HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	糖質加水分解酵素ファミリー97が示す多様な基質認識機構［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	菊池, 麻子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14376号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81375
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kikuchi_Asako_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　　菊 池　麻 子

学 位 論 文 題 名

糖質加水分解酵素ファミリー97 が示す多様な基質認識機構

糖質加水分解酵素の触媒機構は，反応の前後で基質と生成物のアノマー型が反転する反転型機構と保持される保持型機構の 2 種類に大別される。また，糖質加水分解酵素はアミノ酸配列の類似性をもとに糖質加水分解酵素ファミリー（GH）に分類される。一般に，同一 GH に属する酵素の触媒機構は一致する。しかし GH97 は，反転型と保持型の両機構を示す酵素が共存するユニークなグループである。GH97 に属する酵素は系統解析に基づき，さらに 5 つのサブファミリー（A–E）に分類される。本研究および当該研究室の結果から，サブファミリーA には反転型 α-glucoside hydrolase が，サブファミリーB には保持型 α-galactosidase が，サブファミリーC には保持型 β-L-arabinopyranosidase/α-galactosidase が含まれる。解析されたそれぞれの酵素が異なる基質特異性を示すことから，GH97 酵素は触媒機構だけでなく基質認識機構も多様であることが期待される。本研究では，腸内に生息する細菌が有する GH97 酵素のうち，機能未解明の 6 酵素について解析を行い，各酵素の基質特異性および立体構造をそれぞれが属するサブファミリーごとに比較し，タンパク質構造面から基質認識機構を理解することを目的とした。その結果，4 つのサブファミリー（A, B, C および E）に分類される新奇酵素の機能を解明し，同一サブファミリーに属していても異なる基質特異性を示す酵素の存在を明らかにした。さらに，その相違を与える責任因子の究明に成功した。

（1）サブファミリーA に属す 2 酵素（A1ase と A2ase）の基質認識機構

A1ase および A2ase は *p*-nitrophenyl α-D-glucopyranoside（*p*NPαGlc）を最もよく加水分解したことから，これら酵素を α-glucoside hydrolase と決定した。さらに詳細な基質特異性を調べるため，両酵素の α-glucobiose に対する加水分解速度定数（k_{cat}/K_m）を調べ，サブファミリーA に属す既知の Ak3ase（glucoamylase 様の酵素）と比較した。A1ase の各基質に対する k_{cat}/K_m 値は nigerose＞kojibiose＞＞isomaltose＞maltose であった。Ak3ase が α-1,4-グルコシド結合の maltose をよく加水分解するのとは異なり，A1ase は α-1,3-グルコシド結合の nigerose に高い特異性を示すことが分かった。A2ase のそれは kojibiose＞isomaltose＞nigerose＞＞maltose であった。A2ase は Ak3ase よりも α-1,6-グルコシド結合をよく加水分解し，kojibiose や nigerose にも高い活性を示すことが分かった。

X 線結晶構造解析により A1ase および A2ase の立体構造を決定し，構造既知のサブファミリーA 酵素 （Ak3ase や Ak4ase）との比較から基質特異性の多様性について考察した。A1ase と A2ase の全体構造は他の GH97 酵素と類似し，$(\beta/\alpha)_8$ barrel 構造から成る触媒ドメイン，β-sandwich 構造から成る N ドメインおよび C ドメインから構成されていた。A1ase の α-1,3-グルコシド結合に対する特異性は，Ak3ase よりも長い β→α loop の欠損および Ak3ase において基質結合部位を形成する N ドメイン・ループの欠落が関与すると推測された。A2ase や Ak3ase ではサブサイト+1 を構成するアミノ酸残基に違いがあり，これが両酵素の各グルコシド結合に対する特異性の相違に関わると考えられた。また，Ak4ase は α-1,6-グルコシド結合に特異的な α-glucoside hydrolase であり，その基質認識

には N ドメイン上のループに存在する 3 残基のアミノ酸が関与する。A2ase の当該ループには本相互作用を与える 2 残基がないことから，Ak4ase と A2ase では α-1,6-グルコシド結合認識機構が異なることが分かった。

