

平成21年 6月10日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19880009

研究課題名（和文） 孔腐れ菌カタウロコタケによる木材腐朽メカニズムの解明

研究課題名（英文） Wood decay mechanism in pocket rot fungus *Xylobolus frustulatus*

研究代表者

吉田 誠 (YOSHIDA MAKOTO)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・特任准教授

研究者番号：30447510

研究成果の概要：

孔腐れ菌は、木材腐朽初期に、ヘミセルロースおよびリグニンを優先的に分解し、セルロースを残存させるという、特徴的な分解様式を有することが示唆されている。その腐朽メカニズムを解明するため、形態学的解析および分子生物学的解析を行った結果、特徴的な腐朽形態は観察されなかったが、新規の性質を呈する糖アルコール脱水素酵素の存在が確認された。この結果は、本菌における特徴的な糖代謝経路の存在を示唆するものとなる可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,360,000	0	1,360,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,710,000	405,000	3,115,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林産科学・木質工学

キーワード：孔腐れ菌，木材腐朽菌，カタウロコタケ

1. 研究開始当初の背景

木材建築物は、適切な条件で適切に木材を利用すれば、極めて長い耐用年数を示すことが知られている。その反面、火災による消失、物理的損傷、シロアリなどによる食害や微生物による腐朽などによって急激な劣化を受けるといった欠点がある。特に、微生物による腐朽は、木材の強度低下を引き起こすだけでなく、木材の外観を汚染し、美観を損ね、商品価値を下げるといった問題も引き起こすことから、木材の利用上、最も注意を必要とする劣化である。

木材腐朽を引き起こす微生物として、細菌類および糸状菌類が知られている。特に糸状菌類の中の担子菌類（キノコ類）は、木材腐朽の主要な原因とされる微生物である。一般に、担子菌類については、胞子嚢の構造や子実体の形態により科学的に分類されるが、木材利用の観点では、形態学的な特徴ではなく、木材の腐朽の様式により2つに大別されてきた。それらのうち、セルロースやヘミセルロースといった植物細胞壁多糖類のみを分解し、芳香族化合物高分子であるリグニンを分解せず、腐朽材の外観が褐色を呈するもの

を褐色腐朽，多糖類およびリグニンをどちらも分解し，腐朽材が白色を呈するものを白色腐朽として区別し，それらの腐朽を引き起こす担子菌を，それぞれ褐色腐朽菌および白色腐朽菌と呼ぶ。さらに，両腐朽様式は共に，腐朽材の外観に従ってさらに細かく分類が可能である。白色腐朽に関しては，孔腐れ，輪腐れ (Ring rot)，班入り腐れ，海綿腐れなどに分類される。これらの中で，孔腐れは，エゾサルノコシカケやカワウソタケなどの担子菌類により引き起こされる腐朽であり，木材表面に特徴的な白色のレンズ状腐朽跡を呈することから，腐朽による木材強度減少の問題に加え，木材表面の外観汚染といった観点でも問題である。また，本菌は木材腐朽初期に，ヘミセルロースおよびリグニンを優先的に分解し，セルロースを残存させるという，特徴的な分解様式を有することが示唆されている。しかしながら，これまでに白色腐朽菌の木材分解メカニズムに関しては多くの研究がなされてきているにも関わらず，孔腐れ状腐朽に関係する担子菌の木材分解に関する研究報告は限られており，したがって，孔腐れの詳細な腐朽メカニズムには不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では，孔腐れの代表的な原因菌の一つであるカタウロコタケ (*Xylobolus frustulatus* (Pers. Ex Fr) Boidin) に注目する。本菌は，日本のみならず，ヨーロッパや北アメリカなど，様々な地域に分布することが知られている。本研究では，カタウロコタケの腐朽材の形態観察・化学分析および，木材成分を炭素源とした培養系で生産される酵素の生化学的手法による解析を行い，本菌の木材腐朽メカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的な目的を以下に示す。

- (1)カタウロコタケ腐朽材の顕微鏡観察により，孔腐れの特徴的な腐朽跡の形成メカニズムを明らかにする。
- (2)本菌の木材成分分解における選択性を明らかにする。
- (3)本菌に特徴的な因子(酵素)を同定する。

3. 研究の方法

(1)形態学的解析によるカタウロコタケにより腐朽された木材の調査

ポテトデキストロース寒天培地(PDA)上にカタウロコタケを生育させ，生育した菌体の上にブナ木片を置いた。その後，半年間 26℃で静置した後，腐朽材を 105℃のインキュベーター中で乾燥させ，重量を測定した。また，

得られた腐朽材から切片を切り出し，走査型顕微鏡による観察を行った。腐朽を促進させる目的で，木片の代わりにブナ木薄片を載せたものも，同様の方法で顕微鏡観察に供した。

(2)本菌の木材成分分解における選択性の調査

PDA 培地上に生育させたカタウロコタケを直径約 1cm にくり抜き，それを 10 片，アビセル (微結晶セルロース)，カバ由来のキシラン，麦由来のキシランをそれぞれ単一の炭素源として含む培地に植菌し，30 日間培養した。その後，得られた培養液中の様々な糖質加水分解酵素活性およびエステラーゼ活性を測定した。

(3)カタウロコタケに特徴的な因子(酵素)の探索

①PCR ディファレンシャルディスプレイ

PDA 培地上に生育させたカタウロコタケを直径約 1cm にくり抜き，それを 10 片，グルコース，カバ由来のキシランをそれぞれ単一の炭素源として含む培地に植菌し，30 日間培養した。菌体を回収した後，RNA を抽出した。抽出した RNA を鋳型として，GeneFishing™ DEG Premix Kit を用いて一本鎖 cDNA を合成した。この cDNA を用いて，GeneFishing™ DEG Premix Kit に添付の 20 種類の Arbitrary ACP をフォワードプライマー，dT-ACP2 をリバースプライマーとして，合計 20 種のプライマー対により，PCR を行った。PCR 後，反応液 3 μl を 2%アガロースゲル中で電気泳動し，エチジウムブロマイドにより増幅産物を染色した。キシラン培養由来の cDNA を用いた場合のみで増幅が確認されたバンドをゲルから切り出し，抽出した DNA 断片を pGEM-T Easy vector に挿入し，3130 Genetic Analyzer により塩基配列を決定した。

②キシラン培地特異的に発現する遺伝子のクローニング

①で得られた DNA 断片の塩基配列に基づきプライマーを設計し，GeneRacer kit を用いて 3'RACE および 5'RACE を行った。上記 RACE により決定された塩基配列に基づき，cDNA 断片の両末端付近に新たにプライマーを設計し，それを用いて PCR を行い，シーケンスに供することで，目的遺伝子配列を決定した。

③目的遺伝子の組換え酵素としての生産

②で得られた塩基配列中の ORF 領域を PCR にて増幅し，この断片を pET21a ベクター中のマルチプルクローニングサイトの NdeI-NotI に挿入した。その後，シーケンス反応により塩基配列に変異が無いことを

確認した後、このプラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3)を形質展開した。この組換え大腸菌を LB 培地で OD₆₀₀=0.2 となるまで培養し、200 μM IPTG 存在下、18°C、180rpm で 24 時間振とう培養を行った。回収した菌体を超音波破碎に供し、抽出した粗酵素液から、His-Trap カラムにより組換え酵素を精製した。これを SDS-PAGE 分析に供した。また、様々な基質を用いて、本酵素のキャラクタライズを行った。

4. 研究成果

(1)形態学的解析によるカタウロコタケにより腐朽された木材の調査

半年間腐朽させたブナ材の重量減少を測定した結果、腐朽材の重量減少は観察されなかった(図1)。このことから、本菌の木材腐朽能力は低いことが明らかとなった。腐朽材の重量が、未腐朽材に比べて幾分重いのは、PDA 培地で生育した菌体が木材中に侵入したことに起因すると考えられる。また、本菌は一般に担子菌を培養する際に用いられる PDA 培地上でも極めて生育が遅かった。

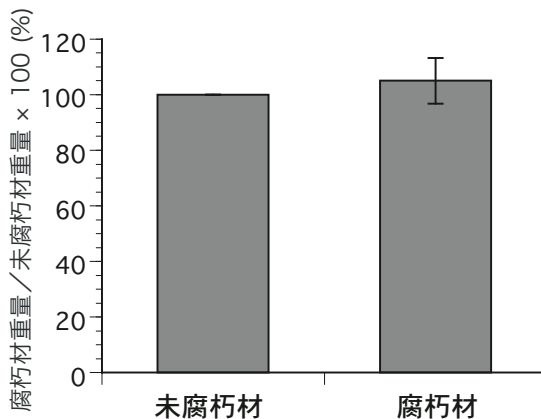


図1 未腐朽材と腐朽材(腐朽期間半年)の重量比較 30サンプルの平均値を示した。

カタウロコタケの木材腐朽の形態学的特徴を調査するため、走査型顕微鏡を用いた観察を行った。その結果、木材中への菌糸の侵入は観察されたが、本菌に特徴的な分解痕などは観察されなかった。

(2)本菌の木材成分分解における選択性の調査

カタウロコタケの木材成分分解における選択性を明らかにするため、本菌をアビセル(微結晶セルロース)、カバ由来のキシラン、麦由来のキシランをそれぞれ単一の炭素源として含む培地で 30 日間培養し、菌体外酵素の活性測定を試みた。その結果、本菌はアビセルを炭素源として生育できないことが

明らかとなった。このことは、本菌が強いセルロース分解能力を保持しないことを示唆している。一方、キシラン培地においては、どちらのキシランの場合も旺盛な生育が観察された。このことから、本菌は、木材成分のうち、キシランを主要な炭素源として利用している可能性が示唆された。これらのキシラン培地における各酵素の活性を図2および図3に示した。これらの結果から、本菌は、キシラン培地においてセルロース分解系酵素およびヘミセルロース分解系酵素をどちらも生産していることが示唆された。しかしながら、いずれの培地においても各酵素の生産量は非常に少なく、酵素を単離する等の操作を進めることは困難であるとの判断に至った。したがって、この後、分子生物学的な解析を行うこととした。

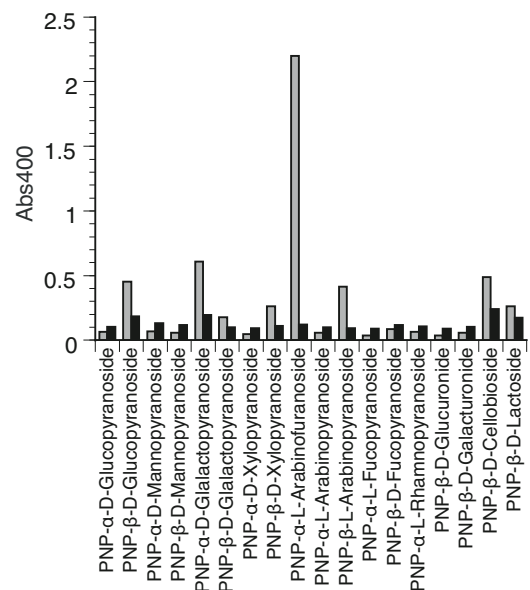


図2 キシラン培地におけるPNP基質分解活性

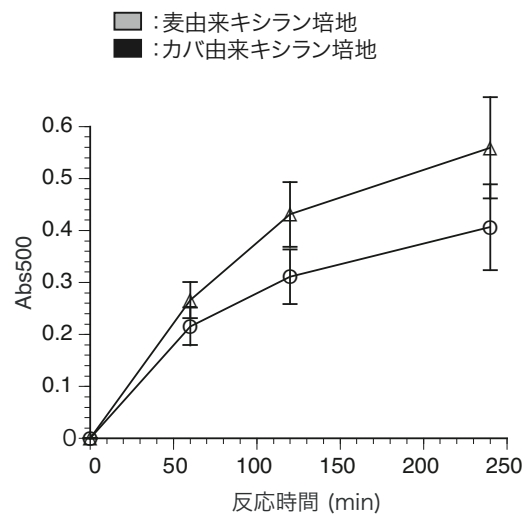


図3 キシラン培地におけるキシラン分解活性

(3)カタウロコタケに特徴的な因子の探索

これまでの結果は、研究を進める前の予想に反して、本菌の特徴を形態学的また生化学的に特定することは困難であることを示している。そこで、分子生物学的観点からアプローチを試みることにした。ここでは、mRNA ディファレンシャルディスプレイ法を用いて解析することとした。グルコース培地とキシラン培地での遺伝子発現パターンをディファレンシャルディスプレイにより解析したところ、数種のキシラン培地特異的に発現する遺伝子を特定することに成功した(図4)。それらのうち、糖代謝に関与すると予想されるタンパク質をコードする遺伝子として、糖アルコール脱水素酵素遺伝子が特定された。cDNA 配列全長をクローニングした結果、この遺伝子は Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR) ファミリーに属する酵素をコードしていることが明らかとなった。また、本酵素は担子菌由来のアラビトール脱水素酵素と高い相同性を示した。したがって、本酵素は MDR ファミリーに属する糖アルコール脱水素酵素をコードしていると予想された。

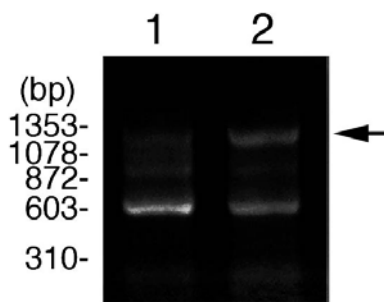


図4 ディファレンシャルディスプレイ解析

1: グルコース培地
2: キシラン培地

得られた cDNA がコードする酵素を大腸菌を宿主として、組換え酵素として発現させることに成功し、SDS-PAGE でほぼ 1 本のバンドとなるまで精製した(図5)。

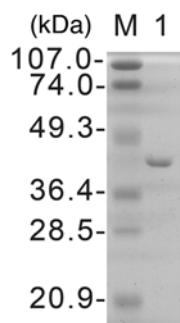


図5 精製した組換え酵素の SDS-PAGE
M: 分子量マーカー
1: 組換え酵素

精製した酵素に含まれる元素を分析したところ、1分子のタンパク質中に亜鉛が2分子存在していることが明らかとなった。したがって、本酵素は亜鉛含有型の糖アルコール脱水素酵素であることが示唆された。また、本酵素の基質特異性を調査した結果、マンニトールの酸化およびフルクトースの還元に対して高い基質特異性を示し、またコファクターとして NADP⁺および NADPH のみを利用することが明らかとなった(図6)。以上のことから、本酵素は MDR ファミリーに属する NADP⁺依存性のマンニトール脱水素酵素であることが明らかとなった。これは、担子菌由来の MDR ファミリー型マンニトール脱水素酵素の初めての例である。

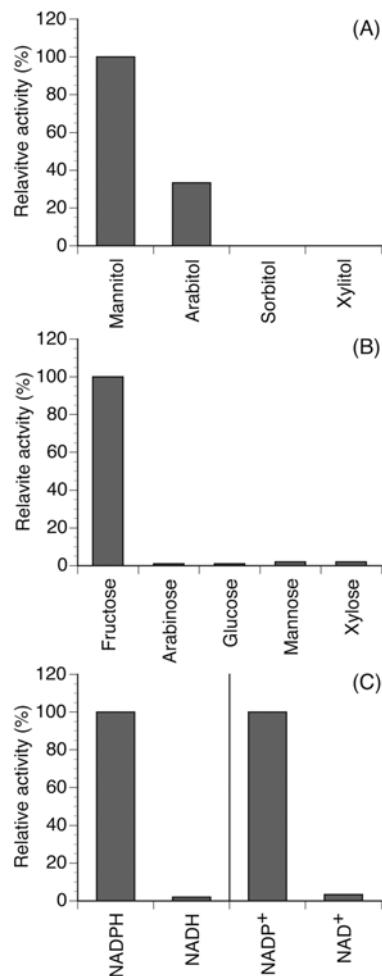


図6 組換え酵素の基質特異性
(A) 基質の酸化反応
(B) 基質の還元反応
(C) コファクターの特異性

本酵素のさらに詳細な解析を行った結果、マンニトールの酸化反応が、フルクトースの還元反応と比較して速い速度で進むことが明らかとなった。従来の糸状菌由来のマンニ

トール脱水素酵素はフルクトースの還元速度の方が高いことが知られており、したがって、本酵素は既知の酵素とは異なる性質を有する可能性がある。また、本酵素の存在は、カタウロコタケが他の糸状菌とは異なる糖代謝系を保持している可能性を示唆するものである。

以上の研究成果については、第34回糖質科学懇話会および第59回日本木材学会大会において報告した。また、現在、学術論文に投稿するため、その準備を進めているところである。

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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 中田裕治, 吉田 誠: 担子菌カタウロコタケが生産する糖アルコール脱水素酵素の解析, 第34回糖質科学懇話会, 2008年11月28日, 山梨県南都留郡

(2) 中田裕治, 吉田 誠, 福田清春: 担子菌 *Xylobolus frustulatus* が生産するマンニトール脱水素酵素の解析, 第59回日本木材学会大会, 2009年3月17日, 長野県松本市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名: 吉田 誠

所属研究機関・部局・職名: 東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・特任准教授

研究者番号: 30447510

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし