

審査の結果の要旨

氏名 李宜海

近年、地球温暖化の進行や石油価格高騰、また化石燃料枯渇などの諸問題の深刻化を受け、再生可能エネルギーであるバイオマスの利用に期待が集まっている。現在、米国やブラジルを中心にトウモロコシやサトウキビなどからバイオエタノールが生産されているが、それら可食性の作物を燃料生産に利用することには食糧との競合という大きな問題が潜在している。この問題の解決のためには非可食性の木質バイオマスからのエタノール生産技術を確立することが重要であるが、植物細胞壁由来の多糖からなる木質バイオマスを糖化することは容易ではない。一方、自然界では様々な生物が木質バイオマス、特にセルロースを分解してエネルギー源としており、中でもシロアリや近縁の材食性昆虫は極めて高効率にセルロースを資化できることが知られている。本研究は新たな木質バイオマス利用技術の確立を目指し、シロアリおよび近縁の材食性昆虫由来の GH1 および GH3 β -グルコシダーゼの異種生産、精製および性質の解析を行ったものである。論文は背景と目的を述べた序章、結果を述べた3つの章、および総括と展望を記した終章からなる。

□第一章では材食性ゴキブリである *Panesthia angustipennis spadica* 由来の β -グルコシダーゼである PaBG1b のメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いた異種生産について述べている。シグナル配列を除く予想成熟体部分の cDNA を増幅後、ベクター pBGP3 に挿入して発現プラスミドを作製した。pBGP3 は *P. pastoris* において恒常的に発現する GAP プロモーター下で異種タンパク質を生産させるためのプラスミドであり、PaBG1b の N 末端には c-myc タグと His₆ タグが付加される。形質転換体の培養上清の活性測定ならびにウェスタンブロットを行ったところ、PaBG1b が培養4日目までに生産されていることが確認された。しかし生産量が十分でなかったため、ベクターを AOX1 プロモーターを利用する pPIC α に変更した。このベクターでは発現はメタノールによって誘導され、c-myc タグと His₆ タグは C 末端に付加される。培養の結果、十分な量の発現が培養7日目までに確認され、以降はこの方法によって生産した PaBG1b を用いることとした。

第二章では PaBG1b の精製と性質の検討について述べている。定法に従い培養上清から硫酸アンモニウム沈殿、ニッケルカラムクロマトグラフィーによる精製を試みたところ、PaBG1b の活性が失われることを見出した。その後の解析でこれがイミダゾールによる阻害によるものであることがわかった。用いる緩衝液をリン酸からトリスに変更したところ、

この阻害が認められなくなったことから、以降はトリス緩衝液を用い、ニッケルカラムおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを行って PaBG1b の精製を行った。精製した PaBG1b に対してグリコペプチダーゼ F およびエンドグリコシダーゼ H による処理を行ったところ、2 本の近接したバンドが認められた。N 末端アミノ酸シーケンス解析から PaBG1b が 2 つの異なる N 末端アミノ酸配列を持つことが分かったことから、この 2 本のバンドはこれらに相当するものであると考えられた。

PaBG1b は *p*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (pNPG) を基質に用いた場合、比活性が 45.5 U/mg、また V_{max} は 59.9 U/mg であったが、セロビオースを基質に用いるとそれぞれ 338.5 U/mg と 436.7 U/mg という非常に高い値を示した。PaBG1b は様々な基質を分解でき、またセロヘキサオースまでのセロオリゴ糖を分解した。調べた限りでは糖転移活性は認められなかった。グルコースに対しては中程度の耐性を示し ($K_i=200.3$ mM)、100 mM までの濃度でセロビオースによる阻害を受けなかった。これらの性質はセルロース分解における PaBG1b の有用性を示すと考えられた。イミダゾールの K_i 値は 4.3 mM であった。

第三章ではヤマトシロアリ共生原生生物由来の GH3 β -グルコシダーゼと考えられた RsBG の生産と解析について述べている。RsBG は BglX ドメインと GH3 C 末端ドメインを持つと予測されたが、求核触媒残基として GH3 ファミリーの β -グルコシダーゼに非常によく保存されているアスパラギン酸ではなくグルタミン酸を持つ。一方 GH1 ファミリーでは求核残基はグルタミン酸であることから、RsBG は配列上は両者の中間的な構造を持つと考えられた。発現カセットを導入した *P. pastoris* 形質転換体の培養上清のウェスタンブロットを行ったところ RsBG の発現が確認された。しかし酵素活性はコントロール株に比べわずかに高い程度であった。また、ニッケルカラムクロマトグラフィーによって精製した RsBG には活性が認められなかった。様々な基質や異なる方法で精製した RsBG、またタグを付加しない RsBG を用いた酵素アッセイを行ったが活性は検出されなかった。これらの結果から、RsBG は検討した基質以外の物質を基質とするか、一部の β -グルコシダーゼで知られているように酵素以外の働きを持つタンパク質であると推測された。

以上、本論文はシロアリおよび近縁の材食性昆虫由来の GH1 および GH3 β -グルコシダーゼの異種生産、精製および性質の解析を行い、特に前者に関しては産業的な利用への可能性を示したものであり、学術的・応用的に貢献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。