

学位論文（要約）

論文題目：Trichoderma reesei 由来セロビオヒドロラーゼ糖結合性モジュールの
ドッキングシミュレーション研究

氏名：椎葉 大偉

糸状菌 *Trichoderma reesei* は結晶性セルロースを基質とする 2 種の高活性セルラーゼ (Cel7A、Cel6A) を生産する。両者はセルロース分解の方向性に違いがあり、Cel7A はセルロース分子鎖を還元末端側から非還元末端側に向かってセロビオース単位で加水分解するのに対し、Cel6A はその逆方向の分解機構が示唆されている。両者とも基質認識に特化した糖質結合モジュール (CBM) を有している。CBM の基質認識面にある 3 つの芳香族アミノ酸が、平面を形成し、セルロース結晶の疎水面を選択的に認識する。両者の野生型 CBM と比較して、部位特異的変異導入による変異型 CBM はセルロース結晶に対する親和性を大きく変化することが知られている。本論文ではこれらの知見を背景に、CBM のセルロース結晶面への吸着挙動や基質特異性についての体系的な理解を目的とした分子モデリングおよび分子シミュレーション (分子動力学 "MD") 研究を実施した。

野生型 Cel7A CBM とセルロース結晶基質間の相互作用解析より、Cel7A CBM が最も安定な親和性を示すセルロース結晶面、およびセルロース結晶に対する Cel7A CBM の安定配向が電子顕微鏡観察や酵素学的研究によって示された Cel7A CBM の選択的吸着や Cel7A の加水分解方向と一致する結果が得られた。さらに、CBM がセルロース結晶疎水性表面に特定の吸着点を持つ可能性も示唆された。吸着点と推定される CBM のセルロースに対する結合エネルギー極小領域が、セルロース分子鎖軸に沿ってセロビオース単位に相当する約 10 Å 間隔で存在することから、CBM は加水分解の進行と連動してセロビオース単位で不連続に移動するものと推定された。また、エネルギー極小点は、疎水性面幅をセルロース分子鎖 1 本まで減少させても確認され、加水分解初期段階から CBM は特定の吸着点に結合するものと推定された。また、Cel7A CBM の結合面アミノ酸に部位得的変異を導入した変異 CBM とセルロース結晶基質間の相互作用解析の結果、酵素学的研究によって示された変異 CBM と野生型 CBM の吸着能の傾向を定性的に再現した。さらに Cel6A CBM に対する同様な相互作用解析の結果から、セルロースとの相互作用が Cel7A CBM より大きい傾向が示され、これも CBM 吸着実験の結果と一致した。一方、Cel6A CBM のセルロース結晶面に対する安定配合は Cel7A CBM と反対方向となり、この点についても実際の Cel6A に対して推定されたプロセッシング方向と一致した。

以上の研究成果から、CBM のセルロース結晶認識に関わる重要アミノ酸を特定するとともに、それらが、CBM のセルラーゼの基質認識において吸着能だけでなく方向特異性に関与する可能性が示され、これまで酵素学・生物物理学的な実験によって得られた CBM の基質認識特性に対して、熱力学的評価と分子レベルでの理解を与える成果が得られた。