

氏 名	なん かい ひろ かず 南 海 浩 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2446 号
学位授与の日付	平 成 14 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Enzymology and Genetics of Xanthan-degrading System and X-Ray Crystal Structure of Xanthan Lyase in <i>Bacillus</i> sp. GL1. (<i>Bacillus</i> sp. GL1 におけるキサントラン分解系の酵素学的・遺伝学的解析, 及びキサントランリアーゼの X 線結晶構造に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 村 田 幸 作 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 井 上 國 世

論 文 内 容 の 要 旨

多糖は、微生物から植物・動物に至るまで広く存在し、自然界でのエコシステムの構築、エネルギー貯蔵や細胞形態維持などに重要な機能を果たしている。また、多糖の低分子化物は、多彩な生理機能を発現する。このような多糖の構造や生理機能の解析には、多糖の分解・修飾に関わる酵素の研究が必要であり、これまでにアミラーゼやセルラーゼなど植物多糖に作用する加水分解酵素については、その詳細な構造・機能の相関が明らかにされ、且つ広範な領域への応用が図られている。しかし、植物多糖と同様に重要なバイオマスである細菌多糖に作用する酵素、特に多糖リアーゼに関しては研究例も少なく、その機能解析、並びに用途開発に関する研究が遅れている。

全ての多糖リアーゼは、多糖分子中のウロン酸残基を厳密に認識し、その非還元末端側のグリコシド結合を β -脱離反応により切断する。この事実、多糖リアーゼに共通した「基質認識と触媒反応に関わる高次構造」の存在を示唆している。

本研究では、多糖リアーゼの構造的共通性を明らかにすることを主目的として、代表的なウロン酸含有ヘテロ多糖であるキサントランの分解に関わる細菌 *Bacillus* sp. GL1 の酵素、遺伝子、及び代謝経路の解析とキサントランリアーゼの X 線結晶構造解析を行った。その結果、ヘテロ多糖リアーゼの特異な生合成機構の存在、多糖リアーゼファミリー 8 に共通した活性クレフトの存在、並びに、ヘテロ多糖リアーゼに共通した 3 次元構造の存在を明らかにした。

第 1 章では、キサントラン分解菌を単離・同定し、本菌におけるキサントラン分解経路の詳細を明らかにした。まず、土壌よりキサントラン分解微生物を分離し、その菌学的・生化学的性質に基づいてバチラス属細菌 (*Bacillus* sp. GL1 ; 以下 GL1 株と略す) と同定した。また、GL1 株の 16SrRNA 遺伝子は、*Paenibacillus polymyxa* (セルロース分解菌) や *P. curdolanolyticus* (カードラン分解菌) などの 16SrRNA 遺伝子と高い相同性 (90% 以上) を示すことから、本菌は、1993 年に *Bacillus* 属の中から再分類された多糖分解菌を含む *Paenibacillus* に属することを示唆した。

さらに、キサントラン分解物を単離同定することにより、GL1 株におけるキサントラン分解経路を決定した。その結果、キサントランは、菌体外酵素であるキサントランリアーゼにより側鎖末端糖 (ピルビン酸マンノース) が遊離され、続いて菌体外酵素 β -D-グルカナーゼにより主鎖が切断されて 4 糖にまで低分子化される。生成した 4 糖は菌体内に取り込まれ、 β -D-グルコシダーゼ、不飽和グルクロニルヒドロラーゼ、及び α -D-マンノシダーゼの逐次反応によって単糖にまで分解されることを明らかにした。

第 2 章では、第 1 章で明らかにしたキサントラン分解に関わる 5 種の酵素 (キサントランリアーゼ、 β -D-グルカナーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、不飽和グルクロニルヒドロラーゼ、 α -D-マンノシダーゼ) を精製し、それらの諸性質を明らかにした。また、 β -D-グルカナーゼを除く 4 種の酵素については、遺伝子をクローニングすることにより一次構造を推定し、大腸菌での大量発現系を確立した。分解の最初に関与するキサントランリアーゼは、その一次構造に基づいてヒアルロン酸リアーゼやコンドロイチンリアーゼを含む多糖リアーゼファミリー 8 に分類された。また、本リアーゼは、99kDa のプレプロ体として生合成された後、2kDa の N 末端ペプチドが除去された 97kDa のプロ体として菌体外に分泌され、さらに自己触媒的と考えられるプロセッシングにより C 末端ポリペプチド (16kDa) が遊離し、81kDa の成熟体になることを明らかにした。

ヘテロ多糖であるアルギン酸、ジェランおよびヒアルロン酸に作用するリアーゼにも、類似のプロセスを伴う翻訳後修飾による成熟化機構が存在することから、キサンタンリアーゼを含めたこれらヘテロ多糖リアーゼには、共通した生合成様式が存在することを示唆した。

