

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	LEE Junseok
論文題目	Studies on the Cellular Responses of the White-Rot Fungus <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> to Lignin-Derived Aromatic Aldehydes (リグニン由来芳香族アルデヒドに対する白色腐朽菌 <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> の細胞応答に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
木材の主要構成成分であるリグニンは、不定形の芳香族高分子として自然界に豊富に存在し、炭素循環において重要な役割を担う。一方、その分解過程ではバニリンやシリングアルデヒドなどの芳香族アルデヒド類が生成される。これらの化合物は有用な化学原料である反面、微生物に対して強い毒性を示し、細胞内の酸化還元恒常性や代謝バランスを攪乱することが知られている。そのため、リグニン分解生物がこれら芳香族アルデヒドにどのように応答し、解毒・代謝しているのかを理解することは、自然界における炭素循環の理解に加え、バイオリファインリーの観点からも重要である。 白色腐朽菌 <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> は、セルロースなどの木材細胞壁多糖を極力壊さずにリグニンを選択的に分解する特性をもつ担子菌として知られており、その菌体は木材腐朽過程において芳香族低分子化合物に頻繁に曝露される。本菌は、リグニン分解に伴って生じる化学的に不安定かつ毒性の高い芳香族アルデヒドに適応しながら生育する必要があると考えられるが、芳香族アルデヒドに対する細胞内応答や代謝制御機構については十分に理解されていなかった。 本研究では、<i>C. subvermispora</i> における芳香族アルデヒド応答の分子基盤を明らかにするため、i) 芳香族アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) 群の構造・機能解析、i) RNA-seq によるバニリン曝露初期のトランスクリプトーム解析、iii) GC-MS を用いた代謝物プロファイリングという三つの階層的アプローチを統合し、本菌が芳香族アルデヒドに対して示す細胞応答を体系的に理解することを目的とした。 第 1 章では、芳香族アルデヒド代謝の初期段階を担う酵素群として、<i>C. subvermispora</i> ゲノム中に同定された 16 個の芳香族アルデヒドデヒドロゲナーゼ候補 (<i>Cs-AldhA-P</i>) に着目した。アミノ酸配列の比較解析および分子系統解析の結果、<i>Cs-Aldh</i> は配列相同性および保存ドメイン構成の違いに基づき 6 つのグループに分類され、それぞれが異なる進化的起源をもつ可能性が示唆された。この多様性は、本菌の芳香族アルデヒド代謝が単一の酵素系ではなく、異なる進化背景をもつ複数酵素群の協調によって構成されていることを示唆するものである。さらに、代表的な 6 種 (<i>Cs-AldhA, E, H, K, I, J</i>) について異種発現タンパク質を用いて酵素反応解析を行った。その結果、バニリン、シリングアルデヒド、プロトカテクアルデヒド、<i>p</i>-ヒドロキシベンズアルデヒドなど多様な基質に対して活性を示し、比活性および基質特異性には酵素ごとに大きな差が認められた。加えて、一部の <i>Cs-Aldh</i> では基質阻害や非線形な反応挙動が観察され、反応速度が基質濃度に単純に比例しない特性を示した。これらの結果から、<i>C. subvermispora</i> は芳香族アルデヒドの化学構造および細胞内濃度の違いに応じて複数の <i>Cs-Aldh</i> を機能的に使い分け、特定の単一酵素に依存しない柔軟な			

解毒・代謝適応機構を構築している可能性が示された。

第 2 章では、バニリンを唯一の炭素源とする条件で培養した菌体を対象に RNA-seq を実施し、バニリン曝露初期の転写応答を解析した。その結果、対照条件（炭素源無し）と比較して 7,653 個の差次的発現遺伝子が同定され、4,236 個が上方制御、3,417 個が下方制御されていた。GO 解析では、上方制御遺伝子に酸化還元反応、ストレス応答、アルデヒド代謝、薬物耐性などの機能が多く含まれ、特にアルコールデヒドロゲナーゼ (AAD) 群の顕著な誘導が確認された。一方、脂質生合成、翻訳関連遺伝子、二次代謝関連遺伝子が下方制御されており、バニリン曝露時には成長や高次代謝活動を抑制して細胞資源を解毒・生存に優先的に配分する戦略が示唆された。さらに、Cs-Aldh 群に着目すると、多くの Cs-Aldh がバニリン曝露初期にやや抑制されていたものの、Cs-AldhL を含む少数の遺伝子は誘導されていた。本 RNA-seq 解析により、Cs-AldhL の高い比活性を持つ酵素学的特徴と転写誘導が一致し、AAD による還元と Cs-AldhL による酸化代謝を組み合わせた二段階の解毒経路が存在する可能性が示された。

