

氏 名(本籍) おお 大 たき 滝 しん 真 さく 作

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 博 第 8 4 8 号

学位授与年月日 平 成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専攻 農学研究科応用生命科学専攻
(博士課程)

学位論文題目 *Aspergillus oryzae* が産生する疎水表面吸着タンパク質に
関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 内 田 隆 史
(副 査) 教 授 山 谷 知 行
教 授 西 森 克 彦
助教授 阿 部 敬 悦

論文内容要旨

序論

現在、世界中で様々な種類の石油を原料とした合成高分子ポリマーがおよそ 1 億 4000 万トン/年の割合で生産されている。そして大量の合成高分子ポリマーが産業廃棄物として自然環境中に遺棄されている。近年、この問題を解決するために生分解性プラスチックが次々と作り出されてきた。そのなかでも polybutylene succinate (PBS) 及び polybutylene succinate-co-adipate (PBSA) は主に succinate、1,4-butandiol が重合されてできた生分解性ポリマーであり、コンポスト、湿土壌、活性汚泥、海水中で生分解される。現在生分解性プラスチックのほとんどが他の廃棄物とともに消却されるか、もしくはコンポストや土壌中で生分解されている。このため生分解性プラスチックを構成しているモノマーやオリゴエステルを回収することは不可能である。そこで我々は麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主として用いた PBSA のリサイクルシステムの構築を目指した。

A. oryzae は古来より清酒、味噌、醤油などの発酵産業に用いられ generally regarded as safe (GRSA) としてその安全性が認知されている。また、*A. oryzae* は優れたタンパク質生産の宿主であり、アミラーゼやプロテアーゼの高生産や異種タンパク質の生産に用いられている。この *A. oryzae* の有用性から *A. oryzae* のゲノム解析が行われ、その全ゲノム配列が明らかとなった。

A. oryzae は PBSA を唯一の炭素源として用いた最少培地にて PBSA を分解資化する。この PBSA 分解酵素として esterase の一種である CutL1 が単離された。また *A. oryzae* は PBSA 分解時に hydrophobin の一種である RolA を強力に発現していることが明らかとなった。RolA は両親媒性タンパク質であり、PBSA の疎水表面に対して吸着する。PBSA 表面に吸着した RolA は CutL1 と相互作用することによって CutL1 を PBSA 表面に濃縮し、PBSA の分解を促進する。これまで *A. oryzae* の PBSA 分解に関わるタンパク質として CutL1 と RolA が見出され、これらは疎水表面に対して非常に強い相互作用を示すことが明らかとなっている。そこで、*A. oryzae* が PBSA 分解時に産生する疎水表面吸着タンパク質を

分離することによって、新たな PBSA 分解促進タンパク質を見出すことができると考えた。そこで本研究は *A. oryzae* が産生する疎水表面吸着タンパク質を単離し、その PBSA 分解促進効果を検証することを目的とした。

第1章 *A. oryzae* が産生する疎水表面吸着タンパク質の分離及び同定

A. oryzae が PBSA 分解時に産生するタンパク質から疎水表面吸着タンパク質の分離を試みた。疎水性担体として Octyl-cellulofine type-S カラムを用い、*A. oryzae* による PBSA 分解濾液からこのカラムと強い相互作用を示すタンパク質の分離を行った。PBSA 分解濾液を 30 % 硫酸で飽和させカラムにアプライした後、タンパク質を硫酸濃度 30-0 % の直線勾配で溶出した (Fig. 1A)。そして硫酸濃度 0 % 付近で溶出した 14.5 kDa のタンパク質の N 末端を解析した結果 DASAVLA という配列が得られた。この配列について *A. oryzae* genome database にて BLAST 検索を行った結果、14.5 kDa タンパク質の推定アミノ酸配列を取得することができた。そしてこの 14.5 kDa タンパク質の相同配列を検索した結果、全く新規タンパク質であることが明らかになり、このタンパク質を **Hydrophobic surface binding protein A (HsbA)** と名付けた。

さらに強力な疎水表面吸着タンパク質を分離するために、HsbA を溶出した後のカラムを精製水で洗浄後、0-70 % の Et-OH 直線勾配でタンパク質の分離を行った。その結果、16、20、100 kDa に溶出タンパク質が見られた (Fig. 1B)。

16 kDa タンパク質の N 末端を解析した結果、AKSVPGNNPL という配列が得られた。この配列について blast 解析を行ったところ、*A. oryzae* で既に報告されている phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein (PG/PI-TP, accession number AAG13652) であることが明らかとなった。PG/PI-TP は細胞内膜の phosphatidylglycerol と phosphatidylinositol の輸送を仲介しているタンパク質であり、菌体内タンパク質であることが報告されている。また、PG/PI-TP のアミノ酸配列内には lipid の結合に関与していると考えられている MD-2-related lipid-

recognition (ML) ドメインが含まれている。

20 kDa タンパク質については N 末端を解析することができなかったが、抗 CutL1 抗体を用いた Western blot 解析により CutL1 であることが明らかとなった。

100 kDa タンパク質の N 末端は ASDDSVFLLG であり、*A. oryzae* genome database に対して BLAST 検索を行い 100 kDa タンパク質の推定アミノ酸配列を取得することができた。この推定アミノ酸配列の相同配列を検索した結果、キイロシヨウジョウバエの中性 ceramidase と 36 % の相同性を示したことから 100 kDa タンパク質は ceramide 分解酵素である ceramidase であることが示唆された。以後、この 100 kDa タンパク質を AO ceramidase と呼ぶ。

CutL1 については PBSA 分解機構について既に調べられている。また、PG/PI-TP は菌体内タンパク質であると報告されており、PBSA 分解に関与している可能性は低いと考えられた。そこで HsbA と AO ceramidase について、その PBSA 分解への関与を検証することにした。

第 2 章 新規疎水表面吸着タンパク質 HsbA の PBSA 分解促進機構

HsbA の推定アミノ酸配列について BLAST 解析を行った結果、HsbA は *Aspergillus fumigatus* と *Aspergillus nidulans* の機能未知タンパク質と 28-44 % の相同性を示し 昆虫感染糸状菌である *Metarhizium anisopliae* が産生する 4MeS と 31 % の相同性を示した。4MeS は全く機能未知であったが、NCBI の protein database を参照することにより *M. anisopliae* が天然の疎水性物質である昆虫クチクラ上で生育する際に発現することが明らかとなった。そこで HsbA は *A. oryzae* が PBSA の疎水表面上で生育する際に必要であるタンパク質であることが考えられた。*A. oryzae* の HsbA 高発現株を作成し、疎水性物質である PBSA とポリウレタン上での生育を観察したところ、HsbA 高発現株は空ベクター株と比較して非常に旺盛な生育を示した (Fig. 2)。そこで HsbA は疎水表面に吸着し、*A. oryzae* の生育を促していると考えられた。PBSA 分解時における HsbA の局在を調べた結

果、HsbA は細胞外に分泌されており、細胞壁、細胞膜、細胞質には局在していなかった (Fig. 3A)。HsbA の発現条件を調べたところ、HsbA は *A. oryzae* を PBSA で培養した場合にのみ発現しており、そのモノマー成分である succinate と 1,4-butandiol で培養した場合は発現しなかった (Fig. 3B)。

HsbA 高発現株の培養上清から HsbA を精製し、*in vitro* における PBSA への吸着を観察した。精製 HsbA 溶液と PBSA ペレットを混合し、溶液中の HsbA の減少を観察したが、HsbA は PBSA に吸着しなかった。そこで溶液中に様々な塩を添加したところ、NaCl と CaCl₂ を添加した場合において HsbA が PBSA ペレットに強く吸着した (Fig. 4A)。次に HsbA が PBSA ペレットに結合した状態における溶出条件を検討した。その結果、PBSA ペレットに結合している HsbA は Tween 80 や Triton X-100 などの非イオン性界面活性剤を添加した場合に溶出した (Fig. 4B)。このことより HsbA は疎水的相互作用によって PBSA ペレットに結合していることが示唆された。そして、CaCl₂ を用いて HsbA を PBSA ペレットに結合させた場合においては EDTA を添加すると HsbA が溶出した (Fig. 4B)。このことから塩化物イオンではなく、Ca²⁺ が HsbA の吸着に関与していることが明らかとなった。

HsbA を PBSA 表面にコーティングし、CutL1による PBSA 分解促進効果を確認した。HsbA に CaCl₂ を添加することによって PBSA マイクロパーティクルを HsbA でコーティングした。この PBSA マイクロパーティクルを洗浄した後に CutL1 を加え、経時的にその濁度の減少を観察した。HsbA コーティングした PBSA マイクロパーティクルは HsbA ノンコーティングの PBSA マイクロパーティクルと比較して最大で約 24 % の分解促進を受けた (Fig. 5)。また、PBSA に対して HsbA コーティングを行わず、CutL1 と HsbA を同時に添加した場合は分解が促進されなかった (Fig. 5)。この分解促進機構を解明するために PBSA フィルム上に HsbA を固定化し、精製 CutL1 を含んだ水溶液に浸した。このフィルムを洗浄後、抗 CutL1 抗体を用いてフィルム上における CutL1 の局在を観察した。その結果、CutL1 は HsbA を固定化したスポット上に濃縮されて存在するこ

とが明らかとなった (Fig. 6)。この CutL1 濃縮効果が HsbA と CutL1 の相互作用であると考え、Quartz crystal microbalance (QCM) 解析を行った。CutL1 をリガンドとした場合はアナライトとして用いた HsbA との相互作用は見られなかったが (Fig. 7A, curve 1)、HsbA をリガンドとして用いた場合は CutL1 との強い相互作用が見られた (Fig. 7B, curve 4)。したがって、CutL1 は疎水表面に固定化された HsbA と相互作用を示すことが明らかとなった。HsbA による PBSA 分解促進モデルを Fig. 8 に示す。PBSA 表面に吸着した HsbA は CutL1 と相互作用し、素早く CutL1 を PBSA 表面にリクルートし濃縮する。PBSA 表面に濃縮された CutL1 によって PBSA は効率よく分解されると考えられた。

第3章 *A. oryzae* が産生する AO ceramidase の PBSA 分解促進機構

AO ceramidase の性質を調べるために、*A. oryzae* の AO ceramidase 高発現株を造成した。そしてこの高発現株の培養上清より AO ceramidase を精製した (Fig. 9)。この精製酵素に対して EndoH を添加し AO ceramidase の糖鎖分解を試みた。その結果 AO ceramidase のバンドは 91 kDa にシフトした。したがって AO ceramidase は糖タンパク質であることが明らかとなった。AO ceramidase の ceramidase 活性を ceramide の蛍光基質である C6-NBD-ceramide と C12-NBD-ceramide を用いて調べた。各基質と AO ceramidase を混合し、インキュベートした後、TLC で各基質の分解物を検出した。C6-NBD-ceramide では分解物は全く見られなかったが、C12-NBD-ceramide において分解物が見られた (Fig. 10)。このことから、AO ceramidase は実際に ceramide 分解活性を持つ ceramidase であることが確認された。また、この結果より AO ceramidase は炭素鎖の長い基質を好む傾向があることが示唆された。次に C12-NBD-ceramide を用いて AO ceramidase の基本性質を調べた。そしてその最適 pH は 6 であり、広い pH において安定であることが明らかとなった (Fig. 11A)。また、その最適温度は 65 °C であり、40 °C までは安定で 80 °C において完全に失活した (Fig. 11B)。

Ceramidase はその最適 pH でアルカリ型と中性型に分けられ、一般的にバクテリアのものはアルカリ型であり粘菌を除いた真核生物のものは中性型である (Table 1)。AO ceramidase は最適 pH を 6 に持つことから中性型であった。高等真核生物の ceramidase は主に菌体内酵素であるのに対し、バクテリア及び粘菌の ceramidase は分泌型である (Table 1)。AO ceramidase も分泌型であり、菌体外 ceramide を基質にしていると考えられた。また AO ceramidase の相同配列を糸状菌 *A. fumigatus*、*A. nidulans*、*Neurospora crassa*、*Magnaporthe grisea*、そして *Fusarium graminearum* のゲノムデータベースで検索したところ全てのデータベース中で相同配列が認められた (Table 2)。一方、酵母である *Saccharomyces cerevisiae*、*Shizosaccharomyces pombe*、そして *Candida albicans* のデータベース中には相同配列は見られなかったことから (Table 2)、ceramidase は糸状菌に特有であることが明らかになった。

AO ceramidase の PBSA 分解への関与を確かめるために、PBSA マイクロパーティクルと精製 AO ceramidase を混合、インキュベートした。しかし、AO ceramidase による PBSA マイクロパーティクルの分解は見られなかった (Fig. 12)。次に、AO ceramidase と CutL1 を混合し、PBSA マイクロパーティクルの分解を観察した。その結果、PBSA マイクロパーティクルを CutL1 単独で分解した場合と比較して、CutL1 と AO ceramidase を混合した場合に最大で 50% 近くの PBSA 分解促進が観察された (Fig. 12)。AO ceramidase の PBSA 分解促進機構を解明するために、CutL1 による PBS 分解物に対して AO ceramidase を加えて PBS 分解物の組成の変化を見た。その結果 AO ceramidase を加えた場合において 1 分子の succinate、2 分子の 1,4-butandiol、そして 1,6-hexamethylene diisocyanate からなるエステル化合物 (以下 SBHB とする) が 68% まで減少した (Fig. 13)。SBHB 分子内には 2 つのウレタン結合が含まれている (Fig. 14)。ウレタン結合とセラミド結合は構造的に類似しているため、AO ceramidase は PBSA 分子内のウレタン結合を分解していると考えられた。CutL1 は高分子の PBSA に対して低分子のオリゴマーの単位でしか切り出すことができず exo 型的に働く。そこで AO

ceramidase が PBSA 分子内のウレタン結合を分解することにより、CutL1 が基質として利用できる PBSA オリゴマーの遊離末端が増えると考えられた。したがって AO ceramidase は高分子の PBSA に対して endo 型的に働くと考えられた。この CutL1 と AO ceramidase を混合することにより、exo 型と endo 型の酵素分解によって高分子の PBSA が協調的に分解されると考えられた (Fig. 15)。

総合考察

A. oryzae が PBSA 分解時に産生するタンパク質から特に疎水性基質と強い相互作用を示すタンパク質を選抜し同定を行った。その結果、新規疎水表面吸着タンパク質である HsbA、PG/PI-TP、CutL1、そして AO ceramidase を取得することができた。その中から HsbA と AO ceramidase について PBSA 分解への関与を検証し、この両タンパク質が CutL1 による PBSA 分解を促進する効果があることを明らかにした。HsbA は PBSA 表面に吸着すると CutL1 と相互作用し、PBSA 表面に CutL1 を濃縮することにより PBSA 分解を促進する効果があると考えられた (Fig. 8)。また AO ceramidase は PBSA 分子内のウレタン結合を分解することにより CutL1 と協調的に PBSA を分解する働きがあることと考えられた (Fig. 15)。

CutL1 は疎水的なエステル物質を基質とし、AO ceramidase は疎水的な ceramide を基質とする酵素である。そして、PG/PI-TP は疎水的な脂質の認識に関与している ML domain を持つタンパク質である。したがって、これらのタンパク質は全て疎水性基質と強く相互作用すると考えられ、本研究で確立された疎水表面吸着タンパク質分離法は非常に有効な方法であると考えられた。また PG/PI-TP は菌体内タンパク質であると報告されているにも関わらず菌体外より分離された。そこで PG/PI-TP が菌体外の基質を輸送するような未知の機構が存在している可能性が考えられた。

現在まで糸状菌が産生する両親媒性タンパク質として hydrophobin のみが知られており、詳しく解析が行われきた。しかし本研究によって新規の両親媒性タン

パク質である HsbA ファミリータンパク質が発見され、その性質が明らかとなった。このことにより、糸状菌は様々な種類の両親媒性タンパク質を巧みに用い、自然環境中に存在する疎水性基質上で展開し、その疎水性基質を分解資化していると考えられた。

現在まで真核生物からバクテリアまで様々な ceramidase についてその性質が調べられてきた。しかし ceramidase が ceramide 以外の基質を加水分解するという報告は無く、ceramidase が生分解性プラスチックの分解を促進することは全く新しい発見である。AO ceramidase の PBSA 分解促進効果を説明する一つのモデルとして AO ceramidase が PBSA 分子内のウレタン結合を分解するというモデルを提唱した (Fig. 15)。しかしながら、本研究において AO ceramidase が直接的にウレタン結合を分解していることを証明することができなかった。したがって、AO ceramidase が別の機構で PBSA の分解を促進している可能性も考えられ、今後 AO ceramidase の詳細な PBSA 分解促進機構の解明が期待される。

A. oryzae が PBSA を分解する際に両親媒性タンパク質である HsbA と加水分解酵素である CutL1 と AO ceramidase は協調的に働き、PBSA を分解していると考えられる。そのモデルを Fig. 16 に示す。PBSA の疎水表面は *A. oryzae* の生育を妨げる (Fig. 16-1)。しかし *A. oryzae* は両親媒性タンパク質である HsbA を産生し、その疎水表面をコーティングすることによって疎水表面上で菌糸を展開させる (Fig. 16-2)。疎水表面上で展開した *A. oryzae* は CutL1 と ceramidase を産生し、協調的に PBSA を分解資化していく (Fig. 16-3,4)。

現在まで糸状菌が産生する疎水表面吸着タンパク質を特異的に標的とし、研究が行われた例はほとんどない。本研究において *A. oryzae* が産生する疎水表面吸着タンパク質の機能を明らかにすることにより、糸状菌の疎水性基質に対する新たな生物学的な側面を明らかにすることができた。今後も糸状菌の新たな疎水表面吸着タンパク質について研究が行われ、糸状菌と疎水性基質の特異な世界の解明されることが期待される。

要約

- 1) *A. oryzae* が PBSA 分解時に産生する疎水表面吸着タンパク質として HsbA、PG/PI-TP、CutL1、そして AO ceramidase を分離した。
- 2) HsbA と AO ceramidase は CutL1 による PBSA 分解を促進する効果があることを明らかにした。
- 3) PBSA 表面に吸着した HsbA は CutL1 と相互作用し、その表面に CutL1 を濃縮することによって PBSA の分解を促進することが示唆された。
- 4) AO ceramidase は PBSA 分子内のウレタン結合を分解することにより、CutL1 による PBSA の分解を促進していると考えられた。

原著論文

Ohtaki, S., H. Maeda, T. Takahashi, Y. Yamagata, F. Hasegawa, K. Gomi, T. Nakajima, and K. Abe.

A novel hydrophobic surface binding protein, HsbA, produced by *Aspergillus oryzae*.
(Submitted to Applied and Environmental Microbiology).

Ohtaki, S., Y. Yamagata, F. Hasegawa, K. Gomi, K. Abe and T. Uchida.

The fungal ceramidase promotes degradation of polybutylen succinate-co-adipate.
(Manuscript in preparation)

参考論文

Takahashi, T., H. Maeda, S. Yoneda, S. Ohtaki, Y. Yamagata, F. Hasegawa, K. Gomi, T. Nakajima, and K. Abe. (2005)

The fungal hydrophobin RolA recruits polyesterase and laterally moves on hydrophobic surfaces.

Molecular Microbiology 57(6)1780-1796.

