



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14820
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88853
Type	doctoral thesis
File Information	Horikoshi_Shū.pdf



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

北海道大学 大学院農学院

生命フロンティアコース 博士後期課程

堀越 秀

目次 頁

1	緒論	1
1.1	β-グルコシダーゼ	1
1.2	GH1 β-グルコシダーゼの分類	1
1.3	GH1 β-グルコシダーゼの反応機構と構造	2
1.4	植物 GH1 β-グルコシダーゼ	7
1.5	本研究の目的	14
2	シロイヌナズナ由来 AtBGlu42 の基質特異性とその分子基盤	27
2.1	緒論	27
2.2	実験材料および方法	28
2.2.1	培地および基質	28
2.2.2	植物材料と生育条件	29
2.2.3	cDNA の調製	29
2.2.4	組換え AtBGlu42 の発現プラスミドの構築	30
2.2.5	組換え AtBGlu42 の生産と精製	33
2.2.6	SDS-PAGE	34
2.2.7	タンパク質の定量	35
2.2.8	活性測定	35
2.2.9	pH および温度の影響	35
2.2.10	基質特異性の解析	36
2.2.11	pNP Glc に対する反応の速度論的解析	36
2.2.12	pNP Glc に対する反応の生成物の TLC 分析	37
2.2.13	セロオリゴ糖に対するサブサイト親和力の算出	38
2.2.14	AtBGlu42 の結晶の調製	40
2.2.15	X 線回折実験および位相決定	40
2.2.16	分子ドッキングシミュレーション	41
2.3	結果	48
2.3.1	組換え AtBGlu42 の調製	48
2.3.2	AtBGlu42 の基質特異性	48
2.3.3	AtBGlu42 の立体構造	49
2.3.4	AtBGlu42 とスコポリンの結合予測	51
2.3.5	AtBGlu42 と Os3BGlu7-オリゴ糖複合体の構造比較	51
2.3.6	AtBGlu42 の Arg342 変異酵素の解析	52
2.4	考察	62
3	β-グルコシドおよび β-マンノシドに対する特異性を決定する分子機構	74
3.1	緒論	74

3.2	実験材料および方法	77
3.2.1	基質	77
3.2.2	β -マンノシダーゼと β -グルコシダーゼの立体構造比較	77
3.2.3	GH1 β -マンノシダーゼと β -グルコシダーゼの多重配列比較と分子系統樹解析	78
3.2.4	組換え AtBGlu44 および Os3BGlu7 の発現プラスミドの構築	78
3.2.5	組換え AtBGlu44 および Os3BGlu7 の生産と精製	79
3.2.6	活性測定および基質特異性の解析	79
3.3	結果	85
3.3.1	β -マンノシダーゼ AtBGlu44 と β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 の変異酵素の設計	85
3.3.2	組換え AtBGlu44 および Os3BGlu7 の調製	86
3.3.3	野生型 AtBGlu44 および Os3BGlu7 の基質特異性	87
3.3.4	AtBGlu44 変異酵素の pNP グリコシド特異性	88
3.3.5	Os3BGlu7 変異酵素の pNP グリコシド特異性	89
3.3.6	AtBGlu44 と Os3BGlu7 変異酵素のメチル配糖体および二糖に対するグリコシド特異性	91
3.4	考察	102
4	β -グルコシドおよび β -D-フコシドに対する基質特異性を決定する分子機構	109
4.1	緒論	109
4.2	実験材料および方法	112
4.2.1	基質および試薬	112
4.2.2	組換え TAGG1 および TAGG2 の発現プラスミドの構築	113
4.2.3	組換え TAGG1 および TAGG2 の生産と精製	114
4.2.4	TAGG1 および TAGG2 の基質特異性の解析	115
4.3	結果	121
4.3.1	メチル D-Fuc の調製	121
4.3.2	組換え TAGG1 および TAGG2 の調製	121
4.3.3	野生型 TAGG1 と TAGG2 の pNP 配糖体とメチル配糖体に対するグリコシド特異性	122
4.3.4	TAGG1 変異酵素の pNP 配糖体とメチル配糖体に対するグリコシド特異性	123
4.3.5	野生型 TAGG1 と TAGG2 および TAGG1 変異酵素のアグリコン特異性	125
4.4	考察	134
5	総合考察—構造に基づく植物 GH1 酵素の機能の整理—	141
	参考文献	149

略語一覽

GH1	Glycoside hydrolase family 1
PDB	Protein Data Bank
β 1	β -strand 1 of $(\beta/\alpha)_8$ -barrel structure
α 1	α -helix 1 of $(\beta/\alpha)_8$ -barrel structure
L1	$\beta \rightarrow \alpha$ loop 1 of $(\beta/\alpha)_8$ -barrel structure
DIMBOA	2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one
TA Glc	tuberic acid β -D-glucopyranoside
SA Glc	salicylic acid β -D-glucopyranoside
ISR	induced systemic resistance
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
DEPC	diethylpyrocarbonate
LB	Luria-Bertani
PEG	polyethylene glycol
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
BSA	bovine serum albumin
pNP Glc	<i>p</i> -nitrophenyl β -D-glucopyranoside
pNP	<i>p</i> -nitrophenol
pNP D-Fuc	<i>p</i> -nitrophenyl β -D-fucopyranoside
pNP Gal	<i>p</i> -nitrophenyl β -D-galactopyranoside
pNP Man	<i>p</i> -nitrophenyl β -D-mannopyranoside
pNP Xyl	<i>p</i> -nitrophenyl β -D-xylopyranoside
pNP Cel ₂	<i>p</i> -nitrophenyl β -D-cellobioside
phenyl Glc	phenyl β -D-glucopyranoside
4MU Glc	4-methylumbelliferyl β -D-glucopyranoside
octyl Glc	octyl β -D-glucopyranoside
methyl Glc	methyl β -D-glucopyranoside
Cel ₂	cellobiose
Cel ₃	cellotriose
Cel ₄	cellotetraose
Cel ₅	cellopentaose
Cel ₆	cellohexaose
Lam ₂	laminaribiose
Lam ₃	laminaritriose
Lam ₄	laminaritetraose
Man ₂	β -(1 \rightarrow 4)-mannobiose
Man β 1-4Glc	β -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose

methyl Man	methyl β -D-mannopyranoside
methyl D-Fuc	methyl β -D-fucopyranoside
methyl Gal	methyl β -D-galactopyranoside
A_i	affinity for glucosyl residue of cellooligosaccharides at the position of subsite i
k_{int}	intrinsic k_{cat}
TLC	thin layer chromatography
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
BCA	bicinchoninic acid

1 緒論

1.1 β -グルコシダーゼ

β -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21) は、配糖体やオリゴ糖の非還元末端の β -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。本酵素は微生物、菌類、植物および動物に至る生物に普遍的に存在し、オリゴ糖、配糖体および糖脂質の代謝など多様な生理機能に関わる (Ketudat Cairns and Esen 2010)。例えば、微生物では植物性多糖であるセルロースの消化に関与しており、セルラーゼにより生成されたセロオリゴ糖を D-グルコースにまで分解する (Shewale 1982)。植物においては、配糖化により不活化、貯蔵されるストレス応答物質 (Hughes *et al.* 1992; Roepke and Bozzo 2015; Nakano *et al.* 2017) や植物ホルモン (Brzobohatý *et al.* 1993; Falk and Rask 1995; Lee *et al.* 2006; Wakuta *et al.* 2010) の活性化や、細胞壁構成オリゴ糖の加水分解による細胞壁代謝に寄与する (Opassiri *et al.* 2003; Hrmova *et al.* 2006; Shim *et al.* 2021)。昆虫では、植物由来の毒性物質の生体防御への利用のために、不活毒性物質配糖体の脱配糖化を担うほか、毒性を持つ植物由来配糖体の脱配糖化により無毒化する (Bridges *et al.* 2002; Poreddy *et al.* 2015)。ヒトでは、糖脂質の一種グルコセレブロシドの代謝に関与しており、この遺伝子の欠損によりグルコセレブロシドが蓄積するとゴーシェ病を発症する (Gatt *et al.* 1966; Meikle *et al.* 1999)。

1.2 GH1 β -グルコシダーゼの分類

β -グルコシダーゼは、糖質加水分解酵素のアミノ酸配列に基づく分類により糖質加水分解酵素群 GH1, GH3, GH5, GH30, GH39 および GH116 に分類される (Drula *et al.* 2021; <http://www.cazy.org/>)。GH1 は、 β -グルコシダーゼに加えて β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23), β -マンノシダーゼ (EC 3.2.1.25), β -キシロシダーゼ (EC 3.2.1.37), β -D-フコシダーゼ (EC 3.2.1.38), ミロシナーゼ (EC 3.2.1.147), β -グルクロニダーゼ (EC 3.2.1.31), β -プリメベロシダーゼ (EC 3.2.1.149), 6-ホスホ- β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.85), および 6-ホスホ- β -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.86) など、多様な β -グリコシダーゼを含む。ひとつの酵素が複数の活性を持つこともある。GH1 β -グルコシダーゼは古細菌、真正細菌、菌類、動物および植物のすべての生物界の生物により保有され、

分子系統樹上では各生物界からの GH1 酵素ごとにクレードが形成される (Marques *et al.* 2003). 植物は多くの GH1 β -グルコシダーゼを持ち, シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は 48, イネ (*Oryza sativa*) は 38 の推定 GH1 酵素を持つ (Xu *et al.* 2004; Opassiri *et al.* 2006). シロイヌナズナの推定 β -グルコシダーゼ遺伝子のうち *AtBglu1*, *AtBglu2*, *AtBglu5*, *AtBglu6*, *AtBglu14*, *AtBglu36*, *AtBglu39* および *AtBglu43*, イネの推定 β -グルコシダーゼ遺伝子のうち *Os4Bglu9*, *Os4Bglu15*, *Os4Bglu17*, *Os5Bglu23*, *Os11Bglu35* および *Os11Bglu37* は, 明らかに全長配列が小さいなどの理由により偽遺伝子であるとされる (Xu *et al.* 2004; Opassiri *et al.* 2006). これまでに酵素機能が報告されているものは, シロイヌナズナでは 18 種 (*AtBglu10*, *AtBglu13*, *AtBglu15*, *AtBglu16*, *AtBglu18* (*AtBG1*), *AtBglu21*, *AtBglu22*, *AtBglu23* (*PYK10*), *AtBglu26* (*PEN2*), *AtBglu33* (*AtBG2*), *AtBglu34* (*TGG4*), *AtBglu35* (*TGG5*), *AtBglu37* (*TGG1*), *AtBglu38* (*TGG2*), *AtBglu44*, *AtBglu45*, *AtBglu46*, *AtBglu48* (*SFR2*)), およびイネでは 11 種 (*Os1Bglu4*, *Os3Bglu6*, *Os3Bglu7*, *Os3Bglu8*, *Os4Bglu12* (*TAGG2*), *Os4Bglu13* (*TAGG1*), *Os4Bglu16*, *Os4Bglu18*, *Os7Bglu26*, *Os9Bglu31*, *Os12Bglu38*) ある (Figure 1-1). これらについては, 1.4 節にて述べる.

1.3 GH1 β -グルコシダーゼの反応機構と構造

1.3.1 触媒反応機構

GH1 に属す β -グルコシダーゼによる β -グルコシドの加水分解では, 反応前後で基質のグルコシル基のアノマー型が保持される (Withers *et al.* 1986). すなわち, β -グルコシドの加水分解により β -グルコースが生じる. アノマー保持型の GH1 β -グルコシダーゼの反応機構は求核二重置換機構によって説明される (Figure 1-2; Rye and Withers 2000). この機構は 2 段の触媒過程を経過し, 1 段目では酵素のグルコシル化, 2 段目では脱グルコシル化が生じる. 一般酸塩基触媒および求核触媒は, いずれも Glu のカルボキシ基が担う. まず, グルコシル化の過程では, 一般酸塩基触媒が一般酸触媒として機能し, カルボキシ基からプロトンを経由してグルコシド酸素に供与する. 同時に, 求核触媒がグルコシド結合の背面からアノマー炭素 (1-C) に求核攻撃する. これらによりグルコシド結合は切断され, α -グルコシル酵素中間体が形成される. 次の脱グルコシル化の過程では, 一般

酸塩基触媒は一般塩基触媒として機能し、解離カルボキシ基がプロトンを水分子から奪う。活性化された水分子は、 α -グルコシル酵素中間体のアノマー炭素を求核攻撃して、グルコシル化されていた求核触媒 Glu との結合が切断されて、酵素は脱グルコシル化され、 β -D-グルコースが生成される。脱グルコシル化過程で、水分子に代わり糖分子などの水酸基が脱プロトン化されて求核剤となると、新たな β -グルコシドが生成される。この反応を糖転移反応と呼ぶ。

グリコシダーゼによるグリコシド結合の加水分解反応において、サブサイト-1 の糖はオキソカルベニウムイオン様の遷移状態を経るとされる (Kempton and Withers 1992; Zechel and Withers 2000)。そのため、遷移状態時のピラノースの立体配座は 2-C, 1-C, 5-O および 5-C が同一平面上に位置する半椅子型 2 種 (${}^4H_3, {}^3H_4$)、ボート型 2 種 (${}^{2,5}B, B_{2,5}$)、またはエンベロープ型 4 種 (${}^3E, E_3, {}^4E, E_4$) のいずれかであり、基質・酵素により決まる (Ardèvol and Rovira 2015)。GH1 β -グリコシダーゼでは、ミカエリス複合体、遷移状態アナログとの複合体、およびグルコシル酵素中間体の各構造についての X 線結晶構造解析および分子動力的解析により、ピラノースの立体配座はミカエリス複合体、遷移状態、グルコシル酵素中間体の順に、 ${}^1S_3 \rightarrow {}^4H_3^\ddagger \rightarrow {}^4C_1$ と変化すると考えられている (Chuenchor *et al.* 2011; Ardèvol and Rovira 2015; Tankrathok *et al.* 2015; Nuhto *et al.* 2020)。

1.3.2 立体構造

これまで 75 種類 (古細菌 5 種, 真正細菌 36 種, 動物 6 種, 菌類 6 種, 植物 17 種, メタゲノム 4 種, 人工酵素 1 種) の GH1 タンパク質の立体構造が解明されており, Protein Data Bank (PDB) データベースに登録されている (<https://www.rcsb.org/>)。GH1 酵素は、いずれも $(\beta/\alpha)_8$ -バレルの触媒ドメイン構造を持ち (Figure 1-3; Jenkins *et al.* 1995)、このうち多くは本ドメインの β -ストランド 4 (β_4) および 7 (β_7) 上にそれぞれ一般酸塩基触媒残基 Glu および求核触媒残基 Glu を持つ (Jenkins *et al.* 1995)。これら触媒残基は、ミロシナーゼを除く GH1 酵素において広く保存されている (Xu *et al.* 2004; Marana 2006)。植物ではチャノキ (*Camellia sinensis*) 由来 β -プリメベロシダーゼ (Saino *et al.* 2014)、イネ (*O. sativa*) 由来 Os3BGlu6 (Seshadri *et al.* 2009)、Os3BGlu7 (Chuenchor *et al.* 2008)、Os4BGlu12 (TAGG2; Sansenya *et al.* 2011)、Os4BGlu18 (Baiya *et al.* 2021) および Os7BGlu26

(Tankrathok *et al.* 2013), インドジャボク (*Rauvolfia serpentina*) 由来ストリクトシジン β -グルコシダーゼ (SG; Barleben *et al.* 2007) およびラウカフリシン β -グルコシダーゼ (RG; Xia *et al.* 2012), ライムギ (*Secale cereale*) 由来 ScGlu (Sue *et al.* 2011), シロガラシ (*Sinapis alba*) 由来ミロシナーゼ (Burmeister 2000), モロコシ (*Sorghum bicolor*) 由来 SbDhr1 (Verdoucq *et al.* 2004), シロツメクサ (*Trifolium repens*) 由来シアン化物 β -グルコシダーゼ (Barrett *et al.* 1995), パンコムギ (*Triticum aestivum*) 由来 TaGlu1B (Sue *et al.* 2006), トウモロコシ (*Zea mays*) 由来 ZmGlu1 (Czjzek *et al.* 2000) の結晶構造が決定されている。ヒト由来の2種 (α -クロトーおよび β -クロトー) は触媒残基を持たず、ホルモンである繊維芽細胞増殖因子の受容体として機能する (Chen *et al.* 2018; Lee *et al.* 2018).

1.3.3 グリコン結合部位

GH1 酵素のグルコシドおよびグルコシドアナログとの複合体構造の解析により、グリコン結合部位 (サブサイト-1) におけるグルコシドの結合様式が明らかにされている (Burmeister *et al.* 1997; Czjzek *et al.* 2001; Zechel *et al.* 2003; Verdoucq *et al.* 2004; Gloster *et al.* 2004; Chuenchor *et al.* 2008; Seshadri *et al.* 2009; Jeng *et al.* 2012). サブサイト-1 を形成する残基は触媒基 2 残基を含み 10 残基である (Figure 1-4). 多くの β -グルコシダーゼでは、 $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 4 (L4) 上の一般酸塩基触媒残基 Glu がグリコシド酸素と、L3 上の His \cdot L4 上の Asn \cdot L7 上の求核触媒残基 Glu が基質グリコンの 2-O と、L1 上の Gln \cdot L3 上の His \cdot L8 上の Trp が 3-O と、L1 上の Gln \cdot L8 上の Glu が 4-O と、L8 上の Glu が 6-O と、水素結合できる距離にある。また、L8 上の Trp は 3-C および 5-C と、L8 上の Phe (または Tyr) は 6-C と、L6 上の Tyr は 5-C および 5-O と、ファンデルワールス相互作用できる距離にある。これらサブサイト-1 を形成する残基は GH1 酵素において高度に保存されている (Figure 1-5; Marana 2006). ただし、例外もある。イネ由来 Os9BGlu31 などのトランスグルコシダーゼやシロガラシ由来などのミロシナーゼでは、3-O と相互作用する L8 上の Trp に代わり Tyr または Phe がある (Opassiri *et al.* 2006; Luang *et al.* 2013). また、ミロシナーゼでは一般酸塩基触媒残基 Glu を有しておらず、代わりにカルボキシ基を持たない Gln を有する (Burmeister *et al.*

1997; Xu *et al.* 2004). ミロシナーゼではアスコルビン酸が補酵素として作用することが知られている (Ettlinger *et al.* 1961). アスコルビン酸が一般酸塩基触媒残基に代わって水分子を活性化し、脱グルコシル化を促進する働きを持つことが、シロガラシ由来ミロシナーゼとアスコルビン酸の複合体の X 線結晶構造解析により示されている (Burmeister *et al.* 2000).

グリコン結合部位形成残基の機能について、デオキシ糖や変異酵素を用いた解析がされている。 *Agrobacterium* 由来 GH1 β -グルコシダーゼでは、各種デオキシグルコシドを基質とした速度論解析により、遷移状態の安定化には基質 2-O・3-O・4-O・6-O のうち 2-O の寄与が最も大きいことが示されている (Namchuk and Withers 1995). また、変異酵素の解析例として、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperdai*) 由来 S β gly では、L1 上の Gln39 と L8 上の Glu451 の各残基の Ala 置換体の解析により、特に L8 上の Glu451 が、4-O との相互作用ならびに基質特異性 (グルコシド、フコシドおよびガラクトシドに対する特異性) に重要であることが示されている (Marana *et al.* 2002). また、古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来 S β -gly では、L3 上の His150 の Ala 置換変異酵素と 2-デオキシグルコシドの反応の速度論解析より、この His が 3-O だけでなく 2-O とも相互作用することが示されている (Strazzulli *et al.* 2019). *S. frugiperda* 由来 S β gly では、求核触媒 Glu399 と相互作用し、基質グリコンの 5-C および 5-O と相互作用できる距離にあるループ 6 上の Tyr331 の Phe 置換体の解析により、この Tyr が求核触媒 Glu の pK_a 低下に寄与するとされている (Marana *et al.* 2003).

古細菌と植物に由来する GH1 酵素では、 β -グルコシドよりも β -マンノシドに高い活性を示す β -マンノシダーゼが報告されている (古細菌, Bauer *et al.* 1996; Kaper *et al.* 2002; Park *et al.* 2011; 植物, Hrmova *et al.* 1998; Mo and Bewley 2002; Xu *et al.* 2004; Kuntothom *et al.* 2009). 古細菌由来 β -マンノシダーゼは GH1 酵素に広く保存される β 2 上の Arg (求核触媒残基 Glu と相互作用する) と L4 上の Asn (基質グリコン 2-O と相互作用する) を持たず、代わりにそれぞれ Gln と Asp を持つ (Kaper *et al.* 2002). 古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 β -マンノシダーゼ BglB の該当残基 Gln77 と Asp206 がマンノシド特異性に重要であると、変異酵素の解析により示されている (Kaper *et al.* 2002). 一方、植物 β -マンノシダーゼでは、古細菌酵素に見られるこれらの残基は見られず、 β 2 上

の Arg も、サブサイト-1 の保存残基も、配列上では全て β -グルコシダーゼと同一である。イネ由来 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 では、変異酵素の解析より、一般酸塩基触媒残基周辺に位置する L3 上の Tyr134 と L4 上の Cys182 がグリコシド選択性に寄与すると示唆された (Tankrathok *et al.* 2013)。しかし、これら残基の変異酵素は依然として高いマンノシド特異性を保持しており、これらのアミノ酸残基はマンノシド特異性の決定的な因子ではない。Os7BGlu26 と基質アナログ (マンノイミダゾールおよびグルコイミダゾール) の複合体構造の X 線結晶構造解析と分子動力学的解析から、基質マンノシドとグルコシド間では遷移状態の安定化機構が異なるとされている (Tankrathok *et al.* 2015)。すなわち、サブサイト-1 のピラノースの立体配座は、ミカエリス複合体 \rightarrow 遷移状態 \rightarrow グルコシル酵素中間体の順に、マンノシドでは ${}^1S_5 \rightarrow B_{2,5}^{\ddagger} \rightarrow {}^0S_2$, グルコシドでは ${}^1S_3 \rightarrow {}^4H_3^{\ddagger} \rightarrow {}^4C_1$ と変化していくと考えられている。

多くの GH1 酵素は、pNP 配糖体のうち β -グルコシドと β -D-フコシドに高い触媒反応効率を示す。これら 2 基質に対する特異性 (k_{cat}/K_m の比率) は、グリコン結合部位を構成するアミノ酸残基が配列上保存されるにも関わらず、多様である (Rouyi *et al.* 2014; Kempton and Withers 1992; Hancock *et al.* 2005; Baiya *et al.* 2014; Fourage *et al.* 2000; Vallmitjana *et al.* 2001; Opassiri *et al.* 2004; Gu *et al.* 2009; Hong *et al.* 2009; Sue *et al.* 2000; Marana *et al.* 2002; Kim *et al.* 2009; Park *et al.* 2010; Uchiyama *et al.* 2013; Berrin *et al.* 2003; Chuankhayan *et al.* 2005; Hwa *et al.* 2015; Seshadri *et al.* 2009)。 *S. frugiperda* 由来 Sf β gly におけるランダム変異酵素や基質結合部位周辺残基の変異酵素の解析より、基質結合部位から遠位の位置にある残基が、これら β -グルコシドと β -D-フコシドに対する特異性に影響を与えることが示されている (Mendonça and Marana 2011; Tamaki *et al.* 2016; Souza *et al.* 2018)。遠位の残基がグリコン結合残基のわずかな配置の違いを与えるものと予想されている (Mendonça and Marana 2011)。

GH1 酵素は高度に保存されたグリコン結合部位を持ちながらも、グリコシド特異性 (グルコシド・マンノシド・D-フコシド) は多様であり、特異性の違いを説明する構造は明らかではない。

1.4 植物 GH1 β -グルコシダーゼ

植物 GH1 β -グルコシダーゼは特定の時期に特定の器官・組織において特定の基質に作用することで、幅広い生物学的プロセスに寄与するとされる (Ketudat Cairns and Esen 2010; Ketudat Cairns *et al.* 2015). 植物 GH1 酵素の多様な機能の基盤は、群としての酵素が作用する基質が特にアグリコンの多様性により非常に多種であることにある。各酵素は、この多様な基質に対して一定の特異性を有する。各酵素が有するアグリコン特異性は、アグリコン結合部位形成残基により生じているものであり、この残基の保存性の低さこそが、基質特異性の多様性を担っている (Figure 1-5; Ketudat Cairns and Esen 2015). これまでの研究例から、植物 GH1 β -グルコシダーゼの機能とそれに寄与する構造について述べる。

1.4.1 配糖体に作用する β -グルコシダーゼ

1.4.1.1 配糖体に作用する各種 β -グルコシダーゼ

植物は固着性であり、すなわち自由に動き回することは基本的にできない。外界からの刺激に対応・適応するために、多様な二次代謝産物をシグナル分子として駆使する。これら生理活性物質は、特定のコンパートメントに不活性な配糖体として備蓄されることがあり、要時 β -グルコシダーゼ等により脱配糖化されて活性化される。

一例として、植物が外敵による食害や病害に対抗するための防御物質が配糖体として備蓄されている場合、傷害により植物組織の破壊に伴い、配糖体は β -グルコシダーゼと邂逅し、脱グルコシル化されて活性型の防御物質となる (Morant *et al.* 2008). 防御物質の配糖体の例として、キャッサバ由来のリナマリン (Figure 1-6 化合物 1; Hughes *et al.* 1992), モロコシ由来のデュリン (化合物 2; Hösel *et al.* 1987), ウメ由来のプルナシン (化合物 3; Kuroki *et al.* 1984), トウモロコシ, ライムギおよびパンコムギなどイネ科植物由来の 2,4-ジヒドロキシ-7-メトキシ-1,4-ベンゾオキサジン-3-オン β -D-グルコシド (DIMBOA Glc; 化合物 4; Esen 1992; Babcock and Esen 1994; Sue *et al.* 2000a; Sue *et al.* 2000b) などが挙げられる。いずれも β -グルコシダーゼにより加水分解され、シアノン化物, アルデヒドおよびヒドロキサム酸などの防御物質となる。シロイヌナズナ由来 β -グルコ

シダーゼ AtBGlu21, AtBGlu22 および AtBGlu23 (PYK10) は、配糖体スコポリン (化合物 5) を加水分解して抗菌化合物スコポレチンを生成する (Ahn *et al.* 2010) ほか、根においてアブラナ科特有の細胞内細胞小器官である小胞体ボディに高度に蓄積してトリプトファン由来グルコシノレート (化合物 6) も加水分解する (Matsushima *et al.* 2004; Nakano *et al.* 2017). グルコシノレート (カラシ油配糖体) はアブラナ科に特有の S-グルコシドであり、加水分解によって毒性化合物であるイソチオシアネートを生成する (Bones and Rossiter 2006). シロイヌナズナ *atbglu23* (*pyk10*) 遺伝子欠損株では、エンドファイトである *Piriformospora indica* による成長促進および稔実向上の効果が弱まったことから、AtBGlu23 は根圏の共生微生物との相互作用に重要な働きを持つと考えられている (Sherameti *et al.* 2008). シロイヌナズナのミロシナーゼ (ミロシナーゼは GH1 酵素であり、 β -グルコシダーゼと一連の番号が付されている) AtBGlu34 (TGG4), AtBGlu35 (TGG5), AtBGlu37 (TGG2) および AtBGlu38 (TGG1) はメチオニン由来グルコシノレートであるシニグリン (化合物 7) の加水分解活性を持つ (Andersson *et al.* 2009; Zhou *et al.* 2012). これら遺伝子 *TGG4* および *TGG5* は根部に特異的に発現し、*TGG1* および *TGG2* は葉部において高度に発現する (Schmid *et al.* 2005). タバコスズメガ *Manduca sexta* の幼虫による葉部の食害の程度は *tgg1* または *tgg2* の単一欠損株では野生株と同程度だが、二重欠損株では顕著に増加する. これより、これらミロシナーゼが食害抵抗性に寄与することが明らかにされた (Barth and Jander 2006). ベルオキシソームに局在する AtBGlu26 (PEN2) もまた、トリプトファン由来グルコシノレート加水分解活性を有し、非宿主抵抗性 (各種病原菌の宿主にならないような強固かつ安定的な抵抗性) に寄与する (Lipka 2005; Bednarek *et al.* 2009).

植物の生理活性物質の代表例として、植物ホルモンにも配糖体として存在するものがある. 配糖体となるホルモン配糖体を基質とする β -グルコシダーゼとしてジベレリン, サイトカイニン, アブシジン酸, サリチル酸およびツベロン酸が挙げられ、これらはいずれも配糖体加水分解酵素の報告がある. ジベレリンの配糖体ジベレリン A4 β -グルコシルエステル (GA₄ GE; 化合物 8) を加水分解する β -グルコシダーゼが矮小イネ抽出液に見出された (Schliemann 1984). GA₄ GE 加水分解活性は、イネ由来 GH1 アイソザイム (Os3BGlu6, Os3BGlu7, Os4BGlu12, Os4BGlu18 および

Os9BGlu31) のうち Os3BGlu6 で最も高い (Hua *et al.* 2013). また, サイトカイニン配糖体 (化合物 9) を加水分解する β -グルコシダーゼは, トウモロコシやセイヨウアブラナで報告されている (Brzobohatý *et al.* 1993; Falk and Rask 1995). アブシジン酸 β -グルコースエステル (化合物 10) の脱配糖化には, シロイヌナズナ由来 AtBGlu18 (AtBG1) および AtBGlu33 (AtBG2) の寄与が知られている (Lee *et al.* 2006; Xu *et al.* 2012). *atbg1* 欠損株ではアブシジン酸の内生量の低下とともに, 気孔の閉鎖運動の機能低下, 乾燥耐性の低下, 発芽が早まるなど, アブシジン酸欠損の特徴的な形質が見られる (Lee *et al.* 2006). ツベロン酸 β -グルコシド (TA Glc; 化合物 11) に関しては, イネ由来の TAGG1 (Os4BGlu13) と TAGG2 (Os4BGlu12) がイネ地上部より TA Glc 加水分解性を指標に精製された酵素である (Wakuta *et al.* 2010, 2011). これら β -グルコシダーゼは TA Glc に限らず各種グルコシドにも作用する. TAGG1 は, TA Glc に最も高い活性を示しつつ, サリチル酸 β -グルコシド (SA Glc; 化合物 12) や GA₄ GE にも作用する (Hua *et al.* 2015). 一方の TAGG2 は, TA Glc への活性に加え, SA Glc に一層高い活性を示す (Himeno *et al.* 2013). イネ植物体の傷害処理では, 処理後数時間で TAGG1 の転写量は減少し, TAGG2 の転写量は増加する. このように両酵素は, 85% の高いアミノ酸配列の同一性を持ちながら活性の特異性に異なる点があり, また遺伝子発現調節にも違いがある (Wakuta *et al.* 2011). TAGG2 遺伝子の過剰発現株, 発現抑制株, および野生型間で, サリチル酸内生量に明確な違いは確認されなかったが, ツベロン酸内生量は発現量の高低と正の相関があり, 植物体内における TAGG2 の TA Glc への作用が示された (武田修士論文, 2015).

シロイヌナズナ β -グルコシダーゼ AtBGlu42 をコードする遺伝子は, 鉄欠乏条件下で根からの鉄キレート剤となるクマリン類の滲出に関与しており, メタボローム解析および欠損株を用いた根の内外のクマリン類の定量によって, このクマリン類の前駆体が先述のスコポリンであることが示されている (Stringlis *et al.* 2018). スコポリンの加水分解産物スコポレチンは抗菌物質であり, 鉄吸収のみならず, 根圏の共生微生物の選抜にも寄与する. 選抜された根圏共生微生物によって植物体全体の免疫が賦活化される現象である, 誘導全身抵抗性 (induced systemic resistance,

ISR) が誘起される (Zamioudis *et al.* 2014). AtBGlu42 は、スコポレチンの生成量調整を通して、鉄吸収と生体防御の二つの機能を担うと考えられている。

GH1 β -グルコシダーゼが、非生物ストレス応答の一環として、フラボノール配糖体の脱配糖化に関わるとする報告もある。サフラン (*Crocus sativus*) 由来 CsBGlu12 に関し、コード遺伝子の紫外線照射や脱水、塩ストレスによる転写量増加や、組換え酵素のナリングニン 7-O- β -グルコシド (化合物 13)、ケルセチン 3-O- β -グルコシド (化合物 14) およびケンペロール 3-O- β -グルコシド (化合物 15) への活性が確認されている (Baba *et al.* 2017)。シロイヌナズナは低温や窒素飢餓に晒されると一時的にフラボノールビスグリコシドを蓄積することが知られている (Olsen *et al.* 2009; Roepke and Bozzo 2015)。シロイヌナズナ由来 AtBGlu15 は、ケルセチン 3-O- β -グルコシド、ケンペロール 3-O- β -グルコシド、およびフラボノールビスグリコシドであるケルセチン 3-O- β -グルコシド-7-O- α -ラムノシド (化合物 16)、ケンペロール 3-O- β -グルコシド-7-O- α -ラムノシド (化合物 17) の脱グルコシル化活性を持ち、これらフラボノールビスグリコシドの加水分解を担うとされる (Roepke and Bozzo 2015)。

植物細胞壁の機械的強度の増強には、フェノール性高分子であるリグニンの蓄積、すなわち、リグニン化が寄与する。このリグニン化には、前駆体であるモノリグノール配糖体の脱グルコシル化段階があり、これを β -グルコシダーゼが担う (Hösel *et al.* 1981)。モノリグノール配糖体であるコニフェリン (化合物 18) やシリルギン (化合物 19) に対して高い活性を持つ β -グルコシダーゼは、ヒヨコマメ (Hösel *et al.* 1978)、オウシュウトウヒ (Marcinowski and Grisebach 1978) およびダイズ (Hösel and Todenhagen 1980) などの植物で確認されている。シロイヌナズナでは AtBGlu45 および AtBGlu46 (Escamilla-Treviño *et al.* 2006) が、イネでは Os4BGlu16 および Os4BGlu18 (Baiya *et al.* 2014) がモノリグノール配糖体 β -グルコシダーゼとして報告されている。AtBGlu45 および AtBGlu46 は茎で高い転写量を示し、AtBGlu45 は維管束間に、AtBGlu46 は原生木部に局在する (Chapelle *et al.* 2012)。また、いずれの単一欠損株でもコニフェリンが蓄積された (Chapelle *et al.* 2012)。また、この *atbglu45* 欠損株でのモノリグノール配糖体蓄積は、Os4BGlu16 ま

たは *Os4BGlu18* の相補により低下する。これより、相補した遺伝子 2 者がイネにおけるモノリグノール配糖体代謝遺伝子であると考えられている (Baiya *et al.* 2018)。

加水分解反応よりも糖転移反応が優先する β -グルコシダーゼもある。トランスグルコシダーゼと呼称される。糖転移反応では、糖供与体 (β -グルコシド) のグルコシル基が糖受容体に移り、生成物として新たな β -グルコシドを生成する。糖受容体として、糖以外の化合物に作用する植物 β -グルコシダーゼには、アントシアニン配糖化酵素 (カーネシオン由来 DcAA5GT とオオバナヒエソウ由来 DgAA7GT, Matsuba *et al.* 2010; シロイヌナズナ由来 AtBGlu10, Miyahara *et al.* 2013), ガラクト脂質配糖化酵素 (シロイヌナズナ由来 SFR2; Moellering *et al.* 2010), フェニルプロパノイド・フラボノイド・植物ホルモン配糖化酵素 (イネ由来 Os9BGlu31; Luang *et al.* 2013) が報告されている。

1.4.1.2 配糖体基質特異性の分子基盤

モロコシ (*S. bicolor*) 由来 SbDhr1 とトウモロコシ (*Z. mays*) 由来 ZmGlu1 では、配列同一性は高い (72%) が、基質特異性は大きく異なる。SbDhr1 は天然基質デュリンに特異的に作用し、他を基質としない。一方、ZmGlu1 はデュリンには作用せず、しかし天然基質 DIMBOA Glc をはじめ様々なアリル配糖体に作用する (Hösel *et al.* 1987; Babcock and Asen 1994)。SbDhr1-デュリン複合体と ZmGlu1-DIMBOA Glc の複合体構造および変異酵素機能の解析から、両酵素間ではアグリコン結合部位が異なり、これにより基質特異性が決定され则认为られている (Czjzek *et al.* 2000; Czjzek *et al.* 2001; Verdoucq *et al.* 2003; Verdoucq *et al.* 2004)。ZmGlu1-DIMBOA Glc 複合体では、L6 上の Trp378 と L4 上の Phe198, Phe205 が DIMBOA 基を挟むように位置し、また L8 上の Phe466, Ala467 が 7-メトキシ基と相互作用する位置にある (Figure 1-7a)。これらの残基のうち Trp378 は GH1 酵素において良く保存される。一方、SbDhr1 のデュリンの複合体構造では、L6 の Trp376 は共通するが、L4 には Val196, Leu203 がある。L8 上に Ser462 および Ser463 があり、水分子を介して *p*-ヒドロキシ基と相互作用する位置にある (Figure 1-7b)。SbDhr1 のこれらアミノ酸残基の側鎖はいずれも小さいく、SbDhr1 のアグリコン結合部位は広い。ZmGlu1 のこれらアグリコン結合部

位形成残基, および Trp378 と相互作用する L8 上の Tyr473 を SbDhr1 の対応残基に置換した ZmGlu1 変異酵素 F205L, F466S, A467S, Y473F は, ZmGlu1 野生型には無いデュリン加水分解活性を示した (Verdoucq *et al.* 2003). 全体構造が類似しながらも, このようなアグリコン結合部位の局所的構造の違いによってアグリコン特異性は大きく変化する.

また, 同じ基質が酵素によっては異なる残基と相互作用する例もある. パンコムギ (*T. aestivum*) 由来の TaGlu1 は DIMBOA Glc に作用する. この TaGlu1-DIMBOA Glc 複合体の構造 (Sue *et al.* 2011; Figure 1-7c)では, ZmGlu1 の Phe198 と Trp378 はそれぞれ Phe198 および Trp379 と保存されるが, ZmGlu1 の Phe205, Phe466, Ala467 の位置にはそれぞれ His205, Ser464, Leu465 がある. DIMBOA 基は L4 上 Phe198 および L6 上 Trp378 に挟まれるように位置するも, ZmGlu1 での結合位置とはわずかに異なり, この Phe198 が 7-メトキシ基と相互作用する位置にある. また, L6 上 Tyr378 が 7-メトキシ基と相互作用する位置にあるが, ZmGlu1 における対応残基は Pro377 であり, 基質と相互作用する距離ではない (Figure 1-7a, 1-7c).

基質特異性に関わる残基は, 基質に直接結合する残基とは限らない. アグリコンに直接結合する残基の裏側, いわゆるセカンドシェルを形成する残基が, 基質に直接結合する残基の配向を調節し, これにより基質特異性を制御する報告例がある. インドジャボク (*R. serpentina*) には二つの GH1 β -グルコシダーゼ RG と SG がある. これらのラウカフリシン (化合物 20) とストリクトシジン (化合物 21) への特異性は大きく異なる. RG はラウカフリシンを良い基質とし, ストリクトシジンへの反応速度はラウカフリシンの 1%程度にとどまる (Warzecha *et al.* 1999; Warzecha *et al.* 2000). 一方, SG はラウカフリシンに作用せず, ストリクトシジン特異的である (Gerasimenko *et al.* 2002). RG-ラウカフリシン複合体 (Xia *et al.* 2012) および SG-ストリクトシジン複合体 (Barleben *et al.* 2007) の構造において, 多くの GH1 酵素に保存される L6 上の Trp (RG では Trp392, SG では Trp388) の配向が, RG の Trp392 では多くの GH1 酵素と共通であるのに対し, SG ではこれとは異なりストリクトシジンのアグリコン部分とスタッキングする位置にある (Figure 1-8; Xia *et al.* 2012). この Trp の配向の違いに, Trp の 2 残基 N 末端側の残基—RG の Ser390, SG の Gly386—が関与する. RG 変異酵素 S390G はラウカフリシンの反応速度が野生型比

30%に減少, ストリクトシジンでは 4.6 倍に増加した (Xia *et al.* 2012). 一方, SG 変異酵素 G386S はストリクトシジンの反応の k_{cat}/K_m が 8.7%に減少した (Barleben *et al.* 2007). これらより, RG の Ser390, SG の Gly386 のそれぞれラウカフリシンとストリクトシジン特異性への重要性が示されている. しかし, これらは直接基質と相互作用するのではなく, RG の Ser390 (O γ)-Trp392 (N ϵ) 間の相互作用の有無により, Trp の配向の自由度が増減し, Trp が RG-ラウカフリシン複合体や SG-ストリクトシジン複合体と同様の配向をそれぞれ取りやすくなったことにより, 特異性が変化したものと考えられている (Xia *et al.* 2012).

1.4.2 オリゴ糖に作用する β -グルコシダーゼ

1.4.2.1 オリゴ糖に作用する各種 β -グルコシダーゼ

β -グルコシダーゼには, 細胞壁の構成成分であるセロオリゴ糖およびラミナリオリゴ糖の加水分解に寄与すると考えられるものもある. イネ由来 Os1BGlu4, Os3BGlu7, Os3BGlu8, Os4BGlu12 および Os7BGlu26 はセロオリゴ糖に対する加水分解活性を示し, 基質としてその鎖長の特異性について多様性を示す (Rouyi *et al.* 2014; Opassiri *et al.* 2003; Opassiri *et al.* 2004; Opassiri *et al.* 2006; Kuntothom *et al.* 2009). これらはまた, ラミナリオリゴ糖のうち二糖に良く作用する. たとえば, Os3BGlu7 および Os3BGlu8 は長鎖のセロオリゴ糖に特異性を示す. なお, これら 2 種をコードする遺伝子は, 花部や実生など多くの器官で高度に発現するが, 各単一欠損株は形質の変化を示さない (Opassiri *et al.* 2003; Ketudat Cairns *et al.* 2015; Shim *et al.* 2021). 次に, シロイヌナズナ由来の β -グルコシダーゼでは, AtBGlu13, AtBGlu15 および AtBGlu16 について組換え酵素とグライコシターゼ化酵素を利用してアグリコン特異性が解析なされ, AtBGlu13 と AtBGlu15 のラミナリオリゴ糖特異性, AtBGlu16 のセロオリゴ糖特異性が示されている (谷口修士論文, 2014; 菅原修士論文, 2016). AtBGlu13 遺伝子は, 花部で転写量が高いことから, 花粉管に含まれる β -(1 \rightarrow 3)結合性グルカンであるカロースの代謝への寄与が示唆されている (菅原修士論文, 2016). オオムギの胚乳では β -マンノオリゴ糖加水分解活性を持つ GH1 酵素 HvMANNOS1 (HvBII) が見つかっている (Hrmova *et al.* 2006). イネ由来 Os7BGlu26 (Kuntothom *et al.* 2009), シロイヌナズナ由来 AtBGlu44

(Xu *et al.* 2004), およびトマト由来 LeMside2 (Mo and Bewley 2002) も β -マンノオリゴ糖に良く作用する GH1 酵素として報告されている。

1.4.2.2 オリゴ糖基質特異性の分子基盤

イネ由来 GH1 β -グルコシダーゼである Os3BGlu7 は Cairns らによる機能構造相関研究により、長鎖セロオリゴ糖加水分解酵素として特徴づけられている (Opassiri *et al.* 2003; Opassiri *et al.* 2004; Chuenchor *et al.* 2008; Chuenchor *et al.* 2011; Pengthaisong and Ketudat Cairns 2014). Os3BGlu7 は二糖から六糖までのセロオリゴ糖に対し高重合度基質に高い反応速度を示し、これに対応する +5 までのサブサイト構造を有する。Os3BGlu7 とセロテトラオース (Cel₄) またはセロペンタオース (Cel₅) の複合体の立体構造解析により、基質結合に重要な残基が提示されている。すなわち、サブサイト+1 と+2 のグルコシル基とスタッキングする Trp358, サブサイト+2 のグルコシル基の 3-O との間で水素結合を形成する Asn245, ならびにサブサイト+3 と+4 のグルコシル基とスタッキングする Tyr341 である (Figure 1-9; Chuenchor *et al.* 2011). これら残基のうち, Trp358 はほとんどの GH1 酵素で良く保存され, Asn245 および Tyr341 は保存されず, これらの相当残基は多様である (Figure 1-5). Asn245 は, Val や Met とした変異酵素の解析により, 三糖以上のセロオリゴ糖の活性に重要であるとされる (Chuenchor *et al.* 2008; Sansenya *et al.* 2012). 一方, Tyr341 を Ala に置換した変異酵素 Y341A では, 野生型と比較して, 四糖および五糖に対する k_{cat}/K_m が若干低下するのみであった (Pengthaisong *et al.* 2012). これは, 変異に伴いセロオリゴ糖の結合様式が変化し, Tyr341 のスタッキングに代わり Arg178 がサブサイト+3 のグルコシル基の 3-O と相互作用することで, セロオリゴ糖との結合が安定化されたためと解釈されている (Figure 1-9; Pengthaisong and Ketudat Cairns 2014).

1.5 本研究の目的

これまでに述べたように, 植物には多数の GH1 アイソザイムがあり, これらはそれぞれが発現する時期, 器官および組織において, 種々の基質に選択的に作用することで, 様々な生物学的プ

ロセスに寄与すると考えられている。しかし、一部の GH1 アイソザイムは基質の重複性を有し、すなわち同一基質に作用する GH1 アイソザイムが複数存在することがある。そのため、単一遺伝子の欠損株では、損失機能が他のアイソザイムにより相補され、顕著な形質変化が表れないこともあり、逆遺伝学的手法による生理機能解析は難しいことが多い (Ketudat Cairns *et al.* 2015)。そのため、多重欠損株が求められるが、欠損導入遺伝子の候補の選定は、高精度な機能予測が必要であり、現状では難しい。更なる酵素機能の情報と機能の分子基盤に関する知見が必要である。これまでにアグリコン特異性の分子基盤については、本章で述べたように、いくつかの GH1 酵素で解析が進められてきたが、酵素・基質ともに多様性が高く、十分に理解されたとは言い難い。また、GH1 酵素はグルコシドだけでなくマンノシドや D-フコシド、ガラクトシドなど多様なグリコシド特異性を示すも、グリコン結合部位形成残基は高度に保存されており、特異性の違いに寄与する構造は明らかではない。そこで、本研究では、GH1 の示す多様なアグリコン特異性およびグリコン特異性に寄与する分子基盤の解明を目的とする。第 2 章では、GH1 酵素のアグリコン特異性について、シロイヌナズナ由来 AtBGlu42 を用いて解析を行う。この AtBGlu42 はスコポリンの加水分解を通して植物の鉄吸収や根圏細菌叢の形成に寄与するとされるが、酵素自体については活性すら未確認である (Stringlis *et al.* 2018)。AtBGlu42 の組換え酵素を調製し、アグリコン特異性および立体構造について述べる。第 3 章では、グリコン特異性の分子基盤についてである。イネ由来 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 およびシロイヌナズナ由来 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 を用いて、グルコシドとマンノシドに対する特異性とその分子基盤について論述する。第 4 章では、イネ由来 TAGG1 と TAGG2 を用いて、それぞれの特徴である高いグルコシド特異性、および D-フコシドとガラクトシドへの特異性についての GH1 酵素の分子基盤について、酵素および基質の両面から論じる。

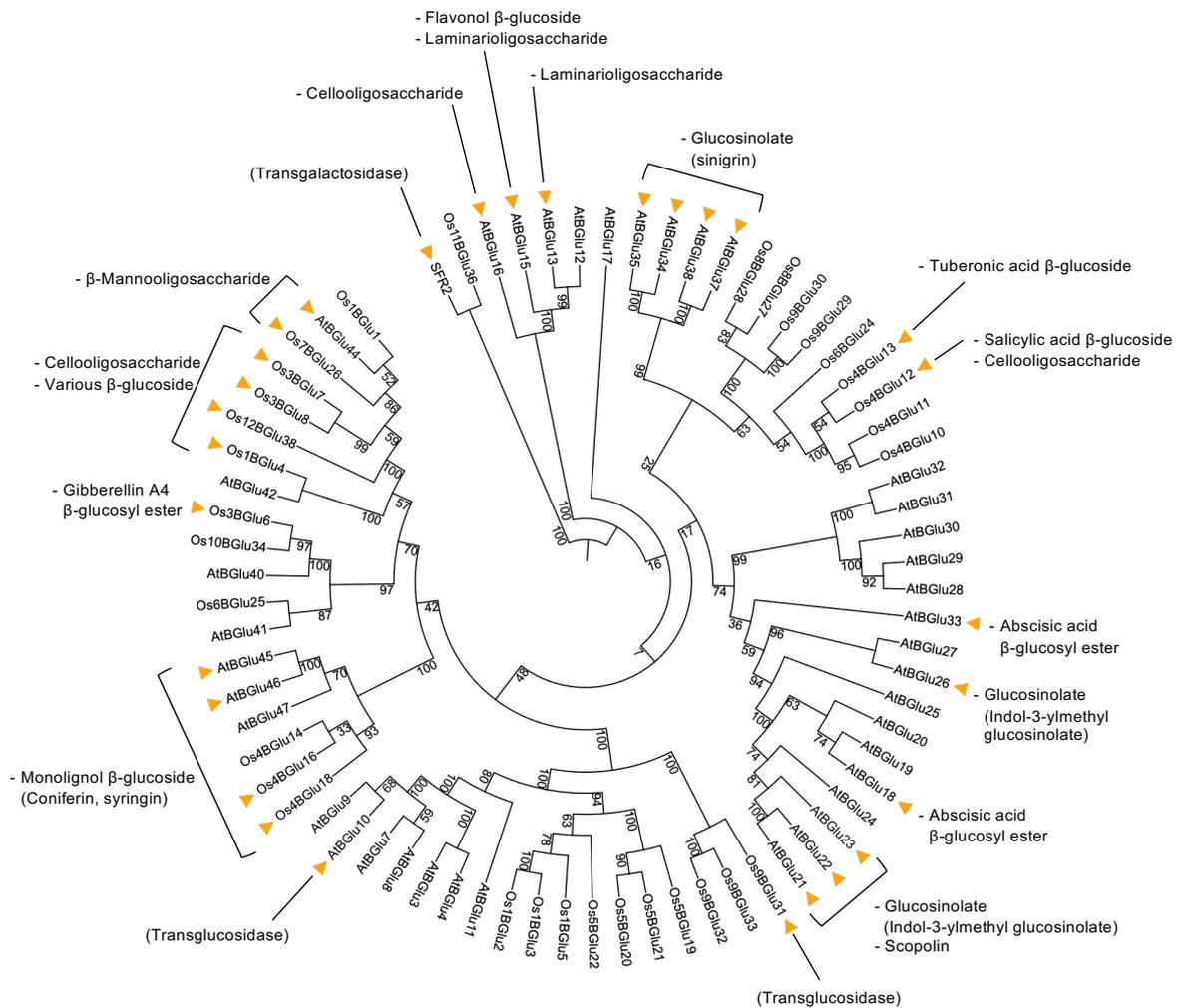


Figure 1-1. Neighbor-joining tree of GH1 β-glucosidases from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*.

Enzymes characterized in previous studies are indicated by orange triangles. Bootstrap values with 100 replications are indicated for each node. The multiple sequence alignment was constructed using MAFFT ver. 7 (Strategy, Auto; Katoh *et al.* 2019). Major substrates or activities for each enzyme are shown.

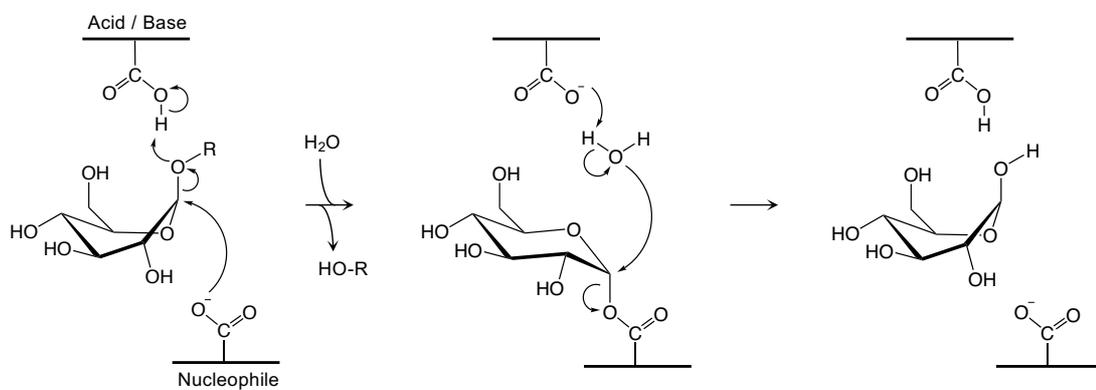


Figure 1-2. Catalytic mechanism of retaining β -glucosidases.

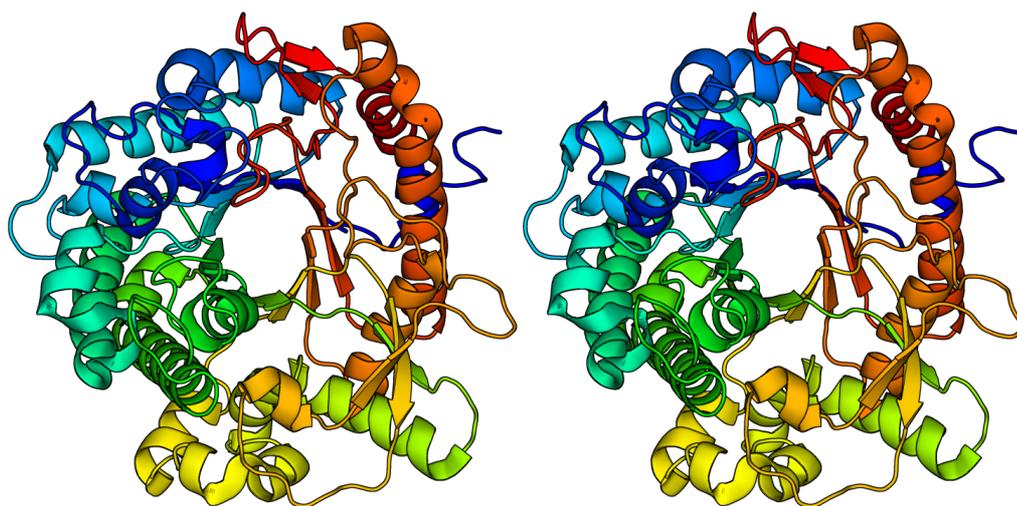


Figure 1-3. Overall structure of GH1 β -glucosidase Os3BGlu7 from *Oryza sativa* (PDB entry, 2RGL; Chuenchor *et al.* 2008). The structure is shown in rainbow coloring from blue (N-terminal) to red (C-terminal).

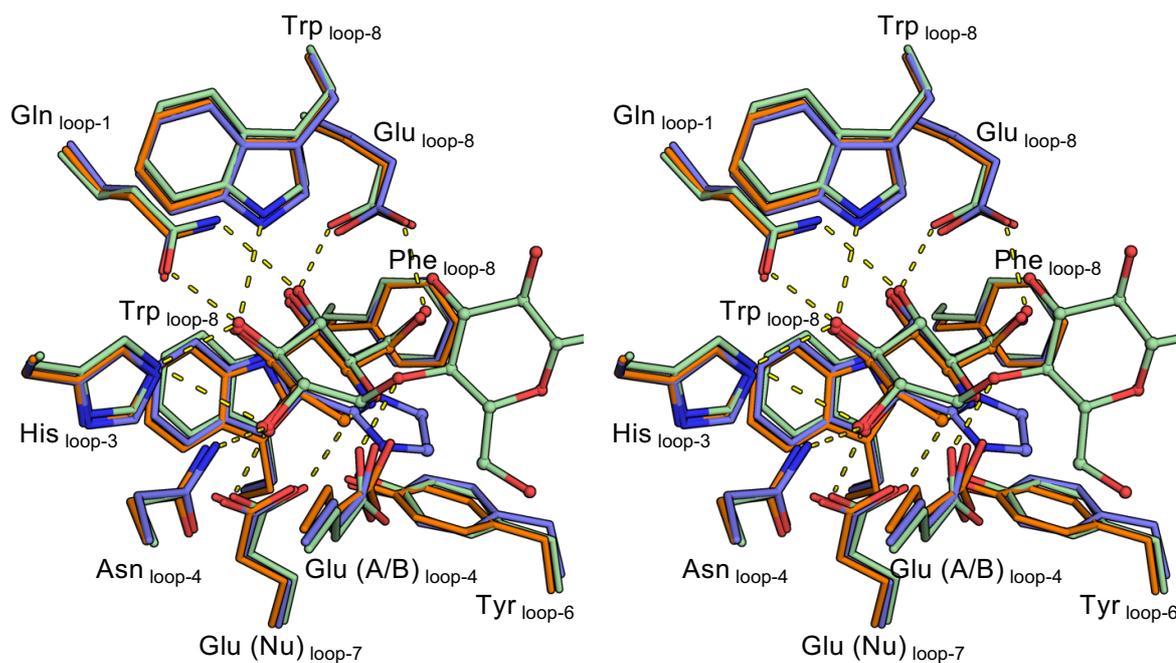


Figure 1-4. Structure of subsite -1 of GH1 β -glucosidases.

The residues at subsite -1 of each GH1 β -glucosidase are shown in stick representations with ligands from each complex. *Oryza sativa* Os3BGlu7-cellopentaose complex (PDB entry, 3F5K; Chuenchor *et al.* 2011), green; *Thermotoga maritima* Tmari_1862-glucoimidazole complex (PDB entry, 2CES; Gloster *et al.* 2006), purple; *Neotermes koshunensis* NkBgl-1-deoxynojirimycin complex (PDB entry, 3VIG; Jeng *et al.* 2012), orange. Predicted hydrogen bonds are indicated by dotted lines.

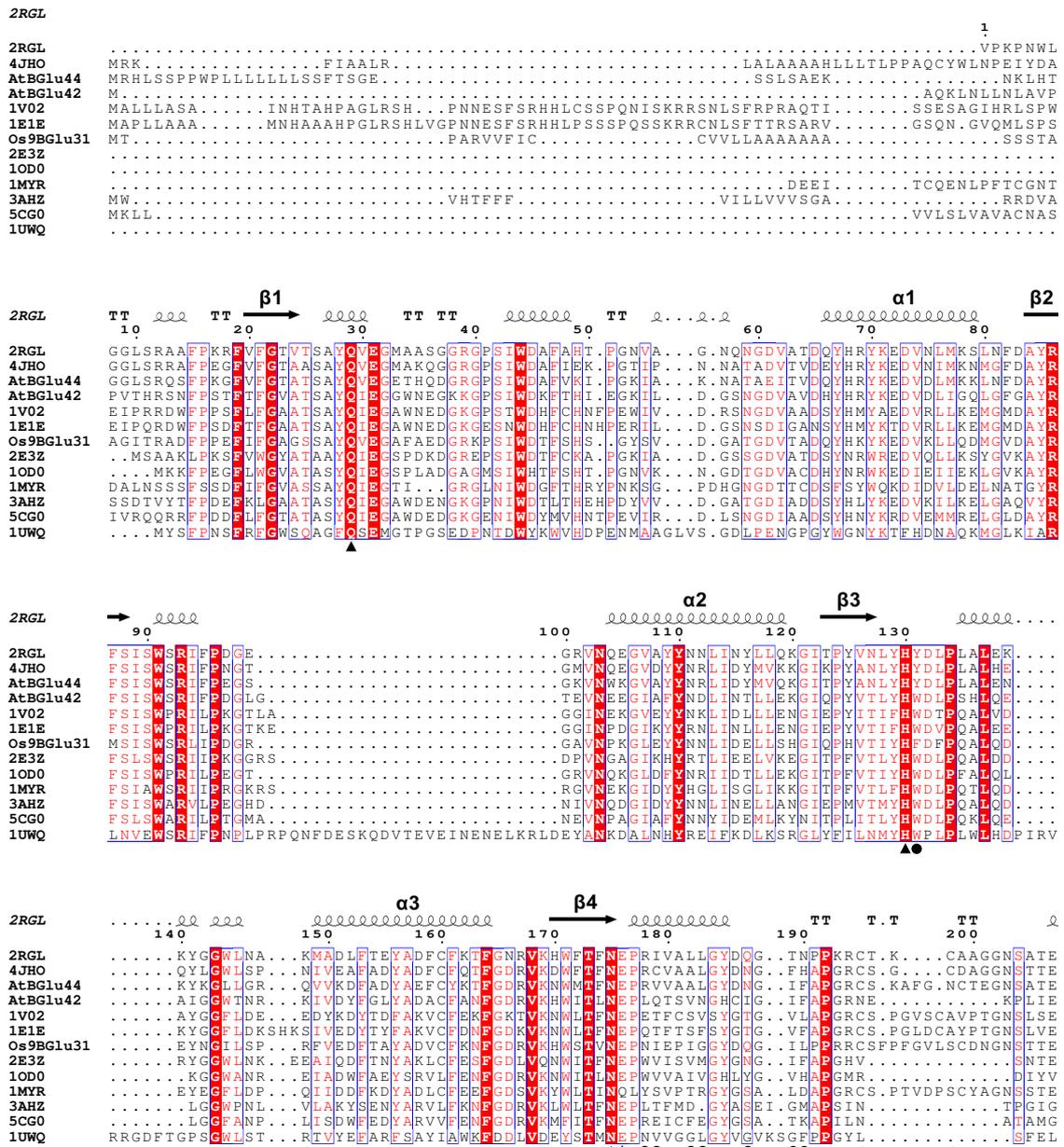


Figure 1-5. Multiple sequence alignment of GH1 β -glucosidases. 2RGL, Os3BGl7 from *Oryza sativa*; 4JHO, Os7BGl26 *Oryza sativa*; 1V02, SbDhr1 from *Sorghum bicolor*; 1E1E, ZmGlu1 from *Zea mays*; 2E3Z, Bgl1A from *Phanerochaete chrysosporium*; 1OD0, Tmari_1862 from *Thermotoga maritima*; 1MYR, myrosinase from *Sinapis alba*; 3AHZ, NkBg1 from *Neotermes koshunensis*; 5CG0, Sfbgl from *Spodoptera frugiperda*; 1UWQ, Ssb-gly from *Sulfolobus solfataricus*. Residues at subsite -1 are indicated by triangle (\blacktriangle). Catalytic acid/base at β 4 and nucleophile at β 7 are indicated by asterisks (*). Residues at possible aglycone binding site are indicated by circle (\bullet). Secondary structures and residue numbers of 2RGL (Os3BGl7) are depicted at the top. The multiple sequence alignment was constructed using MAFFT ver. 7 (Strategy, Auto; Katoh *et al.* 2019).

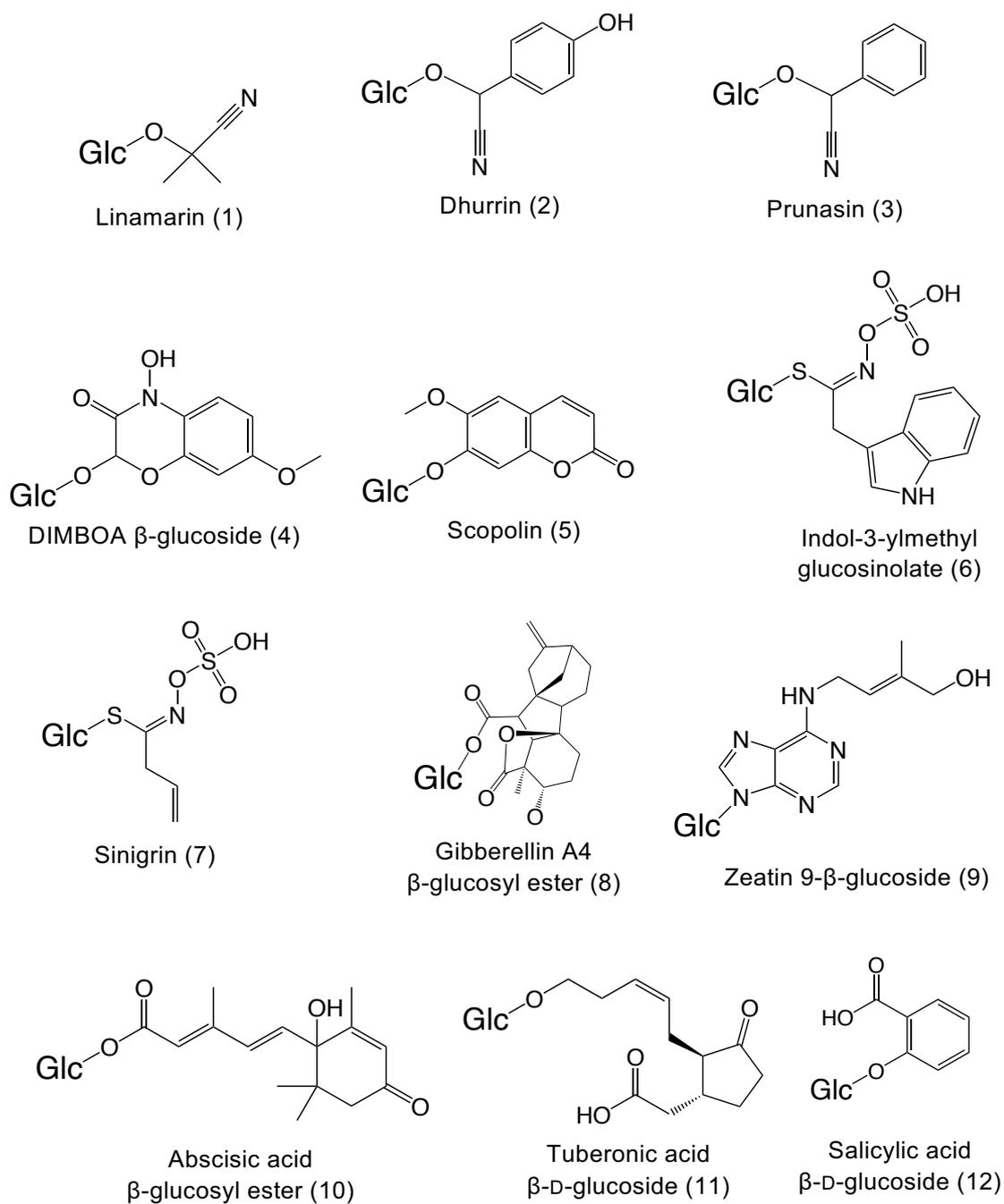
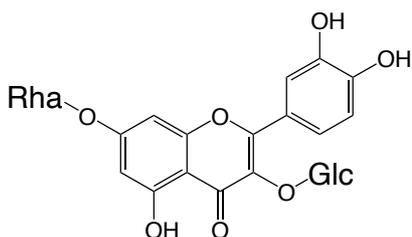
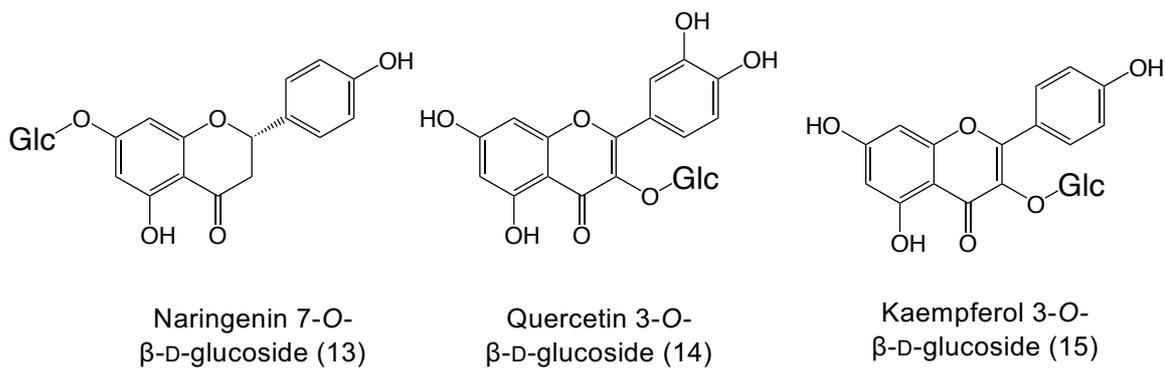
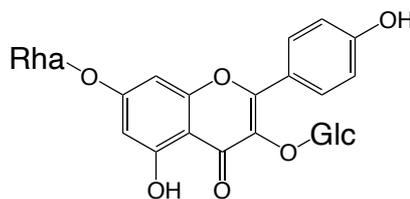


Figure 1-6. Structures of example β -glucosidase substrates in plants.

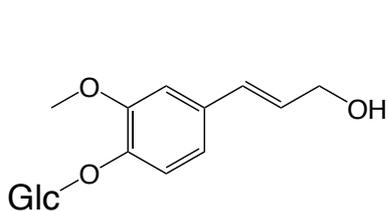
Glc, β -D-glucosyl residue.



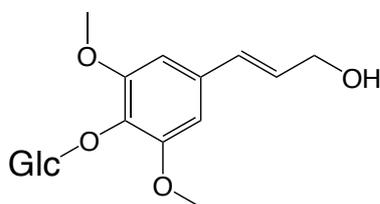
Quercetin 3-O- β -D-glucoside
-7-O- α -L-rhamnoside (16)



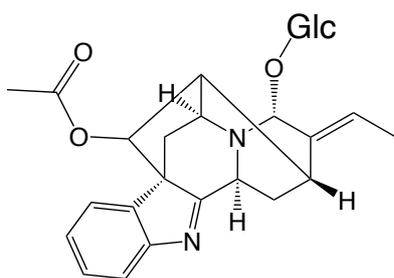
Kaempferol 3-O- β -D-glucoside
-7-O- α -L-rhamnoside (17)



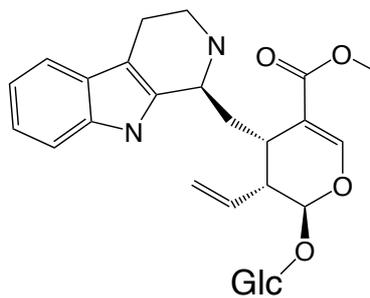
Coniferin (18)



Syringin (19)



Raucafficine (20)



Strictosidine (21)

Figure 1-6. Structures of example β -glucosidase substrates in plants.
(continued). Glc, β -D-glucosyl residue; Rha, α -L-rhamnosyl residue.

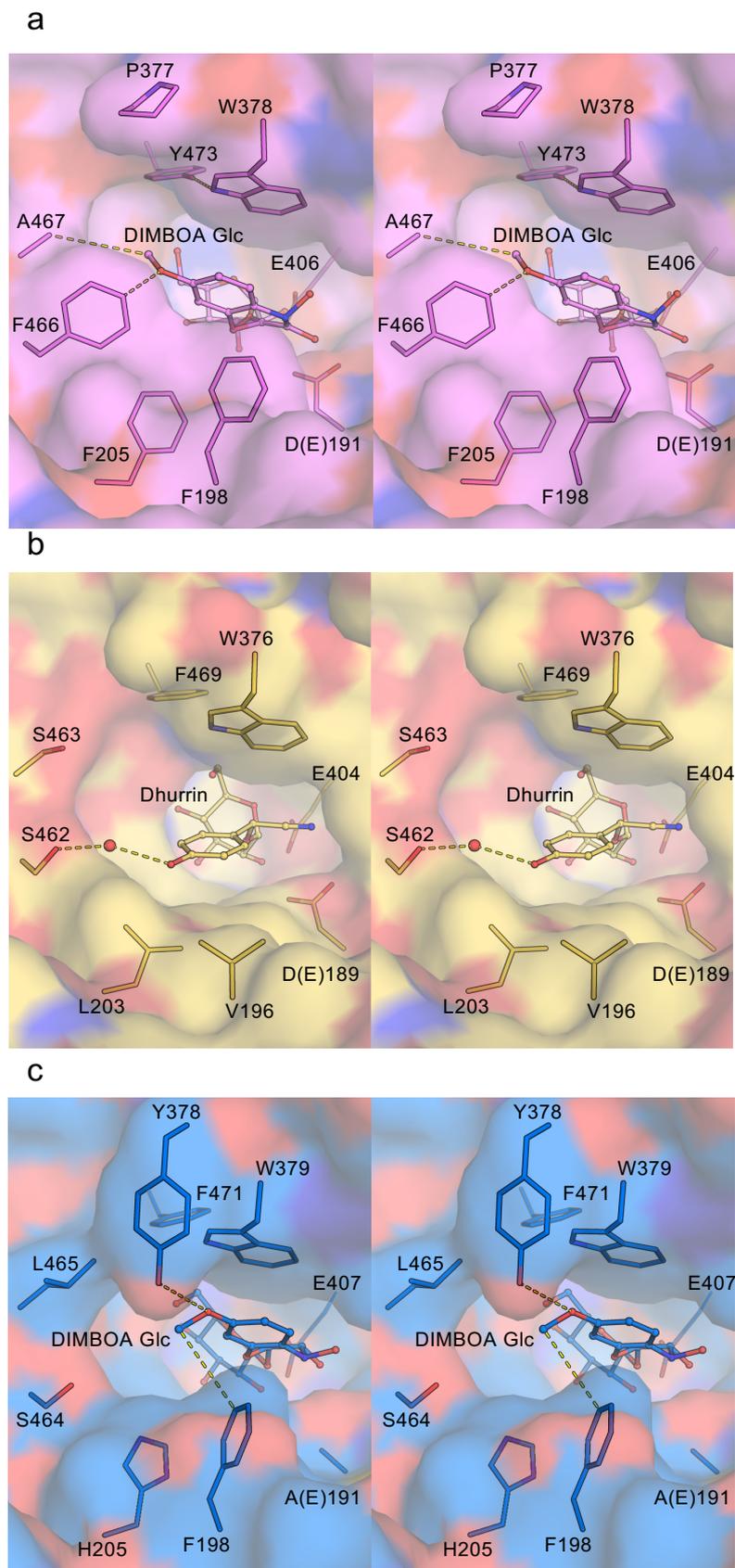


Figure 1-7. Aglycone-binding site of ZmGlu1 with DIMBOA Glc, SbDhr1 with dhurrin, and TaGlu1 with DIMBOA Glc.

(a) ZmGlu1-DIMBOA Glc complex (PDB entry, 1E56; Czjzek *et al.* 2000). (b) SbDhr1-dhurrin complex (PDB entry, 1V03; Verdoucq *et al.* 2004). (c) TaGlu1-DIMBOA Glc complex (PDB entry, 3AIS; Sue *et al.* 2011). Red ball represents oxygen atom of water molecule. Predicted interactions are indicated by dotted lines.

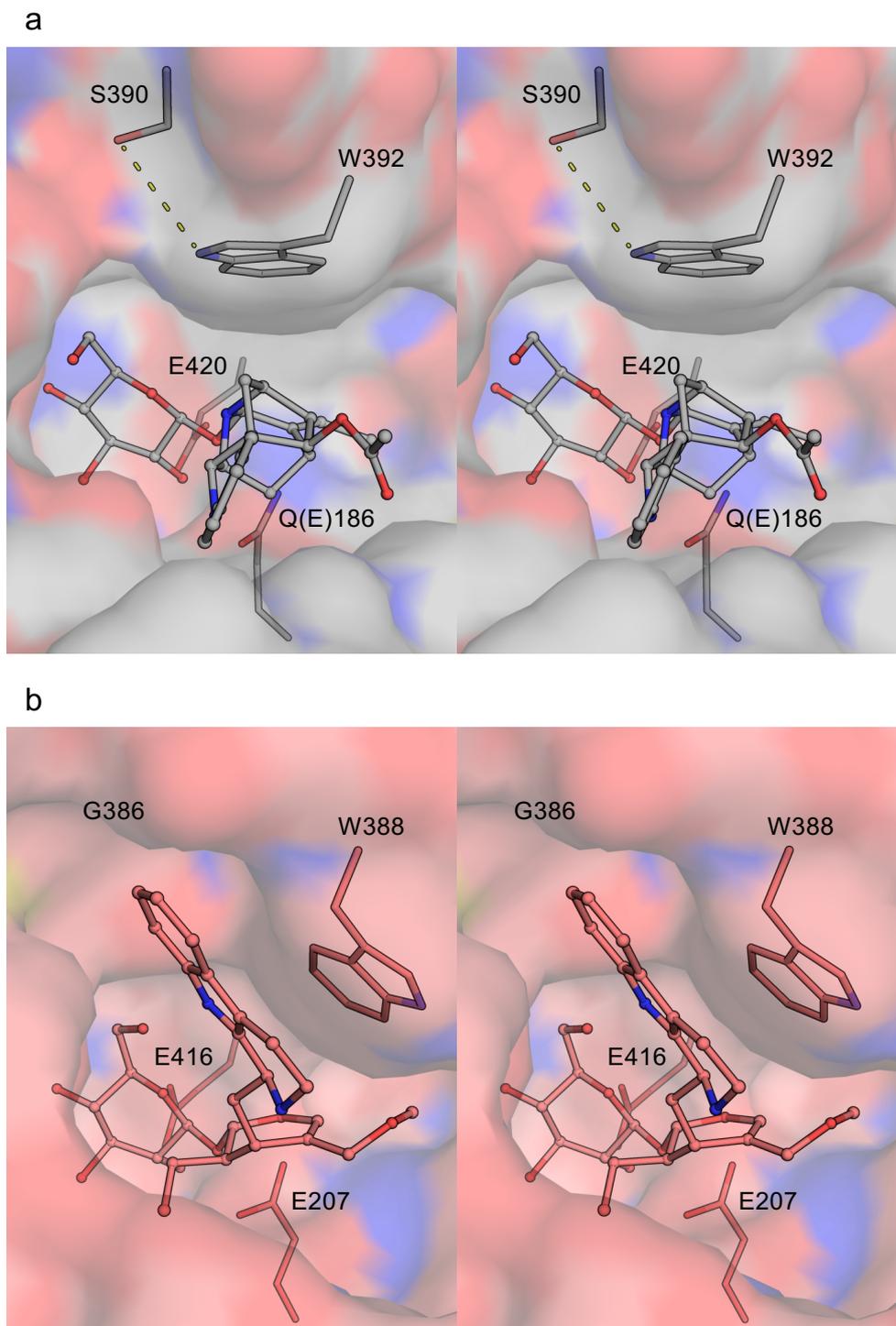


Figure 1-8. Aglycone-binding site of RG and SG.

(a) RG and dihydro-raucaffricine complex (PDB entry, 3U57; Xia *et al.* 2012). (b) SG and strictosidine complex (PDB entry, 2JF6; Barleben *et al.* 2007). Predicted interaction is indicated by dotted lines.

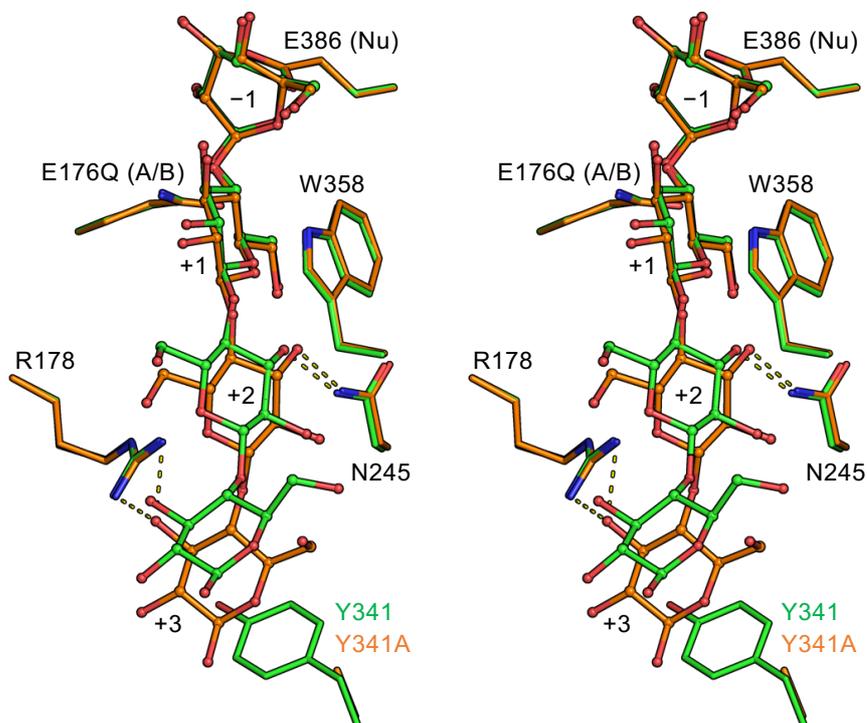


Figure 1-9. Aglycone-binding site of Os3BGlu7 with cellotetraose.

The superposition of the active site of Os3BGlu7 E176Q with cellotetraose (PDB entry, 3F5J; green; Chuenchor *et al.* 2011) and E176Q/Y341A with cellotetraose (PDB entry, 4QLK; orange; Pengthaisong and Ketudat Cairns 2014). Cellotetraose are represented with balls and sticks. Predicted interactions are indicated by dotted lines.

2 シロイヌナズナ由来 AtBGlu42 の基質特異性とその分子基盤

2.1 緒論

シロイヌナズナ由来 GH1 酵素 AtBGlu42 は、他の GH1 アイソザイムと異なり、N-末端シグナルペプチドを持たず、細胞質に局在すると予想される (Xu *et al.* 2004). AtBGlu42 は、遺伝子の発現と *AtBGlu42* 欠損株の表現型の解析に基づき、クマリン β -グルコシドであるスコポリンの脱配糖化を介して、根圏細菌叢が誘導する全身抵抗性の獲得や鉄分の取り込みを促進すると考えられている (Zamioudis *et al.* 2014; Stringlis *et al.* 2018). 一方、AtBGlu42 と高い配列同一性 (64%) を有するイネ由来細胞質局在型 GH1 β -グルコシダーゼ Os1BGlu4 は、サリシンやエスクリンなどの β -グルコシドに加えて、ラミナリビオース (Lam₂; β 1-3 結合) や重合度 3-4 のセロオリゴ糖 (β 1-4 結合) に高い加水分解活性を示す (Rouyi *et al.* 2014). これらのことから、AtBGlu42 がスコポリンに限らず、オリゴ糖を含む様々な β -グルコシドにも作用する可能性も考えられる. 本研究では、組換え大腸菌により調製した AtBGlu42 を用いて、本酵素の酵素学的諸性質と結晶構造を明らかにするとともに、基質特異性に重要なアミノ酸残基について結合構造予測と変異酵素の解析結果に基づき議論する.

2.2 実験材料および方法

2.2.1 培地および基質

2.2.1.1 1/2 ムラシゲ・スクーグ培地

1/2 ムラシゲ・スクーグ培地の組成を以下に示す。0.22% (w/v) ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (富士フィルム和光純薬, 大阪), 1% (w/v) スクロースおよび 0.3% (w/v) ゲランガム (富士フィルム和光純薬)。1 M KOH により pH 5.7 に調整した。

2.2.1.2 Super optimal broth with catabolite repression 培地

Super optimal broth with catabolite repression (SOC) 培地の組成を以下に示す。2% (w/v) トリプトン (ナカライテスク, 京都), 0.5% (w/v) 酵母エキス (ナカライテスク), 0.5% (w/v) NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM Mg₂SO₄ および 20 mM D-グルコース。

2.2.1.3 Luria-Bertani 培地

Luria-Bertani (LB) 培地の組成を以下に示す。1% (w/v) トリプトン, 0.5% (w/v) 酵母エキスおよび 0.5% (w/v) NaCl。1.5% (w/v) 寒天 (富士フィルム和光純薬) を含む LB 培地を LB 寒天培地とした。

2.2.1.4 基質

SA Glc は、既報 (Gryniewicz *et al.* 1993) に基づき有機合成された標品を、本学大学院農学研究 院 松浦 英幸 教授より恵与された。以下に示す市販基質を使用した。p-ニトロフェニル β-D-グルコピラノシド (pNP Glc), pNP β-D-フコピラノシド (pNP D-Fuc), pNP β-D-ガラクトピラノシド (pNP Gal), pNP β-D-マンノピラノシド (pNP Man), pNP β-D-キシロピラノシド (pNP Xyl), セロビオース (Cel₂), ソホロース, pNP β-セロビオシド (pNP Cel₂), アルブチン, フロリジン (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), セロトリオース (Cel₃), セロテトラオース (Cel₄), セロペンタオース (Cel₅), セロヘキサオース (Cel₆), Lam₂, ラミナリトリオース (Lam₃), ラミナリテトラオース

(Lam4) (Megazyme, Bray, Ireland), ゲンチオビオース, メチル β -D-グルコピラノシド (メチル Glc) (ナカライテスク), ネオトレハロース (林原, 岡山), 4-メチルウンベリフェリル β -D-グルコピラノシド (4MU Glc), ヘリシン, オクチル β -D-グルコピラノシド (オクチル Glc) (東京化成工業, 東京), スコポリン (Indofine Chemical Company, Hillsborough, NJ, USA), フェニル β -D-グルコピラノシド (フェニル Glc) (関東化学, 東京). 配糖体の構造を Figure 2-1 に示す.

2.2.2 植物材料と生育条件

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) エコタイプ: Columbia の種子を 70% (v/v) エタノール中で 5 分間振とうした後, 滅菌溶液 (49.5%エムズワンキッチンブリーチ (ウイング, 東京), 0.05% ツイーン 20 (富士フィルム和光純薬)) に置換して 5 分間振とうすることで滅菌した. 滅菌水にて種子を 5 回洗浄した後, 1/2 ムラシゲ・スクーグ培地に播種した. 4°C, 暗所に 3 日間保持することで休眠打破を行った. 人工気象器にて, 22°C, 湿度 50%, 光量子束密度 50 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \text{s})^{-1}$, 明期 16 時間, 暗期 8 時間で 10 日間生育させた.

2.2.3 cDNA の調製

人工気象器にて 10 日間生育させたシロイヌナズナの実生 200 mg を液体窒素で凍結させ, マルチビーズショッカー (安井器械, 大阪) を用い, 1,500 rpm, 15 秒間の破碎を 2 回行った. 全 RNA の抽出に RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用した. 試料中の DNA を Cloned DNase I (RNase free; タカラバイオ, 草津) を用いて分解した. 反応液を以下の 50 μL とした. 全 RNA 50 μg , 10 \times Cloned DNase I Buffer II 5 μL , Cloned DNase I 3 μL , RNase out (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 1 μL に DEPC 処理水を加えて 50 μL とした. 反応液を 37°C に 30 分間保持した. 0.5 M エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (EDTA) 2.5 μL を加え, 80°C に 2 分間保持して DNase I を失活させた. この反応液にジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理水 50 μL を加えた後, エタノール沈澱を行い, 沈澱を乾燥させた. DEPC 処理水 20 μL を加えて全 RNA とした.

調製した全 RNA を鋳型とし, First strand cDNA を Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) を用いて調製した. プライマーに oligo(dT)₁₅ を用いた. まず, 全 RNA 5 µg, 50 ng µL⁻¹ oligo(dT)₁₅ 1 µL, 10 mM dNTP mix 1 µL に DEPC 処理水を加えて 10 µL とし, 65°C に 5 分間保持し, 氷上で冷却した. これに 10× RT buffer 2 µL, 25 mM MgCl₂ 4 µL, 0.1 M ジチオトレイトール 2 µL, 40 U µL⁻¹ RNase out 1 µL および 200 U µL⁻¹ Superscript III RT 1 µL を加え, 25°C に 10 分間, 50°C に 50 分間, および 85°C に 5 分間保持し, 氷上で冷却した. 2 U µL⁻¹ 大腸菌由来 RNase H (Thermo Fisher Scientific) 1 µL を加え, 37°C に 20 分間保持した. これを cDNA として以後の実験に用いた. 使用まで -20°C にて保存した.

2.2.4 組換え AtBGlu42 の発現プラスミドの構築

チオレドキシシンおよび His₆-タグを含む pET-32a (Novagen, Darmstadt, Germany) 由来の 131 残基を AtBGlu42 の Met1 の N 末端側に付加した組換え AtBGlu42 の発現プラスミドを調製した. これら 131 残基は, N 末端から順番に大腸菌由来チオレドキシシン (trxA; LaVallie *et al.* 1993) 109 残基, trxA と His₆-タグをつなぐ 7 残基 (Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-His-Met), His₆-タグ 6 残基, およびトロロンビン認識配列を含む 9 残基 (Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser) である. 2.2.3 で調製した cDNA を鋳型として, *AtBGlu42* (AT5G36890.1) の cDNA を PCR により増幅した. プライマーとして, AtBG42_cDNA_Fw および AtBG42_cDNA_Rv を使用した. 配列を Table 2-1 に示す. 反応液を以下の 50 µL とした. 0.2 mM dNTP mixture, 0.2 % (v/v) cDNA (2.2.3 項での調製品), 0.3 µM 各プライマー, 0.0125 U µL⁻¹ Primestar GXL DNA polymerase (タカラバイオ), 5× Primestar GXL buffer 10 µL. 反応液を 98°C に 1 分間保持した後, 98°C を 10 秒, 55°C を 30 秒, および 72°C を 2 分を 1 サイクルとする温度制御を 40 サイクル行い, 最後に 72°C に 2 分間保持した. これを 1st PCR 反応液とする. 次に PCR により, AtBGlu42 のコーディング領域の両端に pET-32a との相同領域を付加した. プライマーには, AtBG42_pET32_IF_Fw および AtBG42_pET32_IF_Rv を用いた. 配列を Table 2-1 に示す. 反応液を以下の 50 µL とした. 0.2 mM dNTP mixture, 2% (v/v) 1st PCR 反応液, 0.3 µM 各プライマー, 0.025 U µL⁻¹ Primestar HS DNA polymerase (タカラバイオ), 5× Primestar buffer

10 μL . 反応液を 98°C に 1 分間保持した後, 98°C を 10 秒, 55°C を 15 秒, および 72°C を 2 分を 1 サイクルとする温度制御を 25 サイクル行い, 最後に 72°C に 2 分間保持した. 試料全量を 1% (w/v) アガロースゲルにより分離した. 泳動装置に Mupid-2plus (ミューピッド, 東京) を用いて 100 V の定電圧で泳動した. ゲルを 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ エチジウムブロマイドで染色した. 目的 DNA 断片を, Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega, Madison, WI, USA) を用いてゲルより抽出し, 滅菌水 20 μL に溶出させた. これを 2nd PCR 反応液とする. 次にこれを In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) を用いて線状 pET-32a と連結した. 線状 pET-32a を PCR により調製した. プライマーには, pET28_s および pET32_r を用いた. 配列を Table 2-1 に示す. 反応液を以下の 50 μL とした. 0.2 mM dNTP mixture, 0.04 ng mL^{-1} pET-32a, 0.3 μM 各プライマー, 0.025 U μL^{-1} Primestar HS DNA polymerase, 5 \times Primestar buffer 10 μL . 反応液を 98°C に 1 分間保持した後, 98°C を 10 秒, 65°C を 5 秒, および 72°C を 6 分を 1 サイクルとする温度制御を 35 サイクル行い, 最後に 72°C に 6 分間保持した. 反応液よりエタノール沈澱, 制限酵素 *DpnI* (タカラバイオ) による処理, およびアガロースゲル電気泳動による分離と抽出により線状 pET-32a の DNA を得た. 連結反応は, 線状 pET-32a 1 μL , 2nd PCR 反応液 1 μL および 5 \times In-Fusion HD enzyme premix 0.5 μL の混合物を, 50°C に 20 分間保持とした. 大腸菌 DH5 α の形質転換は, Hanahan の方法 (Hanahan 1983) にしたがった. 連結反応液 2.5 μL をコンピテントセル 50 μL に加え, 氷上に 30 分間, 42°C に 1 分間, ついで氷上に 3 分間保持した. これに SOC 培地 1 mL を加え, 37°C にて 30 分間振とう培養した. 菌体を遠心分離 (5,000 \times g, 1 分間, 室温) により回収し, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ アンピシリン (富士フィルム和光純薬) を含む LB 寒天培地 (2.2.1.3 項の調製品) に播種し, 37°C で 16 時間培養した.

形質転換体からのプラスミド調製には, アルカリ/SDS 法および PEG/NaCl 沈澱 (Sambrook and Russell 2001) を用いた. 簡単に説明する. 形質転換体のコロニーを 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ アンピシリンを含む LB 液体培地 2 mL に接種し, 37°C で 16 時間, 180 rpm で振とう培養を行った. 培養液の遠心分離 (5,000 \times g, 2 分間, 室温) により, 菌体を沈澱させた. これを Solution 1 (25 mM トリス HCl 緩衝液 (pH 8.0), 10 mM EDTA, 50 mM D-グルコース) 100 μL に懸濁させた. Solution 2 (0.1 M NaOH, 1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)) 200 μL を加えて穏やかな混和の後, Solution 3 (3 M 酢酸

カリウム, 2 M 酢酸) 150 μL を添加, 混合し, 遠心分離 (15,000 $\times g$, 2 分間) により, 上清を得た. フェノール/クロロホルム (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール = 25:24:1, pH 8.0) による抽出およびエタノール沈澱により沈澱を得た. これを 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ RNase A (タカラバイオ) を含む TE 緩衝液 (10 mM トリス HCl 緩衝液 (pH8.0), 1 mM EDTA) 50 μL に溶解し, 37°C に 30 分間保持した. 続いて, 2.5 M NaCl を含む 20% (w/v) ポリエチレングリコール (PEG) 6000 (富士フィルム和光純薬) 溶液 35 μL と混合し, 氷上に 1 時間保持した後, 遠心分離 (15,000 $\times g$, 10 分間, 4°C) により沈澱を回収し, 滅菌水 20 μL に溶解した. これを AtBGlu42 発現プラスミド (pET32-AtBGlu42) とした.

プラスミドの塩基配列の解析には Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いた. シークエンス反応には Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた. プライマーには, T7_promoter, pET32_trx, AtBG42_340, AtBG42_740 および T7_terminator を用いた. 配列を Table 2-1 に示す. これにより, pET32-AtBGlu42 の AtBGlu42 コード領域および pET-32a との接続部の塩基配列を確認した.

AtBGlu42 変異酵素発現プラスミドの調製には, Primestar Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ) を用いた. 鋳型には pET32-AtBGlu42 を, プライマーには, R342A 発現プラスミドには AtBG42_R342A_PSM_Fw および AtBG42_R342A_PSM_Rv を, R342Y 発現プラスミドの調製には AtBG42_R342Y_PSM_Fw および AtBG42_R342Y_PSM_Rv を用いた (Table 2-1). 反応液を以下の 10 μL とした. 2 \times Primestar max premix 5 μL , 0.02 ng μL^{-1} pET32-AtBGlu42, 0.2 μM 各プライマー. 反応液を 98°C に 1 分間保持した後, 98°C を 10 秒, 55°C を 15 秒, および 72°C を 40 秒を 1 サイクルとする温度制御を 30 サイクル行い, 最後に 72°C に 40 秒間保持した. 本反応液を用い大腸菌 DH5 α の形質転換を行った. 上述の方法にしたがって, プラスミドを調製し, AtBGlu42 コード領域と pET-32a との接続部の塩基配列の解析を行った.

2.2.5 組換え AtBGlu42 の生産と精製

N 末端にチオレドキシニンおよび His₆-タグを付加した AtBGlu42 野生型および変異酵素 (R342A および R342Y) を大腸菌により生産した。発現プラスミドによる大腸菌 Origami B(DE3) (Merck, Darmstadt, Germany) の形質転換は 2.2.4 項記載の方法で行った。ただし, 100 µg mL⁻¹ アンピシリンおよび 15 µg mL⁻¹ カナマイシン (富士フィルム和光純薬) を含む LB 寒天培地に播種してコロニーを形成させた。タンパク質生産には同 LB 液体培地 1.0 L を用い, A₆₀₀ が 0.5 に達するまで 37°C で培養した。ここで, 0.1 M イソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG, 富士フィルム和光純薬) を 0.1 mM になるように添加して, 組換えタンパク質の生産を誘導した。誘導培養を 20°C で 20 時間振とう条件で行った。菌体を遠心分離 (12,000×g, 4°C, 10 分間) により回収し, 0.5 M NaCl を含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5, 緩衝液 A) 30 mL に懸濁した。Branson Sonifier 150 (Branson, Danbury, CT, USA) を用いた超音波破碎 (Output 3, Duty cycle 50%, 30 秒間, 5 回) を行った。遠心分離 (22,000×g, 4°C, 10 分間) による上清を粗酵素液とした。粗酵素液を, 緩衝液 A で平衡化した Ni-Chelating Sepharose Fast Flow カラム (1.6 cm i.d. × 2.5 cm, 5 mL; GE Healthcare, Uppsala, Sweden) によるクロマトグラフィーに供した。30 mM イミダゾールを含む緩衝液 A (約 200 mL) および緩衝液 A における 30–500 mM イミダゾールの直線濃度勾配 (200 mL) によりタンパク質を溶出させた。流速を 4.3 mL min⁻¹, カラム温度を 4°C, 画分液量を 5 mL とした。活性, A₂₈₀ および SDS-PAGE 解析結果に基づき, 精製度の高い活性画分を回収した。20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に対して十分に透析後, Amicon Ultra-15 centrifugal filter (MWCO 30,000; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) を用いて A₂₈₀ が 4.23–5.72 になるまで濃縮し, これを精製酵素とした。使用まで 4°C で保存した。

AtBGlu42 の結晶化用試料は, N 末端のチオレドキシニンおよび His₆-タグを除去したものとした。N 末端タグの除去にはウシ血漿由来トロンビン (Sigma Aldrich) を用いた。上記の方法にしたがって組換え AtBGlu42 野生型を調製した。ただし, 培養液量を 4.0 L とした。カラムクロマトグラフィーの回収画分を, 150 mM NaCl を含む 50 mM トリス HCl 緩衝液 (pH 8.3; 緩衝液 B) に対して十分に透析後, AtBGlu42 に対して 5% (w/w) のトロンビンを添加し, 4°C に 20 時間保持した。

SDS-PAGEにより十分な消化を確認の後、緩衝液 B で平衡化した Ni-Chelating Sepharose Fast Flow カラム (1.6 cm i.d.× 2.5 cm, 5 mL) によるクロマトグラフィーに供し、His₆-タグを含む N 末端タグを担体に吸着させ、目的タンパク質を非吸着画分に回収した。流速を 4.3 mL min⁻¹, カラム温度を 4°C および画分液量を 5 mL とした。20 mM トリス HCl 緩衝液 (pH 7.2; 緩衝液 C) に対して十分に透析を行った後、緩衝液 C で平衡化した DEAE Sepharose Fast Flow カラム (2.5 cm i.d.× 16 cm, 80 mL; GE Healthcare) によるクロマトグラフィーにより分離した。緩衝液 C (200 mL) および緩衝液 C における 0–0.5 M NaCl の直線濃度勾配 (400 mL) によりタンパク質を溶出させた。流速を 2.4 mL min⁻¹, カラム温度を 4°C および画分液量を 5 mL とした。活性、A₂₈₀ および SDS-PAGE 解析結果に基づき、精製度の高い活性画分を回収した。緩衝液 C に対して十分に透析した後、Amicon Ultra-15 centrifugal filter (MWCO 30,000) を用いて A₂₈₀ が 32.0 になるまで濃縮し、これを結晶化用酵素試料とした。使用まで 4°C にて保存した。

2.2.6 SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli の方法 (Laemmli 1970) に準じた。試料に等量の試料用緩衝液 (10% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) グリセロールおよび 0.02% (w/v) ブロモフェノールブルー) を加えて 100°C に 5 分間保持した。10%ポリアクリルアミドゲル (分離ゲル, 0.1% (w/v) SDS, 10% (w/v) アクリルアミド/*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド混合液 (29 : 1), 0.4 M トリス HCl 緩衝液 (pH 8.9); 濃縮ゲル, 0.1% (w/v) SDS, 4.8% (w/v) アクリルアミド/*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド混合液 (29 : 1), 0.1 M トリス HCl 緩衝液 (pH 6.8), 80 × 50 × 1.0 mm) を使用し、泳動装置に Mini Protein III (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いた。ゲル 1 枚当たり 20 mA の定電流で泳動を行った。泳動後のゲルを Rapid CBB KANTO (関東化学) を用いて染色した。脱色液 (10%酢酸および 5%メタノール) を用いて脱色した。

2.2.7 タンパク質の定量

精製標品のタンパク質濃度を、アミノ酸組成分析により定量した。すなわち、精製標品 (約 50 μg) を高真空脱気下、110°C、定沸点 HCl 中で 24 時間加水分解した後、生じたアミノ酸の一部を全自動アミノ酸分析機 (L-8900; 日立ハイテック, 東京) を用いてニンヒドリン比色 (Moore and Stein 1948) により定量した。得られた各アミノ酸のモル量より、タンパク質の含む各アミノ酸残基数を考慮し、各アミノ酸から求まるタンパク質のモル濃度の平均値を求めた。ただし、システインは残基数が少ないため計算に含めなかった。アミノ酸組成分析を本学グローバルファシリティーセンター機器分析委託部門に依頼した。精製標品の比吸光係数 $E_{1\text{cm},280\text{nm}}^{1\%}$ は、野生型 16.9, タグを除いた野生型 19.9, R342A 17.4, および R342Y 17.9 であった。

2.2.8 活性測定

pNP Glc を基質として、以下の標準反応条件下での *p*-ニトロフェノール (pNP) の生成速度を求めた。酵素, 2 mM pNP Glc, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8), 0.2 mg mL⁻¹ ウシ血清アルブミン (BSA; ナカライテックス) を含む反応液 50 μL を 30°C に 10 分間保持した。2 M Na₂CO₃ 25 μL を添加して反応を停止し、 A_{400} より遊離 pNP 濃度を求めた。pNP のモル吸光係数 18,750 M⁻¹ cm⁻¹ を用いた。酵素単位 1 U を標準反応条件下で 1 分間に 1 μmol の pNP を生成する酵素量と定義した。

2.2.9 pH および温度の影響

反応速度の pH および温度の依存性の解析は、標準反応条件 (2.2.8 項) で行った。ただし、pH 依存性の解析では、緩衝液に 80 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 4.1–11.0; 80 mM 酢酸ナトリウム, リン酸ナトリウムおよびグリシン-NaOH 緩衝液の混合液) を用い、酵素濃度を 35.8 nM とした。温度依存性の解析では、反応温度を 25–60°C, 酵素濃度を 24.2 nM とした。pH 安定性の評価では、酵素 (0.89 μM) を 195 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 4.1–11.2) 下で、4°C に 24 時間保持し、これらの残存活性を測定した。温度安定性の評価では、酵素 (24.2 μM) を 1 mg mL⁻¹ BSA を含む

12.5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で, 4–60°C に 15 分間保持し, これらの残存活性を測定した. 処理前の活性に対し, 90%以上の残存活性を示す範囲を安定域とした.

