

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 22日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21248023

研究課題名（和文） 高機能化微生物を利用した木質バイオリファイナリー技術の構築

研究課題名（英文） WOODY BIOREFINERY BY HIGHLY FUNCTIONAL FUNGI

研究代表者

近藤 隆一郎（KONDO RYUICHIRO）

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：80091370

研究成果の概要（和文）：リグノセルロース資源からのバイオ燃料生産を目的とし、環境低負荷型のバイオリファイナリーツールとしての新たな生物的处理法の開発を目指した。白色腐朽菌である *Phanerochaete sordida* YK-624 株の分子育種を試み、高活性リグニン分解菌を作出した。さらに、白色腐朽菌によるエタノール発酵菌のスクリーニングを試み、*Phlebia* sp. MG-60 株が選抜され、脱リグニン、糖化、発酵をワンポットで可能なプロセスを提案した。

研究成果の概要（英文）：The ligninolytic properties of manganese peroxidase over-expressed transformant from hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 were determined. The transformant showed higher ligninolytic activity and selectivity than the wild type. White-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60 was identified as a good producer of ethanol from several cellulosic materials containing lignin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,100,000	4,530,000	19,630,000
2010年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2011年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
年度			
年度			
総計	35,300,000	10,590,000	45,890,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：木質バイオマス・バイオエタノール

1. 研究開始当初の背景

バイオリファイナリーとは、再生可能資源であるバイオマスからバイオ燃料や化成品を作り出すプラントや技術の事である。現在までに発達してきた石油化学工業（オイルリファイナリー）に対して、石油エネルギーへの依存性や環境負荷を低減させる利点がある。現在、世界中で盛んに研究・開発が行われているバイオエタノールを始めとしたバイオ燃料の生産技術もバイオリファイナリーの一部に含まれる。バイオリファイナリー開発における基盤技術は、近年急速に発展してきたポス

トゲノム関連技術であり、この技術を駆使して高効率なプロセス体系を確立する事がバイオリファイナリー実現化への鍵となる。

2. 研究の目的

石油燃料からバイオ燃料への移行は、石油への依存性低下、環境負荷低減などの観点から世界的な流れとなっている。本研究では、リグノセルロース資源からのバイオ燃料生産を目的とした、環境低負荷型のバイオリファイナリーツールとしての新たな生物的处理法の開発を目

指した。

3. 研究の方法

3-1 前処理(脱リグニン)用超高活性リグニン分解菌の分子育種

3-1-1 木材腐朽時高発現タンパク質遺伝子プロモーターの取得及びその効果

供試菌として、*Phanerochaete sordida* YK-624 株を使用した。本菌をエタノールによる脱脂処理を行った風乾ブナ木粉(60-80 mesh) 1 g 及び蒸留水 2.5 ml を含む 100 ml 容三角フラスコに接種し、30°C で 7 日間培養した。本培養系より抽出用緩衝液を用いてタンパク質を抽出し、これを二次元電気泳動に供した。泳動後、強く発現しているタンパク質 (BUNA2) を切り出し、LC-M/MS 解析に供し、Mascot 解析及び de novo シーケンシングによりトリプシン消化断片のアミノ酸配列を解析した。得られたアミノ酸配列断片の情報を用いて縮重プライマーを設計し、縮重 3' RACE PCR を行った。さらに 5' RACE 法を行い、目的タンパク質の完全長 cDNA を取得した。その後、TAIL 及び inverse PCR により目的遺伝子 (*bee2*) のプロモーター領域を取得した。*bee2* プロモーター制御下にてマンガネロペルオキシダーゼ (MnP) 遺伝子 (*mnp4*) が発現するプラスミドを構築し、これを YK-624 株に形質転換した。得られた形質転換株については、実際にリグニン分解試験に供した。

3-1-2 5-アミノレブリン酸シンターゼ

(ALAS) 遺伝子のクローニング及び本遺伝子高発現の MnP 産生に与える影響

各種担子菌及び糸状菌由来 ALAS のアミノ酸配列情報より縮重プライマーを設計し、縮重 PCR を行った。さらに RACE 法及び inverse PCR により ALAS 遺伝子完全長 cDNA を取得し、ゲノム PCR により ALAS 遺伝子ゲノム DNA も取得した。*mnp4* プロモーター制御下にて ALAS 遺伝子が発現するプラスミドを構築し、YK-624 株に形質転換した。得られた形質転換株について MnP 産生能を調査した。

3-2 キチリメンタケへの遺伝子導入

褐色腐朽菌キチリメンタケ KU-41 株は、難腐朽性バイオマスであるスギ材を速やかに分解する優れた特性を持つ。しかしながら褐色腐朽菌は高分子リグニンの分解力を持たず、木質バイオマス中のセルロースのみを分解する性質がある。それとは対照的に、白色腐朽菌はリグニンペルオキシダーゼ、マンガネロペルオキシダーゼ等によって高分子リグニンを分解する能力を有するが、難腐朽性バイオマスであるスギ材上ではほとんど生育

しない。そこで、キチリメンタケ KU-41 株に白色腐朽菌由来の高分子リグニン分解酵素群を発現させることによって、スギ材の腐朽速度を上昇させるとともに高分子リグニンを低分子化し、芳香族性有用化合物を蓄積させることを計画した。研究開始時にはキチリメンタケにおける遺伝子導入系が存在していなかったため、本菌における遺伝子導入系の構築をまず行った。

3-3 白色腐朽菌によるエタノール発酵

3-3-1 菌の選抜

未同定株を含む 29 株の白色腐朽菌を用いた。基質としてグルコース及びアビセルを用い、両者に高い発酵能を有する株を選抜した。

3-3-2 各種炭水化物の発酵能測定

炭素源として、D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-fructose, D-xylose, L-arabinose, 広葉樹末晒クラフトパルプ (UHKP), 新聞紙を用い、それぞれに対する発酵能を調べた。生成したエタノールの定量分析は、以下のように行った。所定期間培養した培地から液層を 1.5ml 回収し、13,600g × 10min, 4°C で遠心分離した後、上清を 1.0ml 採取した。採取した上清を滅菌水で 5 倍希釈し、フィルター (0.45 μm) を通して濾過し、分析試料とした。分析試料は、HPLC にて分析した。

3-3-3 主成分分析

NREL 法に従い、材料の酸不溶性リグニンと構成糖を分析した。構成糖の分析はアルギニンによるポストカラム誘導体化を行うことで分析感度を高めた還元糖分析システムを用いた。

4. 研究成果

4-1 前処理(脱リグニン)用超高活性リグニン分解菌の分子育種

4-1-1 木材腐朽時高発現タンパク質遺伝子プロモーターの取得及びその効果

超高活性リグニン分解菌の分子育種にあたり、木材腐朽時に高発現する遺伝子プロモーターを取得するため、供試菌をブナ木粉に接種し、得られたタンパク質を二次元電気泳動に供した。その結果、中性～塩基性領域に 3 つの強スポット (BUNA1, BUNA2, BUNA3) が見られ、解析が容易だった BUNA2 についてさらに検討を行った。BUNA2 の遺伝子クローニングを行った結果、非翻訳領域を含む 1166 bp の完全長 cDNA の取得に成功し、さらに、*bee2* の開始コドンより 5' 側のの上流領域 1626 bp のプロモーター領域の取得にも成功した。

