

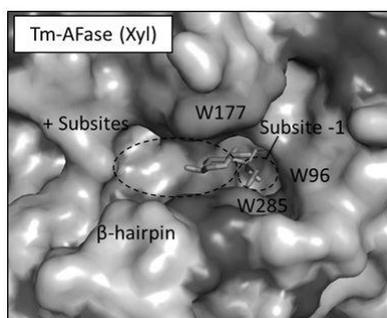
[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

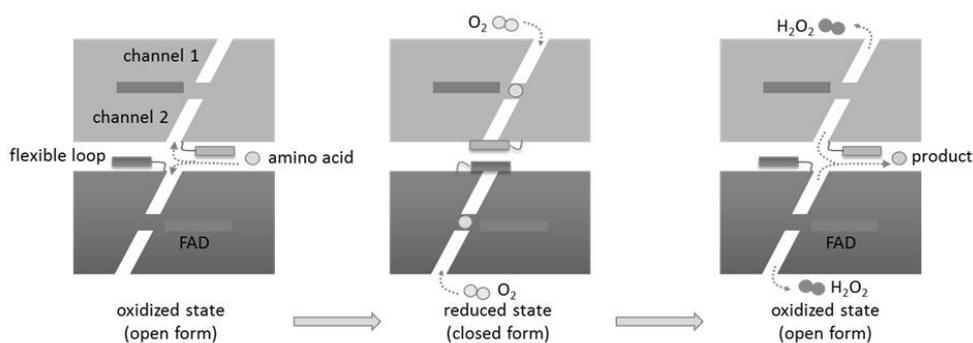
申請者氏名 林 到炫

糖質はエネルギー源、構造糖質、複合糖鎖としての機能をもっており、タンパク質、脂質、核酸に並ぶ重要な生体物質の1つである。糖質加水分解酵素は、多様な形で存在する糖質を効率的に分解する酵素であり、近年バイオエタノールの酵素的生産に用いられるなど、注目されている。一方、アミノ酸関連酵素は生体内のアミノ酸代謝過程に関わる酵素であり、血中アミノ酸による疾病検出を行うために酵素を用いた定量法や、バイオセンサーの開発が進められている。本論文は、糖質・アミノ酸関連酵素の構造解析を行い、基質の認識・触媒反応機構を解明する研究であり、2章より構成される。

序論に続き、第1章では超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* MSB8 由来  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ(Tm-AFase)の X 線結晶構造解析について述べている。Tm-AFase は、糖質加水分解酵素(GH)ファミリー51 に属し、4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl (DMT)基を導入した合成基質 Xyl- $\beta$ -DMT を効率良く切断してキシロオリゴ糖の合成反応を触媒する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。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結晶構造を分解能 1.8 - 2.3 Å で決定した。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 は狭いが、疎水的なスロット状の形状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+側のサブサイトは 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ことが明らかになった。



第2章では、土壌細菌 *Pseudomonas* sp. AIU813 由来の L-アミノ酸オキシダーゼ/オキシゲナーゼ(L-AAOd/Og)の構造解析及び活性転換機構について述べている。L-AAOd/Og は、オキシダーゼとしての酸化脱アミノ反応とモノオキシゲナーゼとしての酸化脱炭酸反応の両方を触媒する新規二機能性酵素である。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。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サブ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。リガンドフリーL-AAOd/Og 及び3種の基質(Lys, Orn, Arg)との複合体構造を、分解能 1.9–2.6 Å で決定した。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。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ことが分かった。



以上、本論文は糖質加水分解酵素 Tm-AFase とアミノ酸関連酵素 L-AAOd/Og の立体構造を解明し、基質との認識作用及び、活性転換機構を構造生物学的に解明したものであり、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。