

称号及び氏名	博士（理学） 曾我部 祐里
学位授与の日付	平成 23 年 12 月 31 日
論文名	「 <i>Penicillium chrysogenum</i> 由来エキソ型アラビナナーゼの構造と機能」
論文審査委員	主査 多田 俊治 副査 八木 孝司 副査 藤井 郁雄

論文要旨

第一章 緒論

植物細胞壁を構成するアラビナンは、主にヘミセルロースやペクチンに含まれており植物バイオマス資源として有効利用が期待されている糖質の一つである。構成単糖であるアラビノースはショ糖と同程度の甘味を持つのに対し、スクラーゼの作用を阻害してショ糖の消化・吸収を抑制することから糖尿病患者の食事療法への、またアラビノオリゴ糖はビフィズス菌を選択的に増殖させるなどの機能を持つことから発ガンや生活習慣病のリスクを軽減する機能性糖質としての利用に期待がかかっている。さらに近年では、アラビノースはバイオエタノールの生産原料としても注目されている。バイオマス資源からこれら糖質の効率的な生産法としては、特定の糖を選択的に分離することができる酵素法が有効である。

アラビナンは、アラビノースが α -1,5-アラビノフラノシド^{*} 結合した直鎖状の構造を主鎖とし、部分的に α -1,2 または α -1,3 結合したアラビノースの側鎖を持っている。その直鎖を分解する酵素としてアラビナナーゼ、側鎖を分解する酵素としてアラビノフラノシダーゼが存在する。近年、本学生命環境科学研究科の阪本らにより *Penicillium chrysogenum* 31B 株からエキソ型 α -1,5-L-アラビナナーゼ (Abnx) が単離された。Abnx は、アラビナンの主鎖をアラビノビオースに加水分解する retaining 型の反応を示す酵素であり、糖加水分解酵素ファミリー GH93 に属している。

本研究では、新規酵素である Abnx の構造および各種アラビノオリゴ糖との複合体の構造を X 線結晶構造解析により高分解能で決定し、その触媒機構や基質認識機構の解明を試みた。このような植物細胞壁分解酵素の分子レベルでの詳細な構造機能解明は、異なった基

質認識機能を持つ複数の酵素を段階的に用いる酵素法開発への途を拓くものと期待される。

第二章 Native Abnx の構造

Abnx 大量発現には、大腸菌 **BL21(DE3)pLysS** を用いて行った。常法に従って精製し、**SDS-PAGE** により純度を確認した。結晶化条件を探索した結果、硫酸アンモニウムを沈殿剤とした条件で結晶を得ることができた。しかし、この結晶では非対称単位にタンパク質分子が 8~16 個程度存在していることもあり、位相の決定が困難であった。そこで新たな結晶系の探索を創晶（株）と共同でレーザー照射法により行った。その結果、**2-methyl-2,4-pentanediol (MPD)** を沈殿剤とした条件で新たな結晶を得ることに成功した。レーザー照射により核の形成が促進されたため新たな結晶化条件の発見につながったものと考えている。回折 X 線測定を放射光施設 **SPring-8** にて行い、**1.14 Å** と極めて高い分解能の良好なデータを得た（斜方晶系、空間群 $P2_12_12_1$ 、格子定数 $a = 66.9$ 、 $b = 77.3$ 、 $c = 79.4$ Å）。多波長異常分散法(MAD 法)を用いた位相の決定を行うため、**Met** 残基を **Se-Met** に置換した Abnx を調製した。**Met** 要求株である大腸菌 **B834(DE3)pLysS** を形質転換し、制限培地による培養を行った。精製後、**native** と同じ条件で **Se-Met** 置換体結晶を得た。大型放射光施設 **SPring-8** にて **Se** 吸収端での **MAD** 測定を行い **1.6 Å** と良質なデータを得た。**MAD** 法により位相を求め、その後 **Abnx** の構造の構築と精密化を行った ($R_{\text{fact}} = 10.6\%$ 、 $R_{\text{free}} = 13.9\%$)。