2.2.10 基質特異性の解析

各基質 (2 mM) に対する反応速度の測定は, 標準反応条件 (2.2.8 項) と同様の 50 μ L で行った. 酵素濃度を Table 2-2a に示す. pNP Cel₂を除く pNP 配糖体に対する反応では pNP 生成速度を 2.2.8 項にしたがって求めた. その他の基質に対する反応では D-グルコース生成速度を求めた. 反応液 50 μ L に対し, 4 M トリス HCl 緩衝液 (pH 7.0) 25 μ L を添加して反応を停止した. 生成 D-グルコースの定量には, グルコースオキシダーゼペルオキシダーゼ法 (Miwa *et al.* 1972) を用いた. すなわち, グルコース CII-テストワコー (富士フィルム和光純薬) の発色剤 (350 mL 用, 1 瓶) を 2.5 mM アミノアンチピリンおよび 40 mM フェノールを含む 0.1 M トリス HCl 緩衝液 (pH 7.0) 175 mL に溶解して調製したグルコスタット試薬 10 μ L を反応停止後の試料に加え, 37°C に 30 分間保持した後, A_{505} を測定した. D-グルコースの標準曲線には, 反応液 50 μ L に代えて 0–0.2 mM D-グルコース水溶液を用いた.

反応速度の基質濃度依存性の解析では, ミカエリス-メンテン式の速度パラメーターを, s-v プロットの非線形回帰分析を用いて決定した. 反応を標準反応条件 (2.2.8 項) で行った. ただし, 基質濃度および酵素濃度を Table 2-2b に示す通りとした. 非線形回帰分析に, Grafit ver. 7.0.2 (Erithacus Software, East Grinstead, UK) を用いた. 求めた K_m が試験した基質濃度よりも大きかった基質 (Lam₄) では, 求めた k_{cat} および K_m の値を用いて算出した k_{cat}/K_m のみを結果に記した.

2.2.11 pNP Glc に対する反応の速度論的解析

野生型酵素の pNP Glc に対する反応では, 速度の基質濃度依存性について, 加水分解反応と糖転移反応の両方を触媒するアノマー保持型酵素の反応機構 (Figure 2-2; Kobayashi *et al.* 2011) に基づき非線形回帰分析を行った. 本反応機構に関する反応速度式を以下に示す.

$$v_{ag} = v_h + v_{tg} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$v_h = k_{cat1} K_{m2} [S] [E]_0 / ([S]^2 + K_{m2} [S] + K_{m1} K_{m2}) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$v_{\text{tg}} = k_{\text{cat}2} [\text{S}]^2 [\text{E}]_0 / ([\text{S}]^2 + K_{\text{m}2} [\text{S}] + K_{\text{m}1} K_{\text{m}2}) \quad (\text{Eq. 3})$$

$$r_{\text{tg}} \equiv v_{\text{tg}} / v_{\text{ag}} = [\text{S}] / (K_{\text{TG}} + [\text{S}]) \quad (\text{Eq. 4})$$

ここで, $[\text{S}]$ は pNP Glc 濃度, v_{ag} , v_{h} および v_{tg} はそれぞれアグリコン生成速度, 加水分解速度および糖転移速度, r_{tg} は糖転移率を示す. 速度パラメーター $k_{\text{cat}1}$, $k_{\text{cat}2}$, $K_{\text{m}1}$ および $K_{\text{m}2}$, および糖転移率のパラメーター K_{TG} は, Figure 2-2 に示す反応スキームに基づく速度定数により以下のように定義される.

$$k_{\text{cat}1} = k_1 k_2 k_3 (k_{-4} + k_5) / \{k_4 k_5 (k_{-1} + k_2) + k_1 (k_{-4} + k_5) (k_2 + k_3)\}$$

$$k_{\text{cat}2} = k_2 k_5 / (k_2 + k_5)$$

$$K_{\text{m}1} = k_3 (k_{-1} + k_2) (k_{-4} + k_5) / \{k_4 k_5 (k_{-1} + k_2) + k_1 (k_{-4} + k_5) (k_2 + k_3)\}$$

$$K_{\text{m}2} = \{k_4 k_5 (k_{-1} + k_2) + k_1 (k_{-4} + k_5) (k_2 + k_3)\} / \{k_1 k_4 (k_2 + k_5)\}$$

$$K_{\text{TG}} = k_{\text{cat}1} K_{\text{m}2} / k_{\text{cat}2}$$

$$= k_3 (k_{-4} + k_5) / (k_4 k_5)$$

14.3 nM AtBGlu42, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8), 0.2 mg mL⁻¹ BSA および 0.125–8 mM pNP Glc からなる反応液 (250 μL) を 30°C に 10 分間保持した. 反応液を 100 μL ずつ取り, それぞれ 1 M Na₂CO₃ 200 μL および 4 M トリス HCl 緩衝液 (pH 7.0) 50 μL を添加して反応を停止した. 上記の方法にしたがってそれぞれ pNP および D-グルコースを定量した. Grafit ver. 7.0.2 を用いた非線形回帰分析により, Eq. 2 を v_{h} に回帰させて速度パラメーター $k_{\text{cat}1}$, $K_{\text{m}1}$ および $K_{\text{m}2}$ を決定した. $k_{\text{cat}2}$ は, 求めた $k_{\text{cat}1}$, $K_{\text{m}1}$ および $K_{\text{m}2}$ を用い, Eq. 1 を v_{ag} に回帰させて決定した.

2.2.12 pNP Glc に対する反応生成物の TLC 分析

AtBGlu42 の pNP Glc に対する反応生成物を薄層クロマトグラフィー (TLC) により分析した. 2.27 μM AtBGlu42, 8 mM pNP Glc, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) および 0.2 mg mL⁻¹ BSA からなる反応液 200 μL を 30°C に 30 分間保持した. 経時的に反応溶液 10 μL を採取して, 100°C に 2 分間保持して反応を停止した. TLC では, TLC Silica gel 60 F₂₅₄ アルミニウムシート (Merck) を用いた. 展開溶媒にクロロホルム : メタノール : 水 = 14 : 6 : 1 (v/v/v) を用いて 1 回

展開した。UV 照射によって pNP 誘導体を検出した。検出液 (酢酸：硫酸：アニスアルデヒド＝100：2：1 (v/v/v)) を噴霧後にプレートを加熱することで糖を検出した。

2.2.13 セロオリゴ糖に対するサブサイト親和力の算出

Hiroimi らのエキソ型グリコシダーゼのサブサイト理論 (Hiroimi *et al.* 1973) により、セロオリゴ糖 (重合度 2–6) に対する AtBGlu42 のサブサイト親和力を算出した。サブサイト理論では二つの仮定がある。第一に、基質結合部位は各グルコシル基と結合するサブサイトにより構成され、それぞれが加成性の成り立つ独立した親和力 A_i (kJ mol^{-1} , i はサブサイト番号を示す) を持つ。これに基づき、酵素 E と基質 S (重合度 n) が結合様式 j (j は基質の非還元末端が占有するサブサイト番号に等しい) によって ES 複合体を形成する際の結合定数 $K_{n,j}$ は標準反応ギブスエネルギーと平衡定数の関係式 $\Delta G = -RT \ln K$ より、以下のように表現される。

$$K_{n,j} = 0.018 \exp \{(\sum_i^{\text{cov.}} A_i)_{n,j} / RT\} \quad (\text{Eq. 5})$$

ただし、 $(\sum_i^{\text{cov.}} A_i)_{n,j}$ は重合度 n の基質が結合様式 j において占有するサブサイトの親和力の総和を表す。cov. は結合様式 j において重合度 n の基質の還元末端グルコシル基が占有するサブサイトを表す。 R は気体定数 ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T は絶対温度 (本実験では 303.2 K) を表す。第二に、生産的結合による酵素基質複合体の加水分解速度は、基質の重合度に関わらず、一定の速度定数 (intrinsic k_{cat} , k_{int}) によって決定される。これらの仮定に基づき、重合度 n の基質に対する K_m , k_{cat} および k_{cat}/K_m である、 $(K_m)_n$ (M), $(k_{\text{cat}})_n$ (s^{-1}) および $(k_{\text{cat}}/K_m)_n$ ($\text{s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) は、 k_{int} および A_i によって以下のように表せる。ここで、 p は生産的な結合様式 ($j = -1$) を、 q は非生産的な結合様式 ($j = -1$ 以外) を表す。また、 $\sum_j K_{n,j}$ は重合度 n の基質の全結合様式における結合定数の総和を表す。

$$\begin{aligned} (K_m)_n &= 1 / \sum_j K_{n,j} \\ &= 1 / (\sum_p K_{n,p} + \sum_q K_{n,q}) \\ &= 1 / 0.018 / [\sum_p \exp \{(\sum_i^{\text{cov.}} A_i)_{n,p} / RT\} + \sum_q \exp \{(\sum_i^{\text{cov.}} A_i)_{n,q} / RT\}] \quad (\text{Eq. 6}) \\ (k_{\text{cat}})_n &= k_{\text{int}} \sum_p K_{n,p} / \sum_j K_{n,j} \\ &= k_{\text{int}} \sum_p K_{n,p} / (\sum_p K_{n,p} + \sum_q K_{n,q}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= k_{\text{int}} / (1 + \sum_q K_{n,q} / \sum_p K_{n,p}) \\
&= k_{\text{int}} / [1 + \sum_q \exp \{(\sum_i^{\text{cov.}} A_i)_{n,q} / RT\} / \sum_p \exp \{(\sum_i^{\text{cov.}} A_i)_{n,p} / RT\}] \quad (\text{Eq. 7})
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
(k_{\text{cat}}/K_m)_n &= k_{\text{int}} \sum_p K_{n,p} \\
&= 0.018 k_{\text{int}} \sum_p \exp \{(\sum_i^{\text{cov.}} A_i)_{n,p} / RT\} \quad (\text{Eq. 8})
\end{aligned}$$

A_{+2} から A_{+5} は、非生産的な結合様式の項を含まない Eq. 8 より導出される Eq. 9 より求められる。算出に使用した各定数を Table 2-4 および 2-5 にまとめる。

$$A_{+(n-1)} = RT \{ \ln (k_{\text{cat}}/K_m)_n - \ln (k_{\text{cat}}/K_m)_{(n-1)} \} \quad (\text{Eq. 9})$$

ここで、野生型の Cel₂ に対する K_m である $(K_m)_2$ (4.07×10^{-3} M) を用いると、見かけの結合親和力である $B_{2,\text{app}}$ ($(\sum_i^{\text{cov.}} A_i)_{2,\text{app}}$) は Eq. 5 より

$$\begin{aligned}
1 / (K_m)_2 &= K_{2,\text{app}} \\
1 / (K_m)_2 &= 0.018 \exp \{B_{2,\text{app}} / RT\} \\
B_{2,\text{app}} &= RT \ln \{1 / (K_m)_2 / 0.018\} \\
&= 24.0 \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}
\end{aligned}$$

となる。Cel₂ がサブサイト +2 から +5 のみに結合する場合の、非生産的な結合様式のいずれの親和力 (最大で $A_{+2} + A_{+3}$ の 8.64 kJ mol^{-1} (Table 2-6)) も、 $B_{2,\text{app}}$ より十分に低いため、これらの結合様式の結合定数への寄与は十分小さいとみなし、非生産的な結合様式において $q = +1$ (非還元末端がサブサイト +1 に結合する様式) 以外の結合様式を無視した。これはより長鎖のセロオリゴ糖でも成立する。結合様式を $p = -1$ および $q = +1$ のみとし、Eq. 7 を以下のように近似した。

$$\begin{aligned}
(k_{\text{cat}})_n &\cong k_{\text{int}} / [1 + \exp \{(\sum_i^{\text{cov.}} A_i)_{n,+1} / RT\} / \exp \{(\sum_i^{\text{cov.}} A_i)_{n,-1} / RT\}] \\
&= k_{\text{int}} / [1 + \exp \{(A_{+1} + A_{+2} + \dots + A_{+n}) / RT\} / \exp \{(A_{-1} + A_{+1} + \dots + A_{+(n-1)}) / RT\}] \\
&= k_{\text{int}} / \{1 + \exp (A_{+n} / RT) / \exp (A_{-1} / RT)\} \quad (\text{Eq. 10})
\end{aligned}$$

$$\exp (A_{+n} / RT) = \{k_{\text{int}} / (k_{\text{cat}})_n - 1\} \exp (A_{-1} / RT) \quad (\text{Eq. 11})$$

ここで、 $n = 2-5$ の $1 / (k_{\text{cat}})_n$ に対して y 軸に $\exp (A_{+n} / RT)$ をプロットし、Eq. 11 を線形回帰させて x 切片の $1 / k_{\text{int}}$ および y 切片の $-\exp (A_{-1} / RT)$ より、 k_{int} と A_{-1} を求めた (k_{int} , 10.5 s^{-1} ; A_{-1} , 11.2 kJ)

mol^{-1}). A_{+1} を, Eq. 8 ($n=2$) を A_{+1} について解くことで得られる以下の式 (Eq. 12) を用いて算出した.

$$A_{+1} = RT \ln \{(k_{\text{cat}}/K_m)_2 / k_{\text{int}}/0.018\} - A_{-1} \quad (\text{Eq. 12})$$

変異酵素 R342A および R342Y についても同様に計算した.

2.2.14 AtBGlu42 の結晶の調製

N 末端側タグを除去した AtBGlu42 のリガンドフリーの結晶を調製した. 結晶の調製をビオラモ蛋白質結晶化プレート (96 ウェル) (アズワン, 大阪) を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法により行った. 2.2.5 で調製した 16.1 mg mL^{-1} AtBGlu42 $0.75 \mu\text{L}$ と結晶化用緩衝液 (0.2 M 酢酸カルシウム, 0.1 M カコジル酸ナトリウム (pH 6.5), 18% (w/v) PEG 8000 (Sigma Aldrich)) $0.75 \mu\text{L}$ を混合して, 20°C に 2 ヶ月間保持した. リザーバー内の結晶化用緩衝液量を $85 \mu\text{L}$ とした.

2.2.15 X 線回折実験および位相決定

X 線回折実験を本学大学院先端生命科学研究院 生命融合科学コース X 線構造生物学研究室に委託して, SPring-8 (佐用, 兵庫) の beamline BL41XU にて行った. 回折実験の間, 結晶を, 液体窒素を用いて -196°C に保持した. すべての回折データについて, X-ray Detector Software (XDS) プログラムパッケージ (Kabsch 2010) を用いて, 指数付け, 積分, スケーリングおよびマージを行った. AtBGlu42 の非対称ユニットに, Matthews coefficient (Matthews 1968) が $2.20 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ に相当する 1 分子が含まれており, 溶媒含有率は 44.2% と推定された. 結果を Table 2-3 に示す.

位相決定は Os3BGlu6 (AtBGlu42 との配列同一性は 52%; PDB entry, 3GNO; Seshadri *et al.* 2009) をサーチモデルとし, Phenix プログラムパッケージに含まれる Phaser-MR (McCoy *et al.* 2007; Adams *et al.* 2010) を用いた分子置換法によって行った. 構造精密化に PHENIX.REFINE (Afonine *et al.* 2012) を用いた. Coot (Emsley and Cowtan 2004) を用いて $2F_o - F_c$ および $F_o - F_c$ マップに基づきフィッティングおよび精密化を行った. 水分子およびグリセロール分子は $2F_o - F_c$ および $F_o - F_c$ マップに基づき構築した. MOLPROBITY (Chen *et al.* 2010) により得られた最終的な精密

化統計および幾何学的性質を Table 2-3 に示す。原子座標と構造因子を Protein Data Bank (PDB entry, 7F3A) に寄託した。すべての構造の図を, PyMOL ver. 2.1 (Schrödinger, LLC, New York, NY, USA) を用いて作成した。

2.2.16 分子ドッキングシミュレーション

AtBGlu42 とスコポリンの結合を予測するために, AutoDock Vina (ADT version 1.5.6; Trott and Olson 2010) を用いて分子ドッキングを行った。スコポリンの構造データを, Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA) を用いて, グルコシル基が 1S_3 配座になるように調整した。AtBGlu42 の活性部位にある水分子およびグリセロール分子は取り除いた。スコポリンを 15.80 (x), 63.04 (y), 43.12 (z) の位置を中心とするグリッドボックス (spacing, 1 Å; 40×40×40) 内にて AtBGlu42 の活性部位にドッキングさせた。

Table 2-1. Primers used for preparation of recombinant AtBGlu42 and its mutants.

Primer name	Sequence (5' to 3')	Orientation	Purpose
AtBG42_cDNA_Fw	GCTTCTTAAGTCTGTCTCTCTCTTC	sense	Preparation of AtBGlu42 expression plasmid
AtBG42_cDNA_Rv	ACGAAACACTTAGTCAAAAATATGAG	antisense	Preparation of AtBGlu42 expression plasmid
AtBG42_pET32_IF_Fw	GTGCCACGCGGTTCTATGGCACAGAAAGCTTAACTT	sense	Preparation of AtBGlu42 expression plasmid
AtBG42_pET32_IF_Rv	CGCAAAGCTTGTGCGACTCATTCCTTCTTACCTTTGT	antisense	Preparation of AtBGlu42 expression plasmid
pET28_s	GTCGACAAGCTTGGGGCCGC	sense	Preparation of liner pET-32a
pET32_r	AGAAACCGGTGGCACCAGAC	antisense	Preparation of liner pET-32a
T7_promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	sense	Sequence analysis
pET32_trx	TCAGTTGAAAAGAGTTCCCTCG	sense	Sequence analysis
AtBG42_340	GGAACTGAAAGTCAAATGAAGAAGGCA	sense	Sequence analysis
AtBG42_740	TCGGTTTGTGTCAGTTGATTGTGAATG	sense	Sequence analysis
T7_terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	antisense	Sequence analysis
AtBG42_R342A_PSM_Fw	TTGGAGGCGGATTGTTGAACTGGAAAAT	sense	Preparation of AtBGlu42 R342A expression plasmid
AtBG42_R342A_PSM_Rv	AACAATCGCCCTCCAATTCTTGTGCTTG	antisense	Preparation of AtBGlu42 R342A expression plasmid
AtBG42_R342Y_PSM_Fw	TTGGAGTATATTGTTGAACTGGAAAAT	sense	Preparation of AtBGlu42 R342Y expression plasmid
AtBG42_R342Y_PSM_Rv	AACAATATACTCCAATTCTTGTGCTTG	antisense	Preparation of AtBGlu42 R342Y expression plasmid

Table 2-2. Concentrations of substrates and enzymes used for measurement of reaction velocities of AtBGlu42 and its variants.

a. Concentrations of enzyme used for measurement of reaction velocities of AtBGlu42 wild type for 2 mM various substrates.

Substrate	Enzyme (nM)
pNP Glc	2.27
pNP D-Fuc	2.27
pNP Gal	22.7
pNP Man	227
pNP Xyl	227
pNP Cel ₂	2.42
4MU Glc	19.4
Scopolin	9.68
Helicin	19.4
SA Glc	968
Arbutin	968
Phlorizin	968
Phenyl Glc	968
Methyl Glc	968
Octyl Glc	968
Cel ₂	48.4
Cel ₃	19.4
Cel ₄	19.4
Cel ₅	19.4
Cel ₆	19.4
Lam ₂	9.68
Lam ₃	19.4
Lam ₄	19.4
Sophorose	19.4
Gentiobiose	193.6
Neotrehalose	968

b. Concentrations of substrates and enzymes used for measurement of kinetic parameters of AtBGlu42 and its variants.

b-1. AtBGlu42 wild type

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)
pNP Glc	0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 *	14.3 *
	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6	4.84
pNP D-Fuc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	2.27
pNP Gal	0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8	35.8
pNP Man	0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6	358
pNP Xyl	0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2	358
pNP Cel ₂	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4	2.42
4MU Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	4.84
Scopolin	0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4	2.42
Helicin	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4	2.42
Cel ₂	0.75, 1.5, 3, 4.5, 6, 9, 12	23.9
Cel ₃	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	4.84
Cel ₄	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	4.84
Cel ₅	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	4.84
Cel ₆	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	4.84
Lam ₂	0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2	7.16
Lam ₃	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	4.84
Lam ₄	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	19.4
Sophorose	0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2	14.3
Gentiobiose	1, 2, 3, 4.5, 6, 9, 12	143

* Conditions for measurement of kinetic parameters of the reaction model of a retaining glycosidase that catalyzes both hydrolysis and transglucosylation.

b-2. AtBGlu42 R342A

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6	7.62
Cel ₂	0.75, 1.5, 3, 4.5, 6, 9, 12	38.1
Cel ₃	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	3.81
Cel ₄	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	3.81
Cel ₅	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	3.81
Cel ₆	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	3.81

b-3. AtBGlu42 R342Y

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6	44.1
Cel ₂	0.75, 1.5, 3, 4.5, 6, 9, 12	221
Cel ₃	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	46.6
Cel ₄	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	25.4
Cel ₅	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	25.4
Cel ₆	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	25.4

Table 2-3. Summary of crystallization conditions, data collection, and refinement statistics.

AtBGlu42-Apo	
Data collection	
PDB entry	7F3A
Beamline	SPring-8 BL41XU
Space group	$P2_1$
Unit cell parameters a, b, c, (Å)	44.7, 93.1, 60.9
Unit cell parameters α , β , γ , (°)	90, 102.5, 90
Wavelength (Å)	1
Resolution range (Å)	50.0-1.70 (1.80-1.70)
R_{meas} (%) ^a	8.1 (84.0)
$CC_{1/2}$	(0.783)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	15.1 (2.00)
Completeness (%)	99.9 (99.7)
Redundancy	6.76 (5.87)
Refinement	
No. reflection	53,471
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%) ^b	16.0/18.0
No. of atoms	
Macromolecules	3,865
Ligand/ion	24
Water	402
B-factors (Å ²)	
Macromolecules	25
Ligand/ion	30.4
Water	34.6
RMSD from ideal	
Bond lengths (Å)	0.006
Bond angles (°)	0.796
Ramachandran	
Favored (%)	98.1
Allowed (%)	1.9
Outliers (%)	0

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

a, $R_{\text{meas}} = \sum_{hkl} \{N(hkl) / [N(hkl) - 1]\}^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $\langle I(hkl) \rangle$ and $N(hkl)$ are the mean intensity of a set of equivalent reflections and the multiplicity, respectively.

b, $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$, R_{free} was calculated for 5% randomly selected test sets that were not used in the refinement.

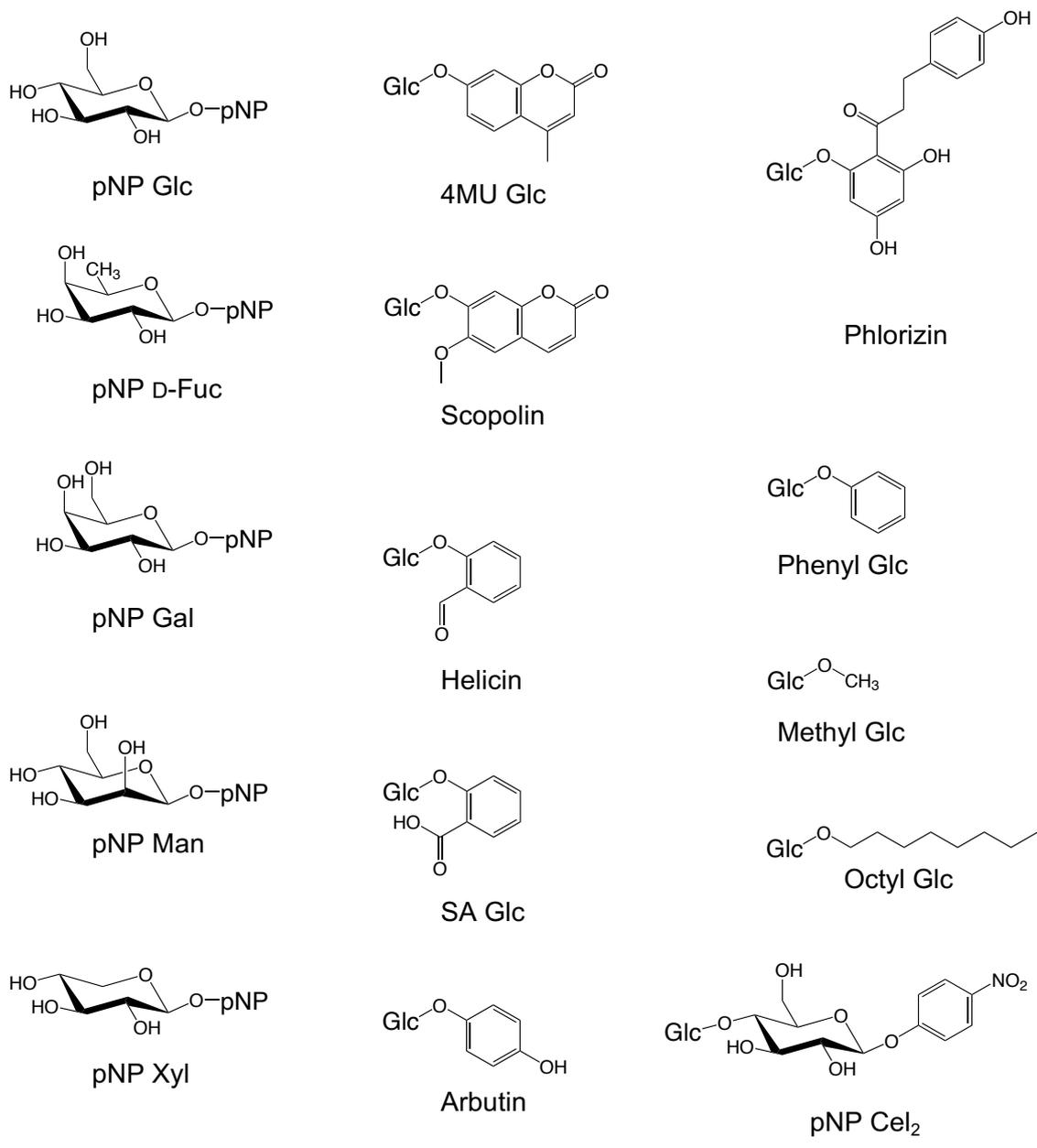


Figure 2-1. Substrates other than oligosaccharides used in this study.

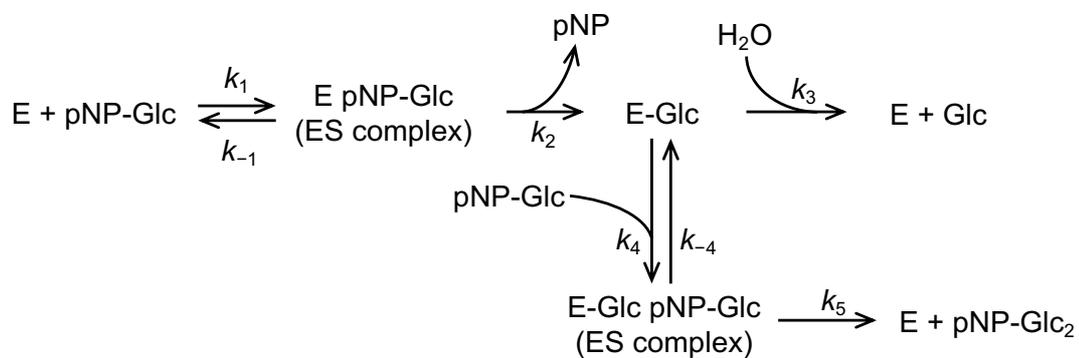


Figure 2-2. Reaction scheme for the reaction with pNP-Glc catalyzed by AtBGlu42. E and E-Glc represent AtBGlu42 (enzyme) and the glucosyl-enzyme intermediate, respectively. pNP-Glc₂ is the transglucosylation product.

2.3 結果

2.3.1 組換え AtBGlu42 の調製

組換え大腸菌を用いて、N末端側にチオレドキシシンおよび His₆-タグを含むベクター由来の 131 残基を付加した AtBGlu42 を生産した。大腸菌形質転換体 1.0 L の培養から得られた無細胞抽出液より、Ni-アフィニティカラムクロマトグラフィーによって 2 mM pNP Glc に対する比活性 10.5 U mg⁻¹ の精製標品 8.8 mg を得た。SDS-PAGE により、分子質量は 70 kDa と見積もられた (Figure 2-3)。これはアミノ酸配列からの計算値 (70,143 Da) と良く一致した。最大反応速度は実験条件下では pH 6.8, 40°C で得られた (Figure 2-4)。本酵素活性は pH 6.3–9.3 (4°C, 24 時間) または 35°C 以下 (pH 7.0, 15 分間) で 90%以上残存した。

Arg342 のセロオリゴ糖鎖長特異性への寄与を明らかにするため、変異酵素 R342A および R342Y を調製した。野生型と同様の方法によって、それぞれ比活性 7.42 U mg⁻¹ および 0.895 U mg⁻¹ の精製標品を 10.0 mg および 5.29 mg 得た。

2.3.2 AtBGlu42 の基質特異性

pNP 配糖体に対する反応を調べた。AtBGlu42 は pNP Glc に対して糖転移反応も触媒した (Figure 2-5ab)。8 mM pNP Glc に対し、pNP Cel₂ を含む糖転移反応の生成物が確認された。反応時間の経過に伴い糖転移産物は基質とともに完全に加水分解された。反応初期におけるアグリコン遊離速度 (v_{ag})、加水分解速度 (v_h) および糖転移速度 (v_g) を pNP および D-グルコース生成速度から求めた。これら 3 速度の基質濃度依存性は加水分解反応と糖転移反応の両方を触媒するアノマー保持型酵素の反応速度式 Eq. 1–3 (2.2.11 項) に良くしたがった (Figure 2-5c)。速度式の各パラメーターは以下の通りである。 k_{cat1} , $9.15 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$; k_{cat2} , $37.8 \pm 1.2 \text{ s}^{-1}$; K_{m1} , $0.127 \pm 0.002 \text{ mM}$; K_{m2} , $26.1 \pm 0.7 \text{ mM}$; k_{cat1}/K_{m1} , $71.9 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 。基質濃度と糖転移率の関係も同反応スキームに基づく式 Eq. 4 (2.2.11 項) に良くしたが、糖転移率のパラメーター K_{TG} は $6.30 \pm 0.08 \text{ mM}$ であった (Figure 2-5d)。他の基質に対する速度の基質濃度依存性ではミカエリス-メンテン式にしたがった (Table 2-4)。加水分解・転移の理論式の定数 k_{cat1}/K_{m1} はグルコシル化酵素に至るまでの反応の速

度定数 $k_1k_2/(k_1+k_2)$ である。一般にグルコシル化酵素は観察されず、エネルギー準位が高い。したがってグルコシル化段階を反応の律速として考えられ、pNP Glc の k_{cat}/K_{m1} を、他の k_{cat}/K_m と比較するのは妥当である。pNP Glc に対する k_{cat}/K_{m1} と比べ、pNP Fuc の値 ($81.3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) は同程度、pNP Gal, pNP Man および pNP Xyl の値は低く、それぞれ pNP Glc に対する値の 1.9%, 1.1% および 0.40% であった。

2 mM 各種 β -グルコシドに対する反応速度を測定した (Table 2-4)。AtBGlu42 はヘリシン, 4MU Glc およびスコポリンに対して高い速度を、フェニル Glc, アルブチン, SA Glc, フロリジン, メチル Glc およびオクチル Glc に対して低い、あるいは検出限界以下 ($< 0.0046 \text{ s}^{-1}$) の速度を示した。これらに対する速度定数 k_{cat}/K_m を Table 2-4 に示す。ヘリシンに対する k_{cat}/K_m ($160 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) が最も高く、スコポリン ($104 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) および 4MU Glc ($97 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) に対しても高い値を示した。逆遺伝学的に示唆されていた AtBGlu42 のスコポリンに対する活性が酵素化学的に確認された。

AtBGlu42 は様々なグルコオリゴ糖を加水分解した。二糖の中で、Lam₂ (Glc β 1-3Glc) に最も高い k_{cat}/K_m ($94.6 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) を示し、次いでソホロース (Glc β 1-2Glc) に高い値 ($13.8 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) を示した。Cel₂ (Glc β 1-4Glc), ゲンチオビオース (Glc β 1-6Glc) およびネオトレハロース (Glc β 1- α 1Glc) に対して低い、あるいは検出限界以下 ($< 0.0046 \text{ s}^{-1}$) の速度を示した。ラミナリオリゴ糖 (重合度 2-4) では二糖に最も高い k_{cat}/K_m を示したのに対して、セロオリゴ糖 (重合度 2-6) では三糖に最も高い値 ($85.5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) を示した。重合度の増加に伴う k_{cat}/K_m の減少は、ラミナリオリゴ糖よりもセロオリゴ糖の方が穏やかであった。

2.3.3 AtBGlu42 の立体構造

結晶構造解析用の試料は生化学的試験用とは別途調製した。Ni アフィニティークロマトグラフィー精製後の試料の N 末端付加領域をトロンピンにより切断し、再度の Ni アフィニティークロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した (Figure 2-3)。本試料は、AtBGlu42 の全配列 Met1-Glu490 およびその N 末端に Gly-Ser の 2 残基を持つ。なお、以降の

残基番号は、この2残基分を無視した AtBGlu42 の番号を付して称す。この AtBGlu42 (56 kDa) の 2 mM pNP Glc に対する比活性は $16.9 \pm 0.3 \text{ U mg}^{-1}$ ($15.8 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$) と、N 末端タグ除去前 ($12.3 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$) とほぼ同等であり、N 末端付加領域による酵素機能への影響はほぼ無いものと考えられた。

X 線結晶構造解析により、AtBGlu42 の立体構造を分解能 1.7 Å で決定した (Table 2-3)。N 末端の Gly, C 末端側 9 残基 (Asp482–Glu490) および $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 6 (L6) の一部分 (Lys328–Glu331) の構造は、電子密度が低く決定できなかった。AtBGlu42 の全体構造は構造既知の GH1 酵素に共通する $(\beta/\alpha)_8$ -バレル構造であった (Figure 2-6a)。バレル構造の L5 および L6 に含まれる β -ストランド ($\beta 5'$, $\beta 6'$ および $\beta 6''$) から構成される小ドメインが、本バレルよりも N 末端にある α -ヘリックスと相互作用できる距離に位置していた。この N 末端の α -ヘリックスは AtBGlu42 に特異的な構造である。配列同一性の高い Os1BGlu4 を含む、シロイヌナズナやイネ由来 GH1 ホモログには、この α -ヘリックスに対応するアミノ酸配列はなかった。抗凍結剤としたグリセロール 4 分子の電子密度が確認された。4 分子中、2 分子は L1 上に、残り 2 分子は活性ポケット (サブサイト -1 および +1) に位置していた (Figure 2-6a)。既知 GH1 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 (PDB entry, 7BZM; Nutho *et al.* 2020) および Tmari_1862 (PDB entry, 2CES; Gloster *et al.* 2006) の立体構造と比較した (Figure 2-6b)。AtBGlu42 の L4 の C 末端側の Glu183 および L7 の C 末端側の Glu388 は既知構造の触媒残基と良く一致した。サブサイト -1 構成残基 (Gln35, His137, Asn182, Tyr317, Glu388, Trp437, Glu444, Trp445 および Phe453) も既知 GH1 β -グルコシダーゼと同様の位置に存在していた。サブサイト -1 のグリセロールと結合する残基 (Gln35, His137, Asn182, Glu183, Glu388, Glu444 および Trp445) を Figure 2-6c に示す。サブサイト -1 のグリセロールの各原子は、GH1 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 および Tmari_1862 のグルコイミダゾール複合体構造において、サブサイト -1 に結合した基質アナログ (グルコイミダゾール) の 2-C, 3-C, 4-C, 2-O, 3-O の位置に良く一致した (Figure 2-6b)。4-O とは 2.3 Å のずれがあった。

2.3.4 AtBGlu42 とスコポリンの結合予測

AtBGlu42 とスコポリンの結合様式を AutoDock Vina を用いたドッキングシミュレーションによって予測した。予測された 9 つの結合構造のうち、1 つの構造で、スコポリンのグルコシル基が他の GH1 酵素の各種複合体における基質あるいは基質アナログと同様にサブサイト-1 に結合し、先述のサブサイト-1 を構成する残基 Gln35, His137, Asn182, Tyr317, Glu388, Trp437, Glu444, Trp445 および Phe453 と相互作用する位置にあった (Figure 2-7)。AtBGlu42 の結晶構造から 15.80 (x), 63.04 (y), 43.12 (z) の位置を中心とするグリッドボックス (spacing, 1 Å; 40×40×40) 内の結合水を取り除いた状態でのスコポリンとの結合エネルギーは $-37.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ と計算された。スコポリンのアグリコンのウンベリフェリル環は Trp360 のインドール環と 3.7 Å の距離で面しており、スタッキング相互作用する位置にあった。6-メトキシ基は Phe197 の側鎖に近く、O-Phe197 (C ζ) 間は 3.4 Å, C-Phe197 (C ζ) 間は 3.8 Å の距離に位置していた。

2.3.5 AtBGlu42 と Os3BGlu7-オリゴ糖複合体の構造比較

AtBGlu42 の構造を Os3BGlu7 の Lam₂ 複合体 (PDB entry, 3AHT; Chuenchor *et al.* 2011) および Cel₅ 複合体 (PDB entry, 3F5K; Chuenchor *et al.* 2011) と比較し、Lam₂ およびセロオリゴ糖との結合に関与する残基を推定した。Lam₂ 結合について、サブサイト+1 では、Os3BGlu7 では一般酸塩基触媒残基 Glu176 がグルコシル基の 2-O および 3-O (グリコシド結合酸素原子) と、Asn245 が 1-O と水素結合を形成する (Figure 2-8a)。これに対して AtBGlu42 では一般酸塩基触媒残基 Glu183 が 2-O および 3-O と水素結合を形成できる距離あるが、Os3BGlu7 の Asn245 に相当する Glu246 は 1-O と相互作用できない位置に配向し、Arg342 と塩橋を形成していた (Figure 2-8b)。代わりに、Asp244 が 1-O と水素結合を形成し得る距離に位置していた。Os3BGlu7 では、Asp244 に対応する残基 Asp243 は Arg178 の方へ配向している。セロオリゴ糖結合について、Os3BGlu7 では Trp358 がサブサイト+1 と+2 で、Asn245 がサブサイト+2 で、Tyr341 がサブサイト+3 と+4 で、それぞれ Cel₅ と相互作用できる距離に位置している (Figure 2-8c)。その他の基質周辺残基は Cel₅ と明確な相互作用をしていなかった。AtBGlu42 において Trp358, Asn245, Tyr341 にそれぞれ対応する残基

Trp360, Glu246, Arg342 は概ね同様の位置にあった (Figure 2-8d). Asn245 を持つ Os3BGlu7 と異なり, AtBGlu42 はこの位置に Glu246 を持つが, Glu246 の側鎖はサブサイト+2 におけるグルコシル基との相互作用に適した距離に位置していた. サブサイト+2 までにセロオリゴ糖の結合への明らかな立体障害となる構造は確認できなかった. 一方で, Arg342 のサブサイト+3 のグルコシル基と衝突する距離 (Arg342 N η 1-C5, 1.7 Å; N η 2-C6, 2.5 Å) にあり, サブサイト+3 に至るセロオリゴ糖の結合において立体障害となり得ることが推定された.

2.3.6 AtBGlu42 の Arg342 変異酵素の解析

変異酵素 R342A および R342Y を調製した (Figure 2-3). pNP Glc に対して, 低い濃度領域 (≤ 0.6 mM) での反応速度からミカエリス-メンテン式のパラメータを求めた (Table 2-5). R342A および R342Y の pNP Glc に対する k_{cat}/K_m は, それぞれ野生型の 52% および 5.4% に低下した. また, 各種セロオリゴ糖に対する基質特異性を評価した (Table 2-5). Cel₂ に対する k_{cat}/K_m がそれぞれ野生型の 72% および 5.4% に低下した. Cel₂ から Cel₆ のうち, R342A は Cel₅ に対して最も高い k_{cat}/K_m を, R342Y は Cel₄ に対して最も高い値を示した. すなわち, セロオリゴ糖の鎖長特異性に関し, 野生型酵素が三糖特異性を示すのに対し, R342A は五糖特異性を, R342Y は四糖特異性を示した. 三糖と四糖に対する k_{cat}/K_m を比較すると, 野生型酵素では三糖に対する四糖の相対値が 0.52 であるのに対し, R342A では 1.2, R342Y では 2.7 であった. サブサイト理論 (Hiromi *et al.* 1973) に基づき, この比率よりサブサイト+3 における親和力を求めた (Table 2-6). 野生型では負の値 (-1.64 kJ mol⁻¹) であったが, R342A では 0.470 kJ mol⁻¹, R342Y では 2.54 kJ mol⁻¹ であった. また, サブサイト+4 の親和力も, 野生型酵素では負の値であったが, R342A では正の値となった. 試験したセロオリゴ糖および pNP Glc に対する反応において, R342Y は野生型と比較して k_{cat} が低く, これにより k_{cat}/K_m が大きく低下していた. R342Y では, pNP Glc およびセロオリゴ糖の k_{cat} が野生型に対し 12–14% であった.

Table 2-4. Reaction velocities and kinetic parameters of recombinant tagged AtBGlu42 for various substrates.

Substrate	$v/[E]_0^a$ (s^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} mM^{-1}$)
pNP Glc	12.3 ± 0.2	10.2 ± 0.0 ^b	0.142 ± 0.002 ^b	72.2 ^b (71.9 ^c)
pNP D-Fuc	12.0 ± 0.0	12.9 ± 0.4	0.158 ± 0.004	81.3
pNP Gal	2.39 ± 0.04	13.6 ± 0.4	9.93 ± 0.41	1.34
pNP Man	0.203 ± 0.003	0.233 ± 0.014	0.290 ± 0.005	0.804
pNP Xyl	0.258 ± 0.002	0.464 ± 0.008	1.62 ± 0.04	0.287
pNP Cel ₂	8.99 ± 0.95	9.40 ± 0.20	0.0978 ± 0.0028	96.1
4MU Glc	8.03 ± 0.09	8.03 ± 0.08	0.0827 ± 0.0022	97.1
Scopolin	8.78 ± 0.01	10.2 ± 0.02	0.0981 ± 0.0001	104
Helicin	10.2 ± 0.3	10.5 ± 0.03	0.0657 ± 0.0044	160
SA Glc	0.316 ± 0.014	N.D.	N.D.	N.D.
Arbutin	< 0.0046	N.D.	N.D.	N.D.
Phlorizin	0.418 ± 0.011	N.D.	N.D.	N.D.
Phenyl Glc	0.0897 ± 0.0046	N.D.	N.D.	N.D.
Methyl Glc	< 0.0046	N.D.	N.D.	N.D.
Octyl Glc	0.0254 ± 0.0027	N.D.	N.D.	N.D.
Cel ₂	2.00 ± 0.01	6.42 ± 0.09	4.07 ± 0.04	1.58
Cel ₃	9.99 ± 0.62	10.8 ± 0.1	0.126 ± 0.002	85.5
Cel ₄	9.34 ± 0.31	10.3 ± 0.3	0.231 ± 0.01	44.7
Cel ₅	8.59 ± 0.20	10.2 ± 0.2	0.283 ± 0.02	35.9
Cel ₆	8.33 ± 0.15	9.67 ± 0.5	0.314 ± 0.02	30.8
Lam ₂	10.6 ± 0.09	11.1 ± 0.2	0.117 ± 0.004	94.6
Lam ₃	8.07 ± 0.35	10.7 ± 1.0	0.636 ± 0.09	16.9
Lam ₄	2.98 ± 0.29	N.D.	N.D.	1.68
Sophorose	8.35 ± 0.10	11.9 ± 0.2	0.864 ± 0.022	13.8
Gentiobiose	0.0593 ± 0.0040	0.543 ± 0.073	16.9 ± 3.1	0.0321
Neotrehalose	< 0.0046	N.D.	N.D.	N.D.

Data are average ± standard deviation for three independent experiments. N.D., not determined. a, Reaction velocity to 2 mM substrates. b, Kinetic parameter of Michaelis-Menten equation in the low substrate concentration (≤ 0.6 mM). c, k_{cat}/K_m obtained from the kinetic model of a retaining glycosidase that catalyzes both hydrolysis and transglycosylation.

Table 2-5 Kinetic parameters of recombinant AtBGlu42 mutants for celooligosaccharides.

Substrate	R342A			R342Y		
	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
pNP Glc	$7.89 \pm 0.13^{\text{a}}$	$0.211 \pm 0.008^{\text{a}}$	37.5^{a}	$1.35 \pm 0.01^{\text{a}}$	$0.270 \pm 0.005^{\text{a}}$	4.98^{a}
Cel ₂	5.43 ± 0.16	4.82 ± 0.34	1.13	0.927 ± 0.044	10.8 ± 0.8	0.0855
Cel ₃	7.54 ± 0.13	0.136 ± 0.010	55.4	1.33 ± 0.03	0.323 ± 0.017	4.12
Cel ₄	8.21 ± 0.05	0.122 ± 0.007	67.1	1.23 ± 0.01	0.109 ± 0.005	11.3
Cel ₅	8.08 ± 0.11	0.107 ± 0.003	75.8	1.31 ± 0.04	0.127 ± 0.008	10.3
Cel ₆	8.10 ± 0.22	0.151 ± 0.014	53.7	1.29 ± 0.03	0.147 ± 0.004	8.78

Data are average \pm standard deviation for three independent experiments. a, Kinetic parameter of Michaelis-Menten equation determined in the low substrate concentration range (≤ 0.6 mM).

Table 2-6. Subsite affinities for cellooligosaccharides.

Subsite	Subsite affinity (kJ mol ⁻¹)		
	wild type	R342A	R342Y
-1	11.2 ± 0.1	11.6 ± 0.2	11.9 ± 0.2
+1	11.6 ± 0.1	11.0 ± 0.3	8.75 ± 0.27
+2	10.1 ± 0.0	9.83 ± 0.12	9.78 ± 0.06
+3	-1.64 ± 0.04	0.470 ± 0.083	2.54 ± 0.03
+4	-0.549 ± 0.059	0.304 ± 0.064	-0.246 ± 0.060
+5	-0.388 ± 0.081	-0.862 ± 0.106	-0.402 ± 0.034

The k_{int} of the wild type, R342A, and R342Y were 10.5 s⁻¹, 7.78 s⁻¹, and 1.31 s⁻¹, respectively.

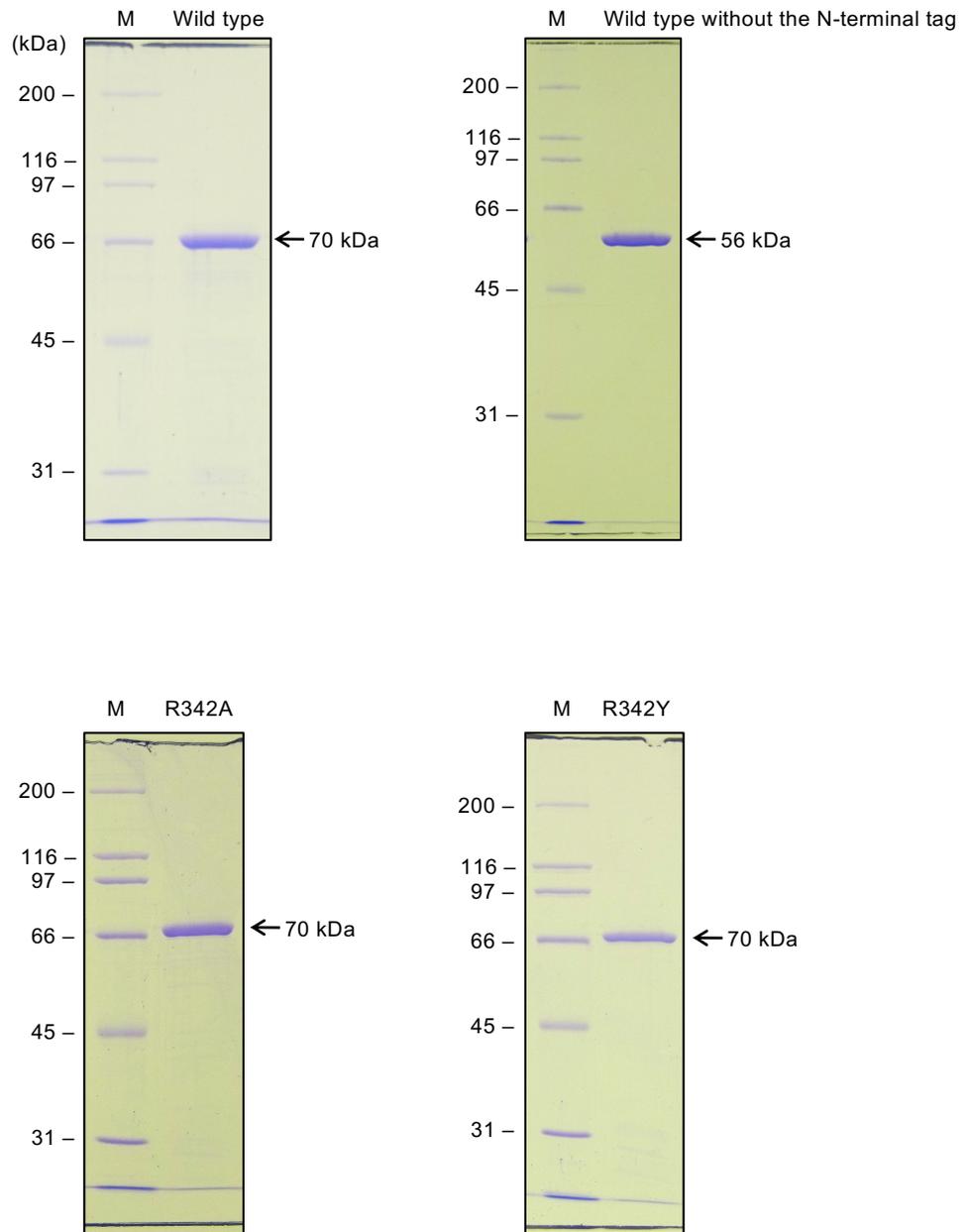


Figure 2-3. SDS-PAGE analysis of purified recombinant AtBGlu42 and its variants. Lane M, protein size marker; the right lane, each purified recombinant enzyme (1 μ g). Protein was stained with CBB. Molecular masses of the standard proteins are shown on the left. Recombinant tagged AtBGlu42 and its variants (70 kDa) and untagged AtBGlu42 (56 kDa) are indicated by an arrow.

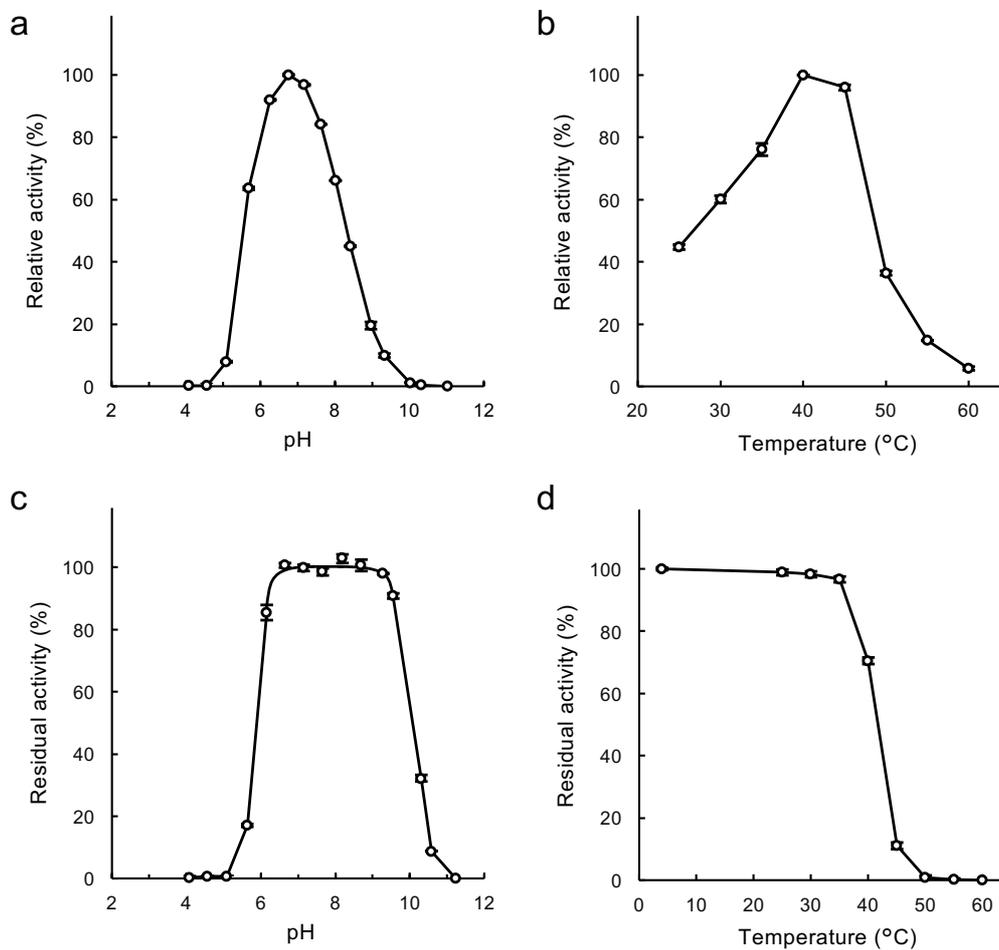


Figure 2-4. Effects of pH and temperature on activity and stability of recombinant tagged AtBGlu42.

(a) Relative activity at various pH (pH 4.1-11.0). (b) Relative activity at various temperatures (25-60 °C). (c) Residual activity after AtBGlu42 was kept in the pH range at 4 °C for 24 h. (d) Residual activity after AtBGlu42 was kept at the temperatures at pH 7.0 for 15 min. Values and error bars are average and standard deviation of three independent experiments, respectively.

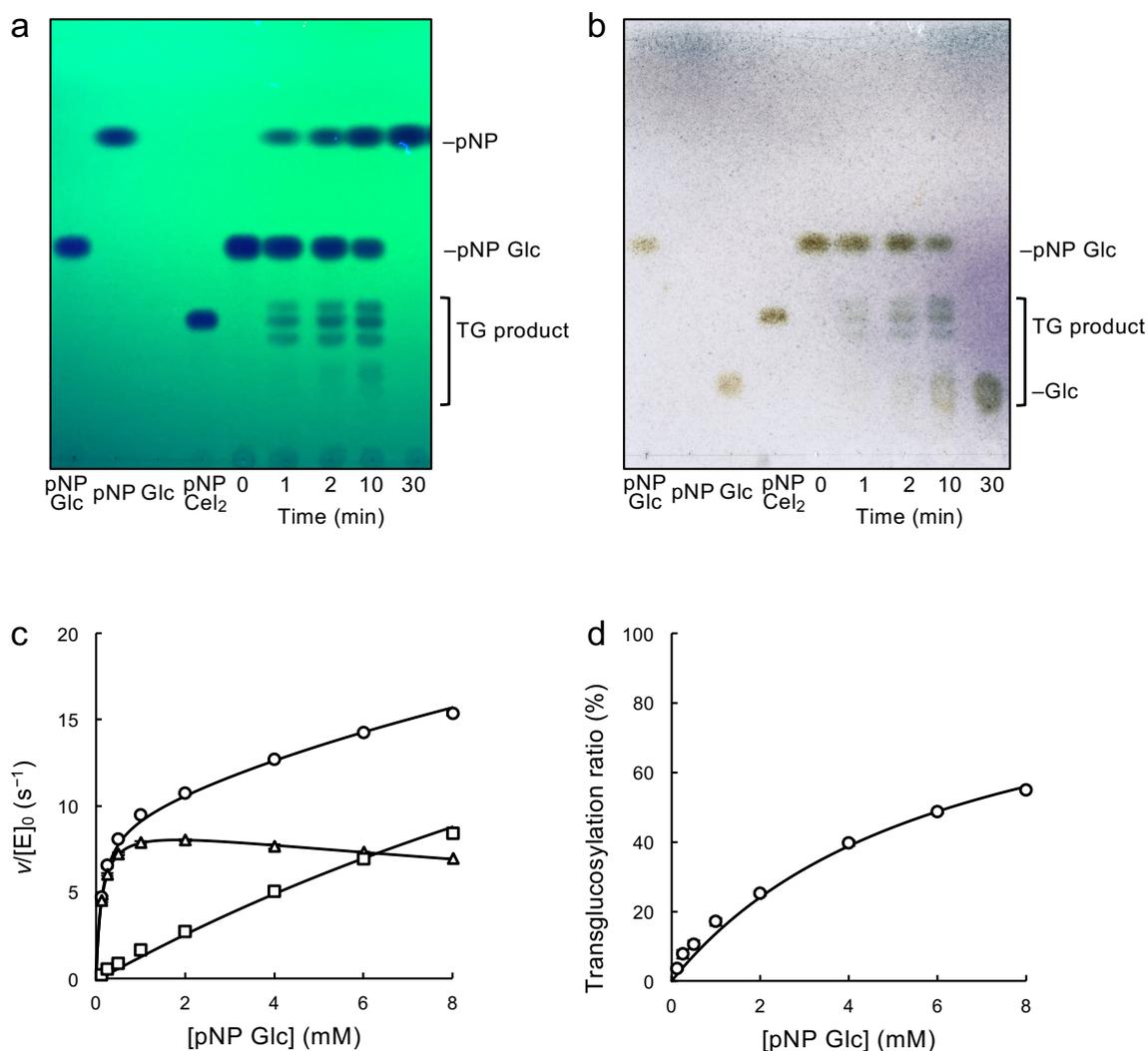


Figure 2-5. Reaction of recombinant tagged AtBGlu42 with pNP Glc.

(a, b) TLC analysis of the reaction of tagged AtBGlu42 (2.27 μM) and 8 mM pNP Glc in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) at 30 $^{\circ}\text{C}$. Reaction products with the pNP group were detected under UV light (a), and those containing sugar were detected by staining (b). (c) The s - v plots of the reaction of with pNP Glc. Velocity for aglycone release (circle), hydrolysis (triangle), and transglucosylation (square) are shown. (d) Transglucosylation ratio ($r_{\text{tg}} = v_{\text{tg}} / v_{\text{ag}}$) against pNP Glc concentration. Values and error bars are average and standard deviation of three independent experiments, respectively. Theoretical lines according to the kinetic scheme are drawn.

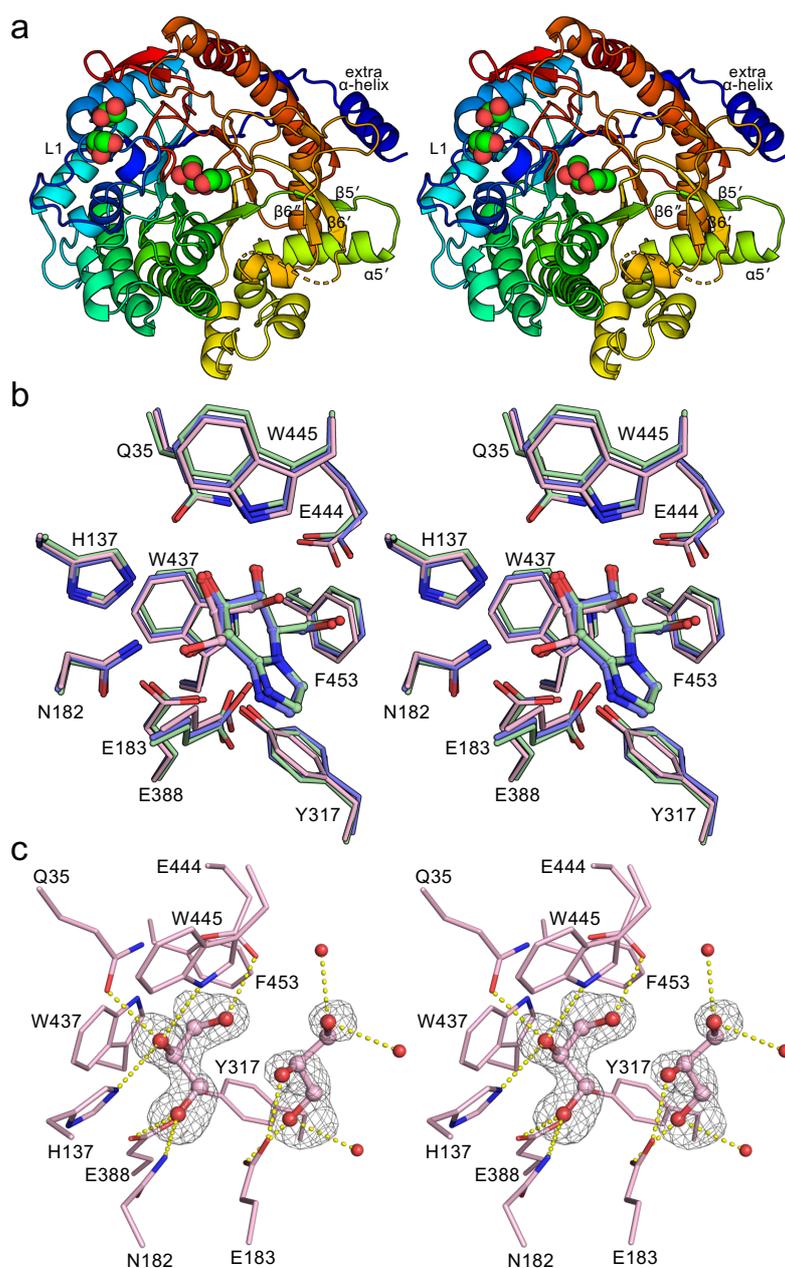


Figure 2-6. Crystal structure of AtBGlu42.

(a) Ribbon diagram of overall AtBGlu42. The structure is shown in rainbow coloring from blue (N-terminal) to red (C-terminal). Four glycerol molecules are shown in sphere representation. The extra N-terminal α -helix is located close to the small local domain composed $\beta \rightarrow \alpha$ loop L5 (containing β -strand $\beta 5'$ and α -helix $\alpha 5'$) and L6 (containing two β -strands $\beta 6'$ and $\beta 6''$). (b) Superimposition of the residues at subsite -1 of AtBGlu42 (pink) with Os3BGlu7 (pale green), and Tmari_1862 (light purple). Inhibitors (glucoimidazole in Os3BGlu7 and Tmari_1862) are shown in ball and stick representation. (c) Close up view of the active site of AtBGlu42. Two glycerol molecules observed are represented with balls and sticks. Water molecules are shown as red balls. Predicted hydrogen bonds are indicated by dotted lines. The $F_o - F_c$ omit electron density map for the glycerol molecules is shown as a mesh contoured at 3.5σ .

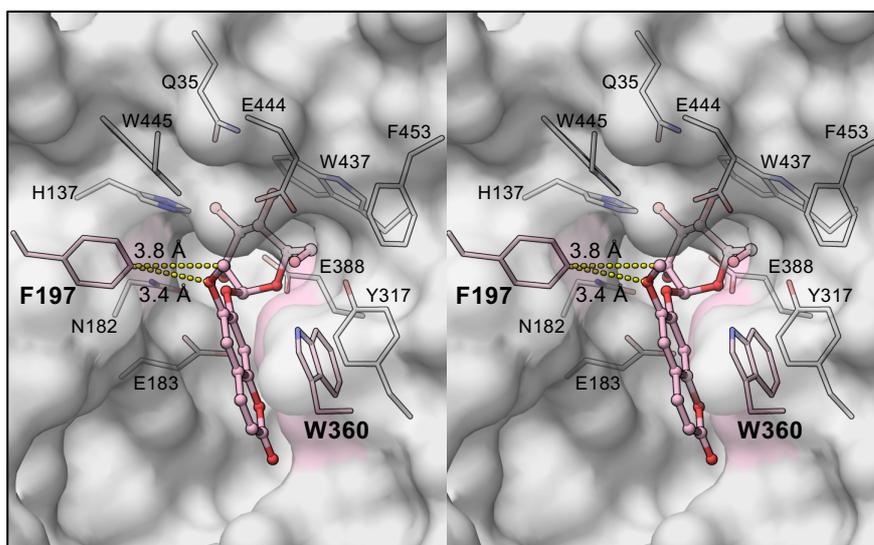


Figure 2-7. Docking simulation of scopolin onto AtBGlu42.

Scopolin is shown with balls and sticks. The amino acid residues surrounding it are shown behind transparent surface in grey or pink. The umbelliferyl plane faces Trp360 and 6-methoxy group is at a distance of 3.4-3.8 Å from Phe197. Predicted interactions between 6-methoxy group and Phe197 are indicated by dotted lines.

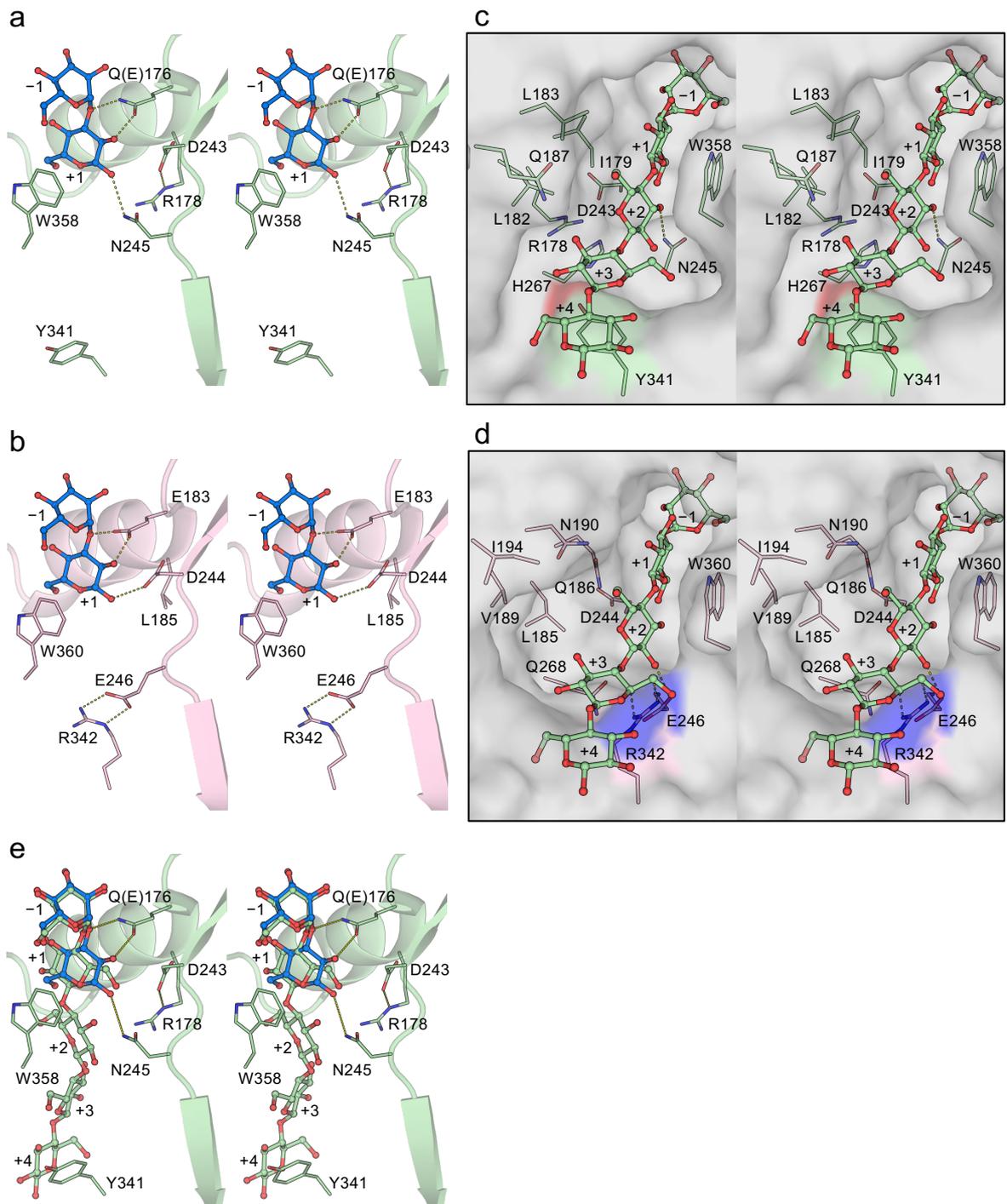


Figure 2-8. Comparison of structure of AtBGlu42 with Os3BGlu7.

(a) The Os3BGlu7-laminaribiose complex (PDB entry, 3AHT; Chuenchor *et al.* 2011). (b) The corresponding part of AtBGlu42. Laminaribiose of the Os3BGlu7 complex superimposed with AtBGlu42 is shown. (c) The Os3BGlu7-cellopentaose complex (PDB entry, 3F5K; Chuenchor *et al.* 2011). (d) The corresponding part of AtBGlu42. Cellopentaose of the Os3BGlu7 complex superimposed with AtBGlu42 is shown. (e) Superimposition of the Os3BGlu7-laminaribiose complex and cellopentaose from Os3BGlu7-cellopentaose complex. The distance between two atoms within a distance of 3.0 Å or less are indicated by dotted lines.

2.4 考察

AtBGlu42 は、逆遺伝学的手法によりスコポリンを加水分解するとされながらも、酵素活性が未確認であった。本研究では、大腸菌を用いて調製した組換え AtBGlu42 を用いて、スコポリンやオリゴ糖を含む様々な基質に対する特異性を明らかにした。X線結晶構造解析により構造を決定し、この構造に基づく結合予測と変異酵素の解析を通じて、スコポリン結合様式を推測し、またセロオリゴ糖鎖長特異性に寄与するアミノ酸残基を明らかにした。

AtBGlu42 の中性至適 pH について考察する。AtBGlu42 は、中性 pH で最も高い活性を示した。一般に、植物細胞の液胞に局在する酵素や、細胞外に分泌される酵素は低 pH で高活性を示し、細胞質局在性酵素は中性域に至適 pH を有す。AtBGlu42 は N 末端にシグナルペプチドを持たないことから、細胞質に局在すると推定される。機能的にも細胞質での作用に適することが確認された。イネ由来推定 GH1 アイソザイムのうち、AtBGlu42 と最も配列同一性の高い Os1BGlu4 もシグナルペプチドを持たず、中性域に至適 pH を有す (Rouyi *et al.* 2014)。Os1BGlu4 の GFP との融合タンパク質のトウモロコシのプロトプラストにおける一過性発現実験により、細胞質局在性が示されている (Rouyi *et al.* 2014)。AtBGlu42 は、このイネ Os1BGlu4 のオーソログとして機能していると考えて良いだろう。

AtBGlu42 のスコポリンへの作用について考察する。AtBGlu42 のスコポリン加水分解活性が確認され、スコポリンは試験した基質の中で k_{cat}/K_m の比較から 2 番目に良い基質であった (Table 2-4)。AtBGlu42 とスコポリンの結合予測では、スコポリンアグリコンの 6-メトキシ基が Phe197 とファンデルワールス相互作用を、ウンベリフェリル基が Trp360 とスタッキング相互作用する (Figure 2-7)。AtBGlu42 は、4MU Glc にも良く作用し、スコポリンと同程度の k_{cat} と K_m を示した (Table 2-4)。4MU にはスコポレチンの 6-メトキシ基はなく、代わりに 4-メチル基がある (Figure 2-1)。4MU Glc のウンベリフェリル環の結合様式が、予測結合構造におけるスコポリンのウンベリフェリル環と同様と仮定すると、4MU の 4-メチル基と Trp360 が相互作用すると予想される (Figure 2-7)。これらのことから、スコポレチンの 6-メトキシ基と Phe197 の相互作用と、4MU の 4-メチル基と Trp360 の相互作用が同程度と考えられる。これまでに、シロイヌナズナ由来 GH1 β -

グルコシダーゼ AtBGlu21, AtBGlu22 および AtBGlu23 はスコポリン加水分解活性を有すると報告されていた (Ahn *et al.* 2010). しかし, これらのスコポリン分解の k_{cat}/K_m は AtBGlu42 と比べ, 1.6%以下と非常に低い. これらの3アイソザイムは, AtBGlu42 の Phe197 と Trp360 を持たず, それぞれ Lys と Ala を持ち, これが低活性の一因と考えられる. すなわち, AtBGlu42 の Phe197 と Trp360 はスコポリン分解の高活性に重要な残基であると考えられる. シロイヌナズナの GH1 アイソザイム 40 種のうち, 3 種 (AtBGlu44, AtBGlu45, AtBGlu46) は AtBGlu42 と同様に Phe と Trp の両残基を持ち, 12 種は Trp を持つ (Figure 2-9). したがって, シロイヌナズナでは AtBGlu42 に限らず, 多くの GH1 アイソザイムがスコポリン加水分解活性を持つと予想される. スコポリン加水分解による根部における鉄吸収促進や根圏細菌叢改善が適切なタイミングで機能するには, AtBGlu42 がスコポリン加水分解活性を持つことに加えて, 細胞質局在性であること, 鉄欠乏条件や有用微生物共生下において根部で発現する (Zamioudis *et al.* 2014) ことが重要であると考えられた.

AtBGlu42 の各種グルコシドへの作用について考察する. 試験した配糖体の中で, AtBGlu42 はヘリシンに対して最も高い k_{cat}/K_m を示し, pNP Glc に対しても高い活性を示した. 一方, アルブチン, フェニル Glc および SA Glc に対する活性は非常に低いか検出されなかった (Table 2-4). pNP の pK_a が 7.15 (Serjeant and Dempsey 1979) であるのに対して, アルブチンのアグリコンであるヒドロキノンの pK_a が 10.9 (Pearce and Simkins 1968) であることから, アルブチンはアグリコンの脱離能が低いいため反応速度が低いと考えられた. フェニル Glc は, スコポリンにおける Phe197 と相互作用する 6-メトキシ基や Trp360 と相互作用する δ -ラクトン環に相当する官能基を持たないため, 反応速度が低いと考えられた (Figure 2-1). ヘリシンのアルデヒド基はスコポリンの 6-メトキシ基と同様に Phe197 と相互作用する可能性がある (Figure 2-1 および 2-7). SA Glc のカルボキシ基は, アルデヒド基よりも嵩高く荷電しているため, Phe197 との結合には適さないと考えられた. SA Glc に高活性を示す *Agrobacterium tumefaciens* 由来 GH1 β -グルコシダーゼ SghA は, AtBGlu42 の Phe197 に相当する残基として His193 を有す (Wang *et al.* 2019). SA Glc との複合体構造では, サリチル酸のカルボキシ基と His193 が塩橋を形成しており, これが SA Glc への高い

活性に寄与すると考えられている。この AtBGlu42 の Phe197 に相当する残基が各種配糖体アグリコン特異性を決定する一因であると考えられる。

AtBGlu42 のグリコシド特異性について考察する。AtBGlu42 は β -グルコシドだけでなく、D-フコシドやガラクトシドなどの β -グリコシドにも活性を示した (Table 2-4)。特に pNP D-Fuc は pNP Glc と同程度の良い基質であった。pNP Gal, pNP Man および pNP Xyl の k_{cat}/K_m は非常に低かった (Table 2-4)。pNP Gal では K_m が高く、pNP Man では k_{cat} が低く、pNP Xyl ではこれら両方であった。このことから、pNP Glc との反応と比較して、pNP Gal と pNP Xyl ではミカエリス複合体と遷移状態の不安定化、pNP Man では遷移状態の不安定化が生じ、特に、pNP Xyl では pNP Gal よりも遷移状態の不安定化の程度が大きいと考えられた。 β -マンノシドのアキシシャル位の 2-O は、AtBGlu42 の活性部位において遷移状態の安定化に適さないと考えられた。GH1 酵素では、グルコシドの遷移状態は立体配座 4H_3 と 4E の中間の構造を、マンノシドの遷移状態は $B_{2,5}$ をとるとされている (Tankrathok *et al.* 2015)。AtBGlu42 では、マンノシドの遷移状態の安定化に寄与する構造を持たないと考えられた。このグリコン特異性に関わる構造については本論文第 3 章にて述べる。

AtBGlu42 のラミナリオリゴ糖二糖特異性について考察する。AtBGlu42 は各種グルコオリゴ糖にも作用した。試験した二糖の中で最も高い k_{cat}/K_m を示す基質は Lam₂ であった。ラミナリオリゴ糖 (重合度 2-4) の中で Lam₂ が最も良い基質であった。ラミナリオリゴ糖の中で二糖に最も高い活性を示すことは、植物 β -グルコシダーゼでしばしば確認される (Opassiri *et al.* 2004; Seshadri *et al.* 2009; Opassiri *et al.* 2010; Rouyi *et al.* 2014)。Os3BGlu7-Lam₂ 複合体の結晶構造において、Lam₂ の還元末端のグルコシル基は、セロオリゴ糖の対応するグルコシル基と同様の位置でサブサイト +1 に結合する。しかし、サブサイト+1 の Trp358 に面するグルコシル基の面が異なり、Lam₂ では α 面が、セロオリゴ糖では β 面が Trp358 に面している (Figure 2-8e; Chuenchor *et al.* 2011)。このため、セロオリゴ糖では、サブサイト+1 のグルコシル基 1-O が、サブサイト+2 のグルコシル基と結合できるのに対し、Lam₂ の 1-O は Asn245 と水素結合する位置にあり、三糖以上のラミナリオリゴ糖の結合が許容されないと考えられた。AtBGlu42 でも、Os3BGlu7-Lam₂ 複合体の構造と同様

の結合が予想された (Figure 2-8b). 重ね合わせ構造において, Os3BGlu7-Lam₂由来の Lam₂のサブサイト+1のグルコシル基が AtBGlu42の Trp360と α 面で結合し, 1-Oが Asp244と水素結合する位置にある (Figure 2-8b). 三糖以上のラミナリオリゴ糖の結合では, サブサイト+1のグルコシル基はこのような結合をとれず, これとは異なる結合様式をとる必要があり, サブサイト+1の親和力は低くなると予想される. このサブサイト+1におけるグルコシル基の結合様式が, ラミナリオリゴ糖の二糖特異性の主因であると考えられる. AtBGlu13および AtBGlu15が Lam₃特異性を示すことが, 菅原により報告されている (菅原修士論文, 2016). これらは Os3BGlu7の Asn245の位置に嵩の小さい Glyを持つことから, サブサイト+1のグルコシル基 1-Oにサブサイト+2のグルコシル基が結合できると考えられる.

次に, AtBGlu42のセロオリゴ糖三糖特異性について考察する. セロオリゴ糖三糖特異性は, 主に Arg342側鎖の立体障害により, サブサイト+3での結合阻害を主因とすると考えられた. 長鎖セロオリゴ糖特異性を示す Os3BGlu7の Cel₅複合体の構造 (Chuenchor *et al.* 2011)では, Tyr341がグルコシル基とスタッキング相互作用し, サブサイト+3を形成する (Figure 2-8c). この複合体構造に AtBGlu42を重ねると, Os3BGlu7の Tyr341に相当する Arg342の側鎖がサブサイト+3のグルコシル基結合空間を占有しており, 立体障害を起こすと考えられる (Figure 2-8d). Arg342変異酵素 R342Aと R342Yのサブサイト+3親和力の負から正への向上も, これを支持する (Table 2-6). 特に R342Yの親和力 (2.5 kJ mol^{-1})は Os3BGlu7の親和力 (2.2 kJ mol^{-1} ; Opassiri *et al.* 2004)と近く, Tyrへの置換により Os3BGlu7と同様の結合部位が形成された可能性は高い.

このように, AtBGlu42の Cel₃特異性の主因は Arg342と考えられるが, 該当する Argを持ちながら Cel₃特異性を示さない酵素もあり, GH1 β -グルコシダーゼのセロオリゴ糖の鎖長特異性の予測には慎重な検討が必要である. 例外の1つ目として, イネ由来 Os1BGlu4をあげる. Os1BGlu4は, AtBGlu42と配列同一性64%を示す. AtBGlu42の Arg342に対応する Arg334を有するが, Cel₃よりも Cel₄に1.9倍高い k_{cat}/K_m を示し, セロオリゴ糖の中で最も Cel₄を好む (Rouyi *et al.* 2014). Os1BGlu4が三糖特異性を示さないのは, Arg334側鎖の向きが異なるためと推定された. すなわち, Arg334が近傍の Glu336 (AtBGlu42の Val344に相当; Figure 2-10a)との相互作用により異なる

配向となり、サブサイト+3における立体障害にならないと考えられた。2例目として、メタゲノム由来β-グルコシダーゼ Td2F2 をあげる。Td2F2 は AtBGlu42 と配列同一性 41%を示す。

AtBGlu42 の Arg342 に対応する残基として Arg313 を有するが、Cel₃ よりも Cel₄ に 1.5 倍高い k_{cat}/K_m を示す (Uchiyama *et al.* 2013; Matsuzawa *et al.* 2016)。両酵素の Arg はいずれも(β/α)₈-バレルのβ→αループ6(L6)上にある。このループはL5とともにサブドメインを形成している。L5上にはβ5′、α5′が、L6上にはβ6′、β6″があり、β5′、β6′、β6″による3本ストランド逆並行シートが形成されている。このサブドメイン構造は、AtBGlu42–Td2F2間で良く一致する。このβ6″のC末端にArgが位置する (Figure 2-10ab; Matsuzawa *et al.* 2016)。しかし、基質 (Os3BGlu7–Cel₅複合体構造に由来する Cel₅) に対して、両酵素の Arg 側鎖の位置関係が異なる。その理由の一つは、Arg 周辺残基との相互作用が異なることである (Figure 2-10ab)。AtBGlu42 の Arg342 は、L5 の Glu246 と塩橋を形成する位置にある (Figure 2-10a)。Td2F2 では、Glu246 との対応残基が Thr225 であり塩橋はなく、Arg313 は β6′ の N 末端側の Arg297 の主鎖カルボニル酸素と相互作用する配向をとる。これにより、Arg313 側鎖はサブサイト+3 から遠ざかるように位置している (Figure 2-10b)。この位置はグルコシル基 6-O とは近いもののセロオリゴ糖の結合を大きく阻害することはない位置にある。もう一つの理由は、(β/α)₈-バレル構造における小ドメインの位置の違いである。AtBGlu42 と Td2F2 の重ね合わせ構造において、(β/α)₈-バレルを構成する β5、α5、β6 および α6 の位置は良く一致するのに対し、両酵素の小ドメインの位置は少し異なり、AtBGlu42 の小ドメインは、Td2F2 のものと比べて α6 に近い位置にある (Figure 2-10c)。AtBGlu42 と Td2F2 の重ね合わせ構造において、Arg342 および Arg313 の Cα 間の距離は 2.9 Å、α5′ の N 末端に位置する Pro255 と Pro234 の Cα 間の距離は 7.0 Å とずれている。両酵素の小ドメインは、それぞれの位置で周囲の構造と相互作用により安定化されている (Figure 2-10de)。Td2F2 では、3つの塩橋があり、α5–α5′、α5′–α6 および α5–α5″ (α5 の C 末端にある α-ヘリックス) に観察される (それぞれ Asp244–Arg249, Asp244–Arg338 および Arg249–Asp263 間を結ぶ; Figure 2-10e)。AtBGlu42 では、これらの塩橋はなく、小ドメインと α6 間に Trp247, Ile265, Lys370 および Tyr374 からなる疎水性コアが形成される (Figure 2-10d)。また、α5′–α5 間をつなぐループ上の残基に相違が見られた。Td2F2 では Asn248 が

$\beta 5'$ - $\beta 5$ 間ループ上の Thr225 の主鎖と水素結合形成距離にあるのに対し, AtBGlu42 では該当残基 Leu269 が $\beta 5$ 上の Val243, $\alpha 5$ 上の Leu273, $\alpha 6$ 上の Met375 と疎水性コアを形成する (Figure 2-10f). 主にこれらの構造の違いにより, 異なる位置にあるそれぞれの小ドメインが安定化し, Arg 側鎖の位置が異なると考えられた.

GH1 酵素の小ドメインの位置について述べる. 第 1 章で述べた構造既知の 75 種の GH1のうち, 2 種の非酵素タンパク質 (PDB entry, 5W21 および 5VAK) と 1 種の人工酵素 (6Z1H) を除いた 72 種と AtBGlu42 の構造を比較した. これらの構造は, 小ドメインの位置に基づき 3 グループに分類される. すなわち, AtBGlu42 の Pro255 と Td2F2 の Pro234 の C α 原子と, 各構造の相当残基の C α 原子間の距離 (それぞれ D_{AtBGlu42} および D_{Td2F2}) に基づき, 小ドメインの位置が AtBGlu42 に近い構造 ($D_{\text{Td2F2}} / D_{\text{AtBGlu42}} \geq 1.8$; AtBGlu42 型), Td2F2 に近い構造 ($D_{\text{Td2F2}} / D_{\text{AtBGlu42}} \leq 0.6$; Td2F2 型) および中間的な構造 ($0.6 < D_{\text{Td2F2}} / D_{\text{AtBGlu42}} < 1.8$; 中間型; 1DWA など) に分類した (Figure 2-11, 2-12). AtBGlu42 型の酵素は 37 種であり, このうち半数は小ドメインと $\alpha 6$ 間の疎水性コア形成に関与する Trp247 の位置に Trp, Tyr, Phe など, Ile265 の位置に Leu, Met, Ile など, Leu269 の位置に Leu, Ile など, Tyr374 の位置に Tyr, Trp, Ileなどを有し, 残基に多様性を示しながらも疎水性コアの形成に寄与する残基を持っていた (Figure 2-13a). Td2F2 型の酵素 24 種では, Td2F2 における小ドメインと $\alpha 6$ 間の塩橋形成に寄与する Asp244, Arg249, Asp263 および Arg338 がそれぞれ 18 種, 18 種, 11 種, 14 種で保存され, $\alpha 5'$ と $\alpha 5$ 間のループ上の Asn248 は 23 種で保存されていた (Figure 2-13b). これらの残基は AtBGlu42 型ではほとんど保存されておらず, 代わりに Td2F2 の Asn248 および Arg249 に対応する残基 (それぞれ AtBGlu42 における Leu269 および Gly270) として, AtBGlu42 型酵素の多くはそれぞれ Leu や Ile, および Gly などを持っていた. これら残基の有無により小ドメインの位置をある程度予測できると考えられた. すなわち, AtBGlu42 の Trp247, Ile265, Leu269, Tyr374 の位置に疎水性残基があれば AtBGlu42 型, Td2F2 の Asp244, Arg249, Asp263 および Arg338 の位置に酸性残基あるいは塩基性残基があり, Asn248 の位置に Asn があれば Td2F2 型であると予想される. 以上より, AtBGlu42 の Arg342 に相当する Arg を持つ酵素のう

ち、小ドメインの位置が AtBGlu42 型であれば三糖セロオリゴ糖特異性を, Td2F2 型であれば四糖特異性を示すと考えられた.

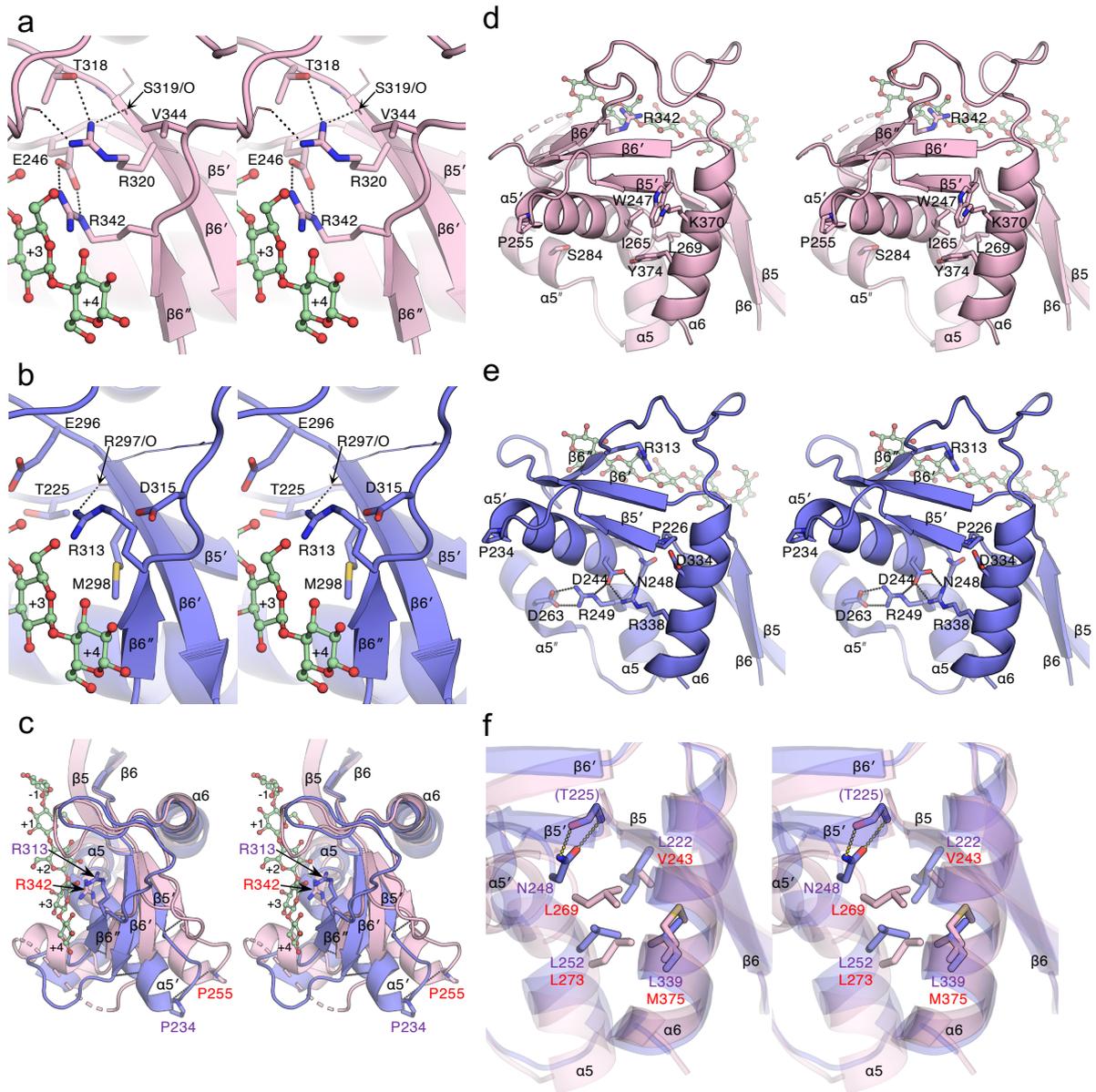


Figure 2-10. Comparison of the three-dimensional structures of AtBglu42 and Td2F2. (a) Arg342 and its surrounding structure of AtBglu42. The ligand is cellopentaose from the Os3Bglu7 complex (PDB entry, 3F5K; Chuenchor *et al.* 2011). (b) Corresponding Arg313 and structure of Td2F2 (PDB entry, 3WH5; Matsuzawa *et al.* 2016). (c) Superposition of the small domain structures of AtBglu42 (pink) and Td2F2 (purple). The small local domain composed of $\beta \rightarrow \alpha$ loops 5 and 6 containing β -sheet ($\beta 5'$, $\beta 6'$, and $\beta 6''$) is shown along with β -strands 5 and 6 and α -helices 5 and 6 of the $(\beta/\alpha)_8$ -barrel. (d) View of the same local structure of AtBglu42 from the right side. The hydrophobic core is observed between the small domain and $\alpha 6$. (e) The equivalent view of Td2F2. The hydrophobic core is not found, but possible salt-bridges between Asp244–Arg338 and Arg249–Asp263 are. (f) Superposition of the structures between small domain, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 5$, and $\beta 6$ of AtBglu42 (pink) and Td2F2 (purple).

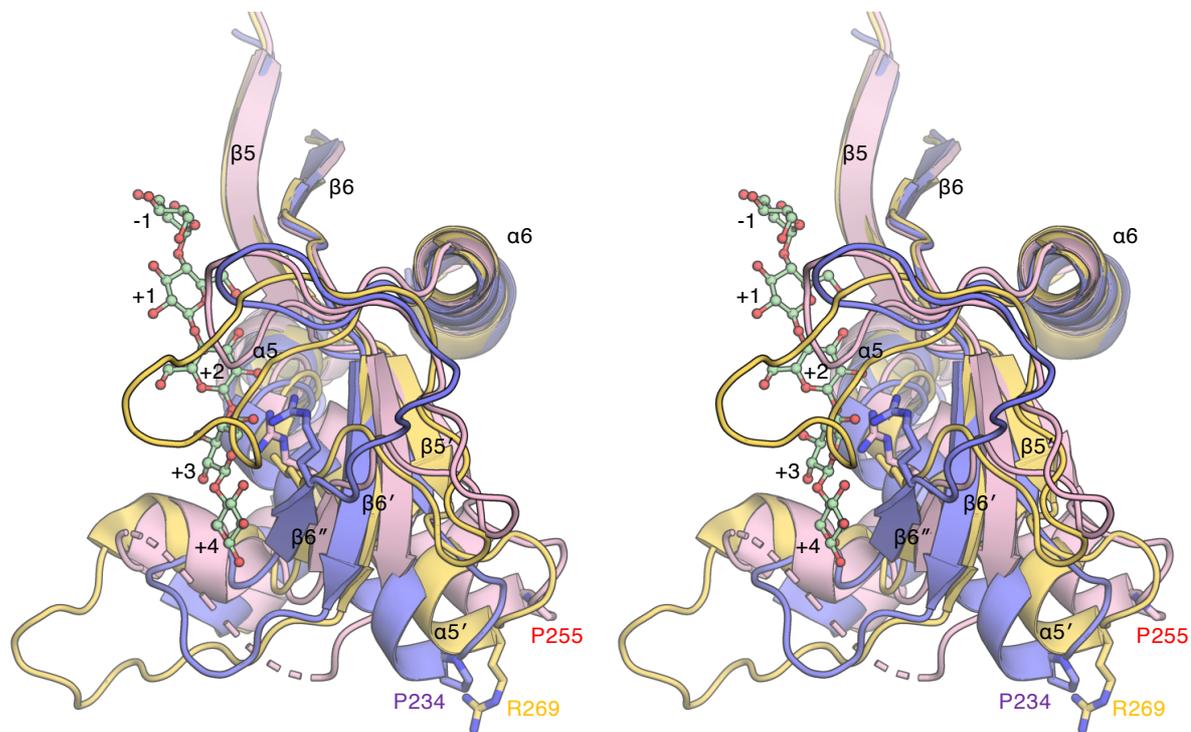
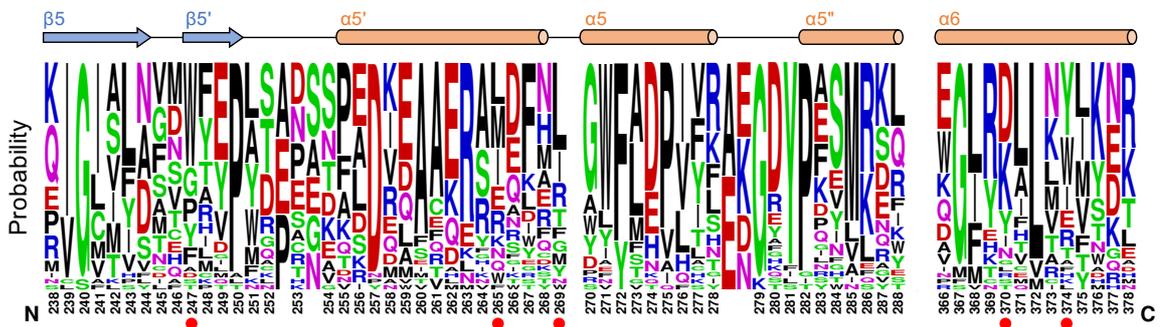
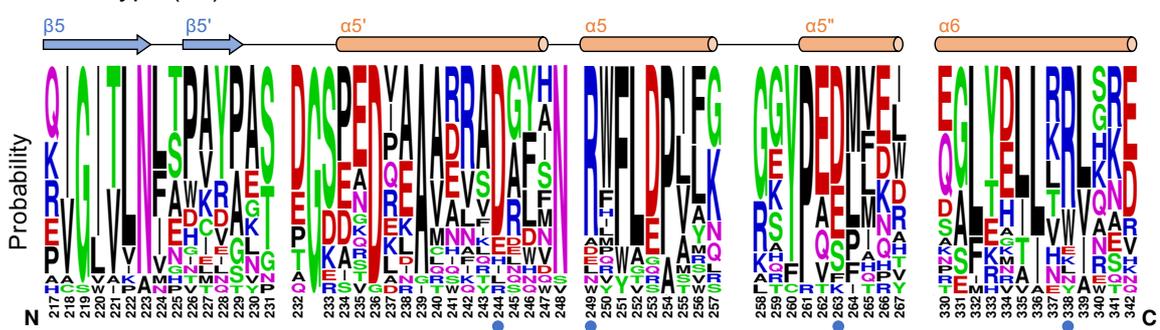


Figure 2-12. Comparison of the three-dimensional structures of AtBGluc42, Td2F2, and 1DWA. Superposition of the small domain structures of AtBGluc42 (pink), Td2F2 (purple), and 1DWA (myrosinase from *Sinapis alba*; yellow; Burmeister 2000). The small local domains composed of $\beta \rightarrow \alpha$ loops 5 and 6 containing β -sheet ($\beta 5'$, $\beta 6'$, and $\beta 6''$) and α -helix ($\alpha 5'$) are shown along with β -strands 5 and 6 and α -helices 5 and 6 of the $(\beta/\alpha)_8$ -barrel.

a. AtBGLu42 type (37)



b. Td2F2 type (24)



c. Intermediate type (12)

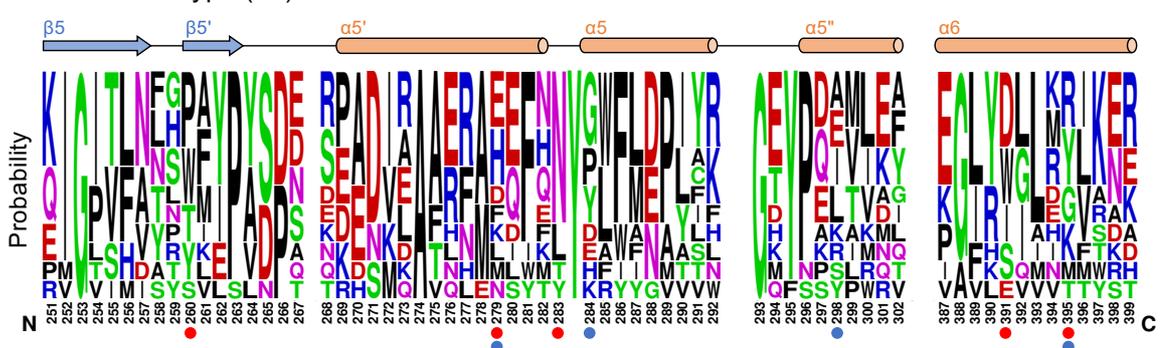


Figure 2-13. Sequence Logos for residues consisting of the small domain in the structure-known GH1 enzymes.

Sequence Logos of 37 sequences of the small domain of AtBGLu42-type enzymes (a), 24 sequences of the small domain of Td2F2-type enzymes (b), and 12 sequences of the small domain of intermediate-type enzymes (c). Residue numbers of AtBGLu42, Td2F2, and 1DWA (myrosinase from *Sinapis alba*) which is one of the intermediate type GH1 enzyme are shown at the bottom of the Sequence Logos of (a), (b), and (c), respectively. Red and blue circles represent the position of the residues involved in the formation of hydrophobic core between the small domain and $\alpha 6$ in AtBGLu42 and salt bridges between those in Td2F2, respectively. The logos were drawn with the weblogo facility (Crooks *et al.* 2004).

3 β -グルコシドおよび β -マンノシドに対する特異性を決定する分子機構

3.1 緒論

GH1 は主に β -グルコシダーゼにより構成される。しかし β -グルコシドに特異性を示す β -グルコシダーゼに加え β -D-フコシド、 β -ガラクトシド、および β -マンノシドに特異性を示す酵素もある。本章では、 β -マンノシドに特異性を示す β -マンノシダーゼに注目し、 β -グルコシダーゼとの異なる基質特異性を決定する分子構造に着目してこれを論じたい。

β -マンノシダーゼは β -マンノシドに作用し、 β -グルコシダーゼは β -グルコシドに作用するのだから、それぞれのグリコン結合部位 (サブサイト-1) はマンノシル基とグルコシル基の結合に適した構造をとると考えられる。しかし、実際には、第 1 章で述べたように、植物由来 β -マンノシダーゼのサブサイト-1 形成残基は GH1 酵素で広く共通のものであり、 β -グルコシダーゼのものと良く一致する。イネ由来 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 でもサブサイト-1 の残基は良く保存されている。しかし、Tankrathok ら (2015) は、 β -マンノシダーゼと基質アナログ (マンノイミダゾール) の複合体の X 線結晶構造および分子動力的解析結果に基づき、マンノシル基の遷移状態の配座が、 β -グルコシダーゼにおけるグルコシル基のものと異なることを提示した。Figure 3-1a に β -マンノシダーゼ Os7BGlu26-マンノイミダゾール複合体 (PDB entry, 4RE2) とイネ由来 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7-グルコイミダゾール複合体 (PDB entry, 7BZM; Nutho *et al.* 2020) の構造の重ね合わせを示す。マンノイミダゾールとグルコイミダゾールの化学構造をそれぞれ Figure 3-1b と 3-1c に示す。リガンドの糖を模した部分の 4-C, 5-C などは両方で良く一致しているが、リガンドの 1-C と特に 2-C および 3-O の位置が異なっている。これはリガンドのグルコース相当部分が 4H_3 と 4E の中間的な構造であるのに対し、 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 ではリガンドのマンノース相当部分が $B_{2,5}$ 配座であることによる。立体配座の違いにより両方で 2-C の位置は異なるが 2-O は良く一致して求核触媒残基 Glu と結合可能な位置にある。また 3-O の位置は大きく異なるがいずれでも $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 3 (L3) 上の His と結合可能である。ただし、これら 2 残基 (β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 の Glu389 と His133) の配置は両酵素間でわずかに異なることを Tankrathok ら

(2015) は指摘している。これら残基のわずかな配置の違いが β -マンノシドと β -グルコシドに対する特異性の違いに寄与すると推定される。

本章では、GH1 酵素の β -グルコシド/ β -マンノシド特異性に寄与する構造を明らかにすることを目的とした。 β -マンノシダーゼとしてシロイヌナズナ由来 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 (Xu *et al.* 2004) を、 β -グルコシダーゼとして Os3BGlu7 を用いた。 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26、 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 および β -グルコシダーゼ AtBGlu42 (第 2 章) の既知構造の比較に基づき、上述の 2 残基の配置に寄与する残基を推定して、部位特異的変異を導入し、両基質特異性の変換について解析した。

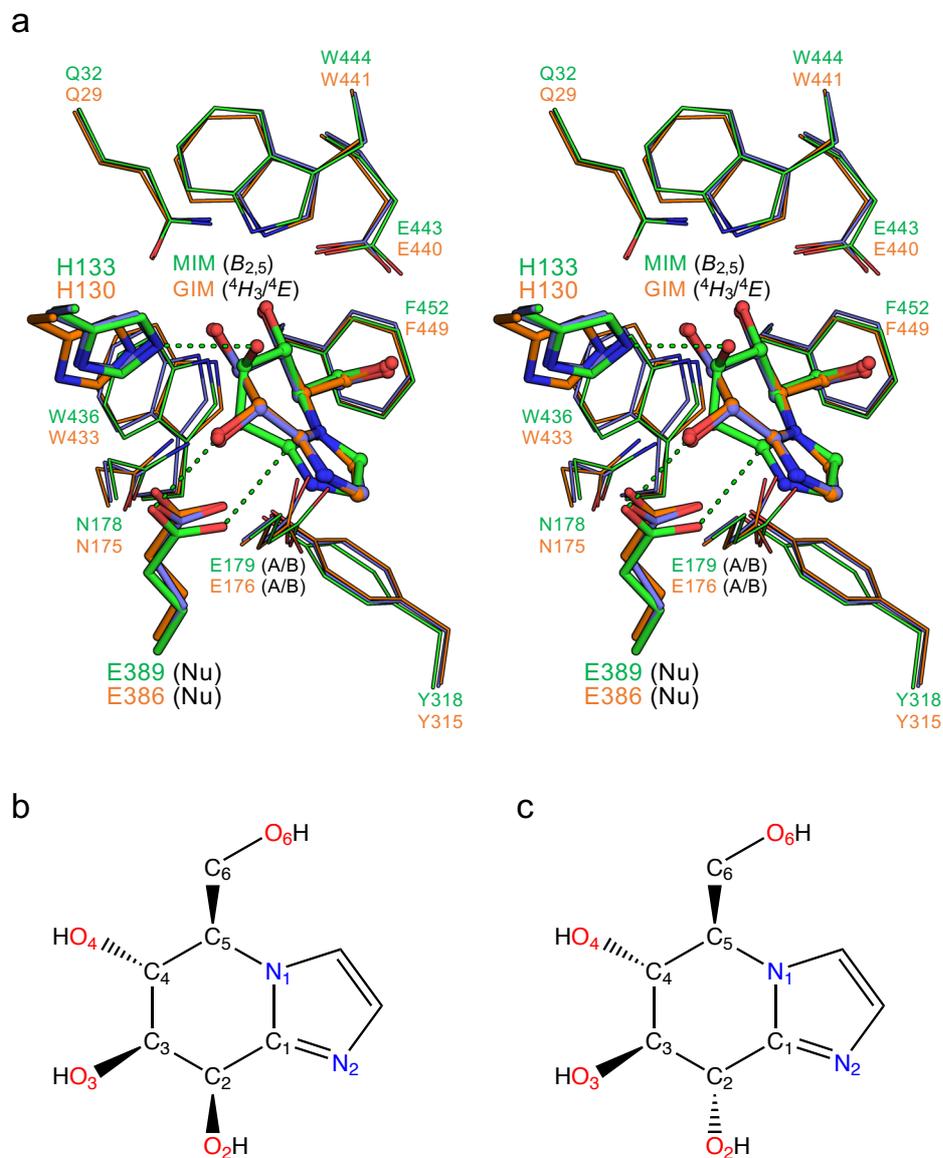


Figure 3-1. (a) Comparison of the subsite -1 of GH1 β -mannosidase Os7BGlu26 and β -glucosidase Os3BGlu7. Residues forming subsite -1 and ligands are shown in superimposed structures Os7BGlu26-mannoimidazole (MIM, green, 4RE2, Tankrathok *et al.* 2015), Os7BGlu26-glucoimidazole (GIM, purple, 4RE3, Tankrathok *et al.* 2015) and Os3BGlu7-glucoimidazole (GIM, orange, 7BZM, Nutho *et al.* 2020). Chemical structures of (b) mannoimidazole and (c) glucoimidazole. The atomic labels used for this study are also given.

3.2 実験材料および方法

3.2.1 基質

β -D-マンノピラノシル (1 \rightarrow 4)-D-グルコース (Man β 1-4Glc) および β -(1 \rightarrow 4)-マンノピオース (Man₂) は、それぞれ川原の方法 (川原修士論文, 2012) および日野の方法 (日野修士論文, 2018) にしたがって、本研究室で調製したものを使用した。その他は市販試薬を使用した。

3.2.2 β -マンノシダーゼと β -グルコシダーゼの立体構造比較

構造既知の β -マンノシダーゼとして Os7BGlu26 を、 β -グルコシダーゼとして Os3BGlu7 および AtBGlu42 を用いた。構造の重ね合わせには、PyMOL ver. 2.1 を用いた。Os7BGlu26 と Os3BGlu7 の重ね合わせでは、まず、それぞれのグルコイミダゾールの複合体構造 (Os7BGlu26-グルコイミダゾール, PDB entry 4RE3, Tankrathok *et al.* 2015; Os3BGlu7-グルコイミダゾール, PDB entry 7BZM, Nutho *et al.* 2020) において、リガンドとサブサイト-1 形成残基の一部を重ね合わせた。すなわち、グルコイミダゾールを構成する 1-C, 2-C, 4-C, 5-C および一般酸塩基触媒残基 Glu (Os7BGlu26, Glu179; Os3BGlu7, Glu176) の C δ , 4-O と 6-O と水素結合を形成する Glu (Os7BGlu26, Glu443; Os3BGlu7, Glu440) の C δ の計 6 原子を pair fitting コマンドにより重ね合わせた (RMSD = 0.108 Å)。次に、Os7BGlu26-マンノイミダゾール複合体構造 (PDB entry, 4RE2; Tankrathok *et al.* 2015) を Os7BGlu26-グルコイミダゾール複合体構造に、align コマンドにより重ね合わせた。すなわち、Os7BGlu26 の全 478 アミノ酸残基のうち、452 アミノ酸残基の C α を重ね合わせた (RMSD = 0.149 Å)。

β -グルコシダーゼ AtBGlu42 はリガンドフリー構造しか解析されていないため、 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 と重ね合わせた。重ね合わせでは、サブサイト-1 を構成する残基のうち、リガンドの 4-O と 6-O 周辺 3 残基の側鎖の原子 (L1-Gln (C δ), L8-Glu (C δ), L8-Phe (C ζ)), および一般酸塩基触媒 Glu の C δ の計 4 原子を pair fitting コマンドにより重ね合わせた (RMSD = 0.476 Å)。

3.2.3 GH1 β -マンノシダーゼと β -グルコシダーゼの多重配列比較と分子系統樹解析

GH1 β -マンノシダーゼおよび β -グルコシダーゼの配列解析を行った。植物由来 β -マンノシダーゼでは、イネ由来 Os7BGlu26 (Kuntothom *et al.* 2009), シロイヌナズナ由来 AtBGlu44 (Xu *et al.* 2004), オオムギ由来 HvBII (Hrmova *et al.* 1998), およびトマト由来 LeMise2 (Mo and Bewley 2002) の配列を用いた。MAFFT version 7 (Strategy, Auto; Katoh *et al.* 2019) を用いて多重配列比較を行った。近隣接合法を用いて分子系統樹を構築した。系統樹を iTOL version 6 を用いて作成した (Letunic and Bork 2021; <https://itol.embl.de/>)。

3.2.4 組換え AtBGlu44 および Os3BGlu7 の発現プラスミドの構築

チオレドキシシンおよび His₆-タグを含む pET-32a 由来の 131 残基 (2.2.4 項参照) を、推定シグナルペプチド 23 残基を除いた AtBGlu44 の 24 残基目の Glu (Glu1 とする) の N 末端側に付加した組換え酵素の発現プラスミドを調製した。推定シグナルペプチドの予測に、SignalP 5.0 サーバー (Almagro Armenteros *et al.* 2019) を用いた。2.2.4 項にしたがい、AtBGlu44 (AT3G18080.1) の cDNA を Primestar GXL DNA polymerase を用いた PCR により増幅した。鋳型に 2.2.3 項で調製したシロイヌナズナの cDNA を、プライマーに AtBG44_cDNA_Fw および AtBG44_cDNA_Rv を用いた。使用したプライマーの配列を Table 3-1 に示す。この増幅断片を鋳型とし、プライマーに AtBG44_pET32_IF_Fw および AtBG44_pET32_IF_Rv (Table 3-1) を用いて、Primestar HS DNA polymerase を用いた PCR により再度増幅した。2.2.4 項にしたがって、増幅 DNA 断片のアガロースゲル電気泳動による分離と抽出の後、pET-32a に挿入した。

チオレドキシシンおよび His₆-タグを含む pET-32a 由来の 131 残基 (2.2.4 項参照) を、推定シグナルペプチド 28 残基を除いた Os3BGlu7 の 29 残基目の Val (Val1 とする) の N 末端側に付加した組換え酵素の発現プラスミドを調製した。2.2.4 項にしたがい、Primestar HS DNA polymerase を用いた PCR により、Os3BGlu7 コード領域の両端に pET-32a との相同領域を付加した。鋳型に pET32-BGlu1 (竹松修士論文, 2014; 本学大学院農学院 生物有機化学研究室) を、プライマーに BGlu1_pET32_IF_Fw および BGlu1_pET32_IF_Rv (Table 3-1) を用いて増幅したものを、上記と同

様に pET-32a に挿入した。鋳型に用いた pET32-BGlu1 は、竹松が Os3BGlu7 コード領域 (Os03g0703000) を制限酵素 *EcoRV* および *EcoRI* を用いて pET-32a に挿入して調製された。

2.2.4 項にしたがい、AtBGlu44 および Os3BGlu7 変異酵素各種の発現プラスミドの調製および各組換え酵素コード領域と隣接部の塩基配列の解析を行った。使用したプライマーの配列を Table 3-1 に示す。

3.2.5 組換え AtBGlu44 および Os3BGlu7 の生産と精製

N 末端にチオレドキシニンおよび His₆-タグを付加した AtBGlu44, Os3BGlu7 および変異酵素各種を 2.2.5 項にしたがって調製した。精製標品を使用まで 4°C で保存した。タンパク質濃度を 2.2.7 項にしたがって定量した。各種精製標品の比吸光係数 $E_{1\text{ cm}, 280\text{ nm}}^{1\%}$ は、AtBGlu44 野生型 18.4, AtBGlu44 N133T 18.5, AtBGlu44 L250S 18.2, AtBGlu44 L250V 20.2, AtBGlu44 L394I 18.9, AtBGlu44 S395T 19.0, AtBGlu44 N133T/L250S 18.7, AtBGlu44 L394I/S395T 19.4, AtBGlu44 N133T/L250S/L394I/S395T 20.2, AtBGlu44 L250V/L394I/S395T 20.0, Os3BGlu7 野生型 19.3, Os3BGlu7 V241L 17.4, Os3BGlu7 I384L 19.9, Os3BGlu7 T385S 19.2, Os3BGlu7 I385L/T385S 19.1, Os3BGlu7 V241L/I384L/T385S 20.3 であった。

3.2.6 活性測定および基質特異性の解析

各酵素の pNP Man, pNP Glc, メチル β-D-マンノピラノシド (メチル Man; Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada), メチル Glc, Man₂, Manβ1-4Glc および Cel₂ に対する反応速度を、以下の方法で測定した。酵素, 基質, 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (AtBGlu44, pH 5.5; Os3BGlu7, pH 5.0) および 0.2 mg mL⁻¹ BSA を含む反応液 50 μL を 30°C に保持した。酵素濃度, 基質濃度および反応時間を Table 3-2 に示す。pNP Man および pNP Glc に対する反応では, 2 M Na₂CO₃ 25 μL を加えて反応を停止し, 2.2.8 項にしたがって生成 pNP を定量した。メチル Glc および Cel₂ に対する反応では, 4 M トリス HCl 緩衝液 (pH 7.0) 25 μL を加えて反応を停止し, 2.2.10 項にしたがって生成 D-グルコースを定量した。メチル Man, Man₂ および Manβ1-4Glc に対する反応では, 反応液を

80°C に 5 分間保持して反応を停止し、遠心分離 (13,000×g, 4°C, 5 分間) 後の上清 45 μL を得た。メチル Man および Man₂ に対する反応では、生成 D-マンノースを F-Kit D-Glucose/D-Fructose (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) およびマンノース-6-リン酸イソメラーゼ (大腸菌由来; Fukui *et al.* 2021) を用いて定量した。すなわち、上清 45 μL に F-Kit D-Glucose/D-Fructose の溶液 I 25 μL, 溶液 II 0.5 μL, 溶液 III 0.5 μL および 300 U mL⁻¹ マンノース-6-リン酸イソメラーゼ 0.1 μL を添加し、30°C に 30 分間保持した後、A₃₄₀ を測定した。D-マンノースの標準曲線には反応液 45 μL に代えて 0–0.2 mM D-マンノース (富士フィルム和光純薬) 水溶液を用いた。Manβ1-4Glc に対する反応液では、生成 D-グルコースを F-Kit D-Glucose/D-Fructose を用いて定量した。すなわち、上清 45 μL に溶液 I 25 μL および溶液 II 0.5 μL を添加し、30°C に 30 分間保持した後、A₃₄₀ を測定した。D-グルコースの標準曲線には反応液 45 μL に代えて 0–0.2 mM D-グルコース水溶液 45 μL を用いた。

反応速度の基質濃度依存性の解析では、ミカエリス-メンテン式の速度パラメーターを、s-v プロットの非線形回帰分析を用いて決定した。非線形回帰分析は 2.2.10 項にしたがい Grafit ver. 7.0.2 を用いた。求めた K_m が試験した基質濃度よりも大きかった基質では、求めた k_{cat} および K_m の値を用いて算出した k_{cat}/K_m のみを記した。

Table 3-1. Primers used for preparation of recombinant AtBGlu44 and Os3BGlu7, and their mutants.

Primer name	Sequence (5' to 3')	Orientation	Purpose
AtBG44_cDNA_Fw	CCAAACGGTCAAACCTCACT	sense	Preparation of AtBGlu44 expression plasmid
AtBG44_cDNA_Rv	AACATAATCCACCCGGCATT	antisense	Preparation of AtBGlu44 expression plasmid
AtBG44_pET32_IF_Fw	GTGCCACGGGTTCTGAATCCCTCTCTGTCCGCAGA	sense	Preparation of AtBGlu44 expression plasmid
AtBG44_pET32_IF_Rv	CGCAAGCTTGTGACTCATTTTGTGTTCGTTTCA	antisense	Preparation of AtBGlu44 expression plasmid
BGlul_pET32_IF_Fw	GTGCCACGGGTTCTGTGCCAAGCCCAACTGGCT	sense	Preparation of Os3BGlu7 expression plasmid
BGlul_pET32_IF_Rv	CGCAAGCTTGTGACTCAGTGTCTTAGCATGTCCC	antisense	Preparation of Os3BGlu7 expression plasmid
AtBG44_N133T_PSM_Fw	TATGCTACCCGTACCACACTACGATCTT	sense	Preparation of AtBGlu44 N133T expression plasmid
AtBG44_N133T_PSM_Rv	GTACAGGGTAGCATAAGGTGTAATCCC	antisense	Preparation of AtBGlu44 N133T expression plasmid
AtBG44_L250S_PSM_Fw	GGGATAAGCTTAGATTTCGTTTGGTAT	sense	Preparation of AtBGlu44 L250S expression plasmid
AtBG44_L250S_PSM_Rv	ATCTAAGCTTATCCCAACCCTCCCTT	antisense	Preparation of AtBGlu44 L250S expression plasmid
AtBG44_L250V_PSM_Fw	GGGATAGTGTAGATTTCGTTTGGTATG	sense	Preparation of AtBGlu44 L250V expression plasmid
AtBG44_L250V_PSM_Rv	ATCTAACACTATCCCAACCCTCCCTTTTG	antisense	Preparation of AtBGlu44 L250V expression plasmid
AtBG44_L394I_PSM_Fw	ATGATCATTTCTGAAAACCGGTATGGAT	sense	Preparation of AtBGlu44 L394I expression plasmid
AtBG44_L394I_PSM_Rv	TTCAGAAAATGATCATAGTAGGGTTGCC	antisense	Preparation of AtBGlu44 L394I expression plasmid
AtBG44_S395T_PSM_Fw	ATCCTCACCGAAAACCGGTATGGATGAC	sense	Preparation of AtBGlu44 S395T expression plasmid
AtBG44_S395T_PSM_Rv	GTTTTCCGGTGAAGATCATAGTAGGGTTGCC	antisense	Preparation of AtBGlu44 S395T expression plasmid
AtBG44_LS394IT_PSM_F	ATGATCATTACCAGAAAACCGGTATGGATGAC	sense	Preparation of AtBGlu44 L394I/S395T expression plasmid
AtBG44_LS394IT_PSM_R	GTTTTCCGGTAAATGATCATAGTAGGGTTGCC	antisense	Preparation of AtBGlu44 L394I/S395T expression plasmid
BGlul_V241L_PSM_Fw	GGAACTACTGCTGGACTTCAAATGGTAT	sense	Preparation of Os3BGlu7 V241L expression plasmid
BGlul_V241L_PSM_Rv	GTCCAGCAGTATCCCAACTTTGGCCTTG	antisense	Preparation of Os3BGlu7 V241L expression plasmid
BGlul_I384L_PSM_Fw	GTCCGTCCTGACTGAAAACCGGAATGGAT	sense	Preparation of Os3BGlu7 I384L expression plasmid
BGlul_I384L_PSM_Rv	TTCAGTCAGGACGACTGTCGGATTCCC	antisense	Preparation of Os3BGlu7 I384L expression plasmid
BGlul_T385S_PSM_Fw	GTCATAAAGCGAAAACCGGAATGGATCAA	sense	Preparation of Os3BGlu7 T385S expression plasmid
BGlul_T385S_PSM_Rv	GTTTTCCGCTTATGACGACTGTCCGGATT	antisense	Preparation of Os3BGlu7 T385S expression plasmid
BGlul_IT384LS_PSM_Fw	GTCCGTCCTGAGCGAAAACCGGAATGGATCAA	sense	Preparation of Os3BGlu7 I384L/T385S expression plasmid
BGlul_IT384LS_PSM_Rv	GTTTTCCGCTCAGGACGACTGTCGGATTCCC	antisense	Preparation of Os3BGlu7 I384L/T385S expression plasmid
T7_promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	sense	Sequence analysis
pET32_trx	TCAGTTGAAAAGAGTTCCTCG	sense	Sequence analysis
AtBG44_seq	TGTACCACACTACGATCTTCCA	sense	Sequence analysis
BGlul_seq	GGTTGAAATGCAAAAATGGCG	sense	Sequence analysis
T7_terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	antisense	Sequence analysis

Table 3-2. Concentrations of substrates and enzymes, and reaction time for measurement of kinetic parameters for the reaction with each substrate in AtBGlu44, Os3BGlu7, and their variants.

(a) AtBGlu44 wild type

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	5.99	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	47.9	10
Methyl Man	2, 4, 6, 8, 12, 16	2880	60
Methyl Glc	2, 4, 6, 8, 12, 16	2880	60
Man ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	57.5	10
Man β 1-4Glc	1, 2, 3, 4, 6, 8	288	10
Cel ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	57.5	10

(b) AtBGlu44 N133T

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	38.8	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	62.1	10

(c) AtBGlu44 L250S

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	121	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	121	10

(d) AtBGlu44 L250V

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	13.1	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	13.1	10
Methyl Man	2, 4, 6, 8, 12, 16	5250	60
Methyl Glc	2, 4, 6, 8, 12, 16	5250	10
Man ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	131	20
Man β 1-4Glc	1, 2, 3, 4, 6, 8	525	20
Cel ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	5.25	20

(e) AtBGlu44 L394I

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	7.85	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	47.1	10

(f) AtBGlu44 S395T

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	4.35	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	34.8	10

(g) AtBGlu44 N133T/L250S

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	104	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	34.6	10

(h) AtBGlu44 L394I/S395T

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	4.33	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	21.7	10

(i) AtBGlu44 N133T/L250S/L394I/S395T

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	72.0	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	7.20	10

(j) AtBGlu44 L250V/L394I/S395T

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	18.4	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	9.22	10
Methyl Man	2, 4, 6, 8, 12, 16	3690	60
Methyl Glc	2, 4, 6, 8, 12, 16	3690	10
Man ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	369	20
Man β 1-4Glc	1, 2, 3, 4, 6, 8	1850	20
Cel ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	3.69	20

(k) Os3BGlu7 wild type

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6	67.5	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.843	10
Methyl Man	2, 4, 6, 8, 12, 16	6750	60
Methyl Glc	2, 4, 6, 8, 12, 16	843	10
Man ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	6750	35
Man β 1-4Glc	1, 2, 3, 4, 6, 8	6750	60
Cel ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	67.5	10

(l) Os3BGlu7 V241L

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.6, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.5, 3.0	10.1	10
pNP Glc	0.0125, 0.01875, 0.025, 0.0375, 0.05	5.05	10
Methyl Man	2, 4, 6, 8, 12, 16	4040	60
Methyl Glc	2, 4, 6, 8, 12, 16	4040	30
Man ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	4040	20
Man β 1-4Glc	1, 2, 3, 4, 6, 8	4040	20
Cel ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	1010	20

(m) Os3BGlu7 I384L

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6	48.9	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.612	10

(n) Os3BGlu7 T385S

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6	52.0	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.650	10

(o) Os3BGlu7 I384L/T385S

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6	22.5	10
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	1.12	10

(p) Os3BGlu7 V241L/I384L/T385S

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Man	0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6	15.3	10
pNP Glc	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4	15.3	10
Methyl Man	2, 4, 6, 8, 12, 16	7010	60
Methyl Glc	2, 4, 6, 8, 12, 16	7010	30
Man ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	7010	20
Man β 1-4Glc	1, 2, 3, 4, 6, 8	7010	20
Cel ₂	1, 2, 3, 4, 6, 8	1750	20

3.3 結果

3.3.1 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 と β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 の変異酵素の設計

β -マンノシダーゼにおいて 3-O と相互作用する L3 上の His および求核触媒残基 Glu の位置の微調整を担う構造として、これら残基の周辺に存在するセカンドシェル残基に着目した。既知の立体構造として、 β -マンノシダーゼには Os7BGlu26 (β -マンノシダーゼ AtBGlu44 との配列同一性は 68%)、 β -グルコシダーゼには Os3BGlu7 および β -グルコシダーゼ AtBGlu42 の構造を用い、セカンドシェル残基の構造を比較した (Figure 3-2)。 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 は β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 と配列同一性 65%、 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 と 64%を示し、構造既知酵素の中で植物 β -マンノシダーゼに最も近縁な β -グルコシダーゼである (Figure 3-3)。また、 β -グルコシダーゼ AtBGlu42 は β -マンノシダーゼ AtBGlu44 と配列同一性 48%を示し、立体構造が既知の β -グルコシダーゼのうち、Os3BGlu7 について β -マンノシダーゼに近縁な β -グルコシダーゼである (Figure 3-3)。グリコシル基の 3-O と相互作用する His について、 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 の His133 は β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 の His130 よりも、マンノイミダゾールの 3-O に近く、水素結合可能な距離 (2.9 Å) に位置する (Figure 3-1, 3-4)。His133 の近傍には、 β 2 上の Arg89 および β 3 上の Asn130 がある。これら 3 残基は側鎖間で相互作用する位置にある (Figure 3-2, 3-4; Arg89 (N η 1)–His133 (N δ), 3.8 Å; Asn130 (N δ)–His133 (C β), 3.7 Å; Arg89 (N η 1)–Asn130 (N δ), 4.3 Å)。Os3BGlu7 および AtBGlu42 でも対応残基 (それぞれ Arg86 と Asn127, Arg92 と Thr134) が同様の位置にあるが、 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 の相当残基とは側鎖の配向が少し異なる。 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 の Arg89 相当残基は古細菌 β -マンノシダーゼを除くほぼ全ての GH1 酵素で Arg として保存されるが、Asn130 相当残基は植物 β -マンノシダーゼと一部の β -グルコシダーゼのみで Asn であり、AtBGlu42 をはじめ多くの β -グルコシダーゼでは Thr である (Figure 3-3)。これら Arg89 および Asn130 に近接する残基として、Os7BGlu26 では β 5 上の Leu244 がある (Figure 3-2, 3-4; Leu244 (C δ 1)–Arg89 (N η 1), 3.5 Å; Leu244 (C δ 1)–Asn130 (N δ), 4.2 Å)。この Leu は植物 β -マンノシダーゼにのみ保存される。 β -グルコシダーゼでは、相当残基は Ala や Thr など嵩の小さな残基が多い (Figure 3-3)。Os3BGlu7 では Val241, AtBGlu42 では Ser242 である (Figure 3-2, 3-4)。 β -マンノ

シダーゼ Os7BGlu26 では, Leu244 の嵩高い側鎖により, Arg89 と Asn130 が Leu244 に離れて配置され, これに伴い His133 がマンノシル残基の 3-O と水素結合しやすい位置に配置されると推定された。

求核触媒残基 Glu は $\beta 7$ の C 末端近くにあり, リガンドの 1-C および 2-O 近傍に位置する (Figure 3-1). 緒論で述べた通り, β -マンノシダーゼと β -グルコシダーゼでは, リガンドの 1-C の位置が完全には一致せず, 求核触媒残基 Glu の位置にも違いが認められる. この触媒残基のずれは, Glu 残基の側鎖の配向の違いではなく, 主鎖構造のずれに依る (Figure 3-2). 求核触媒残基 Glu が位置する $\beta 7$ の主鎖構造にずれが生じている. すなわち, 触媒残基とその N 末端側 2 残基の計 3 残基の主鎖構造が, β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 では β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 および AtBGlu42 と比較して, $(\beta/\alpha)_8$ -バレルを構成する $\alpha 6$ 側にやや寄っている. 該当 3 残基は, β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 では Leu387-Ser388-Glu389, β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 では Ile384-Thr385-Glu386, AtBGlu42 では Ile386-Thr387-Glu388 である. β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 の Leu387-Ser388 は植物 β -マンノシダーゼで良く保存されている (Figure 3-3). β -マンノシダーゼ AtBGlu44 では Leu394-Ser395 が該当する. 一方, β -グルコシダーゼでは, Ile-Thr や Val-Thr が良く保存されている.

以上の通り, β -マンノシダーゼと β -グルコシダーゼ間の基質特異性に寄与する可能性があるリガント 3-O と相互作用する His ならびに求核触媒残基 Glu の 2 残基の位置の差異に関し, これを生み出すセカンドシェル の 4 残基候補を Table 3-3 にまとめる. 変異導入の親酵素を β -マンノシダーゼ AtBGlu44 および β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 とし, 4 残基の相互置換体を作成した.

3.3.2 組換え AtBGlu44 および Os3BGlu7 の調製

β -マンノシダーゼ AtBGlu44 および β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 の野生型酵素および変異酵素として, AtBGlu44 の Glu1 および Os3BGlu7 の Val1 の N 末端に pET-32a 由来するチオレドキシソーム および His₆-タグを含む 131 残基を付加したタンパク質を調製した. 生産には大腸菌 Origami B(DE3)組換え体を用い, 無細胞抽出液から Ni-アフィニティカラムクロマトグラフィーにより精

製した。各形質転換体 1.0 L の培養から調製された精製標品のタンパク質量は以下の通りであった。AtBGlu44 野生型 5.70 mg, N133T 14.2 mg, L250S 8.30 mg, L250V 7.87 mg, L394I 10.4 mg, S395T 3.07 mg, N133T/L250S 11.3 mg, L394I/S395T 5.35 mg, N133T/L250S/L394I/S395T 17.8 mg, L250V/L394I/S395T 5.53 mg, Os3BGlu7 野生型 11.5 mg, V241L 6.54 mg, I384L 10.6 mg, T385S 8.87 mg, I384L/T385S 5.36 mg, V241L/I384L/T385S 6.70 mg であった。いずれの酵素標品も SDS-PAGE により単一のタンパク質バンドを示した (Figure 3-5)。分子質量は各種 AtBGlu44 では 67 kDa, 各種 Os3BGlu7 では 63 kDa であり、アミノ酸配列から計算される分子質量それぞれ 70,464–70,517 Da および 68,206–68,235 Da と概ね一致した (Figure 3-5)。各酵素の 2 mM pNP Glc に対する比活性は以下の通りであった。AtBGlu44 野生型 0.627 U mg^{-1} , N133T 0.339 U mg^{-1} , L250S 0.202 U mg^{-1} , L250V 4.17 U mg^{-1} , L394I 1.14 U mg^{-1} , S395T 0.605 U mg^{-1} , N133T/L250S 0.693 U mg^{-1} , L394I/S395T 1.39 U mg^{-1} , N133T/L250S/L394I/S395T 2.83 U mg^{-1} , L250V/L394I/S395T 7.16 U mg^{-1} , Os3BGlu7 野生型 32.2 U mg^{-1} , V241L 0.595 U mg^{-1} , I384L 20.1 U mg^{-1} , T385S 35.6 U mg^{-1} , I384L/T385S 22.2 U mg^{-1} , V241L/I384L/T385S 0.313 U mg^{-1} であった。

3.3.3 野生型 AtBGlu44 および Os3BGlu7 の基質特異性

AtBGlu44 および Os3BGlu7 の各種マンノシドおよびグルコシドに対する速度パラメーターを測定した (Table 3-4)。AtBGlu44 の pNP Man に対する $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ は $21.8 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ であり, pNP Glc に対する値 ($1.97 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) の 11 倍であった。一方, メチル配糖体 (メチル Glc およびメチル Man) および二糖 (Cel₂ および Man β 1-4Glc) に対しては, グルコシドに対する $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ がマンノシドよりも高く, それぞれ 1.7 および 8.3 倍であった。すなわち, AtBGlu44 のマンノシド/グルコシド選択性について, pNP 配糖体ではマンノシドに選択性が, メチル配糖体や二糖ではグルコシド選択性が高かった。一方, Os3BGlu7 の $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 比は, 試験したいずれの基質でもマンノシドに対してグルコシドの 0.0031–0.013 の値であり, グルコシド選択性が示された。また, 二糖の $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ に基づきサブサイト+1 での基質特異性を評価した。AtBGlu44 では Man₂ の $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ が Man β 1-4Glc よりも 2.4 倍高い一方, Os3BGlu7 では Man₂ の $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ が Man β 1-4Glc の 57% の値であった。すなわち,

サブサイト+1 では, AtBGlu44 はマンノシル基に, Os3BGlu7 はグルコシル基に高い選択性を示した。

3.3.4 AtBGlu44 変異酵素の pNP グリコシド特異性

β -マンノシダーゼ AtBGlu44 のセカンドシエル残基変異酵素のグリコシド特異性を解析した (Table 3-5)。まず, 3 残基を β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 型に置換した 3 重変異酵素 L250V/L394I/S395T について述べる。本変異酵素の k_{cat}/K_m は, pNP Man では $4.81 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 22%), pNP Glc では $12.1 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 6.1 倍) であった。すなわち, 3 残基変異によって pNP Man 特異性は低下, pNP Glc 特異性が大きく増加し, k_{cat}/K_m 比 (pNP Man の k_{cat}/K_m / pNP Glc の k_{cat}/K_m) が 0.40 となる程に pNP Glc への特異性が上回った。pNP Man に対する k_{cat} は 5.63 s^{-1} (野生型比 1.6 倍) と微増し, K_m は 1.17 mM (野生型比 7.1 倍) とより増加した。pNP Glc に対する k_{cat} は 11.8 s^{-1} (野生型比 14 倍) と大きく増加し, K_m も 0.976 mM (野生型比 2.3 倍) と増加した。

4 残基を β -グルコシダーゼ AtBGlu42 型に置換した 4 重変異酵素 N133T/L250S/L394I/S395T についてである。 k_{cat}/K_m は, pNP Man では $1.21 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 5.6%), pNP Glc では $6.48 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 3.3 倍) であった。すなわち, 4 残基の AtBGlu42 型への変異により, pNP Man 特異性は低下, pNP Glc 特異性が大きく増加し, k_{cat}/K_m 比が 0.19 となる程に pNP Glc への特異性が上回った。pNP Man に対する k_{cat} は 0.793 s^{-1} (野生型比 22%) と低下し, K_m は 0.654 mM (野生型比 4.0 倍) と増加した。pNP Glc に対する k_{cat} は 4.60 s^{-1} (野生型比 5.5 倍) と増加し, K_m も 0.710 mM (野生型比 1.7 倍) と増加した。pNP Man に対する k_{cat} は, 値が微増した前述の Os3BGlu7 型への 3 重置換酵素と異なり, 大きく低下した。

AtBGlu42 型への変異を 2 残基に限定した 2 重変異酵素 N133T/L250S の k_{cat}/K_m は, pNP Man では $0.763 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 3.5%) と大きく低下したが, pNP Glc では $1.74 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ であり野生型と同程度であった。すなわち, 主に pNP Man への特異性の低下により, k_{cat}/K_m 比が 0.44 となる程度に pNP Glc への特異性が上回った。pNP Man に対する k_{cat} は 0.273 s^{-1} (野生型比 7.6%) と大きく低下し, K_m は 0.358 mM (野生型比 2.2 倍) と増加した。pNP Glc に対する k_{cat} は 1.06 s^{-1} (野生型

比 1.3 倍) と増加し, K_m も 0.610 mM (野生型比 1.4 倍) と増加した. pNP Man に対する k_{cat} の低下は, 前述の 4 重変異酵素と同様だった.

置換を Os3BGlu7 型と AtBGlu42 型に共通する 2 残基に限定した 2 重変異酵素 L394I/S395T の k_{cat}/K_m は, pNP Man では $24.1 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ と野生型と同等であったが, pNP Glc では $3.62 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型の 1.8 倍) へと増大した. すなわち, 主に pNP Glc の特異性の増加により, pNP Glc よりも pNP Man に高い k_{cat}/K_m を示しながらも, その比は野生型酵素の 11 から 6.7 に低下した.

1 残基に限定した変異酵素 5 種 N133T, L250V, L250S, L394I および S395T は, いずれも pNP Glc よりも pNP Man に高い k_{cat}/K_m を示した. S395T は両基質に対して野生型と同程度の反応定数を示したが, これ以外の 4 酵素は pNP Man の優先性 (特異性, 選択性) の低下を示した. すなわち, pNP Glc よりも pNP Man に高い k_{cat}/K_m を示しながらも, その比は野生型酵素の 11 から, N133T の 3.2, L250V の 1.3, L250S の 1.6, L394I の 6.9 へと低下した. これらの低下は, 主に pNP Man に対する k_{cat}/K_m の低下による (L250S, 3.9% – L394I, 67%). pNP Glc に対する k_{cat}/K_m は, L250S での対野生型比 27%が最低値で, N133T では 69%, L394I と S395T がそれぞれ 107%, 118%, L250V では大きく増加し 373%であった. L250V では, pNP Man に対する k_{cat} と K_m はそれぞれ 10.3 s^{-1} (野生型比 2.9 倍), 1.07 mM (野生型比 6.5 倍) と増加し, pNP Glc に対する k_{cat} と K_m もそれぞれ 5.63 s^{-1} (野生型比 6.7 倍), 0.768 mM (野生型比 1.8 倍) と増加した. これに対して, L250S では, pNP Man に対する k_{cat} と K_m はそれぞれ 0.152 s^{-1} (野生型比 4.3%) と大きく低下, 0.181 mM (野生型比 1.1 倍) と微増し, pNP Glc に対する k_{cat} と K_m もそれぞれ 0.359 s^{-1} (野生型比 43%) と低下, 0.674 mM (野生型比 1.6 倍) と増加した. すなわち, L250S は L250V とは異なる変化を示した.

3.3.5 Os3BGlu7 変異酵素の pNP グリコシド特異性

β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 のセカンドシエル残基変異酵素のグリコシド特異性を解析した (Table 3-5). まず, 3 残基を β -マンノシダーゼ AtBGlu44 型に置換した 3 重変異酵素 V241L/I384L/T385S について述べる. 本変異酵素の k_{cat}/K_m は, pNP Man では $6.46 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 5.0 倍), pNP Glc では $25.7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 13%) であった. すなわち, pNP Man よりも pNP

Glc に高い k_{cat}/K_m を示しながらも、その比 (pNP Man の k_{cat}/K_m / pNP Glc の k_{cat}/K_m) は野生型酵素の 0.0066 から、0.25 に大きく増加した。pNP Man に対する k_{cat} は 16.4 s^{-1} (野生型比 16 倍) と大きく増加し、 K_m も 2.54 mM (野生型比 3.2 倍) と増加した。pNP Glc に対する k_{cat} は 0.322 s^{-1} (野生型比 0.76%) と大きく低下し、 K_m も 0.0125 mM (野生型比 5.9%) と低下した。

置換を Ile384 および Thr385 に限定した 2 重変異酵素 I384L/T385S についてである。 k_{cat}/K_m は、pNP Man では $3.11 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 2.4 倍)、pNP Glc では $166 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 85%) であった。すなわち、pNP Man と pNP Glc の k_{cat}/K_m 比は、野生型酵素の 0.0066 から 0.019 に増加した。pNP Man に対する k_{cat} は 2.88 s^{-1} (野生型比 2.8 倍) と増加し、 K_m は 0.925 mM (野生型比 1.2 倍) と微増した。pNP Glc に対する k_{cat} は 28.1 s^{-1} (野生型比 66%) と低下し、 K_m も 0.169 mM (野生型比 80%) と低下した。

1 残基変異酵素 3 種 V241L, I384L および T385S は、いずれも pNP Man よりも pNP Glc に高い k_{cat}/K_m を示したが、pNP Man の優先性 (特異性, 選択性) の増加を示した。すなわち、pNP Man と pNP Glc の k_{cat}/K_m 比は、野生型酵素の 0.0066 から、V241L の 0.11, I384L の 0.0096, T385S の 0.0093 に増加した。これは、I384L および T385S では pNP Man に対する k_{cat}/K_m の増加のみに依り、V241L では pNP Man の k_{cat}/K_m の増加と pNP Glc の k_{cat}/K_m の低下に依る。すなわち、I384L および T385S の k_{cat}/K_m は、pNP Man ではそれぞれ $1.80 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 1.4 倍) および $1.91 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 1.5 倍) と増加し、pNP Glc ではそれぞれ $188 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ および $205 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ と野生型と同程度であった。これに対し、V241L の k_{cat}/K_m は、pNP Man では $4.43 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 3.4 倍) と増加、pNP Glc では $40.6 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 21%) と低下した。 k_{cat} と K_m の変化は V241L で顕著であった。pNP Man に対する k_{cat} は 10.2 s^{-1} (野生型比 10 倍) と大きく増加し、 K_m も 2.30 mM (野生型比 2.9 倍) と増加した。pNP Glc に対する k_{cat} は 0.588 s^{-1} (野生型比 1.4%) と大きく低下し、 K_m も 0.0145 mM (野生型比 6.8%) と低下した。

3.3.6 AtBGlu44 と Os3BGlu7 変異酵素のメチル配糖体および二糖に対するグリコシド特異性

pNP グリコシド選択性が大きく変化した AtBGlu44 変異酵素 L250V および L250V/L394/S395T, Os3BGlu7 変異酵素 V241L および V241L/I384L/T385S について, メチル配糖体 (メチル Man, メチル Glc) および β 1-4 二糖 (Man₂, Man β 1-4Glc, Cel₂) に対する基質特異性を評価した (Table 3-6, 3-7). pNP 配糖体に対する反応と同様に, AtBGlu44 変異酵素はマンノシド選択性の低下を, Os3BGlu7 変異酵素はマンノシド選択性の増加を示した. まず, AtBGlu44 変異酵素について述べる. AtBGlu44 変異酵素 L250V と L250V/L394/S395T の k_{cat}/K_m は, メチル Man ではそれぞれ $4.50 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 97%) と $2.40 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 52%) であり, メチル Glc ではそれぞれ $4.04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 5.2 倍) と $6.73 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 8.6 倍) であった. すなわち, 変異導入に伴いメチル Man 特異性は低下, メチル Glc 特異性は増加し, その k_{cat}/K_m 比 (メチル Man の k_{cat}/K_m / メチル Glc の k_{cat}/K_m) は野生型酵素の 0.59 に対して, L250V では 0.11, L250V/L394/S395T では 0.036 と低下した. また, 二糖でも同様の傾向が見られ, L250V と L250V/L394/S395T の k_{cat}/K_m は, Man β 1-4Glc ではそれぞれ $5.44 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 80%) と $1.77 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 26%) であり, Cel₂ ではそれぞれ $4.53 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 7.7 倍) と $6.16 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 11 倍) であった. すなわち, 変異導入に伴い Man β 1-4Glc 特異性は低下, Cel₂ 特異性は増加し, その k_{cat}/K_m 比 (Man β 1-4Glc の k_{cat}/K_m / Cel₂ の k_{cat}/K_m) は野生型酵素の 0.12 に対して, L250V では 0.012, L250V/L394/S395T では 0.0029 と低下した.

次に, Os3BGlu7 変異酵素についてである. Os3BGlu7 変異酵素 V241L と V241L/I384L/T385S の k_{cat}/K_m は, メチル Man ではそれぞれ $1.04 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 38%) と $0.886 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 33%) であり, メチル Glc ではそれぞれ $8.78 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 4.1%) と $2.96 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 1.4%) であった. すなわち, 変異導入に伴いメチル Man 特異性は低下したが, メチル Glc 特異性はより大きく低下し, その k_{cat}/K_m 比 (メチル Man の k_{cat}/K_m / メチル Glc の k_{cat}/K_m) は野生型酵素の 0.013 に対して, V241L では 0.12, V241L/I384L/T385S では 0.30 と増加した. また, 二糖における V241L と V241L/I384L/T385S の k_{cat}/K_m は, Man β 1-4Glc ではそれぞれ $1.89 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 3.3 倍) と $2.09 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 3.6 倍) であり, Cel₂ ではそれ

ぞれ $3.19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 1.7%) と $5.66 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 3.0%) であった。すなわち、変異導入によって Man β 1-4Glc 特異性は増加, Cel₂ 特異性は低下し, その $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 比 (Man β 1-4Glc の $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ / Cel₂ の $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) は野生型酵素の 0.0031 に対して, V241L では 0.59, V241L/I384L/T385S では 0.37 と増加した。

Table 3-3. The possible second-shell residues adjusting the position of glycone-binding residues.

Name	Activity	β -strand 3	β -strand 5	β -strand 7	β -strand 7
Os7BGlu26	β -mannosidase	Asn130	Leu244	Leu387	Ser388
Os3BGlu7*	β -glucosidase	Asn127	Val241	Ile384	Thr385
AtBGlu42	β -glucosidase	Thr134	Ser242	Ile386	Thr387
AtBGlu44*	β -mannosidase	Asn130	Leu250	Leu394	Ser395

*, the enzymes analyzed for site-directed mutagenesis in this study.

Table 3-4. Kinetic parameters of AtBGlu44 and Os3BGlu7 wild type.

