

平成30年6月23日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14952

研究課題名(和文) 褐色腐朽菌の高機能化のための分子育種を可能にするキーペプチドの特定

研究課題名(英文) Identification of key peptides which enable to achieve the molecular breeding of brown-rot fungi

研究代表者

吉田 誠 (YOSHIDA, Makoto)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30447510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：褐色腐朽菌はリグニンを未分解のままセルロースを完全分解できる微生物として知られる。したがって、この分解機構を利用した、脱リグニンが不要な新しい植物バイオマス糖化技術が開発可能である。

本研究では、褐色腐朽菌の木材分解主要経路である錯体介在フェントン(CMF)反応に關与する鉄結合性ペプチドもしくは低分子タンパク質に着目した。褐色腐朽菌が分泌する鉄結合性ペプチドもしくは低分子タンパク質を網羅的に解析し、その中から木材分解の制御を可能にするキー因子(ペプチドや低分子タンパク質)を特定することを目指す。

研究成果の概要(英文)：Brown-rot fungi has been considered as microorganisms which are able to remove plant cell wall polysaccharides, such as cellulose and hemicelluloses, together with extensive modification of lignin structure, but without lignin metabolism. The wood degradation mechanism would be used for the development of new saccharification process which does not require the de-lignification process.

We focused that peptides and low-molecular proteins with iron-binding ability, which has been considered to be involved in wood degradation system by brown rot fungi. In the present study, we selected and analyzed the peptides and low-molecular proteins produced by brown rot fungus in order to identify the key factor which enable us to control the brown rot system.

研究分野：植物細胞壁分解

キーワード：木材腐朽 植物細胞壁分解 褐色腐朽

## 1. 研究開始当初の背景

植物バイオマスのリファイナリーでは効率的な糖化が不可欠であり、それを実現するために植物分解性真菌類の分解酵素を利用した糖化技術が盛んに研究されてきたが、依然としてこの糖化プロセスは一連のプロセスにおけるボトルネックである。

褐色腐朽菌はリグニンを未分解のままセルロースを完全分解できる生物として知られ、酵素分解系に加えて、他の真菌類とは全く異なる特殊な非酵素的分解メカニズムを有する。この特殊な分解システムでは、錯体存在下で二価鉄と過酸化水素間で起こる錯体介在フェントン反応(CMF反応)により生成する水酸化ラジカルが、木材細胞壁成分を攻撃すると理解されている。

ところで、木材腐朽菌がペプチドや低分子糖タンパク質を生産し、それらの幾つかは鉄還元性を示すと報告されている<sup>1-4)</sup>。これらは木材中の三価鉄の還元を通じてCMFシステムにおいて役割を果たす可能性が示唆されている。代表者は、これらのペプチドや低分子糖タンパク質が一連のCMF反応に参与する化合物の中で唯一の遺伝子産物であることに着目し、褐色腐朽菌の植物分解機構を代謝工学的に制御するためのキー因子になり得ると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、褐色腐朽菌が木材腐朽時に生産するペプチド(もしくは低分子タンパク質)を同定し、さらに褐色腐朽菌の木材分解に参与するものを特定することで、褐色腐朽菌の代謝工学を可能にするキー因子を見出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 褐色腐朽材中のシュウ酸濃度および二価鉄濃度の調査

スギの丸太から得たカンナ屑10gを培養ボトルに入れた後、5mlの蒸留水を加え、滅菌した。ポテトデキストロース寒天培地上で生育した褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* のNBRC6430株を3mm角に切り抜き植菌した後、27℃で静置培養した。得られた腐朽バイオマスからの抽出液を用いてE-キットシュウ酸(E2100)を用いてシュウ酸濃度を測定した。また、フェロジン試

薬を用いたフェロジンアッセイによる鉄還元能の調査も実施した。

### (2) 金属固定化クロマトグラフィー(IMAC)法による鉄結合性ペプチド(低分子タンパク質)の探索

(1)と同様の条件で培養した木材薄片からの水抽出液を鉄固定化クロマトグラフィーに供した。また、0.5%のセルロースもしくはスギ木粉(いずれもAqueous Counter Collision法にてナノフィブリル化したもの)を含むHighley培地でそれぞれ27℃で培養した際の培養液も同様に固定化クロマトグラフィーに供した。カラムはHiTrap IMAC FF(GE healthcare)に0.1M FeCl<sub>3</sub>溶液を供することにより調整した。カラムクロマトグラフィーにより得られたそれぞれの画分をSDS-PAGEにより分析した。鉄への強い結合性が示唆される画分をフェロジン法に供し、鉄の還元性を調査した。

### (3) RNA-seq解析による鉄結合性ペプチド(低分子タンパク質)の探索

ポテトデキストロース寒天培地上で本菌を培養し、その後、そこから3mm角の菌糸を1箇所切り抜き、0.5%の各種炭素源を含むHighley培地に植菌した後、27℃、10日間培養した。炭素源として、D-グルコース、微結晶性セルロース(アビセル)、スギ木粉を用いた。アビセルと木粉はAqueous Counter Collision法にてナノフィブリル化したものを用いた。得られた菌体から抽出したRNAをIllumina HiSeq 2000を用いたRNA-seq解析に供した。

### (4) 鉄結合性低分子タンパク質のクローニングと異種宿主発現

(3)で得たmRNAから合成したcDNAを鋳型にして、目的の低分子タンパク質をコードすると考えられた遺伝子をPCRによりクローニングした。得られたcDNAをpPICZベクターに挿入し、それを用いて酵母菌 *Pichia pastoris* KM71Hを宿主とした異種宿主発現に供した。メタノールによりタンパク質の生産を誘導し、遠心分離で細胞を除去したものを粗タンパク液とした。得られた粗タンパク液を、鉄を固定化した金属固定化クロマトグラフィー(IMAC)

法により精製し、SDS-PAGE 分析に供した。さらに、フェロジン法を利用して、組換え体の二価鉄還元能を評価した。

#### (5) 鉄結合性低分子タンパク質遺伝子の発現抑制株の作出

Gt58158 遺伝子の RNAi 法による発現抑制株を作出した。すでに研究代表者の研究室で構築された *G. trabeum* 発現ベクターのマルチプルクローニングサイトに Gt58158 遺伝子のセンス鎖 300bp とアンチセンス鎖 250bp を直列に連結させることで、センス鎖とアンチセンス鎖間にループ構造が形成されるように設計した。インサートは チュープリンプロモーター制御下においた。この RNAi ベクターを用いて *G. trabeum* を形質転換し、ハイグロマイシン耐性に基づき選抜した。得られた組換え体を液体培地で培養し、培養液のフェロジンアッセイにより、鉄還元性を調査した。

#### (6) ガンマ線照射による鉄還元能抑制株の作出

農研機構・次世代作物開発研究センター放射線育種場において、寒天培地上で培養した *G. trabeum* 6430 株の菌系にガンマ線を照射した。照射線量は 1500、1200、900、600、300Gy に設定した。ガンマ線照射後の菌系のごく一部をグルコースを炭素源とする液体培地に植菌した後で培養し、菌系が増殖したところで菌系を回収し、ワーリングブレンダーにより菌糸を懸濁した。この懸濁液 1ml を 10ml の Highley 液体培地に接種し、26℃ で 13 日間静置培養した。培養期間中に鉄還元能を定期的に測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 褐色腐朽材中のシュウ酸濃度および二価鉄濃度

シュウ酸は褐色腐朽菌が有する木材分解メカニズムにおいて、三価鉄の可溶化やキレートといった機能を通じて CMF システムに重要な役割を果たしていると考えられている。そこで本研究では、培養 3 か月後のスギカンナ屑からシュウ酸を抽出し、その濃度を測定した。その結果、*G. trabeum*

では約 1g の木粉あたり約 3.5mg ものシュウ酸が検出された。これは同条件で培養した白色腐朽菌 *T. versicolor* と比較して顕著に高い値であり、本菌の木材分解におけるシュウ酸の重要性を支持する。また、同条件で培養した腐朽材における鉄還元能をフェロジン法で評価した結果、*G. trabeum* で腐朽した場合、*T. versicolor* と比較して、約 5 倍以上の鉄還元能が検出された。

#### (2) IMAC 法および RNA-seq 法による鉄結合性ペプチド(低分子タンパク質)の探索

各種培養液に対して鉄を固定化したカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーを実施した。その結果、セルロース液体培地、木粉液体培地、木材薄片培地いずれの場合においても鉄固定カラムに結合するペプチドもしくは低分子タンパク質が得られたものの、いずれのものもフェロジテストにおいて鉄還元性が陰性であった。

そこで、本研究では RNA-seq による遺伝子発現解析により鉄結合性ペプチドを探索することとした。RNA-seq 解析で得られたシークエンスデータからグルコース培地、アビセル培地、スギ木粉培地間で異なる発現挙動を呈する遺伝子を求めた。それぞれの培地間での発現変動遺伝子を MA plot したところ、それぞれの培地間で多くの発現変動遺伝子が見られた。そのパターンを培地間で比較したところ、スギ木粉培養系と

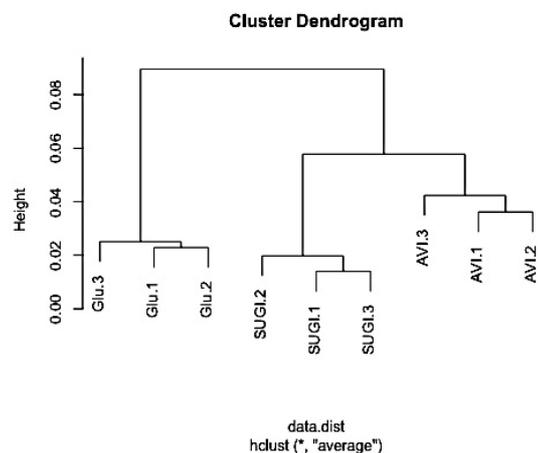


図 1 各培地で検出された発現変動遺伝子のクラスタリング (n=3 で試験した)  
Glu: グルコース培地  
AVI: アビセル培地  
SUGI: スギ木粉培地

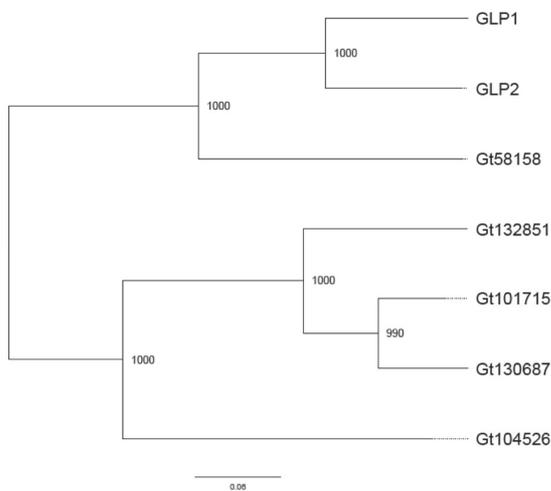


図2 *P. chrysosporium* 由来の GLP と相同性を示す遺伝子がコードするタンパク質の分子系統解析

アビセル培養系における発現変動遺伝子は発現パターンの類似性が比較的高く、一方グルコース培養系はやや異なっていることが示された(図1)。また、アビセル培地と木粉培地における発現変動遺伝子数は、アビセル培養系で発現が増加した遺伝子が83個であるのに対してスギ木粉培養系においては2150個と多く見られた。一方、発現が特異的に減少した遺伝子は、スギ木粉培養系が365個に対してアビセル培養系では3184個であった。

これまでに報告されている白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の菌体外鉄還元性低分子タンパク質 GLP1 と相同性を示すものとして *G. trabeum* のゲノム中に存在する5つの遺伝子はそれぞれ Gt58158、Gt101715、Gt104526、Gt130687、Gt132851 であり、そのうち Gt58158 がもっとも高い相同性を示した(図2)。これらの遺伝子の発現量を RNA-seq データから抽出し、各培地条件における発現量を比較した。その結果、Gt58158、Gt132851、Gt101715 についてはセルロース培地で発現が誘導され、Gt104526 については、セルロース培地およびスギ木粉培地において発現が誘導された(図3)。このことから、これらの遺伝子が木材腐朽で重要な役割を果たすタンパク質をコードしていると考えられた。

### (3) 組換え体の異種宿主発現とその機能解析

RNA-seq によりセルロースもしくは木粉で誘導されることが明らかとなった5種の低分子タンパク質遺伝子 Gt58158、Gt101715、Gt104526、Gt132851 について、酵母菌 *P. pastoris* による異種宿主発現を試みた。SDS-PAGE の結果、いずれも可溶性の組換えタンパク質として生産することができなかった。大腸菌の発現系についても試みたが、酵母菌と同様に可溶性タンパク質として生産することはできなかった。一方で、セルロースや木粉で誘導されなかった Gt130687 は、酵母菌 *P. pastoris* での異種宿主発現において明確なバンドとして観察された。SDS-PAGE で観察されたバンドの移動度から算出した分子量はアミノ酸配列から予想される分子量よりも大きかったことから、糖鎖が付加された糖タンパク質であると考えられた。この組換え Gt130687 をフェロジンテストに供したものの、鉄の還元性は見出されず、また、鉄固定カラムへの結合性も見られなかった。Gt130687 は他の4つの相同遺伝子と遺伝子発現パターンは異なるものの、相同性の観点から、他の4つのタンパク質も同様の性質を有している可能性が高いと考えられる。

### (4) Gt58158 遺伝子発現抑制株の性質

分子系統解析の結果、*P. chrysosporium* 由来の GLP と最も高い相同性を示した Gt58158 遺伝子について、RNAi による発現抑制株を作出した。得られた変異株の培養

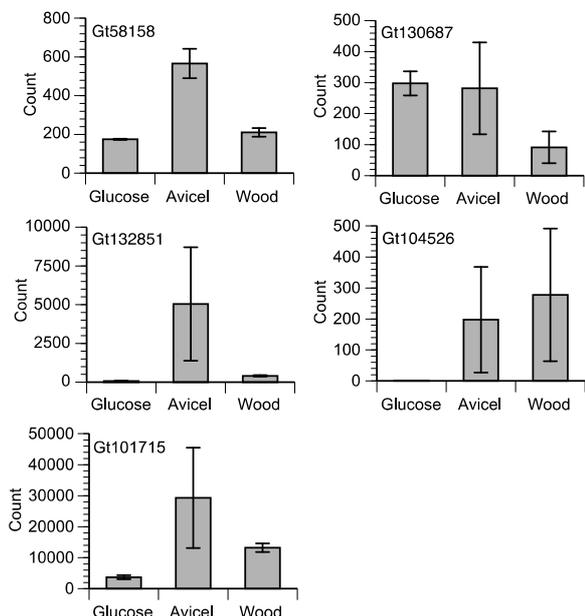


図3 *G. trabeum* 由来 GLP の発現挙動

液を用いてフェロジン法による鉄還元能を調査した結果、野生株とほぼ同程度の還元能が検出された(図4)。

(5) ガンマ線照射により変異導入された株の鉄還元能

*G. trabeum* へのガンマ線照射によりゲノムにランダム変異導入し、得られた変異株の培養液を用いてフェロジン法による鉄還元能を調査した結果、線量900Gyと1500Gyの試験区において、鉄還元能の低下した株が得られた。これらの株の Gt58158、Gt101715、Gt104526、Gt130687、Gt132851 遺伝子の発現を RT-PCR によって調査した結果、いずれの株においてもこれらの遺伝子の明確な発現低下は見られなかった。このことは、本菌においてこれらの低分子タンパク質ではない何らかの鉄還元能を有する物質が存在することを示唆する。

(6) まとめ

過去の文献において、木材腐朽菌がペプチドや低分子糖タンパク質を生産し、それらの幾つかは鉄還元性を示すことが報告されている<sup>1-4)</sup>。しかしながら、これらについては、その機能について生理学的に解析された例はほとんど無い。本研究では、IMACを用いたペプチドーム(プロテオーム)解析、RNA-seqによる選抜と組換え体の機能解析、RNAiによるノックダウン解析、ガンマ線照射によるランダム変異導入解析など様々な角度から鉄還元性のペプチドや低分子糖タンパク質の特定および機能解析を

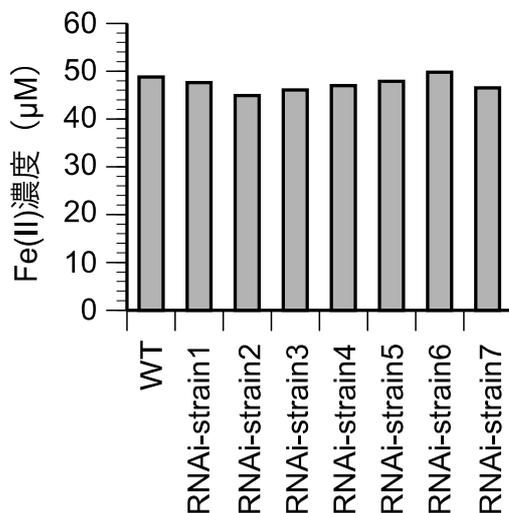


図4 RNAi株と野生株の鉄還元能

試みた。しかしながら、いずれの解析においても明確な鉄還元能を有するペプチドやタンパク質を検出することはできなかった。RNA-seqにより特定された白色腐朽菌 *P. chrysosporium* 由来の GLP と相同性を示す Gt58158、Gt101715、Gt104526、Gt130687、Gt132851 遺伝子のうち Gt58158、Gt101715、Gt104526、Gt132851 遺伝子が木材細胞壁分解に重要である可能性が示唆されたが、本研究の結果からは鉄還元能によって腐朽に関与するとは言い難い。

これまで腐朽菌で報告されてきた鉄還元性ペプチドやタンパク質の存在を、本研究が否定するものであると結論付けることはできないが、少なくとも褐色腐朽菌のモデル菌の一つとして様々な研究がなされてきた *G. trabeum* においては、鉄還元性ペプチドやタンパク質を介した鉄還元システムが生理的に重要な役割を果たしているとは言い難い。これまでの研究において、*G. trabeum* は 2,5-ジメトキシヒドロキノンが主要な鉄還元物質として報告されており、その他の褐色腐朽菌でも同様に各種低分子芳香族化合物の関与が示唆されていることから、それらの腐朽菌においては、低分子芳香族化合物の鉄還元系が発達しており、ペプチド・タンパク質による鉄還元系が未発達である可能性がある。

参考文献

- 1) Biodegradation 13: 383-394 (2002).
- 2) J. Biotechnol. 101: 119-130 (2003).
- 3) J. Biotechnol. 128: 500-511 (2007).
- 4) Sci. China Ser. C:Life Sci. 51: 214-221 (2008).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. 吉田 誠: 腐朽メカニズムの概要と研究の展望. 木材保存. 44(3): 172-175 (2018). 査読無
2. Yuka Kojima, Anikó Várnai, Takuya Ishida, Naoki Sunagawa, Dejan M. Petrovic, Kiyohiko Igarashi, Jody Jellison, Barry Goodell, Gry Alfredsen, Bjørge Westereng, Vincent G.H. Eijsink, Makoto Yoshida: A

Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Xyloglucan Specificity from the Brown-Rot Fungus *Gloeophyllum trabeum* and Its Action on Cellulose-Xyloglucan Complexes. Applied and Environmental Microbiology. 82(22):6557-6572 (2016). doi: 10.1128/AEM.01768-16 査読有

〔学会発表〕(計11件)

1. 近藤里沙子、安藤恵介、半智史、堀川祥生、吉田 誠：進化系統的に異なる分岐群に属する褐色腐朽菌間での木材分解様式の比較. 第68回日本木材学会年次大会. 京都. 2018年3月.
2. 小嶋由香、吉田 誠、砂川直輝、五十嵐圭日子：褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* から見出された新規セルロース結合モジュールの機能解析. 第68回日本木材学会年次大会. 京都. 2018年3月.
3. 吉田 誠：菌類による植物バイオマス分解機構について新たにわかってきたこと. セルロース学会北海道・東北支部セミナー2018 (招待講演). 札幌. 2018年2月.
4. 小嶋由香, Aniko Varnai, Dejan Petrovic, Borge Westereng, Vincent Eijsink, 石田卓也, 砂川直輝, 五十嵐圭日子, Jody Jellison, Barry Goodell, Gry Alfredsen, 吉田 誠：褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* 由来 LPMO9 のセルロースおよびヘミセルロース分解特性. 日本応用糖質学会平成29年度大会. 藤沢. 2017年9月.
5. Yuka Kojima, Aniko Varnai, Takuya Ishida, Naoki Sunagawa, Dejan M. Petrovic, Kiyohiko Igarashi, Jody Jellison, Barry Goodell, Gry Alfredsen, Borge Westereng, Vincent G. H. Eijsink, Makoto Yoshida : Characterization of an LPMO9 acting on cellulose and hemicellulose from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. Gordon Research Conference 2017 -Cellulases & Other Carbohydrate-Active Enzymes-. Proctor Academy (NH, USA). 2017年7月.
6. Makoto Yoshida : Auxiliary Activities Family 12: unique PQQ-dependent redox enzymes. Gordon Research Conference

2017 -Cellulases & Other

Carbohydrate-Active Enzymes-(招待講演). Proctor Academy (NH, USA). 2017年7月.

7. 吉田 誠：腐朽菌の木材分解メカニズムを分子レベルで理解する. 日本木材学会生物劣化研究会2017年春季研究会(招待講演). 福岡. 2017年3月.
8. 渡部翔一、梅澤 究、吉田 誠：褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* の遺伝子組換え技術を利用したレポーター遺伝子の発現. 第67回日本木材学会年次大会. 福岡. 2017年3月.
9. 新倉 舞、梅澤 究、小瀬亮太、堀川祥生、吉田 誠：褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* が有する糖質関連酵素の網羅的遺伝子発現解析. 第67回日本木材学会大会. 福岡. 2017年3月.
10. Yuka Kojima, Aniko Varnai, Takuya Ishida, Naoki Sunagawa, Dejan M. Petrovic, Kiyohiko Igarashi, Jody Jellison, Barry Goodell, Gry Alfredsen, Borge Westereng, Vincent G. H. Eijsink, Makoto Yoshida : Characterization of an LPMO9 from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. LPMO Symposium. Copenhagen (Denmark). 2016年11月.
11. 小嶋由香, 吉田 誠, Aniko Varnai, Dejan Petrovic, Borge Westereng, Vincent Eijsink, 石田卓也, 砂川直輝, 五十嵐圭日子, Jody Jellison Barry Goodell, Gry Alfredsen : 褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* 由来 LPMO9 の多糖分解特性. 第30回セルラーゼ研究会. 佐久. 2016年7月.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

吉田 誠 (YOSHIDA Makoto)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：30447510