

学位論文題名

Molecular analysis of glycoside hydrolase family 13 honeybee α -glucosidase isoenzymes: Involvement of amino acids at conserved region II in substrate specificity and regioselectivity of transglucosylation

(グリコシドヒドラーゼファミリー13に属するミツバチ α -グルコシダーゼの分子解析:

基質認識・糖転移反応の立体特異性に対する保存領域IIに存在するアミノ酸の機能)

学位論文内容の要旨

Based on amino-acid sequence similarity, glycosylases are classified into about 130 glycosyl hydrolase families (GHs). There are three honeybee (*Apis mellifera*) GH 13 α -glucosidase isozymes (HBG-I, HBG-II and HBG-III), each of which is different in enzymatic property, substrate specificity, and regioselectivity of transglucosylation, amino-acid sequence, and localization and physiological function. In order to clarify the amino acid(s) responsible for the specific enzymatic properties of HBG-I, HBG-II and HBG-III, this study focused on the residues in the region II of catalytic site by replacing the amino acids near catalytic residues with the equivalent ones found in the other isozymes. Some mutants enhanced catalytic ability, and altered substrate specificity and transglucosylation specificity, by which function of mutated residue is revealed.

1. Asn226 and His227 in region II of HBG-II:

α -Glucosidases catalyze hydrolytic reaction in the low substrate concentration. In HBG-II, two amino acid residues at catalytic site region II (Asn226 and His227) were mutated to generate N226P, H227Y, and N226P/H227Y, and glucose-releasing velocity from substrate was estimated. All derivatives and recombinant enzymes were heterologously produced with *Pichia pastoris*-system. N226P or H227Y displayed about 2-time or 3-time higher specific activity (using 5.8 mM maltose), respectively, than wild-type HBG-II did. The k_{cat}/K_m value of N226P increased about 4-time, due to both increases of k_{cat} and $1/K_m$ values. H227Y decreased the k_{cat}/K_m value by 0.5-time, because of a large decrease of $1/K_m$ value. However, the k_{cat}/K_m values for sucrose were enhanced about 5-time (N226P) and 1.5-time (H227Y). Interestingly, H227 exhibited almost no substrate-inhibition at the high substrate concentration, while wild-type HBG-II or H227Y showed a strong substrate-inhibition (maltose: 10 to 150 mM; sucrose: 30 to 150 mM for H227Y and 100 to 150 mM for wild-type HBG-II). A double mutant (N226P/H227Y), exhibiting the highest activity at the high substrate concentration of four enzymes, also did not accept any substrate-inhibition, although it

displayed the moderate enhancement of k_{cat}/K_m values at those two substrates. P226N and P226N-Y227H catalyzed both of α -1,4- and α -1,6-transglucosylations (forming maltotriose and panose from maltose; erlose and theanderoose from sucrose). P226N-Y227H accumulated the α -1,6-transglucosylation-products more than that of α -1,4-transglucosylation.

2. Leu225, Pro226, Tyr227, Ile228, and Cys229 in region II of HBG-III:

Mutation at 5 residues (Leu225, Pro226, Tyr227, Ile228, and Cys229) in the conserved region II of HBG-III has generated 11 mutants: 7 single mutants (L225I/V, P226N, Y227H, I228L/M, and C229F), 4 double-mutants (L225I/P226N, P226N/Y227H, Y227H/I228L/M).

The k_{cat}/K_m value of Y227H for maltose was increased by about 15-time, which was the largest in single-mutants, while its k_{cat}/K_m value for sucrose was similar to that for wild-type HBG-III. This property implied that the double-mutation containing Y227H could enhance more maltose-specific activity. Both of Y227H/I228L and Y227H/I228M showed larger k_{cat}/K_m value than Y227H at maltotriose. At maltose, those double mutants had almost the same value to Y227H. Y227H, Y227H/I228L and Y227H/I228M exhibited the strong substrate-inhibition at high maltose concentration of 10 to 150 mM, while wild-type HBG-III did not perform this inhibition.

For maltose, P226N showed such low k_{cat}/K_m value as about 10% of the wild type enzyme, while values for sucrose was not altered, implying that more sucrose-specific mutation was possible at P226N-containing double-mutation. L225I/P226N and P226N/Y227H were produced, and their activities at sucrose and maltose were compared. L225I/P226N maintained its activity at sucrose, while the k_{cat}/K_m value for maltose was decreased by 0.1-time. P226N-Y227H catalyzed α -1,6-transglucosylation from the both substrates. Its rate of α -1,6-transglucosylation on maltose was higher than that of α -1,4-transglucosylation.

3. Conclusion:

Amino-acid sequence alignment work on catalytic region II of HBGs indicates that Asn226-His227 of HBG-II corresponded into Pro226-Tyr227 of HBG-III. Findings above-mentioned strongly indicated that both of Asn226-His227 (HBG-II) and Pro226-Tyr227 (HBG-III) regulate the substrate specificity and the regioselectivity of transglucosylation of GH 13 α -glucosidases. In particular, HBG-III is a honey-producing enzyme. Its quite high k_{cat} and K_m values at sucrose (meaning the high activity and low affinity against highly concentrated sucrose in nectar) contribute to the honey-formation without any substrate inhibition, meaning that honeybees acquired extremely honey-producing α -glucosidase by mutating its catalytic region II, i.e. Pro226-Tyr227 of HBG-III.

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	森	春 英
副 査	教 授	松 井	博 和
副 査	教 授	横 田	篤

学 位 論 文 題 名

Molecular analysis of glycoside hydrolase family 13 honeybee α -glucosidase isoenzymes: Involvement of amino acids at conserved region II in substrate specificity and regioselectivity of transglucosylation

(グリコシドヒドラーゼファミリー13に属するミツバチ α -グルコシダーゼの分子解析:
基質認識・糖転移反応の立体特異性に対する保存領域IIに存在するアミノ酸の機能)

本論文は英文 171 頁, 図 62, 表 48, 6 章からなり, 参考論文 1 編が付されている。

糖質加水分解酵素は一次構造および触媒する反応に基づいて 130 のファミリーに分類されている。ミツバチ *Apis mellifera* には, ファミリーGH13 に属する α -グルコシダーゼのアイソザイムが 3 種(HBG-I, HBG-II, および HBG-III)あり, それぞれ基質特異性, 転移反応における位置選択性など異なる酵素学的性質を示す。本研究は HBG-I, HBG-II および HBG-III 各々の特異的性質を明確にするとともに, これに強く関与するアミノ酸残基の特定を行い, 特に領域 II の 2 アミノ酸残基 (HBG-II の Asn226-His227, HBG-III の Pro226-Tyr227, HBG-I の Pro233-His234 に該当)が各酵素の機能決定因子として強く関与することを明らかにしたものである。

1) HBG-II の領域 II に属する Asn226 および His227 の解析

HBG-II の該当アミノ酸の変異酵素(N226P, H227Y, および二重変異酵素)を *Pichia pastoris* を宿主として作成し, 解析した。基質低濃度領域において, 野生型酵素は maltose を最も良い基質としながらも, kojibiose, isomaltose, sucrose 等にも良く作用した。N226P は更に高い maltose 特異性を示し, k_{cat}/K_m は 5 倍に増加した。一方, H227Y を含む一重・二重変異酵素では k_{cat}/K_m は maltose に対して 0.5 倍以下に低下, sucrose に対し 2~4 倍に増加して, sucrose に対する活性が maltose 水解活性を大きく上回った。HBG-II 野生型は基質高濃度領域において基質阻害様速度低下を示したが, H227Y および二重変異酵素では解消され, 通常の Michaelis-Menten 式に従った。野生型 HBG-II は maltose および sucrose いずれを基質としても加水分解に加えて糖転移を触媒して, 専ら α -1,6-グルコシド結合を生成した (それぞれ panose: Glc- α 1,6-Glc- α 1,4-Glc および theanderose: Glc- α 1,6-Glc- α 1, β 2-Fru)。これに対して,

N226P および N226P/H227Y は α -1,6-グルコシル転移に加えて、 α -1,4-グルコシル転移も触媒し、これにより maltotriose および erlose (Glc- α 1,4-Glc- α 1, β 2-Fru)を生成した。特に二重変異酵素は α -1,6 転移生成物と比べ α -1,4 転移生成物をよく生成し蓄積した。

2) HBG-III の領域 II に属する Leu225, Pro226, Tyr227 Ile228 および Cys229 の解析

HBG-III では、該当アミノ酸(Pro226, Tyr227)を含む 5 アミノ酸残基に変異を導入し、7 一重変異酵素, 4 二重変異酵素, 合計 11 変異酵素を作成して解析した。maltose および sucrose に対して L225V が高い k_{cat} および K_m を示すなど特徴が見られたが、性質の大きな変化は P226N および Y227H 変異を含む変異酵素において観察された。HBG-III は sucrose を最も良い基質とするが、Y227H は maltose に対して 2.5 倍 (比野生型) の k_{cat} 増加と 5.8 倍の K_m 減少により 14 倍もの k_{cat}/K_m 値増加を示し(sucrose に対してはいずれも野生型と同等), maltose を最も良い基質とした。HBG-III 野生型酵素は基質阻害様式を示さないが、Y227H は特に maltose に対して強い基質阻害様式を示した。糖転移反応は、野生型 HBG-III が α -1,4 転移のみを触媒するのに対し、P226N および特に P226N/Y227H 二重変異酵素は α -1,6 転移を良く触媒した。また 150 mM maltose に対する転移率 (水解速度と転移速度の合計値に対する転移速度の比) は、野生型で 68%であるのに対し、Y227H および P226N/Y227H はほぼ 100%となり、高い転移能を示した。

HBG-III はハチミツ生成に関与する主要な酵素である。濃縮花蜜中の高濃度ショ糖水解には高い k_{cat} ならびに低基質阻害が望まれる。西洋ミツバチ *Apis mellifera* は、領域 II の 2 残基 Pro226-Tyr227 により、ハチミツ生成酵素を獲得したと考えられる。

以上、本研究では HBG-I, HBG-II および HBG-III の配列領域 II 内のアミノ酸残基への変異導入により、基質特異性、反応速度、基質阻害様現象、糖転移の位置選択制ならびに糖転移率に大きな変化を与え、すなわちこれら 2 残基の組み合わせが、HBG-I, HBG-II および HBG-III の酵素機能を決定する主要構造因子であることを示した。本研究成果は、領域 II を共有する多種多様な GH13 酵素 (α -アミラーゼ関連酵素) にも適用できる可能性も高く、遺伝子アノテーションならびに糖転移反応を応用したオリゴ糖生産への利用可能性も高い。

よって審査員一同は、Lukana Ngiwsara 氏が博士 (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。