

木質バイオマスの利用における遺伝子工学*

桑 原 正 章**

Genetic Engineering in Utilization of Wood Biomass*

Masaaki KUWAHARA**

(平成3年8月1日受理)

1. はじめに

「バイオマス (Biomass)」とは「ある一定の環境下における生物の現存量」と定義される。バイオマスの最も大きな特徴は再生産が可能であるということである。したがって、バイオマスを一つの資源として見た場合、化石資源が消費の一途に辿るのは大きな相違がある。バイオマス生産の基本は光合成であり、これにより地球上で生産されるバイオマスは年間1,550億トンに達し、その凡そ50%が森林あるいは林地において行なわれるという。また、別の統計によれば、バイオマスの約90%が森林に存在するとされている。

森林で生産されるバイオマスのほとんどは樹木である。ただし、ここでは樹木、木材、これらの廃棄物を含めて木質バイオマスと称することにする。一方、産業の分類から、農産(系)バイオマス、水産(系)バイオマスなどと並んで、林産(系)バイオマスという言葉が用いられるが、木質バイオマスと同義語として扱うことにする。木質バイオマスの主たる構成成分は言うまでもなく、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンである。また、抽出成分も重要な構成成分であり、これらの内には生理活性を有するものもある。木質バイオマスはしばしばリグノセルロース系バイオマスとも呼ばれる。これは、木質バイオマスの主成分がセルロースとリグニンの混合物であり、利用もこれらの成分が基質になることによる。

木質成分の利用のためには種々の方法が可能であり、微生物あるいはそれらの生産する酵素を利用した変換法もその一法である。しかし、このような生物学的変換法の実用化のためには、用いる微生物あるいは酵素の能力をより一層高める必要がある。そのためには遺伝子工学的な手法が重要になろう。ここでは、セルロースとリグニンの分解と変換に焦点をあてることにしたい。

2. 木質バイオマス利用の概要

2.1 木質バイオマスの種類

木質バイオマスには他のバイオマスにおけると同様に、利用の対象となり得る量の資源が存在する。このような資源は他のバイオマスと同様に、生産系と未利用系に分けることができる(表1)。生産系においては、選択育種の結果、その生育速度が通常の株のそれよりもはるかに高くなり、伐採までの栽培期間の短縮

* 第46回木研公開講演会(平成3年5月17日, 大阪)において講演

** バイオマス変換研究室(Laboratory of Biomass Conversion)

Key Words: Conversion of wood biomass, Lignocellulose, White-rot fungi, Lignin peroxidase, Lip, Cloning of LiP gene

表1 利用の対照となる木質バイオマスの分類

生産系	単伐期材	ポプラ, カンバ, プラタナス, ユーカリなど
	炭化水素含有材	ユーカリ, アオサングなど
未利用資源系	低利用広葉樹	クヌギ, ナラなど
	その他の低利用植物	ササなど
	廃棄物	林地残材 (間伐材, 小径木, 枝条など) 製材廃棄物 (端材, 鋸屑, パークなど)

された, いわゆる早生樹や超短伐材に関する研究が注目されている。一方, 未利用の資源としては, 林地に放置されている残材, 製材の過程に発生する種々の廃棄物などがあり, これらは莫大な量に達する。

2.2 木質バイオマスの前処理と利用の形式

木質バイオマスを利用するためには, 材料に対して, 目的に応じて何等かの前処理を行なうことが必要となる (表2)。前処理の目的は, ①木材を適当な大きさ, あるいは粒度, にすること, ②木材組織を破壊すること, ③特定の成分を抽出すること, ④特定の成分を分解すること, などである。このうち, 担子菌のリニン分解能を用いる前処理法は省エネルギー的な処理法であり, パルプ製造 (バイオロジカルパルピング) 過程への利用法¹⁾が開発されている。前処理に使用する担子菌の能力の改良には遺伝子工学的な手法が必要である。このことについては後述する。木質バイオマスの利用には種々の可能性が考えられるが, その方式は全体利用と成分利用に分類することができよう。全体利用としては, 例えば, 木材をチップ化した後に, 蒸煮・爆砕などの処理により木材組織を壊し, 家畜飼料に用いる技術などがある。また, 木粉を培地にしてキノコを栽培することもこの範時に入る利用法である。

表2 木質成分分解微生物の育種に用いられる
バイオテクノロジー

選抜 (スクリーニング) —— 自然界, 既存株から
変異 —— 幅射線, 変異誘発剤など
交雑 (交配, かけあわせ) —— 主として同種間
細胞融合 —— 同種間, 異種間
組換え DNA —— 同種間, 異種間

一方, セルロースやリグニンなどの各成分の特徴を活かした利用のためには, まづ効果的な成分分離技術が必要となる。蒸煮・爆砕処理は高温・高圧の水蒸気により木質試料の組織を崩すことによりヘミセルロースを可溶化し, セルロース, リグニンを分離することを可能にする²⁾。したがって, この処理は成分分離の目的によく合致する。森林総合研究所の開発プロジェクト³⁾によれば, 蒸煮・爆砕した試料は反芻動物の飼料に, 水に抽出されたヘミセルロースからはオリゴ糖が, 溶媒あるいはアルカリ抽出されたリグニンは炭素繊維に加工される。また, 残渣セルロースはセルラーゼにより糖化され, 得られた糖液は酵母を用いる発酵によりアルコールに変換される。この過程は木質バイオマス利用の基幹工程になる可能性がある。また, 木成分のそれぞれから誘導される可能性のある化合物については総説を参照されたい⁴⁾。

3. 木質バイオマス利用への微生物の利用

3.1 木材成分を分解する微生物

木質バイオマスの利用に微生物の能力を応用する目的は, ①木質バイオマスとその成分を有用物質に変換

すること、および、②木質バイオマスあるいはその成分の利用のための前処理を行なうこと、にある。このよな利用目的においては、まず木質の主要成分を分解・変換する微生物を考慮の対象にする必要がある。

木材腐朽菌と称される一群の担子菌にセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンを分解する能力がみらるが、それぞれの成分の分解能は菌により異なる。また、セルロースやヘミセルロースの分解は、ある種の細菌や糸状菌（子のう菌、不完全菌など）にもみられる。

3.2 遺伝子工学的および細胞工学的な手法

木材成分の分解能の高い、例えばセルラーゼやリグニン分解酵素生産能など、の高い菌株を得るためには表3に示すような種々の方法が考えられる。このうち、スクリーニングは従来から行なわれ、目的とする微生物を獲得するための最も基本的な方法である。変異の手法も恒常的によく用いられるが、変異は遺伝子上でランダムに起こるため、目的の性質を持つ変異株（種）を変異を受けていない細胞から効率よく選択するための方法の開発が付随して重要になる。細胞の生殖サイクルを利用した交雑も従来から食用担子菌の優良菌株の育種に用いられ、大きな成果を挙げてきている。新しいテクノロジーとしては、細胞融合と組換えDNAの技術が重要となってきた。

表3 木材試料の前処理

分類	操作
機械的処理	裁断 粉碎——ボールミル、ロールミルなど各種ミル、凍結粉碎 摩砕・解繊
物理化学的処理	蒸煮 爆砕 マイクロ波照射 幅射線照射
化学的処理	酸——硫酸、塩酸、亜硫酸、リン酸、過酢酸など アルカリ——水酸化ナトリウム、アンモニア、カドキセンなど オゾン 有機溶媒——UCT 溶剤、オルガノソルブ法など
生物的処理	木材腐朽菌（担子菌）など

新しい技術のうち、細胞融合は組換えDNAとは異なり、遺伝子の導入にベクター系を必要としないという利点はあるものの、世代を経るにつれて何れかの形質に分離する 경우가多く、融合した細胞中で遺伝子DNAを安定に保つ方策が重要である。目的とする形質を飛躍的に高めるためには組換えDNAの手法が最も効果的と考えられる。さらに、この手法を用いて遺伝子を改変することにより、機能の改善された酵素蛋白質を得ることも可能になる。

以下、組換えDNA技術の応用について、セルロースとリグニンの分解に関与する酵素の生産を例にとって説明する。

4. セルロース分解酵素とその遺伝子

4.1 セルラーゼ

セルロースは酵素的な加水分解を受け、最終的にはセロビオースやグルコースを与える。この反応に関与

する酵素をセルラーゼと総称している。糸状菌のセルラーゼは *Trichoderma reesei* において最も詳細に研究され、これにおいて得られた知見が他の菌種にも適用されることが多い。糸状菌においてはセルラーゼは、

- ①エンド型セルラーゼ (CMC アーゼ)：セルロースの β -1, 4-グルコシド結合をエンド様式で分解,
- ②エキソ型セルラーゼ (セロビオヒドロラーゼ, アビセラーゼ)：セルロースの β -グルコシド結合をエキソ様式で分解し、その非還元末端からセロビオースを生成,
- ③ β -グルコシダーゼ：セルロースの非還元末端に作用しグルコースを生成、また、セロビオースなどオリゴ糖の β -グルコシド結合を分解,

の3つの型の酵素の混合体として生産され、セルロースが低分子糖にまで分解されるのは、これら酵素の複合的な作用によるとされている。このほか、*Aspergillus aculeatus* は還元末端からエキソ型で分解する酵素を生産する⁵⁾。

セルラーゼの工業的な生産には *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* などの糸状菌が用いられている。

4.2 セルラーゼ遺伝子のクローニング

近年、*Trichoderma reesei*, *Aspergillus aculeatus* や *Phanerochaete chrysosporium* などの木材腐朽菌を含む糸状菌、*Cellulomonas fimi*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus* などの細菌でセルラーゼ遺伝子やキシラナーゼ遺伝子のクローニングとその遺伝子 DNA の塩基配列の解析が進展している。さらに、DNA の塩基配列からアミノ酸の配列が演繹され、それらの比較によりリンカー (linker) によって結合したドメイン (domain, 蛋白質の機能に必要な最小のペプチドの配列)、すなわち、セルロース結合ドメイン (cellulose-binding domain) と触媒ドメイン (catalytic domain) には保存性の高い領域 (複数の菌種にわたって相似性の高いアミノ酸配列が共通して存在している領域) が存在することが明らかにされてきた。この保存されているアミノ酸の配列の類似性により、セルラーゼは9つ (あるいは6つ) のファミリーに分けられている。以上の知見については最近の文献⁶⁾に詳しい。

遺伝子工学的な手段によりセルロース分解能を高めようとする場合、変異株の誘導、組換え DNA による育種、蛋白質工学的な酵素の改良などが開発の対象となっている。セルロースからのアルコールの生産を図るプロジェクトにおいて、変異により *T. reesei* のセルラーゼ生産が顕著に高められている。さらに、組換え DNA の手法を用いてセルラーゼ遺伝子を大腸菌や酵母に導入する形質転換の研究が行なわれている。すでに *T. reesei* のエキソ型およびエンド型両セルラーゼの遺伝子が酵母に導入され、セルラーゼが培地中に生産されている⁷⁾。また、*A. aculeatus* 酵素も酵母に導入されている。一方、細菌の遺伝子が大腸菌や酵母で発現した実験例が蓄積されてきている。

