

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06161

研究課題名(和文) 白色腐朽菌による低分子芳香族化合物の資化と生合成

研究課題名(英文) Mineralization and biosynthesis of aromatic compounds by white rot fungi

研究代表者

重富 顕吾 (Shigetomi, Kengo)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：20547202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：きのこの一種である白色腐朽菌は、木材を構成する芳香族系高分子「リグニン」を完全分解する唯一の生物である。このため時に白色腐朽菌はリグニンを「食べる(=資化する)」と形容されることもあるが、実際にこれらがリグニンを食べるのは明らかにされていなかった。本研究では白色腐朽菌が、自身の生産する低分子芳香族化合物であるベラトリルアルコールをムコン酸類に変換することで資化できることを明らかにした。このことは、リグニンについても同様にムコン酸を経ることでその一部を「食べる」ことが出来ることを示唆するものである。また、ムコン酸の形成過程は従来知られていた細菌類とは異なる経路であることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白色腐朽菌の持つ「リグニン分解」という作用はエネルギー収支の観点から、不合理なものであることが指摘されていた(Leisolaら, 2012)。即ちリグニンを分解するためには等量のグルコースが必要であるため、「糖をエネルギー源として獲得するためにリグニンを分解する」という従来の捉え方は辻褄が合わないというものである。本研究の結果は、白色腐朽菌が低分子化したリグニンをもエネルギー源とできることを示唆した。この結果は白色腐朽菌のエネルギーの取り回しについて明らかにしたという点で学術的な意義があるのみではなく、きのこの育種における基礎的な知見を与えたという点で社会的意義の大きなものである。

研究成果の概要(英文)：White rot fungi, a kind of mushroom, are the only organisms that completely degrade lignin, the aromatic polymer that constitutes wood. For this reason, white rot fungi are sometimes described as lignin "eaters" (i.e., mineralizers), but it is not clear whether they actually eat lignin. In this study, we found that white rot fungi can mineralize veratryl alcohol, a low-molecular-weight aromatic compound that they produce, by converting it into muconic acids. This suggests that lignin can also be partially "eaten" through the same process. It was also suggested that the formation process of muconic acid is different from that of bacteria, which have been known previously.

研究分野：木材化学

キーワード：ムコン酸 ベラトリルアルコール 白色腐朽菌 カテコールジオキシゲナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

リグニンセルロースに次いで地球上に最も豊富に存在するバイオマスである。現状その殆どは燃料 (fuel) として利用されているが、豊富な資源量から、例えば fertilizer、feed、fiber、food といった、より高位な利用法の確立が望まれる。リグニンの複雑でヘテロな高分子構造は、これを達成するための大きな障壁となっているが、白色腐朽菌 (White-rot fungi, 以下 WRF) の持つリグニン分解システムは、この複雑系を解決する重要な鍵である。最も単純明瞭な戦略は「リグニンのみを培養基質として、きのこの一種である WRF を育種する (food/feed)、もしくは生理活性物質を生産させる (fertilizer/food)」というものである。しかしながら、WRF はリグニンを「分解する」能力を持つにも関わらず、なぜかリグニンを単一炭素源として生育できない。この問題は、2012 年 Matti Leisola によって “The Lignin Enigma” として指摘されており、今なおその原因は詳らかにされていない。一方、例えば *Pseudomonas* 属や *Rhodococcus* 属などの一部の細菌類は、ベンゼンやトルエンといった低分子芳香族化合物 (Low-Molecular weight-Aromatic Compounds, 以下 LMACs) を資化し、さらにそれらを単一炭素源としても生育できる。WRF がリグニンの分解者である以上、同様の代謝系を備えて LMACs を資化できた方が効率的であるが、WRF がリグニンを単一炭素源として生育できないことは、この資化系を持たないか、一部に問題があることを示唆している。関連する研究として唯一 Kirk らの  $^{14}\text{C}$ -ラベル化リグニンを用いた報告が存在したが、この研究においても発生した  $^{14}\text{CO}_2$  がリグニンの資化によるものなのか、酸化的な培養環境で自発的に生じたかものかは議論されていない。このように WRF が LMACs を「食べる」のかという根源的な謎は解明されていなかった。また、WRF はリグニン分解の際に、自身で芳香族化合物である veratryl alcohol を生産する。この、「リグニンを分解する際に自身で芳香族化合物を産生する」という生理機構は、芳香族化合物の生合成エネルギーコストの点からも、極めて奇妙なものであるが、これに対する合理的な説明は存在しなかった。

### <引用文献>

Leisola *et al.*, *Bio-complexity*, **2012**, 1–11 (2012); Kirk *et al.*, *Arch. Microbiol.*, **117**, 277–285 (1978)

## 2. 研究の目的

前記を背景として、研究代表者は「WRF を介したリグニンの高度利用」に向けては、まず WRF における低分子芳香族化合物の「入」と「出」について基礎的な知見を得ることが不可欠であると考えた。このため、第 1 の課題として「WRF がリグニン分解物である低分子芳香族化合物をエネルギー源として利用 (資化) できるか」、第 2 の課題として「WRF が産生する veratryl alcohol (VA) はいかに生合成されているか」を明らかにすることを目的とした。なお、veratryl alcohol の生合成についてはその前駆物質として L-phenylalanine が提唱されていたことから、これに基づき生合成経路の解明を行うことを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) WRF による LMACs 資化性の検証

資化性の直接的な検証を行うため、低分子芳香族化合物を単一炭素源とした WRF の生育について評価した。被験菌として *Pleurotus eryngii* NBRC32798 株、*Pleurotus ostreatus* NBRC30776 株ならびにゲノム解読済みの *Trametes versicolor* ATCC42462 株、*Phanerochaete chrysosporium* ATCC20696 株を用いた。また、投与する炭素源として guaiacol、benzoic acid、vanillic acid、veratryl alcohol ならびに細菌類における芳香族解裂物質である *cis,cis*-muconic acid を用いた。これらを、最少ミネラルを含む培地に 5 日間おき 6 回にわけて 3.0 g/L となるように投与した。なお、播種する菌体量は ATP 量を定量する BacTiter によって調整した。培養後の菌体を Yatalase、KOH 水で順次処理し、hexane 抽出を行った。得られた hexane 抽出物を GC-MS で分析し、cholesterol を内部標準物質する ergosterol 量として生育量を評価した。

同時に、細菌類における芳香族解裂の鍵酵素、catechol-1,2-dioxygenase (C12O) ならびに catechol-2,3-dioxygenase (C23O) が WRF にも存在するかを検証するため、BLAST を用いて当該遺伝子の探索を行った。さらに類似遺伝子が複数認められた *Trametes versicolor* ATCC42462 株について各種プライマーの設計を行いリアルタイム PCR による発現解析を行った。

### (2) WRF による veratryl alcohol 生合成機構の解明

VA の前駆物質として提唱されていた L-phenylalanine を WRF 無細胞抽出物に投与して生成物を LC-MS で観察することを企図し、L-phenylalanine の重水素ラベル化を行った (Wang *et al.*)。参照のため L-tyrosine についても同様に重水素化を行った。

VA 産生誘導培地とされる LowN-Kirk 培地、LowN/LowC-Kirk 培地、ならびに近年 LiP の産生刺激培地として発表された MidN-Kirk 培地を調製し、それぞれにおける VA 産生量と VA 産生時期について検討した。VA 量は培養液の EtOAc 抽出物を GC-MS で分析することにより定量した。L-Phenylalanine 前後の関連遺伝子について解析を行うため、phenylalanine 上流のアロゲン酸デヒドラターゼ (ADT) ならびに下流のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) を *P. chrysosporium* ATCC20696 株を対象に BLAST 検索した。見出した配列から遺伝子配列を推定し、プライマーの設計、PCR による選抜、RT-PCR に向けたコンストラクト調製を行った。鋳型として VA 産生期前後の *P. chrysosporium* から得た cDNA を用いた。発現量の評価においては、予備的な手法としてアガロース電気泳動のバンドによる半定量的な評価を用いた。また、mRNA の網羅的な発現比較を行うため、同じく VA 産生期前後の mRNA を取得し、RNAseq による解析を行った。

<引用文献>

Wang *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem.* **78**, 1129-1134 (2014). Huang *et al.*, *Pedosphere* **30**, 285-292 (2020)

