

《農芸化学奨励賞》

 $\alpha$ -グリコシダーゼの機能と構造に関する研究

北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門 助教 奥山正幸

$\alpha$ -グリコシダーゼにはデンプンの糖化に用いられる $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼ、オリゴ糖合成に用いられる $\alpha$ -グルコシダーゼなど産業的に重要な酵素が数多く存在する。タンパク質工学を利用してのこれら酵素の機能向上・改変を目指して、触媒機構・基質認識機構の解析といった基礎的な研究に取り組んできた。それらの中でエキソ型に働く $\alpha$ -グルコシダーゼを中心に、触媒残基変異酵素が糖転移反応を触媒する反応、 $\alpha$ -キシロシダーゼの基質認識機構、さらには顕著な類似性を示すアミノ酸配列を有するにもかかわらず異なる触媒機構を有する酵素の発見とその触媒機構の解明について紹介したい。

1.  $\alpha$ -グルコシダーゼのグリコシターゼ化

複合糖質などの糖部分である糖鎖は、細胞壁などの構造成分、糖タンパク質の安定化への寄与、また複合糖質輸送の管理、細胞接着や情報伝達の仲介など多岐にわたる機能を有する。これら糖鎖機能を解析するために必要な糖鎖、特にオリゴ糖の研究室スケールでの合成には化学合成、糖転移酵素の利用などが一般的に用いられるが、糖質加水分解酵素の糖転移反応も利用される。糖質加水分解酵素のうち、アノマー保持型機構で触媒する酵素は、触媒基として求核触媒と酸・塩基触媒を有する。これらの酵素は求核触媒基と基質が共有結合し形成される反応中間体に対して水分子ではなく糖分子が求核攻撃すれば糖転移反応を触媒する(図1A)。糖質加水分解酵素を用いる利点は、110を超えるファミリーに分類されるほど多様な酵素が存在すること、基質が安価なことなどを挙げられるが、生成物が加水分解反応の基質として働いてしまうために生成物の収率を上げるのが困難であるが欠点である。この欠点を克服したのがグリコシターゼである。グリコシターゼは二つの触媒基のう

ち、求核触媒基に変異を導入した変異酵素であり加水分解活性を有さない。しかし基質として通常の基質とは反対のアノマー型を有するフッ化糖を用いると糖転移反応を触媒する。これはフッ化糖が疑似反応中間体として働き、反応の後半のみを触媒するためである(図1B)。以前から $\beta$ -glycosidaseのグリコシターゼ化は報告されていたが、 $\alpha$ -結合に作用する酵素で初めて*Schizosaccharomyces pombe*  $\alpha$ -グルコシダーゼのグリコシターゼ化に成功した。野生型酵素でのオリゴ糖収率が30%程度なのに対して、グリコシターゼでは最大80%の収率でオリゴ糖を生成することができた。

2. 大腸菌 $\alpha$ -キシロシダーゼの基質認識機構

大腸菌 $\alpha$ -キシロシダーゼは $\alpha$ -グルコシダーゼと30%程度のアミノ酸配列の類似性を有するが、 $\alpha$ -グルコシドを基質とせず厳密に $\alpha$ -キシロシドを認識する。この基質特異性の要因を明らかにすることを試みた。要因候補の選択を、①類縁酵素(同一ファミリー)間の配列比較により、②構造既知の遠縁酵素との構造比較により行った。これら要因候補の部位特異的変異酵素のうち2つの変異酵素(TIM-barrelドメインの $\beta \rightarrow \alpha$  loop 1を $\alpha$ -グルコシダーゼ様に変化させたshort loop 1-enzyme、 $\beta \rightarrow \alpha$  loop 2に位置するCys307、Phe308を $\alpha$ -グルコシダーゼ様配列に置換したC307I/F308D-enzyme)で $\alpha$ -キシロシダーゼ活性が低下し、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が上昇した。また大腸菌 $\alpha$ -キシロシダーゼのアグリコン特異性を糖転移反応受容体特異性により評価した。aldopyranohexoseのうちグルコース、マンノース、アロースは糖受容体として働いたが、ガラクトース、グロース、タロースは受容体として働かなかった。すなわち大腸菌 $\alpha$ -キシロシダーゼはエカトリアルの4-OHを選択して受容体とすることがわかった。またこの $\alpha$ -キシロシダーゼはセロビオース、セロトリオースを受容体とした際にはこれら受容体の非還元末端のグルコース残基にキシロシル基を転移した。大腸菌 $\alpha$ -キシロシダーゼの糖転移反応によって得られた $\alpha$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-mannopyranose、 $\alpha$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-fructopyranose、 $\alpha$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-fructofuranoseは新規糖である。またこれらのうち $\alpha$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-mannopyranose、 $\alpha$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-fructofuranoseはラット小腸 $\alpha$ -グルコシダーゼに対して緩い阻害を示すことがわかった。

## 3. 糖質加水分解酵素ファミリー(GH family) 97の触媒機構の分子進化

糖質加水分解酵素はアミノ酸配列類似性により、GH familyに分類される。類似したアミノ酸配列を有するタンパク質は類似した機能、立体構造を有するという経験則に基づき、ファミリー内に触媒機構・立体構造既知な酵素が存在すれば、触媒残基、触媒機構、立体構造を容易に推定できる。しかしGH family 97には明らかな配列類似性を示すにもかかわらず、異なる

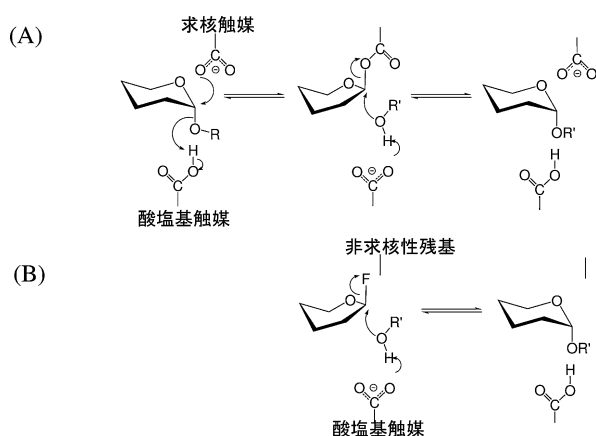


図1 (A) 野生型酵素の糖転移反応と(B)グリコシターゼ  
野生型酵素での糖転移反応産物は酵素の基質となるため生成物の収率は上がらない(A)。グリコシターゼは触媒残基の一つを失っているが、通常の基質とは反対のアノマー型をもつフッ化糖を基質として用いると、糖転移反応を触媒する(B)。加水分解活性を失っているため生成物は蓄積する。

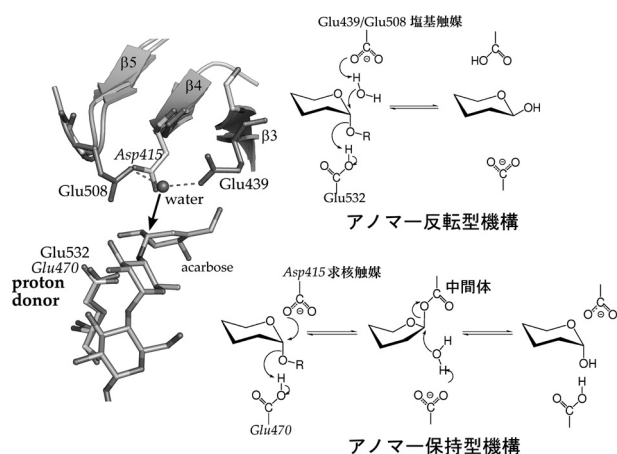


図2 GH family 97に含まれる inverting  $\alpha$ -グルコシダーゼと retaining  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの活性中心構造の重ね合わせとそれぞれの触媒機構

retaining  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの残基番号を斜体で表示. inverting  $\alpha$ -グルコシダーゼでは塩基触媒 (Glu439/Glu508) により活性化された水分子が, retaining  $\alpha$ -ガラクトシダーゼでは求核触媒 (Asp415) がアノマー炭素を求核攻撃する構造を有している. 全体構造はよく類似しているが局所的な構造の違いで触媒機構が異なる.

触媒機構を有する酵素が混在することを発見した. すなわち GH family 97 には  $\alpha$ -グルコシド結合をアノマー反転型機構で加水分解する  $\alpha$ -グルコシダーゼ (inverting  $\alpha$ -グルコシダーゼ) とアノマー保持型機構で  $\alpha$ -ガラクトシド結合を加水分解する  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (retaining  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ) が混在していることを発見した. アノマー反転型機構とは加水分解反応の過程において生成物のアノマー型が基質に対して反転するものであり, 活性中心の触媒基は酸触媒, 塩基触媒として働く. 一方, アノマー保持型機構とは生成物のアノマー型が保持するものであり, 触媒基は酸・塩基触媒, 求核触媒として働く. 二つの GH family 97 酵素の立体構造はよく類似しており, 基質結合に関与する残基もよく保存されていた. さらに開裂するグリコシド結合にプロトンを供与するアミノ酸残基も保存されていた. しかし, 二つの酵素ではアノマー炭素を求核攻撃する機構が異なっていた (図2). inverting  $\alpha$ -グルコシダーゼでは基質類似体 (アカボース) との複合体構造から, アノマー炭素を攻撃するのに適した位置に水分子が配置されており, この水分子 (触媒水) は  $\beta$ -strand 3 と  $\beta$ -strand 5 の C 末端に位置する Glu439 と Glu508 のカルボキシ基に挟まれていた. これらのアミノ酸残基が塩基触媒として働くことで活性化された水分子がアノマー炭素を攻撃すると考えることができる. 一方, retaining  $\alpha$ -ガラクトシダーゼでは inverting  $\alpha$ -グルコシダーゼの塩基触媒残基 Glu439, Glu508 に対応する残基はいずれも Gly 387, Gly446 に置換されていた. しかし inverting  $\alpha$ -グルコシ

ダーゼの触媒水と空間的に同じ位置にカルボキシ基が配置されていた. このカルボキシ基は  $\beta$ -strand 4 の後ろの Asp415 のものである. inverting  $\alpha$ -グルコシダーゼでは触媒水がアノマー炭素を求核攻撃することで反応が終了するのに対して retaining  $\alpha$ -ガラクトシダーゼでは Asp415 のカルボキシ基がアノマー炭素を求核攻撃し反応中間体を形成したのちに, 中間体に対して水分子が求核攻撃しアノマー保持型で反応が進行すると考えることができた.

GH family 97 でアミノ酸配列のマルチプルアライメントを作成すると, GH family 97 の約半数がアノマー反転型, もう半数がアノマー保持型酵素であることがわかる. すなわち family の約半数のアミノ酸配列は, inverting  $\alpha$ -グルコシダーゼの塩基触媒である Glu439 と Glu508 に対応するアミノ酸残基を  $\beta$ 3 および  $\beta$ 5 に保存しており, 残り半数が  $\beta$ 4 に Asp415 に対応する残基を有していた. これは酵素の分子進化の過程において, 触媒残基が TIM バレルの  $\beta$ -strand を移動する “catalytic residue hopping” による結果と考えられる. 以上の結果はたとえアミノ酸配列に明らかな類似性を示しても, 機能が異なる場合があることを示しており, アミノ酸配列の類似性から機能を類推する際には, 触媒残基の保存性を含めて注意深く類推する必要があるということを示している.

本研究は北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門分子酵素学研究室において行われたものです. 博士論文研究として  $\alpha$ -グルコシダーゼ研究を行う機会を与えてくださり, 研究者への途を拓いてくださった北海道大学農学研究院名誉教授・千葉誠哉先生, 同教授・木村淳夫先生に心より感謝申し上げます. グリコシダーゼ,  $\alpha$ -キシロシダーゼの研究を始めるきっかけを与えてくださり, 多くのご指導・ご助言を賜りました北海道大学農学研究院准教授・森 春英先生に深甚なる感謝の意を表します. また, タンパク質構造解析において豊富なご経験とご尽力を賜りました北海道大学大学院先端生命科学研究院准教授・姚 関先生, 同特任助教・尾瀬農之先生, 同教授・田中 勲先生, 同大学院生・北村百世さんに厚く御礼申し上げます.  $\alpha$ -キシロシダーゼの糖転移反応産物の解析においてご尽力くださいました産業総合研究所・矢追克郎博士にも深く感謝申し上げます. 本研究は, 北海道大学大学院農学研究院分子酵素学研究室の博士研究員, 卒業生, 在校生との共同研究であり, 特に本同宏成博士, Kang MinSun 博士には本研究に大きく貢献してくださいましたことを深く感謝申し上げます. 最後になりましたが, 本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会北海道支部長・鍋田憲助先生ならびにご支援賜った諸先生方に心より御礼申し上げます.