

氏名（本籍）	た なか のぶ きよ 田 中 信 清（埼玉県）
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	甲第 1192 号
学位授与の日付	2019 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	新規 Glycoside hydrolase family に属する 真核生物由来 <i>endo-β-1,2-glucanase</i> の単 離同定及び機能構造解析

論文審査委員	（主査）教授 田口 速男
	教授 鎌倉 高志 教授 郡司 天博
	准教授 倉持 幸司 教授 羽田 紀康

論文内容の要旨

糖鎖は、核酸及びタンパク質に続く第 3 の生命鎖として様々な生命現象に関与している。そして、糖鎖に対して作用する酵素はそのアミノ酸配列相同性によって Glycoside hydrolase (GH) family に分類されており、現在までに 153 種にもものぼっている。同じ family 内で、その反応機構はほぼ保存されているために、新規な GH family をみつけることは学術的に非常に重要と考えられる。β-1,2-結合によってグルコースが連なった多糖(β-1,2-グルカン)は *Agrobacterium* など、一部のグラム陰性菌で主に環状糖として分泌されることが知られており、宿主への共生や感染、また細胞内浸透圧の調節物質として知られている。近年、大量調製可能になった直鎖状 β-1,2-グルカンを利用して、原核生物由来 β-1,2-グルカナナーゼ (*CpSGL*) の単離同定が行われ、新規な GH144 が創設された。しかし、真核生物にも β-1,2-グルカン分解活性を示すものが報告されているにもかかわらず、検索された *CpSGL* ホモログの中に真核生物由来のものは全く見出されなかった。すなわち、真核生物の β-1,2-グルカナナーゼは、これとは系統的に異なる新規な family を形成していることが示唆される。そこで本研究では、さらにこの直鎖状 β-1,2-グルカンを用いて、培養液上清中に β-1,2-グルカン分解活性が認められる糸状菌 *Talaromyces funiculosus* から、β-1,2-グルカナナーゼ (*TfSGL*) の単離同定及び機能構造解析を行った。

直鎖状 β-1,2-グルカンを唯一の炭素源とする培地にて、*T. funiculosus* を 3 日間培養し、その培養上清から 3 種のカラムクロマトグラフィーにより目的酵素を精製した。その結果、目的酵素は β-グルコシダーゼと分離され、SDS-PAGE 上で約 60 kDa の単一のバンドとして検

出された。精製酵素の直鎖状 β -1,2-グルカンに対する分解様式を調べたところ、反応初期から主生成物として Sop₂ が検出された。本酵素のアミノ酸配列の部分解析から遺伝子同定を行い、判明した全アミノ酸配列より Blast 検索を行ったところ、既知の糖加水分解酵素 (GH) はヒットしなかった。そして見出されたホモログのほとんどは真核生物のものであり、粘菌や子のう菌に機能未知タンパク質として分布していた。したがって本酵素は新規 GH family に属すると考えられる。

酵母 *Pichia pastoris* を宿主として組換え *TySGL* を発現させ、調製したところ、天然型酵素と同様の分子量及び直鎖状 β -1,2-グルカン分解活性を示した。また、組換え酵素は天然型同様に直鎖状 β -1,2-グルカンに特異的であり、直鎖状 β -1,2-グルカンに対して一般的な GH の kinetic parameter を示した ($k_{cat} = 31 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、 $K_m = 0.015 \text{ (mM)}$)。Sop₃₋₇ に対する基質特異性分析では、Sop₃₋₅ に対しては天然型と同様の分解活性がみられ、Sop₆ からは Sop₂₋₄ が、Sop₇ からは Sop₂₋₅ が同程度に遊離した。本酵素が基質をどちらの末端から分解するのか知るために、Sop₆₋₈ の還元末端を修飾した基質の分解様式を調べた。その結果、いずれも反応初期から Sop₂ に修飾末端が付加した生成物が遊離したため、還元末端側から 2 糖を遊離する酵素であることが明らかとなった。また、本酵素は環状 β -1,2-グルカンに対して直鎖状 β -1,2-グルカンと同程度の分解活性を示したことから、基質内部から分解する *endo* 型の分解活性をもつことが示された。更に本酵素の反応機構 (アノマー反転型または保持型) を決定するために、直鎖状 β -1,2-グルカン分解時の生成物のアノマーを ¹H NMR により検出した。その結果、反応初期に α -アノマー由来のピークが検出されたことから、本酵素がアノマー反転型の反応機構にしたがうことが示された。

立体構造解析にあたっては、高エネルギー加速器研究機構のシンクロトロン放射光を用いてデータ収集を行った。本酵素には立体構造既知のホモログがないため、ヨウ素の異常分散効果を利用して位相決定を行った。そして、結晶構造を解析した結果、 $(\alpha/\alpha)_6$ toroid fold の全体構造を有する *TySGL* の 2.0 Å の立体構造の決定に成功した。さらに、本酵素の触媒機構、基質認識機構を解明するために、分解産物である Sop₂ と *TySGL* の基質複合体、および非活性型変異体 E262Q と β -1,2-グルカンとの Michaelis 複合体構造を取得した。その結果、基質切断点に直接相互作用する触媒候補残基が存在しなかったため、切断点近傍に位置するすべての触媒候補アミノ酸残基に対して部位特異的置換変異体を作成し、それらの β -1,2-グルカンに対する活性を調べた。その結果、E262、D177 (一般酸触媒候補) 及び D446 (一般塩基触媒候補) の 3 変異体に顕著な活性低下が認められた。D446 は β -1,2-グルカンとの複合体構造中において、求核水とは別の水分子を介して求核水と相互作用可能な距離に存在しており、一般塩基触媒として作用している可能性が強く示唆された。一方、D177 及び E262 はそれぞれサブサイト+1 及び+2 に結合した基質の 3 位水酸基を介して基質の切断部位の酸素原子と相互作用していた。

D177 及び E262 のどちらが一般酸触媒かを決定するために、還元末端または還元末端から 2 番目のグルコースユニットの 3 位水酸基が還元された 3-デオキシ-Sop₅ 誘導体 (3dSop₅, 3d'Sop₅) を調製した。まずグルコースを出発物質に用い、3 位の保護基及び脱離基として *p*-トルオイル基を利用することによって、3-デオキシ-Sop₂ 誘導体をより少ないステップで効

率的に化学合成した。この誘導体に対して、1,2- β -D-oligoglucan phosphorylase を作用させることで非還元末端側にグルコースを β -1,2-結合で伸長させ、HPLC を用いて 3dSop₅, 3d'Sop₅ を分離、精製した。TfSGL により分解産物を分析したところ、3d'Sop₅ (サブサイト+1 に 3-デオキシ糖ユニットが結合)からは 3-デオキシ-Sop₂ 及び Sop₃ が遊離したのに対し、3dSop₅ (サブサイト+2 に 3-デオキシ糖ユニットが結合)には分解が認められなかった。この結果は、E262 がサブサイト+2 に結合した基質の 3 位水酸基を介して一般酸触媒残基として機能することを示しており、本酵素が触媒機構の上でも新規な特徴をもつことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

β -1,2-結合によってグルコースが連なった多糖 (β -1,2-glucan) は、一部のグラム陰性菌で主に環状糖として分泌され、宿主への共生や感染、また細胞内浸透圧の調節物質としてはたらくことが知られている。しかし、天然では稀少な多糖であるため、その分解、代謝に関与する酵素の知見は極めて乏しい現状である。近年、人工的な大量調製が可能となった直鎖状 β -1,2-glucan を利用して、グラム陰性土壌細菌として知られる *Chitinophaga pinensis* 由来の β -1,2-glucanase (CpSGL) の同定が行われ、新規な糖加水分解酵素 family (GH) 144 が創設された。一方、真核生物にも β -1,2-glucan 分解活性を示すものが報告されているが、その詳細な機能や構造に関する報告は全くなく、CpSGL のホモログにも真核生物由来のものは見出されていない。本研究は、糸状菌 *Talaromyces funiculosus* から、真核生物の β -1,2-glucanase (TfSGL) を初めて単離同定し、機能構造解析に成功したものである。

直鎖状 β -1,2-glucan を唯一の炭素源とする培地にて *T. funiculosus* を培養し、直鎖状 β -1,2-glucan から Sop₂ を生じる TfSGL を培養上清より精製した。精製酵素のアミノ酸配列部分解析をもとに TfSGL の遺伝子と完全長 cDNA をクローン化し、ここから判明した全アミノ酸配列より Blast 検索を行ったところ、既知の GH はヒットせず、見出されたホモログのほとんどは真核生物 (特に粘菌や子のう菌) の機能未知タンパク質として分布していた。すなわち、本酵素は新規 GH family に属するタンパク質であり、この新規 family のタンパク質は真核生物に広く分布していることが明らかになった。

酵母 *Pichia pastoris* を宿主として発現させ、調製した組換え TfSGL (TfSGLr) は、天然型酵素と同様の分子量及び直鎖状 β -1,2-glucan に特異的な分解活性を示し、一般的な GH 酵素と同等の触媒効率を示した。また、TfSGLr は環状 β -1,2-glucan も分解したことから、endo 型の分解活性をもつことが示されたが、反応の詳細な解析から、直鎖状の β -1,2-glucan に対しては、還元末端側から主に二糖ずつを遊離する exo 型様の活性も有し、さらにその反応機構がアノマー反転型であることも示された。

TfSGLr を結晶化し、2.0 Å 分解能での立体構造決定に成功した。構造解析にあたっては、ヨウ素の異常分散効果を利用して位相決定を行い、高エネルギー加速器研究機構の

シンクロトロン放射光を用いてデータ収集を行った。その結果、TfSGLr の(α/α)₆ toroid fold の全体構造が明らかになった。さらに、触媒機構を解明するため、TfSGLr と分解産物である Sop₂ との複合体、および非活性型変異体である E262Q 変異型 TfSGLr と β -1,2-glucan との複合体構造を決定した。しかし、これらの構造では従来の GH 酵素で知られている基質切断点に直接作用する触媒残基が見出されず、TfSGLr が新規な触媒機構をもつことが示唆された。網羅的に部位特異的変異を導入した解析の結果、触媒候補残基は E262、D177 及び D446 の 3 残基に限定された。このうち、D446 は水分子を介して求核水と相互作用可能な距離に存在することから、特異な一般塩基触媒として作用する可能性が強く示唆された。一方、D177 及び E262 は、それぞれサブサイト+1 及び+2 に結合した基質グルコース部分の 3 位水酸基を介して切断部位の酸素原子と相互作用していることから、これらのいずれかが基質水酸基を介して一般酸触媒として作用する特異な触媒機構が示唆された。これを検証するために、還元末端あるいは還元末端から 2 番目のグルコースユニットの 3 位水酸基が還元された 3-deoxy-Sop₅ 誘導体基質 (3dSop₅, 3d'Sop₅) を調製した。グルコースを出発物質とし、3 位の保護基及び脱離基として *p*-トルオイル基を利用することによって、3-deoxy-Sop₂ 誘導体をより少ないステップで効率的に化学合成した。さらに、1,2- β -oligoglucan phosphorylase を作用させて非還元末端側にグルコースを β -1,2-結合で伸長させ、3dSop₅, 3d'Sop₅ の取得に成功した。これらを用いた反応から、E262 がサブサイト+2 に結合した基質の 3 位水酸基を介して一般酸触媒残基として機能することが示され、TfSGLr が触媒機構の上でも新規な特徴をもつことが明らかになった。

以上、本研究は、真核生物由来の β -1,2-グルカナーゼを初めて同定し、新規な GH family が主に真核生物に分布することを明らかにした。さらに、その構造と機能を詳細に解析するとともに、有機合成、酵素合成を組み合わせることで基質誘導体を合成し、その新規でユニークな触媒機構も明らかにした。これらの研究成果は、糖質科学、酵素学、タンパク質科学の研究分野に大きく貢献するものといえる。よって、本論文は、博士(理学)の学位論文として十分に価値のあるものと認める。