

# 論文題目：網羅的遺伝子発現解析を用いた白色腐朽菌のリグニン分解酵素生産制御機構に関する研究

著者：南 正彦

研究科、専攻名：環境科学研究科 環境動態学専攻

学位記番号：環課 第15号

博士号授与年月日：平成21年 7月30日

## 1. 緒言

自然界においてリグニンは白色腐朽菌と称される一群の担子菌により完全に無機化される。リグニン分解機構の詳細については未解明の点が多いが、白色腐朽菌が生産す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) 等のリグニン分解酵素と呼ばれる酸化酵素群が分解機構の鍵となっていると考えられている。白色腐朽菌のリグニン分解酵素やその遺伝子はリグニン分解機構と同様に二次代謝的に発現すること、その発現機構が十分解明されていないことから、酵素の大量生産が難しい。また、リグニン分解酵素遺伝子を酵母やコウジカビなどで異種発現させた報告はいくつか存在するが、産業として利用可能な効率には達していないことから、白色腐朽菌独自の経路が酵素生産に必要であると考えられている。

本研究では白色腐朽菌のモデル生物として認知されている *Phanerochaete chrysosporium* の LiP と MnP の生産に関与する遺伝子群の検索を目的として、Long Serial Analysis of Gene Expression (LongSAGE) を用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、木質バイオマスの有効利用を進める上で重要な、効率的なリグニン分解酵素の大量生産やリグニン分解機構の制御に関する新たな基礎的な知見が得られた。

## 2. 結果と考察

### 1) リグニン分解酵素活性および菌体重量の経時変化

完全合成培地を用いた *P. chrysosporium* RP78 株の培養系において、培養初期には MnP と LiP の活性は検出できなかった。これらの酵素活性は菌体重量がピークに達する直前から現れ始め、遅れてピークを迎えた。細胞内の cAMP を制御することが知られているアトロピンの添加により、MnP と LiP の活性は有意に抑制された。また、アトロピンは菌体重量には影響しないことが明らかとなり、アトロピンによる MnP と LiP の発現抑制の作用機構が菌体生育の抑制による二次的な影響によるものではないことが示された。

### 2) LongSAGE ライブラリーの作成

培養 3 日目の菌体をリグニン分解酵素生産開始時条件、培養 2 日目の菌体を酵素生産開始前条件、また、アトロピンを添加した培養 3 日目の菌体を酵素生産抑制条件として、LongSAGE ライブラリー作成に供した。それぞれ、1 万を超える遺伝子断片 (タグ) の塩基配列を決定し、比較した。

### 3) 培養 2 日目から 3 日目に発現量が変動する遺伝子群

リグニン分解酵素生産開始時に転写物量が増加する遺伝子を LongSAGE ライブラリーの比較によりリスト化した。多くの遺伝子の発現量が変動しており、MnP の主要アイソザイム遺伝子である *mnp3* (Protein ID 878)、*mnp2* (Protein ID 3589)、LiP の主要アイソザイムである *liph8* (Protein ID 8895) は 4 倍以上転写物量が増加していた。その他にもリグニン分解酵素生産開始前後で発現量が変動している多くの遺伝子が検出された。また、培養 2 日目と培養 3 日目の比較では、リグニン分解酵素生産だけではなく、菌糸生育状態も異なるために、リグニン分解酵素生産に関連がないが菌糸生育に関与する遺伝子も同時に検出してしまう可能性も考えられた。そこで、より正確にリグニン分解酵素生産の制御に関与する候補遺伝子を検出するため、アトロピン添加による酵素発現抑制状態の培養 3 日目の菌体由来のライブラリーを作成し、3 つのライブラリーを組み合わせることで、リグニン分解酵素生産に特異的に関与する遺伝子の検出を試みた。

### 4) 3 つの LongSAGE ライブラリーの比較による重要遺伝子の検出

非階層的なクラスター分析により、培養 3 日目のリグニン分解酵素発現条件ライブラリーと比較して転写物量変化が有意であった 595 の遺伝子が類似の発現様式を持つ 11 のグループに分類された。クラスター 5、6 および 8 に属する 168 遺伝子が MnP および LiP 遺伝子と平行に発現しており、リグニン分解酵素生産に特異的に関与する、あるいはリグニン分解酵素生産制御に関与する可能性が示された。また、今回検出された全ての MnP、LiP 遺伝子群はこれらのクラスターにすべて含まれていた。

### 5) 遺伝子のアノテーション

クラスター 5、6 および 8 に含まれる合計 168 の遺伝子断片についてアノテーションを行った結果、140 の遺伝子断片が 138 の推定 CDS (Coding Sequence) にアノテートされた。138 の Protein ID のうち、80 についてはタンパク質の機能が JGI の Gene Ontology (GO) name アノテーションデータにより予測された。

前述の 80 の予想タンパク質中 58 は酵素遺伝子であり、4 つのリグニン分解酵素遺伝子に加えて、3 つのシトクロム P450 の遺伝子が含まれていた。リグニン分解機構においては、シトクロム P450 は、細胞内に取り込まれた低分子のリグニン誘導体を分解する役割を担っていると考えられている。また、上記 58 遺伝子の中にリピッドペルオキシデーションシステム (脂質過酸化系) に関与する可能性がある脂質代謝遺伝子が複数確認された。リピッドペルオキシデーションシステムはリグニン分解機構において重要と考えられており、興味深い。

上記 58 の酵素遺伝子にはグルタレドキシシン、グルタチオントランスフェラーゼおよびグルタチオン S-トランスフェラーゼを含む多くの生体異物分解遺伝子が含まれていた。リグニン分解酵素は種々の化学ストレスや活性酸素種により誘導されることが知られていること、上述の生体異物分解遺伝子はストレス応答遺伝子としてもよく知られていることから、これらの生体異物分解遺伝子がリグニン分解に関与する可能性は高いと考えられる。

クラスター5、6および8に含まれるシグナル伝達関連因子として、PKC経路に關与するホスホリパーゼDおよびプロテインキナーゼC (PKC) 基質が含まれていた。ホスホリパーゼDはホスファチジルコリンをコリンとホスファチジン酸 (PA) へ分解し、通常PAはジアシルグリセロール (DAG) に速やかに分解されることが知られている。このDAGがPKCを活性化させると推定されている。また、Ca<sup>2+</sup>応答性のシグナル伝達経路因子として、カルモジュリンやカルシウム・カルモジュリン・応答性アデニル酸シクラーゼが検出された。これらとcAMP合成との関連については興味深く、今後の解析が待たれる。

### 3. 総合考察

現在までのところ、*P. chrysosporium* は全ゲノムデータが公的に利用できる唯一の白色腐朽菌である。すなわち、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析などの網羅的発現解析、いわゆるポストゲノム解析が可能な唯一の白色腐朽菌である。これまで他の研究グループにより、マイクロアレイ解析、セクレトーム解析、プロテオーム解析など全ゲノム情報を利用したポストゲノム解析が報告されてきた。しかしながら、それらの解析のほとんどは特定の基質やストレスに対する応答遺伝子の検索に焦点を当てたものであり、リグニン分解酵素の生産制御に関するポストゲノム解析はほとんど行われていなかった。その理由として、基本的にこれらの網羅的解析は比較分析であり、リグニン分解酵素生産についての対照区の設定が困難であることが挙げられる。培地に木質を含んだ条件で高発現している分泌酵素遺伝子の検索を目的とした網羅的発現解析も行われているが、対照実験の設定がないために全遺伝子発現量からみて発現量の割合が多い遺伝子を検出するにとどまっている。そのため、転写因子、シグナル伝達経路因子など、全遺伝子発現量と比較すると発現量が少ないが、白色腐朽菌によるリグニン分解酵素の高生産系の開発やリグニン分解の制御機構の解明に重要な遺伝子の検出はほとんど行われていない。

本研究では、培養系を人為的に調節できる完全合成培地を用いた人工培養系におけるリグニン分解酵素制御に焦点を絞り、複数の対照実験を設定した。具体的には、酵素生産開始前の菌体と、細胞内 cAMP 濃度を制御することでリグニン分解酵素の生産を制御するといわれているアトロピンを添加した菌体から得られたサンプルの両者を対照区として用いた。複数の対照区を比較することで、リグニン分解酵素制御に関わる遺伝子をより正確に検出することを可能とした。

本研究により、cAMP経路をはじめPKC経路で働くと思われる遺伝子など、シグナル伝達に關与する可能性のある遺伝子の発現量がリグニン分解酵素生産時に特異的に発現量が増加することが明らかとなった。これらの知見はリグニン分解酵素の生産制御にはcAMP濃度やCa<sup>2+</sup>シグナリング経路、PKC経路が密接に關与することを示唆している。また、リピッドペルオキシレーションシステムに關与する可能性のある脂質代謝遺伝子、生体異物分解遺伝子およびストレス応答遺伝子も誘導されていることが明らかとなったことから、これらの代謝系がリグニン分解酵素の生産制御に密接に關連していることも示唆された。

本研究の結果は白色腐朽菌のリグニン分解酵素生産制御機構の解明へのステップとして重要な新しい基礎的な知見を提供するとともに、リグニン分解酵素の大量生産への大きな

足掛りになり、環境に大きな負荷を与えない木質バイオマスの効率的な有効利用に大きく寄与するものと考えられる。また、木質上で生育する自然界での白色腐朽菌のリグニン分解機構の解明についても大きく貢献するものと考えられる。