

平成 22 年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19580196
 研究課題名（和文） 木材腐朽に関する新規糖タンパク質の分子生物学的解析と環境汚染物質分解への利用
 研究課題名（英文） Molecular biology of novel glycoprotein participating wood decay and application to degradation of pollutants
 研究代表者
 田中 裕美（TANAKA HIROMI）
 近畿大学・農学部・教授
 研究者番号：30140338

研究成果の概要（和文）：2種の白色腐朽菌から木材腐朽の際に、フェノールオキシダーゼ活性を示す酵素類と協奏的に作用する水酸化ラジカル生成物質を得た。これらの物質はアマドリ化合物や2価鉄を含む糖タンパク質であった。ゲノムの全塩基配列が公表された *Phanerochaete chrysosporium* から、この物質のタンパク質部分をコードする遺伝子を特定した。また、この糖タンパク質によって、リグニンモデル化合物の水酸化反応が確認された。

研究成果の概要（英文）：White-rot basidiomycetes produce extracellular glycoproteins which catalyze redox reaction to produce hydroxyl radical, reduce Fe(III) to Fe(II), and strongly bind Fe(II). White-rot fungi degrade wood when the fungi produce at least one phenol oxidase in combination with hydroxyl radical. The isolation and characterization of DNA sequences that appear to encode these glycoproteins were demonstrated. Lignin-model compounds were hydroxylated by the glycoproteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	710,000	210,000	920,000
年度			
年度			
総計	3,610,000	1,080,000	4,690,000

研究分野：

科研費の分科・細目：林産科学・木質工学（申請時の細目）

キーワード：白色腐朽菌、水酸化ラジカル、*Phanerochaete chrysosporium*、木材腐朽、糖タンパク質、*Ceriporiopsis subvermispora*

1. 研究開始当初の背景

(1)木材を分解できる菌類は腐朽型が異なっても水酸化ラジカルを生成する2価の鉄を含む糖タンパク質を分泌することを既に明

らかにしていた。

(2)リグニンを分解できる白色腐朽菌は環境汚染物質を分解できることが報告されていたが、分解機構は解明されていなかった。

(3)木材中のリグニンや環境汚染物質の分解には、木材腐朽菌の分泌する糖タンパク質によって生成される水酸化ラジカルが関与しているのではないかと考えた。すなわち、水酸化ラジカルによってリグニンの非フェノール性の末端に水酸基が付与され、酸化還元電位が低く天然のリグニンに作用できないマンガンペルオキシダーゼやラッカーゼが作用できるようになる。この木材中のリグニン分解機構と同様な機構が働いて、環境汚染物質も分解される。

(4)白色腐朽菌の *Phanerochaete chrysosporium* の全ゲノム配列が公表され、また糖タンパク質のタンパク質部分のN末端や内部アミノ酸配列が解析され、これらの情報を使用して、遺伝子をすでに特定していた。

2. 研究の目的

(1)糖タンパク質遺伝子の完全長を解明し、この物質の詳細な構造を明らかにする。

(2)糖や2価の鉄とタンパク質の結合様式を解明することによって、水酸化ラジカル生成機構を解明する。

(3)水酸化ラジカル生成糖タンパク質の大量発現系を構築する。

(4)環境汚染物質の分解経路の解明および分解法を確立する。

3. 研究の方法

(1)水酸化ラジカル生成糖タンパク質の詳細な解析を行うために、成長が早く強力なリグニン分解菌として多数の報告があり、全ゲノムの塩基配列が公表されている白色腐朽菌 *P. chrysosporium* を木粉添加培地で培養し、菌体外に分泌される水酸化ラジカル生成物質を回収した。その後、Sephadex G-50 によるゲルろ過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーによって精製した水酸化ラジカル生成物質を、Tricine-SDS-PAGE 後、PVDF膜にブロッティングし、バンドを検出後切り出し、酵素消化した。Smart システムで分離・精製後、アミノ酸シーケンサーによってN末端アミノ酸配列および内部配列を決定した。この配列を用いて、*P. chrysosporium* のゲノムデータベースに対してTBLASTNを用いて検索を行ったところ、配列中に高い相同性を示す配列が検出されたため、その配列を用いてプライマーを作成した。供試菌からRNAを抽出しRT-PCR産物を得、RACE-PCR産物をクローニングしcDNAの完全長を得ることを試みた。さらにゲノムDNAから遺伝子の全配列を明らかにする。さらに、ゲノム上に似たような配列をコードする遺伝子がもう1つあることもわかったので、これに関してもcDNAの完全長およびゲノムDNAから遺伝子の全配列を明らかにする。

