

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15881

研究課題名(和文)環境ダイレクトに選抜された植物分解酸化還元酵素の解析

研究課題名(英文)Analysis of oxidoreductases directly selected from wood decay environments

研究代表者

堀 千明(Hori, Chiaki)

北海道大学・工学研究院・助教

研究者番号：50722948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究では、植物成分の分解に関わる酵素(セルラーゼ等)について、単離された微生物から一つずつ生化学的解析を進めることで詳細な分子機能が明らかになってきた。しかし、環境下において様々な微生物が存在する場合の植物分解についてはほとんど知見が得られていなかった。そこで、本研究では実際に自然環境下で選抜された酵素について生化学的解析を行い、より効率的な植物分解メカニズムを明らかにできた。このような知見は植物バイオマス成分を分解する糖化技術を効率化することに繋がると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物細胞壁の主要な高分子成分(セルロース・ヘミセルロース・リグニン)の分解酵素については、腐朽木材から単離された菌を試験管内で培養・単離・解析することで検証されてきた。一方で環境中で実際に働いている酵素についての理解は不十分であった。そこで本研究では、これら自然環境下での木材分解酵素を対象として、酵素を生化学的に解析し、多様な微生物が関与する分解酵素の一部を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Molecular functions of enzymes involved in the decomposition of plant components such as cellulases and hemicellulases have been elucidated by using biochemical analyses on enzymes from isolated microorganisms. However, little knowledge has been revealed about plant decomposition by various microorganisms in the natural environment. Therefore, in this study, we try to clarify plant decomposition mechanisms by conducting biochemical analysis on the enzymes in the natural environment.

研究分野：森林化学

キーワード：木材腐朽

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁の主要な高分子成分(セルロース・ヘミセルロース・リグニン)の分解酵素については、腐朽木材から単離された菌を試験管内で培養・単離・解析することで検証されてきた。植物細胞壁の主要な高分子成分(セルロース・ヘミセルロース・リグニン)を分解する酵素(CAZymes)は、セルラーゼ・ヘミセルラーゼなどの糖質加水分解(GH)リグニンなどの芳香化合物の酸化還元酵素(AA)などが単離されており、各々相乗的に働くことが知られていた。そのような酵素の相互作用は、単一なモデル微生物を手掛かりに試験管内で生産される酵素を対象として研究されてきた。しかし実際の環境下では、メタゲノム解析などからも、あらゆる種類の生物種が相互にインタラクションすることによって成り立っていると予測されていたが、技術的な限界があり、実際に働いている酵素がどのような酵素なのか、またその酵素を生産する生物種を詳細に特定することが難しかった。即ち、環境下において様々な微生物が存在する場合の植物分解についてはほとんど知見が得られていないのが現状であった。最近申請者は、自然下3地点の腐朽木(コントルタ松)に対して、メタトランスクリプトーム解析・メタプロテオーム解析を実施し、実際に働いている分解酵素(1391個のCAZymes)を初めて網羅的に同定した(Hori et al. Appl. Environ. Microbiol. 80(20) 2018)。したがって、実際の環境下で働く酵素配列や量が明らかになり、これら情報を基にタンパク質合成を行うことで、生化学的な検証ができる基盤が整った。

2. 研究の目的

申請者が環境条件下での網羅的に同定した木材腐朽で実際に働いている酵素の配列情報を解析すると、相乗的に働くことが知られているセルラーゼ・ヘミセルラーゼが高発現していた。このことから、生物相互作用により選抜された酵素群は木材基質に適応した分解を達成していると考えられた。そこで本研究では、これら自然環境下での木材分解酵素を対象として生化学的に解析することを目標とした。

