HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Structure-function relationship of GH13_31 α-glucosidase from Bacillus sp. AHU2216 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Auiewiriyanukul, Waraporn
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13326号
Issue Date	2018-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71864
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Waraporn_Auiewiriyanukul_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

博士の専攻分野の名称　博士（農学）　氏名 Waraporn Auiewiriyanukul

審査担当者　主査　教授　森　春英
副査　教授　横田　篤
副査　教授　木村　淳夫
副査　助教　佐分利　亘

学位論文題名

Structure-function relationship of GH13_31 α-glucosidase from *Bacillus* sp. AHU2216

(*Bacillus* sp. AHU2216 株由来 GH13_31 α-グルコシダーゼの
構造と機能に関する研究)

本論文は英文 79 頁，4 章からなり，図 30 および表 13 を含む．参考論文 1 編が付されている．

α-グルコシダーゼは各種化合物の非還元末端 α-グルコシド結合を加水分解する酵素である．高基質濃度条件ではグルコシル転移反応も触媒する．基質となりうる α-グルコシド結合を含む化合物は，α1-4 結合のマルトオリゴ糖の他，α1-6 結合のイソマルトオリゴ糖やスクロース等，結合・鎖長等の要素により顕著な多様を示すが，α-グルコシダーゼは，これら全てに作用するとは限らず，酵素ごとに異なる基質特異性を示す．α-グルコシダーゼは，タンパク質構造に基づく分類（CAZY 分類）では主としてグリコシド加水分解酵素群 GH13 と GH31 に分類されている．このうち GH13 は α-アミラーゼを代表とする膨大な酵素群である．GH13 酵素は，触媒中心を含む$(\beta/\alpha)_8$バレルフォールドのドメイン A を共有する．GH13 の α-グルコシダーゼにおいても共通の触媒機構を持つと考えられるが，酵素により多様な基質特異性や程度の異なる糖転移能が示され，構造機能相関研究の推進が必要とされている．本研究では，*Bacillus* sp. AHU2216 菌体内 α-グルコシダーゼの機能解析と構造解析を各種変異導入と併せて行い，本酵素の構造機能相関，特にマルトオリゴ糖に対する基質特異性に寄与する構造因子について研究を行ったものである．

1)　*Bacillus* sp. AHU2216 菌体内 α-グルコシダーゼの機能と構造の解析

土壌からの単離菌 *Bacillus* sp. AHU2216 の無細胞抽出液に，マルトースを基質として α1-4 グルコシル転移反応によりマルトトリオースを生成する活性が見出された．近縁のゲノム既読株 *Bacillus megaterium* WSH_002 の DNA 配列情報を参照し，AHU2216 株由来の GH13 酵素遺伝子を単離し，大腸菌を用いて組換え酵素 *Bsp*AG13_31A を調製し，機能を解析した．本酵素はマルトオリゴ糖，特に二糖マルトースに対し高い基質特異性を示した．基質マルトースの糖転移定数 K_{tg}（加水分解と糖転移速度が一致する時の基質濃度）は 21.6 mM であった．

タンパク質の高次構造は，野生型のアポ酵素の結晶，および触媒残基変異酵素 (E256Q)のマルトオリゴ糖（二糖から四糖）との共結晶の解析により解像度 1.6–2.5

Åで決定された．リガンドは酵素の触媒中心に生産様式で結合していた．サブサイト+1 上のグルコシル基(2-OH)は His203 および Asn258 と水素結合を形成する位置にあった．Asn258 側鎖は，サブサイト+2 においてやや立体障害となる位置にあったが，リガンドの三糖および四糖の電子密度はサブサイト+2/+3 上でも十分あり，グルコシル基の結合が支持された．ただし，グルコシル基間の回転角が最安定なものとは異なっており，これにより三糖以上での速度低下が起こったものと考えられた．一方，$(\beta/\alpha)_8$ バレル構造上の β6-α6 ループ（ループ６）は電子密度が低く，高いフレキシビリティーが予想された．ループ 6 上の Trp288 はアポ酵素ではサブサイト+1 付近にあり，しかし複合体ではこれとは大きく異なる位置にあった．すなわち，基質結合に伴う適合誘導が確認された．本ループ構造の大きな動きはユニークであり，本酵素の高い転移能に関連する可能性が示唆された．

2)　Asn258 変異導入による基質特異性と転移能の改変

Asn258 の改変酵素を調製し，Asn258 の酵素機能への関与について解析を行った．変異酵素 N258P および N258G は，野生型のα1-4 結合特異性を保持したが，二糖特異性は消失した．すなわち三糖特異性を示し，k_{cat}/K_m は二糖より 11–27 倍高値であった（野生型では 0.27 倍）． N258G はまた，非常に高い糖転移能を示し，K_{tg}（マルトース）は 1.13 mM であった．N258P は，スクロースにも良く作用し，転移反応によりエルロース(Glcα1-4Glcα1-2βFru)を生成した． E256Q/N258P および E256Q/N258G の三糖との複合体構造が 1.5–1.7 Å で決定された．Asn258 の立体障害は解消され，三糖はサブサイト+2 において安定な構造であり，かつ Met229 がグルコシル基(3-OH)と水素結合形成位置にあった．これにより，反応機構上の ES 複合体および遷移状態の安定化が生じ，三糖特異性が上がったと考えられた．

以上，本研究は *Bsp*AG13_31A を発見し，本酵素のα1-4 結合および二糖特異性に注目し，これらに関与する構造因子を明らかにした．実際に，単一アミノ酸残基の改変による大幅な機能改変を示した. 本酵素の糖転移能についても示唆を与えており，GH13α-グルコシダーゼと関連酵素の構造機能の理解に大きく寄与するものである．

よって審査員一同は，Waraporn Auiewiriyanukul が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた．