

## 論文内容の要旨

博士論文題目    バイオエネルギー生産のためのセルロース代謝に関わる  
酵素の生物化学的研究

氏    名                    藤元 奈保子

石油に大きく依存した産業構造により、水、大気、土壌など地球規模の環境破壊が問題となっている。この問題解決には、炭素資源が循環できる持続型の産業構造を形成することが強く求められているが、そのためには食糧以外のバイオマスからのエネルギー生産が不可欠である。本研究では、地球上に多量に存在するセルロース資源からバイオエネルギーを生産するために有効な微生物の探索を目的として、セルロース代謝に関わる酵素の生物化学的研究を行った。

まず、セルロースからバイオエタノールを生産するために必要な微生物を探索した。牛ルーメン液から、カルボキシメチルセルロースを炭素源とする培地を用いてセルロース分解菌のスクリーニングを行ったところ、これまでセルロースの分解活性が一番良いと報告されている *Trichoderma reesei* 株よりも、高いセルラーゼ活性を有する耐熱性及び微好気性の *Bacillus licheniformis* 株を発見した。また、本株の育種によりセルロースから 1 ステップでエタノールを生産できる可能性を示した。

つぎに、セルロースの分解によって得られるグルコースを燃料に用いるバイオ燃料電池の陽極で作用するグルコース脱水素酵素の機能に着目して検討を行った。ピロロキノリンキノン依存性の膜結合型グルコース脱水素酵素 (mGDH) を水溶性酵素 (cGDH) に改変することが、バイオ燃料電池の開発に有効であるとの視点から、大腸菌のスクリーニング結果にもとづいて、mGDH の変異体をいくつか作製して、それらの機能を評価した。その結果、mGDH の N 末端側の膜貫通領域にあるシステインをアラニンに置換した変異体 (mGDHC23A) と、mGDH の膜貫通領域と触媒領域の間にシグナルペプチダーゼ認識配列を挿入した変異体 (mGDH4aa) の両者の構造的特徴を併せもつ二重変異体 (mGDH4aaC23A) において、cGDH が発現することを見出した。一方、cGDH の活性を持続させるために、大腸菌の膜面分やペリプラズム画分ではたらくプ

ロテアーゼ及びペプチダーゼをコードする遺伝子の内で、40 の遺伝子が分解に寄与することを明らかにした。これらの遺伝子を一つずつ破壊した株において cGDH の発現状態を評価したところ、6 種類の遺伝子破壊株の細胞抽出液において cGDH の分解が抑制されることを見出した。これらの知見をもとに、グルコース脱水素酵素の安定発現には cGDH の分解に関わるプロテアーゼ遺伝子の破壊が有効であり、それを宿主として mGDH4aaC23A 変異体を発現させることで、バイオ燃料電池の構成要素として適した cGDH が得られる可能性を提示した。

以上のように、本研究ではバイオエネルギー生産を目指して、セルロース代謝に関わる酵素の生物化学的研究を行い、セルロースの分解に有効な耐熱性及び微好気性の微生物の単離に成功すると共に、水溶性グルコース脱水素酵素の安定発現のための指針を提示できた。これらの成果は、バイオエネルギー生産のためのシステム構築に有用な基礎的知見である。

(論文審査結果の要旨)

本論文は、セルロース資源からバイオエネルギーを生産するために有効な微生物の探索を目的として、セルロース代謝に関わる酵素の生物化学的研究を行った成果について述べている。得られた結果は以下のとおりである。

1. セルロースからバイオエタノールを生産するために必要な微生物を探索するために、牛ルーメン液から、カルボキシメチルセルロースを炭素源とする培地を用いてセルロース分解菌のスクリーニングを行った。その結果、これまでセルロースの分解活性が一番良いと報告されている *Trichoderma reesei* 株よりも、高いセルラーゼ活性を有する耐熱性及び微好気性の *Bacillus licheniformis* 株を発見した。また、本株の育種によりセルロースから 1 ステップでエタノールを生産できる可能性を示した。

2. セルロースの分解によって得られるグルコースを燃料に用いるバイオ燃料電池の陽極で作用するグルコース脱水素酵素の機能向上を目指して、ピロロキノリンキノン依存性の膜結合型グルコース脱水素酵素 (mGDH) を水溶性酵素 (cGDH) に改変する検討を行った。大腸菌のスクリーニング結果にもとづいて、mGDH の変異体をいくつか作製してそれらの機能を評価したところ、mGDH の N 末端側の膜貫通領域にあるシステインをアラニンに置換した変異体と、mGDH の膜貫通領域と触媒領域の間にシグナルペプチダーゼ認識配列を挿入した変異体の両者の構造的特徴を併せもつ二重変異体において、cGDH が発現することを見出した。一方、cGDH の活性を持続させるために、大腸菌の膜画分やペリプラズム画分ではたらくプロテアーゼ及びペプチダーゼをコードする遺伝子の内で、40 の遺伝子が分解に寄与することを明らかにした。また、これらの遺伝子を一つずつ破壊した株において cGDH の発現状態を評価したところ、6 種類の遺伝子破壊株の細胞抽出液において cGDH の分解が抑制されることを見出した。

以上のように、本論文ではバイオエネルギー生産を目指して、セルロース代謝に関わる酵素の生物化学的研究を行い、セルロースの分解に有効な耐熱性及び微好気性の微生物の単離に成功すると共に、水溶性グルコース脱水素酵素の安定発現のための指針を提示している。本研究の成果は、バイオエネルギー生産システム構築のための重要な設計指針を与えるものであり、学術的価値は高い。よって審査委員一同は、本論文は博士(理学)論文として認定できると判断した。