

## 《農芸化学奨励賞》

## 糖質分解酵素と特殊環境で働く酵素の構造生物学的研究



東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 助教 伏 信 進 矢

## はじめに

生物環境において普遍的に存在する糖質をどのように分解してエネルギー源としていくかは、生き物にとってまさに「メシの種」の問題であろう。糖質をエネルギー源とする分解経路においては、加水分解とともにリン酸の付加・除去がキーとなり、そのような反応を触媒する糖加水分解酵素、糖加リン酸分解酵素（糖ホスホリラーゼ）、糖キナーゼなどが重要な役割を担う（図1）。多糖は構成糖と重合様式の違いに起因する多様性をもち、グリコシド結合を分解する酵素は、それに応じた多様な機能をもつ必要がある。実際、これまでに知られている糖質関連酵素のファミリーの数は非常に多く、フォールドもさまざまであることから、これらの酵素が複数の起源から進化してきたことがわかる。さらに、特殊環境で生育する微生物は、周囲の環境に合わせて、効率的に働く酵素を獲得してきたと考えられる。さまざまな基質と特殊環境に適応した酵素のメカニズムを理解し、応用に結びつけていくには、その立体構造を知ることが不可欠である。

本研究では、糖質分解酵素と特殊環境で働く酵素を中心に X 線結晶構造解析を行い、多くの重要な知見を得た。以下にその主な成果を記す。

## 1. 酸性キシラナーゼの好酸性機構の解明

焼酎醸造に用いられている白麹菌は培地に大量のクエン酸を出してその pH を大幅に下げる。白麹菌が培地中に分泌する 3 種の主要なキシラナーゼのうち、キシラナーゼ C は至適 pH が 2.0 で pH 1.0 まで安定な、非常に好酸性・耐酸性のキシラナーゼであり、Glycoside Hydrolase ファミリーでは GH11 に属する。本酵素の立体構造を決定した結果、活性中心の酸/塩基触媒残基 Glu170 と、その近傍に位置する Asp37 が距離 2.8 Å の強い水素結合を作っていることを見いだした。至適 pH が 4.5 以下の好酸性キシラナーゼでは Asp37 に相当する残基は必ず Asp であるのに対し、至適 pH が 4.5 以上の中性/アルカリ性キシラナーゼではこれにあたる残基は Asn であり、Glu との距離も 3.1 Å 以上と離れている。そこで、Asp37 を Asn

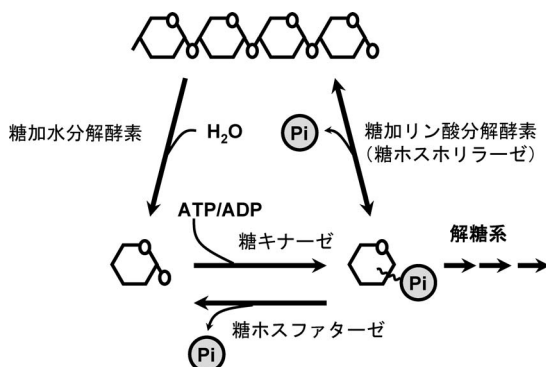


図1 糖・リン酸の結合の生成・切断にかかわる酵素

に置換した変異体を作製したところ、至適 pH が 5.0 へと大幅にシフトしたことから、この残基の違いが GH11 キシラナーゼの至適 pH を決定する主要因であることを明らかにした。また、本酵素の分子表面の静電ポテンシャルを可視化したところ、全体的に強い負電荷を帯びており、特に基質結合クレフトともう一つの面に偏って集中していることがわかった。このように極端な表面電荷の存在は他の耐酸性酵素だけでなく、耐塩性酵素、耐アルカリ性酵素などでも知られており、特殊環境で働く酵素の特徴の一つと考えられた。

## 2. 還元末端キシロース遊離エキソオリゴキシラナーゼ

分岐糖鎖は非還元末端を数多くもつため、通常のエキソ型糖質分解酵素は非還元末端から糖を切り出す。ところが、好アルカリ性土壌細菌 *Bacillus halodurans* がもつ菌体内酵素 BH 2105 は、キシロオリゴ糖の還元末端からキシロースを遊離するという非常に変わった活性をもっていることから、還元末端キシロース遊離オリゴキシラナーゼ (REX) と名づけられた。REX の立体構造を決定し、この酵素の基質結合部位は、 $-2 \cdot -1 \cdot +1$  の、合計 3 つのサブサイトからなっていることが確認された（図2）。さらに、還元末端側 (+1) の先、+2 に当たる部分に存在するループが基質結合クレフトを塞いでいることから、本酵素がユニークな基質特異性をもつ理由が判明した。また、本研究は反転型糖加水分解酵素としては初となるグライコシターゼ（変異導入型糖鎖合成酵素）の設計の基盤となった。

## 3. 新規 GH ファミリー酵素

糖質関連酵素はフランスの Henrissat らによりアミノ酸配列の相同性を元に分類されている (<http://www.cazy.org>)。糖加水分解酵素を中心とした GH、糖転移酵素を中心とした GT (Glycosyl Transferase)、糖質結合モジュールである CBM (Carbohydrate Binding Module) などのクラスに分かれるが、それぞれ数十を超えるファミリーからなり、なかでも GH は

