



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Structure-function relationship of fungal α -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 31 [an abstract of entire text]
Author(s)	宋, 敬模
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/53955
Type	doctoral thesis
File Information	Song_Kyung_Mo_summary.pdf



学位論文内容の要約

博士の専攻分野名称：博士（農学）

氏 名： Song, Kyung-Mo

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)

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-グルコシド結合を生成する。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した。

（１）PAG の精製と性質解明

組換えPAGは、異種宿主発現中に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

生成し、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。