

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 河 合 哲 志

非可食性のリグノセルロース系バイオマスから生産されるバイオエタノールは、エネルギーの安全保障や地球温暖化対策、持続可能な社会に資する再生可能なエネルギーとして注目されている。バイオエタノールは植物の構成成分であるセルロース等の多糖類を分解し、そこで得られた糖を微生物による発酵を通じて生産される。分解法として硫酸を用いた化学的な加水分解法が開発されているが環境負荷が高いことが問題である。それに対し、微生物が生産する酵素を用いた生物学的な分解法は温和な条件で分解するため環境負荷が低いことが利点である。しかし、バイオマスを完全に分解するためには大量の酵素が必要であり、その酵素コストが本手法の工業的利用の最大の障壁となっている。

糸状菌 *Trichoderma reesei* はバイオマス分解に必要な種々の酵素、セルラーゼやヘミセルラーゼを菌体外に分泌し、さらにその生産量が非常に多いため、その活用が期待されている。本菌株は既に数十年の菌株育種の歴史を持ち、分泌される酵素のタンパク質工学的な改変や、分泌される多数の成分酵素の割合の最適化など多数の知見が蓄積されているが、実用的な酵素の開発には至っていないのが現状である。そこで本研究はバイオエタノール生産に資する酵素を開発すること目的とし、日本独自の育種菌株である *T. reesei* PC-3-7 株を親株とした酵素の高機能化及び高機能化のための酵素活性及び糖化反応の解析を行った。

第一章では、社会的及び学術的背景をまとめ、本研究の意義並び目的を述べ、それを達成するための実施方法について記載した。

第二章ではリグノセルロース系バイオマスの活用方法並びにこれを活用するための酵素生産菌及び酵素の開発に関する先行研究をまとめることで、従来の酵素高機能化手法の課題を指摘し、酵素の働きを解析するためには新規評価手法が必要であることを提示した。

第三章では *T. reesei* PC-3-7 株由来酵素の BGL 活性を向上することで酵素活性及びバイオマス糖化能を向上した酵素を構築した。BGL 活性の向上のため、*Aspergillus aculeatus* 由来 BGL である AaBG1 を異種宿主発現した。AaBG1 の発現には親株の *xyn3* プロモーターを用い相同組換えし、*T. reesei* X3AB1 株を構築した。本株が分泌する酵素 JN11 はセルラーゼ活性やキシラナーゼ活性を損なうことなく BGL 活性が 63 倍に向上していた。さらに糖化能は全ての糖化前処理バイオマスに対して市販酵素を上回った。JN11 と市販酵素は同等のセルロース分解活性を有するため、JN11 のバイオマス糖化能の高さは酵素活性では説明ができない。そこで主要な成分酵素 3 種 (CBH I・CBH II・EG I) の糖化に対する影響を調べた。その結果、酵素活性に測定する市販の微結晶セルロース Avicel と水蒸気爆砕処理スギでは各成分の糖化に与える影響が全く異なることが示唆された。このことから基質に合わせて成分酵素を最適化することが JN11 の更なる強化に繋がると推察された。

第四章では CBH I、CBH II 及び EG I が糖化反応に与える影響は前処理種類によって異なることを明らかにした。上記成分酵素の影響を評価するために標的とする成分酵素 1 種類のみを欠損させた単一成分欠損酵素を用い、各種の前処理バイオマスを糖化した。これは各成分酵素が相乗的に作用するため、単独酵素では本来の働きが正しく評価できないためである。単一成分欠損酵素を用いることで、欠損した酵素以外の全ての酵素の相乗効果が保たれた条件で評価することが可能となる。評価の結果、CBH I は全てのバイオマスに大きな欠損効果が表れたが、CBH II 及び EG I は基質種によって影響が大きく異なることが明らかとなった。CBH II や EG I の発現プロモーターは 2 及び 3 番目に強力であるため、これを酵素改変に利用できることが示唆された。

第五章では XYN III の重要性を明らかにし、本酵素を含む酵素 JN13H を構築することでヘミセルロースを含む NaOH 処理バイオマスに対する糖化能を JN11 より向上させた。JN13H は AaBG1 の発現に *egl1* プロモーターを用い、これを非相同組換えすることで EG I を維持しながら XYN III をより多く含む酵素となった。JN13H のバイオマス糖化能を評価した結果、糖化に必要な酵素量が JN11H と比較して 30% 低減し、市販酵素に対しては半分以下となることを明らかにした。酵素改良のツールとして *xyn3* プロモーターに加えて *egl1* プロモーターがさらなる酵素の改良に応用可能であろうとの展望を示した。

第六章では本論文にまとめた *T. reesei* PC-3-7 株を親株としたバイオマス分解酵素の高機能化に関する研究成果を総括し、本研究の課題と今後の展望について述べた。