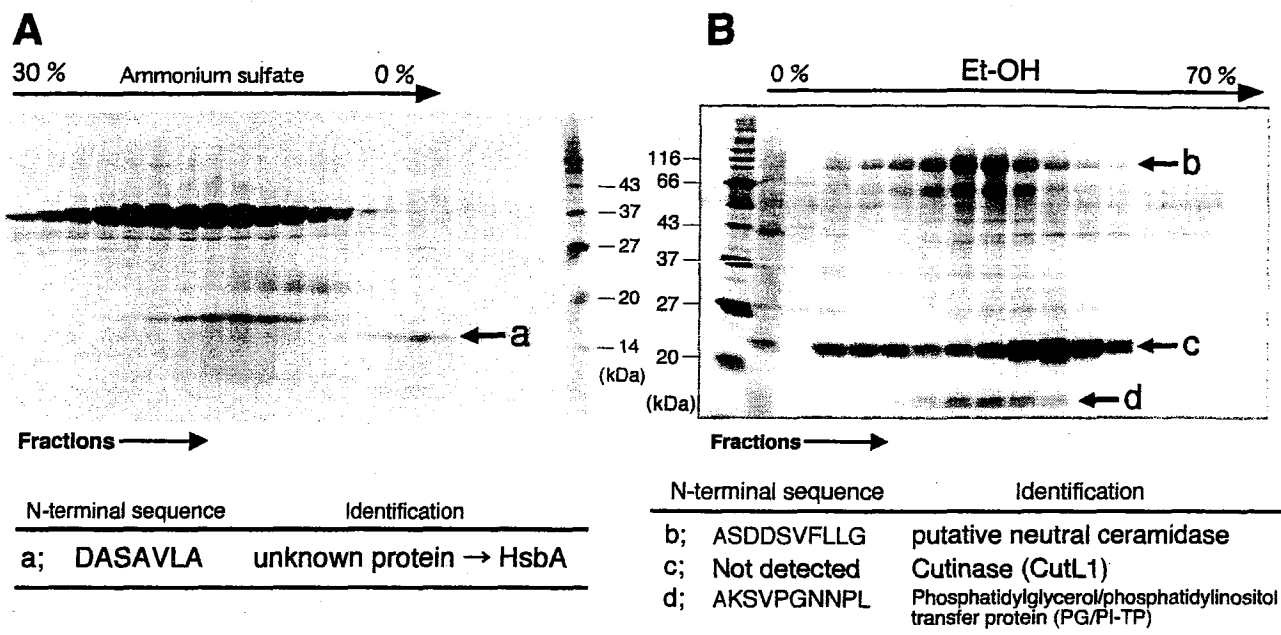


Fig. 1. Isolation and identification of hydrophobic surface binding proteins in eluted fractions from Octyl-cellulofine. The culture supernatant of *A. oryzae* RIB40 grown in CD-PBSA was applied to an octyl-cellulofine column. (A) Proteins were eluted from the column by a linear gradient (30-0 %) of ammonium sulfate. (B) Proteins were eluted from the column by a linear gradient (0-70 %) of Et-OH. The N-terminal sequences of the hydrophobic surface binding proteins were detected by protein sequencing. The proteins were identified by blast analysis against *A. oryzae* RIB40 genome database.

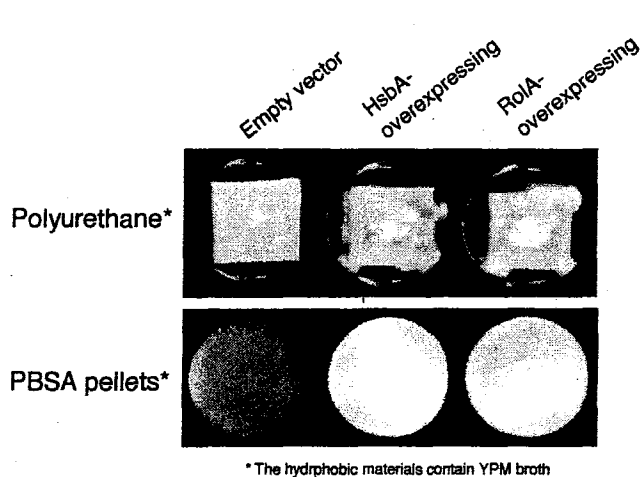


Fig. 2. Growth of the HsbA overexpressing strain on the hydrophobic materials. Polyurethane sheet (6 cm x 6 cm x 6 mm) and PBSA pellets (average diameter, 1 mm) contained YPM broth (10 ml). Spores (10^6) of *A. oryzae* strains, such as HsbA-overexpressing, RolA-overexpressing, and an empty vector strain were inoculated to the polyurethane sheets or PBSA pellets. The polyurethane sheet and PBSA pellets were incubated at 30 °C for 5 days. The HsbA-overexpressing and RolA overexpressing strains grew well on the hydrophobic materials, but the empty vector strain indicated poor growth.

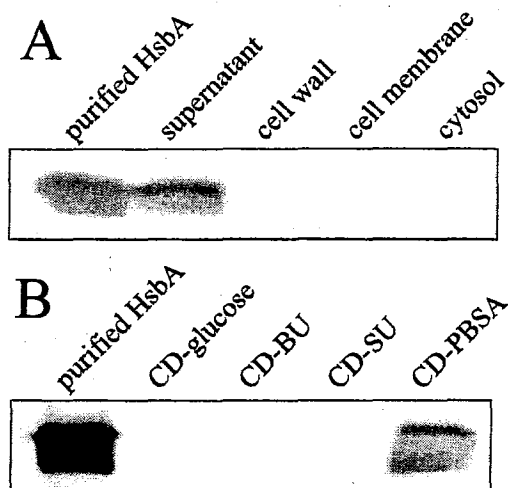


Fig. 3. Expression and localization of HsbA. Western blot analysis was performed with an anti-HsbA polyclonal antibody towards proteins (100 μ g) from (A) the supernatant, cell wall, cell membrane and cytoplasmic fractions, (B) supernatants from broths of culture grown on CD-glucose, CD-1,4-butandiol, CD-succinate or CD-PBSA.

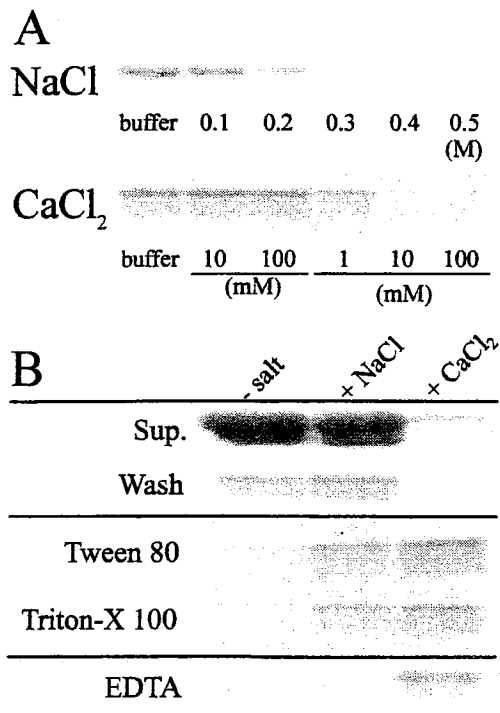


Fig. 4. Binding and release of HsbA to PBSA pellets. PBSA pellets (0.2 g) and purified HsbA (10 μ g) were mixed in the presence of NaCl or CaCl₂. (A) PBSA pellets were removed by centrifugation. The supernatant were analyzed by SDS-PAGE and HsbA was detected. (B) PBSA pellets were washed three times with washing buffer and then mixed with 0.01% (w/v) Tween 80, 0.01% (w/v) Triton-X 100, or 10 mM EDTA. The PBSA pellets were removed by centrifugation, and the HsbA remaining in the supernatant was precipitated with TCA and then detected by SDS-PAGE.

