

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	中西昭仁
論文題目	Construction of a novel system of pretreatment and saccharification for cellulosic biomass (セルロースバイオマスに対する新規な前処理・糖化システムの構築)		
(論文内容の要旨)			
循環型社会の構築に有用とされるバイオリファイナリーのうち、食糧と競合しない非可食系バイオマス由来のバイオエタノール産生が強く望まれている。非可食バイオマスから糖化発酵を行うには効率的な前処理が必要となる。そこで前処理効果を高めるために反応系の構築を行った。系の構築には環境負荷が少なく高度なインフラ設備を必要としない酵素法を選択し、かつ分離精製にかかる手間やコストを軽減し、糖化発酵の際不必要なコンタミネーションを避けることのできる酵母の細胞表層工学を採用した。実バイオマスとして「新聞紙」や「熱水処理した稲わら」を用い、以下の通りに前処理効果を評価した。			
1. <i>Trametes</i> sp. Ha1由来の酵素laccaseによる前処理効果			
非可食バイオマスである古紙などの「新聞紙」は主要な構成成分がセルロースであるため、バイオ燃料の資源としては好ましい。ただ、リン酸膨潤させたセルロースから直接エタノール発酵を行えるセルラーゼ提示酵母で「新聞紙」を反応処理しても、エタノール発酵を確認することができなかった。そこで、本研究では、リグニン分解酵素に注目し、リグニン分解能をもつ白色腐朽菌<i>Trametes</i> sp. Ha1の菌体外酵素のうち強力な酸化活性を有するlaccase Iで新聞紙の前処理反応を行い、次に、セルラーゼ提示酵母を反応させた結果、エタノールを発酵生産できることを明らかにした。			
2. Laccase 提示酵母を用いた前処理効果			
酵素の分離・精製コストを下げるため<i>Trametes</i> sp. Ha1からラッカーゼ遺伝子を単離し、表層提示発現用プラスミドに組み込み、酵母BY4741(<i>Δsed1</i>)を形質転換しlaccase I酵素提示酵母を構築した。一方、稲わらは特異的にシリカを溜め込み、リグニン含量も高いため、前処理無しの直接糖化は難しい。そこでリグニンをはじめとする他の細胞壁成分とセルロースとを繋ぐヘミセルロースを分解しセルロース画分を活用しやすくすることを目的に、稲わらを熱水処理に供した。熱水処理を施した稲わら(hydrothermally processed rice straw: HPRS)に対し、セルラーゼ提示酵母で糖化発酵を行ったところ、エタノール発酵が確認された。そこで更なるエタノール発酵の向上を目指し、酵素laccase Iのメディエーターとして2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS)存在下でHPRSに対してlaccase I提示酵母で24 時間前処理を行い、その後精製セルラーゼとともにセルラーゼ提示酵母で糖化発酵を行った結果、非提示酵母で前処理をした場合に比べて1.2倍発酵効率が向上することを明らかにした。			
3. セルロース分解に適したcarbohydrate-binding module (CBM)の組み合わせの選抜			

セルラーゼには、基質を分解する活性モジュール、セルロース分子を認識して結合するモジュール(CBM)、これら二つを接続するモジュールの三つのモジュールを持つものが多い。その中でもセルラーゼ活性に及ぼすCBMの役割は非常に重要であり、セルラーゼのセルロース上への集積化や、セルロース鎖間の水素結合の解離などの役割を持っていると考えられている。CBMには非常に高度に保存されたアミノ酸残基があり、これによって特定のCBMの構造や結合能力を保存していると考えられるが、逆に全く保存されていない領域もあることが明らかとなった。自然界には多種多様なバイオマスセルロースが産生しており、そのためセルロース繊維のより合わせが各々バイオマスごとに異なっていて、このCBMの非保存領域がセルロースの多様性に対応していると考えた。実際、単に一種類のセルラーゼがセルロースに最適化されているのではなく、自然界での多種多様なセルロースに対し複数のセルラーゼが共役してセルロースの分解に最適化されている。

