

論文の内容の要旨

生物材料科学専攻
平成 21 年度 博士課程 入学
氏 名 杉本 直久
指導教員名 鮫島 正浩

論文題目

Functional analysis and application of fungal cellulose-binding domains
(糸状菌由来セルロース結合性ドメインの機能解析と応用に関する研究)

第一章 序論

結晶性セルロースは、その界面への吸着能を持つセルラーゼ酵素によって効率的に可溶性オリゴ糖へと分解される。結晶性セルロースに単独で効率的に作用できるセルラーゼのひとつに糸状菌由来セロビオヒドロラーゼ I (CBHI) があるが、一般的に CBHI は、加水分解反応を触媒するドメイン (CD) と結晶性セルロースへの吸着能を持つドメイン (CBD) がリンカーで結ばれた 2 ドメイン構造を有する。そのため、セルロースへの吸着量と分解反応を厳密に対応づけることが難しく、分解時における CBD の役割について、未だわからないことが多い。一方、最近になって、結晶性セルロース表面上で CBHI が高密度になると CBD のみによる非生産的な吸着が上昇し、表面上で部分的に起こる分子の渋滞が分解反応速度を減少させると考えられてきている。このことから、セルロース表面上において CBD の機能に依存した酵素吸着量を制御できれば、分解効率の改善ができると期待される。

本研究では、結晶性セルロースと糸状菌由来 CBD の相互作用に関して詳細に解析することによって、セルラーゼによる結晶性セルロースの分解反応についての新たな知見を得ることを目指した。さらに、CBD のセルロースへの吸脱着能を利用したタンパク質の精製への応用についても検討した。

第二章 CBD 融合タンパク質の発現

セルラーゼ分子の触媒ドメインを蛍光タンパク質に置き換え、非生産的結合のみ可能な CBD 融合タンパク質を構築することとした。蛍光タンパク質を CD の代わりに保持することで、分子サイズをセルラーゼに近づけ、またタンパク質の正確な濃度測定が行える利点を持つと考えられる。子囊菌 *Trichoderma reesei*、または担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来セルラーゼ (CBHI、CBHII) の CD を遺伝子工学的手法により赤色蛍光タンパク質 (red-fluorescent protein; RFP) に置き換えた CBD 融合タンパク質遺伝子を作製した。それら遺伝子を発現ベクターに連結した後、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* に導入し、得られた各種形質転換体のタンパク質発現を確認した。メタノールによって誘導した場合、各種 CBD 融合タンパク質の発現が確認できた。発現条件を最適化することで、発現レベルは、RFP-CBD_{TrCBHI} について最大で約 1 g/L に達した。

第三章 CBD 融合タンパク質のアフィニティー精製

特定物質へのタンパク質のアフィニティーを利用することで簡便なタンパク質の精製法を提供することが期待される。これまで様々なセルロース基質を用いたアフィニティー精製法が開発されているが、糸状菌由来 CBD の利用については現在までにほとんど報告がない。そこで、第二章で発現生産させた CBD 融合タンパク質を簡便に精製することを目的に、RFP-CBD_{TrCBHI} を用いて結晶性セルロース担体を用いたアフィニティー精製ができるかどうか検討した。この融合タンパク質は、高濃度の硫酸アンモニウム (1 M) 存在下でセルロースカラムに強く吸着し、その後、水によって容易に溶出させることができた。一連のこの操作は、疎水性相互作用クロマトグラフィーと同様であるが、疎水的タンパク質であるウシ由来血清アルブミン (BSA) はこの条件下でセルロースカラムに吸着しなかったことから、セルロースに吸着するには疎水性相互作用以外の因子も重要であることが示唆された。また、この時の回収率は室温において約 80% と高収率であり、このことは、糸状菌由来 CBD は本質的には可逆的に結晶性セルロースに吸着することを示唆する。さらに SDS-PAGE 上で単一バンドを与えた。配列の異なる CBD (*T. reesei* 由来 CBHII、*P. chrysosporium* 由来 CBHI、CBHII) についても検討したところ同様に精製できた。以上のことから、CBD_{TrCBHI} を融合タンパク質のアフィニティータグとして用いた簡便で安価なアフィニティー精製法を提供できるものと考えられた。

第四章 CBD の結晶性セルロースに対する吸着挙動解析

$TrCBHI$ は、結晶性セルロースを効率的に分解できるセルラーゼの一つであるが、非生産的な吸着、つまり CBD のみによる吸着が分解速度を減少させると考えられている。このことから、 CBD_{TrCBHI} の結晶性セルロースへの吸着挙動を理解することはセルラーゼの反応効率化を検討する上で大事である。また、CBD を失った $TrCBHI$ は、結晶性セルロースへの活性は減少する一方で、非晶性セルロースに対しては、ほとんど変化がないことが分かっている。そこで精製した $RFP-CBD_{TrCBHI}$ を用いて、高結晶性セルロース（シオグサ由来 I_{α} -rich）と非晶性セルロース（PASC）に対する吸着解析を行い、結晶性セルロースに対する吸着特性の解明を試みた。得られた吸着データのスキッチャードプロット解析から、どちらの基質への吸着も単純な Langmuir 型の吸着様式ではないことが分かった。そこで、様々な吸着モデル式を用いて解析したところ、実測した吸着データは Hill の式で良く近似できる〔シミュレーションできる〕ことが明らかとなり、その場合、負の協同性の存在が示唆された。興味深いことに、I 型の結晶性セルロースへの吸着では、低温では負の協同性が強く表れたが、常温になるにつれて負の協同性は解除された。一方で、非晶性セルロースに対する吸着様式にも強い負の協同性が表れたが、それは温度の上昇によっても解除されなかった。このことから、結晶性セルロースに対して観察された負の協同性の解除は、平らで整ったセルロース結晶表面でのみ観察されるものと考えられた。

また、Hill の式から算出された親和力係数の温度依存性から吸着エンタルピーを見積もったところ、非晶性セルロースに比べて結晶性セルロースの吸着エンタルピー変化は大きな負の値を示した。また、結合の Gibbs 自由エネルギー変化は両基質間でほとんどかわらないので、結晶性セルロースへの CBD の吸着には、エンタルピー的寄与が大きく関与することが明らかとなった。このことから、CBD の結晶性セルロースへの吸着には、水素結合などの配向依存的な相互作用力が大きく関与しているものと考えられた。

第五章 総括

糸状菌由来 CBD を用いた融合タンパク質の発現生産ならびにセルロースを基材とするアフィニティー・クロマトグラフィーによる精製に成功した。

また、得られた CBD 融合タンパク質の吸着挙動について、Hill の式を用いて解析を行った。その結果、CBD とセルロースの相互作用はエンタルピー的寄与が大きく、セルロース分子鎖の疎水平面を単なる疎水面として認識しているのではなく、分子鎖の立体的特徴を強く認識する可能性を示した。さらに、CBD はセ

ルロースに対して負の協同性を持ち吸着することが明らかとなった。これら CBD の吸着解析から、セルラーゼによる結晶性セルロース分解のさらなる効率化には協同性を指標にした CBD の分子改変が重要な役割を担うことが予測された。