

褐色腐朽菌によるセルロースの酵素分解の
制約要因に関する分子生物学的解析

加治佐 平

-目次-

第1章	序論	1
1.1	木材とその細胞壁構造	2
1.2	木材腐朽菌による木材の分解様式	2
1.3	木材腐朽菌のセルロース分解に関する既往の研究	6
1.3.1	白色腐朽菌によるセルロース分解メカニズム	
1.3.2	白色腐朽菌 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> が生産するセルラーゼ	
1.3.3	白色腐朽菌 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> のセルロース分解に関与する酸化還元酵素	
1.4	褐色腐朽菌によるセルロース分解メカニズム	16
1.5	褐色腐朽菌のセルラーゼおよびセルロース分解関連酵素	18
1.6	本研究の目的	19
	参考文献	20
第2章	褐色腐朽菌 <i>Coniophora puteana</i> 由来セロビオヒドロラーゼ遺伝子のクローニングとキャラクタライゼーション	36
2.1	緒言	37
2.2	実験方法	39
2.2.1	菌株および保存	
2.2.2	菌糸からのゲノムDNAの抽出	
2.2.3	CODEHOP-PCRを用いた <i>C. puteana</i> ゲノムからのCel6およびCel7遺伝子の検出	
2.2.4	Cel6 および Cel7 遺伝子をコードする全長 cDNA のクローニング	
2.2.5	RT-PCR による <i>C. puteanacel6</i> および <i>cel7</i> 遺伝子の発現解析	
2.3	結果	45
2.3.1	<i>C. puteana</i> 由来 Cel6 および Cel7 遺伝子ホモログの検出	
2.3.2	<i>C. puteana</i> 由来 2 つの Cel6 遺伝子 cDNA の全長クローニング	
2.3.3	<i>C. puteana</i> 由来2つのCel7遺伝子cDNAの全長クローニング	
2.3.4	<i>C. puteanacel6</i> および <i>cel7</i> 遺伝子の発現解析	
2.4	考察	55
	参考文献	60

第3章 褐色腐朽菌 <i>Coniophora puteana</i> 由来セロビオース脱水素酵素の特性解析および遺伝子のクローニング	63
3.1 緒言	64
3.2 実験方法	66
3.2.1 培養	
3.2.2 CDH 活性測定	
3.2.3 CDH の精製	
3.2.4 CDH をコードする cDNA のクローニング	
3.2.5 質量分析	
3.3 結果	69
3.3.1 <i>C. puteana</i> のセルロース培養系における菌糸生長および CDH 活性	
3.3.2 <i>C. puteana</i> CDH の精製	
3.3.3 <i>C. puteana</i> CDH をコードする cDNA のクローニング	
3.4 考察	74
参考文献	75
第4章 CODEHOP-PCR 法を用いた木材腐朽菌ゲノムからのセルロース分解関連酵素遺伝子の検出	80
4.1 緒言	81
4.2 実験手法	82
4.2.1 菌株および培養	
4.2.2 菌糸からの DNA の抽出および rDNA 上の Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域での種の同定	
4.2.3 CODEHOP プライマー設計	
4.2.4 PCR 反応	
4.2.5 PCR 増幅産物のシーケンス解析	
4.3 結果	86
4.3.1 ITS 領域での種の同定	
4.3.2 CODEHOP プライマーを用いた木材腐朽菌ゲノムからの Cel6、Cel7、CDH 遺伝子の検出	

4.4	考察	89
	参考文献	94
第 5 章	総括	97
	公表論文一覧	100
	謝辞	101

Abbreviations

BLAST	basic local alignment search tool
bp	base pairs
CBH	cellobiohydrolase
CBM	carbohydrate-binding modules
CDH	cellobiose dehydrogenase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CODEHOP	<u>C</u> onsensus <u>D</u> Egenerate <u>H</u> ybrid <u>O</u> ligonucleotide <u>P</u> rimers
DNA	deoxyribonucleic acid
DP	degree of polymerization
EBI	European Bioinformatics Institute
EG	endo- β -1,4-glucanase
FAD	flavin adenine dinucleotide
GH	glycoside hydrolase
GMC	glucose-methano-choline
GPD	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
ITS	internal transcribed spacer
kDa	kilo Dalton
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
RACE	rapid amplification of cDNA ends
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcriptase- polymerase chain reaction
UTR	untransrated region

第1章

序論

1.1. 木材とその細胞壁構造

木材を構成する細胞壁はその形成過程の違いから1次壁と2次壁に区別できる。1次壁は細胞が伸長や拡大中に堆積する薄い細胞壁であり、2次壁は細胞の伸張や拡大停止後に1次壁の内側に堆積する厚い細胞壁である。細胞と細胞を接着している部分を細胞間層または中層という(Core et al. 1979)。1次壁の薄さから細胞間層との境界がわかりにくいため、細胞間層とそれを挟む隣接する2細胞の1次壁を合わせて複合細胞間層(compound middle lamella)と呼ぶ。また、2次壁は分厚い多層構造をとり、S₁、S₂、そしてS₃層の3つの層から構成される。S₃層が最も細胞内腔側に位置する。S₂層は一般的に真ん中の層であり、最も厚い。そしてS₁層は2次壁の最も外層を形成している。これら2次壁はセルロースがそれぞれの層によって細胞の軸の回りに異なったマイクロフィブリル形態をとるために3つに区別されている。木材細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、およびリグニンの3つの主成分より構成されるが、その中でもセルロースは細胞壁においてほぼ1/2の成分(40-45%)を占めることから最も重要な成分である。セルロースは主に2次壁に位置する。セルロースはD-グルコピラノース単位が β -1,4-グルコシル結合した単一構造をなすことから、グルコース残基は単位構造ごとに180°ずつ回転している。このことからセルロースの繰り返し単位としてグルコースではなく、セロビオースであることが理解できる(Attalla 1983)。直鎖状のセルロース分子は分子内および分子間水素結合により強固な性質を持っている(Gardner and Blackwell 1974)。セルロース分子のサイズは一般的に重合度(DP)によって表すが、木材細胞壁を構成するセルロース分子のDPは4000-5500程度である(Kondo 2000)。セルロースは水素結合、疎水結合およびファンデルワールス力により結晶性のマイクロフィブリル構造をとる(Brown and Saxena 2000)。このマイクロフィブリルによる大きな凝集によってセルロースの強固な特性が生まれていると考えられる。また、セルロースマイクロフィブリルには整った結晶領域のみならず、非定形(アモルファスな)そして非結晶なセルロース領域も存在する。高結晶セルロースはアモルファスな領域に比べてセルラーゼが作用しにくいことが広く知られており、それゆえセルロースの結晶性がセルロースに結合して分解するセルラーゼの効率に大きな影響を及ぼしている(Chang and Holtzaple 2000)。

1.2. 木材腐朽菌による木材の分解様式

森林の生態系の中で、植物は光を利用して酸素を生成する一方(明反応)、大気中の二酸化炭素を取り込み、生命活動に必要な炭水化物および有機物を合成する(暗反応)独立栄養生物である。一方、動物や微生物は他の生物による有機物を分解して生命活動に必要な

なエネルギーを得る従属栄養生物である。消化器官を有する動物とは異なり、微生物は固体の有機物を取り込めないために栄養物は必ず低分子化、可溶化して取り込まなければならない。

分類学上、微生物はその細胞構造の差異から真核生物である菌類と、原核生物である細菌類に大きく分かれる。そして菌類とは菌界に属する生物の総称であり、真菌類とも呼ばれる。菌界にはツボカビ門、接合菌門、子囊菌門、担子菌門、不完全菌、地衣植物門が属し、いわゆるキノコ、カビ、酵母が含まれる。また、分類学上の単位ではないが、細胞増殖における形態的な分類として、菌類には多数の管状の細胞から菌糸を形成し、孢子または体細胞分裂によって形成される分生子によって増殖する糸状菌（キノコ、カビが含まれる）と、単細胞のままでは出芽あるいは分裂により繁殖する酵母が存在する。

木材腐朽菌というカテゴリーは分類学上、または細胞の形態的な分類とは無関係であり、木材を腐朽させる真菌類の中で腐朽の進展した木材の外観から名付けられたものである。木材腐朽菌は、その腐朽型から白色腐朽、褐色腐朽、そして軟腐朽に大別される（高橋 1989）。この内、褐色腐朽菌および白色腐朽菌は大部分が担子菌に属し、腐朽によって木材を暗褐色もしくは白色に変色させる(Kirk and Cowling 1984)。一方、軟腐朽菌はそのほとんどが子囊菌と不完全菌に属する。本研究においては、分類学上の体系とは全く異なる木材腐朽菌について、さらに木材腐朽菌の内、主に担子菌が属する白色腐朽菌と褐色腐朽菌について論じていく。

一般的に、白色腐朽菌は大部分が広葉樹において多く見られ、褐色腐朽菌は針葉樹においてしばしば見られる。白色腐朽菌の木材分解様式の特徴として、木材の重量減少に従って木材強度の劣化も緩やかに進行していくことが挙げられる一方、褐色腐朽菌の木材分解様式の特徴は、腐朽の初期段階において木材重量の減少が見られる前に激しい強度劣化が引き起こされる点にある。これらの木材分解様式の差異を引き起こす原因としては両者における木材主成分の分解様式にあると考えられる。すなわち、両者では木材腐朽においてリグニン、ヘミセルロース、そしてセルロース成分それぞれに分解様式の違いが見受けられる。その中で、最も大きな違いはリグニン分解能力にあると言える。これまで白色腐朽菌はリグニンを分解、減少させるのに対して、褐色腐朽菌はリグニンをほとんど分解しないとされてきた。これまでリグニン分解性の差異を引き起こすフェノール性物質の酸化反応を利用した白色および褐色腐朽菌の識別法により主に木材腐朽菌は分類されてきた(Bavendamm 1928)。白色腐朽菌の多くは様々なリグニン分解酵素を菌体外に分泌することが知られており、木材細

胞壁中のリグニンにおけるC_α-C_β結合、β-O-4結合、そして芳香核を開裂させることで、完全に低分子化することができる。一方、褐色腐朽菌の多くでは、これまでリグニン分解酵素の生産は確認されておらず、リグニン由来芳香族残基の部分的酸化、芳香族メトキシル基の減少、カルボニル基およびカルボキシル基が共役したフェノール水酸基の増加などの減少からリグニンを分解しないと言われてきた(Kirk 1975, Ander and Eriksson 1977, Agosin et al. 1989, Jin et al. 1990, Irbe et al. 2001)。近年、褐色腐朽菌*Gloeophyllum trabeum*において、褐色腐朽の進んだ木材中に残渣として残る芳香族高分子はリグニン由来のものではなく、脱メトキシル基およびβ-O-4開裂によるフェノール性水酸化ラジカルの重合物であることが示された(Yelle et al. 2008)。いずれにしても、褐色腐朽菌の多くでリグニン分解による低分子化が見られないことは事実である。両者の木材分解時におけるグルコースおよびリグニン成分の減少率をFig. 1.1に示したが、広葉樹材もしくは針葉樹材に関わらず、白色腐朽菌の大部分がリグニンを大きく減少させる一方、それらと比較して褐色腐朽菌の大部分がほとんどリグニンを減少させないこと、さらに相対的にグルコース量が大幅に減少していることが見て取れる。

また、リグニン分解だけでなく、セルロース、ヘミセルロースといった多糖類分解様式においても両菌では大きく異なることが知られている(Eriksson et al. 1990)。白色腐朽菌では、木材細胞壁の2次壁各層の結晶性セルロースがS₃からS₁へ徐々に分解されていき、そしてセルロース分解と同時にリグニンおよびヘミセルロースといった全ての木材細胞壁成分が徐々に分解されていくことが観察されている(Wilcox 1968)。対照的に、褐色腐朽菌は木材腐朽初期において木材細胞壁の2次壁のS₃およびS₁層を残したまま、選択的にS₂層のみを分解する(Wilcox 1968, Blanchette et al. 1990, Daniel 1994)。これはS₂層がS₁層やS₃層と比較してリグニン量が少ないことから、褐色腐朽菌が多糖を選択的に分解しやすいためと考えられる(Daniel 1994)。その際、ヘミセルロース成分がまず分解除去され(Curling et al. 2001, Sivonen et al. 2003)、同時にセルロースの急激な重合度低下が生じる。そして腐朽が進むに従って、2次壁の全ての層に存在する結晶性セルロースが大々的に除去されていく。褐色腐朽菌を位置づける定義としてNilsson (1985)は、褐色腐朽菌は主に多糖を分解し、セルロースの激しい重合度低下をもたらす菌である、と述べている(Fig. 1.2)。

木材腐朽担子菌のうち、褐色腐朽菌として分類されているものは6%に過ぎず、その大半が多孔菌類(Polypores)である(Rayner and Boddy, 1988)。しかし、地球上の土壌中の炭素1/4が寒帯針葉樹林に存在すると考えられており、この木質堆積物の多くが褐色腐朽担子菌により腐食されている(McFee and Stone, 1966)。一方で、木材腐朽担子菌は木造構造物や産業木

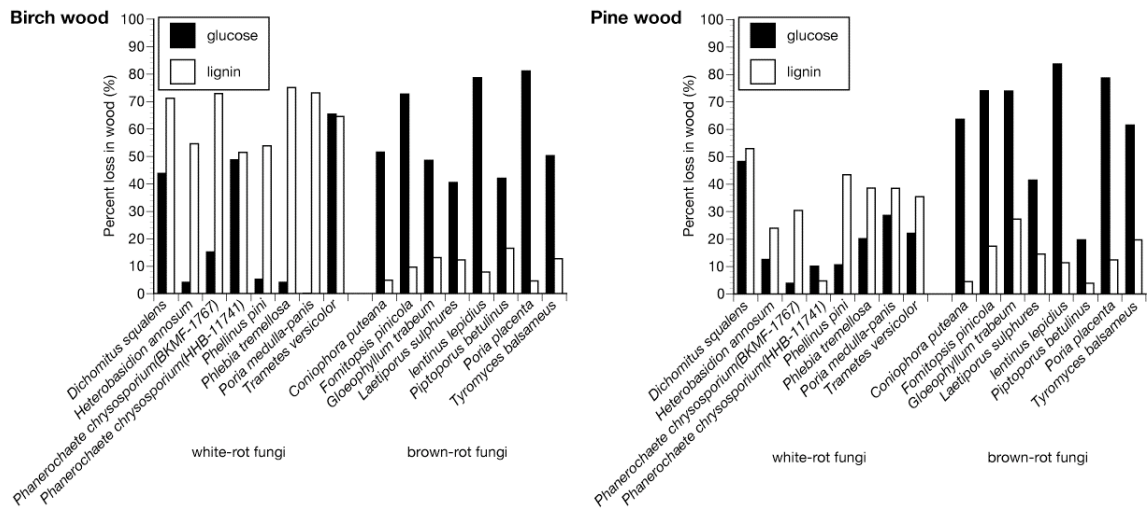


Fig. 1.1. Percent loss of glucose and lignin in wood polysaccharides lost in birch and white pine after 12 weeks of decay by white- and brown-rot fungi (reference cited: Eriksson et al., 1990).

材に対して甚大な被害を与える。その中で褐色腐朽という腐朽パターンが最も代償が大きく、破壊的な木材劣化形態を示す。米国においては針葉樹林材腐朽被害全体の約80%が褐色腐朽菌によるものであることがわかっている(Kim, 2007)。また、褐色腐朽菌が木造構造物被害を及ぼす理由として、至適生育条件は含水率30-70%、至適温度は15-40℃と、人間の建物内における住環境に相当しており、人間の生活環境と類似している点が考えられる(Table 1.1)。これらのことから、褐色腐朽菌の急激な多糖分解能力についてそのメカニズムについて理解することは非常に重要である。しかしながら、褐色腐朽菌の多糖分解メカニズムに関する研究は、ヘミセルロース分解においてはその分解酵素であるヘミセルラーゼがいくつかの褐色腐朽菌において単離され、白色腐朽菌と同様に酵素的な分解メカニズムが知られているが

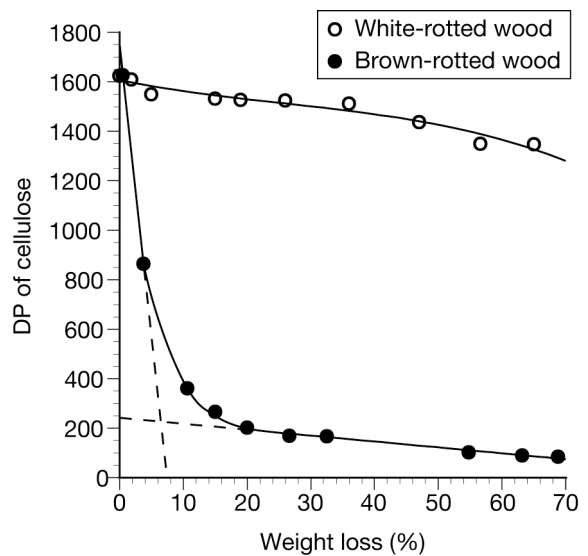


Fig. 1.2. Changes in DP of cellulose from white- and brown decayed wood (Cowling, 1965). White-rot fungus: *Trametes versicolor*, brown-rot fungus: *Poria placenta*.

(King 1966, Keilich et al. 1970, Highley 1976, Herr et al. 1978, Highley et al. 1981, Milagres and Sales 2001, Cohen et al. 2005)、セルロース分解に関する研究は非常に限られている。

Table 1.1. Moisture content of wood and temperature for the growth of typical brown-rot fungi in buildings

Fungi	Moisture content (%)	Temperature (°C)
<i>Serpula lacrymans</i> (ナミダタケ)	20-55	15-22
<i>Coniophora puteana</i> (イドタケ)	30-70	20-32
<i>Antrodia sinuosa</i> (ワタグサレキン)	35-55	25-30
<i>Gloeophyllum trabeum</i> (キチリメンタケ)	40-60	28-40
<i>Paxillus panuoides</i> (イチョウタケ)	35-70	23-32
<i>Neolentinus lepideus</i> (マツオオジ)	35-60	27-31

(Data from Viitanen and Ritschkoff, 1991)

1.3. 木材腐朽菌のセルロース分解に関する既往の研究

1.3.1. 白色腐朽菌によるセルロース分解メカニズム

白色腐朽菌のセルロース分解メカニズムは多くの糸状菌と同じく、酵素的な分解メカニズムによって行われるものであることが示唆されてきた。そして、白色腐朽菌を含めた糸状菌のセルロース分解メカニズムに関する研究は、その分解酵素であるセルラーゼの詳細な機能解析および構造解析によって明らかにされてきた。その中で、子囊菌 *Trichoderma reesei* はセルラーゼによるセルロース分解メカニズムが最初に考察され、これまで最も研究されてきた菌である。Reese(1950)らは、セルラーゼが C_1 および C_x 酵素の複合系において作用することを提唱した。この説によると、結晶性セルロースの C_1 - C_x メカニズムとは、まず、 C_1 コンポーネントが結晶性セルロースの結晶構造を膨潤させることで結晶鎖をはがし、離れたセルロース鎖は C_1 コンポーネントや β -グルコシダーゼにより加水分解されるというモデルであった(Fig. 1. 3A)。その後、King(1965)は C_1 セルラーゼの精製の過程において、その酵素の精製度が上がるにつれてセルロースより産生されるグルコース量が減り、主生成物がセロビオースに変化することを発見した。後にこのセロビオース産生酵素が精製され、エキソ-グルカナーゼと名付けられ、その後セロビオヒドロラーゼと呼ばれる酵素となる。一方、 C_1 酵素と協調的に作用すると考えられた C_x セルラーゼはエンドグルカナーゼであることが明らかとなり、 C_1 - C_x メカニズムからエンド-エキソメカニズムによるセルロース分解機構が提唱された(endo-exo synergism) (Farerstam and Pettersson 1980, Henrissat et al. 1985, Wood and

McCRAE 1978, Streamer et al. 1975, Uzcategui et al. 1991b, Henriksson et al. 1999)。そのモデルでは2種類の触媒機構の異なる酵素 *exo*- β -1,4-glucanase (cellobiohydrolase; CBH: EC 3.2.1.91)および *endo*- β -1,4-glucanase (EG: EC3.2.1.4)に分類され、EGがセルロースの非晶領域を不規則に加水分解することでセルロースは低分子化され、それによって生じたセルロース末端よりCBHが漸次的に加水分解を行い、セロビオースを生産すると考えられた(Fig. 1. 3B)。

さらに、*T. reesei*において2つのCBH(CBHI, CBHII)と、5つのEG(EGI, EGII, EGIII, EGIV, EGV)がセルロース培養系より単離された。このことから、同一の菌より様々な種類のセルラーゼが生産されることが明らかとなった。近年、これら多種多様の加水分解酵素群の分類分けは触媒様式からアミノ酸配列の相同性および疎水性クラスター解析による分類法へと移行した (Henrissat et al. 1989, Henrissat 1991, Henrissat and Baïroch 1993, Henrissat et al. 1998, Davies and Henrissat 1995)。その結果、現在114のGHファミリーの中で、糸状菌が生産するCBHは全てGH6およびGH7に属することが明らかとなっている(CAZy; <http://www.cazy.org/>) (Henrissat et al. 1991)。また、興味深いことに、*T. reesei*由来CBHIとEGIでは触媒メカニズムの点ではエンド型とエキソ型で全く異なるにもかかわらず、同じ糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー7に位置づけられることとなった。このことは酵素の特性がわずかな構造上の差異

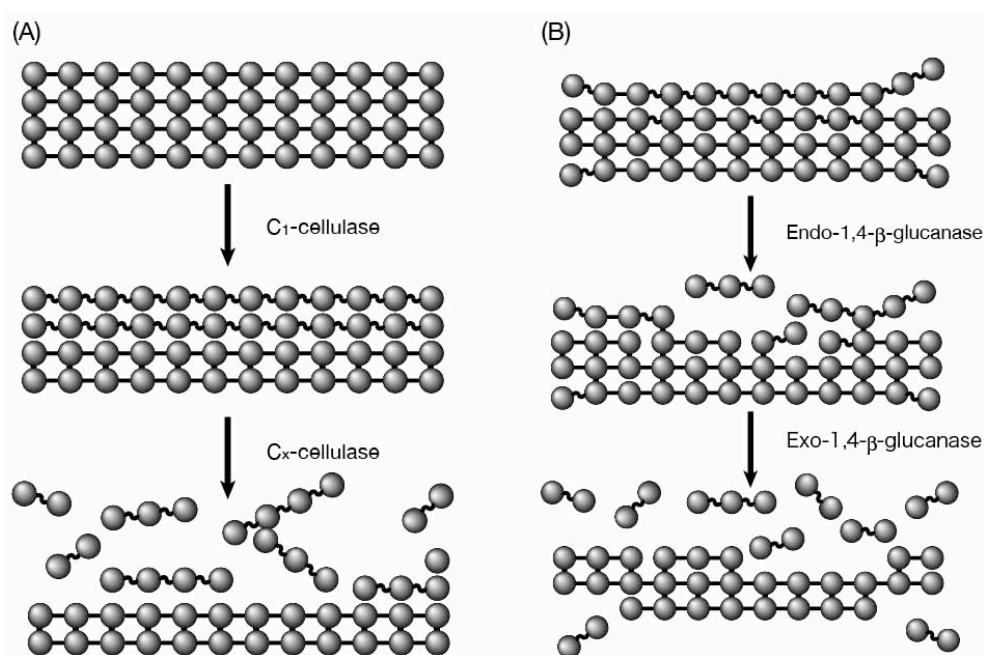


Fig. 1. 3. The C₁-C_x (A) and the endo-exo (B) mechanisms for cellulose biodegradation by filamentous fungi. ●-●; cellulose chain with hydrogen bond, ●●; cellulose chain without hydrogen bond.

によって決まることを示唆するものであり、それ以降、酵素の特性を決定する因子を探求していく3次元構造解析が進められてきた。その結果、*T. reesei* 由来 GH ファミリー7について、CBHI (*T. reesei* 由来 Cel7A)は触媒中心がループによって覆われることによってトンネル構造をした中に活性中心が存在するような形態をとるのに対して、EGI (*T. reesei* 由来 Cel7B)ではループ構造がなく、活性中心が完全にオープンな形をとることが明らかとなった(Fig. 1. 4.; Divne et al. 1994, Kleywegt et al. 1997)。同じように *Humicola insolens* 由来 GH ファミリー6について、CBHII (*H. insolens* 由来 Cel6A)では活性中心が2つのループで覆われているのに対して、EGVI (*H. insolens* 由来 Cel6B)ではC末端側のループが1つ欠如しており、またもう一方のN末端ループも活性中心を覆わない形でアミノ酸配列が変化していることが明らかとなっている(Fig. 1. 5) (Varrot et al. 1999; Davies et al. 2000)。そして、現在では糖質加水分解酵素ファミリーに属する諸酵素の結晶構造解析が進むにつれ、GH ファミリーからさらに新しいスーパーファミリーとしてClanという、酵素の3次元構造による分類分けも進行中である(Pickersgill et al. 1998)。

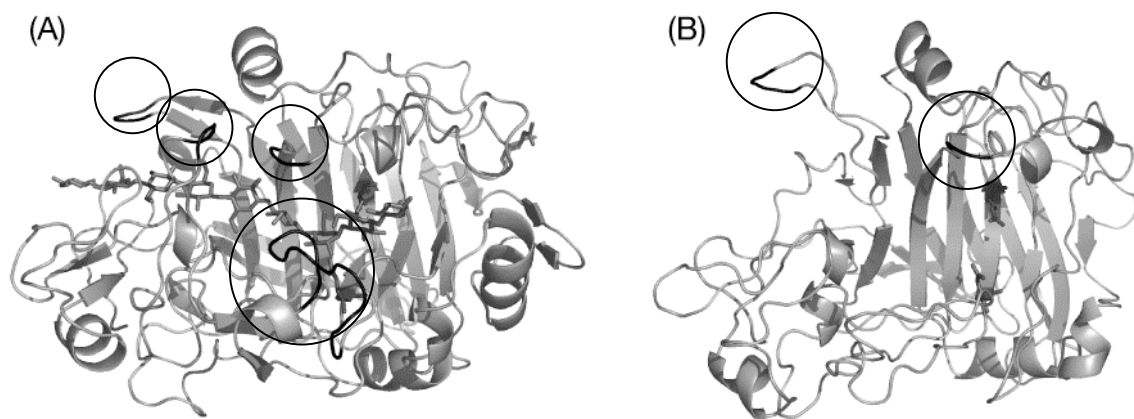


Fig. 1. 4. Three dimensional structures of (A) CBHI (Cel7A), and (B) EGI (Cel7B) from *T. reesei*. The regions of loop structure were blacked.

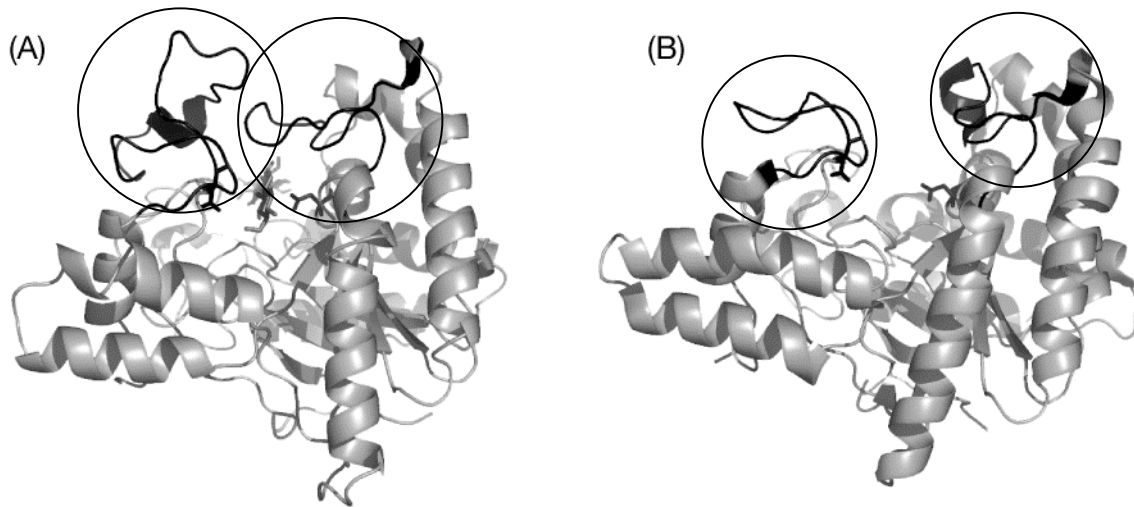


Fig. 1. 5. Structures of (A) CBHII (Cel6A), and (B) EGVI (Cel6B) from *H. insolens*. The regions of loop structure were blacked.

このような酵素の機能と構造に関する研究が進む中で、セルラーゼのセルロース分子鎖に対する分解様式についても研究が行われてきており、Davies と Henrissat はプロセッシビティという分解モードの概念を提案した (Davies and Henrissat 1995)。プロセッシビティとは、CBH が EG よりもセルロースマイクロフィブリルよりセロオリゴ糖生成効率が良いことに対して、CBH のエキソ型と EG のエンド型といったセルロース鎖の活性中心への捕捉に対する議論ではなく、プロセッシビティというセルラーゼによる加水分解反応の連続性について述べている (Henrissat 1998)。それによると、CBH では、触媒部位がループ構造により覆われたトンネル構造をしているために、一度セルロース鎖が捕捉されると酵素は触媒反応 1 回転ごとに脱離することなく逐次的に隣のグリコシド結合へと移動していく processive な分解を行う。一方、EG では触媒部位を覆うループが完全に欠如しているために触媒反応 1 回転すると、酵素がセルロース鎖より脱離してしまう non-processive な分解を行うというものである (Fig. 1.6)。実際に、*T. reesei* 由来 CBHI がセルロースマイクロフィブリルの還元末端側から、*T. reesei* 由来 CBHII が非還元末端側から processive に分解している様子が電子顕微鏡において観察されている (Koyama et al., 1997, Imai et al., 1998)。

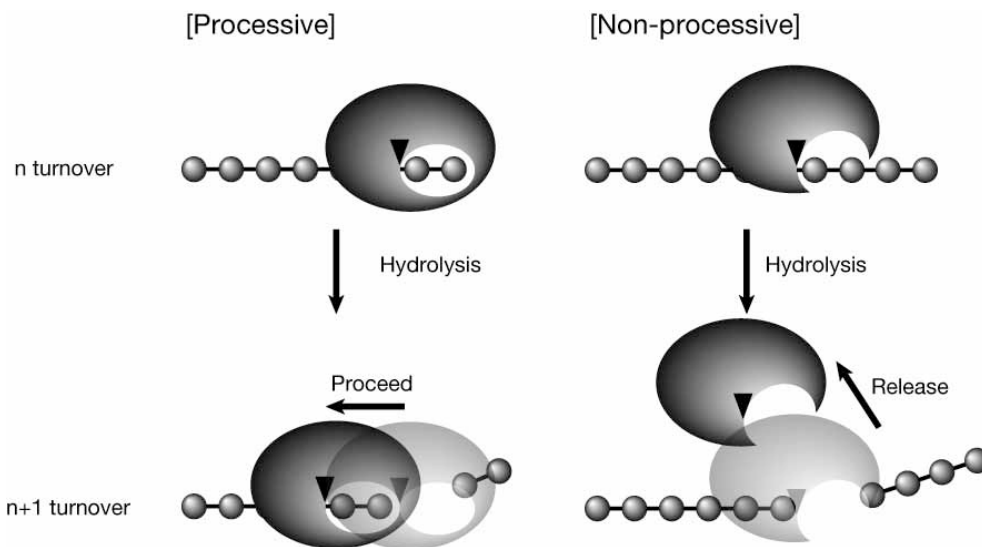


Fig. 1. 6. Different mode of cellulose degradation by cellulases.

また、セルラーゼのプロセッシビティを發揮するにあたり、触媒ドメインとは別のドメイン構造が重要な役割を果たしていることが明らかとなっており、糖結合性モジュール(CBM)は小さな 3 kDa ほどのドメインであり、*O*-グルコシル化されたリンカー領域によって触媒ドメインとつながっている(Shoemaker et al. 1983, Abuja et al. 1988, Tomme et al. 1988, Johansson et al. 1989)。

Fig. 1. 7 に示したのはほとんどの糸状菌のセルラーゼにおいて見られる CBM ファミリー1 に属する CBM である。CBM ファミリー1 に属する CBM はおよそ 40 残基ほどのアミノ酸配列から成り、その中の 3 つの芳香族アミノ酸残基が約 10.4 Å 程の間隔を開けて平坦な表面を形成し、セルロースの疎水面とファンデルワールス力によって結合する(Linder et al., 1995)。CBM の機能については様々な酵素学的な研究により、その機能が明らかにされてきており、*T. reesei*Cel7A において CBM を除去した酵素は結晶性セルロースの分解性著しく減少するが、可溶性もしくはアモルファスセルロースに対してはほとんど分解性の減少が見られない

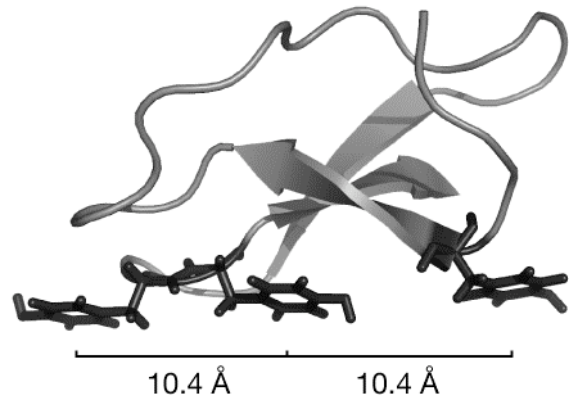


Fig. 1. 7. Structure of Carbohydrate binding modules (CBM) family 1 from *T. reesei* Cel7A (pdb 1cbh; Kraulis et al, 1989)

という報告がある(Ståhlberg et al. 1991)。このことから CBM を介したセルロース表面への酵素の吸着が効率よい結晶性セルロースの加水分解において重要な役割を果たすことが示唆されてきた(Lee and Fan 1982, Lee and Fan 1983, Steiner et al. 1988, Sattler et al. 1989, Nidetzky et al. 1994)。一方、*T. reesei*Cel7B は CBM を有しているが、結晶性基質に対してはほぼ不活性である(Kleman-Leyer et al. 1996)。

1.3.2. 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産するセルラーゼ

白色腐朽菌による酵素的なセルロース分解については他のセルロース分解性糸状菌と同様のメカニズムをとると認識されてきており、明らかにされてきた糸状菌のセルロース分解メカニズムに沿って、モデル菌 *Phanerochaete chrysosporium* を中心に研究が行われてきた。Eriksson と Pettersson (1975a, 1975b)は 5 つの EG および 1 つの CBH (CBHI)を本菌のセルロース培養液より単離した。その後、Uzcategui ら(1991a)は CBHI がセルロース培養液中総タンパク質の 12 %を占めること、およびもう 1 つの CBHII がによって単離された。さらに Henriksson ら(1999)は精製 EG が *T. reesei*EGIII と同様の機能を持つ酵素であることを発見した。これらのことから、セルロース培養系における *P. chrysosporium* の菌体外酵素パターンは *T. reesei* と類似しており、これらの CBH および EG によって *P. chrysosporium* は協調的にセルロースの加水分解を行っていることが示唆された(Streamer et al. 1975, Uzcategui et al. 1991b, Henriksson et al. 1999)。その後、1990 年前後より分子生物学的な研究が本菌のセルラーゼにおいて行われ、Sims らは *T. reesei*CBHI のゲノム断片をプローブに、*P. chrysosporium* 由来 CBHI のゲノム領域について明らかにした(Sims et al., 1988)。さらに、*P. chrysosporium* はゲノム上に 6 つの CBHI アイソザイムを有することが明らかとなった(Covert et al., 1992a, b, Wymelenberg et al., 1993, Sims et al., 1994)。そして、現在では *P. chrysosporium* ゲノムが米国エネルギー省の Joint Genome Institute より公開されている(Martinez et al., 2004)。その結果、*P. chrysosporium* は CBH として 1 つの Cel6 および 6 つの Cel7 アイソザイムをゲノム上に有することが明らかとなった (Munoz et al., 2001, Martinez et al., 2004)。一方、セルロース培養系において Cel7 遺伝子群のなかで *cel7D* が最も主要な発現量を示し、*cel7A* や *cel7B* の約 1000 倍ほどであることが示されている(Covert et al., 1992b, Wymelenberg et al., 1993)。*P. chrysosporium* のセルロース培養系において主要な CBHI タンパク質と考えられる Cel7D は結晶構造が明らかとなっており、*T. reesei* 由来 CBHI との構造比較も行われた(von Ossowski et al., 2003)。その結果、活性中心を覆うループが *T. reesei* 由来 CBHI と比較して数残基短いことが明らかにされた。しかしなが

らセルロース鎖の取り込みに関するアミノ酸残基は全て保存されていることが明らかとなった。これまでに同定されている担子菌由来 GH6 および 7 に属するセルラーゼを Table. 1. 2 および Table. 1. 3 にそれぞれ示した。

Table 1. 2. GH6s from Basidiomycetes.

Fungi	Type of wood-rotting	name of protein	Catalytic Type	CBM	Reference
<i>Agaricus bisporus</i>	-	Cel3A	CBH	+	Chow et al., 1994
<i>Coprinus cinerea</i>	-	CC1G_01107	CBH	+	Genome annotation from Broad Institute
		CC1G_10605	CBH	-	Genome annotation from Broad Institute
		CC1G_08276	CBH	-	Genome annotation from Broad Institute
		CC1G_08277	CBH	-	Genome annotation from Broad Institute
		CC1G_04166	CBH	-	Genome annotation from Broad Institute
<i>Irpex lacteus</i>	white-rot	Cex3	CBH	+	Toda et al., unpublished.
<i>Lentinus edodes</i>	white-rot	Cel6B	CBH	+	Lee et al., 2001
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	white-rot	CBHIII	CBH	+	Tempelaars et al., 1994
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	white-rot	CBHIII	CBH	+	Keawsompong and Peberdy, unpublished.
<i>Polyporus arcularius</i>	white-rot	Cel3	CBH	+	Ohnishi et al., 2007
<i>Trametes versicolor</i>	white-rot	CBHII	CBH	+	Novo et al., 2001
<i>Volvariella volvacea</i>	white-rot	CBHIII-I	CBH	+	Ding et al., 2006

Table 1. 3. GH7s from Basidiomycetes.

Fungi	Type of wood-rotting	Name of protei	Catalytic type	CBM	Reference
<i>Agaricus bisporus</i>	-	Cel2	CBH	+	Yague et al., 1997
<i>Athlia rolfsii</i>	-	Cbh-1	CBH	+	Yasokawa et al., 2003
<i>Coprinus cinerea</i>	-	CC1G_12409	CBH	-	Lange et al., 2003
		CC1G_13448	CBH	-	genome annotation from Broad Institute
		CC1G_12410	CBH	-	genome annotation from Broad Institute
	-	CC1G_12411	CBH	-	genome annotation from Broad Institute
<i>Irpex lacteus</i>	white-rot	Cel1	CBH	+	Hamada et al., 1999
		Cel2	CBH	+	Hamada et al., 1999
		Cel3	CBH	+	Hamada et al., 1999
<i>Lentinus edodes</i>	white-rot	Cel7A	CBH	+	Lee et al., 2001
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	white-rot	Cel7A	CBH	-	Sim et al., 1988
		Cel7B	CBH	+	Lange et al., 2003
		Cel7C	CBH	+	Covert et al., 1992
		Cel7D	CBH	+	Sim et al., 1994
		Cel7E	CBH	+	Covert et al., 1992
		Cel7F	CBH	+	Covert et al., 1992
		Cel7F	CBH	+	Covert et al., 1992
<i>Pleurotus sp.</i>	white-rot	Cbhi-1	CBH	-	Eizmendi et al., unpublished.
		Cbhi-2	CBH	+	Eizmendi et al., unpublished.
		Cbhi-3	CBH	+	Eizmendi et al., unpublished.
		Cbhi-4	CBH	+	Eizmendi et al., unpublished.
<i>Polyporus arcularius</i>	white-rot	Cel1	CBH	-	Ohnishi et al., 2007
<i>Schizophyllum commune</i>	white-rot	Cel1	CBH	-	Weber et al., 2005
<i>Trametes versicolor</i>	white-rot	Cel7A	CBH	-	Lahjouji et al., 2007
<i>Volvariella volvacea</i>	-	Cbhi-I	CBH	+	Jia et al., 1999
		Cbhi-II	CBH	-	Ding et al., 2006

1.3.3. 白色腐朽菌のセルロース分解に関与する酸化還元酵素

白色腐朽菌のセルロース分解過程において、セルラーゼのみならず、酸化的なプロセスも関与していることは古くより考えられていた。Eriksson ら(1974)は無細胞系の菌培養液を用いたコットンの分解が、窒素雰囲気下と比較して酸素雰囲気下において著しく分解が促進されることを発見した。その後、白色腐朽菌 *Sporotrichum pulverulentum* (*Phanerochaete chrysosporium*)のセルロース分解に関与している酸化酵素を、セロビオースキノン酸化還元酵素(Westermark and Eriksson 1974a, b, 1975)、そしてセロビオース酸化酵素(Ayers et al., 1978, Ayers and Eriksson, 1982)であることを同定した。セロビオース酸化酵素は酸素に比べ、チトクロム *c* のような Fe(III)を含む化合物を効率よく還元、つまり電子受容体とすることが明らかとなり(Kremer and Wood, 1992, Samejima and Eriksson, 1992)、現在セロビオース脱水素酵素(CDH)と呼ばれている(Bao et al., 1993)。CDH は白色腐朽菌において広くその生産、もしくは遺伝子のクローニングが行われている。CDH はこれまでに知られている酵素の中では唯一の菌体外フラボヘムタンパク質であり、分子内に 1 分子の *b* 型ヘムおよび 1 分子のフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)をドメインとして含む(Morpeth, 1985, Henriksson et al., 1991)。 *P. chrysosporium* 由来 CDH では、フラビンドメインにおいて糖質が酸化されることが明らかになっており(Henriksson et al., 1991)、基質特異性はセロビオースおよびセロオリゴ糖が高いことが明らかとなっている(Ayers et al., 1978, Henriksson et al., 1998, Kremer and Wood, 1992)。白色腐朽菌のセルロース培養系における CDH の生理的役割については様々な考察がされてきており、Ayers らは、CDH がセロビオースを酸化することでセルラーゼ系による生成物阻害の解除とセルロース末端の再結合防止の役割を果たすと報告している(Ayers et al., 1978)。そして *Trichoderma* sp.の培養液を用いたセルロースの分解が CDH 存在下で促進されることが観察された(Bao and Renganathan, 1992)。さらに Igarashi らは CDH が CBHI の生成物阻害を解除することでセルロース分解が促進されることを生化学的に証明した(Igarashi et al., 1998)。現在まで CDH のアミノ酸配列は様々な菌で明らかになっており(Raices et al., 1995, Li et al., 1996, Dumonceaux et al., 1998, Moukha et al., 1999, Subramaniam et al., 1999, Xu et al., 2001)、それらのリストを Table 1.4 に示した。さらに CDH のヘムドメインの 3 次元構造(Hallberg et al., 2000)、そしてフラビンドメインの 3 次元構造(Hallberg et al., 2002)が解かれた結果、ヘムのリガンドとなるヒスチジン残基およびメチオニン残基が同定され、フラビンドメインにおいてもフラビン結合モチーフやグルコース・メタノール・コリン酸化還元酵素モチーフなど、CDH の機能および構造として重要な部位が同定されている。また、CDH 遺伝子の発現挙動については

様々な白色腐朽菌において研究報告があり、CDH 遺伝子がセルロースおよび木粉培地において発現誘導されているが、グルコースでは発現しないことが明らかとなっている(Li et al., 1996, Dumonceaux et al., 1998, Vallim et al., 1998, Moukha et al., 1999, Subramaniam et al., 1999, Yoshida et al., 2002)。また、Yoshida らは、*P. chrysosporium* のセロビオース代謝において、CDH 遺伝子の方が β -グルコシダーゼ遺伝子よりセロビオースによって発現誘導されることを定量的に証明した(Yoshida et al., 2004)。これらのことから、白色腐朽菌 *P. chrysosporium* による結晶性セルロース分解経路において、結晶性セルロースに対して分解性を有する Cel7D(CBHI) がセロビオースを分解生成物として生産し、分解生成物であるセロビオースが CDH によってセロビオノラクトンへ酸化されるという Cel7 と CDH の共役的な分解メカニズムが示唆されてきた(Fig. 1. 8)。

Table. 1. 4. CDHs from basidiomycetes.

Fungi	Type of wood-rotting	Reference
<i>Agaricus bisporus</i>	-	Morpeth, 1990
<i>Athelia rolfsii</i>	-	Zamocky et al., unpublished; Baminger et al., 2001
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	White-rot	Harreither et al., unpublished
<i>Coniophora puteana</i>	Brown-rot	Schmidhalter and Canevascini, 1992, 1993
<i>Coprinopsis cinerea</i>	-	genome annotation from Broad Institute
<i>Flammulina velutipes</i>	-	Fang et al., 1997
<i>Fomes annosus</i>	White-rot	Hutterman and Noelle, 1982
<i>Ganoderma gibbasum</i>	-	Fang et al., 1997
<i>Grifola frondosa</i>	White-rot	Yoshida et al., 2002
<i>Hericium erinaceus</i>	White-rot	Fang et al., 1997
<i>Irpex lacteus</i>	White-rot	Hai et al., 2000; Nozaki et al., unpublished
<i>Laccaria bicolor</i>	-	genome information from Joint Genome Institute
<i>Merulius tremellosus</i>	White-rot	Ander and Eriksson, 1977
<i>Myriococcum thermophilum</i>	-	Zamocky et al., 2008
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	White-rot	Bao et al., 1993; Raice et al., 1995; Li et al., 1996; Li et al., 1997
<i>Phlebia radiata</i>	White-rot	Ander and Eriksson, 1977
<i>Pleurotus ostreatus</i>	White-rot	Ander and Eriksson, 1977
<i>Polyporus dichrous</i>	White-rot	Ander and Eriksson, 1977
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	White-rot	Moukha et al., 1999; Sigoillot et al., 2002
<i>Schizophyllum commune</i>	White-rot	Fang et al., 1998
<i>Trametes versicolor</i>	White-rot	Roy et al., 1996; Dumonceaux et al., 1998; Stapleton et al., 2003, 2004
<i>Ustilago maydis</i>	-	genome information from Broad Institute

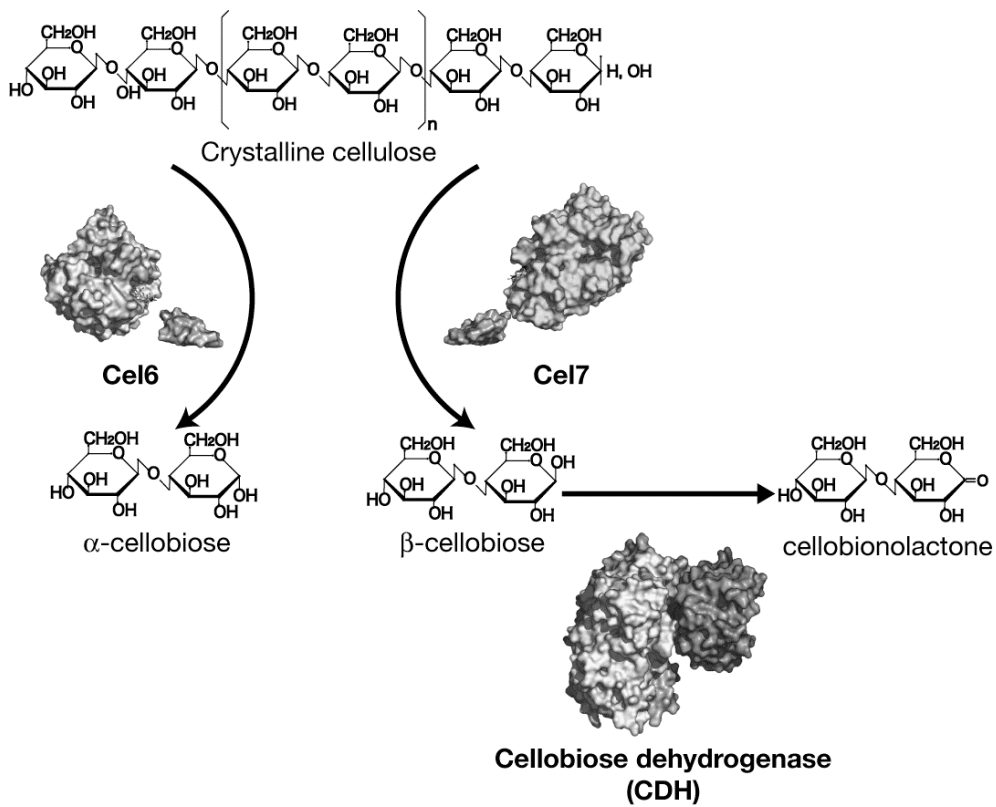
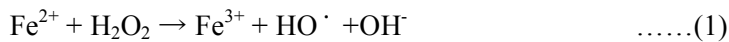


Fig. 1. 8. Crystalline cellulose degradative pathway of white-rot fungus *P. chrysosporium*.

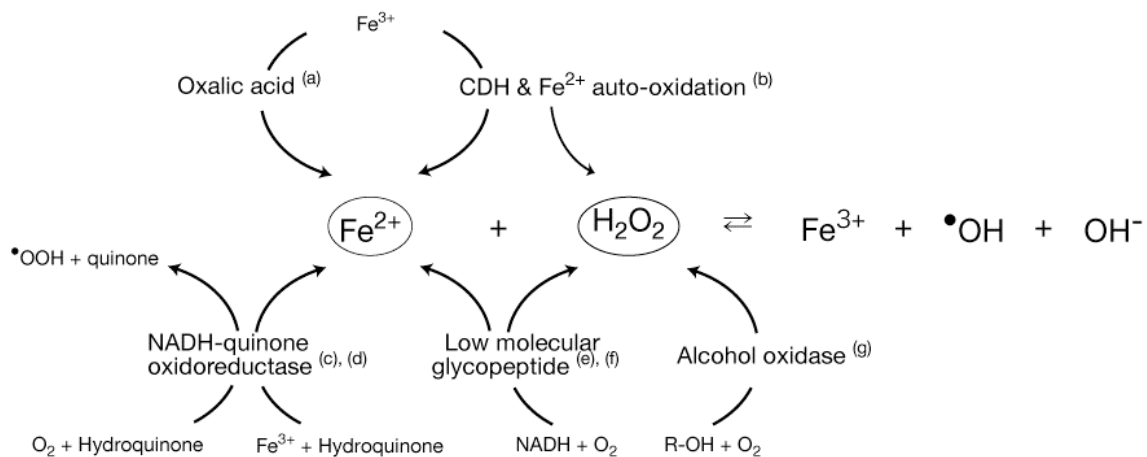
1.4. 褐色腐朽菌によるセルロース分解メカニズム

褐色腐朽の特徴として木材腐朽初期段階において木材重量減少が起こる前に、セルロースの重合度が約 10000 から 250 にまで急激に低下する(Cowling 1961, Wilcox 1978, Kirk et al., 1991, Kleman-Leyer et al., 1992)。そして、白色腐朽と褐色腐朽の根本的な差異は褐色腐朽菌がセルロースマイクロフィブリル全体に対して作用するのに対して、白色腐朽菌はマイクロフィブリル表面から漸進的に浸食していくところにあると述べられている(Kleman-Leyer et al., 1992)。このようなセルロース分解様式の差異から、褐色腐朽菌のセルロース分解メカニズムは白色腐朽菌や子嚢菌とは異なるものであると考えられてきた。褐色腐朽菌はエンド-1,4- β -グルカナナーゼを生産するがエキソ-1,4- β -グルカナナーゼを生産する菌は報告されていなかった(Highley 1973)。それゆえに褐色腐朽菌は *P. chrysosporium* や *T. reesei* のようなエンド-エキソ協調的な結晶性セルロース分解を行わない菌であると考えられてきた(Highley et al., 1983, Highley, 1987, Knowles et al., 1987, Enoki et al., 1988)。褐色腐朽菌がセルロース重合度を腐朽初期段階に急激に低下させる一方で、白色腐朽菌はセルロース重合度を緩やかに低下させ、同時に分解産物を資化させていることから、褐色腐朽菌と白色腐朽菌ではセルラーゼの誘導および抑制に決定的な違いがあると考えられてきた。実際に、褐色腐朽菌の数種類においてグルコースを唯一の炭素源とした培養系において豊富なセルラーゼが生産された報告がある(Highley 1973)。このようなセルラーゼ発現パターンは白色腐朽菌では見られなかったものであり、*P. chrysosporium* のセルラーゼはセロビオースで誘導され、少量のグルコースで抑制された(Eriksson and Hamp 1978)。また、褐色腐朽菌は明らかなエンド-エキソの協調的な結晶性セルロース分解メカニズムの欠如が認められたものの、それに代わるような酵素系は見つかっていない。さらに褐色腐朽菌が選択的に木材細胞壁の S₂ 層を分解することや、セルロース分解様式から、木材細胞壁壁孔を通過でき、フィブリル構造の結合を切ることで菌体外化合物が生産されていると考えられた(Flournoy et al., 1991)。その中で、Flournoy らは 6 kDa 以上の分子は木材微小孔から締め出されることを報告しており、さらに Srebotnik と Messner(1991)は電子顕微鏡によって 2 kDa 以下の分子のみが木材細胞壁微小孔を通過できることを証明し、木材細胞壁微小孔は腐朽が進行しても大きさは変化しないことを観察した。また、Daniel や Kim らによる免疫電子顕微鏡法によって、褐色腐朽菌が生産するセルラーゼが木材細胞壁に侵入できないことが確認された(Daniel, 1994, Kim et al, 1991, 1992)。そのことから、褐色腐朽菌が菌体外に生産する非酵素的セルロース分解因子の発見に研究の焦点が当てられてきた。そして、Koenigs(1974a)は酵素系によるセルロース分解メカニズムの代替機構

として、褐色腐朽菌によるセルロースの酸化を唱えた。Halliwell は最初にフェントン反応によって生じるヒドロキシラジカルもしくは類似の酸化試薬による褐色腐朽菌のセルロース分解の可能性について示唆し(Halliwell 1965)、Koenigs は白色腐朽菌と比較して褐色腐朽菌が培養液中により多くの H_2O_2 を生産することを発見したことから(Koenigs 1974b)、褐色腐朽菌は(1)式で示される H_2O_2/Fe^{2+} システムによるフェントン反応により産生されたヒドロキシラジカルによって酸化的に結晶性セルロースに対して最初に作用すると考えた(Koenigs 1974a)。



その後、褐色腐朽菌のセルロース分解メカニズムに関する研究の焦点はフェントン反応系においてラジカルを生成するそのフェントン試薬の代謝系についてに当てられ、それについて仮説的な諸々の議論がされてきた(Highley 1980, 1982, 1987, Highley and murmanis 1985, Enoki et al., 1990, 1991, Hirano et al., 1995, Tanaka et al., 1999, Hyde and Wood 1995, 1996, 1997, Goodell et al., 1997, Takao 1965, Green et al., 1991, Shimazono 1955, Shimada et al., 1991, Schmidt et al., 1981, Shimada et al., 1997, Cohen et al., 2002, 2004, 2005, Jensen et al., 2001, 2002, Daniel et al., 1994, 2007)。このようにこれまでの褐色腐朽菌のセルロース分解メカニズムに関しては、ヒドロキシラジカルによって結晶性セルロースをランダムに非晶化させることが通説となり、どのようにヒドロキシラジカルを生成するかという点に研究が限られ、 Fe^{2+} と H_2O_2 の生成経路の解明に絞られてきた。ヒドロキシラジカルの生成メカニズムについて様々なモデルが考えられてきたが、その生成経路に関する諸説の概略図を Fig. 1.9 に示した。



(a): Schmidt et al., (b): Hyde and Wood, (c): Jensen et al., (d): Cohen et al., (e): Enoki et al., (f): Tanaka et al., (g): Daniel et al.

Fig. 1. 9. Proposed producing mechanisms of Fenton reagent for non-enzymatic cellulose degradation by brown-rot fungi .

1.5. 褐色腐朽菌のセルラーゼおよびセルロース分解関連酵素

これまで述べたように褐色腐朽菌からは白色腐朽菌や子囊菌のような結晶性セルロースを分解するに十分な酵素系が見つかってこなかったため、非酵素的な分解メカニズムに焦点が当てられてきた。実際に、子囊菌や白色腐朽菌の様々なセルラーゼが単離、特性解析されてきた一方で、褐色腐朽菌の培養液から結晶性セルロースの分解は確認されていない (Highley 1982, Micales and Highley 1988, Micales and Highley, 1990, Uemura et al., 1993)。そのため、褐色腐朽菌のセルラーゼに関する研究は非常に限られている。これまでにキャラクタライズされた褐色腐朽菌由来のセルラーゼの一覧を Table 1. 5 に示す。この中で、褐色腐朽菌 *Coniophora puteana* (イドタケ) は、結晶性セルロース分解能力は白色腐朽菌に比べて低いことが報告されているが (Highley 1980)、セルロース分解系において *p*-nitrophenyl- β -D-lactoside 加水分解活性を有する 2 つの CBH および CDH を生産した報告があり、これらの酵素の特性を解析した結果はあるが、CBH に関してはどのような構造のものであるか、および結晶性セルロースを分解しているのかが明らかにされていない (Schmidhalter and Canevascini, 1992, 1993a, 1993b)。CDH に関してはセロビオースおよびセロオリゴ糖に関して活性を有していたことのみが報告されているにとどまり (Hyde and Wood, 1996)、白色腐朽菌由来 CDH と比較して特性に違いがあるのか等、不明確であった。いずれにしても、*C. puteana* は他の白色腐朽菌と類似したセルロース分解酵素を生産することが報告されているが、その他の褐色腐朽菌については、数種類の菌において EG の生産は確認されているが、CBH および CDH を生産した例は報告されていない。

Table 1. 5. Cellulases from brown-rot fungi

Fungi	Catalytic type	GH family	Reference
<i>Coniophora puteana</i>	CBH	Not known	Schmidhalter and Canevascini, 1992, 1993
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	EG	Not known	Mansfield et al., 1998
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	EG	5, 12	Herr et al., 1978; Mansfield et al., 1998; Cohen et al., 2005
<i>Piptoporus betulinus</i>	EG	Not known	Valaskova and Baldrian, 2006
<i>Polyporus schweinitzii</i>	EG	Not known	Bailey et al., 1969
<i>Serpula incrassata</i>	EG	Not known	Kleman-Leyer and Kirk, 1994
<i>Tyromyces(Fomitopsis) palustris</i>	EG	5, 12	Ishihara and Shimizu, 1984; Yoon et al., 2005, 2007

1.6. 本研究の目的

これまで述べたように、褐色腐朽菌においてはセルロース分解に関する酵素学的な知見は限られており、それらの酵素をコードする遺伝子に関する解析はほとんど見当たらない。そこで、本研究では、褐色腐朽菌について、白色腐朽菌のセルロース分解系において重要であることが明らかとなっているCel6、Cel7、そしてCDHについてそれらの酵素遺伝子の解析に基づく分子生物学的な考察を行い、褐色腐朽菌において結晶性セルロースの酵素分解を制約する要因について明らかにすることを目的とした。本研究においては、まず褐色腐朽菌に分類されているにもかかわらず、白色腐朽菌と同様なセルロース分解酵素パターンを示すことが知られている*C. puteana*が生産するCBHおよびCDHについて解析を行い、それらの酵素の構造または機能を他の白色腐朽菌および糸状菌由来の酵素と比較することで*C. puteana*の結晶性セルロースの酵素分解の制約要因について考察した。次に複数種の褐色腐朽菌を対象に、ゲノムDNA上における各酵素遺伝子の分布を調べることで、*C. puteana*以外の褐色腐朽菌において結晶性セルロースの酵素分解に関して制約要因を解明することを目的とした。

参考文献

- Abuja, P. M., Schmuck, M., Pilz, I., Tomme, P., Claeysens, M., and Esterbauer, H.:** Structural and functional domains of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: a small angle X-ray scattering study of the intact enzyme and its core. *Eur. Biophys. J. Biophys.* 15: 339-342. (1988).
- Agosin, E., Jarpa, S., Rojas, E., and Espejo, E.:** Solidstate fermentation of pine sawdust by selected brown-rot fungi. *Enzyme microb. Technol.* 11; 511-517. (1989).
- Ander, P., and Eriksson, K. -E.:** Selective degradation of wood components by white-rot fungus. *Physiologia Plantarum* 41: 239-248. (1977).
- Atalla, R. H.:** The structure of cellulose: recent developments. In: Slotes EJ (ed) *Wood and agricultural residues*. Academic Press, New York, 59-77. (1983).
- Ayers, A. R., Ayers, S. B., and Eriksson, K.-E. L.:** Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.*,90: 171-181. (1978).
- Ayers, A. R., and Eriksson, K.-E. L.:** Cellobiose oxidase from *Sporotrichum pulverulentum*. *Methods Enzymol.* 89: 129-135. (1982).
- Bailey, P. J., Liese, W., Roesch, R., Keilich, G., and Afting, E. G.:** Cellulase (beta-1,4-glucan 4-glucanohydrolase) from the wood-degrading fungus *Polyporus schweinitzii* Fr. *Biochim. Biophys. Acta.* 185: 381-391. (1969).
- Baminger, U., Subramaniam, S. S., Renganathan, V., and Haltrich, D.:** Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase from the plant pathogen *Sclerotium (Athelia) rolfsii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1766-1774. (2001).
- Bao, W., Usha, S. N., and Renganathan, V.:** Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel extracellular hemoflavoenzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 705-713. (1993).
- Bavendamm, W.:** Ueber das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstorenden pilzen. *Zeitsch. F. Pflanzenkrankh. U. Pflanzenschutz.* 38: 258-276. (1928).
- Brown Jr, R. M., and Saxena, I. M.:** Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 57-67. (2000).
- Chang, V. S., and Holtzapple, M. T.:** Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86: 5-37. (2000).

- Chow, C. M., Yague, E., Raguz, S., Wood, D. A., and Thurston, C. F.:** The cel3 gene of *Agaricus bisporus* codes for a modular cellulose and is transcriptionally regulated by the carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2779-2785. (1994).
- Cohen, R., Jensen Jr, K. A., Houtman, C. J., and Hammel, K. E.:** Significant levels of extracellular reactive oxygen species produced by brown rot basidiomycetes on cellulose. *FEBS Lett.* 531: 483-488 (2002).
- Cohen, R., Suzuki, M. R., and Hammel, K. E.:** Differential stress-induced regulation of two quinine reductases in the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 324-331 (2004).
- Cohen, R., Suzuki, M. R., and Hammel, K. E.:** Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2412–2417. (2005).
- Core, H. A., Cpte. W. A., and Day, A. C.:** Wood structure and identification. 7th ed. Syracuse, NY; Syracuse University Press. P182. (1979).
- Covert, S. F., Bolduc, J., and Cullen, D.:** Genomic organization of a cellulase gene family in *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Genet.* 22: 407-413. (1992a).
- Covert, S. F., Wymelenberg, A. V., and Cullen, D.:** Structure, organization, and transcription of a cellobiohydrolase gene cluster from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2168-2175. (1992b).
- Cowling, E. B.:** Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. US Dept. Agric. Technol. Bull. No. 5795 p. 152 (1961).
- Curling, S., Clausen, C. A., and Winandy, J. E.:** The effect of hemicellulose degradation on the mechanical properties of wood during brown rot decay. IRG/WP 01-20219. (2001).
- Daniel, G.:** Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 199-233 (1994).
- Daniel, G., Volc, J., and Kubatova, E.:** Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2524-2532 (1994).
- Daniel G.:** Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 199-233. (1994).

- Daniel, G., Volc, J., Filonova, L., Plihal, O., Kubatova, E., and Halada, P.:** Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H₂O₂ in brown rot decay of wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6241-6253 (2007).
- Davies, G., and Henrissat, B.:** Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-859. (1995).
- Davies, G. J., Brzozowski, A. M., Dauter, M., Varrot, A., and Schulein, M.:** Structure and function of *Humicola insolens* family 6 cellulases: structure of the endoglucanase, Cel6B, at 1.6 Å resolution. *Biochem. J.* 348: 201-207. (2000).
- Ding, S., Ge, W., and Buswell, J. A.:** Cloning of multiple cellulase cDNAs from *Volvariella volvacea* and their differential expression during substrate colonization and fruiting. *FEMS Microbiol. Lett.* 263: 207-213. (2006).
- Divne, C., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J. K., Teeri, T. T., and Jones, T. A.:** The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science.* 265: 524-528. (1994).
- Dumoncaux, T. J., Bartholomew, K. A., Charles, T. C., Moukha, S. M., and Archibald, F. S.:** Cloning and sequencing of a gene encoding cellobiose dehydrogenase from *Trametes versicolor*. *Gene* 210: 211-219. (1998).
- Enoki, A., Tanaka, H., and Fuse, G.:** Degradation of lignin-related compounds, pure cellulose, and wood components by white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung* 42: 85-93. (1988).
- Enoki, A., Tanaka, H., yoshioka, S., and Fuse, G.:** Extracellular H₂O₂-producing and one-electron oxidation system of brown-rot fungi. International Research Group on Wood preservation Document No. IRG/WP/1445. (1990).
- Enoki, A., Fuse, G., and Tanaka, H.:** Extracellular H₂O₂-producing and H₂O₂-reducing compounds of wood decay fungi. *Inter. Res. Group Wood Preserv., IRG Secretariat, Stockholm, Doc. No. IRG/WP/1516.* (1991).
- Enoki, A., Hirano, T., and Tanaka, H.:** Extracellular substance from the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum* that produces and reduces hydrogen peroxide. *Mater. Org.* 27: 247-261. (1992).
- Eriksson, K.-E., Pettersson, B., and Westermarck, U.:** Oxidation: an important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. *FEBS Lett.* 49: 282-285. (1974).

- Eriksson, K. –E., and Pettersson, B.:** Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Cryosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. I. Separation, purification, and physico-chemical characterization of five endo-1,4- β -glucanase. Eur. J. Biochem. 51: 193-206. (1975a).
- Eriksson, K. –E., and Pettersson, B.:** Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Cryosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. II. Purification and physico-chemical characterization of an exo-1,4- β -glucanase. Eur. J. Biochem. 51: 213-218. (1975b).
- Eriksson, K. –E., and Hamp, S. G.:** Regulation of Endo-1, 4- β -glucanase Production in *Sporotrichum pulverulentum*. Eur. J. Biochem. 90: 183-190. (1978).
- Eriksson, K. –E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P.:** Microbial and enzymatic degradation of wood components. Springer, Berlin Germany. (1990).
- Fagerstm, L. G., and Pettersson, L. G.:** The 1,4- β -glucan cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei* QM9414. FEBS Lett. 119: 97-100. (1980).
- Fang, J., Qu, Y. B., and Gao, P. J.:** Wide distribution of cellobiose-oxidizing enzymes in wood-rot fungus indicates a physiological importance in lignocellulosics degradation. Biotechnol. Technic. 11: 195-197. (1997).
- Fang, J., Liu, W., and Gao, P. J.:** Cellobiose dehydrogenase from *Schizophyllum commune*: purification and study of some catalytic, inactivation, and cellulose-binding properties. Arch. Biochem. Biophys. 353: 37-46. (1998).
- Flournoy, D. S., Kirk, T. K., and Highley, T. L.:** Wood decay by brown-rot fungi: changes in pore structure and cell wall volume. Holzforschung 45: 383-388. (1991).
- Gardener, K. H., and Blackwell, J.:** The structure of native cellulose. Biopolymers 13: 1975-2001. (1974).
- Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L., and Xu, G.:** Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. J. Biotechnol. 53: 133-162. (1997).
- Green, F., Larsen, M. J., Winandy, J. E., and Highley, T. L.:** Role of oxalic acid in incipient brown-rot decay. Mater. Org. 26: 191-213. (1991).
- Hai, P. Q., Nozaki, K., Amano, Y., and Kanda, T.:** purification and characterization of cellobiose

dehydrogenase from *Irpex lacteus* and its adsorption on cellulose. *J. Appl. Glycosci.* 47: 311-318. (2000).

Hallberg, B., Bergfors, T., Backbro, K., Pettersson, G., Henriksson, G., and Divne, C.: A new scaffold for binding haem in the cytochrome domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *Structure* 8: 79-88. (2000).

Hallberg, B., Henriksson, G., Pettersson, G., and Divne, C.: Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 315: 421-434. (2002).

Halliwell, G.: Catalytic decomposition of cellulose under biological conditions. *Biochem. J.* 95: 35-40. (1965).

Hamada, N., Fuse, N., Shimosaka, M., Kodaira, R., Amano, Y., Kanda, T., and Okazaki, M.: Cloning and characterization of a new exo-cellulase gene, *cel3*, in *Irpex lacteus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 172: 231-237. (1999).

Hastrup, A. C. S., Green III, F., Clausen, C., and Jensen, B.: *Serpula lacrymans*, the dry rot fungus and tolerance towards copper-based wood preservatives. IRG/WP 05-10555. (2005).

Henriksson, G., Pettersson, G., Johansson, G., Ruiz, A., and Uzcategui, E.: Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains. *Eur. J. Biochem.*, 196: 101-106. (1991).

Henriksson, G., Sild, V., Szabo, I. J., Pettersson, G., and Johansson, G.: Substrate specificity of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1383: 48-54. (1998).

Henriksson, G., Nutt, A., Henriksson, H., Pettersson, B., Stahlberg, J., Johansson, G., and Pettersson, G.: Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. *Eur. J. Biochem.* 259: 88-95. (1999).

Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C., and Schulein, M.: Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Biotechnology*, 3: 722-726. (1985).

Henrissat, B., Claeysens, M., Tomme, P., Lemesle, L., and Mornon, J. P.: Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* 81: 83-95. (1989).

Henrissat, B.: A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316. (1991).

- Henrissat, B., and Bairoch, A.:** Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316: 695-696. (1993).
- Henrissat, B., Teeri, T. T., and Warren, R. A. J.:** A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett.* 425: 352-354. (1998).
- Henrissat, B.:** Glycosidase families. *Biochem Soc. Trans.* 26: 153-156. (1998).
- Herr, D., Baumer, F., and Dellweg, H.:** Purification and properties of an extracellular endo-1,4-beta-glucanase from *Lenzites trabea*. *Arch. Microbiol.* 117: 287-292. (1978).
- Highley, T. L.:** Influence of carbon source on cellulase activity of white-rot and brown-rot fungi. *Wood and Fiber* 5: 50-58. (1973).
- Highley, T. L.:** Hemicellulases of white- and brown-rot fungi in relation to host preferences. *Mat. Und. Org.* 11: 33-46. (1976).
- Highley, T. L.:** Cellulose degradation by cellulose-clearing and non-cellulose-clearing brown-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1145-1147. (1980).
- Highley, T. L., Wolter, K. E., and Evans, F.:** Polysaccharide-degrading complex produced in wood and in liquid media by the brown-rot fungus, *Poria placenta*. *Wood Fiber* 13:265-274. (1981).
- Highley, T. L.:** Is extracellular hydrogen peroxide involved in cellulose degradation by brown-rot fungi?. *Mater. Org.* 17: 205-214. (1982).
- Highley, T. L., Murmanis, L., and Palmer, J. G.:** Electron microscopy of cellulose decomposition by brown-rot fungi. *Holzforschung* 37: 271-277. (1983).
- Highley, T. L., and Murmanis, L. L.:** Determination of hydrogen peroxide production in *Coriolus versicolor* and *Poria placenta* during wood degradation. *Mater. Org.* 20: 241-252. (1985).
- Highley, T. L.:** Changes in chemical components of hardwood and softwood by brown-rot fungi. *Mater. Org.* 22: 39-45. (1987).
- Hirano, T., Tanaka, H., and Enoki, A.:** Extracellular substance from the brown-rot basidiomycete *Tyromyces palustris* that reduces molecular oxygen to hydroxyl radicals and ferric iron to ferrous iron. *Mokuzai Gakkaishi* 41, 334-341. (1995).
- Hutterman, A., and Noelle.:** Characterization and regulation of cellobiose dehydrogenase in *Fomes annous*. *Holzforschung* 36: 283-286. (1982).
- Hyde, S.M., and Wood, P.M.:** Cellobiose dehydrogenase: An Fe(III) reductase involved in lignocellulose degradation by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *Int. Conf. Biotechnol. Pulp*

and Paper Industry, Vienna, p. 262. (1995).

Hyde, S.M., and Wood, P.M.: Kinetic and antigenic similarities for cellobiose dehydrogenase from the brown rot fungus *Coniophora puteana* and the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Lett. 145: 439-444. (1996).

Hyde, S.M., and Wood, P.M.: A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe(III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe(II) oxidation at a distance from the hyphae. Microbiology 143: 259-266. (1997).

Igarashi, K., Samejima, M., and Eriksson, K.-E. L.: Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase 1 activity by relieving product inhibition. Eur. J. Biochem. 253: 101-106. (1998).

Imai, T., Boisset, C., Samejima, M., Igarashi, K., and Sugiyama, J.: Unidirectional processive action of cellobiohydrolase Cel7A on *Valonia* cellulose microcrystals. FEBS Lett. 432: 113-116. (1998).

Irbe, I., Anderson, I., Andersons, B., and Chirkova, J.: Use of ¹³C NMR, sorption and chemical analyses for characteristics of brown-rotted Scots pine. Int. Biodeter. Biodegr. 47: 37-45. (2001).

Ishihara, M., and Shimizu, K.: Purification and properties of two extracellular endo-cellulases from the brown-rotting fungus *Tyromyces palustris*. Mokuzai Gakkaishi 30: 79-87. (1984).

Jensen, K. A. Jr., Houtman, C. J., Ryan, Z. C., and Hammel, K. E.: Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2705-2711 (2001).

Jensen, K. A. Jr., Ryan, Z. C., Wymelenberg, A. V., Cullen, D., and Hammel, K. E.: An NADH: quinone oxidoreductase active during biodegradation by the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2699-2703 (2002).

Jia, J., Dyer, P. S., Buswell, J. A., and Peberdy, J. F.: Cloning of the cbhI and cbhII genes involved in cellulose utilisation by the straw mushroom *Volvariella volvacea*. Mol. Gen. Genet. 261: 985-993. (1999).

Jin, L., Schultz, T. P., and Nicholas, D. D.: Structural characterization of brown-rotted lignin. Holzforschung 44: 133-138. (1990).

Johansson, G., Ståhlberg, J., Lindeberg, G., Engstrom, A., and Pettersson, G.: Isolated fungal cellulase terminal domains and a synthetic minimum analog bind to cellulose. FEBS Lett. 243:

389-393. (1989).

Keilich, G., Bailey, P., and Liese, M.: Enzymatic degradation of cellulose, cellulose derivatives and hemicelluloses in relation to the fungal decay of wood. *Wood Sci. Technol.* 4: 273-283. (1970).

Kim, Y. S., Goodell, B., and Jellison, J.: Immuno-electron microscopic localization of extracellular metabolites in spruce wood decayed by brown-rot fungus *Postia placenta*. *Holzforschung* 45: 389-393 (1991).

Kim, Y. S., Choi, J.H., and Bae, H. J.: Ultrastructural localization of extracellular fungal metabolites from *Tyromyces palustris* using TEM and immunogold labeling. *Mokuzai Gakkaishi* 38: 490-494 (1992).

Kim, Y. S.: 木材保存 33: 48-57 (2007).

King, K. W.: Enzymatic attack on highly crystalline hydrocellulose. *J. Ferment. Technol. (Japan)* 43: 79-94. (1965).

King, N. J.: The extracellular enzymes of *Coniophora cerebella*. *Biochem. J.* 108: 784-792. (1966).

Kirk, T. K.: Effects of a brown-rot fungus, *Lenzites trabea*, on lignin in spruce wood. *Holzforschung* 29: 99-107. (1975).

Kirk, T. K., and Cowling, E. B.: Biological decomposition of solid wood. *Adv. Chem. Ser.* 207: 455-487. (1984).

Kirk, T. K., Ibach, R., Mozuch, M. D., Conner, A. H., and Highley, T. L.: Characteristics of cotton cellulose depolymerized by a brown-rot fungus, by acid, or by chemical oxidants. *Holzforschung* 45: 239-244. (1991).

Kraulis, J., Clore, G. M., Nilges, M., Jones, T. A., Pettersson, G., Knowles, J., and Gronenborn, A. M.: Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry* 28: 7241-7257 (1989).

Kleman-Leyer, K., Agosin, E., Conner, A. H., and Kirk, T. K.: Changes in molecular size distribution of cellulose during attack by white rot and brown rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1266-1270. (1992).

Kleman-Leyer, K., and Kirk, T. K.: Three native cellulose-depolymerizing endoglucanases from solid-substrate cultures of the brown-rot fungus *Meruliporia (Serpula) incrassata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2839-2845. (1994).

- Kleman-Leyer, K., Siika-aho, M., Teeri, T. T., and Kirk, K.:** The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2883-2887. (1996).
- Kleywegt, G. J., Zou, J. Y., Divne, C., Davies, G. J., Sinning, I., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Srisodsuk, M., Teeri, T. T., and Jones, T. A.:** The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. *J. Mol. Biol.* 272: 383-397. (1997).
- Knowles, J., Lehtovaara, P., and Teeri, T. T.:** Cellulase families and their genes. *Trends in Biotechnol.* 5: 255-261. (1987).
- Koenigs, J. W.:** Hydrogen peroxide and iron: A proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes. *Wood Fiber* 6: 66–80. (1974a).
- Koenigs, J. W.:** Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. *Arch. Microbiol.* 99: 129-145. (1974b).
- Kondo, T., Togawa, E., and Brown Jr. R. M.:** “Nematic ordered cellulose” : A concept of glucan chain association. *Biomacromolecules* 2: 1324-1330. (2001).
- Koyama, M., Helbert, W., Imai, T., Sugiyama, J., and Henrisst, B.:** Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 9091-9095. (1997).
- Kremer, S. M., and Wood, P. M.:** Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe(II) reductase. Kinetic comparison with neutrophil NADPH oxidase and yeast flavocytochrome *b2*. *Eur. J. Biochem.* 205: 133-138. (1992).
- Lahjouji, K., Storms, R., Xiao, Z., Joung, K. B., Zheng, Y., Powlowski, J., Tsang, A., and Varin, L.:** Biochemical and molecular characterization of a cellobiohydrolase from *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 337-346. (2007).
- Lange, L., Wu, W., Aubert, D., Landvik, S., Schnorr, K.M., and Clausen, I.G.:** Polypeptides having cellobiohydrolase I activity and polynucleotides encoding same. Patent: WO 03000941-A 03-JAN-2003; Novozymes A/S (DK).
- Lee, C. C., Wong, D. W., and Robertson, G. H.:** Cloning and characterization of two cellulose genes from *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 355-360. (2001).
- Lee, Y. H., and Fan, L. T.:** Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: analysis of

the initial rates. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 2383-2406. (1982).

Lee, Y. H., and Fan, L. T.: Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose (II) Analysis of extended hydrolysis times. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 939-966. (1983).

Li, B., Nagalla, S. R., and Renganathan, B.: Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1329-1335. (1996).

Li, B., Nagalla, S. R., and Renganathan, B.: Cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* is encoded by two allelic variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 796-799. (1997).

Linder, M., Mattinen, M-L., Kontteli, M., lindeberg, G., Stahlberg, J., Drankenberg, T., Reinikainen, T., Pettersson, G., and Annala, A.: Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein Sci.* 4: 1056-1064. (1995).

Mansfield, S. D., Saddler, J. N., and Gubitz, G. M.: Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*. *Enzyme Microb. Technol.* 23: 133-140. (1998).

Martinez, D., Iarrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D. S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., and Rokhsar, D.: Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* 22: 695-700. (2004).

McFee, W. W., and Stone, E. L.: The persistence of decaying wood in the humus layers of northern forests. *Proc. Soil Am.* 30: 513-516. (1966).

Micales, J.A., and Highley, T.L.: Some physiological characteristics of a Nondegradative strain of *Postia (=Poria) placenta*. International Research Group on Wood Preservation. IRG/WP/1341. (1988).

Micales, J. A., and Highley, T. L.: Factors associated with decay capacity of the brown-rot. *Biodegrad. Res.* 3: 285-302. (1990).

Milagres, A. M., and Sales, R. M.: Evaluating the basidiomycetes *Poria medulla-panis* and *Wolfiporia cocos* for xylanase production. *Enzyme Microb. Technol.* 28: 522-526. (2001).

Morpeth, F. F.: Some properties of cellobiose oxidase from the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biochem. J.* 228: 557-564. (1985).

- Morpeth, F. F.:** Cellobiose oxidoreductases. In chemistry and biochemistry of flavoproteins. Ed. F. Muller, vol. 1. pp. 337-348, CRC-press. Boca Raton. (1990).
- Moukha, S. M., Dumonceaux, T. J., Record, E., and Archibald, F. S.:** Cloning and analysis of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase. *Gene* 234: 23-33. (1999).
- Munoz, I. G., Ubhayasekera, W., Henriksson, H., Szabo, I., Pettersson, G., Johansson, G., Mowbray, S. L., and Stahlberg, J.:** Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 Å resolution and homology models of the isozymes. *J. Mol. Biol.* 314: 1097-1111. (2001).
- Nidetzky, B., Steiner, W., and Claeysens, M.:** Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adoptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis. *Biochem. J.* 303: 817-823. (1994).
- Nilsson, T.:** Defining fungal decay types- a proposal for discussion. Intern Res. Group on Wood Preserv. Document IRG/WP/1264. (1985).
- Novo, C., Simoes, F., Mendonca, D., Matos, J., and Clemente, A.:** Primary structure deduction and molecular modelling from a cDNA of a cellobiohydrolase-like protein from the white-rot fungus *Coriolus versicolor*. *Int. J. Biol. Macromol.* 28: 285-292 (2001).
- Ohnishi, Y., Nagase, M., Ichyanagi, T., Kitamoto, Y., and Aimi, T.:** Transcriptional regulation of two cellobiohydrolase encoding genes (cel1 and cel2) from the wood-degrading basidiomycete *Polyporus arcularius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 1069-1078. (2007).
- Pickersgill, R., Harris, G., Lo Leggio, L., Mayans, O., and Jenkins, J.:** Superfamilies: the 4/7 superfamily of beta alpha-barrel glycosidases and the right-handed parallel beta-helix superfamily. *Biochem. Soc. Trans.* 26: 190-198. (1998).
- Rayner, A. D. M., and Boddy, L.:** Fungal decomposition of wood: its biology and ecology. John Wiley and Sons, Chichester, New York, (1988).
- Raices, M., Paifer, E., Cremata, J., Montesino, R., Stahlberg, J., Divne, C., Szabo, I. J., Henriksson, G., Johansson, G., and Pettersson, G.:** Cloning and characterization of a cDNA encoding a cellobiose dehydrogenase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 369: 233-238. (1995).
- Reese, E. T., Siu, R. G., and Levenson, H. S.:** The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 59: 485-497.

(1950).

Roy, B.P., Dumonceaux, T., Koukoulas, A. A., and Archibald, F. S.: Purification and characterization of cellobiose dehydrogenases from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4417-4427. (1996).

Samejima, M., and Eriksson, K.-E. L.: A comparison of the catalytic properties of cellobiose: quinone oxidoreductase and cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.* 207: 103-107. (1992).

Sattler, W., Esterbauer, H., Glatter, O., and Steiner, W.: The effect of enzyme concentration on the rate of the hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 1221-1234. (1989).

Schmidhalter, D. R., and Canevascini, G.: Characterization of the cellulolytic enzyme system from the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 431-436. (1992).

Schmidhalter, D. R., and Canevascini, G.: Purification and characterization of two exocellobiohydrolases from the brown rot fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 551-558. (1993a).

Schmidhalter, D. R., and Canevascini, G.: Isolation and characterization of the cellobiose dehydrogenase from the brown-rot fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 559-563. (1993b).

Schmidt, C.J., Whitten, B.K., Nicholas, D.D.: A proposed role for oxalic acid in non-enzymatic wood decay by brown-rot fungi. *Proc. Ann. Meet. American Wood-Preservers' Assoc.* 77: 157-164. (1981).

Shimada, M., Akamatsu, Y., Ohta, A., and Takahashi, M.: Biochemical relationships between biodegradation of cellulose and formation of oxalic acid in brown-rot decay. *Int. Res. Group on Wood Pres. Doc. No. IRG/WP/1472.* (1991).

Shimada, M., Akamatsu, Y., Tokimatsu, T., Mii, K., and Hattori, T.: Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. *J. Biotechnol.* 53: 102-113 (1997).

Shimazono, H.: Oxalic acid decarboxylase, a new enzyme from the mycelium of wood destroying fungi. *J. Biochem.* 42: 321-340. (1955).

Shoemaker, S., Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kwok, S., Myambo, K., and Innis, M.: Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* Strain-L27.

Bio/Technology 1: 691-696. (1983).

Sigoillot, C., Lomascolo, A., Record, E., Robert, J. L., Asther, M., and Sigoillot, J. C.: lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 876-883. (2002).

Sims, P., James, C., and Broda, P.: The identification, molecular cloning and characterization of a gene from *Phanerochaete chrysosporium* that shows strong homology to the exo-cellobiohydrolase I gene from *Trichoderma reesei*. *Gene* 74: 411-422. (1988).

Sims, P. F., Soares-Felipe, M. S., Wang, Q., Gent, m. E., Tempelaars, C., and Broda, P.: Differential expression of multiple exo-cellobiohydrolase I-like genes in the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Mol. Microbiol.* 12: 209-216. (1994).

Sivonen, H., Nuopponen, M., Maunu, S. L., Sundholm, F., and Vuorinen, T.: Carbon-thirteen cross-polarization magnetic angle spinning nuclear magnetic resonance and fourier transform infrared studies of thermally modified wood exposed to brown and soft rot fungi. *Appl. Spectroscopy* 57: 266-273. (2003).

Srebotnik, E., and Messner, K.: Immunoelectron microscopical study of the porosity of brown-rot degraded wood. *Holzforschung* 45: 95-101 (1991).

Ståhlberg, J., Johansson, G., and Pettersson, G.: A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the two-domain structure of cellobiohydrolase I. *Bio/Technology* 9: 286-290. (1991).

Stapleton, P. C., and Dobson, A. D. W.: Carbon repression of cellobiose dehydrogenase production in the white rot fungus *Trametes versicolor* is mediated at the level of gene transcription. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 167-172. (2003).

Stapleton, P. C., O'Brien, M. M., O'Callaghan, J., and Dobson, A. D. W.: Molecular cloning of the cellobiose dehydrogenase gene from *Trametes versicolor* and expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* 34: 55-63. (2004)

Steiner, W., Sattler, W., and Esterbauer, H.: Adsorption of *Trichoderma reesei* cellulase on cellulose: experimental data and their analysis by different equations. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 853-865 (1988).

Streamer, M., Eriksson, K. -E., and Pettersson, B.: Extracellular enzyme system utilized by the

fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. Functional characterization of five endo-1,4- β -glucanases and on exo-1,4- β -glucanase. Eur. J. Biochem. 59: 607-613. (1975).

Subramaniam, S. R., Nagalla, S. R., and Renganathan, V.: Cloning and characterization of a thermostable cellobiose dehydrogenase from *Sporotrichum thermophile*. Arch. Biochem. Biophys. 365: 223-230. (1999).

高橋 旨象: きのこと木材 (1989).

Takao, S.: Organic acid production by Basidiomycetes. I. Screening of acid-producing strains. Appl. Microbiol. 13: 732-737. (1965).

Tanaka, H., Itakura, S., and Enoki, A.: Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. J. Biotechnol. 75: 57-70. (1999).

Tempelaars, C. A., Birch, P. R., Sims, P. F., and Broda, P.: Isolation, characterization, and analysis of the expression of the cbhII gene of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4387-4393. (1994).

Tomme, P., Van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., Van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T. T., and Claeyssens, M.: Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414: analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. Eur. J. Biochem. 170: 575-581. (1988).

Uemura, S., Mitsuro, M., and Jellison, J.: Differential responses of wood-rot fungi cellulases towards antibodies against *Trichoderma viride* cellobiohydrolase I. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 788-794. (1993).

Uzcategui, E., Raices, M., montesion, R., Johansson, G., Pettersson, G., and Eriksson, K. -E.: Pilot-scale production and purification of the cellulolytic enzyme system from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. Appl. Biochem. 13: 323-334. (1991a).

Uzcategui, E., Ruiz, A., Montersino, R., Johansson, G., and Pettersson, G.: The 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. J. Biotechnol. 19: 271-286. (1991b).

- Valaskova, V., and Baldrian, P.:** Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* – production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology* 152: 3613-3622. (2006).
- Vallim, M. A., Janse, B. J. H., Gaskell, J., Pizzirani, A. A., and Cullen, D.:** *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase and cellobiose dehydrogenase transcripts in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1924-1928. (1998).
- Varrot, A., Hastrup, S., Schulein, M., and Davies, G. J.:** Crystal structure of the catalytic core domain of the family 6 cellobiohydrolase II. Cel6A, from *Humicola insolens*, at 1.92 Å resolution. *Biochem. J.* 337: 297-304. (1999).
- von Ossowski, I., Stahlberg, J., Koivula, A., Piens, K., Becker, D., Boer, H., Harle, R., Harris, M., Divne, C., Mahdi, S., Zhao, Y., Driguez, H., Claeysens, M., Sinnott, M. L., and Teeri, T. T.:** Engineering the exo-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Cel7A. A comparison with *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D. *J. Mol. Biol.* 333: 817-829. (2003).
- Weber, M., Salo, V., Uuskallio, M., and Raudaskoski, M.:** Ectopic expression of a constitutively active Cdc42 small GTPase alters the morphology of haploid and dikaryotic hyphae in the filamentous homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet. Biol.* 42: 624-637. (2005).
- Westermark, U., and Eriksson, K. E.:** Carbohydrate-dependent enzymic quinone reduction. during lignin degradation. *Acta Chem. Scand.* B28: 204-208. (1974a).
- Westermark, U., and Eriksson, K. E.:** Cellobiose: quinone oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. *Acta Chem. Scand.* B28: 209-214. (1974b).
- Westermark, U., and Eriksson, K. E.:** Purification and properties of cellobiose: quinone oxidoreductase from *Sporotrichum pulverulentum*. *Acta Chem. Scand.* B29: 419-424. (1975).
- Wilcox, W.W.:** Changes in wood microstructure through progressive stages of decay. USDA For. Serv. Res. Paper FPL 70: 1-46. (1968).
- Wilcox W.W.:** Review of literature on the effects of early stages of decay on wood strength. *Wood and Fiber* 9: 252-257. (1978).
- Wood, T. M., and McCrae, S. I.:** The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. *Biochem. J.* 171: 61-72. (1978).
- Wymelengerg, A. V., Covert, S., and Cullen, D.:** identification of the gene encoding the major

cellobiohydrolase of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. microbial. 59: 3492-3494. (1993).

Xu, F., Golightly, E. J., Duke, K. R., Lassen, S. F., Knusen, B., Christensen, S., Brown, K. M., Brown, S. H., and Schulein, M.: *Humicola insolens* cellobiose dehydrogenase: cloning, redox chemistry, and “logic gate” -like dual functionality. Enzyme Microb. Technol. 28: 744-753. (2001).

Yague, E., mehak-Zunic, M., Morgan, L., Wood, D. A., and Thurston, C. F.: Expression of CEL2 and CEL4, two proteins from *Agaricus bisporus* with similarity to fungal cellobiohydrolase I and beta-mannanase, respectively, is regulated by the carbon source. Microbiology 143: 239-244. (1997).

Yasokawa, D., Shimizu, T., Nakagawa, R., Ikeda, T., and Nagashima, K.: Cloning, sequencing, and heterologous expression of a cellobiohydrolase cDNA from the basidiomycete *Corticium rolfsii*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 1319-1326. (2003).

Yelle, D. J., Ralph, J., Lu, F., and Hammel, K. E.: Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. Environ. Microbiol. 10: 1844-1849. (2008).

Yoon, J. J., and Kim, Y.-K.: Degradation of crystalline cellulose by the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*. J. Microbiol. 43: 487-492. (2005).

Yoon, J. J., Cha, C. J., Kim, Y. S., Son, D. W., and Kim, Y. K.: The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. J. Microbiol. Biotechnol. 17: 800–805. (2007).

Yoshida, M., Ohira, T., Igarashi, K., Nagasawa, H., and Samejima, M.: Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase from the wood-rotting fungus *Grifola frondosa*. FEMS Microbiol. Lett. 217: 225-230. (2002).

Yoshida, M., Igarashi, K., Kawai, R., Aida, K., and Samejima, M.: Differential transcription of β -glucosidase and cellobiose dehydrogenase genes in cellulose degradation by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Lett. 235: 177-182. (2004).

Zamocky, M., Schumann, C., Sygmond, C., O’Callaghan, J., Dobson, A. D., Ludwig, R., Haltrich, D., and Peterbauer, C. K.: Cloning, sequence analysis and heterologous expression in *Pichia pastoris* of a gene encoding a thermostable cellobiose dehydrogenase from *Myriococcum thermophilum*. Protein Expr. Purif. 59: 258-265. (2008).

第 2 章

褐色腐朽菌 *Coniophora puteana* 由来

セロビオヒドロラーゼ遺伝子のクローニングと

キャラクタライゼーション

2.1. 緒言

本章では、糸状菌における主なセルラーゼとしての CBH が含まれる GH ファミリー 6 および 7 の酵素遺伝子を *C. puteana* ゲノムよりその存在を明らかにすることを目的とした。未知遺伝子の検出に関して、分子生物学的な手法としてサザンハイブリダイゼーション、ゲノムライブラリー、縮重 PCR 法がこれまで主な手法として知られてきたが、本研究においては、近年ホモログ遺伝子の検出に優れていることで注目されている COnsensus DEgenerated Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP) -PCR 法 (Rose et al., 1998; Rose et al., 2003) を用いて *C. puteana* のゲノムから Cel6 および Cel7 遺伝子を検出することを試みた。CODEHOP ではホモログタンパク質遺伝子の PCR スクリーニングに有用な手法としてバクテリアから植物まで広く使用されている (Morant et al., 2002; Luzhetskyy et al., 2007; Acevedo et al., 2008)。CODEHOP は他種由来の既知タンパク質アミノ酸配列をアライメント解析に供し、保存性の高いアミノ酸配列わずか 3-4 残基において縮重配列を 3' 側に作成し (Core region; 10-12 bp)、一方、5' 側 (Clamp region; 14-20 bp) にはアニーリング温度を上げるためどの配列にも同確率でハイブリダイズするような配列をプログラムする (Fig. 2.1)。よって、縮重度を下げることが従来に比べて大きく異なる点である。その特性の異なる 2 領域からなるプライマーの特性とタッチダウン PCR と組み合わせることで、標的配列と非ターゲット配列の増幅差をサイクルごとに広げることができる (Fig. 2.2)。そして、CODEHOP-PCR 法によって得られた断片配列から、セルロース培養系における発現遺伝子として RACE 法により、全長遺伝子のクローニングを行った。このようにして得られた塩基配列からの推定アミノ酸配列を他の糸状菌由来 GH6 および GH7 と比較することで結晶性セルロース分解能を有する酵素との構造および機能の差について推察することを試みた。

Amino acid alignment

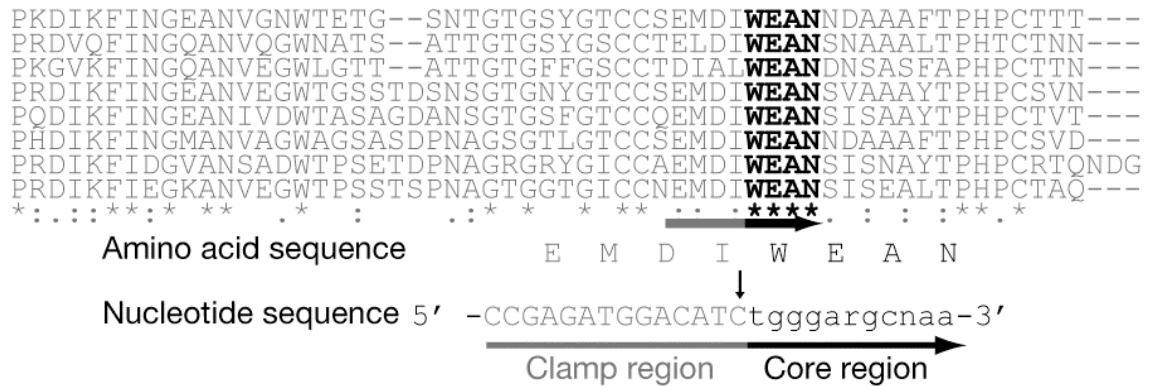


Fig. 2.1. CODEHOP strategy. Conserved motifs of 3-4 amino acids using a short 3' degenerate core containing all codon possibilities. Annealing of the degenerate core of the primer to the starting template is stabilized by the 5' consensus clamp.

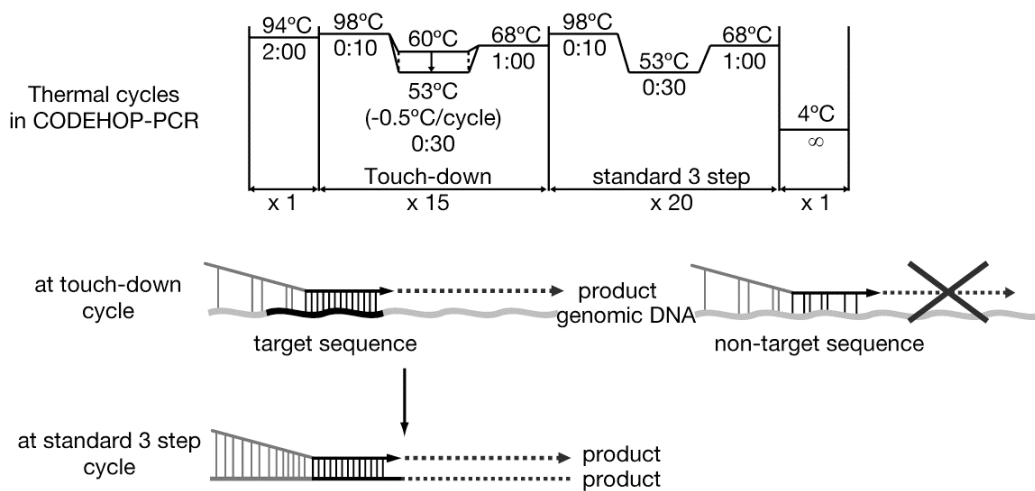


Fig. 2.2. Schematic strategy of CODEHOP-PCR. Vertical lines indicate matches between primer (arrow) and template or synthesized product. During standard 3 step rounds of amplification, annealing of primer to PCR product is driven by the identical match with the 5' consensus.

2.2. 実験方法

2.2.1. 菌株および保存

Coniophora puteana WD-758はNational Institute of Agricultural Science (NIAS)におけるGenebankより取得した。菌株は、ポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地において、26.5 °C, 7日間静置培養し、4°Cにて保存しておいた。

2.2.2. 菌糸からのゲノムDNAの抽出

保存しておいた*C. puteana*をパンチで打ち抜き、500 ml 三角フラスコ中200 mlのPotato Dextrose Broth (PDB)培地において26.5 °C、3日間振とう培養を行い、生育した菌糸を回収した。回収した菌糸を液体窒素下にて乳鉢と乳棒を用いて破碎後、DNeasy plant maxi kit (Qiagen, Hilden, Germany)によってDNAを抽出した。抽出したDNA濃度をGene Spec I (Naka Instruments, Japan)を用いて260 nmにおける吸光度の値から求め、純度は260/280 nmの比より算出した。

2.2.3. CODEHOP-PCRを用いた*C. puteana*ゲノムからのCel6およびCel7遺伝子の検出

次に、*C. puteana*ゲノムDNA上のCel6、Cel7遺伝子クローニングのため、Consensus DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP) のアルゴリズムを用いてプライマーを作成した(Rose et al. 1998, 2003)。CODEHOPプライマーの設計において、まず、既往の担子菌および子嚢菌由来Cel6およびCel7アミノ酸配列をそれぞれ既定値にてEBI-ClustalW server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>)を用いてアライメント解析を行い、その結果をBlocks Multiple Alignment Processor (http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/process_blocks.html)によってギャップなしのアミノ酸ブロックに整形後、CODEHOPプログラム (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>)に供することで縮重プライマーを作成した。本研究で使用したプライマーの位置および塩基配列をFig. 2. 3に示した。Cel6遺伝子のCODEHOPプライマーについては、フォワードプライマーF1-F3をCBM領域で設計し、その他のプライマー(F4-F5, R1-R6)は触媒ドメイン上に設計した。また、Cel7遺伝子のCODEHOPプライマーはリバースプライマーR4-R6をCBM領域で設計し、その他のプライマー(F1-F5, R1-R3)は触媒ドメイン上に設計した。*C. puteana*ゲノムDNA20 ngを鋳型とし、上述の各プライマーセットを用いて、200 μM dNTP、300 pMプライマー、1.5 mM MgSO₄、0.5 U of KOD-plus ver.2 DNA polymerase (TOYOBO, Japan)そして1x buffer for KOD plus-ver. 2を混合し、全量25 μl

としてPCRを行った。PCRによる増幅はPCR thermal cycler Dice model TP600 (TaKaRa Bio, Otsu, Japan)を用いた。PCRにおける温度サイクルはタッチダウン(A)と標準的な3ステップのPCR(B)に分けて行った。まず、最初に94°Cで2分の変性を行った後、(A) 98 °C10秒, 60 °C (-0.5 °C/サイクル)30秒, 68 °C 1-1.5分を15サイクル行い、引き続いて(B) 98 °C10秒, 53 °C30秒, 68 °C1-1.5分を20サイクル行った。そして最後に68°C2分間の伸長を行い、4 °Cで保持した。全てのPCR産物はZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)に導入し、Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (GE healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks, UK)を用いたシーケンシング反応を行った後、Hitachi DNA sequencer (SQ5500E)によって塩基配列を解析した。PCR産物の塩基配列はNCBI non-redundant protein sequences (nr) データベースおよびJGI *P. chrysosporium* genome information (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=Phchr1&advanced=1>)におけるBLASTXを用いてホモロジー検索を行った。

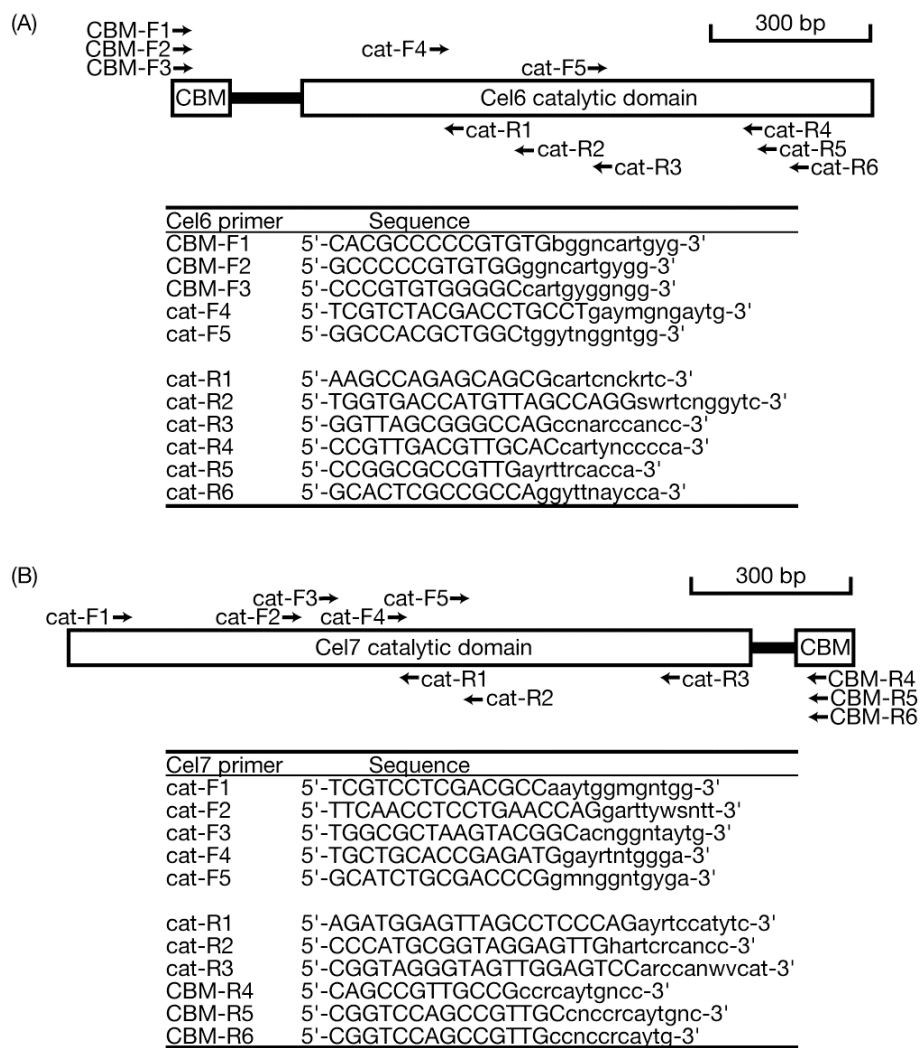


Fig. 2. 3. Primer locations and nucleotide sequences of CODEHOP primer for the detection of (A) *cel6* gene, (B) *cel7* gene. “cat” means the constructed primer location at catalytic domain, and “CBM” means it at CBM, respectively.

2.2.4. Cel6およびCel7遺伝子をコードする全長cDNAのクローニング

PDAプレート(Nihon Pharmaceutical, Japan)で26.5 °C、2週間培養した*C. puteana*の菌糸をパンチで打ち抜き、500 mlの三角フラスコ中の200 mlのポテトデキストロース液体培地(Sigma-Aldrich, MO, USA)に植菌した。26.5 °Cで3日間振とう培養した後(150 rpm, ø 30 mm)、菌糸を集菌し、10 mlの0.9 % NaClに再懸濁させ、2 Lのセルロース培地に植菌した。セルロース培地の組成は1 Lあたり、2.6 g (NH₄)₂HPO₄、1.1 g KH₂PO₄、2.0 g 2,2-ジメチルコハク酸、1.0 g 酵母抽出物、1.0 g ポリペプトン(Nihon Pharmaceutical)、0.5 g MgSO₄•7H₂O、10 mg FeSO₄•7H₂O、74 mg CaCl₂•2H₂O、6.0 mg ZnSO₄•7H₂O、5.0 mg MnSO₄•4H₂O、1.0 mg CoCl₂•6H₂O、20 g アビセル(Funakoshi, Tokyo)とした。5 L三角フラスコ中の培養液は26.5 °Cにて7日間振とう培養(150 rpm, ø 30 mm)を行った。菌糸をフィルターろ過して集菌し、乳鉢と乳棒を用いて破碎した。全RNAは1 gの菌糸およびセルロース粉末よりRNAiso (TaKaRa Bio, Otsu, Japan)およびそのプロトコルに従って抽出し、全RNA中のmRNAはmRNA Purification Kit (TaKaRa Bio)を用いて精製した。精製したmRNAよりReveTra Ace (Toyobo Co. Ltd, Osaka, Japan)、5'RACE cDNA Synthesis primer of a SMART RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa Bio)、そして3'RACE Adapter primer (Invitrogen)を用いて1本鎖cDNAを合成し、PCRの鋳型とした。*C. puteana* Cel6およびCel7をコードする全長cDNAをクローニングするため、5'-RACE PCRはフォワードプライマーUniversal Primer Mix (TaKaRa Bio)を用い、リバースプライマーはゲノム配列より各遺伝子に特異的な配列のプライマー(*cel6A*-5RACE-R:
5'-CGGCGGAGTCGGTGATGGAAGGAATAGC-3', *cel6B*-5RACE-R:
5'-GGGAGGAGTCGCTGATCTGCTGGACGGC-3', *cel7A*-5RACE-R:
5'-CGTGCACTCCGTCTGACCGTTGACC-3', *cel7B*-5RACE-R:
5'-TTGAAGTTGCACCCATCGTAGTCCGCG-3')を設計し、RT-PCRを行った。3'-RACE PCRはフォワードプライマーとしてゲノム配列より各遺伝子に特異的な配列のプライマー(*cel6A*-3RACE-F: 5'- CCCACTTCTACTTCCTCAGCATCGAC -3', *cel6B*-3RACE-F: 5'- CGACAACGGCCAGGCGAATTATGA -3', *cel7A*-3RACE-F: 5'- CTGGGCTCGTGCTGCAGCGAGAT -3', *cel7B*-3RACE-F: 5'- CGAATGGGACACCACCATCTG -3')を設計し、リバースプライマーにはUniversal Adapter Primer (Invitrogen)を用いてRT-PCRを行った。最後に5'-および3'-非翻訳領域(UTR)における各遺伝子の特異的な配列をプライマー対としてゲノムDNAを鋳型としたRT-PCRを行うことによって各遺伝子の完全長cDNAを取得した。全てのPCR産物は上記と同様の方法でサブクローニングおよびシーケンシングを行

った。決定した塩基配列より推定されるアミノ酸配列のホモロジー検索はBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)におけるNCBI conserved domainデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)を用い、シグナルペプチドの存在はCenter for Biological Sequence AnalysisにおけるSignalP version 3.0サーバー (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)を用いて解析した。また、*N*-グリコシレーション部位はMotif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)にて予測した。アミノ酸配列の他の担子菌との相同性比較解析はCLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson et al. 1994)においてアルゴリズムBlossumを用いて行った。また、担子菌および子囊菌由来アミノ酸配列に対してCLUSTAL Wを用いてアライメント解析を行い、出力したデータより系統樹を作成した。系統樹ファイルはMAFFTサーバによりMinimum Linkage法を用いて出力後、FigTreeバージョン1.1.2によって系統樹を作成した。

2. 2. 5. RT-PCRによる*C. puteanacel6*および*cel7*遺伝子の発現解析

mRNAの抽出および一本鎖cDNAの合成はAvicelを炭素源とした上記と同様の培養条件下、および同様の手法を用いて行った。発現解析のターゲット遺伝子としてクローニングした*cel6A*、*cel6B*、*cel7A*、*cel7B*、そしてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *gpd*)遺伝子を*cel6*および*cel7*遺伝子と同様にCODEHOP-PCRにより*C. puteana*ゲノムからクローニングし、発現解析に用いた。一本鎖cDNAを鋳型として、各遺伝子についてゲノムの塩基配列情報よりイントロンをまたぐようなプライマーペアを設計し、RT-PCRを行った。各遺伝子のプライマー配列は以下に示した。

(*Cel6A*-F: 5'-AATGCGGTGGTCAAGACTGGACTG-3',
Cel6A-R: 5'-CGTACTCGGGTTCAGAAAGATCTG-3',
Cel6B-F: 5'-AACCCAGAATACGTCGCCGAGGTAC-3',
Cel6B-R: 5'-CGAACGTCGGGATACTGCTTAATGC-3',
Cel7A-F: 5'-AACGGAGTGGCCAACCTCCAGAAC-3',
Cel7A-R: 5'-TCGTCCGTGATGCTGTTGTACGTC-3',
Cel7B-F: 5'-GGCGAGGCTAACATTGAGGGCTG-3',
Cel7B-R: 5'-CAGAACTGGTCCGTGACCGAGTC-3',
GPD-F: 5'-TCGCCATCAACGACCCCTTCATTG-3',
GPD-R: 5'-GCGTTCGAGATGGTGTACTTGGAGTC-3')

各プライマーの融解温度はOligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)にて、最近隣法によって算出した。PCR産物は2%アガロースゲルにより分離し、サブクローニングおよびシーケンスは上記と同様の手法により行った。

2.3. 結果

2.3.1. *C. puteana* 由来 Cel6 および Cel7 遺伝子ホモログの検出

Cel6 および Cel7 遺伝子それぞれに対して触媒ドメイン部分のみを増幅させるプライマーセット(Cel6: cat F4-F5 vs cat R2-R6, Cel7: cat F1-R5 vs cat R1-R3)、そして CBM 領域と触媒ドメインを含んだ領域を増幅させるプライマーセット(Cel6: CBM F1-F3 vs cat R1-R6, Cel7: cat F1-F5 vs CBM R4-R6)でそれぞれの CODEHOP-PCR を行った。

Fig. 2.4 に示した *C. puteana* ゲノム DNA からの Cel6 遺伝子の増幅の結果では、触媒ドメイン部分のみで増幅された PCR 産物(cat F4-F5 vs cat R2-R6)として2つのバンドが現れ、それぞれクローニングおよび塩基配列を決定後、BLASTX 解析に供したところ、両者とも Cel6 に属する担子菌由来のセロビオヒドロラーゼと 60 %以上の高い相同性を示したことから2種類の *cel6* ホモログ(*cel6A*, *cel6B*)を取得することに成功した。一方、CBM 領域と触媒ドメインを含んだ領域でのプライマーセット (CBM F1-F3 vs cat R1-R6) による PCR においては、明瞭な1つの PCR 産物を確認した。そして、その PCR 産物の塩基配列を決定し、BLASTX 解析に供したところ、Cel6 に属する担子菌由来セロビオヒドロラーゼと 60 %以上の高い相同性を示し、CBM が付随することが明らかとなった。さらに、その塩基配列は触媒ドメイン部分のみで増幅された2種類の Cel6 ホモログ断片配列の一つ(*cel6A*)と一致した。また、CBM-F1 vs Cat-R2, CBM-F2 vs Cat-R2, CBM-F3 vs Cat-R3, そして CBM-F2 vs Cat-R5 においては、メインの産物によるバンド以外にも複数のバンドが現れた。しかしながら、それらの塩基配列も明らかにしたところ、Cel6 遺伝子に相同性の高い配列ではないことが明らかとなった。それぞれのプライマーセットにおいて増幅された Fig. 2.4 に示した PCR 産物の配列解析より得られた遺伝子断片を Table 2.1 に示した。

次に Fig. 2.5 に示した *C. puteana* ゲノム DNA からの Cel7 遺伝子の増幅に関して、触媒ドメイン部分のみで増幅された PCR 産物 (cat F1-F5 vs cat R1-R3) としていずれのプライマーセットにおいても1つの明瞭なバンドが出現し、これらの PCR 産物を全てクローニングしたところ、配列の異なる2種類の塩基配列を得た。BLASTX 解析の結果、それぞれ Cel7 に属する担子菌由来セロビオヒドロラーゼと 70 %以上の高い相同性を有していたことから、2種類の *cel7* ホモログ(*cel7A*, *cel7B*)の取得に成功した。一方、CBM 領域と触媒ドメインを含んだ領域での増幅された PCR 産物 (F1-F5 vs R4-R6) からは予想される分子量付近に明瞭なバンドは現れず、スメアもしくは予想される分子量とは明らかに低分子なバンドのみしか得られなかった。それぞれのプライマーセットにおいて増幅された Fig. 2.5 に示した PCR 産物の配

列解析より得られた遺伝子断片を Table 2.2 に示した。

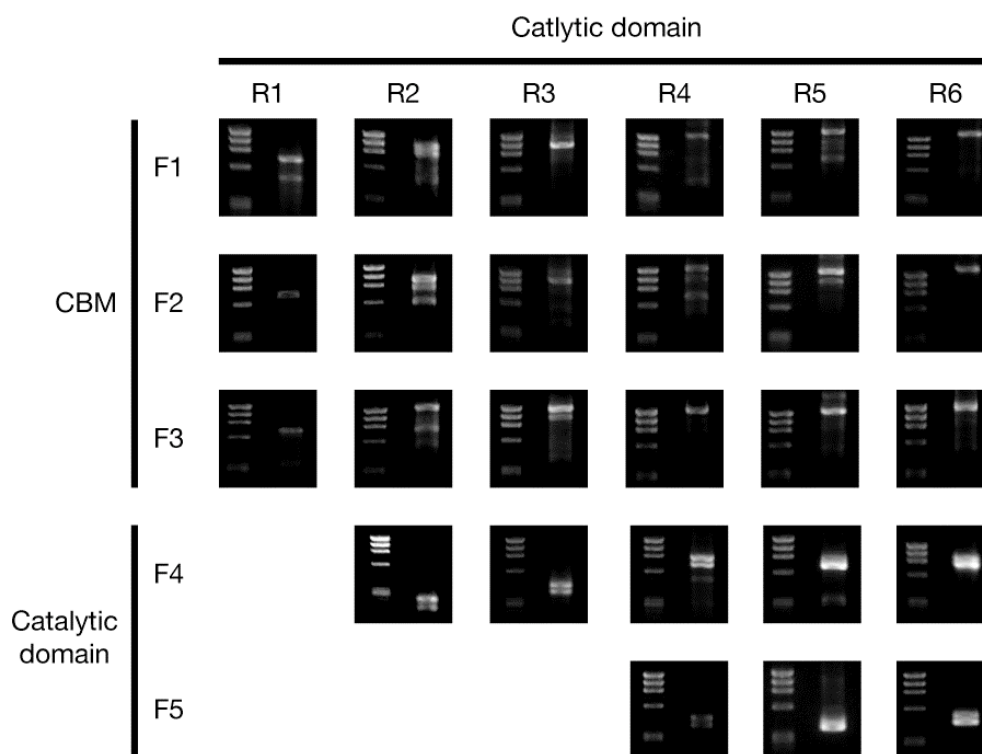


Fig. 2. 4. PCR amplicons for detection of *cel6* gene from *C. puteana* genomic DNA. 20 ng genomic DNA was used in PCR as a template. Left lane of each figures was molecular weight size marker, ϕ X174-*Hae*III-digest.

Table 2. 1. Detected *cel6* homolog genes from *C. puteana* using each primer set.

<i>cel6</i> gene	R1	R2	R3	R4	R5	R6
F1	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>
F2	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>
F3	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>	<i>cel6A</i>
F4		<i>cel6A, cel6B</i>	<i>cel6A, cel6B</i>	<i>cel6A, cel6B</i>	<i>cel6A, cel6B</i>	<i>cel6A, cel6B</i>
F5			<i>cel6A, cel6B</i>	<i>cel6A, cel6B</i>	<i>cel6A, cel6B</i>	<i>cel6A, cel6B</i>

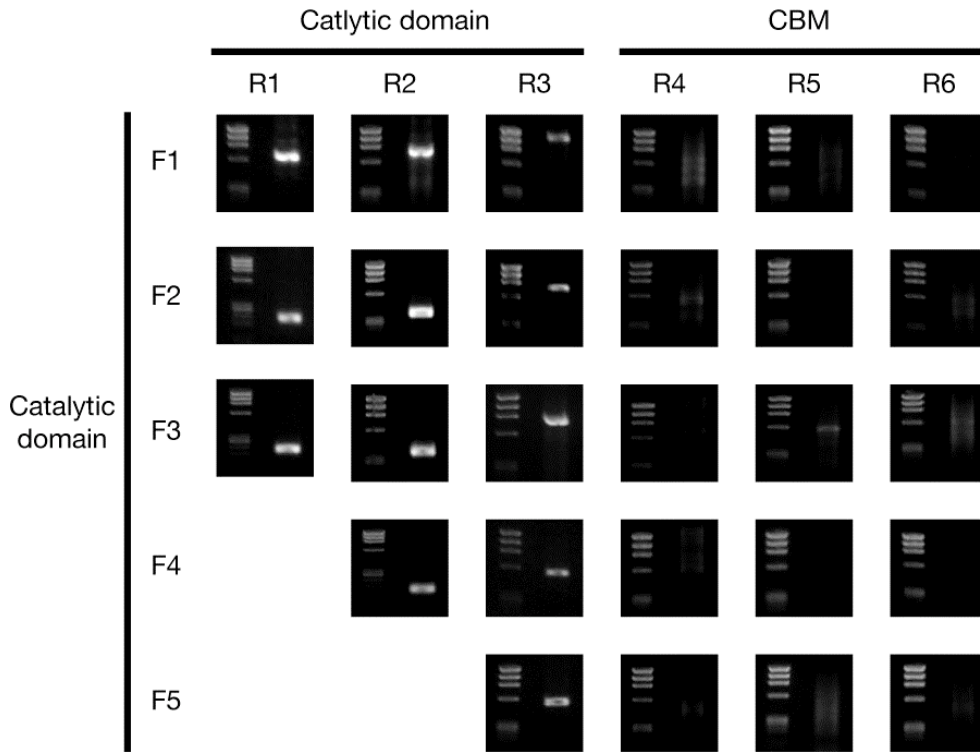


Fig. 2. 5. PCR amplicons for detection of *cel7* gene from *C. puteana* genomic DNA. 20 ng genomic DNA was used in PCR as a template. Left lane of each figures was molecular weight size marker, ϕ X174-*Hae*III-digest.

Table 2. 2. Detected *cel7* homolog genes from *C. puteana* using each primer set.

<i>cel7</i> gene	R1	R2	R3	R4	R5	R6
F1	<i>cel7A, cel7B</i>	<i>cel7A, cel7B</i>	<i>cel7A, cel7B</i>	N. D.	N. D.	N. D.
F2	<i>cel7A, cel7B</i>	<i>cel7A, cel7B</i>	<i>cel7A, cel7B</i>	N. D.	N. D.	N. D.
F3	<i>cel7A, cel7B</i>	<i>cel7A, cel7B</i>	<i>cel7A, cel7B</i>	N. D.	N. D.	N. D.
F4		<i>cel7A, cel7B</i>	<i>cel7A, cel7B</i>	N. D.	N. D.	N. D.
F5			<i>cel7A, cel7B</i>	N. D.	N. D.	N. D.

N. D.: not detected.

2.3.2. *C. puteana* 由来 2 つの Cel6 遺伝子 cDNA の全長クローニング

C. puteana 由来 Cel6 遺伝子の全長 cDNA をクローン化するために、セルロース培養系における *C. puteana* 菌糸より、mRNA を抽出した。抽出した mRNA より一本鎖 cDNA を合成し、その cDNA を鋳型とし、CODEHHOP-PCR によって取得したゲノム DNA からのそれぞれの遺伝子配列より特異的プライマーを用いて 3'RACE および 5'RACE PCR を行った。それぞれの塩基配列およびそれに基づく推定アミノ酸配列を Fig. 2. 6 に示した。*cel6Ac*DNA はオープンリーディングフレーム 461 残基を含む、1531 bp の塩基配列から構成されていた。N 末端 20 残基は SignalP プログラムからシグナルペプチドであることが推測されたことから、成熟タンパク質は 441 残基から成るタンパク質であることが推察された。*cel6Bc*DNA はオープンリーディングフレーム 389 残基を含む、1239 bp から構成されていた。N 末端 18 残基は SignalP プログラムからシグナルペプチドであることが推測されたことから、成熟タンパク質は 371 残基から成るタンパク質であることが推察された。*C. puteana* 由来 Cel6A、Cel6B の推定アミノ酸配列の相同性は 83 % であり、担子菌由来 Cel6 とのアミノ酸配列の相同性を調べた結果、*C. puteana* 由来 Cel6A が 58-83 %、Cel6B が 56-83 % の相同性を有することが明らかとなった。

次に決定した塩基配列より推定されるアミノ酸配列を 3 次元構造が明らかになっている子囊菌 *Humicola insolens* 由来 CBHII、*H. insolens* 由来 EGVI、*T. reesei* 由来 CBHII、そして *P. chrysosporium* 由来 CBHII のアミノ酸配列とアライメント解析により比較した(Fig. 2. 7)。その結果、*C. puteana* 由来 Cel6A は N 末端に CBM を有することが明らかとなり、一方、*C. puteana* 由来 Cel6B においては CBM が欠如していることが明らかとなった。また、触媒作用における酸および塩基残基と推察される 2 つのアスパラギン酸残基、活性部位において基質と結合するトリプトファン残基、そして触媒サイトにおいてよりアクティブなコンフォメーションにグルコースを歪めるチロシン残基などは *C. puteana* 由来 Cel6A および Cel6B において全て保存されていた。そして、*T. reesei*、*H. insolens* 由来セロビオヒドロラーゼと類似したループ構造のアミノ酸配列が存在していた。一方、GH ファミリー 6 に属する *H. insolens* 由来 EGVI では C 末端ループ構造においてその部分のアミノ酸配列が欠如していた。

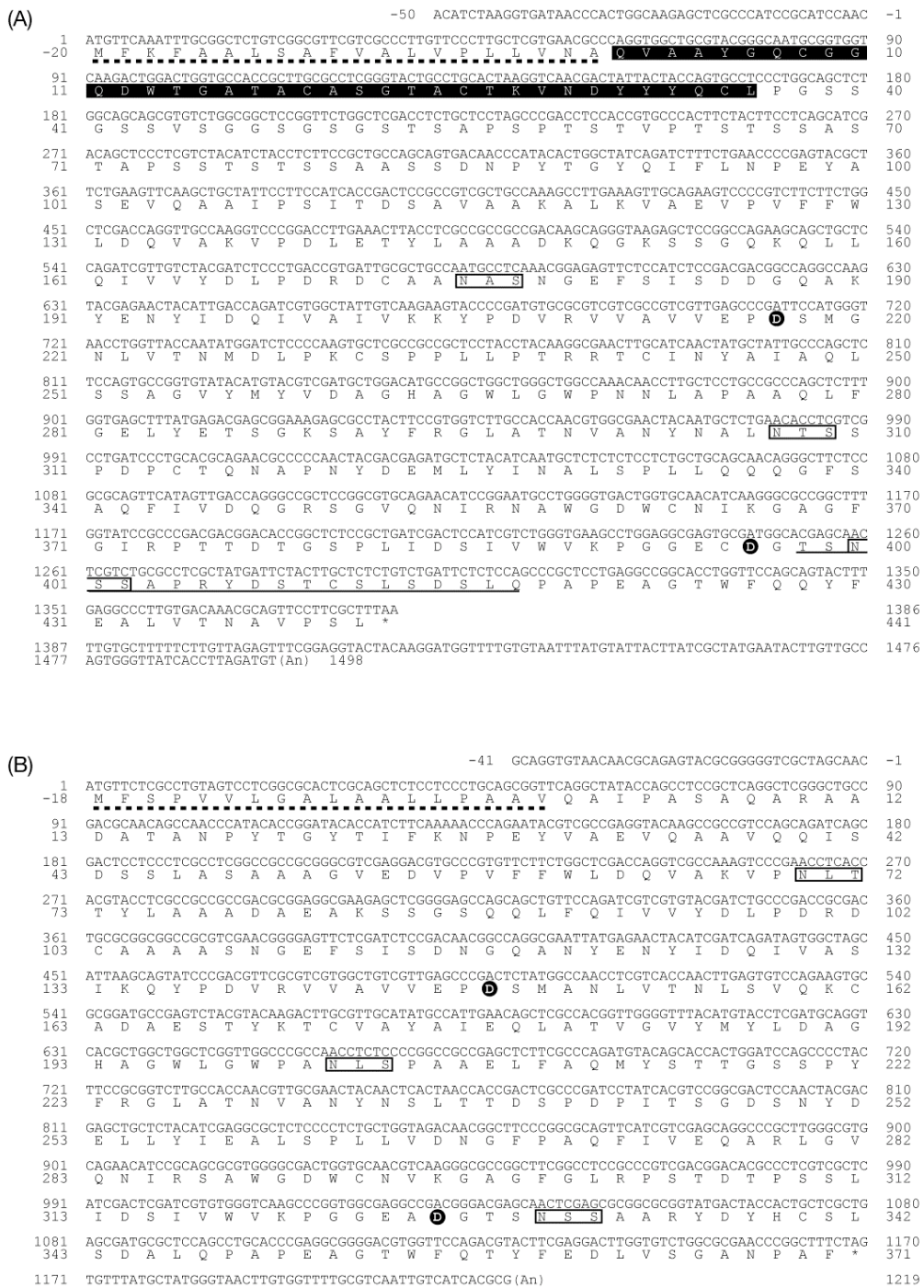


Fig. 2. 6. The nucleotide sequence of cDNA encoding *C. puteana* Cel6A (A), and Cel6B (B) precursors and the deduced amino acid sequences. The potential signal peptide sequence are dashed underlined. The possible N-glycosylation sites are boxed. The possible catalytic residues are filled circled and CBM motif is boxed.

```

CpuCel6A      -----QVAAYGQCGGQDWTGATACASGTACTKVNDYQQCLPGSSGSSVSGGSGSG 51
CpuCel6B      -----
PchCBHII      -----QASEWGQCGGIGWTGPTTCVSGTTCTVLPYYSQCLPGSAVTTTTSVITSHS 51
TreCBHII      -VPLEERQACSSVWGQCGGQNWSGPTCCASGSTCVYSNDYYSQCLPGAASSSSSTRAAST 59
HinCBHII      APVVEERQNCAPTWGQCGGIGFNGPTCCQSGSTCVKQNDWYSQCLPGSQVTTTSTTSS 60
HinEGVI      -----

CpuCel6A      STSAPSPSTSTVPTSTSSASTAPSSSTSSA-----ASSDNPYTGQIFLNPPEYASEVQ 104
CpuCel6B      -----QAI PASAQARAA-----DATANPYTGTYIFKNPEYVAEVQ 35
PchCBHII      SSVSSVSHSGSSTSTSSPTGPTGNPPP-----PSANNPWTGFQIFLSPYYANEVA 104
TreCBHII      TSRVSPSTSRSSS----ATPPPSTTRVPPVSGGTATYSGNPFVGVTPWANAYYASEVS 115
HinCBHII      SSTTSRATSTTRTGCVTSITTAPTRTVTIIPGGATTTASYNGNPFEGVQLWANNYYRSEVH 120
HinEGVI      -----QSGNPFSGRTLTVNSDYSSKLD 22
                ** : *      . * : :

CpuCel6A      ----AAIPSI TDSAVA AKKVAEVPVFFWLDQVAKVPDLETYLAADKQKSGSQK--Q 158
CpuCel6B      ----AAVQQISDSSLASAAGVEDVPVFFWLDQVAKV PNLTTYLAADAERKSSGSG--Q 89
PchCBHII      ----AAAKQITDPTLSSKAASVANIPTFTWLDVAKIPDLGTYLASASALGKSTGK--Q 158
TreCBHII      S---LAI PSLTG-AMATAAAVAKVPSFMDLDT-LDKTPLMEQTLADIR TANKNGGN--Y 168
HinCBHII      T---LAI PQITDPALRAASAVAEVPSFOWLDRNVTVDTLLEVETLSEIRAANQAGANPPY 177
HinEGVI      QTRQAFLSRGDQTNAAKVKYVQEKVGT FYWISNI FLLRDI DVAIQNARA AKARGENP--- 79
                . : * * : . :

CpuCel6A      LLQIVVYDLPDRDCAANASNGEFSISDDGQAKYEN-YIDQIVAI VKKYPDVRVVAVVEPD 217
CpuCel6B      LFQIVVYDLPDRDCAAAA SNGEFSISDNGQANYEN-YIDQIVASIKQY PDVRVVAVVEPD 148
PchCBHII      LVQIVVYDLPDRDCAAKASNGEFSIANNGQANYEN-YIDQIVAIQQFPDVRVVAVVEPD 217
TreCBHII      AGQFVVYDLPDRDCAALASNGEYSIADGGVAKYKN-YIDTIRQIVVEYSDIR TLLVIEPD 227
HinCBHII      AAQIVVYDLPDRDCAAAA SNGEWAIANN GANNYKG-YINRIRELISFSDVRTILVIEPD 236
HinEGVI      IVGLVYDLPDRDCSAGESSGELKLSQNGLNRYKNEYVNPFAQKLKAASDVQFAVILEPD 139
                : : * : * * * * : * : * : : : : : : : : : : : : : : * * * *

CpuCel6A      SMGNLVTNMDLPKCSFPLPTRRTCINYAI AQLSSAGVYMYVDAGHAGWLGWPNNLPAA 277
CpuCel6B      SMANLVTNLSVQKCADES-TYKTCVAYAI EQLATVGVYMYLDAGHAGWLGWPANLSPAA 207
PchCBHII      SLANLVTNLSVQKCANAKT-TYLACVNYALTNLAKVGVMYMDAGHAGWLGWPANLSPAA 276
TreCBHII      SLANLVTNLGTPKCANAQS-AYLECI NYAVTQNLNPNVAMYL DAGHAGWLGWPANQDPA 286
HinCBHII      SLANMVTNMNVAKCSGAAS-TYRELT IYALKQLDLPHVAMYMDAGHAGWLGWPANI QPAA 295
HinEGVI      AIGNMVTGT-SAFCRNARG-PQQAIGYAI S QLQASHIHLYLDVANGWLGWADKLEPTA 197
                : : * : * * . * . . . * : : * : : : * : * : * : * : * : * : * : *

CpuCel6A      QLFGELEYETSGKSAYFRGLATNVANYALNTSSPDPCTQNAFPNYDEMLYINALSPLLQQ 337
CpuCel6B      ELFAQMYSTTGSSPYFRGLATNVANYNSLT TDS PDPITSGDSNYDELLYIEALSPLLVDN 267
PchCBHII      QLFTQVWQNAKSPFIKGLATNVANYALQAAS PDPITQGNPNYDEIHYINALAPLLQQA 336
TreCBHII      QLFANVYKNASSPRALRGLATNVANYNGWNITSPPSY TQGNVYNEKLYIHAIGPLLANH 346
HinCBHII      ELFAKIYEDAGKPRAVRGLATNVANYNAWSISSPPPY TSNPNYDEKHYIEAFRPLLEAR 355
HinEGVI      QEVATILQKAGNNAKIRGFSSNVSNYPYSTSNPPPY TSGSPSPDESRYATNIANAMRQR 257
                : . : . . . . : * : : * * * * * * . * . * . . : * * : : :

CpuCel6A      GFS-AQFIVDQGRSGVQ NIR-NAWGDW CNIKGAGFGIRPTDTTGSPLIDSIVVVKPGGEC 395
CpuCel6B      GFP-AQFIVEQARLGVQ NIR-SAWGDW CNVKAGGFLRPSDTTPSSLIDSIVVVKPGGEA 325
PchCBHII      GWD-ATFIVDQGRSGVQ NIR-QQWGDW CNIKGAGFGTRPTTNTGSQFIDSIVVVKPGGEC 394
TreCBHII      GWSNAFFITDQGRSGKQPTGQQQWGDW CNVIGTGFGRPSANTGDSLLDSFVVKPGGEC 406
HinCBHII      GFP-AQFIVDQGRSGKQPTGQKEWGDW CNAIGTGFGRPTANTGHQYVDAFVVKPGGEC 414
HinEGVI      GLP-TQFIIDQSRVALSGAR-SEWGDW CNVNPAGFGQPTTNTNPNVDVAIVVVKPGGES 315
                * : * * : * . . . * * * * * : * * : * * : * : * * * * * .

CpuCel6A      DGTSNSSAPRYDSTCSLSDSLQPAPEAGTW FQYFEALVTNAVPSL-- 441
CpuCel6B      DGTSNSSAARYDYHCSLSDALQPAPEAGTW FQTYFEDLVSGANPAF-- 371
PchCBHII      DGTSNSSSPRYDSTCSLPDAAQPAPEAGTW FQAYFQTLVSAANPPL-- 440
TreCBHII      DGTS DSSAPRFD SHCALPDALQPAQAGAWFQAYFVQLLTNANPSFL- 453
HinCBHII      DGTS DTTAARYDYHCGLEDALKPAPEAGQW FQAYFEQLLRNANPPF-- 460
HinEGVI      DGQCGMGG-----APAAGMWF DAYAQM LTONAHDEIAR 348
                * * . . . * * * * * : * * * * :

```

Fig. 2. 7. Sequence alignment of *C. puteana* Cel6s with CBHII from *P. chrysosporium* and Cel6s from ascomycetes which were resolved 3D-structure. CBM regions are boxed and the possible catalytic residues are indicated as bold type. The residues corresponding to interaction with substrates are indicated as black-boxed. The possible amino acid sequences forming the loop structures in catalytic site were double-underlined.

2.3.3. *C. puteana* 由来 2 つの Cel7 遺伝子 cDNA の全長クローニング

一方、Cel6 遺伝子の場合と同様の手法で 2 つの Cel7 遺伝子を cDNA としてクローニングした。それぞれの塩基配列およびそれに基づく推定アミノ酸配列を Fig. 2.8 に示した。2 つの Cel7 遺伝子をコードする cDNA について、Cel7AcDNA はオープンリーディングフレーム 454 残基を含む 1615 bp から構成されていた。N 末端 18 残基は SignalP プログラムからシグナルペプチドであることが推測されたことから、成熟タンパク質は 436 残基から成るタンパク質であることが推察された。Cel7B cDNA はオープンリーディングフレーム 454 残基を含む 1620 bp から構成されていた。N 末端 18 残基は SignalP プログラムからシグナルペプチドであることが推測されたことから、成熟タンパク質は 441 残基から成るタンパク質であることが推察された。*C. puteana* 由来 Cel7A、Cel7B の推定アミノ酸配列の相同性は 89 % であり、担子菌由来 Cel7 とのアミノ酸配列の相同性を調べた結果、*C. puteana* 由来 Cel7A が 72-82 %、Cel6B が 71-84 % の相同性を有することが明らかとなった。

次に決定した塩基配列より推定されるアミノ酸配列を 3 次元構造が明らかになっている子囊菌 *T. reesei* 由来 CBHI、*T. reesei* 由来 EGI そして *P. chrysosporium* 由来 Cel7D のアミノ酸配列とアライメント解析により比較した (Fig. 2.9)。その結果、*C. puteana* 由来 Cel7A および Cel7B は共に CBM が欠如していることが明らかとなった。また、求核残基となるグルタミン酸残基 (Glu210 in both Cel7A and Cel7B)、およびプロトン供与残基となるグルタミン酸残基 (Glu215 in both Cel7A and Cel7B)、そして活性部位において基質と結合するトリプトファン残基、アルギニン残基などは *C. puteana* 由来 Cel7A および Cel7B において全て保存されていた。そして、*T. reesei* 由来 CBHI もしくは *P. chrysosporium* 由来 Cel7D において見られるループ構造部分のアミノ酸配列が *C. puteana* 由来 Cel7A および Cel7B 共に存在することが明らかとなった。

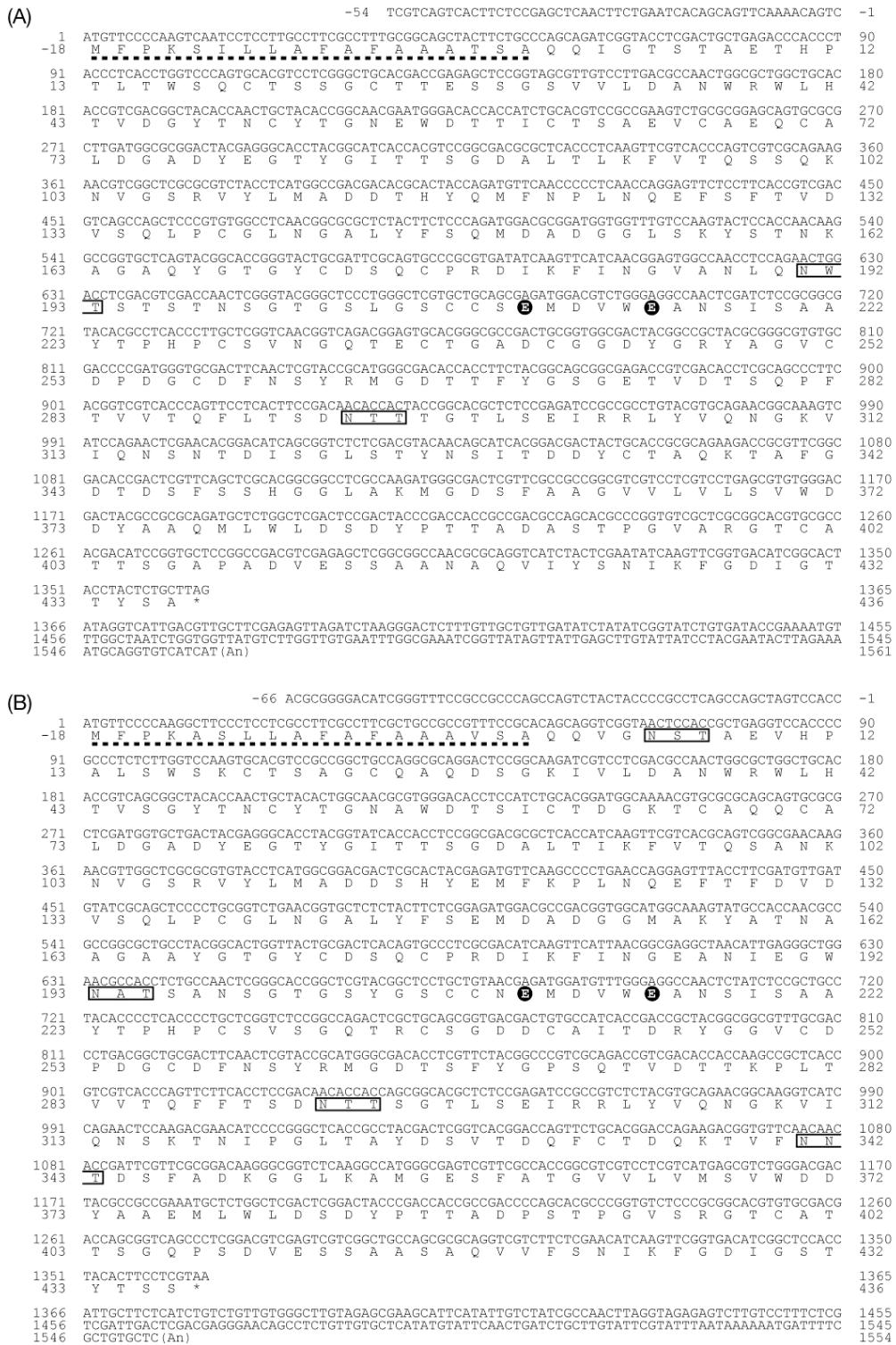


Fig. 2. 8. The nucleotide sequence of cDNA encoding *C. puteana* Cel7A (A), and Cel7B (B) precursors and the deduced amino acid sequences. The potential signal peptide sequence are dashed underlined. The possible N-glycosylation sites are boxed. The possible catalytic residues indicate as filled circle.

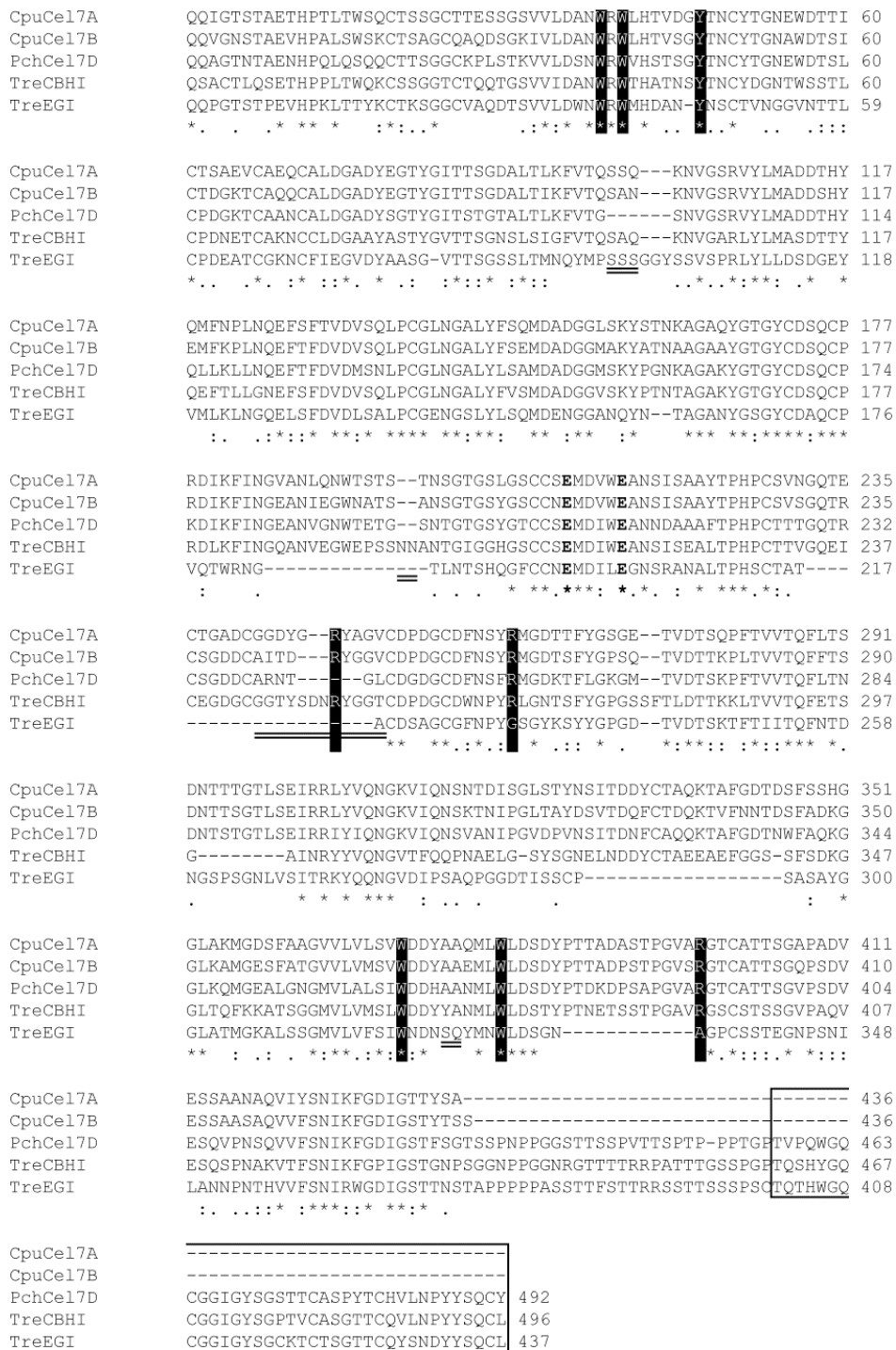


Fig. 2. 9. Sequence alignment of *C. puteana* Cel7s with Cel7s from *P. chrysosporium* and from ascomycetes which were resolved 3D-structure. CBM regions are boxed and the possible catalytic residues are indicated as bold type. The residues corresponding to interaction with substrates are indicated as black-boxed. The possible amino acid sequences forming the loop structures in catalytic site were double-underlined.

2.3.4. *C. puteana* cel6 および cel7 遺伝子の発現解析

C. puteana のセルロース培養系における *cel6* および *cel7* 遺伝子の発現を比較するため、RT-PCR により培養 7 日目における mRNA の発現量を半定量的に解析した。各遺伝子に特異的なプライマー設計に関して、ゲノムより得た塩基配列情報によりイントロンを挟んだプライマーを設計することで、ゲノム DNA のコンタミネーションを防ぎ、は起こらなかった。全てのプライマーは 23-26 bp の長さ、そして $T_m=61-62\text{ }^\circ\text{C}$ になるよう設計した。Fig. 2. 10 に示すように *cel6* および *cel7* 各遺伝子の発現には顕著な差が見られた。恒常的高発現遺伝子である *gpd* 遺伝子の発現量を基にすると、*cel6B* および *cel7A* は *gpd* 遺伝子より発現量が多いと見られ、*cel6A* および *cel7B* は顕著に発現量が低いことが明らかとなった。

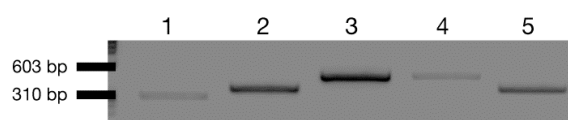


Fig. 2. 10. Electrophoresis of PCR products on 2 % agarose gel. Expression pattern was analyzed using mRNA extracted from day-7 mycelium.
Lane1; *C. puteanacel6A*, Lane2; *C. puteanacel6B*,
Lane3; *C. puteanacel7A*, Lane4; *C. puteanacel7B*,
Lane5; *C. puteanagpd*

2.4 考察

CODEHOP-PCRを用いた*C. puteana*のゲノムDNAに対する解析により、*C. puteana*はCel6およびCel7遺伝子を少なくともそれぞれ2種類(*cel6A*, *cel6B*, *cel7A*, *cel7B*)有することが明らかとなった。また、それら4種類全ての酵素遺伝子の全長配列をセルロース分解系における発現遺伝子として取得した。

Cel6遺伝子については担子菌*Coprinus cinerea*のゲノム情報によると、Cel6遺伝子ホモログを合計5種類有していることが明らかとなったが(Broad Institute; http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/coprinus_cinereus/Home.html)、その他の担子菌および子囊菌では、白色腐朽菌*P. chrysosporium*、そして子囊菌*Aspergillus niger*、*T. reesei*のゲノム情報からそれぞれ1コピー有することが明らかとなっている(JGI homepage; <http://genome.jgi-psf.org/>)。また、第1章のTable1. 2にも示したように多くの担子菌においてCel6遺伝子は1コピー明らかにされている。しかしながら、子囊菌*H. insolens*は機能の異なる2種類のCel6、CBHとEGを生産することが酵素の機能および構造レベルにおいて明らかとなっている(Varrot et al., 1999, Davies et al., 2000)。そこで本研究で取得した*C. puteana*由来*cel6*は少なくとも2つのアイソザイムが存在することが明らかとなったが、得られた塩基配列より推定したアミノ酸配列を他菌種由来Cel6と比較したところ、両酵素ともループ構造を有しており、さらにループ構造部分におけるアミノ酸の種類も担子菌由来Cel6とほぼ同様であったことから、*C. puteana*Cel6A、Cel6B共にループ構造のあるCBH型の酵素であることが示唆された。

一方、Cel7遺伝子においては*P. chrysosporium*のゲノム解析およびゲノム情報によるとCel7アイソザイムを6つ有することが明らかとなっている(Covert et al., 1992)。また、*C. cinerea*においては4種類のCel7遺伝子アイソザイムがゲノム上に存在することが明らかとなった。さらに第1章のTable1. 3にも示したように多くの担子菌においてCel7遺伝子には複数のアイソザイムが存在する可能性が示唆されている。よって、本研究において*C. puteana*のゲノムDNA上より2種類のCel7アイソザイムをコードする遺伝子をクローニングしたが、その他のアイソザイムの可能性を考慮してCODEHOP-PCRにおいて見られたバンド部分を全てシーケンス解析に供しても、それ以外の遺伝子は見つからなかった。

*C. puteana*のセルロース分解に関して、SchmidhalterとCanevasciniは本菌のセルロース培養液の主な発現タンパク質として*p*-nitrophenyl- β -D-lactosideの加水分解活性を有するセロビオヒドロラーゼを2種類単離している(Schmidhalter and Canevascini 1992, 1993a)。これは活性の特性からCel7であったことが予想されるが、結晶性セルロースに対する活性については詳細に

述べられていない。また、本菌のセルロース培養液が結晶性セルロース分解活性を示さないことも報告されている(Highley, 1973; 1980)。本研究においてクローニングされた本菌由来2種類の*cel7*(*cel7A*, *cel7B*)は触媒ドメインにおいては*T. reesei*由来CBHI (Cel7A)および*P. chrysosporium* Cel7Dと同様に活性中心を覆うループ構造が存在し、*T. reesei*由来EGI (Cel7B)のようにループ構造が存在せず、活性中心がオープンになっているものではないことが明らかとなった(Fig. 2. 9)。同様に*C. puteana* Cel6AおよびCel6Bについても触媒ドメインにおいては*H. insolens*由来CBHIIおよび*T. reesei*由来CBHIIIと同様に活性中心を覆うループ構造が存在していた。一方、*H. insolens*由来EGVIではC末端側のループ構造に相当するアミノ酸配列が欠如していた(Fig. 2. 7)。Cel6およびCel7の触媒ドメインにおけるアミノ酸配列アライメントから作成した分子系統樹をそれぞれFig. 2. 11、Fig. 2. 12に示した。その結果、*C. puteana*由来Cel6は、Fig. 2. 11においてCel6A、Cel6B共に4種類の*C. cinerea*由来GH6(*Coprinus_cinereus*_CC1G_08276, 08277, 04166, 10605)を除き、全ての担子菌由来Cel6が含まれるグループに属することが明らかとなった。このことから、*C. puteana*由来Cel6の触媒ドメインは、糸状菌全体で比較した場合、担子菌由来の酵素と類似した構造を有していることが示唆された。しかしながら、その担子菌由来Cel6グループの中において*C. puteana*由来Cel6AおよびCel6Bは早い階層において他との分岐を示していた。このことから、*C. puteana*由来Cel6AおよびCel6Bの触媒ドメインは担子菌の中では他のCel6とは若干異なる構造を有することが明らかとなった。

そして*C. puteana*由来Cel7に関しては、Fig. 2. 12においてCel7A、Cel7B共にほとんどの担子菌由来Cel7が属するグループの中央付近に位置していたことから、触媒ドメインの構造としては担子菌由来Cel7と類似していることが明らかとなった。糸状菌由来Cel7に関して、配列の相同性および構造骨格の相同性は糸状菌間で高いため、アミノ酸配列アライメントはループ部分の長さもしくは欠失を反映しているものであると考えられた。その結果として、子囊菌由来GH7はCBHとして位置づけられている酵素が含まれる群と、EGとして位置づけられている酵素が含まれる群に大きく2つの分かれることが明らかとなった(Fig. 2. 12の矢印部)。担子菌由来Cel7は2つに分かれた子囊菌由来Cel7の内、CBH型が含まれる分岐群に含まれ、その後、担子菌由来Cel7のクレードに分かれた。アミノ酸配列のアライメントから、担子菌由来Cel7のループ部分は子囊菌由来CBHの分岐群に含まれるCel7よりも短いことが明らかとなった。

一方、CBMに関しては4つの*C. puteana*由来Cel6およびCel7の内、3つにおいて欠如して

いたことから、それらの酵素は結晶性セルロースに対しては分解活性が低いものと推察された。それに対してCel6AのみはCBMが付随していたことから、結晶性セルロースに対して活性を有すると推定された。そこで、培養7日目における各遺伝子の発現量をFig. 2. 10に示したようにRT-PCRによって比較したところ、mRNAの発現量が多いものはCel7AおよびCel6Bであり、Cel6Aの発現は相対的に低かったことからCBMを有するCel6Aは結晶性セルロースを分解するのに十分な量が発現されていないことが考えられた。また、培養7日目の菌体外液のクロマトグラムからはCel6Aタンパク質が確認されなかったことを含めても、*C. puteana*のCel6およびCel7遺伝子の発現パターンが、CBMを有するCel6, Cel7が高発現する*P. chrysosporium*とは異なる可能性が示唆された。

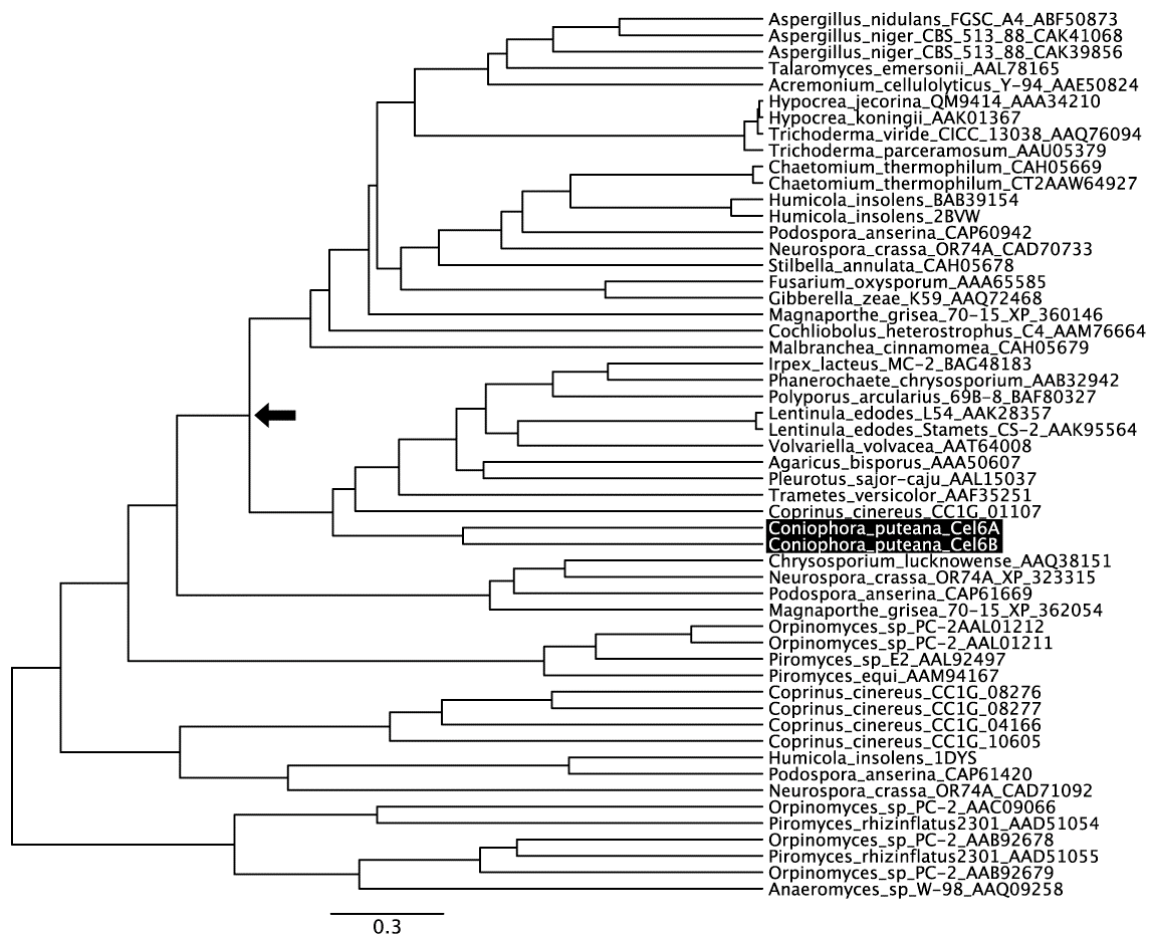


Fig. 2. 11. Phylogenetic tree made from the alignment of amino acid sequences from basidiomycetes and ascomycetes in database. The clade of almost Cel6s from basidiomycetes except 4 Cel6s from *Coprinus cinereus* is indicated as arrow head.

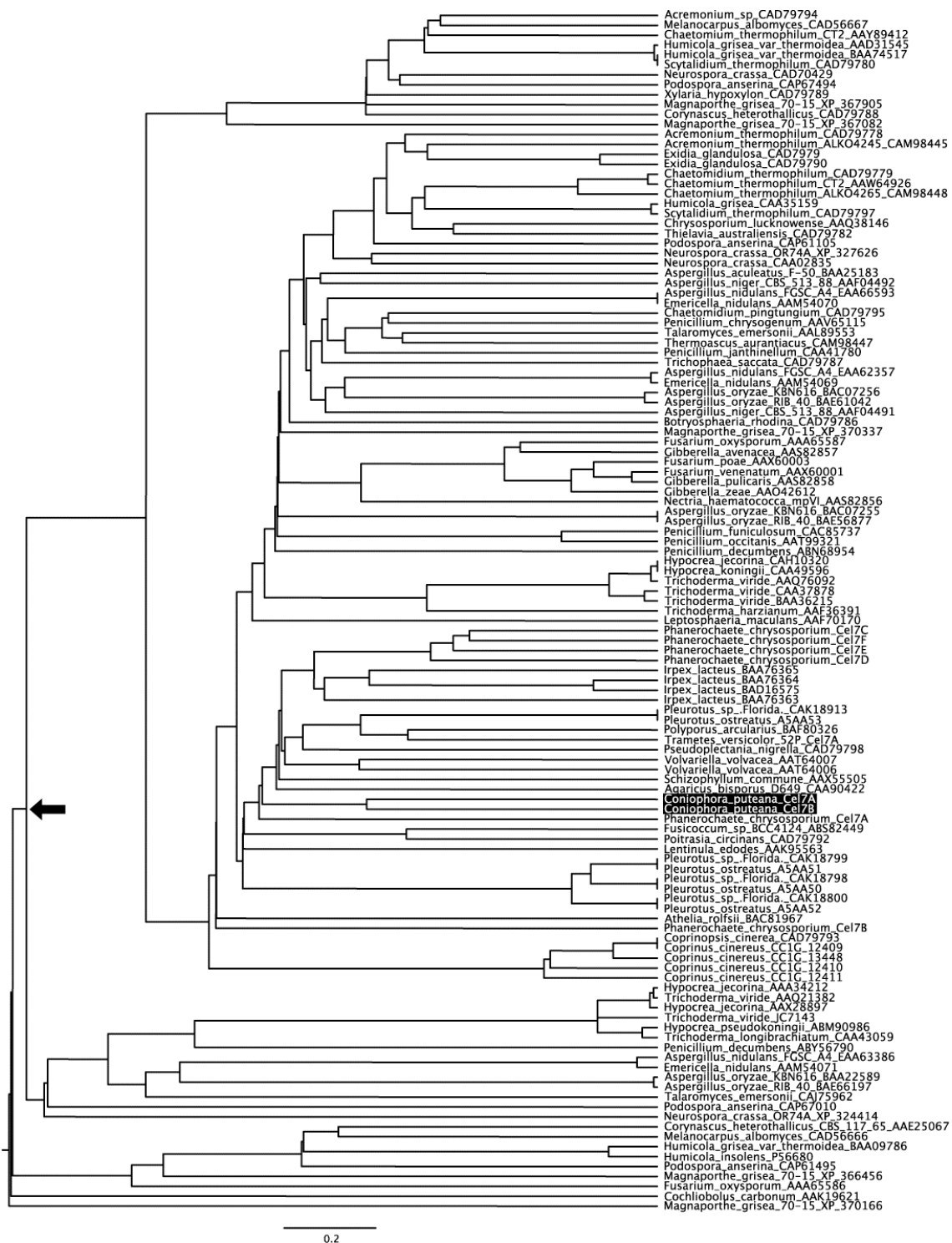


Fig. 2. 12. Phylogenetic tree made from the alignment of amino acid sequences from basidiomycetes and ascomycetes in database. The clade showed by arrow head indicates as EGs belonging to Cel7 from ascomycetes and CBHs belonging to Cel7 from ascomycetes and all basidiomycetes.

参考文献

- Acevedo, J. P., Reyes, F., Parra, L. P., Salazar, O., Andrews, B. A., and Asenjo, J. A.:** Cloning of complete genes for novel hydrolytic enzymes from Antarctic sea water bacteria by use of an improved genome walking technique. *J. Biotechnol.* 133: 277-286 (2008).
- Covert, S. F., Bolduc, J., and Cullen, D.:** Genomic organization of a cellulase gene family in *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Genet.* 22: 407-413. (1992a).
- Davies, G. J., Brzozowski, A. M., Dauter, M., Varrot, A., and Schulein, M.:** Structure and function of *Humicola insolens* family 6 cellulases: structure of the endoglucanase, Cel6B, at 1.6 Å resolution. *Biochem. J.* 348: 201-207. (2000).
- Eriksson, K.-E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P.:** Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. New York. Springer-Verlag. (1990).
- Flournoy, D. S., Kirk, T. K., and Highley, T. L.:** Wood decay by brown-rot fungi: changes in pore structure and cell wall volume. *Holzforschung* 45: 383-388 (1991).
- Luzhetskyy, A., Weiss, H., Charge, A., Welle, E., Linnenbrink, A., Vente, A., Bechthold, A.:** A strategy for cloning glycosyltransferase genes involved in natural product biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 1367-1375 (2007).
- Henrissat, B.:** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316. (1991).
- Highley, T. L.:** Influence of carbon source on cellulase activity of white-rot and brown-rot fungi. *Wood and Fiber* 5: 50-58. (1973).
- Highley, T. L.:** Cellulose degradation by cellulose-clearing and non-cellulose-clearing brown-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1145-1147. (1980).
- Igarashi, K., Samejima, M., and Eriksson, K.-E. L.:** Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase 1 activity by relieving product inhibition. *Eur. J. Biochem.* 253: 101-106 (1998).
- Jasalavich, C. A., Ostrofsky, A., and Jellison, J.:** Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4725-4734 (2000).
- Kajisa, T., Yoshida, M., Igarashi, K., Katayama, A., Nishino, T., and Samejima, M.:** Characterization and molecular cloning of cellobiose dehydrogenase from the brown-rot fungus

Coniophora puteana. J. Biosci. Bioeng. 98: 57-63 (2004).

Koenigs, J. W.: Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization and pH changes. Arch. Microbiol. 99: 129-145 (1974).

Morant, M., Hehn, A., and Werck-Reichhart, D.: Conservation and diversity of gene families explored using the CODEHOP strategy in higher plants. BMC Plant Biol. 2: 7-18 (2002).

Munoz, I. G., Ubhayasekera, W., Henriksson, H., Szabo, I., Pettersson, G., Johansson, G., Mowbray, S. L., and Stahlberg, J.: Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 Å resolution and homology models of the isozymes. J. Mol. Biol. 314: 1097-1111. (2001).

Rose, T. M.: CODEHOP-mediated PCR - a powerful technique for the identification and characterization of viral genomes. Virol. J. 2:20-43 (2005).

Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrokovski, S., McCallum C. M., and Henikoff, S.: Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. Nucleic Acids Res. 26: 1628-1635 (1998).

Stahlber, J., Johansson, G., and Pettersson, G.: A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the two-domain structure of cellobiohydrolase I. Bio/Technol. 9: 286-290. (1991).

Schmidhalter, D. R., and Canevascini, G.: Characterization of the cellulolytic enzyme system from the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 431-436. (1992).

Schmidhalter, D. R., and Canevascini, G.: Purification and characterization of two exocellobiohydrolases from the brown rot fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst. Arch. Biochem. Biophys. 300: 551-558. (1993a).

Schmidhalter, D. R., and Canevascini, G.: Isolation and characterization of the cellobiose dehydrogenase from the brown-rot fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst. Arch. Biochem. Biophys. 300: 559-563. (1993b).

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G.: The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25: 4876-4882 (1997).

Uzcategui, E., Ruiz, A., Montersino, R., Johansson, G., and Pettersson, G.: The 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. J. Biotechnol. 19: 271-286. (1991).

Varrot, A., Hastrup, S., Schulein, M., and Davies, G. J.: Crystal structure of the catalytic core domain of the family 6 cellobiohydrolase II. Cel6A, from *Humicola insolens*, at 1.92 Å resolution. *Biochem. J.* 337: 297-304. (1999).

第 3 章

褐色腐朽菌 *Coniophora puteana* 由来
セロビオース脱水素酵素の特性解析
および遺伝子のクローニング

3.1. 緒言

前章において白色腐朽菌と類似したパターンを示す *C. puteana* のセルロース分解酵素系の中で、CBHにあたる Cel6 および Cel7 の構造およびその発現パターンが結晶性セルロース分解に対する制約要因になっていることが明らかとなった。次に、本章においては白色腐朽菌のセルロース分解系において CBH の下流に位置するセロビオース脱水素酵素 (Cellobiose dehydrogenase; CDH) について、*C. puteana* 由来の酵素について解析することを試みた。

白色腐朽菌のセルロース分解系においてセルラーゼの作用のみならず、酸化反応の重要性も示唆されてきたことから、その酸化還元酵素として CDH がその機能について詳細に調べられてきており、木材分解過程において何らかの生理的機能を果たしていることは明らかであった。本酵素の生理機能については現在も明らかにはなっていないが、白色腐朽菌由来の CDH に関してセルロース分解への関与またはリグニン分解への関与ともに議論されてきた。しかしながら、白色腐朽菌由来 CDH の直接的な結晶性セルロース分解への生理的な役割としてセルラーゼによってセルロースからセロビオースおよびセロオリゴ糖の濃度が上がることによる生成物阻害の解除が示唆されている (Ayers et al., 1978, Igarashi et al., 1998)。Bao と Renganathan は微結晶性セルロース (アビセル) の分解性への CDH の影響について *Trichoderma* のセルラーゼの存在下において報告している (Bao and Renganathan 1992)。さらに彼らは CDH が CBH の結晶性セルロースへの作用を促進することを発見し (Bao and Renganathan 1992)、Igarashi らは CDH がセロビオースをセロビオノラクトンへ酸化することにより、CBH の生成物阻害を解除することを示した (Igarashi et al. 1998)。また、CDH はセルロース表面に吸着し (Henriksson et al. 1991, Renganathan et al. 1990, Samejima et al. 1997)、*in vivo* の系においても同様にセルロース表面に吸着していることが示された (Igarashi et al. 1997)。近年、CDH と菌体外 β -グルコシダーゼ (BGL) の速度論的解析および発現解析により、*P. chrysosporium* のセルロース分解において CDH は BGL よりも重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Igarashi et al. 2003, Yoshida et al. 2004)。以上のことから白色腐朽菌 *P. chrysosporium* 由来 CDH がセルロース分解系におけるセロビオース代謝に関与していることが明らかにされてきた。

一方、*C. puteana* 由来 CDH は Schmidhalter and Canevascini (1992, 1993b) によって、セルロース分解酵素系において生産することが明らかとなり、単離された。その後、*C. puteana* 由来 CDH は *P. chrysosporium* 由来 CDH と速度論的解析の結果、類似した機能を有すること

が示された(Hyde and Wood, 1996)。しかしながら、白色腐朽菌と褐色腐朽菌のセルロース分解メカニズムが異なるとの概念に基づき、褐色腐朽菌の酸化的なセルロース分解メカニズムに関わる酵素に位置づけられ、フェントン反応に関わることが仮説的に述べられている(Hyde and Wood, 1997)。そこで、本章においては *C. puteana* 由来 CDH の機能と構造に関して情報を得るため、精製 *C. puteana* 由来 CDH の機能的な特徴を、また CDH をコードする cDNA をクローニングすることにより構造的な特徴を明らかにし、他の白色腐朽菌由来 CDH と比較することを目的とした。

3.2. 実験方法

3.2.1. 培養

ポテトデキストロース寒天プレート(Nihon Pharmaceutical, Japan)で 26.5 °C、2 週間培養した *Coniophora puteana* WD-758 の菌糸をパンチで打ち抜き、500 ml の三角フラスコ中の 200 ml のポテトデキストロース液体培地(Sigma-Aldrich, MO, USA)に植菌した。26.5 °C で 3 日間振とう培養した後(150 rpm, ϕ 30 mm)、菌糸を集菌し、10 ml の 0.9 % NaCl に再懸濁させ、200 ml のセルロース培地に植菌した。セルロース培地の組成は 1 L あたり、2.6 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、1.1 g KH_2PO_4 、2.0 g 2,2-ジメチルコハク酸、1.0 g 酵母抽出物、1.0 g ポリペプトン(Nihon Pharmaceutical)、0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、74 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、6.0 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5.0 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、20 g アビセル(Funakoshi, Tokyo)とした。500 ml 三角フラスコ中の培養液は 26.5 °C にて、6 日間第 2 章と同様の振とう培養を行い、5 ml の培養液を毎日集菌することで菌体生長および酵素活性を測定した。

3.2.2. CDH 活性測定

CDH 活性は Samejima と Eriksson の手法に従い、セロビオース、セロテトラオース、セロペンタオース、そしてグルコースを基質として測定した(Samejima and Eriksson 1992)。定常状態における速度パラメータ(K_m and k_{cat})を求めるため、シトクロム c の還元活性を基質濃度 25-1000 μM の範囲で測定した。そして、速度と基質濃度の値をプロットしたデータを DeltaGraph 4.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, US)を用いてミカエリス-メンテンの式に近似し、定常状態における速度パラメータ(K_m and k_{cat})を算出した。

3.2.3. CDH の精製

2 つのフラスコから 6 日目の培養液をフィルターろ過することで集め、PM-10 ultrafiltration membrane and a Ultrafree centrifugal filter device (Millipore, MA, USA)を用いて 20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に置換した。その溶液を同緩衝液で平衡化した DEAE-Toyopearl 650S カラム (7.5 mm x 170 mm; Tosoh, Tokyo)に供した。タンパク質は 250 ml NaCl を 0M から 0.5 M に直線的なグラジエントをかけることで溶出した。CDH 活性をしめした画分を集め、1 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に置換した後、同緩衝液で平衡化した Phenyl-Toyopearl 650S カラム (11 mm x 210 mm; Tosoh)に供した。タンパク質は 250 ml 硫酸アンモニウムを 1 M から 0 M にグラジエントをかけることで溶出し

た。CDH 活性を示した画分を Ultrafree centrifugal filter device (Millipore)を用いて 20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で平衡化した後、濃縮し、同緩衝液、0.5 M Na₂SO₄、および 0.05 % NaN₃を含む溶液で平衡化させた TSKgel SuperSW3000 カラム(7.5 mm x 75 mm; Tosoh)に供した。ピーク画分を集め、20 mM 酢酸ナトリウム水溶液(pH 5.0)で塩析した後、TSKgel SuperQ-5PW カラム(7.5 mm x 75 mm; Tosoh)に供することで最後の精製ステップを行った。タンパク質は同緩衝液中の NaCl の濃度を 0 から 0.5M に直線的なグラジエントをかけることで溶出した。CDH の精製度は SDS-PAGE で確認し、精製 CDH 濃度は 421 nm の吸光度で算出した($\epsilon_{421} = 130 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

3.2.4. CDH をコードする cDNA のクローニング

第 2 章と同様にセルロース培養 6 日目の菌糸を回収し、液体窒素中で破碎した。破碎した菌体およそ 100mg より E. Z. N. A. Fungal RNA Kit (Omega Bio-tek, GA, USA)とそのプロトコルに基づき全 RNA を抽出した。全 RNA を Ready-To-Go™ You-prime First-strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences, NJ, USA)により 1 本鎖 DNA を合成することで、CDH 遺伝子断片を取得する際および 3'RACE-PCR を行う際の鋳型とした。5'RACE における鋳型については、3 g の菌糸から ISOGEN (Nippon Gene, Japan)を用いて全 RNA を抽出後、mRNA を *Oligotex*™-dT30<Super> mRNA Purification Kit(TaKaRa Bio, Otsu, Japan)を用いて精製し、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences, CA, USA)を用いて 5' RACE first-strand cDNA を合成した。縮重プライマーは既にアミノ酸配列があきらかにされている CDH の共通配列より作成した。用いたプライマーの配列およびクローン化した cDNA における位置についての概略図は Fig. 3. 1. に示した。

全ての PCR 産物は pGEM-T Easy Vectors (Promega, WI, USA) にライゲーションし、Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences)と DNA sequencer SQ5500E (Hitachi Electronics Engineering, Tokyo)を用いて塩基配列を明らかにした。塩基配列の相同性検索は BLASTX(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al. 1997)を用いた。推定アミノ酸配列においては、SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)によってシグナルペプチドを予測し、白色腐朽菌由来 CDH との相同性比較 CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson et al. 1994)および PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al. 1997)を用いて行った。

3.2.5. 質量分析

SDS-PAGE ゲルより切り出した精製 *C. puteana* CDH をアセトニトリルで洗い、100 mM 炭酸水素アンモニウムに浸漬した。ゲル中のタンパク質を 100 mM ジチオスレイトールで 56 °C、30 分間還元後、暗所にて 100 mM ヨードアセタミドで 37 °C、30 分間アルキル化を行った。その後、ゲルをアセトニトリルで洗浄し、真空中で乾燥させた。トリプシングル内消化は 100 mM 炭酸水素アンモニウム中、0.25 mg/ml トリプシンにて 37°C で一晩行った。トリプシン消化したペプチドは ZipTip C₁₈ (Millipore) で精製した。Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) は Reflex III reflector time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany) を用いてディレイド・エクストラクションおよび陽イオンリフレクターモードで行った。質量値は計算による理論値と *C. puteana* CDH の成熟タンパク質のアミノ酸配列を比較し、オンラインソフトウェア FindMod tool(<http://us.expasy.org/tools/findmod>) で算出した。

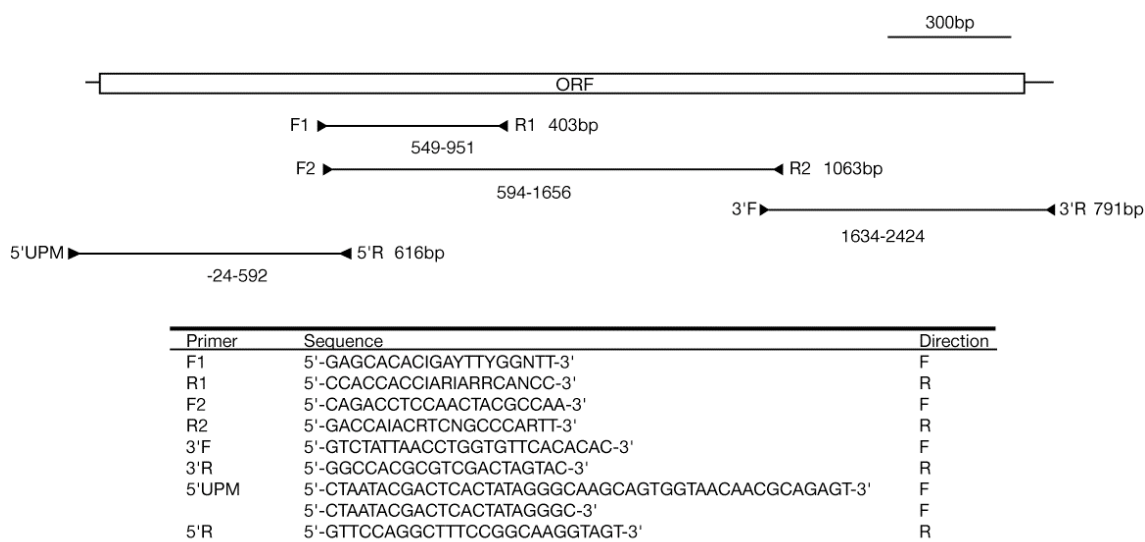


Fig. 3.1. Schematic diagram of cDNA encoding *C. puteana* CDH, showing the locations and nucleotide sequences of primers used for PCR. F and R indicate the forward and reverse directions, respectively.

3.3. 結果

3.3.1. *C. puteana* のセルロース培養系における菌糸生長および CDH 活性

本研究において、Fig. 3.2 に示すように、微結晶セルロースのアビセル培地において *C. puteana* の明らかな生長が見られた。培養液では菌体の生長に伴い2日目より明らかな CDH 活性を示した。培養6日後、菌体生長および CDH 活性は最大値を示した。

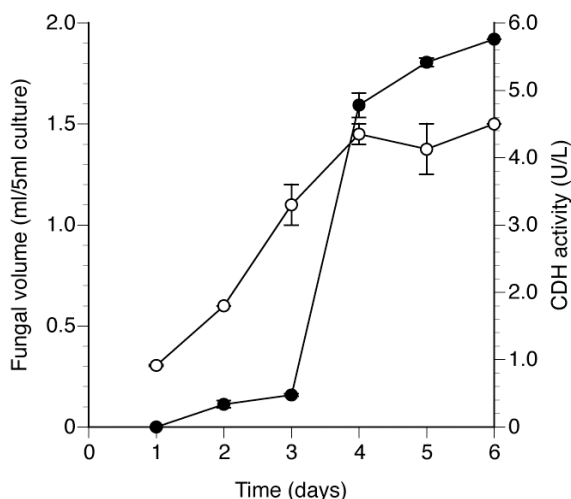


Fig. 3. 2. Time course of fungal volume and CDH activity in the culture of *C. puteana*. Open circles, Fungal volume; filled circles, CDH activity. Fungal volume and CDH activity were measured as described in Materials and Method.

3.3.2. *C. puteana* CDH の精製

CDHを培養6日目の菌体外液より4ステップのカラムクロマトグラフィーにより精製した。全ての精製過程において CDH 活性は単一のピークを示したことから、*C. puteana* は本培養液において単コピーの CDH を生産していることが明らかとなった。精製の最終ステップにおいて、酵素は SDS-PAGE において単一バンドを示し、分子量は 115 kDa であった(Fig. 3. 3)。精製酵素は、550 nm 付近に幅のあるピークおよび 421 nm に Soret-band が見られたことから、典型的な CDH の吸収スペクトルであった。*C. puteana* CDH の R_z 値(A_{421}/A_{280})は 0.62 であった(Fig. 3.4)。Table 3. 1 で示したように、精製酵素はセロビオースおよびセロオリゴ糖に対して活性があったが、モノマーであるグルコースには活性を示さなかった。

Table 3. 1. Steady-state kinetic parameters of purified *C. puteana* CDH for several electron donors*

Substrate	Kinetic constants		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$)
Cellobiose	46.4	45.9	9.9
Celotriose	70.3	64.4	9.2
Celotetraose	71.9	60.7	8.4
Cellopentaose	200	30.7	1.5
Glucose	N. D.**	N. D.**	N. D.**

*Activities were measured for various concentrations of substrates (25-1000 mM) using 50 μM cytochrome *c* as an electron acceptor at pH 4.0 and 30 °C. **N. D.: not detected.

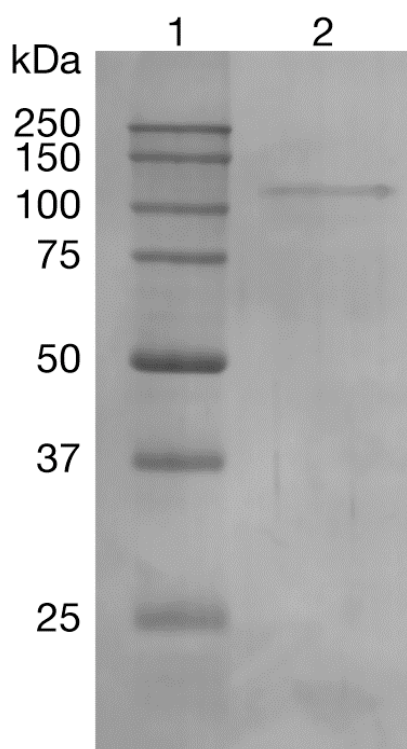


Fig. 3. 3. SDS-PAGE of purified *C. puteana* CDH. Lane 1, Size marker; lane 2, purified *C. puteana* CDH. The sample was separated on 12% polyacrylamide gel.

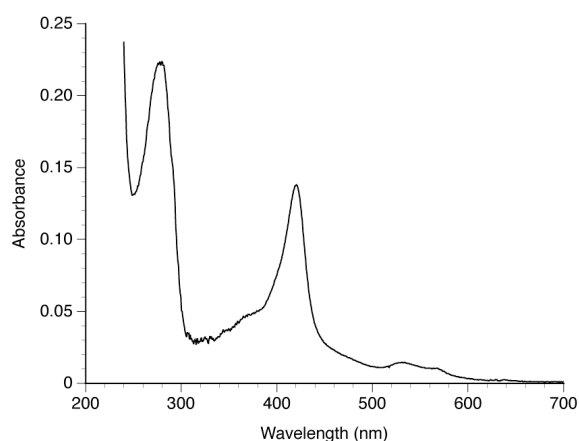


Fig. 3. 4. Absorption spectrum of oxidized *C. puteana* CDH.

3.3.3. *C. puteana* 由来 CDH をコードする cDNA のクローニング

C. puteana CDH の構造情報を得ることを目的として、本酵素をコードする cDNA を培養 6 日目の菌糸より抽出した全 RNA よりクローン化した。RT-PCR において縮重プライマー対 F1 および R1 を用いてアガロース電気泳動で 403 bp のバンドが見られた。その断片の配列をシーケンスによって明らかにし、BLASTX 解析に供したところ、白色腐朽菌由来 CDH の塩基

配列より推定されるアミノ酸配列と高い相同性を有することが明らかとなり、その PCR 産物が *C. puteana* CDH をコードする cDNA 断片であることが示唆された。その後、F2/R2 のプライマー対を用いた 2 回目の RT-PCR、3' RACE、そして 5' RACE PCR を行い、F3/R3 のプライマー対で *C. puteana* CDH の全長 cDNA を得ることに成功した。*C. puteana* CDH cDNA の塩基配列および推定アミノ酸配列は Fig. 3.5 に示した。cDNA は 2448 塩基より構成され、774 残基のオープンリーディングフレームが含まれていた。N 末端 18 残基はオンラインプログラム SignalP によってシグナルペプチドと予想され、*C. puteana* CDH の成熟タンパク質は 756 残基より成ることが推定された。クローン化した cDNA と精製酵素の一致を明らかにするため、トリプシン消化ペプチドの理論質量値と精製 CDH のトリプシン消化ペプチド断片の質量値を比較した。Table 3.2 で示したように、ペプチド断片の MALDI-TOF MS データは Fig. 3.5 において下線部で表した各々の計算質量データと一致した。この結果から本研究におけるクローン化した CDH をコードする cDNA と精製 CDH が同一のものであることが明らかとなった。PSI-BLAST 解析の結果、*C. puteana* CDH の推定アミノ酸配列は他の白色腐朽菌由来 CDH と 69-73 % の相同性を示した。この値は白色腐朽菌由来 CDH 同士で比較した時の相同性の範囲内であった。その結果、*C. puteana* CDH は他の白色腐朽菌由来 CDH と似通った構造をしている可能性が示唆された。Table 3.3 で示したように、CDH 全体でのアミノ酸残基数に大きな差異は見られないが、SDS-PAGE における *C. puteana* CDH の分子量がこれまでに知られている CDH より大きいことが明らかとなった。これは予想される N-グリコシレーション部位が他の CDH が 6-11 サイトであるのに対して、*C. puteana* CDH には 13 サイトも含んでいることに起因していることが予測された。Schmidhalter と Canevascini は *C. puteana* CDH の N-型糖鎖を Endo H で処理すると分子量が大きく低下することを報告している (Schmidhalter and Canevascini 1993b)。他の菌由来 CDH とのアライメントの結果、本酵素は N 末端領域 (1-187 residues) にヘムドメインを含み、親水性残基が豊富なリンカー領域 (188-209 residues) をはさんで、C-末端領域 (210-756 residues) にフラビンドメインを有していると考えられた。これまでの報告によると、*P. chrysosporium* CDH の 3D 構造解析の結果、Met 65 および His 163 がヘムのリガンドであることが明らかとなっている (Hallberg et al. 2000, Hallberg et al. 2002, Rotsaert et al. 2001)。*P. chrysosporium* および他の菌由来 CDH アミノ酸配列と比較した結果、*C. puteana* においては Met 64 および His 160 の 2 つのアミノ酸残基がヘムのリガンドであることが予測された (Fig. 3.5)。*C. puteana* CDH におけるフラビン結合モチーフ (GXGXXG, X は全てのアミノ酸残基) は 224-229 番目のアミノ酸配列が相当すると考えられた。さらに、様々な酸化酵素

Table 3. 2. List of tryptic fragments matching the theoretical digested fragments of mature *C. puteana* CDH*

Measured mass (Da)	Predicted mass (Da)	Δ mass (Da)	MC**	Peptide fragments	Position
870.585	870.5771	-0.007	1	KVLLLER	242-248
1098.490	1098.4810	-0.008	0	SYTGSDGQQR	571-580
1165.627	1165.6211	-0.005	0	DYTLVSNVVR	425-434
1194.654	1194.6477	-0.005	0	VILSAGSYGTAR	463-474
1397.579	1397.6291	0.050	0	LPSTDHPSTDGDR	346-358
1474.764	1474.8012	0.037	0	GGPVATYLQ TALQR	405-418
1630.824	1630.9023	0.078	1	RGGPVATYLQ TALQR	404-418
1855.906	1855.9912	0.085	1	SNVVYKDYTLVSNVVR	419-434
1865.829	1865.9292	0.100	1	DQSGVFAGASPKVNFWR	554-570
1872.800	1872.9027	0.103	1	DHVFGYSAFDLNGKR	389-404

*Trypsin digestion was performed as described in Materials and Methods, and the MALDI-TOF MS data were analyzed using FindMod tool (<http://us.expasy.org/tools/findmod>).

**MC: number of miscleavages in trypsin digestion.

Table 3. 3. Comparison of physical properties of *C. puteana* CDH with those of CDHs from white-rot fungi

Fungal species	Deduced amino acid residues	Predicted mass (kDa)	Measured mass (kDa)	Number of N-glycosylation sites	References
<i>Coniophora puteana</i>	756	81	115	13	This work
<i>Athelia rolfsii</i>	752	80	110	11	a
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	755	80	90	6	b, c, d
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	750	79	92	8	e, f
<i>Trametes versicolor</i>	750	79	97	7	g, h

a: Baminger et al. (2001), b: Ayers et al. (1978), c: Hallberg et al. (2002), d: Rotsaert et al. (2001), e: Sigoillot et al. (2002), f: Li et al. (1996), g: Roy et al. (1996), h: Raices et al. (1995).

3.4. 考察

褐色腐朽菌の結晶性セルロース分解に関しては様々なメカニズムが報告されてきている。その中でヒドロキシラジカルによる酸化反応の重要性はしばしば提唱されてきている。Hyde と Wood(1997)は *C. puteana* CDH の機能の可能性として菌糸周辺における酸化的なセルロース分解のためのフェントン試薬として Fe^{3+} を Fe^{2+} へ還元する役割を果たすものであることを述べている。本章における実験結果より、*C. puteana* CDH のヘムドメインにおける Fe^{3+} を Fe^{2+} への還元について生理的な議論はできないが、Fig. 3. 7 に示すように CDH のアミノ酸配列のアライメントから系統樹を作成したところ、*C. puteana* は白色腐朽菌由来 CDH のグループに含まれることが明らかのように、構造的に白色腐朽菌由来 CDH と何ら差異は生じていない。また、近年我々のグループは生化学的な根拠をもって、白色腐朽菌のセルロース分解過程において CBH と協調的に働きセロビオース代謝を行う CDH の重要性を示唆した (Igarashi et al., 1998)。本研究において述べてきたように、*C. puteana* 由来 CDH は構造の面からも機能速度論的な特性からも他の白色腐朽菌由来 CDH とほぼ同様であったこと、および *C. puteana* は 2 つの CBH も生産することが報告されていることから、本菌によるセルロース分解においても CBH と協調してセルロース分解に関与する可能性が示唆された。

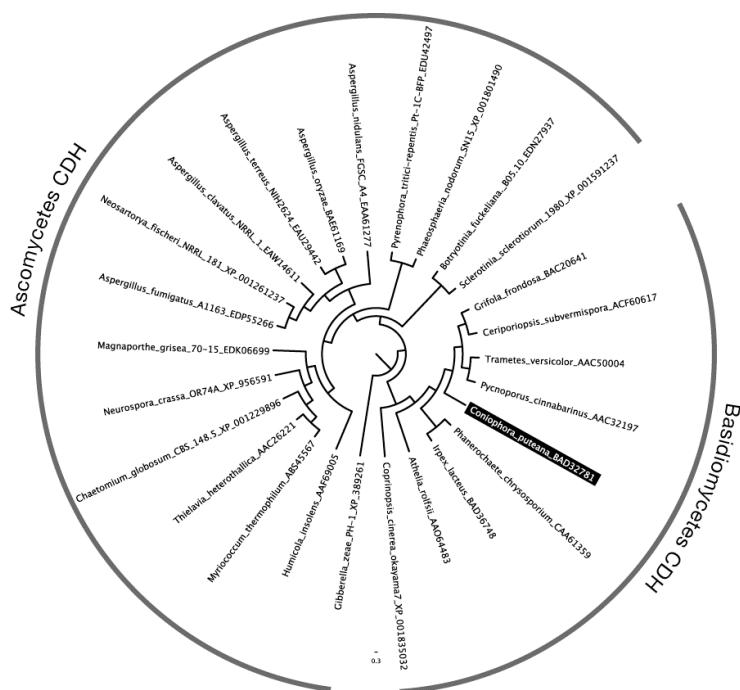


Fig. 3. 7. Phylogenetic tree from amino acid sequences of CDH from filamentous fungi. Black boxed: *C. puteana* CDH in this study.

参考文献

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J.:** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids. Res.* 25: 3389-3402 (1997).
- Ayers, A. R., Ayers, S. B., and Eriksson, K.-E. L.:** Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* 90: 171-181 (1978).
- Bao, W., and Renganathan, V.:** Cellobiose oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* enhances crystalline cellulose degradation by cellulases. *FEBS Lett.* 302: 77-80 (1992).
- Baminger, U., Subramaniam, S. S., Renganathan, V., and Haltrich, D.:** Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase from the plant pathogen *Sclerotium (Athelia) rolfsii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1766-1744 (2001).
- Blanchette, R. A., Nilsson, T., Daniel, G., and Abad, A.:** Biological degradation of wood. *Adv. Chem. Ser.* 225: 141-174 (1990).
- Cavener, D. R.:** GMC oxidoreductases; A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *J. Mol. Biol.* 223: 811-814 (1992).
- Dumonceaux, T. J., Bartholomew, K. A., Charles, T. C., Moukha, S. M., and Archibald, F. S.:** Cloning and sequencing of a gene encoding cellobiose dehydrogenase from *Trametes versicolor*. *Gene* 210: 211-219 (1998).
- Enoki, A., Tanaka, H., and Fuse, G.:** Relationship between degradation of wood and production of H₂O₂-producing or one-electron oxidases by brown-rot fungi. *Wood Sci. Technol.* 23: 1-12 (1989).
- Eriksson, K.-E., Pettersson, B., and Westermarck, U.:** Oxidation: an important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. *FEBS Lett.* 49: 282-285 (1974).
- Flournoy, D. S., Kirk, T. K., and Highley, T. L.:** Wood decay by brown-rot fungi: Changes in pore structure and cell wall volume. *Holzforschung* 45: 383-388 (1991).
- Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L., and Xu, G.:** Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *J. Biotechnol.* 53: 133-162 (1997).
- Hallberg, B. M., Bergfors, T., Backbro, K., Pettersson, G., Henriksson, G., and Divne, C.:** A new scaffold for binding haem in the cytochrome domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose

dehydrogenase. *Structure* 8: 79-88 (2000).

Hallberg, B. M., Henriksson, G., Pettersson, G., and Divne, C.: Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 315: 421-434 (2002).

Henriksson, G., Pettersson, G., Johansson, G., Ruiz, A., and Uzcategui, E.: Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains. *Eur. J. Biochem.* 196: 101-106 (1991).

Highley, T. L.: Influence of carbon source on cellulase activity of white-rot and brown-rot fungi. *Wood and Fiber* 5: 50-58 (1973).

Highley, T. L.: Cellulose degradation by cellulose-clearing and non cellulose-clearing brown-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1145-1147 (1980).

Hyde, S. M., and Wood, P. M.: Kinetic and antigenic similarities for cellobiose dehydrogenase from the brown rot fungus *Coniophora puteana* and the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 145: 439-444 (1996).

Hyde, S. M., and Wood, P. M.: A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe(III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe(II) oxidation at a distance from the hyphae. *Microbiology* 143: 259-266 (1997).

Igarashi, K., Samejima, M., and Eriksson, K.-E. L.: Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase 1 activity by relieving product inhibition. *Eur. J. Biochem.* 253: 101-106 (1998).

Igarashi, K., Samejima, M., Saburi, Y., Habu, N., and Eriksson, K.-E. L.: Localization of cellobiose dehydrogenase in cellulose-grown cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genet. Biol.* 21: 214-22 (1997).

Igarashi, K., Momohara, I., Nishino, T., and Samejima, M.: Kinetics of inter-domain electron transfer in flavocytochrome cellobiose dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. J.* 365: 521-526 (2002).

Igarashi, K., Tani, T., Kawai, R., and Samejima, M.: Family3 β -glucosidase from cellulose-degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a glucan 1,3- β -glucosidase. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 572-576 (2003).

Kim, Y. S., Wi, S. G., Lee, K. H., and Singh, A. P.: Cytochemical localization of hydrogen peroxide

production during wood decay by brown-rot fungi *Tyromyces palustris* and *Coniophora puteana*. *Holzforschung* 56: 7–12 (2002).

Kirk, T. K., and Highley, T. L.: Quantitative changes in structural components of conifer woods during decay by white- and brown-rot fungi. *Phytopathology* 63: 1338-1342 (1973).

Koenigs, J. W.: Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization and pH changes. *Arch. Microbiol.* 99: 129-145 (1974).

Koenigs, J. W.: Peroxidase activity in brown-rot basidiomycetes. *Arch. Microbiol.* 73: 121-124 (1970).

Koenigs, J. W.: Hydrogen peroxide and iron: A proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes. *Wood and Fiber* 6: 66-69 (1974).

Kremer, S. M., and Wood, P. M.: Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe(II) reductase. Kinetic comparison with neutrophil NADPH oxidase and yeast flavocytochrome b₂. *Eur. J. Biochem.* 205: 133-138 (1992).

Laemmli, U. K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).

Li, B., Nagalla, S. R., and Renganathan, V.: Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1329-1335 (1996).

Li, B., Nagalla, S. R., and Renganathan, V.: Cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* is encoded by two allelic variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 796-799 (1997).

Morpeth, F. F.: Some properties of cellobiose oxidase from the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biochem. J.* 228: 557-564 (1985).

Moukha, S. M., Dumonceaux, T. J., Record, E., and Archibald, F. S.: Cloning and analysis of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase. *Gene* 234: 23-33 (1999).

Nilsson, T., and Ginns, J.: Cellulolytic activity and the taxonomic position of selected brown-rot fungi. *Mycologia* 71: 170-177 (1979).

Raices, M., Paifer, E., Cremata, J., Montesino, R., Stahlberg, J., Divne, C., Szabo, I. J., Henriksson, G., Johansson, G., and Pettersson, G.: Cloning and characterization of a cDNA encoding a cellobiose dehydrogenase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 369: 233-238 (1995).

Renganathan, V., Usha, S. N., and Lindenburg, F.: Cellobiose oxidizing enzymes from lignocellulose-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Interaction with microcrystalline cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 609-613 (1990).

Rotsaert, F. A., Li, B., Renganathan, V., and Gold, M. H.: Site-directed mutagenesis of the heme axial ligands in the hemoflavoenzyme cellobiose dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 390: 206-214 (2001).

Roy, B. P., Dumonceaux, T., Koukoulas, A. A., and Archibald, F. S.: Purification and characterization of cellobiose dehydrogenases from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4417-4427 (1996).

Samejima, M., and Eriksson, K.-E. L.: A comparison of the catalytic properties of cellobiose: quinone oxidoreductase and cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.* 207: 103-107 (1992).

Samejima, M., Ohkubo, T., Igarashi, K., Isogai, A., Kuga, S., Sugiyama, J., and Eriksson, K.-E. L.: The behaviour of *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase on adsorption to crystalline and amorphous celluloses. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 25: 135-141 (1997).

Schmidhalter, D. R., and Canevascini, G.: Characterization of the cellulolytic enzyme system from the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 431-436 (1992).

Schmidhalter, D. R., and Canevascini, G.: Purification and characterization of two exo-cellobiohydrolases from the brown-rot fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr) Karst. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 551-558 (1993).

Schmidhalter, D. R., and Canevascini, G.: Isolation and characterization of the cellobiose dehydrogenase from the brown-rot fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 559-563 (1993).

Sigoillot, C., Lomascolo, A., Record, E., Robert, J. L., Asther, M., and Sigoillot, J. C.: Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. *Enzyme. Microb. Technol.* 31: 876-883 (2002).

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* 22: 4673-4680 (1994).

Viitanen, H. A.: Modelling the time factor in the development of brown rot decay in pine and spruce sapwood – The effect of critical humidity and temperature conditions. *Holzforschung* 51: 99-106 (1997).

Wilson, M. T., Hogg, N., and Jones, G. D.: Reaction of reduced cellobiose oxidase with oxygen. Is cellobiose oxidase primarily an oxidase? *Biochem. J.* 270: 265-267 (1990).

Yoshida, M., Ohira, T., Igarashi, K., Nagasawa, H., Aida, K., Hallberg, B. M., Divne, C., Nishino, T., and Samejima, M.: Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2050-2057 (2001).

Yoshida, M., Ohira, T., Igarashi, K., Nagasawa, H., and Samejima, M.: Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase from the wood-rotting fungus *Grifola frondosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 217: 225-230 (2002).

Yoshida, M., Igarashi, K., Kawai, R., Aida, K., Samejima, M.: Differential transcription of β -glucosidase and cellobiose dehydrogenase in cellulose degradation by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. 235: 177-182 (2004).

第 4 章

CODEHOP-PCR 法による褐色腐朽菌ゲノムからの セルロース分解関連酵素遺伝子の検出

4.1. 緒言

前章までの研究によって、褐色腐朽菌 *C. puteana* は白色腐朽菌 *P. chrysosporium* と類似したセルロース分解関連酵素をゲノム上に有しており、それらは全て発現していた。しかしながら、発現レベルにおいて結晶性セルロース分解能を有するセルラーゼの発現挙動が *P. chrysosporium* とは異なるため、そのことが酵素的なセルロース分解の制約要因であることが考えられた。一方、近年 JGI によって明らかにされた褐色腐朽菌 *P. placenta* のゲノム情報に基づくと、本菌においては Cel6, Cel7, CDH 遺伝子といった白色腐朽菌のセルロース分解経路における鍵酵素が全て欠失していることが示されている。このことから褐色腐朽菌のセルロース分解のもう一つの制約要因としてゲノム上におけるセルロース分解関連酵素遺伝子の存在有無が挙げられると考えた。

現在、褐色腐朽菌によるセルロース分解酵素系に関する情報は非常に乏しい。褐色腐朽菌によるセルロース分解酵素に関する報告のほとんどがエンド型の酵素に焦点が当てられてきた (Bailey et al. 1969, Herr et al. 1978, Ishihara and Shimizu 1984, Kleman-Leyer and Kirk 1994, Clausen 1995, Mansfield et al. 1998, Cohen et al. 2005, Valaskova 2006)。したがって、白色腐朽菌の多くで見られるような CDH や CBH を褐色腐朽菌は生産しないと考えられてきた (Highley 1974, Eriksson 1990)。これらのことから、これまで褐色腐朽菌は CBH と EG の協調的な結晶性セルロース分解システムを失ったと信じられてきており、酵素的なセルロース分解メカニズムではなく、ラジカル種等の非酵素的なセルロースの酸化分解のメカニズムへと議論は移されていった (Highley 1973, Koenigs 1974a, b, Highley 1980)。

そこで本章においては数種類の褐色腐朽菌ゲノム DNA より Cel6, Cel7 遺伝子、また Cel6 および Cel7 遺伝子の付随する CBM、そして CDH 遺伝子の分布について CODEHOP-PCR を用いることで明らかにし、褐色腐朽菌におけるセルロース分解関連酵素遺伝子の存在と、木材腐朽菌の進化系統をふまえて考察した。

4.2. 実験手法

4.2.1. 菌株および培養

本章の供試菌の株名および生物学的分類はTable 4. 1に示した。菌の接種に備え、全ての菌は3.9 % (w/v)のポテトデキストロース寒天培地(PDA agar; Nihon Pharmaceutical, Tokyo, Japan)において26.5 °C, 7日間静置培養し、4°Cにて保存しておいた。

Table 4. 1. Fungal strains used in this study.

Strain	Type of decayed wood	Taxonomy (Family)
<i>Fomitopsis palustris</i> FFPRI0507	Brown-Rot	Coriolaceae
<i>Fomitopsis pinicola</i> NBRC 8705	Brown-Rot	Coriolaceae
<i>Neolentinus lepideus</i> A397	Brown-Rot	Gloeophyllaceae
<i>Postia placenta</i> MAD-698	Brown-Rot	Coriolaceae
<i>Serpula lacrymans</i> WD-1707	Brown-Rot	Coniophorineae
<i>Lenzites betulinus</i> FK142	White-Rot	Schizophyllaceae
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> K-3	White-Rot	Corticaceae
<i>Pycnoporus coccineus</i> HT4	White-Rot	Polyporaceae
<i>Schizophyllum commune</i> WD-1638	White-Rot	Schizophyllaceae
<i>Trametes versicolor</i> FFPRI1030	White-Rot	Coriolaceae

4.2.2. 菌糸からの DNA の抽出および rDNA 上の Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域での種の同定

PDAプレート培地において保存しておいた各菌をパンチで打ち抜き、500 ml 三角フラスコ中200 mlのPotato Dextrose Broth (PDB)培地において26.5 °C, 3日間振とう培養を行い、生育した菌糸を回収した。回収した菌糸を液体窒素下にて乳鉢と乳棒を用いて破碎後、DNeasy plant maxi kit (Qiagen, Hilden, Germany)によってDNAを抽出した。全DNAの濃度はGene Spec I (Naka Instruments, Japan)を用いて260 nmにおける吸光度の値から求め、純度は260/280 nmの比より算出した。濃度測定後、全ての菌からのDNA濃度が20 ng/mlになるように調整した。菌株の同定はリボソームDNA (rDNA) 領域における2つの介在配列 (Internal transcribed spacer, ITS IおよびITS II) とその間に位置する5.8 S領域をデータベースと比較することによって行った。その際、ITS領域の増幅は担子菌に特異的なプライマー対ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')およびITS4-B (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3')を用いて増幅した(Jasalavich et al 2000)。決定したそれぞれの木材腐朽菌由来のITS領域の塩基配列に加えて、NCBIデータベースに登録されている木材腐朽菌のITS領域の塩基配列を引用し、MAFFTソフトウェア (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>)によりE-INS-iアルゴリズムを用いてマルチプルアライメントを行い、系統解析を行った。系統樹ファイルはMAFFTサーバにより

Minimum Linkage法を用いて出力後、FigTreeバージョン1.1.2によって系統樹を作成した。外群を作成するために子囊菌*Aspergillus niger* および *Trichoderma reesei* 由来のrDNAのデータをNCBI nucleotide sequence database (*A. niger*; NW_001594105 from *A. niger* CBS 513.88 and *T. reesei*; Z48933 from *T. reesei* ATCC 24449 and 26921)より取得し、外群とした。

4.2.3. CODEHOPプライマー設計

Cel6遺伝子、Cel7遺伝子、そしてCDH遺伝子をクローニングするため、プライマーはCOnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP) プログラムを用いて作成した。Cel6遺伝子、Cel7遺伝子については第2章において*C. puteana*由来Cel6およびCel7遺伝子のクローニングに使用したCODEHOPを用いた。そしてCDH遺伝子については担子菌由来の酵素に加え、子囊菌由来アミノ酸配列まで含めてEBI-ClustalW server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>)に供することでアライメント解析を行った。アライメントデータはBlocks Multiple Alignment Processor (http://blocks.fhrc.org/blocks/process_blocks.html)にかけることで相同タンパク質の保存性の高い領域においてギャップなしのアミノ酸セグメントを作成した。そのアミノ酸セグメントを直接CODEHOPプログラムに出力することでプライマーを設計した。本プログラムにおいてはコドン使用頻度を担子菌モード (*Pleurotus ostreatus*) に選択したが、より全ての菌において共通性を持たせるため、プライマーの数塩基を改変した。Cel6、Cel7、そしてCDH遺伝子において用いたプライマーセットおよびロケーションはFig. 4. 1に示した。また、CODEHOP-PCRのポジティブコントロールとして真核生物で広く分布していることが知られている解糖系酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GPD: 1. 2. 1. 12) 遺伝子をクローニングした。GPD遺伝子のCODEHOPプライマーはNCBIデータベースに登録されている担子菌由来アミノ酸配列のアライメントより作成し、フォワードプライマー (5'-CGGCCGTATCGTCCTCmgnaaygcnbt-3')およびリバースプライマー (5'-GCGAGTAGCCCCACTCGttrtacctacca-3')を用いてPCRを行った。

4.2.4. PCR反応

全てのPCR反応は前述にて調整した各菌の20 ng全DNAを鋳型として、200 μ M dNTP、300 pMプライマー、1.5 mM MgSO₄、0.5 U of KOD-plus ver.2 DNA polymerase (TOYOBO, Japan)そして1x buffer for KOD plus-ver. 2を混合し、全量25 μ lとして行った。PCRによる増幅はPCR

thermal cycler Dice model TP600 (TaKaRa Bio, otsu, Japan)を用いた。CODEHOPプライマーを用いたGPD、Cel6、Cel7、そしてCDH遺伝子の増幅におけるPCR温度サイクルはタッチダウン(A)と標準的な3ステップのPCR(B)に分けて行った。まず、最初に94°Cで2分の変性を行った後、(A) 98 °C10秒、60 °C (-0.5 °C/サイクル)30秒、68 °C1-1.5分を15サイクル行い、引き続いて(B) 98 °C10秒、53 °C30秒、68 °C1-1.5分を20サイクル行った。そして最後に68°C2分間の伸長を行い、4 °Cで保持した。伸長時間は各PCR反応において予測される最も大きな断片の大きさに合わせて適用した。PCR産物が得られなかった場合においては、タッチダウン過程におけるアニーリング温度を1 °Cずつ下げるか、もしくは他のアミノ酸セグメントにおいて作成したCODEHOPプライマーを用いてnestPCRを行うことで目的の断片を取得した。PCR産物は1 x TAE (10 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) およびエチジウムブロミド(EtBr)の入った2 %アガロースゲルにて電気泳動を行い、分離した。バンドはUVライト下で DNAにインターカレートしたEtBrの蛍光で検出し、撮影した。

4.2.5. PCR増幅産物のシーケンス解析

PCR産物は全てZero Blunts TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen)にライゲーションし、大腸菌を形質転換後、プラスミドを抽出し、Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences)を用いたシーケンスをDNA sequencer SQ5500E (Hitachi Electronics Engineering)にて行った。決定した塩基配列について、ITS領域はNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)のBLASTN with nucleotide collection (nr/nt)データベースに、GPD、Cel6、Cel7、そしてCDH遺伝子はBLASTX with non-redundant protein sequences (nr)データベースに相同性検索をかけた。

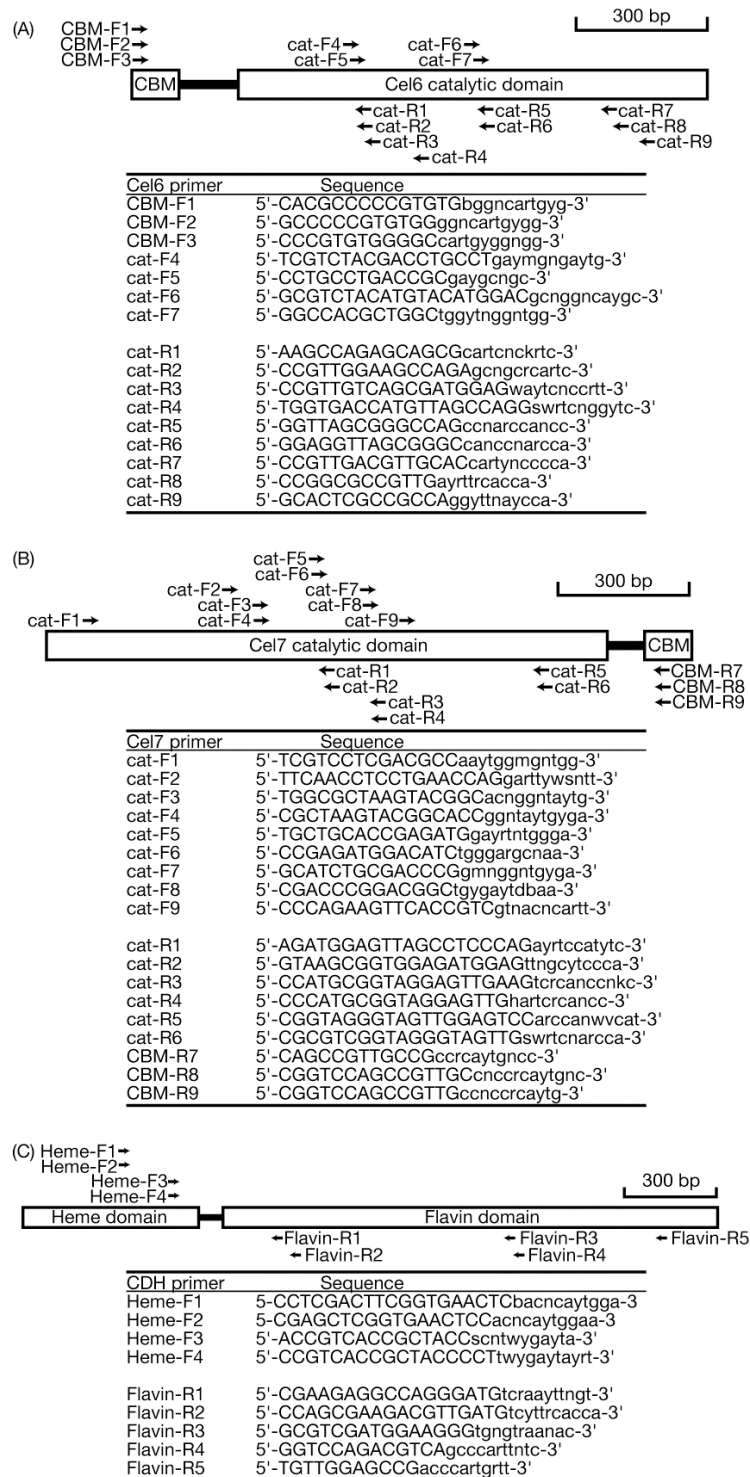


Fig. 4. 1. Primer locations and nucleotide sequences of CODEHOP primer for the detection of (A) *cel6* gene, (B) *cel7* gene, (C) *cdh* gene. “cat” means the constructed primer location at catalytic domain, “CBM” means it at CBM, “Heme” means it at heme domain, “Flavin” means it at flavin domain, respectively.

4.3. 結果

4.3.1. ITS 領域での種の同定

rDNA 上 ITS 領域の増幅において、ITS1-F (higher fungus specific primer) および ITS4-B (basidiomycete specific) を用いた PCR によって、単一のバンド(800-950 bp)を供試菌全てより得た。全ての PCR 産物の塩基配列を明らかにし、NCBI の BLASTN 検索を行った。その結果、*L. betulinus* を除く全てのサンプルが各々の菌株に該当する種と 99- 100 %の同一性を示した。*L. betulinus* はデータベースに ITS1, 5.8S, そして ITSII の塩基配列データベースが存在しなかったが、*L. betulinus* は *Trametes* sp. Vega230 および *Polyporales* sp. VegaE3-65 と 100 %の同一性を示した。

4.3.2. CODEHOP プライマーを用いた木材腐朽菌ゲノムからの Cel6、Cel7、CDH 遺伝子の検出

まず、CODEHOP プライマーの信頼性を確かめるために、CODEHOP プライマーを用いて GPD 遺伝子の取得を行った。その結果、GPD 遺伝子においては作成した CODEHOP プライマー対によって供試菌全てより GPD 遺伝子断片が取得された (Fig. 4. 2)。その他の CODEHOP プライマーを用いて PCR を行ったが、GPD 遺伝子においては、ほぼ全てのプライマー対を用いた場合に明瞭な PCR 産物の増幅が確認できた。それらの PCR 産物のうち、最も分子量の大きいものの塩基配列を確認し、BLASTX で検索したところ、全ての菌より担子菌由来 GPD 遺伝子と高い相同性を有する遺伝子断片配列であることが明らかとなった。取得した塩基配列を MAFFT サーバーにおいてアライメント解析に供した結果、各配列同士 66-90%の相同性を有しており、さらにイントロンが 2-6 つ挿入されていることが明らかとなった。

次にセルロース分解関連酵素として Cel6、Cel7、CDH について CODEHOP-PCR を用いて各菌からの検出を試みた。それぞれの遺伝子の検出について、GH6 においては担子菌および子囊菌由来 Cel6 アミノ酸アライメントより 6 つの保存性の高いアミノ酸ブロックから 45 対のプライマーペアを設計した。Cel7 においては同様に作成した 8 つのブロックから 65 対のプライマーペアを設計した。CDH においては 5 つのブロックからヘムドメインとフラビンドメインを含むよう、20 対のプライマーペアを設計した。

Cel6 遺伝子について、まず、触媒ドメインにおけるプライマー対 F4-F7 vs R4-R9 の 18 組の組み合わせにおいて PCR を行った結果、*C. puteana*、*S. lacrymans*、*L. betulinus*、*P.*

chryso sporium, *P. coccineus*, *S. commune*, 及び *T. versicolor* より Cel6 遺伝子のクローニングに成功した。そして CBM 領域において作成したフォワードプライマーと触媒ドメインにおいて作成したリバースプライマーで PCR を行った組み合わせ F1-F3 vs R1-R9 の 27 組の組み合わせにおいては F1 vs R4、F1 vs R6、F1 vs R8、F2 vs R6、F2 vs R8、F3 vs R8 のプライマーセットにおいて *C. puteana*、*S. lacrymans*、*L. betulinus*、*P. chryso sporium*、*P. coccineus*、*S. commune*、及び *T. versicolor* より Cel6 遺伝子ホモログを検出した。一方、Cel7 遺伝子については、触媒ドメインにおいてのプライマー対 F1-F9 vs R1-R6 の 38 組の組み合わせにおいて PCR を行った結果、*C. puteana*、*L. betulinus*、*P. chryso sporium*、*P. coccineus*、*S. commune*、及び *T. versicolor* より Cel7 遺伝子断片を取得することができた。また触媒ドメインにおいて作成したフォワードプライマーと CBM 領域において作成したリバースプライマーの組み合わせ F1-F9 vs R7-R9 の 27 組で PCR を行った結果、*L. betulinus*、および *P. chryso sporium* より Cel7 遺伝子ホモログを検出した。そして、CDH 遺伝子については、ヘムドメインとフラビンドメインを含むプライマー対 20 組のプライマーセットにおいて PCR を行った結果、*C. puteana*、*S. lacrymans*、*L. betulinus*、*P. chryso sporium*、*P. coccineus*、*S. commune*、及び *T. versicolor* より CDH 遺伝子断片を取得することに成功した。塩基配列決定後、BLASTX 検索をしたところ、全て担子菌由来 Cel6、Cel7、CDH 遺伝子と高い相同性を有していた。以上の遺伝子検出結果においてポジティブクローンが得られた菌および遺伝子の一覧表を Table 4. 1 に示した。また、MAFFT においてアライメント解析を行うことで各菌由来の取得した遺伝子の塩基配列の同一性を調べたところ、それぞれ Cel6 遺伝子が 37-87% であり、Cel7 遺伝子が 56-78%、CDH 遺伝子の塩基配列が 28-69% であった。

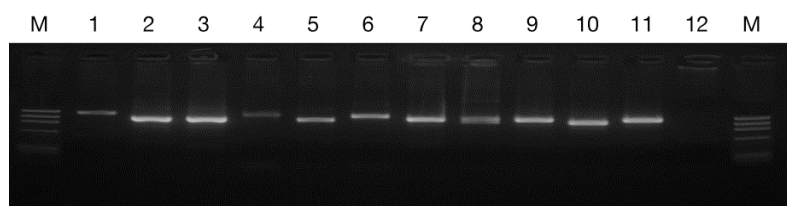


Fig. 4. 2. PCR fragments of *gpd* gene amplified using *gpd* CODEHOP primer pair from genomic DNA of wood-rot fungi. Electrophoresis in 2 % (wt/vol) agarose in 1 x TAE. The two outer lanes contain molecular weight markers, fX174-*Hae* III digest (M). lane 1, *Coniophora puteana*; lane 2, *Fomitopsis palustris*; lane 3, *Fomitopsis pinicola*; lane 4, *Neolentinus lepideus*; lane 5, *Postia placenta*; lane 6, *Serpula lacrymans*; lane 7, *Lenzites betulinus*; lane 8, *Phanerochaete chryso sporium*; lane 9, *Pycnoporus coccineus*; lane 10, *Schizophyllum commune*; lane 11, *Trametes versicolor*; lane 12, Negative control (i. e., PCR template was used distilled water.).

Table. 4. 1. The results of detection for cellulolytic enzymes on genomic DNAs of wood rot fungi by CODEHOP-PCR in this study

Fungi/Region	<i>cel6</i>		<i>cel7</i>		<i>cdh</i>
	catalytic	catalytic + CBM	catalytic	catalytic + CBM	Heme + Flavin
<i>C. puteana</i>	+	+	+	-	+
<i>F. palustris</i>	-	-	-	-	-
<i>F. pinicola</i>	-	-	-	-	-
<i>N. lepideus</i>	-	-	-	-	-
<i>P. placenta</i>	-	-	-	-	-
<i>S. lacrymans</i>	+	+	-	-	+
<i>L. betulinus</i>	+	+	+	+	+
<i>P. chrysosporium</i>	+	+	+	+	+
<i>P. coccineus</i>	+	+	+	-	+
<i>S. commune</i>	+	+	+	-	+
<i>T. versicolor</i>	+	+	+	-	+

4.4. 考察

これまで木材腐朽担子菌は腐朽材の色によって分類分けされてきており、白色腐朽と褐色腐朽の2種類に分類されてきた。そしてセルロース分解メカニズムも木材腐朽の形態的な分類を基に考えられてきた。その結果、白色腐朽菌はCBHおよびEGを生産することで結晶性セルロースを酵素的に加水分解するメカニズムを持つと言われてきた。一方、対照的にはほとんどの褐色腐朽菌でCBHは同定されていない(Highley 1973, 1980)。それゆえに、褐色腐朽菌によるセルロース分解に関しては酵素的な加水分解メカニズムの代わりに酸化反応のプロセスがこれまでに報告されている(Koenigs 1974, Highley 1977)。木材腐朽菌による異なったセルロース分解酵素系を生み出す要因を分子生物学的な側面から見つめるために、本章においてはCODEHOP-PCRによるCel6およびCel7遺伝子の検出、それらに付随するCBMの存在、CDH遺伝子、そしてrDNA上のITS領域の塩基配列より作成した分子系統樹を以って木材腐朽菌の進化について考察を加えた。

CODEHOPプライマーを用いたCel6、Cel7、そしてCDH遺伝子の増幅を試みたが、その前にCODEHOPプライマーの増幅信頼性を確かめるために、供試菌よりCODEHOPプライマーを用いたGPD遺伝子の増幅を行った。その結果、GPD遺伝子は供試菌全てより検出できたことから、CODEHOPプライマーを用いたゲノムからの未知遺伝子のスクリーニングに有用であると考えられた。そして次に、Cel6、Cel7、そしてCDH遺伝子の検出を行った。その結果、白色腐朽菌からはCel6、Cel7、そしてCDH遺伝子が全てクローニングできたのに対して、褐色腐朽菌からはCel6、CDH遺伝子が*C. puteana* および*S. lacrymans* から、Cel7遺伝子が*C. puteana* のみより検出でき、他の褐色腐朽菌からは検出されなかった。また、Cel6およびCel7遺伝子について、塩基配列を確認し、イントロン予測、および推定アミノ酸配列を解析したところ、白色腐朽菌由来Cel6、Cel7、褐色腐朽菌由来Cel6、Cel7のいずれもループ構造と考えられるアミノ酸配列を有しており、CBH型の酵素であることが明らかとなった。これまで褐色腐朽菌はCBHを生産しないことが報告されてきたが、Cel6およびCel7に属するCBHをゲノム上に有する褐色腐朽菌も存在することが明らかとなった。今回のPCRによる検出のみではクローニングされてこなかった他の褐色腐朽菌のゲノム上にCel6およびCel7遺伝子が存在しないと予想されるが、その中の褐色腐朽菌*P. placenta* MAD-698はゲノム情報が公開されており、ゲノム上にCel6、Cel7、そしてCDH遺伝子が欠如していることが明らかとなっている。このことから、ゲノム上にCel6およびCel7遺伝子が存在しない菌が存在することが明らかとなり、*P. placenta* を含む4種の褐色腐朽菌においては、ゲノム上において

Cel6、Cel7、そして CDH 遺伝子が欠如していることが結晶性セルロースの酵素的な分解への制約要因となっている可能性が示唆された。そして、これらの菌株はセロビオース代謝まで含めたセルロース分解機構が白色腐朽菌の場合とは大きく異なることが示唆された。

さらに CBM については、Cel6 では検出された全ての遺伝子に CBM が分布していることが明らかとなったが、Cel7 については白色腐朽菌の *Lenzites betulinus* および *P. chrysosporium* のみより検出された。このことは、白色腐朽菌においても、結晶性セルロースに対する分解能力について菌種による能力差を遺伝子あるいは酵素レベルで再考していく必要性を示唆している。さらに、すべての白色腐朽菌の Cel6 においては CBM の存在が確認されたが、Cel7 においては CBM の存在が限られていることから、白色腐朽菌による結晶性セルロースの分解における Cel6 の存在の重要性を示唆するものと考えられる。

本章において、供試した白色腐朽菌からはゲノム上における CBH 遺伝子および CDH 遺伝子の存在が明らかとなり、褐色腐朽菌からはそれらのセルロース分解関連酵素群を一部有するものと完全に検出されなかったものが存在していたことから、木材腐朽菌の腐朽型と一致してゲノム上におけるセルロース関連酵素群の存在が考えられたが、Fig. 4.3 に示した ITS 領域における進化系統樹から、褐色腐朽菌と白色腐朽菌は分子進化的に明確に分かれるものではなく、白色腐朽菌、褐色腐朽菌それぞれが菌種にもしくは属に依存して系統進化しているものであることが見て取れる。このことから、木材腐朽菌の腐朽型と菌の系統進化は一致しないことが明らかとなった。以上の結果より、褐色腐朽菌における結晶性セルロース分解能力の制約要因には、*C. puteana* のように、Cel6、Cel7、そして CDH 遺伝子の発現レベルおよび生産される酵素の機能レベルにおいて制御されている褐色腐朽菌もいれば、それらの酵素遺伝子がゲノムレベルにおいて既に制御されている褐色腐朽菌が存在し、また、その制御レベルは褐色腐朽菌の菌種に依存していることが明らかとなった。

また、興味深いことに、ゲノムが開示されている白色腐朽菌 *P. chrysosporium* と、褐色腐朽菌 *P. placenta* は菌の進化的に非常に近縁であることが Fig. 4.3 より見て取れる。これほど進化系統的に近縁でありながらゲノム上におけるセルロース分解関連酵素遺伝子群の有無が明確に分かれていることはゲノム上におけるこれらの遺伝子に何らかの特徴が考えられる。そこで、JGI のホームページより両者のゲノム配列を利用し、*cel6*、*cel7*、そして *cdh* 遺伝子座についての比較ゲノム解析を行った(*P. chrysosporium* genome information:

<http://genome.jgi-psf.org/Phchr1/Phchr1.home.html>, *P. placenta* genome information:

<http://genome.jgi-psf.org/Pospl1/Pospl1.home.html>)。Fig. 4.4 では *P. chrysosporium* の *cel6* 周辺の

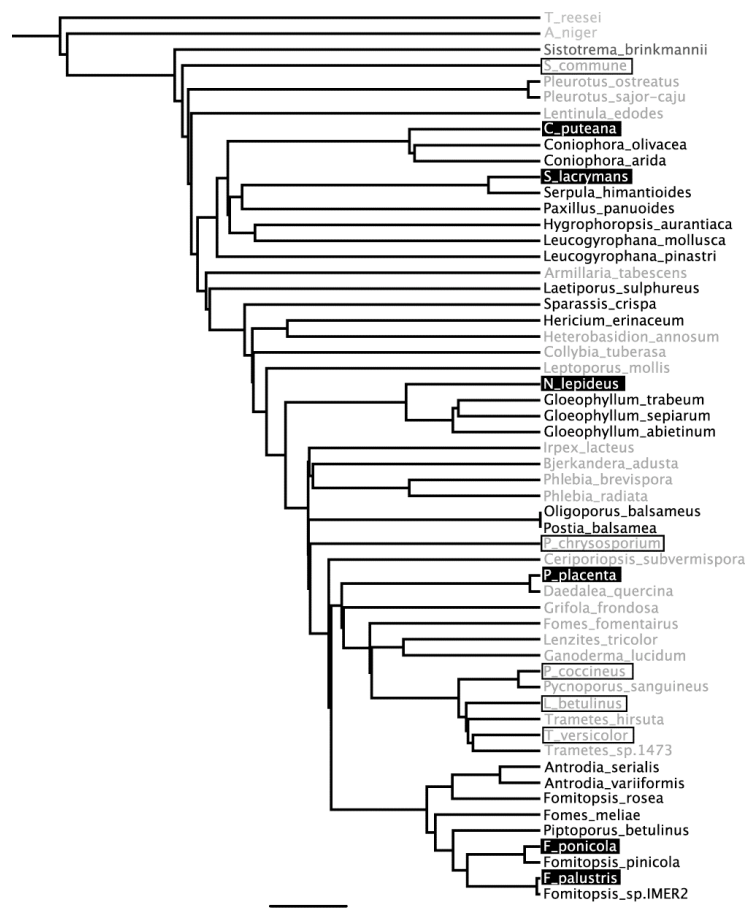


Fig. 4. 3. The Phylogenetic tree of ITS regions from wood-rot. ITS sequences were aligned by MAFFT server using minimum linkage method. The ITS sequences of *A. niger* (accession number; NW_001594105 from *A. niger* CBS 513.88) and *T. reesei* (accession number; Z48933 from *T. reesei* ATCC 24449 and 26921) obtained from NCBI nucleotide sequence database were used as out-group. Brown-rot fungi from database are indicated as black characters, and white-rot fungi as gray characters. Brown-rot fungi and white-rot fungi whose ITS sequences were determined in this chapter are indicated as black boxed and black-bordered line, respectively.

遺伝座と、その遺伝座に相当すると考えられる *P. placenta* の遺伝座を比較したものである。Fig. 4. 5 では同様に *cdh* 遺伝子周辺の遺伝座について解析した図を示した。両遺伝座ともに *P. placenta* においては *cel6*、*cdh* 遺伝子が欠損し、他のタンパク質をコードする遺伝子もしくは非コード領域に置換されていることが伺える。一方、Fig. 4. 6 では *P. chrysosporium* 由来 *cel7* 遺伝子のアイソザイムの遺伝子配座について示した。*P. chrysosporium* 由来の *cel7* アイソザイムは幾つかのクラスタ構造を有しており、中でも *cel7F* は同様の完全配列が 2 コピー存在し、クラスタ構造を為している上に、同様の部分配列を他の遺伝座にも有していた。また、*P.*

chryso sporium 由来の *cel7* アイソザイムの周辺の遺伝子について *P. placenta* においても検索したが、どの *cel7* アイソザイム遺伝子座の周りも *P. placenta* ゲノム遺伝子座とは共通の様子は見られなかった。これらのことから、*cel7* アイソザイム周辺の遺伝子の転移が頻繁に行われてきたこと、さらに *cel7* 遺伝子に関するレトロトランスポゾンの可能性を示唆する結果を得た。これまでのゲノム生物学において、トランスポゾン、レトロトランスポゾンは転移、または複製的転移によって、遺伝子座の変異や増幅は考えられてきたが、木材腐朽菌におけるセルロース分解関連酵素遺伝子群の挿入や欠如の機構は突然変異等、未だ解明することのできない領域にあると思われる。

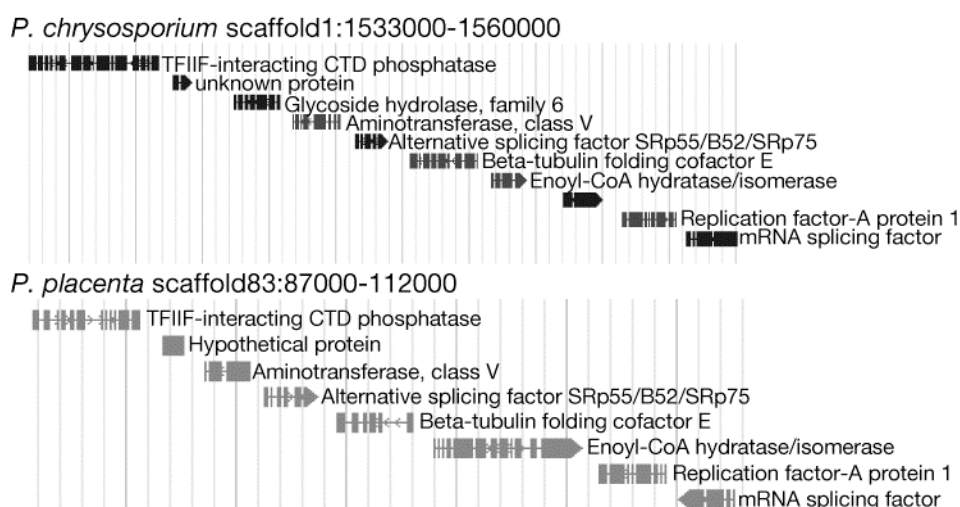


Fig. 4. 4. Comparative genome analysis about gene loci of *cel6* from *P. chryso sporium* and its surroundings with those from *P. placenta*. Both of the genomes were annotated by Joint Genome Institute from DOE.

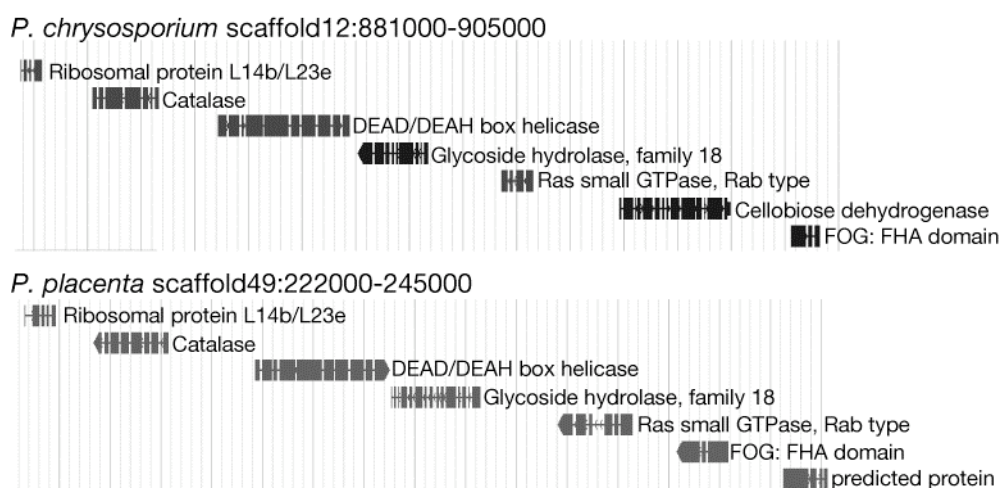


Fig. 4. 5. Comparative genome analysis about gene loci of *cdh* from *P. chryso sporium* and its surroundings with those from *P. placenta*. Both of the genomes were annotated by Joint Genome Institute from DOE.

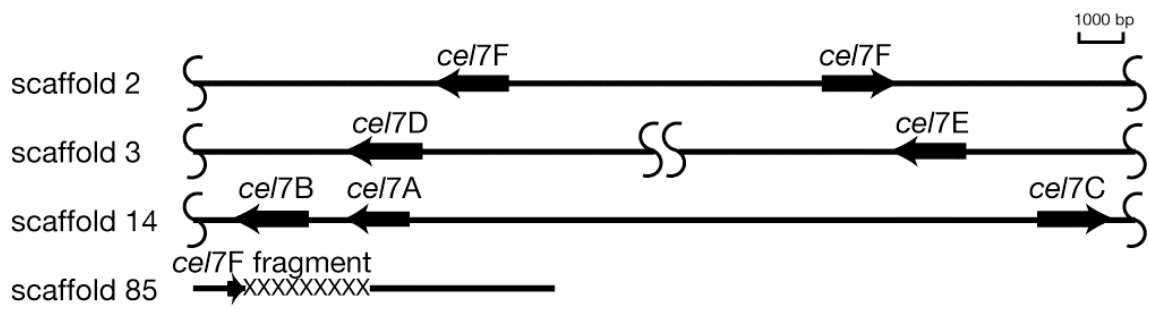


Fig. 4. 6. Gene loci map of *cel7* isozyms from *P. chrysosporium*.
 xxxxxxx region indicates unreadable bases by Joint Genome Institute from DOE.

参考文献

- Ayers, A. R., Ayers, S. B., and Eriksson, K. E.:** Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*. Eur. J. Biochem. 90: 171-181 (1978).
- Bailey, P. J., Lese, W., Roesch, R., Kilich, G., and Afting, E. G.:** Cellulase (beta-1,4-glucan 4-glucanohydrolase) from the wood-degrading fungus *Polyporus schweinitzii* Fr. I. Purification. Bichim. Biophys. Acta. 185: 381-391 (1969).
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, T., Gibson, T. J., Higgins, D. G., and Thompson, J. D.:** Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic. Acids. Res. 31: 3497-3500 (2003).
- Clausen, C. A.:** Dissociation of the Multienzyme Complex of the Brown-Rot Fungus *Postia-Placenta*. FEMS Microbiol. Lett. 127: 73-78 (1995).
- Cohen, R., Suzuki, M. R., and Hammel, K. E.:** Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2412-2417 (2005).
- Eriksson, K. -E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P.:** Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. New York. Springer-Verlag. (1990).
- Eriksson, K. E., Pettersson, B., and Westermarck, U.:** Oxidation: an important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. FEBS Lett. 49: 282-285 (1974).
- Felsenstein, J.:** Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap. Evolution 39: 783-791 (1985).
- Foster, S. J., and Monahan, B. J.:** Whole genome amplification from filamentous fungi using Phi29-mediated multiple displacement amplification. Fungal Genet. Biol. 42: 367-375 (2005).
- Gadkar, B., and Rillig, M. C.:** Application of Phi29 DNA polymerase mediated whole genome amplification on single spores of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. FEMS Microbiol. Lett. 242: 65-71 (2005).
- Henrissat, B.:** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280: 309-316 (1991).
- Herr, D., Baumer, F., and Dellweg, H.:** Purification and Properties of an Extracellular Endo-1,4-Beta-Glucanase from *Lenzites-Trabea*. Arch. Microbiol. 117: 287-292 (1978).

- Highley, T. L.:** Influence of carbon source on cellulase activity of white-rot and brown-rot fungi. *Wood and Fiber* 5: 50-58 (1973).
- Highley, T. L.:** Cellulose Degradation by Cellulose-Clearing and Non-Cellulose-Clearing Brown-Rot Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1145-1147 (1980).
- Igarashi, K., Samejima, M., and Eriksson, K. E.:** Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition. *Eur. J. Biochem.* 253: 101-106 (1997).
- Igarashi, K., Samejima, M., Saburi, Y., Habu, N., and Eriksson, K. E.:** Localization of cellobiose dehydrogenase in cellulose-grown cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genet. Biol.* 21: 214-222 (1997).
- Igarashi, K., Tani, T., Kawai, R., and Samejima, M.:** Family 3 beta-glucosidase from cellulose-degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a glucan 1,3-beta-glucosidase. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 572-576 (2003).
- Ishihara, M., and Shimizu, K.:** Purification and properties of two extracellular endo-cellulases from the brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. *Mokuzai Gakkaishi* 30:79-87 (1984).
- Jasalavich, C. A., Ostrofsky, A., and Jellison, J.:** Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4725-4734 (2000).
- Kleman-Leyer, K., Agosin, E., Conner, A. H., and Kirk, T. K.:** Changes in Molecular Size Distribution of Cellulose during Attack by White Rot and Brown Rot Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1266-1270 (1992).
- Kleman-Leyer, K. M., and Kirk, T. K.:** Three Native Cellulose-Depolymerizing Endoglucanases from Solid-Substrate Cultures of the Brown Rot Fungus *Meruliporia (Serpula) incrassata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2839-2845 (1994).
- Koenigs, J. W.:** Hydrogen peroxide and iron: A proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes. *Wood Fiber* 6: 66-80. (1974a).
- Koenigs, J. W.:** Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. *Arch. Microbiol.* 99: 129-145. (1974b).
- Mansfield, S. D., Saddler, J. N., and Gubitz, G. M.:** Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*. *Enzyme Microb. Technol.* 23:

133-140 (1998).

Rose, T. M.: CODEHOP-mediated PCR - a powerful technique for the identification and characterization of viral genomes. *Viol. J.* 2:20-43 (2005).

Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrokovski, S., McCallum C. M., and Henikoff, S.: Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* 26: 1628-1635 (1998).

Samejima, M., Sugiyama, J., Igarashi, K., and Eriksson, K. E. L.: Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose. *Carbohydr. Res.* 305: 281-288 (1997).

Streamer, M., Eriksson, K. E., and Pettersson, B.: Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. Functional characterization of five endo-1,4-beta-glucanases and one exo-1,4-beta-glucanase. *Eur. J. Biochem.* 59: 607-613 (1975).

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G.: The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882 (1997).

Valaskova, V., and Baldrian, P.: Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus*-production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology* 152: 3613-3622 (2006).

Wood, T. M., and McCrae, S. I.: Cellulase from *Fusarium solani*: purification and properties of the C1 component. *Carbohydr. Res.* 57: 117-133 (1977).

Yoshida, M., Igarashi, K., Kawai, R., Aida, K., and Samejima, M.: Differential transcription of beta-glucosidase and cellobiose dehydrogenase genes in cellulose degradation by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 235: 177-182 (2004).

第 5 章

総括

本研究では褐色腐朽菌 *C. puteana* が典型的な褐色腐朽型の木材腐朽様式およびセルロース分解様式を示すにもかかわらず、セルロース分解系において生産する酵素パターンが白色腐朽菌と類似していることが確認されていたことから、本菌をいわば白色腐朽菌と褐色腐朽菌の中間に位置するような菌と考え、セルロース分解に関与すると思われる酵素について解析を行った。まず、*C. puteana* 由来 CBH として Cel6 および Cel7 遺伝子についてその配列をゲノム上から取得し、配列解析によって酵素構造を他の白色腐朽菌や子囊菌由来の酵素と比較することで推測した。その結果、CBM の欠如という酵素の構造ならびに機能的な制約、あるいは CBM を保有する Cel6 においては mRNA の低発現という要因によって本菌が結晶性セルロース分解に制約を受けていることが明らかとなった。次に *C. puteana* 由来 CDH について、同様の解析を行ったが、他の白色腐朽菌由来の CDH と比較して、本酵素からは明確な酵素構造ならびに機能的な制約は見られず、他の白色腐朽菌由来 CDH と同様、セロビオースまたはセロオリゴ糖代謝に関与していることが推察された。

C. puteana のセルロース分解関連酵素遺伝子において Cel6、Cel7 遺伝子という主要なセルラーゼに酵素構造、ならびに mRNA の発現レベルにおいて白色腐朽菌とは異なる様子が見られたことから、他の褐色腐朽菌についてさらに理解を深めていくことを目的として、Cel6、Cel7、そして CDH 遺伝子についてゲノム上を CODEHOP-PCR 法によって精査した。その結果、*C. puteana*、および *S. lacrymans* 以外の多くの褐色腐朽菌においては、ゲノム上において Cel6、Cel7、そして CDH 遺伝子が欠如している可能性が示唆された。また、GPD 遺伝子の配列解析に基づく分子系統樹から、褐色腐朽菌は 2 つのグループに分類されることが明らかとなり、ひとつのグループは木材腐朽菌の進化の初期過程で白色腐朽菌から進化してきており、その中に Cel6 や CDH といったセルロース分解関連酵素遺伝子をゲノム上に有していることが明らかとなった *C. puteana*、および *S. lacrymans* が含まれていた。また、他のグループは白色腐朽菌として進化した後新しい進化として発生してきた褐色腐朽菌であることが示唆された。そのグループの中にはゲノム情報から Cel6、Cel7、そして CDH 遺伝子といったセルロース分解関連酵素遺伝子がすべて欠落している *P. placenta* が含まれていた。本研究における PCR 法によるスクリーニングは、コドンユースエージや酵素遺伝子配列が大きく他の菌とは離れている可能性などを考慮すると、この結果からゲノム上における各酵素遺伝子の有無については保証できるものではないが、本研究での CODEHOP-PCR 法によってスクリーニングされてこなかったものに対しては、少なくとも各遺伝子における子囊菌を含めた保存性の高いアミノ酸配列部分が存在しない可能性が高く、スクリーニング結果として褐色腐朽菌におけ

る酵素遺伝子分布についてのある一定の傾向が示されたものであると考えられる。また、*C. puteana*、および *S. lacrymans* において検出された Cel6 と CDH に関して、これまで CDH はセルロース分解系において Cel7 とのコンビネーションで扱われることが多かったが、Cel6 と CDH の関係についての協調的な発現や作用機作を考慮していかなくてはならないと思われた。

以上の結果から、褐色腐朽菌における結晶性セルロース分解能力の制約要因には、Cel6 および Cel7 遺伝子のゲノムレベル、発現レベル、そして酵素分子の機能レベルのいずれもが関与していること、また、その制御レベルは褐色腐朽菌の菌種に依存していることが明らかとなった。また、白色腐朽菌までを含めて、木材腐朽菌におけるセルロース分解酵素系には非常に多くのバリエーションがあり、そのことが結晶性セルロースの分解能力に関係していることが示唆される。また、セルロース分解系のみならず、白色腐朽菌と褐色腐朽菌の木材分解様式として大きな差異を与えているリグニン分解酵素系においてもゲノムレベル、酵素遺伝子の発現レベル、酵素機能および構造レベルにおいて木材腐朽菌間で調べることで、木材腐朽菌による大きな腐朽形態の違いを与えていた因子が明らかになっていくと思われる。

公表論文一覧

1. **Taira Kajisa, Makoto Yoshida, Kiyohiko Igarashi, Akira Katayama, Takeshi Nishino, and Masahiro Samejima:** Characterization and molecular cloning of cellobiose dehydrogenase from the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *J. Biosci. Bioeng.* 98:57-63 (2004).

2. **Taira Kajisa, Kiyohiko Igarashi, and Masahiro Samejima:** The genes encoding glycoside hydrolase family 6 and 7 cellulases from the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *J. Wood Sci.* (2008). (投稿中)

謝辞

東京大学大学院農学生命科学研究科森林化学研究室の鮫島正浩教授には、研究に関するあらゆることをご指導頂いただけでなく、学会への出席や多くの方とお会いする機会など、未熟な私のために様々なご尽力を承りました。これほどまでに学生のことを考えてくださる教授の下で研究できたことはとても幸せなことだと心より感謝致します。五十嵐圭日子助手には実験全般から、研究者としてのあり方に至るまで全てを教えて頂きました。本当に感謝しております。寺田珠美助手には研究室生活に関する様々なことでお世話になりました。東京農工大学大学院の吉田誠特任准教授には、研究室の先輩として私が学部生の時分より実験や研究に関する全てのことを丁寧に教えて頂き、心より感謝致します。そして、川合理恵博士をはじめとする森林化学研究室の皆さん、徳安健博士をはじめとするOB、OGの皆さんに感謝致します。また、韓国森林科学院のDr. Yoon jeong-Jun氏に感謝致します。森林化学研究室の同期、後輩の皆様からは多くの助言を頂き、大変お世話になりました。御礼申し上げます。

最後に、いついかなる時も私を全ての面で支えてくれた父母、姉、祖父母、そして妻に感謝し、謝辞とさせていただきます。

平成21年3月23日