

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 2 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20380100

研究課題名（和文）

担子菌による木材分解の引き金となるヘミセルロース分子構造の認識と応答機構

研究課題名（英文）

Recognition and response mechanism on hemicellulose structure in the initial stage of wood degradation by basidiomycete fungi

研究代表者

鮫島 正浩 (SAMEJIMA MASAHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30162530

研究成果の概要（和文）：担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* によるセルロースの分解はキシランの存在によって促進される。キシランの分解によって生成したキシロオリゴ糖がいくつかのセルロース分解関連酵素の遺伝子発現を増強し、このことがセルロース分解の促進の一因となると示唆された。また、キシラン中のアセチル残基のエステル結合の開裂と引き続くキシロオリゴ糖の生成によるセルロース分解酵素系の誘導が本菌による木材分解の引き金になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Xylan facilitates degradation of cellulose by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Xylooligosaccharides, the degradation products of xylan, enhance expression of the genes encoding several cellulolytic enzymes, resulting in the above phenomenon. Moreover, cleavage of the ester linkages in acetyl residues of xylan and successive production of xylooligosaccharides seem to be a trigger of wood deterioration by this fungus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：木質バイオマス、木材分解、セルロース、ヘミセルロース、担子菌、プロテオーム、発現応答、*Phanerochaete chrysosporium*

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 木材はセルロース、ヘミセルロースならびにリグニンを主要な構成成分とする強固な細胞壁を持つ中空の植物細胞が組織化された構造体である。このような木材を分解できる微生物を木材腐朽菌と呼んでいるが、そのほとんどが分類学的には担子菌類である。これらの担子菌は複雑な結合様式で重合した難分解性高分子物質であるリグニンや結晶性の繊維構造を有するセルロースに対して高い分解活性を示すことが特徴であり、これらの分解機構については古くから研究が進められてきた。また、細胞壁中でリグニンとセルロースの間に存在するヘミセルロースについては、担子菌による木材分解の初期過程において、リグニンやセルロースの分解に先立って減少してくことが古くから知られている。一方、ヘミセルロースを単独の基質として担子菌の培養実験を行うと、菌は必ずしも良好な生育を示さないことが明らかになっている。

(2) 上記のことから、担子菌による木材の分解の初発においては、ヘミセルロース構造中には担子菌による分解に対して何らかの抵抗性を示す構造が存在し、また、その構造的な制約が解除されることが木材分解の促進のためには必要であるという着想を得た。

## 2. 研究の目的

(1) 生化学的な観点に立つと、担子菌による木材の分解はそれを構成する3つの主要成分であるセルロース、ヘミセルロースならびにリグニンの生分解反応である。その中で、木材分解の初発においてはヘミセルロースの分解が起こり、これが木材全体の分解への大きな引き金を握っていると予想した。本研究では、このことを生化学的ならびに分子生物学的に実証することを目的とした。

(2) 本研究では、全ゲノム情報がすでに開示されている白色木材腐朽菌である担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 等を供試菌として、本菌が木材の主要な構成多糖であるセルロースの分解過程で生産する多様な菌体外酵素について二次元電気泳動法と LC-MS/MS 解析に基づく網羅的な同定ならびに比較定量、さらに少量のキシランを共存させた場合のその変化について解析を行った。また、その中で主要な酵素ならびに特徴的な変化を示した酵素について、それぞれに対応する遺伝子の発現応答を解析した。さらに、その結果に基づき、担子菌による木材分解の初発となるヘミセルロースの分子構造の認識とそ

の応答機構について考察を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 担子菌 *P. chrysosporium* の胞子を、2% w/v セルロース、2% w/v セルロース+0.2% w/v キシランあるいは2% w/v 広葉樹木粉(シラカバ木粉およびそのアンモニア前処理済みシラカバ木粉)をそれぞれ炭素源基質とする Kremer & Wood の液体培地に接種し、回転振とう培養を行った。経日的にサンプリングし、菌体量、菌体外タンパク質量、セルラーゼ、キシラナーゼ、セロビオース脱水素酵素(CDH)等の活性を測定した。

(2) 培養2日目のサンプルについて、二次元電気泳動ならびに LC-MS/MS によって、菌体外に分泌された酵素についてプロテオーム解析を行い、関連する各酵素の同定ならびに比較定量を行った。また、同様のプロテオーム解析を担子菌 *Flammulina velutipes* (エノキタケ) についても行った。

(3) グリセロールを基質として前培養した *P. chrysosporium* 菌体を用いて、重合度の異なる各キシロオリゴ糖ならびに各セロオリゴ糖による6時間のインキュベーションによる各酵素遺伝子の発現応答について、定量 PCR 法を用いて計測を行った。

## 4. 研究成果

(1) 担子菌 *P. chrysosporium* の培養において、セルロース培地に少量のキシランを添加すると菌体の初期成長速度を著しく増加すると同時に、菌体外タンパク質生産が促進された。この際、菌体外液のキシラナーゼ活性が著しく増加するが、同時にセルラーゼ活性についても増加する傾向が認められた。さらに、キシランの存在は CDH 活性を顕著に増大させた。このような現象は、イネ科草本植物由来のアラビノキシランおよび広葉樹由来のグルクロノキシランどちらを添加した場合にも認められた。このことから、これらの効果はキシランの側鎖構造よりも共通に存在する主鎖構造に由来する現象であると考察した(雑誌論文①および②)。

(2) セルロース分解培養系ならびにこれに少量のキシランを添加した培養系から得た菌体外液を二次元電気泳動に供したところ、菌体外タンパク質として47個のスポットが分離された。また、本菌のゲノム配列データベースを用いた LC-MS/MS 解析によって、それぞれのタンパク質について遺伝子座への

帰属ならびにスポットの蛍光強度に基づく定量解析を行った。その結果、キシランの添加により強度が2倍以上に増加しているスポットが12個検出された。それらのうち、7個のスポットはキシラン分解関連酵素に対応するものであったが、セルロース分解関連酵素として位置づけられているCDH、また最近の研究によってセルロース分解を促進する菌体外酸化還元酵素として位置づけられるようになったGHファミリー61に属するタンパク質GH61Cについても、キシラン添加によってスポット強度が増加した(雑誌論文②)。さらに、本菌が生産する菌体外酵素のプロテオーム解析の過程で、新規セルラーゼを発見し、その酵素機能を解析した(雑誌論文⑥)。

(3) 全ゲノム配列情報が解読されていない担子菌 *F. velutipes* について、各種バイオマスを利用して培養した菌体から抽出した全mRNAに対してcDNAを合成して、これについて次世代シーケンサー454GX FLX Titaniumを利用してDNA配列情報データベースを構築した。その結果、*P. chrysosporium* の場合と同様に菌体外酵素のプロテオーム解析が出来ることを明らかにした。また、本菌ではセルロース単独の基質とする培養系でも、多様なヘミセルロース分解酵素群を生産していることが明らかとなった(雑誌論文③)。

(4) 担子菌 *P. chrysosporium* について、セルロース分解関連酵素遺伝子の発現応答への各重合度のキシロオリゴ糖の影響について解析を試みた。また、セロオリゴ糖についても同様の実験を行い、両者の影響について比較検討した。なお、この実験では、本菌における主要なセルラーゼであるCel6A、Cel7CおよびCel7D、また菌体外タンパク質の網羅的解析によりキシラン添加により分泌が促進されたCDHおよびGH61タンパク質の遺伝子を実験の対象とした。グリセロールを基質とする培地で前培養した *P. chrysosporium* 菌体を含む培養系にキシロースおよび重合度(DP)2-4のキシロオリゴ糖を添加した後、各セルロース分解関連酵素遺伝子の発現応答を定量PCR法により経時的にモニタリングした。その結果、キシロオリゴ糖添加1時間後、*cel7C*、*cel7D*、*cdh*、*gh61B*、*gh61C*等の遺伝子の転写レベルが増加することが明らかとなった。また、キシロオリゴ糖添加によるこれらの遺伝子発現応答は、対照としたセロオリゴ糖添加による遺伝子発現量の増加に比べると一般的にはオーダーレベルで小さかったが、その中で*cel7C*だけはキシロオリゴ糖によっても際だった発現応答を示すことが明らかとなった。また、セロオリゴ

糖による発現誘導については、セルラーゼ遺伝子と同様に、*cdh*、*gh61B* および *gh61C* においても顕著に認められた。さらに、キシロオリゴ糖ならびにセロオリゴ糖添加による発現パターンを比較すると、*cel7C*、*cdh*、*gh61B* が非常に共通なパターンを示すことが明らかとなった(雑誌論文①、④、⑤および⑦)。

(5) キシロオリゴ糖の存在はセルロース分解に関与するCel7CやCel7DならびにCDHやGH61ファミリーに分類される酸化還元酵素等の遺伝子発現を増大させるが、キシロオリゴ糖による誘導はセロオリゴ糖による誘導に比べると転写レベルが低かったことから、担子菌 *P. chrysosporium* においては、キシロオリゴ糖によって誘導生産されたセルラーゼCel7C等によるセルロース分解によってセロオリゴ糖の生成が促され、これが他のセルロース分解関連酵素の遺伝子を連鎖的に強く発現誘導するといったカスケード的な応答機構が存在する可能性が示唆された。

(6) シラカバ木粉ならびにそのアンモニア前処理木粉を基質として、*P. chrysosporium* の培養実験を行った。その結果、アンモニア前処理木粉では、本菌の成長が著しく向上することが明らかとなった。また、同時に本菌が生産する菌体外酵素によってアンモニア処理木粉の分解が著しく向上することも示された(学会発表③)。アンモニア前処理を行った木粉中のキシランでは、エステル結合の開裂により、キシラン主鎖を修飾しているアセチル基の脱離等の変化が起こっていることが化学分析およびプロテオーム解析の結果から示唆された。

(7) 以上の結果を総括すると、担子菌 *P. chrysosporium* による広葉樹木材の分解においては、キシラン中のアセチル残基のエステル結合の開裂と引き続くキシラン主鎖の分解によるキシロオリゴ糖の生成によるセルロース分解酵素系の誘導が木材分解の引き金になると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① C. Hori, H. Suzuki, K. Igarashi, M. Samejima, Transcriptional response of cellobiose dehydrogenase gene to cello- and xylooligosaccharides in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, 査読有, Appl. Environ. Microbiol., in press.
- ② C. Hori, K. Igarashi, A. Katayama, M. Samejima, Effects of xylan and starch on secretome of the basidiomycete

- Phanerochaete chrysosporium*, 査読有 FEMS Microbiol. Lett., Vol. 321, 2011, pp. 14-23.
- ③ 石黒真希, 堀千明, 片山映, 五十嵐圭日子, 高島幸司, 金子哲, 鮫島正浩, 木材学会誌, 査読有, 56巻, 2010, 388-396.
- ④ H. Suzuki, K. Igarashi, M. Samejima, Cellotriose and cellobiose as inducers of the genes encoding cellobiohydrolases in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Environ. Microbiol., 査読有, Vol.27, 2010, pp. 273-281.
- ⑤ H. Suzuki, K. Igarashi, M. Samejima, Quantitative transcriptional analysis genes encoding glycoside hydrolase family 7 cellulase isozymes in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, FEMS Microbiol. Lett., 査読有, Vol. 299, 2009, pp. 159-165.
- ⑥ K. Igarashi, T. Ishida, .C Horii and M. Samejima, Characterization of an endoglucanase belonging to a new subfamily of glycoside hydrolase family 45 of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, 査読有, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 71, 2008, pp. 5628-5634
- ⑦ H. Suzuki, K. Igarashi, and M. Samejima, Real-time quantitative analysis of carbon catabolite derepression of cellulolytic genes expressed in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 査読有, Vol. 80, 2008, pp. 99-106.

[学会発表] (計9件)

- ① 堀千明, 五十嵐圭日子, 片山映, 鮫島正浩, 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の菌体外酵素生産に与えるキシランおよびキシロオリゴ糖の影響, 第61回日本木材学会大会, 2011年3月20日, 京都市
- ② 和田朋子, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用いた木材腐朽菌の系統解析と定量化, 第61回日本木材学会大会, 2011年3月19日, 京都市
- ③ 櫻木潔, 堀千明, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 林礼子, 三橋秀一, *Phanerochaete chrysosporium* がアンモニア処理シラカバ分解時に生産する菌体外酵素のセクレトーム解析, 第61回日本木材学会大会, 2011年3月18日, 京都市
- ④ 鮫島正浩, 石黒真希, 堀千明, 五十嵐圭日子, 金子哲, 高島幸司, 片山映, エノキタケがセルロース分解性培養系で生産する全分泌タンパク質の解析, 第60回日本木材学会大会, 2010年3月18日, 宮崎市

- ⑤ 堀千明, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 片山映, 担子菌 *Postia placenta* がグルコマンナン分解過程で生産する菌体外タンパク質の網羅的解析, 第60回日本木材学会大会, 2010年3月18日, 宮崎市
- ⑥ 鈴木一史, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* におけるセルロース分解酵素遺伝子のキシランに対する発現応答の定量解析, 第60回日本木材学会大会, 2010年3月18日, 宮崎市
- ⑦ 堀千明, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 片山映, 西野武士, バイオマス構成多糖の分解過程における担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセクレトーム解析, 第59回日本木材学会大会, 2009年3月16日, 松本市
- ⑧ 鈴木一史, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* における、セルロースおよびグルコースに対する *cel7* 遺伝子群の発現応答の差に関する定量的解析, 第59回日本木材学会大会, 2009年3月15日, 松本市
- ⑨ 鈴木一史, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, カーボンカタボライト抑制解除環境下における担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の *cel7* 遺伝子群の発現挙動に関する定量的解析, 第8回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2008年11月18日, 金沢市

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: エンドグルカナーゼ活性を有する新規タンパク質、そのDNA、及びそれらの利用  
 発明者: 五十嵐圭日子、鮫島正浩  
 権利者: 同上  
 種類: 特許  
 番号: 特開 201002242 号  
 出願年月日: 2008年7月16日  
 国内外別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鮫島 正浩 (SAMEJIMA MASAHIRO)  
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
 研究者番号: 30162530

### (2) 研究分担者

五十嵐 圭日子 (IGARASHI KIYOHICO)  
 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