

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02252

研究課題名(和文) 褐色腐朽菌由来の全く新しいタイプのセルロース結合ドメインの機能解明とその応用

研究課題名(英文) Characterization and application of a novel cellulose-binding domain from brown rot fungi

研究代表者

吉田 誠 (Yoshida, Makoto)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30447510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：自然界において木材を分解する菌類の一種である褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* が有するセルロース結合ドメイン(CBD)が、これまでに知られているCBDと比較して、10倍以上の吸着効率で天然の結晶性セルロースに特異的に吸着することを明らかにした。このCBDは従来知られているものとは全く異なるメカニズムでセルロースに吸着することも明らかにした。さらに、この新規CBDをセルロース結晶領域の分布様式をモニタリングするツールとして利用することができる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セルロース結合ドメイン(CBD)は、様々なセルロース分解酵素に付加する構造的に独立した領域であり、そのセルロースに吸着する特性から、セルロースの構造的な特性の可視化や植物細胞壁構造の可視化、セルロース材料の改質などに用いることができるポテンシャルを有する。しかしながら、従来のCBDはセルロースへの特異性が低いという欠点を抱えている。本研究では、真菌類の一種が有する新たなCBDの機能解析により、このドメインが極めて高い特異性かつ高い親和性でセルロースに吸着することを見出した。これは、CBDを用いたセルロースの新たな解析法の提案につながると同時に、セルロースの新規改質技術の開発にも寄与する。

研究成果の概要(英文)：The novel cellulose-binding domain (CBD) of the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*, which is one of wood decay fungi in nature, was found to adsorb onto specifically crystalline cellulose with more than 10 times higher adsorption efficiency than previously known CBD. We also found that this novel CBD adsorbed on cellulose through a completely different mechanism with that of the previously known CBD. In addition, we found that this novel CBD could be used as a tool to monitor the distribution pattern of crystal regions in native cellulose.

研究分野：木材腐朽菌学

キーワード：セルロース結合ドメイン 褐色腐朽菌 CBM 溶解性多糖モノオキシゲナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

糸状菌は多様な分解酵素を細胞外に分泌することで、セルロースを分解し、それを栄養源として代謝する。セルロース分解酵素には、しばしば酵素の触媒を担う触媒ドメインに加えて、セルロース結合ドメイン (**Cellulose-Binding Domain: CBD**) と呼ばれる構造的に独立した領域を付加的に保持しており、この **CBD** がセルロースに吸着することでセルラーゼの触媒ドメインをセルロース分子近傍に位置させる機能を有する。**CBD** がセルロース分解酵素に付加する意義については、結晶性セルロースを分解可能な酵素として知られるセロビオヒドロラーゼにおいてよく研究されており、実際に **CBD** を欠損させたセロビオヒドロラーゼは結晶性セルロース分解活性を大きく低下させる一方で、その欠損が非晶性セルロースや可溶性のセロオリゴ糖などの分解活性には影響しないことから明らかな通り、このドメインはセルラーゼがセルロースの結晶領域を分解するために不可欠な因子であることが知られている。**CBD** はその構造的な類似性から、**Carbohydrate-Active enZyme (CAZy)** データベースにおいて多くのファミリーに分類されているが、真菌類由来のセルラーゼに付加する **CBD** はそのほとんどが **Family 1 Carbohydrate-Binding Module (CBM1)** に属する。**CBM1** には共通した構造的特徴が見られ、3つの芳香族アミノ酸が直線的に平面上に配列することで疎水面を形成し、それによってセルロースマイクロフィブリルの疎水面に吸着する。しかし、このような結合メカニズムは、セルロースの結晶領域だけではなくセルロースの非晶領域への結合を導く上に、リグニンなどセルロース以外の疎水性高分子への吸着をも引き起こす。

ところがごく最近、研究代表者のグループの研究において、木材腐朽菌類の一種である褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* が分泌する酸化的にセルロースを低分子化する酵素である溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (**LPMO**) の **C** 末端に機能未知ドメインが存在することを見出し、その付加ドメインを詳細に生化学的に解析したところ、この付加領域が天然の結晶性セルロースのみに特異的に結合する **CBD** である可能性が見出された。このドメインのアミノ酸配列は既知のセルロース結合ドメインには相同性を示さないこと、そして、従来のセルロース結合ドメインでは類を見ない極めて特異性の高い結晶性セルロースへの吸着能を呈することは、この新規 **CBD** が既知のものとは全く異なるメカニズムでセルロースに結合することを意味しており、すなわち、セルロースマイクロフィブリルの疎水面の認識ではない、何らかの新しい結合メカニズムが存在していることを強く示唆する。したがって、この非特異的な吸着がほとんど生じない新規のセルロース結合ドメインを利用することで、これまでに不可能であったセルロース結合ドメインを用いたセルロース結晶領域の可視化が可能となり、それによりセルロースマイクロフィブリルにおける結晶領域の分布などに関する情報をモニタリングすることが可能となるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」で記述した通り、褐色腐朽菌 *G. trabeum* が生産する **LPMO** の **C** 末端機能未知ドメインは、天然のセルロースの結晶領域のみに吸着するこれまでに類を見ない新しい特徴を有する **CBD** であることが明らかとなりつつある。そこで本研究では、この新規の **CBD** を **GtCBD** と名付け、この新規セルロース結合ドメインにおける結晶性セルロースへの吸着特性を明らかにするとともに、その吸着メカニズムに関する情報を得ることを目指した。さらに、セルロースの結晶領域の分布といったセルロースマイクロフィブリルにおける重要な特性をモニタリングするツールとして **GtCBD** を用いることができるのではないかとこの着想を得て、その利用の可能性を探ることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) セルロース結晶領域への吸着特性の調査

酵母菌 *Pichia pastoris* を用いた異種宿主発現系を利用して **GtCBD** を赤色蛍光タンパク質 (**RFP**) との融合タンパク質として生産させ、精製したのち、この精製融合タンパク質を用いて種々のセルロースへの吸着特性を調査した。**GtCBD** の特性を比較する対象として、これまでに最も研究されている **CBM1** の一つである真菌類 *Trichoderma reesei* 由来のセロビオヒドロラーゼ **I** に付加するセルロース結合ドメインを **RFP** に融合させたものを用いた。具体的には、これら融合タンパク質と各種セルロースを混合し、一定時間おいた後、遠心分離によりセルロースを沈殿させ、上清の **RFP** が発する蛍光を測定することで、セルロースへの吸着能を定量した。

### (2) セルロース結合メカニズムの調査

**GtCBD** のセルロース結合メカニズムを明らかにするためにはその立体構造の情報が有用であると考え、本ドメインの三次元構造解析を試みた。本研究では、立体構造解析として、組換え **GtCBD** の **X** 線結晶構造解析を試みた。また、**GtCBD** は分子量が比較的小さいことを考慮し、**NMR** による立体構造解析も試みた。さらに、ゲノム情報を利用した相同性検索を行い、**GtCBD** と相同性を示す配列を見出し、そこで見出された相同アミノ酸配列と **GtCBD** のアミノ酸配列を用いてマルチプルアラインメント解析を実施し、**GtCBD** に保存されているアミノ酸残基を特定した。特定された保存性の高いアミノ酸残基をアラニンに置換する点変異導入を行い、それにより得られた組換え **GtCBD** 変異体のセルロースへの結合性を (1) で実施した事項と同様にして調査することで、それぞれの保存されたアミノ酸残基のセルロース結合への関与を明らかにす

ることを試みた。

### (3) GtCBD を利用したセルロース結晶領域の可視化の試み

酵母菌 *Pichia pastoris* を用いた異種宿主発現系を利用して生産した RFP-GtCBD 融合タンパク質を用いて、種々のセルロースに吸着させ、これを蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。また、**Calcofluor White** を用いた染色も行なった。比較として、緑色蛍光タンパク質 (**GFP**) と **CBM1** との融合タンパク質を、さらに、ネガティブコントロールとして、**RFP** のみで成り立つ組換え体を用いて、同様に調査した。

## 4. 研究成果

### (1) セルロース結晶領域への吸着特性の調査

これまでの研究において、**GtCBD** は天然のセルロースであるセルロース **I**、**I** に結合するものの、セルロース **III<sub>1</sub>** などの人工的に処理したセルロースには吸着しないこと、また、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどの水溶性のセルロース誘導体および各種ヘミセルロースやペクチンなどにも吸着しないことが明らかとなっている。ここでは、その吸着の結合パラメーターからそれぞれのセルロース基質に対する吸着能を定量化することを試みた。その結果、**GtCBD** のセルロース **I**、**I** に対する吸着効率は従来よく研究されてきた **CBM1** と比較して、**10** 倍程度も高いことが明らかとなった。特に、最大吸着量については **CBM1** と比較して、その差異は顕著なものではなかったが、親和性については **GtCBD** が極めて高いことが明らかとなった。