第 3 章では、GC-MS による代謝物プロファイリングにより、バニリン曝露時の代謝動態を解析した。バニリンは速やかにバニリルアルコールへ還元され、その後バニリン酸へ再酸化される主要経路が確認され、これは第 2 章で示した AAD や Cs-AldhL の転写誘導と整合的であった。また、急性バニリンストレス下では、反応性の高い芳香族アルデヒドを速やかに緩衝する初動の解毒反応としてまず還元が優先され、その後、バニリン濃度の低下や細胞内レドックス状態の回復に伴い、バニリルアルコールが再酸化されて ALDH 依存的にバニリン酸へ変換される代謝モデルが支持された。さらに、バニリン酸は一部が代謝され TCA サイクル中間体として有機酸へ変換されることが示された。一方、通常条件下で産生され、水酸化ラジカルの発生を抑制することでセルロースなどの細胞壁多糖の酸化的分解を抑制する新規二次代謝産物セリポリック酸は、バニリン曝露下では微量しか検出されず、毒性ストレス下では二次代謝を抑制し一次代謝とストレス応答に資源を優先的に配分する生理的戦略が示唆された。

以上の成果を総合すると、*C. subvermispora* は芳香族アルデヒド曝露時に、(1) ALDH 群による基質特異的解毒反応、(2) RNA-seq が示した広範な転写ネットワークの再編成、(3) GC-MS で示された代謝フラックスの再構築という三階層の統合的応答を行っていることが明らかとなった。これらの酵素学的・転写的・代謝的知見の統合は、本菌の高いバニリン耐性および選択的リグニン分解能の分子基盤を理解する上で有益であり、リグニン変換に関わる真菌の代謝柔軟性の解明に寄与するものである。

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)

本論文は、白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* における芳香族アルデヒド応答の分子基盤を、①芳香族アルデヒドデヒドロゲナーゼ (*Cs-Aldh*) 群の構造機能解析、②RNA-seq によるバニリン曝露初期の網羅的転写解析、③ GC-MS による代謝物解析の三つの異なる階層から統合的に明らかにした研究成果をまとめたものである。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. ゲノム情報に基づき 16 個の *Cs-Aldh* を同定し、配列比較・系統解析・構造予測により 6 グループに分類した。さらに代表酵素の活性測定により、基質特異性や比活性が大きく異なること、一部に基質阻害を伴う非線形な反応特性があることを示し、*C. subvermispora* の芳香族アルデヒド代謝が多様な酵素群による柔軟な解毒機構として構築されていることを明らかにした。

2. RNA-seq により 7,653 個の差次的発現遺伝子を同定し、酸化還元反応、ストレス応答、アルデヒド代謝などが広く誘導される一方、脂質生合成、翻訳関連遺伝子、二次代謝関連遺伝子が抑制される代謝再構築を明らかにした。特に、AAD 群の強い誘導と *Cs-AldhL* の転写上昇は、芳香族アルデヒドに対する「還元 → 再酸化 → 代謝流入」という二段階の代謝戦略の存在を示す重要な知見である。

3. GC-MS により、バニリンがバニリルアルコール・バニリン酸を経て TCA サイクルへ取り込まれる代謝フラックスが明らかとなり、転写応答と整合する代謝的再構築が示された。また通常条件で産生されるセリポリック酸類がバニリン曝露下で抑制されることから、毒性ストレス下で二次代謝を抑えて一次代謝に資源を優先する生理的戦略を提唱した。

以上のように、本論文は 酵素学・転写制御・代謝動態 の三階層から *C. subvermispora* における芳香族アルデヒド応答を体系的に明らかにしたものである。選択的リグニン分解能を支える細胞応答機構の理解を深める点で学術的価値が高く、リグニン分解生物の代謝柔軟性の解明および芳香族化合物代謝系の応用展開に資するものである。本論文の成果は、菌類学、酵素化学、バイオマス変換学の発展に寄与するところが多い。

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、令和 8 年 1 月 28 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要約による公表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と支障がある場合は、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）