

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19229

研究課題名(和文)新規白色腐朽菌によるメタン・ブタノール産生経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of methane- and butanol-production pathways 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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：高活性リグニン分解菌ノックアウトライブラリーよりメタンもしくはブタノール高産生株の選抜を行った。今回はブタノール高産生株は取得できなかったが、メタン産生株(M株)の獲得に成功した。M株ゲノムにおけるノックアウト部位を特定するため、MiSeqを用いてM株の全ゲノム解析を実施した。しかしながらノックアウト部位の特定には至らなかった。これは、M株は多核菌糸を形成しており、ある特定の核にのみノックアウトが行われていなかったためと断定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

元々メタン産生能を有さない白色腐朽担子菌においても、突然変異処理を施すことにより、メタン産生能を示すことが明らかとなった。これは、木質バイオマスから本菌を用いることでメタンが産生可能となることを示しており、メタン生合成経路を解明し、関連各種遺伝子を高発現させることで、ワンポットで木材よりメタンを産生可能な菌の育種が可能となる。このような菌の作出は、低炭素社会の実現の一翼を担うものである。

研究成果の概要(英文)：We screened each mutant which produced methane or butanol, from hyper lignin degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. Although no butanol-producing mutant was detected, methane-producing mutant was isolated. In order to analyze the mutation site of the genome DNA, whole genome sequence was carried out by MiSeq. We could not determine the mutation site since the cell of *P. sordida* YK-624 was coenocyte and the mutation was occurred in only a certain nucleus.

研究分野：環境生化学

キーワード：白色腐朽菌 メタン ブタノール バイオリファイナリー

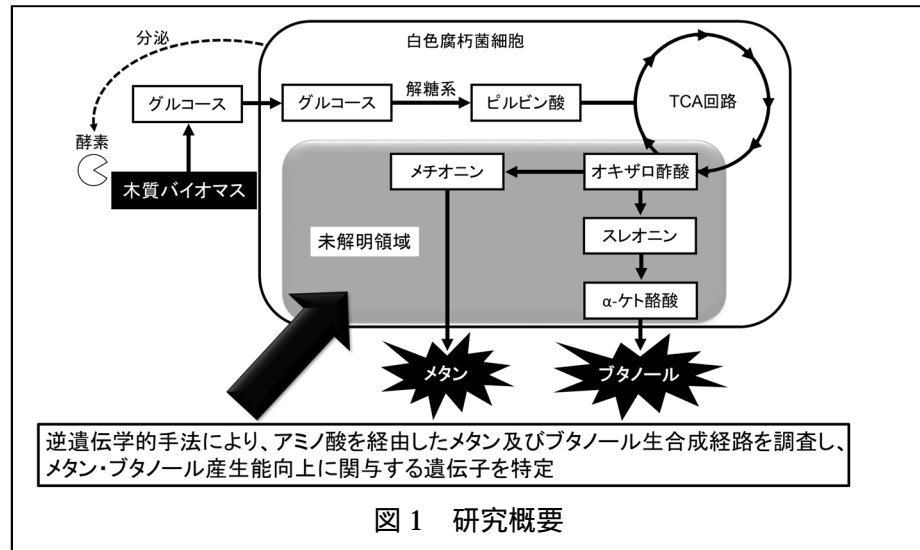
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化など地球環境が悪化するなかで、「低環境負荷型・再生可能エネルギー生産技術の確立」は避けては通れない、極めて重要な課題である。『キノコので、木よりバイオ燃料を生産する』これが本研究の最終目標である。キノコ(担子菌)は木材を分解可能な上、様々な発酵能を有することが知られており、木質バイオマスからバイオ燃料を生産するのに最も適した微生物である。

本目標を実現すべく、研究代表者は『メタン発酵能』『ブタノール発酵能』といった、極めて斬新な発酵能を有する白色腐朽菌(キノコの仲間)を、世界で初めて発見した。特に、これまでの

予備検討において、メタン及びブタノールの前駆体はそれぞれメチオニン、スレオニンであったことから、白色腐朽菌の氨基酸生合成能を向上させることで、メタン、ブタノール産生能も大きく向上することが予想されるものの、白色腐朽菌における氨基酸生合成機構は未解明な部分が多い(図1)。



2. 研究の目的

そこで本研究では、白色腐朽菌による氨基酸合成を経由した高付加価値バイオ燃料(メタン、ブタノール)の木質バイオマスからの効率的生産技術確立を最終目標に、本研究では、これまで未解明領域であった白色腐朽菌の氨基酸生合成経路を経由したメタン・ブタノール産生能向上に関与する遺伝子を特定することを目的に検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 供試菌

供試菌として、高活性リグニン分解菌である *Phanerochaete sordida* YK-624 株を使用した。本菌はポテトデキストロース寒天(PDA)培地上にて、4℃で保存した。

(2) 変異株の作出

P. sordida YK-624 株から UV 照射により作出した UV-64 株(URA5 遺伝子欠損株)を用いて、本株に URA5 遺伝子を非相同組み換えにより作出した変異株(U株)73株を実験に使用した。

(3) U株の培養及びメタン・ブタノールの定量

U株を PDA 培地にて前培養後、5 ml の発酵液体培地 (glucose 20 g/L, yeast extract 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L, pH 4.5) を含むバイアル瓶に接種後、30℃で12日間半嫌気培養を行った。培養終了後、バイアル瓶のヘッドスペースの気体を 1 mL 採取し、Gas Chromatography-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD; ジーエルサイエンス GC-3200) 分析に供し、メタン濃度を測定した。GC-TCD 分析条件は Molecular Sieve 5A 60/80 SUS 3 mm × O.D. 1/8inch / I.D. 2.2 mm カラムを用いてアルゴンを 26 mL/min でキャリアーガスとして流した。Detector 80、injection port 80、oven 50 とし、TCD 電流量 70 mA とした。また培養液を遠心分離 (16, 800×g, 10 min, 4℃) し、上清をフィルター (親水性 PTPE, 0.2 μm, Millex-LG) でろ過した。これを HPLC 分析に供し、1-ブタノール産生の有無を確認した。HPLC 分析は Shodex SH1821 カラムを用いて溶離液 (0.5 mM H₂SO₄ aq.) を流速 0.6 mL/min で分析した。カラム温度は 75℃ とし、検出器は Refractive Index Detector (RI) を使用した。

(4) URA5 遺伝子挿入箇所同定

U株ゲノムにおける URA5 遺伝子挿入箇所を同定すべく、まずは inverse PCR を行った。目的株よりゲノム DNA を抽出後、特定の制限酵素で消化し、未知配列及び URA5 遺伝子の一部を含むプロモーター側の断片、及び未知配列及び URA5 遺伝子の一部を含むターミネーター側の断片を得た。得られた制限酵素処理断片をライゲーションし、得られたライゲーション反応液をテンプレートにし、各種プライマーを用いて inverse PCR を行った。増幅産物はアガロースゲル電気泳動後切り出し、抽出し、シーケンス解析に供した。

また目的株のゲノム DNA を抽出後、MiSeq による全ゲノム解析に供し、URA5 遺伝子挿入箇所の同定も試みた。

4. 研究成果

(1) メタンもしくはブタノール産生株の取得

本研究では、URA5 遺伝子挿入による遺伝子ノックアウト株よりメタンもしくはブタノール産生株の取得を行い、産生株ゲノム中の URA5 遺伝子挿入部位を特定することで、メタンもしくはブタノール産生に關与する遺伝子の同定を試みた。

U 株 73 株を液体培地にて半嫌気培養後、ヘッドスペースをメタン分析、培養液を 1-ブタノール分析に供した。その結果、今回の実験ではブタノール産生株は取得出来なかった。一方で、野生株より高いメタン産生能を示した株が 20 株存在した。さらに絞り込みを行った結果、U5、U6、U8、U65、U82、U94 にてより高いメタン産生能が認められた (図 2)。

これまでの検討で、メタンの前駆体はメチオニンであることが予想されているため、培地にメチオニンを添加した際のメタン産生能についても評価した。その結果、U6 はメチオニンの添加により優位にメタン産生量が増加した (図 3)。よって、以降の実験では U6 を用いて、URA5 遺伝子挿入箇所の同定を行うこととした。

(2) メタン産生株 U6 における URA5 遺伝子挿入箇所の同定

まずは常套手段として、inverse PCR による URA5 遺伝子挿入箇所の同定を試みた。何種類ものプライマーを設計し、各種 inverse PCR を行ったが、挿入箇所の特定には至らなかった。よって、MiSeq を用いた全ゲノム解析に供し、URA5 遺伝子挿入箇所の同定を試みた。しかしながら、本手法においても、野生株が有している URA5 遺伝子位置にしか、URA5 遺伝子を見つけることが出来なかった。何故この様な結果になったのか、各種検討を行った。

予想として、*P. sordida* YK-624 株は多核体を形成しており、プロトプラスト化しても多核体を形成しており、URA5 遺伝子がどこか 1 つの核にのみ導入されても、また複数の核に、異なる位置に挿入された場合、inverse PCR や MiSeq を用いた全ゲノム解析において、URA5 遺伝子挿入位置が特定出来ていない、と考えた。そこでまず、*P. sordida* YK-624 株菌糸の核数を観察した結果、一細胞当たり平均 3.2 ± 1.1 核の多核菌糸であることが判明した (図 4)。さらに、プロトプラストの核を観察した結果、一細胞当たり平均 2.4 ± 0.7 個の核が存在するこ

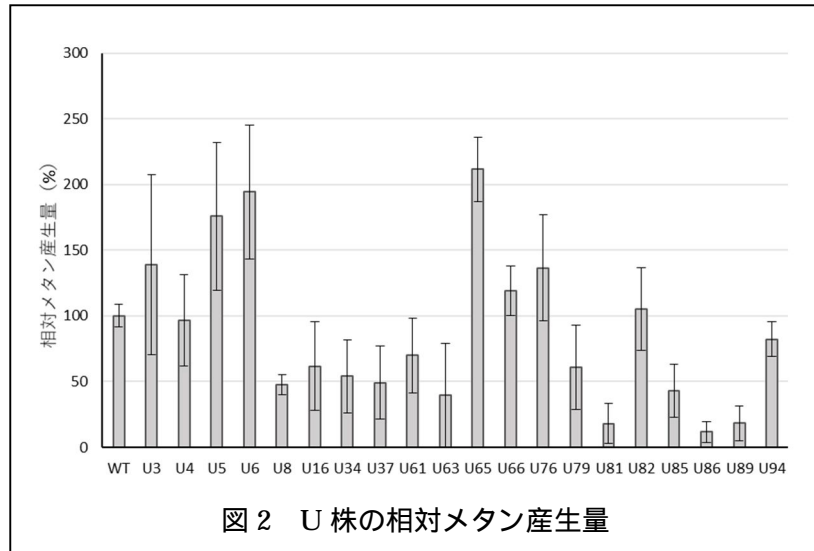


図 2 U 株の相対メタン産生量

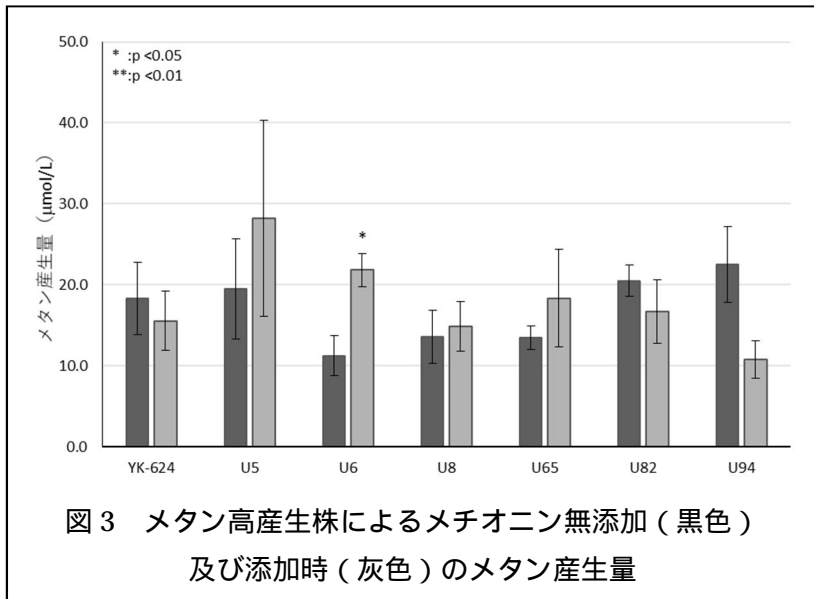


図 3 メタン高産生株によるメチオニン無添加 (黒色) 及び添加時 (灰色) のメタン産生量

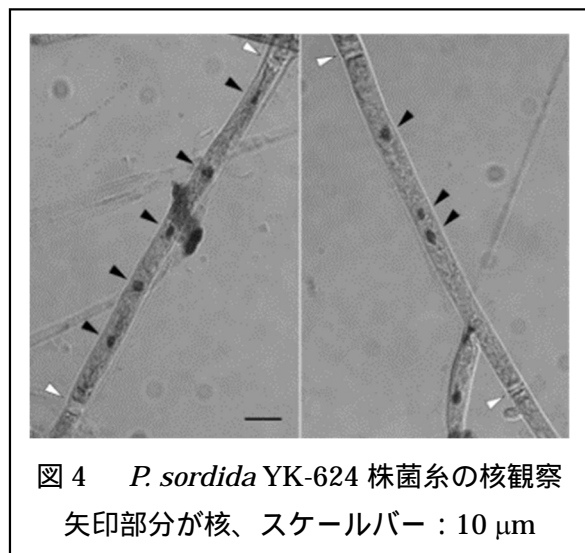


図 4 *P. sordida* YK-624 株菌糸の核観察
矢印部分が核、スケールバー：10 μm

とが判明した(図5)。

以上の結果より、*P. sordida* YK-624 株菌糸及びプロトプラスとは多核体を形成しており、そのため、URA5 遺伝子挿入箇所が特定出来なかったと結論付けた。

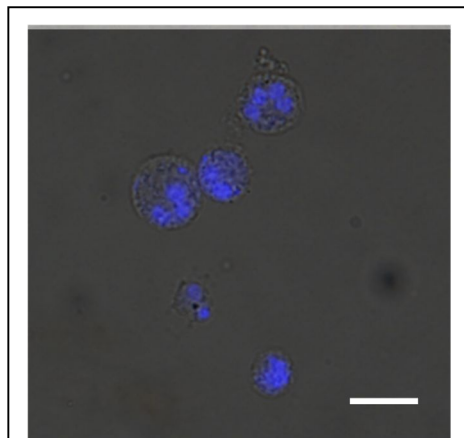


図5 *P. sordida* YK-624 株プロトプラスとの核観察
青色が核、スケールバー：10 μ m

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----