### (2) セルロース結合メカニズムの調査

本研究では、**GtCBD** がセルロースに対して極めて高い親和性と特異性を有することから、その結合メカニズムを明らかにするため、立体構造解析を試みた。**X** 線結晶構造解析を実施するために、組換え **GtCBD** を単一ドメインとして発現させることに成功したことから、それを用いて結晶の調整を試みたが、明確な回折像を得ることはできなかった。また、**GtCBD** が **LPMO** の付加ドメインであることを考慮して、**LPMO** をインタクトな状態で結晶化し、それを用いて **X** 線構造解析を実施することを試みた。しかしながら、これについても、明確な回折像を得ることはできなかった。一方、**GtCBD** が **NMR** による構造解析に十分な分子量であることを考慮して、**NMR** を用いた構造解析を実施したが、これについても、立体構造を明らかにすることはできなかった。

そこで、生化学的な解析から構造的特徴を明らかにするため、点変異導入による変異体を利用して、セルロース吸着に關与するアミノ酸残基の特定を試みた。具体的には、ゲノム情報を利用した相同性検索を実施して、**GtCBD** と相同性を示す配列を見出し、それらを対象としたマルチプルアラインメント解析により **GtCBD** に保存されているアミノ酸残基を特定した。**11** 残基の保存されたアミノ酸残基を対象として、それぞれアラニンに置換した組換え **GtCBD** 変異体を遺伝子工学的に作出し、セルロースへの吸着特性を調査した。その結果、4 つのシステインに変異導入したものについては、それぞれ結合性が大きく低下した。三次元構造モデリングの結果から、**GtCBD** は2つのアルファヘリックスからなることが予測され、それら2つのアルファヘリックスに、2つずつシステインが含まれること、また、アルファヘリックスが並列に配列した際に、それらのシステインがそれぞれ向かい合う位置で配置することが予測されたことから(図1)、このドメインは2つのアルファヘリックスが2つのジスルフィド結合で結合した構造であることが示唆された。さらに、複数の芳香族アミノ酸残基および酸性アミノ酸残基、塩基性アミノ酸残基をアラニンに置換した際にそれぞれ結合能力の低下が観察されたことから、本ドメインの天然セルロースへの吸着やセルロースの認識には、多様な化学的相互作用が存在していることが明らかとなった。

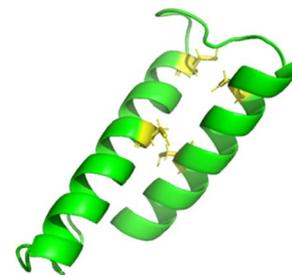


図1 GtCBD の予測構造  
黄色残基：システイン

### (3) GtCBD を利用したセルロース結晶領域の可視化の試み

これまでの研究により、**GtCBD** が天然のセルロースを特異的に認識し、さらに極めて高い親和性をもって吸着することが明らかになった。そこでここでは、**GtCBD** を利用してセルロースの結晶領域を可視化することを目指した。具体的には、RFP-GtCBD 融合タンパク質を用いて、種々のセルロースに吸着させ、これを蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。さらに、従来よく研究されてきた **CBD** である **CBM1** についても吸着挙動を可視化するため、**RFP** とは異なる蛍光タンパク質として **GFP** を用いて、これを **CBM1** と融合させたタンパク質を組換え体として発現させ、これを用いて **RFP-GtCBD** と同様の試験を行い、両者の結果を比較することで、セルロースにおける結晶領域を可視化することを試みた。その結果、**RFP** のみで成り立つ組換え体では、蛍光は全く観察されなかった。一方で、**GtCBD** では **RFP** に起因する蛍光が、**CBM1** については **GFP** に起因する蛍光がそれぞれ観察された。それぞれのサン

