

氏名（本籍）	新開（金房）純代（ 鹿児島県 ）		
学位の種類	博 士（ 農学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6966 号		
学位授与年月日	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> 分泌タンパク質のセルロース糖化機能解析		
主査	筑波大学准教授（連係大学院）	博士（畜産学）	田島 清
副査	筑波大学教授（連係大学院）	博士（農学）	榎引史郎
副査	筑波大学教授（連係大学院）	博士（獣医学）	三森眞琴
副査	筑波大学教授	Ph. D.（家畜生理学）	田島淳史

論 文 の 要 旨

セルロース系バイオマスはバイオ燃料生産など広い分野での利用が期待され、微生物由来のセルラーゼによる酵素糖化法の研究が進められている。*Caldicellulosiruptor bescii*は、従来研究されてきたセルラーゼとは異なり同一分子内に2つの触媒部位を持つマルチドメインセルラーゼを有し、分子内相乗効果により強力なセルラーゼ活性を示すことが想定される。そこで本研究ではセルロース系バイオマス糖化の効率化に資することを目的に、*C. bescii*が細胞外に分泌するタンパク質のセルラーゼ活性とその特性評価、活性を示さないタンパク質の機能を解析した。

*C. bescii*粗酵素液の調製は、基質にセロビオースを用いた培養上清を濃縮することにより行った。粗酵素液の基礎的な性質の解明を試みたところ、ヘミセルロース分解活性が高く、pH5.0-6.0、75℃以上の高温でセルロース系バイオマスを糖化し、高いキシラナーゼ活性を有することが示された。また、従来の酵素糖化法で用いられている *Trichoderma reesei*粗酵素液よりもタンパク質比活性値が2倍高いことを明らかにした。

次に、粗酵素液のセルラーゼ関連タンパク質を酵素電気泳動法および質量分析法により解析した。その結果、粗酵素液内にはセルロース分解活性を示す4種のマルチドメインセルラーゼCel1A、Cel19B/Man5A、Cel1E、Cel1Fと、3種の細胞外基質結合タンパク質SBP44、SBP50、SBP60が存在することを明らかにした。本菌の粗酵素液には複数の触媒部位を有するマルチドメインセルラーゼおよびSBPが存在し、これらの相乗効果により効率的にセルロースを分解することが示唆された。

さらに、粗酵素液によるセルロースの加水分解過程を透過型電子顕微鏡と原子間力顕微鏡を用いて観察し、セルロース表面構造の変化および酵素の局在から本菌の繊維分解機構の解明を試みた。その結果、粗酵素液に含まれるタンパク質がセルロース表面に付着することで、セルロース

高が1.2nm増加し、粘着性を帯び凝集、膨潤化することを示した。観察された粒子はマルチドメインセルラーゼおよびSBPを含むと考えられるが、その特定および局在の解明には至らなかった。

次に、本菌のセルラーゼ関連タンパク質の機能を分子レベルで明らかにするために、6種のマルチドメインセルラーゼおよび4種のSBPの発現系の構築および機能解析を試み、SBP44、SBP50、SBP56の大量発現法を確立した。発現した3種のSBPタンパク質は結合基質に対する特異性がそれぞれ異なることを明らかにした。

以上の結果から、*C. bescii*粗酵素液が高いセルラーゼ活性を示したのは、本菌が複数のマルチドメインセルラーゼを有することに加え、加水分解活性を持たないSBPによる基質への選択的結合が、何らかの役割を担っていると推察された。

本研究により、高い酵素活性を有する*C. bescii*分泌タンパク質によるセルロース糖化機能の一端が解明された。

審 査 の 要 旨

セルラーゼの研究は*T. reesei*や*Clostridium thermocellum*を中心に進められてきた。本研究では、これらの微生物が産生するセルラーゼよりも高活性な酵素を求め、マルチドメインセルラーゼを有する*C. bescii*に着目し、細胞外分泌タンパク質のセルロース糖化機能について基礎的な解析を進めた。①*T. reesei*と*C. bescii*の粗酵素液を用いた比較において、タンパク質比活性値で*C. bescii*のセルラーゼ活性は2倍高いことを見出した。②*C. bescii*が分泌するタンパク質の質量分析の結果、4種のマルチドメインセルラーゼが含まれていること、それ以外にセルロース分解に関連する3種の細胞外基質結合タンパク質 (SBP) が存在することを明らかにした。③また、繊維分解過程の原子間力顕微鏡、電子顕微鏡観察から、分泌タンパク質の付着により繊維の凝集および膨潤化とみられる物理的な変化が生じることを示した。④細胞外基質結合タンパク質であるSBP44、SBP50、SBP56の機能解析から、SBPごとに結合する基質に特異性を有することを示した。

以上の結果より、*C. bescii*は従来研究されてきた*T. reesei*よりも高いセルラーゼ活性を持ち、それが複数のマルチドメインセルラーゼによることを明らかにしたことは高く評価できる。さらに、高活性の実現のために細胞外基質結合タンパク質が何らかの役割を担っていることを示唆したことは、さらなる研究を進める上での指針となると考えられる。

平成26年1月16日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。