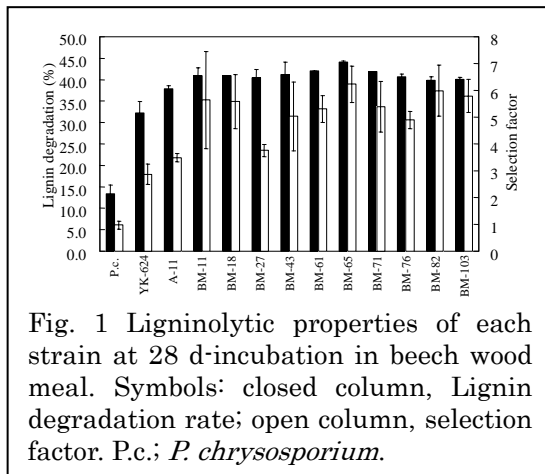


Fig. 1 Ligninolytic properties of each strain at 28 d-incubation in beech wood meal. Symbols: closed column, Lignin degradation rate; open column, selection factor. P.c.; *P. chrysosporium*.

bee2 プロモーター制御下にて *mnp4* が発現するプラスミドを構築し、これを YK-624 株に形質転換した結果、10 株の目的遺伝子導入株を取得した。これをブナ木粉に接種し、30°C で 4 週間培養した結果、全ての株が野生株より高いリグニン分解率を示し、特に BM-65 株は野生株と比較して 1.35 倍のリグニン分解率を示した (Fig. 1)。つまり、今回取得した *bee2* プロモーターは、YK-624 株のリグニン分解特性の改善に有効であることが示された。

4-1-2 ALAS 遺伝子のクローニング及び本遺伝子高発現の MnP 産生に与える影響

リグニン分解酵素である MnP やリグニペルオキシダーゼは活性中心にヘムを含む。そのため、これらリグニン分解酵素高生産株の分子育種を考えた場合、ヘムの供給 (生合成) も考慮する必要がある。そこで、ヘム生合成において律速段階の酵素である ALAS に着目し、本酵素遺伝子のクローニングを行うと共に、本遺伝子高発現の MnP 産生に与える影響について検討した。

遺伝子クローニングの結果、非翻訳領域を含む 2,203 bp の完全長 cDNA 及び 1,972 bp の genomic DNA の取得に成功した。

mnp4 プロモーター制御下にて ALAS 遺伝子が発現するプラスミドを構築し、これを YK-624 株に形質転換した結果、14 株の目的遺伝子導入株 (A 株) を取得した。Kirk LN-HC 液体培地で 20 日間培養し、培養液を用いてこの期間の MnP 活性を測定した。比較対象として、U 株 (マーカー遺伝子のみ導入した株) を 5 株用いた。A 株 14 株の MnP 活性の積算値の平均が 77.2 ± 21.8 nkat であり、一方で U 株 5 株の平均値は 65.7 ± 6.5 nkat であった (Fig. 2)。これら 2 つの系を統計処理した結果、有意差が見られ、ALAS 遺伝子の高発現が MnP 生産能を向上させることが示された。

4-2 キチリメンタケへの遺伝子導入

遺伝子導入系構築を成功させるにあたって

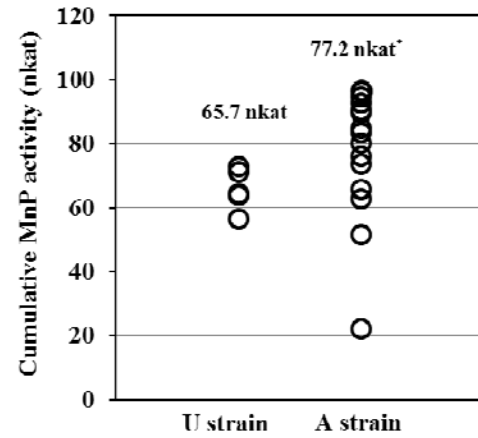


Fig. 2 Cumulative MnP activities of transformants which showed higher expression of ALAS gene.

