

学位論文題名

Catalytic Mechanism and Molecular Structure
of Trehalase from Honeybee

(ミツバチ Trehalase の反応機構および構造に関する研究)

学位論文内容の要旨

トレハラーゼ (α, α -trehalose glucohydrolase, EC 3.2.1.28) は、非還元糖であるトレハロースのみに特異的に作用し、 α -グルコシド結合を加水分解する酵素である。ヒトの血糖はグルコースであるのに対し、昆虫のそれはトレハロースであり、本酵素は昆虫血リンパのトレハロースをグルコースにする重要な生理的作用を持つ。従って、ミツバチにも強いトレハラーゼ活性が認められるが、アミノ酸一次配列などの構造情報は明らかにされていない。一方、トレハラーゼは加水分解酵素としても興味深い研究対象である。本酵素は加水分解の際に基質アノマー構造を反転させ、 α と β -型のグルコースを等モル遊離する。反転型酵素の反応において求核置換反応機構とオキソカルベニウムイオン反応機構が提唱されており、現在、前者が強く支持されている。また、触媒アミノ酸のうちプロトン供与体はヒスチジン残基と報告され、糖質分解酵素一般では酸性アミノ酸であるのに対し、極めて特殊な存在となっている。

ミツバチには性質がほぼ一致する遊離型と結合型の2つの酵素が存在する。本研究では、結合型トレハラーゼに着目し、活性発現に必須な解離基を推定した。次に本酵素の反応機構を解析するため、 $[1,1'\text{-}^2\text{H}]$ トレハロースを酵素合成した。本基質の加水分解において強い α -第二次アイソトープ効果を見出し、これより反応の遷移状態における中間体（オキソカルベニウムイオン）を予測した。さらに酵素遺伝子をクローニングし、アミノ酸一次配列を推定するとともに、相同解析から触媒アミノ酸はヒスチジン残基ではないことを明らかにした。

(1) 酵素の精製、諸性質と活性発現に必須な解離基の推定

結合型トレハラーゼの精製を試みた。ミツバチを 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.3) 中で磨砕後、得られた残渣に洗浄操作（緩衝液添加・攪拌抽出・遠心分離）を行い、上清に活性が認められなくなるまで同操作を繰り返した。酵素の可溶化は、沈殿懸濁液の pH を 8.0 に調整することで行った。その後、硫安分画、イオン交換、疎水およびゲル濾過の各クロマト操作により約 20% の収率で電気泳動的に単一の酵素標品を単離した。得られた精製酵素の諸性質を調べた（分子量、約 69,000; 至適 pH, 6.8; pH 安定域, pH 4.5 - 12.5; 温度安定域, 15 分の処理で 40 °C 以下）。本酵素はトレハロースに対してのみ活性があり、他の二糖類や合成基質には作用を示さなかった。

活性発現に必須な解離基を動的解析で推定した。至適 pH よりアルカリ側において緩衝液による塩濃度依存的な阻害が見い出された。この現象は用いた5種類の緩衝液全てで認められ、それらに共通な成分はなかった。その阻害様式は拮抗型で、 K_i 値は pH で異なるが約 40 - 80 mMの範囲であった。低濃度の緩衝液において活性低下が大きいことが認められたので、反応速度の緩衝液濃度依存性から"真の反応速度"を算出した。この取り扱いを各基質濃度さらに各 pH で行い、速度パラメーターを求め、 V/K_m 値と pH の関係からアルカリ側の解離基の pK_a 値を推定した。至適 pH や酸性領域ではこのような阻害現象は認められず、 V/K_m 値の pH 依存性から酸性側解離基の pK_a 値を求めた。さらに同様な手法を用いて、解離熱や低誘電率の溶媒における pK_a 値の変化を調べ、酸性側・アルカリ側の活性解離基はともにカルボキシル基であると推定した。また、カルボキシル基に高い特異性を示す水溶性カルボジイミドを用いた化学修飾実験からも、活性部位に酸性アミノ酸残基が存在する結果が得られた。

(2) 加水分解反応における α -第二次アイソトープ効果

糖質加水分解酵素の反応において求核置換反応機構とオキソカルベニウムイオン反応機構が提唱されている。両機構は、基質の加水分解反応におけるアイソトープ効果の測定で区別できる。測定の際、基質となる $[1,1\text{-}^2\text{H}]$ トレハロースを本酵素の縮合反応で調製した。縮合反応の作用条件を検討後、最適条件下で $[1\text{-}^2\text{H}]$ グルコースから $[1,1\text{-}^2\text{H}]$ トレハロースの合成を行った。また、同様な手法で軽水素標識のトレハロースも調製した。得られた2種類の生成物を単離精製後、それらの構造を解析し、目的の $[1,1\text{-}^1\text{H}]$ および $[1,1\text{-}^2\text{H}]$ トレハロースであることを確認した。両基質に酵素を作用させ、速度パラメーターを求めた。 K_m 値は同一であったが、重水素標識基質に対する k_0 値が大きく低下し、軽水素基質の約 60 % となった。この比は、これまで報告された糖質加水分解酵素 (77 - 88 %) より約 20 - 30 % も低い値であり、最大級の α -第二次アイソトープ効果が観察された。従って、反応の遷移状態においてオキソカルベニウムイオン中間体が存在すること、この形成が律速になっていることが想定された。

(3) 酵素遺伝子のクローニングと推定アミノ酸一次配列

精製酵素の N末端および内部アミノ酸配列を調べた。トレハラーゼを還元条件化でピリジルエチル化後、プロテアーゼ消化を行い、ペプチド断片を単離した。これらの酵素や各断片をエドマン分解に供し、得られたアミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、ミツバチ成虫から調製した cDNA ライブラリーに対し RT-PCR を行った。増幅断片からプライマーを作成後、5' RACE および 3' RACE に nested PCR を組み合わせて行い、cDNA をクローニングした。cDNA は全長 3,002 bp からなり、5'-URT, 870 bp、ORF, 1,881 bp、3'-URT, 233 bp、poly(A), 18 bp を含んでいた。ORF から推定されるアミノ酸配列の長さは 626 残基であり、N-グリコシド型糖鎖の結合部位が 6 か所見い出された。N末端側の 17 アミノ酸がシグナル配列であり、成熟酵素の分子量は 69,177 と算出された。この値は、SDS-電気泳動法で得られた約 69,000 と一致した。さらに、エドマン分解で求めた全てのペプチドのアミノ酸配列が認められ、本遺伝子がミツバチの結合型トレハラーゼのものであると推定した。

報告された他起源のトレハラーゼやそのホモログとの構造に関する相同解析を行った。一次構造上で約 35 から 40 % の高い保存性があること、予想される二次構造もほぼ一致することが認められた。しかし、酵素活性に必須であると報告されたヒスチジンは 1 残基も保存されておらず、触媒残基ではないことが明らかになった。これは (1) の結果を支持するものである。動的解析で触媒残基と推定した酸性アミノ酸は 5 残基保存され、そのうち 4 残基は高度に保存された領域中に存在する。これらのうち 2 残基が本酵素の触媒基、すなわち求核基とプロトン供与体であると予想された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 淳 夫
副 査 教 授 内 藤 哲
副 査 教 授 伴 戸 久 徳

学 位 論 文 題 名

Catalytic Mechanism and Molecular Structure of Trehalase from Honeybee

(ミツバチ Trehalase の反応機構および構造に関する研究)

本論文は、英文79頁、図42、表5、5章からなり、他に参考論文3編が添えられている。

トレハラーゼ (EC 3.2.1.28) はトレハロースのみを特異的に加水分解する酵素である。昆虫の血糖はトレハロースであり、本酵素は昆虫血リンパのトレハロースをグルコースにする重要な生理的作用を持つ。従って、ミツバチにも強い酵素活性が認められるが、アミノ酸一次配列などの構造情報は明らかにされていない。一方、トレハラーゼは加水分解酵素としても興味深い研究対象である。本酵素は加水分解の際に基質アノマー構造を反転させる。反転型酵素の反応において求核置換反応機構とオキシカルベニウムイオン反応機構が提唱されており、現在、前者が強く支持されている。また、触媒アミノ酸のうちプロトン供与体はヒスチジン残基と報告され、糖質分解酵素一般では酸性アミノ酸であるのに対し、極めて特殊な存在である。

