



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 [全文の要約]
Author(s)	菊池, 麻子
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/81384
Type	doctoral thesis
File Information	Kikuchi_Asako_summary.pdf



博士論文の要約

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

1. 課題設定

多糖・オリゴ糖・配糖体などの糖質を加水分解する酵素の触媒機構は、その反応の前後で基質と生成物のアノマー型が保持される保持型機構および反転する反転型機構の2つの反応機作に大別できる。また、これらの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）に分類されている。同じファミリーに属す酵素の立体構造は、触媒部位の構造も含め類似すると理解されており、これは一般に同一 GH に属す酵素の触媒機構は一致することを意味する。一方 極めて稀ではあるが、例外も存在する。その好例が GH97 であり、反転型と保持型の両機構を示す酵素が共存する。本現象が当該グループのユニークな第1の特徴である。

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。これまでの研究結果から、サブファミリーAには反転型 α -グルコシドヒドラーゼが、サブファミリーBには保持型 α -ガラクトシダーゼが、サブファミリーCには保持型 β -L-アラビノピラノシダーゼ／ α -ガラクトシダーゼが含まれる。すなわち、類似する触媒構造を保持するにもかかわらず、異なる基質特異性を示す。これが GH97 グループにおける第2のユニークな性質である。これらの先行知見から、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予想できる。

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、それぞれが属するサブファミリーごとに基質特異性および立体構造を解析・比較し、タンパク質構造面から多様な基質認識機構を理解することを目的とした。

2. 方法

腸内細菌から目的の酵素遺伝子を分離し、*Escherichia coli* の発現系で生産した。精製作業の迅速化のため、常法のタグ標識を行い、アフィニティークロマトグラフィーを使用し酵素単離を行った。酵素化学的性質を明らかにし、基質特異性を調べた。変異酵素の場合も同様の実験を実施した。基質は市販品を用いたが、一部は有機合成法により調製した。基質特異性の評価は、速度パラメータ (k_{cat}/K_m 値) を求めて行った。X 線立体構造解析に用いた結晶は、各酵素をシッティングドロップ蒸気拡散法などで作製し、常法に従い構造解析を行った。

3. 結論・考察

3-1) サブファミリーAに属す A1ase と A2ase :

A1ase および A2ase は *p*-ニトロフェニル α -D-グルコピラノシド (*p*NP α Glc) を最もよく加水分解したことから、これらの酵素を α -グルコシドヒドラーゼと決定した。さらに、A1ase および A2ase の α -グルコビオースに対する k_{cat}/K_m 値を求め、サブファミリーA に属す既知の Ak3ase (触媒機構はグルコアミラーゼと同一の酵素) と比較することで、基質特異性を解析した。A1ase の k_{cat}/K_m 値はニゲロース > コージビオース > イソマルトース > マルトースであった。Ak3ase が α -1,4-グルコシド結合のマルトースをよく加水分解したが、これとは異なり、A1ase は α -1,3-グルコシド結合のニゲロースに高い特異性を示すことが分かった。A2ase の場合はコージビオース > イソマルトース > ニゲロース > マルトース 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、コージビオースやニゲロースにも高い活性を示すことが分かった。以上の結果から、サブファミリーA において基質認識が異なる複数酵素の存在が分かった。

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た。これらの知見を構造既知のサブファミリーA 酵素である Ak3ase や Ak4ase と比較し、基質特異性の多様性を考察した。A1ase と A2ase の全体構造は他の GH97 酵素と類似し、3つのドメインから形成されていた。3ドメインとは「 $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造の触媒ドメイン・ β -サンドイッチ構造の N ドメイン・C ドメイン」である。まず、A1ase が示すニゲロース (α -1,3-グルコシド結合の α -グルコビオース) に対する特異性は、Ak3ase のより長い $\beta \rightarrow \alpha$ ループや基質結合に寄与する N ドメイン・ループの欠損が原因と推測された。次に、A2ase であるが、Ak3ase と比較するとサブサイト+1を形成するアミノ酸残基に違いがあり、これが A2ase と Ak3ase の各 α -グルコビオースに対する特異性の相違に関与すると考えられた。また、A2ase のイソマルトース (α -1,6-グルコシド結合の α -グルコビオース) に対する低い特異性を Ak4ase との構造比較から考察した。Ak4ase は α -1,6-グルコシド結合に特異的な酵素であり、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 には本相互作用を与える2残基がなく、Ak4ase のような α -1,6-グルコシド結合認識が効率的に行われないことが分かった。

3-2) サブファミリーB に属す B1ase と B2ase :

B1ase および B2ase は *p*-ニトロフェニル α -D-ガラクトピラノシド (*p*NP α Gal) を最もよく加水分解したことから、これら酵素を α -ガラクトシダーゼと決定した。天然基質であるメリビオースおよびラフィノースを用いて基質特異性を調べた。B1ase の両基質に対する k_{cat}/K_m はメリビオース > ラフィノース (検出限界以下) であった。一方、B2ase のメリビオースおよびラフィノースに対する k_{cat}/K_m は、ほぼ同等の値を示した。

構造既知の Bk3ase との比較から B1ase および B2ase が示す天然基質に対する認識を評価した。Bk3ase は B1ase と同様に、メリビオースに対する k_{cat}/K_m がラフィノース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 はサブサイト+2の構造が異なっており、この構造的差異が基質特異性の相違に関与することを明らかにした。また、B1ase は *p*NP α Gal を基質としてガラクトシル転移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*NP α Gal 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。

3-3) サブファミリーC に属す Clase :

既知のサブファミリーC に属する Ck2ase は *p*-ニトロフェニル β-L-アラビノピラノシド (*p*NPβ-L-Ara) と *p*NPαGal の両基質に特異性を示す β-L-アラビノピラノシダーゼ/α-ガラクトシダーゼである。一方、本研究の対象酵素である Clase は、*p*NPβ-L-Ara よりも *p*NPαGal に対して約 30 倍大きい k_{cat}/K_m 値を示したことから、α-ガラクトシダーゼと決定した。次に、Clase 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-ガラクトシドの 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 Clase (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、Clase 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-ガラクトシドの 6 位水酸基と相互作用している位置にある Tyr 残基のフェノール性水酸基が Clase 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 Clase の基質選択性よりも、α-ガラクトシド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。

3-4) サブファミリーE に属す Elase :

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、Elase 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、Elase 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、Elase は当該残基を塩基触媒とする反転型グリコシダーゼである可能性が示唆された。

本研究は、GH97 の 4 つのサブファミリー (A、B、C および E) に分類される機能未知な酵素について、その新奇な機能を明らかにした。さらに同一サブファミリーに属していながら、異なる基質特異性を示す酵素の存在を見出した。さらに構造生物学的手法を用いて、その相違を与える責任因子の究明に成功した。