

論文題目 エキソ型ガラクトサン分解酵素の基質認識機構

第一章 序論

植物細胞壁は天然に最も豊富にみられる有機化合物であり、細胞の力学的強度を担保するだけでなく、細胞分裂や細胞接着、細胞分化・増殖の制御、シグナル伝達、生体防御、水理機能などの非常に重要な役割を担う構造体である。植物細胞壁のうち主に成長中の細胞にみられる一次細胞壁はセルロースやヘミセルロース、ペクチンとよばれる多糖類が複雑に絡まりあった構造をとり、様々な酵素の作用により成長の過程でその構造は変化する。また、バイオマスの大半は植物細胞壁であるため、細胞壁多糖類に作用する酵素の機能を詳細に明らかにすることは植物の成長メカニズムの解明やバイオマスの有効活用につながると期待される。ガラクトサンはペクチンの側鎖やプロテオグリカンの1つのアラビノガラクトサンタンパク質 (AGP) の糖鎖領域にみられ、細胞壁強度の維持やシグナル伝達などの多くの生理学的な機能に関与する。しかしながらその糖鎖構造や分解酵素に関する研究は多くなく、いまだ不明な点が多い。そこで本研究ではガラクトサンを非還元末端から分解するエキソ型ガラクトサン分解酵素に着目し、植物と担子菌が産生する酵素の酵素基質複合体の立体構造解析を行い、各酵素の機能と構造の相関や生物種によるガラクトサン分解機構の差異を明らかにすることを目的とした。

第二章 トマト果実由来 GH35 β -ガラクトシダーゼの酵素基質複合体の構造解析

果実の“硬さ”は野菜や果物の商品価値を決めるだけでなく、それらの収穫方法や運搬方法などの様々な場面に影響を与えるため、収穫後の果実の軟化を制御することは非常に重要である。多くの果実において硬度が急激に低下する際に β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23) が関与して細胞壁中のガラクトシル含量が著しく低下することが報告されている。植物の β -ガラクトシダーゼはすべて糖質関連酵素 (CAZy) データベースの糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー35 に分類される。トマト (*Solanum lycopersicum*) 果実に発現する17のGH35 β -ガラクトシダーゼのうちTBG4は、 β -1,3、 β -1,4、 β -1,6-ガラクトシル結合に対して加水分解活性を示すという特性があり、これは酵素活性が報告されている他の生物由来の酵素と比べ基質特異性が低く、ブロードである。したがって、TBG4は他の酵素とは異なるメカニズムで基質を認識すると考えられる。そこで本章では、酵母で異宿主発現した組換え酵素を用いて酵素基質複合体のX線結晶構造解析、アンサンブルリファインメント、ドッキングシミュレーションを行うことによりTBG4の基質認識機構の解明を試みた。X線結晶構造解析ではTBG4野生型(WT)とガラクトースの複合体、酸/塩基触媒残基Glu181の変異体(E181A)と β -1,3-ガラクトビオース、 β -1,4-ガラクトビオース、 β -1,6-ガラクトビオースとの各複合体の合計4つの立体構造を決定した。触媒部位に着目すると、サブサイト-1位ではガラクトビオースと酵素との相互作用が保存されていた。一方、サブサイ

ト+1位は触媒ポケット入口の大きく開いた部分に位置しており、基質の種類により酵素との相互作用様式に差異がみられた。アンサンブルリファインメントでは、反応性の高い基質が結合している時ほど触媒部位のゆらぎが小さく、反応性が低い基質が結合している時ほど触媒部位のゆらぎが大きいことが示された。さらに、ドッキングシミュレーションの結果から反応性の高い基質ほど触媒部位に生産的に結合しやすく、反応性の低い基質は非生産的に結合しやすいことが示された。また、TBG4はより多くの正のサブサイトを持ち、長いガラクトタンを認識して加水分解反応を示す可能性が示唆された。以上の結果より、TBG4は触媒ポケット入口が広く開いた構造をとるために様々な結合様式のガラクトオリゴ糖を認識できるが、その反応性の高さは触媒部位への基質の生産的結合のしやすさおよびゆらぎの大きさに関係があると結論づけた。なお、本章において決定した構造は植物のGH35 β -ガラクトシダーゼの酵素基質複合体として最初の構造であった。

