

学位論文要旨 Dissertation Abstract

氏名： 上地 敬子
Name

学位論文題目： Relationships Between Structure and Activity of Rare Sugar
Title of Dissertation: Producibile Enzymes Based on X-ray Crystal Structure Analysis
(X線結晶構造解析法による希少糖生産酵素の構造と活性の
相関性に関する研究)

学位論文要旨：
Dissertation Abstract

単糖は不正炭素原子を多く有するため、構造多様性に富んでおり、未修飾の4炭糖、5炭糖、6炭糖で計59種類存在する。そのうち、天然に豊富に存在するブドウ糖(D-グルコース)や果糖(D-フルクトース)などの数種類を天然型単糖、これらを除いた自然界にわずかにしか存在しない単糖類を希少糖と呼んでいる。我々は微生物やその酵素による転換反応を利用して、安価な天然型単糖から希少糖を生産するための研究を行ってきた。これまでの研究により、微生物由来の異性化酵素、微生物による酸化還元反応および化学的還元反応を組み合わせ、希少糖の生産戦略図であるイズモリングを構築した。希少糖は、医薬品中間体として注目されてきたが、近年、新たな生理作用に関する報告例が増加するにつれ、その有用性や応用についての関心が高まりつつある素材である。希少糖のさらなる利用・実用化のために、希少糖の生産効率の改善が求められている。

本研究では、希少糖の生産効率を改善するために、まず新規の希少糖生産酵素の獲得を目指した。続いてX線結晶構造解析により、獲得した酵素の構造を明らかにし、希少糖生産に還元し得る知見を得ることを目的とした。

1. 根粒菌由来のケトース3-エピメラーゼの獲得と諸性質の検討^{*1}

ケトース3-エピメラーゼは希少糖の生産における重要な酵素のひとつで、ケトースの炭素第3位の水酸基のエピ化反応を触媒し、天然型単糖であるD-フルクトースから生理作用が報告されている希少糖D-プシコースを一段階の反応で生産することができる。既知のケトース3-エピメラーゼとは特性の異なる新たな酵素を探索し、根粒菌*Mesorhizobium loti* Tono株由来のL-リブロース3-エピメラーゼを見出し、その組換え酵素の諸性質を明らかにした。本酵素は既知の酵素が6炭糖に最も高い活性を示すのに対し、5炭糖に最も高い活性を示すことを明らかにした。また、微生物酸化反応と固定化酵素を利用して、リビトールからL-キシロースを生産した。

2. L-リブロース3-エピメラーゼのX線結晶構造解析^{*2}

L-リブロース3-エピメラーゼは、既知の酵素と基質特異性が異なっていた。そのため、本酵素の構造を明らかにし既知の酵素の構造と比較することにより、今

後の希少糖生産に有用な知見が得られると考え、X線結晶構造解析を行った。L-リブローズ3-エピメラーゼの結晶を作製し、2.7Åの分解能で反射データを獲得、同酵素の構造を決定した。L-リブローズ3-エピメラーゼのモノマー構造は $(\alpha/\beta)_8$ Tim-barrel構造をしており、構造が既知の同ファミリーに属する酵素とよく類似していた。しかしながら、これらの酵素と比較して、本酵素はC末端領域の α -ヘリックスとそれに付随するループ領域が著しく長いことが明らかとなった。構造を詳細に検討した結果、この特徴的なC末端領域がL-リブローズ3-エピメラーゼの熱安定性に寄与していることを明らかにした。また、L-リブローズ3-エピメラーゼと既知の酵素の活性部位を比較し、基質特異性の相違について考察した。

3. 分子動力学(MD)シミュレーションによる酵素基質複合体の検討

酵素の触媒メカニズムや基質が配位した複合体の構造を理解することは、希少糖生産において、変異酵素を作製する際に重要な手がかりとなる。しかしながら、L-リブローズ3-エピメラーゼと基質の複合体の結晶は得られなかった。そこで、MDシミュレーションを利用して酵素基質複合体の挙動について検討した。MDシミュレーションの結果、活性部位を構成するいくつかのアミノ酸残基が基質特異性の決定に関与していることが示唆された。

4. 根粒菌由来のL-ラムノースイソメラーゼの獲得と諸性質の検討^{*3}

L-ラムノースイソメラーゼは、ケトース3-エピメラーゼと同様に希少糖生産において重要な酵素で、アルドース-ケトース間の可逆的異性化反応を触媒し、希少糖D-プシコースから、生理作用を持つ希少糖D-アロースを生産することができる。既知の酵素と異なる特性を持つ酵素の獲得を目指し、*M. loti*由来のL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子をクローニングし、組換え酵素を獲得し、その諸性質を明らかにした。本酵素は、*Pseudomonas stutzeri*由来の同酵素と高い相同性を示し、その諸性質も類似していた。また、微生物酸化反応と固定化酵素を利用して、ガラクトールから希少糖L-タロースを生産した。

本研究において、根粒菌*M. loti*由来のL-リブローズ3-エピメラーゼとL-ラムノースイソメラーゼを獲得し、その諸性質を明らかにするとともに希少糖L-キシロースとL-タロースを従来より効率よく生産することができた。また、L-リブローズ3-エピメラーゼの構造解析およびMDシミュレーションにより、今後の希少糖生産に有用な知見を得ることができた。

*1 Uechi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 511-515. (2013).

*2 Uechi *et al.*, *Acta Cryst.*, D69, 2330-2339. (2013).

*3 Takata *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1006-1009. (2011).