

(論文内容の要旨)

植物は生理活性物質等を配糖体として一時的に不活化し貯蔵している。配糖体の多くは単糖配糖体の β -グルコシドであるが、グルコースの 6 位が種々の単糖で修飾された二糖配糖体も多くの植物から単離されている。単糖配糖体を加水分解して生理活性物質を放出する酵素として β -グルコシダーゼはよく知られているが、二糖配糖体を特異的に加水分解する β -グリコシダーゼ (以下、ジグリコシダーゼと表記) も存在し、現在 5 種類の遺伝子が同定されている。ジグリコシダーゼはアミノ酸配列から β -グルコシダーゼと同じグリコシル加水分解酵素ファミリー 1 に分類され、ジグリコシダーゼは近縁種の β -グルコシダーゼから進化した酵素であると予想される。チャ樹 (*Camellia sinensis*) から単離された β -プリメベロシダーゼ (以下、PD と省略) は、茶の香気前駆体 β -プリメベロシド ($6\text{-}O\text{-}\beta\text{-D}\text{-xylopyranosyl-}\beta\text{-D}\text{-glucopyranoside}$) に高い基質特異性を示す一方、単糖配糖体をほとんど加水分解しない。そのため、PD をはじめとするジグリコシダーゼは、進化の過程で二糖と単糖を識別するメカニズムを獲得したと考えられる。したがって、ファミリー 1 グリコシダーゼの分子進化を考える上で、ジグリコシダーゼの二糖認識機構の解明は意義深い。基質の構造活性相関から、ジグリコシダーゼは二糖めの 6-位修飾糖の認識部位を持っていると予想されるが詳細は不明である。さらに、ジグリコシダーゼがなぜ単糖配糖体を加水分解しないのかも明らかになっていない。

本研究は、ジグリコシダーゼの二糖認識機構を、X 線結晶構造解析、酵素反応速度論、バイオインフォマティクスによって解明したものである。その過程で、基質認識のプロブとして用いた PD の阻害剤 β -プリメベロシルアミジン誘導体の阻害機構についても詳細に研究しており、明らかになった二糖認識機構をもとに、 β -グルコシダーゼからジグリコシダーゼへの分子進化について考察している。その内容は以下のようまとめられる。

- 1) PD の X 線結晶構造解析を行うために、昆虫細胞を用いて PD の大量発現系を構築した。N 末端シグナル配列を含む PD の全長 cDNA を組み込んだバキュロウイルスを作製し、糖タンパク質の発現に適した昆虫細胞 (High Five) に感染させ、PD を発現させた。その結果、PD は N 末端分泌シグナルにより培地中に分泌され、糖鎖修飾を受けていた。発現された PD は安定であり、天然の PD と同様の基質特異性を示した。培地 1 L あたり 8 mg の PD が発現され、結晶化に十分な量の PD を得る系を確立した。
- 2) X 線結晶構造解析において基質結合部位のリガンドとして用いるため、PD の基質アナログ阻害剤である β -プリメベロシルアミジン誘導体の阻害活性を測定した。その結果、 β -プリメベロシルアミジン誘導体は、PD を、基質に対して競争阻害することが明らかになった。一方、PD は単糖配糖体アナログである β -グルコシルアミジン誘導体による阻害を受けなかったことから、PD は阻害剤に対しても二糖選択性を持つことを示した。これらの結果から、 β -プリメベロシルアミジン誘導体が二糖認識機構をさぐるプローブとして適した阻害剤であることを明らかにした。

- 3) β -プリメベロシルアミジン誘導体をリガンドとして利用したアフィニティー精製法を確立した。PD の吸着量には pH 依存性があることを見出し、高 pH 領域で PD を吸着させ、pH を下げることで溶出する効率的な精製法を確立した。この方法により高純度の PD を大量に得ることに成功した。
- 4) α -マンノシダーゼを用いて PD の修飾糖鎖を均一に切断した。糖鎖切断によって PD の結晶性が改善し、単結晶が得られた。ソーキングによって β -プリメベロシルアミジン誘導体を取り込ませた複合体結晶を作成し、分解能 1.8 Å で構造を決定した。その結果、PD は二糖めの β -キシロシドに結合する特別なサブサイト-2 を持っており、Glu470、Ser473、Gln477が β -キシロシドを水素結合によって認識していることを見いだした。また PD は、本来、単糖配糖体のアグリコン認識に必要な Trp が Ala に置換しており、この変異が、単糖配糖体に対する活性が低い原因であることが示唆された。
- 5) β -プリメベロシルアミジン誘導体の阻害機構を、阻害活性の pH 依存性と結晶構造から明らかにした。 β -プリメベロシルアミジン誘導体の阻害活性は高い pH ほど強くなり、pH 5.4 付近に変曲点をもつシグモイド型の阻害曲線を示した。この阻害活性の変曲点は、PD の酸/塩基触媒残基である Glu203 の pK_a 5.3 とほぼ一致したことから、 β -プリメベロシルアミジンは Glu203 と静電的相互作用していることが示唆された。また結晶構造解析から、 β -プリメベロシルアミジン誘導体のアミノ基と Glu203 とが静電的に相互作用する位置にあることを明らかにした。
- 6) スイカズラ科ムシカリ (*Viburnum furcatum*) 由来のジグリコシダーゼであるフルカチンヒドロラーゼ (以下、FHと省略) のホモロジーモデリングを行い、そのモデルをもとに *p*-ニトロフェニルプリメベロシドのドッキングシミュレーションを行った。得られた基質-酵素複合体の構造から、FH の Ser504 が二糖めの β -キシロシドの認識に関わるアミノ酸であると予想された。Ser504 は PD の Ser 473 と同じ位置にあり、 β -キシロシドの 3 位水酸基と近接していた。Ser504 の変異実験を行い、反応速度定数を測定した結果、変異体 S504W と S504A の *p*-ニトロフェニルプリメベロシドに対する K_m 値が上昇し、Ser504 が FH でも二糖めの β -キシロシドを認識していることを示した。
- 7) ジグリコシダーゼは β -グルコシダーゼから進化する過程で、二糖めの β -グリコシドとサブサイト-2 を構成するアミノ酸残基との間の水素結合による二糖認識機構を獲得する一方、単糖配糖体のアグリコン認識に必要な Trp を失った結果、単糖配糖体をほとんど加水分解せず、二糖配糖体を特異的に加水分解するジグリコシダーゼへと進化したと考察した。すなわち、ジグリコシダーゼの基質特異性の変化は、基質結合部位を構成する数個のアミノ酸残基の変異によるものである。多くの植物から二糖配糖体が単離されている事実を考え合わせると、 β -グルコシダーゼから平行進化した未知のジグリコシダーゼが植物界に広く存在する可能性が示唆される。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ジグリコシダーゼの二糖認識機構を解明し、ジグリコシダーゼの進化について考察した研究成果である。典型的なジグリコシダーゼであるチャ樹由来の β -プリメベロシダーゼ (PD) について、大量発現とアフィニティー精製ののち、二糖型の基質アナログ阻害剤 β -プリメベロシルアミジン誘導体をリガンドとして高分解能 X 線結晶構造解析を行い、ジグリコシダーゼの二糖認識機構の詳細を明らかにしている。また、類縁のジグリコシダーゼであるフルカチンヒドロラーゼ (FH) のバイオインフォマティクスによる解析をもとに変異実験を行い、二糖認識機構が PD と共通することを見出している。これらの結果は、ジグリコシダーゼが、基質結合部位における僅かな変異により β -グルコシダーゼから進化したことを示しており、ジグリコシダーゼが植物界に広く存在することを示唆する重要な知見を与えるものである。また、本論文で阻害機構が明らかにされた β -プリメベロシルアミジン誘導体およびアフィニティークロマトグラフィーは、 β -グリコシダーゼの新たな研究ツールとなると期待される。本論文で評価される主な点は以下の通りである。

- 1) 昆虫細胞を用いて、糖鎖修飾を受けた PD の大量発現系を確立した。
- 2) PD は、本酵素用に開発された二糖配糖体アナログ阻害剤である β -プリメベロシルアミジン誘導体によって基質と競争的な阻害を受けることを明らかにし、 β -プリメベロシルアミジンをリガンドとする効率的なアフィニティー精製法を確立した。
- 3) β -プリメベロシルアミジン誘導体との複合体結晶を作製し、その構造を分解能 1.8 Å で決定した。その結果、PD は二糖めの β -キシロシドに結合する特別なサブサイト-2 を持ち、Glu470、Ser473、Gln477 がキシロース部分を水素結合によって認識する機構を明らかにするとともに、PD は配糖体のアグリコン認識に必要な Trp が Ala に置換しており、この変異が単糖配糖体に対する活性が低い原因であることを示した。
- 4) 阻害の pH 依存性および X 線結晶構造解析により、阻害剤のアミジノ基が PD の酸塩基触媒残基である Glu203 と静電的に相互作用することを示した。
- 5) FH が PD と共通の機構で二糖めの β -グリコシドを認識していることを示した。

以上のように、本論文は、二糖配糖体アナログ阻害剤である β -プリメベロシルアミジンを利用して、 β -プリメベロシダーゼの X 線結晶構造解析を成功させ、ジグリコシダーゼの二糖認識機構を詳細に解明したものである。これまで構造活性相関から推定されてきたジグリコシダーゼの二糖認識機構を、基質結合部位の限られたアミノ酸変異と、二糖との水素結合形成によるものであることを明らかにしている。これらの点で、本論文は酵素化学、植物生理学、および、生理活性化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 20 年 12 月 15 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分にあるものと認めた。