

	カガリ シュン
氏 名	小川 俊
本籍（国籍）	福島県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連論第連論 173 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当論文博士
研究科及び専攻	連合農学研究科
学位論文題目	食品産業関連酵素を対象とした蛋白質工学的研究（The protein engineering study of the food industry-related enzymes）
学位審査委員	主査 弘前大学 教授 吉田 孝 副査 小関 卓也(山形 教授)、濱田 茂樹(弘前 准教授)、山田 美和 (岩手 准教授)

論文の内容の要旨

食品産業に利用可能な酵素の開発を目的として、エンドポリガラクトナーゼ(EndoPG)、及び oligo-1,6-glucosidase(イソマルターゼ)に関する研究を行った。

始めに、リンゴ銀葉病菌 *Stereum purpureum* 由来の EndoPG について酵素的解析を行った。本菌は等電点の異なる 4 種の EndoPG I ~IV を生産するが、その中で EndoPG I 及び IV について検討を加えた。EndoPG I は他の EndoPG に比べて耐熱性が高く、特有の C 末端配列を有するなどの特徴がある。EndoPG I の高い耐熱性と糖鎖修飾の関係を解明するため、*Pichia pastoris* を宿主とした発現系を構築した。この発現系により糖鎖結合数の異なる組換え酵素を作成し、熱変性曲線を調べたところ、当初の予想に反し 1 つの酵素標品中に熱安定性の異なる複数の組換え酵素の混在が示唆された。LC-MS 分析によりジスルフィド結合(全 3 箇所)の解析を行った結果、一部のジスルフィド結合が形成されていない不完全体の混在が確認され、これが熱安定性の不均一さをもたらすと考えられた。*P. pastoris* によるタンパク質発現系でジスルフィド結合の不完全体を確認した最初の報告となった。一方、EndoPG I に付加された糖鎖は耐熱性向上に寄与していない事が示唆された。次に、EndoPG I の高い耐熱性の検討を目的として、同起源の EndoPG IV と比較検討した。*S. purpureum* の培養ろ液から N 結合型糖鎖の数が異なる EndoPG IVa、IVb を精製して耐熱性を調べた。その結果、IVa、IVb 共に T_m 値は 62°C であり、EndoPG I の T_m 値 79.5°C と比較すると 17.5°C もの差が示された。EndoPG IV の cDNA クローニングを行い、EndoPG I と一次構造を比較した結果、アミノ酸配列の相同性は 72% であり、蛋白質の耐熱性に影響する可能性のあるプロリン残基の数が EndoPG I では 10 残基あり、EndoPGIV (8 残基)

より多い事が明らかになった。*P. pastoris* 宿主による発現系ではジスルフィド結合の不完全体が混在した事から、酵素の高分泌能で知られる麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主とした酵素生産について検討を行った。*A. oryzae* 宿主により分泌された組換え EndoPG IVの熱変性曲線の解析から、ジスルフィド結合の不完全体は含まれていないと考えられた。又、N結合型糖鎖は GlcNAc₂hexose₅₋₁₀ であり、hexose にはガラクトースとマンノースが含まれる事を明らかにした。これらの結果から、*A. oryzae* は *P. pastoris* に比べ、酵素生産の宿主としてジスルフィド結合の形成能が高いと考えられた。次に、EndoPG I の持つ特徴的な C 末端配列について機能解析を行った。*S. purpureum* の培養液から精製された EndoPG I は C 末端 44 残基配列を欠失した成熟型として得られるが、成熟型配列に C 末端 44 残基を加えた Pro-EndoPG I を大腸菌宿主により発現させた。その酵素的解析から、Pro-EndoPG I は酵素活性を示さない事、プロ配列の一部を V8 プロテアーゼで分解すると PG 活性が示される事が明らかになり、C 末端プロ配列が自己を不活性化している可能性が示された。プロ配列による酵素活性の制御は、糖質分解酵素としては希少な例である。一方、リンゴ幼木に Pro-EndoPG I を注入する試験を行ったところ、成熟型 EndoPG I を注入した場合と同様の銀葉症状が示され、植物病理学的に興味深い情報が得られた。

デンプン加工は食品工業用酵素の主要な用途の 1 つである事から、澱粉糖化への利用を目的としてイソマルターゼの利用性向上に関する検討を行った。澱粉からグルコースを製造する際に副産物として生じるイソマルトースをイソマルターゼで分解すれば、グルコースの収率を改善できる可能性がある。その為には高濃度のグルコースによる生成物阻害を低減する必要があり(グルコース耐性の獲得)、又、糖化工程は 60°C 付近で行われる事から、高い耐熱性も同時に望まれる。本研究では、耐熱性イソマルターゼとして報告されている *Geobacillus thermoglucosidasius* 由来のイソマルターゼにアミノ酸変異を導入し、グルコース耐性の向上を目指した。変異酵素を検討した結果、野生型では 2.2% のグルコースにより酵素反応が阻害されるのに対し、4 重変異体(M203W/Q216E /G259E /R298I)では 2.7% まで反応が可能となった。耐熱性や最適温度など酵素の基本的性質は変異による影響を受けなかった。基質結合ポケットの出入り口付近の変異は効果が大きいと推定され、 α -グルコシダーゼのグルコース耐性について新たな知見を得る事ができた。

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、食品産業用酵素の構造解析及び機能改良を目的としてタンパク質工学的研究を行った成果をまとめたものである。エンドポリガラクトツロナーゼ(EndoPG)は一般にペクチン分解酵素として果汁の清澄化などに利用されている。本研究では植物病原菌であるリンゴ銀葉病菌 *Stereum purpureum* 由来の EndoPG について様々な解析を行った。第

1章では4つのアイソザイムのうち最も熱安定性の高い EndoPG I を酵母 *Pichia pastoris* を宿主として発現させ、熱安定性と糖鎖の関係について調べた。N 結合型糖鎖数の異なる酵素の熱変性曲線の比較から、糖鎖は耐熱性の向上に寄与しない事が示唆されたが、同じ酵素標品中に熱変性曲線の異なる組換え酵素が共存する事が示唆された。LC-MS による解析から、一部のジスルフィド結合が形成されない不完全体の存在を検出した。一方、糸状菌 *A. oryzae* を宿主として酵素の生産を行った場合、不完全体は検出されず、ジスルフィド結合形成能が高い事が示された。

S. purpureum の培養液から精製された EndoPG I は、遺伝子上コードされる C 末端アミノ酸 44 残基を欠失した成熟型として得られる。C 末端 44 残基を含む Pro-EndoPG I を大腸菌で発現すると、そのままでは酵素活性を示さないが、V8 プロテアーゼで C 末端配列を除去すると活性が示された。C 末端プロ配列による酵素の自己不活性化は、糖質分解酵素として希少な例である。リンゴの幼木に Pro-EndoPG I を注入した試験では、成熟型 EndoPG I を注入した際と同様の銀葉症状が示され、植物病理学的に非常に興味深い情報が得られた。

第2章では、澱粉糖化工業への利用を目的としてイソマルターゼに着目した。澱粉からグルコースを製造する際の副産物であるイソマルトースをイソマルターゼで分解できれば、グルコース収率の向上が期待できる。しかしイソマルターゼなどのグルコシダーゼは一般に、生成物（グルコース）の濃度が高まると阻害される事が知られている。イソマルターゼをこの工程に利用するには、生成物阻害に対する耐性（グルコース耐性）と高い熱安定性が求められる。本研究では耐熱性イソマルターゼである *Geobacillus thermoglucosidarius* 由来のイソマルターゼにアミノ酸変異を導入し、グルコース耐性の向上について検討した。その結果、天然型では 2.2% のグルコース存在下で酵素反応が阻害されるのに対し、4 重変異体(M203W/Q216E /G259E /R298I)では 2.7% まで酵素反応が可能となった。特に、基質結合ポケットの出入り口付近へのアミノ酸置換が効果的であるという傾向が見られた。一方、耐熱性や最適温度などの酵素の基本的性能は、変異導入による影響を受けていない事を確認した。

EndoPG に関する研究成果は、異種遺伝子発現系を利用して酵素生産を行う際に有益な情報となり、又、イソマルターゼの改変において、酵素本来の反応性を損なわずに生成物阻害を低減させた事は大きなエポックと言える。本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Ogawa S., Shimizu T., Ohki H., Araya T., Okuno T. and Miyairi K. (2009)
Expression, purification, and analyses of glycosylation and disulfide bonds of *Stereum purpureum* endopolygalacturonase I in *Pichia pastoris*
Protein Expression and Purification. **65**(1), 15-22.
2. Ogawa S., Saka M., Yoshizaki T., Shimizu T., Okuno T. and Miyairi K. (2009)
Purification, Characterization and Amino Acid Sequence of Endopolygalacturonases IVa and IVb from Fungus *Stereum purpureum*
Journal of Applied Glycoscience. **56**, 261-266.
3. Ogawa S., Shimizu T., Kimura T., Utoh K., Okuno T. and Miyairi K. (2010)
The pro-form of *Stereum purpureum* endopolygalacturonase I is inactivated by a pro-sequence in the C-terminal region
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. **74**(3), 558-62.
4. Ogawa S., Itoh M., Ohki H., Kimura T., Shimizu T., Matsuda M. and Miyairi K. (2012)
Glycosylation status and conformational stability of recombinant *Stereum purpureum* endopolygalacturonase IVs produced in an *Aspergillus oryzae* expression system
Journal of Applied Glycoscience. **59**, 37-42.
5. Ogawa S., Shiota K. and Yoshida T. (2015)
Improvement of the glucose tolerance of oligo-1,6-glucosidase from *Geobacillus thermoglucosidasius*
Journal of Applied Glycoscience. **62**, 21-24.

参考論文

- 1, Kimura T., Ogawa M., Shimizu T. and Miyairi K. (2012)
Active suppression of EndoPG IV by ligation of the pro-sequence from *Stereum purpureum* Pro-EndoPG I
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. **76** (1), 196-198.