

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (岡野 啓志)

論文題名

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

論文内容の要旨

本研究では、新規セルラーゼやエステラーゼ/リパーゼを枝葉コンポストからメタゲノム法により単離し、それぞれの構造と、活性や安定性の特徴を調べた。第1章では、取得された10種類の新規セルラーゼのうち、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。結晶構造解析の結果、N末端リンカー領域 (FL) のC末端残基 (Glu34、Pro35) が中心領域と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。そこでFL欠損変異体、E34A変異体を構築し、活性や安定性を測定した結果、FLは酵素活性には必要ないが、耐熱化に寄与してい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。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。至適温度は70℃であり、その結晶構造は3種類の相同タンパク質と類似していた。Ig-likeドメインの欠損変異体は、酵素活性が著しく低下し、耐熱性も低下した。一方Ig-likeドメインと触媒ドメイン間に形成される、Gln40が形成する水素結合と、Asp99-Arg545間の塩橋は、相同タンパク質にも保存されており、これらは活性には影響しないが、協調的に耐熱化に寄与することを明らかにした。第3章では、取得された6種類の新規エステラーゼ/リパーゼのうち、N末端に長い伸長領域 (LNTE) を持つエステラーゼLC-Est1の構造と機能の解析を行った。Far-UV CDスペクトルやLNTE欠損変異体の結晶構造解析より、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。一方野生型とLNTE欠損変異体の諸特性の比較により、LNTEが加水分解効率の向上に大きく寄与し、耐熱性にも僅かに寄与することを明らかにした。

以上のように、本論文では、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-Est1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、新規エステラーゼとしての産業利用も期待できる。また、LC-CelAのFL、LC-CelGのIg-likeドメイン、LC-Est1のLNTEは、いずれも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リンカーやドメインであるが、これら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。これらを利用することにより、酵素機能を向上させる新たな手法の開発に繋がると期待される。本研究を通して、枝葉コンポスト由来の新規酵素の諸特性や構造を解析することにより、セルラーゼやエステラーゼの構造と機能について新たな知見を得た。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (岡野 啓志)			
論文審査担当者	(職)	氏	名
	主 査	教授	金谷 茂則
	副 査	教授	福住 俊一
	副 査	教授	菊地 和也
	副 査	教授	高井 義造
	副 査	教授	渡部 平司
	副 査	教授	伊東 忍
	副 査	教授	兼松 泰男

論文審査の結果の要旨

本論文は、枝葉コンポストからメタゲノム法により単離した新規セルラーゼ (LC-CelA、LC-CelG)、新規エステラーゼ (LC-Est1) の構造、安定性、活性について研究したものであり、以下に示すように、序論、本論 3 章、および総括から構成されている。序論では、セルラーゼやエステラーゼ/リパーゼの分類、構造、触媒機構、基質認識機構などに関するこれまでの研究をまとめるとともに、本研究の目的と意義を述べている。第 1 章では、枝葉コンポストからメタゲノム法により単離した 10 種類の新規セルラーゼのうち、LC-CelA は RmCel12A と高いアミノ酸配列の相同性を示し、RmCel12A 同様、極めて高い耐熱性を示すことを明らかにしている。また、LC-CelA の結晶構造を決定することにより、N 末端リンカー領域 (FL) の C 末端 2 残基 (Glu34、Pro35) が中心領域と 3 つの水素結合を介して相互作用していることを明らかにしている。さらに、FL 欠損変異体、E34A 変異体を構築し、活性や安定性を測定することにより、FL は酵素活性には必要ないが、耐熱化に寄与することを明らかにしている。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 の結晶構造を決定することにより、その結晶構造は 3 種類の相同タンパク質の構造と類似していることを明らかにしている。また、LC-CelG は至適温度が 70°C と、高い耐熱性を示すことを明らかにしている。さらに、Ig-like ドメインの欠損変異体や部位特異的変異体を構築し、諸特性を解析することにより、Ig-like ドメインは本酵素の活性や安定性に重要であること、Ig-like ドメインと触媒ドメイン間に形成される水素結合や塩橋は、活性には影響しないが、耐熱化に寄与することを明らかにしている。第 3 章では、枝葉コンポストからメタゲノム法により単離した 6 種類の新規エステラーゼ/リパーゼのうち、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うことにより、LNTE は触媒ドメインのフォールディングには必要ないが加水分解効率の向上に大きく寄与すること、耐熱性にも僅かに寄与することを明らかにしている。

以上のように、本研究では、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ている。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-Est1 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、新規エステラーゼとしての産業利用も期待できる。また、LC-CelA の FL、LC-CelG の Ig-like ドメイン、LC-Est1 の LNTE は、いずれも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リンカーやドメインであるが、これら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ている。これらを利用することにより、酵素機能を向上させる新たな手法の開発に繋がると期待される。本研究を通して、セルラーゼやエステラーゼの構造と機能について新たな知見が得られた。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。