

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03114

研究課題名(和文) 白色腐朽菌 - 細菌複合微生物系における高リグニン分解能を誘導する相互作用機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of interaction mechanisms improving ligninolytic properties in white rot fungal-bacterial consortia

研究代表者

森 智夫 (Mori, Toshio)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：80536516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：白色腐朽菌床に自然界由来細菌を混入させた複合微生物系を作成し、優れたリグニン分解特性を維持可能な継代培養法を開発した。本モデル複合微生物系の菌叢構造を元にリグニン分解に関連する細菌代謝系を予測し、ナフトキノン誘導体などの酸化ストレス物質が、白色腐朽菌の生育を阻害することで多糖の消費を抑え、同時にリグニン分解酵素を誘導することで、複合微生物系が高いリグニン分解選択性を示すと予測した。更に、複合微生物系のリグニン分解酵素活性と細菌叢を元に冗長性解析により、リグニン分解酵素を誘導する細菌の特定を試み、いくつかの候補細菌の選抜に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白色腐朽菌はリグニンを分解し、しばしばセルロース等多糖成分に富んだ腐朽残渣を生じるため、低環境負荷型脱リグニンツールとしてバイオマス利用分野への応用が期待されているが、その活性は実用レベルではない。白色腐朽菌の木材腐朽特性を改善・制御する細菌との相互作用機構を明らかにしていくことで、試薬や遺伝子組換えに頼らない細菌との相互作用を利用した白色腐朽菌機能の制御技術が提案可能となる。本研究成果は、資源循環型社会構築に寄与しうる、新たな微生物活用技術開発に向けた第一歩となる。

研究成果の概要(英文)：Microbial consortia consisting of white-rot fungus *Phanerochaete sordida* and natural occurring bacteria were created, and a subcultivation method maintaining excellent ligninolytic properties was developed. Based on prediction of metagenomic functional abundances was conducted from the bacterial community structure of the consortia, it was predicted that oxidative stress substances like naphthoquinone derivatives would inhibit fungal growth, thereby reducing polysaccharide consumption, and inducing ligninolytic enzymes, then the consortia would exhibit highly selective lignin degradation activity. Furthermore, redundancy analysis using ligninolytic activity and microbial community structure of the consortia was performed to identify bacteria that induce ligninolytic enzyme activity, resulting several candidate bacteria were successfully obtained.

研究分野：応用微生物学

キーワード：白色腐朽菌 複合微生物系 微生物間相互作用 リグニン分解 木材腐朽

1. 研究開始当初の背景

白色腐朽菌は、木材の主要成分の全て(多糖成分およびリグニン)を分解可能であるというユニークな機能をもつ微生物である。リグニンは難分解性芳香族高分子化合物であり、植物体に剛性や通導性の他、微生物や化学反応に対する耐久性を付与し、生物的・産業的に価値の高い多糖類を保護している。そのため、白色腐朽菌は森林生態系の最終分解者として炭素循環における重要な役割を担っているのみならず、リグニンを中温域で分解可能であるため、低環境負荷型脱リグニンツールとしての応用が期待されている。

白色腐朽菌によるリグニン生分解の研究は、古くは1970年代より行われているが、未だにその全貌が解明されていない。そのため、ゲノム編集など遺伝子工学的手法が発達した現状においても、産業利用可能なレベルにまでリグニン分解力を向上させた白色腐朽菌の作出は不可能な状況である。一方、自然界におけるリグニン生分解は、白色腐朽菌の他、様々な微生物の共存下で行われており、白色腐朽菌が周辺微生物から何らかの作用を受けながらリグニン生分解を行っている事は容易に推測される。カビや酵母などの真菌類においては、真菌-細菌間相互作用によって初めて発現・成立する代謝機構が数多く報告されていることから(e.g. FEMS Microbiol. Rev. 2018、Nat. Commun. 2018)、白色腐朽菌のリグニン生分解機構においても細菌と相互作用する事で顕在化する機構が存在する可能性は極めて高い。しかし、「自然界において白色腐朽菌と細菌がどの様に相互作用し、リグニン分解を行っているか?」という「問い」に対する答えは先行研究の中には、ほぼ皆無であった。

2. 研究の目的

自然界における微生物生態系の細菌叢は非常に不安定であり、容易にその群集構造は変化する。また、その90~99%は難培養性であり、自然界生態系で表れる表現型を実験室内で再現し、解析を行うことは限りなく不可能に近い。一方で白色腐朽菌と単離された細菌との共培養は再現性高く培養可能であるが、難培養性菌が排除されているため、共培養系は自然界における生態系を代表しているとは言えない。つまり自然界中での白色腐朽菌-細菌間相互作用を解析するには、難培養性細菌を含む自然界由来細菌叢と白色腐朽菌から構成された、再現良く表現型を示すモデル生態系(複合微生物系)の開発が必須である。

申請者は数年前からこの課題に取り組み、高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* のリグニン分解特性改善を目的に複合微生物系の構築に取り組み、*P. sordida* 単独より優れたリグニン分解特性を再現良く示すモデル複合微生物系の構築を試みてきた。白色腐朽菌-細菌叢モデル複合微生物系はリグニン生分解に関連する相互作用を解析する強力なツールである。加えて、その様なモデル複合微生物系に関する前例はなく、学術的独自性の高い、未知の微生物機能や相互作用の発見につながる独創性の高い研究を展開することが可能な研究材料である。本研究では、モデル複合微生物系を用いて、白色腐朽菌のリグニン分解能に対して細菌叢が果たす役割、相互作用メカニズムの解析を行い、白色腐朽菌-細菌複合微生物系における、白色腐朽菌-細菌間相互作用による高リグニン分解活性発現機構を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* が蔓延したブナ木粉菌床を、各種土壌に所定期間埋設し細菌叢を混入させ白色腐朽菌-細菌複合微生物系を作成した。回収した菌床は表面に付着した土壌を削り落とし、コアアンプルを新たなブナ木粉に植え継いだ。複合微生物系をブナ木粉で継代を繰り返し、木材腐朽特性を調べ優れたリグニン分解特性を示す複合微生物系を選抜した。

木粉で継代した複合微生物系を、寒天培地に接種し継代した。これをブナ木粉に植菌し、木材腐朽特性を調査した。各継代回数 of 寒天培地から複合微生物系を回収・ゲノム抽出を行い 16S rDNA アンプリコン解析を行い菌叢比較を行うとともに、PICRUSt2 による細菌遺伝子予測を行い、複合微生物系のリグニン分解特性に影響を与える細菌遺伝子の予測を行った。

また、複合微生物系と *P. sordida* を高窒素源含有液体培地にて培養し、リグニン分解酵素活性について調査した。液体培地から、菌体を回収し、total RNA あるいはゲノム抽出を行った。Total RNA を用いて、*P. sordida* 単独培養時との比較発現差解析を行い、複合微生物系内で白色腐朽菌がどのような影響を受けているのかを調査した。ゲノムを用いて 16S rDNA のアンプリコン解析を行い、リグニン分解酵素の発現に関与する細菌の予測を行った。

4. 研究成果

菌床を種々の土壌に埋設し作成した複合微生物系の、木材腐朽特性は様々であり、大きく阻害されたものから、木材腐朽活性が向上したものまで様々であった。木材腐朽活性が向上した複合微生物系を木粉培地で継代したところ、複数回の継代でその活性は消失してしまったため、複合微生物系の木材腐朽特性を維持可能な継代培養法の開発を試みた。様々な継代培養法を試みた結果、複合微生物系は寒天培地で培養した際にフェノール酸化活性(リグニン分解酵素活性を含

む)を示し、この形質は継代培養を繰り返しても維持される事を見出した。寒天培地で継代した複合微生物系は数十回の継代を経ても、高いリグニン分解選択性を維持しており、本培養法により安定した表現型を示すモデル複合微生物系の開発に成功したと判断した。複合微生物系の菌叢は非常に安定しており、図1に示す NMDS 解析では、木粉による継代()では菌叢が大きく変動しているのに対し、複合微生物系(、)では30回目までの継代培養で菌叢は殆ど変動していないことが示された。しかし、冗長性(RDA)解析によってリグニン分解特性と関連性を示す細菌の予測を試みたが、関連性を示唆する細菌を得ることは出来なかった。そこで、PICRUST2による遺伝子予測を行い、リグニン分解特性と相関を示す細菌代謝系の探索を行った。その結果、複数の代謝系に相関が示されたが、一次代謝系以外ではメナキノン(ナフトキノン)合成関連経路に高い相関が示された。そこで市販のナフトキノン誘導体含有寒天培地を用いて *P. sordida* を培養したところ、菌糸生育が抑制されると共にフェノール酸化活性が誘導された。この結果から、複合微生物系内の細菌が分泌するナフトキノン類あるいはそれに類する酸化ストレス誘引物質が、白色腐朽菌の菌糸生育を阻害することで木粉中多糖の消費を抑制し、同時にリグニン分解酵素を誘導することでリグニン分解を進行させるため、複合微生物系で高いリグニン分解選択性が観察されるものと予想した。

