

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石田 卓也

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)

自然界に存在する様々な多糖はそれを構成する単糖残基がグリコシド結合によって重合した構造体であるが、その多くは主鎖と側鎖から成る分岐構造を有している。このような多糖のグリコシド結合を分解するために、生物は多種多様な糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase: GH) を生産するが、これらは主鎖と側鎖の認識という観点から、主鎖構造のみを認識する酵素群、側鎖構造のみを認識する酵素群および主鎖と側鎖両者の構造を認識する酵素群の3種に分類することができる。その中で、酵素分子の構造分類であるGHファミリー55および74では、主鎖と側鎖の両者を認識する酵素群のみが存在することが大きな特長であることが知られている。その一方で、これらのファミリーに属する酵素については酵素分子の3次元構造に関する情報が限られている。このような背景から、本研究では、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産するファミリー55および74に属するGHを対象に酵素分子の3次元構造をX線解析により明らかにし、得られた構造情報と基質に対する反応特性を相互に比較することにより、それぞれの酵素が多糖の分岐構造を認識するメカニズムについて考察を行った。

GHファミリー74に属するPcXgh74Bは、 β -グルカン主鎖にキシロースなどの側鎖を分岐構造として持つキシログルカンを分解する酵素である。本研究では、この酵素のクローニングを行い、これにより形質転換した酵母菌 *Pichia pastoris* を用いてPcXgh74Bを組換え体として生産した。また、得られた酵素を精製し、タマリンド種子由来のキシログルカン (TXG) を基質として酵素反応を行い、その際に得られた生成物の同定ならびに定量分析を行った。その結果、PcXgh74B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、主鎖のグルコース残基を4つ含むオリゴ糖 (XGO4 : DP=7-9) を与えることを示した。一方、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) を蓄積する特徴を明らかにした。また、蒸気拡散法によって作成したPcXgh74B触媒ドメインの結晶にX線回折データを取得し、分子置換法によって解析を行ない、分解能2.5Åの構造を得た。その結果、PcXgh74BはGHファミリー74に属する構造既知のキシログルカナーゼと同様に7枚羽の β -プロペラ構造から成る2つのドメインがリンカーを介して向かい合った構造を有しており、そこに存在する両ドメインのア

ミノ酸残基が基質認識ならびに触媒活性に関与するサブサイトを形成していることを明らかにした。また、GH74に属するTXGをランダムに加水分解する *Geotrichum* 由来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4つの芳香族アミノ酸が分子表面に並んでいることが特徴であり、この存在がエンド性に関与していることを示した。また、XGO4のみを反応初期から生産する *Paenibacillus* 由来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を明らかにし、PcXgh74Bではこの部位での基質との相互作用が弱いことを示した。

GHファミリー55に属するPcLam55Aは β -1,3/1,6グルカンであるラミナリンを基質とする β -1,3グルカナナーゼである。本酵素はラミナリ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 β -1,6結合した二糖）を与えることが知られている。このことから、本酵素は側鎖の β -1,6結合による分岐構造を迂回して、主鎖の β -1,3結合を加水分解すると考えらるが、これまでGHファミリー55に属する酵素については結晶構造が解明された例はない。そこで、本研究では、PcLam55Aの3次元構造を解析した。酵母菌 *Pichia pastoris* を用いて異宿主発現体として得たセレノメチオニン置換体PcLam55Aを結晶化し、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し、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。その結果、PcLam55Aの結晶構造は、二つの β -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、それにより出来上がったあばら骨のような構造の間に基質認識と触媒中心に関与するサブサイトが存在することを明らかにした。また、リガンドとして用いたグルコノラクトンの結合には、両ドメインのアミノ酸残基が関与していることを示した。さらに、グルコノラクトンの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いることから、グルコノラクトンはサブサイト-1に結合していると考察した。また、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、この構造が分岐点の β -1,6結合による側鎖グルコース残基の受け入れ部分であり、加水分解生成物としてゲンチオビオースを生成するという本酵素の特徴に関与していると推定した。さらに、分子表面の湾曲した部位には芳香族アミノ酸が並んでおり、 β -1,3グルカン主鎖の結合に適した構造となっていると考察した。

本研究では、リンカーによって結ばれた相同性を有する二つのドメイン間に基質認識と触媒中心に関与するサブサイトを、PcLam55AとPcXgh74Bが共通構造として有することを明らかにした。また、このような構造がそれぞれの基質の全体構造の認識に適した結合サイトの形成に有利であると考察している。さらに、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て、側鎖の認識に関与するアミノ酸残基は比較的多様であり、このことが側鎖の認識に大きく影響していることを示した。以上、本研究によって、これまで情報が限られていた主鎖と側鎖両者の構造を認識する糖質加水分解酵素の高次構造を明らかにし、それに基づき各酵素の分岐構造の認識メカニズムについて多くの知見が得られたことは、糖質酵素科学における学術上、応用上貢献することが少なくない。よって、審査員一同は、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。