

論文の内容の要旨

生物材料科学専攻
平成 18 年度博士課程進学

氏 名 塚田剛士
指導教員名 鮫島正浩

論文題目 糖質加水分解酵素ファミリー1に属する β -グルコシダーゼの構造と機能に関する研究

第一章 序論

近年地球温暖化や石油価格高騰の影響を受け、再生可能でカーボンニュートラルな資源である植物バイオマスから、エタノールや化成品等の有用物質を生産することが望まれている。植物細胞壁の主成分であるセルロースから酵素を利用してグルコースを得るためには、セルラーゼによりセロビオースなどの可溶性オリゴ糖へ分解した後、それら生成糖を β -グルコシダーゼ(BGL)によりグルコースまで分解する必要がある。糖質加水分解酵素(GH)は立体構造類似性からファミリーとして分類されているが、その中でBGLは主にファミリー1または3に分類されている。多くのセルロース分解性糸状菌が菌体外に生産するBGLはGHファミリー3に分類されているが、これらのBGLはセロビオースに対する反応性に乏しいことが知られている。一方、糸状菌が菌体内に生産するGHファミリー1に属するBGLに関しては殆ど研究が為されていないのが現状である。セロビオースに対して高い親和性を示すBGLを利用することでセルロースの分解効率を向上させることができるため、現在、セロビオースを良好な基質とするBGLが求められている。そこで本研究では、GHファミリー1に属するBGLの構造と機能の関係を明らかにすることにより、セロビオースに対する反応特性の高い新規なBGLを取得するための指針を得ることを目的とした。

第二章 GHファミリー1に属するBGL遺伝子のクローニング

本章では担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* のゲノム情報を利用し、GH ファミリー1 に属する 2 種の BGL 遺伝子クローニングをおこなった。*P. chrysosporium* の全ゲノム配列情報をもとにプライマー対を設計した後、RT-PCR により 2 種類の cDNA (*bg11A*, *bg11B*) をクローニングし、塩基配列ならびに推定アミノ酸配列を決定した。その結果、*bg11A* は 1389bp、*bg11B* は 1623bp のオープンリーディングフレームを有していた。また BGL1A と BGL1B のアミノ酸配列相同性は 65% と非常に高く、両 BGL は他の糸状菌由来 GH ファミリー1 に属する BGL と 45% 以上の相同性を示すことが明らかとなった。アラインメント解析を行った結果、両 BGL の推定アミノ酸配列には加水分解の際に酸・塩基触媒として作用するグルタミン酸残基、ならびに求核触媒として作用するグルタミン酸残基が保存されていた。

第三章 組換えBGL1A、BGL1Bの機能解析

本章では第二章で得られた遺伝子がコードするタンパク質(BGL1A、BGL1B)の酵素学的性質を解析した。クローニングした *bg11A* および *bg11B* を発現ベクターに組み込み、大腸菌を宿主とした発現系を利用することで組換えタンパク質を生産し、三段のカラム分画により精製をおこなった。両酵素の pH 依存性、安定性を測定したところ、至適 pH はともに pH6.0-6.5 であったが、BGL1A の方が酸性域における活性、安定性に優れる酵素であることが示された。セロビオースに対する加水分解活性を測定したところ、BGL1B のセロビオースに対する親和性は BGL1A や GH ファミリー3 に属する多くの BGL と比較して一桁低い値であったことから、BGL1B はセロビオースを効率よく加水分解する酵素であることが明らかとなった。両酵素の温度依存性、安定性はともに BGL1A の方が高い傾向が見られた。セロオリゴ糖(重合度 2-5)に対する反応速度パラメータから算出したサブサイトアフィニティーを比較した結果、BGL1A はサブサイト-1、+2 が強いため重合度 3 以上セロオリゴ糖に対して高い反応特性を示すと考えられた。BGL1B はサブサイト+1 の親和性が強いためセロビオースを良い基質にでき、全てのセロオリゴ糖に対して糖転移反応を示したと考えられた。

第四章 セロビオース認識に関与する因子の解析

第三章から BGL1A と BGL1B はセロビオースに対する反応特性(親和性、反応速度)が大きく異なることが明らかとなった。そこで本章では、両酵素の変異体を機能解析することで、セロビオースの認識に関与する因子を解析した。両酵素間における活性中心の比較を行ったところ、サブサイト+1 を構成すると推測される 8 つの残基のうち、5 つのアミノ酸残基が互いに異なっていた。しかしながら、サブサイト-1 を構成するアミノ酸残基群は互いに全て保存されていたため、サブサイト+1 において異なる 5 残基が両酵素のセロビオースに対する反応特性の差異を生み出す要因であると考えられた。BGL1A 変異体の機能解析をおこなったところ、反応特性を顕著に向上させることはできなかった。D229N、K253A 変異体においては基質親和性が著しく低下していたが、両アミノ酸は水素結合を形成していることが立体構造から明らかとなっているため、両アミノ酸の相

相互作用が活性中心の構造形成に重要であると考えられた。一方、BGL1B 変異体を機能解析した結果、BGL1B においては D246 とセロビオースの還元末端側 C6 位メチロール基における水素結合形成が、セロビオースに対して高い親和性を示すために重要であることを示唆する結果が得られた。

第五章 酸性域における活性に関与する因子の解析

第三章から BGL1A と BGL1B は酸性域における活性保持率が大きく異なることが明らかとなった。そこで本章では、両酵素の変異体を機能解析することで、酸性域における活性に関与する因子を解析した。BGL1A 変異体を作製し pH 依存性を野生型と比較したところ、いずれの変異体においても酸性域における活性保持に顕著な変化は観測されなかったことから、それらの残基が求核触媒の解離状態には関与していないことが示された。D229N、H231D、K253A 変異体においては中性からアルカリ性域における活性の変化が観測されたため、それらの残基が直接または間接的に酸・塩基触媒と相互作用していることが推測された。さらにいずれの BGL1A 変異体においても酸性域における pH 安定性の変化は観測されなかったため、BGL1A が酸性域で高い活性を保持できる要因は高い酸安定性によると考えられた。

第六章 総括

本研究ではセロビオースに対して優れた反応特性を有する BGL を取得するため、*P. chrysosporium* 由来 GH ファミリー1 に属する 2 種の BGL 遺伝子をクローニングし、それらがコードするタンパク質を組換え体として生産し機能解析をおこなった。その結果、BGL1A と BGL1B は酸性域における pH 依存性ならびにセロビオースに対する反応特性が互いに異なることを明らかにした。また両酵素は高いアミノ酸配列相同性を有しているが、立体構造の解析を行うとサブサイト +1 を構成する 5 つのアミノ酸残基が互いに異なっていた。そこで両酵素の機能に差異を与えているアミノ酸残基の特定を行うために部位特異的変異体の作製を行い、各変異体の酵素活性を測定した。その結果、BGL1B の D246 とセロビオースの還元末端側 C6 位メチロール基間における水素結合が、セロビオースに対して高い親和性を示すために重要であることを明らかにした。一方、BGL1A が酸性域においても活性保持率が高い理由としては、同酵素の構造が BGL1B と比べて酸安定性に優れることに基づくことを示した。以上の本研究で得られた知見から、今後、酸性域における BGL1B の構造安定化につながる要因を明らかにすることで、酸性域で活性を保持し、セロビオースに対して高い親和性を有する BGL を取得することが可能になると考えられた。