

## 論文の内容の要旨

生物材料科学専攻

平成19年度 博士課程 進学

氏名 石田 卓也

指導教員名 鮫島 正浩

### 論文題目

Studies on recognition mechanism for branched polysaccharides  
in Family 55 and 74 glycoside hydrolases  
(ファミリー55および74に属する糖質加水分解酵素における  
分岐多糖の認識メカニズム)

### 第一章 序論

自然界には様々な多糖が存在するが、それらのうちセルロースを除く多くの多糖は何らかの分岐構造を有している。分岐の頻度・長さ・含まれる糖の種類はその多糖を生産する生物種や存在する場所などにより異なり、分岐構造の違いによって多糖の機能も多様である。一方で生物は、自身や他の生物が生産した糖質を分解するために糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase: GH) を生産する。これまでに、基質特異性、反応メカニズム、分解様式において性質の異なるGHが多数報告されており、それらはCAZyデータベースにおいてアミノ酸配列の相同性と疎水性クラスター解析によって、現在115のファミリーに分類されている。これらのうち、基質の分岐構造を認識して分岐多糖の主鎖を分解するGHが複数報告されている。これらのうち、GHファミリー55および74に属するGHは、ファミリー内の全ての酵素が同種の分岐多糖に対して高い特異性を示すという点で特徴的なファミリーと言える。

本研究では、GHファミリー55および74に属する酵素が、それぞれの基質の分岐構造を認識する機構を解明し、GHが分岐した基質を認識、分解する機構について新たな知見を得ることを目的とした。

## 第二章 $\beta$ -1,3グルカナーゼPcLam55AのX線結晶構造解析

PcLam55Aは、 $\beta$ -1,3/1,6グルカンであるラミナリンを唯一の炭素源とする培地において、*P. chrysosporium*が菌体外に分泌する主要な $\beta$ -1,3グルカナーゼである。GHファミリー55に属する多くの酵素と同様に、本酵素は $\beta$ -1,3/1,6グルカンを基質としたとき、グルコースとゲンチオビオース（グルコースが $\beta$ -1,6結合した二糖）を与えることが知られている。この性質から、本酵素は $\beta$ -1,6結合の分岐を迂回して、全ての $\beta$ -1,3結合を加水分解すると考えられるが、これまでGHファミリー55で結晶構造が解明された例はない。そこで、本章ではPcLam55Aの加水分解様式と構造との関係を解明することを目的に、X線結晶構造解析を行った。

*Pichia pastoris*を用いて異宿主発現したセレノメチオニン置換体PcLam55Aを結晶化し、高エネルギー加速器研究機構にてX線回折データを取得後、多波長異常分散法によって位相決定を行った。最終的に分解能1.7Åのアポ構造と分解能2.5Åのグルコノラクトン複合体構造を得た。(Fig. 1)

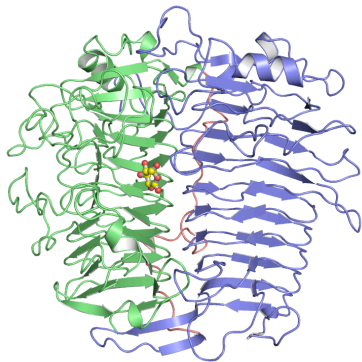


Fig. 1 PcLam55Aの結晶構造

青：N-ドメイン、緑：C-ドメイン、橙：リンカー領域  
中央のball & stickモデルはリガンドであるグルコノラクトン分子。

GHファミリー55に属する酵素は、アミノ酸配列を用いた二次構造予測の結果から、 $\beta$ -ヘリックスと呼ばれる構造を二つ含むと考えられていたが、本研究で明らかとなったPcLam55Aの結晶構造中では、二つの $\beta$ -ヘリックスドメインは長いリンカー領域でつながれており、あばら骨のような全体構造を形成していることが明らかとなった。リガンドとして用いたグルコノラクトンは二つの $\beta$ -ヘリックスドメインの間に存在し、両ドメインのアミノ酸残基が結合に関与していた。また、C-1位付近には触媒に直接関与すると考えられるグルタミン酸残基と水分子が存在しており、グルコノラクトンはサブサイト-1に結合していると考えられた。C-6位付近にはグルコース残基が結合できるスペースが存在しており、この構造が、 $\beta$ -1,6結合を活性中心に受け入れゲンチオビオースユニットを生成するという本酵素の特徴を与えていると考えられた。さらに、分子表面の湾曲した基質結合クレフトと考えられる部位には保存性の高い芳香族アミノ酸が並んでおり、らせん構造を形成しやすいと考えられる $\beta$ -1,3/1,6グルカン分子の結合に適した構造となっていることが示唆された。

