

令和元年5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18727

研究課題名(和文)立木加害性の木材腐朽菌による木材分解機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating wood degradation mechanism of a standing tree pathogen

研究代表者

堀 千明 (Hori, Chiaki)

北海道大学・工学研究院・助教

研究者番号：50722948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、木材腐朽菌の中でも未解明な立木加害性の白色腐朽菌ベッコウタケに着目して、多面的なオミクス解析手法により本菌の植物分解機構を初めて明らかにすることを目的とした。本研究において、立木加害性の白色腐朽菌ベッコウタケのゲノム情報を初めて解読することから、比較ゲノム解析およびプロテオーム解析を行った。その結果、特徴的な植物バイオマス分解酵素群や樹木防御物質分解のための酵素が同定できた。これらのことから、ベッコウタケの樹木を分解する分子メカニズムの一端を明らかにすることができ、この知見は、植物バイオマス分解利用や樹木保護に役立つものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベッコウタケは北海道大学構内をはじめ日本中で倒木被害を引き起こしており、倒木による物損事故などが社会的に大きく取り上げられている。しかしながら予防策はなく、被害が確認できてから伐採するなど対処療法が行われているが、子実体に気づきにくいなど問題点が多い。そこで本研究では予防法に至る知見を得るため、ベッコウタケ菌の特徴的な植物バイオマス分解機構や樹木が生産する防御物質の分解メカニズムを明らかにした。この知見は、樹木保護や植物バイオマス分解利用に将来的に役立つ可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first disclosed genome sequences of hardwood pathogen, *Pereniporia fraxinea*. Comparative genomic analysis showed that *Pereniporia fraxinea* has no difference in CAZy (enzymes related wood degradation) between other white rot fungi. Secreted enzymes from *Pereniporia fraxinea* grown on culture media including wood, cellulose or glucose as a sole carbon source were analyzed and compared with model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. As a result, this fungus secreted a unique cellulase and lots of laccases. These enzymes might be useful for tree protection and plant biomass utilization in the future.

研究分野：木質科学

キーワード：木材腐朽菌 ベッコウタケ 樹木病理 ゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年地表で最大量の炭素源である植物バイオマスエネルギー資源として利用するための多面的な研究が急務となっている。なかでも植物を効率よく分解出来る腐朽菌の植物分解機構を理解するための研究が進んでいる。本研究では、木材腐朽菌の中でも未解明な立木加害性の白色腐朽菌ベッコウタケに着目して、多面的なオミクス解析手法により本菌の植物分解機構を包括的に理解することを目指す。このような知見は植物バイオマス分解利用に応用できる可能性がある。また、ベッコウタケは北海道大学構内をはじめ、日本中で甚大な倒木被害を引き起こしており、本研究によりベッコウタケによる分解の要になるような酵素を同定できた場合、本菌を防除する阻害剤の開発など樹木の保護につながる知見も得られる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、木材腐朽菌の中でも未解明な立木加害性の白色腐朽菌ベッコウタケに着目して、多面的なオミクス解析手法により本菌の植物分解機構を初めて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

まず、本菌を単離・同定し、ゲノム DNA を抽出して、次世代シーケンサーによって全ゲノム配列を解読する。得られたゲノム配列において遺伝子予測を行い、他の腐朽菌と植物成分の分解ポテンシャルを比較する。また、このゲノム情報を利用して、木材分解過程で生産されるタンパク質をプロテオーム解析によって網羅的に同定することで、本菌の木材分解機構を解明し、他の腐朽菌と比較することで特徴的な分解機構を明らかにする。

4. 研究成果

まず、ベッコウタケを北海道大学構内にて被害木から糸状菌を単離した。この糸状菌を顕微鏡観察すると共に、PCR 法によって ITS 領域を増幅し、シーケンス解析をすることから、本菌がベッコウタケであることを同定した。得られた菌糸を様々な炭素源を用いた培養条件下で生育させた場合に生産される菌体外タンパク質生産量やセルロースやヘミセルロースといった植物成分の分解酵素活性を測定した。その結果、セルロース培地によって種々の分解酵素が生産されていることを明らかにした。この菌体外酵素パターンは木粉培地で生産されるパターンと非常に似ていた。さらに、顕微鏡観察とシーケンス解析からベッコウタケと同定した担子孢子5種についても、同様の培養を行い、二核保有する菌糸と同等の植物分解活性を示すものを選抜した。

次に、北海道大学構内の被害木から子実体を形成していたベッコウタケから単離・選抜した菌糸を用いて、DNAを抽出し、大規模シーケンサーに全塩基配列を解読し、遺伝子予測を行なった。得られた全遺伝子情報を元に、他の糸状菌ゲノムと植物成分および抽出成分の分解ポテンシャルを比較したところ、他の糸状菌ゲノムと植物成分および抽出成分の分解ポテンシャルを比較した。その結果、糖質関連酵素(CAZy)においてほとんど同じ遺伝子を保有していた。

そこで、木粉や植物多糖成分の分解過程において生産される菌体外タンパク質の植物成分の分解活性を他の白色腐朽菌と比較したところ、多糖分解活性が非常に高いことを明らかにした。またタンパク質生産パターンも全く異なることから、プロテオーム解析でより詳細に明らかにする必要があると示唆された。そこで、上述したゲノム配列をデータベースとして、各種培養系の菌体外タン

パク質をプロテオーム解析に供したところ、主に生産されるセルロース分解酵素が異なることが明らかになった。この酵素は植物バイオマス分解の効率化に寄与する可能性を示唆している。

さらに、樹木において防御物質を蓄積する反応帯部から抽出した成分を添加した際のベッコウタケの菌系成長およびタンパク質生産を解析した。それらの結果から本菌が他の白色腐朽菌と比較して、抽出成分への耐性が強いこと、また、その耐性の強さにラッカーゼ活性が重要である可能性を見出した。抽出成分を添加した培養系で得られたタンパク質をプロテオーム解析することで、この抽出成分の分解に関連する酵素を同定した。この酵素を阻害することで、本菌の樹木防御を突破する能力は著しく低下する可能性が示唆された。

以上のことから、本研究によりベッコウタケの樹木を分解する分子メカニズムの一端を明らかにすることができ、この知見は、植物バイオマス利用や樹木保護に将来的に役立つものと考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

1. Hori C, Yamazaki T, Ribordy G, Takisawa K, Matsumoto K, Ooi T, Zinn M, Taguchi S.: High-cell density culture of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli* by using glucose/xylose-switching fed-batch jar fermentation. *J. Biosci. Bioeng.*, in press (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.11.006.) 査読有り
2. Matsumoto K, Saito J, Yokoo T, Hori C, Nagata A, Kudoh Y, Ooi T, Taguchi S.: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxidase (RuBisCO)-mediated *de novo* synthesis of glycolate-based polyhydroxyalkanoate in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.*, in press (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2019.03.002.) 査読有り
3. Watanabe T, Kojima H, Umezawa K, Hori C, Takasuka T, Kato Y, Fukui M.: Genomes of neutrophilic sulfur-oxidizing chemolithoautotrophs representing 9 proteobacterial species from 8 genera. *Frontiers in Microbiol.*, in press (DOI: 10.3389/fmicb.2019.00316.) 査読有り
4. Mutuku JM, Cui S, Hori C, Takeda Y, Tobimatsu Y, Nakabayashi R, Mori T, Saito K, Demura T, Umezawa T, Yoshida S, Shirasu K.: The structure of lignin deposited after infection is crucial for *Striga hermonthica* resistance. *Plant Physiol.*, 179(4):1796-1809, 2019. 査読有り
5. Kumakura K* and Hori C*, Matsuoka H, Igarashi K, Samejima M.: Protein components of water extracts from fruiting bodies of the Reishi mushroom *Ganoderma lucidum* contribute to the production of functional molecules. *J. Sci. Food Agric.*, 99(2):529-535, 2019. 査読有り
*共同筆頭著者
6. Hori C, Gaskell J, Cullen D, Sabat G, Stewart PE, Lail K, Peng Y, Barry K, Grigoriev IV, Kohler A, Fauchery L, Martin F, Zeiner CA, Bhatnagar JM.: Multi-omic analyses of extensively decayed *Pinus contorta* reveal expression of diverse array of lignocellulose degrading enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(20):e01133-18, 2018. 査読有り *Spotlight researchに選出された **国際共同研究

7. Sakuragi S, Hori C, Igarashi K, Samejima M.: Secretome analysis of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on ammonia-treated lignocellulosic biomass from birch wood. *J. Wood Sci.*, 64(6):845-853, 2018. 査読有り
8. Matsumoto K, Iijima M, Hori C, Utsunomia C, Ooi T, and Taguchi S.: *In vitro* analysis of D-lactyl-CoA-polymerizing polyhydroxyalkanoate synthase in polylactate and poly(lactate-co-3 hydroxybutyrate) Syntheses, *Biomacromolecules*, 19(7):2889-2895, 2018. 査読有り
9. 上田幹朗、堀 千明、玉井裕、山岸祐介、宮本敏澄、佐野雄三: “ベッコウタケ接種に対する生立木樹幹二次木部の反応”, 木材学会誌, Vol.64(1), pp.1-9, 2018. 査読有り
10. Matsumoto K, Hori C, Fujii R, Takaya M, Ooba T, Ooi T, Isono T, Satoh T, Taguchi S.: “Dynamic changes of intracellular monomer levels regulate block sequence of polyhydroxyalkanoates in engineered *Escherichia coli*.”, *Biomacromolecules*, Vol.19(2), pp.662-671, 2018. 査読有り
11. Hori C, Oishi K, Matsumoto K, Taguchi S, Ooi T.: Site-directed saturation mutagenesis of polyhydroxyalkanoate synthase for efficient microbial production of poly[(R)-2-hydroxybutyrate], *J Biosci Bioeng.*, 125(6):632-636, 2017. 査読有り
12. Utsunomia, C., Saito, T., Matsumoto, K., Hori, C., Isono, T., Satoh, T., Taguchi, S. Synthesis of lactate (LA)-based poly(ester-urethane) using hydroxyl-terminated LA-based oligomers from a microbial secretion system. *J. Polym. Res.* Vol. 24, pp.167-172, 2017. 査読有り
13. Utsunomia, C., Matsumoto, K., Date, S., Hori, C., Taguchi, S.: “Microbial secretion of lactate-enriched oligomers for efficient conversion into lactide: A biological shortcut to polylactide”, *J Biosci Bioeng.*, Vol.124(2), pp.204-208, 2017. 査読有り
14. Utsunomia, C., Hori, C., Matsumoto, K., Taguchi, S.: “Investigation of the *Escherichia coli* membrane transporters involved in the secretion of D-lactate-based oligomers by loss-of-function screening” *J Biosci Bioeng.*, Vol.124 (6), pp.635-640, 2017. 査読有り
15. Utsunomia, C., Matsumoto, K., Date, S., Hori, C., Taguchi, S.: “Microbial secretion of lactate-enriched oligomers for efficient conversion into lactide: A biological shortcut to polylactide”, *J Biosci Bioeng.*, Vol.124(2), pp.204-208, 2017. 査読有り
16. Yoshimi, Y., Sugawara, Y., Hori, C., Igarashi, K., Kaneko, S., Tsumuraya, Y., Kotake, T.: “A protease/peptidase from culture medium of *Flammulina velutipes* that acts on arabinogalactan-protein.”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol 25, pp.1-7, 2016. 査読有り
17. Song, X., Yu, X., Hori, C., Demura, T., Ohtani, M., Zhuge, Q. Heterologous overexpression of poplar SnRK2 genes enhanced salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* Vol.7(612), pp.1-11, 2016. 査

[学会発表](計41件)

<国際会議 計10件; 国内会議 計31件>

堀千明、ジル・ガスケル、ダニエル・カレン、大井俊彦、松本謙一郎：マルチメタオミクス解析によって明らかになった自然環境下での木材分解の多様性、日本農芸化学会、東京、2019.3.27. (O)

堀千明、大井俊彦、松本謙一郎、ジル・ガスケル、ダニエル・カレン：腐朽された樹木のメタ・オミクス解析 ～環境下で腐朽を担う微生物群と酵素群が明らかに～、第69回日本木材学会大会、函館アリーナ、函館、2019.3.15 (P)

松本壘、堀千明、大井俊彦、松本謙一郎、宮本敏澄、重富顕吾、佐野雄三：ハリエンジュが生産する生体防御物質に対する立木加害性木材腐朽菌ベッコウタケの応答、第69回日本木材学会大会、函館アリーナ、函館、2019.3.15 (P)

岩田茉奈、堀千明、大井俊彦、松本謙一郎、佐野雄三：針葉樹分解性白色腐朽菌 *Phlebiopsis gigantea*における抽出成分の分解性解析、第69回日本木材学会大会、函館アリーナ、函館、2019.3.15 (P)

高田直樹、堀千明、松本謙一郎、Pui Ying Lam、飛松裕基、永野聡一郎：R3 MYB遺伝子の過剰発現によるポプラ木質の酵素糖化性の改良、第60回日本植物生理学会年会、名古屋、2019.3.13-15 (O)

堀千明、Jill Gaskel, Dan Cullen, 大井俊彦、松本謙一郎：マルチメタオミクス解析で明らかになった自然環境下での植物分解者達の戦略、日本生物工学会北日本支部札幌シンポジウム、北海道大学、札幌、2018.10. 5 (P)

岩田茉奈、堀千明、大井俊彦、松本謙一郎：木材腐朽菌 *Phlebiopsis gigantea*における針葉樹由来抗菌性物質の分解メカニズム、日本生物工学会北日本支部札幌シンポジウム、北海道大学、札幌、2018.10. 5 (P)

松本壘、堀千明、宮本敏澄、重富顕吾、佐野雄三、大井俊彦、松本謙一郎：木材腐朽菌ベッコウタケと宿主木ハリエンジュの相互作用解析、日本生物工学会北日本支部札幌シンポジウム、北海道大学、札幌、2018.10. 5 (P) **優秀ポスター受賞**

Iwata M, Hori C, Ken' ichiro M, Ooi T: Omics analyses of wood-decay fungus *Phlebiopsis gigantea* during degradation of soft wood. CSE International Student Symposium 2018, Hokkaido University, Sapporo, 2018.8.27 (P)

岩田茉奈、堀千明、大井俊彦、松本謙一郎：針葉樹分解過程における木材腐朽菌 *Phlebiopsis gigantea*のオミクス解析、2018年度生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー、北見工業大学、北見 2018.6.30 (P) **ポスター賞**

松本壘、堀千明、宮本敏澄、重富顕吾、佐野雄三、大井俊彦、松本謙一郎：植物生体防御物質が生産する立木加害性木材腐朽菌ベッコウタケの生長および分解酵素生産に及ぼす影響、2018年度生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー、北見工業大学、北見 2018.6.30 (P)

堀千明、SONG Ruopu, MINKOFF B. Benjamin, 飛松裕基、高須賀太一：森林害虫共生微生物が生産する菌体外酵素の解析、第68回日本木材学会、京都府立大学、京都 2018.3.15 (P)

Hori C, Matsumoto R, Miyamoto T, Shigetomi K, Sano Y, Ooi T, Matsumoto K: Effects of plant defensive substances on growth and CAZy production of wood decay fungus *Pereniporia fraxinea* that infects living tree, International Symposium on Biomass Refinery: From Biomass Crops to Chemicals and Fuels, Hokkaido University, Sapporo, 2018.2.6 (P)

堀 千明、松本謙一郎、田口精一：“きのこゲノム情報を利用した植物バイオマス分解の効率化”、第6回JACI/GSCシンポジウム、東京国際フォーラム、2017.7.4. (P)

糀谷紗季、鈴木梨央、酒井杏匠、高須賀太一、堀 千明、志水元亨、加藤雅士「種々の樹木成分で生育させた白色腐朽菌*Phanerochaete chrysosporium*の細胞外プロテオーム解析」第16回糸状菌分子生物学会 京都 2016.11.17-18.

上田幹朗、堀 千明、山岸祐介、宮本敏澄、玉井 裕、佐野雄三「ベッコウタケ接種に対する生立木樹幹二次木部の反応」日本木材学会北海道支部 第48回研究発表会 札幌 2016.11.10.

その他：国際会議 その他8件；国内会議 その他17件

* 略語；(P)，ポスター発表；(O)，口頭発表.

〔図書〕(計1件)

1. Hori, C. and Cullen, D. Chapter 6. Prospects for Bioprocess Development Based on Recent Genome Advances in Lignocellulose Degrading Basidiomycetes. *In* Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications. Eds, Schmolli, M. and Dattenböck, C., Springer International Publishing, (2016) 161-181

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐野 雄三

ローマ字氏名：(SANO, yuzo)

研究協力者氏名：飛松 裕基

ローマ字氏名：(TOBIMATSU, yuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。