第3章では、キサンタンリアーゼ、及びキサンタンリアーゼとピルビン酸マンノース複合体のX線結晶構造を決定し、本酵素が α_5/α_5 バレル構造を有するN末端側 α -ドメインと、カルシウムイオンを含み5枚の逆並行 β -シート構造を有するC末端側 β -ドメインから成ることを明らかにした。また、キサンタンリアーゼとピルビン酸マンノース複合体のX線結晶構造の解析から、本酵素の活性部位は、 α -ドメインと β -ドメインの境界に面した α -ドメイン側に形成されるクレフトに存在することを示した。類似のクレフト構造は、多糖リアーゼファミリー8に属するヒアルロン酸リアーゼとコンドロイチンACリアーゼにも存在することから、この活性クレフトは多糖リアーゼファミリー8に共通した構造であることが示唆された。多糖リアーゼファミリー8に属するヘテロ多糖リアーゼ（キサンタンリアーゼ、ヒアルロン酸リアーゼ、及びコンドロイチンACリアーゼ）は、互いに類似した全体構造（ α/α バレル—逆平行 β -シート）を示し、同じくヘテロ多糖リアーゼであるアルギン酸リアーゼ（A1-III）も α/α バレル構造を基本骨格に持つことが知られている。このことから、キサンタンリアーゼを含め、これまでに構造が明らかにされたヘテロ多糖リアーゼは、主に α/α バレルを共通の基本構造として含み、 β -シートヘリックス構造のホモ多糖リアーゼ（ペクチンリアーゼ、ペクチン酸リアーゼ）とは異なることを明らかにした。つまり、多糖リアーゼは、構造上2種類 [β -シートヘリックス構造と α/α バレル（+逆平行 β -シート）構造] に大別されることを見だし、高次構造に基づく多糖リアーゼの分類法を示した。

論文審査の結果の要旨

多糖は、自然界においてエコシステムの構築、エネルギー貯蔵や細胞形態維持などに重要な機能を有し、さらに、その低分子化合物は多彩な生理機能を発現する。これまでに、植物ホモ多糖に作用する加水分解酵素（アミラーゼやセルラーゼなど）については、その詳細な構造・機能の相関が明らかにされ、且つ広範な領域への応用が図られている。しかし、植物多糖と同様に重要なバイオマスである微生物由来のウロン酸含有ヘテロ多糖に作用する酵素、特に多糖リアーゼに関しては研究例も少なく、その機能解析並びに用途開発に関する研究が遅れている。

本研究は、多糖リアーゼの構造的共通性を明らかにすることを主目的として、代表的なウロン酸含有ヘテロ多糖であるキサンタンの分解に関わる細菌 *Bacillus* sp. GL1 の酵素、遺伝子、及び代謝経路の解析とキサンタンリアーゼのX線結晶構造解析を行ったものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. 多糖キサンタンを分解する土壌分離細菌 (*Bacillus* sp. GL1) の菌学的性質を明らかにし、キサンタン分解経路を確定した。
2. キサンタン分解経路に含まれる酵素（キサンタンリアーゼ、 β -D-グルカナーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、不飽和グルクロニルヒドロラーゼ、 α -D-マンノシダーゼ）の性状、並びに β -D-グルカナーゼ以外の酵素の遺伝子構造を明らかにし、大量発現法を確立した。
3. ヘテロ多糖リアーゼには、共通した生合成様式（自己触媒的と考えられるプロセッシングによる成熟化）が存在することを示した。
4. キサンタンリアーゼのX線結晶構造を決定し、本酵素はN末端側 α -バレルドメインとカルシウムイオンを含むC末端側逆平行 β -シートドメインから成り、両ドメインの境界に面した α -ドメイン側に形成されるクレフトに活性部位が存在することを明らかにした。また、クレフトを覆うN末端側 α -バレルドメインとC末端側 β -シートドメインの2本のループが、活性部位への基質固定に関与していることを明らかにした。
5. キサンタンリアーゼの触媒ドメイン [N末端側 α -ドメイン (α/α バレル構造)] と類似の触媒ドメインを有するが、一次構造上は相同性が認められない糖質関連酵素の一群（セルラーゼ、アルギン酸リアーゼ、N-アシル-D-グルコサミン-2-エピメラーゼなど）の存在を見だし、 α/α バレル構造が、これら酵素の分子進化と活性発現に重要であることを示した。
6. 多糖リアーゼファミリー8に共通した活性クレフトの存在、及びヘテロ多糖リアーゼに共通した三次元構造の存在を明

らかにし、高次構造に基づく多糖リアーゼの分類法を示した。

以上のように、本論文は、土壌分離細菌 *Bacillus* sp. GL1 におけるキサントンの完全分解に関わる酵素群の生合成と活性発現制御に関する酵素科学的・遺伝学的諸特性を明らかにすることによって、糖質の構造解析、並びに新規糖質の分子設計に有用な酵素と方法論を提供した。また、キサントンリアーゼの X 線結晶構造解析結果に基づいて、類似の触媒ドメイン (α/α パレル構造) を有する糖質関連酵素群の分子進化に新たな知見を加えるとともに、高次構造に依存した多糖リアーゼの分類法を示した。これらの結果は、酵素化学、微生物生産学、生物機能変換学、及び進化構造生物学の進展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14年9月19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あるものと認めた。