HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Dextran dextrinaseの触媒機構および細胞局在性の解明［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	貞廣, 樹里
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11816号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58652
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Juri_Sadahiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学）　　氏名　　貞廣　樹里

学位論文題名

Dextran dextrinase の触媒機構および細胞局在性の解明

酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* ATCC 11894 は dextran 合成酵素 dextran dextrinase (DDase)の唯一の生産菌である．当該菌株は dextrin および glucose 添加培養により，それぞれ菌体外および菌体内に DDase を産すると報告された．本酵素はマルトオリゴ糖に作用し，その非還元末端α-(1→4)-グルコシル基を受容体へ連続的にα-(1→6)-転移することにより，多糖 dextran を合成する．すなわち，生成物において立体配座が保持される機構により反応を触媒する．既に菌体外 DDase 遺伝子が単離され，その一次配列が決定された．興味深いことに, DDase は glucoamylase や glucodextranase のような立体配座の反転型の加水分解酵素 [いずれも glycoside hydrolase family (GH) 15 に属す] と類似する配列を有していた．本研究では, DDase の触媒機構および細胞局在性を究明することを目的とした．

（１）組換え菌体外 DDase の生産と諸性質の解析

大腸菌による組換え菌体外 DDase の生産を行い，効率的な回収に成功した．DDase の反応初期生成物をイオン交換型 HPLC で定量し, 初速度の算出を行った. DDase は maltotetraose (4 糖) を基質とした場合，maltotriose（3 糖）および maltopentaose（5 糖）のみを生成した．菌体外 DDase は，α-(1→6)-転移のみを示すと報告されていたが，既報とは異なり，反応初期にはα-(1→4)-転移のみを触媒した．温度や pH の活性および安定性に与える影響は天然酵素に類似した．DDase は強い遠心力を与えると凝集・不溶化する性質を示したが， 界面活性剤などの添加により，活性を維持した状態で不溶化が改善された．

（２）活性ドメインの推定および触媒残基の機能解析

DDase は 3 次構造予測から，5 つのドメイン構造 (N1，N2，A，B および C) を有すると推測された．このうち，N2，A および B ドメインは，それぞれ glucodextranase の N，A (触媒ドメイン) および B ドメインと類似性を示した．欠失変異酵素の解析により，N1，N2 および A ドメインが DDase の活性に必須であった．この A ドメインには，glucodextranase および glucoamylase で保存されている, 活性部位形成残基および 2 つの触媒残基 (酸性アミノ酸) が認められた．従って，反転型 GH 15 酵素の一般酸触媒および一般塩基触媒残基に相当するアミノ酸が，保持型酵素の DDase においてそれぞれ一般酸塩基触媒および求核触媒残基として作用すると予想された．これらの候補に変異を導入すると，マルトオリゴ糖に対する活性を失った. 前者の Asn 置換酵素では maltotetraose に対する基質特異性 (k_{cat}/K_m 値)

が著しく低下した (親酵素の約 10^{-6} 倍). しかし，触媒にプロトン化要求性の低いα-glucosyl fluoride に対しては，maltotetraose ほどの影響を受けず，親酵素の約 10^{-2} 倍となった．親酵素はβ-glucosyl fluoride を基質としなかったが, 後者の候補にかさの小さな非求核性のアミノ酸を導入すると，β-glucosyl fluoride をグルコシル供与体とし isomaltotriose への転移反応を触媒した．これらの事実から，前述の両候補はそれぞれ酸塩基触媒および求核触媒残基として機能することが示された．従って，DDase の A ドメインは触媒ドメインであり，反転型 GH 15 酵素と類似した触媒構造を利用しながらも，保持型転移反応を行うことがわかった．但し，保持型反応機構の DDase では求核触媒残基が反転型酵素の塩基触媒残基よりもアノメリック炭素に近いこと予想され，塩基触媒近傍の構造が他の GH 15 酵素と異なると考えられる．

（３）dextran 合成機構

DDase はマルトオリゴ糖を供与体や受容体として連続的なα-(1→6)-転移により dextran を合成する．しかし，反応初期にはマルトオリゴ糖の不均化反応 [受容体へのα-(1→4)-転移; 平均重合度を変化させずに短鎖と長鎖の生成物を合成する反応] が優先的に行われ, 受容体への連続的なα-(1→6)-転移は確認されなかった．すなわち，dextran に至るまでの中間的なα-(1→6)-オリゴ糖が検出されなかった. 非還元末端にα-(1→6)-グルコシル基を有す様々な分子種は受容体として微弱であり，連続的なα-(1→6)-転移を受けなかった．従って，1 回の反応ごとに酵素から生成物が遊離する non-processive な伸長反応ではなく，生成された受容体が酵素に結合したまま，鎖長伸長される processive 機構と判明した．

（４）菌体外と菌体内 DDase の同一性と培養による細胞局在性の変化

菌体外と菌体内 DDase は，基質への初期反応，受容体特異性や分子量も異なると報告されている．しかし，両 DDase は類似した触媒作用を示し，蛋白質解析から同一であることが示された．また，菌体内 DDase は，本菌のスフェロプラスト作製や *n*-butanol 抽出から細胞表層に局在することが明らかになった．DDase は遊離型として培養上清に，結合型として表層に局在するが，培養初期の glucose 存在下では遊離型のみであり，glucose が枯渇すると表層結合型となり蓄積した．従って，培養時期により，局在性の変化が観察された．

（５）菌体からの DDase 遊離因子および菌体との結合領域

これまで，遊離型や表層結合型 DDase は培地の炭素源を変えて調製されてきた（それぞれ，dextrin や glucose の添加培養）．このような観察から，本研究では炭素源を遊離因子と予想し，酵素の遊離実験を行った．最も効果的であったのは maltotetraose であったが，阻害剤 acarbose 存在下で遊離に至らず，生成物の dextran が直接的な遊離因子と判明した．菌体と組換え酵素との結合実験から，C 末端に結合領域があることが示された．従って，遊離型となる dextrin 添加培養では, 生成物の dextran の結合阻害のため細胞表層に結合できないが, glucose 培養では dextran の合成がないため，細胞表層に結合すると結論づけた．