

期間番号：25301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580101

研究課題名 (和文) ミミズとその共生微生物由来の酵素共役反応系を利用するバイオマスの分解と資源の回収

研究課題名 (英文) Recycling recovery of biomass and refinaly of the several useful compounds using the enzymatic coupling reaction system from earthworm and the enzymes from it' s intesitinarl microorganisums.

研究代表者

中島 伸佳 (NAKAJIMA, Nobuyoshi)

岡山県立大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：10198070

研究成果の概要 (和文) : 「ミミズ」及び「ミミズに共生する微生物 (ミミズの腸内細菌)」の、それぞれが生産する「分解酵素反応」や「酸化還元酵素」を共役的に組み合わせることで、自然界のエコシステムを模倣したバイオマスの分解のための「酵素複合反応システム」を構築し、食品や有機系廃棄物などのバイオマス中の「難分解性タンパク質やセルロース」などを効率的に分解すると同時に、「アミノ酸やオリゴ糖」などを回収することで、「有機系バイオマス」の循環的分解と共に、有用資源の再利用を可能にする「酵素バイオリアクター技術」を開発し、「資源循環型社会の構築」に貢献することを主目的に、本研究では、特にミミズ腸内細菌由来の放線菌等が生産する有用酵素類の探索を中心に研究を行った。

研究成果の概要 (英文) : The construction of the recycling-recovery system of several useful compounds from biomass with the use of the enzymatic coupling reactions was performed as a final study goal. At first, the proteases from earthworm and the enzymes (polysaccharide degrading enzymes and carbonyl reductases) from it' s intestinal bacteria were selected and purified, and then these enzymological characterization was investigated for the elucidation of the structure and catalytic functions of these enzyme proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：ミミズ、プロテアーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、酸化還元酵素、バイオマス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、地球温暖化対策、循環型社会形成、戦力的産業育成、農山漁村活性などの観点から「バイオマス・ニッポン総合戦略」が閣議

決定されるなど、バイオマス利用促進の取り組みが活発となっている。「バイオマス (Biomass)」とは、「生物資源 (Bio)」の「量 (mass)」を表す概念で、「再生可能な、生物

由来の有機性資源で化石資源を除いたもの」である。具体的には、生ごみや食品廃棄物、家畜排泄物、製材工場の残材や建築廃材といった「廃棄物」、「間伐材」や「稲わらやもみ殻」といった未利用資源、そしてブラジルやアメリカで自動車燃料としてガソリンに混合し、利用されているエタノールの生産原料であるサトウキビやトウモロコシといった「資源作物」がこれに当たる。バイオマス利用の例としては、バイオディーゼル燃料、堆肥化、バイオマス由来プラスチック、機能性食品の原料などがあり、周辺技術も含めて研究・技術開発が進められている。バイオマスの中でも、「稲わらやもみ殻」などの農作物非食用部は未利用率が高く、「有機系バイオマス」の利用促進のための重要課題となっている。この理由の一つとして、農作物非食用部にはセルロースなどの難分解性成分が多いことが挙げられる。セルロースはグルコースへの分解が可能であり、また十分な量が存在することから、食料やエネルギーそして環境問題を解決するための資源として期待されている。しかし、セルロースからグルコースへの変換にかかるコストや分解する酵素の触媒効率が低いといった理由から未利用のままである。植物の主成分であるセルロースは、グルコースが、beta-1,4-グリコシド結合で 100-10,000 個結合した直鎖状の高分子多糖であり、直鎖間に生じた水素結合により集合し微細繊維を有する。また、この繊維間隙を埋める形で存在するヘミセルロースは、キシロースの重合体であるキシランを主成分とし、植物細胞壁の 30-40%を占め、セルロースに次いで主要な成分である。このキシロースもセルロースと同様に、beta-1,4-グリコシド結合からなる難分解性多糖である。現在、これらの多糖類を含む未利用バイオマスについて、経済的に分解し、かつ有用資源を効率的に得られる実用的な方法が求められている。多糖類の分解法としては、酸加水分解などの化学的処理による分解、あるいは微生物やその酵素を利用した分解があり、後者には基質となる多糖類の beta-1,4-グリコシド結合を加水分解し、単糖やオリゴ糖を生成するセルラーゼ (EC 3.2.1.4) やキシラーゼ (EC 3.2.1.8) が利用されている。これまでに多様な生物由来の多糖類分解酵素について研究されているが、成分が複雑な未利用バイオマスの分解は、単一微生物あるいは単一酵素による分解法ではほとんど効果がみられないが現状である。一方、ミミズ、細菌、真菌類等の土壤に生息する生物は、生態系の分解者として知られている。特に、ミミズは有機物を摂食してその可給態養分を濃縮し、速やかに土壤に還元する能力を持っており、生ごみ等から堆肥を作る際に利用されている。また、ミミズ糞土中の細菌および放線菌

