

## 論文の内容の要旨

生物材料科学 専攻

平成23年度博士課程 進学

氏名 中村 彰彦

指導教員名 鮫島 正浩

論文題目 **Molecular and functional analysis of glycoside hydrolase family 7 cellobiohydrolases from filamentous fungi**

**(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)**

### 1. 序論

セルロースは植物等の細胞壁を構成する主要な成分として地球上に最も多量に生産されている有機化合物であり、自然界においては担子菌（キノコ）や子囊菌（カビ）などの糸状菌及びバクテリアなどによって分解されている。これらの微生物は様々なセルラーゼを生産してセルロースを分解しているが、中でも糖質加水分解酵素ファミリー7(GH7)に分類されているセルラーゼ(Cel7)は糸状菌に特異的であり、セルロースを炭素源とした際に菌体外に生産される酵素の半分を占める重要な酵素である。セルロース分解性糸状菌の *Trichoderma reesei* (子囊菌 *Hypocrea jecorina*)由来Cel7はセルロースの還元末端からセロビオースを切りだすセロビオヒドロラーゼ(CBH)とセルロース鎖の途中を切断するエンド型グルカナーゼ(EG)の2種類に大別されており、CBHのみが結晶性セルロースを効率的に分解できる。まず両者の構造的違いとして、CBHではセルロース鎖と相互作用をするサブサイトを覆う様にループ構造が存在しトンネル様の構造をしているのに対し、EGではループ領域が欠損しており活性中心が溶媒に露出している事がX線結晶構造解析により明らかにされている。またCBHの触媒ドメインは-7から+3までの10個のサブサイト構造を有しており、トンネル構造の入り口であるサブサイト

-7及び-4にはCBHに特異的なトリプトファン残基Trp40及びTrp38が保存されている。加えて反応性の違いとして*T. reesei*由来CBH (*TrCel7A*)では、セルロース鎖を取り込んだ後に、連続的にセロビオースを切り出すプロセッシブ反応を行う事が知られている。そして、このプロセッシブ反応には*TrCel7A*の3つループ領域で覆われたトンネル構造が重要である事が報告されている。一方、CBHについてアミノ酸配列の相同性に基づく分類系統樹を作成すると、3つループ構造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。

本研究の目的は、これらのGH7のCBHに特徴的な構造とその差異が結晶性セルロースの分解性に与える影響を調べることで、CBHの分子機能を明らかにすることである。そこで、まず*T. reesei* 由来CBH である*TrCel7A*のトリプトファン残基Trp40及びTrp38をアラニン残基に変化させた変異体と天然型酵素の活性を比較する事で各トリプトファン残基によるセルロース鎖の認識機能について解析した。次に、担子菌*Phanerochaete chrysosporium*がセルロース分解培地で主に生産するCBHである*PcCel7C*と*PcCel7D*の活性を*TrCel7A*のそれと比較することで、ループ領域構造の差異が結晶性セルロースに対するプロセッシブ反応に与える影響について解析した。

## 2. 結果と考察

### CBHに特異的なトリプトファン残基によるセルロース鎖の認識特性の解析

天然型*TrCel7A*(WT)、Trp40をAlaに変えた変異体(W40A)及びTrp38をAlaに変えた変異体(W38A)の結晶性セルロースに対する活性を比較した。その結果、2種の変異体では著しく活性が低下していた事から、これら2つの残基は結晶性セルロースに対し、CBHとして働く為に重要である事が確認された。次に2つの残基の働きを定量的に評価する為に、固体の結晶性セルロースと異なり濃度の定義が可能である可溶性のオリゴ糖に対する反応性をWT、W40A及びW38Aについて比較した。様々な濃度のCellotetraoseからの生成物生産速度を測定し、反応モデルに基づく式を導出して各反応速度定数を求めた。反応効率を示す $k_{cat}/K_m$ の値を比較するとWTと比較してW38Aは反応効率の減少、W40Aは反応効率の上昇を示した。即ちTrp38は基質の活性中心への取り込みを上昇させる効果があると確認できた一方で、結晶性セルロースの場合とは異なりCellotetraoseの分解には必ずしも、Trp40による基質の認識は必要ではないことが明らかとなった。つまりTrp40の働

きを考える上では、結晶性セルロースと可溶性オリゴ糖の性質の違いが重要である事が明らかとなった。2つの基質の特に大きな違いとして、結晶性セルロース表面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により還元末端の自由度が低い事が想定される。つまり、Trp40によって還元末端のグルコース残基を認識することが反応を開始するために重要ではないかと推測された。そこで、分子動力学シミュレーションによってこの検証を試みた。その結果、WTではサブサイト-7にセルロース末端が吸着すれば取り込み可能であるのに対し、W40Aでは少なくともサブサイト-5まで吸着しなければセルロース鎖を取り込めない事が判明した。これはTrp40によって、結晶性セルロース表面に存在するセルロース分子鎖の還元末端1グルコース残基を捉えることが反応を開始するために極めて重要である事を示している。その一方で、Cellotetraoseのような可溶性のオリゴ糖ではサブサイトの深くに基質が直接に結合可能なことからW40の寄与が少ない事も示している。一方、*T. reesei*由来CBHのTrCel7Aでは、トンネル入口に特異的に保存されているトリプトファン残基Trp40でセルロース分子鎖を認識して取り込み、さらにTrp38を利用してセルロース分子鎖を活性中心に送り込む事で結晶性セルロースを効率的に分解していると考えられた。

#### セロビオヒドロラーゼの結晶性セルロースに対するプロセッシブ反応に関する解析

*P. chrysosporium*由来CBHのPcCel7CとPcCel7Dは*T. reesei*由来TrCel7Aが保有するループ領域の1つが欠落しているが、結晶性セルロースを分解する事が出来る。しかしながら、結晶性セルロースIIIに対する生化学的な反応速度を比べると、PcCel7DはTrCel7Aと同等の分解速度であったが、PcCel7Cによる分解速度はこれより遅かった。そこで、この速度の差が何に依存しているかを解析する目的で、高速AFMを用いて、各酵素の結晶性セルロースIIIに対して一分子を観察を行ったところ、PcCel7C及びDについても、TrCel7Aと同様に、セルロース上を移動する酵素分子を観測する事ができた。すなわち、サブサイト-7および-4の2つのトリプトファン残基を保有しているが、ループ領域の1つが欠損している担子菌由来CBHもプロセッシブ反応を行う事が分かった。一方、高速AFM観察に基づき3種のCBHについて運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。次にセルロース表面での滞在時間を解析し、セルロース表面からの解離速度定数を比較するとTrCel7Aが最も小さく、

次がPcCel7D、最も大きかったのがPcCel7Cであった。そして、この値から計算される半減期と平均速度から半減距離を推定すると、TrCel7Aが最も長く、次いでPcCel7D、PcCel7Cの順であった。高速AFMで観測される速度はプロセッシブ反応サイクルの速度を示しており、また解離速度定数はセルロース鎖へのアフィニティを反映すると判断されることから、アフィニティの高い酵素ほどプロセッシブ反応サイクルの速度は遅いが、プロセッシビティが高いという関係にあることが明らかとなった。また通常の生化学的手法に基づく活性測定により得られた結晶性セルロース分解速度はプロセッシブサイクルの速度や解離速度定数よりもプロセッシビティと相関性のあることが示された。さらにプロセッシビティは速度定数ではなく、触媒ドメインの一回の吸着当りの反応効率と定義される事から、CBHの触媒ドメインが還元末端グルコース残基を捉えられる確率が低く、その速度が遅い事がCBHによる結晶性セルロースの分解反応全体の律速であると考えられた。

### 3. まとめ

GH7に属するCBHが結晶性セルロースの表面に存在する自由度の低いセルロース分子鎖の末端を捉え分解を開始する上で、サブサイト-7および-4に存在する2つのトリプトファン残基が重要な機能を果たしていることを明らかにした。また、GH7のCBHは、セルロース分子鎖が強固に束となり反応開始可能な末端が少ない結晶性セルロースの分解において、プロセッシブ反応により触媒ドメインの一回の吸着当りの反応効率を上昇させる事を分子機能的な特徴とする酵素であることを明らかにした。