

氏名（本籍）	こば やし かい と 小林 海 渡（東京都）
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	甲第 1190 号
学位授与の日付	2019 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	<b><math>\beta</math>-1,2-グルコオリゴ糖の比色定量法の確立 及び <math>\beta</math>-1,2-グルコオリゴ糖に作用する新規 糖転移酵素の機能と構造の解明</b>

論文審査委員	（主査）教授 田口 速男
	教授 鎌倉 高志      教授 酒井 秀樹
	准教授 倉持 幸司      教授 高橋 秀依

## 論文内容の要旨

$\beta$ -1,2-グルカンはグルコースが  $\beta$ -1,2-グルコシド結合で重合している糖鎖であるが、天然では直鎖状もしくは環状で存在することが知られている。近年、細菌由来  $\beta$ -1,2-グルカナーゼ(SGL)が同定され、新たに Glycoside hydrolase (GH) family 144 が創設された。 $\beta$ -1,2-グルカン/グルコオリゴ糖に働く酵素はホスホリラーゼ(GH94)、グルコシダーゼ(GH3)、グルカナーゼ(GH144)などが知られているが、糖鎖の希少性ゆえ他の糖鎖に比べて関連酵素の報告はまだ少ない。また、グルカナーゼなどの酵素の活性を測定する際には比色定量が用いられることが多いが、 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖(Sop<sub>ns</sub>, n は重合度)を正確に定量できる比色定量法は知られていない。本研究では、 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の比色定量法の確立と、 $\beta$ -1,2-グルカン/グルコオリゴ糖に働く新規酵素の探索、機能・構造解析を行った。

$\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の定量に使える比色定量法を探索した。様々な糖の還元末端を認識する比色定量法を Sop<sub>2</sub> を用いて調べた結果、DNS 法、tetrazolium blue 法ではほとんど発色しなかった。PAHBAH 法や ferricyanide 法では 3 糖以上の Sop<sub>ns</sub> ではソホロースよりも顕著に発色が少なかったため、 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖混合物が生成する  $\beta$ -1,2-グルカナーゼの定量には適していないと言える。そこで、MBTH(3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン)と糖の還元末端を反応させアジンを生成し、アジンと酸化型 MBTH を反応させて生じる青色色素を定量する方法(MBTH 法、Gordon E.A. and Diane M.B., *Anal. Biochem.*, 305, 287-289(2002))を検討した。MBTH 法では Sop<sub>3-5</sub> で同じ吸光度を示したが、グルコースと Sop<sub>2</sub> の吸光度が Sop<sub>3-5</sub> と異なっていた。これらの比色定量法の中で、Sop<sub>3-5</sub>

で同じ吸光度を示した MBTH 法を改良して Sop<sub>ns</sub> 定量に使えるようにした。MBTH 法の反応条件(塩基、反応温度等)を変え、Sop<sub>ns</sub> 定量に最適な条件を検討した。2 種類の塩基 (NaOH, KOH)を試した結果、塩基の種類が反応性に与える影響は少なかった。熱処理の反応時間が MBTH 法に与える影響を調べた結果、反応時間が短い場合は 3 糖以上の Sop<sub>ns</sub> の発色が Sop<sub>2</sub> よりも明らかに小さかったが、反応時間を伸ばすことで Sop<sub>3-5</sub> の吸光度は増加した。反応時間が 30・40 分で Sop<sub>2-5</sub> の発色は同程度となった。そこで、熱処理の時間を 30 分とした条件を  $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖定量用の改良型 MBTH 法とした。この条件下で、0.2・2 mM の範囲で Sop<sub>ns</sub> 濃度と吸光度の関係は直線性を示した。以上から、改良型 MBTH 法は Sop<sub>ns</sub> の定量に適した方法であると言える。

