

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20560727

研究課題名（和文） 増殖形態の最適化によるマンガンペルオキシダーゼの高効率生産

研究課題名（英文） Efficient production of manganese peroxidase by the optimization of growth morphology

研究代表者

櫻井 明彦 (SAKURAI AKIHIKO)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：40283163

研究成果の概要（和文）：リグニン分解酵素は、環境汚染物質の分解やセルロース系バイオマスの前処理への応用が期待されている。本研究では、その一種であるマンガンペルオキシダーゼの高効率生産を目指し、白色腐朽菌の増殖形態と生産性の関係について検討した。培養条件と増殖形態、マンガンペルオキシダーゼ生産量との関係を遺伝子発現量から解析したところ、増殖により形成される菌糸体ペレットの直径が一定値（0.7mm）以下の場合に遺伝子発現量が高くなることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Ligninolytic enzymes are expected as an agent for the degradation of environmental pollutant and/or for the pretreatment of cellulolytic biomass. The purpose of this study was to produce high amount of manganese peroxidase, a kind of ligninolytic enzymes, by the optimization of growth morphology of white-rot fungus. The expression level of manganese peroxidase gene was high when the diameter of mycelial pellet was below 0.7 mm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオ生産プロセス

## 1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン類などの難分解性有害化学物質の分解に関して、現在精力的に研究が進められている物理化学的処理法（熔融固化など）は、処理速度は高いが高温・高圧の反応条件を必要とする。このため、消費エネルギーが大きいことや設備コストが高いこと、処理後の熔融固化物（ガラス状物質）が産業廃棄物となるため土壌の埋め戻しができないこと、などの弱点がある。一方、特殊な微生物（*Sphingomonas* 属細菌など）を用いて有害物を分解する生物処理についても研究さ

れているが、処理速度が低く実用レベルには達していない。

このため、新たな有害物質処理方法として白色腐朽菌、あるいは白色腐朽菌が生産するリグニン分解酵素を利用したバイオレメディエーションが期待され、国内外で多くの研究が進められている。しかしながら、現在まで実用化には至っていない。この原因としては、分解酵素生産性の高い優良株が得られていないことや、効率の良い培養方法が見出されていないことが挙げられる。

そこで、我々は酸化還元酵素を用いたバイ

オレメディエーションの実用化を目指し、新規微生物のスクリーニングから酸化還元酵素の生産及び環境浄化への利用について研究を進めてきた。その結果、腐朽木材を含む土壌からリグニン分解酵素の一つであるマンガンペルオキシダーゼの生産性が高い白色腐朽菌を得ることに成功した。この白色腐朽菌の培養特性を予備検討したところ、増殖形態によりマンガンペルオキシダーゼの生産性が大きく変化する傾向が見られた。

## 2. 研究の目的

本研究では、mRNA の発現量を指標としてマンガンペルオキシダーゼの生産に適した白色腐朽菌の増殖形態を明らかにすること、及びそのための培養条件を明らかにすることを目的として検討を進めた。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養方法

マンガンペルオキシダーゼ生産用の白色腐朽菌としては、当研究室で自然界からスクリーニングした *Bjerkandera* sp. L-25 株を用いた。これを 500mL のバッフル付き三角フラスコ内の液体培地 100mL に植菌し、液体振盪培養法により培養した。

### (2) 分析方法

マンガンペルオキシダーゼ活性は、キレートによる吸光度変化 (マロン酸-Mn 法) により測定した。mRNA の発現量については、増殖した菌糸体から RNA を ISOGEN で抽出し、realtime RT-PCR 法を用いて解析した。PCR 用のプライマーとしては、F: TCGACTGACCTTCCACGATG、R: CGCCTGCGAATTGAATAAAG を使い、リファレンスとしては  $\alpha$  チューブリン (F: GACACCGTGATGGACAAGG、R: GCCTCGTTRTCGACCATGGA) を用いた。また、realtime PCR には SYBR Green I を用いたインターカレタ法を用いた。

