

称号及び氏名 博士（農学）山口亜佐子

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 31 日

論文名 「*Bacillus* 属細菌に由来する耐熱性エンドアラビナーゼの
構造機能解析」

論文審査委員 主査 教授 西村 勁一郎

副査 教授 北村 進一

副査 教授 新田 康則

副査 助教授 多田 俊治

論文要旨

第一章 諸論

農業廃棄物などに含まれるセルロース、ペクチンおよびヘミセルロースといったバイオマス資源の有効利用は 21 世紀の重要な課題である。アラビノースは、その重合体であるアラビナンとしてヘミセルロース中に大量に含まれている。アラビナンは、アラビノースが α -1,5 結合した直鎖状構造を骨格とし、部分的に α -1,2 または α -1,3 結合したアラビノース側鎖を持つ。骨格部分を加水分解する α -1,5-アラビナーゼ (ABN) と側鎖を切断する α -L-アラビノフラノシダーゼ (ABF) との協奏的な作用により、アラビノースやアラビノオリゴ糖が生成する。

アラビノースはショ糖と同程度の甘さを示すが、腸内でスクラーゼの作用を阻害しショ糖の消化・吸収を抑制することから、糖尿病の予防や肥満防止に有用な機能性糖質として期待されている。バイオマス資源からのアラビノースの生産には、複雑な精製工程が不要で、特定の糖を選択的に順次分離することができ、環境にも優しいという点で酵素を用いる方法が注目されている。特に

この工程においても雑菌の増殖を抑制することのできる、高温で利用が可能な耐熱性酵素の開発が望まれている。近年、高温性細菌 *Bacillus thermodenitrificans* TS-3 から耐熱性エンドアラビナーゼ (ABN-TS) が単離された。これは至適温度である 70°C での失活半減期は約 11 時間であり、熱安定性がかなり高い酵素である。

本研究では、まだ立体構造についての報告のないエンド型 ABN の構造機能相関および耐熱性機構の解明を目指して、ABN-TS の X 線結晶構造解析を行った。また耐熱性をもたらすための構造的要因を明らかにするために変異体の作製を行い、構造耐熱性相関についても考察した。

第二章 耐熱性エンドアラビナーゼ (ABN-TS) の結晶化と回折 X 線測定

ABN-TS の X 線結晶構造解析のためにその大量発現と結晶化を行った。ABN-TS の大量発現には枯草菌 MI112 株を用いた。酵素は常法に従って精製し、SDS-PAGE により純度を確認した。結晶化条件の検索および最適化を行ったところ、沈殿剤として 1M クエン酸ナトリウム (pH 6.0) を用いた系において、20°C で約 4 週間後に板状の結晶を再現性良く得ることができた。また低温条件下で良質な回折 X 線データを得るために、結晶の抗凍結剤使用条件下での測定についての検討を行い、沈殿剤溶液に 28% のショ糖を含む系を最適条件として見出した。本結晶の回折 X 線測定は、大型放射光施設 Spring-8 において、液体窒素温度条件下 (100K) で行った。その結果、この結晶は斜方晶系に属し、空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a=40.3$ 、 $b=77.8$ 、 $c=89.7\text{\AA}$ であった。また収集したデータは、分解能 = 1.9 \AA 、完全性 = 99.2%、 $R_{\text{merge}}=8.6\%$ 、 $I/\sigma(I)=10.5$ と極めて良好なものであった。

第三章 耐熱エンドアラビナーゼ (ABN-TS) の立体構造解析

本結晶構造の位相は、既に報告されている中温性細菌 *Cellvibrio japonicus* 由来の、主としてエキソ型活性を示す ABN (Arb43A) の構造をモデルとして分子置換法により決定した。その後、構造の構築と精密化を繰り返して行い、本酵素の立体構造を明らかにした (R -factor=18.3%、 R -free-factor=22.5%)。

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、5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。構造全体としては、プロペラ軸を中心とした円筒形の形状をしており、その上下に存在する2つの面の一方には、基質結合部位と考えられる特徴的なクレフト構造が存在していた。

既報の Arb43A も 5 片の羽根からなる β -プロペラ構造を持っており、本酵素の全体構造はそれに極めて良く類似していた。しかし、両酵素のクレフト構造には大きな相違点があった。すなわち、エンド型およびエキソ型の両活性を持つ Arb43A は、クレフトの一端が 13 個のアミノ酸残基から構成される大きなループ構造をもって閉じていたのに対し、典型的なエンド型酵素である ABN-TS には同じ位置にそのようなループはなく、クレフトの両端が完全に開いたオープン構造をもっていた。このようなオープン構造は他のエンド型糖質分解酵素に共通していて、アラビナンのどの部位ともランダムに結合しやすく、エンド型活性に有利な構造であると考えられた。

β -プロペラ構造は多くのタンパク質に見出されている。その多くが、C末端側の最後に羽根にN末端の β -ストランドが加わるという特徴をもつ。このような両末端の相互作用により β -プロペラ構造が閉環され、この構造の安定化に寄与していると考えられている。ABN-TS にはそのような特徴は見出されなかったが、極めて興味深い2つの特徴のあることがわかった。その一つは、N末端の Phe7 から Gly21 部分がN末端側の1番目の羽根とC末端側の5番目の

羽根の間に割り込み、両方の羽根のアミノ酸残基と水素結合や疎水性相互作用を形成していることである。すなわちN末端が両方の羽根を結びつける接着剤のような役割を演じており、それにより閉環されていた。もう一つは、N末端に近い Phe4 がプロペラの中央に位置して2番目の羽根の主鎖と水素結合を、3番目の羽根の Phe152 とスタッキング相互作用を形成していることである。これらの相互作用により、 β -プロペラ構造の少なくとも2片の羽根が結びつけられていた。これら2種類の相互作用様式が、ABN-TSの β -プロペラ構造の安定化に寄与しており、その結果として耐熱性が向上したものと考えた。

第四章 ABN-TSのN末端欠損変異体の作成と熱安定性

前章の解析結果から、ABN-TSのN末端のアミノ酸残基が本酵素の熱安定性に重要な役割を演じていると推定した。このことを確認するために本酵素のN末端の Val12 から Trp17 までの16残基を削除した変異体を作製し、熱安定性などの酵素特性を明らかにすることにした。変異体の作製は、相当する遺伝子を挿入したプラスミドを作製し、塩基配列を確認した後に大腸菌 JM109 株に発現させることによって行った。変異体酵素は常法に従って精製し、SDS-PAGEにより分子量は約33kDaであることを確認した。

得られた変異体酵素について、安定性に及ぼす温度の影響について検討した。その結果、変異体は野生型酵素と同じく至適温度は70°Cであったが、70°Cで4時間加温した場合には野生型では80%以上の残存活性があったのに対して、変異体では60°Cにおいて4時間の加温でもわずか35%の残存活性しか示さないなど、熱安定性の明らかな低下が見られた。このような結果から、ABN-TSのN末端領域が熱安定性に重要な役割を果たしていると結論した。

一方、変異体は熱安定性が低下したにもかかわらず、その至適温度は野生型酵素とほぼ同じであった。このことは変異体の熱安定性が基質存在下では上昇

したことを示唆している。基質が酵素のクレフトに結合することによって、5片全ての羽根が基質と相互作用して環状構造を安定化したものと考えられる。そこで、酵素活性を測定した時と同一濃度の基質存在下での野生型酵素、および変異体の熱安定性を測定した。その結果、この条件では変異体の熱安定性が顕著に向上することが判明した。

これらのことから、本酵素の環状構造を安定化することが、 β -プロペラ構造の熱安定性の向上に最も有効な方法であると結論した。

第五章 総括

本研究では、ABN-TS の立体構造を X線結晶構造解析により明らかにした。さらに構造の安定性に関わる分子内や基質との相互作用等について詳しく検討し、特に熱安定性に関わると推定される構造的特徴について考察した。また、ABN-TS の N末端欠損変異体を作製し、N末端領域が熱安定性に重要な働きをもつことを確認した。これらの知見に基づいて、変異体の構造解析や安定性をより一層高めた変異体の分子設計を行うことが可能となった。そのような研究により ABN-TSの耐熱性機構を解明でき、アラビノースの効率的な生産に向けた開発が進むものと考えられる。

審査結果の要旨

農業廃棄物などに含まれるセルロース、ペクチンおよびヘミセルロースなどのバイオマス資源の有効利用は 21 世紀の重要な課題である。ヘミセルロース中に大量に含まれるアラビノースの重合体であるアラビナンは、 α -1,5-アラビナーゼ (ABN) によって分解される。アラビノースは糖尿病の予防や肥満防止に有用な機能性糖質として期待されている。バイオマスからのアラビノースの生産には、複雑な精製工程が不要で特定の糖を選択的に順次分離することがで

き、また環境にも優しいという利点を持つ酵素を用いる方法が注目されている。特にこの工程においても雑菌の増殖を抑制することのできる、高温での利用が可能な耐熱性酵素の開発が望まれている。近年、高温性細菌 *Bacillus thermodenitrificans* TS-3 から耐熱性エンドアラビナーゼ (ABN-TS) が単離された。これは至適温度である 70°C での失活半減期は約 11 時間であり、熱安定性がかなり高い酵素である。

本論文では、まだ立体構造についての報告のないエンド型 ABN の構造機能相関および耐熱性機構の解明を目指し、ABN-TS の立体構造を X 線結晶構造解析により決定した。また耐熱性をもたらすための構造的要因を明らかにするために変異体の作製を行い、構造耐熱性相関についても考察した。

第一章ではバイオマス利用の問題点や酵素法による生産の利点について述べた。また、タンパク質の基本的な立体構造の特徴についても述べた。これらのことを背景として、耐熱性酵素の構造機能相関や耐熱性機構を解明する意義について言及した。

第二章では ABN-TS の X 線結晶構造解析のためにその大量発現と結晶化を行った。酵素の大量発現は枯草菌 MI112 株を用いて行い、培養上清から ABN-TS を精製してその結晶化に成功した。また低温条件下で良質な回折 X 線データを得るために、結晶の抗凍結剤使用条件下での測定についての条件検索を行い、最良の条件下での回折 X 線測定を行った。その結果、良質な回折 X 線データを収集できた。

第三章では、ABN-TS の立体構造を解析し、構造化学的特徴について考察した。位相は分子置換法により決定した。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、5 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判明した。既報の中温性細菌 *Cellvibrio japonicus* 由来の、エンド型とエキソ型の両方の活性を示す ABN (Arb43A) の構造と比較した結

果、両酵素のクレフト構造に大きな相違点があった。また、本酵素ではN末端とプロペラの羽根との相互作用によって、1番目の羽根とC末端側の5番目の羽根、2番目と3番目の羽根が相互作用するという構造的な特徴があった。このような相互作用が、ABN-TSの β -プロペラ構造の安定化に寄与しており、その結果として耐熱性が向上したものと考えた。

第四章では、ABN-TSのN末端16残基を欠損させた変異体を作製し、熱安定性などの酵素特性を明らかにした。野生型酵素と変異体の耐熱性を比較することにより、変異体における明らかな耐熱性の低下を見いだした。このような結果から、ABN-TSのN末端領域が、熱安定性に重要な役割を果たしていると結論した。また、酵素活性を測定した時と同一濃度の基質存在下での、野生型および変異体酵素の熱安定性を測定し、その結果、この条件では変異体の熱安定性が顕著に向上することを認めた、これらのことから、本酵素の環状構造を安定化することが、 β -プロペラ構造の熱安定性の向上に最も有効な方法であると結論した。

第五章では、本研究で得られた知見を集約するとともに、変異体の構造解析や安定性を更に高めた変異体の分子設計を行うことの重要性について述べた。

本論文では、ABN-TSの立体構造をX線結晶構造解析により明らかにした。その結果に基づいて本酵素の安定性に関わる分子内相互作用等について詳しく検討し、特に熱安定性に関わっていると推定される構造的特徴について考察した。また、本酵素のN末端欠損変異体を作製し、N末端領域が熱安定性に重要な働きをもつことを明らかにした。本研究の成果は、これまで不明であったABN類の耐熱性機構解明へ向かう重要な知見であり、アラビノースの効率的な工業的生産に向けた貢献は大きい。本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。