

## 論文の内容の要旨

論文題目 放線菌 (*Streptomyces olivaceoviridis* E-86) 由来ファミリー10 キシラナーゼの立体構造と機能に関する研究

氏名 藤 本 瑞

キシラナーゼは、植物細胞壁に含まれるヘミセルロースの主成分であるキシランの主鎖の $\beta$ -1,4-グリコシド結合を主に加水分解するエンド型酵素である。キシラナーゼは、触媒ドメインの一次配列や立体構造の相同性から糖分解酵素 (glycosyl hydrolase, GH) の主に2つのファミリーGH10 と GH11 に分類される。また、セルラーゼやキシラナーゼなど植物細胞壁を分解する加水分解酵素は、触媒ドメインの他にも幾つかの糖結合モジュールを分子内に有しており、全体としてモジュール構造をとっている場合が多い。放線菌 (*Streptomyces olivaceoviridis* E-86) は、GH10 及び GH11 の2種類のキシラナーゼを生産する。GH10 に属するキシラナーゼ (FXYN) は、DNA 配列より1次構造が決定され、その分子量は約 45,000 であり、GH10 に共通な TIM バレル構造をもつ触媒ドメインを N 末端に有し、11 残基の Gly/Pro-rich リンカー部位を介し C 末端には 123 残基のキシラン結合ドメイン (XBD) も有することが明らかとなった。また、XBD は不溶性キシランに対して酵素活性を高める働きがあることが明らかとなった。本研究では、FXYN が触媒ドメイン及び XBD を有するマルチドメイン構造を持っていることに着目し、本酵素の触媒ドメインの詳細な構造、XBD の基質に対する特異性、および、酵素全体での不溶性キシランに対する反応機構を酵素の立体構造の見地から明らかにすること、および本酵素の分子モデリングの基盤を確立することを目的として、

結晶構造解析に着手した。

FXYN の結晶化は、2% McIlvaine 緩衝液 pH 5.7、1.05 M 硫酸アンモニウム溶液を沈殿剤とし、20 mg/ml の蛋白質溶液と 1:1 で混合したものをハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行い、最長 1.0 mm を越える柱状、あるいはブロック状の良質な結晶が安定して得られる条件を確立した。結晶は斜方晶系の空間群  $P2_12_12_1$  に属し、格子定数は  $a = 79.6$ ,  $b = 95.2$ ,  $c = 140.3$  Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  であった。Photon Factory を中心に X 線回折データの測定を行い、1.9 Å 分解能を越えるデータの取得に成功した。

構造解析は、他の GH10 に属するキシラナーゼの触媒ドメインをサーチモデルとした分子置換法を用いて進め、最終的にリンカー部分を除く酵素全体の結晶構造の構築に成功した。触媒ドメインは、TIM-バレルからなっており、触媒溝は TIM-バレルの中心にあるβ-バレルの C 末端側に存在する。XBD はサブドメイン  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の3つのサブドメインからなる3回繰り返り配列でできた球状ドメインであり、その構造はβ-trefoil 構造をとっていた。また、これまでに植物由来ガラクトース結合レクチンとして認識されてきたリシンB鎖と類似していることが明らかとなった。両ドメインをつなぐリンカーのうちの9残基は電子密度が観察されず、リンカー部分は高い可動性があることにより構造は同定されなかった。

次に、本酵素の基質認識機構を解明するために、キシロオリゴ糖として、キシロース、キシロピオース、キシロトリオース、それ以外にラクトース、ガラクトース、グルコースとの複合体構造を決定した。各糖の複合体は全てソーキング法により作製し、ラクトース、ガラクトース複合体は常温で、それ以外は糖自体を不凍液とし、低温下で X 線回折データを収集した。クライオ法で決定した構造では、リンカー部分の電子密度も確認できた。キシロオリゴ糖との複合体の解析では、触媒溝における  $-3 \sim -1$ 、 $+1 \sim +3$  のサブサイト構造、および、XBD のサブドメイン  $\alpha$  と  $\gamma$  のキシラン結合機構を明らかにした。また、リシンのガラクトース結合部位と同じ部位で XBD ではキシランを認識すること、その際の糖の結合様式は異なることを明らかにした。さらに、ラクトース、ガラクトース複合体では、XBD はどちらの糖にも結合し、その結合様式はリシンのものと同じであることから、XBD はガラクトース結合レクチン能も持ち合わせていることが明らかとなった。3つのサブドメインでは糖結合に関与するアミノ酸が配列、構造ともに厳密に保持されていることから、XBD は3つの部位でキシランを認識することが可能であると考えられた。

さらに、4-O-メチルグルクロノキシロオリゴ糖、アラビノキシロオリゴ糖との複合体構造の解析では、FXYN の側鎖を有するキシランに対する結合様式を明らかにした。また、側鎖を有するためリガンドが非対称になったことから、キシロオリゴ糖との複合体では決められなかった糖の方向も決定することができ、その結果、XBD のキシラン結合部位はキシランに対し、2つの方向に結合することができることも明らかにされた。

以上のことから、XBD は基質結合部位を3つ持っており、それぞれが基質を2つの方向に認識できることにより基質結合の可能性を高めていること、可動性のリンカーを介して触媒ドメインと XBD がお互いに自由に動けるため、触媒ドメインが XBD の結合した基質に近づく可能性を高めていることなどを利用して、FXYN は不溶性の基質に対して非常に効率的な反応機構を採用して機能していることが明らかとなった。