

平成 20 年度 修士論文

白色腐朽菌の Cellobiohydrolase 遺伝子の
配列決定

Sequencing of the Cellobiohydrolase genes of
white rot fungi.

物質・環境システム工学コース

1115011 為則智之

1 要旨

【緒言】

近年、化石資源の枯渇や地球温暖化が重大な問題とされている。化石資源への依存軽減が急務となっているが、その対策の一つにバイオマス利用が上げられる。中でも、自動車等の燃料であるガソリンの代替として、バイオマスから生産されるバイオエタノールの研究が盛んに行われている。現在、バイオマスを用いたエネルギー変換は、主にサトウキビやトウモロコシを原料としており、食糧と競合することから問題視されている。そこで、非食資源である木質バイオマスを原料とすることが検討されている再生可能な資源である木質バイオマスをエネルギー変換するためには構成成分であるセルロースをグルコース単位まで加水分解する必要がある。しかし、木質バイオマスはリグニンで被覆されておりセルロースをセルラーゼで加水分解するためには酸処理によりリグニンを分解しなければならないが有害な薬品を使うので環境に対する負荷が大きい。白色腐朽菌は、リグニナーゼとセルラーゼの両方を生産する担子菌である。本研究では、白色腐朽菌のセルラーゼ遺伝子の配列決定を目的とした。セルラーゼの生産メカニズムが明らかになればセルラーゼを大量生産することが可能である。またセルラーゼ生産を抑制した菌株を作ることができる。

【方法】

Pleurotus ostreatus, *P. pulmonarius* および *Trametes versicolor* よりゲノム DNA を抽出した。COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers(CODEHOP; 共通-縮重-ハイブリッド-オリゴヌクレオチド-プライマー) を近縁種のアミノ酸情報より作成した。供試菌から抽出したゲノム DNA テンプレートとして CODEHOP を用いて PCR を行った。増幅された DNA 断片をクローニングし、さらにシーケンスを行った。決定された塩基配列について生物情報データベース DDBJ/EMBL/GenBank に対して Web ツールを用いて BLAST 検索を行い、高い相同性を示す情報を検索した。

【結果】

cellobiohidrolase (CBH) および endo-glucanase について CODEHOP を作成しこれを用いて PCR を行った。その結果 *P. ostreatus* の結晶性セルロース分解酵素である CBH 断片 601bp が増幅された。しかし endo-glucanase では DNA 増幅ができなかった。*P. ostreatus* の CBH で増幅した遺伝子断片は *P. sajor-caju* CBH と 95% 相同性を示した。そこで、この配列情報を参照して primer を設計し、遺伝子 CBH の全長決定を行った。その結果 *P. ostreatus* の CBH 遺伝子配列 4161bp のうち、3015bp の配列を決定できた。*P. sajor-caju* CBH

と *Moniliophthora perniciosa* の cellulose binding domain(CBD)の遺伝子を比較したところ 1390 ~ 2377bp の部分が CBD だと推定された。