

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 22 年度博士課程 進学
氏名 林 到炫
指導教員名 伏信 進矢

論文題目 糖質・アミノ酸関連酵素の立体構造に基づいた基質の認識・触媒機構の研究

1. X 線結晶構造解析による *Thermotoga maritima* MSB8 由来 GH51 α -L-アラビノフラノシダーゼの基質認識触媒機構の解明¹⁾

ヘミセルロースの一種であるアラビノキシランはキシランを主鎖として多様な側鎖で修飾されており、セルロースとともに植物細胞壁に豊富に存在するバイオマスポリマーとして知られている。 α -L-アラビノフラノシダーゼはキシラン主鎖に α -1,2、 α -1,3、 α -1,5 結合で結合している L-アラビノフラノースをエキソ型で切断し、ヘミセルロースの効率的な分解を促進するアクセサリー酵素の 1 つである。本研究では糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 51 に属する高度好熱性細菌 *Thermotoga maritima* 由来 α -L-アラビノフラノシダーゼ (Tm-AFase) の X 線結晶構造解析を行なった。さらに、Tm-AFase が 4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl (DMT) 基を導入した合成基質 Xyl- β -DMT を効率良く切断してキシロオリゴ糖の合成反応を起こすという報告に基づき、DMT 基と Tm-AFase のサブサイト+1 の相互作用を

明らかにすることを試みた。

大腸菌で発現させた Tm-AFase の組換え蛋白質を熱処理やカラムクロマトグラフィー等により精製、結晶化し、KEK-PFにて X 線回折実験を行なった。Tm-AFase と最も高いアミノ酸配列相同性(配列同一性 35%)を有する構造既知の *Geobacillus stearothermophilus* 由来のアラビノフラノシダーゼ(Gs-AFase)の立体構造をサーチモデルとして用いて分子置換法で位相を決定した。基質フリーの構造とアラビノース及びキシロース複合体の構造を分解能 1.8 -2.3 Å で決定した。Tm-AFase の単量体は(α/β)₈-barrel と β -sandwich domain からなり、結晶格子中の非対称単位は六量体を形成していた。活性中心には活性中心残基(E172, E281)が保存されており、抗凍結剤として用いたエチレングリコール分子が結合していた。アラビノース複合体構造ではアラビノース分子がサブサイト-1、+2、+3 に、結晶化バッファー由来の Tris 分子がサブサイト+1 に結合していた。また、キシロース複合体構造では、キシロース分子がサブサイト+1 に、Tris 分子がサブサイト-1 に結合していた。これらの基質の結合様式により Tm-AFase のサブサイト+1 は Gs-AFase より狭いが、より疎水的なスロット状の形状(Coin slot-like hydrophobic cavity)をとっていることが分かった。また、本研究では Automated docking を用いて、DMT-Xyl との結合様式を推定した。その結果、DMT 基は Tm-AFase と疎水性プラットフォームを強く形成しており、これらの結果から Tm-AFase の「Coin slot-like hydrophobic cavity」は DMT 糖をドナーとアクセプター両方として受容できるような形状を取っていると考えられた。

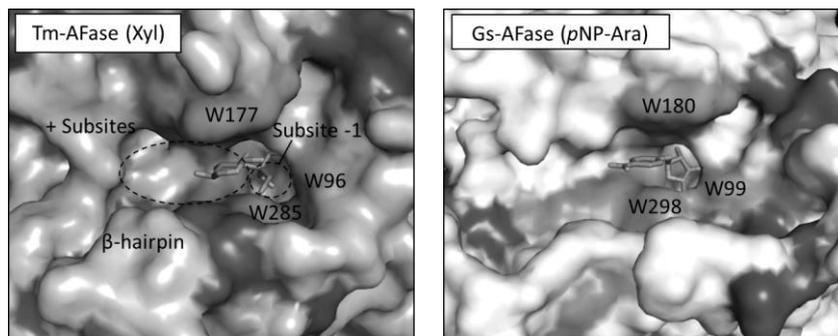


図 1 Tm-AFase と Gs-AFase の活性部位の分子表面図

2. 新規二機能性フラビン酵素 *Pseudomonas sp.* AIU 813 由来 L-アミノ酸オキシダーゼ/オキシゲナーゼの二機能性反応機構に関する構造生物学的研究

Pseudomonas sp. AIU 813 から L-アミノ酸オキシダーゼとして発見された本

酵素は、その後オキシダーゼとしての酸化的脱アミノ反応とモノオキシゲナーゼとしての酸化的脱炭酸反応の両方を触媒する新規二機能性酵素 L-アミノ酸オキシダーゼ/オキシゲナーゼ(L-AAOd/Og)であることが明らかになっている。また、この酵素に *p*-クロロ水銀安息香酸(*p*CMB)を添加することによってモノオキシゲナーゼ活性が減少し、オキシダーゼ活性が上昇することに着目して、変異体酵素 L-AAOd/Og C254I が作成された。L-AAOd/Og C254I は、*p*CMB の修飾を受けず、高いオキシダーゼ活性のみをもつことが報告されている。我々は、アミノ酸配列の比較や系統樹解析を通して L-AAOd/Og がオキシダーゼとモノオキシゲナーゼの活性を両方持つ新規のファミリーに属する可能性があるかと判断し、その立体構造を明らかにすることを旨とした。また、L-AAOd/Og の活性の転換を構造生物学的観点から解釈し、その転移メカニズムを明らかにすることを試みた。

大腸菌で発現させた L-AAOd/Og の組み換え蛋白質を精製、結晶化し、KEK-PF にて X 線回折実験を行った。構造既知の類似酵素との配列相同性が 22% 以下であるため、分子置換法は適用できず、Se-Met 置換体を用いてその位相の決定を行った。沈殿剤として PEG3350 を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶を作成した。リガンドフリー L-AAOd/Og 及び 3 つのリガンド(Lys, Orn, Arg)との複合体構造を、最大分解能 1.9 – 2.6 Å で決定した。L-AAOd/Og は、結晶格子中四量体で存在しており、各単量体は FAD 結合ドメイン、基質結合ドメイン、7 つの α -ヘリックスが集まった Helical ドメインの 3 つのドメインで構成されていた。基質が結合すると予測される活性中心は、Trp235、Trp418、Phe416 などの芳香環を持つ残基による疎水性ポケットが形成されており、また Trp516 と Phe473、FAD のフラビン環によって形成された Aromatic cage が基質との結合に重要な役割をしていた。3 つの基質の結合様式に大きな違いはなく、各基質のアミノ基(-NH₂)は Asp238 や 2 つの水分子と、カルボキシル基(-CO₂⁻)は Arg102 と相互作用をしていた。一方、活性転移の鍵であると予測される 254 番目のシステイン残基は Aromatic cage を形成する Trp516 の隣に位置していたため、この残基に変異が導入されることによって基質の結合様式が変わると予測された。共結晶法とソーキング法を用いた *p*CMB 処理による構造の変化を調べたところ、C254 と Q258 が含まれるループが *p*CMB の修飾によって元の位置から約 3 ~ 4 Å ほどコンフォメーション変化を起こしていた。Q258 は L-AAOd/Og がオキシダーゼ反応を触媒するときに関わる水分子との相互作用をしている残基であるため、この残基が含まれるループのコンフォメーション変化は本酵素の活性転換機構に重要な影

響を及ぼしていると考えられる。

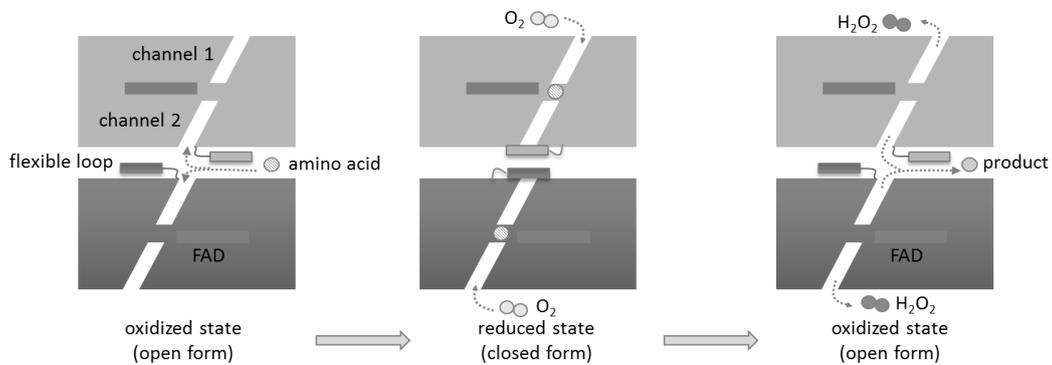


図 2 基質結合による L-AAOd/Og の触媒反応メカニズム

3. 総括

本研究では、糖質加水分解酵素である好熱性細菌 *Thermotoga maritima* MSB8 由来 α -L-アラビノフラノシダーゼ (Tm-AFase) 及びアミノ酸関連酵素の一種である土壌細菌 *Pseudomonas sp.* AIU 813 由来 L-リジンオキシダーゼ/オキシゲナーゼ (L-AAOd/Og) の X 線結晶構造解析に成功した。第 1 章の対象酵素であった Tm-AFase は、最も高い耐熱性を持つアラビノフラノシダーゼであるが、本研究の構造解析によりその耐熱性機構が明らかになった。また、アラビノースやキシロースとの複合体構造解析及び Automated docking により DMT 糖との結合様式を解析した研究から、これから DMT 糖を用いた新たなオリゴ糖合成にも利用されることが期待される。第 2 章では二機能性フラビン酵素 L-AAOd/Og のリガンドフリー構造、基質複合体構造や pCMB 修飾構造を通して基質と酵素が利用する分子内チャンネルの作用機構、オキシゲナーゼからオキシダーゼへの活性転換機構を新しく提案することができた。これらの結果は、将来リジン検出及び定量のためのリジンセンサーなどの開発につながると期待される。

1) [Im, D.-H.](#), Kimura, K., Hayasaka, F., Tanaka, T., Noguchi, M., Kobayashi, A., Shoda, S., Miyazaki, K., Wakagi, T., Fushinobu, S. (2012) Crystal structures of glycoside hydrolase family 51 α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga maritima*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 423-428.