

高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida*
YK-624
株における新規リグニンペルオキシダーゼ高発現株
のリグニン分解特性

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2011-08-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 杉浦, 立樹, 山岸, 賢治, 平井, 浩文, 河岸, 洋和 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/5798

高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株における新規リグニンペルオキシ
ダーゼ高発現株のリグニン分解特性^{*1}

杉浦立樹^{*2}, 山岸賢治^{*3}, 平井浩文^{*4}, 河岸洋和^{*2, 4}

Ligninolytic properties of highly expressed transformant with novel lignin peroxidase from hyper
lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624.

Tatsuki SUGIURA^{*2}, Kenji YAMAGISHI^{*3}, Hirofumi HIRAI^{*4} and Hirokazu KAWAGISHI^{*2, 4}

欄外表題 : LiP を高発現する形質転換白色腐朽菌のリグニン分解特性

^{*1} Received May 21, 2010; accepted July 21, 2010.

^{*2} 静岡大学創造科学技術大学院

Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529, Japan

^{*3} 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター

National Agricultural Research Center for the Tohoku Region, National Agriculture and Food
Research Organization, Fukushima 960-2156, Japan

^{*4} 静岡大学農学部応用生物化学科

Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University,
Shizuoka 422-8529, Japan

Abstract

The ligninolytic properties of A-11, which was a YK-LiP2 over-expressed transformant from hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624, were determined. This transformant showed higher ligninolytic activity by 7.6% and selectively than wild type of *P. sordida* YK-624 in beech wood meal after 4-week incubation. LiP activity in A-11 cultured in the wood meal was also higher than that of the wild type, and the constant expression of recombinant *ylpA* was demonstrated by transcriptional analysis. Moreover, high glucose conversion was observed in the enzymatic saccharification of the wood meal which was treated with A-11, compared with that of the wild type-treated wood meal. These results suggest that high expression of YK-LiP gene in *P. sordida* YK-624 improves both ligninolytic ability and saccharification of the fungal treated-wood meal.

keywords: *Phanerochaete sordida* YK-624, homologous expression, lignin peroxidase, lignin degradation, enzymatic saccharification.

高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の産生する、新規リグニンペルオキシダーゼの 1 種である YK-LiP2 をコードする遺伝子 *ylpA* を高発現する形質転換体 A-11 株のリグニン分解特性を調査した。ブナ木粉培地において A-11 株は野生株より高いリグニン分解活性を示し、4 週間培養後のリグニン分解率は野生株と比較して 7.6% 高い値を示した。また、その時のリグニン分解選択性も野生株より高い値を示した。A-11 株を接種した木粉中の LiP 活性は野生株のものより高く、また組換え *ylpA* の転写解析より、A-11 株は培養期間を通して安定して組換え *ylpA* を転写していることが判明した。これらの結果より、*ylpA* の高発現が *P. sordida* YK-624 株のリグニン分解活性を上昇させたことが示された。さらに、市販のセルラーゼを用いた酵素糖化性について検討したところ、A-11 株により処理した木粉は野生株のものより高い糖化性を示した。

1. 緒言

リグニンは、植物細胞壁の約 20-30%を占める難分解性芳香族高分子であり、白色腐朽菌はこれを高度に分解できる唯一の微生物として知られている¹⁾。白色腐朽菌が産生するリグニン分解酵素として、リグニンペルオキシダーゼ (LiP)、マンガンペルオキシダーゼ (MnP)、ラッカーゼ²⁾及び LiP と MnP の Hybrid 型酵素である versatile peroxidase^{3, 4)} の 4 つのファミリーが知られている。本研究の供試菌株である *Phanerochaete sordida* YK-624 株は、腐朽材より分離された白色腐朽菌であり、代表的な白色腐朽菌である *P. chrysosporium* やカワラタケと比較して、高いリグニン分解能とリグニン選択性を示す高活性・高選択性リグニン分解菌である⁵⁾。我々はすでに、本菌株が産生する主なリグニン分解酵素は MnP^{5, 6)} と LiP⁷⁾であり、特に本菌株が産生する 2 種類の新規 LiP (YK-LiP1 及び YK-LiP2) は、*P. chrysosporium* の LiP (アイソザイム H8)と比較して、高いリグニンモデル化合物分解能と高い過酸化水素耐性を有するユニークな酵素であることを報告している^{8, 9)}。