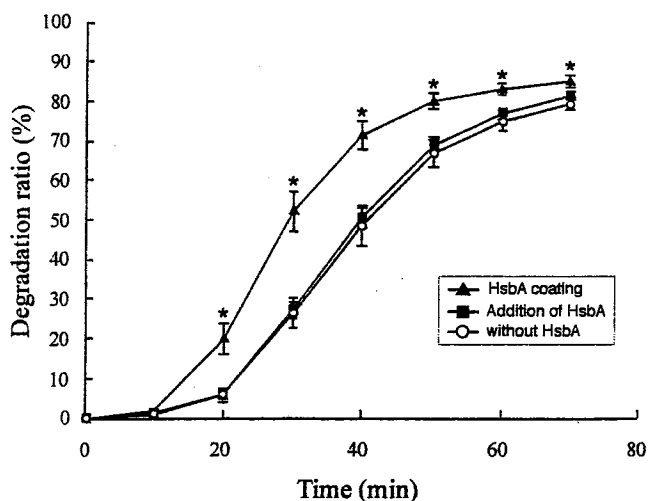


Fig. 5. HsbA and CutL1 combine to degrade PBSA. HsbA was absorbed to PBSA microparticles in the presence (\blacktriangle) or absence (\blacksquare) of CaCl₂ and (\circ) denotes lack of HsbA as control. PBSA microparticles were washed three times with buffer. PBSA microparticles were resuspended in a degradation buffer containing 5 μ g/ml CutL1. OD₆₃₀ of the PBSA suspension was measured and the degradation ratio was calculated. The percent degradation (P_d) was calculated as $P_d = (1 - C_a/C_b) \times 100$, where C_a is the concentration of the PBSA microparticles after degradation and C_b is the concentration of the PBSA microparticles before degradation. The data are the mean \pm SD for 6 measurements. Statistical analysis was performed with a Student *t* test. *, $P < 0.01$.



Fig. 6. Condensation of CutL1 on the HsbA immobilized on the surface of PBSA film. Purified HsbA (10 μ g) was immobilized on the surface of PBSA film. The film was washed with purified water 3 times. The film was soaked in CutL1 solution (10 μ g/ml) for 1 hour at 37 $^{\circ}$ C. The film was washed with purified water 3 times. Then, the film was visualized by immunostaining with anti-HsbA or anti-CutL1 polyclonal antibodies followed by alkaline phosphatase-conjugated anti-IgG antibodies.

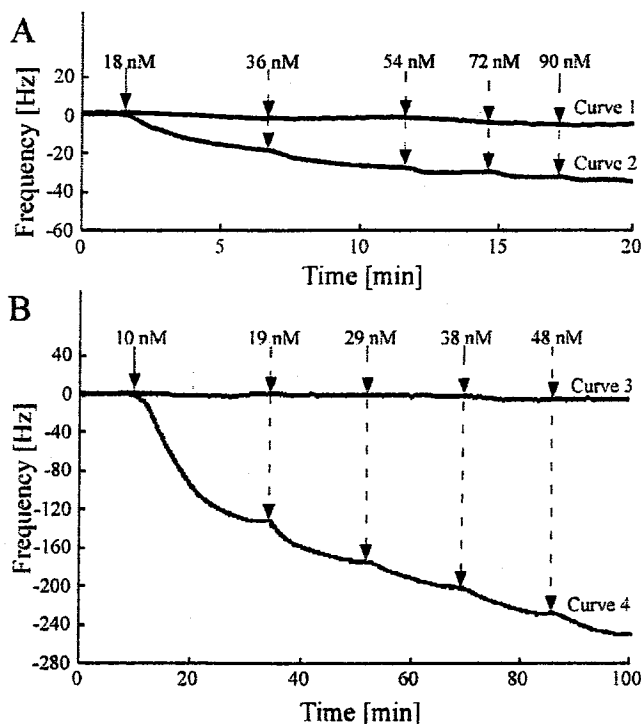


Fig. 7. QCM monitoring of interaction between HsbA and CutL1. (A) Interaction of soluble BSA (curve 2) or HsbA (curve 1) with CutL1 coated on a QCM electrode. (B) Interaction of soluble BSA (curve 3) or CutL1 (curve 4) with HsbA coated on a QCM electrode. Curve 1: HsbA (18–90 nM final concentrations) was injected stepwise into an analysis chamber in which a CutL1-coated electrode was immersed. Curve 2: BSA (18–90 nM final concentrations) was injected stepwise into an analysis chamber in which a CutL1-coated electrode was immersed. Curve 3: BSA (10–48 nM final concentration) was injected stepwise into the analysis chamber in which HsbA-coated electrode was immersed. Curve 4: CutL1 (10–48 nM final concentration) was injected stepwise into the analysis chamber in which HsbA-coated electrode was immersed.

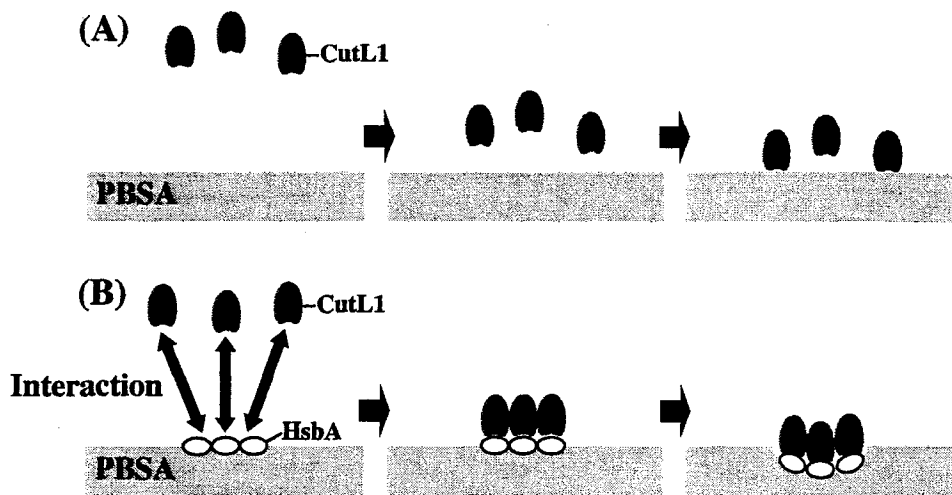


Fig. 8. The schematic model of HsbA and CutL1 combining to degrade PBSA. (A) CutL1 degrades PBSA without any condensation by amphiphilic proteins. (B) CutL1 molecules are condensed on the PBSA surface by interaction between CutL1 molecules and HsbA molecules adsorbed on the PBSA surface. Consequently, CutL1 molecules rapidly accumulate on the PBSA surface and enzymatic degradation of PBSA could be stimulated.

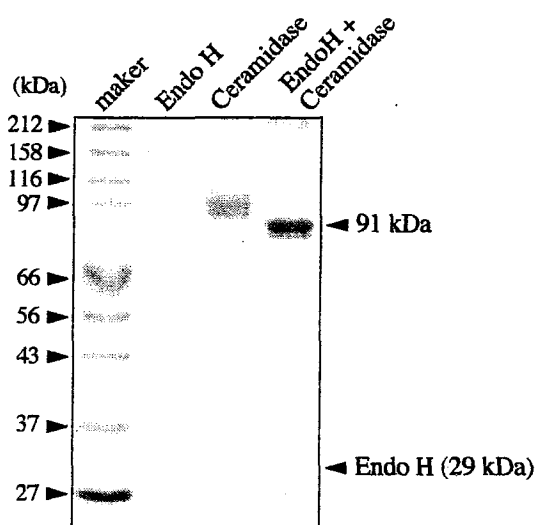


Fig. 9. Purification and deglycosylation of *A. oryzae* ceramidase. Purified AO ceramidase was deglycosylated by Endo H. Purified AO ceramidase and deglycosylated AO ceramidase were subjected to SDS-PAGE and stained with CBB.

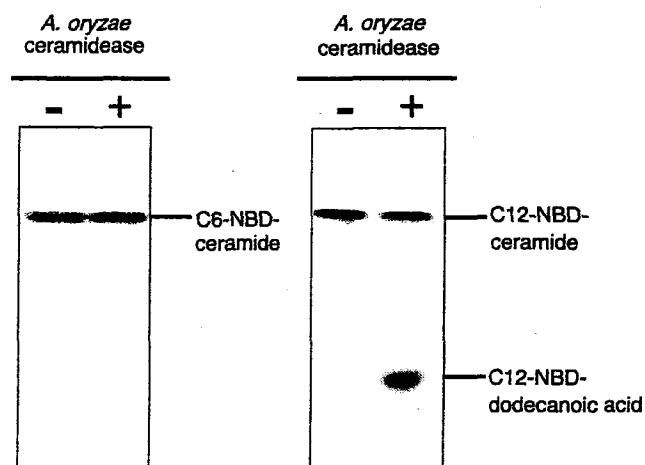


Fig. 10. Ceramide hydrolysis by *A. oryzae* ceramidase. Reaction mixture contained 275 pmol C6-NBD-ceramide or C12-NBD-ceramide and an appropriate amount of the enzyme in 20 μ l of 50 mM MES-NaOH buffer (pH 6.0). Following incubation at 37 $^{\circ}$ C for 30 min, the samples were evaporated, dissolved in 20 μ l of chloroform/methanol (2/1 v/v), and applied to a TLC plate which was developed with the solvent (chloroform/methanol/25% ammonia, 90/20/0.5, v/v).

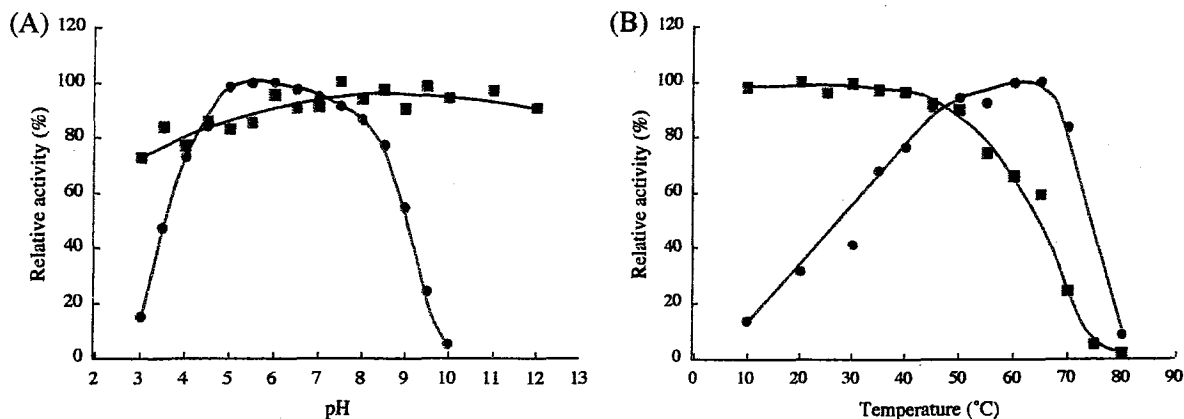


Fig. 11. Effects of pH (A) and temperature (B) on the ceramidase activity of the *A. oryzae* ceramidase. (A) The optimal pH (circles) of the enzyme was measured at 37 $^{\circ}$ C using C12-NBD-ceramide as the substrate. Ceramidase activities were assayed at the pH values indicated, and are shown relative to the activity at pH 6.0. pH stability (squares) was measured with C12-NBD-ceramide as the substrate at 37 $^{\circ}$ C and pH 6.0, after incubating the enzyme in 100 mM BCP buffer at each pH value for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. Residual ceramidase activities were assayed at pH 6.0. (B) The optimal temperature (circles) was evaluated by measuring the ceramidase activity with C12-NBD-ceramide as the substrate at different temperatures (20–80 $^{\circ}$ C) and pH 6.0. Thermostability (squares) of the enzyme was measured at 37 $^{\circ}$ C and pH 6.0 using C12-NBD-ceramide as the substrate, after incubating the enzyme for 10 min at various temperatures (20–80 $^{\circ}$ C) at pH 6.0.

