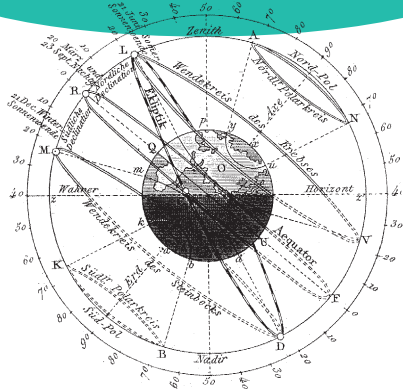


【解説】



【2021年農芸化学若手女性研究者賞】

植物バイオマス分解利用に関する基礎研究

多様な腐朽菌による木質成分の分解システムの解明と樹木による木質形成の改変について

堀 千明



*セルラーゼの結晶構造(PDB・1Z3T)を作画に用いた。

キーワード：木材腐朽菌，樹木分解酵素，植物バイオマス利用

Basic Researches toward Plant Biomass Utilization: Elucidation of Various Lignocellulose Degradation Systems by Wood Decay Fungi and Modification of Xylem Formation in Tree
Chiaki HORI, 北海道大学地球環境科学研究所環境生物科学部門

再生可能な資源である植物バイオマスを原料に燃料・化学品・材料を生産するバイオリファインリーが注目されている。しかし植物バイオマスは有用な資源であるが、植物細胞壁中に含まれるセルロース・ヘミセルロース・リグニンを主成分とするリグノセルロースが難分解性であることが問題となっている。環境中ではリグノセルロースを効率的に分解・利用する木材腐朽菌が知られており、細胞外にセルラーゼ、ヘミセルラーゼ、リグニン分解関連酵素などを分泌している。そこで筆者は腐朽菌が保有する樹木成分の認識と分解酵素の多様性について研究するとともに、より実環境に近い実験条件下での樹木分解に着目した研究を行うことで、樹木分解の効率化を目指している。さらに、樹木による細胞壁形成に着目することで、分解しやすい樹木の創生に関する研究を推進している。本稿では、筆者が農芸化学若手女性研究者賞を受賞した内容“植物バイオマス分解利用に関する基礎研究”についてご紹介する。

微生物による植物分解メカニズムの解明に向けて

1. モデル木材腐朽菌における植物細胞壁成分の認識・分解機構について

木材腐朽菌は培地中のセルロースの分解物を認識することでセルロース分解酵素を生産することが知られていた。しかし、セルロース以外の多糖類に対する認識・応

◇◇◇ コラム ◇◇◇

思い返すと、生物の教科書で「生産者」「消費者」「分解者」を習ったのが分解との初めての出会いだったと思う。生産者は光合成によって無機物から有機物を作り出す植物であり、消費者は草食動物やそれを捕食する肉食動物などを指し、生物の死骸や排泄物などを対象に有機物から無機物まで変換する微生物などを指していた。植物の死骸として発生する大量の落ち葉や倒木などを微生物が分解することは理解できたが、分解者の実体についての説明はなかった。しかし研究としては、古くから森林生態系における木質の分解者は、きのこに代表される木材腐朽菌と知られており、また木材を保存・利用する際に加害する菌として研究されてきた。そこで大学の授業では分解者を直に感じてもらうようにしている。私が所属する北海道大学は広大なキャンパスに演習林や原生林が含まれており散策できる。みなさんも近場の山や森、公園に行った際に、分解されている倒木や切り株を見つけたら、足で踏んでみて頂きたい。中が白くて繊維質になっているものだと白色腐朽菌が分解した木であり、中が茶色くてボロボロならば

褐色腐朽菌が加害した木である。このような両菌の木材分解形態の差異は、木質主要成分であるセルロース・ヘミセルロース・リグニンの分解能力の違いから生じている。白色腐朽菌は、木材中のポリフェニルプロパノイドであるリグニンを低分子化するため、分解した木質は白くなる。一方で、褐色腐朽菌においては、リグニンを部分的に酸化するに留まり分解残渣として残っていくため、分解した木質は茶色になる。両菌の違いは分解後の明白な色の違いに加え、触感も違うことが特徴だ。褐色腐朽菌の方は手や足で触るとボロボロに崩れ落ちる一方で、白色腐朽菌が加害した場合は繊維質が残る。この特徴は、セルロース分解の差異に関係している。セルロースには、長い直鎖状のセルロース分子が分子間で水素結合している強固な結晶領域と、分子間結合が緩んでいる非晶領域の2つの領域がある。非晶領域を選択的に分解する褐色腐朽菌はセルロースの重合度を著しく低下させるため、木質の強度も著しく低下する（ボロボロに崩れる）。森林浴の際には荘厳な樹木や可憐な花だけでなく足元に転がる腐った木を観察して、目に見えにくい分解者の力に想いを馳せてみるのは如何でしょう。

答機構についてはほとんど報告がなかった。そこで筆者らは、木材腐朽のモデル菌としてリグノセルロース分解能力が高く、全ゲノム情報が開示されている *Phanerochaete chrysosporium* を対象に、代表的な多糖類であるデンプンおよびキシランに対する応答を解析した。具体的には、セルロース培地に、キシランおよびデンプンを添加した場合におけるモデル腐朽菌の酵素生産に与える影響を比較した。その結果、デンプン添加は酵素生産量を約1/2に抑制する一方で、キシラン添加は酵素生産量を約2倍に促進することを見出した。この結果から、分解しやすいデンプンを添加することによって生じたグルコースが優先的に資化され、セルロースを資化せずとも十分なエネルギーがあるため、セルロース分解関連酵素の生産が抑制されたと考えられた。このような代謝生成物のグルコースなどによって上流の酵素生産を抑制するカタボライトリプレッションが生じたと予想された。他方、キシランを添加した場合はキシラン分解物は栄養源とはならず、キシラン分解酵素と共に新規のセルロース分解関連酵素の生産を促進すること明らかにした⁽¹⁾。これはキシラン分解物が栄養源となるセルロースの存在を示唆するシグナル分子の役割を果たしていると考えられた。そこで次に、腐朽菌がキシラン分解物のどのような成分を認識しているのかという課題に取り組んだ。重合

度1~4のキシロオリゴ糖や、対象実験としてセロオリゴ糖に対するセルロース分解関連酵素遺伝子の発現応答解析を行ったところ、セロオリゴ糖とキシロオリゴ糖といった構成糖に加え、添加したオリゴ糖の重合度毎に生産される酵素が異なっていた。即ち、腐朽菌は重合度の違うオリゴ糖を異なるシグナル分子として認識することで、セルロースやキシラン分解酵素生産をコントロールし、植物細胞壁上のキシラン・セルロース層を順番に効率よく分解する機構を保有していることが明らかになった⁽²⁾。

2. 腐朽菌における多様な植物分解機構について

2004年にモデル腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の全ゲノム配列情報が開示されプロテオーム解析が可能になると、それまで主要な酵素を一つずつ単離していた頃には予想できない程様々な酵素が協調して植物分解を進めている可能性が示唆された^(3,4)。そこで、腐朽菌における多様な植物分解機構を明らかにするために、腐朽菌として大別される白色腐朽菌と褐色腐朽菌の分解機構解明に国際共同研究体制で取り組んだ。白色腐朽菌は、セルロース・ヘミセルロース・リグニン全てを分解することができる一方、褐色腐朽菌はセルロース・ヘミセルロースといった多糖のみを分解する事が知られていたが、この分解形態の違いをゲノムレベルで解析するた

め、糖質関連酵素データ (Carbohydrate-active enzymes; CAZymes) に分類される植物細胞壁分解酵素をコードする遺伝子を解析する試みが行われた。その結果、当初の予想通りリグニン分解に関与するリグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼなどの真菌由来分泌型クラスIIペルオキシダーゼ (PODII) が褐色腐朽菌には欠損していた⁽⁶⁾。さらに、セルロースやヘミセルロースの分解に関与するセルラーゼやヘミセルラーゼに付与されているセルロース吸着モジュールファミリー1 (CBM1) も褐色腐朽菌は欠損していることが明らかになった。しかし木材腐朽菌は担子菌の分類の中でも多くの目にまたがって分布しており、それ以上の統一した見解は得られなかった。そこで筆者らは、分解能力が高いハラタケ目に属する11種の白色腐朽菌および褐色腐朽菌を対象に比較ゲノム・プロテオーム解析を実施した。その結果、白色腐朽菌はセルロースやヘミセルロースを分解する加水分解酵素や酸化還元酵素をコードする多様な遺伝子を保持する一方で、褐色腐朽菌はそれら酵素をコードする遺伝子の数が非常に少なかった (もしくは保有していなかった)。即ち、白色腐朽菌は、多糖に含まれる様々な結合を特異的に分解する加水分解酵素や酸化還元酵素を獲得した結果、多様な酵素群を協調的に生産することで効率的なセルロース・ヘミセルロース・リグニン分解を行っていることが明らかになった。一方で、褐色腐朽菌は一部の特異性の広いエンド型セルラーゼ・ヘミセルラーゼを利用しており、また、フェントン反応に利用される還元された鉄イオンを供給するとされるキノン還元酵素を利用していた⁽⁶⁾。このことは、進化的に白色腐朽菌より後に出現した褐色腐朽菌が、多様な酵素群の代わりにフェントン反応を介してラジカルを生成させ、非特異的に多糖類やリグニンを効率よく分解する戦略を選択したことを示している。

以上の白色・褐色腐朽菌の腐朽機構の違いに加え、木材腐朽菌には分解する樹種の傾向がある。一般に白色腐朽菌は広葉樹を主に分解し、針葉樹を分解するのは褐色腐朽菌である場合が多く、これらは樹種選択性と呼ばれている。しかし、これまで白色腐朽菌と褐色腐朽菌を用いて調べられていたが、この2つのグループは分解メカニズムが大きく違うため、樹種選択性を支える仕組みは長らく不明であった。そこで筆者らは、ハラタケ目の中で高い針葉樹分解能力を保持する白色腐朽菌 *Phlebiopsis gigantea* に着目し、通常の白色腐朽菌と分解メカニズムを比較オミクス解析することで樹種選択性の違いに取り組むこととした⁽⁷⁾。特に針葉樹には、抽出成分と呼ばれる抗菌成分が多く含まれているため、針葉樹分解におい

て抽出成分の分解能力が大きく関わっていると予想した。その結果、本菌は、植物細胞壁分解に関わる CAZy 遺伝子については通常の白色腐朽菌とほとんど違いがない一方で、抽出成分の分解能力が高いことが示唆された。なかでも、針葉樹の抽出成分として多く含まれる脂質を素早く分解するために、本菌は菌体外リパーゼおよび菌体内グリオキシル酸回路を増強しており、このことが針葉樹を分解できることに関与していることが示唆された。また、筆者らは本リパーゼのリコンビナント酵素を調整し樹木抽出成分と作用させたところ、様々な脂肪酸が検出できたことから、本リパーゼが樹木中に含まれる多様な脂質を分解できることを生化学的に示した (図1)⁽⁸⁾。以上の通り、木材腐朽菌の多様性について酵素分子メカニズムが明らかになってきているが、機能未知酵素による木材分解への関与や、酵素以外の有機酸などによる関与など他にも考慮すべき点があるため、様々な木材腐朽菌の分解機構が今後明らかになると考える。

3. メタ環境における植物分解のオミクス解析

難分解性の木質の分解は森林生態系における炭素循環の中心的な要素であり、その循環において腐朽菌は重要であると予想されてきた。これまで植物分解に関わる酵素に関しては、単離した菌を対象とした実験室内条件での報告がなされ、試験管内で多くの腐朽菌由来のセルラーゼ・ヘミセルラーゼが研究されてきた。しかし、自然環境下では様々な微生物が腐朽に関わりと予想されるが、このようなメタ環境下における樹木分解プロセスの詳細は不明であった。そこで筆者らは環境条件下での微生物による植物細胞壁分解において実際に働いている酵素を、これまで試験管内で適用してきたマルチ・オミクス解析を環境条件に応用することで初めて網羅的に同定した⁽⁹⁾。実際には、環境下で腐朽されたコントルタマツ

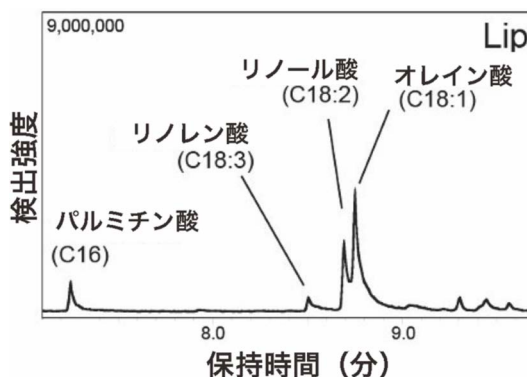


図1 ■ 担子菌由来リパーゼLip19208のリコンビナント酵素の抽出成分を反応させた際の生成物をGC-MS解析した結果

を回収し、ゲノム、mRNA、タンパク質を抽出し、それぞれ次世代シーケンサーやLC-MS/MSで網羅的に解析することで、メタゲノム解析・メタトランスクリプトーム解析、メタプロテオーム解析を同時に行った。特に、メタトランスクリプトームはde-novoアセンブリーを行い、得られた52,011個のコンティグに対して機能解析を行った。その結果、1,316コンティグがCAZyをコードした転写産物であり(図2)、それら遺伝子の多くは白色腐朽菌および褐色腐朽菌が含まれる担子菌由来であった(図3)。メタゲノム解析の結果、同定された種の中で優勢であったのは子囊菌であった(即ち、担子菌は優勢でなかった)一方で、担子菌が植物分解に関わる転写産物を多く生産していたことは大変興味深い結果

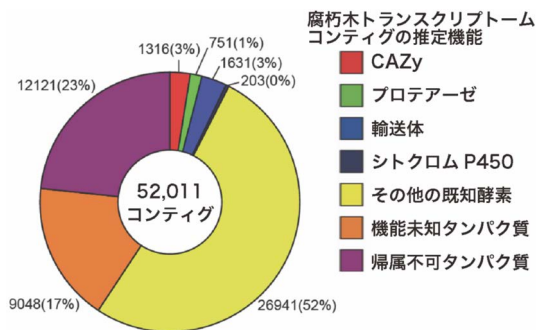


図2 ■ 環境中の腐朽木メタトランスクリプトーム解析によって取得された52,011コンティグの推定機能解析結果

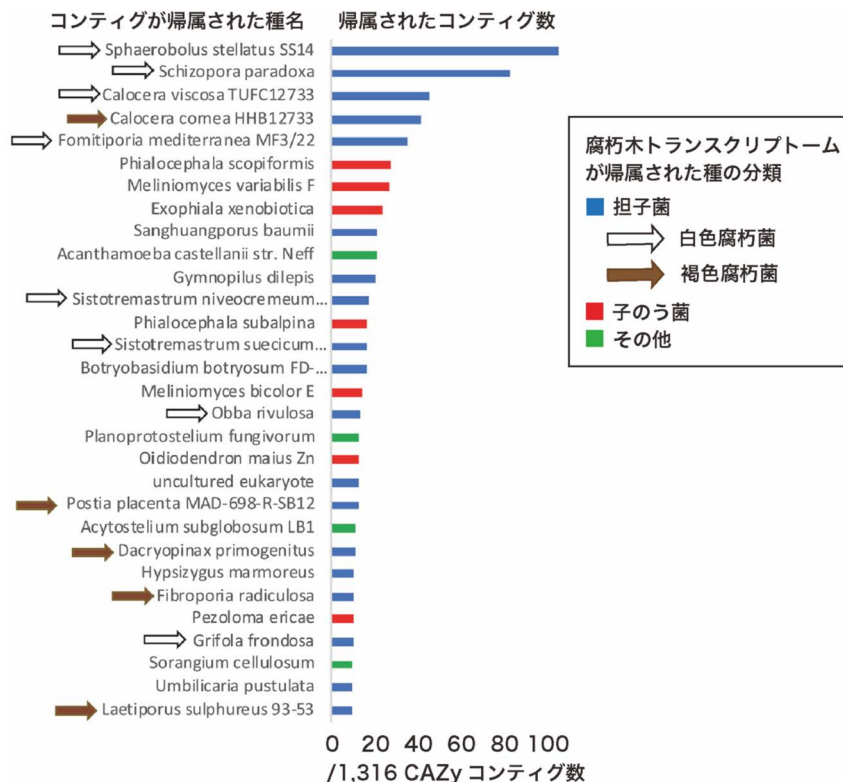


図3 ■ 環境中の腐朽木メタトランスクリプトーム解析によって取得されたCAZyをコードする1,316コンティグを相同性検索によって帰属した際のトップ30種の分布結果

であった。本研究から、環境中の木質分解において木材腐朽菌が重要な働きをしていること、即ち森林生態系における炭素循環において重要であることを初めて明らかにした。さらに、転写産物を詳細に機能解析した結果、これまで試験管内実験で解析されてきた主要なセルラーゼやヘミセルラーゼが環境条件下でも高発現していた。例えば、白色腐朽菌が生産するセルラーゼとして知られている糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー6, 7, 5, 12, 45や、セルロースを酸化的に分解すると考えられている補助活性 (Auxiliary Activities; AA) ファミリー9の多糖溶解モノオキシゲナーゼが、実際の植物分解を担っていることを証明した。さらに、白色腐朽菌が生産するマンガンペルオキシダーゼと同時に、褐色腐朽菌が生産するキノン還元酵素が同定されたことは、環境中において白色腐朽菌や褐色腐朽菌が共存して木質を分解していることを強く示す。さらに、本研究から取得した様々な生物由来のメタトランスクリプトーム情報52,011のコンティグには、データベースに登録されているが機能が報告されていない配列 (機能未知タンパク質) が17%、データベースに登録されていない全く新しい遺伝子 (帰属不可タンパク質) が23%も含まれていた (図2)。今後は環境中の効率的な植物分解機構の理解に加えて、これら機能未知遺伝子の酵素機能の解明および植物バイオマス分解応用が期待される。

分解しやすい樹木の創生

木質バイオマスは、木部細胞壁が高い難分解性を示すことから、バイオリファイナリーのための効率的な木質バイオマスの分解工程の開発が求められている。効率的な木質バイオマスの分解の実現には、上記微生物由来の粗酵素抽出液の活性だけでは十分ではないことが分かって来ており、そのため最近では木質バイオマスに着目し、分解しやすい植物を作成するための様々な取り組みが行われている。例えば、セルロースやリグニン合成に関わる遺伝子を組換えた植物を作成することで、細胞壁

中のリグニン量の減少やリグニンモノマー組成やその他構造変化を誘導したり、セルロース量を増加させることに成功している。しかしながら、依然としてこれら組換え植物の分解効率が高くないのが現状であった。そこで筆者らは、セルロースやリグニン合成遺伝子の発現を制御する木質形成に関わる転写因子の中から木質バイオマスの糖化効率を向上させる遺伝子の探索を行った⁽¹⁰⁾。樹木モデルのポプラを対象とし、木質形成時に発現が上昇する33個の転写因子 (TF) 遺伝子に着目し、それらを木部細胞壁構造の制御因子として選択した。次に、33個それぞれのTF遺伝子を過剰発現させたハイブリッ

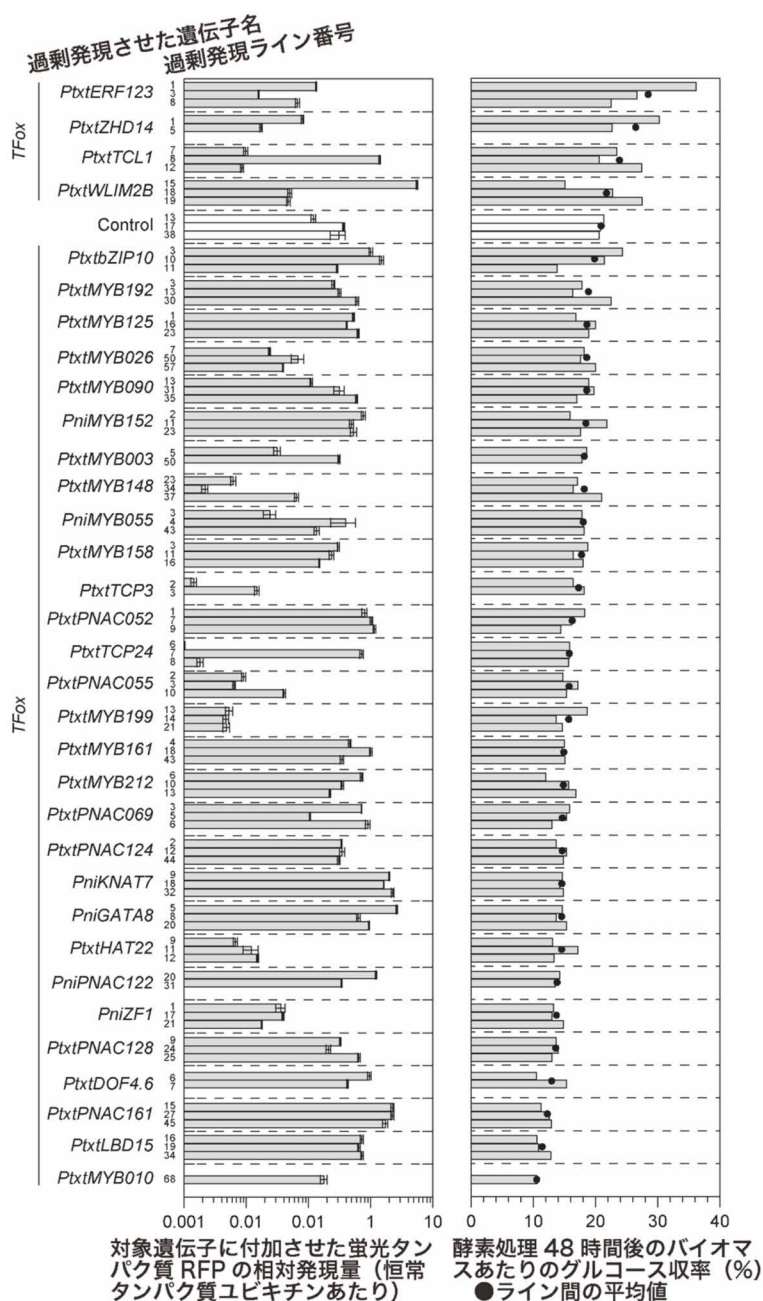


図4 ■ 木質形成に関わる候補転写因子33個をハイブリットアспенで過剰発現した組換えポプラ (TFox) に関して、対象遺伝子の相対発現量 (左図) と酵素糖化率を測定した結果 (右図)

左図のエラーバーは組換えポプラのラインにおいて生物的な反復した ($n=3$)。

ドアスペン (*Populus tremula* × *Populus tremuloides*) を実生の状態で回収し、セルラーゼ酵素糖化試験を行った。その結果、4種類の推定転写因子遺伝子を過剰発現した組換えポプラにおいて、細胞壁の酵素糖化性向上が確認できた(図4)。酵素糖化性向上が見られた組換え体について、温室内で成熟した木部を形成させるまで2ヶ月ほど生育させ、改めて酵素糖化を調べたところ、グルカンの糖化率がコントロールと比較して有意に1.5倍に増加し、これまでの報告と比較して高い値を示した。また、グルカンの加水分解性に加え、キシランの加水分解性も有意に増加していた。このような糖化率の向上は、細胞壁の成分分析からセルロース含量が高く、キシランおよびリグニン含量が少なくなっているためであることが示唆された。さらに、そのような傾向は各多糖の合成遺伝子の発現量が、導入した転写因子によってバランスよく制御された結果であることも明らかになった。以上の結果から、本研究により、細胞壁の難分解性を抑制し酵素分解を改善する有効な転写因子ターゲットの新規同定に至った。

おわりに

地球陸域上の再生可能な炭素源のほとんどが植物中に存在し、近年その資源量の豊富さから樹木が貯蔵する木質バイオマスの高度利用が強く求められている。きのこに代表される木材腐朽菌は単独で植物を完全分解できることから、腐朽菌による植物バイオマス生分解機構の解明は、生態系での炭素循環に加え、木質バイオマスからの有用物質への変換利用を考える上で非常に重要だと考えられている。筆者は、多様な腐朽菌を対象に、各植物成分に対する遺伝子応答をゲノム情報を利用して解析することで、腐朽菌グループが保有する植物分解メカニズムの多様性を明らかにすべく研究を進めてきた。さらに、そのような情報をバイオマス利用につなげる応用研究も行っている。これら研究は新規バイオマス分解酵素や代謝経路の発見、バイオマス分解の効率化へと繋がる可能性がある。

謝辞：本研究は、大学生時代から現職までの間、東京大学大学院農学生命科学研究科、米国農務省林産研究所(FPL)/ Wisconsin 大学マディソン校、理化学研究所環境資源科学センター、北海道大学農学研究院、工学研究院および環境科学研究院で行ったものです。多くの先生方や学生諸氏の支えをいただくことで、研究を継続できています。特に上述しました研究において、恩師である現・信州大学鮫島正広特任教

授や東京大学五十嵐圭子教授に大変お世話になりました。またFPLのDan Cullen博士とは上述しました共同研究を行ってとても光栄です。また上述の樹木改変研究に関しましては、高田直樹博士および飛松裕基博士に様々なご助言・ご助力いただきました。北海道大学地球環境科学研究院においては、森川正章博士および三輪京子博士に着任から温かく迎えていただき、研究室内外において大変お世話になっております。皆様に心よりの感謝を示しますとともに、これからもご指導ご鞭撻のほど、どうぞ宜しくお願い申し上げます。

文献

- 1) C. Hori, K. Igarashi, A. Katayama & M. Samejima: *FEMS Microbiol. Lett.*, **321**, 14 (2011).
- 2) C. Hori, H. Suzuki, K. Igarashi & M. Samejima: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 3770 (2012).
- 3) D. Martinez, L. F. Larrondo, N. Putnam, M. D. S. Gelpke, K. Huang, J. Chapman, K. G. Hefenbein, P. Ramaiya, J. C. Dettler, F. Larimer *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **22**, 695 (2004).
- 4) A. Wymelengerg, G. Sabat, D. Martinez, A. S. Rajangam, T. T. Teeri, J. Gaskell, P. J. Kersten & D. Cullen: *J. Biotechnol.*, **118**, 17 (2005).
- 5) D. Floudas, M. Binder, R. Riley, K. Barry, R. A. Blanchette, B. Henrissat, A. T. Martinez, R. Otillar, J. W. Spataro, J. S. Yadav *et al.*: *Science*, **236**, 1715 (2012).
- 6) C. Hori, J. Gaskell, K. Igarashi, M. Samejima, D. Hibbett, B. Henrissat & D. Cullen: *Mycologia*, **105**, 1412 (2013).
- 7) C. Hori, T. Ishida, K. Igarashi, M. Samejima, H. Suzuki, E. Master, P. Ferreira, F. J. Ruiz-Dueñas, B. Held, P. Canessa *et al.*: *PLoS Genet.*, **10**, e1004759 (2014).
- 8) M. Iwata, A. Gutiérrez, G. Marques, G. Sabat, P. J. Kersten, D. Cullen, J. M. Bhatnagar, J. Yadav, A. Lipzen, Y. Yoshinaga *et al.*: *Sci. Rep.*, **11**, 12528 (2020).
- 9) C. Hori, J. Gaskell, D. Cullen, G. Sabat, P. E. Stewart, K. Lail, Y. Peng, K. Barry, I. V. Grigoriev, A. Kohler *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, e01133 (2018).
- 10) C. Hori, N. Takata, P. Y. Lam, Y. Tobimatsu, S. Nagan, J. C. Mortimer & D. Cullen: *Sci. Rep.*, **10**, 22043 (2020).

プロフィール



堀 千明 (Chiaki HORI)

<略歴>2007年東京大学農学部卒業/2012年同大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了/同年米国農務省林産研究所研究員/2013年理化学研究所JSPS特別研究員/2015年北海道大学農学部JSPS特別研究員・博士研究員/2016年同大学工学部助教/2022年同大学地球環境科学研究院(理学部兼任)准教授,現在に至る<研究テーマと抱負>植物と菌類の両方を研究しながら、植物バイオマス利用について考えていきたい<趣味>森林浴・食べる<所属研究室ホームページ><https://noah.ees.hokudai.ac.jp/emb/hori/>

Copyright © 2023 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.61.590