



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Function and structure of β 1-3-glucan-degrading enzymes from the pink snow mold fungus, <i>Microdochium nivale</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	太田, 智也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15765号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92637
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	OTA_Tomoya_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 太田 智也

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

学位論文題名

Function and structure of β 1-3-glucan-degrading enzymes from the pink snow mold fungus, *Microdochium nivale*

(紅色雪腐病菌 *Microdochium nivale* 由来 β 1-3-グルカン分解酵素の機能と構造に関する研究)

本論文は英文 135 頁, 図 32, 表 8, 5 章からなり, 参考論文 3 編が付されている。

β 1-3 グルカンは植物, 糸状菌などに広く存在し, 構造にも多様性がある。免疫賦活作用, 抗腫瘍活性などの機能性を有すものも知られている。糸状菌では炭素源の獲得, 自身の細胞壁制御等において β 1-3 グルカン分解酵素が用いられる。紅色雪腐病菌 *Microdochium nivale* はコムギはじめイネ科作物に感染する植物病原性糸状菌であるが, 本菌が生産する糖質加水分解酵素に関する知見は乏しい。本研究は, *M. nivale* の培養上清中に 2 種の β -グルカン分解酵素—糖質加水分解酵素群 GH55 のエンド β -1,3-グルカナーゼおよび GH3 β -グルコシダーゼ—を見出し, これらについて組換え酵素を用いて解析を行ったものである。GH55 酵素では, 基質グルカン鎖に対しエンド様式で作用（内部結合に作用）するが, ランダムな作用ではなく基質グルカン鎖の特定箇所を切断することを酵素の寄与構造と合わせて初めて明らかにした。GH3 β -グルコシダーゼでは, 基質特異性等の解析に加え, 本酵素に特徴的に見出された基質阻害および各種単糖による阻害や活性化の現象を総合的に解釈する反応機構を, 速度論的解析結果に基づき提唱した。あわせて有機化学合成により, β 1-3/1-6 結合を任意の位置に有するグルカン主鎖を合成するための手法の開発も行われている。

1) *M. nivale* 由来 GH55 エンド β -1,3-グルカナーゼの機能と構造に関する研究

GH55 酵素群は主にエキソおよびエンド β -1,3-グルカナーゼからなり, 専ら前者の機能構造解析が進められてきた。*M. nivale* 由来の GH55 酵素は, β 1-3 結合のラミナリオリゴ糖にはエキソ様式で作用する一方, 良く作用する多糖基質ラミナリン（ラミナリオリゴ糖が β 1-6 結合で連結した直鎖の主鎖と, β 1-6 結合による分岐側鎖からなる）にはエンド様式で作用すること, 更にラミナリン分解の NMR 分析により, ラミナリン主鎖中のラミナリオリゴ糖部分の非還元末端 β 1-3 結合を特異的に切断することを明らかにした。酵素タンパク質の結晶構造解析により, このラミ

ナリン切断に関わるタンパク質構造が確認された。すなわち、本エンド型酵素は、既存のエキシ型酵素と同様に非還元末端に β 1-6 側鎖を有するラミナリオリゴ糖の結合構造を持つが、クレフト構造が更に延長しており、これが切断箇所の非還元末端側のラミナリン主鎖の結合部位であると予測した。さらにこのクレフト延長に寄与するタンパク質フォールド上の構造を提示し、当該ループ長に基づきエキソ様式・エンド様式を推定できる可能性を示した。

2) *M. nivale* 由来 GH3 β -グルコシダーゼの酵素機能に関する研究

β -グルコシダーゼは基質非還元末端の β -グルコシド結合を加水分解する酵素である。*M. nivale* 由来酵素は GH3 β -グルコシダーゼであり、*Aspergillus aculeatus* 由来酵素 AaBGL1 と高い配列同一性を示した。AaBGL1 と同様に、 β 1-3 グルコシドはじめ多様なオリゴ糖に作用する一方、AaBGL1 とは異なり、合成基質の加水分解では基質阻害、ならびにグルコースによる顕著な競争的阻害が認められた。他の単糖存在下では、単糖の種類に応じて、基質阻害の緩和および加水分解速度の増減が認められた。いずれでも転移反応は見られなかった。以上についての速度論的解析により、第一基質の切断により生じたグルコシル酵素中間体に対し、水分子と第二基質、更に単糖も競合して結合する反応モデルを提唱した。すなわち単糖添加により基質阻害を回避でき、更に単糖種によっては水分子との反応性が高い単糖結合複合体となる。 β -グルコシダーゼの高活性化の基盤となる研究成果である。

3) β 1-3/1-6 結合を任意の位置に有するグルカン鎖の有機化学的合成法の開発

従来より各種オリゴ糖の化学合成は行われてきたが、本研究ではラミナリン主鎖のような β 1-3, 1-6 結合からなる直鎖オリゴ糖の合理的合成方法を開発した。すなわち β 1-3 結合および β 1-6 結合の生成に適した単糖誘導体ユニットを合成し、これらを順次縮合させて非還元末端側に伸長させる反応系を開発した。本法を用いて β 1-3, 1-6 結合を含む 4 糖 $\text{Glc}\beta$ 1-6 $\text{Glc}\beta$ 1-3 $\text{Glc}\beta$ 1-3 Glc の誘導体の化学合成が行われた。

以上、本研究は β 1-3 グルカン分解酵素 2 種の機能構造解析とオリゴ糖の化学合成を行ったものである。GH55 酵素の新たな分子機構、GH3 酵素の単糖複合体の機能性の提唱など、多様な β 1-3 グルカンの分解や有効利用、ならびに機能性解析に資する基盤的研究として評価できる。

よって審査員一同は、OTA Tomoya 氏が博士（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。