

# 博士學位論文審査等報告書

審査委員 主査 織田 昌幸

副査 渡部 邦彦

副査 高野 和文

1 氏 名

判谷 吉嗣

2 学位の種類

博士（農学）

3 学位授与の要件

学位規程第3条第3項該当

4 学位論文題目

酵素の高機能化を目指した変異導入体の機能解析

5 学位論文の要旨および審査結果の要旨

【学位論文の要旨】

別紙に記載

【論文目録】

別紙に記載

【審査結果の要旨】

本研究は、酵素の高機能化研究の一環として、効率的なオリゴ糖生成と polyethylene terephthalate (PET) の分解方法を見出すことを目指し、種々の条件下で *Cellulosimicrobium cellulans* DK-1 由来 endo-1,3- $\beta$ -glucanase 変異体と *Saccharomonospora viridis* AHK190 由来の cutinase 様酵素 Cut190 変異体の機能解析を実施、考察したものである。その成果として、酵素科学分野で重要な知見となる基礎情報を得ることができた。

オリゴ糖は、医薬品開発等の幅広い分野で活用が期待されるが、一般的な化学合成での課題も多く、簡便な操作で位置選択性の高い合成が可能となる酵素を利用し

た方法が注目を集めている。本研究対象の endo-1,3- $\beta$ -glucanase は、糖結合モジュールと触媒ドメインからなり、触媒ドメインは糖加水分解酵素ファミリーの GH16 に属する。本研究では、触媒ドメイン活性中心の求核性残基 Glu119 を Gly に置換し、本来有している糖加水分解活性を糖転移活性に変換することを試みた。その結果、E119G 変異体は、laminarioligosaccharides に対して糖転移活性を有した。その基質認識は、野生型の加水分解と同様のメカニズムで起こり、変異導入により求核性残基が欠如し、水の代わりに糖が基質と共有結合することにより、糖転移反応が誘起されたと考えられた。さらに laminaritriose の糖転移反応は、laminaribiose 存在下で亢進することを明らかにした。

PET は、日常生活にも幅広く用いられている一方、使用済み PET の蓄積が環境問題となっている。酵素を利用した PET 分解は、エネルギー使用が少なく環境への負荷が少ない手法であるが、その活性は未だ不十分であることから、様々な研究が試みられている。本研究では、高い PET 分解活性と熱安定性を有する Cut190\_S226P/R228S 変異体 (Cut190\*と表記) および Cut190\* Q138A/D250C-E296C 変異体を用い、PET の部分構造である bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET) を基質とし、様々な条件下 ( $\text{Ca}^{2+}$ 濃度、pH、温度、圧力) で各変異体の機能解析を実施した。 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の検討により、BHET に対する Cut190\*の活性は、 $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下でも観測されることが明らかとなり、BHET は Cut190\*の closed form に結合すると推測された。また、酵素による BHET の加水分解と圧力による化学的な加水分解の相加効果が認められ、PET 分解効率化の可能性が示された。一方、フーリエ変換赤外分光分析の結果から、Cut190\*は加圧下 (~400 MPa) において構造に大きな変化はないことが示され、圧力による相加効果の結果を支持した。

以上、2種類の酵素を対象にした高機能化に関する一連の研究成果は、酵素の構造機能解明に貢献する重要な基礎情報となり、本研究科の博士の学位にふさわしい内容と研究レベルであると判断した。

## 6 最終試験の結果の要旨

平成 31 年 2 月 14 日 (木) 午後 1 時より、博士学位論文発表会を、本学合同講義室棟第 2 講義室にて、公開で行った。口頭発表のあと、質疑応答が行われた。質問の内容は、2種類の酵素で温度の効果が異なる理由、酵素速度論を決定する難しさの理由、実際の応用利用での高機能化レベルの目標値、糖転移活性上昇のために含水率を下げる試みの有効性、糖転移活性の高機能化に元来の糖転移酵素を使わない理由、Cut190 の高濃度側や高 pH 側で活性が低下する理由、Cut190 で高温側での圧力効果の可能性、等、多岐に及ぶものであった。いずれの質問に対しても、的確に回答した。

最終試験の結果については、審査委員全員一致で合格とした。