



Title	Reaction mechanism of glycosidases by studying 1,5-anhydro-D-fructose production [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Maneesan, Janjira
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第11540号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/57176">http://hdl.handle.net/2115/57176</a>
Rights(URL)	<a href="http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Janjira_Maneesan_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野名称      博士（農学）      氏名    Janjira Maneesan

審査担当者    主査    教授    木村   淳夫  
                  副査    教授    森     春英  
                  副査    准教授 松浦   英幸  
                  副査    講師   奥山   正幸

### 学位論文題名

Reaction mechanism of glycosidases by studying 1,5-anhydro-D-fructose production

(1,5-アンヒドロ-D-フラクトース生成によるグリコシダーゼの反応機構の究明)

本論文は英文69頁、図23、表4、6章からなり、参考論文3編が付されている。

糖質酵素には2つの反応機構モデルが提案されている。すなわち、二重（あるいは一重）求核置換反応機構およびオキソカルベニウムイオン中間体反応機構である。現在は、前者が広く信じられている。一方、糖質酵素の触媒反応は両機構から説明できるため、その推定には明白な実験事実が重要である。

幾つかの糖質酵素が glycoside hydrolase family (GH) 31 に分類され、 $\alpha$ -1,4-glucan lyase (GLase) と  $\alpha$ -glucosidase (AGase) は本グループの構成員である。従って、AGase と GLase のアミノ酸一次配列は 23~28%の類似を示し、触媒アミノ酸も一致する。阻害剤特異性や基質特異性にも共通性が見られる。しかしながら、AGase と GLase が示す酵素反応は異なり、前者は加水分解反応を触媒し glucose を遊離するのに対し、後者は脱離反応を触媒し 1,5-anhydro-D-fructose (AF) を生成する。これらの知見は、GH31 型の AGase が脱離反応を行い、AF を産することを示唆している。本研究の目的は GH31 AGase が触媒する反応における AF 生産の究明である。

#### (1) AF 生産の解析

AGase は主に加水分解反応を触媒するので、脱離反応の頻度は少ないと考えられた。従って、生成する AF は微量と予想されたため、LC-MS-MS を利用した分析を行った。本手法には内部標準である  $[^{13}\text{C}]\text{AF}$  が必要であり、 $[^{13}\text{C}]\text{starch}$  に GLase を作用させて調製した。 $[^{13}\text{C}]\text{AF}$  はゲル濾過および HPLC で精製した。AF は互変異性化を生じかつ不安定なため、

オキシム誘導体 ( $[^{13}\text{C}]\text{AF-OX}$ ) に導き、LC-MS-MS で分析した。GH31 型の AGase は、*Aspergillus niger* 由来の野生型酵素 (ANGase) を用いた。

## (2) ANGase が示す AF の生成

ANGase を基質であるマルトオリゴ糖 (マルトース~マルトヘキサオース) に反応させ、オキシム誘導体化の処理を行い経時的に AF の生成量 ( $[^{12}\text{C}]\text{AFOX}$  の量) を調べた。用いたいずれの基質においても glucose 生産と比べ微量ではあるが明白な AF 産生が認められ、経時的に増加した。従って、ANGase (GH31 型の AGase) が脱離反応を触媒し、AF を生成することが初めて明らかにされた。また、細菌由来の AGase も同様に AF を産することが判明した。

AF の生成は反応機構に深く関係していると考えられる。冒頭でも述べたが、糖質酵素には求核置換反応機構 (共有結合形成で反応が進行) およびオキソカルベニウムイオン中間体反応機構 (イオン結合形成で反応が進行) が提唱されている。ANGase が後者の機構に従い反応を触媒するならば、オキソカルベニウムイオンの酸素原子が正に荷電した際に、2位水素が引き抜かれ、容易に AF が生成される (2位水素の摘出は、触媒アミノ酸の酸性残基あるいは水分子からの水酸イオンによると予想)。しかしながら、求核置換反応機構ではこのような2位水素の引き抜きは困難である。従って、ANGase はオキソカルベニウムイオン中間体反応機構により進行すると推察された。

本研究は、GH31 に属する2つの酵素 (AGase と GLase) が異なる反応を触媒する点に着眼し、GLase が示す脱離反応 (AF 生成) を AGase が行うか否かを検証した。微量な AF の定量測定に成功し GH31 型の AGase が AF を生産していることを発見した。当該糖質加水分解酵素が AF 生成を行うことは、その反応がオキソカルベニウムイオン中間体反応機構に従っていることを暗示し、機構推定に関わる新たな結果を取得できた。以上のように本研究は、糖質加水分解酵素に関し、学術的に貴重な多くの新規な知見を提供した。

よって審査員一同は、Janjira Maneesan が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。