数が周囲の土壤よりも多く、代謝活動も高いという報告もあることから、ミミズと微生物が共存していることが、土壤の有機物分解活性に影響している可能性があると考えられる。これらのことから、近年、バイオマスの分解や有効利用について、ミミズや土壤微生物類を活用する方法が注目されており、上述したミミズによる「生ごみの堆肥化」もその一例である。しかし、堆肥化に生物体を利用する方法は温度や水分等の管理の問題から、常に一定の効率を得ることは困難である。このような現状を踏まえ、当研究室では土壤における「ミミズと微生物」という共存関係から発想を得て、エコシステムを模倣した複合酵素反応システムの構築を目指している。すなわち、ミミズと土壤微生物の酵素を組み合わせることで、経済的かつ効率的なバイオマス分解および分解生成物であるオリゴ糖やアミノ酸といった有用資源の回収 (バイオリファイナリー) を行う技術である。これまでに、申請者らによりミミズがきわめて安定で強力なセリンプロテアーゼを産生していることが明らかにされている。このプロテアーゼは難分解性の動物性バイオマスとなるコラーゲンやエラスチン、更に、生分解プラスチックなどの加水分解も触媒することができると報告されており、本酵素のバイオマス分解への利用が期待される。一方、土壤における多糖類分解酵素活性は微生物量と相関関係にあるとの報告などから、土壤における「未利用バイオマス」の分解と再利用はミミズよりも微生物が行っている可能性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

バイオマスは、地球温暖化対策や循環型社会形成の観点からその利用が注目されている。バイオマスのうち、農作物非食用部はセルロース、キシラン等の難分解性多糖の含有率が多いなどの理由から未利用率が高く、未利用バイオマスと呼ばれている。当研究室では、土壤においてバイオマス分解を担っている「ミミズと微生物」の共存関係から発想を得て、エコシステムを模倣した複合酵素反応システムによるバイオマス分解および有用資源の回収を目指している。これまでに、動物性バイオマスの分解を触媒する酵素としてミミズ由来のプロテアーゼの利用可能性が期待されているが、ミミズには未利用バイオマスを分解するための多糖類分解酵素活性が弱く、土壤における未利用バイオマスの分解は主に微生物が行っている可能性が高い。また、複合酵素反応システムの構築においてはミミズプロテアーゼに分解されない多糖類分解酵素が望ましい。そこで、該当する酵素はミミズ体内で消化を受けない微生物が産生しているのではないかと考え、ミミ

ズから単離される微生物である放線菌に注目し、ミミズ糞土より単離された微生物（主に放線菌）を用いて、多糖類分解活性や還元酵素活性を有する微生物のスクリーニングを行った。

### 3. 研究の方法

ミミズ、並びに、その共生微生物由来のプロテアーゼ、多糖類分解酵素、並びに酸化還元酵素等の酵素活性の測定は、培養液を粗酵素液として、主に分光光学的方法により酵素活性を測定（微生物のスクリーニング）した。また、生成物の同定はクロマトグラフィー的手法にて解析した。さらに、セルロース分解等においては、培地上での生育に伴う基質：多糖類の分解反応に関する検討も併せて検討した。

### 4. 研究成果

ミミズ糞土より単離された放線菌から、No. 4 および No. 11 を多糖類分解菌として選択した。No. 4 は高キシラン分解活性を有しており、エンドキシラナーゼを産生している可能性が示唆された。No. 11 は CMC およびキシラン分解活性を有した。本菌はエンド型の作用様式を示すカルボキシメチルセルラーゼおよびエンドキシラナーゼを産生している可能性が示唆された。また、2 株のキシラン分解に伴う還元糖収量は 20-25%程度、No. 11 の CMC 分解に伴う還元糖収量は 15%程度であった。なお、高活性なセルラーゼ生産菌や、高活性なカルボニル還元酵素生産菌（以上、ミミズ糞由来の放線菌由来）の単離にも成功した。併せて、これらの酵素類を用いた有用生理機能物質の生物変換についても検討を行った。

