

審査の結果の要旨

氏名 南 焜祐

近年、ユニークな基質特異性や反応メカニズムを持つ新規な酵素の発見にともない、新規な糖代謝経路の発見が相次いでいる。本論文は微生物から新たに発見された二種類の菌体内糖代謝経路、すなわち酸化的なセルロース分解経路と、ヒト母乳オリゴ糖およびヒト腸管糖タンパク質の特異的な代謝経路で働く酵素に関する研究であり、2章より構成される。

第1章では *Saccharophagus degradans* 由来のセロビオン酸ホスホリラーゼ (CBAP) である Sde0906 の構造生物学的な研究について述べている。CBAP はこれまで3種類の微生物、アカバネカビ *Neurospora crassa*、カンキツかいよう病菌 *Xanthomonas campestris*、多糖分解性の海洋細菌 *S. degradans* から発見されており、GH94 ファミリーに属している。GH94 に属する酵素の分子系統樹では、CBAP は既知酵素と異なる枝にあり、アミノ酸配列が大きく違っていた。CBAP はセロビオン酸を加リン酸分解してグルコース 1 リン酸とグルコン酸 (グルコース C1 酸化物) を生産する反応を触媒するが、逆反応 (合成反応) において、グルコン酸のかわりに C6 酸化物であるグルクロン酸を受容体基質に用いると、グルコースとグルクロン酸が β -1,3 結合した二糖 (Glc- β 1,3-GlcUA) が得られることも知られている。Sde0906 は構造既知のタンパク質とのアミノ酸配列の相同性が低いため、セレノメチオニン置換体の結晶を用いて SAD 法により位相決定を行なった。Apo 構造に加えて、ソーキング法により3種類の複合体構造 (セロビオン酸、グルコン酸、Glc- β 1,3-GlcUA) を得ることに成功した。Sde0906 の全体構造は N 末端の β -サンドイッチドメインと C 末端の $(\alpha/\alpha)_6$ バレルドメインからなっていた。また、沈殿剤として用いた硫酸アンモニウムに由来する硫酸イオンが、全ての結晶構造のリン酸結合部位に結合していた。セロビオン酸とグルコン酸の複合体ではグルコン酸 (部分) の C1 カルボキシル基は R609 と K613、そして隣のサブユニットの Q190 によって認識されていた。しかし、Glc- β 1,3-GlcUA の複合体では、サブサイト+1 のグルクロン酸部分は環状の構造を取っており、上記三残基と相互作用しておらず、その位置には硫酸イオンが結合していた。これらの残基の役割を調べるために、R609A、K613A、Q190A の変異体を作成し、それらの活性を合成反応を通じて調べた。その結果、グルコン酸及びグルクロン酸をアクセプター基質として用いた場合のいずれにおいても、全ての変異体で酵素活性が大きく下がっており、特に R609A と K613A ではほとんど活性が見られなかった。従って、これらの残基がグルコン酸とグルクロン酸の結合に重要であることが強

く示された。Glc- β 1,3-GlcUA の結晶構造においては、結晶化バッファー中に高濃度存在する硫酸イオンが正しい位置への結合を阻害したと考えられ、実際、グルクロン酸分子をサブサイト+1 にモデリングした結果、その C6 カルボキシル基は上記の三残基と直接相互作用できる位置に結合できることが示唆された。さらに、立体構造が決定されている他の GH94 酵素と活性中心の構造を比較した結果、サブサイト-1 の残基には高い保存性が見られたが、サブサイト+1 は保存性が低いことから、CBAP は他の GH94 とは異なるユニークなサブサイト+1 を持つことが明らかになった。以上の結果より、*S. degradans* 由来の CBAP の立体構造を初めて決定することに成功し、基質認識と触媒反応に関する構造基盤を明らかにした。

第2章では *Bifidobacterium longum* で発見された新規な代謝経路である GNB/LNB 経路に存在する UDP-galactose 4-epimerase (bGalE) の基質特異性の構造基盤について述べている。GNB/LNB 経路はヒト母乳に含まれるオリゴ糖や腸管内の糖タンパク質であるムチンの糖鎖を特異的に分解する代謝経路であり、乳幼児糞便より単離されたビフィズス菌を中心に存在することが知られている。GalE は基質特異性によって複数の Group に分けられる。Group 1 に属する大腸菌由来の GalE (eGalE) は基質特異性が狭く、UDP-Glc/Gal 間の反応のみを触媒するが、Group 2 に属する bGalE とヒト由来の GalE (hGalE) は、UDP-Glc/Gal だけでなく UDP-GlcNAc/GalNAc 間の反応も触媒する。bGalE の立体構造を分子置換法で決定し、共結晶化により UDP、UDP-Glc、UDP-GlcNAc の三つの複合体が得られた。bGalE の全体構造は NAD⁺結合ドメインと UDP-ヘキソース結合ドメインから成っていた。bGalE の立体構造を他の GalE と比較した結果、C2 位のヒドロキシル基または N-アセチル基が結合する部分においてアスパラギン残基の側鎖が柔軟に構造変化すること、さらに糖の環の O5 原子が結合する部分がシステイン残基でありここに大きなポケットが存在することが、基質の大きな N-アセチル基を許容できることを示した。bGalE の持つ基質認識機構は hGalE とよく似ており、ヒト腸内細菌であるビフィズス菌由来の酵素がヒト由来の酵素と同様の構造基盤を持つことが明らかとなった。

以上、本論文は新規な代謝に関与している 2 種類の酵素で 6 種類の複合体の立体構造を決定した上、それらの反応機構及び基質特異性の構造基盤を解明したものであり、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。