



Title	Structure-function relationship of fungal α -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 31 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	宋, 敬模
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11101号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53954
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Song_Kyung_Mo_review.pdf, 「審査の要旨」



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野名称 博士（農学） 氏 名 Song, Kyung-Mo

審査担当者 主 査 教 授 木村 淳夫
副 査 教 授 森 春英
副 査 講 師 奥山 正幸

学位論文題名

Structure-function relationship of fungal α -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 31
(Glycoside hydrolase family 31 に属する真菌類由来 α -glucosidase の構造と機能に関する研究)

本論文は英文 146 頁、図 47、表 22、7 章からなり、参考論文 2 編が付されている。

2 つの真菌類由来の α -glucosidase、すなわち *Podospira anserina* 由来の酵素（PAG）と *Schwanniomyces occidentalis* 由来の酵素（SOG）は、アミノ酸配列の類似性から glycoside hydrolase family 31 に分類される。しかし、PAG は α -1,3-と α -1,4-グルコシド結合を加水分解反応や糖転移反応で認識し、切断・生成するのに対し、SOG は α -1,4-グルコシド結合をよく加水分解し、糖転移作用では α -1,4-と α -1,6-グルコシド結合を合成する。本研究では、これらの相違を支配する構造因子を明らかにするため、構造と機能の関係究明を行った。

（1）PAG の精製と性質解明

組換え PAG（C 末端に His タグを有する）は、加水分解と糖転移の両反応において α -1,3-と α -1,4-グルコシド結合に対し高い構造親和性を示し、 α -1,3-結合への転移能が強かった。しかし、培養中に protease による限定分解が生じ、2 つのサブユニットに分断された。そこで、Native 酵素の精製を試みた。可溶性澱粉を炭素源とした培地で *P. anserina* を培養し、培養液から精製酵素を得た。Native 酵素は、組換え酵素と同様な α -1,3-と α -1,4-結合への高親和性を有しており、培養上清に nigerose と maltose を生成した。一方、精製 Native 酵素に関しても 2 サブユニットへの分断が認められ、両サブユニットの N 末端アミノ酸配列は組換え PAG のものと一致した。そこで、protease 切断サイトを予測し、1 アミノ酸置換法で他のアミノ酸に変え、分解がない全長を有する組換え PAG を取得した。性質を調べ比較すると切断型酵素と同一であり、protease 切断は性質に影響を与えないと判断された。

(2) SOG W324Y が示す糖転移反応の性質解明

SOG は加水分解反応で広い基質特異性を示し、糖転移反応では α -1,4-と α -1,6-グルコシド結合に対し高い構造親和性を有する。我々のこれまでの研究において、Trp324 が α -1,6-結合の加水分解反応に重要であることが解明されていたが、糖転移作用への影響は調べられていなかった。本研究では W324Y を構築し、糖転移反応に対する特異性を解明した。

100 mM maltose に対する転移反応において W324Y は α -1,2-と α -1,4-結合を構築し、 α -1,6-結合の形成能を消失した。すなわち、Trp324 は α -1,6-結合への加水分解反応ならびに転移反応に重要であることが認められた。また、W324Y は新たな転移糖を生成することが認められ、構造解析の結果、2,4-di-*O*-(α -D-glucopyranosyl)-D-glucopyranose であった。

(3) アミノ酸置換法を用いた SOG と PAG の構造-活性相関

SOG と PAG は高い配列相同性を有するが、反応の構造特異性が異なる。両酵素の一次構造比較ならびに human maltase の立体構造に基づいた点突然変異を SOG の活性部位に行った。human maltase の活性ポケットは、(β/α)₈ ドメイン、インサート 1 およびインサート 2 (それぞれ、 β_3 と α_3 間および β_4 と α_4 間から長く突き出した領域) および N ループ (N 末端ドメインから延びたループ) から形成されている。変異を β_3 、 $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 1、 $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 2、 $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 8、インサート 2 および N ループに発生させた。変異体の速度パラメーターや転移反応を解析した結果、 α -1,6-グルコシド結合や α -1,3-グルコシド結合への認識に寄与する構造因子が明らかになった。

本研究は、アミノ酸配列において高い相同性を示す 2 つの真菌類由来の glycoside hydrolase family 31 α -glucosidase (PAG と SOG) を取り上げ、PAG についてはプロテアーゼによる限定分解 (翻訳後修飾) の活性に対する影響を明らかにした。両酵素の加水分解作用と糖転移作用の立体構造特異性における相違を究明し、 α -1,6-グルコシド結合および α -1,3-グルコシド結合への認識に関与する構造因子を解明した。 α -1,3-結合を有する nigerose や α -1,6-結合を有する isomaltose の生産はオリゴ糖産業において重要である。以上のように本研究は、真菌類由来の GH31 酵素に関し、学術的ならびに産業的に貴重な多くの新知見を提供した。

よって審査員一同は、Song, Kyung-Mo 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。