#### 【結論】

ミミズ糞土からされた放線菌から多糖類分解活性を有する菌株として No. 4 および 11 を選択した。前者は高いキシラン分解活性を有しており、後者は CMC 分解活性並びに No. 4 とは異なる作用機序のキシラン分解活性が確認された。また、ミミズ糞から単離した「セルラーゼ生産菌」や「カルボニル還元酵素生産菌」を含めて、今後、これらの酵素の諸性質の詳細な確認を行い、ミミズプロテアーゼとの相性も確認した上で、「酵素複合バイオリクター構築」、並びに「ミミズや微生物間のエコシステム」を活用した、さらなる「有機系バイオマス分解への利用と有用物質のリサイクル」への可能性を検討していくことが必要である。

### 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 10 件）

1. K. Simoda, S. Sakamoto, N. Nakajima, and H Hamada, Synthesis of Unnatural Mono- and Oligosaccharides of Farnesol, Geraniol, and (S)-Perillyl Alcohol by Biocatalytic Glycosylations. *Chem. Lett.*, 37(5), pp. 556-557, 2008.
2. K. Ishihara, C. Kato, H. Yamaguchi, R. Iwai, H. Hamada, N. Masuoka, and N. Nakajima, Stereoselective Reduction of Carbonyl Compounds with Actinomycete: Purification and Characterization of Three Keto ester Reductase from *Streptomyces avermitilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(12), pp. 3249-3257, 2008.
3. K. Simoda, N. Kubota, T. Kobayashi, N. Nakajima, and H. Hamada, Production of (2R,3S)-2-Benzamidomethyl-3-hydroxybutanoates by Immobilized Plant Cells of *Parthenocissus tricuspidata*. *Biochem. Insights*, 2, pp. 1-3, 2009.
4. 桑木信輔、中島伸佳、石原浩二、双 全、田中英彦、植物性素材を原料とした「乳酸菌・酵母発酵エキス」に関する研究、微量栄養素研究、26, pp. 96-104, 2009.
5. K. Simoda, N. Kubota, K. Taniuchi, D. Sato, N. Nakajima, and H. Hamada, Biotransformation of Naringin and Naringenin by Cultured *Eucalyptus perriniana* Cells. *Phytochemistry*, 71, pp. 201-205, 2010.
6. K. Ishihara, M. Nishimura, M. Nishi, N. Masuoka, and N. Nakajima, Preparation of Chiral 2-Chloromandelamide: Stereoselective Reduction of an Aromatic  $\alpha$ -Keto Amide with Actinomycete Strains. *Biochem. Insights*, 3, pp. 19-24, 2010.
7. Y. Uchimura, K. Ishihara, and N. Nakajima, Isoquercitrin Improved the Health of Japanese Pearl Oyster, *Pinctada fucata martensii*, Affected by Akoya Oyster Disease. *Aqua. Sci.*, 58(1), pp. 151-153, 2010.
8. K. Ishihara, S-I. Kwon, N. Masuoka, N. Nakajima, and H. Hamada, One-procedure Synthesis of Capsiate from Capsaicin by Lipase-catalyzed Dynamic Transacylation. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, pp. 1337-1340, 2010.
9. K. Ishihara, Y. Katsube, N. Kumazawa, N. Masuoka, and N. Nakajima, Preparation of Arbutin Derivatives: Lipase-catalyzed Direct Acylation without the Need of Vinyl Ester as an Acyl Donor. *J. Biosci. Bioeng.*, 109(6), pp. 554-556, 2010.
10. H. Katsuragi, K. Simoda, H. Hamada, and

N. Nakajima, Biotransformation of Cinnamic acid, p-Coumaric acid, Caffeic acid, and Ferulic acid by Plant Cultured Cells, *Eucaryputus periniana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(9), pp. 1920-1924, 2010.

