

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21880026

研究課題名（和文）白色腐朽菌の菌体外多糖マトリックス中の過酸化代謝物によるリグニン分解機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of extracellular peroxidized metabolites from the glucan matrix involved in lignin biodegradation by white rot fungi

研究代表者

西村 裕志 (NISHIMURA HIROSHI)

京都大学・生存圏研究所・研究員

研究者番号：50553989

研究成果の概要（和文）：

選択的的白色腐朽菌によるリグニン分解は菌体外における複雑な反応機構である。本研究では、反応場である菌体外多糖マトリックスに着目し、この中に含まれるリグニン分解反応に関与し得る酸化代謝物の探索を実施した。その結果、新規酸化代謝物の同定に成功した。*In vitro* 分解反応系において非フェノール性リグニン 2 量体モデルの分解が見られたことから、こうした代謝物の有効性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Lignin degradation by selective white rot fungi is an extracellular complicated event. Here, we focused on the reaction site – extracellular glucan matrix, and screen some oxidative metabolites which could be involved in the reaction. As results, we succeeded in identifying the oxidative unique metabolites. *In vitro* degradation of a non-phenolic β -O-4 lignin model dimer was observed in the biomimetic reaction, suggesting that the efficacy of these metabolites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：森林学

科研費の分科・細目：木質科学

キーワード：リグニン、バイオマス、担子菌、セリポリク酸、木材腐朽菌

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化、環境汚染、資源枯渇といった地球規模の重大な問題に対処するためには、化石資源の大量消費に依存した社会から、持続可能かつカーボンニュートラルな資源を循環利用する社会への転換が必要である。そうした観点から木質バイオマス(木材)を効率的

に変換・利用する技術の開発が求められている。木質バイオマス変換において、多糖を覆うリグニンの分解除去は重要な課題である。本研究では、環境負荷の小さいリグニン分解反応系として、選択的的白色腐朽菌が有するリグニン分解反応に着目する。選択的的白色腐朽菌はリグニンを高選択的に分解する一方、セルロースの分解率が低いというユニークな

腐朽メカニズムを有する。これは、細胞壁の侵食なしに広範囲のリグニンを分解する、いわば遠隔攻撃であり、その分子種の探索、同定が腐朽メカニズム解明の鍵である。

研究代表者らはこれまでに選択的的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* の菌体外代謝物について研究を行ってきた。特に代表的な代謝物セリポリック酸について類縁体や絶対配置などを含めた構造解析を行った。このセリポリック酸はセルロースを激しく分解するフェントン反応の抑制効果があり、選択的リグニン分解において重要な役割を担っていると考えられる。しかしながら、リグニン分解を担う代謝物については十分な知見が得られていなかった。

C. subvermispora による木材腐朽においては、菌糸表面を覆う多糖マトリックスである sheath が木材細胞壁と接触する領域からリグニン分解が進行する現象が観察されている。そこで、研究代表者は sheath 中にリグニン分解に関与する代謝物として、酸化、過酸化および被過酸化性代謝物が存在している可能性に着目した。

2. 研究の目的

選択的的白色腐朽菌 *C. subvermispora* が産生する、酸化・過酸化代謝物およびその前駆体の構造とその生成機構および実際のリグニン分解反応を詳細に解析し、新しいリグニン分解機構を提案することを目的とする。

具体的には、過酸化代謝物や過酸化反応を検出するアッセイ系の新規に確立し、これを用いて、酸化・過酸化代謝物の探索と構造決定を行う。新規代謝物同定は、天然物への同位体標識法や、化学合成、*in vitro* 合成による標準品との比較を行う。また、確立したアッセイ系を指標に過酸化反応の触媒酵素の探索を行う。以上の知見で得られた酸化・過酸化代謝物およびその前駆体を用いて、実際のリグニン分解系における有効性を難分解性の非フェノール性リグニン 2 量体モデル化合物を用いて、評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 代謝物の探索と同定

選択的的白色腐朽菌は前培養後、木片入り培地により 3-6 週間静置培養を行い、菌体外面分を回収後、sheath 画分を分画し、代謝物抽出液および粗酵素液を調製した。また、¹³C 同位体標識体の調製、酸化代謝物の *in vitro* 合成、

前駆体となる代謝物の化学合成を行った。これらの天然代謝物および合成品について、分画後 LC/IT-TOF-MS 分析に供し、精密質量、保持時間、MS フラグメンテーション解析を行った。

(2) 過酸化酵素および前駆体生成酵素の同定

過酸化活性を指標として目的酵素の精製を行った。特に電気泳動(native-PAGE、IEF)上で過酸化酵素の活性染色を行い、目的タンパク質を消化酵素処理後 MALDI-TOF-MS 分析に供した。また、前駆体生成酵素はゲノム情報を元にプライマーを作成し、cDNA のクローニング、および大腸菌による異種発現を行い、LC/ESI-MS による触媒活性分析を行った。

(3) リグニン分解機構の解析

リグニン分解機構に関しては、非フェノール性リグニン 2 量体モデル化合物を用いて、代謝物と分解酵素による *in vitro* 分解反応系を構築し、GC/MS 分析により詳細な解析を行った。

4. 研究成果

研究代表者らはまず、菌糸表面を覆うグルカン層(多糖マトリックス)である sheath に着目した。先行研究において sheath と木材細胞二次壁の接触面からのリグニン分解が観察されていることから、sheath 画分に含まれる代謝物および酵素の抽出を行った。その中からリグニン分解に直接関与しうる過酸化代謝物および被過酸化性代謝物に着目し、これを検出するアッセイ系を開発した。アッセイ系は簡易的には、脂質過酸化物との反応による蛍光検出法を用い、さらに基質の酸化反応を GC/MS 法によって評価する方法を組み合わせで行った。

次に、上記アッセイ系を用いて過酸化酵素の同定および過酸化前駆体の探索とその生成酵素の同定を試みた。菌体外抽出酵素画分から、弱陰イオン交換クロマトグラフィー(DEAE)により活性画分を取得し、これを電気泳動(native-PAGE)上で過酸化酵素の活性染色を行ったが十分な分離と検出感度が得られなかった。そこで疎水性相互作用、静電相互作用による HPLC による分離を行った。得られた酵素は、トリプシン消化を行い、MALDI-TOF-MS を用いた(PSD; MS/MS)分析およびマスショット解析(データベース検索)による同定を試みたが、標的酵素の同定には至らなかった。

過酸化前駆体については、 ^{13}C 同位体標識により構造決定を行い、その生成酵素を推定し、関連文献とゲノムライブラリーを用いてプライマーを作成し、cDNA のクローニング、および大腸菌による異種発現を行い、LC/ESI-MS による触媒活性分析を行った結果、活性を確認することができた。

酸化代謝物として、新規の酸化ジカルボン酸代謝物であるセリポリック酸エポキシドを見いだした。セリポリック酸エポキシドは *in vitro* 合成品の LC/IT-TOF-MS 分析結果との一致により同定した。また、 ^{13}C 同位体標識を行い、精密質量分析と MS フラグメント解析による構造決定を行った。次に過酸化代謝物の前駆体と予想される新規不飽和セリポリック酸 2 種を化学合成し、これが菌体外多糖マトリックスである sheatn 中の天然代謝物と LC/IT-TOF-MS 分析における保持時間、精密質量、MS フラグメントが一致することから、セリポリック酸 G、H として同定した。さらに、セリポリック酸 G、H の過酸化反応が本菌のマンガンペルオキシダーゼ(MnP)触媒系を介して難分解性の非フェノール性リグニンモデル 2 量体を効果的に分解することを見出した。新規不飽和セリポリック酸 G は分子内にアルカジエニル構造を有し、過酸化反応開始のイニシエーターとして機能していると考えられる。本反応系は常温、常圧、水系でのリグニン分解反応であり、環境に温和なりグニン分解系開発へ向けた重要な知見である。本研究は、担子菌のメタボロミクスの基盤構築に貢献するとともに、バイオマスの有効利用法の開発に寄与する。こうした成果を、国内および国際学会において発表し、2010 年フランスで開催されたリグノセロースバイオテクノロジーの国際会議 Lignobiotech one において Poster prize を受賞した。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 1 件)

- (1) 小澤佑, 西村裕志ら: 担子菌による木質分解過程の NMR 法を用いた包括解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集:161, 京都女子大学, 2011.3.27 (震災により中止,既発表扱い)(oral)

- (2) 西村裕志, 渡辺隆司: FT-ICR-MS を用いた選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispota* 二次代謝物の解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集:161, 京都女子大学, 2011.3.27 (震災により中止,既発表扱い)(oral)
- (3) 北秋亘平, 西村裕志ら: 選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispota* のジカルボン酸メチル化酵素の発現および機能解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集:161, 京都女子大学, 2011.3.27 (震災により中止,既発表扱い)(oral)
- (4) 佐々木碧, 西村裕志ら: 選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispota* が産生する新規不飽和セリポリック酸, 日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集:161, 京都女子大学, 2011.3.27 (震災により中止,既発表扱い)(oral)
- (5) 北秋亘平, 西村裕志ら: 選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispota* のジカルボン酸メチル化酵素遺伝子のクローニングおよび機能解析, 第 61 回日本木材学会大会要旨集:77, 京都大学, 2011.3.20 (oral)
- (6) Watanabe T., Nishimura H. et al: Ceriporic acids, iron redox silencer produced by the selective white rot basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*, Pacificchem 2010, Hawaii, Honolulu, 2010.12.18 (oral)
- (7) Nishimura H., Watanabe T. et al: Structural and functional analyses of secondary metabolites involved in extracellular glucan sheath produced by *Ceriporiopsis subvermispota*, Lignobiotech One:102, Reims, France, 2010.3.30 (Poster prize)
- (8) 西村裕志, 瀬戸川雄一ら: 選択的白色腐朽菌が産生するエポキシ化セリポリック酸関連代謝物の同定, 第60回日本木材学会大会研究発表要旨集:148, 宮崎市民プラザ, 2010.3.17 (poster)

〔図書〕（計0件）

〔その他〕

アウトリーチ活動

- (1) 西村裕志: きのこに学ぶ木の食べ方, 小中高大連携推進事業～サイエンス・コミュニケーター・プロジェクト～事業報告書, 京都大学:58-61, 2011.2 (高校3校へ授業,実習を含む研究活動の紹介を実施)
- (2) 西村裕志: キノコに学ぶ木の食べ方～代謝物分析とバイオマス変換, 若手研究者によるサイエンスコミュニケーター派遣プロジェクト事業報告書, 京都大学:20, 36, 46, 2010.1 (中学校2校へ授業,実習を含む研究活動の紹介を実施)

シンポジウム講演など

- (1) 西村裕志, 渡辺隆司ら: ラジカル反応を統御する担子菌代謝物の構造解析, 第151回生存圏シンポジウム 第1回 DASH/FBAS全国共同利用成果報告会要旨集: 25-26, 京都大学, 2010.6.1
- (2) 西村裕志: 選択的白色腐朽菌によるリグニン分解 ～木質バイオマスの微生物変換, 第6回持続的生存圏創成のためのエネルギー循環シンポジウム-バイオマス変換とマイクロ波応用-講演要旨集:23-26, 京都大学, 2010.3.4

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 裕志 (NISHIMURA HIROSHI)
京都大学・生存圏研究所・研究員
研究者番号: 50553989