



Title	Functions, structures, and applications of enzymes acting on trehalose and its derivatives [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	田口, 陽大
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14383号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81099
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Taguchi_Yodai_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	Yodai Taguchi
審査担当者	主査	准教授	佐分利 亘
	副査	教授	森 春英
	副査	教授	横田 篤
	副査	教授	松浦 英幸

学位論文題名

Functions, structures, and applications of enzymes acting on trehalose and its derivatives

（トレハロースおよびその誘導体に作用する酵素の構造、機能
ならびに応用に関する研究）

本論文は英文 160 頁，図 44，表 11，6 章からなり，参考論文 2 編が付されている．

トレハロース（Tre: Glc α 1-1 α Glc）は非還元性の二糖であり，エネルギー源や適合溶質として働く．Tre は，多くの生物でトレハロース 6-リン酸（Tre6P）を経由した経路（TPS-TPP 経路）により合成され，主として加水分解酵素のトレハラーゼにより分解される．TPS-TPP 経路では，Tre6P シンターゼ（TPS）が UDP-グルコースとグルコース 6-リン酸（Glc6P）からトレハロース 6-リン酸（Tre6P: Glc α 1-1 α Glc6P）を合成し，ホスファターゼ（TPP）が Tre6P を脱リン酸化する．中間体の Tre6P は，極微量しか存在しないが，植物の開花や糖代謝などを制御する極めて重要な生理活性物質である．植物における Tre6P を含めた Tre 関連化合物の代謝について，代謝酵素の生化学的機能・構造に関する知見は乏しい．これは Tre6P や類縁化合物の供給が困難なため，酵素の機能・構造解析を遂行することが難しいことによる．本研究では，類縁化合物も含めた Tre6P の効率的合成法を整備し，Tre 代謝関連酵素の機能と構造を明らかにすることが目的とされた．

1) ホスホリラーゼの逆反応を利用した Tre6P およびその誘導体の酵素合成

Tre6P の合成には，乳酸球菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が有する Tre6P ホスホリラーゼ（TrePP）が用いられた．本酵素は Tre6P を可逆的に加リン酸分解する酵素であり，加リン酸分解生成物の Glc6P と β -グルコース 1-リン酸（ β -Glc1P）に対する反応により Tre6P を生成する．100 mM β -Glc1P と Glc6P に対する反応により 92% の高い収率で Tre6P が合成された．より安価な原料を出発原料とした Tre6P の合成のため，マルトースホスホリラーゼ（MP）によるマルトースの加リン酸分解（ β -Glc1P の生成）とムターゼによる β -Glc1P の Glc6P への変換を TrePP 反応と組合せた反応系が構築された．マルトース 100 mmol と無機リン酸 60 mmol から純度 98% の Tre6P 二カリウム塩 19 mmol (9.4 g) が合成された（理論収率 38%）．その他，TrePP が β -Glc1P 存在下で Man6P にも作用することが見出され，この反応により新規糖リン酸 Glc α 1-1 α Man6P が合成された．

2) *Arabidopsis thaliana* 由来 TPP アイソザイムの酵素化学的性質の解明

植物は多くの TPP アイソザイムをコードする遺伝子を持ち、これらが外部環境に応じて器官・組織特異的に発現することで Tre6P 量が厳密に調整されると考えられている。 *A. thaliana* は 10 種の TPP 遺伝子 (AtTPPA-J) を持ち、翻訳産物のアミノ酸配列同一性は互いに 40–82% 同一である。本研究では、全ての AtTPP アイソザイムの機能が大腸菌による組換え酵素を用いて解析された。AtTPPI を除く 9 種の TPP に Tre6P ホスファターゼ活性が確認された。Tre6P への k_{cat}/K_m 値 (低濃度基質に対する反応速度の指標) は $0.113\text{--}23.0\text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ と多様であり、各組織における遺伝子発現強度と併せて AtTPPA および AtTPPB がそれぞれ地上部および根部における主要な TPP と推定された。Tre6P および Glc α 1-1 α Man6P など各種糖リン酸に対するホスファターゼ活性に基づき、TPP は α 1-1 α 結合したグルコシル基を有する糖リン酸に特異的に作用することが明らかにされた。

3) *A. thaliana* 由来トレハラーゼの pH 依存的な基質特異性の変化に関する分子機構の解明

AtTRE1 は *A. thaliana* が持つ唯一のトレハラーゼである。本研究では大腸菌により生産した組換え AtTRE1 (N 末端膜結合領域削除体) が Tre に加えて、Glc α 1-1 α Xyl, Glc α 1-1 α Gal, Glc α 1-4-L-Ara および Tre6P など Tre 類縁化合物をも加水分解することが明らかにされた。トレハロースに対する速度パラメータの pH 依存性の解析により、本酵素の k_{cat} は酸性域と中性域に二つのピークを示すことが判明した。このことより、酸性域と中性域で異なる ES 複合体を形成することが示唆された (それぞれ ES_a と ES_n とする)。興味深いことに、この pH 依存性は基質により異なり、Tre6P の加水分解の k_{cat} は酸性域にのみピークを示した。AtTRE1 (D380A 変異酵素) と Tre との複合体の結晶構造の解析により、触媒 (α/α)₆ バレルの α 1 $\rightarrow\alpha$ 2 および α 11 $\rightarrow\alpha$ 12 ループにより覆われた閉じた酵素分子への Tre の結合が確認された。Tre と周辺残基の位置関係より、この閉じた構造は Tre6P に対する反応に適さないと考えられ、ES_n はこの閉じた構造に類似すると推定された。D380A 変異酵素については、Tre6P 存在下で得られた結晶の X 線回折実験において Tre6P の電子密度は確認されなかったものの、 α 1 $\rightarrow\alpha$ 2 および α 11 $\rightarrow\alpha$ 12 上のアミノ酸残基の配向が異なることに起因してこれらのループが一部開いた構造が得られた。この構造では Tre6P 結合において Glc6P 基のリン酸基を収容するための空間が存在することから、Tre6P への反応に適する ES_a はこの構造に類似すると推定された。 α 1 $\rightarrow\alpha$ 2 および α 11 $\rightarrow\alpha$ 12 ループ上のアミノ酸残基への部位特異的変異により、基質結合部位を広げると Tre6P に対する特異性が高まり、閉じた構造を安定化させると低下することが確認された。すなわち、AtTRE1 の基質特異性は α 1 $\rightarrow\alpha$ 2 および α 11 $\rightarrow\alpha$ 12 ループの構造変化により変化し、pH 条件がこの構造変化を引き起こし得ると考えられた。

本研究は、Tre6P およびその誘導体の効率的合成方法の確立によりこれらを利用した各種解析を可能とし、植物トレハロース代謝酵素群の機能と構造の解明へと結びつけたものであり、学術的に高く評価することができる。よって審査員一同は、Yodai Taguchi 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。