

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮永 顕正

植物の細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、リグニンなどからなる。近年、天然の有機物としてセルロースに次いで多量に存在するヘミセルロースの有効利用が注目されている。ヘミセルロースの一種であるアラビノキシランは、キシロースで構成される主鎖にアラビノースなどの側鎖が結合しているという構造をとる。アラビノフラノシダーゼは、このアラビノース側鎖を分解する酵素であり、焼酎の発酵において穀物の分解や香り成分の生成を助ける役割をすることから、醸造産業において重要な酵素の一つである。しかし、糖質加水分解酵素ファミリー54 (GH54) に属するアラビノフラノシダーゼは、基質特異性などの研究は進んでいたものの、その構造は明らかになっておらず、構造学的な研究は全く進んでいなかった。そのため、触媒残基も同定されておらず、基質認識機構についても不明であった。本論文では、白麹菌 *Aspergillus kawachii* 由来 GH54 -L-アラビノフラノシダーゼ (AkAbf54) を研究対象にして立体構造解析を行うことで、GH54 酵素の反応機構や基質認識機構を明らかにすることを目的にしたものである。

第二章でその発現、精製、結晶化、構造解析について述べた。酵母 *Pichia pastoris* による大量発現に成功し、精製及び結晶化を行い、良質な結晶を得た。重原子同型置換法により位相を決定し、分解能 1.75 Å で立体構造を明らかにした。また、アラビノース複合体構造も決定した。

その結果、AkAbf54 は、N 末触媒ドメインと C 末ドメインの二つのドメインから構成されることが分かった。第三章では主に N 末側にある触媒ドメインについての構造の特徴を述べた。β-サンドイッチフォールドを持っており、負に荷電した触媒ポケットを持っていた。アラビノース複合体の活性中心の構造と変異体を用いた実験から、触媒残基を決定した。求核性残基が Glu221 であり、酸・塩基触媒残基が Asp297 であった。反応機構はアノマー保持型であることが以前に報告されていたが、二つの触媒残基間の距離はこの報告を裏付けるものであった。アラビノースを認識する残基も決定した。その中で、シスペプチド結合で隣り合ったシステイン (Cys176 と Cys177) 間で形成されるジスルフィド結合が見られ、基質を疎水的に認識する役割を果たすことが分かった。このような認識は他に例のないものであり、基質認識を考える上で非常に興味深い。

第四章では C 末側にあるドメインについて構造の特徴を述べた。この C 末ドメインに

アラビノース結合能があることは、活性中心にアラビノースがどのように結合するかを見るためにアラビノース複合体構造を明らかにしたところ、偶然発見されたものである。このことから、このドメインが糖質結合ドメイン (CBM) であることが分かり、アラビノース結合ドメインと名付けた。独立した結合ポケットを二つ ( -サブドメインと -サブドメインに一つずつ) 持っていることが分かった。アラビノース結合ドメインは、その構造の特徴とアラビノースを結合するという機能から新しく CBM42 に分類された。

アラビノオリゴ糖との複合体構造を明らかにしたところ、CBM42 は側鎖の糖アラビノースと主に相互作用しており、主鎖の糖キシロースとはほとんど相互作用していないことが明らかになった。このことから、CBM42 はヘミセルロースの側鎖を認識して結合するという性質を示すことが予想された。これは驚くべきことであった。なぜならば、これまで報告されてきたヘミセルロースに結合する CBM は、主鎖の糖を認識する性質を示すものばかりであったからである。そこで、CBM42 の機能解析を行い、本当にそのような性質を示すのかを調べた。機能解析に先立ち、アラビノース結合に関わる残基であるアスパラギン酸 Asp435 と Asp488 の変異体を作成した。

まず、不溶性基質に対して活性測定を行った。片方のアスパラギン酸を変異させると野生型と比較して 5~10 倍程度活性が低下し、両方のアスパラギン酸を変異させると 50 倍程度と活性が相乗的に低下した。このことから、CBM42 は糖質結合ドメインとして確かに機能していることが分かった。次に、不溶性糖に対する CBM42 の結合力を Binding assay やアフィニティゲル電気泳動により調べた。その結果、CBM42 はアラビノース側鎖を多く含むヘミセルロースほど結合力が高いことが分かった。また、アスパラギン酸を変異させると結合力を失った。そして、ITC により、オリゴ糖に対する結合力を測定した。アラビノース糖に対する結合定数は、 $2.0 \times 10^3$  程度と他の CBM と比較して弱い値を示した。一方、キシロース糖に対しては結合が検出できなかった。このことはキシラン主鎖の結合サイトがないことを示している。

これらのことから、CBM42 は、( ) 糖結合ポケットを二つ持ち、この二つが不溶性糖に対する結合に働く、( ) ヘミセルロースのアラビノース側鎖一糖のみを認識する、( ) 糖に対する結合定数が  $10^3$  程度と他の CBM と比較して弱い、といった機能を示すことが明らかになった。この CBM42 のヘミセルロースの側鎖の糖のみを認識するという新規性は応用性を秘めている。他の細胞壁分解酵素と組み合わせることにより、分解対象を特異的に制御出来る可能性を持つためである。

以上、本論文は、GH54 アラビノフラノシダーゼの構造解析、機能解析を行い、触媒残基の同定や基質認識機構の解明を行っただけでなく、ヘミセルロースの側鎖のみを認識するという新たな CBM42 の発見に至ったものであり、学術上ならびに応用上貢献するところ大である。よって審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学術論文として価値あるものと認めた。