

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15568

研究課題名（和文）褐色腐朽菌の結晶性セルロース分解におけるキーマルゼの解明

研究課題名（英文）Exploration of key enzymes for crystalline cellulose degradation in brown rot fungi

研究代表者

梅澤 究 (Umezawa, Kiwamu)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：70802544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：褐色腐朽菌における結晶性セルロースの分解機構を明らかにすべく、申請者らが網羅的遺伝子発現解析から見いだした、木質基質により顕著に発現増加する3種類のタンパク質である、ファミリー9溶解性多糖モノオキシゲナーゼ（LPMO9）、ファミリー14 LPMO（LPMO14）、エクспанシン様タンパク質の機能解析を行った。本研究では、これらの3種類のタンパク質を組換えタンパク質として発現させ、その糖質加水分解酵素との相乗作用および糖質結合能の調査を進めることで、その機能の解明につながる新たな知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

褐色腐朽菌は木造建築物の腐朽被害および木質バイオマスの糖化への応用の観点から極めて重要な生物である。本研究では他の糸状菌で知られる結晶性セルロース分解酵素を持たない本菌が、結晶性セルロースをどのように分解しているのかを明らかにすべく、申請者らが網羅的遺伝子発現解析から見いだした、3種類の結晶性セルロース分解への関与が予想されるタンパク質の解析を行った。本研究で組換えタンパク質として発現させ、糖質加水分解酵素との相乗作用や糖質結合能の知見を得ることができたこれらのタンパク質について、今後、より詳細な解析を行うことで、木材利用への応用につながる知見が得られることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To clarify the degradation mechanism of crystalline cellulose in brown rot fungi, the functions of three proteins, a family 9 lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO9), a family 14 lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO14) and an expansin-like protein, which significantly up-regulated by woody substrates were analysed. These three proteins were expressed as recombinant proteins and their synergistic effects with glycoside hydrolases and their carbohydrate-binding ability were investigated. These results provide new insights into their physiological functions in brown rot fungi.

研究分野：木材腐朽菌学

キーワード：木材腐朽菌 褐色腐朽菌 木質バイオマス バイオリファイナリー 糖質関連酵素

### 1. 研究開始当初の背景

褐色腐朽菌は針葉樹の主要な分解生物であり、木造建築物に腐朽被害を及ぼす主な害菌であることから、木質バイオマス利用の拡大に向けて極めて重要な生物である。褐色腐朽菌の木材細胞壁分解機構は、フェントン反応による非酵素的な分解反応により説明されてきたが、フェントン反応で分解されたセルロースは、結晶性セルロースの割合が高まることが報告されている。しかしながら、褐色腐朽菌は他の糸状菌で知られる結晶性セルロース分解酵素の遺伝子をほとんど持たないことが知られていることから、その結晶性セルロース分解機構には謎が残されている。

### 2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究において、褐色腐朽菌における網羅的遺伝子発現解析により、セルロース基質および木質基質での培養時に、ファミリー9 溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (LPMO9)、ファミリー14 LPMO (LPMO14) およびエクспанシン様タンパク質 (EXPN) の3種類の遺伝子が高発現となることを見いだした。これらのタンパク質は先行研究において、糸状菌のセルロースおよびヘミセルロースの分解への関与が示されていることから、申請者はこれらのタンパク質が褐色腐朽菌の結晶性セルロース分解において、鍵となる働きを果たしていると予想した。そこで、本研究ではこれらのタンパク質の詳細な機能解析を行い、その褐色腐朽機構における働きを明らかにすることを目的とした。本研究の成果は、褐色腐朽機構の全容解明につながる知見となり、木質バイオマス変換への応用に発展することが期待できる。

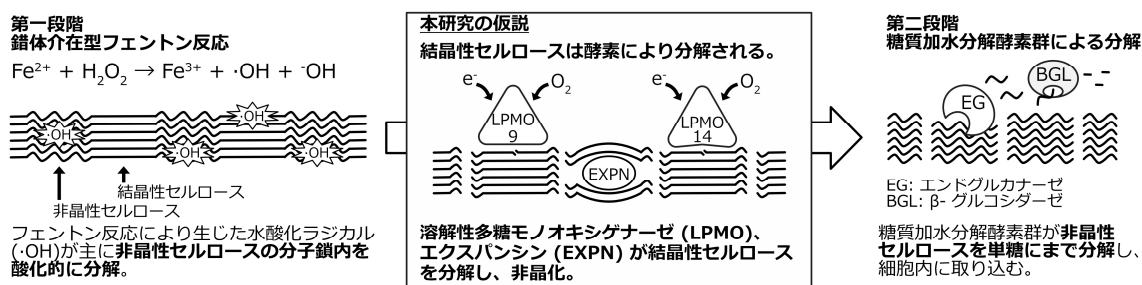


図. 褐色腐朽菌のセルロース分解機構と本研究の仮説.