解析の結果、本酵素は **4** つの逆平行 β -ストランドからなる β -シートを 1 片の羽根とし、**6** 片の羽根が環状に集まった β -プロペラ構造を持つことがわかった (図 1)。また **N** 末端側の **1** 本の β -ストランドと **C** 末端側の **3** 本の β -ストランドより **1** 片の羽根を構成する ‘ベルクロ’ 構造と呼ばれる独特な閉環構造をとっていた。本構造は全体として円筒型をしており、構造の一方の面には基質結合部位と推定されるクレフト構造が形成されていた。**Glu64**、**Glu174**、**Glu246**、**Tyr337** がクレフト構造に沿って存在しており、これらが触媒反応に直接関わる残基であることが示唆された。また、結晶化条件に含まれていた **MPD** と酢酸イオンがクレフト内に見出された。

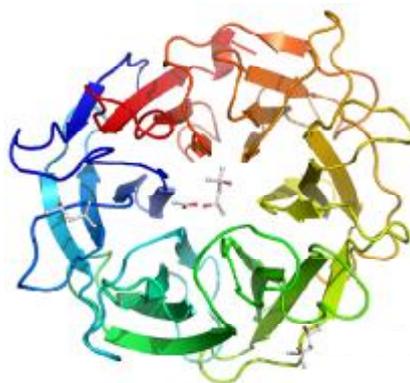


図 1 Abnx の構造

第三章 触媒機構の解明

Abnx の触媒機構や基質認識機構に関する手がかりを得ることを目的として、生成物であるアラビノビオース (A2) と Abnx の複合体の構造解析を行った。複合体結晶は、A2 を含む沈殿剤溶液に native 結晶を 10 秒浸漬させることにより調製した。回折 X 線測定を大型放射光施設 PF-AR NW-12 にて行い、1.04 Å の高分解能データを得、複合体構造を明らかにした ($R_{\text{fact}} = 10.6\%$ 、 $R_{\text{free}} = 12.6\%$)。

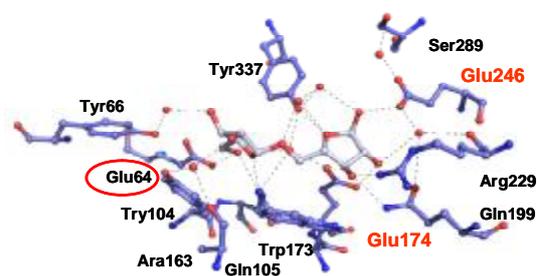
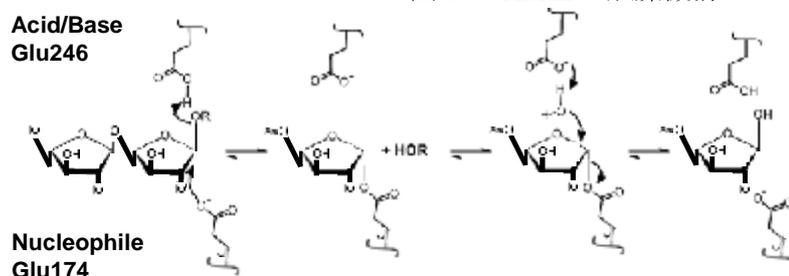


図 2 活性中心

その結果、クレフト内に A2 分子に相当する明瞭な電子密度を見出し、糖鎖結合部位を明らかにすることができた (図 2)。Glu174 はアノマー炭素と 3.2 Å の距離にあったことから、求核攻撃をおこなう catalytic nucleophile であり、一方 Glu246 は、アラビナンの加水分解部位であるアノマー炭素の OH 基と水素結合を形成 (2.6 Å) していたことから、catalytic acid/base であると推定した (図 3)。そこで Glu174 および Glu246 の変異体 (E174A/Q および E246A/Q) を作製し、直鎖アラビナンに対する活性測定を行ったところ予測通り活性を示さなかったことから、これら残基が触媒残基であると結論した。また Abnx はエキソ型の反応機構を示す酵素であり、本複合体構造において Glu64 が非還元末端側の糖の C5-OH と水素結合を形成していたことから、本残基がエキソ活性を示す要因であると考えられた。

図 3 Abnx の触媒機構



第四章 基質認識機構の解明

Abnx のサブサイトは 6 箇所存在するものと推定されたことから、それらの位置を特定するため、アラビノヘキサオース (A6) との複合体を、酵素活性をほぼ示さない pH 8.5 の溶液に 5 分浸漬させることにより調製し、構造解析を試みた。回折 X 線測定を大型放射光施設 PF にて行い、1.18 Å の高分解能データを得た。解析の結果、+1 位に結合する 3 糖目の糖が見出された ($R_{\text{fact}} = 13.4\%$ 、 $R_{\text{free}} = 14.9\%$)。3 糖目は、芳香族側鎖を持つ Phe258 と Tyr337 の間に嵌まり込むような位置で存在しており、さらに Ser289 と水素結合を形成していた。しかし 4 糖目以降は溶液中に突出しており電子密度が不明瞭であったため、+2 サブサイト以降の決定には至らなかった (図 4)。pH 8.5 においても僅かに活性は存在していることか

