

## 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 6 月 8 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580404

研究課題名（和文）木質リグニン分解酵素生産制御法の開発に関する研究

研究課題名（英文）Exploitation of new method to control ligninolytic enzymes production

研究代表者

入江 俊一（IRIE TOSHIKAZU）

滋賀県立大学 環境科学部 准教授

研究者番号：30336721

研究成果の概要（和文）：白色腐朽菌は強力なリグニン分解系を持ち、木質リグニンやダイオキシンのような難分解性有機物を効率的に分解できることで知られている。これを利用することにより、環境に与える負荷が少ない状態で木質を有望な燃料資源へと変換、または、環境汚染物質を除去する新規バイオリアクターの構築が可能であると考えられる。しかし、白色腐朽菌のリグニン分解系は多くの既知、および未知遺伝子からできており、しかも、それら遺伝子の発現は誘導性であるのだが、誘導因子の詳細は不明である。白色腐朽菌のリグニン分解能についての知識は不十分であり、このことがバイオリアクター開発の大きな障害となっている。もし、リグニン分解系全体を調節するマスターレギュレーター遺伝子を特定することができれば、リグニン高分解菌育種のためのターゲットとなるばかりでなく、リグニン分解系を研究する上でも重要な手掛かりになるだろう。

本研究においては、世界で最も広く研究されている白色腐朽菌である *Phanerochaete chrysosporium* を供試菌として用いて、リグニンペルオキシダーゼ（LiP）およびマンガンペルオキシダーゼ（MnP）の発現初期の菌体を用いたトランスクリプトーム解析を行った。LiP および MnP は典型的なリグニン分解酵素であり、リグニン分解系発現の良い指標と考えられている。解析の結果、カルモデュリン（CaM）をコードする遺伝子が *lip* および *mnp* 遺伝子と並行に発現していることが明らかとなった。そこで、CaM の役割について考察するため、CaM 阻害剤である W-7 が LiP および MnP の発現に与える影響について調査した。その結果、CaM は LiP および MnP アイソザイム遺伝子群の発現において重要な役割を持ち、cAMP シグナルは CaM 遺伝子転写の活性化を通して LiP および MnP アイソザイム遺伝子群の転写を活性化することが示唆された。現在、我々は、新規リグニン高分解菌育種のターゲットを同定することを目的として、CaM 相互作用タンパクについて解析を行っているところである。

研究成果の概要（英文）：White-rot fungi are known to have a powerful ligninolytic system that can completely degrade wood lignin as well as persistent organic pollutants such as dioxin. This ability may be applicable to the construction of a novel potent bioreactor system to convert wood to potent materials and energy sources with low environmental load and to bioremediate polluted environments. However, the ligninolytic property of these fungi is attributable to many known and unknown enzyme genes, expression of which is inductive, and the factors that determine this expression are not completely understood. The lack of knowledge regarding the ligninolytic property of these fungi is an impediment to the development of a highly effective lignin-degrading fungal strain for the construction of an efficient bioreactor system. The identification of a master regulator that regulates the entire ligninolytic system in white-rot fungi could be used as a target for breeding a high lignin-degrading strain and for furthering our understanding of the lignin-degradation system in these fungi.

In this study, we conducted a transcriptome analysis during the early development of Lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) in *Phanerochaete chrysosporium*, which is one of the most widely researched white-rot fungus in the world.

LiP and MnP are typical ligninolytic enzymes and considered good indicators for ligninolytic system expression. The transcriptome analysis indicated that the gene encoding calmodulin (CaM) was expressed in parallel with the *lip* and *mnp* genes. Then, we investigated effects of a calmodulin (CaM) inhibitor, W-7 on the expression of LiP and MnP genes in *P. chrysosporium* in order to consider the role of CaM. As a result, it was suggested that CaM has an important role for the expression of isozyme genes of LiP and MnP at the transcription level and that cAMP signaling functions to increase the transcription of LiP and MnP through the induction of *cam* transcription. We are currently investigating CaM-interacting proteins to analyze the downstream pathway regulated by CaM with the aim to identify a breeding target for construction of novel high lignin-degrading strains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

### 1. 研究開始当初の背景

木質は世界で最も豊富な再生可能資源であり、年間数百億トンから千数百億トン生産されていると言われている。しかし、液化燃料、樹脂などへ加工することが難しく、石油代替資源としての利用は進んでいない。木質を有効利用することは植林地の保全や、森林面積の減少を食い止める動機付けにもなる。

白色腐朽菌は強力なリグニン分解系を持ち、木質リグニンやダイオキシンのような難分解性有機物を効率的に分解できることで知られている。これを利用することにより、環境に与える負荷が少ない状態で木質を有望な燃料資源へと変換、または、環境汚染物質を除去する新規バイオリアクターの構築が可能であると考えられる。しかし、白色腐朽菌のリグニン分解系は多くの既知、および未知遺伝子からできており。しかも、それら遺伝子の発現は誘導性であるのだが、誘導因子の詳細は不明である。白色腐朽菌のリグニン分解能についての知識は不十分であり、このことがバイオリアクター開発の大きな障害となっている。もし、リグニン分解系全体を調節するマスターレギュレーター遺伝子を特定することができれば、リグニン高分解菌育種のためのターゲットとなるばかりでなく、リグニン分解系を研究する上でも重要な手掛かりになるだろう。

### 2. 研究の目的

白色腐朽菌におけるリグニン分解機構を調節するマスターレギュレーター遺伝子を特定することを最終的な目的として、LiP および MnP 発現に関わるシグナル伝達経路について解析を行う。

### 3. 研究の方法

供試菌として、世界で最も広く研究されている白色腐朽菌である *P. chrysosporium* を用いた。LiP および MnP の活性発現直前の菌体 (培養 2 日目)、直後の菌体 (培養 3 日目)、および cAMP 阻害剤を入れた培養 3 日目の菌体から RNA を抽出し、Long Serial Analysis of Gene Expression 法によるトランスクリプトーム解析を行った。

LiP および MnP 発現における CaM の働き、cAMP シグナリングとの関連性を調べるために、培養 2 日目の培養物に 10 mM の cAMP とホスホジエステラーゼ阻害剤として 500  $\mu$ M の IBMX を添加した条件、または CaM 阻害剤として 100  $\mu$ M の W-7 を加えた条件などを設定して、酵素活性の経時変化を測定した。

### 4. 研究成果

3 種のライブラリーを比較し、酵素発現時に *p* 値が 0.05 以下かつ発現量が二倍以上変化したものについて検索した結果、発現量が増加した遺伝子が 71 個、減少した遺伝子が 22 個現れた。発現量が増加した遺伝子には、リグニン分解酵

素遺伝子 (LiP H8 遺伝子、*mnp2*、*mnp3*)、CaM 遺伝子などの  $Ca^{2+}$  シグナリング関連遺伝子などが含まれていた。またクラスター解析の結果、それら遺伝子はクラスターを形成し、さらに、*mnp2* とカルモデュリン、*mnp3* とホスホリパーゼ D、リシン B レクチン、シトクローム P450、カレオシンがそれぞれサブクラスターを形成した。各遺伝子の詳細な働きは未だ不明であるが、これら遺伝子はリグニン分解酵素発現において重要な働きをすることが示唆された (発表論文(1)参照)。

CaM の役割について考察するため、CaM 阻害剤である W-7 が LiP および MnP の発現に与える影響について調査した。培養物に 10 mM の cAMP とホスホジエステラーゼ阻害剤として 500  $\mu$ M の IBMX を添加したところ、有意に LiP 活性および MnP 活性が増加した。これにより、cAMP シグナルが LiP および MnP 活性に関与する直接的な証拠が初めて得られた (Fig.1)。

