

	ツジ マサハル
氏 名	辻 雅晴
本籍（国籍）	北海道
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連論第166号
学位授与年月日	平成27年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当論文博士
研究科及び専攻	連合農学研究科
学位論文題目	Study on the cold adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic basidiomycetous yeast <i>Mrakia blollopis</i> (南極産担子菌酵母 <i>Mrakia blollopis</i> の低温適応戦略とバイオテクノロジーの可能性に関する研究)
学位審査委員	主査 教授 佐野 輝男 副査 准教授 田中 和明 副査 准教授 長谷 修 副査 准教授 磯貝 雅道 副査 准教授 殿内 暁夫 副査 研究チーム長 星野 保 ((独) 産業技術総合研究所)

論文の内容の要旨

本論文はこれまでほとんど明らかにされてこなかったスカルプスネス露岩域に点在する湖沼群の菌類の多様性と担子菌酵母 *Mrakia blollopis* がどのように貧栄養・低温条件下で生存しているのかを明らかにした後、この菌を利用し低温環境下での乳脂肪分解・エタノール発酵およびリグノセルロース系バイオマスからの同時糖化発酵などバイオテクノロジーへの応用を試みた。

本論文は全部で7章から構成されている。

まず、第1章では *Mrakia* 属菌の歴史について概説し、第2章ではスカルプスネス露岩域に点在する16の湖沼の周辺土壌および湖底堆積物から菌類を計71分離株取得し、その塩基配列を基に子囊菌類5属、担子菌類5属を同定した。菌類は主に細胞外多糖・不凍タンパク質・低温性酵素の分泌および膜の高流動性などのいずれかもしくは複数の生理学的特徴が低温環境で生存していく上で有利に働いていると言われている。最も分離頻度が高かった *Mrakia* 属菌は不凍活性が検出できなただけでなく、細胞外多糖もほとんど分泌しないにも関わらず-1℃でも十分に成長できるという珍しい特徴を持っていることに加え、細胞膜に含まれている不飽和脂肪酸濃度が極めて高いことから細胞膜の高い膜流動性によって低温環境に適応していることを明らかにした。

第3章では、南極産担子菌酵母 *Mrakia blollopis* を使った低温下での酪農排水処理を試みた。乳脂肪は低温下で凝固するのに加え、低温下では微生物の活性も低下することから微生物による処理が最も難しい物質の1つであり、河川や地下水の汚染などの原因となっている。そ

ここで低温でも成長が可能なスカルブスネス露岩域から分離した *Mrakia* 属菌について低温での乳脂肪分解能について調べた。その結果、多くの *Mrakia* 属菌は乳脂肪分解能を持っていること、特に *Mrakia blollopis* SK-4 株は低温での乳脂肪分解能に優れていることを明らかにした。そこで SK-4 株を活性汚泥に添加することにより酪農排水中に含まれる乳脂肪を効率良く分解できるのではないかと考え、SK-4 株入りの活性汚泥と通常の活性汚泥を使用して低温下での乳脂肪分解能の比較を行った。私は SK-4 株を添加した活性汚泥は通常の活性汚泥と比較して約 1.25 倍の乳脂肪を分解することを明らかにした。この乳脂肪分解率の向上は SK-4 株から分泌されている脂質分解酵素の働きによるものと考え、次に SK-4 株の脂質分解酵素の精製とその特徴の確認を行った。その結果、65°Cまでの熱および pH 3~10 まで安定な上、重金属や有機溶媒に対しても極めて安定な脂質分解酵素を持っていることを明らかにした。

第 4 章では *Mrakia blollopis* SK-4 株のエタノール発酵における初期 pH の影響を調査した。一般的にエタノール発酵は pH4~5 の酸性条件下で行われ、アルカリ条件下では発酵阻害が起こることが知られている。しかし *Mrakia* 属菌の多くは pH8 ~ 9 の弱アルカリ環境から分離されていることから、*M. blollopis* SK-4 株を用いエタノール発酵に対する初期 pH(pH2.0~11.0)と生菌数に及ぼす影響について調べることにした。私は SK-4 株が pH4.0~10.5 までの幅広い pH で 40g/l のグルコースを完全に消費することができることを示した。中でも pH8.0~9.0 の弱アルカリ性の条件下で最もグルコース消費速度とエタノール発酵効率が良かったことを明らかにした。さらに pH8.0~9.0 の弱アルカリ条件下では細胞の生存率が酸性条件下での生存率よりも高いことも明らかにした。SK-4 株は東南極スカルブスネス露岩域に位置する長池の湖底堆積物から分離された。長池の湖水の pH は約 9.0 であることから、SK-4 株は長池の環境に適応するため弱アルカリ条件下でのエタノール発酵能を獲得した可能性があることが分かった。

第 5 章では *Mrakia blollopis* SK-4 株の大きな特徴の 1 つであった低温下でのエタノール発酵能を利用し、様々な基質からの並行複式発酵を試みた。まず、SK-4 株のエタノール発酵能を調べるため、40g/l、60g/l、120g/l のグルコース濃度から 10°Cの条件下で発酵試験を行ってみた。SK-4 株は全てのグルコース濃度で完全にグルコースを消費し、最大で約 48g/l (約 6% (w/v))のエタノールを生産したことから SK-4 株は特にエタノール耐性に優れた株であることが予想された。そこで並行複式発酵により、ユーカリ木粉からの低温下での同時糖化発酵を試みた。その結果、高濃度のグルコースは残存していたが、約 1%のエタノールの生産に成功した。さらに糖化反応の改善だけではなく、リグノセルロースに含まれる発酵阻害物質のリグニンと結合するといわれている非イオン性界面活性剤存在下で並行複式発酵を行ったところ約 1.6 倍のエタノールを得ることに成功した。

第 6 章では第 5 章で試みた並行複式発酵を脂質分解酵素と非イオン性界面活性剤を添加することにより発酵効率の改善を試みた。私は並行複式発酵を行うために破碎等の前処理を施された木質系バイオマスは細胞中に含まれているワックスや油成分が基質を覆うことによりセルラーゼと基質との接触が妨げられていると予想した。そこでこの基質表面を覆うワックスや油成分を除去するため、脂質分解酵素と非イオン性界面活性剤を添加した条件で並行複式発酵を試みた。その結果、通常の並行複式発酵と比較して 2.4 倍のエタノール生産に成功した。

最後に第 7 章では本論文についての要旨と今後の展望についてまとめた。

論文審査の結果の要旨

本論文は南極スカルプスネス露岩域に点在する湖沼群の菌類の多様性と優占種・担子菌酵母 *Mrakia blollopis* の貧栄養・低温条件下での生存特性を分析した後、この菌を利用し低温環境下での乳脂肪分解・エタノール発酵及びリグノセルロース系バイオマスの同時糖化発酵への応用を試みたもので、7章から構成されている。

第1章では *Mrakia* 属菌の研究史を概説し、第2章ではスカルプスネス露岩域の湖沼周辺土壌・湖底堆積物から分離した71菌株の塩基配列を分析し、子囊菌類5属、担子菌類5属を同定した。特に分離頻度が高い *Mrakia* 属菌の低温・貧栄養環境への適応特性を分析し、本菌は不凍活性が検出できず、細胞外多糖もほとんど分泌しないが -1°C でも十分に成長できる珍しい特徴を持つことを明らかにした。

第3章では、上述の南極産担子菌酵母 *M. blollopis* を使った低温酪農排水処理を試みた。乳脂肪は低温下で凝固し、低温下では微生物活性も低下することから微生物による処理が難しい物質であり、河川や地下水汚染の原因となっている。そこで *Mrakia* 属菌の低温乳脂肪分解能を調べ、特に *M. blollopis* SK-4 株は低温乳脂肪分解能に優れていること、活性汚泥に添加することで通常の活性汚泥の約1.25倍の乳脂肪を分解できること、乳脂肪分解率の向上は脂質分解酵素の特性により、SK-4 株の脂質分解酵素は耐熱性 65°C 、耐酸性 pH 3~10、重金属や有機溶媒存在下でも安定なことを明らかにした。

第4章では *M. blollopis* SK-4 株の低温エタノール発酵能を分析し、様々な基質からの並行複式発酵を試みた。SK-4 株はエタノール耐性に優れた株で、 $40\text{g}\sim 120\text{g}/\text{l}$ のグルコース濃度から 10°C でグルコースを完全に消化し、最大で約 $48\text{g}/\text{l}$ (約6%)のエタノールを生産した。そこでユーカリ木粉からの低温下での同時糖化発酵を試みた結果、約1%のエタノールの生産に成功した。さらにリグノセルロースに含まれる発酵阻害物質のリグニンと結合する非イオン性界面活性剤添加で約1.6倍のエタノールを得ることに成功した。

第5章では並行複式発酵効率の改善を試み、脂質分解酵素と非イオン性界面活性剤を添加した条件で通常の2.4倍のエタノール生産に成功した。

第6章ではSK-4株がpH4.0~10.5までの幅広いpHで $40\text{g}/\text{l}$ のグルコースを完全に消化でき、特にpH8.0~9.0の弱アルカリ性条件下で最もグルコース消費速度とエタノール発酵効率が良く、細胞の生存率も高いことを明らかにした。

最後に第7章では本論文の成果を総括し、極地環境に生息する菌類の有する未知の可能性とその将来展望を考察した。

以上、本研究は、極地環境に生息する *Mrakia* 属菌に焦点をあて、その低温条件下における特性に関する新知見を得て、関連分野の将来展望を考察したものである。

本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士(農学)の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Tsuji M, Fujiu S, Xiao N, Hanada, Y, Kudoh S, Kondo H, Tsuda S, Hoshino T (2013) “**Cold adaptation of fungi obtained from soil and lake sediment in the Skarvsnes ice-free area, Antarctica**” FEMS Microbiol Lett, 346, pp. 121-130.
2. Tsuji M, Yokota Y, Shimohara K, Kudoh S, Hoshino T (2013) “**An application of wastewater**

- treatment in a cold environment and stable lipase production of Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*” PLOS ONE 8(3): e59376.
3. Tsuji M, Goshima T, Matsushika A, Kudoh S, Hoshino T (2013) “**Direct ethanol fermentation from lignocellulosic biomass by Antarctic Basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis* under a low temperature condition**” Cryobiology, 67, 241-243.
 4. Tsuji M[†], Singh SM, Yokota Y, Kudoh S, Hoshino T (2013) “**Influence of initial pH on ethanol production by Antarctic Basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis* ”** Biosci Biotech Bioch, 77(12) 2483-2485. (†: Corresponding author)
 5. Tsuji M[†], Yokota Y, Kudoh S, Hoshino T (2014) “**Improvement of direct ethanol fermentation from woody biomasses by Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis* under a low temperature condition**” Cryobiology, 68, 303-305. (†: Corresponding author)

参考文献

1. Li S-F, Guo R, Tsuji M, Sano T (2006) **Two grapevine viroids in China and the possible detection of a third**” Plant Pathology. 55(4), 564.
2. Li S-F, Su Q, Guo R, Tsuji M, Sano T (2006) “**First report of *Coleus blumei* viroid from coleus in China**” Plant Pathology. 55(4), 565.
3. He Y-H, Isono S, Shibuya M, Tsuji M, Adkar-Purushothama CR, Tanaka K, Sano T (2012) “**Oligo-DNA custom macroarray for monitoring major pathogenic and non-pathogenic fungi and bacteria in the phyllosphere of apple trees**” PLoS ONE 7(3): e34249.
4. 下原広大, 藤生誠一, 辻雅晴, 工藤栄, 星野保, 横田祐司 (2012) “南極産 *Mrakia* 属担子菌酵母の乳脂肪分解能とその温度依存性” 用水と排水, 54(9), 691-696.
5. Jiang D, Sano T, Tsuji M, Araki H, Sagawa K, Adkar-Purushothama CR, Zhang Z, Guo R, Xie L, Wang H, Li S-F (2012) “**Comprehensive diversity analysis of viroids infecting grapevine on China and Japan**” Virus Research. 169, 237-245.
6. Singh P, Tsuji M, Singh SM, Roy A, Hoshino T (2013) “**Taxonomic characterization, adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeasts from ice cores of Midre Lovénbreen glacier, Svalbard, Arctic**” Cryobiology, 66, 167-175.
7. Goshima T*, Tsuji M*, Inoue H, Yano S, Hoshino T, Matsushika A (2013) “**Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain**” Biosci Biotech Bioch, 77 (7), 1505-1510. (* These authors contributed equally to this work.)
8. Goshima T, Negi K, Tsuji M, Inoue H, Yano S, Hoshino T, Matsushika A (2013) “**Ethanol fermentation from xylose by metabolically engineered strains of *Kluyveromyces marxianus* ”** J Biosci Bioeng, 116 (5), 551-554.
9. 横田祐司, 辻雅晴, 湯本勲, 星野保 (2013) “南極産担子菌酵母を利用した低温下でのパーラー排水の活性汚泥処理” 用水と排水, 55(11), 831-835.
10. Singh P, Singh S.M, Tsuji M, Prasad G. S, Hoshino T (2014) “***Rhodotorula svalbardensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from cryoconite holes of Ny-Ålesund, Arctic**” Cryobiology, 68,122-128.
11. Tsuji M[†], Yokota Y, Kudoh S, Hoshino T (2014) “**Effects of nitrogen concentration and culturing temperature on lipase secretion and morphology of the Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis***” Int J Res Eng Sci, 2 (5), 49-55. (†: Corresponding author)