

## 学 位 論 文 要 旨

糖質代謝に関わるピロロキノリンキノン依存性 Auxiliary Activities ファミリー12 酵素  
の酵素学的機能に関する研究

### Characterization of pyrroloquinoline quinone-dependent Auxiliary Activities family 12 enzymes involved in carbohydrate metabolism

環境資源共生科学専攻 森林資源物質科学大講座

梅澤 究

近年、地球温暖化やエネルギー問題を背景にして、化石資源の代替資源の開発が切望されている。その中でも植物に由来するセルロース系バイオマスはその豊富な賦存量から注目されている。セルロースは D-グルコース間の  $\beta$ -1,4-グルコシド結合により形成される多糖類であり、分子鎖同士の相互作用により結晶性を呈するために難分解性である。この難分解なセルロースを低分子化（糖化）する手段として、糸状菌の酵素系が注目されている。

糸状菌はセルラーゼなどの加水分解酵素とファミリー9 溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (LPMO9) などの酸化還元酵素の協調作用によりセルロースを分解する。LPMO9 はセルロース鎖内部の  $\beta$ -1,4-グリコシド結合の C1 位または C4 位に酸素を付加し、セルロース鎖を開裂させる銅依存性酸化還元酵素である。LPMO9 の活性化には外部からの電子供給が必要であるが、この電子供与体としてアスコルビン酸などの低分子化合物とともに、セロピオース脱水素酵素 (CDH) などが見出されており、特に後者は LPMO9 の生理的な電子供与体として有力視されている。

CDH は糖質関連酵素ファミリー (CAZy) による分類において Auxiliary Activities (AA) ファミリー3 に分類されるフラビンドメインによってセロピオースを酸化する。ここで得られた電子は AA8 に分類されるヘムドメインに分子内電子伝達され、さらに LPMO9 などの外部電子受容体に分子間電子伝達される。これまで LPMO9 の電子供与体として知られていた酵素は CDH のみであったが、最近、N 末端に AA8 ドメインを持ち、C 末端には CBM1 を有するピロロキノリンキノン (PQQ) 依存性ピラノース脱水素酵素 (CcPDHA) が見出された。本酵素は 2-ケト-D-グルコースに対して最大活性を示すのに加えて、L-フコースや数種のピラノースに対しても活性を有していた、この新規ピラノース脱水素ドメインには構造的な新規性から AA ファミリー12 が新たに割り当てられた。

新規酵素である CcPDHA の CBM1 はセルロースに対して結合能を有していたことから、セルロース分解への関与が示唆されたものの、その生理学的役割については未だ不明であった。そこで本研究では、この PQQ 依存性ピラノース脱水素酵素の生理的役割を明らかにし、また、AA12 酵素の酵素学的機能を明らかにするために以下の研究を行った。

第二章では、CcPDHA が LPMO9 の電子供与体として働く酵素であるという仮説のもと、CcPDHA の LPMO9 への電子供給能を評価した。*Neurospora crassa* 由来の 2 種類の LPMO9 (NcLPMO9F, NcLPMO9C) に対する CcPDHA の電子供給能を、LPMO9 によるセルロース分解活性に基づき評価した。その結果、CcPDHA はいずれの LPMO9 に対しても高い電子供給能を示したことから、本酵素が LPMO9 の電子供与体として働きうることが示唆された。さらに、CcPDHA のドメイン欠損体を LPMO9 の電子供与体として用いた実験から、本酵素は AA8 ドメインを通じて LPMO9 に電子伝達していることおよび CcPDHA における CBM1 は結晶性セルロースに対する LPMO9 の活性化を促進する働きをしていることが示唆された。

第三章では、*C. cinerea* の有する CcPDHA ホモログのうち、特徴的なアミノ酸配列を有することが予想された 2 種類 (CcPDHB, CcPDHC) を酵母菌 *Pichia pastoris* を用い発現させ、組換え酵素の機能解析を行った。CcPDHB は構造的に特異な CBM1 を有しており、糖質吸着に重要な芳香族アミノ酸残基の一つがヒスチジンであり、C 末端に 13 残基程度の機能未知付加配列を有していた。組換え酵素の機能解析の結果、本酵素は CcPDHA と同様の基質特異性を示したが、その活性は非常に弱いものであった。また、本酵素はいずれの条件でもセルロースへの明確な吸着能を示さなかった。一方、CcPDHC は AA8 ドメインを有さず、AA12 ドメインと CBM1 のみからなるタンパク質であり、AA12 ドメインの触媒残基と予想されるヒスチジンがグルタミンに置換されていた。この酵素の組換え体を用いて種々の糖類およびアルコールに対する活性を測定したが、いずれの基質に対しても活性を示さなかった。これらの結果は、上記 2 種の CcPDHA ホモログが、機能を失った遺伝子である可能性を示している。

第四章では、グラム陰性菌 *Pseudomonas aureofaciens* のゲノム上に見いだされた CcPDHA ホモログ (Pa2KGDH) をクローニングし、大腸菌を用いて組換え酵素を発現し、その機能解析を行った。本酵素は CcPDHA と異なり、触媒ドメイン単独で構成されるタンパク質であった。機能解析の結果、本酵素は PQQ 存在下で特異的に 2-ケト-D-グルコースを酸化した。これは CcPDHA が数種のピラノースに対して高い活性有することとは異なる性質である。反応生成物の <sup>1</sup>H-NMR から、Pa2KGDH は基質の C1 位を酸化し、2-ケト-D-グルコン酸を生成することが明らかになった。本酵素と CcPDH の PQQ および Ca<sup>2+</sup>との結合に関わるアミノ酸および活性部位周辺のアミノ酸のほとんどが保存されており、両者が類似した構造的特徴を有していることから、細菌類においても CcPDHA と類似した特徴を有する AA12 ホモログが存在することが明らかになった。

本論文では、AA12 酵素の機能に関する多くの知見を得た。第二章で示したように CcPDHA は LPMO9 に高い電子供給能を示したことから、その生理的役割は LPMO9 への電子伝達にある可能性が高い。一方で、第四章で示したように、細菌類の AA12 ホモログも CcPDHA と同様に 2-ケト-D-グルコースを最適基質とし、2-ケト-D-グルコン酸を生成する機能を有していたことは、微生物界において 2-ケト-D-グルコース代謝系が広く存在することを示唆している。