

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金野 尚武

本研究では、再生セルロース、ボールミル粉碎非晶化天然セルロースの TEMPO (2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical) 触媒酸化で得られる新規水溶性ポリグルクロン酸である、セロウロン酸の生分解機構を詳細に検討し、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、および糸状菌 *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い、多くの新しい知見を得ることができた。

Brevundimonas sp. SH203 によるセロウロン酸の生分解機構を解明するため、セロウロン酸分解酵素の単離—精製を行った。まず、セロウロン酸を炭素源とする培地で当該細菌を培養したところ、高いセロウロン酸リアーゼ活性を示し、培養 3 日目の無細胞抽出液より、2 種類のセロウロン酸リアーゼ (CUL-I、II) を単離—精製した。分子量はそれぞれ 39 kDa、62 kDa であった。それぞれの酵素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、マグネシウムイオンによる処理で大きく失活した。温度に対しては CUL-I が 50°C、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。基質特異性については、ウロン酸構造を有するアルギン酸、アミロウロン酸、ヒアルロン酸およ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 と II 混合系でセロウロン酸分解生成物を分析しところ、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、エンド型にセロウロン酸を分解するリアーゼであることが明らかになった。最終的には、二量体が最も多く蓄積した。一方、CUL-II は単量体のみが生成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り、高重合度のセロウロン酸よりも二量体に対して高い分解活性を有していた。CUL-I と CUL-II を混合した場合、単独よりも著しく効率的に単量体にまで低分子化された。以上の結果から、*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続いて CUL-II がモノマーにまで分解していることが明らかになった。

続いて、糸状菌 *Trichoderma reesei* によるセロウロン酸の生分解機構を検討した。*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リアーゼ (TrGL) であることが示された)。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、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。

TrGL はセロウロン酸に対して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 倍のリアーゼ活性を示し、温度安定性も増加することが明らかとなった。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。

続いて、TrGL の3次元構造解析を行った。まず、単結晶を調製し、高出力X線回折により結晶構造解析を行った。その結果、TrGL の構造中には主に β ストランドが含まれており、全体として β -jelly roll 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おり、前述のカルシウムイオンの効果を説明できた。また、アルギン酸リアーゼと活性中心を比較し、活性中心のアミノ酸残基を特定することができた。

以上のように、本セロウロン酸の生分解機構の研究によって、土壌菌からのセロウロン酸分解酵素の単離精製および特性解析、糸状菌からのセロウロン酸分解酵素の単離精製、アミノ酸配列の決定、クローニング、大量生産、結晶構造解析、三次元構造解析、活性中心の特定等、極めて多くの基礎的な知見が得られた。また、本研究結果の意義として、セロウロン酸分解酵素によって分解されるポリグルクロン酸が植物の細胞壁成分として存在している可能性を示唆すると共に、セルロースの新しい生分解機構の存在も示唆するなど貴重な成果を得ることができた。これらの成果は、セルロース科学はもとより、酵素学、遺伝子工学、分子生物学の観点からも高く評価されている。従って、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。