

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15074

研究課題名(和文)木質バイオマスから水素産生可能な白色腐朽菌株の開発

研究課題名(英文)Development of white-rot fungi which can produce hydrogen from woody biomass

研究代表者

平井 浩文(Hirai, Hirofumi)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：70322138

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)：水素を産生する白色腐朽菌として選抜されたTrametes versicolor K-41株の水素産生特性を調査したところ、本菌は好氣的に水素を産生していることが判明した。そこで、本菌の水素産生の鍵酵素と思われるヒドロゲナーゼ遺伝子を高発現する株を作出した結果、野生株の1.5倍の水素産生を示す株の取得に成功した。さらに本菌はシュウ酸-ギ酸を介した経路により水素を産生していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Trametes versicolor K-41, which was selected as the hydrogen-producing white-rot fungus, aerobically produced hydrogen in the woody medium. Hydrogenase (HYD) is involved in the hydrogen production, and the molecular breeding of HYD gene-overexpressing transformants was carried out. We obtained the transformant which showed 1.5-fold higher hydrogen-producing ability than wild type. Moreover, the strain K-41 produces hydrogen via the oxalate-formate pathway.

研究分野：環境生化学

キーワード：水素発酵 白色腐朽菌 好気 木質バイオマス

### 1. 研究開始当初の背景

世界的に石油・天然ガスに代わるクリーンな代替エネルギーとして水素が脚光を浴びている。水素の製造方法として、天然ガス、石油、石炭といった化石燃料から水素を取り出す方法が採られているが、本法は枯渇していく化石燃料を使い、製造過程では二酸化炭素も排出することから、資源・環境問題とは逆行する方法である。再生可能なバイオマスから、さらに生物学的手法による水素生産が可能となれば、水素生産技術のプレイクスルーとなる。

研究代表者はこれまでに、全ゲノム解析が行われた木材腐朽菌の大多数が水素発酵の鍵酵素であるヒドロゲナーゼ (HYD) 遺伝子を有していることを見出し、半嫌気条件下で培養すると、いくつかの白色腐朽菌で本遺伝子が発現するとともに、低濃度 (1.2 μmol/L) ではあるが水素を産生することを発見した。

### 2. 研究の目的

木質バイオマスの約5割を占めるセルロースを炭素源 (電子源) として水素を生産する場合、リグニンの特異的除去及びセルロースのグルコースへ的高速分解技術、HYD 遺伝子高発現による水素発酵技術、この2つの技術が統合的に機能しないと、汎用性の高い技術開発は困難である。そこで本研究課題では『水素産生白色腐朽菌の分子育種による木質バイオマスからの水素生産』を目指し、各種検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試菌

供試菌として、自然界より水素産生白色腐朽菌として選抜された *Trametes versicolor* K-41 株を使用した。

#### (2) 水素産生特性の解析

供試菌をスギ木粉培地 (含水率 85%) を含む 100 mL 三角フラスコに接種し、30 °C で5日間静置培養した。前培養後、密栓し、所定期間培養を行った。培養後、ヘッドスペース中の水素濃度を GC-TCD にて測定した。またガス置換器によりヘッドスペース中の酸素濃度を変化させて検討を行った。

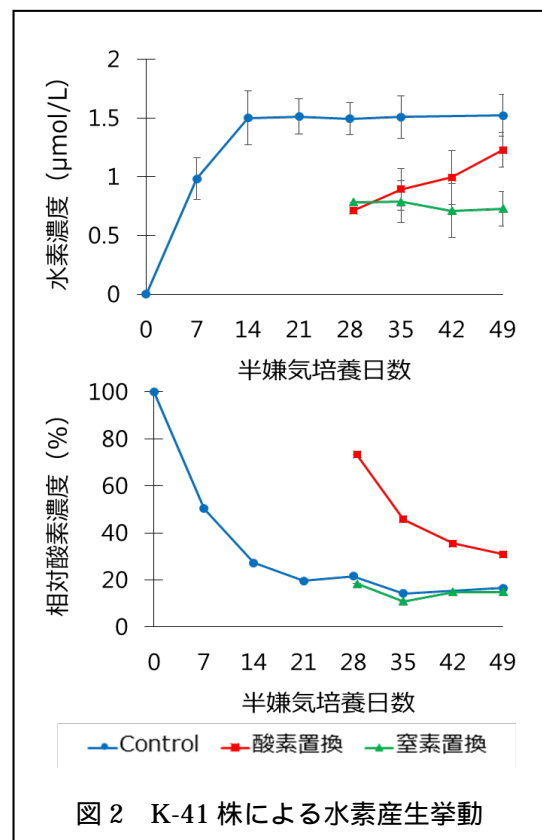
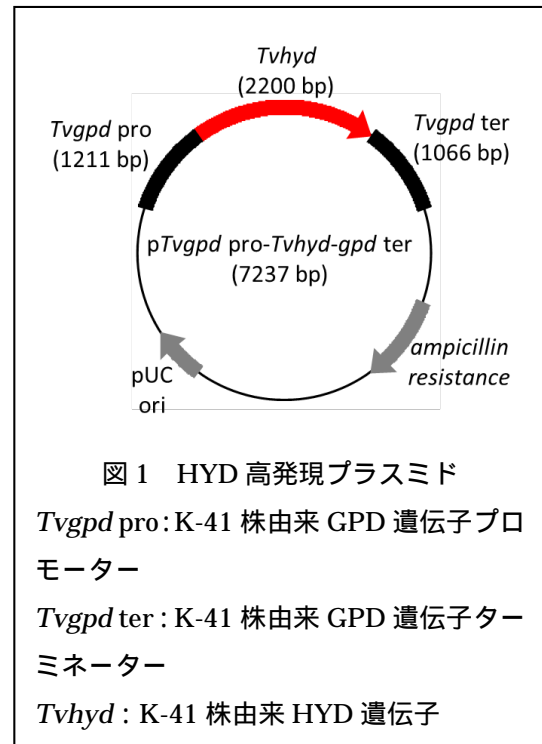
さらに、発酵液体培地 (1L 当たり、グルコース 20 g、酵母抽出物 10 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g、pH 4.5) に CaCO<sub>3</sub>、シュウ酸、ギ酸を添加し、その時の水素産生量も測定した。その際、菌体より無細胞抽出液を調製し、シュウ酸デカルボキシラーゼ (OXDC) 及びギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH) 活性を測定するとともに、菌体より RNA を抽出し、RT-PCR により各種遺伝子の発現量を確認し、水素産生との関係について考察した。

#### (3) HYD 高発現株の作出及び水素産生特性

K-41 株由来 HYD 遺伝子、グリセルアルデ

ヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPD) 遺伝子プロモーター及びターミネーター遺伝子を取得し、図1に示すようなプラスミドを構築した。K-41 株のプロトプラストを調製し、これに上記プラスミドを形質転換した。得られた復帰株をゲノム PCR に供し、目的遺伝子が導入された株の選抜を行った。

遺伝子導入株については、スギ木粉培地に接種し、1週間好気培養後に密栓し、2週間



半嫌気培養を行い、ヘッドスペース中の水素濃度を GC-TCD にて測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) K-41 株の水素産生特性

K-41 株の水素産生特性を調査すべく、まずは水素産生の経時変化を追跡した。その結果、培養 14 日まで水素濃度は増加し、その後水素産生が停止した(図 2)。その時の酸素相対濃度は約 20%まで低下していたことから、培養 28 日目にヘッドスペースを酸素あるいは窒素で置換したところ、酸素置換した系では再度水素産生が開始した。なお、窒素置換した系では新たな水素産生は認められなかった。これらの結果より、K-41 株は好氣的に水素を産生している可能性が示唆されたため、培養系ヘッドスペース中の酸素濃度を変化させて培養し、その時の水素産生量を測定した。その結果、培養開始時の酸素濃度が 30%の時、最も水素を産生したが、100%においても水素産生が認められ、逆に 1%の時は水素産生が認められなかった(図 3)。これらの培養系における HYD 遺伝子発現を確認したところ、どの酸素濃度においても HYD

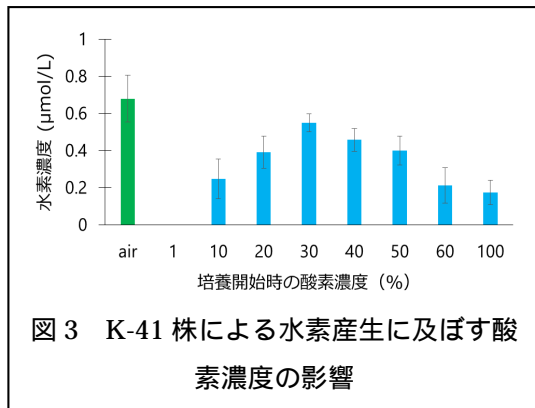


図 3 K-41 株による水素産生に及ぼす酸素濃度の影響

遺伝子の発現は認められた(図 4)。以上の結果より、K-41 株は好氣的に、木質バイオマスを原料として水素を産生可能であることが判明した。

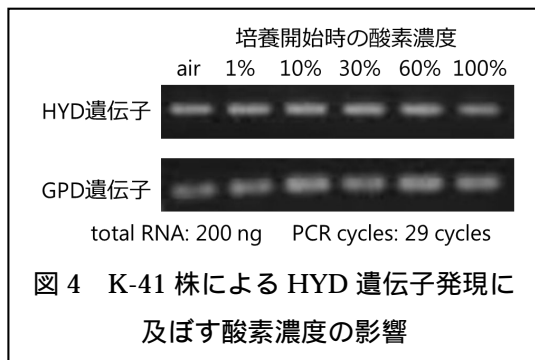


図 4 K-41 株による HYD 遺伝子発現に及ぼす酸素濃度の影響

##### (2) HYD 遺伝子高発現株の水素産生能

K-41 株による水素産生に HYD が関与していると予想し、HYD 高発現株の作出を行った。図 1 に示すプラスミドを K-41 株に形質転換した結果、12 株の遺伝子導入株 (H 株) の取得に成功した。これらの株をスギ木粉培

