

## 審査の結果の要旨

氏名 立岡 美夏子

セルロースはD-グルコースの $\beta$ -1,4-グリコシド結合に基づく直鎖分子によって構成された高分子化合物であるが、天然セルロースでは、これが束となり結晶性を有するマイクロフィブリルとして存在している。そのため、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。このようなセルロースを効率的に分解できる糸状菌においては、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー7 および6 に属するセロビオヒドロラーゼ (CBH) を主要な酵素として生産する。このうち、GH ファミリー7 に属する CBH においては、その構造と反応機構の関係についてすでに多くの知見が得られている。一方、GH ファミリー6 に属する CBH の構造と反応機構の詳細については未だに不明な点が多い。そこで、論文申請者は、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観点から、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の GH ファミリー6 に属する CBH (*PcCel16A*) について、その構造と反応機構の関係を明らかにすることを目的に以下の研究に取り組んだ。まず、X線解析により *PcCel16A* の立体構造を決定し、さらに高分解能 X線結晶構造解析により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 *PcCel16A* の構造的特徴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。本論文は、上記の実験結果を取り纏めたものであり、その主要な成果を以下に記載する。

*PcCel16A* は、GH ファミリー6 に属する触媒ドメイン (CD) と糖質結合モジュール (CBM) の2ドメイン構造をとるが、論文申請者は *PcCel16A*-CD について、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて異宿主発現生産し、さらにこれを結晶化した後、X線構造解析によりアポ体の構造およびセロビオースを結合した複合体の構造を分解能 1.2 Å および 2.1 Å でそれぞれ決定した。それに基づき、*PcCel16A*-CD 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) によって覆われた構造を有することを明らかにした。この構造は、すでに報告されている他の糸状菌由来の GH ファミリー6 に属する CBH の場合と類似しているが、本研究では、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いこと、また、C末端側ループは両者でほとんど構造変化を起こさないが、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等の新たな知見を得て、N末端ループが加水分解反応に直接的に関与していることを示した。

また、GH ファミリー6 に属する CBH は、セルロースの分子鎖から $\alpha$ -セロビオースを生成する立体反転型の加水分解を触媒することがすでに知られているが、その反応機構の詳細については明らかになっていないため、さらに論文申請者は *PcCel16A* の活性中心について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線構造解析を行い、それぞれについて分解能 0.8 Å および 0.85 Å の構造情報を得ることに成功した。その結果、アポ体ではアスパラギン酸残基 (Asp216) がプロトンを保持してい

ること、一方、複合体では脱プロトン化されていることを C-O 結合距離の測定により明らかにし、この残基が一般酸触媒として機能している直接の証拠を示した。また、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することを示し、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を示すなど、GH ファミリー 6 に属する CBH の反応機構について新たに重要な知見を与えた。

また、PcCel16A は天然セルロースのアンモニア処理によって得られる III<sub>I</sub> 型結晶性セルロースに対して高い反応性を有することを特徴としている。そこで、III<sub>I</sub> 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作用機作について情報を得ることを目的として、論文申請者は新たにランダム変異導入法の開発を試み、その結果、ハイスループットで変異体酵素を得ることに成功した。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、III<sub>I</sub> 型結晶性セルロースと非結晶性のリン酸膨潤セルロース (PASC) を基質として加水分解活性の違いを比較した。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 2 つの変異体を得られた。また、ひとつの変異体では、既往の研究でも結晶性セルロース上の分子鎖の取り込みに重要とされている CD のサブサイト+4 に存在するトリプトファン残基への変異 (Trp267Cys) が起こしており、また、もうひとつの変異体では、結晶性セルロースへの吸着に必要な 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) が存在することを明らかにした。これに加えて、両基質への比活性向上に繋がると考えられるサブサイト-2 付近のグリシン残基への変異 (Gly421Asp) を起こした変異体も取得した。

以上、論文申請者である立岡美香子は、PcCel16A を対象とする実験を通して、GH ファミリー 6 に属する CBH の構造と反応機構について重要な知見を得るとともに、セルロースの酵素糖化の効率化に向けた変異体の作製においても新たな可能性を示した。これらの研究成果は学術上、応用上、ともに貢献するところが少なくないと判断され、よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。