

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	油 屋 駿 介
論文題目	Studies on molecular recognition and degradation mechanism of plant cell wall polysaccharides-assimilating <i>Clostridium cellulovorans</i> using proteome analysis (プロテオーム解析を用いたクロストリジウムセルロボランスの植物細胞壁多糖分解と分子認識機構の解析)		
(論文内容の要旨)			
<p><i>Clostridium cellulovorans</i> は、植物細胞壁多糖の主成分であるセルロース、ヘミセルロース、ペクチンすべてを分解・代謝できる微生物として大きく注目を集めている。この微生物は多糖群に応じて分泌する酵素群を最適化し分泌酵素と細胞表層上の複合体酵素とを協調させて、植物細胞壁多糖を効率よく分解している。しかし、本微生物が植物細胞壁を分解・代謝する際に外部に存在する多糖を感知・識別して糖質加水分解酵素群や代謝酵素群の発現様式を変動させる仕組みは明らかになっていない。加えて、本微生物が植物細胞壁多糖を代謝する際に変動させる糖質分解酵素群や代謝酵素群も個別には明らかになっていない。</p> <p>これらの分子機構を解析するために、本研究では定量プロテオーム解析に着目した。しかし、現状のプロテオーム解析は網羅性と感度が不足しているため、発現しているタンパク質の多くは同定することができない。</p> <p>本研究ではまずプロテオーム解析で用いる分析機器類のパラメーターを「実験計画法」によって最適化し、高い網羅性を持つプロテオーム解析法を構築した。続いて比較定量プロテオーム解析により <i>C. cellulovorans</i> が植物細胞壁を感知し、発現様式を変化させる機構の解析を行った。さらに経時的プロテオーム解析を行うことで、植物細胞壁多糖の分解・代謝に関わる分子機構の解析を行った。</p>			
1. プロテオーム解析における液体クロマトグラフィー (LC) -エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) -質量分析器 (MS/MS) の高感度化を目指した新規最適化法の確立			
<p>プロテオーム解析において主に用いられている LC-ESI-MS/MS の性能を最大限に発揮するには、十数種類に及ぶパラメーターを最適化する必要がある。また、LC、ESI、MS/MS が持つそれぞれのパラメーターは、パラメーター間や機械間でも相互に影響し合うため、その影響を加味したパラメーターの最適化を行う必要がある。現在 LC-ESI-MS/MS のパラメーターを最適化する際には、十数種類に及ぶパラメーターを1つ1つ変更しているためパラメーター間の相互の影響を加味しきれていない。そこで本研究では、LC、ESI、MS/MS すべてのパラメーターを同時に最適化するために、新規の「実験計画法」を用いた LC-ESI-MS/MS の最適化法を確立することを目指した。</p> <p>LC-ESI-MS/MS がもつ14種類のパラメーターを同時に最適化するために、「実験計画法」の一種である「決定的スクリーニング法」を用いた。「決定的スクリーニング法」は多くのパラメーターを同時に最適化可能であるため、パラメーター間や機械間</p>			

で相互の影響を加味した上でパラメーターを最適化できる。本手法を用いて、14個のパラメーターを最適化するためには LC-ESI-MS/MS の分析が30回必要であった。次に異なる条件で30回の分析を行い、得られた結果の回帰解析を行うことにより、同定数の増加に有意に影響しているパラメーターを探索した。

統計的解析の結果、8つのパラメーターがタンパク質の同定数に有意に影響していることが明らかとなった。また単一のパラメーターだけではなく、2種類のパラメーターが相互に影響しあうことで同定数の増加に有意に影響していることを見出だした。相互に影響し合うパラメーターの中にはこれまで知られていなかった MS と LC の間のパラメーター (Gradient (%) - Dynamic exclusion (sec)、Gradient time (min) - Resolution) が含まれていた。得られた結果からタンパク質同定数を増加させるための最適なパラメーターを決定し、最適なパラメーターと最適化前のパラメーターでタンパク質の同定数を比較したところ、同定数が有意に 8.1 % 増加していた。

## 2. *C. cellulovorans* がヘミセルロースとペクチンを感知し、発現タンパク質群を変化させる機構の比較プロテオーム解析

*C. cellulovorans* は植物細胞壁に存在するほとんどの多糖を効率よく分解・代謝できる。これは本微生物が培養上清中に存在する植物細胞壁多糖に応じて、多糖分解酵素や多糖代謝酵素の発現様式を最適化しているからである。しかし、本微生物が培養上清中に存在する多糖成分を感知し、発現タンパク質群を変化させる機構は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、*C. cellulovorans* をグルコース、ヘミセルロース (キシラン、ガラクトマンナン)、ペクチンを炭素源として培養し、各炭素源間で比較プロテオーム解析を行い、植物細胞壁多糖の感知や発現様式の変化に関わるタンパク質群を探索した。

各多糖で培養したサンプルから全菌体タンパク質を抽出し、ペプチド断片を調製した。前章で最適化したパラメーターを用いて、それぞれの炭素源で培養した菌体から調製したペプチド断片で定量プロテオーム解析を行った。プロテオーム解析の結果、

*C. cellulovorans* のタンパク質を734個同定できた。さらに得られた結果を統計的に比較することでそれぞれの植物細胞壁多糖で培養した際に *C. cellulovorans* が有意に発現を増加しているタンパク質群を抽出した。これらの植物細胞壁多糖特異的に増加しているタンパク質群をコードする遺伝子群は、ゲノム上で遺伝子クラスターを形成していた。

キシランとガラクトマンナンで有意に発現が上昇していた遺伝子クラスター中には、これらの分解酵素と代謝酵素群と「二成分制御系」に関わる遺伝子群が含まれていた。「二成分制御系」は近縁種の *Clostridium cellulolyticum* において、キシランなどの感知とそれに伴う発現様式の変化に用いられていることが報告されている。このことから、*C. cellulovorans* においても同様の機構でキシランやガラクトマンナンを感知し、発現様式を変化させていることが考えられる。一方、ペクチンで有意に発現が上昇していたクラスター中には、ペクチンの分解・代謝酵素群と糖結合領域を持つ転写因子が含まれていた。ペクチンにおいては、これらの転写因子が分解・代謝酵素

群の発現様式を制御しているのではないかと考えられた。

### 3. 時系列プロテオーム解析による *C. cellulovorans* の植物細胞壁構成多糖の分解・代謝様式の解析

*C. cellulovorans* は菌体中の酵素と分泌酵素群を最適化させることで植物細胞壁構成多糖を効率よく分解・代謝することができる。これまでは定常期に入った酵素群の変動結果から *C. cellulovorans* の解析が行われていた。しかし、植物細胞壁多糖を分解・代謝するときには、*C. cellulovorans* の培養初期・中期・後期において大きく菌体・上清タンパク質群のプロファイルが異なっていると考えられる。そこで、植物細胞壁構成多糖を分解・代謝する過程で経時的に変動する代謝・分解酵素群を明らかにするために、時系列定量プロテオーム解析を行った。

*C. cellulovorans* をグルコース、セルロース、ヘミセルロース（キシラン、ガラクトマンナン）、ペクチンを炭素源として培養し、菌体タンパク質と分泌タンパク質からプロテオーム解析のサンプルを調製し、それぞれの炭素源から調製した菌体・分泌タンパク質に対して定量プロテオーム解析を行った。その結果、菌体から1895タンパク質、培養上清からは879タンパク質がそれぞれ同定できた。

得られたタンパク質の経時的プロファイリングの結果、菌体タンパク質においてはセルロソームを構成するセルロソーマルタンパク質が培養時間の経過とともに減少し、分泌タンパク質においてはセルロソーマルタンパク質が培養時間の経過とともに増加していることが明らかになった。これは、培養時間の経過に応じて菌体表面から *C. cellulovorans* が培養上清中にセルロソームを分泌していることを示唆した。また分泌タンパク質のネットワーク解析の結果から、分泌プロテアーゼとセルロソーマルプロテアーゼインヒビターが協調的に発現していることが明らかになった。このセルロソーマルプロテアーゼインヒビターは植物由来のプロテアーゼを阻害することが知られている。このことから培養上清で協調的に発現している分泌プロテアーゼと分泌セルロソーマルプロテアーゼインヒビターは植物のプロテアーゼや抗微生物タンパク質を阻害・分解することで、植物から菌体やセルロソームを防御していることが推測された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

*Clostridium cellulovorans* は植物細胞壁を構成する多糖群すべてを分解・代謝することができる微生物である。*C. cellulovorans* は培養上清中に存在する植物細胞壁多糖に応じて、糖質分解酵素群や代謝酵素群を最適化することで植物細胞壁多糖を効率よく分解・代謝することができる。本研究では「実験計画法」を用いて高い網羅性を持つプロテオーム解析法を確立した後に、様々な多糖で培養した本微生物の比較プロテオーム解析と経時的プロテオーム解析を行い、糖質分解酵素群や代謝酵素群の最適化メカニズムを考察した。評価すべき点は以下である。

1. 「実験計画法」を用いた新規 LC-ESI-MS/MS の分析パラメーター最適化法を用いることによって、タンパク質同定数が増加した。これには、8つのパラメーターが有意に影響していた。このパラメーターの中には LC と MS 間における相互の影響が含まれていた。
2. 比較プロテオーム解析により、キシラン、ガラクトマンナン、ペクチンそれぞれに対して特異的に発現を上昇させているタンパク質群が明らかになった。この解析結果から培養上清中に存在するヘミセルロース、ペクチンを感知し、発現様式を変化させる分子モデルを提唱した。
3. 時系列プロテオーム解析により、経時的に菌体タンパク質や分泌タンパク質を変動させることで、セルロース、キシラン、ガラクトマンナン、ペクチンを分解していくメカニズムが明らかになった。タンパク質の経時的プロファイリングを行うことで、菌体上のセルロソームを細胞表層から分泌することで植物多糖を分解していくことを明らかにした。またネットワーク解析の結果より、上清に分泌するプロテアーゼとプロテアーゼインヒビターにより植物からの攻撃による菌体やセルロソーム分解を防御していることが推測された。

以上のように、本論文は、プロテオーム解析で用いる分析機器類のパラメーターを「実験計画法」によって最適化し高い網羅性を持つプロテオーム解析法の構築に成功した。この手法を用いて、*C. cellulovorans* が植物細胞壁を感知し発現様式を変化させる機構を明らかにした。さらに、経時的プロテオーム解析を行うことで、植物細胞壁多糖の分解・代謝に関わる分子機構が解明された。これらの結果は、生体高分子化学、バイオマス変換学、応用微生物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31年2月8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。また、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。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、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： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）