



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional analysis of maltose phosphorylase MalE from Bacillus sp. AHU2001 and synthesis of oligosaccharides and sugar phosphates with the enzyme [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	高, 宇
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13758号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75985
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yu_Gao_review.pdf, 審査の要旨



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	Gao Yu
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	講師	佐分利 亘

学位論文題名

Functional analysis of maltose phosphorylase MalE from *Bacillus* sp. AHU2001 and synthesis of oligosaccharides and sugar phosphates with the enzyme

(*Bacillus* sp. AHU2001 由来マルトースホスホリラーゼ MalE の機能ならびに本酵素を用いたオリゴ糖および糖リン酸の合成に関する研究)

本論文は英文 88 頁，4 章からなり，図 40 および表 6 を含む．参考論文 1 編が付されている．

マルトースホスホリラーゼ (MP) は，加リン酸分解により基質マルトース (Glc α 1-4Glc) を切断して糖リン酸 β Glc1P と Glc を生成する．反応は可逆的であり，逆反応すなわち β Glc1P と Glc からマルトースの合成も触媒する．逆反応において Glc の代替として各種単糖を糖受容体として用いることにより，マルトース以外の二糖の合成例もある．MP は，タンパク質構造に基づく糖質関連酵素の分類 (CAZY 分類) では酵素群 GH65 に分類される．GH65 には MP の他， α -グルコシドに作用する各種ホスホリラーゼが含まれる．本群では立体構造既知の酵素は少なく，MP の構造も 1 例のみであり，かつこれは基質等との複合体構造ではない．受容体糖質の結合様式に関する知見は不十分である．

当研究室にて単離された *Bacillus* sp. AHU2001 の α -グルコシダーゼ遺伝子 AG31A の下流には推定遺伝子 *malCDE* がある．このうち MalE は推定配列から GH65 MP と予測される．Gao 氏は，本 MalE タンパク質に注目し，酵素機能解析と糖質合成への酵素利用の観点から，本研究を行った．

1) MalE タンパク質の機能解析

大腸菌 BL21(DE3) 形質転換体により MalE 組換えタンパク質を生産し，カラムクロマトグラフィーにより精製酵素が調製された．生産量は培養 2 L から精製酵素 13.6 mg であった．分子質量は SDS-PAGE およびゲルろ過カラムクロマトグラフィーによりそれぞれ 90 kDa, 193 kDa と測定され，ホモ二量体であることが示された．MalE は試験した加リン酸分解基質候補 (各種グルコ二糖およびマルトトリオース) のうち，唯一マルトースに対して作用を示し，従って MP であると判断された．

加リン酸分解速度は，測定条件下では pH 8.0 および 45°C で最大値となった．マルトース加リン酸分解反応は，逐次 Bi Bi 機構に従った．すなわち，2 基質 (リン酸とマルトース) が酵素と結合した三者複合体の形成を経て反応は進む ($K_{iA}(\text{Pi})$),

9.07 mM; $K_{mB}(\text{maltose})$ 0.835 mM, k_{cat} , 30.9 s⁻¹).

加リン酸分解の逆反応における受容体特異性の解析では、各種単糖、単糖誘導体、および二糖のうち速度を示した 15 種について、10 mM βGlc1P 存在下での速度定数 k_{cat}/K_m により評価した。D-Glc, D-GlcN および 6-deoxy-D-glucose (6DGlc) に高い作用を示した。その他各種基質に対する速度も含め、単糖受容体結合部位 (サブサイト + 1) において、D-Glc の 1(α 型), 3, 4 位 OH および 6 位 CH₂ の重要性が示された。2 位 OH は置換可能であり、低親和性ながらも嵩高い修飾を有する糖質 (GlcNAc や二糖 kojibiose など) も基質となる。予想立体構造、ならびに既存の GH65 酵素基質複合体の二糖リガンド結合を参考に、受容体結合に関わる酵素構造を予測して、これによって受容体基質特異性に解釈を与えた。

2) 各種二糖と糖リン酸の合成および合成二糖の消化性の解析

単糖 8 種 (D-Man, D-Glc, GlcNAc, D-Xyl, D-All, D-Lyx, 2DGlc, L-Sor) を受容体基質として βGlc1P と反応させた。13-76% の収率で二糖精製標品が得られた。ESI-MS および NMR により構造が決定された。合成された糖はいずれも非還元末端側に α -グルコシル基を有する二糖であり、結合は 2DGlc および L-Sor を含む二糖では α 1-3 結合、他 6 種では全て α 1-4 結合であった。

8 種の合成二糖について、ラット小腸消化酵素による分解性を解析した。分解速度は、マルトース分解速度に対し 28-45% であった。特に 1-3 結合の 2 種 (Glc α 1-3(2DG), Glc α 1-3Sor) は 28.0-28.1% と低値を示した。すなわち合成二糖の小腸での分解性はマルトースよりも低いと考えられた。

糖リン酸 βGlc1P は、マルトースの加リン酸分解により、Glc6P は βGlc1P 生産反応系に更に β -ホスホグルコムターゼを添加した反応系により合成された。酵母添加によりマルトースの加リン酸分解で生じる Glc 濃度が低下し、これに伴い平衡が βGlc1P 生成側に傾き、合成収率の向上が認められた。反応液中での βGlc1P および Glc6P はそれぞれ 62% および 80% に達した。

以上、本研究は MalE タンパク質を用いて MP の機能、特に多数の受容体候補に対する反応解析により受容体結合部位の特異性を明らかにしたものである。新規糖質を含む各種二糖の合成と小腸消化性の解析、ならびに糖リン酸合成の高効率化を行ったものであり、MP および関連 GH65 酵素の機能と応用に寄与するものである。

よって審査員一同は、Gao Yu 氏が博士 (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。