

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 堀 千明

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、植物細胞壁の主要な構成成分であるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニン等の分解機構について幅広く研究されている木材腐朽菌である。本菌はセルロースを分解する際に、セルラーゼ等の加水分解酵素群を生産するが、これに加えてセロオリゴ糖を酸化するセロビオース脱水素酵素 (CDH) と呼ばれる酸化還元酵素を生産することが知られている。一方、植物細胞壁中において、セルロースはキシラン等のヘミセルロースに覆われる形で存在するため、本来、セルロースとキシランの分解は切り離して考えることはできないが、本菌においては相互の関係を調べた研究例はほとんどない。そこで、本研究では、担子菌 *P. chrysosporium* による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ついて明らかにすることを目的として、菌体外酵素の網羅的解析および関連酵素遺伝子の発現応答解析を行った。

まず、キシランの存在がセルロース分解培養系での菌体の成長量、菌体外タンパク質生産量、さらにセルロースおよびキシラン分解に関連する酵素活性に与える影響を調べた。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著しく増加させると同時に菌体外タンパク質生産が促進された。また、この際、菌体外液のキシラナーゼ活性が著しく増加するが、同時にセルロース分解酵素の生産においても増加する傾向が認められた。さらに、キシランの存在は CDH 活性を顕著に増大させた。このような現象は、イネ科草本植物由来のアラビノキシランおよび広葉樹由来のグルクロノキシランどちらを添加した場合にも認められた。このことから、これらの効果はキシランの側鎖構造よりも共通に存在する主鎖構造に由来する現象であると考察した。

次に、セルロース培地にキシランを添加することが個々の菌体外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、セルロース分解培養系から得た菌体外液について二次元電気泳動法による分泌タンパク質の網羅的な解析を行った。具体的には、二次元電気泳動上で分離された 47 個の菌体外タンパク質スポットについて、担子菌 *P. chrysosporium* のゲノム配列データベースを用いた LC-MS/MS 解析によって遺伝子座の帰属を行い、さらにスポットの蛍光強度に基づく定量解析を行った。キシランの添加により強度が 2 倍以上に増加しているスポットが 12 個検出されたが、それらのうち、7 個のスポットはキシラン分解関連酵素に対応するものであることが確認された。しかしながら、同時にセルロース分解関連酵素として位置づけられている CDH、また最近の研究によってセルロース分解を促進する菌体外酸化還元酵素として位置づけられるようになった GH ファミリー 61 に属するタンパク質 GH61C についても、キシラン添加によりスポット強度が増加することが明らかとなった。

そこで、これらに対応するセルロース分解関連酵素遺伝子の発現応答について解析を試

みた。ここでは、本菌における主要なセルラーゼである Cel6A、Cel7C および Cel7D、また菌体外タンパク質の網羅的解析によりキシラン添加により分泌が促進されたと考えられる CDH および GH61 タンパク質の遺伝子を対象とした。実験としては、レストイング状態にある *P. chrysosporium* 菌体を含む培養系にキシラン主鎖の構成糖であるキシロースおよび重合度 (DP) 2-4 のキシロオリゴ糖を添加した後、各セルロース分解関連酵素遺伝子の発現応答を定量 PCR 法により経時的にモニタリングした。また、対照としてセロオリゴ糖を添加した場合の発現応答についても情報を取得した。その結果、キシロオリゴ糖添加後、*cel7C*、*cel7D*、*cdh*、*gh61B*、*gh61C*等の遺伝子の転写レベルが増加することが明らかとなった。また、キシロオリゴ糖添加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添加による遺伝子発現量の増加に比べると一般的にはオーダーレベルで小さかったが、その中で *cel7C* だけはキシロオリゴ糖によっても際だった発現応答をすることが明らかとなった。また、セロオリゴ糖による発現誘導については、セルラーゼ遺伝子と同様に、*cdh* および GH61 酵素遺伝子においても顕著に認められた。さらに、キシロオリゴ糖ならびにセロオリゴ糖添加による発現パターンを比較すると、*cel7C*、*cdh*、*gh61B* が非常に共通なパターンを示すことが明らかとなった。

以上、本研究では、担子菌 *P. chrysosporium* においては、キシランの存在がセルロース分解に関与するいくつかのセルラーゼならびに CDH ならびに GH61 ファミリーに分類される酸化還元酵素等の生産を促進することを明らかにした。さらに、これらの促進については、キシラン主鎖構造を構成するキシロオリゴ糖による酵素遺伝子の発現誘導が関与することを示した。一方、キシロオリゴ糖による誘導はセロオリゴ糖による誘導に比べると転写レベルが低かったことから、キシロオリゴ糖によって誘導された Cel7Cn 等によるセルロース分解の促進によって生成したセロオリゴ糖が、さらに他のセルロース分解関連酵素の発現を強く誘導するといったカスケード的な発現誘導機構が存在することも示唆された。以上、本研究で得られた成果によって、セルロース分解関連酵素系におけるキシランならびにその分解生成物であるキシロオリゴ糖の影響について分子生物学的な立場から考察するための道筋が得られ、このことは担子菌によるセルロース分解酵素系の発現制御機構の解明に向けた今後の展開において、学術上、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。