

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02311

研究課題名(和文) 新規白色腐朽菌の好気的水素産生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Studies on aerobic hydrogen production by novel white-rot fungi

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：好気的に水素を産生する白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41株の水素産生機構の解明を目指し検討を行った。K-41株のシュウ酸代謝系及び水素産生系は共役しており、TCAサイクルから生じるシュウ酸がシュウ酸デカルボキシラーゼによりギ酸へと変換され、ギ酸はギ酸デヒドロゲナーゼにより二酸化炭素になる際、電子をHYDに伝達し、H⁺を水素へと還元する、といった水素産生経路の存在を提案するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41株は好気的に水素を産生可能であり、今回の検討で、その水素産生経路の特定に成功した。よって、本経路を遺伝子工学的に強化することで、木材を原料とした大気存在下における水素産生が可能となる。さらに、これまで知られている水素産生微生物は嫌気条件下でしか使用出来なかったため、本菌が利用可能となれば、シンプルな培養系で安価に水素を産生可能となる。

研究成果の概要(英文)：Oxalate is involved in the aerobic production of hydrogen by white-rot fungus *Trametes versicolor* K-41, and oxalate is transformed to formate by oxalate decarboxylase, and then formate is transformed to carbon dioxide and electron. This electron and proton are transformed to hydrogen by hydrogenase. Thus, the production of hydrogen is related to the metabolism of oxalate in K-41.

研究分野：環境微生物学

キーワード：水素発酵 白色腐朽菌 木材腐朽 エネルギー獲得戦略

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水素は二酸化炭素を排出しない再生エネルギーとして期待されており、近年、新しい水素生産法として生物を利用する研究が盛んに行われている。*Enterobacter* 属や *Clostridium* 属を代表とする水素産生菌は嫌氣的に水素を産生しており、本過程では解糖系で生じるピルビン酸を乳酸に変換している。これは嫌気条件下で解糖を再開するために NAD⁺が必要であり、ピルビン酸を乳酸に還元することで電子を放出し、必要な NAD⁺などを補っている。この様に嫌気性微生物は独自の生存戦略を有しており、嫌気といった特殊環境で巧みにその代謝系を稼働させている。

シイタケ、ヒラタケを代表とする白色腐朽菌は、木材中の細胞壁を固めバリアーとなるリグニンを高度に分解可能な唯一の微生物であることから、生物的脱リグニンツールとして期待されている。研究代表者はこれまでに、「木質バイオマスの酵素糖化前処理用 超高活性リグニン分解菌の分子育種」について研究を進め、切れ味鋭いリグニン除去技術として実用化に資するリグニン分解菌の育種に成功している。

研究代表者は、木粉と水のみでの培地で好氣的に水素を産生する白色腐朽菌 (*Trametes versicolor* K-41 株) を世界で初めて発見し、遺伝子発現により水素産生の鍵酵素がヒドロゲナーゼ (HYD) であることを特定した。しかしながら、木粉を基質とした白色腐朽菌における好氣的水素産生経路の全貌、及び『なぜ木粉から好氣的に水素を産生するのか? その生存戦略』は未解明なままである。

2. 研究の目的

白色腐朽菌は菌体外にリグニン分解酵素やセルラーゼ等を分泌するとともに、各種ラジカル種を発生させることで木質細胞壁の難分解性リグニンとセルロースを巧みに分解・利用して資化する仕組みを持っている。本研究は、研究代表者が見出した好氣的水素産生白色腐朽菌 K-41 株を活用し、本菌が木粉からリグニンやセルロースの酵素分解を経て、どの様にして水素を産生しているのか、細胞外と細胞内を通して水素の産生・制御メカニズムを解明することを目的としている。本研究の特色は次の3点が挙げられる。

微生物生存戦略の新たな提案

嫌気性微生物の水素発酵はエネルギー獲得の生存戦略である。ここで提案する研究が成功すれば、図2に示すように、産生される水素が、細胞外で行われるリグニン及びセルロース分解の制御因子(細胞にダメージを与えるラジカル種の制御)となっているのか?あるいは、細胞内における ATP 産生(エネルギー獲得)の制御因子となっているのか?といった新規な機能が解明される。

微生物水素発酵研究の新たな切り口

これまでに知られている嫌氣的水素発酵に対し、好氣的水素産生の制御メカニズムを分子レベルで解明することで、新しい視点での微生物の機能を理解することが可能となり、普遍性の高い点で学術研究全般に与える波及効果は極めて大きい。