5. リグニン分解酵素とその遺伝子

5.1 リグニン分解酵素

リグニン分解酵素としてはリグニンペルオキシダーゼ (リグニナーゼ) (以下 LiP), Mn (II) ペルオキシダーゼ (以下 MnP), フェノールオキシダーゼ (ラッカーゼ) (以下 Lac) の3種類の酵素が挙げられている。担子菌によって生産されるこれらの酵素はいずれも菌体外に分泌生産される糖蛋白質である。

反応の上での重要な性質は、前2者は反応の電子受容体として過酸化水素を、また後者は分子状酸素を必要とするということである。これらの酵素による初発反応はアリルカチオンラジカルあるいはフェノキシラジカルの生成であり、それ以降は電子の移動により側鎖の α 位の酸化、炭素間結合の切断、芳香環の開裂など多様な反応を行なうとされている。これら3種類の酵素の機能と主な性質を表4に示す。

5.2 LiP を生産する担子菌のスクリーニング

LiP と MnP は最初に *P. chrysosporium* で見出されたが、その後いくつかの担子菌で存在が示されて

表4 リグニン分解酵素とその機能

項目	ラッカーゼ	リグニンペルオキシダーゼ	Mn(II)ペルオキシダーゼ
機能	子実体形成, 色素形成, 細胞間接着, リグニン分解, 分解物の解毒	リグニン分解	リグニン分解
基質	フェノール性物質	非フェノール性物質 フェノール性物質 ⁹⁾	フェノール性物質
電子受容体	分子状酸素	過酸化水素	過酸化水素
酵素蛋白質	銅, 多分子型	ヘム, 多分子型	ヘム, 多分子型
生産微生物	<i>C. versicolor</i> , <i>L. edodes</i> , <i>S. commune</i> , <i>A. bisporus</i> , <i>R. riginosus</i> , <i>F. anosus</i> , <i>N. crassa</i> その他多数	<i>P. chrysosporium</i> , <i>C. versicolor</i> , <i>P. radiata</i> , <i>B. adusta</i>	<i>P. chrysosporium</i> , <i>C. versicolor</i> , <i>P. radiata</i> , <i>L. edodes</i> , <i>P. ostreatus</i>

いる。しかし、木材腐朽菌の多くにこの酵素活性の存在が確かめられているわけではない。これまで、リグニン分解菌のスクリーニングとしてバベンダム反応が用いられてきている。これは適当な組成の寒天培地にフェノール性化合物を加え、菌の生育に伴ってコロニーの周辺に生成する褐色の発色をもってリグニン分解性の指標とするものである。しかし、この反応は主としてフェノール酸化酵素活性の生産を示し、LiP あるいは MnP の生産能とは必ずしも一致しない。また、LiP に限らず、リグニン分解酵素活性の測定は従来白色腐朽菌とされている菌株の液体培養を酵素標品として行なわれている。しかし、これまでに行なわれている方法は必ずしも LiP 生産菌のスクリーニングとして正確な方法とは言えない。それは、① LiP や MnP の生産は培地の栄養条件、特に窒素源の濃度に影響されることが多く、場合によっては酵素生産に不適当な条件で培養している可能性がある、②リグニン分解酵素の生産は菌の生育期により大きく変動するため、適切な培養期間を逸している可能性がある、③ LiP 活性をベラトリアルコールの酸化をもって測定した場合、高いアルコール酸化酵素活性に LiP 活性が隠されることがある、④プロテアーゼが同時に生産されている場合、酵素蛋白が分解されている可能性がある、などの理由による。

以上の方法に代わる方法として、われわれは、後述する *P. chrysosporium* の LiPDNA の塩基配列の一部 (0.59 kb) をプローブとして (図1), 各種の担子菌の染色体 DNA の制限酵素分解断片とハイブリダイゼーションを行なった⁹⁾。これは、後に述べるように、LiP 遺伝子の DNA の塩基配列が担子菌の菌種にかかわらず相同性が高いと推定されることに依っている。その結果、白色腐朽菌ヤケイロタケ (*Bjerkandera adusta*) などに LiP 遺伝子が存在する可能性を認めた。従来これは LiP を生産しない菌として報告されていたものであった¹⁰⁾。実際、本菌はグルコース-ペプトン培地において、アリルアルコール (ベラトリル

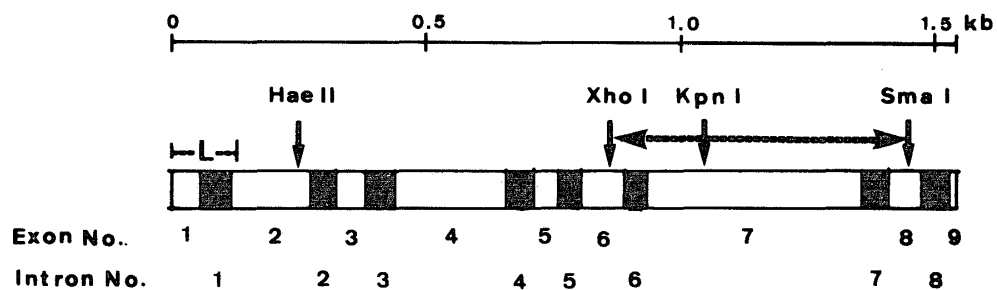


図1 *P. chrysosporium* の LiP 遺伝子 (H8) の制限地図⁹⁾
 ■, イントロン; □, エクソン; ←, オリゴヌクレオチドプローブの調製に用いたフラグメント; L, リーダー配列

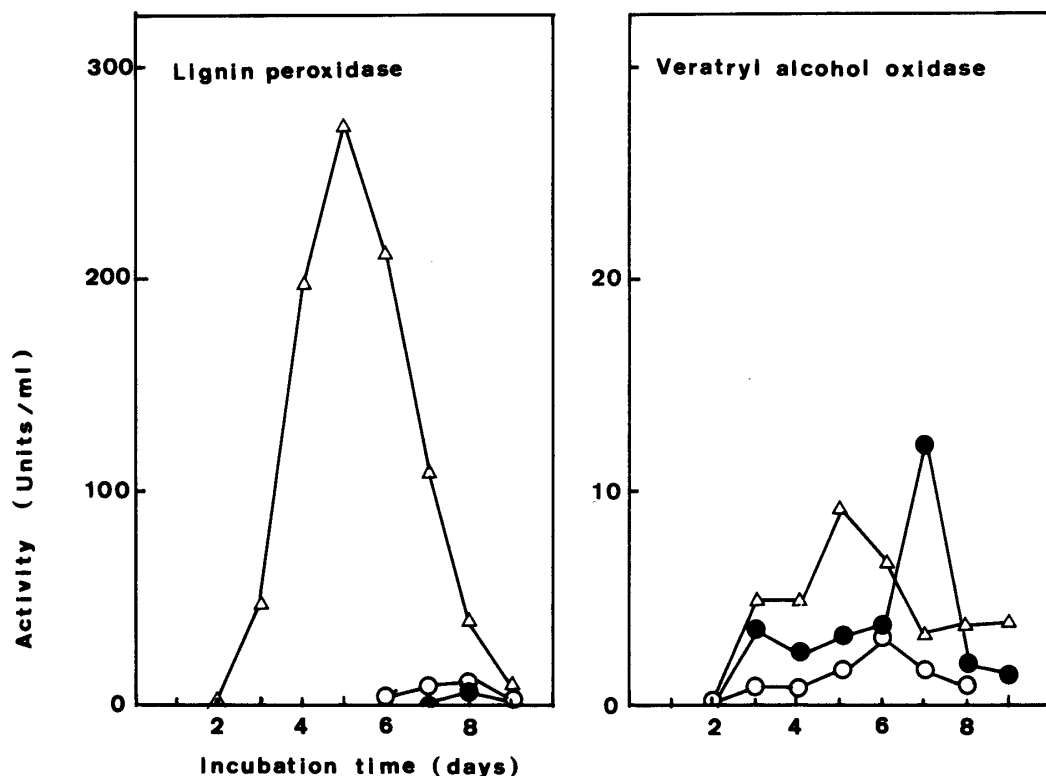


図2 *B. adusta* による LiP およびベラトリルアルコール酸化酵素生産に及ぼす培養条件の影響⁹⁾
 △, グルコース-ペプトン培地; ●, Kirk の高濃度窒素源培地; ○, Kirk の低濃度窒素源培地

アルコール) 酸化酵素とともに, LiP を生産することを見出している (図2)。このような DNA レベルでのスクリーニング法を用いることにより, 培養条件や生育の時期などにかかわらず, LiP の生産能を判定することがさきる。

一方, 著者らは従来の方法を用い, 種々の培養条件での, この2つの酵素の生産能のスクリーニングを行なっているが, LiP よりも MnP が広く担子菌に分布するという傾向を認めている (未発表)。たとえば, 食用担子菌であるシイタケ (*Lentinus edodes*) やヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) では MnP は生産されるものの LiP 活性は検出されない^{11,12)}。*P. chrysosporium* では LiP と MnP の活性は同一の培養中に検出されているので, これらの菌においては, LiP は生産されていないと判断される。われわれは, *B. adusta* に適用した DNA をプローブを用いる方法を担子菌でも検討している。

Lac はこれまで担子菌に限らず多くの糸状菌に見出だされているが, ここでは省略する。

5.3 アイソザイムの生産

LiP と MnP は, 一つの菌において単一の酵素としてではなく, 基本的な性質を同じくする酵素蛋白質 (アイソザイム) の混合物として生産される。例えば, *P. chrysosporium* では, アニオン交換 HPLC により6つの LiP, すなわち, H1(LiP3), H2(LiP2), H6(LiP4), H7(LiP5), H8(LiP1) および H10(LiP6) が, また, 4つの MnP, すなわち, H3(MnP1), H4(MnP2), H5(MnP3) および H9(MnP4) が分離されている¹³⁾。これらの酵素は, それぞれの等電点を異にしている。

前述のように, LiP 活性の検出された *B. adusta* をグルコース-ペプトン培地で培養し, その粗酵素液を DEAE-Sepharose クロマトグラフィーにより分離すると, 図3に示すように, 4つの活性ピークが得られた。このピークに分離された酵素蛋白質は等電点電気泳動により, pI の異なることが示された⁹⁾。

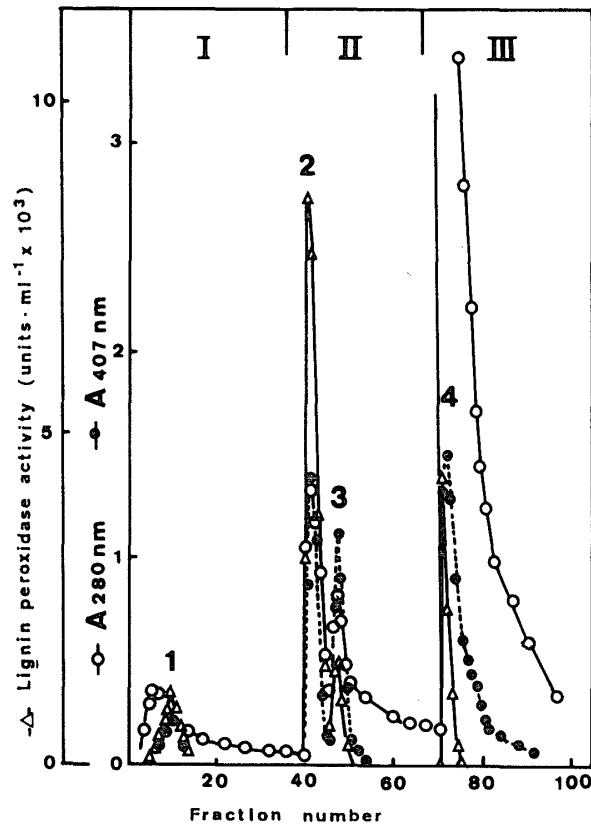


図3 *B. adusta* (グルコース-ペプトン培養; 6日間)の培養液中に生産される LiP の DEAE-セフアロースカラムクロマトグラフィー⁹⁾
 溶出溶媒: I, 20 mM コハク酸緩衝液 (pH 4.5); II + 0.1 M NaCl; III +0.5 M NaCl

Lac においても、複数の酵素蛋白が同一菌により生産されることが認められており、等電点の相違によりグループ分けされ、LacA および B と称されている。また、カワラタケ (*Coriolus versicolor*) においては LacI, II, III などと称されている。後者の場合 LacII に高分子リグニンを分解する活性があると報告されている¹⁴⁾。

5.4 リグニン分解酵素遺伝子のクローニングと塩基配列

a. LiP 遺伝子

P. chrysosporium:

LiP をコードする遺伝子は *P. chrysosporium* の cDNA 及び染色体 DNA からクローニングされ、塩基配列が決定されている。図4にわれわれが同菌の染色体 DNA からクローニングした遺伝子の塩基配列とそれから予測されるアミノ酸の配列¹⁵⁾を示す。これによれば、酵素の菌体外への分泌生産を指示する28個のアミノ酸からなるシグナルペプチドと、酵素蛋白本体を構成する Ala に始まる344個のアミノ酸をコードする配列が示された。これらの配列は、50~60個の短い塩基対からなるイントロンより分断されていることも示された。N-グリコシル化の部位は配列から1箇所のみで、Asn(257)と考えられる。また、上流域には、“CAAT” および “TATA” 配列が認められた。

先に述べたように、本菌においては LiP は少なくとも6つのアイソザイムが生産されるが、それぞれをコードする遺伝子が存在するか否かが問題となる。Zhang¹⁶⁾ によれば、*P. chrysosporium* の DNA のサ

