

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	近藤 辰哉
学位授与の日付	2020年3月31日	
論文名	Studies on fungal exo-type glycosidic enzymes acting on arabinogalactans with novel catalytic activities （新規な触媒活性を持つアラビノガラクトタンに作用する糸状菌由来エキソ型糖質関連酵素に関する研究）	
論文審査委員	主査	阪本 龍司
	副査	川口 剛司
	副査	片岡 道彦

論文要旨

緒論

ペクチンは植物一次細胞壁および中葉組織に局在し、植物組織中では細胞接着や細胞強度の調節などに関与している。複雑な糖鎖構造を有するペクチンは、主にホモガラクトツロナン、ラムノガラクトツロナン-I (RG-I)、RG-II 領域から構成されており、RG-I には分岐アラビナンおよび I 型アラビノガラクトタン (AG-I)、AG-II が側鎖として結合している。また、AG-II はペクチンの他、アラビアガム (GA) などのアラビノガラクトタンプロテイン (AGP) の主成分として植物組織に広く存在し、細胞分化や細胞間認識、花粉管誘導、プログラム細胞死などに関与していると考えられている。これらの多糖は植物生理学的に重要な分子であることは認識されているものの、非常に複雑な糖鎖構造を有することから、それらの構造機能相関はほとんど解明されていない。一方、食品産業においてペクチンや GA は、それらの物性を利用してゲル化剤や増粘剤等として多用されており、機能性素材としても注目されている。

ある種の糸状菌は種々の植物細胞壁多糖分解酵素を分泌生産し、効率的に細胞壁を分解することができる。しかしながら、ペクチンや AGP に関しては、糖鎖構造の複雑さ故に、これらの分解酵素の研究は遅れているのが現状である。本研究グループでは、これまでにペクチンおよび AGP 高分解菌を単離し、それらが生産する多種多様な分解酵素の特性を決定し、糸状菌による多糖分解機構について解明を進めてきた。高い特異性を有する酵素は、ヘテロ多糖を限定的に分解できることから、多糖構造を変化させるための有効なツールとなる。すなわち、糖鎖構造や構造機能相関の解析や多糖の物性改変、多糖からのオリゴ糖

調製など幅広い用途が期待できる。

本研究では、上記の糸状菌が生産する新規な触媒活性を有する AG-I/AG-II 分解酵素遺伝子を単離、クローニングし、基質特異性解析および X 線結晶構造解析による分子レベルでの触媒機構の解明を目的とした。

第 1 章：RG-I に結合した β -1,4-ガラクトシル残基を遊離させる GH35 β -ガラクトシダーゼの機能解析

本章では、AG-I 分解に焦点を置き、*Penicillium chrysogenum* 31B 株由来グリコシドヒドロラーゼ (GH) 35 に属する 3 種の組換え β -ガラクトシダーゼ (BGAL) アイソザイム (PcBGAL35A, PcBGAL35B, PcGALX35C) を、酵母分泌系により発現させ、酵素学的解析および ¹H-NMR を用いて、これらの基質特異性を解析した。

PcBGAL35A のアミノ酸配列の類似性は、他の GH35 BGAL と比較すると 30% 以下であった。PcBGAL35B のアミノ酸配列は、*Penicillium* sp. の BGAL のアミノ酸配列と約 80% が一致し、PcGALX35C のアミノ酸配列は、PcBGAL35A と同じ系統樹クラスターに分類された。基質特異性を検討した結果、PcBGAL35A は、pNP 基質や β -1,4-ガラクトシルオリゴ糖に活性を示したが、 β -1,4-ガラクトシル RG-I に対して最も高い活性を示し、触媒効率 (k_{cat}/K_m) は pNP 基質と比較すると約 10 倍高いことが明らかとなった。HPAEC-PAD を用いてその分解様式を分析した結果、RG-I に結合したガラクトシル残基の重合度低下に伴い、PcBGAL35A の活性が上昇した。PcBGAL35A は、RG-I に結合したガラクトシル残基を根元から切断することが可能な、これまでに報告例のないユニークなエキソ型グリコシダーゼであった。PcBGAL35B は、分子系統樹および基質特異性解析を基に、AG-II の糖化酵素であると結論付けた。一方、PcGALX35C は、先行研究によってエキソ- β -1,4-ガラクタナーゼであると報告されているが、詳細な基質特異性は明らかになっていないため、同様に特異性を検討したところ、 β -1,4-ガラクトシルオリゴマーおよびポリマーに対して同様の触媒効率を有することが分かった。さらに、PcGALX35C は重合度 2 以上の RG-I 結合 β -1,4-ガラクトシルオリゴマーをエキソ型で加水分解し、ガラクトースを遊離した。これらの結果を基に PcBGAL35A と PcGALX35C はガラクトシル RG-I 分解の鍵酵素であることが示唆された。また、両酵素は *P. chrysogenum* 31B 由来エンド- β -1,4-ガラクタナーゼ (PcGAL1) および α -アラビノフラノシダーゼ (AFS1) と協調的に、RG-I に結合した AG-I を分解することが示唆された。

第 2 章：新規 4-O-L-ラムノシル- β -グルクロニダーゼの機能・結晶構造解析

本章では、AG-II の中で最も複雑な糖鎖構造を有する GA の側鎖末端に作用する *Fusarium oxysporum* 12S 株由来 β -グルクロニダーゼ (GlcAase; FoBGlcA) を、酵母分泌系によって発現させ、酵素学的解析および X 線結晶構造解析によってその触媒機構を分子レベルで明らかにした。

FoBGlcA のアミノ酸配列は、GH79 間で独立したクラスターに分類され、その相同性は GH79 間で約 20% 以下であったが、触媒残基がファミリー間で保存されていたことから、本酵素は GH79 のスーパーファミリーに分類される可能性が示唆された。多糖に対する酵素活性を調べた結果、GA に対してのみ顕著な活性を示し、その分解産物を構成糖分析および ESI-MS 解析により α -L-ラムノシル (1 \rightarrow 4) グルクロン酸 (Rha-GlcA) と同定した。また、GlcA 残基を非還元末端に持つオリゴ糖に対しては、極めて微弱な活性であったこと

から、本酵素を 4-O-L-ラムノシル- β -グルクロニダーゼと命名した。GA を基質とした際、本酵素による Rha-GlcA の遊離率は約 70%に留まったため、側鎖末端付近に阻害残基が局在することが示唆された。そこで、様々な側鎖パターンを持つオリゴ糖に対する比活性およびキネティックパラメーターを算出した結果、FoBGlcA は隣接するアラビノフラノース (Araf) 残基によって顕著に活性が阻害された。

次に、基質特異性を分子レベルで解明するために、FoBGlcA の結晶化を試みたところ、分解能 1.51 Å の回折データを与える結晶を調製することに成功し、セレノメチオン標識を用いた単波長異常分散 (Se-SAD) 法によってアポ体構造を決定した。FoBGlcA の全体構造は、N 末端の (β/α)₈-バレルドメイン (触媒ドメイン) と C 末端の逆平行 β -シートドメインから構成され、GH79 間で保存されるドメイン構造と類似していた。反応生成物との複合体構造は、ソーキング法によって獲得した。リガンドとの結合様式を基にアミノ酸変異体を作製し、触媒残基および触媒に関与する残基を決定した。GH79 に属する *Acidobacterium capsulatum* 由来 GlcAase (AcGlcA79A) ではサブサイト-2 をブロックする様にループ構造が位置していたが、FoBGlcA におけるループ構造は溶媒に露出し、Rha-GlcA を受容できるポケット構造を確認した。つまり、このループ構造の局在が本酵素の基質特異性の要因であることが示唆された。FoBGlcA のリガンド結合部位は AcGlcA79A と比較すると、推定される+側サブサイトに相違が見られた。AcGlcA79A の+側サブサイトは、アラニンとロイシン残基によるポケットを形成していたのに対し、FoBGlcA では二つのフェニルアラニン残基 (Phe167 と Phe212) が保存されており、糖残基との疎水的結合に有利なサブサイト構造であることが示唆された。また、+側サブサイトに結合しうる糖残基をモデリングし、 α -1,3 または α -1,4-Araf 残基による阻害様式を推測した結果、Phe212 が α -1,4-Araf 残基受容の障害となる可能性が示唆されたためアミノ酸変異体解析を行ったが、その立体障害様式の解明は困難であった。

第 3 章 : L-ラムノース- α -1,4-D-グルクロン酸リアーゼの機能・結晶構造解析

本章では、GA 側鎖末端から Rha を遊離する *F. oxysporum* 12S 株由来 L-ラムノース- α -1,4-D-グルクロン酸リアーゼ (FoRham1) を酵母分泌系によって発現させ、酵素学的解析および X 線結晶構造解析によってその触媒機構を分子レベルで明らかにした。

