



Title	Schizosaccharomyces pombe -Glucosidase の構造と機能に関する研究
Author(s)	奥山, 正幸
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第5564号
Issue Date	2001-03-23
DOI	10.11501/3182436
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/32797
Type	theses (doctoral)
File Information	5564.pdf



[Instructions for use](#)

Schizosaccharomyces pombe α -Glucosidase の構造と機能に関する研究

奥山 正幸

略語

Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
SDS	sodium dodecylsulfate
EDTA	disodium ethylenediaminetetraacetate
PEG	polyethyleneglycol
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP および dTTP を含む)
cDNA	complementary DNA
TE	10 mM Tris-HCl (pH 8.0, 5 mM EDTA を含む)
PVDF	polyvinylidene difluoride
PCR	polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription PCR
UTR	cDNA 上の 5' および 3' 末端非翻訳領域
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
TAA	Taka-amylase A
CGTase	cyclomaltodextrin glucanotransferase
GSDII	glycogen storage disease type II
pNPX	<i>p</i> -nitrophenyl α -xylopyranoside
CBE	condurotol B epoxide
DEPC	diethyl pyrocarbonate
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide

目次

第1章 序論

第1節	α -Glucosidase の分類	1
第2節	Glycosidase の反応機構	3
第3節	α -Glucosidase の触媒残基について	4
第4節	Glycosidase の触媒残基の同定	7
第5節	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> α -glucosidase に関する研究と本研究の概要	8

第2章 *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase cDNA およびゲノミック DNA のクローニングとその発現

第1節	緒言	14
第2節	実験材料および方法	15
第3節	実験結果	
第1項	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> α -glucosidase cDNA のクローニング	20
第2項	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> α -glucosidase 遺伝子のクローニングおよび発現	21
第4節	考察	
第1項	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> α -glucosidase cDNA のクローニング	25
第2項	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> α -glucosidase 遺伝子のクローニングおよび発現	28
第5節	要約	31

第3章 *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase の異種宿主での発現

第1節	緒言	60
第2節	実験材料および方法	61
第3節	実験結果	
第1項	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> での <i>Schizosaccharomyces pombe</i> α -glucosidase の発現	66
第2項	<i>Pichia pastoris</i> での <i>Schizosaccharomyces pombe</i> α -glucosidase の発現	69
第4節	考察	
第1項	<i>S. cerevisiae</i> での発現	73

第2項	<i>P. pastris</i> での発現	75
第5節	要約	78
第4章	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> α -glucosidase 活性中心の推定	
第1節	緒言	101
第2節	実験材料および方法	101
第3節	実験結果	
第1項	活性解離基の推定	108
第2項	部位特異的変異導入による活性に必須なアミノ酸残基の推定	108
第3項	Conduritol B epoxide (CBE)による失活の速度論	111
第4項	D481A/G、D647A/G に対する NaN_3 、 HCOONa の効果	112
第5項	D-Glucal の水和反応	113
第4節	考察	114
第5節	要約	121
第5章	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> α -glucosidase 活性中心芳香族アミノ酸残基の役割	
第1節	緒言	146
第2節	実験材料および方法	147
第3節	実験結果および考察	
第1項	活性中心に保存されたトリプトファン残基変異酵素の基質特異性	149
第2項	<i>N</i> -Bromosuccinimide (NBS)による化学修飾	153
第4節	要約	
第6章	総括	162
参考文献		165
謝辞		

第1章 序論

第1節 α -glucosidase の分類

α -Glucosidase (EC 3.2.1.20) は α -glucoside 結合をもつ基質の非還元末端から加水分解によって α -glucose を遊離するエキソ型の酵素である。また国際生化学連合酵素委員会の酵素分類表に記載されている oligo-1,6-glucosidase (EC 3.2.1.10) や sucrase-isomaltase (EC 3.2.1.48/EC 3.2.1.10) も α -glucosidase に含まれる。同じく基質の非還元末端から glucose を遊離する酵素に glucoamylase (EC 3.2.1.3) が挙げられるが、生成物が β -glucose であり α -glucosidase とは明確に区別される。

α -Glucosidase はこれまで微生物、植物、動物など様々な生物から分離精製されており、その基質特異性から3タイプに分類されている¹⁾。Type I は heteroside をよく加水分解する。すなわち maltose よりも aryl α -glucoside や sucrose をよく加水分解する。Type II は aryl α -glucoside よりも maltose のような holoside をよく加水分解する。Type III は Type II の基質特異性に加えて starch や glycogen のような高分子の基質に対して作用する。しかし基質特異性が広いのが特徴である α -glucosidase を基質特異性で分類するのは困難である。例えばミツバチ由来の α -glucosidase は heteroside である sucrose と holoside である maltose をともによく加水分解する^{2,3)}。

一方で近年、遺伝子クローニングにより数多くの α -glucosidase の一次構造が明らかにされた。一次構造からはふたつのファミリー、 α -glucosidase family I、 α -glucosidase family II に分けられることが明らかになっている⁴⁾。

α -Glucosidase family I はいわゆる α -amylase family 酵素群がもつ4つの保存領域をもつがそれらと全アミノ酸配列の相同性はない。 α -amylase family とはその構造の類似性、触媒機構の共通性などをもとに提案された酵素群である⁵⁾。 α -amylase family の定義は以下のようにまとめられている。1) α -glucoside 結合に作用する。2) α -アノマーのグルコースあるいはマルトオリゴ糖を生成する、もしくは糖転移反応により新たな α -glucoside 結合を形成する。3) 一次構造上にそれぞれの酵素に共通の4つの保存領域が存在する。そしてこの保存領域内に触媒部位のすべてと基質結合部位の多くが存在する。4) 触媒部位として Taka-amylase A (TAA) の Asp-206、Glu-230、Asp-297 に対応する Asp、Glu、Asp 残基をもつ。 α -glucosidase のうちこれらの定義をみたす酵素は *Saccharomyces carlsbergensis*⁶⁾、*Bacillus cereus*⁷⁾、*Saccharomyces cerevisiae*⁸⁾、*Candida albicans*⁹⁾、*Escherichia coli*¹⁰⁾、ミツバチ¹¹⁾、yellow-fever mosquito¹²⁾ 由来のものなどにみられる。 α -Glucosidase family I では *Bacillus cereus* oligo 1,6-glucosidase において3D構造が明らかにされている¹³⁾。

α -Glucosidase family II は α -amylase family 酵素群同様、 α -glucoside 結合に作用し、 α -アノマーのグルコースを生成し、糖転移反応により新たな α -glucoside 結合を形成するが、一次構造上にそれぞれの酵素に共通の4つの保存領域をもたない。一次構造を α -glucosidase

family Iと比較しても全く相同性を示さない。この α -glucosidase family IIには哺乳類由来の α -glucosidase (ヒトリソゾーム¹⁴⁾、ラット sucrase-isomaltase complex (SI-complex)¹⁵⁾、ウサギ SI-complex¹⁶⁾、ヒト SI-complex¹⁷⁾、植物 (大麦^{18, 19)}、テンサイ²⁰⁾、ホウレンソウ²¹⁾、ソバ²²⁾) 由来 α -glucosidase、糸状菌 (*Aspergillus niger*^{23, 24)}、*Aspergillus oryzae*²⁵⁾、*Mucor javanicus*²⁶⁾) 由来 α -glucosidase、酵母 *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase²⁷⁾、*Candida tsukubaensis* α -glucosidase²⁸⁾、*Candida albicans* glucoamylase (accession number; SWISS-PROT, O74254) などが含まれる。*S. occidentalis* glucoamylase は glucoamylase として登録されているが α -glucosidase であることを生成物のアノマー型から確認している²⁹⁾。これまでは α -glucosidase family II は真核生物にのみ見つけていたが、最近では *Bacillus thermoamyloliquefaciens*³⁰⁾、*Alicyclobacillus acidocaloarius*³¹⁾、*Sulfolobus solfataricus*³²⁾といった細菌や始原菌からも見つけている。

B. Henrissat は glycoside hydrolases をそのアミノ酸配列の相同性から 83 family に分類している^{33, 34)}。この分類では family ごとで活性中心、反応機構が保存されている。glycoside hydrolases の反応機構は一般酸塩基触媒反応であるとされているが、この反応は生成物の C1 炭素のアノマー型を保持する反応 (retaining; $\alpha \rightarrow \alpha$, $\beta \rightarrow \beta$) と反転する反応 (invertin; $\alpha \rightarrow \beta$, $\beta \rightarrow \alpha$) に分けられる。これが Henrissat の分類する family ごとに保存されており、例えば glycoside hydrolase family 1 (GH family 1) には β -glucosidase (EC 3.2.1.21); β -galactosidase (EC 3.2.1.23); 6-phospho- β -galactosidase (EC 3.2.1.85); 6-phospho- β -glucosidase (EC 3.2.1.86); lactase-phlorizin hydrolase (EC 3.2.1.62), (EC 3.2.1.108); β -mannosidase (EC 3.2.1.25); myrosinase (EC 3.2.3.1)が含まれるが、反応機構は retaining であり、触媒残基はふたつのグルタミン酸残基 (*Agrobacterium* β -glucosidase で触媒残基と推定された Glu-170, Glu-357) であるとされている^{33, 78)}。 α -glucosidase family I, II はそれぞれ GH family 13, GH family 31 に含まれる。

GH family 13 には α -glucosidase の他に α -amylase (EC 3.2.1.1)、pullulanase (EC 3.2.1.41)、cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19)、cyclomaltodextrinase (EC 3.2.1.54)、trehalose-6-phosphate hydrolase (EC 3.2.1.93)、maltogenic amylase (EC 3.2.1.133)、neopullulanase (EC 3.2.1.135)、maltotetraose-forming α -amylase (EC 3.2.1.60)、isoamylase (EC 3.2.1.68)、glucodextranase (EC 3.2.1.70)、maltohexaose-forming α -amylase (EC 3.2.1.98)、branching enzyme (EC 2.4.1.18)、trehalose synthase (EC 5.4.99.16)、4- α -glucanotransferase (EC 2.4.1.25)、maltopentaose-forming α -amylase (EC 3.2.1.1)、amylosucrase (EC 2.4.1.4)、sucrose phosphorylase (EC 2.4.1.7)などが含まれる。

GH family 31 には α -glucosidase (EC 3.2.1.20)のほか、 α -xylosidase、 α -glucan lyase (EC 4.2.2.13)が含まれる。いずれも α -glucoside 結合に作用するが α -xylosidase は基質の非還元末端が xylose、 α -glucan lyase は生成物が glucose ではなくリアーゼ反応による 1,5-anhydrofructose である (Fig. 1-1)³⁵⁾。

α -glucoside 結合を加水分解する酵素にはこのほかに、新規に合成されたポリペプチドの N-結合糖鎖のトリミングを行う glucosidase I, II が見つけている³⁶⁻⁴²⁾。glucosidase I は小胞

体に局在する糖タンパク質である。付加された *N* 型糖鎖 mannose コア糖鎖の非還元末端の α -1,2-glucoside 結合に作用する。哺乳類⁴³⁾、*S. cerevisiae*⁴⁴⁾から精製されており、一部性質が調べられている。分子量 83-95 kDa、最適 pH6.7-6.8、基質特異性は非常に狭く $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ の α -1,2 glucoside 結合に作用するが $\text{Glc}_2\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ には作用しない。ヒト脳海馬より cDNA がクローニングされているが、一次構造は上記のいずれの α -glucosidase の分類にも当てはまらない⁴⁵⁾。最近では「glucosidase I の生成物のアノマー型が β である」という報告があり、この酵素は α -glucosidase ではなく glucoamylase 型の酵素であることがわかった⁴⁶⁾。

glucosidase II は 104 kDa と 58 kDa の 2 つのサブユニット α -、 β -サブユニットからなる糖タンパク質である⁴⁷⁻⁵⁰⁾。*N* 型結合糖鎖の非還元末端から 2、3 番目の α -1,3 glucoside 結合に作用する。最適 pH は 6.0-7.5 で基質特異性については α -1,3、 α -1,4 glucoside 結合に対しては高い特異性を示すが α -1,1-、 α -1,2-、 α -1,6-glucoside、glycogen に対しては特異性が低い⁵¹⁾。また α -サブユニットに触媒活性部位を含み、アミノ酸配列から GH family 31 に含まれる。

第 2 節 Glycosidase の触媒機構

α -glucosidase を含め glycosylase の反応機構は未確定の部分が多くその反応を統一的に説明できる合理的なモデルは確立されていない。そこでここでは現在有力な 2 つの反応機構、オキソカルボニウムイオン中間体反応機構と求核二重置換反応機構についてふれる。またアノマー-retaining 酵素 ($\alpha \rightarrow \alpha$, $\beta \rightarrow \beta$) についてのみ例を挙げる。

いずれの場合もふたつのカルボキシル基 ($-\text{COO}^-$ と $-\text{COOH}$) が反応に関わっている。

オキソカルボニウムイオン中間体反応機構を簡単に説明する (Fig. 1-2)。切断される glucoside 結合の酸素原子にプロトンが付加され、非還元末端側 glucose のアノメリック炭素から H-O-R が遊離し、この glucose はオキソカルボニウムイオンを生成する。これに求核種である OH⁻ が攻撃して (この求核置換反応は $\text{S}_{\text{N}}1$ 反応である) 加水分解が終了するというものである。

一方、求核二重置換反応機構ではアノメリック炭素に求核基 (COO^-) が反応し、遷移状態のオキソカルボニウムイオン中間体を経て共有結合する。すなわちグルコシル-酵素反応中間体を生成する。次に水分子の OH⁻ が求核種としてアノメリック炭素を攻撃し、加水分解反応が終了する。このときの求核置換反応は $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応である。加水分解が終了するまでにワルデン反転を伴った 2 回の置換反応がおきる (Fig. 1-3)。

すなわち、これらふたつの反応機構の違いはグリコシル中間体が酵素と共有結合を作るのか否かである。

オキソカルボニウムイオン中間体反応機構を支持する結果は、水分子の OH⁻ の求核反応が $\text{S}_{\text{N}}1$ で進行していることを示す α -第 2 次動力学同位体効果が α -glucosidase で観察されたこと

である⁵²⁾。また *Bacillus subtilis* α -amylase (GH family 13)の触媒残基変異酵素 E208Q の maltopentaose との複合体の結晶構造⁵³⁾では活性中心の-COO⁻に対応する Asp-176 とアノメリック炭素の距離が 3 Å であり共有結合はとれないことを示している。

一方、求核二重置換反応機構を支持する結果としては、TAA による置換基効果⁵⁴⁾やブタ膵臓 α -amylase において反応中間体を NMR で観測したなどが挙げられるが、最近では基質アナログを用いることでグリコシル-酵素複合体をとらえられていることを挙げるができる。これらはアノメリック炭素により脱離基であるフッ素を結合し、また 2 位や 5 位に電気陰性度の大きいフッ素を配置することで、活性化エネルギーが高くなることを利用し、 k_2 過程より k_1 過程が速くなり中間体が貯まることを利用している。例えば α -amylase family 酵素群のひとつである *Bacillus circulans* 251 起源の cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase; GH family 13) では基質として 4-deoxymaltotriosyl α -fluoride を用いると、Asp-229 (TAA Asp-206 に対応) がアノメリック炭素と共有結合を形成することが確認されている⁵⁶⁾。*S. cerevisiae* α -glucosidase (GH family 13)の求核残基 Asp-214 への 5-fluoro- α -D-glucosyl fluoride や 5-fluoro- β -L-idosyl fluoride の結合も求核二重置換反応機構を支持する結果の一つである⁵⁷⁾。*Bacillus circulans* xylanase (GH family 11)では $[\delta\text{-}^{13}\text{C}]$ で Glu をラベルし、¹³C-NMR を用いて xylanase を pH 滴定している⁵⁸⁾。その結果、求核残基 Glu-78、酸塩基触媒残基 Glu-172 の pK_a 値はそれぞれ 4.6、6.7 であるが、基質アナログ 2',4'-dinitrophenyl 2-deoxy-2-fluoro- β -xylobioside を反応させると滴定カーブは Glu-172 のみで得られ、求核残基 Glu-78 は glycoside 結合を形成するため pH の変化により化学シフトの移動は起こらないという報告もある。また同時に、基質アナログが結合した状態では酸塩基触媒残基 Glu-172 の pK_a 値が約 2.5 減少し、Glu-172 が塩基としても働くことが示されており、 pK_a の状態は周辺環境により定められていることが示されている。

ただし共有結合したグリコシル-酵素複合体は基質アナログを用いたときに認められているのであって、基質そのものと酵素の複合体を観察されているわけではない。

また最近、共有結合したグリコシル-酵素複合体を単離して X線解析したという報告があり、これも求核二重置換反応機構を支持する大きな結果である⁵⁹⁻⁶¹⁾。しかし「安定な単離状態で共有結合が存在したからという理由からでは、真の反応中間体が共有結合型であるとは言い切れない。反応中間体に関しては、どちらとも言えない中間型ではないか」という考え方もあり⁶²⁾、現在まででは最初にも述べたように反応機構は確立されたモデルが存在しない状態である。

第3節 α -Glucosidase の触媒残基について

触媒反応に関わる解離基は2つのカルボキシル基、解離型カルボキシレート (-COO⁻) とカルボキシル基 (-COOH) が関わっていることを多くの α -glucosidase で示されている。そ

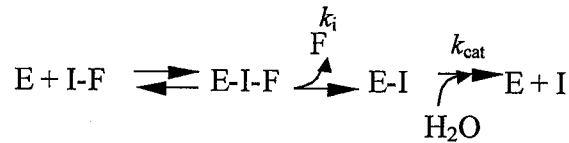
してその触媒反応機構は一般酸塩基触媒であるとされている。

α -glucosidase では、Conduritol B epoxide (CBE) や 5-fluoro glycosyl fluoride を用いて活性に必須なアミノ酸残基のうち求核残基が同定されている。

自殺基質である CBE は Fig. 1-4 のような反応モードで解離型カルボキレートに結合し *scyllo*-inositol エステルを形成しているとされている。通常の酸触媒による開環反応では *D-chillo*-inositol が形成されることからこの反応が酵素反応由来であるとされている⁶³。活性部位に入ってきた CBE は酸塩基触媒残基によりそのエポキシ環の酸素原子がプロトン付加を受ける。求電子状態となった CBE の 2 位の炭素原子が解離型カルボキレートにより攻撃され共有結合を作り酵素は失活するというものである。すなわち CBE により修飾される解離型カルボキシル基は触媒反応における求核残基であるとされている。CBE と結合したペプチドは分離、解析されており、CBE により修飾されるカルボキシル基がアスパラギン酸残基のものであることが明らかにされた。 α -glucosidase family I ではミツバチ α -glucosidase I で Asp が親和標識されている⁶⁴。この Asp は α -amylase family 酵素群の region 2 に位置する保存された Asp (TAA で Asp-206 に相当) である。 α -glucosidase family II ではウサギ小腸 sucrase-isomaltase complex^{65, 66} の Asp-505 (isomaltase)、Asp-1394 (sucrase)、ヒトリソソーム α -glucosidase の Asp-518⁶⁷、テンサイ α -glucosidase の Asp-469⁶⁸、*Aspergillus niger* α -glucosidase P2 サブユニットの Asp-224⁶⁹ で CBE による親和標識および結合したペプチドの単離が行われている。加えてヒトリソソーム α -glucosidase では CBE と結合する Asp-518 を部位特異的変異により Asn、Glu、Gly への置換を行い、いずれも酵素活性が失われることが確認されている⁶⁷。

CBE 以外では α -glucosidase family I に含まれる *S. cerevisiae* α -glucosidase で 5-fluoro- α -D-glucosyl fluoride や 5-fluoro- β -L-idosyl fluoride を自殺基質として用い、触媒反応の求核残基を決定している⁵⁷。反応は Scheme 1 で説明されており、障害がおきるのは k_i よりも k_{cat} の方が小さいために E-I が蓄積するためであるとされている。E は遊離の酵素、I-F は 5-fluoro-glycosyl fluoride、I は生成物を示す。5-fluoro glycosyl fluoride により不活性化された α -glucosidase のペプチド断片を質量分析計で測定したところ分子量が 181 だけ大きい化学種が生成していることが認められ、Asp-214 が修飾されていると同定された。この残基は前述した CBE で修飾されるミツバチ α -glucosidase I (α -glucosidase family I) の Asp に対応する。修飾の反応モード、また α -amylase family 酵素群において region 2 に保存された残基であることから、*S. cerevisiae* α -glucosidase の Asp-214 は触媒反応の求核残基であると同定されている。5-fluoro-glycosyl fluoride は阻害剤として有用であり α -galactosidase⁷⁰、 α -mannosidase⁷¹、 β -mannosidase⁷² などでもこれを用いて触媒求核残基が調べられている。

Scheme 1



E, free enzyme; I-F 5-fluoro-glycosyl fluoride; I, product released

その他、酸塩基触媒残基などの触媒残基については、 α -glucosidase family I は α -amylase family 酵素群と一次構造上に共通した4つの領域 (Region 1-4) の中に含まれるとされている。例えば α -glucosidase family I に含まれる *Bacillus* sp. SAM1606 α -glucosidase の場合、Asp-209 が TAA の Asp-206 に対応し、Glu-271 が酸塩基触媒残基 (TAA, Glu-230)、Asp-345 (TAA, Asp-297) が3番目の残基ということになる⁷³⁾。 α -amylase family 酵素群には様々な酵素が含まれるが触媒機構は統一的なものと考えられており⁵⁾、Taka-amylase A を例に簡単に触媒機構を示すとそれぞれの残基の役割は以下ようになる。「基質が触媒部位に侵入するとそれまでプロトンを経由して結合していた Glu-230 と Asp-297 のカルボキシル基からプロトンが離れ glucoside 結合の酸素原子を攻撃することで、glucoside 結合が切断される。生じたカルボニウムイオン中間体を Asp-206 の解離型カルボキシル基が支える様な形で安定化させる。次に入ってきた水分子は Glu-230 からプロトンを奪われできた OH がカルボニウムイオン中間体のアノメリック炭素を攻撃し反応終了する。」と説明されている。

一方、 α -amylase family 酵素群とは全く異なる α -glucosidase family II では酸塩基触媒残基やその他の必須なアミノ酸残基は未だ知られていない。

ヒト酸性 α -glucosidase ではその遺伝的欠損が glycogen-storage disease type II (GSDII、糖原病 II 型) を引き起こすことは古くから知られており、多くの変異遺伝子が GSDII 患者から単離、解析されている。GSDII を引き起こす変異を *in vitro* で部位特異的に導入した cDNA を一過性発現させ、その塩基置換 (アミノ酸置換) による翻訳後修飾や細胞内輸送、残存酵素活性の変化についての研究が行われている。これらの変異ヒト酸性 α -glucosidase は多くの場合、酵素活性を完全にもしくはそのほとんどを失うが、原因が翻訳後修飾や細胞内輸送のような機能の欠損によるものなのか、酵素化学的に必要な機能を失うためなのかは明らかでない。

触媒残基とは別に大麦 high-pI α -glucosidase では水素結合による酵素-基質相互作用を調べている。遷移状態の安定エネルギー $-\Delta\Delta G^\ddagger$ を様々な deoxy 誘導体 maltose から計算し maltose と酵素の結合を Fig. 1-5 のように示している。¹⁹⁾

第4節 glycosidase での触媒残基の同定

glycosidase の多くはふたつのカルボキシル基による一般酸塩基触媒反応であることが知られている。これらのカルボキシル基を提供する酸性アミノ酸残基 Asp や Glu の同定は前項で述べたような自殺基質を用いた親和標識によるもの、また保存されたアミノ酸残基への部位特異的変異の導入による活性の変化などで調べられている。基質と複合体を形成した酵素の X 線結晶解析でアミノ酸残基と基質の距離関係などから触媒に関わっているであろうアミノ酸残基を推定し部位特異的変異を導入し活性の変化を見ているものもある。

また最近では α -amylase family 酵素群の *Pseudomonas stutzeri* G4-アミラーゼ (GH family 13) で活性残基の 5 種の変異体とマルトテトラオースの複合体の詳細な構造解析により触媒残基の役割を調べた報告もある⁶²⁾。 α -amylase family 酵素群では region 4 に位置する TAA での Asp-297 (G4 アミラーゼでは Asp-294) は 3 番目の触媒残基として扱われるが、この役割について調べられている。これによると Asp-294 がアスパラギン酸のままであると、サブサイト-1 位の糖残基が歪んだ構造をとって酵素に結合しているのが観測されるが、Asn-294 変異体では歪みがとれて、ほぼ regular-chair 型の糖構造をとること、また Asn-294 変異体との複合体では、マルトテトラオースの結合が弱くなっていることを示唆する結果が得られたことから 3 番目の触媒残基 Asp-294 の役割は、-1 位の糖の O-2、O-3 に強く水素結合することにより、基質結合力を強め、かつ加水分解反応を誘引するように歪みを与えることであると報告している。

β -glycosidase では求核残基や酸塩基触媒残基の決定を azide や formate といった外用求核試薬を用いることで行っている。すなわち求核残基もしくは酸塩基触媒残基の変異酵素で失ったそれぞれの Brønsted 塩基の役割を azide や formate のような求核試薬に行わせ活性を回復させるというもので、ケミカルレスキューと呼ばれる手法である。この場合、基質には 2,4-dinitrophenyl β -D-glucoside などよい脱離基をもった基質を使うことで反応を促進させることが必要である。これらの反応モードは Fig. 1-6 のように示される。例えば求核残基の変異酵素を使用した場合、外用求核試薬として NaN_3 を使うと、求核残基の代わりに NaN_3 が C1 に求核攻撃し、またこのとき酸塩基触媒残基が glucoside 結合の酸素原子にプロトン付加し反応が進行する。生成物はアノマーの反転した α -glucosyl azide である。酸塩基触媒残基変異酵素の場合では、求核残基が C1 を攻撃した後、基質の 2,4-dinitrophenol はよい脱離基なので ($\text{p}K_a$ 3.96) プロトン供与を必要としないで遊離し、生成したオキソカルボニウムイオン中間体に NaN_3 が求核種として C1 を求核攻撃し β -glucosyl azide を生成する。

このケミカルレスキューにより以下のような β -glycosidase で触媒残基が決定されている。*Cellulomonas fumi* exoglucanase/xylanase (Cex; GH family 10) の求核残基は Glu-233⁷⁴⁾、酸塩基触媒残基は Glu-127⁷⁵⁾、*Sulfolobus solfataricus* β -glycosidase (S β -gly; GH family 1) の求核残基は Glu-387⁷⁶⁾、*Bacillus circulans* xylanase (GH family 11) の酸塩基触媒残基は Glu-172⁷⁷⁾、*Agrobacterium faecalis* β -glucosidase (GH family 1) の酸塩基触媒残基は Glu170⁷⁸⁾、*Bacillus*

licheniformis 1,3-1,4-β-glucanase (GH family 16)では求核残基は Glu-134、酸塩基触媒残基は Glu-138⁷⁹⁾などである。

第5節 *Schizosaccharomyces pombe* α-glucosidase に関する研究と本研究の概要

Schizosaccharomyces pombe α-glucosidase は 1965 年に、菌体内より部分精製され、その性質、基質特異性、糖転移反応について調べられている^{80,81)}。要約すると最適 pH は酸性側 (pH 4.0-4.4) で、基質特異性は maltopentaose までの maltooligosaccharide に高い特異性を示し、phenyl α-glucoside に対しては特異性が低い。また maltose からの糖転移反応産物は isomaltose が主な産物で微量の panose、isomaltotriose、nigerose、kojibiose、maltotriose が生産される。これらの性質は同じ酵母である *Saccharomyces* 属α-glucosidase とは異なるもので、糸状菌起源のものと類似している^{80,81)}。

その後、菌体外分泌α-glucosidase が確認されている。大量分泌条件、精製法、酵素化学的性質、基質特異性とサブサイト構造が調べられており以下にまとめる⁸²⁾。

分泌条件

炭素源について調べられている。炭素源が glucose、maltose の際には培養液にα-glucosidase は分泌されず、maltotriose、-tetraose、-pentaose の場合に分泌される。また菌体量当たりの分泌量は maltopentaose で最大となる。

酵素化学的性質

- 1) 分子量は 219,000 (SDS-PAGE)
- 2) 最適 pH は 4.5
- 3) pH 安定域は 3-8 (4 °C, 24 h 処理)
- 4) 糖タンパク質であり mannose を標準糖とし phenol-硫酸法により 78%の糖を含む。化学的に糖鎖を除去したタンパク質の分子量は SDS-PAGE で 114,000 である。
- 5) 酵素的に糖鎖を除去した酵素は pH および温度安定性には変化がないがプロテアーゼに対して感受性を増す。

基質特異性およびサブサイト構造

maltopentaose までの maltooligosaccharide に対して高い特異性を示すが、isomaltose、phenyl α-glucoside、soluble starch に対する特異性は低い (k_0/K_m : 56 sec⁻¹・mM⁻¹ for maltose, 5.9 sec⁻¹・mM⁻¹ for isomaltose, 5.9 sec⁻¹・mM⁻¹ for phenyl α-glucoside, 1.95 sec⁻¹・mM⁻¹ for soluble starch)。サブサイト構造についてはサブサイト親和力 A_3 が 0、それ以降は負の値を示し、活性中心はサブサイト 1、2、3 よりできていると推測される。

本研究は *S. pombe* α-glucosidase の構造と機能の関係を明らかにすることを目的とした。なかでも触媒活性に必須なアミノ酸残基を調べることを主目的とした。そのためにまず第2章で *S. pombe* α-glucosidase cDNA のクローニングによりそのアミノ酸配列を推定した。また

ゲノミック DNA のクローニングを行い、遺伝子上流領域配列のホモロジーから *S. pombe* α -glucosidase の発現制御を推定した。第 3 章では構造と機能の関係をタンパク質工学的手法により明らかにするための第一段階として、得られた cDNA の異種宿主発現を行った。そして第 4 章で、これまで相同性のある α -glucosidase で保存された酸性アミノ酸残基に部位特異的に変異を導入することで触媒活性に必須なアミノ酸残基の推定を行った。第 5 章では、触媒活性に必須な酸性アミノ酸残基の近傍に位置する芳香族アミノ酸に変異を導入し基質特異性の変化などを調べた。

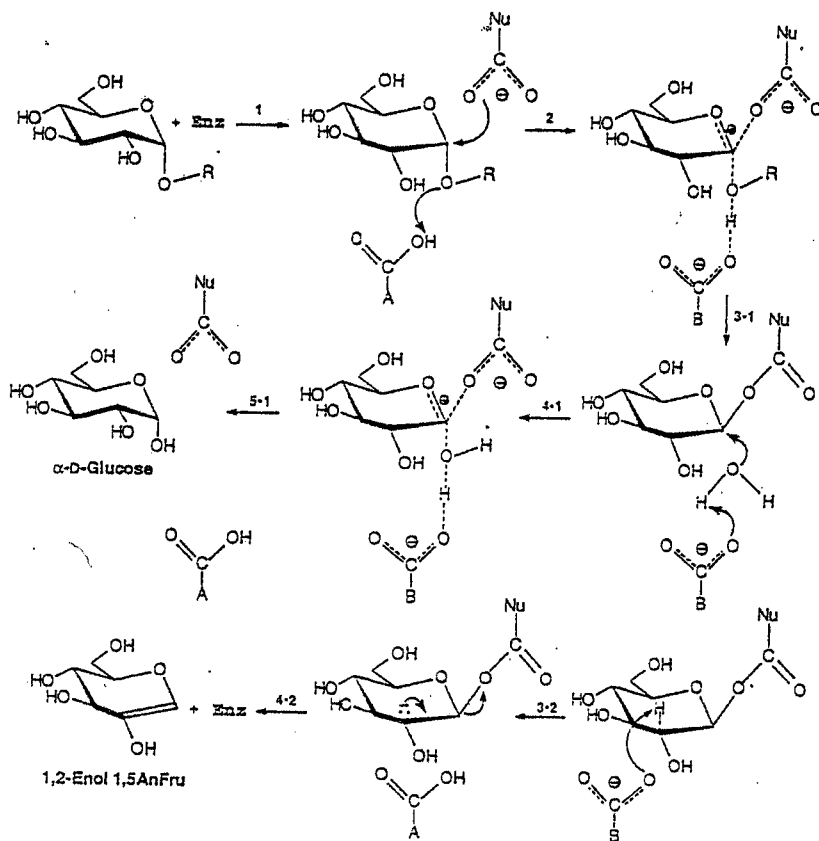


Fig. 1-1. Prediction of reaction mechanisms of α -glucosidase (upper) and α -1,4-glucan lyase (lower). [Adapted from Shukun Yu et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1443**, 1-15 (1999).]

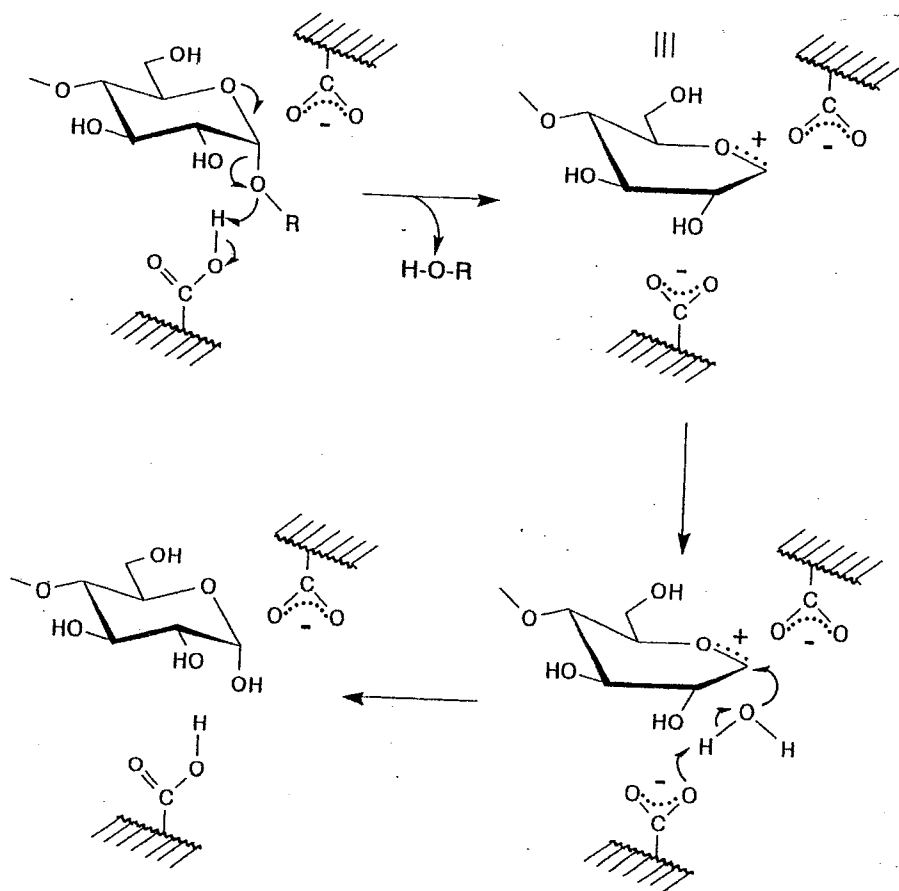


Fig. 1-2. Carbenium ion intermediate mechanism.
 [Adapted from Seiya. Chiba, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61** 1233-1239 (1997).]

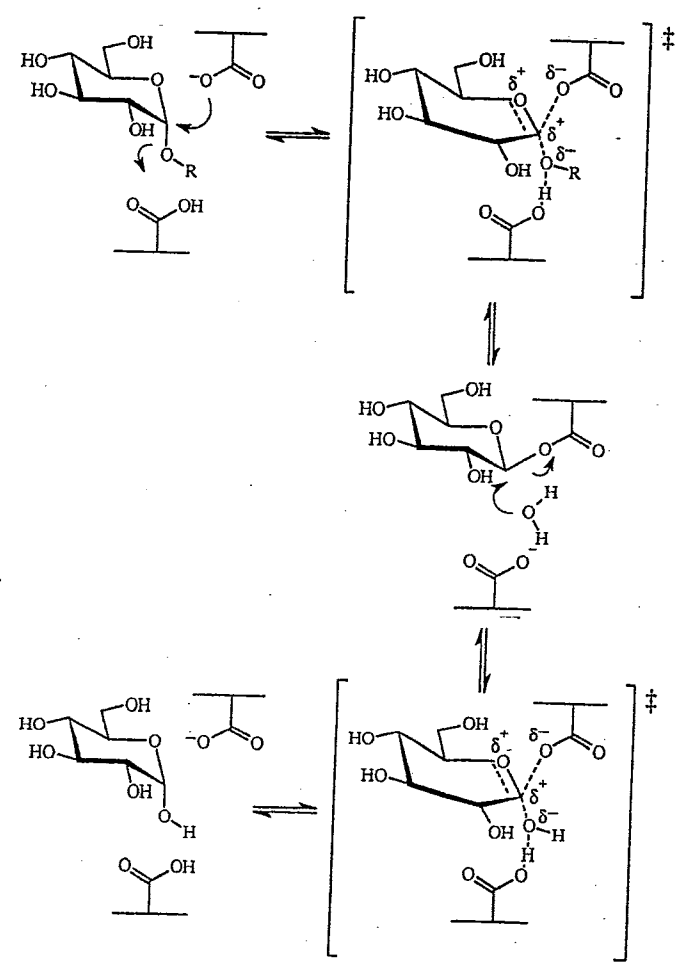


Fig. 1-3. Nucleophilic double displacement mechanism.
 [Adapted from John D. McCarter and Stephen G. Withers, *J. Biol. Chem.*, **271** 6889-6894, (1996).]

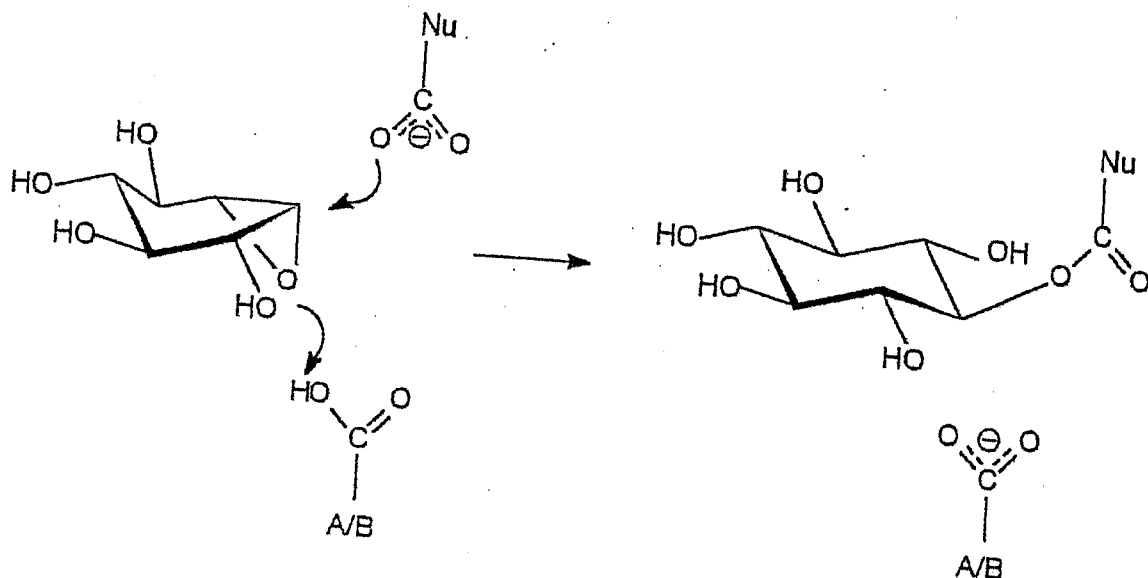


Fig. 1-4. Inactivation of an α -glucosidase with coduritol B epoxide. [Adapted from Torben P. Frandsen and Birte Svensson, *Plant Mol. Biol.*, 37, 1-13 (1998).]

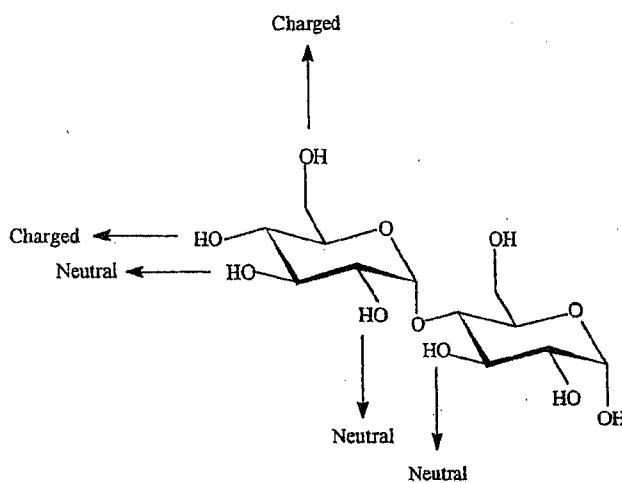


Fig. 1-5. Schematic representation of proposed charge or neutral hydrogen bonds from maltose to high-pI α -glucosidase. [Torben P. Frandsen et al., *Plant Physiol.*, 123, 275-286 (2000).]

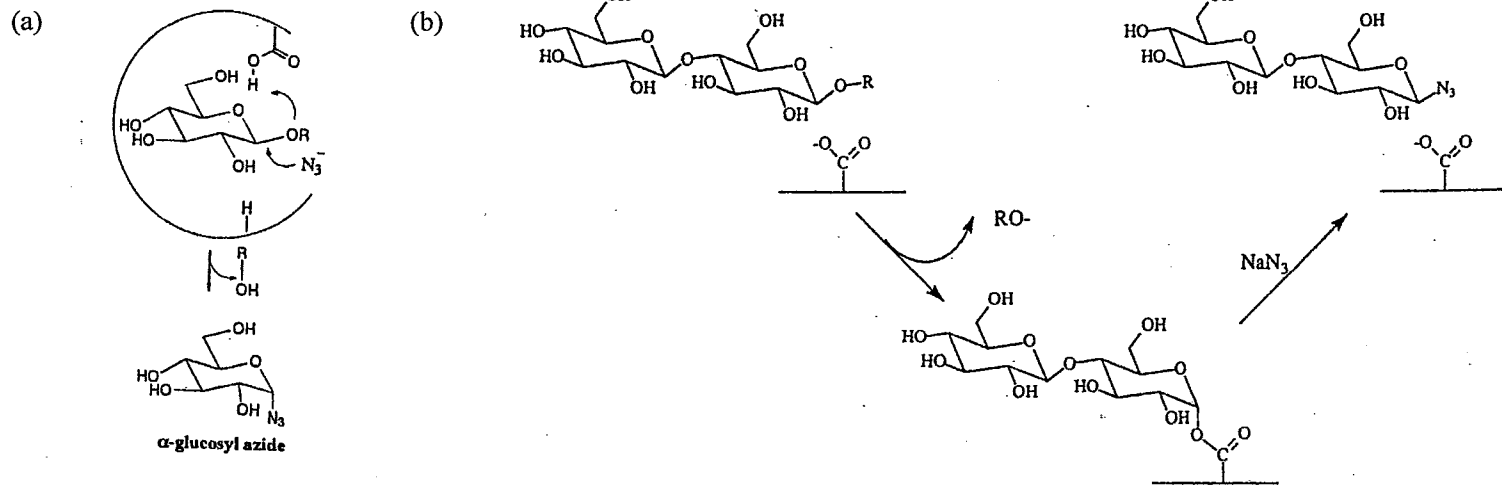


Fig. 1-6. Restoration of nucleophile (a) or acid/base catalyst (b) mutant activity by sodium azide.

[Adapted from (a) Marco Moracci et al., *Biochemistry*, **37**, 17262-17270 (1998) and (b) Alasdair M. MacLeod et al., *Biochemistry*, **33**, 6371-6276 (1994).]

第2章 *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase cDNA およびゲノミック DNA のクローニングとその発現

第1節 緒言

α -glucosidase のアミノ酸配列について

これまで多くの α -glucosidase の一次構造がその遺伝子のクローニングにより調べられている。*Aspergillus niger* α -glucosidase はその中で唯一化学的解析 (Edman 分解) により調べられている²³⁾。 α -glucosidase は前述の通り、一次構造から大きく分けて二つのグループ α -glucosidase family I, II に分類できる。本研究では *S. pombe* α -glucosidase の一次構造を cDNA のクローニングにより推定する。

α -glucosidase ゲノム遺伝子について

真核生物において α -glucosidase ゲノム遺伝子のクローニングの例は少ない。酵母や真菌では、*Schwanniomyces occidentalis*⁸³⁾、*Candida tsukubaensis*^{28, 84)}、*Aspergillus niger*²⁴⁾、*Aspergillus oryzae*²⁵⁾で行われている。*Saccharomyces cerevisiae* では α -glucosidase をコードする *MAL62* 遺伝子の周りに permease とそれらの遺伝子の activator からなる *MAL* loci として構成されている⁸⁵⁾。 α -glucosidase と permease の発現は maltose により活性化され glucose により抑制されることがわかっている⁸⁶⁾。*C. tsukubaensis* α -glucosidase では自身のプロモーターが *S. cerevisiae* でも働くこと、glucose の存在が発現に影響を与えないことを調べている⁸⁷⁾。一方で *S. occidentalis* α -glucosidase の場合 *S. cerevisiae* で自身のプロモーターは動かない⁸⁴⁾。*A. oryzae* α -glucosidase ではレポーター遺伝子によるプロモーター解析が行われており maltose による誘導、高いレベルの発現に必須なプロモーター配列 (Region III, tcgggcatttatcggg) の解析を行っている。また glucose により発現が抑制されることも調べている。

本研究では α -glucosidase のゲノム遺伝子のクローニングを行うことで 5' 上流域のプロモーター様配列から発現制御機構を推測する。またあわせて glucose による遺伝子発現の抑制を調べる。

第2節 実験材料および方法

(1) 菌株

Schizosaccharomyces pombe (AHU3179)は北海道大学農学部生物機能化学科応用菌学講座より恵与されたものを用いた。クローニングのために使用した大腸菌宿主には JM109 [*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB) / F'[traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔM15]*]を用いた。大腸菌コンピテントセルを Hanahan の方法に従い調製した。プラスミドクローニングベクターには pBluescript II KS (STRATAGENE)を使用した。プラスミド DNA の調製をアルカリ/SDS 法と PEG/NaCl 沈殿を組み合わせた方法により行った。

(2) 試薬

制限酵素、修飾酵素、SUPERSCRIPTM Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloning、SUPERSCRIP Preamplification System は LIFETECHNOLOGIES 社製のものを用いた。Gigapack Gold III Packaging Extract (STRATAGENE)、DNA Ligation Kit Ver. 2、BcaBEST Labeling Kit (宝酒造)をそれぞれ市販のものを用いた。その他特に明記しない試薬についても市販のものを使用した。

(3) 酵素

S. pombe α-glucosidase を既報の方法⁸²⁾に従い精製した。すなわち、*S. pombe* を 31 の M5E2 合成培地で培養した培養上清を回収し、エタノール沈殿、DEAE-Sepharose CL-6B による陰イオン交換クロマトグラフィー、Sepharose 6B によるゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせた方法により SDS-PAGE で単一になるまで精製を行ったものを酵素標品として使用した。

(4) アミノ酸配列の解析

(4)-1. S-ピリジルエチル化

脱塩水に対して透析した酵素溶液 (2 nmol) を遠心濃縮した後、タンパク質を 10 mM EDTA、8M urea を含む 0.2 M Tris-HCl (pH 9.0) 100 μl に溶解した。2 μl の 2-mercaptoethanol を加え、窒素置換した後、室温で 16 時間以上放置した。その後 3 μl の 4-vinylpyridine を加え、遮光し窒素置換後、室温で振盪し反応させた。4 時間後、氷酢酸を加え pH を 4 以下にし、20 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) に対して透析した。その後 20 mM Tris-HCl (pH9.0) に対して透析し、遠心濃縮機で試料を乾固させた。

(4)-2. lysyl endopeptidase 消化

S-ピリジルエチル化し乾固したタンパク質に urea を終濃度 8 M になるように加え、0.2 M Tris-HCl (pH 9.0)に溶解した。37 °C に 2 時間保持した後、0.2 M Tris-HCl (pH 9.0)を等量加え、urea 終濃度が 4 M となるようにし、タンパク質に対し 1/100 (モル比) の割合で Lysyl Endopeptidase (和光純薬)を加え、37°C で 24 時間消化した。

(4)-3. 逆相 HPLC

プロテアーゼ消化したペプチドの分離、回収を、逆相 HPLC により行った。カラムには Cosmosil 5C₈-AR-300 Packed Column (4.6mm x 150mm, Nacalai tesque)を用いた。流速 800 μ l/min、カラム温度 50 $^{\circ}$ Cで行った。溶出を 0.1% TFA-CH₃CN 溶媒系で行い、ペプチドの検出を 216nm における吸光度を測定し行った。

(4)-4. アミノ酸配列の決定

Edman 反応によるアミノ酸配列の分析を、ABI 477A protein sequencer/120A PTH analyzer system を用いて行った。HPLC で単離したペプチドを遠心濃縮機で乾固し 100% TFA 30 μ l に溶解しシーケンサーに供した。以下プロトコールに従い分析を行った。

(5) オリゴヌクレオチドの合成

reverse transcription-PCR (RT-PCR)のプライマーとして、得られたアミノ酸配列をもとに P34 (sense; 5'-CAGTATATIGAGTTIACIACIAATATGGT-3') と P32 (antisense; 5'-AAGTCIGGGAAIGCIGIGAAICCGGCCA-3')の inosine を含むオリゴヌクレオチドを作製した。これらの合成には ABI 380B DNA Synthesizer を使用した。合成試料を OPC カラム(ABI) によって精製し、凍結乾燥により試料を乾固させた後に蒸留水で溶解して、20 mM 溶液として保存した。なおオリゴヌクレオチドの濃度は、その 260 nm での吸光度が 1 のとき 33 ng/ μ l と仮定して計算した。

(6) *S. pombe* 全 RNA の単離、mRNA の調製および cDNA の合成

S. pombe を MSE2 培地で 600 nm の吸光度 1.2 まで培養し、Hot phenol 法⁹⁰⁾を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA 200 μ g より Oligotex dT-30 Super (宝酒造) を用いて poly(A)⁺ RNA を精製した。得られた poly(A)⁺ RNA より SUPERSKRIPPT Preamplication System を使用して一本鎖 cDNA を合成した。この逆転写反応液より 0.1 μ l を鋳型として、RT-PCR を行った。反応の際の温度制御には Perkin Elmer 社の GeneAmp System 2400 を使用した。

(7) *S. pombe* cDNA ライブラリーの作製

(6)の方法に従い *S. pombe* から全 RNA を抽出し、poly(A)⁺ RNA を精製した。その後 cDNA ライブラリーの作製を SUPERSKRIPPTTM Lambda System for cDNA Synthesis and λ Cloning を用いて、添付のプロトコールに従って行った。

in vitro パッケージングを Gigapack III Gold packaging Extract を用いて以下のように行った。得られた cDNA ライブラリー 5 μ l を Gigapack III Gold packaging Extract に加え 22 $^{\circ}$ C、90 分間保持し *in vitro* パッケージング反応を行った。500 μ l SM (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 7 mM MgSO₄, 0.01% gelatin) を加えることにより反応を停止し、さらに 20 μ l のクロロホルムを添加し、使用時まで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

作製した組換え λ フェージの大腸菌への感染を以下のように行った。まず宿主大腸菌 Y1090(r) [*AlacU169 proA⁺ hsdR17(r_k⁻,m_k⁺) Δ lon araD139 strA supF(trpC22::Tn10)*] を調製した。0.2% maltose、10 mM MgCl₂ を含む LB 培地 (1% Bacto tryptone、0.5% Bacto yeast extract、0.5%

NaCl) で OD₆₀₀ が 0.7-0.8 になるまで培養し、集菌後 10 mM MgCl₂ を OD₆₀₀ が 0.5 になるように加え懸濁した。この Y1090(r) 溶液 600 μl をライブラリー溶液 (100 μl) と混合し 37°C で 15 分間保持し、ファージを大腸菌に感染させた。あらかじめ溶解し 55 °C に保温してある top LB 培地 (1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl, 0.7% Bacto agar) 約 9 ml をこれに加え、LB 培地 (1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl, 1.4% Bacto agar) 上に重層し、一晚 37°C でプラークを形成させた。

(8) *S. pombe* cDNA ライブラリーのスクリーニング

(8)-1. プラークリフト

作製したプレートからナイロン膜 (Hybond N+, Amersham) へのλファージ DNA の転写を以下のように行った。なお 1 枚のプレートから 2 枚のナイロン膜の写しを作製した。

ナイロン膜 (13 cm x 9 cm) をプレート上に約 1 分間 (2 枚目の膜は約 5 分間) 接触させ、接触面を上に向けて濾紙上で乾燥させた。同じく接触面を上にしてアルカリ変性液 (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)、続いて中和液 (0.5 M Tris/HCl (pH 8.0), 1.5 M NaCl) をそれぞれ染み込ませた濾紙上に 7 分間ならびに 3 分間ずつ放置した。3 分間の中和処理をもう一度行った後に、膜を 2 x SSC (0.3 M NaCl, 30 mM クエン酸ナトリウム) で洗い、濾紙上で乾かした。最後に DNA 接触面を 3 分間紫外線照射することで DNA を膜に固定させた。

(8)-2. プロープの作製

プライマー P34、P32 を用いて、1st synthesis cDNA をテンプレートに RT-PCR を行い、その増幅断片を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。BcaBEST Labeling Kit を用いたランダムプライミング法によってこの DNA 断片の放射能標識を行った。25 ng の DNA 断片に対して 1.85 MBq の [α-³²P]dCTP を使用し、添付のプロトコールに従って標識反応を行った。

(8)-3. プラークハイブリダイゼーション、洗浄および検出

4 枚のナイロン膜に対し 10 ml の Rapid-hyb buffer (Amersham) を用いて、65°C で 90 分間プレハイブリダイゼーションを行った後に、放射標識したプロープ断片全量をこれに加え、65 °C で一晚ハイブリダイゼーションを行った。余剰プロープの洗浄を 2 x SSC/0.1% SDS、1 x SSC/0.1% SDS、0.1 x SSC/0.1% SDS 溶液中で 65 °C、20 分間、それぞれ 2 回、2 回、および 6 回行った。洗浄後、X 線フィルムのオートラジオグラフィを行い、得られた 16 個の独立したポジティブシグナルプラークを回収し SM 中にファージを溶出させた。回収したファージを再び播種し、二次スクリーニングを行ったところ、16 個のポジティブクローンのうち 14 個について再びポジティブプラークが出現した。

得られた陽性クローンの insert DNA の鎖長確認を λgt11 プライマー (forward (GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCCG), reverse (TTGACACCAGACCAACTGGTAATG)) を用いて PCR により行った。プレートから回収したλファージプラークを水 20 μl に懸濁させ、

室温で30分間放置した後に90℃、10分間の熱処理を行いこれをテンプレートとした。PCRを94℃, 1 min / 55℃, 2 min / 72℃, 3 min、25サイクルで行った。

(9) λ ファージ DNA の調製

一種の組換え体につき5枚の角形プレートに λ ファージを全面溶菌になるように播種し(1枚あたり50,000 プラーク)、そのプレート中に10 ml の λ -diluent (10 mM Tris-HCl, pH 7.5、10 mM MgSO₄)を加え、室温で3時間緩やかに振盪した。 λ -diluent を回収し、QIAGEN Lambda Midi Kit (QIAGEN) を用いて添付のプロトコールに従いファージ DNA を精製した。インサート DNA を λ gt22A のアダプターの *SalI*、*NotI* 制限酵素サイトで切り出し、常法に従い Bluescript II にサブクローニングした。

(10) 塩基配列の解析

塩基配列の決定をジデオキシ法により行った。種々の制限酵素断片を Bluescript II のマルチクローニングサイトにサブクローニングし、得られた二本鎖 DNA を塩基配列決定のための鋳型とし、シーケンス反応を Thermo Sequenase (Amersham) を用いて添付のプロトコールに従い行った。プライマーには蛍光標識された M13 -21 ならびに M13 リバースプライマー (ABI, Perkin Elmer) を用いた。解析には ABI373A DNA Sequencer (ABI, Perkin Elmer) を使用した。

(11) *S. pombe* 全 DNA の単離

YPD (1% Bacto yeast extract、2% polypeptone、2% glucose) で一晩培養した *S. pombe* 菌体から Moreno, S.らの方法⁹¹⁾を参考に行った。すなわち遠心分離 (3,800 x g、5 min、4℃) により集めた菌体を 5×10^7 cell/500 μ l になるようにソルビトール溶液 (1 M sorbitol、100 mM EDTA (7.5)) に懸濁し、20 μ l の 50 mg/ml Zymolyase 20-T (生化学工業) を加え 37℃ で4時間保持した。遠心分離 (1,500 x g、30 sec、4℃) で菌体を回収し Tris 溶液 (50 mM Tris / HCl, pH 7.5、20 mM EDTA) 500 μ l に懸濁した後、10% SDS を 50 μ l を加え良く混合し 65℃ に30分間保持した。次に 5 M 酢酸カリウム 200 μ l を加えた後、氷中に1時間放置した。遠心分離 (12,000 x g、5 min、4℃) で上清を回収しイソプロパノール沈殿により DNA を回収した。その後 ribonuclease A により RNA を分解し、フェノール/クロロホルム抽出によりタンパク質の除去を行い、DNA の精製を行った。最終的に 5×10^7 cell から 7.2 μ g の全 DNA を調製することができた。

(12) サザンハイブリダイゼーション

3.6 μ g の全 DNA を種々の制限酵素 (*SalI*、*BamHI*、*XhoI*、*EcoRI*、*PstI*、*SacI*、*ApaI* (宝酒造)) で完全消化した後、0.5 x TBE 緩衝液 (0.5 x TBE; 0.045 M Tris-borate、0.001 M EDTA) 中で 0.8% アガロース (SeaKem GTG Agarose; BMA 社) ゲル電気泳動 (ゲルサイズ; 10 x 11 cm) を 50 V 定電圧で行った。電気泳動槽には Mupid-2 (コスモバイオ社) を用いた。泳動

終了後、定法に従いナイロン膜 (Hybond N+) に DNA を転写した。プローブには本節 (8) で示した cDNA の PCR 増幅断片 34-32CP を用いた。プローブのラベル、ハイブリダイゼーション、検出には AlkPhos Direct Geneimages™ (Amersham) を用い添付のプロトコールに従って行った。ハイブリダイゼーションを 65 °C で行った。また検出の際の発光基質には CDP-Star detection reagent (Amersham) を用いた。

(13) Inverse PCR の鋳型の調製

S. pombe ゲノム DNA 0.5 µg を制限酵素 (5'未知領域増幅には *EcoRI*、3'未知領域増幅には *BglII*) で完全に消化しエタノール沈殿後、DNA を 10 µl の水に溶解させた。DNA Ligation Kit Ver. 2 を 10 µl 加え 16 °C で 30 分間セルフライゲーション反応を行った。70 °C に 10 分間保持することで反応を停止させエタノール沈殿後、そのまま Inverse PCR の鋳型とした。

(14) ノザンハイブリダイゼーション

本節 (6) の方法に従い *S. pombe* から全 RNA を抽出した後、全 RNA 20 µg を 0.66 M ホルムアルデヒドを含む 1.2%アガロースゲルを用いて MOPS 緩衝液 (20 mM MOPS、5 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA) 中で電気泳動しナイロン膜 (Hybond N, Amersham) にプロットティングした。プロットティング前のゲルの前処理を以下のように行った。泳動終了後のゲルを水洗し、50 mM NaOH で 45 分、0.1 M Tris-HCl (pH7.4) で 45 分、20 x SSC (3M NaCl、0.3 M クエン酸) で 1 時間振とうした後常法にしたがいプロットティングを行った。プローブには本節 (8) で示した cDNA の PCR 増幅断片 34-32CP を用い、プローブのラベル、ハイブリダイゼーション、検出には AlkPhos Direct Geneimages™ を用い添付のプロトコールに従って行った。ハイブリダイゼーションを 50 °C で行った。また検出の際の発光基質には CDP-Star detection reagent を用いた。

(15) 活性の測定および酵素単位

α-Glucosidase 活性測定を以下の 500 µl の反応系とした。

200 µl of 0.1 M sodium acetate buffer (pH4.5)

100 µl of enzyme solution

200 µl of 0.5% maltose

氷浴中に冷却しておいた試験管に緩衝液と酵素液を加え、35°C で 3 分間保持した後、基質添加により反応を開始した。酵素の希釈には 0.05% Triton X-100 を含む 50 mM sodium acetate buffer (pH4.5) により行った。一定時間反応させた後 1 ml の 2M Tris-HCl (pH7.0) を加えることにより反応を停止した。遊離した glucose 量を Tris-glucose oxidase-peroxidase 法 (グルコース AR-II、和光純薬工業) により定量した。すなわち、酵素反応を停止させた反応系に Glucostat 試薬を 200 µl 加え、1 時間、35°C で保持し発色させた後、505 nm の吸光度を測定し検量線と比較することにより定量した。

酵素単位は 1 分間に 1 µmol の基質を加水分解する酵素活性を 1 unit として計算した。

第3節 実験結果

第1項 *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase cDNA のクローニング

1. *S. pombe* α -glucosidase のアミノ酸配列の解析

α -glucosidase のアミノ末端と、その Lysyl Endopeptidase 消化ペプチドを逆相 HPLC により分離、回収したペプチドのアミノ酸配列の結果を Table 2-1 に示した (SP29、SP32、SP34、SPN)。これらのペプチドのアミノ酸配列は α -glucosidase family II、glucoside hydrolases family 31 に属する酵素と相同性を示した。*A. niger* α -glucosidase と比較すると、SP29 は P2 subunit の 125-145 番目のアミノ酸配列、SP32 は P2 subunit の 176-199 番目のアミノ酸配列、SP34 は P1 subunit の 157-176 番目のアミノ酸配列と相同であった。

2. プローブの調製

プローブの調製を PCR 法により行った。これまでに一次構造が決定している α -glucosidase との相同性の比較から Lysyl endopeptidase 消化ペプチド SP34、SP32 の位置関係を予測し、このアミノ酸配列からオリゴヌクレオチド P34、P32 を作製し、RT-PCR を行った。鋳型には既報の MSE2 合成培地で培養した *S. pombe* から調製した cDNA を用いた。プライマー P34、P32 を用いて 94°C, 30 秒 / 55°C, 30 秒 / 72°C, 30 秒を 25 サイクル行った。その結果、約 800 bp の DNA 断片 (34-32C) が増幅した。PCR 産物を pBluescript II にサブクローニングし (34-32C/KS)、塩基配列を解析した。

34-32C の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は Lysyl endopeptidase 消化ペプチドのアミノ酸配列を含み、また *A. niger*、テンサイ、ヒトリソソム α -glucosidase などのアミノ酸配列と相同性を示した。このことからこの PCR 増幅断片は *S. pombe* α -glucosidase の cDNA の一部であると判断し、これを 34-32CP プローブと命名し cDNA ライブラリーのスクリーニングに利用した。

3. α -glucosidase cDNA の単離

S. pombe より作製した cDNA ライブラリー約 12,000 pfu を、³²P でラベルした 34-32CP プローブでスクリーニングした。一次スクリーニングの結果 16 個の陽性クローンを得た。これらについて二次スクリーニングを行った結果、14 クロオンが陽性であった。

得られた陽性クローンについてインサート DNA の鎖長を確認するために λ gt11 プライマーを用いて PCR を行った。その結果、約 4,000 bp、3,500 bp、2,500 bp の DNA 断片が増幅した。インサート DNA が約 2,500 bp のクローンについては本酵素のオープンリーディングフレーム (ORF) が約 3,000 bp であることをその相同性から予想できていたので 5' 領域が欠落しているものと判断した。約 4,000 bp、3,500 bp の PCR 産物について 5' 末端から約 1,000 bp と 3' 末端から約 300 bp のシーケンスを行った (Fig. 2-1)。その結果、この 2 クロオンの鎖長の相違は 5' UTR の大きさの違いであることがわかり、その他の配列については共通で

あることがわかったので約 4,000 bp のクローンについてファージ DNA を調製した。その挿入断片を λ gt22A の *Sal*I 部位と *Not*I 部位を利用し BluescriptII にサブクローニングした後、塩基配列を Fig. 2-3 の方法に従って解析した。

4. α -glucosidase cDNA の構造

塩基配列の解析の結果、cDNA は全長 4,176 bp であった (Fig. 2-3)。開始コドン ATG から ORF が 2,910 bp 存在し、969 アミノ酸をコードしていた。このアミノ酸配列から推定される分子量は 108,648.3 であった。翻訳領域の GC 含量は 41.9%、コドンの 3 番目の GC 含量は 37.7% であった。その上流には 5'-UTR が 1,037 bp 存在し、下流は 157 bp の 3'-UTR と 72 bp の poly A からなっていた。5'-UTR に ORF は見つからなかった。poly A 開始シグナル (AAUAAA) を poly A 開始点より上流 17、21、46 bp に見つけることができた。またスクリーニングに用いた 34-32CP プローブの塩基配列は *S. pombe* α -glucosidase cDNA と完全に一致した。

ORF から推定されるアミノ酸配列には精製酵素の N 末端および, Lysylendo peptidase 消化ペプチド断片のアミノ酸配列が含まれていた。精製酵素の N 末端アミノ酸配列は開始 Met より 25 残基目の Asn から始まっていたことから 24 アミノ酸配列はシグナル配列であることを予想できた。また N 型結合糖鎖付加モチーフ (N-X-T/S) は 27 カ所にあった。アミノ酸配列から見積もった分子量は 106,139.04 (シグナル配列を含まない) であるが、精製酵素の分子量は SDS-PAGE で約 219 kDa であるので、翻訳後の糖鎖の付加を予想できた。

推定されるアミノ酸配列を Fasta 検索すると、 α -glucosidase family II に含まれる酵素と相同性を示した (Table 2-2)。なかでも糸状菌、酵母起源の α -glucosidase とは高い相同性を示し、*Aspergillus nidulans* α -glucosidase と 47.6%、*A. niger* α -glucosidase と 46.6%、*S. occidentalis* α -glucosidase (glucoamylase) と 45.1%、*A. oryzae* α -glucosidase と 44.7% の相同性を示した。植物起源との相同性は *Arabidopsis thaliana* α -glucosidase (36.6%)、大麦 (Igri) high pl α -glucosidase (35.9%) が高く、ほかにはヒトリソソム α -glucosidase と 34.7%、*Contarnix japonica* (ニホンウズラ) 酸性マルターゼと 35.4%、Pacific white shrimp α -glucosidase と 33% の相同性を示した。 α -glucosidase のほかにも *Arabidopsis thaliana*、*Tropaeolum majus* α -xylosidase とそれぞれ 33.4%、34.5% の相同性を示した。また小胞体に局在する糖鎖の glucose トリミング酵素である glucosidase II α -subunit (哺乳類起源) とも約 27% の相同性を示した。*Gracilariopsis lemaneiformis* α -1,4-glucan lyase とは 23% の相同性を示した。以上のことから *S. pombe* α -glucosidase が glucoside hydrolases family 31 に含まれること、また α -glucosidase family II に属することがわかった。

