

令和 6 年 6 月 2 0 日現在

機関番号：8 2 6 7 0

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：2 2 K 2 0 5 9 6

研究課題名（和文）木材腐朽菌の新しいリグニン分解経路におけるキー酵素の性質解明

研究課題名（英文）Investigation of key enzymes for novel lignin-degrading pathways employed by wood rotting fungi

研究代表者

田丸 慶明（Tamaru, Yoshiaki）

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・研究開発本部機能化学材料技術部バイオ技術グループ・研究員

研究者番号：9 0 9 6 5 8 6 5

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：担子菌のゲノム上より、白色腐朽菌および褐色腐朽菌を含む木材腐朽菌に高度に保存されている担子菌ユニークなプロテアーゼ様の新規菌体外タンパク質をコードする遺伝子群を見出した。本研究では、木材腐朽菌の一種である *Gloeophyllum trabeum* が有する当該タンパク質を組換えタンパク質として取得することに成功し、木材腐朽菌が有する菌体外酵素の機能解明に向けた取り組みを実施することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木材腐朽菌が有する菌体外酵素の機能の解明は、その応用可能性などを考慮すると木質バイオマスを有効利用するための技術開発などにおいて有用であると考えられる。本研究課題で着目した菌体外タンパク質は、担子菌ユニークかつ木材腐朽菌にも高度に保存されていたことなどから、木材腐朽菌においても重要なタンパク質であることが強く予想される。今後、当該組換えタンパク質の機能をより詳細に明らかとしていくことで、上記技術等への応用につながる知見の創出が期待される。

研究成果の概要（英文）：Genes coding the protease-like novel extracellular proteins were discovered from the genome information of wood rotting fungi. It was found that the genes were widely conserved among basidiomycetes, including white-rot and brown-rot fungi. The target proteins from *Gloeophyllum trabeum* were successfully obtained as recombinant proteins, and characterization of these proteins was also attempted in this research.

研究分野：微生物酵素

キーワード：担子菌 プロテアーゼ様菌体外タンパク質

1．研究開始当初の背景

植物細胞壁の構成成分であるリグニンは難分解性の芳香族ポリマーであり、木質バイオマスの効率的な有効利用を阻む要因の一つとなっている。これまでに、木質バイオマスの分解工程に微生物の植物細胞壁分解能力を利用するための試みが行われてきており、木材腐朽菌には木質バイオマスを単独で分解できる木材腐朽性の担子菌が含まれる。本担子菌は白色腐朽菌と褐色腐朽菌に大別され、白色腐朽菌はリグニンを効率的に分解でき、菌体外酸化還元酵素がリグニン分解に寄与すると考えられている。一方で、褐色腐朽菌は非酵素的な植物細胞壁分解メカニズムを有することなどが提案されており、本菌群はリグニンを部分的に分解および改質できることが報告されている。このように、木材腐朽性担子菌のリグニン分解メカニズムへの酸化還元酵素などの関与が知られているものの、その他菌体外酵素の寄与については明らかとなっていない点が多い。

2．研究の目的

先行研究において、木材腐朽性の担子菌に分解させた木材から得られたリグニン抽出物は健全材のものと比較してカルボニル基の含有率が上昇することが報告されている。ポリマー中のカルボニル基は加水分解が可能な化学構造の存在を示している可能性があることなどから、木材腐朽性担子菌のリグニン分解メカニズムには酸化還元酵素だけでなく、加水分解酵素も関与し得ると仮説を立てた。本研究課題では、研究代表者が見出した担子菌ユニークなプロテアーゼ様の新規タンパク質に着目することとし、木材腐朽性担子菌 *Gloeophyllum trabeum* 由来の当該タンパク質を組換え発現させて機能解析することを目的とした。

3．研究の方法

アミノ酸配列解析および三次元立体構造モデルの取得

G. trabeum が保持する着目した複数個のプロテアーゼ様タンパク質 (*GtPLP*) のアミノ酸配列をシグナルペプチド配列検出プログラムに供した。シグナルペプチド配列を除いた各 *GtPLP* のアミノ酸配列をアライメント配列解析に供した。また、同アミノ酸配列をそれぞれ Colabfold に供し、三次元立体構造モデルを取得した。

組換えタンパク質の発現

GtPLP の各遺伝子を酵母発現用ベクター pPICZ A にそれぞれ挿入し、作製したベクターを酵母菌 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) KM71H 株にそれぞれ導入した。導入の結果得られた形質転換株をそれぞれ培養して、メタノールによる目的遺伝子の発現誘導を行い、培養液上清を回収した。各培養液上清および脱糖鎖処理済みの各上清サンプルを SDS-PAGE 分析に供した。限外ろ過によって各培養液上清の培地成分などを希釈し、希釈後の各培養液上清を陰イオン交換カラムにより分画した。カラム精製によって得られた各 *GtPLP* の画分の純度を SDS-PAGE 分析にて確認した。

低分子化合物を用いたモデル基質の探索

カラム精製によって得られた各 *GtPLP* の画分を脱塩処理および緩衝液置換し、その *GtPLP* 溶液を購入した各低分子化合物と特定の条件下でそれぞれ混合してインキュベートした。インキュベート後の混合液から分析用のサンプルをそれぞれ調製し、HPLC 分析に供した。

4．研究成果

各 *GtPLP* のアミノ酸配列を解析した結果、すべて N 末端側にシグナルペプチド配列を有していた。さらに、各 *GtPLP* は既知のプロテアーゼと同様の触媒アミノ酸残基を保持していたことから、本タンパク質は菌体外加水分解酵素であることが強く予想された。また、取得した *GtPLP* の三次元立体構造モデルより、触媒アミノ酸残基がタンパク質表面に露出していることが示唆された。加えて、複数個の内 1 個のタンパク質は C 末端側にリンカー領域および機能未知の延長配列と推測されるアミノ酸配列を有していることが明らかとなった(図 1)。構築した目的タンパク質発現ベクターで形質転換した *K. phaffii* KM71H 株を培養して発現誘導し、各培養液上清およびその脱糖鎖処理サンプルを SDS-PAGE 分析に供した。その結果、対照株と比較して、発現株のサンプルで目的タンパク質の推定分子量付近などに顕著なユニークバンドが確認された。カラム精製に



図 1．複数個中 1 個の *GtPLP* の C 末端領域の立体構造モデル

よって、比較的高純度の *GitPLP* の画分が得られたことから、脱塩処理および緩衝液置換した本画分と各低分子化合物を用いてモデル基質の探索を実施した。その結果、試した反応条件下で *GitPLP* は今回用いた化合物に対して加水分解酵素活性を示さないことが明らかとなった。今後、更なるモデル基質の探索を進めて行き、詳細な機能を明らかとしていく予定である。これによって、木材腐朽菌が有する菌体外酵素の機能解明につながる新たな知見の獲得が期待される。

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 田丸慶明
2．発表標題 木材腐朽菌由来プロテアーゼ様新規菌体外タンパク質の機能解析
3．学会等名 日本木材保存協会第39回年次大会
4．発表年 2023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
---------	---------