

論文の内容の要旨

生物材料科学専攻
平成 18 年度博士課程 入学
氏 名 石黒 真希
指導教員名 鮫島 正浩

論文題目 エノキタケのトランスクリプトーム配列データベースの構築と
バイオマス変換酵素探索への応用

第一章 序論

近年、石油資源の問題をめぐり、その代替資源としてのバイオマスの利用推進に関する研究開発が盛んに行われるようになり、特に未利用資源量が豊富なことから、農産残渣や林地残材を主体とするセルロース系バイオマスの利用拡大が期待されている。また一方で、一般にキノコと呼ばれる子実体を形成する担子菌は、自然界において枯れ木や倒木などを分解する分解者としての役割を担っており、木材をはじめとするセルロース系バイオマスを分解できる主要な生物と位置づけることができる。このような背景から、セルロース系バイオマスに対する分解能が高い担子菌の能力が注目されており、バイオマス変換利用の分野においても担子菌の分子生物学的・生化学的な情報の提供が求められている。このような要請により、すでにいくつかの菌種においてはゲノム全塩基配列が解読されているが、酵素検索における信頼性や発現酵素に対応した遺伝子情報の有効性を高めるためには、ゲノム情報よりも全転写産物(トランスクリプトーム)配列情報が有効であると考えられる。そこで本研究では、セルロース系バイオマス変換に有用と位置づけられる食用担子菌エノキタケ *Flammulina velutipes* を対象として、セルロース系バイ

オマスとそれに関連した種々の基質を含むモデル培地において本菌を培養し、その菌糸体から得た全転写産物の配列情報をデータベース化した。さらに、このデータベースを利用して、セルロース培養系において生産されるエノキタケの菌体外酵素の網羅的な同定、また検出された酵素における cDNA 配列の取得と組み換えタンパク質の発現生産を試み、その有用性を検証した。

第二章 セルロース系バイオマスのモデル培養系における

トランスクリプトーム配列データベースの構築

エノキタケがセルロース系バイオマスにおいて生産する菌体外酵素の網羅的な解析に有効なツールを取得するため、本菌のトランスクリプトーム配列データベースを構築した。セルロース系バイオマスの分解に関連したタンパク質の転写産物を網羅的に回収するため、炭素源としてバイオマス粉末またはセルロースに多糖を混合した 12 種類の各培地においてエノキタケの振とう培養を行い、培養 3 日目の菌糸体から全 RNA を抽出した。得られた全 RNA から cDNA ライブラリーを構築し、その全塩基配列を第二世代 DNA シークエンサーにより決定した。その結果、総数 486,043 のリードから約 10 Mb 塩基のシークエンスデータが得られ、これをアセンブリした結果、平均 364.9 塩基のコンティグ 20,756 個から構成される総塩基長約 7.6 Mb のトランスクリプトーム配列データベースが得られた。エノキタケのゲノムサイズは 20~27 Mb との報告があることから、全転写産物配列サイズは 10 Mb 程度と推測されるため、本データベースは十分な情報量を備えていることが考えられた。

第三章 セルロース培養系におけるエノキタケの全分泌タンパク質解析

セルロース培養系から得たエノキタケの菌体外タンパク質を二次元電気泳動にて分離し、検出されたスポットについてトランスクリプトーム配列データベースを利用した同定を試み、それにより本データベースの有効性について検証した。全分泌タンパク質（セクレトーム）解析の結果、41 個の全てのスポットにおいて対応する cDNA 配列が帰属でき、この cDNA 配列を NCBI サーバ上における BLASTX 検索にかけたところ、41 個中 27 個のスポットが糖質加水分解酵素（GH）や糖質エステラーゼ、糖質酸化酵素などの糖質分解関連酵素と同定された。さらに、リグニン分解に関与する酵素や糖質結合ドメインを有する機能未知タンパク質も同定されるなど、本データベースが菌体外酵素の網羅的同定に対して十分な情報量を備えており、データベースとしての有効性が検証された。

第四章 トランスクリプトーム配列データベースの菌体外酵素解析への 利用

利用例 1 GH ファミリー7 に属するセロビオヒドロラーゼ I の同定と クローニング

トランスクリプトーム配列データベースを利用したエノキタケ菌体外酵素解析の実証例 1 として、セルロース培養系においてエノキタケが生産する GH ファミリー7 に属するセロビオヒドロラーゼ I (Cel17) の同定を試みた。エノキタケのセルロース培養系から *p*-ニトロフェニル- β -D-ラクツシドに対して分解活性を示す 2 種のセルラーゼを精製し、エドマン分解法によって得られた両酵素の部分アミノ酸配列を本データベースに対して TBLASTN 検索にかけた。その結果、両酵素は互いに異なる配列を有する Cel17 と同定され、それぞれを *FvCel17A*, *FvCel17B* と命名した。さらに、それぞれの Cel17 が帰属されたコンティグ配列から特異的配列プライマーを設計して Cel17 をコードする cDNA 全長配列のクローニングを行い、アミノ酸配列を推定した。

利用例 2 GH ファミリー6 セロビオヒドロラーゼ II のクローニングと 組換え酵素の生産

本データベースを利用したエノキタケ菌体外酵素解析の実証例 2 として、セクレトーム解析によって同定された GH ファミリー6 に属するセロビオヒドロラーゼ II (Cel16) の cDNA クローニングと酵母発現系による組換え酵素の生産を試みた。セクレトーム解析から MASCOT 検索によって得られた Cel16 と相同するコンティグ配列をもとに遺伝子特異的プライマーを設計し、Cel16 をコードする cDNA の全長配列をクローニングした (*FvCel16*)。取得した *FvCel16* の配列をタンパク質発現用ベクターに導入し、酵母菌 *Pichia pastoris* の形質転換により、組換え *FvCel16* を発現生産させた。

利用例 3 GH ファミリー51 α -L-アラビノフラノシダーゼのクローニングと 組換え酵素の生産

本データベースを利用したエノキタケ菌体外酵素解析の実証例 3 として、生産量の少ない菌体外酵素の cDNA 全長クローニングおよび組換え酵素の生産を試みた。*p*-ニトロフェニル- α -L-アラビノフラノシドに対する分解活性を指標に、エノキタケの培養上清のカラムクロマトグラフィーによって部分精製した活性画分を二次元電気泳動に供した。分離されたタンパク質スポットを LC-MS/MS 解析に供し、本データベースに対して MASCOT 検索を行った結果、GH ファミリー51 に属する α -アラビノフラノシダーゼ (*FvAraf51*) と相同するコンティグ配列を取得した。次に、遺伝子特異的プライマーにより

FvAraf51 の cDNA 全長配列をクローニングし、さらに *Pichia* 酵母を用いて組み換え *FvAraf51* を発現生産させた。

第五章 総括

本研究では、セルロース系バイオマスに関連した種々の基質においてエノキタケを培養し、その菌糸体から得た全転写産物の配列情報をデータベース化することに成功した。また、これを利用したセクレトーム解析では、エノキタケがセルロース培養系において生産するタンパク質の網羅的な同定が可能であることを示した。その結果から、各酵素に特異的なプライマー設計が可能となり、これにより同定した酵素における cDNA の全長クローニングと *Pichia* 酵母による組み換え酵素生産へ発展させることに成功した。したがって、トランスクリプトーム配列データベースを構築することにより、セクレトーム解析をはじめとした菌体外酵素の同定や酵素遺伝子の配列情報が取得でき、さらなるタンパク質の同定や組換え酵素の発現生産など多面的な応用が可能であることを示した。したがって、エノキタケの生物機能を利用した生化学的・分子生物学的なバイオマス変換研究推進のためのプラットフォームが構築できた。