

学位論文題名

Clostridium thermocellum のセルラーゼに関する研究

学位論文内容の要旨

C. thermocellum の生産する巨大セルラーゼ群（セルロソーム）は、分子量 $2 \sim 6.5 \times 10^3$ kDa であり、タンパク質変性剤の中でドデシル硫酸ナトリウム(SDS) によってのみ解離させることが可能とされ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって14-50 個のサブユニットから構成されていることが判っている。このような酵素複合体である為、個々のサブユニットをネイティブな条件下で均一に精製することは困難とされ、各サブユニットをコードする遺伝子のクローニングが盛んに行われており、現在までに22種類のエンドグルカナーゼ遺伝子が得られている。しかし、これらの遺伝子産物である組換え体酵素には、結晶性セルロース（アビセル）を分解する活性は見出されていない。一方、セルロソームの中で最大分子量（210 kDa）を示す糖タンパク質である S_L サブユニットと分子量82 kDaのエンドグルカナーゼである S_S サブユニットを共存させると初めてアビセルを分解するという協同作用が見出されている。

本研究では、このような背景の中で

1. SDS 等のタンパク質変性剤を用いることなくセルロソームの単純化（サブセルロソーム）及び酵素の単離を可能とした。
2. サブセルロソームを構成するタンパク質をコードする遺伝子のクローニングを行った。
3. 2種の組換え体酵素の精製を行い、諸性質を明らかにした。
4. 精製した各酵素の組合わせによるアビセルの協同分解作用を認めることができた。
5. 酵素の遺伝子の塩基配列を決定し、酵素の構造を推定した。

本研究によってC. thermocellum の生産するセルロソームから単純化したサブセルロソームを調製し、またアビセルの分解に関し協同作用を示すと報告のある2個のサブユニットの精製、それらをコードする遺伝子のクローニング、組換え体酵素の精製及び各酵素の組合わせによるアビセルの協同分解作用を明らかにすることにより、C. thermocellum のセルラーゼに関する酵素学及び遺伝子工学の発展に寄与した。

本研究を要約すると、

1. C. thermocellum の生産する巨大セルラーゼ群（セルロソーム）からSDS 等のタンパク質変性剤を用いることなくセルロソームよりも単純で高活性を示す6個サブユニット（J1～J6: J1= S_L , J3= S_S ）から成るサブセルロソームの調製を行った。
2. J1(S_L) サブユニットの精製はネイティブな条件下では不可能であり、SDS-PAGE後にゲルから抽出調製を行った。本方法により取得したJ1サブユニットには、従来認められなかったエンドグルカナーゼ及びアビセラナーゼ活性を見出すことがで

きた。J1の分子量は 210 kDa、カルボキシメチルセルロース(CMC)に対する最適反応 pHは6.0、最適反応温度は60℃であった。

3. SDS 等のタンパク質変性剤を用いることなくセルロソームからJ3(S_s)サブユニットを均一に精製した。J3の分子量は82 kDa、CMC に対する最適反応 pHは 6.6~7.6、最適反応温度は70℃であった。J3はセロペンタオース、セロヘキサオースを分解したがアビセルに対しては全く活性を示さなかった。またJ3の活性は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウムにより阻害された。

4. 精製した *C. thermocellum* のJ1及びJ3を共存させアビセルに作用させるとアビセルからセロピオースの生成が、J1単独の場合に比べ約1.8 倍促進することが認められた。

5. サブセルロソームを構成する 6 個サブユニットに対する抗体を取得し、これを用いて各サブユニットをコードする遺伝子のクローニングを行った。得られた遺伝子は全て新規なものであった。

6. 組換え体J1を大腸菌体内より均一に精製した。組換え体J1の分子量は37 kDa、CMC に対する最適反応 pHは 6.6、最適反応温度は55℃であった。また、*C. thermocellum* のJ1と同様にアビセルからセロピオースを生成する活性を有していた。J1の分子量に比べ組換え体J1のそれが小さい原因は、取得した遺伝子が完全なものではなくその一部をコードするものである為であった。

7. 組換え体J3を大腸菌体内より均一に精製した。組換え体J3の分子量は38 kDa、CMCに対する最適反応 pHは 5.5~6.5、最適反応温度は60℃であり、アビセルに対しては全く活性を示さなかった。組換え体J3の活性は、SH試薬により阻害されたが、塩化ナトリウム、塩化マグネシウムは活性に何ら影響を及ぼさなかった。これらは *C. thermocellum* のJ3の諸性質とは異なるものであった。

8. 組換え体J1、J3を共存させアビセルに作用させるとアビセルからセロピオースの生成が、組換え体J1単独の場合に比べ約1.7 倍促進することが認められた。これは *C. thermocellum* のJ1、J3の結果と同程度のものであった。

9. 組換え体J3をコードする遺伝子の塩基配列を決定したところ、978 bpの塩基対から成るオープンリーディングフレームが認められた。本遺伝子より得られる組換え体J3は、325 アミノ酸残基から構成され、その分子量は35,186 Daと算出された。精製した組換え体J3のN末アミノ酸配列は本遺伝子より得られるN末アミノ酸配列と一致した。

10. *C. thermocellum* のJ3を臭化シアン処理することで得られた 3 個のペプチドのN末アミノ酸配列を決定した結果、組換え体J3中のアミノ酸配列と一致している部分を見出した。このことから組換え体J3をコードする遺伝子は、J3の一部または関連のあるタンパク質をコードするものであることが示唆された。

11. アビセルの協同分解作用に関し、J1はセルロース表面に付着し、J3のアンカータンパク質として働くという説が提唱されてきたが、今回J1自体にアビセラゼ活性を認めたことから、J1は単なるアンカータンパク質ではないことが明らかになった。

さらにJ3にはアビセラゼ活性が認められなかったことから、J3はJ1の活性を増強する働きを有するエンドグルカナーゼであることが示唆された。これらのことは、組換え体酵素においても同様に認められた。

以上、*C. thermocellum* の生産する巨大セルラーゼ群（セルロソーム）に関し、特に結晶性セルロースの分解において協同作用を示すと報告のある2個のサブユニットJ1, J3について精製を行い、酵素特性を明らかにした。また、両サブユニットを用いてアビセルの協同分解作用を認めた。さらに両サブユニットをコードする遺伝子のクローニングを行ったところ、それぞれのサブユニットの一部あるいは関連のあるタンパク質をコードする遺伝子が取得されたと考えられたが、それぞれの組換え体酵素を用いた場合においてもアビセルの分解における協同作用を認めることができた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 千 葉 誠 哉
副 査 教 授 匂 坂 勝之助

学 位 論 文 題 名

Clostridium thermocellum のセルラーゼに関する研究

本論文は、和文150 頁、図48、表17、引用文献141、第1章～3章及び総括から成り、他に参考論文19編が付されている。

C. thermocellum は、菌体表面並びに菌体外に巨大セルラーゼ群（セルロソーム）を生産し、これはタンパク質変性剤の中でドデシル硫酸ナトリウム（SDS）によってのみ解離させることが可能であり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により14-50 個のサブユニット（分子量：20～210 kDa）から構成されている。これらのサブユニットの中で最大分子量（210 kDa）を示す糖タンパク質である S_L サブユニットと分子量 82 kDa のエンドグルカナーゼである S_S サブユニットを共存させると初めて結晶性セルロース（アビセル）を分解するという協同作用が見出されている。

本研究は、この協同作用を示す S_L サブユニット及び S_S サブユニットを精製し、アビセル分解における協同作用を確認すると共にそれぞれのサブユニットをコードする遺伝子を取得し、組換え体タンパク質を用いてその協同作用を明らかにすることを目的とした。その結果、各サブユニットの精製過程においてセルロソームよりも単純で高活性のサブセルロソームの調製を可能とし、さらに S_S サブユニットの単離に成功した。また、各サブユニットをコードする遺伝子を取得し、これらのタンパク質を用いて各組み合わせによるアビセルの分解を検討したところアビセルからセロピオースの生成促進という協同作用を認めることができた。

第1章は、C. thermocellum の巨大セルラーゼ群（セルロソーム）に関する研究史について述べられている。

第2章は、C. thermocellum のセルラーゼの精製と諸性質について述べられ下記の内容が含まれている。

1. SDS によってのみ解離させることが可能であるとされているセルロソームからネイティブな条件下で6個サブユニット（J1～J6: $J1=S_L$, $J3=S_S$ ）から成るセルロソームよりも高活性で単純なサブセルロソームの調製を可能とした。
2. $J1(S_L)$ サブユニットの精製はネイティブな条件下では不可能であり、SDS-PAGE後にゲルから抽出調製を行った。本方法により取得した $J1$ サブユニットには、従来認められなかったエンドグルカナーゼ及びアビセラナーゼ活性を見出した。

3. J3(S_s) サブユニットをネイティブな条件下で均一に精製し、諸性質を明らかにした。

第3章では、サブセルロソームのタンパク質をコードする遺伝子の取得及び組換え体J1, J3の精製と諸性質について述べられ下記の内容が含まれている。

1. サブセルロソームを構成する6個サブユニットに対する抗体を取得し、これを用いて各サブユニットをコードする遺伝子のクローニングを行った。

2. 組換え体J1を大腸菌体内より均一に精製し、C. thermocellumのJ1サブユニットと同様にエンドグルカナーゼ及びアビセラゼ活性を見出した。

3. 組換え体J3を大腸菌体内より均一に精製し、諸性質を明らかにした。

4. C. thermocellum のJ1, J3並びに組換え体J1, J3の各組合わせにおいてアビセルからセロビオースの生成を促進させるという協同分解作用を明らかにした。

5. 組換え体J3をコードする遺伝子の塩基配列を決定したところ、組換え体J3は325 アミノ酸残基から成り、本来のJ3とは異なっているタンパク質であった。しかし、J3を臭化シアン処理することで得られた3個のペプチドのN末アミノ酸配列を決定した結果、組換え体J3中のアミノ酸配列と一致している部分を見出した。このことから組換え体J3をコードする遺伝子は、J3の一部または関連のあるタンパク質をコードするものであることが示唆された。

以上の様にC. thermocellum の生産するセルロソームに関し、結晶性セルロースの分解に関与するサブユニットの精製、諸性質の検討及び遺伝子のクローニング等を行い、基礎的及び産業的な貢献を果たした。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 小林 徹 は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。