

生物機能応用科学専攻

氏名	荒井 隆益
学位記番号	生博 甲第 138 号
学位記授与の日付け	平成 15 年 3 月 25 日
学位論文題目	<i>Clostridium thermocellum</i> が生産する 2 種のマルチドメインセルラーゼに関する研究
論文審査委員	主査 教授・大宮 邦雄 教授・荒木 利芳 教授・田口 寛 助教授・栗冠 和郎 助教授・木村 哲也 信州大学工学部 教授・神田 鷹久

要 旨

現在までに多数のセルラーゼ遺伝子がクローニングされ、それらにコードされる遺伝子産物の酵素特性や構造などについても明らかにされている。しかし、これらの酵素の結晶性セルロースに対する活性は微弱であり、バイオマス有効利用にセルラーゼを用いるためには新たに活性の強いセルラーゼの探索や詳細なセルラーゼの特性解析が必要である。

本研究はマルチドメインから成る 2 種のセルラーゼの特性解析の成果をとりまとめたものである。

*C. thermocellum*のエンドグルカナーゼ*celJ*遺伝子の下流に存在する新規セルラーゼ遺伝子*celQ*は、2130bp からなり、アミノ酸 710、分子量 79,809 のタンパク質をコードしていた。相同性検索から推定される酵素 CelQ は、N 末端側から糖質分解酵素ファミリー 9 に属する触媒ドメイン、ファミリー 3c の糖質結合モジュール (CBM)、ドックリンドメインが存在していた。ドックリンを除いた酵素 (CelQ Δ doc) を大腸菌で発現させ、精製した。CelQ Δ doc は、カルボキシメチルセルロース (CMC)、大麦 β -グルカンに対して強い活性を示した。CMC を基質とした場合の K_m は 3.3mg/ml、 V_{max} は 235 μ mol/min/mg であった。CelQ のセロオリゴ糖に対する作用を調べた結果、主要分解産物としてグルコース、セロビオースを生じた。CelQ Δ doc を作用させた時の CMC 溶液の粘度を測定した結果、生成還元糖量に対する粘度低下率は、*C. thermocellum*由来のエンドグルカナーゼ CelC とほぼ同じであった。以上の結果、CelQ がエン

ド型の酵素であると結論づけた。ウェスタンブロット解析の結果 CelQ は、セルロソームの構成成分であることがわかった。CBM を CelQ から除去し触媒ドメイン (CD) のみを発現し、CD 酵素活性を測定したところ、CelQ Δ doc の 1000 分の 1 にまで低下した。また、CBM のみを単独で発現させたところ、このタンパク質は基質に吸着しなかった。したがって CelQ では、触媒ドメインと CBM が一体となって 1 つの触媒活性を示すと考えられた。

celJ 遺伝子の塩基配列はすでに決定されており、それによりコードされている酵素 CelJ は、N 末端側からシグナルペプチド、ファミリー 30CBM (CBM30)、Ig-like domain (Ig)、ファミリー 9 (CD9)、ファミリー 44 (CD44) の 2 種類の触媒ドメイン、ドックリンドメイン、機能不明 (UD) ドメインから成る。CBM30 の機能を明らかにするとともに、ファミリー 9 触媒ドメインの酵素特性を調べた。

CBM から CD9、Ig から CD9、CD9、CBM から Ig、CBM 各領域から成るタンパク質それぞれを CBM30-Ig-CD9、Ig-CD9、CD9、CBM30-Ig、CBM30 とし、それらが大腸菌で発現させ、精製を行った。

CBM30-Ig-CD9 は、CMC、リケナン、大麦 β -グルカンに対して強い活性を示した。CBM30-Ig-CD9 のセロオリゴ糖に対する作用を調べた結果、最終分解産物としてセロビオースと少量のセロトリオースを生じた。CBM30-Ig-CD9 を作用させた時の CMC 溶液の粘度を測定した結果、生成還元糖量に対する粘度低下率は、

