



Title	植物由来GH1 β -グルコシダーゼ類の基質特異性の分子基盤 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	堀越, 秀
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14820号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85528
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Horikoshi_Shu_review.pdf, 審査の要旨



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 堀越 秀

審査担当者	主査	教授	森	春英
	副査	教授	松浦	英幸
	副査	准教授	佐分利	亘
	副査	講師	奥山	正幸

学位論文題名

植物由来 GH1 β -グルコシダーゼ類の基質特異性の分子基盤

本論文は和文 169 頁，5 章からなり，図 38，表 21 を含む．参考論文 1 編が付されている．

天然にはオリゴ糖や配糖体などの多様な β -グルコシドが存在する． β -グルコシダーゼは，これらの β -グルコシド結合を加水分解して β -D-グルコースを生成する酵素である．多様な β -グルコシドのうち特定のものに作用する基質特異性を通して，様々な生物学的プロセスに関わるとされる． β -グルコシダーゼが属する主要な酵素群が GH1 である．植物には GH1 β -グルコシダーゼアイソザイムが多く，シロイヌナズナには 48，イネには 38 の推定遺伝子がある．GH1 β -グルコシダーゼは主要な酵素であるにもかかわらず，この多重性により機能の解明が十分には進められていない．本論文は，酵素科学的アプローチによって，いくつかの植物 GH1 酵素の基質特異性を明らかにし，また基質特異性発現の分子機構を基質と酵素タンパク質の結合様式に基づき論じたものである．基質特異性として， β -グルコシドのアグリコン部分の特異性に加え，グリコン側の特異性にも注目し，組換え酵素の精密な機能解析を基本に，立体構造の決定，結合予測モデル，多数の変異酵素の作成，基質合成等により研究が行われた．内容は，以下の 3 点に要約できる．

1. アグリコン特異性を決定する分子機構

シロイヌナズナ由来 GH1 酵素 AtBGlu42 は，逆遺伝学的解析により，スコポリン（スコポレチンの β -グルコシド配糖体）からスコポレチンを生成して鉄吸収や根圏菌叢改善を誘起する鍵酵素とされていた．本研究では，この AtBGlu42 のスコポリン加水分解活性を組換え酵素を用いて初めて確認した．また，この他，4-メチルウンベリフェリル β -グルコシド等の配糖体，オリゴ糖のラミナリ 2 糖，セロ 3 糖への高い特異性も速度論に基づき明らかにした．X 線結晶構造解析による立体構造の決定，スコポリンとの結合予測，ならびに既知のセロオリゴ糖複合体構造との比較に基づき，配糖体やオリゴ糖の特異性に関わる構造を提唱した．特に，セロ 3 糖特異性については，Arg 残基の立体障害により 4 糖の結合が阻害されるためと予測し，変異酵素を用いてこれを証明した．すなわち該当 Arg の変異により，セロ 3 糖特異性から 4 糖または

5 糖特異性への変化を示した。さらに、該当 Arg を一次構造上に保存するがセロオリゴ糖の鎖長特異性が異なる既知酵素との構造比較に基づき、当該残基を含むサブドメインの配置のずれを主因とすることを周辺構造との相互作用の違いも含めて指摘している。

2. グリコン特異性 (β -D-グルコシドと β -D-マンノシド) を決定する分子機構

GH1 酵素群には、 β -グルコシダーゼだけではなく、 β -D-マンノシダーゼや β -D-フコシダーゼなど、 β -グルコシド以外に作用する酵素も含まれる。つまり基質特異性の多様性はグリコン部分にも見られる。しかし、グリコン結合部位 (サブサイト-1) を形成する残基は高度に保存されており、グリコン特異性を決定する酵素構造は不明であった。本論文では、サブサイト-1 形成残基のわずかな配置の違いに注目し、この違いの原因となる残基を推定し、変異酵素を用いてこれを証明した。すなわち、シロイヌナズナ由来 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 とイネ由来 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 の両組換え酵素を用いて、サブサイト-1 形成残基に隣接するいわゆるセカンドシェル の 4 残基が、グリコン結合残基 His と求核触媒残基 Glu の配置にわずかな違いを与えると推定し、両酵素間で該当残基の相互変換を行った。これにより、 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 変異酵素は、 β -マンノシド特異性を失い β -グルコシド特異性に変換されたことを、基質 4-ニトロフェニル β -グルコシドおよび β -マンノシドに対する k_{cat}/K_m に基づき明示している。 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 変異酵素では、両基質の k_{cat}/K_m は逆転には至らなかったが、 β -グルコシダーゼの顕著な低下 (k_{cat}/K_m の親酵素比 13%までの低下) と β -マンノシダーゼの増加 (5 倍) を示した。

3. グリコン特異性 (β -D-グルコシドと β -D-フコシド) を決定する分子機構

基質のグリコン特異性の 2 点目である。イネ GH1 酵素 TAGG1 と TAGG2 は、基質を 4-ニトロフェニル配糖体とすると、それぞれ β -グルコシドと同 β -D-フコシドに良く作用するが、両酵素の配列同一性は高く、特にサブサイト-1 形成残基はセカンドシェルも含めて一致する。このことから、アグリコン結合様式がグリコン特異性に影響を与えると仮説をたて、これを証明したものである。基質をメチル配糖体とすると、両酵素ともフコシドよりもグルコシドに高い作用を示した。また、酵素の推定アグリコン結合部位近傍に両酵素間で異なる 8 残基を見出し、これらの変換により TAGG1 が、4-ニトロフェニル β -D-フコシドの k_{cat}/K_m の 4.2 倍増となるなど、TAGG2 型の特異性を示すようになった。これにより、グリコン特異性がアグリコンの結合様式に依存して変化するという新しい分子機構モデルを提唱している。

以上のように本論文は、多様な GH1 酵素群の β -グルコシダーゼ類の基質特異性の分子機構についてアグリコン部分のみならずグリコン部分についても理解を大きく進めるものである。多様な GH1 酵素の機能推定にもつながる研究として評価できる。

よって、審査員一同は、堀越秀が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。