

氏 名	むら しま こういちろう 村 島 弘 一 郎
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2456 号
学位授与の日付	平 成 15 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Design of Subunit Compositions for Artificial Cellulosomes with Recombinant Proteins from <i>Clostridium cellulovorans</i> (<i>Clostridium cellulovorans</i> 由来の組換えタンパク質を用いた人工セルロソーム組成の設計に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 東 順 一 教 授 津 田 盛 也 教 授 武 田 博 清

論 文 内 容 の 要 旨

バイオマスを酵素により単糖に分解し、さらにエタノール等の燃料に変換することにより、バイオマスからエネルギーを生産することができる。バイオマスの変換のための酵素として、これまで好気的な糸状菌等の微生物由来のセルラーゼが用いられてきた。しかし、酵素のコストが高すぎる等のため、現在のところ本工程から利益を得るにはいたっておらず、さらに高活性の酵素が求められている。一方、嫌気性菌の分泌するセルロソームと呼ばれる酵素複合体は、好気的な微生物由来のセルラーゼと比較して10倍程度高い比活性を有しており、バイオマスの変換のための酵素として期待されている。しかし、嫌気性菌による天然セルロソームの生産量が微量であるため、実用化にいたっていない。本論文は、嫌気性菌の一種である *Clostridium cellulovorans* 由来のセルロソームの構成成分を遺伝子組換え技術により大腸菌で発現させて得られた組換えタンパク質を用いて人工セルロソームを調製し、得られた人工セルロソームの酵素組成を最適化することにより天然セルロソームの生産性の低さを克服するとともに農産廃棄物の分解のための新たな酵素源の開発を試みたものであり、その内容は以下のようにまとめられる。

1. コーン茎の分解に重要な酵素成分を同定する目的で、*C. cellulovorans* の生産する天然セルロソームを精製し、そのサブユニット構成を分析した。その結果、ファミリー 5, 9 および 48 に分類される 3 種のセルラーゼと 1 種のキシラナーゼがコーン茎の分解に重要な成分であることを示している。
2. *C. cellulovorans* より単離した 3 種のセルラーゼの遺伝子を用いて組換えセルラーゼ EngE, EngH および ExgS を発現させた。これらの組換えセルラーゼを用いて人工セルロソームを調製し、コーン茎の主要成分であるセルロースの分解を行った。その結果、3 種のセルラーゼは相乗的にセルロースを分解することを見出している。また、その相乗作用は、エンドタイプのセルラーゼである EngE および EngH がセルロース鎖をランダムに切断してセルロース鎖末端の数を増大しつつ生成したセルロース鎖末端からエキソタイプのセルラーゼである ExgS が還元糖を遊離することに起因することを明らかにしている。さらに、3 種のセルラーゼの量比を変化させた実験から、セルロースの分解に最適なセルラーゼの組成を決定することを可能としている。
3. *C. cellulovorans* より新規なキシラナーゼ xynA の遺伝子を単離し、推定アミノ酸配列からドメイン構造を解析するとともに、大腸菌を用いて組換えキシラナーゼを発現させた。さらに、得られた組換えキシラナーゼを用いて人工セルロソームを調製し、セルラーゼの共存下コーン茎の分解を行った。その結果、キシラナーゼとセルラーゼはコーン茎を相乗的に分解することを見出している。この相乗作用は、コーン細胞壁中でセルロースミクロフィブリルの表層を被覆しているキシラン鎖がキシラナーゼに分解されたためセルラーゼのセルロース鎖へのアクセスビリティが向上したことに起因すると推定している。また、様々な量比のキシラナーゼとセルラーゼでコーン茎の分解を行うことにより、コーンの茎の分解に最適なキシラナーゼとセルラーゼの量比を決定することに成功している。
4. 上記した結果に基づいて様々な組合せの人工セルロソームを調製した結果、セルロソームの酵素組成をデザインすることによりセルロソームの基質特異性を人為的に制御することが可能となることを明らかにしている。また、従来の技術では

人工セルロソームは天然セルロソームの有するバイオマス分解活性の1%程度しか再構築できなかったが、酵素組成を人為的に変化させることにより20%まで再構築の割合を高めることを可能としている。

5. 進化分子工学的手法を用いて、*C. cellulovorans*のセルロソームの構成成分の1種であるセルラーゼ EngB の耐熱性の向上を試みた。EngB 遺伝子にシャッフリングおよびランダムに変異を導入することにより、変異セルラーゼのライブラリーを作成し、3株由来の耐熱性セルラーゼを得た。そのうち1種は耐熱性が7倍向上していた。これら3種の耐熱性セルラーゼは、いずれも酵素活性が親株と同等であったことから、進化分子工学的手法により酵素活性を犠牲にすることなく EngB の耐熱性を向上させ得ることを示している。

論文審査の結果の要旨

バイオマスを酵素により分解した後発酵によりエタノール等の燃料に変換するバイオマスの変換は、酵素のコストが高すぎる等のため、未だ実用化にいたっていない。本論文では、比活性が高いことが知られている嫌気性菌の一種である *Clostridium cellulovorans* 由来の酵素複合体セルロソームを人工的に調製し、その酵素組成をデザインすることにより、セルロソームをバイオマス変換のための酵素源として利用するために行ったものであり、評価される点は以下のとおりである。

1. *C. cellulovorans*の生産する天然セルロソームを精製し、そのサブユニット構成を詳細に分析した。その結果、ファミリー5、9および48に分類される3種のセルラーゼと1種のキシラナーゼがコーン茎の分解に重要な成分である可能性を示唆するとともに、これらの成分の存在量比がコーン茎の分解に重要な要素であることを明らかにしたことは、人工セルロソーム調製の基礎となり意義は大きい。

2. *C. cellulovorans*より単離されたファミリー5、9および48に分類される3種のセルラーゼ遺伝子を実験室で発現させ、得られた組換えセルラーゼを用いて人工セルロソームを調製し、コーン茎の主要成分であるセルロースの分解を行った。その結果、セルロースは3種類のセルラーゼにより相乗的に分解されることを見出している。また、これらのセルラーゼの量比とセルロース分解活性との相関を詳細に分析し、セルロース分解に最適なセルラーゼの組成を決定している。このことはバイオマス中のセルロースの分解実施上新たな展開を開くものでその意義は大きい。

3. *C. cellulovorans*より新規なキシラナーゼ xynA の遺伝子を単離し、遺伝子配列より推定されたアミノ酸配列を基に本キシラナーゼのドメイン構造を明らかにしている。さらに、本遺伝子を大腸菌にて発現させることにより得られた組換えキシラナーゼを用いて人工セルロソームを調製し、セルラーゼと共存させてコーン茎の分解を行った。その結果、キシラナーゼとセルラーゼはコーン茎を相乗的に分解することを明らかにしている。また、様々な量比のキシラナーゼとセルラーゼでコーン茎の分解を行うことにより、コーン茎の分解に最適なキシラナーゼとセルラーゼの量比を決定している。この事実はセルロース・ヘミセルロース複合体である天然セルロースを分解する上で重要であり、本研究の成果として高く評価できる。

4. 上記の結果に基づいて、組合せの異なる様々な人工セルロソームの調製を行った結果、セルロソームの酵素組成をデザインすることにより、得られたセルロソームの基質特異性を人為的に制御できることを示している。さらに、従来技術では人工セルロソームは天然セルロソームの活性の1%程度のみ再構築できるに過ぎなかったが、本論文では、酵素組成を最適化することにより、天然セルロソームの有するバイオマス分解活性の20%を再構築できることを示している。これらの結果はバイオマスの変換にセルロソームの利用が視野に入ったことを示すものでその意義は大きい。

5. 進化分子工学的手法を用いて、*C. cellulovorans*由来のセルラーゼ EngB の耐熱性の向上した3株のスクリーニングに成功し、そのうちの1種由来のセルラーゼは耐熱性が元の EngB と比較して7倍向上していることを見出している。また、進化分子工学的手法により短期間に酵素の特性を向上させる得ることを示し、本方法を応用することによりその他の酵素についても特性を向上させ得ることを提言したことは高く評価できる。

以上のように、本論文は人工セルロソームの酵素組成と活性との関係を詳細に検討することにより、バイオマスの変換のための酵素として人工セルロソームが利用できる可能性を示したものであり、森林生化学、微生物環境制御学ならびに森林生態学の発展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14年11月18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。