

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 May Thin Kyu

論文題目

Nutrient-dependent predominant secretion of GH family enzymes by *Aspergillus* spp isolated from fields in subtropical region

(亜熱帯のフィールドから分離したアスペルギルス属糸状菌による GH ファミリー酵素群の栄養依存的優勢分泌)

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	小鹿 一
委員	名古屋大学教授	小林 哲夫
委員	名古屋大学教授	吉村 徹
委員	名古屋大学教授	浅川 晋
委員	名古屋大学教授	佐藤 ちひろ
委員	名古屋大学准教授	灘野 大太
委員	名古屋大学助教	大島 健司
委員	福島大学教授	松田 幹

天然に存在するセルロースは、そのほとんどが結晶状の線状微細繊維構造をとっており結晶セルロース (crystalline cellulose) とよばれる。結晶セルロースには微細構造上の特徴からいくつかのタイプに分類される。主要なタイプである I 型結晶セルロースは、2,000-25,000 個のグルコース残基からなり準結晶セルロースとよばれる β -1,4-グルカン鎖が 36 本集まって直径約 10 nm の直線微細繊維を形成している。このような β -1,4-グルカン鎖の準結晶性の構造により結晶セルロースは水溶液に不溶で、水を浸透させない (防水性)。水に溶けず、油のように微粒子状に分散することもない個体であるため酵素的分解に対して極めて高い抵抗性を示す。したがって、微生物はセルロース分解酵素系を持たないかぎりセルロースを消化吸収して炭素源として利用することはできない。ヒトや動物はそもそもセルロースの β -1,4-グリコシド結合を水解する酵素遺伝子を持っていないため、結晶性、準結晶性にかかわらずセルロースをエネルギー源として利用することはできない。

自然界においては、枯れて朽ちた植物の細胞壁などのセルロースは、その分解系を持つ糸状菌 (カビ) や放線菌、さらに嫌気性細菌などによって分解されオリゴ糖やグルコースにまで分解、低分子化され、これらの微生物の細胞内に吸収されて栄養源となる。さらに生成したグルコースやオリゴ糖は植物組織を拡散し、付近に存在し、セルロース分解系を持たない他の微生物にも利用され、微生物間での競合や共生が存在し、セルロース分解微生物は微生物叢の形成や変動にも重要な役割を果たしている。自然界の植物組織や農業・食品産業の廃棄物に含まれる植物バイオマス中のセルロースを生物的に分解、低分子化することは産業的利用において、さらに持続的炭素循環を介した地球環境の保全の観点からも重要である。

このような研究背景の下、本学位論文にまとめられた研究においては、セルロース分解能を持つ野生の糸状菌を探索、分離・同定し、それらが持つ多様なセルロース分解系を明らかにすること、さらに分解酵素系を利用して農業・食品産業の廃棄物のセルロースからグルコースよりも付加価値の高いセロオリゴ糖を生成させることを目指して実験研究が行われた。亜熱帯の土壌や稲藁から結晶セルロースを溶解する活性を指標にして分離した糸状菌株 (結晶セルロース溶解活性菌株) を用いて、栄養制限下および非制限下でセルロースのみを炭水化物源として培養した際に分離菌株から分泌されるタンパク質を質量分析法により網羅的に解析して主にゲノム塩基配列データベースを用いて同定あるいは推定した研究成果、さらに量的に極めて優勢な分泌タンパク質について、その遺伝子コード領域とその両側 (flanking) 領域のゲノム DNA 塩基配列を解析した研究成果が本博士学位論文の内容であり、その要点を以下に記す。

1. 栄養制限下でのセルロースに応答した β -1,4-glucan 分解酵素群の優勢分泌

分離したセルロース溶解性糸状菌野生株を、栄養を制限した液体培地で結晶セルロ

ースのみを炭水化物源として培養した。培地中に分泌された全タンパク質を SDS-電気泳動分析および分離した各タンパク質の LC-質量分析により、*Aspergillus* 属あるいは *Talaromyces* 属と推定された 4 株が、分子量 50 K~60K のタンパク質を極めて優勢に分泌すること、それらのタンパク質は二種類の cellobiohydrolases (Glycoside Hydrolase family: GH6 and GH7) と 3 種類の endo- β -1,4-glucanases (GH5, GH7 and GH12) であることを明らかにした。エンド型の酵素と末端から 2 糖 (セロビオース) を切出す酵素が主要成分であったことから、結晶セルロースからのセロビオースの生成を予想して、この分泌タンパク質と結晶セルロースを反応させ、生成したオリゴ糖を定量した。還元末端標識誘導体化後に LC-質量分析による高感度定量系を確立して 2-4 糖のセロオリゴ糖を定量した。その結果、分泌された酵素混合物によりグルコースのみならず、グルコースに匹敵する量のセロビオースが生成し、さらに量的にはセロビオースの 1/5 から 1/10 程度ではあるもののセロトリオースも生成した。さらにこの酵素混合物は粉末化した稲ワラからもセロビオースを生成することを明らかにし、稲ワラを単にバイオマスエネルギーとしてではなく、より付加価値の高い機能性オリゴ糖生産への利用の可能性を示した。

2. 栄養非制限下でのセルロースに応答したインテグリン様繰返し構造ドメイン含有タンパク質 (インテグリン様タンパク質) と β -1,3-glucan 分解酵素群の優勢分泌

栄養制限条件で結晶セルロースのみを炭水化物源として培養すると、極めて優先的に cellobiohydrolases と endo- β -1,4-glucanases が分泌されたことから、栄養制限を解除して同様に培養することで、さらに多くのセルロース分解酵素を分泌することを期待して研究を進めた。しかし、予想に反して、上記の 4 野生株を栄養非制限条件下で結晶セルロースのみを炭水化物源として培養すると、セルロース分解系の酵素の分泌はむしろ低下し、質量分析での検出限界以下となった。一方で、分子量 30 K あるいは 70 K のタンパク質を極めて優勢に分泌した。質量分析により、30 K のタンパク質は integrin- α 鎖の N-末端繰返し構造ドメインと相同性の高い未知のタンパク質 (インテグリン様タンパク質) であり、70 K のタンパク質も FG-GAP repeat domain を持つ未知のタンパク質と推定された。4 株の中で、*Aspergillus fumigatus* UY014 と UY015 株では、30 K のバンドからは、Alkaline protease 1 について、3 番目に高いスコアで glucan endo-1,3- β -glucosidase eg1C が同定された。一方、ヘミセルロース (キシラン) を唯一の炭水化物源として培養すると endo- β -1,4-glucanases の分泌が顕著に誘導されたが、インテグリン様タンパク質の分泌はむしろ減少した。インテグリン様タンパク質の機能は未知であるが、細胞と細胞外マトリクス間での結合や信号伝達に関与するインテグリンと類似の構造を持つことから、培地に添加された結晶セルロースや糸状菌自身の細胞壁グルカンなどと相互作用するタンパク質である可能性も考えられる。glucan

endo-1,3- β -glucosidase/glucanase eglC は糸状菌細胞壁成分の骨格をなす β -1,3-glucan を内部で切断して細胞壁の構造を緩め膨潤させ細胞壁をリモデルして分生子 (conidia) の発芽や菌糸の分岐などに関与すると推定される。このように、栄養制限を解除すると当面の栄養源が培地中に存在するため、セルロースを分解する酵素を分泌する前に菌糸を分岐・成長させているとも考えられる。さらなる実証研究が必要であるが、菌糸を伸ばし餌となると結晶セルロースを覆うことで、その後の分泌酵素による結晶セルロースの分解を効率化しようとしていると考えることもできる。

3. *Aspergillus* 属の中で section *Fumigati* と section *Flavi* にのみインテグリン様タンパク質遺伝子が存在する可能性

分離した野生株のインテグリン様タンパク質遺伝子のコード領域 (CDS) を、種特異的プライマーを用いてゲノム DNA から PCR 増幅し塩基配列を決定して blast 検索を行った結果、得られた相同遺伝子 (orthologue) を持つ糸状菌の中で *Aspergillus* 属の中でも section *Fumigati* と section *Flavi* に属する種のみであり、*Aspergillus nidulans* や *Aspergillus niger* のような 2 つの section 以外に分類される種は含まれていなかった。CDS の塩基配列相同性は section 内では高く、2 つの section 間での相同性の値には顕著な差異が認められた。さらにこの遺伝子は 2 つの section では異なる染色体に存在し、CDS の両側 flanking region の塩基配列には 2 つの section 間で相同性は認められなかった。section *Fumigati* および *Flavi* にそれぞれ属する野生株 *Aspergillus fumigatus* UY015 と保存菌株である *Aspergillus oryzae* RIB40、およびいずれにも属さない保存菌株 *Aspergillus nidulans* A4 についてセルロース・栄養非制限培地でのインテグリン様タンパク質の分泌を調べた結果、*Aspergillus fumigatus* UY015 と *Aspergillus oryzae* RIB40 はインテグリン様タンパク質を優勢に分泌したが、*Aspergillus nidulans* A4 では質量分析によっても検出されず、発現、分泌していないと推定された。

以上のように、本学位論文にまとめられた研究内容は、*Aspergillus* 属糸状菌の分離野生株と研究・産業用保存株を用いて炭水化物源と栄養に依存した多糖加水分解酵素およびインテグリン様機能未知タンパク質の特異的優勢分泌を明らかにし、インテグリン様タンパク質遺伝子が *Aspergillus* 属の中でも 2 つの section にのみ存在することを示唆しており独創性と新規性が認められる。農学および関連専門分野における高度な学術的価値を持ち、今後の研究に大きく貢献する優れた研究成果であると評価し、博士 (農学) に値すると判定した。