第三章 担子菌由来 GH43 エキソ- β -1,3-ガラクタナーゼの酵素基質複合体の構造解析

AGPは植物の成長および発達の過程で生理学的に重要な役割を担うが、その糖鎖構造が非常に複雑であるために、機能と構造の相関はほとんど解明されていない。AGPをはじめとする複雑な構造をもつ糖鎖の構造解析には一般に糖質加水分解酵素が用いられる。担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来エキソ- β -1,3-ガラクタナーゼ (*Pc1,3Gal43A*; EC 3.2.1.145) は主に β -1,6-ガラクトタンから構成される側鎖を迂回しながら β -1,3-ガラクトタン主鎖を特異的に認識し非還元末端から切断する“バイパス活性”を示すため AGP 糖鎖の構造解析に用いる上で非常に有用である。しかし、本酵素の立体構造は明らかになっておらず、側鎖をバイパスするメカニズムは不明であった。そこで本章では、X線結晶構造解析とアンサンブルリファインメントを組み合わせ *Pc1,3Gal43A* のバイパスメカニズムの解明を目指した。構造解析の結果、野生型 (WT) のアポ構造、WT とガラクトースの複合体、一般酸残基の変異体 E208Q および E208A と β -1,3-ガラクトトリオース (E208Q_Gal3、E208A_Gal3) の複合体の4つの立体構造を決定し、*Pc1,3Gal43A* は GH43 サブファミリー24 (GH43_sub24) に典型的にみられる5枚羽根プロペラ構造の触媒ドメインと炭水化物結合モジュールファミリー (CBM) 35 にみられる β -ゼリーロール構造の糖質結合ドメインから構成されているとわかった。GH43_sub24 は、他の GH43 サブファミリーで保存されている触媒塩基の Asp を欠いているが、構造解析および変異体の酵素特性を解析した結果から Gln263 が互変異性化してイミド酸となって触媒塩基として機能すると特定した。また、構造解析の結果から *Pc1,3Gal43A* の触媒ポケットの底部から溶媒に続く -1~+2 の3つのサブサイトを同定し、特にサブサイト-1位に結合するガラクトースの6位メチロール基の隣に空間が存在すると明らかにした。同様の表面構造は他のバイパス可能な酵素にのみみられたことから、この構造的特徴が β -1,6-ガラクトタン側鎖のバイパスを可能にしていると結論づけた。さらにアンサンブルリファインメントの結果から、基質認識に強く関与するアミノ酸残基を特定した。加えて構造解析の結果より、本酵素の CBM は他の多糖類に結合する構造既知の CBM35 とは異なるメカニズムで基質を認識すると明らかにした。なお、本章において決定した構造は真菌由来の GH43_sub24 に属する酵素として、またガラクトタンに結合性を示す CBM35 としてそれぞれ新規の構造であった。

第四章 総括

本研究ではエキソ型ガラクトサン分解酵素の構造と機能の相関や生物種によるガラクトサン分解機構を比較するために TBG4 と *Pc1,3Gal43A* の酵素基質複合体の構造解析を行い、各酵素の酵素特性と立体構造の相関を比較した。その結果、両酵素ともにサブサイト-1 位では複数の水素結合を形成して強く基質を認識していたが、サブサイト+1 位における主な相互作用は TBG4 では疎水性相互作用であり、水素結合はほとんどみられない弱い認識様式であったのに対し、*Pc1,3Gal43A* では疎水性相互作用に加え複数の水素結合により強く基質を認識していた。したがって、ガラクトシダーゼとガラクタナーゼの基質特異性の厳密さの違いはサブサイト+1 位以降の相互作用の強さと相関があると考えられた。また、表面構造を比較すると TBG4 は触媒ポケットの入口が大きく、奥に向かって少しずつ狭くなる漏斗状の構造をとっていたのに対し、*Pc1,3Gal43A* は触媒ポケット入口から底までちょうどガラクトース 1 残基が結合可能な大きさの筒状の構造をとっていた。つまり、TBG4 は触媒ポケット入口が広いために様々な結合様式のガラクトサンを受容可能であり、*Pc1,3Gal43A* は比較的狭いポケット入口とすることで β -1,3-ガラクトサンの認識に特化した構造にしていると推察された。

植物は多数の GH35 β -ガラクトシダーゼを産生し、他のファミリーに分類されるエンド型の酵素は産生しない。植物がエキソ型の酵素を好むのは細胞骨格の維持に関与するガラクトサンを急激に分解してしまうのは植物にとって望ましくないためであり、多数の β -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するのは器官や成長段階に合わせて酵素を使い分けているからであると推察される。一方で真菌は様々なファミリーに属するエンド型、エキソ型のガラクトサン分解酵素を産生するが、これはガラクトサンを分解して栄養源としたい菌にとってはなるべく迅速に糖鎖の重合度を低下し、体内に取り込める大きさにまで分解することが望ましいためであると推測される。また、概して担子菌は子のう菌と比べ有するガラクトサン分解酵素遺伝子が少なく、ペクチン分解に関わる酵素にも同様の傾向がみられたため、各菌が有する酵素の種類や数は生存環境および生存戦略の違いに起因すると考えられた。

以上のように本研究では植物と担子菌のエキソ型ガラクトサン分解酵素の基質認識機構を明らかにし、その相違点を比較した。本研究において得られた知見は各酵素の性質の理解だけでなく有用な酵素の作出につながるため、今後のガラクトサンの構造解析や分解に関する研究の足掛かりになると期待される。