

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 杉本 直久

結晶性セルロースを効率的に分解できるセルラーゼとして知られている糸状菌由来セロビオヒドロラーゼ I (CBHI) は、タンパク質構造的に見ると、糖質加水分解酵素ファミリー 7 に属する触媒ドメイン (CD; catalytic domain) と糖質結合モジュールファミリー 1 に属するセルロース結合性ドメイン (CBD; cellulose-binding domain) がリンカーで結ばれた構造によって構成されている。また、結晶性セルロースの分解において、これらの 2 つのドメインが相補的に機能することが必要であると一般的に認識されているが、CBD の機能については未だに不明な点が多い。一方、結晶性セルロース表面上に吸着した CBHI が高密度になると CBD のみに依存した非生産的な吸着量が上昇し、その結果、結晶性セルロースの分解が非効率化されることが最近になって指摘されている。したがって、セルロース表面上において CBD のみに依存した非生産的な吸着を制御することが出来れば、分解効率の改善が期待でき、さらには CBHI の脱離回収への応用も可能となると考えられる。このような背景から、本研究では、結晶性セルロースと糸状菌由来 CBD との相互作用を明らかにするために、その詳細な解析を行うことを目指した。また、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ならびに回収への応用についても検討を行った。

まず、CBD の機能のみによるセルロースへの非生産的な吸着の解析を目的として、糸状菌 *Trichoderma reesei* CBHI の CD を遺伝子工学的手法により赤色蛍光タンパク質 (RFP; red-fluorescent protein) に置き換えた CBD 融合タンパク質 (RFP-CBD_{TrCBHI}) を作製した。この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、形質転換体タンパク質の発現生産を行った。メタノール添加によって誘導した場合、CBD 融合タンパク質の発現が確認でき、また発現条件を最適化することで、最大で約 1 g/L の RFP-CBD_{TrCBHI} を生産することに成功した。

次に、発現生産させた RFP-CBD_{TrCBHI} を簡便に精製ならびに回収することを目的に、結晶性セルロース担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーの導入を検討した。その結果、この CBD 融合タンパク質は高濃度の硫酸アンモニウムの存在下でセルロースカラムに強く吸着するが、その後、水を用いて容易に溶出できることを明らかにした。この操作条件は通常のスル水性相互作用クロマトグラフィーと類似しているが、スル水的タンパク質であるウシ由来血清アルブミン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スル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、このクロマトグラフィーによる CBD 融合タンパク質の回収率は約 80% であることから、実用的にも利用可能であることが示された。

精製した RFP-CBD_{TrCBHI} を用いて、シオグサ由来 I_a 型結晶性セルロースと非晶性セルロースに対する吸着実験を行い、結晶性セルロースに対する吸着特性の解析を試みた。得られた吸着データのスキッチャードプロット解析の結果、予想に反して、どちらの基質への融合タンパク質の吸着も単項の Langmuir 式では近似でき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ことが明らかとなり、さらに、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_a 型結晶性セルロースへの吸着では、負の協同性が低温では強く現れるが、常温になるにつれて負の協同性は解除される方向に向かった。一方、非晶性セルロースに対する吸着様式にはさらに強い負の協同性が現れ、それは温度の上昇によっても解除されなかった。また、Hill の式から算出した上清タンパク質濃度の温度依存性から見積もった吸着エンタルピーの変化は、I_a 型結晶性セルロースの場合、吸着したタンパク質の表面密度に対して強く依存し、表面密度の上昇とともに大きく減少することを明らかにした。一方、非晶性セルロースに対する吸着では、このような傾向は認められなかった。この結果に基づき、I_a 型結晶性セルロースにおいては吸着した CBD 融合タンパク質同士の立体的な排除効果に基づく分子の表面拡散がより自由に起こるという見解に至った。

以上、本研究で得られた成果は、今後、セルラーゼによる結晶性セルロース分解の効率化ならびに酵素の脱離回収を行うために重要な CBD の吸着機能を制御する方策を検討していく上で重要な知見を与えており、学術上ならびに応用上、貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文を博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。