

# 博士學位論文

内容の要旨

及び

審査結果の要旨

令和6年3月

近畿大学大学院

農学研究科

学位論文審査結果の報告書

氏 名 小 西 康 仁

---

生 年 月 日 1981 年 3 月 8 日

本 籍 (国籍) 香 川 県

---

学位の種類 博 士 ( 農 学 )

学位記番号 第 2 6 1 号

学位授与の条件 学位規程第5条該当  
(博士の学位)

論 文 題 目 Studies on cell wall decomposition

---

of *Tricholoma matsutake* using bacterial enzymes

---

(細菌由来酵素を用いた*Tricholoma matsutake*細胞壁分解に関する研究)

---

学位論文受理日 令和6年 1月 16日

学位論文審査終了日 令和6年 2月 6日

審 査 委 員

(主 査) 大 沼 貴 之 教 授

---

(副主査) 上 垣 浩 一 教 授

---

(副主査) 白 坂 憲 章 教 授

---

(副 査)

---

指 導 教 員 白 坂 憲 章 教 授

---

## 論文内容の要旨

担子菌には商業的に価値の高い種が多数存在しており、生産を安定化するため、および新規なキノコの栽培を目指した生化学的、遺伝子工学的研究が必要となってくる。しかし、担子菌が有する多くの遺伝子は機能が解明されていない。マツタケ (*Tricholoma matsutake*) もその中のきのこの一つであり、人工栽培化の確立が強く求められている。一般的に生物の遺伝子機能解析の手法として遺伝子欠損株の作成などが行われるが、その際には担子菌などの糸状菌ではプロトプラスト化した細胞を用いるのが一般的であるとともに最も効率の良い手法である。しかしプロトプラスト法では高いプロトプラスト形成率や再生率が重要であることも事実である。糸状菌の細胞壁を構成する成分は、水溶性  $\beta$ -グルカンをも有する外層、アルカリ可溶性の  $\alpha$ -1,3-グルカンをも有する中間層、およびキチンと密接に結合した  $\beta$ -1,3 および  $\beta$ -1,6-グルカンであるアルカリ不溶性の内部層という複雑な 3層構造を有しているとされている。そのため、セルラーゼやキチナーゼを主成分とした市販の細胞壁分解酵素を主体とした処理を行うことでプロトプラスト化が試みられているが、これらの酵素のみでは中間層の  $\alpha$ -1,3-グルカンの分解が困難であり、担子菌類ではプロトプラストの作成が困難なケースも多い。

そこで本研究では中間層の主成分であると予想される  $\alpha$ -1,3-グルカンに着目し、これを分解する  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼに着目した。 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの担子菌への利用例として、*Bacillus circulans* KA-304 株由来の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ (Ag1-KA) およびキチナーゼを用いて *Schizophyllum commune* のプロトプラスト形成率を有意に上昇させた報告があり、 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼが担子菌のプロトプラスト形成に有効であることが示唆されている。また、*Paenibacillus glycanilyticus* FH11 株由来の 2 種類の組換え  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼでも同様の報告がある。このことから、担子菌のプロトプラスト形成には GH ファミリー87の細菌型酵素を用いることが有効である可能性が考えられる。GH ファミリー87に分類される細菌型の  $\alpha$ -1,3-グルコシダーゼは、触媒ドメインの遺伝子配列の違いから 3 つのサブグループに分類されている。サブグループ 1 とサブグループ 3 については、いくつかの細菌から酵素学的性質が実験され、報告されている。しかし、サブグループ 2 の酵素の化学的特性については詳細な報告がない。

そこで本研究の第1章では、マツタケの安定したプロトプラスト形成のために、GH ファミリー87 の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの諸性質の解析を目的として、サブグループ 2に属する *Paenibacillus alginolyticus* NBRC15375 株由来の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ (PaAg1) をクローニングし、大腸菌で発現させた。また、サブグループ 1 およびサブグループ 3 に属する *P. glycanilyticus* NBRC16188 株由来の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ (PgAg1-N1 および PgAg1-N2) もクローニングし、大腸菌で発現させ、これら 3 つのサブグループの酵素特性を比較した。

次に、第2章ではマツタケの細胞壁を消化する土壌細菌をスクリーニングし、本細菌の生産する $\alpha$ -1,3-グルカナーゼを精製し、諸性質を解析した。

## 第1章

### GH ファミリー87 のサブグループ 2 (マイナーグループ) に分類される *P. alginolyticus* NBRC15375 由来 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの発現と特性

細菌の $\alpha$ -1,3-グルカナーゼはグリコシドヒドロラーゼ (GH) ファミリー87 に分類され、触媒ドメインの遺伝子配列の違いから3つのサブグループに分類されている。サブグループ1とサブグループ3については、いくつかの細菌から酵素学的性質が実験され、報告されている。しかし、サブグループ2の酵素の化学的特性はこれまで調べられていない。GH ファミリー87のサブグループ2に属する *P. alginolyticus* NBRC15375 由来の $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ遺伝子 (PaAg1) をクローニングし、大腸菌で発現させた。また、*P. glycanilyticus* NBRC16188 由来の PgAg1-N1 (サブグループ3) と PgAg1-N2 (サブグループ1) を大腸菌で発現させ、その酵素特性を比較した。PaAg1のアミノ酸配列は、触媒ドメインのみを比較した場合、他のサブグループとの相同性は有意に低いことが示された。ムタン分解反応によるオリゴ糖生成物は、GH ファミリー87のサブグループ1、2、3間で異なる特徴を持つようであった。

