





(生物圏生命科学専攻長 奥村 克純)



(副専攻長 福崎 智司)



学位論文審査の結果の要旨

専攻	生物圏生命科学	氏名	汪 亜運 (オウ アウン / Wang YaYun)
審査委員	主査	教授 木村 哲哉	
	副査	教授 荻田 修一	
	副査	教授 田丸 浩	
	副査	本学名誉教授 (生物資源学研究科特任教授) 栗冠 和郎	
論文題目 (題目変更の有無) 有・ <input checked="" type="radio"/> 無	Studies on characterization of a novel hemicellulase Abf62A-Axe6A from <i>Ruminiclostridium josui</i> and development of its host-vector system (<i>Ruminiclostridium josui</i> の新規ヘミセルラーゼAbf62A-Axe6Aの酵素特性と宿主・ベクター系の開発に関する研究)		
<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p><i>Ruminiclostridium josui</i>はタイ王国のコンポストから分離された中温性の嫌気性細菌で、複雑な植物細胞壁を分解できることから、植物細胞壁を分解しバイオ燃料に変換するためのモデル微生物として期待される。本菌のセルロース及びセルロースを取り囲んでいるヘミセルロースを分解する酵素であるセルラーゼやヘミセルラーゼについて、学位取得申請者の所属する研究室から多くの報告がなされている。本菌の各種セルラーゼやヘミセルラーゼは、細胞表層の骨格蛋白質上にブドウの房のように並んだセルロソームという構造をとって効率的な分解を行う。最近、本菌のゲノム配列が明らかとなり、その情報から多くの新規ヘミセルラーゼ遺伝子の存在が予測され、複雑な植物細胞壁を分解する多様な酵素を生産することが推測された。本研究では、これら新規な酵素についてその性質を明らかとし、さらに、本菌の酵素生産性を遺伝子工学的に向上させるための宿主ベクター系の開発を目的とした。</p> <p>ゲノム解析から、本菌には新規ヘミセルラーゼRjAbf62A-Axe6A遺伝子が存在した。この酵素は、推定アミノ酸配列のN末端側から順に、分泌シグナル、糖質加水分解酵素ファミリー62(GH62)に属する活性モジュール(RjAbf62)、ファミリー6糖質結合モジュール(RjCBM6)、ドックリンモジュール、ファミリー6糖質エステラーゼ活性モジュール(RjAxe6A)をもつモジュラー酵素であることが推定された。この酵素の各モジュールの機能を明らかにするため、分泌シグナルを除く全長(RjAbf62-Axe6A)、GH62とCBM6(RjAbf62A-CBM6)、Axe6Aのみ(RjAxe6A)の組換え酵素を大腸菌で生産させて精製し、各酵素について性質を調べた。全長酵素RjAbf62-Axe6Aでは、アラビノキシランに対して高い分解活性を示し、テンサイアラビナンにも分解活性を示した。主な分解物はアラビノースであった。アラビノキシロオリゴ糖を基質に使用した詳細な解析によって、α-1,2とα-1,3アラビノフラノシド結合を切断し、アラビノースを遊離す</p>			

ることが分かった。また、 α -1,5アラビノフラノシド結合に対しても弱い分解活性を示した。さらに、予想に反してシラカバキシランやブナキシランに対してエンド型のキシラナーゼ活性を示した。しかし、RjAxe6を除いたRjAbf62-CBM6はキシラナーゼ活性が失われていたことから、RjAxe6はキシラン分解に重要な役割を果たすことが示された。また、RjAxe6はアセチルキシランエステラーゼ活性を持ち、一方でRjAbf62-Axe6Aは不溶性のアラビノキシランにも高い分解活性を示すことも分かった。以上の発見はGH62をもつモジュラー酵素が、 α -L-アラビノフラノシダーゼ活性に加えてエンドキシラナーゼ活性を示す世界で初めての報告となった。

*R. josui*は上記のように、複雑な植物細胞壁を分解する多様な酵素を生産する。この能力を遺伝子工学的に高機能化し分解力を高めることは、本菌を用いたバイオエネルギー生産にとって重要なことである。そこで、本菌の遺伝子工学的な改良に必須となる宿主ベクター系の確立を行った。まず、細菌の形質転換実験において最も大きな障害となる制限酵素が本菌に存在するか生化学的な解析を行ったところ、既知の*DpnI*と同じ配列を切断する酵素*RjoI*が存在することを見いだした。*RjoI*はメチル化された配列を認識したことから、シャトルベクターをあらかじめメチル化活性のない大腸菌から抽出して、*R. josui*に電気穿孔法で形質転換を行ったところ 6.6×10^3 コロニー/ μ gDNAの高効率で形質転換に成功した。このシャトルベクターと形質転換方法を応用して、骨格蛋白質遺伝子プロモーターとセルラーゼ*RjCel48A*遺伝子を融合した遺伝子を本菌に導入したところ、*RjCel48A*蛋白質の生産に成功した。このことは、本研究で開発した宿主ベクター系が、本菌の遺伝子工学的な改良に応用できることを示している。

本研究の成果により、バイオマス分解によるエネルギー生産に応用が期待される*R. josui*がもつ新規なヘミセルラーゼ酵素の性質が明らかとなり、本菌のもつ多様な植物細胞壁分解能の一端が解き明かされた。さらに本菌を遺伝子工学的に改良し、バイオマス分解力の高い株を育種するために必須な宿主ベクター系を確立し、本菌の分子遺伝学的な解析と応用に必要な実験技術確立への道が開かれた。これらの成果は、植物バイオマスの有効利用による循環型社会の構築に貢献することが十分に期待される。このようなことから、本審査委員会は提出された論文が博士学位論文として価値あるものと全員一致で認めた。