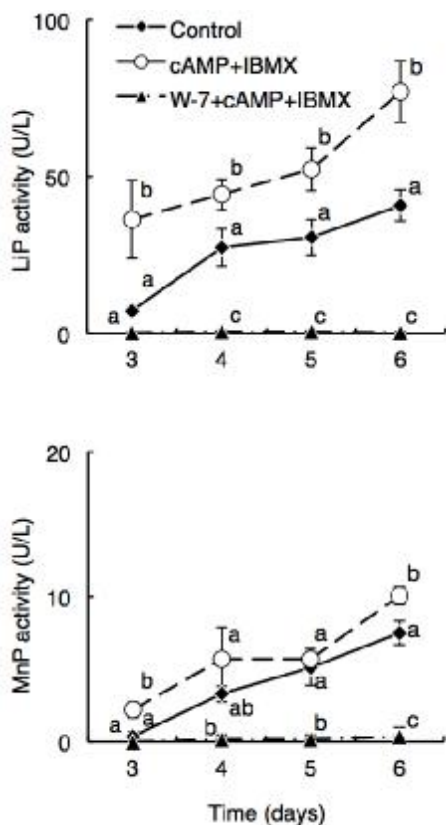


Fig. 1 酵素活性経時変化

cAMP、IBMX に加えて CaM 阻害剤として 100  $\mu$ M の W-7 を添加したところ、酵素活性は消失した。また、100  $\mu$ M W-7 添加では細胞内 cAMP 濃度に変化は生じなかった。以上のことは、LiP および MnP 発現において、CaM シグナルが cAMP シグナルの下流に位置することを示唆している。

次に、*P. chrysosporium* が持つ全 LiP および全 MnP アイソザイム遺伝子の転写物量について、上記薬剤に対する影響を調べた。その結果、W-7 は転写レベルで全 LiP および全 MnP アイソザイム遺伝子の発現を抑制することが判明した。また、cAMP と IBMX の添加は CaM の転写を増加させることが分かった (発表論文(2)、(3)参照)。これはトランスクリプトーム解析の結果とも一致する。

以上の結果から、CaM は LiP および MnP アイソザイム遺伝子群の発現において重要な役割を持ち、cAMP シグナルは CaM 遺伝子転写の活性化を通して LiP および MnP アイソザイム遺伝子群の転写を活性化することが示唆された (Fig. 2)。

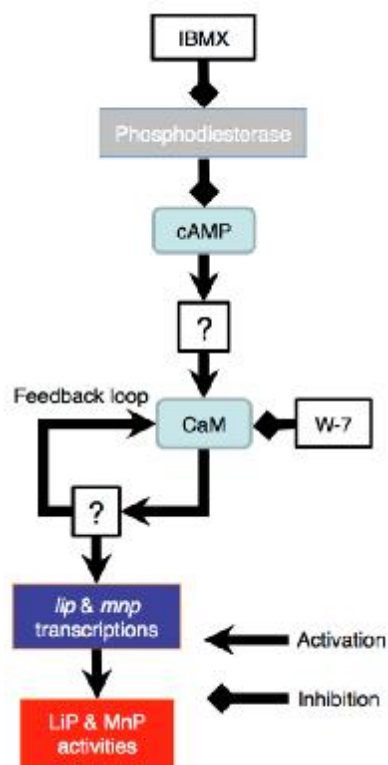


Fig. 2 リグニン分解酵素発現機構

現在、我々は、新規リグニン高分解菌育種のターゲットを同定することを目的として、CaM 相互作用タンパクについて解析している。具体的には、ファージディスプレイ法を用いて CaM 結合性のタンパク質を網羅的に検出し、プルダウン法にて CaM 結合性の確認を行い、検出されたタンパク質機能について考察を行っているところである。

## 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 3 件)

(1) Minami M., K. Suzuki, A. Shimizu, T. Hongo, T. Sakamoto, N. Ohyama, H. Kitaura, A. Kusaka, K. Iwama, and T. Irie (2009) Changes in the gene expression of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* by the addition of atropine. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73(8):1722-1731