(2)水酸化ラジカル生成糖タンパク質の大量発現系の確立するために、完全長のcDNAおよび遺伝子のゲノム配列を解析する。これらを用いて大腸菌や酵母に遺伝子を組み換えて、大量に水酸化ラジカル生成物質を発現させる系を確立する。遺伝子組み換えによって得られた物質は、タンパク質のみであると考えられるので、このままで活性があるかどうか検討する。あるいはグルコースを添加してグリケーションを起こすことが必要なのか、少量の2価鉄の添加の必要性について検討する。

(3)水酸化ラジカル生成糖タンパク質の構造解析および詳細な作用機構の解明を行った。選択的リグニン分解菌として注目を集めている *Ceriporiopsis subvermispora* および数種の腐朽菌からも水酸化ラジカル生成糖タンパク質を分離・精製し、その物理化学的諸性質を検討した。タンパク質部分のN末端および内部配列アミノ酸解析によって、ゲノムの全塩基配列がわかっている *P. chrysosporium* の情報を用いて遺伝子が特定できないか検討した。

(4)環境汚染物質の代謝経路の解明および分解法の確立のために、数種の水酸化ラジカル生成糖タンパク質の分泌量が多い供試菌を用いて、モデル化合物分解実験を行った。ダイオキシン類などの環境汚染物質のモデルとして、トリクロロジベンゾフランなどを用いて検討した。中間代謝物の同定をガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、質量分析計を用いて行い代謝経路を解明する。過酸化水素と2価鉄を用いたフェントン反応によって生成させた水酸化ラジカルと、白色腐朽菌や褐色腐朽菌の菌体外に分泌される糖タンパク質によって生成される水酸化ラジカルによる環境汚染物質の分解実験を行う。モデル化合物の残存量の測定、中間代謝物の同定を行い、分解経路を明らかにする。

4. 研究成果

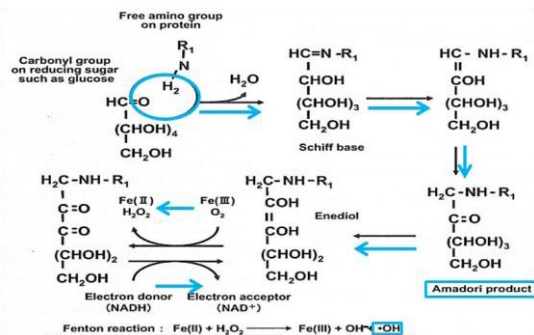
(1)全ゲノムの塩基配列が公表されている白色腐朽菌 *P. chrysosporium* から既に特定していた遺伝子 *glp1* と *glp2* について、*glp1* に関しては5'末端および3'末端の非翻訳領域を解析し、転写開始点および2つの異なる転写終結点を解明した。*glp2* に関しては3'末端は解析できたが、5'末端については、*glp1* と *glp2* の配列が類似しており、*glp2* に特異的なプライマーの設計が難しい点が原因であるが、引き続き解析中である。

(2) *glp1* 遺伝子は大腸菌に組み換え、タンパク質を発現させるために、pET-32 Xa/LIC ベクター系を用いた。その結果、発現は確認出

来たが、発現させたタンパク質を精製するのが困難であった。すなわち、使用する酵素が誤消化を起こす可能性やその後の精製段階でかなり長時間を必要とした。そのため、BIO-RAD 社の新製品である Profinity eXact Fusion-Tag System を使用し発現を試み、発現させることができた。効率よく多量に発現タンパク質を得るために、培養条件や発現条件の検討を行い、いくつかの改善点を見出すことができた。