ら、複合体結晶調製時において加水分解により生成したテトラオース (A4) が **Abnx** に結合した構造であると考えた。

そこで、不活性変異体である E174Q と A6 との複合体の構造解析を試みた。変異体結晶を、A6 を含む沈殿剤溶液 (pH 4.5) に 30 分間浸漬させ、回折 X 線測定を大型放射光施設 PF にて行い、1.0 Å の高分解能データを得ることができた。構造解析の結果 ($R_{\text{fact}} = 12.9\%$ 、 $R_{\text{free}} = 13.5\%$)、-2 から +4 サブサイトに位置する 6 糖分の糖鎖を見出すことができた (図 4)。+2 サブサイトに入り込む 4 糖目は Pro165 と水素結合していた。5 と 6 番目の糖は **Abnx** のループに沿うように存在し、5 糖目は Tyr256 と疎水性相互作用、6 糖目は Thr255 および Tyr256 と水素結合していた。

上記の高 pH 複合体と比較すると、+1 サブサイトにおいて Glu246 および Ser289 と基質の結合が大きく異なっていた (図 4)。これにより **Abnx** には二通りの基質結合様式が存在し、これが重合度の異なる基質 $K_m \cdot K_{\text{cat}}$ の相違に関わっているのではないかと考えられた。**Abnx** は低重合度の基質ほど $K_m \cdot K_{\text{cat}}$ の値は低い。高 pH 複合体構造において A4 は安定的な構造をとっており遷移状態に移りにくく加水分解されにくいと考えられた。対する E174Q 複合体構造の A6 では、+4 サブサイトに糖が水素結合することにより、-1 と +1 サブサイト間で糖鎖が 90° 折れ曲がる構造をとっていた。これが -1 サブサイトに結合するアラビノースに影響を与え、より遷移状態に移りやすい糖コンフォメーションを形作ることが、**Abnx** の活性において長鎖の基質が有利となる要因の一つであると考えられた。

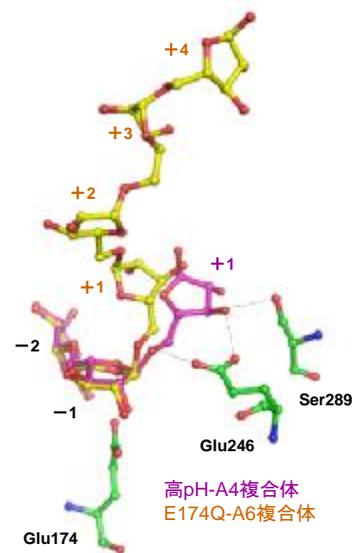


図 4 各複合体の糖鎖構造

第五章 β-プロペラ構造の比較

Abnx と GH33 に属す 6 枚羽根のシアリダーゼ、GH43 に属する 5 枚羽根のアラビナナーゼおよび近年報告された GH93 に属す *Fusarium graminearum* 由来エキソ型アラビナナーゼ (Arb93A) との構造機能相関について検討した。

シアリダーゼ：**Abnx**、シアリダーゼ共に 6 枚羽根以上に存在する Asp-box-motif が見いだされるなど、立体構造の相同性は高い。しかし基質結合に関わるクレフトが、**Abnx** では負電荷をシアリダーゼでは正電荷を帯びており、このことが基質選択性の一翼を担っているものと考えられた。

GH43 アラビナナーゼ：羽根の枚数に差がある他、**Abnx** は GH43 の酵素に特徴的な pKa モジュレータとして働くとされる酸性残基および Ca^{2+} を持っていないという大きな相違がみられた。しかし **Abnx** での pKa モジュレータ機構については未だ不明であった。

GH93 アラビナーゼ: Abnx と Arb93A の立体構造は極めて良く類似しているが、Arb93A では基質の重合度の相違による活性値の差はほとんどない。両酵素には、+1 サブサイトにおける残基 (Abnx : Ser289、Arb93A : Gly288) やサブサイトの形成に関わるループ構造などに相違があり、これらのことより両酵素の触媒機構が異なることが示唆された。

結語

P. chrysogenum 31B 株由来エキソ型 α -1,5-L-アラビナーゼ、Abnx の発現系を構築し、精製・結晶化を行い高品質結晶を得た。また、新規構造であったことから、Se-Met 置換体の作製・結晶化を行い、多波長異常分散法による位相決定を行った。その後の複合体も含め全て回折 X 線測定は大型放射光施設を用いて行い、何れも極めて高い分解能のデータを得た。構造解析の結果、Abnx は 6 片の羽根が環状に集まった β -プロペラ構造を持つことを明らかにした。また、アラビノビオースとの複合体の構造決定と変異体による活性測定を行い、catalytic nucleophile および catalytic acid/base の役割を担う活性残基を特定し、触媒反応機構を明らかにした。さらに、アラビノテトラオース複合体とアラビノヘキサオース複合体の構造解析を行い、基質結合部位および基質認識機構を明らかにした。

論文リスト

“High resolution crystal structure of exo-arabinanase from *Penicillium chrysogenum*”
Sogabe, Y., Kitatani, T., Yamaguchi, A., Kinoshita, T., Adachi, H., Takano, K., Inoue, T., Mori, Y., Matsumura, H., Sakamoto, T. & Tada, T. (2011) *Acta Cryst.* **D67**, 415-422.

審査結果の要旨

酵素機能の解明は生命科学の基盤的研究課題である。しかし、アミノ酸配列という一次構造と立体構造の関係も、立体構造と機能の関係も未だ明らかではなく、個々の酵素における分子あるいは原子レベルでの構造機能相関研究の推進が待たれている。本学位論文は、アラビナン分解酵素について、酵素並びに基質や生成物との複合体の構造を 1 \AA に近い極めて高い分解能で決定し、各アミノ酸残基とリガンド分子との間の相互作用様式について詳細な検討を行い、遷移状態を含む反応機構および基質選択性といった酵素特性について分子レベルで論じたものである。

第1章では、糖鎖分解酵素の分類について述べ、本研究の対象とした新規アラビナン分解酵素 **Abnx** の位置づけについて概説している。

第2章では、X線結晶構造解析によって決定した **Abnx** の立体構造について報告している (1.14 \AA 分解能)。レーザー光照射と溶液攪拌の最新の技術を用い極めて良質な結晶を得る条件を見出し、以下の高分解能構造解析に繋げている。位相は **Se-Met** 置換体を用いた多波長異常分散法により求め、本酵素は6枚羽根の β プロペラ構造を持つことを明らかにした。

第3章では、**Abnx** と生成物であるアラビノビオースとの複合体の構造の高分解能での解明 (1.04 \AA 分解能) および部位特異的変異体の酵素活性測定結果に基づき、触媒残基を特定し反応機構を論じている。これら研究成果は **Acta Crystallographica Section D** に筆頭著者として掲載されている。また、本結果より、**Abnx** の糖鎖分解酵素分類における位置づけが明らかにされている。

第4章では、基質であるアラビノヘキサオースと **Abnx** との複合体の高 **pH** 条件下で調製した結晶および同基質と **Abnx** 不活性変異体との複合体結晶の構造解析を行い (1.18 \AA & 1.00 \AA 分解能)、基質結合部位および相互作用様式を明らかにしている。特に、重合度の異なるアラビノオリゴ糖認識に差異の生じる構造要因の特定や遷移状態への移行機構など極めて興味深い結論を導きだしている。

第5章では、6枚羽根型の β プロペラ構造を持つ他のアラビナナーゼおよびシアリダーゼ、5枚羽根型のアラビナナーゼとの構造比較を行い、これら酵素群の反応機構および基質認識機構の相違に関わる構造要因について論じている。

第6章は、約一兆個の分子のある時間内での平均構造を見るタンパク質X線結晶構造解析を活用して得られた本研究の成果を取り纏めたものである。

以上のように、本論文は、タンパク質X線高分解能構造解析に基づきアラビナン分解酵素の構造と機能の相関、特に遷移状態について理解を深めており、酵素学および構造生物学の研究に大きく貢献している。したがって、本学位論文審査委員会は、当該論文が博士(理学)の学位を授与するに相当すると結論した。