

Title	メタゲノム法により枝葉コンポストから単離した新規 セルラーゼとエステラーゼの構造と機能に関する研究
Author(s)	岡野, 啓志
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52152
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

# 博士学位論文

メタゲノム法により枝葉コンポストから単離した新規 セルラーゼとエステラーゼの構造と機能に関する研究

Studies on the structures and functions of novel cellulases and esterase isolated from leaf-branch compost by a metagenomic approach

# 岡野 啓志

# 2015年1月

大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻 物質生命工学講座 極限生命工学領域 金谷研究室

目次

序論

- 1. 新規酵素取得におけるメタゲノム解析法の有用性
- 2. 好熱性新規酵素取得元としての枝葉コンポスト
- 3. セルラーゼ
- 4. 油脂分解酵素
- 5. 本研究の目的

第1章 Rhodothermus marinus 由来 Cel12A と高い相同性を示す新規 GHF12 セ ルラーゼ LC-CelA の構造と安定性の解析

1-1. はじめに

- 1-2. 実験材料および方法
  - 1-2-1. 菌体、プラスミド
  - 1-2-2. DNA ライブラリーの構築とスクリーニング
  - 1-2-3. プラスミド構築
  - 1-2-4. 大量発現と精製
  - 1-2-5. 配列分析
  - 1-2-6. 酵素活性
  - 1-2-7. CD (Circular dichroism) スペクトル
  - 1-2-8. 熱変性測定
  - 1-2-9. 結晶化
  - 1-2-10. X線回折データ収集と構造決定
  - 1-2-11. Protein Data Bank accession number
- 1-3. 実験結果
  - 1-3-1. メタゲノム DNA ライブラリー由来セルラーゼ遺伝子のクローニング
  - 1-3-2. Pre-LC-CelA~Jのアミノ酸配列
  - 1-3-3. Pre-LC-CelA と Pre-RmCel12A のアミノ酸配列比較
  - 1-3-4. LC-CelA と LC-CelA-His の大量発現と精製
  - 1-3-5. LC-CelA-His の活性
  - 1-3-6. LC-CelA-His の耐熱性
  - 1-3-7. LC-CelA-His の熱変性

- 1-3-8. LC-CelA の活性と安定性
- 1-3-9. LC-CelA の結晶構造
- 1-3-10. AFL-LC-CelA-His と E34A-LC-CelA-His の安定性
- 1-3-11. DTT 存在下における LC-CelA-His の安定性
- 1-3-12. AFL-LC-CelA-His と E34A-LC-CelA-His の活性
- 1-4. 考察
- 第2章 N末端に Ig-like ドメインを有する GHF9 セルラーゼ LC-CelG の構造、 活性および安定性の解析
- 2-1. はじめに
- 2-2. 実験材料および方法
  - 2-2-1. プラスミド構築
  - 2-2-2. 大量発現と精製
  - 2-2-3. 酵素活性
  - 2-2-4. CD (Circular dichroism) スペクトル
  - 2-2-5. 熱変性測定
  - 2-2-6. 結晶化
  - 2-2-7. X線回折データ収集と構造決定
  - 2-2-8. Protein Data Bank accession number
- 2-3. 実験結果
  - 2-3-1. LC-CelG のアミノ酸配列
  - 2-3-2. LC-CelG と His-LC-CelG の大量発現と精製
  - 2-3-3. His-LC-CelGの活性
  - 2-3-4. His-LC-CelG の耐熱性
  - 2-3-5. LC-CelG の結晶構造
  - 2-3-6. 基質結合ポケット
  - 2-3-7. 金属結合部位
  - 2-3-8. Ig-like ドメインと触媒ドメインの相互作用
  - 2-3-9. LC-CelG の活性や耐熱性における Ig-like ドメインの重要性
- 2-4. 考察

- 第3章 N末端に長い伸長領域を有する新規エステラーゼ LC-Est1の構造と諸 特性解析
- 3-1. はじめに
- 3-2. 実験材料および方法
  - 3-2-1. 菌体、プラスミド
  - 3-2-2. プラスミド構築
  - 3-2-3. 大量発現と精製
  - 3-2-4. 酵素活性
  - 3-2-5. CD (Circular dichroism) スペクトル
  - 3-2-6. 熱変性測定
  - 3-2-7. 結晶化
  - 3-2-8. X線回折データ収集と構造決定
  - 3-2-9. Protein Data Bank accession number
- 3-3. 実験結果
  - 3-3-1. メタゲノムから単離された新規エステル/脂肪分解酵素の同定
  - 3-3-2. LC-Est1-6のアミノ酸配列
  - 3-3-3. LC-Est1 と CSu-Est、Tm-EstA のアミノ酸配列比較
  - 3-3-4. LC-Est1、LC-Est1C、LC-Est1C\*の大量発現と精製
  - 3-3-5. LC-Est1C\*の結晶構造
  - 3-3-6. LC-Est1 と LC-Est1C の酵素活性
  - 3-3-7. LC-Est1 と LC-Est1C の耐熱性
  - 3-3-8. LC-Est1C\*とTm-EstACの構造的特徴の比較

3-4. 考察

総括

参考文献

本研究に関する論文

### 謝辞

【序論】

## 1. 新規酵素取得におけるメタゲノム解析法の有用性

地球上に生息する多種多様な微生物が生産する酵素には、多様な基質特異 性を有するものの他、高温、低温、高 pH、低 pH、高塩濃度環境に対応したもの や、界面活性剤や有機溶媒などに対して高い安定性を有するものも多く、様々な 用途に応用されている。産業等に利用される様々な酵素は、通常、その酵素を生 産する微生物を土壌、湖沼、河川、海洋など自然界からスクリーニングすること により獲得される。しかし、地球上に生息する微生物のうち、人工的な環境で単 離・培養が可能なものは僅か 1%未満にすぎず、大半は難培養微生物である。ゆ えに自然界には未知の新規有用酵素が数多く存在していると考えられる。

これら難培養微生物由来の遺伝子資源を単離する方法として、近年メタゲ ノム解析法が注目されている [1-6]。この方法は、環境中から微生物の単離・培 養を介することなく、様々な微生物由来のゲノム DNA を環境サンプルから直接 抽出し、遺伝子資源を解析する方法である。まず、環境中から抽出した DNA を シェアリングにより約 25 kb のサイズに断片化し、フォスミドベクターとライゲ ーションを行い、λファージに封入し、大腸菌を感染させることにより、多数の クローンからなるメタゲノムライブラリーを構築する。次に、得られたフォスミ ドライブラリーを用いて、目的の活性を有する酵素遺伝子のスクリーニングが 行われる。この方法を用いると、これまで解析されたことのない難培養微生物や 未発見の微生物が持つ酵素遺伝子を解析できるようになるので、従来よりも新 規酵素遺伝子を効率的に取得できる。

# 2. 好熱性新規酵素取得元としての枝葉コンポスト

大阪府吹田市万博記念公園では、園内で発生する植物残材を園内で有効活 用する「植物残材ゼロミッション」という取り組みが行われており、その一環と してコンポスト(堆肥)化事業が行われている。本事業では、園内で剪定や伐採 により発生した幹や枝葉を粉砕したもの(ウッドチップ)に尿素を添加して、屋 外の堆肥化ヤードに積み上げ、水分調整や切り返しなどの処理を行いながら自 然に発生する微生物による分解や発酵を促進させて堆肥化させている。この堆 肥化過程で、積み上げられたウッドチップ内部の温度は発酵熱で最高 80℃ に達 する。そのため、本コンポストは多種多様な好熱性微生物の宝庫であると考えら れる。またセルロースやエステルを含む細胞壁を分解する微生物が多く存在す ると考えられる。

本研究室ではこれまでに、4 か月間発酵させて温度が 60°C に上昇した枝葉 コンポスト (pH 6.0) からメタゲノム法により新規クチナーゼや新規リボヌクレ アーゼ H (RNase H) [7] を単離している。このクチナーゼは細胞壁の外側にある クチクラと呼ばれる透明で水を通さない層を形成するクチンを分解し、かつポ リエチレンテレフタレート(PET)を分解するため、産業酵素としての利用が期待 されている [8]。またこのクチナーゼは極めて変性速度の遅い耐熱性の高い酵素 であることが分かった [12]。一方で、新規 RNase H のうち、LC9-RNase H1 はユ ニークな活性部位のアミノ酸モチーフを有する RNase H1 であること [9]、LC11-RNase H1 はユニークな基質認識機構を有する RNase H1 であることが発見され た [10-11]。このように、これらの RNase H の研究は、RNase H の分子多様性や 基質認識機構に関して新たな知見を与える。しかしこの枝葉コンポストからセ ルラーゼやエステラーゼはまだ単離されていない。

## 3. セルラーゼ

セルロースはグルコースがβ-1,4 結合により連なった直鎖状のポリマーであ り、植物細胞壁の主成分である。これは植物の光合成により作られる再生可能な 物質であるため、地球上に豊富に存在し、枯渇することのない資源である。近年 「バイオリファイナリー」という概念が広まっており、エネルギーや化学品の原 料としてセルロースのような草木系・木質系バイオマスに注目が集まっている。 特にスイッチグラスなどのリグノセルロース系バイオマスは、食糧生産と競合 しないために安定供給が可能である。この豊富な資源を工業的な規模でグルコ ースに転換する技術開発ができれば、微生物を用いた発酵によりアルコール、有 機酸やアミノ酸といった化学製品を、化石資源に頼ることなく獲得することが 可能となる。特に化石燃料由来のエネルギー資源は、環境汚染やその枯渇が大き な問題となっており、セルロースの有効活用はそれら問題の解決につながると 期待されている。セルロースをグルコースに転換する方法としては、これまで酸 糖化法の研究が進んでいるが、厳しい反応条件を必要とし、工業的規模で生産す るにはコスト面が大きな問題となる。そこで比較的温和な条件で副産物を伴わ ずにグルコースまで分解する方法として、酵素による糖化が注目されている [13-17]。

細胞壁のセルロースは主要成分であり、水素結合を介してセルロース間を 架橋するヘミセルロースにより、細胞壁に強度と柔軟性を与えている。またペク チンは隙間の拡充やネットワーク形成を行っている。このように細胞壁は複雑 で強固な構造を取っている。セルロース糖化過程は、まず高温高圧条件下で物理 化学的前処理を施し、セルロース分解酵素による糖化を行う。様々な酵素が細胞 壁の分解に関わっているが、特にセルロースの加水分解に関わっている酵素を 総称してセルラーゼと呼ぶ。これは基質の切断様式により次の 3 つに分類され る [18,19]。非結晶セルロース鎖の内部をランダムに切断するエンドグルカナー ゼ (EC 3.2.1.4)、セルロースの還元・非還元末端からそれぞれ二糖単位で分解す るセロビオヒドロラーゼ (EC 3.2.1.91, 3.2.1.176)、これら酵素により生じたセロ ビオースやセロオリゴ糖をグルコース単糖まで分解するβ-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21) である。糖質のグリコシド結合を加水分解する糖質加水分解酵素は、ア ミノ酸配列の類似性に基づき分類され、それらは CAZy database (http://www.cazy.org/) にまとめられている。現在までに Glycoside hydrolase family (GHF)1-133 まで分類されており、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラー ゼ、β-グルコシダーゼはそれぞれ合計 12、5、6 種類のファミリーに分類される。。

セルラーゼは前述のバイオエタノール生産だけではなく、洗剤、食品加工、 繊維加工、医薬品生産などその用途は多岐にわたる。酵素糖化に用いられる酵素 として、現在は糸状菌 Tricoderma reesei 由来酵素が注目されている。本菌は細胞 壁の分解に関わる酵素を全て有し、かつその分泌量が非常に多いことから、本菌 の培養液を用いるだけで効率良く糖化が行えるという利点がある。一方で好熱 嫌気性細菌 Clostridium thermocellum にも注目が集まっている。これはセルラー ゼ、ヘミセルラーゼ等が規則的に配列し、巨大な酵素複合体として結晶性セルロ ースにも効率的に作用することができるセルロソームを生産する。また耐熱性 に優れた酵素を生産することができるため、高温条件下での使用にも応用が可 能である。糖化にかかるコスト削減は工業化に向けた最大の課題であるが、高温 にするほど反応速度や基質の溶解度が上昇し、グルコース消費に伴う収率の低 下を引き起こす雑菌の繁殖を防ぐことができるため、活性の高い新規耐熱性セ ルラーゼの単離が望まれている。またこの新規セルラーゼの構造や機能を解析 することにより、セルラーゼの安定性や活性を高める方法について新たな知見 を得ることが望まれている。

3

## 4. エステラーゼ/リパーゼ

エステラーゼやリパーゼは、脂肪酸エステルやトリグリセリドなどのカル ボン酸エステルを分解する酵素であり、微生物からヒトまであらゆる生物が有 している。エステラーゼとリパーゼは基質特異性の違いに基づき、短鎖カルボン 酸エステルを優先的に分解するものがエステラーゼ (EC3.1.1.1)、高級脂肪酸エ ステルを優先的に分解するものがリパーゼ (EC3.1.1.3) と分類されている [20]。 医薬品、食品の油脂加工、廃水中の油脂処理をはじめ、近年ではバイオディーゼ ル燃料の合成や生分解性プラスチックの加水分解といったバイオマス産業にお いても、エステラーゼ/リパーゼの用途は拡大している。油脂の分解やエステル 合成を行う際に、水酸化ナトリウムの代わりにこれらの酵素を利用することに より、環境負荷が軽減されると期待されている [21]。このような様々な用途に 適したエステラーゼ/リパーゼを効率よく見つけるためには、既存のエステラー ゼ/リパーゼのバリエーションを増やす必要がある。従って、新規エステラーゼ/ リパーゼの単離が望まれている。またこの新規エステラーゼ/ リパーゼの単離が望まれている。またこの新規エステラーゼ/

エステラーゼはカルボン酸とアルコール間のエステル結合の加水分解を水 溶媒中で触媒する [22]。まず触媒セリン残基のヒドロキシル基が基質によりア シル化され、アシル-酵素中間体を形成し、エステル結合を加水分解する。エス テラーゼはα/β hydrolase 構造をとり、セリン、ヒスチジン、アスパラギン酸(あ るいはグルタミン酸)が触媒トライアドを形成している。このセリン残基は保存 された5アミノ酸残基モチーフ Gly-X-Ser-X-Glyに位置する。エステラーゼの構 造はリパーゼとよく似ている [22-23]。しかしリパーゼは水に不溶性の基質を分 解するため、触媒部位を覆う lid 構造を有している。この lid 構造が開くことに より、基質を認識することが可能になる [24]。一方でエステラーゼの基質は水 溶性であるため、このような lid 構造は有していない。これらエステラーゼ/リパ ーゼは、アミノ酸配列や生化学的な特徴に基づき、8 つのファミリー (Family I– VIII) に分類される [79]。エステラーゼは様々なエステル結合の加水分解を触媒 し、高い構造安定性を有し、立体選択性を示す。また、有機溶媒中では合成反応 を促進するため、産業用生体触媒として非常に注目されている [20, 25, 26]。

# 5. 本研究の目的

一般的に高温環境で安定な酵素は、生産コストが抑えられ、長期間の保存が 可能となる傾向にあるため、熱安定な酵素は産業利用上有用である [27-29]。ま た反応温度が高くなると、反応速度が増加し、基質や生産物の可溶性が増加し、 反応溶液の粘度が低下し、コンタミネーションを防ぐことが可能である。特に、 上記にも示した通り、セルラーゼによる分解産物であるグルコースの収率を上 げるためには、コンタミネーションを防ぐことは不可欠である。そこで本研究で は、枝葉コンポストからメタゲノム法により耐熱性のある新規セルラーゼと新 規エステラーゼ/リパーゼを単離することを目的とした。そのために、まず枝葉コ ンポストから抽出したメタゲノムを用いて遺伝子ライブラリーを構築し、CM セ ルロースやトリブチリンを含むプレート上でハローを形成するコロニーをスク リーニングした。その結果、10種類の新規セルラーゼ遺伝子と6種類の新規エ ステラーゼ/リパーゼ遺伝子をクローニングすることに成功した。これらの遺伝 子がコードする酵素のうち、2つのセルラーゼ LC-CelA と LC-CelG、および1 つのエステラーゼ LC-Est1 について、その構造ならびに諸特性を解析した。LC-CelA は N 末端にフレキシブルリンカー (FL) を持つが、非常に耐熱性の高い Rhodothermus marinus 由来セルラーゼと高い相同性を示す。LC-CelG は N 末端に Ig-like ドメインを持つが、耐熱性に優れ強い細胞壁分解活性を有することから 産業利用に向けた研究が進んでいる好熱嫌気性細菌 Clostridium thermocellum 由 来エンドグルカナーゼと比較的高い相同性を示す。LC-Est1 は N 末端に機能未 知の長い伸長領域を有するが、そのホモログも含めて構造や機能の解析はまだ されていない。一般的なエステラーゼ/リパーゼ取得源である土壌細菌から単離 されたエステラーゼ/リパーゼから実用化された例はまだ少なく、LC-Est1 の機 能未知ドメインのように新規性の高い構造を持つエステラーゼの取得は大変興 味深い。また、これまでにセルラーゼやエステラーゼの触媒機構や基質認識機構 についての研究は進んでいるが、その末端伸長領域やドメインの役割について はまだ分かっていない点も多い。そこで本研究では LC-CelA の FL、LC-CelG の Ig-like ドメイン、LC-Est1のN末端伸長領域に注目し、結晶構造解析や諸特性解 析を通して、これらが活性や安定性にどのような影響を及ぼすのか解析した。

# 第1章 *Rhodothermus marinus* 由来 Cel12A と高い相同性を示す新規 GHF12 セ ルラーゼ LC-CelA の構造と安定性の解析

1-1. はじめに

序論で述べたとおりセルラーゼは、バイオエタノール生産のためのセルロ ース糖化酵素、洗剤添加物、食品加工用酵素、医薬品合成用酵素、繊維加工用酵 素などとして産業的に広く利用されている。セルラーゼの工業化における最大 の課題は酵素製造にかかるコスト削減である。高温では、酵素の反応速度や基質 の溶解度が上昇し、雑菌の繁殖に伴う収率の低下などが防げるため、高温でも安 定な耐熱性セルラーゼの単離が望まれている。万博記念公園の枝葉コンポスト はセルラーゼの基質となるセルロースを多く含み、発酵により内部温度が 60℃ 以上の高温となるため、新規耐熱性セルラーゼの取得源として期待される。また メタゲノム法は、微生物の単離・培養を介することなく、様々な微生物由来のゲ ノム DNA を環境サンプルから直接抽出するため、新規酵素の取得を効率良く行 うことが可能である。そこで本章では、このメタゲノム法を用いて、枝葉コンポ ストから新規耐熱性セルラーゼを取得することを目的とした。

さらに、今回枝葉コンポストから単離された 10 種類の新規セルラーゼのう ち、LC-CelA は耐熱性に極めて優れた *Rhodothermus marinus* 由来のセルラーゼと 高い相同性を示したことから、LC-CelA も同様に耐熱性に優れたセルラーゼで あると期待される。そこで LC-CelA の構造と諸特性を調べることを次の目的と した。また構造解析により N 末端付近に特徴的な水素結合やジスルフィド結合 が確認されたことから、それらの安定性における役割を調べた。

 $\mathbf{6}$ 

#### 1-2. 実験材料および方法

1-2-1. 菌体、プラスミド

大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RP は Stratagene 社から、プラスミド pET25b は Novagen 社からそれぞれ購入した。BL21-CodonPlus(DE3)-RP 形質転換体は LB 培 地 (トリプトン 10 g L<sup>-1</sup>、Yeast extract 5 g L<sup>-1</sup>、NaCl 10 g L<sup>-1</sup>) に 50 mg L<sup>-1</sup>アンピ シリンを添加して培養した。

# 1-2-2. DNA ライブラリーの構築とスクリーニング

尿素を加え4ヶ月間発酵させた万博記念公園の枝葉コンポスト(温度 67°C、 pH 7.5)から、メタゲノム DNA の抽出を行った。Fosmid Library Production kit (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI, USA)を用い、メタゲノム DNA ライ ブラリーの構築を行った [8]。12.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>クロラムフェニコール、0.01% L-アラ ビノース、0.5% CM セルロース、0.1 mg mL<sup>-1</sup>トリパンブルーを含む LB 寒天培 地を用いて、この DNA ライブラリーを植菌し、CM セルロース分解活性を有す るクローンを探索した [33]。2、3 日間 37°C で培養後、50、80°C でインキュベ ートし、CM セルロースの加水分解によるハローの形成を確認した。CM セルロ ース分解酵素遺伝子の ORF 配列は EZ-Tn5TM<T7/KAN-2> Promoter Insertion kit (EPICENTRE Biotechnologies)を用いて *in vitro*トランスポゾン変異法により決定 した。DNA の塩基配列は ABI Prism 310 DNA sequencer (Applied Biosystems)を用 いて決定した。

1-2-3. プラスミド構築

Pre-LC-CelA (Met1-Arg261) が導入されたフォスミドベクターを鋳型として、 LC-CelA (Leu20-Arg261)、C 末端に His-tag を導入した LC-CelA-His、さらに N 末 端フレキシブルループ (FL) を欠損させたΔFL-LC-CelA-His (Thr36-Arg261) の 発現用ベクターを構築した。また LC-CelA-His 発現ベクターpET-LC-CelA-His を 鋳型とし、Glu34 のコドン GAG を GCT (Ala) になるようにプライマーを設計し て、E34A-LC-CelA-His 発現ベクターを構築した。プライマーの合成は北海道シ ステムサイエンスに依頼した。

