

論文の内容の要約

氏 名	築田 理華子
学位の種類	博士（農学）
学府又は研究科・専攻	連合農学研究科 環境資源共生科学専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文名	褐色腐朽菌におけるヘミセルロース分解酵素の酵素学的特徴および褐色腐朽材の形態学的特徴に関する研究

【論文の内容の要約】

木材は生物劣化を受けるため、木材を構造部材として使用する木造建築物を長期にわたり安全に利用するためには、生物劣化対策が極めて重要である。木材腐朽菌の一種である褐色腐朽菌は、木造建築物の構造部材に使用される針葉樹を腐朽することから、我が国における木造建築物の代表的な害菌である。さらに褐色腐朽菌は、腐朽の初期段階で木材の強度を急激に低下させるため、腐朽を早期に発見し、対策を講じる必要があるが、その木材分解機構については未だ明らかでない点も多く、詳細な理解が求められている。本菌の一つの特徴として、リグニン分解酵素や結晶性セルロース分解酵素を遺伝子レベルで欠損または大幅に減少させていることが知られている。これは、褐色腐朽菌が木材分解に必要な酵素分解系を完全に保持しないことを意味し、現在ではこの不完全な酵素分解系に加えて非酵素的な分解系が関与することで木材を分解していると考えられている。さらに、この非酵素的分解系は、腐朽初期に生じるセルロースの急激な重合度低下に関与すると考えられており、現在ではこれが木材の強度低下にもつながると考えられている。しかしながら、腐朽初期にはこのほかにも、木材細胞壁主成分の一つであるヘミセルロースが優先的に分解されることや、木材細胞壁に特徴的な形態変化が生じることが知られている。このことから、本研究ではこれら二点に焦点を当て、酵素学的手法と形態学的手法による調査を実施し、褐色腐朽初期のメカニズムに関する新たな洞察を得ることを目的とした。

褐色腐朽菌は保存する木材分解酵素の遺伝子数が他の木材腐朽菌と比較して少ないが、ヘミセルロース分解に関連する分解酵素は保存している特徴がある。これは本菌のヘミセルロース分解では酵素分解系が重要であることを示唆する。そこで第二章と第三章では、褐色腐朽菌のモデル菌である *Gloeophyllum trabeum* を対象とし、各種ヘミセルラーゼの機能解析を実施した。第二章では、*G. trabeum* が有する糖質加水分解酵素ファミリー10 (GH10) に属する3つのキシラナーゼ (*GtA6499*, *GtI38785*, *GtI40289*) を、酵母菌 *Pichia pastoris* を用いて異種発現させて機能解析を実施した。その結果、すべてにおいてカバ由来キシランに対する分解活性が観察され、キシラナーゼ活性を有することが示されたが、脱

リグニン処理をしたカバ木粉において分解活性が認められたのは、*Gt46499* と *Gt140289* のみであったことから、木材分解におけるこれらの役割はそれぞれで異なることが示唆された。また、*Gt140289* には N 末端にセルロース吸着ドメイン (CBM1) が付加していた。そこで、セルロース吸着性がヘミセルロース分解に与える影響を調査するために、CBM1 欠損型 (*Gt140289dCBM1*) も作出し、同様に調査を行なった。その結果、脱リグニン処理をしたカバ木粉を基質とした場合でのみ、分解活性が低下したことから、セルロース吸着性は木材中に存在するヘミセルロースを分解するために重要であることが示唆された。さらに、これら酵素を混合し、相乗作用を調査した結果、*Gt140289* と *Gt138785* の組み合わせにおいてのみ相乗効果が認められ、*Gt138785* は *Gt140289* から切り出されたキシランに対して作用することが示唆され、またこの相乗作用は CBM1 を欠損すると観察されなかったことから、セルロースへの吸着性がキシラナーゼの分解部位を制御していることが示唆された。第三章では糖質加水分解酵素ファミリー51 (GH51) に分類される *GtAbf51A* を酵母菌 *Pichia pastoris* を用いて異種発現させ、機能解析を行った。その結果、*GtAbf51A* は多糖基質に対してはほとんど作用せず、GH10 キシラナーゼの分解産物であるアラビノキシロオリゴ糖に活性を示したことから、これはキシラナーゼなどによって切り出されたアラビノキシロオリゴ糖に作用して、針葉樹キシランの分解に関与することが示唆された。

第四章では、褐色腐朽材の形態学的な調査を実施した。腐朽材は、脆く観察試料の作製時に壊れやすいことに加えて、腐朽の進行度合いにばらつきがあり観察が難しい点がある。本研究では、樹脂包埋切片の作製に加えて、近年、木材試料の観察に適応されたブロードイオンビームを用いて観察試料を作製し、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。放射柔細胞は、割合は少ないものの、長く生細胞として存在し、栄養分の貯蔵などを担う木材細胞である。本研究では、腐朽後に細胞内腔に観察された残渣が消失した特徴や、放射柔細胞の末端壁が優先的に分解された特徴が観察され、菌が残渣を代謝していること、そして末端壁を速やかに分解することで、菌が放射柔細胞を蔓延することが示唆された。さらに、末端壁には原形質連絡と呼ばれる孔が存在し、腐朽材では、原形質連絡から細胞間層にかけて腐朽痕が観察されたことから、菌がこれを利用して末端壁を腐朽していることが示唆された。樹木の大部分を占める仮道管では、従来の特徴であるS<sub>2</sub>層からの分解は観察されず、クラックやS<sub>1</sub>層とS<sub>2</sub>層の間での剥離が観察された。このような形態変化は以前の調査でも報告されており、これらは褐色腐朽菌がもたらす一般的な形態変化であることが示された。

第五章ではこれらの結果を踏まえ、褐色腐朽初期における分解機構について考察した。第四章で、クラックや剥離といった腐朽痕が観察されたことは、木材が組織構造レベルで健全でないことを示唆するものであり、そのような形態学的な変化によって木材強度が低下する可能性があった。また、腐朽材で観察されたS<sub>1</sub>層とS<sub>2</sub>層間の剥離は、ヘミセルロースの化学的な抽出によっても生じることが報告されており、本菌が腐朽初期にヘミセルロースを優先的に分解することを踏まえると、これが関与している可能性がある。本研究結果は、褐色腐朽初期の木材分解メカニズムに新たな洞察を提供する。