

## 審査の結果の要旨

氏名 河 南 俊 郎

癌の湿潤および転移，エイズ，インフルエンザ，その他のレトロウイルスによって引き起こされる感染症，ならびに糖尿病などの極めて重篤な疾病においてグリコシダーゼの関与が明らかにされ，グリコシダーゼ阻害剤の臨床への応用研究が注目されている。

安全性に優れかつ選択的性の高いグリコシダーゼ阻害剤の開発研究においては，酵素反応機構をタンパク質の立体構造に基づき原子レベルで解析することが，極めて重要であると考えられる。

本研究は，*Bacillus* sp. KSM-330が産生するエンドグルカナーゼK (EGK) を研究対象として選び，安定同位体を用いたNMR分光法により極めて狭いpH-活性プロファイルを示す酵素反応を解析すると同時にグリコシダーゼの反応機構解析のための戦略を確立することを目指している。

まず，EGK遺伝子のサブクローニングにより大量発現系を構築し，第二に，EGKの加水分解反応によって生成した糖アノメリック位の立体配置の変化に伴う<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの経時的変化から，EGKの属するファミリー8酵素の反応立体選択性が反転の反応機構で進行することを明らかにしている。反応立体選択性は活性部位におけるアミノ酸側鎖の配向と相関していると考えられており，この結果は，ファミリー8酵素群の活性部位の構造を考察する上で意味あるものと考えられる。

第三に，酵素活性部位に存在し活性発現に重要と考えられるTrp残基の解析を行っている。EGKのTrp残基を反応部位解析のためのNMRプローブとするために，発現系により選択的にTrp残基側鎖C2位炭素を<sup>13</sup>C標識している。また，クロスピークの帰属は，部位特異的変異体を用いることにより行っている。これにより，二次元NMRスペクトル上で酵素分子中のTrpの挙動を包括的に捉えることが可能となった。

化学修飾剤NBSと反応するTrp残基を特定するために，修飾した<sup>13</sup>C標識EGKのNMR解析を行っている。この化学修飾では，<sup>13</sup>C標識部位のプロトンの脱離と連動し活性低下に伴ってスペクトル上の反応部位クロスピークが確実に消失する。このように，化学修飾における反応特性を生かした標識酵素の調製とNMR測定法の特徴を生かした組み合わせにより，酵素反応部位を明確に特定づける新たな方法を提示している。また，拮抗阻害剤存在下<sup>13</sup>C標識したEGKのNMR測定により，酵素活性発現に関与している2個のTrp残基(174および243位)の基質への結合の関与を明らかにしている。

更に，NMRの結果に基づき，2個のTrp残基変異体の酵素反応論的解析を行いTrp174およびTrp243が基質の結合と触媒作用の発現に関与していることを示した。

以上のように、安定同位体利用のNMRは、酵素活性部位と阻害剤との相互作用による立体構造変化や、化学修飾による官能基変換等の情報を、分子量50kDaにも及ぶ酵素分子でも正確に与えてくれることが示された。

第四に、触媒活性に重要なこれらのTrp残基に安定同位体を導入し、触媒反応機構の解析を行っている。2種類の安定同位体標識法を用いて、野生体のスペクトルのTrp主鎖、および側鎖特異的に同定し、更に、変異体の標識によりTrp残基の部位特異的帰属を終了している。<sup>15</sup>N標識した野生体の主鎖NHの重水素交換実験より、Trp174およびTrp243は、それぞれ親水的、疎水的環境下にあることが示唆された。この結果は、同ファミリー8に属する*clostridium thermocellum*の産生するCelAの立体構造とよく一致することが示された。

次に、EGK活性部位には、4個の酸性アミノ酸残基が存在していることがCelAX線結晶との比較から示唆されたことから、これらのアミノ酸残基の触媒反応への寄与について検討している。

変異体E130QとD191NのpH-比活性プロファイル比較から、Glu130とAsp191は、酵素活性発現に決定的な役目を担っており、この2つのアミノ酸残基の役割を解明するために、野生体および4種類の酸性アミノ酸残基の変異体についてTrp残基の<sup>13</sup>Cに直結した<sup>1</sup>HシグナルのpH依存性を解析している。

Glu193およびAsp300への変位導入は、化学シフトのpH依存性に影響を与えないものの、活性低下を招く小さな構造変化を起こしていることが判明している。この様に、生物学的挙動変化を伴う酵素活性部位の極めて小さな構造変化に対しても、NMR法は適切に情報を提供することを明示した。一方、Glu130およびAsp191の変異体はpH依存性を示さないことから、変異体E130QのAsp191およびD191NのGlu130のpKaが共に4以下であることが判明し、野生体Glu130とAsp191のpKaが、両者の相互作用により通常値4.0から5.5まで上昇していることを示した。

以上の結果より、EGKにおいて、この二つの触媒残基のpKa値が同じであることが著しく狭いpH-活性プロファイルが生じる原因になっていることを明らかにしている。

本研究により、グリコシダーゼの反応機構解析手法に関する新しいアプローチを示すとともに、本酵素の極めて狭いpH-活性プロファイルに関する新しい知見を明らかにしている。

以上、河南 俊郎の研究成果は酵素化学、生物有機化学、および医薬化学研究に資すること大であり、博士(薬学)の学位を授与するに十分なものと認めた。