〔学会発表〕(計20件)

1. 笠原・中島、他3名、植物培養細胞によるナリゲニンの配糖化、第11回生体触媒化学シンポジウム、2008
2. 石原、中島、他3名、岡山県特産品を利用した機能性食品素材の開発に関する基礎的研究、第12回岡山リサーチパーク研究発表・展示会、2008
3. 小林、中島、他4名、植物培養細胞によるレスベラトロールの配糖化、日本化学会第88回大会、2008
4. 中島、石原、他1名、ミミズ由来のセリンプロテアーゼのリパーゼ反応について、日本農芸化学会中四国支部 第21回講演会、2008
5. 小林、中島、他3名、植物培養細胞によるモノテルペンの配糖化、第26回日本植物細胞分子生物学会、2008
6. 浜田、中島、他5名、植物培養細胞による活性フェノールの配糖化、第50回天然有機化合物討論会、2008
7. 浜田、中島、他3名、植物培養細胞によるテルペン類の配糖化、第52回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、2008
8. 岩井・中島、石原、他2名、緑藻由来のケトエステル還元酵素の精製と酵素化学特徴の解明、第12回生体触媒化学シンポジウム、2008
9. 石原・中島、他2名、岡山県特産品ピオオーネを利用した機能性食品素材の開発に関する研究、第13回岡山リサーチパーク研究発表展示会、岡山市、2009
10. 桑木、中島、他2名、乳酸菌・酵母による植物発酵エキスに関する研究、2009年度日本農芸化学会大会、福岡市、2009
11. 浜田、中島、他4名、植物培養細胞によるフラバノン類の変換、第42回酸化反応討論会、仙台市、2009
12. 大広、中島、他3名、CGTaseを活用したアルブチン多糖配糖体の調製、第13回生体触媒化学シンポジウム、高松市、2009
13. H. Hamada, K. Shimoda, N. Nakajima, *et. al.*, Glycosylation of Biological Active Compounds Using Plant Cultured Cells, *Plant Biology* 2009, (Hawai, USA), 2009. 7.
14. K. Ishihara, M. Yoshida, N. Nakajima, *et. al.*, Purification and Characterization of a novel keto ester reductase from a green alga, *Chlorella*

*sorokiniana*: comparison of enzymological properties with other microbial keto ester reductases, *Pacificchem* 2010, (Hawai, USA), 2010. 12.

15. K. Ishihara, H. Yamaguchi, N. Nakajima, *et. al.*, Purification and Characterization of three keto ester reductases from *Streptomyces avermitilis*: an approach based on protein chemistry and bioinformatics. *Pacificchem* 2010, (Hawai, USA), 2010. 12.
16. 浜田、中島、他2名、植物培養細胞を用いたカテキン類の変換、日本化学会第90回大会、大阪市、2010
17. 山本、中島、他2名、植物培養細胞を用いたフラバノン類の物質変換、日本化学会第90回大会、大阪市、2010
18. 浜田、中島、他2名、植物培養細胞を用いたカテキン類の変換、日本化学会第90回大会、大阪市、2010
19. 浜田、中島、他2名、植物培養細胞を活用した高機能性素材の開発、日本植物組織培養学会第83回大会、岡山市、2010
20. 浜田、中島、他2名、ナノファイバーを活用した環式および非環式モノテルペン類の物質変換、第54回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、甲府市、2010

〔図書〕(計2件)

1. 中島、栄養科学NEXTシリーズ「基礎化学」、辻、中村編著、第6章、第1節 食品中の有機化合物の構造、及び、第2節 食品中の有機化合物の機能を分担執筆、講談社サイエンティフィック、2010. 4. 発行
2. 中島、栄養科学NEXTシリーズ「基礎有機化学」、高橋、辻編著、第3章、第2節 アミノ酸とタンパク質、及び、第4節 ビタミンを分担執筆、講談社サイエンティフィック、2010. 5. 発行

〔その他〕

「報告書」：中島、ミミズと共生微生物由来の酵素反応システムを利用したバイオマスの分解と利用に関する研究、(財)両備てい園記念財団研究成果報告書 第24集、pp. 122-128, 2009

「新聞掲載」：中島、コラム「バイオテクノロジーの世界：1-3」、岡山日日新聞、平成21年2月4-25日掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 伸佳 (NAKAJIMA, Nobuyoshi)

岡山県立大学・保健福祉学部・准教授  
研究者番号：10198070

(3) 連携研究者

石原 浩二 (Kohji Ishihara)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号 : 50273537