

樹木抽出成分の分解に関与する酵素の探索と利用

北海道大学 工学研究院 応用化学部門 堀 千明



【略歴】

- 2007年3月 東京大学 農学部 植物資源プロセス学科卒業
- 2009年3月 東京大学農学生命科学研究科修士課程修了
- 2011年4月 日本学術振興会 特別研究員 (DC2)
- 2012年3月 東京大学農学生命科学研究科博士課程修了
- 2012年3月 博士 (農学) 取得
- 2012年4月 日本学術振興会 特別研究員 (切替 PD)
- 2012年6月 米国農務省林産研究所 (USDA-FPL)・ウィスコンシン大学-マディソン校 (UW-Madison)
Visiting researcher
- 2013年4月 日本学術振興会 特別研究員 (PD)
- 2013年4月 理化学研究所 環境資源科学研究センター 訪問研究員
- 2015年4月 北海道大学 農学研究院 訪問研究員
- 2016年4月 北海道大学 農学研究院 研究員
- 2016年10月 北海道大学 工学研究院 応用化学部門 助教

【要旨】

白色腐朽菌は樹木細胞壁を構成するリグノセルロースを効率良く分解することが知られている。しかしほとんどの白色腐朽菌は伐採したばかりの針葉樹に対しては、樹木抽出成分に含まれる樹脂酸やテルペン類、中性脂肪、長鎖脂肪酸等の阻害物質を除かない限り分解することが出来ない。しかしながら白色腐朽菌 *Phlebiopsis gigantea* はこれら阻害物質に耐性があるため針葉樹に一早くコロニーを形成できることが知られている。このような抽出成分は粘着性であることから製紙等の加工の際に取り除くことが必要となるが、抽出成分の分解メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。私たちはこれまでの研究で、腐朽菌が生産する分解酵素をゲノミクス・トランスクリプトミクス・プロテオミクスといったオミクス解析から網羅的に明らかにしてきた (Hori et al. 2011 FEMS Microbiol.; Hori et al. 2013 Appl. Environ. Microbiol.; Hori et al. 2013 Mycologia)。そこで、本菌の針葉樹分解時のオミクス解析を行ったところ、リグノセルロースと共に抽出成分の分解に関与すると考えられる酵素を見いだした。(Hori et al. 2014 PLoS Genet.)。そこで、本研究では、抽出成分を含む培養系を経時的にオミクス解析することにより、*P. gigantea* が保有する抽出物質分解メカニズムの詳細を明らかにする。

抽出成分分解酵素の探索

これまでの研究で腐朽菌 *P. gigantea* が抽出成分を含む木粉に応答する遺伝子を解析したが、セルラーゼなどの細胞壁分解酵素が誘導されてしまっていた。そこで今回は、木質成分ではなく抽出成分に反応して生産する酵素を絞り込むことを目的とした。セルロースに抽出成分を1倍（天然におけるセルロースに対する抽出成分の比率）・2倍・4倍量をコートしたものを炭素源とした培地で腐朽菌 *P. gigantea* を培養し、経時的な遺伝子発現およびタンパク質生産発現について RNAseq 解析および LC-MS/MS プロテオミクス解析を行った。その結果、誘導されたタンパク質は、細胞壁分解酵素をほとんど含まず、リパーゼなど抽出成分の分解に関与する酵素が主であった。したがって、抽出成分の分解に関与する遺伝子を解析する培養系を確立できたと考えられた。

抽出成分分解酵素（リパーゼ）の機能解析

これら候補遺伝子を以後の解析対象とした。これまでの研究において、*P. gigantea* 培養時に抽出成分中の脂質が分解されていることを確認していることから、まず脂質分解酵素の探索を行った。RNAseq 解析およびプロテオーム解析結果から、抽出成分存在下で発現が上昇したリパーゼ遺伝子を含む、ゲノム中のリパーゼ遺伝子10個を合成し、小麦胚芽由来の無細胞発現系によりタンパク質を生産した。得られた10種の酵素について、モデル基質を用いたリパーゼ活性測定を行った。抽出成分によって最も発現が上昇し、プロテオーム解析で菌体外に検出された酵素について、高い活性が検出された。このリパーゼについて、pH依存性および温度依存性を明らかにしたところ、室温および弱酸性条件下で最も高い活性値を示した。このことは、本菌の生育条件と合致していた。また、本酵素が抽出成分中に含まれる脂質を分解することを GC-MS により明らかにした。

本研究から得られた結果は、抽出成分の分解メカニズムが明らかになると共に、抗菌活性等薬理効果や高分子モノマー化合物など様々な機能をもつ抽出成分の変換利用へと繋がる可能性があると考えている。

【謝辞】

本研究は、米国農務省林産研究所/ウィスコンシン大学マディソン校の Dan Cullen 教授の元で行った研究を基盤にしており、その後も数多くの助言や支援を頂きました。また、研究の継続を支えて下さった北海道大学工学研究院田口精一名誉教授と松本謙一郎教授、大井俊彦准教授、理化学研究所環境資源科学研究センター・奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス領域出村拓教授に感謝申し上げます。恩師の東京大学大学院農学生命科学研究科の鮫島正浩教授（現信州大学・特任教授）と五十嵐圭日子准教授に厚く御礼申し上げます。