

審査の結果の要旨

氏名 王 瑞杰

植物バイオマスは地球上で最も豊富に存在する有機物であり、再生可能なエネルギー源や化成品の原材料として期待されている。しかし、その主成分である植物細胞壁はセルロース・ヘミセルロース・リグニンが複雑に絡み合った構造を持つため、容易には分解・利用することができない。特にヘミセルロースとリグニンは、ヘミセルロース中のキシランに結合した 4-*O*-メチル-D-グルクロン酸とリグニン中の芳香環の水酸基との間のエステル結合によって結合しており、植物細胞壁を強固なものにしている。この結合を切断する酵素が糸状菌や細菌から見つかり、グルクロン酸エステラーゼ (glucuronoyl esterase; GE) と呼ばれている。これまでの GE に関する研究は酵素学的側面からの解析が主であり、その生理機能については殆ど知見がない。本研究は GE がバイオマス分解に果たす役割についてアカパンカビをモデルに解析を加えたものであり、背景と目的を述べた序章、結果を述べた第 1 章から第 3 章、および結論と展望を述べた第 4 章からなる。

第 1 章ではアカパンカビが持つ唯一の GE である *NcGE* の *in vitro* および *in vivo* での働きが述べられている。*Pichia pastoris* で異種生産した *NcGE* と市販のセルラーゼ、キシラナーゼがそれぞれ単独および混合ののち天然基質であるクワ科木材粉 (Mulberry wood powder; MWP) と反応され、遊離還元糖が測定された。その結果、*NcGE* がセルラーゼ、キシラナーゼによる還元糖の遊離を促進することが示された。続いて *NcGE* を高発現するアカパンカビ *NcGE*^{OEX} 株が作製され、その効果が検討された。その結果、*NcGE*^{OEX} 株ではコントロール株に比べ培養上清のキシラナーゼ活性が有意に高いことが示された。転写レベルでは、*NcGE*^{OEX} 株ではセロビオヒドロラーゼ CBH-1、キシラナーゼ GH10-1、GH10-2、セルラーゼ、キシラナーゼの転写に関わる転写因子 CLR-2 等をコードする遺伝子の発現が上昇していた。これらの結果から、*NcGE*^{OEX} 株では *NcGE* とセルラーゼ・キシラナーゼの相乗作用によって MWP の分解が促進され、その結果生産された何らかの誘導因子が CLR-2 を介して *cbh-1*、*gh10-1*、*gh10-2* 等の発現を促進するとの仮説が提唱された。

第 2 章では第 1 章の結果を受け、*NcGE* によるキシラナーゼ類の発現上昇にどのような転写因子に関わるかが解析されている。転写因子 CLR-1 はセルロース存在下で活性化し、*clr-2* や β -グルコシダーゼ遺伝子の転写を促進する。CLR-2 はセルラーゼ類の転写を活性化し、セルロースの分解が促進される。一方、ヘミセルロースは転写因子 XLR-1 を活性化し、これ

がキシラナーゼ類の転写を促進する。*NcGE*^{OEX}株において *clr-1* を破壊したところ、*clr-2* の転写が減少するとともに、*cbh-1* や *gh10-1* などの転写も同様に低下した。 Δ *clr-2* 株では *clr-1* の発現には変化は見られなかったが、*cbh-1* や *gh10-1* などの転写は低下した。一方、 Δ *xlr-1* 株ではキシラナーゼ、キシロシダーゼ遺伝子の発現がほぼ消失した。さらに、転写因子遺伝子破壊株では *NcGE* 高発現に伴うキシラナーゼ活性の上昇がほとんど見られなくなった。これらの結果から、*NcGE* は CLR-1、CLR-2、XLR-1 を介してセルラーゼ・キシラナーゼ類の発現を促進することが明らかにされたと述べている。本章では最後に、*NcGE* および市販キシラナーゼで処理した MWP の抽出物を培地に添加すると様々な遺伝子の転写が活性化することが示されている。この結果は第 1 章において示唆された未知誘導因子の存在を支持するものであり、今後この因子の同定を行うべきであると述べている。

第 3 章では第 2 章で述べられたキシラナーゼ、キシロシダーゼ類について解析されている。ゲノムデータベースから 6 個のキシラナーゼ、4 個のキシロシダーゼ遺伝子が同定され、それらの発現がキシランや MWP 培地で誘導されることが示されたのち、すでに報告のある 3 つのキシロシダーゼを除く 7 遺伝子について大腸菌での異種発現が行われた。その結果、4 つのキシラナーゼについて活性型タンパク質の発現に成功し、おのおのの性質が調べられた。また、上記 10 遺伝子の破壊株のキシランおよび MWP 培地での生育が調べられ、細胞内キシロシダーゼ GH43-1 が特に重要な役割を果たすことが示された。

以上、本研究はアカパンカビによるバイオマス分解における GE の生理機能を *in vitro*、*in vivo* の両面から解析を加えたものであり、その成果は学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。