The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structure, stability and activity of metagenome-derived LC-cutinase with polyethylene terephthalate (PET) degrading ability
Author(s)	Sulaiman, Sintawee
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/50519
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name （Sintawee Sulaiman）	
Title	Structure, stability and activity of metagenome-derived LC-cutinase with polyethylene terephthalate (PET) degrading ability （ポリエチレンテレフタレート（PET）分解能を有するメタゲノム由来LC—クチナーゼの構造、安定性、活性）

A novel cutinase, LC-cutinase (LCC), was isolated from leaf-branch compost using metagenomic approach. LCC shows the high amino acid sequence identities of 57% to *Thermobifida fusca* cutinase and 52% to *T. alba* cutinase. This enzyme hydrolyzed various fatty acid monoesters with acyl chain length of 2 to 18, with a preference for short-chain substrates (C_4 substrate at most) most optimally at pH 8.5 and 50°C, but could not hydrolyze olive oil. In addition, this enzyme had an ability to degrade poly(ε-caprolactone) (PCL) and polyethylene terephthalate (PET). The specific PET-degrading activity of LCC was determined to be 12 mg/h/mg of enzyme at pH 8.0 and 50°C. This activity is higher than those of the bacterial and fungal cutinases reported thus far, suggesting that LCC serves as a good model for analyzing the structure-activity-stability relationships of cutinase and also is potentially applicable for surface modification and degradation of aliphatic and aromatic polyesters. The crystal structure of LCC was determined at 1.5 Å resolution. The structure reveals that LCC belongs to the α/β hydrolase superfamily and the central parallel β sheet (9 β-strands) is surrounded by two predominantly helical connections (10 α–helices). The structure highly resembles the structure of *T. alba* cutinase by the RMSD value of 0.77 Å for 255 Cα atoms. The catalytic triad of LCC consists of Ser165, Asp210 and His242. This enzyme contains one disulfide bond forming between Cys275 and Cys292. Furthermore, LCC structure indicates that the active site residues of LCC are embedded in the hydrophobic patch which is formed by Tyr95, Thr96, Phe125, Met166, Trp190, Thr211, Val212 and Phe243. A long groove is extended from the catalytic pocket in this hydrophobic patch, suggesting that this groove serves as a binding site of an amphiphilic long-chain substrate. In order to enlarge the substrate binding pocket or increase its hydrophobicity, LCC-Y95A and LCC-Y95F were constructed, respectively. The optimum temperature for activities of these enzymes toward *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB) was equally 50°C. However, the activity of LCC-Y95F was higher than that of LCC-WT at 70°C. The binding affinity and turnover number of LCC-Y95A were lower than those of LCC-WT at both 50 and 70°C. LCC-Y95A was less stable than LCC-WT by 4.2 °C, whereas LCC-Y95F was more stable than LCC-WT by 8.6°C. These results suggest that hydrophobicity of the substrate binding site is important for both stability and activity of LCC. The optimum temperature for activity of LCC toward *p*NPB increases by 10°C in the presence of 1% PEG. Likewise, the optimum temperature for activity of LCC toward PET was higher than that toward *p*NPB by 20°C. These results suggest that the activity of LCC decreases at ≥ 60°C due to heat-induced local conformational change of the active site and this conformational change is partly prevented by binding of a long-chain substrate. In addition, in order to examine whether the removal of the disulfide bond affects the activity and stability of LCC, LCC-C275/292A-cutinase was constructed. The temperature dependence of activity of LCC-C275/292A-cutinase indicates that the mutations shift the optimum temperature for activity downward by 20°C without significantly affecting the maximal activity. The denaturation temperature, $T_{1/2}$, and the midpoint of the translation of GdnHCl-induced unfolding curve, C_m, at 30°C of LCC-C275/292A-cutinase were 70.6°C and 3.0 M, respectively, which were lower than those of LCC-WT by 15.6°C and 1.0 M, respectively. The free energy change of unfolding in the absence of GdnHCl, $\Delta G(H_2O)$, of LCC-C275/292A-cutinase was 31.2 kJ mol^{-1} at 30°C, which was lower than that of LCC-WT by 10.6 kJ mol^{-1}. LCC unfolded very slowly in GdnHCl with the unfolding rate, $k_u(H_2O)$, of 3.28×10^{-6} s^{-1} at 50°C. This value is lower than those of fungal cutinases by six orders of magnitude. These results indicate that LCC is a thermodynamic and kinetically robust protein. Therefore, LCC is a promising enzyme for industrial uses in a variety of fields. The information of the structure-stability-activity relationships of LCC obtained in this study will facilitate engineering LCC variants with higher activity and stability in a rational manner.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	(Sulaiman, Sintawee)		
論文審査担当者		(職)	氏　名
	主 査	教 授	金谷　茂則
	副 査	教 授	原島　俊
	副 査	教 授	大竹　久夫
	副 査	教 授	福井　希一
	副 査	教 授	福崎　英一郎
	副 査	教 授	村中　俊哉
	副 査	教 授	紀ノ岡　正博
	副 査	教 授	渡邉　肇
	副 査	教 授	仁平　卓也
	副 査	教 授	藤山　和仁
	副 査	教 授	永井　健治

論文審査の結果の要旨

本論文は、枝葉コンポストからメタゲノム法により単離した新規クチナーゼ（LC-cutinase）の構造、安定性、活性について研究したものであり、以下に示すように、序論、本論４章、および総括から構成されている。第１章（序論）では、カビ類や細菌由来クチナーゼの分類、生理機能、構造、触媒機構、基質認識機構などに関するこれまでの研究をまとめるとともに、本研究の目的と意義を述べている。第２章では、メタゲノム法により万博枝葉コンポストから単離したトリブチリン分解酵素の一つが細菌由来クチナーゼと高い相同性を示し、果物表皮のクチンを分解することから、新規クチナーゼ（LC-cutinase）であることを明らかにしている。また、LC-cutinase は比較的鎖長の短い脂肪酸エステルやトリグリセリドだけでなく、ポリカプロラクトン（PCL）やポリエチレンテレフタレート（PET）などの合成ポリエステルも分解することを明らかにしている。第３章では、LC-cutinase の結晶構造を決定することにより、LC-cutinase は α/β ヒドロラーゼファミリーに属すること、C末端に一つだけジスルフィド結合を有することを明らかにしている。また、Ser165、Asp210、His242 が LC-cutinase の触媒基トリオを形成すること、疎水性残基が基質結合部位を形成することを明らかにしている。第４章では、基質結合部位を形成する疎水性残基の一つである Tyr95 を Phe と Ala に置換した変異体の活性や安定性を解析することにより、基質結合部位の疎水性が低下すると活性も安定性も低下することを明らかにしている。また、活性の至適温度（50℃）がタンパク質の変性温度（86℃）より極めて低いこと、この至適温度はポリエチレングリコール存在下で 10℃、基質を PET に変えることにより少なくとも 20℃向上することから、LC-cutinase の活性部位は局所的に不安定化していること、その安定性は長鎖基質の結合により部分的に回復することを明らかにしている。第５章では、ジスルフィド結合を形成する Cys275 と Cys292 をいずれも Ala に置換した変異体を構築し、その安定性や活性を野生型酵素と比較することにより、LC-cutinase は熱力学的、速度論的に極めて安定なタンパク質であること、ジスルフィド結合は LC-cutinase の熱力学的、速度論的安定性に寄与することを明らかにしている。第６章（総括）では、本研究で得られた結果に基づき LC-cutinase の基質認識機構、安定化機構、さらには LC-cutinase の産業利用の可能性やメタゲノム法の有用性について考察するとともに、今後の展望について述べている。

以上のように、本論文はメタゲノム法により単離した新規クチナーゼ（LC-cutinase）の構造、安定性、活性に関して構造生物学的な観点から新たな知見を見いだした点で意義深い。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。