

氏名 判谷 吉嗣

題目：酵素の高機能化を目指した変異導入体の機能解析

本研究は、酵素の高機能化研究の一環として、効率的なオリゴ糖生成および polyethylene terephthalate (PET) 分解の方法を見出す事を目的とし、種々の条件下で *Cellulosimicrobium cellulans* DK-1 由来 endo-1,3- β -glucanase 変異体および *Saccharomonospora viridis* AHK190 由来の cutinase 様酵素 Cut190 変異体の機能解析を実施・考察したものである。

第 1 章: 序論

酵素は、温和な条件下で効率よく、高い特異性で反応が進行するため、食品、医療、製薬など、様々な分野で活用されている。一方で、目的とする酵素の安定性や機能性が不十分なため、産業利用に至っていないケースが数多くあり、変異の導入や反応条件を最適化する研究が行われている。一般的に、酵素の安定性を向上させるため、蛋白質の水素結合や疎水性相互作用を増加させる変異や、構造エントロピーを減少させる変異が導入される。また、機能性を向上あるいは改変するため、酵素の構造情報や配列情報を参考に、基質の親和性を高める変異や機能改変に繋がる変異が導入される。また、圧力は、非共有結合に影響を与え、蛋白質の立体構造や反応機構を変化させるため、酵素を高圧処理し、活性を調節するという試みがなされている。このような酵素の安定性や機能性についての研究は、様々な酵素へ応用が可能で重要な知見となる。本研究では、endo-1,3- β -glucanase および Cut190 変異体の機能解析および機能改変を試みた。また、Cut190 については、高圧下での基質分解を検討することで、PET 分解能の向上を目指した。

第 2 章: *Cellulosimicrobium cellulans* 由来 endo-1,3- β -glucanase 変異体の糖転移活性能の解析

オリゴ糖は、医薬品開発等の幅広い分野で活用が期待される。しかし、オリゴ糖の一般的な化学合成では、生成物の位置選択的な合成が難しいことから、大量に合成できない。そのため、簡便な操作で位置選択性の高い合成が可能となる酵素を利用した方法が注目を集めている。Endo-1,3- β -glucanase は、糖結合モジュールと触媒ドメインからなり、触媒ドメインは糖加水分解酵素ファミリーの GH16 に属する。本研究では、オリゴ糖を効率よく取得することを目的として、触媒ドメイン活性中心の求核性残基 Glu119 を Gly に置換し、本来有している糖加水分解活性を糖転移活性に変換することを試みた。その結果、endo-1,3- β -glucanase E119G 変異体は、

laminarioligosaccharides (3 – 5 sugar) に対して糖転移活性を有した。その基質認識は、野生型の加水分解と同様のメカニズムで起こり、変異導入により求核性残基が欠如し、水の代わりに糖が基質と共有結合することにより、糖転移反応が誘起されたと考えられた。さらに、laminaritriose の糖転移反応は、laminaribiose 存在下で亢進した。

第 3 章: Polyethylene terephthalate (PET)モデル基質 bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET)に対する *Saccharomonospora viridis* AHK190 由来 cutinase 様酵素 Cut190 変異体の加水分解活性解析

PETは、頑強性、透明性、および可塑性などの特性から、飲料のボトルや衣類などに幅広く用いられている。しかし、PETは自然界では安定で、使用済みPETの蓄積が環境問題となっている。酵素を利用したPET分解は、エネルギー使用が少なく環境への負荷が少ない手法であるが、その活性は未だ不十分であることから、様々な研究が試みられている。Cut190はPET加水分解活性を有し、当研究室において耐熱性や活性を上げる変異導入が進められてきた。その中から高いPET分解活性と熱安定性を有する Cut190_S226P/R228S 変異体 (Cut190* と表記) および Cut190*Q138A/D250C-E296C変異体が見出されている。本研究では、PETの部分構造である bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET)を基質とし、様々な条件下 (Ca²⁺濃度, pH, 温度, 圧力) でCut190*の機能解析を実施した。通常、PET加水分解酵素の機能解析において、PETの構造とは異なる poly(butylene succinate-co-adipate) (PBSA)などが、その簡便性のため基質として広く用いられる。しかし、基質認識能を考慮する上で、PETの部分構造であるBHETを基質として評価することは重要と考えられ、これを用いた機能解析を実施した。Ca²⁺濃度の検討により、BHETに対するCut190*の活性は、Ca²⁺非存在下でも観測されることが明らかとなり、BHETはCut190*のclosed formに結合すると推測された。また、Cut190*あるいはCut190*Q138A/D250C-E296Cと圧力を組み合わせることにより、酵素によるBHETの加水分解と圧力による化学的な加水分解の相加効果が認められ、PET分解効率化の可能性が示された。Cut190*はフーリエ変換赤外分光分析の結果から、加圧下 (~400 MPa) において、蛋白質の構造や動きに大きな変化はないことが示されており、このため相加効果が認められたと考えられた。

第 4 章: 総括

Endo-1,3-β-glucanase および Cut190 変異体の機能解析および機能改変を試みた。Endo-1,3-β-glucanase の研究では、活性中心の求核性残基への変異導入により糖転移反応を発現することが明らかとなった。今後、更なる変異の導入や効率的な脱離基を有する基質 (糖ドナー) を用いることにより、糖転移反応の亢進が期待される。Cut190 の研究では、PET 加水分解酵素の基質として BHET が利用可能であり、酵素の機能的、構造的な解析の有用なツールとなることが示された。また、BHET を基質

とした高圧実験の結果から、加圧下で酵素反応を行うことにより、圧力による化学的な加水分解と酵素による加水分解の相加的な効果が確認され、PET 分解を効率化できる可能性が示唆された。今後、更に変異導入や圧力の検討を行うことにより、PET 分解能の向上が期待される。これらの知見は、今後、endo-1,3- β -glucanase, Cut190 および他の酵素の高機能化研究に活かされ、さらに、産業利用に応用されていくものと考えられる。