白色腐朽菌による環境浄化および統合木質バイオリファイナリー

亀井　一郎（宮崎大学　農学部）
kamei@cc.miyazaki-u.ac.jp

森林内の分解者として重要な役割を果たすのは木材腐朽菌と呼ばれるきのこの仲間であり、地球環境の炭素循環に大きく寄与している。木材保存の視点からは、これら木材腐朽菌は木造家屋の腐朽被害など害菌として防除の対象となるが、一方で木材という反応性に乏しい材料を資化するために進化させてきた強力な有機物分解能力は、細菌類など他の微生物種に無い特異なシステムを保持しており、多くの分野で利用が期待されている。植物細胞壁の芳香族高分子であるリグニンは，炭水化物であるセルロースを被覆することで、外来の分解者から身を守る鎧として機能している。一方、木材腐朽菌の中でも白色腐朽菌と呼ばれる一群は、菌体外に特異な酸化還元酵素を分泌することで、リグニンを分解することを特徴としている。白色腐朽菌によるリグニンの分解機構はリグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ、ラッカーゼおよび多機能型ペルオキシダーゼの４つのリグニン分解酵素ファミリーが有する生化学的特長と関連付けて研究されており、高分子基質に対応した特異なメカニズムについて興味深い知見が数多く報告されている。一方、白色腐朽菌が有する様々な有機化合物の分解力を、ダイオキシンや PCB を初めとした環境汚染物質の分解・無毒化に利用するための基礎的・応用的研究が盛んに行われてきた。また、リグニンを分解する能力を生かして、近年注目されるバイオリファイナリー分野において、生物的な糖化前処理法として研究されている。演者はこれまでに、白色腐朽菌を用いた環境浄化（ファンガルレメディエーション）技術の確立を目指して、特に有機汚染物質分解経路の解明を進めてきた。また木材の脱リグニン・糖化・発酵のすべての能力を保持する特殊な白色腐朽菌を用いて、微生物単独で木材からエタノールを生産するプロセス（統合木質バイオリファイナリー）開発を目指した研究を進めてきた。

ファンガルレメディエーション技術に関する研究

1950 年代から世界各地の野生生物種に生殖・繁殖の異常が報告され、化学物質による内分泌かく乱作用の報告が相次ぎ、現在までに内分泌かく乱物質として総称される物質は 70 種近くに及ぶ。特に、残留性（難分解性）、生物蓄積性、長距離移動性、毒性のすべての特性を有する物質として定義された残留性有機汚染物質（Persistent Organic Pollutants;POPs）は、ダイオキシンや PCB をはじめとする 12 物質が最初に対象となり、2001 年に採択された「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」で国際的に協調して削減、廃絶等を推進することとなっている。現在、さらに 10 物質が POPs として追加指定され、現在も廃絶への活動が続いている。これら難分解性有機汚染物質による広範囲な環境汚染に、微生物を用いた浄化法が求められている。

筆者らはまず塩素化ダイオキシン異性体を分解可能な白色腐朽菌を用いて、三から四塩素置換されたダイオキシン異性体の一部が分解可能であり、その分解経路に初発の水酸化とその後のメトキシル化が含まれていることを明らかにした [1)]。またダイオキシン分解能に優れる白色腐朽菌がいずれも *Phlebia* 属に属すること突き止め、遺伝的類縁関係に基づく選抜アプローチを実践したところ、強力な分解菌として *Phlebia brevispora* の選抜に成功し、細菌類では分解が困難な四塩

素化ダイオキシン異性体を分解可能であると証明した[2)]。そこで、四塩素置換ダイオキシンを不純物として含むクロロニトロフェン製剤を処理したところ、クロロニトロフェンと共に混入している四塩素化ダイオキシンも分解できることを示した[3)]。さらに、ダイオキシン汚染された水田汚染土壌中の 1,3,6,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin を分解・浄化できることを示した[4)]。また、白色腐朽菌による PCB の詳細な分解経路を明らかにし、初発の水酸化反応から環開裂を経ることを明らかにした[5)]。さらに、毒性の高い PCB 異性体の分解が可能であることを代謝物レベルで証明した[6)]。いずれも初発の反応が水酸化反応であり、阻害剤の試験などから細胞内のシトクロム P450 モノオキシゲナーゼの関与が示唆され、ディルドリンのようなドリン系有機汚染物質も同様の反応で水酸化することが明らかとなった[7)]。これらの成果により、不明であった白色腐朽菌による汚染物質分解経路の一端を明らかにした。新たに POPs として指定された化合物についても白色腐朽菌による分解を試みた。エンドスルファンは 1990 年代に強力な殺虫剤として大量に使用されていた経緯があるが、エンドスルファンとその代謝物であるエンドスルファンスルフェートが水生生物に毒性があることが判明し、2011 年 5 月に POPs に指定された。特に環境中でエンドスルファンから生じるエンドスルファンスルフェートは微生物分解を受けにくい性質がある。演者らは木材腐朽菌の中から白色腐朽菌である *Trametes hirsute* をエンドスルファンおよびエンドスルファンスルフェートの分解無毒化が可能な菌として選抜した[8)]。この菌はエンドスルファン分解時にエンドスルファンスルフェートを一旦生じるが、エンドスルファンスルフェートをさらに分解することが明らかとなっている[8)]。有機塩素系農薬の土壌汚染は農耕地を中心として広がっており，栽培される作物への残留など直接的に食の安全と関わっている。従って安全性の高いバイオレメディエーションの適用は理にかなっており、今後の展開が期待される.

疎水性の高い汚染物質は土壌中無機鉱物や土壌有機物に強固に吸着し菌との接触を阻害するため，菌が分解能力を十分に発揮できないことがある。長期間汚染され続けてきた土壌では特にこの傾向が強い。この問題により，実験室のフラスコレベルの試験で良好な結果を示す分解菌が見つかっても，実際に土壌と共存させると著しく分解力が低下するため，実用化への大きな壁となっている。これらの問題を解決するために，演者らは複合微生物系に注目している。複数の分解菌，もしくは分解菌の生存に有利に働く微生物コンソーシアを人工的に構築することで，より効果の高いバイオオーグメンテーション用微生物製剤の開発が期待できる。筆者らはこの点に着目し，木材腐朽菌の生育に有利に働く細菌類の分離，機能解析の研究を進めており，実際に木材腐朽菌の菌糸伸長を促進する細菌の存在を明らかにしている[9)]。今後はさらに複合微生物系の構造と機能解析に関する基礎的検討の進展が期待され，実用化に向けて農学，工学，理学等複数の学術分野と産業界が融合して取り組むことが必要だと考えている。

統合木質バイオリファイナリー（Integrated Fungal Fermentation）の提案

植物細胞壁中のセルロースやヘミセルロースは、それぞれを酵素反応等によりグルコースやキシロースなどの単糖へと加水分解することで、エタノールやキシリトール、有機酸や他の化学製品の原料として使用可能である。しかしながら、細胞壁中のセルロースは強固な結晶構造を保持しており、リグニンやヘミセルロースと直接会合していることから酵素的な加水分解が妨げられる。木材の酵素糖化効率を改善し、発酵や他の化学製品の合成に使用できる単糖の収量を増加させるには、構造や化学組成を改変する前処理の過程が必ず必要になるため、多くの関連研究がセルラーゼによるセルロースの加水分解効率を最大化するための前処理法の開発に集中していた。

リグノセルロースの前処理方法は、物理化学的前処理法が多く研究されてきたが、それらの方法は多くのエネルギー、耐腐食性の耐圧反応容器、反応後の材料の洗浄などを必要とし、糖化後の発酵過程を阻害する物質が生成する可能性が高く、廃液処理の問題もある。演者らは、これらの要素反応（脱リグニン、糖化、発酵）を、白色腐朽菌を用いることで単独の微生物反応で完結するプロセス開発が可能ではないかと考えた。

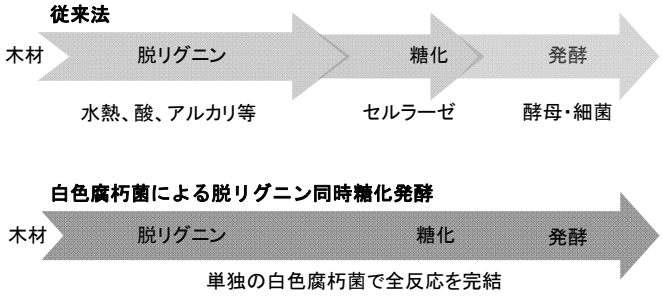

図１　Integrated Fungal Fermentation Process (IFFP)

そこで、演者らは、脱リグニン能、セルロース糖化能、発酵能を合わせ持つ白色腐朽菌の選抜に取り組んだ。従来、生物的なリグニン分解能力、セルロース糖化能力を持つ白色腐朽菌が、エタノール発酵能力を保持すれば、従来法として多段階の処理が必要なリグノセルロースからのエタノール生産工程を単独の白色腐朽菌で完結し得ると考えたためである（図１）。その結果、セルロース材料から直接エタノール発酵が可能な菌として耐塩性白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 が選抜された。本菌は通気を遮断した条件下（半好気条件：シリコン栓で培養基を密封）でバイオマスを形成する主要な六炭糖を高効率でエタノールに変換し，グルコースの次に多く含まれるキシロースの発酵も可能である。また、種々のセルロース材料（クラフトパルプ、アルカリ処理バガス、きのこ廃菌床）からエタノールを直接生成することができ、セルロース基質濃度 9%と固相に近い条件でも発酵可能であることが示された[10,11,12]。

Phlebia sp. MG-60 はマングローブ林から分離された耐塩性白色腐朽菌であり、大量のマンガンペルオキシダーゼを生産し、選択的なリグニン分解能力を保持することが示されている[13]。そこで演者らは、好気固相条件下での脱リグニンと、嫌気液体条件下での同時糖化・発酵を組み合わせることで、ワンポットでの木質バイオマスの発酵が可能であることを実証した[14]。演者らはこのプロセスを「多機能型担子菌による統合木質バイオリファイナリープロセス（Integrated Fungal Fermentation Process (IFFP)）」（特願 2011-122579）として提案した。本プロセスの最大の特徴は好気固相条件と嫌気液体条件の切り替えにあり、*Phlebia* sp. MG-60 株がもつ選択的な脱リグニンとセルロースの糖化・発酵能力を明確に切り替わる。また、脱リグニン過程でいくつかの無機塩を加えることで脱リグニン能を高めることが可能であった。現在は *Phlebia* sp. MG-60 の高効率な形質転換系の構築に成功し、リグニン分解酵素をはじめとする種々の遺伝子強制発現が可能となっている。現在、本菌の脱リグニン能の強化や、糖質代謝経路の改変を試みている。

Integrated Fungal Fermentation Process は長時間を要することが最大の問題点である。しかしながら前処理に使用するのは含水率調整用の水のみであること、外部からセルラーゼ等を添加しないこと、発酵用に酵母を使用しないことなど、環境負荷低減やコスト削減に寄与する要素が多く含まれている。代謝改変等の菌株そのものの改良や培養条件の検討により、近い将来時間短縮および生成物の多様化を可能とし、木材の新しいバイオリファイナリー技術としての確立を目指したい。

最後に

21 世紀に入り、世界は化石資源由来のエネルギーや化学物質依存の社会から、再生可能資源依存型の社会へ大きく舵を取ろうとしている。木材をはじめとするバイオマスは有機物の供給源として重要な位置を占めると考えられるが、その変換・利用については、太古より木質バイオマスを利用し進化してきた木材腐朽菌に学ぶところは大きい。演者は白色腐朽菌の機能を環境科学分野で生かすことを念頭に、二つの研究対象に絞って研究を推進してきたが、実用化についてはいくつも課題が存在する。近年充実してきたゲノム情報を十分に活用し、一つ一つの課題を克服することで、工業用微生物および生物触媒としての地位確立が期待される。

謝辞

宮崎大学農学部よりご推薦を賜り、このたびの日本農学進歩賞の受賞に至りましたことを身に余る光栄に感じております。村上 昇 前宮崎大学農学部長をはじめ、ご支援いただきました関係各位の皆様方に厚く御礼申し上げます。本稿で紹介いたしました研究成果は、演者が博士後期課程在籍中から、ポストドクター、現職に至るまで、複数の研究室を渡り歩きながら多くの共同研究者の皆様のご支援のもと遂行されたものです。近藤 隆一郎先生（九州大学名誉教授）、高木 和広先生（農業環境技術研究所主任研究員）、重松 幹二先生（福岡大学教授）、目黒 貞利先生（宮崎大学教授）には特に多くのご指導とご鞭撻を賜りました。また、堤 祐司先生（九州大学教授），平井 浩文先生（静岡大学教授）には公私にわたり有益なご議論・ご助言をいただきました。ここに全ての方々のお名前を挙げることはできませんが、これまでに出会い切磋琢磨した先輩、後輩、同輩の皆様に深く感謝申し上げます。最後に、いつも研究遂行に協力してくれる宮崎大学農学部　森林バイオマス科学研究室の学生・院生・スタッフの皆様に深く感謝申し上げます。

引用文献

1) Kamei, I., Kondo, R.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 68:560-566 (2005).
2) Kamei I., Suhara H., Kondo R.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 69:358-366 (2005)
3) Kamei I., Kodno R.: Chemosphere 65:1221-1227 (2006).
4) Kamei I., Watanabe M., Harada K., Miyahara T., Suzuki S., Matsufuji Y., Kondo R.: Chemosphere 75:1294-1300 (2009).
5) Kamei I., Kogura R., Kondo R.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:566-575 (2006).
6) Kamei I, Sonoki S., Haraguchi K., Kondo R.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 73:932-940 (2006).
7) Kamei, I., Takagi, K., Kondo R.: Pest Manag. Sci. 66:888-891 (2010).
8) Kamei I., Takagi K., Kondo R.: J. Wood Sci. 57:317-322 (2011).
9) Kamei, I., Yoshida, T., Enami, D. and Meguro S.: Curr. Microbiol. 64:173-178 (2012).
10) Kamei I., Nitta T., Nagano Y., Yamaguchi M., Yamasaki Y., Meguro S.: Int. Biodeter. Biodegrad. 94:57-62 (2014).
11) Kamei I., Hirota Y., Meguro S.: BioResources 9:5114-5124 (2014).
12) Kamei I., Hirota Y., Hirai H., Meguro S., Kondo R.: Bioresour. Technol. 112:137-142 (2012).
13) Kamei I., Daikoku C., Tsutsumi Y., Kondo R.: Appl. Environ. Microbiol. 74:2709-2716 (2008).
14) Kamei I., Hirota Y., Meguro S.: Bioresour. Technol. 126:137-141 (2012).