バイオマスは再生可能な持続的資源であり、カーボンニュートラルで大気中の CO₂を増加させないエネルギー資源として着目されている。その中でもバイオエタノール生産技術の確立は、地球環境を改善するための急務の課題である。しかしながら、現在実用化されているバイオエタノール生産は、トウモロコシやサトウキビといった食用植物を原料としているため、食糧価格の高騰といった社会問題を引き起こしている。この問題を解決するため、木質系バイオマスからのバイオエタノール生産に関する研究も行われている。しかし、木材は難分解性芳香族高分子であるリグニンを含み、また、セルロースは強固な結晶構造を有するため、セルラーゼによる糖化効率を大きく妨げており、これらが原因で実用化技術が確立されていないのが現状である。

我々は、木質バイオマスの前処理 (脱リグニン) 用超高活性リグニン分解菌の分子育種を目的として、*P. sordida* YK-624株より、ウラシル生合成遺伝子の一つである orotate phosphoribosyltransferase 遺伝子 (*PsURA5*) 欠損株である UV-64株を作出し、*PsURA5*を選択

マーカーとした形質転換系を構築した¹⁰⁾。さらに、YL-LiP1及びYK-LiP2をコードする遺伝子 (*ylpB*及び*ylpA*) の完全長cDNA及びgenome DNAを取得し、本形質転換系を用いて*ylpA*を高発現するhomologous発現株の作出を試み、A-11株を取得している¹¹⁾。

本研究では、YK-LiP2高生産株であるA-11株を用いて広葉樹ブナ木粉の菌処理を行い、LiP系酵素の高生産がリグニン分解に及ぼす影響を検討した。また、菌処理木粉の酵素糖化性についても検討し、LiP系酵素高生産株を用いて木質バイオマスからエタノールを生産する有効性についても検証した。

2. 材料及び方法

2.1 供試菌

P. sordida YK-624 株 (ATCC 90872)⁵⁾、その *ylpA* 高発現株である A-11 株¹¹⁾、及び *P. chrysosporium* ME 446 株を用いた。

2.2 培地組成及び培養方法

簡易的な脱脂方法として、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 容三角フラスコをオートクレーブで滅菌した。PDA プレートで3日間前培養した供試菌のプレート外縁付近より打ち抜いた菌体ディスク1個を滅菌済みブナ木粉の中央に接種し、30℃で1~4週間静置培養を行った。

2.3 リグニン分解率及びリグニン分解選択性の測定

所定期間 (1~4 週間) 菌処理を行った木粉の絶乾重量を測定し、重量減少量を算出した。その後、同じ木粉を用いて Klason 法により Klason リグニン及び酸可溶性リグニンの定量を行い、未処理木粉の Klason リグニン量及び酸可溶性リグニン量からリグニン分解率を算出した。また、以下の式よりリグニン分解選択性 (Selection factor; SF)⁵⁾を算出した。

$SF = \text{リグニン減少量} / \text{ホロセルロース減少量}$

$\text{ホロセルロース減少量} = \text{重量減少量} - \text{リグニン減少量}$

2.4 粗酵素液の調製及び酵素活性の測定

2.2の方法で所定期間菌処理を行った木粉を含む100 mL容三角フラスコに50 mM マロン酸緩衝液 (pH 4.0, 0.05% Tween 20 を含む) を添加し, ワーリングブレンダーを用いて20 秒間破碎した後, 10 分間氷冷する操作を破碎時間が積算5 分間になるまで繰り返した。得られた破碎液をガラスフィルターGA-100, GB-140, 及びメンブランフィルター (ポアサイズ 0.45 μm 及び 0.2 μm) (全て Advantec, 東京) を用いてろ過し, 得られたろ液を粗酵素液とした。

MnP 活性の測定は, Perie¹²⁾らの方法に準じて行った。50 mM マロン酸緩衝液 (pH 4.5 ; 1 mL) 中に, 1 mM 2,6-dimethoxyphenol (DMP), 1 mM MnSO_4 及び粗酵素液を添加し, 30°C で5 分間プレインキュベート後, 0.2 mM H_2O_2 を添加し, DMP の酸化を 470 nm の吸光度の増加 ($\epsilon_{470}=49.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) により測定した。なお, 1 秒間あたりに 1 mol の DMP を酸化する酵素量を 1 kat と定義した。