桑原：木質バイオマスの利用における遺伝子工学

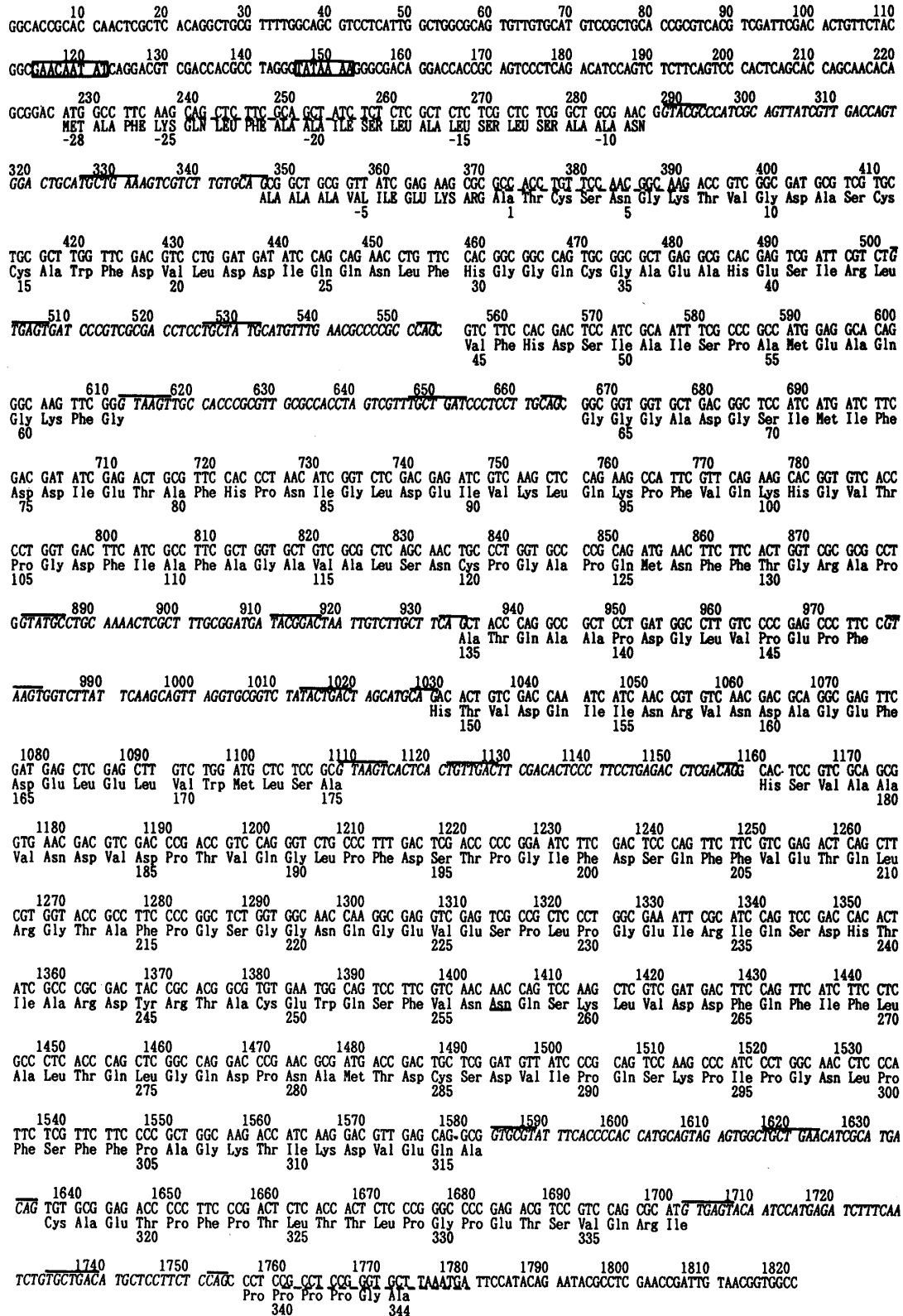


図4 *P. chrysosporium* LiP 遺伝子 (H8) の塩基配列とそれから演繹されるアミノ酸配列¹⁵⁾
 イントロンはイタリック体で、また、シグナルペプチドに相当するアミノ酸配列は大文字で示した。“CAAT” および “TATA” ボックスは長方形で囲った。詳細については文献15)を参照。

ザンハイブリダイゼーションは6個以上の異なる遺伝子がこの菌に存在することを示している。われわれの実験においても、この菌の染色体 DNA を各種の制限酵素で切断し、次のオリゴヌクレオチド

プローブ 1 (リーダー配列の一部に相当): 5'-CAGCTCTTGGCAGCTATCTCT-3'

プローブ 2 (N-末端の一部に相当): 5'-GCCACCTGTTCCAACGGCAAG-3'

プローブ 3 (C-末端周辺部分に相当): 5'-CGCCTCCGGGTGCTTAAATGA-3'

を混合したプローブでザンハイブリダイゼーションを行なったところ、制限酵素 *Hind* III 断片においては5つの、また、*Pst*I 断片においては4つのシグナルが得られ、遺伝子が複数存在することを認めている。*B. adusta*:

われわれは、前述のように DNA プローブを用いるスクリーニングにより *B. adusta* に LiP 遺伝子の存在を認め、染色体 DNA および cDNA より本遺伝子のクローニングと塩基配列の決定を行なった。得られた塩基配列の概要を図5に示す。塩基配列から、23個のアミノ酸からなるシグナルペプチドと、酵素蛋白質の349個のアミノ酸配列を演繹した¹⁸⁾。アミノ酸配列から算出される分子量は約37,000であり、精製された酵素の41,000とは差が認められたが、これは蛋白に結合する糖に由来するものと判断される。また、N-グルコシル化の部位は Asn(103) の1個所であることを推定した。また、一方、この菌の生産するアイソザイムを精製し、その N-末端付近のアミノ酸配列を決定し、その配列と塩基配列とを比較した結果、この遺伝子 (LPO-1) は最も活性の高いアイソザイム LiP-2 をコードしていることを認めた。

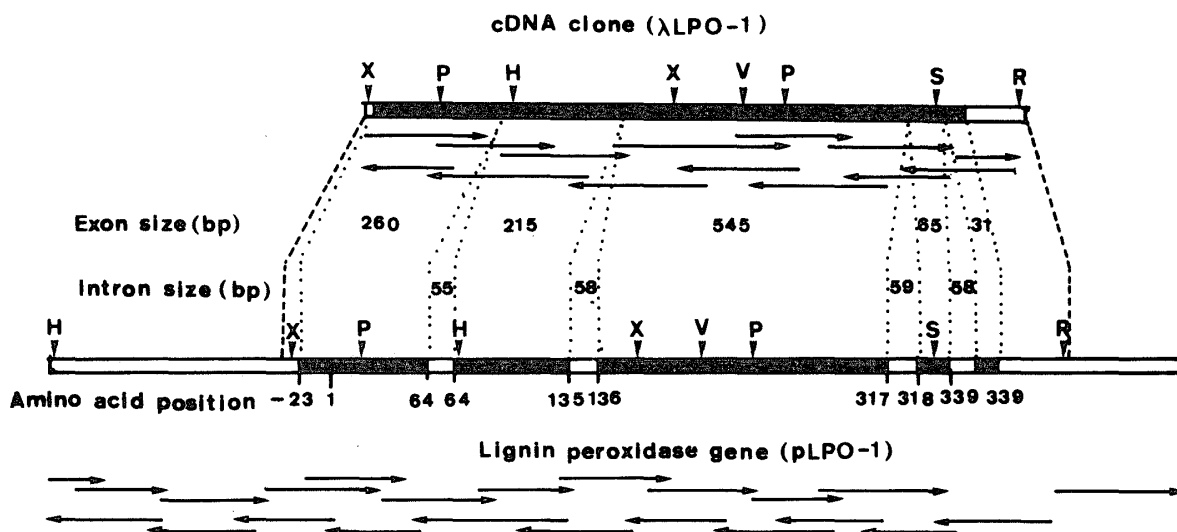


図5 *B. adusta* の cDNA および染色体 DNA からクローニングされた LiP 遺伝子の制限地図と塩基配列分析のストラテジー¹⁸⁾

□, イントロン; ■, エクソン

b. MnP 遺伝子および LiP 遺伝子の相似性

P. chrysosporium によって生産される MnP アイソザイムの一つ (MnP-1) をコードする遺伝子 (*mnp-1*) の一つがクローニングされ、その塩基配列から、21個のアミノ酸からなるシグナルペプチドと、酵素蛋白質に相当する357個のアミノ酸配列が演繹されている¹⁹⁾。また、N-グルコシル化の部位と考えられる Asn は一個所であった。この遺伝子の塩基配列中には、57-72 bp のサイズの6個のイントロンを含むことが見出された。塩基配列の比較から、*P. chrysosporium* の MnP と3種類の LiP のアミノ酸組成は約50%の相似性を示した。また、ヌクレオチドの相似性は約60%であった。

