

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石黒 真希

近年、石油資源の利活用を取り巻く資源枯渇問題、二酸化炭素排出削減課題、さらに資源確保に絡む安全保障問題など様々な観点から、その代替資源としてのバイオマス利用の推進が強く望まれてきている。その中で、資源量が豊富なセルロース系バイオマスの利用拡大が特に注目されているが、一方で、そのためには多くの技術革新も必要とされている。木材腐朽に関わる担子菌類は自然界におけるセルロース系バイオマスの分解者として主要な生物と位置づけることができる。したがって、このような担子菌が有する生物機能をバイオマス変換技術開発の中で活用していくことは非常に理にかなったことであり、そのための基礎として、担子菌がバイオマス分解のために生産する酵素やその産生遺伝子に関する情報を網羅的に取得することが重要となる。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全ゲノム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生産された酵素に対応した遺伝子情報の有効性を高めるためには、ゲノム情報よりもむしろ全転写産物(トランスクリプトーム)配列情報の取得が重要であると考えられる。このような背景から、本研究では、食用きのこ生産菌として現場での栽培経験が多く、また種々のセルロース系バイオマス原料に対して広く適応能力を有する担子菌エノキタケ *Flammulina velutipes* を対象として、セルロース系バイオマス分解過程で発現する遺伝子のトランスクリプトーム配列情報をデータベース化することを試みた。さらに、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、また検出されたバイオマス変換酵素に対する cDNA 全長配列の取得と組換え酵素の発現生産などへのデータベースの応用性について検証を行った。

本研究においては、まず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 12 種類から得たバイオマス粉末、精製したセルロースあるいはヘミセルロースをそれぞれ炭素源とする培地においてエノキタケを培養後、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、ロッシュ社の第二世代 DNA シークエンサーを用いて総数 486,043 のリードから約 10 Mb 相当の塩基配列情報を取得した。これをアセンブリし、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を構築した。

次に、エノキタケのセルロース培養系から得た菌体外液を二次元電気泳動にて分離し、そこで検出されたバイオマス変換酵素についてトランスクリプトーム配列データ

ベースを利用して網羅的に解析することを試みた。その結果、電気泳動ゲルから抽出した 41 個のスポットすべてがデータベース上の cDNA 配列と対応させることが出来た。また、この cDNA 配列を NCBI サーバ上で BLASTX 検索に供すると、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して帰属することが可能であった。さらに、それ以外の酵素としては、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などが含まれていた。以上のことから、本データベースが菌体外酵素の網羅的解析に対して十分な情報量を備えていることが確認された。

さらに、構築されたトランスクリプトーム配列データベースの個々のバイオマス変換酵素のクローニングならびに組換え酵素生産などの活用性について検証を行った。その例として、まず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-ラクトシドに対して分解活性を示す酵素として精製された 2 種のセルラーゼの同定を試みた。その結果、それぞれ異なるアミノ酸配列を有する GH ファミリー7 に属する酵素であると同定された。次に、二次元電気泳動ならびにトランスクリプトーム配列データベース解析によって同定された GH ファミリー6 に属する酵素(Cel6)について、構築されたデータベース上で相同する配列に基づき遺伝子特異的プライマーを設計し、Cel6 をコードする cDNA の全長配列をクローニングした。また、取得した Cel6 遺伝子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酵素として発現生産した。さらに、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について、 α -アラビノフラノシダーゼを例に取り上げ、構築されたデータベースの有用性を検証した。すなわち、*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、これにより分離されたタンパク質スポットから GH ファミリー51 に属する α -アラビノフラノシダーゼに対応するコンティグ配列を取得した。その結果に基づき、遺伝子特異的プライマーにより cDNA 全長配列をクローニングし、さらに *Pichia* 酵母を用いて活性を有する組換え酵素を発現生産させた。

このように、本研究では、エノキタケからセルロース系バイオマス変換酵素の網羅的解析ならびに取得に資するトランスクリプトーム配列情報データベースを構築することに成功した。また、これにより同定された酵素についてデータベース上の配列情報を利用することで、対応する遺伝子のcDNA全長クローニングと*Pichia*酵母による組み換え酵素生産を容易に行うことが可能であることを実証した。以上、本研究により、エノキタケの生物機能をバイオマス変換利用するための生化学的および分子生物学的プラットフォームの構築ができたと評価でき、このことは学術上、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、本論文を博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。