増殖した菌糸体の形態は、フラスコ中の培養菌糸体の全量をシャーレに取り出し撮影した後、Sigma scan と ImageJ を用いて画像解析した。

## 4. 研究成果

### (1) マンガンペルオキシダーゼ生産の経時変化

液体振盪培養法でマンガンペルオキシダーゼ生産を行った場合の経時変化を Fig. 1 に示す。150rpm で培養を行った場合には、約 10 日間の培養で最大マンガンペルオキシダーゼ活性 2.5U/mL が得られたが、100rpm、50rpm で培養を行った場合には 1.0~1.5U/mL であった。

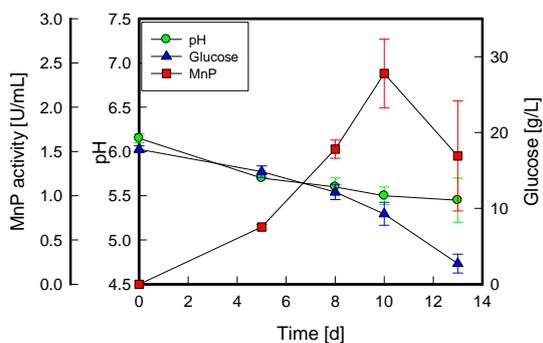


Fig. 1 振盪培養法によるマンガンペルオキシダーゼの生産 (振盪速度 150rpm)

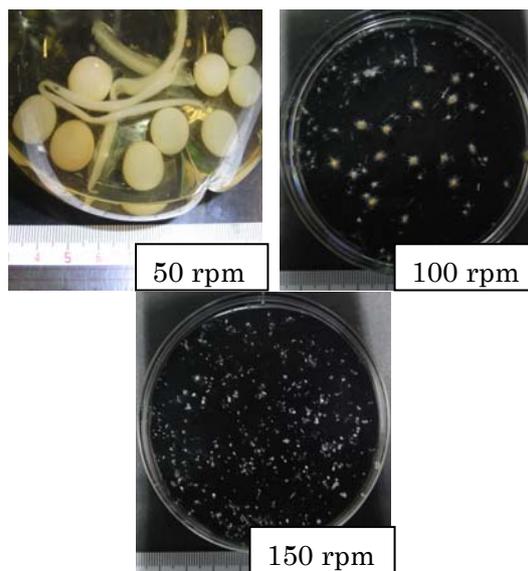


Fig. 2 振盪培養 8 日目の菌糸体の様子  
振盪速度が異なる条件で培養した場合の

Table 1 振盪速度と増殖形態の関係

Time [d]	50 rpm		100 rpm		150 rpm	
	Number of pellets	Average diameter [mm]	Number of pellets	Average diameter [mm]	Number of pellets	Average diameter [mm]
8	9	14	187	0.66	401	0.43
10	8	12	228	0.62	328	0.48
13	7	13	218	0.71	340	0.5

菌糸体の状態は、Fig.2 に示すように、150rpm と 100rpm では、100rpm で僅かにペレット径が大きくなる程度であったが、50rpm では極端にペレット径が大きくなった。これらの画像を解析した結果を Table 1 に示す。100rpm では平均ペレット径は 0.7mm 程度で、ペレット数は 200 程度であった。150rpm では平均径は 0.5mm 程度に低下するが、ペレット数は 350 程度まで増加した。150rpm での生産性の高さは、ペレット数の多さによるものかもしれない。

### (2) 振盪速度と遺伝子発現の関係

次に振盪速度と最大マンガンペルオキシダーゼ活性、遺伝子発現量の関係を Fig.3 に示す。最大マンガンペルオキシダーゼについては、50rpm と 100rpm では 150rpm の 60% 程度まで低下し、これらの中に大きな違いが見られなかった。一方、遺伝子発現量については、150rpm と 100rpm では大きな違いが見られず、50rpm では 40% 以下に低下した。150rpm と 100rpm では遺伝子発現量に大きな違いはないが、最大マンガンペルオキシダーゼ活性に大きな違いが見られた。また、100rpm と 50rpm を比較すると、遺伝子発現量に大きな違いがあるが、最大マンガンペルオキシダーゼ活性に大きな違いが見られなかった。これらの結果から、マンガンペルオキシダーゼの生産には、マンガンペルオキシダーゼ遺伝子の発現以外にも影響を与えている因子があることが示唆された。