次に、複合微生物系でリグニン分解酵素活性を誘導する細菌を探索すべく検討を行った。*P. sordida* はリグニン分解酵素活性を示さない高窒素含有液体培地を用いて、複合微生物系を培養した結果、複合微生物系では強力にマンガンペルオキシダーゼ(MnP)活性が誘導されていることが示された。*P. sordida* 単独培養との比較発現解析を行った結果、複合微生物系ではリグニン分解酵素を含む種々のペルオキシダーゼ遺伝子発現量が上昇しており、また Gene ontology 解析を行ったところ、ペルオキシダーゼに加え酸化ストレス応答遺伝子群の発現上昇が観察され、上述の予測と同様に、酸化ストレス応答としてリグニン分解酵素活性が上昇している可能性が示された。培養期間中の MnP 活性および菌叢構造を元に RDA 解析を行ったところ、MnP 活性に関連すると予測される複数の細菌を複数見出した(図2)。これらの細菌種あるいは類縁種を用いてフェノール酸化活性誘導試験を行ったところ、いくつかの細菌が *P. sordida* のリグニン分解酵素活性を誘導する可能性が見出された。誘導機構などの詳細について検討を進めている。

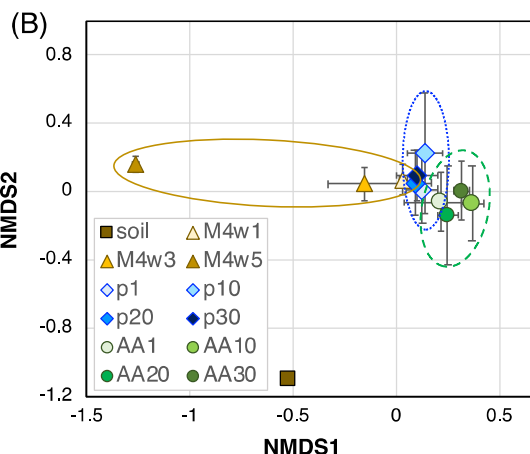


図1. 継代培養による菌叢の変動

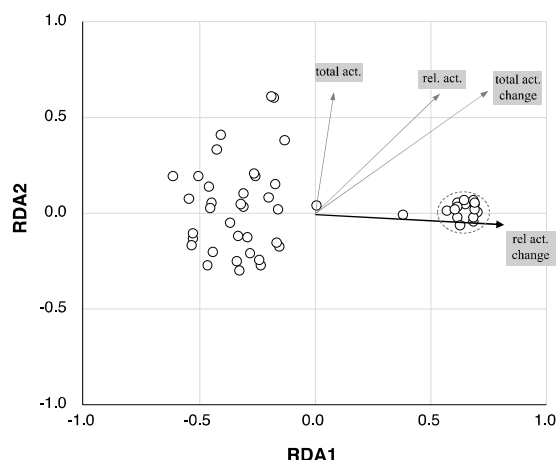


図2. MnP 活性に関連する細菌予測

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toshio Mori, Taiki Terashima, Masaki Matsumura, Koudai Tsuruta, Hideo Dohra, Hirokazu Kawagishi, and Hirofumi Hirai	4. 巻 in press
2. 論文標題 Construction of white-rot fungal-bacterial consortia with improved ligninolytic properties and stable bacterial community structure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ISME communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 森智夫、寺島大貴、松村真輝、鶴田紘大、河岸洋和、平井浩文
2. 発表標題 高リグニン分解選択性を示すモデル白色腐朽菌 - 細菌複合微生物系の構築
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴田 紘大、寺島 大貴、森 智夫、河岸洋和、平井浩文
2. 発表標題 リグニン分解選択性に優れたモデル白色腐朽菌 細菌複合微生物系の構築
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会（名古屋・岐阜大会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 紙本 葉月、森 智夫、河岸 洋和、平井 浩文
2. 発表標題 高リグニン選択性を有する白色腐朽菌 <i>Phanerochaete sordida</i> YK-624-細菌複合微生物系の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第65回リグニン討論会
4. 発表年 2020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)	
研究 分担者	河岸 洋和 (Hirokazu Kawagishi) (70183283)	静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授 (13801)	削除：2020年9月30日

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
---------	---------