

京都大学	博士 (農 学)	氏名	小 倉 康 平
論文題目	X-ray Crystallographic Studies on Reaction Diversity of Alginate Lyases with β -Jelly Roll as a Common Basic Scaffold (β -ジェリーロール構造を共通の基本骨格にもつアルギン酸リアーゼの反応多様性に関する X 線結晶学的研究)		
(論文内容の要旨)			
多糖リアーゼ (PL) は、多糖分子内のウロン酸残基を認識し、そのグリコシド結合をβ-脱離反応により切断する。中性多糖に作用するヒドロラーゼに比べ、酸性多糖を分解するリアーゼ反応の分子機構には不明な点が多い。アルギン酸は、互いに C5 位エピマーの関係にあるβ-D-マンヌロン酸 (M) とα-L-グルロン酸 (G) の 2 種類のウロン酸を構成糖とするヘテロ多糖であり、分子内で 3 種類のブロック (ポリ M、ポリ G、MG 混在領域) 構造を形成する。アルギン酸リアーゼは、アルギン酸の 1,4-グリコシド結合を切断するが、本酵素のブロック認識機構や作用様式の構造要因は明らかにされていない。 PL は、一次構造上 21 のファミリーに分類される。アルギン酸リアーゼの多くはブロック特異性を示すが、ファミリー PL-7 に属する <i>Sphingomonas</i> 属細菌 A1 株由来アルギン酸リアーゼ A1-II' はアルギン酸分子内の全てのブロックに作用する。また、ファミリー PL-14 には、異なる作用様式 (エンドやエキソ型) を示すアルギン酸リアーゼが存在する。本論文は、ファミリー PL-7 の A1-II' とファミリー PL-14 クロレラウイルス CVK2 由来 vAL-1(S) を分子生物学と構造生物学の観点から解析し、酸性多糖の分解に関わるリアーゼの酵素化学的特性 (ブロック認識機構、触媒反応機構、および作用様式) を明らかにしたものである。本論文の内容は以下のように要約される。 第一章では、X 線解析によりファミリー PL-7 A1-II' の結晶構造を超高分解能 (0.78 Å) で決定した。これは、アルギン酸分子内の全ブロックに作用するアルギン酸リアーゼの最初の構造決定である。A1-II' は、2 枚の逆平行β-シート (シート A, β-鎖 A1-A7; シート B, B1-B6) から成るグローブ様β-ジェリーロール構造を示し、分子中央のβ-鎖 A2-A5 とその周辺のループから成るクレフトを形成する。また、構造中には主鎖における多くの N-H 基に水素に相当する電子密度マップが認められ、グローブ様逆平行β-シートの形成に関わる主鎖の N-H 基と C=O 基間の結合が水素を介していることを実証した。 第二章では、A1-II' の広いブロック認識機構と触媒反応機構を明らかにした。A1-II' のクレフトを構成する Tyr284 の部位特異的変異体 Y284F と組成の異なるアルギン酸三糖 (MMG あるいは GGG) との各複合体の結晶構造を決定した。複合体中で、MMG および GGG は還元末端側 (サブサイト+1, +2, +3) に結合していた。M および G のカルボキシル基は、サブサイト+1 では Arg146 と Gln189 に、+2 では Thr139 と Asn141 によって厳密に認識される。一方、その他の水酸基との結合に関わるアミノ酸残基は、M と G とで異なっていた。このことから、M と G の両方との結合を許容するサブサイト構造が A1-II' とアルギン酸分子内の各ブロックとの反応を可能にすることが示された。 A1-II' 変異体 (H191N/Y284F) と基質 (アルギン酸四糖: GGMG) との複合体の結晶構造を決定した。GGMG は、非還元末端側サブサイト-1 からサブサイト+3 にかけて結合していた。得られた複合体の構造に基づいて野性型酵素-基質結合モデルを <i>in silico</i> で構築し、部位特異的変異体の結果と併せて A1-II' の触媒反応機構を提唱した。Gln189 がカルボキシル基の安定化を、His191 が C5 プロトンの引き抜きを、および Tyr284 が O4 へのプロトン付加を行う。 第三章では、X 線解析によりファミリー PL-14 vAL-1(S) の結晶構造を決定し、その特異な pH 依存的な作用様式の構造要因を明らかにした。クロレラ細胞壁分解酵素 vAL-1 は、N 末端側 11 kDa (細胞壁吸着モチーフ) およびファミ			

