



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Catalytic mechanism of three α -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 31 [an abstract of entire text]
Author(s)	馬, 旻
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12880号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67837
Type	doctoral thesis
File Information	Min_Ma_summary.pdf



博士論文の要約

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 Min Ma

学位論文題名

Catalytic mechanism of three α -glucosidases belonging to
glycoside hydrolase family 31

(Glycoside hydrolase family 31 に属する 3 つの α -glucosidase の
触媒機構に関する研究)

1. 諸論

α -グルコシダーゼは基質の非還元末端にある α -グルコシド結合をエキソ様式で加水分解する糖質酵素である。また、基質の高濃度では α -グルコシド結合の合成反応を同時に触媒する。後者の合成反応は「糖転移作用」として知られ、産業上において有用なオリゴ糖の製造に使用されている。例えば、プレバイオティック効果を示すパノースやイソマルトオリゴ糖あるいは免疫機能を促進するニゲロオリゴ糖の生産が挙げられる。従って、 α -グルコシダーゼの反応機構を究明することは、効率的なオリゴ糖生産の確立に貢献する。本研究は、3 つの微生物 α -グルコシダーゼ (AgdA、AgdB および McAG31) を取り上げ、それらの触媒機構を究明した。特に AgdA については糖転移機作を対象に、また AgdB と McAG31 については両酵素に観察されたユニークな現象を対象に解析を行った。

2. AgdA の糖転移反応特異性を制御する構造因子

2-1. 課題設定：

Aspergillus niger の染色体には、AgdA と AgdB をコードする遺伝子があり、それぞれ染色体-6 および染色体-2 に存在する。従って、両者はアイソザイムとなる。AgdA はその糖転移作用で、パノースやイソマルトオリゴ糖 [α -(1 $\rightarrow$ 6)-グルコオリゴ糖] を工業生産することが知られている。しかし、本作用の反応初期に関するデータがないこと、また、糖転移反応を制御する構造因子（タンパク質機能を発揮するアミノ酸や配列などの部分構造を意味する科学用語）が不明であることなど、重要な知見が欠落している。本研究では、これらの問題点を解決することで AgdA の産業利用をさらに促進することを目的として、解析を行った。

2-2. 方法：

AgdA mRNA から cDNA を取得した後に、*Pichia pastoris* を用いて組換え酵素を生産した。また、生成オリゴ糖は薄層クロマトグラフィーによる定性分析およびイオン交換型カラムを備えた高感度高速液体クロマトグラフィーによる定量分析を用いて解析した。後者の手法で、マルトースを基質にした際の糖転移率を次式により求めた： $R_{\text{tg}} = v_{\text{tg}} / (v_{\text{h}} + v_{\text{tg}}) \times 100 = 2 \times v_{\text{tg}} / (v_{\text{glc}} + v_{\text{tg}}) \times 100$ 。本式において R_{tg} は糖転移率、 v_{tg} は転移速度、 v_{h} は加水分解速度、 v_{glc} はグルコースの生成速度、である。

2-3. 結論・考察：

まず、野生型 AgdA が示す糖転移の初期反応について、マルトースを基質に用いて解析する

と、 α -(1 $\rightarrow$ 6)-型の他に、 α -(1 $\rightarrow$ 4)-型の転移反応を行っていることが判明した。AgdA は、 α -(1 $\rightarrow$ 6)型転移で α -(1 $\rightarrow$ 6)-グルコオリゴ糖を生産することが知られていたが、 α -(1 $\rightarrow$ 4)型に転移する能力を初めて見出した。

類縁酵素の立体構造から、糖転移反応を制御するアミノ酸残基を予想した。すなわち、サブサイト+1 やサブサイト+2 には転移反応の受容体基質が結合するため、両サブサイトを構築するアミノ酸に着目した。構造比較の結果から候補として Asn694 を選出し、4 種類の置換酵素 (N694A/L/F/W) を作製した。マルトオリゴ糖に対する加水分解速度から、Asn694 がサブサイト+1 および+2 に存在することを確認できた。

次に、各変異酵素のマルトースに対する糖転移作用を調べた。まず反応初期における R_{lg} (糖転移率) の比較を行うと、N694L/F/W が野生型酵素より大きな値を与え、特に N694F および N694W の R_{lg} 値は約 2 ~ 3 倍高いことが認められた。N694A はマルトトリオース [α -(1 $\rightarrow$ 4)-型の 3 糖] を野生型酵素より多く生産することが観察された。すなわち、Ala 置換で α -(1 $\rightarrow$ 4)-型転移能が上昇した。一方、反応後期においては、N694F と N694W がイソマルトオリゴ糖を野生型酵素より大量に生産した。N694A と N694L が生成する主なオリゴ糖の主成分はパノースであり、野生型酵素と異なる結果 (主成分はイソマルトース) を与えた。

