

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 加治佐 平

論文題目：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

木材腐朽菌は、それが原因となる腐朽木材の色の違いによって、白色腐朽菌と褐色腐朽菌に分類されてきた。両者の大きな差異はリグニン分解能にある一方で、セルロース分解についても著しい差が認められており、白色腐朽菌に比べて褐色腐朽菌では、結晶性セルロースの分解に対して制約を受けていることが一般的に知られている。これまで、結晶性セルロース分解に関する酵素研究については、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* において関連する遺伝子の解析も含めて詳細に進められており、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー6および7に属するセロビオヒドロラーゼ (CBH) が主要なセルラーゼとして関与することが示されている。また、セロビオース脱水素酵素 (CDH) も Cel17 に共役的な作用をすることが示唆されている。一方、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いる。そこで本研究では、褐色腐朽菌について上記に挙げた酵素の遺伝子に注目し、結晶性セルロースの酵素分解の制約要因に関して分子生物学的な立場から解析することを目的とした。

褐色腐朽菌 *Coniophora puteana* (イドタケ) は CBH を生産することがすでに報告されている。そこで、褐色腐朽菌 *C. puteana* ゲノム DNA に対して糸状菌由来の GH ファミリー6および7に属するセルラーゼ (Cel16 および Cel17) のアミノ酸配列に基づき設計したプライマーを用いた CODEHOP-PCR 法によって遺伝子増幅を行ったところ、2つの Cel16 および2つの Cel17 に対応する遺伝子断片を検出することに成功した。さらに、セルロース培養系から得た mRNA から、これら4つの遺伝子に相当する全長 cDNA をクローニングした (*cel16A*, *cel16B*, *cel17A*, *cel17B*)。それぞれの塩基配列より推定されたアミノ酸配列をアライメント解析に供したところ、4つの酵素の触媒ドメインには糸状菌由来の GH6 および7に属する CBH に特徴的なタンパク質構造ならびにアミノ酸残基を保存されていることを明らかにした。しかしながら、CBH が結晶性セルロース分解するために必要とされる糖結合性モジュール (CBM) については、4つの酵素のうち1つの酵素 (Cel16A) のみで存在が確認された。このことから、*C. puteana* において、酵素機能として結晶性セルロースの分解に関与できる酵素は CBM を有する Cel16A のみであると推定された。

次に、セルロース培地で培養した褐色腐朽菌 *C. puteana* から由来 CDH 遺伝子を全長 cDNA としてクローニングし、その塩基配列に基づいて推定したアミノ酸配列を他の白色腐朽菌由来 CDH と比較した。その結果、両者間では70%程度と高い相同性が認められ、ヘムのリガンド、フラビン結合ドメイン、そして GMC 酸化還元酵素モチーフといった CDH に特徴的な配列は保存されていた。ま

た、同培養液中より精製したCDHについて、白色腐朽菌*P. chrysosporium*由来CDHと比較した結果、セロビオースに対してほぼ同一の酵素機能を示すが明らかとなった。以上の結果から、褐色腐朽菌*C. puteana*においても白色腐朽菌*P. chrysosporium*の場合と同様に、CDHはCe17の作用によってセルロースから生成されるセロビオースの代謝に関与する酵素として機能していることが示唆された。

さらに、11種の木材腐朽菌から得たゲノムDNAについて、CODEHOP-PCR法によってCe16, Ce17, さらにCDH遺伝子の分布を調べた。その結果、これまで白色腐朽菌に位置づけられてきた5種ではすべての酵素の遺伝子がゲノム上に存在することが確認できた。一方、褐色腐朽菌においては、*C. puteana*以外では、*Serpula lacrymans*かはCe16およびCDH遺伝子が検出され、この中にはCBMを含むCe16遺伝子も存在することが明らかとなった。一方、Ce17遺伝子は*C. puteana*以外の5種類の褐色腐朽菌からは検出されなかった。以上の結果から、多くの褐色腐朽菌では、ゲノムDNA上でCe16もしくはCe17遺伝子、あるいは両者が欠如していることが結晶性セルロースの分解制約の要因となっていることが示唆された。また、*C. puteana*および*S. lacrymans*以外の4種の褐色腐朽菌ではCDH遺伝子も検出されなかったことから、これらの菌株で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。

本研究において、褐色腐朽菌*C. puteana*では、4種のCe16およびCe17が存在するにも関わらず、その多くはCBMが欠如しているという構造的な要因によって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。他の4種類の褐色腐朽菌においては、ゲノム上においてCe16, Ce17, そしてCDH遺伝子のすべてあるいは一部が欠如していることが結晶性セルロース分解の制約要因となっていると推定された。以上、本研究によって、これまで情報が乏しかった褐色腐朽菌におけるセルロース分解に関わる酵素について遺伝子解析に基づき多くの知見が得られたことは、木材腐朽菌学における学術上、応用上貢献することが少なくない。よって、審査委員一同は、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。