

(第5号様式)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	寺見 優司
審査委員	主査 高田 悟郎 副査 森本 兼司 副査 渡部 保夫 副査 芦内 誠 副査 神鳥 成弘

論文名

Reaction Mechanism of Rare Sugar-Producing L-Ribose 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)

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、*Cellulomonas parahominis* の生産するL-リボ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-リボースイソメラーゼの結晶構造および触媒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、*C. parahominis*由来のL-リボースイソメラーゼの獲得と諸性質を明らかにした。L-リボースイソメラーゼは希少糖の生産における重要な希少酵素のひとつで、L-リボース・L-リブローズ間の可逆的異性化反応を触媒し、L型の希少糖を含む様々な希少糖の生産に用いることができる。すでに発見されている既知の酵素の熱安定性は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、遺伝子組換えを行って、組換えL-リボースイソメラーゼを生産した。本酵素は、熱安定性が40°Cまでと安定性に優れ、基質特異性は、L-リボースのほか、D-リキソース、D-タロース、L-アロース、L-グロース、D-マンノースに対して特異性を示すことが分かった。

次に、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。次に、固定化L-リボースイソメラーゼを用いて、L-プシコース、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、L-アロース、D-タロースに転換された。また、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行ったところ、150時間程度繰り返し反応が可能であり、これらの希少糖の大量生産が可能となった。

最後に、本酵素を結晶化しX線構造解析によりその結晶構造を明らかにした。本酵素はcupin-type  $\beta$ -barrelと呼ばれる構造をしており、互いに面した大きな $\beta$ シート間に活性部位が存在する。基質酵素複合体構造から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を許容していることが分かった。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。

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28年2月6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。