

論文の内容の要旨

生物材料科学専攻

平成14年度博士課程 進学

氏名 吉田 誠

指導教官名 鮫島正浩

担子菌のセルロース分解系で生産される酸化還元タンパク質に関する分子生物学的研究

木材腐朽担子菌のセルロース分解は一般に、セルラーゼや β -グルコシダーゼなどの加水分解酵素により進行すると理解されてきた。しかしながら、担子菌のセルロース分解において、酸化還元反応の関与を示唆する幾つかの実験結果が報告され、この過程でセロビオース脱水素酵素(CDH)が見いだされた。CDHはヘムとフラビンをそれぞれ別々のドメイン上に含む菌体外フラボヘム酵素であり、セロビオースの還元末端を酸化しラク톤を生じる反応を触媒することが知られているが、これまでのところ生理的にどのような役割を果たしているかは不明である。そこで、本研究ではCDHの機能解析を行い、その生理的機能を明らかにすることを目指し研究を行った。CDHを解析するにあたり、本研究では分子生物学的手法に注目した。分子生物学的手法は、生化学的手法とは異なるアプローチにより、生命現象に対して新たな切り口から多くの情報を得ることを可能にし、さらに遺伝子組換え技術による酵素の大量生産や変異酵素の作成など酵素学的研究においても不可欠な技術である。しかしながら、CDHに関しては、これまで為されてきた分子生物学的な研究例は非常に限られているのが現状である。そこで本研究では、まずCDHの解析に対して種々の分子生物学的手法を導入することを試みた。さらに、近年のゲノム解析の進行に伴い、遺伝子情報や新規タンパク質の情報を得ることが飛躍的に簡便になり、ゲノミックアプローチといった新たな研究スタイルが出来つつある。そこで本研究では、CDHと異なるセルロース分解に関与する酸化還元タンパク質を新たに見いだすため、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のゲノムデータベースを探索し、その結果見いだされたタンパク質の組換え体を生産し、その機能を解析した。

1. 担子菌由来セロピオース脱水素酵素遺伝子のクローニング

ゲノミクスが全盛を迎えつつある昨今、ゲノム解析がなされた生物から目的の遺伝子を簡便にクローニングすることが可能になってきているが、現時点ではゲノム解析が進行している生物はごく僅かであり、多くはクローニングの際に多大な時間とコストを要する。それはCDHの場合も同様であり、これまでにクローニングされてきた*cdh*遺伝子は全てDNAライブラリーを用いた労力の要する方法でなされたものであった。そこで、本研究では特徴的なアミノ酸配列およびモチーフを利用した*cdh*遺伝子のPCRによる簡便なクローニング手法を確立することを目指した。種々のCDH間で保存性が非常に高く、しかもCDHの特徴の一つでもあるGMC酸化還元酵素モチーフに着目して縮重プライマーを設計し、それを用いてセルロース培地で生育させたマイタケから*cdh*遺伝子に相当するcDNA断片を取得することに成功した(Fig. 1)。その後、得られた配列情報に基づきRT-PCRおよびRACEを行い、*cdh*遺伝子全長配列を決定することことに成功した。同様の縮重プライマーを用いて、担子菌*P. chrysosporium*由来のfirst-strand cDNAからも*cdh*遺伝子断片が取得できたことから、本ストラテジーは様々な担子菌からの*cdh*遺伝子クローニングに有用であると見なせた。

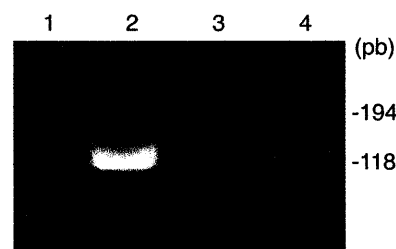


Fig. 1 Electrophoresis of PCR products. 1, *P. chrysosporium* grown on glucose culture; 2, *P. chrysosporium* grown on cellulose culture; 3, *G. frondosa* grown on glucose culture; 4, *G. frondosa* grown on cellulose culture.

2. 酵母菌*Pichia pastoris*によるセロピオース脱水素酵素の異種宿主発現系の構築

遺伝子工学的手法による酵素の組換え体生産技術は、工業的に有用な酵素を大量に作出することを可能するだけでなく、変異体を用いた生化学研究にも大きく寄与する。そこで本研究では酵母菌*Pichia pastoris*を宿主としたCDHの異種宿主発現系の構築を試みた。その結果、組換えCDHを活性型で生産することに成功し、しかも、*P. chrysosporium*培養系で生産された野性CDHや同宿主発現系におけるCDHの約10倍もの効率の生産量を得た(Fig. 2)。さらに組換え体の性質を野生型と比較したところ、スペクトル特性、酵素触媒機能、セルロース吸着能全ての点でほぼ同様の結果が得られた。したがって、この発現系の利用が、今後のCDH機能に対する生化学的解析に大きく寄与するものと考えられる。

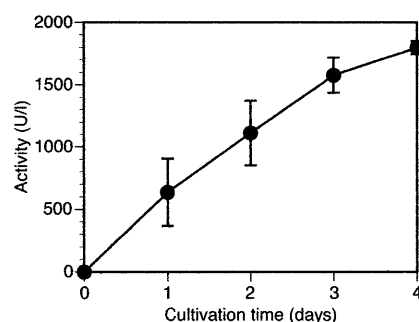


Fig. 2 Course changes of CDH activity in the culture solution of *P. pastoris*. CDH activity was monitored using cytochrome *c* as electron acceptor.

3. セロビオース脱水素酵素遺伝子の発現挙動

*P. chrysosporium*によりセルロース培養液に分泌されるCDHとBGLは、酵素活性の観点からセロビオースに対して互いに競合することが知られている。したがって、本菌のセロビオース代謝には菌体外BGLによるセロビオース加水分解経路もしくはCDHによるセロビオースの酸化経路が存在することになるが、これまで多くの研究者は加水分解経路のみに注目してきており、酸化経路の役割はほとんど理解されていない。そこで本研究では、*bgl*遺伝子および*cdh*遺伝子のセルロース培養系での発現挙動およびセルロースの構成糖に対する発現応答を調べ、セロビオースに対する加水分解反応と酸化反応の関与についての知見を得ることを目的とした。異なる酵素の遺伝子発現を比較する場合、鋭敏で定量性に優れたmRNAの検出技術が要求されるが、一般によく用いられるノーザンブロット解析や競合PCR解析技術は感度や定量性の問題から、僅かな遺伝子発現の変化を追跡することが難しい。そこで本研究ではリアルタイムPCRの技術を採用した。この技術はPCRの高い検出感度と厳密な特異性および非常に正確な定量性を有することから最近様々な分野で注目されている。この手法を用いて発現解析を試みた結果、これまでセロビオースに作用する主要な酵素であると考えられてきた菌体外*bgl*遺伝子の発現はセロビオース存在下で抑制され、一方、*cdh*遺伝子発現は明らかに誘導されることが明らかとなった(Fig. 3)。この結果から、セルラーゼにより切り出されたセロビオースはBGLによる加水分解ではなく、CDHによりセロビオノラクトンに酸化されることが示唆された。

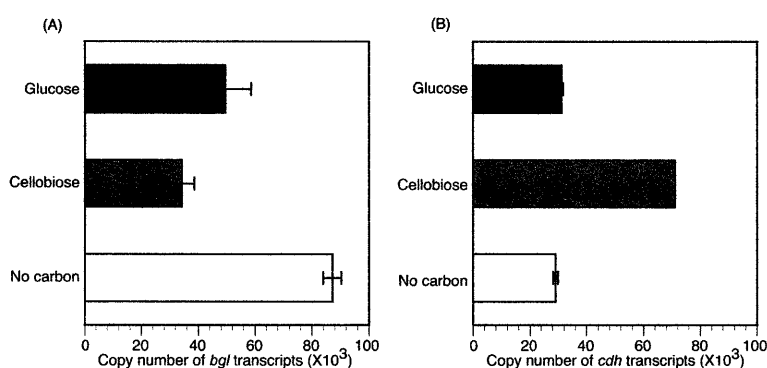


Fig. 3 Effects of carbon sources on *bgl* (A) and *cdh* (B) transcription. The fungus was first cultivated in medium containing 2% glucose for 3 days, then the mycelia were harvested, washed and transferred to culture medium containing 2% glucose, 2% cellobiose or no carbon source. After another 6 h of incubation, total RNA (75 ng) extracted from the mycelium was subjected to real-time quantitative PCR. Each error bar shows the standard error in triplicate tests for each sample.

4. ヘムドメインの多様性

CDHは脱水素酵素であることからセロビオースの酸化に伴い電子受容体の還元が起こる。この電子受容体は未だ同定されていないが、このことはCDH以外にもセルロース分解に関与する酸化還元酵素が存在していることを示唆している。そこで、本研究では*P. chrysosporium*のゲノム情報を用いて、セルロース分解における酸化還元反応に関与するタンパク質を探索した。その結果、CDHのヘムドメインと相同性を示し、さらにそのC末端側にフラビンドメインではなく糖質結合モジュール(CBM1)を

有する新規のヘムタンパク質Carbohydrate-Binding Cytochrome b_{562} (CBCyt. b_{562})が見いだされた(Fig. 4)。このタンパク質を組換え体として生産し、その機能を調べた結果、CBCyt. b_{562} のヘムドメインは電子伝達のみ機能を有するヘムドメインであり、CBM1はセルロースとキチンに強く吸着することが明らかとなった。また、*cbcyt. b₅₆₂*遺伝子の発現はカーボンカタボライトリプレッションにより制御されることから、CBCyt. b_{562} は糖代謝に関与する電子伝達タンパク質であることが示唆された。さらに、このヘムドメインに相同性を示す様々な酸化還元酵素遺伝子が糸状菌のゲノム上に見いだされ、そのC末端はRieske centerドメインや膜貫通ドメインなどそれぞれ多様な特徴を有していた。これらの結果は糸状菌が様々な酸化還元システムを獲得するために機能ドメインを組み合わせた分子進化(ドメインシャッフリング)を行ってきたことを示唆していると思われる。また、これらのヘムタンパク質遺伝子は糸状菌のゲノム上にのみ見いだされたことから、糸状菌に特徴的な電子伝達系の存在が示唆された。

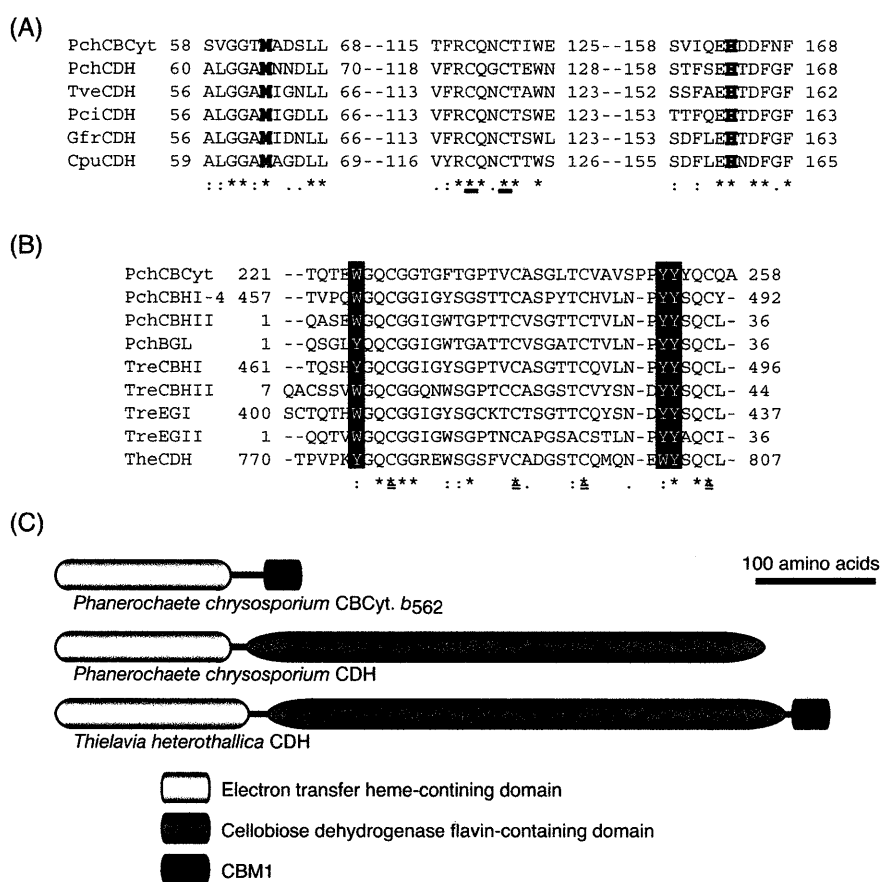


Fig. 4 (A) Multiple alignment of (A) the cytochrome domains of CBCyt. b_{562} and basidiomycetes CDHs. Bold type indicates possible heme ligands, and conserved cysteines for disulfide bond are underlined. Pch, *P. chrysosporium*; Tve, *Trametes versicolor*; Pci, *Pycnoporus cinnabarinus*; Gfr, *Grifola frondosa*; Cpu, *Coniophora puteana*. (B) Multiple alignment of CBCyt. b_{562} CBM1 with other known CBM1s. Aromatic residues for carbohydrate-binding are black-boxed and conserved cysteines are double-underlined. Tre, *Trichoderma reesei*; The, *Thielavia heterothallica*. (C) Domain organization of CBCyt. b_{562} and CDH from *Phanerochaete chrysosporium* and CBM1-carrying CDH from *Thielavia heterothallica*.