

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658161

研究課題名(和文) リグニン変換バイオリアクター構築のための白色腐朽菌の菌糸鞘の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of hyphal sheath of white-rot fungus for lignin conversion bioreactor construction

研究代表者

高野 麻理子 (Takano, Mariko)

独立行政法人森林総合研究所・きのこ・微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：10353749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：白色腐朽菌を、リグニン分解酵素の生産条件で培養し、リグニン分解酵素活性と菌糸鞘の分布を組織化学的に解析した。培養後2-3日目に菌糸先端部にリグニン分解酵素反応がペルオキシダーゼ活性染色として認められ、培養3-4日目には菌糸鞘内部でもペルオキシダーゼ活性染色が認められた。ペルオキシダーゼ活性染色を生じた酵素がマンガンペルオキシダーゼ酵素であることを特定し、酵素タンパク質のN末端アミノ酸配列が、マンガンペルオキシダーゼ遺伝子配列と一致することを確認した。以上の結果より、白色腐朽菌の菌糸鞘内部ではマンガンペルオキシダーゼ酵素反応が生じており、リグニン分解バイオリアクターとして機能していることを示した。

研究成果の概要(英文)：White-rot fungus was cultivated in ligninolytic conditions and was histochemically analyzed distribution of lignin-degrading enzyme activity and hyphal sheath. Lignin-degrading enzyme reaction was observed as peroxidase activity staining at hyphal tips after 2-3 days cultivation and was observed to extended in hyphal sheath after 3-4 days of cultivation. It was confirmed that the enzyme, which produced peroxidase activity staining, is manganese peroxidase. N-terminal amino acid sequence of the enzyme protein was consistent with manganese peroxidase gene sequences. These results showed that the manganese peroxidase reaction occurred in hyphal sheath of a white rot fungus, and suggested that hyphal sheath of white-rot fungus functioned as a lignin-degrading bioreactor.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林圏科学 木質科学

キーワード：菌糸鞘 白色腐朽菌 リグニン ペルオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化や化石資源の枯渇問題の解決のため、木質バイオマスの利用が期待されている。リグニンとは木材細胞壁の主要構成成分のひとつであり、セルロースに次ぐ莫大なバイオマス資源である。リグニンの化学構造は、コニフェリルアルコール、シナピルアルコール、*p*-クマリルアルコールからなるフェニルプロパン骨格が、3次元方向にランダムに結合した芳香族高分子であり、難分解性である。白色腐朽菌は木質資源の中でも化学的変換や利用の難しいリグニンを効率的に変換できるため、そのリグニン分解メカニズムの解明が注目されている。白色腐朽菌のリグニン分解酵素として、これまでにリグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ、パーサチルペルオキシダーゼ、ラッカーゼが報告されており、各酵素の構造、遺伝子配列、触媒メカニズムについて詳細な分析が行われてきた。また、リグニンモデル化合物を用いた試験管中の多くの研究により、リグニンの芳香核分子間の様々な結合の開裂機構が明らかにされてきた。しかし、このような研究の進展にも関わらず、リグニン生分解反応において最も重要である樹木細胞壁中の高分子リグニンがいかに低分子化され、分解していくかについては未だに明らかになっていない。樹木細胞壁中のリグニン分解の初期反応を明らかにするには、*in situ* (実際の生体中でリグニンが分解する場所)での反応状況の解明が重要だと考えられるが、これまでの研究では生体から単離された各成分についての分析がなされており、*in situ*での腐朽現場の実態を示す知見は得られていなかった。白色腐朽菌の菌体構造は、菌糸と、菌糸外にある菌糸鞘(hyphal sheath)と呼ばれるゲル状物質との混成体である。菌糸鞘は、以前から菌体外酵素の保持濃縮の場としての重要性が指摘されてきたが、その機能については明らかになっていない。本研究では、白色腐朽菌のリグニン分解における菌糸鞘の機能について分析した。

2. 研究の目的

白色腐朽菌の菌糸鞘(きんししょう)は、菌体外酵素の保持濃縮の場としての重要性が指摘されており、リグニン変換のバイオリアクターとして作用していると考えられる。本研究では、リグニン分解酵素反応における菌糸鞘の機能を解明することを目的とする。リグニン分解酵素は窒素制限培地で二次代謝期に限定して生産される。そこで、リグニン分解条件と非リグニン分解条件とで、菌糸鞘の生成消失過程を顕微鏡観察によって分析比較し、培養条件による菌糸鞘生成への影響を調べる。次に、リグニン分解酵素反応の分布をペルオキシダーゼ活性染色によって可視化し、リグニン分解

酵素反応の分布と菌糸鞘の分布とに相関が認められるか検証する。また、菌糸鞘内のリグニン分解酵素反応に関与する酵素を特定し、その酵素の機能と遺伝子を分析する。これらの分析により、白色腐朽菌のリグニン分解酵素反応における菌糸鞘の機能を解明する。

3. 研究の方法

菌株

白色腐朽菌は森林総合研究所所有の *Phanerochaete crassa* WD1694 株を用いた。

培養

ポテトデキストロース寒天培地で培養した *P. crassa* WD1694 株をコルクボーラーで打ち抜き、リン酸二水素カリウム 600mg/l、リン酸二カリウム 400mg/l、グルコース 10g/l、リン酸水素二アンモニウム 1g/l、硫酸マンガン7水和物 0.5g/l、酵母抽出エキス 100mg/l からなる液体培地 100ml に植菌し、34℃で4日間しんとう培養した後、ホモジナイズして種菌とした。

リグニン分解条件培養として、未晒しクラフトパルプ 250 mg (UKP、蒸留水 50 ml からなるパルプ培地を滅菌し、種菌 10 ml を植菌して 34℃で所定期間しんとう培養した。

非リグニン分解条件培養として、グルコース 1%、リン酸水素二アンモニウム 0.1%、リン酸二水素カリウム 600mg/l、硫酸マンガン7水和物 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/l、酵母抽出エキス 100mg/l からなる液体培地を滅菌し、種菌 10 ml を植菌し、34℃で所定期間しんとう培養した。

ペルオキシダーゼ活性染色

培地試料にペルオキシダーゼ活性染色基質を最終濃度 20% (v/v) になるように添加し、ペルオキシダーゼ活性染色した。青色呈色が生じた後、顕微鏡観察した。

菌糸鞘の染色

菌糸鞘の染色は試料に 20%フロキシシン B 溶液を添加して行った。染色後の試料は水を加えた後、上澄を取り除くことを繰り返し数回洗浄し、顕微鏡観察した。

顕微鏡

顕微鏡観察には、倒立顕微鏡ニコン Eclipse TE2000-U を使用した。

マンガンペルオキシダーゼ酵素活性測定

マンガンペルオキシダーゼ活性は ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin e-6-sulfonic acid) の酸化によって生じる 414nm の吸光度の増加を測定した。酵素活性は ABTS 40mg/l、硫酸マンガン7水和物 2mM、過酸化水素 10 μ M、試料 100 μ l を含む 50mM (pH 3.5) のマロン酸緩衝液中で測

定した。ラッカーゼ活性は、マンガンペルオキシダーゼ活性測定溶液から硫酸マンガノ7水和物と過酸化水素を除いて測定した。ペルオキシダーゼ活性は、マンガンペルオキシダーゼ活性測定溶液から硫酸マンガノ7水和物を除いて測定した。

マンガンペルオキシダーゼのN末端アミノ酸配列の決定

マンガンペルオキシダーゼは既報に従って、*P. crassa* WD1694 株を培養して生産し、イオン交換樹脂(SP-セファロース, GEヘルスケア)に吸着して回収した。マンガンペルオキシダーゼを塩化ナトリウム(0.5M)を含むリン酸緩衝液(10mM, pH6.8)で溶出した後、脱塩し、限外濾過濃縮し等電点電気泳動で精製し、N末端アミノ酸配列の決定に用いた。

遺伝子解析

PCR(polymerase-chain-reaction)によるマンガンペルオキシダーゼ遺伝子のクローニングを行った。*P. chrysosporium* 由来のMnP 遺伝子の既知配列から degenerated primer を作成し、*P. crassa* WD1694 のゲノムからマンガンペルオキシダーゼ遺伝子のクローニングを行った。

4. 研究成果

白色腐朽菌の菌体構造は、菌糸と菌糸外にある菌系鞘と呼ばれるゲル状物質との混成体である。菌系鞘は、以前から菌体外酵素の保持濃縮の場としての重要性が指摘されてきたが、具体的な機能については明らかになっていなかった。本研究は、白色腐朽菌のリグニン分解において、菌系鞘の持つ機能を解明することを目的とする。

はじめに、菌系鞘の生成と培養条件について分析した。リグニン分解条件として、パルプ培地を設定し、白色腐朽菌 *P. crassa* WD1694 株の菌系鞘の生成と分布の状態を位相差顕微鏡とフロキシシンB染色による菌系鞘染色法の併用によって分析した。その結果、菌系鞘は、培養24時間後から培養2日目まで顕著に認められたが、培養3日以降は、染色強度の低下とともに菌系鞘の減少が認められた。対照実験として、非リグニン分解条件を設定し、同様に菌系鞘の生成状態を観察した。非リグニン分解条件下では、リグニン分解条件下より菌体の生育量が多く、菌系鞘の生成量も多かった。いずれの培地でも、菌系鞘は、菌体量の増加が停止した以降は、増加しなかった。パルプ培地では培養後期には菌系鞘の減少が認められた。非リグニン分解条件下では培養期間中、菌系鞘の減少は認められなかった。

次に、菌系鞘の生成とリグニン分解ペルオキシダーゼ反応との相関を調べた。リグニン分解条件として、パルプ培地を設定した。リグニン分解条件下では、培養後2-

3日目に菌糸先端部にペルオキシダーゼ活性染色としてリグニン分解酵素反応が認められ、培養3-4日目には菌系鞘内部でもペルオキシダーゼ活性染色が認められた。また、フロキシシンBによる菌系鞘の染色とペルオキシダーゼ活性染色の二重染色結果より、菌糸と菌系鞘で凝集した菌糸塊内部で菌糸先端から菌糸に沿ったペルオキシダーゼ活性染色の生成が認められた。

これらの結果より、菌系鞘の生成はリグニン分解条件に限定されないが、菌系鞘には分泌されたリグニン分解酵素やその反応を保持する機能のあることが示唆された。

次に、培養液中の菌体外酵素活性を分析した。リグニン分解酵素として知られているマンガンペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、ラッカーゼの各酵素活性を測定した結果、マンガンペルオキシダーゼが主要なリグニン分解酵素として検出された(図1)。

マンガンペルオキシダーゼ酵素の触媒活性について分析した結果、マンガンペルオキシダーゼが、Mn(II)を酸化し、非フェノール性芳香族は酸化できない *Phanerochaete chrysosporium* のマンガンペルオキシダーゼと同じタイプのリグニン分解酵素であることを明らかにした。

P. crassa WD1694 のゲノムから、4種のマンガンペルオキシダーゼ遺伝子部分配列を得た。これらをもとにインバースPCRを繰り返し行い、白色腐朽菌 *Phanerochaete crassa* WD1694 菌のマンガンペルオキシダーゼ遺伝子をクローニングし、配列決定した結果、3組のアレルを含む4ゲノム遺伝子を特定した。これらの *P. crassa* マンガンペルオキシダーゼ遺伝子は、イントロン-エキソン構造分析結果より、*Phanerochaete chrysosporium* 由来のマンガンペルオキシダーゼ遺伝子 *mnp2*, *mnp3* と相関性が高い2つのサブファミリーと、イントロンを5つしか持たない新たなサブファミリーの3グループに分類された。白色腐朽菌由来のマンガンペルオキシダーゼ酵素は *P. chrysosporium* 型のクラシック型と、*Pleurotus eryngii* 型のバーサタイルペルオキシダーゼが知られているが、*P. crassa* 由来のマンガンペルオキシダーゼは、クラシック型のマンガンペルオキシダーゼであることを遺伝子レベルで明らかにした。

精製した *P. crassa* WD1694 由来のマンガンペルオキシダーゼ酵素は、分子量とN末端アミノ酸配列が同一で、等電点が異なる4個のアイソザイムを含んでいた。精製酵素のマンガンペルオキシダーゼ B3 遺伝子配列から推定されたN末端アミノ酸配列と一致したが、その他の *P. crassa* マンガンペルオキシダーゼ遺伝子から推定されたN末端アミノ酸配列とは一致しなかった。これらの結果は、*P. crassa* WD1694 由来の4個

のマンガンペルオキシダーゼアイソザイムが一遺伝子由来であることを示唆していた。

以上の結果より、白色腐朽菌の菌糸鞘内部では、マンガンペルオキシダーゼを主体としたリグニン分解酵素反応が生じることが明らかになった。

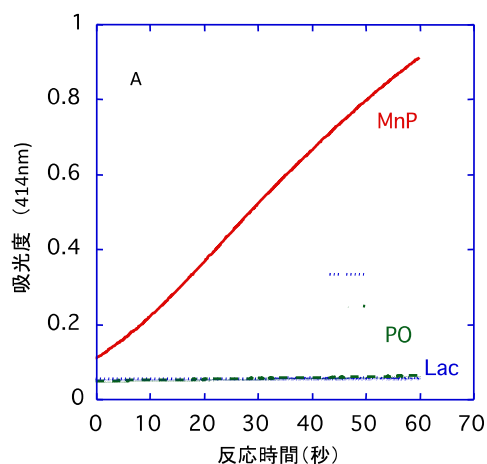


図1 白色腐朽菌の培地中のリグニン分解酵素活性
MnP, マンガンペルオキシダーゼ
PO, ペルオキシダーゼ
Lac, ラッカーゼ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takano M, Yamaguchi M, Sano H, Nakamura M, Shibuya H, Miyazaki Y. Genomic gene encoding manganese peroxidase from a white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694, *Journal of Wood Science*, 査読有、2013、59(2):141-148

〔学会発表〕(計 2 件)

高野麻理子、山口宗義、中村雅哉、白色腐朽菌 *P. crassa* WD1694 菌株の菌体外ペルオキシダーゼ反応の菌糸先端への局在化機構について、第64回日本木材学会大会講演要旨集、2014.3.13、愛媛県県民文化会館ひめぎんホール(松山市)

Takano M, Yamaguchi M, Sano H, Nakamura M, Shibuya H, Miyazaki Y. Cloning and sequencing of manganese peroxidase gene from *Phanerochaete crassa* WD1694, *Lignobiotech II symposium Programme & Abstracts*, 2012.10.15、アクロス福岡(福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 麻理子 (TAKANO, Mariko)
独立行政法人・森林総合研究所
きのこ・微生物研究領域・主任研究員
研究者番号：10353749