

## 研究終了報告書

### 「炭素循環の先駆的分解者である腐朽菌の樹木分解機構の解明」

研究期間：2019年9月～2022年3月

研究者：堀 千明

加速フェーズ期間：2022年4月～2023年3月

#### 1. 研究のねらい

糸状菌の一種である木材腐朽菌(キノコ)は、難分解性の樹木細胞壁を単独で分解できることから、生態系の炭素循環において先駆的な分解者として働いている。一方樹木は、頑強な細胞壁構造に加えて、腐朽菌の侵入の際に、抗菌作用のある化合物を蓄積することで外敵である腐朽菌による分解を防御している。通常の腐朽菌はこの防御機構を克服できないため、倒木などの死んだ樹木しか分解しない。しかし私達が単離した腐朽菌ベッコウタケ (*Pereniporia fraxinea*)は、生きている樹木に感染し、物理的強度を弱らせ、倒伏させる。そこで本研究では腐朽菌ベッコウタケをモデルとして、樹木と寄生性腐朽菌を相互作用させた時の機序を分子レベルで解明することで「寄生」機構に迫ることを目標とした。加速フェーズでは、本研究で構築した *in vivo* 相互作用培養系の分子メカニズムを詳細に明らかにすることを目的として、分子生物学的なアプローチに加えて、分析化学および生化学的解析を行った。さらに、ベッコウタケ菌の阻害剤開発にむけて、酵素阻害剤開発を実施した。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本研究では、通常の腐朽菌とは異なり、申請者独自に単離した寄生性腐朽菌がなぜ生きている樹木に取り付けるのかという寄生性を解明することを目標としている。具体的には、研究テーマAでベッコウタケ菌の生きた樹木を分解できる戦略の解明を目指し、研究テーマBで寄生性を担う鍵酵素の同定および分子メカニズム解明を目的としている。テーマAでは、樹木(ポプラ)と寄生性腐朽菌(ベッコウタケ菌)やその他腐朽菌を相互作用させる独自の培養系の開発に成功した。その結果、ベッコウタケ菌においては生きている樹木を加害し朽ちさせる一方で、寄生性を持たないコントロール腐朽菌では観察されないことを発見した。本樹木-菌糸切片を顕微鏡観察することから細胞壁分解や防御物質蓄積の変化、ならびに相互作用条件で分布および侵入経路を明らかにした。テーマBでは、環境中で樹木を加害した場合に生産された防御物質の成分を解析し、主要成分を同定した。この物質をベッコウタケ菌が無毒化する能力が高いことを初めて見出し、その分子メカニズムを組換え酵素を用いて明らかにした。さらに、本研究で構築した *in vivo* 相互作用培養系について分析化学や生化学的解析から詳細に分子メカニズムを明らかにすることができた。また、ベッコウタケ菌は、樹木防御物質の無毒化の高い酵素を生産している可能性が示唆された。さらにケミカルスクリーニング法によって本酵素の阻害剤の開発に成功した。

以上、これまでに報告がない、寄生性腐朽菌の戦略について新規性の高い結果が得られた。

## (2) 詳細

研究テーマ A: *In vivo* 解析「樹木と寄生性腐朽菌の培養系構築と顕微鏡観察とオミクス解析」  
樹木(ポプラ)と寄生性腐朽菌(ベッコウタケ菌)の相互作用させ、ベッコウタケ菌においては生きている樹木を加害し朽ちさせる一方で、寄生性を持たないコントロール腐朽菌では観察されない独自の培養系を構築することに成功した。本樹木-菌糸切片を顕微鏡観察することから細胞壁分解や防御物質蓄積の変化、ならびに相互作用条件で分布および侵入経路を明らかにした。具体的には、ベッコウタケ菌を摂取した場合のみ道管までに茶褐色の蓄積物が観察されたため、通水機能が低下することが樹木を朽ちさせる原因であると予想された。さらに、ベッコウタケ菌の菌糸のみが樹木細胞内に根の表面から侵入できることを明らかにした。移動経路として効率的な組織を移動している上に、細胞壁を突き破って移動している様子も観察され、通常の菌と比較して樹木に感染・移動する能力や細胞壁分解能力が高いことが示された。

加速フェーズでは、本研究で構築した菌類と樹木の共培養系で蓄積物はタンニン酸である可能性が明らかとなった。すなわち、*in vitro* 解析で明らかにしたタンニン酸が *in vivo* のベッコウタケ菌と樹木の相互作用時にも、樹木防御物質として重要であることが示せた。

研究テーマ B: *In vitro* 解析「樹木由来防御物質に作用する寄生性腐朽菌由来鍵酵素の同定」  
環境中で樹木を加害した場合に生産された防御物質の成分を解析し、主要成分を同定した。この物質をベッコウタケ菌が無毒化する能力が高いことを初めて見出した。この無毒化させる機構を明らかにするため、まず発現解析を行い、幾つかのターゲット酵素を同定した。それらターゲット酵素をタンニン酸を無毒化させる候補酵素として、対象遺伝子をクローニングし、酵母を用いたタンパク質生産系を用いることで、機能的に酵素を発現させた。得られた組換え粗酵素を用いて、樹木防御物質の無毒化に関与していることを初めて明らかにできた。更に、本酵素が樹木防御物質のフェノール性プロトンに作用することで、疎水化もしくは高分子化することで沈殿物とし、無毒化しているという分子メカニズムを初めて明らかにできた。

加速フェーズでは、さらに本酵素について詳細な生化学的解析を行うことで、一般的に多くの菌が保有している酵素との基質特異性の違いを明らかにした。このことは、ベッコウタケ菌が生産している酵素は、樹木防御物質の無毒化の高い酵素である可能性を示唆していた。さらにケミカルスクリーニング法によって本酵素の阻害剤の開発に成功し、既知の阻害剤とは異なる化合物を5種類特定した。

## 3. 今後の展開

本研究テーマ A で明らかになった寄生性腐朽菌の生きた樹木を朽ちさせる戦略を支える分子メカニズムの全体像が、本培養系のオミクス解析を進めることにより、明らかにできると考えている。現在、経時的なサンプルから RNAseq 解析に供し、データベースを構築しながら解析を進めているため、今後1年で新規分子メカニズムを提示できると予想している。さらに、経時的なサンプルの細胞壁や抽出成分などを成分解析することで、相互作用条件でどのよ

うなインタラクションが起きているのかを分子レベルで今後 1～数年で明らかにできると考えている。

#### 4. 自己評価

##### <研究目的の達成状況>

研究目的の要であった樹木と寄生性腐朽菌の新しい *in vivo* 培養系の構築ができた点は評価したい。時間がかかる培養系であり、ACT-X 予算により、じっくりと取り組めた結果だと考えられる。またこの培養系で目視された新しい現象をどういう風に切り取っていくのか手探りであったが、現象をダイレクトに見れる顕微鏡技術を駆使することで寄生性腐朽菌の戦略が解明できた点も評価したい。また *in vitro* 解析を用いることで分子メカニズムの一部も解明できた。以上、寄生性腐朽菌(ベッコウタケ菌)がなぜ生きている樹木に取り付けるのかという分子機構の一部を明らかにする研究目標が達成できた。

##### <研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)>

樹木と腐朽菌の新しい *in vivo* 培養系の顕微鏡観察と酵素生産・解析技術を活かした *in vitro* 研究に研究実施体制を及び研究費執行を重点化することで、上述したように、寄生性腐朽菌の戦略解明と鍵酵素同定が大いに進んだ。以上から、研究の進め方は適切であったと考えている。

##### <研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果>

樹木と寄生性腐朽菌の相互作用の分子メカニズムの解明は、自然界での炭素循環システムの理解に繋がるため基礎科学において重要である。さらに寄生性腐朽菌は北海道大学でも問題になっている公共道路・施設の植樹に加え、木材・パルプ・バイオマス事業への森林管理供給において問題となっているため、社会・経済においても重要な課題である。本研究を進めることで、樹木と糸状菌の相互関与分子メカニズム解明や菌類からの樹木防御法開発などが予想されるため、科学技術及び社会・経済への波及効果は大きいと考えられる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 8件(加速フェーズ実施後更新1件)

1. Iwata, M., Gutiérrez, A., Marques, G., Sabat, G., Kersten, P.J., Cullen, C., Bhatnagar, J.M., Yadav, J., Lipzen, A., Yoshinaga, Y., Sharma, A., Adam, C., Daum, C., Ng, V., Grigoriev, I.V., **Hori, C.\*** Omics analyses and biochemical study of *Phlebiopsis gigantea* elucidate its degradation strategy of wood extractives. *Scientific Rep.*, 11, 12528, 2021. **\*責任著者**

樹木には有機溶媒で抽出される”抽出成分”と呼ばれる二次代謝産物を多数含むが、腐朽菌による分解機構はほとんど明らかにされていなかった。これら抽出成分は高い抗菌作用があることから、樹木と腐朽菌の関係を明らかにする上で非常に重要と考えた。そこで腐朽菌による抽出成分の分解メカニズムを最先端の分子生物学的・分析化学的手法を用いて明

らかにした。本研究を通し、生化学的解析を用いることで、既報の酵素機能とは異なる特徴を有する新規リパーゼの発見および機能の同定を行った。

2. **Hori, C.,\*** Takata, N., Lam, P.Y., Tobimatsu, Y., Nagano, S., Mortimer, J.C., Cullen, D. Identifying transcription factors that reduce wood recalcitrance and improve enzymatic degradation of xylem cell wall in Populus. *Scientific Rep.*, 10, 22043, 2020. **\*責任著者**

これまで多くの遺伝子を対象に組換え植物を創出することによって、細胞壁の酵素糖化効率を上げる試みがされてきたが、植物の恒常性維持機能に阻まれ成功例は少ない。そこで本研究では樹木細胞壁形成に關与する可能性のある転写因子33個を対象に樹木細胞壁糖化効率を評価した。その結果、野生株に比べ、酵素による加水分解が約2倍促進される組換え株の取得に成功し、新規転写因子の同定、及び被制御遺伝子群が解明できた。

3. **Hori, C.,\*** Song R, Matsumoto K, Matsumoto R, Minkoff BB, Oita S, Hara H, Takasuka TE.\*: “Proteomic characterization of lignocellulolytic enzymes secreted by the insect-associated fungus, *Daldinia decipiens* oita, isolated from the forest in northern Japan.” *Appl. Environ. Microbiol.*, 86(8) e02350–19, 2020. **\*共同責任著者**

森林害虫として知られるキバチにおいて、昆虫共生微生物が樹木細胞壁の主要な分解の担っていることが知られていたが、これまでは昆虫と共生菌類の共生やその分布などに情報が限られていた。そこで本研究ではキバチ共生木材腐朽菌 *Daldinia decipiens* oita 株を、環境中から採取したキバチから単離し、分子生物学的な手法(網羅的プロテオミクス解析)を用いることで、特徴的な樹木細胞壁の分解活性や分解酵素について初めて明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 2件(特許公開前のもも含む)

1	発明者	堀 千明(旧姓)
	発明の名称	担子菌由来の新規な高機能性リパーゼの利用
	出願人	北海道大学
	出願日	2021/02/18
	出願番号	2021-024557
	概要	リパーゼは、脂質のエステル結合を加水分解する酵素の総称であり、多分野で産業利用されており、用途も多様であることから、基質特異性や分解特異性等の性質が異なる多くの種類のリパーゼが存在する。本発明で、担子菌(木材腐朽菌)から新規の高機能性リパーゼの生産法及び利用法を開発した。
2	発明者	堀 千明(旧姓)
	発明の名称	Use of novel highly functional lipase from Basidiomycetes(担子菌由来の新規な高機能性リパーゼの利用)
	出願人	北海道大学
	出願日	2022/02/17
	出願番号	PCT/JP2022/6467
	概要	リパーゼは、脂質のエステル結合を加水分解する酵素の総称であり、多分野で産業利用されており、用途も多様であることから、基質特異性や分解特異性等の性質が異なる多くの種類のリパーゼが存在する。本発明で、担子菌(木材腐朽菌)から新規の高機能性リパ

	一ゼの生産法及び利用法を開発した。
--	-------------------

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

**堀 千明, 旭硝子財団 化学・生命分野 研究奨励**「樹木が生産する抗菌成分を担子菌が克服する分子相互作用の解明」, 2021年4月26日.

**堀 千明, 日本農芸化学学会 若手女性研究者賞**, バイオマス分解利用に関する基礎研究, 日本農芸化学学会, 2021年3月18日

久保田美穂、**堀 千明**、他、**キッコーマン賞(口頭発表)受賞**, 生立木が生産する生体防御物質に対する病原性木材腐朽菌の分解メカニズムの解析、糸状菌分子生物学カンファレンス若手の会, 2020年11月13日

**堀 千明**、天野エンザイム科学技術振興財団 研究奨励賞, 樹木抽出成分の分解に関与する酵素の探索と利用, 2020年6月12日

**堀 千明, 日本木材学会 研究奨励賞**, 微生物による木材腐朽の多様性に関するオミクス解析, 日本木材学会 2020年3月16日

松本壘、**堀 千明**、他、**糸状菌分子生物学カンファレンス 優秀ポスター賞**, 生立木が生産する生体防御物質に対する病原性木材腐朽菌の分解メカニズムの解析、糸状菌分子生物学研究会, 2019年11月7日