

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	田中 秀典
題 目	真菌由来エンド-1,4- $\beta$ -キシラナーゼに関する生化学および分子遺伝学的研究 (Studies on Biochemical and Molecular Characterization of Fungal Endo-1,4- $\beta$ -xylanases)
<p>本研究は、真菌 <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 20524 より 2 種、<i>Penicillium citrinum</i> FERM P-15944 より 1 種の細胞外キシラナーゼを精製し、そのコードする遺伝子のクローニング、発現調節機構および酵母による異種発現系の構築について追究したものである。</p> <p><i>A. pullulans</i> 由来の XynI (分子量 24,000、等電点 6.7) および <i>P. citrinum</i> 由来の XynA (分子量 20,000、等電点 3.5) は Glycoside hydrolase (GH) ファミリー 11 に属し、<i>A. pullulans</i> 由来の XynII (分子量 39,000、等電点 8.9) は GH ファミリー 10 に属することを明らかにした。XynI は活性の至適 pH が 2.0 の好酸性キシラナーゼであったが、活性の至適 pH が 4.8 の <i>A. pullulans</i> NRRL Y-2311-1 由来 XynA と 94% の高い相同性を示した。そこで好酸性に関与するアミノ酸を特定するために、XynI の 3 次元モデルの構築とアミノ酸の部位特異的変異を行い、クレフトの端に位置する既報の Asp-73 だけでなく、新たに Glu-157 も関与していることを明らかにした。</p> <p>これら 3 種それぞれの分泌シグナル配列を含むキシラナーゼ遺伝子を酵母 <i>Pichia pastoris</i> において発現させたところ、培養液上清中に分泌したキシラナーゼの活性が検出された。この発現系を用いて、XynI の 34 アミノ酸残基からなる長いプレプロ型の分泌シグナルによる分泌量と、酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の <math>\alpha</math>-ファクター (<math>\alpha</math>-MF) および <i>P. pastoris</i> の酸性ホスファターゼ (PHO1) の分泌シグナルによる分泌量と比較した。その結果、XynI (178 mg/l) と <math>\alpha</math>-MF のシグナル配列による分泌量は同程度で、PHO1 によるものと比べ 2 倍程度多く分泌した。さらに、XynI のシグナル配列は、大腸菌においてもタンパク質分泌能を示した。つまり、このシグナル配列は、真核細胞だけでなく細菌細胞においても異種タンパク質の分泌発現に利用できる可能性が示唆された。</p> <p>GH ファミリー 10 のキシラナーゼ XynII (活性の至適 pH 6.0) は、<i>A. pullulans</i> を pH 6.0 に維持した条件で培養した培養液上清より精製し、そのコードする遺伝子をクローニングした。一方、GH ファミリー 11 のキシラナーゼ (XynI) は pH を調整していない培養液上清から精製した。これら 2 種のキシラナーゼ遺伝子の発現が培養中の pH によって調節されているかどうかを調べるために、リアルタイム PCR を用いて発現量を解析した。その結果、<i>A. pullulans</i> はキシラナーゼの活性の至適 pH において、そのコードしている遺伝子の発現量が增大する調節システムを有するものと推察された。</p> <p>最後に、XynI の分泌シグナルをコードする領域と <i>P. citrinum</i> 由来の中性付近に活性の至適 pH を持つ XynA の成熟タンパク質をコードする領域を融合した。この融合遺伝子をエタノール生産性大腸菌 K011 株に導入することによりキシラン分解能を付与し、キシランからの直接エタノール発酵性菌株の作出を試みた。この得られた形質転換体はエタノール生産能を失うことなく、培養液上清中にキシラナーゼ活性を検出できた。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Hidenori Tanaka
題 目	Studies on Biochemical and Molecular Characterization of Fungal Endo-1,4- $\beta$ -xylanases (真菌由来エンド-1,4- $\beta$ -キシラナーゼに関する生化学および分子遺伝学的研究)
<p>This study describes purification of three extracellular xylanases from <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 20524 and <i>Penicillium citrinum</i> FERM P-15944 and characterization of their enzymatic properties. Moreover, all the fungal xylanase genes were cloned, sequenced and expressed in yeasts, and the regulatory system of these xylanase genes was studied.</p> <p>The XynI (<math>M_r</math> of 24,000 and <math>pI</math> of 6.7) and XynA (<math>M_r</math> of 20,000 and <math>pI</math> below 3.5) from <i>A. pullulans</i> and <i>P. citrinum</i>, respectively, were classified into glycosyl hydrolase (GH) family 11, while the XynII (<math>M_r</math> of 39,000 and <math>pI</math> of 8.9) from <i>A. pullulans</i> was classified into GH family 10. Xylanase activity of the XynI was optimal at pH 2.0. The deduced amino acid sequence showed 94% identity with that of a previously reported equivalent gene (<i>xynA</i>) encoding a xylanase with an optimum pH of 4.8 from <i>A. pullulans</i> NRRL Y-2311-1. The construction of a 3D model and mutational analysis of the XynI has facilitated identification of key amino acid residues responsible for its low pH optimum, along with their locations; it was found that Glu-157 and Asp-73 at the edge of the active site cleft play an important role in its acidophilicity.</p> <p>These cloned xylanase genes were expressed in <i>Pichia pastoris</i> using its own secretory signal sequence. Subsequently, the XynI signal peptide was compared with the signal peptides of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <math>\alpha</math>-mating factor (<math>\alpha</math>-MF) and <i>P. pastoris</i> acid phosphatase (PHO1) for the secretion efficiency of XynI expressed in <i>P. pastoris</i>. The amount of recombinant xylanase XynI secreted into the medium by its own signal peptide (178 mg/l) was comparable to that by the <math>\alpha</math>-MF signal peptide and two-fold higher than that by the PHO1 peptide. In addition, the XynI signal peptide allowed protein secretion in <i>Escherichia coli</i>, suggesting that the signal sequence is useful for heterologous secretory expression in both bacterial and eukaryotic cells.</p> <p>The family-10 xylanase (XynII), which had optimum pH at 6.0, was purified and its encoding gene was cloned from <i>A. pullulans</i> under the pH controlled culture condition, whereas the family-11 xylanase (XynI) was purified from the fungal culture without pH control. To investigate whether the <i>xynII</i> was regulated by the ambient pH, the expression levels were quantified by using real-time PCR. These results showed that <i>A. pullulans</i> seems to have a regulatory system responsible for the high transcription level at the optimum pH for the enzyme activity of the gene product.</p> <p>Finally, it was attempted to create the ethanologenic derivative of <i>E. coli</i> KO11 that ferment xylan directly using the secretory signal peptide of XynI from <i>A. pullulans</i> and the neutral xylanase XynA from <i>P. citrinum</i>. The resultant transformant successfully expressed the xylanase without losing the ethanol productivity and the activity was detected in the culture supernatant.</p>	

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	田中秀典
審査委員	主査 宮崎大学 教授 太田一良
	副査 宮崎大学 教授 六車三治男
	副査 佐賀大学 教授 加藤富民雄
	副査 鹿児島大学 教授 安部淳一
	副査 宮崎大学 助教授 吉田直人
審査協力者	宮崎大学工学部 教授 林幸男
題目	Studies on Biochemical and Molecular Characterization of Fungal Endo-1,4- $\beta$ -xylanases (真菌由来エンド-1,4- $\beta$ -キシラナーゼに関する生化学および分子遺伝学的研究)
<p>本論文は、真菌 <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 20524 より 2 種、<i>Penicillium citrinum</i> FERM P-15944 より 1 種の細胞外キシラナーゼを精製し、そのコードする遺伝子のクローニング、発現調節機構および酵母による異種発現系の構築について追究したものである。</p> <p><i>A. pullulans</i> 由来の XynI (分子量 24,000、等電点 6.7) および <i>P. citrinum</i> 由来の XynA (分子量 20,000、等電点 3.5) は Glycoside hydrolase (GH) ファミリー 11 に属し、<i>A. pullulans</i> 由来の XynII (分子量 39,000、等電点 8.9) は GH ファミリー 10 に属することを明らかにした。XynI は活性の至適 pH が 2.0 の好酸性キシラナーゼであったが、活性の至適 pH が 4.8 の <i>A. pullulans</i> NRRL Y-2311-1 由来 XynA と 94% の高い相同性を示した。そこで好酸性に関与するアミノ酸を特定するために、XynI の 3 次元モデルの構築とアミノ酸の部位特異的変異を行い、クレフトの端に位置する既報の Asp-73 だけでなく、新たに Glu-157 も関与していることを明らかにした。</p>	

これら3種それぞれの分泌シグナル配列を含むキシラナーゼ遺伝子を酵母 *Pichia pastoris* において発現させたところ、培養液上清中に分泌したキシラナーゼの活性が検出された。この発現系を用いて、XynI の34アミノ酸残基からなる長いプレプロ型の分泌シグナルによる分泌量と、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の $\alpha$ -ファクター ( $\alpha$ -MF) および *P. pastoris* の酸性ホスファターゼ (PH01) の分泌シグナルによる分泌量と比較した。その結果、XynI (178 mg/l) と $\alpha$ -MFのシグナル配列による分泌量は同程度で、PH01によるものと比べ2倍程度多く分泌した。さらに、XynIのシグナル配列は、大腸菌においてもタンパク質分泌能を示した。つまり、このシグナル配列は、真核細胞だけでなく細菌細胞においても異種タンパク質の分泌発現に利用できる可能性が示唆された。

GHファミリー10のキシラナーゼ XynII (活性の至適 pH 6.0) は、*A. pullulans* を pH 6.0 に維持した条件で培養した培養液上清より精製し、そのコードする遺伝子をクローニングした。一方、GHファミリー11のキシラナーゼ (XynI) は pH を調整していない培養液上清から精製した。これら2種のキシラナーゼ遺伝子の発現が培養中の pH によって調節されているかどうかを調べるために、リアルタイム PCR を用いて発現量を解析した。その結果、*A. pullulans* はキシラナーゼの活性の至適 pH において、そのコードしている遺伝子の発現量が増大する調節システムを有するものと推察された。

最後に、XynI の分泌シグナルをコードする領域と *P. citrinum* 由来の中性付近に活性の至適 pH を持つ XynA の成熟タンパク質をコードする領域を融合した。この融合遺伝子をエタノール生産性大腸菌 K011 株に導入することによりキシラン分解能を付与し、キシランからの直接エタノール発酵性菌株の作出を試みた。この得られた形質転換体はエタノール生産能を失うことなく、培養液上清中にキシラナーゼ活性を検出できた。

以上のように、本論文は *Aureobasidium* 属および *Penicillium* 属真菌が細胞外に産生する3種のエンド型キシラナーゼの性質とコードする遺伝子の構造を明らかにし、各遺伝子の転写レベルでの発現と分子進化について考察したもので、真菌類の糖質関連酵素遺伝子研究の発展に貢献する価値ある学位論文として高く評価できるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	田 中 秀 典
審査委員	主 査 宮崎大学 教授 太 田 一 良
	副 査 宮崎大学 教授 六 車 三 治 男
	副 査 佐賀大学 教授 加 藤 富 民 雄
	副 査 鹿児島大学 教授 安 部 淳 一
	副 査 宮崎大学 助教授 吉 田 直 人
審査協力者	宮崎大学工学部 教授 林 幸 男
実施年月日	平成18年 1月13日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <span style="float: right;">(口答)・筆答</span>	
<p>主査、副査及び審査協力者の6名は、平成18年1月13日(金)の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有するものと認めた。</p>	

学位申請者 氏名	田中秀典
<p>[質問 1] 実用化に向けてキシラナーゼを使ってキシランからどのようにすれば直接エタノールを生産する菌株を作出することができるかと考えるか。</p> <p>[回答 1] 発酵に十分なキシロースを供給するため、より強力なプロモーターを用いキシラナーゼの発現量を上昇させることと、キシロシダーゼの導入によるキシロオリゴ糖からのキシロース生産性の向上が考えられる。</p> <p>[質問 2] 木質資源からキシランを取り出しキシロースまで分解する一連の過程を考えたとき、経済的評価についてどのように考えるか。</p> <p>[回答 2] 現在、プラントスケールでのキシランの糖化は、酸加水分解によって行われ、その加水分解率は 70-80%とされている。この残り 20%程度を酵素糖化するだけでも、生産効率の向上を図ることができ、コスト削減に貢献することができる。さらに、酸加水分解プロセスの全てを酵素糖化で代替できれば、プラント製造および廃液処理のコストの削減が見込める。</p> <p>[質問 3] キシラナーゼ XynI の好酸性に関与するアミノ酸について、至適 pH が Glu-153 の変異体では変化せずに Glu-157 の変異体で変化したのはなぜか。</p> <p>[回答 3] Glu-157 の側鎖はクレフトの内側を向いているのに対し、Glu-153 は側鎖が外側を向いているため、至適 pH が変化しなかったものと思われる。Glu-157 においては、低い pH 領域でのみカルボキシル基とキシランとの静電的な反発力が抑えられるが、Glu-157 に置換することで高い pH 領域でもこの反発力が抑えられるためと考察した。</p> <p>[質問 4] Asp-73 と Glu-157 の変異体での至適 pH への影響に違いはあるか。</p> <p>[回答 4] Asp-73 の変異体は、至適 pH のプロファイルが全体的に中性側にシフトすると共に活性の大幅な低下を示した。Glu-157 の変異体は活性のピークが中性側に移動しているのみである。このことより、Asp-73 は本酵素の触媒機能全体に影響を及ぼし、Glu-157 は基質との結合に若干の影響を与えているものと推察した。</p> <p>[質問 5] 他のキシラナーゼに関する多数の研究と比べ、本論文の研究で誇れる新奇なところはどこか。</p> <p>[回答 5] <i>Aureobasidium</i> 属真菌由来の遺伝子として初めてキシラナーゼ遺伝子 <i>xynII</i> が pH による転写制御を受けていることを明らかにした。さらに、真核生物由来の分泌シグナル配列が大腸菌において Sec システム様の働きをする可能性を示唆した。</p> <p>[質問 6] <i>Aureobasidium pullulans</i> を培養した際に pH が低下した原因は何か。</p> <p>[回答 6] 主としてギ酸の生成によるものである。</p>	