博 士 (農 学) 姜 熙 權

学 位 論 文 題 名

Catalytic mechanism of glycoside hydrolase family 66 enzymes: dextranase and cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase

(グリコシドヒドラーゼファミリー66に属するデキストラナーゼと環状イソマルトオリゴ糖合成酵素の触媒反応機構)

学位論文内容の要旨

Based on amino acid sequence similarity, glycosylases are classified into more than 110 glycosyl hydrolase families (GHs). GH66 group is composed of two kinds of industrially important enzymes: dextranase and cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase (CITase). While the substrate is a dextran, dextranase and CITase catalyze completely different reactions: dextranase (EC 3.2.1.11) endowisely hydrolyzes an α-1,6-linkage of dextran; CITase (EC 2.4.1.248) synthesizes several cycloisomalto-oligosaccharides (CIs) from dextran. The reaction mechanism of GH66 enzymes has not been described clearly until now, so that the reaction mechanism of the dextranase and CITase was studied.

1. Mechanism-based inhibition of dextranase by ω-epoxyalkyl α-glucopyranosides

Dextranase (SmDex), used for the research, was prepared from *Streptococcus mutans* ATCC 25175 with the truncation at C- and N-terminal regions of original enzyme. The enzyme property and action pattern to dextran were identical to as those of recombinant enzyme without truncation. At first, SmDex was produced using *Escherichia coli* cells harboring SmDex-expression plasmid, followed by purification. To identify the catalytic amino acid residue of SmDex, the suicide substrate inhibition method was applied using mechanism-based inhibitor, by which the catalytic residue was specifically labeled. Three types of ω-epoxyalkyl α-glucoside (EAGs) [ω-epoxybutyl α-D-glucoside (E4G), ω-epoxypentyl α-D-glucoside (E5G), and ω-epoxyhexyl α-D-glucoside (E6G); having alkyl chains of various lengths] were tested to SmDex. Each EAG inactivated SmDex irreversibly with the pseudo-first order kinetics. Alkyl chain length-dependent inactivation was observed and the degree of activity loss was E5G, E6G and E4G, in that order, implying that the distance between epoxide group and glucosyl residue of EAG was important in modification of SmDex. Inactivation by E5G followed the model of reversible intermediate-complex formation mechanism (suicide inhibitor-based mechanism). The rate constant of irreversible inactivation (k) and the dissociation constant of intermediate-complex (K_R) of SmDex and E5G were 0.44 min^{-1} and 1.45 mM, respectively. This is the first research that EAG becomes a suicide inhibitor for endodextranase.

2. Structural elements involving in cyclization of CITase

CITase from *Bacillus circulans* T-3040 catalyzes four kinds of reactions: cyclization, intermolecular transglycosylation, coupling, and hydrolysis. In cyclization, this CITase produced mainly three types of CIs (CI-7, CI-8 and CI-9, having glucose units of 7-9, respectively) from dextran. According to amino-acid sequence comparison in GH66 enzymes, CITase contains the CBM6 near catalytic region as a specific insertion region. CBM (carbohydrate-binding module) is a partial protein structure to bind to the carbohydrate (mono-, oligo- and/or polysaccharide), so that CBM6 of CITase was considered to be a possible structural element for CI-production. CBM6-truncated CITase produced a small amount of CIs, suggesting that CBM6 is important in cyclization, but CITase also has another unknown structural element for cyclization. To elucidate the unknown structural element, the site-directed mutagenesis method was applied to Glu342, Trp344, His541, and Glu542 of CITase. Each mutant enzyme showed the different catalytic property compared with a parent CITase. E342Q drastically decreased its enzyme activity. Since Glu342 is conserved in all of GH66 enzymes, Glu342 is considered to be a catalytic residue. Trp344 was a candidate residue located at subsite +1 and W344A lost its enzyme activity completely. The cyclization activity (CA) and hydrolysis activity (HA) of H541A were decreased to 21% and 28% of parent CITase, respectively. The CA/HA-ratio (CA per HA) was estimated to be 75% (CA/HA-ratio of parent CITase being 100%), meaning HA became dominant by the mutation at His541. As for Glu542, two mutated enzymes of E542A and E542Q were constructed. Values of CA, HA and CA/HA-ratio of E542A were 9%, 18% and 53%, and those of E542Q were 44%, 61% and 73%, respectively. The reduction of CA/HA-ratio of His541- and Glu542-mutated CITase indicates that both residues of His541 and E542 are located at the important position of active site, such as the substrate-binding site.

In the reaction of CITase with dextran, CIs were produced dominantly at the initial stage. At the final stage, CITase degraded the produced CIs to form glucose, isomaltose, and isomaltotriose. CIs were reported as inhibitors of dextran sucrase (DSase) from lactic acid bacteria, a major enzyme to synthesize dextran. DSase utilizes the isomaltooligosaccharides to form dextran as acceptor substrate. Therefore, it is suspected that, in the natural environments where both of CITase and DSase are secreted from each host, CIs give a benefit to *B. circulans* T-3040 by inhibiting dextran-formation from isomaltooligosaccharides. All degradation products from dextran by CITase reaction (such as linear and cyclic isomaltooligosaccharides as well as glucose) are thought to be utilized by *B. circulans* T-3040.

学位論文審査の要旨

主 査　教 授　木 村 淳 夫
副 査　教 授　横 田　　篤
副 査　准教授　森　　春 英

学 位 論 文 題 名

Catalytic mechanism of glycoside hydrolase family 66 enzymes: dextranase and cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase

（グリコシドヒドラーゼファミリー66に属するデキストラナーゼと環状イソマルトオリゴ糖合成酵素の触媒反応機構）

本論文は、英文66頁、図14、表4、2章からなり、参考論文5編が添えられている。

グリコシラーゼは、アミノ酸配列の類似性に基づいて現在110以上のグルコシド ヒドラーゼ ファミリー（GH）に分類されている。GH66のグループには、産業上において重要な2つ酵素［デキストラナーゼと環状イソマルトオリゴ糖合成酵素（CITase)］が所属する。両酵素の基質はデキストランであるが、全く異なる反応を触媒する。すなわち、デキストラナーゼはエンド型の加水分解活性を示すのに対し、CITaseは分子内転移を行い、環状イソマルトオリゴ糖（CI）を生成する。GH66糖質酵素の反応機構はこれまで明らかにされておらず、本研究で分子解析を行った。

（1）ω-エポキシアルキルα-グルコピラノシドによるデキストラナーゼの自殺基質型失活

GH66に属す *Streptococcus mutans* ATCC 25175 由来のエンド型デキストラナーゼの組換え酵素（SmDex）を生産・精製し本実験に用いた。SmDexの触媒アミノ酸を決定するため、3種類のω-エポキシアルキルα-グルコピラノシド［3',4'-エポキシブチルα-D-グルコピラノシド（E4G)、4',5'-エポキシペンチルα-D-グルコピラノシド（E5G）および5',6'-エポキシヘキシルα-D-グルコピラノシド（E6G）：アグリコンのアルキル鎖長が異なる］の本酵素に対する失活機構を調べた。E4G、E5GおよびE6Gを作用させると、SmDexは擬一次的な活性低下を示した。アルキル鎖長に依存した失活が認められ、失活の度合いはE5G>E6G>E4Gであった。従ってω-エポキシアルキルα-グルコピラノシドのグルコース残基とエポキシ基の距離が、SmDexの失活に対し重要であることが判明した。

最も高い失活を示したE5G を選択し詳細な解析を行った。E5Gは可逆的な中間体を形成する失活機構（自殺酵素型の失活機構）を与え、不活性化の一次定数（k）と中間体の解離定数（K_R）はそれぞれ0.44 min^{-1}および1.45 mMと算出された。不活性化反応の二次速度定数（k/K_R）は、水溶液中におけるエポキシドによるアニオン攻撃の二次速度定数の約 10^5 倍大きな値であり、E5G はSmDex の触媒アミノ酸に結合すると示唆された。本論文は、ω-エポキシアルキルα-グルコピラノシドがエンド型デキストラナーゼの自殺基質になることを示す初めての報告である。

（２）CITaseの環状化反応に関わる構造因子の解析

Bacillus circulans T-3040 の CITase は４つの反応（環状化反応、分子間転移反応、カップリング反応および加水分解反応）を触媒する。主反応である環状化作用により、本酵素は３種類のCI（CI-7、CI-8 と CI-9 と略；グルコース残基がそれぞれ７～８の CI）をデキストランから生産する。GH66糖質酵素のアミノ酸配列比較から、環状化反応に関わる構造因子として、Glu342、Trp344、His541およびGlu542に注目し、部位特異的な変異を発生させた。E342Qは触媒作用を完全に失った。Glu342は GH66 酵素の全てに完全保存されており、触媒アミノ酸と考えられた。Trp344 はサブサイト+1に位置すると想定され、その変異酵素（W344A）は活性を全く示さなかった。His541 の Ala 置換酵素が示す環状化活性（CA）および加水分解活性（HA）は、親酵素に比べそれぞれ21% および28%に低下した。両活性の比（CA/HA と略；親酵素を 100%とする）は75%となり、環状化反応の度合いが減少することが判明した。Glu542 について作製したE542A と E542Qも同様な現象を示し、それらの CA、HA および CA/HA はそれぞれ 9%、18%と 53%（E542A）ならびに 44%、61%と 73%（E542Q）と測定された。従って、His541 と Glu542 は環状化反応に重要な構造因子と考えられ、基質結合部位に存在すると推定した。

本研究は、２つの GH66 糖質酵素（SmDex と CITase）を取り上げ、SmDexについてはω-エポキシアルキルα-グルコピラノシドが自殺基質型の失活機構で本酵素に作用することを究明した。CITase に関しては４つのアミノ酸残基の機能を解析し、特に His541 と Glu542 が本酵素の環状化反応に重要な構造因子であることを推定した。以上のように本研究は、反応機構が解明されていないGH66 糖質酵素に関し学術的に重要な新知見を提供した。

よって審査員一同は、Hee-Kwon Kang 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。