

|         |  |
|---------|--|
| 氏名      | かみ つじ ひさ とし<br>上 辻 久 敏   |
| 学位の種類   | 博士 (農 学)   |
| 学位記番号   | 農 博 第 1416 号   |
| 学位授与の日付 | 平成 16 年 3 月 23 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  | Studies on manganese peroxidase isozymes from the basidiomycete <i>Pleurotus ostreatus</i> : Differential gene expression and functional properties in polymer degradation<br>(担子菌ヒラタケのマンガンペルオキシダーゼアイソザイムに関する研究：特異的遺伝子発現とポリマー分解における機能特性) |
| 論文調査委員  | (主 査)<br>教授 渡邊隆司 教授 島田幹夫 教授 江崎信芳   |

### 論 文 内 容 の 要 旨

担子菌類に属する白色腐朽菌は自然界において木質中のリグニンを分解する特異な微生物である。白色腐朽菌は、菌体外にリグニンペルオキシダーゼ (LiP), マンガンペルオキシダーゼ (MnP) という 2 種のリグニン分解性のペルオキシダーゼとフェノールオキシダーゼであるラッカーゼを生産する。これらの酵素に加え、近年 LiP と MnP のハイブリッド型のペルオキシダーゼが見出された。白色腐朽菌ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* は、酵素活性の発現に  $Mn^{2+}$  を必要とする典型的な MnP アイソザイムの他に、LiP と MnP のハイブリッド型酵素 ( $Mn^{2+}$  酸化能をもつことから MnP アイソザイムとして分類されている) を生産することが知られている。しかしながら、機能の異なるこれらのペルオキシダーゼアイソザイムの発現制御機構や、高分子物質に対する触媒機能は十分解明されていない。本研究では、ヒラタケの生産するマンガン酸化能をもつペルオキシダーゼアイソザイムの発現制御と高分子物質に対する反応特性を解析した。その主な内容は以下のとおりである。

- 1) 白色腐朽菌ヒラタケの生産するマンガン酸化能を有するペルオキシダーゼアイソザイムについて種々の条件において培養実験を行うことにより、アイソザイム MnP2 と MnP3 がそれぞれペプトン無添加および添加条件下で特異的に生産されることを見出した。また、これらのアイソザイムの発現には転写レベルの発現調節が存在していることを示した。両酵素のアミノ酸配列と基質特異性から、MnP2 は酵素表層の Trp からヘムにいたるロングレンジ電子移動経路とヘム近傍のマンガン結合サイトを合わせもつハイブリッド型酵素であることを示した。
- 2) マンガン酸化能をもつペルオキシダーゼアイソザイムの発現調節機構に関して詳細な解析を行うために MnP2 と MnP3 を生産する完全合成培地を探索し、両アイソザイムを特異的に生産する培養条件を見出した。完全合成培地を用いた解析の結果、*mnp2* は低窒素条件下で構成的に発現され、*mnp3* は  $Mn^{2+}$  に依存して転写が誘導されることを明らかにした。この結果は、MnP2 と MnP3 の発現が、培地成分の変化に応じて個別に特異的な転写調節を受けていることを示す。また、ハイブリッド型酵素 MnP2 の酵素活性の発現には、高分子基質による過剰過酸化水素からの保護機構が関与することを示した。
- 3) 白色腐朽菌ヒラタケの生産する MnP アイソザイムである MnP2, MnP3 と高分子色素である Poly R-478 とリボヌクレアーゼ (RNase) A を反応させて、高分子基質に対する反応性を分析した。その結果、MnP2 は Poly R-478 と RNase を  $Mn^{2+}$  およびペラトリアルコール (VA) 非存在下で直接酸化することを明らかにした。これに対し MnP3 はこれらの高分子基質に対する直接酸化能を有しなかった。また、MnP2 の compound I は Poly R-478 と RNase を添加することにより compound II を経て休止型まで還元されるのに対し、MnP3 の compound I と II はこれらの高分子基質を添加しても休止型に還元されないことを示した。また、N-プロモスクシンイミドを用いた酵素の化学修飾と VA 酸化に対する RNase の酵素阻害実験により、MnP2 とによる高分子基質の直接酸化には酵素表層の Trp が関与することを示した。さらに、VA 依存的に高分子を酸化する *Phanerochaete chrysosporium* LiP-H8 と、高分子の直接酸化能をもつヒラタケ MnP2 の構造を分子

モデリングにより比較し、両酵素間の Trp 近傍の酸性アミノ酸の配置が、高分子基質の酸化によるメディエーターへの依存性に影響していると考察した。

以上のように、本研究によって、ヒラタケの生産するペルオキシダーゼアイソザイム MnP2 と MnP3 では、高分子基質に対する反応性に顕著な違いがあり、また機能の異なるそれぞれのアイソザイムが培地成分の変化に応じて個別に特異的な転写調節を受けることが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は白色腐朽菌 *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) の生産するマンガン酸化能をもつペルオキシダーゼアイソザイムの発現制御と高分子基質に対する反応特性を解析した研究であり評価すべき点は以下のとおりである。

- 1) 白色腐朽菌ヒラタケの生産するマンガン酸化能を有するペルオキシダーゼアイソザイム MnP2 と MnP3 がそれぞれペプトン無添加および添加条件下で特異的に生産されることを見出すとともに、これらの酵素の発現が転写レベルの調節を受けていることを示した。これは、ヒラタケ MnP2 と MnP3 を液体培地で特異的に生産した初めての研究である。
- 2) ヒラタケ MnP2 は、高分子基質を直接酸化できるのに対し、MnP3 は高分子基質の直接酸化能を有しないことを示した。また、MnP2 による高分子基質の直接酸化に酵素表層の Trp 残基からのロングレンジ電子移動が関与することを示した。さらに、メディエーターに依存して高分子基質を酸化するヒラタケ *Phanerochaete chrysosporium* LiP-H8 と MnP2 の構造を分子モデリングにより比較し、高分子酸化におけるメディエーターへの依存性に酵素表層の Trp 近傍の酸性アミノ酸の配置が関与することを示した。これまで、マンガン結合サイトとロングレンジ電子移動経路を合わせ持つハイブリッド型酵素による高分子の直接酸化は報告されておらず、この高分子直接酸化反応を酵素の酸化中間体のスペクトル解析を含めて証明したことは、特に評価に値する。
- 3) マンガン酸化能をもつペルオキシダーゼアイソザイムの発現調節機構を詳細に解析するため、MnP2 と MnP3 を特異的に生産する完全合成培地を見出し、*mnp2* は低窒素条件下で構成的に発現されるのに対し、*mnp3* は培地中の  $Mn^{2+}$  に依存して転写が誘導されることを示した。これは、ヒラタケの MnP アイソザイムの発現調節機構を完全合成培地で解析した初めての報告である。

以上のように、本論文はヒラタケの生産するマンガン酸化能を有するペルオキシダーゼアイソザイムが高分子基質に対して異なる反応特性をもち、それらの酵素が個別に異なる発現制御を受けていることを示したもので、酵素化学、菌類学、バイオマス変換化学の発展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16年2月20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。