液の pH が 3 以下となることが分かった。シュウ酸等の有機酸の分泌によるものと考えられるが、今後、固定化方法が確立し、吸着した重金属等の脱着用の酸として利用できる可能性が示唆された。

今後の課題としては、放射性同位元素や重金属を吸着・蓄積させる条件を最適化するために *C. subvermispora* や大量に産生するシースの固定化方法、特に固定化担体の検討が重要であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

渡邊 崇人 . 選択的白色腐朽菌と *Pseudomonas* 属細菌によるリグニン分解機構の解明 -木質バイオマスの利活用に向けて- . 2014 年九州大学農学部発酵化学研究室セミナー, 2014 年 11 月 22 日, 九州大学 (福岡県・福岡市)

渡邊 崇人, 吉岡康一, 李俊錫, 西村裕志, 渡辺隆司: バニリン添加時の選択的白色腐朽菌のプロテオーム解析. 日本農芸化学会 2015 年度 (平成 27 年度) 大会, 2015 年 3 月 28 日, 岡山大学 (岡山県・岡山市)

渡邊 崇人, 吉岡康一, 西村裕志, 渡辺隆司: バニリン添加時の選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* の菌体内タンパク質の発現解析. 日本農芸化学会 2016 年度 (平成 28 年度) 大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

渡邊 崇人, 藤原秀彦. *Rhodococcus wratislaviensis* T301 株のリグニン由来芳香族化合物代謝に関与する遺伝子の探索と単離. 第 6 回 KF ゲノムセミナー, 2016 年 12 月 16 日, 九州大学 (福岡県・福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 崇人 (WATANABE, Takahito)
京都大学・生存圏研究所・助教