ミツバチには結合型と遊離型の2つのトレハラーゼが存在するが、本研究では結合型酵素について、1) 動的解析による活性に必須なアミノ酸残基の推定、2) 反応の遷移状態における中間体と反応機構の推定、3) 酵素遺伝子クローニングによるアミノ酸一次配列の推定と相同解析を目的に行われた。

1. 酵素の精製、諸性質と活性発現に必須な解離基の推定

結合型トレハラーゼの精製法を確立し、電気泳動的に単一な酵素標品を単離した。精製酵素の諸性質を調べた(分子量、約 69,000; 至適 pH, 6.8; pH 安定域, pH 4.5 - 12.5; 温度安定域, 15 分の処理で 40 °C 以下)。本酵素はトレハロースに対してのみ活性を示した。

活性発現に必須な解離基を動的解析で推定した。至適 pH よりアルカリ側で緩衝液による阻害が見い出された。阻害様式は拮抗型で、 K_i 値は pH で異なるが約 40 - 80 mM の範囲であった。低濃度の緩衝液において活性低下が大きいので、反応速度の緩衝液濃度依存性から "真の

反応速度"を算出した。この取り扱いを各基質濃度さらに各 pH で行い、 V/K_m 値を求め、pH との関係からアルカリ側の解離基の pK_a 値を推定した。至適 pH や酸性領域ではこのような阻害現象は認められず、 V/K_m 値の pH 依存性から酸性側解離基の pK_a 値を求めた。さらに同様な手法を用いて、解離熱や低誘電率の溶媒における pK_a 値の変化を調べ、酸性側・アルカリ側の活性解離基はともにカルボキシル基であると推定した。また、化学修飾の実験からも活性部位に酸性アミノ酸残基が存在する結果が得られた。

2. 加水分解反応における α -第二次アイソトープ効果

糖質加水分解酵素の反応において求核置換反応機構とオキソカルベニウムイオン反応機構が提唱されている。両機構は、基質の加水分解反応におけるアイソトープ効果の測定で区別できる。測定の際、基質となる $[1,1'-^2\text{H}]$ トレハロースを本酵素の縮合反応で調製した。縮合反応の最適条件を求め、軽水素標識のトレハロースも調製した。得られた2種類の生成物を単離・構造解析を行い、目的のものであることを確認した。両基質に酵素を作用させ、速度パラメータを求めた。 K_m 値は同一であったが、重水素標識基質に対する k_0 値が大きく低下し、軽水素基質の約 60 % となった。この比は、これまで報告された糖質加水分解酵素 (77-88 %) より約 20-30 % も低い値であり、最大級の α -第二次アイソトープ効果が観察された。従って、反応の遷移状態においてオキソカルベニウムイオン中間体が存在すること、この形成が律速になっていることが想定された。

3. 酵素遺伝子のクローニングと推定アミノ酸一次配列

精製酵素の N 末端および内部アミノ酸配列を調べた。得られたアミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、ミツバチ成虫から調製した cDNA ライブラリーに対し各種 PCR 法を組み合わせ、cDNA をクローニングした。得られたアミノ酸一次配列の N 末端 17 アミノ酸がシグナル配列であった。エドマン分解で求めた全ての内部配列が認められ、本遺伝子がミツバチの結合型トレハラーゼのものであると推定した。

他起源のトレハラーゼやそのホモログとの構造に関する相同解析を行った。一次構造上で約 35 から 40 % の高い保存性があり、予想される二次構造もほぼ一致した。しかし、酵素活性に必須であると報告されたヒスチジンは 1 残基も保存されておらず、触媒残基ではないことが明らかになった。これは 1. の結果を支持するものである。動的解析で触媒残基と推定した酸性アミノ酸は 5 残基保存されていた。これらのうち 2 残基が本酵素の触媒基、すなわち求核基とプロトン供与体と予想された。

以上のように本研究は、ミツバチが持つトレハラーゼの触媒アミノ酸残基、反応機構、一次構造の推定をを行ったものであり、トレハラーゼの触媒反応を考えるうえで学術的に貴重な基

礎的知見を提供している。

よって審査員一同は、Jin-Ha Lee が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。