

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉田 誠

木材は地球上に存在するバイオマスの90%以上を占めていると言われていたが、そのうちの50%近くはセルロースである。したがって、木材の主たる分解者である担子菌によるセルロース分解機構の解明は、基礎学として自然界での炭素循環システムを理解していくために、また応用学としてセルロースの酵素変換などを考えていくために重要な研究課題と位置づけることができる。しかしながら、これまでの担子菌によるセルロース分解に関する研究では、主として酵素の基質特異性および反応速度論的な解析などの生化学的な手法に基づき行われてきており、近年になって進展が著しい分生物学的な解析手法の導入については必ずしも十分に生かされているとは言えない。

そこで、本論文の申請者は担子菌におけるセルロース分解機構の解析に対して分子生物学的手法を積極的に導入することにより、研究の新展開を図ることを目的に研究を進めた。本論文は全6章から構成されているが、審査の過程では各章の内容を精査し、その上で論文全体の学術性の評価を行った。

第1章は序論である。ここでは糸状菌由来のセルロース分解酵素に関する既往の知見、さらに担子菌によるセルロース分解および関連酵素に関する既往の知見が良く整理され詳細にわたって解説されている。その上で、本研究の目的を明確に位置づけている。

第2章では、担子菌のセルロース分解で重要な働きをされると考えられる菌体外酸化還元タンパク質のセロビオース脱水素酵素 (CDH) の効率的なクローニング手法の確立について述べている。従来、CDHのクローニングでは、全ゲノムからDNAライブラリーを構築して行ってきたが、申請者はCDHの構造的特徴の一つであるGMC酸化還元酵素モチーフに共通する相同性配列に基づきプライマーを設計し、これを利用したPCRによる簡便なCDHクローニング手法を確立した。また、この手法により食用担子菌マイタケ (*Grifola frondosa*) からCDH遺伝子をcDNAでクローニングすることに成功した。

第3章では、酵母菌 *Pichia pastoris* によるCDH遺伝子の異種発現系の構築を試みた。担子菌が生産する菌体外酵素を異種菌株の発現系を用いてCDHのように分子内にフラビンとヘムのような補欠分子属を含む酸化還元酵素を組換えタンパク質として発現させた例はない。申請者は細胞外への組換えタンパク質分泌が容易なこと、さらに糖鎖修飾が過剰にならないことなどのことから酵母菌 *P. pastoris* を適切な発現宿主とすることを考え、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来CDHのcDNAを導入した発現ベクターpPIC9Kで *P. pastoris* を形質転換した。その結果、野生CDHとタンパク質構造と酵素活性が同等の組換え体CDHを従来の場合に比べて10倍の効率で生産することに成功した。遺伝子組換え技術を用いたCDHの量産およびCDH変異体生産への可能性を切り開いたことは学術的貢献が大きい。

第4章では、*P. chrysosporium*によるセロビオース代謝系における $cdh$ および $bgl$  (菌体外 $\beta$ -グルコシダーゼ)遺伝子の発現応答解析にリアルタイムPCR法を用いることを試みた。これまで、長年にわたって本菌が生産する菌体外BGLはセルロース分解によって生成するセロビオースの代謝に重要な働きをしていると考えられてきたが、本研究で明らかにしたセロビオースに対する両遺伝子の発現応答の解析により、 $bgl$ 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を明らかにした。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により加水分解されるのではなく、CDHによりセロビオノラクトンに酸化されることを支持する分子生物学的な証拠が得られた。

第5章では、ごく最近に米国エネルギー省Joint Genome Instituteで解読された*P. chrysosporium*のゲノム情報を用いて、新規の菌体外酸化還元タンパク質を発見した。このタンパク質は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を有することから、Carbohydrate-Binding Cytochrome  $b_{562}$  (CBCyt.  $b_{562}$ )と命名した。さらに、このタンパク質を組換え体として生産し、その構造ならびに機能解析を行った結果、CBCyt.  $b_{562}$ を介した糖代謝に関与する新規な菌体外電子伝達機構が存在することを示した。

第6章は本論文の総括であり、申請者が行った一連の分子生物学的手法の導入が担子菌による多様なセルロース分解系の解明に向けて新たな展開をもたらすことを主張している。

審査委員一同は、以上の内容の学術的貢献は高いと評価し、よって本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。