

氏 名	たまらーと あーちやら THUMARAT USCHARA
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 6 2 7 号
学位授与の日付	平成 24 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	Biochemical, genetic and structural analysis of cutinases from <i>Thermobifida alba</i> AHK119 (堆肥由来好熱性放線菌 <i>Thermobifida alba</i> AHK119 由来のクチナーゼの生化学的、分子生物学的及び構造解析)
審 査 委 員	(主査)教授 鈴木秀之 教授 伊倉宏司 教授 山口政光 特任教授 *河合富佐子

論文内容の要旨

本論文はポリエチレンテレフタレートに近い構造を有するいわば改変ポリエチレンテレフタレートを分解できる堆肥由来の放線菌 *Thermobifida alba* AHK119 の分解酵素に関する研究である。分解酵素をコードすると思われる遺伝子 *est119* をクローニングし、様々なベクターと大腸菌ホストで発現を試みた結果、pQE80L と *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) をそれぞれベクターとホストとしたときに、可溶性活性酵素として発現させることができた。発現酵素は化学合成された脂肪酸及び脂肪酸-芳香族ポリエステル類を広く基質とするとともに、ポリ乳酸にも活性を示すポリエステル分解酵素であることを確認した。モデル基質である *p*-nitrophenyl acyl esters に対する基質特異性などから、本酵素はリパーゼファミリーの中のクチナーゼグループに属する酵素であると考えられる。アミノ酸配列に基づく 3 次元モデリングの結果もクチナーゼタイプの特徴を示した。本酵素は高濃度の Ca^{2+} で活性化され、耐熱性が増加した。これまで、金属イオンがこの種の酵素を活性化させることは知られていない。本酵素を結晶化し、1.76 Å という高解像度の X 線解析を行うことに成功し、3 次元モデリングの正しさが立証された。さらに本酵素の遺伝子の改変をランダム突然変異法で試み、約 9,000 のクローンをスクリーニングして活性と耐熱性の増加した 10 クローンをえた。これらの解析から、活性と耐熱性に関連するアミノ酸を特定し、その結果をもとに活性と耐熱性の改善した二重変異酵素を作成した。他方、*Thermobifida* のゲノム情報に基づいて、タンデム遺伝子の存在が予測できたので、*est119* の上下流を解析し、上流に相同性の高い遺伝子 *est1* が存在することを確認した。*T. fusca* と *T. cellulosylitica* はクチナーゼ 1 及び 2 に分類される 1 対の遺伝子をタンデムに保有し、*T. alba* ではクチナーゼ 1 タイプの遺伝子が報告されているが、AHK119 のタンデム遺伝子は共にクチナーゼ 2 に近いものであった。新たな遺伝子 *est1* は *est119* に対して 95% の identity と 98% の similarity を有する。これらの酵素は基質特異性や耐熱性から耐熱触媒として広く応用が期待できる。今後、*est1* 遺伝子の発現解析を行い、Est119 と比較

することによって、ポリエステル分解能と基質認識機能、耐熱性に対する解析と遺伝子改変を進めることが期待できる。

論文審査の結果の要旨

本論文は次の4部分で構成されており、以下でそれぞれについてまとめることにする。

1. 放線菌 *Thermobifida alba* AHK119 のエステラーゼ遺伝子のクローニングと発現酵素 (Est119) の解析
2. Est119 の変異酵素の作成と解析
3. Est119 の結晶構造の X 線解析
4. Est119 遺伝子と相同性を有するタンデム遺伝子のクローニングと解析

「1」では相同遺伝子の塩基配列と *T. alba* に近い *T. fusca* のコドンユーセージからプライマーを作成して、PCR 産物をえて、これがいわゆるリパーゼファミリーのコンセンサス配列を含んでいることを確認後、インバース PCR によりオープンリーディングフレームを得ている。これをいくつかのベクターと宿主の組み合わせで発現解析を行った結果、pQE80L と *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) の組み合わせで可溶性タンパクとして発現させることができた。発現酵素は Nickel-NTA レジンをういたアフィニティークロマトグラフィーでほぼ単一に精製し、ゲル濾過および SDS-PAGE による分子量測定結果から単量体タンパク質であることを確認した。精製酵素は *p*-nitrophenyl acyl esters に対する基質特異性からリパーゼファミリーのクチナーゼ様酵素であることが確認されている。GC-リッチな配列をうまくシーケンスし、巧みに発現させたことは高く評価できる。本酵素は脂肪族及び脂肪族-芳香族ポリエステルに広い活性を有する。また、高濃度 Ca^{2+} の存在下で活性と耐熱性の増加が認められた。これらの結果は本酵素の応用性を示唆するものである。「2」では酵素の活性と耐熱性を増強するために error-prone PCR に基づくランダム変異でえた約 9,000 という膨大なクローンをスクリーニングして A68V 変異と S219P 変異を活性及び耐熱性に関する変異としてえると共に活性と耐熱性の改善した二重変異酵素を作成した。また、3次元モデリングに基づいて変異と機能の相関性を考察しているのも評価できる。「3」では本酵素の結晶化のため、さらに MonoQ による陰イオン交換クロマトグラフィーで酵素を高度に精製し、結晶酵素をえるに至っている。えられた結晶は 1.76Å という解析度の高い X 線解析結果をもたらした。この種の酵素でははじめての結晶構造解析であり、この結果から 3次元モデリングの正しさが立証され、さらに将来的には基質結合領域などの解析が期待できる。「4」では *Thermobifida* では Est119 と相同性を有する酵素遺伝子がタンデム遺伝子として存在することがいくつか報告されているので、本菌についても *est119* の上下流をシーケンスした結果、上流に相同性酵素遺伝子が存在することを見出した。他の *Thermobifida* では 2 つの遺伝子はクチナーゼ 1 及び 2 のグループに分けられるが、本菌の酵素遺伝子はいずれもクチナーゼ 2 に属すると考えられた。この結果はこれらのタンデム遺伝子が広く分布していることをうかがわせる結果であり、将来的には遺伝子起源の解明にも繋がるとともに、発現酵素の比較から活性や耐熱性の解析が進むことが期待できる。本研究により、脂肪族及び脂肪族-芳香族ポリエステル類の分解酵素とその遺伝子に関する基礎的な知見が得られたばかりでなく、将来の応用に繋がる基盤的な研究成果をえており、高く評価できる。

これらの研究成果は、査読制度の確立した国際誌の2編の論文と現在投稿中である1編の論文にまとめられている。

1. X. Hu, U. Thumarat, X. Zhang, M. Tang, and F. Kawai. Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.*** 87: 771-779 (2010).
2. U. Thumarat, R. Nakamura, T. Kawabata, H. Suzuki, and F. Kawai. Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type polyesterase from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.*** published online (doi: 10.1007/s00253-011-3781-6) (2011).
3. K. Kitadokoro, U. Thumarat, R. Nakamura, K. Nishimura, H. Karatani, H. Suzuki, and F. Kawai. Crystal structure of cutinase Est119 from *Thermobifida alba* AHK119 that can degrade modified polyethylene terephthalate at 1.76 Å resolution. ***Polymer Degradation and Stability*** submitted.