## 1-2-4. 大量発現と精製

LC-CelA、LC-CelA-His、AFL-LC-CelA-His および E34A-LC-CelA-His は、1-2-3 で構築した発現ベクターを用い、それぞれ大腸菌 BL21(DE3) Codon Plus の中 で封入体として以下の方法で発現させた。組換え大腸菌を OD600 の値が 0.5 程度 になるまで 37°C で振盪培養し、終濃度が 0.5 mM になるように Isopropyl β-D-thio galactopyranoside (IPTG) を加えて更に4時間培養した。菌体を6,000g、10分の 遠心分離により回収し、TE バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) に再懸濁した。ソニケーションによる菌体破砕後、30,000gで30分遠心分離し、 上清を回収した。TE バッファーに透析した後、70℃で 30 分間熱処理し、30,000 g、30 分の遠心分離により沈殿を除去した。LC-CelA-His、ΔFL-LC-CelA-His、E34A-LC-CelA-Hisの精製は、熱処理後の上清をバッファーA(20mM Tris-HCl(pH 7.0)、 10 mM イミダゾール、0.3 M NaCl) に透析し、バッファーA で平衡化した HiTrap Chelating HP カラム (GE Healthcare) に供し、イミダゾール濃度を 10 mM から 300 mM まで直線的に上げて目的タンパク質をカラムから溶出させることによ り行った。回収したタンパク質は 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) に透析した後保存し た。His-tag を持たない LC-CelA の精製は、熱処理後上清を1mM DTT を含む TE バッファーにより平衡化した HiTrap Q HP カラム (GE Healthcare) に供し、NaCl 濃度を0Mから1Mまで直線的に上げて目的タンパク質をカラムから溶出させ ることにより行った。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、50mM NaCl を含む TE バッファーで平衡化した Hi-Load 16/60 Superdex 200 pg カラム (GE Healthcare) に供し、目的タンパク質を含むフラクションを回収した。精製した タンパク質の純度は SDS-PAGE により確認した [34]。N 末端アミノ酸配列は、 Procise automated sequencer model 491 (Applied Biosystems) により決定した。タン パク質の濃度は、280 nm における Tyr と Trp の分子吸光係数 1,576、5,225 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> [35] を用いて計算した。1 mg mL<sup>-1</sup>のタンパク質溶液の吸光係数 (A<sub>280</sub><sup>0.1%</sup>) に基 づき決定した。この値は LC-CelA、LC-CelA-His、ΔFL-LC-CelA-His、E34A-LC-CelA-His に対し、それぞれ 3.37、2.96、3.15、2.97 であった。

## 1-2-5. 配列分析

メタゲノムから単離された新規セルラーゼのアミノ酸配列のホモロジーサ ーチは DDBJ blastp search tool (<u>http://blast.ddbj.nig.ac.jp/blastn?lang=en/</u>) により行 った。PROTSCALE tool (<u>http://web.expasy.org/protscale/</u>) によりフレキシブル領域、 親 水 性 領 域 の 予 測 を 行 っ た 。 Compute p*I*/Mw tool (<u>http://web.expasy.org/compute\_pi/</u>) により等電点 (p*I*) を算出した。SMART tool (<u>http://smart.embl.de/</u>) によりドメインサーチを行った。

# 1-2-6. 酵素活性

酵素活性は CM セルロースを基質として dinitrosalicylic acid (DNS) stopped method により測定した [36]。反応溶液 (100 mM sodium phosphate (pH 7.0)、1% (w/v) CM セルロース (low viscosity grade, Sigma-Aldrich) ) 90 µL に 0.1 mg mL<sup>-1</sup> 酵 素溶液 10 µL を加えて反応を開始させ、10 分後に 10% SDS を 10 µL 加え、3 分 ボイルすることで反応を停止させた。この溶液に DNS 試薬 [36] を 300 µL 加 え、5 分ボイルし、氷冷した。17,000 g で 5 分遠心し、上清 100 µL を MilliQ 100 µL と混合した。このサンプルの波長 500 nm の吸光度 (A<sub>500</sub>) を測定した。グル コースを標準サンプルとして、その吸光度から描いた標準直線から、酵素反応に より生じた還元糖の量を推定した。1 分間に 1 µmol の還元糖を生成する酵素量 を 1 unit と定義した。温度依存性解析では pH 7.0、40 – 100°C の各温度条件で測 定した。pH 依存性解析は 90°C、pH 4.0 – 10.5 の各 pH 条件で測定した。この測 定において、pH 4.0 – 6.0 の範囲では 100 mM sodium citrate、pH 6.0 – 8.0 の範囲 では 100 mM sodium phosphate、pH 8.0 – 10.5 の範囲では 100 mM glycine-NaOH の バッファーを用いた。

1-2-7. CD (circular dichroism) スペクトル

Far-UV (200 – 260 nm) CD スペクトルは J-725 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic) を用いて 25°C で測定した。測定用バッファーは 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) を用いた。測定には 0.1 mg mL<sup>-1</sup>のサンプル、2 mm 光路長のセルを用いた。平均残基分子楕円率[θ] (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) はアミノ酸の平均分子量 110 を用いて計算した。

# 1-2-8. 熱変性測定

熱変性曲線は温度変化に伴う波長 222 nm の CD 値をモニターすることで得られた。サンプルは 3.0 M グアニジン塩酸を含む 10 mM Tris-HCl (pH7.0) に溶かした。測定はタンパク質濃度 0.1 mg mL<sup>-1</sup>、光路長 2 mm、昇温速度 3.0°C min<sup>-1</sup>

の条件で行った。変性中点温度 (Tm) は最小二乗法を基にしたカーブフィッティングにより計算した。

# 1-2-9. 結晶化

結晶化に用いる LC-CelA は 10 mM Tris-HCl (pH8.0) に透析し、Centricon (Millipore) で 10 mg mL<sup>-1</sup>に濃縮した。まず、Hampton Research 社の結晶化キット (Crystal Screen I, II) と Emerald BioStructures 社の結晶化キット (Wizard I - IV) を 用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。条件探索は 4°C、20°C の温度条 件の下、96-well Corning CrystalEX Microplates (Hampton Research) を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。結晶化ドロップは 1  $\mu$ L の LC-CelA 溶液と 1  $\mu$ L のリザーバー溶液を混合して調製し、100  $\mu$ l のリザーバー溶液 に対して蒸気拡散平衡化させた。数週間後、4°C の温度条件で、Wizard I No.28 (0.1 M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (pH 7.5)、0.2 M NaCl、20% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 3000) をリザーバー溶液として用いた 条件で結晶が得られた。結晶の質を向上させるために、リザーバー溶液の最適化 を行った。その結果、11.7 mg mL<sup>-1</sup>のタンパク質溶液 1  $\mu$ L と最適化されたリザ ーバー溶液 (0.1 M HEPES (pH 7.5)、0.2 M NaCl、23% (w/v) PEG 3350) 1  $\mu$ L を混 合して調製したドロップをリザーバー溶液 100  $\mu$ L に対して数週間かけて蒸気拡散平衡化させることにより、X 線回折データ収集に適した結晶が得られた。

## 1-2-10. X線回折データ収集と構造決定

X 線回折データセットの収集は、SPring-8 のビームライン BL44XU のシン クロトロン放射光で行った。データ収集時には、クライオプロテクタント溶液は 使用せず、結晶を CryoLoop (Hampton Research) にセットし、-173℃の窒素ガス を吹き付けた状態で、0.9 Å の波長でデータ収集を行った。HKL2000 [37] を用い て、得られた回折データを処理した。計算された電子密度図を元に、*Rm*Cel12A (PDB code: 1H0B) の構造を鋳型とし、CCP4 [38] 内の MOLREP [39] による分子 置換法により、LC-CelA の初期分子モデルを構築した。ArpWarp [40] を用いて モデルを自動的に作成した。モデルの精密化は REFMAC [41] を用いて行い、 COOT [42] によりモデルをさらに修正した。LC-CelA 構造の図は PyMol (http://www.pymol.org) を用いて作成した。

# 1-2-11. Protein Data Bank accession number

解析した LC-CelA の構造座標および構造因子は PDB コード番号 3WX5 として、Protein Data Bank に登録した。

#### 1-3. 実験結果

1-3-1. メタゲノム DNA ライブラリー由来セルラーゼ遺伝子のクローニング 枝葉コンポストからメタゲノム DNA を抽出し、メタゲノムライブラリーを 構築した。本ライブラリーは、約 35 kb のメタゲノム DNA 断片が挿入された
21,000 個のクローンから成っている。ついで、このうち 6,000 個のクローンから CM セルロースとトリパンブルーを含むプレート上で 50°C においてハローを形 成するクローンをスクリーニングした。その結果、37°C では 24 個のクローンが ハローを形成し、10 個は 50°C でもハローを形成した。これらのクローンの遺伝 子配列を決定することにより、10 種類の新規セルラーゼ遺伝子を同定した。こ れらの遺伝子がコードするセルラーゼは N 末端にシグナルペプチド (SP) を有 するため、それぞれ Pre-LC-CelA~J と名付けた。このうち、Pre-LC-CelA、Pre-LC-CelD、Pre-LC-CelF、Pre-LC-CelG、Pre-LC-CelI は 80°C でもハローを形成したの で、高い熱安定性を有することが示唆された。

### 1-3-2. Pre-LC-CelA~Jのアミノ酸配列

Pre-LC-CelA~J は 261 - 782 残基のアミノ酸から成る。BlastX を用いてこれ らセルラーゼのアミノ酸配列のホモロジーサーチを行ったところ、いずれも既 存のセルラーゼと 42 - 76%の相同性を示した (Table 1-1)。つまり、いずれも既存 のセルラーゼとは異なる配列を持っており、メタゲノム法が新規セルラーゼの 探索に有用であることが確認された。Pre-LC-CelA~J のアミノ酸配列は accession number KF626648-KF626657 として GenBank に登録した。

Pre-LC-CelA~Jの一次構造を模式的に Figure 1-1 に示す。ドメイン解析ツー ル SMART [43] を用いて、SP、セルラーゼドメイン、セルロース結合ドメイン を予測した。いずれも N 末端に 16 – 36 残基から成る SP を有しており、分泌タ ンパク質であることが示唆された。またいずれもセルラーゼドメインを有して おり、Pre-LC-CelA、Pre-LC-CelD、Pre-LC-CelE は GHF12 セルラーゼ、Pre-LC-CelF、Pre-LC-CelG は GHF9 セルラーゼ、Pre-LC-CelB、Pre-LC-CelJ は GHF6 セ ルラーゼ、Pre-LC-CelI は GHF3 セルラーゼ、Pre-LC-CelH は GHF44 セルラーゼ、 Pre-LC-CelC は GHF51 セルラーゼの触媒ドメインを有している。加えて、Pre-LC-CelD と Pre-LC-CelF は cellulose binding domain II (CBDII) 、Pre-LC-CelF は cellulose binding module 3 (CBM3) も有している。PROTSCALE によると、Pre-LC- CelG 以外は、いずれも SP と触媒ドメインの間に 14 - 29 残基から成る親水性の flexible loop (FL) を有している。これらの FL は酸性で、その pI 値は 3.28 – 5.52 である。



**Fig. 1-1.** Schematic representation of the primary structures of metagenome-derived cellulases from leaf-branch compost. Putative signal peptides (N-terminal open boxes), putative flexible linkers (black boxes), glycoside hydrolase family (GHF) domains (grey boxes), and cellulose binding domains/modules (C-terminal open boxes) are shown. The numbers above the sequence represent the positions of the N- and C-terminal residues of each protein. The numbers below the sequence represent the positions of the N- and C-terminal residues of each region or domain.

		Protein with the highest sequence identity				
Cellulases	No. of residues	Protein	Source organism <sup>a</sup>	Accession No.	Identity (%)	
Pre-LC-CelA	261	Glycoside hydrolase family 12	Rhodothermus marinus (65°C)	G2SJ29	76	
Pre-LC-CelB	596	Cellulase	Plesiocystis pacifica SIR-1 (18°C)	A6G3Z7	50	
Pre-LC-CelC	515	$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase-like protein	<i>Opitutus terrae</i> (30°C)	B1ZZJ5	45	
Pre-LC-CelD	400	Glycosyl hydrolase family 12	Thermobispora bispora (50°C)	D6Y3Q3	45	
Pre-LC-CelE	286	Cellulase 12A	Streptomyces sp. 11AG8 (35°C)	Q9KIH1	43	
Pre-LC-CelF	782	Uncharacterized protein	Streptosporangium roseum (26°C)	D2B808	62	
Pre-LC-CelG	577	Glycosyl hydrolase family 9	Microcoleus sp. PCC 7113 (25°C)	K9WM66	42	
Pre-LC-CelH	742	Cellulase	Candidatus Methylomirabilis oxyfera $(25^{\circ}\mathrm{C})$	D5MF13	64	
Pre-LC-CelI	592	Glucosidase-like glycosyl hydrolase	Xenococcus sp. PCC 7305 (25°C)	L8M232	57	
Pre-LC-CelJ	326	Glycoside hydrolase family 6	Frankia sp. EUN1f (30°C)	D3D8M1	53	

**Table 1-1**. List of cellulases isolated from leaf-branch compost and proteins with the highest amino acid sequence identities

<sup>a</sup> The optimum growth temperature of each organism is shown in parenthesis.

14

SP はタンパク質が分泌されると除去されるので、これらのタンパク質は LC-CelA~J として機能すると考えられる。このうち、LC-CelA(Leu20-Arg261) は 極めて高い耐熱性を示すことが知られている *Rm*Cel12A (Cys18-Gln261) と 76% のアミノ酸配列相同性を示すため、特に熱安定性の高いセルラーゼであること が予測された (Table 1-1)。

1-3-3. Pre-LC-CelA と Pre-RmCel12A のアミノ酸配列比較

Pre-LC-CelA と Pre-*Rm*Cel12A のアミノ酸配列を比較した (Fig. 1-2)。いずれ も 261 残基から成る。しかし Pre-LC-CelA の SP (Met1 - Val19)、FL (Leu20 - Pro35) と Pre-*Rm*Cel12A の SP (Met1 - Gly17)、FL (Cys18 - Pro37) の領域は僅かに相違が ある [44]。ΔFL-*Rm*Cel12A (Thr38 - Lys261) の基質複合体構造 [32] によると、 Trp9、Trp26、Trp69、Trp159、Trp161、Tyr163、Trp209 (Pre-*Rm*Cel12A ではそれぞ れ Trp45、Trp62、Trp104、Trp195、Trp197、Tyr199、Trp245 に相当) が活性部位 クレフト付近で広域にわたり芳香族ネットワークを形成しており、基質結合に 関わると考えられる。Asn24、His67、Arg100、Met136、Pro137、Gly138 (Pre-*Rm*Cel12A ではそれぞれ Asn60、His103、Arg136、Met172、Pro173、Gly174 に相 当) もこのクレフトの形成に関わっている。2 つの触媒残基 Glu124、Glu207 (Pre-*Rm*Cel12A ではそれぞれ Glu160、Glu243 に相当) はこのクレフトに位置してい る。これらの残基は全て Pre-LC-CelA でも保存されている。

*Rm*Cell2A の FL 欠損変異体の  $T_m$  値は野生型よりも 8.4°C 低く、90°C にお ける半減期が 5 時間から 2 時間に低下することから [44] 、FL が *Rm*Cell2A の 耐熱化に寄与することが示唆されている。しかし、FL を含んだ *Rm*Cell2A の結 晶構造は解かれていないため [31, 32]、この耐熱化機構はまだ分かっていない。 そこで、LC-CelA が *Rm*Cell2A 同様に高い熱安定性を有するのかどうか、また、 FL がどのような構造を形成するのかを調べるために、LC-CelA および His-tag を C 末端に導入した LC-CelA-His をそれぞれ大腸菌で大量生産し、精製後、諸特 性解析と結晶構造解析を行った。

15



**Fig. 1-2.** Alignment of the amino acid sequences of pre-LC-CelA and pre-Cel12A from *Rhodothermus marinus* (pre-*Rm*Cel12A). The accession numbers are KF626648 for pre-LC-CelA and G2SJ29 for pre-*Rm*Cel12A. For the pre-*Rm*Cel12A sequence, the identical residues with those in the pre-LC-CelA sequence are indicated by asterisks (\*). Gaps are shown by dashes. A putative signal peptide (SP) is underlined. The region predicted as a flexible linker (FL) between a putative SP and a catalytic domain is boxed. The amino acid residues responsible for dimerization and catalytic activity of *Rm*Cel12A are denoted above the sequences by open and closed circles respectively. The aromatic and non-aromatic amino acid residues that form the active site cleft of *Rm*Cel12A and corresponding residues of LC-CelA are shown in boldface. Numbers represent the positions of the amino acid residues that start from the initiator methionine residue that start from the initiator methionine residues that start from the initiator methionine residues that start from the initiator methionine residues that start from the initiator methionine for the *Rm*Cel12A, are shown above the sequences of LC-CelA, which are identical to those of *Rm*Cel12A, are shown above the sequences.

# 1-3-4. LC-CelA と LC-CelA-His の大量発現と精製

Pre-LC-CelA の SP は、Pre-LC-CelA がその宿主細胞から分泌されるときに 除去される。しかし、大腸菌を用いて発現させても Pre-LC-CelA が分泌され、そ の SP が除去されるとは限らないので、本研究では SP を含まない LC-CelA (Leu20 – Arg261) と LC-CelA-His をそれぞれ大腸菌で大量発現させた。LC-CelA は N 末 端に Met-Asp が導入されており、LC-CelA-His は N 末端に Met、C 末端に His-tag が導入されている。発現誘導後、ソニケーションにより菌体を破砕し、遠心分離 により可溶性画分と不溶性画分に分離したところ、LC-CelA、LC-CelA-His いず れも大腸菌菌体内に蓄積し、そのうち約 20 – 30%が可溶性であることが分かっ た。可溶性タンパク質を回収し、それぞれ 1-2-4 の手順に従って SDS-PAGE で単 ーバンドが得られるまで精製を行った。いずれも 1 L の培養液から約 3 mg の精 製タンパク質が得られた。LC-CelA の N 末端アミノ酸配列は Met-Asp-Leu-Phe-であることから、FL 領域の欠損は見られなかった。

ゲルろ過クロマトグラフィーによると、LC-CelAの分子量はおおよそ 29 kDa であると推定された。これはアミノ酸配列から計算された値 (26.9 kDa) とほぼ 一致するため、LC-CelA は溶液中において単量体で存在することが示唆された。 一方、 $\Delta$ FL-*Rm*Cel12A は二量体で存在することが報告されている [32]。 $\Delta$ FL-*Rm*Cel12A の二量体構造は Glu40 と Arg83 の間に形成される塩橋により安定化 される。しかし、LC-CelA においては、Arg83 は Arg81 として保存されているも のの Glu40 は Thr38 に置換されている (Fig. 1-2)。従って、LC-CelA は塩橋構造 を形成できず、二量体構造を形成しないと考えられる。

## 1-3-5. LC-CelA-His の活性

LC-CelA-His の酵素活性の温度依存性を、CM セルロースを基質として 40 - 100°C の範囲で測定した。Figure 1-3A に示すように、LC-CelA-His は 90°C で最 大活性を示す。至適温度が 100°C 以上の *Rm*Cel12A と比べるとやや低い温度で あるが、ほぼ匹敵している [44]。一方、60°C での LC-CelA-His の比活性 4.2 units mg<sup>-1</sup>は、RmCel12A の 65°C における比活性 3.1 units mg<sup>-1</sup>よりわずかに高い [44]。 つまり LC-CelA-His は *Rm*Cel12A 同様非常に耐熱性の高い酵素であり、僅かに *Rm*Cel12A よりも活性が強いと言える。

LC-CelA-His の酵素活性の pH 依存性を、pH 4.0 – 10.5 の範囲で測定した。 Figure 1-3B に示すように、LC-CelA-His は pH 5.0 – 9.0 の広い範囲で最大活性に 近い活性を示した。*Rm*Cel12A も pH 5.0 – 8.0 の範囲で最大活性に近い活性を示 したが、pH 9.0 では最大活性の半分程度の活性であった [30]。よって LC-CelA-His の方が *Rm*Cel12A よりも弱アルカリ環境において安定であることが示唆され る。

17



**Fig. 1-3.** Optimum temperature and pH for activity of LC-CelA-His. The temperature (A) and pH (B) dependencies of the enzymatic activity of LC-CelA-His are shown. The activity was determined at pH 7.0 and the temperatures indicated (A) or at 90°C and the pHs indicated (B) using 1% (w/v) carboxymethyl-cellulose (CM-cellulose) as a substrate, as described in Experimental procedures. The buffers used to analyze the pH dependence of the activity were 100 mM sodium citrate (pH 4.0-6.0), 100 mM sodium phosphate (pH 6.0-8.0) and 100 mM Glycine-NaOH (pH 8.0-10.5). The experiment was carried out at least twice, and errors from the average values are indicated by *vertical lines*.

# 1-3-6. LC-CelA-His の熱失活

LC-CelA-His の耐熱性を調べるため、100 mM sodium phosphate (pH 7.0) に透 析した酵素 (0.05 mg mL<sup>-1</sup>) を 60 - 100°C の各温度で 30 分間インキュベートし、 残存活性を pH 7.0、60°C の条件で求めた。Figure 1-4 に示すように、LC-CelA-His は 90°C、30 分間のインキュベート後では活性をほぼ保持していたが、95°C、30 分間のインキュベート後はほとんど失活していた。この結果は至適温度が 90°C であることとほぼ一致する (Fig. 1-3A)。一方で 100°C、30 分間のインキュベー ト後の残存活性はほぼ失われていたが (Fig. 1-4)、100°C における活性は最大活 性の 80%を保持していた (Fig. 1-3A)。これは、この測定条件では酵素が完全に 変性する前に、基質を加水分解するからであると考えられる。

#### 1-3-7. LC-CelA-His の熱変性

より定量的に LC-CelA-His の耐熱性を調べるために、3 M グアニジン塩酸 存在下 pH 7.0 で 222 nm の CD 値をモニターすることにより熱変性曲線を測定し た。熱変性はこの条件では可逆的に起こる。また≤2 M グアニジン塩酸存在下で は、100℃ でも完全には変性しなかった。Figure 1-5 に 3 M グアニジン塩酸存在 下での変性曲線を示す。LC-CelA-His の変性中点温度 ( $T_m$ ) は 86.8°C であった。 グアニジン塩酸非存在下における RmCel12A の  $T_m$  値は 102.9°C であるが[44]、 LC-CelA-His はグアニジン塩酸非存在下では、100°C では十分に変性をしないた め、RmCel12A 同様極めて耐熱性の高い酵素であることが分かった。



**Fig. 1-4.** Stability of LC-CelA-His and its derivatives against heat inactivation. LC-CelA-His was incubated at pH 7.0 and the temperatures indicated for 30 min in the absence of DTT (filled circle) or in the presence of 1mM DTT (open circle).  $\Delta$ FL-LC-CelA-His (filled square) and E34A-LC-CelA-His (filled triangle) were also incubated at the same condition in the absence of DTT. The residual activities were determined at pH 7.0 and 60°C using CM-cellulose as a substrate, as described in Experimental procedures. The experiment was carried out at least twice, and errors from the average values are indicated by *vertical lines*.



