

氏 名	つき はら た か ひさ 月 原 多 佳 久
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1661 号
学位授与の日付	平 成 19 年 11 月 26 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	Studies on a lignin-degrading enzyme of the basidiomycete <i>Pleurotus ostreatus</i> using a homologous gene expression system: Oxidation mechanism and molecular breeding of the versatile peroxidase MnP2 (担子菌ヒラタケのリグニン分解酵素に関する研究－ホモログス発現系を用いた多機能型ペルオキシダーゼMnP2の酸化機構解明と分子育種－)
論文調査委員	(主 査) 教 授 渡 邊 隆 司 教 授 二 井 一 禎 教 授 三 上 文 三

論 文 内 容 の 要 旨

木材腐朽性担子菌は、木材中の高分子リグニンや様々な難分解性環境汚染物質を分解するため、リグノセルロース資源の変換利用における前処理プロセスや、汚染環境のバイオレメディエーションへの利用が期待されている。一般に木材腐朽性担子菌によるリグニン分解は、菌体外酸化酵素によって初発されるラジカル連鎖反応により開始され、細分化したリグニンフラグメントは菌体内へ取り込まれ無機化されると考えられている。木材腐朽性担子菌の持つ代表的な菌体外酵素には、 Mn^{2+} の直接酸化能をもつマンガンペルオキシダーゼ (MnP) とベラトリルアルコール (VA) などの非フェノール性化合物を酸化できるリグニンペルオキシダーゼ (LiP) がある。近年は、MnPとLiP両方の性質を併せ持つハイブリット型酵素である多機能型ペルオキシダーゼ (VP) が報告されている。*Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) のMnP2は、MnPと同様 Mn^{2+} を直接酸化する他、LiPの特徴的基質であるベラトリルアルコール (VA) も酸化することからVPであることが示されている。さらに、ヒラタケのMnP2 (VP) はLiPとは異なり、メディエーター非存在下で高分子基質 (Poly R-478, RNase A) を直接酸化する。しかし、MnP2 (VP) によるこのユニークな高分子基質酸化のメカニズムには未解明の点が多く、詳細な解析が必要である。これまでリグニン分解酵素の発現は、主に大腸菌、昆虫細胞、酵母、子囊菌などの異種生物において試みられてきたが、こうした系では酵素活性の消失や低生産性、糖鎖修飾の異常などが報告されている。これに対し同種発現系では、天然型の酵素と同一の構造及び性質を持つ組換え酵素が生産されると考えられる上、菌自身のリグニン分解系の強化も期待することができる。本研究は、天然型のMnP2の高発現と本酵素による高分子基質酸化メカニズムの解明を目的とし、ヒラタケ自身を用いた組換えMnP2生産株の作成と大量発現系の開発、部位特異的変異による酵素機能の解明を行った。主な内容は以下のとおりである。

1) *mnp2*を構成的に転写させるため、ミトコンドリアの電子伝達系の構成因子であるコハク酸デヒドロゲナーゼIpサブユニットをコードするヒラタケの*sdi1*遺伝子プロモーターを用いた組換え*mnp2*発現ベクターを作成し、野生株に形質転換導入した。その結果、組換え*mnp2*遺伝子を含む安定形質転換体を複数単離することに成功し、形質転換体による組換えMnP2 (VP) の発現が確認された。また、形質転換体はPoly R-478の脱色及びbenzo[a]pyreneの除去能が強化されており、MnP2 (VP) を高発現する菌自身が汚染物質の分解・除去などのプロセスにおける生体触媒として高いポテンシャルを持つことが示された。

2) 大量のMnP2 (VP) を分泌・精製して酵素の反応特性を詳細に解析するため、在来MnP活性を持つアイソザイムの発現が無く、組換えMnP2 (VP) だけを特異的に高発現するフスマ及びフスマ熱水抽出液を添加した振とう培養系を開発した。同種発現系を用いて生産した組換えMnP2 (VP) と天然型MnP2 (VP) では、 Mn^{2+} 、 H_2O_2 、VA及びRNase Aに対して反応性の差は認められなかった。今回開発した系は、現在報告されている担子菌類の同種発現系の中で、最も組換え

タンパクの発現量が高く、MnP2 (VP) の構造機能相関の解析だけでなく、天然の、あるいは人工的に改変された様々な担子菌ペルオキシダーゼの大量発現にも有効であると考えられる。

3) MnP2 (VP) による高分子基質の直接酸化反応のメカニズムを解明するため、同種発現系を用いて発現した種々のアミノ酸置換変異体の精製を行い、低分子基質 (Mn^{2+} , H_2O_2 , VA) 及び高分子基質 (Poly R-478, RNase A) に対する酸化能力について解析を行った。その結果、VA および高分子基質の酸化はMnP2 (VP) 表面のW170を介しての電子移動を経て起こる事が示された。さらに、野生型MnP2 (VP) とそのアミノ酸置換変異体の構造を、VA依存的に高分子化合物を酸化する *Phanerochaete chrysosporium* LiP アイソザイム H8 の構造を基に分子モデリングして両者の構造を比較した結果、MnP2 (VP) では基質がW170に接近するときに、周辺のアミノ酸により立体障害を受けないことが、LiP-H8には不可能な高分子基質の直接酸化反応に重要である事が強く示唆された。

4) アミノ酸置換により新たな糖鎖修飾が生じたR263Nを用い、様々な基質に対する反応性を調べたところ、VAに対する $V_{\max}$ が野生型MnP2 (VP) と比較して約3倍上昇していた。さらに、Poly R-478を基質とした時、野生型MnP2 (VP) と比べ、より広いpH域における反応性やpH 3.0における酵素活性の高い安定性が確認された。一方、同様の現象はVAや Mn^{2+} を基質とした際には観察されなかった。これは、高分子化合物Poly R-478では、糖鎖とPoly R-478の相互作用により天然型酵素から反応性が変化したことを示唆する。この結果は、本研究で開発された同種発現系を用いることによって、担子菌類における翻訳後修飾による酵素の反応性の変化の解析が可能となったことを示す。

以上のように、本研究では組換え多機能型ペルオキシダーゼの同種発現に初めて成功するとともに、高分子色素の脱色及び多環芳香族物質の除去能が強化された形質転換体の育種に成功し、さらには、組換え多機能型ペルオキシダーゼの特異的大量発現系の開発に成功した。また、多機能型ペルオキシダーゼの高分子基質の直接酸化におけるW170からへムまでの長距離電子移動の関与とW170周辺のアミノ酸の立体障害の影響を示した。さらに、翻訳後修飾が本酵素の高分子基質との反応性に変化をもたらすことを示し、同種発現系開発の重要性を指摘した。

論文審査の結果の要旨

本論文は白色腐朽菌 *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) を用いた組換えMnP2生産株の作成と大量発現系の開発、部位特異的変異による酵素機能の解明を行った研究であり、評価すべき点は以下のとおりである。

- 1) *mnp2* を構成的に転写させる組換え *mnp2* 発現ベクターを作成し、野生株に形質転換導入した。形質転換体による組換えMnP2 (VP) の発現を酵素活性、mRNA およびアイソザイムレベルで示した。これは組換え多機能型ペルオキシダーゼの同種発現に成功した初めての研究である。また、形質転換体は高分子色素の脱色及び多環芳香族環境汚染物質の除去能が強化されたことを明らかにしており、育種された菌自身の有用性を示した事は評価に値する。
- 2) 在来 の *mnp2* の転写が完全に抑制される条件下で、組換えMnP2のみを特異的に高発現する培養系の開発に成功した。開発した同種発現系は、R263Nで見られたようにヒラタケの酵素生産過程における翻訳後の修飾を反映するものであり、アミノ酸配列といった酵素の一次構造のみならず、担子菌類における翻訳後修飾や、分泌、培地中での酵素安定性等が酵素の反応性に与える影響を今後解析していく手段として評価できる。
- 3) ヒラタケMnP2 (VP) における部位特異的変異による比較解析を行った結果、高分子基質の酸化はMnP2表面のW170を介しての電子移動を経て起こる事を示した。またヒラタケのMnP2 (VP) による高分子基質の酸化は、反応部位であるW170周辺のアミノ酸残基による立体障害の有無が重要であり、その構造的特徴により *Phanerochaete chrysosporium* LiP アイソザイム H8 には不可能な高分子基質の直接酸化反応が可能になる事を示した。これまで、ペルオキシダーゼによる高分子の直接酸化機構のアミノ酸レベルでの解析は報告されておらず、部位特異的変異により証明したことは特に評価に値する。

以上のように、本論文は組換えMnP2 (VP) を発現する遺伝子組換えヒラタケが汚染物質の高い分解除去能を持つ他、在来の異種発現系では達成できなかった翻訳後修飾までも含んだ酵素の構造と反応性の相関を解析する系を開発したこと、長距離電子移動を介したMnP2 (VP) による高分子基質の直接酸化機構をアミノ酸置換変異により示したもので、酵素化学、菌類学、バイオマス変換化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19年9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。