

Structural and functional analysis of the GH family 6 cellobiohydrolase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

その他のタイトル	担子菌 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 由来GHファミリー6に属するセロビオヒドロラーゼの構造と機能解析
学位授与年月日	2018-03-22
URL	http://doi.org/10.15083/00078185

論文の内容の要旨

生物材料科学専攻
平成 27 年度博士課程進学
氏 名 立岡 美夏子
指導教員名 鮫島 正浩

論文題目

Structural and functional analysis of the GH family 6
cellobiohydrolase from the basidiomycete *Phanerochaete*
chrysosporium

(担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 GH ファミリー 6 に属する
セロビオヒドロラーゼの構造と機能解析)

1. 緒言

セルロースは D-グルコースの β -1, 4-グリコシド結合に基づく分子鎖によって構成された高分子化合物であり、天然にはマイクロフィブリルと呼ばれる結晶性を持つ束構造として存在しているため、その構造中に存在する分子鎖は加水分解に対して高い抵抗性を示すことが知られている。セルロースを効率的に分解する糸状菌には、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 7 および 6 に属する 2 つのセロビオヒドロラーゼ (CBH I および CBH II) を主要な酵素として生産するものが古くから知られている。CBH II はセルロースから α -セロビオースを生成する立体反転型酵素であり、特にセルロースの非還元末端に作用する酵素であると考えられているが、その詳細な機構については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、セルロースの加水分解機構および結晶性セルロースマイクロフィブリルへの作用機序の両観点から、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の CBH II (*PcCel16A*) の機能と構造の関係を明らかにすることを目的とした。まず X 線結晶構造解析により *PcCel16A* の立体構造を決定し、さらに、加水分解機構に関する詳細情報を得るため、高分解能 X 線結晶構造解析による触媒残基のプロトン化状態の決定を試みた。また、結晶性セルロースマイクロフィブリルの分解に寄与する性質を明らかにすることを目指し、ランダム変異導入法による *PcCel16A* の機能改変を試みた。

2. *PcCel16A* 全体構造の解析

PcCel16A は、GH ファミリー 6 に属する触媒ドメイン (CD) と糖質結合ドメイン (CBM)

の 2 ドメイン構造をとる。本研究では、PcCel16A-CD をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて異宿主発現し、X線結晶構造解析により PcCel16A-CD の構造(アポ体) およびセロビオースを結合した構造(複合体) をそれぞれ分解能 1.2 Å、2.1 Å で構造決定した。これまでに構造が明らかとなっている GH ファミリー6 の CBH と同様に、PcCel16A は還元末端側にサブサイト+1 から+4、非還元末端側に-1 から-2 のサブサイトを持ち、活性中心は2つのループ(N末端およびC末端ループ) によって覆われたトンネル構造であった。アポ体及び複合体での分子のゆらぎを比較したところ、2つのループはどちらもアポ体では柔軟性が高い構造をとり、複合体ではループのゆらぎは小さくなった。C末端側ループはほとんど構造変化を起こさない一方で、N末端側のループは基質の結合によって触媒中心を閉じるように大きく構造変化することから、N末端ループは加水分解反応に関与していると考えられた。

