

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 クリスチアーネ アケミ ウチマ
Cristiane Akemi Uchima

近年、地球温暖化の進行や石油価格高騰などの諸問題の深刻化、また化石燃料枯渇への懸念を受け、再生可能エネルギーであるバイオマスからのエタノール等の生産に期待が集まっている。現在、米国やブラジルを中心にトウモロコシやサトウキビなどからバイオエタノールが生産されているが、それら可食性の作物を燃料生産に利用することには食糧との競合という大きな問題が潜在している。この問題の解決のためには、非可食性の木質バイオマスからのエタノール生産技術を確立することが決定的に重要であるが、植物細胞壁由来の多糖からなる木質バイオマスを糖化することは容易ではなく、実用化に至っていない。一方、自然界では様々な生物が木質バイオマス、特にセルロースを分解してエネルギー源としており、中でもシロアリは極めて高効率にセルロースを資化できることが知られている。本研究は新たな木質バイオマス利用技術の確立を目指し、シロアリ由来の3種類のGHF1 β -グルコシダーゼの異種生産系の確立、精製および性質の解析を行ったものである。論文は序章、結果を述べた4つの章、および総括と展望を記した終章からなる。

第一章では3つの β -グルコシダーゼ、即ちコウシュンシロアリのG1NkBG(以下NkBG)、タカサゴシロアリのG1sgNtBG1とG1mgNtBG1(以下各々sgNtBGとmgNtBG)の異種生産について述べている。3つの酵素とも麹菌 *Aspergillus oryzae* の発現システムを利用して生産を試みたが、NkBGのみ生産が認められた。sgNtBGとmgNtBGが生産されない原因を調べたところ、これらを導入した麹菌株ではそのコード領域の途中でポリAが付加された未成熟 mRNA が作られていることがわかった。興味深いことに、両遺伝子を酵母 *Pichia pastoris* に導入したところ問題なく生産されたことから、麹菌と *P. pastoris* においてはポリA付加シグナルの認識機構がかなり異なるものと考えられた。

第二章では3つの β -グルコシダーゼの精製と性質の解析について述べている。NkBGは麹菌培養上清から硫酸アンモニウム沈殿と数種のクロマトグラフィーを行うことにより精製を行った。sgNtBGとmgNtBGはそのN末端に付加した6 \times Hisタグを利用してNi²⁺-NTAカラムによる精製を行った。精製酵素を用いて各々のV_{max}とK_m値をp-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG)を基質に調べたところ、NkBGはそれぞれ16 U/mg、と0.23 mg/ml、sgNtBGは0.8 U/mgと0.2 mg/ml、mgNtBGは8.0 U/mgと0.2 mg/mlであっ

た。

一般に β -グルコシダーゼはその活性が反応産物であるグルコースによって阻害されることが知られている。3つの β -グルコシダーゼについてグルコース感受性を調べたところ、興味深いことに NkBG の活性は 0.1~0.6 M グルコースの存在下でやや亢進し、1 M グルコース存在下でも 92%の活性を保持することがわかった。sgNtBG と mgNtBG の活性はグルコースによって濃度依存的に阻害されたが、それでも一般的な β -グルコシダーゼに比べ高いグルコース耐性を示した。

第三章ではシロアリ由来の3つの β -グルコシダーゼと、市販の β -グルコシダーゼ剤である Novozyme 188 との比較を行っている。その結果、耐熱性、グルコース耐性などの点において mgNtBG が優れた性質を持つことが分かった。また、市販のセルラーゼ剤である Celluclast を用いた結晶性セルロース分解においても、mgNtBG が Novozyme 188 に比べより高い協調的効果を示すことがわかった。

第四章では *P. pastoris* を用いた異種タンパク質生産において有用なベクター pBGP3 の作製について述べている。pBGP3 は発現タンパク質の N 末端に myc エピトープタグと 6×His タグが付加されるように設計されたベクターであり、発現タンパク質は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来のプレプロ α -ファクターとの融合タンパク質として生産され、この配列を利用して分泌経路に送られる。プレプロ α -ファクター配列は分泌系路上で切断され、目的タンパク質のみが分泌される。第一章における sgNtBG と mgNtBG の生産にはこのベクターが用いられており、その有用性が実証された。

以上、本論文はシロアリ由来の3種類の β -グルコシダーゼの異種生産と精製、性質の解析、およびそれらが示すバイオマス分解促進効果を示したものであり、学術的・応用的に貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。