

氏名	ホン 洪	ジョン 洞
学位(専攻分野)	博士(農学)	
学位記番号	農博第1346号	
学位授与の日付	平成15年3月24日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻	
学位論文題目	Studies on Thermostable Cellulases from Fungi (カビの耐熱性セルラーゼに関する研究)	
論文調査委員	(主査) 教授 熊谷英彦	教授 井上國世 教授 江崎信芳

論文内容の要旨

セルロースは、地球上に最も多く存在する有機化合物であり、未利用バイオマスの主成分である。多くの微生物がセルロースを分解資化するが、その分解に直接関与する酵素がセルラーゼである。セルラーゼは、endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase および β -glucosidase などからなる酵素群の総称であり、これらが共同的に働きセルロースを分解し、最終的にグルコースを生成する。

本論文は、セルロースの効率的な酵素分解を目的としてカビの耐熱性セルラーゼに関する研究を行い、その結果を取りまとめたものである。本研究において著者は、*Aspergillus niger* の耐熱性 endo- β -1,4-glucanase 遺伝子と *Thermoascus aurantiacus* の耐熱性 cellobiohydrolase 遺伝子をクローニングし、組み換え酵素の性質を明らかにした。また、耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* において形質転換システムを構築し、耐熱性セルラーゼ遺伝子の発現株を作製した。その内容は以下のように要約できる。

1. 精製酵素のアミノ酸配列を基に *A. niger* 由来ゲノム DNA を鋳型として PCR 法により遺伝子断片の増幅を行った。次いで、*A. niger* の cDNA ライブラリーを構築し、先の PCR 増幅断片をプローブとしてスクリーニングを行い陽性クローンを得、996bp からなる ORF を特定した。そのコードするタンパク質は、他の endo- β -1,4-glucanase と高い相同性を持ち、glycoside hydrolase のファミリー 5 に属することが判明したので、本遺伝子を *eng1* と命名した。*eng1* cDNA を高発現プロモーター GAPDH を持つ多コピープラスミドに挿入し、これにより出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を形質転換した。この形質転換株は、セルラーゼを細胞外に分泌し、培地中のカルボキシメチルセルロースを分解することを確認した。本形質転換株の培養液から組み換え酵素を精製し、その性質を解析した。精製酵素は糖鎖を持ち、熱に安定で 80°C、1 時間処理後、56% の活性を有していた。また、その最適反応温度は 70°C であった。

2. 耐熱性セルラーゼを有することが知られているカビ *Thermoascus* の数株について、高温増殖性とセルラーゼ生産能を調べ、*T. aurantiacus* IFO9748 株を選択した。本菌のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、その増幅断片をプローブとして、本菌の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。約 1.6kbp のヌクレオチド断片を含む陽性クローンを得、1371bp からなる ORF を見いだした。本遺伝子が glycoside hydrolase のファミリー 7 に属することを明らかにし、*cbh1* と命名した。GAPDH プロモーターを用いて *cbh1* 遺伝子を出芽酵母 *S. cerevisiae* で発現させた。本酵素が細胞外に分泌生産されていることを確認し、培養液より本酵素を精製、その性質を解析した。精製酵素は、65°C、1 時間処理後、80% の活性を保持していた。本酵素の耐熱性は、Endo-H 処理により糖鎖を除くと低下した。TLC を用いた分析から、本酵素は Avicel と pNP-セロビオシドを分解して主にセロビオースを遊離すること、また、pNP-ラクトースを分解してラクトースを遊離することが明らかとなった。また、ノーザンプロット解析により *cbh1* 遺伝子は、37°C よりも 50°C においてより多く発現していることを明らかにした。

3. 高温での増殖性ならびにエタノール生産能を指標として酵母のスクリーニングを行い、*Kluyveromyces marxianus*

IFO1777 株を選定した。次いで、*S. cerevisiae* との相同性を指標として栄養要求性マーカー遺伝子である *URA3*, *LEU2*, *TRP1* のクローニングを行い、*URA3* 遺伝子に関しては kanamycin 耐性遺伝子と組み換えることで遺伝子破壊株を構築した。さらに、*URA3* 遺伝子を含む染色体挿入型プラスミドを作製し、*A. niger eng1* ならびに *T. aurantiacus cbh1* 遺伝子を、それぞれ高発現プロモーターである *GAPDH* ならびに *ADH* の下流につないで本プラスミドに挿入し、これを用いて先のウラシル要求性 *K. marxianus* 変異株を形質転換した。この形質転換株を 45°C で培養したところ、培養ろ液に両酵素活性が検出され、両遺伝子の耐熱性酵母でのクローニングを確認することができた。

論文審査の結果の要旨

大気中の炭酸ガスの増加により地球温暖化が進行し、炭酸ガス排出量の削減が強く求められている。そのような状況下、未利用バイオマスを原料とする資源循環型のエネルギー供給システムの構築が、化石燃料の使用量を減らし、炭酸ガスの排出量を削減する有効な手段の一つであると考えられている。しかしながら、バイオマスの主成分であるセルロースは強固な化学構造を持つため、構成成分であるグルコースにまで効率良く分解することは容易ではない。本論文の著者は、高温でのセルロース分解系が、分解反応の効率化のみならず、反応中の雑菌の繁殖を防げること、形質転換株の環境への拡散を抑えやすいことなどの有利な面を持つと考え、熱に安定なセルラーゼの高生産を目指して、耐熱性セルラーゼ類の遺伝子のクローニングを行い、出芽酵母、さらには耐熱性酵母での発現を行った。成果として評価できる主な点は以下のとおりである。

1. *Aspergillus niger* 由来耐熱性 endo- β -1,4-glucanase の遺伝子のクローニングを行い、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を本遺伝子で形質転換し、高発現株を得た。組み換え酵素が細胞外に分泌生産されることを確認し、これを精製した。精製酵素は、糖鎖を持ち、80°C で1時間の処理後、56%の活性を有すること、またその最適反応温度は70°C であることなど、その性質を解明した。

2. 耐熱性のカビ *Thermoascus aurantiacus* 由来の耐熱性 cellobiohydrolase の遺伝子のクローニングならびに *S. cerevisiae* における高発現を行った。組み換え酵素が細胞外に分泌生産されることを確認し、これを精製した。精製酵素は、糖鎖を持ち、65°C で1時間の処理後80%の活性を有することなど、その性質を解明した。また、*cbh1* 遺伝子は、37°C よりも50°C においてより高く発現していることを明らかにした。

3. 耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を用いて形質転換系の構築を行った。*A. niger* の耐熱性 endo- β -1,4-glucanase ならびに *T. aurantiacus* の cellobiohydrolase 遺伝子を高発現プロモーターの下流につないだ染色体挿入型ベクターを構築し、*Kluyveromyces* を形質転換することで両酵素の高温での発現酵母株を構築した。

以上のように本論文は、耐熱性 endo- β -1,4-glucanase の遺伝子および cellobiohydrolase の遺伝子をクローニングし、発現酵素の性質をそれぞれ解明し、さらに耐熱性酵母の耐熱性セルラーゼ発現株を分子育種したものであり、応用微生物学および酵素生産の実際に寄与するところが大きい。

よって、本論文は、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年2月13日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。