

氏名	WIDYASTI Erma
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	博 甲 第 8820 号
学位授与年月日	平成 30年 9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	Degradation Properties of Oil Palm Trunk Fiber by Novel Thermophilic Anaerobic Xylan Degrading Bacteria <i>Caldicoprobacter</i> sp. CL-2 (新規好熱嫌気性キシラン分解細菌 <i>Caldicoprobacter</i> sp. CL-2によるオイルパーム幹繊維の分解特性の研究)
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	筑波大学准教授 博士（農学） 中川 明子
副査	筑波大学准教授 博士（農学） 野口 良造

## 論 文 の 要 旨

審査対象論文は、パームオイル産業の農作物残渣の一つであるオイルパーム幹（OPT）を取り上げ、OPT繊維を高分解する新規好熱嫌気性キシラン分解細菌の単離、特徴化、及びOPTの効率的な分解にキシラン分解活性が非常に重要であることを明らかにした。

食品、化成品等の様々な分野において不可欠なパーム油は、東南アジア地域で世界の生産量の約90%を占めるほどの一大産業であり、世界で最も利用される植物油脂として有名である。需要の拡大に伴い生産量も拡大し、2012年の世界のパーム油生産量は約5,000万トンに達し、世界最大の植物油脂資源となっている。

本博士論文の第一章において、著者は、対象論文が注目している東南アジアにおけるオイルパーム産業に関して最新の情報を用いて、特にインドネシア国内の生産量や政策に関して解説している。またオイルパーム果実の収穫にとって重要なOPTについて、経済的生産樹齢があること、すなわち古木になり、パーム実の生産力が低下するため、約20～25年に一斉に伐採し再植林を行うため、膨大なバイオマス資源が排出される。そのOPTが現在利用されずにパーム農園に破棄・放置され、病虫害蔓延の原因となっているという。OPTの有効な利用法の開発と共に環境負荷を掛けない対策、高度化利用に関する必要性を述べている。

第二章において、著者は、リグノセルロース成分を主体とするOPTの微生物を用い、エネルギー創出技術（バイオガス製造）を可能にする糖化技術開発に取り組んだ。OPTの前処理技術として、従来の化学薬品や熱を利用しない湿式摩砕法を選択し、OPTの繊維化処理を行った。OPTを繊維化し繊維表面積を広げることで、微生物や分解酵素の分解をしやすくするのが狙いである。電子顕微鏡から、湿式摩砕後のOPTに繊維化が起きていることを確認している。さらにこの繊維化したOPTを用いて効率良く生物糖化する好熱嫌気性微生物の単離を試みている。分離源として国際農林水産業研究センターで保存されている約50種類の堆肥を用いた。著者は最終的に幾度もの単離精製を繰り返し、OPTの分解性の高い好熱嫌気性細菌CL-2株の純粋分離に成功した。16SrRNA遺伝子シーケンス、及び系統樹解析から、このCL-2は *Caldicoprobacter faecale* DSM 20678に98%の相同

性を持つ近縁種であった。さらに形態観察及びグラム染色、糖の資化性や胞子形成能を調べた結果、本菌は同属ではあるものの新種であることを示唆した。

第三章において、著者は、CL-2株の繊維化OPTの分解能に関して研究、考察を行っている。OPTはヘミセルロース、特にキシランの存在量が他の草本系バイオマスに比較して高いのが特徴である。興味深いことにOPT高分解活性を有する本菌にはセルロース分解能は無いという。これらの結果から、OPT分解には特にキシラン分解活性が極めて重要であることが示された。また先の近縁種の*C. faecalis*はキシラン分解活性を有しないことから、CL-2は、糖質代謝からも異なる性質を有する。培養液を用いたザイモグラム解析では、50 kDaと40 kDaのタンパク質が、キシラン分解に大きく関与していることが明らかとなった。また調製した粗酵素液を用いたクロマトグラフィー (TLC) 解析では、本菌が有するキシラン分解酵素の主要な分解産物がキシロピオースであり、エンドタイプのキシラナーゼと推察された。

第四章において、著者は、このCL-2株のキシラン分解酵素の特徴化を行うために、CL-2株のゲノムDNAを用いてキシラナーゼ遺伝子のクローニングを行った。糖質加水分解酵素 (GH) のデータベースから現在、キシラナーゼは主にGHファミリー5、10、11、43の4つのファミリーへグループ化されている。エンドタイプのキシラナーゼは、GHファミリー11が有名であり、先のTLC解析から、CL-2株の有するキシラナーゼも同様であると考察している。そこで、nested-PCR法により、既知キシラナーゼと保存化されているアミノ酸配列領域を検索し、プライマーをデザインすることで、PCRフラグメントを得て、本菌からキシラナーゼ遺伝子 (XynA) の取得に成功した。XynAキシラナーゼの構造学的特徴は、分子量41.7kDaを有し、N末端側からGH・ファミリー11モジュール、糖質結合モジュール・ファミリー36と2つの機能モジュールを有するキシラナーゼであった。XynAの推定分子量から、CL-2株の有する40 kDaのキシラナーゼであると結論している。より詳細な酵素の特徴化を行うために、本遺伝子を用い大腸菌からの組換えタンパク質の調製、精製を行い、酵素速度論的解析も行った。一方、なぜ本菌が高いOPT分解能を有しているのかを検証するため、本菌から得た粗酵素と調製した組換えタンパク質XynAを混ぜることで、粗酵素液単独、又はXynA単独に比較し、高いOPT分解能が得られることから、両者に高い相乗効果があることが明らかとなった。そして、著者はCL-2株のXynAは、恐らく他のキシラナーゼ酵素と相乗的協同作用を生じることで、OPTの高分解能を示すと結論付けている。

以上、著者は、OPTの効率的な分解能を有する新規であろう好熱嫌気性キシラン分解細菌CL-2株の単離に成功した。またOPT高分解能の役割を果たしているキシラナーゼXynA遺伝子を単離、特徴化し、他のキシラン分解酵素との高い相乗効果によりOPT高効率分解を行っていることを明らかにした。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、パームオイル産業の農作物残渣の一つであるオイルパーム幹 (OPT) を取り上げ、OPTの環境配慮型の前処理方法とともに、その効率的な分解を達成すべく新規好熱嫌気性キシラン分解細菌CL-2株の単離に成功した。さらにはその微生物学的性質や、酵素学的特徴を遺伝的解析により明らかにし、OPTの生物学的分解にはキシラン分解活性が極めて重要であることを示したことは、OPTの高度利用促進にとって意義深い。

平成30年7月6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。