Fig. 1-5. Thermal denaturation curves of LC-CelA-His and its derivatives. Thermal denaturation curves of LC-CelA-His (thin dashed line),  $\Delta$ FL-LC-CelA-His (thick solid line) and E34A-LC-CelA-His (thick dashed line) obtained in the absence of DTT and that of LC-CelA-His obtained in the presence of 1 mM DTT (thin solid line) are shown. These curves were obtained at pH 7.0 in the presence of 3M GdnHCl by monitoring the change in CD values at 222 nm as described in Experimental procedures.

1-3-8. LC-CelA の活性と安定性

C 末端に導入した His-tag の影響を調べるために、LC-CelA の活性と安定性 を決定した。CM セルロースを基質として用いたときの 60°C での LC-CelA の活 性は 4.3 units mg<sup>-1</sup>であり、これは LC-CelA-His (4.2 units mg<sup>-1</sup>) とほぼ等しい。ま た LC-CelA の  $T_m$  値は 86.0°C であり、これも LC-CelA-His (86.8°C) とほぼ等し い。これらのことから、His-tag の存在は LC-CelA の活性や安定性にほとんど影 響しないと言える。

#### 1-3-9. LC-CelA の結晶構造

LC-CelA の FL がどのように折り畳まれているかを調べるために、LC-CelA の結晶構造を 1.85 Å の分解能で決定した。非対称ユニット中に 2 分子 (A、B) 存在した。いずれの分子も N 末端領域には不規則な揺らぎがあり、N 末端の Met-Asp と FL 領域の大部分 (Leu20 – Glu32) の電子密度を観測することはできなかった。分子 A と B の構造は極めて類似しており、その平均二乗偏差 (RMSD) 値 は 0.08 Å であった。データ収集および精密化の統計値を Table 1-2 に示す。

LC-CelA (分子 A) の全体構造を Figure 1-6A に示す。LC-CelA は典型的なβ-ジェリーロール構造を持ち、2 つのβシートと 1 つのαヘリックスから成る。FL 領域を除いた LC-CelA の構造はΔFL-*Rm*Cel12A (PDB code: 1H0B) の構造と極め て類似しており、その RMSD 値は 0.33 Å であった。LC-CelA の活性部位周辺の 構造をΔFL-*Rm*Cel12A-セロペントース複合体構造 (PDB code: 2BWC) [32] と重 ね合わせたところ、2 つの触媒残基 (Glu158、Glu241) を含め、基質結合ポケッ トを形成すると予測されるアミノ酸残基の配置は ΔFL-*Rm*Cel12A とほぼ一致し た (Fig. 1-6B)。LC-CelA の基質結合ポケットは、*Rm*Cel12A のように芳香族残基 (主に Trp) が一連のグルコース結合サブサイトを形成し、グルコースユニットと スタッキング相互作用を形成するか、極性残基が糖分子と特異的な水素結合を 形成すると考えられる [32]。またΔFL-*Rm*Cel12A の結晶中では HEPES 分子が基 質結合部位に結合していた [31]。しかし LC-CelA の結晶構造中では、HEPES 分 子を表す明確な電子密度は見られなかったことから、LC-CelA の活性部位には HEPES 分子は強くは結合していないことが示唆された。これは活性部位のアミ ノ酸配置の僅かな違いによるものかもしれない。

Crystal	LC-CelA		
Wavelength (Å)	0.900		
Space group	C121		
Cell parameters			
a, b, c (Å)	130.78, 59.58, 74.95		
$\alpha = \gamma, \beta$ (°)	90.00, 122.89		
Molecules/asymmetric unit	2		
Resolution range (Å)	50.00-1.85 $(1.88$ -1.85) <sup>a</sup>		
Reflections measured	297,834		
Unique reflections	41,281		
Redundancy	7.2 (7.4)		
Completeness (%)	99.4 (99.6) <sup>a</sup>		
$R_{\rm merge}$ (%) <sup>b</sup>	12.0 (37.1) <sup>a</sup>		
Average $I/\sigma(I)$	21.8 (5.6) <sup>a</sup>		
Refinement statistics			
Resolution limits (Å)	62.9-1.9		
No. of atoms			
Protein/water	1798/507		
$R_{work}$ (%) / $R_{free}$ (%) <sup>c</sup>	16.2/20.5		
Rms deviations from ideal values			
Bond lengths (Å)	0.012		
Bond angles (°)	1.200		
Average B factors $(Å^2)$			
Protein	15.2		
Water	27.2		
Ramachandran plot statistics			
Preferred regions (%)	96.9		
Allowed regions (%)	3.1		
Molprobity score <sup>d</sup>	1.35		

Table 1-2. Data collection and refinement statistics of LC-CelA

<sup>a</sup> Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

<sup>b</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle|/\sum I_{hkl}$ , where  $I_{hkl}$  is an intensity measurement for reflection with indices hkl and  $\langle I_{hkl} \rangle$  is the mean intensity for multiply recorded reflections.

<sup>c</sup> Free *R*-value was calculated using 5% of the total reflections chosen randomly and omitted from refinement.

<sup>d</sup> MolProbity score combines the clashscore, rotamer, and Ramachandran evaluations into a single score, normalized to be on the same scale as X-ray resolution [53].





Fig. 1-6. Crystal structure of LC-CelA. (A and B) The entire structure (A) and the structure around the active site (B) of LC-CelA are superimposed on those of RmCel12A in complex with the substrate (<sub>D</sub>(+)-cellopentose) (PDB: 2BWC). The structures of LC-CelA and RmCel12A are colored cyan and gray respectively. The region predicted as a flexible linker (FL) of LC-CelA is colored orange. The central region of LC-CelA that contacts FL is colored green. Two acidic active site residues (Glu158 and Glu241), two disulfide bonds (Cys40-Cys67 and Cys100-Cys105), twelve residues forming the substrate binding site of LC-CelA, and C-terminal two residues of FL (Glu34 and Pro35) are shown as stick models with labels. The corresponding residues of RmCel12A, except for those corresponding to Glu34 and Pro35, and the substrate bound to RmCel12A are also shown as stick models. In these stick models, the oxygen, nitrogen and sulfur atoms are colored red, blue and yellow respectively. The substrate and the residues forming the substrate binding site are not shown in panel A for simplicity. Six  $\beta$ -strands forming sheet A ( $\beta$ A1– $\beta$ A6), nine  $\beta$ -strands forming sheet B ( $\beta$ B1– $\beta$ B9),  $\beta$ C1-strand, and one  $\alpha$ -helix are shown in panel A. N and C represent the N- and C-termini. (C) Electron density around the region, where hydrogen bonds are formed between the FL and central regions of LC-CelA. The 2Fo–Fc map contoured at the 1.5p level is shown. The side chain and main chain atoms are shown as stick models, where the oxygen and nitrogen atoms are colored red and blue respectively, and the carbon atoms are colored orange and green for the FL and central regions respectively as in panel A. Three hydrogen bonds formed between Glu34  $O^{\delta 1}$  and Thr74 N, between Glu34  $O^{\delta 1}$  and Glu73 N, and between Pro35 O and Leu72 N are shown by broken lines together with their distances.

LC-CelA の構造中に、Cys40 – Cys67、Cys100 – Cys105 の 2 つのジスルフィ ド結合が見られた。Cys40 – Cys67 は触媒ドメインの N 末端付近のβA1 鎖と βB1 鎖の間のループとβA2 鎖を繋ぐ。また、Cys100 – Cys105 は短いループ (His101 – Ala104) を形成する。Cys40 – Cys67 のジスルフィド結合は GHF12 セルラーゼに 広く保存されているが、Cys100 – Cys105 のジスルフィド結合は *Rm*Cel12A と *Streptomyces* 属由来 GHF12 セルラーゼでのみ保存されている。

FL 領域の大部分は不規則な揺らぎがあり、その電子密度を観測することは できなかったが、C 末端 3 残基 (Asp33-Pro35)のみはっきりとした電子密度が 観測された。興味深いことに、このうち2残基は、3本の水素結合を介して酵素 本体の Leu72-Thr74の主鎖と相互作用していた (Fig. 1-6C)。興味深いことに、こ の領域は 3 つの水素結合 (Glu34 O<sup> $\delta$ 1</sup> と Thr74 N 間、Glu34 O<sup> $\delta$ 1</sup> と Glu73 N 間、 Pro35 O と Leu72 N 間)を介して中心領域 ( $\beta$ A2 鎖と $\beta$ A3 鎖の間のループ)と相 互作用している。これらの残基は *Rm*Cel12A でも保存されているため、これらの 水素結合は RmCel12A でも同様に形成されると考えられる。

# 1-3-10. AFL-LC-CelA-His と E34A-LC-CelA-His の安定性

上述のN末端付近の水素結合がLC-CelAの安定性に寄与するかどうかを調 べるために、FL 欠損変異体  $\Delta$ FL-LC-CelA-His と Glu34→Ala 変異体 E34A-LC-CelA-His を構築し、熱処理、ニッケルアフィニティクロマトグラフィーにより 精製した。収量はいずれも LC-CelA-His と同程度であった(培養液 1 L あたり 3 mg)。いずれも Far-UV CD スペクトルは LC-CelA-His と類似することから(Fig. 1-7)、FL 領域の欠損や変異は全体構造にはほとんど影響しないことが示唆された。



Fig. 1-7. CD spectra of LC-CelA-His and its derivatives. The far-UV CD spectrum of LC-CelA-His was measured at pH 7.0 and  $25^{\circ}$ C either in the absence of DTT (thin dashed line) or in the presence of 1 mM DTT (thin solid line), as described in Experimental procedures. The far-UV CD spectra of  $\Delta$ FL-LC-CelA-His (thick solid line) and E34A-LC-CelA-His (thick dashed line) were also measured at pH 7.0 and  $25^{\circ}$ C in the absence of DTT.

LC-CelA-His と同様に、ΔFL-LC-CelA-His と E34A-LC-CelA-His を 60 - 100°C の各温度で 30 分間インキュベートし、残存活性を pH 7.0、60°C の条件で求めた (Fig. 1-4)。LC-CelA-His は 90°C、30 分間のインキュベート後もほぼ最大活性を 保持していたのに対し、ΔFL-LC-CelA-His は 85°C でインキュベートした後は 60%、90°C でインキュベートした後はほぼ 100%活性が失われていた。同様に E34A-LC-CelA-His も 85°C でインキュベートした後は 20%、90°C でインキュベ ートした後は 60%程度活性が低下していた。つまり耐熱性は LC-CelA-His> E34A-LC-CelA-His> ΔFL-LC-CelA-His の順に低下した。

続いて、 $\Delta$ FL-LC-CelA-His と E34A-LC-CelA-His について、3 M グアニジン 塩酸存在下 pH 7.0 で熱変性曲線を測定した (Fig. 1-5)。それぞれの  $T_m$  値を Table 1-3 にまとめる。 $\Delta$ FL-LC-CelA-His と E34A-LC-CelA-His の  $T_m$  値 は、LC-CelA-His よりそれぞれ 14.7°C、12.0°C 低下していた。従って、LC-CelA の FL は上記 の水素結合によって、RmCel12A の FL 同様、LC-CelA の耐熱化に寄与すること が示唆された。また  $T_m$  値の差より、Pro35 よりも Glu34 が形成する水素結合の 方が、FL による LC-CelA の安定化に強く寄与することが示唆された。水素結合 は一般的にタンパク質の安定化に大きく寄与することが報告されている [45]。 一方で不規則に揺らいでいる FL 領域 (Leu20-Glu32) は LC-CelA の安定化にほ とんど寄与しないと考えられた。

Protein	[DTT]	Specific activity <sup>a</sup>	Relative activity	$T_{\rm m}^{\ \rm b}$	$\Delta T_{\rm m}{}^{\rm c}$
	(mM)	(U/mg)	(%)	(°C)	(°C)
LC-CelA-His	0	4.2	100	86.8	_
	1	4.2	100	58.8	-28.0
ΔFL-LC-CelA-His	0	3.9	93	72.1	-14.7
E34A-LC-CelA-Hi	is 0	4.0	96	74.8	-12.0

Table 1-3. Activities and stabilities of LC-CelA-His and its derivatives

<sup>a</sup> The specific activity was determined at 60°C either in the presence or absence of DTT using CM-cellulose as a substrate, as described in Experimental procedures. Each experiment was carried out at least twice and the average value is shown. Errors are within 10% of the values reported.

<sup>b</sup> The melting temperature ( $T_m$ ), which is the temperature of the midpoint of the transition, was determined from the thermal denaturation curves shown in Fig. 5.

<sup>c</sup>  $\Delta T_{\rm m}$  = Tm determined - 86.8°C.

1-3-11. DTT 存在下における LC-CelA-His の安定性

ジスルフィド結合がタンパク質の耐熱化に寄与する例は数多く報告されて いる [12, 46-49]。そこで LC-CelA に存在する 2 つのジスルフィド結合が耐熱化 に寄与するかどうかを調べるため、3 M グアニジン塩酸存在下 pH 7.0 で熱変性 曲線を測定した。この熱変性曲線を Figure 1-5 に示す。1 mM DTT 存在下におけ る LC-CelA-His の  $T_m$ 値は DTT 非存在下のときと比べ 28.0°C 低下した (Table 1-3)。よってジスルフィド結合も LC-CelA の耐熱化に大きく寄与することが示唆 された。なお、10 mM DTT 存在下での  $T_m$ 値は 59.8°C で、1 mM DTT 存在下で の  $T_m$ 値 (58.8°C) とほぼ同じであるため、LC-CelA-His のジスルフィド結合は 1 mM DTT で十分還元されていると考えられる。

いずれのジスルフィド結合が LC-CelA の耐熱化に強く寄与するのかは分かっていない。ただし、一般にジスルフィド結合間の残基数が多いほど安定性に強く寄与することが報告されている [46]。Cys40 – Cys67 間と Cys100 – Cys105 間のアミノ酸残基数はそれぞれ 26 残基、4 残基であるため、恐らく前者のジスルフィド結合が主に耐熱化に寄与していると考えられた。

ジスルフィド結合は LC-CelA あるいは RmCel12A と Streptomyces 種由来 GHF12 セルラーゼの耐熱性の違いの主な要因ではないと考えられる。なぜなら、 LC-CelA の 2 つのジスルフィド結合は、これらのタンパク質に保存されている ためである。RmCel12A と Streptomyces sp. 11AG8 由来 GHF12 セルラーゼ (StCel12A)の変性剤非存在下での変性中点温度 Tm 値はそれぞれ 102.9°C [44]、 65.7°C [50] であり、RmCel12A の方が StCel12A よりも極めて耐熱性が高い。LC-CelAの耐熱性も RmCel12A に匹敵するため、StCel12A よりも耐熱性は極めて高 いと考えられる。タンパク質は一般に、イオン結合や水素結合、ジスルフィド結 合、ループ領域中のプロリン残基の数が多いほど、またタンパク質内部の疎水性 度が高いほど耐熱性が高いとされている [45]。そこで、LC-CelA、RmCel12A、 StCel12A (PDB: 1OA4) についてこれらの比較を行った。LC-CelA の内部残基全 体に対する内部の非極性残基の割合は 66.7% であり、これは RmCell2A (65.2%) と同程度である一方、StCel12A (60.8%) よりも大幅に高い。また LC-CelA のイ オン結合の数は10で、RmCel12A(8)と同程度であるが、StCel12A(5)よりも多 い。一方、水素結合やループ中のプロリン残基の数にはこのような傾向は見られ なかった。よって主に酵素内部の疎水性度とイオン対の数が、LC-CelA あるいは *Rm*Cell2A と *St*Cell2A の安定性の差を生んでいると考えられる。

# 1-3-12 AFL-LC-CelA-His と E34A-LC-CelA-His の活性

ΔFL-LC-CelA-His と E34A-LC-CelA-His は LC-CelA の至適温度である 90°C では失活する恐れがあるため (Fig. 1-4)、これらの酵素の活性は CM セルロース を基質として 60°C で測定した。その結果、いずれの活性もほぼ LC-CelA-His と 同じであった (Table 1-3)。よって、FL の欠損や変異は LC-CelA の酵素活性には ほぼ影響を及ぼさないことが示唆された。同様に DTT 存在、非存在条件で LC-CelA-His の活性に差は見られなかったため、ジスルフィド結合の還元も LC-CelA の活性にはほどんど影響しないと考えられた。

#### 1.4 考察

枝葉コンポストからメタゲノム法により 10 種類の耐熱性の高い新規セルラ ーゼを単離した。その中で、耐熱性に優れた *R. marinus* 由来の GHF12 セルラー ゼ (*Rm*Cel12A)のホモログである LC-CelA の結晶構造を決定した。これは N 末 端のフレキシブルリンカー (FL)を含む GHF12 セルラーゼとしては初めての構 造である。しかし、FL 領域の大半は明確な電子密度を与えず、フレキシビリテ ィの高いことが分かった。この結果は、酵素と細胞膜を繋ぐ疎水性度の高いシグ ナルペプチドと酵素の触媒コアを分離するために FL が必要であるという仮説 に一致する [44]。しかし FL の C 末端 2 残基 (Glu34、Pro35)は明確な電子密度 を与え、中心領域 (Leu72-Thr74)と3つの水素結合を介して相互作用している ことが明らかになった。また Cys40-Cys67、Cys100-Cys105 間に2つのジスル フィド結合が形成されていた。

LC-CelA は至適温度が 90℃ の極めて耐熱性の高い酵素である。LC-CelA の 変性温度は FL の欠損により 14.9℃ 低下した。これは FL と中心領域間の水素結 合を失うことが主な原因である。*Rm*Cel12A においても同様に FL を欠損させる と変性温度は 8.4℃ 低下した [44]。これも LC-CelA の Glu34 と Pro35 に相当す る残基を失うことに起因すると考えられる。データベースサーチによるとこれ らの残基は LC-CelA と *Rm*Cel12A のみに保存され、FL と中心領域間に形成され る水素結合による耐熱化はこれら酵素に特有であることが示唆される。一方 DTT によるジスルフィド結合の還元により、LC-CelA の変性温度は 28 ℃ 低下 した。N 末端付近に位置する Cys40-Cys67 間のジスルフィド結合の方が、Cys100 - Cys105 間のジスルフィド結合よりもループ間のアミノ酸残基数が多いため、 耐熱化に強く寄与すると推測された。

GHF11 キシナラーゼは GHF12 セルラーゼとアミノ酸配列の相同性は低い が、その結晶構造は極めて類似している。N 末端にある 11 残基のユニークな伸 長配列と中心領域の間に形成される水素結合やジスルフィド結合により耐熱性 を向上させている GHF11 キシラナーゼが最近報告された [51]。また GHF11 キ シラナーゼの耐熱性を、N 末端への変異導入 [52] や N 末端のジスルフィド結 合の導入 [53-56] により向上させるという研究が複数報告されている。また、数 は少ないが、GHF12 セルラーゼの活性や耐熱性を向上させるタンパク質工学的 研究も報告されている[57,58]。本研究の成果は、GHF12 セルラーゼや GHF11 キ シラナーゼの耐熱性を向上させるための新たな手法としての応用が期待できる。

# 第2章 N末端に Ig-like ドメインを有する GHF9 セルラーゼ LC-CelG の構造、 活性および安定性の解析

2-1. はじめに

第1章で述べたとおり、メタゲノム法により枝葉コンポストから新規セル ラーゼを10種類単離した。このうち、新規GHF9セルラーゼであるLC-CelGは 577アミノ酸残基から成り、N末端にシグナルペプチド(Met1 – Ala19)を持つ。 シグナルペプチドを除いたLC-CelGはN末端Ig-likeドメイン(Leu20 – Pro132) とC末端触媒ドメイン(Val133 – Leu577)から成る。LC-CelGはMicrocoleus sp. PCC 7113 由来GHF9 酵素 (accession No. K9WM66)と42%のアミノ酸配列相同 性がある。また結晶構造が決定されているものでは、Alicyclobacillus acidocaldarius 由来Cel9A (AaCel9A)(3EZ8)[63]、C. thermocellum 由来CelD (CtCelD)(1CLC)[64]、C. thermocellum 由来セロビオヒドロラーゼCbhA(CtCbhA) (1UT9)[65]とそれぞれ31%、31%、29%の比較的低いアミノ酸配列相同性を示 す。これらのことより、LC-CelGも高い耐熱性を示すのか、またこれらのGHF9 セルラーゼと類似の構造を有するのかを調べることは大変興味深い。

GHF9 セルラーゼはよく研究が進んでいるセルラーゼファミリーの 1 つで あり、大半はエンドグルカナーゼであるが、セロビオヒドロラーゼや他の糖分解 酵素も含まれている。これまでに 100 種類以上の GHF9 酵素の諸特性解析が進 んでいる。そのうち12種類は結晶構造が解かれており、ドメインの数や様式に 基づき、3 つのグループに分けることができる。1 つ目は C. cellulolyticum 由来 Cel9M (PDB ID 1IA6) [59]、C. thermocellum 由来 CelT (2YIK) [60]、ミミズ (Eisenia fetida) 由来 EF-EG2 (3WC3) [61]、シロアリ (Nasutitermes takasagoensis) 由来 NtEgl (1KSC) [62] が含まれ、いずれも触媒ドメインのみから成っている。2つ目 は AaCel9A、CtCelD、CtCbhA が含まれ、いずれも N 末端 Immunoglobulin-like (Iglike) ドメインと触媒ドメインから成る。3つ目には C. cellulolyticum 由来 Cel9G (1G87) [66]、Thermomonospora fusca 由来 endo/exocellulase E4 (1TF4) [67] が含ま れ、C末端ファミリー3 carbohydrate-binding module (CBM3) と触媒ドメインから 成る。GHF9 酵素の触媒ドメインは(α/α)6-バレル構造を有し、触媒残基は2つの アスパラギン酸と 1 つのグルタミン酸である。これら 2 つのアスパラギン酸残 基は、脱プロトン化により求核試薬として働く水分子を活性化させ、グルタミン 酸は一般酸 (プロトンドナー) として働く [68]。2 つのアスパラギン酸残基はこ
の水分子と結合している。なお、CtCbhA は Ig-like ドメイン、触媒ドメインの他 に、N 末端領域に CBM4、X11、X12 モジュールを持つ。しかし、CtCbhA は Iglike ドメインと触媒ドメインのみで活性を有し、N 末端領域のモジュールを含ま ない変異体の結晶構造が解かれている [65]。また CtCbhA は Ig-like ドメインの 欠損により、不活性化することが報告されている [69]。しかし GHF9 酵素にお ける Ig-like ドメインの役割はまだ明確には分かっていない。

そこで本章では、LC-CelG を大腸菌で大量生産し、精製後、諸特性解析と結 晶構造解析を行った。その結果、LC-CelG が熱安定なエンドグルカナーゼである こと、また結晶構造から他の Ig-like ドメインを有する GHF9 酵素と類似の構造 を有することを明らかにした。また Ig-like ドメインの欠損変異体と、Ig-like ド メインと触媒ドメイン間の相互作用に関わる残基の変異体を構築し、活性や耐 熱性を測定した。そしてこれらの結果より、Ig-like ドメインの役割を議論した。

## 2-2. 実験材料および方法

#### 2-2-1. プラスミド構築

Pre-LC-CelG (Met1 – Leu577) が導入されたフォスミドベクターを鋳型とし て、N 末端に Met を導入した LC-CelG (Leu20 – Leu577)、N 末端に His-tag を導 入した His-LC-CelG の発現用ベクター (それぞれ pET-LC-CelG、pET-His-LC-CelG)を構築した。さらに Ig-like ドメイン欠損変異体 His- $\Delta$ Ig-CelG の発現用ベク ターpET-His- $\Delta$ Ig-CelG を構築した。また pET-His-LC-CelG を鋳型とし、Gln40 の コドン CAG、Asp99 のコドン GAC を GCC (Ala) になるようにプライマーを設 計して、His-Q40A-CelG、His-D99A-CelG、His-Q40A/D99A-CelG の発現ベクター をそれぞれ構築した。PCR は KOD DNA ポリメラーゼ (Toyobo) を用いて、Gene Amp PCR system 2400 (Applied Biosystems) により行った。プライマーの合成は北 海道システムサイエンスに依頼した。構築したプラスミドの DNA 塩基配列は Prism 310 DNA sequencer を用いて決定した。

#### 2-2-2. 大量発現と精製

LC-CelG やその変異体は、2-2-1 で構築した発現ベクターを用い、それぞれ 大腸菌 BL21(DE3) の中で封入体として以下の方法で発現させた。組換え大腸菌 を OD<sub>600</sub> の値が 0.5 程度になるまで NZCYM 培地を用いて 37℃ で振盪培養し、 終濃度が 0.5 mM になるように Isopropyl β-D-thio galactopyranoside (IPTG)を加え て更に4時間培養した。8,000g、10分間の遠心分離により菌体を回収し、1mM DTT を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に再懸濁した。ソニケーションによる菌体 破砕後、30,000gで30分間遠心分離し、上清を回収した。50%硫酸アンモニウ ムを用いてタンパク質を沈殿させ、1 mM DTT、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM ZnCl<sub>2</sub>を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) に溶解させた。そして 10 mM 2-メルカプトエタノール、 1 mM CaCl<sub>2</sub>を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) に一晩透析した。そして 60°C で 60 分間熱処理をして、30,000g、30分の遠心分離により沈殿を除去した。続いてLC-CelG の精製においては、遠心分離後の上清を 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) により平 衡化した HiTrap Q HP カラム (GE Healthcare) に供し、NaCl 濃度を 0 M から 1 M まで直線的に上昇させることにより目的タンパク質をカラムから溶出させた。 目的タンパク質を含むフラクションを回収し、50 mM NaCl を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化した Hi-Load 16/60 Superdex 200 pg カラム (GE Healthcare) に供し、目的タンパク質を含むフラクションを回収した。次に His-LC-CelG、His-ΔIg-CelG、His-Q40A-CelG、His-D99A-CelG、His-Q40A/D99A-CelG の精製におい ては、遠心分離後の上清を1 mM DTT、10 mM イミダゾール、0.3 M NaCl を含 む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) (バッファーA) に透析し、バッファーA で平衡化した HiTrap Chelating HP カラム (GE Healthcare) に供し、イミダゾール濃度を 10 mM から 300 mM まで直線的に上昇させることにより目的タンパク質をカラムから 溶出させた。回収したフラクションは 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に透析した。

#### 2-2-3. 酵素活性

1-2-6 と同様の手法で行った。ただし酵素濃度は 0.01 mg mL<sup>-1</sup> とした。

# 2-2-4. CD (circular dichroism) スペクトル

1-2-7 と同様の手法で行った。

#### 2-2-5. 熱変性測定

熱変性曲線は温度変化に伴う波長 222 nm の CD 値をモニターすることで得られた。サンプルは 5.0 mM CaCl<sub>2</sub>を含む 10 mM Tris-HCl (pH7.0) に溶かした。 測定はタンパク質濃度 0.1 mg mL<sup>-1</sup>、光路長 2 mm、昇温速度 1.0°C/min の条件で 行った。変性中点温度 ( $T_{1/2}$ ) は最小二乗法を基にしたカーブフィッティングに より計算した。

2-2-6. 結晶化

1-2-9 と同様に結晶化条件を検討した。ただし結晶化に用いた LC-CelG の濃度は 10.3 mg mL<sup>-1</sup> とした。数か月後、20°C の温度条件の下、Crystal Screen I No.6 (0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)、0.2 M magnesium chloride hexahydrate、30% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 4000) をリザーバー溶液として用いた条件で良質な直方体の単結晶が得られた。

## 2-2-7. X線回折データ収集と構造決定

1-2-10 と同様の手法で行った。ただし CtCelD (PDB code: 1CLC)の構造を鋳型とした。

# 2-2-8. Protein Data Bank accession number

解析した LC-CelG の構造座標および構造因子は PDB コード番号 3X17 とし

て、Protein Data Bank に登録した。

## 2-3. 実験結果

## 2-3-1. LC-CelG のアミノ酸配列

シグナルペプチドを除いた LC-CelG (Leu20 – Leu577) のアミノ酸配列を CtCelD、AaCel9A、CtCbhA と比較し、Figure 2-1 に示す。CtCelD、AaCel9A、CtCbhA のアミノ酸残基数はそれぞれ 649、537、813 である。GHF9 セルラーゼの 3 つの 活性部位残基は、LC-CelG において Asp194、Asp197、Glu558 として保存されて いる。これらの残基はCtCelD では Asp198、Asp201、Glu555、AaCel9A では Asp143、 Asp146、Glu515、CtCbhA では Asp383、Asp386、Glu795 として保存されている。 AaCel9A とセロテトラオースとの共結晶構造によると [70]、Asp143、Asp146、 Tyr150、Phe221、Gly298、Tyr300、Trp343、Ile400、Trp401、His461、Arg463、His485、 Gln487、Tyr511、Glu515、Tyr519 が基質結合ポケットを形成している。LC-CelG において、Phe221、Ile400、Tyr519 はそれぞれ Trp270、His450、Asp562 に置換さ れているが、その他の残基は全て保存されている。よって LC-CelG の基質結合 メカニズムや触媒メカニズムは AaCel9A と類似していることが示唆された。

金属イオン結合部位の数はこれら 4 つの GHF9 セルラーゼの間で異なって いる。CtCelD は 1 つの Zn<sup>2+</sup>結合部位 (Zn site) と 3 つの Ca<sup>2+</sup>結合部位 (Ca1 – Ca3 site) を持つ。これらのうち Ca2 site のみが AaCel9A と CtCbhA でも保存されて いる。Zn site と Ca3 site は AaCel9A のみ保存されており、Ca1 site は CtCbhA の み保存されている。つまり、AaCel9A は Zn、Ca2、Ca3 site を持ち、CtCbhA は Ca1、Ca2 site を持つ。Zn site は CtCelD では Cys155、Cys173、His174、His197 に より形成され、AaCel9A では Cys104、Cys121、His122、His142 により形成され る。LC-CelGにおいて、対応する残基はCys150、Asp166、His167、His193であ ることから、Zn site は LC-CelG でも保存されていると考えられた。Cal site は CtCelD では水分子、Glu236、Asn239、Ile241、Asp243、Asp246 により形成され、 CtCbhA では Asp421、Glu428、Asn431、Tyr433、Asp435、Asp438 により形成さ れる。LC-CelG において、対応する残基は Asp225、Glu232、Asn235、Val237、 Asp239、Asp242 であり、Ca1 site も LC-CelG で保存されていると考えられた。 Ca2 site は CtCelD では Thr356、Ser358、Asp361、Asp362、Asp401 により形成さ れ、AaCel9A では Asp302、Glu304、Asp307、Glu308、Ala344 により形成され、 CtCbhA では Asp557、Tyr559、Asp562、Asp563、Gly617 により形成される。LC-CelG において、対応する残基は Asp351、Asp353、Asp356、Asp357、Val395 であ

り、Ca2 site も LC-CelG で保存されていると考えられた。Ca3 site は CtCelD では Ser465、Asp468、Val470 により形成され、AaCel9A では Ser520、Asp523、Ile525 により形成される。LC-CelG において、対応する残基は Val514、Ser517、Val519 であるため、Ca3 site は LC-CelG では保存されていないと考えられた。

## 2-3-2. LC-CelG と His-LC-CelG の大量発現と精製

構造解析と諸特性解析のために、シグナルペプチドを除き、N 末端に Met を 導入した LC-CelG (Leu20-Leu577)、N 末端に His-tag を導入した His-LC-CelG を 構築した。大腸菌内で大量発現を行い、菌体破砕後、遠心分離により可溶型とし て得られた。それぞれ 2-2-2 の手順に従って SDS-PAGE で単一バンドが得られる まで精製を行った。1L の培養液から LC-CelG は約 3 mg、His-LC-CelG は約 4 mg の精製タンパク質が得られた。LC-CelG の N 末端アミノ酸配列は Met-Leu-Ala-Gly-であり、シグナルペプチド領域以外の欠損は見られなかった。ゲルろ過クロ マトグラフィーによると LC-CelG の分子量は 60 kDa と見積もられた。これはア ミノ酸配列から計算した値 (62.6 kDa) とほぼ一致したので、LC-CelG は溶液中 においてモノマーで存在することが示唆された。

## 2-3-3. His-LC-CelG の活性

LC-CelG が CtCelD や AaCel9A のようにエンドグルカナーゼであるか、 CtCbhA のようにセロビオヒドロラーゼであるかを確かめるために、CM セルロ ースと p-ニトロフェニルセロビオシドを基質として、100 mM sodium phosphate (pH 7.0)、50°C の条件下で His-LC-CelG の加水分解活性を調べた。酵素、CMC、 p-ニトロフェニルセロビオシドの濃度はそれぞれ 0.01 mg mL<sup>-1</sup>、1% (w/v)、1 mM とした。His-LC-CelG は CM セルロースには活性を示したが、p-ニトロフェニル セロビオシドには不活性であったため、LC-CelG はエンドグルカナーゼである ことが示唆された。

			Ba	ßb	ßc	ßd	ße ßf	ßg	$\frac{\beta h}{\alpha 1}$	
	LC-CelG CtCelD AaCel9A CtCbhA	LAGSVQTRHDLLQG KVSAAKITENYQFD MPSRVP DPEYTKPVEYILPQ	AQ I L VNQVGYHPATP SR I RLNS I GF I PNHS KS I FYNQVGYL I SGD PDVRVNQVGYL PEGK	QAVLALAPGTAAGIRPG Katiaancst RFWIQAHEPQP VatvvcnstQPVK	WTPTLQIVRADDG FYVVKEDG FALRTPEG WQLKNAAG	QVVWEGTMAGP TIVYTGTATSM QAVFAGMTKPV VVVLEGYTEPK	SEDRLVSGDTL YRADF FDNDTKETVY I ADF GGNWYVGDF GLDK-DSQDYVHWLDF	TSLTAPGR-YVAQVVGG SSVNEEGT-YYLAVPGV TALRVPGT-YTLTVG SDFATEGIGYYFELPTVNSF	PRSPEFALGPVYRDVLY GKSVNFKLAMNVYEDAFK TLEARVVTHRRAYRDVLE PTNYSHPFDTRKDTYTQMKY	139 144 93 313
	LC-CelG CtCelD AaCel9A CtCbhA	Z AAARSYYLQRCGVA TAMLGMYLLRCGTS AMLRFFDYQLCGVV DALAFFYHKRSGIP	B1 IDDPIT VSATYNGI LPEDEAGPWA IEMPYAGGEQWTRPAC	B2 ZZ GVSHALDHHEDGYVL HYSHGPCHTNDAYLD HGACHTSDAKVF GHIGIEPNKGDTNVPTWP	DDPFYRAGT YINGQHT GTER QDDEYAGIPQKNY	Z* RLEATGGWHDA KKDSTKGWHDA RALACPGGWHDA /TKDVTGGWYDA	* + GDYGKYVTTTAVTAAQ GDYNKYVVNAGITVGS GDYGKYTVPAAKAVAD GDHGKYVVNGGIAVWT	LLKAYELYPQAF MFLAWEHFKDQLEPV LLLAHEYFPAALAHVR LMNMYERAKIRGLDNWGPYF	1 1 1 1 1 DGQLHLPESGNGVPDIDE ALEIPEKNNSIPDFLDE PMRSVHRAPHLPPALEV RDGGMNIPEQNNGYPDIDE	243 247 193 439
36	LC-CelG CtCelD AaCel9A CtCbhA	<u>A3</u> VRWGLEWLFRMQRP LKYEIDWILTMQYP AREEIAWLLTMQDP ARWEIEFFKKMQVT	B5 DGAVYHKLA DGSGRVAHKVS ATGGVYHKV EKEDPSTAGMVHHKTH	+ AGLRWPGMIR-PEQDVQR STRNFGGFIM-PENEHDE TPSFPPLDTRPEDDDAP IDFRWTALGMLPHEDPQP	B6 RYVYR I TTODTAK RFF VPWSSAATAD LVLSP I SYAATAT RYLRPVSTAATLN	α4 (AAAAWAMAAR I )FVAMTAMAAR I FCAAMAHAALV IFAATLAQSARL	APFDAAFARKALAAA FRPYDPQYAEKCINAA YRPFDPALSSCCADAA WKDYDPTFAADCLEKA	EQAWRFLAASGP I LDYPAEL KVSYEFLKNN-PANVFANQS RRAYAWLGAH-EMQPFHNPE E I AWQAALKHPD I YAEYTPO	+ + 2 2 22 DNSGSGPYDDRDADDRF GGFSTGEYATVSDADDRL DGILTGEYGDAELRDELL SSGGPGGGPYNDDYVGDEFY	359 364 310 565
	LC-CelG CtCelD AaCel9A CtCbhA	<u>α6</u> WAAVELWVVTGRAE WAAAEMWETLGDEE WASCALLRMTGDSA WAACELYVTTGKDE	<u>α7</u> YH-DYIARMARTGLP/ YLRDFENRAAQFSKK WARVCEPLLDLDL YKNYLMNSPHYLEMP/	YAPVS EADFD PWELG KMGENGGANGEDNGLWG	+2 WVNPAALCYF WDNVANLCMF WADVALYCVM CFTWGTTQGLCTI	B DYVTLGQKG-D TYLLSERPGKN IDYLRTPRAAVS TLALVENGLPA	α9 PA I RARL VQR I LEGAR PAL VQS I KDSLL STAD DDVRNK VK SRLL RELD TD I QKARNN I AKAADR	SVFQTYEQSGYGVPILAGS- SIVRTSQNHGYGR-TLGTT- ALAAMAESHPFGIPMRDDD- WLENIEEQGYRLPIKQAEDE	++ FHWGSNKEALAKGMLL YYWGCNGTVVRQTMIL FIWGSNMVLLNRAMAF ERGGYPWGSNSFILNQMIVM	464 470 414 691
	LC-CelG CtCelD AaCel9A CtCbhA	LFAHHLEPR-PEYE QVANKISPN-NDYV LLAEGVGVLHPAAH GYAYDFTGD-SKYL	<u>∝11</u> RAALAQLDYVLGVNPL NAALDA I SHVFGRNYY TVAQRAADYLFGANPL DGMFDG I SYLL <mark>G</mark> RNAM	+ _AKSYVTGLGSNPPRNPH /NRSYVTGLGINPPMNPH _GQCYVTGFGQRPVRHPH IDQSYVTGYGERPLQNPH	μ HRLVKASGVM DRRSGADGIW HRPSVADDVD DRFWTPQTSKRFF 3 3 3	IVPGLLVGGP /EPWPGYLVGGG )HPVPGMVVGGP /APPPGIISGGP	+ + NDHPQTKAIRPHM WP NRHLQDEIARAQLAGR NSRFEDPTINAAVKKD	+ * GPRGYADVTDSYETNEP/ GPKDWVDIQDSYQTNEI/ PAME-AYIDHQDSYSTNEV/ TPPQKCFIDHTDSWGTNEI1	A13 + AIDYNAPLVEVAAHFASL AINWNAALIYALAGEVNY AVYWNSPAVEVIAALLEA VNWNAPFAWVTAYLDEQ	577 574 534 814

Figure 2-1. Alignment of amino acid sequences of LC-CelG, CtCelD, AaCel9A and CtCbhA. The accession numbers are KF626654 for LC-CelG, CAA28255 for CtCelD, ACV59481 for AaCel9A, and ABN51651 for CtCbhA. The amino acid sequence of LC-CelG without a putative signal peptide (residues 20-577) and the corresponding regions of other three proteins are shown. The amino acid residues, which are conserved in all four proteins, are denoted with white letters and highlighted in black. The amino acid residues, which are conserved in two or three different proteins, are highlighted in gray. The ranges of the secondary structures of LC-CelG (βa-βh strands for the Ig-like domain, and  $\beta$ 1- $\beta$ 6 strands and  $\alpha$ 1- $\alpha$ 13 helices for the cellulase domain) are shown above its sequence based on its crystal structure. The residues that form the catalytic site (Asp194, Asp197 and Glu558), substrate binding site, Zn site (Cys150, Asp166, His167 and His193), Ca1 site (Asp225, Glu232, Asn235, Val237, Asp239 and Asp242) and Ca2 site (Asp351, Asp353, Asp356, Asp357 and Val395) are indicated by "\*", "+", "z", "1" and "2" respectively, above the LC-CelG sequence. The residues that form the Ca3 site of CtCelD and AaCel9A are indicated by "3" below the sequences. The position, at which N-terminal Ig-like domain of LC-CelG is truncated to construct His- $\Delta$ Ig-CelG, is shown by solid arrow head above the LC-CelG sequence. Likewise, Gln40 and Asp99 of LC-CelG, which are mutated in this study, are indicated by open arrow heads.

His-LC-CelG の酵素活性の pH 依存性を、 $60^{\circ}$ C、 pH 4.0 – 10.0 の範囲で CM セルロースを基質として測定した。Figure 2-2A に示すように、His-LC-CelG は pH 5.0 – 9.0 の範囲で最大活性の 80%以上の活性を示した。同様に His-LC-CelG の酵素活性の温度依存性を、CM セルロースを基質として pH 7.0、40 - 90°C の範 囲で測定した。Figure 2-2B に示すように、His-LC-CelG は 70°C で最大活性を示 した。70°C、 pH 7.0 における His-LC-CelG の比活性は 50.1 ± 0.3 units mg<sup>-1</sup>であっ た。70°C、 pH 5.5 における AaCel9A の比活性は 80 units mg<sup>-1</sup>であることが報告 されており [71]、His-LC-CelG は AaCel9A よりも活性が若干弱いが、同程度の 耐熱性を示すことが示唆された。一方で、AaCel9A は最大活性の 50%以上を示 す範囲が pH 4.5 – 7.0 であるため、His-LC-CelG の方が AaCel9A よりも pH に対 する適合範囲が広いことが示唆された。なお、LC-CelG の pH や温度依存性は His-LC-CelG と類似していたので、N 末端への His-tag の付加は LC-CelG の活性 にはほとんど影響を及ぼさない。



**Figure 2-2.** Optimum pH and temperature for activity of His-LC-CelG. The pH (A) and temperature (B) dependencies of the enzymatic activity of His-LC-CelG are shown. The activity was determined at 60°C at the pH indicated (A) or at pH 7.0 and the temperatures indicated (B) using 1% (w/v) CM-cellulose as a substrate, as described in Materials and Methods. The buffers used to analyze the pH dependence of the activity were 100 mM sodium citrate (pH 4.0-6.5), 100 mM sodium phosphate (pH 6.0-8.0) and 100 mM Glycine-NaOH (pH 8.0-10.0). The experiment was carried out at least twice, and errors from the average values are indicated by *vertical lines*.

# 2-3-4. His-LC-CelG の耐熱性

His-LC-CelG の耐熱性を調べるため、5 mM CaCl<sub>2</sub>存在下、pH 7.0 の条件で熱変性曲線を測定した。なおこの条件での熱変性は不可逆であった。Figure 2-3 に His-LC-CelG の熱変性曲線を示す。変性中点温度 ( $T_{1/2}$ ) は 81.4°C であった。 AaCel9A の  $T_{1/2}$  値は 77.9°C であるため [69]、His-LC-CelG の耐熱性が僅かに高い。また His-LC-CelG の  $T_{1/2}$  値は活性の至適温度 (70°C) よりも高く、これは活性部位付近が温度変化に伴い局所的に先に変性を起こすためであると考えられる。なお、LC-CelG の  $T_{1/2}$  値は His-LC-CelG と類似していたので、N 末端への His-tag の付加は LC-CelG の安定性にはほとんど影響を及ぼさない。



**Figure 2-3.** Thermal denaturation curves of His-LC-CelG and its derivatives. The thermal denaturation curves of His-LC-CelG (thin solid line), His- $\Delta$ Ig-CelG (thick solid line), His-Q40A-CelG (thin dashed line), His-D99A-CelG (thick dotted line) and His-Q40A/D99A-CelG (thick dashed line) are shown. These curves were obtained in the presence of 5 mM CaCl<sub>2</sub> at pH 7.0 by monitoring the change in CD values at 222 nm as described in Materials and Methods.

