



## 糖質加水分解酵素の機能構造相関の解明と応用

北海道大学大学院農学研究院 田上 貴 祥

### はじめに

糖質は構成単糖・結合様式・重合度・修飾などの違いによって無限ともいえる分子種が想定される化合物であり、それらはエネルギー貯蔵や骨格形成、情報伝達など、互いに役割を相補できない独自の機能を有している。生物は酵素(タンパク質)を駆逐することでこれらの多様な糖質構造を明確に区別し、巧みに使い分けている。糖質関連酵素の緻密な分子機構を明らかにすることは生命現象を理解しようとする基礎的な観点のみならず、薬剤開発や機能性糖質生産などの応用へとつながる点でも重要である。我々はこれまでに $\alpha$ -グリコシドに作用する多様な糖質加水分解酵素の基礎応用研究を展開してきた。以下では、著者が中心となって進めたデンプン代謝関連酵素に関する研究の成果について紹介する。

### 1. 真核生物 $\alpha$ -グルコシダーゼの構造機能解析と機能改変

$\alpha$ -グルコシダーゼ(AGL)は基質の非還元末端の $\alpha$ -グルコシド結合に作用する酵素であり、ほぼ全ての生物種に分布する酵素である。その内、真菌類、植物および哺乳動物のAGLはアミノ酸配列が類似しており、糖質加水分解酵素ファミリー-31(GH31)に分類される。GH31AGLは酵素起源に関わらずマルトオリゴ糖に対して高い基質特異性を有しており、いずれもデンプン代謝に関与する酵素であると考えられている。GH31AGLは基質特異性が類似している一方で、マルトオリゴ糖の重合度に対する特異性は酵素間で多様であることが知られていた。*Aspergillus niger*や*Schizosaccharomyces pombe*などの真菌類由来のGH31AGLはマルトトリオースに最も高い $k_{cat}/K_m$ 値を示し、より高重合度のマルトオリゴ糖に対する $k_{cat}/K_m$ 値は減少する。一方で植物由来のGH31AGLは高重合度のマルトオリゴ糖に対しても同程度もしくは高い $k_{cat}/K_m$ 値を示す。なかでもテンサイ由来のAGLは顕著な高重合度基質特異性を有しており、その構造機能相関に興味を持たれた。GH31AGL群のアミノ酸配列比較の結果、テンサイAGLに特徴的なPhe236残基を見出し、これに部位特異的変異を導入することで重合度3以上のマルトオリゴ糖に対する特異性が低下することを明らかにした。また、テンサイAGLのPhe236に相当するPhe残基を*A. niger*由来AGLに変異導入することで、本酵素の基質重合度に対する特異性を改変することにも成功した<sup>1)</sup>。

テンサイAGLによる基質認識の分子機構を明らかにするため、本酵素のX線結晶構造解析を実施した。テンサイ種子から精製したAGLを結晶化し、その構造を分解能2.8Åで決定した<sup>2)</sup>。テンサイAGLの全体構造は低重合度基質特異的なヒトの小腸AGLと良く類似していたが、N末端ドメインから突き出た形で活性ポケット入口の一部を形成するループ(N-loop)が両者で異なっていた。Phe236はN-loopを構成するア

ミノ酸残基であり、GH31AGLにおけるN-loopのアミノ酸配列の多様性が基質重合度に対する特異性を多様化する一因であると結論づけた。

さらに活性ポケットから離れた位置での基質認識機構を明らかにするために、擬似四糖阻害剤であるアカルボースの還元末端側マルトース構造を伸長させた新規な高重合度擬似糖(ACn, nは重合度)を酵素合成した<sup>3)</sup>。ACn合成にはアズキ子葉から精製した不均化酵素(DPE1)を用いた。DPE1は葉緑体における同化デンプンの代謝に関わる酵素であり、マルトオリゴ糖非還元末端側のマルトース構造(二糖単位)を他のマルトオリゴ糖に分子間転移することで基質の重合度を不均一化する酵素であるが、基質が四糖の場合には三糖単位での転移を触媒する。この特異性を応用し、アカルボースとマルトテトラオースの混合液にDPE1を作用させることでAC5-AC10の合成に成功した(図1A)。反応初期にはAC7が最も多く生成したことから、DPE1がAC4から擬似三糖単位で転移していることが示唆された。AC8とテンサイAGLの複合体結晶構造解析の結果、AC8還元末端側のマルトペンタオース部分はテンサイAGLによる強固な捕捉を受けておらず、分子内水素結合によって安定化したらせん構造を形成していた(図1B)。以上の結果から、テンサイAGLは高重合度マルトオリゴ糖の自発的ならせん構造形成による基質自身の安定化エネルギーを利用することで加水分解反応の遷移状態を安定化するという分子機構を有していると考えられた<sup>4)</sup>。

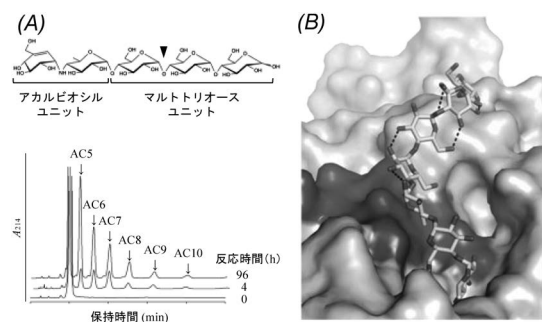


図1. ACnの酵素合成とテンサイAGL-AC8複合体構造 (A) AC5の構造とDPE1によるACn合成反応の経時変化。DPE1はマルトオリゴ糖の不均化反応に加えて矢印位置のグルコシド結合を切断して他のマルトオリゴ糖分子に $\alpha$ -1,4転移する反応を触媒したことで、一連の重合度のACnを合成したと考えられる。(B) テンサイAGLに結合したAC8。AC8の還元末端側は分子内水素結合(点線)によって安定化していた。テンサイAGLの濃色部分はN-loopを示す。

## 2. 環状四糖の代謝に関わる新規糖質加水分解酵素の発見

高等生物においてデンプン代謝の場となるのは体内であり、競合者がいない環境である為、その代謝は単純な加水分解で十分である。一方、細菌や真菌類などの単細胞生物は分子量の大きなデンプンを細胞内に取り込むことができない為、分泌酵素を用いて細胞外でデンプンを加水分解する必要がある。しかしこの代謝経路では、折角エネルギーを投じて生産したデンプン分解物を周囲の競合者に奪われてしまう可能性がある。そこである種の細菌は、デンプンをユニークなオリゴ糖へと変換することでエネルギー源を独占するための代謝経路を獲得した。

西本ら株式会社林原の研究グループは、グラム陽性細菌の *Sporosarcina globispora* や *Arthrobacter globiformis* がデンプンを炭素源とした場合にグルコース 4 分子が  $\alpha$ -1,3 結合と  $\alpha$ -1,6 結合で交互に連結した環状四糖 (CNN) を生産することを発見し、CNN 合成に関わる 2 つの菌体外糖転移酵素 (6GT および IMT) を同定した。これらはいずれも GH31 に分類される酵素であった。一方で、CNN がどのように代謝されるのかは長らく不明であった。著者らは、放線菌 *Kribbella flavida* が 6GT と IMT に加えて IMT と配列類似性の高い機能未知 GH31 酵素 (Kfla1895) をゲノム上にコードしていることを見出した。Kfla1895 遺伝子の周辺には、転写制御因子、糖質輸送タンパク質および機能未知 GH15 酵素 (Kfla1896) の遺伝子がコードされていた。GH15 は、デンプン糖化産業に利用されるグルコアミラーゼが多く分類されているファミリーであった。酵素機能解析の結果、Kfla1895 は CNN の 2 箇所の  $\alpha$ -1,3 結合を順に加水分解して 2 分子のイソマルトースを生成する新規酵素 (1,3- $\alpha$ -イソマルトシダーゼ: EC 3.2.1.204) であり、Kfla1896 はイソマルトースを特異的に加水分解して  $\beta$ -グルコースを生成する新規酵素 (イソマルトースグルコヒドラーゼ: EC 3.2.1.205) であった。本研究により、長らく不明であった CNN を経由する新規デンプン代謝経路の全容 (図2) が明らかとなった<sup>5)</sup>。X線結晶構造解析の結果、Kfla1895 は同一ファミリー酵素の GH31AGL には無い N 末端ドメインを有しており、その一部が CNN の結合に伴って構造変化する誘導適合機構を有する酵素であることが明らかとなった。Kfla1896 については、他の GH15 酵素が持たない  $\alpha$ -ヘリックスと Phe290 残基がそれぞれ基質特異性と触媒機構に関わる構造因子であることを明らかにした<sup>6)</sup>。デンプン糖化産業においてはグルコアミラーゼが高濃度グルコース条件下で縮合反応によりイソマルトースを副生することが問題となる。Kfla1896 の Phe290 には縮合反応速度を低下させる機能があることを見出し、Phe290 に相当する Phe 残基をグルコアミラーゼに導入することで縮合反応が抑制された改良型酵素を作出できる可能性が示唆された。

### おわりに

デンプン代謝関連酵素研究の歴史は古く、高峰讓吉博士が開発した麹菌の  $\alpha$ -アミラーゼを主成分とする胃腸薬「TAKA-DI-ASTASE」の販売が開始されたのは 1895 年のことである。デンプン代謝研究を時代遅れと思う方も多だろうが、未だに新奇酵素とそれらが生産する新奇な糖質の発見が相次いでいるのが実情である。昨年には、天然に存在しないと考えられてきた  $\alpha$ -L-グルコシドを分解合成する酵素の発見<sup>7)</sup>もあった。糖質と

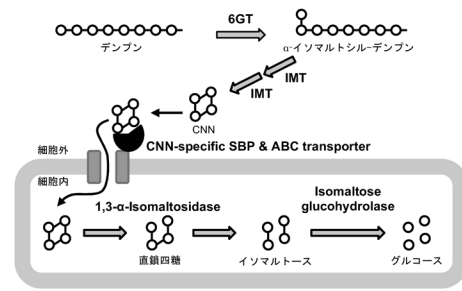


図2. CNN を経由するデンプン代謝経路  
本代謝経路は *K. flavida* の他に、病原細菌 *Listeria monocytogenes* でも見つまっている。

関連酵素研究の新時代の幕開けを予感させている。

### (引用文献)

- 1) T. Tagami, *et al.*, Key aromatic residues at subsites +2 and +3 of glycoside hydrolase family 31  $\alpha$ -glucosidase contribute to recognition of long-chain substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 329–335, (2013)
- 2) T. Tagami, *et al.*, Molecular basis for the recognition of long-chain substrates by plant  $\alpha$ -glucosidases. *J. Biol. Chem.*, **288**, 19296–19303, (2013)
- 3) T. Tagami, *et al.*, Enzymatic synthesis of acarviosyl-maltooligosaccharides using disproportionating enzyme 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 312–319, (2013)
- 4) T. Tagami, *et al.*, Structural advantage of sugar beet  $\alpha$ -glucosidase to stabilize the Michaelis complex with long-chain substrate. *J. Biol. Chem.*, **290**, 1796–1803, (2015)
- 5) T. Tagami, *et al.*, Two novel glycoside hydrolases responsible for the catabolism of cyclobis-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -nigerosyl. *J. Biol. Chem.*, **291**, 16438–16447, (2016)
- 6) T. Tagami, *et al.*, Structural insights reveal the second base catalyst of isomaltose glucohydrolase. *FEBS J.*, **289**, 1118–1134, (2022)
- 7) R. Shishiuchi, *et al.*, Discovery of  $\alpha$ -l-glucosidase raises the possibility of  $\alpha$ -l-glucosides in nature. *ACS Omega*, **7**, 47411–47423, (2022)

謝辞 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 分子酵素学研究室および酪農学園大学農食環境学群食と健康学類 応用生化学研究室において行われたものです。不本意に分子酵素学研究室への配属が決まって意気消沈する学部生の私に、酵素学の魅力を語り、本奨励賞を受賞できるまでにご指導ご鞭撻頂いた木村淳夫先生、森春英先生、奥山正幸先生 (北海道大学) に心から御礼申し上げます。岩崎智仁先生 (酪農学園大学) には私の研究テーマを尊重しつつ、多くの新しい実験手法をご教授頂きました。タンパク質の立体構造解析では、姚関先生 (北海道大学)、田中良和先生 (東北大学)、本同宏成先生 (静岡県立大学)、山下恵太郎博士 (MRC 分子生物学研究所) ら多くの方々にご協力頂きました。糖質の構造解析では、福士江里博士と高田祐輔氏 (北海道大学) にご協力頂きました。研究成果の多くは分子酵素学研究室の学生諸氏の尽力によって達成されたものです。農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センターおよび株式会社林原には研究試料をご恵与頂きました。ここに感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました、日本農芸化学会北海道支部長の松浦英幸先生 (北海道大学) に深謝いたします。