

発表番号 33 (0316)

好塩性白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株による底質土壤汚染物質の分解と浄化機能

助成研究者：近藤隆一郎（九州大学大学院農学研究院）

共同研究者：堤 祐司（九州大学大学院農学研究院）

近年、白色腐朽菌の難分解性物質に対する高い分解能力を環境浄化に応用しようとする試みがなされ、ダイオキシン類や PCB などの難分解性有機塩素化合物の生分解に関する基礎的研究が盛んに行われている。一方で、高い塩濃度条件下で生息するマングローブ林内においても木材由来のセルロースおよびリグニン由来の炭素は自然界で循環されているが、このような条件下で生息する白色腐朽菌に関する報告はほとんど見られない。このような背景のもと、過去の研究において我々は沖縄マングローブ林内の腐朽材より白色腐朽菌を多数採取し、そのリグニン分解能力を指標にスクリーニングを行った結果、白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株を単離するに至った。さらに、本菌株の諸特性を検討した結果、本菌株は高塩濃度（3% sea salts）条件下で高い成長速度と高いリグニン分解活性を保持することが明らかとなった。そこで本研究では、白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株を底質土壤汚染物質の分解と環境浄化に用いるための基礎的知見を得ることを目的として、3% sea salts 存在下での白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株によるリグニン分解および難分解性化合物分解の鍵酵素となるマンガネロペルオキシダーゼ (MnP) の発現挙動について検討を行った

Phlebia sp. MG-60 株は 3% sea salts 条件では、非共存下とは異なる MnP アイソザイムを発現し、その産生量は増大した。すなわち、*Phlebia* sp. MG-60 株は sea salts の存在下でもリグニン分解活性を維持するために積極的に MnP アイソザイムの発現切り替えと産生量を増大させることで対応していると予測された。また本研究では *Phlebia* sp. MG-60 株の 3 種の MnP 部分 cDNA 配列を得るとともに、sea salts に誘導される 2 種の MnP アイソザイムを同定した。

これまでに白色腐朽菌は多様な難分解性化合物や合成高分子を分解することが知られており、MnP は分解反応の鍵酵素であることが知られている。しかしながら本研究で明らかになったように、*Phanerochaete chrysosporium* に代表される多くの白色腐朽菌は高塩濃度条件下で成長が悪く、また MnP の産生も抑制される。今後は高塩濃度条件下における *Phlebia* sp. MG-60 株による難分解性化合物の分解反応条件の最適化を行うことにより、本菌株による環境浄化の可能性が期待できる。

17

助成番号 0316

好塩性白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株による底質土壌汚染物質の分解と浄化機能

助成研究者：近藤 隆一郎（九州大学大学院農学研究院）

共同研究者：堤 祐司（九州大学大学院農学研究院）

1. 研究目的

自然界における木材の分解者として白色腐朽菌が知られており、白色腐朽菌は木材細胞壁中のフェノール性の三次元高分子であるリグニンを分解しうる唯一の微生物である。近年、白色腐朽菌の難分解性物質に対する高い分解能力を環境浄化に応用しようとする試みがなされ、ダイオキシン類やPCBなどの難分解性有機塩素化合物の生分解に関する基礎的研究が盛んに行われている(例えば 1-3)。一方で、高い塩濃度条件下で生息するマングローブ林内においても木材由来のセルロースおよびリグニン由来の炭素は自然界で循環されているが、このような高塩濃度条件下で生息する白色腐朽菌に関する報告はほとんど見られない(4)。このような背景のもと、過去の研究において我々は沖縄マングローブ林内の腐朽材より白色腐朽菌を多数採取し、そのリグニン分解能力を指標にスクリーニングを行った結果、白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株を単離するに至った。さらに、本菌株の諸特性を検討した結果、本菌株は高塩濃度（3% sea salts）条件下で高い成長速度と高いリグニン分解活性を保持することが明らかとなった(5,6)。これらの結果から、*Phlebia* sp. MG-60 株はこれまでに報告のない、唯一の好塩性白色腐朽菌であり、その生理的特徴に興味を持たれるとともに応用面での展開が期待される。そこで本研究では、白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株を底質土壌汚染物質の分解と環境浄化に用いるための基礎的知見として、3% sea salts 存在下での MG-60 株によるリグニン分解および難分解性化合物分解の鍵酵素となるマンガンペルオキシダーゼ (MnP) の発現挙動について検討を行った。

2. 3% sea salts 存在下での *Phlebia* sp. MG-60 株による MnP 産生

過去の研究において、代表的な白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* は 3% sea salts 存在下でそのリグニン分解活性が大幅に低下するものの、*Phlebia* sp. MG-60 は同条件下でリグニン分解活性および染料 Poly R-478 の脱色能を維持することから、高塩濃度条件においてもリグニン分解鍵酵素である MnP を産生するこ

とが予想された。そこで本項では 3% sea salts 条件下での *Phlebia* sp. MG-60 による MnP 産生について詳細に検討するとともに、産生される MnP アイソザイムについても検討した。

2.1 研究方法

2.1.1 菌体重量および菌体外総タンパク量あたりの MnP 活性

potato dextrose agar (PDA) 培地上で 5 日間前培養した *Phlebia* sp. MG-60 株を 3% sea salts 添加、無添加の条件で調製した Kirk 基本液体培地（HCLN, pH 4.5）中で 30、150rpm にて振とう培養し、培養日数（6, 8, 10, 12, 14 日）ごとに菌体重量、MnP 活性、および細胞外総タンパク量を測定した。測定に際し、培養液をろ過後、PD-10 で脱塩をしたものを酵素試料として用いた。Mn³⁺-マロン酸錯体の生成を 270nm で測定し、MnP 活性とした。細胞外タンパク量の測定は BSA をスタンダードとしてブラッドフォード法で行った。

上記と同様に sea salts 無添加の条件下で MG-60 株を培養し、培養 10 日目に 3%となるように sea salts を添加した。その後 12, 24, 48 時間後に培養液を回収し、MnP 活性の測定を行った。また酵素試料の一部を SDS-PAGE に供し、sea salts の存在による MnP アイソザイムの変化を調べた。

2.1.2 MnP アイソザイムの分画

3% sea salts 添加および無添加条件下で *Phlebia* sp. MG-60 株を 10 日間培養し、培養液を回収した。濃縮、脱塩した後、DEAE sepharose CL6B を用いてこれを分画し、MnP 活性を有するフラクションを分取した。次いで sea salts 無添加のものは superdex 75 を、また、3% sea salts を添加したものは MonoQ を用いて先の MnP 画分をさらに精製した。

2.2 研究結果と考察

3% sea salts を添加して培養することにより、*Phlebia* sp. MG-60 株の菌体重量は若干増加した。3% sea salts 存在下で *Phlebia* sp. MG-60 株の MnP 産生量は増加し、菌体重量あたりの MnP 活性も著しく増加した（Fig. 1）。代表的白色腐朽菌である *P. chrysosporium* を同様に 3% sea salts を含む条件で培養し、MnP 産生の経時変化を調べた結果、Fig. 2 に示すように MnP の産生開始時期が大きく遅れ、またその産生量も少なくなった。

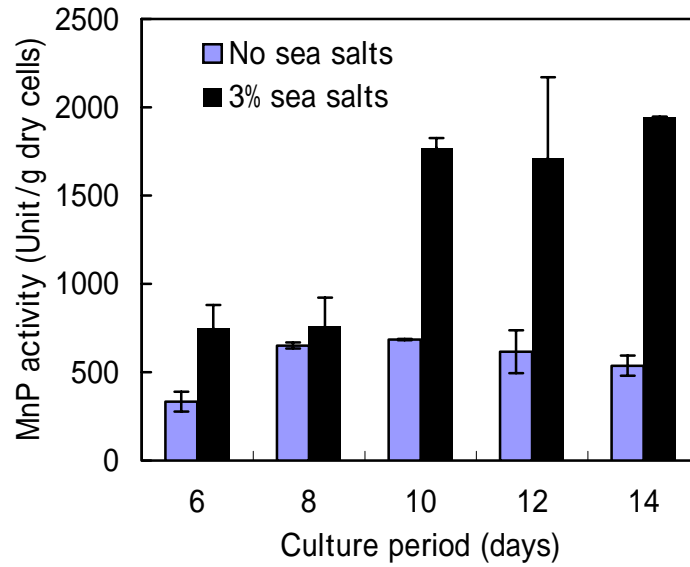


Fig. 1 Effect of the sea salts on the MnP production by *Phlebia sp. MG-60*. MnP activity was expressed as unit per gram of dry mycerial weight.

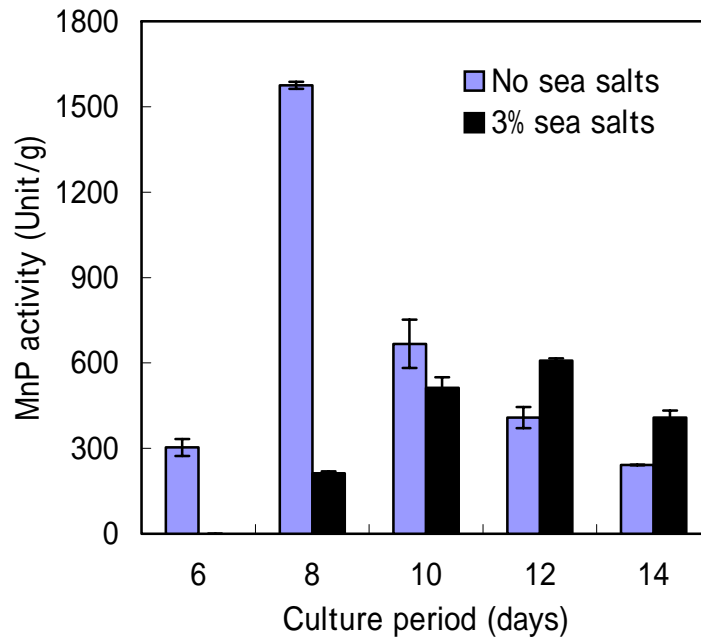


Fig. 2 Effect of the sea salts on the MnP production by *Phanerochaete chrysosporium*. MnP activity was expressed as unit per gram of dry mycerial weight.

また、培養液中に分泌される細胞外総タンパク量当りで算出した MnP 活性も 3% sea salts 条件下では、sea salts 無添加の約 3 倍に増加した (data not shown)。以上の結果より、sea salts 添加による *Phlebia* sp. MG-60 株の MnP 産生量増大は、菌体の成長促進による菌体重量増加によるものではなく、むしろ sea salts の存在に応答し、MG-60 株が積極的に MnP の生産を行った結果と判断できる。

Sea salts による MnP の産生誘導をさらに詳細に確認するため、*Phlebia* sp. MG-60 株を sea salts 無添加で培養し、培養 10 日目に 3% となるように sea salts を添加した後の MnP 産生を経時的に追跡した。その結果、sea salts 添加後 24 ~ 48 時間以内に MnP 産生が顕著に増加したことから (Fig. 3)、MG-60 株の MnP 産生は sea salts によって誘導を受けることが確認された。

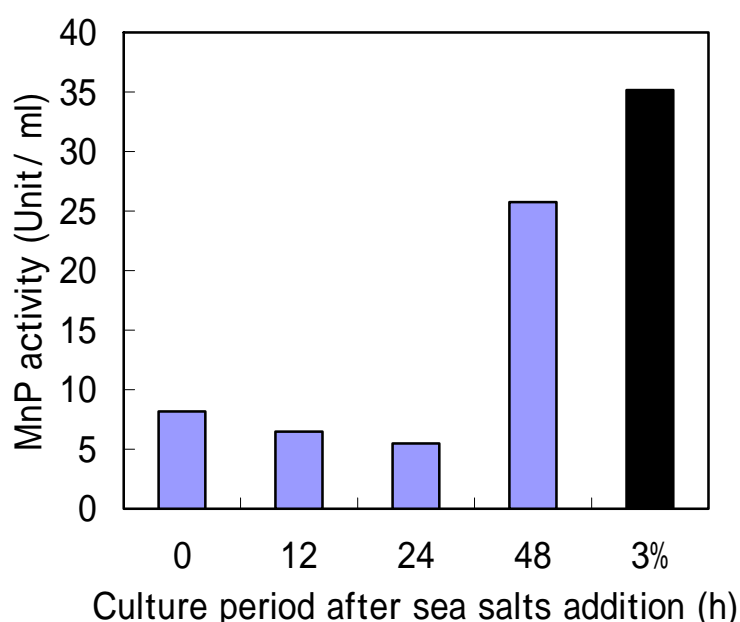


Fig. 3 Effect of the sea salts addition on the MnP production by *Phlebia* sp. MG-60. Sea salts were added to the culture of *Phlebia* sp. MG-60 after 10 days incubation without adding sea salts. The MnP activity was determined 12, 24, and 48 hours after sea salts addition. 3%; The MnP activity produced in the culture of *Phlebia* sp. MG-60 with 3% sea salts.