次に、 $\beta$ -1,2-グルカン/グルコオリゴ糖に作用する新規酵素の探索及び機能構造解析を行った。多くの SGL ホモログ遺伝子は遺伝子クラスターを形成するが、構成遺伝子には機能未同定の推定糖加水分解酵素が多くある。その中から、GH35 に属する酵素の機能・構造解析を行った。*Ignavibacterium album*、*Chloroflexus* sp. Y-400-fl 由来の 2 種の GH35 酵素 (IaSGT、ChSGT)を大腸菌内で発現させ、精製した。様々な糖鎖を用いて基質の探索を行ったところ、IaSGT と ChSGT は特異的に Sop<sub>ns</sub> に作用し、グルコース単位を転移する新規活性を示した。しかし、Sop<sub>ns</sub> に対して両酵素とも反応速度論量の解析において高い  $K_m$  値を示したことから、Sop<sub>ns</sub> はドナーあるいはアクセプターとしては親和性が低いと考えられた。そこで、X 線結晶構造解析により IaSGT の Sop<sub>2</sub> 複合体構造を決定したところ、Sop<sub>ns</sub> のみがサブサイト-1 から+1 へ結合していたため、Sop<sub>2</sub> は真のドナーと考えられた。しかし、3 糖以上の Sop<sub>ns</sub> と IaSGT との複合体構造ではサブサイト+2 以降の電子密度が明らかに不明瞭であった。また、グルコースとの複合体構造ではグルコースがサブサイト+1 に結合していた。そのため、サブサイト+1 以降には何らかのグルコシドが結合すると考え、各種グルコシド(Glc- $\alpha/\beta$ -R)をアクセプターとして活性を調べたところ、IaSGT ではアグリコンが Aryl 基や Alkyl 基の  $\alpha$  アノマーのグルコシド配糖体(Glc- $\alpha$ -R)に特に高い親和性を示した。一方で、ChSGT では配糖体に対しての親和性は低かった。IaSGT と高い活性を示した各種配糖体との複合体構造を解析したところ、グルコース部分はサブサイト+1 に観察され、アグリコン部分が疎水性残基に囲まれていたことから、Aryl 基や Alkyl 基をもつ  $\alpha$  アノマーのグルコシド配糖体が高い親和性を持つことが構造的に裏付けられたと言える。また、*p*Np- $\alpha$ -glucoside をアクセプターとした際の Sop<sub>2</sub> と Sop<sub>3</sub> の  $K_m$  に大きな差はなかった。以上から IaSGT において、ドナーは Sop<sub>ns</sub> であり、Aryl 基や Alkyl 基をもつ  $\alpha$  アノマーのグルコシド配糖体が真のアクセプターと考えられた。このような活性は今まで報告されておらず、IaSGT、ChSGT は  $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖に作用する新規活性を有する酵素であると言える。

## 論文審査の結果の要旨

$\beta$ -1,2-グルカンはグルコースが  $\beta$ -1,2-グルコシド結合で重合した糖鎖であり、天然では稀少であるが、直鎖状もしくは環状のものが見出されている。近年、 $\beta$ -1,2-グルカンを特異的に加水分解する  $\beta$ -1,2-グルカナーゼ (SGL) の同定によって、新たに Glycoside hydrolase (GH) family 144 が創設され、この family のタンパク質が生物界に広く分布していることが明らかになった。しかし、こうした SGL の活性測定や反応速度論的な解析には、反応生成物である  $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖 ( $Sop_n$ s,  $n$  は重合度) を精度よく簡便に定量することが必要となる。そこで、本研究は、まず  $Sop_n$ s を正確、簡便に定量できる比色定量法を検討、確立した。また、 $\beta$ -1,2-グルカンや  $Sop_n$ s に作用する酵素は、SGL (GH144) 以外に、ホスホリラーゼ (GH94)、グルコシダーゼ (GH3) が報告されているが、他の糖鎖に作用する酵素に比べると、その知見はまだ極めて少ない。そこでさらに、本研究では、 $\beta$ -1,2-グルカンや  $Sop_n$ s にはたらく新規酵素を探索した。その結果、新規糖転移酵素を見出すとともに、その機能・構造を解明することにも成功した。

SGL の反応測定では、 $\beta$ -1,2-グルカンの加水分解とともに増大する還元末端を定量的に測定できることが望ましい。そこで、まず  $Sop_2$  を用いて、糖の還元末端を定量する様々な比色定量法を検討した結果、MBTH (3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン) を用いて定量する方法 (MBTH 法) が、精度、感度ともに比較的良好な定量結果を示した。しかし、従来の MBTH 法をそのまま用いた場合には、 $Sop_{3-5}$  の吸光度はよく一致したものの、 $Sop_2$  の吸光度がこれらと顕著に異なったため、さらに改良の必要が認められた。そこで、反応条件 (塩基、反応温度等) を検討した結果、 $Sop_{2-5}$  の発色が同程度となる条件を見出すことに成功した。また、実際に SGL の活性測定に応用し、この改良法が活性測定に十分適した方法であることを実証した。

多くの SGL ホモログ遺伝子は遺伝子クラスターを形成しているが、そのクラスターの構成遺伝子には機能未同定の推定糖加水分解酵素をコードするものが多い。そこで、新規酵素の探索は、こうした中から、GH35 に属する機能未知酵素群を対象に行った。その結果、グラム陰性細菌 *Ignavibacterium album*、および *Chloroflexus* sp. Y-400-fl 由来の 2 種の GH35 酵素 (IaSGT、ChSGT) に、特異的に  $Sop_n$ s に作用しグルコース単位を転移する活性が認められた。すなわち、これらの酵素は新規な糖転移活性をもつ酵素ということができる。しかしその一方で、両酵素とも  $Sop_n$ s に対して高い  $K_m$  値を示したことから、 $Sop_n$ s がこれらの酵素の生理的な反応でのドナー、あるいはアクセプターではない可能性も示唆された。

IaSGT については、結晶化と X 線結晶構造解析により、1.8 Å 分解能の立体構造決定に成功した。構造解析にあたっては、セレノメチオニン置換体酵素を作成して単波長異常分散法によって位相を決定し、高エネルギー加速器研究機構のシンクロトロン放射光を用いてデータ収集を行った。解析結果から、IaSGT が 3 つのドメイン { ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (TIM バレル) domain, Rossmann fold domain, Ig like domain } から構成されるサブユニットが 2 つ会合

したホモ 2 量体構造を有するタンパク質であることが示された。さらに、様々な Sop<sub>ns</sub> 基質やグルコシド配糖体との複合体構造を決定した結果、Sop<sub>2</sub> は真のドナーであるが、アクセプターとしてはグルコシド配糖体がより好ましい基質となることが示唆された。そこで、実際に各種グルコシド (Glc- $\alpha$ / $\beta$ -R) をアクセプターとして活性を検討したところ、アグリコンが Aryl 基や Alkyl 基の  $\alpha$  アノマーのグルコシド配糖体 (Glc- $\alpha$ -R) に特に高い親和性を示した。これらの配糖体との複合体構造では、グルコース部分がサブサイト+1 に観察され、アグリコン部分が疎水性残基に囲まれていることから、この酵素が Aryl 基や Alkyl 基をもつ  $\alpha$  アノマーのグルコシド配糖体が高い親和性をもつことが構造的にも裏付けられた。すなわち、IaSGT は、Sop<sub>2</sub> をドナーとし、Aryl 基や Alkyl 基をもつ  $\alpha$  アノマーのグルコシド配糖体を好ましいアクセプターとする新規な糖転移酵素といえる。

以上のように、本研究は、 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖の簡便で正確な定量法を確立し、これまで研究が遅れていた  $\beta$ -1,2-グルカン関連酵素の研究に極めて有効なツールを与えた。加えて、新規な  $\beta$ -1,2-グルカン関連糖転移酵素を発見し、その構造と機能の解析を通して機能-構造連関を明らかにした。これらの研究成果は、糖質科学、酵素学、タンパク質科学の研究分野に大きく貢献するものといえる。よって、本論文は、博士（理学）の学位論文として十分に価値のあるものと認める。