



## 植物バイオマス分解利用に関する基礎研究

北海道大学大学院工学研究院 堀 千 明

### はじめに

地球上の再生可能な炭素源のほとんどが植物中に存在し、近年その資源量の豊富さから植物バイオマスの高度利用が強く求められています。きのこに代表される木材腐朽菌は単独で植物を完全分解できることから、腐朽菌による植物バイオマス生分解機構の解明は、生態系での炭素循環に加え、バイオマスからの有用物質への変換利用を考える上で非常に重要だと考えられています。2004年にモデル腐朽菌のゲノム配列情報が開示されプロテオーム解析が可能になると、今まで主要な酵素を一つずつ単離していた頃に想定された以上の様々な酵素が協調して植物分解を進めている可能性が示唆されました<sup>1,2)</sup>。筆者は、多様な腐朽菌を対象に、各植物成分に対する遺伝子応答をゲノム情報を利用して解析することで、腐朽菌グループが保有する植物分解メカニズムの多様性を明らかにすべく研究を進めてきました。さらに、最近では生態系内で実際に植物分解を担っている微生物群やそれらが生産する分解酵素メカニズムの全体像を世界に先駆けて明らかにしました。このような研究は新規バイオマス分解酵素や代謝経路の発見へと繋がる可能性があります。また、植物バイオマス分解の応用を見据え、植物バイオマス由来糖からのバイオプラスチック生産についても研究を進めています。本稿ではこれら成果について紹介致します。

### 1. 微生物による植物分解メカニズムの解明に向けて

#### 1-1. 腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* における植物細胞壁成分の認識機構について

腐朽菌が保有する植物分解戦略を明らかにするため、セルロース培地において、キシランおよびデンプンの添加がモデル腐朽菌の酵素生産に与える影響を比較した。その結果、デンプンは酵素生産量を約1/2に抑制する一方で、キシランは酵素生産量を約2倍に促進することを見出した。この際のプロテオーム解析により、キシラン添加がキシラン分解酵素と共に新規のセルロース分解関連酵素の生産を促進することを見いだした<sup>3)</sup>。またキシランは多糖であることから、腐朽菌はその分解物を認識していると予想された。そこで、重合度1~4のキシロオリゴ糖やセロオリゴ糖に対するセルロース分解関連酵素遺伝子の発現応答解析を行ったところ、腐朽菌がこれら重合度の違うオリゴ糖を異なるシグナル分子として認識することで、セルロースやキシラン分解酵素生産をコントロールコントロールしていた。このことから、腐朽菌が植物細胞壁上のキシラン・セルロース層を順番に効率よく分解する機構を保有していることが示唆された<sup>4)</sup>。

#### 1-2. 腐朽菌における分解機構の多様性について

国際連携の元、約30種の真菌のゲノム情報を解析し、木材腐朽菌の起源や分解メカニズムの多様性を明らかにした<sup>5)</sup>。さ

らに、11種のハラタケ目に属する白色腐朽菌および褐色腐朽菌の比較ゲノム・プロテオーム解析結果を基に、白色腐朽菌は様々な特異的反応を引き起こす加水分解酵素や酸化還元酵素を獲得してきており、多様な酵素群を協調的に生産することで効率的なセルロース・ヘミセルロース・リグニン分解を行っていることを明らかにした。一方で進化的に白色腐朽菌より後に出現した褐色腐朽菌は、一部の基質特異性の緩いエンド型セルラーゼやヘミセルラーゼだけを保有していることを明らかにした。これらの糖質分解酵素と共に酸化還元酵素を介したフェントンケミストリーを利用することで、褐色腐朽菌は、木材を非特異的に効率よく分解していることが示唆された<sup>6)</sup>。また一般に、針葉樹は分解されにくいことが知られていたが、その原因は分子レベルで理解されていなかった。そこで、ハラタケ目の中で高い針葉樹分解能力を保持する *Phlebiopsis gigantea* に着目し、その分解メカニズムをオミクス解析で明らかにした<sup>7)</sup>。その結果、針葉樹に多く含まれる抽出成分を素早く分解するために、抽出成分中の様々な分解に関わる酵素に加え、菌体内β酸化経路およびグリオキシル酸経路を増強することが明らかになった。以上、これら腐朽菌が保有する分解メカニズムの多様性に関する内容をまとめた総説を和文誌：化学と生物で発表した<sup>8)</sup>。

#### 1-3. メタ環境におけるオミクス解析

これまで植物分解に関わる酵素に関しては、環境中から単離された腐朽菌由来のセルラーゼ・ヘミセルラーゼに関して、試験管内での研究が多くされてきたが、実際の環境下で働く酵素の全体像は不明であった。そこで我々は、環境条件下での微生物による植物細胞壁分解において実際に働いている酵素について、これまで進めてきたオミクス解析を環境条件に応用することで初めて網羅的に同定した<sup>9)</sup>。本研究により、環境条件下においても、試験管内で同定・解析されていた主要なセルラーゼやヘミセルラーゼが中心となり植物分解を進めることが証明できた。この際に、木材腐朽菌は、メタゲノム解析によって示された存在比としては多数を占めていない場合にも、植物分解酵素の大部分は木材腐朽菌から生産されていることを明らかにした。加えて、シロアリの腸内で植物細胞壁分解に関わっていることが知られている原生動物などの微生物群が自然環境下において植物分解に関わっていることが分かった。本研究から取得した様々な生物由来の酵素情報は(計1391個の植物分解関連酵素を含む)、これまでに解析されていない全く新しい遺伝子資源であった。今後は環境中の効率的な植物分解機構の理解に加えて、これら酵素機能の解明および植物バイオマス分解の実学への応用が期待される。

## 2. 植物分解物を利用したバイオポリマー生産について

植物バイオマス由来糖からのバイオプラスチック生産の効率化および生分解性プラスチックに関する研究を進めている<sup>10-12)</sup>。我々の研究室で開発された非天然型ポリマーである微生物産生ポリ乳酸ポリマーを分解する微生物群はほとんど明らかになっていないため、自然環境下から分解能力を保有する微生物群を単離・解析した<sup>12)</sup>。その結果、天然型の生分解性プラスチックを分解する微生物の中でも特定の分解酵素を保有する一部の微生物群しか乳酸ポリマーを分解しないことが示された。また、それら分解菌は重合度 (DP) 20 以下の乳酸オリゴマーについては分解することが強く示唆された。このことは乳酸ポリマー中の乳酸連鎖を<20程度にすることが、微生物由来の酵素の生分解性にとって重要なファクターであることを示しており、この知見をもとに、新たな生分解性プラスチックのデザインが可能になるのではと応用が期待される。

## おわりに

これまでに微生物による植物バイオマス分解に関する研究は、先達の研究者により数多くの研究がなされてきましたが、近年、先端解析技術を用いることで新たな側面が明らかになってきました。この度、賞をいただきましたことも、これからも研鑽をおこたらず精進するようにとの激励だと感じております。これからも植物分解利用に関する基礎研究を多面的に進めていければと思っております。

## (引用文献)

- Martinez, D. et al.: Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnol.*, Vol. 22(6), 695-700, (2004)
- Wymelengerg, A. et al.: The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: Database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. *J. Biotechnol.*, Vol. 118 (1), 17-34, (2005)
- Hori, C., Igarashi, K., Katayama, A., Samejima, M.: Effects of xylan and starch on secretome of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on cellulose. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 321(1), 14-23, (2011)
- Hori, C., Suzuki, H., Igarashi, K., Samejima, M.: Transcriptional response of cellobiose dehydrogenase gene to cello- and xylo-oligosaccharides in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 78(10), 3770-3773, (2012)
- Hori, C., Gaskel, J., Igarashi, K., Samejima, M., Hibbett, D., Henrissat, B., Cullen, D.: Genome-wide analysis of polysaccharides degrading enzymes in eleven white- and brown-rot Polyporales provides insight into mechanisms of wood decay. *Mycologia*, Vol. 105(6), 1412-1427, (2013)
- Hori, C., Gaskel, J., Igarashi, K., Kersten P., Mozuch M., Samejima M., Cullen D.: Temporal alterations in the secretome of the selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispota* during growth on aspen wood reveal this organism's strategy for degrading lignocellulose. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 80(7), 2062-2070, (2014)
- Hori, C., Ishida, T., Igarashi, K., Samejima, M., Suzuki, H., Master, E., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Held, B., Canessa, P., Larrondo, L.F., Schmoll, M., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Gaskell, J.A., Kersten, P., St John, F., Glasner, J., Sabat, G., Splinter, BonDurant S., Syed, K., Yadav, J., Mgbeahuruike, A.C., Kovalchuk, A., Asiegbu, F.O., Lackner, G., Hoffmeister, D., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Sun, H., Lindquist, E., Barry, K., Riley, R., Grigoriev, I.V., Henrissat, B., Kues, U., Berka, R.M., Martinez, A.T., Covert, S.F., Blanchette, R.A., Cullen, D.: Analysis of the *Phlebiopsis gigantea* genome, transcriptome and secretome gives insight into its pioneer colonization strategies of wood. *PLoS genetics*, Vol. 10(12), e1004759, (2014)
- 堀 千明, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩. 木材腐朽担子菌のゲノム・ポストゲノム解析から植物細胞壁と分解酵素の共進化を考える. *化学と生物*, Vol. 53(6): 381-388, (2015)
- Hori C, Gaskell J, Cullen D, Sabat G, Stewart PE, Lail K, Peng Y, Barry K, Grigoriev IV, Kohler A, Fauchery L, Martin F, Zeiner CA, Bhatnagar JM.: Multi-omic analyses of extensively decayed *Pinus contorta* reveal expression of diverse array of lignocellulose degrading enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 84(20) e01133-18, (2018)
- Hori C, Oishi K, Matsumoto K, Taguchi S, Ooi T.: Site-directed saturation mutagenesis of polyhydroxylalkanoate synthase for efficient microbial production of poly [(R)-2-hydroxybutyrate]. *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 125(6): 632-636, (2018)
- Hori C, Yamazaki T, Ribordy G, Takisawa K, Matsumoto K, Ooi T, Zinn M, Taguchi S.: High-cell density culture of poly (lactate-co-3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli* by using glucose/xylose-switching fed-batch jar fermentation. *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 127(6): 721-725, 2019
- Hori C, Sugiyama T, Watanabe K, Sun J, Kamada Y, Ooi T, Isono T, Satoh T, Sato S, Taguchi S, Matsumoto K.: Isolation of poly [D-lactate (LA)-co-3-hydroxybutyrate]-degrading bacteria from soil and characterization of D-LA homo-oligomer degradation by the isolated strain. *Polymer Degradation and Stability*.

謝辞 本研究は、大学生時代から現職までの間、東京大学大学院農学生命科学研究科、米国農務省林産研究所/ウィスコンシン大学マディソン校、理化学研究所環境資源科学研究センター、北海道大学農学研究院および北海道大学工学研究院で行われたものです。北海道大学工学研究院応用化学部門の松本謙一郎教授、大井俊彦准教授、田口精一教授〔現・東京農業大学〕のご指導により、バイオポリマー生産について研究する機会を頂きました。心より感謝申し上げます。また、同大利徹教授には普段より激励頂きましたこと、また本賞にご推薦頂きまして誠にありがとうございます。北海道大学農学研究院森林科学分野の佐野雄三教授、荒井圭太准教授、山岸祐介助教や関係者の皆様には、樹木研究を発展する機会を与えて下さり、ありがとうございます。理化学研究所では、植物細胞壁合成について学ぶ機会を与えて下さいました。奈良先端科学技術大学院の出村拓教授、東京大学大谷美紗都准教授や関係者の皆様には大変感謝いたしております。米国農務省林産研究所の Dan Cullen 教授とはこれまで多くの共同研究を推進しており、数多くの助言や支援を頂きまして、大変感謝しております。最後になりましたが、恩師である東京大学大学院農学生命科学研究科の鮫島正浩教授 (現信州大学・特任教授) と五十嵐圭日子准教授からは学生時代から一貫して研究者として必要な様々な考えや知識をご指導を頂きました。心より厚く御礼申し上げます。また共同研究で大変お世話になっております。京都大学生存圏研究所飛松裕基准教授に感謝申し上げます。

私はこれまでに上述では書ききれない程の共同実験者の皆様や諸先輩方々からアドバイスや、学生諸氏の支えを頂くことで、これまで研究を続けられたと感じております。皆様へ心よりの感謝を示しますとともに、これからもご指導ご鞭撻のほど、どうぞ宜しくお願い申し上げます。