

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	Apisan Phienluphon
論文題目	Insights into the structure and functionality of feruloyl esterases for the efficient utilization of lignocellulosic biomass (リグノセルロース系バイオマスの有効活用に向けたフェルラ酸エステラーゼの構造と機能に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、フェルラ酸エステラーゼの構造と機能の相関及びその草本系バイオマスの利活用への応用を論じた結果をまとめたもので、5章からなっている。</p> <p>第1章は序論で、最初に木本・草本系バイオマスを構成する三大成分セルロース、ヘミセルロース及びリグニンの化学構造と高次構造を説明している。次に高付加価値物質であるフェルラ酸がエステルを形成する事で、ヘミセルロース鎖どうし及びヘミセルロース鎖とリグニン鎖が架橋され、当該バイオマスの利活用の障害となっている事が述べられている。最後にある種の木材腐朽菌はこのエステル結合を切断するフェルラ酸エステラーゼ(FAE)を有しており、アミノ酸の配列に基づいていくつかのサブファミリー(SF)に分類されているが、この内のSF5とSF6に関しては立体構造が報告されておらず、この為に機能発現機構は未解明である事が説明されている。そこで本学位論文ではSF5とSF6に属するFAEに関して結晶構造を決定し、変異体に関する活性データと組み合わせる事で、機能発現機構を解明する事を目指す事が述べられている。さらに、FAEとキシラーゼ(XYN)を細胞表面に提示した酵母を調製し、これを用いて天然バイオマスであるサトウキビ収穫廃棄物からキシロースとFAEの獲得を試みる事が述べられている。</p> <p>第2章では、SF6に属する <i>Aspergillus sydowii</i> 由来の FAE(AsFAE)の単体及び基質アナログとの複合体の結晶構造を報告している。構造情報に基づいて変異体を作成してその活性を測定する事で、活性を発現する上で重要なアミノ酸残基及びその活性発現における役割の解明が述べられている。また、基質の特異性が変化した変異体を調製する事に成功した事も述べられている。</p> <p>第3章では、SF5に属する <i>Acremonium alcalophilum</i> 由来の FAE(AaFAE)の単体及び基質アナログとの複合体の結晶構造を報告している。構造情報に基づいて変異体を作成してその活性を測定する事で、活性を発現する上で重要なアミノ酸残基及びその活性発現における役割の解明が述べられている。また、活性が上昇した変異体を調製する事に成功した事も述べられている。AaFAEはAsFAEに比べて基質結合ポケットが広いので、より大きな基質に対しても酵素活性を示す事が予想されたが、実際実バイオマスにAaFAEを作用させたところ、フェルラ酸の2量体を得られ、この仮説が実証された事が述べられている。</p> <p>第4章では、有用な酵素を酵母の細胞表面に提示する手法(yeast surface display, YSD)を用いて、実バイオマスであるサトウキビ収穫廃棄物から有用物質キシランと</p>			

フェルラ酸を獲得する事が述べられている。XYN を細胞表面に提示する酵母(X-酵母)、FAE を提示する酵母(F-酵母)、XYN と FAE の 2 種類の酵素を提示する酵母(X/F-酵母)の 3 種を創製した事が説明されている。実バイオマスに X-酵母のみを作用させた際に比べ、X-酵母と F-酵母を両方作用させた際には、キシランの収量が 1.2 倍に増大する事が見いだされ、XYN と FAE のシナジーがその原因であると説明されている。次に X/F-酵母を作用させると、X-酵母と F-酵母を両方作用させた際よりも、キシランの収量がさらに 1.2 倍に増大する事が見いだされ、XYN と FAE の近接効果はその原因であると述べられている。X/F-酵母を作用させると、フェルラ酸の収量に関しても改善がみられる事も述べられている。

第 5 章は結論で、今回解明された FAE の構造と機能の相関がまとめられている。また、FAE と XYN を YSD の手法と組み合わせる事で、実バイオマスであるサトウキビの収穫廃棄物から、有用物質であるキシランとフェルラ酸を効率的に取得できる事が述べられている。本研究によって、高温・高圧や強酸・強塩基に依らない木本・草本系バイオマスの環境に優しい利活用において、酵素が大きなポテンシャル有する事が示されたと結ばれている。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

草本・木本系バイオマスの三大成分はセルロース、ヘミセルロース及びリグニンである。フェルラ酸はエステル結合を形成する事で、ヘミセルロース鎖どうし及びヘミセルロース鎖とリグニン鎖を架橋し、当該バイオマスの利活用の障害となっている。木材腐朽菌が有するフェルラ酸エステラーゼ(FAE)を用いてこの結合を切断する事で、高温・高圧や強酸・強塩基に依らない環境に優しいバイオマスの利活用が可能になると期待される。本論文は、FAEの構造と機能の相関及びその草本系バイオマスの利活用への応用を研究した結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. サブファミリー(SF)6に属する *Aspergillus sydowii*由来の FAE(AsFAE)の単体及び基質アナログとの複合体の結晶構造の決定に成功した。また、変異体を作成してその活性を測定する事で、活性発現に重要なアミノ酸残基及びその役割を解明した。さらに、基質の特異性を変化させた変異体を調製する事にも成功した。

2. SF5に属する *Acremonium alcalophilum*由来の FAE(AaFAE)の単体及び基質アナログとの複合体の結晶構造の決定に成功した。また、変異体を作成してその活性を測定する事で、活性発現に重要なアミノ酸残基及びその役割を解明した。また、活性が上昇した変異体を調製する事にも成功した。さらに、AaFAEはAsFAEに比べて基質結合ポケットが広いので、より大きな基質に対しても酵素活性を示す事が予想されたが、実際実バイオマスに AaFAE を作用させたところ、フェルラ酸の 2 量体が得られ、この仮説が実証された。

3. キシラーゼ(XYN)を細胞表面に提示する酵母(X-酵母)、FAEを提示する酵母(F-酵母)、XYNとFAEの2種類の酵素を提示する酵母(X/F-酵母)の3種を創製する事に成功した。実バイオマスにX-酵母のみを作用させた際に比べ、X-酵母とF-酵母を両方作用させた際には、XYNとFAEのシナジーによってキシランの収量が1.2倍増大する事を見いだした。次にX/F-酵母を作用させると、X-酵母とF-酵母を両方作用させた際よりも、XYNとFAEの近接効果によってキシランの収量がさらに1.2倍増大する事を見いだした。X/F-酵母を作用させると、高付加価値物質であるフェルラ酸の収量も増大する事を見いだした。

以上本論文ではFAEの動作原理を解明するとともに、これを用いた環境に優しい木本・草本系バイオマスの利活用の可能性が示された。

よって、本論文は博士(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和6年1月23日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表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