

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中島 将博

---

本論文は序論、第一章 *Sulfolobus tokodaii* と *Thermotoga maritima* 由来 $\alpha$ -マンノシダーゼの諸性質の解析、第二章 *Thermotoga maritima* 由来 $\alpha$ -マンノシダーゼの予備的 X 線結晶解析、第三章 *Thermotoga maritima* 由来 $\alpha$ -マンノシダーゼの酸塩基触媒残基の同定、第四章 総合討論より構成されている。

序論ではグリコシドヒドロラーゼ(GH)ファミリーの GH38 が系統樹によると大きく GMan、LMan、ERCMan の 3 つのグループに分けられること、GMan が真核生物において N-グリカンの生合成に関わる重要な酵素であること、ERCMan がアラインメントから GMan や LMan と異なる性質をもつ可能性があることを述べている。

第一章では *Sulfolobus tokodaii* 由来 $\alpha$ -マンノシダーゼ(ST1008)と *Thermotoga maritima* 由来 $\alpha$ -マンノシダーゼ(TM1851)の発現、精製とキャラクタリゼーションを行った。これらの酵素は広い基質特異性を持ち GH38 としての特徴を示した。また、ST1008、TM1851 は活性に金属が必須であること、そして ST1008 が亜鉛イオン、TM1851 がコバルトイオンの添加により最も高い活性を示すことも明らかにした。スワインソニンによる活性の阻害は、ERCMan である ST1008、TM1851 では GMan や LMan の場合より弱いことを示した。

第二章では TM1851 を用いて結晶化条件の探索を行い、PEG と NaCl を含む条件で空間群 *C2* に属する菱形結晶を作製し、この結晶から分解能 2.9 Å の回折データを得た。また、カドミウム置換体とネイティブ結晶の回折データ間の差パターンマップにより金属由来のピークが検出された。

第三章では TM1851 の活性中心に存在すると予想される保存されたアスパラギン酸 Asp257、Asp367、Asp460、Asp568 の変異体を作製し、その詳細を調べることによりこれらの機能の解明、特に酸塩基触媒残基の同定を試みた。

D367N、D367A の relative activity は wild type の 100 分の 1 以下に低下し、Asp367 が求核性触媒残基であることが明らかとなった。

アラインメントから GMan や LMan の酸塩基触媒残基に相当する TM1851 の Asp460 の変異体 D460N ではほとんど活性が低下せず、Asp460 が酸塩基触媒残基でないことを示した。

D257G のジニトロフェニル- $\alpha$ -D-マンノピラノシド(DNP-Man)に対する  $k_{cat}$ 、 $k_{cat}/K_m$  は

*p*-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-マンノピラノシド(pNP-Man)の場合より明らかに大きく、Asp257の変異により酸触媒としての機能が顕著に低下したことが示された。また、D257GのpH profileにおける塩基性側のpH依存性の完全な消失やpNP-Manを基質としたときのNa-formateによる $k_{cat}$ の著しい増加もAsp257が酸触媒としてはたらくことを支持している。

D568GではDNP-Manを基質としたときの $K_m$ がpNP-Manが基質のときより大きくなったのでAsp568は基質の認識に重要であることが示された。

これらの結果と*Drosophila melanogaster*由来GManの活性中心の構造からTM1851の推定反応機構を提唱した。

このように本論文において、ERCManの機能、酸塩基触媒残基がGMan、LManとは異なることを明らかにし、新たな推定反応機構を提唱したので学術上貢献するところが少ない。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。