



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular basis for reactions of GH15 α -glucan 4(6)- α -glucosyltransferase
Author(s)	秦, 天翼
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16773号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16773
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99618
Type	doctoral thesis
File Information	QIN_Tianyi_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



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 秦 天翼

審査担当者	主査	教授	森	春英
	副査	教授	奥山	正幸
	副査	准教授	佐分利	亘
	副査	准教授	田上	貴祥
	副査	助教	太田	智也

学位論文題名

Molecular basis for reactions of GH15 α -glucan 4(6)- α -glucosyltransferase
(GH15 α -グルカン 4(6)- α -グルコシル転移酵素が触媒する反応の分子基盤)

本論文は英文 133 頁、図 62、表 14、6 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

本研究は、CAZy データベースにおいてファミリーGH15 に分類される転移酵素として、 α -グルカン 4(6)- α -グルコシル転移酵素（46GT）について酵素化学的に詳細に解析したものである。

糖質関連酵素は CAZy データベースにおいて、配列類似性を主因子として分類されている。ファミリーGH15 の転移酵素には、デキストランデキシトリーナーゼ (DDase) と 46GT の 2 種がある。いずれも α 1-4 結合のマルトオリゴ糖(MOS)に作用して、非還元末端の α -グルコシル基の α 1-4/1-6 転移を繰り返し、最終的に α 1-6 結合からなる生成物、DDase では多糖デキストランを、46GT ではイソマルトオリゴ糖(IMO)を生成する。MOS を材料として、デキストラン、IMO 等をワンポット合成でき、産業的利用が期待される酵素である。しかし、MOS から最終生成物に至るまでの糖質合成経路が明確ではなく、このために特に最終生成物の鎖長（重合度）の制御機構が未確定であった。また、ファミリーGH15 は、近年上記転移酵素が見出されるまでは、グルコアミラーゼ(GA)等の加水分解酵素によって構成されていた。これらは、反応機構が異なり、GA 等の加水分解酵素ではアノマー反転型機構、DDase 等転移酵素ではアノマー保持型機構により触媒が進む。すなわち、配列相同性があり、触媒残基も保存されている同一ファミリーの酵素が、MOS を共通の基質としながらも、異なる反応機構で加水分解・転移を触媒する、稀有な例となっていた。

本研究は、主に *Tepidibacillus decaturensis* 由来 46GT (Td46GT)を用いて、(1) MOS から IMO への多段階変換反応を、転移反応における糖供与体と糖受容体の特異性の解析により明らかにするとともに、(2)立体構造解析および変異酵素解析により基質結合残基とその機能を明らかにし、さらに(3)立体構造情報に基づく反応機構の変換、すなわち 46GT を GA 様のアノマー反転型加水分解酵素とする最少残基を特定したものである。

1) Td46GT による MOS から IMO への変換機構の解明

MOS から IMO への変換は、MOS 間の α 1-4 転移による鎖長不均化と、MOS の 2 糖や 3 糖の非還元末端側に IMO を結合した中間産物の生成を経由した。糖受容体を複数含む反応系における初期生成物の定量解析により、転移反応生成物の 1-4/1-6 結合特異性は受容体に依存することを証明し、さらにこの受容体特異性を相対値(RASC)として求める手法を確立した。RASC から受容体のサブサイトマップが計算され、これは 1 基質反応の特異性定数から計算される供与体のサブサイトマップとよく一致した。すなわち、46GT の糖供与体と受容体のサブサイトが共通することを定量的に明らかにした。また、RASC に基づき、MOS と IMO の混合物の反応進行に伴う逐次的変化を定量的に予測可能であることを実証した。

2) Td46GT の立体構造と基質結合部位の決定

阻害剤である擬似 4 糖アカルボースと Td46GT 触媒残基変異体 E666Q の複合体構造を決定し、Td46GT がドメイン N、A、C からなること、ドメイン N-A は DDase のドメイン N2-A によく一致することを明らかにした。ドメイン C は新規構造であった。構造中に Ca^{2+} イオンの結合が認められ、機能解析でも Ca^{2+} による熱安定性および反応速度の向上が確認された。サブサイト-1/+1 の形成残基およびリガンドの結合様式は、DDase、GA 等とよく一致した。ただし、触媒残基の一つである Glu666 は、GA の該当塩基触媒よりも基質に近接した、求核触媒として適した位置にあると予測された。サブサイト+2/+3 形成残基が構造から推定され、これらの変異による親和力低下が確認された。

3) Td46GT の GA 様アノマー反転型加水分解酵素への変換

求核触媒残基に注目し、これと直接または間接的作用が予想される残基のうち、GA 等では保存されていない残基を選択した。Td46GT を親酵素とする多重変異体は、転移活性を失い、速度は低いながら加水分解活性を示した。変異箇所の限定を行い、最少 4 残基変異が必須であること、および加水分解生成物は β -Glc であることが確認された。これら 4 残基の変異により、触媒残基 Glu の側鎖カルボキシ基が直接求核反応する位置からわずかに離れ、これに代わり水分子が求核反応に適した位置に結合したものと考えられる。触媒残基自体を維持したまま、その機能変化により反応機構を変化させる初の研究例となる研究成果である。

以上、本研究では GH15 46GT を用いて、糖転移反応の受容体特異性の解析手法の確立、画期的な反応機構改変等を行い、糖転移を利用したものづくりや、アノマー保持型・反転型の相互変換による酵素の一層の多様化等、糖質関連酵素とその応用に新たな展開をもたらすカギとなる成果を挙げている。

よって審査員一同は、QIN Tianyi 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。