

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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 β -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。放線菌 (*Streptomyces olivaceoviridis* E-86) の生産する糖分解酵素ファミリー10に属するキシラナーゼ (FXYN) は、TIM バレル構造をもつ触媒ドメインを N 末端に有し、Gly/Pro-rich リンカー部位を介し C 末端にはキシラン結合ドメイン (XBD) を有するマルチドメイン酵素である。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ている。本論文では、FXYN の結晶構造解析を行い立体構造を決定し、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し、本酵素の分子モデリングの基盤を確立した。

まず序論で、放線菌キシラナーゼの諸性質や、本論文の研究目的について概説した後、第1章では、FXYN の結晶化を行っている。硫酸アンモニウム溶液を沈殿剤としたハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化を行い、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結晶化条件を確立した。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。

第2章では、FXYN の構造解析を行っている。他の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構造解析を進め、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 末端側に存在した。XBD はサブドメイン α 、 β 、 γ の3つのサブドメインからなる3回繰り返し配列でできた球状ドメインであり、その構造は β -trefoil 構造であることを明らかにした。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 鎖が有する構造と類似していることを明らかにした。

次に、第3章では、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、キシロビオース、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の構造を決定した。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。キシロオリゴ糖との複合体の解析では、触媒溝におけるサブサイト構造、および、XBD のサブドメイン α と γ 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を明らかにした。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可能性も示した。

第4章では、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を行い、側鎖を有するキシランに対する FXYN の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つの方向に結合でき、総じて 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を明らかにした。

以上、本論文は放線菌キシラナーゼ FXYN の結晶構造解析を行い、詳細な糖結合構造を明らかにし、XBD を利用することにより不溶性基質に対して効率的な酵素反応を行うための反応機構を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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あるものと認めた。