

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450247

研究課題名(和文) 木材分解に関与する新規糖タンパク質の大量発現系の確立とバイオマスの効率的分解

研究課題名(英文) Production of novel glycoproteins participating wood decay and application to degradation of biomass

研究代表者

田中 裕美 (TANAKA, Hiromi)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：30140338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：木材を分解できる菌類は腐朽型が異なっても、菌体外へ水酸化ラジカルを生成する二価の鉄を含む糖タンパク質を分泌することを既に明らかにした。この物質によって水酸化ラジカルが連続的に生成されるためには、酸素の供給とこの物質の酸化型を還元型にする電子供与体の存在が必要であるが、木材を分解できる菌類の培養基中にピリジン補酵素を検出した。褐色腐朽菌に関して、この物質を大量に得るためにエチレン発生量による一電子酸化活性を測定することにより培養方法を検討した。

研究成果の概要(英文)：During wood degradation, white-rot, brown-rot, and soft-rot fungi produce glycoprotein that catalyzes a redox reaction between oxygen and electron donors to produce hydroxyl radicals, reduces Fe(III) to Fe(II), and strongly binds Fe(II). The continuous generation of hydroxyl radicals requires a constant supply of oxygen and an electron donor for the reduction of oxidized form of the glycoprotein to the reduced form. The extracellular pyridine coenzymes were detected in cultures of white-, brown-, and soft-rot fungi. Thus, these pyridine coenzymes could serve as electron donors for the production of hydroxyl radicals during wood degradation. Moreover, the culture method for brown-rot fungi was examined by determining ethylene generation which indicates one-electron oxidation activity.

研究分野：木質科学

キーワード：木材分解 水酸化ラジカル 糖タンパク質 ピリジン補酵素 褐色腐朽菌

1. 研究開始当初の背景

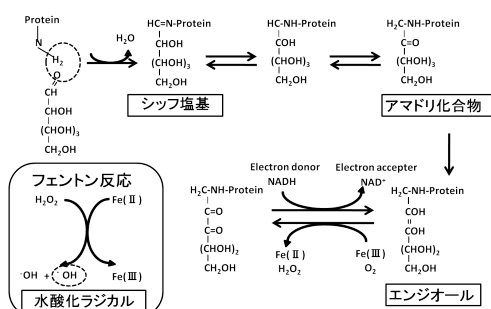
(1) 木材を分解できる菌類はそれらの腐朽型に関わらず、木材を分解する際に二価の鉄を含む糖タンパク質を分泌し、これによって生成される水酸化ラジカルが細胞壁のリグニンを変質させ、セルロースの結晶構造を破壊していることを既に明らかにしていた。その後それぞれの腐朽型が分泌する酵素類の違いによって腐朽型が異なってくる。

(2) この物質の分離・精製が困難であったため、公表された白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の全ゲノムの塩基配列の情報を用いて遺伝子を単離することを試みた。*P. chrysosporium* からこの物質を部分精製し、N末端アミノ酸配列や内部アミノ酸配列、塩基配列からタンパク質部分の遺伝子 *glp1*, *glp2* が特定された。さらにいくつかの腐朽菌からも類似の遺伝子があることが報告された。木材を分解できる菌類は普遍的にこの物質を分泌することが明らかとなった。

(3) この物質によって連続的に水酸化ラジカルが生成されるためには、酸素の供給と酸化された糖タンパク質を還元する電子供与体の存在が必要であるが、それは特定されていなかった。

2. 研究の目的

(1) 木材を分解できる菌類は水酸化ラジカルを生成する二価の鉄を含む糖タンパク質を分泌する。この物質の糖部分の組成解析から、通常の糖タンパク質ではなくグリケーション(非酵素的な糖化反応)によって糖が付加しているものと予想した。ただし、その詳細は明らかでなく、鉄の結合位置についても不明である。この物質は電子供与体の存在下、下図のように水酸化ラジカルを生成する。またエンジオール構造により、三価の鉄を二価にするという機構を提案している。そこで電子供与体を特定し、連続的な水酸化ラジカル生成機構を明確にする。



(2) 白色腐朽菌 *P. chrysosporium* から遺伝子は特定できたが、他の木材腐朽菌からもこの物質の遺伝子をクローニングする。発現時期の解析や大量発現系に最適な遺伝子を見出す。

(3) 木質系バイオマスの分解について、この物質とリグニン分解酵素やセルラーゼを協奏的に作用させて、リグニンの除去、セルロースの分解に分けて検討する。バイオ燃料の効率的な前処理として利用する方法を

討する。

3. 研究の方法

(1) 種々な白色腐朽菌や褐色腐朽菌を木粉添加培地で培養し、菌体外に分泌される水酸化ラジカル生成物質を回収する。その後、Sephadex G-50 によるゲルろ過クロマトグラフィー、DEAE Sepharose CL-6B によるイオン交換クロマトグラフィーにより部分精製する。Tricine-SDS-PAGE 後、PVDF 膜にプロットティングし、バンドを検出後切り出し、酵素消化する。AKTA purifier 10 で分離・精製後、N末端および内部配列アミノ酸をアミノ酸シーケンサーにより解析する。

(2) 水酸化ラジカル生成糖タンパク質の N末端および内部アミノ酸配列結果をもとにプライマーを設計し RT-PCR 法によって、ゲノムの塩基配列が解析されている木材腐朽菌の水酸化ラジカル生成物質遺伝子をクローニングする。またリアルタイム PCR 装置を用いることにより、どの菌の遺伝子がどのような培養条件(培養期間、温度、培地の種類など)で高い発現量を示すか検討する。それによって、大量発現系に最適な遺伝子を選択する。

(3) 糖部分の組成を還元アミノ化反応によって、単糖を 4-アミノ安息香酸エチルエステル標識し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて解析する。糖消化酵素を用いて分解し、糖部分の構造解析を行う。*P. chrysosporium* からの物質の糖組成は以前解析したが(Tanaka, et al., J. Biotechnol., 2007)、他の木材腐朽菌からの物質についても糖組成分析を行う。

(4) *P. chrysosporium* は菌体外に NADH を分泌することが報告されており(Kuwahara et al., J. Ferment. Technol., 1984)、電子供与体の候補として NADH を考えている。そこで種々な木材腐朽菌の菌体外に分泌される NADH の定量を、MTT 法を用いて分光光度計により測定する。分泌量の高かった腐朽菌については、HPLC により NADH の定性・定量を行う。

(5) 大腸菌のタンパク質発現系である pET-32 Xa/LIC ベクターを用い、Thioredoxin-Tag、His-Tag、S-Tag を含む融合タンパク質として発現させ、S-Agarose protein で精製する方法、Profinity exact Fusion-Tag システムを用いて発現・精製する方法を検討する。さらに真核生物の酵母、糸状菌に遺伝子を組み込むため、pPIC9K など(*Pichia pastoris* 系ベクター)、pWYG7L など(*Saccharomyces cerevisiae* 系ベクター)、pPTR I DNA (染色体組込型シャトルベクター)、pPTR II DNA (自律複製型シャトルベクター)のベクター系を用いた大量発現系を構築する。

(6) 大量にタンパク質を得たら、糖、二価の鉄を添加し、水酸化ラジカル生成の検証を行う。水酸化ラジカルが生成されリグニン基

質に水酸基が付与されれば、非フェノール性の末端をもつ木材中の天然リグニンの末端が水酸化され、ラッカーゼやマンガンペルオキシダーゼが作用してリグニン分解が可能になることをリグニンモデル化合物を用いて検証する。さらに、結晶性セルロースを用いて、セルロースマイクロフィブリル間の水素結合が切断され、効率的なセルロース分解が起こるかどうかが確認する。

4. 研究成果

(1) 白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora*、褐色腐朽菌 *Fomitopsis palustris*、*Gloeophyllum trabeum*、*Postia placenta* を木粉添加 Kirk 寒天培地で培養し、菌体外分泌物を回収し、部分精製後タンパク質部分の N 末端および内部配列アミノ酸配列解析を行った。褐色腐朽菌 *F. palustris* および *P. placenta* は菌体外に存在する多糖類のため、また *G. trabeum* は生育が悪く回収量が少なく完全な N 末端アミノ酸配列解析までには至らなかった。

(2) 白色腐朽菌 *C. subvermispora*、褐色腐朽菌 *P. placenta* を用いて、*P. chrysosporium* の遺伝子 *glp1*、*glp2* と類似の塩基配列があることが報告された。そこで、これらの情報を用いて遺伝子をいくつか特定したが、分子量など *P. chrysosporium* と類似性が認められないものもあった。

(3) 褐色腐朽菌 *F. palustris*、*P. placenta* および *G. trabeum* は木粉添加寒天培地では菌体外分泌物の回収量が少なかった。そのため培養法を検討した結果、木粉を湿らす程度の少量の液体培地でエチレン発生量測定による一電子酸化活性が高いことがわかった。グルコース濃度は菌の種類によって 0.2% あるいは 0.5% のどちらが良いかが異なっていた。今後はこの培養法を用いると回収量が向上し、寒天を用いないので回収操作が容易になると思われる。

(4) *P. chrysosporium* において大腸菌によるタンパク質発現系を構築するために、発現システムとして pET System を用い、ベクターに pET32 Xa/LIC Vector、クローニング用宿主として大腸菌 NovaBlue、発現用宿主に大腸菌 BL21(DE3) を用いた系と、Profinity exact Protein Purification System を用い、ベクターとして RIC-Ready pPAL7 Vector、宿主として大腸菌 C-Max 5 を用いた系を検討した。いずれの系もタンパク質の発現を確認できたが、精製過程に問題があり、タンパク質を大量に得ることはできなかった。

(5) 酵母タンパク質発現系を用い、ベクターに N 末端翻訳領域から終止コドンまでの塩基配列をインサートし、発現用酵母 PGSY-1 と 2 Vector で形質転換後、得られたタンパク質を精製した。発現量の多かった PGSY-1 Vector を用いた発現タンパク質を用い、抗原抗体反応で目的タンパク質の確認を行った。ただし、精製のためのタグ切断はうまくいか

なかったのでタグ付きのままその後の実験を行った。グルコース、NADH、二価の鉄などとともにエチレン発生量を測定し、水酸化ラジカル発生を確認した。

(6) この物質によって水酸化ラジカルが連続的に生成されるためには電子供与体の存在が必要であるが、電子供与体の候補として NADH を想定し、ピリジン補酵素の定量を酵素サイクル法である MTT 法を用いて測定した。白色腐朽菌、褐色腐朽菌、軟腐朽菌では培養基中にピリジン補酵素を検出できたが、木材を分解できない菌類では検出できなかった。さらにピリジン補酵素抽出の際にエタノールを添加する方法についても検討したが、エタノールを添加したほうがピリジン補酵素が多く検出されることがわかった。これらの結果から、木材を分解できる菌類は菌体外に存在するピリジン補酵素を電子供与体として、三価の鉄を二価に酸素を過酸化水素に還元し、連続的に水酸化ラジカルを生産していることが説明できた。

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 1 件)

Ryuta Kido, Midori Takeeda, Yutakaka Miyagawa, Shuji Itakura, Hiromi Tanaka, Presence of Extracellular NAD⁺ and NADH in Cultures of Wood-Degrading Fungi, *Biocontrol Sci.*, 査読有、20, 2015, 105-113

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bio/20/2/20_105/_pdf

[学会発表](計 6 件)

田中 裕美、木材腐朽における微生物遷移と木材腐朽機構、第 67 回日本木材学会、平成 29 年 3 月 19 日、九州大学(福岡県福岡市)

田中 裕美、種々な木材生息菌の培養基中のピリジン補酵素の測定、日本防菌防黴学会第 42 回年次大会、平成 27 年 9 月 1 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

Ryuta Kido, Midori Takeeda, Mitsuhiro Manabe, Yutaka Miyagawa, Tatsuhiro Katashiba, Masayasu Yamauchi, Shuji Itakura, Hiromi Tanaka, Extracellular NAD⁺ and NADH by white-rot, brown-rot, and soft-rot fungi, IAWPS International Symposium on Wood Science and Technology 2015 (IAWPS 2015), 平成 27 年 3 月 16 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

田中 裕美、城戸 竜太、板倉修司、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の分泌する水酸化ラジカル生成物質遺伝子の発現系の構築、第 64 回日本木材学会大会、平成 26 年 3 月 14 日、愛媛大学(愛媛県松山市)

田中 裕美、軟腐朽菌 *Graphium* sp. ラッカーゼの分離・精製および物理化学的諸性質、日本防菌防黴学会第 40 回年次大会、平成 25 年 9 月 11 日、千里ライフサイエンスセンター（大阪府豊中市）

田中 裕美、軟腐朽菌 *Graphium* sp. ラッカーゼの諸性質および生産性向上のための培養条件の検討、日本木材保存協会第 29 回年次大会、平成 25 年 5 月 28 日、メルパルク東京（東京都港区）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 裕美 (TANAKA Hiromi)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号：30140338

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()