(2) Sakamoto T., H. Kitaura, M. Minami, Y. Honda, T. Watanabe, A. Ueda, K. Suzuki, T. Irie (2010) Transcriptional effect of a calmodulin inhibitor, W-7, on the ligninolytic enzyme genes in *Phanerochaete chrysosporium*. *Current Genetics* 56(5):401-410

(3) Sakamoto T., Y. Yao, Y. Hida, Y. Honda, T. Watanabe, W. Hashigaya, K. Suzuki, T. Irie (2012) A calmodulin inhibitor, W-7 influences the effect of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate signaling on ligninolytic enzyme gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*. *AMB express* 2(1):7 (online journal)

[学会発表] (計 11 件)

(1) 阪本鷹行, 南 正彦, 上田暁生, 鈴木一実, 入江俊一 (2009) *Phanerochaete chrysosporium* リグニン分解酵素発現におけるカルモデュリン阻害剤の影響, 日本菌学会第 53 回大会、鳥取大学

(2) 阪本鷹行, 北浦博法, 南 正彦, 上田暁生, 鈴木一実, 入江俊一 (2009) *Phanerochaete chrysosporium* のリグニン分解酵素発現におけるカルモデュリン阻害剤の影響, 第 54 回リグニン討論会、静岡県男女共同参画センター

(3) 阪本鷹行, 北浦博法, 南 正彦, 上田暁生, 鈴木一実, 入江俊一 (2009) カルモデュリン阻害条件における *Phanerochaete chrysosporium* リグニン分解酵素アイソザイム群の発現様式, 第 9 回糸状菌分子生物学コンファレンス、東京大学

(4) SAKAMOTO, T., M. MINAMI, Y. HONDA, T. WATANABE, K. SUZUKI, T. IRIE (2010) A calmodulin inhibitor, W-7 repressed expression of ligninolytic enzyme genes, *IMC9 The Biology of Fungi*, Edinburgh, UK

(5) Irie, T., T. Sakamoto, K. Suzuki (2010) A study on signaling pathway of ligninolytic enzyme expression, *IMC9 The Biology of Fungi*, Edinburgh, UK

(6) 阪本鷹行、本田与一、渡辺隆司、大山尚毅、鈴木一実、入江俊一 (2011) リグニン分解酵素の発現を調節するカルモデュリン相互作用タンパクの検索, 第 61 回 日本木材学会大会, 京都大学

(7) 矢尾祐樹, 阪本鷹行, 橋ヶ谷 渉, 肥田嘉文, 鈴木一実, 本田与一、渡辺隆司, 入江俊一 (2011) リグニン分解酵素発現における cAMP シグナルの作用, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 京都大学

(8) Irie, T., T. Sakamoto, Y. Yao, K. Suzuki (2011) Research on signaling pathways in ligninolytic enzyme expression, *World Congress of Microbes-2011*, Beijing, China

(9) Sakamoto, T., Y. Honda, I. Kameshita, T. Watanabe, K. Suzuki, T. Irie (2011) Screening of calmodulin-binding proteins expressed during ligninolytic enzyme production. *IUMS2011: The Unlimited World of Microbes*, Submiss No.12509, Sapporo Japan

(10) Yao Y., T. Sakamoto, Y. Honda, T. Watanabe, W. Hashigaya, Y. Hida, K. Suzuki, T. Irie (2011) Effects of cAMP on ligninolytic enzymes production in *Phanerochaete chrysosporium*. *IUMS2011: The Unlimited World of Microbes*, Submiss No.12509, Sapporo Japan

(11) 阪本鷹行、矢尾祐樹、本田与一、亀下勇、鈴木一実、入江俊一 (2012) リグニン分解酵素発現におけるカルモデュリンの働き, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都女子大

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江俊一 (IRIE TOSHIKAZU)

滋賀県立大学 環境科学部 准教授

研究者番号 : 30336721