ルを **Calcofluor White** で染色し、それぞれの組換えタンパク質の蛍光挙動と重ね合わせた結果、**GtCBD** は疎水面のみならず親水面においても吸着する可能性が見出された。すなわち、**CBM1** はセルロースマイクロフィブリルの疎水面に吸着することがよく知られているが、この結果は、**GtCBD** が **CBM1** とは異なるセルロースマイクロフィブリルの領域に結合することを明確に示している。**GtCBD** のセルロース認識性については今後さらなる研究が必要であるものの、**GtCBD** は **CBM1** とは異なるセルロース結晶領域の認識メカニズムを有することは明らかであり、したがって、セルロースの結晶領域の可視化や新たなセルロースの改質のツールとして有用である可能性が強く示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshiaki Tamaru, Makoto Yoshida, Lindsay D Eltis, Barry Goodell	4. 巻 128
2. 論文標題 Multiple iron reduction by methoxylated phenolic lignin structures and the generation of reactive oxygen species by lignocellulose surfaces	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 340-346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.149	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 近藤 里沙子, 堀川 祥生, 半 智史, 安藤 恵介, 吉田 誠	4. 巻 45
2. 論文標題 Polyporalesに属する木材腐朽菌により腐朽された材のX線回折法およびフーリエ変換赤外分光法による分析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 木材保存	6. 最初と最後の頁 268-279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5990/jwpa.45.268	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 Yuka Kojima, Aniko Vernai, Vincent G. H. Eijsink, Makoto Yoshida	4. 巻 32
2. 論文標題 The Role of Lytic Polysaccharide Monoxygenases in Wood Rotting Basidiomycetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E135-E143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.2020.7E	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 Yuan Zhu, Nayomi Plaza, Yuka Kojima, Makoto Yoshida, Jiwei Zhang, Jody Jellison, Sai Venkatesh Pingali, Hugh O' Neill, and Barry Goodell	4. 巻 11
2. 論文標題 Nanostructural Analysis of Enzymatic and Non-enzymatic Brown Rot Fungal Deconstruction of the Lignocellulose Cell Wall	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.01389	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 Kiwamu Umezawa, Mai Niikura, Yuka Kojima, Barry Goodell, Makoto Yoshida	4. 巻 15
2. 論文標題 Transcriptome analysis of the brown rot fungus <i>Gloeophyllum trabeum</i> during lignocellulose degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0243984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0243984	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

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 近藤里沙子、安藤恵介、半 智史、堀川祥生、吉田 誠
2. 発表標題 異なる分岐群に属する褐色腐朽菌における腐朽様式の比較解析
3. 学会等名 日本木材保存協会第34回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小嶋由香、吉田誠、砂川直輝、五十嵐圭日子
2. 発表標題 結晶性セルロースに特異的に結合する新規セルロース結合モジュールの機能解析
3. 学会等名 セルラーゼ研究会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小嶋由香、吉田誠、砂川直輝、五十嵐圭日子
2. 発表標題 褐色腐朽菌 <i>Gloeophyllum trabeum</i> 由来の新規結晶性セルロース結合モジュールの機能解析
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤里沙子、堀川祥生、半 智史、安藤恵介、吉田 誠
2. 発表標題 異なる進化系統群に属する褐色腐朽菌を対象とした木材分解様式の比較解析
3. 学会等名 日本木材保存協会第35回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小嶋由香、吉田 誠、砂川直輝、五十嵐圭日子
2. 発表標題 新規結晶性セルロース結合モジュールを用いたセルロース結晶領域の蛍光標識
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会(鳥取大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木萌里、小嶋由香、吉田 誠、和田 昌久
2. 発表標題 褐色腐朽菌Gloeophyllum trabeumにおいて見出された新規セルロース結合ドメインの点変異導入解析
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会(東京大会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小嶋由香、田川聡美、吉田誠、砂川直輝、五十嵐圭日子
2. 発表標題 新規結晶性セルロース結合モジュールの機能解析およびセルロース評価への応用
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会(東京大会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 築田理華子、堀川祥生、吉田誠
2. 発表標題 褐色腐朽菌Gloeophyllum trabeum由来GH10キシラナーゼに付加するセルロース結合ドメインの役割
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会(東京大会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木萌里、小嶋由香、田川聡美、吉田誠、五十嵐圭日子、砂川直輝、和田昌久
2. 発表標題 褐色腐朽菌Gloeophyllum trabeum 由来新規セルロース結合ドメインのセルロース結合メカニズムに関する研究
3. 学会等名 日本木材保存協会第37回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 築田理華子、堀川祥生、吉田誠
2. 発表標題 褐色腐朽菌Gloeophyllum trabeum由来GH10キシラナーゼに付加するセルロース結合ドメインの生理的意義に関する研究
3. 学会等名 日本木材保存協会第37回年次大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担 者	五十嵐 圭日子	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授	
	(Igarashi Kiyohiko)		
	(80345181)	(12601)	

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			
ノルウェー	Norwegian University of Life Sciences			
米国	University of Massachusetts			