

(第5号様式)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	上地 敬子
審査委員	主査 高田 悟郎 副査 麻田 恭彦 副査 森本 兼司 副査 渡部 保夫 副査 芦内 誠

論文名

Relationships Between Structure and Activity of Rare Sugar Producing 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)

審査結果の要旨

希少糖は、天然にはまったく存在しないかごくわずかにしか存在しない単糖類、およびその誘導体の総称であり、大量に得るのが難しい糖が多く、きわめて高価な糖がほとんどである。一方、近年、さまざまな機能性が見出されるようになり、生理活性物質として注目されている。希少糖は、低カロリーの甘味料や虫歯予防に効果的な食品添加物として実用化されつつあるのをはじめ、自身の持つ抗酸化作用による臓器虚血保護作用、老化防止、抗がん、抗免疫物質として、あるいは抗菌作用や基質アナログ、グリコシダーゼ阻害剤の前駆物質といった広範囲の応用が期待される夢の糖であるといえる。

われわれは、希少糖を低コストで大量に生産するための研究を進めている。すでに、全希少糖の生産手順が明らかとなっているが、短い反応ステップでより希少性の高い糖、とくにL型単糖の生産は困難である。本研究では、*Mesorhizobium loti*の生産するL-リブロース3-エピメラーゼおよびL-ラムノースイソメラーゼの新規性、希少糖生産に対する優位性を明らかにするとともに、L-リブロース3-エピメラーゼの結晶構造および基質認識機構を明らかにした。本学位論文における研究成果の概要は以下のとおりまとめることができる。

まず、*M. loti*由来のケトース3-エピメラーゼの獲得と諸性質を明らかにした。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-ブ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*M. loti*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新規の酵素であることがわかった。また、本酵素を用いることで微生物酸化反応と固定化酵素を利用して、リビトールから希少糖L-キシロースの生産が可能となった。

次に、同酵素を結晶化しX線構造解析によりその結晶構造を明らかにした。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-リブロース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-リブロース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-リブロース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-リブロース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も明らかにした。また、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ので、MDシミュレーションを利用した酵素基質複合体の挙動を明らかにした。MDシミュレーションにより、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することを示唆する成果が得られた。

最後に、*M. loti*由来のL-ラムノースイソメラーゼの獲得と諸性質を明らかにした。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-アロースの生産に応用できる。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、その諸性質も類似することを明らかにした。また、本酵素を用いることで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-タロースの生産が可能となった。現在、本酵素においてもX線構造解析を進めているところである。

M. loti は、種々の希少糖生産の鍵酵素である2種類の重要な酵素である、ケトース3-エピメラーゼとL-ラムノースイソメラーゼをもつ初めての微生物である。したがって、希少糖の生産手順に適合させると、これらの酵素を用いれば、多くの希少糖が生産可能になるという重要な研究成果を得ることができた。ケトース3-エピメラーゼについてはX線結晶構造解析を行い、L-リブロースに強く作用するケトペントース3-エピメラーゼであることを初めて発見した。また、L-ラムノースイソメラーゼは*P. stutzeri*と同様に、生理活性希少糖D-アロースの大量生産に利用可能であると考えられた。このように希少糖の生産性を向上させ、生産コストを下げることによって、希少糖をもっと広く普及させるための優れた基盤的研究成果を得ることができた。

本論文の学位論文公開審査会は、平成26年2月1日に愛媛大学農学部において開催され、論文発表と公開審査会が行われた。引き続き、学位論文審査委員会が開かれ、論文の内容について審査した結果、審査委員全員一致して、本論文は博士(農学)の学位を授与するに値するものと判定した。