3. PcCel16A の活性中心アミノ酸残基の解析

GH ファミリー6 に属する CBH は、グリコシド結合へプロトンを供与する一般酸触媒残基(Asp216) と、求核水分子から水分子ネットワークを介してプロトンを受け取るアスパラギン酸(Asp170) によって加水分解を行うと考えられている(Grotthuss 機構、Koivula *et al.* 2002)。しかしながらその詳細については明らかになっていないため、PcCel16A の活性中心について詳細な情報を得ることを目指し、微小重力下で得た結晶を用いてアポ体及び複合体の高分解能 X線構造解析(分解能 0.8 Å 及び 0.85 Å) を行った。アポ体では一般酸触媒のアスパラギン酸(Asp216) は Asp170 と比較的強い水素結合距離(2.54 Å) にあったが、炭素酸素間の結合(C-O) 距離が Asp216 では 1.30 Å と 1.24 Å、Asp170 では 1.25 Å と 1.27 Å であったことから、Asp216 側にプロトンが保持されていることが示された。一方、複合体では Asp216 の C-O 距離は 1.27 Å と 1.26 Å に変化しており、脱プロトン化状態となっていた。また、Asp170 は脱プロトン化状態(C-O 距離 1.28 Å と 1.26 Å) であった一方、酵素内部に位置する Asp258 はプロトン化状態(C-O 距離 1.28 Å と 1.23 Å) であると考えられた。したがって、Asp216 の脱プロトン化を引き起こす要因として、Asp170 との直接的な水素結合の消失と、Asp258 との水分子を介した新たな水素結合ネットワークの形成が考えられた。既往の研究で Asp170 および Asp258 に相当する残基が Asp216 のプロトン化状態に影響することが確認されていたが(Damude *et al.* 1995, Wolfgang *et al.* 1999)、Asp170 が加水分解前の Asp216 のプロトン化に寄与している一方で、Asp258 はグリコシド結合へのプロトン供与の際の Asp216 の脱プロトン化に寄与していることが明らかとなった。また、Asp170 はアポ体及び複合体のどちらのコンフォメーションにおいても脱プロトン化状態であり、水分子ネットワーク側に結合距離のやや短い方(1.26 Å) を向けていたことから、水分子ネットワークからのプロトン受容の機構を裏付ける結果は得られなかった。一方、これまで得られている構造も含めて精査した結果、ループの開閉は Asp170 の構造変化と強く連動しており、Asp170 が Asp216 周辺の環境変化を主導する役割として GH ファミリー6 に属する CBH にとって重要な残基であると結論付けられた。

4. ランダム変異導入法の開発と PcCel16A の機能解析への応用

PcCel16A はアンモニア処理後の III₁ 型結晶性セルロースに対し、高い反応性を示すことが明らかにされている(Igarashi *et al.* 2012)。そこで、III₁ 型結晶性セルロースに対する活性の異なる変異体の取得し、それに基づき本酵素の結晶性セルロースへの反応機構について情報を得ることを目的として、ランダム変異導入法の開発と変異体の作製を行った。まず、変異を導入するために Mn²⁺ 存在下で Phi29 DNA ポリメラーゼによる

遺伝子増幅を行い、続いて十分な遺伝子を得るために Mn^{2+} 非存在下で遺伝子増幅を行った。 Mn^{2+} 濃度等の条件検討の結果、酵素の機能改変に最適と考えられている 1 kb あたり 2-3 変異が導入される条件を見出した。変異導入遺伝子を用いて *P. pastoris* の形質転換を行い、得られた数百の変異体についてスクリーニングを行った後、活性のある変異体について非晶性基質としてリン酸膨潤セルロース (PASC)、結晶性基質としてアンモニア処理したシオグサ由来 III₁ 型セルロースを用いて活性の違いを検討した。その結果、非晶性セルロースには活性を保持している一方で、結晶性セルロースに対する活性が著しく低下した変異体を得られた。ひとつの変異体では、CD のサブサイト+4 のトリプトファン残基への変異 (Trp267Cys) が起こっており、結晶性セルロース分解には基質の取り込み口に位置する Trp が重要であると明らかにした先行研究の結果 (Koivula *et al.* 1998) と同様であった。また、もうひとつの変異体では CBM のジスルフィド結合を形成するシステイン残基への変異 (Cys25Tyr) が確認されたことから、セルロースへの吸着性が変化したことが示唆された。また、一部の變異体について加水分解活性とタンパク質量の比較検討を行ったところ、生成物の出口に位置するサブサイト-2 付近の変異 (Gly421Asp) が比活性の向上につながる可能性が示唆された。

5. まとめ

本研究では、担子菌由来の CBH II (*PcCel16A*) の加水分解触媒機構を明らかにすることを目的とし、まず *PcCel16A* の X 線結晶構造解析を行った。*PcCel16A* の触媒中心はこれまでに構造が明らかにされた担子菌や子囊菌の GH ファミリー6 の CBH と同様に、2 つのループで覆われたトンネル型構造であった。N 末端ループは基質の結合に伴い大きな構造変化を起こすことから、セルロース鎖の加水分解機構に関与することが示唆された。アミノ酸のプロトン化状態を含めた詳細な解析の結果、一般酸触媒近傍の水素結合ネットワークの組換えによるプロトン供与と N 末端ループの構造変化の仕組みを明らかにした。

また、*PcCel16A* の機能改変に適用可能なランダム変異導入法の開発を行い、変異体の効率的な取得法を確立した。結晶性セルロースの分解に重要な残基への変異や、比活性を高めると示唆される変異を見出したことによって、反応メカニズムの解析や酵素の効率化に向けた道筋を示した。