

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580475

研究課題名(和文)木質バイオマスからのワンステップ乳酸生産菌の開発

研究課題名(英文)Development of lactate-producing white-rot fungi from woody biomass

## 研究代表者

平井 浩文(HIRAI, Hirofumi)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70322138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：高活性リグニン分解菌*Phanerochaete sordida* YK-624株をベースとした乳酸生産菌の分子育種を行った。乳酸菌由来乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)遺伝子を導入したところ、最大で0.690 g/Lの乳酸産生量を示す株の取得に成功した。ピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子ノックダウンプラスミドを構築し、本プラスミド及びLDH遺伝子発現プラスミドを共形質転換した結果、乳酸産生が改善され、最大で0.922 g/Lの乳酸産生量を示す株の取得に成功した。またリグニン分解を効率的に行える固体培養バイオリアクターの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the molecular breedings of lactate-producing fungi in *Phanerochaete sordida* YK-624. Lactate dehydrogenase (LDH) gene of *Bifidobacterium longum* was introduced in *P. sordida* YK-624, and 0.690 g/L lactate was detected in culture fluid inoculated with the most producing transformant. To improve the production of lactate, we constructed pyruvate decarboxylase gene-knock down plasmid. Both the LDH expression plasmid and the knock down plasmid were co-transformed into *P. sordida* YK-624, and 0.922 g/L lactate was detected in culture fluid inoculated with the most producing transformant. Moreover, we developed the bioreactor which lignin was effectively degraded by white-rot fungi under solid state fermentation.

研究分野：環境生化学

キーワード：乳酸発酵 白色腐朽菌 バイオリアクター

## 1. 研究開始当初の背景

21世紀を迎え、資源・環境問題はますます深刻になりつつある。石油を始めとする化石資源の枯渇問題や、東日本大震災における原子力発電所事故から、再生可能資源の導入や、温室ガス削減に向けたバイオマス的大幅導入が社会的にも急務な課題となっている。なかでも、再生可能資源から作られるバイオマスプラスチックの利用が注目され、かつ多方面で検討されている。その代表的素材が、乳酸を原料として作られるポリ乳酸(PLA)である。乳酸は、主としてジャガイモやトウモロコシ等から得られるデンプンを糖化し、得られる生成グルコースを乳酸菌により発酵させ生産されている。しかしながら、ジャガイモやトウモロコシは食用植物であり、PLAの需要が拡大されれば、これら植物に由来する様々な食糧の価格が高騰するといった社会問題を引き起こすことが容易に推測される。そのため、非可食セルロース系バイオマスからの乳酸生産技術開発が急務な課題となっている。セルロース系バイオマスの代表格は木材であるが、木材は難分解性芳香族高分子化合物であるリグニンを約3割含み、この疎水性リグニンによりセルロースを容易に糖化出来ないといった実用面で大きな障害を抱え、未だ実用に至っていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

乳酸の生産に、木質系の非可食性素材を利用し、高効率に乳酸を生産する技術開発こそが次世代を見据えた革新的イノベーションとして期待される。木材から乳酸を生産する場合、リグニンの特異的除去(除去技術)及びセルロースのグルコースへの分解(糖化技術)、グルコースの乳酸発酵(発酵技術)、この2つの技術が統合的に機能しないと、汎用性の高い技術開発は困難である。

申請者らのこれまでの業績から、高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624株の分子育種により、木材からワンステップで乳酸を生産する画期的方法を考案した。

そこで本申請では、『木材(リグニン及びセルロース)分解能の強化及び乳酸発酵能の付与』により、木材からワンステップで乳酸を生産する白色腐朽菌株の作出を行い、全く新しい角度から乳酸生産技術を構築する。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)遺伝子発現プラスミドの構築

本実験では *P. chrysosporium* 由来 LDH 遺伝子 (*Pcldh*) 及び乳酸菌 *Bifidobacterium longum* 由来 LDH 遺伝子 (*Blldh*) を使用した。*Pcldh* の場合 MnP 遺伝子プロモーターにより、*Blldh* の場合 GPD 遺伝子プロモーターにより発現するプラスミドを構築した。なお *Blldh* の場合、*P. chrysosporium* ゲノム

配列情報を元にコドン最適化を行った。

### (2) ピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)遺伝子ノックダウンシステムの構築

本研究では RNAi 法を用いて、*P. sordida* YK-624 株由来 PDC 遺伝子 (*Pspdc*) ノックダウンシステムの構築を試みた。*Pspdc* の一部配列 (1st exon+1st intron+2nd exon) をセンス鎖及びリンカーとして、これに 1st exon のアンチセンス鎖を結合させ、これを GPD 遺伝子プロモーターにより発現するプラスミドを構築した。

### (3) 形質転換

*P. sordida* YK-624 株由来 UV-64 株 (URA5 遺伝子に変異を持つウラシル要求性変異株) を培養し、菌体よりプロトプラストを調製した。本プロトプラストと目的遺伝子発現プラスミド及び URA5 遺伝子プラスミドを混合し、PEG 法により共形質転換を行った。ウラシルを含まない寒天培地に上記プロトプラストを添加し、所定期間培養後、復帰株を取得した。得られた復帰株を簡易ゲノム抽出に供し、目的遺伝子特異的プライマーを用いてゲノム PCR を行うことで、目的遺伝子導入株の選抜を行った。

### (4) 遺伝子導入株による乳酸生産試験

Kirk (HNHC) 液体培地 (*Pcldh* 導入株) もしくは発酵培地 (グルコース: 2%、Yeast extract: 1%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1%、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0.2%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.05%、pH 4.5) (*Blldh* 導入株) を使用した。これら液体培地 10 ml を含む 100 ml 容共栓付き三角フラスコに菌体を接種し、密栓後、30℃ で所定期間、静置培養を行った。

### (5) 各種定量

乳酸、エタノール、グルコース量については HPLC (カラム: Shodex SH1821、溶離液: 0.5 mM 硫酸水溶液、流速: 0.6 ml/min、カラム温度: 75℃、検出器: RI) を用いて定量した。

### (6) RT-PCR

菌体より total RNA を抽出し、PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa) を用いて、200 ng の total RNA を cDNA 化した。これをテンプレートとして、目的遺伝子特異的プライマーを用いて PCR に供し (サイクル数: 25)、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供した。また比較対象として、*P. sordida* YK-624 株由来アクチン遺伝子 (*Psact0*) も同様に RT-PCR に供した。

### (7) 固体培養用バイオリアクターの開発

下部から強制通気が可能で、木粉等の塊を数日おきに攪拌出来るバイオリアクターを設計し、製作した。

これにブナ木粉 100 g、蒸留水 203.5 ml を添加し、滅菌した。本装置に *P. sordida* YK-624 株菌体懸濁液を均一に添加し、4 週間、30℃ で培養した。また培養期間を通して、5 L/min で湿潤空気による通気を行った。

培養後、木粉中のリグニン含量を Klason 法により定量し、リグニン分解率を算出した。

#### 4. 研究成果

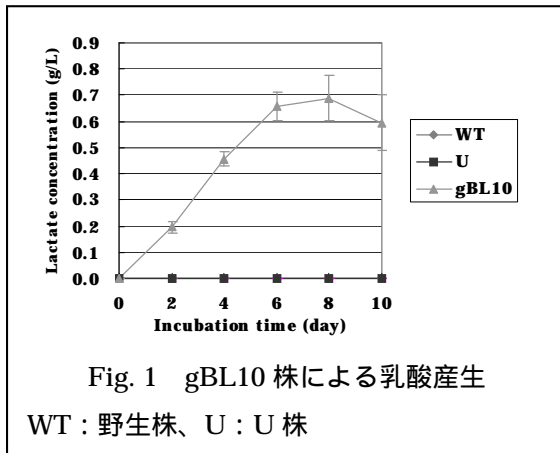
##### (1) LDH 遺伝子高発現による乳酸産生株作出の試み

白色腐朽菌による乳酸産生に関する報告はないものの、そのゲノムには LDH 遺伝子を有していることを突き止めた。そこで、全ゲノム情報が公開されている *P. chrysosporium* 由来 *Pcldh* をクローニングし、発現プラスミドを構築後、UV-64 株へ形質転換を行った。その結果、21 株の遺伝子導入株の取得に成功した。

得られた遺伝子導入株の乳酸産生能について調査したところ、大部分の株で乳酸産生が認められたものの、その濃度は極めて少なく、最も高い株で 100 mg/L (培養 10 日間) の乳酸しか検出されなかった。

原因として *P. chrysosporium* 由来 LDH は比活性が低いことが推測されたため、実際に乳酸産生能の高い *B. longum* 由来 *Blldh* を導入することにした。

その結果、18 株の遺伝子導入株 (gBL 株) が得られ、特に gBL10 株では培養 4 日間で 0.6 g/L の乳酸産生が認められた。また本株による乳酸産生の経時変化を追跡した結果、培養 8 日間にて最大の乳酸産生 (0.69 g/L) が認められた (Fig. 1)。



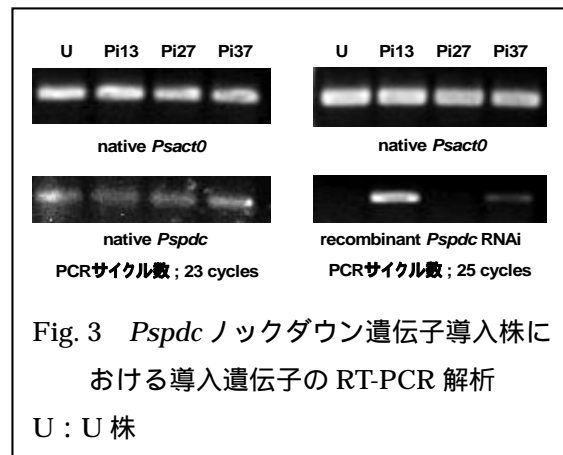
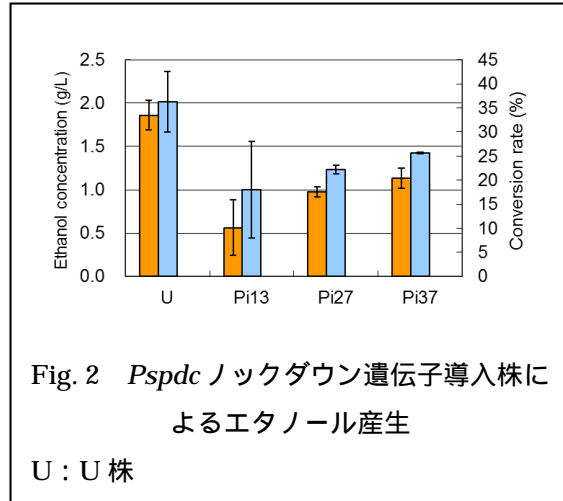
##### (2) RNAi 法を用いた PDC 遺伝子ノックダウンによるエタノール産生抑制

(1)において、*Blldh* の導入により乳酸産生能の改善が認められたが、以前として高いエタノール産生 (2.6 g/L) も観察された。LDH の基質であるピルビン酸は、アルコール発酵の鍵酵素である PDC の基質でもあるため、PDC 遺伝子の発現を抑制することにより、さらなる乳酸産生が見込まれる。そこで本研究では、RNAi 法により PDC 遺伝子発現を抑制することで、エタノール産生が抑制可能かどうか検討した。

25 株の *Pspdc* ノックダウン遺伝子導入株 (Pi 株) が得られたため、これらの株のエタノール産生能を調査した。その結果、大部分の株でエタノール産生量の低下が観察され、中でも Pi13 株ではコントロール株 (UV-64 株に URA5 遺伝子のみを導入した株 : U 株)

と比較してエタノール産生量が 0.3 倍に低下していた (Fig. 2)。また RT-PCR による発現解析により、recombinant *Pspdc* RNAi の発現、及び *Pspdc* の発現の減少を確認した (Fig. 3)。

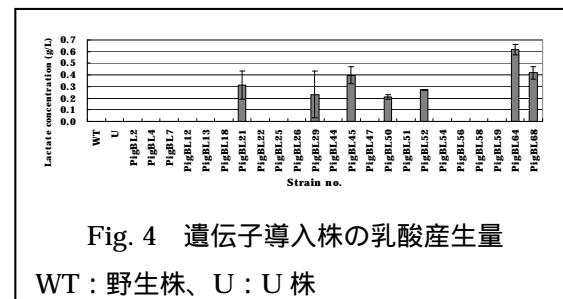
以上の結果より、*Pspdc* ノックダウンシステムの構築に成功したと結論づけた。



##### (3) LDH 遺伝子高発現及び PDC 遺伝子ノックダウンによる乳酸産生能の改善

(2)において、*Pspdc* ノックダウンシステムの構築に成功したため、本実験では 4-1 で構築した *Blldh* 発現プラスミド及び 4-2 で構築した *Pspdc* ノックダウンプラスミドの共形質転換による乳酸産生能の改善を試みた。

23 株の両遺伝子導入株 (PigBL 株) を取得し、これらの株の乳酸産生能について調査した (Fig. 4)。その結果、7 株で乳酸産生が観察され、最も高い乳酸産生を示した PigBL64 株を乳酸高産生株として選抜した。



PigBL64 株を用いて経時的に乳酸産生量を調査した結果、培養 10 日目に最も高い 0.922 g/L の乳酸産生量を示した (Fig. 5)。

RT-PCR による発現解析により、培養期間を通して recombinant *Blldh* は高発現していた (Fig. 6)。また、recombinant *Pspdc* RNAi は培養期間を通して発現量の増加が観察された。recombinant *Blldh* の発現及び、recombinant *Pspdc* RNAi の発現に伴い、乳酸産生量の上昇及びエタノール産生量が低下していたことから、*Blldh* の発現及び *Pspdc* の発現抑制と乳酸産生には正の相関性がある事が判明した。

以上の結果から、*Blldh* の発現により乳酸発酵能を付与可能であり、*Pspdc* の発現抑制により乳酸発酵能の改善が可能であると証明された。

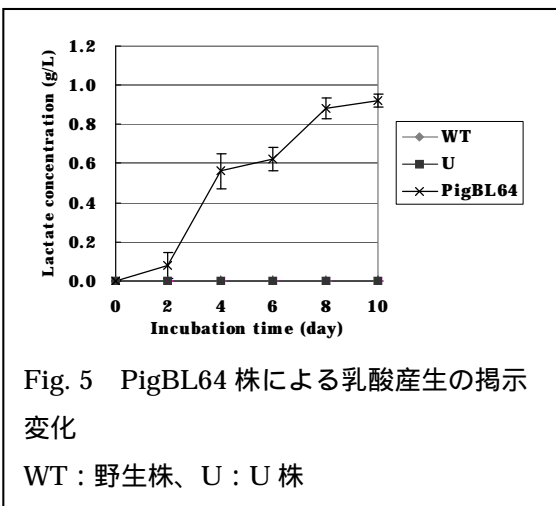


Fig. 5 PigBL64 株による乳酸産生の掲示変化

WT : 野生株、U : U 株

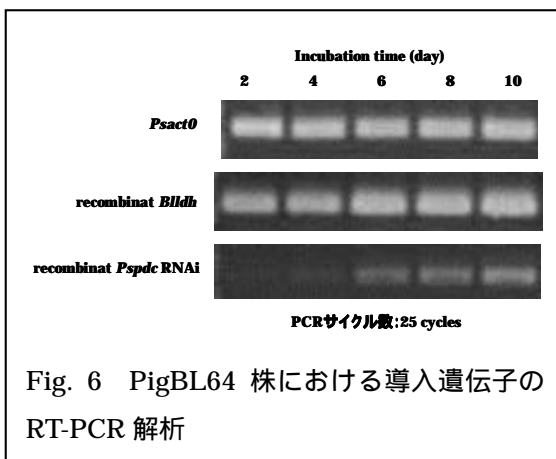


Fig. 6 PigBL64 株における導入遺伝子の RT-PCR 解析

#### (4) 固体培養用バイオリアクターの開発

木質バイオマスを原料に微生物処理により有用物質を生産するには、フラスコレベルで示すリグニン分解能及び各種発酵能を再現可能な固体培養用バイオリアクターの開発が必要である。そこで本実験では Fig. 7 に示す様なバイオリアクター装置を製作し、実際にブナ木粉のリグニン生分解試験を行った (Fig. 8)。その結果、100 ml 容三角フラスコで観察されるリグニン分解より高い分解が今回開発したバイオリアクター装置において認められた。本装置は強制的に湿潤空

気を連続通気可能であり、さらに白色腐朽菌によるリグニン生分解が定常期になる前に培地 (木粉) を攪拌することで、新たな菌糸成長が可能であるため、リグニン生分解が促進されたと予想される。

これまでに「リグニン生分解」に着目したバイオリアクター装置の開発に関する報告はない。よって本研究において、効率的に生物学的脱リグニン処理が可能なバイオリアクター装置の開発に成功したと結論づけた。



Fig. 7 製作したバイオリアクター装置

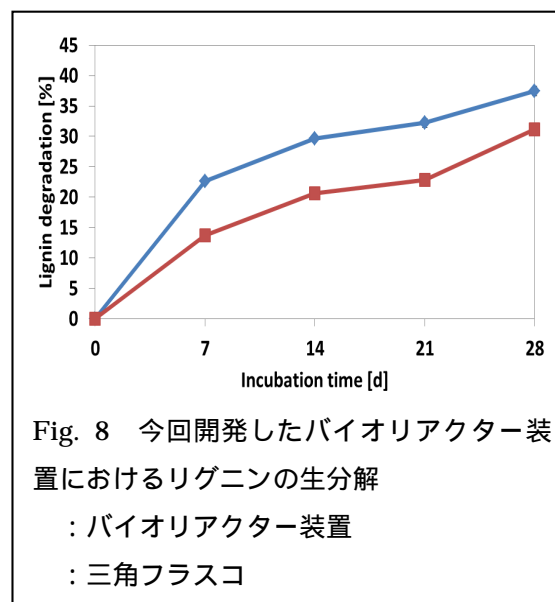


Fig. 8 今回開発したバイオリアクター装置におけるリグニンの生分解

: バイオリアクター装置  
: 三角フラスコ

#### 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)

Hirofumi Hirai, Kenta Misumi, Tomohiro Suzuki, Hiokazu Kawagishi, Improvement of manganese peroxidase production by the hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 by recombinant expression of the 5-aminolevulinic acid synthase gene, *Current Microbiology*, 査読有, Vol. 67, 2013, 708-711

10.1007/s00284-013-0428-0

Tatsuki Sugiura, Toshio Mori, Ichiro Kamei, Hirofumi Hirai, Hirokazu Kawagishi, Ryuichiro Kondo, Improvement of ligninolytic properties in the hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 using a novel gene promoter, *FEMS Microbiology Letters*, 査読有, Vol. 331, 2012, pp. 81-88

10.1111/j.1574-6968.2012.02556.x

〔学会発表〕(計 3件)

隅谷友紀、河岸洋和、平井浩文、白色腐朽菌を用いた木質バイオリファイナリー技術の構築～乳酸生産株の作出～、第65回日本木材学会大会、2015年3月18日、タワーホール船堀(東京都)

富成宏典、新谷政己、金原和秀、Development of a delignification process of woody biomass by white-rot fungi *Phanerochaete sordida* YK-624, Thailand-Japan Joint Symposium, Young Scientist Seminar Kasetsart University, 2015年3月5日, Bangkok, Thailand

隅谷友紀、河岸洋和、平井浩文、高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624株におけるRNAi技術の構築、第59回リグニン討論会、2014年9月11日、福井工業大学(福井市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biochem/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平井 浩文 (Hirai, Hirofumi)

静岡大学農学部・教授

研究者番号：70322138

(2)研究分担者

金原 和秀 (Kimbara, Kazuhide)

静岡大学工学部・教授