

学位論文題名

Study on Antifreeze Proteins from Cold Adapted Fungi and Diatoms

(低温適応菌類及び藻類由来の不凍タンパク質に関する研究)

学位論文内容の要旨

菌類や藻類は低温環境に適応する物質の一つとして不凍タンパク質を細胞外に分泌することが報告されている。不凍タンパク質は過冷却状態の水中に発生する氷結晶に結合し、その成長を抑制することで、水溶液の凝固点を降下する能力を持つ生体物質である。更に、不凍タンパク質は凍結に至った溶液中の無数の氷結晶が自発的に互いに結びつく再結晶化を抑制することができる。不凍タンパク質は生物種に依存して多様な構造を有すると報告されてきた。すなわち、不凍タンパク質は魚類においては5種類、昆虫類においては4種類、植物においては3種類以上のアミノ酸配列及び高次構造が異なるタイプに分類されている。本研究は、はじめに菌類及び藻類の不凍タンパク質が約70%もの高いアミノ酸配列の相同性を示すことに着目した。類似性の高い不凍タンパク質が生物界に跨って存在するという知見は過去に得られておらず、それらの生化学および生理学的機能にも未知な点が多いと考えられた。特に、本研究の開始以前は雪腐病菌すなわち積雪下で越冬性を持つ作物に対して病原性を示す担子菌類の一種 *Typhula ishikariensis* からのみ菌類不凍タンパク質が単離されていた。担子菌類以外の菌類が不凍タンパク質を有しているか否かは全く不明であった。

本論文の前半では、多様な分類群に属する145種の低温適応菌類について、それぞれを -1°C 下において培養し、菌体外に不凍物質が放出されるか否かの解析結果について詳述した。試供した全ての分類群について、菌体外における不凍活性を見出し、担子菌以外に、卵菌、サカゲツボカビ、接合菌、子囊菌において不凍物質(不凍タンパク質を含む)を生産する菌類が存在することを世界で初めて明らかにした。

また、菌類における不凍タンパク質の多様性を明らかにするために、南極産の子囊菌 *Antarctomyces psychrotrophicus* の培養液を出発物質とした不凍タンパク質の精製と生化学的性質の解析を行い、担子菌由来の不凍タンパク質と比較した。その結果、子囊菌由来の不凍タンパク質は担子菌由来のタンパク質と比べ、分子量、N末端のアミノ酸配列、アミノ酸組成、分子の糖鎖修飾、不凍活性が大きく異なることを明らかにした。子囊菌由来の不凍タンパク質の機能的特徴は凝固点降下が低く、子囊菌の菌糸成長に十分な氷の再結晶化を阻害する活性を示した。子囊菌は菌糸が凍結しても死滅しないため、菌糸の凍結抑制よりも、氷の再結晶化抑制効果が主要な機能であると考えられた。担子菌由来の不凍タンパク質の機能の特徴として、子囊菌由来の不凍タンパク質より10倍以上高い凝固点降下を示し、菌体環境の凍結抑制として働くことが示唆された。このようにして、新たな菌類由来不凍タンパク質の発見に至り、菌類において不凍タンパク質は多様性を示すことを明らかにした。ここで、糖鎖修飾されたタンパク質をコードする遺伝子を特定することが困難であったため、A.

psychrotrophicus のトランスクリプトーム解析を行い、子囊菌不凍タンパク質をコードする 2 種の候補遺伝子を同定した。候補遺伝子は N 末端アミノ酸配列、分子量、アミノ酸組成、糖鎖修飾の予想部位が培養液より精製された不凍タンパク質と一致した。同配列を担子菌由来の不凍タンパク質のものと比較した結果、約 25% の類似性を示すことが判明し、子囊菌由来の不凍タンパク質は新規分子種であることが裏付けられた。

本論文の後半では、336 種の藻類について細胞外の不凍活性を調べ、世界各地に生息する藻類の不凍活性を調べた結果を記述した。解析の結果、約 15% の 61 種について不凍活性を見出すことができた。現在までに、南極または北極の約 10 種の藻類についてのみ不凍タンパク質の発現が報告されている。本研究では、藻類由来不凍タンパク質の代表例として南極の海水に生息する珪藻類の *Navicula glaciei* 由来の不凍タンパク質に注目し、その氷結晶結合機能を解析して、配列相同性の高い担子菌由来の不凍タンパク質の機能と比較した。その結果、藻類の不凍タンパク質は氷の再結晶化を抑制するだけではなく、高い凝固点降下能を有することを明らかにした。また、珪藻類および担子菌由来の不凍タンパク質の凝固点降下能は類似した pH 依存性を示すこと、特に各々の生存環境の pH 付近において高い能力を発揮することを明らかにした。更に、これらの不凍タンパク質の氷結晶結合様式は時間依存的に変化することを見出し、その理由をこれらの不凍タンパク質が氷結晶の湾曲表面に対しても結合するためと考察した。このことは、低濃度の不凍タンパク質であっても、十分に長い時間を経ることで凝固点を降下させられることを示唆している。珪藻類及び担子菌類由来の不凍タンパク質の凝固点降下能は生存環境における凍結抑制に寄与すると考えられ、低濃度でも十分な効果を示すと考えられる。

総じて本論文は、菌類及び藻類について過去に例のない膨大な細胞外不凍活性の探索を行った結果について記述した。特に、南極産の子囊菌由来の新規不凍タンパク質を単離精製するに至り、その性質及び機能の解析に成功した。担子菌由来の不凍タンパク質との間で生化学的性質の比較を行い、菌類不凍タンパク質は多様性を示すことを明らかにした。更に、アミノ酸配列相同性の高い担子菌類と珪藻類由来の不凍タンパク質の機能解析も行った。両者には高い不凍活性及びその時間に依存した氷結晶結合様式があることを見出し、菌類及び藻類の不凍タンパク質の生理的機能を考察するまでに至った。

学位論文審査の要旨

主 査 客員教授 津 田 栄
(連携分野教員)

副 査 客員教授 扇 谷 悟
(連携分野教員)

副 査 教 授 出 村 誠
(生命科学院)

副 査 客員准教授 星 野 保
(連携分野教員)

学位論文題名

Study on Antifreeze Proteins from Cold Adapted Fungi and Diatoms (低温適応菌類及び藻類由来の不凍タンパク質に関する研究)

本学位論文は、一般に不凍タンパク質 (Antifreeze Protein: AFP) と呼ばれている生体内氷結晶結合物質に関して、その菌類における多様性と構造機能相関の研究成果を申請者が詳述したものです。

前半では、南極産の子囊菌 *Antarctomyces psychrotrophicus* の培養液を出発物質とした菌類由来 AFP の精製と生化学的性質の解析結果について記述し、この AFP は担子菌由来のものとは比べ、分子量、N末端のアミノ酸配列、アミノ酸組成、分子の糖鎖修飾、不凍活性が大きく異なることを明らかにしています。更に、子囊菌 AFP は凝固点降下能力が低い一方で氷の再結晶化を強く阻害すること、担子菌由来 AFP は子囊菌由来 AFP より 10 倍以上高い凝固点降下を有し菌体環境の凍結抑制として働くことを記述しています。このように新たな菌類由来 AFP を見出すと共に、菌類 AFP が多様性を示すことを初めて明らかにしました。更に、トランスクリプトーム解析に基づいた子囊菌 AFP コード遺伝子の同定、見出された候補遺伝子が子囊菌 AFP の N 末端アミノ酸配列、分子量、アミノ酸組成、糖鎖修飾の予想部位と一致することから、子囊菌由来 AFP はこれまでに報告の無い新規分子種であることを初めて明らかにしました。

後半では、世界中から様々に集めた 336 種もの藻類について細胞外の AFP 活性を調べ、世界各地に生息する藻類の不凍活性を調べた結果について記述しています。約 15% である 61 種について AFP 活性を見出し、南極海氷に生息する珪藻類の *Navicula glaciei* 由来 AFP について、これが氷の再結晶化を抑制するのみならず高い凝固点降下能を有することを初めて明らかにしました。また、菌類 AFP の氷結晶結合様式は時間依存的に変化し、低濃度であっても氷結晶上に長時間存在することによって凝固点を降下させる働きを有することを明らかにしました。

本論文に詳述された研究成果は、申請者の主著論文として複数報の国際学会誌に掲載され当該研究分野に大きな発展をもたらしました。よって本論文は北海道大学博士（理学）の学位申請論文として審査に値するものと認めます。