しかし、各々のバイオマスのセルロースに対し最適なCBMの組み合わせを選抜すれば、1つのセルラーゼでより効率的にセルロースを分解できる見込みがある。セルロースの初期分解に大きく関与するendoglucanase のファミリー1のCBMにおいて、非保存領域(18、23、26、27番目のアミノ酸)に遺伝子工学的に網羅的変異を導入し、この変異のあるCBMをもつendoglucanase IIとcellobiohydrolase、 β -glucosidaseを酵母細胞表層上で提示する酵母群を構築した。各種のセルロースに対し、糖化効率の良いCBMを提示した酵母群がより多くのグルコースを得て生き残ることができるため、選択したバイオマスに対し最適なCBM提示酵母群を選抜できると考えた。Laccase I で処理した新聞紙を唯一の炭素源とする生育培地においてこのような選抜を行ってから完全培地のプレートにて生き残った酵母を育成し、形成されたコロニーのCBM遺伝子の配列を確認した結果、46のwild typeのCBM提示株に対し1つの変異CBM提示株(N18R、S23T、S26S、T27H)を獲得した。次に、laccase I 処理の新聞紙を基質としこの割合で発酵を行ったところ、wild typeのみで発酵させた場合に比べ発酵初期において1.5倍の発酵効率向上を明らかにした。また、実バイオマスであるHPRSを唯一の炭素源とした生育培地においても酵母群を選抜した後、生き残った酵母の持つCBM遺伝子を調べたところ、wild type 2株、RTSH変異(N18R、S23T、S26S、T27H) 10株、RPQA変異(N18R、S23P、S26Q、T27A) 7株、RPLA変異(N18R、S23P、S26L、T27A) 1株を獲得した。この結果より、実バイオマス中のセルロースに適したCBMの組み合わせを選抜できる可能性を示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

実バイオマスの糖化発酵では、効果的な前処理系の構築、セルラーゼによる分解に適したCBM選抜系の構築などが課題である。この課題を克服するために、本研究では、laccase Iによる前処理効果の評価、laccase I 提示酵母での前処理系の構築に加え、セルロース分解に適したendoglucanaseのCBM選抜系の構築を行った。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. リグニン分解能をもつ白色腐朽菌*Trametes* sp. Ha1の菌体外酵素のうち強力な酸化活性を有するlaccase Iで新聞紙の前処理を行うことによって、セルラーゼ提示酵母により、エタノール発酵ができることを明らかにした。

2. HPRSに対し、セルラーゼ提示酵母による糖化発酵を行ったところ、エタノール発酵が確認された。そこで更なるエタノール発酵の向上を目指し、HPRSに対してメディエーターABTS存在下でlaccase I 提示酵母で前処理を行い、その後、セルラーゼ提示酵母で糖化発酵を行った結果、非提示酵母で前処理をした場合に比べて発酵効率が向上することを明らかにした。

3. *Trichoderma reesei* endoglucanase IIのファミリー1のCBMにおいて、非保存領域に遺伝子工学的に網羅的な変異を導入し、この変異CBMをもつendoglucanase II、cellobiohydrolase、 β -glucosidaseを酵母細胞表層上で提示する酵母群を構築した。laccase I で処理した新聞紙を唯一の炭素源とした生育培地において選抜を行い、生き残った酵母を用いて発酵を行ったところ、wild typeのみで発酵させた場合に比べ発酵初期において1.5倍の発酵効率向上を明らかにした。また、実バイオマスであるHPRSを唯一の炭素源とした生育培地において酵母群を選抜後、生き残った酵母のCBM遺伝子を調べたところ、endoglucanase II のCBMの選抜が行われていることが確認された。よって、実バイオマス中のセルロースに適したCBMの組み合わせが存在し、それを選抜できる系の構築が可能となった。

以上のように本論文は、実バイオマスの糖化発酵を行うにあたって、前処理系の構築、および今まで着眼されてこなかったendoglucanase II のCBMの非保存領域を改変させ、酵母の細胞表層工学を活用して実バイオマスに最適なCBMを選抜させるという全く新しい系の構築を行ったものであり、生体高分子化学、森林代謝機能化学および木質バイオマス変換化学に寄与することが大きい。

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 24 年 4 月 12 日、論文並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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降