

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 塚田 剛士

論文題目：糖質加水分解酵素ファミリー1に属する  
 $\beta$ -グルコシダーゼの構造と機能に関する研究

植物細胞壁の主成分であるセルロースから酵素を利用してグルコースを得るためには、セルラーゼによりセロビオースなどの可溶性オリゴ糖へ分解した後、それら生成糖を $\beta$ -グルコシダーゼ(BGL)によりグルコースまで分解する必要がある。これまでセルラーゼに関しては多くの研究がなされているが、従来から着目されてきた糖質加水分解酵素(GH)ファミリー3に属するBGLについては、セロビオースを良好な基質とする酵素の取得には至っていない。そこで、これまで研究例の少ないGHファミリー1に着目して、セロビオースに対して高い反応性を示す新規なBGLを取得することを目指して研究を行った。

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の全ゲノム配列情報をもとに設計したプライマー対を利用したRT-PCRによって、GHファミリー1に属する2種類のcDNA (*bg11A*, *bg11B*) をクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、*bg11A* は1389bp、*bg11B* は1623bpのオープンリーディングフレームを有し、また塩基配列から推定したアミノ酸配列では、BGL1AとBGL1Bの相同性は65%と非常に高いことを明らかにした。さらに、アラインメント解析を行った結果、GHファミリー1に属するBGLに特徴的な酸・塩基触媒グルタミン酸残基ならびに求核触媒グルタミン酸残基が保存されていることを示した。

クローニングした*bg11A* および*bg11B* を発現ベクターに組み込み、大腸菌を宿主とした発現系を利用することで組換え酵素(BGL1A および BGL1B) を生産した。三段のカラム分画によって精製をした両酵素について、基質に対する反応のpH依存性を測定したところ、至適pHはともにpH6.0-6.5であったが、BGL1Aは酸性域においても活性が保持されることが明らかとなった。また、セロビオースに対する加水分解活性を測定したところ、BGL1Bはセロビオースを効率よく加水分解する酵素であることを明らかにした。さらに、セロオリゴ糖(重合度2-5)に対する反応特性を比較すると、BGL1Aはセロビオースに対する活性がより重合度の大きい基質に対して著しく低いのに対して、BGL1Bは全てのセロオリゴ糖に対して高い反応特性を示すことを明らかにした。

さらに、2種のBGLについて立体構造の解析に基づく活性中心の比較を行ったところ、サブサイト-1を構成するアミノ酸残基群は互いに全て保存されているが、両者ではサブサイト+1においては5つのアミノ酸残基が互いに異なっていることを明らかにした。このことから、これらの

アミノ酸残基の違いが両酵素のセロビオースに対する反応特性の差異を生み出す要因であると考えた。そこで、これら5残基を相互置換したBGL1A変異体、BGL1B変異体を作成し、基質に対する反応特性を解析した。その結果、BGL1Aでは、D229NならびにK253A変異体において基質に対する親和性が著しく低下することを明らかにし、その理由としては両アミノ酸残基の相互作用が活性中心の構造形成に重要であると推定した。また、BGL1Bにおいては、D246とセロビオースの還元末端側C6位メチロール基における水素結合形成が、セロビオースに対する高い親和性を示すために重要であることを示した。

また、BGL1AとBGL1Bでは、酸性域におけるpH依存性が大きく異なる。そこで、BGL1Aの変異体についてpH依存性を調べることで、酸性域における活性に関与する因子について考察を試みた。BGL1A変異体を作成しpH依存性を野生型と比較したところ、いずれの変異体においても酸性域における活性保持に顕著な変化は観測されなかった。しかしながら、D229N、H231D、K253A変異体においては中性からアルカリ性域における活性の変化が観測されたため、それらの残基が直接または間接的に酸・塩基触媒と相互作用していると推測した。

本研究では、GHファミリー1に属する2種のBGL(BGL1AおよびBGL1B)を組換え酵素として生産し、その機能解析を行った。その結果、両酵素は高いアミノ酸配列相同性を有するにも関わらず、セロビオースに対する反応特性ならびに酸性域におけるpH依存性が互いに大きく異なることを明らかにした。また、セロビオースに対する親和性を高めるためには、BGL1BのD246残基のようにセロビオースの還元末端残基のC6位メチロール基を認識するアミノ酸残基の機能に注目することが重要であることを示した。以上、本研究で得た業績は、セロビオースに対して高い反応性を示すBGLの取得に向けて、学術上、応用上貢献することが少なくない。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。