

氏 名	わた なべ とも き 渡 邊 知 樹
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1706 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Mechanisms for oxalic acid decomposition and transport in wood-rotting fungi (木材腐朽菌におけるシュウ酸分解, 輸送機構の解明)
論文調査委員	(主 査) 教 授 梅 澤 俊 明 教 授 矢 崎 一 史 教 授 江 崎 信 芳

### 論 文 内 容 の 要 旨

木材腐朽担子菌は、リグニン分解性の白色腐朽菌とリグニン非分解性の褐色腐朽菌の二者に大別される。これらの木材腐朽菌は、地球上に最も多量に存在する木質バイオマスを栄養源として生育しており、自然界の炭素循環に大きな役割を果たしている。すなわちこれらの菌は、人類生存に重要な役割を果たしているが、他方、この木質分解能力は、木構造部材の力学的強度低下を引き起こすなど、これらの菌は有害菌としても位置付けられている。

白色腐朽菌と褐色腐朽菌による木質分解においては、いずれも木質成分分解酵素に加えシュウ酸が重要な機能を果たしていることが明らかにされてきた。一方、白色腐朽菌と褐色腐朽菌とでは、シュウ酸の代謝に関して、相違点があることが知られてきた。すなわち、両菌は、いずれもシュウ酸を生合成するものの、白色腐朽菌は、シュウ酸を速やかに分解し、培地中には少量しか蓄積しないことに対し、褐色腐朽菌は、培地中に大量のシュウ酸を蓄積することが古くから報告されてきた。

しかし、これらの現象の生化学的機構は、全く未解明であった。そこで、本研究では、これらの機構解明に取り組み、白色腐朽菌におけるシュウ酸の二酸化炭素への分解機構、および褐色腐朽菌におけるシュウ酸排出機構に関して以下に取りまとめた成果を得た。

(1) 白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* は、栄養菌糸生育期と定常期において、異なる二つのシュウ酸分解系を機能させていることを酵素学的に明らかにした。

すなわち、本菌は栄養菌糸生育期においては、シュウ酸脱炭酸酵素 (ODC) と NAD 依存性ギ酸脱水素酵素 (FDH) からなる分解系を発動させ、シュウ酸分解に共役して生成する NADH を経由する ATP 生産を通じて、生育に必要なエネルギーの一部を賄うことを示した。

一方、定常期においては、シュウ酸酸化酵素 (OXO) によりシュウ酸を分解し、生じた過酸化水素をリグニン分解に関わるペルオキシダーゼに供給することを示した。

(2) *C. subvermispora* から、FDH を精製し以下の特性を有することを明らかにした。

すなわち、CsFDH は、(a) サブユニット分子質量 42kDa のホモダイマー酵素であること、(b) 至適 pH 6.5、至適温度 30℃ を有すること、(c)  $K_m$  値 2.5mM (ギ酸)、28  $\mu$ M (NAD) を有すること、(d) その反応機構が、Ordered Bi Bi 機構であることが示された。これらの諸特性は、総じて、酵母や植物由来の FDH と類似していた。

次に、精製酵素の内部アミノ酸配列情報を基に、CsFDH をコードする cDNA 2 種 (*CsFDH1* および *CsFDH2*) をクローニングした。両クローンはいずれも精製酵素の内部アミノ酸配列に一致する配列を有すると共に、高い相同性を示したが、*CsFDH1* の発現量が *CsFDH2* のそれより著しく高いことから、CsFDH の発現に主に関わる遺伝子は *CsFDH1* であることが示された。

(3) 褐色腐朽菌 オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) におけるシュウ酸排出機構を明らかにした。

まず、オオウズラタケによるシュウ酸の排出が ATP に依存する二次輸送であることを、オオウズラタケ膜ベシクルを用

いた生化学実験により明らかにした。

そこで、この輸送機能を持つタンパク質を同定するため、オオウズラタケ cDNA ライブラリーにより形質転換した酵母を用い、シュウ酸耐性を指標とした機能スクリーニングを行った。その結果、酵母にシュウ酸特異的耐性を付与する機能未知タンパク質をコードする cDNA が数種得られた。本研究では、これらのうちの 2 種につき機能を解析することができ、それぞれ FpTRP26 (*Fomitopsis palustris* Thioredoxin Related Protein 26kDa), FpOAR (*Fomitopsis palustris* Oxalic Acid Resistance protein) と命名した。

配列解析に基づき、FpTRP26 は細胞質に局在する可溶性タンパク質であると推定された。FpTRP26 形質転換酵母内のシュウ酸は、コントロールよりも減少していたことから、FpTRP26 はオオウズラタケ細胞内のシュウ酸量を減少させる機能を有することが強く示唆された。

一方、FpOAR はそのアミノ酸配列の特徴から、6 回の膜貫通  $\alpha$ -ヘリックスを有し、細胞膜に局在すると推定された。そこで、形質転換酵母から調製した膜ベシクルのシュウ酸輸送能を解析したところ、オオウズラタケを用いた実験の場合と同様に、ATP 依存的なシュウ酸輸送が認められた。よって、FpOAR はオオウズラタケにおいてシュウ酸を細胞外に排出する二次輸送体として機能することが示唆された。

以上の様に、白色腐朽菌 *C. subvermispora* では役割の異なる二つのシュウ酸分解系が存在し、各々、シュウ酸分解と共役したエネルギー獲得及びリグニン分解を制御することが示された。特に FDH は、栄養菌糸生育期においてシュウ酸からのエネルギー獲得において鍵酵素として機能することが示された。一方、褐色腐朽菌オオウズラタケにおいては、FpTRP26 と FpOAR が、各々、細胞内シュウ酸量の減少とシュウ酸の細胞外への排出に寄与することにより、シュウ酸毒性を回避する機構が解明された。本研究は、木材腐朽菌の代謝生理学上重要な知見を提供するとともに、環境に負荷を与えない新規な木材防腐剤開発への基礎的知見を提供するものである。

## 論文審査の結果の要旨

白色腐朽菌と褐色腐朽菌は、シュウ酸代謝能に大きな違いを示すことが知られている。すなわち、両者はいずれもシュウ酸を生合成するものの、白色腐朽菌はシュウ酸を速やかに分解し、培地中には少量しか蓄積しないが、褐色腐朽菌は栄養菌糸の生育段階においてシュウ酸を大量に培地中に蓄積し、銅含有木材防腐剤の無毒化や構造多糖の加水分解を引き起こす。しかし、これらの現象に対する基礎生化学的研究は殆どなされておらず、木材腐朽菌におけるシュウ酸代謝及び菌体外への輸送の分子機構は未解明であった。

以上の背景の下、本論文は、白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* におけるシュウ酸分解機構、及び褐色腐朽菌オオウズラタケにおけるシュウ酸の菌体外への排出機構を代謝生理学的観点から明らかにしたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

- (1) 白色腐朽菌 *C. subvermispora* が、栄養菌糸生育期と定常期において異なる二つのシュウ酸分解系を機能させていることを酵素学的に明らかにした。すなわち、本菌は栄養菌糸生育期においては、シュウ酸脱炭酸酵素 (ODC) と NAD 依存性ギ酸脱水素酵素 (FDH) からなる分解系を発動させ、シュウ酸分解に共役して生育に必要なエネルギーの一部を賄うことを示した。一方、定常期においては、シュウ酸酸化酵素 (OXO) によりシュウ酸を分解し、生じた過酸化水素をリグニン分解に関わるペルオキシダーゼに供給することを示した。
- (2) FDH を *C. subvermispora* より精製し、その特質を明らかにした。さらに本酵素をコードする cDNA を複数クローニングすると共に、それらの内で生理的に主要な機能を果たしているものを同定した。
- (3) 褐色腐朽菌オオウズラタケから、細胞内シュウ酸量を減少させる機能を有する可溶性タンパク質 FpTRP26、及びシュウ酸を細胞外へ排出する二次輸送体タンパク質 FpOAR を同定した。これらは従来機能未知とされていたタンパク質ファミリーに属しており、当該ファミリーの機能解明につき初めて報告した。

以上のように、本研究は、白色腐朽菌によるシュウ酸分解の分子機構を初めて解明するとともに、褐色腐朽菌によるシュウ酸排出機構を分子レベルで初めて明らかにしたものであり、森林代謝機能化学、木質生化学、木材腐朽菌学、木材防腐学、タンパク質科学などに寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成20年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。