

氏 名	アナルル SVJP ナラヤナ ANNALURU SVJP NARAYANA
学位(専攻分野)	博 士 (エネルギー科学)
学 位 記 番 号	エ ネ 博 第 152 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	エ ネ ル ギ ー 科 学 研 究 科 エ ネ ル ギ ー 社 会 ・ 環 境 科 学 専 攻
学位論文題目	Thermostabilization of Xylose Metabolizing Enzyme by Protein Engineering for Efficient Ethanol Production from Woody Biomass (木質バイオマスからの高効率エタノール生産を目指したタンパク質工学によるキシロース代謝酵素の高温安定化に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 牧 野 圭 祐 教 授 吉 川 暹 助 教 授 小 瀧 努

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、木質バイオマスのエタノールへの生物的高効率変換達成のために、重要な役割を担う酵素構造安定化に関して行った研究の成果を纏めたものであり、以下の4章からなっている。

第1章は序論で、タンパク質工学による酵素の高機能化についての概説、より詳細な高機能化の方法、さらにタンパク質の熱安定性に関する理論等に関して詳細を纏めている。

第2章では、木質バイオマスからのエタノール高効率生産において重要な役割を担う酵素の一つであるキシリトール脱水素酵素(XDH)を研究対象とし、タンパク質工学的手法による熱安定性向上に関する研究結果を纏めている。野生型XDHは触媒活性に必須の亜鉛イオンを一つ有しているが、本研究では、このXDHに変異を加え、さらに一つの亜鉛イオン(構造亜鉛イオン)を結合させることにより熱安定性の向上したXDHを作成している。このC4XDHと名付けた酵素の熱安定性をさらに向上させることを目指してタンパク質工学的手法により研究を進めた。まず、すでに立体構造が明らかにされている類似の酵素の立体構造を参考にして、XDHおよびC4XDHの立体構造を推定した。その推定構造に基づき、構造亜鉛イオンが結合している酵素タンパク質部位近傍がループ構造を持っていることを見出し、その部位を変異させることによりさらに熱安定性が向上する可能性があると考え、他の類似の酵素たんぱく質と比較し、構造亜鉛イオンが結合している部位近傍の熱安定性に寄与すると推測されるアミノ酸残基を4つ選択した。選択した4つのアミノ酸残基(95番残基のプロリン、98番残基のフェニルアラニン、101番残基のグルタミン酸および112番残基のヒスチジン)をそれぞれ、セリン、アルギニン、フェニルアラニンおよびアスパラギン酸に変異させた酵素(それぞれ、C4/P95S、C4/F98R、C4/E101FおよびC4/H112Dと名付けた)をPCR法を利用した部位特異的変異法により作成している。作成した酵素の比活性はC4/XDHとほとんど変化していないことを見出している。さらに、それらの作成した変異酵素の熱安定性を酵素活性の熱による失活曲線および温度変化による円二色性(CD)の変化から評価し、作成した4つの酵素のうち2つの酵素(C4/F98RおよびC4/E101F)の熱安定性がC4XDHより向上していることを明らかにしている。これは、構造亜鉛イオン結合部位近傍のループ構造近傍のアミノ酸残基を変異させることにより熱安定性が向上させることができることを示したものであり、同様の手法は構造亜鉛イオンが結合している類似の他の酵素タンパク質についても適応できる技術であり、汎用性の高い研究結果である。

第3章では、第2章の結果に基づき、さらに熱安定性の向上した変異XDH酵素の作成を目指した結果を纏めている。第2章では構造亜鉛イオン結合部位のループ構造近傍のアミノ酸残基を4つ選び、それぞれのアミノ酸残基を部位特異的変異法により変異させた酵素を作成し、それらの変異酵素の酵素活性および熱安定性を測定した結果、4つの変異酵素のうち2つの変異酵素(C4/F98RおよびC4/E101F)の熱安定性が向上していることを見出した。これらの2つの変異を同時に酵素に導入することによりさらに熱安定性の向上した酵素が得られるのではと考えて研究を進めている。そこでまず、第2章で作成したC4/E101FをテンプレートとしてPCR法を利用した部位特異的変異法により98番残基をアルギニンに変異させ

酵素 C4/F98R/E101F を作成している。作成した酵素の比活性はもとの C4/F98R および C4/E101F とほとんど変化していないことを見出している。さらに、C4/F98R/E101F の熱安定性を酵素活性の熱による失活曲線および温度変化による円二色性 (CD) の変化から評価し、C4/F98R/E101F の熱安定性は C4/F98R および C4/E101F よりさらに向上していることを明らかにした。本研究は、立体構造が明らかでない酵素であっても、立体構造の明らかとなっている類似の酵素と比較することにより変異アミノ酸を特定することにより酵素機能の高度化を行えることを示しており、特に構造亜鉛イオンを結合している類似の酵素の熱安定性向上には本研究の手法がほぼそのまま適応できると考えられ、本研究で得られた結果は非常に汎用性の高いものであるといえる。

第 4 章には、全体の結論が纏められている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、木質バイオマスのエネルギー物質、特にバイオエタノールへの生物的高効率変換において、重要な役割を担う酵素の高機能化に関するものであり、得られた主な成果は以下のとおりである。

木質バイオマスを酵母などの生物を用いて高効率にバイオエタノールに変換するためには、木質バイオマス由来の主要五炭糖であるキシロースをいかに効率よく変換するかが重要な課題である。その変換に関与する幾つかの酵素のうち、キシリトールをキシロースにする反応を司るキシリトール脱水素酵素 (xylitol dehydrogenase: XDH) は、高効率化において最も重要な酵素の一つであるが、NADP⁺ 依存型 XDH 変異体を酵母 *S. cerevisiae* に形質導入することで高効率エタノール生産が可能であると報告されている。本論文は、XDH にタンパク質工学的手法により変異を導入することにより、酵素構造の変化を導入した場合に付随する最大の問題である「熱安定性低下」に対する解決策を探索した結果に関するものである。

同じファミリーに属する酵素類の構造データを詳細に検討し、タンパク質工学的手法によってアミノ酸配列を変化して第二の亜鉛イオンを導入して構造安定化に成功したが、本研究では、導入された亜鉛結合部位近傍に存在するループ構造に注目し、ループ構造内のアミノ酸への変異導入による更なる構造安定化を目指して、4 種類の変異を導入している。得られる変異酵素について熱安定性を測定し、それらのうち、2 つの変異導入酵素がより高い熱安定性を示すことを明らかにしている。さらに、これらの 2 つの変異を同時に導入した酵素を作成し、さらに熱安定性が向上した酵素の作成に成功している。本研究の結果、高効率でキシロースをエタノールに変換する、高い構造安定性を有した実用性に富む XDH を世界で初めて作出している。

以上、本研究は、木質バイオマスのバイオエタノールへの変換において、最もキーとなる酵素である XDH の構造安定性を伴った高機能化に、タンパク質工学的手法により成功したものである。また、本研究で得られた結果は、この酵素だけにとどまらず他の亜鉛結合酵素の高機能化にも応用することが期待できる汎用性のある手法であり、酵素の高機能化の研究分野においても大きな貢献を行ったと評価する。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 19 年 2 月 15 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。