

# トレハロース代謝酵素の生化学的性質と物質合成への応用に関する研究

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生物化学 田口 陽大

## 1. 背景と目的

トレハロース (Tre,  $\alpha$ -D-GlcP-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-GlcP) は、生体では一般的にトレハロース 6-リン酸 (Tre6P) を中間体として合成される。Tre や Tre6P は、植物の生長やストレス耐性を調節するが、その機構は明らかでない。Tre および Tre6P の機能評価や、これらの量を調節する代謝酵素の生化学的解析は、Tre 代謝の理解に有益な情報を与える。本研究では 1) 希少な Tre6P およびその類縁体の合成と、2) *Arabidopsis thaliana* の唯一のトレハラーゼ (Tre を加水分解する) とアノテーションされる AtTRE1 の酵素化学的性質解明を目的とした。

## 2. 結果と考察

1) **Tre6P および Tre6P 類縁体の合成** *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 由来の Tre6P 加リン酸分解酵素 (L1TrePP) を用いた Tre6P 合成を検討した。本酵素の加リン酸分解の逆反応により  $\beta$ -Glc1P と Glc6P (各 100 mM) から Tre6P が収率 92% で生成された。次にマルトース (Mal) と Glc6P から Tre6P を合成した。マルトースホスホリラーゼによる Mal からの  $\beta$ -Glc1P 生成反応と、L1TrePP の Tre6P 合成反応とのカップリングにより、Tre6P が収率 65% で得られた。基質を Mal と無機リン酸のみとし、 $\beta$ -ホスホグルコムターゼを追加した。これにより Mal から生成する  $\beta$ -Glc1P が一部 Glc6P に変換され、L1TrePP の基質となる。反応条件を検討し、100 mM Mal, 50 mM 無機リン酸とした時に Tre6P 33 mM が生成した (収率 66%)。L1TrePP は、主に Glc6P を基質としたが、Man6P も基質とし、Glc6P 比で 0.05% の活性を示した。 $\beta$ -Glc1P と Man6P から、新規糖リン酸  $\alpha$ -GlcP-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -Man6P が収率 88% で合成された。

2) **AtTRE1 の生化学的諸性質** 大腸菌による組換え AtTRE1 の生産を検討したが、全長 AtTRE1 は生産されず、予測膜貫通領域 (Met1-Leu63) を除いた dNAtTRE1 が生産された。精製酵素を解析した。反応速度の pH 依存性に関して、 $k_{cat}/K_m$  は pH 4.5 で最大値を示したのに対し、 $k_{cat}$  は pH 3.7 と pH 6.9 で 2 つの極大値を示した。これより基質結合による触媒残基の解離状態の変化が想定された。各種の  $\alpha$ -グルコシド (12 種類) を用いて基質特異性を解析した。dNAtTRE1 は Tre, Tre6P, Glc  $\alpha$ 1- $\alpha$ 1Xyl, Glc  $\alpha$ 1- $\alpha$ 1Gal および Glc  $\alpha$ 1-4-L-Ara を基質とした。Glc  $\alpha$ 1-4-L-Ara と Glc  $\alpha$ 1- $\alpha$ 1Gal に対する  $k_{cat}/K_m$  は、pH 3.7 では同等であったが、pH 6.9 では Glc  $\alpha$ 1-4-L-Ara に対して高い  $k_{cat}/K_m$  を示した。Tre6P に対しては、いずれの pH においても調べた基質の中で最も低い  $k_{cat}/K_m$  を示したが、pH 3.7 において、pH 6.9 における  $k_{cat}/K_m$  の 166 倍の値を示した。すなわち、dNAtTRE1 の基質特異性は pH に依存して変化した。AtTRE1 のモデル構造を、大腸菌のトレハラーゼ TreA の構造に基づき予測した。モデル構造では基質結合部位がループ構造によりほぼ完全に覆われており、基質・生成物の出入りに伴うループ構造の開閉が考えられた。この構造変化が、pH に依存した酵素機能の変化に関与する可能性がある。