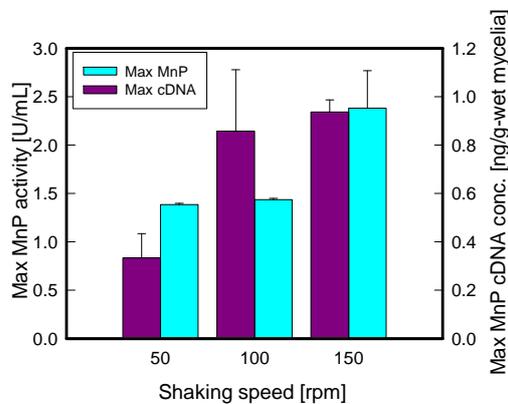


Fig. 3 振盪速度と最大マンガンペルオキシダーゼ活性、遺伝子発現量の関係

### (3) 培地成分と遺伝子発現の関係

振盪速度によるマンガンペルオキシダーゼ活性の違いについては、遺伝子発現以外の因子の可能性が示唆されたため、培地成分によるマンガンペルオキシダーゼ活性の上昇と遺伝子発現の関係について検討した。マンガンペルオキシダーゼ活性を誘導する培地成分として Mn を加えた場合の経時変化を Fig. 4 に示す。Mn の添加によりマンガンペルオキシダーゼ活性が 10 倍以上になっており、酵素活性の誘導に Mn が非常に有効であるこ

とが分かる。

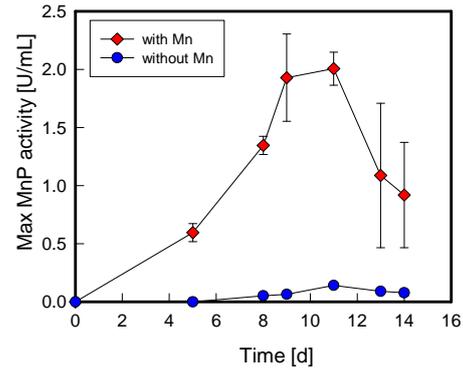


Fig. 4 Mn 添加によるマンガンペルオキシダーゼ活性の誘導

遺伝子発現に及ぼす Mn 添加の影響を整理したところ、Fig. 5 に示すように遺伝子発現量の違いが最大マンガンペルオキシダーゼ活性に影響していることが明らかになった。しかし、遺伝子発現量の差に比べて酵素活性の違いが小さいことから、遺伝子発現量以外の要因が影響していると考えられる。

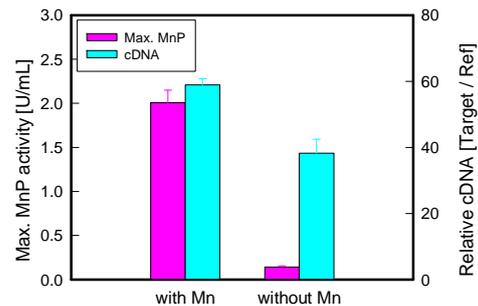


Fig. 5 Mn 添加と遺伝子発現量、最大マンガンペルオキシダーゼ活性の関係

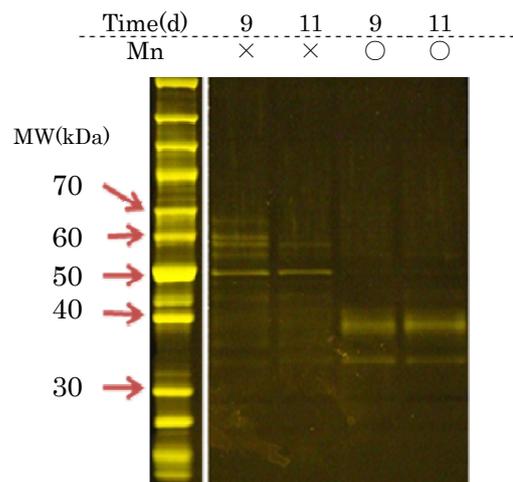


Fig. 6 SDS-PAGE による菌体外タンパク質の確認

そこで、菌体外に分泌されるタンパク質につ

いて、SDS-PAGE により解析した。その結果、Fig.6 に示すように、培養 9 日目、11 日目ともにマンガンを追加した場合には、マンガンペルオキシダーゼの分子量である 40 kDa 付近に濃いバンドが確認された。一方、マンガン未添加の場合には 40 kDa 付近のバンドは薄く、50~70 kDa 付近に濃いバンドが確認された。この結果から、マンガンの添加によりマンガンペルオキシダーゼの生産が誘導されるだけでなく、他のタンパク質の生産が抑制されていることが明らかとなった。

