

氏名	丸田 和彦
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博乙第4142号
学位授与の日付	平成18年 9月30日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)
学位論文の題目	Studies of Genes Encoding Trehalose-forming Enzymes and Synthesis of Trehalose Derivatives (トレハロース生成酵素の遺伝子とトレハロース誘導体の合成に関する研究)
論文審査委員	教授 虎谷哲夫 教授 中西一弘 教授 酒井 裕

学位論文内容の要旨

1992年に著者が発見した細菌のトレハロース生合成系は、マルトオリゴシルトレハロース合成酵素 (EC 5.4.99.15, malto-oligosyltrehalose synthase; MTSase) とトレハロース遊離酵素 (EC 3.2.1.141, malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase; MTHase) によって、マルトデキストリンからトレハロースを生成する酵素系である。本酵素系ではまず、MTSaseが分子内転移反応によりマルトデキストリンをマルトオリゴシルトレハロースへ変換し、次にMTHaseがマルトオリゴシルトレハロースへ作用し、マルトデキストリンとトレハロースを繋いでいる α -1,4-グルコシド結合を加水分解することでトレハロースを遊離させる。著者は、*Arthrobacter* sp. Q36、*Rhizobium* sp. M-11、*Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909の三株からそれぞれの遺伝子をクローニングした。その結果、これら三株のいずれにおいても、MTSaseとMTHaseの遺伝子はオペロンを形成していた。広いDNA領域をクローニングした*Arthrobacter* sp.と*S. acidocaldarius*では、そのオペロンにイソアミラーゼの遺伝子が含まれることも分かった。MTSaseとMTHaseは、*S. acidocaldarius*由来のもので前者が720アミノ酸残基、後者が556アミノ酸残基からなるポリペプチドであった。両酵素のアミノ酸配列中には、 α -アミラーゼファミリー酵素の共通領域がそれぞれ存在した。*S. acidocaldarius*のMTSaseに関して部位特異的変異解析を行った。その結果、Asp228、Glu255、Asp443は、本酵素の触媒残基であることが支持された。また、活性部位近傍に位置し、MTSaseに特徴的なLys390とLys445は、本酵素の分子内転移反応に関わるアミノ酸残基と考えられた。

著者は、*Thermoanaerobacter brockii* ATCC 35047由来トレハロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.64, TP) の遺伝子をクローニングした。TPは774アミノ酸残基からなるポリペプチドで、*Lactobacillus brevis* 由来マルトースホスホリラーゼ (MP) のアミノ酸配列と34%の相同性を示した。またその配列中には、MPの触媒残基に対応するAsp370とGlu498が保存されていた。さらに、 β -G1Pを供与体とし、種々のオリゴ糖を受容体としてTPの受容体特異性を調べた。その結果、TPはグルコースの6位誘導体であるイソマルトース、ゲンチオビオース、メリビオース、イソマルトトリオース、イソパノースなども受容体とし、それぞれから対応するトレハロース誘導体を合成した。特に、メリビオースから生成する6-O- α -D-ガラクトピラノシルトレハロースは新規糖質であった。

論文審査結果の要旨

トレハロースは2分子のグルコースが α , α -1,1-グルコシド結合した非還元性の二糖で、細菌、菌類、植物、無脊椎動物などに広く存在している。カビ、酵母では孢子発芽の、昆虫では飛翔のエネルギー源として機能し、また、乾燥や熱、凍結、酸化などのストレスから蛋白質や細胞膜を保護する作用があるとされている。本研究は、トレハロース生成に関わる酵素の遺伝子クローン化と解析およびトレハロース誘導体の合成に関するもので、以下の成果を得ている。

本申請者らは、マルトデキストリンからトレハロースを生成する新しいトレハロース生合成系をすでに発見している。本系はマルトオリゴシルトレハロース合成酵素 (MTSase) とトレハロース遊離酵素 (MTHase) から成り、MTSaseが分子内転移反応によりマルトデキストリンをマルトオリゴシルトレハロースへ変換した後、MTHaseがこれに作用し、 α -1,4-グルコシド結合を加水分解してトレハロースを遊離させる。本研究で、*Arthrobacter* sp.、*Rhizobium* sp.、*Sulfolobus acidocaldarius*のMTSaseとMTHaseの遺伝子をクローン化し解析した結果、いずれの細菌においても、両酵素遺伝子はオペロンを形成して存在し、*Arthrobacter* sp.と*S. acidocaldarius*では、そのオペロンにイソアミラーゼ (α -1,6-グルコシド結合を切る枝切り酵素) 遺伝子も含まれていた。*S. acidocaldarius*のMTSaseとMTHaseには α -アミラーゼファミリー酵素の共通アミノ酸配列が存在した。MTSaseに部位特異的変異を導入して解析した結果、Asp228、Glu255、Asp443が触媒残基であることが示された。活性部位近傍に存在するMTSaseに特徴的なLys390とLys445は、糖の分子内転移反応に関わるアミノ酸残基であると結論された。

トレハロース生成酵素として、他にトレハロースホスホリラーゼ (TP) が知られている。*Thermoanaerobacter brockii*由来の酵素遺伝子をクローン化したところ、TPはマルトースホスホリラーゼ (MP) のアミノ酸配列と34%の同一性を示した。その配列中には、MPの触媒残基に対応するAsp370とGlu498が保存されていた。 β -グルコース1-リン酸を供与体として、TPの受容体特異性を調べた結果、TPはグルコースの6位誘導体も受容体とした。したがって、TPは新規糖質を含む各種トレハロース誘導体の合成に有用であると結論された。

以上のように本研究では、トレハロース生成酵素の遺伝子とトレハロース誘導体の合成に関して重要かつ独創的な新知見が得られている。よって、本論文は博士 (工学) の学位に値するものと認める。