C. thermocellum CelC と比べて少なかった。以上のことから CBM30-Ig-CD9 は典型的なエンドグルカナーゼとは異なるものと考えられた。CBM を欠いた Ig-CD9, CD9 の酵素活性を測定した結果、わずかな活性しか示さなかった。この結果 CelJ のファミリー9 触媒ドメインにおいても CelQ と同様 CBM が酵素活性に不可欠であることが分かった。

CBM30 の不溶性多糖, 可溶性多糖に対する親和性を調べた。CBM30 は, 不溶性セルロース, 可溶性セルロース共に親和性を示した。この他, リケナン, バーレイb-グルカンに対して親和性を示したが, キシラン, キチン, アガロースに対しては親和性を示さなかった。CBM30 の可溶性オリゴ糖に対する結合特性を VP-ITC titration

calorimeter を使用し定量的に解析した。CBM30 は, セロペンタオース, セロヘキサオースに親和性を示し, それぞれのオリゴ糖に対する結合定数は, 2.3×10^4 , 8.2×10^4 であった。CBM30 は, 不溶性や可溶性セルロース, b-1,3,-1,4 結合から構成されるリケナンや大麦グルカンなど幅広い基質に親和性を示した。これは, 隣接するファミリー9 触媒ドメインの基質特異性と一致しており, CBM30 の存在は, 触媒ドメインの活性を強めていると考えられた。

以上の研究によってファミリー9 触媒ドメインの触媒作用に, CBM が不可欠であることが明らかになった。また, ファミリー30CBM の詳細な機能を明らかにした。

生物機能応用科学専攻

氏名	川浦 知子
学位記番号	生博 甲第 139 号
学位記授与の日付け	平成 15 年 3 月 25 日
学位論文題目	バクテリオファージ ϕ X174 スパイクタンパク質 G による LPS 認識機構に関する研究
論文審査委員	主査 教授・西川 司朗 教授・古市 幸生 教授・田中 晶善 助教授・稲垣 穰 講師・苅田 修一

要 旨

小さな正 20 面体ウイルスであるバクテリオファージ ϕ X174 は, 一本鎖環状 DNA と F, G, H, J の 4 種類のタンパク質から構成される, 最も単純なファージの一つである。正 20 面体の各頂点に存在する 5 つの G タンパク質と 1 つの H タンパク質で構成されるスパイクと呼ばれる突起を持っている。 ϕ X174 は大腸菌 C 株などの腸内細菌科のラフ型株のうち, 菌体を覆うリポ多糖 (LPS) が完全な R-コア糖鎖を持つ Ra 株を宿主としており, 感染の際には前述のスパイク部分で細胞表面の LPS をレセプターとして認識し, それがスイッチとなってカプシドの変形を起こし, DNA を放出すると考えられている。本研究では, ϕ X174 の宿主認識における G タンパク質の機能とレセプター側の LPS の構造的な要請について, さまざまな検討を行った。得られた結果を

総合的に考察することにより, タンパク質による糖鎖並びに糖脂質認識の一機構が分子レベルで解明を進めた。

まず, G タンパク質の LPS 結合能について検討した。G タンパク質の N 末端にヒスチジンタグを持つ融合タンパク質 (HisG) を調製し, 2 段階のクロマトグラフィーにより電気泳動上で単一のバンドを示すタンパク質を得た。この HisG とファージ宿主菌株あるいは非宿主菌株由来の LPS との結合能を, 酵素リンク法および蛍光滴定法を用いて確認したところ, HisG は, 宿主菌株 LPS と特異的に結合することが明らかになった。

次に, LPS 構造中のどの部分が HisG の認識に重要かを調べるため, 親水性の R-コア糖鎖の長さが異なる各種の LPS, および大腸菌 C 株 LPS を部分分解して疎水性の脂肪酸鎖を除去した脱アシル誘導体を用いて, LPS の部分構造に対する要請を検討した。HisG の蛍光