地にて培養した結果、7 株で野生株より高い水素産生能が認められ、特に H10 株では野生株より約 1.5 倍高い水素産生能が確認された(図 5)。よって、K-41 株による水素産生に

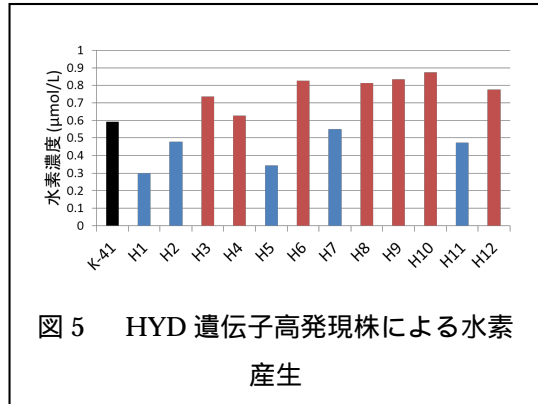


図 5 HYD 遺伝子高発現株による水素産生

HYD が関与しており、HYD 遺伝子を高発現させることで水素産生能が改善可能であることが示唆された。しかしながらその効果は限定的であったため、K-41 株の水素産生経路について解析を行うこととした。

##### (3) K-41 株の水素産生経路

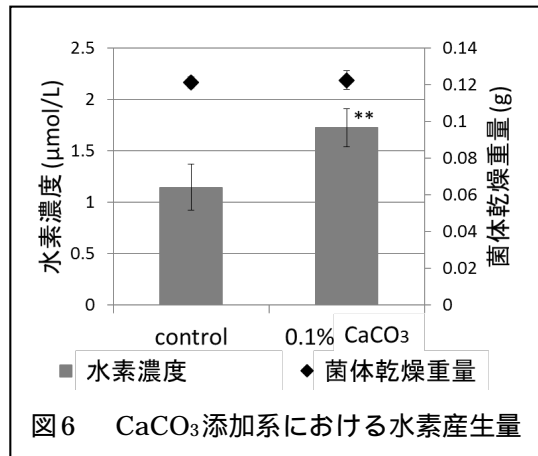


図 6 CaCO<sub>3</sub> 添加系における水素産生量

嫌気微生物による水素産生においてギ酸経路が存在する。一方、白色腐朽菌の多くは木材腐朽時にシュウ酸を産生し、このシュウ酸は OXDC によりギ酸へと変換され、このギ酸の代謝に FDH が関与していることは知られている。そこで、K-41 株における水素産生経路として、シュウ酸及びギ酸を介した経路が存在すると仮定し、検討を行った。

木材腐朽菌培養系に CaCO<sub>3</sub> を添加するとシュウ酸の産生量が増加するという報告があることから、培養系

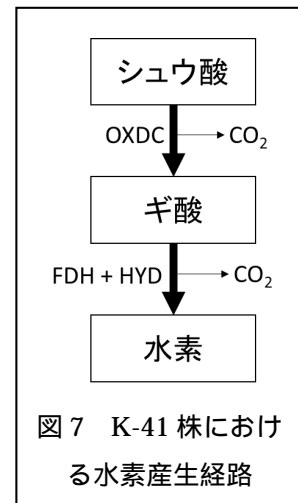


図 7 K-41 株における水素産生経路

に CaCO<sub>3</sub> を添加し、その時のシュウ酸産生量と水素産生量を調査した結果、CaCO<sub>3</sub> の添加によりシュウ酸及びギ酸産生量の増加が確認された。これらの系の水素産生量を測定したところ、水素産生量の増加も確認された（図 6）。

この系における OXDC 及び FDH 活性を測定したところ、両活性共に CaCO<sub>3</sub> 添加系において活性増加が認められた。さらに、RT-PCR により OXDC 及び FDH 遺伝子の転写量も比較したところ、CaCO<sub>3</sub> 添加系において両遺伝子ともに転写量の増加が認められた。

以上の結果より、K-41 株は、シュウ酸・ギ酸を介した水素産生経路を有することが示唆された（図 7）。

## 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 5 件）

高橋沙綾、森智夫、河岸洋和、平井浩文、白色腐朽菌による木質バイオマスからの好気的水素産生に関する研究、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

曾我亜由美、高橋沙綾、森智夫、河岸洋和、平井浩文、白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株による水素産生能向上に関する研究、第 69 回日本生物工学会大会、2017 年

曾我亜由美、高橋沙綾、有本美沙、森智夫、河岸洋和、平井浩文、白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株による木質バイオマスからの水素産生、第 68 回日本生物工学会大会、2016 年

平井浩文、地球環境問題解決に向けた担子菌の利用研究、日本きのこ学会第 20 回大会 公開シンポジウム（招待講演）2016 年

高橋沙綾、森智夫、河岸洋和、平井浩文、白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株による木質バイオマスからの好気的水素産生特性、第 67 回日本木材学会大会、2016 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biochem/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 浩文 (HIRAI, Hirofumi)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：70322138

(2) 研究分担者

森 智夫 (MORI, Toshio)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：80536516