

論文の内容の要旨

生物材料科学専攻

平成 18 年度博士課程 入学

氏 名：金野 尚武

指導教員名：磯貝 明

論文題目 **Studies on biodegradation of cellouronate**
(セロウロン酸の生分解に関する研究)

近年、自然界の物質循環に適合する生分解性高分子の需要が高まっている。生分解性機能材料を開発する手法の 1 つに、バイオマスの化学改質がある。地球上で最も多量に生物生産されるセルロースも、様々な化学改質により新しい機能が付与され、その利用範囲が拡大されてきた。しかしながら多くの場合、バイオマス由来であっても化学改質された生成物が環境中で完全に生物分解・代謝されることは難しい。

再生セルロースに、TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical) 触媒酸化を適用すると、C6 位の 1 級水酸基のみが選択的にカルボキシ基に変換され、水溶性の β -1,4 ポリグルクロン酸ナトリウム (セロウロン酸、グルクロナン) が得られる。セロウロン酸は、セルロースを人工的に化学反応で改質したポリウロン酸であるので、自然環境中での生分解性は低いと予想されていた。しかし、セロウロン酸の生分解性は代表的な水溶性セルロース誘導体であるカルボキシメチルセルロース (CMC) と比較して明らかに優れており、天然多糖であるアルギン酸と同程度であることが判明した。本研究では、このセロウロン酸の高い生分解性に着目した。生分解メカニズムの解明を目的として、1) 土壌から単離したグラム陰性細菌 *Brevundimonas* sp. SH203 が生産するセロウロン酸分解酵素の精製と特性解析、2) 糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来セロウロン酸分解酵素のクローニング、大量発現、特性解析及び結晶構造解析を行った。

Brevundimonas属細菌によるセロウロン酸の生分解

1) セロウロン酸分解酵素の精製

土壌より単離した *Brevundimonas* sp. SH203 を、セロウロン酸を炭素源とする培地で培養すると、培養液中の TC (全炭素量) は3日目で約 50%まで減少し、それに伴い菌体の超音波処理により得られる無細胞抽出液中に高いセロウロン酸リナーゼ活性を示した。よって、本菌のセロウロン酸の分解には主にリナーゼが関与していることが明らかとなった。培養3日目の無細胞抽出液より、セロウロン酸リナーゼを精製した。精製を進める過程で、2つリナーゼの存在が確認され、それぞれセロウロン酸リナーゼ I、II (CUL-I、II) とし、SDS-PAGE 上で単一バンドとなるまで精製した (Figure 1)。分子量はそれぞれ 39 KDa、62 KDa であった。

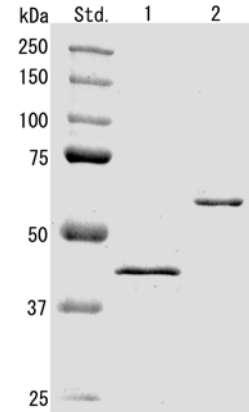


Figure 1. SDS-PAGE of purified CUL-I (1) and CUL-II (2).

2) *Brevundimonas* 属細菌由来セロウロン酸リナーゼの特性解析

CUL-I、CUL-II それぞれの生化学的性質を調べたところ、両酵素とも至適 pH は 7.5 付近であり、pH 5-8 で 24 時間処理後も 80%以上の活性を維持していた。金属の影響は CUL-I の方が敏感に受け、 $MnCl_2$ による処理で 50%以下にまで失活した。温度に対しては CUL-I が 50 °C 下、10 分間の処理でほぼ失活したのに対し、CUL-II は 70 °C まで安定であった。また、基質特異性を調べたところ、ウロン酸構造を有するアルギン酸、アミロウロン酸、ヒアルロン酸及びペクチンに対して CUL-I、II ともにほぼ活性を示さず、セロウロン酸に対する高い基質特異性が確認された。

CUL-I、CUL-II 及び CUL-I、II 混合系でセロウロン酸分解生成物をそれぞれ調製し、分析した。CUL-I は反応の初期において、複数のセロウロン酸オリゴマーを生成したことから、CUL-I はエンド型にセロウロン酸を分解するリナーゼであることが示された。さらに分解が進み、最終的には、ダイマーが最も多く蓄積した。一方、CUL-II はセロウロン酸分解能が CUL-I に比べて低いことが確認された。モノマーのみが生成

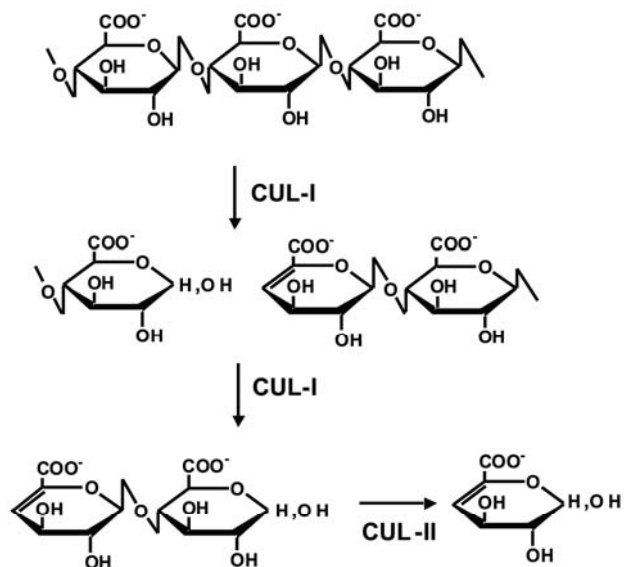


Figure 2. Schematic degradation system of cellouronate by CUL-I and CUL-II from *Brevundimonas* sp. SH203.

物として得られることから、CUL-II はエクソ型セロウロン酸リアーゼであると考えられた。一方で CUL-II は高重合度のセロウロン酸よりもダイマーに対して高い分解活性を有することが明らかになった。CUL-I と CUL-II を混合した場合、反応初期では CUL-I の反応で認められたように複数のセロウロン酸オリゴマーが生成しダイマーが多く検出されたが、最終的にはモノマーにまで低分子化されていた。以上の結果より、*Brevundimonas* sp. SH203 はセロウロン酸を CUL-I でエンド型に分解し、生成したダイマーを CUL-II がモノマーにまで分解していることが示された (Figure 2)。

糸状菌 *Trichoderma reesei* によるセロウロン酸の生分解

1) *Trichoderma reesei* 由来セロウロン酸分解酵素のクローニングと大量発現

T. reesei をセロウロン酸を唯一の炭素源とする液体培地で培養し、菌体外液を SDS-PAGE で分析した。*T. reesei* はセロウロン酸を唯一の炭素源とする培地で生育することができ、菌体外液中に 27 kDa の分子量を持つタンパク質を最も多量に生産した。検出されたタンパク質の cDNA を *T. reesei* の全ゲノム情報を用いてクローニングしたところ、得られた cDNA は 777 bp のオープンリーディングフレームを有しており、258 残基のアミノ酸配列が推定された。

この cDNA をメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* に導入し、組み換えタンパク質を大量発現させた。得られた組み換えタンパク質でセロウロン酸を処理し、分解生成物を ^{13}C NMR で分析したところ、本酵素は β -脱離反応によりセロウロン酸を分解する β -1,4 ポリグルクロン酸リアーゼ (TrGL) であることが示された (Figure 3)。

TrGL のアミノ酸配列と相同性の高いタンパク質を検索した結果、全て Hypothetical protein であり、どの多糖リアーゼ (PL) とも相同性を示さなかったことから、本酵素は新規多糖リアーゼファミリー (PL ファミリー20) に属することが明らかとなった。

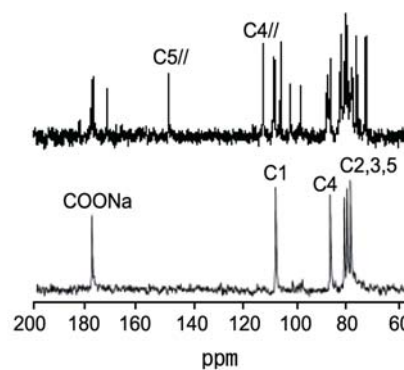


Figure 3. ^{13}C NMR spectra of cellouronate before and after treatment with TrGL for 24 h. C4// and C5// show C4 and C5, respectively, of the unsaturated non-reducing terminus.