重要なパラメーターであるプロトプラスト生成量及び再生率を最適化し、良質の KU-41 株由来プロトプラストを調製するプロトコルを確立した。KU-41 株より構成的発現遺伝子 GPD (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) を取得し、その配列を利用してハイグロマイシン耐性遺伝子を発現させるマーカープラスミドを構築した。本遺伝子を利用して形質転換を行ったところ、一回の操作で数百の形質転換体を得られたことから、高効率の KU-41 株遺伝子導入系が構築できたことを確認した。また、本遺伝子導入系を利用して緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を導入したところ、菌糸が強い緑色蛍光を発したことから、KU-41 株において任意の外来遺伝子を導入可能であることが示された (Fig. 3)

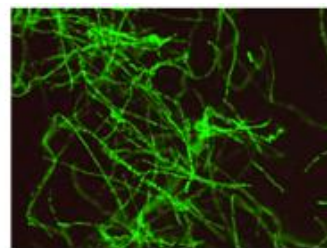


Fig. 3 KU-70 株における EGFP 発現

4-3 白色腐朽菌によるエタノール発酵

4-3-1 *Phlebia* sp. MG-60 の選抜

選抜の過程で、供試した担子菌はいずれも半嫌気条件でグルコースからエタノールを生産した。しかしながら生産量は菌株によって大きく異なり、試験に供した 12

株の白色腐朽菌のうちグルコースを基質として高いエタノール発酵（理論収率の70%以上）が観察されたものは3種（*Phlebia* sp. MG-60、*Punctularia* sp. TUFC20056、および未同定株 SUGI 32）であった。さらに、微結晶性セルロースを基質としたエタノール発酵が観察されたのは *Phlebia* sp. MG-60 と未同定株 SUGI32 であった。発酵効率は *Phlebia* sp. MG-60 が最も高く、480 h の培養で 2.8 g/L のエタノール溶液が得られ、これは理論収率の 25.3% に相当する。従って本菌株を用いてさらに検討を行うこととした。

4-3-2 UHKP および新聞紙の組成分析

リグニン含量は UHKP および新聞紙それぞれ 2.5 および 15.2% であった。新聞紙は再生紙の含有率が高まっているものの、脱リグニン処理を施さない機械パルプが多く含まれているため、多くのリグニンが含まれている。また、検出された構成糖とリグニン量を合計すると、UHKP はほぼ 100% であるのに対し、新聞紙は 85.8% であった。新聞紙は印刷に使用されたインクなどが含まれていることが原因と考えられた。それぞれの材料の糖組成から算出されたエタノールの理論収率は 584 mg/g UHKP および 413 mg/g 新聞紙と見積もられ、この値を元に検討を進めた。

4-3-3 セルロース基質の発酵

Phlebia sp. MG-60 用いた広葉樹クラフトパルプからの直接エタノール発酵を行った結果を Fig.4 に示す。寒天片を接種し、半好気的条件下で培養した場合、エタノールの生産は培養開始 48 時間以降に始まり、288 時間後にほぼ最高値となる 7.1 g/L のエタノールが検出された。これは 0.36 g エタノール/g UHKP の変換率であり、糖組成から算出された理論収率の 60.7% となる (Fig. 4 A)。一方、菌糸体の破砕物を接種し、半好気条件下で培養した場合、エタノール生産の初期速度と、最大収率が改善した。エタノールの生産は培養 24 時間後から始まり、168 時間までに 8.4 g/L のエタノールが検出された。これは 0.42 g エタノール/g UHKP の変換率であり、糖組成から算出された理論収率の 71.8% となる (Fig. 4 B)。以上のことから本菌は広葉樹未晒クラフトパルプから酵素添加なしに直接エタノールを生産可能であることが示され、接種方法を工夫することで発酵速度も改善可能であることが示された。また新聞紙を発酵基質として用いた結果を Fig.4 C に示す。菌糸体の破砕物を接種し、半好気条件下で培養した場合、エタノールの生産は培養 24 時間後から始まり、216 時間までに 4.2 g/L のエタノールが検出された。これは 0.20 g エタノール/g 新聞紙の変換率であり、糖組成から算出された理論収率の 51.1% となる。以上のことから本菌はリグニンと不純物であるインクを含む

