

氏 名	エルマン ムニール Erman Munir
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1225 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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	A Novel Mechanism for Oxalic Acid Biosynthesis Coordinating with Energy Generating Systems in the Wood - Rotting Basidiomycete <i>Fomitopsis palustris</i> (木材腐朽担子菌オオウズラタケにおけるエネルギー生成系と連動する新規 シュウ酸生成機構の解明)
論文調査委員	(主 査) 教 授 島 田 幹 夫 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 江 崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

住宅などの木構造部材を攻撃する褐色腐朽菌には生理学的特徴としてシュウ酸合成能力の高いものが多く、それらは多量にシュウ酸を分泌して銅含有の木材防腐剤を無毒化する銅耐性菌としても知られている。また褐色腐朽菌はリグニン分解能力をもたないにもかかわらず、その木材腐朽力は白色腐朽菌のそれよりも特に初期段階で強烈であり、木材強度が急激に低下することも褐色腐朽菌の特徴の一つである。そこで、木造住宅のみならず木造文化財などを保護する観点からも、褐色腐朽菌の代謝生理学的研究が注目されていた。本論文は、銅耐性褐色腐朽菌の一つであるオオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) について、基礎と応用学の観点からシュウ酸生成機構を酵素レベルで解明したものであり、その内容は以下のようによまとめられる。

1) 褐色腐朽菌オオウズラタケをグルコース培地で生育させた場合、消費グルコースに対するシュウ酸の理論収率は約80%であり、概ね1モルのグルコースから2モルのシュウ酸が生成する化学量論が成立つことを明らかにした。培養期間中において、二つのシュウ酸合成酵素(オキサロ酢酸加水分解酵素とシトクロム依存型グリオキシル酸脱水素酵素)と二つのグリオキシル酸回路鍵酵素(イソクエン酸リアーゼとリンゴ酸合成酵素)の活性変動は連動しており、シュウ酸集積量との強い相関性を示した。また、クエン酸(TCA)回路とグリオキシル酸回路に含まれる12種類の酵素の活性を解析することにより、シュウ酸合成の原動力は、TCA回路とグリオキシル酸回路の双方に連動する代謝機構によるものであることを明らかにした。この新規代謝機構において、イソクエン酸リアーゼは中心的な鍵酵素であり、本酵素を特異的阻害剤(イタコン酸)で阻害することにより、シュウ酸生成のみならず本腐朽菌の成長を抑制することに成功した。

2) イソクエン酸リアーゼは病原菌に対するポストゲノム創薬開発研究のターゲットとして、現在注目を浴びている微生物酵素の一つである。しかしこれまで担子菌類から本酵素を単離・精製した例はなく、その酵素的特徴も未解明であったが、本研究において初めて電気泳動的に均一なたんぱく質として23%の収率で単離され、その酵素的性質が明らかにされた。その主な性質は以下のようである。(1) Mg^{2+} 要求性で、分子質量186kDaで60kDaのサブユニット3個からなる酵素である。(2)最適pHは7.0、イソクエン酸基質に対する基質親和定数(K_m 値)は1.6mM。(3)活性中心にはSH基を含む。

(4)イタコン酸とシュウ酸によって阻害され、その阻害定数(K_i 値)はそれぞれ、37および68 μ Mである。

3) リンゴ酸脱水素酵素も担子菌類から10%の収率で単離・精製され、主に以下のような酵素的性質が明らかとなった。(1)本酵素は Mg^{2+} 要求性で、分子質量520kDaで、65kDaのサブユニット8個からなるたんぱく質である。(2)最適pHは8.5であり、グリオキシル酸とアセチル CoA に対する K_m 値はそれぞれ45と2.2 μ Mである。(3)本酵素はシュウ酸とグリコール酸によって競争的に阻害され、その K_i 値はそれぞれ、8.5および17 μ Mである。

4) 8種類の褐色腐朽菌と15種の白色腐朽菌を、グルコースを主要炭素源とした培地で生育させることにより、上記二つのグリオキシル酸回路酵素の活性を比較した。その結果、程度の差はあるが、二つの酵素はともにオオウズラタケを筆頭に白

色腐朽菌と褐色腐朽菌の双方において高い活性をもつ傾向が示された。

以上、本研究によって木材腐朽担子菌類の生理学的特徴の一つであるシュウ酸合成能力は、グリオキシル酸回路と TCA 回路の双方に連動する新規な代謝機構によって説明された。これらは有害木材腐朽菌の攻撃から木質資源を保護するために有効な基礎的知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

森林微生物としての木材腐朽担子菌類は、リグニン分解性の白色腐朽菌と非分解性の褐色腐朽菌に二分される。前者とは対照的に後者は栄養菌糸の発育段階においてシュウ酸などの有機酸を多量に分泌するものが多く、銅含有木材防腐剤を無毒化する銅耐性菌としても著名である。また、その生理的特徴と木質構造部材の微生物劣化および表面汚染の問題とは密接な関係が存在することは予想されていたが、その問題解決のための基礎生化学的研究はほとんど実施されてはいなかった。

本論文は、木材腐朽菌の代謝生理学的観点から褐色腐朽菌オオウズラタケのシュウ酸生合成機構を解明し、連動する TCA 回路とグリオキシル酸回路に含まれる鍵酵素の役割を明らかにしたものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1) オオウズラタケをグルコース培地で生育させた場合、培養期間中において、二つのシュウ酸合成酵素（オキサロ酢酸加水分解酵素とシトクロム依存型グリオキシル酸脱水素酵素）と二つのグリオキシル酸回路酵素（イソクエン酸リアーゼとリンゴ酸合成酵素）の活性変動は連動しており、シュウ酸集積量との強い相関性を示した。エネルギー生成系の TCA 回路とグリオキシル酸回路に含まれる12種類の酵素の活性を検出し、解析することにより、シュウ酸合成の原動力は、TCA 回路とグリオキシル酸回路の双方に連動する代謝機構によるものであることを初めて明らかにした。この新規な代謝機構において、イソクエン酸リアーゼが中心的な鍵酵素であり、本酵素を特異的阻害剤（イタコン酸）で阻害することにより、シュウ酸生合成のみならず本腐朽菌の成長を抑制することに成功した。

2) イソクエン酸リアーゼは病原菌に対するポストゲノム創薬開発研究のターゲットとして、現在注目を浴びている微生物酵素の一つであるが、これまでいかなる担子菌類からも単離・精製された例はなく、その酵素的特徴も未解明であった。しかし、本研究において初めて電気泳動的に均一なたんぱく質として23%の収率で単離され、その酵素的性質が明らかにされた。また、リンゴ酸脱水素酵素も担子菌類から10%の収率で初めて単離・精製され、酵素的性質が明らかとなった。

3) 8種類の褐色腐朽菌と15種類の白色腐朽菌を、グルコースを主要炭素源とした培地で生育させることにより、二つのグリオキシル酸回路鍵酵素の分布と活性を比較した。その結果、程度の差はあるが、二つの酵素はともにオオウズラタケを筆頭に褐色腐朽菌と白色腐朽菌の双方において高い活性をもつ傾向が示された。興味深いことに、通説に反してグリオキシル酸回路の鍵酵素の活性はグルコース抑制を受けないことが分かり、このユニークな生理学的特徴は木材腐朽担子菌類に共通する可能性が高いことが示唆された。

以上、本研究は木材腐朽担子菌類のエネルギー生成系と連動する新規シュウ酸生合成機構を明らかにするとともに、関係する鍵酵素の酵素化学的性質を明らかにしたものであり、木質生化学、木材腐朽菌学、森林微生物学および微生物酵素学へ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14年1月17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。