



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Structure and function of dextran-related enzymes from Streptococcus mutans [an abstract of entire text]
Author(s)	Klahan, Patcharapa
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13323号
Issue Date	2018-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71871
Type	doctoral thesis
File Information	Patcharapa_Klahan_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 Patcharapa Klahan

学位論文題名

Structure and function of dextran-related enzymes from *Streptococcus mutans*

(*Streptococcus mutans* 由来デキストラン関連酵素の構造と機能に関する研究)

1. 諸論

Streptococcus mutans は、う蝕形成に関わる口内細菌として知られ、菌体外にデキストラン様の多糖を生産することがその要因の1つである。一方、本糖質は当該細菌にとり貯蔵多糖と理解できるので、デキストランを分解する酵素を産する。従って、デキストラン分解酵素の研究は興味深く、特に触媒作用の分子機構を明らかにすることは極めて重要である。我々は、既にエンド型デキストラナーゼ (DEXase と略; デキストランをランダムに加水分解する酵素) およびデキストラン・グルコシダーゼ [DGase と略; デキストランやイソマルトオリゴ糖 (α -1,6 結合のグルコース残基から成るオリゴ糖) を非還元末端からエキソ型に加水分解する酵素] の2酵素について X 線結晶構造解析に成功した。本研究では、それらの立体構造を基に分子機構の解析を試みた。その結果、DEXase では生成物特異性を制御する構造因子を解明でき、DGase は基質認識に重要な構造因子を明らかにした。また、オリゴ-1,6-グルコシダーゼ (O16Gase と略) はイソマルトオリゴ糖を非還元末端からエキソ型に加水分解するが、O16Gase と保存性が高い酵素タンパク質をコードする遺伝子を *S. mutans* のゲノム中に見出した。本タンパク質の機能を解明するために当該遺伝子の異種宿主発現を行うとともに、基質認識機構を調べた。なお、DGase と O16Gase は類似したエキソ型分解反応を触媒するが、両者の相違は DGase が長鎖オリゴ糖に高い作用を示すのに対し、O16Gase は短鎖オリゴ糖を好む点にある。

2. DEXase の生成物特異性を制御する構造因子

2-1. 課題設定：

イソマルトオリゴ糖はプレバイオテックス効果を示し、大腸の有用細菌を増殖するが、短鎖のオリゴ糖は小腸での消化・吸収が早いので、長鎖タイプが望まれる。また、近年に長鎖オリゴ糖の製造が停止し、その供給が渴望されている。一方、*S. mutans* の DEXase は、デキストランをエンド様式で加水分解するが、最終的な生成物は主に単糖 (グルコース; Glc) や2糖 (イソマルトース; IG2 と略) であり、長鎖オリゴ糖の生産量は低い。仮に、本酵素の生成物特異性を改良し、長鎖イソマルトオリゴ糖が大量調製できると、糖質科学者にとっても朗報となる。本研究では、DEXase とその近縁酵素の立体構造を基に生成物特異性をコントロールするアミノ酸残基を究明した。

2-2. 方法：

本 DEXase を *Escherichia coli* の発現系で生産すると、N 末端と C 末端の両領域がプロテア

一ゼによる消化を受ける。従って、消化領域を予め除去した削除体を作製し実験に用いた。生成物特異性に関与するアミノ酸の予想は、DEXase およびその類縁酵素の立体構造を比較し行った。候補残基の一重変異体や多重変異体を構築し、デキストランに作用させた。得られた生成物をイオン交換型 HPLC で定量した。また、野生型酵素や変異酵素による基質の切断様式をサブサイト認識（基質分子にある個々のグルコース残基を認識する部位をサブサイトと呼称）から評価した。その評価に用いた合成基質（*p*-ニトロフェニル α -イソマルトオリゴ糖）を酵素法で調製し、合成基質から生じる生成物も前述の HPLC で定量した。