LiP 活性の測定は Wariishi¹³⁾らの方法に準じて行った。基質である ferrocyanochrome *c* は 0.75 mM ferricytochrome *c* 水溶液に 0.25 M 亜二チオン酸ナトリウムを添加して1 時間静置した後, PD-10 (GE Healthcare UK Ltd., England)を用いて脱塩を行うことで作製した。得られた溶液中の ferrocyanochrome *c* の濃度を 550 nm の吸光度 ($\epsilon_{550}=27.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) より算出した。20 mM コハク酸緩衝液 (pH 3.0 ; 1 mL) 中に, 13 μM ferrocyanochrome *c* 及び粗酵素液を添加し, 30°C で5 分間プレインキュベート後, 0.2 mM H_2O_2 を添加し, ferrocyanochrome *c* から ferricytochrome *c* への酸化を 550 nm の吸光度の減少 ($\epsilon_{550}=19.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) により測定した。なお, 1 秒間あたりに 1 mol の ferrocyanochrome *c* を酸化する酵素量を 1 kat と定義した。

2.5 RT-PCR による転写解析

2.2の方法で所定期間菌処理を行った木粉 0.5 g (湿重量) を液体窒素で凍結した後, 乳鉢ですり潰し, Plant RNA Isolation Reagent (Invitrogen, California, USA) を用いて粗 total RNA を抽出し, RNeasy Plant mini kit (QIAGEN, Valencia, USA) を用いて total RNA を精製した。Hirai ら¹⁴⁾の手法に準じて, 得られた total RNA 200 ng を用い, Primescript RT-PCR

kit (TaKaRa Bio, 大津) を用いて RT-PCR を行った。転写解析に用いたプライマーを Table 1 に示す。内在性 *ylpA* (*nylpA*) の増幅にはプライマー-*ylpA* 5'UTR F と *ylpA* 213-232 R を、組換え *ylpA* (*rylpA*) の増幅にはプライマー-PsGPD 5'UTR F と *ylpA* 213-232 R を、*PsActin* の増幅にはプライマー-P. sor Actin F と P. sor Actin R を用いた。

2.6 菌処理木粉の酵素糖化性

菌糸の蔓延により固着した木粉を解すと同時に、木粉をさらに砕いて表面積を広げることと酵素の作用効率を上げる目的で、2.2 の方法で 30 日間菌処理を行った木粉 0.4 g (乾燥重量) をボールミルで破碎処理 (湿式粉碎, 15 往復/秒・2 min) した。破碎木粉に 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5), 0.02% NaN₃, セルラーゼとして Celluclast 1.5L-Novozym 188 混合物 (30: 1 v/v, Final 0.25 FPU/mL, とともに Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) を添加して 20 mL とし, 45°C で 42 時間振盪した。この反応液から上清を回収し, ジニトロサリチル酸法¹⁵⁾ によって還元糖濃度を, グルコース CII-テストワコーキット (Wako, 大阪) によりグルコース濃度を測定した。還元糖濃度は, グルコース溶液を用いて作製した検量線により定量した。

3. 結果及び考察

3.1 YK-LiP2 遺伝子高発現株のリグニン分解特性

YK-LiP2 遺伝子 (*ylpA*) 高発現のリグニン分解特性に及ぼす影響を検討するため, 野生株及び *ylpA* 高発現株である A-11 株, 及び既存の白色腐朽菌である *P. chrysosporium* をブナ木粉に接種し, その際のリグニン分解率の推移を観察した。Fig. 1 に示すように, 野生株及び A-11 株は共に, 全期間を通して *P. chrysosporium* より高いリグニン分解率を示した。また, A-11 株は 2 週間目以降, 野生株より高いリグニン分解率を示し, 4 週間培養後のリグニン分解率は野生株と比較して 7.6% 上昇した。

リグニン分解選択性の指標である SF を算出した結果を Table 2 に示す。この結果より, 4 週間培養後のリグニン分解選択性は野生株より A-11 株の方が高いことが示された。これ

らのことから、*ylpA* の高発現は、リグニン分解能を向上させるのみでなく、リグニン分解選択性も向上させることが示唆された。

3.2 木粉処理時に検出されるリグニン分解酵素活性の経時変化

3.1 において、*ylpA* 高発現株である A-11 株のリグニン分解能が向上することが示された。次に、これが実際に YK-LiP2 が高生産されたことに起因しているのかどうかを確認するため、木粉処理時に検出されるリグニン分解酵素活性を経時的に測定した。

Fig. 2 に木粉培地にて検出された MnP 活性の経時変化を示す。野生株及び A-11 株ともに、培養 7 日目において *P. chrysosporium* より明らかに高い MnP 活性を示した。また、培養期間における累積 MnP 活性でも野生株及び A-11 株は *P. chrysosporium* より高い値を示したが、野生株と A-11 株の累積 MnP 活性の間に違いは認められなかった (Table 3)。Fig. 3 に木粉培地にて検出された LiP 活性の経時変化を示す。野生株は 1 週目、A-11 株は 2 週目において有意に高い LiP 活性を示し、また培養 4 週間での累積 LiP 活性は A-11 株が野生株より有意に高い値を示した (Table 3)。

以上の結果より、A-11 株のリグニン分解能の向上は、LiP 産生量が増加したことに起因していることが証明された。

3.3 転写解析

3.2 において、A-11 株を接種した木粉培地において野生株より高い LiP 活性が検出されたが、これが rYK-LiP2 に起因しているのかどうか検証するため、木粉培地より total RNA を抽出し、RT-PCR 解析に供した。Fig. 4 に示すように、アガロースゲル電気泳動の結果、内因性の *nylpA* の転写量には変動が無いことが示された。また、*rylpA* は 1~4 週間の全培養期間で安定して発現しており、このことから A-11 株における LiP 活性の上昇は、rYK-LiP2 の生産に起因していることが判明した。

3.4 菌処理木粉の酵素糖化性

本研究では、市販の糖化酵素を用いた菌処理木粉の酵素糖化実験を行い、リグニン分解能及びリグニン分解選択性が向上した A-11 株により木粉を処理することで、酵素糖化性

が向上するかどうか検討した。Fig. 5 に示すように、野生株による菌処理木粉は未処理木粉と比較して約 3 倍の糖化効率を示し、さらに A-11 株による処理木粉は野生株処理木粉と比較して 1.4 倍の糖化効率を示すことがわかった。このことから、*P. sordida* YK-624 株による前処理により糖化効率が上昇すること、また、A-11 株による前処理によって糖化効率がさらに上昇することが示された。

4. 結論

本研究では、木質バイオマスからのバイオエタノール生産に必要な前処理用超高活性リグニン分解菌を作出することを最終目標とし、まず始めに、リグニン分解酵素高生産の有用性を検証するため、*P. sordida* YK-624 株由来新規 LiP である YK-LiP2 高生産形質転換株、A-11 株のリグニン分解特性及び菌処理木粉の酵素糖化特性を検証した。

ブナ木粉培地におけるリグニン分解率を野生株と比較した結果、A-11 株は野生株より高いリグニン分解率を示し、またリグニン分解選択性も向上する結果が得られた。

リグニン分解力の上昇が *ylpA* の高発現によるものであることを確認するため、各株を培養したブナ木粉培地から粗酵素を調製し、MnP 活性及び LiP 活性を経時的に測定した結果、A-11 株では野生株と比較して、累積 LiP 活性の増加が観察された。また、RT-PCR 解析より、*nylpA* の転写量には変化が見られなかったものの、A-11 株では *rylpA* が全培養期間において安定して転写されていた。これらのことから、A-11 株におけるリグニン分解力の上昇が、*ylpA* の高発現によるものであることが証明された。

菌処理木粉の酵素糖化性は、野生株と比較して A-11 株により処理した木粉がより効率的に糖化されることが示された。

以上の結果から、高活性リグニン分解菌 *P. sordida* YK-624 株において、1 つのリグニン分解酵素遺伝子を高発現するだけで、有意なリグニン分解力とリグニン分解選択性の上昇が得られることが判明した。従って今後、複数のリグニン分解酵素及び芳香環代謝遺伝子群を同時に高発現させることで、「超高活性リグニン分解菌」の作出が可能であると考えら

れる。

謝辞

本研究の一部は，日本学術振興会・科学研究費補助金・基盤研究 A「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（No. 21248023）」の助成を受けたものである。

文献

- 1) Kirk, T. K., Farrell, R. L.: *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 465-505 (1987).
- 2) Gold, M. H., Alic, M.: *Microbiol. rev.* **57**, 605-622 (1993).
- 3) Ruiz-Dueñas, F. J., Camarero, S., Pérez-Boada, M., Martíne, M. J., Martínez, A.T.: *Biochem. Soc. Trans.* **29** (Pt 2), 116-122 (2001).
- 4) Kamitsuji, H., Watanabe, T., Honda, Y., Kuwahara, M.: *Biochem J.* **386** (Pt 2), 387-393 (2005).
- 5) Hirai, H., Kondo, R., Sakai, K.: *Mokuzai Gakkaishi* **40**, 980-986 (1994).
- 6) Hirai, H., Kondo, R., Sakai, K.: *Mokuzai Gakkaishi* **41**, 69-75 (1995).
- 7) Machii, Y., Hirai, H., Nishida, T.: *FEMS Microbiol Lett.* **233**, 283-287 (2004).
- 8) Sugiura, M., Hirai, H., Nishida, T.: *FEMS Microbiol. Lett.* **224**, 285-290 (2003).
- 9) Hirai, H., Sugiura, M., Kawai, S., Nishida, T.: *FEMS Microbiol. Lett.* **246**, 19-24 (2005).
- 10) Yamagishi, K., Kimura, T., Oita, S., Sugiura, T., Hirai, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 1079-1091 (2007).
- 11) Sugiura, T., Yamagishi, K., Kimura, T., Nishida, T., Kawagishi, H., Hirai, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1793-1798 (2009).

12) Perie, F. H., Gold, M. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2240-2245 (1991).

13) Wariishi, H., Sheng, D., Gold, M. H.: *Biochemistry* **33**, 5545-5552 (1994).

14) Hirai, H., Kashima, Y., Hayashi, K., Sugiura, T., Yamagishi, K., Kawagishi, H., Nishida, T.:
FEMS Microbiol. Lett. **286**, 130-135 (2008).

15) Miller, G. L., *Anal. Chem.* **31**, 426-428 (1959).

Table 1. Oligonucleotides used as primers in this study.

Primer Name	5' - Nucleotide sequence -3'
ylpA 5'UTR F	GTCAGCACTCAAGCGGCAAT
ylpA 213-232 R	TAGAGTCGTGGAAGACCAGA
PsGPD 5'UTR F	CACATCCATCCTCTACTCAA
P. sor Actin F	AGCACGGTATCGTCACCAAC
P. sor Actin R	AGCGAAACCCTCGTAGATGG

Table 2. Selection factor (SF) of the wild type of *P. sordida* YK-624 (WT), A-11, and *P. chrysosporium* (Pc).

	SF			
	Incubation time (days)			
	7	14	21	28
WT	9.2±3.8*	2.5±0.3*	2.4±0.1*	1.5±0.3*
A-11	4.2±0.0*	2.7±0.0*	2.6±0.1* ⁺	2.4±0.0* ⁺
Pc	1.8±0.4	0.6±0.1	0.6±0.2	0.5±0.0

* Significantly higher than Pc ($P < 0.05$).

⁺ Significantly higher than WT ($P < 0.05$).

Table 3. Cumulative ligninolytic enzyme activities during incubation time of the wild type of *P. sordida* YK-624 (WT), A-11, and *P. chrysosporium* (Pc).

	Cumulative ligninolytic enzyme activities (nkat/g)	
	MnP	LiP
WT	36.9 ± 3.6*	25.4 ± 3.0
A-11	37.5 ± 9.6*	30.1 ± 0.5* [†]
Pc	21.8 ± 4.1	22.7 ± 1.0

* Significantly higher than Pc ($P < 0.05$).

[†] Significantly higher than WT ($P < 0.05$).

