

論文の内容の要旨

生物材料科学専攻
平成21年度博士課程 進学
氏名 堀 千 明
指導教員名 鮫 島 正 浩

論文題目

Effects of xylan on production of cellulolytic enzymes by the basidiomycete

Phanerochaete chrysosporium

(担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のセルロース分解関連酵素生産に及ぼすキシランの影響に関する研究)

第1章序論

担子菌類には植物が生産するセルロースおよびヘミセルロースなどの多様な糖類および難分解性高分子化合物のリグニンを単独で完全分解できる白色木材腐朽菌が存在する。その中でも担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* はこれらの分解能力の高さから幅広く研究されているモデル菌であり、菌体外に多様な分解関連酵素を分泌することが知られている。本菌は、セルロースを分解する際に、セルラーゼと総称される加水分解酵素に加え、セロビオース脱水素酵素 (CDH) を生産している。セルラーゼによって生成したセロオリゴ糖が CDH によって酸化されることから、セルロース代謝において本酸化還元酵素が重要であることが示唆される一方本酵素の生理学的役割は未だに不明である。これまでの研究で、固体であるセルロースを分解する際には、その分解物である可溶性のグルコースおよびセロオリゴ糖がこれらセルロース分解関連酵素の生産に影響を与えることが明らか

となっている。一方、木材中ではセルロースは主要なヘミセルロース成分であるキシランと共存しているが、これまで、キシランの存在が本菌におけるセルロース分解関連酵素の生産に与える影響について研究している例はない。そこで、本研究では、担子菌 *P. chrysosporium* において、キシランがセルロース分解系に与える影響を明らかにすることを目的として、網羅的解析およびセルロース分解関連酵素遺伝子の発現応答解析を行った。

第2章 キシランが菌の成長および菌体外酵素生産に与える影響

本章ではキシランが、セルロース培地で培養した菌体の成長量や菌体外酵素生産量に与える影響を検証した。キシランを単独の基質とした場合に本菌は成長しないにもかかわらず、セルロース培地に少量のキシランを添加すると菌体の初期成長速度を増加させるのと同時に菌体外タンパク質生産が促進された。このときキシラン分解酵素生産だけでなく、セルロース分解酵素生産も促進することが明らかとなった。さらに、キシランは CDH 生産も顕著に促進させた。また、キシランは、キシロースが β -1,4 結合した主鎖にアラビノースやグルクロン酸などの側鎖が付加されたヘテロ多糖である。側鎖構造が違うアラビノキシランおよびグルクロノキシランを添加した場合にも、同様の効果を示したことから、キシラン添加による効果は側鎖よりも主鎖構造に由来するという着想を得た。

第3章 キシラン添加培養系において生産される菌体外酵素の網羅的解析

本章では、セルロース培地にキシランを添加することが個々のセルロース分解酵素生産にどのような影響を与えるかを明らかにするために、二次元電気泳動法ならびに担子菌 *P. chrysosporium* のゲノム配列データベースを利用した検索により網羅的解析を実施した。セルロース単独の場合とキシランを添加した場合において生産されたタンパク質のうち、対応する各遺伝子情報によって帰属された47個のタンパク質スポットの蛍光強度について比較定量解析をおこなった。その結果、キシランを添加すると、構成タンパク質のなかに強度が2倍以上に増加しているスポットが12個あった。それらのうち7個のスポットが、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー10 推定エンドキシラーゼまたは糖エステラーゼファミリー15 推定グルクロノイルエステラーゼなどのキシラン分解関連酵素であった。興味深いことに、セルロース代謝の中で位置づけられているセロビオース脱水素酵素 (CDH) およびセルロースを酸化的に分解することが最近の研究によって示されている GH ファミリー61 に属するタンパク質 (GH61C) についても同時にスポット強度が増加されることが明らかとなった。

第4章 キシロオリゴ糖が各セルロース分解関連酵素の遺伝子発現に与える影響

前章までの結果により、キシランの存在が担子菌 *P. chrysosporium* によるセルロース分解を促進すること、特にその関連酵素の中でも CDH や GH61 タンパク質などの酸化還元酵素に与える影響が大きいことが明らかとなった。そこで、本章では、このような現象を遺伝子レベルで明らかにすることを目的とした。これまでの研究で、GH61 タンパク質は、CDH の電子受容体としての候補であること、および、CDH の電子供与体のセロオリゴ糖を生産する酵素である主要なセルラーゼは CDH に深く関与していることも示唆されている。そこで、本章では CDH に加え、それに関与すると推測される酵素である GH61 アイソザイム (*gh61A-D*) および主要なセルラーゼ (*Cel16A*, *Cel17C* および *Cel17D*; 対応遺伝子 *cel16A*, *cel17C*, *cel17D*) の発現挙動を調べた。

キシロースおよび重合度 (DP) 2-4 のキシロオリゴ糖 (X1, X2, X3, X4) を添加した培地で担子菌 *P. chrysosporium* の培養を行い、経時的に菌体をサンプリングし、各セルロース分解関連酵素遺伝子の発現応答を定量 PCR 法によりモニタリングした。その結果、X2 以上のキシロオリゴ糖により添加 1 時間後に *cdh* とともに、*gh61B*, *gh61C*, *cel17C* および *cel17D* の転写産物が増加することが明らかとなった。また、*cel16A* およびその他 *gh61A* および *gh61D* については明確な発現応答の変化を示さなかった。ただし、キシロオリゴ糖によるこれらの遺伝子発現応答は、対照としたセロオリゴ糖による発現量の増加に比べると一般的には小さかったが、その中で *cel17C* だけはキシロオリゴ糖により高い発現応答をすることが特徴であった。一方、セロオリゴ糖による応答については、セルラーゼ遺伝子と同様に、これら CDH および GH61 遺伝子全ての発現も誘導されることも明らかとなった。それら発現パターンを比較すると、CDH は、*gh61B* および *cel17C* が *cdh* と非常に似たパターンを示した。

第5章 総括

キシランをセルロース培地に添加すると菌体の初期成長を速め、それと同時にタンパク質生産およびセルラーゼ生産を促進することが明らかとなった。また、この現象にキシラン側鎖よりも主鎖構造が関与している可能性が示唆された。さらに、分泌タンパク質の網羅的解析によって、キシランがセルロース分解関連酵素のなかでも CDH および GH61 タンパク質といった酸化還元酵素の生産を顕著に促進する可能性が示された。したがって、このことを確認するために、CDH ならびに GH61 タンパク質、さらにセルラーゼ遺伝子の発現挙動にキシロオリゴ糖およびセロオリゴ糖が与える影響について精査した。その結果、CDH と同様の遺伝子発現応答パターンを示す遺伝子と

して、*ce17C*および *gh61B*が挙げられた。このことは、これら遺伝子に対応する酵素が CDH の電子供与体の生成酵素と電子受容体である可能性が示唆された。また、セルロース分解培養系にキシランを添加したことによって観察された本菌の成長促進は、キシラン分解によって生成されたキシロオリゴ糖によって *Ce17C* 等の一部のセルロース分解酵素生産の誘導が促進されることに起因すると考えられた。