（2）サブファミリーB に属す 2 酵素（B1ase と B2ase）の基質認識機構

B1ase および B2ase は *p*-nitrophenyl α-D-galactopyranoside（*p*NPαGal）を最もよく加水分解したことから，これら酵素を α-galactosidase と決定した。さらに詳細な基質特異性を調べるため，両酵素の melibiose および raffinose に対する k_{cat}/K_m を調べた。B1ase の melibiose に対する k_{cat}/K_m は 0.00031 $s^{-1}mM^{-1}$ であり，raffinose に対する k_{cat}/K_m 値は検出限界以下となった。一方，B2ase の melibiose および raffinose に対する k_{cat}/K_m は同等の値を示し, それぞれ 0.66 $s^{-1}mM^{-1}$ および 1.0 $s^{-1}mM^{-1}$ であった。サブファミリーB に属す既知酵素の Bk3ase（α-galactosidase）では B1ase と同様に，melibiose に対する k_{cat}/K_m が raffinose に対するそれよりも大きい。X 線結晶構造解析の結果から，Bk3ase，B1ase および B2ase ではサブサイト+2 の構造が異なっており, これが基質特異性の相違に関与することを解明した。また，B1ase は *p*NPαGal を基質として α-1,6-galactosyl 転移反応を触媒することが分かった。B1ase では，Bk3ase ならびに B2ase と比べてサブサイト+1 を構成する N ドメインのループがオープン型となり，*p*NPαGal を受容体として許容しやすくなった結果，転移反応を触媒できると考えられた。

（3）サブファミリーC に属す酵素（C1ase）の基質認識機構

既知のサブファミリーC に属する Ck2ase は *p*-nitrophenyl β-L-arabinopyranosidase（*p*NPβ-L-Ara）と *p*NPαGal の両基質に特異性を示す β-L-arabinopyranosidase/α-galactosidase である。一方，本研究により解析した C1ase は， *p*NPβ-L-Ara よりも *p*NPαGal に対して 26 倍大きい k_{cat}/K_m 値を示したことから，α-galactosidase と決定した。次に，C1ase の基質認識機構が Ck2ase と同様か調べるため，サブサイト−1 において基質の α-galactoside の 6 位水酸基と相互作用することが予想された Ala 残基に注目した。本アミノ酸は Ck2ase では Asn であり，Ala を Asn に置換した C1ase（A→N 変異体）を作製し基質特異性を比較した。A→N 変異酵素の *p*NPαGal および *p*NPβ-L-Ara に対する k_{cat}/K_m はともに減少した。*p*NPβ-L-Ara に対する k_{cat}/K_m が上昇しなかったことから, C1ase の基質認識機構は Ck2ase と異なることが判明した。立体構造解析の結果から，α-galactoside の 6 位水酸基と相互作用しうる位置にある Tyr 残基のフェノール性水酸基が C1ase の基質認識に関与することが予想された。当該 Tyr を Phe および Trp に置換した変異酵素（それぞれ Y→F および Y→W）では *p*NPαGal および *p*NPβ-L-Ara に対する k_{cat}/K_m がともに減少した。また二重置換酵素 Y→F/A→N および Y→W/A→N も，*p*NPαGal および *p*NPβ-L-Ara に対する k_{cat}/K_m が同様に減少した。これらの結果から，Tyr 残基および Ala 残基は C1ase の基質選択性よりも，α-galactoside 加水分解における反応遷移状態の安定化に寄与することが示唆された。

（4）サブファミリーE に属す酵素（E1ase）の触媒機構

サブファミリーE に分類されるタンパク質群は，他のサブファミリーとは異なる触媒残基の保存性を示す。サブファミリーE の触媒機構と基質特異性を明らかにすることを目的とし，E1ase の構造解析を行った。得られた酵素結晶の X 線立体構造解析から，E1ase の酸性アミノ酸のカルボキシ基が GH97 反転型酵素の一般塩基触媒と重なる位置にあることが分かった。これより，E1ase は当該残基を塩基触媒とする反転型 glycosidase である可能性が示唆された。