HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Structural and functional studies of novel α-L-glucosidase from Cecembia lonarensis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	KANG, Hye-jin
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16095号
Issue Date	2024-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93473
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KANG_Hye-jin_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　KANG Hye-Jin

審査担当者　主査　教授　奥山　正幸
副査　教授　森　春英
副査　教授　尾之内　均
副査　准教授　田上　貴祥

学位論文題名

Structural and functional studies of novel α-L-glucosidase from *Cecembia lonarensis*

（*Cecembia lonarensis* 由来新規 α-L-グルコシダーゼの構造と機能に関する研究）

本論文は英文 140 頁，図 61，表 21，6 章からなり，参考論文 2 編が付されている。

天然に L-グルコースや α-L-グルコシルの存在は知られていないが，*p*-ニトロフェニル（pNP）α-L-グルコシドを加水分解する α-L-グルコシダーゼ，ClAgl29A と ClAgl29B が，細菌 *Cecembia lonarensis* に見出されている。ClAgl29A と ClAgl29B は，α-L-フコシダーゼの相同タンパク質であるが，α-L-フコシドよりも α-L-グルコシドに高い基質特異性を示すことがわかっている。一方でこの基質特異性を発揮する構造的な要因，また α-L-グルコシド以外への基質特異性は明らかとされていなかった。本研究は，ClAgl29A と ClAgl29B の基質特異性の詳細を解明することを目的に行われ，X 線結晶構造解析より α-L-グルコシル認識に関する構造因子を特定した。また α-L-グルコシドと構造が類似する α-L-ラムノシドや α-L-キノボシド（6-デオキシ-α-L-グルコシド），α-L-キシロシドに対する基質特異性を評価することで，α-L-グルコシダーゼとして見出された ClAgl29A と ClAgl29B が α-L-キノボシダーゼである可能性を示している。さらに ClAgl29A と ClAgl29B が触媒する糖転移反応を α-L-グルコシルオリゴ糖合成に応用利用するための基盤的研究として，変異型 α-L-グルコシダーゼの解析と α-L-グルコシルオリゴ糖合成を行っている。

1)　X 線結晶構造解析

ClAgl29A と ClAgl29B の X 線結晶構造解析を行った。これら酵素の三次元構造は，α-L-フコシダーゼの三次元構造と類似していた。α-L-グルコシル基と α-L-フコシル基には，4 位水酸基の立体配置と 6 位水酸基の有無に相違がある。ClAgl29B の β-L-グルコースとの複合体構造解析により，ClAgl29B は α-L-フコシル基の 4 位水酸基立体配置よりも α-L-グルコシル基の 4 位水酸基立体配置の認識に適した基質結合部位構造をもつことが示された。一方で 6 位水酸基を認識するための特別な構造を有していなかった。ClAgl29A も ClAgl29B と同様の基質結合部位を有していた。以上から，α-L-グルコシダーゼの基質特異性は 4 位水酸基の立体配置の選択性に起

因することが示された。ClAgl29B 求核触媒残基変異酵素（D327S）と α-L-Glc-(1→3)-α-L-Glc-*O*-pNP の複合体結晶構造解析では，活性部位とは別の糖結合サイトの存在を示唆する結果が得られた。

2)　α-L-グリコシドに対する基質特異性

4 位水酸基の立体配置が α-L-グルコシドと同じである α-L-ラムノシド，α-L-キシロシド，および α-L-キノボシドの pNP 誘導体を有機化学的に合成し，これらに対する ClAgl29A と ClAgl29B の基質特異性を調べた。pNP α-L-ラムノシド分解速度は，いずれの酵素でもほかの基質に対するものよりも顕著に小さかった。両酵素の pNP α-L-キシロシドおよび pNP α-L-キノボシド，ならびにすでに報告のある pNP α-L-グルコシドに対する k_{cat}/K_m 値は，pNP α-L-キノボシドで最も大きく，ついで pNP α-L-グルコシド，pNP α-L-キシロシドの順に大きかった。以上により，ClAgl29A と ClAgl29B の天然基質は α-L-グルコシドよりもむしろ α-L-キノボシドであり，これら酵素が特定の細菌のリポ多糖中に見出される α-L-キノボシルの分解に関与している可能性が示唆された。

3)　変異型 α-L-グルコシダーゼの糖転移反応

変異酵素 ClAgl29B S132D，Q275L，S132D/Q275L では，pNP α-L-グルコシドが高濃度のときの糖転移率が野生型 ClAgl29B よりも高く，Ser132 と Gln275 の糖転移反応への寄与が示された。常法により，求核触媒変異酵素（ClAgl29A D315S もしくは ClAgl29B D327S）と β-L-グルコシルフルオリドを用いて，各種 D-グリコシドの α-L-グルコシル化を試みた。ClAgl29A D315S の反応では pNP α-D-キシロシドと pNP β-D-キシロシドをそれぞれ収率 87%と 68%で, ClAgl29B D327S の反応では pNP β-D-セロビオシドを収率 67%で α-L-グルコシル化できた。ClAgl29A と ClAgl29B の求核触媒変異酵素が α-L-グルコシルオリゴ糖合成に応用利用可能なことが示された。

以上，本研究は，α-L-グルコシダーゼの基質認識にかかわる構造的特徴と新規基質特異性を明らかにし，α-L-グルコシダーゼ改変酵素を用いて α-L-グルコシルオリゴ糖合成を行ったものである。これらの研究成果は，未知 α-L-グリコシドの代謝経路の解明や α-L-グリコシルオリゴ糖の機能解明に資する基盤的な研究として評価できる。

よって審査員一同は、Kang Hye-Jin 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。