

Title	Heterologous expression and characterization of lignocellulose degradation enzymes of wood rotting fungus <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> , manganese peroxidases and glucuronoyl esterases( Abstract_要旨 )
Author(s)	Lin, Meng-I
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2018-09-25
URL	<a href="https://doi.org/10.14989/doctor.k21386">https://doi.org/10.14989/doctor.k21386</a>
Right	許諾条件により本文は2019-09-30に公開; 学位規則第9条第2項により要約公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	LIN MENG-I
論文題目	Heterologous expression and characterization of lignocellulose degradation enzymes of wood rotting fungus <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> , manganese peroxidases and glucuronoyl esterases (木材腐朽菌 <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> が産生する木質分解酵素マンガンペルオキシダーゼとグルクロノイルエステラーゼの異種発現と活性解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、木材腐朽菌のゲノム上にコードされた木質バイオマスを分解する活性を有する酵素に関し、異種宿主を用いた発現・精製系を確立し、酵素としての性質をキャラクター化しての結果をまとめたもので、7章からなっている。</p> <p>第1章は序論で、木質バイオマスからバイオエネルギーと有用物質を効率的に取得する為には、主要成分であるリグニンの分解、及びリグニンともう一つの主要成分であるヘミセルロースとの間の共有結合(LCC結合)の切断が、必要である事を説明している。低エネルギー負荷かつ低環境負荷でこれらを行うには、木材腐朽菌のリグニン分解酵素であるマンガンペルオキシダーゼ(MnP)と、LCC結合を切断する酵素であるグルクロノイルエステラーゼ(GE)の利用が有力であると指摘している。その上で、まずこの二つの酵素を異種宿主を用いて発現・精製する系を確立し、次に両酵素の性質を解析するという本論文の目的を述べている。</p> <p>第2章では、リグニンを優先的に分解する木材腐朽菌である <i>Ceriporiopsis subvermispota</i>(Cs)のゲノム上にコードされている3種類のMnP(short MnP、long MnP、extralong MnP)に関し、大腸菌を用いた可溶性画分への異種発現に成功した。培養を低温において行い、分子シャペロンを共発現させる事、培養中にヘミンを連続的に投与する事が成功の鍵であった。さらに発現したMnPを、3種のカラムクロマトグラフィーを用いて、高い純度まで精製する事に成功した。</p> <p>第3章では、精製した3種類のMnPの活性を検証し、いずれも活性を有する事を確認した。酸化活性はlong MnPが最も高く、また熱安定性はextralong MnPが最も高い事が分かった。MnPがリグニンの2量体モデル化合物に対する反応性を有する事も確認できた。</p> <p>第4章では、short MnPが他のMnPとは異なる性質を有する事を見出した。short MnPは、ある種の基質に対しては、マンガンイオンが存在しない条件下においても、酸化反応を生じる事が分かった。また非フェノール性の基質に対しても、反応を生じる事も分かった。これらの事はshort MnPが、リグニンペルオキシダーゼ(LiP)及びヴァーサタイルペルオキシダーゼ(VP)と同様の性質を有する事を示している。一方別の基質に対しては、マンガンイオンが存在しない条件下においては酸化反応が生じない事も分り、LiP及びVPとは異なる性質を有している事も分った。以上よりshort MnPは、これまでに知られている酵素とは異なる種類の酵素である事が示唆さ</p>			

れた。

第5章では、菌類のゲノム上にコードされている GE (FGE) に関し、系統樹解析を行った。その結果 FGE は、7つのクレードに分類される事が分かった。この内クレード II と V に属する FGE に関しては、これまでに解析例が全く無い事も判明した。

第6章では、FGE のクレード II に分類される *Pleurotus eryngii* (Pe) のゲノム上にコードされている GE (PeGE) と、同クレード V に分類される *Cs* のゲノム上にコードされている GE (CsGE) に関し、*Pichia pastoris* 酵母を用いた異種発現に成功した。両 GE の精製にも成功した。精製した両 GE は、いずれも LCC 結合を切断する活性を有する事が確認された。GE の LCC 結合切断活性を、従来法より正確に決定する手法の開発にも成功した。PeGE は、これまでに活性が報告された GE の中で最も高い活性を有する事が分かった。また PeGE は CsGE に比べ、各種の阻害剤・添加剤に対する耐性が高い事も分り、木質バイオマスの利活用により適していると考えられた。

第7章は総括で、木質バイオマスの利活用に有用であると考えられる3種の MnP と2種の GE の異種発現法及び精製法の確立と、得られた5種の酵素の活性のキャラクタリゼーションに関し、得られた成果を要約している。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

木質バイオマスからバイオエネルギーと有用物質を効率的に取得する為には、主要成分であるリグニンの分解、及びリグニンともう一つの主要成分であるヘミセルロースとの間の共有結合(LCC結合)の切断が、必要である。そこで本論文では、木材腐朽菌が有するリグニン分解酵素であるマンガンペルオキシダーゼ(MnP)と、LCC結合を切断する酵素であるグルクロノイルエステラーゼ(GE)に注目し、まずこれらの酵素を異種宿主を用いて発現・精製する系を確立し、次に得られた両酵素の性質を解析した結果をまとめており、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 木材腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora*(Cs)のゲノム上にコードされている3種類のMnP(short MnP、long MnP、extralong MnP)に関し、大腸菌を用いた異種発現と精製に成功した。

2. 酸化活性はlong MnPが最も高く、また熱安定性はextralong MnPが最も高い事が分かった。リグニンのモデル化合物に対する反応性を有する事も確認できた。

3. short MnPは、ある種の基質に対しては、マンガンイオンが存在しない条件下においても、酸化反応を行う事が分かった。また、非フェノール性の基質に対して反応する事も分かった。これらの事からshort MnPは、これまでに知られている酵素とは性質が異なる事が分かった。

4. 菌類のゲノム上にコードされているGE(FGE)に関する系統樹を作成し、7つのクレードから成る事が分かった。この内クレードIIとVに属するFGEに関しては、これまでに解析例が全く無い事も判明した。

5. クレードIIに分類される *Pleurotus eryngii*(Pe)のゲノム上にコードされているGE(PeGE)と、クレードVに分類されるCsにコードされているGE(CsGE)に関し、*Pichia pastoris*酵母を用いた異種発現と精製に成功した。PeGEは、これまでに活性が報告されたGEの中で、最も高い活性を有する事が分かった。またPeGEは各種の阻害剤・添加剤に対する耐性が高い事も分り、木質バイオマスの利活用により適していると考えられた。

以上本論文では、3種のMnPと2種のGEの異種発現法及び精製法を確立し、得られた5種の酵素の活性のキャラクタリゼーションを行った。得られた知見は、酵素を用いた木質バイオマスの利活用の基盤となり、エネルギー科学の研究に寄与するところ大である。よって、本論文は博士(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成30年8月30日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 2019年9月30日以降