### 3. 研究の方法

#### 組換えタンパク質の発現

褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* NBRC6430 株が有する3つの推定結晶性セルロース分解酵素 (GtLPMO9B, GtLPMO14A, GtEXPN1) 遺伝子を酵母発現用ベクターの pPICZ $\alpha$  に挿入し、作製したベクターを酵母菌 *Pichia pastoris* KM71 株に導入することで、目的遺伝子を発現する組換え酵母を得た。また、GtLPMO9B と GtLPMO14A については、*P. pastoris* での発現に最適化した遺伝子を合成し、分泌シグナル配列をネイティブ配列に置換してベクターに挿入したのも作製した。得られた組換え酵母に対して、メタノール誘導を行うことで、組換え酵素を発現した。得られた組換え酵素を、GtLPMO9B および GtLPMO14A については strep tag によるアフィニティークロマトグラフィーで精製し、GtEXPN1 については Q カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。カラムクロマトグラフィー後のタンパク質溶液を SDS-PAGE に供することで、精製タンパク質が得られたことを確認した。

#### セルロース分解酵素との相乗作用の調査

精製タンパク質と、Avicel (結晶性セルロース)、Celluclast (セルロース分解酵素製剤)、緩衝液を 1.5 mL マイクロチューブ内で混合し、恒温振とう機にて 50°C で 3 時間振とうした後に、遠心することで、生成された糖を含む上清を回収した。この酵素反応液上清に含まれる還元糖の濃度を、Somogyi-Nelson 法により求めた。測定は波長 660 nm の吸光度で行い、マルトーススタンダードの検量線を用いて、各反応液における還元糖濃度を求めた。

#### 糖質吸着能測定

糖質として、Avicel、リン酸膨潤セルロース、カニ殻由来キチン、ブナ由来キシラン、スギ木粉、*G. trabeum* 菌糸粉末を用いて、精製タンパク質の吸着能を測定した。反応液には精製タンパク質と糖質、緩衝液を加え、1.5 mL マイクロチューブ内で混合し、恒温振とう機にて 10°C で 30 分間振とうした後に、遠心して上清を回収した。回収した上清のタンパク質濃度を BCA 法により測定し、反応液に加えた際のタンパク質濃度との差から糖質に吸着したタンパク質の量を求めた。

#### 4. 研究成果

*P. pastoris* での組換えタンパク質の発現の結果、GtEXLX1 の発現が確認された一方で、GtLPMO9B と GtLPMO14A については *G. trabeum* 由来の遺伝子配列を用いて、pPICZ $\alpha$  由来の  $\alpha$ -factor 分泌シグナルで発現させた際には、組換え酵素を得ることができなかった。このため、先行研究の報告に基づき、各遺伝子の配列を *P. pastoris* での発現にコドン最適化したうえで、各遺伝子由来のネイティブなシグナル配列を用いたベクターを作製し、それを *P. pastoris* に導入した。その結果、これらの酵素についても、組換え酵素を得ることができた。

GtEXPN1 について、セルロース分解酵素との相乗作用の調査を行った結果、コントロールとの間に還元糖生成量に有意差は見られず、本実験の条件においてはセルロース分解酵素との間に相乗作用を示さないことが示された。また、本タンパク質の糖質吸着能の調査においても、いずれの糖質に対しても有意な吸着は見られず、本実験の条件においてはこれらの糖質に対する吸着能を持たないことが示された。このことから、GtEXPN1 については、褐色腐朽菌の結晶性セルロース分解反応においてはクリティカルな役割を担っているタンパク質ではないことが示唆された。

本研究で得られた組換えタンパク質の機能解析を進めていくことで、これらのタンパク質の褐色腐朽菌の木材分解機構における機能が明らかになり、木質バイオマス変換への応用につながる知見となることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅澤究、北野紘夢、板倉修司
2. 発表標題 褐色腐朽菌Gloeophyllum trabeumが木材分解時に高発現させる エクспанシン様タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------