

## 論文の内容の要旨

生物材料科学 専攻  
平成19年度博士課程 進学  
氏 名 鈴木 一史  
指導教員名 鮫島 正浩

Quantitative transcriptional analysis of the cellulolytic genes in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

(担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* におけるセルロース分解関連酵素遺伝子の発現応答に関する定量的解析)

### 第一章 序論

セルロースはグルコースが  $\beta$ -1,4-グルコシド結合した水に不溶な固体基質である。木材腐朽菌の一種である担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、様々な酵素を菌体外に分泌してセルロースの分解を行うことが知られているが、固体であるセルロースをどのように認識し、応答することで基質の分解を行っているかについてはほとんど理解されていない。セルロース分解に関わる酵素遺伝子の発現応答として、まず始めに炭素源が欠乏した環境での発現活性化（抑制解除；derepression）が生じることが予想される。次いでセルロースに由来する何らかの可溶性物質によって高レベルの遺伝子発現が誘導され（induction）、最終的に生成したグルコースによって遺伝子発現が抑制される（repression）という機構が考えられる。したがって、本菌のセルロース認識および分解の仕組みを理解するためには、分解に関与していると予想される酵素遺伝子群について以上の三つの段階の発現応答に関して詳細な解析することが重要だと考えられる。一方で本

菌のゲノム解析から、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー6 に属するセロビオヒドロラーゼ (CBH; Cel16A)、GH ファミリー7 に分類される6種類のセルラーゼ様タンパク質 (Cel17A-Cel17F/G) およびセロビオース脱水素酵素 (CDH) をコードする遺伝子群をゲノム中に保有していることが知られている。既往の研究から、各 *cel17* 遺伝子はセルロース培養下における発現量に差がみられることや、*cel17C* および *cel17D* はグルコースによって発現が抑制されることなどが示されている。しかし、従来の電気泳動による解析手法は定量性や検出感度が不十分であり、多様な *cel17* 遺伝子の発現挙動やセルロース分解における働きの差については詳細な知見が得られていない。そこで本研究では、本菌が保有する多様な *cel17* 遺伝子群に関してリアルタイム PCR を用いた定量的かつ高感度な発現解析手法を確立し、詳細な発現応答解析を行うことで、本菌によるセルロースの認識および分解においてこれらが担う役割の差異に関する知見を得ることを目的とした。

## 第二章 炭素源欠乏環境におけるセルロース分解関連酵素遺伝子群の発現応答解析

本菌をはじめにグルコースを炭素源とした培地を用いて培養し、得られた菌体を洗浄したのち炭素源を含まない培地に移した。残留しているグルコースを消費させた後にさらに培養を続けることで、炭素源が欠乏した環境に対する発現応答を解析することが可能になった。本培養系から抽出して得られた全 mRNA 中の *actin* 遺伝子の発現量を内部標準として定量 PCR 解析を行った結果、*cel16A*、*cel17D* の発現量は培養3時間後から指数関数的に増加した。発現量の増加率は1時間あたり *cel16A* で2.1倍、*cel17D* で2.7倍となり、6時間後の転写産物量はそれぞれ  $10^5$  コピーの *actin* あたり  $1.8 \times 10^5$  および  $1.5 \times 10^5$  コピーとなった。また *cdh* の発現量は *cel16A* および *cel17D* と比べて2時間程度遅れて増加が観察され、最大で  $2.9 \times 10^3$  コピーとなった。以上の結果から、これらの遺伝子の発現には炭素源欠乏環境下における derepression による転写の活性化が重要な役割を持つことが示された。

次に *cel17D* 以外の *cel17* 遺伝子群に対しても同様の解析を行うことを試みた。しかしながら、*cel17* 遺伝子群 (*cel17A-F/G*) は互いの配列相同性が約70-90%と非常に高いため、翻訳領域における定量 PCR 用プライマーの設計が困難であった。そこで本研究では、遺伝子の下流に存在する3'非翻訳領域(3'-UTR)を同定、利用することによって各遺伝子に特異的な定量 PCR 解析を行う手法を検討した。3'RACE法により各 *cel17* 遺伝子の3'-UTRの配列および核型間の多型の同定を行い、同定した3'-UTR中に各遺伝子特異的なプライマー対を設計した。これらを用いた PCR

増幅産物が標的遺伝子特異的であることが電気泳動、シーケンス解析および融解曲線解析によって確認できたことから、本手法を用いて炭素源欠乏環境における各 *cel7* 遺伝子発現量の定量 PCR 解析を試みた。その結果、*cel7C* の発現量は増加するが、*cel7D* よりも増加のタイミングが遅かった。*cel7C* の本培養 6 時間後の転写産物量は  $3.8 \times 10^4$  コピーであり *cel7D* よりも 3.5 倍少なかった。このことから、*cel7C* は *cel7D* に比べて derepression による影響を受けにくいことが示唆された。またその他の 4 遺伝子は発現量があまり変化しなかったことから、derepression の影響を受ける遺伝子は一部に限られることが示唆された。

### 第三章 セルロース分解関連酵素遺伝子の発現誘導および抑制に関する定量的解析

定量 RT-PCR 解析によって、セルロース培養およびグルコース培養におけるセルロース分解関連遺伝子の発現応答を評価した。その結果、*cel7* 遺伝子群はセルロース培養においてグルコース培養下よりも高い発現量を示すグループ (*cel7B, C, D, F/G*) と差がみられないグループ (*cel7A, E*) に分けられることが示された。*cel6A* および *cdh* はセルロース培養においてより高い発現量を示した。また、セルロース培養下で高い発現量を示す遺伝子のほとんどが、培養 3 日目に発現量が低下する傾向が見られた。培地中に生成した成分の経日変化を HPLC によって解析したところ、培養 2 日目に約  $100 \mu\text{M}$  のセロビオース (C2) が蓄積していた。さらに少量のセロトリオース (C3) やセロテトラオース (C4) が生成していたことから、これらの可溶性セロオリゴ糖がそれぞれの遺伝子の発現応答に関与していることが予想された。

次に、セロオリゴ糖による発現誘導効果を定量的に評価した。第二章で構築した培地に 20mM グリセロールを添加して、repression および derepression が生じない培養系を構築し、各セロオリゴ糖を添加した時の誘導効果を評価した。結果、*cel7A, cel7B* および *cel7E* については発現量の変化は観察されなかったが、*cel7C, cel7D, cel7F/G, cel6A* および *cdh* について、いずれも C3 および C4 の添加によって顕著な発現量の増加が見られた。発現量の最大値は  $10^5$  コピーの actin に対してそれぞれ  $2.7 \times 10^6$ 、 $1.7 \times 10^6$ 、 $7.6 \times 10^3$ 、 $2.4 \times 10^5$ 、 $1.6 \times 10^4$  コピーとなり、これらの値は *cel7F/G* を除いてセルロース培養における発現量より高かった。またこれらの最大値は *cel7D* 以外は C4 培養において観察された。一方 C2 では、*cel7C, cdh* に対して誘導効果がみられたが、他の 3 遺伝子に対しては効果がほとんど見られなかった。以上の結果により各セロオリゴ糖に対する発現応答の強さは遺伝子によって差があることが示された。したがって本菌は、セルロース分解

中に生成するセロオリゴ糖の組成を認識することで各遺伝子の発現パターンを変化させている可能性が考えられた。

#### 第四章 総括

本研究において定量した各遺伝子の発現量を各培養条件の間で比較すると、*cel7C* および *cdh* に対しては induction による発現活性化が強く作用することが示された。また *cel7D* の発現については、induction と derepression 両方の作用により活性化されるという傾向が明らかになった。また *cel6A* においては derepression による発現量増加がその他の条件と比較して顕著であることが示された。このことから、*cel6A* はセルロース分解初期において主に働く酵素遺伝子であると考えられた。以上の結果から、本菌によるセルロースの分解においては、はじめに derepression によって発現が活性化された *cel6A* や *cel7D* の翻訳産物が主に働き、次にセルロースから生成した可溶性のセロオリゴ糖によって *cel7C* や *cel7D*, *cdh* の発現が高いレベルで誘導され、大量生産されたこれらの翻訳産物によってセルロース分解が進行するというメカニズムが考えられた。