2-3. 結論・考察：

まず、野生型 DEXase を用い、基質濃度の長鎖オリゴ糖生成に与える影響を調べると、高基質濃度で長鎖型の収量向上が観察された。次に生成物特異性を制御できるアミノ酸として Trp279、Thr558 および Thr563 を予想し、それらの変異酵素である T558H、W279A/T563N と W279F/T563N を作製した。3つの置換酵素はデキストランの低濃度でも長鎖オリゴ糖を最終生成物として与えた（本低濃度では、野生型は Glc や IG2 を生産）。特に、T558H はイソマルトペンタオース（5 グルコース残基から成るオリゴ糖）を多く生産した。基質分子の切断様式を調べると、導入したアミノ酸変異がサブサイトの-4 位に影響することが判明した。従って、当該サブサイトが本酵素の生成物特異性に大きく影響することが明らかになった。

3. DGase の基質認識機構

3-1. 課題設定：

DGase は α -1,6 グルコシド結合を認識し加水分解するが、 α -1,4 結合には作用できない。これまで Val195、Lys275 と Glu371 の 3 残基が α -1,6 結合の特異性に重要であることが知られていたが、さらなるアミノ酸の関与が示唆された。本研究では新たに予想された残基の機能を明らかにすることを目的とし、DGase が示す基質認識の分子機構を究明した。

3-2. 方法：

S. mutans から単離した DGase 遺伝子を *E. coli* で発現生産し、組換え酵素を得た。また目的のアミノ酸を置換した多重変異体を作製した。用いた基質は市販品を使用した。オリゴ糖の分析手法は、2-2 項に従い行った。

3-3. 結論・考察：

α -1,4 結合に特異性が高い類縁酵素の立体構造を用いて、DGase に存在する α -1,6 結合の認識アミノ酸を予想した。V195A/K275A/E371A を親酵素（3 重変異体）とし、候補残基の置換を実施し 4 重変異酵素の構築を行った。同様にショ糖を基質にする類縁酵素との比較から新たな残基を予想し、V195A を親酵素とした 2 重変異体の調製を行った。作製した 4 重および 2 重変異酵素は、 α -1,6 結合の分解力を低下させたが、 α -1,4 結合への活性は増加した。さらに 2 重変異体はショ糖に対する親和力を上昇させた。これらのアミノ酸変異は、糖転移反応の基質特異性にも変化を与えた。すなわち、野生型 DGase は元来 α -1,6 結合を有する基質のみに糖転移を生じるが、2 重変異体は α -1,6 結合基質および α -1,4 結合基質の双方を利用でき、4 重変異体は α -1,4 結合基質だけに作用を示した。以上の結果から、本酵素の基質認識を制御する 2 つのアミノ酸を新たに見出した。

4. O16Gase 様タンパク質の性質解明と基質認識機構

4-1. 課題設定：

短鎖のイソマルトオリゴ糖をエキソ型に加水分解すると予想される O16Gase 様タンパク質

をコードするゲノム遺伝子を見出したので、酵素機能の解明を行った。その結果、当該タンパク質はトレハロース 6-リン酸加水分解酵素（T6Pase と略）であることが判明した。T6Pase 自体の触媒機構も未解明であるので、特に基質認識に関して分子解析を行い、新たな知見の取得に成功した。

4-2. 方法：

主な手法は、3-2 項に準じて行った。

4-3. 結論・考察：

E. coli の発現系で生産した組換えタンパク質を O16Gase の天然基質である短鎖イソマルトオリゴ糖に作用させたが、酵素活性が認められなかった。しかしながら、トレハロース 6-リン酸（Tre6-P と略）を効率良く加水分解したことから T6Pase と判断された。Tre6-P のリン酸基の認識に必要な塩基性アミノ酸を推定し、部位特異的変異法により同機能を確認した。さらにトレハロース部分を認識する中性アミノ酸を 2 残基予想し、それぞれに変異を導入した。得られた置換酵素は Tre6-P に対する活性を失ったが、他の基質に作用できた。すなわち、*p*-ニトロフェニル α -グルコシドには若干の活性低下が、またショ糖に活性増加が確認された。従って、Tre6-P のトレハロース部分を認識するアミノ酸の推定に成功した。