

学位論文の審査結果の要旨

本学位論文は、セルラーゼ高生産菌である糸状菌 *Trichoderma reesei* において、セルラーゼの生産量をさらに向上させるために、セルラーゼ誘導物質（ソホロース）の合成機構を解明するとともに、その合成酵素の酵素化学的性質を遺伝子工学的手法を利用して改良することを目的としたものであり、以下に示す5章から構成される。

第1章では、研究の背景およびこれまでの研究内容について解説し、課題と目的を明確にしている。

第2章では、ソホロース合成に関与すると予想されるβ-グルコシダーゼ (BGL) アイソザイム9種類を異種発現し、全ての酵素化学的性質を明らかにするとともに、糖転移反応によるソホロース合成能力を評価した。糖転移活性を有する4種類のアイソザイムについては、転移生成物の種類と量を経時的に調査し、結果として Cel1A が最も高い変換率でソホロースの合成を行うことを明らかにした。また、その原因を各種オリゴ糖基質に対する反応速度論的解析によって合理的に証明した。本結果により、Cel1A の高いソホロース合成能力と *T. reesei* における全ての BGL アイソザイムの酵素化学的性質が初めて明らかとなった。

第3章では、特にソホロース合成能力が高い Cel1A と Cel3A に着目し、*T. reesei* における遺伝子欠損株を作製して、セルラーゼ誘導能力に及ぼす影響を調査した。Cel1A 遺伝子欠損株は、セルラーゼの生産時期が著しく遅延し、生産量が低下することを、転写レベルおよびタンパク質発現レベルで明らかにした。また、セルラーゼ転写因子の発現量も同様の傾向を示すことから、Cel1A はセルラーゼ誘導の初期段階に重要な役割を果たしていることを解明した。さらに、この現象は、培地へのソホロースの添加によって、野生株と同様なレベルまで回復することから、Cel1A はソホロースの合成を行うことでセルラーゼ誘導に寄与していることが示唆された。一方、Cel3A は主に細胞外でセロビオースの分解に関与することを明らかにし、セルラーゼの培養後期の誘導に関与していることを見出した。

第4章では、Cel1A にアミノ酸変異を導入することで、グルコース活性化を付与し、グルコース耐性を向上させ、さらには温度および pH 安定性を改良することに成功した。この変異酵素を利用することでソホロース合成量の増大が期待でき、本菌におけるセルラーゼ生産量の向上につながる可能性が期待された。

第5章では、得られた全ての結果を総括するとともに、セルラーゼ誘導機構の全解明に向けた展望が述べられている。

本学位論文は、申請者を筆頭著者とする審査付き原著論文2編に基づいてまとめられており、学術的に高い評価を得ている。また、セルラーゼ生産量の向上に貢献できる有用な知見を含んでおり、セルロース資源の有効利用に向けた応用研究としての価値も存在すると考えられる。以上の結果から、本論文は博士（工学）の学位論文として十分に値するものであると審査員全員一致で判断した。

公表主要論文名

Boyang Guo, Nobuaki Sato, Peter Biely, Yoshihiko Amano, Kouichi Nozaki,
Comparison of catalytic properties of multiple β-glucosidases of *Trichoderma reesei*.
Applied Microbiol Biotechnol, **100** (11), 4959–4968 (2016)

Boyang Guo, Yoshihiko Amano, Kouichi Nozaki,
Improvements in glucose sensitivity and stability of *Trichoderma reesei* β-glucosidase using
site-directed mutagenesis. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0147301 (2016)