HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	糖質加水分解酵素ファミリー97が示す多様な基質認識機構［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	菊池, 麻子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14376号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81375
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kikuchi_Asako_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（農学）　　氏　名　菊池　麻子

審査担当者　主　査　教　授　木村　淳夫
副　査　教　授　森　春英
副　査　講　師　奥山　正幸

学 位 論 文 題 名

糖質加水分解酵素ファミリー97 が示す多様な基質認識機構

本論文は，和文 200 頁，図 68，表 25，6 章からなり，参考論文 1 編が添えられている．

糖質加水分解酵素の触媒機構は，反応の前後で基質と生成物のアノマー型が反転する反転型機構と保持される保持型機構の 2 種に大別される．また，糖質加水分解酵素はアミノ酸配列の類似性をもとに糖質加水分解酵素ファミリー（GH）に分類される．一般に，同一 GH に属す酵素の触媒機構は一致するが，GH97 は反転型と保持型の酵素が共存する希有な現象を呈する．本グループは，さらに 5 つのサブファミリー（SF と略）A–E に分類される．SF-A には反転型 α-glucoside hydrolase が，SF-B には保持型 α-galactosidase が，SF-C には保持型 β-L-arabinopyranosidase/α-galactosidase が含まれる．既知の SF 酵素が異なる基質特異性を示すことから，GH97 酵素は触媒機構のみならず基質認識も多様と推察できる．本研究では，腸内細菌が有する GH97 酵素のうち，機能未解明な 6 酵素について触媒作用および立体構造を SF ごとに解析・比較し，タンパク質構造から反応機構を理解することを目的とした．

（1）SF-A に属す 2 酵素（A1ase と A2ase）

A1ase および A2ase は α-glucoside 基質に最も高く作用したことから，両酵素を α-glucoside hydrolase と決定した．さらに k_{cat}/K_m を求め基質特異性を定量的に評価した．A1ase は α-1,3 グルコシド結合に高い特異性を示した．A2ase は α-1,6 グルコシド結合を好むが，広い特異性が認められた．X 線結晶構造解析により A1ase および A2ase の立体構造を決定した．両酵素の基本構造は他の GH97 酵素と類似した．A1ase の α-1,3 グルコシド結合特異性は，触媒部位を形成する長鎖 β→α loop および N ドメインループの変異と欠落によると推測された．A2ase の特徴的な特異性は，サブサイト+1 および N ドメインループに存在するアミノ酸残基の相違や一部欠損が関与すると考えられた．

（2）SF-B に属す 2 酵素（B1ase と B2ase）

高い α-galactoside 結合への特異性から，B1ase と B2ase を α-galactosidase と推定した．しかし，両酵素の天然基質 melibiose と raffinose に対する作用は低いことが判明した．本性質を両者の X 線結晶構造解析の結果から調べると，サブサイト+2 を形成する構造に起因することが判明した．一方，B1ase に α-1,6-galactosyl 転移作用を見出した．糖転移反応には受容体基質を必要とするが，本酵素のサブサイト+1 を構成する N ドメインループがオープン型となり，当該基質を許容しやすくなったと想定された．

（3）SF-C に属す酵素（C1ase）

既知の SF-C 酵素は β-L-arabinopyranosidase/α-galactosidase である．一方, C1ase は β-L-arabinopyranosidase 活性が低く，α-galactosidase と決定した．この低活性を解析するため C1ase の立体構造を解明し，β-L-arabinopyranoside 構造を認識できるアミノ酸の置換酵素を作製した．既知酵素の構造情報を参考に C1ase のサブサイト−1 において α-galactose 残基の 6 位水酸基と相互作用できるアミノ酸（Tyr と Ala）を選び，一重変異体や二重変異体を作出した．構築した置換体は β-L-arabinopyranosidase および α-galactosidase の両活性を低下させた．従って Tyr と Ala 残基の機能は，加水分解の遷移状態安定化と示唆された．また，SF-C に β-L-arabinopyranosidase 活性に高低がある酵素の存在を認めた．

（4）SF-E に属す酵素（E1ase）

SF-E に分類されるタンパク質群は，他の SF とは異なる触媒残基の保存性を示す．SF-E の触媒機構と基質特異性の究明を目的とし，E1ase の構造決定を行った．得られた酵素結晶の X 線立体構造解析から，E1ase の酸性アミノ酸のカルボキシ基が GH97 反転型酵素の一般塩基触媒と空間的に一致する位置に存在した．これより，E1ase は当該残基を塩基触媒とする反転型反応を触媒する可能性が示唆された．

以上のように本研究は，構造生物学的およびタンパク質工学的な手法を用いて GH97 の SF に分類される多様な新奇酵素の立体構造および機能を詳細に解析した．その結果，同一 SF に属していても異なる機能を示す酵素の存在を明らかにし，その相違を与える責任因子の解明に成功した．これらの成果は，糖質加水分解酵素においてユニークな反応機構や基質認識を示す GH97 の分子機作やその分子進化に関し学術的に重要な基礎的知見を提供した．

よって，審査員一同は，菊池麻子が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた．