

審査の結果の要旨

氏 名 HUYNH HIEP HUNG

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に結合した水酸基との間にはエステル結合が存在し、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から見つかっており、グルクロン酸エステラーゼ (glucuronoyl esterase; GE) と呼ばれている。本論文は新たな GE としてアカパンカビに由来する *NcGE* と *Aspergillus fumigatus* 由来の *AfGE* を取得してその解析を行ったものであり、背景を述べた序章、結果を述べた第 1 章から第 4 章、および結論と展望を述べた第 5 章からなる。

第 1 章では *NcGE* と *AfGE* の異種発現について述べている。最初にクローニングされた GE である *Trichoderma reesei* 由来の *Cip2* のアミノ酸配列を基にアカパンカビのゲノムを探索し、類似性を示す配列として *NcGE* を見出した。定法に従って *Pichia pastoris* を用いた異種発現を行ったところ、培養上清中に目的タンパク質および GE 活性が認められ、*NcGE* が GE の一種であることが確認された。一方、*AfGE* については推定イントロンが見出されたため麹菌を用いて異種発現を行った。その結果、目的タンパク質および活性が確認され、*AfGE* もまた GE であることがわかった。*Cip2*、*NcGE*、および *AfGE* のアミノ酸配列の比較から、触媒 3 残基 (Ser, His, Glu) を含むコンセンサス配列の存在が示唆された。

第 2 章では *NcGE* と *AfGE* の精製と酵素学的性質について述べている。両タンパク質とも Ni^{2+} カラムとイオン交換カラムによる精製を行った。至適条件や安定性を検討したところ、*NcGE* は至適 pH が中性付近で、高温で不安定であったのに対し、*AfGE* は pH 5 付近が至適であり、また 50~60°C でも安定であった。一般に工業的なバイオマスの分解は pH 5、50°C といった条件で行われることから、*AfGE* はそれらに合致する性質を持つことがわかった。

第 3 章では GE の基質特異性に関する解析が述べられている。これまでに報告されている GE はすべてグルクロン酸の 4 位に O-メチル基を持つ基質を好むことが知られてい

る。*NcGE* と *AfGE* についても、共同研究者が合成した 4-*O*-メチル基を持つ基質と持たない基質の一对の基質を用いて比較したところ、前者の方が良く分解された。実際の植物細胞壁においてもこの 4-*O*-メチルグルクロン酸はリグニンと結合していることから、この基質特異性は理にかなっている。しかし、それが *GE* のどのような構造に起因するかはわかっていなかった。そこで、すでに報告されている *Sporotrichum thermophile* 由来の *StGE2* の結晶構造を基に構造予測を行ったところ、保存された Lys 残基が関与する可能性が見出された。この点を検証するため、*AfGE* の同残基を Ala、Glu、Gln、および Arg に置換した点変異体を作製し、上記の基質を用いた比較を行った。その結果、Ala、Glu、Gln 置換体では両基質とも同程度に分解された。このことから、この Lys 残基が 4-*O*-メチル基の認識に関与することが示唆された。一方、Lys と同じく正電荷を持つ Arg 置換体では野生型と同様に 4-*O*-メチル基を持つ基質の方が良く分解された。しかし、この部位での基質認識に静電的相互作用が関与するとは考えにくいため、他の相互作用が原因であると考えられた。

第 4 章ではアカパンカビを用いて *GE* の生理機能を解析している。これまで *GE* は酵素添加剤としてバイオマス分解を促進することはわかっていたが、生産菌におけるバイオマス分解および資化に関わるかどうかはわかっていなかった。そこで *NcGE* を欠損したアカパンカビ変異株を用いてその点を検討した。スギやマテバシイの木材抽出物を単一炭素源として野生株と *NcGE* 欠損株を培養し、その上清の還元糖を定量したところ、野生株の方がより多くの還元糖を生成することがわかった。一方、*NcGE* 欠損株の培養中に精製 *NcGE* を添加したところ、還元糖生成量が野生株と同程度にまで回復した。このような回復は熱失活した *NcGE* を添加した場合には認められなかったが、一方で *NcGE* で前処理した木材抽出物を用いて培養した場合には高い還元糖の生成が認められた。また、セルロース系の基質であるカルボキシメチルセルロースやアビセルを用いて培養した場合には野生株と *NcGE* 欠損株の間で還元糖の生成に差はなかった。これらの結果から、*NcGE* が宿主において他のセルラーゼやヘミセルラーゼと協調的に働いてバイオマス分解を促進することが示唆され、その生理機能の一端が初めて明らかになった。

以上、本研究は糸状菌に由来する 2 つの *GE* の酵素学的性質を解析し、基質特異性の原因を明らかにするとともに、その生理機能の解明を試みたものであり、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。