もう一つ重要なことは、ヘムの結合部位に存在するヒスチジン (proximal His) と過酸化水素の開裂に関

	Distal histidine	Proximal histidine
LPO-2	³⁹ A H Q A I R L T F H D A V	L E T V W G L I A H T V G ¹⁸⁰
LiP H8	³⁸ A H E S I R L V F H D S I	L E L V W M L S A H S V A ¹⁷⁹
LiP H2	³⁹ A H W A L R M V F H D S I	I E T V W L L S A H S I A ¹⁸⁰
MnP H4	³⁷ A H E V I R L T F H D A I	F E V V S L L A S H T V A ¹⁷⁶
HRP	³³ A A S I L R L H F H D C F	S D L V A L S G G H T F G ¹⁷³
Turnip	³³ G A S I L R L F F H D C F	R D M V A L S G A H T I G ¹⁷¹
CCP	⁴³ G P V L V R L A W H T S G	R E V V A L M G A H A L G ¹⁷⁷

図6 *B. adusta* LiP と他のペルオキシダーゼのヒスチジン周辺のアミノ酸配列の相似性。詳しくは文献18)および19)を参照。

与するヒスチジン (distal His) 周辺のアミノ酸配列が、LiP と MnP の間でも、また、これらと担子菌以外から精製されているペルオキシダーゼの間でも極めて相似性が高いということである。これは、ペルオキシダーゼがヘムを配位し、過酸化水素を電子受容体とするという共通の性質を持つことからすれば当然のことかも知れない。*P. chrysosporium* および *B. adusta* の LiP, *P. chrysosporium* の MnP および西洋ワサビなどのペルオキシダーゼの His 周辺のアミノ酸配列を図6に示す¹⁸⁾。

c. LiP および MnP 遺伝子の発現

LiP と MnP の生産は二次代謝過程であるという特徴がある。これは、これらの酵素の生産が、菌体の栄養生長が停止するか、あるいは、停止に近づいた状態において行なわれることを意味する。また、二次代謝は培地中の栄養源、特に窒素濃度の低下によって引き起こされる。したがって、両酵素の生産のためには、窒素濃度の低い培地での培養を行なうことが必要となる。このような特徴は、*P. chrysosporium* などに見出されるが、かならずしもすべてのリグニン分解菌に普遍的に適用できるとは限らないようである。

この二次代謝の引金となる遺伝的な要因は未だ明確ではない。cDNA をプローブとするノーザンハイブリダイゼーションの実験は、mRNA が低窒素原濃度の培養においてのみ検出されることから、これら酵素の発現は共通して転写 (transcription) のレベルで窒素により制御されることを示している。さらに、ノーザンハイブリダイゼーションによって、MnP は基質の一つである Mn によっても転写の段階で制御されることも明らかにされた^{20,21)}。

d. Lac 遺伝子

Lac 遺伝子構造の解析は担子菌以外の微生物で詳細に行なわれている。木材腐朽菌では *Coriolus hirusus* (アラゲカワラタケ) や *C. versicolor* で構造が検討されている。*C. hirusus* では、決定された塩基配列から、21個のアミノ酸からなるシグナルペプチドと、酵素蛋白に相当する499個のアミノ酸配列が演繹されている。また、この塩基配列中には10個のイントロンが認められている²²⁾。

5.5 形質転換系

担子菌での酵素の生産能は発酵工業に用いられる微生物に比べて極端に低い。そのため、これら酵素の生産には遺伝子工学的な手法はきわめて有利である。形質転換系の開発は、①工業的なレベルでリグニン分解酵素を生産すること、②リグニン分解酵素遺伝子の強化された菌株を育種すること、の意味を持つ。①の場合は、白色腐朽菌のリグニン分解遺伝子を大腸菌あるいは酵母に導入し、このような生育速度のたかい微生物によりリグニン分解酵素を生産させることを目的としている。また、②の場合では、リグニン分解遺伝子を、本来それを有する菌株中で増幅させ、リグニン分解能を強化することを目的としている。

これまでのところ、LiP 遺伝子が *Escherichia coli* および酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に導入され、LiP が菌体内で産生されている²³⁾が、菌体外に分泌生産されたという報告は見られない。しかし、ご

く最近になって、昆虫の培養細胞系を用いて LiP²⁴⁾ および MnP²⁵⁾ が発現することが報告された。これは、酵素蛋白の合成系と同時にヘムの合成系も機能するためと考えられる。一方、*C. hirustus* の Lac 遺伝子も酵母に導入され、Lac が菌体内で産生されている。しかし、これらの酵素は工業的なレベルでの生産には到達していない。

以上のような異種遺伝子の発現系の確立した大腸菌や酵母の系(宿主-ベクター系)を用いるのではなく、担子菌や担子菌に近い遺伝子発現系を有する糸状菌に目的とする遺伝子を導入する試みは成功しているとは言えない。この場合、宿主となる担子菌の形質転換に用いるベクターの開発が第一に必要である。これまで、*P. chrysosporium* の形質転換について2つの試みが行なわれている。まず、一つは染色体組込み型ベクターの作成である。Gold らのグループ²⁶⁾はスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) の形質転換系で作成されているにアデニン合成遺伝子を組込んだプラスミドを *P. chrysosporium* のアデニン要求株 (Ade⁻) に導入し、アデニン要求性を示さなくなった株 (Ade^r) を得ている。この時、プラスミドは宿主の染色体 DNA にその複数が組込まれていた。もう一方は自律増殖型ベクターの作成である。Reddy らのグループ²⁷⁾は酵母において自律増殖する *P. chrysosporium* の染色体断片とカナマイシン耐性遺伝子 (Kan^r) を組込んだ酵母系プラスミドが、*P. chrysosporium* で染色体に組込まれることなく、長期間染色体外で環状に保持されることを見出している。以上の2つのベクター系を用いての、リグニン分解担子菌の遺伝子による担子菌の形質転換は遠からず達成されるもの期待される。

