

学 位 論 文 題 名

Penicillium purpurogenum P-26のセルラーゼ誘導機構に関する研究

学位論文内容の要旨

セルロースは太陽エネルギーによる地球上最も豊富で再生可能なバイオマス資源であるが、その利用はまだ限定されている。これを一般生物が利用しやすいグルコースに効率よく変換することは、まだ解決されていない技術課題である。そこでセルラーゼ生産菌として分離された*Penicillium purpurogenum*について、セルラーゼ誘導機構を解明するため、誘導物質の探索、セルロースから誘導物質までの経路とそこに関与する酵素について研究した。また、セルラーゼ生産向上を目的としたカタボライトリプレッション耐性株の取得もあわせて試みた。

1. *Penicillium purpurogenum* P-26のセルラーゼ誘導物質の探索

本菌は構成的に β -グルコシダーゼを分泌するためセロオリゴ糖を与えても速やかに加水分解され、誘導が観察されない。そこでセルラーゼ誘導物質の探索を行うに先立ち、ノジリマイシンを用いて誘導物質の β -グルコシダーゼによる加水分解抑制を試み、10 μ g/mlの濃度でセロビオースを誘導物質とした場合、セルラーゼ活性が検出できた。この条件で各種糖類を誘導物質として誘導実験を行ったところ、これまでセルラーゼ誘導物質として報告のなかったゲンチオビオースが顕著な誘導効果を持っていることが明らかとなった。また、水溶性セロオリゴ糖は、ノジリマイシンが存在しなくてもある程度の誘導能を持ち、ノジリマイシンの存在でCMCアーゼをさらに誘導することがわかった。ゲンチオビオースが本菌の誘導物質であることが明らかになったので、ゲンチオビオースのアナログであるチオゲンチオビオースを合成し、そのセルラーゼ誘導効果を調べたところ、ノジリマイシンの存在に関わりなく、顕著な効果を示し、それはゲンチオビオースの効果（ノジリマイシン存在下）を上回るものであった。また、その消費が極めて遅く、菌の増殖がほとんど見られないことから、その誘導が無利益誘導である可能性が示された。

2. *Trichoderma reesei* QM9414および*Sporotrichum thermophile*によるノジリマイシン存在下でのセルラーゼ誘導

*P. purpurogenum*では、ノジリマイシンの添加により初めて各種糖類のセルラーゼ誘導能が評価できるようになったので、 β -1 $\rightarrow$ 2結合のソホロースが誘導物質である*T. reesei*と β -1 $\rightarrow$ 4結合のセロビオースが誘導物質である*S. thermophile*の2株についても同様の誘導実験を行い、*P. purpurogenum*との比較を行った。その結果、*T. reesei*においては、セロビオース、ソホロース、およびモノアセチルセロビオースを誘導物質とした

場合、ノジリマイシン添加により、セルラーゼ生成が顕著に促進された。それに対し、*S. thermophile*においては、セロビオースを誘導物質とした場合、ノジリマイシン添加は阻害的に作用した。この結果から、これらの菌はいずれも *P. purpurogenum* のセルラーゼ誘導機構とは異なった機構を有していることが示された。

3. *Penicillium purpurogenum* P-26の菌体内酵素による糖転移反応

誘導物質であることが明らかとなったゲンチオビオースが、セルロースの結合様式ではない β -1 $\rightarrow$ 6結合を持つことに着目し、この物質が糖転移によって生成すると考え、この糖転移反応を触媒する酵素の局在と、粗酵素液レベルでの解析を行った。その結果、*Penicillium purpurogenum* P-26の菌体内に糖転移反応を触媒する酵素が存在し、その酵素は β -グルコシダーゼであると考えられた。菌体内粗酵素の糖転移反応により、セロビオースからラミナリビオースとゲンチオビオースが、また、ラミナリビオースからゲンチオビオースが生成し、一旦生成したゲンチオビオースは比較的安定に保たれることが明らかとなった。なお、菌体外および菌体結合性の酵素は糖転移反応を行わなかった。

4. 菌体内 β -グルコシダーゼの精製、諸性質およびセルラーゼ誘導における役割

本菌の誘導物質であるゲンチオビオースへの変換を菌体内 β -グルコシダーゼが行っていると考え、その精製、諸性質、およびセルラーゼ誘導における役割を検討した。その結果、本菌の菌体内 β -グルコシダーゼは、セロビオース、アビセルSFおよびアビセルSFにセロビオースオクタアセテートを加えて培養したときに生産される誘導酵素であった。この酵素の生産は、アビセルSFにセロビオースオクタアセテートを加えた培地で5日間培養したときに最大となった。次に、本酵素を精製し、セロビオースを基質として糖転移反応を検討した結果、ゲンチオビオースを生成することが確認された。この酵素の反応の至適pHは6.5、pH 6.0~8.0で安定、反応の至適温度は40℃で、35℃以下で安定、分子量56,000の単量体であった。セロビオースに対するKm値は0.71 mM、セロビオースを基質としたときのノジリマイシンによるKi値は3.67 mMであった。セロオリゴ糖や各種の β -結合を持つ糖類と反応したが、アビセルSFやCMCには作用しなかった。また、この酵素の基質特異性およびKm値からゲンチオビオースがセロビオースおよびラミナリビオースと比較した場合、最も分解を受けにくい糖類であることが明らかになった。本酵素のこのような特性は、真の誘導物質であるゲンチオビオースを安定に存在させられるという点で、本菌のセルラーゼ誘導において有利であると推察された。

5. セルラーゼ生産向上を目的としたカタボライトリプレッション耐性変異株の取得

グルコースによるカタボライトリプレッションが解除された変異株の取得を目的とし、2-デオキシ-D-グルコース耐性を指標とし検討したところ、NTG処理と紫外線照射の組み合わせで8株、紫外線照射のみで11株、NTG処理のみで6株をそれぞれ取得した。次にこれらの変異株を10~50 g/lのグリセロールまたはグルコースを含むWalsethセルロース培地でクリアゾーン形成能を調べ、50 g/lのグリセロールまたはグルコース存在下でもクリアゾーンを形成する株4株をさらに選抜した。このうちNTUV-45-4株が最も大きいクリアゾーン比を示した。次にNTUV-45-4株と親株を1%アビセルのみを炭素源とする液体培養9日目で比較したところ、NTUV-45-4株はアビセラーゼ

で23%、CMCアーゼで15%、 β -グルコシダーゼで25%親株より高いセルラーゼ生産能を示した。また、1%アビセルに3%グルコースを加えた培地の場合は、親株ではグルコースの添加により、9日後のセルラーゼ生産が、アビセラーゼで58%、CMCアーゼで68%、 β -グルコシダーゼで67%と、いずれも大きく抑制されていた。一方、NTUV-45-4株では、アビセラーゼで3.4%、CMCアーゼで43%、 β -グルコシダーゼで17%の減少であり、アビセラーゼと β -グルコシダーゼのカタボライトリプレッションが解除されていた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 千 葉 誠 哉
副 査 教 授 本 間 守

学 位 論 文 題 名

Penicillium purpurogenum P-26のセルラーゼ誘導機構に関する研究

本論文は、和文120頁、図30、表22、引用文献90、11章からなり、ほかに参考論文11編が付されている。

セルラーゼ生産菌として分離された*Penicillium purpurogenum*について、セルラーゼ誘導機構を解明するため、誘導物質の探索、セルロースから誘導物質までの経路とそこに関与する酵素について研究した。また、セルラーゼ生産向上を目的としたカタボライトリプレッション耐性株の取得もあわせて試みた。

本菌は構成的に β -グルコシダーゼを分泌するためセロオリゴ糖を与えても速やかに加水分解され、誘導が観察されない。そこでセルラーゼ誘導物質の探索を行うに先立ち、ノジリマイシンを用いて誘導物質の β -グルコシダーゼによる加水分解抑制を試み、 $10\ \mu\text{g/ml}$ の濃度で、セロビオースを誘導物質とした場合セルラーゼ活性が検出できた。この条件で各種糖類を誘導物質として誘導実験を行ったところ、これまでセルラーゼ誘導物質として報告のなかったゲンチオビオースが顕著な誘導効果を持っていることが明らかとなった。また、水溶性セロオリゴ糖は、ノジリマイシンが存在しなくても、ある程度の誘導能を持つことがわかった。次にゲンチオビオースのアナログであるチオゲンチオビオースを合成し、そのセルラーゼ誘導効果を調べたところ、ノジリマイシンの存在に関わりなく、顕著な効果を示し、それはゲンチオビオースの効果（ノジリマイシン存在下）を上回るものであった。また、その消費が極めて遅く、菌の増殖がほとんど見られないことから、その誘導が無利益誘導である可能性が示された。

