

学 位 論 文 題 名

Structural Biology of Cellulosome Components

(セルロソーム構成要素の構造生物学的研究)

学位論文内容の要旨

セルロースは植物の細胞壁の主要成分として地球上に最も豊富に存在するバイオマスの1つである。セルロース分解酵素であるセルラーゼを産生できる一部の微生物に限って、セルロースを炭素栄養源として利用することができる。その中でも、結晶性セルロースを分解できるほど高効率のセルラーゼ分解能を持つ、巨大なタンパク質複合体セルロソームを産生する微生物が知られている。セルロソームは、複数の活性タンパク質と1つの足場タンパク質が会合した、非常に特徴的な構造をとっている。活性タンパク質は、さまざまなセルラーゼと糖質結合タンパク質からなる。対照的に足場タンパク質は、まったく酵素活性を持たず、複数の活性タンパク質とタンパク質-タンパク質相互作用によって会合し、擬似の枝分かれ構造を構成する役割を果たしている。セルロソーム全体としては、多数の活性モジュールが柔軟性のある部位でつながれたマルチドメイン様の構造をとっており、含まれるセルラーゼの多様性と、この独特の柔軟性を持った構造が、セルロソームの極めて高いセルロース分解活性に寄与している。一方で、セルラーゼ活性や糖質結合活性、そしてセルロソームの高次構造を支えるタンパク質-タンパク質相互作用部分といった原子レベルの詳細な機構については、未解明な部分が多い。本研究は、X線結晶構造解析によってセルロソームの詳細な構造を明らかにし、そこからセルロソームの高効率セルラーゼ活性や、独特の高次構造の詳細を解き明かしていく目的で行っている。

本研究は、三重大学大学院資源循環学科と共同研究を行っており、代表的なセルラーゼ分解性嫌気性菌である *Clostridium thermocellum* 及び *Clostridium josui* 由来セルロソームの構成タンパク質について、X線結晶構造解析に取り組んでいる。特に *C. thermocellum* セルロソームの活性タンパク質 CelJ 中の活性モジュール Cel44A について、X線結晶構造解析に成功した。CelJ は2つの活性モジュールと2つの糖質結合モジュールで構成されるマルチドメイン酵素であり、その活性モジュールの1つである Cel44A は、糖加水分解酵素ファミリー44 (GH44) に分類されるセルラーゼである。Cel44A は β -1,4-エンドグルカナーゼ活性のほかにキシラナーゼ活性、リケナーゼ活性、キシログ

ルカナナーゼ活性が確認されており、基質特異性に幅があることが知られていた。

野生型 Cel44A は、亜鉛の異常散乱を用いた 2 波長異常散乱法によって位相決定され、0.96Å の高分解能で構造が決定された。Cel44A は TIM バレルに似た TIM-like バレルと β -サンドイッチドメインから構成され、カルシウムイオンが結合した小さなドメインが付属していた。全体構造は、 β -サンドイッチ部も含めて糖加水分解酵素 GH5, 30, 39, 51 にそれぞれ属する酵素と類似しており、この立体構造類似性から、2 つの活性残基が推定された。これらの糖加水分解酵素で、基質特異性はそれぞれに異なっており、GH30, 39, 51 の酵素がエキソグルカナナーゼ活性であるのに対し、GH5 と Cel44A が属する GH44 はエンドグルカナナーゼ活性を示す。次に、既に活性が確認されていたセロオリゴ糖を結晶に導入し、反応後産物がタンパク質に結合した状態の複合体構造を得ることに成功した。この構造では、導入した 6 糖もしくは 5 糖の非還元側 4 糖が反応後産物として電子密度中で明確に観察され、詳細な基質の認識環境が明らかとなった。構造類似性から推定された 2 つの活性残基は、基質の切断端の上下に位置しており、加水分解反応を行うために適当な位置を占めていた。そこで、この 2 つの残基にそれぞれグルタミンへの変異をかけた変異体を作製し(E186Q, E359Q)、基質として活性が確認されているカルボキシメチルセルロースに対する活性測定を行った結果、野生型と比較して明らかな失活が確認された。この実験結果と GH5, 30, 39, 51 との立体構造類似性とを合わせて、この 2 つのグルタミン酸が活性残基であると同定した。この 2 つの変異体のうち、E186Q と基質との複合体の結晶構造も決定し、活性部位より還元末端側の基質認識機構も明らかとなった。糖加水分解酵素には、保持型と反転型の 2 つの反応メカニズムが存在することが知られているが、以前に GH44 に属する酵素について、反転型であるという実験結果が報告がされている。この GH44 に属する酵素と Cel44A は 60%近い、高い 1 次配列相同性があるにも関わらず、本研究の立体構造から得られた情報は、保持型の加水分解を行うことを強く示唆していた。そこで、プロトン NMR によって反応産物の立体異性体の経時的変化を測定し、Cel44A では保持型の加水分解が行われているという直接的な情報を得ることができた。Cel44A の特徴とも言える、幅のある基質特異性は、基質が結合する分子表面の溝に空間的な余裕があること、及び基質との数箇所の水素結合によって説明することができた。特に分子表面に、基質が結合する溝から分岐するような大きな溝は、Cel44A のキシログルカナナーゼ活性を説明するのに適当であり、キシログルカナナーゼ活性の詳細な解析が進行中である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 佐々木 直 樹

副 査 教 授 渡 邊 信 久 (名古屋大学)

副 査 准教授 姚 関

学 位 論 文 題 名

Structural Biology of Cellulosome Components

(セルロソーム構成要素の構造生物学的研究)

セルロースは植物の細胞壁の主要成分として地球上に最も豊富に存在するバイオマスの1つである。セルロース分解酵素であるセルラーゼを産生できる一部の微生物に限って、セルロースを炭素栄養源として利用することができる。その中でも、結晶性セルロースを分解できるほど高効率のセルラーゼ分解能を持つ、巨大なタンパク質複合体セルロソームを産生する微生物が知られている。セルロソームは、複数の活性タンパク質と1つの足場タンパク質が会合した、非常に特徴的な構造をとっている。活性タンパク質は、さまざまなセルラーゼと糖質結合タンパク質からなる。対照的に足場タンパク質は、まったく酵素活性を持たず、複数の活性タンパク質とタンパク質-タンパク質相互作用によって会合し、擬似の枝分かれ構造を構成する役割を果たしている。セルロソーム全体としては、多数の活性モジュールが柔軟性のある部位でつながれたマルチドメイン様の構造をとっており、含まれるセルラーゼの多様性と、この独特の柔軟性を持った構造が、セルロソームの極めて高いセルロース分解活性に寄与している。一方で、セルラーゼ活性や糖質結合活性、そしてセルロソームの高次構造を支えるタンパク質-タンパク質相互作用部分といった原子レベルの詳細な機構については、未解明な部分が多い。

本研究では、代表的なセルラーゼ分解性嫌気性菌である *Clostridium thermocellum* セルロソームの活性タンパク質 CelJ 中の活性モジュール Cel44A について X 線結晶構造解析を行い、セルロソームの高効率セルラーゼ活性や、独特の高次構造の詳細を調べた。CelJ は2つの活性モジュールと2つの糖質結合モジュールで構成されるマルチドメイン酵素であり、その活性モジュールの1つである Cel44A は、糖加水分解酵素ファミリー44 (GH44) に分類されるセルラーゼである。Cel44A は β -1,4-エンドグルカナーゼ活性のほかにキシラナーゼ活性、リケナーゼ活性、キシログルカナーゼ活性が確認されており、基質特異性に幅があることが知られていた。

野生型 Cel44A は、亜鉛の異常散乱を用いた 2 波長異常散乱法によって位相決定され、0.96Å の高分解能で構造が決定された。Cel44A は TIM バレルに似た TIM-like バレルと β -サンドイッチドメインから構成され、カルシウムイオンが結合した小さなドメインが付属していた。全体構造は、 β -サンドイッチ部も含めて糖加水分解酵素 GH5, 30, 39, 51 にそれぞれ属する酵素と類似しており、この立体構造類似性から、2 つの活性残基が推定された。これらの糖加水分解酵素で、基質特異性はそれぞれに異なっており、GH30, 39, 51 の酵素がエキソグルカナーゼ活性であるのに対し、GH5 と Cel44A が属する GH44 はエンドグルカナーゼ活性を示す。次に、既に活性が確認されていたセロオリゴ糖を結晶に導入し、反応後産物がタンパク質に結合した状態の複合体構造を得ることに成功した。この構造では、導入した 6 糖もしくは 5 糖の非還元側 4 糖が反応後産物として電子密度中で明確に観察され、詳細な基質の認識環境が明らかとなった。構造類似性から推定された 2 つの活性残基は、基質の切断端の上下に位置しており、加水分解反応を行うために適当な位置を占めていた。そこで、この 2 つの残基にそれぞれグルタミンへの変異をかけた変異体を作製し(E186Q, E359Q)、基質として活性が確認されているカルボキシメチルセルロースに対する活性測定を行った結果、野生型と比較して明らかな失活が確認された。この実験結果と GH5, 30, 39, 51 との立体構造類似性とを合わせて、この 2 つのグルタミン酸が活性残基であると同定した。この 2 つの変異体のうち、E186Q と基質との複合体の結晶構造も決定し、活性部位より還元末端側の基質認識機構も明らかとなった。糖加水分解酵素には、保持型と反転型の 2 つの反応メカニズムが存在することが知られているが、以前に GH44 に属する酵素について、反転型であるという実験結果が報告されている。この GH44 に属する酵素と Cel44A は 60% 近い、高い 1 次配列相同性があるにも関わらず、本研究の立体構造から得られた情報は、保持型の加水分解を行うことを強く示唆していた。そこで、プロトン NMR によって反応産物の立体異性体の経時的変化を測定し、過去の報告を覆して Cel44A では保持型の加水分解が行われているという直接的な情報を得ることができた。Cel44A の特徴とも言える、幅のある基質特異性は、基質が結合する分子表面の溝に空間的な余裕があること、及び基質との数箇所の水素結合によって説明することができた。特に基質結合部位以外に分子表面に存在する大きなクレフト構造から、Cel44A のキシログルカナーゼ活性は側鎖の位置に制限されずに主鎖部分を切断できることを示唆している。

本学位論文は、エンドグルカナーゼ Cel44A について構造決定を行い、さらに基質との複合体結晶構造解析により、活性機構と独特の基質認識機構を研究したものである。本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあり、よって審査員一同は申請者が博士(理学)の学位を得る十分な資格があるものと認めた。