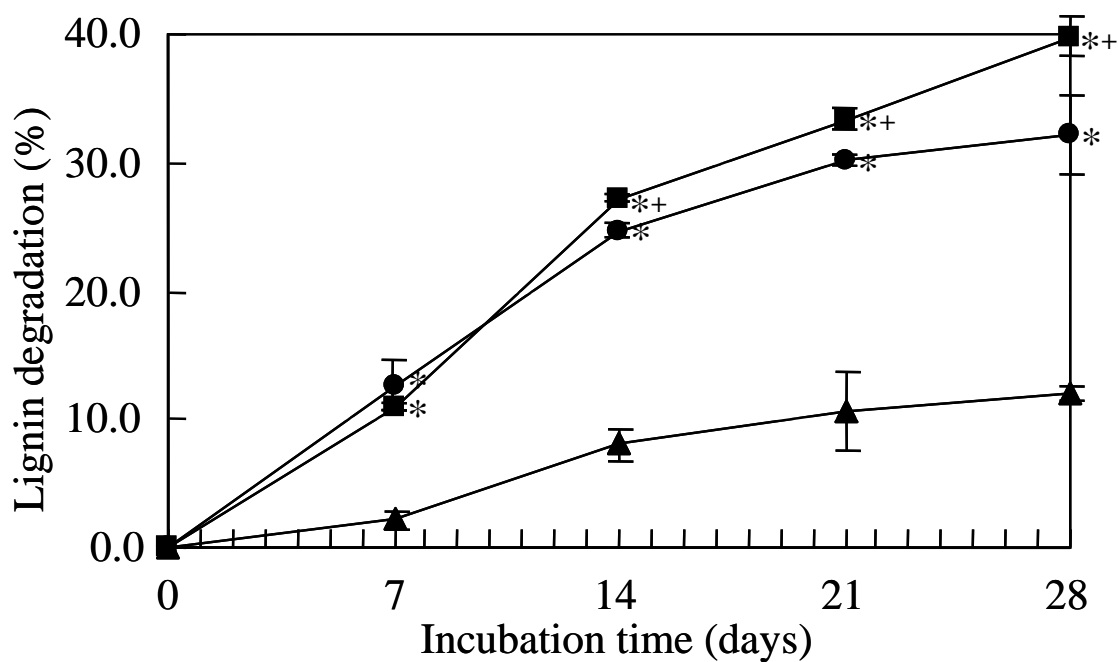


Fig. 1. Lignin degradation of beech wood meal by each strain.

Note: Bars indicate standard deviation.

Symbols: square, A-11; circle, wild type of *P. sordida* YK-624; triangle, *P. chrysosporium*.

* Significantly higher than Pc ($P < 0.05$).

+ Significantly higher than WT ($P < 0.05$).

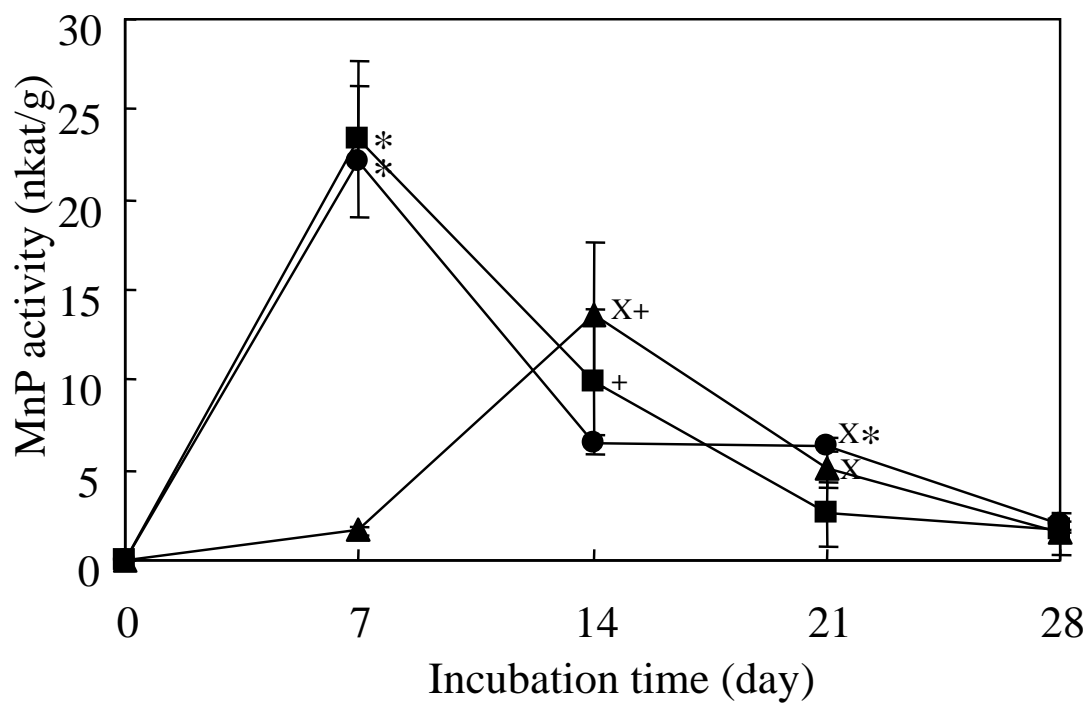


Fig. 2. MnP activities detected in fungal-treated beech wood meals.

