

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25年 5月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21580402

研究課題名（和文） リグニン分解酵素は、なぜ異種発現できないのか？

研究課題名（英文） Characterization of unique properties in expression of ligninolytic enzymes by white-rot fungi

研究代表者

本田 与一（HONDA YOICHI）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70252517

研究成果の概要（和文）：木質系バイオマスは、食糧と競合しない循環型のバイオマス資源として、その変換利用に社会的要請が高まりつつある。白色腐朽菌（キノコ）の仲間は、木材中に存在する難分解性の高分子リグニンを分解する能力を持っており、その特有の酵素群を大量に調整することができれば、木質バイオマスの利用におけるエネルギーや環境負荷を大きく低減することが期待されている。本研究では、リグニンを分解する酵素がどのような発現制御を受けているかを明らかにするための基礎的な研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Lignocellulosic resources are expected as sustainable resources which can be converted to useful materials such as bio-ethanol or biodegradable plastics and not competing with utilization as foods. However, effective elimination of lignin is a bottle neck in the conversion process of lignocellulosics and white-rot fungi can solve this problem providing specific enzymes which are very difficult to produce by heterologous organisms. In this study, basic properties specific for expression of proteins have been analyzed in white-rot fungi, such as *Pleurotus ostreatus* and *Ceriporiopsis subvermispora*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：木材腐朽菌、バイオマス、リグニン分解、遺伝子組換え

1. 研究開始当初の背景

石油資源の枯渇と地球温暖化問題への対応が急がれている中で、木質系バイオマスは、トウモロコシやサトウキビなどのデンプン系バイオマス資源と異なり、食糧と競合しない循環型のバイオマス資源として、エタノールや生分解性プラスチックなどへ

の変換利用に社会的要請が高まりつつある。木材に代表されるリグノセルロースは、多糖類のまわりを難分解性のリグニンが被覆しているため、デンプンなどと異なり酵素的な糖化に先立つ前処理が必要であり、各国で効率のよい糖化を可能にする総合プロセスの開発が盛んに試みられている。担子

菌類に属する白色腐朽菌（キノコ）の仲間は、木材中に存在する難分解性の高分子リグニンを分解する能力を持っており、その特有の酵素群を大量に調整し、リグノセロースのリファイナリープロセスにおいてセルラーゼによる糖化の際に併せて用いることができれば、前処理に必要とされるエネルギーや酸などの環境負荷を大きく低減することが期待されている。

これまでの研究では、酵母などの異種生物を用いて白色腐朽菌のリグニン分解酵素を活性ある形で発現することは困難であり、人工的にリフォールディングを行うことで酵素分子の数%が活性を示すのみであった。このことは、担子菌類独自の遺伝子発現機構が存在し、異種生物による発現系では、タンパク質の折りたたみ機構や修飾機構の違いが存在していることを示している。

2. 研究の目的

本研究は、リグニン分解酵素がなぜ異種生物では発現しにくいのかという問題点を端緒として、白色腐朽菌独自の菌体外酵素遺伝子発現系、およびタンパク質折りたたみのメカニズムについて分子生物学的なメスを入れることを目的とする。本研究の成果により、リグニン分解酵素を大量に生産することが可能になれば、木質バイオマスの効率的な酵素糖化や難分解環境汚染物質の処理など、様々な産業プロセスを開発するためのプラットフォームを確立することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 子囊菌で報告されているタンパク質折りたたみ制御系の *hacA* 遺伝子のホモログのクローニングを行った。一般にパン酵母などとして知られ、分子遺伝学的な研究にモデルと生物として良く用いられている子囊酵母 *Sacharomycete cerevisiae* の *hacA* 遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列をもとに、様々な子囊菌類において保存されているアミノ酸領域に相当する部分に対応する縮重プライマーを合成し、PCRにより担子器類のホモログをクローニングすることを試みた。

(2) 木材中のリグニンを効率よく分解する担子菌の仲間である白色腐朽菌では、遺伝子発現制御系の分子メカニズム解明の為のアッセイ系が存在していない。このため、選択的リグニン分解菌 *Ceriporiopsis subvermispora* を材料として、一過性の形質転換（トランスフェクション）による遺伝子発現解析系の開発を試みた。また、国

産の白色腐朽菌ヒラタケにおけるレポーター遺伝子の開発を試みた。

4. 研究成果

(1) 子囊菌で報告されているタンパク質折りたたみ制御系の *hacA* 遺伝子のホモログのクローニングについて、ヒラタケゲノムDNAを鋳型とした縮重プライマーを用いたPCR実験を初年度および翌年度に試みた。しかしながら、繰り返し検討を行ったがポジティブなクローンは得られなかった。このことは担子菌では子囊菌と異なる独特なタンパク質分泌系を持っていることを示唆するものと考えられる。現在では、ヒラタケのゲノムDNA塩基配列が公開されており、相同性検索を用いることで、比較的相同性の低いホモログの存在を確認することが可能であり、またジーンターゲット系も開発されたことからそうした相同性の低い候補遺伝子の機能を解析することもできる可能性がある。担子菌類では、同じ真菌類の子囊菌類とはかなり異なるタンパク質発現・修飾系をもつことが予想されるため、今後の解析の結果に期待したい。

(2) 一方、白色腐朽菌における遺伝子発現の開始をコントロールするプロモーターの活性評価系は、これまで有効なものが存在していなかった。選択的リグニン分解菌 *C. subvermispora* における一過性の形質転換体の取得を試み、導入遺伝子に依存して一時的に形質が発現する実験系を見出すことに成功した。本実験結果では、染色体上への組み込み位置やコピー数による影響を受けない一過性の遺伝子発現系を用いて、正確にプロモーター活性を測定することができアッセイ系を担子菌類では初めて開発し、担子菌類における遺伝子の転写開始に必要な配列の解析を可能とする新しい研究の方向性を見出すに至った。