3. 研究の方法

自然環境下において複数の地点での腐朽木材を回収し、機械的な破砕機で細かい粉末状のサンプルを作成した。得られたサンプルからDNAやRNA、タンパク質を抽出した。抽出したDNAを鋳型にITS配列および16S配列を大規模シーケンサーで網羅的に解析することで、微生物叢を明らかにした。また、得られたRNAについても大規模シーケンサーで解析することで、遺伝子配列および発現量を網羅的に解析した。得られたタンパク質については、LC-MS/MSを用いたプロテオーム解析を行った。また、一連のメタオミクス解析情報の中から木質分解酵素遺伝子の選択を行い、遺伝子合成を行った。これら遺伝子配列を用いて、多サンプルを解析可能な*in vitro*タンパク質合成系を用いて、各酵素において適した*in vitro*発現系を構築した。合成したタンパク質から機能的な発現を行えたものについて、酵素活性を様々な条件下で測定した。

4. 研究成果

本研究では、自然環境下において複数の地点での腐朽木材を回収し、微生物叢や酵素配列および発現量を網羅的に解析する、メタオミクス解析を行った。その結果、木材分解に関わっていることが予想される様々な微生物種由来の遺伝子が同定された。これまでのメタオミクス解析情報と同じく、CAZymes遺伝子と予想される、既知CAZymes遺伝子と相同性の高い配列は約10%に留まり、ほとんどが既知酵素として報告されているのとは類似性が低い配列、すなわち、機能未知の解析されていない配列であった。また、場所や腐朽状態によって微生物叢や分解酵素の種類に違いがあることを観察できた。

また、得られた情報の中からCAZymes遺伝子を幾つか選択し、遺伝子合成を行った。各酵素において、適した*in vitro*発現系を構築するため、まずは真核生物のタンパク質合成に適した小麦胚芽無細胞系を用いて、発現を試みた。しかし十分な酵素量や酵素活性を得ることが難しかった。そこで、これまでに各酵素で報告されていたタンパク質発現量や活性量を高めることが報告されていた補酵素を添加した。さらに、微量活性測定法が報告されているものについては活性測定条件についても検討した。その結果、ダイペルオキシダーゼ(DyP)および可溶性多糖モノオキシゲナーゼ(LPMO)について、機能的発現が実現でき、これらに

ついてハイスループット酵素合成方法を構築することに成功した。得れた調整酵素に、モデル基質に対する酵素特性を解析し、様々な pH や温度条件下での活性を測定した。以上から、実際に自然環境下で選抜された酵素について生化学的解析を行うことで、植物分解メカニズムの詳細を明らかにできた。このような知見は植物バイオマス成分を分解する糖化技術を効率化することに繋がると考えている。

これら成果を元に、論文発表 11 件、学会発表 20 件(うち招待講演 7 件)、特許 1 件を行なった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hori Chiaki, Yu Xiang, Mortimer Jenny C., Sano Ryosuke, Matsumoto Tomoko, Kikuchi Jun, Demura Taku, Ohtani Misato	4. 巻 37
2. 論文標題 Impact of abiotic stress on the regulation of cell wall biosynthesis in Populus trichocarpa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 273 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.0326a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hori Chiaki, Takata Naoki, Lam Pui Ying, Tobimatsu Yuki, Nagano Soichiro, Mortimer Jenny C., Cullen Dan	4. 巻 10
2. 論文標題 Identifying transcription factors that reduce wood recalcitrance and improve enzymatic degradation of xylem cell wall in Populus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78781-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshinari Akira, Hosokawa Takuya, Beier Marcel Paschal, Oshima Keishi, Ogino Yuka, Hori Chiaki, Takasuka Taichi E, Fukao Yoichiro, Fujiwara Toru, Takano Junpei	4. 巻 33
2. 論文標題 Transport-coupled ubiquitination of the borate transporter BOR1 for its boron-dependent degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 420 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koaa020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hori Chiaki, Sugiyama Tomohiro, Watanabe Kodai, Sun Jian, Kamada Yuu, Ooi Toshihiko, Isono Takuya, Satoh Toshifumi, Sato Shin-ichiro, Taguchi Seiichi, Matsumoto Ken'ichiro	4. 巻 179
2. 論文標題 Isolation of poly[d-lactate (LA)-co-3-hydroxybutyrate]-degrading bacteria from soil and characterization of d-LA homo-oligomer degradation by the isolated strains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymer Degradation and Stability	6. 最初と最後の頁 109231 ~ 109231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori Chiaki, Song Ruopu, Matsumoto Kazuki, Matsumoto Ruy, Minkoff Benjamin B., Oita Shuzo, Hara Hideho, Takasuka Taichi E.	4. 巻 86
2. 論文標題 Proteomic characterization of lignocellulolytic enzymes secreted by the insect-associated fungus <i>Daldinia decipiens</i> oita, isolated from a forest in Northern Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e02350-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.02350-19	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori Chiaki, Song Ruopu, Matsumoto Kazuki, Matsumoto Ruy, Minkoff Benjamin B., Oita Shuzo, Hara Hideho, Takasuka Taichi E.	4. 巻 86
2. 論文標題 Proteomic Characterization of Lignocellulolytic Enzymes Secreted by the Insect-Associated Fungus <i>Daldinia decipiens</i> oita, Isolated from a Forest in Northern Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e02350-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.02350-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sudo Maho, Hori Chiaki, Ooi Toshihiko, Mizuno Shoji, Tsuge Takeharu, Matsumoto Ken'ichiro	4. 巻 129
2. 論文標題 Synergy of valine and threonine supplementation on poly(2-hydroxybutyrate-block-3-hydroxybutyrate) synthesis in engineered <i>Escherichia coli</i> expressing chimeric polyhydroxyalkanoate synthase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 302 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.09.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Satoko, Kim Seungill, Wafula Eric K., Tanskanen Jaakko, Kim Yong-Min, Honaas Loren, Yang Zhenzhen, Spallek Thomas, Conn Caitlin E., Ichihashi Yasunori, Cheong Kyeongchae, Cui Songkui, Der Joshua P., Gundlach Heidrun, Jiao Yuannian, Hori Chiaki, et al.	4. 巻 29
2. 論文標題 Genome Sequence of <i>Striga asiatica</i> Provides Insight into the Evolution of Plant Parasitism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3041 ~ 3052.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.07.086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsumoto Ken'ichiro, Saito Juri, Yokoo Toshinori, Hori Chiaki, Nagata Akihiro, Kudoh Yuki, Ooi Toshihiko, Taguchi Seiichi	4. 巻 128
2. 論文標題 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)-mediated de novo synthesis of glycolate-based polyhydroxyalkanoate in Escherichia coli	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 302 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mutuku J. Musembi, Cui Songkui, Hori Chiaki, Takeda Yuri, Tobimatsu Yuki, Nakabayashi Ryo, Mori Tetsuya, Saito Kazuki, Demura Taku, Umezawa Toshiaki, Yoshida Satoko, Shirasu Ken	4. 巻 179
2. 論文標題 The Structural Integrity of Lignin Is Crucial for Resistance against Striga hermonthica Parasitism in Rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1796 ~ 1809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.01133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hori Chiaki, Yoshida Makoto, Igarashi Kiyohiko, Samejima Masahiro	4. 巻 65
2. 論文標題 Origin and Diversity of Wood Decay Fungi Revealed by Genome-Based Analyses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mokuzai Gakkaishi	6. 最初と最後の頁 173 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2488/jwrs.65.173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 堀千明
2. 発表標題 植物バイオマス分解利用に関する基礎研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀千明
2. 発表標題 微生物による木材腐朽の多様性に関するオミクス解析
3. 学会等名 第71回 日本木材学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原悠暉、斎藤樹理、永田暁洋、大潟祥梧、二宮太樹、谷口遼、松本直己、堀千明、大井俊彦、蘆田弘樹、松本謙一郎
2. 発表標題 RuBisCO経路を利用した組換え大腸菌によるポリヒドロキシアルカン酸の合成とRuBisCO評価系への応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤昂希、鈴木裕満、鈴木健吾、酒井杏匠、高須賀太一、堀千明、加藤雅士、志水元亨
2. 発表標題 Aspergillus nidulans由来新規ラムのガラクトツロナンリアーゼの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田美穂、堀千明、大井俊彦、松本謙一郎
2. 発表標題 病原性腐朽菌ベッコウタケ 由来ラッカーゼ と樹木由来生体防御物質との反応
3. 学会等名 糸状菌分子生物学カンファレンス若手の会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀千明
2. 発表標題 微生物による木材腐朽の多様性に関するオミクス解析
3. 学会等名 セルロース学会北海道・東北支部セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Hori C
2. 発表標題 Meta-multi omics analyses of wood decay in nature.
3. 学会等名 Asian Micology Congress 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 堀千明
2. 発表標題 担子菌によるバイオマス分解のメカニズム
3. 学会等名 第33回セルラーゼ研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Hori C
2. 発表標題 Microbial strategy for wood degradation in nature ecosystem
3. 学会等名 International Symposium on Biopolymer Synthesis and Degradation（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 堀千明
2. 発表標題 木材腐朽菌による植物分解の多様性と進化
3. 学会等名 第63回日本菌学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Kubota M, Matsumoto R, Hori C, Ooi T, Matsumoto K
2. 発表標題 Enzymatic mechanism of tolerance to tree defense substrates by the pathogen.
3. 学会等名 Hokkaido University-National Central University Joint Symposium on Material Chemistry and Physics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Matsumoto R, Hori C, Ooi T, Matsumoto K
2. 発表標題 Molecular mechanism of detoxifying plant defense substrates by wood decay fungi.
3. 学会等名 ICBP2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Matsumoto R, Hori C, Ooi T, Matsumoto K
2. 発表標題 Molecular mechanism of detoxifying plant defense substrates by wood pathogens
3. 学会等名 International Symposium on Biopolymer Synthesis and Degradation (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Iwata M, Hori C, Ooi T, Matsumoto K
2. 発表標題 The mechanism of conifer wood degradation by white-rot fungus, <i>Phlebiopsis gigantea</i>
3. 学会等名 International Symposium on Biopolymer Synthesis and Degradation (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Arai S, Iijima M, Hori C, Utsunomia C, Ooi T, Taguchi S, Matsumoto K
2. 発表標題 In vitro analysis of D-lactyl-CoA-polymerizing enzyme in lactate-containing polyhydroxyalkanoates synthesis
3. 学会等名 International Symposium on Biopolymer Synthesis and Degradation (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Hosoe Y, Aoki S, Hori C, Ooi T, Taguchi S, Matsumoto K
2. 発表標題 In vitro evolution of polyester synthase for enhanced production of 2-hydroxybutyrate-containing polymer
3. 学会等名 International Symposium on Biopolymer Synthesis and Degradation (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 梶川彩香、榊原早也果、荒井修造、大井俊彦、堀千明、松本謙一郎
2. 発表標題 新規配列制御型グリコール酸ポリマーの生合成と構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 堀千明
2. 発表標題 植物資源の分解利用へ～メタ環境のオミクス解析・樹木とキノコ（真菌類）の解析
3. 学会等名 超異分野meetup
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松本壘、堀千明、宮本敏澄、重富建吾、佐野雄三、大井俊彦、松本謙一郎
2. 発表標題 生立木が生産する生体防御物質に対する病原性木材腐朽菌の分解メカニズムの解析
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 大瀧祥梧、永田暁洋、齋藤樹理、横尾俊憲、工藤悠希、堀千明、大井俊彦、田口精一、松本謙一郎
2. 発表標題 Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) 反応を経由したグリコール酸ポリマー生合成系とその応用
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 担子菌由来の新規な高機能性リパーゼの利用	発明者 堀 千明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-024557	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Forest Products Laboratory	JGI institute		