



Title	Three-dimensional-structure of Malto-oligosyltrehalose synthase
Author(s)	小林, 正則
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43610">https://hdl.handle.net/11094/43610</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	こ ばやし まさ のり 小 林 正 則
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 7 8 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科高分子科学専攻
学 位 論 文 名	Three-dimensional-structure of Malto-oligosyltrehalose synthase (マルトオリゴシルトレハロース合成酵素のX線結晶構造解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 月 原 富 武  (副査) 教 授 後 藤 祐 児    助教授 松 浦 良 樹    助教授 金 子 文 俊

### 論 文 内 容 の 要 旨

マルトオリゴシルトレハロース合成酵素 (MTSase) は、マルトオリゴシルトレハローストレハロ加水分解酵素と共にマルトオリゴ糖に作用して、効率よくトレハロースを合成する。トレハロースは、優れた蛋白質保護作用を持つ二糖で、現在では前述した生合成反応によって大量に合成され、広く食品などに応用されている。また、MTSase は酵素反応としては比較的まれな、分子内置換反応を行うことでも知られており、また  $\alpha$ -アミラーゼファミリーでは特異な、還元末端部位の認識を行っている。

我々は、このような MTSase の反応および基質認識様式を分子レベルで解明するために、MTSase の詳細な構造を X 線結晶構造解析によって解明することとした。

MTSase の結晶化の際に、蛋白質分子の化学修飾のひとつである、リジン還元メチル化法を行った。さらに、より精密に結晶化条件を設定する事によって、空間群  $P2_1$ 、格子定数が  $a=56.5$ 、 $b=68.5$ 、 $c=93.8$  Å、 $\beta=101.5^\circ$  の結晶を作成した。この結晶を用いた回折実験では、放射光施設 Photon Factory において 1.9 Å 分解能でネイティブデータを収集した。

この結晶を用いて、重原子同形置換法により位相を決定し、MTSase の構造解析を行った。使用した重原子誘導体は、 $K_2UO_2F_6$  と  $Hg(CH_3COO)_2$  の二種類であった。これら二種類の重原子誘導体からは、実験室系の回折実験装置で、それぞれ 2.4 Å、2.7 Å 分解能のデータを収集した。

ネイティブデータと 2 種類の重原子誘導体からのデータから重原子の位置を差パターン図より決定して、それを用いてプログラム SHARP により重原子位置の精密化および初期位相の決定を行った。

この初期位相を用いて計算された電子密度図を基に、プログラム O を用いて MTSase のモデルを構築し、それをプログラム XPLOR で精密化した。その結果 MTSase の全体構造が決定でき、最終的な R および free-R 値はそれぞれ 19.7、25.6% となった。

その全体構造から判明した主だった特徴を挙げると

1. ドメイン A, B, C から構成され、ドメイン A には他の  $\alpha$  アミラーゼと同様に、 $(\beta/\alpha)_8$  パレルが存在した。
2. MTSase の  $(\beta/\alpha)_8$  パレルは、5 本目の  $\alpha$ -ヘリックスが欠損しており、6 本目の  $\beta$ -ストランドが乱れた構

造をとっていた。

3.  $\alpha$ -アミラーゼで保存されている、活性に関与するアミノ酸残基の配置は、MTSase でも保存されていた。

4. 活性部位と推測される部分は、他の  $\alpha$  アミラーゼと違い、2つのセグメントで覆われており、ポケットを形成していた。

以上のことから、MTSase の反応は二段階で進むと推測できた。この二段階反応は、最初に  $\alpha$ -アミラーゼ様の反応で還元末端側のグルコース-1分子が切断され、遊離したグルコースが反転して再結合すると考えられる。この再結合に際しては、活性部位を覆う構造が、遊離したグルコース分子を保持しておくためだけでなく、反転および再結合に重要な働きを持つリジン残基を保持していることから、反応そのものに対して非常に重要な働きをしていると推測された。

#### 論文審査の結果の要旨

小林君の論文は、マルトオリゴトレハロース合成酵素のX線結晶構造解析とそれに基づいた酵素反応機構の解明に関するものである。この酵素はマルトオリゴサッカライドの末端でグルコースを分子内転位させてマルトオリゴトレハロースを合成する。当初、各アミノ酸残基を同定し原子座標をきめるのに十分な結晶を得ることができなかったが、リジン残基をメチル化して結晶を作成することによって、再現性良く良質の結晶を得ることに成功した。立体構造に基づいて基質結合のモデルを作成し、分子内転位反応の機構を解明することができた。分子内転位機構の解明の事例は希であり、この研究は分子内転位反応のを制御する酵素の役割を解明することができた画期的研究である。よって、この論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。