

# 白色腐朽菌におけるリグニン分解酵素発現機構の解析

阪本 鷹行

環境動態学専攻

## 1. 背景

木質バイオマスはカーボンニュートラルな再生可能資源であり、次世代エネルギー候補の一つとして注目されている。また、原油を用いたケミカルリファイナリーに代わるバイオリファイナリー原料として、様々な工業用化学物質の原料となることも特色の一つである。しかし、木質は嵩張るために効率的な輸送が難しく、さらに構造が非常に強固であるため高度な加工には多くのエネルギーが必要となる。即ち、木質資源の有用性を高めるためには、液化などの分解加工を安価に可能とする技術が必要となる。木質の堅牢性の主因は、構成成分の3割程度を占める難分解性リグニンであり、このリグニンを効率的に分解することが鍵となる。

自然界において白色腐朽菌と呼ばれる一群の担子菌類は、必要に応じて木質リグニンを完全に分解することができる。しかし、一連のリグニン分解反応において機能するタンパク質群は未解明のものが数多く、リグニン分解反応が誘導される条件も十分に解明されていない。もし、リグニン分解関連遺伝子群を統括的に調節しているマスターレギュレーター遺伝子が特定されれば、リグニン高分解菌育種のための重要な育種ターゲットとなるはずである。ただし、リグニン分解能試験を指標としたスクリーニングはリグニン定量に多くの時間と労力が必要となり、現実的では無い。そこで、本研究ではリグニン分解反応に必須といわれているリグニン分解酵素発現に関与するシグナル伝達因子の解析を行い、リグニン分解発現調節機構における重要な知見を得ることを目的とした。より具体的には、先行研究として、環状アデノシンーリン酸 (cAMP) とカルモデュリン (CaM) が白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* におけるリグニンペルオキシダーゼ (LiP) とマンガンペルオキシダーゼ (MnP) 発現調節に関与する可能性を示した報告があったため、この2つの因子に焦点を当てて解析を行った。

## 2. 結果と考察

### 1) *P. chrysosporium* における CaM の解析

ヒトの CaM1 タンパク質におけるアミノ酸配列を用いた検索により、*P. chrysosporium* RP78 株のゲノムデータベースから *CaM* 遺伝子を推定した。クローン化およびシーケンスの結果、データベース

の予測に誤りがあったものの、再推定アミノ酸配列において CaM 特有の4つの EF-ハンド構造が高度に保存されていることが確認でき、他生物の CaM アミノ酸配列とも極めて高い類似性が示されたため、protein\_ID 10767 を *P. chrysosporium* RP78 株の *CaM* (*PcCaM*) 遺伝子と特定した。また、サブプロット解析により、RP78 株は CaM をコードする遺伝子を単一で持つことが示された。

大腸菌において異種発現させた組換え *PcCaM* タンパク質は、CaM の特性である  $Ca^{2+}$  存在下と非存在下における SDS-PAGE 泳動差を示し、またプルダウン法およびウエスタンブロット法を用いたタンパク質-タンパク質相互作用機能解析についてもカルシニューリン (代表的な CaM 結合タンパク質) との相互作用を示した。

### 2) CaM および cAMP とリグニン分解酵素発現との関連における薬理的解析

典型的な CaM 阻害剤としてナフタレンスルホンアミド系薬剤である W-7 および W-5 を使い、CaM シグナル系における薬理的解析を行った。その結果、*P. chrysosporium* における LiP 活性および MnP 活性は共に W-7 の濃度に依存して抑制され、両酵素共に 100  $\mu$ M の W-7 を培養 48 時間後に添加することによって培養 120 時間後までほぼ完全に抑制された。また、100  $\mu$ M の W-7 を添加する時期による影響を調べたところ、MnP 活性については添加時期に係わらず顕著な活性抑制が見られた。しかし、LiP 活性においては W-7 添加時期の遅延に伴った抑制効果の減少が見られ、培養 84 時間後の添加ではその後の活性に有意な差は現れなかった。これらの結果から、培養 48 時間の時点で 100  $\mu$ M W-7 を添加することで両酵素とも十分に抑制されることが分かった。また、培養開始 24 時間以内に 100  $\mu$ M W-7 を添加した場合は目視で観察できるほどその後の菌糸生育を阻害したが、培養開始 48 時間後における添加は薬剤無添加条件と比べて菌糸生育に有意な影響を示さなかった。W-7 と同様の作用機序で働き、W-7 に比べて CaM との親和性が低いため阻害効果が弱いことが知られている W-5 を用いた対照実験の結果、W-5 による両酵素活性の抑制効果は W-7 よりも弱く、両薬剤間における CaM への親和性の差に依存した抑制効果の差が確認された。こ

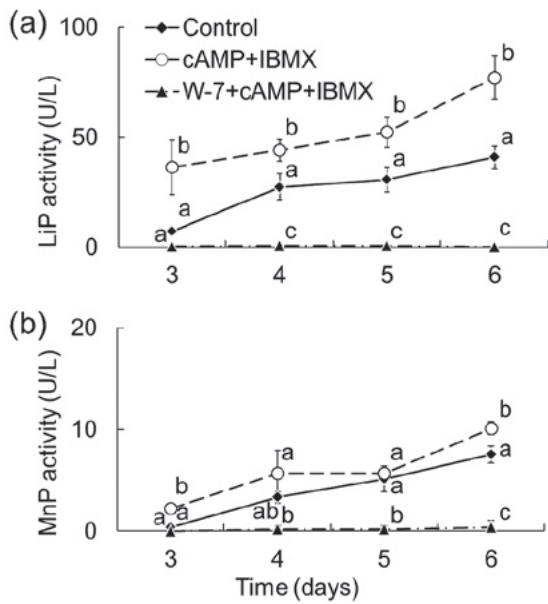


図1. 外因性cAMP添加条件における*P. chrysosporium*のLiPおよびMnP活性  
5 mM cAMP、100  $\mu$ M IBMX および 100  $\mu$ M W-7 を培養開始 48 時間後に添加した。(a) は LiP 活性、(b) は MnP 活性の経時変化をそれぞれ示し、それぞれ 4 反復し、エラーバーは標準偏差を表す。薬剤条件および測定時における二元配置分散分析 (ANOVA) を行い、Bonferroni の方法によって多重比較を行った。異なるアルファベットは異なる薬剤条件間に  $P < 0.05$  水準で有意差が認められることを意味する。

のことから、W-7 および W-5 による抑制効果が狙い通り PcCaM を阻害したためであることが強く示唆された。

*P. chrysosporium* の LiP、MnP 発現と細胞内 cAMP においてはこれまでに相関のみが示され (MacDonald ら 1984, 1985; Boominathan と Reddy 1992)、同条件において LiP、MnP 発現と PcCaM 発現との相関も示された (Minami ら 2007, 2009)。LiP、MnP 発現と PcCaM との因果関係は上記までの研究で明らかにしたが、cAMP との直接的な関係は明らかになっていなかった。そこで、LiP および MnP 発現と cAMP とにおける直接的な因果関係を明らかにするために、cAMP および cAMP 分解酵素であるホスホジエステラーゼの阻害剤としてイソブチルメチルキサンチン (IBMX) を外部添加し、その後の LiP および MnP 活性の経時変化を調べた。その結果、5 mM の cAMP および 100  $\mu$ M の IBMX を添加することで安定した酵素活性の増加効果が得られ、両酵素、特に LiP において薬剤無添加

の条件と比べて有意に活性が増加した (図 1)。

さらに、CaM 阻害剤である W-7 を使い、CaM シグナル系と cAMP シグナル系との関係についても同時に調査したところ、100  $\mu$ M の W-7 を同時添加することで cAMP および IBMX による活性上昇効果が打ち消され、LiP、MnP 共に完全に抑制された (図 1)。また、cAMP と IBMX の添加条件、または cAMP と IBMX および W-7 の同時添加条件の菌糸生育において薬剤無添加条件との有意な差は認められなかった。また、W-7 添加条件と薬剤無添加条件との細胞内 cAMP 濃度に有意な差は認められなかった。

cAMP と IBMX 添加条件、そして cAMP と IBMX および W-7 同時添加条件において、RP78 株の全ゲノムから予想される LiP および MnP をコードする計 15 の遺伝子 (Martinez ら 2004) および PcCaM 遺伝子についてリアルタイム RT-PCR を用いた転写レベルの比較を行った。cAMP および IBMX 添加条件において殆どの LiP、MnP アイソザイム遺伝子群および PcCaM 遺伝子の転写物量は薬剤無添加条件に比べて有意に上昇していた (図 2)。さらに、W-7 は cAMP および IBMX 添加による酵素活性の上昇効果を打ち消すだけでなく、すべてのアイソザイム遺伝子の転写物量を定常値以下にまで抑制した (図 2)。PcCaM 遺伝子の転写物量もまた cAMP および IBMX 添加によって増加し、W-7 によってある程度抑制された。これらのことから、cAMP が *P. chrysosporium* の LiP、MnP 発現調節に関与し、さらに CaM は cAMP シグナルの下流に存在することが示唆された。

### 3) ファージディスプレイ法による推定的 CaM 相互作用タンパク質の網羅的解析

*P. chrysosporium* の LiP および MnP 生産時における CaM 結合タンパク質を検索するため、ファージディスプレイ法を用いた網羅的解析を行った。PcCaM を固定したプレートを用いてパニングを 2 回繰り返した後、溶出した PcCaM 結合組換えファージ群を大腸菌に感染させて得られたプラークをランダムに 288 個ピックアップしてファージの有する cDNA をシーケンスした。その結果、機能既知・未知のものを合わせて 121 の推定的 CaM 結合タンパク質群が得られた。これらの推定的 CaM 結合タンパク質のうちキシロースレダクターゼ (protein\_ID 7571)、オキシステロール結合タンパク質 (ID 9416)、ジエネラクトンヒドロラーゼ (ID 134615)、アデノシルホモシステイナーゼ (ID 10308)、Ras 様 GTPase (ID 2943) について大腸菌で異種発現

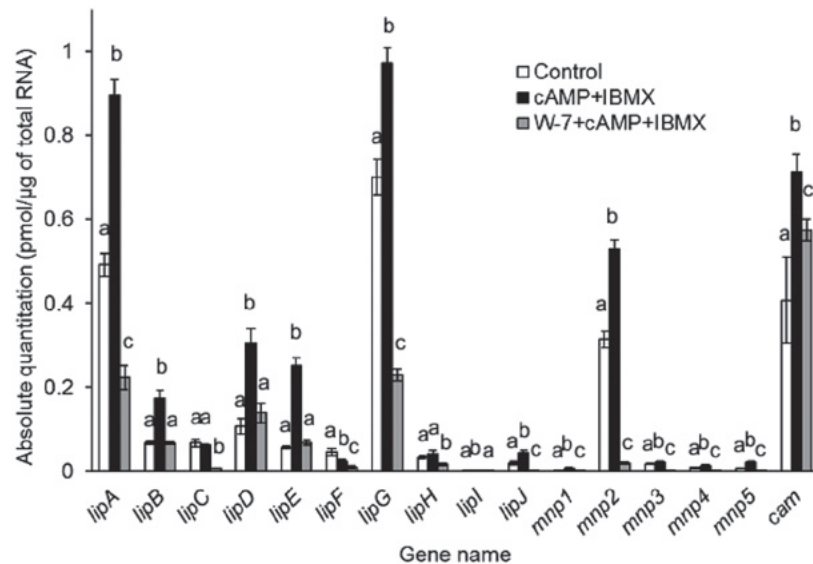


図2. *P. chrysosporium* における cAMP および IBMX 添加条件下での LiP、MnP、PcCaM 遺伝子の絶対転写物量。5 mM cAMP、100 μM IBMX および 100 μM W-7 を培養開始 48 時間後に添加し、各条件の mRNA を培養開始 72 時間目の菌体から抽出した。内部標準遺伝子には actin を使い、それぞれ 4 反復し、エラーバーは標準偏差を表す。一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、Turkey の HSD 検定を用いた多重比較を行った。異なるアルファベットは異なる条件間に  $P < 0.05$  水準で有意差が認められることを意味する。

させ、プルダウンおよびウエスタンブロット解析を行った結果、5つの推定的 CaM 結合タンパク質すべてが様々な様式で実際に CaM と結合することを確認した。これらのタンパク質遺伝子および残りの推定的 CaM 結合タンパク質遺伝子についてはさらなる解析を行うことで、より直接的にリグニン分解酵素発現に関与する因子の特定が期待できる。

#### 4) *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) を用いた cAMP 関連遺伝子の機能解析

これまでの研究により白色腐朽菌のリグニン分解酵素発現に cAMP シグナル系が重要であることが示唆されたが、*P. chrysosporium* には実用的な形質転換系が存在しないため遺伝子機能解析を行うことが困難である。そこで、本研究では形質転換系の確立している白色腐朽菌ヒラタケを用いて解析を進めることとした。具体的には、cAMP 生産を司ると考えられる三量体 G タンパク質  $\alpha$  サブユニット ( $G\alpha$ ) のドミナントアクティブ化による cAMP 高生産変異株の作出を試みた。まず、ヒラタケ PC9 株のゲノムデータベースから分子系統解析により *Schizophyllum commune* 由来のアデニル酸シクラーゼ相互作用性  $G\alpha$  遺伝子のオーソログ遺伝子候補を 4 つ (protein\_ID 65367、115090、117454、130194) を選出し、クローン化を行った。次に、これら 4 つの遺伝子について、GTP アーゼ活性に重要なグルタミン (Q) をアルギニン (R)

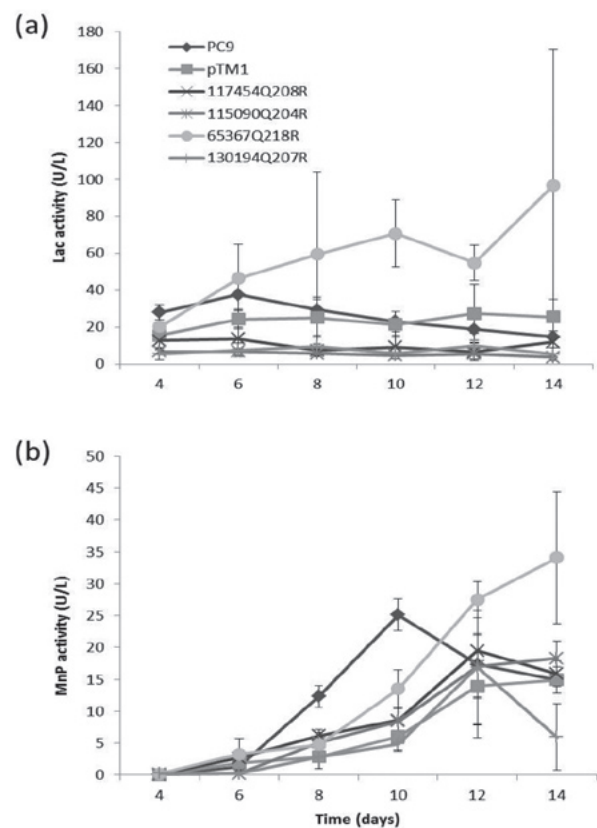


図3. ヒラタケにおける推定的  $G\alpha$  ドミナントアクティブ変異株の酵素活性 (a) は Lac 活性、(b) は MnP 活性を示す。エラーバーは標準偏差を表す。



に置換するような点突然変異を加えてドミナントアクティブ化を図った変異遺伝子を過剰発現する変異株 65367Q218R、115090Q204R、117454Q208R、130194Q207R をそれぞれ作成した。ヒラタケはリグニン分解酵素としてラッカーゼ (Lac) と MnP を生産するため、得られた変異株においてそれぞれの活性の経時変化を測定したところ、65367Q218R 株のみ野生株よりも有意な Lac 活性上昇を示し、MnP 活性についても野生型より遅れたものの、上昇傾向が見られた。このことから、protein\_ID 65367 がコードする G  $\alpha$  の活性化によって生産される cAMP がリグニン分解酵素発現全体に関与することが強く示唆される。

### 3. 総合考察

白色腐朽菌は LiP、MnP、Lac といった強力な酸化酵素等によって、木質リグニンを解重合して効率的に木質を分解する機構を有する。しかし、リグニン分解機構は複雑なうえ未解明な部分が多く、特定のリグニン分解酵素遺伝子に着目した研究等も多く行われているが、まだ効率的なバイオリクター系の実現には至っていない。しかし、機構を統御する調節因子を特定することができれば、これを育種ターゲットとすることにより、リグニン分解能力全体をボトムアップした白色腐朽菌株の育種が可能ならずである。そこで、本研究ではモデル白色腐朽菌 *P. chrysosporium* における知見を基に、リグニン分解酵素発現と cAMP シグナルおよび CaM シグナルとの因果関係の解析を行い、将来的なシグナル伝達系構成要素を育種ターゲットとしたリグニン高分解菌育種の可能性を考察することを目的とした。

本研究により、*P. chrysosporium* においてリグニン分解機構発現と cAMP シグナルとの因果関係が明らかとなり、さらに CaM シグナルは cAMP シグナルの下流に存在してリグニン分解酵素発現を調節することが示された。また、*P. chrysosporium* においては CaM と相互作用し得る推定的 CaM 結合性タンパク質群も明らかにした。今後、これらの推定的 CaM 結合タンパク質群、または、さらにその下流因子を解析することで、よりリグニン分解機構発現に直接的に関与する調節因子が特定できるだろう。それらの調節因子を育種のターゲットとすることで木質リグニンを高効率で分解する菌株の育種が期待される。しかしながら、*P. chrysosporium* においては実用的な形質転換系が確立されておらず、更なる解析、育種のために *P. chrysosporium* を利用するためのボトルネックとなっている。本研究では、再現性の高い効率的な形質転換系が確立さ

れているヒラタケへ供試菌の変更を行い、これに対応した。しかし、*P. chrysosporium* は白色腐朽菌研究で最も歴史のある供試菌であり、研究の蓄積も多い。*P. chrysosporium* における実用的な形質転換系の開発は今後も継続していくべきである。

ヒラタケにおいて cAMP 合成経路を司るとされる G  $\alpha$  を一アミノ酸変異によってドミナントアクティブ化させたところ、Lac 生産が著しく上昇することが示された。このことは、異なる白色腐朽菌である *P. chrysosporium* とヒラタケとの間に cAMP シグナルを介した同様のリグニン分解機構調節経路が存在することを示唆している。さらに、シグナル伝達経路の遺伝子を育種ターゲットとすることでリグニン分解酵素高発現株を作成することが可能であることが世界で初めて示された。

今回得られた高 Lac 発現菌株 (65367Q218R) を利用することで Lac 高生産系の開発が期待できる。Lac は工業廃水処理、食品添加物、樹脂生産など、幅広い応用が期待される酵素であり、特に白色腐朽菌の Lac は高い酸化還元能力と広い基質特異性をもつために有用であると考えられている。また、木本や草本性のリグノセルロース資源からのバイオエタノール生産において Lac 添加によってリグノセルロース資源における糖化効率の改善が期待されることから、将来的な課題として検討していきたい。短期的な今後の目標としては、Lac 生産に適した培養条件などについても検討していく必要があると考えられる。また、この高 Lac 発現菌株 (65367Q218R) は当初の目的である木質リグニン分解能が向上していることが期待されるため、今後は木質リグニン処理能の試験も必要である。これに加えて、cAMP シグナルおよび CaM シグナルにおける他の育種ターゲット候補遺伝子についても遺伝子機能解析を進めることで、効率の木質バイオマス変換バイオリクター系に向けてより有用な育種ターゲットの検索が期待できる。

### 引用文献

- Boominathan K, Reddy CA (1992). Proc Natl Acad Sci USA 89, 5586-5590.
- MacDonald MJ, Paterson A, Broda P (1984). J Bacteriol 160, 470-472.
- MacDonald MJ, Ambler R, Broda P (1985). Arch Microbiol 142, 152-156.
- Martinez D, et al. (2004). Nat Biotechnol 22, 695-700.
- Minami M, et al. (2007). Appl Microbiol Biotechnol 75, 609-618.
- Minami M, et al. (2009). Biosci Biotechnol Biochem 73, 1722-1731.