

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580455

研究課題名(和文)銅耐性担子菌による銅含有木材防腐剤処理廃材からの銅回収

研究課題名(英文)Removal of copper from wood waste treated with copper-containing wood preservative

研究代表者

服部 武文(HATTORI, Takefumi)

徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部・准教授

研究者番号：60212148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：銅耐性木材腐朽菌オオウズラタケ、チョークアナタケを、銅含有木材ブロックと培養した。腐朽による重量減少が無い培養2週間で、菌から分泌されたシュウ酸は、シュウ酸銅鉱物moolooiteを木材表層に形成させた。その時点で、moolooiteと木材表層の菌糸を除去すると、オオウズラタケで42.9%、チョークアナタケで34.7%の銅が除去された。加えて、オオウズラタケは、木材ブロックから離れた地点まで、銅を運搬していることが示された。さらに、オキサロ酢酸加水分解酵素は、シュウ酸生合成の主要な酵素であることを、遺伝子発現量を比較し明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Copper-sulfate treated wood was cultivated with copper tolerant wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris* and *Antrodia xantha*, separately. At 2 weeks, when weight loss of the wood has not been observed, oxalate secreted from fungi precipitated copper oxalate complex, moolooite, on interface between the wood block surface and the fungal mycelia colonized on it. Removal of moolooite together with the colonized mycelia, 42.9% (*F. palustris*) and 34.7% (*A. xantha*) of copper was removed. Furthermore, the mycelia of *F. palustris* were shown to transport copper from wood specimens to a place far from the wood block. On the other hand, an oxalate biosynthetic pathway in *F. palustris* was assessed based on amounts of gene transcripts encoding two oxalate-producing enzymes: oxaloacetate acetylhydrolase (FpOAH) and glyoxylate dehydrogenase (FpGLOXDH). FpOAH was found to be mainly responsible for oxalate biosynthesis in this fungus.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：銅除去 銅耐性菌 オオウズラタケ チョークアナタケ シュウ酸 シュウ酸銅 銅運搬 木材防腐剤

### 1. 研究開始当初の背景

人間活動による重金属汚染は世界的に広がっている。木材産業では、銅、ひ素、クロムを含む防腐剤(CCA)で処理された廃材を、安全に廃棄処理する方法が未開発である。この廃材は、日本では20万立米/年、米国ではこの数十倍は発生し、蓄積する一方である。また、現在日本では、CCAに代わり銅含有防腐剤により10万立米/年の木材が新たに処理され使用されている。そこで、銅を含む重金属を安全に防腐処理木材から除去し、回収する技術開発(重金属のレメディエーション)は緊喫の課題である。

これまで検討された、CCA処理木材を高温で熱分解・燃焼させ、有害金属を捕集する方法では、ひ素が揮発し、その放出を阻止できないと指摘されている。一方、溶媒抽出回収法では、CCA処理木材をキレート剤、無機酸、有機酸を含む溶媒により重金属を抽出する。比較的抽出効率は高いが、コストが高いことが指摘されている。それに対し、微生物処理法は、バクテリア、真菌類の菌糸を用いた培養処理、またはその培養液を用いた重金属抽出処理であり、溶媒抽出回収法と比較し、低コストであると指摘されている。

微生物処理方法では、銅に耐性を持つ木材腐朽菌が候補菌として注目されている。この銅耐性は木材腐朽菌が分泌するシュウ酸が、菌に毒性を示す銅を、シュウ酸銅として沈殿させ菌糸に吸収させなくするため、発揮されると考えられている。しかし、菌糸を用いた培養処理においては、銅の除去率が低いことが問題とされている。すなわち、木材廃材内部において難水溶性のシュウ酸銅が生成し沈殿する事により、その後の処理においても容易には銅が除去できなくなることが原因と考えられている。

代表者服部は、このシュウ酸生合成機構を含む炭素代謝機構に関し、銅耐性菌であるオオウズラタケを用い解明してきた。その結果、本菌は通常の生物とは異なるTCA回路を持ち、これまた先例の無い構成的に作用する特異なグリオキシル酸(GLOX)回路が、常時TCA回路と協調しながらシュウ酸発酵を行い、菌糸生育に必要なエネルギー獲得をしている事を明らかにした。

さらにシュウ酸生合成酵素として、グリオキシル酸脱水素酵素(FpGLOXDH)と、オキサロ酢酸加水分解酵素(FpOAH)の2種を明らかにした。FpGLOXDHはcDNAクローニングを行ったが、FpOAHは精製できず、cDNAクローニングも達成できていなかった。

また、分担者酒井は、木材保存剤(木材用防腐防蟻剤)を含浸させた木材杭を使った野外防腐効力試験において、処理杭の腐朽の進行状況を観察し耐用年数を推定する研究を長年実施してきた。その過程で、銅含有木材防腐剤で処理したにもかかわらず、腐朽が進行するという現象に直面した。そこで、自然界で実際に活動している銅耐性菌を用いて、

