

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 今村 博臣

本論文は glycoside hydrolase のファミリー 57 に関するもので、5 章からなる。

超好熱性古細菌 *Thermococcus litoralis* に由来する酵素について X 線結晶構造解析、酵素学的解析、およびタンパク質工学的解析を行い、ファミリー 57 酵素の立体構造、触媒機構、生体内での機能について研究を行った。

第一章では、*T. litoralis* 4- α -グルカノトランスフェラーゼ (TLGT) 遺伝子中に多量に含まれる AGA、AGG コドンが大腸菌ではレアコドンであることに着目し、TLGT 遺伝子を大腸菌で tRNA_{AGA}、tRNA_{AGG} およびシャペロニン GroELS と共発現する系を構築し、TLGT の発現量および可溶性に与える影響について検討している。tRNA_{AGA}、tRNA_{AGG} とともに TLGT の発現量を上昇する効果がみられた。また GroELS との共発現によって TLGT は効果的に可溶化された。可溶性画分の酵素活性は、tRNA_{AGA}/tRNA_{AGG}/GroELS すべてを共発現させた系では TLGT 遺伝子のみ発現させた場合よりもおよそ 5 倍上昇していた。

第二章では、人工基質 3KBG5CNP

を用い、TLGT の触媒反応が Ping-Pong Bi Bi 機構で進むことを明らかにしている。続いて、アノマー保持型酵素が反応途中で求核性触媒残基と基質が共有結合したグリコシル酵素中間体を形成することを利用し、3KBG5CNP を受容体基質非存在下で TLGT と短時間反応させた後、変性・分解して質量分析を行うことで、グリコシル酵素中間体のトラップ・検出に成功した。基質が共有結合したペプチドのシグナルの Post-source decay (PSD) 解析と、部位特異的変異体の解析により TLGT の求核性触媒が Glu123 であることを決定した。

第三章では、TLGT の X 線結晶構造解析について述べている。まず、セレノメチオニンラベルした TLGT 結晶を用い、多波長以上分散法によって分解能 2.8 Å で立体構造を決定した。次に、別の結晶を用い、リガンドが結合していない構造と阻害剤であるアカボースとの複合体構造を分解能 2.4 Å で決定した。TLGT は N 末端側のドメイン I と C 末端側のドメイン II の 2 つのドメインから構成されていた。ドメイン I のコア部分は、新規の (β/α)₇-バレルを有していた。バレルとそれに続く α ヘリックス領域の間には活性中心クレフトが形成されていた。複合体の構造から、Asp214 が TLGT の酸/塩基触媒残基として働くことが示された。更に、基質結合に関わる残基も明かとなった。また、活性中心クレフトを覆うループ部分と活性中心から離れた場所に存在する基質結合部位が、重合度の低いシクロアミロースの生成を妨げ、重合度の高いシクロアミロースの生成に重要な役割をしていることが示唆された。一方、ドメイン II は 2 つの大きな β シートが平行に重なった β サンドイッチ構造をとっており、2 本の短い α ヘリックスを除き、 β ストランドのみから形成されていた。

2 つの別の結晶から得られた構造から TLGT は二量体だと考えられた。そこで第四章ではタンパク質工学的手法を用いて、単量体間の相互作用について解析した結果を述べてい

る。単量体間の相互作用は主に一カ所での疎水性相互作用と、二つの水素結合ネットワークによって行われている。これらの相互作用に関与している残基に相互作用を破壊するような変異を加えた結果、TLGTの熱安定性は大幅に低下した。このことから二量体化がTLGTの熱安定性に重要な役割を果たしていると考えられた。

第五章では、*T. litoralis* から細胞外アミロプラーゼ遺伝子およびマルトデキストリントランスポーター遺伝子の配列を報告している。大腸菌で発現・生成した *T. litoralis* アミロプラーゼはスターチの α -1,4 および α -1,6-結合を加水分解して、グルコースと様々な長さのマルトデキストリンを生成した。また、マルトテトラオース以上のマルトデキストリンの α -1,4 結合を *exo* 型に加水分解した。また、トランスポーターはマルトトリオース以上のマルトデキストリンを輸送することが示唆された。これらの結果から 4- α -グルカノトランスフェラーゼとアミロプラーゼという2つのファミリー 57 の酵素が *T. litoralis* のスターチ/マルトデキストリン代謝において重要な役割を果たしていると考えられた。

本論文は、glycoside hydrolase ファミリー 57 の酵素について様々な手法を用い包括的に解析した結果をまとめたものである。特に立体構造、触媒機構、触媒残基、そして基質結合残基については今回の研究によって初めて得られた知見である。

よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値のあるものであると認めた。