

学位論文題名

計算化学による洗剤用糖質分解酵素の特性支配因子の 解明と耐熱化検討

学位論文内容の要旨

好アルカリ性バチルス属は好アルカリ性のアミラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、プロテアーゼといった食品工業、洗剤工業、繊維工業等に重要なタンパク質を生産する。また、糖質分解酵素は地球規模のエネルギー問題や環境問題の解決に向け、再生可能な天然資源の有効利用を行う上で、今後ますます重要な位置を占めるものと期待される。我々の研究室では、主に洗剤用酵素としての利用を目的に、アルカリセルラーゼやアルカリ液化型 α -アミラーゼなどを好アルカリ性細菌より見出してきた。さらに、タンパク質工学の手法を用いて、洗剤用酵素として最適な特性を付加することで、洗剤用酵素として市販することにも成功した。これまでに得られてきた野生型ならびに変異酵素の持つ特性の支配因子を見出し、それを構造上の変化と結び付けることができれば、より広範な要求に応じられる自在な酵素設計への道が開けると考え、モデリングおよびシミュレーション等の計算化学技術を駆使して解析を試みた。

第2章では、*Bacillus* sp. KSM-1378 株から取得したアルカリ液化型 α -アミラーゼ AmyK の3次元構造をモデリングにより構築し、モデル構造から AmyK の野生型ならびに変異酵素の特性解析と更なる耐熱化検討を行った。AmyK の Arg181-Gly182 を欠失させることにより(dRG)、耐熱性のみならずキレート剤耐性も付与できた。欠失による耐熱性とキレート剤耐性メカニズムを明らかにするため、立体構造が判明した *B. amyloliquefaciens* 株由来の α -アミラーゼ(BAA)を雛型にして、AmyK のモデル構造を構築した。モデル構造より、Phe180-Asn197 ループ上の Ala186 と Asp188 が Ca と結合していることが判明した。分子動力学計算より、変異酵素においてループ部の可動範囲が狭まることで Ala186 主鎖の酸素と Ca との親和性が増すことが判明し、これにより耐熱性とキレート剤耐性が向上するものと示唆された。また、Trp187 が B ドメインの隙間に入り込んで、アンカーとしてループを繋ぎ止める働きをしていることが分かった。このアンカー効果を高める変異導入として、Arg124Pro 変異酵素を構築した結果、更なる耐熱性向上が見られた。

第3章では、AmyK の Arg181-Gly182、Thr183-Gly184 欠失変異酵素の諸性質比較を、モデル構造から行った。*B. Stearothermophilus* 株由来の α -アミラーゼ(BSA)の立体構造では、Ile181-Gly182(AmyK の Thr183-Gly184 に相当)の存在が Ca と Asp207 との配位を妨げているため、

Arg179-Gly180よりIle181-Gly182を除去した方が α -アミラーゼの耐熱性が増大するとされていた。しかし、BAAおよびBSAを雛型にしたAmyKモデル構造の比較や、BSA結晶構造の最適化からは、配位を妨げる効果はないと推測された。また、AmyKのArg181-Gly182とThr183-Gly184を欠失した変異酵素では、EDTA耐性は同程度に向上していた。さらに、Arg181-Gly182欠失酵素の耐熱性の方が明らかに高いことが判明した。したがってAmyKの耐熱性に関わる微細構造はBSAと異なっていることが示唆された。

第4章では、*Bacillus* sp. KSM-K38株より取得した、カルシウム非依存性新規液化型 α -アミラーゼAmyK38の3次元構造をモデリングにより構築し、モデル構造からAmyK38諸性質発現メカニズムの解析と、部位特異的変異による耐熱化検討を行った。AmyK38は、高いキレート剤耐性と酸化剤耐性を有するが、耐熱性の低いこれまでにない酵素であった。酵素特性支配因子を明らかにするため*B. licheniformis*株由来の α -アミラーゼ結晶構造(BLA)を雛型にして、AmyK38のモデル構造を構築した。モデル構造より、1)活性中心近傍の酸化剤の攻撃対象となるMet(BLAではMet197)がLeuに変わっているために酸化剤耐性を有している、2)Ca結合サイトのAspとGluの多くが中性の残基に換わっており、Caを安定に保持できないためにキレート剤耐性を有している、ことが判明した。また、dRGとのキメラ酵素の構築および部位特異的変異により、AmyK38のTyr11をPheに置換(Y11F)することにより、耐熱性を獲得することが判明した。モデル構造により、Y11Fの耐熱性向上はPhe11周辺のパッキングがより密になった結果であると推定した。

第5章では、結晶構造を用いてAmyK38の部位特異的変異による更なる耐熱化検討を行った。最近得られたAmyK38結晶構造とモデル構造を比較した結果、両者に大きな違いは無く、モデル構造を用いたAmyK38およびその変異酵素の特性発現機構の推定は支持された。AmyK38のさらなる熱安定性の向上を目的としてAmyK38の結晶構造をBLA結晶構造と比較した。AmyK38のGln167-Gln170間のループ構造にはBLAのGlu167とLys170間の様な静電相互作用が認められなかったため、部位特異的変異による新たな静電相互作用の構築を試みた。その結果、AmyK38のGln167またはTyr169をそれぞれGluまたはLysに置換することによって熱安定性の向上が認められた。さらに、これらのアミノ酸置換と前述のY11F置換を組み合わせることによって本酵素の熱安定性は大幅に向上した。

第6章では、*Bacillus* sp. KSM-64株より取得した、アルカリセルラーゼEgl-64の3次元構造をモデリングにより構築し、モデル構造を用いたEgl-64の部位特異的変異による耐熱化検討を行った。Egl-64、Egl-237酵素を、それぞれ、好アルカリ*Bacillus* sp. KSM-64株およびKSM-S234株より得ているが、Egl-64はEgl-237との相同性が92%と高いにも関わらず耐熱性はEgl-237よりも低い。イオン性残基とプロリンに注目して配列を比較した結果、Egl-237に特異的なイオン性残基としてLys137、Lys179、Lys194の3つのリジン残基を見出した。*Bacillus* sp. KSM-635株由来のアルカリセルラーゼ結晶構造を雛形にEgl-64のモデル構造を構築した。モデル構造においてEgl-237のLys137、Lys179、Lys194に相当する残基(Glu137、Asn179、Asp194)をリジンへ置換し、分子動力学計算を行った結果、Asn179LysとGlu175、Asp194LysとGlu190が安定なイオン対を形成するこ

とが示唆された。Egl-64 と Egl-237 のキメラ酵素の構築および部位特異的変異により、Egl-64 の Asn179Lysと Asp194Lys が唯一の耐熱性向上変異であることが判明した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松井博和
副査	教授	横田篤
副査	准教授	伊藤浩之
副査	准教授	森春英

学位論文題名

計算化学による洗剤用糖質分解酵素の特性支配因子の 解明と耐熱化検討

本論文は、図52、表12、引用文献 93 および要約を含む8章125頁からなる和文論文である。別に参考論文 11 編が添えられている。

筆者らは、主に洗剤用酵素としての利用を目的に、アルカリセルラーゼやアルカリ液化型 α -アミラーゼなどを好アルカリ性細菌より見出してきた。さらに、タンパク質工学の手法を用いて、最適な特性を付加することで、洗剤用酵素として市販することにも成功した。本研究では、これまでに得られてきた野生型ならびに変異酵素の持つ特性の支配因子をモデリングおよびシミュレーション等の計算化学技術を駆使して見出し、それを構造上の変化と結び付けることにより、さらなる高機能化を目指している。得られた結果は以下の通りである。

1. アルカリ液化型 α -アミラーゼ AmyK の野生型ならびに変異酵素の特性解析と更なる耐熱化検討
Bacillus sp. KSM-1378 株から取得した AmyK の Arg181-Gly182 欠失(dRG)により、耐熱性とキレート剤耐性が付与できた。AmyK のモデル構造を構築し解析した結果、Ala186 と Asp188 が Ca と結合していることが判明した。分子動力学計算より、dRG において Ala186 主鎖の酸素と Ca との親和性が増し、これにより耐熱性とキレート剤耐性が向上するものと判断した。また、Trp187 が B ドメインの隙間に入り込んで、アンカーとしてループを繋ぎ止める働きをしていることが分かった。このアンカー効果を高める変異導入として、Arg124Pro 変異酵素を構築した結果、更なる耐熱性向上が得られた。

2. アルカリ液化型 α -アミラーゼ AmyK の Arg181-Gly182(dRG)、Thr183-Gly184(dTG)欠失変異酵素の諸性質の比較

B. Stearothermophilus 株由来の α -アミラーゼ(BSA)の立体構造では、Ile181-Gly182(AmyK の Thr183-Gly184 に相当)の存在が Ca と Asp207 との配位を妨げているため、Arg179-Gly180 より Ile181-Gly182 を除去した方が α -アミラーゼの耐熱性が増大するとされていた。しかし、BAA および

BSAを雛型にしたAmyKモデル構造の比較や、BSA結晶構造の最適化からは、配位を妨げる効果はないと推測された。また、AmyKのdRGとdTGでは、EDTA耐性は同程度に向上し、dRGの耐熱性の方が明らかに高いことが判明し、AmyKの耐熱性に関わる微細構造はBSAと異なることが示唆された。

3. カルシウム非依存性新規液化型 α -アミラーゼ AmyK38 の諸性質発現メカニズムの解析と耐熱化検討

Bacillus sp. KSM-K38 から取得した AmyK38 は、高いキレート剤耐性と酸化剤耐性を有するが、耐熱性は低かった。AmyK38 のモデル構造より、1) 活性中心近傍の酸化剤の攻撃対象となる Met が Leu に変わっているために酸化剤耐性を有している、2) Ca 結合サイトの Asp と Glu の多くが中性の残基に換わっており、Ca を安定に保持できないためにキレート剤耐性を有していることが判明した。また、dRG とのキメラ酵素の構築および部位特異的変異により、AmyK38 の Tyr11 を Phe に置換 (Y11F) することにより、耐熱性が向上した。モデル構造により、Y11F の耐熱性向上は Phe11 周辺のパッキングがより密になった結果であると推定した。

4. カルシウム非依存性新規液化型 α -アミラーゼ AmyK38 の更なる耐熱化検討

AmyK38 のさらなる熱安定性の向上を目的として AmyK38 の結晶構造を *B. licheniformis* 株由来のアミラーゼ BLA 結晶構造と比較した。AmyK38 の Gln167-Gln170 間のループ構造には BLA の Glu167 と Lys170 間の様な静電相互作用が認められなかったため、部位特異的変異による新たな静電相互作用の構築を試みた。その結果、AmyK38 の Gln167 または Tyr169 をそれぞれ Glu または Lys に置換することによって熱安定性の向上が認められた。さらに、これらのアミノ酸置換と前述の Y11F 置換を組み合わせることによって本酵素の熱安定性は大幅に向上した。

5. アルカリセルラーゼ Egl-64 の耐熱化検討

Egl-64、Egl-237 酵素をそれぞれ好アルカリ *Bacillus* sp. KSM-64 株および KSM-S234 株より得ているが、Egl-64 は Egl-237 との相同性が92%と高いにも関わらず耐熱性は Egl-237 よりも低い。イオン性残基とプロリンに注目して配列を比較した結果、Egl-237 に特異的なイオン性残基として Lys137、Lys179、Lys194 の3つのリジン残基を見出した。Egl-64 のモデル構造を構築し、Egl-237 の Lys137、Lys179、Lys194 に相当する残基 (Glu137、Asn179、Asp194) をリジンへ置換し、分子動力学計算を行った結果、Asn179Lys と Glu175、Asp194Lys と Glu190 が安定なイオン対を形成することが示唆された。Egl-64 と Egl-237 のキメラ酵素の構築および部位特異的変異により、Egl-64 の Asn179Lys と Asp194Lys が唯一の耐熱性向上変異であることが判明した。

本研究は、アミラーゼおよびセルラーゼの糖質分解酵素に関してその3次元構造をコンピュータ上で構築し、各酵素の性質発現メカニズムを立体構造から解析している。それだけではなく、さらなる耐熱性の付与の可能性を種々の計算化学的手法を用いて提案しており、学術的に高く評価できる。

よって審査員一同は、小澤忠弘氏が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。