銅含有木材防腐剤で処理された木材の腐朽機構を検討することで、自然界において担子菌が木材中の重金属を移動集積・変質させる機構や、環境汚染への影響等に関する新しい知見を得ることができると発想した。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究は2つの課題のもと研究を行った。

(1) 銅耐性木材腐朽菌の銅含有木材処理における、銅移動集積の検討

(2) 銅耐性木材腐朽菌の銅耐性に重要と考えられる、シュウ酸の生合成機構に関するさらなる知見の獲得

申請研究で得る知見を基に、新規木材防腐剤の開発と、廃棄木材からの環境に配慮した理想的な重金属回収を、システムとして提案する考えである。

### 3. 研究の方法

(1) 銅耐性木材腐朽菌の銅含有木材処理における、銅移動集積の検討

培養処理：

自然乾燥させたスギ辺材(20 mm×20 mm×20 mm)に、硫酸銅水溶液を加圧注入し銅を平均0.4重量%含浸させた。調製した銅含有試験片をJISK1571(2010)を参考に、オオウズラタケ(*Fomitopsis palustris*)、チョークアナタケ(*Antrodia xantha*)により、2、4、6週間培養処理した。銅を含有しない(銅非含有)スギ辺材も、同様に培養処理した。さらに、植菌せず同様に処理した銅含有試験片をコントロール試験片とした。

培養処理後の試験片に残存した銅の定量：

培養処理が終了した試験片の表面から菌糸マットおよび表層に蓄積した薄青緑物質を除去した後、5個の試験片について残存した銅の量を蛍光X線分析法により定量した。培養処理による銅除去率は以下の式により求めた。

$$\text{銅除去率(重量\%)} = 100 - \frac{\text{培養試験片中の銅重量} \times 100}{\text{コントロール試験片中の銅重量}}$$

培養処理木材に含まれるシュウ酸の定量：

培養処理試験片からシュウ酸を1N-HClで振とう(150 rpm)抽出し、ENZYTEC OXALIC ACID (R-Biopharm AG)キットにより定量した。

菌糸に含有された銅の定量：

木材片に直接接していない菌糸を採集し、ICP発光分光分析装置により定量した。

培養処理木材表層に生成された物質の同

定：

X線結晶回折により同定した。

(2) 銅耐性木材腐朽菌の銅耐性に重要と考えられるシュウ酸の生合成機構に関するさらなる知見の獲得

cDNA *FpOAH* クローニング：

オオウズラタケを静置液体培養し、培養 5 日菌体より抽出した RNA から cDNA を調製した。子嚢菌、担子菌のオキサロ酢酸加水分解酵素遺伝子で、アノテーションのみ、及び、当該酵素活性も示されているものを基にプライマーを設計し、PCR、5'、3'-RACE により、cDNA 断片を調製した。オオウズラタケ cDNA ライブラリーを鋳型として、当該酵素のコード領域全長を PCR により得た。pET23a を用い、大腸菌で組換え酵素を調製、精製した。酵素反応で生成したシュウ酸を GC-MS で定量し、活性を確認した。

*FpOAH*, *FpGLOXDH* の発現量の比較：

*FpOAH*, *FpGLOXDH* が組み込まれた pET23a を用い qRT-PCR の検量線を作成し、培養時におけるこれら遺伝子の発現を定量的に評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 銅耐性木材腐朽菌の銅含有木材処理における、銅移動集積の検討

両菌共、培養処理 2 週間で、銅含有木材の全面が菌糸にほぼ覆われた。その時点で、銅含有木材の表層には、薄青緑色の物質が生成していた。それは、シュウ酸銅鉍物 moolooite であることを、X線結晶回折により明らかにした。同時期、この木材表層に直接接していない箇所のおオウズラタケ菌糸からは、銅非含有木材の相当する腐朽菌糸の、7.5 倍以上の銅が検出された。この時点、銅含有木材に蓄積されたシュウ酸量は、6 週間経過時の 0.25 倍であった。

これらの結果は、オオウズラタケが銅含有木材の表層を被覆した時点では、シュウ酸含量が低いにもかかわらず、既に木材表層に直接接していない箇所まで、銅を運搬していることを示している。その機構の解明には今後の検討が必要であるが、菌糸を通して運搬されていることが強く示唆される。木材表層のシュウ酸銅鉍物と菌糸を取り除くことで、木材中の銅は、オオウズラタケにより 42.9% (2 週) 46.0% (6 週)、またチョークアナタケにより 34.7% (2 週) 40.7% (6 週) 除去された。これは培養 2 週間の時点で、97.2% (オオウズラタケ)、85% (チョークアナタケ) が除去された事となる。このように、微生物処理方法は長期間を有することが欠点の 1 つとされるが、両菌の銅の運搬は菌糸の被覆時点で速やかに進行していることが見出された。

(2) 銅耐性木材腐朽菌の銅耐性に重要と考えられる、シュウ酸の生合成機構に関するさらなる知見の獲得

cDNA *FpOAH* の解析により、*FpOAH* は、他生物に由来するオキサロ酢酸加水分解酵素と同じく、ICL/PERM\_KPHMT enzyme super family に属することが分かった。組換え *FpOAH* はオオウズラタケより調製された粗酵素と同様、マンガン(II)存在下当該酵素活性を示した。*FpOAH* の発現量は *FpGLOXDH* の発現量よりも 22~148 倍高かった。

この結果は、銅無添加条件下で、*FpOAH* が触媒する経路がシュウ酸生合成の主要経路とする提案を遺伝子レベルで確認した物である。

以上、木材廃材ブロックからの銅回収システム構築に利用し得る、木材腐朽菌を見出した。さらに、ブラシによる簡便な銅除去に重要な、菌糸による銅の運搬に関する知見を得た。また、木材表面においてシュウ酸銅を形成する、シュウ酸生合成経路を明らかにした。

本研究の結果を基に、将来的には図 1 に示す重金属回収システムを提案する予定である。すなわち、防腐剤処理木材を使用中は担子菌による重金属の移動集積がなく、廃棄木材を組換え微生物処理することにより、容易に重金属を回収できるシステムである。

これに向けて、木材廃材ブロックからの銅回収システム構築のため、現在用いられている銅含有防腐剤からの銅回収を検討しているところである。

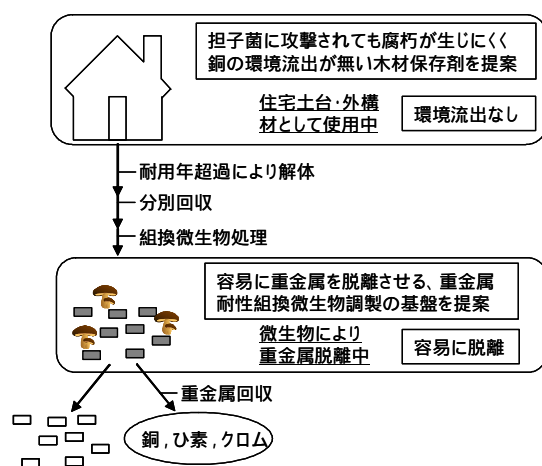


図 1 木材防腐剤回収システム

#### 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 1 件)

Hiroichi Hisamori, Tomoki Watanabe,

Shiro Suzuki, Kumiko Okawa, Haruko Sakai, Tsuyoshi Yoshimura, Toshiaki Umezawa and Takefumi Hattori, Cloning and expression analysis of a cDNA encoding an oxaloacetate acetylhydrolase from the brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*, Sustainable Humanosphere, vol. 9, 57-64 (2013). 学内者による査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

服部武文：きのこの特徴的な代謝とその役割 グリオキシル酸(GLOX)回路を中心として，第 64 回日本木材学会大会，平成 26 年 3 月 13 日～15 日，愛媛大学，(愛媛県、松山市)

服部武文，鈴木史朗，吉村剛，梅澤俊明，酒井温子：銅耐性担子菌による銅含有木材防腐剤処理廃材からの銅除去機構，第 64 回日本木材学会大会，平成 26 年 3 月 13 日～15 日，愛媛大学，(愛媛県、松山市)

久森弘道，酒井温子，鈴木史朗，吉村剛，梅澤俊明，服部武文：銅耐性担子菌による銅含有木材防腐剤処理廃材からの銅回収，第 63 回日本木材学会大会，平成 25 年 3 月 27 日～29 日，岩手大学，(岩手県、盛岡市)

久森弘道，渡邊知樹，鈴木史朗，大川久美子，酒井温子，吉村剛，梅澤俊明，服部武文：銅耐性褐色腐朽菌オオウズラタケ(*Fomitopsis palustris*)のシュウ酸生合成におけるオキサロ酢酸加水分解酵素の役割，第 62 回日本木材学会大会，平成 24 年 3 月 15 日～17 日，北海道大学，(北海道、札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

服部 武文 (HATTORI, Takefumi)  
徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部・准教授  
研究者番号：60212148

### (2) 研究分担者

酒井 温子 (SAKAI, Haruko)  
奈良県森林技術センター・木材利用課・主任研究員  
研究者番号：90205708

梅澤 俊明 (UMEZAWA, Toshiaki)  
京都大学・生存圏研究所・教授  
研究者番号：80151926

吉村 剛 (YOSHIMURA, Tsuyoshi)  
京都大学・生存圏研究所・教授  
研究者番号：40230809

鈴木 史朗 (SUZUKI, Shiro)  
京都大学・生存圏研究所・助教  
研究者番号：70437268