以上の知見から、Asn694 が AgdA の糖転移反応を制御する責任アミノ酸 (すなわち、構造因子) であることが判明した。なお、工業的なオリゴ糖生産は「反応後期における糖転移生成物の生成が重要」である。この観点から Asn694 に対し構築した 4 種の点置換酵素は、反応後期においてプレバイオティック効果を示すイソマルトオリゴ糖やパノースを野生型酵素より多く生産・蓄積することから、有用な変異体であることが判明した。

3. 機能未知 AgdB の性質解明

3-1. 課題設定:

A. niger の染色体にある機能が未知な遺伝子 AgdB は、トランスクリプトーム解析によりデンプン代謝に関与することが認められた。その推定アミノ酸配列は、 α -グルコシダーゼである AgdA のそれに相同するため、同様な酵素活性を示すと推定された。そこで、AgdB の機能を明らかにすることを目的に、まず遺伝子発現を試みた。

3-2. 方法:

主な手法は、2-2 項に従った。

3-3. 結論・考察:

P. pastoris を用いて生産した後に、カラムクロマト精製した組換え酵素は、native ゲル電気泳動で 2 つのバンドを与えた。両バンドからタンパク質 (AgdB-I と AgdB-II と命名) を回収し、SDS-ゲル電気泳動法に供すると、AgdB-I と AgdB-II のいずれも 2 つのペプチド・バンドを与えた (AgdB-I からのペプチドを AgdB-I-a および AgdB-I-b と命名、AgdB-II からのペプチドを AgdB-II-a および AgdB-II-b と命名)。それらの N 末端アミノ酸配列を解析すると、AgdB-I-a と AgdB-II-a の配列が、また AgdB-I-b と AgdB-II-b の配列が同一であった。従って、AgdB は翻訳後にプロテアーゼ消化を受けて 2 つのペプチドを形成することが明らかとなった。次に、SDS-ゲル電気泳動法で異なる分子量を示した AgdB-I-a と AgdB-II-a を *N*-グルコシド型糖鎖の切断酵素で処理すると、同一分子量を与えた。すなわち、AgdB-I と AgdB-II は「それらの AgdB-I-a や AgdB-II-a に結合する *N*-グルコシド型糖鎖の構造差異」によって生成されたアイソフォームであることが判明した。AgdB-I-a ペプチド (あるいは AgdB-II-a ペプチド) において、*N*-グルコシド型糖鎖が結合する全ての Asn (Asn-Xxx-Ser/Thr の Asn) を Asp に点置換すると、Asn354 の変異酵素 (N354D) が電気泳動的に均一な酵素標品を与えた。従って、以

降の実験において、N354D を親酵素に用いることにした。 AgdB (すなわち N354D) は α -グルコ 2 糖の加水分解反応において、 α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコシド結合を有するマルトースおよび α -(1 $\rightarrow$ 3)-結合型のニゲロースに高い活性を示した。ニゲロースに対する高活性は AgdA に認められない。従って、両酵素は構造のみならず触媒能も AgdA と異なることが認められ、機能が違うユニークなアイソザイムと結論できた。

4. 熱安定な McAG31 の触媒機構

4-1. 課題設定：

好熱性微生物の酵素は、高温条件下で反応できるため、産業利用において雑菌混入の防止や高い反応速度の獲得など有利な点が多い。一方、産業に用いられる GH31 型の α -グルコシダーゼにおいて、熱安定性が高い酵素に関する研究は少ない (GH31 の「GH」は分類上において糖質加水分解酵素を指す用語；「31」は 31 番目のグループに属することを意味する)。この点に着目し、好熱性微生物の GH31 α -グルコシダーゼである McAG31 を取り上げ、その性質を明らかにした。

4-2. 方法：

主な手法は、2-2 項に準じて行った。但し、酵素遺伝子の発現は *Escherichia coli* を用いた。

4-3. 結論・考察：

E. coli の発現系で生産後に、クロマト精製した組換え McAG31 は、極めて高い熱安定性を示した。また、加水分解反応では α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコシド結合から構成されるマルトオリゴ糖に高い作用を示し、 α -(1 $\rightarrow$ 6)-結合を分解できなかった。また、酵素自体を予備加熱すると活性が上昇する現象が観察された。タンパク質の巻き戻しが充分でなく、加熱処理がその構造形成に寄与すると考えられた。二次構造は加熱の前後で変化がないことから、微視的な巻き戻しが生じていると推察した。以上の結果から、高温条件下で高い活性を与える GH31 α -グルコシダーゼの取得に成功した。