

様式 I

博士学位論文調査報告書

論文題目

Enzymatic and structural studies of glutathione S-transferases of white-rot fungus
Ceriporiopsis subvermispota which is a selective degrader of lignin in woody biomass
(木質バイオマス中のリグニンを選択的に分解する白色腐朽菌
Ceriporiopsis subvermispota のグルタチオン S-トランスフェラーゼに関する
酵素学および構造学的研究)

申請者 WAN HASNIDAH BINTI WAN OSMAN

最終学歴 平成31年3月
京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻博士後期課程
研究指導認定見込

学識確認 平成 年 月 日 (論文博士のみ)

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
(主査) 教授 片平 正人

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
教授 森井 孝

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
教授 木下 正弘

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	WAN HASNIDAH BINTI WAN OSMAN
論文題目	Enzymatic and structural studies of glutathione S-transferases of white-rot fungus <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> which is a selective degrader of lignin in woody biomass (木質バイオマス中のリグニンを選択的に分解する白色腐朽菌 <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> のグルタチオン S-トランスフェラーゼに関する酵素学および構造学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、木材腐朽菌 <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> (Cs) が有する酵素で、木質バイオマス中のリグニンの分解において主要な役割を果たすと考えられている二つのグルタチオン S-トランスフェラーゼ (CsGST63524 (以下 GST1) 及び CsGST83044 (以下 GST2)) に関し、異種発現する系の構築、酵素活性の解析、結晶構造解析及び変異体の活性解析を行った結果をまとめたもので、5章からなっている。</p> <p>第1章は序論で、木質バイオマスの三大成分はセルロース、ヘミセルロース及びリグニンであるが、これらからエネルギーと有用物質を獲得する為には、これらの高分子化合物を分解する事が必要である事が指摘されている。その上で、この分解を酵素で行う事は、環境負荷・エネルギー負荷が小さい有効な方法である事が説明されている。CsGST は、この分解を行う酵素として有望である事から、二つの CsGST を異種発現する系を構築し、次に酵素活性の解析、結晶構造解析及び変異体の活性解析を行うという本論文の目的を述べている。</p> <p>第2章では、まず二つの CsGST の大腸菌を用いた異種発現系の構築と精製法の確立に成功した。続いてこれらに関して、グルタチオン (GSH) 付加活性、ペルオキシダーゼ活性、チオール転移活性、エーテラーゼ活性、及びエステラーゼ活性に関する酵素反応定数を決定した。GST2 に関し、リグニンの分解において大切であるエーテラーゼ活性を有する事を、真菌の GST としては初めて見出した。</p> <p>第3章では、GST1 に関する結晶構造解析と変異体の活性の解析を行った。X線結晶構造解析によって、GST1 の単体及び GSH との複合体に関し、立体構造を決定する事に成功した。酵素反応において鍵となる GSH の硫黄原子に最も近い GST1 の残基は、セリン残基であった。そこでこれをアラニン残基に置換した変異体を作成して酵素活性を解析したところ、意外にも活性が維持されている事が分かった。立体構造において、GSH の硫黄原子に近い他の残基として、アスパラギン残基とチロシン残基が見出された。これらの残基を各々アラニン残基に置換して酵素活性を解析したところ、活性が落ちている事が分かった。これにより GST1 の活性残基を決定する事ができた。</p> <p>第4章では、GST2 に関する結晶構造解析と変異体の活性の解析を行った。X線結晶構造解析によって、GST2 の単体及び GSH との複合体に関し、立体構造を決定する事に成功した。GSH の硫黄原子に近い残基を探索した結果、二つのアスパラギン残基と一つのチロシン残基が見出された。なおこれらの残基は、上記の GST1 において活性残基として見出された残基とは、一</p>			

次構造上及び三次構造上異なる位置にあり、これらとは関連が無い別のアミノ酸残基であった。GST2の合計三つのアミノ酸残基を、各々アラニン残基に置換して酵素活性を解析したところ、いずれも活性が落ちている事が分かった。これにより、GST2の活性残基を決定する事ができた。また、結晶構造に基づいて両CsGSTの基質結合部位を推定した。その結果、GST1に比べてGST2の基質結合ポケットは小さい事が分かった。基質がかさ高い場合、GST1に比べてGST2の活性が低い、基質結合ポケットが小さい事がこの原因である事が示唆された。

第5章は総括で、木質バイオマス中のリグニンの分解において主要な役割を果たすと考えられている二つのGSTについて、異種発現する系の構築、酵素活性の解析、結晶構造解析及び変異体の活性解析に関し、得られた成果を要約している。

(論文審査の結果の要旨)

木質バイオマスの三大成分はセルロース、ヘミセルロース及びリグニンである。これらからエネルギーと有用物質を獲得する為には、これらの高分子化合物を分解する事が必要となる。この分解を酵素で行う事は、環境負荷・エネルギー負荷が小さい有効な方法である。*Ceriporiopsis subvermispota* (Cs)は、リグニンを選択的に分解する木材腐朽菌であり、同菌が有する酵素グルタチオン S-トランスフェラーゼ (CsGST)は、リグニンの分解において主要な役割を果たすと考えられている。そこで本論文では、二つの CsGST (CsGST63524 (以下 GST1) 及び CsGST83044 (以下 GST2)) に関し、異種発現する系の構築、酵素活性の解析、結晶構造解析及び変異体の活性解析を行った結果をまとめており、得られた主な成果は次の通りである。

1. 二つの CsGST に関し、大腸菌を用いた異種発現系の構築と精製法の確立に成功した。
2. 二つの CsGST について、グルタチオン (GSH) 付加活性、ペルオキシダーゼ活性、チオール転移活性、エーテラーゼ活性、及びエステラーゼ活性に関する酵素反応定数を決定した。GST2 に関し、リグニンの分解において大切であるエーテラーゼ活性を有する事を、真菌の GST としては初めて見出した。
3. X 線結晶構造解析によって、二つの CsGST 各々について、GST 単体及び GSH との複合体に関し、立体構造を決定する事ができた。
4. 得られた構造と変異体の活性の解析に基づいて、二つの CsGST 各々について、酵素反応における活性残基を決定する事に成功した。
5. 得られた構造に基づいて、二つの CsGST の基質結合部位を推定した。その結果、GST1 に比べて GST2 の基質結合ポケットは小さい事が分かった。基質がかさ高い場合、GST1 に比べて GST2 の活性が低い、基質結合ポケットが小さい事がこの原因である事が示唆された。

以上本論文では、二つの CsGST に関して異種発現法及び精製法を確立し、酵素活性の解析、結晶構造解析及び変異体の活性解析によって、酵素としてキャラクター化を、アミノ酸残基・原子レベルの分解能で行った。得られた知見は、酵素を用いた木質バイオマスの利活用の基盤となり、エネルギー科学の研究に寄与するところ大である。よって、本論文は博士 (エネルギー科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 31 年 2 月 28 日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 2020年3月31日以降