Table 1 Identity, localization and optimal pH of AO ceramidase orthologs

Species	Identity (%)	Localization	Optimal pH
Rat	36	Intracellular	Neutral
Mouse	36	Intracellular	Neutral
Human	36	Intracellular	Neutral
Fruit fly	36	Intracellular	Neutral
<i>A. oryzae</i>	-	Extracellular	Neutral
Slime mold	36	Extracellular	Acid
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33	Extracellular	Alkaline
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32	Extracellular	Alkaline

Table 2 Ceramidase orthologs found in fungal genome databases

Species	Ceramidase
Filamentous fungi	
<i>Aspergillus oryzae</i>	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+
<i>Aspergillus nidulans</i>	+
<i>Neurospora crassa</i>	+
<i>Magnaporthe grisea</i>	+
<i>Fusarium graminearum</i>	+
Yeasts	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-

+; a ceramidase ortholog was found in the genome database
 -; no ceramidase orthologs were found in the genome database

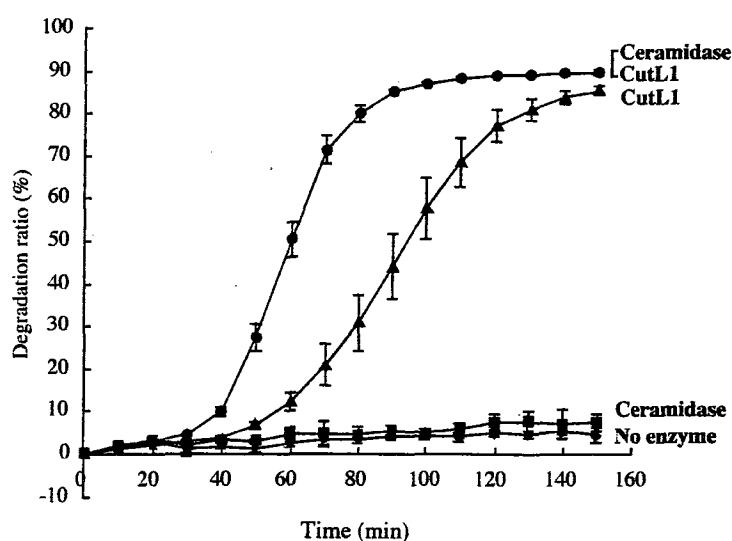


Fig. 12. *A. oryzae* ceramidase promotes degradation of PBSA microparticles by CutL1. PBSA microparticles were degraded by 10 $\mu\text{g/ml}$ of CutL1 (\blacktriangle), 10 $\mu\text{g/ml}$ of ceramidase (\blacksquare), mixture of CutL1 (10 $\mu\text{g/ml}$) and ceramidase (10 $\mu\text{g/ml}$) (\bullet), and no enzyme (\blacklozenge). The PBSA microparticles were incubated at 37 °C and turbidity of the PBSA microparticles were monitored at OD₆₃₀ every 10 min. The percent degradation (P_d) was calculated as $P_d = (1 - C_a/C_b) \times 100$, where C_a is the concentration of the PBSA microparticles after degradation and C_b is the concentration of the PBSA microparticles before degradation. The data are the mean \pm SD for 6 measurements.

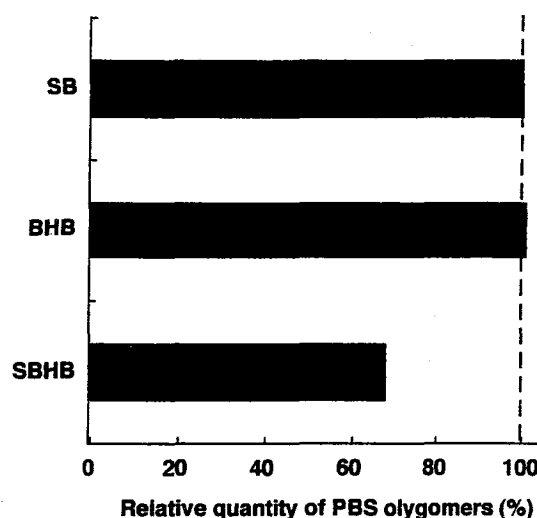


Fig. 13. Hydrolysis of PBS oligomers by *A. oryzae* ceramidase. S, B, and H indicate succinate, 1,4-butandiol, and 1,6-hexamethylene diisocyanate. To prepare PBS oligomers, PBS pellets were hydrolyzed by CutL1 and then ultrafiltrated to remove CutL1. The ceramidase (300 μU) was added to PBS oligomers and incubated at 45 °C for 6 hours. The sample was ultrafiltrated to remove ceramidase and analyzed by reverse-phase chromatography. The relative quantity of PBS oligomers (R_q) was calculated as $R_q = Q_a/Q_b \times 100$, where Q_a is the quantity of the PBS oligomers after incubation with the ceramidase and Q_b is the quantity of PBS oligomers after incubation without the ceramidase as control.

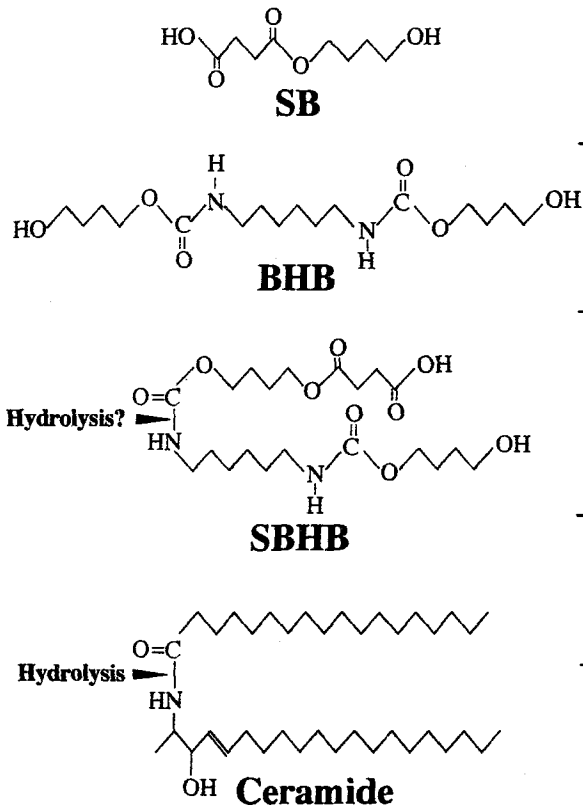


Fig. 14. The structure of PBS oligomers containing urethane bond. S, B, and H denote succinate, 1,4-butandiol, and 1,6-hexamethylene diisocyanate. The two urethane bonds were made by condensation reaction between 1,4-butandiol and 1,6-hexamethylene diisocyanate in BHB and SBHB molecule.

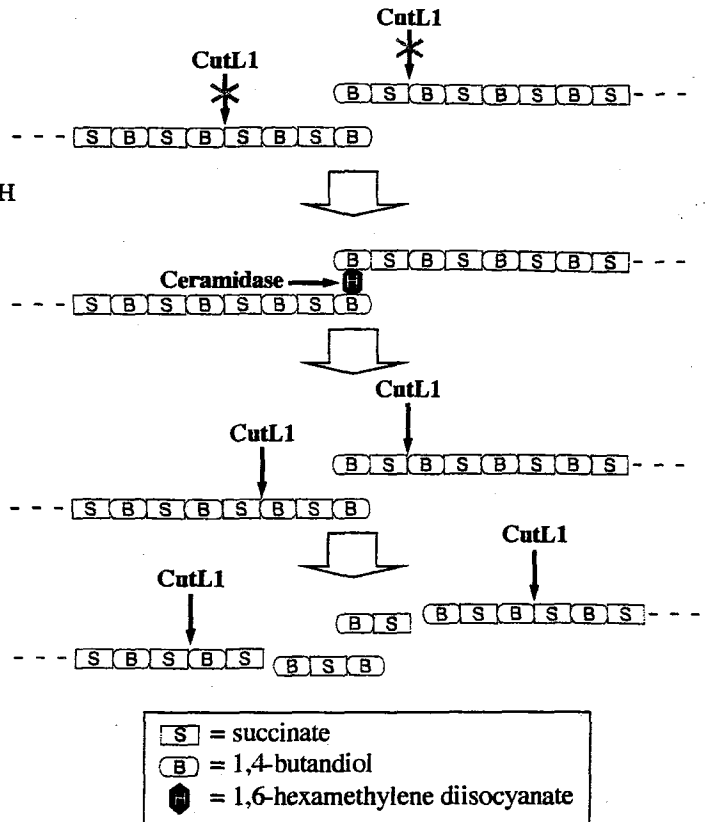


Fig. 15. The schematic model of cooperative hydrolysis of PBSA by CutL1 and *A. oryzae* ceramidase. Because CutL1 hydrolyzes only low-molecular-mass PBSA oligomers, CutL1 seems to act like exo-enzyme against PBSA polymers. CutL1 only hydrolyzes free terminals of PBSA polymers. The ceramidase seems to hydrolyze urethane bonds in PBSA polymers and act like endo-enzyme against PBSA polymers. This cooperative hydrolysis of PBSA polymer by the endo-enzyme (ceramidase) and exo-enzyme (CutL1) enables effective degradation of PBSA.

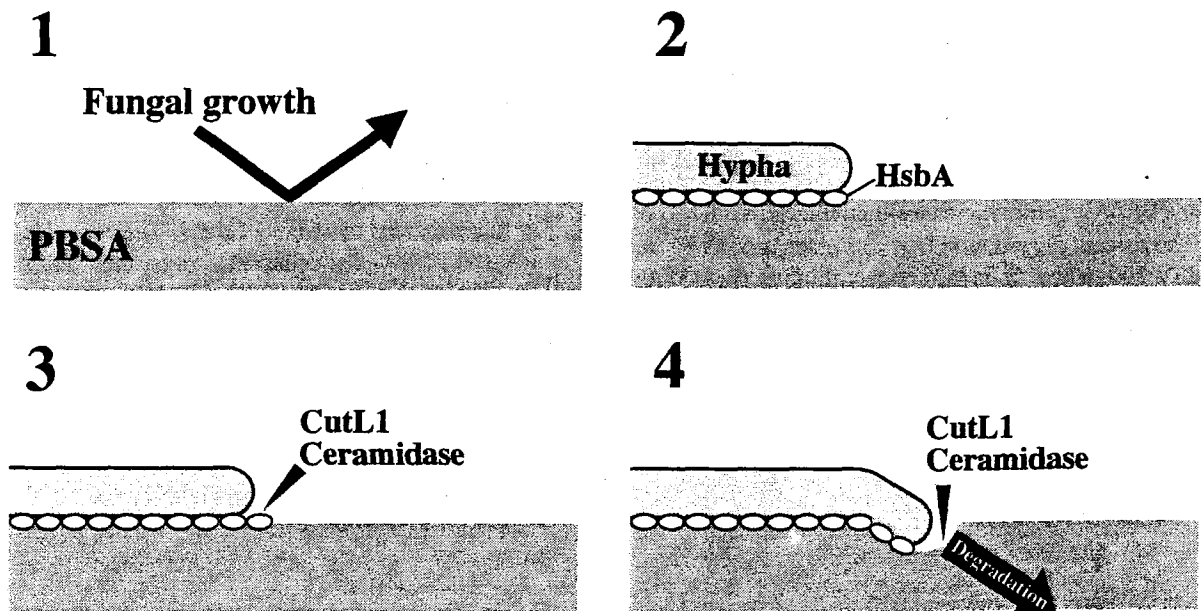


Fig. 16. The schematic model of PBSA degradation by *A. oryzae*. 1; The hydrophobicity of PBSA inhibits fungal growth on the surface of PBSA. 2; HsbA adsorbed on the PBSA surface enables fungal growth on the hydrophobic surface of PBSA. 3; The fungal hypha produce CutL1 and ceramidase on PBSA surface and PBSA is effectively degraded by cooperative action of HsbA, CutL1 and ceramidase. 4; The fungal hypha enter in PBSA by hydrolyzing and assimilating PBSA monomers.

論文審査結果要旨

近年、環境への配慮の高まりにより、生分解性プラスチックが注目を集めている。Polybutylene succinate-co-adipate (PBSA) は succinate, 1,4-butandiol, そして adipate が重合されてできた生分解性プラスチックであり、農業用のフィルムなどの用途に使われている。近年 *Aspergillus oryzae* を用いて PBSA を積極的に分解し、そのモノマーやオリゴマーを回収、リサイクルする試みが行われている。

現在まで PBSA 分解酵素の CutL1 が単離され、その性質が詳しく調べられている。また、*A. oryzae* は両親媒性タンパク質の一種である RolA を高発現させ、疎水性の高い PBSA を効率よく生分解していることが明らかにされている。そして、これら PBSA 分解促進タンパク質である CutL1 と RolA は非常に疎水的な素材に対して強い相互作用を示す。このことから *A. oryzae* が産生するタンパク質から疎水的な素材に対して強い相互作用を示すタンパク質を分離することができれば、PBSA 分解に関与する新規のタンパク質を取得することができると考えられた。そこで候補者は *A. oryzae* が PBSA 分解時に産生するタンパク質から疎水表面吸着タンパク質を分離し、それらの PBSA 分解促進効果を検証することを目的として本研究に着手した。

候補者は新規疎水表面吸着タンパク質として HsbA, AO ceramidase の単離に成功した。HsbA は PBSA 表面に吸着した状態で CutL1 による分解を促進する。疎水表面に吸着した HsbA は CutL1 と相互作用をしたことから PBSA 表面に吸着した HsbA は CutL1 と相互作用することによって PBSA 表面に CutL1 を濃縮し、PBSA 分解を促進していると考えられた。また、AO ceramidase はそれ自体では PBSA 分解効果を示さなかったが、CutL1 と混合すると非常に有効な PBSA 分解促進効果を示した。PBSA オリゴマーを用いた分解実験により、AO ceramidase が PBSA 分子内に存在しているウレタン結合を分解し、PBSA 分解を促進していることが示唆された。

以上、候補者の研究は世界で初めて糸状菌が産生する疎水表面吸着タンパク質に着目し、その分離法を確立したという点で非常に画期的である。またさらに、単離された新規疎水表面吸着タンパク質が生分解性プラスチック分解を促進する効果があることを証明した点において、審査員一同、候補者は博士（農学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると認定した。