Note: The preparation of enzyme solutions and the assay of MnP activities were described in Materials and methods. Bars indicate standard deviation.

Symbols: square, A-11; circle, wild type of *P. sordida* YK-624; triangle, *P. chrysosporium*.

* Significantly higher than Pc ($P < 0.05$).

+ Significantly higher than WT ($P < 0.05$).

^X Significantly higher than A-11 ($P < 0.05$).

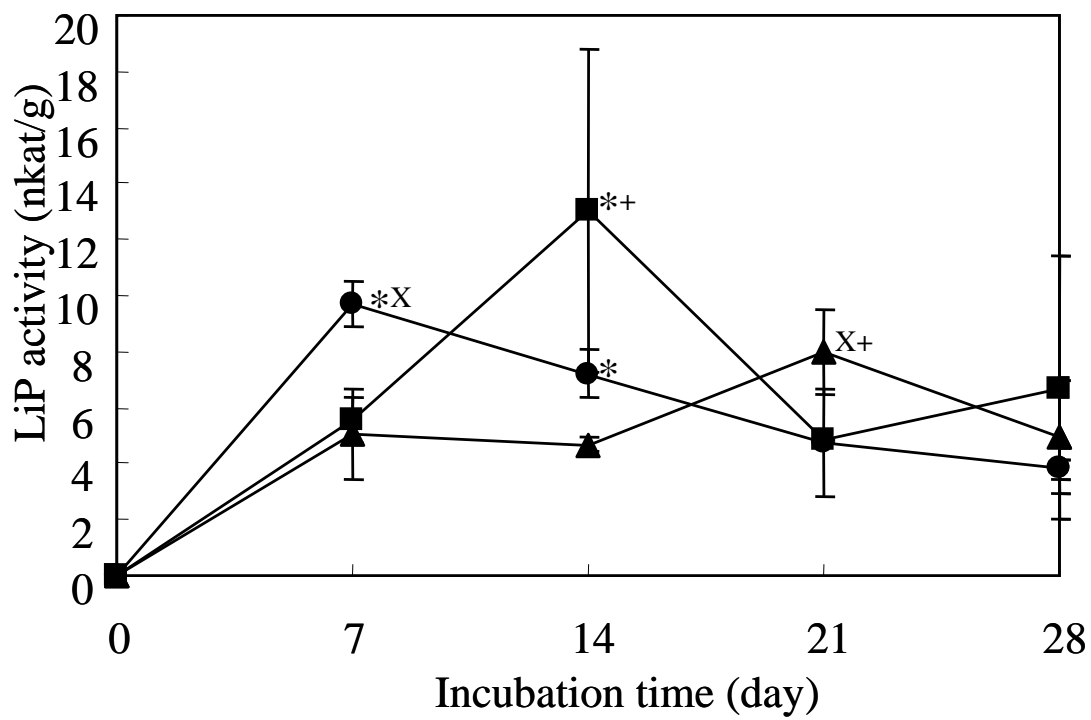


Fig. 3. LiP activities detected in fungal-treated beech wood meals.

Note: The preparation of enzyme solutions and the assay of LiP activities were described in Materials and methods. Bars indicate standard deviation.

