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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野名称　博士（農学）　氏 名　貞廣 樹里

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
副 査　助 教　佐分利 亘

学位論文題名

Dextran dextrinase の触媒機構および細胞局在性の解明

本論文は、和文 151 頁、図 66、表 10、7 章からなり，参考論文 2 編が添えられている．

dextran はα-1,6 グルコシド結合を主鎖とする多糖であり，研究分野・医薬・食品・化粧品などの産業分野で利用がある。酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* 由来 dextrin dextranase (DDase) は α-1,4 結合からなる maltodextrin の非還元末端から順次グルコシル基を転移し dextran を形成する反応を触媒する．DDase は立体配座の保持型酵素であるが，反転型の加水分解酵素に類似する配列を有している．本研究では，DDase の触媒機構および細胞局在性の究明を目的とした．

（１）組換え菌体外 DDase の生産と諸性質の解析

大腸菌で生産した組換え菌体外 DDase を用いて動的解析や生成物分析を行った．DDase は maltotetraose (G4) から maltotriose と maltopentaose を生成した．すなわち，反応初期にα-(1→4)-転移のみを触媒し，既報と異なる結果が得られた．基本的性質は天然酵素に類似した．強い遠心力で形成される DDase の不溶体は，界面活性剤の添加で活性を維持した状態で可溶化された．

（２）活性ドメインの推定および触媒残基の機能解析

DDase は構造予測から５ドメイン（N1，N2，A，B と C）を有すると推測され，欠失実験から前３者が酵素活性に必須であった．A ドメインには配列類似酵素（反転型酵素）の活性部位形成残基および２つの触媒残基が認められた．触媒アミノ酸〔酸塩基触媒残基 (AB) と求核触媒残基 (NU)〕の候補に変異を導入すると，酵素活性を失った．AB の Asn 置換酵素では G4 に対する活性が著しく低下した（親酵素の約 10^{-6} 倍）が，触媒にプロトン化要求性の低い α-glucosyl fluoride に対しては，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，NU の候補にかさの小さな非求核性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．以上の結果から，前述の候補は AB や NU として機能することが示された．従って， A ドメインは触媒ドメインであり，反転型酵素に類似した触媒構造を利用し，保持型転移反応を行うことがわかった．

（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が優先的に行われ，連続的な α-1,6 転移は確認されなかった．また，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，鎖長伸長する processive 機構で dextran が生成されると判断した．

（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

菌体外と菌体内に存在する DDase は異なるとの報告があるが，両者は反応や蛋白質特性が同じであり同一酵素と判断した．菌体内 DDase は細胞内ではなく細胞表層に局在した．一方，培養初期の glucose 存在下では遊離型（菌体外）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が変化した．

（５）菌体からの DDase 遊離因子および菌体との結合領域

菌体からの DDase の遊離を調べ，生成物の dextran が直接的な遊離因子と判定した．菌体と組換え酵素との結合実験から，C 末端に結合領域が存在した．従って， dextrin 培養で生産される dextran が結合を阻害するため細胞表層に結合できないが，glucose 培養では dextran 合成がないため，細胞表層に結合すると結論した．

以上のように本研究は，DDase の初期反応や諸性質を詳細に解析した後，初めて触媒残基の決定や機能解析に成功した。本知見から触媒機構（保持型転移）ならびに活性ドメインを推定できた。また，dextran に至るまでの鎖長伸長が processive 機構によることを提唱した．さらに，細胞局在性に関しては，菌体内外の酵素が同一であり，局在性の変化機構を解明した．表層結合型 DDase（すなわち菌体内酵素）の遊離因子および菌体との結合領域を明らかにした．これらの点は，dextrin dextranase に関し学術的に重要な基礎的知見を提供した．

よって，審査員一同は，貞廣樹里が博士（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．