

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 寺見 優司
Name

学位論文題目： Reaction Mechanism of Rare Sugar-Producing L-Ribose
Title of Dissertation: Isomerase 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L-リボース
イソメラーゼの希少糖反応機構に関する研究)

学位論文要約：
Dissertation Summary

糖類の最小単位である単糖は、その構造的多様性から多くの種類が存在する。そのうち、自然界に多く存在する単糖類はD-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、D-キシロース、D-リボース、L-アラビノースの7種類しか存在しない。それら以外の自然界にほとんど存在しない単糖すべてを総称して希少糖と定義している。希少糖は我々の研究室が世界の中心となり、先駆けて研究開発を行ってきた糖類であり、微生物の酵素反応、酸化還元反応等を組み合わせ、希少糖生産戦略図（イズモリング）を構築した。イズモリングは全単糖の分子構造と生成酵素の関連性を体系化したものであり、イズモリングを利用することで、事実上すべての希少糖の生産が可能となった。さらには、一部の希少糖の大量生産が可能になったことで、希少糖には様々な生理活性があることがわかってきており、魅力的な研究素材として関心を寄せられている。このことから、すべての希少糖の応用研究・実用化に向けて、さらなる希少糖の生産能の向上が必要であると考えられる。本研究では希少糖生産効率改善を目的とし、希少糖の生産に不可欠な酵素のなかでも、L-リボースイソメラーゼに着目した。本酵素を大量に取得し、詳細な酵素学的諸性質を解明し、希少糖生産への応用を実際に希少糖を生産することにより検討した。本酵素の三次元構造を決定し、本酵素のユニークな反応触媒機構・安定性の解明を行った。以下に、それぞれについての研究成果を示す。

1. *Cellulomonas parahominis*由来L-リボースイソメラーゼの大量発現と諸性質の検討^{*1}

L-リボースイソメラーゼは、自然界にごくわずかしか存在しない単糖類およびその誘導体と定義される希少糖を生産するための重要な希少酵素と位置付けられており、これまでに、*Acinetobacter* sp. DL-28株が生産するL-リボースイソメラーゼの検討が行われてきた。しかし、本酵素の熱安定性は30°Cまでと低いため、スクリーニングによって新たに、*C. parahominis*を分離し、*C. parahominis*由来L-リボースイソメラーゼ遺伝子の全塩基配列決定を行ったところ、本遺伝子がORF 747 bpからなり249アミノ酸をコードし、推定分子量27,435 Daであることが分かった。また、遺伝子の相同性検索を行ったところ、*Geodermatophilus obscurus*由来推定タ

ンパク質と82%、*Acinetobacter* sp.由来L-リボースイソメラーゼと75%の相同性を確認できた。加えて遺伝子組換えを行い、組換えL-リボースイソメラーゼを大量に得ることで詳細な酵素学的諸性質の検討を行った。得られた組換え酵素の諸性質を調べたところ、至適pH 9.0、pHの安定性は7.0-10.0、至適温度40°C、熱安定性が40°Cまでと安定性に優れ、基質特異性は、L-リボースに対する活性を100%としたとき、D-リキソース (43.4%)、D-タロース (36.8%)、L-アロース (8.34%)、L-グルコース (2.27%)、D-マンノース (2.07%) に対して特異性を示すことが明らかとなった。加えて、*C. parahominis*由来L-リボースイソメラーゼ、および*Acinetobacter* sp. DL-28株由来L-リボースイソメラーゼの酵素反応速度を検討し比較を行ったところ、*C. parahominis*由来L-リボースイソメラーゼの方が、上記の基質に対して触媒効率が同等かそれ以上であり、基質特異性が広いことが示唆された。

2. L-リボースイソメラーゼ、化学的還元、微生物酸化反応を利用したL-アロース・D-タロースの生産^{*2}

C. parahominis 由来L-リボースイソメラーゼが熱安定性に優れ、広い基質特異性を有していることから、希少糖生産への応用を模索した。大量生産が可能となっている希少糖D-プシコースを出発原料とし、水素化ホウ素ナトリウムによる化学的還元と、*Gluconobacter thailandicus* NBRC 3254株を用いた微生物酸化反応を組み合わせL-プシコースおよびD-タガトースを生産した。還元反応では、100%反応が進み、D-プシコースの60%がアリトール、40%がD-タリトールに転換された。微生物酸化反応では、生産物であるL-プシコースとD-タガトースにはほぼ完全に転換された。次に、固定化L-リボースイソメラーゼを用いて、10% L-プシコース、10% D-タガトースを基質としてバッチ式にて反応を行った結果、それぞれ、約33.0%、13.0%がL-アロース、D-タロースに転換された。固定化L-リボースイソメラーゼの繰り返し反応時間の検討を40°Cにて行ったところ、150時間程度繰り返し反応が可能であると分かった。また、*Acinetobacter* sp. DL-28株由来L-リボースイソメラーゼも同様に固定化し、固定化酵素の再利用を30°Cにて検討した結果、約70時間後にはほぼ失活していた。これらの結果より、*C. parahominis*株由来の固定化L-リボースイソメラーゼを用いることで、より長い時間、連続的に生産反応が行えるという知見が得られた。

3. L-リボースイソメラーゼのX線結晶構造解析^{*3}

組換えL-リボースイソメラーゼの酵素学的諸性質より、本酵素は既知の同酵素と相同性が高いにも関わらず、基質特異性が広いことが明らかになった。この要因を明らかにすることは、今後の希少糖生産のための重要な知見が得られると考え、本酵素のX線結晶構造解析に取り組んだ。精製酵素を調整し、30 mg/mlまで濃縮し、結晶化のスクリーニングを行い、最終的に0.1 M sodium acetate trihydrate (pH 4.6)、3.9 M ammonium acetate、ハンギングドロップ蒸気拡散法により良質な結晶を

作成できた。高濃度の基質溶液に数秒浸した結晶を用いて、データ収集・構造解析を行ったところ、基質複合体構造（L-リボース、L-アロース、L-プシコース）の構造も得られた。本酵素はcupin-type β -barrelと呼ばれる構造をしており、互いに面した大きな β シート間に活性部位が存在した。基質酵素複合体構造から、活性部位には金属イオンが配位し、Glu113およびGlu204が触媒に関与していることが示唆された。また、Glu211およびArg243は基質の結合において柔軟に動くことにより、単糖のC4、C5位の様々な立体配置の認識（D-リキソース、D-タロース、L-アロース等）を許容していることが分かった。この柔軟性こそが、本酵素の基質特異性の広さにつながっていると考えられた。さらに本酵素は四量体であるが、活性部位はそれぞれのサブユニットの中心に形成され、他のサブユニットからのアミノ酸残基が関与しておらず、四量体形成の生物学的意味が不明である。サブユニット間で相互作用しているアミノ酸残基に変異を導入し、四量体を形成できない変異酵素（E17A、S20W、A24W、R26A、およびPhe42からGlu61を除去した酵素）を作成した。変異酵素のゲル濾過の結果、四量体は部分的に二量体に解離していることが確認でき、二量体が増えるにつれ、L-リボースイソメラーゼの酵素活性も減少しており、酵素活性の維持には四量体形成が必要であることが示唆された。

4. 結論

本研究の成果により、*C. parahominis*由来L-リボースイソメラーゼを大量に獲得した。酵素学的諸性質を詳細に検討するとともに、希少糖D-プシコースから希少糖L-アロースおよびD-タロースまでの大量生産を行った。また、L-リボースイソメラーゼの結晶構造解析により、基質の認識に関するユニークな知見が得られ、今後の希少糖生産に大いに役立つことが期待される。

*1 : Morimoto *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **115**(4): 377-381. (2013)

*2 : Terami *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**(10): 1725-1729. (2015)

*3 : Terami *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**(15): 6303-6313. (2015)