

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04526

研究課題名(和文)細菌類から木材腐朽菌へのキノン類の供給経路を標的とした次世代木材防腐剤の開発

研究課題名(英文) Development of next generation wood preservatives targeting supply chain of PQQ from bacteria to wood rotting 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) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：木材腐朽菌は木材の強度低下を引き起こすことが知られている。これは木造構造物の崩壊の危険性を大きく増大させることから、この現象を抑制するために木材保存剤が利用される。その中で、最近、環境への配慮の高まりを受け、環境への負荷が低い木材防腐剤の開発が求められている。本研究では、真菌類の木材分解で機能すると考えられるピラノース脱水素酵素(PDH)が、細菌由来のピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とすることに注目した。そこで、PDHのPQQ結合阻害剤を探索し、それをベースとした防腐剤開発の可能性を評価した。

研究成果の概要(英文)：Wood rotting fungi have been considered to cause the reduction in wood strength. Since this leads to a significant increase of the risk of collapse in wood structures, wood preservatives are used to prevent the phenomenon. Recently, the development of the wood preservatives with a low environmental burden are required in response to growing attention to environmental consideration. We focused the fact that fungal pyranose dehydrogenase (PDH), which has been considered to work in the degradation of plant cell wall, uses pyrroloquinoline quinone (PQQ), which is provided from bacteria, as a cofactor. In the present study, inhibitor for PQQ-binding in PDH was selected, and its potential as a wood preservatives was evaluated.

研究分野：木材腐朽菌学

キーワード：木材保存剤 微生物間相互作用 PQQ 木材腐朽

1. 研究開始当初の背景

真菌類の植物細胞壁分解に基づく木材劣化を腐朽と呼ぶ。腐朽は木材に急激な強度低下を引き起こすことや初期診断が困難なことから細心の注意を払うべき劣化の一つであり、その劣化防止策として木材防腐剤が使用される。木材防腐剤に求められる性能は、効能の持続性、木材への高浸透性、木材からの低溶脱性など様々であるが、環境への配慮の高まりを受け、上記の性能を担保しつつも低毒性で環境への負荷が低い木材防腐剤の開発が求められている。

代表者の吉田は分担者の五十嵐と協力し、担子菌 *Coprinopsis cinerea* がピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とするセルロース結合性ピラノース脱水素酵素(PDH)を生産することを見いだした。本酵素はN末端にb型ヘムを含むヘムドメイン、C末端にセルロース結合ドメイン(CBD)を有しており、それらのドメイン間にL-フコースや2-ケト-D-グルコースなどに作用する脱水素ドメインが存在し、この脱水素ドメインがPQQ依存性の糖質酸化活性を有する。ところで、PQQは限られた種の細菌類のみが生合成可能であることが知られており、真菌類は合成できないと考えられている。すなわち、このPQQ依存性PDHの存在は、腐朽菌が木材分解するために細菌が合成した物質(PQQ)の供給が必要である可能性を示している。このような背景を受け、細菌から腐朽菌へのPQQの供給を阻害することで、木材分解を特異的に防ぐという新しいコンセプトの木材防腐剤が開発できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では細菌から真菌由来PQQ依存性PDHへのPQQの供給をターゲットとして、そのような細菌-担子菌間の連絡の遮断を作用機序とした新規木材防腐剤開発が可能かどうかを調査することを目的とした。具体的には、(1)PDHにおけるPQQ結合様式の詳細を解明し、さらに(2)PQQの結合阻害剤を見出すことを目指した。さらに、(3)その阻害剤が植物細胞壁分解能力の低減を通じた防腐性能を発現する能力を有するかを評価し、(4)その防腐性能の発現メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来 PDH (CcPDH) ホ口体の立体構造解析

CcPDH 遺伝子の脱水素ドメインをゲノム中に導入した酵母菌 *Pichia pastoris* を用いて、メタノールを誘導物質とした組換え酵素発現を実施した。得られた組換え脱水素ドメインを精製し、これに10倍量のPQQを添加し4で3時間インキュベートした後、酵素に結合していないPQQを限外ろ過により除き、ホ口体のサンプルを得た。1 mM CaCl₂ 含む50 mM 酢酸緩衝液(pH 6.0)にホ口体PQQドメインが3.68 mMになるよう濃縮し、バッチ法で4、約2ヶ月間静置し結晶化し、得られた結晶をX線構造解析に供した。

(2) CcPDH と溶解性多糖モノオキシゲナーゼ(LPMO9)との相互作用解析

完全長CcPDH、およびそのドメイン欠損体(CBM1欠損体および脱水素ドメインのみ)と、子のう菌 *Neurospora crassa* 由来の2種のLPMO9 (NcLPMO9C、NcLPMO9F)を酵母菌 *P. pastoris* を異種宿主として組換え酵素として発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。得られた3種の組換え体を電子供与体としてLPMO9の活性を測定した。LPMO9活性はICS-3000 (Dionex)を用いたHPAEC-PADにより、LPMO9の反応生成物であるC1位およびC4位の酸化されたセロオリゴ糖を検出することで評価した。

(3) 化合物ライブラリーを利用した阻害剤の探索

精製した組換えCcPDHを用いて、阻害剤の探索を実施した。阻害剤の探索には理化学研究所環境資源科学研究センター化合物リソース開発研究ユニット化合物バンクから提供を受けたNPDepo化合物ライブラリーを利用した。具体的には、96穴マイクロプレートにそれぞれ異なる化合物を調整し、そのウェル中でCcPDH活性を測定した。その際、基質としてL-フコースを用い、電子受容体としてチトクロムcを用いた。CcPDH活性はチトクロムcの還元をモニターすることで算出した。それぞれの化合物存在下で測定されたCcPDH活性を、非存在下での活性を比較することで、阻害効果を調査した。

(4) 特定された阻害剤が *C. cinerea* の成長に与える影響の調査

阻害剤の選抜実験で顕著な阻害効果が認められた化合物を利用して、それを培地に添加した際に *C. cinerea* の生育に与える影響について調査した。*C. cinerea* として 5338 株を用い、これを 1% 微結晶セルロースおよび 0.2% カバ由来キシランを炭素源とする Wood 培地もしくは 1% グルコースを単一の炭素源とする Wood 培地で 25℃ で振とう培養した。この培地に 10 μM の阻害剤を添加したものと添加しなかったものを準備し、それぞれの条件で培養した *C. cinerea* の菌体量から阻害剤の生育への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) CcPDH ホロ体の立体構造

組換え CcPDH を精製したのち、PQQ 共存下での結晶化および X 線構造解析により、1.3 Å の分解能でホロ体の立体構造を明らかにした (図 1)。その結果、本酵素は 6 枚羽から構成される β プロペラ構造であり、分子中に明確な PQQ の存在が確認された。また、PQQ 結合に関わるアミノ酸残基を詳細に解析したところ、Arg273、His363、Arg430、Asn431、His539、His560、Trp563、Asn564、Arg621 の 9 つのアミノ酸残基が PQQ と相互作用していることが明らかとなった。これまでの我々の研究において、CcPDH は PQQ を添加した時のみ基質の酸化活性を呈すること、PQQ への結合能を ITC で調査した際に Kd 値が 1 nM 程度と PQQ への極めて高い親和性を持つことが明らかとなっていたため CcPDH を PQQ 依存性酵素とみなしてきたが、本研究により

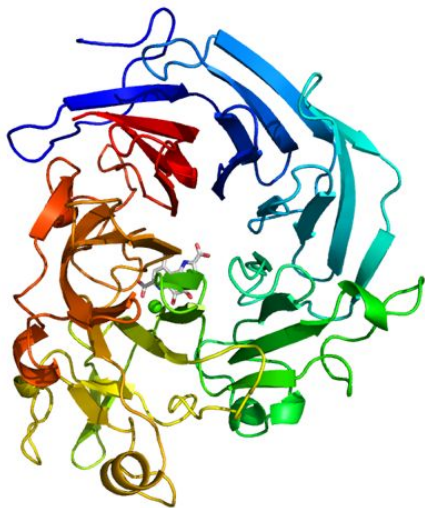


図 1 CcPDH ホロ体の三次元構造

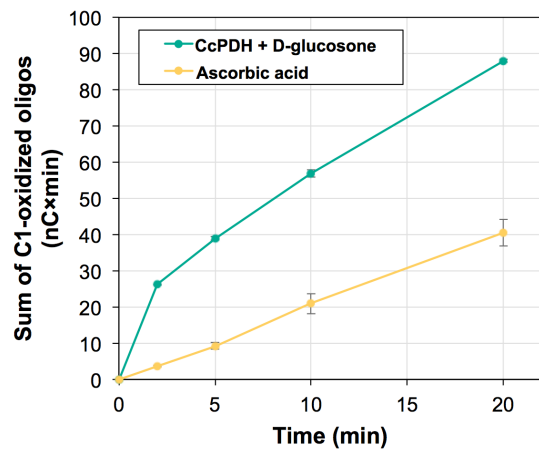


図 2 LPMO9 への電子供与能の比較

CcPDH が PQQ を明確に認識し、結合していることが明らかになったことで、本酵素が PQQ を結合する酵素であることが明確に証明された。すなわち、本研究により、CcPDH における PQQ の結合様式が明らかとなったとともに、本酵素が世界で初めて見出された真核生物由来の PQQ 依存性酵素であると結論づけた。

(2) CcPDH と LPMO9 の分子間相互作用

インタクトな CcPDH を LPMO9 の電子供与体として用いて LPMO9 のセルロース分解活性を測定したところ、NcLPMO9F の反応液からは C1 位が酸化されたセロオリゴ糖が検出された。また、NcLPMO9C を用いた場合には、その反応液からは C4 位が酸化されたセロオリゴ糖が検出された。このことは、CcPDH がいずれの LPMO9 に対しても良好な電子供給体として機能することを示唆する。一方、CcPDH とアスコルビン酸をそれぞれ電子供給源とした場合の LPMO 活性を比較すると、前者で、より多くの分解産物が検出された (図 2)。このことは、CcPDH が LPMO9 のモデル電子供与体としてしばしば用いられるアスコルビン酸と比較しても、より良好な電子供給源となることを示唆している。

CcPDH の脱水素ドメインのみを LPMO9 の電子供与体として用い、リン酸膨潤セルロースを基質とした分解活性を測定したところ、完全長 CcPDH と比較して、LPMO9 活性が著しく低下した。このことは、脱水素ドメイン単独では LPMO9 への電子供給効率が非常に低いこと、さらには CcPDH がヘムドメインを通じて LPMO9 に電子伝達を行っていることを強く示唆する。また、CcPDH における CBD の役割を明らかにするため、CBD を欠損させた組換え体を用いて LPMO9 活性を測定したところ、完全長 CcPDH を用いた場合

と比較して LPMO9 活性の低下が見られた。このことは、CcPDH の CBD が CcPDH から LPMO9 への電子伝達に重要な働きを果たすことを意味する。

(3) 化合物ライブラリーを利用した阻害剤の探索

本課題のもっとも主要な目的の一つに CcPDH の PQQ 結合阻害剤を見出すことが挙げられる。本研究ではまず初めに、いくつかのキノン類の PQQ 結合阻害剤としての性能評価を実施した。L-フコースを基質としてチトクロム c を電子受容体とした活性測定系に PQQ および阻害剤の候補であるナフトキノンやフェナントレンキノンなどを添加し、CcPDH 活性を測定したが、いずれのキノン類においても阻害効果は見られなかった。また、PQQ 結合にカルシウムイオンが重要であることが明らかになったことから、2 価の金属イオンの添加の効果についても調査した。その結果、二価金属イオンである Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} などの添加は阻害効果を呈さなただけでなく、 Mg^{2+} と Sr^{2+} を用いた場合には、カルシウムイオン非存在下でも活性が観察されたことから、これらの二価金属イオンはカルシウムイオンの代替として PQQ 結合に関与することができると考えられた。

CcPDH における PQQ 結合阻害剤を探索するために、理化学研究所環境資源科学研究センター化合物リソース開発研究ユニット化合物バンクから提供を受けた NPDepo 化合物ライブラリーを用いて、阻害剤の探索を実施したところ、6 種類の化合物に対して CcPDH 活性への阻害効果が認められた。それらの化合物は PQQ と部分的に構造類似性を示したのも多く、それらが CcPDH の PQQ 結合を阻害することで活性を阻害していると予想された。それらの 6 種のうち顕著な効果を示した 2 種は Berberine chloride および Ouabain octahydrate であり、両者は少なくとも $1.25\text{ng}/\mu\text{L}$ 程度の濃度で阻害効果を生じることが明らかとなった。特に Berberine chloride は PQQ との構造類似性が高く、PQQ アナログとして働く可能性が示唆された。

(4) 選抜された PQQ 阻害剤による *C. cinerea* の生育阻害の可能性

阻害剤として選抜された Berberine chloride および Ouabain octahydrate の *C. cinerea* の生育阻害剤としての効果を調査した。4-2 に示した実験により、CcPDH が LPMO9 の電子供与体として機能することが示唆されたことから、CcPDH の機能の阻害はセルロース分解能の低下に繋がる可能性が予想されたため、

培地としてグルコースのみならず、セルロースとキシランを混合した培地も調整し、試験に供した。その結果を図 3 に示した。図 3 A が示す通り、これらの阻害剤を添加した場合、グルコースを単一の炭素源とする培地における菌体の成長量に影響は観察されなかった。このことは、これらの化合物が *C. cinerea* の基礎代謝系に影響を与えないことを示唆している。一方、セルロースとキシランを混合した培地において培養した際に、Ouabain octahydrate を添加した培地では有意な成長阻害は見られなかったが、成長速度に幾分の遅延傾向が観察された。一方で Berberine chloride を添加した培地においても、顕著な成長阻害効果ではなかったものの、菌体成長量が低下する傾向が観察された(図 3 B)。これらの化合物は、その成長阻害効果は高くないことから、これ自体が保存剤として利用できる可能性は低いものの、細菌類から供給される化合物の利用性を低減させることで、植物の分解能力を低減させることが可能であることを示唆する。

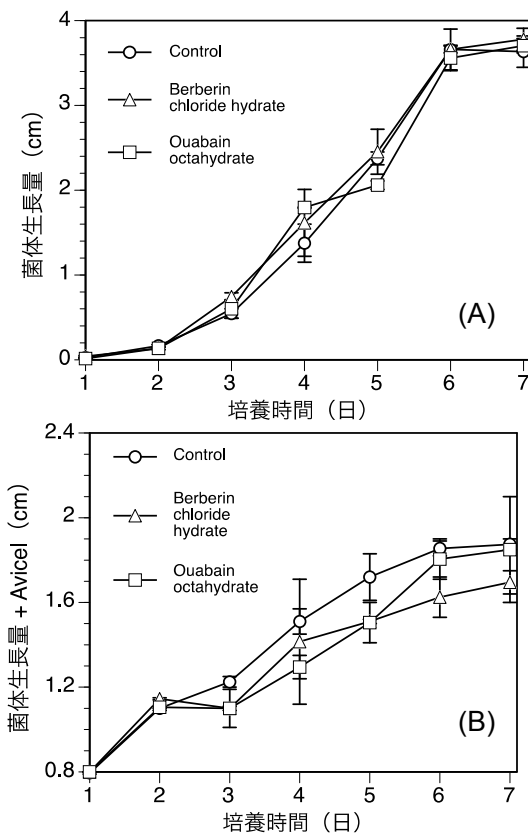


図 3 *C. cinerea* の菌系成長に阻害剤添加が及ぼす影響
(A): グルコース培地
(B): アピセル+キシラン培地

(5) 結論

CcPDH を PQQ 結合した状態で三次元構造解析することに成功し、PQQ 結合メカニズムを明らかにした。我々が知る限り、これは真核生物が PQQ を補酵素として利用することを直接的に示した世界初の報告である。また、CcPDH から LPMO9 へと極めて効率よく電子伝達がなされ、それによって LPMO9 が活性化されることも明らかにした。さらに、化合物ライブラリーを利用して PQQ 結合阻害剤を見出し、それを添加したセルロース培地においてのみ、菌体の生育が抑制傾向を示した。この生育阻害効果は低かったことから、本化合物が防腐剤に使用できる可能性は低いが、本課題で対象としたような細菌類から供給される化合物を真菌が利用できなくなるような阻害剤を利用するというコンセプトを利用した木材保存剤開発の潜在性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Yoshiaki Tamaru, Kiwamu Umezawa and Makoto Yoshida : Characterization of an aryl-alcohol oxidase from the plant saprophytic basidiomycete *Coprinopsis cinerea* with broad substrate specificity against aromatic alcohols. *Biotechnology Letters*. In Press. doi: 10.1007/s10529-018-2534-3 査読有
 2. Anikó Várnai, Kiwamu Umezawa, Makoto Yoshida, and Vincent Eijsink : The pyrroloquinoline-quinone dependent pyranose dehydrogenase from *Coprinopsis cinerea* (CcPDH) drives lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) action. *Applied and Environmental Microbiology*. In Press. doi: 10.1128/AEM.00156-18. 査読有
 3. 吉田 誠 : 腐朽メカニズムの概要と研究の展望. *木材保存*. 44(3): 172-175 (2018). 査読無
 4. Takashi Tonozuka, Yutaro Tanaka, Shunsaku Okuyama, Takatsugu Miyazaki, Atsushi Nishikawa, and Makoto Yoshida. Structure of the catalytic domain of α -L-arabinofuranosidase from *Coprinopsis cinerea*, CcAbf62A, provides insights into structure-function relationships in glycoside hydrolase family 62. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 181(2):511-525 (2017). doi: 10.1007/s12010-016-2227-0 査読有
5. Yuka Kojima, Anikó Várnai, Takuya Ishida, Naoki Sunagawa, Dejan M. Petrovic, Kiyohiko Igarashi, Jody Jellison, Barry Goodell, Gry Alfredsen, Børge Westereng, Vincent G.H. Eijsink, Makoto Yoshida : A Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Xyloglucan Specificity from the Brown-Rot Fungus *Gloeophyllum trabeum* and Its Action on Cellulose-Xyloglucan Complexes. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(22):6557-6572 (2016). doi: 10.1128/AEM.01768-16 査読有
 6. Kouta Takeda, Hirotohi Matsumura, Takuya Ishida, Makoto Yoshida, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samejima, Hiroyuki Ohno, Nobuhumi Nakamura : pH-dependent electron transfer reaction and direct bioelectrocatalysis of the quinoxinone pyranose dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 477(3):369-373 (2016). doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.096. 査読有
 7. 吉田 誠 : 自然界における木材腐朽現象の多様性. *応用糖質科学*. 5(4):200-203 (2015). 査読無

[学会発表](計16件)

1. 木村徳王、田丸慶明、吉田 誠、梅澤 究 : *Pseudomonas aureofaciens* 由来 2-ケト-D-グルコース 脱水素酵素における点変異導入が酵素活性に与える影響. 第68回日本木材学会年次大会. 京都. 2018年3月.
2. 田丸慶明、梅澤 究、吉田 誠 : 植物分解性担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来アリアルアルコール酸化酵素の基質認識機構の調査. 第68回日本木材学会年次大会. 京都. 2018年3月.
3. 吉田 誠 : 菌類による植物バイオマス分解機構について新たにわかってきたこと. セルロース学会北海道・東北支部セミナー2018 (招待講演). 札幌. 2018年2月.
4. 小嶋由香、Aniko Varnai、Dejan Petrovic、Borge Westereng、Vincent Eijsink、石田卓也、砂川直輝、五十嵐圭日子、Jody Jellison、Barry Goodell、Gry Alfredsen、吉田 誠 : 褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* 由来 LPMO9 のセルロースおよびヘミセルロース分解特性. 日本応用糖質科学会平成29年度大会. 藤沢. 2017年9月.
5. 田丸慶明、梅澤 究、吉田 誠 : *Coprinopsis cinerea* 由来アリアルアルコール酸化酵素

- の点変異導入による基質特異性の改変.
日本応用糖質科学会平成 29 年度大会. 藤沢. 2017 年 9 月.
6. Aniko Varnai, Kiwamu Umezawa, Makoto Yoshida, Vincent G.H. Eijsink : The pyrroloquinoline-quinone (PQQ)-dependent quinoxinohemoprotein pyranose dehydrogenase from *Coprinopsis cinerea* (CcPDH), belonging to the AA12 family, drives lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) action. Enzyme Engineering XXIV. Toulouse (France). 2017 年 9 月.
 7. 田丸慶明、梅澤 究、吉田 誠 : *Coprinopsis cinerea* 由来アリアルアルコール酸化酵素の基質特異性の調査. 第 31 回セルラーゼ研究会. 佐久. 2017 年 7 月.
 8. Yoshiaki Tamaru, Kiwamu Umezawa, Makoto Yoshida : Characterization of AA3 aryl-alcohol oxidase from the plant-saprophytic basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. Gordon Research Conference 2017 -Cellulases & Other Carbohydrate-Active Enzymes-. Proctor Academy (NH, USA). 2017 年 7 月.
 9. Yuka Kojima, Aniko Varnai, Takuya Ishida, Naoki Sunagawa, Dejan M. Petrovic, Kiyohiko Igarashi, Jody Jellison, Barry Goodell, Gry Alfredsen, Bjarne Westereeng, Vincent G. H. Eijsink, Makoto Yoshida : Characterization of an LPMO9 acting on cellulose and hemicellulose from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. Gordon Research Conference 2017 -Cellulases & Other Carbohydrate-Active Enzymes-. Proctor Academy (NH, USA). 2017 年 7 月.
 10. Makoto Yoshida : Auxiliary Activities Family 12: unique PQQ-dependent redox enzymes. Gordon Research Conference 2017 -Cellulases & Other Carbohydrate-Active Enzymes-(招待講演). Proctor Academy (NH, USA). 2017 年 7 月.
 11. 吉田 誠 : 腐朽菌の木材分解メカニズムを分子レベルで理解する. 日本木材学会生物劣化研究会 2017 年春季研究会講演会 (招待講演). 福岡. 2017 年 3 月.
 12. 田丸慶明、梅澤 究、吉田 誠 : 担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来アリアルアルコール酸化酵素の酵素学的機能解析. 第 67 回日本木材学会年次大会. 福岡. 2017 年 3 月.
 13. 梅澤 究、吉田 誠、武田康太、中村暢文、大野弘幸、Aniko Varnai、Vincent Eijsink : ピロロキノリンキノン依存性ピラノース脱水素酵素と溶解性多糖モノオキシゲナーゼの相互作用に関する研究. 第 67 回日本木材学会年次大会. 福岡. 2017 年 3 月.
 14. 梅澤 究、吉田 誠、武田康太、中村暢文、大野弘幸、石田卓也、五十嵐圭日子、鮫島正浩 : ユニークな CBM1 を有する担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来 AA12 ピラノース脱水素酵素アイソザイムの機能解析. 第 66 回日本木材学会大会. 名古屋. 2016 年 3 月.
 15. 戸谷光平、梅澤究、石田卓也、吉田誠、五十嵐圭日子、鮫島正浩 : 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 PQQ 依存性酸化還元酵素遺伝子のクローニングおよび発現. 第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス. 東京. 2015 年 11 月.
 16. Kiwamu Umezawa, Kouta Takeda, Takuya Ishida, Kiyohiko Igarashi, Nobuhumi Nakamura, Masahiro Samejima, Hiroyuki Ohno, and Makoto Yoshida : Comparison of Enzymatic Properties between AA12 Pyranose Dehydrogenases from *Coprinopsis cinerea*. Gordon Research Conference 2015: Cellulosome, Cellulases & Other Carbohydrate Modifying Enzymes. Proctor Academy (NH, USA). 2015 年 8 月
- 〔その他〕
- ホームページ等
1. 東京農工大学 研究要素集
「次世代木材防腐剤の開発」
http://www.rd.tuat.ac.jp/activities/factors/search/20150730_3.html
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
吉田 誠 (YOSHIDA Makoto)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号 : 30447510
 - (2)研究分担者
五十嵐 圭日子 (IGARASHI Kiyohiko)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号 : 80345181