Symbols: Refer to Fig. 2

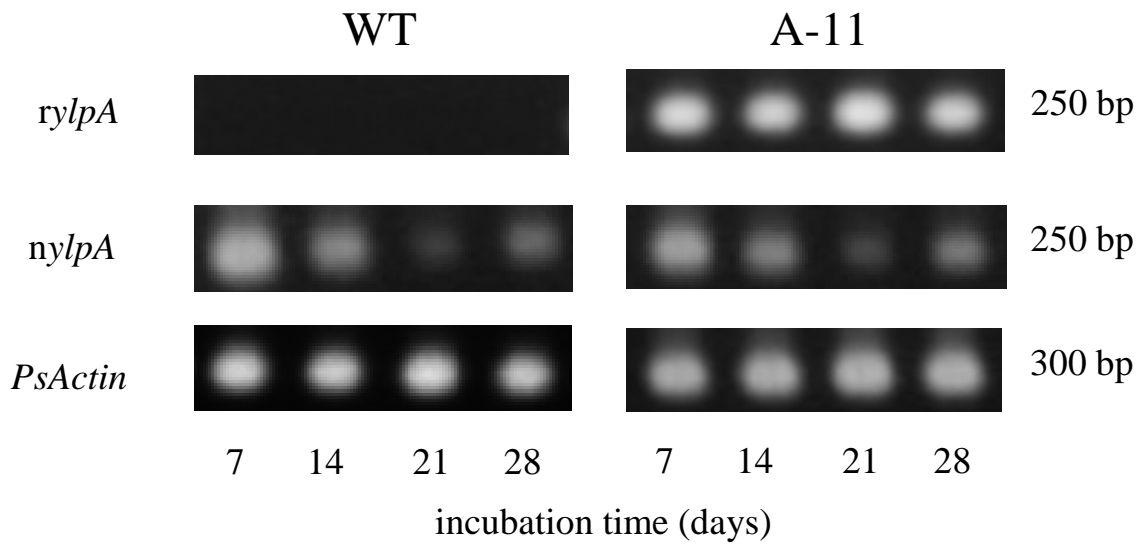


Fig. 4. RT-PCR analysis of native *ylpA* (*nylpA*) and recombinant *ylpA* (*rylpA*).

note: An equal amount of total RNA from WT or A-11 was applied to RT-PCR. Actin gene (*PsActin*) of *P. sordida* YK-624 was used as an internal control.

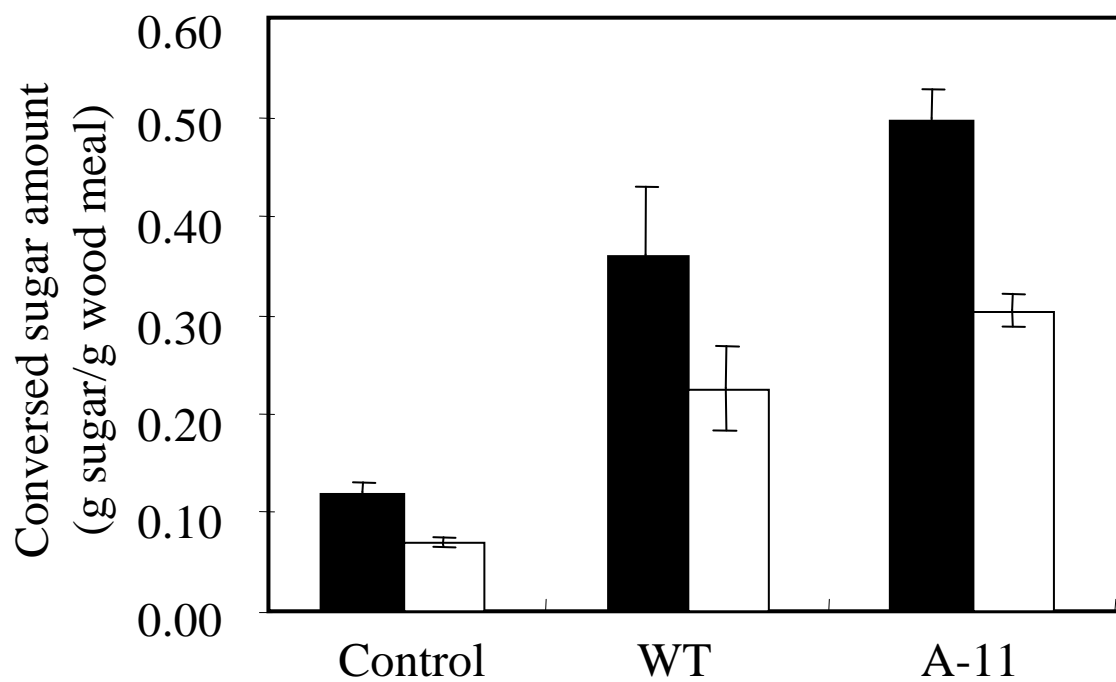


Fig. 5. Enzymatic saccharification of beech wood meals treated by A-11 and the wild type of *P. sordida* YK-624 (WT).

Note: The amounts of reducing sugar and glucose were determined by the methods described in Materials and methods. Bars indicate standard deviation.

Symbols: closed column, reducing sugar; open column, glucose.