

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Cesur Aylin
審査委員	主査 渡邊 彰 副査 小川 雅廣 副査 芦内 誠 副査 渡邊 誠也 副査 田中 直孝

論文名

Studies on laccases produced by the basidiomycete *Flammulina velutipes*
(担子菌 *Flammulina velutipes* が生産するラッカーゼに関する研究)

審査結果の要旨

ラッカーゼは、その構造中に通常 4 つの銅原子を含有するフェノール酸化酵素の一種であり、基質となるフェノール系化合物の酸化を行い、その際、分子状酸素を利用し水分子へと還元する。このような反応を触媒するラッカーゼは、基質を直接またはメディエーターを介して変換することから、その特異性はたいへん広いことが知られている。また、ラッカーゼは、リグニン分解や色素合成などの生物としての重要な機能に関わるだけでなく、様々な産業分野においても利用されており、高い実用性も兼ね備えた酵素の一つであるといえる。

一方、本研究の対象である担子菌キノコは、菌糸体から子実体への顕著な形態変化機構を有しており、形成された子実体は食用種においては可食部となるなど、産業上極めて有用な生物種である。さらに、担子菌キノコには、木質系バイオマスの高い分解能力を持つ種や、薬理効果を示す種々の有用生理活性物質を生産する種も存在している。このような特徴を持つ担子菌キノコは、上述したラッカーゼの優れた生産者としても知られ、複数のアイソザイムを菌体内外に生産している。しかしながら、それら各々のアイソザイムの生理的役割や機能に関しては、未だ不明な点も多く残されているのが現状である。

そこで申請者は、本研究において食用担子菌キノコの一つである *Flammulina velutipes* (エノキタケ) が生産するラッカーゼやそのアイソザイムの生理的役割や機能について解析を行った。

第1章では、*F. velutipes* の子実体形成する正常株 (FVN-1) と形成しない子実体形成不良株 (FVD-1) を用いる YBLB アッセイの解析から *F. velutipes* が生産するラッカーゼと子実体形成の間には密接な関係性があることについて考察した。YBLB アッセイとは、菌糸の状態、その菌の子実体形成能を識別する方法で、正常株では培養液の色調が青緑色から黄色へ、不良株では青緑色から青色へ変化することを利用したものである。まず、YBLB アッセイに用いる培地には pH 指示薬である BTB が含まれていることから、菌糸培養に伴う培地の pH および BTB に由来する吸光度 615 nm の経時変化について解析を行った。その結果、

FVN-1 および FVD-1 とともに培養時間の経過に伴って若干アルカリ性側にシフトしたものの、それらの間に実質的な差は認められなかった。それに対して、615 nm の吸光度においては、FVN-1 では減少し、FVD-1 では上昇する現象が観察された。これらの現象を踏まえ、FVN-1 および FVD-1 の菌体外における酵素反応の関与について検討した結果、フェノール酸化酵素の一種であるラッカーゼの生産性に差があることが判明した。すなわち、YBLB アッセイにおける色調の変化は *F. velutipes* が菌体外に生産するラッカーゼによるものであることが考えられた。そこで、このアッセイ解析において得られた知見が、実際の *F. velutipes* の栽培系において当てはまるかどうかについて栽培培地を模倣した木粉固体培地を用いて検討した。その結果、FVN-1 では、子実体形成に必須な低温処理（培養温度の低温への移行）に応答してラッカーゼ活性が上昇したのに対し、FVD-1 ではそのような現象は観察されず、*F. velutipes* の子実体形成とラッカーゼの間には密接な関係性があることが示唆された。

第 2 章では、*F. velutipes* の FVN-1 と FVD-1 の子実体形成過程でのラッカーゼ活性の推移やアイソザイムレベルでの比較解析から、*F. velutipes* が保持する複数のアイソザイムの内、FVN-1 の子実体形成過程で顕著に検出されるアイソザイムを見出し、詳細解析のため異種宿主を用いる本アイソザイムの効率的発現系の構築について検討を行った。異種発現宿主としては、担子菌と同じ糸状性真菌類であり、生育が早くかつ菌体外へのタンパク質生産が旺盛である麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いた。発現には、*A. oryzae* において大量に生産されるタカアミラーゼ A (TAA) のプロモーターおよびターミネーター領域を保持するベクターを用いた。さらに、*A. oryzae* において効果的な分泌生産を促すため、本アイソザイムが本来保持するシグナルペプチド (SP) 領域を TAA の SP 領域に置き換えた。発現ベクターの *A. oryzae* への導入の結果、短期間で本アイソザイムの高生産を行う株を取得することに成功した。本研究における大量調製系の構築は、将来的な *F. velutipes* の生長における本アイソザイムの役割の解明において大きく貢献することが期待される。

第 3 章では、通常、遺伝子やタンパク質の発現は培養条件に左右されることから、*F. velutipes* の培養条件に応じて特徴的に検出されるラッカーゼアイソザイムに着目し、本アイソザイムの酵素学的諸性質について解析を行った。まず、*F. velutipes* の子実体形成培地である木粉固体培地およびその成分を元にした液体培地を用いて、固体培養、次いで液体培養、そして再び固体培養の順に *F. velutipes* を生育後、移し替え、それぞれの培養条件において生産されるラッカーゼアイソザイムの比較を行った。その結果、特徴的な応答を示すアイソザイムを見出すことができた。引き続き、見出されたアイソザイムについて精製を行い、その酵素学的諸性質について解析した結果、本アイソザイムは、約 53 kDa の単量体構造を取っており、pH 8 および 30°C 以下の条件下で安定であった。また、基質として ABTS に対して高い触媒効率を示し、その活性は、Cl⁻ (30 mM)、Fe²⁺ (1 mM)、DTT (5 mM)、NaN₃ (0.01 mM)、L-Cys (5 mM) の添加により大きく阻害を受けることが示された。

以上のように、本研究では、担子菌キノコ *F. velutipes* が生産するラッカーゼや同アイソザイムの機能や特徴について、新たな考察や知見を得ることができた。前述のように、ラッカーゼはその特徴から、基礎面のみでなく、応用面においても幅広い貢献が期待される。よって、本研究から得られた成果は、ラッカーゼが示す生理機能の解明や有効活用に関して大きく寄与するものと考えられる。

本論文に関する公開審査会は、令和 4 年 2 月 4 日にリモートシステムを利用して開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査委員会で、本論文の内容を慎重に審議した結果、審査委員全員一致して博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。