

氏 名	ユン 尹	チョン 最	ジュン 俊
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)		
学 位 記 番 号	農 博 第 1300 号		
学位授与の日付	平 成 14 年 11 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	Enzymatic Studies on the Glyoxylate and TCA Cycles during Fruit Body Formation of Wood-Decay Fungi (木材腐朽菌の子実体形成期におけるグリオキシル酸及びクエン酸回路に関 する酵素学的研究)		
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

木材腐朽担子菌は、地球上に最も多量に存在する木質バイオマスを基質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。これらの担子菌類の中には建築物の木構造部材を腐朽し、その力学的強度を著しく低下させる有害な木材腐朽菌も多く存在する。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、木材腐朽担子菌の代謝生理学的研究が注目されてきた。木材腐朽菌を制御するためには、菌系体の生育のみならず胞子形成器官である子実体の形成を阻害することも重要であると考えられる。しかしながら、木材腐朽菌の子実体形成過程における炭素代謝調節機構については未解明な部分が多い。本論文は、褐色腐朽担子菌オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) と食用菌エノキタケ (*Flammulina velutipes*) の子実体形成過程における炭素代謝を酵素レベルで解明し、その類似点と相違点を解析したものであり、その内容は以下のようにまとめられる。

1) 本研究において最も重要な課題であったオオウズラタケの子実体形成に必要な液体培養系の確立を試みた。炭素源として5%グルコースを用いて30℃、暗黒下約21日間培養すると、子実体形成が誘導された。これによって、オオウズラタケの子実体を液体培養系で効率よく形成させる方法を初めて確立することができた。オオウズラタケの形態的特徴として、傘や茎がなく子実体表面にたくさんの細孔が観察された。アメリカや日本産の標本と照合して多孔性菌類の仲間であることを確認した。

2) 褐色腐朽菌オオウズラタケの培養期間中において、栄養菌糸成長期ではグルコースの消費に伴って菌糸体重量とシュウ酸集積量は増加したが、子実体形成期に差しかかるとシュウ酸集積量は減少した。一方、培地中の溶存酸素濃度は初期濃度の8.1ppmから2.6ppmまで急激に減少した後、子実体形成の進行とともに6.3ppmまで回復した。したがって、本菌の培養初期の栄養菌糸成長とシュウ酸集積量及び酸素吸収量とはよく相関していることがわかった。また、培養中期における培地中の酸素濃度及びpHの低下が本菌の子実体誘導に寄与する可能性が示唆された。

3) オオウズラタケの栄養菌糸成長期では、シュウ酸合成酵素(オキサロアセターゼ及びグリオキシル酸デヒドロゲナーゼ)とグリオキシル酸回路の鍵酵素(イソクエン酸リアーゼ及びリンゴ酸合成酵素)は、高い活性を示していたが、子実体形成期に差しかかると急激に低下した。これに対して、クエン酸(TCA)回路の鍵酵素の一つであるNADP-イソクエン酸デヒドロゲナーゼは、栄養菌糸成長期においてイソクエン酸リアーゼより低い活性を示したが、子実体形成期においては増大し、約2倍から4倍の活性を示した。したがって、本菌の栄養菌糸成長期においては、シュウ酸合成と連動したグリオキシル酸回路が活発であるが、子実体形成期においては、グルタミン酸合成系と連動してNADP-イソクエン酸デヒドロゲナーゼが相対的に活性化されていることを見出した。この結果は、白色腐朽担子菌エノキタケのそれとほとんど同じであった。したがって、NADP-イソクエン酸デヒドロゲナーゼが子実体形成において中心的な役割を果たしていることが示された。

4) NADP-イソクエン酸デヒドロゲナーゼは、オオウズラタケから3%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)分子質量115kDaで55kDaのサブユニット2個からなるMg²⁺要求性の酵素である。(2)最適

PHは9.0, イソクエン酸に対する基質親和定数 (K_m 値)は $12.7\mu\text{M}$ である。(3)2-オキソグルタル酸によって競争的に阻害され、その阻害定数 (K_i 値)は $127\mu\text{M}$ である。また、オキサロ酢酸とグリオキシル酸は単独では阻害作用をほとんど示さなかったが、それらを同時に加えることにより混合型の阻害を示した。(4)陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて0.02M イソクエン酸を含んだ緩衝液を用いることによって、本酵素の良好な精製結果が初めて得られた。

以上、本研究によって木材腐朽担子菌の子実体形成においてグリオキシル酸回路とTCA回路が連動し、この両代謝プロセスが本菌のライフサイクルにおいて要求されるエネルギー代謝を精妙に調節することが明らかとなった。また本研究は、有害木材腐朽菌の攻撃から木質資源を保護するための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生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の特徴をもつ。また、その生理学的特徴と木質構造部材の微生物劣化との間には密接な関係が存在することは広く知られてはいたが、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子実体形成期におけるグリオキシル酸及びクエン酸(TCA)回路の鍵酵素の役割をシュウ酸生成との関連で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) オオウズラタケの子実体形成のための液体培養系を初めて確立し、子実体形成過程における炭素代謝、特に有機酸代謝系の変動を酵素的に解析することを可能にした。本液体培養系は、オオウズラタケに関する新たな生理・生化学的知見を得る好都合な実験系であることが明らかとなった。本菌の培養期間中における培地内のグルコース消費量とシュウ酸集積量との量的関係及び酸素濃度とpHの変動を調べた結果、グルコースの消費のみならず酸素濃度とpHの低下は、子実体形成誘導の引き金となる可能性が示唆された。

2) オオウズラタケの栄養菌糸成長期では、シュウ酸合成酵素(オキサロアセターゼ及びグリオキシル酸デヒドロゲナーゼ)とグリオキシル酸回路の鍵酵素(イソクエン酸リアーゼ及びリンゴ酸合成酵素)は、高い活性を示していたが、子実体形成期に差しかかると急激に低下した。これに対して、TCA回路の鍵酵素であるNADP-イソクエン酸デヒドロゲナーゼは、栄養菌糸成長期においてイソクエン酸リアーゼより低い活性を示したが、子実体形成期においては増大し約2倍から4倍の活性を示した。したがって、オオウズラタケの栄養菌糸成長期では、グリオキシル酸回路と連動してシュウ酸合成が活発であり、子実体形成期においては、TCA回路と連動してグルタミン酸合成系が活発となることを初めて明らかにした。この結果は、NADP-イソクエン酸デヒドロゲナーゼが子実体形成において中心的な役割を果たしていることを強く示唆するものである。

3) 白色腐朽担子菌エノキタケを用いて同様な代謝変動の解析を行ったところ、エノキタケにおいても子実体形成期においては、NADP-イソクエン酸デヒドロゲナーゼと連動してグルタミン酸合成酵素が活性化されることを見出した。したがって、本酵素が褐色腐朽菌と白色腐朽菌の子実体形成において重要な役割を果たしている鍵酵素の一つであることが明らかとなった。

4) NADP-イソクエン酸デヒドロゲナーゼを褐色腐朽担子菌オオウズラタケから単離・精製し、その諸性質を明らかにした。本酵素は、これまでに数多くの生物種から単離されているが、木材腐朽担子菌からの精製はこれが最初の例である。酵素の諸性質は既報の酵素のそれと類似点が多かったが、本酵素研究によって木材腐朽菌の栄養代謝及び子実体形成機構の分子メカニズムを明らかにするための重要な知見が見出された。

以上、本研究は銅耐性菌である褐色腐朽菌オオウズラタケの子実体形成期におけるシュウ酸合成と連動するエネルギー代謝系の役割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、及び微生物酵素学への発展に寄与するところが大いである。

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10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。