### (3)まとめ

マンガンペルオキシダーゼ生産に最適な増殖形態を検討した結果、0.5mm 程度のペレット状に増殖する場合が最も適していることが明らかとなった。また、その場合にマンガンペルオキシダーゼ遺伝子の発現量が多くなる傾向にあったが、これ以外の因子も影響していた。

マンガンペルオキシダーゼ遺伝子の発現量とマンガンペルオキシダーゼ生産性の相関関係は弱いため、マンガンペルオキシダーゼ以外のタンパク質の生産を抑制することが生産性向上に重要であると考えられる。

## 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① S. Fujihara, M. Hatashita, A. Sakurai, M. Sakakibara: Production of manganese peroxidase by white rot fungi from potato-processing wastewater: Role of amino acids on biosynthesis. African J. Biotechnol., 9, 725-731(2010)
- ② [30] S. Fujihara, A. Sakurai, M. Sakakibara: Optimization of medium components for manganese peroxidase production by white rot fungus strain L-25. J. Chem. Eng. Jpn., 41, 796-803 (2008).

[学会発表] (計 9 件)

- ① 瀬瀬 由香菜, 藤原 伸哉, 畑下 昌範, 櫻井 明彦、イオンビーム照射による白色腐朽菌の育種、第 6 2 回日本生物工学学会大会、2010.10
- ② 藤原 伸哉, 瀬瀬 由香菜, 櫻井 明彦, 畑下 昌範、マンガンペルオキシダーゼ生産における遺伝子発現及び細胞外タンパク質の解析、第 6 2 回日本生物工学、2010.10
- ③ A.Sakurai, Y. Koketsu, S.Fujihara, M. Hatashita、Production of manganese peroxidase by *Bjerkandera* sp. mutant

induced by ion beam irradiation、IBS2010proceedings, 2010.9

- ④ 瀬瀬 由香菜, 櫻井 明彦, 榊原 三樹男, 畑下 昌範、ビーム照射による白色腐朽菌の高性能化、化学工学会 第 7 5 年会、2010.3
- ⑤ S.Fujihara, A.Sakurai, M.Sakakibara Expression analysis of manganese peroxidase gene in white rot fungus L-25 in the presence of amino acids APBioChEC09 proceedings, 2009.11
- ⑥ S. Fujihara, A.Sakurai, M.Sakakibara, Effect of Amino Acids on Manganese Peroxidase Production, 8th World Congress of Chemical Engineering, 2009.8
- ⑦ 藤原 伸哉, 櫻井 明彦, 榊原 三樹男、白色腐朽菌 L-25 株のマンガンペルオキシダーゼ生産に与えるアミノ酸の影響、化学工学会新潟大会、2008.8
- ⑧ 橋詰 直幸, 櫻井 明彦, 榊原 三樹男、白色腐朽菌における増殖形態とマンガンペルオキシダーゼ生産性の関係、化学工学会新潟大会、2008.08
- ⑨ 神戸真暁, 熊谷宏之, 南保幸男, 櫻井明彦、染色排水からのダイオキシン類低減化試験について、第 17 回環境化学討論会、2008.06

[図書] (計 1 件)

小宮山 眞監修、酵素利用技術大系 (分担: 廃水処理 (フェノール廃液)) NTS (2010)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 難分解性物質の分解菌およびそれを用いた環境の浄化方法

発明者: 櫻井 明彦

権利者: 福井大学

種類: 特許

番号: 4247395

取得年月日: 2009. 1. 23

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 明彦 (SAKURAI AKIHIKO)

研究者番号: 40283163

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし