

《農芸化学奨励賞》



植物多糖に作用する糖質分解酵素の構造生物学的研究

独立行政法人農業生物資源研究所・タンパク質機能研究ユニット 主任研究員 藤 本 瑞

デンプンやセルロースなど人間の生活に密接にかかわっている植物多糖を分解し利用する研究は古くから行われているが、最近バイオマス、バイオ燃料という形で改めて脚光を浴びている。一方で、近年の糖研究の飛躍的な進歩により、糖や糖鎖の構造や機能が次々と明らかになり、糖鎖生物学が注目されている。植物糖鎖の食品・工業への応用もその版図を広げており、多種多様な糖や糖鎖の機能が明らかとなり利用されるようになってきている。筆者は糖質分解酵素の食品・製糖分野への応用に必要な分子研究基盤確立のための構造生物学研究を行い、酵素の植物多糖認識機構の解明を行っている。これまで行った研究の中から、以下にキシラナーゼ、 α -アミラーゼおよび α -ガラクトシダーゼについて簡単に紹介させていただく。

1. 放線菌キシラナーゼとその糖結合モジュールの構造生物学研究

キシラナーゼはヘミセルロースの主成分であるキシランを加水分解する酵素であり、主に糸状菌や土壌細菌が生産する。不溶性基質であるキシランを効率良く分解するために、触媒ドメインのほかに同一分子内に基質結合ドメインを有するマルチドメイン構造をもつキシラナーゼの存在が知られていた。しかしその構造が仇となって、分子全体の結晶構造解析が成功せず、触媒ドメイン、基質結合ドメインのみの構造解析しか行われていなかった。そのようななか、糖加水分解酵素ファミリー10 (GH10) に属する触媒ドメインと糖結合モジュールファミリー13 (CBM13) に属する基質結合ドメインを有する放線菌 *Streptomyces olivaceoviridis* キシラナーゼの両ドメイン存在下での結晶構造の決定に成功した (図1)。

触媒ドメインは $(\beta/\alpha)_8$ バレル、CBM13は3回繰り返し配列より構成される球状ドメイン構造を有しており、両ドメイン間にはリンカーペプチドが存在していた。このリンカーの電子密度は明瞭に観察されず、リンカー部位はフレキシブルな構造をとること、および両ドメインは独立して基質に作用するという酵素作用機構が示唆された。キシロオリゴ糖との複合体解析よ

り触媒ドメインの五つのサブサイトを特定した。さらに、アラビノフラノースやグルクロン酸の側鎖付キシロオリゴ糖との複合体構造解析より、本酵素の天然キシランに対する基質認識機構を明らかにした。

放線菌キシラナーゼの基質結合ドメイン CBM13 は、40 アミノ酸程度の長さの類似配列が3回繰り返して構成される β トレフォイルと呼ばれる構造を呈しているが、これは植物毒素であるリシンのB鎖に代表されるガラクトース結合レクチンとしてこれまでよく知られていたものである。今回の解析により、キシラナーゼのCBM13は、3回繰り返しの各サブドメインに一つずつ計三つのキシラン結合部位を有していることが示された。キシラナーゼのCBM13は長鎖キシロオリゴ糖に対し鎖の途中のキシロースを認識できること、および対称性の高い基質であるキシランに対し2方向で結合できることも明らかになった。これらの結果からキシラナーゼのCBM13は、3カ所ある基質結合部位のいずれかが難分解性基質にうまく結合し、酵素を基質周りにとどめることにより分解効率を引き出すというユニークな戦略をとっていることが示唆された。

また、ミズ由来ガラクトース結合レクチンや、アラビノピラノシダーゼのL-アラビノース結合ドメインの構造解析も行い、総合的にCBM13の糖認識機構を明らかにした。CBM13の糖結合部位の場所は共通で、糖を認識するいくつかのアミノ酸は非常によく保存されているが、糖の結合様式を変えることで、異なる糖を認識することが可能になっていることが明らかとなった。

2. α -アミラーゼの構造生物学研究

α -アミラーゼはデンプンやマルトオリゴ糖の α -1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素であり、食品・化学工業での利用価値が高く、分子設計のターゲットにもなっている。基質結合構造や阻害剤複合体構造を含むGH13に属する枯草菌 *Bacillus subtilis* α -アミラーゼ、中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来 α -アミラーゼの立体構造を明らかにした (図2)。

枯草菌 α -アミラーゼは基質結合構造情報を得るため、タンパク質試料として触媒アミノ酸であるGlu208をグルタミンに変異させたE208Q変異体を、基質としてマルトペンタオース(G5)を使用し、これらを共結晶化させた。E208Qはデンプンやマルトオリゴ糖に対する分解活性をもたず、強く結合することから、G5が酵素の触媒溝に結合した構造を得ることに成功した。 α -アミラーゼは $(\beta/\alpha)_8$ バレルの触媒ドメインと逆平行 β シートのグリークキーモチーフをもつC末端ドメインより構成され、さらに触媒ドメインは $(\beta/\alpha)_8$ バレルのコアであるAドメインとその途中から突出して触媒溝の対岸を形成するBドメインに分けられている。G5の結合位置および触媒アミノ酸との距離から、三つの触媒関連アミノ酸の役割、および、糖分解機構を解明することができた。また、枯草菌 α -アミラーゼ

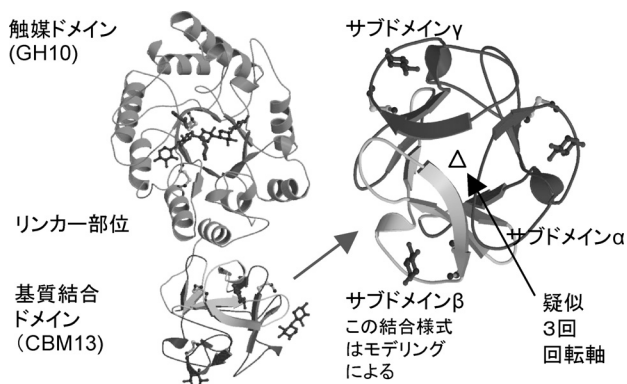


図1 放線菌 (*Streptomyces olivaceoviridis*) キシラナーゼのキシロトリオースとの複合体の結晶構造

では阻害剤アカボースとの複合体の構造解析も行い、アカボースへの強い親和性の構造的根拠を解明した。中等度好熱菌 α -アミラーゼの立体構造解析では、タンパク質の立体構造より熱安定性機構について考察を行った。

3. α -ガラクトシダーゼの構造生物学研究

α -ガラクトシダーゼは、ガラクトマンナン、ガラクトオリゴ糖およびガラクトリピドなどの α 結合ガラクトースを加水分解する酵素で、動物、植物、微生物と広く存在する。基質認識機構や分解機構を明らかにすることも併せて X 線結晶解析にとりかかった。

まず、GH27 に属するイネの α -ガラクトシダーゼの結晶構造を、ガラクトースとの複合体として決定した (図 3)。酵素は (β/α)₈ バレルの触媒ドメインと逆平行 β シートのグリークキーモチーフをもつ C 末端ドメインより構成され、ガラクトースは触媒ドメインの中央にできた基質結合ポケットに結合していた。同じファミリーの *N*-アセチルガラクトサミニダーゼと比較すると、基質ポケットの構造は基本的には酷似していたが、2 位の水酸基を認識するアミノ酸三つに違いが見られた。 α -ガラクトシダーゼでは 2 位の水酸基に対しシステイン、トリプトファンといった大きなアミノ酸でしっかりと認識しており、*N*-アセチルガラクトサミンの *N*-アセチル基の入るスペースを埋めていた。 α -ガラクトシダーゼの高い基質特異性の発現機構が明らかになった。また、糸状菌 (*Umbelopsis vinacea*) 由来 α -ガラクトシダーゼ I は、末端ガラクトースの分解のみを司るというユニークな基質特異性をもつ。構造解析によりこの酵素の 4 量体構造が明らかとなり、4 量体化することにより触媒部位の近傍が分子境界に関与し基質結合様式が限定され、特異的な基質認識機構を発現していることが示された。 α -ガラクトシダーゼの立体構造はイネ由来のものが世界で初めての構造解析例となった。

おわりに

最近、アラビノガラクトタンパク質の糖鎖から L-アラビノースを切り出すアラビノピラノシダーゼの構造を決定した。この酵素は、触媒ドメインと 2 番目の β ドメインは GH27 の α ガラクトシダーゼと高いアミノ酸配列相同性を持ち、立体構造も酷似しているが、C 末端側に二つのドメインを余計に保持しており、最後のドメインは CBM13 に属する基質結合ドメインである。GH27, CBM13 とともにガラクトースを認識するものがよく知られているが、本酵素では L-アラビノースを認識する。触媒ドメインでは、ガラクトースと L-アラビノースの認識の違いは一つのアミノ酸の変位により引き起こされていることが明らかになった。このように糖を認識する酵素やタンパク質は、限られた構造モジュールの組み合わせや、アミノ酸の変異により全く異なる糖の認識能や活性を示すことがある。逆に、全く違う酵素同士でも非常に酷似した構造モジュールを共有することがある。この点において、糖質関連酵素や糖結合タンパク質は、酵素反応を制御するための分子改変の格好のターゲットでありそのための分子構造基盤が蓄積されつつあるが、解明され

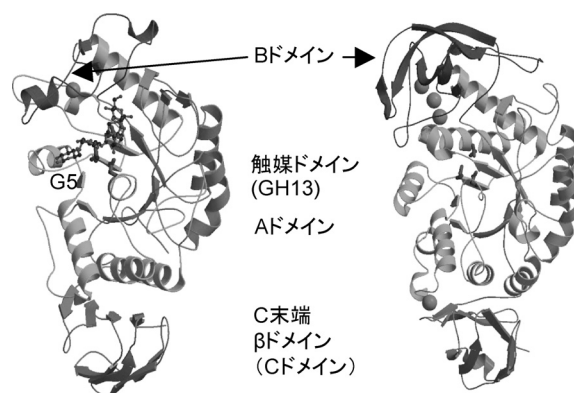


図 2 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) α -アミラーゼ/G5 複合体 (左)、中等度好熱菌 (*B. stearothermophilus*) α -アミラーゼ (右) の結晶構造

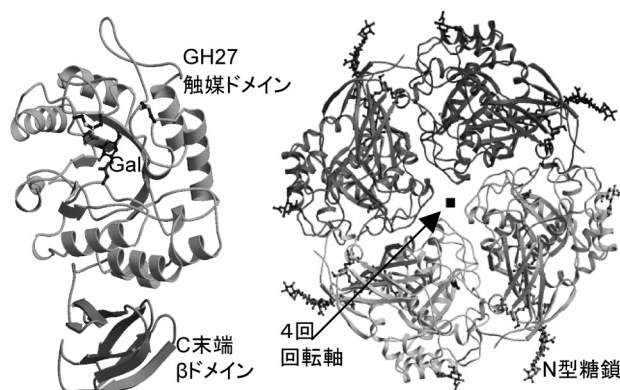


図 3 イネ (*Oryza sativa* L.) α -ガラクトシダーゼの結晶構造 (左)、および糸状菌 (*Umbelopsis vinacea*) α -ガラクトシダーゼ I の 4 量体構造 (右)

ていない点もいまだ多く残されている。日本は、酵素を利用した植物多糖の産業利用およびその基礎研究において、世界的に見ても高い水準を維持しており、そのような環境の中で研究に携われることに感謝し、引き続き構造生物学研究という形で当分野の一翼を担わせていただけるよう研究を行って参りたい。

本研究は、独立行政法人 (前農林水産省) 農業生物資源研究所タンパク質機能研究ユニット (および前身である蛋白機能研究チーム、遺伝子情報管理研究室) で行われたものであり、受賞対象となった研究は、タンパク質機能研究ユニットのスタッフや技術支援の方、筑波大学、食品総合研究所、産業技術総合研究所、山形大学などの多くの共同研究者、学生さんとともに行いました。これまでのご指導、ご協力を深く感謝いたします。また、私は東京大学農学部農芸化学科農薬学研究室から始まり、農業環境技術研究所、農業生物資源研究所へと移る過程で多くの先生、研究者の方々と知り合いさまざまなことを学ぶことができ現在に至っています。これまでのご指導に深く感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長の東京大学・清水 誠先生およびご支援賜った諸先生方に厚く御礼上げます。