次いで、sea salts 添加および無添加で *Phlebia* sp. MG-60 株を培養し、各培養液から MnP 活性を示すフラクションを分画し、SDS-PAGE に供した。その結果、sea salts 無添加時では 45 kDa 付近に主要なバンドとして MnP タンパクが確認された。一方 3% sea salts を添加した条件下で培養した培養液中には約 47 kDa お

よび 50 kDa にそれぞれ MnP タンパクが確認された。すなわち、sea salts 添加および無添加の培養条件において *Phlebia* sp. MG-60 は異なる MnP アイソザイムを産生するという興味深い結果が得られた。そこで、sea salts の添加による MnP アイソザイムの発現誘導を経時的に追跡するため、sea salts を添加しない培地で 10 日間 *Phlebia* sp. MG-60 を培養した後、sea salts 添加して 0, 12, 24, 48 時間後に培養ろ液を採取し、SDS-PAGE で解析した。

その結果、Fig. 4 に示すように、sea salts 添加後 0~24 時間までは 45 kDa の MnP が主要なアイソザイムであったのに対し、48 時間後には 45 kDa のアイソザイムが減少する一方で、47 kDa および 50 kDa の MnP が主要なアイソザイムとなった。Fig. 4 で見られた MnP アイソザイムの切り替えと、Fig. 3 における sea salts 添加による MnP 活性の増加はよく一致した。

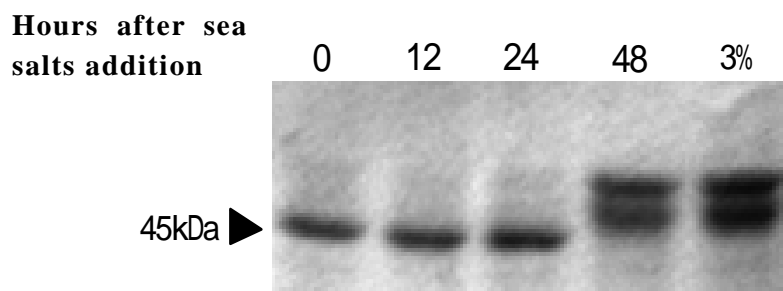


Fig. 4 Changes of the MnP isoenzyme produced by *Phlebia* sp. MG-60.

Sea salts were added to the culture of *Phlebia* sp. MG-60 after 10 days incubation without adding sea salts. The culture fluid was harvested at 12, 24, and 48 hours after sea salts addition. 3%; The MnP isoenzyme produced in the culture of *Phlebia* sp. MG-60 with 3% sea salts.

sea salts 無添加および 3% sea salts の培養ろ液より MnP の部分精製を試みた。sea salts 無添加の培養ろ液より superdex 75 による精製を経て得られた部分精製 MnP は、45 kDa の MnP アイソザイムであることを SDS-PAGE により確認した。また、3% sea salts を添加した培養ろ液を MonoQ を用いて分画した結果、Fig. 5 に示すように Fr. 1 と Fr. 2 の 2 つの MnP アイソザイムに分画することができた。各フラクションを単離し、SDS-PAGE に供した結果、Fr. 1 の MnP は 47 kDa のアイソザイムに、また Fr. 2 の MnP は 50 kDa のアイソザイムに一致することが確認された。

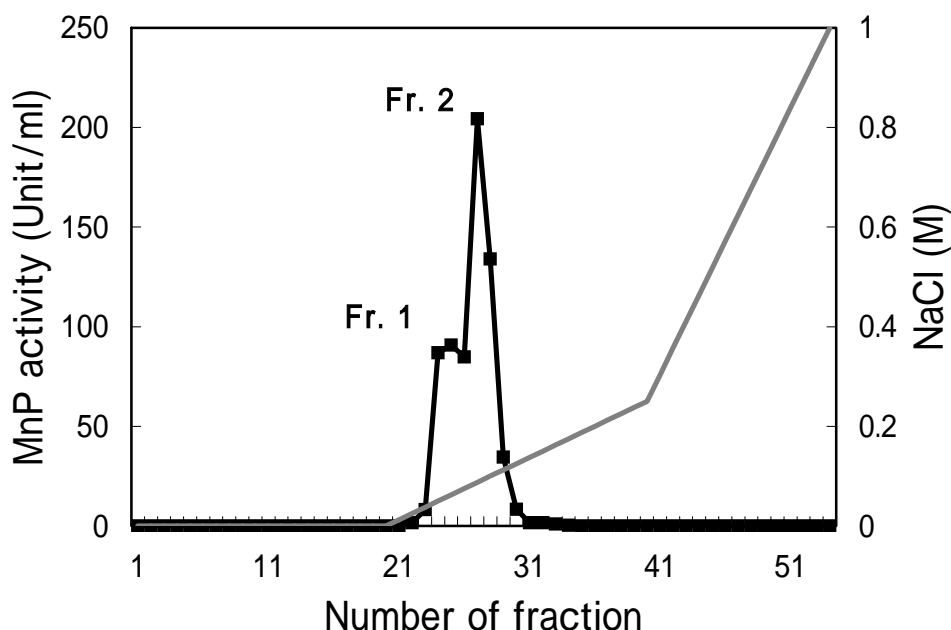


Fig. 5 Fractionation of MnP isoenzymes produced by *Phlebia* sp. MG-60 under 3% sea salts culture condition.

Crude enzyme preparation was fractionated by a Mono Q column with NaCl gradient. Each fraction was collected and the MnP activity was determined.

以上の結果より、好塩性白色腐朽菌である *Phlebia* sp. MG-60 株は sea salts の存在・非存在によって異なる MnP アイソザイムを発現すること。さらに、sea salts 存在下では発現する MnP タンパク量も多くなるために MnP 活性が増加することが明らかとなった。なお、培地にマンニトールを添加することで、浸透圧を高くした培地で *Phlebia* sp. MG-60 株を培養した際にも MnP 活性の増大および MnP アイソザイムの変化が認められたが、その変化は sea salts を添加した場合ほど明瞭ではなかった。このことから、sea salts 添加条件における *Phlebia* sp. MG-60 株の MnP 産生の変化は培地の浸透圧変化だけでは単純に説明できない。

3. MG-60 株の MnP 遺伝子のクローニングと発現解析

Sea salts の有無により *Phlebia* sp. MG-60 株は異なる MnP アイソザイムを発現した。そこで本項では、各 MnP アイソザイムに関する知見を得るため RT-PCR

および RACE 法により MnP cDNA のクローニングを試みた。また、ノーザンハイブリダイゼーションによる各アイソザイムの発現解析を行い、sea salts によって誘導される MnP アイソザイムの同定を行なった。

3.1 研究方法

3.1.1 MG-60 株の MnP cDNA のクローニング

Sea salts 無添加および 3% sea salts を含む Kirk 培地で 10 日間 MG-60 株を培養後、菌体をろ別した。TRIzol を用いて菌体より Total RNA を調製し、これを鋳型に逆転写反応を行った。MnP に特異的なアミノ酸配列をもとに作成した数種のプライマーを用いて PCR による MnP 配列の増幅を行った。得られた 2 種の配列をもとに特異的プライマーを作成して 3'-RACE を行った。

3.1.2 発現解析

Sea salts 無添加および 3% sea salts を添加した Kirk 培地で 10 日間培養した MG-60 株の菌体から、上記と同様の方法で Total RNA を調製した。また、sea salts 無添加で 10 日間培養した後、培地中に 3% となるよう sea salts を添加後、さらに 2 日間培養を行なった菌体からも Total RNA の調製を行った。得られた RNA を電気泳動後、メンブランにブロッティングを行なった。クローニングにより得られた MnP cDNA 配列をプローブとして ³²P で標識後、ノーザンハイブリダイゼーションを行なった。

3.2 研究結果と考察

Sea salts 無添加で培養した *Phlebia* sp. MG-60 株菌体より調製した RNA と MnP の保存配列をもとに作成したプライマーを用いて RT-PCR を行なった結果、約 400bp の DNA フラグメントが増幅された。これらの塩基配列を解読したところ、2 種の異なる cDNA が存在した。両配列を BLAST により解析した結果、共に既知の MnP と高い相同性を示したことから、これらは MG-60 株の MnP 部分配列であると判断した。各配列をもとに特異的プライマーを作成し、3'-RACE を行った結果、両アイソザイムの 3' 側の約 750bp の塩基配列を決定した。これらの配列には MnP に保存されている proximal histidine およびマンガン結合部位が含まれており、また NCBI BLAST による相同性検索の結果も既知の MnP と比較的高い相同性を示したことから、得られた配列はいずれも MG-60 株の MnP 部分配列であると判断し、それらをそれぞれを *MGmnp1*, *MGmnp2* とした。これら二つのアイソザイムの相同性は 50% 程度であった。

一方、3% sea salts を添加した培地で培養した *Phlebia* sp. MG-60 株から調

製した RNA を用いて RT-PCR を行なった結果、2 種類の MnP 配列が得られた。その内の一つは先に得られた *MGmnp2* と同一配列であり、先に確定した配列と合わせ *MGmnp2* の約 1100bp の配列を決定した。もう一方の配列は *MGmnp1* と 56%、*MGmnp2* と 73% の相同性を有していたこと、ならびに MnP の保存配列を有していたことから、これを 3 番目の MnP アイソザイム *MGmnp3* (約 620bp) とした。なお、*MGmnp1* は *Phlebia radiata* の *mnp3* と最も相同性が高く、*MGmnp2* および *MGmnp3* は *P. radiata* の *mnp2* と最も相同性が高かった。

先に得られた *MGmnp1* および *MGmnp2* をプローブとして用い、ノーザンハイブリダイゼーションによる MnP の発現解析を行った。結果の一部を Fig. 6 に示すが、sea salts 無添加で 10 日間培養した後、sea salts を添加しさらに 48 時間培養した場合、および 3% sea salts を含む培地中で 12 日間培養した場合には、*MGmnp2* の発現が非常に強く、一方、sea salts 無添加で培養した菌体では *MGmnp2* の発現はほとんど確認できない程度であった。これらの結果から、*MGmnp2* と *MGmnp3* は sea salts の存在により誘導を受ける 47kDa あるいは 50kDa の MnP アイソザイムを、また *MGmnp1* は 45 kDa の MnP アイソザイムをコードしていると予想した。これら MnP アイソザイムの発現は、sea salts の添加により強く制御されていることから、本アイソザイムの発現調節機構に興味を持たれる。

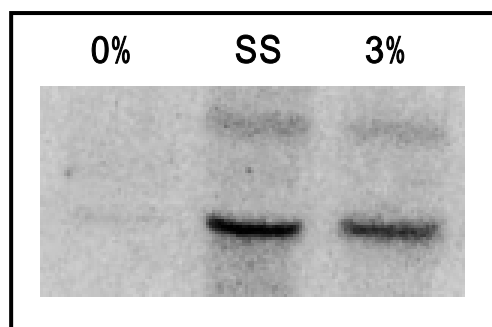


Fig. 6 Expression of MnP gene in *Phlebia* sp. MG-60.

Total RNA blot was hybridized with ³²P-labeled *MGmnp2* sequence.

RNA was prepared from the culture without sea salts (0%), the culture in which 3% sea salts was added at 10-day of incubation (SS), and culture with 3% sea salts (3%).

4. 今後の課題

本研究では好塩性白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株の sea salts 共存培養条件におけるリグニン分解酵素 MnP の産生挙動ならびに MnP の特性について検討を行った。これまでに好塩性の白色腐朽菌に関する報告はなく、*Phlebia* sp. MG-60 株の MnP 産生に関する生理化学的知見は本菌株を環境汚染物質の分解に用いる際に重要な情報となる。

Phlebia sp. MG-60 株は海水と同じ塩濃度である 3% sea salts 条件において、

非共存下とは異なる MnP アイソザイムを発現し、その産生量は増大した。Sea salts の存在による、MnP の発現切り替え応答は sea salts 添加の 24 ~ 48 時間に以内に起こった。すなわち、*Phlebia* sp. MG-60 株は sea salts の存在下でもリグニン分解活性を維持するために積極的に MnP アイソザイムの発現切り替えと産生量を増大させることで対応していると予測される。また本研究では *Phlebia* sp. MG-60 株の 3 種の MnP 部分 cDNA 配列を得るとともに、sea salts に誘導される 2 種の MnP アイソザイムを同定した。

これまでに白色腐朽菌は多様な難分解性化合物や合成高分子を分解することが知られており、MnP は分解反応の鍵酵素であることが知られている。しかしながら本研究で明らかになったように、*P. chrysosporium* に代表される多くの白色腐朽菌は高塩濃度条件下で成長が悪く、また MnP の産生も抑制される。今後は高塩濃度条件下における *Phlebia* sp. MG-60 株による難分解性化合物の分解反応条件の最適化を行うことにより、本菌株による環境浄化の可能性が期待できる。

5. 文献等

- (1) 森 智夫、近藤 隆一郎： 白色腐朽担子菌による塩素化芳香族化合物の生分解, *Radioisotopes*, 52, 665-666 (2003)
- (2) Mori, T., Kitano, S., Kondo, R.: Biodegradation of Chloronaphthalenes and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by White-Rot Fungus *Phlebia lindtneri*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 380-383 (2003)
- (3) Suhara, H., Daikoku, C., Takata, H., Suzuki, S., Matsufuji, Y., Sakai, K., Kondo R.: Monitoring of white-rot fungus during bioremediation of polychlorinated dioxin-contaminated fly ash, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62:601-607 (2003)
- (4) Raghukumar C.: Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. *Mycological Research* 104, 1222-1226 (2000)
- (5) Li, X., Kondo, R., Sakai, K.: Studies on hypersaline-tolerant white-rot fungi (I). Screening of lignin-degrading fungi in hypersaline conditions. *J. Wood Sci.* 48, 147-152 (2002)
- (6) Li, X., Kondo, R., Sakai, K.: In vivo and in vitro biobleaching of unbleached hardwood kraft pulp by marine fungus, *Phlebia* sp. MG-60. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. 185-191 (2002).

Degradation of recalcitrant pollutants in sediment by halotolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60

Ryuichiro Kondo and Yuji Tsutsumi (Faculty of Agriculture, Kyusyu University)

Marine fungi are regarded as major decomposers of woody and herbaceous substrata entering marine ecosystem, and they have been identified from substrata containing lignocelluloses. Most of the studies, however, were concentrated on biodiversity and classification of marine fungi. Marine fungi grow on marine and estuarine environments, so these white-rot fungi were isolated from decayed mangrove and sea grass, and their lignin-modifying enzymes might have certain hypersaline ability and could be applied to the salt environment. *Phlebia* sp. MG-60 is a ligninolytic basidiomycete isolated from mangrove stands in Japan based on its lignin degradative ability. This fungus can grow and exhibit high lignin degrading ability under the culture condition with high salt concentration. In this study, therefore, we investigated the production of manganese peroxidase (MnP) by MG-60.

The strain *Phlebia* sp. MG-60 grew faster and produced more MnP activity in the medium containing 3% sea salts. When 3% sea salts were added to the culture of *Phlebia* sp. MG-60 at the 10-day of the incubation without sea salts, the MnP activity also largely increased. The increase of MnP activity was observed within 48 hours after the sea salts addition.

We sequentially harvested the crude culture fluid from the culture of *Phlebia* sp. MG-60, 0, 12, 24, 48 hours after sea salts addition, and ran SDS-PAGE of them to see the secreted protein profiles. A 45 kDa protein was the only major protein during 24 hours, thereafter, this protein disappeared instead, 47 kDa and 50 kDa proteins were produced until 48 hours. This striking change was well consistent with the increase of MnP activity. These results suggest that these newly produced proteins (47 kDa and 50 kDa) are sea salts-responsive MnP isoforms. Thus, *Phlebia* sp. MG-60 changes MnP isoforms as the response to sea salts.

The RT-PCR and 3'-RACE technique resulted in cloning two partial MnP cDNA, *MGmnp1*(750 bp), *MGmnp2*(1100 bp). These partial MnP cDNAs, *MGmnp1* and *MGmnp2*, are less similar (ca. 50%) each other. The *MGmnp2* was extensively expressed in the culture containing sea salt and was also clearly induced within 48 h after the addition of sea salts to the culture without sea salts. However, *MGmnp1* mRNA was not induced or enhanced in the sea salt containing culture. These results indicate that *MGmnp2* is a cDNA encoding sea salts-inducible MnP isoform of *Phlebia* sp. MG-60.