

## 審査の結果の要旨

氏名 阿部 紘一

糖質は非常に多種多様であるが、その分解・代謝には未だに不明な部分が多い。 $\beta$ -1,2-グルカンおよび $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖( $Sop_n$ ,  $n$ は重合度)はグルコースが $\beta$ -1,2-結合で繋がった糖質であるが、自然界での存在が希少であるためにその分解・代謝に関わるタンパク質の研究はあまり進んでいないのが現状である。本論文は $\beta$ -1,2-グルカン/ $Sop_n$ の代謝に関わる2つのタンパク質の構造・機能研究であり、2章から構成される。

第1章では *Chitinophaga pinensis* 由来のエンド- $\beta$ -1,2-グルカナーゼである Cpin\_6279 タンパク質の構造機能解析について述べている。X線結晶構造解析により Cpin\_6279 のリガンドフリー状態の構造、および反応生成物である Sop<sub>3</sub>との複合体構造を決定することに成功した。Cpin\_6279の全体構造は ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub>-barrel であり、エンド型酵素でよく見られるクレフト構造をとっている。複合体構造ではクレフトの中心に Sop<sub>3</sub>とグルコースが結合している。これにより、新規ファミリー初の複合体構造が明らかとなり、糖質加水分解酵素ファミリー144が新設された。Cpin\_6279と Sop<sub>5</sub>との複合体構造をドッキング解析により推測したところ、結晶構造中のグルコースは-3サブサイト、Sop<sub>3</sub>は+1から+3サブサイトに結合していることが示唆された。基質結合部位の周辺には保存性の高い6つの酸性残基が存在する。また、Sop<sub>5</sub>の切断されるグリコシド結合の C1 原子に求核攻撃できる位置に水分子が結晶構造中で観察されたが、この水分子は酸性残基ではなく、2つの Tyr 残基と直接あるいは間接的に水素結合している。そこで、これらの残基の変異解析を行ったところ、2つの Tyr 残基に関しては大幅な活性の低下は見られなかったが、6つの酸性残基のうち3つに関しては顕著な活性の低下が見られ、触媒に重要であることが示された。同位体標識と質量分析を行ったところ、Cpin\_6279は Sop<sub>7</sub>を主に-4から+3サブサイトで結合することが示された。また、-2から+5サブサイトでは Sop<sub>7</sub>と結合できないことも示され、-3サブサイトが基質の結合に必須であることが示唆された。

第2章では *Listeria innocua* で発見された $\beta$ -1,2-グルカン利用遺伝子座内の Lin1841の構造と機能について述べている。本章は、 $\beta$ -1,2-グルカン/ $Sop_n$ の取り込みに重要と推測される Lin1841に着目した研究が行われた。等温滴定熱量測定により様々な糖リガンドとの結合を調べたところ、Lin1841は3糖以上の Sop<sub>n</sub>に特異的に結合したことから、Lin1841は Sop<sub>n</sub>-binding

protein (SO-BP) と名付けられた。結合定数 ( $K_a$ ) は  $10^{4-6} \text{ M}^{-1}$  であり、結合過程はエンタルピー駆動型であった。結合の定圧モル熱容量変化 ( $\Delta C_p$ ) を算出したところ、SO-BP の結合において、糖リガンドと芳香族アミノ酸側鎖との間で 2 つから 3 つのスタッキング相互作用が形成されることが推測された。X 線結晶構造解析により、SO-BP のリガンドフリー状態、および Sop<sub>3-5</sub> との複合体構造を決定することに成功した。SO-BP の全体構造は 2 つの球状ドメインとそれを繋ぐヒンジ領域から構成される。SO-BP はリガンドフリー状態では 2 つのドメインが離れた open 構造を取っているのに対し、Sop<sub>3-5</sub> との複合体構造では 2 つのドメインが近接した closed 構造をとっている。リガンドフリー状態の SO-BP が溶液中で他にどのようなコンフォメーションをとるのかを分子動力学 (MD) シミュレーションにより調べたところ、SO-BP は溶液中でより開いた構造をとり得ることが示唆された。結合サイトにおいて、Sop<sub>3-5</sub> は 2 つのドメインに挟まれるかたちで結合し、SO-BP の表面構造と相補的なジグザグな構造をとっている。結合した各オリゴ糖と SO-BP との相互作用を調べたところ、水を介した極性結合が多数形成されており、SO-BP の結合がエンタルピー駆動型であることと対応していた。また、Sop<sub>3-5</sub> は、いずれも 2 つの Trp 残基の側鎖とスタッキング相互作用を形成しており、上記の  $\Delta C_p$  のデータと良い相関を示した。さらに、MD シミュレーションに基づく自由エネルギー計算を行ったところ、Sop<sub>3</sub> の 3 つ目のグルコース残基の相互作用が結合に重要であることが明らかとなった。

以上、本論文は 2 つの 6-1,2-グルカンの代謝に関わる酵素・タンパク質の詳細な機能と構造を解明することに成功したものであり、これらの研究成果は学術上・応用上寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。