第2項 *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase 遺伝子のクローニングおよび発現

1. ゲノミックサザンハイブリダイゼーション

S. pombe α -glucosidase 遺伝子の単離に先立って、前項で単離した *S. pombe* α -glucosidase

cDNA に対応する遺伝子の存在の確認、並びにそのコピー数の推定をサザン解析により、行った。

34-32CP をプローブに用い、AlkPhos Direct Geneimages™ により 65°C でハイブリダイゼーションを行った。その結果、すべての制限酵素で単一なバンドが検出された (Fig. 2-4)。またこの際、*S. pombe* 全 DNA 3.6 µg 中 (一倍体ゲノムサイズを 14 Mb とする) に占める 800 bp の目標配列量 (205 pg) を含むコントロール試料 (*S. pombe* α-glucosidase cDNA 全長を含んだ Bluescript II KS, 1.8 ng) を共に電気泳動し、得られたオートラジオグラムでのバンドの濃淡を比較した。この結果、このコントロール試料とほかの全 DNA で検出されたバンドの強度はほぼ一致した。

以上のことから、α-glucosidase 遺伝子が単一コピーで存在していることを予想できた。

またα-glucosidase コード領域周辺の制限酵素地図を Fig. 2-4 のように作製した。

2. α-glucosidase 遺伝子の単離

α-glucosidase 遺伝子の単離を PCR 法により行った (Fig. 2-5)。まず cDNA をコードしている領域からそれに続く 5' 上流および 3' 下流未知領域の増幅を inverse PCR 法により行った。次に inverse PCR 産物の末端の配列決定を行い、それぞれの末端配列から新たなプライマーを合成し、ゲノム DNA を鋳型として通常の PCR を行った。

2-1) Inverse PCR

inverse PCR 反応を以下のように行った。

5' 上流未知領域の増幅にはゲノム DNA を *EcoRI* で消化し、セルフライゲーションしたものを鋳型に用いた。cDNA の塩基配列をもとに作製した p355 (5'-gtaatcaatattagaccacaaaagggtttc-3'; Nos. 2085-2111 nt, antisense)、p676 (5'-ggtattcccattgtaggagctaatggtttgtg-3'; Nos. 2042-2072 nt, sense) をプライマーに、50 µl の反応液で 94°C 30 sec、50°C 2 sec、74°C 3 min を 30 サイクル行った。耐熱性 DNA ポリメラーゼには KOD Dash (TOYOBO) を用いた。アガロースゲル電気泳動で反応産物を確認したところ、約 3,900 bp と約 1,000 bp にバンドが得られた。そこでこの反応産物の 1/10 µl を鋳型として、プライマーには同じく cDNA の配列を元に作製した p711 (5'-atttaccagatctcacaacagccctac-3'; Nos. 3159-3185 nt, sense)、p218 (5'-ggggctagcttcattattagcccaaaagg-3'; Nos. 1675-1703 nt, antisense) を用いて nested PCR を行った。50 µl の反応液で 94°C 30 sec、55°C 2 sec、74°C 3 min を 25 サイクル行った。耐熱性 DNA ポリメラーゼには KOD Dash を用いた。アガロースゲル電気泳動で反応産物の長さを確認したところ予想される約 3,400 bp の産物が得られた。これを Bluescript II SK にサブクローニングし末端の配列解析を行った結果、反応産物は既知領域の *EcoRI* 下流に未知領域が続いていた。配列解析の結果を基に未知領域の 5' 末端から 28 mer のオリゴヌクレオチドプライマー (5'-gaattcttttctgcatattctctct-3') を合成しこれを agd-f と命名した。

3' 下流未知領域の増幅にはゲノム DNA を *BglII* で消化し、セルフライゲーションしたものを鋳型に用いた。cDNA の塩基配列をもとに作製した pCLA (5'-taatcgatctcgcttcaccgat-3'; Nos. 3945-3967 nt, sense)、p355 をプライマーに、50 µl の反応液で 94 °C 30 sec、50 °C 2

sec, 74°C 3 min を 25 サイクル行った。耐熱性 DNA ポリメラーゼには KOD Dash を用いた。反応産物の確認をアガロースゲル電気泳動で行ったところ、バンドが数本現れたため、nested PCR を行うことにした。反応産物の 1/10 μ l を鋳型として、プライマーには pCLA、p218 を用いた。50 μ l の反応液で 98°C 15 sec, 55°C 2 sec, 74°C 3 min を 25 サイクル行った。耐熱性 DNA ポリメラーゼには KOD DNA polymerase (TOYOBO) を用いた。アガロースゲル電気泳動で反応産物の鎖長を確認したところ予想される約 3,000 bp の産物が得られたので、これを pBluescript II SK にサブクローニングし末端の配列解析を行った結果、既知領域の *Bgl*III 上流に未知領域が続いていた。未知領域の 3' 末端から 28 mer のアンチセンスのオリゴヌクレオチドプライマー (5' - tctagcatttctcttaaggtcagataaa - 3') を合成しこれを agd-r と命名した。

2-2) Long PCR

新たにゲノム DNA 200 ng を鋳型として、agd-f、agd-r をプライマーとして用いて、PCR を行った。50 μ l の反応液で 94 °C 30 sec、70 °C 7 min を 25 サイクル行った。耐熱性 DNA ポリメラーゼには KOD Dash を用いた。アガロースゲル電気泳動で反応産物の大きさを確認したところ予想される約 7,000 bp の産物が得られた。そこでこの反応産物を *Nhe*I、*Xho*I で消化し得られた 3 つの DNA 断片をそれぞれ BluescriptII SK にサブクローニングした。また *Nhe*I、*Xho*I 制限酵素サイトを含むそれぞれの領域をサブクローニングするために反応産物を *Bgl*III と *Ssp*I、*Pvu*II と *Eco*RI でそれぞれ消化し得られた断片を BluescriptII SK にサブクローニングした。これらの塩基配列を Fig. 2-6 の方法に従って解析した。

3. α -glucosidase 遺伝子を含む DNA 断片の構造

塩基配列の解析の結果、PCR 反応産物の全長は 7,431 bp であった (Fig. 2-7)。この中に α -glucosidase 遺伝子が含まれていた。この配列は cDNA の塩基配列と完全に一致していたことから、本遺伝子はイントロンを含んでいない。

本遺伝子 3' 下流の塩基配列の BLAST 検索 (blastx) を行うと、*S. pombe* brefeldin A resistance protein、*Emericella nidulans* azole fungicides resistance protein、*S. cerevisiae* Snq2 といった ATP-binding cassette (ABC) superfamily transport proteins と相同性のあるタンパク質をコードする配列の一部 (ORF2) を見つけることができた。しかしこれのプロモーター様配列は見つからなかった。これらの ABC superfamily transport proteins と ORF2 のアラインメントを作製した (Fig. 2-8)。ORF2 には ATP 結合タンパク質が高度に保存しているアミノ酸配列モチーフ Walker A と Walker B⁹¹⁾ が見つかった。

次に α -glucosidase 遺伝子 5' 上流域におけるプロモーターの推定を相同性から行った。本遺伝子の転写開始点は未同定であるので、ここでは cDNA の開始点を +1 とした。真核生物 RNA Polymerase II プロモーター配列とのホモロジーからコアプロモーターを予測すると、-50 から -42 に存在する 5'-TTATAAAAG-3' 配列が TATA box と推定できた。また -6 から 1 に存在する 5'-TTATTCA-3' はイニシエーター配列 (Inr; YYANWYY) と推定できた。CAAT 配列は 6 カ所見つかった。これら以外では -360 から -355 に GC-box 様配列 (CCGGGG) が見つ

かった。GC-box は *A. nidulans*、*A. niger* では CreA タンパク質結合部位⁹²⁾、*S. cerevisiae* では Mig1 タンパク質結合部位⁹³⁾であり、これらのタンパク質はカーボンカタボライトリプレッション調節タンパク質として知られている。他には *A. oryzae amyB*⁹⁴⁾、*glaA*⁹⁵⁾、*agda*⁸⁸⁾ 遺伝子において高レベル発現に関与している Region I 類似配列が-876 から-869 (TCACCGCT) に、また基本転写に関与している Region II 類似配列が-193 から-186 (GGCGGAAT) に位置していた。これらの遺伝子がそれぞれ α -amylase、glucoamylase、 α -glucosidase をそれぞれコードしており glucose 存在下では遺伝子は発現されないことが明らかにされている。よってこれらの上流プロモーターエレメント様配列の存在により *S. pombe* α -glucosidase 遺伝子の発現は glucose により抑制されていることを予想できた。

4. glucose による α -glucosidase の発現制御

ここまでで *S. pombe* α -glucosidase 遺伝子は glucose により発現が抑制されていることをその 5' 上流域のホモロジーから予想できた。そこで培地中の glucose 濃度と α -glucosidase の発現の関係を見ることにした。*S. pombe* を glucose 飢餓の状態にした際に α -glucosidase は誘導されるのか、また α -glucosidase を分泌している状態の *S. pombe* に glucose を加えた際にその発現が停止するのか、を観察した。

まず *S. pombe* を glucose 飢餓の状態にしたときの α -glucosidase の発現を以下のように観察した。9% glucose を炭素源とした EMM2 最小培地 100 ml で *S. pombe* を OD₆₀₀=1 まで生育させた。この培養上清には maltase 活性を検出できなかった。しかし菌体懸濁液には 0.08 U / OD₆₀₀ の maltase 活性を検出できた。遠心分離 (3,800 x g, 5 min, 4 °C) により集菌後、0.1% glucose を加えた EMM2 最少培地 (0.1% glucose / EMM2) 100 ml で菌体を洗浄した後、新しい 0.1% glucose / EMM2 100 ml に植え継いだ。これにより glucose 飢餓状態を作りだし、培養上清 maltase 活性を経時的に観察した結果が Fig. 2-9 である。各時間に培養液 1 ml を遠心分離 (3,800 x g, 5 min, 4 °C) し培養上清の maltase 活性を測定した。0 時間には 0 U/ml 培養液だった maltase 活性は 10 時間後に 0.22 U/ml 培養液、24 時間後には 0.53 U/ml 培養液まで上昇した。さらに低濃度 glucose に移した 0 時間後、10 時間後の菌体より全 RNA を単離しノザン解析を行った (Fig. 2-9)。34-32CP をプローブに用い、50°C でハイブリダイゼーションを行い、AlkPhos Direct により検出した。その結果、 α -glucosidase mRNA は 0 時間では検出されなかったが、低濃度 glucose 条件としてから 10 時間のものに発現を認められた。この結果は glucose 高濃度の培地から低濃度の培地へ菌体を移したとき、すなわち *S. pombe* を glucose 飢餓状態にしたときに α -glucosidase が転写レベルで誘導されることを示す。

次に α -glucosidase を培養上清に分泌している *S. pombe* 培養液に glucose を加えたときの分泌の変化を以下のように観察した。3% glycerol を炭素源とした EMM2 90 ml で *S. pombe* を培養した。この条件で *S. pombe* は α -glucosidase を効率的に分泌する。OD₆₀₀=1 のとき、培養液にそれぞれ終濃度が 0%、3%、6%、9% になるようにそれぞれ 10 倍濃度の glucose を 10 ml 加えた。このときの培養上清 maltase 活性は 0.9 U/ml 培養液であった。その後の各時間での菌体あたりの (OD₆₀₀ あたりの) maltase 活性を観察した結果が Fig. 2-10 である。いずれの

濃度でも glucose を加えた直後から菌体あたりの maltase 活性が減少した。すなわち α -glucosidase の発現が抑制された。また glucose 添加後 10 時間の菌体より全 RNA を単離しノザン解析を行った (Fig. 2-10)。34-32CP をプローブに用い、50°C でハイブリダイゼーションを行い、AlkPhos Direct により検出した。その結果、濃度を問わず glucose を加えた培養液の菌体では α -glucosidase mRNA は検出されなかったが、glucose を加えない場合には発現が認められた。この結果から *S. pombe* α -glucosidase の発現は培養液に glucose を添加することに応答し転写レベルでその発現が抑制されることがわかった。

以上の結果から α -glucosidase は培養液中の glucose の濃度によりその発現が制御されていることがわかった。

第 4 節 考察

第 1 項 *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase cDNA のクローニング

得られた 4,176 bp の α -glucosidase cDNA には 1,037 bp からなる長い 5'-UTR が含まれていた。ノザン解析の際に (Fig. 2-10) rRNA (25S, 18S) の電気泳動距離から見積もった *S. pombe* α -glucosidase mRNA のサイズが約 4.2 kb だったことから、この大きい 5'-UTR を含む 4,176 bp の cDNA は間違いなく mRNA 由来だと言える。*S. cerevisiae* ではアミノ酸合成系遺伝子の正の発現制御転写因子である *GCN4* の mRNA が上流に長い 5' 非翻訳領域をもつ (約 600 bp)^{96,97}。5' 非翻訳領域には 4 つの短い ORF があり、これらの相互作用により翻訳レベルで *GCN4* が発現制御されていると考えられている⁹⁸。また *HIS4* 遺伝子転写産物の非翻訳リーダ領域はヘアピン構造をとり強く翻訳が阻害されると報告されている。しかし α -glucosidase cDNA 5' UTR には ORF は含まれておらず、また二次構造予測を行ったが特別な構造は見つからなかった。この長い 5' 非翻訳領域がどのような機能を持つかは不明であるが考えることができるのは mRNA の安定性に関与しそれによる翻訳レベルの制御である。

970 コドンの ORF は開始 ATG が 2 つ並んだ ATGATG で始まっていたが、翻訳開始領域内に ATG が複数ある場合、ほとんど例外なく 5' 側の ATG から翻訳が開始される事が *S. cerevisiae* で調べられており⁹⁹、*S. pombe* でも翻訳はおそらく最初の ATG から始まっているであろうと予想できる。970 コドンとその 3 番目の GC 含量は (それぞれ 41.9%、37.7%)、これまで解っている *S. pombe* 塩基配列の 562 CDS (2652176 コドン) の GC 含量 (39.8%、3 番目のコドン 33.15%) と比較して平均的であることがわかる。*S. pombe* α -glucosidase の N 末端アミノ酸配列は 25 番目の Asn から始まっており、開始 Met から 24 番目の Gly までは本酵素のシグナルペプチドである。またアミノ酸配列中には、27 カ所の N 型糖鎖付加シグナル配列 (NXT/S) が含まれていたが、本酵素は 78% の糖を含んでいることをわかっている。すなわち、菌体外酵素である α -glucosidase は前駆体タンパク質がシグナルペプチドにより小胞体へ運ばれ N 型糖鎖付加シグナルへの糖鎖付加、シグナルペプチドの除去が行われ、ゴルジ体に運ばれた後に更なる糖の付加が行われ、細胞表層まで輸送されていると予想できる。

比較的相同性の高い 17 種類の α -glucosidase family II (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Candida tsukubaensis*, *Mucor javanicus*, 大麦 (Morex)、テンサイ、ソバ、ホウレンソウ由来の各 α -glucosidase、ヒト酸性 α -glucosidase、ラット isomaltase、ラット sucrase、ウサギ isomaltase、ウサギ sucrase、ヒト isomaltase、ヒト sucrase) と配列比較した結果 (Fig. 2-11)、相同性の特に高い領域は *S. pombe* α -glucosidase のアミノ酸残基で 312-368、476-488、599-705、732-741 の範囲であった。N 末端から約 150 残基、C 末端から約 90 残基は相同性が低い。また微生物 (カビ、酵母) 由来の α -glucosidase 特有の配列が *S. pombe* α -glucosidase で 489-567 に存在した。植物、哺乳類起源の α -glucosidase にはない配列である。この配列がドメイン間をつなぐリンカー配列のようなものであり、高等生物への進化の過程で除去されたと予想できる。*A. niger* glucoamylase では 2 つのドメイン間 (触媒ドメイン、デンプン吸着ドメイン) をつなぐリンカーと同じような Ser、Thr の豊富な配列がありそれらが O-glycosylation されていることが知られている¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾。本酵素においてこの領域は Ser、Thr、Pro がそれぞれ 13、5、6 残基と領域内の 30% を占め、また同じくこの領域を持つ *A. niger* α -glucosidase ではこの領域の豊富な Ser、Thr が O-glycosylation されていることがわかっている²³⁾。このことはこのリンカー様配列がドメイン間をつなぐリンカーのようなものであることの可能性を高めている。そして α -glucosidase family II が N 末端側ドメイン、C 末端側ドメインから構成されているのではないかとすることを予想させる。

glucosyl hydrolase family 31 には始原菌 *Sulfolobus solfataricus* α -glucosidase が含まれ *S. pombe* α -glucosidase とは 22.7% の相同性を示した。この酵素のアミノ酸配列から計算される分子量 80.5 kDa (693 アミノ酸) はこれまで α -glucosidase family II で報告されているものなかでもっとも小さいものである。*S. solfataricus* α -glucosidase と本酵素を Clustal W により配列比較すると (Fig. 2-12)、本酵素のアミノ酸配列で 172-270、501-555、853-887 に相当する部分が大きく欠落している。この領域は触媒活性には必要がないということになる。糖鎖のトリミングに関わる glucosidase II α -subunit と相同性を示した (Fig. 2-13)。N 型糖鎖 mannose コア糖鎖の非還元末端の 2、3 番目の glucose の α -1,3-glucoside 結合に作用する。glucosidase II の mannose コア糖鎖は 11 mannose 残基が枝分かれしており、それに glucose が 2 残基結合したものであり比較的嵩が大きい。glucosidase II は他の α -glucosidase family II の酵素より活性中心が広いことを予想できる。またブタ、ヒト、マウス由来の glucosidase II 間のアミノ酸配列の相同性は 90% を越える。これは α -1,3-glucoside 結合に作用する高い基質特異性を進化の過程で維持と想像できる。最近 *Bacillus thermoamyloliquefaciens* から細菌でははじめて glucoside hydrolase family 31 に属する α -glucosidase が報告された³⁰⁾。この報告では glucoside hydrolase family 31 の α -glucosidase はその二次構造予測から 3 つの領域 (Region N、Region A、Region C) に分割されると報告されている。Region N は 14 β -strands から、Region A は 8 α -helices、4 β -strands、Region C は 14 β -strands から構成されると推測されている。そこで *S. pombe* α -glucosidase で二次構造の予測を行った (Fig. 2-14)。報告と同じように二次構造の構成から 3 部分に分割できた。N 末端側 (1-268、アミノ酸残基; Region N) が 16 β -strands と 1 α -helix から、アミノ酸残基 269-742 の範囲 (Region A) は 9 α -helices、5 β -strands

から、C 末端側 (743-945, アミノ酸残基; Region C) は 14 β -sheets をとると予測された。保存性に高い領域は α -helix、 β -strand が混合した形を取っている Region A であり、これらの中に触媒部位を含むのであろう。

Arabidopsis thaliana、*Tropaeolum majus* α -xylosidase と比較的高い相同性を示した (それぞれ 33.4%、34.5%) が、このほかに *Sulfolobus solfataricus* α -xylosidase が 18% の相同性を示す。 α -xylosidase に関する報告はあまり多くはないがいくつかの微生物、植物にこの酵素が存在することを知られており基質特異性から 3 タイプに分類されている^{103, 104)}。

Type A p-nitrophenyl α -xylopyranoside (pNPX)、isopremeverose、xyloglucan oligosaccharide を加水分解できる。

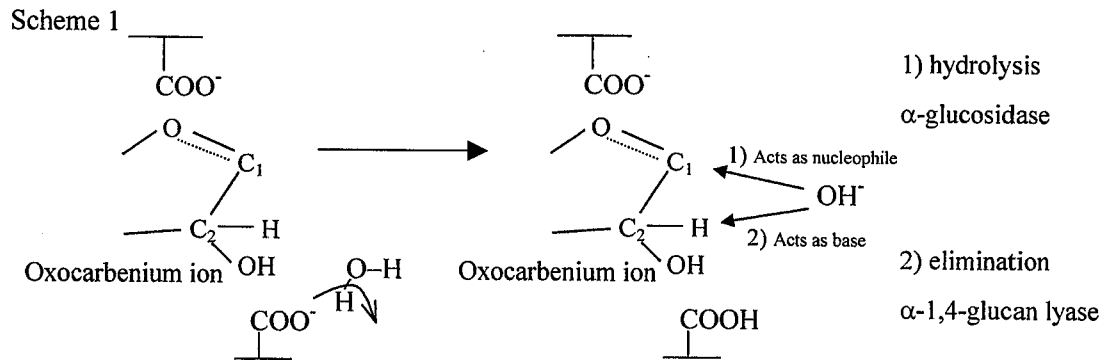
Type B pNPX、isopremeverose を加水分解できず、xyloglucan oligosaccharide のみを加水分解できる。

Type C pNPX を加水分解し、isopremeverose を少し加水分解するが xyloglucan oligosaccharide を加水分解できない。

本酵素と高い相同性を示すキンレンカ (*Tropaeolum majus* L.) 発芽種子由来 α -xylosidase は Type B の基質特異性を示す¹⁰⁵⁾。すなわち pNPX を加水分解できない。一方で *A. niger* α -glucosidase は pNPX を加水分解でき、isopremeverose を比較的高い反応効率で分解できることが知られている¹⁰⁶⁾。同じ α -glucosidase family II に属する *S. pombe*、ソバ α -glucosidase は pNPX を加水分解できない。また *S. solfataricus* α -xylosidase は、 α -xylosidase 活性に加えて maltose など maltooligosaccharide を加水分解できる¹⁰⁷⁾。しかし α -glucosidase の α -xylosidase 活性、またその逆は調べられていないものがほとんどである。このほかにも maltooligosaccharide を加水分解できる α -xylosidase や、pNPX、isopremeverose、xyloglucan oligosaccharide を加水分解できる α -glucosidase が存在することを予想できる。この基質特異性を調べることにより α -xylosidase を含めた α -glucosidase family II、すなわち glucoside hydrolase family 31 内でのグループ分けの再編成ができそうである。そしてこれらを再検討することは基質の非還元末端 glucose 残基の認識、特に 6 位炭素の認識の機構を知る手がかりになるであろう。

本酵素を含めた glucoside hydrolase family 31 には全体としての相同性は低いが局所的に相同性を示す紅藻、真菌由来の α -1,4-glucan lyase が含まれる³⁵⁾。 α -1,4-glucan lyase はデンプンやグリコーゲンの非還元末端からリアーゼ反応により 1,5-anhydro-D-fructose を遊離する酵素である。 α -glucosidase family II 間で良く保存された領域が α -1,4-glucan lyase でも保存されており、似たタンパク質構造、触媒反応機構をとることが推測されている (Fig. 1-1)³⁵⁾。すなわち α -1,4-glucan lyase の反応機構は酸塩基触媒残基が塩基として働くときに水からではなく遊離する glucose 残基の 2 位炭素からプロトンを引き抜くものと考えられている。しかし有機化学的に考えればこれはオキソカルベニウムイオンに対して酸塩基触媒残基により脱プロトン化された OH が求核種として働くのか塩基として働くのか、すなわち置換反応なのか脱離反応なのかと考える方が妥当であろう。言い換えれば、OH が 1 番炭素に求核攻

撃すれば加水分解反応 (α -glucosidase) であるし、2 番炭素からプロトンを引き抜けば脱離反応 (α -1,4-glucan lyase) という考え方である (Scheme 1)。これらは活性部位の環境の違いで起きるのであろう。例えば α -glucosidase ならオキソカルボニウムイオン中間体は OH が 1 番炭素に求核攻撃しやすいように配置される活性部位構造、 α -1,4-glucan lyase なら二重結合が安定化するような構造が存在するのだろう。タンパク質工学的手法により α -glucosidase の α -1,4-glucan lyase への変換が可能であると考えられ、もしこれが成功すれば α -glucosidase および α -1,4-glucan lyase の触媒反応機構を知る上で重要な知見となるであろう。



最後に α -glucosidase family I と family II についてだが、これらの酵素はそれぞれ glycoside hydrolase family 13、family 31 に含まれる。すなわちアミノ酸配列は全く相同性を示さない。立体構造については α -glucosidase family II でまだその構造が解析されていないので比較はできない。反応に関しては α -glucosidase family I、II ともに α -glucoside 結合をもつ基質の非還元末端から α -glucose を遊離する酵素であるが、基質特異性に関しては family I の酵素は heteroside に高い特異性を持つものが多く (Type I)、family II の酵素は holoside に作用するタイプ (Type II or III) が多い。またこれまでの報告では D-glucal を水和できるのは family II の酵素ばかりである¹⁰⁸⁾。反応機構は両者とも求核残基と酸塩基触媒残基が働く一般酸塩基触媒であるが、活性部位の環境や基質の認識などの違いが基質特異性の相違に反映されると考えられる。

第 2 項 *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase 遺伝子の構造および発現

1. α -glucosidase 遺伝子の構造

サザン解析の結果から、本遺伝子が単一コピーで存在することを示した。しかし塩基配列のデータベースには *Schizosaccharomyces pombe* 由来の putative glycoside hydrolase family 31 protein が登録されておりアミノ酸レベルで本研究 α -glucosidase と 62 %の相同性を示す。サザン解析によりこの遺伝子が検出されなかったのはプローブの塩基配列が 68 %と比較的ホモロジーが低いことと、ハイブリダイゼーションの温度を 65 °C と高めに設定したためと思われる。

PCR 法により α -glucosidase 遺伝子を含むゲノム DNA 断片を単離した。PCR 法の場合、耐

熱性 DNA polymerase を使用するためその変異頻度が問題となる。しかし本研究では既知の cDNA 部分と比較して一つの変異も現れなかった。本研究で用いた KOD Dash が α 型酵素と Pol I 型酵素の混合した普通の混合型とは違い KOD DNA polymerase の単一系酵素のため伸長性、増幅効率、正確性が有効に作用したものと思われる。

α -glucosidase 遺伝子は cDNA の塩基配列と完全に一致したことからイントロンを含まない。 α -glucosidase family II ではいくつかのゲノム遺伝子がクローニングされているが *Schwanniomyces occidentalis* 由来⁸³⁾、*Candida tsukubaensis* 由来^{28,84)}などの酵母由来の遺伝子にはイントロンが含まれていない。しかしながら *Aspergillus oryzae*²⁵⁾、*A. niger*²⁴⁾ α -glucosidase 遺伝子では3カ所イントロンを含む。*Arabidopsis thaliana* α -glucosidase 遺伝子は6エキソン5イントロンから¹⁰⁹⁾、ヒト酸性 α -glucosidase は20エキソン19イントロンから構成されている¹¹⁰⁾。従って α -glucosidase family II では種を越えてのイントロンの数が保存されていないことがわかる。これらのイントロンの位置を比較してみると *A. oryzae* 遺伝子の第1イントロン、第2イントロンはそれぞれヒト酸性 α -glucosidase 遺伝子の第4、第7イントロンと同じような位置に存在する。一方 *Arabidopsis* α -glucosidase 遺伝子の第1、第2、第3、第5イントロンはそれぞれ同じくヒト酸性 α -glucosidase 遺伝子の第2、第6、第8、第17イントロンと同じような位置に存在する。以上のことは進化によりイントロンが挿入されていったことを想像させる。

本遺伝子3'下流には ATP-binding cassette (ABC) superfamily transport proteins と相同性のあるタンパク質をコードする配列の一部を見つけることができた。ABC superfamily transport protein の多くは1,500 アミノ酸程度であるので¹¹¹⁾その一部であると考えられる。しかしその5'上流にプロモーター様配列を見つけることはできなかった。この遺伝子が発現していることを確認するにはノザン解析などが必要である。もし maltooligosaccharide 代謝酵素群コードする遺伝子が α -glucosidase の近くに存在するならば ABC superfamily transport proteins が糖の輸送に関わっている可能性がある。細菌では maltose の輸送に ATP 依存性の輸送体 MalFGK2 が関与する。しかしながら酵母での糖の輸送は *S. cerevisiae* で Hxt タンパク質による促進拡散が良く知られている。これは MFS (major facilitator superfamily) 輸送体として知られるものであり、細菌から哺乳類まで広く単糖類の輸送に寄与している。*S. pombe* でも Hxt 類似タンパク質である Ght タンパク質が促進拡散により糖の輸送を行っていると考えられている¹¹²⁾。しかしながらこの MFS、ABC トランスポーターが密接にそれぞれの発現をコントロールしているという報告もあり¹¹³⁾、本遺伝子下流で見つかった ABC superfamily transport proteins が糖輸送に関わっていることを予想できる。

2. Glucose よる α -glucosidase の発現制御

α -glucosidase 遺伝子5'上流域における相同性の検索から-360 から-355 に GC-box 様配列 (CCGGGG) が見つかった。GC-box は *A. nidulans*、*A. niger* では CreA タンパク質結合部位⁹²⁾、*S. cerevisiae* では Mig1 タンパク質結合部位⁹³⁾であり、これらの CreA、Mig1 はカーボン

カタボライトリプレッション調節タンパク質として知られている。よってこの cis エレメント様配列のより α -glucosidase 遺伝子の発現は glucose により抑制されていることを予想できたため培地中の glucose 濃度と α -glucosidase の発現の関係を見た。その結果、高濃度 glucose 培地から低濃度 glucose 培地へと菌体を移すと α -glucosidase の発現が増加すること、 α -glucosidase を発現している菌体に glucose を加えるとその発現は減少すること、またこれらの減少は転写レベルで制御されていることを明らかにした。すなわち α -glucosidase の発現はカタボライトリプレッションにより制御されていることがわかった。

S. pombe の場合、glucose に対して応答する遺伝子の制御には2種類の制御が考えられている。fructose-1,6-bisphosphatase をコードする *fbp1*⁺ 遺伝子などは glucose の存在によりその転写、発現が完全に停止すると報告されている^{114, 115})。 *fbp1*⁺ ではその発現が cAMP シグナル伝達経路により厳密に制御されている¹¹⁶)。一方 invertase をコードする *inv1*⁺ 遺伝子は、発現が cAMP 非依存性であること、遺伝子 5' 上流には GC-box が存在することが確認されている¹¹⁷)。また GC-box 結合タンパク質であり glucose 抑制に関わる因子として *Aspergillus* や *Saccharomyces* で同定されている CREA や Mig1 と同性的のあるタンパク質をコードする遺伝子 *scr1*⁺ が同定されており、これは *inv1*⁺ を制御するが *fbp1*⁺ を制御しないことがわかって¹¹⁷)。すなわち *inv1*⁺ 遺伝子は cAMP シグナル伝達経路と別経路で GC-box 結合タンパク質を介して glucose に対し応答していると解釈されている。そしてこの場合 glucose 高濃度の条件でも invertase を菌体表層に確認できる¹¹⁸)。本酵素の場合、後者の制御をうけていると予想できる。すなわち cAMP 依存性の発現をする遺伝子とは違い、穏やかな glucose 制御をうけていると予想できる。菌体が glucose 高濃度にさらされている際でも α -glucosidase 活性消失せず、0.08 U / OD₆₀₀ の maltase 活性が検出できたのもこのためであろう。 α -glucosidase や invertase は細胞が maltose や sucrose を利用する際に早い段階でそれらに作用し、glucose や fructose を生成する酵素である。*S. cerevisiae* では galactose、sucrose、maltose の分解に関わる *GAL*、*SUC*、*MAL* 遺伝子は似た制御をうけることが知られており¹¹⁹)、*S. pombe* でも同様に α -glucosidase と invertase が同じ制御をうけていることを予想できる。また菌体表層まで分泌される α -glucosidase や invertase は *S. cerevisiae* invertase がそうであるように細胞壁構成成分の一つであることも予想できる¹²⁰)。すなわち構成的な発現も必要なのかもしれない。

第5節 要約

1. *S. pombe* α -glucosidase の cDNA をそのライブラリーからスクリーニングした。スクリーニングにはアミノ酸配列から合成したオリゴヌクレオチドプライマーでの RT-PCR 産物を用いた。

2. cDNA は全長 4,176 bp、970 コドンの ORF を含んでいた。5' UTR が 1,037 bp と大きかった。ORF は 969 アミノ酸がコードされていた。その配列は α -glucosidase family II 酵素と相同性のあるものだった。

3. *S. pombe* α -glucosidase 遺伝子を PCR により単離した。遺伝子にはイントロンが含まれなかった。3' 下流には ABC superfamily transporter 様タンパク質がコードされていた。

4. *S. pombe* α -glucosidase 遺伝子は培地中の glucose の濃度で転写制御されていた。すなわち glucose 高濃度で発現は抑制されたが、おそらくその制御は cAMP 非依存性であることを考察した。

Table 2-1. Partial Amino Acid Sequences of SPGase.

	Sequence
SP-29	XDMQTFFSDLVSNHQVYVPII
SP-32	XXNGSIYIGAVWPGFTAFTPDTNPD
SP-34	XVFEDQYIELTTNMVENYNL
SPN	NVYQTLNVIGDR

SP-29, SP-32, and SP-34 are the inner sequences, and SP-N is the N-terminal sequence analyzed in accordance with Materials and Methods. Letter X indicates unidentified residue.

Table 2-2 Sequence Homology Analysis by FASTA program

	length ^a	overlap ^b	identities ^c	accession ^d
<i>A. oryzae</i>	985	961	44.7	D45179-1
<i>A. nidulans</i>	992	946	47.6	AF208225-2
<i>A. niger</i>	985	935	46.6	D45356-1
<i>Dictyostelium discoideum</i>	943	682	30.4	U72236-1
<i>M. javanicus</i>	864	816	38	D67034-1
<i>S. occidentalis</i>	958	971	45.1	M60207-1
<i>C. tsukubaensis</i>	1070	1084	35	X56024-1
Barley (Igri)	879	910	35.9	AF118226-1
Barley (Morex)	877	910	35.6	U22450-1
Spinach	903	932	35.4	D86624-1
Sugar beet	913	947	33.5	D89615-1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	902	858	36.6	AL163814-11
<i>Solanum tuberosum</i>	928	933	34.6	AJ277244-1
<i>Mus musculus</i> lysosomal	953	934	34.5	U49351-1
human lysosomal	952	930	34.7	X55079-1
<i>Bos taurus</i>	937	929	35.2	AF171665-1
<i>Conturnix japonica</i>	874	900	33.6	AB000967-1
<i>Penaeus vannamei</i>	920	901	33	AJ250828-1
<i>Tetrahymena pyriformis</i> lysosomal	923	700	32	O00906
<i>Alicyclobacillus acidocaloarius</i>	728	731	28	AJ252101-6
<i>Tropaeolum majus</i> (α -xylosidase)	935	934	34.5	AJ131520-1
<i>Arabidopsis thaliana</i> (α -xylosidase)	915	937	33.4	AF087483-1
<i>Mus musculus</i> (glucosidase II)	966	835	27.3	U92793-1
<i>Homo sapiens</i> (glucosidase II)	943	836	27.6	AJ000332-1
<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	1092	613	23	Y18740
(α -1,4-glucan lyase Isozyme 4)				
<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	1091	877	22.5	Y18738
(α -1,4-glucan lyase Isozyme 2)				
<i>Morchella costata</i> (α -1,4-glucan lyase)	1066	727	22.7	Y18800
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	693	713	22.7	AF042494

^a Length of aligned sequence. ^b Number of residues aligned. ^c Percentage of pairwise sequence identity. ^d Genbank, EMBL, or DDBJ accession number

```

4.2 CCTCTTTAAACCGCCCTTCTATTGCCAAATTGCCTATTTGGTTAATCTTTTCCATTCTTT 960
3.5 -----GCCCTTCTATTGCCAAATTGCCTATTTGGTTAATCTTTTCCATTCTTT 48
      *****

4.2 TTCTCTACGATTCTTTTTAGTTGGTACTTTGATTTTTCTTAAAACTTTTTGATCTCTTTTT 1020
3.5 TTCTCTACGATTCTTTTTAGTTGGTACTTTGATTTTTCTTAAAACTTTTTGATCTCTTTTT 108
      *****

4.2 TTGTTTTTTTTTTTAAACGATGATGATTTCTACTGCCTACCAATCTCTATTTTAACTGCTC 1080
3.5 TTGTTTTTTTTTTTAAACGATGATGATTTCTACTGCCTACCAATCTCTATTTTAACTGCTC 168
      *****

4.2 TGTTTTCAGCAATCTCGATTGCTGTGCGGTAACGTCTACCAAACCTTTAAATGTCATTGGTG 1140
3.5 TGTTTTCAGCAATCTCGATTGCTGTGCGGTAACGTCTACCAAACCTTTAAATGTCATTGGTG 228
      *****

4.2 ATCGCAATGTCACTATCCCTACCAATGGTATCCCTCAACGCTTATCCGTATATGACCCAT 1200
3.5 ATCGCAATGTCACTATCCCTACCAATGGTATCCCTCAACGCTTATCCGTATATGACCCAT 288
      *****

4.2 ATCGCGGTGTAAATTGTCAAGGATATC 1227.....3756 TA
3.5 ATCGCGGTGTAAATTGTCAAGGATATC 315.....TA
      *****

4.2 CGAAGTTAGCCAACCCTTGGCCAACGTAACGATCCTTGGTCTCACTGAATCCCCTAGTTC 3817
3.5 CGAAGTTAGCCAACCCTTGGCCAACGTAACGATCCTTGGTCTCACTGAATCCCCTAGTTC
      *****

4.2 AATCACCTTGAATGGACAAAACGTCTCCTCCTTCCAGTACTCTAACGATACTGAGGAATT 3877
3.5 AATCACCTTGAATGGACAAAACGTCTCCTCCTTCCAGTACTCTAACGATACTGAGGAATT
      *****

4.2 GCTAATTACCGGTCTACAGAACATTACTTCCTCTGGTGCATTTGCCAACAGCTGGAATCT 3937
3.5 GCTAATTACCGGTCTACAGAACATTACTTCCTCTGGTGCATTTGCCAACAGCTGGAATCT
      *****

4.2 TACTTTGTAGTCGCTCTCGCTTCACCCGATTTTTTCACCGGCAATCCAGGAACCGAGCACT 3997
3.5 TACTTTGTAGTCGCTCTCGCTTCACCCGATTTTTTCACCGGCAATCCAGGAACCGAGCACT
      *****

4.2 AATTAACAGTCTAGTTTGTTCATCTAGCAACTCTCGAGATGCTTGTAGTATATGGAATA 4057
3.5 AATTAACAGTCTAGTTTGTTCATCTAGCAACTCTCGAGATGCTTGTAGTATATGGAATA
      *****

4.2 AACTTACAGTCATTGTTAGTCAATTCAATAAATAAACTACTTTTTCTAAAAAAAAAAAAAA 4117
3.5 AACTTACAGTCATTGTTAGTCAATTCAATAAATAAACTACTTTTTCTAAAAAAAAAAAAAA
      *****

4.2 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 4176
3.5 A-----
      *

```

Fig. 2-1. Partial sequences of DNAs amplified from two positive plaques. Part of the DNA sequences amplified from positive plaques using PCR with λ gt11 primers were aligned. 4.2, approximately 4,000 bp DNA fragment; 3.5, approximately 3,500 bp DNA fragment. Numbers are corresponding to those of the cloned cDNA. Identical nucleotides were marked with asterisks (*)

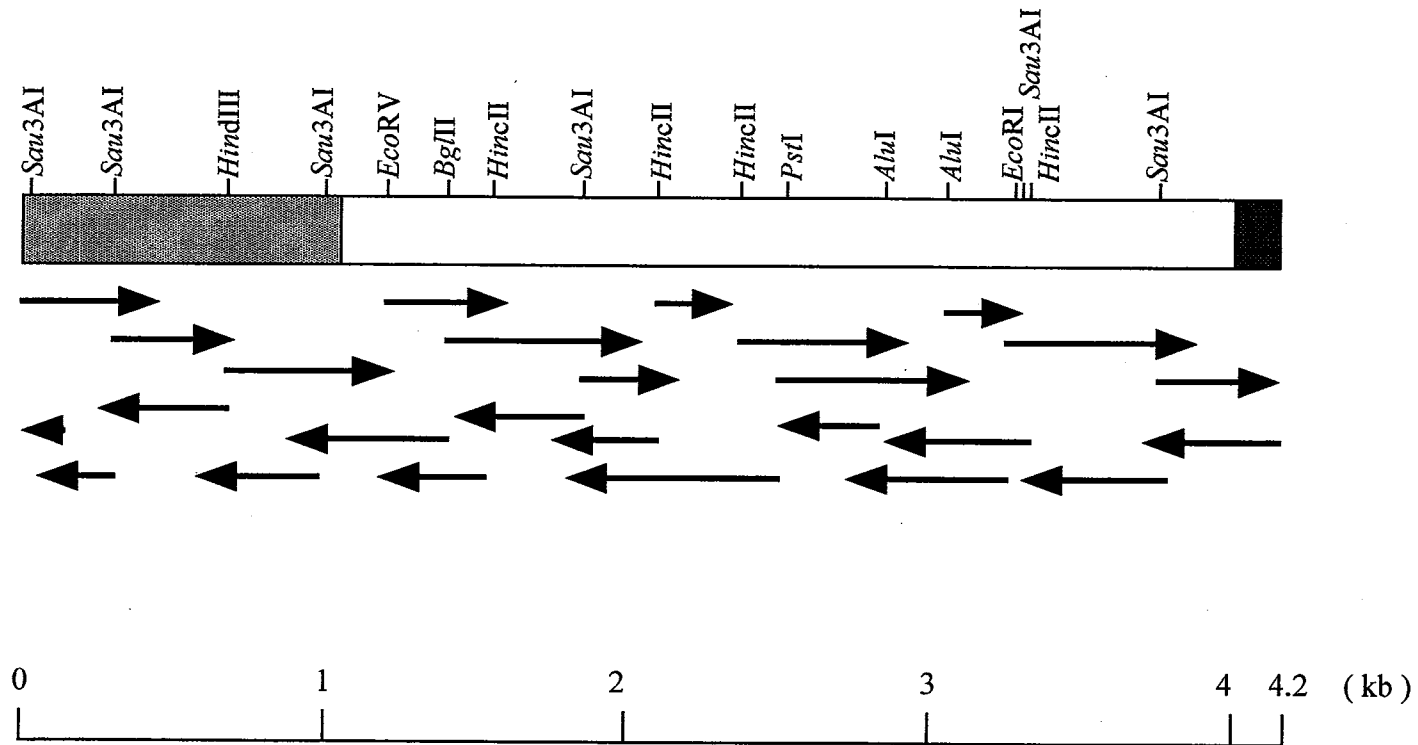


Fig. 2-2. Sequence strategy of *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase cDNA. The direction and extent of each sequencing run is indicated by an arrow drawn below the diagrams and positions of restriction enzyme site used in subcloning fragments for sequence are also shown. The light- and dark-screens in the diagram are 5'- and 3' untranslated regions, respectively.

1 ATAAGTCAAGTGAATACCTCGCGCCPTTTTGGTTCIAAGTTTTTCATCAACTTTTTTGATCCGAAATCTTCCAGTGTCTGTACTCTATCG
90 GTAAACACAGTTGGGTATAACTCAATAGTTTTTCATACIGTTTTCTCCCTGIGATTACACCACTCCCTTTATTAATAAACCAAGCAATATCTGTT
180 CCACTAGAACAGAGTGTCTCTCAACCTTCCACACCTTTAAATTTATTTTGGTAAAGTTTTGATTCTTTTGCTACTGTTTTTTTGTCCCTCC
270 CCACATCCGCTTAGTAAAGTCTCCOACATGCAAAAGAAACGAGTGGATTGATTCCATCCOACGAGAAAATCGATCCATTTTCCAAC
360 CTATCGCCCTACTTTTTTACAAAAAGTTACTFAAACGTTGGGTTTGGATTATCTTTTTTTTTTGGCTTTTAGATTGATTGCGACTTGG
450 CTTTCAAAGGCTTTACCCATCAAATCAATTAATCAAGGCTTTTTGCGCTTCCCTCCGTTCTTTGCACTTCAAGCGAACATACACTTGGT
540 TTGCAAAAAGTGTAAAGTAAACAGCTACAAAAGTTTTCTCCOCCACTTTTTATAAGGTTCCGTTAGCCGCTCTTAATTAACGTCGTTTTGG
630 ACTTGATTGGTTAATCTTACCCTTACCCTTTTTTGGGTTTCCCTTTTTTAAAACGCGGTTTTAAACAAACCCCTTCAAGCTTTTTGCT
720 GAAAGAGCTTTTTCTTTCCIACTTACTATATAATATACATACACACACATATATAATATAATACTTTTTTATTTATATTGAAAAAAA
810 ACTTGGACAAGAAAGTCTACAATTTCTATTGTTGTAGTCTTGGCTTAATTTTTTGTCTGTCTCTTAAAACCCCTCTTTTTCTTTAGGATTTC
900 GCCTCTTTAAAACCGCCCTTCTATGCCAATGCGCTATTGGTTAATCTTTTTCCATTCTTTTTCTCTACGATTCTTTTTTAGTTGGTACTT
990 TGATTTTTCTTAAAACCTTTTTGATCTTTTTTTTTTTTTTAAACGATGATGATTCTACTGCTTACCAATCTCTATTTTTACTGCT

M M I S T A Y Q S L F L T A 14

1080 CTGTTTTTCAGCAATCTCGATTGCTGTGCGGTAACGTCIACCAAACITTAATGTCATTTGGTGTATCGCAATGTCACATATCCCTTACCAATGGT
L F S A I S I A V G N V Y Q T L N V I G D R N V T I P T N G 44
1170 ATCCCTCAACGCTTATCCGTATATGACCCATATCGCGGTGTAATTTGTCAGGATAITCAAGCTGTTAACATAITCTGAGTCAAAAATGGC
I P Q R L S V Y D P Y R G V N C Q G Y Q A V N I S E S Q N G 74
1260 GTTACTGCCCTATCTCGCACTACTCGCGAGCCCTTGCATGCTTATGGTACTGATTACCCATTTGTTGTTCTCTCAACGTCACATATGAGGAA
V T A Y L A L L G E P C Y A Y G T D Y P L L F L N V T Y E E 104
1350 GCGACCGAGTTTATATATCAATCAAGAGCGCTAATAACACITCAATTTCCAAITTTACCAGTAGGAAAGATCTTTGGGATGCTCCCTTATAT
A D R V H I S I K D A N N T Q F Q F T S R K D L W D A P L Y 134
1440 TCACCTCTTACAATAACACAAACCTTCTGTACAACTTTTTGTAACATGCCAATCCITTCGAATTTTGGGTTACACGTAAGAGCGATGGT
S P S Y N N T N L L Y N F S Y N A N P F E F W V T R K S D G 164
1530 GAAGTTTTTATTTGATACAGCGGACAGAAATGGTTTTTCCGAGATCAGTATATTTGAGTTAACTACTAATATGGTTGAAAATTTATAATCTT
E V L F D T R G Q K L V F E D Q Y I E L T F N M V E N Y N L 194
1620 TATGGTCTCGCTGAACCATCCATGGTTTTACGTCITGGAAATAACTTAAACCGTACCTTTTTGGGCTAATGATGAGCTAGCCCGTGGAC
Y G L A E T I H G L R L G N N L T R T F W A N D E A S P V D 224
1710 CAAAACATGTAACGAGTCAATCCATACTATTTAGAACAAGATAACAAGCGGATGGTATAAATTTCAACTTTGAAACGAAACCACTTATACT
Q N M Y G S H P Y Y L E Q R Y K A D G I N S T L N E T T Y T 254
1800 TCTTCTCTCATGGTGTCTTATGCTTACAGCTAATGGAATGGATGTTCTTTTTGCGCAAGATTATCTTCAATGATCGAATGATCGGTGGT
S S S H G V L M L T A N G M D V L L R Q D Y L Q Y R M I G G 284
1890 GTTATCGACCTTTTTGTTATACAGTGGTAGCAGTGGAGTCCOAGGAGACTGTCAAGCAATTCGTTCAATCCATTTGAAAGCCCTGCTATG
V I D L F V Y S G S T E S P K E T V K Q F V Q S I G K P A M 314
1980 CATCAATATTTGGACATTTGGGTTACCACTCATGTCGTTGGGTTTACACAAATATACAGAAATCATGGAGTTGCTCAAAATTACATTGAT
H Q Y W T L G Y H S C R W G Y T N I T E I M D V R Q N Y I D 344
2070 GCAGACATCCAGTGGAAACCTTTTTGGTCTGATATTGATTACATGGAGAAATATAGAGATTTTACCGTGTACCCCTGTTTTCTTATCAAG
A D I P V E T F W S D I D Y M E K Y R D F T V D P V S Y S K 374
2160 TCAGATAAGCAAAACATTTTTAGTATTGGTAAAGCAATCATCAGCATTACGTTCCAATCATTTGATGCTGCGATTTATGCGCAACCC
S D M Q T F F S D L V S N H Q H Y V P I I D A A I Y A A N P 404
2250 TACAATCACACGACACTCTTATATATCCATACTATGACGGGTTGAAAAGGACATTTTTCTTAAAAATCCATTAATGGAAGTATCTACATT
Y N H T D D S Y Y P Y Y A G V E K D I F L K N P N G S I Y I 434
2340 GGTGGGTTTTGGCCAGGATTCACIGCTTTCCCTGATTTCAACCAATCCCGATGTTGGTGGACTATTTGGAAGACTGTCTTATCAACCTTACT
G A V W P G F T A F P D F T N P D V V D Y W K D C L I N L T 464
2430 TATGCTTTTTGGATCGAATGGTACTGTTCCATTCAGTGGAAATTTGACIGATATGACGAACCCCTCTTCTGTTCTGCGTGGGCTCTTGTGGG
Y A F G S N G T V P F S G I W T D M N E P S S F C V G S C G 494
2520 AGTGTATGATTGACTTAAAACCCGACAGCCCTTGGTCCGAAITTTCAAAGCAGTATTCATCCAGAGGATTTAACGTTTCCAATGTG
S A M I D L N P A E P L V G I S K Q Y S I P E G F N V S N V 524

```

2610  ACTGAGTATAGTTCTGCTTACAGTGCCTTCACTTAGCAACTACTATGCCACTGCAACATCATCGGIGTTCCAAATTTGTTTACCAACTGCT
    T E Y S S A Y S A S L S N Y Y A T A T S S V F Q I V S P T A 554
2700  ACTCCATTAGGTTTGAAGCCAGATTACAACTTAACTGGCCCCCTTATGCTATTAAACAATGAACAAGGAATCATGATATTGCCAATCAC
    T P L G L K P D Y N I N W P P Y A I N N E Q G N H D I A N H 584
2790  ATIGTAAGCCCCAATGCGACCACTCATGATGGGAACCCAAACGTTACGATATTTTCAACATGATGGTTATGGTGGAGACAAAGGTCATAC
    I V S P N A T T H D G T Q R Y D I F N M Y G Y G E T K V S Y 614
2880  GCAGCTCAACCCAAATTTCTCTAATGAACGACCCCTTATCTTGGAGTCGTTCTACCTTCTTGGGATCTGGAGTCTATGGTGGACATTGG
    A A L T Q I S P N E R P F F I L S R S T F L G S G V Y G A H W 644
2970  TTGGGIGATAATCATTTCTCTATGGTCTAACATGTTCTTCTCCATTCTTGGAAATGATCGTTTTTAACATGATGGGTAATCCAAATGGTAGGA
    L G D N H S L W S N M F F S I S G M I V F N M M G I P M V G 674
3060  GCTGATGTTTGGTTCCTTGGTGGATTGAGATGAGAACHTTGGCTCTCGTTGGATGGCTATGGGTCCTTTTTCGCCATTCTATAGAAAT
    A D V C G F L G D S D E E L C S R W M A M G A F S P F Y R N 704
3150  CATAACAACATTTACCAATCTCACAGAGCCCTACACATGGTCTTCTGTTGCTGAGGCCCTACGTCGTCGCTATGTACATTCGTTATTCT
    H N N I Y Q, I S Q E P Y T W S S V A E A S R R A M Y I R Y S 734
3240  TTACTCCCTTACGGTATACTATCATGGCTAAGGCATCCCAAGATGGCACACCTGCCCTACGTCCTTTGTTGTTGATTTCCCAACGAT
    L L P Y W Y T I M A K A S Q D G T P A L R A L F V E F P N D 764
3330  CCTACTCTAGCAGCGTTGACCGTCAATTCATGGTAGCGGACTCTCTATTTGGTGGACACCTGTCCTGGAGCCCTAATGTTGAATACGTTCAA
    P T L A D V D R Q F M V G D S L L V T P V L E P N V E Y V Q 794
3420  GGIGTTTTCCCTGGTGGACAAACAGCAGCTGATGGTATGACTGGTACAAACACACIGAAATTTGTTGTCATAACAACGAAATGTTACTCTG
    G V F P G D N S T V W Y D W Y N H T E I V R Q Y N E N V T L 824
3510  TAGGCTCCTTTGGAAACATCAATGTCGCTATTGCGTGGTGGTAGTGTCTTCCCATGCAACAACCTTCGCTCACTACTTATGAAAGTCTG
    Y A P L E H I N V A I R G G S V L P M Q Q P S L T T Y E S R 854
3600  CAAAATCCATTCAACCTCCTCGTTCGCTTTGGATAGAGATGGTTCTGCTACTGGTGCCTTTACCTTGTATGATGGTGTTCCTCATTCAGCTA
    Q N P F N L L V A L D R D G S A T G E L Y L D D G V S I E L 884
3690  AACGCTACACTTTCCGTTAGCCTTACATTTAGTATGGTGTGTTTGGTGGCGTTCCAACTGGCAGCTACGAAGTTAGCCAAACCCCTTGGCC
    N A T L S V S F T F S D G V L S A V P T G S Y E V S Q P L A 914
3780  AACGTAACGATCCCTGGTCTCACGAAATCCCTAGTTCATTCACCTTGAATGGACAAAACGTCCTCCTTCCAGTACTCTAACGATACT
    N V T I L G L T E S P S S I T L N G Q N V S S F Q Y S N D T 944
3870  GAGGAATGCTAATTAACGGTCTACAGAACATTACTTCCCTCGTGGTGCATTTGCCAACAGCTGGAAATCTTACTTTGTAGTGCCTCTCGCTT
    E E L L I T G L Q N I T S S G A F A N S W N L T L * 969
3960  CACCCGATTTTTCACCGGCAATCCAGGAACCGAGCACTAATTAACAGTCTAGTTTGTGTCATCTAGCAACTCTCGAGATGCTTGTAGTAT
4050  ATGGAATAAACTTACAGTCAATGTTAGTCAATCAATAAATAAACTTACITTTTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
4140  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 4176

```

Fig. 2-3. Nucleotides and Amino Acids Sequences of *S. pombe* α -glucosidase.

Numbers on the right designate amino acids 1-969 in the ORF, and numbering of nucleotide sequence is on the left with 1,037 representing the first base of the initial methionine. The signal sequence and the polyadenylation signal AATAAA are wave- and double-underlined, respectively. The N-terminal and inner sequences of native *S. pombe* α -glucosidase that were determined by Edman degradation are bold-underlined. The amino acid sequences for making primer A and B indicate black background letters. The potential *N*-glycosylation sites (Asn-X-Thr, Ser) are underlined.

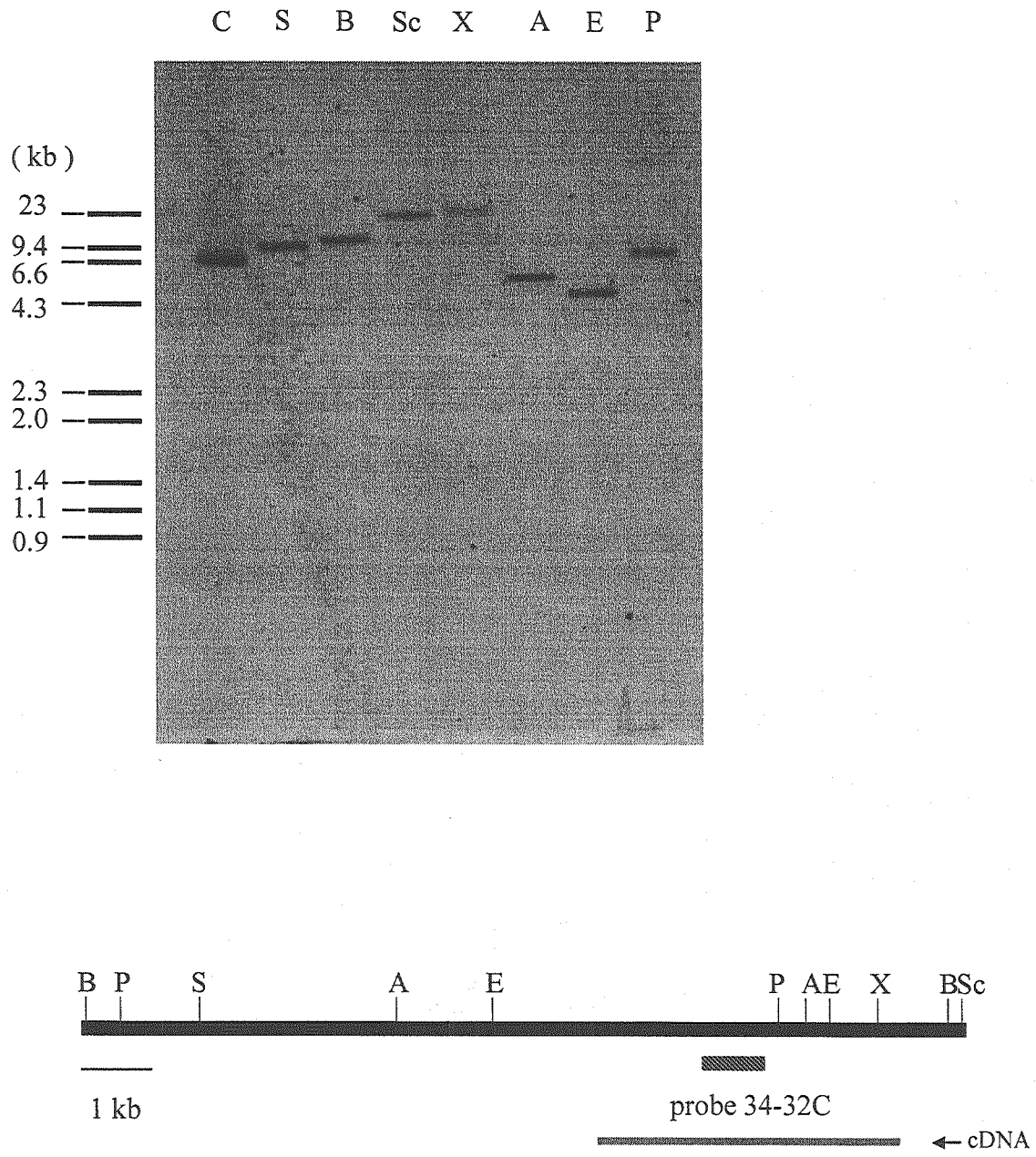
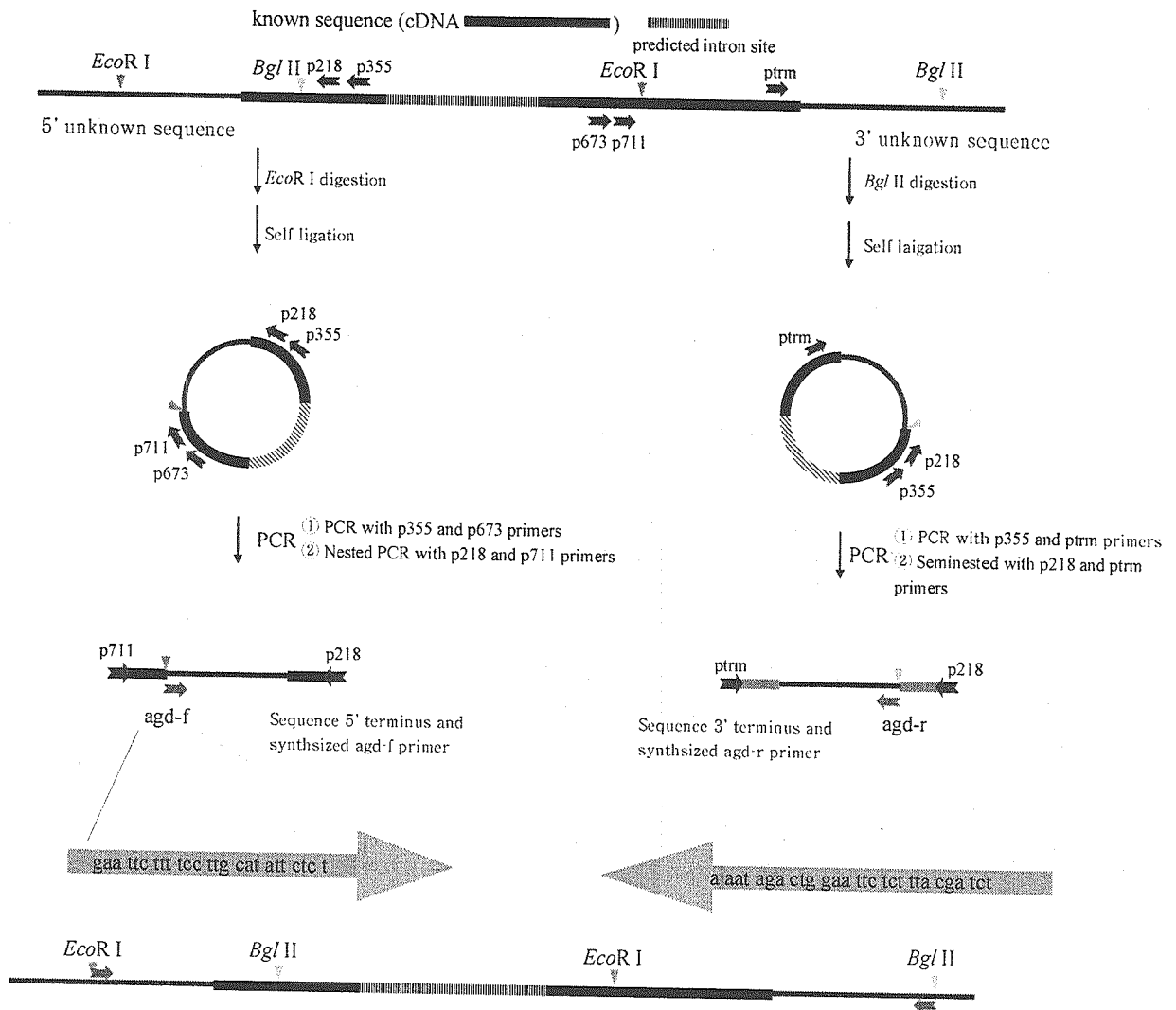


Fig. 2-4. Southern Blot Analysis of *S. pombe* Genomic DNA.

Upper; Approximately 3.6 μ g of genomic DNA was digested with several enzymes, separated on a 0.8% agarose gel, and transferred on Hybond N+ membrane. *Sal*I (S), *Bam*HI (B), *Sac*I (Sc), *Xho*I (X), *Apa*LI (A), *Eco*RI (E), *Pst*I (P), cDNA (C). The blot was hybridized with the 803 bp DNA probe (1575 to 2377 nt of cDNA, 34-32C) derived from PCR fragment, which was labeled using AlkPhos direct gene image system (Amersham).

Lower; The restriction map of DNA fragment containing α -glucosidase gene. The location of the 34-32C is also shown in diagram.



Using the agd-f and agd-r primers, and intact genomic DNA, the long PCR was carried out.

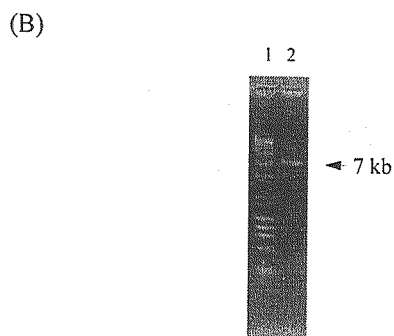


Fig. 2-5. Isolation of DNA fragment containing the gene for α -glucosidase of *S. pombe*.

(A) Schematic representation of inverse PCR and long PCR.

(B) Lane 1, DNA size marker. Lane 2, product of PCR using agd-f and agd-r primer.

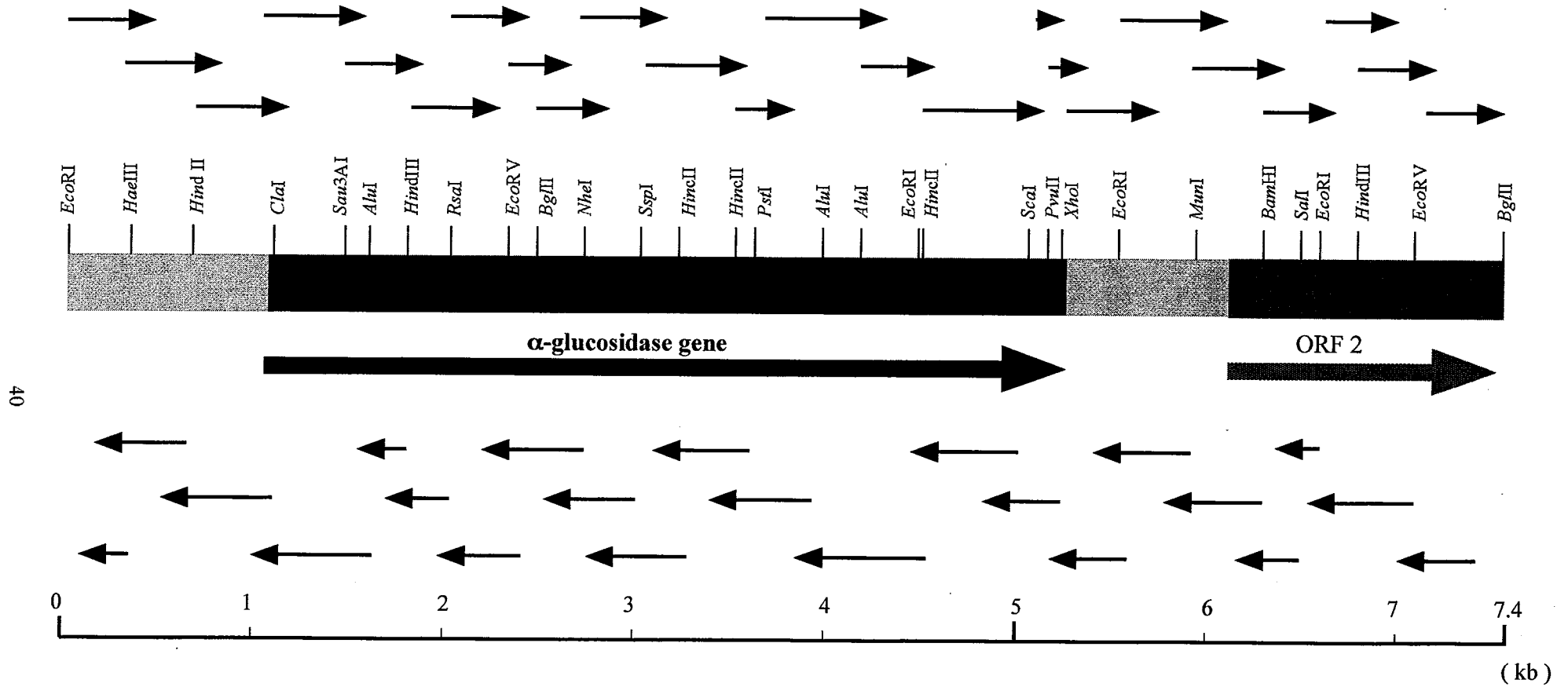


Fig. 2-6. Structure and sequencing strategy of the DNA fragment containing gene for α -glucosidase of *S. pombe*. The direction and extent of each sequencing run is indicated by arrow drawn below the diagram, and the positions of restriction enzyme sites used in subcloning fragments for sequencing are shown.

gaattcttttccttgcatattctcctctgtcttgccattctccatttcgcactccttc -1076
 gcacaccacattcgatcgctactgcctatagcacatatttgcttactactcgcaaaattc -1016
 cctacaacgaaaagaatgggtccacgtaagtcacgcaagcgaccaataatccgtttgac -956
 cattagttaatgggtcaggagagcttacgttttttaaccaggcgaaaatggggtagacat -896
 tatggcacctgatgtgCGCTCACCGCTacaaagtgggtgtgtatgtgtgtattttattttg -836
 Region I (-876)
 ggctttctttggtgaaaaataaaaacaaaaaaaggagtcgaaaaagcacttttgcatg -776
 atgagataatgtatctacatagttacatgaacaaagaaactcgtaattgaacaaatgata -716
 agaattaacttggtatacaacgtacatatgggtttttattcgtcgtctatgccatctact -656
 actacactatgaacaagaaccgttctatcttacttgctcgacatatttttagcctgggt -596
 attttggtcgtttctttcttacagctcctctaattttaatattgcaatgcatccgtttc -536
 catcgttatttttcatctttcaatcttaccacagccgttattgctttgtgaaaagaag -476
 ctttacctaccctgagaaatgcaaaccaataataattggtgggctatctaacctaagca -416
 cacttaactccgaaatcccgaatcaatctttttacggcgtaggaaagcgcaaagtCCGGG -356
 GC-box (-360)
 Gttcagatgatcaatggtttttggacgcttaaaatagccatgtagtggtggatgctaag -296
 gttaagatttgtctaagagttatcatatcatataaacatctgacacttggttttcccttg -236
 aactattcttccccacagtgtgaacttgcacatcttccggttGGCGGAATttgataaaac -176
 Region II (-193)
 cgtaacggcaatctcgaatgatgggagattttgatctgaccgcaatttcgctttcccca -116
 cccttacgtcgaaaatgacaacatgaagggtgaagagtgatatttgtgaagagtgaattt -56
 1
 tgtagTTATAAAGaaagcggttcgctcgcacttttttaatcgattcgtTTATTCAtaag 5
 TATA-box (-50) initiator
 tcaagtgaatacctcgcgcctttttggttctaagttttcatcaactttttgatccgaaa 65
 tcttccagtgctgtactctatcggtaacacagttgggtataactcaatagttttcatac 125
 tgttttctcctgtgattacaccactccctttattaaaaccaagcaatatctgttccacta 185
 gaacagaagtgtctcacaacctccacacctttaatttattttgtaagttttgattcctt 245
 tgctacttggtttttgtcctccccccacatccgccttagtaagtcctccccacattgcaa 305
 aagaaacgagtcgattgattccatccccacgagaaaatcgatccattttccaacctatcg 365
 cctactttttttacaaaaagttactaaacgttgggtttgattatcttttttttggctt 425
 ttagattgattcgattcgacttggtttcaaaggctttaccatcaaatcaattaatcaa 485
 ggcttttcgcttctcctcgttctttgcaccttcaagcgaacatacacttcgttttgcaa 545
 aaagtgctaagtaacacaagctacaaaagtttctccccacttttataagggtcgcttag 605
 ccgctcttaattacgtcgtttttggacttgattgggttaatcctacctttaccttttttg 665
 ggtttcgctcctttttaaaacgocggtttaaacaaacctttcaagcttttcggtgaaaga 725
 gcttttctttcctaacttactatataatatacacacacacacacacacacacacacacac 785
 tttttatttatattgaaaaaaaaaacttgacaagaaagtctacaattctattggtgtag 845

ttcttgcttaatTTTTTgtctgtctcttaaaaccctctttttctttacgatttgcctct 905
 ttaaaccgccccttctattgccaaattgcctatttggtaaatcttttccattctttttctc 965
 tacgattcttttagttggactttgatttttcttaaaactttttgatctcttttttggtt 1025
 ttttttttaacgatgatgatttctactgcctaccaatctctatttttaactgctctggtt 1085
 M M I S T A Y Q S L F L T A L F
 tcagcaatctcgattgctgctggttaacgtctaccaaaactttaaatgctcattggtgatgc 1145
 S A I S I A V G N V Y Q T L N V I G D R
 aatgtcactatccctaccaatggatccctcaacgctttatccgtatatgacccatagc 1205
 N V T I P T N G I P Q R L S V Y D P Y R
 ggtgtaaattgtcaaggatatcaagctgttaacatatctgagtcacaaaatggcgttact 1265
 G V N C Q G Y Q A V N I S E S Q N G V T
 gcctatctcgactactcggcgagccttgctatgcctatgggtactgattaccattggtg 1325
 A Y L A L L G E P C Y A Y G T D Y P L L
 ttcctcaacgtcacatatgaggaagccgaccgagttcatatatcaatcaaagacgcta 1385
 F L N V T Y E E A D R V H I S I K D A N
 aacactcaattccaatttaccagtaggaaagatctttgggatgctccccttatattcacct 1445
 N T Q F Q F T S R K D L W D A P L Y S P
 tcttacaataacacaaaaccttctgtacaacttttctgacaatgccaatcttttcgaattt 1505
 S Y N N T N L L Y N F S Y N A N P F E F
 tgggttacacgtaagagcgatgggtgaagttttatgtatcacgcggacagaaattgggt 1565
 W V T R K S D G E V L F D T R G Q K L V
 ttcgaagatcagtatattgagttaactactaataatgggtgaaaattataatctttatgg 1625
 F E D Q Y I E L T T N M V E N Y N L Y G
 ctcgctgaaaccatccatgggtttacgtctgggaaataacttaaccctgaccttttgggct 1685
 L A E T I H G L R L G N N L T R T F W A
 aatgatgaagctagccccgtggaccaaaacatgtacggaagtcataactatttagaa 1745
 N D E A S P V D Q N M Y G S H P Y Y L E
 caagatacaaggcggatgggtataaattcaactttgaacgaaaccacttatacttcttct 1805
 Q R Y K A D G I N S T L N E T T Y T S S
 tctcatgggtggtcttatgcttacagctaattggaatggatggtcttttgcgccaagattat 1865
 S H G V L M L T A N G M D V L L R Q D Y
 cttcagtatcgaatcggtgggtggttatcgaccttttgtatacagtggttagcactgag 1925
 L Q Y R M I G G V I D L F V Y S G S T E
 agtcccaaggagactgtcaagcaattcgttcaatccattggaaagcctgctatgcatcaa 1985
 S P K E T V K Q F V Q S I G K P A M H Q
 tattggacattgggttaccactcatgctggtgggttacacaaatatcacagaaatcatg 2045
 Y W T L G Y H S C R W G Y T N I T E I M
 gacgttcgtcaaaattacattgatgcagacattccagtggaaccttttgggtctgatatt 2105
 D V R Q N Y I D A D I P V E T F W S D I
 gattacatggagaaatatagagattttaccggttgacctgtttcttattcaaagtcagat 2165
 D Y M E K Y R D F T V D P V S Y S K S D
 atgcaaacatttttccagtgatttggtaagcaatcatcagcattacgttccaatcattgat 2225
 M Q T F F S D L V S N H Q H Y V P I I D
 gctgcgatttatgcccgaaccctacaatcacactgacgactcttattatccatactat 2285
 A A I Y A A N P Y N H T D D S Y Y P Y Y
 gcaggcgttgaaaaggacattttcttaaaaaatcctaattggaagtatctacattggtgcy 2345
 A G V E K D I F L K N P N G S I Y I G A
 gtttggccaggattcactgctttccctgatttcaccaatcccgatgtggttgactattgg 2405
 V W P G F T A F P D F T N P D V V D Y W
 aaagactgtcttatcaaccttacttatgcttttggatcgaatgggtactggtccattcagt 2465
 K D C L I N L T Y A F G S N G T V P F S
 ggaatttggactgatatgaacgaaccctcttcggttctgctgggctcttggggagtgc 2625
 G I W T D M N E P S S F C V G S C G S A
 atgattgacttaaacctgcagagcccttggctcggaaatttcaaagcagttccatccca 2585
 M I D L N P A E P L V G I S K Q Y S I P
 gaaggtttaaacttccaatgtgactgagtatagttctgcttacagtgcttcacttagc 2645
 E G F N V S N V T E Y S S A Y S A S L S
 aactactatgccactgcaacatcatcgtgttccaaattgttccaccaactgctactcca 2705
 N Y Y A T A T S S V F Q I V S P T A T P
 ttaggttgaagccagattacaacattaactggcccccttatgctattaacaatgaacaa 2765
 L G L K P D Y N I N W P P Y A I N N E Q

ggaaatcatgatattgccaatcacattgtaagccccaatgcgaccactcatgatggaacc 2825
G N H D I A N H I V S P N A T T H D G T
caacgttacgatattttcaacatgtatggttatgggtgagacaaaggtctcatacgcagct 2885
Q R Y D I F N M Y G Y G E T K V S Y A A
ctaaccxaaatttctcctaataatgaacgaccctttatcttgagtcggttctaccttcttggga 2945
L T Q I S P N E R P F I L S R S T F L G
tctggagtctatgggtgcacattggttgggtgataatcattctctatgggtctaacaatgttc 3005
S G V Y G A H W L G D N H S L W S N M F
ttctccatttctggaatgatcgtttttaacatgatgggtattccaatggtaggagctgat 3065
F S I S G M I V F N M M G I P M V G A D
gtttggtggttctccttgggtgattcagatgaagaactttgctctcgttggatggctatgggt 3125
V C G F L G D S D E E L C S R W M A M G
gctttttcgcattctatagaaatcataacaacattaccaaatctcacaagagccttac 3185
A F S P F Y R N H N N I Y Q I S Q E P Y
acatgggtcttctggtgctgaggcctcacgtcgtgctatgtacattcgttattctttactc 3245
T W S S V A E A S R R A M Y I R Y S L L
ccttactgggtatactatcatggcctaaggcatcccaagatggcacacctgccttacgtgct 3305
P Y W Y T I M A K A S Q D G T P A L R A
ttggtcgttgaattccccaacgatcctactctagcagacgttgaccgtcaattcatggta 3365
L F V E F P N D P T L A D V D R Q F M V
ggcgactctctatgggtgacacctgtcttggagcctaataatggtgaatacgttcaagggtt 3425
G D S L L V T P V L E P N V E Y V Q G V
ttcctgggtgacaacagcactgtatggatgactgggtacaaccacactgaaattggtcgt 3485
F P G D N S T V W Y D W Y N H T E I V R
caataacaacgaaaatggtactctgtacgctccttggaaacacatcaatgtcgtattcgt 3545
Q Y N E N V T L Y A P L E H I N V A I R
gggtgtagtggttcttcccatgcaacaaccttgcgtcactacttatgaaagtctcaaaat 3605
G G S V L P M Q Q P S L T T Y E S R Q N
ccattcaacctcctcgtcgttggatagagatgggtctcgtactgggtgagctttacctt 3665
P F N L L V A L D R D G S A T G E L Y L
gatgatgggttcttccattgagctaaacgctaacacttccggttagcttcacatttagtgat 3725
D D G V S I E L N A T L S V S F T F S D
gggtgttttgagtgcggttccaactggcagctacgaagttagccaacccttggccaacgta 3785
G V L S A V P T G S Y E V S Q P L A N V
acgatccttgggtctcactgaatcccctagttcaatcaccttgaatggacaaaacgtctcc 3845
T I L G L T E S P S S I T L N G Q N V S
tccttccagctactcaacgatactgaggaattgctaattaccggtctacagaacattact 3905
S F Q Y S N D T E E L L I T G L Q N I T
tcctctggtgcatgttggcaacagctggaatcttactttgtagtcgctctcgttccaccg 3965
S S G A F A N S W N L T L *
atttttcaccggcaatccaggaaccgagcactaattaacagtcctagtttggttgcatctag 4025
caactctcgagatgcttgtatgatatggaataaacttacagtcattggttagtcaattcaa 4085
taaataaactactttttctacacaaccatcagatagcaccgctgcataaagatggatgt 4145
ttatgtatttaacgtaaaatttaccggtgatctttcaaacgcattaaacaaatttacaca 4205
tactattaaacctgcttcgctcgcggttaaactctgtatagcgataaaatttttgtcgtcc 4265
gaattcgtcaattatcttaaaagtagtatgatggtgcaaacatattttactagcgaaa 4325
gcttgaagatgtaaaagcaaagggtattaatcaggaatccttgaagtaaggtaaaactaaa 4385
gtatcttcacaatttttcttgaacaaggaacttgcataatggattccttcagcttatc 4445
caattatcgaatgcaagaaattgctgtattgatataaccaggtgacaaactacgatctac 4505
gcaacaaatagttataagggaaccccgagtttagcaacgtcacgatcgattgtctttaaaa 4565
aatttttgctttcttactactattatggctaccattgaagggttgaattagaaggattt 4625
aaagggttaacactcttttgaacacatacaattggttgcactgtggcacgagtgaaaca 4685
gaaaaagggaaagggtgatttggatgatcctaacagcaaaaacaccaagtgctctgataag 4745

tttgagcagaaagttgaagaataacttagaagtcctcaatgaactgcacttgacaggtcgg	4805
acatcaggatTTTTGcatgcgaaatTTTcaccgTCgaaggtgccttcaaccCGaaatTTTcaa	4865
<u>M R N F T V E G A F N P K F Q</u>	15
attcGatcattcTTTgcGcaattactacacCCcattcaatattatattttcgaacgggtcct	4925
<u>I R S F F A Q L L H P I N I I F R T G P</u>	35
aaacgcgacatcatccctTTTggTTaaaggatttGatggTtatctgcagccCGgttcatca	4985
<u>K R D I I P L V K G F D G Y L Q P G S S</u>	55
ttactggTgtTgggCCatgaaggatccggtgggtccacactgctaaaggcTTTgtgtggt	5045
<u>L L V L G H E G S G G S T L L K A L C G</u>	75
attgtagaatCaaatgagaggtTgaatggatcGcttattacgacggTTtagattacaaa	5105
<u>I V E S N E R L N G S L L H Y D G L D Y K</u>	85
atagcgcattctcaatTTTaaagctgactTgagttattgtggtgaaggtcattccaaagta	5165
<u>I A H S Q F K A D L S Y C G E G H S K V</u>	105
gctactatcaccggtccgacatttattagagtttGtttGctcctgTCgacttctGcatca	5225
<u>A T I T V R H L L E F V C S C R L P A S</u>	125
aaatgatgacCCCGagaagtcattatatccgTCgcattTgcgaaatcattcgcgatgca	5285
<u>K Y D H P R S H Y I R R I C E I I R D A</u>	185
tttgattTgggagactTTTtacaaccatcgaattctTCgctctTTtaactccggcgatcag	5345
<u>F D L G D F Y N H R I L R V F N S G D Q</u>	245
attaaggtcGatgtTgctcagaccatgtgtgcacgacCCctaatacaatgctgggataac	5405
<u>I K V D V A Q T M C A R P L I Q C W D N</u>	305
aacatgcgTgattTTTgactccatattccgTtattgacatccTTtcgcatatcaaagtGctt	5465
<u>N M R D F D S I S V I D I L S H I K V L</u>	365
tcacataagctGgtactacactggtagccattgtTtagtcaagcttctgatagaaatTTTt	5525
<u>S H K L G T T L V A I V S Q A S D R I F</u>	385
catatgtTCgacatggTcactTTTgatgtatgaaggtgaacaaatattctatgggcctacg	5585
<u>H M F D M V T L M Y E G E Q I F Y G P T</u>	405
agccgTTTaaagccatattTctTggatctTggTTTcattccagcaaaacatagcactact	5645
<u>S R L K P Y F L D L G F I P A K H S T T</u>	425
gTtgaattTgTcactcTTTgacataccCagaatgagTattataaaataaaagcattcag	5705
<u>V E F V T S L T Y P E M S I I N K K H Q</u>	485
ggatttattcctTCgactcctgCCgaatttagagaatgctggctTCgaagcgaagattat	5765
<u>G F I P S T P A E F R E C W L R S E D Y</u>	505
gCCaaactaatcaagTTTatggatcGatagaggaaaatcatagtGatatccacgcctTT	5825
<u>A K L I K F M D R Y E E N H S D I H A F</u>	525
aaagatgCCaaatTTgatcaaacacgTTTtacaAAAatcttaagatggcTTaattccaat	5885
<u>K D A K F D Q T R L Q K F L R W L N S N</u>	585
ccatgccttattccctatagactTcaggtattTgctaccgctaaggtgactTTTTTTTcaa	5945
<u>P C L I P Y R L Q V F A T A K V T F F Q</u>	605
tacTTcatgattactcGtatattgctactTTTcgtTTTcacttatgTTTTTcaggcactT	6005
<u>Y L H D Y S Y I A T F V F T Y V F Q A L</u>	625
atgctTggctctcTTTtataaTTTaaGaaacgagTcaagTgaattgtactcagcgGc	6065
<u>M L G S L F Y N L R N E S S E L Y S R G</u>	645
agtgtgtTgTcgaatgctattgTTTTTgcagccattcagacaatgtctgaagTggacatc	6125
<u>S V L S N A I V F A A I Q T M S E V D I</u>	665
atTTTTTgAAAAaTcGctgtTTTaaaggacatcgtgtCCaatctTTtatcatccgtct	6185
<u>I F L K K S L F K E H R V Q S L Y H P S</u>	685
gcagcattgatgggtTccaatctcgtTgagTTTcctatgcgtattgtggTTgtcaccatg	6245
<u>A A L M G S N L V E F P M R I V V V T M</u>	705
tacgacattattgtgtattTTTTTatccgacTTaagagaaatgctagatct	6296
<u>Y D I I V Y F L S D L K R N A R S</u>	722

Fig. 2-7. Nucleotide sequence of DNA fragment containing the gene for α -glucosidase of *S. pombe*, and deduced amino acid sequence.

Numbering is from the cDNA starting point. The six putative CAAT sequences, TATA-box, and initiator are underlined. The putative GC-box is indicated by black-background. Bold and capital letters show the elements, region I and region II, identified as associated with high expression (region I) and basal expression (region II) of the *amyB* and the *glaA* and the *agdA* in *Aspergillus oryzae*.

* 20 * 40 * 60 *
 BFR1 : --MNQNSDTHHGQALGSTLNHTTEVTRISNS--SDHFEDSSSNVDESLDSSNPSSNEKASHTNEEYRSKG : 66
 ATRE : MSFGLGISPNLPRSQSVVSHNLPQAHGLDEN--DDIYHNHSTTAQPGASEKDKSEDGETLHENEPEP---G : 65
 SNQ2 : ---MSNIKSTQDSSHNAVARSSASFAASEESFTGI THDKDEQSDTPADKLT KMLTGPARDTASQISATV : 67
 ORF2 : ----- : -

80 * 100 * 120 * 140
 BFR1 : NQSYVPSSSNEPSPPESSSSNSDSSSSDSSVDRLAGDPFELGENFNLKHYL RAYKDSLQRDD--IITRSSG : 134
 ATRE : EARVTLARQLTRHSTRLTAKSTLENPFLLDSDSTLNPNSPNFRVRDRWMKMLLEIRSRDPERYPDRTAG : 135
 SNQ2 : SEMAPDVVSKVESFADALSRHTTRSGAFNMDSDSDDGFDAAHAIFES-----FVRDAEQGIHIRKAG : 129
 ORF2 : ----- : -
 d f d r g

* 160 * 180 * 200 *
 BFR1 : VCMRDHSVYGVGSGYEFLKTFPDI FLP--YRAITEKQVVEK-AILSHCHALANAGELVMVLGQPGSGC : 200
 ATRE : IAFKNLSVHGFSGPTDYQKDVMMVLLLEIGT IARRLAGMKMPKI-QILRDFEGLVRS GEMLVVLGRPGSGC : 204
 SNQ2 : VTIEDVSAKGVDSALEGATFGN ILCPLTIFKGIKAKRHQKMRQITISNVNALAEAGEMILVLRPGAGC : 199
 ORF2 : --MRNFTVEGAFNPKFQIRSFFAQLLHF INIIFRTGPKRDIIP--LVKGF DGYLQPGSSLLVLGHEGSGG : 66
 sv G f ll p i k i l Ge VLG pGsGc
 Walker A

220 * 240 * 260 * 280
 BFR1 : STFLRSVTS DTVHYKR-VEGTTHTDGI DKADMKKFPGDLLYSGEN DVHFP SLTTAEITLDFAAKCRTPNN : 269
 ATRE : STFLKTIAGEMNGIQVSDDAVLN YQGIS SKNMQNSERGEAIYTAENDIHFPPQLSVGDTLMFSALARA PRN : 274
 SNQ2 : SSFLKVTAGEIDQFAGGVSGEVAYDGI PQEEMMKRYKADVIYNGELDVHFPYLT VKQITLDFAIACKTPAL : 269
 ORF2 : STLLKALCGIVESNER-LNGSLHYDGLDYKIAHSQKADLSYCGEGHSGKVATITVRHLL EEFVCSRLPAS : 135
 StfLk g g YdGi m f d Y gE d hfp ltv tL F cr P

* 300 * 320 * 340 *
 BFR1 : RPCNLTRQ EYVSRERHLIATAFGLTHTFNTKVGND FVRGVSGGERKRVITISEGFATRPTIACWDNSTRGL : 339
 ATRE : RLEGVSRKQYAEHRMDVVMAMLC LSHITINTRVGNDFIRGVSGGERKRVSI AEATLSQAPLQ CWDNSTRGL : 344
 SNQ2 : RVNVNVSKEYIASRRDLYATIFGLRH TYNTKVGND FVRGVSGGERKRVSI AEALAAKGSIT YCWDNATRGL : 339
 ORF2 : KYDHP-RSHYIRRIC EIRDAFDLGD FYNHRILRVENS----GDQIKVDVAQTM CARPLIQ CWDNNMRDF : 200
 r r Y r fgL ht Nt vgnDf rgvsgGerkrV iae i CWDN tRgl
 Walker B

360 * 380 * 400 * 420
 BFR1 : DSSTAFEFVNLRTCANELKMTS FVTAYQASEKIYKLFDRICVLYAGRQIYYG PADKAKQYFLDMGFDCH : 409
 ATRE : DSANALEFCKNLALMSKYTGSTACVAIYQASQSAVDVDFDKVTVLVEGRQIYFGNTKDAKFFVDMGFECP : 414
 SNQ2 : DASTALEYAKAIRIMTNLLKSTAFVTIYQASENIYETFDKVTVLVSGKOLYFGLIHEAKPYFAKMGYLCP : 409
 ORF2 : DSISVIDILSHIKVLSHKLG TILVAIVSQASDRIFHMFDMVTLMYEGE QIFYCPTSRILKPYFLDLGHIPA : 270
 Ds a e l T v yQAS iy FD vtvly G QIy G aK yF dmGf c

* 440 * 460 * 480 *
 BFR1 : PRETTDPDFLTAISDEK-ARFPRKGFENRVPRTEDEF EQMWRNSSVYADLMAEMESYDKRWTETTPASSEA : 478
 ATRE : BROTTADFLTSLTSEA-ERLVRPCYEGRVPCTEDEF AAWKRSEERAKLMAEIEEYERQYPIGGPS---- : 479
 SNQ2 : PRQATAEFLTALTDENG FHLIKPCYENKVPRTAEEFETYWLNSPEFAQMKKDIAAVKEKVNTEKTK---- : 475
 ORF2 : KHSTIVEEFTVSLTYEE-MSIINKKHQGFIPSTPAEHR ECWLRSEDYAKLIKFMDRY EENHSDIHAFK--- : 336
 r tT FlT lt P g e vP Tp EF W S A l Y

500 * 520 * 540 * 560
 BFR1 : PEKDNFGSDISATTKHELYRQSAVAEAKSKRVKDTSPYTVTFSSQLWYCLARSWERYINDPAYIGSMAFAF : 548
 ATRE : -----YDAFVDARKAMQSKRQRVNSPYTISIWOQVSLCVVRGFQRLRGDFSLTTTSLIGN : 534
 SNQ2 : -----EYDESMAQEKSKYTRKKSYYTVSYWEQVKLCTQRGFQRIYGNKSYTVINVCSA : 529
 ORF2 : -----DAKFDQTRLQKFLRWLNSNECLIPYRLQVFATAKVTFFQYLHDYSVIATFVFTY : 390
 kskr spyt Qv c r f r d sy

```

          *           580           *           600           *           620           *
BFR1 : LFQSLIIGSIFYDMKLNIVDVFSRGGVIFFSILFCALQSLSEIANMTSORPIIAKHRASALYHPAADVIS : 618
ATRE : FMMALLIGSVFFDLPDDTSSFYRGALEFFAVLLNFFSSALEILTLYSORPIVEKQSRYAFYHDFAEAVA : 604
SNQ2 : IIGSFTIGSLFYNTPSSTSGAFSRGGVLYFALLYYSLMGLANIS--FEHRPILOKHKGYSLYHPSAEAIG : 597
ORF2 : VFQALMLGSLFYNLRNESSELYSRGSVLSNAIVFAAIQTMSLDVDIIFLKKSLFKEHRVQSLYHPSAALMG : 460
      q li GS Fy      ts      SRG vL fa l a      ei f rpi kh      lyHP A

          640           *           660           *           680           *           700
BFR1 : SLIVDLFFRFINISVFSIVLYFLTNLKRITAGGTWYFLFLFIGATCMSAFFRSLAGIMPNVESASALGGI : 688
ATRE : SMICDTPYKLIINSFTENVPLYLMTNLRDAAAFFLFWIFSVVTTFTMSMIFRTIASTSRSLSQALVPAAM : 674
SNQ2 : STLASFFFRMIGLTCFFILFFLSGLHRTAGSEFFIYLFELTMCSEAINGLEFEMVSSVCDTLSQANSISGI : 667
ORF2 : SNLVEFEMRIVVVTMYDIIVYFLSDLKRNARS----- : 492
      S      P r i f i lyfl L R A f t f      f      a

```

Fig. 2-8. Alignment of the ORF 2 and N-terminus of other fungal ABC superfamily protein.

The multiple alignments were done by clustal w. The black-background letters show residues conserved among more than three sequences. Walker A and B motifs, shared by ATP binding proteins, were underlined. Abbreviations: BFR1, brefecerin A resistance protein from *Schizosaccharomyces pombe* (AB003671); ATRE, ABC transporter protein from *Emericella nidulans* (AJ276241); SNQ2, SNQ2 protein from *Saccharomyces cerevisiae* (X66732); ORF2, open reading frame at downstream of α -glucosidase from *S. pombe* (this work).

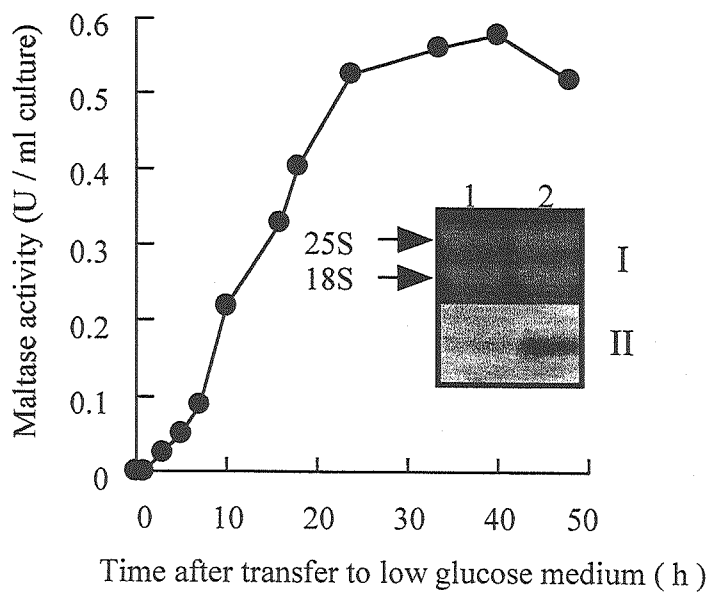


Fig. 2-9. Glucose Depletion Triggers Secretion of α -Glucosidase.

S. pombe were grown in minimum medium containing 9% glucose. When the culture density reached an A_{600} of 1.0, the culture cells were collected, washed and resuspended in the medium containing 0.1% glucose. The inset shows the Northern blot analysis. Total RNA was extracted from *S. pombe* by the hot phenol method. Approximately 20 μ g of total RNA, isolated from 0 h-cultured (lane 1), and 10 h-cultured (lane 2) cells from transfer to low glucose medium, were separated on a formaldehyde-agarose gel. Panel I was stained by ethidium bromide. Panel II was northern blot analysis. RNA were blotted onto Hybond-N membranes, and the blot was developed by an alkaline phosphatase labeled cDNA probe (803 bp, at 1575 to 2377 nt of cDNA, 34-32C) prepared using the AlkPhos direct gene image system. Hybridization was done at 50 $^{\circ}$ C.

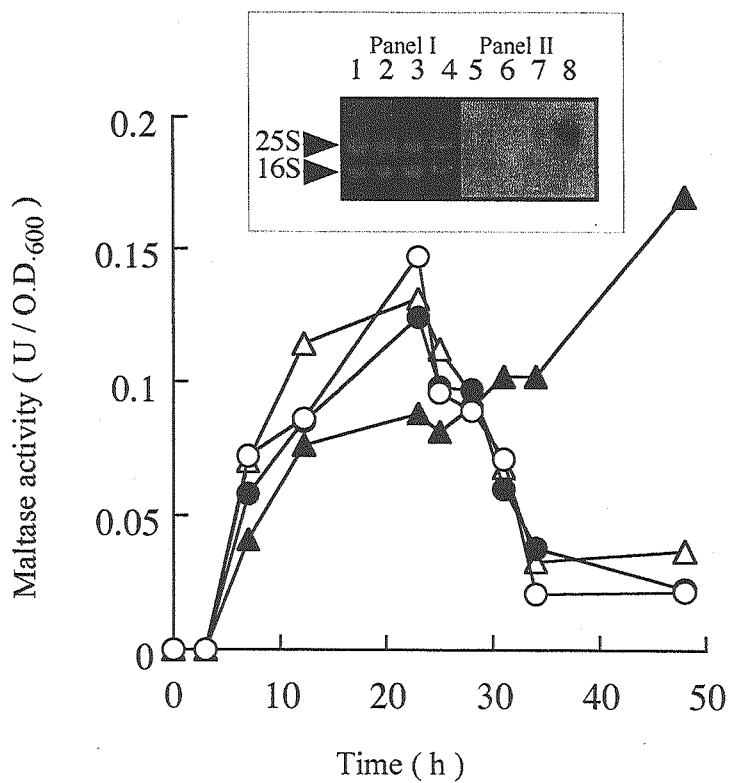


Fig. 2-10. Secretion of α -Glucosidase was Inactivated by Addition of Glucose.

Cells were grown in minimum medium with 3% glycerol as a carbon source. After 24 h, the indicated concentrations (final concentrations; ○, 9%; ●, 6%; △, 3%; ▲, 0%) of glucose were added.

The inset shows northern blot analysis after 10 h from adding glucose. Experimental conditions of northern analysis were the same as Fig. 3. Approximately 20 μ g of total RNA isolated from the cells cultivated with individual glucose concentration (lanes 1 and 5, 9%; lanes 2 and 6, 6%; lanes 3 and 7, 3%; lanes 4 and 8, 0%). Panel I was stained by ethidium bromide. Panel II was the result of northern blot analysis.

```

*          20          *          40          *          60          *
SPG : -----M : 1
SOG : -----MIFLKLKISIVI : 12
CTG : -----MRSIKA : 6
ANG : -----MVKLTH : 6
AOG : -----MAGLKS : 6
MJG : ----- : -
GAA : MGVRHPPCSHRLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQOGASRPGPRDAQA : 70
RIM : -----MAKKKFSALEISLIVLFIIVTAIAIALVTVLTKVPAVEEIKSPTPTSNSPTSTPTSTPTST : 65
RSU : ----- : -
RBI : -----MAKRKFSGLEITLIVLFIIVTIIAIALI AVLATKTPAVEEVNP-----SSSTPTTTSTTT : 55
RBS : ----- : -
HIM : -----MARKKFSGLEISLIVLFIIVTIIAIALI VLATKTPAVDEISD-----STSTPATTRVTT : 55
HSU : ----- : -
BAG : ----- : -
SBG : -----MERSKLPR : 8
BWG : -----MPKHTH : 6
SNG : -----MKKK : 4

```

```

80          *          100          *          120          *          140
SPG : MISTAYQSLFLTALFSAISIAVGNVYQTLNVIGDRNVTIPTNGIPQ-----RLSVYDPYRGVNCQGYQAV : 66
SOG : GLGLVSAIQAAPASSIGSSASASSSESSQATIPNDVTLGVKQIPN-----IFNDSAVDANAAAKGYDLV : 77
CTG : ASLTPLLAALFTLSSTLALPSSVWEHQLETNVLALRDTNNGSSS-----TISPSFDVTKCPGYKLVG : 70
ANG : LLARAWLVPLAYGASQSLSTAP--SQPQFTIPASADVGAQLIAN-----IDDPQAADAQSVC PGYKAS : 69
AOG : FLASSWLLPVACGASQSI VPSTSATAAYSQFTIPASADVGANLVAN-----IDDPQAVNAQSVC PGYKAS : 71
MJG : -----MAKVSFIFVAIALITGNVLCQTDATYAVSSSAPGYKIDG-----HVRKTE : 45
GAA : HPGRPRAVPTQCDVPPNSRFD CAP-DKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPSPSYKLE : 139
RIM : STPSPGKCPPEQGEPINERINWIPEQ-HPTKAICEERGCCRWPWN-----NTVIPWCFFADNHG-YNAE : 127
RSU : -----RTFS DNEKFTCYPDVGTATEGTCTQRGCLWQPVSG-----LSNVPPYFPENNPYTLT : 54
RBI : STSGSVSCPSSELMNEVVNERINCIPEQ-SPTQAI CAQRNCCWRPWN-----NSDIPWCFFVDNHG-YNVE : 117
RBS : -----DQTFLESEKITCYPDADIATQEKCTQRGCIWDTNTV-----NPRAP ECFYFKTDPNPSVSVS : 55
HIM : NPSDSGKCPNVLNDFVNV RINCIPEQ-FPTEGIC AQRGCCRWPWN-----DSLIPWCFFVDNHG-YNVQ : 117
HSU : -----NQIFSENERFNCPDADLATEQKCTQRGCVWRTGSS-----LSKAPECFYPRQDNSYSVN : 55
BAG : ---MATVGVLLCLCLCLFAPRLCSSKEEG-----PLAAR-TVLAV-----AVTMEGALRAEAATGGRSS : 56
SBG : YICPTLAVVLPVLVLCMVVEGATTSKNDNQGEAIGYGYQVKNKAVDN-----STGKSLTALLQLIRNSPVY : 73
BWG : HANPAKLLLLAATLLFCSL FVVSSEDEVVG----YGYRVVRAKVDS-----SS-NTLTAFLK LINASSLY : 66
SNG : IPSLALGILLVFLQLYLVAGISTSENDPEG-VIGYGYKVKSVK VDS-----GTRRSLTALPQLVKNSSVY : 68

```

```

*          160          *          180          *          200          *
SPG : NISESQNGVITAYLALLG--EPCYAYGTDYPLLFLNVTYEEADR VHISIK----DANNTQFQFTSRKDLWD : 130
SOG : NVTNTPRGLTGIEK LK--EATNIYGYDFDYLNLTVEYQADTRLNVHIEPTDLSDFVLP EHLVVKPLVE : 144
CTG : QPQQSQHGFTAQHSLAG--DACNAYGVDIANLTL SVVEYEQHQLHVHIYDTAKQYQLPNGLIFDRPGDN : 138
ANG : KVQHNSRGFTASLELAG--RPCNVYGT DVESLTL SVEYQDSDRLNIQILP THVDSTNASWYFLSENLVPR : 137
AOG : DVKHSSQGFTASLELAG--DPCNVYGT D VDSLTLTVEYQAKDRLNIQIVPTYFDASNASWYILSEELVPR : 139
MJG : AGLHIPLTLNSRGNK--TGIDTFGKTIKDI TVDVEYETERLHV KISD--K-AKKOYLVPDSP LGFE : 108
GAA : NLSSEMGYTALTRT---TPTFFPKDILTLRLDVM METENRLHFTIKDP-----ANRRYEVPLET : 197
RIM : SITNENAGLKATLNRI P---SPTLFGEDIKSVILTTQTQTGNRFRFKITD-----PNNKRYEVP HQFVK : 188
RSU : SIQPLPTGITAEQLNPPNARIKLP SNPISTLRVGVKYHPNDMLQFKIYD-----AQHKRYEVPVPLNI : 118
RBI : GMTTSTGLEARLN RKS---TPTLFGNDINNVLLT TESQTANRLRFK LTD-----PNNKRYEVP HQFVT : 178
RBS : STQYSPTGITADLQLNPT RTRITL PSEPITNLRVEVKYHKNDMVQFKIFD-----PQNKRYEVPVPLDI : 119
HIM : DMTTTSIGVEAKLNRI P---SPTLFGNDINSV LFTTQNQTPNRRFRFKITD-----PNNRRYEVPHQYVK : 178
HSU : SARYSSMGITADLQ LNTANARIKLP SDPISTLRVEVKYHKNDMLQFKIYD-----PQKKRYEVPVPLNI : 119
BAG : TGDVQRLAVYASLETD---SRLRVRI TDADHPRWEVPQDII PRP-----APGDVLHDAPPASSA : 112
SBG : GPD IHFLSFTASFEED---DTLRIRFTDANNRRWEIPNEVLPRP-PPPPS---PPPLSSLQHLPKPIQON : 136
BWG : GQDIPNLFTATFEKD---YRLRIRITDAEKPRWEIPNEVLHRD-----GSSHGHP LDRPTT : 122
SNG : GPD IQLLSITASLESN---DRLRVRI TD AKHRRWEIPDNILHRHQPPPPP---PHLSLSSLYRTLSSPTT : 132

```

```

220      *      240      *      260      *      280
SPG : APLYSYSPYNNNTNLYNFSYNAN-----PTEFWVTRKSDGEVLFDR----- : 171
SOG : G-DAQSYNFDNSDLVFEYSN-T-----DTSFEVIRSSSTKEVLFSTK----- : 183
CTG : PADIQNGSTADQSDLVFHHTAENGTQSGNGGWAFWIARKSSGDVIFDTRASNIPTYNDGLSSVSNTKRN : 208
ANG : PKASLNASVQSDFVSVWSNEP-----SDFNKVIRKATGDALFSTE----- : 178
AOG : PKASQNASVPQSDFFVSVWSNEP-----SDFNKVIRKATGDVLFNTK----- : 180
MJG : RPQIKHYVSPKHSNLDFOYTAK-----PFSFKVVRKDDKTTIFDTTN----- : 150
GAA : PRVHSRAPSP---LYSVEFSEE-----PTGVIVHRQLDGRVLLNTT----- : 235
RIM : EETGIPAAD---TYDVOVSEN-----PFSIKVIRKSNKVLCDTS----- : 226
RSU : PDTPTSSNE---RYDVEIKEN-----PTGIQVRRRSSGKLIWDSR----- : 156
RBI : EFAGPAATE---TYDVOVTEN-----PFSIKVIRKSNRILFDSS----- : 216
RBS : PATPTSTQEN---RYDVEIKEN-----PFGIQIRRRSTGKVIWDSC----- : 158
HIM : EFTGPTVSD---TYDVKVAQN-----PFSIQVIRRSKVKTLFDTS----- : 216
HSU : PTPPTISTYED---RYDVEIKEN-----PFGIQIRRRSSGRVIWDSW----- : 158
BAG : PLQGRVLSPAGSDLVLTVHAS-----PFRFTVSRRTSTGDTLFDATA----- : 152
SBG : QPTTTLVLSHPHSDLAFTLFHTT-----PFGFTIYRKSTHDLVDFDAT-P----- : 178
BWG : PPSAAVLTHPNSDLIFRLHDTN-----PFGFSVTRRSTNDVLFDRSA----- : 165
SNG : NRRKILLSHPNSDLITFSLINTT-----PFGFTISRKSTHDLVDFDAT-P----- : 174
      l      f      R

```

```

*      300      *      320      *      340      *
SPG : ----GQKLVFEDQYIELTTNMVENYN-LYGLAETHH-GLRLGNL-TRTFWANDEASP-VDONMYGSHHP : 232
SOG : ----GNPLVFSNQFIQFNSSLKKNHV-ITGLGESIH-GLVNEPGS-VKTLFANVGGP-IDGNLYGVHP : 244
CTG : TTAMPAHEMVFENQYLQISSALPTGAN-IYGLGEYVTGSRFRNPDETLPFFTLGAGTP-VDSNMYGYHP : 276
ANG : ----GAHVLVENCQIEFVTALPEEYN-LYGLGEHIT-QFRLORNA-NLTIYPSDDGTP-IDQNLVYQHP : 239
AOG : ----GSTLVYENCQIEFVTALPEEYN-LYGLGERMN-QLRLENA-NLTYAADIADP-IDDNLYGHHA : 241
MJG : ----MPLVFEDQYELSTKVPEDAN-IYGLGEVTA--PFRRTHN-VTTLWARDNPDD-FYRNIYGAHP : 209
GAA : ----VAPLFFADQFLQLSTSLPSQYI--TGLAEHLSPLMLSTSWT-RITLWNRDLAPT-PGANLYGSHHP : 296
RIM : ----VGPLLYSNQYLQISTRLPSEYIYGFGEVHTAFKRDLNWH--TWPIFTRDEIPGDNNHNLVGHQT : 289
RSU : ----LPGFGFNDQFIQISTRLPSEYIYGFGEVHTAFKRDLNWH--TWGMFTRDQPPG-YKLNSYGFHP : 218
RBI : ----IGPLVYSDQYLQISTRLPSEYMYGFGEVHVKRFRHDLNWH--TWPIFTRDQHTDDNNHNLVGHQT : 279
RBS : ----LPGFAFNDQFIQISTRLPSEYIYGFGEVHTAFKRDLNWH--TWGMFTRDQPPG-YKLNSYGFHP : 220
HIM : ----IGPLVYSDQYLQISARLPSDYIYGFGEVHVKRFRHDLNWH--TWPIFTRDQLPGDNNHNLVGHQT : 279
HSU : ----LPGFAFNDQFIQISTRLPSEYIYGFGEVHTAFKRDLNWH--TWGMFTRDQPPG-YKLNSYGFHP : 220
BAG : ----PGLVFRDKYLEVTSALPAGRASLYGLGEHTKSSFRLRHND-SFTLWNADIGASYVDVNLVYGSHP : 215
SBG : IPSNPTTFLIYKQYLQQLSSSLPAQQAHLVGLGEHTKPTFQLAHNQ-ILTLWNADIASFNRLNLYGSHP : 247
BWG : DPETDPVGLVFKDQYLQQLSSSLPADRSNLYGICEHTKPTFRLARNQ-TLTLWNADIASYNVDLNLVYGSHP : 234
SNG : DPTNPNTFLIFIDQYLHLTSSLPGTRAHIYGLGEHSKPTFQLAHNQ-TLTMRADIPSSNPVDVNLVYGSHP : 243
      q      lp      G e      D      N Y G h

```

```

360      *      380      *      400      *      420
SPG : YLEQRYKADG-----IN---STLNETTYTSSSHCVLMLTANGMDVLLRQD-YLQYRMIGVIDLDFVY : 291
SOG : VMLDQRYD-----T-----ETTHAVYWR TSAIQEVLIGEE-SITWRALSGVIDLYFF : 290
CTG : IYTEARRGSDG-----KLRTHSVHLQNTAGMDVLLRRG-VIQYRAIGGTLDFRFF : 325
ANG : FYLDTRYKGRQNGSYIPVKSSEADASQDYISLSHCVFLRNHSHGLEILLRSQ-KLIWRTLGGIDLTFY : 308
AOG : FYLDTRYKVGQNKSHITIVKSSEAEPSQEYVSYSHCVFLRNHSHGLEILLRDQ-KLIWRTLGGIDLTFY : 310
MJG : YVQEVVDG-----KAHCALLMNAHGMVDVITTEG-RITYKVIIGGIDLYFF : 253
GAA : FYLALEDG-----GSAHGVFLNLSNAMDVVLQSPALSWRSTGGILDVYIF : 342
RIM : FFMGIGDTS-----GKSYGVFLMNSNAMEVFIQPTPIITYRVTGGILDYFIF : 336
RSU : YVMALENE-----GNAHCVLLNLSNMGDVTFQPTPALTYRTVGGILDYFYM : 264
RBI : FFMCIEDTT-----GKSFCVFLMNSNAMEIFIQPTPIVYRVTGGILDYFIF : 326
RBS : YVMALEDE-----GNAHCVLLNLSNMGDVTFQPTPALTYRTVGGILDYFYM : 266
HIM : FFMCIEDTS-----GKSFCVFLMNSNAMEIFIQPTPIVYRVTGGILDYFYL : 326
HSU : YVMALEEE-----GNAHCVFLNLSNAMDVTFQPTPALTYRTVGGILDYFYM : 266
BAG : FYMDVRAP-----G-TAHGVLLLSNMGDVLVYGG-SYTYKVIIGVLDLYFF : 260
SBG : FYMDVRSSP-----MVGSTHGVFLNLSNMGDVEYTG-D-RITYKVIIGGIDLYIF : 295
BWG : FYLDVRAP-----LGTSGVLLNLSNMGDVEYTG-D-KITYKVIIGVLDLYVF : 280
SNG : FYMDVRSSP-----VAGSTHGVLLNLSNMGDVEYTG-D-RITYKVIIGGIDLYFF : 291
      y      gv l n m      gG D

```

```

*          440          *          460          *          480          *
SPG : SCST-----ESFKETVVKQFVQSIG-KPAMHOYWTLCYHSCRWGYTNITEIMDVQRN : 341
SOG : SC-----PTFKDAIQOYVKEIG-LPAFQPYWSLGYHQCRWGYDTIEKLSEVVEN : 338
CTG : SEDQPASSSSSSSGNDKAVATVKNSENTAIQOYVNFIGNPVIHPYWSYGFHLCRWGYNNVSETQAVIDA : 394
ANG : SG-----PAPADVTRQYLTSTVGLPAMQOYNTLGFHQCRWGYNNWSDLADVVAN : 357
AOG : SG-----PTQAEVTKOYQLSTVGLPAMQOYNTLGFHQCRWGYNNWSEFEDVLAN : 359
MJG : APKS-----GKENDLSIAYTDLIG-KPMMPSHMMLGWHHCRYGYPNIDKVEYVKKR : 303
GAA : LG-----PEEKSVVQOYLDVVG-YPFMPYWGGLGFHLCRWGYSSTAITROVVEN : 390
RIM : LG-----DTEQVVQOYQEVHW-RPAMPAYWNLGFQLSRWNYGSLDTVSEVVR : 384
RSU : LG-----PTPEIATROYHEVIG-FPVMPYWALGFQLCRYGYRNTSEIEQLYND : 312
RBI : LG-----DTEQVVQOYQELIG-RPAMPAYWNLGFQLSRWNYNSLDVVKVVR : 374
RBS : LG-----PTPEVATQOYHEVIG-HPVMPYWSLGFQLCRYGYRNTSEIIELEYG : 314
HIM : LG-----DTEQVVQOYQELVIG-LPAMPAYWNLGFQLSRWNYKSLDVVKVVR : 374
HSU : LG-----PTPEQVATKQYHEVIG-HPVMPYWALGFQLCRYGYRNTSEIIELEYG : 314
BAG : AC-----PNPLAVVDQYQTLIA-RPAMPYWSFGFHQCRYGYLNVSDLERVAR : 308
SBG : AC-----RTEPMVLDQYTKLIG-RPAMPYWAFGFHQCRWGYRVDVNEIETVVDK : 343
BWG : EG-----PTPEDEVVQOYTELIG-RPAMPYWSFGFHQCRYGYRNTSEIIELEYG : 328
SNG : AC-----PSEGQVVEQFTRVIG-RPAMPYWAFGFHQCRYGYRNTSEIIELEYG : 339
g          p          qy          P          yw          Gf          CR          Y          v

```

```

500          *          520          *          540          *          560
SPG : YIDADIPVETVFSDDIDYMEKYRDFTVDPVSYSKSDMQTFSDLVSNHQHYVPIIDAAYAAANPNYHTDDS : 411
SOG : FKKFNIPLLETIWSDDIDYMDSYKDFTYDPHRFPLDEYRKFELDELHKNNQHYVPIIDAAYVVPNPNNATDNE : 408
CTG : MRQNNIPLLEVQWNIIDYLQEFRDFITLDPQRFQKEFAAMIAKLKDNNQHYIPIIDMAIPKAPTND--D TDV : 462
ANG : FEKFEIPLLEYIWTDDIDYMHGYRNFNDQHRFSYSEGDEFSLKSLHESGRYVPIIDAAIYIPNPENASD-A : 426
AOG : FERFEIPLLEYLWADIDYMHGYRNFNDQHRFSYEEGKELNKLHAGGRRWVPIIDGALYIPNPENASD-A : 428
MJG : YKEANIPLQTVVVDIDYMEETKDFTEFKVNFQDRMIGLGEQLHKDQNYVVMVDPATISAN-----TT : 366
GAA : MTRAHFPLDVQWNIIDYMDSRDDFTFNK--DGFRDFPAMVQELHQGRRYMMIVDPATISSSGP----AGS : 454
RIM : NREAGIPYDAQVTDIDYMEDHKDFTYDR--VKFNGLPEFAQDLHNHG-KYIILDPATISINKR--ANGAE : 449
RSU : MVAANIPLYDVQYTDIDYMERQLDFTIG---ERFKTLPEFVDRIRKDKGMKYIVILAPATISGNE----TQP : 374
RBI : NREALIPFDFTQVSDIDYMEDKKDFTYDR--VAYNGLPEFVQDLHDHGQKYVILDPATISINRR--ASGEA : 440
RBS : MVAADIPYDVQYTDIDYMERQLDFTID---ENFRELPQFVDRIRGEGMRYIILDPATISGNE----TRP : 376
HIM : NREAGIPFDFTQVTDIDYMEDKKDFTYDQ---VAFNGLPQFVQDLHDHGQKYVILDPATISIGRR--ANGTT : 440
HSU : MVAANIPLYDVQYTDIDYMERQLDFTIG---EAFQDLPEFVDRIRGEGMRYIILDPATISGNE----TKT : 376
BAG : YAKARIPLEVMWTDIDYMDGFKDFTLDRVNFATAELRPFVDRILHRNAQKYVILDPATISIRVDP---I-DAT : 374
SBG : YAEARIPLEVMWTDIDYMDAFKDFTLDPVHFPLDKMQQFVTKLHRNGQRYVPIIDPGINTN-----KS : 406
BWG : YSTMRIPLLEAMWTDIDYMEANKDFTVDPVNFPLDKMQRFVVKLHKNGQKYVAILDPGINTN-----TT : 392
SNG : YAKARIPLEVMWTDIDYMDAYKDFTLDPVNFPLDKMKKEFVNNLHKNGQKYVAILDPGINTN-----KT : 402
ip          DidYm          dft d          f          l          y          i          d          i

```

```

*          580          *          600          *          620          *
SPG : YYPYACVVEKDI FLKNP-NGSIYICAVWPGFTAFF-----DFTNPDVVYWKDCLINLTYAF : 467
SOG : YQPFHYCNETDVFLKNP-DGSLYICAVWQVTLFS-----RFLSRKHSMDMKVIKDWYELT : 462
CTG : YYPGTRCDELDFIKNR-NGSQYICBVWPGYTN-----FVDQQAENAGKWWTEAIRNFSEIV : 518
ANG : YATYDRGAADDVFLKNP-DGSLYICAVWPGYTVFP-----DWHHPKAVDFWANELVIWSKKV : 482
AOG : YETYDRGAKDDVFIKNP-DGSLYICAVWPGYTVFP-----DWHHPKASDFWANELVTWVNKL : 484
MJG : YEPYVRGTEMDVWIKN-ADGSDFIGSVWPGFTTFP-----DWHHPNATKYWNKEIIDFVDM : 422
GAA : YRPYDEGLRRGVFITN-ETGQPLIKVWPGSTAFP-----DFTNPTALAWWEDMVAEFHDQV : 510
RIM : YQTYVRCNEKNVWVNESDGTTPICEVWPGGLT-----VYPDFTNPQTIEWWANE : 498
RSU : YPAFERGIQKDFVFKWPNTINDICWPKVWPDLPNVTIDETITETEDEVNASRAHVAFPDFFRNSTLEWWARE : 444
RBI : YESYDRCAQNVWVNESDGTTPICEVWPGGDT-----VYPDFTSPNCIEWWANE : 489
RBS : YPAFDRGEAKDFVFKWPNTSDICWAKVWPDLPNITIDESLTEDEVNASRAHAFAFPDFFRNSTAEWWTRE : 446
HIM : YATYBRGNTQHVWVNESDGTTPICEVWPGGLT-----VYPDFTNPCIDWANE : 489
HSU : YPAFERCQONDVFKWPNTINDICWAKVWPDLPNITIDKTLTEDEVNASRAHVAFPDFFRNSTAEWWARE : 446
BAG : YGTFVRGMQODIFLKR--NGTNFVGNVWPGDVYFP-----DFMHPAAAEFWAREISLFRRTI : 429
SBG : YGTFIRGMQSNVFIKR--NGNPYLCSVWPGPVYFP-----DFLDPAARSFWWDEIKRFRDIL : 461
BWG : YGTFQRAMKADIFIKR--QGEPYQCEVWPGPVYFP-----DFLNPKTTFWWISEIQTFNAL : 447
SNG : YETYIRGMKHDVFLKR--NGKPYLCSVWPGPVYFP-----DFLKPSALTFWTDEIKRFLNLL : 457
Y          rg          v          g          Wp

```


640 * 660 * 680 * 700

SPG : GSNGT---VPFSGIWIWDMNEPSSFCVGS CGSAMI DLNPAEPLVGIS----- : 510
SOG : P-----FDGLWADMNEVSSFCVGS CGTGKYFENPAYPPFTVG----- : 499
CTG : D-----FSGIWIWDMNEPSSFCVIGNAAGPETNLSNTPAYTAATS SVAGWPQGYNNLTWGTSGNITVNG : 579
ANG : A-----FDGVWYDMSEVSSFCVGS CGTGNLTLNPAHPSFLLPGEF----- : 522
AOG : H-----YDGVWYDMAEVSFCVGS CGTGNLSMNPAPHPFALPGEF----- : 524
MJG : G-----VDGLWIDMNEPASFCLGSCGSGKVDAG----- : 450
GAA : P-----FDGMWIDMNEPSSNFIRGSE----- : 530
RIM : CNLFH-QQVEYDGLWIDMNEVSSFIQGS LN----- : 527
RSU : IYDFYNEKMKFDGLWIDMNEPSSFIQMGG----- : 474
RBI : CNIFH-QEVNYDGLWIDMNEVSSFVQGSN----- : 517
RBS : ILDFYNNYMKFDGLWIDMNEPSSFVNGTTT----- : 476
HIM : CSIFH-QEVQYDGLWIDMNEVSSFIQGST----- : 517
HSU : IYDFYNEKMKFDGLWIDMNEPSSFVNGTTT----- : 476
BAG : P-----VDGLWIDMNEISNFYN----- : 446
SBG : P-----IDGLWIDMNEASNFITS----- : 479
BWG : P-----VDGLWIDMNEVSNFIS----- : 465
SNG : P-----VDGLWIDMNEISNFIS----- : 475

dG W DMnE s F

* 720 * 740 * 760 *

SPG : -----KQYSIPEGFNVSNVTEYSSAYSASLSNYATATSSVVFQIVSPTATPLGLKP-DYNINWPPYAIN : 573
SOG : -----SKATSYPGFVDVSNASEWKS IQSSISATAKTSSTSSVSSSSTIDYMN TLAPGKGNINYPYAIY : 564
CTG : SYTYQQGPVQNDGSKQRRLSLRDEDVLVQRDINVNGGNGDKFGPEDPNYQYANSSQRYLSNPPYAIH : 649
ANG : ---GDIIYDYPEAFNITNATEAASASAGASSQAAATATTS---TSVSYLRTPPTPGVRNVEHPPYVIN : 585
AOG : ---GNVVYDYPEGFNITNATEAASASAGAASQSAASST---TSAPYLRTPPTPGVRNVDHPPYVIN : 586
MJG : -----NQPYRWYTEEEQAAN---HTR---WEKELKAMGNPPGEERNLLYPYAIN : 495
GAA : -----DGC PNNELE NPPYVPG : 546
RIM : -----L-----KGVLLIVLN---YPPETPG : 544
RSU : -----K-----VLNECRRM TLNYPYVFS P : 494
RBI : -----N-----KGCNDNTLN---YPPYIPD : 533
RBS : -----N-----VCRNTE---LNYPPYFPE : 492
HIM : -----N-----KGCNVNKLN---YPPETPD : 533
HSU : -----N-----QCRNDE---LNYPPYFPE : 492
BAG : -----PEPMNALDDPPYRIN : 461
SBG : -----A-----PTPGSTLDNPPYKIN : 495
BWG : -----P-----PIPDSPLDNPPYVIN : 481
SNG : -----P-----PIPGSTLDNPPYKIN : 491

Ppy

780 * 800 * 820 * 840

SPG : NEQGNHD---IANHIVSPNATTHDG---TQRYDIENMYGYGETKVSYAAL TQISPNER-PFILSRSTFL : 635
SOG : NMQGDSD---LATHAVSPNATHADG---TVEYDIENLYGYLEQENATYHALLEVFPNKR-PFMISRSTFP : 626
CTG : NGIHISETPLNVNLDKKTVM AEAVGVDGQRAFYDVHNLDCGLEEQHFYNALRDIRPQER-PFLISRSTYP : 718
ANG : HDQEGHD---LSVHAVSPNATHVDG---VEEYDVHGLYGHQGLNATYQGLLEVW SHKRRPFIIGRSTFA : 648
AOG : HVQP GHD---LSVHAISPNS THSDG---VQ EYDVHSLYGHQGINATYHGLLKVWENKR-PFIIARSTFS : 648
MJG : NGAGNLS---EFTVATTALHYGN---IPHYDIENLYCHAESHITRQALIKHKNKIR-PFVLT RSTSF : 555
GAA : VVG GTLQ---AAT ICASSHQFLS---THYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRP---FVISRSTFA : 604
RIM : ILDKV MYS---KTL CMDAVQHWG---KQYDVHSLYGY SMAIATEQAVERVFPNKRS-FILTRSTFG : 603
RSU : ELRVKBE GEGASISEAMC METEHLIDGSSVLQYDVHNL YGWSQVKPTLDALQNTTG-LRG-IVISRSTYP : 562
RBI : IVDKLMYS---KTL CMDSVQYWG---KQYDVHSLYGY SMAIATERAVERVFPNKRS-FILTRSTFA : 592
RBS : LTKRTDG---LHFRTMCMETEHLISD GSSVLHYDVHNL YGWSQAKPTYDALQKTTG-KRG-IVISRSTYP : 557
HIM : ILDKLMYS---KTL CMDAVQNWG---KQYDVHSLYGY SMAIATEQAVQKVFPNKRS-FILTRSTFA : 592
HSU : LTKRTDG---LHFRTICMEAEQILSDGTSVLHYDVHNL YGWSQMKPTHDALQKTTG-KRG-IVISRSTYP : 557
BAG : NDGTGRP---INNKTVRPLAVHYGG---VTEYEENLFLGLLEARATGRGVLRDTGRRP---FVLSRSTFV : 522
SBG : NSGGRVP---INSKTIPATAMHYGN---VTEYNAENLYGFLESQATREALVRPATRGP---FLLSRSTFA : 556
BWG : NSGGRRP---INEKTIPVSSVHYGN---VSDYNVNL YGYLEATATNVALKKVTKQRP---FVLSRSTFI : 542
SNG : NSGVMLP---IINKTIPPTAMHYGD---IPEYNVNL YGYLEARVTRAAALIKLTEKRP---FVLSRSTFS : 552

Y h lyG t a f RSt

```

*           860           *           880           *           900           *
SPG : GSCVYGAHWLGDNHSLSNMFFS-----ISGMIVNMMGIPMVGADVCGHFGDS-DEELCSRW : 692
SOG : RACKWTGHWGDNNTADWAYAYFS-----IPQAFSMGIAGLPFFGADVCGFNGNS-DSELCRW : 683
CTG : GACKFTGHWLGDNYALWTILPGEEAYKAGAGMAQS-IDGVLOFQIFGIHLIADICGFNRNS-DEELCNRW : 787
ANG : GSGKWAGHWGDNYSKWSMYYS-----ISQALSISLFGIPMFGADTCGFNGNS-DEELCNRW : 705
AOG : GSGKWAGHWGDNFSKWSMFFS-----ISQALQISLFGIPMFGVDTCGFNGNT-DEELCNRW : 705
MJG : GSGKSVGHWTGDNHSFWPYLKNS-----IANILNEQMFVSVSADVCGFNSDT-TEELCTRW : 612
GAA : GHCRYAGHWLGDVWSSWEQLASS-----VPEILOENLLGVPLVGADVCGFLGNT-SEELCVRW : 661
RIM : GSGRHAHWLGDNTASWEQMEWS-----ITGMLEFGIFGMPLVGATSCGFLADT-TEELCRRW : 660
RSU : TTGRWGGHWLGDNYTTWDNLEKS-----LIGMLELNLFGIPYIGADICGVFHDGSGYPSLYFVG : 620
RBI : GSGRHAHWLGDNTATWEQMEWS-----ITGMLEFGIFGMPLVGADICGFQAET-TEELCRRW : 649
RBS : TAGRWAGHWLGDNYARWDMNDKS-----LIGMMEFSLFGISYTGADICGFFNDS-EYHLCTRW : 614
HIM : GSGRHAHWLGDNTASWEQMEWS-----ITGMLEFSLFGIPLVGADICGFVAET-TEELCRRW : 649
HSU : TSGRWGGHWLGDNYARWDMNDKS-----LIGMMEFSLFGISYTGADICGFFNNS-EYHLCTRW : 614
BAG : GSGRYTAYWTGDNAATWGDLYS-----INTMLSGLFGMPMIADICGFNGNT-TEELCGRW : 579
SBG : GSGKYTAHWLGDNAARWDDLQYS-----IPTMLNFGIFGMPIADICGFVAEST-TEELCRRW : 613
BWG : GSGKYTAHWLGDNAATWTNMAAS-----IPTILDFGLFGIPMIADICGFAYTT-TEELCRRW : 599
SNG : GSGKYTAHWLGDNAATWDLVYS-----IPSMLEDFGLFGIPMVGADICGFNGNT-TEELCRRW : 609
G   hW Gdn   W   s           i   f   fG   Gad CGf           eLc   rw

```

```

*           920           *           940           *           960           *           980
SPG : MAMGAFSPFYRN-HNNIYQISQEPYTWSSVAEA---SRRAMYTRYSLLPYWYTIMAKASQDGTALRALF : 758
SOG : MQLGSFFPFYRN-HNYLGAIDQEPYVWESVAEA---TRTSMAIRYLLLPYTYLLHESHTTGLPILRAFS : 749
CTG : MMLCAFLPFYRN-HNTIGAIQEPFRWDSVAN---ASRIAINKRYEILPSLYSHMAQSAESCEPAVRALW : 853
ANG : MQLSAFFPFYRN-HNELSTIPEPYRWASVIEA---TKSAMRIRYAILPYFYTLFDLAHTTGSTVMRALS : 771
AOG : MQLSAFFPFYRN-HNVLSAIPEPYRWASVIDA---TKAAMNIRYAILPYFYTLFHLAHTTGSTVMRALA : 771
MJG : MEIGAFYPFYRN-HNNNAAKDQEPYLWESTAEAS---RIAINTRYEMLPYFYTLFESNRGLGVWRPLI : 678
GAA : TOLGAFYPFYRN-HNSLLSLPEPYSFSEP---AQQAMRKALTRYALLPHLYTLFHQAHVACETVARPLF : 728
RIM : MQLGAFYPFYRN-HNAEGYMEQDPAYFGQD---SSRHYLTIRYTLPLFLYTLFYRAHMFGETVARPFL : 724
RSU : IOLGAFYPFYRN-HNADGFEHQDPVSWMKL---LLQMSKKVLEIRYTLPLFYTYQMEHAHAGGTVIRPLM : 688
RBI : MQLGAFYPFYRN-HNADGFEHQDPAFFGQDSLVLKSSRHYLNIRYTLPLFLYTLFYKAHAFGETVARPVL : 718
RBS : TOLGAFYPFYRN-HNIQFTRQDPVSWNQT---FVEMTRNLNIRYTLPLFYTYQLHEIHAGGTVIRPLM : 681
HIM : MQLGAFYPFYRN-HNSDGYEHQDPAFFGQNSLLVKSROYLTIRYTLPLFLYTLFYKAHVGETVARPVL : 718
HSU : MQLGAFYPFYRN-HNIANTRQDPASWNET---FAEMSRNLNIRYTLPLFYTYQMEHAIHANGTVIRPLL : 681
BAG : IOLGAFYPFYRN-HSAIFTVRELYLWPSVAAS---GRKALGTRYQLLPYFYTLMYEAHMTGAPIARPLF : 645
SBG : IOLGAFYPFYRN-HSARDTTHQELYLWESVAAS---ARTVLGLRYELLPYTYTLMYDANLRGSPARPLS : 679
BWG : IOLGAFYPFYRN-HSDNLSEPELQWGSVTES---ARKVLGLRYRLLPYTYTLMYEAHKKGTPIARPLF : 665
SNG : IOLGAFYPFYRN-HSSLGTTYQELYRWESVAAS---ARKVLGLRYRLLPYTYTLMYEAQLNGIPIARPLF : 675
qlgaF Pf R h           q           r           RY LP Yt           G           R

```

```

*           1000           *           1020           *           1040           *
SPG : VEFPNDPT-LADVDRQFMVGDSSLVTPVLEPNVEYVQGVFPGD-NSTVWYDWNHTEIVRQYN----- : 819
SOG : WQFPNDRS-LSGVDNQFFVGDGLVVTPLVEPGVDKVKGVFPAGAGKEEVYDWTQREVHFHFKD----- : 811
CTG : YEFDEVFEQTKDYAHQFLFCDDLLVSPVLEPNVTQIKALFPNAGGKWRNVFSYEALDVEYNKN----- : 916
ANG : WEFPNDPT-LAAVETQFMVGPAMVVPVLEPLVNTVKGVFPVGVHGEVWYDWTQAAVDAKPG----- : 833
AOG : WEFPNDPS-LAAVGTQFLVGPVSMVIPVLEPQVDTVQGVFPVGVHGEVWYDWTQAVDAKPG----- : 833
MJG : FEYPAYEE-LVSNVQTLVGSIDLLSPVLEDEKTSVKAQFBGGQ---WYDWTHELTVDNKSNK----- : 738
GAA : LEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLG---TWYDLQTVPIEALGSLPPPAAPRE : 795
RIM : YEFYDDTN-SWIEDTQFLWGPALLITPVLPRGVENVSAIIPNAT---WYDYETGIKRPWRKER----- : 783
RSU : HEFFDDKE-TWEIYKQFLWGPAFMVTPEPFRSPTVTGYVVKAR---WFDYHTGADIKLKGIL----- : 747
RBI : HEFYEDTN-SWVEDREFLWGPALLITPVLITQGAETVSAYIPDAV---WYDYETGAKRPWRKQR----- : 777
RBS : HEFFDDRT-TWIDIFLQFLWGPAFMVTPEPYTTVVRGYVFNAR---WFDYHTGEDIGIRGQF----- : 740
HIM : HEFYEDTN-SWIEDTEFLWGPALLITPVLKQGADTVSAYIPDAI---WYDYESGAKRPWRKQR----- : 777
HSU : HEFFDEKP-TWIDIFKQFLWGPAFMVTPEPYVQTVNAYVFNAR---WFDYHTGKDIGVRGQF----- : 740
BAG : FSYPHDVA-TYGVDRQFLLRGVLVSPVLEPGPTVTDAYFPAG---RWYRLYDYSIAVATRGT----- : 704
SBG : FTFPDDVA-TYGISSQFLICRGIMVSPVLQPGSSIVNAYSERG---NWSLSNYTSSVSVSAG----- : 738
BWG : FSFPNDPN-TYGIDAQFLICKGMVSPVLITQGATSVTAYFBSG---NWFNLFNYTKTVSSPANG----- : 725
SNG : FSFPDDIK-TYGISSQFLICKGMVSPVLKPGVSVTAYFBRG---NWFDFLDYTRSVTASTG----- : 734
f   d           qf1 G           PV1           v           P

```

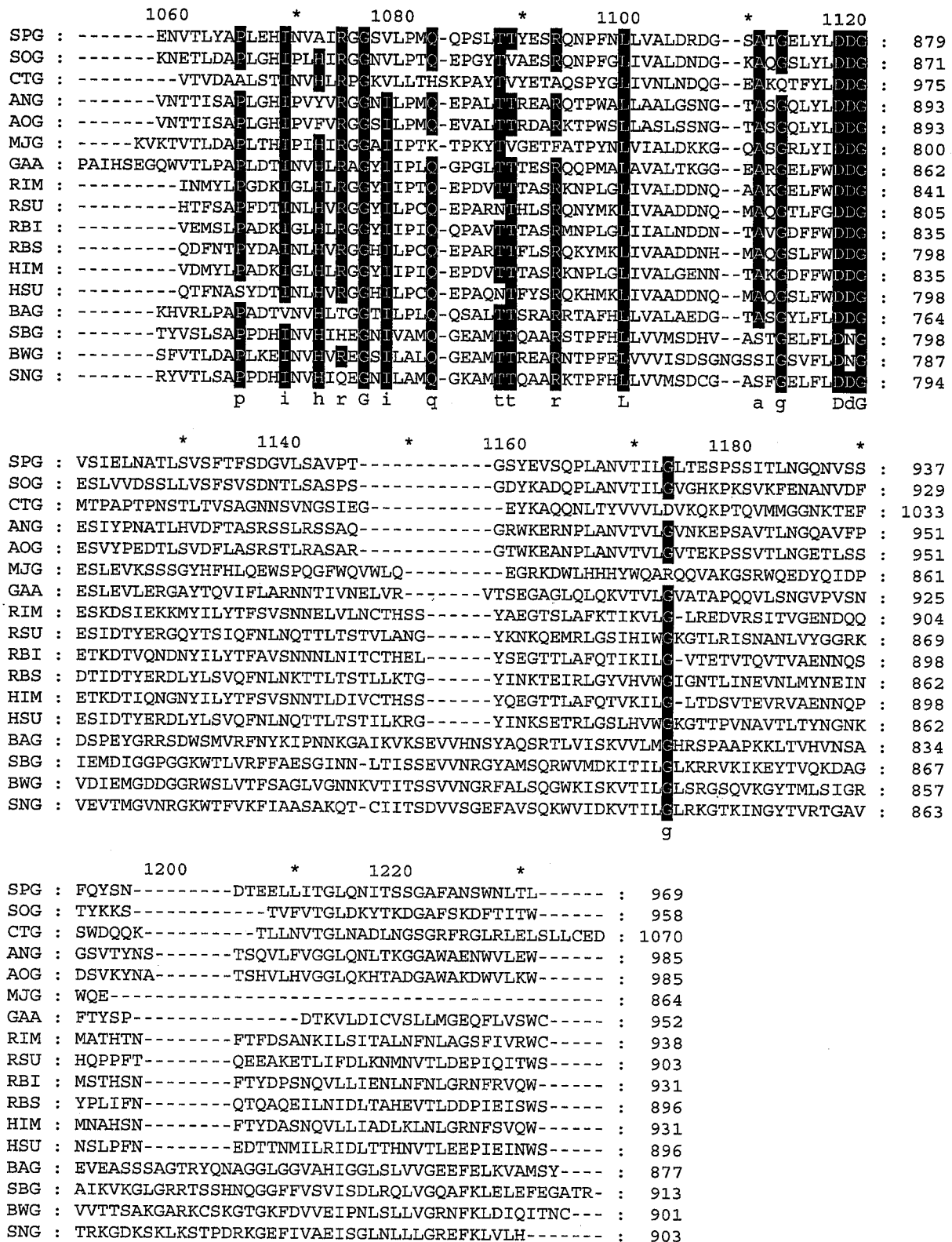


Fig. 2-11. Multiple Sequence Alignments of α -Glucosidase Family II Enzymes.

The multiple alignment was done by Clustal W. The black-background letters show the residues conserved among more than the 14 sequences.

Abbreviations: SPG, *S. pombe* α -glucosidase; SOG, *S. occidentalis* glucoamylase; CTG, *C. tsukubaensis* α -glucosidase; ANG, *A. niger* α -glucosidase; AOG, *A. oryzae* α -glucosidase; MJG, *M. javanicus* α -glucosidase; GAA, human lysosomal α -glucosidase; RIM, rat SI isomaltase domain; RSU, rat SI sucrase domain; RBI, rabbit sucrase-isomaltase complex (SI) isomaltase domain; RBS, rabbit SI sucrase domain; HIM, human SI isomaltase domain; HSU, human SI sucrase domain; BAG, barley high pI α -glucosidase (Morex); SBG, sugar beet α -glucosidase; BWG, buckwheat α -glucosidase; SNG, spinach α -glucosidase.

```

      *           20           *           40           *           60           *
SSG : -----MOTIKIYENKGVYKVVICEPFPPIEP-----LEQKISSSNKSLSELGLTIVQCNKVI : 53
SPG : MMISTAYQSLFLTALFSAISIAVGNVYQTLNVIGDRNVTIPTNGIPQRLSVYDPYRGVNCQGYQAVNISE : 70

      80           *           100           *           120           *           140
SSG : VEKSLDLKEHIIGLGEKAFELDR-----KRKRYVMYNVDAGAYKKYQDPLVSIPLFISVKDG : 111
SPG : SQNGVTAYLALLGEPQYAYGTDYPLLFLNVTYEEADRVHISIKDANTQFQFTSRKDLWDAPLYSPSYNN : 140

      *           160           *           180           *           200           *
SSG : VATGYFFN-----SASKVIFDVG----- : 129
SPG : TNLLYNFSYNANPFEFWVTRKSDGEVLFDTRGQKLVFEDQYIELTTMVENYNLYGLAETHGLRLGNNL : 210

      220           *           240           *           260           *           280
SSG : -----LEEYDKVIVT : 139
SPG : TRTFWANDEASPVDQNMYGSHPYLEQRYKADGINSTLNETTYTSSSHGVLMLTANGMDVLLRQDYLQYR : 280

      *           300           *           320           *           340           *
SSG : IPEDSVEFYVIEG--PRIEDVLEKYELTELTGKPFLPMWAFGYMISRYSYPQDKVELVDIMQEGFRVA : 207
SPG : MIGGVIDLFYSCSTESPKETVKQFVQSIGKPAMHQYWTLGYHSCRWGYTNITEIMDVRQNYIDADIPVE : 350

      360           *           380           *           400           *           420
SSG : GVFLDIHYMDSYKLFTWHPYRFPEP--KKLIDELHKRNVKLITEVDHGIR-----VDQNYSPFLSCMG : 268
SPG : TFWSDIDYMEKYRDEFTVDPVSYSKSDMQTFFSDLVSNHQHYVPLIDAAIYAANPYNHTDSYPYAGYE : 420

      *           440           *           460           *           480           *
SSG : --KPCEIESCELFVCKMWPGTVYPDFFREDTREWWAGLISEWLSQG-----VDGIWLDMNEPTDTSR : 329
SPG : KDIRLKNPNGSIYIGAVWPGTAFPDHTNPDVVDYWKDCLINLTYAFGSNGTVPFSCIWTDMNESSECV : 490

      500           *           520           *           540           *           560
SSG : AIEIRDVLSS-----LEVQFR : 345
SPG : GSCGSAMIDLNPAEPLVGISKQYSIPEGFNVSNVTEYSSAYSASLSNYATATSSVFQIVSPTATLGLK : 560
      P

      *           580           *           600           *           620           *
SSG : DDRLVTTFP-----DNVVHYLRGKRVKHEKVR-----NAYPLYEAMATFKGFRTSHRN-EIFILS : 399
SPG : PDYNINWPPYAINNEQGNHDIANHIVSPNATTHDGTQRYDIFMMYGYETKVSYAALTQISPNERFILS : 630

      640           *           660           *           680           *           700
SSG : RAGYACIQRYAFIWTCDNTPSWDDLKLQLQLVLGLSISGVPFVCGDIGCGFQRNFAEIDNSMDLVKYYA : 469
SPG : RSTFLGSGVYGAHWLGDNHSLWSNMFFSISGMIVFNMCGIPMVCADVCGFLG-----DSDEELCSRWMA : 694

      *           720           *           740           *           760           *
SSG : LALHFFPYRSHKATDGIDTEPVFLPDYYKEKVKEIVELRYKFLPYIYSLAEASEKHPVIRPLFYEFQD : 539
SPG : MGARSEFYRNHNIYQISQEPYTWSS-VAEASRRAMYIRYSLPYWYTIMAKASQDGTPALRALFVEFPN : 763

      780           *           800           *           820           *           840
SSG : DDMYRIEDEYWVCKYLLYAPIVSKESRLVTLPRGK----WYNYWNGEIIN-----GKSVVKSTHELPI : 600
SPG : DPTLADVDRQFWVCDSLLVTPVLEPNVEYVQGVFPGDNSTVWYDWYNHTEIVRQYNENVTLYAPLEHINV : 833

      *           860           *           880           *           900           *
SSG : YLREGSIIPLEGDEIVYG-----ETSFKRYDNAEITSS : 634
SPG : AIRGGSVLPMQQPSLTTYESRQNPFNLLVALDRDGSATGELYLDDGVSIELNATLSVSFTFSDGVLSAVP : 903

      920           *           940           *           960           *
SSG : SNEIKFSREIYVSKLTITSEKEVSKIIVDDSKEIQVEKTMQNTYVAKINOKIRGKINLE----- : 693
SPG : TGSYEVSQPLANVTILGLTESPSSITLNGQNVSFPQYSNDTELLITLQNITSSGAFANSWNLTL : 969

```

Fig. 2-12. Alignment of *Sulforobus solfataricus* and *S. pombe* α -glucosidase. The characters with black background are showing identical residues. The gaps over 10 amino acids are indicated by wavy underline. Abbreviations: SSG, *S. solfataricus* α -glucosidase; SPG, *S. pombe* α -glucosidase.

```

*      20      *      40      *      60      *      80
SusII : MAAVAAVAARRRRSWTGVVLAFLGVCLGLTLAVDRSNFKTCEESSFCKRQRSIRPGQSPYRALLDLSLQLGPDTLTIHLIN : 80
HomoII : MAAVAAVAARRRRSWASHVLAFLGVCLGITLAVDRSNFKTCEESSFCKRQRSIRPGLSPYRALLDLSLQLGPDSLTVHLIH : 80
MusII : MAAIAVAARRRRSWLSVLAFLGVCLGITLAVDRSNFKTCEESSFCKRQRSIRPGLSPYRALLDTLQLGPDALTIVHLIH : 80
SPG : -----MMISTAYQSLFLTALFSAISIAVGNVYQTLNVIIGDRNVTIPTNGHLPQRLSVVDPYRQVNVCOGYQAVNISESQ : 72
      L L L I S Y G

*      100     *      120     *      140     *      160
SusII : EVTKVLLVLELQGLQKNMTRIRIRIDELEPRRPRYRVPDVLVAEPPTARLSVSGQDDNSVEVTVAEGPYKIILTARPFRLDL : 160
HomoII : EVTKVLLVLELQGLQKNMTRFRIRIDELEPRRPRYRVPDVLVADPPIARLSVSGRDENSVELTMAEGPYKIILTARPFRLDL : 160
MusII : EVTKVLLVLELQGLQKNMTRIRIRIDELEPRRPRYRVPDVLVADPPTARLSVSGRDDNSVELTVAEGPYKIILTARPFRLDL : 160
SPG : NGVTAYLALLGEPCYAYGTDYPLLFLLNVTYEEADRVHISIKDANNTQFQFTSRKD-----LWDAEFLYSPS : 137
      L L T L L P

*      180     *      200     *      220     *      240
SusII : LEDRSLLLSVNARGLLNFEHQRAPRVRSQ-----GSKDPAEGDGAQPEEAPGDGDKPPEEIQGKA : 218
HomoII : LEDRSLLLSVNARGLLNFEHQRAPRVRSQ-----GSKDPAEGDGAQPEETPRDGDKPEETQGKA : 218
MusII : LEDRSLLLSVNARGLLMAFEHQRAPRVRFSDKVSALGSLVWDKIKNLFQRQESKDPAEGNGAQPEATPGDGDKPEETQEKA : 240
SPG : YNNTNLLYNFNSYN-ANFEHFWVTRKSDG----- : 164
      LL FE

*      260     *      280     *      300     *      320
SusII : EKDEPGAWBETFKTHSDSKPYGPTSVGLDFSLPGMEHVYVGIPEHADSLRLKLVTEGGDPYRLYNLDFVQYELYNPMALYGS : 298
HomoII : EKDEPGAWBETFKTHSDSKPYGPMVSVGLDFSLPGMEHVYVGIPEHADNLRRLKLVTEGGEPYRLYNLDFVQYELYNPMALYGS : 298
MusII : EKDEPGAWBETFKTHSDSKPYGPTSVGLDFSLPGMEHVYVGIPEHADSLRLKLVTEGGEPYRLYNLDFVQYELNPMALYGS : 320
SPG : -----EVLFDTRGQKLVFEDQYIEITTNMVENYNLYGLAETIHGLRLGNLNRTRTFWANDEASVPDQNMVYGSHPYYLE : 236
      E F T L YG E LRL Y

*      340     *      360     *      380     *      400
SusII : VPVLLAHSFHRDLGIFWLNAEETWVDISSNTAGKTLFGKMLDYLQSGETPQTDVWRWMSSEGIIDVFLLLC--PSVFDVF : 376
HomoII : VPVLLAHNPHRDLGIFWLNAEETWVDISSNTAGKTLFGKMDYLQSGETPQTDVWRWMSSETGIIDVFLLLC--PSISDFV : 376
MusII : VPVLLAHSFHRDLGIFWLNAEETWVDISSNTAGKTLFGKMLDYLQSGETPQTDVWRWMSSEGIIDVFLMLC--PSVFDVF : 398
SPG : QRYKADGINSTLNETTYTSSSHGVLMLTANGMDVLRQDYLYQYRMIGG-----VIDLFVYSGSTESPKETV : 302
      N L Y G ID F G S

*      420     *      440     *      460     *      480
SusII : ROYASLTGCTQALPPLFSLGYPHQRWNYRDEADVLEVDGDFDDHNLPCDVIWLDIEHADGKRYFTWDPSPRFQP----- : 449
HomoII : ROYASLTGCTQALPPLFSLGYPHQRWNYRDEADVLEVDGDFDDHNLPCDVIWLDIEHADGKRYFTWDPSPRFQP----- : 449
MusII : ROYASLTGCTQALPPLFSLGYPHQRWNYRDEADVLEVDGDFDDHNLPCDVIWLDIEHADGKRYFTWDPSPRFQP----- : 471
SPG : KQFVQSTCKPAMHQYWTLLGYHSCRWGTNITEIMDVRQNYIDADIPVETPFSDDIDYMEKYRDFTVDPVSYSKSDMQTFFS : 382
      Q G A LGYH RW Y V Q D P W DI R FT DP

*      500     *      520     *      540     *      560
SusII : --RTMLEHLASKRRRKLVAIVDPHIKVDSSYRVHEELQNLGLYVKTRDGSDEYEGWCWPGGAASYPDFFTNPKMRAWWADMFR- : 526
HomoII : --RTMLERLASKRRRKLVAIVDPHIKVDSSYRVHEELRNGLYVKTRDGSDEYEGWCWPGGASGYPDFFTNPTMRAWWANMFS- : 526
MusII : --LNMLEHLASKRRRKLVAIVDPHIKVDSSYRVHEELRNHGLYVKTRDGSDEYEGWCWPGGASASYPDFFTNPRMRAWWSNMFS- : 548
SPG : DLVSNHQHYVPIIDAAYANPNYHTDSSYPYAGVEKIDFLKPNPNSIYIGAVWPGFTAFPDFFTNPDVVVDYWKDCLIN : 462
      P D Y K GS Y G WPG PDFFTN W

*      580     *      600     *      620     *      640
SusII : ---FENYEGSSSNLYVWDMNEPSVFNGL----- : 551
HomoII : ---YDNYEGSAPNLFVWDMNEPSVFNGL----- : 551
MusII : ---FDNYEGSAPNLYVWDMNEPSVFNGL----- : 573
SPG : LTYAFGSNGTVPFSGIWTDMNEPSSFCVGS CGSAMIDLNPAPLVLGISKQYSIPEGFNVSNTVEYSSAYSASLSNYATA : 542
      G W DMNEPS F

*      660     *      680     *      700     *      720
SusII : -----PEVTMLKDAQHYGCWEHRDLHNIYGFYVHMATADGLVLRSG : 592
HomoII : -----PEVTMLKDAQHYGCWEHRDVHNIYGLYVHMATADGLRQRSG : 592
MusII : -----PEVTMLKDAVHYGCWEHRDIHNIYGLYVHMATADGLIQRSG : 614
SPG : TSSVFQIVSPTATPLGLKPDYNINWPPYAINNEQGNHDIANHIVSPNATHTHDTQRYDIFNMYCYGETKVSYAALTIQISP : 622
      A G D N YG L S

*      740     *      760     *      780     *      800
SusII : GVERPFVLSRAFFAGSQRFGAVWTGDNITAEWDHLKISIPMCLSLGLVGVSFCCGADVGGFFKNPEPELLVVRWYQMGAYQPF : 672
HomoII : GMERPFVLSRAFFAGSQRFGAVWTGDNITAEWDHLKISIPMCLSLGLVGLSFCGADVGGFFKNPEPELLVVRWYQMGAYQPF : 672
MusII : GIERPFVLSRAFFAGSQRFGAVWTGDNITAEWDHLKISIPMCLSLALVGLSFCGADVGGFFKNPEPELLVVRWYQMGAYQPF : 694
SPG : -NERPFILSRSTFLGSGVYCAHWLGDNHSLSNMNMFSTSGMIVFNMMGIPMVGADVCGFLGDSDEELCSRWMAMGAFSPF : 701
      ERPF L R F GS GA W GDN W SI G GADV GF EL RW MGA PF

```

```

*           820           *           840           *           860           *           880
SusII : FRFAHLDTGRRREPWLLPTQYQDMIRDALGQRYSLLEFWYTLFYQAHREGVPVMRAWVHYPQDVTTFSIDDEFLLGDAL : 752
HomoII : FRFAHLDTGRRREPWLLPSQHNDIRDALGQRYSLLEFWYTLLLYQAHREGIPVMRPLWVQYPQDVTTFNIDDOYLLGDAL : 752
MusII : FRFAHLDTGRRREPWLLASQYQDARDALFQRYSLLEFWYTLFYQAHKEGFPVMRPLWVQYPEDMSTFSIEDQFMLGDAL : 774
SPG : YRNHNNIYQISQEPYTWS-SVAEASRRAMYIRYSLLEFWYTIMAKASQDGTPALRALFWEFFPNDPTLADVDRQFMVGDSL : 780
      R H           EP           R A           RYSLLE WYT           A           G P           R L V           P D           GD L

*           900           *           920           *           940           *           960
SusII : LVHPVTDSEAHGVQVYLPGQG-EVWYDVHSYQKYHG--PQTLYLPVTSSIPVFQRCGTIVPRWMRVRRSSDCMKDDPIT : 829
HomoII : LVHPVSDSGAHGVQVYLPGQG-EVWYDIQSYQKHHG--PQTLYLPVTSSIPVFQRCGTIVPRWMRVRRSSECMKDDPIT : 829
MusII : LIHPVSDAGAHGVQVYLPGQE-EVWYDIQSYQKHHG--PQTLYLPVTSSIPVFQRCGTIVPRWMRVRRSSDCMKDDPIT : 851
SPG : LVTPVLEPNVEYVQVFPGDNSTVWYDWYNHTEIVRQYNENVTLYAPLEHINVAIRGGSVLPMQQPSLTTYESRQN-EFN : 859
      L PV           VQ PG           VWYD           L L I V RGG P           P

*           980           *           1000           *           1020           *           1040
SusII : LFVALSPQCTAQGELFLDDGHTFNYQTGFEFLRRSFSGNTLVSSSADSKGHFETPVWIERVVIICAGKPAVVLQTKG : 909
HomoII : LFVALSPQCTAQGELFLDDGYTFNYQTREFLRRSFSGNTLVSSSADPECHFETPIWIERVVIICAGKPAAVVLQTKG : 909
MusII : LFVALSPQCTAQGELFLDDGHTFNYQTRHEFFLRRSFSGSTLVSSSADPKCHLETPIWIERVVIICAGKPAAVVLQTKG : 931
SPG : LLVALDRDCSATGELYLDDGVSIELN---ATLSVSTFSDGVLS---AVPTGSYEVSQLANVTLILGTESPSSITLNGQ : 933
      L VAL G A GEL LDDG           L F FS L A G E V I G

*           1060           *
SusII : SPESRLSFQHDPETSVLILRKPGVN--VASDWSIHLR : 944
HomoII : SPESRLSFQHDPETSVLVLRKPGVIN--VASDWSIHLR : 944
MusII : SPESRLSFQHDPETSVLILRKPGVS--VASDWSIHLR : 966
SPG : NVSSFQYSNDTELLLITGLQNITSSGAFANSWNLTL-- : 969
      S E L A W L

```

Fig. 2-13. Alignment of glucosidase II localized in endoplasmic reticulum. The characters with black background show identical residue. Abbreviations: SusII, *Sus scrofa* (pig) glucosidase II; HomoII, *Homo sapiens* (human) glucosidase II; Mus II, *Mus musculus* (house mouse) glucosidase II, SPG, *S. pombe* α -glucosidase.

AA73.....74.....75.....76.....77.....78
PHD	KASQDGTALRALFVEFPNDPTLADVDRQFMVGDSSLVTPVLEPNVEYVQGVFPGDNSTV
SUB	HHH.LLL.....LLLLLL.....EEE.....EEEE.LLLL.....EEEE.LLL..E
	cβ1 cβ2 cβ3
AA79.....80.....81.....82.....83.....84
PHD	WYDWNHTEIVRQYNENVTLYAPLEHINVAIRGGSVLPMPQPSLTITYESRQNPFNLLVAL
SUB	EEEE..L.....LLL.EEEE.LLLL.EEEE.LL.....LLLLLLL.....LL..EEEE
	cβ4 cβ4' cβ5 cβ6 cβ7 cβ8
AA85.....86.....87.....88.....89.....90
PHD	DRDGSATGELYLDGVSIELNATLSVSTFSDGVLSAVPTGSYEVSQPLANVTILGLTES
SUB	.LLL.LL.....L.EEEEEEEE.LL.EEEE.....EEEEEEE.LL
	cβ9 cβ10 cβ11 cβ12
AA91.....92.....93.....94.....
PHD	PSSITLNGQNVSSFQYSNDTEELLITGLQNTSSGAFANSWNLTL
SUB	L.EEEE..LL..EE.....EEEE.....LLL..EEE..L
	cβ13 cβ13' cβ13" cβ14

Fig. 2-14. Predicted secondary structure of *S. pombe* α -glucosidase.

The prediction of secondary structure was done by PHD, predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein>) The boundaries were Ser 268 at the C-end of Region N and Gly 269 at the N-end of Region A, and Thr 742 at the C-end of Region A and Leu 743 at the N-end of Region C.

Abbreviations, H=Helix, E=Extended (sheet), blank=rest (loop), L=loop, AA=amino acid sequence, PHD=Profile network prediction HeiDelberg, SUB=a subset of the prediction, for all residues with an expected accuracy > 82%, "." means that no prediction is made for this residue.

第3章 *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase の異種宿主での発現

第1節 緒言

本章では前章で得た cDNA を用いて *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase の異種宿主での発現を行った。*S. pombe* α -glucosidase の機能と構造の相関関係を知るためにはタンパク質工学的な手法が必要になる。その第一段階として発現系の構築が必要である。

これまで α -glucosidase family II に属する酵素ではいくつかの酵素で異種宿主発現が行われている。*Schwanniomyces occidentalis* α -glucosidase (glucoamylase)⁸³⁾、*Candida tsukubaensis* α -glucosidase が *Saccharomyces cerevisiae*^{28,87)}、大麦 α -glucosidase が *Pichia pastoris*^{121, 122)} で、*Mucor javanicus* α -glucosidase²⁶⁾ が大腸菌で発現されている。またヒト酸性 α -glucosidase は COS 細胞や繊維芽細胞での一過性発現が行われている。*S. occidentalis* α -glucosidase (glucoamylase) は遺伝子のクローニング後、*GAL1* プロモーター下で *S. cerevisiae* で発現が行われており、組み換え酵素は培養液中に分泌されている。その性質の一部が決められている⁸³⁾。翻訳後の糖鎖による修飾の違いから *S. cerevisiae* での組み換え酵素の方の分子量が小さいほかは *S. occidentalis* から精製された酵素とほぼ同じ性質を示している。

C. tsukubaensis α -glucosidase では遺伝子のクローニングを *S. cerevisiae* の形質転換体で行っている²⁸⁾。*C. tsukubaensis* ゲノミックライブラリーを *S. cerevisiae* で作製し dextrin やデンプンを資化できる形質転換体を選択した。その結果、得られた遺伝子が α -glucosidase であり、また *C. tsukubaensis* α -glucosidase のプロモーターが *S. cerevisiae* で動くことをわかっている⁸⁷⁾。この組み換え酵素も培養液中に分泌される。

大麦 α -glucosidase の発現は *Pichia pastoris* の発現系で行われている。 α -glucosidase family II の酵素で最初で唯一の *P. pastoris* での発現である¹²¹⁾。*S. cerevisiae* α -factor の分泌ペプチドと融合タンパク質を作ることによって菌体外への分泌に成功している。また培養をフラスコではなくファーメンターを使うことで分泌量を 13 倍までに増加させている¹²²⁾。

M. javanicus α -glucosidase の大腸菌での発現はその発現量が非常に低く、maltose、soluble starch を基質にそれぞれ 0.014、0.019 U/mg 粗抽出液と非常に微量な発現しか得られていない²⁶⁾。

ヒト酸性 α -glucosidase ではその遺伝的欠損症である Glycogen storage disease II (GSDII) の研究により α -glucosidase family II のなかで最も研究の進んでいる酵素である。遺伝的変異により生じたアミノ酸置換を実際に *in vitro* で生じさせ COS 細胞、繊維芽細胞をもちいて一過性の発現を行っている。その発現、細胞内輸送などを調べている例がいくつかあるが、酵素化学的な報告は見つからない。

S. cerevisiae はその遺伝学的、生理学的背景が良く知られており異種タンパク質生産の格好の宿主の 1 つである。酵母は高等真核生物と同様の特質を備えているうえに細菌と同様に培養が容易である。真核生物である酵母は細菌にはないグルコシル化のようなタンパク

質の翻訳後修飾を行うことができる。また酵母形質転換や遺伝子操作の技術が確立していること、遺伝子制御に関する知見が豊富であること、人体には無害であるということも異種タンパク質生産に利用されるための有利な要因である。

しかし *S. cerevisiae* での異種宿主発現の場合、異種タンパク質は実際よりも過度のグリコシル化をうけてしまう。*P. pasotris* を宿主とした異種タンパク質は、*S. cerevisiae* のそれと比べて過度のグリコシル化を受けないことが特徴である^{123, 124})。 *S. cerevisiae* の糖タンパク質によく見られる N 型糖鎖ではおよそ 50-150 の mannose 残基からなる糖鎖を含むのに対して、*P. pasotris* のそれは平均 8-14、長くても約 30 の mannose 残基の糖鎖である。最近では *P. pasotris* を用いた異種タンパク質の高発現系の報告が数多くある¹²⁴)。この菌の特徴は炭素源をメタノールに切り替えるとメタノールを資化する代謝系が強力に誘導されることである。例えば Alcohol oxidase (AOX1) プロモーターを用いると強力な異種タンパク質の誘導発現がなされる。また高密度培養ができることもこの菌の異種タンパク質の発現に有利な材料である。

S. pombe α -glucosidase の異種宿主発現を *S. cerevisiae*、*P. pasotris* を用いて行う。また発現した組み換え酵素を精製し、その酵素化学的性質、基質特異性について検討する。

第2節 実験材料および方法

(1) 試薬

制限酵素、修飾酵素には LIFETECHNOLOGIES 社製のものを用いた。glucose、maltose、*p*-nitrophenyl maltoside (ナカライテスク)、maltotriose (和光純薬)、nigerose、maltotetraose、maltopentaose (日本食品加工)、isomaltose、phenyl α -glucoside (Sigma) をそれぞれ市販のものを使用した。maltose については市販品 (ナカライテスク) を再結晶を数回繰り返したものを使用した。kojibiose にはソバ α -glucosidase の糖転移反応を利用して調製したものを使用した。各種遺伝子工学用試薬は第 2 章に示した。その他特に明記のないものは市販品を使用した。

(2) 培地

YPD 1% yeast extract (Difco)、2% polypeptone (日本製薬)、2% glucose
SC-ura 2% Raffinose、0.67% Bacto yeast nitrogen base (Difco)、0.002% adenine、0.001% Met、0.002% Arg、0.002% His、0.003% Tyr、0.004% Lys、0.004% Trp、0.005% Thr、0.006% Ile、0.006% Leu、0.006% Phe
BMGY 1% yeast extract、2% Bactopeptone (Difco)、100 mM potassium phosphate buffer (pH6.0)、1.34% Bacto yeast nitrogen base、 4×10^{-5} % biotin、1% glycerol
BMMY 1% yeast extract、2% Bactopeptone (Difco)、100 mM potassium phosphate buffer (pH6.0)、

1.34% Bacto yeast nitrogen base, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 0.5% methanol

(3) オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドの合成を北海道システムサイエンスに外注した。乾固してあるものを蒸留水で溶解して、20 μ M 溶液として保存した。

(4) *S. cerevisiae* での発現

(4)-1. 発現ベクターの構築 (Fig. 3-1)

S. cerevisiae での発現ベクターの構築の概要を Fig. 3-1 に示した。DNA 操作に関しては常法に従った。第 2 章で得られた cDNA の 5'-UTR、3'-UTR の一部 (各 6、84 bp) と ORF を *S. cerevisiae* 発現ベクター pYES2 (Invitrogen) の *GAL1* promoter 下流に挿入した。まず 5'-UTR 上に *Hind*III 認識部位を導入するために *Hind*III 認識配列を含んだミスマッチプライマー-MHd3 (sense; 5'-TTTAAGCTTAAACGATGATGATTTCTACT-3', position from 1,024 to 1,051 nt in the cDNA) を用いて PCR を行った。アンチセンスプライマーには第 2 章で用いた P32 (5'-AAGTCIGGGAAIGCIGIGAAICCGGCCA-3', position from 2,349 to 2,377 nt in the cDNA) を用いた。得られた増幅断片を *Hind*III、*Bgl*II、で消化し、Fragment 1 (386 bp) とした。この Fragment 1 のシーケンスを行い、鋳型 DNA と同一であることを確認した。次に cDNA の *Bgl*II から *Xho*I までを切り出しこれを Fragment 2 (2,616 bp) とした。Fragment 1 と Fragment 2 を pYES2 のマルチクローニングサイトの *Hind*III と *Xho*I の間に挿入した。この発現プラスミドベクターを SPG/pYES と名付けた。

(4)-2. *S. cerevisiae* の形質転換と組換えタンパク質の誘導

S. cerevisiae の形質転換をリチウム法¹²⁵⁾の変法¹²⁶⁾により行った。選択をウラシル要求性により行った。組み換えタンパク質の誘導を以下のように行った。SC-ura 培地に形質転換体を接種し振盪培養を行った後、600 nm の吸光度が 1-1.5 になったところで galactose を終濃度 2% になるように加え、組換えタンパク質の誘導を行った。

(4)-3. 菌体の破碎

酵母菌体の破碎にはガラスビーズを用いた。菌体を概ね 3 倍容量の抽出用緩衝液 (pH 4.5; 50 mM sodium acetate buffer, pH4.5, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatin A, 1 μ g/ml leupeptin) に懸濁後、等容量のガラスビーズ (425-600 microns, Sigma) を加え低温室内で vortex ミキサーを用いて激しく攪拌した。1 分攪拌後、1 分氷上で冷やすという操作を 15-20 回繰り返して破碎を行った。未破碎菌体、細胞壁などの不溶性画分を遠心分離 (15,000 \times g, 20 min, 4 $^{\circ}$ C) により除き、上清を粗抽出液とした。

(5) *P. pastoris* での発現

(5)-1 発現ベクターの構築

構築の概要を Fig. 3-2 に示した。

S. cerevisiae での発現に用いた発現プラスミド SPG/pYES の挿入断片を *Hind* III、*Xho* I サイトで消化後回収し、pPICZA の *Eco*RI、*Xho*I 部位を利用して挿入した。まずベクターを調製した。ベクター-pPICZA を *Eco*RI 消化し平滑末端処理後 *Xho*I 消化、エタノール沈殿で精製した。次に挿入断片を調製した。SPG/pYES を *Hind*III で消化し平滑末端処理したものを *Xho*I で消化したものをアガロースゲル電気泳動により精製しこれを挿入断片とした。平滑末端処理には、*E. coli* DNA polymerase I large fragment (Klenow, LIFETECHNOLOGY)を用いた。ベクターと挿入断片を連結しこれを SPG/pPICZA とした。

(5)-2. *P. pastoris* の形質転換と組み換えタンパク質の誘導

P. pastoris の形質転換を *Pichia* Expression Kit (Invitrogen) のプロトコールに準じて電気穿孔法により行った。発現ベクター約 20 μ g を *Sac*I により消化し直鎖状にして形質転換に用いた。選択を抗生物質 Zeocin 耐性により行った。PCR により形質転換の確認を行った。そのための鋳型 DNA を以下のように調製した。パッチより菌体を少量かき取り 200 μ l の抽出用緩衝液 (10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1% SDS) に懸濁した。等量のガラスビーズを加え 1 分間 vortex により激しく攪拌した。そこへフェノール/クロロフォルムを 200 μ l 加え、1 分間 vortex により激しく攪拌し遠心分離により水相を回収した。それを再びフェノール/クロロフォルム処理、エタノール沈殿してこれを鋳型とした。5' AOX プライマー (5'-gactggttccaattgacaagc-3') と cDNA 内部のプライマー (5'-ggggctagcttcattattagcccaaaagg-3'; Nos. 1675-1703 nt in the cDNA, antisense) にて PCR (94 $^{\circ}$ C, 30 sec, 52 $^{\circ}$ C, 30 sec, 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 25 cycle) をして、増幅断片を確認した。

組み換えタンパク質の誘導は以下のように行った。BMGY 培地に形質転換体を接種し、30 $^{\circ}$ C で振盪培養を行い、菌体濃度が目的の濁度に達した後、遠心分離 (1,500 x g, 25 $^{\circ}$ C, 5 min) により菌体を回収し培地を BMMY 培地に換えて培養を続けることで組み換えタンパク質の誘導を行った。methanol を 24 時間ごとに 0.5% になるように添加した。

(6) カラムクロマトグラフィー

DEAE-Sepharose CL-6B、Sepharose 6B (Pharmacia)、Bio-Gel P-200 (BIO-RAD) を定法により再生し、所定の緩衝液による平衡化を行った後に使用した。

(7) 活性測定および酵素単位

α -Glucosidase 活性測定を以下の 500 μ l の反応系とした。

200 μ l of 0.1 M sodium acetate buffer (pH4.5)

100 μ l of enzyme solution

200 μ l of 0.5% maltose

氷浴中に冷却しておいた試験管に緩衝液と酵素液を加え、35 $^{\circ}$ C で 3 分間保持した後、基質添加により反応を開始した。酵素の希釈には 0.05% Triton X-100 を含む 50 mM sodium acetate buffer (pH4.5) により行った。一定時間反応させた後 1 ml の 2M Tris-HCl (pH7.0) を

加えることにより反応を停止した。遊離した glucose 量を Tris-glucose oxidase-peroxidase 法 (グルコース AR-II、和光純薬工業) により定量した。すなわち、酵素反応を停止した反応系に Glucostat 試薬を 200 μ l 加え、1 時間、35°C で保持し発色させた後、505 nm の吸光度を測定し検量線と比較することにより定量した。

1 分間に 1 μ mol の基質を加水分解する酵素量を 1 unit の酵素単位とした。

(8) タンパク質の定量

タンパク質の定量を、Bradford 法¹²⁷⁾もしくは UV 法で行った。Bradford 法では bovine serum albumin をスタンダードとし算出した。UV 法では 280 nm の吸光度を測定し比吸光係数 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ を 10 と仮定して算出した。精製酵素標品については比吸光係数をその乾燥重量から求めた。

(9) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を Laemmli の方法¹²⁸⁾に従い行った。試料に試料用緩衝液 (4% SDS, 0.02% BPB, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl, pH6.8) を等量加え 95 °C で 5 分間処理し、これを泳動用試料とした。泳動を Mini-Protean II もしくは Mini-Protean III (BIO-RAD) を用いて、ゲル 1 枚あたり 15 mA (濃縮ゲル中)、25 mA (分離ゲル中) の定電流でおこなった。泳動後のタンパク染色を Rapid CBB KANTO (関東化学) を用いて行い、脱色には 10% acetic acid、15% methanol 溶液を用いた。

(10) N 末端アミノ酸配列の解析

S. cerevisiae 組み換え酵素の PVDF 膜 (Problott; ABI, Perkin Elmer) へのタンパク質の転写を以下のように行った。(9)に従い SDS-PAGE を行った後のゲルを超純水で 5 分間洗浄し、転写バッファー (30 mM Tris, 17 mM boric acid, 0.055% SDS, 20% methanol) で平衡化した。PVDF 膜を methanol で活性化させた後、転写バッファーで平衡化した。転写装置にはセミドライ型トランスブロットング装置 (マリソル社) を用い、陰極側から転写バッファーに浸したろ紙 (chromatography paper 17chr; Whatman) 4 枚、ゲル、PVDF 膜、ろ紙 4 枚を重ね、25 mA/ゲル (40 cm²) の条件で 90 分間転写した。転写後の PVDF 膜を超純水、50 mM NaCl、超純水の順で洗浄後、CBB G-250 で染色し、50% methanol で脱色した。PVDF 膜上で染色された目的のバンドを切り出し、50 mM NaCl で 1 回、超純水で 3 回洗浄後、風乾した。

P. pastoris 組み換え酵素は ProSorb (PE-バイオシステムズ) を用いて、タンパク質を PVDF 膜に吸着させた。操作は添付のプロトコールに従った。

両組み換え酵素の膜転写物を用いた N 末端アミノ酸配列の解析を ABI477A protein sequenser/120A PHT analyzer system (PE-バイオシステムズ) を使用して行った。

(11) 全糖量の測定

酵素の糖含量を phenol-硫酸法¹²⁹⁾により mannose を標準糖として測定した。反応液の総量

を 1.4 ml とした。すなわち 200 μ l の試料溶液 (8-19 μ g のタンパク質を含む) に対し 200 μ l の 5% phenol を加え混合後、1 ml の濃硫酸を加えることで反応させた。酵素溶液をあらかじめ脱塩水に対して十分に透析し、測定に使用した。

(12) 脱糖鎖処理

1 mg の糖タンパク質に対し、Endoglycosidase F (*N*-glycosidase F-free, Boeringer Mannheim) を 2 unit 加え、50 mM sodium acetate buffer, pH 4.5 中で 37 $^{\circ}$ C に一晩保持し脱糖鎖処理を行った。

第3節 実験結果

第1項 *Saccharomyces cerevisiae* での *S. pombe* α -glucosidase の発現

1. *S. cerevisiae* の形質転換と組み換え酵素の誘導

まず Fig. 3-1 の手順により *S. cerevisiae* *GAL1* プロモーター下流に *S. pombe* α -glucosidase cDNA ORF を挿入し発現プラスミド SPG/pYES を作製した。これをリチウム法により *S. cerevisiae* に導入し、uracil 要求性により形質転換体を選択した。次に組換えタンパク質の誘導を行った。まず前培養を行った。2% raffinose を炭素源として用いた SC-ura 培地 (SC-ura) 20 ml で一晩 30 °C で振盪培養を行い、これを前培養液とした。次に新しい SC-ura 100 ml に対し OD₆₀₀ が 0.2 になるようにこの前培養液を植え継ぎ、本培養を開始した。30 °C で振盪培養を行い、約 6 時間後に OD₆₀₀ が約 1 になったところで galactose を終濃度 2% になるように添加し、この後 48 時間 30 °C で振盪培養を続けることで誘導を行った。48 時間後の培養液の OD₆₀₀ は 4.8 であった。遠心分離により (3,800 x g, 5 min, 4 °C) により集菌を行った。氷冷水により菌体を一度洗った後に、抽出用緩衝液 (50 mM sodium acetate buffer, pH4.5, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatine A, 1 μ g/ml leupeptine) に懸濁し、ガラスビーズにより菌体の破碎を行った。粗抽出液には比活性 4.33 U/mg の maltase 活性を検出した。このときのタンパク質の定量を Bradford 法により行った。培養上清には maltase 活性は検出されなかった。また同条件 (SC+ura) で培養、破碎を行った発現プラスミドをもたない *S. cerevisiae* には菌体内外ともに maltase 活性は検出されなかった。よって *S. cerevisiae* が組み換え *S. pombe* α -glucosidase を発現できるものと判断した。しかしこのとき上記条件での培養では培養上清の pH が 2 近くまで低下していた。そこで仮に組換え酵素が培地上清に分泌されていても失活していることが予想できた。

次に SC-ura に MES-NaOH (pH 6) を終濃度 0.1 M 加えることで pH の低下を防止した。この培地で培養、組換え酵素の誘導を行い、maltase 活性を培地上清、菌体抽出液、および菌体を直接用いてそれぞれ測定した。菌体、菌体抽出液を次のように調製した。遠心分離 (3,800 x g, 5 min, 4 °C) により集菌した菌体を氷冷水で洗浄後、抽出用緩衝液に懸濁し、これを 2 等分した。一方を懸濁液のまま maltase 活性測定を行い、これを菌体そのものの maltase 活性とした。もう一方をガラスビーズで破碎し、菌体抽出液とした。培養液の OD₆₀₀=1 あたりの各画分の maltase 活性を Table 3-1 にまとめた。培地上清には pH の調整にもかかわらず (培養終了時、pH 5) maltase 活性を検出できなかった。このことから maltase 活性が培地中に検出できないのは pH の低下によるものではないことがわかった。一方、菌体そのものに maltase 活性を検出したことから組換え酵素は菌体表層へ分泌されていることがわかった。粗抽出液の SDS-PAGE を行った。組換え体では分子量 200 kDa 付近に幅の広いバンド

が得られた (Fig. 3-3)。以上のことから *S. pombe* α -glucosidase cDNA を *S. cerevisiae* を宿主とし異種宿主発現できることがわかった。また発現した組換え酵素はペリプラズムに分泌されていると予想できた。

2. *S. cerevisiae* 組み換え酵素の精製

S. pombe α -glucosidase 組換え酵素を *S. cerevisiae* 形質転換体より精製した。

まず前培養を行った。SC-ura 培地 50 ml に対して形質転換体一白金耳を植菌し 30 °C で一晚振盪培養した。次に SC-ura (pH 6) 培地 100 ml に対し前培養液を 5 ml ずつ植え継ぎ本培養を開始した。本培養を 500 ml (坂口フラスコ x 5 本) で行った。12 時間、30°C で振盪培養を行った後、galactose を終濃度 2% 加え、30°C で振盪培養を続け、組換え酵素の誘導を行った。58 時間後に培養を終了し、遠心分離 (3,800 x g, 5 min, 4 °C) により集菌した。このときの OD₆₀₀ は 7.35 であった。氷冷水により菌体を一度洗った後に、抽出用緩衝液 (50 mM sodium acetate buffer, pH4.5, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatine A, 1 μ g/ml leupeptine) に懸濁し、フレンチプレスにより菌体を破碎した。その後、遠心分離 (18,000 x g, 30 min, 4 °C) により上清 30 ml を回収し、これを粗抽出液とした。

次に陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B カラム (ϕ 1.6 x 18 cm, 36ml) に粗抽出液を直接吸着させた。溶出を、0-1 M NaCl 直線濃度勾配により行った (Fig. 3-4)。活性画分 (Fraction Nos. 137-146, 18 ml) を回収し、コロジオンバッグを用いて 50 mM NaCl を含む 50 mM sodium acetate buffer (pH4.5) に対して透析をし、約 1ml まで濃縮した。

これを、あらかじめ 50 mM NaCl を含む 50 mM sodium acetate buffer (pH4.5) で平衡化した Sepharose 6B カラム (ϕ 1.8 x 36 cm, 92 ml) に供しゲル濾過クロマトグラフィーを行った (Fig. 3-5)。このゲル濾過により得られた活性画分 (Fraction Nos. 47-58, 14 ml) を回収し、コロジオンバッグを用いて 0.2 M NaCl を含む 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) に対して透析をし、約 1 ml まで濃縮した。

これを、0.2 M NaCl を含む 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) で平衡化された Bio-Gel P-200 カラム (ϕ 1.5 x 26 cm, 46 ml) に供しゲル濾過クロマトグラフィーを行った (Fig. 3-6)。得られた活性画分 (Fraction Nos. 28-38, 5.6 ml) を回収し、コロジオンバッグを用いて 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) に対して透析をした。

次にこれを 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) で平衡化された DEAE-Sepharose CL-6B カラム (ϕ 1.4 x 9 cm, 14 ml) に吸着させ、陰イオンカラムクロマトグラフィーを行った (Fig. 3-7)。このクロマトグラフィーでの活性画分を集め、次に SDS-PAGE を行った (Fig. 3-3)。その結果、組換え体からの精製酵素は幅の広いバンドを与えた (Fig. 3-3 B, lane 1)。一方、これを Endoglycosidase F (Endo F) を用いて脱糖鎖処理したものでは分子量約 11 万付近にバンドが認められた (Fig. 3-3 B, lane 2)。この結果から組換えタンパク質が糖タンパク質で

あることが予想できた。このとき Endo F 処理により主バンドの他に、唯一分子量 5 万付近にもバンドが出現した。Endo F 処理をしないものにはみられなかったバンドなのでこれが夾雑タンパクなのか否かを調べるためにバンドをエレクトロブロットングにより PVDF 膜へ転写し N 末端のアミノ酸配列を解析した。この結果、約 5 万のバンドの N 末端アミノ酸配列が組換え酵素の N 末端 VGNVY...であることがわかり、何らかの原因により Endo F 処理中に酵素が断片化されたと推察した。これらの判断から精製が完了したと判断し、DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィー活性画分 (Fraction Nos. 54-60) を回収して以降の実験に用いた。全活性 72 U、粗酵素液から約 25 倍に精製された。全過程における回収率は 20%であった。以上の精製過程について得られた結果を Table 3-2 にまとめて示した。

3 *S. cerevisiae* 組み換え酵素の諸性質

3-(1) 比吸光係数

タンパク質を milliQ 水に対して十分透析した後、凍結乾燥した。凍結乾燥標品を秤量した後、0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) で溶解し 280 nm での吸光度を測定し比吸光係数を算出した。比吸光係数は $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 6.58$ であった。

3-(2) 糖含量の測定

組み換え酵素が糖タンパク質であることが予想できたので、糖含量を phenol-硫酸法により測定した。その結果、mannose 換算で 55%の糖が含まれていた。

3-(3) N 末端アミノ酸配列の解析

まず Endo F により脱糖鎖処理した精製酵素を SDS-PAGE により分離しこれをゲルから PVDF 膜へブロットングし、N 末端アミノ酸配列を解析した。その結果 *S. cerevisiae* での組換え酵素は、*S. pombe* 培養上清より精製した酵素 (Native 酵素) より 2 アミノ酸残基 N 末端側でプロセッシングされていた (Fig. 3-8)。すなわち VGNVYQTLNVIGDRNVTIP が解析された。

3-(4) pH 活性曲線

pH 活性曲線を、種々の pH (pH 2.5-7.5) での酵素活性を測定し求めた (Fig. 3-9)。広域緩衝液には McIlvaine 緩衝液を用いた。最適 pH は 4.5 で、Native 酵素と同じ値を示した。

3-(5) pH 安定性

pH 安定性を Britton-Robinson 緩衝液 (pH 2-12) を用いて調べた。まず、酵素溶液 20 μl と各 pH の Britton-Robinson 緩衝液 80 μl を混合し 24 時間、4 $^{\circ}\text{C}$ に放置した。その後、1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) を 300 μl 加え、pH を 4.5 に戻し、残存活性を測定した (Fig 3-9)。その結果、pH 4-8 での安定性が確認できた。Native 酵素は同じ条件で pH 3-8 の範囲で安定である。

3-(6) 温度安定性

温度安定性を以下のように調べた。

まず 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) 280 μ l をあらかじめ各温度 (25、30、33、34、35、37、38、42、45、および 50 $^{\circ}$ C) で 3 分間保持した。これに酵素溶液 20 μ l を加え、そのまま 15 分間その温度で保持した後、氷上へ移し 30 分間放置した。

その後、残存活性を測定したところ、37 $^{\circ}$ C まで安定であることがわかった (Fig. 3-10)。以上の結果は Native 酵素と同じである。しかし組換え酵素が 45 $^{\circ}$ C、15 分間で完全に失活したのに対し Native 酵素は同条件で 40% の残存活性を有している。

3-(7) 基質特異性

S. cerevisiae 組換え酵素の各種基質に対する K_m 、 V の速度論量を測定した。それぞれの基質について基質濃度を变化させ初速度を測定した。 K_m 、 V の速度論量を $1/s - 1/v$ プロットおよび $s - s/v$ プロットにより求めた。maltose に対する速度パラメーターを求めたプロットを Fig. 3-11 に示す。各種基質に対する K_m 、 k_0 を Table 3-3 にまとめた。これから組換え酵素は maltose などの maltooligosaccharide に対して特異性が高いことがわかった。また α -1,2-、 α -1,3-、 α -1,6-結合に対しても作用する。この基質特異性の傾向は Native 酵素と同じである。しかし Native 酵素より K_m は大きい値、 V は小さい値を示したものが多い。

第 2 項 *Pichia pastris* での *S. pombe* α -glucosidase の発現

1. *P. pastris* の形質転換と組み換え酵素の誘導

発現ベクターに pPICZA を用いて cDNA の翻訳領域すべてを挿入した (SPG/pPICZ)。 *S. cerevisiae* での α -glucosidase の発現に使用した発現プラスミド、pYES/SPG のインサート部分を利用した。宿主には *P. pastoris* GS115 を用い遺伝子導入を電気穿孔法により行った。形質転換体のスクリーニングは抗生物質 Zeocin 耐性を用いた。MDH プレート上に作製した形質転換体を無作為に 10 個選択した。開始時の OD₆₀₀ をおよそ 8 として BMMY 2 ml で培養を 48 時間行った。その結果、最大 (SPG/pPICZ 21 によるもの) で、培養上清 0.76 U/ml 培養液、菌体懸濁液で 2.4 U/ml 培養液の maltase 活性を検出した。次に 50 ml の BMMY (200 ml 容三角フラスコを使用) を用い誘導培養を行った。誘導 72 時間目において、maltase 活性は培養上清および菌体懸濁液にそれぞれ約 1 U/ml 培養液および 2.5 U/ml 培養液であった。菌体懸濁液および無細胞抽出液の maltase 活性について調べた。同様に誘導 72 時間後の培養液から遠心分離 (5,500 x g, 4 $^{\circ}$ C, 5 min) により回収した菌体 (使用時まで -80 $^{\circ}$ C で保存) を氷冷水により一度洗い、抽出用緩衝液に懸濁した。この一部をガラスビーズにて破碎した。不溶性画分を遠心分離 (15,000 x g, 20 min, 4 $^{\circ}$ C) により除き、無細胞抽出液とした。菌体懸濁液および無細胞抽出液の maltase 活性を測定した。菌体懸濁液 1 ml あたりの maltase 活性は、菌体懸濁液および無細胞抽出液でそれぞれ 42.8 U/ml 懸濁液、45.1 U/ml 懸濁液であり、ほぼ同程度であった。これは発現した組み換え酵素がほとんど細胞表層まで輸送されていることを示す。

また、培養上清および無細胞抽出液を SDS-PAGE により解析した (Fig. 3-12)。その結果、培養上清および無細胞抽出液いずれにも組換え酵素と思われる約 180 kDa 程度の分子量を示す幅の広いバンドが検出された。

以上より、*S. pombe* α -glucosidase は *P. pastoris* を宿主として発現し、その約 30 % は培養液に分泌されることがわかった。

2. *P. pastoris* 組み換え酵素の精製

S. pombe α -glucosidase 組換え酵素を *P. pastoris* 形質転換体 (SPG/pPICZ 21) 培養上清より精製した。

まず種培養を行った。形質転換体を 2 ml の BMGY 培地に植菌し、30°C で、20 時間振盪培養した。これを、200 μ l ずつ 200 ml の BMGY 培地に植菌した。培養には坂口フラスコを 4 本用い、計 800 ml の BMGY 培地で培養を行った。30°C で 24 時間振盪培養し、OD₆₀₀ が 8.8 になったところで遠心分離 (1,500 x g, 25°C, 5 min) により集菌しその一部を BMMY 誘導培地に移し、組換え酵素の誘導を行った。このとき坂口フラスコ 5 本を用い、計 11 で組換えタンパク質の誘導を行った。BMMY 誘導培地に植え換えた直後の OD₆₀₀ は 3.5 であった。24 時間ごとに 0.5 % になるよう培地に methanol を添加した。102 時間後に培養を終了し、遠心分離 (5,500 x g, 4°C, 5 min) により培養上清を回収した。このときの OD₆₀₀ は 15.8、培養上清の maltase 活性は、全活性 900 U、比活性 11.8 U/mg であった。なお、タンパク質の定量を Bradford 法によって行った。

回収した培養上清 (925 ml) に、あらかじめ -20°C に冷やしておいた 2 倍量の ethanol を攪拌しながら徐々に加え、エタノール沈殿を行った。この操作は -20°C の低温実験室で行った。沈殿を遠心分離 (15,000 x g, 30 min, 4°C) により回収した。得られた沈殿に約 100 ml の溶解用緩衝液 (500 mM sodium acetate buffer, pH 4.5) を加え、一晚攪拌し沈殿を溶解したのち、遠心分離 (15,000 x g, 30 min, 4°C) により上清を回収した。このときの沈殿に再度溶解用緩衝液約 30 ml 加え、攪拌し、遠心分離 (15,000 x g, 30 min, 4°C) により上清を回収した。この得られた 2 つのエタノール沈殿溶解液をそれぞれ 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) に対して透析した。はじめに回収した溶解液に 361 U、再度沈殿を溶解した溶解液に 199 U、計 560 U の maltase 活性を回収した。このときの、比活性は 53.8 U/mg であった。タンパク質の定量を Bradford 法により行った。

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。20 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B カラム (ϕ 1.8 x 30 cm, 76 ml) に供し、吸着させた。0-1 M の NaCl 直線濃度勾配により溶出を行った (Fig. 3-13)。以下すべてのクロマトグラフィー操作では UV 法によりタンパク質を定量した。活性画分 (Fraction No. 111-117, 21 ml) を回収しコロジオンバッグを使って 2 ml にまで濃縮し、50 mM NaCl を含む 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) に対して透析した。

次に、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った。50 mM NaCl を含む 50 mM sodium

acetate buffer (pH 4.5)で平衡化した Sepharose 6B カラム (ϕ 1.6 x 102 cm, 204 ml) に濃縮・透析した酵素溶液を供した (Fig. 3-14)。得られた活性画分 (Fraction No.64-73, 20 ml) を回収し、20 mM sodium acetate buffer (pH 4.5)に対して透析した。

再び、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (2回目) を行った。透析した酵素溶液を 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.5)で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B カラム (ϕ 1.4 x 9 cm, 14 ml) に吸着させた。0-0.6 M の NaCl 直線濃度勾配により溶出を行った (Fig. 3-15)。このとき、タンパク質の溶出パターンは連続した二つのピークとして得られた。活性画分は1つめのピークに含まれ、後半のピークは夾雑タンパクを含むことを SDS-PAGE により確認した。後半のピーク由来の夾雑タンパクを除くため、活性画分の頂点から前半を比活性を指標に回収した (Fraction Nos.98-103, 3 ml)。この精製酵素画分の比活性は 104 U/mg であった。各精製過程について Table 3-4 にまとめた。

この精製酵素画分を SDS-PAGE に供した (Fig. 3-16)。精製酵素のバンドは分子量 17.3 万付近に幅が広いバンドとして確認された。これ以外にタンパク質バンドは認められなかった。精製酵素を Endoglycosidase F を用いて脱糖鎖処理すると、分子量約 11.7 万付近にバンドが確認された。この分子量の減少は糖鎖除去によるものだといえる。このことから組換えタンパク質が糖タンパク質であることが予想できる。またここで示された SDS-PAGE による解析において分子量約 5.5 万を示すバンドは、*S. pombe* からの精製酵素標品および、*S. cerevisiae* での組換え酵素精製標品においても観察されている。*S. cerevisiae* での組換え酵素では、この約 5.5 万ペプチドの N 末端アミノ酸解析が行われている。組換え酵素と同じ N 末端配列を持つことが確認され、脱糖鎖処理中の酵素の断片化と推測されている。*P. pastoris* 培養上清からの本精製標品においては、夾雑タンパク質、酵素の断片化との確認はしなかったが、同様の理由により酵素タンパク質が脱糖鎖処理中に断片化したものと判断した。以上より、本精製標品は電気泳動的に単一であり、これを酵素標品として以下の実験に用いた。

3. *P. pastris* 組換え酵素の諸性質

3-(1) N 末端アミノ酸配列の解析

PVDF 膜への吸着を ProSorb (PE-バイオシステムズ) を用いて行い、組換え酵素の N 末端アミノ酸配列を解析した。その結果、Native 酵素の N 末端配列と同じアミノ酸配列 N V Y Q T L N V I G D R N V T I P が解析された。すなわち Native 酵素と同じ位置 (第 24 残基-第 25 残基間) でシグナル配列が除去されていることがわかった (Fig. 3-8)。

3-(2) 比吸光係数

タンパク質を milliQ 水に対して十分透析した後、凍結乾燥した。凍結乾燥標品を秤量した後、0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) で溶解し 280 nm での吸光度を測定し比吸光係数を算出した。比吸光係数は $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2.46$ であった。

3-(3) 糖含量の測定

組み換え酵素が糖タンパク質であることが予想できたので、糖含量を phenol-硫酸法により測定した。その結果、18.7 μg の酵素に mannose 換算で 13.8 μg の糖が含まれていた。組み換え酵素の糖含量は 74% であることがわかった。

3-(4) pH 活性曲線

種々の pH における maltase 活性を測定した。広域緩衝液には、McIlvaine 緩衝液を用いた。その結果、最適 pH は 4.5 であった (Fig. 3-17)。これは Native 酵素と *S. cerevisiae* 組換え酵素の値と一致する。

3-(5) pH 安定性

組換え酵素の pH に対する安定性を調べた。広域緩衝液には、Britton-Robinson 緩衝液 (pH 2.5-12) を用いた。酵素溶液 (0.60 U/ml, 0.05% Triton X-100 を含む) 20 μl と各 pH の Britton-Robinson buffer 80 μl とを合わせ 4°C に静置した。24 時間後、1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) を 200 μl 加え、pH を 4.5 に戻し、それぞれの残存活性を測定した (Fig. 3-17)。その結果、pH 3.6-8 の範囲で安定であった。同様の条件で Native 酵素は pH 3-8、*S. cerevisiae* 組換え酵素は pH 4-8 で安定である。

3-(6) 温度安定性

種々の温度で処理することで、組換え酵素の温度に対する安定性を調べた。まず、20 μl の酵素溶液 (0.60 U/ml) と 280 μl の 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) を混合し、各温度に保持した。15 分後、直ちに氷上に移し 30 分間静置した。その後、残存活性を測定した。その結果、37°C まで活性の低下がみられなかった (Fig. 3-18)。同様の条件で Native 酵素、*S. cerevisiae* 組換え酵素は 37°C まで安定である。ただし、45°C において、Native 酵素は 40%、*S. cerevisiae* 組換え酵素は完全に失活したのに対して、本酵素は 18% の残存活性を有した。

3-(7) 基質特異性

P. pastris 組換え酵素の各種基質に対する K_m 、 V の速度論量を測定した。それぞれの基質について基質濃度を変化させ初速度を測定した。 K_m 、 V の速度論量を $1/s - 1/v$ プロットおよび $s - s/v$ プロットにより求めた。maltose に対する速度パラメーターを求めたプロットを Fig. 3-19 に示す。各種基質に対する K_m 、 k_0 を Table 3-3 にまとめた。これから組換え酵素は maltose などの maltooligosaccharide に対して特異性が高いことがわかった。また α -1,2-、 α -1,3-、 α -1,6-結合に対しても作用する。この基質特異性の傾向は Native 酵素と同じである。

第4節 考察

第1項 *S. cerevisiae* での発現

cDNA 5'非翻訳領域に *Hind*III 制限酵素サイトを新たに設け、これと 3'非翻訳領域の *Xho*I 制限酵素サイトで発現ベクター pYES2 のクローニングサイトへ挿入した。*Hind*III サイトの導入を PCR を用いて行ったが、プライマーを設計する際には ATG 上流が GC rich にならないようにまた ATG より上流-3 位を Kozak コンセンサス配列^{130, 131)}に則り A になるようにした。

構築した発現プラスミド pYES / SPGase で *S. cerevisiae* を形質転換し、培養、組換え酵素の誘導を行ったところ粗抽出液中に 4.33 U / mg の maltase 活性が得られた。これは培養液 1 ml あたり 0.69 U に相当する。*S. pombe* で培養を行うと培養液 1 ml あたり約 0.6 U の酵素が得られるので⁸²⁾*S. cerevisiae* での発現系でも培養液 1 ml あたりではほぼ同等の酵素量が得られることになる。

本酵素は *S. pombe* では培地に分泌されるが *S. cerevisiae* での発現では培地中には分泌されなかった。それでは組換え酵素はどこに局在しているのでしょうか。酵母では新規に生合成された分泌タンパク質は、まず小胞体膜を通過し、ここで N 結合型コア糖鎖が転移される。組換え酵素の N 末端アミノ酸配列は VGNVY...で、*S. pombe* で分泌される酵素よりも 2 残基前の 22 番目の Ala と 23 番目の Val のあいだでプロセッシングされていた (Fig. 3-8) が酵母はシグナルペプチドを認識し輸送経路に組み換えタンパク質を乗せているようである。真核生物のシグナルペプチダーゼの認識部位や反応効率はそのプロペプチド一次構造、二次構造に依存するとされている^{132, 133)}。例えばシグナルペプチド切断点から 5-6 残基上流にはβ-ターン構造をとることが一般的らしい。プロペプチドの膜通過を阻害しシグナルが除去されるようにペプチドを留めるらしい。一次構造は特異性を決定するとされており、真核生物の場合、シグナルペプチド切断点から上流-3 位と-1 位は側鎖が中性で嵩の小さいアミノ酸残基 (Ala, Gly, Ser, Thr, Cys) となる。これはシグナルペプチダーゼがふたつの小さい側鎖を認識するためとされている¹³⁴⁾。これをシグナルペプチドの “(-3, -1) rule” という。Native 酵素の場合-3 位と-1 位はそれぞれ Ala と Gly が相当する。組み換え酵素の場合は-3 位には Ser、-1 位には Ala が位置することになる。いずれの場合も小さい側鎖のアミノ酸残基が位置する。またシグナルペプチドの切断効率と正確さは-1 位のアミノ酸残基の種類で決まるとされている¹³⁵⁾。例えば-1 位のアミノ酸残基の種類によっては通常の切断部位の他に切断箇所が増えることも報告されている。Native 酵素と組み換え酵素でシグナル切断点の違いが認められたことは *S. cerevisiae* のシグナルペプチダーゼが-1 位のアミノ酸残基として Gly より Ala と高い親和性を示すことを示唆する。

小胞体を通過したタンパク質はゴルジ体を経由して細胞表層や液胞へ移行する。この過程で細胞表層へ移行するタンパク質 (invertase や acid phosphatase) は 50 以上の mannose 残

基からなる外部糖鎖が付加される。一方液胞へ移行するタンパク質のコア糖鎖は 9-13 個ほどの大きさにしかならない。従って例外¹³⁶⁾を除けば、糖タンパク質に付加される糖の大きさを酵素的局在性がわかるはずである。今回の組換え α -glucosidase の場合、SDS-PAGE の結果からコア糖鎖の外側に不均一な mannose 鎖のクラスターが付加されていることは明らかである。このことは酵素がゴルジ体を経由していることを意味する。次に N 結合型糖鎖のサイズについて考察する。糖鎖によりバンドが不鮮明ではあるが SDS-PAGE から見積もった組換え酵素の分子量は約 220 kDa である。一方、アミノ酸配列から計算するとタンパク質部分の分子量は 10,6139.04 であるから糖鎖部分の分子量は約 114kDa になる。糖 1 残基の分子量を 162 とすると糖鎖を構成する糖の数は約 700 個になる。一般的に N-グリコシル化サイトの約 2/3 はグリコシル化酵素が接近できないためにグリコシル化されないといわれる¹³⁷⁾。本酵素ではアミノ酸配列中に N-グリコシル化モチーフが 27 カ所見つかったが、1/3 の 9 カ所に糖鎖が付加しているとする N 結合型糖鎖 1 つあたり約 78 個の糖残基からなっている計算になる。またもしすべての付加サイトがグリコシル化していたとしても N 結合型糖鎖 1 つあたり約 26 個の糖残基から構成されていると計算できる。このことから組換え酵素は細胞表層へ分泌されていると推測できる。さらに菌体懸濁液に maltase 活性を検出することができる (Table 3-1) ことも細胞表層へ組換え酵素が分泌されていることを支持する。しかしながら *S. occidentalis*、*C. tsukubaensis* α -glucosidase では *S. cerevisiae* での組み換え体においても培養液中に分泌される^{83, 87)}。これに対し本酵素は細胞表層まで分泌されているにも関わらず、培地に分泌されないのはなぜだろうか。分子量が大きいためと考えられる。*C. tsukubaensis* α -glucosidase では組み換え酵素の分子量についての報告はないが *S. occidentalis* α -glucosidase (glucoamylase) の場合、分子量は 138-145 kDa である⁸³⁾。本研究における *S. cerevisiae* 発現組み換え酵素は 200 kDa を越える大きさである。*S. cerevisiae* では invertase が分子量が大きい (650 kDa のオクタマー) ために細胞壁でとどまっている。また発現量が低いことも培地へ分泌しない理由に挙げられる。本発現系は *GALI* プロモーターにより制御しているがその特徴は発現を調節できることである。プロモーター自身はさほど強力なものではない。発現量が増えれば培養上清まで分泌されることを期待できる。

組換え酵素を陰イオン交換、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製したところ SDS-PAGE で糖タンパク質特有の幅広いバンドながら単一になるまで精製された。SDS-PAGE でバンドが幅広くなるのはすでに述べたようにコア糖鎖の外側に付加する不均一な mannose クラスター鎖のためである。精製酵素を Endo F 処理し SDS-PAGE を行うとメインの約 110 kDa のバンドに収束するほかに約 50 kDa にもバンドが現れた。この 50 kDa のバンドは N 末端アミノ酸配列の結果、夾雑タンパクではないことはわかったのだが、なぜ Endo F 処理により 50 kDa に組換え酵素の N 末端配列をもつバンドが出現したかは不明である。泳動用試料の処理を穏和な条件 (4°C、一晚) で行っても結果に変化はなかったので煮沸による試料の断片化ではない。同様に *S. pombe* から精製した酵素を Endo F 処理した場合にもメインバンドのほかに同様の低分子バンドが現れる。protease の混入を考慮し protease

inhibitor を加え Endo F 処理を行ったが結果は同じであった⁸²⁾。

組換え酵素の各種基質に対する K_m は Native 酵素のそれとほぼ同じである。nigerose などいくつかの基質で K_m に差があるのは試薬の違いから生じるものであると考えている。反応速度は組み換え酵素が 2 倍程度大きい。この違いはタンパク質の定量や分子量測定の不正確さに起因するのではないだろうか。Native 酵素と組み換え酵素を比較すると比吸光係数が大きく違う (Native 酵素 1.74 ; 組み換え酵素 6.58)。アミノ酸配列から予想する比吸光係数は $E_{1cm}^{1\%} = 18$ である¹³⁸⁾。これに糖鎖付加などの翻訳後修飾により成熟タンパク質が生産されるが本酵素は全体の 50%を越える糖鎖付加が付加される。また宿主によって糖鎖の付加の量、質ともに違う。その差によって比吸光係数に違いが出るのだろう。また本酵素の分子量を SDS-PAGE により見積もっているが、不均一な糖鎖構造をもつ本酵素はそのバンドが幅広い。例えば組み換え酵素の SDS-PAGE でのバンドは幅 9 mm にも広がる (ゲル 6 cm)。これでは正確な分子量の測定は困難である。従って単純に組み換え酵素と Native 酵素の V 、 k_0 の比較はできないと考える。

一般的諸性質では酵素の糖含量に Native 酵素と比較して差異があった (Native 酵素が 78% に対して組換え酵素が 55%)。これは糖鎖の構成糖の違いや不均一な mannose クラスタ鎖の大きさの違いによるものである。*S. cerevisiae* では *S. pombe* と違い、糖鎖に galactose を含まないので phenol-硫酸法の発色率が異なる。その他の pH、温度に関する性質は Native 酵素と比較してほぼ同等であった (Table 3-5)。

今後この発現系を用い、機能改変などの機能と構造の解析が可能である。

第 2 項 *P. pastoris* での発現

S. pombe α -glucosidase の *S. cerevisiae* での発現系が構築されたことで *P. pastoris* の発現系においても *S. pombe* α -glucosidase が発現できると期待した。またこの際、*P. pastoris* における発現系で *S. cerevisiae* での組換え酵素の問題点を解消できることを期待した。すなわち、菌体外培養液中への酵素の分泌、生産量の増加、または酵素の糖鎖含量の低下などである。その結果、maltase 活性を有する形質転換体を得ることができ、誘導培養によって、培養上清および菌体表層に *S. pombe* α -glucosidase を分泌することがわかった。1 l の培養液より、菌体表層で約 2,500 U、約 25 mg、培養上清で約 1,000 U、約 10 mg の組換えタンパク質が得られ、精製過程での損失を考えても 1 mg 以上の組換え酵素が数百 ml の培養液から容易に得られると考えた。*S. cerevisiae* 組換え酵素は培養液 1 ml あたりの無細胞抽出液より 0.6 U の酵素が得られるのに対し、*P. pastoris* 組換え酵素は培養液 1 ml あたり培養上清から 1.0 U、無細胞抽出液から 2.5 U の酵素が得られる。無細胞抽出液を比較して 4 倍以上の活性がある。また、培養上清にも全発現量の 30 %程度の活性がある。従って、培養上清からあるいは無

細胞抽出液から、いずれからも *S. cerevisiae* よりも多くの組換え酵素が得られる。しかしながら培養条件の検討は、組換え酵素の精製の操作における容易さに大きく影響するため重要である。また、酵素の局在性についても改善されるかもしれない。酵素の局在性について考察する。組換え酵素の N 末端アミノ酸の配列が *S. pombe* の培養液から精製された酵素と同じ残基 (Gly-24 と Asn-25 の間) でプロセッシングされることからゴルジ体経由の分泌系にのっているはずである。菌体の懸濁液と無細胞抽出液がほぼ同程度の活性を示したことからほぼ全ての酵素活性は細胞表層にあると考えてよい。しかし培養上清に酵素が分泌されていたが、培養上清より菌体懸濁液に多くの maltase 活性を検出した。以上のことから細胞表層まで分泌され、細胞壁にとどまり、一部が培養上清まで分泌されることが示唆された。

P. pasotris を宿主として発現した α -glucosidase は maltase 活性により培養上清より無細胞抽出液に 2 倍以上多くあることを示されたが、精製の容易さを考慮して、組換え酵素を *P. pasotris* 形質転換体の培養上清から精製した。すでに確立された *S. pombe* 培養上清からの手法をもとに、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行った。精製の結果、比活性 26 U/mg を与える酵素標品が得られた。一般に *P. pastoris* 培養上清から酵素を回収した場合、*P. pasotris* 自身の分泌するタンパク質は非常に少ない。組換えタンパク質以外の夾雑タンパク質が、培養上清の SDS-PAGE から予測できた。しかし、実際の精製過程では回収率が 23% と低いものとなった。一回目の陰イオン交換の結果から、Fraction Nos. 150-164 付近に、アプライしたタンパク質量に比べて過剰の A_{280} が認められたが、これらの画分では波長 260 nm の吸光度が A_{280} の 1.6 倍ほどであった。試料がエタノール沈殿画分であること、陰イオン交換に吸着することと併せて、これらが核酸であることが予想できた。これらの核酸画分は培地成分である Yeast extract 由来のものであると考えられ培地成分の検討も必要であろう。またこの核酸を簡単に除くことができれば精製操作も容易になるだろう。またアフィニティークロマトグラフィーも有効である。ブタ肝臓 glucosidase II では N-5-carboxypentyl-1-deoxynojirimycin-AH-Sepharose を使ったアフィニティークロマトグラフィーが行われている。また Sephacryl S-200 や Sephadex G-200 でのアフィニティークロマトグラフィーの報告もある。今後この発現系を用いて X 線結晶解析などを行う場合、効率よい組み換え酵素の分泌とその精製が必要になる。その際にはアフィニティークロマトグラフィーが有効な手段となる。加えて精製を容易にするためには、先にも述べたが培養条件の検討が必要である。培養上清の不純物が少なく、なお早い誘導で酵素を回収できるような培地、培養条件を検討する必要がある。今回の精製には誘導培養を 100 時間以上行った培養上清を用いたが、誘導培養の早い時間で回収した場合、夾雑タンパク質、培養上清の不純物が少ない可能性がある。また、菌体表層にとどまっていると思われる組換え酵素についても精製を行い、精製の簡便性や酵素の性質を検討し培養上清からの酵素と比較する必要があるだろう。

精製酵素標品は SDS-PAGE・CBB 染色で幅が広いが単一のバンドとして検出された。こ

の幅の広いバンドは、*S. pombe* 培養上清より精製された酵素標品 (Native 酵素)、*S. cerevisiae* 組換え酵素でも認められている。バンド巾の中心をその移動度と仮定し、分子量を 173 kDa と見積もった。これは、*S. cerevisiae* 組換え酵素よりも、およそ 30 kDa ほど小さい。精製酵素を Endo-F により脱糖鎖処理することにより、このバンドは 117 kDa にメインのバンドに収束した。一般に、*P. pasotris* を宿主とした糖タンパク質では、*S. cerevisiae* の糖タンパク質より付加する *N* 型糖鎖の大きさが小さい。*S. cerevisiae* の糖タンパク質に典型的に見られる *N* 型糖鎖ではおよそ 50-150 の mannose 残基からなる糖鎖を含む¹³⁹⁾のに対して、*P. pasotris* のそれは平均 8-14、長くても約 30 の mannose 残基の糖鎖である^{123, 124)}。また、*N* 型糖鎖の構造に関しても違いがみられ、*S. cerevisiae* の糖タンパク質が 1,3-Man 結合を持つのに対して、*P. pasotris* は 1,3-mannosyl-transferase 活性がないため、1,3-Man 結合を持たない¹⁴⁰⁾。脱糖鎖処理によりバンドのシフトした約 56 kDa の差を糖鎖部分の分子量とすると、単糖残基 1 分子の分子量 162 として、330 ほどの hexose がついている計算になる。*S. pombe* α -glucosidase には 27 個の *N* 型糖鎖付加サイトがあり、そのすべてに糖鎖がついているとすると、1 糖鎖あたり 12 個、3 分の 1 に糖鎖がついているとして、1 糖鎖あたり 36 個の糖残基からなっていると推測できる。これは、*S. cerevisiae* の糖タンパク質がもつ糖鎖より小さい。これらの結果より、本組換え酵素は糖タンパク質であり、*S. cerevisiae* 組換え酵素より少ない糖鎖付加を受ける酵素であると考えられる。精製した組換え酵素は比活性 26 U/mg であり、Native 酵素 21 U/mg と比べてほぼ同じである。pH 安定性、温度安定性も Native 酵素とほぼかわりない (Table 3-5)。そして、糖鎖の付加が比較的少ない。発現量、触媒能、糖鎖の量の点から *P. pasotris* での組換え *S. pombe* α -glucosidase はタンパク質工学への利用により適していると判断できる。

第5節 要約

1. *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase を *S. cerevisiae* で発現させることに成功した。培養液 1 ml あたり無細胞抽出液から 0.6 U の組み換え酵素を得られた。組み換え酵素は細胞表層まで移行していることを予想できたが培養液中には分泌されなかった。
2. *S. cerevisiae* 組み換え酵素は DEAE-Sepharose CL-6B 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、Sepharose 6B ゲル濾過クロマトグラフィーにより比活性 45 U/mg、25 倍まで精製された。性質は *S. pombe* から精製された酵素 (Native 酵素) とほぼ同じ性質を示した。
3. *S. pombe* α -glucosidase を *P. pasris* で発現させることに成功した。培養液 1 ml あたり培養上清から 1.0 U、無細胞抽出液から 2.5 U の酵素を得られた。
4. *P. pasris* 組み換え酵素は DEAE-Sepharose CL 6B 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、Sepharose 6B ゲル濾過クロマトグラフィーにより比活性 26 U/mg、20 倍まで精製された。性質は Native 酵素とほぼ同じ性質を示した。大きな違いは分子量であり、Native 酵素 210 kDa に対して *P. pasris* 組み換え酵素は 173 kDa であった。これは *P. pasris* での発現系は *S. pombe*、*S. cerevisiae* よりも過度の糖付加をうけないために起きたと考えられる。

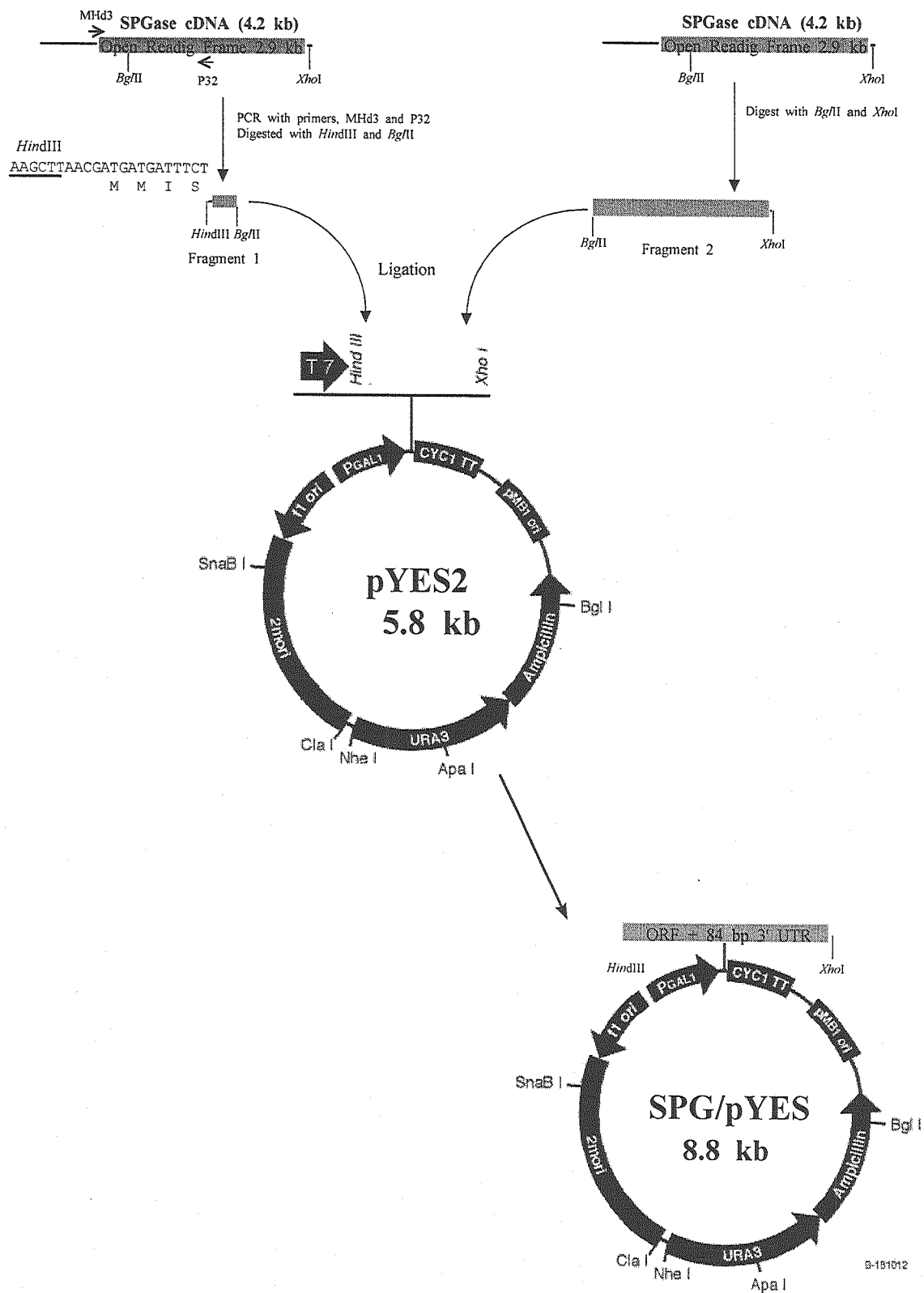


Fig. 3-1. Construction of SPG/ pYES expression plasmid. An ORF containing 6 bp of 5' and 84 bp of 3' untranslated regions of *S. pombe* α -glucosidase cDNA was inserted into pYES2 for expression in *S. cerevisiae*.

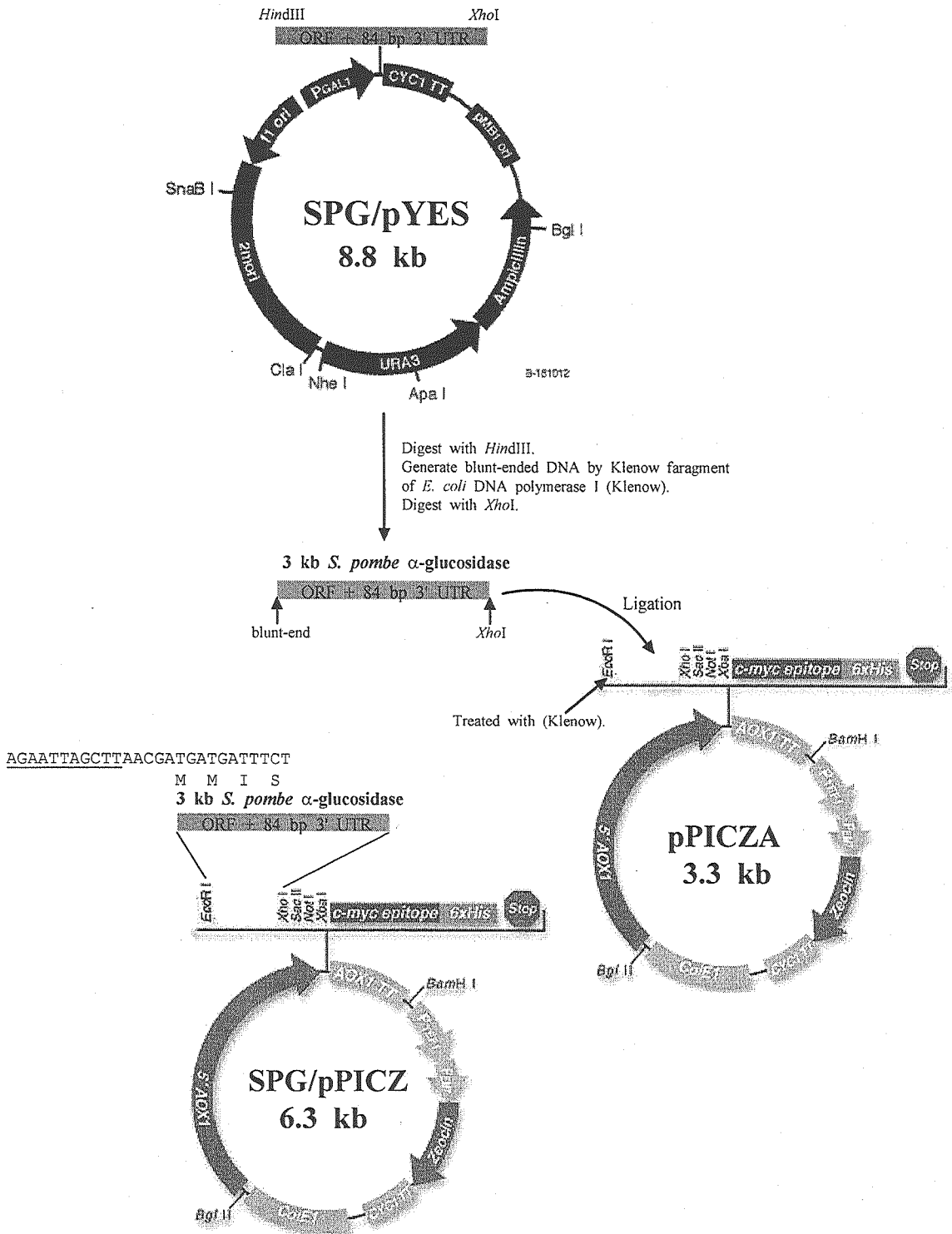


Fig. 3-2. Construction of SPG/pPICZA expression plasmid. An ORF containing 6 bp of 5' and 84 bp of 3' untranslated regions of *S. pombe* α-glucosidase cDNA was inserted into pPICZA for expression in *P. pastoris*. Underline is 5' attachment site with vector.

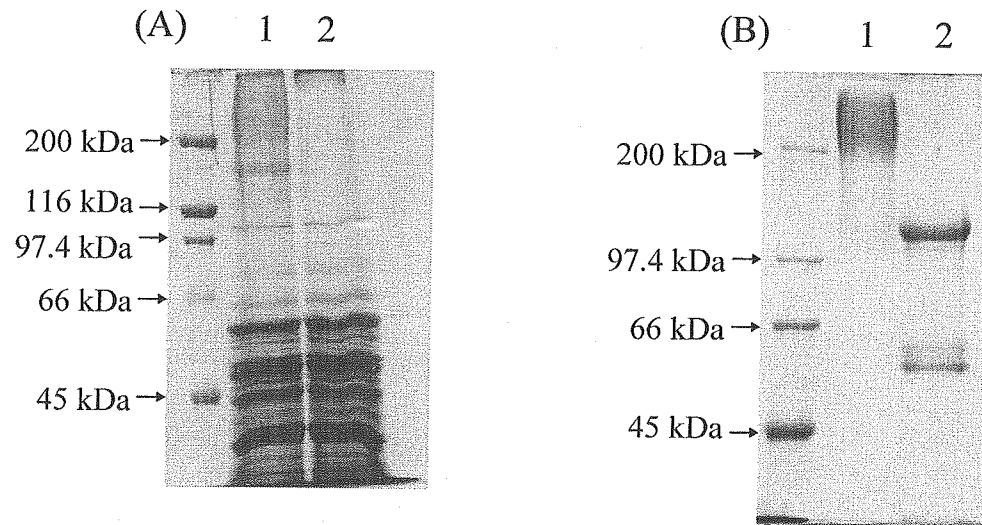


Fig. 3-3. SDS-Polyacrylamide electrophoresis of recombinant α -glucosidase produced in *S. cerevisiae*. (A), Crude extract of the *S. cerevisiae* transformants carrying pYES/SPGase (lane 1) and control without plasmid (lane 2). (B), Purified recombinant α -glucosidase before (lane 1) and after (lane 2) treatment with Endo F.

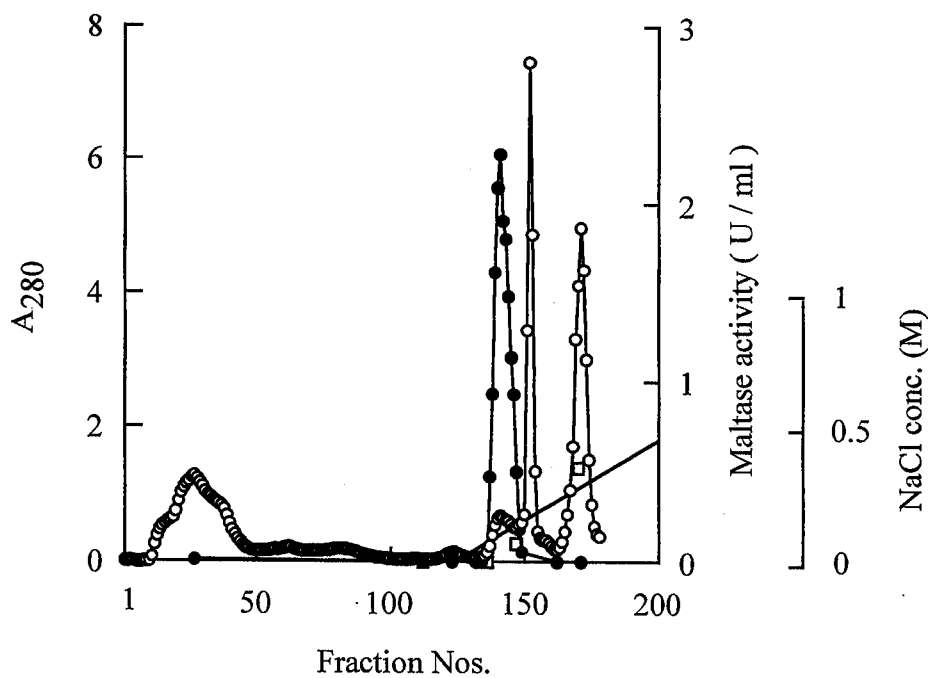


Fig. 3-4. DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography of recombinant α -glucosidase produced in *S. cerevisiae*.

Sample volume, 30 ml; column size, $\phi 3 \times 30$ cm (36 ml); flow rate, 14 ml/h, 7 cm/hr; buffer A, 50 mM sodium acetate buffer (pH4.5); buffer B, buffer A with 1 M NaCl; gradient, 0-100% of buffer B; fraction volume, 2 ml; \circ , A₂₈₀; \bullet , maltase activity (U/ml); \square , NaCl concentration (M).

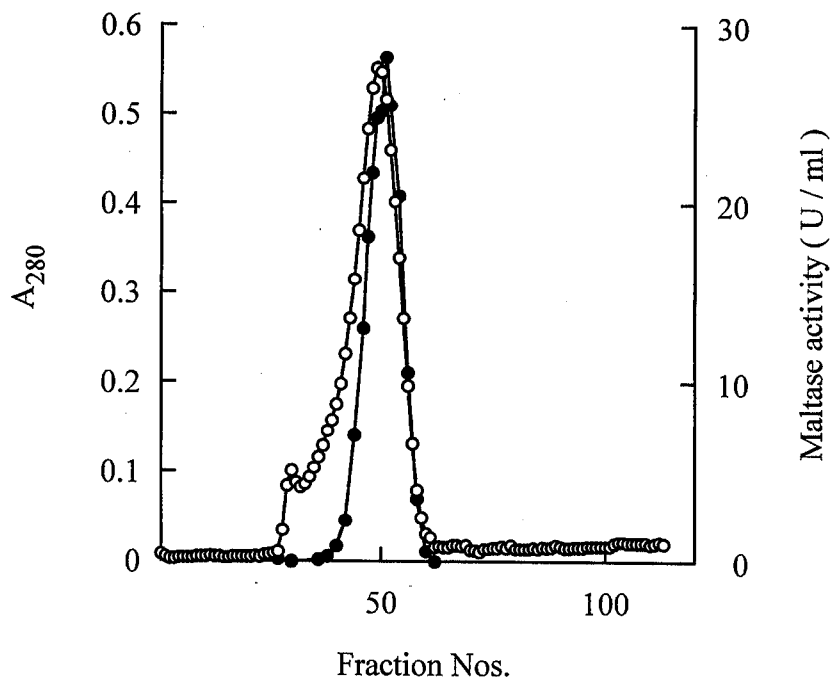


Fig. 3-5. Sepharose 6B column chromatography of recombinant α -glucosidase produced in *S. cerevisiae*.

Sample volume, 1 ml; column size, ϕ 1.8 x 36 cm (92 ml); flow rate, 8.1 ml/h, 2.3 cm/hr; buffer, 50 mM sodium acetate buffer containing 50 mM sodium chloride (pH4.5); fraction volume, 1 ml; ○, A_{280} ; ●, maltase activity (U/ml).

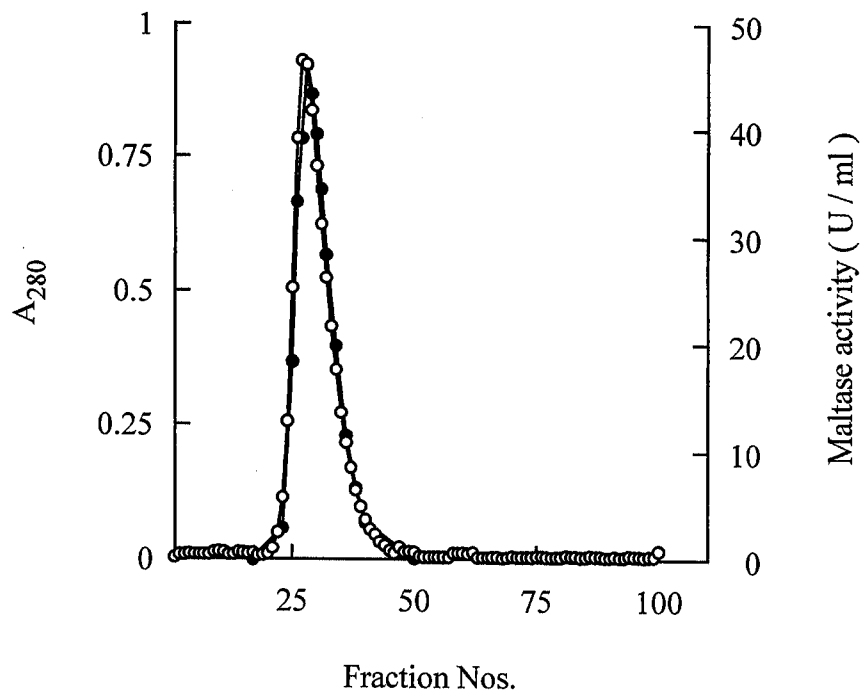


Fig. 3-6. Bio-Gel P-200 column chromatography of recombinant α -glucosidase produced in *S. cerevisiae*.

Sample volume, 1 ml; column size, ϕ 1.5 x 36 cm (46 ml); flow rate, 5.3 ml / h, 3 cm / hr; buffer, 10 mM sodium acetate buffer containing 200 mM sodium chloride (pH4.5); fraction volume, 0.5 ml; ○, A₂₈₀; ●, maltase activity (U/ml).

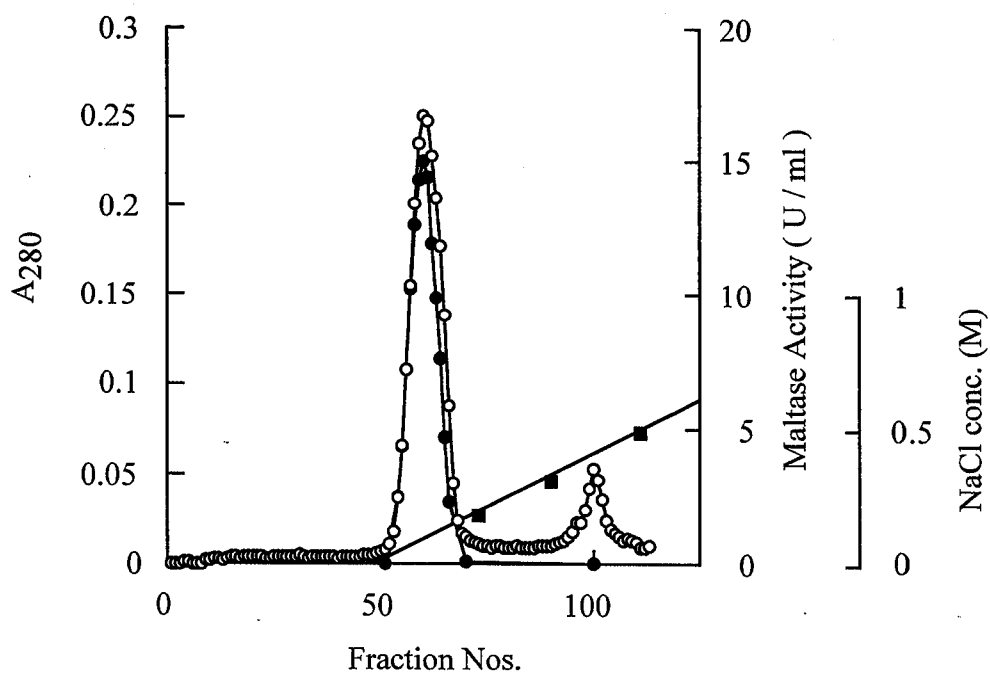


Fig. 3-7. DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography (2nd) of recombinant α -glucosidase produced in *S. cerevisiae*.

Sample volume, 30 ml; column size, $\phi 1.4 \times 9$ cm (14 ml); flow rate, 7 ml / h, 5.8 cm / hr; buffer A, 20 mM sodium acetate buffer (pH4.5); buffer B, buffer A with 0.7 M NaCl; gradient, 0-100% of buffer B; fraction volume, 1 ml; ○, A₂₈₀; ●, maltase activity (U/ml); ■, NaCl concentration (M).

Pro-enzyme	1 2 3 4	MMISTAY.....	20 23 25	SIAVGNVYQTLNVIGDRNVTIP
Native (<i>S. pombe</i> from culture medium)				NVYQTLNVIGDRNVTIP
Recombinant (<i>P. pastoris</i> from culture medium)				NVYQTLNVIGDRNVTIP
Recombinant (<i>S. cerevisiae</i> from cell free extract)				VGNVYQTLNVIGDRNVTIP

Fig. 3-8. N-terminal amino acid sequences of native and recombinant α -glucosidases.

The sequence of pro-enzyme is deduced from cDNA for α -glucosidase of *S. pombe*.

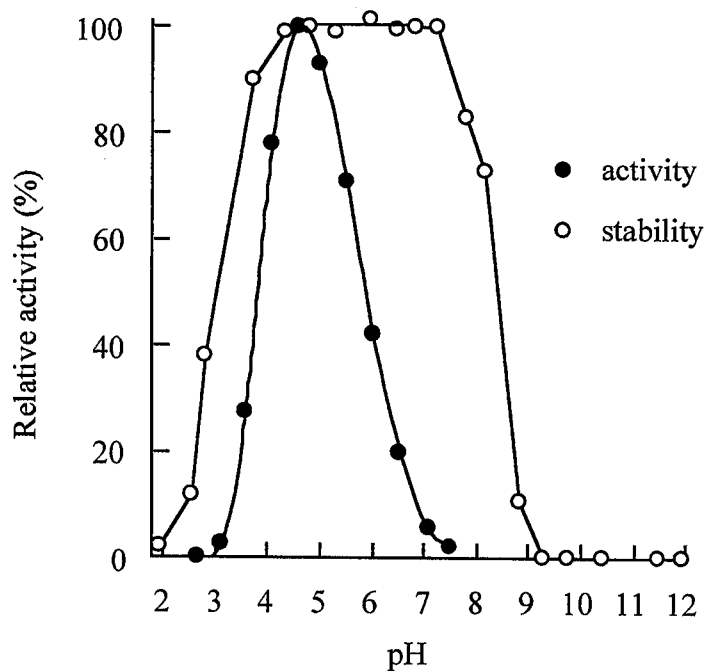


Fig. 3-9. pH activity and stability curves of recombinant *S. pombe* α -glucosidase.

pH activity curve: The reaction mixture containing 50 μ l of enzyme, 250 μ l of McIlvaine buffer and 200 μ l of 0.5% maltose was incubated at 35 $^{\circ}$ C.

pH stability curve: After the mixture containing 20 μ l of enzyme and 80 μ l of Britton-Robison buffer had been kept at 4 $^{\circ}$ C for 24 hr, 200 μ l of 1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 200 μ l of 0.5% maltose were added, and the reaction mixture was incubated at 35 $^{\circ}$ C.

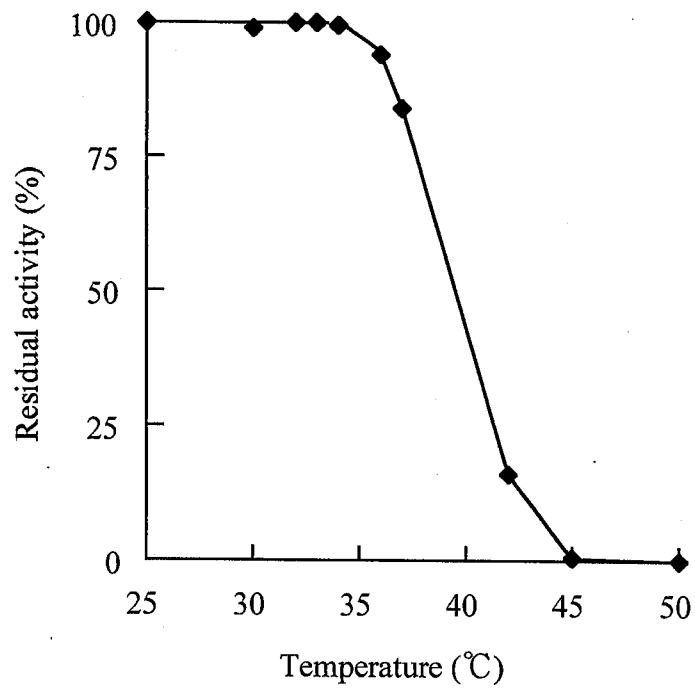


Fig. 3-10. Temperature stability curve of recombinant *S. pombe* α -glucosidase.

After the mixture consisting of 20 μ l of enzyme and 280 μ l of 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5) had kept at various temperatures for 15 min, it was put on ice. To heat-treated enzyme, 200 μ l of 0.5% maltose was added, and the reaction mixture was incubated at 35 $^{\circ}$ C

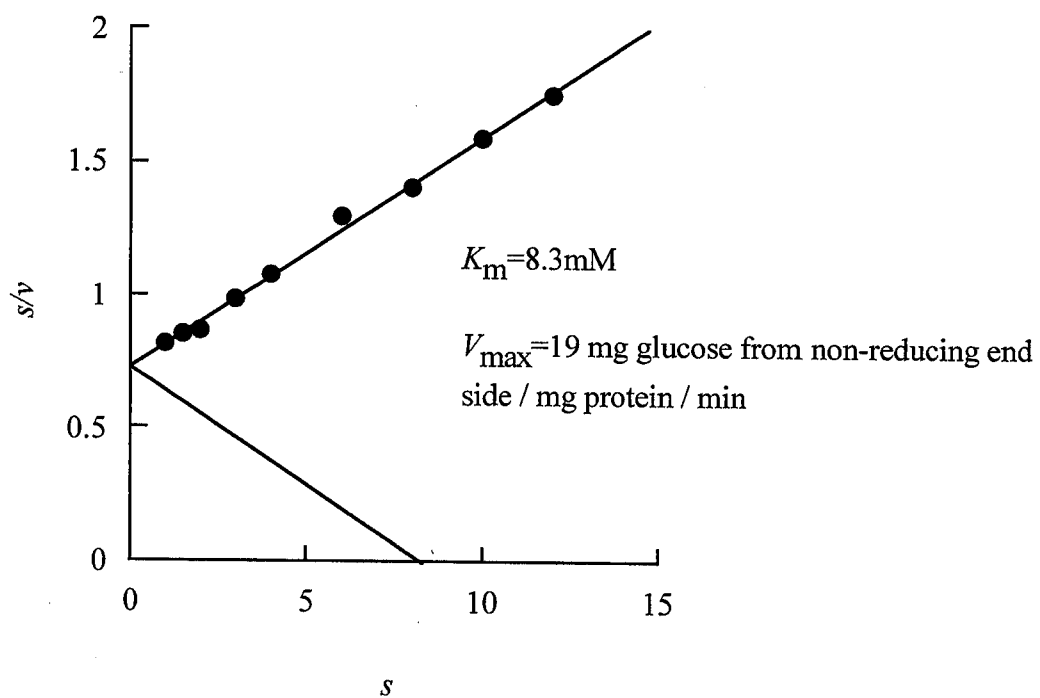
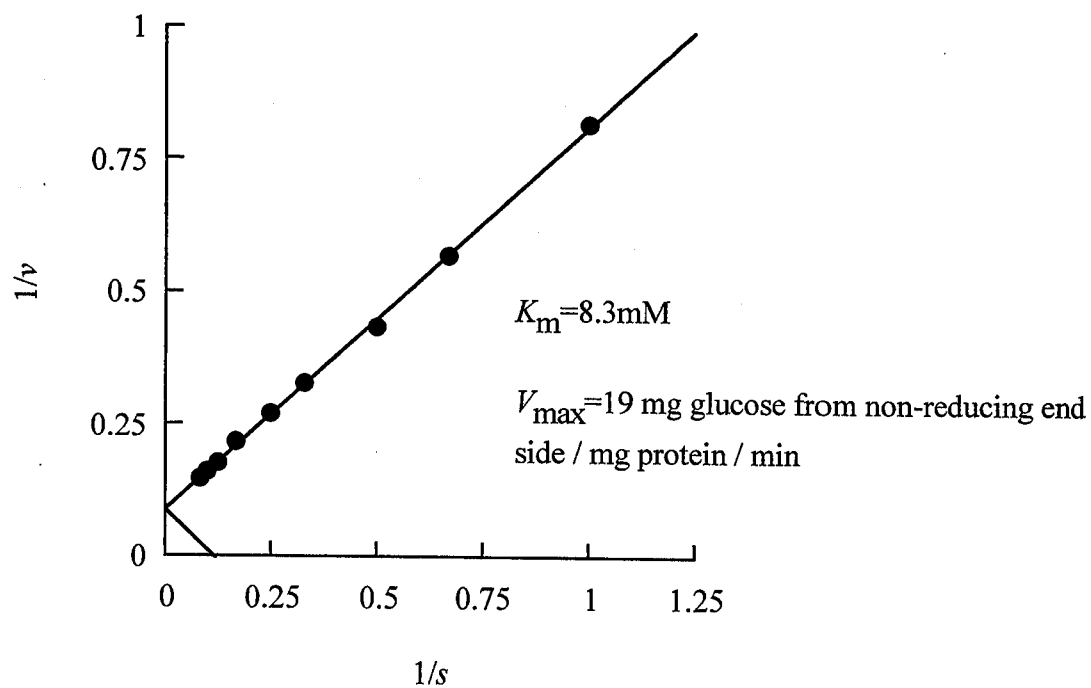


Fig. 3-11. $1/s - 1/v$ and $s - s/v$ plots for hydrolysis of maltose by recombinant *S. pombe* α -glucosidase produced in *S. cerevisiae*.

The reaction mixture containing $50 \mu\text{l}$ of enzyme, $200 \mu\text{l}$ of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and $250 \mu\text{l}$ substrate was incubated at $35 \text{ }^\circ\text{C}$. s , mM; v , mg glucose from non-reducing end side / mg protein / min.

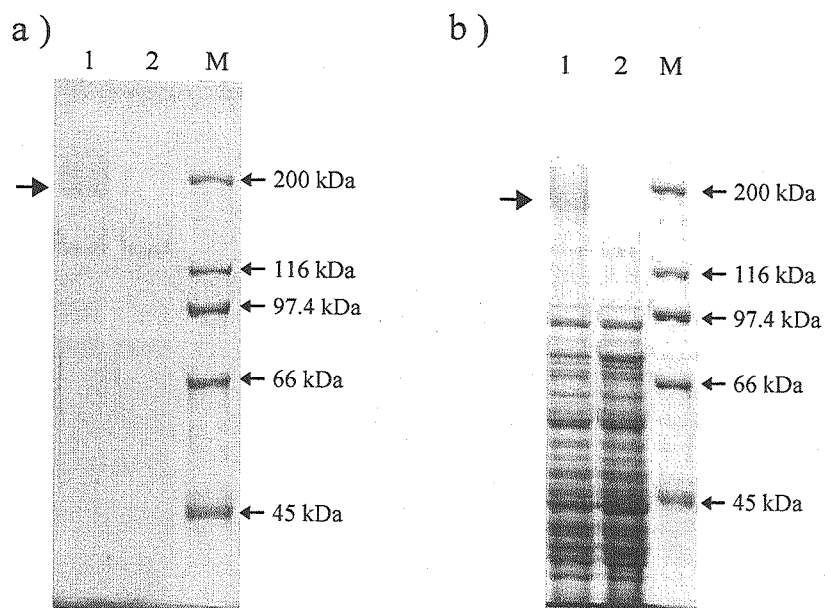


Fig. 3-12. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of recombinant α -glucosidase produced in *P. pastiris*.

SDS-polyacrylamide gel (7.5 %) was stained with Rapid CBB KANTO. M, molecular weight size markers.

a) Lane 1, induced recombinant protein in culture medium of *P. pastoris* transformed with SPG/pPICZ ; lane 2, culture medium of *P. pastoris* transformed with pPICZA (control).

b) Lane 1, induced recombinant protein in cell free extract of *P. pastoris* transformed with SPG/pPICZ ; lane 2, culture medium of *P. pastoris* transformed with pPICZA (control).

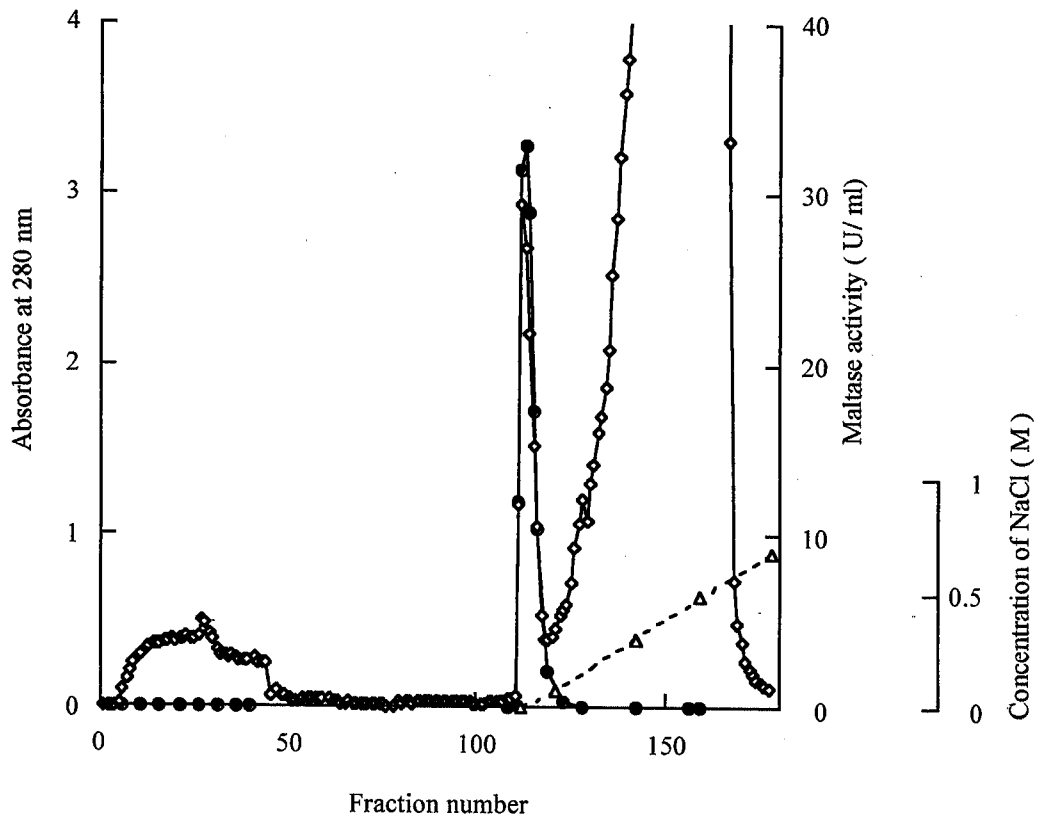


Fig. 3-13. DEAE-sepharose CL 6B column chromatography of recombinant α -glucosidase produced in *P. pastris*.

Sample volume, 270 ml; column size, $\phi 1.8 \times 30$ cm (76 ml); flow rate, 24 ml / h, 9.4 cm / hr; buffer A, 20 mM sodium acetate buffer (pH4.5); buffer B, buffer A with 1 M NaCl; gradient, 0-100% of buffer B; fraction volume, 3 ml; ○, A_{280} ; ●, maltase activity (U/ml); △, NaCl concentration (M).

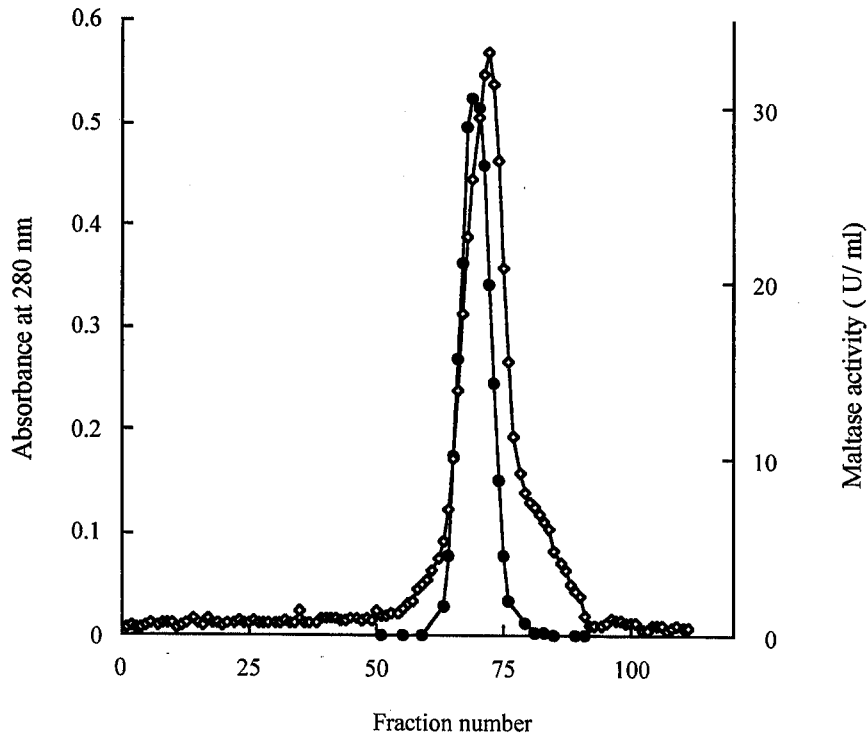


Fig. 3-14. Sepharose 6B column chromatography of recombinant α -glucosidase produced in *P. pastoris*.

Sample volume, 1 ml; column size, $\phi 1.6 \times 102$ cm (204 ml); flow rate, 8.4 ml / h, 4.2 cm / hr; buffer, 50 mM sodium acetate buffer containing 50 mM sodium chloride (pH4.5); fraction volume, 1 ml; ○, A_{280} ; ●, maltase activity (U/ml).

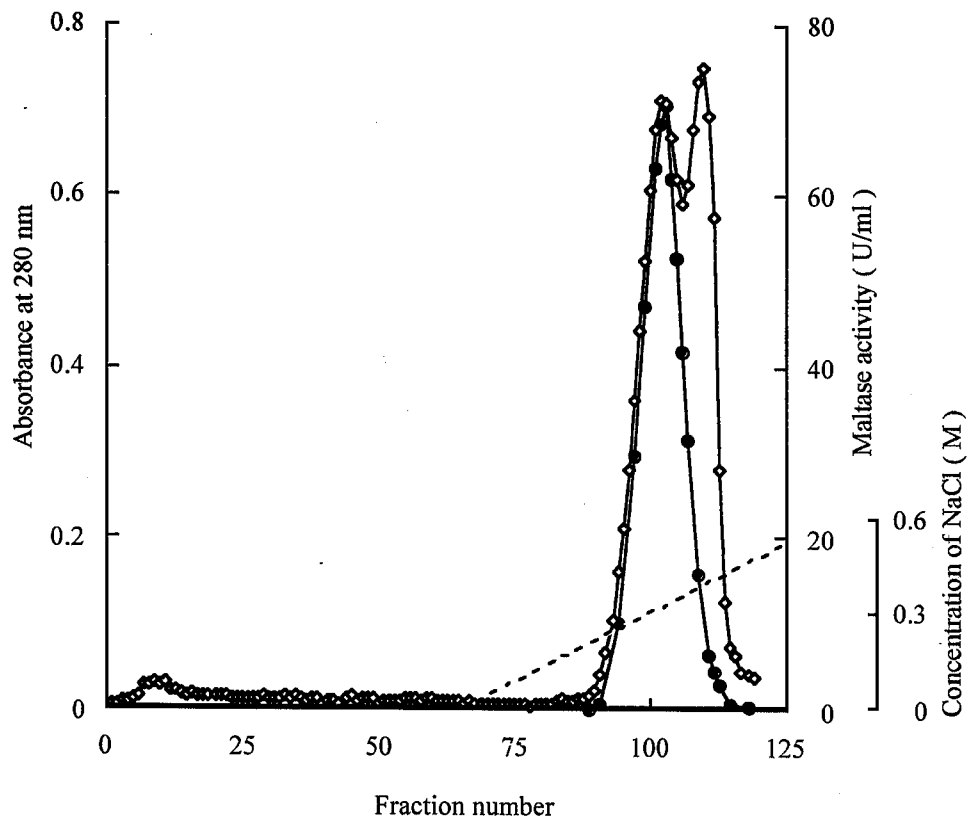


Fig. 3-15. DEAE-sepharose CL 6B column chromatography (2nd) of recombinant α -glucosidase produced in *P. pastris*.

Sample volume, 22 ml; column size, $\phi 1.4 \times 9$ cm (14 ml); flow rate, 8 ml / h, 4 cm / hr; buffer A, 20 mM sodium acetate buffer (pH4.5); buffer B, buffer A with 0.6 M NaCl; gradient, 0-100% of buffer B; fraction volume, 0.5 ml; ○, A_{280} ; ●, maltase activity (U/ml); ---, NaCl concentration (M).

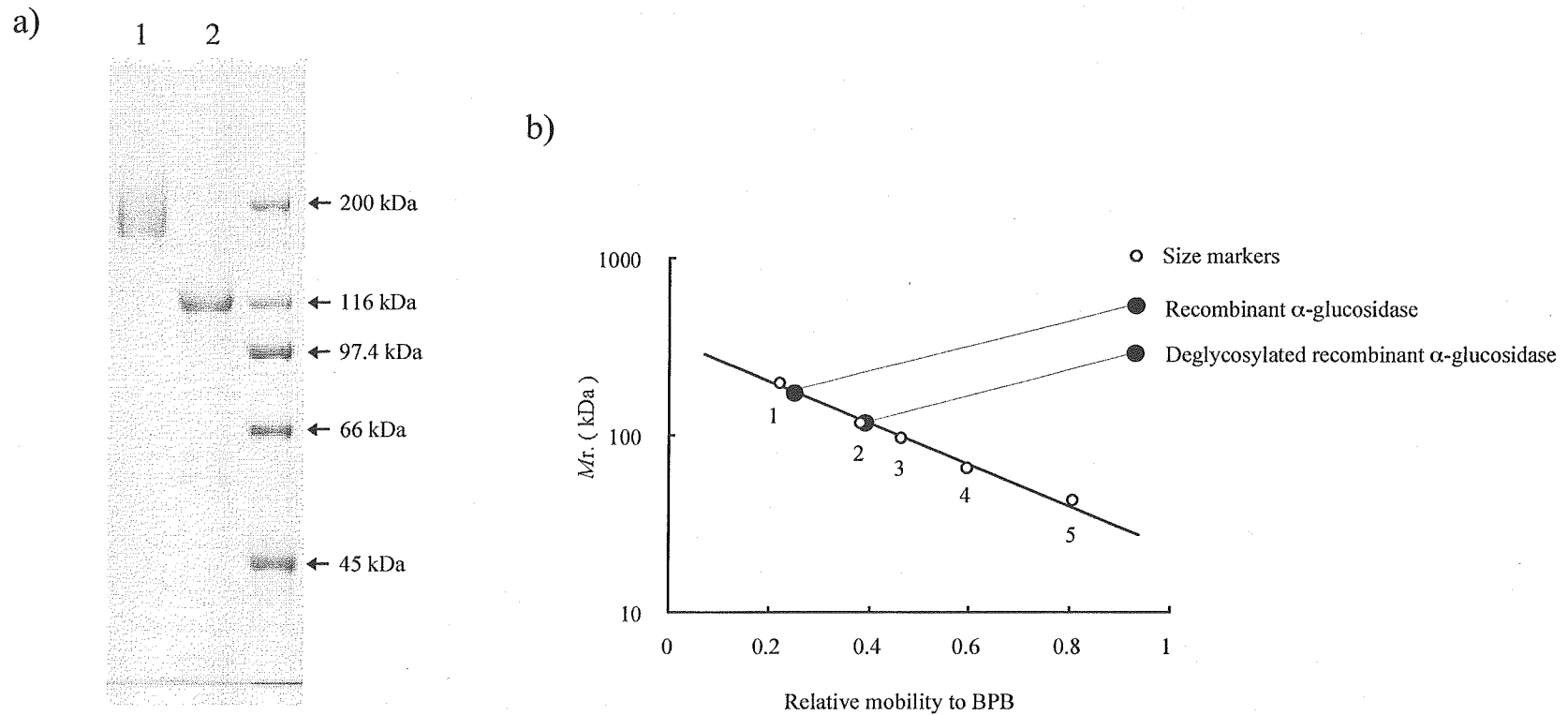


Fig. 3-16. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of recombinant α -glucosidase produced in *P. pastoris*.

a) Lane 1; Purified recombinant α -glucosidase. Lane 2; Deglycosylated recombinant α -glucosidase. SDS-polyacrylamide gel (7.5 %) was stained with Rapid CBB KANTO.

b) Estimation of molecular weight of recombinant α -glucosidase. Molecular weight of recombinant α -glucosidase was estimated to be 173 kDa and that of deglycosylated protein was estimated to be 117 kDa. 1, myosin, 200 kDa; 2, β -galactosidase, 116 kDa; 3, phosphorylase B, 97 kDa; 4, bovine serum albumin, 66 kDa; 5, ovalbumin, 45 kDa.

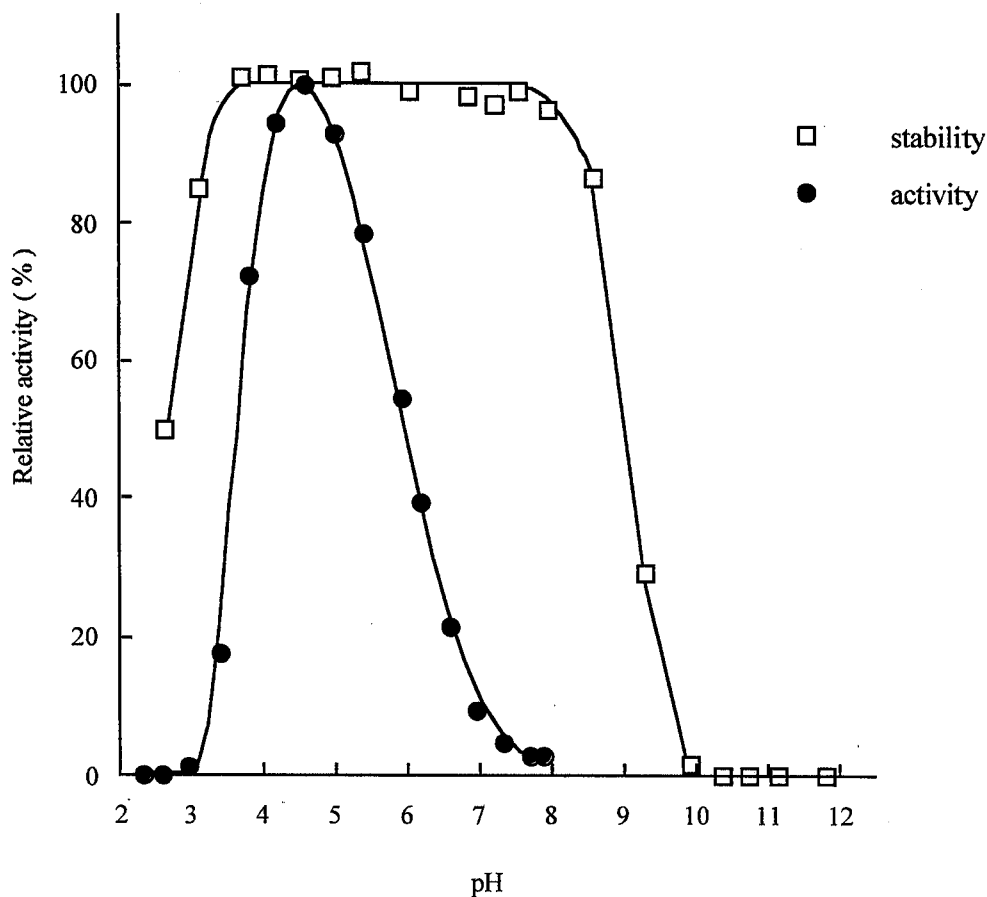


Fig. 3-17. pH activity and stability curves of recombinant *S. pombe* α -glucosidase produced in *P. pastoris*.

pH activity curve: The reaction mixture containing 50 μ l of enzyme diluted by 50 mM sodium acetate buffer containing 0.05 % Triton X-100 (pH 4.5), 250 μ l of McIlvaine buffer and 200 μ l of 0.5 % maltose was incubated at 35 $^{\circ}$ C.

pH stability curve: The mixture containing 20 μ l of enzyme diluted by 20 mM sodium acetate buffer containing 0.05 % Triton X-100 (pH 4.5) and 80 μ l of Britton-Robinson buffer had been kept at 4 $^{\circ}$ C. After 24 hour, added 1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 200 μ l of 0.5 % maltose, then the reaction mixture was incubated at 35 $^{\circ}$ C.

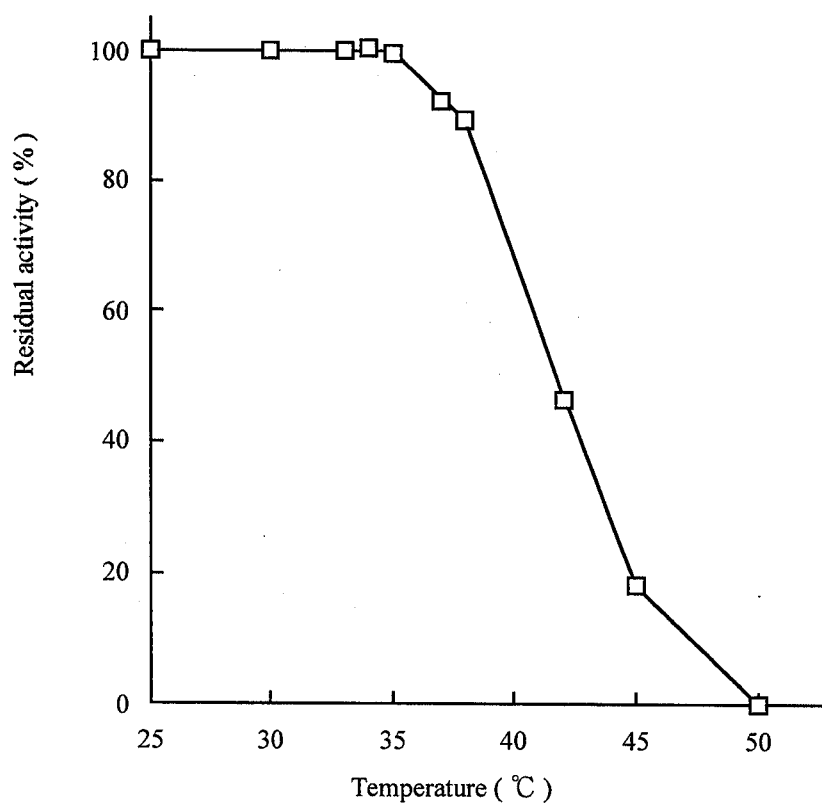


Fig. 3-12. Temperature stability curve of recombinant *S. pombe* α -glucosidase produced in *P. pastoris*.

The mixture containing 20 μ l of enzyme diluted by 50 mM sodium acetate buffer containing 0.05 % Triton X-100 (pH 4.5) had kept at various temperature for 15 min, and then put on ice immediately. The reaction mixture containing the heat-treated enzyme and 200 μ l of 0.5 % maltose was incubated at 35 $^{\circ}$ C.

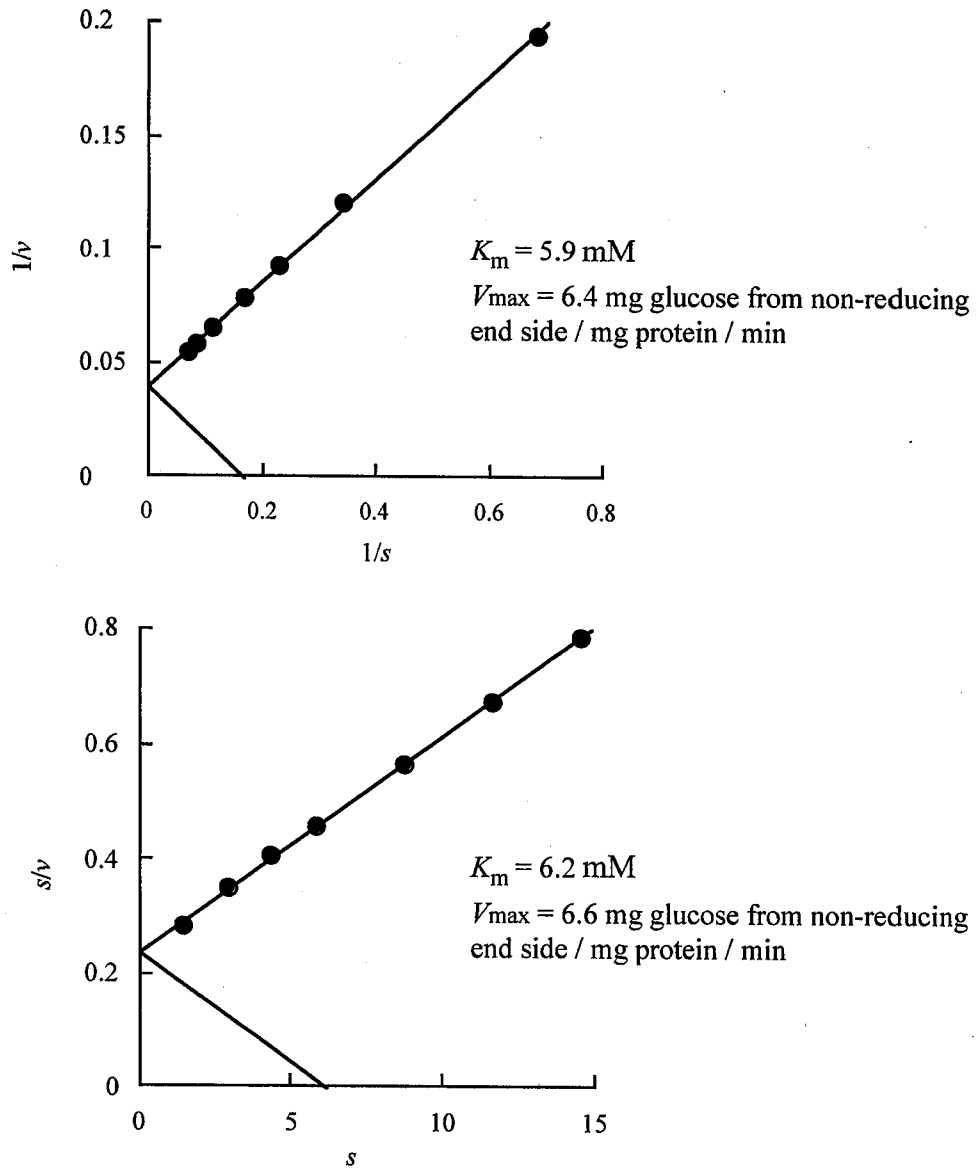


Fig. 3-19. $1/s - 1/v$ and $s - s/v$ plots for hydrolysis of maltose by recombinant *S. pombe* α -glucosidase.

The reaction mixture containing 100 μl of enzyme, 200 μl of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 200 μl substrate was incubated at 35 $^{\circ}\text{C}$.

Table 3-1 Maltase activity in *S. cerevisiae* transformants

Plasmid (SPGase / pYES)	Maltase (U / OD ₆₀₀ = 1) in		
	Cell surface*	Cell free extract*	medium
—	N.D.**	0.0008	N.D.**
+	0.598	0.349	N.D.**

* For maltase assays, the cells were grown in SC media (plasmid -,supplemented with uracil; plasmid +, without uracil) and washed with ice cold water. After resuspension in extraction buffer (described in “Materials and Methods”), the cell suspension was split into two fractions of the same volume. The maltase activity of one half was assayed directly (cell surface), and the other half was disrupted by glass beads and the activity in the obtained soluble fraction was assayed (cell free extract).

** Not detectable

Table 3-2 Summary of the purification of *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase produced in *Saccharomyces cerevisiae*

	Total ^a protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U / mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
Cell free extract	130	356	2.8	1	100
DEAE-Sepharose CL-6B	9.5	283	30	11	80
Sepharose 6B	5.1	246	48	18	69
Bio-Gel P-200	2.8	136	50	18	39
DEAE-Sepharose CL-6B	1.1	72	69	25	20

^a Protein concentration was calculated under the assumption that $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ at the 280 nm was 10.

Table 3-3 Kinetic Parameters of Native and Recombinant α -Glucosidases for Hydrolysis of various substrates

Substrate	<i>S. cerevisiae</i>			<i>P. pastris</i>			<i>S. pombe</i>		
	k_0 (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_0/K_m (s ⁻¹ · mM ⁻¹)	k_0 (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_0/K_m (s ⁻¹ · mM ⁻¹)	k_0 (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_0/K_m (s ⁻¹ · mM ⁻¹)
maltose	352	8.3	42	104	6.2	17	155	6.2	25
maltotriose	248	5.6	44	127	5.1	25	165	6.6	25
maltotetraose	191	9.2	21	125	7.2	17	137	7.3	19
maltopentaose	163	17	9.5	101	10	10	137	13	11
kojibiose	110	21	5.2	64	17	3.9	76	19	4.0
nigerose	132	25	5.3	80	25	3.2	174	64	2.7
isomaltose	56	13	4.3	24	15	1.6	38	14	2.7
phenyl α -glucoside	24	12	2.0	8	9.9	0.81	26	9.7	2.7
phenyl α -malto-side		N.D.			N.D.		101	4.8	21
<i>p</i> -nitrophenyl α -malto-side	284	3.2	89	136	3.5	39		N.D.	
soluble starch	135	39	3.5	79	30	2.6	47	34	1.4

N.D., not determined.

Table 3-4 Summary of purification for *S. pombe* α -glucosidase produced in *P. pastoris*

Procedure	Total protein	Total activity	Specific activity	Recovery	Purification
	[mg]	[U]	[U/mg]	[%]	[-fold]
Culture supernatant	76.0*	900	11.8	100	1
Ethanol precipitation	10.4*	560	53.8	62	4.6
DEAE-Sepharose CL-6B	30.5**	488	16.0	54	1.4
Sepharose 6B	7.70**	440	57.1	49	4.8
DEAE-Sepharose CL-6B	1.97**	204	104	23	8.9

* Protein concentration was measured by Bradford method.

** Protein concentration was measured by UV method, calculated under the assumption that $E_{1\text{ cm}, 280\text{ nm}}^{1\%}$ was 10.0.

Table 3-5 Properties of Native and Recombinant α -Glucosidases

	Recombinant in <i>S. cerevisiae</i>	Recombinant in <i>P. pastris</i>	Native
Amount of expressed enzyme	0.7 U/ml culture	3.5 U/ml culture	0.6 U/ml culture
Specific activity	45 U/mg protein ^a	26 U/mg protein ^b	21 U/mg protein ^c
Optimum pH	4.5	4.5	4.5
pH stability	4-8	3.6-8	3-8
Temperature stability	$\leq 37^\circ\text{C}$	$\leq 37^\circ\text{C}$	$\leq 37^\circ\text{C}$
Sugar content as mannose	55%	74%	78%
N-terminal sequence	(23) ^d VGNVYQTLNVI	(25) ^d NVYQTLNVI	(25) ^d NVYQTLNVI

^a Protein concentration was calculated with the assumption that $E_{1\text{ cm}, 280\text{ nm}}^{1\%}$ was 6.58.

^b Protein concentration was calculated on the basis of result that $E_{1\text{ cm}, 280\text{ nm}}^{1\%}$ was 1.74.

^c Protein concentration was calculated with the assumption that $E_{1\text{ cm}, 280\text{ nm}}^{1\%}$ was 2.46.

^d The numbers show positions of the residues on the precursor protein.

Optimum pH was determined at 10 pH values (pH 2.5-7.5 in McIlvain buffer). To examine pH stability, the enzyme was incubated at various pH values (pH 2-12 in Britton-Robinson buffer) for 24 h at 5°C, and the remaining activities were assayed at pH 4.5. To examine the temperature stability, the enzyme was incubated at various temperatures (25-50°C) for 15 min, and immediately cooled, the remaining activities were assayed at 35°C. The ranges of pH or temperature stability were determined over 95% activity remaining. Sugar content was measured by phenol-sulfuric acid method.

第4章 *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase の触媒活性に直接関与するアミノ酸残基の決定

第1節 緒言

本章では *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase の活性に必須なアミノ酸残基の推定を行う。まず、反応速度の pH の影響を調べ活性解離基の同定を行う。そこからアミノ酸残基の種類をアスパラギン酸、およびグルタミン酸と同定し α -glucosidase family II で完全に保存されているこれらの残基に部位特異的変異を導入し、変異酵素を *S. cerevisiae* で発現させる。その活性の変化から、触媒残基の推定を行う。また CBE による化学修飾の失活の速度論的解析を行い、触媒活性の求核残基を推定する。次に活性に必須なアミノ酸残基の変異酵素が D-glucal を水和できるか否かを調べる。

いくつかの glycosidase は glycal を水和することができる^{108, 141)}。exo- α -glucanase は D-glucal から、2-deoxy β -D-glucose を生成し、また β -amylase は maltal を水和することができる。また sweet almond β -glucosidase は D-glucal から、2-deoxy β -D-glucose を生成する。 α -glucosidase では *A. niger*、ソバ、イネアイズザイム II、テンサイ、ブタ血清 α -glucosidase は D-glucal を水和し、2-deoxy α -D-glucose を生成する。ピール酵母 α -glucosidase II、ミツバチ α -glucosidase は作用を示さない。 α -glucosidase の水和反応は *trans* 付加であることがわかっており、生成物のアノマー型が酵素反応での生成物と同じアノマー型をとることが特徴である。また glucal はその構造がオキソカルボニウムイオンに似ていることから、触媒反応はオキソカルボニウムイオン中間体経由で進行していることが推定されている。

D-glucal がオキソカルボニウムイオン反応中間体に構造が似ていることから、酸塩基触媒残基のみで酵素反応が進むことを期待して変異酵素での水和反応を試みた。まず *S. pombe* α -glucosidase が D-glucal を水和できることを確認した。次に活性に必須な残基の変異酵素で D-glucal の水和を試みた。

またいくつかの β -glycosidase では求核残基、酸塩基触媒残基の変異酵素にアジ化ナトリウムなどの求核試薬を加えることで活性が復活することが知られている。そこで *S. pombe* α -glucosidase でもケミカルレスキューにより、これらの残基を決定できることを期待して求核試薬 NaN_3 、 HCOONa が、活性に必須な残基の変異酵素に対し、活性を回復させることができるかどうかを調べる。

第2節 実験材料および方法

(1) 試薬、菌株

Methanol (HPLC grade, 関東化学)、2-deoxyglucose, grade III, diethylpyrocarbonate (Sigma)、histidine, sodium azide, sodium formate, *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (ナカライテスク)、

Conduritol B epoxide (Biomol Reserch Laboratories) についてはそれぞれ市販のものを用いた。Kunkel 法での dUTPase とウラシル DNA グリコシラーゼ欠損株大腸菌 (*dut*⁻, *ung*⁻) には CJ236、*ung*⁺、*mutS* 株大腸菌には BMH71-18 *mutS*、通常の *ung*⁺ 株大腸菌には MV1184 を用いた。その他各種菌株、各種基質、各種遺伝子工学用試薬やそれらの扱いは第 2 章、第 3 章で述べた。その他特に明記しないものは市販のものを用いた。

(2) 酵素

野生型酵素には第 3 章で精製した *S. cerevisiae* 組み換え酵素を用いた。また CBE による親和標識の速度論的実験には *S. pombe* 培養上清より精製した酵素を用いた。

(3) オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドを北海道システムサイエンスに依頼合成させた。乾固してあるものを蒸留水で溶解させ、20 μ M 溶液として保存した。

(4) 部位特異的変異の導入

部位特異的変異の導入を Kunkel 法¹⁴²⁾、megaprimer PCR¹⁴³⁾もしくはプライマーにミスマッチ塩基を導入した通常の PCR で行った。また可能な限り、変異導入の確認のために制限酵素認識部位を設け、制限酵素感受性により変異導入を確かめた。またいずれの変異も配列解析により確認を行った。操作は定法に従い行った。変異導入に使用したプライマーを Table 4-1 に示した。

(4)-1 Kunkel 法¹⁴²⁾による変異導入

Kunkel 法¹⁴²⁾でのウラシルを含む ssDNA の調製を以下のように行った。

まず変異導入の目標となる DNA 断片を Bluescript II にサブクローニングし、大腸菌 CJ236 へ導入した。形質転換体を 2xYT/Amp 150 (1.6% Bacto trypton, 1% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl, ampicillin 150 μ g/ml) で培養し、M13KO7 を感染させた。37°C で 30 分間振盪培養後、kanamycin を終濃度 70 μ g/ml 加え、そのまま 37°C で振盪培養を行った。20 時間後、遠心分離で上清を集め、常法に従い、PEG/NaCl 沈殿、phenol 抽出により ssDNA を調製した。

Kunkel 法での形質転換を以下のように行った。

Kunkel 法に従い相補鎖合成した DNA 溶液 10 μ l を大腸菌 BMH71-18 *mutS* コンピテントセル 100 μ l と混合し、0°C で 30 分間、42°C で 90 秒間、0°C で 2 分間静置した。SOC 培地 (2% Bacto trypton, 0.5% Bacto yeast extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucose) 890 μ l を加え、37°C で 1 時間振盪した。30 μ l の M13KO7 を加え、37°C で 30 分間振盪した後、この培養液を 2xYT/Amp 150/Km 70 培地 (2xYT, Amp 150 μ g/ml, kanamycin 70 μ g/ml) 1 ml に 300 μ l 接種し、37°C で 20 時間、振盪培養を行った。遠心分離により上清を回収しこれを 2xTY 培地で 10⁶ 希釈したもの 20 μ l を、あらかじめ M9 培地で培養した大腸菌 MV1184 80 μ l と混合し、37 °C で 10 分間静置した。このうち 50 μ l を LB/Amp100 プレー

トに塗布し、37°Cで培養した。形成したコロニーから常法に従いプラスミドDNAを調製し、シーケンスを行って、変異導入を確認した。

(4)-2 megaprimer PCR¹⁴³⁾

megaprimer PCR による部位特異的変異の導入を定法に従って行った。耐熱性 DNA polymerase には KOD DNA polymerase (TOYOBO)を用いた。1st PCR の増幅断片、すなわち megaprimer の精製を QIAGEN PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いた。また 2nd PCR では最終生成物の収率を上げるために通常の megaprimer PCR の前に megaprimer のみを用いてアシメトリックに 5 サイクル PCR を行った。

(5) 部位特異的変異酵素発現ベクターの構築

D481G、D647G を除く変異酵素の発現を *S. cerevisiae* で行った。D481G、D647G 変異酵素の発現を *P. pastris* で行った。

(5)-1 D218N (Fig. 4-1)

通常の PCR により変異を導入した。変異を挿入したミスマッチプライマー D218N と MHd3 (第 3 章参照) を用いて *S. pombe* α -glucosidase cDNA を鋳型に PCR を行った。得られた増幅断片、すなわち変異の導入された DNA 断片を Bluescript II SK にサブクローニングし、さらにこのクローンを *NheI* と *EcoRI* で消化し、そこへ cDNA から切り出した *NheI*-*EcoRI* 断片を挿入した。得られたクローンの *HindIII*-*EcoRI* 断片を SPG/pYES のそれと入れ替えた。これを D218N 発現ベクターとした。

(5)-2 D287N、D355N、D481N、E484Q (Fig. 4-2)

これらの変異導入には Kunkel 法を用いた。Kunkel 法の鋳型には cDNA の *EcoRV* から *PstI* の DNA 断片を Bluescript II KS にサブクローニングしたものをを用いた。次に変異の導入された DNA 断片を酵母発現ベクターへの挿入法を説明する。変異の導入された DNA 断片が挿入されている Bluescript II KS を *PstI* と *XbaI* で消化し、そこへ SPG/pYES から切り出した *PstI*-*XbaI* 断片を挿入した。得られたクローンの *BglII*-*XhoI* 断片を SPG/pYES のそれと入れ替えた。これらを D287N、D355N、D481N、E484Q 発現ベクターとした。

(5)-3 D647N、D676N、E714Q (Fig. 4-3)

これらの変異導入には Kunkel 法を用いた。Kunkel 法の鋳型には cDNA の *PstI* から *EcoRI* の DNA 断片を Bluescript II KS にサブクローニングしたものをを用いた。次に変異の導入された DNA 断片を酵母発現ベクターへの挿入法を説明する。変異の導入された DNA 断片が挿入されている Bluescript II KS を *PstI* と *SmaI* で消化し、そこへ SPG/pYES から切り出した *EcoRV*-*PstI* 断片を挿入した。得られたクローンの *BglII*-*EcoRI* 断片を SPG/pYES のそれと入れ替えた。これらを D647N、D676N、E714Q 発現ベクターとした。

(5)-4. D877N (Fig. 4-4)

Megaprimer PCR により変異を導入した。鋳型には全長 cDNA を *SalI* と *NotI* で Bluescript II KS 挿入したもの (第 2 章参照) を用いた。1st PCR のプライマーには標的変異の含まれる

D887N ともう一方には E714Q を用いた。2nd PCR のプライマーには megaprimer と M13-20 ユニバーサルプライマーを用いた。増幅 DNA 断片を *EcoRI* と *XhoI* で消化し SPG/pYES のそれと入れ替えた。これを D877N 発現ベクターとした。

(5)-4. D481A, D481E, E484A, E484D, E484A, E504V, H579S, D580N (Fig. 4-6)

これらの変異導入に先立って *S. pombe* α -glucosidase cDNA に *BamHI* 認識部位を導入した (Fig. 4-5)。

変異酵素発現ベクター構築の際、変異の導入された DNA 断片を SPG/pYES へ挿入する操作が煩雑である。そこでこれらの作業を簡便に進めるために *S. pombe* α -glucosidase cDNA の 2444 番目の塩基をグアニンからシトシンに変換することで *BamHI* 認識部位を設けた。この変異はアミノ酸置換の起こらないサイレント変異 (469Ser TCG→TCC) である。変異導入を megaprimer PCR により行った。鑄型には cDNA の *EcoRV* から *PstI* の DNA 断片を Bluescript II KS にサブクローニングしたものをを用いた。1st PCR のプライマーには *Bam*, M13 reverse ユニバーサルプライマーを用いた。2nd PCR のプライマーには megaprimer, M13 -20 ユニバーサルプライマーを用いた。変異の導入された増幅 DNA 断片を *EcoRV* と *PstI* で Bluescript II KS にサブクローニングした。次に変異の導入された DNA 断片を酵母発現ベクターにどのように挿入したかを説明する。変異の導入された DNA 断片が挿入されている Bluescript II KS を *PstI* と *XbaI* で消化し、そこへ SPG/pYES から切り出した *PstI*-*XbaI* 断片を挿入した。得られたクローンの *BglII*-*XhoI* 断片を SPG/pYES のそれと入れ替えた。これを SPG (G2444C)/pYES とした。サイレント変異による発現への影響のないことを粗抽出液の maltase 活性で確認し (SPG/pYES 形質転換体 2.6 U/mg, SPG (G2444C)/pYES 形質転換体 2.5 U/mg)、以降の実験にこれを用いた。

次に D481A, D481E, E484A, E484D, E484A, E504V, H579S, D580N の変異導入について説明する。これらの変異導入を megaprimer PCR により行った。まず SPG (G2444C)/pYES から *BamHI*-*EcoRI* 断片を切り出し Bluescript II にサブクローニングした。これを鑄型とした。1st PCR のプライマーには標的変異を含むプライマーと M13 reverse ユニバーサルプライマーを用いた。2nd PCR のプライマーには megaprimer と M13 -20 ユニバーサルプライマーを用いた。変異を含む増幅断片を *BamHI* と *EcoRI* で消化し SPG (G2444C)/pYES の *BamHI*-*EcoRI* 部位と入れ替えた。これらをそれぞれ D481A, D481E, E484A, E484D, E484A, E504V, H579S, D580N 発現ベクターとした。

(5)-5. D647A, D647E (Fig. 4-7)

これらの変異導入を megaprimer PCR により行った。SPG (G2444C)/pYES から *BamHI*-*EcoRI* 断片を切り出し Bluescript II にサブクローニングしたものを鑄型とした。1st PCR のプライマーには標的変異を含むプライマーと M13 -20 ユニバーサルプライマーを用いた。2nd PCR のプライマーには megaprimer と M13 reverse ユニバーサルプライマーを用いた。変異を含む増幅断片を *BamHI* と *EcoRI* で消化し SPG (G2444C)/pYES の *BamHI*-*EcoRI* 部分と入れ替えた。これらをそれぞれ D647A, D647E 発現ベクターとした。

(5)-6. H388N (Fig. 4-8)

これらの変異導入を megaprimer PCR により行った。SPG (G2444C)/pYES から *EcoRV-BamHI* 断片を切り出し Bluescript II にサブクローニングしたものを鋳型とした。1st PCR のプライマーには標的変異を含むプライマーと M13 reverse ユニバーサルプライマーを用いた。2nd PCR のプライマーには megaprimer と M13 -20 ユニバーサルプライマーを用いた。変異を含む増幅断片を *BglIII* と *BamHI* で消化し SPG (G2444C)/pYES の *BglIII-BamHI* 部分と入れ替えた。これを H388N 発現ベクターとした。

(5)-7. D481G (Fig. 4-9)

D481G 変異酵素の発現を *P. pastris* で行った。

変異導入を megaprimer PCR で行った。鋳型には SPG (G2444C)/pYES から *BamHI-EcoRI* 断片を切り出し Bluescript II にサブクローニングしたものをを用いた。1st PCR のプライマーには標的変異を含むプライマーと M13 reverse ユニバーサルプライマーを用いた。2nd PCR のプライマーには megaprimer と M13 -20 ユニバーサルプライマーを用いた。次に変異の導入された DNA 断片を *P. pastris* 発現ベクターにどのように挿入したかを説明する。変異を含む増幅断片を *BamHI* と *EcoRI* で消化し、まず SPG (G2444C)/pYES の *BamHI-EcoRI* 部分と入れ替えた。次に得られたクローンを *NheI* と *EcoRI* で消化し SPG/pPICZA (第3章参照) の *NheI* から *EcoRI* 部分と入れ替えた。これを D481G 発現ベクターとした。

(5)-8. D647G (Fig. 4-10)

D647G 変異酵素の発現を *P. pastris* で行った。

変異導入を megaprimer PCR で行った。鋳型には SPG (G2444C)/pYES から *BamHI-EcoRI* 断片を切り出し Bluescript II にサブクローニングしたものをを用いた。1st PCR のプライマーには標的変異を含むプライマーと M13 -20 ユニバーサルプライマーを用いた。2nd PCR のプライマーには megaprimer と M13 reverse ユニバーサルプライマーを用いた。次に変異の導入された DNA 断片を *P. pastris* 発現ベクターにどのように挿入したかを説明する。変異を含む増幅断片を *BamHI* と *EcoRI* で消化し、まず SPG (G2444C)/pYES の *BamHI-EcoRI* 部分と入れ替えた。次に得られたクローンを *NheI* と *EcoRI* で消化し SPG/pPICZA の *NheI* から *EcoRI* 部分と入れ替えた。これを D647G 発現ベクターとした。

(6) 変異酵素の発現誘導と精製

S. cerevisiae、*P. pastris* いずれの組み換えタンパク質の場合も発現の誘導、精製法を第3章の野生型酵素のそれに従った。(Fig. 4-11)

(7). 生化学的実験手法

活性測定、タンパク質の定量、SDS-PAGE など特に明記しない生化学的実験手法は第3章のそれと等しい。また変異酵素の活性は大幅に減少しているため活性測定の反応時間を長くした。

(8) CD スペクトルの測定

CD スペクトルの測定を Jasco spectropolarimeter J-720 (JASCO)を用いて 200-250 nm の範囲で行った。10 mM sodium phosphate buffer (pH 5.8)中でタンパク質濃度を 32-160 $\mu\text{g/ml}$ に設定し、25°Cで測定した。

(9) D-glucal の調製

D-glucal の調製を既報の方法¹⁰⁸⁾に従い行った。すなわち 5 mmol の 3, 4, 6-tri-O-acetyl-D-glucal (Aldrich Chemical Company Inc.) を 25 mM ナトリウムメトキシド (和光純薬) の methanol 溶液 40 ml に溶解した。室温で 6 時間放置した後、3 g の Silicagel 60 (ナカライテスク) を加え減圧下で乾燥させ、これを Silicagel 60 カラム (ϕ 2.1x36 cm) に供し分画した。カラムクロマトグラフィーの溶媒には ethylacetate/ethanol 混合液 (ethylacetate/ethanol=5/1) を用いた。D-glucal 画分を薄層クロマトグラフィー (Merck Silica gel 60 plate、展開溶媒, 2-propanol : 1-propanol : water = 12 : 3 : 4) により確認し、溶出画分を回収し減圧下で濃縮した。濃縮液に ethanol を加え減圧下に放置し、次に benzene を加え減圧、乾燥することで結晶 D-glucal が得られた。得られた結晶は Drierite®, 8 mesh (Aldrich) とともに減圧下で 1 日間放置した。その後、結晶を秤量し、1 M 溶液として methanol に溶かし使用時まで -20°C に保存した。使用時には methanol を蒸発させた後、脱塩水に溶かし Millex-GV® (0.22 μm , Millipore) を通して使用した。

(9) 2-deoxyglucose の定量

2-deoxyglucose の定量を Tris-glucose oxidase-peroxidase 法 (グルコース AR-II、和光純薬工業) により行った。すなわち反応液に Glucostat 試薬を 200 μl 加え、2 時間、35°C で保持し発色させた後、505 nm の吸光度を測定し検量線と比較することにより定量した。

第3節 実験結果

第1項 活性解離基の推定

活性解離基の種類を同定する目的で酵素反応の速度に対する pH の影響を調べた。

まず pK_e 値を求めた。基質には 1.7 mM maltopentaose を用いた。各 pH における V/K_m の比を直接求めるため基質濃度を maltopentaose の K_m の 1/10 に設定した。広域緩衝液には McIlvaine buffer を用いた。35°C での pK_e 値はそれぞれ $pK_{e1}=3.9$ 、 $pK_{e2}=5.6$ であった (Fig. 4-12)。

次に活性解離基の解離熱を pK_e の温度変化から van't Hoff の式により求めた。まず基質に 1.7 mM maltopentaose を用い、各温度 (10、15、20、25、30°C) での pK_e を求めた。これを van't Hoff の式に当てはめ解離熱を求めた。それぞれ $\Delta H_{e1}=-3.6$ 、 $\Delta H_{e2}=2.9$ であった (Fig. 4-13)。

次にメタノールを加えることにより誘電率を低くした溶媒での pK_e の変化を見た。Fig. 4-14 に 1.7 mM maltopentaose の加水分解反応の相対活性-pH 曲線に対する 20% (v/v) メタノールの効果を示した。解離基 1 に対して 0.1 pH 単位、解離基 2 に対して 0.1 pH 単位それぞれアルカリ側に移動している (Fig. 4-14)。

これらの結果から解離基 1 はカルボキシル基であることを推定できた。解離基 2 はカルボキシル基と推定できるが、その pK 値、解離熱からイミダゾール基である可能性もあった。そこで DEPC (diethylpyrocarbonate) で酵素を化学修飾し、その失活を見ることにした。60 mM sodium phosphate buffer (pH 6) 中で 0.24 μ M *S. pombe* α -glucosidase を終濃度 9 mM もしくは 37 mM の DEPC を用いて 20°C で修飾した。修飾反応開始より 0、3、6、9、12、15 分に反応液の一部をとり終濃度 86 mM になるように histidine を加えることで修飾反応を停止させ、残存 maltase 活性を測定した。その結果、終濃度 37 mM の DEPC で 15 分間修飾を行っても活性は 80% 残存していた。またこのとき防御修飾を行う目的で修飾反応液中に K_m の 10 倍である 56 mM の maltotriose を加えた修飾反応を行ったが修飾が防御されることはなかった (Fig. 4-15)。以上の結果から解離基 2 もカルボキシル基であると判断した。

これら結果から活性解離基は二つのカルボキシル基 (-COO⁻と-COOH) であると推定した。

第2項 部位特異的変異導入による活性に必須なアミノ酸残基の推定

前項で活性解離基が 2 個のカルボキシル基であることがわかった。そこでこれらの解離基を有するアミノ酸残基を推定する目的で部位特異的変異酵素を作製した。

1. α -glucosidase family II で保存されたカルボキシル基への変異導入

α -glucosidase family II で完全に保存されたアスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu) 残基をアスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln) 残基に置換し活性を失うものを探した。

まず α -glucosidase family II で完全に保存されたカルボキシル基を検索する目的で

α -glucosidase family II に含まれる 17 種類の α -glucosidase (*A. niger*, *A. oryzae*, *S. occidentalis*, *C. tsukubaensis*, *M. javanicus*, 大麦 (Morex), テンサイ, ソバ, ホウレンソウ, ヒト酸性 α -glucosidase, ラット isomaltase, ラット sucrase, ウサギ isomaltase, ウサギ sucrase, ヒト isomaltase, ヒト sucrase) の配列比較を clustal w により作製した。その結果, α -glucosidase family II では 8 カ所 (Asp-218, Asp-287, Asp-355, Asp-481, Glu-484, Asp-647, Glu-714, Asp-877) でカルボキシル基が保存されていた。(Fig. 2-11)。

次にこれら 8 個の Asp 残基, Glu 残基をそれぞれ部位特異的に Asn 残基, Gln 残基に置換するよう変異を導入した *S. cerevisiae* 発現プラスミドベクターを作製し *S. cerevisiae* を形質転換した。uracil 要求性により選択した形質転換体をそれぞれ SC-ura 培地で一晚培養した。またこの時対照として野生型酵素を SC-ura 培地で, プラスミドを保持しない *S. cerevisiae* を SC+ura 培地で培養した。終濃度 2% で galactose を加えることにより組み換え変異酵素 (D218N, D287N, D355N, D481N, E484Q, D647N, E714Q, D877N) を発現させた。誘導 48 時間後, 菌体を回収し, ガラスビーズで破碎し粗抽出液を得た。得られた粗抽出液の maltase 活性を測定した結果を Table 4-2 にまとめた。この際のタンパク質の定量を Bradford 法で行った。粗抽出液の maltase 活性から変異酵素を 3 つのグループに分類することができた。

- | | |
|---|---------------------|
| (1) 効果的な活性の減少が見られなかったもの | D287N, E714Q |
| (2) 大幅に活性の減少が見られるが明らかに活性を示すもの | D218N, D355N, D877N |
| (3) ほぼ完全に活性を失うもの。すなわち対照と同じ, もしくはそれ以下の活性しか示さないもの | D481N, E484Q, D647N |

次にグループ(3)に属するものについて変異酵素の精製を行いその maltase 活性を調べた (Table 4-3)。精製の手順を第 3 章で示した野生型酵素のそれにしたがった (Fig. 4-11)。その結果 D481N, E484Q, D647N は野生型と比較して maltase 活性でそれぞれ 0.009 %, 0.001 %, 0.001 % とほぼ完全に活性を失った。またこの 3 つのアミノ酸残基を Ala 残基に置換した部位特異的な変異酵素を *S. cerevisiae* で発現させ精製し (Fig. 4-11), その maltase 活性を測定した。D481A, E484A, D647A の maltase 活性は野生型の 0.001 %, 0.002 %, 0.000 2% とほぼ完全に活性を失った。またこれらについて CD スペクトルを測定した。200-250 nm の波長でモル楕円率を測定したところ野生型酵素とほぼ一致した。以上のことよりこれらの部位特異的な変異 D481A, E484A, D647A によって大きな二次構造の変化が起きていないことがわかった。

グループ(2)に属する D218N, D355N, D887N も同様に精製し maltase 活性を測定したところ, 野生型と比較してそれぞれ 0.06 %, 0.1 %, 0.2 % と大きく活性は減少していたが明らかに活性は残存していた (Table 4-3)。またグループ(2)のなかでも maltase 活性の減少の大きい D218N について *p*-nitrophenyl α -glucopyranoside 分解活性を調べた。3.9 mM pNPG を用い野生型酵素と比較したところ 10% の残存活性を有していた (野生型酵素; 3.57 μ mol

p-nitrophenol/min/mg protein, D218N; 0.35 μ mol *p*-nitrophenol/min/mg protein)。

これらの結果からこの3つのアミノ酸残基 Asp-481、Glu-484、Asp-647 が活性に必須であると判断した。

次に、ここまでで活性に必須なアミノ酸残基であると判断した Asp-481、Glu-484、Asp-647 についてそれぞれカルボキシル基を残す変異を導入したときの活性の変化を見た。すなわち D481E、E484D、D647E 変異酵素を *S. cerevisiae* で発現させその粗抽出液の maltase 活性を調べた。その結果を Table 4-2 に示す。D481E、D647E では活性を失うが E484D では野生型に対して 9 %の maltase 活性が残存した。これにより触媒反応において Glu-484 の位置にカルボキシル基が必要であることがわかった。

2. α -amylase family 保存領域様配列への変異導入

α -amylase family では活性中心として高度に保存されている4つの保存領域類似配列の存在が知られている。これらの領域内には基質結合残基 (TAA; His-122、His-296)、触媒残基 (TAA; Asp-206、Glu-230、Asp-297) が存在する。*S. pombe* α -glucosidase アミノ酸配列中にこの α -amylase 保存領域様配列が見つかった。すなわち 377-MQTFPSDLVSNH-388 が Region 1 に、476-SGIWTDMNEP-485 が Region 2 に、504-EPLV-507 が Region 3 に、572-INNEQGNHD-580 が Region 4 に類似している (Table 4-4)。そこでこれらの領域中で触媒や基質結合に関わっているアミノ酸残基と相同な His-388 (TAA; His-122)、Glu-504 (TAA; Glu-230)、His-579 (TAA; His-296)、Asp-580 (TAA; Asp-297) の部位特異的変異酵素を作製した。置換後のアミノ酸残基を *S. occidentalis* α -glucosidase と配列比較したときに相当するアミノ酸残基にした。すなわち H388 \rightarrow N、E504 \rightarrow Y、H579 \rightarrow S、D580 \rightarrow N 変異酵素を作製し、その活性の変化を調べた。また Asp-481 も TAA; Asp-206 に相当する残基だがこのアミノ酸残基は α -glucosidase family II で保存されたアミノ酸残基なので「1. α -glucosidase family II で保存されたカルボキシル基への変異導入」で変異酵素を作製し、活性の変化を既に調べた。

部位特異的の導入には megaprimer PCR 法を用いた。変異を導入した *S. cerevisiae* 発現プラスミドベクターを作製し *S. cerevisiae* を形質転換した。uracil 要求性により選択した形質転換体をそれぞれ SC-ura 培地で一晚培養した。終濃度 2%の galactose を加えることにより組み換え変異酵素 H388N、E504V、H579S、D580N を発現させた。誘導 48 時間後、菌体を回収し、ガラスビーズで破碎し粗抽出液を得た。得られた粗抽出液の maltase 活性の結果を Table 4-5 にまとめた。野生型酵素と比較してそれぞれ 69%、182%、12%、167%の活性が残存した。したがってこれらの残基が活性には必須ではないことがわかった。

3. Asp-676 への変異導入

Glycogen storage disease type II (GSDII)患者酸性 α -glucosidase の解析の結果から Asp-645 が活性に必須であるプロトドナーである可能性が示されている⁴⁾。そこで *S. pombe* α -glucosidase でこれに対応する Asp-676 を Asn に置換した変異酵素を *S. cerevisiae* で発現さ

せた。部位特異的の導入には Kunkel 法を用いた。変異を導入した *S. cerevisiae* 発現プラスミドベクターを作製し *S. cerevisiae* を形質転換した。uracil 要求性により選択した形質転換体をそれぞれ SC-ura 培地で一晚培養した。終濃度 2% の galactose を加えることにより組み換え変異酵素を誘導した。誘導 48 時間後、菌体を回収し、ガラスビーズで破碎し粗抽出液を得た。得られた粗抽出液の maltase 活性を測定した結果、野生型酵素の 2% にあたる 0.004 U/mg の活性を有していた (Table 4-2)。よってこの残基がプロトンドナーではないことがわかった。

第3項 Conduritol B epoxide (CBE)による失活の速度論

本酵素の CBE による親和標識の失活の速度論的解析を行った。

1.34 μM の酵素を 40 mM sodium acetate buffer (pH4.5)中、35°Cで 0、0.475、0.95、1.9、3.8、7.6 mM の CBE と 20 分間反応させた。修飾反応の停止を 50mM sodium acetate buffer (pH 4.5, 0.05% Triton X-100 を含む)で 50 倍に希釈することで行い、修飾された酵素の残存活性を測定した。それぞれの CBE 濃度で、時間に対する残存活性の対数プロットが直線関係を示した (Fig. 4-16)。このことから失活反応は擬一次的に進んでいることをいえる。見かけの一次反応速度定数 (k_{obs}) を (2) より求めた。

$$v = -d\varepsilon/dt = k_{\text{obs}}\varepsilon \quad (1)$$

$$k_{\text{obs}} = 1/t \cdot 2.303 \log (\varepsilon_0/\varepsilon) \quad (2)$$

(ε , 残存する活性を失っていない酵素濃度; v , 不活性化速度; ε_0 , 酵素初濃度)

各 CBE 濃度での見かけの一次反応速度定数を求めプロットをしたところ飽和曲線が得られた (Fig. 4-16)。このことから、酵素と CBE が酵素と基質との酵素反応と同様に、Michaelis-Menten 型の間体を形成後、失活しているといえる。



(E, 酵素; E-CBE, CBE の修飾により不活性化を受けた酵素)

また $1/k_{\text{obs}}$ 対 $1/[\text{CBE}]$ プロット (Fig. 4-16) に、直線関係 (3) が得られその直線の $1/k_{\text{obs}}$ 切片および傾きから酵素-CBE 複合体 ($\text{E}^* \text{CBE}$) の解離定数 K_R と $\text{E}^* \text{CBE}$ 複合体不活性化の一次速度定数 k を求めた。

$$1/k_{\text{obs}} = (K_R/k)(1/[\text{CBE}]) + 1/k \quad (3)$$

$K_R = 4.4 \text{ mM}$, $k = 4.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であった。

次に $\log k_{\text{obs}}$ を $\log[\text{CBE}]$ に対してプロットをしたところ直線を与えその勾配は 0.81 であった (Fig. 4-16)。従って化学量論的に酵素 1 分子に対し 1 分子の CBE が結合することにより

失活していることがわかる^{69, 144}。

次に α -glucosidase の拮抗阻害剤である Tris による防御修飾を行った。

100 mM Tris の存在下、もしくは非存在下で 3.8 mM CBE による修飾反応を行った(Fig. 4-16)。40 mM sodium acetate buffer (pH4.5)で 50 倍に希釈して反応を止め酵素の残存活性を測定した。なお、この残存活性の測定は 2 mM Tris の存在下で行った。この防御修飾の結果から拮抗阻害剤 Tris の存在下では CBE による失活が防御されていることがわかる。すなわち CBE により修飾されるアミノ酸残基は活性中心に位置すると考えられる。

次に部分修飾した酵素と修飾していない酵素の maltose に対する K_m , V を求めた。酵素を 1.9 mM の CBE と 0 分、5 分、10 分、15 分の各時間 35°C で反応させ、残存活性 100%、66.3%、47.6%、26.7%までそれぞれ部分修飾した。部分修飾酵素の maltose に対する Linweaver-Burk プロットより、部分修飾により V は減少したが K_m は変化していないことがわかった(Fig. 4-17)。この結果から酵素の失活が all or none タイプのものであることがわかる。

以上の結果から酵素 1 分子に対し 1 分子の CBE が活性に重要なアミノ酸残基に結合することにより失活していることがわかる。

第4項 D481A/G、D647A/G に対する NaN_3 、 HCOONa の効果

前項まで Asp-481、Asp-647 を触媒残基と推定した。これらのアミノ酸残基の変異酵素 D481A、D481G、D647A、D647G に対する NaN_3 もしくは HCOONa の効果をみた。すなわち一般的求核試薬である NaN_3 や HCOONa を酵素反応の外用求核試薬として用いたときに、これらの変異酵素の活性が回復するか否かを見た。

まず D481A を用いて NaN_3 、 HCOONa の酵素反応に与える影響をみた。酵素活性測定反応系に NaN_3 を 0~2 M 加え、7.4 mM *p*-nitrophenyl α -glucoside を基質に用い遊離する *p*-nitrophenol の量を測定した。この際、緩衝液には 280 mM sodium acetate buffer (pH 4.5)を用いたが、 NaN_3 を 2 M 加えると pH 5.5 まで上昇した。反応を 35°C で行った。しかしいずれの濃度においても活性の回復は見られなかった。同様に D481G に対する NaN_3 、 HCOONa の影響も調べたが活性の回復は見られなかった。ただしこの場合、野生型酵素活性も 2M NaN_3 も阻害をうけた。

次に D647A、D647G での NaN_3 、 HCOONa の酵素反応に与える影響をみた。D481A と同様に反応系に NaN_3 や HCOONa を 0~2 M 加え、*p*-nitrophenyl α -glucoside を基質に用い遊離する *p*-nitrophenol の量を測定した。しかしいずれの濃度においても活性の回復は見られなかった。

以上の結果を Table 4-6 にまとめた。

これらの結果から β -glucanase、 β -glycosidase で報告のあるような NaN_3 や HCOONa といった求核試薬が酵素反応の求核種として反応が進行するケミカルレスキューが *S. pombe* α -glucosidase 変異酵素では生じないことがわかった。

第5項 D-Glucal の水和反応

1. 野生型酵素での D-glucal の水和

S. pombe α -glucosidase の野生型酵素を使用して D-glucal の水和反応を行った。D-glucal 濃度を変化させ初速度を測定した。D-glucal 濃度と初速度をプロットしたところ飽和曲線が得られた。 K_m 、 V の速度論量を $1/s-1/v$ プロットにより求めた (Fig. 4-18)。 $K_m=82$ mM、 $V=100$ μg 2-deoxyglucose/min/mg protein であった。従って *S. pombe* α -glucosidase が D-glucal を水和できることがわかった。

2. D481A、D647A、E484A 変異酵素での D-glucal の水和

D481A を用いて D-glucal の水和反応の有無を調べた。40 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) 中で 50 mM D-glucal と D481A 59 μg を 35°C で反応させた。生成 2-deoxyglucose の生成速度は 0.012 μg 2-deoxyglucose/min/mg protein であった。これは同様の条件での野生型酵素を用いた場合の 2-deoxyglucose 生成速度、41 μg 2-deoxyglucose/min/mg protein の 0.03% の水和反応率である。

同条件で D647A 48 μg を用いて D-glucal の水和を行ったところ 2-deoxyglucose 生成速度は 0.025 μg 2-deoxyglucose/min/mg protein であった。野生型酵素の 0.06% の値である。

これらの結果から D481A、D647A が maltase 活性同様、D-glucal 水和反応も失っていることがわかる。

一方、活性中心でもう一つ必須な役割を果たしている Glu-484 の変異酵素 E484A 18 μg を用いて D-glucal の水和反応を行ったところ、2 μg 2-deoxyglucose/min/mg protein であった。これは野生型酵素の 4.9% の水和活性である。maltase 活性の場合 0.002% まで活性が減少しているのと比較して D-glucal 水和活性の減少率は低いことがわかった。また E484A の D-glucal 水和反応の K_m 、 V の速度論量を Lineweaver-Burk plot により求めた。 $K_m=1,540$ mM、 $V=42.9$ μg 2-deoxyglucose/min/mg protein であった。

第4節 考察

1. *S. pombe* α -glucosidase の活性解離基の推定

S. pombe α -glucosidase の活性解離基の同定を目的として酵素反応の速度に対する pH の影響を調べた。通常、遊離の酵素における pK 値 (pK_{e1} , pK_{e2}) を V/K_m の pH 依存性から求めるが、本研究ではこれの簡便法として基質を K_m の 1/10 濃度に設定しその pH 依存性から pK_{e1} , pK_{e2} を求めた。その結果から 2 つのカルボキシル基が活性解離基であることを同定できた。解離熱の値からアルカリ側の解離基がイミダゾール基であることも予想できたが DEPC で酵素を修飾しても活性の減少がほとんど見られなかったことから、イミダゾール基が活性には関わっていないことが判明した。 α -glucosidase family II ではこれまでテンサイ¹⁴⁵⁾、*A. niger*¹⁴⁶⁾ α -glucosidase などその活性解離基が調べられているがいずれも 2 つのカルボキシル基である。

2. Asp-481 を触媒反応の求核残基であると推定した

Asp-481 は触媒反応における求核残基であると予想できる。以下それについて考察する。本酵素の CBE による失活の速度論的解析の結果からは「活性中心に位置する触媒反応に重要なアミノ酸残基に CBE が結合することで酵素が失活している。また酵素 1 分子に対し 1 分子の CBE が結合することで失活している」ことがわかった。自殺基質 CBE は触媒反応における求核残基のカルボキシル基に特異的に結合するとされている。その親和標識反応は Fig. 1-4 のように進行していると考えられている。すなわち CBE のエポキシ環の酸素原子と α -glucoside 結合の酸素分子は立体的に同じような位置にあるため活性中心に侵入した CBE は酸塩基触媒基によりプロトン付加を受け、開環する。それにより生成したオキソニウムイオンは求核残基の攻撃を受けて結合するというものである。これまでいくつかの α -glucosidase で CBE により修飾されるアミノ酸残基、すなわち求核残基が同定されている。ウサギ小腸 sucrase-isomaltase complex の Asp-505 と Asp-1394^{65, 66)}、ヒトリソソーム α -glucosidase では Asp-518⁶⁷⁾、テンサイ α -glucosidase では Asp-469⁶⁸⁾、*A. niger* α -glucosidase では P2 subunit の Asp-235⁶⁹⁾ が CBE に親和標識される。従ってこれらの Asp 残基はこれらの α -glucosidase の求核残基であるとされている。この Asp 残基はすべての α -glucosidase family II の酵素で保存されており、*S. pombe* α -glucosidase では Asp-481 に相当する (Table 4-7)。本研究で部位特異的変異酵素 D481N、D481A の maltase 活性が野生型と比較してそれぞれ 0.009%、0.001%まで活性を失うことがわかった。

以上を併せて考えると *S. pombe* α -glucosidase の失活は CBE により Asp-481 が修飾されることで起きており、そして Asp-481 は触媒反応の求核残基であると推定した。

3. 触媒反応における Glu-484 の役割について

Glu-484 は求核残基と推定した Asp-481 の近傍にある残基である。その Gln、Ala 変異酵素 E484Q、E484A は活性をそれぞれ 0.001%、0.002%まで活性を失うことからこの残基が触媒活性に必須であることは予想がつく。しかしカルボキシル基を残した変異酵素 E484D はその活性を野生型と比較して 9%維持する。

似たような現象がヒトリソソーム α -glucosidase で報告されている¹⁴⁷⁾。Glu-484 に対応する Glu-521 \rightarrow Lys、Gln、Asp 変異酵素を COS 細胞で発現させると E521Q が活性を完全に失い、E521K では成熟タンパク質の合成すらできないのに対して、E521D は約 10%活性が残存する、というものである。本研究の結果とこのヒトリソソーム α -glucosidase の結果と併せて考えると、加水分解反応において必須なのは Glu-484 の位置でのカルボキシル基であることがわかる。TAA での酸塩基触媒残基変異酵素の例をあげると、酸塩基触媒残基 Glu-230 を Asp に変えた場合、活性を完全に失う¹⁴⁸⁾。酸塩基触媒残基の場合それがカルボキシル基を残す変異であっても活性を失うことになる。また E484A では D-glucal 水和反応の減少が他の D481A、D647A に比べて小さい。D-glucal の水和反応は酸塩基触媒残基によって活性化された OH が C-1 炭素を攻撃して終了する。すなわち Glu-484 は酸塩基触媒残基ではないといえるのではないだろうか。

Glu-484 の触媒反応での役割は何であろうか？以下それについて E484A 変異酵素は maltase 活性をほぼ失うのに対し D-glucal を水和できるという事実から考察したい。

まず一次構造に相同性は全くないが同じく α -glucoside 結合に作用し、その反応機構は似たものであると予想される酵素群 α -amylase family の一つである *Pseudomonas stutzeri* マルトテトラオース生成 α -アミラーゼ (G4-アミラーゼ) を例に挙げたい⁶²⁾。G4-アミラーゼでは求核残基、酸塩基触媒残基に続く第 3 のカルボキシル基である Asp294 (TAA では Asp297) の役割を「サブサイト-1 位に結合する glucosyl 残基の O-2、O-3 に強く水素結合することにより、基質結合力を強め、かつ加水分解反応を誘引するように歪みを与えることである。すなわち fixer として働いている」と説明している。基質に歪みを与えられたときサブサイト-1 位上の glucosyl 残基は半いす形の構造をとり、1 番炭素 (C1) はほとんど sp^2 混成軌道に近い電子状態を有する。

D-glucal は 1 番炭素 (C1) と 2 番炭素 (C2) が二重結合でつながっている基質で C1 は sp^2 混成軌道である。すなわち通常の基質にすでに歪みを与えられた状態と同じである。一方 maltose は非還元末端 glucosyl 残基 (glc-1) の C1 は sp^3 混成軌道である (本来の加水分解を Scheme 4-1 に示す)。E484A は maltase 活性を失うが D-glucal を水和できる。すなわち基質に歪みがあれば反応を進行できることになる。E484A は基質に歪みを与えることができなくなっているので、すでに歪みを与えられている基質 D-glucal なら反応を進行できるが (Scheme 4-3)、歪みを与える必要のある maltose を加水分解することになる (Scheme 4-2)。すなわち Glu-484 の役割は基質に歪みを与えることと推論できる。

Glu-484 が「基質にひずみを与える役割」を担っていると仮定すると α -glucosidase と α -1,4-glucan lyase の反応の違いを以下のように考察できる。 α -glucosidase と相同性を持つ

α -1,4-glucan lyase は本研究で活性に必須であるとした3つのアミノ酸残基のうち Glu-484 を保存していない³⁵⁾。Glu-484 が基質にひずみを与えると glc-1 の C1 は sp^2 混成軌道に近い電子状態をとることになるだろう。すなわちここでは結合角を $109^\circ 28'$ から 120° に広げることが Glu-484 の役割だと仮定している。このことで酸塩基触媒残基にプロトンを奪われ水分子から生成した OH が C1 に攻撃しやすい立体配置になっている。しかし Glu-484 を保存していない α -1,4-glucan lyase は基質に十分な歪みを与えられないために C1 は sp^3 混合軌道のままで、OH は立体障害のため C1 を求核攻撃できない。そのため C2 からプロトンを奪う脱離反応に傾くのではないだろうか。

また、全く違う Glu-484 の役割としては酸塩基触媒残基と水素結合を形成し酸塩基触媒残基がまずは酸として働くことをサポートしている、という考えもある。すなわち α -amylase family 酵素群における TAA の Asp-297 の役割と同様に基質結合前に酸塩基触媒残基の pK_a を押し上げることに寄与しているという考えである。

4. Asp-647 を酸塩基触媒残基であると推定した

Asp-647 変異酵素 D647N、D647A は野生型酵素の 0.001%、0.0002% とほぼ完全に活性を失う。活性に必須であると判断した3残基のうち Asp-481 が求核残基、Glu-484 が fixer として働いていると予想できた。よってこの残基が酸塩基触媒残基であることを予想できる。以上をまとめて加水分解反応への3残基の関わりを示す反応モードを以下のように予想した (Fig. 4-19)。まず基質が酵素活性部位へ進入してくる。進入してきた基質の glc-1 は Glu-484 により歪められ半いす形をとる。それと同時に Asp-647 が酸として働き glucoside 結合の酸素原子にプロトンを供与することで加水分解が始まる。glucoside 結合は切断されアグリコンが遊離し、カルボニウムイオン中間体を生じる。Asp-647 が塩基として働き水からプロトンを奪い生じた OH がカルボニウムイオン中間体の C1 を攻撃し反応が終了する。ここでカルボニウムイオン中間体が Asp-481 と共有結合を形成するか、もしくは Asp-481 がカルボニウムイオン中間体の安定化にのみ寄与しているかが議論となるがここでは安定化にのみ寄与していると考えた。

また Asp-481 と Glu-484、Asp-647 とその周辺を α -glucosidase family II でアラインメントしてみた (Table 4-7)。Asp-481 と Glu-484 を含む領域を Region A とし、Asp-647 を含む領域を Region B とした。これらの領域を α -glucosidase family II の触媒に必須なアミノ酸残基を含む保存領域として提唱したい。それぞれの領域はとともによくアミノ酸残基が保存された領域であることがわかる。Asp-481、Glu-484、Asp-647 のほかに、Gly-477、Trp-479、Met-482、Phe-488、Trp-644、Gly-646、Trp-652 が完全に保存されている。また *M. javanicus* 由来 (Ser→Ala) を除き Ser-486、大麦 (Morex) 由来 (His→Tyr) を除き His-643、ヒト酸性リソソーム由来 (Asn→Val) を除き Asn-648 が保存されている。また芳香族アミノ酸残基が多い。一般的に基質結合に関わるアミノ酸領域にはよく芳香族アミノ酸が配置されている。本酵素でも芳香族アミノ酸は糖の疎水面とスタッキング相互作用により基質結合に関わっている可能性

がある。これについては次章で考察する。

一般的に酵素の触媒部位は疎水性であり、決められた水分子しか進入してこないと考えられる。Asp-647 の直後には *N* 型糖鎖付加モチーフ 648-NHS-650 が存在する。糖鎖付加部位が同定されている *A. niger* α -glucosidase ではこれが P2 subunit の 415-NYS-417 に対応するが、この Asn には糖鎖が付加されていないことがわかっている¹⁵⁰⁾。すなわちこの事実は糖鎖が付加しないことにより、活性中心における糖鎖による立体障害を回避し、かつ疎水的環境を維持していることを示唆している。

最後にこの酸塩基触媒残基 Asp-647 をはじめ、求核残基 Asp-481、第3残基 Glu-484 変異酵素がなぜ完全に活性を失わないのか？ということについて考察する。例えば Asp-647 変異酵素について考える。上述で推測した反応機構に従えば、活性部位に進入してきた基質分子は Glu-484 により歪められることにより余分なエネルギーを内蔵することになる。すなわち原系 (E+S) での基底状態のエネルギーが高くなるわけで活性化エネルギーが小さくても反応が進むようになる。よって触媒残基の変異酵素であっても自発的な反応より加水分解が速く進行するのではないだろうか。

5. D-glucal の水和反応について

α -glucosidase は D-glucal を水和し 2-deoxy glucose を生成することは古くから知られている。maltase 活性を失った変異酵素 (D481A、E484A、D647A) で D-glucal の水和反応を調べたところ E484A は野生型の約 5%水和活性を残存していたのに対して D481A、D647A は水和活性も失った。これらの結果からは D-glucal の水和も通常の加水分解反応と同様に進行していることが予想できる。すなわち活性部位に侵入してきた D-glucal の 2 位に酸塩基触媒残基 Asp-647 がプロトンを供与し、D-glucal はカルボカチオン中間体を形成する。Asp-481 は活性部位で解離型をとり、カルボカチオン中間体の安定化に寄与していることになる。もし二重置換反応をとるなら中間体と共有結合を形成する。その後プロトンを失った Asp-647 にプロトンを奪われた水分子の OH が C1 炭素を攻撃して 2-deoxy glucose を生成する。D647A はプロトンを付加することも水を活性化することもできないため水和反応は進行しないし、D481A は反応中間体を安定化することができないので水和反応は生じないのだろう。一方 E484A は前節でも考察したように基質分子に歪みを与える fixer の役割であるから、元来歪みの与えられている D-glucal に対して酸塩基触媒残基、求核残基が残存していれば水和活性を示すのではないだろうか。

5. その他の部位特異的変異酵素について

保存されたカルボキシル基に部位特異的変異を導入すると触媒反応に必要な残基以外であっても Asp-218、Asp-355、Asp-877 の Asn への変異酵素が活性を大幅に失っている。このことはこれらの残基が酵素の機能において重要な働きをしていることを示す。進化の過程において保存されており、これらのアミノ酸残基は触媒残基以外の重要な機能を備えてい

る可能性は高い。例えば基質認識、また活性中心構造の維持などを予想できる。その中で Asp-218 の *p*-nitrophenyl α -glucoside 分解活性と maltose 分解活性とを比較したとき、maltase 活性の減少が大きい。このことは Asp-218 がサブサイト 2 での glucose 残基の認識に関わっていることを予想させる。

6. α -amylase family 酵素群保存領域様配列について

S. pombe α -glucosidase アミノ酸配列中には α -amylase family 酵素群で高度に保存された領域 (Region 1-4) と似た配列が見いだされた (Table 4-4)。これらの領域には α -amylase family 酵素群では触媒残基 Asp-206、Glu-230、Asp-297 (TAA でのアミノ酸番号。それぞれ Region 2、Region 3、Region 4 に位置する) が含まれる。また Region 1 と Region 4 とで保存されている His 残基 (TAA His-122、His-296) は基質と水素結合を介して相互作用しており、遷移状態の安定化に寄与していると考えられている^{151, 152})。そこでこれらに相当する *S. pombe* α -glucosidase のアミノ酸残基 His-388、His-579、Glu-504、Asp-580 が活性に関わっていないことを確認するために変異を導入した。Asp-206 に相当する残基は *S. pombe* α -glucosidase では Asp-481 で活性に必須であることをすでに示してある。もし *S. pombe* α -glucosidase において α -amylase family と同様に他の 3 領域も活性中心を形成しているならば、基質結合部位 (TAA His-122、His-296) に相当する His-388、His-579 や、触媒アミノ酸残基 (TAA Glu-230、Asp-297) に相当する Glu-504、Asp-580 に部位特異的変異を導入した酵素は活性をほぼ完全に失うはずである。しかし変異酵素 H388N、E504Y、H579S、D580N はそれぞれ粗抽出液で野生型酵素の 69%、182%、12%、167%の活性を示した。変異酵素 E504Y、D580N の活性が増加したのは培養条件の微妙な違いなどの理由で組み換えタンパク質の発現量が多かったためと考えられる。したがって変異酵素の活性から考えて *S. pombe* α -glucosidase の α -amylase family 保存領域様配列のうち、Region 1、3、4 は単なる一次構造の類似であり、活性中心を形成するものではないと結論できる。

α -glucosidase family I と family II との一次構造上の相同性は低い。しかし反応は α -glucoside 結合に作用し、 α -アノマーの生成、 α -glucoside 結合の形成に関して同じである。おそらく反応機構は同一であると推測できる。比較的下等な生物である *S. pombe* に α -amylase family 酵素群に共通な配列が見つかったことで α -glucosidase family I と family II が共通な祖先から派生したものかもしれないという見方もある¹⁵³)。しかしそのような分岐進化の中でも触媒残基を含む保存領域配列が淘汰されるとは考えにくく、このふたつの α -glucosidase family は異なる起源のものが次第に同じ性質をもつようになった収斂進化であろう。また *Candida albicans* では α -glucosidase がふたつ報告されており、それぞれ α -glucosidase family I、family II に属する。これも収斂進化を後押しする事実ではないだろうか。

7. Asp-676 について

Asp-676 はヒトリソソーム α -glucosidase では Asp-645 に相当する。ヒトリソソーム

α -glucosidase はその遺伝的欠損症が glycogen storage disease type II (GSD II, Pompe 病)を引き起こすことから、 α -glucosidase family II のなかでも研究の進んでいる酵素の一つである。Pompe 病患者から得られた遺伝子から様々な欠損部位が見つかっており、またそれらの変異を *in vitro* mutagenesis により新たに cDNA に導入し、COS 細胞や繊維芽細胞などで発現し、その細胞内輸送などが調べられている (<http://www.eur.nl/FGG/CH1/pompe/mutation.htm>)。Asp-645 の変異はその一つであり Asp-645→His, Glu, Asn への置換が見つまっている¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾。これらの変異を新たに cDNA に導入し COS 細胞に導入すると活性をほぼ完全に失ってしまうこと、またこの Asp-645 周辺のアミノ酸残基が非常に良く保存された領域であったことからこの Asp-645 が触媒反応のプロトンドナーとして報告された⁴⁾。しかし本研究でこの Asp-645 と相同である *S. pombe* α -glucosidase の Asp-676→Asn 変異酵素が活性を野生型の 2%を残存していたことからこれがプロトンドナーであることを否定した。またヒトリソーム α -glucosidase の Asp-645 においても Glu 変異酵素を COS 細胞ではなく繊維芽細胞で発現した場合には、野生型の 33%の活性を残すという報告¹⁵⁷⁾もありこれがプロトンドナーではないことがわかる。Asp-645 の変異による Pompe 病は、酵素の細胞内輸送、リン酸化などの翻訳後修飾ができなくなるために引き起こされる、というのが有力である。

今回、Asp-645 が触媒反応のプロトンドナーではないことがわかったが、遺伝変異とそれらが活性を失うことが数多く報告されているヒトリソーム α -glucosidase の遺伝的欠損によるアミノ酸残基置換のデータは α -glucosidase family II の酵素化学的研究を進める上でも参考になると思う。これまで報告されている Pompe 病のうちエキソンの変異によりアミノ酸残基置換、欠損のものをまとめた。(Table 4-8)

8. Asp-481、Asp-647 変異酵素が NaN_3 、 HCOONa により活性を復帰しないことについて
いくつかの β -glycosidase ではその求核残基、酸塩基触媒残基に変異を導入し活性を失った酵素の反応液に NaN_3 などの求核試薬を加えることでそれを求核剤として反応が進行することが報告されている。*Cellulomonas fumi* exoglucanase/xylanase (Cex)^{74, 75)}、*Sulfolobus solfataricus* β -glycosidase (Ss β -gly)⁷⁶⁾、*Agrobacterium faecalis* β -glucosidase⁷⁸⁾、*Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- β -glucanase⁷⁹⁾などで報告があるが、例えば Cex では 2 M NaN_3 を加えるとその酸塩基触媒残基変異酵素 E127A は約 200 倍の k_{cat} の値をとるようになる。そこで *S. pombe* α -glucosidase 求核残基変異酵素、酸塩基触媒残基変異酵素で求核試薬による活性の復帰、すなわちケミカルレスキューが起きることを期待したが、結果は NaN_3 、 HCOONa の添加による活性の復帰は見られなかった。すなわち外用の求核試薬を用いて求核残基、酸塩基触媒残基を決定することはできなかった。なぜケミカルレスキューが起きなかったのかについて考察する。まず、求核試薬が所定の位置、基質 glc-1 の C1 の近くに侵入できないことを予想できる。すなわち Asp-481 や Asp-647 は溶媒と接し難い位置にあるという考えである。*S. pombe* α -glucosidase では立体構造が未知であるため、活性部位の構造や glc-1 の C1 付近の状態を知ることはできない。そこで同じ α -glucoside 結合に作用する酵素群 α -amylase

family の TAA を例にする。これまで α -amylase では変異酵素でのケミカルレスキューの報告はない。TAA の場合、求核残基 Asp-206 は活性クレフトの最底部に位置し glc-1 と近接していることが知られている。*S. pombe* α -glucosidase においてもこれに対応する Asp-481 が活性部位の底に位置するために求核試薬が進入していけないことが考えられる。また Asp-647 については疎水環境に位置することを先に考察した。これが正しければ Asp-647 の位置まで求核試薬が進入していけない可能性がある。これまで β -結合に作用する酵素では触媒残基変異酵素でのケミカルレスキューの報告が数多くあるのに対し α -結合に作用する酵素ではその報告が見つからない。 α -結合に作用する酵素、 β -結合に作用する酵素で反応機構に違いがあるだろうか。おそらく反応機構には違いはないであろう。一般酸塩基触媒により進行している。しかし、 α -glucoside は glc-1 アノマー炭素の-OH 基が axial、 β -glucoside は glc-1 アノマー炭素の-OH 基が equatorial に結合している。それぞれの glycosidase が α -結合もしくは β -結合に対してそれぞれ特異性をもつのは基質の結合様式と触媒残基の位置関係によるものと考えられる。その位置関係が α -結合と β -結合に作用する酵素で違うため、 α -結合に作用する酵素では求核試薬が近づきにくくなっているのではないだろうか。

また今回、基質には *p*-nitrophenyl α -glucoside を使った。Ss β -gly でのケミカルレスキューでは、基質に 2-もしくは 4-nitrophenyl β -glucoside を使うよりも 2,4-dinitrophenyl β -glucoside を使ったほうがより活性の復帰が大きい。2,4-dinitrophenyl 基は 4-nitrophenyl に比べて非常に良い脱離基なので反応は進行しやすくなっているのである。また酸塩基触媒残基変異酵素の場合は基質がよりよい脱離基をもっていなければケミカルレスキューは不可能である。

また sodium azide による酵素反応の阻害が大きいことも要因となる。例えば Ssb-gly では sodium azide によりほとんど阻害を受けない⁷⁶⁾が、*S. pombe* α -glucosidase 野生型酵素は 10% 以下まで阻害を受けた。

第5節 要約

1. 酵素反応の pH による影響から *S. pombe* α -glucosidase の活性解離基は 2 つのカルボキシル基であることがわかった。
2. α -glucosidase family II に含まれる 17 種の酵素で完全に保存されたカルボキシル基に部位特異的変異を導入し、*S. cerevisiae* で発現させたところ Asp-481、Glu-484、Asp-647 が活性に必須であることがわかった。
3. Asp-481 は *S. pombe* α -glucosidase が自殺基質 CBE が 1 対 1 で結合することで失活すること、またその相同性から触媒反応の求核残基であることを予想できた。
4. Glu-484 は Gln、Ala への変異では maltase 活性を失うのに対し、カルボキシル基を残す変異 E484D では maltase 活性を野生型の 10% 示した。活性中心のこの位置でのカルボキシル基が加水分解反応に必須であることがわかった。E484A は maltose を加水分解することはできないが、より遷移状態に近い構造をもつ D-glucal を水和できることから Glu-484 は基質に歪みを与える役割を果たしていると予想した。
5. 3 つの必須な残基のうち残る Asp-647 が触媒活性の酸塩基触媒残基の最有力候補であることがはじめて明らかにされた。

Table 4-1 Oligonucleotides Used for Mutation in Amino Acid

	Sequence of oligonucleotides primer ^a	Restriction site inserted or deleted
D218N	5'-GGGGCTAGCTT CATT ATTAGCCCAAAGG-3'	
D287N	5'-GTATACAAAAAG AT <u>TAATAACACCACCG</u> -3'	<i>VspI</i> inserted
D355N	5'-GTAATCAAT ▼ <u>ATTAGACCAAAGGTTTC</u> -3'	<i>SspI</i> inserted
D355E	5'-CATGTAAT ▼ <u>CGATTTCAGACCAAAG</u> -3'	<i>Clal</i> inserted
D481E	5'-TTCGTT CATTTC AGTCCAAATTC-3'	
D481N	5'-GTT CATATT AGTCCAAATTC-3'	
D481A	5'-TTCGTT CATAGC AGTCCAAAT-3'	
E484Q	5'-AAGAGGG TTGG TT CATATC -3'	
E484D	5'-ACGAAGAGGG ATCG TT CATATC -3'	
E484A	5'-CGAAGAGGG TGCG TT CATATC -3'	
D647N	5'-TATGG ▼ TGCT CATTGGTTGGGTAATAATCATT C-3'	<i>ApaLI</i> deleted
D647E	5'-TGGTTGGGT GAAA ATCATTCT-3'	
D647A	5'-TGGTTGGGT GCTA ATCATTCT-3'	
D676N	5'-GGTATTCC ▼ CATGGTAGGAGCT AATGTTTGTG -3'	<i>NcoI</i> inserted
E714Q	5'-ATTTACCA ▼ GATCTCACA ACAGCCCTAC -3'	<i>BglII</i> inserted
D877N	5'-CACCAT CATTAAGG TAGAGCT ▼ CACCAG-3'	<i>SacI</i> inserted

^a The substituted nucleotides are indicated as bold letters. Mutant codons are underlined. The symbols (▼ and ▼) show the restriction sites inserted and deleted, respectively.

