

氏名	いし はら ひろ き 石原宏基
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	甲第395号
学位授与年月日	平成17年 9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	粘度法による測定で反応生成物の蓄積によりエンド分解が顕著に促進されるアミスギタケ由来新規エンドセルラーゼの酵素学的、遺伝子工学的研究 (Enzymology and genetic engineering of novel <i>Polyporus arcularius</i> endocellulase that is enhanced the viscometric endocellulase activity by the reaction products such as cellobiose and cellooligosaccharides)
学位論文審査委員	(主査) 北本豊 (副査) 滝本晃一 時本景亮 松田英幸 会見忠則

学位論文の内容の要旨

アミスギタケ (*Polyporus arcularius*) は、サルノコシカケ科に属する木材腐朽担子菌で、4種類のカルボキシメチルセルラーゼ(CMCアーゼ)を産生する。そのうち CMC アーゼ I, II および IIIa を精製し、粘度法による各セルラーゼ成分の特性の解明を行った。その結果、酵素反応生成物の蓄積によりエンド分解が数倍に促進される新規な酵素特性を示した CMC アーゼ IIIa について、その遺伝子(*cel3A*)をコードするゲノム DNA および cDNA についてシーケンスし、その特性について調査した。

CMC アーゼ I, II および IIIa の分子質量は、それぞれ 39.1 kDa, 36.3 kDa および 24.3 kDa であった。CMC アーゼ I および II の反応液にセロビオースおよびセロオリゴ糖を添加すると、粘度法で測定したエンドセルラーゼ活性が阻害された。一方、CMC アーゼ IIIa の活性は、セロビオースあるいはセロオリゴ糖の添加濃度に比例して増大した。CMC アーゼ IIIa の活性促進はセロビオースの添加がもっとも効果的で、セロオリゴ糖では糖鎖が長くなるほど効果が低減した。CMC アーゼ IIIa 活性は、セロビオース 20 mM の添加により、無添加の 500%以上を示した。CMC アーゼ I および II のセロビオース添加による阻害は、基質と反応生成物間の拮抗阻害によると推定された。一方、CMC アーゼ IIIa の活性促進から本酵素には活性部位以外にもう1つ反応生成物が結合する部位の存在が示唆された。

精製 CMC アーゼ IIIa の部分的アミノ酸配列から PCR プライマーを設計し、CMC アーゼ

IIIa をコードする遺伝子(*cel3A*)の増幅を行い、その塩基配列を決定した。*cel3A* をコードする領域は1329 bpから構成され、243 アミノ酸のポリペプチドをコードしていることがわかった。ゲノムサザンハイブリダイゼーションにより、*cel3A* は半数体ゲノム内で単一コピー遺伝子であることが判明した。

cel3A タンパク質は細胞外タンパク質と推定された。シグナルペプチドを除去した後の *cel3A* タンパク質の分子質量は 24,270 Da と推計され、*P. arcularius* から精製した CMC アーゼ IIIa と同一であると結論した。

cel3A タンパク質は *Aspergillus aculeatus* の FI-CMCCase などと類似点があり、糸状菌のファミリー12に属するグリコシルヒドロラーゼにおいて活性部位に関係する6個のコンセンサスボックスが CMC アーゼ IIIa にも存在した。これらのことから、*cel3A* タンパク質はエンドグルカナーゼであり、ファミリー12 のグリコシルヒドロラーゼの1つであると結論した。

大腸菌での *cel3A* cDNA の発現を試みたところ、25°C、4時間、1 mM IPTG の誘導下で、CMC アーゼ活性が検出された。また、*cel3A* cDNA の発現は、糖鎖付加のない蛋白質の状態でも活性を有することを証明した。さらに、粘度法による測定で、CMC アーゼ活性は、セロビオースの添加により数倍に増大した。このことから、*rCel3A* は、ネイティブな CMC アーゼ IIIa とほとんど同じ酵素学的特性を有していることが確認された。