# 2-3-5. LC-CelG の結晶構造

LC-CelG と他の GHF9 セルラーゼの構造が類似しているかどうかを調べる ために、LC-CelG の結晶構造を 2.15 Å の分解能で決定した。非対称ユニット中 に 2 分子 (A、B)存在した。LC-CelG は溶液中ではモノマーで存在するため、結 晶中に見られる分子間相互作用は結晶のパッキングによるものと考えられた。 いずれも N 末端の Met 残基と Ig-like ドメインの一部 (Leu20 – Asp29)は不規則 な揺らぎのため、その電子密度を観測することはできなかった。分子 A と B の 構造は極めて類似しており、その平均二乗偏差 (RMSD)値は 0.30 Å であった。 データ収集および精密化の統計値を Table 2-1 に示す。

Crystal	LC-CelG			
Wavelength (Å)	0.900			
Space group	$P2_{1}2_{1}2_{1}$			
Cell parameters				
a, b, c (Å)	84.631, 89.913, 151.157			
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90.00			
Molecules/asymmetric unit	2			
Resolution range (Å)	50.00-2.15 (2.19-2.15) <sup>a</sup>			
Reflections measured	941,321			
Unique reflections	63,355			
Redundancy	14.9 (15.0)			
Completeness (%)	99.9 (100.0) <sup>a</sup>			
$R_{\rm merge}$ (%) <sup>b</sup>	13.3 (68.7) <sup>a</sup>			
Average $I/\sigma(I)$	28.0 (2.6) <sup>a</sup>			
Refinement statistics				
Resolution limits (Å)	77.28-2.15			
No. of atoms				
Protein/water	4239/410			
$R_{work}$ (%) / $R_{free}$ (%) <sup>c</sup>	18.7/24.6			
Rms deviations from ideal values				
Bond lengths (Å)	0.011			
Bond angles (°)	1.190			
Average B factors $(Å^2)$				
MonomerA / B	47.6 / 39.6			
$Zn^{2+}/Ca^{2+}1/Ca^{2+}2$ in monomer A	40.6 / 79.3 / 46.0			
$Zn^{2+}/Ca^{2+}1/Ca^{2+}2$ in monomer B	34.3 / 56.8 / 33.6			
Water	44.3			
Ramachandran plot statistics				
Preferred regions (%)	95.3			
Allowed regions (%)	4.5			

Table 2-1. Data collection and refinement statistics of LC-CelG

<sup>a</sup> Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

<sup>b</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle|/\sum I_{hkl}$ , where  $I_{hkl}$  is an intensity measurement for reflection with indices hkl and  $\langle I_{hkl} \rangle$  is the mean intensity for multiply recorded reflections.

<sup>c</sup> Free *R*-value was calculated using 5% of the total reflections chosen randomly and omitted from refinement.

LC-CelG と CtCelD (PDB code: 1CLC)の結晶構造の重ね合わせ図を Fig. 2-4A に示す。これらの構造は比較的よく類似しており、RMSD 値は 1.58 Å であっ た。同様に LC-CelG の構造は AaCelA や CtCbhA とも類似しており、RMSD 値は それぞれ 1.49 Å、1.92 Å であった。LC-CelG の触媒ドメインの構造は典型的な ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub>-バレル構造であり、中心の( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub>-バレルを形成する 12 本の長い $\alpha$ -ヘリッ クスと 2 本の短い $\alpha$ -ヘリックス、及び 6 本ずつの逆平行β鎖で形成される 2 つの β-シートから成る。Ig-like ドメインは 4 本ずつの逆平行β鎖で形成される 2 つの β-シートから成る。3 つの触媒残基 (Asp194、Asp197、Glu558)の立体配置は CtCelD (Fig. 2-4A)、AaCel9A (Fig. 2-4B)、CtCbhA とほぼ一致していた。Asp194 と Asp197 は求核試薬として働くと考えられる水分子と水素結合を形成してい た。Asp194、Asp197 とその水分子の距離はそれぞれ 2.6 Å、2.7 Å である。

2-3-6. 基質結合ポケット

AaCel9A のセロテトラオース複合体構造 (PDB code: 3H3K) を基に、LC-CelGの基質結合ポケット構造を比較した (Fig. 2-4B)。LC-CelGの基質結合ポケ ットを形成するアミノ酸の立体配置は AaCel9A と非常に類似しており、これら の残基が AaCel9A と同様に基質と相互作用することが示唆された。Tyr201 OH、 Gly347 N、Tyr349 OH、Glu558 O<sup> $\epsilon$ 1</sup>、Asp562 O<sup> $\delta$ 1</sup> はサブサイト-1 のグリコシルユ ニット (Glc(-1))と水素結合を形成すると考えられた。Trp394 N<sup>ε1</sup> は Glc(-2)と水 素結合を形成し、Trp451 はスタッキング相互作用によりその結合を促進させる と考えられた。His450 と His532 はスタッキング相互作用により Glc(-4)の結合を 促進すると考えられた。His510 と Arg512 は Glc(+1)と水素結合を形成し、Trp270 と Tyr554 はスタッキング相互作用によりその結合を促進すると考えられた。一 方、AaCel9A において Gln487 N<sup>€</sup>が Glc(-3)と水素結合を形成するが、LC-CeG で は対応する残基である Gln534 №の位置が異なるため、同様に水素結合を形成す るかどうかは不明である。またサブサイト-1と+1の間で基質が大きく捻じ曲が らないとサブサイト+1には結合できないため、AaCel9A-セロテトラオース複合 体構造のサブサイト+1 が基質結合に関わるかどうかはまだ不明である。セロテ トラオースは AaCel9A により加水分解されるため、AaCel9A-基質複合体構造の 決定に利用された [70]。しかし、AaCel9A の結晶へのソーキングを行った際、 セロテトラオースはサブサイト-4から-1に生成物のような形で結合した [70]。

AaCel9Aの基質複合体構造によると、Asp143とAsp146 (LC-CelG において

Asp194 と Asp197) は Glc(-1)の O1 原子と水素結合を形成する。しかしセロテト ラオースが結合していない構造によると、求核試薬として機能すると考えられ る水分子が O1 原子の位置に結合することが示唆された [70]。この O1 原子は Glc(-1)と Glc(+1)がグリコシド結合を形成しているときは存在しないが、この結 合が切断されたときは存在した。この結果より、Glc(-1)と Glc(+1)の間の C1-O4 結合が開裂した後の O1 原子のように、水分子は LC-CelG の Asp194 と Asp197 に結合することが示唆された。

## 2-3-7. 金属結合部位

CtCelD や AaCel9A、CtCbhA と LC-CelG のアミノ酸配列を比較すると、LC-CelGは1つのZn<sup>2+</sup>結合部位(Zn site)と2つのCa<sup>2+</sup>結合部位(Ca1 site、Ca2 site) を持つことが予測された (Fig. 2-1)。CtCelD の Zn site、Ca1 site、Ca2 site に対応 する LC-CelG の各部位の 2Fo-Fc マップをそれぞれ Figure 2-4C、D、E に示す。 結晶化試薬に金属イオンは存在せず、Zn<sup>2+</sup>イオンの配位構造はCa<sup>2+</sup>イオンとは異 なるため、それぞれの電子密度ピークを Zn<sup>2+</sup>イオン、Ca<sup>2+</sup>イオン (Ca1、Ca2) と 同定した。CtCelD の Ca3 site に対応する領域には明確な電子密度ピークは観測 されなかったため、LC-CelG は Ca3 site を持たないと考えられた。Zn<sup>2+</sup>イオンは Cys150 SH、Asp166 O<sup> $\delta^2$ </sup>、His167 N<sup> $\delta^1$ </sup>、His193 N<sup> $\epsilon^2$ </sup>と4 配位している (Fig. 2-4C)。 Cal site  $\mathcal{O}$  Ca<sup>2+</sup> $/ \pm \lambda \lambda$  Cal Sp225 O<sup> $\delta$ 1</sup>, Glu232 O, Asn235 O<sup> $\delta$ </sup>, Val237 O, Asp239 O<sup>δ1</sup>、Asp242 O<sup>δ2</sup> と 6 配位している (Fig. 2-4D)。Ca2 site の Ca<sup>2+</sup>イオンは Asp351 O<sup>δ1</sup>、Asp351 O<sup>δ2</sup>、Asp353 O、Asp356 O<sup>δ1</sup>、Asp357 O<sup>δ2</sup>、Val395 O、水分子と7 配 位している (Fig. 2-4E)。ただし Cal site の Ca<sup>2+</sup>イオンの電子密度ピークは他の 2 つの金属イオンよりも弱い。これは恐らくこの部位への Ca<sup>2+</sup>イオンの結合が弱 く、結晶化や特性解析を行う際に Ca<sup>2+</sup>イオンを含まない緩衝液に透析すること により、この部位から Ca<sup>2+</sup>イオンが部分的に解離したためであると考えられる。 しかし 10 mM CaCl2 存在下での酵素活性は、非存在下とほぼ同程度であったこ とから、この部位への Ca<sup>2+</sup>イオンの結合は活性には特に影響しないと考えられ た。一方、他の2つの金属イオンは、金属を含まないバッファーに透析した後も LC-CelG に強く結合していた。









Figure 2-4. Crystal structure of LC-CelG. (A) A stereo view of the overall structure of LC-CelG. The structure of LC-CelG is superimposed on that of CtCelD (PDB code 1CLC). For the LC-CelG structure, the Ig-like and catalytic domains are colored cyan and green respectively. One zinc and two calcium ions (Ca1 and Ca2) are shown as orange and yellow spheres, with the numbers of the calcium ions indicated. Three active site residues (Asp194, Asp197 and Glu558) are indicated by green stick models, in which the oxygen and nitrogen atoms are colored red and blue respectively. The entire CtCelD structure, including one zinc and three calcium ions (Ca1-Ca3), is colored gray. Three active site residues (Asp198, Asp201 and Glu555) are indicated by gray stick models. They are labeled in parentheses. (B) The structure around the substrate binding pocket. The structure around the substrate binding pocket of LC-CelG is superimposed on that of AaCel9A in complex with cellotetraose (PDB code 3H3K). The residues forming the substrate binding pocket of LC-CelG are indicated by green stick models, and the corresponding residues and cellotetraose in the AaCel9A structure are indicated by gray stick models. In these stick models, the oxygen and nitrogen atoms are colored red and blue respectively. The labels for the AaCel9A structure are shown in parentheses. The five subsites are labeled from -4 to +1. The water molecule is shown as red sphere. Dashed lines represent hydrogen bonds. (C-E) Electron density around the binding sites of zinc ion (C), and calcium ions Ca1 (D) and Ca2 (E). The zinc and calcium ions are shown as orange and yellow spheres respectively. The water molecule is shown as red sphere. The residues coordinated with these metal ions are indicated as shown in (B). In (C) and (E), the  $2F_{o}-F_{c}$  maps contoured at the 2.0 $\sigma$  and 4.0 $\sigma$  levels are shown in magenta and blue respectively. In (D), the  $2F_{o}-F_{c}$  map contoured at the 1.5 $\sigma$  level is shown in orange. (F) The structure around Gln40 and Asp99. Gln40 and Asp99 located in the Ig-like domain are shown as cyan stick models. The residues that are located in the catalytic domain and form hydrogen bonds with Gln40 (Ala494, Ser503 and Asn504) or salt bridge with Asp99 (Arg545) are shown by green stick models. In these stick models, the oxygen and nitrogen atoms are colored red and blue respectively

# 2-3-8. Ig-like ドメインと触媒ドメインの相互作用

CtCelD や AaCel9A、CtCbhA と同様に、LC-CelG の Ig-like ドメインと触媒 ドメインの界面には多数の親水性、疎水性相互作用が形成される。しかし、LC-CelG の Ig-like ドメインに存在する Gln40 と、触媒ドメインの  $\alpha$ 11- $\alpha$ 12 ヘリック ス間のループの間に形成される水素結合は、4 つの GHF9 セルラーゼの間で保存 されている唯一のドメイン間相互作用である。Gln40 は AaCel9A では Gln13、 CtCbhA では Gln218 として保存されている。CtCelD では Ser58 となっているが、 他と同様に  $\alpha$ 11- $\alpha$ 12 ヘリックス間のループと水素結合を形成している。Gln40 の 側鎖が形成する水素結合を Figure 2-4F に示す。Gln40 N<sup>6</sup> と Ala494 O 間、Gln40 N<sup>6</sup> と Ser503 N 間、Gln40 O<sup>6</sup> と Asn504 N 間の距離はそれぞれ 2.9、3.0、2.9 Å であ る。また、LC-CelG の Asp99 と Arg545 の間に形成される塩橋は、Ig-like ドメイ ンと触媒ドメインの間に形成される唯一の塩橋であり (Fig. 2-4F)、CtCelD (Glu103 と Lys542) と CtCbhA (Asp267 と Lys782) でも保存されている。AaCel9A においては、この塩橋を形成する酸性残基が位置するループを欠いていること から (Fig. 2-1)、この塩橋は形成されていない。

2-3-9. LC-CelG の活性や耐熱性における Ig-like ドメインの役割

CtCbhA は Ig-like ドメインの欠損により不活性化することが報告されてい るが [69]、GHF9 セルラーゼにおける Ig-like ドメインの役割はまだそれほど良 く分かっていない。CtCbhA の Ig-like ドメインと触媒ドメイン間に形成される 1 つ (Asp264–Tyr676)、あるいは 2 つ (Thr230–Gly661、Asp262–Gly661)の水素 結合を取り除くことにより、耐熱性はそれぞれ 8.7°C、6.0°C 低下するが、活性 は保持している [69]。しかし Ig-like ドメインの欠損により、他の GHF9 酵素も 同様に失活するかどうかはまだ分かっていない。また GHF9 セルラーゼに保存 されている Ig-like ドメインと触媒ドメイン間の相互作用が安定性や活性に影響 するかどうかはまだ調べられていない。なお、CtCbhA における Asp264–Tyr676、 Thr230–Gly661、Asp262–Gly661 間の相互作用は LC-CelG では保存されていな い。

そこで LC-CelG が Ig-like ドメインの欠損により失活するのかどうかを調べ るために、Ig-like ドメイン欠損変異体 His-ΔIg-CelG を構築した。また、Gln40 が 形成する水素結合と、Asp99-Arg545 間の塩橋が His-LC-CelG の活性や安定性に 影響するかどうかを調べるために、Gln40、Asp99 のいずれか、あるいは両方を Ala に変異した His-Q40A-CelG、His-D99A-CelG、His-Q40A/D99A-CelG をそれぞ れ構築した。いずれも 2-2-2 の手順に従い精製を行った。いずれの変異体も大腸 菌における発現レベルは His-LC-CelG と同程度であった。しかし His-ΔIg-CelG はほとんどが不溶化してしまい、可溶性タンパク質として菌体内に蓄積した量 はごく僅かであったため、精製後の収量が他と比べて極めて少なくなった。他の 変異体はいずれも大部分が可溶性タンパク質として菌体内に蓄積した (Fig. 2-5)。 結果として、1 L の培養液から精製された量は、His-ΔIg-CelG の場合は 0.3 mg、 他の変異体の場合は His-LC-CelG と同程度の約 4 mg であった。



**Figure 2-5**. SDS-PAGE analysis of His-LC-CelG and its derivatives. "I" and "S" indicate insoluble form and soluble form after sonication, respectively.

これらの変異タンパク質の Far-UV CD スペクトルを pH 7.0、25℃ の条件で 測定し、His-LC-CelG のスペクトルと共に Figure 2-6 にまとめた。His-ΔIg-CelG 以外のスペクトルは類似しており、Gln40 や Asp99 の変異が His-LC-CelG の二次 構造にほとんど影響しないことが示唆された。His-ΔIg-CelG のスペクトルの形は His-LC-CelG に類似しているが、210 – 220 nm の範囲の谷が深いため、His-ΔIg-CelG のヘリックス含量は His-LC-CelG よりも多いことが示唆された。結晶構造 より、His-LC-CelG、His-ΔIg-CelG のヘリックス含量はそれぞれ 36.6%、45.8%で あり、これは Far-UV CD スペクトルの結果と一致している。これにより Ig-like ドメインの欠損による触媒ドメインの大きな構造変化は生じていないことが示 唆された。 pH 7.0、50°C の条件で CM セルロースを基質として酵素活性を測定した。 His-LC-CelG の酵素活性は Ig-like ドメインの欠損により 1/100 にまで低下したの に対して、Gln40 や Asp99 の変異によりほとんど低下しなかった (Table 2-2)。 His- $\Delta$ Ig-CelG は 37°C でもほとんど活性を示さなかった。この結果より、Ig-like ドメインの欠損は His-LC-CelG の酵素活性を大幅に低下させるが、Gln40 や Asp99 の変異は酵素活性には大きな影響を及ぼさないと考えられた。

これらの変異体の熱変性を、5 mM CaCl<sub>2</sub>存在下、pH 7.0 の条件で、222 nm の CD 値をモニターすることにより解析した。なおこの条件での熱変性は不可 逆的であった。Figure 2-3、Table 2-2 に熱変性曲線と  $T_{1/2}$  値をそれぞれまとめる。 His- $\Delta$ Ig-CelG と His-Q40A/D99A-CelG の  $T_{1/2}$  値は His-LC-CelG よりもそれぞれ 6.3°C、5.0°C 低下した。この結果より、Ig-like ドメインは His-LC-CelG の耐熱化 に寄与するが、その 80%程度は Gln40 と Asp99 が介するドメイン間相互作用に よるものであることが示唆された。しかし His-Q40A-CelG と His-D99A-CelG の  $T_{1/2}$  値は、それぞれ His-LC-CelG と同程度か 1.9°C のみ低いことから、Gln40 と Asp99 が介するドメイン間相互作用は協調的に耐熱化に寄与することが示唆さ れた。



**Figure 2-6.** CD spectra of His-LC-CelG and its derivatives. The far-UV CD spectra of His-LC-CelG (thin solid line), His- $\Delta$ Ig-CelG (thick solid line), His-Q40A-CelG (thin dashed line), His-D99A-CelG (thick dotted line) and His-Q40A/D99A-CelG (thick dashed line) were measured at pH 7.0 and 25°C, as described in Materials and Methods.

Protein	Specific activity <sup>a</sup>	Relative activity <sup>b</sup>	$T_{1/2}{}^{\mathrm{c}}$	$\Delta T_{1/2}^{\mathrm{d}}$	
	(Units mg <sup>-1</sup> )	(%)	(°C)	(°C)	
His-LC-CelG	34.4±0.4	100	81.4±0.2	_	
His-Q40A-CelG	32.2±0.9	94	81.4±0.2	0	
His-D99A-CelG	36.3±1.2	106	79.5±0.1	-1.9	
His-Q40A/D99A-Cel	G 33.2±0.1	97	$76.4 \pm 0.2$	-5.0	
His-∆Ig-CelG	$0.4{\pm}0.2$	1.1	75.1±0.1	-6.3	

Table 2-2. Activities and stabilities of His-LC-CelG and its mutants

<sup>a</sup> The specific activity was determined at pH 7.0 and 50°C using CM-cellulose as a substrate, as described in Materials and Methods. Each experiment was carried out at least twice and the average value is shown together with the error.

<sup>b</sup> The relative activity was calculated by dividing the specific activity of the protein by that of His-LC-CelG.

<sup>c</sup> The temperature of the midpoint of the thermal denaturation transition,  $T_{1/2}$ , was determined from the thermal denaturation curves shown in Figure 2-3.

 $^{d}\Delta T_{1/2} = T_{1/2} \mbox{ determined} - 81.4^{\circ} C$  .

2-4. 考察

LC-CelG は N 末端に Ig-like ドメインを有する GHF9 セルラーゼである。今 回 LC-CelG と 29-31%のアミノ酸配列相同性を示す 3 つの GHF9 セルラーゼの 結晶構造を基に、Ig-like ドメインの役割について活性や耐熱性の面から考察し た。His-LC-CelG の Ig-like ドメイン欠損変異体 His-ΔIg-CelG はほとんど失活し、 耐熱性は 6.3℃ 低下した (Table 2-1)。CtCbhA においても Ig-like ドメインの欠損 変異体は失活し、熱変性温度は 10.3℃ 低下した [69]。CtCbhA における考察を 基にすると [69]、His-LC-CelG の Ig-like ドメインを欠損することにより、Ig-like ドメインと触媒ドメイン間の複数の相互作用が失われ、活性部位のコンフォメ ーションが僅かに変化するという仮説が考えられた。触媒残基 Glu558 や基質結 合ポケットを形成する残基が複数位置しているα11 とα13 ヘリックスの間にあ る長いループ領域は、Ig-like ドメインと複数の相互作用を形成している。 ゆえに Ig-like ドメインの欠損によりこのループのコンフォメーションが変化すると考 えられる。つまり Ig-like ドメインは活性部位のコンフォメーションの形成と基 質結合ポケットの機能を持たせるために必要であるのかもしれない。AaCel9Aの 分子動力学シミュレーションによると、Ig-like ドメインは基質結合ポケットや 触媒部位の残基と動力学的に相関があると示唆された [72]。また CtCbhA は p-ニトロフェニルセロビオシドの加水分解活性を有するが、Ig-like ドメインの欠 損変異体はその活性を失うため、Ig-like ドメインが基質認識に直接関与する可 能性は低いと考えられた [69]。この基質のセロビオシド部分は、Ig-like ドメイ ンから離れたサブサイト-1 と-2 に結合する。つまり Ig-like ドメインは間接的に 活性に強く関与していると考えられる。今回の研究では、His-LC-CelGのGln40 と Asp99 の二重変異体は熱変性温度が 5.0℃ 低下したが、活性は保持していた (Table 2-1)。つまり Gln40、Asp99 の変異のみでは、この長いループ領域のコンフ オメーションを変化させるのに十分ではないと考えられる。

Ig-like ドメインは His-LC-CelG や CtCbhA の安定化に寄与していることが分 かった。このことにより、これらの GHF9 セルラーゼが高温環境に適応するの にこのドメインを必要とすること示唆された。しかし耐熱性の高い GHF9 酵素 全てがこのドメインを有しているわけではない。様々な生物から単離された Iglike ドメインを有さない GHF9 酵素も、様々な温度環境に適応している [73-75]。 このことから Ig-like ドメインは GHF9 セルラーゼの耐熱化に必ずしも必要では ないことが示唆された。 Ig-like ドメインを欠損させると、大腸菌内での AaCel9A の発現レベルが大 幅に低下することが報告されている [72]。これは、Ig-like ドメインの欠損によ り、触媒ドメインが正しくフォールディングされないことによるものであると 推測されている。LC-CelG においても同様の結果が得られた。His-ΔIg-CelG は大 腸菌内で大半が不溶型として蓄積した。これは Ig-like ドメインの欠損が His-LC-CelG のフォールディングに影響するためと考えられた。しかし、大腸菌内で可 溶型として蓄積した His-ΔIg-CelG は、CD スペクトルによると His-LC-CelG の触 媒ドメインと類似した二次構造を有していることが予測された。一方でその活 性は極めて弱く、His-LC-CelG の 1%程度であった。これらの結果より、Ig-like ド メインは GHF9 酵素の触媒ドメインのフォールディングを助ける分子内シャペ ロンのような機能を有すると考えられる。このドメインを有していない場合、触 媒ドメインはほとんど正しくフォールディングできないか、あるいはフォール ディングが非常に遅くなり、フォールディングプロセスが完了する前に封入体 を形成してしまうのかもしれない。

# 第3章 N 末端に長い伸長領域を有する新規エステラーゼ LC-Est1 の構造と諸 特性解析

3-1. はじめに

エステラーゼ/リパーゼはあらゆる生物が保有している酵素であり、その触 媒機構や基質認識機構などについてはこれまでよく研究されている。エステラ ーゼ/リパーゼは脂肪酸エステルやトリグリセリドのカルボン酸エステルを加水 分解するが、カルボン酸エステル結合を有する化合物は多岐にわたり、その基質 特異性に従ってエステラーゼ/リパーゼは多数に分類されている。実際、基質特 異性の違いに基づき、医薬品、食品の油脂加工、廃液中の油脂処理をはじめ、近 年ではバイオディーゼル燃料の合成や生分解性プラスチックの加水分解といっ たバイオマス産業など、エステラーゼ/リパーゼは多種多様な分野で利用されて いる。このような様々な用途に適したエステラーゼ/リパーゼを効率よく見つけ るためには、既存のエステラーゼ/リパーゼのバリエーションを増やす必要があ る。従って、新規エステラーゼ/リパーゼの単離は現在でも望まれている。

今回新規酵素の取得源として注目している枝葉コンポストは、第1章で示 したセルラーゼ基質であるセルロースだけではなく、植物性油脂や天然樹脂ポ リマーも豊富であると考えられる。ゆえにこれらに特異的に働くエステラーゼ/ リパーゼを生産する好熱性微生物群が枝葉コンポストには集積していると予想 される。また、土壌細菌から単離されたエステラーゼ/リパーゼで、バイオマス 産業の分野で実用化されている例はまだ少ないため、土壌細菌が多数存在する と考えられる枝葉コンポストは新規エステラーゼ/リパーゼの取得源として有望 である。そこで本章では、メタゲノム法を用いて枝葉コンポストから新規のエス テラーゼ/リパーゼを取得することを目的とした。

今回枝葉コンポストから単離された 6 種類の新規エステラーゼ/リパーゼの うち、LC-Est1 は N 末端に長い伸長領域を有する新しいタイプのエステラーゼ である。この伸長領域と相同性の高い酵素は 1 つしか存在せず、その構造や機 能は明らかになっていない。そこでこの伸長領域が活性や安定性に必要なのか どうかを調べることを次の目的とし、結晶構造解析や諸特性解析を行った。

53

#### 3-2. 実験材料および方法

3-2-1. 菌体、プラスミド

大腸菌、プラスミド、培地はそれぞれ 1-2-1 と同様のものを使用した。

1-2-2. スクリーニング

12.5 µg mL<sup>-1</sup>クロラムフェニコール、0.2% Tween 80、2% トリブチリンを含む LB 寒天培地を用いて、メタゲノム DNA ライブラリーを植菌し、トリブチリン分解活性を有するクローンを探索した [33]。2、3 日間 37℃ で培養後、50℃ でインキュベートし、トリブチリンの加水分解によるハローの形成を確認した。 トリブチリン分解酵素遺伝子の ORF 配列は 1-2-2 と同様に決定した。

#### 3-2-3. プラスミド構築

LC-Est1 遺伝子が導入されたフォスミドベクターを鋳型として、いずれもN 末端に His-tag を導入した LC-Est1 (Gln26–Lys510)、LC-Est1C (Glu284–Lys510)、 LC-Est1C\* (Pro304–Lys510) の発現用ベクターを構築した。プライマーの合成は 北海道システムサイエンスに依頼した。DNA の塩基配列は ABI Prism 310 DNA sequencer を用いて決定した。

#### 3-2-4. 大量発現と精製

LC-Est1、LC-Est1C、LC-Est1C\*は、3-2-3 で構築した発現ベクターを用い、 それぞれ大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RPの中で封入体として以下の方法で発現 させた。組換え大腸菌を OD<sub>600</sub>の値が 0.5 程度になるまで 37°C で振盪培養し、 終濃度が 0.5 mM になるように Isopropyl  $\beta$ -D-thio galactopyranoside (IPTG)を加え て更に 4 時間培養した。菌体を 8,000 g、10 分の遠心分離により回収し、1 mM EDTA を含む 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) に再懸濁した。ソニケーションに よる菌体破砕後、30,000 g で 30 分遠心分離し、上清を回収した。20 mM phosphate buffer (pH 6.0) により透析した後、同バッファーにより平衡化した HiTrap SP HP カラム (GE Healthcare) に供し、NaCl 濃度を 0 M から 1 M まで直線的に上昇さ せることにより目的タンパク質をカラムから溶出させた。目的タンパク質を含 むフラクションを回収し、10 mM イミダゾール、0.3 M NaCl を含む 20 mM HP カラムに供し、イミダゾール濃度を 10 mM から 300 mM まで直線的に上昇 させることにより目的タンパク質をカラムから溶出させた。回収したタンパク 質は 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) に透析した。

LC-Est1C\*のセレノメチオニン置換体はメチオニン要求大腸菌 B834(DE3) pLysS を用いて、セレノメチオニンを含む最小培地で大量生産した [76]。精製は 上記と同様に行った。

大腸菌における発現レベル、精製純度の確認は SDS-PAGE により行った [34]。タンパク質の濃度は、280 nm における Tyr と Trp の分子吸光係数 1,576、 5,225 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> [35] を用いて計算した。1 mg mL<sup>-1</sup> のタンパク質溶液の吸光係数 (A<sub>280</sub><sup>0.1%</sup>)に基づき決定した。この値は LC-Est1、LC-Est1C、LC-Est1C\*に対し、 それぞれ 0.75、0.98、1.01 であった。

## 3-2-5. 酵素活性

基質としては *p*-nitrophenyl (NP) acetate (C2)、*p*-NP butyrate (C4)、*p*-NP caproate (C6)、*p*-NP caprylate (C8)、*p*-NP decanoate (C10)、*p*-NP laurate (C12)、*p*-NP myristate (C14)を使用した。活性測定は 10% アセトニトリル、1 mM 基質を含む 20 mM Tris-HCl (pH7.5)を用いて所定の温度で行った。基質から遊離した *p*-ニトロフェノールの量は U-2810 形分光光度計 (HITACHI)を用い、412 nm の吸収を測定することにより決定した。この際、*p*-ニトロフェノールの 412 nm における分子吸光係数 14,200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>を用いた。酵素活性の 1 Unit は 1 分間に 1 µmol の *p*-ニトロフェノールを生産する酵素量と定義した。比活性はタンパク質 1 µmol あたりの酵素活性と定義した。

温度依存性解析では 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を用い、20 – 80℃の各温度条件で測定した。pH 依存性解析は 30℃の温度で、pH 4.0 – 9.0 の各 pH 条件で測定した。この測定において、pH 4.0 – 6.0 の範囲は 20 mM sodium citrate、pH 6.0 – 8.0 の範囲では 20 mM sodium phosphate、pH 7.0 – 9.0 の範囲では 20 mM Tris-HCl を用いた。

カイネティックパラメーターの決定には、*p*-NP butyrate (C4)を基質として 用いた。基質濃度は 0.25 – 6.0 mM の範囲とした。この加水分解はミカエリス・ メンテン式に従っており、Lineweaver-Burk plot によりカイネティックパラメー ターを決定した。

# 3-2-6. CD (circular dichroism) スペクトル

1-2-7 と同様の手法で行った。

#### 3-2-7. 熱変性測定

熱変性曲線は温度変化に伴う波長 222 nm の CD 値をモニターすることで得られた。サンプルは 10 mM Tris-HCl (pH7.0) に溶かした。測定はタンパク質濃度 0.1 mg mL<sup>-1</sup>、光路長 2 mm、昇温速度 1.0°C の条件で行った。変性剤を含まない 条件では、熱変性は不可逆であった。変性中点温度 ( $T_{1/2}$ ) は最小二乗法を基にしたカーブフィッティングにより計算した。

## 3-2-8. 結晶化

結晶化に用いる LC-Est1\*の天然体とセレノメチオニン置換体は 10 mM Tris-HCl (pH8.0) に透析し、Centricon で 19 mg mL<sup>-1</sup>に濃縮した。Hampton Research 社 の結晶化キット(Crystal Screen I, II) と Emerald BioStructures 社の結晶化キット (Wizard I - IV) を用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。条件探索には 4°C、20°C の温度条件の下、96-well Corning CrystalEX Microplates (Hampton Research) を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。結晶化ド ロップはタンパク質溶液 1 µL とリザーバー溶液 1 µL を混合して調製し、100 µl のリザーバー溶液に対して蒸気拡散平衡化させた。天然体の結晶は 20°C で、 Index No.71 (0.1 M Bis-Tris (pH 6.5)、0.2 M sodium chloride、25% (w/v) polyethylene glycol 3,350) をリザーバー溶液として用いた条件で 1 週間後に得られた。セレノ メチオニン置換体は結晶の質を向上させるためにさらにリザーバー溶液の最適 化を行った。その結果、最適化されたリザーバー溶液 (0.1 M Bis-Tris (pH 6.5)、 0.18 M sodium chloride、21% (w/v) polyethylene glycol 3,350) を用いて、4°C で 2 週間蒸気拡散平衡化させることにより、良質な結晶が得られた。

# 3-2-9. X線回折データ収集と構造決定

天然体とセレノメチオニン置換体の LC-Est1C\*の X 線回折データセットの 収集は、SPring-8 のビームライン BL44XU のシンクロトロン放射光を用い、-173℃ の窒素ガスを吹き付けた状態で、0.9 Å の波長でデータ収集を行った。 HKL2000 を用いて、得られた回折データを処理した [37]。LC-Est1C\*の構造は HKL2MAP [77] 中の SHELX [78] を用いて、多波長異常分散 (MAD) 法により 決定した。そして ArpWarp [40] を用いてモデルを自動的に決定した。モデルの 精密化は REFMAC [41] を用いて行い、COOT [42] によりモデルをさらに修正 した。LC-CelA 構造の図は PyMol (<u>http://www.pymol.org</u>) を用いて作成した。

# 3-2-10. Protein Data Bank accession number

解析した LC-Est1C\*の構造座標および構造因子は PDB コード番号 3WYD として、Protein Data Bank に登録した。

#### 3-3. 実験結果

#### 3-3-1. メタゲノムから単離された新規エステラーゼ/リパーゼの同定

枝葉コンポストからメタゲノム法により新規エステラーゼ/リパーゼを単離 できるかどうかを調べるために、第1章で構築したメタゲノムライブラリーを 用いて、トリブチリンを含むプレート上で 50°C においてハローを形成するクロ ーンをスクリーニングした。その結果得られたクローンのうち6つは 50°C で比 較的大きなハローを形成する。これらのクローンから得られるエステラーゼ/リ パーゼは、活性や安定性、分泌レベルが比較的高いと考えられる。そこで、これ らのクローンが新規のエステラーゼ/リパーゼ遺伝子を持つかどうかを調べるた めに、フォスミドベクターをこれらのクローンから抽出し、DNA 挿入塩基配列 を決定した。挿入配列の平均サイズは 35 kb である。BlastX を用いたホモロジー サーチによりオープンリーディングフレームを解析することにより、5 種類の新 規エステラーゼと1 種類の新規リパーゼ遺伝子を同定した。これらの遺伝子が コードするタンパク質を LC-Est1-6 と名付けた。

3-3-2. LC-Est1-6のアミノ酸配列

LC-Est1 – 6のアミノ酸残基数と、これらのタンパク質に対して最も高いア ミノ酸配列相同性を示すタンパク質をそれぞれ Table 3-1 にまとめる。LC-Est1 – 6のアミノ酸残基数はいずれも 265 - 587 の間である。データベース上に存在す る LC-Est1 – 6 と最も相同性の高いタンパク質は、それぞれ LC-Est1 – 6 と 44 – 73%の相同性を示す。LC-Est1 – 6 のアミノ酸配列は accession number KM40609 – KM406411、KM406413 – KM406415 として GenBank に登録した。

		Protein with the highest sequence identity					
Cellulases	No. of						
	residues	Protein	Source organism	Accession No.	Identity (%)		
LC-Est1	510	Esterase	Candidatus Solibacter usitatus	ABJ82142	46		
LC-Est2	383	Carboxylesterase typeB	Planctomyces brasiliensis	ADY57734	51		
පු LC-Est3	265	Lipase	(bacterium enrichment culture)	ADR10200	73		
LC-Est4	534	Putative carboxylesterase	Bradyrhizobium sp. STM 3843	WP_008970463	52		
LC-Est5	303	Esterase/lipase	(uncultured bacterium)	AGF91880	53		
LC-Est6	587	Putative esterase	Geobacillus thermoglucosidasius	GAJ43165	44		

 Table 3-1. List of esterases/lipases isolated from leaf-branch compost and proteins with the highest amino acid sequence identities

 Protein with the highest sequence identity

LC-Est1 – 6 の一次構造を模式的に Figure 3-1 に示す。SignalIP 3.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/) を用いた N 末端配列分析と SMART (http://smart.embl.de) を用いたドメインサーチにより、シグナルペプチドと esterase/lipase/peptidase (Pfam domain)の触媒ドメインを予測した。LC-Est1、LC-Est2、LC-Est4 は N 末端にシグナルペプチドを有するため、分泌タンパク質であ ることが示唆された。その他はシグナルペプチドを持たないため、細胞質タンパ ク質であるか、Sec を介さない経路により分泌されることが示唆された。LC-Est1 は"esterase" domain、LC-Est2 と LC-Est4 は"COesterase"(carboxylesterase) domain、 LC-Est5 と LC-Est6 は "Abhydrolase" (α/β hydrolase) domain を持つため、これら は恐らくエステラーゼである。LC-Est6は "PepXC" (X-Pro dipeptidyl-peptidase Cterminal domain) domain も有することから、エステラーゼ活性だけではなく、ペ プチダーゼ活性も持つことが示唆された。LC-Est3 は"Lipase 2" domain を持つ ため、リパーゼと考えられる。Arpigny と Jaeger による分類法 [79] に基づき、 触媒ドメインのアミノ酸配列の違いにより LC-Est1 – 6 を分類すると、LC-Est1 は Family V、LC-Est2 は Family I-6、LC-Est3 は Family III、LC-Est4 は Family VII、 LC-Est5 は Family IV、LC-Est6 は Family VI esterases/lipases に属する。



**Figure 3-1.** Schematic representation of the primary structures of metagenomederived esterolytic/lipolytic enzymes from leaf-branch compost. A putative signal peptide and a putative esterase/lipase/peptidase domain are shown by black and grey boxes respectively. "COesterase", "Abhydrolase", and "PepX C" represent "carboxylesterase", " $\alpha/\beta$ -hydrolase", and "X-Pro dipeptidyl-peptidase C-terminal domain" respectively. The numbers above the sequence represent the positions of the N- and C-terminal residues of each protein. The numbers below the sequence represent the positions of the N- and C-terminal residues of each domain. The regions that are defined as long N-terminal extension (LNTE) and C-terminal esterase domain (LC-Est1C) of LC-Est1 in this study are also shown.

LC-Est1 は 510 アミノ酸から成り、分子量 55,620 kDa、等電点 (pl) 8.67 で、 シグナルペプチドを除いた形 (Gln26-Lys510) で分泌されると考えられる。LC-Est1 は機能未知の長い N 末端ドメイン (Long N-terminal extension、LNTE) を有 する (Fig. 3-1)。ここでは、Gln26 – Phe283 を LNTE、Glu284 – Lys510 を C 末端 エステラーゼドメインと定義した。SMART によると LNTE は既存の機能や構造 の分かっているいかなるドメインとも相同性を示さなかった。ホモロジーサー チによると Candidatus Solibacter usitatus Ellin6076 由来 putative esterase (CSu-Est、 ABJ82142) のみが LC-Est1 全体のアミノ酸配列と有意な類似性を示した。C.S. usitatus Ellin6076 は Acidobacteria 門の亜門 3 に属し、9.9 Mbp の巨大なゲノムを 持っている [80]。Acidobacteria 門は環境中に豊富に存在する門の一つであり、 土壌や堆積物中に見つかっており、26の亜門に分類される。CSu-EstのみがLC-Est1 同様 LNTE を持ち、両者のアミノ酸配列の相同性は 46%である。しかし、 CSu-Est の構造や機能についての研究はされておらず、LNTE の役割も分かって いない。一方、LC-Est1のC末端エステラーゼドメイン (LC-Est1C、Glu284-Lys510) は他のエステラーゼやリパーゼと最大 30%程度のアミノ酸配列相同性を示す。 そのうち、結晶構造が決定されている Thermotoga maritima MSB8 由来耐熱性エ ステラーゼ EstA (Tm-EstA、NP\_227849) [81] は、LC-Est1 の C 末端エステラーゼ ドメインと29%のアミノ酸配列相同性を示す。

#### 3-3-3. LC-Est1 と CSu-Est、Tm-EstA のアミノ酸配列比較

LC-Est1、CSu-Est、Tm-EstAのアミノ酸配列のアライメントをFigure 3-2に 示す。CSu-Est とTm-EstAはN末端に15残基のシグナルペプチドを有するた め、LC-Est1同様分泌タンパク質であることが示唆された。エステラーゼ/リパー ゼの触媒トライアドを構成するアミノ酸残基(LC-Est1においてはSer399、 Asp447、His479)は全て保存されている。エステラーゼ/リパーゼでよく保存され ている触媒セリン残基を含むGXSXGモチーフも、LC-Est1においてGHSMG (Gly397 – Gly401)として保存されている。Tm-EstAの結晶構造(PDB code: 3DOH)によると、Tm-EstAはN末端Ig-likeドメイン(Gln16-Asp157)とC末端 エステラーゼドメイン(Tm-EstAC、Asp158-Arg395)から成る。N末端Ig-likeド メインはTm-EstAのオリゴマー化に寄与しており、またTm-EstAの活性や安定 性にも重要であると報告されている[81]。しかし、LC-Est1のLNTEはTm-EstA のIg-likeドメインと相同性が低いため、LC-Est1やCSu-EstのLNTEはTm-EstA のIg-likeドメインとは異なる構造を形成することが示唆される。



Figure 3-2. Alignment of amino acid sequences of LC-Est1, CSu-Est and Tm-EstA. The amino acid residues, which are conserved in all three proteins, are denoted with white letters and highlighted in black. The amino acid residues, which are conserved in two different proteins, are highlighted in gray. The amino acid residues that form a catalytic triad (Ser399, Asp447 and His479 for LC-Est1) are denoted by asterisks. A peptide of each protein predicted by the SignalP 3.0 signal Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/) is underlined. Solid and open triangles above the sequences represent the positions, at which N-terminal regions of LC-Est1 are truncated to construct LC-Est1C and LC-Est1C\* respectively. The ranges of the secondary structures of LC-Est1C\* and Tm-EstA are shown above and below the sequences respectively. " $\alpha$ ", " $\beta$ " and " $\eta$ " represent  $\alpha$  helix,  $\beta$  strand, and  $3_{10}$  helix respectively. Gaps are denoted by dashes. The numbers represent the positions of the amino acid residues starting from the N terminus of the protein. The accession numbers of these sequences are KM406409 for LC-Est1, ABJ82142 for CSu-Est, and NP\_227849 for Tm-EstA.

# 3-3-4. LC-Est1、LC-Est1C、LC-Est1C\*の大量発現と精製

LNTE がどのような構造を形成するのか、また LNTE は LC-Est1 の活性や 安定性に必要なのかを調べるために、LC-Est1 (Gln26–Lys510)、LC-Est1C (Glu284 – Lys510)、LC-Est1C\* (Pro304–Lys510)を構築し、大腸菌で大量発現した。LC-Est1 の Glu284 に対応する Tm-EstA の Thr145 は、N 末端 Ig-like ドメインのβH 鎖 に位置し、これはη3 3<sub>10</sub> ヘリックスを介して C 末端エステラーゼドメインに繋 がっている (Fig. 3-2)。同様に、LC-Est1 の Pro304 に対応する Tm-EstA の Pro173 は、エステラーゼドメインのβ2 鎖に位置する。ゆえに、LC-Est1C はエステラー ゼドメイン全体を含むのに対し、LC-Est1C\*はβ1 鎖を欠いていることが予測され る。

大腸菌内で発現を行うと、いずれも可溶型で目的タンパク質が得られた。そ れぞれ 3-2-3 の手順に従って SDS-PAGE で単一バンドが得られるまで精製を行 った。1 L の培養液から LC-Est1 は 6 mg、LC-Est1C は 2 mg、LC-Est1C\*は 3 mg の精製タンパク質がそれぞれ得られた。ゲルろ過クロマトグラフィーによると、 LC-Est1、LC-Est1C、LC-Est1C\*の分子量はそれぞれ 58 kDa、28 kDa、26 kDa と 推定され、これはアミノ酸配列から計算した値 (それぞれ 55,620 Da、27,382 Da、 25,094 Da) とほぼ一致することから、いずれも溶液中においてモノマーで存在 することが示唆された。

LC-Est1 と LC-Est1C の Far-UV CD スペクトルを Figure 3-3 に示す。いずれ も 220 nm 付近で[θ]値が最も小さな曲線を描く。LC-Est1C の Far-UV CD スペク トルは LC-Est1 よりも 220 nm 付近の谷の深さが浅かったので、LC-Est1C のヘリ ックス含量は LC-Est1 よりも低いことが示唆された。なお LC-Est1C\*のスペクト ルは LC-Est1C と類似していた。



**Figure 3-3.** Far-UV CD spectra. The far-UV CD spectra of LC-Est1 (solid line) and LC-Est1C (broken line) were measured at 25°C in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) as described in Materials and Methods.