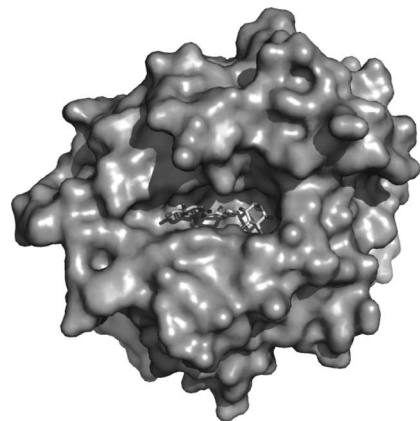


図2 REX の分子表面

左から右に、サブサイト-2、-1、+1 に結合したキシロースを示す。

110以上のファミリーからなる最大のクラスである。構造未知のGHファミリーの立体構造の決定は、同じファミリーに属する相同な酵素群の構造の「代表例」となり、タンパク質工学に不可欠な情報を提供する。これまで新規に決定した4種のGHファミリー(GH42, 54, 57, 94)のうち2種について以下に記す。

①糖加リン酸分解酵素(糖ホスホリラーゼ)は、糖鎖に水ではなくリン酸を付加しつつグリコシド結合を切断する酵素であり、その反応可逆性によりオリゴ糖を効率よく合成できる有用酵素である。ホスホリラーゼはリン酸転位反応を触媒するため、原則的にGTファミリーに分類されてきた。しかし、当初GT36に分類されていたキトビオースホスホリラーゼの立体構造を決定した結果、加水分解酵素であるGH15グルコアミラーゼと、GH65に分類されるマルトースホスホリラーゼに類似していることが明らかになった。活性中心付近のトポロジーもよく似ており、酸触媒残基(Asp492)の位置は、GH15とほぼ一致していた。反転型加水分解酵素では水による求核攻撃を塩基触媒残基(プロトン受容体)が助けるが、本酵素ではこの位置にリン酸が結合し、直接アノマー炭素に求核攻撃を行うことがわかった。上記の理由からGT36は廃止され、新設ファミリーGH94への再分類が確定した。現在では、糖質ホスホリラーゼは、保持型GTタイプ(GT35グリコゲンホスホリラーゼやGT4トレハロースホスホリラーゼなど)、保持型GHタイプ(GH13スクロースホスホリラーゼなど)、反転型GHタイプ(GH94やGH65など)に分類されることがわかってきており、その立体構造が決定されるまではGHまたはGTへのクラス分けは留保されるようになっている。

同じくGH94に属するセロビオースホスホリラーゼにおいては、結晶構造をもとに基質結合部位へのドッキング解析および分子動力学解析を行い、その反応に伴った基質のコンホメーション変化の詳細を明らかにした。基質(セロビオース)のグリコン部位は、溶液中では $^4C_1$ コンホメーションが安定であるが、ES複合体の状態では $^1S_3$ 遷移状態(オキソカルベニウムイオン様中間体)では $E_3$ を経て、反応産物(グルコース1-リン酸)では再び $^4C_1$ に戻ることが示唆された。

②焼酎醸造においてヘミセルロース分解とフレーバー生成を助けることがわかっている、白麹菌由来の $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの立体構造をGH54として初めて決定した。その結

果、構造的にも機能的にも新規な糖質結合モジュールが存在することを発見し、新たなファミリー(CBM42)として認定された。また、CBM42はアラビノース側鎖のみを特異的に認識することが明らかになった。それまで知られているCBMは、結晶性セルロースなどの疎水表面に結合するもの、グリカン鎖を包むように結合するもの、オリゴ糖に結合するレクチン様の3タイプが知られていたが、CBM42のように単糖を認識するタイプは初めてであった。

#### 4. 特殊環境で働く酵素群

難分解性の芳香族系炭化水素であるクメンの分解菌の酵素群のうち、鍵酵素の一つである加水分解酵素(CumD)の結晶構造を決定した。CumDと8種類の基質アナログの複合体構造も決定し、その基質認識の詳細を明らかにした。さらに、超好熱性古細菌を中心に特殊環境で働くタンパク質の新規構造を多数解明し、金属結合タンパク質スルエリスリン、フルクトース1,6-ビスホスファターゼ、ADP依存性グルコキナーゼなどの研究を通じて構造生物学的に重要な成果を得た。

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻酵素学研究室で行われたものです。研究を行う機会を与えていただき、同研究室においてご指導、ご助言を賜りました太田隆久先生、松沢 洋先生、酒井 坦先生、田口速男先生、祥雲弘文先生、若木高善先生に深甚なる感謝の意を表します。また本研究は同研究室で研究を行われた多くの皆様の多大なる努力の賜物であり、伊藤創平博士、今村博臣博士、西増弘志博士、日高將文博士、宮永顕正博士をはじめご協力いただきましたすべての卒業生、在学生、在籍者の皆様に厚く御礼申し上げます。ご指導・ご鞭撻いただきました伊藤 清先生、岩田 想先生、大森俊雄先生、北岡本光先生、小関卓也先生、今野美智子先生、西山 真先生、濡木 理先生、野尻秀昭先生、林 清先生、Peter J. Reilly先生、元島英雅先生、山根久和先生に心より御礼申し上げます。また本研究は共同研究者の皆様のご協力なくしてはなしえませんでした。ここですべての方のお名前を挙げることはできませんが、皆様に深く感謝申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関東支部長の久保田紀久枝先生と諸先生方に厚く御礼申し上げます。