

(様式第9 別紙2：公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名：鹿島 康浩

2. 養成カリキュラム名：超耐熱性糖質分解酵素の実用化研究

3. 養成カリキュラムの達成状況

超好熱性始原菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来超耐熱性セルラーゼの大量生産系、菌体外分泌生産系及び、概酵素の機能向上を目的として、研究を行ってきた。蛋白質の一次構造改変による、生産量の向上と活性の増強、*Bacillus* 属細菌を用いた菌体外分泌生産系の確立を行った。さらに、超耐熱性始原菌に存在するチオレドキシソキシソ関連酵素による酸化ストレス防御系の解析にも成功し、当初の目的を十分に達成することが出来た。

4. 成果 (A 4版3枚程度)

経済産業省製品評価センターにより決定されその情報が公開されている超好熱始原菌の全ゲノム配列を基にして、大腸菌を用いた糖化酵素遺伝子の発現生産によってその有用性が明らかになった。しかし、本超耐熱性糖化酵素は、大腸菌による発現系では生産量が非常に少なく、実際の産業利用には不向きである。本酵素の人類社会における有効利用、さらにゲノム情報から得た情報を有効に利用するためには、標的タンパク質を大量に生産しうる分泌生産系の確立が急務であることが伺える。

Brevibacillus brevis は、菌体外に異種タンパク質を多量に生産する性質をもった好気性細菌である。すでに、宿主 - ベクター系も構築され、様々な特徴を持つ発現分泌用プラスミドベクターも構築されている。これらを利用して、数十に及ぶ有用タンパク質を1リットル当たり数グラムに及ぶ非常に効率の良い分泌生産することが可能であり、医薬、食品工業、その他様々な産業に利用されている。しかし、超好熱始原菌由来のタンパク質・酵素は、これまで本菌で発現されてきた細菌・哺乳類由来のタンパク質とは性質が大きく異なり、既存の発現系を用いて容易に分泌生産させることは困難である。そこで、*P. horikoshii* OT3 株由来超耐熱性糖化酵素の産業利用を目指し、多量生産系の構築を行った。

P. horikoshii からクローニングされている超耐熱性糖化酵素のうち、超耐熱性セルラーゼをモデルとして、その大量生産系の確立を目指して研

究を行った。現在までに、*B. brevis* を宿主とした様々な分泌生産用プラスミドベクターが構築されているが、これら既存のベクターを用いて分泌発現を試みたが、形質転換体の取得は出来なかった。標的酵素の C-末端領域には、大腸菌での生産時に欠失してしまう部分が存在している。さらにこの領域は、酵素自体の発現量を著しく減少させる原因になっているものと考えられる。この欠失は、細胞内プロテアーゼによると考えられるが、この領域を失っていると本酵素においても、結晶性セルロースに対する分解活性は維持されている。そこで、本酵素遺伝子の C-末端側から 44 番目のセリン残基の位置にアンバー変異を PCR を用いたポイントミューテーションにより導入し、本酵素遺伝子から、C-末端 44 アミノ酸残基をコードする塩基を除去したデリションミュータントを作成した。この遺伝子を発現ベクター pET11a の T7 プロモーター下流に挿入し、大腸菌内で大量発現及び精製し、酵素学的性質を検討したところ、酵素学的性質は野生型とほぼ同様であり、結晶性セルロースに対する分解活性を維持していた。さらに、その生産量は大腸菌を用いた発現系において数十倍の値を示したため、本知見を *Bacillus* 属細菌による分泌生産系に応用することによって、超耐熱性セルラーゼの分泌生産に初めて成功した。さらに、*B. brevis* での生産に用いるシグナル配列の改良及び、シグナルペプチド切断部位を改変することにより、分泌生産量を大きく増加させることに成功した。これら、一連の研究によって、超耐熱性セルラーゼの生産量を 50 ~ 100 倍に増大させることに成功した。

さらに、超耐熱性セルラーゼの機能解析を目的として、site directed mutagenesis を用いた変異導入による活性残基の同定を試みた。本エンドグルカナーゼは、他の *Pyrococcus* 属に無い family 5 のセルラーゼであり、*Acidothermus cellulolyticus* の同タイプのセルラーゼと比較的高いホモロジーを有している。耐熱性及び、セルロース結合領域を持たないという性質を考えると、その活性中心に関する情報は重要である。そこで、アラインメントから、本エンドグルカナーゼの活性中心であると予測される、2つのグルタミン酸残基をポイントミューテーションによりそれぞれグルタミン残基に変換し、得られた 2 種の酵素の性質を検討した。その結果、一方のミュータントは活性を完全に失ったが、もう一方のミュータントは反応速度の低下のみが認められた。これらの結果は、アラインメントから予測された活性中心のうち、一方は活性中心として働いてはならず、既存の酵素と構造的に異なっていることが強く示唆された。

また、結晶性セルロース分解活性をもつ本超耐熱性セルラーゼの、不溶性セルロースに対する分解活性の更なる向上を目指した検討も行った。*P. horikoshii* と同じ超好熱性始原菌に属する *P. furiosus* の超耐熱性キチナーゼの基質結合領域を、本セルラーゼの C - 末端に連結することによって作成したキメラ酵素を造成することによって、結晶性セルロースに対する活性を 2 倍に増加させることにも成功した。これら一連の研究によって、超耐熱性セルラーゼの大量生産系の構築と機能向上を達成することが出来た。

P. horikoshii のゲノム配列データベースより、細胞内におけるレドックス制御に関与すると考えられる酵素（グルタレドキシシン及びチオレドキシシンレダクターゼ）の遺伝子をクローニングし、大腸菌によって発現させた蛋白質の性質について詳細な解析を行った。その結果、グルタレドキシシンはゲノム配列で予測されたチオールトランスフェラーゼ活性は示さず、チオレドキシシンレダクターゼによって NADPH を用いて還元され、レドキシシンシステムを構成している、新規のプロテインジスルフィドオキドレダクターゼであることが明らかになった。さらに、微量の酸素を培養時に添加することによって *P. horikoshii* から誘導される細胞内蛋白質を 2-D 電気泳動によって分離し、決定された N 末端アミノ酸配列からゲノムデータベースを用いて同定した。その結果、本蛋白質は、相同性検索によって、アルキルヒドロパーオキシドレダクターゼ (AhpC) であることが予測された。そこで、同定された遺伝子を PCR によって調製し、発現ベクター pET21a の T7 プロモーター下流に挿入し、本酵素を大腸菌によって発現させると共に、その性質を検討した。その結果、本酵素は培養・発現時及び酵素蛋白質の調製時において、通常空気条件下において失活する性質をもち、酸素に対して非常に不安定であることが明らかになった。そこで、本酵素を微好気条件下にて発現し、完全嫌気条件下にて部分精製することにより、その酵素学的性質を検討した。その結果、この AhpC は、上述したレドキシシンシステムによって還元されることによって、アルキルヒドロパーオキシドを消去していることが明らかとなった。また、ウェスタン解析によって、本酵素は、微量の酸素及び過酸化水素によって *P. horikoshii* 内で誘導されることも明らかになった。*P. furiosus* で報告されている、スーパーオキシドレダクターゼ (SOR) のホモログが *P. horikoshii* においても存在しており、ここで解析した AhpC は SOR によるスーパーオキシドアニオンの還元によって生ずる過酸化水素によって誘導され、その除去をおこなっていることが予測される。*P. horikoshii* にはグルタチオンシステムに関与する遺伝子のホモログは存在しておらず、細胞内のグルタチオンも検出されない。これら一連の研究によって、チオレドキシシンシステムによる細胞内蛋白質の SS 還元系と、このシステムに依存した活性酸素種の除去機構が *P. horikoshii* で、はじめて明らかすることができた。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)

1. Yasuhiro Kashima, Shigezo Udaka, High-level production of hyperthermophilic cellulase in the *Bacillus brevis* expression and secretion system. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 235-237 (2004)
2. Yasuhiro Kashima and Kazuhiko Ishikawa, Hyperthermophilic novel protein-disulfide oxidoreductase and thioredoxin reductase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. Arch. Biochem. Biophys., 418, 179-185 (2003).

3. Yasuhiro Kashima and Kazuhiko Ishikawa, Alkyl hydroperoxide reductase dependent on thioredoxin-like protein from *Pyrococcus horikoshii*. J. Biochem. 134, 25-29 (2003).

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

1. 鹿島康浩、森一茂、石川一彦、*P. horikoshii*由来超耐熱性セルラーゼの機能解析、
2004年度日本農芸化学会大会講演要旨集、pp109

2. 鹿島康浩、石川一彦、*Pyrococcus horikoshii* のチオレドキシン様蛋白質と
その性質、2003年度日
本農芸化学会大会講演要旨集、pp.25

(3) 特許等 (出願番号を記載)