## 第2章

### マツタケ子実体を分解する *Paenibacillus* 属 MU1 株由来の $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの精製とその諸性質の解析

マツタケのプロトプラスト生産を目的として、マツタケの乾燥子実体に対する分解活性を有する MU1 株は、マツタケ子実体を唯一の栄養源とする培地を用いて土壌試料から分離した。そのため、マツタケの細胞壁を分解する可能性がある。本菌のドラフトゲノム配列は、36 コンティグ、合計 6.6M bp、平均 184,698bpであった。全ゲノム配列データから、MU1 株は *Paenibacillus* 属と同定された。本菌の分解活性のうち、 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼを均質に精製し、その酵素特性を明らかにした。本酵素はムタンから精製した $\alpha$ -1,3-グルカンに作用するが、他の多糖類やオリゴ糖は基質とならない。酵素はリン酸緩衝液中にて、40°C、pH6.0 付近で最大活性を示した。酵素遺伝子は、質量分析および全ゲノム解析情報を参考にクローニングされた。推定されたアミノ酸配列は、*P. glycanilyticus* や他の *Paenibacillus* 属の discoidin domain-containing protein や $\alpha$ -1,3-グルカナーゼと高い相同性を示した。以上の結果より、本酵素は GH ファミリー87のマイナーグループ (サブグループ3) に分類された。

## 論文審査結果の要旨

一般的に生物の遺伝子機能解析の手法として遺伝子欠損株の作成が行われるが、担子菌などの糸状菌ではプロトプラスト化した細胞を用いるのが一般的であるとともに最も効率の良い手法である。しかしこの手法では、高いプロトプラスト形成率や再生率が重要であるが担子菌類においては必ずしも確立された手法ではない。このことは糸状菌の細胞壁を構成する成分は、水溶性 $\beta$ -グルカンを含む外層、アルカリ可溶性の $\alpha$ -1,3-グルカンを含む中間層、およびキチンと密接に結合した $\beta$ -1,3 および $\beta$ -1,6-グルカンであるアルカリ不溶性の内部層という複雑な3層構造を有していることに起因していると考えられている。そこでプロトプラスト化にはセルラーゼやキチナーゼを主成分とした市販の細胞壁分解酵素を主体とした処理が試みられているが、これらの酵素のみでは中間層の $\alpha$ -1,3-グルカンの分解が困難であり、プロトプラストの作成が困難なケースも多い。

そこで本研究では中間層の主成分であると予想される $\alpha$ -1,3-グルカンに着目し、これを分解する $\alpha$ -1,3-グルカナーゼに着目した。 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの担子菌への利用例として、*Bacillus circulans* KA-304 株由来の $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ (Ag1-KA) や *Paenibacillus glycanilyticus* FH11 株由来の組換え $\alpha$ -1,3-グルカナーゼをキチナーゼと併用することにより担子菌のプロトプラスト形成率を有意に上昇させた報告があり、 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼが担子菌のプロトプラスト形成に有効であることが示唆されている。本研究では、上記のように担子菌のプロトプラスト形成には GH ファミリー87の細菌型酵素を用いることが有効である可能性を考えた。

そこで本研究の第1章では、マツタケの安定したプロトプラスト形成のために、触媒ドメインの遺伝子配列の違いから3つのサブグループに分類されている $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの諸性質の解析を目的として、これまで詳細な報告のないサブグループ2に属する *Paenibacillus alginolyticus* NBRC15375 株由来の $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ (PaAg1) をクローニングし、大腸菌で発現させた。また、サブグループ1およびサブグループ3に属する *P. glycanilyticus* NBRC16188 株由来の $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ (PgAg1-N1 および PgAg1-N2) もクローニングし、大腸菌で発現させ、これら3つのサブグループの酵素特性を比較した。その結果、PaAg1のアミノ酸配列は、触媒ドメインのみを比較した場合、他のサブグループとの相同性は有意に低いことが示された。ムタン分解反応によるオリゴ糖生成物は、GH ファミリー87のサブグループ1、2、3間で異なり、PaAg1は4糖、PgAg1-N1は3糖、PgAg1-N2は2糖をそれぞれムタン由来の $\alpha$ -1,3-グルカンから生成物として生成すること明らかにしている。

第2章では、マツタケのプロトプラスト生産を目的として、マツタケの乾燥子実体に対する分解活性を有する MU1 株をマツタケ子実体を唯一の栄養源とする培地を用いて土壌試料から分離した。そのため、マツタケの細胞壁を分解する可能性があると考えられた。本菌のドラフトゲノム配列は、36 コンティグ、合計 6.6M-bpからなる平均 184,698bpであった。全ゲノム配列データから、MU1 株は *Paenibacillus* 属と同定された。本菌の分解活性のうち、 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼを均質に精製し、その酵素特性を明らかにした。本酵素はムタンから精製した $\alpha$ -1,3-グルカンに作用するが、他の多糖類やオリゴ糖は基質とならない。酵素はリン酸緩衝液中にて、40°C、pH6.0 付近で最大活性を示した。酵素遺伝子は、質量分析および全ゲノム解析情報を参考にクローニングされた。推定されたアミノ酸配列は、*P. glycanilyticus* や他の *Paenibacillus* 属の discoidin domain-containing protein や $\alpha$ -1,3-グルカナーゼと高い相同性を示した。以上の結果より、本酵素は GH ファミリー87 のマイナーグループ（サブグループ 3）に分類された。

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、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、令和6年2月13日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。