以上の研究によって、著者は、従来の報告では見られない粘度法による測定で反応生成物の蓄積によりエンド分解が顕著に促進されるアミスギタケ由来の新規なエンドセルラーゼを発見するに至った。

論文審査の結果の要旨

アミスギタケ (*Polyporus arcularius*) は、サルノコシカケ科に属する木材腐朽担子菌で、4種類のカルボキシメチルセルラーゼ(CMC アーゼ)を産生する。そのうち CMC アーゼ I, II および IIIa を精製し、粘度法による各セルラーゼ成分の特性の解明を行った。その結果、酵素反応生成物の蓄積によりエンド分解が数倍に促進される新規な酵素特性を示した CMC アーゼ IIIa について、その遺伝子(*cel3A*)をコードするゲノム DNA および cDNA についてシーケンスし、その特性について調査した。CMC アーゼ I, II および IIIa の分子質量は、それぞれ 39.1 kDa, 36.3 kDa および 24.3 kDa であった。CMC アーゼ I および II の反応液にセロビオースおよびセロオリゴ糖を添加すると、粘度法で測定したエンドセルラーゼ活性が阻害された。一方、CMC アーゼ IIIa の活性は、セロビオースあるいはセロオリゴ糖の添加濃度に比例して増大した。CMC アーゼ IIIa の活性促進はセロビオースの添加がもっとも効果的で、セロオリゴ糖では糖鎖が長くなるほど効果が低減した。CMC アーゼ IIIa 活性は、セロビオース 20 mM の添加により、無添加の 500% 以上を示した。CMC アーゼ I および II のセロビオース添加による阻害は、基質と反応生成物間の拮抗阻害によると推定された。一方、CMC アーゼ IIIa の活性促進から本酵素には活性部位以

外にもう1つ反応生成物が結合する部位の存在が示唆された。

精製 CMC アーゼ IIIa の部分的アミノ酸配列から PCR プライマーを設計し、CMC アーゼ IIIa をコードする遺伝子(*cel3A*)の増幅を行い、その塩基配列を決定した。*cel3A* をコードする領域は 967bp から構成され、243 アミノ酸のポリペプチドをコードしていることがわかった。ゲノムサザンハイブリダイゼーションにより、*cel3A* は半数体ゲノム内で単一コピー遺伝子であることが判明した。

Cel3A タンパク質は細胞外タンパク質と推定された。シグナルペプチドを除去した後の *Cel3A* タンパク質の分子質量は 24,270 Da と推計され、*P. arcularius* から精製した CMC アーゼ IIIa と同一であると結論した。*Cel3A* タンパク質は *Aspergillus aculeatus* の FI-CMCase などと類似点があり糸状菌のファミリー12 に属するグリコシルヒドロラーゼにおいて活性部位に関係する6個のコンセンサスボックスが CMC アーゼ IIIa にも存在した。これらのことから、*Cel3A* タンパク質はエンドグルカナーゼであり、ファミリー12のグリコシルヒドロラーゼの1つであると結論した。

大腸菌での *cel3A* cDNA の発現を試みたところ、25℃、4時間、1 mM IPTG の誘導下で、CMC アーゼ活性が検出された。また、*cel3A* cDNA の発現は、糖鎖付加のない蛋白質の状態でも活性を有することを証明した。さらに、粘度法による測定で、CMC アーゼ活性は、セロビオースの添加により数倍に増大した。このことから、*rCel3A* は、ネイティブな CMC アーゼ IIIa とほとんど同じ酵素学的特性を有していることが確認された。

本研究は、従来の報告ではほとんど見られない粘度法による測定法を担子菌のセルラーゼの研究に適用し、加水分解反応生成物、すなわちセロビオースやセロオリゴ糖の蓄積によりエンド分解が顕著に促進されるアミスギタケ由来の新規な機能のエンドセルラーゼを発見し、その酵素学および遺伝子工学的研究手法を適用してエンドセルラーゼに関する全く新規な知見を得たものであり、学位論文として十分価値を有するものと判定した。