

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 工藤 俊祐

石油代替エネルギーの導入が求められる中、近年食料と競合しないバガスや稲わら、木材などのリグノセルロース系バイオマスの利用促進が強く求められている。リグノセルロースはセルロースがヘミセルロース・リグニンと複雑に絡み合った構造をとっており、その利用に向けこの強固で多種多様な構造の分解・糖化のコストが大きな課題である。

堆肥中においては複雑なリグノセルロースが多様な微生物種及び酵素の共同作用によって分解されている。また、こうした環境中の 90%以上の微生物は未培養であることが知られ、新たな微生物・遺伝子資源としても期待が持たれる。しかし堆肥のような環境を直接解析、実験対象とすることはその物理的構造の複雑さや狭雑物の多さから種々の実験操作（核酸抽出・タンパク質抽出・分解過程の解析等）において様々な障害を有している。また存在する生物種が極めて多様であるため有用な生物資源へのアクセスやその菌叢解析も困難となっている。

そこで本研究では、堆肥からリグノセルロース基質を含む液体培地で継代培養を繰り返すことで、分解を行う微生物群集の解析及び利用のしやすい形での抽出・安定化を試みた。こうして構築されたリグノセルロース分解微生物群集を用いて、機能解析及び菌叢構造解析を行い、分解システムの知見を得ることを目指した。また微生物群集が生産する酵素群を用いたリグノセルロース糖化システムの検討及び、群集内に集積された新規遺伝子資源の取得を行うこともあわせて目的とした。なお本研究ではリグノセルロース基質として、ゴルフ場などの施設で廃棄物として生じる芝草と、サトウキビからの砂糖生産において、同じく廃棄物として発生するバガスの 2 種を用いた。

1 芝草分解微生物群集 TG60 の構築と機能構造的解析

本節では 6 日間の培養で 58%の芝草を可溶化する、高い分解能を有した安定な芝草分解微生物群集 TG60 を構築した。TG60 と接種源とした堆肥についてバクテリアの Universal primer を使用してクローンライブラリーによる菌叢比較を行ったところ、堆肥から得られた 72 クロオンが 57 OTU に分類され、きわめて多様な菌叢になった一方、TG60 から取得した 73 クロオンは 10 OTU に分類され全て *Firmicutes* 門に属しており、これらの菌群が分解に重要であることが示唆された。また TG60 からは高温嫌気性セルロース分解菌として報告されている *Clostridium stercorarium* に 92%の相同性を有する配列が得られ、新規のセルロース分解菌が集積されていると考えられた。

2 バガス分解微生物群集

2-1 バガス分解微生物群集 BA50・BA60 の構築と機能・構造的解析

バガスを分解対象リグノセルロースとして用い、TG60 と同様の方法で、50℃で継代培養

した BA50 と 60℃ で継代培養した BA60 の 2 種のバガス分解微生物群集を集積した。これらの群集の、構造的安定性及び、機能性の高さや安定性を確認したのち両群集を 40℃ から 70℃ まで培養温度を変えてバガスの分解力を比較したところ、BA50 は 50℃、BA60 は 60 ~ 65℃ で最も強い分解力を発揮し、同一の堆肥を起源とする機能的に異なるバガス分解微生物集団であることが示された。

クローンライブラリー解析を行ったところ、BA50 では 68% のクローンが *Proteobacteria* 門に属し、BA60 では 53% のクローンが *Firmicutes* 門に属しており、大きく異なる菌叢パターンが見られた。また BA60 からはセルロース分解菌として知られる *C. stercorarium*、*C. thermocellum* に近縁な配列が得られた。一方、BA50 からはこうした配列は得られなかったが、高温嫌気性セルロース分解菌の集中する *Clostridium* cluster III の specific primer を用いて再度クローンライブラリーを作製したところ *C. straminsolvens*、*Bacteroides cellulosolvens* に近縁な配列が得られた。以上の結果から異なる特徴を有する 2 種の安定なバガス分解微生物群集 BA50・BA60 の集積に成功し、群集内には新規のセルロース分解菌と推定される菌が複数種ずつ存在することが示唆された。

2-2 BA50・BA60 の生産する酵素群の解析

BA50・BA60 は、リグノセルロース特にバガスの分解に適したセルラーゼ群を生産可能であると考えられた。そこで両群集の培養液からセルラーゼ群の抽出を試みた。結果 Carboxymethyl cellulose (CMC) に対する分解の比活性が BA50 からは 26.9 倍、BA60 からは 14.2 倍の酵素群を抽出することに成功した。抽出したセルラーゼ群を 20 Unit(CMCase)/g-biomass となるようにバガスに添加し 24 時間反応後グルコース濃度を測定したところ、バガスからの直接のグルコース生産に成功した。糖回収率は BA50 由来のセルラーゼで 9.5%、BA60 由来のセルラーゼで 43.1% であった。

2-3 メタゲノムアプローチによる新規遺伝子取得

新規セルロース分解菌を含みバガスを効率的に分解することが示された BA50・BA60 から抽出したゲノム DNA を用いて、メタゲノムライブラリーを作製し新規セルラーゼ遺伝子の取得を目指した。CMC 分解を指標にスクリーニングを行ったところ、BA50 からは 60,000 クローン中 5 クローン、BA60 からは 20,000 クローン中 4 クローンの活性を確認した。これらクローンの塩基配列を決定し、Protein BLAST により相同性検索を行ったところ既知の配列と高い相同性を有するものもあったが、既知配列との相同性が 56% と新規性の高いセルラーゼ遺伝子の取得に成功した。

総括

本研究は複雑かつ多様な構造をもつリグノセルロース分解に対し、有効な微生物群集を効率よく構築することが可能であることを示し、このような群集を用いた統合的アプローチが今後の研究進展にきわめて有効であることを示すものであると考えられた。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位としてふさわしいと認めた。