

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木 一史

論文題目：

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)

本研究は、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium*によるセルロース分解過程におけるセルラーゼ等の菌体外酵素の生産に関わる遺伝子の発現応答を定量的に解析し、その結果に基づき、その原因となる機構について考察することを目的としている。そこで、担子菌が固体基質であるセルロースを菌体内に取り込むことができないことに基づく炭素源欠乏下での遺伝子発現の活性化（抑制解除；derepression）、セルロースの分解によって生成した可溶性物質による誘導による遺伝子発現（induction）、さらに分解によって生成したグルコースによる遺伝子発現の抑制（repression）という3つの機構ならびにその組み合わせが分解酵素遺伝子の発現制御の要因となるという前提に立って、これを実証するための研究設計を行って実行している。また、本研究では、同菌のゲノム情報に基づき、セルロース分解酵素として糖質加水分解酵素（GH）ファミリー6に属するセルラーゼ（Ce16A）、GHファミリー7に分類される6種類のセルラーゼ（Ce17A-Ce17F/G）およびセロビオース脱水素酵素（CDH）を対象にそれらをコードする遺伝子の発現応答を解析している。

研究内容としては、まずセルロースが固体であることから、これを菌体内に取り込めない状態を想定して、菌にとって炭素源が欠乏した環境下における遺伝子の発現応答、すなわちderepressionについて解析した。グルコースを基質とする培地で *P. chrysosporium*を前培養し、得られた菌体を洗浄したのち、グルコースを全く含まない培地に移した。その後、6時間培養を行い、その過程での各遺伝子の転写産物量をリアルタイムPCRにより定量した。まず、対象としたいずれの遺伝子においても、グルコースが残存する培養初期では遺伝子発現が抑制されていることを確認した。しかしながら、グルコースが欠乏した状態での培養では、*ce16A*および*ce17D*では培養3時間以降に明確な転写産物量の増加が認められた。また、*cdh*についても培養5時間以降に増加が観察された。培養6時間後の転写産物量は 10^5 コピーのactinあたり*ce16A*では 1.8×10^5 、*ce17D*では 1.5×10^5 コピー、さらに*cdh*では 2.9×10^3 コピーとなった。以上の結果から、これらの遺伝子は炭素源欠乏環境下におけるderepressionによる発現の活性化が起こることが示された。さらに、*ce17D*以外の*ce17*遺伝子群についても同様の条件で発現応答を調べたところ、*ce17C*については培養6時間後に

発現量は増加することを確認し、その発現量は 3.8×10^4 コピーであった。一方、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*ce17*遺伝子は*ce17D*など一部に限られることが示唆された。

次に、セルロースの分解によって生成した可溶性セロオリゴ糖によるinduction効果を定量的に評価した。ここでは、repression およびderepression が生じない培養系としてグリセロールを炭素源とする培地を選択し、各セロオリゴ糖を添加した時のinduction効果を調べた。その結果、*ce17A*、*ce17B* および*ce17E* については発現量の変化は観察されなかったが、*ce17C*、*ce17D*、*ce17F/G*、*ce16A* および*cdh*について、いずれもセロトリオースおよびセロテトラオースの添加によって顕著な発現量の増加を確認した。また、発現による転写産物量の最大値は 10^5 コピーのactinに対してそれぞれ 2.7×10^6 、 1.7×10^6 、 7.6×10^3 、 2.4×10^5 、 1.6×10^4 コピーとなり、これらの値はいずれの場合もderepressionによる発現量に比べて著しく高かった。また、これらの最大値は*ce17D* 以外はセロテトラオースを添加した培養において観察された。一方、セロピオースを基質とした場合では、*ce17C*、*cdh* に対してinduction効果がみられたが、他の3つの遺伝子に対しては効果がほとんど見られなかった。以上のことから、各遺伝子に対するinduction効果の強さはセロオリゴ糖の重合度によって差があることが明らかとなった。また、担子菌*P. chrysosporium*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ことが示唆された。

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、*ce17C*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*ce17D*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*ce16A*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、*ce16A*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*ce16A*や*ce17D*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 *ce17C*や*ce17D*、さらに*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。

以上、本研究によって、担子菌*P. 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ついて多くの知見が得られたことは、糸状菌分子生物学における学術上、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。