### 第三章 キシログルカナーゼPcXgh74Bの機能解析および結晶構造解析

キシログルカンの構造は、 $\beta$ -1,4グルカンの主鎖にキシロースの側鎖が高頻度に結合したもので、側鎖の構造は植物種や組織によって多様である。*P. chryso sporium*はセルロースを炭素源として生長する際、キシログルカンに特異的として知られるGHファミリー74に属する酵素（PcXgh74B）を菌体外に分泌することが知られている。本章では、GHファミリー74に属するキシログルカナーゼの構造と機能の相関を明らかにすることを目的に、PcXgh74Bの組換えタンパク質を生産し、その機能解析および結晶構造解析を行った。

*P. chryso sporium*のゲノムデータベース中、GHファミリー74に属する既知のキシログルカナーゼと高い相同性を示した、Scaffold 19 (159204-162458)の遺伝子配列をもとにクローニングを行った。*P. pastoris*を用いて生産した組換え体PcXgh74Bを精製し、タマリンド種子由来のキシログルカン（TXG）を基質とした時の主な生成物の同定、TXG溶液の粘度低下速度の測定、TXG分解物の重合度分布の遷移の分析を行った。

生産した組換えタンパク質は、TXGに対し、他のGHファミリー74に属するエンド型キシログルカナーゼと同様の活性を示した。すなわち、本酵素はTXG中の、側鎖のないグルコース残基のグリコシド結合のみを特異的に加水分解し、主鎖のグルコースを四つ含むオリゴ糖（XGO4：DP=7-9）を与えることが明らかとなった。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた基質の重合度分布の分析から、TXG分解の初期段階において主鎖のグルコース残基を8個含むオリゴ糖（XGO8：DP=14-18）を蓄積し、反応時間が長くなるにつれて最終産物であるXGO4を生成するという新規な性質が明らかとなった。また、蒸気拡散法によって作成したPcXgh74Bの触媒ドメインの結晶を用いて回折データを取得し、分子置換法によって構造解析を行った。X線結晶構造解析の結果、分解能2.5Åの構造（アポ酵素およびXGO4との複合体構造：Fig. 2）を得た。

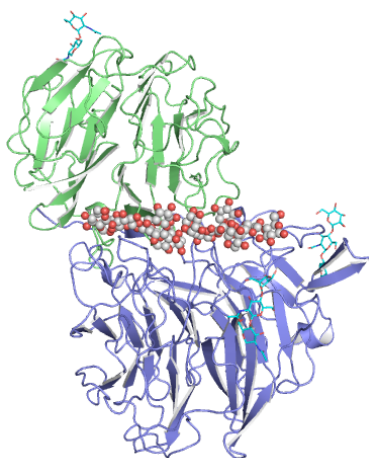


Fig. 2 Xgh74Bの結晶構造  
青：N-ドメイン、緑：C-ドメイン、  
リガンドであるXGO4分子はball & stickモデルで示されている。

PcXgh74BはGHファミリー74に属する構造既知の酵素と同様に七枚羽の $\beta$ -プロペラ構造二つによる二枚貝のような構造をしていた。TXGポリマーをランダムに過水分解する*Geotrichum* XEGの構造と比較すると、PcXgh74Bではサブサイト+5から+7にあたる部位に四つの芳香族アミノ酸が分子表面に並んでいた。また、XGO4のみを反応初期から生産し、XGO8を蓄積しない*Paenibacillus* XEG74とのアミノ酸配列の比較から、サブサイト-2のキシロース側鎖を認識するアミノ酸の違いから、PcXgh74Bではこの部位での基質との相互作用が弱いことが示唆された。このような構造がXGO8を蓄積するというPcXgh74Bに特徴的な分解特性に関与していることが考えられる。

#### 第四章 総括

本研究で明らかとなったPcLam55AとPcXgh74Bの構造は、相同性を有する二つのドメインによって活性中心を形成していた。遺伝子重複によって形成されたと考えられるこのようなドメイン構造が、それぞれの基質の全体構造に適した形状の基質結合サイトを形成するのに有利であったと考えられる。また、主鎖に含まれる糖残基を認識するアミノ酸は各ファミリー内でよく保存されているのに対し、側鎖の認識に関与するアミノ酸残基は比較的多様性があった。機能解析の結果から、側鎖の認識の多様性が加水分解特性に影響していることが示唆された。これらのファミリーでは、ドメイン構造が基質の全体構造に対する特異性を維持するための基盤として、また、少数のアミノ酸による側鎖の認識が分解特性の多様性を与える機構として機能していると考えられた。

#### 発表論文

- 1) Ishida T, Yaoi K, Hiyoshi A, Igarashi K, Samejima M. *FEBS J*, 274 5727-5736, (2007).
- 2) Ishida T, Fushinobu S, Kawai R, Kitaoka M, Igarashi K, Samejima M. *J Biol Chem*, 284, 10100-10109, (2009).