Table 4-2 Maltase Activity of SPGase Mutant in the Cell-free Extract

Position and type of mutation	Maltase activity	
	(U / mg protein) ^a	(%) ^b
Willd-type	0.20	100
Control (<i>S.cerevisiae</i>) ^c	0.00026	0.13
218 D→N	0.0012	0.60
287 D→N	0.14	70
355 D→N	0.00060	0.30
355 D→E	0.00060	0.30
481 D→N	0.00040	0.20
481 D→E	0.00020	0.10
481 D→A	0.00032	0.16
484 E→Q	0.00026	0.13
484 E→D	0.018	9.0
484 E→A	0.00040	0.20
647 D→N	0.00026	0.13
647 D→E	0.00020	0.10
647 D→A	0.00016	0.08
676 D→N	0.0040	2.0
714 E→Q	0.052	26
877 D→N	0.00080	0.40

^a The protein concentration was measured by the Bradford method.

^b The activities were compared with the wild-type.

^c *S. cerevisiae* not carrying SPGase / pYES.

Table 4-4 Conserved Amino Acid Sequences in α -Amylase, Related Enzymes, and α -Glucosidases Containing Regions Deduced as Catalytic Sites.

Enzyme*	Region 1	Region 2	Region 3	Region 4
α-amylase family				
<i>Asperigillus oryzae</i> AMY	117-DVVANH	202-GLRIDTVKH	230-EVLD	292-FVENHD
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NPL	242-DAVFNH	324-GWRLDVANH	357-EIWH	419-LLGSHD
<i>Pseudomonas amyloclavata</i> IAM	291-DVVYNH	370-GFRFDLASV	454-EWSV	502-FIDVHD
<i>Klebsiella aerogenes</i> PUL	600-DVVYNH	671-GFRFDLMGY	704-EGWD	827-YVSKHD
<i>Bacillus stearothermophilus</i> CGT	131-DFAPNH	221-GIRMDAVKH	253-EWFL	319-FIDNHD
<i>Escherichia coli</i> BE	335-DWVPNH	401-ALRVDAVAS	426-EFGG	521-LPLSHD
α-glucosidase Family I				
<i>Sacchromyces cerevisiae</i> AG	106-DLVINH	210-GFRIDTAGL	276-EVAH	344-YIENHD
<i>Bacillus cereus</i> AG	98-DVVVNH	195-GFRMDVINP	255-EMPG	324-YWNNHD
Mosquito AG	114-DFVPNH	215-GFRIDAVPY	290-EGYT	351-VLGNHD
α-glucosidase Family II				
<i>Schizosacchromyces pombe</i> AG	383-DLVSNH	477-GIWTDMSEV	504-EPLV	575-EQGNHD

AMY, α -amylase; NPL, neopullulanase; IAM, isoamylase; PUL, pullulanase; CGT, cyclomaltodextrin glucanotransferase; BE, 1,4- α -glucan branching enzyme; AG, α -glucosidase.

Table 4-3 Maltase Activity of Purified SPGase Mutant

Position of mutation	Maltase activity	
	(U / mg protein) ^a	(%) ^b
Wild-type	45	100
218 D→N	2.9×10^{-2}	0.06
355 D→N	4.8×10^{-2}	0.1
877 D→N	7.0×10^{-2}	0.2
481 D→N	4.1×10^{-3}	0.009
D→A	4.4×10^{-4}	0.001
484 E→Q	6.4×10^{-4}	0.001
E→A	8.2×10^{-4}	0.002
647 D→N	6.4×10^{-4}	0.001
D→A	7.3×10^{-5}	0.0002

^a The protein concentration was calculated with assumption that $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 6.58.

^b The specific activities were compared with the wild-type.

Table 4-5 Maltase activity of SPGase Mutant in the Cell-free Extract

Position of mutation	Maltase activity	
	(U / mg protein) ^a	(%) ^b
Wild type	0.51	100
H388N	0.35	69
E504Y	0.93	182
H579S	0.06	12
D580N	0.85	167

^a The protein concentration was measured by the Bradford method.

^b The activities were compared with the wild-type.

Table 4-6 Effects of Sodium Azide or Sodium Formate on the Specific Activity of Wild-type and Mutant *S. pombe* α -glucosidase

Nucleophile	Enzyme	Concentration of external nucleophile (M)			
		2	1	0.5	0
NaN ₃	D481A	0.00038	0.00145	0.0029	0.0039
	D481G	0.00002	0.00044	N.D.	0.00024
	D647A	0.00048	N.D.	N.D.	0.0010
	D647G	0.00011	N.D.	0.00011	0.00029
	Wild-type	0.032	0.098	0.12	1.4
HCOONa	D481A	0.0014	0.0016	N.D.	0.0031
	D481G	0.000059	N.D.	0.00032	0.00024
	D647A	0.00067	N.D.	N.D.	0.0010
	D647G	0.00034	N.D.	0.0004	0.0003
	Wild-type	1.4	1.63	N.D.	1.4

Values are shown as μ mol *p*-nitrophenol liberated per min per mg protein at 35°C from 7.4 mM *p*-nitrophenyl α -glucoside. N.D. means 'not determined'.

Table 4-7 Multiple Alignments of Two Conservative Regions, Region A and B, Including Essential Residues of SPGase.

Origin		Region A			Region B	
<i>S. pombe</i>	476	SGIWTD <u>M</u> NEPSSF	488	641	GAHWLGD <u>NH</u> SLW	652
<i>A. niger</i> (P2 subunit)	219	DGVWYDMSEVSSF	231	408	AGHWGGD <u>NYS</u> KW	419
<i>A. oryzae</i>	487	DGVWYDMAEVSSF	499	654	AGHWGGD <u>NFS</u> KW	665
<i>C. tsukubaensis</i>	521	SGIWLD <u>M</u> NEPSSF	533	724	TGHWLGDNYALW	735
<i>M. javanicus</i>	425	DGLWIDMNEPASF	437	561	VGHWTGD <u>NHS</u> FW	572
<i>S. occidentalis</i>	465	DGIWADMNEVSSF	477	632	TGHWGGDNTADW	643
Sugar beet	464	DGIWIDMNEASN <u>F</u>	476	562	TAHWTGDNAATW	573
Barley	432	DGLWIDMNEISNF	444	528	TAYWTGDNAATW	539
Spinach	460	DGLWIDMNEISNF	472	558	TAHWTGDNAATW	569
Human	513	DGMWIDMNEPSNF	525	610	AGHWTGDVWSSW	621
Rabbit (sucrase)	1389	DGLWIDMNEPSSF	1401	1494	AGHWLGDNYARW	1505
Rabbit (isomaltase)	500	DGLWIDMNEVSSF	512	598	AAHWLGDNTATW	609
Human (sucrase)	1389	DGLWIDMNEPSSF	1401	1494	GGHWLGDNYARW	1505
Human (isomaltase)	500	DGLWIDMNEVSSF	512	598	AAHWLGDNTASW	609
Rat (sucrase)	1394	DGLWIDMNEVSSF	1406	1506	GGHWLGDNYTTW	1517
Rat (isomaltase)	509	DGLWIDMNEVSSF	521	609	ANHWLGDNTASW	620
Consensus ^a		dG W DM E s F			hW GDn W	

^a Amino acid residues which are identical to all or the majority of the sequences are indicated by capitals and lower-case letters, respectively.

Asp identified to be labeled by CBE is underlined. Bold Asp and Glu are interpreted as critical residues for catalysis. The *N*-glycosylated motif, NXS (or T), is double-underlined. The numbers are amino acid residues from the N-terminus of deduced amino acid sequence for each protein except *A. niger* α -glucosidase. In the case of *A. niger* α -glucosidase, the number correspond to the sequence of P2 subunit.

Table 4-8 Register of Mutations in Human Acid α -Glucosidase

GAA (AA-change)	Effect	Correspond to SPG
del Met 1→His 952	mild	Met 1→His 109
Arg 199 His	polymorfism	Leu 128
His 223 Arg	polymorfism	Thr 159
Leu 299 Arg	severe	Leu 235
Gly 309 Arg	severe	Gly259
Met 318 Thr	severe	Met 268
Trp 402 Arg	severe	Trp 352
Gly 478 Arg	severe	Gly 435
Met 519 Val	severe	Met 482
Met 519 Thr	severe	
Glu 521 Lys	severe	Glu 484
Ser 529 Val	mild	Ala 542
Pro 545 Leu	mild	Ile 572
Ser 566 Pro	severe	His 593
Gly 576 Ser	mild	Gly 606
Gly 638 Trp	unknown	Gly 669
Gly 643 Arg	severe	Gly 674
Asp 645 His	severe	Asp 676
Asp 645 Asn	severe	
Asp 645 Glu	severe	
Cys 647 Trp	severe	Cys 678
Gly 648 Ser	severe	Gly 679
Arg 672 Trp	less severe	Arg 703
Arg 672 Gln	less severe	
Glu 689 Lys	polymorfism	Glu 714
Arg 725 Trp	less severe	Arg 755
del Glu 730→Cys 952	severe	Glu 730→Leu 969
Trp 746 Termination	severe	Val 776
Trp 746 Cys	polymorfism	
Pro 768 Arg	severe	Pro 798
Ile 780 Val	polymorfism	Tyr 806
Val 816 Ile	polymorfism	Val 833
del Gly 828→Asn 882	severe	Gln 845→Leu 884
Arg 854 Termination	severe	Thr 871
del Lys 903→Cys 952	severe	Asn 915→Leu 969
Thr 927 Ile	polymorfism	Gln 939
Val 949 Asp	severe	Asn 963

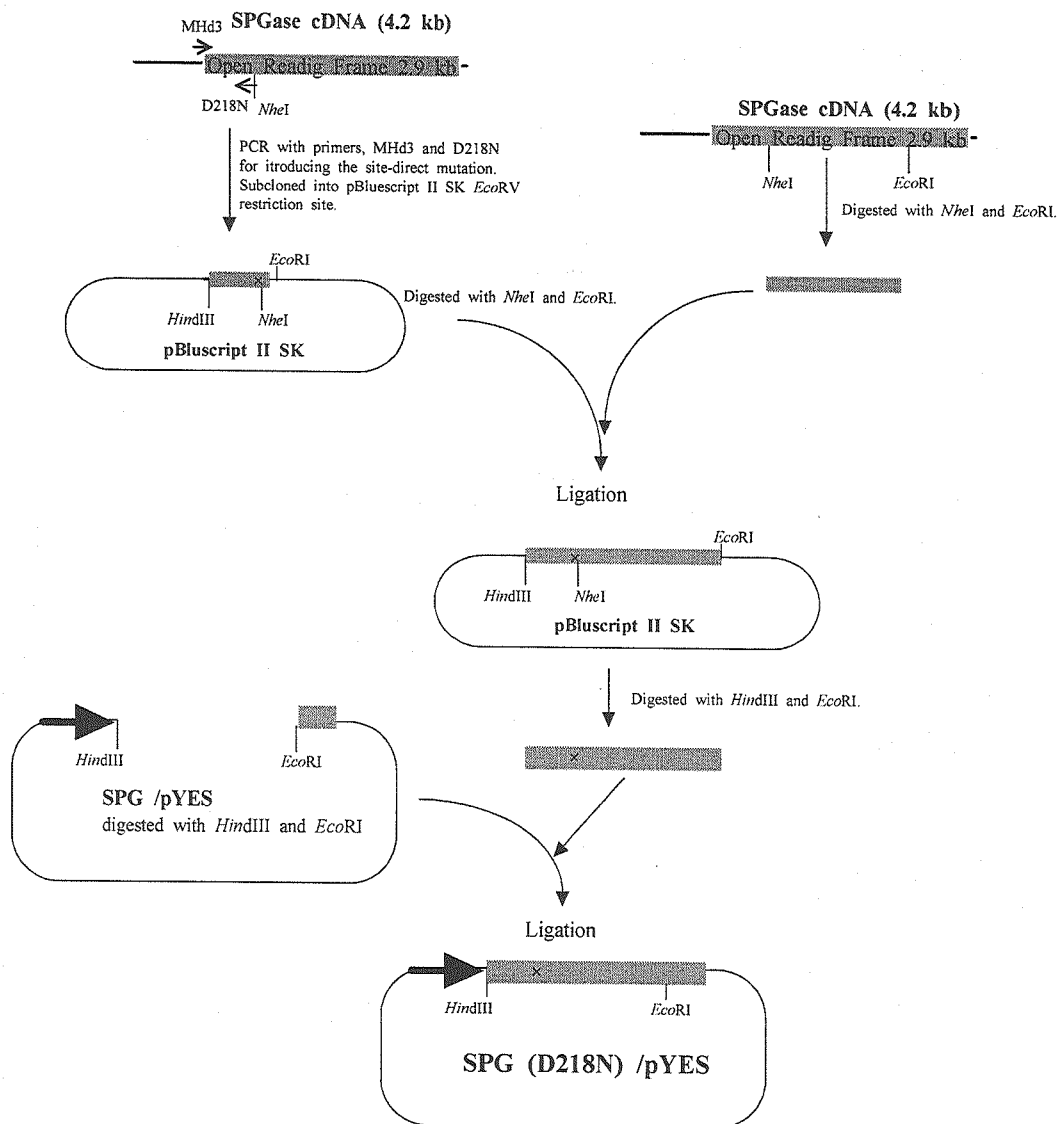


Fig. 4-1. Construction of SPG (D218N) / pYES expression vector. D218N mutation was introduced by primer-template mismatch PCR. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly introduced mutation was shown by ×.

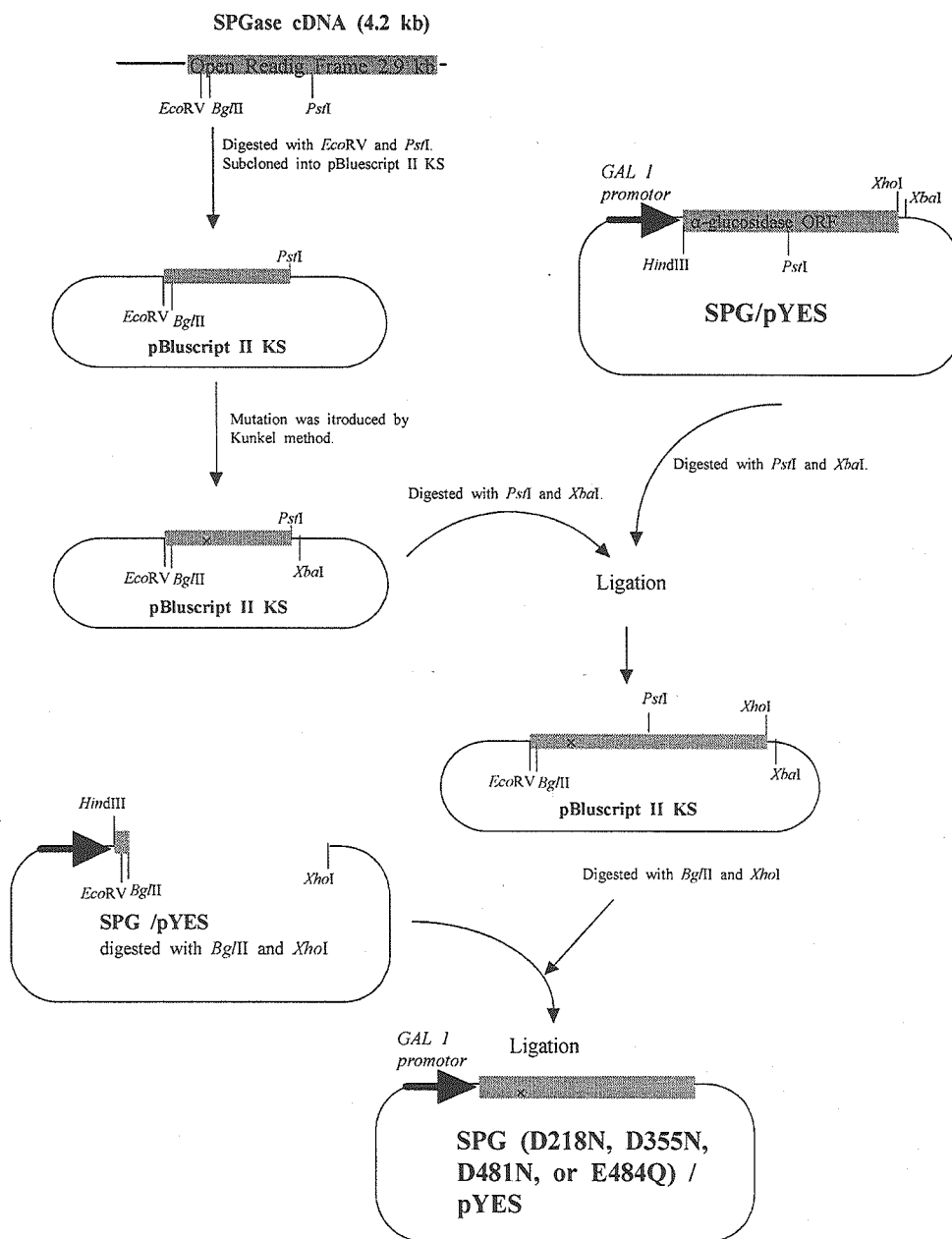


Fig. 4-2. Construction of SPG (D287N, D355N, D481N, or E484Q) / pYES) / pYES expression vector.

These mutations were introduced by Kunkel method. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly generated mutation was shown by x.

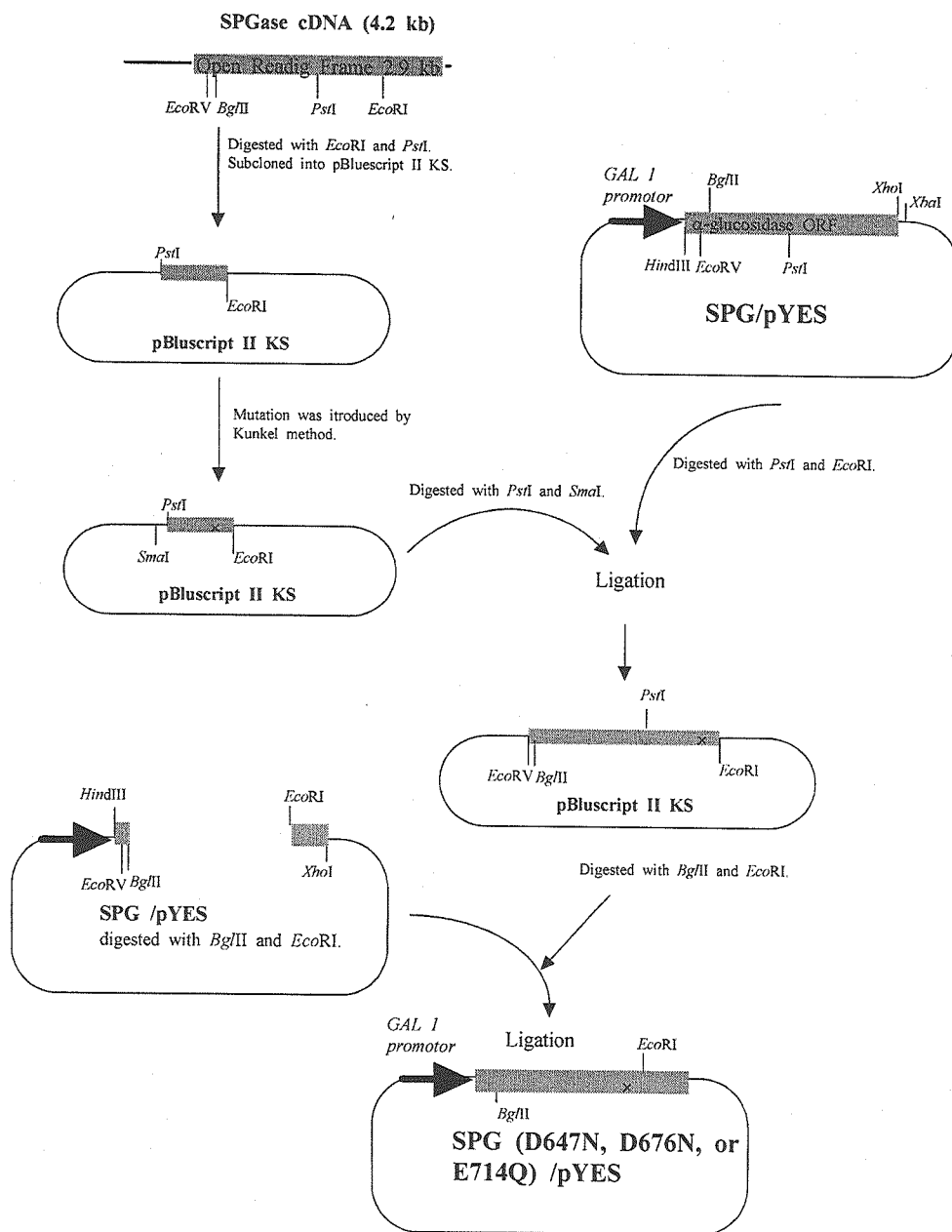


Fig. 4-3. Construction of SPG (D647N, D676N, or E714Q) /pYES) / pYES expression vector.

These mutations were introduced by Kunkel method. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly generated mutation was shown by ×.

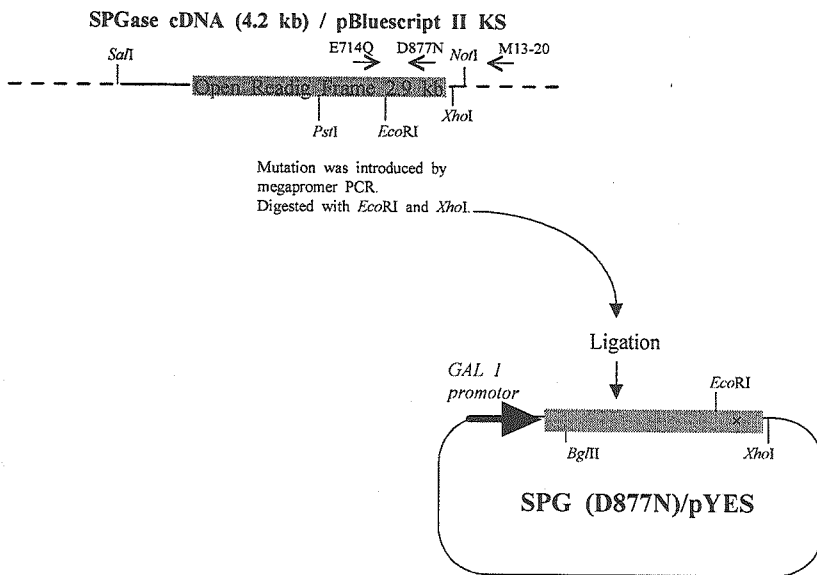


Fig. 4-4. Construction of SPG (D887N) / pYES expression vector. These mutations were introduced by megaprimer PCR method. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly generated mutation was shown by ×.

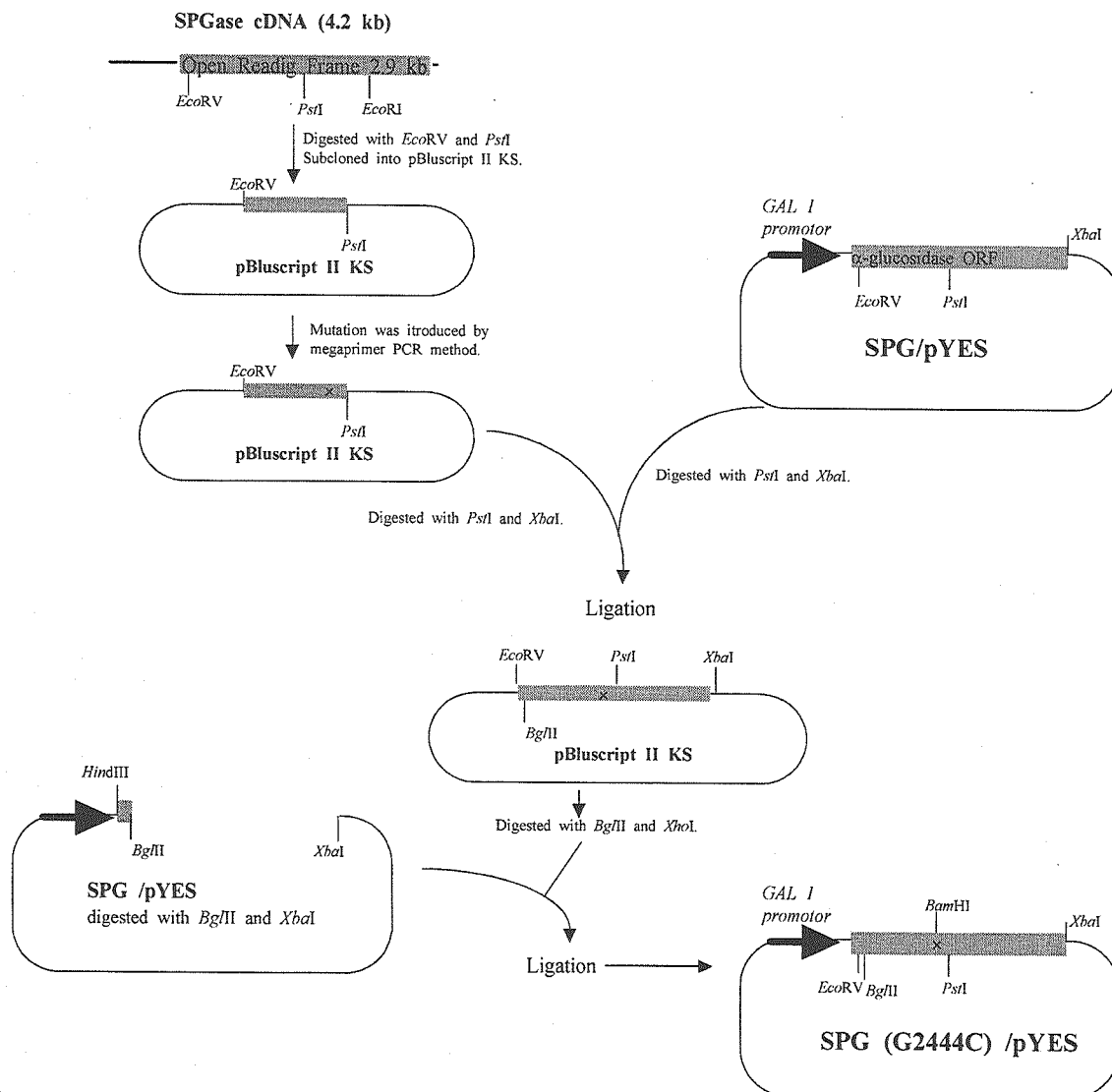


Fig. 4-5. Construction of SPG (G2444C) / pYES expression vector. These mutations were introduced by megaprimer PCR method. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly generated mutation was shown by ×.

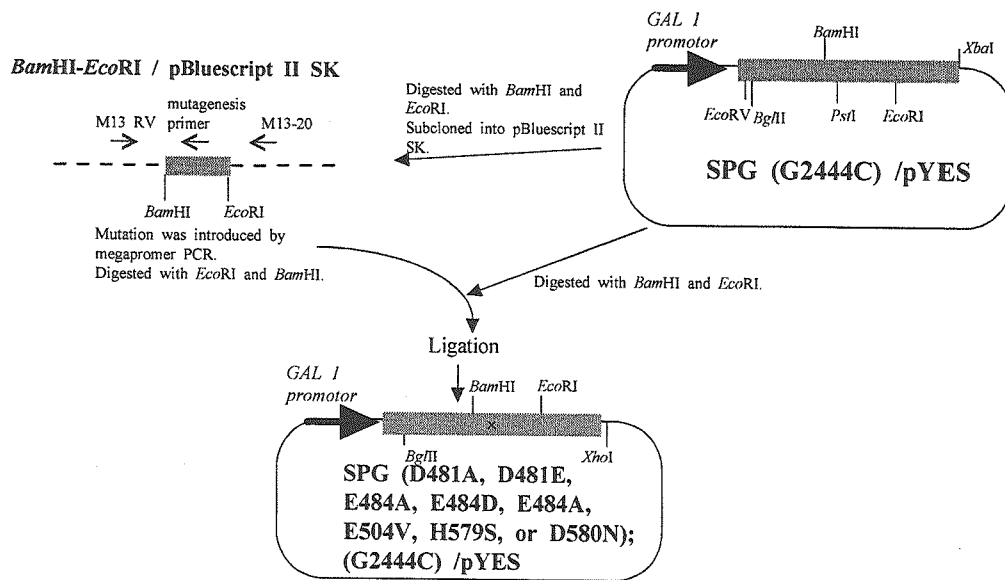


Fig. 4-6. Construction of SPG (D481A, D481E, E484A, E484D, E484A, E504V, H579S, or D580N) / pYES expression vector.

These mutations were introduced by megaprimer PCR method. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly generated mutation was shown by ×.

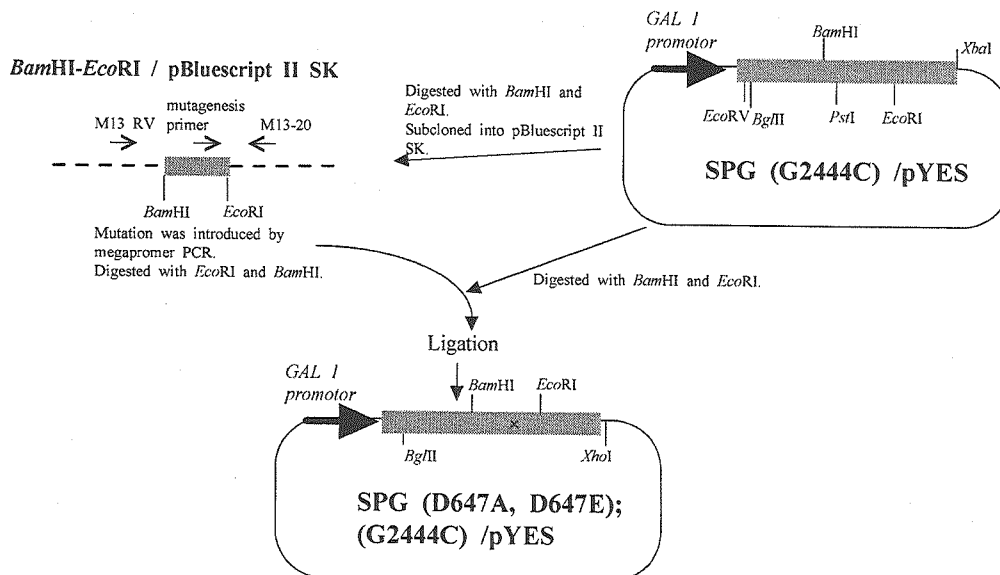


Fig. 4-7. Construction of SPG (D647A, D647E) / pYES expression vector.

These mutations were introduced by megaprimer PCR method. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly generated mutation was shown by ×.

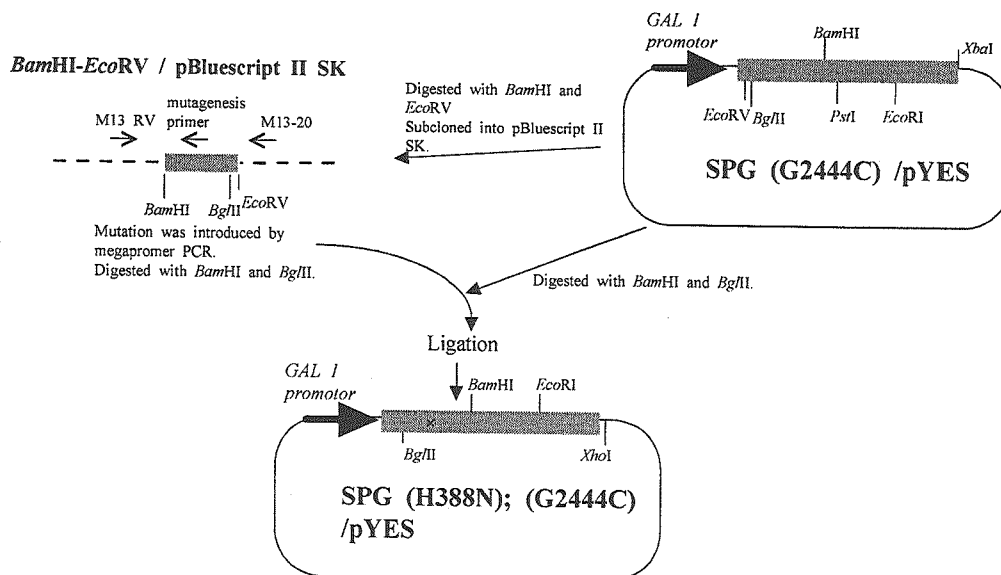


Fig. 4-8. Construction of SPG (H388N) / pYES expression vector. These mutations were introduced by megaprimer PCR method. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly generated mutation was shown by ×.

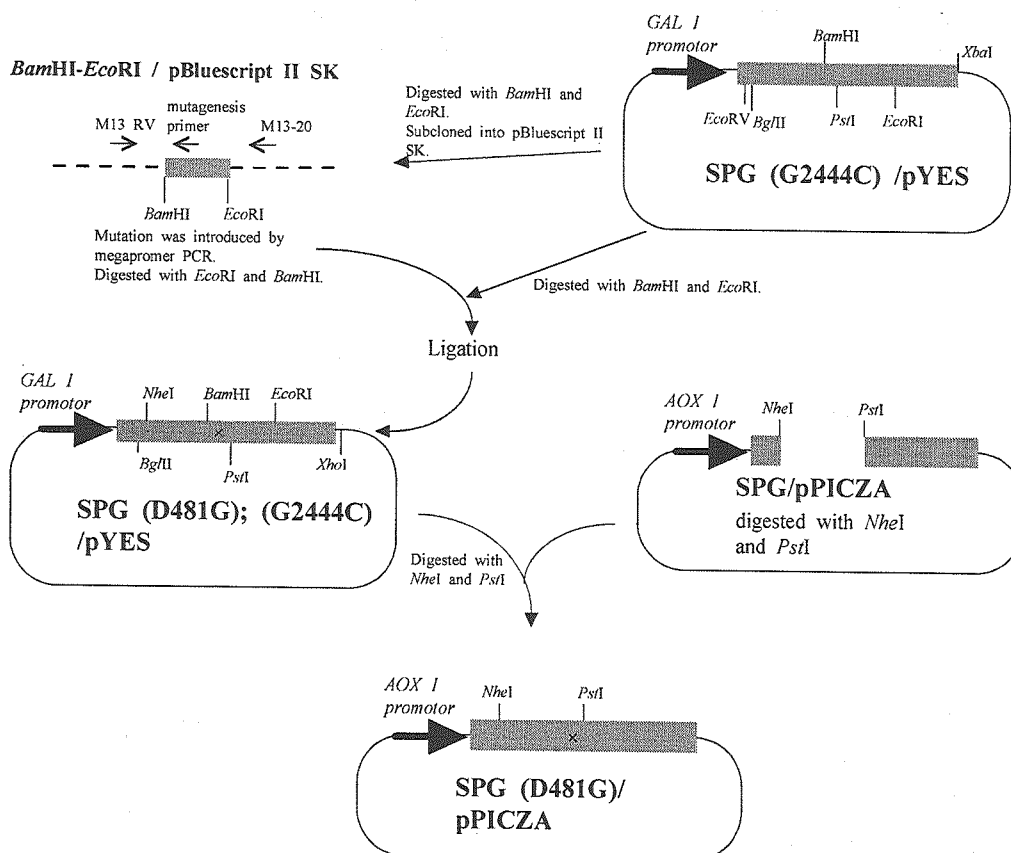


Fig. 4-9. Construction of SPG (D481G) / pPICZA expression vector. These mutations were introduced by megaprimer PCR method. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly generated mutation was shown by ×.

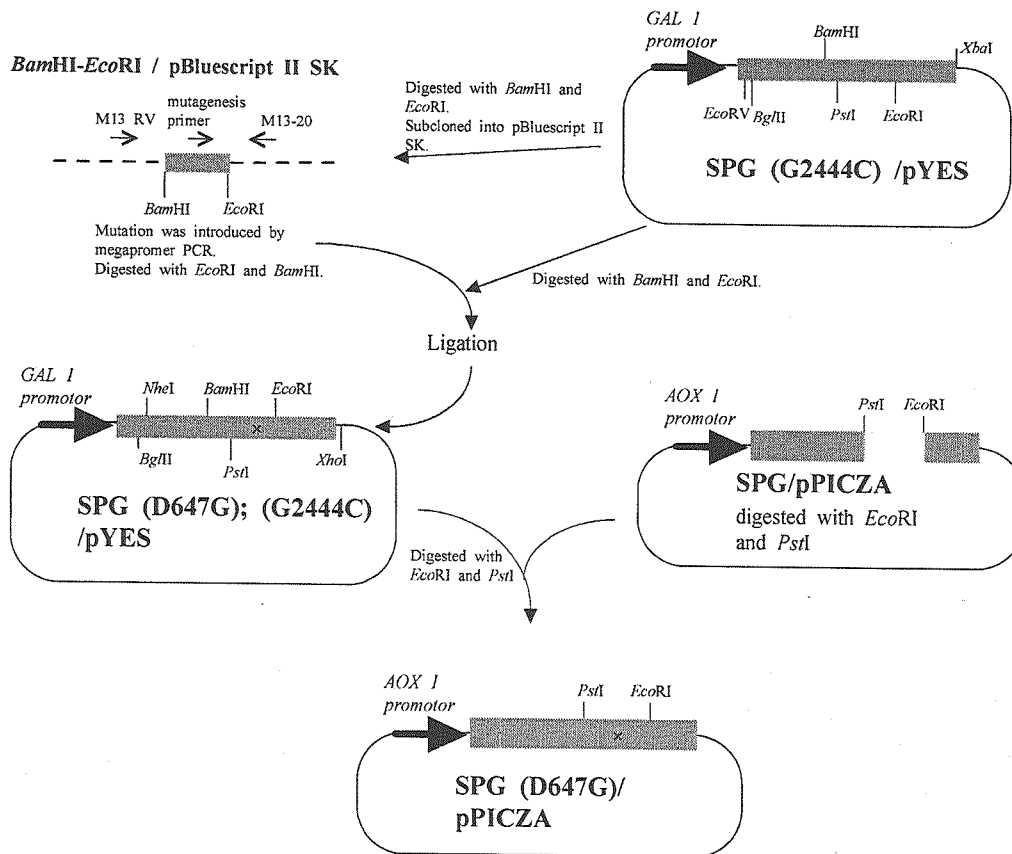


Fig. 4-10. Construction of SPG (D647G) / pPICZA expression vector. These mutations were introduced by megaprimer PCR method. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly generated mutation was shown by ×.

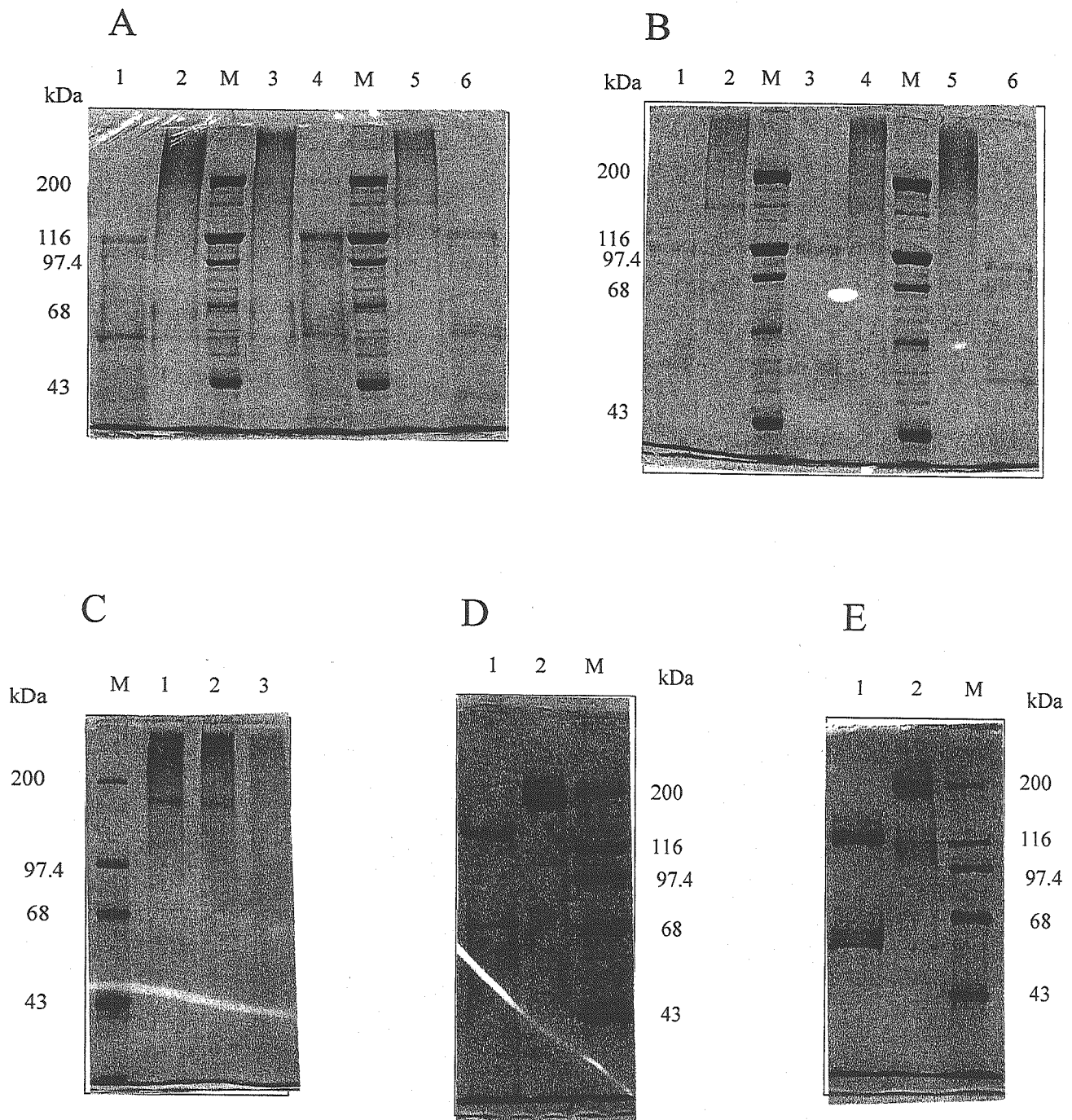


Fig. 4-11. SDS-PAGE of *S. pombe* α -glucosidase mutants.

panel A: lane 1, deglycosylated D481N; lane 2 D481N; lane 3, E484Q; lane 4, deglycosylated E484Q; lane 5, D647N; lane 6 deglycosylated D647N.

panel B: lane 1, deglycosylated D647A; lane 2 D647N; lane 3, deglycosylated E484A; lane 4, E484A; lane 5, D481A; lane 6 deglycosylated D481A

panel C, lane 1, D218N; lane 2, D355N; lane 3, D877N.

panel D, lane 1, deglycosylated D481G; lane 2, D481G.

panel E, lane 1, deglycosylated D647G, lane 2, D647G.

The lane M is size markers.

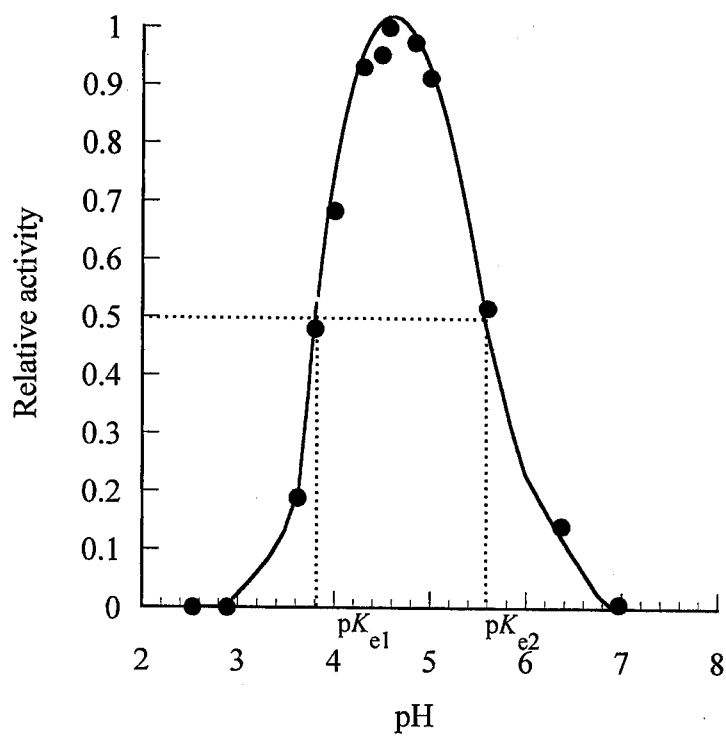


Fig. 4-12. pH activity curve of *S. pombe* α -glucosidase. The reaction mixture containing 100 μ l of 8.5 mM maltopentaose, 200 μ l of McIlvaine buffer of various pHs, 100 μ l of (26 μ g/ml) enzyme was incubated at 35°C for 5 min.

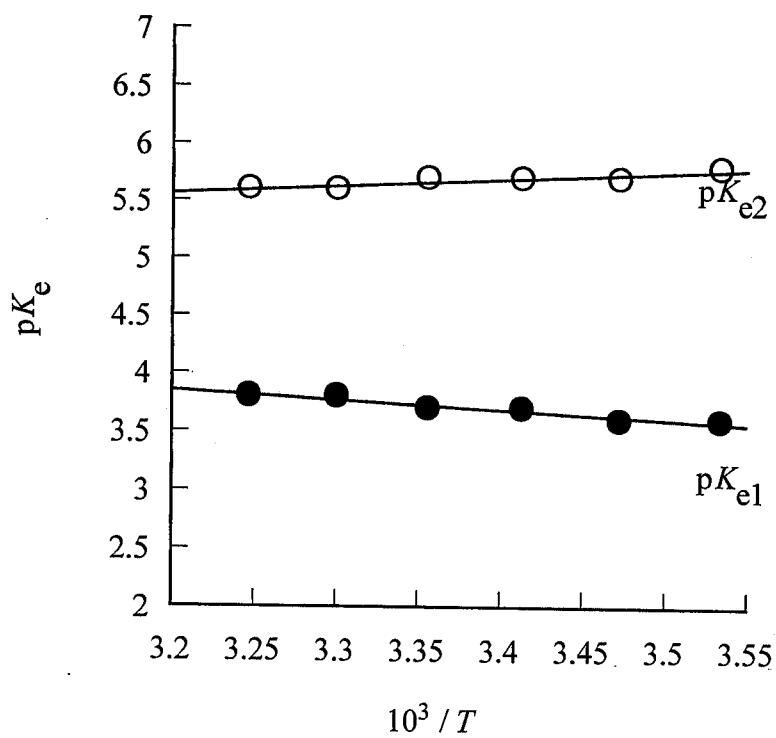


Fig. 4-13. Temperature dependence of pK_{e1} and pK_{e2} values of α -glucosidase. The ΔH_e values assumed by the equation of van't Hoff were -3.6 kcal/mol for acid (ΔH_{e1}) and 2.9 kcal/mol for alkaline (ΔH_{e2}) ionizable group.

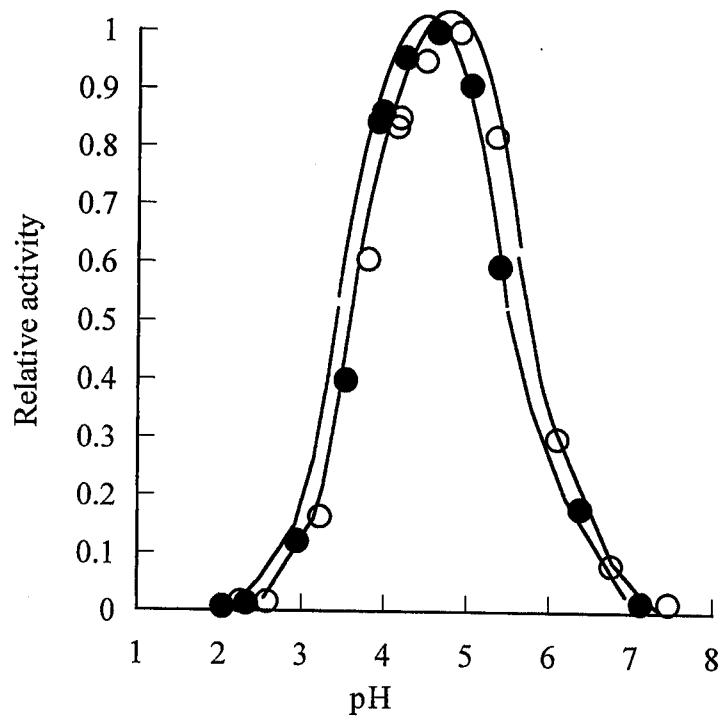


Fig 4-14. Effects of methanol on hydrolysis of maltopentaose at various pHs.

The reaction mixture containing 0.1 ml of 8.5 mM G5, 0.2 ml of McIlvain buffer, 100 μ l of methanol or water and 0.1 ml of 26 μ g/ml enzyme solution was incubated at 35°C. ○, in 0% methanol; ●, in 20% methanol

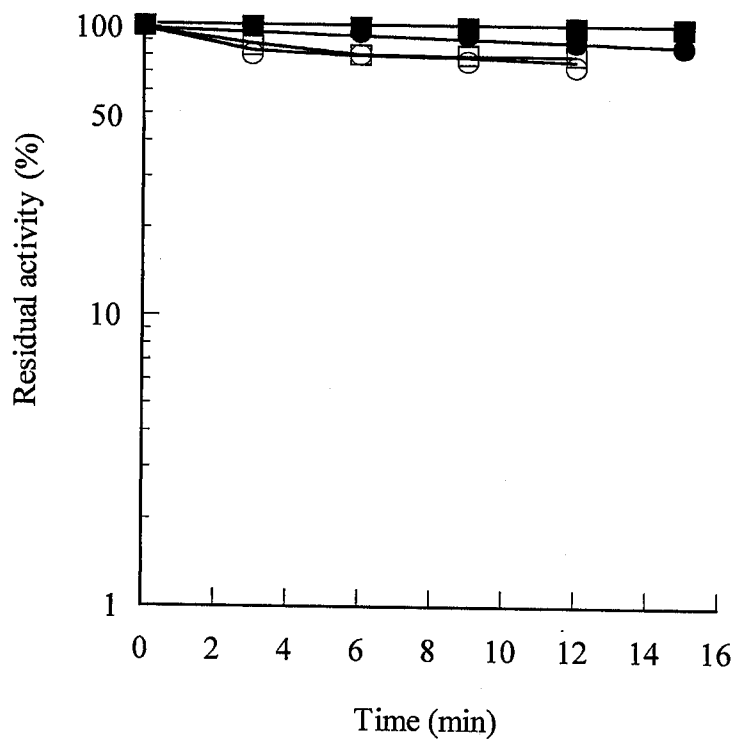


Fig. 4-15. Modification of *S. pombe* α -Glucosidase with DEPC. The enzyme ($0.24 \mu\text{M}$) was incubated with 0, 9, or 37 mM of DEPC in 60 mM sodium phosphate buffer (pH 6) at 20°C . At the indicated time, aliquot of reaction mixture was removed and added to 86 mM histidine, and the residual activity for 0.2 % maltose was measured in 40 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) at 35°C . ■, 0 mM DEPC; ●, 3 mM DEPC; □, 37 mM DEPC; ○, 37 mM DEPC + 56 mM maltotriose.

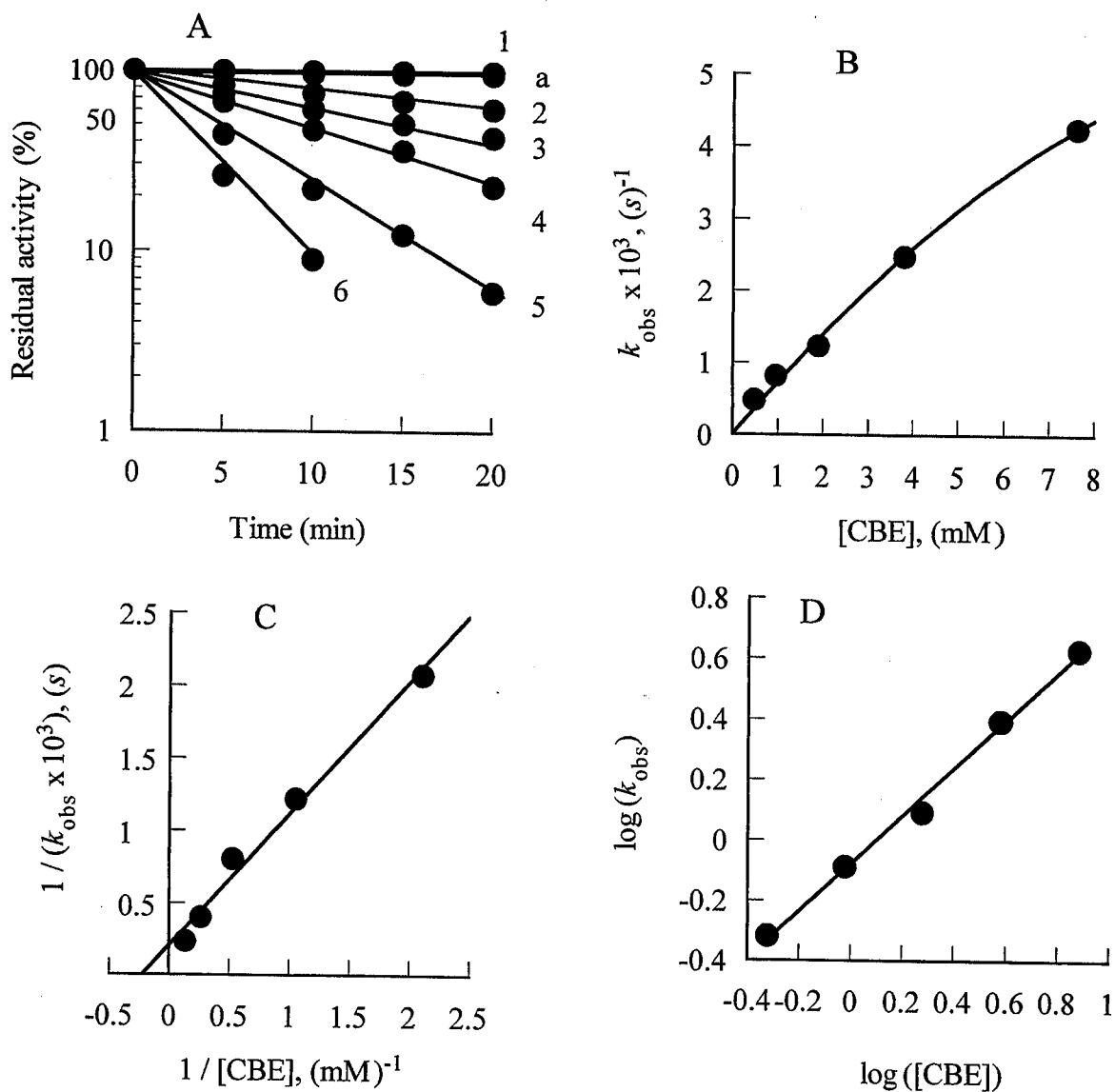


Fig. 4-16. Inactivation of *S. pombe* α -glucosidase by CBE.

A: *S. pombe* α -glucosidase (134 nM) was incubated with various concentrations of CBE at 35°C in 40 mM sodiumacetate buffer, pH 4.5. At indicated time, an aliquot of the mixture was taken, and then residual activity was measured using 0.2% maltose as substrate at 35°C and pH 4.5. Curve 1, 0 mM CBE; 2, 0.475 mM CBE; 3, 0.95 mM CBE; 4, 1.9 mM CBE; 5, 3.8 mM CBE; 6, 7.6 mM CBE. Tris of 100 mM was added to mixture of *S. pombe* α -glucosidase and 3.8 mM CBE under the same conditions as A, and residual activity was shown by curve a. B, C, and D: The k_{obs} values were calculated from A and replotted with [CBE].

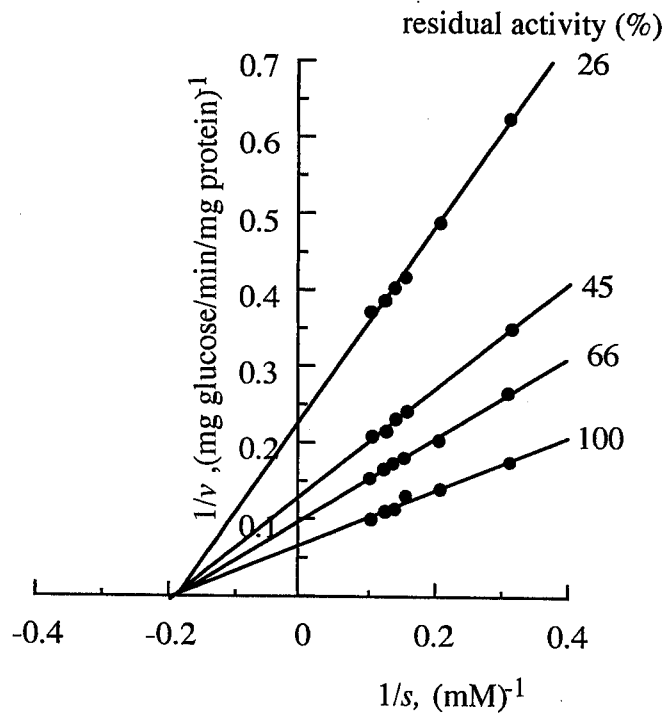


Fig.4-17. Change in K_m and V during inactivation by CBE.

The modification mixture consisting of 6×10^{-4} mM enzyme and 1.9 mM CBE in 40 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) was incubated at 35 °C. At 0 min, 5 min, 10 min and 15 min, 100 μ l of the reaction mixture was taken out and diluted 30-fold with ice-cold 50 mM sodium acetate buffer containing 0.05% Triton X-100 (pH 4.5) to stop the reaction. The K_m and V value of modified enzymes were determined by Lineweaver-Burk plots.

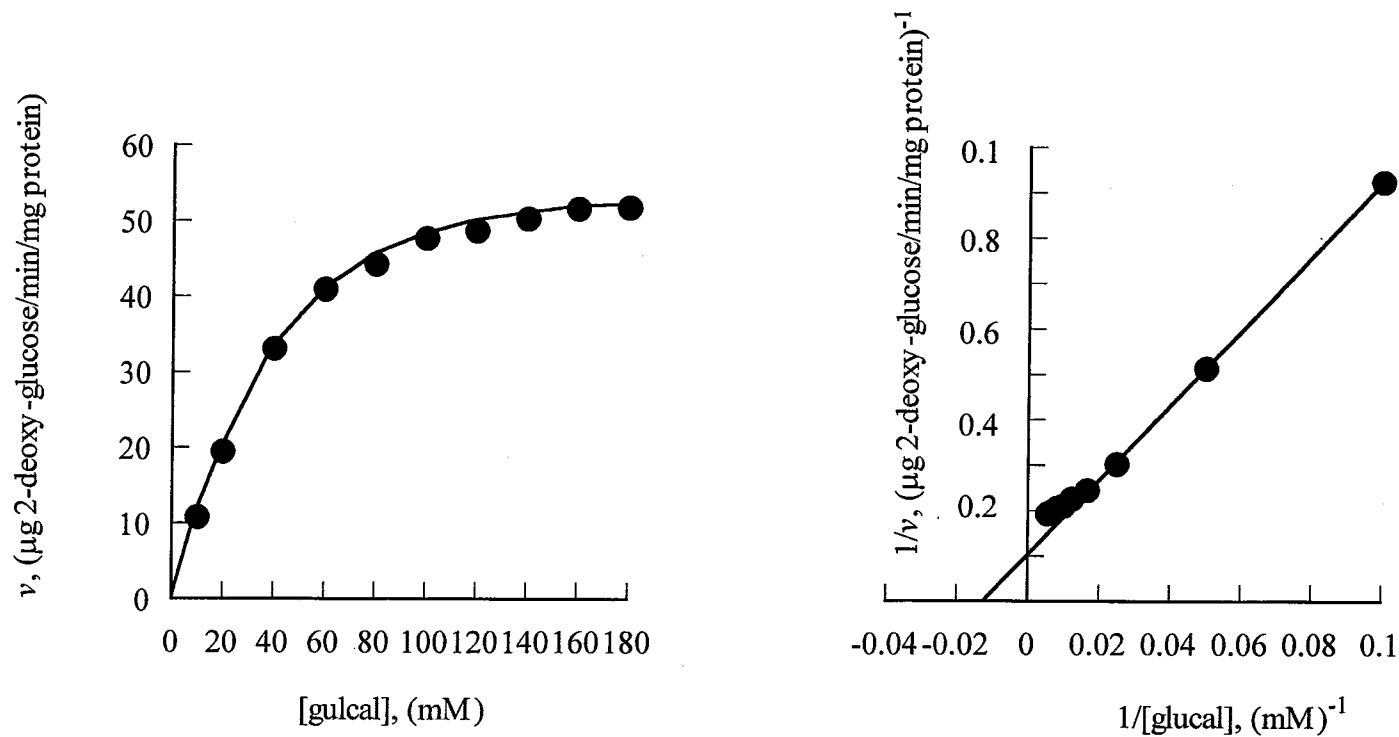
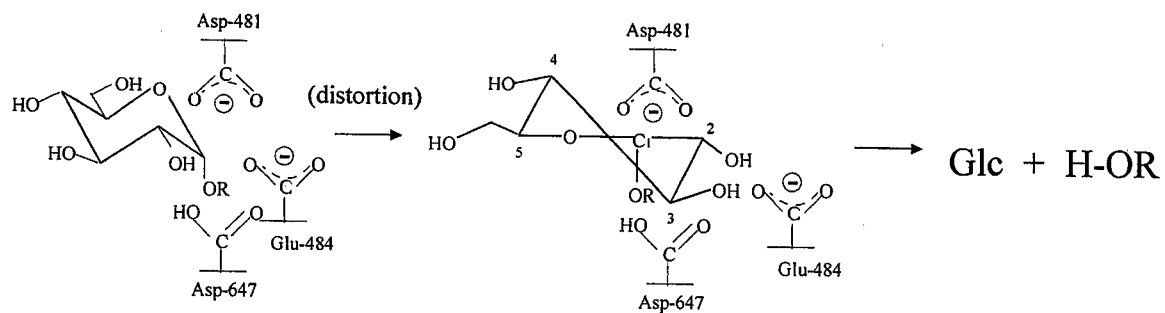


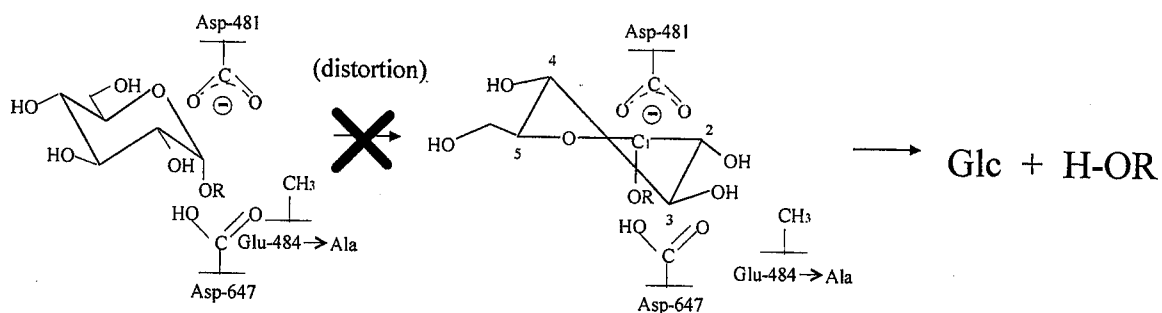
Fig. 4-18. D-Glucal hydration.

A, Initial rate of D-glucal hydration catalyzed by *S. pombe* α -glucosidase, plotted as a function of substrate concentration. The reaction mixture containing 40 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), 16 μg of enzyme, and various concentration of substrate was incubated at 35°C. B, Double reciprocal plots of determined A.

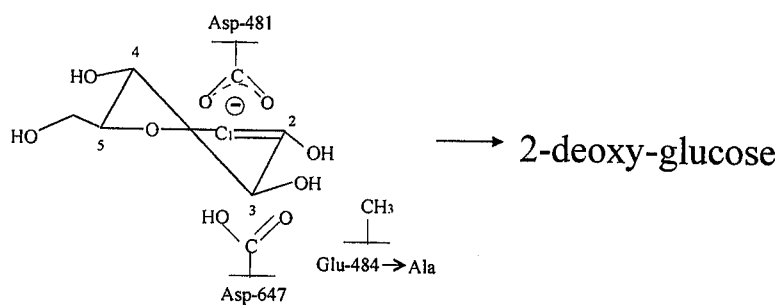
Scheme 4-1



Scheme 4-2



Scheme 4-3



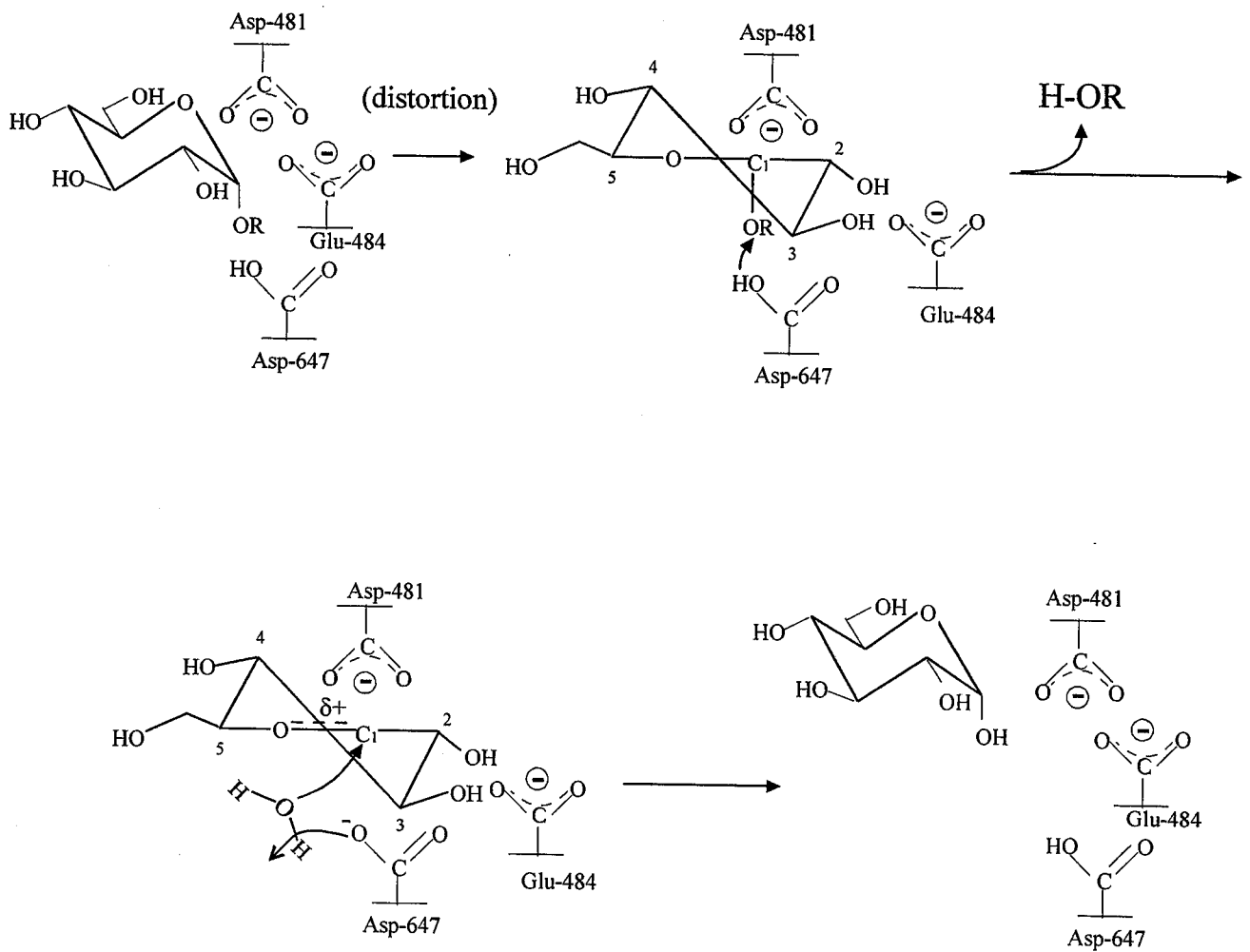


Fig. 4-19. Prediction of catalytic mechanism in *S. pombe* α -glucosidase.

第5章 *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase 活性中心の芳香族アミノ酸残基の役割

第1節 緒言

前章で推定した触媒残基を含む領域 Region A および Region B には α -glucosidase family II でいくつかのアミノ酸残基が保存されている。そのなかでも芳香族アミノ酸残基が 4 つ保存されている。Trp-479、Phe-488、Trp-644、Trp-652 であるが本章ではこのうち Trp 残基に注目する。

Trp 残基はかさばったインドール環の疎水面に基づく相互作用によりタンパク質の高次構造維持に貢献しているものと考えられている。また触媒残基としてプロトンの授受に関与する機能は知られていないが、基質結合部位にあって、基質との結合に重要な役割を果たしているものがある。例えば、卵白リゾチーム Trp-62^{158, 159)}をはじめ、*Pseudomonas fluorescens* xylanase A はサブサイト-1 を 3 個の Trp 残基が取り囲み、そのうち Trp-313 の疎水面が glucose とスタックしていることがその立体構造から明らかにされている¹⁶⁰⁾。 α -glucosidase と同様に α -glucoside 結合をもつ基質の非還元末端から加水分解する *Aspergillus awamori* glucoamylase ではサブサイト 2、4 にそれぞれ Trp-178、Trp-120 が配置されており、それらが基質酵素複合体遷移状態の安定性に関わっていると考えられている^{161, 162)}。加水分解酵素以外でも maltodextrin-binding protein は 4 つの Trp が maltose、maltodextrin を捕捉する¹⁶³⁾。

一方、Phe 残基もフェニル基の疎水面が基質結合に関わっている報告がいくつかある。例えば、exo- β -(1,3)-glucanase は平行に並んだ 2 つの Phe 残基がサブサイト 1 の glucose を挟むかたちで押さえ込んでいることがその立体構造から明らかにされている¹⁶⁴⁾。また *S. cerevisiae* の glucose transporter *Hxt2* は Phe-431 を Tyr に変換すると glucose のみではなく galactose も輸送するようになることが示されている¹⁶⁵⁾。すなわち、Phe 残基が糖のエピマーを認識している。

α -glucosidase family II では *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase (α -glucosidase) で活性中心の Trp-468 の Ala への置換は α -1,4 結合よりも α -1,6 結合により影響を与えることが示されている¹⁶⁶⁾。この Trp 残基は *S. pombe* α -glucosidase では Trp-479 に相当する。

本章では触媒残基を含む保存領域 Region A および Region B に保存された Trp 残基の Ala 変異酵素を作製し、その K_m 、 V を求める。本酵素は立体構造が明らかではないので、野生型酵素との K_m 、 V の比較から予想できる Trp の役割を考察する。

第2節 実験材料および方法

(1) 試薬、菌株

N-bromosuccinimide、tryptophan (ナカライテスク) には市販のものを用いた。各種菌株、各種基質、各種遺伝子工学用試薬は第2章、第3章で述べた。その他特に明記しないものは市販のものを用いた。

(2) オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドを北海道システムサイエンスに依頼合成させた。乾固してあるものを蒸留水で溶解させて、20 μ M 溶液として保存した。

(3) 部位特異的変異の導入

部位特異的変異の導入を megaprimer PCR で行った。また変異導入の確認のために可能な限り制限酵素認識部位を設け、制限酵素感受性により変異導入を確かめた。変異導入に使用したプライマーを Table 5-1 に示した。またいずれの変異もシーケンスにより変異導入の確認を行った。DNA 操作は定法に従って行った。

megaprimer PCR による部位特異的変異の導入を定法に従って行った。耐熱性 DNA polymerase には KOD DNA polymerase を用いた。1st PCR の増幅断片、すなわち megaprimer の精製を QIAGEN PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いた。また 2nd PCR は最終生成物の収率を上げるために通常の megaprimer PCR の前に megaprimer のみを用いてアシンメトリックに 5 サイクル PCR を行った。

(4) 部位特異的変異酵素発現ベクターの構築

変異酵素の発現を *S. cerevisiae* で行った。

(4)-1 W479A (Fig. 5-1)

変異導入を megaprimer PCR により行った。まず SPG (G2444C)/pYES から *Bam*HI-*Eco*RI 断片を切り出し Bluescript II SK にサブクローニングした。これを鋳型とした。1st PCR のプライマーには標的変異を含むプライマーと M13 reverse ユニバーサルプライマーを用いた。2nd PCR のプライマーには megaprimer と M13 -20 ユニバーサルプライマーを用いた。変異を含む増幅断片を *Bam*HI と *Eco*RI で消化し SPG (G2444C)/pYES の *Bam*HI-*Eco*RI 部位と入れ替えた。これを W479A 発現ベクターとした。

(4)-2. W644A、W652A (Fig. 5-2)

変異導入を megaprimer PCR により行った。SPG (G2444C)/pYES から *Bam*HI-*Eco*RI 断片を切り出し Bluescript II にサブクローニングしたものを鋳型とした。1st PCR のプライマーには標的変異を含むプライマーと M13 -20 ユニバーサルプライマーを用いた。2nd PCR のプライマーには megaprimer と M13 reverse ユニバーサルプライマーを用いた。変異を含む増幅断

片を *Bam*HI と *Eco*RI で消化し SPG (G2444C)/pYES の *Bam*HI-*Eco*RI 部分と入れ替えた。これらをそれぞれ W644A、W652A 発現ベクターとした。

(5) 変異酵素の発現誘導と精製

S. cerevisiae、*P. pastris* いずれの組み換えタンパク質の場合も発現の誘導、精製法を第 3 章の野生型酵素のそれに従った。(Fig. 5-3)

(6) 比吸光係数

Trp 変異酵素のため比吸光係数をそれぞれの変異酵素で求めた。タンパク質を milliQ 水に対して十分透析した後、凍結乾燥した。凍結乾燥標品を秤量した後、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で溶解し 280 nm での吸光度を測定し比吸光係数を算出した。比吸光係数は W479A が $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 5.87$ 、W644A が $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 5.81$ 、W652A が $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 5.90$ であった。

(7) pH 活性曲線

W479A、W644A、W652A の pH 活性曲線を各 pH で maltase 活性を測定し求めた。広域緩衝液には McIlvaine buffer を用いた。

(8) *N*-bromosuccinimide (NBS)による Trp 残基の分光的定量

40 mM sodium acetate buffer (pH 4.5)中の 2.92 μ M タンパク質溶液 500 μ l を分光用セルに入れ、280 nm での吸光度を記録した。10 μ l の 2 mM NBS を加え、混合し、室温で 1 分間放置後 280 nm での吸光度を記録した。NBS 添加の作業を 280 nm での吸光度が減少しなくなるまで続け、最小となった 280 nm での吸光度を記録した。タンパク質 1 mol あたりの酸化トリプトファンの mol 数 n を

$$n = \frac{\Delta A \times 1.31 \times MW \times V}{W \times 5500}$$

(W =タンパク質の mg、 V =タンパク質溶液量 ml、 ΔA =NBS 酸化に伴う 280 nm での吸光度の減少値、 MW =分子量)により求めた。

(9) 生化学的実験手法

活性測定、タンパク質の定量、SDS-PAGE など特に明記しない生化学的実験手法は第 3 章のそれと等しい。

第3節 実験結果および考察

第1項 活性中心に保存されたトリプトファン残基変異酵素の基質特異性

前章までで推定した α -glucosidase family II の活性部位に保存されている Trp-479、Trp-644、Trp-652(いずれも *S. pombe* α -glucosidase のアミノ酸番号)についてその Ala 変異酵素(W479A、W644A、W652A)を *S. cerevisiae* で発現させ精製した後、基質特異性の変化を調べた。発現と精製の方法は第3章の野生型酵素のそれに従った。

それぞれの変異酵素の各種基質に対する K_m 、 V の速度論量を測定した。緩衝液には 40 mM sodium acetate buffer (pH 4.5)を用い、反応を 35°Cで行った。それぞれの基質について基質濃度を変化させ初速度を測定した。 K_m 、 V の速度論量を $1/s - 1/v$ プロットおよび $s - s/v$ プロットにより求めた。各種基質に対する K_m 、 V を野生型と併せて Table 5-1, 2, 3, 4 にまとめた。

W479A、W644A、W652A ともに k_0 が大きく減少している。しかしいずれの変異酵素でも完全に活性を失ったものではなく、これらの Trp 残基は触媒活性に必須ではないが重要な役割を果たしていることがわかった。例えばこれら Trp 残基変異酵素は K_m の変化が大きいことからこれらの残基が基質結合に関わっていることを予想できる。また結合とともに基質と酵素の複合体を基底状態から遷移状態へ構造を変化させる役割を果たしていることも考えられる。そのために遷移状態を作りにくい変異酵素では k_0 が大きく減少している。また遷移状態の安定性への関与も想定できる。例えば W479A の変異による maltotriose (G3) に対する遷移状態の自由エネルギーの変化¹⁶⁷⁾を $\Delta(\Delta G) = -RT \ln[(k_0/K_m)_{mut}/(k_0/K_m)_{wt}]$ から計算すると野生型酵素と比較して 19 kJ/mol も増加する。それだけ遷移状態を形成しにくくなっていること、遷移状態が不安定であることを予想できる。

W479A の k_0 、 K_m および k_0/K_m の二糖類に対する減少の割合から Trp-479 はサブサイト 2 に関与しているのではないかと考えられた。 k_0 は maltose を除く二糖類と phenyl α -glucoside (ϕ G) に対する減少が大きい (1%未満)。 K_m はすべての基質に対して野生型酵素と比較して増加しているが、特に二糖類 maltose (G2) に対して 11 倍、isomaltose (IG2) に対して 5 倍と大きい。 k_0/K_m はサブサイト 1、2 を占める二糖類と ϕ G でその減少の割合が大きく、そのなかでも G2 よりも IG2、kojibiose、 ϕ G での減少の割合が大きい。これはサブサイト 2 の構造変化を想像させる。また nigerose に対しての K_m の変化が小さいのは野生型酵素において元来親和力が弱いためと思われる。一方、 K_m は G3 に対して 46 倍、*p*-nitrophenyl α -maltoside (pNPG2) に対して 6 倍の増加が見られたので、サブサイト 3 への関与も予想できる。野生型酵素の場合 pNPG2 に対する K_m は G3 に対するそれよりも小さい。このことは pNPG2 がよりサブサイト 3 との関係が強いことを示しており、もし Trp-479 がサブサイト 3 に関与しているならその変異酵素は G3 よりも pNPG2 に対してその親和力変化が大きくなるはずであ

る。しかし W479A で G3 と pNPG2 の K_m を比較すると G3 の方が減少の割合が大きい。このことは Trp-479 がサブサイト 3 よりむしろサブサイト 2 に位置していることを示している。従って Trp-479 はサブサイト 2 に位置していると予想した。またサブサイト 2 の基質との結合はサブサイト 3 での結合に強く影響していることを示唆している。また k_0/K_m を比較すると W479A は G2 よりも maltotetraose (G4)、maltopentaose (G5) を良く切断するように基質特異性が変化していることがわかる。 α -glucosidase family II に含まれる *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase (α -glucosidase) では Trp-479 と相同な Trp-468 の部位特異的変異酵素の研究が行われている。その結果は maltose よりも isomaltose に対して影響が大きいというものである。本研究では maltose への影響も大きかったので違う結果である。ただし *S. occidentalis* glucoamylase での maltase 活性測定での基質濃度の違い、また基質高濃度で野生型酵素より W468A 変異酵素が基質阻害を受けなくなったという報告をみると maltose との親和力にも影響を及ぼしているようにみえる。

W644A の k_0 は野生型酵素と比較してすべての基質に対して 5%以下に減少した。野生型酵素と比較して K_m の上昇が見られるのは IG2、G3、G4、pNPG2 に対してのみである。サブサイト 3 を占める基質が多く、よって Trp-644 はサブサイト 3 に関与していると予想した。もしそうであれば IG2 の結合にはサブサイト 3 が関与していることを予想できる。phenyl α -glucoside に対しては 52%まで K_m が減少している。これは野生型酵素ではサブサイト 3 において phenyl 基と Trp-644 に強いスタッキング効果があるために非生産的結合が増えるのに対し、W644A はそれが壊れるために生産的結合が増えるためではないかと予想できる。実際、野生型酵素はサブサイト 3 を *p*-nitrophenol が占める形の pNPG2 が最適な基質である。これは *p*-nitrophenol が Trp-644 とのスタッキング効果により強く結合するためであろう。また G5 に対する K_m が野生型と同様まで回復している。これはサブサイト 5 付近にも基質を押さえる構造があることを示唆する。

W652A の k_0 は野生型酵素と比較してすべての基質に対して 12%以下に減少した。野生型酵素と比較して IG2、kojibiose、G3、G4 に対して K_m の上昇が見られるが際だった変化は観られない。また W479A や W644A と比べて芳香環を有した基質 ϕ G と pNPG2 に対する K_m の変化がみられないことから Trp のインドール環と基質のスタッキング効果による結合に関与している可能性は低いかもしれない。一方 W479A、W644A、W652A の pH 活性曲線を求めると W479A、W644A の最適 pH は 4.5 で野生型酵素と同じであるのに対して W652A は pH4.8 とアルカリ側にシフトした (Fig. 5-4)。このことから Trp-652 が他の Trp-644、Trp-497 よりももっと活性中心に近い場所に位置することを予想できる。活性中心に基質が入り込んできると新たに水素結合や疎水相互作用で酵素-基質複合体を形成し、そのときの静電的相互作用の変化でプロトドナー残基からプロトンがはずれ、加水分解反応が開始すると考えられる。もしそのとき Trp-652 が疎水相互作用によってその一端を担うと考えると、W652A では安定な酵素-基質複合体を形成することができなくなるはずである。そうするとプロトンを放出しづらくなり pH 活性曲線がアルカリ側にシフトすることも予想できる。

Trp-652 は基質結合に関わっているであろう Trp-497、Trp-644 とは違う働きをしているかもしれない。

その他に糖質関連酵素での芳香族アミノ酸残基はその空間的配置から基質のエピマー特異性を決定している可能性があるという報告がある^{149,165}。そこで W497A、W644A、W652A 変異酵素が glucose のエピマーを加水分解できるかどうかを調べた。すなわち基質のエピマーの決定をこれらの Trp 残基が行っていることを期待した。2 mM *p*-nitrophenyl α -galactoside、*p*-nitrophenyl α -mannoside を基質に用い *p*-nitrophenol の遊離量を定量した。変異酵素はそれぞれ 5.2 μ g 用い、反応を 35°C で行った。しかしこれらの基質を加水分解することはなかった。また同様の条件で *p*-nitrophenyl β -glucoside を基質に用いたが加水分解されなかった。従ってこれらの Trp 残基のみにより基質のエピマー型の認識をしていることはないことがわかった。

第2項 N-bromosuccinimide (NBS)による化学修飾

前項までで基質結合に関わる Trp 残基がサブサイト 2、3 に位置することを予想できた。そこで Trp の修飾試薬である NBS を用いて化学修飾を行うことにした。例えばサブサイト 3 で基質結合に関わっている Trp 残基があるとする。G3 存在下と非存在下で NBS の修飾を行った場合、失活に差が出ることを期待して行った。

野生型酵素 146 pmol を 40 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) 中で 0-2 mM の NBS と 10°C で 1 分間反応させた。修飾反応停止を過剰の tryptophan を加えることで行った。残存 maltase 活性を測定し、NBS の酵素に対する mol 比 (NBS/酵素) に対してプロットした (Fig. 5-5)。mol 比が 51 のとき酵素は完全に失活している。このとき NBS によるペプチド結合の化学的切断の起きていないことを SDS-PAGE により確認した。また NBS で酸化された tryptophan が 280 nm の吸光度が減少することを利用して Trp 残基数を計算した。280 nm の吸光度を測定しその減少値から理論上の修飾された Trp 残基数を計算し NBS の酵素に対する mol 比 (NBS/酵素) に対してプロットした。完全に失活するときには Trp 残基が 6 個修飾されていることがわかった。次に修飾反応を 76 mM G3、G4 存在下で行った。すなわち基質存在下で修飾による失活を防ぐことができるかどうかを見た。しかし G3 および G4 で修飾による失活は防ぐことはできず、野生型酵素と同じ形の失活曲線を描いた (Fig. 5-6)。すなわちこの結果からは活性中心やその近傍以外の Trp 残基が修飾されて失活していることがわかる。Trp 残基はかさばったインドール環に基づく相互作用によりタンパク質の高次構造維持に貢献しているものと考えられている。NBS は tryptophan を酸化し oxytryptophan を生成するが、これは tryptophan に比べると遙かに親水性である。この変換に伴いタンパク質の局所的環境の変化は大きいものと予想でき、高次構造が維持できなくなるために失活を起こすのであろう。

また前項までで酵素活性に重要な働きをしているであろうと予想した Trp-479、Trp-644、Trp-652 が NBS により修飾され失活を起こしているのかも不明になった。本来これらの残基が G3、G4 により修飾を防がれているのに活性中心以外の Trp 残基の修飾による失活のためにそれが観察できないことも予想できた。また本来 Trp-479、Trp-644、Trp-652 が活性中心以外、すなわち基質防御を受けない場所に位置しアミノ酸置換による触媒能の変化を起こしていることも予想できた。

そこで次に野生型酵素と同様に変異酵素 W479A、W644A、W652A を NBS で化学修飾した。残存 maltase 活性を測定し、NBS の酵素に対する mol 比 (NBS/酵素) に対してプロットした結果を Fig. 5-7 に示す。いずれの変異酵素も NBS での失活曲線は野生型酵素のそれと同じ曲線を描いた。よってこれらの Trp-479、Trp-644、Trp-652 以外に修飾されると失活が起きる Trp 残基が存在することを予想できた。実際、先の実験で Trp 残基 6 個が修飾されて失活を起こしているので候補はこれら以外に 3 残基あるはずである。

以上をまとめると部位特異的変異酵素 W479A、W644A、W652A の速度論的解析の結果から Trp-479、Trp-644、Trp-652 が活性発現に重要な働きをしていることを予想できた。そのうち Trp-479、Trp-644 は基質結合に関わっているのではないかと予想できた。また NBS による化学修飾の結果からは Trp-479、Trp-644、Trp-652 以外に酵素活性に重要な働きをしている Trp 残基の存在を予想できた。

第4節 要約

1. 活性中心近傍に保存された Trp 残基、Trp-479、Trp-644、Trp-652 それぞれの Ala 変異酵素を作製し、その各種基質に対する速度パラメーターを求めたところ、すべての変異酵素で k_0 が大幅に減少した。よってこれらの残基が触媒活性には必須ではないが重要であることがわかった。
2. Trp 変異酵素の K_m の変化から、Trp-479 はサブサイト 2、Trp-644 がサブサイト 3 に貢献していると考察した。また Trp-652 はその Ala 変異酵素で pH 活性曲線がアルカリ側にシフトしたことから、他の Trp-479、Trp-644 よりももっと活性中心に近い位置で触媒活性に貢献していることを考察した。
3. NBS による化学修飾の結果、Trp-479、Trp-644、Trp-652 以外にも活性発現に関与する Trp 残基が存在することがわかった。それは活性中心以外で Trp 残基特有の大きい芳香環による相互作用で高次構造に貢献している残基と考察した。

Table 5-1 Oligonucleotides Used for Mutation in Amino Acid

	Sequence of oligonucleotide primer ^a	Restriction site inserted
W479A	5'-tcata <u>tcagtAG</u> ▼CTattccactga-3'	<i>AluI</i>
W644A	5'-ggtgcacat <u>GCA</u> ▼tgggtgat-3'	<i>NsiI</i>
W652A	5'-gataatcattcG▼cta <u>GCG</u> tctaacatg-3'	<i>NheI</i>

^a The substituted nucleotides are indicated as capital letters. Mutant codons are underlined. The symbols (▼) show the cleavage point in the inserted restriction sites.

Table 5-2 Kinetic Parameters of Wild type α -Glucosidase for Hydrolysis of Various Substrates

	$K_m^a)$	$V^b)$	relative V	$k_0^c)$	$k_0/K_m^d)$
maltose	8.3	19	100	352	42
maltotriose	5.6	13	177	249	44
maltotetraose	9.2	10	136	190	21
maltopentaose	17	8.7	116	162	9.6
isomaltose	13	3.0	40	56	4.3
kojibiose	21	5.9	78	110	5.1
nigerose	25	7.1	94	132	5.2
phenyl α -glucoside	12	0.50	7	9	0.8
<i>p</i> -nitrophenyl α -maltoside	3.2	15	203	284	89

^{a)} mM.

^{b)} mg glucose liberated from non-reducing terminal / mg of protein / min.

^{c)} sec⁻¹.

^{d)} sec⁻¹ mM⁻¹.

Table 5-3 Kinetic Parameters of W479A α -Glucosidase for Hydrolysis of Various Substrates

	$K_m^a)$	$V^b)$	relative V	$k_0^c)$	$k_0/K_m^d)$
maltose	90	1.3	100	23	0.26
maltotriose	257	0.37	29	6.9	0.03
maltotetraose	41	0.54	43	10	0.24
maltopentaose	58	1.2	90	21	0.37
isomaltose	66	0.025	2	0.47	0.01
kojibiose	83	0.053	4	0.98	0.01
nigerose	28	0.054	4	1.0	0.04
phenyl α -glucoside	32	0.005	0.3	0.09	0.003
<i>p</i> -nitrophenyl α -maltoside	20	0.91	72	17	0.84

^{a)} mM.

^{b)} mg glucose liberated from non-reducing terminal / mg of protein / min.

^{c)} sec⁻¹.

^{d)} sec⁻¹ mM⁻¹.

Table 5-4 Kinetic Parameters of W644A α -Glucosidase for Hydrolysis of Various Substrates

	K_m ^{a)}	V ^{b)}	relative V	k_0 ^{c)}	k_0/K_m ^{d)}
maltose	8.9	0.57	100	11	1.2
maltotriose	21	0.68	119	13	0.59
maltotetraose	14	0.47	82	8.7	0.62
maltopentaose	16	0.41	71	7.5	0.49
isomaltose	20	0.01	1.7	0.18	0.009
kojibiose	16	0.081	14	1.5	0.092
nigerose	21	0.016	2.7	0.29	0.014
phenyl α -glucoside	6.4	0.005	0.91	0.097	0.015
<i>p</i> -nitrophenyl α -maltoside	5.4	0.66	115	12	2.3

^{a)} mM.

^{b)} mg glucose liberated from non-reducing terminal / mg of protein / min.

^{c)} sec⁻¹.

^{d)} sec⁻¹ · mM⁻¹.

Table 5-5 Kinetic Parameters of W652A α -Glucosidase for Hydrolysis of Various Substrates

	K_m ^{a)}	V ^{b)}	relative V	k_0 ^{c)}	k_0/K_m ^{d)}
maltose	6.2	1.1	100	19	3.1
maltotriose	9.3	1.1	101	20	2.1
maltotetraose	14	1.2	111	22	1.6
maltopentaose	14	0.59	56	11	0.80
isomaltose	25	0.15	14	2.8	0.11
kojibiose	34	0.40	38	7.5	0.22
nigerose	24	0.21	18	3.9	0.16
phenyl α -glucoside	12	0.021	2	0.39	0.03
<i>p</i> -nitrophenyl α -maltoside	2.8	0.83	79	15	5.5

^{a)} mM.

^{b)} mg glucose liberated from non-reducing terminal / mg of protein / min.

^{c)} sec⁻¹.

^{d)} sec⁻¹ · mM⁻¹.

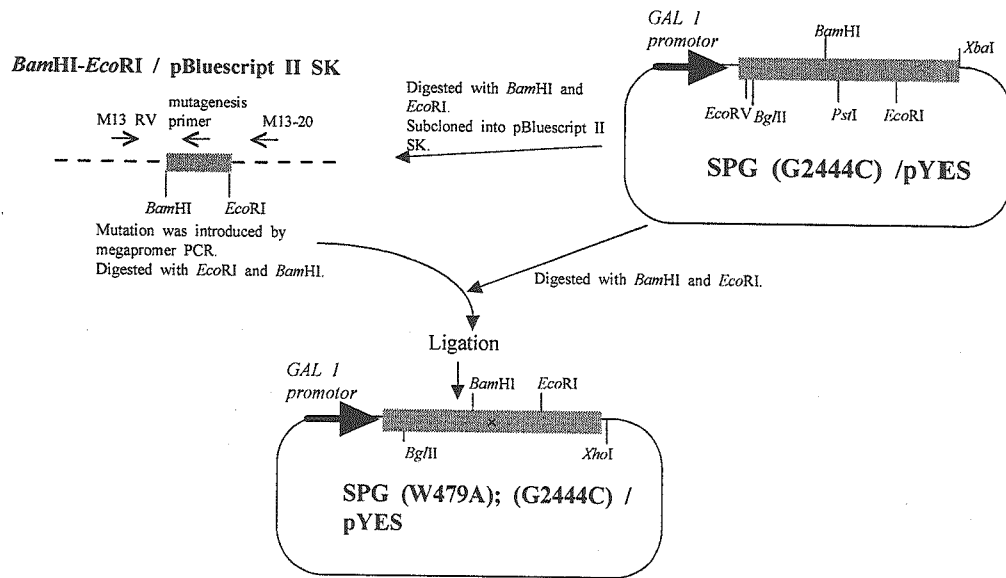


Fig. 5-1. Construction of SPG (W479A) / pYES expression vector. These mutations were introduced by megaprimer PCR method. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly generated mutation was shown by ×.

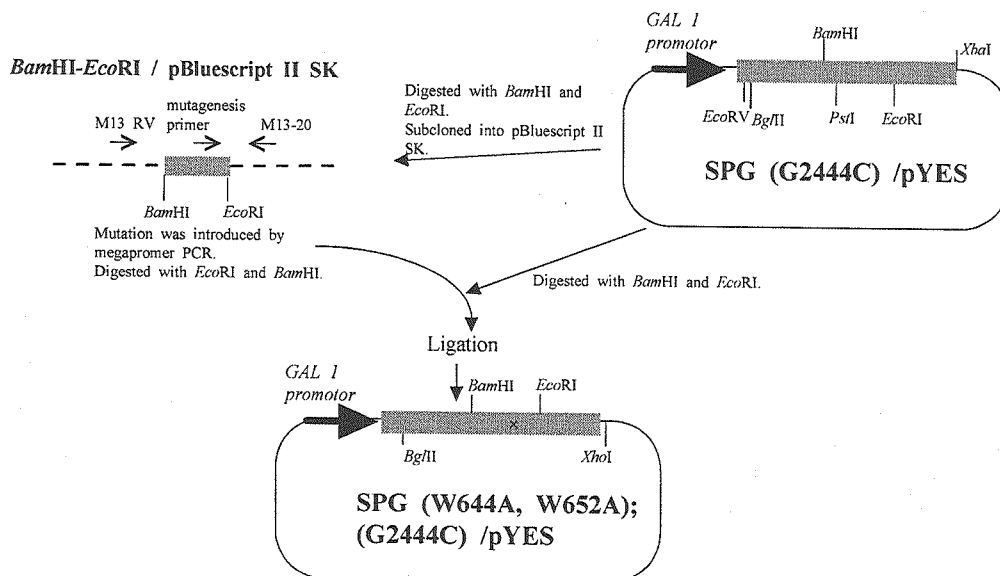


Fig. 5-2. Construction of SPG (W644A, W652A) / pYES expression vector. These mutations were introduced by megaprimer PCR method. The mutation was confirmed by DNA sequencing. The newly generated mutation was shown by ×.

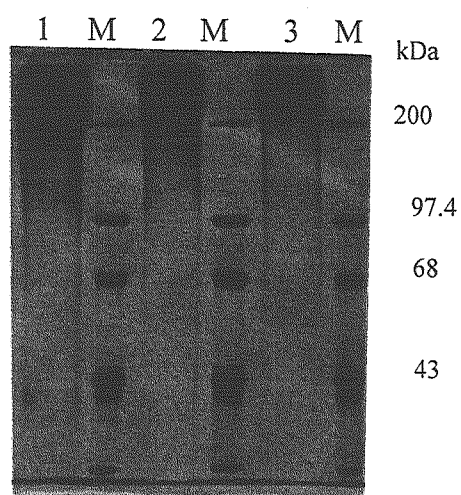


Fig. 5-3. W479A, W644A, and W652A mutants of *S. pombe* α -glucosidase purified from cell-free extract.

S. pombe α -glucosidase mutants W479A, W644A, and W652A were purified basically in the same way as the purification of wild-type enzyme. lane 1, W479A; lane 2, W644A; lane 3, W652A. M, molecular size markers.

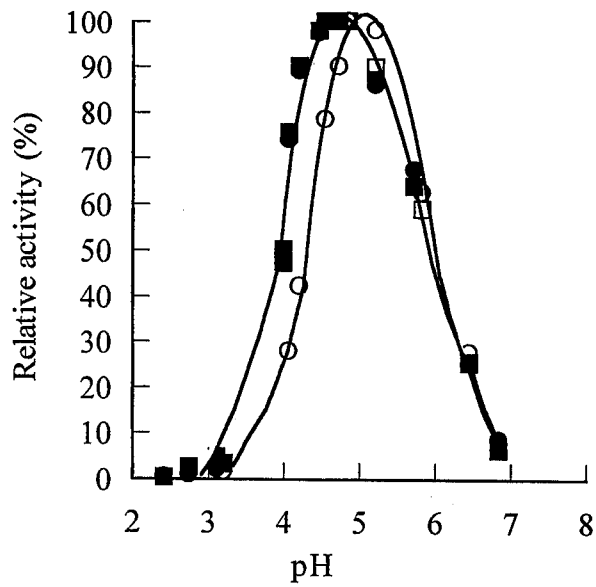


Fig. 5-4. pH activity profile of wild-type and Trp mutants of *S. pombe* α -glucosidase. The reaction mixture containing 50 μ l of enzyme, 250 μ l of McIlvaine buffer and 200 μ l of 0.5% maltose was incubated at 35°C. ■, Wild type; ●, W479A; □, W644A; ○, W652A.

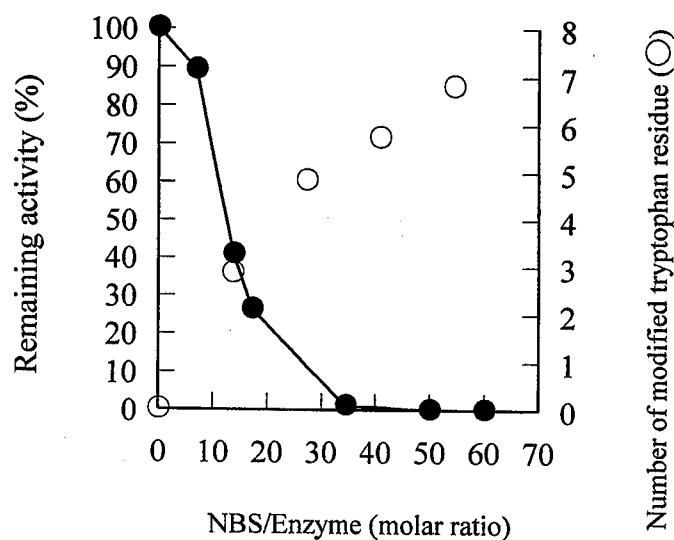


Fig. 5-5. Inactivation of *S. pombe* α -glucosidase by NBS.

The reaction mixture containing 2.9 μ M enzyme and various concentration (0 – 2 mM) of NBS was incubated at 10°C for 1 min in 40 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). The number of tryptophan residue modified by NBS (○) was calculated from the decrease in the absorption at 280 nm. The remaining activity of enzyme towards 0.2% maltose (●) was shown.

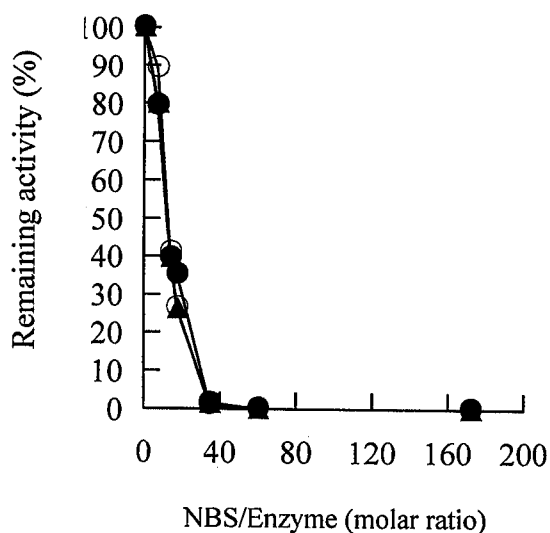


Fig. 5-6. Inactivation of *S. pombe* α -glucosidase by NBS in the presence or absence of substrate.

The reaction mixtures containing 2.9 μ M enzyme and various concentration (0 – 2 mM) of NBS in the presence of 76 mM maltotriose (●) or maltotetraose (▲), or in the absence of substrate (○) was incubated at 10°C for 1 min in 40 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). The remaining activity of enzyme towards 0.2% maltose was shown.

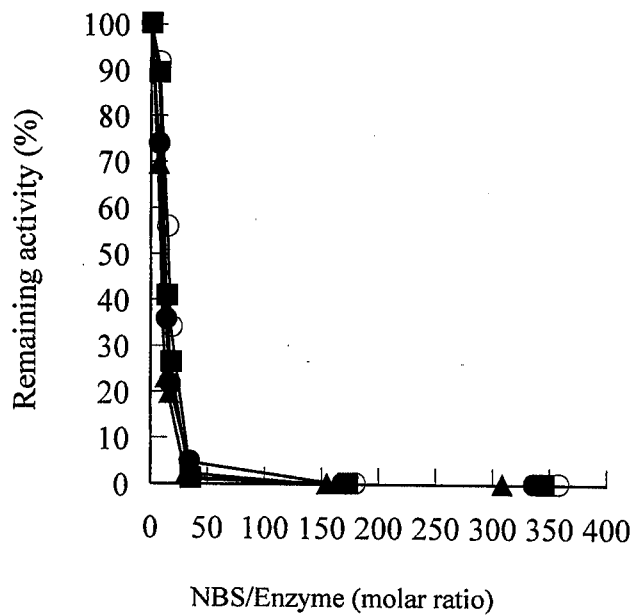


Fig. 5-7. Inactivation of Trp mutants and wild-type *S. pombe* α -glucosidase by NBS. The reaction mixtures containing 2.9 μ M enzyme and various concentration (0 – 2 mM) of NBS was incubated at 10°C for 1 min in 40 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). The remaining activity of W479A (■), W644A (●), W652A (▲), and wild type (○) towards 0.2% maltose was shown.

第6章 総括

本研究は *S. pombe* α -glucosidase の構造と機能の関係を明らかにすることを目的として行った。まず構造を知るために第2章では cDNA のクローニングを行い、その一次構造を明らかにした。*S. pombe* α -glucosidase は α -glucosidase family II に属することがわかった。family II には哺乳類、植物、カビ、酵母由来の α -glucosidase が含まれるが、それぞれ基質特異性などの性質は異なる。例えばテンサイ由来 α -glucosidase などは maltose よりも starch のような高分子の基質に高い特異性を示す¹⁶⁸⁾、ソバ種子由来の α -glucosidase はその糖転移産物として kojibiose, nigerose をよく生産するという性質を示す¹⁶⁹⁾。いずれも *S. pombe* α -glucosidase にはない性質であるが、タンパク質工学的な手法によりこれらの形質を *S. pombe* α -glucosidase に導入することは可能と考えられる。

ふたつの family に分類できる α -glucosidase のうち family I の酵素は、その触媒アミノ酸残基や基質結合アミノ酸残基が α -amylase family 酵素群に共通の保存領域に保存されているが、family II では触媒残基は自殺基質 CBE の化学修飾によって同定されている求核残基のみであった。そこで本研究では *S. pombe* α -glucosidase を用いて触媒活性に必須なアミノ酸残基の探索を行った。そのためには部位特異的変異の導入が必要となる。そこで第3章ではタンパク質工学的解析を自由に行えるように異種宿主発現系の構築を行った。*S. cerevisiae*、*P. pastoris* を宿主にした場合ともに、効率よく組み換えタンパク質生産を行うことができた。*S. cerevisiae* では培養液 1 ml あたり粗抽出液中に 0.6 U、*P. pastoris* では培養液 1 ml あたり培養上清に 1 U、粗抽出液中に 2.5 U の活性を得られた。ただし、いずれの場合も 50% を越える glycosylation を受ける。これは今後タンパク質工学的研究を進めていく上では不利な材料である。Signal sequence に変異を導入することでコア糖鎖のみのタンパク質の生産に成功している例もあるが、タンパク質は細胞内に蓄積するため、精製の段階を考えると不都合である。

第4章では得られた発現系を用いて部位特異的変異の導入により触媒残基の同定を行った。*S. pombe* α -glucosidase の活性解離基を反応速度の pH 影響から調べるとふたつのカルボキシル基であるとわかった。そこで触媒残基に必須な残基の推定を行うにあたり、17 種類の α -glucosidase family II に含まれる酵素を配列比較すると、8 カ所のカルボキシル基を提供する Asp、Glu 残基 (Asp-218、Asp-287、Asp-355、Asp-481、Glu-484、Asp-647、Glu-714、Asp-877) の保存が確認され、これらを標的とすることとした。これらを Asn、Gln に変換する変異を導入したところ Asp-481、Glu-484、Asp-647 が活性に必須なアミノ酸残基であることがわかった。

Asp-481 はこれまで family II で自殺基質 CBE の修飾により同定されている Asp 残基と相同な残基であることと、*S. pombe* α -glucosidase もまた CBE と 1 対 1 で結合することで失活することから、Asp-481 が触媒反応の求核残基であると推定した。

Asp-481 の近傍にある Glu-484 も Gln、Ala の変異を導入すると活性を失うことから活性発

現には必須な残基である。しかしカルボキシル基を残した変異酵素 E484D はその活性は野生型と比較して 9%まで回復する。似たような現象がヒトリソソーム α -glucosidase で報告されており、Glu-484 に対応する Glu-521 \rightarrow Lys、Gln、Asp 変異酵素の場合、E521D のみが野生型の約 10%活性をもつ¹⁴⁷⁾。よって加水分解反応において必須なのは Glu-484 の位置でのカルボキシル基であることがわかった。また役割として E484A は D-glucal 水和反応の減少が他の D481A、D647A に比べて小さいことから基質に歪みを与えることであると予想した。

活性に必須であると判断した 3 残基のうち Asp-481 が求核残基、Glu-484 が fixer として働いていると予想できた。Asp-647 変異酵素 D647N、D647A は野生型酵素の 0.001%、0.0002% とほぼ完全に活性を失う。従ってこの残基が酸塩基触媒残基であることを予想した。第 2 章で行った二次構造予測の結果では Asp-481 は β -sheet の終端、Glu-484 が β -sheet と β -sheet の間の loop、Asp-647 は α -helix が始まる前の loop に位置する。

これらの Asp-481、Glu-484、Asp-647 を含むアミノ酸配列領域は α -glucosidase family II で非常によく保存されている。なかでも芳香族アミノ酸残基が顕著であり、Trp 残基が 3 つ保存されていた。そこでこれら Trp-479、Trp-644、Trp-652 に変異を Ala に置換した酵素を作製し、その基質特異性の変化からそれぞれの Trp 残基の役割を予想した。いずれの変異酵素の場合も k_0 の値が大きく減少したことから、触媒活性において必須ではないが重要な働きを果していることを予想できた。また基質特異性の変化から Trp-479 がサブサイト 2、Trp-644 がサブサイト 3 に関わっていることを予想した。

以上これらの Asp、Glu、Trp 残基の活性部位で位置関係の予想を Fig. 6 にまとめた。しかしこれらはいずれも想像であり、立体構造の解析をしてみなければ解明できない。1 次構造から得られる情報 (相同性) と機能 (触媒残基) の関係の解明を本研究で行った。次は立体構造と機能の関係の解明が必要である。立体構造の解明が急務である。

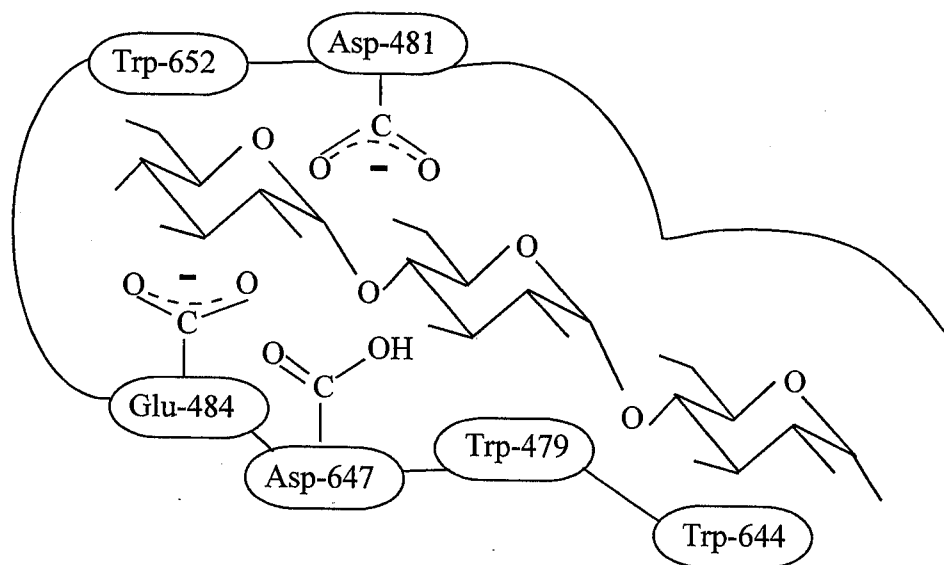


Fig. 6. Schematic drawing of predicted active site of α -glucosidase from *S. pombe* in complex with maltotoriose. By the site direct mutagenesis, Asp-481, Glu-484, and Asp-647 residues were confirmed to be essential in the catalytic reaction. The carboxylate group ($-\text{COO}^-$) of the Asp-481 residue was assumed to be the catalytic nucleophile by the chemical modification with conduritol B epoxide, and the role of the Glu-484 residue was expected to induce the ring distortion of substrate. The carboxyl group ($-\text{COOH}$) of the Asp-647 residue was a candidate for the proton donor. Trp-479, and Trp-644 were presumed to be located in subsite 2 and 3, respectively.

参考文献

- 1) Chiba S, α -Glucosidases. In, The Amylase Reserch Society of Japan (ed) Handbook of amylase and related enzymes, pp. 104-105. Pergamon Press, Oxford (1988)
- 2) Huber RE and Thompson DJ, *Biochemistry*, **12**, 4011-4020 (1973)
- 3) 竹脇俊一、千葉誠哉、下村得治、日本農芸化学会講演要旨集、**52**, 101 (1977)
- 4) Chiba S, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61** 1233-1239 (1997)
- 5) Takata H., Kuriki T, Okada S., Takesada Y., Iizuka M., Minamiura N., and Imanaka T., *J.Biol.Chem.*, **267**(26), 18447-18452 (1992)
- 6) Hong SH. and Marmur J., *Gene*, **41**, 75-84 (1986)
- 7) Watanabe K., Kitamura K., Iha H., and Suzuki Y., *Eur.J.Biochem.*, **192**, 609-620 (1990)
- 8) Volckaert G., Voet M., Robben J., *Yeast*, **13**, 251-259 (1997)
- 9) Geber A., Wikkamson PR., Rex JH., Sweeney EC., and Bennett JE., *J.Bacteriol.*, **174**, 6992-6996 (1992)
- 10) Tapio S., Yeh F., Shuman HA., and Boos W., *J.Biol.Chem.*, **266**, 19450-19458 (1991)
- 11) Ohashi K., Sawamoto M., Takeuchi H., Natori S., and Kubo T., *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **221**, 380-385 (1996)
- 12) James AA., Blackmer K., and Racioppi JV., *Gene* **75**, 73-83 (1989)
- 13) Kizaki H., Hata Y., Watanabe K., Katsube Y., and Suzuki Y., *J.Biochem.* **113**, 646-649 (1993)
- 14) Hoefsloot LH., Westerveld MH., Kroos MA., van Beeumen J., Reuser AJJ., and Oostra BA., *EMBO J.*, **7**, 1697-1704 (1988)
- 15) Chandrasena G., Osterholm DE., Sunitha I., and Henning SJ., *Gene* **150**, 355-360 (1994)
- 16) Hunziker W., Spiess M., Semenza G., and Lodish HF., *Cell* **48**, 227-234 (1986)
- 17) Chandrasena G., Osterholm DE., Sunitha I., and Henning SJ., *Gene* **150**, 355-360 (1994)
- 18) Tibbot BK. and Skadsen RW., *Plant Mol.Biol.* **30**, 229-241 (1996)
- 19) Frandesen TP., Lok F., Mirgorodskaya E., Roepstorff P., and Svensson B., *Plant Physiol.* **123**, 275-286 (2000)
- 20) Matsui H., Iwanami S., Ito H., Mori H., Honma M., and Chiba S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 875-880 (1997)
- 21) Sugimoto M., Furui S., and Suzuki Y., *Plant Mol. Biol.* **33**, 765-768 (1997)
- 22) 森一生、平成 8 年度修士論文
- 23) Kimura A., Takata M., Sakai O., Matsui H., Takai N., Takayanagi T., Nishimura I., Uozumi T., and Chiba S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1368-1370 (1992)
- 24) Nakamura A., Nishimura I., Yokoyama A., Lee DG., Hidaka M., Masaki H., Kimura A., Chiba S., and Uozumi T., *J. Biotechnol.* **53**, 75-84 (1997)
- 25) Minetoki T., Gomi K., Kitamoto K., Kumagai C., and Tamura G., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1516-1521 (1995)

- 26) Sugimoto M. and Suzuki Y., *J. Biochem.* **119**, 500-505 (1996)
- 27) Naim HY., Niermann T., Kleinhans U., Hollenberg CP., and Strasser AWM., *FEBS Lett.* **294**, 109-112 (1991)
- 28) Kinsella BT., Hogan S., Larkin A., and Cantwell BA., *Eur.J.Biochem.* **202**,657-664 (1991)
- 29) 佐藤史暁、平成 10 年度修士論文
- 30) Kashiwabara S., Azuma S., Tsuduki M, Suzuki Y., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1379-93 (2000)
- 31) Hulsmann A., Lurz R., Scheffel F., Schneider E., *J Bacteriol* **182**, 6292-301, (2000)
- 32) Rolfsmeier M., Haseltine C., Bini E., Clark A., Blum P. *J Bacteriol* **180**, 1287-9 (1998)
- 33) Henrissat B., *Biochem. J.*, **280**, 309-316 (1991)
- 34) Henrissat B., and Bairoch A., *Biochem. J.*, **293**, 781-788 (1993)
- 35) Yu S., Bojsen K., Svensson B., and Marcussen J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1433**, 1-15 (1999)
- 36) Ugalde RA., Staneloni RJ., and Leoir LF., *Biochem.Biophys.Res.Commun.***91**, 1174-1181 (1979)
- 37) Spiro RG., Spiro MJ., and Bhoyroo VD., *J.Biol.Chem.***254**, 7659-7667 (1979)
- 38) Elting JJ., Chen WW., and Lennarz WJ., *J.Biol.Chem.***255**, 2325-2331 (1980)
- 39) Ugalde RA., Staneloni RJ., and Leloir LF., *Eur.J.Biochem.* **113**, 97-103 (1980)
- 40) Sturm A., Johnson KD., Szumilo T., Elbein AD., and Chrispeels MJ., *Plant Physiol.* **85**, 741-745 (1987)
- 41) Kilker Jr. RD., Saunier B., Tkacz JS., and Herscovics A., *J.Biol.Chem.* **256**, 5299-5303 (1981)
- 42) Saunier B., Kilker Jr. R.D., Tkacz JS., Quaroni A., and Herscovics A., *J.Biol.Chem.* **257**, 14155-14161 (1982)
- 43) Nielson BL. and Brown LR., *Anal. Biochem.* **141**, 311-315 (1984)
- 44) Bause E., Erkens R., Schweden J., and Jaehicke L., *FEBS Lett* **206**, 208-212 (1986)
- 45) Kalz-Füller B., Bieberich E., and Bause E., *Eur.J.Biochem.* **231**,344-351 (1995)
- 46) Palcic MM., Scaman CH., Otter A., Szpacenko A., Romaniouk A., Li YX., Vijay IK., *Glycoconj J* **16**, 351-5 (1999)
- 47) Trombetta ES., Simons JF., Helenius A., *J.Biol.Chem.* **271**, 27509-27516 (1996)
- 48) Arendt CW, Ostergaard HL., *J. Biol. Chem* **272** 13117-25 (1997)
- 49) Pelletier MF, Marcil A, Sevigny G, Jakob CA, Tessier DC, Chevet E, Menard R, Bergeron JJ, Thomas DY, *Glycobiology* **10**, 815-27 (2000)
- 50) Trembl K, Meimaroglou D, Hentges A, Bause E, *Glycobiology*, **10**, 493-502 (2000)
- 51) Brada D. and Dubach UC., *Eur.J.Biochem.* **141**, 149-156 (1984)
- 52) Igaki S., Kimura A., and Chiba S., *Oyo Toshitsu Kagaku (J. Appl. Glycosci.)*, **45**, 269-274 (1998)
- 53) Fujimoto Z, Takase K, Doui N, Momma M, Matsumoto T, Mizuno H., *J. Mol. Biol.* **277**, 393-407 (1998)
- 54) Isoda Y., Shimizu Y., Hashimoto A., Fujiwara H., Nitta Y., Kagemoto A., *J. Biochem.* **111**,

- 204-209 (1992)
- 55) Tao BY, Reilly PJ, Robyt JF, *Biochim. Biophys. Acta*, **995**, 214-220 (1989)
 - 56) Mosi R., He S., Uitdehaag J., Dijkstra BW., and Withers SG, *Biochemistry*, **36**, 9927-9934 (1997)
 - 57) McCarter JD., Withers SG., *J. Biol. Chem.*, **271**, 6889-6894 (1996)
 - 58) McIntosh, LP., Hand G., Johnson PE., Joshi MD., Körner M., Plesniak LA. Ziser L., Wakarchuk WW., and Withers SG., *Biochemistry* **35**, 9958-9966 (1996)
 - 59) White A., Tull D., Johns K., Withers SG., and Rose DR., *Nat. Struct. Biol.*, **3** 149-154 (1996)
 - 60) Notenboom V., Birsan C., Nitz M., Rose DR., Warren RAJ., and Withers SG., *Nat. Struct. Biol.*, **5** 812-818 (1998)
 - 61) Uitdehaag JCM., Mosi R., Kalk KH., Veen B.A.v.d., Dijkhuizen L., Withers SG., and Dijkstra, BW., *Nat. Struct. Biol.*, **6** 432-436 (1999)
 - 62) Hasegawa K, Kubota M, Matsuura Y, *Protein Eng.* **12**, 819-24 (1999)
 - 63) Brawn H., Legler G., Deshusses J. and Semenza G., *Biochim. Biophys. Acta*, **483**, 135-140 (1977)
 - 64) 高村由紀子、平成2年度修士論文
 - 65) Quaroni A., Gershon E., and Semenza G., *J. Biol. Chem.* **249**, 6424-6433 (1974)
 - 66) Quaroni A. and Semenza G., *J. Biol. Chem.* **251**, 3250-3253 (1976)
 - 67) Hermans MMP., Kroos MA., van Beeumen J., Oostra BA., and Reuser AJJ., *J. Biol. Chem.* **266**, 13507-13512 (1991)
 - 68) Iwanami S., Matsui H., Kimura A., Ito H., Mori H., Honma M., and Chiba S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 459-463 (1995)
 - 69) Kimura A., Takata M., Fukushi Y., Mori H., Matsui H., and Chiba S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1091-1098 (1997)
 - 70) Hart DO., He S., Chany CJ., Withers SG., Sims PFG., Sinnott ML., and Brumer H., *Biochemistry* **39**, 9826-9836 (2000)
 - 71) Howard S., He S., Withers SG., *J. Biol. Chem.* **273**, 2067-2072 (1998)
 - 72) Stoll D., He S., Withers SG., and Warren RAJ., *Biochem. J.* **351**, 833-838 (2000)
 - 73) Nakao M., Nakayama T., Kakudo A., Inohara M., Harada M., Omura F., and Shibano Y., *Eur. J. Biochem.* **220**, 293-300 (1994)
 - 74) MacLeod AM., Tull D., Rupitz K., Warren RAJ., and Withers SG., *Biochemistry* **35**, 13165-13172 (1996)
 - 75) MacLeod AM., Lindhorst T., Withers SG., and Warren RAJ., *Biochemistry* **33**, 6371-6376 (1996)
 - 76) Moracci M., Trincone A., Perugino G., Ciaramella M., and Rossi M., *Biochemistry* **37**, 17262-17270 (1998)
 - 77) Lawson SL., Wakarchuk WW., and Withers SG., *Biochemistry* **36**, 2257-2265 (1997)
 - 78) Wang Q., Trimbur D., Graham R., Warren RAJ., and Withers SG., *Biochemistry* **34**, 14554-14562

(1995)

- 79) Viladot JL, de Ramon E, Durany O, Planas A., *Biochemistry* **37**, 11332-42 (1998)
- 80) Chiba S. and Shimomura T., *Agr.Biol.Chem.* **29**, 540-547, (1965)
- 81) Chiba S. and Shimomura T., *Agr.Biol.Chem.* **30**, 536-540, (1966)
- 82) 谷本佳博、平成6年度修士論文
- 83) Dohmen RJ., Strasser WM., Dahlems UM., Hollenberg CP., *Gene*, **95**, 111-121 (1990)
- 84) Kinsella BT., Larkin A., Bolton M., and Cantwell BA., *Curr Genet*, **20**, 45-52 (1991)
- 85) Needleman RB, Kaback DB, Dubin RA, Perkins EL, Rosenberg NG, Sutherland KA, Forrest DB, Michels CA., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 2811-5 (1984)
- 86) Chang YS, Dubin RA, Perkins E, Forrest D, Michels CA, Needleman RB., *Curr Genet* **14**, 201-9 (1988)
- 87) Kinsella BT., Cantwell BA., *Yeast* **7**, 445-454 (1991)
- 88) Minetoki T., Nunokawa Y., Gomi K., Kitamoto K., Kumagai C., and Tamura G., *Curr Genet* **30**, 432-438 (1996)
- 89) Kohrer K, Domdey H., *Methods Enzymol*, **194**, 398-405 (1991)
- 90) Moreno S., Klar A., and Nurse P., *Methods Enzymol.*, **194**, 795-823, (1991)
- 91) Walker JE., Saraste M., Runswick MJ., and Gay NJ., *EMBO J* **1**, 945-951 (1982)
- 92) Cubero B, Scazzocchio C., *EMBO J* **13**, 407-15 (1994)
- 93) Lundin M, Nehlin JO, Ronne H., *Mol Cell Biol* **14**, 1979-85 (1994)
- 94) Tsuchiya K, Tada S, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, and Tamura G., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1849-1853 (1992)
- 95) Hata Y, Kitamoto K, Gomi K, Kumagai C, Tamura G, *Curr Genet* **22**, 85-91 (1992)
- 96) Hinnebusch AG, *Proc.Natl.Acad.Sci.* **81**, 6442-6446 (1984)
- 97) Thireos G., Penn M., and Greer H., *Proc.Natl.Acad.Sci.* **81**, 5096-5100 (1984)
- 98) Mueller PP and Hinnebusch AG, *Cell* **45**, 201-207 (1986)
- 99) Barr PJ, Brake AJ, Valenzuela P, 水永武光、大隈良典共訳、酵母の遺伝子工学、宝酒造 (1995)
- 100) Aleshin A, Golubev A, Firsov LM, and Honzatko RB, *J.Biol.Chem.* **267**, 19291-19298 (1992)
- 101) Williamson G, Belshaw NJ, and Williamson MP, *Biochem. J.* **282**, 423-428 (1992)
- 102) Gunnarsson A, Svensson B, Nilsson B, and Svensson S, *Eur. J. Biochem.* **145**, 463-467 (1984)
- 103) Yoshikawa K, Yamamoto K, and Okada S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1275-1280 (1993)
- 104) Yoshikawa K, Yamamoto K, and Okada S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1281-1285 (1993)
- 105) Fanutti C., Gidley MJ., and Reid JSG., *Planta* **184**, 137-147 (1991)
- 106) Yoshikawa K, Yamamoto K, and Okada S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1392-1398 (1994)

- 107) Moracci M, Ponzano BC, Trincone A, Fusco S, De Rosa M, van Der Oost J, Sensen CW, Charlebois RL, Rossi M, *J Biol Chem*, **275**, 22082-9 (2000)
- 108) Chiba, S., Brewer, CF., Okada, G., Matsui, H., and Hehre, EJ. *Biochemistry*, **27**, 1546-1569 (1988)
- 109) Monroe JD., Hall BD., Gough CM. and Stephen AL, *Plant Physiol.* **115**, 863-864 (1997)
- 110) Hoefsloot LH, Hoogeveen-Westerveld MH, Reuser AJJ, and Oostra BA, *Biochem J.* **272**, 493-497 (1990)
- 111) Turi TG and Rose JK, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **213**, 410-418 (1995)
- 112) Özcan S. and Johnston M., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 554-569 (1999)
- 113) Nourani A., Wesolowski-Louvel M., Delaveau T., Jacq C, and Delahodde A., *Mol Cell Biol.* **17**, 5453-5460 (1997)
- 114) Vassarotti A. and Friesen D. *J Biol Chem.*, **260**, 6348-6353 (1985)
- 115) Hoffman CS. and Winston F., *Genetics* **124**, 807-816 (1990)
- 116) Yamawaki-Kataoka Y., Tamaoki T., Choe H-R., Tanaka H., and Kataoka T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5693-5697 (1989)
- 117) Tanaka N., Ohuchi N., Mukai Y., Osaka Y., Ohtani Y., Tabuchi M., Bhuiyan MSA., Fukui H., Harashima S., and Takegawa K., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **245**, 246-253, (1998).
- 118) Moreno S., Sanchez Y., Villanueva JR., and Rodriguez L., *Arch. Microbiol.* **142**, 370-374 (1985)
- 119) Ronne, H., *Trends Genet.* **11**, 12-17 (1995)
- 120) Cid VJ., Durán A., del Rey F., Snyder MP., Nombela C., and Sánchez M., *Microbiol. Rev.* **59**, 345-386 (1995)
- 121) Tibbot BK., Henson CA., and Skadsen RW., *Plant Mol. Biol.* **38**, 379-391 (1998)
- 122) Muslin EH., Kanikura AM., Clark SE., Henson CA., *Protein Expr Purif.* **18**, 20-6 (2000)
- 123) Grinna LS., Tschopp JF., *Yeast* **5**, 107-115 (1989)
- 124) Bretthauer RK., and Castello FJ., *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 193-200 (1999)
- 125) Ito H., Fukuda Y., Murata K., and Kimura A., *J.Bacteriol.* **153**, 163-168, (1983)
- 126) 日本生化学会編, “ 新生化学実験講座 1, タンパク質 VI, 合成および発現 ” 東京化学同人
- 127) Bradford M.M., *Anal.Biochem.* **72**, 248-254 (1976)
- 128) Laemmli OK., *Nature* **227**, 680-685 (1970)
- 129) Dubois M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA., and Smith F., *Anal. Chem.* **28**, 350-356 (1956)
- 130) Kozak M. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **83**, 2850-2854 (1986)
- 131) Hamilton R., Watanabe CK., and de Boer HA., *Nucl. Acid Res.* **15**, 3581-3593 (1987)
- 132) von Heijne G., *J. Mol. Biol.*, **173**, 243-251 (1984)

- 133) von Heijne G., *J. Mol. Biol.*, **184**, 99-105 (1985)
- 134) von Heijne, G. *Eur. J. Biochem.* **133**, 17-21 (1983)
- 135) Folz, R.J., Nothwehr, S.F., and Gordon, J.I., *J. Biol. Chem.*, **263**, 2070-2078 (1988).
- 136) Innis MA, Holland MJ, McCabe PC, Cole GE, Wittman VP, Tal R, Watt KWK, Gelfand DH, Holland JP, and Meade JH, *Science* **228**, 21-26 (1985)
- 137) Pless DD. and Lenarz WJ., *Proc.Natl.Acad.Sci.* **74**,134-138 (1977)
- 138) Gill SC., von Hippel PH., *Anal Biochem.*, **182**, 319-26 (1989)
- 139) Kukuruzinska MA., Bergh MLE., and Jackson BJ., *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 915-944 (1987).
- 140) Cregg JM., Vedvick TS., and Raschke WC., *Bio/Technology* **11**, 905-910 (1993)
- 141) Hehre EJ., Genghof DS., Sternlicht H., and Brewer CF., *Biochemistry* **16**, 1780-1787 (1977)
- 142) Ausubel FM., Breny R., Kingston RE., Moore DD., Seidman JG., Smith JA., and Struhl K. (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, (1987)
- 143) Datta AK., *Nucl. Acid Res.* **23**, 4530-4531 (1995)
- 144) Levy HM., Leber PD., and Ryan EM. *J. Biol. Chem.*, **238**, 3654-3659 (1963)
- 145) Matsui H. and Chiba S., *Agri.Biol.Chem.* **45**, 141-147 (1981)
- 146) Kimura A., Somoto A., Mori H., Sakai O., Matsui H., and Chiba S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**,475-479 (1997)
- 147) Hermans, M.M.P., de Graaff, E., Kroos, M.A., Wisselaar, H.A., Oostra, B.A., and Reuser, A.J.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 919-926 (1991)
- 148) Nagashima, T., Tada, S., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., and Toda, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 207-210 (1992)
- 149) Quioco FA., *Biochem. Soc. Trans.*, **21**, 442-448 (1993)
- 150) Takayanagi T, Kimura A, Chiba S, Ajisaka K., *Carbohydr. Res.*, **256**, 149-58 (1994).
- 151) Soggard M., Kadziola A., Haser B., and Svesson B., *J. Biol. Chem.* **268**, 22480-22484 (1993)
- 152) Ishikawa K., Matsui I, Honda K., and Nakatani H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.***183**, 286-291 (1992)
- 153) 木村淳夫, *Oyo Toshitsu Kagaku (J. Appl. Glycosci.)*, **45**, 71-79 (1998)
- 154) Lin CY, Hwang B, Hsiao KJ, Jin YR., *J. Inherit. Metab. Dis.*, **10**, 11-17 (1987)
- 155) Hermans, M.M.P., de Graaff, E., Kroos, M.A., Wisselaar, H.A., Willemsen, R., Oostra, B.A., and Reuser, A.J.J., *Biochem J.*, **289**, 687-693 (1993).
- 156) Lin CY and Shieh JJ., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 886-893 (1991)
- 157) Martiniuk F., Mehler M., Bodkin M., Tzall S., Hirschhorn K., Zhong N., and Hirschhorn R., *DNA Cell Biol.* **10**, 681-687 (1991)
- 158) Lowe G., Whitworth AS., *Biochem J.* **141**, 503-15 (1973)
- 159) Maenaka K, Matsushima M, Song H, Sunada F, Watanabe K, Kumagai I, *J Mol. Biol.* **247**, 281-293 (1995)

- 160) Leggio LL, Jenkins J, Harris GW, Pickersgill RW., *Protein* **41**, 362-373 (2000)
- 161) Sierks MR., Ford C., Reilly PJ., and Svensson B., *Protein Eng.* **2**, 621-625 (1989)
- 162) Sierks MR., Ford C., Reilly PJ., and Svensson B., *Protein Eng.* **6**, 75-79 (1993)
- 163) Martineau P, Szmelcman S, Spurlino JC, Quioco FA, Hofnung M., *J Mol Biol* **214**, 337-52 (1990)
- 164) Cutfield SM, Davies GJ, Murshudov G, Anderson BF, Moody PC, Sullivan PA, Cutfield JF., *J. Mol. Biol.* **294**, 771-783 (1999)
- 165) Kasahara M., Maeda M., *J. Biol. Chem.* **273**, 29106-12 (1998)
- 166) Hulseweh B., Dahlems UM., Dohmen J., Strasser AWM., and Hollenberg CP., *Eur. J. Biochem.* **244**, 128-133 (1997)
- 167) Wilkinson AJ., Fersht AR., Blow DM., and Winter G., *Biochemistry* **22**, 3581-3586 (1983)
- 168) Matsui H., Chiba S., and Shimomura T., *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1855-1860 (1978)
- 169) 千葉誠哉、下村得治、澱粉科学 (*J. Jap. Soc. Strach Sci.*) **26**, 59-67 (1979)
- 170) Haguenaer-Tsapis R, Hinnen A., *Mol. Cell Biol.* **4**, 2668-2675 (1984)

謝辞

本研究遂行および本論文作成にあたり、懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院農学研究科 千葉 誠哉教授、内藤 哲教授、木村 淳夫助教授に心より厚く御礼申し上げます。また研究の遂行にあたり直接ご指導、有益なご教示を下さいました北海道大学大学院農学研究科 森 春英博士に深く感謝いたします。

本研究遂行にあたり、直接ご協力いただきました伊藤 征也氏、奥野 愛氏、志水 なつ実氏、渡辺 琴美氏に心より御礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究遂行にあたり多大なご支援、ご協力を下さいました北海道大学大学院農学研究科応用分子生物学講座蛋白質機能工学分野の皆様、ならびに分子生命科学講座生物化学分野の皆様にご心より感謝申し上げます。