FoRham1 のアミノ酸配列は、GH145 と最も高い相同性 (23%) を示し、分子系統樹においても同様のクラスターに分類された。しかし、GH145 の推定触媒残基および他の保存残基は、FoRham1 および FoRham1 ホモログ遺伝子において保存されていないことが判明した。最大 19%の相同性を示したウルバンリアーゼが分類される多糖リアーゼ (PL) 24 と比較したところ、本ファミリーに保存される残基は、FoRham1 およびホモログ間で保存されていたことから、本酵素は、多糖リアーゼである可能性が示唆された。基質特異性を解析した結果、FoRham1 はウルバンに活性を示さず、GA から Rha を遊離することが明らかとなった。さらに、 β 脱離反応に伴う二重結合生成は ¹H-NMR などにより確認されたため、FoRham1 を L-ラムノース- α -1,4-D-グルクロン酸リアーゼであると決定した。Rha-GlcA を非還元末端に含む様々なオリゴ糖に対する比活性およびキネティックパラメーターを算出したところ、二糖の Rha-GlcA に最も高い比活性を示し、その触媒効率は四糖と比較すると約 8 倍高いことが明らかとなった。つまり、FoRham1 は第二章の FoBGlcA と協調的に、GA 側鎖末端の Rha-GlcA を分解することが示唆された。多糖リアーゼの触媒機構は、PL ファミリー間で異なることから、新規 PL ファミリーに分類される可能性が高い FoRham1

の触媒機構を解明するために、X線結晶構造解析を行った。

FoRham1の結晶化を試みた結果、アポ体で最大分解能1.05 Åの回折データを与える結晶を獲得した。位相決定はSe-SAD法によって決定し、高分解能の結晶構造を決定した。FoRham1の全体構造は、GH145およびPL24に保存される七枚羽β-プロペラ構造であったが、*Alteromonas* sp. 由来PL24ウルバンリアーゼ(LOR_107)とのRMSD値は3.637であった。さらに、活性欠損体H105FのRha-GlcA複合体構造は、ソーキング法によって獲得した。リガンドとの結合様式を基にアミノ酸変異体を作製し、触媒残基を推定した。その触媒機構はLOR_107とは異なる反応機構であることが示唆された。興味深いことに、サブサイト+1に結合したGlcAの立体配座は安定な⁴C₁から¹Eへ変化していたため、触媒の遷移状態、いわゆる反応中間体構造であることが考えられた。さらに、リガンド結合部位の表面モデルを観察すると、GlcA残基のO-1位はクレフトに向けて配向していた。つまり、FoRham1のRha-GlcAに対する高い触媒効率の構造的要因は、この立体配座変化に起因することが示唆された。

本学位論文によって得られた結果は、糖質関連酵素における触媒機構の解明という学術的意義にとどまらず、ペクチンおよびAGPの植物生理学的な機能解明やペクチン構造解析ツールへの応用に向けた基盤となるものである。

審査結果の要旨

複雑な糖鎖構造を有するペクチンのラムノガラクトシロナン-I (RG-I) には、分岐アラビナンおよびI型アラビノガラクトタン (AG-I)、AG-IIが側鎖として結合している。AG-IIは、アラビアガム (GA) の主成分として植物組織に広く存在している。これらの多糖は、食品産業においてゲル化剤や増粘剤として利用されており、植物生理学的にも重要な分子であるが、それらの構造機能相関はほとんど解明されていない。

本研究グループでは、これまでにペクチンおよびAG-II高分解菌を単離し、それら分解酵素の特性を基に、糸状菌による多糖分解機構について解明を進めてきた。高い効率性および特異性を有する酵素は、多糖構造を変化させるための有効なツールとなる。すなわち、糖鎖構造や構造機能相関の解析や多糖の物性改変、多糖からのオリゴ糖調製など幅広い用途が期待できる。本研究は、新規な触媒活性を有するエキソ型AG-I/AG-II分解酵素の基質特異性解析およびX線結晶構造解析による分子レベルでの触媒機構の解明を目的として行われた。

第一章では、AG-I分解に焦点を置き、*Penicillium chrysogenum* 31B株由来グリコシドヒドロラーゼ (GH) 35に属するβ-ガラクトシダーゼ (PcBGAL35A, PcBGAL35B, PcGALX35C) を、酵母分泌系により発現させ、酵素学的解析および¹H-NMRを用いて、これらの基質特異性を解析した。PcBGAL35Aは、pNP基質やβ-1,4-ガラクトシルオリゴ糖に活性を示したが、β-1,4-ガラクトシルRG-Iに対して最も高い活性を示し、触媒効率 (k_{cat}/K_m) はpNP基質と比較すると約10倍高いことが明らかとなり、ガラクトシル残基の重合度低下に伴い、PcBGAL35Aの活性上昇が示された。PcBGAL35Aは、RG-Iに結合したガラクトシル残基を根元から切断することが可能な、これまでに報告例のないユニークなエキソ型グリコシ

