

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780183

研究課題名(和文) プロテオミクスによる白色腐朽菌の選択的リグニン分解機構と鍵代謝物生合成系の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the selective lignin degradation mechanism in a white rot fungus and the biosynthetic pathway of its key metabolites through a proteomic approach

研究代表者

渡邊 崇人 (WATANABE, Takahito)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：30362403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispota* は、セルロースを極力壊さずにリグニンを選択的に分解する。その選択的リグニン分解機構を解明する一環として、今回は、リグニン分解フラグメントの1つであるバニリンに対する細胞応答を調べた。蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動を行い、バニリン存在下と非存在下での発現プロファイルを取得した結果、バニリンで発現が誘導される、または、抑制されるタンパク質が見つかった。また、サプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーションによりバニリンで誘導される遺伝子を数多く取得した。

研究成果の概要(英文)：A white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*, can selectively degrade lignin without serious damage to cellulose. In order to elucidate the molecular mechanism of the selective lignin degradation, we tried to investigate the cellular response of *C. subvermispota* to a lignin fragment, vanillin. We obtained expression profiles of *C. subvermispota* in the presence and absence of vanillin through a proteomics-based approach, and detected vanillin-induced and repressed proteins. Using suppression subtractive hybridization, moreover, we also obtained many genes clones that are up-regulated in the presence of vanillin.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：リグニン 白色腐朽菌 脂質関連代謝物 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

木材の成分であるリグニンは、天然の難分解性芳香族化合物である。天然物であることから、当然生物によって分解されるが、リグニンを唯一無機化(二酸化炭素と水にまで分解)できるのは担子菌(キノコ)の一種である白色腐朽菌だけである。しかしながら、白色腐朽菌のリグニン分解機構は、分解に関わっているリグニン分解酵素の構造・機能については詳細な解析がなされているものの、リグニン分解機構の分子レベルでの全容解明は未だ部分的なものであった。

一方、白色腐朽菌の中には、木材の細胞壁多糖であるセルロースを極力壊さずにリグニンを選択的に分解するというユニークな特徴を有しているものが存在している。その代表的な選択的的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispota* については、「なぜセルロースを壊さずにリグニンだけを分解するのか？」その選択的リグニン分解機構が非常に注目されていた。

2. 研究の目的

研究代表者は、先にリグニン分解フラグメントの1つであるバニリン存在下で *C. subvermispota* を培養すると長鎖不飽和脂肪酸の生合成に関わる酵素遺伝子の転写が誘導されるということを発表した [Watanabe, T. et al. (2010) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 215-224]。また、木粉やバニリン存在下では、長鎖の飽和・不飽和脂肪酸の産生量の他に、セルロースの破壊を抑制する新規な脂質関連代謝物 ceriporic acid の産生量も増加することが確認されている。従って、本菌のリグニン分解と脂質代謝系には分子レベルで何らかの因果関係があるものと強く示唆された。しかしながら、脂質代謝に関与する酵素だけでなく、実際、(選択的)リグニン分解時にどのような酵素が誘導的に発現するのか把握できていなかった。そこで、プロテオミクスを始めとするオミクス研究を立ち上げ、本菌の(選択的)リグニン分解に関与する酵素や遺伝子を網羅的に把握し、長鎖脂肪酸や ceriporic acid 等の鍵代謝物の生合成系、そして、最終的には、本菌のリグニン分解機構の分子レベルでの解明に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)バニリン等のリグニン分解フラグメントを添加して培養する際に大量に産生される菌体外多糖(ゼラチン様物質)を菌体から除去し、また、菌体内タンパク質の抽出効率を高めるために、菌体の破碎方法や抽出バッファの組成を最適化する。さらに、抽出後のタンパク質の濃縮や純度を高めるための精製方法を検討する等、菌体外多糖を産生する *C. subvermispota* からの菌体内タンパク質抽出方法を確立する。

(2)抽出した菌体内タンパク質を二次元電気

泳動に供する際の各操作及び諸条件を検討する。具体的には、一次元目の等電点電気泳動(IEF)で使用する Immobiline DryStrip の選択、サンプルの膨潤や添加方法、IEFの条件(フォーカシングの条件)、IEF後の DryStrip の平衡化条件、二次元目のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)の条件等を検討する。(3)一般的な二次元電気泳動の際、ゲル間で泳動のばらつきが発生する。これを回避するために、複数のサンプルを異なる蛍光色素で標識し、一枚のゲルで泳動分離することのできる蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動(Two-dimensional difference gel electrophoresis: 2D-DIGE)をバニリン添加及び非添加の条件で培養した *C. subvermispota* の菌体内タンパク質を用いて試みる。

(4)2D-DIGEによって分離した、特に発現差のあるタンパク質のスポットを切り出し、トリプシン消化(In-gel digestion)後、MALDI-TOF-MSを用いた質量分析を行う。主にMS/MS解析を行い、その後、*C. subvermispota*の全タンパク質のアミノ酸配列を用いたMS/MS解析のデータベース検索を行うことでタンパク質の同定を行う。

(5)*C. subvermispota*をバニリン添加及び非添加で培養し、それぞれからtotal RNAを抽出後、Suppression Subtractive Hybridization(SSH)によりバニリン添加によって転写が誘導される遺伝子を取得する。発現差のある(転写量が上昇する)遺伝子については濃縮を行い、真に発現差のある遺伝子の絞り込みを行う。これにより取得できた全ての遺伝子に対して塩基配列を決定する。決定した配列を本菌のゲノムデータベース等を用いて同源性検索(BLAST解析)し、機能の推定・分類を試みる。

(6)2D-DIGE及びSSHで得られた結果、また、過去に得られた結果や断片的な既知の情報を統合し、さらには、他の担子菌や生物で明らかとなっている代謝経路を参考にして *C. subvermispota* が産生する代謝物の生合成経路の推定を試みる。

4. 研究成果

(1)大量の菌体外多糖が付着した *C. subvermispota* に水と有機溶媒の混合液を用いて洗浄したところ、菌糸体を回収することが可能になった。なお、菌糸体を回収する際は、通常の濾紙よりは、ゼラチン様物質を濾過する際に良く用いられるフィルターの方が回収しやすかった。

菌体内タンパク質を抽出するために菌体破碎を行う際、ペーパータオル等を用いて菌体から水分を除去することが極めて重要であり、抽出効率に大きな影響が出ることが分かった。菌体の破碎については、*C. subvermispota* の場合、液体窒素や海砂による破碎よりもビースを用いた破碎の方が菌体内タンパク質の抽出効率が結果的に高かつ

た。また、破碎の際に用いる抽出バッファーとしては、二次元電気泳動で用いる尿素や界面活性剤等を含む可溶化力の高い膨潤バッファーが最適であった。

今回、基質として与えていたバニリンや培養とともに産生される菌体外多糖等はタンパク質の抽出過程で必ずコンタミネーションし、結果的に二次元電気泳動を妨害する大きな原因となった。そこで、これらの妨害物質を除去するためにアセトンやトリクロロ酢酸を用いてタンパク質の沈殿を介した精製を行ったが、複数市販されている二次元電気泳動用サンプルの精製に最適化された試薬キットを用いた方がタンパク質のロスも少なく良好であった。

以上の一連の操作を確実に行うことによって、菌体外多糖を大量に産生する *C. subvermispora* から菌体内タンパク質を抽出することが可能となった。今回、確立した抽出方法は、菌体外多糖を産生する他の担子菌においても適用できると思われる。

(2) *C. subvermispora* の菌体内タンパク質を二次元電気泳動する際、ヒト、大腸菌、酵母等のモデル生物で使用されている標準的なプロトコールでは、タンパク質の分離が悪く、良好なタンパク質プロファイルを取得できなかった。特に、垂直方向（縦方向）のストリークが多く検出された。また、部分的にタンパク質のスポットがスメアリングしたり、ぼやけた感じになる等不鮮明であった。この原因を鋭意追求した結果、タンパク質の可溶化に問題があることが判明した。そこで、抽出したタンパク質を精製後、DryStrip を膨潤する際に用いる膨潤バッファーに膜タンパク質の可溶化に使用される界面活性剤を加え、また、還元剤の濃度も高めたところ、ストリークの検出が抑えられるようになり、検出されるスポットも鮮明になった。さらに、IEF 後の DryStrip の平衡化バッファーや SDS-PAGE のゲル中の SDS 濃度を高める等もストリークの消失に一定の効果があった。なお、前述したようにタンパク質を抽出する段階、すなわち、菌体を回収し、破碎する段階から可溶化力の高い膨潤バッファーを用いるとタンパク質の抽出効率が高まるだけでなく、二次元電気泳動で検出されるタンパク質のスポットの数も増加した。以上より、*C. subvermispora* の菌体内タンパク質においては、タンパク質の可溶化力の高い状態を保って IEF や SDS-PAGE を行うことが極めて重要であると分かった。

(3) バニリン添加及び非添加でそれぞれ培養して抽出した *C. subvermispora* の菌体内タンパク質を異なる蛍光波長を有する蛍光色素で標識し、その後、混合して二次元電気泳動 (2D-DIGE) を行った。タンパク質を構成するアミノ酸の側鎖に蛍光色素が共有結合する関係でタンパク質の疎水性が上がり、可溶化に問題が生じて、二次元電気泳動に乱れが生じるという懸念があったが、本研究で考

案した可溶化力の高い膨潤バッファーを用いる限り、泳動結果に問題が出ることはなかった。泳動後は、それぞれの蛍光波長でゲルのイメージを取得し、それらのイメージを画像処理ソフト上で着色し、重ね合わせることで各タンパク質スポットがバニリンによって発現が誘導されたか、或いは、抑制されたか、すなわち、発現量の変化を色の違いから視覚的に検出することが容易になった。また、異なる 2 種類のサンプルを同じゲルに泳動することから、別々のゲルに泳動する場合と比べ、ゲル間で発生する泳動のばらつきを完全に排除でき、正確な比較解析ができるようになった。さらに、蛍光色素による標識の方が、銀染色などの染色方法よりも感度が高く、煩雑な染色作業も不要になった。今後、本菌の菌体内タンパク質を用いた 2D-DIGE は、発現差のあるタンパク質の探索において強力な解析法となることは間違いない。

今回、実際に 2D-DIGE によりバニリン添加及び非添加において両者の発現プロファイルが異なり、発現差の異なるタンパク質の存在が明らかとなった。これらの結果は、バニリンが *C. subvermispora* の細胞応答を大きくシフトさせる分子であると言える。

(4) 2D-DIGE により明らかとなった発現差のあるタンパク質のスポットについてさらなる解析を行うためには、そのスポットを切り出す必要がある 2D-DIGE 後のゲルについては、目視でスポットを切り出すことができないため、泳動ゲルをクマシーブリアントブルー (CBB) で染色後、スポットを切り出した。なお、本研究で用いた膨潤バッファーの可溶化力が高いことから DryStrip にタンパク質を多くの上せて二次元電気泳動が可能になった。従って、レーザーを照射し、蛍光を利用して（蛍光染色によって）検出されるタンパク質のスポット数と CBB 染色によって肉眼で見ることのできるスポットの数に大きな差は認められなかった。一般に CBB 染色は、蛍光染色よりも感度が低いが、逆に CBB で染まるタンパク質のスポットであれば、その後に行う MALDI-TOF-MS を用いた質量分析に必要なタンパク質（ペプチド）の量が確保できているという良い判断基準になった。

切り出したタンパク質のスポットに関しては、トリプシン消化を行うが、トリプシンの最適温度で短時間消化するよりは、少し低めの温度で長時間消化した方が後に検出されるペプチドのピークの数が多かった。また、消化後のペプチドサンプルの脱塩後、マトリックスと混合し、MALDI-TOF-MS のターゲットプレート上でサンプルを結晶化させるが、サンプルによって結晶のでき方やその形態が異なる場合があった。今後、良好な結晶を作るためにマトリックスとペプチドの混合を始めとするサンプルの調製法の検討を行う必要性が出てきた。しかしながら、得られたペプチドサンプルを MALDI-TOF-MS

を用いて MS/MS 解析し、その後、*C. subvermispota* の全タンパク質のアミノ酸配列を用いてデータベース検索 (Mascot 検索) することでタンパク質の同定を行うことは十分に可能であった。なお、本菌のような担子菌は、高等な真核微生物に相当するため、Mascot 検索によるタンパク質の同定に関してはタンパク質翻訳後の修飾等を十分に考慮して検索を行うことが重要であった。

以上により、*C. subvermispota* の発現差のあるタンパク質の同定、さらには、今後、本菌のプロテオミクス研究を加速させる必須の方法を確立した。

(5) 前述したように、これまでに *C. subvermispota* においてバニリン添加時の長鎖不飽和脂肪酸の生合成に関わる遺伝子の転写の誘導や脂質関連代謝物の産生量の増加等を明らかとしている。そこで、バニリン添加及び非添加時の本菌の RNA を用いて SSH を行い、バニリン添加によって転写が誘導される遺伝子の取得を試みた。その結果、バニリン添加によって転写が誘導された遺伝子を約 100 個取得することができた。*C. subvermispota* のゲノムデータベース、白色腐朽菌のモデル種である *Phanerochaete chrysosporium* のゲノムデータベース、そして、その他の生物のデータベースを用いて BLAST 解析を行い、機能の推定と分類を行った。その結果、まず、リグニンの代謝については、芳香族化合物の分解に関与する遺伝子、脂質代謝については、脂肪酸生合成系、acyl-CoA の輸送に関与するタンパク質、過酸化脂質の還元を担う酵素遺伝子等が存在した。二次代謝物の生合成については、非リボゾームペプチド合成酵素、チトクローム P450 還元酵素等の遺伝子、また、細胞応答に密接に関係するシグナル伝達系については、カルシニューリン等のタンパク質フォスファターゼやカルモジュリン結合タンパク質等が複数ヒットした。さらに、バニリンの添加によって細胞や DNA の損傷が引き起こされるのか、細胞壁の合成や DNA 修復に関する遺伝子が検出された。当然、全く機能が推定できない本菌固有の遺伝子もあれば、膜、DNA、そして、NAD、FAD、CoA 等補酵素への結合に関する機能ドメインを有している酵素遺伝子も多く存在した。以上の SSH による転写 (RNA) レベルの結果と前述の 2D-DIGE による発現 (タンパク質) レベルの結果を合わせるとバニリンは *C. subvermispota* においてリグニン分解を制御する分子の一つであることが強く示唆された。

(6) 本研究で取得され、機能が推定、或いは、同定できた酵素遺伝子を白色腐朽菌の既知の、或は、推定されている代謝経路に当てはめることを試みた。その結果、例えば、バニリンの代謝においては、*C. subvermispota* においても特にバニリンの分解に関する遺伝子の発現が誘導されていることが強く示唆

された。しかしながら、芳香環の開裂を担うジオキシゲナーゼや *P. chrysosporium* のようにバニリン添加によるマンガンペルオキシダーゼの発現の誘導及びヘム合成系の活性化を示唆する結果には至らなかった。今後のプロテオミクスの研究により一層精査する必要があると思われる。一方、本菌のリグニン分解と密接な関係のある脂肪酸、特に長鎖の脂肪酸の代謝経路については、脂肪酸活性化、生合成、不飽和化の酵素遺伝子の転写 (発現) が誘導され、バニリンによって脂質代謝が活性化していることが明らかとなった。また、長鎖脂肪酸は構造的に本菌の鍵代謝物である ceriporic acid の前駆体であると予想されていることから、ceriporic acid の生合成系も活性化しているものと考えられる。なお、アシル CoA とオキザロ酢酸との縮合から始まると提案されている ceriporic acid の生合成系については、複数の酵素の関与が予想される [Gutierrez, A. et al. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1344-1350]。本研究の 2D-DIGE において検出された発現差のあるタンパク質や SSH で取得したものの機能が推定できなかった遺伝子については、ceriporic acid 生合成酵素や生合成遺伝子である可能性が十分考えられる。

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)

[雑誌論文](計2件)

Watanabe, T., Nishimura, H, Watanabe, T.: Vanillin-induced cellular response in the white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*: Sustainable Humanosphere 9, p. 2 (2013) 査読無
<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/ISSN/1880-6503/>

Fernandez-Fueyo, E., Ruiz-Duenas, F. J., Ferreira, P., Floudas, D., Hibbett, D. S., Canessa, P., Larrondo, L. F., James, T. Y., Seelenfreund, D., Lobos, S., Polanco, R., Tello, M., Honda, Y., Watanabe, T., Watanabe, T., Ryu, J. S., Kubicek, C. P., Schmoll, M., Gaskell, J., Hammel, K. E., St John, F. J., Vanden Wymelenberg, A., Sabat, G., Splinter BonDurant, S., Syed, K., Yadav, J. S., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lavin, J. L., Oguiza, J. A., Perez, G., Pisabarro, A. G., Ramirez, L., Santoyo, F., Master, E., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Lombard, V., Magnuson, J. K., Kues, U., Hori, C., Igarashi, K., Samejima, M., Held, B. W., Barry, K. W., LaButti, K. M., Lapidus, A., Lindquist, E. A., Lucas, S. M., Riley, R., Salamov, A. A., Hoffmeister, D., Schwenk, D., Hadar, Y., Yarden, O., de Vries, R. P., Wiebenga, A., Stenlid, J., Eastwood, D., Grigoriev, I. V., Berka, R. M., Blanchette, R.

A., Kersten, P., Martinez, A. T., Vicuna, R., Cullen, D.: Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispota* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5458-5463 (2012)
査読有
DOI: 10.1073/pnas.1119912109

[学会発表](計4件)

渡邊崇人, 森賢一郎, 木戸彩子, 長谷川隆大, 西村裕志, 本田与一, 渡辺隆司: 選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispota* のバニリンに対する細胞応答. 第13回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2013年11月21日, つくば

渡邊崇人, 森賢一郎, 木戸彩子, 長谷川隆大, 和泉千尋, 津田冴子, 西村裕志, 渡辺隆司: 選択的リグニン分解菌のバニリンに対する細胞応答. 日本農芸化学会2013年度(平成25年度)大会, 2013年3月26日, 仙台

Watanabe, T., Mori, K., Kido, A., Izumi, C., Hasegawa, T., Tsuda, S., Nishimura, H., Honda, Y., Watanabe, T.: Cellular response of a selective lignin-degrading fungus to vanillin. Lignobiotech II Symposium, 2nd Symposium on Biotechnology Applied to Lignocelluloses, Oct. 14-17, 2012, Fukuoka

森賢一郎, 高田理江, 渡邊崇人, 本田与一, 渡辺隆司: 選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispota* のリグニン分解フラグメントに対する転写応答及び代謝物解析. 第62回日本木材学会大会, 2012年3月17日, 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 崇人 (WATANABE, Takahito)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号: 30362403