(3) 選択的なリグニン分解菌として知られる *C. subvermispota* は、他の白色腐朽菌と異なり結晶性のセルロースを分解できるエクソ型の酵素活性が弱いことを既に明らかにしていた。またリグニン分解には水酸化ラジカル生成糖タンパク質とフェノールオキシダーゼ活性を示す酵素(マンガンペルオキシダーゼ、ラッカーゼ)の関与が考えられたので、この菌からも水酸化ラジカル生成糖タンパク質の分離・精製を行い、物理化学的諸性質を検討した。その結果、*P. chrysosporium* のものと同様の性質を示す物質が得られた。またこの物質のタンパク質部分のN末端アミノ酸配列は *P. chrysosporium* のものと70%の相同性を示した。

(4) *P. chrysosporium* と *C. subvermispota* からの水酸化ラジカル生成物質は2価の鉄を含む糖タンパク質で、分子量はいずれも14000前後であった。この物質は鉄や銅に対する還元力があり、アミノケトース(アマドリ化合物)を含んでいることがわかった。これまでの結果から水酸化ラジカル生成機構を以下のように提案した。タンパク質部分の側鎖のアミノ基と還元糖が非酵素的に結合し、 Schiff 塩基を経てアマドリ化合物を生じる。このアマドリ化合物中のエンジオール構造が、3価の鉄を2価に、2価の銅を1価に還元し、また酸素をスーパーオキシドアニオンを経て過酸化水素にする。さらに2価の鉄と過酸化水素がフェントン反応によって水酸化ラジカルを生成する。3価の鉄はNADHなどの電子供与体の存在下、再び2価に還元され連続的に水酸化ラジカルを生成できる。



(5) さらにこの物質を用いた環境汚染物質の分解法の確立のために、モデル化合物を用いて分解実験を行い、化合物の水酸化反応が起こっていることを確かめた。ただし、モデル

化合物が水溶性でないものは反応が進行しにくく、実験条件の検討が必要であった。

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 田中裕美、木材、建材などカビによる劣化、かびと生活、査読無、2巻、2009、16-23
- ② Hiromi Tanaka, Kenji Koike, Shuji Itakura, Akio Enoki, Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota*, *Enzyme and Microbial Technology*, 査読有, Vol. 45, 2009, 384-390

[学会発表] (計10件)

- ① 牛島慶太、白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispota* が分泌する糖タンパク質から生成される水酸化ラジカルの測定、第60回日本木材学会大会、平成22年3月18日、宮崎
- ② 田中裕美、木材の腐朽機構—木材腐朽機構関与する水酸化ラジカル生成物質について—、第60回日本木材学会大会、平成22年3月18日、宮崎
- ③ 城戸竜太、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の分泌する水酸化ラジカル生成物質遺伝子の解析と発現、2009年度日本防菌防霉学会若手の会、平成21年12月11日、徳島
- ④ 井上夕樹、白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispota* が分泌する糖タンパク質の物理化学的性質について、第59回日本木材学会大会、平成21年3月15日、松本
- ⑤ Akio Enoki, Characterization of a hydroxyl-radical-producing glycoprotein from the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*, The 39th Annual Meeting of The International Research Group on Wood Preservation, 平成20年5月27日、Istanbul (Turkey)
- ⑥ 城戸竜太、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の分泌する水酸化ラジカル生成物質遺伝子の全長解析、第58回日本木材学会大会、平成20年3月17日、筑波
- ⑦ Hiromi Tanaka, Characterization of hydroxyl-radical-producing glycoprotein and its presumptive genes from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, International conference "Biodeterioration of Wood and Wood Products" BWWP2007, 平成19年8月28日、Riga (Latvia)

- ⑧ Akio Enoki, Mechanism of wood decay: physical and chemical properties of hydroxyl-radical-producing substances from wood decay fungi, International conference “Biodeterioration of Wood and Wood Products” BWWP2007, 平成 19 年 8 月 27 日, Riga (Latvia)
- ⑨ 中村圭一、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* およびこの菌が分泌する糖タンパク質による芳香族化合物の代謝、第 57 回日本木材学会大会、平成 19 年 8 月 9 日、広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 裕美 (TANAKA HIROMI)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号：30140338

(2) 研究分担者

榎 章郎 (ENOKI AKIO)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号：80027169

(3) 連携研究者

()

研究者番号：