続いてこのプロモーターアッセイ系の評価を行った。*gpd* 遺伝子は、解糖系の鍵酵素である (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) をコードしており、転写量の高いハウスキーピング遺伝子として知られている。*C. subvermispora* の *gpd* 遺伝子プロモーターからの転写開始に必要な塩基配列を明らかにするために、1233~0 bp に至る様々な長さのプロモーター領域を持つ 14 株からなる欠失シリーズを作成し、ハイグロマイシン耐性遺伝子の発現を行わせることによって、転写開始活性を比較した。その結果、基本的な転写開始には翻訳開始点の上流 141 bp が必須であることが明らかになった。次にこの領域の塩基配列を *in silico* で解析したところ、TATAA

box, CT-rich motif の他、真核生物の転写においてしばしば観察される Sp-1, AP-1, GCN4 結合配列などが存在していることが明らかになった。

続いて *gpd* 遺伝子の最小プロモーター領域内の *cis* 配列の重要性の評価を行った。*gpd* 遺伝子プロモーターからの転写開始に必要な塩基配列を明らかにするために、基本的な転写開始に必要であることが明らかとなった翻訳開始点の上流 141 bp 内に存在する TATAA box, CT-rich motif, Sp-1, AP-1, GCN4 結合配列内に部位特定的な変異株を作成し、転写活性を測定した。その結果、GCN4、AP-1 結合コンセンサス配列と TATAA-box に変異を入れた時に、プロモーター活性が著しく低下するという結果となった。従って、これらの配列が転写の開始に重要であることが明らかとなった。(こうした一連の結果については、追加の実験結果が揃った際に、学術雑誌への投稿論文としてとりまとめる予定である。)

これらの結果は、担子菌における初めてのプロモーター配列解析となった。また、この系は、遺伝子の転写開始の制御機構の解明だけではなく、転写物の成熟に必要な配列や、翻訳開始に必要な配列、翻訳効率の変化など、担子菌類における遺伝子発現の様々なフェーズの解析に用いることができるため、当該分野における基礎科学の進展と、応用に向けた障壁の除去のための基盤となることが期待される。

さらに、国産の重要な白色腐朽菌であるヒラタケにおいて組換え GFP 遺伝子の導入、および安定形質転換体での発現に成功した。また、この系を用いてリグニン分解に関与すると考えられる同菌のラッカーゼ遺伝子のうち、培地中に銅イオンを添加することで、著しく発現が誘導されることが知られている *poxc* および *poxa1b* のプロモーターを用いた GFP 遺伝子の発現に成功した (学術雑誌に掲載)。これは、同菌において初めてのレポーター系の開発となった。今後、より正確にプロモーター活性が測定可能なトランスフェクションによる発現量の同定が可能かどうか、解析を行っていく予定である。

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 2 件)

1. Enhanced green fluorescent protein expression in *Pleurotus ostreatus* for in vivo analysis of fungal laccase promoters Antonella Amore, Yoichi Honda and Vincenza

Faraco, Appl. Biochem. Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-012-9816-3 (査読あり)

2. Copper induction of enhanced green fluorescent protein expression in *Pleurotus ostreatus* driven by laccase *poxa1b* promoter Antonella Amore, Yoichi Honda and Vincenza Faraco, FEMS Microbiol. Lett. 337 (2012) 155-163 (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

1. A new system for in vivo analyses of *Pleurotus ostreatus* promoters of laccases for food and beverages industries Antonella Amore, Yoichi Honda and Vincenza Faraco, International Conference on Industrial Biotechnology (ICIB 2012) Patiala (India), 21-23 November, 2012

2. Honda Y., Tanigawa E., Watanabe T. and T. Watanabe: Mutational analysis of *GPD* promoter sequence using a transient gene expression -A new promoter assay system for basidiomycetous fungi-. The 7 International Conference of the World Society for Mushroom Biology and Mushroom Products, Arcachon, France, 2011/10/4-7

3. Honda Y., E. Tanigawa, Takahito Watanabe and Takashi Watanabe: Transient gene expression and promoter analysis in basidiomycete: The 6th meeting of East Asia for Mushroom Science 2010, 2010/11/12-15, Gyeongju, Korea p.71 (2010)

4. 本田与一, 谷川瑛二, 渡邊崇人, 渡辺隆司: *gpd* 遺伝子プロモーターの解析: GCN4 結合配列の機能について, 日本きのこ学会第 14 回大会, 東京, 2010/9/15-17

5. 本田与一, 谷川瑛二, 渡邊崇人, 渡辺隆司: 担子菌における新規プロモーターアッセイ系の開発, 日本菌学会第 54 回大会, 東京, 2010/5/29-30

6. Honda, Y., E. Tanigawa, H. Kawabe, J. Watari, Takahito Watanabe, Takashi Watanabe, Genetic transformation and promoter assay systems in selective lignin degrader, *Ceriporiopsis subvermispora*, Lignobiotech one, 1st Symposium on Biotechnology Applied to Lignocelluloses, 2010/3/28-4/1, Reims, France 31 (2010)

7. 谷川瑛二、川邊陽文、渡利純子、渡邊崇

人、本田与一、渡辺隆司，選択的リグニン分解菌 *Ceriporiopsis subvermispora* の安定形質転換系とプロモーターアッセイ系の開発，第 60 回日本木材学会大会，宮崎，2010/3/17-19

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田与一 (HONDA YOICHI)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：70252517

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし