



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物由来GH1 β -グルコシダーゼ類の基質特異性の分子基盤 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	堀越, 秀
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14820号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85528
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Horikoshi_Shu_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 堀越 秀

学位論文題名

植物由来 GH1 β -グルコシダーゼ類の基質特異性の分子基盤

β -グルコシダーゼは、配糖体やオリゴ糖の非還元末端の β -D-グルコシド結合を加水分解し、 β -D-グルコースを遊離する酵素である。生物に普遍的に存在し、様々な生物学的プロセスに関わるとされる。本酵素は、アミノ酸配列の類似性に基づく糖質加水分解酵素の分類において、いくつかの酵素群に分類される。その中で主要な酵素群が GH1 である。植物には GH1 β -グルコシダーゼアイソザイムが多数あり、推定遺伝子はシロイヌナズナでは 48、イネでは 38 ある。これらの発現制御により特定の時期に特定の組織器官でアイソザイムが生じ、個々の酵素の特異性により生体内に存在する多様な基質（生理活性物質の配糖体やオリゴ糖などの β -D-グルコシド）のうち特定のものが分解されると考えられる。しかし、これまでに機能解析された酵素数は少なく、また逆遺伝学的手法による機能解析も、遺伝子の多重性と相互相補性のために限定的であり、機能未知の酵素が多い。さらに、GH1 酵素の中には β -D-グルコシド以外に β -D-マンノシドや β -D-フコシドにも作用する酵素もある。そのため、GH1 β -グルコシダーゼの基質特異性については、 β -D-グルコシドのアグリコン部の多様性に加えて、グリコン側の特異性も評価する必要がある。これら GH1 酵素の機能を高精度で予測するためには、基質特異性についての酵素分子構造に基づく理解が強く求められている。本研究では、植物 GH1 β -グルコシダーゼ類の機能解析とともに、基質特異性の発現機構について、基質グリコシドのアグリコンとグリコンそれぞれの結合部位に注目しながら、酵素構造に基づく分子機構の解明を進め、以下の3点を明らかにした。

1. アグリコン特異性を決定する分子機構

シロイヌナズナ由来 GH1 酵素 AtBGluc42 は、逆遺伝学的解析によりスコポリン（ベンゾピラン構造を持つスコポレチンの β -グルコシド）を加水分解し、鉄吸収ならびに根圏菌叢改善を誘起するスコポレチンを生成する鍵酵素とされるが、酵素活性自体は確認されていなかった。組換え AtBGluc42 を調製し、各種基質に対する反応速度を測定した。本酵素はスコポリンおよび類似構造の 4-メチルウンベリフェリル β -グルコシドに高い k_{cat}/K_m を示し、フェニル β -グルコシドには低速度であった。オリゴ糖のうち、ラミナリオリゴ糖 ($\beta 1 \rightarrow 3$) では 2 糖に、セロオリゴ糖 ($\beta 1 \rightarrow 4$) では 3 糖に対してスコポリンと同等の高い k_{cat}/K_m を示した。

X 線結晶構造解析により立体構造を決定し、これに基づき基質特異性に寄与する構造を解析した。本酵素のリガンドフリー構造を 1.7 Å 分解能で決定した。全体構造は GH1 酵素に共通の $(\beta/\alpha)_8$ -バレル構造であった。AutoDock Vina を用いたスコポリンの結合予測により、6-メトキシ基と Phe197 間、ピラン環部分と Trp360 間で相互作用が推定された。セロオリゴ糖の 3 糖特異性は、他酵素の既知構造との比較と変異酵素の解析により、 $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 6 上

の Arg342 の立体障害によるものと判断された。すなわち、本酵素と配列同一性の高いイネ由来 GH1 酵素 Os3BGlu7 の 5 糖複合体構造との重ね合わせにおいて Arg342 はセロオリゴ糖結合の立体障害になると予想され、この Arg342 の Ala/Tyr 置換により 3 糖特異性の解消、ならびに 4 糖または 5 糖で k_{cat}/K_m 最大値が得られた。メタゲノム由来 GH1 酵素 Td2F2 は当該 Arg を持つにも関わらず 4 糖特異性を示すなど、単純に配列上の該当 Arg だけでは機能が定まらない。これについて、詳細な構造比較により、該当残基がサブドメイン上にあり、このドメインの配置にわずかな違いがあること、そしてこのサブドメイン配置の違いに伴い周辺構造との塩橋や疎水的相互作用が異なっていることを指摘した。

2. グリコン特異性 (β -D-グルコシドと β -D-マンノシド) を決定する分子機構

GH1 酵素の基質特異性はアグリコン部分に限らず、グリコン部分でも多様性を示す。すなわち、酵素によってグルコシド、マンノシド、フコシドなど多様なグリコシドに作用する。しかし、グリコン結合部位 (サブサイト-1) で基質と直接結合する残基は、基質グリコン特異性に関わらず高度に保存されており、グリコン特異性に寄与する構造は不明であった。シロイヌナズナ由来 GH1 酵素 AtBGlu44 は β -マンノシドに、AtBGlu42 と Os3BGlu7 は β -グルコシドに特異性を示す。精密な構造比較により、グリコン結合残基に隣接するいわゆるセカンドシェル の 4 残基が、グリコン結合残基 His ならびに求核触媒残基 Glu の位置にわずかな違いを与えると推定された。これらの残基を変換した β -マンノシダーゼ AtBGlu44 変異酵素は、 β -マンノシド特異性ではなく β -グルコシド特異性を示した。すなわち、*p*-ニトロフェニル β -グルコシド (pNP Glc) と pNP β -マンノシド (pNP Man) に対する k_{cat}/K_m を比べると、野生型 AtBGlu44 では pNP Man が 11 倍高いが、当該残基を β -グルコシダーゼ AtBGlu42 型または Os3BGlu7 型とした変異体では、pNP Man の低下と pNP Glc の増加により、pNP Glc が 2.5 から 5.3 倍高い値となった。 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 を親酵素とした β -マンノシダーゼ AtBGlu44 型への置換では、 k_{cat}/K_m 値は逆転までに至らなかったが、pNP Glc では 13% まで低下し、pNP Man では 5 倍に増加した。したがって、これらセカンドシェル残基が、グリコン特異性決定の一因であることが明らかになった。

3. グリコン特異性 (β -D-グルコシドと β -D-フコシド) を決定する分子機構

イネ GH1 酵素 TAGG1 および TAGG2 は、pNP Glc と pNP β -フコシド (pNP Fuc) いずれにも作用するが作用の程度は異なり、TAGG1 は pNP Glc を、TAGG2 は pNP Fuc をより良い基質とする。しかし、両酵素の配列同一性は高く (85%)、グリコン結合部位 (サブサイト-1) はセカンドシェルも含めて一致し、アグリコン結合部位にのみ違いが見られた。そこで、基質アグリコンがグリコン特異性に影響を与える可能性について解析した。基質をメチル配糖体とすると、両酵素ともフコシドよりもグルコシドにより良く作用した。すなわち、TAGG1 は pNP 配糖体とメチル配糖体いずれでもグルコシド特異性を示したが、TAGG2 はそれぞれフコシドおよびグルコシドに良く作用し、基質アグリコンによりグリコン特異性が変化した。次に、酵素のアグリコン結合部位の改変に伴うグリコン特異性の変化を解析した。両酵素の基質アグリコン結合部位で異なる 8 残基を TAGG1 を親酵素として TAGG2 型に変換すると、pNP Fuc の k_{cat}/K_m の 4.2 倍増を伴って、フコシド特異的になった。以上のことから、アグリコン側の結合様式の違いによってグリコン側の特異性が変化するという新しい分子機構モデルを提唱した。