#### 3-3-5. LC-Est1C\*の結晶構造

LNTE の欠損が LC-Est1 の C 末端エステラーゼドメインの構造に影響する かどうかを調べるには、LC-Est1 と LC-Est1C の結晶構造を決定する必要があっ た。結晶化条件検討の末、X 線回折実験に適する結晶は LC-Est1C\*のみ得られた。 LC-Est1 と LC-Est1C の結晶化も試みたが、構造解析に適した良質の結晶を得る ことはできなかった。これは恐らく LNTE や LC-Est1C の N 末端領域がフレキシ ブルで、良質な結晶の形成を妨げているからと考えられる。

LC-Est1C\*の結晶構造を MAD 法により 1.53 Å の分解能で決定した。データ 収集および精密化の統計値を Table 3-2 に示す。非対称ユニット中に 2 分子 (A、 B) 存在した。分子 A の Arg361 – Met366 と Ala503 – Lys510、分子 B の Arg361 – Met366 と Arg501 – Lys510 は不規則な揺らぎのために、その電子密度を観測する ことはできなかった。分子 A と B の構造は極めて類似しており、その RMSD 値 は 0.24 Å であった。本研究では分子 A の構造を使用した。

LC-Est1C\*の結晶構造によると、LC-Est1C\*は典型的な  $\alpha/\beta$  hydrolase fold を 有していた (Fig. 3-4)。LC-Est1C\*の構造は Tm-EstAC (PDB code: 3DOH) の構造 と良く類似しており、RMSD 値は 1.25 Å であった。この結果、LC-Est1 のエステ ラーゼドメインの構造は LNTE の欠損によりそれほど変化しないことが示唆さ れた。LC-Est1C\*の触媒トライアドを形成する活性部位残基 (Ser399、Asp447、 His479) の立体構造は Tm-EstA の触媒残基 (Ser286、Asp334、His374) とほぼー 致した。LC-Est1C\*の構造は、 $\beta4$  鎖と $\alpha$ B ヘリックスの間のループ、 $\beta$ 8 鎖と $\alpha$ F ヘ リックスの間のループを除いて、Tm-EstA のエステラーゼドメインと類似して いた。LC-Est1C\*のβ4 鎖と $\alpha$ B ヘリックスの間のループ (Lys359 – Gly369) は短 く、全体の電子密度ははっきりとしていない。一方 Tm-EstA の対応するループ (Pro234 – Pro255) は長く、触媒部位のトンネルの一部を形成し、酵素活性に影響 する Phe246 を含んでいる [81]。LC-Est1C\*の $\beta$ 8 鎖と $\alpha$ F ヘリックスの間のルー プ (Pro475 – His479) は短いのに対して Tm-EstA の対応するループ (Glu362 – His374) は比較的長く、 $\eta$ 7 ヘリックスを含んでいる。

	Native	SeMet-peak	SeMet-inflection	SeMet-remote
Data collection statistics				
Wavelength (Å)	0.900	0.978769	0.979101	0.994813
Space group	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$P2_12_12_1$	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$P2_{1}2_{1}2_{1}$
Cell parameters				
a, b, c (Å)	45.86, 55.45, 156.27	46.13, 55.73, 156.24	46.13, 55.78, 156.32	46.13, 55.79, 156.35
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90	90	90	90
Molecules/asymmetric unit	2	2	2	2
Resolution range (Å)	50.00-1.53 (1.56-1.53) <sup>a</sup>	50.00-2.30 (2.34-2.30) <sup>a</sup>	50.00-2.30 (2.34-2.30) <sup>a</sup>	50.00-2.30 (2.34-2.30) <sup>a</sup>
Reflections measured	392,694	123,978	122,975	121,933
Unique reflections	60,179	17,756	17,643	17,581
Redundancy	6.5 (7.2) <sup>a</sup>	$7.0(7.3)^{a}$	7.0 (7.3) <sup>a</sup>	$6.9 (7.3)^{a}$
Completeness (%)	98.5 (100.0) <sup>a</sup>	94.6 (99.7) <sup>a</sup>	93.9 (99.5) <sup>a</sup>	93.6 (99.5) <sup>a</sup>
$R_{merge}$ (%) <sup>b</sup>	18.1 (28.3) <sup>a</sup>	11.5 (33.4) <sup>a</sup>	9.5 (36.5) <sup>a</sup>	10.3 (42.2) <sup>a</sup>
Average $I/\sigma(I)$	14.5 (3.6) <sup>a</sup>	23.3 (5.0) <sup>a</sup>	23.5 (4.5) <sup>a</sup>	$22.2 (3.8)^{a}$
Refinement statistics				
Resolution range (Å)	78.14-1.53			
No. of atoms				
Protein/Water	2992/451			
R <sub>work</sub> (%)	19.1			
$R_{\text{free}}$ (%) <sup>c</sup>	22.5			
Rms deviations from ideal valu	es			
Bond lengths (Å)	0.014			
Bond angles (°)	1.439			
Average B factors ( $Å^2$ )				
Protein/Water	18.3/31.6			
Ramachandran plot statistics				
Favored region (%)	97.1			
Allowed region (%)	2.9			

**Table 3-2** Data collection and refinement statistics of LC-Est1C\*

<sup>a</sup> Values in parentheses are for the highest-resolution shell. <sup>b</sup>  $R_{merge} = \sum |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum I_{hkl}$ , where  $I_{hkl}$  is an intensity measurement for reflection with indices hkl and  $\langle I_{hkl} \rangle$  is the mean intensity for multiply recorded reflections. <sup>c</sup> Free *R*-value was calculated using 5% of the total reflections chosen randomly and omitted from refinement.

65


**Figure 3-4.** Crystal structure of LC-Est1C\*. The stereo view of the structure of LC-Est1C\* (cyan) is superimposed on that of the C-terminal esterase domain of Tm-EstA (PDB entry 3DOH). Three active-site residues of LC-Est1C\* (Ser399, Asp447 and His479) and the corresponding residues of Tm-EstA (Ser286, Asp334 and His374) are shown by stick models. N and C represent N- and C-termini.

## 3-3-6. LC-Est1 と LC-Est1C の酵素活性

LC-Est1C\*は $\beta$ 1 鎖を含まないため、今回 LC-Est1C を諸特性解析に使用した。 まず、pNP-acetate (C2) からpNP-myristate (C14) まで鎖長の異なる基質を用いて、 pH 7.5、30°C の条件下で LC-Est1 と LC-Est1C の酵素活性を測定した。その結果 を Figure 3-5 に示す。LC-Est1 は C4 基質を最も良く分解し、C6 基質でも同程度 の活性を示した。しかし C2 あるいは C8 基質を用いたときは、最大活性の 15– 25%程度の活性しか示さず、C10 以上の基質はほとんど分解しなかった。LC-Est1 同様、LC-Est1C も C6 基質を最も良く分解し、C4 基質でも同程度の活性を示し た。また、いずれもオリーブオイルは分解しなかった。ゆえに LNTE の欠損は、 LC-Est1 の基質特異性にはほとんど影響しない。しかし、C4 基質を用いて 30°C、 pH 7.5 で測定した LC-Est1 と LC-Est1C の比活性はそれぞれ 255 units/µmol、101 units/µmol であったので、LC-Est1 の活性は LNTE の欠損により約 60%低下した (Table 3-3)。従って、LNTE は LC-Est1 の活性を高めるのに必要である。



**Figure 3-5.** Substrate selectivity of LC-Est1 and LC-Est1C. Specific activities of LC-Est1 (solid bar) and LC-Est1C (grey bar) toward triglyceride substrates are shown. C2~C14 represent the acyl chain lengths of the substrates. The experiment was carried out in duplicate. Each value represents the average value and errors from the average values are shown.

Table 3-3. Specific activities, kinetic parameters, and  $T_{1/2}$  values of LC-Est1 and LC-Est1C<sup>a</sup>

Protein	Specific	Relative				
	activity	activity	$K_{ m m}$	$k_{ m cat}$	$T_{1/2}$	$\Delta T_{1/2}{}^{\mathrm{b}}$
	(unit/µmol)	(%)	(mM)	(s <sup>-1</sup> )	(°C)	(°C)
LC-Est1	$255\pm31$	100	$0.30\pm0.01$	$5.8 \pm 0.3$	$67.2\pm0.4$	-
LC-Est1C	$101\pm19$	40	$0.48\pm0.04$	$2.4\pm0.1$	$63.9\pm0.1$	-3.3

<sup>a</sup> The enzymatic activity was determined at 30°C for 10 min, in 100 µl of 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 10% acetonitrile, by using *p*-nitrophenyl butyrate (C4) as a substrate. The substrate concentration was 1 mM. For determination of the kinetic parameters, the substrate concentration was varied from 0.25 to 6.0 mM. The relative activity was calculated by dividing the specific activity of LC-Est1C by that of LC-Est1. Experiments were carried out at least twice and the average values are shown together with the errors. The temperature of the midpoint of the thermal denaturation transition,  $T_{1/2}$ , was determined by monitoring the change in the CD value at 222 nm.

<sup>b</sup>  $\Delta T_{1/2} = T_{1/2}(\text{LC-Est1C}) - T_{1/2}(\text{LC-Est1}).$ 

LC-Est1 と LC-Est1C の酵素活性の温度依存性を、C4 基質を用いて pH 7.5、 20 - 80°C の範囲で測定した (Fig. 3-6)。いずれも 40°C で最大活性を示した。同 様に pH 依存性を、C4 基質を用いて 30°C、 pH 4.0-9.0 の範囲で測定した (Fig. 3-7)。いずれも pH 7.5 で最大活性を示した。ただし Tris-HCl を用いて pH 7.0 – 9.0 の範囲で LC-Est1C の酵素活性を測定した場合は、pH 8.0 の方が pH 7.5 に比 べて僅かに活性が高かった。これらの結果より、LNTE の欠損は LC-Est1 の至適 温度や至適 pH にはほとんど影響しないことが示唆された。なお、LC-Est1C\*の 比活性や温度依存性は LC-Est1C とほぼ同程度であり、LC-Est1C の N 末端側 20 残基の欠損が、LC-Est1C の安定性に僅かに影響している可能性は排除できない ものの、活性や安定性にはほとんど影響しないと考えられた。



**Figure 3-7**. Optimum pH for activities of LC-Est1 and LC-Est1C. The pH dependencies of the enzymatic activities of LC-Est1 (solid line) and LC-Est1C (broken line) are shown. The activity was determined at 30°C and the pH values indicated using *p*NP-butyrate (C4) as a substrate, as described in Materials and Methods. The buffers used to analyze the pH dependence of activity were 20 mM sodium citrate (pH 4.0-6.0) (open circle), 20 mM sodium phosphate (pH 6.0-8.0) (cross) and 20 mM Tris-HCl (pH 7.0-9.0) (solid square). The experiment was carried out at least twice, and errors from the average values are indicated by *vertical lines*.

LC-Est1Cの酵素活性がLC-Est1よりも低い要因が、基質結合親和性の減少によるものか、ターンオーバー数の減少によるものかを調べるために、C4 基質を用いて、30°C、pH7.5の条件下で、LC-Est1とLC-Est1Cのキネティックパラメーターを決定した。いずれも Michaelis-Menten kinetics に従い、キネティックパラメーターを Lineweaver-Burk plot により決定した (Table 3-3)。LC-Est1Cの Km 値はLC-Est1よりも僅かに高く、kcat 値はLC-Est1よりも 60%程度低かった。これらの結果より、LNTEの欠損は基質結合親和性よりも、LC-Est1のターンオーバー数を減少させることが示唆された。おそらく、LNTEの欠損により、活性部位のコンフォメーションが僅かに変化すると考えられる。

3-3-7. LC-Est1 と LC-Est1C の耐熱性

LNTE の欠損による LC-Est1 の耐熱性への影響を調べるために、pH 7.5 で LC-Est1 と LC-Est1C の熱変性曲線を測定した。この条件ではこれらの熱変性は 不可逆的に起こる。10 mM Tris-HCl (pH 7.5) の条件で測定した LC-Est1 と LC-Est1C の熱変性曲線を Figure 3-8 に示し、熱変性曲線の中点温度 ( $T_{1/2}$ ) を Table 3-3 にまとめる。LC-Est1C の  $T_{1/2}$  値は LC-Est1 よりも 3.3°C 低かったので、LNTE は LC-Est1 の安定化にやや寄与することが示唆された。



**Figure 8**. Thermal denaturation LC-Est1 and LC-Est1C. The thermal denaturation curves of LC-Est1 (solid line) and LC-Est1C (broken line) measured in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) are shown. The curves were recorded by monitoring the change in CD values at 222 nm as described in Materials and Methods.

3-3-8. LC-Est1C\*とTm-EstACの構造的特徴の比較

Tm-EstA は 95℃以上で最大活性を示すのに対して、Tm-EstAC は 60℃ で最 大活性を示し、Ig-like ドメインの欠損により耐熱性が大幅に低下している [81]。 それでも、40℃ で最大活性を示す LC-Est1C\*に比べればまだ大幅に耐熱性は高 い。一般的にイオン対の数 [82]、水素結合の数 [83]、ループ領域中のプロリン 残基の数 [84]、ジスルフィド結合の数 [85] が多いほど、また内部の疎水性度が 高い [86] ほど、また第 1 章に示した N 末端の固定化や C 末端の固定化 [87] に より、タンパク質の安定性は高くなる傾向にある。そこで LC-Est1C\*と Tm-EstAC を比較すると、イオン対の数、水素結合の数、ループ中のプロリン残基の数は Tm-EstAC の方が LC-Est1C\*よりも多い (Table 3-4)。LC-Est1C\*と Tm-EstAC のイ オン対の数はそれぞれ 11、14、水素結合の数はそれぞれ 169、206、ループ中の プロリン残基の数はそれぞれ 10、12 であった。しかしいずれの酵素もジスルフ ィド結合は存在していない。反対に、内部の疎水性度は LC-Est1C\*が 71.3%であ るのに対し、Tm-EstAC は 65.4%であった。これらの結果より、イオン対や水素 結合の数、ループ中のプロリン残基の数の違いが、LC-Est1C\*と Tm-EstAC の安 定性の違いをもたらすと考えられた。

	LC-Est1C*	Tm-EstAC
No. of amino acids	199	222
Opt. Temp. for activity (°C) <sup>a</sup>	40	60
Content of the residues (%)		
Buried polar	15.6	20.2
Buried apolar	38.7	38.3
Buried apolar/buried total	71.3	65.4
No. of ion pairs (≤4.0 Å)	11	14
No. of hydrogen bonds	169	206
No. of disulfide bond	0	0
No. of Pro in loop	10	12

Table 3-4. Structural features of LC-Est1C\* and Tm-EstAC

<sup>a</sup> Data from Ref. 81 for Tm-EstAC.

### 3-4. 考察

枝葉コンポストからメタゲノム法により単離された、N 末端に機能未知の ドメイン (LNTE) を持つ新規エステラーゼ LC-Est1 について解析を行った。LC-Est1 と LC-Est1C の Far-UV CD スペクトルや LC-Est1C\*の結晶構造より、LNTE は触媒ドメインのコンフォメーションには影響を及ぼさないことが示唆された。 LC-Est1 に比べて LC-Est1C の活性は約 60%低く、 $k_{cat}$  値も約 60%低いことから、 LNTE が加水分解効率の向上に寄与していることが示唆された。また  $T_{1/2}$  値は LC-Est1 よりも LC-Est1C の方が 3.3°C 低いため、LNTE が僅かに耐熱化にも寄与 していると考えられた。

LC-Est1 の LNTE と相同性が高く、その機能が知られているタンパク質はこ れまでに見つかっていない。今回の研究で、活性や安定性における役割は検討さ れたものの、LC-Est1 の全体構造は解かれていないため、LC-Est1 における LNTE の役割は未知な点が多い。Tm-EstA は Ig-like ドメインの欠損によりオリゴマー 形成能を失い、その活性や安定性も大きく低下する [81]。Tm-EstA は溶液中に おいて6量体で存在し、Tm-EstAの至適温度が95℃以上、100℃での半減期は 1.5 時間であることから、極めて熱安定な酵素である。一方で Tm-EstAC は単量 体として存在し、Tm-EstAの5%の活性しか示さず、その至適温度は60℃であ り、90℃での半減期が15分である。これらの結果より、Tm-EstAの Ig-like ドメ インは多量体化を誘導して活性や安定性を高める役割を果たしていると考えら れている。しかし、LC-Est1 の LNTE は Tm-EstA の Ig-like ドメインとは異なる 役割を持つと考えられる。なぜなら LC-Est1 と LC-Est1C はいずれも溶液中で単 量体として存在し、LC-Est1 における LNTE の欠損は、Tm-EstA における Ig-like ドメインの欠損ほど活性や安定性に影響を与えないためである。LC-Est1の LNTE は恐らく独立したドメインとして存在し、エステラーゼドメインとは弱い 相互作用しかしていないと考えられる。これらの相互作用を取り除くことによ り、LC-Estl を僅かに不安定化し、同時に活性部位のコンフォメーションを僅か に変えることにより、活性を低下させると予想される。本酵素が活性を示す基質 の発見、またそれに基づく活性や基質認識、安定性における LNTE の役割を調 べるためには、全体の結晶構造の解明が待たれる。

# 【総括】

耐熱性の高い新規セルラーゼと新規エステラーゼ/リパーゼの取得を目指し て、枝葉コンポストからメタゲノム法により10種類の新規セルラーゼ遺伝子と 6種類の新規エステラーゼ/リパーゼ遺伝子を取得した。その中でも耐熱性に優 れ、産業利用への応用が期待できる2種類の新規セルラーゼと、N末端に長い 伸長領域を有する新規エステラーゼを研究の対象とした。セルラーゼやエステ ラーゼの基質認識や触媒機能に必須な触媒ドメインの役割に関してはこれまで の研究でかなり明らかにされている。一方、付随するドメインやリンカー領域の 中にはその役割がまだ明らかにされていないものも多い。そこで本研究ではメ タゲノム法で単離した酵素が有する付随領域の役割を明らかにすることを目的 として構造機能解析を試みた。

第1章では、至適温度が95℃以上である RmCel12A と高いアミノ酸配列の 相同性を示すセルラーゼ LC-CelA を研究の対象とした。RmCel12A の N 末端 FL が安定性に寄与すると考えられたことから、FL を含んだ LC-CelA の結晶構造を 初めて解析した。その結果、FL の C 末端 2 残基 (Glu34、Pro35) が中心領域 (Leu72 – Thr74) と3つの水素結合を介して相互作用していることが明らかにな った。この水素結合が安定性に寄与するかどうかを調べるために、FL 欠損変異 体、E34A 変異体を構築し、その活性や安定性を解析した。すると、これら変異 体の活性は野生型とほぼ同程度有していたが、耐熱性が大幅に低下しており、高 い安定性に必要であることを明らかにした。また、野生型酵素の安定性が DTT 存在下では DTT 非存在下と比べて大きく低下することから、N 末端付近の分子 内ジスルフィド結合も耐熱化に大きく寄与することを明らかにした。今回発見 した N 末端残基の水素結合は LC-CelA と RmCel12A 以外では保存されていな い。従って、N 末端領域に水素結合を導入する方法は、他の GHF12 セルラーゼ の安定化法として有効であることが期待される。実際、GHF12 セルラーゼと構 造が類似している GHF11 キシラナーゼにおいて、N 末端のユニークな伸長配列 や N 末端付近ジスルフィド結合が安定化に寄与する例がいくつか報告されてい る。

第2章では、N末端に Ig-like ドメインを有するセルラーゼ LC-CelG の結晶 構造を決定し、諸特性を解析した。すでに結晶構造の決定されている3種類の 相同タンパク質と比較することにより、全体構造および触媒残基や基質結合ポ

ケットを形成する残基の構造には大きな違いがないことを明らかにした。一方、 金属イオンの結合部位には違いが見られた。これらの部位は、触媒機構には必須 ではないが、構造の安定化には寄与することが示唆された。Ig-like ドメインの役 割を調べるために、His-ΔIg-CelG と、ドメイン間の相互作用に関わる Gln40、 Asp99 をそれぞれ Ala に置換した変異体、および両方を Ala に置換した変異体を 構築し、諸特性を解析した。His-ΔIg-CelG の二次構造は His-LC-CelG と類似して いることが CD スペクトルから示唆された。しかし、His-ΔIg-CelG はほとんどす べて不溶性タンパク質として菌体内に蓄積し、可溶性タンパク質として蓄積し た His-ΔIg-CelG の活性は His-LC-CelG の 1/100 に減少した。また、その T<sub>1/2</sub> 値は His-LC-CelG より 6.3°C 低下した。一方、His-Q40A/D99A-CelG の T<sub>1/2</sub> 値は His-LC-CelGより 5.0℃ 低下したものの、大半が可溶性タンパク質として得られ、活 性も His-LC-CelG と同程度であった。LC-CelG の結晶構造によると、Ig-like ドメ インは活性部位や基質結合ポケットを形成する残基を有する長いループ領域と 相互作用している。従って、これらの結果より、Ig-like ドメインは分子内シャペ ロン機能を有しており上述の長いループ領域のフォールディングに必要である ことが示唆された。ただしGln40、Asp99の変異のみでは、この長いループ領域 のコンフォメーションを変化させるのに十分ではないと考えられる。GHF9 酵素 の中には LC-CelG のように N 末端に Ig-like ドメインを有するものの他に、C 末 端に Family 3 carbohydrate-binding module を有するもの、触媒ドメインのみで機 能するものが存在する。ゆえにこれらのドメインの有無による活性や基質結合、 安定化機構の違いを分子レベルで解き明かすことは大変興味深い。

