

氏名（本籍）	Krisna SEPTININGRUM		
学位の種類	博 士（生物資源工学）		
学位記番号	博 甲 第	7346	号
学位授与年月日	平成 27 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	Studies on Hexenuronosyl Xylooligosaccharide Degrading Enzymes from <i>Paenibacillus</i> species ( <i>Paenibacillus</i> 属細菌の持つヘキセウロノシルキシロオリゴ糖分解酵素に関する研究)		
主査	筑波大学教授（連携）	博士（農芸化学）	小杉 昭彦
副査	筑波大学教授	農学 博士	大井 洋
副査	筑波大学教授	理学 博士	藤村 達人
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	中川 明子

## 論 文 の 要 旨

紙を製造する工程において、木材から高純度でセルロースを抽出することが紙の品質を決定づける重要なファクターの一つである。特に高白色度紙等、上質な紙ではセルロース、少量のキシラン以外の成分の混入は、その後の工程において紙品質に大きく左右されることから前処理を必要とする。木材は、セルロース、ヘミセルロースそしてリグニンの3成分で複雑に構成されており、強アルカリ薬剤を用いてヘミセルロースやリグニンを溶解させ純度の高いセルロースを抽出する。その強アルカリ工程下において、キシランの修飾残基であるメチルグルクロン酸がヘキセウロン酸へ変換される。この生成されるヘキセウロン酸残基は、紙の白色度を減じる原因となることが知られており、効果的、効率的に除去する前処理技術の開発が望まれている。現在、さらなるアルカリ処理やオゾン処理のような特殊処理を行なうことで、ヘキセウロン酸分子を除去する化学的前処理方法が一般的であるが、昨今の環境負荷低減のため酵素や微生物のような生物学的処理方法が注目されている。これまでの研究からヘキセウロン酸を直接分解するには、リグニン分解酵素の一つであるラッカーゼや、キシランそのものを除去するキシラナーゼの利用により一定の除去効果があることが明らかとなっている。しかしラッカーゼはキシラナーゼとの併用が必要なこと、またキシラナーゼの大量使用はキシランの大幅な減少のため紙の強度低下を招くことから使用は限られている。一方、ヘキセウロン酸で修飾されるキシランの構造は、4-O-メチルグルクロン酸（以下、MeGlcA）修飾構造に類似しており、MeGlcAとキシラン分子を切断する特異的加水分解酵素 $\alpha$ -グルクロニダーゼ（EC 3.2.1.139）の存在が知られている。

一方、MeGlcAとヘキセウロン酸残基の構造的相違は、その4位のメチル基の修飾が水素に置換された構造をもち、その高い構造類似性から同様に加水分解できる可能性があるが、これまでヘキセウロン酸残基に対する $\alpha$ -グルクロニダーゼの酵素学的知見は全く知られていない。もし $\alpha$ -グルクロニダーゼがヘキセウロン酸残基を除去できれば、これまでの上記分解可能な酵素の中で最も直接的であり、かつ単独で除去可能な酵素と考えられ実用的酵素として期待できる。

本研究ではキシラン分解酵素生産する微生物として良く特徴化され、またJIRCAS保有菌株の*Paenibacillus curdlanolyticus* B6株、また筑波大学で分離されヘキセウロン酸残基で修飾を受けたキシロオリゴ糖を分解できる*Paenibacillus*属細菌07株の2つの*Paenibacillus*属細菌に注目し、 $\alpha$ -グルクロニダーゼによるヘキセウロン

酸側鎖分解メカニズム及び、*Paenibacillus*属細菌のヘキセウロン酸修飾キシロオリゴ糖の分解様式に関して考察した。

ヘキセウロン酸側鎖で修飾された酵素基質を調製するために、ユーカリ蒸解パルプからモデル基質となるヘキシノシルキシロトリオース（以下、 $\Delta X3$ と略す）を精製及び調製した。 $\Delta X3$ はキシロトリオースを母体に非還元末端の4位にヘキセウロン酸残基が $\alpha$ -1,2結合している。この $\Delta X3$ に $\alpha$ -グルコシダーゼが作用するかどうかを確認するため、*P. curdlanolyticus* B6から $\alpha$ -グルコシダーゼとして糖質加水分解酵素（GH）ファミリー67に属するAguAを単離（以下、AguAと呼ぶ）、そしてクローニングを行ない、大腸菌にて組換え酵素として調製し、酵素反応に供した。結果、AguAを $\Delta X3$ に作用させた時、 $\Delta X3$ の減少に伴いキシロトリオース及びヘキセウロン酸の遊離が確認されたことから、AguAは $\Delta X3$ のヘキセウロン酸残基を加水分解することが出来ることが新たに証明された。一方、AguAの $\Delta X3$ に対する酵素作用メカニズムを解明するため、速度論的解析から考察した結果、 $V_{max}$  や $k_{cat}$ といった酵素触媒作用がMeGlcAと比較して大きく低下していることが明らかとなった。このことは、 $\alpha$ -グルコシダーゼが作用する際に、ヘキセウロン酸残基が酵素触媒反応を不安定にさせる事が示唆された。従って、AguA活性中心付近のヘキセウロン酸残基への親和性を酵素工学的に高めることで高活性を有するAguAを作出可能となることを示した。

さらに生物学的処理技術の開発検討を行なうため、*P. curdlanolyticus* B6及び*Paenibacillus*属細菌07株の菌体外酵素及び菌体内酵素を用いて $\Delta X3$ 加水分解様式に関して考察した。結果、*P. curdlanolyticus* B6からの菌体外酵素画分では $\Delta X3$ を分解することはできず、菌体内酵素画分においてのみAguA活性の存在が認められ、 $\Delta X3$ を加水分解することができた。すなわち*P. curdlanolyticus* B6においては、上記、AguAによる $\Delta X3$ のヘキセウロン酸残基の切断、除去が行なわれ、キシロオリゴ糖が遊離し速やかに代謝されることが明らかとなった。一方、*Paenibacillus*属細菌07株では、菌体外酵素画分においてキシロトリオースの遊離が認められたが、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は認められない。従って、 $\alpha$ -グルコシダーゼ以外でヘキセウロン酸残基を切断できる未知の酵素の存在が示唆された。菌体内酵素画分における $\Delta X3$ の加水分解では、キシロースと $\Delta X2$ （同じくヘキセウロン酸残基で修飾されたキシロビオース）の遊離が認められた。すなわち $\Delta X3$ の母体となるキシロトリオースの還元末端に作用する $\beta$ -キシロシダーゼにより $\Delta X3$ は低分子化してゆく様式で加水分解されてゆくことが明らかとなった。

## 審 査 の 要 旨

本研究では2種類の*Paenibacillus*属細菌を用い、自然界には存在せず製紙製造過程で産出されるヘキセウロン酸残基の生物学的除去方法を開発するため、 $\alpha$ -グルコシダーゼのヘキセウロン酸残基切断除去の酵素作用機作を基礎的研究から考察し、実用的提案として*Paenibacillus*属細菌を用いた際の生物学的前処理方法を考察、さらに $\Delta X3$ の加水分解様式を通じて微生物の持つヘミセルロース分解戦略の多様性を明らかにした。本研究により、これまで環境負荷の大きかった化学処理に頼ることなく、*Paenibacillus*属細菌の酵素や菌体を用いる生物学的処理への可能性を示した点で評価できる。

平成27年1月26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、審査委員全員により合格と判定された。

よって、著者は博士（生物資源工学）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。