新聞紙からも酵素添加なしに直接エタノールを生産可能であることが示された。

4-4-3 単糖の発酵性

ヘキソース（グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース）を発酵基質としたとき、いずれの糖も効率よくエタノー

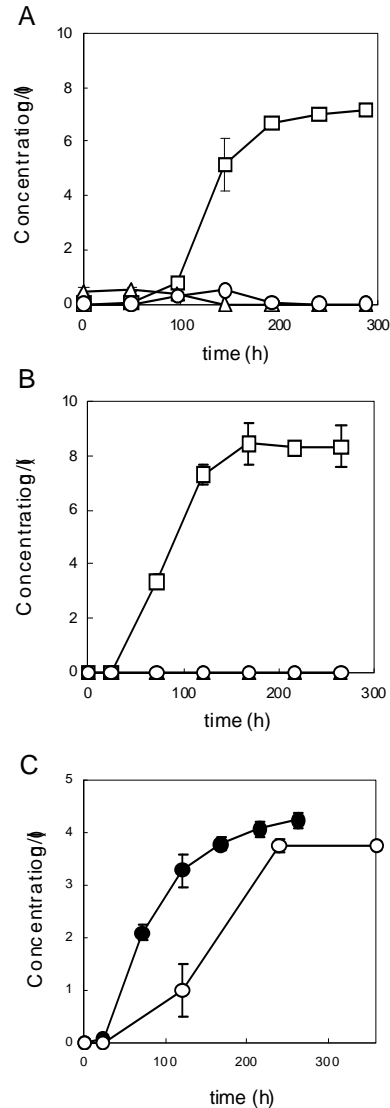


Fig. 4 *Phlebia* sp. MG-60 を用いたセルロース基質の直接発酵。A:UHKP に菌糸片を接種, B:UHKP に菌糸体破砕物を接種, C:新聞紙の発酵: ○菌糸片接種, ●菌糸破砕物接種

ルに変換された（それぞれ理論収率の 86.9, 79.0, 79.5, 78.2%）。一方、ペントース（キシロースおよびアラビノース）を発酵基質とした場合、アラビノースの発酵は観察されなかった。しかしながら、キシロースを発酵基質とした場合に理論収率の 65.0% のエタノールが生産された。また同時に 1.3 g/L のキシリトールの生産も確認された。

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3件)

① Kamei et al. Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60、*Bioresource Technology*、査読有、2012、In press.

〔学会発表〕(計37件)

- ① 亀井一郎、廣田佳幸、目黒貞利、平井浩文、山岸賢治、森智夫、近藤隆一郎、高機能性微生物による木質バイオリファナー ～白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株によるセルロースの直接エタノール発酵～、第56回リグニン討論会、2011年9月16日、山形大学。
- ② 平井浩文、杉浦立樹、河岸洋和、亀井一郎、森智夫、近藤隆一郎、高機能性微生物利用型木質バイオリファイナー技術の開発 – 脱リグニンプロセス用超リグニン分解菌の分子育種、第63回日本生物工学会大会、2011年9月27日、東京農工大学。
- ③ Ichiro Kamei, Daisuke Enami, Tatsuya Minami, Sadatoshi Meguro, Hirofumi Hirai, Toshio Mori, Ryuichiro Kondo, Isolation of saccharification enzymes-producing fungi and functional screening of novel genes from metagenome libraries derived from soils, 33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2011年5月3日、シアトル(米国)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：担子菌を用いるエタノールの製造方法

発明者：亀井一郎 他

権利者：

種類：特願

番号：2011-122579

出願年月日：平成23年5月31日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 隆一郎 (KONDO RYUICHIRO)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：80091370

(2)研究分担者

平井 浩文 (HIRAI HIROFUMI)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：70322138

亀井 一郎 (KAMEI ICHIRO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90526526

山岸 賢治 (YAMAGISI KENJI)

独) 農業・食品産業技術総合研究機構

東北農業研究センター・主任研究員

研究者番号：80355304

(3)連携研究者

()

研究者番号：