2) *Trichoderma reesei* 由来セロウロン酸リアーゼの特性解析

TrGL はセロウロン酸に対し、高い基質特異性を有し、pH 6.5、50 °C で最も高い活性を示した。また、その活性は Ca^{2+} 濃度に依存し、2 mM の CaCl_2 存在下では約 80 倍のり

アーゼ活性を示し、 Ca^{2+} 存在下では温度安定性も増加することが明らかとなった (Figure 4)。

本酵素によるセロウロン酸分解生成物の分子量分布を経時的に調べたところ、反応初期には複数のセロウロン酸オリゴマーを生成したことから、エンド型にセロウロン酸を分解するリアーゼであると考えられた。最終生成物として重合度 2-4 のオリゴマーを蓄積した。

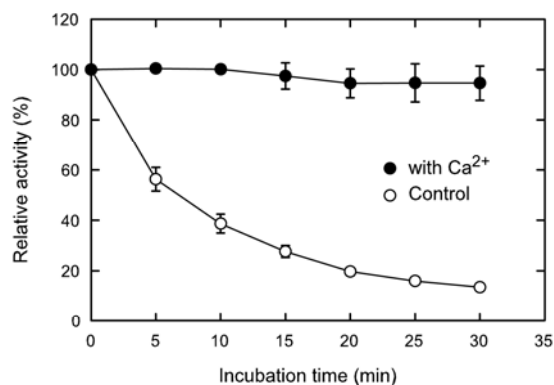


Figure 4. Effect of Ca^{2+} on the thermo-stability of recombinant TrGL. The enzyme solution was incubated in the presence or absence of CaCl_2 (2 mM) at 50 °C.

3) *Trichoderma reesei* 由来セロウロン酸リアーゼの結晶構造解析

TrGL の単結晶を 20% PEG 3350、0.2 M diammonium hydrogen citrate buffer (pH 5.0)、2.5 mM CaCl_2 からなる条件で調製し、結晶構造解析を行った。得られた結晶は X 線回折実験に供し、Se-MAD 法により分解能 1.8 Å の構造を得た。TrGL の結晶構造中には主に β ストランドが含まれており、全体として β -jelly roll の構造をとることが明らかとなった。結晶構造中には構造安定化に寄与していると思われるカルシウムイオンが結合していた (Figure 5)。他の β -jelly roll 構造を有する多糖リアーゼ (PL ファミリー7 アルギン酸リアーゼ) と活性中心を比較したところ、Gln91、His53、Tyr200 が活性中心残基であると予想された。

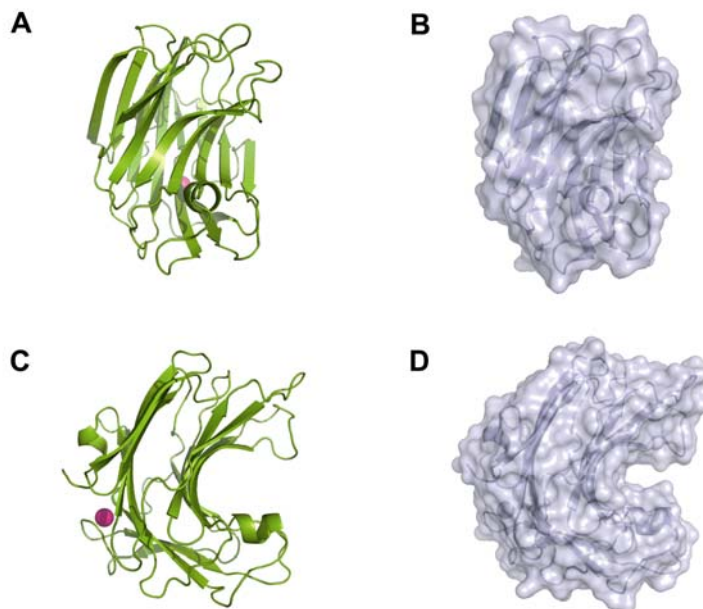


Figure 5. Overall structure of TrGL. (A) Ribbon representation of the TrGL. (B) Molecular surface of A. (C) The view rotated 90° around the vertical axis from that in A. (D) Molecular surface of C. The calcium ion is shown as a pink sphere.