リーPL-14 アルギン酸リアーゼと相同性を示す C 末端側 27 kDa (触媒モジュール)の 2 つのドメインから成る。全長 vAL-1 と触媒モジュール断片 vAL-1(S)は、ともにアルギン酸リアーゼ活性を示した。ファミリーPL-14 で初めて結晶構造を決定した vAL-1(S)は、グローブ様 β -ジェリーロール構造を基本骨格にもち、2 枚の逆平行 β -シート (シート A, β -鎖 A1-A7; シート B, B1-B6) と β -ターンを介した 2 枚の小さいシート (シート C, C1-C2; シート D, D1-D2) から構成される。

vAL-1(S)は pH 7 ではアルギン酸から種々のオリゴ糖を遊離し、pH 10 ではアルギン酸二糖を優先的に遊離したことから、本酵素が pH 依存的な作用様式を示すことが明らかになった (pH 7, エンド型; pH 10, エキソ型)。pH 7 あるいは 10 での vAL-1(S)と D-グルクロン酸との各複合体の結晶構造では、グルクロン酸は pH 7 ではクレフトの外側 (A6-A7 周辺) に結合するのに対し、pH 10 ではクレフトの内側 (A4-A6) に結合していた。vAL-1(S)は、糖との結合部位を pH 依存的に変化させることにより、エンドあるいはエキソ型の作用様式が発現することを明らかにした。

上記の結果に基づいて、 β -ジェリーロール構造を共通の基本骨格とするアルギン酸リアーゼについて、その反応多様性に関わる分子機構と構造要因を明らかにした。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 3 5 字×3 6 行で作成し、
合わせ

て、3,000 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、2,000～5,000 characters
で作成し

審査結果の要旨は日本語 500～2,000 字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

アルギン酸は、マンヌロン酸 M とグルロン酸 G の 2 種類のウロン酸からなるヘテロ酸性多糖であり、分子内に 3 種類のブロック (ポリ M、ポリ G、MG 混在領域) 構造をもつ。アルギン酸リアーゼは、アルギン酸のグリコシド結合を β -脱離反応により切断する。しかし、本酵素のブロック認識機構や作用様式 (エンドやエキソ型) に関わる構造要因は不明である。本論文は、アルギン酸リアーゼ活性を示す *Sphingomonas* 属細菌 A1 株由来 A1-II' およびクロレラウイルス CVK2 由来 vAL-1(S) を対象に、酵素学的・構造生物学的解析を行ない、共通の基本骨格をもつアルギン酸リアーゼの反応多様性を明らかにした一連の研究をまとめたものである。評価すべき主要な点は以下のように要約される。

1. ファミリー PL-7 および PL-14 に各々属する A1-II' と vAL-1(S) の結晶構造を決定した。両酵素は、ともに β -ジェリーロール構造を基本骨格とし、それぞれのファミリーで保存されたアミノ酸残基が活性中心を構築することを明らかにした。

2. A1-II' は、M と G の両方と結合するサブサイト構造を有することにより、アルギン酸分子内の全てのブロックを分解できることを明らかにした。A1-II' の触媒反応は、Gln189、His191、および Tyr284 の作用により進行することを提唱した。

3. vAL-1(S) は、アルギン酸との反応において pH 依存的な作用様式を示した (pH 7, エンド型; pH 10, エキソ型)。各サブサイトの親和性が pH 依存的に異なることにより、アルギン酸の結合部位が変化し、エンドあるいはエキソ型の作用様式が生じることを明らかにした。

以上のように、本論文は、2 種類の新規なアルギン酸リアーゼの結晶構造を決定し、本酵素におけるブロック認識機構や作用様式に関わる構造要因を明らかにしたものであり、酵素化学、構造生物学、糖質科学、および生物機能変換学の発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 22 年 2 月 12 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。

注) 論文審査の結果の要旨の結句には、学位論文の審査についての認定を明記すること。

更に、試問の結果の要旨 (例えば「平成 年 月 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。」) を付け加えること。

Web での即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降