4. 研究成果

(1) WRF による LMACs 資化性の検証

被験菌に対して guaiacol, benzoic acid, vanillic acid, veratryl alcohol(VA), *cis,cis*-muconic acid を単一炭素源として投与し、その生育を評価した。当初、炭素源を培養初日から全量投与していたが、フェノール性の guaiacol, vanillic acid においては液体培地の褐変がみられるのみで生育が見られなかったため、投与は複数回に分けて行うこととした。しかしながら、この条件においてもこれらの化合物、ならびに benzoic acid 条件における生育は認められなかった。一方、VA 条件 (図 1, ■) ならびに *cis,cis*-muconic acid 条件 (■) においては炭素源無し条件 (□) に比べて *P. eringii* を除く 3 菌株で有意な生育が見られた。培地の褐変は、培地中に分泌されるラッカーゼやマンガンペルオキシダーゼによるフェノキシドの酸化が原因だと考えられた。

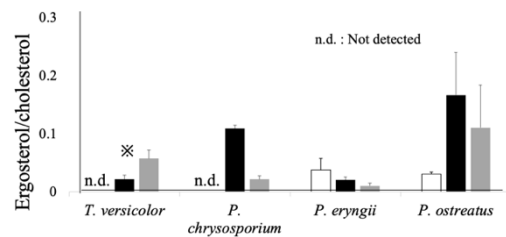


図 1. 単一炭素源投与における各菌の生育量

次いで、ゲノム解読済みである *T.*

*versicolor* ATCC42462 株、*P. chrysosporium* ATCC20696 株を中心に、バクテリアの環開裂酵素である C120 と C230 遺伝子の探索を行った。その結果、いずれの菌株においても C230 に相当する遺伝子を見出すことはできず、一部の菌株では C120 に類似する遺伝子が存在した。特に *T. versicolor* においては aromatic compounds dioxygenase にアノテーション出来る 3 つの遺伝子 (XP\_008034211、XP\_008036115、XP\_008035458) を発見した。それぞれの *T. pubescebs* 当該遺伝子に対する identity はそれぞれ 98,46,82% であった。また、バクテリアの C120 と比較して活性部位に必要とされる Y, W, H 残基はいずれも保存されていた。一部のアミノ酸配列を図 2 に示す。一方で、*P. chrysosporium* においては類似する配列が認められたものの、一部配列の欠落や重要アミノ酸の L や S への置換が認められた。

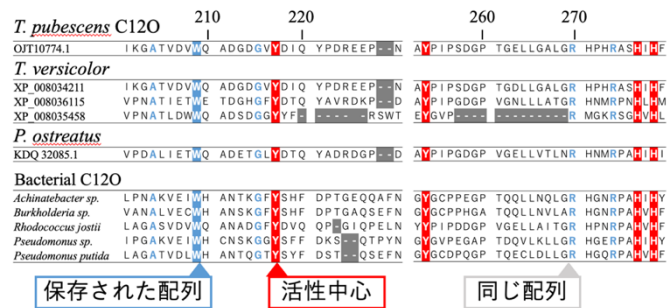


図 2. 各 C120 の部分アミノ酸配列

*T. pubescens* 当該遺伝子に対する identity はそれぞれ 98,46,82% であった。また、バクテリアの C120 と比較して活性部位に必要とされる Y, W, H 残基はいずれも保存されていた。一部のアミノ酸配列を図 2 に示す。一方で、*P. chrysosporium* においては類似する配列が認められたものの、一部配列の欠落や重要アミノ酸の L や S への置換が認められた。

C120 の存在が示唆された *T. versicolor* について、それぞれの発現解析を行った。このうち、適切なプライマーが設計できた XP\_008034211、XP\_008036115 の結果についてのみ述べる。内在性コントロールとして  $\alpha 1$ -tublin ならびに  $\alpha 2$ -tublin を用い、 $\Delta\Delta Ct$  法にて比較定量を行った。*T. versicolor* を脱脂トドマツチップを含む PD 培地ならびに含まない培地で 30 日間培養した後、mRNA 抽出と cDNA 合成を経て、realtime-PCR を行った。結果はいずれの tublin を対象にしても同様であった。図 3 に  $\alpha 2$ -tublin をコントロールとした結果を示す。トドマツ添加条件では LiP の  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  値が 52 程度であったのに対し、推定 C120 遺伝子の値は顕著ではなかった。即ち、LiP が発現するような "lignolytic" な条件においてもこ

