

氏名(本籍)	く の あつし 久野 敦(茨城県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	博乙第1838号
学位授与年月日	平成14年4月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Studies on the Structure-Function Relationship of Xylanases from <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> E-86 (放線菌由来キシラナーゼの構造機能相関に関する研究)
主査	筑波大学教授 農学博士 日下部 功
副査	筑波大学併任助教授 農学博士 小林 秀行
副査	筑波大学教授 理学博士 山根 國男
副査	筑波大学併任教授 薬学博士 水野 洋

論文の内容の要旨

本研究は、これまでに詳細に基質特異性が解明されている放線菌由来キシラナーゼの遺伝子を単離し、その構造を解明すると同時に、遺伝子工学的手法を駆使して本酵素の反応機構を解明、及び今まで存在が未知であった基質結合ドメインの諸性質を解明し、最終的には本酵素の構造機能相関を明らかにすることを目的として行った。また、今まで研究対象となっていたものとは異なるファミリーのキシラナーゼを同一の放線菌から単離することに成功し、その遺伝子のクローニングと、配列の決定も行った。

まず第1章では、FXYNとGXYNの構造機能相関の解明を最終目的として、FXYNのクローニングとGXYNの精製、その性質と基質特異性の解明、及びクローニングを試みた。精製したGXYNの分子量は約23,000、至適pHは6.0であった。次に *fxyn* 及び *gxyn* のクローニングを行った結果、*fxyn* 遺伝子と *gxyn* 遺伝子はそれぞれ1431bpと696bpからなり、477個と232個のアミノ酸をコードしていた。また、FXYNはファミリーFに属する触媒ドメインとファミリー13に属する基質結合ドメインから構成され、GXYNはファミリーGに属する単一の触媒ドメインから構成されていた。さらに、*gxyn* 遺伝子のすぐ下流には681bpのORFが存在し、アセチルキシランエステラーゼ遺伝子 (*axe*) であることが明らかになった。このようなクラスター遺伝子の形成は、*S. lividans* 由来の *xln B* 遺伝子と *axe* 遺伝子間にも見られ、興味深いことに、*S. olivaceoviridis* 由来のGXYNとAXEの両酵素は基質結合ドメインを持たないのに対し、*S. lividans* 由来のものは両酵素とも相同性の高い基質結合ドメインを有していた。

第2章では、FXYNの触媒機構の解明を最終目的として、部位特異的変異法により、活性中心である2つのGlu (E128, E236) をそれぞれHisに置換した変異型酵素 (E128H, E236H) を作製し、その反応速度論的解析を行った。CDスペクトルの測定結果から、アミノ酸の置換がタンパク質のフォールディングに影響を与えていないことを確認後、pNP-X₂を基質として、野生型及び変異型酵素の反応速度論的解析を行ったところ両変異型酵素とも *k_{cat}* 値は2,000分の1以下に減少していたが、変異型酵素E128Hの *K_m* 値は1,000分の1に減少しており、E128Hは野生型酵素より基質との結合能が上昇していることが明らかになった。

第3章では、FXYNの触媒ドメインの構造機能相関をさらに解明するために、同じファミリーに属するが特異性が異なる、*Cellulomonas fimi* 由来 *Cex* とFXYNの分子の一部をモジュール・シャッフリング法を用いて入れ替えた変異型酵素を作製し、反応速度論的解析を行い、その影響を調べた。今回は酸塩基触媒 (E128) を有し、ま

た基質結合に関与するアミノ酸残基も含むモジュール10に着目してシャッフルを行った。その結果、モジュール10領域は、FXYNの基質特異性に大きく影響を与えていることが明らかになった。

第4章では、FXYNのC末端側に位置している機能ドメイン、基質結合ドメイン(XBD)の酵素反応における役割と、その糖結合特性について検討し、XBDは不溶性キシランに選択的に結合し、キシラン付近の酵素濃度を高くし、分解能を向上させる役目があることを明らかにした。また、XBDは3糖単位でキシランを認識し、さらにXBDの結合ポケットはキシロビオースとラクトースでは異なる結合様式で結合することが示唆された。

本研究における構造解析で新たに発見されたXBDは、リシンB鎖を代表するレクチン群と非常によく類似した構造をしており、糖との結合に必須であるアミノ酸もよく保存されているが、その結合特性は全く異なっていた。この差異を解明することは今後の課題であると同時に、それが解明された後にXBDの糖結合ポケットを自由自在にデザインし、ある細胞の表層に存在する糖鎖へ特異的に結合するレクチンの創出を実現させることで、ドラッグデリバリーなどの応用分野への利用拡大が期待される。

審査の結果の要旨

放線菌E-86のfamily Fキシラナーゼの酵素化学的性質や特異性は他の酵素と比較しても非常によく研究されているが、酵素の構造と特異性については不明な点が多い。また、基質結合ドメインの有無と機能も不明であった。このような現状から申請者は同菌のキシラナーゼの立体構造や反応機構の解明、基質ドメインの性質を解明し、酵素の立体構造と機能の相関を明らかにする研究を行っている。酵素の結晶解析や遺伝子工学的手法を駆使して研究を行った結果、E-86株はのfamily FとGの2種類の酵素を生産し、前者は触媒ドメインと基質結合ドメインからなるが、後者は触媒ドメインのみから成っていることを明らかにした。

family Fの触媒機構を解明する目的で、Glu(E128, E236)をHis(E128H, E236H)に置換した結果、E128Hは野生型酵素よりも基質結合能が上昇した。一方、基質結合ドメインは不溶性キシランに選択的に結合し、キシラン付近の酵素濃度を高くし、分解能を高めた。このドメインは三糖単位でキシランを認識した。本酵素の一次および三次構造を解明した一連の研究成果は酵素化学の発展に大きく寄与し、高く評価できる。これ迄に糖質関連酵素の特異性の解明は構造既知の糖質に酵素を作用させて解析する以外に方法はなかったが、申請者の研究成果から特異性の類推が可能になると思われる。この研究の更なる発展と酵素の実用化に期待する。

よって、著者は博士(学術)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。