第3章では、N末端に長い伸長領域 (LNTE) を持つ新規エステラーゼ LC-Est1の構造と機能の解析を行った。LC-Est1 と LC-Est1Cの Far-UV CD スペクト ルや LC-Est1C\*の結晶構造より、LNTE は触媒ドメインのフォールディングには 必要のないことが示唆された。LC-Est1 に比べて LC-Est1C の活性は約 60%低く、  $k_{cat}$  値も約 60%低いことから、LNTE が加水分解効率の向上に寄与することが示 唆された。また、LC-Est1Cの  $T_{1/2}$  値は LC-Est1 より 3.3℃ 低いので、LNTE は僅 かに安定化にも寄与していると考えられた。LC-Est1C と 29%のアミノ酸配列相 同性を示し、結晶構造が決定されている Tm-EstA は N 末端に Ig-like ドメインを 有するが、この Ig-like ドメインはオリゴマー化に必要で、Ig-like ドメインを除 去すると酵素活性や安定性は大きく低下することから、LNTE の役割を明らかにするた めに、LNTEを含むLC-Est1の結晶構造の解明が待たれる。

本研究を通して、メタゲノム法により身近な枝葉コンポストから、新規のセ ルラーゼとエステラーゼを単離し、結晶構造解析、諸特性解析を行うことに成功 した。このうち、LC-CelA と LC-CelG は高度な熱安定性を有することから産業 上有用であると期待される。一方、LC-Estl は機能未知のN末端伸長領域を有す ることから、更に構造や機能解析を進めることで、新規エステラーゼ/リパーゼ としての産業利用も期待できる。本研究では、触媒部位や基質結合部位から離れ た末端のリンカーやドメインの役割に焦点を当て、それらの活性や安定性にお ける役割について調べた。その結果、酵素機能上重要な領域からは大きく離れた 場所に位置するこれらのリンカーやドメインが活性や安定性に大きな影響を及 ぼすことを明らかにした。一方、LC-CelG の Ig-like ドメインや LC-Estl の LNTE などの役割を分子レベルで解明できれば、これらのドメインを利用して酵素の 機能を向上させる新たな方法を見つけ出すことができると期待される。

- 1. Steele, H.L., Jaeger, K.E., Daniel, R. and Streit, W.R. (2009) Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 25-37.
- 2. Uchiyama, T. and Miyazaki, K. (2009) Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 616-622.
- 3. Tuffin, M., Anderson, D., Heath, C. and Cowan, D.A. (2009) Metagenomic gene discovery: how far have we moved into novel sequence space? *Biotechnol. J.* **4**, 1671-1683.
- 4. Duan, C.J. and Feng, J.X. (2010) Mining metagenomes for novel cellulase genes. *Biotechnol. Lett.* **32**, 1765–1775.
- Simon, C. and Daniel, R. (2011) Metagenomic analyses: past and future trends. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1153-1161.
- 6. Iqbal, H.A., Feng, Z. and Brady, S.F. (2012) Biocatalysts and small molecule products from metagenomic studies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16**, 109-116.
- Kanaya, E., Sakabe, T., Nguyen, N.T., Koikeda, S., Koga, Y., Takano, K. and Kanaya, S. (2010) Cloning of the RNase H genes from a metagenomic DNA library: identification of a new type 1 RNase H without a typical active-site motif. *J. Appl. Microbiol.* 109, 974–983.
- Sulaiman, S., Yamato, S., Kanaya, E., Kim, J.J., Koga, Y., Takano, K. and Kanaya, S. (2011) Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate degrading activity from leaf-branch compost using a metagenomic approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1556-1562.
- Nguyen, TN., You, D.-J., Kanaya, E., Koga, Y. and Kanaya, S. (2013) Crystal structure of metagenome-derived LC9-RNase H1 with atypical DEDN active site motif. *FEBS Lett.* 587, 1418–1423.
- Nguyen, T.N., Angkawidjaja, C., Kanaya, E., Koga, Y., Takano, K. and Kanaya, S. (2012) Activity, stability, and structure of metagenome-derived LC11-RNase H1, a homolog of *Sulfolobus tokodaii* RNase H1. *Protein Sci.* 21, 553-561.
- Nguyen, T.N., You, D.-J., Matsumoto, H., Kanaya, E., Koga, Y. and Kanaya, S. (2013) Crystal structure of metagenome-derived LC11-RNase H1 in complex with RNA/DNA hybrid. *J. Struct. Biol.* 182, 144–154.

- 12. Sulaiman, S., You, D.-J., Kanaya, E., Koga, Y. and Kanaya, S. (2014) Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase. *Biochemistry* **53**, 1858–1869.
- 13. Wilson, D.B. (2009) Cellulases and biofuels. Curr. Opin. Biotechnol. 20, 295-299.
- 14. Lynd, L.R., van Zyl, W.H., McBride, J.E. and Laser, M. (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 577-583.
- 15. la Grange, D.C., den Haan, R. and van Zyl, W.H. (2010) Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 1195-1208.
- Yanase, S., Yamada, R., Kaneko, S., Noda, H., Hasunuma, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H. and Kondo, A. (2010) Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast. *Biotechnol. J.* 5, 449–455.
- Yamada, R., Nakatani, Y., Ogino, C. and Kondo, A. (2013) Efficient direct ethanol production from cellulose by cellulase- and cellodextrin transporter-coexpressing *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express* 3, 34.
- Hu, J., Arantes, V., Pribowo, A., Gourlay, K. and Saddler, J.N. (2014) Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. *Energy Environ. Sci.* 7, 2308–2315.
- 19. Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H. and Pretorius, I.S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol. *Mol. Biol. Rev.* **66**, 506–577.
- López-López, O., Cerdán, M.E. and Gonzalez-Siso, M.I. (2014) New extremophilic lipases and esterases from metagenomics. *Curr. Protein Pept. Sci.* 15, 445-455.
- 21. Akoh, C.C., Chang, S.W., Lee, G.C. and Shaw, J.F. (2007) Enzymatic approach to biodiesel production. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 8995-9005.
- 22. Holmquist, M. (2000) Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 209-235.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G. and Goldman, A. (1992) The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 5, 197-211.
- 24. Verger, R. (1997) 'Interfacial activation' of lipases, facts and artifacts. *Tibtech.* **15**, 32–38.
- 25. Bornscheuer, U.T. (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 73-81.

- Jochens, H., Hesseler, M., Stiba, K., Padhi, S.K., Kazlauskas, R.J. and Bornscheuer, U.T. (2011) Protein engineering of α/β-hydrolase fold enzymes. *Chembiochem.* 12, 1508-1517.
- 27. Bruins, M.E., Janssen, A.E. and Boom, R.M. (2001) Thermozymes and their applications: a review of recent literature and patents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **90**, 155–186.
- 28. Haki, G.D. and Rakshit, S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour. Technol.* **89**, 17–34.
- 29. Unsworth, L.D., van der Oost, J. and Koutsopoulos, S. (2007) Hyperthermophilic enzymes stability, activity and implementation strategies for high temperature applications. *FEBS J.* **274**, 4044–4056.
- Halldorsdottir, S., Thorolfsdottir, E.T., Spilliaert, R., Johansson, M., Thorbijarnardottir, S.H., Palsdottir, A., Hreggvidsson, G.O., Kristjansson, J.K., Holst, O. and Eggertsson, G. (1998) Cloning, sequencing and overexpression of a *Rhodothermus marinus* gene encoding a thermostable cellulase of glycosyl hydrolase Family 12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 277–284.
- 31. Crennell, S.J., Hreggvidsson, G.O. and Nordberg Karlsson, E. (2002) The structure of *Rhodothermus marinus* Cel12A, a highly thermostable family 12 endoglucanase, at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **320**, 883–897.
- 32. Crennell, S.J., Cook, D., Minns, A., Svergun, D., Andersen, R.L. and Nordberg Karlsson, E. (2006) Dimerisation and an increase in active site aromatic groups as adaptations to high temperatures: X-ray solution scattering and substrate-bound crystal structures of *Rhodothermus marinus* endoglucanase Cel12A. *J. Mol. Biol.* 356, 57–71.
- Jo, W.S., Bae, S.H., Choi, S.Y., Park, S.D., Yoo, Y.B. and Park, S.C. (2010) Development of detection methods for cellulolytic activity of *Auricularia auriculajudae*. *Mycobiology* 38, 74–77.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- 35. Goodwin, T.W. and Morton, R.A. (1946) The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Biochem. J.* **40**, 628-632.
- 36. Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W.E. and Burton, A.L. (1960) Measurement of

carboxymethylcellulase activity. Anal. Biochem. 2, 127–132.

- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307–326.
- 38. Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763.
- 39. Vagin, A. and Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25.
- Langer, G., Cohen, S.X., Lamzin, V.S. and Perrakis, A. (2008) Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat. Protoc.* 3, 1171–1179.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. and Dodson, E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, 240–255.
- 42. Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132.
- Gilkes, N.R., Henrlssat, B., Kilburn, D.G., Miller Jr., R.C. and Warren, R.A.J. (1991) Domains in microbial β-l,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* 55, 303–315.
- 44. Wicher, K.B., Abou-Hachem, M., Halldórsdóttir, S., Thorbjarnadóttir, S.H., Eggertsson, G., Hreggvidsson, G.O., Nordberg Karlsson, E. and Holst, O. (2001) Deletion of a cytotoxic, N-terminal putative signal peptide results in a significant increase in production yields in Escherichia coli and improved specific activity of Cel12A from *Rhodothermus marinus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 578–584.
- 45. Pace, C.N., Scholtz, J.M. and Grimsley, G.R. (2014) Forces stabilizing proteins. *FEBS Lett.* **588**, 2177–2184.
- Pace, C.N., Grimsley, G.R., Thomson, J.A. and Barnett, B.J. (1988) Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 263, 11820–11825.
- Piatek, R., Bruz´dziak, P., Wojciechowski, M., Zalewska-Piatek, B.M. and Kur, J. (2010) The noncanonical disulfide bond as the important stabilizing element of the immunoglobulin fold of the Dr fimbrial DraE subunit. *Biochemistry* 49, 1460–1468.
- 48. Schulenburg, C., Weininger, U., Neumann, P., Meiselbach, H., Stubbs, M.T., Sticht,

H., Balbach, J., Ulbrich-Hofmann, R. and Arnold, U. (2010) Impact of the C-terminal disulfide bond on the folding and stability of onconase. *ChemBioChem* **11**, 978–986.

- Mason, J.M., Bendall, D.S., Howe, C.J. and Worrall, J.A.R. (2012) The role of a disulfide bridge in the stability and folding kinetics of *Arabidopsis thaliana* cytochrome c6A. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 311–318.
- Sandgren, M., Gualfetti, P.J., Shaw, A., Gross, L.S., Saldajeno, M., Day, A.G., Jones, T.A. and Mitchinson, C. (2003) Comparison of family 12 glycoside hydrolases and recruited substitutions important for thermal stability. *Protein Sci.* 12, 848–860.
- Cheng, Y.S., Chen, C.C., Huang, C.H., Ko, T.P., Luo, W., Huang, J.W., Liu, J.R. and Guo, R.T. (2014) Structural analysis of a glycoside hydrolase family 11 xylanase from *Neocallimastix patriciarum*: insights into the molecular basis of a thermophilic enzyme. *J. Biol. Chem.* 289, 11020–11028.
- Dumon, C., Varvak, A., Wall, M.A., Flint, J.E., Lewis, R.J., Lakey, J.H., Morland, C., Luginbühl, P., Healey, S., Todaro, T., DeSantis, G., Sun, M., Parra-Gessert, L., Tan, X., Weiner, D.P. and Gilbert, H.J. (2008) Engineering hyperthermostability into a GH11 xylanase is mediated by subtle changes to protein structure. *J. Biol. Chem.* 283, 22557–22564.
- Fenel, F., Leisola, M., Jänis, J. and Turunen, O. (2004) A de novo designed Nterminal disulphide bridge stabilizes the *Trichoderma reesei* endo-1,4-bxylanase II. *J. Biotechnol.* 108, 137–143.
- 54. Jänis, J., Turunen, O., Leisola, M., Derrick, P.J., Rouvinen, J. and Vainiotalo, P. (2004) Characterization of mutant xylanases using fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: stabilizing contributions of disulfide bridges and Nterminal extensions. *Biochemistry* 43, 9556–9566.
- 55. Wang, Y., Fu, Z., Huang, H., Zhang, H., Yao, B., Xiong, H. and Turunen, O. (2012) Improved thermal performance of *Thermomyces lanuginosus* GH11 xylanase by engineering of an N-terminal disulfide bridge. *Bioresour. Technol.* **112**, 275–279.
- 56. Li, H., Kankaanpää, A., Xiong, H., Hummel, M., Sixta, H., Ojamo, H. and Turunen, O. (2013) Thermostabilization of extremophilic *Dictyoglomus thermophilum* GH11 xylanase by an N-terminal disulfide bridge and the effect of ionic liquid [emim] OAc on the enzymatic performance. *Enzyme Microb. Technol.* 53, 414–419.
- 57. Tishkov, V.I., Gusakov, A.V., Cherkashina, A.S. and Sinitsyn, A.P. (2013)

Engineering the pH-optimum of activity of the GH12 family endoglucanase by sitedirected mutagenesis. *Biochimie* **95**, 1704–1710.

- Sandgren, M., Ståhlberg, J. and Mitchinson, C. (2005) Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 89, 246–291.
- 59. Parsiegla, G., Belaïch, A., Belaïch, J.P. and Haser, R. (2002) Crystal structure of the cellulase Cel9M enlightens structure/function relationships of the variable catalytic modules in glycoside hydrolases. *Biochemistry* **41**, 11134-11142.
- 60. Kesavulu, M.M., Tsai, J.Y., Lee, H.L., Liang, P.H. and Hsiao, C.D. (2012) Structure of the catalytic domain of the *Clostridium thermocellum* cellulase CelT. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 310-320.
- 61. Arimori, T., Ito, A., Nakazawa, M., Ueda, M. and Tamada, T. (2013) Crystal structure of endo-1,4-β-glucanase from *Eisenia fetida*. *J. Synchrotron Radiat*. **20**, 884-889.
- 62. Khademi, S., Guarino, L.A., Watanabe, H., Tokuda, G. and Meyer, E.F. (2002) Structure of an endoglucanase from termite, *Nasutitermes takasagoensis. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**, 653-659.
- Pereira, J.H., Sapra, R., Volponi, J.V., Kozina, C.L., Simmons, B. and Adams, P.D. (2009) Structure of endoglucanase Cel9A from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 65, 744-750.
- 64. Chauvaux, S., Souchon, H., Alzari, P.M., Chariot, P. and Beguin, P. (1995) Structural and functional analysis of the metal-binding sites of *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelD. *J. Biol. Chem.* **270**, 9757-62.
- Schubot, F.D., Kataeva, I.A., Chang, J., Shah, A.K., Ljungdahl, L.G., Rose, J.P. and Wang, B.C. (2004) Structural basis for the exocellulase activity of the cellobiohydrolase CbhA from *Clostridium thermocellum*. *Biochemistry* 43, 1163-1170.
- Mandelman, D., Belaich, A., Belaich, J.P., Aghajari, N., Driguez, H. and Haser, R. (2003) X-Ray crystal structure of the multidomain endoglucanase Cel9G from *Clostridium cellulolyticum* complexed with natural and synthetic cello-oligosaccharides. *J. Bacteriol.* 185, 4127-4135.
- 67. Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D.B. and Karplus, P.A. (1997) Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 810-818.

- Zhou, W., Irwin, D.C., Escovar-Kousen, J. and Wilson, D.B. (2004) Kinetic studies of *Thermobifida fusca* Cel9A active site mutant enzymes. *Biochemistry* 43, 9655-9663.
- Kataeva, I.A., Uversky, V.N., Brewer, J.M., Schubot, F., Rose, J.P., Wang, B.C. and Ljungdahl, L.G. (2004) Interactions between immunoglobulin-like and catalytic modules in *Clostridium thermocellum* cellulosomal cellobiohydrolase CbhA. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 759–769.
- Eckert, K., Vigouroux, A., Lo Leggio, L. and Moréra, S. (2009) Crystal structures of *A. acidocaldarius* endoglucanase Cel9A in complex with cello-oligosaccharides: strong -1 and -2 subsites mimic cellobiohydrolase activity. *J. Mol. Biol.* **394**, 61–70.
- Eckert, K., Zielinski, F., Lo Leggio, L. and Schneider, E. (2002) Gene cloning, sequencing, and characterization of a family 9 endoglucanase (CelA) with an unusual pattern of activity from the thermoacidophile *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC27009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 428–436.
- 72. Liu, H., Pereira, J.H., Adams, P.D., Sapra, R., Simmons, B.A. and Sale, K.L. (2010) Molecular simulations provide new insights into the role of the accessory immunoglobulin-like domain of Cel9A. *FEBS Lett.* **584**, 3431–3435.
- 73. Ueda, M., Ito, A., Nakazawa, M., Miyatake, K., Sakaguchi, M. and Inouye, K. (2014) Cloning and expression of the cold-adapted endo-1,4-β-glucanase gene from *Eisenia fetida*. *Carbohydr. Polym.* **101**, 511–516.
- Kurokawa, J., Hemjinda, E., Arai, T., Kimura, T., Sakka, K. and Ohmiya, K. (2002) *Clostridium thermocellum* cellulase CelT, a family 9 endoglucanase without an Iglike domain or family 3c carbohydrate-binding module. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 455–461.
- Mingardon, F., Bagert, J.D., Maisonnier, C., Trudeau, D.L. and Arnold, F.H. (2011) Comparison of family 9 cellulases from mesophilic and thermophilic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1436-1442.
- 76. Hendrickson, W.A., Horton, J.R. and LeMaster, D.M. (1990) Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J.* 9, 1665-1672.
- 77. Pape, T. and Schneider, T.R. (2004) HKL2MAP: a graphical user interface for

macromolecular phasing with SHELX programs. J. Appl. Crystallogr. 37, 843-844.

- 78. Sheldrick, G.M. (2008) A short history of SHELX. Acta Crystallogr. A Found Crystallogr. 64, 112–122.
- Arpigny, J.L. and Jaeger, K.E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343, 177-183.
- Challacombe, J.F., Eichorst, S.A., Hauser, L., Land, M., Xie, G. and Kuske, C.R. (2011) Biological consequences of ancient gene acquisition and duplication in the large genome of *Candidatus Solibacter usitatus* Ellin6076. *PLoS ONE* 6, e24882.
- Levisson, M., Sun, L., Hendriks, S., Swinkels, P., Akveld, T., Bultema, J.B., Barendregt, A., van den Heuvel, R.H., Dijkstra, B.W., van der Oost, J. and Kengen, S.W. (2009) Crystal structure and biochemical properties of a novel thermostable esterase containing an immunoglobulin-like domain. *J. Mol. Biol.* 385, 949-962.
- Karshikoff, A. and Ladenstein, R. (2001) Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a "traffic rule" for hot roads. *Trends Biochem. Sci.* 26, 550–556.
- Shirley, B.A., Stanssens, P., Hahn, U. and Pace, C.N. (1992) Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1. *Biochemistry* 31, 725-732.
- Watanabe, K., Chishiro, K., Kitamura, K. and Suzuki, Y. (1991) Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006. J. Biol. Chem. 266, 24287–24294.
- Boutz, D.R., Cascio, D., Whitelegge, J., Perry, L.J. and Yeates, T.O. (2007) Discovery of a thermophilic protein complex stabilized by topologically interlinked chains. *J. Mol. Biol.* 368, 1332–1344.
- Pace, C.N., Fu, H., Fryar, K.L., Landua, J., Trevino, S.R., Shirley, B.A., Hendricks, M.M., Iimura, S., Gajiwala, K., Scholtz, J.M. and Grimsley, G.R. (2011) Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *J. Mol. Biol.* 408, 514–528.
- You, D.J., Chon, H., Koga, Y., Takano, K. and Kanaya, S. (2007) Crystal structure of type 1 ribonuclease H from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*: role of arginine 118 and C-terminal anchoring. *Biochemistry* 46, 11494–11503.

本研究に関する論文

- <u>Okano, H.</u>, Ozaki, M., Kanaya, E., Kim, JJ., Angkawidjaja, C., Koga, Y. and Kanaya, S. (2014) Structure and stability of metagenome-derived glycoside hydrolase family 12 cellulase (LC-CelA) a homolog of Cel12A from *Rhodothermus marinus*. *FEBS Open Bio* 4, 936–946.
- Okano, H., Hong, X., Kanaya, E., Angkawidjaja, C. and Kanaya, S. (2015) Structural and biochemical characterization of a metagenome-derived esterase with a long Nterminal extension. *Protein Sci.* 24, 93-104.
- Okano, H., Ozaki, M., Kanaya, E., Angkawidjaja, C. and Kanaya, S. (2015) Structure, activity and stability of metagenome-derived glycoside hydrolase family 9 endoglucanase with an N-terminal Ig-like domain. *Protein Sci.*, in press. doi: 10.1002/pro.2632.

### 謝辞

本研究は、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 金谷茂則教授の もとにおいて行われたものであり、先生より多大なる御指導、御鞭撻を賜りまし たことを心より感謝致します。

本研究に際し、暖かい激励と御指導を賜りました大阪大学大学院工学研究 科生命先端工学専攻 古賀雄一准教授、Clement Angkawidjaja 特任助教、京都府 立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 高野和文教授に謹んで御 礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、有益な御助言を賜りました大阪大学大学院工 学研究科生命先端工学専攻 福住俊一教授、菊地和也教授に深く感謝致します。 日々様々な便宜を図って戴きました松本玲子女史、森尾雅江女史に深く感謝致 します。また、6年間の研究生活において様々な面で温かい御配慮を戴いた金谷 研究室の皆様に感謝致します。

最後に、在学中も様々な面で支援して下さった家族の皆様に深く感謝致し ます。

#### 岡野 啓志