バイオマス利用のツールとしての期待

微生物による木質バイオマスを原料としたエネルギー生産は、世界が目指すべき低炭素社会を実現し、資源の乏しい我が国が厳しい国際競争の中で持続的に発展していくためにも必要なテクノロジーである。本研究の遂行は、『白色腐朽菌』をバイオマス利用ツールとする新たなテクノロジーの創出へとつながるものである。

これまでの研究成果を基に、未解明である白色腐朽菌の好氣的水素産生メカニズムの生化学的研究を完成させ、白色腐朽菌を利用した新たなエネルギー生産に展開するための基礎となる研究を実行し、『木質バイオマス利用のツールとしての白色腐朽菌の価値の向上』へと繋げる。

3. 研究の方法

(1) 真菌 HYD 様タンパク質の分子系統解析

新規 HYD 様遺伝子が、既知の[FeFe]-HYD や Nar1/NARF のいずれのグループに属するのか系統解析を行った。

(2) K-41 株による水素産生経路に推定

発酵液体培地 10 ml (glucose 20 g/L, yeast extract 10 g/L, KH₂PO₄ 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L) あるいはスギ木粉培地 (脱脂スギ木粉 0.5 g, 蒸留水 1.25 ml) を含む培養系に K-41 株を接種し、所定期間培養を行った。培養後、各濃度の CaCO₃、シュウ酸、もしくはギ酸を添加し密栓後、さらに培養を行った。培養後、ヘッドスペースを GC-TCD 分析に供し、水素産生量を測定した。

また、培養系における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)活性を測定すべく、培養菌体より無細胞抽出液を調製し、酵素活性測定に供した。さらに、FDH 及び HYD 遺伝子発現量を測定すべく、培養菌体より total RNA を調製後、RT-PCR に供した。

(3) FDH の大腸菌による異種発現

FDH の酸素耐性を調査すべく、大腸菌による rFDH の獲得を行った。FDH cDNA を発現プ

ラスミドに導入後、これを大腸菌に形質転換し、本大腸菌を大量培養した。大腸菌無細胞抽出液を調製後、これを Ni アフィニティークロマトグラフィーに供し、rFDH を獲得した。これを大気存在下で酵素活性測定に供した。

(4) K-41 株由来 HYD 精製の試み

今回、K-41 株に His タグあるいは GST タグ付き HYD を産生させるべく、rHYD 発現プラスミドを構築し、これを K-41 株に導入した。遺伝子導入株を選抜後、qRT-PCR により目的遺伝子高発現株を選抜し、本株を発酵液体培地にて培養後菌体を回収し、無細胞抽出液を調製した。これをアフィニティークロマトグラフィーに供し、目的タンパク質の溶出を確認するとともに、SDS-PAGE に供した。

4. 研究成果

(1) 真菌 HYD 様タンパク質の分子系統解析

種々の真菌由来 [FeFe]-HYD 様タンパク質をアミノ酸配列翻訳産物の Blast 検索に供したところ、nuclear architecture related1 (Nar1) タンパク質が 60% 以上の相同性を示した。その一方で、*Clamydomonas reinhardtii* といった代表的な [FeFe]-HYD とは 30% 程度の相同性しか示さなかった。そこで、新規 HYD 様遺伝子が、既知の [FeFe]-HYD と Nar1/NARF のいずれのグループに属するのか系統解析を行った。その結果、真菌由来 HYD 様タンパク質は、Nar1/NARF クラスタから更に分岐した単一のクラスタを形成しており、いずれのグループにも属さないことが示唆された (Fig. 1)。真菌由来 HYD 様タンパク質 (K-41 株由来 HYD (TvHYD)、*Phanerochaete sordida* YK-624 株由来 HYD (PsHYD)) は、共に [FeFe]-HYD の活性中心である [2Fe] 及び cubane [4Fe4S] を保持するために必要なシステインで形成される H-cluster を保存していた (Fig. 2)。

(2) K-41 株による水素産生経路に推定

これまでに、培地に CaCO₃ を添加するとシュウ酸産生量が増加することが報告されている。そこで、K-41 株培養系に CaCO₃ を添加し、実際にシュウ酸産生量が増加し、その際の水素産生量がどのようになるか検討を行った。その結果、CaCO₃ の添加によりシュウ酸産生量及び水素産生量ともに増加した (Fig. 3)。また、本培養系におけるギ酸量も大きく増加しており、シュウ酸がギ酸に変換されていることが示唆された。つまり、K-41 株においてシュウ酸代謝系と水素産生系がリンクしてい

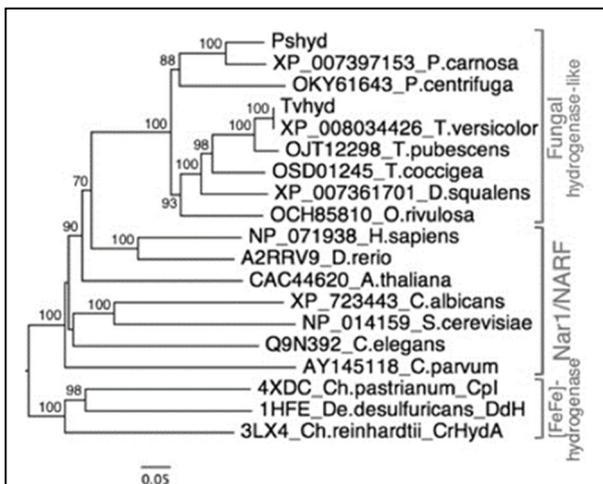


Fig. 1 真菌 HYD 様タンパク質、[FeFe]-HYD、Nar1/NARF の分子系統解析

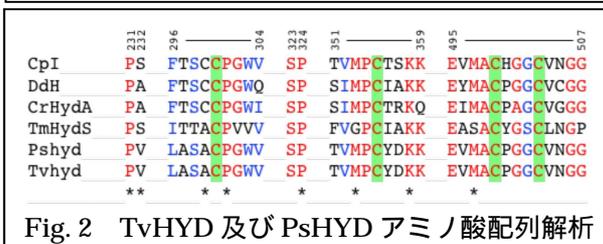


Fig. 2 TvHYD 及び PsHYD アミノ酸配列解析

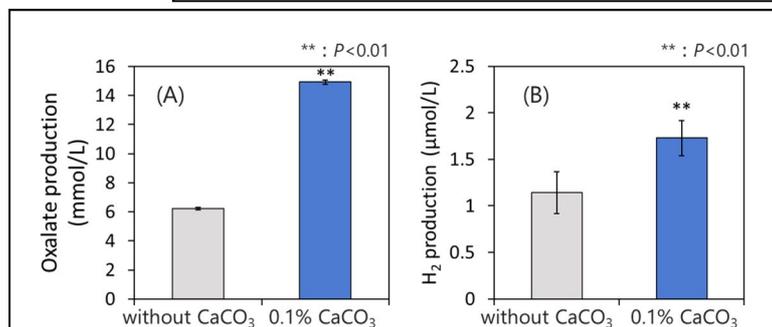


Fig. 3 CaCO₃ 添加培地における K-41 株によるシュウ酸産生量(A)及び水素産生量(B)

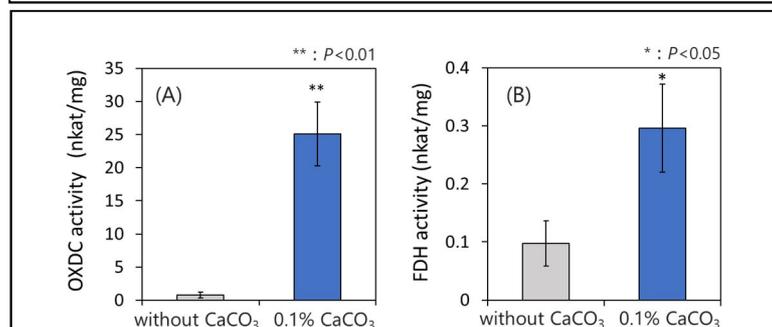


Fig. 4 CaCO₃ 添加培地において生育した K-41 株における OXDC(A)及び FDH(B)活性

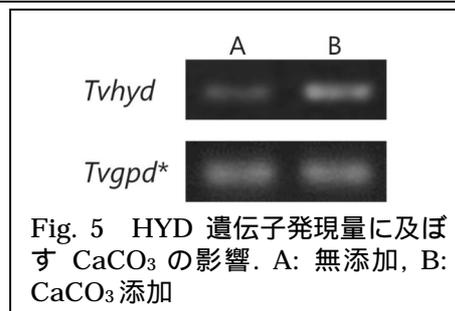


Fig. 5 HYD 遺伝子発現量に及ぼす CaCO₃ の影響. A: 無添加, B: CaCO₃ 添加

る可能性が極めて高いことが示された。そこで、シュウ酸代謝系に関連する酵素(シュウ酸デカルボキシラーゼ(OXDC)、ギ酸デヒドロゲナーゼ(FDH))の活性を測定したところ、CaCO₃添加培地においてOXDC及びFDH活性ともに大きく増加していることが判明した(Fig. 4)。さらに、HYD遺伝子の発現量を半定量RT-PCRで解析した結果、CaCO₃添加培地においてHYD遺伝子発現量の増加が認められた(Fig. 5)。

本仮説をさらに証明すべく、培地にシュウ酸もしくはギ酸を添加し、その際の水素産生量を調査した結果、シュウ酸やギ酸の添加により、水素産生量が増加することが判明した(Fig. 6)。

以上の結果より、K-41株のシュウ酸代謝系及び水素産生系は共役しており、Fig. 7に示すように、TCAサイクルから生じるシュウ酸がOXDCによりギ酸へと変換され、ギ酸はFDHにより二酸化炭素になる際、電子をHYDに伝達し、H⁺を水素へと還元する、といった水素産生経路の存在を提案するに至った。

(3) K-41株による水素産生が好氣的である理由の解明

一般的な微生物による水素産生は嫌氣的であり、これはHYDが酸素耐性を有していないことに起因している。K-41株は好氣的に水素を産生可能であるが、これが水素産生経路における酵素系が酸素耐性を有しているためである、という仮説の元、rFDH及びrHYDの獲得を試み、これらの酸素感受性を調査した。FDHについては大腸菌にて異種発現させ、活性型rFDHの獲得に成功した。本酵素は酸素の有無に関わらず活性を有していた。つまり、FDHは酸素耐性を有していることが証明された。一方、HYDの場合、活性中心が嫌氣性微生物と異なる可能性があり、大腸菌における異種発現ではなく、K-41株によるhomologous発現を試みた。まずはC末端いHisタグを付けたHYDの獲得を試みたが、NiアフィニティーカラムクロマトグラフィーにおいてrHYDの存在を確認することが出来なかった。これはHisタグがタンパク質内部に巻き込まれたためNiアフィニティーカラムに吸着できなかったと予想した。そこで、N末端にGSTタグを付けたHYDの獲得を試みたが、やはりアフィニティーカラムクロマトグラフィーにおいてrHYDの存在を確認することが出来なかった。遺伝子導入株において、それぞれを遺伝子の発現は確認しており、転写までは正常に機能していることは判明している。今回の結果は、翻訳が正常に行われなかったか、翻訳は行われたが翻訳後すぐに分解させてしまったか、あるいは、rHYDが膜酵素であり、抽出が出来ていない可能性が考えられた。この点については今後の検討課題である。

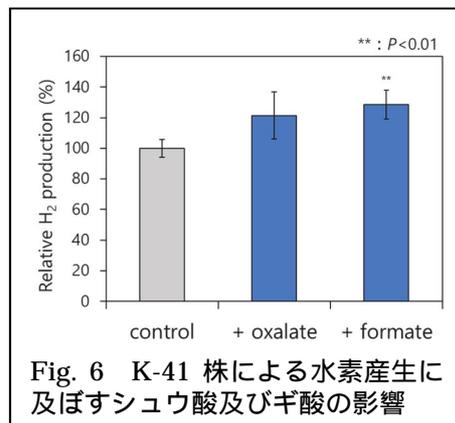


Fig. 6 K-41株による水素産生に及ぼすシュウ酸及びギ酸の影響

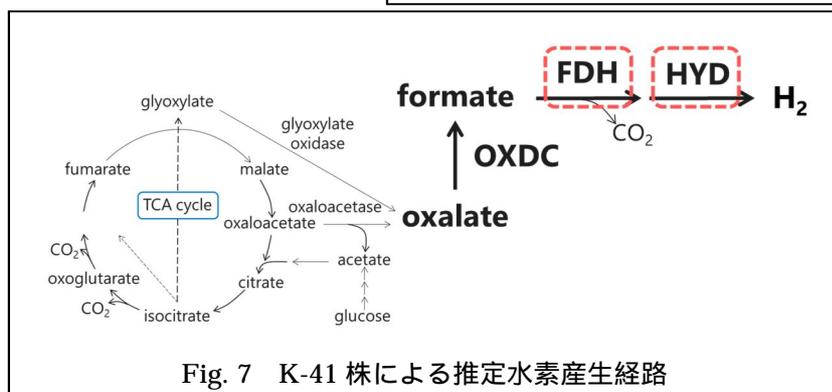


Fig. 7 K-41株による推定水素産生経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岸川凜太郎、森智夫、河岸洋和、平井浩文
2. 発表標題 白色腐朽菌の好気的水素産生に関するヒドロゲナーゼの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋沙綾、曾我亜由美、森智夫、河岸洋和、平井浩文
2. 発表標題 白色腐朽菌Trametes versicolor K-41株による好気的水素産生経路の解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋沙綾、森智夫、河岸洋和、平井浩文
2. 発表標題 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生化学的研究
3. 学会等名 第63回リグニン討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 智大 (Suzuki Tomohiro) (10649601)	宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授 (12201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森 智夫 (Mori Toshio) (80536516)	静岡大学・農学部・准教授 (13801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関