

Molecular and functional analysis of glycoside hydrolase family 7 cellobiohydrolases from filamentous fungi

その他のタイトル	糖質加水分解酵素ファミリー7に属する糸状菌由来セロビオヒドロラーゼの分子機能解析
学位授与年月日	2014-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00006907

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中村 彰彦

植物細胞壁の主要な構成成分であるセルロースに対する加水分解反応を触媒する酵素はセルラーゼと総称されている。このうち、結晶性セルロースに対して高い分解活性を示し、反応生成物としてセロビオースを与えることを特徴とする酵素については、さらにセロビオヒドロラーゼ(CBH)と命名されている。一方、セルラーゼはタンパク質構造に基づく糖質加水分解酵素ファミリーによっても分類されており、例えば、セルロース分解糸状菌が生産する主要なセルラーゼは糖質加水分解酵素ファミリー7に属し、Cel7と呼ばれている。この中で、セルロース分解性糸状菌 *Trichoderma reesei*が生産する主要なCBHである *TrCel7A*は結晶性セルロース表面のセルロース分子鎖を還元末端から取りこみ、これを連続的に加水分解してセロビオースを切り出す反応、すなわちプロセッシブな加水分解反応を行うことが知られている。また、このような性質に関与する *TrCel7A*のタンパク質構造としては、基質結合サイト上に存在する3つのループ領域で覆われたトンネル構造が重要であることが報告されている。しかしながら、未だにその構造と酵素機能との関係は十分に整理されているとは言えない。

このような背景を受けて、本研究では、まずCBHのトンネル構造の入り口であるサブサイト-7及び-4にトリプトファン残基Trp40及びTrp38が特異的に保存されていることに着目し、これらの残基の機能を明らかにすることを試みた。天然酵素の *TrCel7A*(WT)、これのTrp40残基をAlaに替えた変異酵素(W40A)及びTrp38残基をAlaに替えた変異酵素(W38A)を用いて結晶性セルロースに対する活性を生化学的な反応解析により比較したところ、2種の変異酵素では結晶性セルロースに対する活性が著しく低下することを明らかにした。これにより、これら2つのトリプトファン残基は結晶性セルロース表面に存在するセルロース分子鎖の加水分解反応のために重要であることが確認された。これに対して、2種の変異酵素により可溶性セロオリゴ糖cellotetraoseの加水分解反応を行った結果では、WTと比較してW38Aでは反応効率が向上し、逆にW40Aでは反応効率が低下した。このことから、Trp38はcellotetraoseの活性中心への送り込みに対しては機能するが、一方、Trp40残基はcellotetraoseの認識と取り込みに対して必要でないことが明らかとなった。すなわち、Trp40残基は結晶性セルロースの表面に存在するセルロース分子鎖の取り込みに対してのみ特異的な働きをすることが示された。また、その理由は、結晶構造上に存在するセルロース分子鎖では分子鎖同士の相互作用が強く、それにより分子鎖の還元末端の自由度が低いためと考えられた。そこで、このことを分子動力学シミュレーションによって検証することを試みた。その結果、WTではサブサイト-7にセルロースの還元末端が吸着すれば分子鎖の取り込み可能であるのに対し、W40Aではサブサイト-7から分子鎖を取り込めないことが示された。以上のことから、*TrCel7A*では、トンネル構造の入口に特異的に保存されているTrp40残基でセルロース分子鎖の還元末端を認識してこれを取り込み、さらにTrp38残基を利用してセルロース分子鎖を活性中心に分子鎖を送り込むことで結晶性セルロースを効率的に分解するというメカニズムを提案するに至った。

CBHについては、その構造中に存在する3つのループ領域の内、特に活性中心を覆うループ領域の有無により子囊菌由来のグループと担子菌由来のグループに分かれることが知られている。そこで、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の主要なCBHである *PcCel7C* と *PcCel7D* の機能を *TrCel7A* のそれと比較することでトンネル構造とプロセッシブ反応の関係について知見が得られるとの着想を得て、ループ領域構造の差異が結晶性セルロース表面上に存在するセルロース分子鎖に対するプロセッシブ反応に与える影響について解析を行った。まず、*PcCel7C*、*PcCel7D* 及び *TrCel7A* について、結晶性セルロースに対する生化学的な反応速度を比較した。その結果、いずれも結晶性セルロースを分解することができるが、その分解活性は *TrCel7A* が最も高く、これに *PcCel7D* が続き、そして *PcCel7C* が最も低いことが明らかとなった。また、高速AFMを用いて、各酵素について結晶性セルロース分解における酵素一分子の挙動解析を行ったところ、*TrCel7A* と同様に、*PcCel7C* 及び *PcCel7D* についてもセルロース上を移動することが確認できた。すなわち、活性中心を覆う1つのループ領域が欠損している担子菌由来CBHでもプロセッシブ反応を行えることが明らかとなった。さらに、高速AFM観察に基づき3種のCBHについて移動速度を解析すると、*PcCel7C* が最も速く、次が *PcCel7D* であり、最も遅いものが *TrCel7A* であった。一方、セルロース表面での滞在時間の解析によってセルロース表面からの解離速度定数を求めると、*TrCel7A* が最も小さく、次が *PcCel7D*、最も大きかったのが *PcCel7C* であった。さらに、この値から計算したプロセッシブ反応を行っている酵素の半減時間と平均移動速度から計算したプロセッシビティ値について評価を行うと、*TrCel7A* が最も大きく、次いで *PcCel7D*、*PcCel7C* の順であることが判った。以上の結果から、一分子酵素の観察結果に基づくプロセッシビティに関する評価がCBHによる結晶性セルロース分解特性を良く反映していることを明らかにした。

本研究の成果によって、CBHの構造的特徴と結晶性セルロース分解特性に関係について極めて重要な科学的な新知見を得ることができた。この成果はCBHによる結晶性セルロースの分解特性の定量解析において大きな進歩と言えるとともに、今後、CBHの機能改質していくために必要な理論的な評価指標として活用することが可能である。以上、学術上ならびに応用上、本研究の成果は貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文を博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。