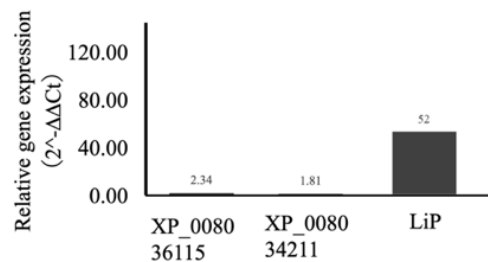


図 3.  $\alpha 2$ -tublin を内在性コントロールとした発現量

れら推定 C12O 遺伝子は同調して発現誘導されていなかった。同様に RNAseq による発現解析も行った。この解析においては DEG (differently expressed genes) の有意性が低かったものの、Lac が 1 位ランク (=発現刺激を受けている) にあった結果の中で、上記 2 遺伝子のランクは非常に低かった。

以上の結果をまとめると、1) WRF はムコン酸ならびに非フェノール性化合物である VA を資化できる; 2) フェノール性化合物は資化できず、菌体外で酸化反応を受けるのみである; 3) C23O 遺伝子は WRF に認められず、C12O 遺伝子は一部の WRF 中に存在するが、少なくともその発現はリグニン分解とは同調しない、ということになる。VA は LiP (リグニンペルオキシダーゼ) 酸化により、そのおよそ 19% がムコン酸類縁体に変換されることが知られている

(図4)。このことから、VA は一部がムコン酸類へ変換され、それを WRF が資化したと考えるのが妥当であろう。LiP は非フェノール性化合物の酸化は得意な一方、フェノール性化合物によって阻害を受ける。これはフェノール性化合物が資化されなかった結果と一致する。さらに、benzoic acid が資化されなかったことは、LiP が無置換 or 一置換ベンゼンの酸化還元電位 (ORP) に及ばないことに付合する (図4)。また、ムコン酸の形成はあくまでバクテリア型(C12O 依存)ではなく、LiP 酸化によるものだと推定される。

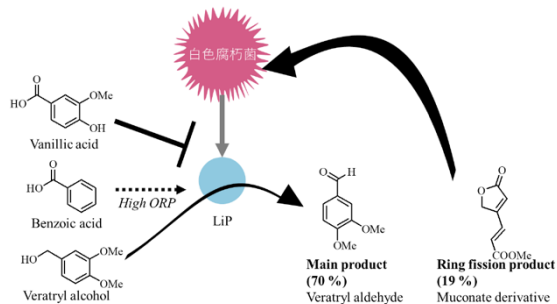


図4. 予想される WRF による VA 資化機構

VA の資化を元にした議論にはなってしまうが、天然のリグニンの 90% は非フェノール性の構造とされる。これを LiP によって酸化分解すればムコン酸類は生じ得るため、WRF はこの文脈ではリグニンを「食べる」ことができると予想される。なお、VA は次の項目で述べる通り、WRF 自身の代謝産物である。今回の実験は必ずしも WRF が VA を「環境中でも」資化していることを意味するものではない。これは今回の培養がバイアル瓶という閉鎖系で行ったために観察された結果であって、VA が拡散できる環境中では条件が異なることを付言する。

## (2) WRF による veratryl alcohol 生合成機構の解明

Veratryl alcohol (VA) の生合成経路を解明する目的で、その前駆物質とされる L-phenylalanine の芳香環重水素化を行った。また、L-tyrosine についても芳香環重水素化を行い、それぞれ 1 分子あたり 2-4 個の重水素が導入された試料 1-2 g 程度を調製済みである。これらを投与し中間体を捉える実験は現在進行中である。