一方、*L. edodes* や *P. ostreatus* のミトコンドリア中にはプラスミド様の DNA が見出され、その自律増殖配列 (ARS) がクローニングされている²⁸⁾。このような ARS を組込んだベクターが作成できれば、担子菌の形質転換に利用できるものと考えられる。

おわりに

現在、木質バイオマスはリグノセルロース系バイオマスとして取扱われることが多い。このことは、このバイオマス中のセルロースの利用、特にセルロースの酵素糖化と、それから得られる糖からのアルコールの生産が当面の開発課題となっていることを意味している。この工程に微生物を用いるための遺伝子工学的な研究においては、現在のところ、セルラーゼに関する研究がリグニン分解酵素に関する研究よりも進展している。さらに、発酵過程については、発酵に用いる酵母にセルラーゼ遺伝子を導入し、糖化と発酵を同時に行なわせることが試みられている。これと同様に、キシロース発酵性酵母にキシラナーゼ遺伝子を導入、キシラン分解を行いながら発酵させるというプロセスも検討されている。

以上のような糖化-発酵の工程に限らず、木質バイオマスの利用に微生物やその酵素を利用するためには、その能力を格段に高めるための遺伝学的な基礎研究の蓄積がさらに必要と考えられる。さらに、前処理技術、反応工学的技術、生産物の分離技術など、各種の技術を総合的に開発することが必要である。

引用文献

- 1) P.C. Trotter: *Tappi Journal*, May 1990, 201-205
- 2) 棚橋光彦: 木材研究・資料, No. 19, 34-65 (1983)
- 3) 志水一允: 木材成分総合利用研究成果集, 木材成分総合利用技術研究組合編, p. 9-16 (1990)
- 4) 岡村圭造: 化学, 増刊 No. 19, 7-20 (1980)
- 5) J. KANAMOTO, R. SAKAMOTO, M. ARAI and S. MURAO: *J. Ferment. Technol.*, 57, 168-175 (1979)
- 6) N.R. GILKES, B. HENRISSAT, D.G. KILBURN, R.C. MILLER, Jr. and R.A.J. WARREN: *Microbiol. Rev.*, 55, 303-315 (1991)
- 7) M.E. PENTTILÄ, M. ANDRÉ, P. LETHTOVAARA, M. BAILEY, T.T. TEERI and K.C. KNOWLES: *Gene*, 63, 103-112 (1988)
- 8) S. YOKOTA, T. UMEZAWA, T. HIGUCHI and S. KAWAI: *Holzforschung*, 44, 271-276 (1990)
- 9) Y. KIMURA, Y. ASADA and M. KUWAHARA: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 436-442 (1990)

- 10) R. WALDNER, M.S.A. LEISOLA and A. FIECHTER: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 400-407 (1988)
- 11) H. KOFUJITA, Y. ASADA and M. KUWAHARA: *Mokuzai Gakkaishi*, **37**, 555-561 (1991)
- 12) H. KOFUJITA, T. OHTA, Y. ASADA and M. KUWAHARA: *Mokuzai Gakkaishi*, **37**, 562-569 (1991)
- 13) R.L. FARRELL, K.E. MURTAGH, M. TIEN, M.D. MOZUCH and T.K. KIRK: *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 322-328 (1989)
- 14) N. MOROHOSHI, H. WARIISHI, C. MURAIISO, T. NAGAI and T. HARAGUCHI: *Mokuzai Gakkaishi*, **33**, 218-225 (1987)
- 15) Y. ASADA, Y. KIMURA, M. KUWAHARA, A. TSUKAMOTO, K. KOIDE, A. OKA and M. TAKANAMI: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 469-473 (1988)
- 16) T.J. ZHANG, C.A. REDDY and A. RASSOLY: *Gene*, **97**, 191-198 (1991)
- 17) A. BROWN, P.F.G. SIMA, U. RAEDAR and P. BRODA: *Gene*, **73**, 77-85 (1988)
- 18) Y. KIMURA, T. OKA, Y. ASADA and M. KUWAHARA: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press
- 19) B.J. GODFREY, M.B. MAYFIELD, J.A. BLOWN and M.H. GOLD: *Gene*, **93**, 119-124 (1990)
- 20) M. TIEN and C.-P.P. TU: *Nature*, **326**, 520-423 (1987)
- 21) J.A. BROWN, J.K. GLENN and M.H. GOLD: *J. Bacteriol.*, **172**, 3125-3130 (1990)
- 22) Y. KOJIMA, Y. TSUKUDA, Y. KAWAI, A. TSUKAAMOTO, J. SUGIURA, M. SAKAINO and Y. KITA: *J. Biol. Chem.*, **265**, 15224-15230 (1990)
- 23) European Patent Application, 0261980
- 24) T.M. JHONSON and J.K. KLi: *FASEB J.*, **5**, A1546 (1991)
- 25) E.A. PEASE, S.D. ADNST and M. TIEN: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 897-903 (1991)
- 26) M. ALIC, E.K. CLARK, J.R. KORNEGAY and I.H. GOLD: *Cur. Gennet.*, **17**, 305-311 (1990)
- 27) T. RANDALL, C.A. REDDY and K. BOOMINATHAN: *J. Bacteriol.*, **173**, 776-782 (1991)
- 28) Y. KATAYOSE, S. KAJIMARA and K. SHISHIDO: *Nucelic Acids Rec.*, **18**, 1395-1400 (1990)