

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 日 高 將 文

糖質の代謝に関連する酵素(糖質関連酵素)は、触媒能を基に糖加水分解酵素(Glycoside Hydrolase, GH; EC3.2.1 群)、糖転移酵素(GlycosylTransferase, GT; EC2.4 群)、エステラーゼ、多糖リアーゼの4つのクラスに分類されている。各クラスは、アミノ酸配列に基づいて分類されたファミリーで構成されており、同一ファミリー内に分類される酵素は、立体構造、機能に高い類似性を示すと考えられる。GHは約12000の遺伝子が97のファミリーに、GTは約10000の遺伝子が75のファミリーに分類されている。近年、立体構造の決定や構造予測により、全く異なる機能を有するファミリー間で、立体構造の相同性が見い出されてきた。そのため構造未知ファミリーの立体構造を解明することは、そのファミリー内の酵素のみならず、類似構造を有する多くのファミリーに対しても分子進化、触媒反応、基質認識機構などの新たな構造的知見を与えることが期待されている。本論文は、応用面で重要度の高い構造未知の糖質関連酵素ファミリーGH-42, GT-36を対象としてX線結晶構造解析を行い、これらの新規構造を構造既知ファミリーと比較し、糖質関連酵素の進化的、構造的関連について興味深い知見を得ている。

第1章では、GH-42に属する耐熱性 β -ガラクトシダーゼの構造と機能を解明した研究について記述されている。 β -ガラクトシダーゼは、ラクトースをガラクトースとグルコースに加水分解する酵素である。大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼは、ラクトースオペロンを形成するlacZ遺伝子の産物として知られ、 α 相補と呼ばれる特異な性質を応用した分子生物学実験などに利用されており、有用酵素の一つとして知られている。近年、乳製品中ラクトースの加水分解活性を利用した乳業への応用が試みられ、工業利用を目指した耐熱性の β -ガラクトシダーゼが注目されている。好熱性細菌 *Thermus thermophilus* A4 由来の β -ガラクトシダーゼ(A4- β -Gal)は、70°Cで20時間以上安定な極めて高い耐熱性を有し、アミノ酸配列からGH-42に分類される。GH-42は、その有用性にも関わらず反応機構、立体構造、触媒残基など不明であった。本論文では¹H NMRを用いて、A4- β -Galの反応が、加水分解反応の前後で糖アノマーの反転を伴わないアノマー保持型であることを明らかにした。またA4- β -Galの立体構造を、多波長異常分散法(MAD法)を用いて1.6Å分解能で決定した。A4- β -Galの立体構造は、TIMバレルフォールドを有していた。TIMバレルはGHの構造として最も多いフォールドであり、他のTIMバレル型糖質関連酵素との構造比較から触媒残基(Glu141, Glu312)を決定した。A4- β -GalのTIMバレルフォールドからGHの進化上、以下の極めて興味深い点を見出した。GH及びGTは、基質と生成物のアノマーの関係から、アノマー反転型と保持型に分けられるが、それぞれ異なる反応機構をとることが知られており、これらの酵素は独立した分子進化を果たしたと考えられてきた。A4- β -Galは保持型酵素であるが、活性中心部位は保持型酵素、骨格となるTIMバレル構造は反転型酵素の特徴を持つ、極めて特殊な形状であった。これは、A4- β -Galが反転型酵

素と保持型酵素の進化の分岐を示しており、保持型・反転型酵素の構造的・進化的な関連を示す初めての発見であった。

第2章では、GT-36に属する加リン酸分解酵素である、キトビオースホスホリラーゼ(ChBP)の構造に関する研究を行っている。加リン酸分解酵素は、糖鎖にリン酸を付加しつつ切断し、糖リン酸を生成する反応を触媒するが、糖・リン酸の結合エネルギーは糖核酸の結合エネルギーほど高くないため、反応は合成方向にも進む可逆性を有する。従って、加リン酸分解酵素は様々な糖鎖合成に応用されている。加リン酸分解酵素は転移反応を触媒するためGTに分類されるべき酵素であるが、一部の加リン酸分解酵素はGH酵素とアミノ酸配列が相同なため、GHに分類されている。そのため加リン酸分解酵素の分類は非常に複雑であり、また立体構造情報が少ないため、その反応機構やGH、GTとの関係は不明な部分が多かった。ChBPはキトビオース(GlcNAc- β (1,4)-GlcNAc) + リン酸 \leftrightarrow GlcNAc- α -1-リン酸 + GlcNAcの反応を触媒する反転型の加リン酸分解酵素である。ChBPはセロビオースホスホリラーゼ(CBP)などとともにGT-36に分類されていた。本論文ではGT-36の酵素として初めてChBPの立体構造をMAD法を用いて1.6Å分解能で明らかにした。その立体構造は既知のGTとは全く異なるフォールドを有する一方、GH-15、GH-65の酵素と相同性を示した。また、反転型加リン酸分解酵素として初めて基質(GlcNAc)、リン酸アナログ(硫酸)との三者複合体を明らかにした。これらの構造的基盤から、反転型加リン酸分解酵素の反応機構が推定された。この反応機構は、グリコシド結合を求核攻撃する分子がリン酸である点を除けば、反転型GHの反応機構と酷似している。以上の結果を踏まえて、GT-36は新設されたGHファミリー(GH-94)に再分類されることになった。これは、GTに分類されていた酵素が立体構造の解明によりGHに再分類された最初の例となった。

第3章では、ChBPと同じくGH-94に分類されるセロビオースホスホリラーゼ(CBP)の構造解析に関して記述している。CBPは、反応機構、基質特異性、オリゴ糖合成への応用に関して、同ファミリー中最も詳細な解析が行われている酵素である。分子置換法を用い、CBPの活性中心にグルコースとリン酸が結合した立体構造を2.1Å分解能で決定し、ChBPでは得られなかったリン酸の結合に関する知見が得られた。また、ChBPとの立体構造比較から、それぞれの基質特異性を決定している残基が明らかになった。

以上、本論文は、新規な構造を有する糖質関連酵素を3種決定し、それらの酵素の産業利用・応用上重要な構造基盤を得ることに成功しただけでなく、糖質関連酵素の分子進化に関して重要な基礎的知見を得ている。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あるものと認めた。