ダーゼであることを明らかにした。PcBGAL35B は、分子系統樹および基質特異性解析を基に、AG-II の糖化酵素であると結論付けた。一方、PcGALX35C は、 β -1,4-ガラクトシルオリゴマーおよびポリマーに対して同様の触媒効率を有することが示された。さらに、PcGALX35C は重合度 2 以上の RG-I 結合 β -1,4-ガラクトシルオリゴマーをエキソ型で加水分解した。これらの結果を基に PcBGAL35A と PcGALX35C はガラクトシル RG-I 分解の鍵酵素であることが示された。

第二章では、GA の側鎖末端に作用する *Fusarium oxysporum* 12S 株由来 β -グルクロニダーゼ (GlcAase; FoBGlcA) を、酵母分泌系によって発現させ、酵素学的解析および X 線結晶構造解析によってその触媒機構を分子レベルで明らかにした。FoBGlcA は、分子系統樹より GH79 のスーパーファミリーに分類される可能性が示された。多糖に対する酵素活性を調べた結果、GA に対して顕著な活性を示し、その分解産物は α -L-ラムノシル (1 \rightarrow 4) グルクロン酸 (Rha-GlcA) と同定されたことから、4-O-L-ラムノシル- β -グルクロニダーゼと命名した。また、FoBGlcA は隣接するアラビノフラノース (Araf) 残基によって、顕著な活性阻害を受けることを示した。FoBGlcA の反応生成物との複合体構造におけるリガンド結合様式を基に、触媒残基および触媒関連残基を決定した。FoBGlcA は、触媒部位近傍のループ構造の局在によって、ラムノース (Rha) 残基を受容できるサブサイトを有することを見出した。相同性が最も高い GH79 に属する AcGlcA79A の + 側サブサイトは、アラニンとロイシン残基によるポケットを形成していたのに対し、FoBGlcA では二つのフェニルアラニン残基 (Phe167 と Phe212) が存在しており、触媒活性の結果を踏まえ、糖残基との疎水的結合に有利なサブサイト構造であることを示した。また、分子モデリングの結果、 α -1,4-Araf 残基は Phe212 による立体障害を受けることを推測したが、変異体解析ではその立体障害様式を解明することが困難であった。しかし、Phe167 および Phe212 が本酵素の基質結合に重要であることを示した。

第三章では、GA 側鎖末端から Rha を遊離させる *F. oxysporum* 12S 株由来 L-ラムノース- α -1,4-D-グルクロン酸リアーゼ (FoRham1) を酵母分泌系によって発現させ、酵素学的解析および X 線結晶構造解析によってその触媒機構を分子レベルで明らかにした。FoRham1 は、分子系統樹およびアライメント解析の結果から、新規多糖リアーゼ (PL) ファミリーに分類される可能性が示された。 β 脱離反応に伴う二重結合生成は $^1\text{H-NMR}$ などにより検出し、L-ラムノース- α -1,4-D-グルクロン酸リアーゼであると決定された。本酵素は、二糖の Rha-GlcA に最も高い触媒効率を示した。つまり、FoRham1 は第二章の FoBGlcA と協調的に、GA 側鎖末端の Rha-GlcA を分解することが示された。また、FoRham1 の立体構造は、アポ体において最大分解能 1.05 Å で決定された。活性欠損体 H105F の Rha-GlcA 複合体構造におけるリガンドとの結合様式を基にアミノ酸変異体を作製し、その触媒機構を提唱した。触媒機構は PL24 とは異なる反応機構であることが示された。本酵素の触媒遷移状態は、GlcA の立体配座変化 ($^4\text{C}_1$ から ^1E) によって決定され、触媒効率と立体配座変化の相関を明らかにした。

本研究は、糸状菌由来の新規エキソ型糖質関連酵素の機能を動力学パラメーターや NMR を用いて明らかにし、その高分解能の結晶構造から構造機能相関を明らかにした。また、微生物による生存戦略の一端を明らかにしたものである。これらの知見は、応用微生物学、酵素学、構造生物学、糖鎖生物学の分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。