

2021 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

## 研究成果報告書

## (1) 事業名 共同研究員

## (2) 研究代表者

氏名：三宅 英雄

所属機関名・部局名・職名：三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

## (3) 研究課題名：微生物が生産する糖質関連酵素の構造と機能解析

## (4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：栗栖 源嗣 教授 (研究室名：蛋白質結晶学研究室)

## (5) 研究成果の概要 (公開)

糖質およびそれを含む生体分子の機能は、大別すると、デンプンやグリコーゲンなどのエネルギー貯蔵体、セルロースやヘミセルロースのような固いものやペクチンや種々の海藻由来多糖のように柔らかいものを含めた生物の構造支持体、細胞表面の糖タンパク質や糖脂質など、分子認識や細胞間認識のような高次の機能をもつものなどがある。このように多彩な糖質の機能は、その構造的な多様性に起因する。それに伴って、糖質を合成・分解する酵素も複雑な分子進化を経て、多様性を獲得してきた。これらの酵素は、グリコシド結合の切断および生成を触媒する点は共通であるが、その触媒メカニズムは様々であり、近年ではそれら酵素が共役的に働くことで相乗効果が見られるなど構造生物学的に解明されていない点が多い。そこで本研究では、①*Clostridium* 属が生産する「セルロソーム」と呼ばれるセルラーゼやヘミセルラーゼなどから構成される超高分子複合体の構造と機能に関する研究、②糖質加水分解酵素ファミリー30 (GH30) の構造と機能に関する研究、③エキソ型アルギン酸リアーゼの生成物の特徴と触媒機構に関する研究について行った。

①に関しては、*Clostridium cellulovorans* が生産するマンナーゼ A (ManA) とセルロソーム骨格タンパク質 CbpC の相互作用解析を行った。野生型である ManA, ManA の 45 番目の Ser を Ala に置換した ManA\_S45A, CbpC を作製し、等温滴定型熱量計を用いて相互作用解析を行った。ManA と CbpC、ManA\_S45A と CbpC の熱力学的パラメータを算出した結果、両者ともエントロピー駆動型の結合を示した。しかしながら、 $K_d$  の値は ManA と比べ ManA\_S45A は約 100 倍低い結合力を示した。これらの結果から ManA の Ser45 は CbpC との相互作用において重要であることが分かった。②に関しては、*Caldicellulosiruptor bescii* が生産する GH30 の  $\beta$ -1,6-グルコシダーゼの結晶を得ることに成功した。③に関しては、*Falsirhodobacter* sp. alg1 が生産する PL15 の AlyFRB と *Saccharophagus degradans* 2-40 が生産する PL17 の Alg17C の生成物を経時的に追跡し、それらの生成物の特徴から触媒機構の推定を行った。同じエキソ型アルギン酸リアーゼでも両者の触媒機構は異なり、AlyFRB は、 $\beta$ -脱離反応における不飽和ウロン酸の生成と不飽和ウロン酸の開環反応の両方の触媒機構を備えていることが分かった。