*P. purpurogenum*では、ノジリマイシンの添加により初めて各種糖類のセルラーゼ誘導能が評価できるようになったので、 β -1 $\rightarrow$ 2結合のソホロースが誘導物質である *Trichoderma reesei*と β -1 $\rightarrow$ 4結合のセロビオースが誘導物質である *Sporotrichum thermophile*の2株についても同様の誘導実験を行い、*P. purpurogenum*との比較を行った。その結果、*T. reesei*においては、セロビオース、ソホロース、およびモノアセチルセロビオースを誘導物質とした場合、ノジリマイシン添加により、セルラーゼ生成が顕著に促進された。それに対し、*S. thermophile*においては、セロビオースを誘導物質と

した場合、ノジリマイシン添加は阻害的に作用した。この結果から、これらの菌はいずれも *P. purpurogenum* のセルラーゼ誘導機構とは異なった機構を有していることが示された。

誘導物質であることが明らかとなったゲンチオビオースが、セルロースの結合様式ではない β -1 $\rightarrow$ 6結合を持つことに着目し、この物質が糖転移によって生成すると考え、この糖転移反応を触媒する酵素の局在と、粗酵素液レベルでの解析を行った。その結果、*P. purpurogenum* の菌体内に糖転移反応を触媒する酵素が存在し、その酵素は β -グルコシダーゼであると考えられた。菌体内粗酵素の糖転移反応により、セロビオースからラミナリビオースとゲンチオビオースが、また、ラミナリビオースからゲンチオビオースが生成し、一旦生成したゲンチオビオースは比較的安定に保たれることが明らかとなった。

本菌の誘導物質であるゲンチオビオースへの変換を菌体内 β -グルコシダーゼが行っていると考え、その精製、諸性質、およびセルラーゼ誘導における役割を検討した。本酵素を精製し、セロビオースを基質として糖転移反応を検討した結果、ゲンチオビオースを生成することが確認された。この酵素の反応の至適pHは6.5、pH 6.0~8.0で安定、反応の至適温度は40℃で、35℃以下で安定、分子量56,000の単量体であった。セロビオースに対するKm値は0.71 mM、セロビオースを基質としたときのノジリマイシンによるKi値は3.67 mMであった。また、この酵素の基質特異性およびKm値からゲンチオビオースがセロビオースおよびラミナリビオースと比較した場合、最も分解を受けにくい糖類であることが明らかとなった。本酵素のこのような特性は、真の誘導物質であるゲンチオビオースを安定に存在させるということが出来る点で、本菌のセルラーゼ誘導において有利であると推察された。

グルコースによるカタボライトリプレッションが解除された変異株の取得を目的とし、2-デオキシ-D-グルコース耐性を指標とし検討したところ、NTG処理と紫外線照射の組み合わせによって変異株NTUV-45-4を取得した。本変異株と親株を液体培養で比較したところ、1%アビセルのみを炭素源とする培養では、NTUV-45-4株はいずれのセルラーゼも親株より高い生産能を示した。また、親株では、グルコースの添加により、いずれのセルラーゼ生産も大きく抑制されていたのに対し、NTUV-45-4株ではアビセラゼと β -グルコシダーゼのカタボライトリプレッションが解除されていた。

以上、*P. purpurogenum* についてそのセルラーゼ誘導機構を解明するため、誘導物質の探索、セルロースから誘導物質までの経路とそこに関与する酵素について研究し、これらに関する基礎的知見を得た。これらはセルロースの高度利用の分野において基礎的及び産業的な貢献を果たすものである。

よって、審査員一同は別に行った学力確認試験の結果と併せて、本論文の提出者 須藤 学 は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。