本課題の中では、とりわけ VA の生合成が 1) 予め貯蔵された L-phenylalanine から合成されるか、2) さらに上流のシキミ酸合成から開始しているのか、を明らかにすることを中心課題に据えた。これは、シキミ酸経路 (=芳香環の形成) というエネルギー消費の激しい経路が栄養欠乏時に刺激されると仮定すると、不合理だと考えたためである。この目的のために、L-phenylalanine を合成する ADT と、L-phenylalanine を PAL の VA 産生期における発現量を定量することとした。まず *P. chrysosporium* ATCC20696 株について VA 産生期の同定を行った。VA 産生は LowN-Kirk 培地や LowN/LowC-Kirk で誘導されることが知られていたが、近年 LiP の産生刺激培地として発表された MidN-Kirk 培地についても検討した。その結果、MidN-Kirk 培地を用いた培養の 6 日目まで最大量 2.0 mM が確認された。次いで *P. chrysosporium* について *pal* ならびに *adt* 遺伝子の探索を行った。その結果、それぞれ shotgun sequence の contig-15 ならびに contig-3 に類似配列を発見した。このうちイントロンについては GeneScan を用いて予想し、推定 mRNA を構築した。標的配列を元に、プロダクトサイズが 100-150 bp となるようにプライマーを複数設計し、適当なプライマーの選抜を行った。その結果、*pal* については product size 133 bp のプライマーセット、*adt* 遺伝子については product size 149 bp のプライマーセットが適切な増幅産物を与えることが確認された。さらに、それぞれの配列を確認するため、TA-cloning により T-vector (pTAC-2) のコンストラクトを調製し、M13 プライマーを用いてシーケンスを行った。シーケンス結果は意図した配列が増幅されたことを示し、*adt* 遺伝子についてはエキソンジャンクションにプライマーを設計したため介在するイントロンの位置を同定できた。VA 産生期の菌体から調製した cDNA を鋳型として、それぞれ PCR と続くアガロースゲル電気泳動に供したところ、いずれの遺伝子も VA 産生期に入ってバンドの密度が上昇した (図5)。これは半定量的な結果ではあるが、VA 産生は L-phenylalanine から産生されていると仮定するならば、その産生は「上流のシキミ酸合成から開始している」ということを示す。

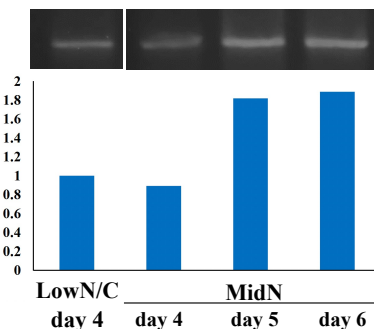


図5. ゲルバンド密度による *adt* 発現量の比較



同時に RNAseq による発現比較も検討した。LowN/LowC-Kirk で4日間培養した菌体から得た total RNA を参照として、MidN-Kirk 培地の VA 産生期 4, 5, 6 日目の菌体から得た total RNA との比較を行った。図 6 に LowN/LowC 4 日目と MidN 4 日目を比較した MA plot を示す。有意な DEG はピンクのドットで示され、このうち縦軸で 0-5、横軸で 10-20 の領域が「MidN 4 日目 (=VA が有意に産生されているサンプル) で発現量が上がっている遺伝子」を示す。これら DEG に判定された 16 の遺伝子についてアノテーションを確認したところ、このうち 5 つがシキミ酸経路途中から分岐する同一の酵素を示しており、興味深いことに DEG の中には *adt* や *pal* は含まれていなかった。これらの DEG から予想される経路は L-phenylalanine が中間体であるという既存の報告に反するものであるが、*pal* の介在を前提とするよりも、より理にかなった生合成経路の存在を示唆している。前述の半定量的実験では *pal*、*adt* の上昇が認められたが、これらは VA というよりも、同時に発現する LiP へ phenylalanine を供給するためかもしれない。得られた *pal*、*adt* の部分配列を持つプラスミドコンストラクトは real-time-PCR の絶対定量に耐える品質であることを確認している。今後、本成果を元に *pal*、*adt* と、新たに発見された遺伝子の発現量を real-time-PCR により精密に比較することにより、生合成経路の慎重な検証が必要とされる。

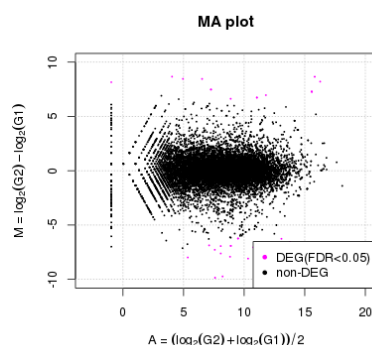


図 6. LowN/LowC 4 日目と MidN 4 日目を比較した MA plot

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永井翔龍、重富顕吾、生方信
2. 発表標題 白色腐朽菌はリグニンを“食べる”のか?
3. 学会等名 日本木材学会北海道支部研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shota Nagai, Kengo Shigetomi, Makoto Ubukata
2. 発表標題 A study on the mineralization of low-molecular weight aromatic compounds by white-rot fungi
3. 学会等名 1st International Lignin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------