Substrate	AtBGlu44				Os3BGlu7			
	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ratio (-fold)	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ratio (-fold)
pNP Man	3.57 ± 0.01	0.164 ± 0.001	21.8	11 ^a	1.02 ± 0.01	0.791 ± 0.008	1.29	0.0066 ^a
pNP Glc	0.841 ± 0.009	0.427 ± 0.008	1.97	1 ^a	42.5 ± 0.6	0.212 ± 0.009	196	1 ^a
Methyl Man	0.00164 ± 0.00000	3.54 ± 0.14	0.000463	0.59 ^b	N.D.	N.D.	0.000273	0.013 ^b
Methyl Glc	N.D.	N.D.	0.000781	1 ^b	N.D.	N.D.	0.0216	1 ^b
Man ₂	N.D.	N.D.	0.164		N.D.	N.D.	0.000332	
Man β 1-4Glc	N.D.	N.D.	0.0682	0.12 ^c	N.D.	N.D.	0.000579	0.0031 ^c
Cel ₂	1.35 ± 0.02	2.30 ± 0.08	0.587	1 ^c	N.D.	N.D.	0.186	1 ^c

Data are average \pm standard deviation for three independent experiments. a, Ratio of $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ to that for pNP Glc. b, Ratio of $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ to that for methyl Glc. c, Ratio of $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ to that for Cel₂. N.D., not determined due to high K_{m} .

Table 3-5. Kinetic parameters of AtBGluc44 and Os3BGluc7 mutant enzymes for pNP glycosides.

Enzyme	pNP Man				pNP Glc				$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ratio ^b (-fold)
	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ratio ^a (%)	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ratio ^a (%)	
AtBGluc44 wild type	3.57 ± 0.01	0.164 ± 0.001	21.8	100	0.841 ± 0.009	0.427 ± 0.008	1.97	100	11
L250V/L394I/S395T	5.63 ± 0.06	1.17 ± 0.01	4.81	22	11.8 ± 0.4	0.976 ± 0.052	12.1	614	0.40
N133T/L250S/L394I/S395T	0.793 ± 0.058	0.654 ± 0.078	1.21	5.6	4.60 ± 0.12	0.710 ± 0.021	6.48	328	0.19
N133T/L250S	0.273 ± 0.002	0.358 ± 0.010	0.763	3.5	1.06 ± 0.01	0.610 ± 0.010	1.74	88	0.44
L394I/S395T	4.98 ± 0.02	0.207 ± 0.003	24.1	111	2.05 ± 0.02	0.566 ± 0.013	3.62	184	6.7
N133T	0.416 ± 0.006	0.0948 ± 0.003	4.39	20	0.561 ± 0.003	0.412 ± 0.008	1.36	69	3.2
L250V	10.3 ± 0.2	1.07 ± 0.02	9.63	44	5.63 ± 0.05	0.768 ± 0.021	7.33	372	1.3
L250S	0.152 ± 0.001	0.181 ± 0.005	0.840	3.9	0.359 ± 0.003	0.674 ± 0.008	0.533	27	1.6
L394I	4.93 ± 0.07	0.339 ± 0.010	14.5	67	2.01 ± 0.05	0.951 ± 0.035	2.11	107	6.9
S395T	3.71 ± 0.01	0.130 ± 0.001	28.5	131	0.871 ± 0.005	0.374 ± 0.005	2.33	118	12
Os3BGluc7 wild type	1.02 ± 0.01	0.791 ± 0.008	1.29	100	41.5 ± 0.6	0.212 ± 0.009	196	100	0.0066
V241L/I384L/T385S	16.4 ± 0.1	2.54 ± 0.01	6.46	501	0.322 ± 0.002	0.0125 ± 0.0003	25.7	13	0.25
I384L/T385S	2.88 ± 0.07	0.925 ± 0.041	3.11	241	28.1 ± 0.1	0.169 ± 0.001	166	85	0.019
V241L	10.2 ± 0.2	2.30 ± 0.06	4.43	344	0.588 ± 0.046	0.0145 ± 0.0041	40.6	21	0.11
I384L	1.61 ± 0.03	0.896 ± 0.022	1.80	140	26.7 ± 0.3	0.142 ± 0.004	188	96	0.0096
T385S	1.88 ± 0.01	0.985 ± 0.021	1.91	148	51.5 ± 0.4	0.251 ± 0.005	205	105	0.0093
AtBGluc42 wild type	0.233 ± 0.014	0.290 ± 0.005	0.804		10.2 ± 0.0	0.142 ± 0.002	71.9		0.011

Data are average ± standard deviation for three independent experiments. a, Ratio of $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ to that of wild type. b, Ratio of $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ for pNP Man to that for pNP Glc.

Table 3-6. Kinetic parameters of AtBGlu44 and Os3BGlu7 mutant enzymes for methyl glycosides.

Enzyme	Methyl Man					Methyl Glc				
	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ratio ^a (%)	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ratio ^a (%)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ratio ^b (-fold)	
AtBGlu44	wild type	0.00164 ± 0.00000	3.54 ± 0.14	0.000463	100	N.D.	0.000781	100	0.59	
	L250V	N.D.	N.D.	0.000450	97	N.D.	0.00404	517	0.11	
	L250V/L394I/S395T	N.D.	N.D.	0.000240	51	N.D.	0.00673	862	0.036	
Os3BGlu7	wild type	N.D.	N.D.	0.000273	100	N.D.	0.0216	100	0.013	
	V241L	N.D.	N.D.	0.000104	38	13.9 ± 0.8	0.000878	4.1	0.12	
	V241L/I384L/T385S	N.D.	N.D.	0.000886	33	N.D.	0.000296	1.4	0.30	

Data are average ± standard deviation for three independent experiments. a, Ratio of $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ to that of wild type. b, Ratio of $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ for methyl Man to that for methyl Glc. N.D., not determined due to high K_{m} .

Table 3-7. Kinetic parameters of AtBGlu44 and Os3BGlu7 mutant enzymes for disaccharides.

Enzyme	Man ₂			Manβ1-4Glc			Cel ₂			
	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat}/K_m ratio ^a (%)	k_{cat}/K_m ratio ^a (%)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat}/K_m ratio ^a (%)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat}/K_m ratio ^a (%)	k_{cat}/K_m ratio ^b (-fold)
AtBGlu44	wild type	0.164	100	0.0682	100	1.35 ± 0.02	2.30 ± 0.08	0.587	100	0.12
	L250V	0.0715	44	0.0544	80	21.7 ± 0.1	4.79 ± 0.12	4.53	772	0.012
	L250V/L394I/S395T	0.0215	13	0.0177	26	33.9 ± 0.7	5.50 ± 0.20	6.16	1050	0.0029
Os3BGlu7	wild type	0.000332	100	0.000579	100	N.D.	N.D.	0.186	100	0.0031
	V241L	0.00105	316	0.00189	326	N.D.	N.D.	0.00319	1.7	0.59
	V241L/I384L/T385S	0.00107	322	0.00209	361	N.D.	N.D.	0.00566	3.0	0.37

Data are average ± standard deviation for three independent experiments. a, Ratio of k_{cat}/K_m to that of wild type. b, Ratio of k_{cat}/K_m for Manβ1-4Glc to that for Cel₂. N.D., not determined due to high K_m .

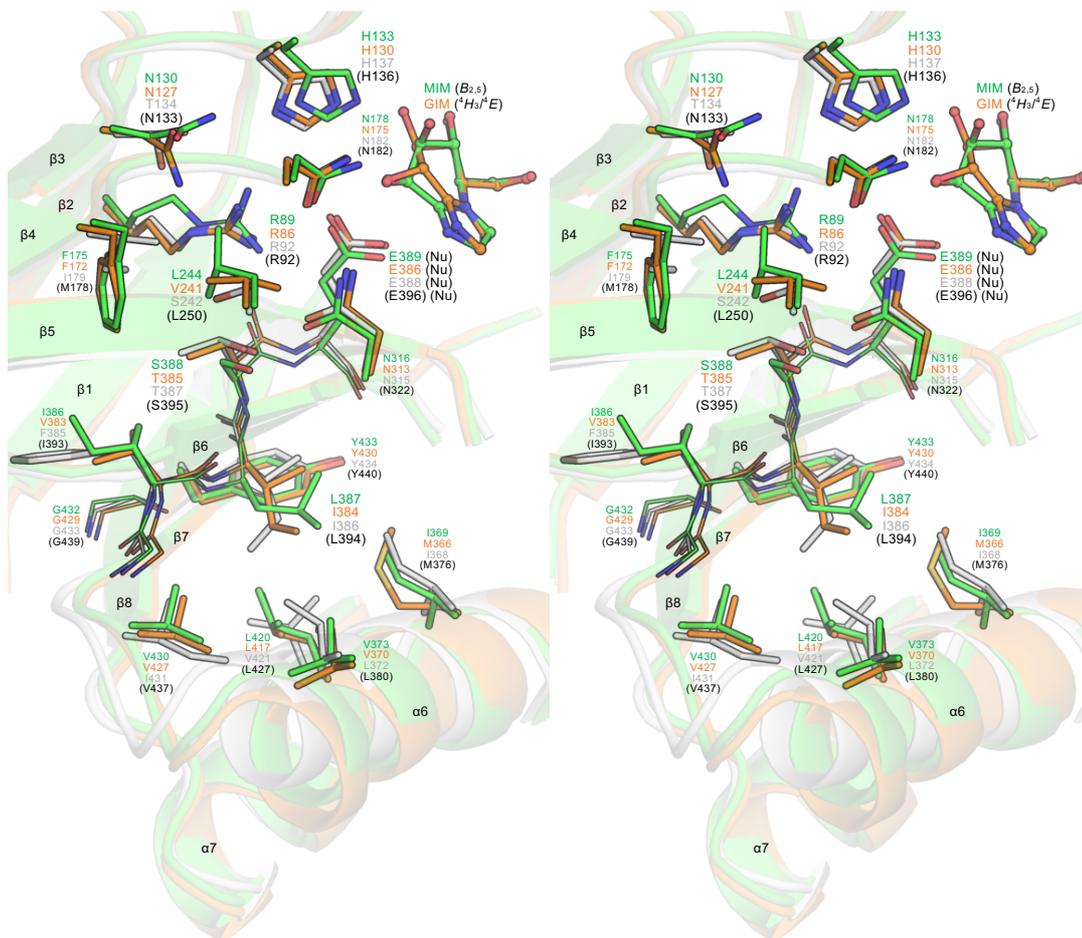


Figure 3-2. Comparison of the structures of GH1 β -mannosidase Os7BGlu26 and β -glucosidases Os3BGlu7 and AtBGlu42.

Subsite –1 residues including conserved His and Glu, residues surrounding them, and ligands (mannoimidazole and glucoimidazole) are shown. Green, Os7BGlu26-mannoimidazole. Orange, Os3BGlu7-glucoimidazole. Gray, AtBGlu42. Residue names in parentheses are of β -mannosidase AtBGlu44.

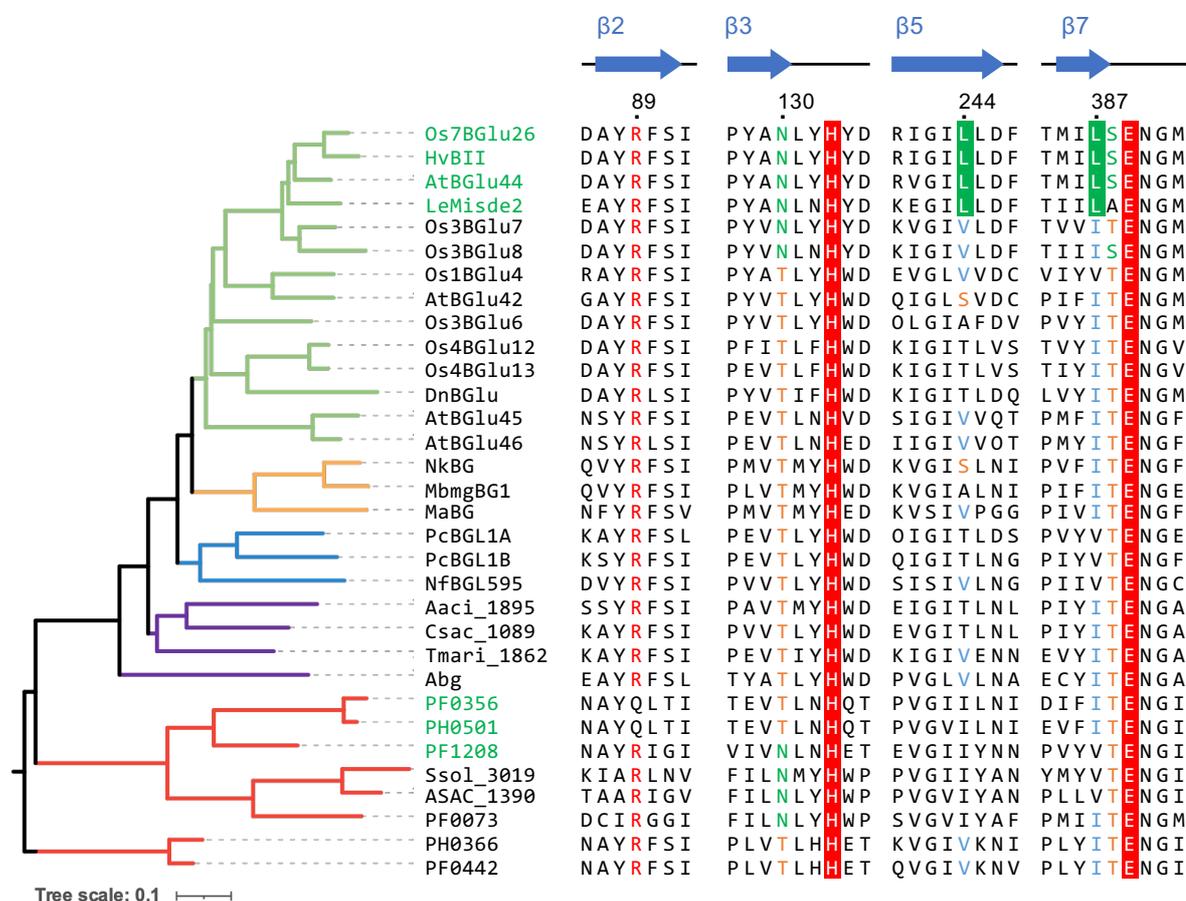


Figure 3-3. Phylogenetic tree and multiple sequence alignment of GH1 β -mannosidases and β -glucosidases.

The phylogenetic tree of GH1 protein from plants (green), animals (yellow), fungi (blue), bacteria (purple), and archaea (red) are shown. β -Mannosidase and β -glucosidase are shown in green and black, respectively. Substrate-binding and nucleophilic residues (His and Glu, respectively) at subsite -1 and Arg residue interacting with nucleophilic residue are highlighted in red, the residues conserved in plant β -mannosidases are colored in green, and the corresponding residues in β -glucosidase Os3BGlu7 and AtBGlu42 are colored in blue and orange, respectively. Secondary structures and residue numbers of Os7BGlu26 are depicted on the top. Multiple sequence alignment of GH1 enzymes was conducted using MAFFT version 7 (Strategy, Auto; Katoh *et al.* 2019).

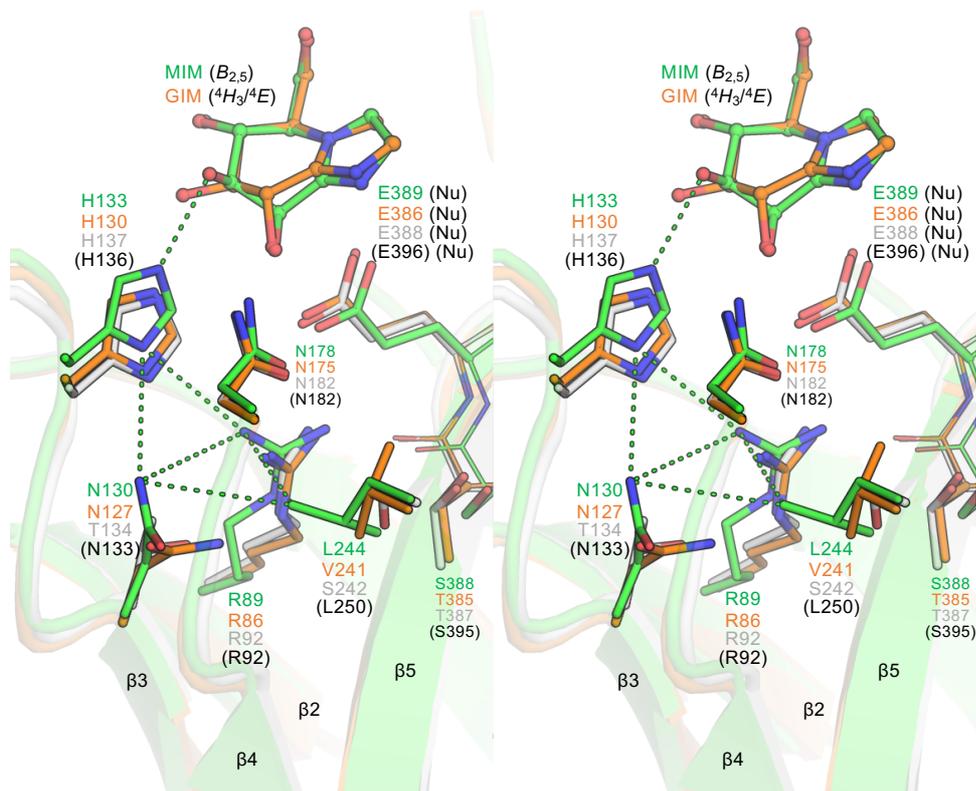


Figure 3-4. Comparison of the structure of GH1 β -mannosidase Os7BGlu26 and β -glucosidases Os3BGlu7 and AtBGlu42 around His residues forming subsite -1.

Structure around subsite - 1 residues His, residues surrounding them, and ligands mannoimidazole and glucoimidazole are shown. green, Os7BGlu26-mannoimidazole. orange, Os3BGlu7-glucoimidazole. gray, AtBGlu42. Residue names in parentheses are of β -mannosidase AtBGlu44.

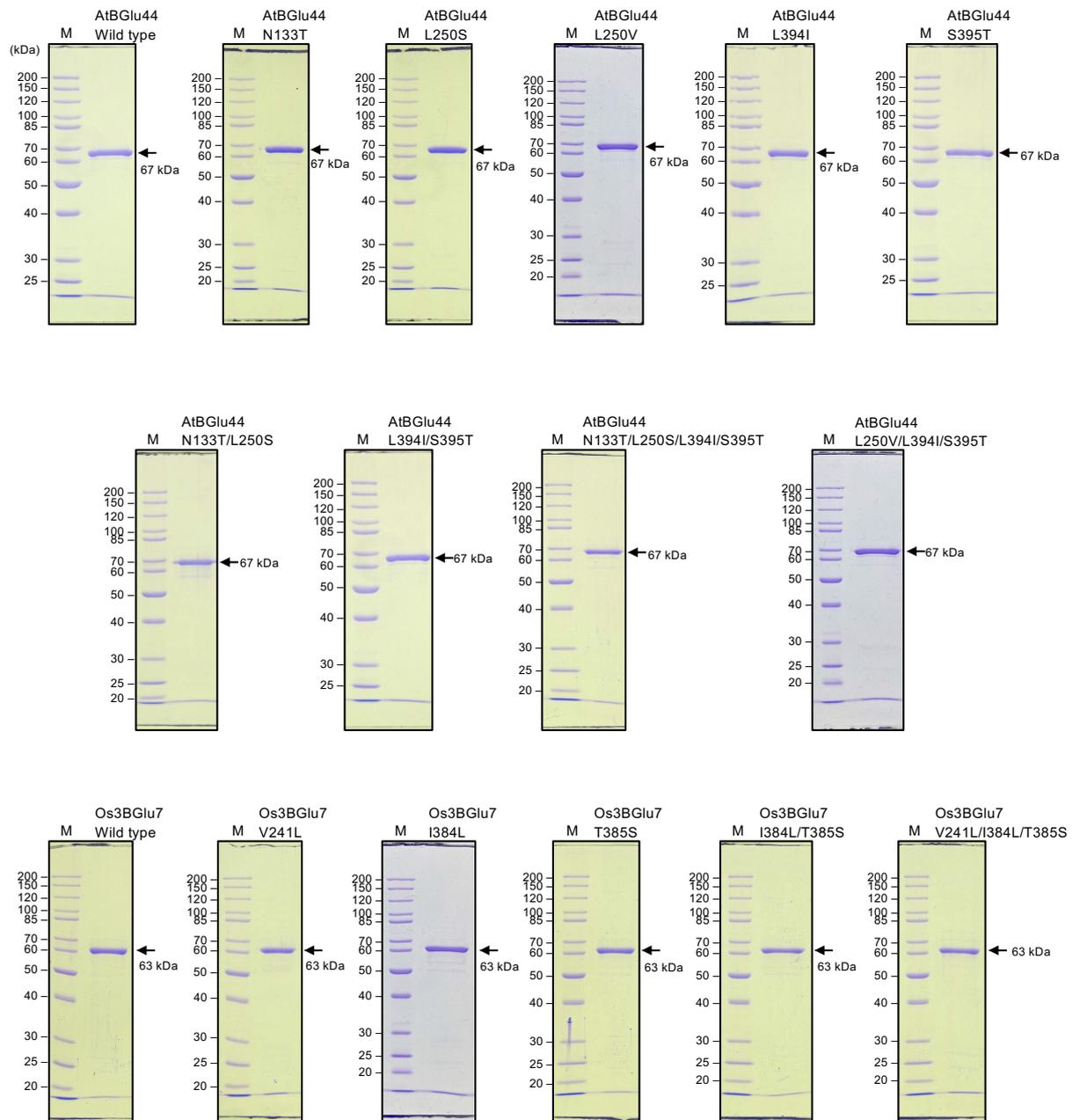


Figure 3-5. SDS-PAGE analysis of purified recombinant AtBGluc44, Os3BGlu7, and their variants. Lane M, protein size marker; the right lane, each purified recombinant enzyme (1 μ g). Protein was stained with CBB. Molecular masses of the standard proteins are shown on the left. Recombinant AtBGluc44 and its variants (67 kDa), and Os3BGlu7 and its variants (63 kDa) are indicated by an arrow.

3.4 考察

本章では、サブサイト-1 でグリコシル基の 3-O と相互作用する His および求核触媒残基 Glu のわずかな位置のずれが酵素の基質特異性に寄与するとの考えに基づき、これら周辺のエカンドシェル 4 残基の機能解析を行った。4 残基は β -マンノシダーゼ AtBGlu44 の Asn133, Leu250, Leu384 および Ser385 に該当する残基である。それぞれ β 3 (Asn133), β 5 (Leu250), β 7 (Leu384), および L7 (Ser385) にあり、ここでは各該当残基を β 3-Asn, β 5-Leu, β 7-Leu, L7-Ser などと呼ぶことにする。

これらが、 β 3 の C 末端側ループ (L3) にある His および β 7 の C 末端側ループ (L7) にある Glu の位置を制御することでマンノシドとグルコシドの選択性に寄与すると推定し、これら残基の変異体の解析を行った。本項では、各残基のグリコシド特異性等への寄与について考察する。

はじめに、これらの注目したセカンドシェル残基が L3-His の側鎖の配向に与える影響について考察する。まず、 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 の構造では、基質 3-O と結合する L3-His の周辺には、保存性の高い β 2-Arg (Os7BGlu26 の Arg89) および β 4-Asn (Os7BGlu26 の Asn178) とともに候補残基 β 3-Asn (Os7BGlu26 の Asn130) があり、これら 3 残基に隣接してもうひとつの候補残基 β 5-Leu (Os7BGlu26 の Leu244) が存在する (Figure 3-2, 3-4; Tankrathok *et al.* 2015)。 β 7-Leu と L7-Ser は遠い (Figure 3-2)。 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 における β 3-Asn \rightarrow Thr (β 3-N133T) と β 5-Leu \rightarrow Ser/Val (β 5-L250S/V) の改変は変異の一重・多重にかかわらず、マンノシド選択性を低下させた。pNP Man の k_{cat}/K_m は pNP Glc の値に対し、野生型では 11 倍のところ、0.19 倍 (4 重変異)–3.2 倍 (β 3-N133T) に大きく低下した。特に、 β 5-L250S 変異は pNP Man の k_{cat}/K_m 自体を大きく低下させ、単独変異でも β 3-N133T との 2 重変異でも野生型の 4%、4 候補残基の全変異でも 6%にまで低下させた。一方、 β 5-L250V 変異は、pNP Glc の k_{cat}/K_m を増大させ、単独でも 3 重変異でもグルコシドの k_{cat}/K_m が野生型の 3 倍以上になった。逆に、 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 の当該残基への変異導入 (β 5-V241L) では、pNP Man の k_{cat}/K_m が pNP Glc の値と比べて野生型では 0.0066 倍だったところ 0.11 倍に大幅に向上した。この現象は単純には、 β -マンノシダーゼの β 3-Asn と β 5-Leu を β -グルコシダーゼの該当残基に変えることによって、両酵素の構造間に見られた違い、すなわち β 2-Arg や β 3-Asn 相当の側鎖の配向が β -グルコシダーゼ様になり、これに伴い L3-His とグリ

コシドの 3-O との位置に変化が生じたためと解釈される。しかし、 β 5-Leu は L3-His に加えて、L7-Glu の位置にも影響している可能性がある。これについては後述する。

次に、セカンドシェル残基が L7 上の求核触媒残基 Glu の位置に与える影響について考察する。 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 と β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 間ではこの L7-Glu の位置がずれている (Tankrathok *et al.* 2015, Nutho *et al.* 2020)。これは側鎖の配向の違いではなく、L7- β 7 主鎖自体のずれによる (Figure 3-2. L7-Glu とその N 末端側 2 残基すなわち Os7BGlu26 の Leu387-Ser388-Glu389, Os3BGlu7 の Ile384-Thr385-Glu386 に注目する)。すなわち、 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 では該当の主鎖構造がサブサイト-1 側よりも、 $(\beta/\alpha)_8$ -バレルを構成する α_6 に近づく位置にあり、これにより L7-Glu (Glu389) がマンノイミダゾールの 1-C および 2-C に近づき過ぎず、求核触媒に適した位置に配置される。 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 の対応残基 β 7-Leu394, L7-Ser395 および β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 の β 7-Ile384, L7-Thr385 の相互変換酵素では、両酵素の k_{cat}/K_m 比 (pNP Man の値 / pNP Glc の値) は AtBGlu44 側では野生型の 11 に対して β 7-L394I では 6.9 に低下 (S395T では 12 で野生型とほぼ同じ)、Os3BGlu7 側では野生型の 0.0066 に対して β 7-I384L, T385S とともに単一変異で 0.01 近く、二重変異で 0.019 と上昇した。 k_{cat}/K_m の変動は、pNP Man では野生型の 67% までの低下 (AtBGlu44 の β 7-L394I) や 140–242% への増加 (Os3BGlu7 の β 7-I384L, L7-T385S, I384L/T385S) であるのに対し、pNP Glc では 107% (AtBGlu44 の β 7-L394I), 85–105% (Os3BGlu7 の β 7-I384L, L7-T385S, I384L/T385S) と変化の程度が小さく、すなわち当該残基の変異は pNP Man への影響が大きかった。前項の L3-His のセカンドシェル残基よりも効果は低い、 β 7-残基と L7-残基が pNP Man と pNP Glc の特異性に影響を与えることが確認された。 β 7 の残基の置換に伴う特異性の変化について考える。 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 の該当残基は Leu387-Ser388-(Glu389) である。 β 7-Leu387 は $(\beta/\alpha)_8$ -バレルの円柱状 β -シートの外側に位置し、 α_6 を向いている (Figure 3-2)。 β 7-Leu を Ile に置換すると α_6 などの周辺残基と衝突しづらくなるように思えるが、実際には C_α の位置を一致させて β 7-Leu387 を Ile にすると、 C_α - C_β 軸の角度に依らず $C_\gamma 1$ または $C_\gamma 2$ が周囲の 4 残基 (α 7-Leu420 (C_δ), β 8-Val430 (C_γ), β 8-Gly432 (C_O) および β 8-Tyr433 (C_δ)) のいずれかと 3.4 Å 以下の位置にあり、すなわち衝突する (Figure 3-6)。このことか

ら、 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 の $\beta 7$ -Leu394 の Ile 置換体では、少なくともこの衝突を避ける構造となっているはずであり、1つの可能性として該当残基が Ile である β -グルコシダーゼ Os7BGlu7 や AtBGlu42 のような構造 (Figure 3-2) となっていると想定できる。この場合、 $\beta 7$ のシフトにより求核触媒残基 Glu はマンノシドの 1-C に接近し過ぎて、マンノシドに対する活性は低下すると考えられる。改変酵素が示す特異性の変化は、これに矛盾しない。 β -グルコシダーゼでは、 $\beta 7$ -Leu に該当する残基は Val または Ile である (Figure 3-3)。いずれの残基でも C γ 1 と C γ 2 を有することから、この二つの C γ が主鎖構造の配置の制御を通してグルコシド選択性に寄与しているかもしれない。 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 の L7-S395T 変異はマンノシド選択性に影響しないが、 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 の相当残基 L7-T385S 変異は pNP Man の k_{cat}/K_m を 148% に増加させ、マンノシド選択性が増加したことから、限定的ではあるが、この L7-Ser がマンノシド選択性に寄与すると考えられた。 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 では対応残基は L7-Thr385 である。L7-Thr385 の C γ は、この 2 残基 N 末端側の $\beta 7$ -Val383 の C γ と近接する (3.8 Å, Figure 3-2, 3-7)。 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 では、この $\beta 7$ -Val383 (C γ) の位置に $\beta 7$ -Ile386 (C γ 2) がある。L7-Ser388 に代えて C β と O γ の位置を保持して Thr を導入すると、Thr の C γ が $\beta 7$ -Ile386 の C γ 2 と衝突する (3.0 Å)。このことから、L7-Ser および Thr の C γ の有無によってこの残基の C α の位置が影響を受ける可能性も考えられる。すなわち、 β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 では、該当残基は C γ のない L7-Ser388 であり、これは Ile386 (C γ 2) と衝突せず近接でき (Ile386 (C α)–Ser388 (C α), 5.2 Å)、これにより求核触媒残基 L7-Glu389 がリガンドから遠ざかる構造が安定化する (Figure 3-2, 3-7)。これに対して、 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 では、該当残基は C γ を持つ L7-Thr385 であり、これは $\beta 7$ -Val383 と接触があるため遠ざかり (Val383 (C α)–Thr385 (C α), 5.5 Å)、求核触媒残基 L7-Glu386 がリガンドに近づく構造が安定化すると考えられた (Figure 3-2, 3-7)。植物 β -マンノシダーゼはこれら L7-Ser および Thr の位置に Ser あるいはより嵩の小さな Ala を持つ (Figure 3-3)。以上より、この位置に C γ のない嵩の小さな残基を持つことが β -マンノシダーゼ活性に寄与するかもしれない。

L7上の求核触媒残基 Glu の位置に影響を与える残基として L7-Glu の N 末端側 2 残基の寄与について述べてきたが, β 5-Leu (β -マンノシダーゼ Os7BGlu26 では Leu244) の寄与についても考察したい。先述の通り, β 5-Leu 変異がマンノシド・グルコシド特異性を大きく変え, その機構として β 2-Arg と β 3-Asn を介して L3-His に影響を与えたと考えられた。しかし β 5-Leu 変異は L7-Glu に対しても影響しうる位置にある。 β 5-Leu (C δ) は L7-Ser (同 Ser388) と近接しており (Leu244 (C δ 2)-Ser388 (C β /O γ), 3.4 Å), Figure 3-2 と 3-7 に示すように β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 重ね合わせでは L7-Thr385 (C β , O γ) とそれぞれ 2.9 Å, 2.8 Å の距離にあり近過ぎる。すなわち, β 5-Leu は前述の通り L3-His の配向調節に加えて, Leu387-Ser388-Glu389 の主鎖構造のシフトにも寄与し, これに伴い求核触媒残基 L7-Glu389 の適切配置にも関わりがあると推定される。AtBGlu44 の β 7-Leu-Ser の二重置換体 β 7-L394I-S395T では, k_{cat}/K_m 比は野生型の 11 から 6.7 に低下しているが, k_{cat}/K_m 値自体は pNP Man, pNP Glc いずれに対しても上がり, 野生型比でそれぞれ 111%, 184% になっている。また, β 5-Leu 変異 (L250V) の単一変異では pNP Man の k_{cat}/K_m 値は 44% に低下, pNP Glc の値は 328% に増加している。これらが合わさった三重変異 (L250V/L394I/S395T) では, pNP Man の値が 22% にまで低下, pNP Glc の値が 614% にまで増加とさらなる変化がみられ, 相乗的効果とみなせる。L3-His と L7-Glu の両者の変化による相乗効果ともみなせるが, β 5-Leu 変異と β 7-Leu-Ser の変異が相乗的に β 7 構造に影響を与えている可能性も十分に考えられるだろう。

AtBGlu44 のグリコシド特異性に対する基質アグリコンの影響について考察する。本酵素は基質アグリコン構造の違いによって, 異なるグリコシド選択性を示した (Table 3-4)。Os7BGlu26 のマンノイミダゾール複合体構造とグルコイミダゾール複合体構造では, 1-C と 2-C の位置が異なることから, 遷移状態とミカエリス複合体のアグリコンの位置がマンノシドとグルコシドで異なる可能性がある (Figure 3-1; Tankrathok *et al.* 2015)。このため, マンノシドとグルコシドでは, アグリコンと酵素のアグリコン結合部位との相互作用が異なり, 基質アグリコンの構造に応じてグリコシド選択性が変化したと考えられた。ただし, 今回着目したセカンドシェル残基への変異導入によるグリコシド選択性の変化は pNP 配糖体, メチル配糖体, 二糖のいずれの基質でも確認さ

れたため、これら残基のグリコシド選択性への寄与は基質アグリコンの構造に依存せず、サブサイト-1の構造変化に起因すると考えられた。

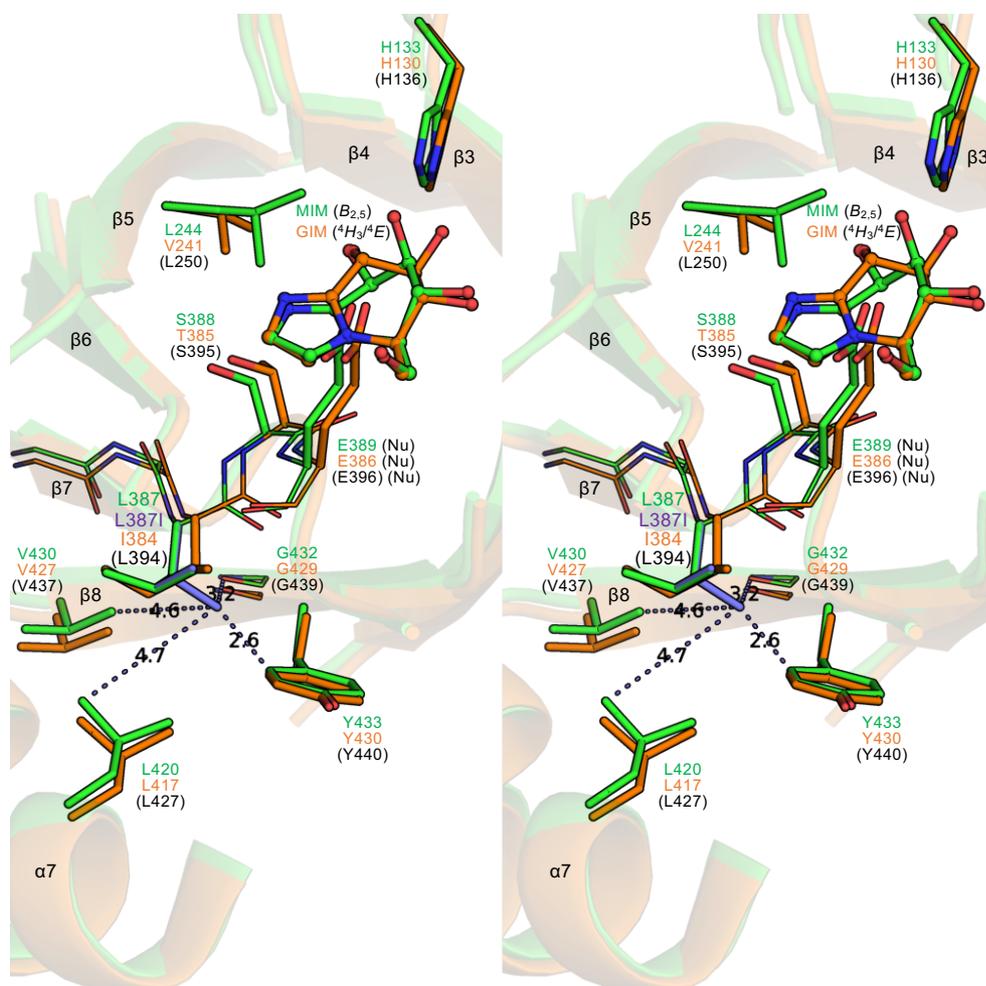


Figure 3-6. Comparison of the structures of GH1 β -mannosidase Os7BGlu26 and β -glucosidases Os3BGlu7 around Leu or Ile residues on the β -strand 7. Leu or Ile on the β -strand 7, residues surrounding them, and ligands mannoimidazole and glucoimidazole are shown. Green, Os7BGlu26-mannoimidazole. Orange, Os3BGlu7-glucoimidazole. Purple, Leu387 of Os7BGlu26 mutated to Ile. Residue names in parentheses are of β -mannosidase AtBGlu44. Distances between two atoms are indicated by dotted lines with distances (\AA).

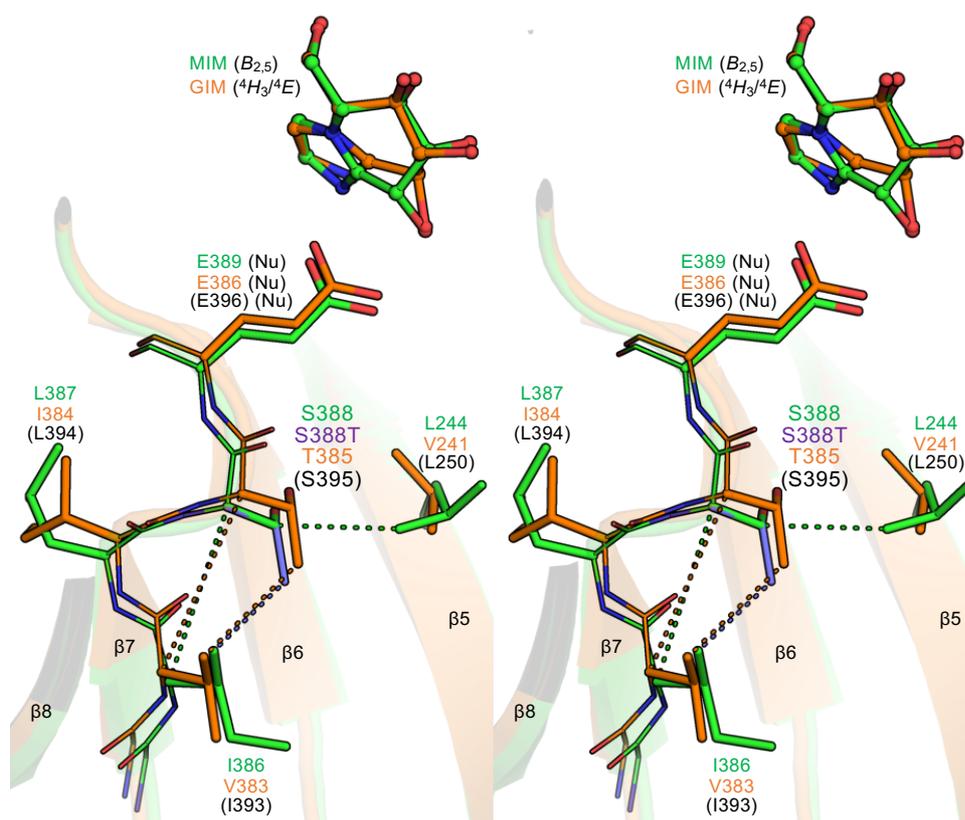


Figure 3-7. Comparison of the structures of GH1 β -mannosidase Os7BGlu26 and β -glucosidases Os3BGlu7 around Ser or The residues on the $\beta \rightarrow \alpha$ loop 7. Ser or The residues on the $\beta \rightarrow \alpha$ loop 7, residues surrounding them, and ligands mannoimidazole and glucoimidazole are shown. Green, Os7BGlu26-mannoimidazole. Orange, Os3BGlu7-glucoimidazole. Purple, Ser388 of Os7BGlu26 mutated to Thr. Residue names in parentheses are of β -mannosidase AtBGlu44. Distances between two atoms are indicated by dotted lines.

4 β -グルコシドおよび β -D-フコシドに対する基質特異性を決定する分子機構

4.1 緒論

ほとんどの GH1 酵素は β -D-グルコシドおよび β -D-フコシドの pNP 配糖体に作用するが、これら 2 基質に対する速度比は酵素により大きく異なる。サブサイト-1 において基質と相互作用する残基は保存されており、サブサイト-1 を構成するアミノ酸残基の違いによりグリコン特異性の違いを説明できないことは第 1 章で既に述べた。イネ由来 TAGG1 と TAGG2 は高いアミノ酸配列の同一性 (85%) を示すにも関わらず、それぞれ pNP Glc と pNP D-Fuc に高い特異性を示し、これら基質に対する特異性が明確に異なる (Hua *et al.* 2015; Opassiri *et al.* 2010)。両酵素のサブサイト-1 構成残基については、3 章で述べたセカンドシェル残基も含めて全て同一であり、両酵素間で基質結合部位周辺における構造の違いは、アグリコン結合部位周辺の 8 残基に限定される。すなわち、TAGG1 における L4 上 7 残基 (Leu176, Ser177, Val180, Ala181, Ser185, Gly186, Met188) と L5 上 1 残基 (Asn247)、TAGG2 における L4 上 6 残基 (Trp178, Thr179, Ser182, Asn183, Thr187, Leu189; TAGG1 の Gly186 に対応する残基は欠失している) と L5 上 1 残基 (His249) である (Figure 4-1)。したがって、両酵素間の pNP グリコシド特異性の違いには、アグリコン結合部位側の構造の違いが関与する可能性が考えられた。すなわち、グリコン特異性へのアグリコン結合様式の寄与が予想された。

本章では、これについて明らかにすることを目的とする。まず、TAGG1 と TAGG2 各野生型酵素を用いて、グリコン特異性のアグリコン依存性について述べる。すなわち、各グリコシドの pNP 配糖体とメチル配糖体を基質としたときのグリコシド特異性の解析についてである。次に、酵素側のアグリコン結合部位改変酵素の解析結果について述べる。ここでは、TAGG1 を親酵素として、上述の 8 残基のうち 1 残基から 3 残基を TAGG2 型にした TAGG1 変異酵素 TAGG1 L176W, S177T, L176W/S177T, V180S/A181N, S185T, Δ G186, Δ G186/M188L, N247H および L176W/S177T/N247H, L4 上の 7 残基を TAGG2 型にした 7 重変異酵素 TAGG1 L176W-M188L, および 8 残基全てを TAGG2 型にした 8 重変異酵素 TAGG1 L176W-M188L/N247H の基質特異性に

ついて述べる。以上を通して、本章では、グリコン特異性がアアグリコン結合様式に依存して変化するという、新たな概念を提唱したい。

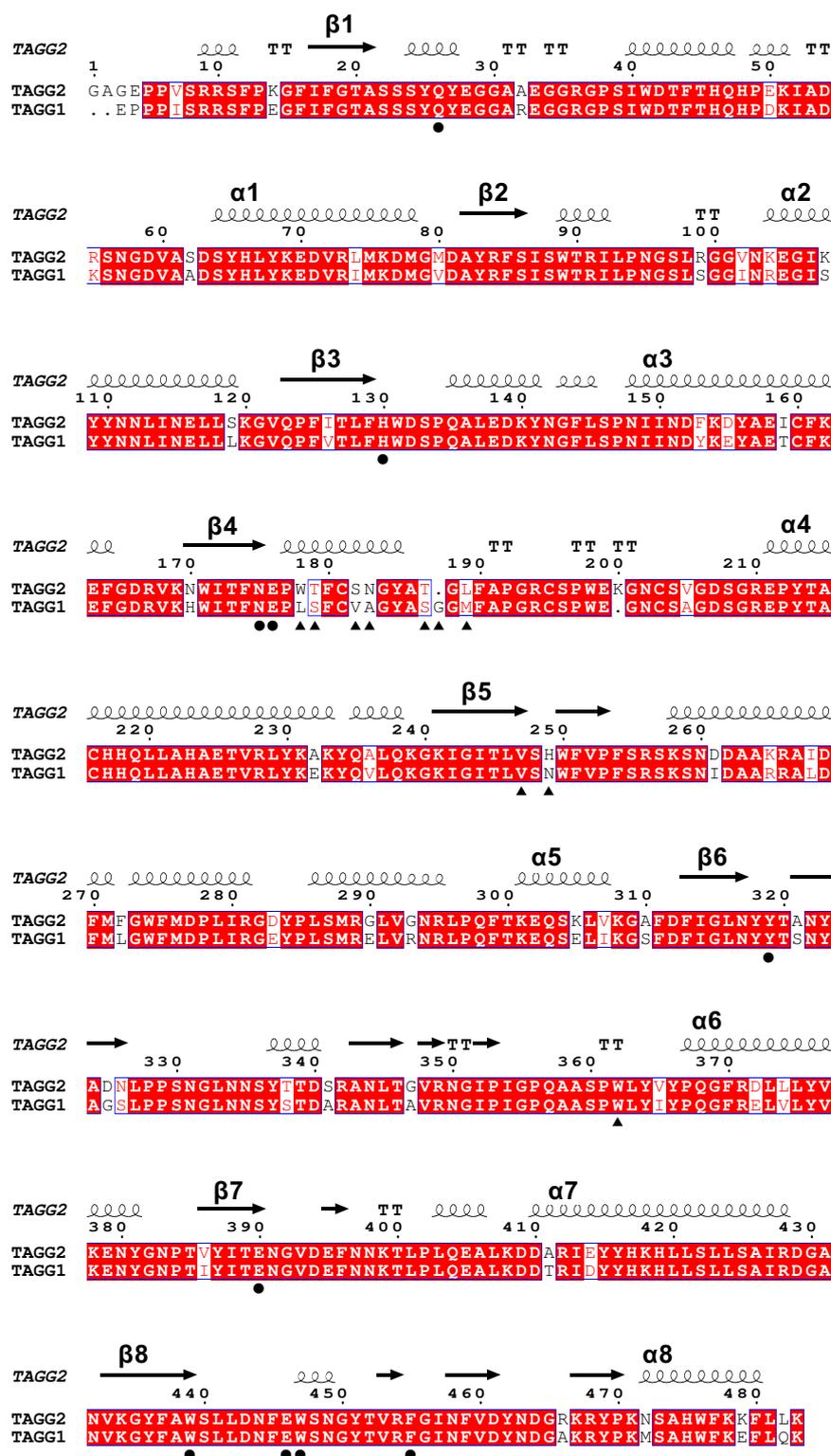


Figure 4-1. Comparison of amino acid sequences of TAGG1 and TAGG2.

Black circles and black triangles represent residues interacting with glycane of substrate at subsite -1 and possible aglycone-binding residues, respectively. Secondary structure and residue numbers of TAGG2 are depicted on the top. Multiple sequence alignment of TAGG1 and TAGG2 was conducted using MAFFT version 7 (Strategy, Auto; Katoh *et al.* 2019). The figure was generated by using the program ESPrpt 3.0 (Robert and Gouet 2014).

4.2 実験材料および方法

4.2.1 基質および試薬

4.2.1.1 メチル β -D-フコピラノシドの調製

メチル β -D-フコピラノシド (メチル D-Fuc) の調製標品は, pNP D-Fuc とメタノールを材料とした糖転移反応により合成した. 反応液を以下の 20 mL とした. 39.6 nM TAGG2 (4.2.3 項の調製品), 10 mM pNP D-Fuc (200 μ mol), 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) および 30% (v/v) メタノール. 反応液を 30°C に 80 分間保持した後, 100°C に 3 分間保持して反応を停止した. TLC (2.2.12 項) により, pNP D-Fuc の分解, ならびにメチル D-Fuc と pNP の生成を確認した. イオン交換樹脂 Amberlite MB-4 (オルガノ, 東京) による処理 (pNP, 酵素, 緩衝液等の塩類の除去) を行った. 処理後の試料の TLC 分析を行い, pNP が非検出であることを確認した. 試料を凍結乾燥し, 得られた白色粉末をメチル D-Fuc 標品とした. エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) および炭素核磁気共鳴スペクトル分析 (^{13}C -NMR) により, 標品の構造解析を行った. ESI-MS の分析装置に Thermo Scientific Exactive (Thermo Fisher Scientific) を用いた. 試料をメタノールで溶解し, 溶媒をメタノール, キャピラリーの温度を 300°C, 印加電圧を 3 kV としてイオン化を行い, 生成した陽イオンを検出した. 分析を本学グローバルファシリティセンター機器分析委託部門に依頼した. ^{13}C -NMR 分析には Bruker Avance Neo 500 (500 MHz; Bruker, Billerica, MA, USA) を用いた. 試料 2 mg を D_2O (99.75%, 富士フィルム和光純薬) 50 μL に溶解し, 測定試料とした. 分析を本学農学部 GC-MS & NMR 測定室に依頼した.

TA Glc は, 既報 (Matsuura *et al.* 2000) に基づき有機合成された標品 (本学大学院農学研究院 松浦英幸 教授より恵与) を用いた.

その他は, 市販試薬を用いた.

4.2.1.2 ビシンコニン酸試薬

ビシンコニン酸 (BCA) 試薬 (Waffenschmidt and Jaenicke 1987) を以下の様に調製した.

Na_2CO_3 13.7 g と NaHCO_3 6 g を脱塩水 225 mL に溶解した後, ビシンコニン酸ナトリウム (同仁化

学研究所, 益城, 熊本) 486 mg を溶解し, 脱塩水で 250 mL に定容した. これを BCA 試薬 A 液とした. 脱塩水 225 mL に硫酸銅 5 水和物 310 mg および L-セリン 315 mg を溶解し, 脱塩水で 250 mL に定容した. これを BCA 試薬 B 液とした. A 液, B 液ともに遮光瓶中で 4°C に保存した. 要時都度, 等量 (v/v) を混合し使用した.

4.2.2 組換え TAGG1 および TAGG2 発現プラスミドの構築

チオレドキシシンおよび His₆-タグを含む pET-32a 由来の 131 残基 (2.2.4 項参照) を, シグナルペプチド 25 残基を除いた TAGG1 およびシグナルペプチド 24 残基を除いた TAGG2 の N 末端側にそれぞれ付加した組換え酵素発現プラスミドを調製した. 2.2.4 項記載の方法にしたがい, Primestar HS DNA polymerase を用いた PCR により, TAGG1 コード領域および TAGG2 コード領域の両端に pET-32a との相同領域を付加した. TAGG1 には, 鋳型に pSW60 (和久田博士論文, 2011) を, プライマーに OsTG1_pET32_IF_Fw および OsTG1_pET32_IF_Rv を, TAGG2 には, 鋳型に pSW88 (Himeno *et al.* 2013) を, プライマーに OsTG2_pET32_IF_Fw および OsTG2_pET32_IF_Rv を用いた. なお, 鋳型とした pSW60 および pSW88 は, それぞれ TAGG1 (Os04g0474900) および TAGG2 (Os04g0474800) の cDNA が pBluescript II SK(+) (Stratagene, Jolla, LA, USA) の *EcoRV* サイトに導入されたプラスミドである. 使用したプライマーの配列を Table 4-1 に示す. 2.2.4 項にしたがい, アガロースゲル電気泳動による分離と抽出の後, In-Fusion HD Cloning Kit により pET-32a に連結した. 調製したプラスミドをそれぞれ pET32-TAGG1 および pET32-TAGG2 とした.

TAGG1 および TAGG2 の $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 1 (L1) 上のトロンピン認識配列 (TAGG1, Gly33-Arg34-Gly35; TAGG2, Gly35-Arg36-Gly37) を改変した. すなわち, それぞれ Gly33, Gly35 をトロンピンによって消化されない Lys (Furlong *et al.* 2002) に置換した (酵素名をそれぞれ TAGG1 G33K および TAGG2 G35K とする). TAGG1 G33K および TAGG2 G35K の発現プラスミドを, 2.2.4 項にしたがって Primestar Mutagenesis Basal Kit により調製した. TAGG1 G33K 発現プラスミドには, 鋳型に pET32-TAGG1 を, プライマーに OsTG2_G35K_PSM_Fw および OsTG1_G33K_PSM_Rv を, TAGG2 G35K 発現プラスミドには, 鋳型に pET32-TAGG2 を, プライマーに

OsTG2_G35K_PSM_Fw および OsTG2_G35K_PSM_Rv を用いた。使用したプライマーの配列を Table 4-1 に示す。調製したプラスミドを、それぞれ pET32-TAGG1-GK および pET32-TAGG2-GK とする。以降、TAGG1 G33K と TAGG2 G35K をそれぞれ野生型 TAGG1 および野生型 TAGG2 とする。

各種 TAGG1 変異酵素の発現プラスミドを、2.2.4 項にしたがって Primestar Mutagenesis Basal Kit により調製した。鋳型には pET32-TAGG1-GK を、プライマーには Table 4-1 に示す各種プライマーを用いた。TAGG1 L176W-M188L 発現プラスミドの調製には、TAGG1 発現プラスミドのうち Leu176-Met188 コード配列を除いた線状 pET32-TAGG1-GK と TAGG2 の Trp178-Leu189 コード配列を連結させた。ここで、TAGG2 の Trp178-Leu189 コード配列の調製には、鋳型に pET32-TAGG2-GK を、プライマーに TG2_cmr_W178_IFi_Fw および TG2_cmr_L189_IFi_Rv を、線状 pET32-TAGG1-GK の調製には、鋳型に pET32-TAGG1-GK を、プライマーに TG2_cmr_L189_IFv_Fw および TG2_cmr_W178_IFv_Rv を用いた。使用したプライマーの配列を Table 4-1 に示す。2.2.4 項にしたがって、アガロースゲル電気泳動による分離と抽出後、In-Fusion HD Cloning Kit により連結した。得られたプラスミドの組換え酵素コード領域および接続部の塩基配列の解析を行った。塩基配列解析に使用したプライマーの配列を Table 4-1 に示す。

4.2.3 組換え TAGG1 および TAGG2 の生産と調製

N 末端にチオレドキシニンおよび His₆-タグを付加した TAGG1 および TAGG2 (前項 Gly→Lys 変異を含む。以後、それぞれ N タグ付き TAGG1, TAGG2 と呼ぶ) の野生型酵素および各種 N タグ付き TAGG1 変異酵素を大腸菌により生産した。N タグ付き TAGG1 の野生型酵素および変異酵素の生産には大腸菌 Rosetta-gami 2(DE3)株 (Merck) を、N タグ付き TAGG2 の野生型酵素の生産には大腸菌 Origami B(DE3)株を用いた。大腸菌の形質転換および組換えタンパク質の生産の誘導を 2.2.4 項および 2.2.5 項にしたがって行った。ただし、Rosetta-gami 2(DE3)形質転換体の培養には 100 μg mL⁻¹ アンピシリンおよび 34 μg mL⁻¹ クロラムフェニコール (富士フィルム和光純薬) を含む LB 培地を用いた。2.2.5 項にしたがい、タンパク質の抽出、精製およびトロンビン処理を行っ

た。ただし、緩衝液 A および緩衝液 B に代えて緩衝液 D (150 mM NaCl を含む 20 mM トリス HCl 緩衝液 (pH 8.3)) を用いた。トロンビン処理後の試料を、緩衝液 D で平衡化した Ni-Chelating Sepharose Fast Flow カラム (1.6 cm i.d. × 2.5 cm, 5 mL) によるクロマトグラフィーに供し、酵素から切断された His₆-タグを含む N 末端タグ部分を担体に吸着させ、目的の酵素タンパク質を緩衝液 D (200mL) と 30 mM イミダゾールを含む緩衝液 D (100 mL) による非吸着画分に溶出させ、これを回収した。クロマトグラフィーでは流速を 4 mL min⁻¹, カラム温度を 4°C, 画分液量を 5 mL とした。次に、回収画分を緩衝液 E (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)) に対して十分に透析後、緩衝液 E で平衡化した CM Sepharose Fast Flow カラム (2.5 cm i.d. × 6.0 cm, 30 mL; GE Healthcare) によるクロマトグラフィーにより分離した。緩衝液 E (200 mL) および緩衝液 E における 0–0.5 M NaCl の直線濃度勾配 (200 mL) によってタンパク質を溶出させた。流速を 3 mL min⁻¹, カラム温度を 4°C, 画分液量を 5 mL とした。活性および A₂₈₀ に基づき、精製度の高い活性画分を回収した。回収画分を緩衝液 E に対して十分に透析した後、Vivaspin 20 centrifugal concentrators (MWCO 30,000; Sartorius, Göttingen, Germany) を用いて A₂₈₀ が 0.075–4.24 になるように濃縮し、これを精製酵素とした。使用まで 4°C で保存した。タンパク質濃度を 2.2.7 項にしたがって定量した。各種精製標品の比吸光係数 E_{1cm,280 nm}^{1%} は, TAGG1 野生型 19.8, TAGG2 野生型 19.4, TAGG1 L176W–M188L/N247H 20.9, TAGG1 L176W–M188L 20.1, TAGG1 L176W/S177T/N247H 20.1, TAGG1 L176W/S177T 20.4, TAGG1 L176W 21.0, TAGG1 S177T 19.9, TAGG1 V180S/A181N 20.1, TAGG1 S185T 19.8, TAGG1 ΔG186 20.0, TAGG1 ΔG186/M188L 20.4, および TAGG1 N247H 21.9 であった。

4.2.4 TAGG1 および TAGG2 の基質特異性の解析

各基質 (1 mM) に対する反応速度の測定を以下の標準反応条件で行った。基質には, pNP Glc, pNP D-Fuc, pNP Gal, SA Glc, TA Glc, ヘリシン, フェニル Glc, オクチル Glc, Cel₂, Cel₃, Lam₂ および Lam₃ を用いた。酵素 (濃度を Table 4-2a を示す), 1 mM 基質, 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) および 0.2 mg mL⁻¹ BSA からなる反応液 50 μL を 30°C に 10 分間保持した。pNP 配糖体

に対する反応では、酵素反応を 2 M Na₂CO₃ 25 μL の添加により停止し、2.2.8 項にしたがって生成 pNP を定量した。その他の基質に対する反応では、4 M トリス HCl 緩衝液 (pH 7.0) 25 μL の添加により停止し、2.2.10 項にしたがって生成 D-グルコースを定量した。

TAGG1 と TAGG2 の野生型酵素, および TAGG1 変異酵素 5 種 (L176W-M188L/N247H, L176W/S177T/N247H, L176W-M188L, L176W/S177T および N247H) の反応速度の基質濃度依存性の解析では、s-v プロット上でミカエリス-メンテン式を非線形回帰させて速度パラメーターを決定した。pNP Glc, pNP D-Fuc, pNP Gal およびメチル Glc に対する反応を上記標準反応条件で行った。ただし、酵素濃度、基質濃度および反応時間を Table 4-2b に示す通りとした。メチル D-Fuc およびメチル Gal に対する反応を、上記標準反応条件で行った。ただし、BSA 濃度を 0.02 mg mL⁻¹, 反応液を 150 μL とし、酵素濃度、基質濃度および反応時間を Table 4-2b に示す通りとした。反応時間中、経時的に 5 回に分けて反応液 29 μL を分取しそれぞれ BCA 試薬 (4.2.1.2 項の調製品) 50 μL と混合して反応を停止した後、氷上に保持した。80°C に 30 分間保持し、氷冷後に、A₅₆₀ を測定した。標準曲線には、29 μL の反応液に代えて 0-0.2 mM D-フコース (東京化成工業) 水溶液、または 0-0.12 mM D-ガラクトース (ナカライテスク) 水溶液を用いた。反応速度の基質濃度依存性の解析は、2.2.10 項にしたがって Grafit ver. 7.0.2 を用いた非線形回帰分析により行った。求めた K_m が試験した基質濃度よりも大きかった基質では、求めた k_{cat} および K_m の値を用いて算出した k_{cat}/K_m のみを記した。

Table 4-1. Primers used for preparation of recombinant TAGG1 and TAGG2 wild type, and TAGG1 mutants.

Primer name	Sequence (5' to 3')	Orientation	Purpose
OsTG1_pET32_IF_Fw	GTGCCACGGGTTCTGAGCCGCCGCGATCAGCCG	sense	Preparation of TAGG1 expression plasmid
OsTG1_pET32_IF_Rv	CGCAAGCTTGTGCACTCATTTCTGGAGAACTCCT	antisense	Preparation of TAGG1 expression plasmid
OsTG2_pET32_IF_Fw	GTGCCACGGGTTCTGGCCGCGGAGCCGCGGT	sense	Preparation of TAGG2 expression plasmid
OsTG2_pET32_IF_Rv	CGCAAGCTTGTGCACTCATTTACAGGAACTTCT	antisense	Preparation of TAGG2 expression plasmid
OsTG2_G35K_PSM_Fw	GAGGGCAAAAGAGGACCAAGCATCTGG	sense	Preparation of TAGG1 G33K and TAGG2 G35K expression plasmid
OsTG1_G33K_PSM_Rv	TCCTCTTTTGCCCTCTCTGGGCCACC	antisense	Preparation of TAGG1 G33K expression plasmid
OsTG2_G35K_PSM_Rv	TCCTCTTTTGCCCTCCGCTGGGCCACC	antisense	Preparation of TAGG2 G35K expression plasmid
OsTG1_LSI176WT_PSM_Fw	AGCCTTGGACTTTCCTGTGTGGGGATAT	sense	Preparation of TAGG1 L176W/S177T expression plasmid
OsTG1_LSI176WT_PSM_Rv	CAGAAAGTCCAAGGCTCATTAAGGTGAT	antisense	Preparation of TAGG1 L176W/S177T expression plasmid
OsTG1_L176W_PSM_Fw	GAGCCTTGGAGCTTCTGTGTGGCGGA	sense	Preparation of TAGG1 L176W expression plasmid
OsTG1_L176W_PSM_Rv	GAAGCTCCAAGGCTCATTAAGGTGAT	antisense	Preparation of TAGG1 L176W expression plasmid
OsTG1_S177T_PSM_Fw	CCTTTGACTTCTGTGTGGGGATAT	sense	Preparation of TAGG1 S177T expression plasmid
OsTG1_S177T_PSM_Rv	ACAGAAAGTCAAAGGCTCATTAAGGT	antisense	Preparation of TAGG1 S177T expression plasmid
OsTG1_VA180SN_PSM_Fw	TCGTCTAAATGGATATGCATCAGGTGGC	sense	Preparation of TAGG1 V180S/A181N expression plasmid
OsTG1_VA180SN_PSM_Rv	TATCCATTAGAACAGAAAGCTCAAAGGCTC	antisense	Preparation of TAGG1 V180S/A181N expression plasmid
OsTG1_S185T_PSM_Fw	TATGCAACTGGTGGCATGTTGCACCA	sense	Preparation of TAGG1 S185T expression plasmid
OsTG1_S185T_PSM_Rv	GCCACCAGTTGCATATCCCGCAACACA	antisense	Preparation of TAGG1 S185T expression plasmid
OsTG1_GG186G_PSM_Fw	GCATCAGGCATGTTTGCACCAGGCCG	sense	Preparation of TAGG1 Δ G186 expression plasmid
OsTG1_GG186G_PSM_Rv	CAAACATGCCTGATGCATATCCCGCA	antisense	Preparation of TAGG1 Δ G186 expression plasmid
OsTG1_GM187L_PSM_Fw	ATCAGGTCTGTTTGCACCAGGCCGT	sense	Preparation of TAGG1 Δ G186/M188L expression plasmid
OsTG1_GM187L_PSM_Rv	GCAAACAGACCTGATGCATATCCCGC	antisense	Preparation of TAGG1 Δ G186/M188L expression plasmid
OsTG1_N247H_PSM_Fw	GTCTCGCATTGGTTGTTCCTTCTCC	sense	Preparation of TAGG1 N247H expression plasmid
OsTG1_N247H_PSM_Rv	AAACCAATGCGAGACCAAGTTATTCC	antisense	Preparation of TAGG1 N247H expression plasmid
TG2_cmr_W178_IF1_Fw	GGATCACCTTCAATGAGCCT	sense	Preparation of TAGG1 L176W-M188L expression plasmid
TG2_cmr_L189_IF1_Rv	GAACAACGGCTGGTGCAA	antisense	Preparation of TAGG1 L176W-M188L expression plasmid
TG2_cmr_L189_IFv_Fw	TTTGACCAGGCCGTTGTTCT	sense	Preparation of TAGG1 L176W-M188L expression plasmid
TG2_cmr_W178_IFv_Rv	AGGCTCATTGAAGGTGATCC	antisense	Preparation of TAGG1 L176W-M188L expression plasmid
T7_promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	sense	Sequence analysis
pET32_trx	TCAGTTGAAAGAGTTCTCG	sense	Sequence analysis
OsTAGG1_seq_400	AACAGAGAAAGGCATCAGCTA	sense	Sequence analysis
OsTAGG1_seq_800	TCCTACAAAAGGGGAAGATT	sense	Sequence analysis
T7_terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	antisense	Sequence analysis

Table 4-2. Concentrations of substrates and enzymes used for measurement of reaction velocities of TAGG1 and TAGG2 wild type, and TAGG1 mutants.

a. Concentrations of enzymes (nM) used for measurement of reaction velocities for 1 mM various substrates.

Enzyme	pNP Glc	pNP D-Fuc	pNP Gal	SA Glc	TA Glc	Helicin	Phenyl Glc	Octyl Glc	Cel ₂	Cel ₃	Lam ₂	Lam ₃
TAGG1 wild type	0.258	4.64	4.64	6.44	6.44	0.580	11.6	2.90	92.7	11.6	1.16	2.90
TAGG2 wild type	0.0880	0.0880	0.0165	2.00	1.57	0.264	0.792	0.792	66.0	1.58	0.792	26.4
TAGG1 L176W-M188L/N247H	0.0283	0.0283	0.209	2.46	1.23	0.339	0.976	1.23	272	2.46	2.46	51.7
L176W-M188L	0.0926	0.259	0.648	2.59	1.47	0.233	2.33	0.778	97.3	9.73	0.973	19.5
L176W/S177T/N247H	0.204	0.423	0.423	2.11	0.752	0.211	2.11	0.752	134	6.36	0.752	13.4
L176W/S177T	0.237	0.237	0.474	2.31	0.881	0.286	2.31	0.881	148	7.40	0.881	14.8
L176W	0.263	3.22	3.98	4.37	2.73	0.370	12.9	4.37	322	12.9	1.46	12.9
S177T	0.275	2.47	3.05	5.81	3.42	0.471	16.5	5.81	247	16.5	1.88	3.42
V180S/A181N	0.151	4.53	4.53	9.70	5.90	0.693	27.2	9.70	33.9	27.2	3.23	5.90
S185T	0.413	4.13	3.91	6.61	3.67	0.510	18.4	6.61	165	18.4	0.919	3.67
ΔG186	0.303	6.07	6.07	7.92	4.55	0.609	18.2	7.92	45.5	18.2	2.60	4.55
ΔG186/M188L	0.269	5.37	5.37	6.14	3.70	0.511	17.9	6.14	53.7	17.9	2.15	3.70
N247H	2.95	0.312	2.95	2.95	9.42	0.362	2.95	19.2	125	9.42	1.13	19.2

b. Concentrations of substrates and enzymes, and reaction time for measurement of kinetic parameters for the reactions with each substrate in TAGG1 and TAGG2 wild type, and TAGG1 variants.

(b-1) TAGG1 wild type

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.0927	10
pNP D-Fuc	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4	0.927	10
pNP Gal	0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4, 3.2	15.5	10
Methyl Glc	0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25	92.7	22
Methyl D-Fuc	0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5	185	90

(b-2) TAGG2 wild type

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.0792	10
pNP D-Fuc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.0528	10
pNP Gal	0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4, 3.2	0.325	10
Methyl Glc	0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2	39.6	10
Methyl D-Fuc	0.25, 0.5, 0.75, 1	158	10
Methyl Gal	2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15	396	50

(b-3) TAGG1 L176W–M188L/N247H

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.130	10
pNP D-Fuc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.0652	10
pNP Gal	0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4, 3.2	0.307	10
Methyl Glc	0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25	54.3	10
Methyl D-Fuc	0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5	54.3	35
Methyl Gal	2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15	326	50

(b-4) TAGG1 L177W/S177T/N247H

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.0586	10
pNP D-Fuc	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4	0.0791	10
pNP Gal	0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4, 3.2	0.376	10
Methyl Glc	0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25	66.8	10
Methyl D-Fuc	0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5	134	45

(b-5) TAGG1 L177W–M188L

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.0584	10
pNP D-Fuc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.0584	10
pNP Gal	0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4, 3.2	1.80	10
Methyl Glc	0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25	77.8	10
Methyl d-Fuc	0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5	77.8	35
Methyl Gal	2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15	292	50

(b-6) TAGG1 L176W/S177T

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.0474	10
pNP D-Fuc	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4	0.118	10
pNP Gal	0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4, 3.2	2.63	10

(b-7) TAGG1 N247H

Substrate	Substrate (mM)	Enzyme (nM)	Time (min)
pNP Glc	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8	0.142	10
pNP D-Fuc	0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4	0.312	10
pNP Gal	0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4, 3.2	8.32	10

4.3 結果

4.3.1 メチル D-Fuc の調製

メチル D-Fuc の調製を、酵素 TAGG2 による糖転移反応により行った。糖供与体基質に 10 mM pNP D-Fuc を、糖受容体を 30%メタノールとした。反応条件下 30°C で 80 分間保持した。TLC 解析により、pNP D-Fuc の消失およびメチル D-Fuc と pNP の生成が認められた (Figure 4-2)。反応液には Fuc の生成は検出されなかった。脱塩により pNP を除去し (Figure 4-2)、凍結乾燥品を調製した。以上により、pNP D-Fuc 56.5 mg (200 μ mol) より、メチル D-Fuc 23.5 mg (132 μ mol, 収率 67%) を得た。調製標品の ESI-MS 解析では、 m/z 201.07 Da が得られた (Figure 4-3)。これはメチル D-Fuc の $[M+Na]^+$ 201.074 (単一同位体質量) に一致する。また、 ^{13}C -NMR 分析では、観測された化学シフト値が、既報 (Sabir *et al.* 2010) のメチル D-Fuc の各炭素原子の値と一致した (Table 4-3)。以上より、本調製標品はメチル D-Fuc であることが確認された。

4.3.2 組換え TAGG1 および TAGG2 の調製

TAGG1 と TAGG2 の野生型酵素、および TAGG1 変異酵素 (シグナル配列を除いた成熟酵素部分と、その N 末端側の 2 残基 Gly-Ser からなる) を調製した。ここではまず、組換え大腸菌を用いて、N 末端にベクター pET-32a に由来する 131 残基を有す各種酵素を生産した。培養 1.0 L の菌体の無細胞抽出液から Ni-アフィニティカラムクロマトグラフィーにより部分精製を行った。続いて、N 末端付加配列をトロンピンにより切断し、イオン交換等のカラムクロマトグラフィーにより精製を行った。調製された精製標品のタンパク質量は以下の通りであった。TAGG1 野生型 0.194 mg, TAGG2 野生型 2.07 mg, TAGG1 L176W-M188L/N247H 0.718 mg, TAGG1 L176W-M188L 0.450 mg, TAGG1 L176W/S177T/N247H 0.662 mg, TAGG1 L176W/S177T 0.391 mg, TAGG1 L176W 0.248 mg, TAGG1 S177T 0.218 mg, TAGG1 V180S/A181N 0.0261 mg, TAGG1 S185T 0.109 mg, TAGG1 Δ G186 0.0248 mg, TAGG1 Δ G186/M188L 0.0329 mg, TAGG1 N247H 0.0549 mg であった。いずれの精製標品も SDS-PAGE により単一のタンパク質バンドを示した (Figure 4-4)。分子質量はいずれも 49 kDa と見積もられ、配列からの計算値 54,902–55,087 Da (各種 TAGG1) と

55,105 Da (TAGG2) と概ね一致した (Figure 4-4). 2 mM pNP Glc に対する比活性は, TAGG1 野生型 138 U mg⁻¹, TAGG2 野生型 317 U mg⁻¹, TAGG1 L176W-M188L/N247H 270 U mg⁻¹, TAGG1 L176W-M188L 223 U mg⁻¹, TAGG1 L176W/S177T/N247H 305 U mg⁻¹, TAGG1 L176W/S177T 249 U mg⁻¹, TAGG1 L176W 201 U mg⁻¹, TAGG1 S177T 188 U mg⁻¹, TAGG1 V180S/A181N 131 U mg⁻¹, TAGG1 S185T 140 U mg⁻¹, TAGG1 ΔG186 123 U mg⁻¹, TAGG1 ΔG186/M188L 141 U mg⁻¹, TAGG1 N247H 204 U mg⁻¹であった.

4.3.3 野生型 TAGG1 と TAGG2 の pNP 配糖体とメチル配糖体に対するグリコシド特異性

TAGG1 と TAGG2 の野生型酵素の pNP 配糖体およびメチル配糖体の各種グリコシド (グルコシド, D-フコシド, ガラクトシド) に対する速度パラメーターを求めた (Table 4-4). TAGG1 の k_{cat}/K_m は, pNP Glc では 846 s⁻¹ mM⁻¹, pNP D-Fuc では 373 s⁻¹ mM⁻¹ であり, グルコシドに 2.3 倍高い値を示した. メチル Glc では 0.501 s⁻¹ mM⁻¹, メチル D-Fuc では 0.162 s⁻¹ mM⁻¹ であり, pNP 配糖体と同様にグルコシドに高く, 3.1 倍高い値を示した. 一方, TAGG2 の k_{cat}/K_m は, pNP Glc では 1300 s⁻¹ mM⁻¹, pNP D-Fuc では 2460 s⁻¹ mM⁻¹ であり, D-フコシドに 1.9 倍高い値を示したが, メチル Glc では 2.04 s⁻¹ mM⁻¹, メチル D-Fuc では 0.667 s⁻¹ mM⁻¹ であり, グルコシドに 3.1 倍高い値を示した. すなわち, TAGG1 は両基質でグルコシド特異性を示したが, TAGG2 は pNP 配糖体では D-フコシド特異性を, メチル配糖体ではグルコシド特異性を示し, 基質アグリコンの違いによってグリコシド特異性が変化した. また, pNP 配糖体ではガラクトシドに対する特異性も異なった. TAGG1 では pNP Gal の k_{cat}/K_m (6.71 s⁻¹ mM⁻¹) は pNP Glc の値 (846 s⁻¹ mM⁻¹) の 0.0079 倍であるのに対して, TAGG2 では pNP Gal の k_{cat}/K_m (305 s⁻¹ mM⁻¹) は pNP Glc の値 (1300 s⁻¹ mM⁻¹) の 0.23 倍であり, pNP Gal は他基質との相対値, 絶対値のいずれでも TAGG2 において TAGG1 よりも良く作用する基質であった.

4.3.4 TAGG1 変異酵素の pNP 配糖体とメチル配糖体に対するグリコシド特異性

各種 TAGG1 変異酵素の 1 mM pNP 配糖体の反応速度 (pNP 遊離速度を全酵素濃度 $[E]_0$ で除した値) を測定した (Table 4-5). まず, 推定アグリコン結合部位の 8 残基すべてを TAGG2 型に置換した L176W-M188L/N247H についてである. 本変異酵素では, ほとんどの基質で反応速度が大きく上昇し, TAGG2 野生型に近い値となった. pNP Glc では 2.0 倍 (201 s^{-1}), pNP D-Fuc では 60 倍 (275 s^{-1}), pNP Gal では 46 倍 (158 s^{-1}) に増加した. これにより, pNP D-Fuc の対 pNP Glc 速度比 ($v_{\text{pNP D-Fuc}} / v_{\text{pNP Glc}}$) は 1.37 であり, 変異導入により TAGG1 野生型の値 (0.046) から大幅に増加して TAGG2 の値 (1.39) とほぼ一致した.

置換を 1 残基および 2 残基に限定した変異酵素のうち, V180S/A181N, S185T, Δ G186 および Δ G186/M188L は野生型酵素とほぼ同等の速度比 $v_{\text{pNP D-Fuc}} / v_{\text{pNP Glc}}$ (0.041–0.049) を示したが, L176W, S177T, L176W/S177T および N247H は野生型酵素より高い $v_{\text{pNP D-Fuc}} / v_{\text{pNP Glc}}$ (0.058–0.25) を示し, 特異性が TAGG2 に近づいた.

次に, pNP D-Fuc への速度比が向上した TAGG1 変異酵素 5 種について, pNP 配糖体の反応速度パラメーターを求めた (Table 4-6). まず, 8 残基すべて置換した変異酵素 L176W-M188L/N247H について述べる. 本変異酵素の k_{cat}/K_m は, pNP Glc では野生型の 0.90 倍に微減 ($758 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), pNP D-Fuc では 4.2 倍 ($1550 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), pNP Gal では 36 倍 ($241 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) と大幅に増加した. pNP D-Fuc と pNP Gal の値は顕著な増加により, TAGG2 の値に近づいた. pNP Glc に対する pNP D-Fuc と pNP Gal の k_{cat}/K_m 比はそれぞれ 2.0, 0.32 であり, TAGG1 の値 (0.44, 0.0079) よりも TAGG2 の値 (1.9, 0.23) に近かった. すなわち, TAGG2 型の特異性を示した. pNP Glc に対する k_{cat} は 275 s^{-1} (野生型比 2.1 倍), K_m は 0.362 mM (野生型比 2.4 倍) と増加した. pNP D-Fuc に対する k_{cat} は 334 s^{-1} (野生型比 68 倍), K_m は 0.216 mM (野生型比 16 倍) と大きく増加し, TAGG2 の値 (k_{cat} , 398 s^{-1} ; K_m , 0.162 mM) に近いた. pNP Gal に対する k_{cat} も 424 s^{-1} (野生型比 68 倍) と大きく増加, K_m は 1.76 mM (野生型比 1.9 倍) と増加し, TAGG2 の値 (k_{cat} , 313 s^{-1} ; K_m , 1.03 mM) に近いた. すなわち, 8 重変異酵素は k_{cat}/K_m だけでなく, k_{cat} と K_m も TAGG2 型に変化した.

置換を限定した変異酵素について述べる。2重変異酵素 L176W/S177T の k_{cat}/K_m は、pNP Glc の値 ($2840 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) が野生型比で 3.4 倍と最も顕著に増加し、TAGG2 の値 ($1300 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) をも大きく上回った。pNP D-Fuc の値 ($1970 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) も 5.3 倍増であり、TAGG2 の値 ($2460 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) に近づいた。pNP Gal の値 ($35.9 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) も 5.4 倍増だが、TAGG2 の値 ($305 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) を大きく下回った。pNP Glc に対する pNP D-Fuc と pNP Gal の k_{cat}/K_m 比は 0.69 と 0.013 であり、速度は増加したが依然 pNP Glc 特異性を示しており、TAGG2 型にはならなかった。

単一変異酵素 N247H の k_{cat}/K_m は、pNP Glc, pNP D-Fuc, および pNP Gal ではそれぞれ 0.94 倍, 1.8 倍, 1.5 倍の値となり、いずれの基質に対しても最も TAGG1 野生型に近い値を示した。

7重変異酵素 L176W-M188L の k_{cat}/K_m は、pNP Glc では $2240 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 2.7 倍), pNP D-Fuc では $2470 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 6.6 倍), pNP Gal では $49.9 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 7.4 倍) であった。pNP Glc に対する pNP D-Fuc と pNP Gal の k_{cat}/K_m 比は 1.1 と 0.022 であり、わずかに pNP D-Fuc 特異性に变化した。

3重変異酵素 L176W/S177T/N247H の k_{cat}/K_m は、pNP Glc では $1980 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 2.4 倍), pNP D-Fuc では $2430 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 6.5 倍), pNP Gal では $235 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (野生型比 35 倍) であり、pNP D-Fuc の値が最も高かった。pNP Glc に対する pNP D-Fuc と pNP Gal の k_{cat}/K_m 比は 1.2 と 0.12 であり、これまでの置換を限定した変異酵素の中で最も 8重変異体や TAGG2 に特異性が近づいた。pNP Glc に対する k_{cat} は 274 s^{-1} (野生型比 2.1 倍) と増加し、 K_m は 0.138 mM (野生型比 90%) と微減した。pNP D-Fuc に対する k_{cat} は 54.4 s^{-1} (野生型比 11 倍), K_m は 0.0224 mM (野生型比 1.7 倍) と増加し、TAGG2 の値 (k_{cat} , 398 s^{-1} ; K_m , 0.162 mM) に近いた。pNP Gal に対する k_{cat} も 256 s^{-1} (野生型比 41 倍) と大きく増加、 K_m は 1.09 mM (野生型比 1.2 倍) と増加し、TAGG2 の値 (k_{cat} , 313 s^{-1} ; K_m , 1.03 mM) に近いた。すなわち、3重変異酵素は k_{cat}/K_m だけでなく、 k_{cat} と K_m も TAGG2 型に変化した。

メチル配糖体に対するグリコシド 3 種の速度パラメーターを求めた (Table 4-7)。対象酵素は 8重, 7重, および 3重変異酵素とした (いずれも pNP 配糖体において pNP D-Fuc に高い k_{cat}/K_m を示した)。8重変異酵素 L176W-M188L/N247H, 7重変異酵素 L176W-M188L, 3重変異酵素

L176W/S177T/N247H の k_{cat}/K_m は、メチル Glc およびメチル D-Fuc に野生型のそれぞれ 3.7–2.7 倍, 2.4–3.5 倍, 2.8–2.6 倍の値を示した。すなわち、値が増加し TAGG2 に近づいた。メチル D-Fuc の対メチル Glc の k_{cat}/K_m 比は 0.24–0.48 であり, TAGG1 と TAGG2 野生型酵素の値 (0.32–0.33) に近かった。

4.3.5 野生型 TAGG1 と TAGG2 および TAGG1 変異酵素のアグリコン特異性

アグリコン特異性の評価のため, 1 mM 各種 β -グルコシドに対する速度を解析した (Table 4-5)。先の pNP 配糖体 3 種, その他配糖体グルコシド 5 種, およびオリゴ糖 4 種を基質とした。TAGG1 は, ヘリシンに最も高い速度 (141 s^{-1}) を, Cel₂ に最も低い速度 (0.164 s^{-1}) を示した。これは TAGG2 および全ての変異酵素で共通した。TAGG1 と TAGG2 の特徴づけをする。TAGG1 は, フェニル Glc と Cel₃ の速度が TAGG2 と比較して特に低い一方, Lam₃ の速度は TAGG2 より高値となっている。TAGG2 は, Lam₃ を除く全てに対して TAGG1 よりも 1.2–23 倍高い速度を示し, 特にフェニル Glc と Cel₃ に対してそれぞれ TAGG1 の 23 倍および 9.8 倍であった。一方, Lam₃ には TAGG1 の 9.2%の値を示した。

TAGG1 の 8 重, 7 重, 3 重変異酵素は, TAGG2 様の特異性を示した。すなわち, 速度の対 TAGG1 相対値は, フェニル Glc では 3.7–23.2 倍, Cel₃ では 2.0–6.5 倍の高値, Lam₃ では 5.5–21%の低値であった。その他の変異体は, TAGG1 と同程度か低下した値を示した。基質では Lam₃ の速度が最も低下し, 上記の TAGG2 様となった多重変異酵素のみならずほとんどの変異酵素で低下した (TAGG1 野生型の 5.5–75%)。ただし, S177T でのみ 1.9 倍に増加した。変異酵素別では, V180S/A181N では pNP 配糖体を除く全ての基質で速度低下がみられた。対 TAGG1 野生型の速度比で, Cel₃ の 14%, Lam₃ の 18%から SA Glc の 63%の範囲で速度が低下した。

Table 4-3. Chemical shifts of the preparation from the reaction of methanol and pNP D-Fuc by TAGG2 in the ^{13}C -NMR spectra.

Carbon	δC (ppm)	δC^* (ppm)
C1	104.61	104.26
C2	71.71	70.16
C3	73.84	73.52
C4	71.33	69.92
C5	72.22	71.03
C6	16.27	16.58
OCH ₃	58.01	55.69

* Sabir *et al.* 2010

Table 4-4. Kinetic parameters of TAGG1 and TAGG2 wild type.

	TAGG1				TAGG2			
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	k_{cat}/K_m ratio (-fold)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	k_{cat}/K_m ratio (-fold)
pNP Glc	130 ± 1	0.153 ± 0.008	846	1 ^a	322 ± 10	0.247 ± 0.016	1300	1 ^a
pNP D-Fuc	4.92 ± 0.061	0.0132 ± 0.0003	373	0.44 ^a	398 ± 13	0.162 ± 0.008	2460	1.9 ^a
pNP Gal	6.27 ± 0.09	0.934 ± 0.024	6.71	0.0079 ^a	313 ± 4	1.03 ± 0.03	305	0.23 ^a
Methyl Glc	N.D.	N.D.	0.501	1 ^b	N.D.	N.D.	2.04	1 ^b
Methyl D-Fuc	0.0925 ± 0.008	0.57 ± 0.148	0.162	0.32 ^b	N.D.	N.D.	0.667	0.33 ^b
Methyl Gal	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.0109	0.0053 ^b

Data are average \pm standard deviation for three independent experiments. N.D., not determined. a, Ratio of k_{cat}/K_m to that for pNP Glc. b, Ratio of k_{cat}/K_m to that for methyl Glc.

Table 4-5. Reaction velocities ($v/[E]_0 \cdot s^{-1}$) of TAGG1 and TAGG2 wild type, and TAGG1 mutants for pNP Glc, pNP D-Fuc, pNP Gal, pNP Gal, and various β -glucosides (1 mM).

Enzyme	pNP Glc	pNP D-Fuc	pNP Gal	SA Glc	TA Glc	Helicin	Phenyl Glc	Octyl Glc	Celb	Cel3	Lam2	Lam3
TAGG1 wild type	101 ± 4	4.60 ± 0.11	3.45 ± 0.12	10.3 ± 0.2	13.2 ± 0.1	141 ± 1	4.20 ± 0.02	12.1 ± 0.1	0.164 ± 0.001	4.13 ± 0.02	35.5 ± 1.0	19.5 ± 0.5
TAGG2 wild type	230 ± 4	320 ± 11	143 ± 2	35.8 ± 0.5	51.8 ± 0.3	278 ± 5	97.2 ± 1.1	77.4 ± 0.8	0.354 ± 0.002	40.4 ± 0.2	42.6 ± 1.1	1.80 ± 0.06
TAGG1 L176W-M188L/N247H	201 ± 7	275 ± 5	158 ± 2	13.2 ± 0.1	66.2 ± 2.0	201 ± 4	97.6 ± 3.8	95.2 ± 3.4	0.229 ± 0.006	15.0 ± 0.2	24.5 ± 0.4	1.07 ± 0.04
L176W-M188L	160 ± 5	124 ± 3	29.7 ± 0.2	23.1 ± 0.4	58.0 ± 0.4	222 ± 7	25.4 ± 0.4	71.3 ± 0.6	0.380 ± 0.005	8.53 ± 0.03	40.6 ± 1.2	4.10 ± 0.03
L176W/S177T/N247H	232 ± 2	53.3 ± 1.6	127 ± 0	36.4 ± 0.4	39.4 ± 2.4	235 ± 7	64.3 ± 0.2	39.4 ± 1.6	0.0798 ± 0.0032	27.0 ± 0.5	25.6 ± 1.6	1.47 ± 0.10
L176W/S177T	185 ± 2	46.7 ± 2.4	18.9 ± 0.7	25.0 ± 0.4	28.7 ± 1.6	178 ± 2	15.4 ± 0.1	35.4 ± 1.6	0.144 ± 0.006	10.3 ± 0.2	36.5 ± 0.9	10.8 ± 0.1
L176W	155 ± 3	9.06 ± 0.17	6.74 ± 0.02	19.0 ± 0.6	10.2 ± 0.2	162 ± 2	5.92 ± 0.23	18.2 ± 1.2	0.0900 ± 0.0010	9.35 ± 0.09	21.1 ± 2.0	6.36 ± 0.31
S177T	122 ± 3	10.6 ± 0.1	5.04 ± 0.09	11.5 ± 0.4	13.3 ± 0.9	138 ± 3	6.49 ± 0.15	15.1 ± 0.3	0.217 ± 0.002	4.21 ± 0.14	50.6 ± 0.5	36.4 ± 1.8
V180S/A181N	102 ± 3	4.84 ± 0.2	3.17 ± 0.13	6.48 ± 0.03	3.59 ± 0.35	67.9 ± 0.3	1.41 ± 0.04	3.11 ± 0.11	0.0599 ± 0.0095	0.558 ± 0.041	14.4 ± 0.2	3.59 ± 0.04
S185T	105 ± 1	4.32 ± 0.02	3.28 ± 0.03	8.92 ± 0.2	11.1 ± 0.3	121 ± 2	3.35 ± 0.07	9.55 ± 0.29	0.132 ± 0.007	2.93 ± 0.09	33.5 ± 1.3	14.6 ± 0.1
Δ G186	93.3 ± 3.7	4.59 ± 0.12	3.08 ± 0.06	7.05 ± 0.29	16.8 ± 0.3	99.3 ± 0.3	3.31 ± 0.03	9.39 ± 0.12	0.1113 ± 0.012	1.83 ± 0.07	23.5 ± 0.0	11.1 ± 0.8
Δ G186/M188L	107 ± 0	4.71 ± 0.15	3.48 ± 0.09	8.89 ± 0.07	17.1 ± 0.8	120 ± 2	3.83 ± 0.05	10.1 ± 0.2	0.132 ± 0.011	2.16 ± 0.03	29.6 ± 0.2	11.5 ± 0.8
N247H	145 ± 4	18.4 ± 0.4	7.09 ± 0.18	13.4 ± 0.2	8.12 ± 0.59	146 ± 10	9.84 ± 1.01	6.74 ± 0.04	0.0486 ± 0.0056	6.20 ± 0.15	21.9 ± 1.4	1.61 ± 0.1

Data are average ± standard deviation for three independent experiments.

Table 4-6. Kinetic parameters of TAGG1 and TAGG2 wild type, and TAGG1 mutants for pNP β -glycosides.

Enzyme	pNP Glc				pNP D-Fuc				pNP Gal			
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} mM^{-1}$)	k_{cat}/K_m ratio ^a (-fold)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} mM^{-1}$)	k_{cat}/K_m ratio ^a (-fold)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} mM^{-1}$)	k_{cat}/K_m ratio ^a (-fold)
TAGG1 wild type	130 \pm 1	0.153 \pm 0.008	846	1	4.92 \pm 0.061	0.0132 \pm 0.0003	373	1	6.27 \pm 0.09	0.934 \pm 0.024	6.71	1
TAGG2 wild type	322 \pm 10	0.247 \pm 0.016	1300	1.5	398 \pm 13	0.162 \pm 0.008	2460	6.6	313 \pm 4	1.03 \pm 0.03	305	46
TAGG1 L176W-M188L/N247H	275 \pm 2	0.362 \pm 0.003	758	0.90	334 \pm 12	0.216 \pm 0.015	1550	4.2	424 \pm 2	1.76 \pm 0.02	241	36
L176W-M188L	188 \pm 3	0.084 \pm 0.005	2240	2.7	155 \pm 5	0.0628 \pm 0.0068	2470	6.6	88.4 \pm 2.5	1.77 \pm 0.08	49.9	7.4
L176W/S177T/N247H	274 \pm 3	0.138 \pm 0.004	1980	2.4	54.4 \pm 0.3	0.0224 \pm 0.001	2430	6.5	256 \pm 0	1.09 \pm 0.03	235	35
L176W/S177T	188 \pm 6	0.0663 \pm 0.0033	2840	3.4	49.2 \pm 1.4	0.0249 \pm 0.0024	1970	5.3	35.8 \pm 0.4	0.998 \pm 0.02	35.9	5.4
N247H	173 \pm 2	0.216 \pm 0.009	797	0.94	18.2 \pm 0.5	0.0271 \pm 0.0037	672	1.8	22.3 \pm 0.4	2.17 \pm 0.05	10.3	1.5

Data are average \pm standard deviation for three independent experiments. a. Ratio of k_{cat}/K_m to that of TAGG1 wild type.

Table 4-7. Kinetic parameters of TAGG1 and TAGG2 wild type, and TAGG1 mutants for methyl β -glycosides.

Enzyme	Methyl Glc		Methyl D-Fuc		Methyl Gal	
	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
TAGG1 wild type	0.501	0.0925 ± 0.008	0.57 ± 0.148	0.162	N.D.	N.D.
TAGG2 wild type	2.04	N.D.	N.D.	0.667	0.0109	0.0109
TAGG1 L176W-M188L/N247H	1.84	N.D.	N.D.	0.443	0.0102	0.0102
L176W-M188L	1.18	N.D.	N.D.	0.565	0.00579	0.00579
L176W/S177T/N247H	1.40	N.D.	N.D.	0.421	N.D.	N.D.

Data are average \pm standard deviation for three independent experiments. N.D., not determined.

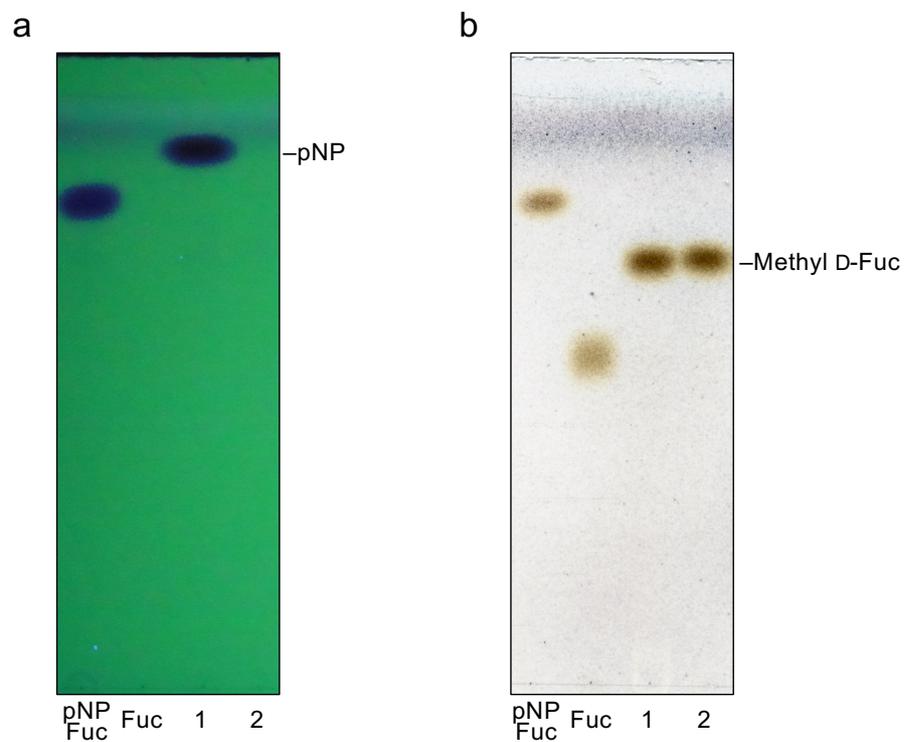


Figure 4-2. TLC analysis of the formation of methyl β -D-fucopyranoside from pNP β -D-fucopyranoside and methanol in transglycosylation catalyzed by TAGG2.

The transglycosylation by TAGG2 (39.6 nM) with 10 mM pNP D-Fuc and 30% (v/v) methanol in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) was done at 30 °C for 80 min. The reaction was analyzed by TLC visualized with UV (a) and carbohydrate staining (b).

1, Reaction mixture. 2, the reaction mixture desalted by using Amberlite MB-4, after termination of the reaction. pNP Fuc (pNP D-Fuc) and Fuc (D-fucose), authentic standards.

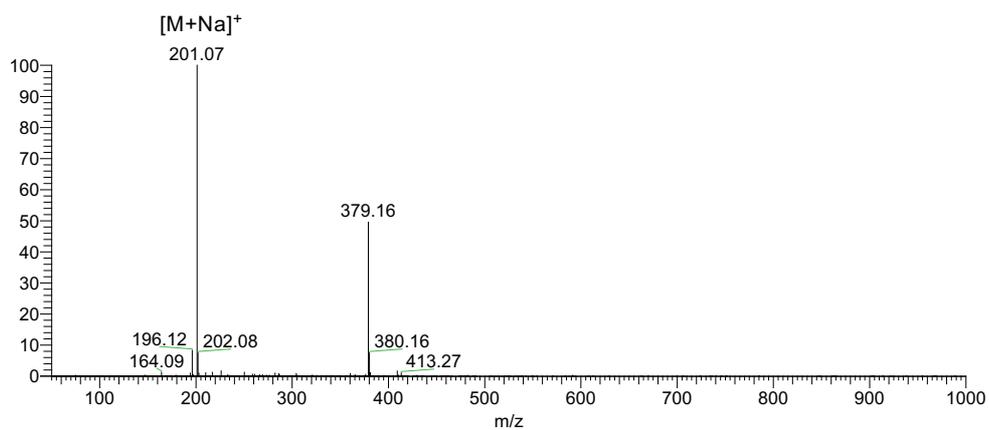


Figure 4-3. ESI-MS analysis of the prepared methyl β -D-fucopyranoside.

Product ion spectra of the preparation at m/z 201.07 corresponds to sodium adduct of methyl β -D-fucopyranoside (201.074 Da).

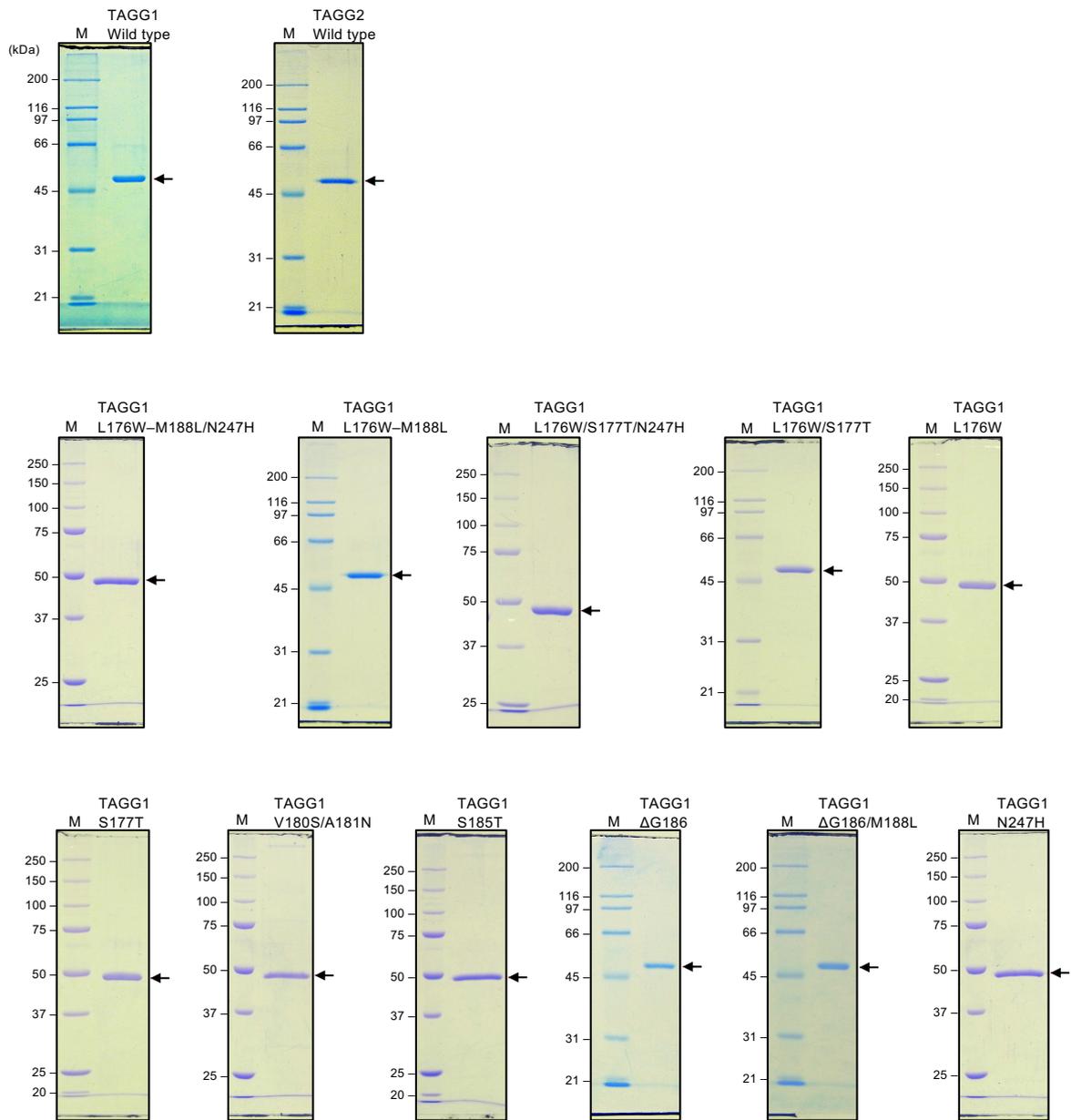


Figure 4-4 . SDS-PAGE analysis of purified recombinant TAGG1, TAGG2, and TAGG1 variants. Lane M, protein size marker; the right lane, each purified recombinant enzyme (1 μ g). Protein was stained with CBB. Molecular masses of the standard proteins are shown on the left. Recombinant TAGG1 and its variants (49 kDa), and TAGG2 (49 kDa) are indicated by an arrow.

4.4 考察

本章では, GH1 β -グルコシダーゼ基質グルコシド・D-フコシド特異性が, 基質アグリコンの結合様式に依存することについて, pNP Glc 特異的な TAGG1 と pNP D-Fuc 特異的な TAGG2 を用いて, 基質側のアグリコン部分の変換および酵素側の推定アグリコン結合部位の変換の両面から明示した. すなわち, TAGG2 は, pNP 配糖体では β -D-フコシドに良く作用するが, メチル配糖体では β -D-グルコシドに良く作用した (Table 4-4). また, TAGG1 を親酵素とし, TAGG2 型のアグリコン結合部位を導入すると, pNP Glc よりも pNP D-Fuc に良く作用するようになり, pNP Gal に対する速度も大きく増加した (Table 4-6). 以上より, 基質のアグリコン部分の結合様式が, 少なくとも β -D-グルコシド, β -D-フコシド, β -D-ガラクトシドの特異性に影響を与えることは確実であると言える. 以降, グリコシド特異性の基質アグリコンの結合様式依存性に関する分子機構について考察していく.

まず, pNP 配糖体におけるグリコシド特異性に寄与する鍵残基について考察する. 推定アグリコン結合残基を TAGG2 の対応残基に置換した TAGG1 変異酵素は, TAGG2 と同じく pNP D-Fuc に最も良く作用した. 特に 8 重置換体 L176W-M188L/N247H の pNP Glc, pNP D-Fuc, pNP Gal に対する k_{cat}/K_m の比率は TAGG1 野生型よりも TAGG2 に近い値となった. これは, 置換を 3 残基に限定した 3 重置換体 L176W/S177T/N247H でも同様であった. また, 単一置換体 N247H および 2 重置換体 L176W/S177T では特異性の逆転には至らなかったが, pNP D-Fuc 特異性が増加し, 単一置換体 L176W, S177T では, 1 mM 基質に対する速度において, pNP D-Fuc 選択性の増加が認められた. 推定アグリコン結合部位に位置する Leu176, Ser177, Asn247 の 3 残基が pNP Glc と pNP D-Fuc に対する特異性に重要な残基であると考えられた. TAGG1 の Ser177 相当残基への変異導入による pNP Glc と pNP D-Fuc に対する特異性の変化は, その他 GH1 酵素においても確認される. ヒト (*Homo sapiens*) 由来 hCBG の V168Y における pNP D-Fuc に対する pNP Glc の k_{cat}/K_m 比は野生型の値 0.24 から 0.30 に微増し, *S. frugiperda* 由来 Sf β gly の E190A では野生型の値 0.23 から 0.90 に増加している (Berrin *et al.* 2003; Mendonça and Marana 2008). このことは, 推定アグリコン結合部

位 Ser177 相当残基による pNP Glc と pNP D-Fuc 特異性への影響が GH1 酵素に普遍的であることを示唆する。

次に、予想される pNP 結合様式について考察する。TAGG1 と TAGG2 の pNP Glc との結合様式を推定するため、*N. koshunensis* 由来 NkBgl の一般酸塩基触媒変異酵素 (E193D) と pNP Glc の複合体構造 (PDB entry, 3AI0; Jeng *et al.* 2011), TAGG1 (ColabFold (Mirdita *et al.* 2021) により作成) および TAGG2 (PDB entry, 3PTQ; Sansenya *et al.* 2011) の構造を比較した (Figure 4-5)。TAGG1 の Leu176, Ser177, Asn247 および TAGG2 における対応残基は pNP 基と相互作用し得る距離に位置した。今回、TAGG2 および、これら 3 残基に対する変異を含む TAGG1 変異酵素 (8 重置換体 L176W-M188L/N247H および 3 重置換体 L176W/S177T/N247H) は、pNP 配糖体では D-フコシド特異性を示し、メチル配糖体では TAGG1 と同じグルコシド特異性を示した。メチル配糖体はアグリコンの嵩が小さいことから、アグリコン結合部位と基質アグリコンとの相互作用がほとんどないと考えられる。これらのことから、TAGG2 型のアグリコン結合部位を持つ酵素では、メチル配糖体ではグルコシドに対する作用に適した結合様式、おそらくは TAGG1 と同様なものをとるが、pNP 配糖体では pNP 基とアグリコン結合部位の相互作用により、グリコンの結合様式がグルコシドに対する作用に適さないものに変化すると推定された。すなわち、グルコシド・フコシド特異性はアグリコンの結合様式に依存すると考えられた。

pNP 結合様式に伴うグリコン側の結合様式の変化について考察する。上述したようにアグリコンの結合様式に依存してグリコン結合様式が変化するとき、サブサイト-1 において、結合様式の変化に対応する残基が存在すると予想される。メタゲノム由来 Td2F2 の D-グルコース複合体と D-フコース複合体の重ね合わせ構造 (それぞれ PDB entry は 3WH6 と 3WH7; Matsuzawa *et al.* 2016) では、グリコン結合部位 (サブサイト-1) に存在する D-グルコースと D-フコースと相互作用する残基のうち、L8 上の Glu406 (D-グルコースの 4-O と 6-O あるいは D-フコースの 4-O と相互作用する) にのみ側鎖配向の違いが見られる (Figure 4-6)。このことから、側鎖配向に多様性を持つこの L8-Glu は、アグリコン結合様式に伴って変化するグルコシドおよび D-フコシドの結合を許容し得ると考えられる。この L8 上の Glu 側鎖配向の多様性は、その他の GH1 酵素 *Z. mays* 由

来 ZmGlu1 (1E56 と 1V08; Verdoucq *et al.* 2004), *N. koshunensis* 由来 NkBgl (3AI0 と 3VIL; Jeng *et al.* 2012) および *O. sativa* 由来 Os3BGlu6 (3GNP; Seshadri *et al.* 2009) などにおいて確認される。また、この L8-Glu はグルコシド・フコシド・ガラクトシドに対する特異性に重要であることが変異酵素の解析より示されている (Marana *et al.* 2002)。 *S. frugiperda* 由来 Sfβgly は、TAGG2 と同様に pNP D-Fuc に最も高い k_{cat}/K_m を示す (pNP Glc, $2.4 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$; pNP D-Fuc, $6.7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$; pNP Gal, $0.17 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)。 該当残基 Glu451 の Ala 置換体の k_{cat}/K_m は、pNP Glc で $0.026 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (野生型比 $1.1 \times 10^{-3}\%$)、pNP D-Fuc で $0.39 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (野生型比 $5.8 \times 10^{-3}\%$)、pNP Gal で $0.57 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (野生型比 0.34%) であり、pNP Glc で顕著に低下したことから、L8-Glu451 は特にグルコシドに対する作用に重要であることが示されている。 これらのことから、各グリコン結合様式のグルコシドへの作用の有利・不利は、L8-Glu の側鎖配向に依存すると予想された。 すなわち、TAGG1 のアグリコン結合部位を持つ酵素やアグリコンの嵩が小さい基質の結合では、L8-Glu はグルコシドへの作用に適した配向をとるが、TAGG2 のアグリコン結合部位を持つ酵素とアグリコンの嵩高い基質の結合では、アグリコン側の酵素-基質間の相互作用によりグリコンの結合様式が変化し、これに伴い L8-Glu の側鎖がグルコシドに対する作用に不利な配向をとると考えられた。

既知 GH1 酵素における、推定アグリコン結合部位形成残基と pNP Glc と pNP D-Fuc に対する特異性の相関について考察する。 推定アグリコン結合部位形成残基として、TAGG1 の Leu177, Ser178, Asn247 の 3 残基に加え、Val245 および Trp360 の 2 残基に着目した。 Val245 および Trp360 は TAGG1 および TAGG2 間で保存され、NkBgl と pNP Glc の複合体構造と TAGG1 の重ね合わせ構造において pNP 基と相互作用できる距離に位置する (Figure 4-5)。 これら 5 残基に相当する残基について、pNP Glc および pNP D-Fuc に対する特異性が解析されている GH 1 酵素 22 種における配列比較を行った (Table 4-8)。 これら GH1 酵素の pNP D-Fuc の k_{cat}/K_m に対する pNP Glc の k_{cat}/K_m の相対値は様々であり、pNP Glc と pNP D-Fuc に対する特異性は多様である (Rouyi *et al.* 2014; Kempton and Withers 1992; Hancock *et al.* 2005; Baiya *et al.* 2014; Fourage *et al.* 2000; Vallmitjana *et al.* 2001; Opassiri *et al.* 2004; Gu *et al.* 2009; Hong *et al.* 2009; Sue *et al.* 2000; Marana *et al.* 2002; Kim *et al.* 2009; Park *et al.* 2010; Uchiyama *et al.* 2013; Berrin *et al.* 2003; Chuankhayan *et al.*

2005; Hwa *et al.* 2015; Seshadri *et al.* 2009). 推定アグリコン結合部位形成残基の保存性は低く, pNP Glc 特異性が高い (pNP D-Fuc に対する pNP Glc の k_{cat}/K_m 比が 1 より大きい) 酵素でのみ保存される残基, または pNP D-Fuc 特異性が高い (k_{cat}/K_m 比が 1 より小さい) 酵素でのみ保存される残基はなく, pNP Glc と pNP D-Fuc に対する特異性とこれら残基の種類に明確な相関は見られなかった. GH1 酵素の多様なアグリコン結合部位が pNP Glc および pNP D-Fuc に対する多様な特異性に寄与すると考えられた.

本章で, 基質アグリコンによってグリコシド特異性が変化することが示された. この結果は, グリコシド特異性の評価に pNP 基質のみを用いることに警鐘を鳴らすと言える. グリコシド特異性の評価のためには, 基質アグリコン側の構造を考慮する必要があるだろう.

Table 4-8. Alignment of the residues consist of aglycone binding site of GH1 enzymes in which the activities for pNP Glc and pNP D-Fuc are determined.

Kingdom	Organism	Enzyme	pNP Glc		pNP D-Fuc		ratio ^a	L176	S177	V245	N247	W360	Reference
			k_{cat}/K_m	$(s^{-1} mM^{-1})$	k_{cat}/K_m	$(s^{-1} mM^{-1})$							
Plant	<i>Oryza sativa</i>	TAGG1	846		373		2.27	L	S	V	N	W	This study
Plant	<i>Oryza sativa</i>	Os1BGlu4	17.9		9.34		1.92	L	Q	D	E	W	Rouyi <i>et al.</i> 2014
Bacteria	<i>Agrobacterium</i> sp.	Abg	2170		1160		1.88	W	C	N	H	W	Kempton and Withers 1992
Archaea	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Ss β -gly	29.8		24.6		1.21	N	V	A	S	W	Hancock <i>et al.</i> 2005
Plant	<i>Oryza sativa</i>	Os4BGlu16	1.06		0.896		1.18	N	L	A	K	G	Baiya <i>et al.</i> 2014
Bacteria	<i>Thermus thermophilus</i> HB27	BglT	227		247		0.92	W	C	N	A	W	Fourage <i>et al.</i> 2000
Plant	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtBGlu42	72.2		81.3		0.89	L	Q	D	E	W	This study
Bacteria	<i>Streptomyces</i> sp.	Bgl3	190		265		0.72	W	C	N	H	W	Vallmitjana <i>et al.</i> 2001
Plant	<i>Oryza sativa</i>	Os3BGlu7	34.7		57.5		0.60	R	I	D	N	W	Opassiri <i>et al.</i> 2004
Bacteria	<i>Thermus thermophilus</i> HJ6	β -gly	57.1		105		0.54	W	C	N	A	W	Gu <i>et al.</i> 2009
Plant	<i>Oryza sativa</i>	TAGG2	1300		2460		0.53	W	T	V	H	W	This study
Bacteria	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Csac_1089	579		1190		0.49	Y	C	N	T	W	Hong <i>et al.</i> 2009
Plant	<i>Secale cereale</i>	ScGlu	30.3		78.6		0.39	H	T	D	M	W	Sue <i>et al.</i> 2000
Animal	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Sf β gly	2.4		6.7		0.36	R	E	S	N	W	Marana <i>et al.</i> 2002
Archaea	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	TaBglA	381		1070		0.36	N	I	A	G	W	Kim <i>et al.</i> 2009
Archaea	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	SaBgaS	46		134		0.34	N	V	A	T	W	Park <i>et al.</i> 2010
Bacteria	metagenome	Td2F2	32.3		115		0.28	W	C	N	T	R	Uchiyama <i>et al.</i> 2013
Animal	<i>Homo sapiens</i>	hCBG	6.9		28.9		0.24	N	V	F	V	W	Berrin <i>et al.</i> 2003
Plant	<i>Dalbergia nigrescens</i>	DnBGlu	0.876		4.02		0.22	Q	V	D	R	W	Chuankhayan <i>et al.</i> 2005
Plant	<i>Oryza sativa</i>	Os4BGlu18	0.789		4.06		0.19	N	V	Y	T	T	Baiya <i>et al.</i> 2014
Archaea	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	Tkbgly	49.5		343		0.14	M	V	N	I	W	Hwa <i>et al.</i> 2015
Plant	<i>Oryza sativa</i>	Os3BGlu6	6.2		67		0.09	H	T	D	M	W	Seshadri <i>et al.</i> 2009

^a, Ratio of k_{cat}/K_m for pNP Glc to that for pNP D-Fuc.

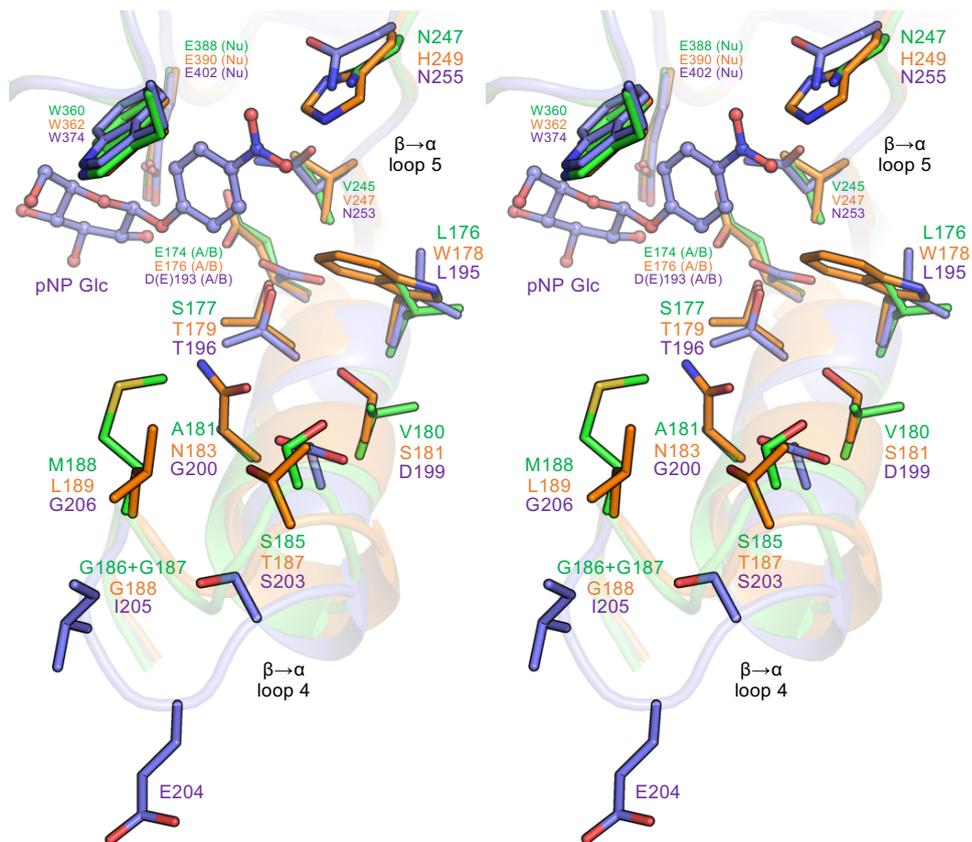


Figure 4-5. Comparison of possible aglycone binding site of TAGG1 and TAGG2.

Residues around the possible aglycone binding site are shown in the superimposed structures of TAGG1 (green; Colabfold), TAGG2 (orange; PDB entry, 3PTQ; Sansenya *et al.* 2011), and NkBgl (purple; PDB entry, 3AI0; Jeng *et al.* 2011). pNP Glc of NkBgl complex (purple) is shown shown in ball and stick representation.

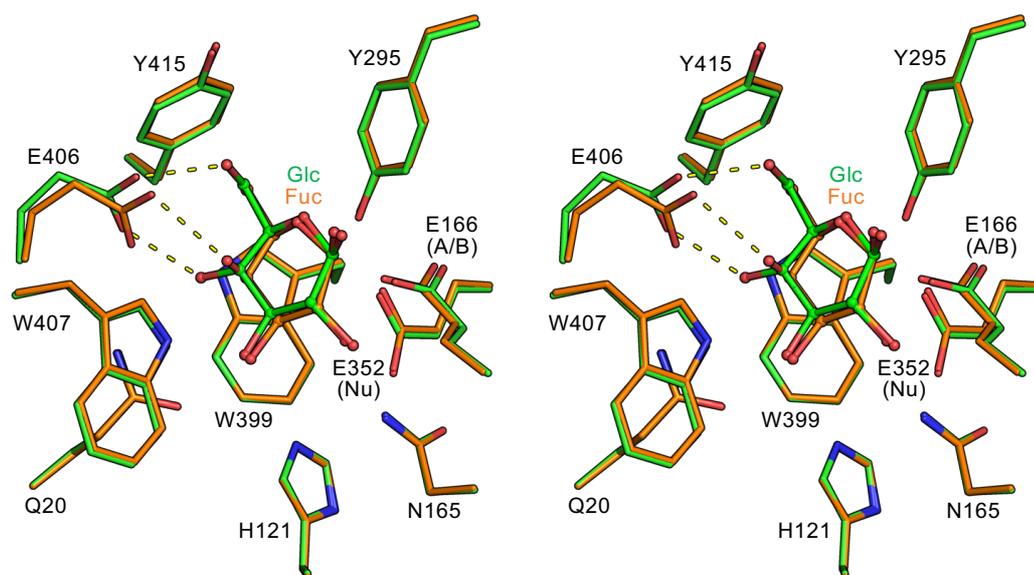


Figure 4-6. Comparison of the residues arrangement for D-glucose and D-fucose binding in Td2F2 complex.

Residues around glycone binding site of Td2F2-D-glucose complex (green; PDB entry, 3WH6; Matsuzawa *et al.* 2016) and Td2F2-D-fucose complex (orange; PDB entry, 3WH7; Matsuzawa *et al.* 2016). D-Glucose and D-fucose are shown in ball and stick representation. Predicted hydrogen bonds are indicated by dotted lines.

5 総合考察—構造に基づく植物 GH1 酵素の機能の整理—

本研究では、植物 GH1 酵素が示す多様なアグリコンおよびグリコン特異性を支える分子基盤を明らかにすることを目的として、GH1 酵素の機能・構造解析を行った。第2章では、スコポリンなどクマリン配糖体の加水分解を担うとされていたシロイヌナズナ由来 AtBGlu42 の酵素機能と結晶構造を明らかにし、本酵素がスコポリンに高い加水分解活性を持つことを生化学的に示すとともに、結晶構造と結合予測に基づき Phe197 および Trp360 がスコポリンとの結合に寄与すると推定した。また、本酵素がセロオリゴ糖にも良く作用することを見出し、本酵素が示すセロオリゴ糖三糖に対する高い特異性に Arg342 が重要であることを部位特異的変異酵素の機能に基づき示した。また、同 Arg342 はサブドメイン上にあり、サブドメインの配置等により該当 Arg の配置および機能に違いが生じ得ることを考察した。第3章では、シロイヌナズナ由来 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 およびイネ由来 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 を対象とし、これら酵素がそれぞれ示すマンノシドとグルコシドに対する特異性がサブサイト-1 のセカンドシェル残基の違いによることを明らかにした。第4章では、pNP Glc と pNP D-Fuc に対してそれぞれ特異的なイネ由来 TAGG1 および TAGG2 に関し、アグリコンの異なる基質への作用と TAGG1 の推定アグリコン結合部位の変異酵素の機能を解析して、グルコシドと D-フコシドに対する特異性が基質のアグリコン部分と酵素のアグリコン結合部位の相互作用に依存することを明らかにした。

本章では、本研究で明らかにした酵素の基質特異性ならびに基質特異性に寄与する構造を加味して、植物 GH1 酵素の機能を整理する。シロイヌナズナおよびイネを含む植物8種 (シロイヌナズナ, *A. thaliana*; トマト, *S. lycopersicum*; イネ, *O. sativa*; オオムギ, *H. vulgare*; モロコシ, *S. bicolor*; トウモロコシ, *Z. mays*; ヒメツリガネゴケ, *Physcomitrella patens*; イヌカタヒバ, *Selaginella moellendorffii*) に由来する GH1 酵素の配列の分子系統樹が Figure 5-1, 5-2, 5-3 である。この図は、植物ゲノムデータベース Phytozome v13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) より GH1 酵素の Pfam ID (PF00232) を有する推定 GH1 酵素の 264 配列を 3.2.3 項にしたがい多重整列し、 $(\beta/\alpha)_8$ -バレルを構成する β -ストランドの欠失が認められた配列を非機能的酵素として除外して得

た 200 配列より, 3.2.3 項にしたがい作成した. 以下に示す注目残基に基づき各 GH1 酵素の機能を推定した.

AtBGlu42 とスコポリンの結合予測により, スコポリンの 6-メトキシ基とファンデルワールス相互作用する Phe197, およびウンベリフェリル基とスタッキング相互作用する Trp360 が, スコポリンへの高活性に重要と考えられた (第 2 章 Figure 2-7). 収集した 200 の推定 GH1 酵素のうち, Phe197 および Trp360 を有するものはそれぞれ 49 個および 105 個, 両方が保存されるものは 31 個であり, これらの酵素は系統樹上で特定のクレードを形成していなかった (Figure 5-1). シロイヌナズナでは AtBGlu44, AtBGlu45 および AtBGlu46 の 3 種が両残基を保持していた. これらのうち, AtBGlu44 は第 3 章で述べたように β -マンノシダーゼであり, グリコシドへの作用に適したサブサイト-1 構造を持たない. 本酵素の 4MU Glc に対する活性は低く (0.782 U/mg, 10 mM 基質濃度), スコポリンに対する加水分解活性は低いと推定される (Xu *et al.* 2004). AtBGlu45 および AtBGlu46 は, 組換え酵素および欠損株の解析から, 茎部において植物細胞壁中のリグニンの前駆体モノリグノール配糖体 (コニフェリンおよびシリンギン) の加水分解を担うとされる (Escamilla-Treviño *et al.* 2006; Chapelle *et al.* 2012). AtBGlu46 については, 4MU Glc に対してコニフェリンやシリンギンと同程度の比活性 (1.77 U/mg, 10 mM 基質濃度) を示すことが示されており, スコポリンに対する加水分解活性を持つ可能性がある (Escamilla-Treviño *et al.* 2006). スコポリンはオーキシン様活性を持つ 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸処理により地上部における蓄積が誘導される (Kai *et al.* 2006) ことから, この様な条件下で地上部にスコポリンが蓄積すると茎部に存在する AtBGlu45 および AtBGlu46 により加水分解されると考えられる. また, AtBGlu45 欠損株では根部に光を連続的に照射する生育条件下において, 野生型より根部におけるスコポリン内生量が高いことが報告されている (Chapelle *et al.* 2012). これは人工的な環境ではあるが, AtBGlu45 による根部におけるスコポリンの代謝の可能性を示唆するものである.

セロオリゴ糖の鎖長特異性に, AtBGlu42 における L6 上の Arg342 に相当する残基が重要であることを明らかにした (第 2 章). AtBGlu42 の三糖特異性は Arg342 が四糖以上のセロオリゴ糖に対してサブサイト+3 において立体障害となることによる. 一方, メタゲノム由来 Td2F2 では該当

残基に Arg313 を持つのも四糖特異性である。Arg313 が L5 および L6 からなる小ドメイン上にあり、この小ドメインの位置が L5 と $\alpha 6$ 間に形成される塩橋により AtBGlu42 とは異なり、これにより、Arg313 が異なる位置に配置されサブサイト+3 における立体障害とならないと考えられた (第 2 章)。全 200 の植物 GH1 酵素は Td2F2 において塩橋形成に寄与する残基を持たなかったことから、これらの小ドメインは AtBGlu42 と同様の配向をとると予想された。このことは 17 種の立体構造既知の植物 GH1 酵素はいずれも Td2F2 様の小ドメイン構造をとらないことと矛盾しない (第 2 章)。200 個の植物 GH1 タンパク質のうち、AtBGlu42 の Arg342 相当残基として Arg を持つ酵素は 8 個のみであり、Arg との塩橋の形成により、Arg をサブサイト+3 において立体障害となる位置に配向させると推定される L5 上の Glu (AtBGlu42 における Glu246) を持つものは、分子系統樹において同一クレード内に属す AtBGlu42 およびイネ由来 Os1BGlu4 を含む 5 個であった (Figure 5-2)。ただし、Os1BGlu4 は該当残基に Arg334 を持つが四糖特異性を示す (Rouyi *et al.* 2014)。これは、この Arg334 の 2 残基 C 末端側の Glu336 (AtBGlu42 の対応残基は Val344) により Arg 側鎖の配向がサブサイト+3 から遠ざかり、Arg が立体障害とならないためと推定された (第 2 章)。これら 5 個のタンパク質のうち、Os1BGlu4 を含む単子葉植物由来の 4 個は Arg の 2 残基 C 末端側に Glu を持つことから、四糖特異性を示すと予想された。AtBGlu42 において Arg342 を、長鎖セロオリゴ糖を好む Os3BGlu7 (Opassiri *et al.* 2004) の対応残基 Tyr への置換により、鎖長特異性が長鎖側にシフトしたことから、この Tyr は長鎖特異性に寄与すると考えられた (第 2 章)。Os3BGlu7 と同じく長鎖特異性を示す Os3BGlu8 (Kuntothom *et al.* 2009) はこの位置に Phe を持つことから、Tyr や Phe のような芳香属アミノ酸残基が長鎖特異性に重要であると考えられる。200 配列のうち、Arg342 該当残基に Tyr および Phe を持つ酵素は 43 個であった。そのうち、Os3BGlu7 においてサブサイト+2 のグルコシル基と相互作用する Asn245 および Trp358 (それぞれ AtBGlu42 の Glu246 および Trp360 に相当する) の両方を持つものは単子葉植物 (*O. sativa*, *Z. mays*, *S. bicolor*, *H. vulgare*) 由来の 10 個であり、これらは分子系統樹において Os3BGlu7 および Os3BGlu8 を含むクレードに属していた。Os3BGlu7 と Os3BGlu8 はイネにおいて花部や実生など組織の生長が盛んな器官において盛んに転写されることから、これらは長鎖セロオリゴ糖分解により細胞壁

代謝に寄与すると予想されているが、それぞれの欠損株では明確な表現型が観察されていない (Opassiri *et al.* 2003; Ketudat Cairns *et al.* 2015; Shim *et al.* 2021). このことは, Os3BGlu7 と Os3BGlu8 の機能の重複性によるものと考えられ, これら酵素の生理機能を明らかにするには多重変異株の解析が望まれる.

シロイヌナズナ由来 β -マンノシダーゼ AtBGlu44 およびイネ由来 β -グルコシダーゼ Os3BGlu7 の変異酵素の解析を通じて, 基質グリコンと相互作用する残基の配向調節に寄与すると考えられる β 3-Asn, β 5-Leu, β 7-Leu-Ser がマンノシド特異性に重要な構造であることがわかった (第3章). 全200の植物GH1酵素のうち, これら4残基を持つものは11個であり, いずれも分子系統樹上では4種の既知植物 β -マンノシダーゼ (*O. sativa* 由来 Os7BGlu26 (Kuntothom *et al.* 2009), *A. thaliana* 由来 AtBGlu44 (Xu *et al.* 2004), *H. vulgare* 由来 HvBII (Hrmova *et al.* 1998) および *S. lycopersicum* 由来 LeMise2 (Mo and Bewley 2002)) および長鎖セロオリゴ糖加水分解酵素 Os3BGlu7 および Os3BGlu8 が属するクレードに属す (Figure 5-3). ここで配列比較に用いた8種の植物のうち, ヒメツリガネゴケを除く7種の維管束植物全てが β -マンノシダーゼを持つと予想された. また, シロイヌナズナの β -マンノシダーゼは AtBGlu44 のみであり, イネでは Os7BGlu26 に加え Os1BGlu1 も β -マンノシダーゼであると予想された. 同じクレードに属する Os12BGlu38 の遺伝子は花粉管で発現量が高く, ヘテロ欠損株における自家受精によって Os12BGlu38 ホモ欠損株が得られなかったことから受精に重要な機能を担うと考えられている (Shim *et al.* 2021). また, 欠損株において花粉管の内壁が欠失しており, 組換え酵素は低いながらもグルコオリゴ糖加水分解活性を示すことから, 内壁構成多糖の構成成分であるオリゴ糖を分解し, 花粉管内壁の正常な発達に寄与すると考えられている (Shim *et al.* 2021). Os12BGlu38 は, β -マンノシダーゼ活性に最も重要だと考えられる β 5-Leu を有するが, その他 β 3-Asn, β 7-Leu-Ser の位置に, それぞれ β 3-Val, β 7-Ile-Gly を持つ. β 7-Ile は β -グルコシド特異性に寄与することを第3章で示したが, β 3-Val および L7-Gly のグルコシドとマンノシドに対する特異性への寄与は不明である. β -マンノシダーゼにおける β 5-Leu は β 3-Asn と L7-Ser との側鎖間の相互作用により, それぞれ基質グリコン 3-O と相互作用する L3-His 側鎖の配向および求核触媒残基 L7-Glu の主鎖の位

置をマンノシドの結合に適する構造に調節すると予想される。しかし、Os12BGlu38 では β -マンノシダーゼにおける β 3-Asn および L7-Ser が、それぞれ嵩の小さな β 3-Val および L7-Gly であるため、 β 5-Leu による L3-His の側鎖の配向および L7-Glu の位置の調節は起こらないと考えられた。このことから Os12BGlu38 の構造は β -マンノシドに対する作用に適さないと予想された。

本研究により、混沌としていた植物 GH1 酵素の基質特異性と構造の相関の一端が整理された。これらの知見に基づく高精度な機能予測により、植物 GH1 酵素の生理機能の解明が進むことを期待したい。

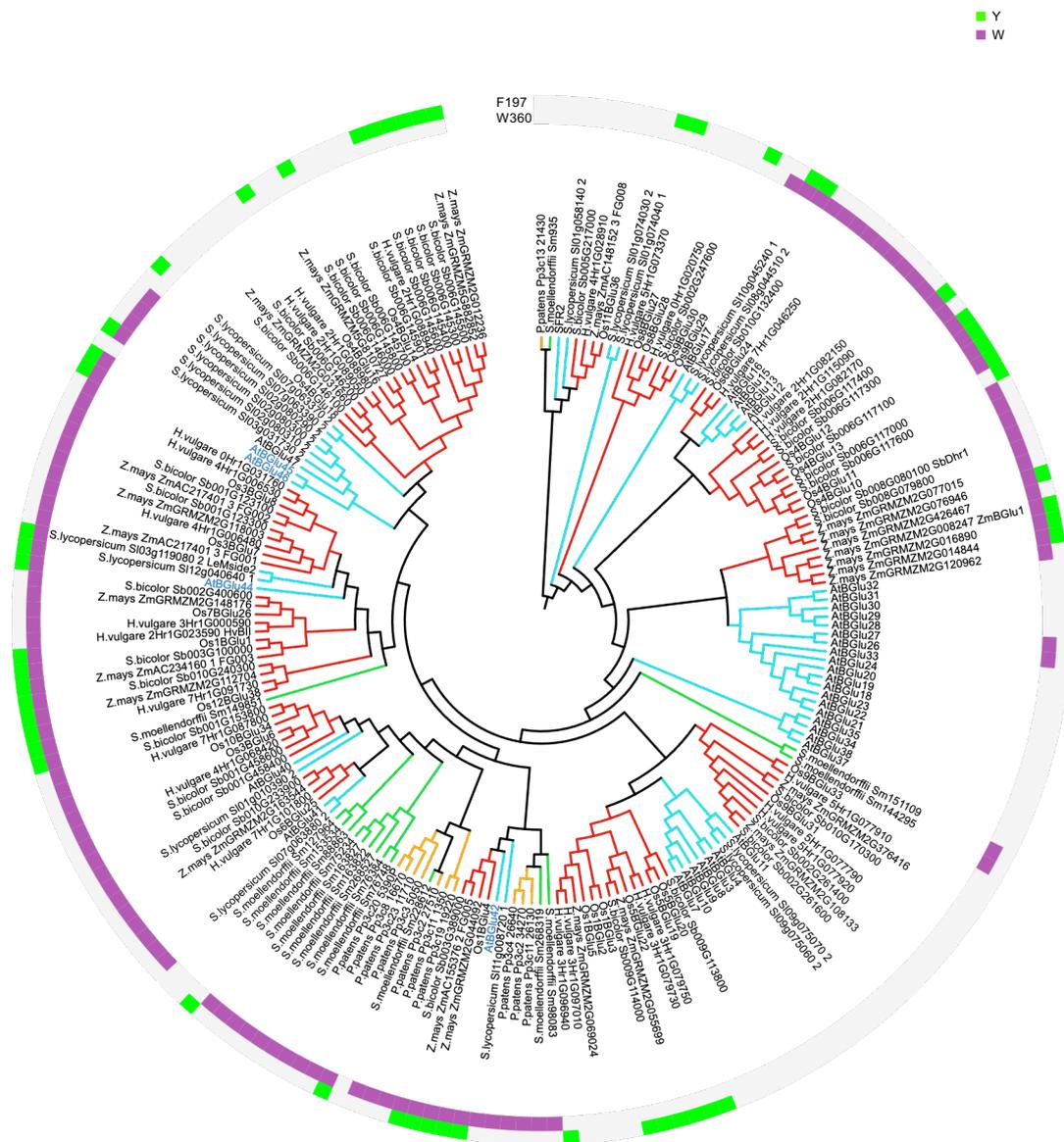


Figure 5-1. The phylogenetic tree of 200 GH1 enzymes and possible scopolin-binding residues across the plant kingdom.

The tree was made by the neighbor-joining method. Branches are colored according to the taxonomy (Bryophytes, yellow; Lycophytes, green; Monocots, red; Eudicots, blue). Color boxes at the rings surrounding the tree indicate the possible GH1 enzymes with the possible scopolin-binding residues at the position of Phe197 (green) and Trp360 (violet) of AtBGlu42.

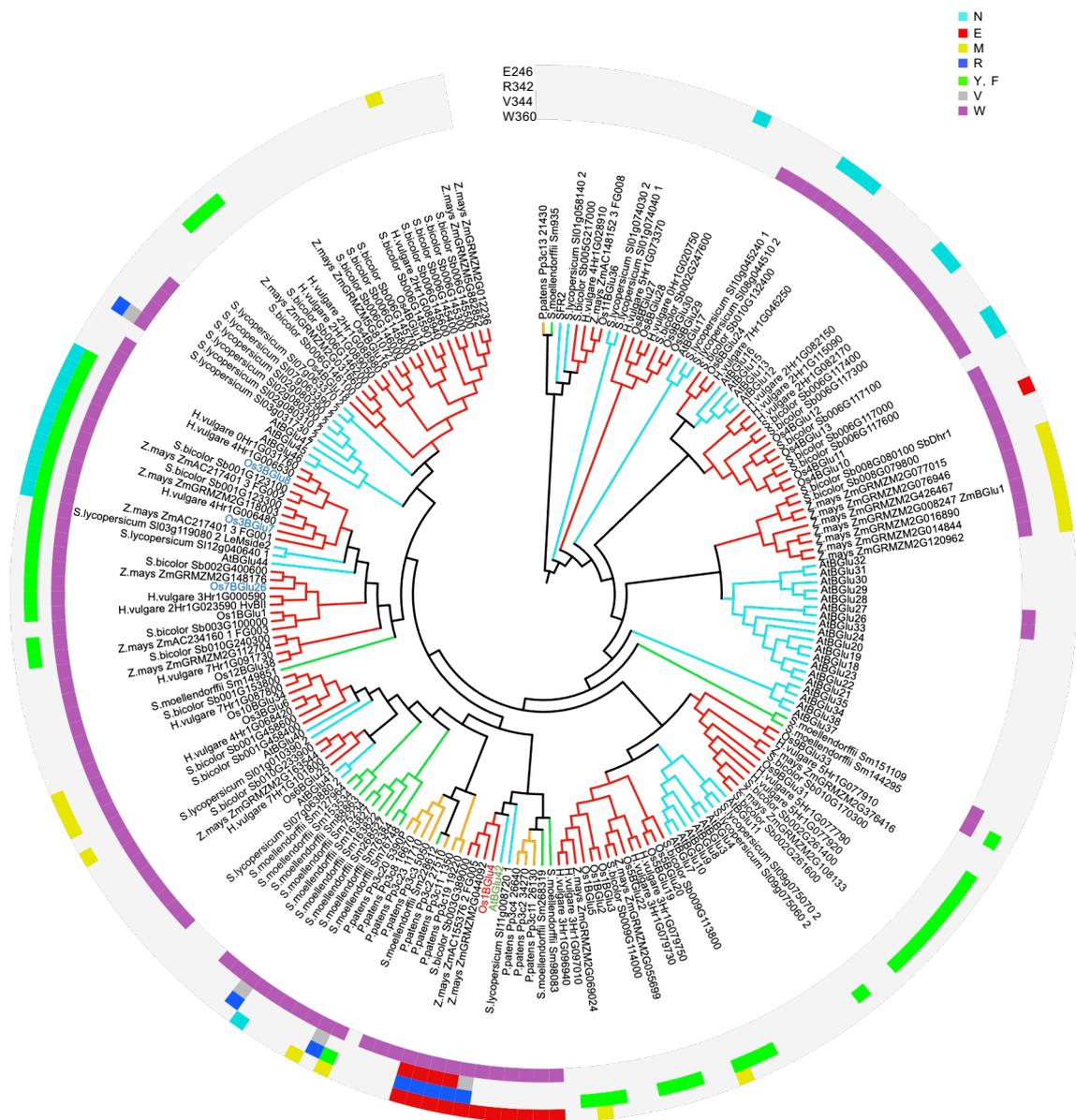


Figure 5-2. The phylogenetic tree of 200 GH1 enzymes and possible residues that affect cellobiosaccharide-specificities across the plant kingdom.

The tree was made by the neighbor-joining method. Branches are colored according to the taxonomy (Bryophytes, yellow; Lycophytes, green; Monocots, red; Eudicots, blue). Color boxes at the rings surrounding the tree indicate the possible GH1 enzymes with the possible residues that affect cellobiosaccharide-specificities at the position of Glu246, Arg342, Val344 and Trp360 of AtBGlu42. Asn, Glu, Met, Arg, Tyr and Phe, Val, and Trp are shown in cyan, red, yellow, blue, green, grey, and purple, respectively. Cellotriose specific enzyme (AtBGlu42), cellotetraose specific enzyme (Os1BGlu4), and cellohexaose specific enzyme (Os3BGlu7, Os3BGlu8, and Os7BGlu26) are shown in green, red, and blue, respectively.

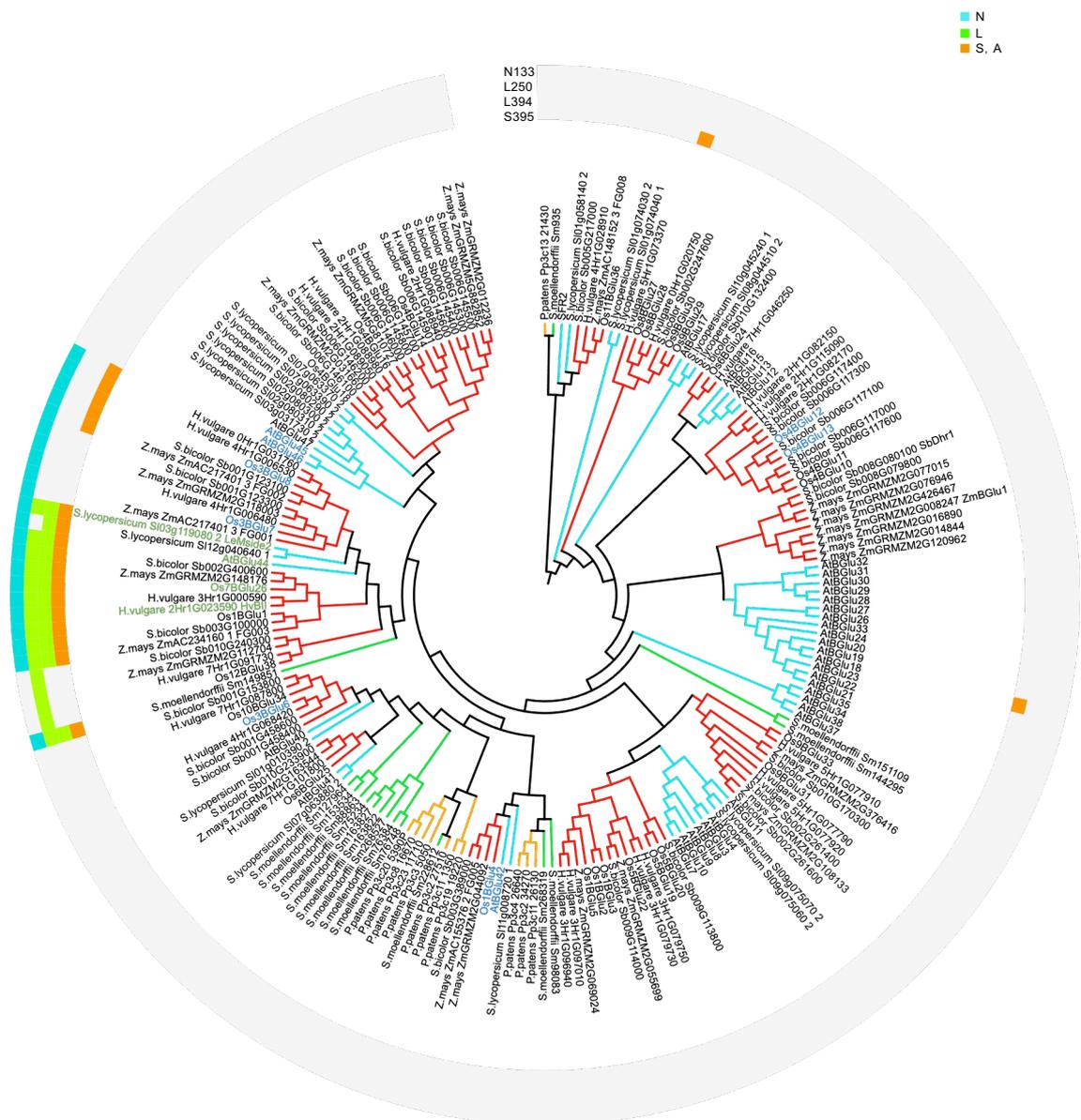


Figure 5-3. The phylogenetic tree of 200 GH1 enzymes and residues that affect mannoside specificity across the plant kingdom.

The tree was made by the neighbor-joining method. Branches are colored according to the taxonomy (Bryophytes, yellow; Lycophytes, green; Monocots, red; Eudicots, blue). Color boxes at the rings surrounding the tree indicate the possible GH1 enzymes with the residues that affect mannoside specificity at the position of Asn133, Leu250, Leu394 and Ser395 of AtBGlu44. Asn, Leu, and Ser and Ala are shown in cyan, green, and orange, respectively. The characterized β -mannosidases and β -glucosidases are shown in green and blue, respectively.

参考文献

- Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen sVB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. *PHENIX*: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;**66**:213-221.
- Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH, Adams PD. Towards automated crystallographic structure refinement with *phenix.refine*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2012;**68**:352-367.
- Ahn YO, Shimizu B, Sakata K, Gantulga D, Zhou C, Bevan DR, Esen A. Scopolin-hydrolyzing β -glucosidases in roots of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2010;**51**:132-143.
- Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol* 2019;**37**:420-423.
- Andersson D, Chakrabarty R, Bejai S, Zhang J, Rask L, Meijer J. Myrosinases from root and leaves of *Arabidopsis thaliana* have different catalytic properties. *Phytochemistry* 2009;**70**:1345-1354.
- Ardèvol A, Rovira C. Reaction mechanisms in carbohydrate-active enzymes: glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Insights from *ab initio* quantum mechanics/molecular mechanics dynamic simulations. *J Am Chem Soc* 2015;**137**:7528-7547.
- Baba SA, Vishwakarma RA, Ashraf N. Functional characterization of CsBGlu12, a β -glucosidase from *Crocus sativus*, provides insights into its role in abiotic stress through accumulation of antioxidant flavonols. *J Biol Chem* 2017;**292**:4700-4713.
- Babcock GD, Esen A. Substrate specificity of maize β -glucosidase. *Plant Sci* 1994;**101**:31-39.
- Baiya S, Hua Y, Ekkhara W, Ketudat Cairns JR. Expression and enzymatic properties of rice (*Oryza sativa* L.) monoglucosyl β -glucosidases. *Plant Sci* 2014;**227**:101-109.

- Baiya S, Mahong B, Lee SK, Jeon JS, Ketudat Cairns JR. Demonstration of monolignol β -glucosidase activity of rice Os4BGlu14, Os4BGlu16 and Os4BGlu18 in *Arabidopsis thaliana* *bglu45* mutant. *Plant Physiol Biochem* 2018;**127**:223-230.
- Baiya S, Pengthaisong S, Kitjaruwankul S, Ketudat Cairns JR. Structural analysis of rice Os4BGlu18 monolignol β -glucosidase. *PLoS One* 2021;**16**:e0241325.
- Barleben L, Panjikar S, Ruppert M, Koepke J, Stöckigt J. Molecular architecture of strictosidine glucosidase: the gateway to the biosynthesis of the monoterpenoid indole alkaloid family. *Plant Cell* 2007;**19**:2886-2897.
- Barth C, Jander G. Arabidopsis myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant J* 2006;**46**:549-562.
- Barrett T, Suresh CG, Tolley SP, Dodson EJ, Hughes MA. The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure* 1995;**3**:951-960.
- Bauer MW, Bylina EJ, Swanson RV, Kelly RM. Comparison of a β -glucosidase and a β -mannosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Purification, characterization, gene cloning, and sequence analysis. *J Biol Chem* 1996;**271**:23749-23755.
- Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Svatos A, Schneider B, Doubsky J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, Molina A, Schulze-Lefert P. A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 2009;**323**:101-106.
- Berrin JG, Czjzek M, Kroon PA, McLauchlan WR, Puigserver A, Williamson G, Juge N. Substrate (aglycone) specificity of human cytosolic β -glucosidase. *Biochem J* 2003;**373**:41-48.
- Bones AM, Rossiter JT. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* 2006;**67**:1053-1067.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248-254.

- Bridges M, Jones AM, Bones AM, Hodgson C, Cole R, Bartlet E, Wallsgrove R, Karapapa VK, Watts N, Rossiter JT. Spatial organization of the glucosinolate-myrosinase system in brassica specialist aphids is similar to that of the host plant. *Proc Biol Sci* 2002;**269**:187-191.
- Brzobohatý B, Moore I, Kristoffersen P, Bako L, Campos N, Schell J, Palme K. Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* 1993;**262**:1051-1054.
- Burmeister WP, Cottaz S, Driguez H, Iori R, Palmieri S, Henrissat B. The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* 1997;**5**:663-675.
- Burmeister WP. Structural changes in a cryo-cooled protein crystal owing to radiation damage. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2000;**56**:328-341.
- Burmeister WP, Cottaz S, Rollin P, Vasella A, Henrissat B. High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *J Biol Chem* 2000;**275**:39385-39393.
- Chapelle A, Morreel K, Vanholme R, Le-Bris P, Morin H, Lapierre C, Boerjan W, Jouanin L, Demont-Caulet N. Impact of the absence of stem-specific β -glucosidases on lignin and monolignols. *Plant Physiol* 2012;**160**:1204-1217.
- Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;**66**:12-21.
- Chen G, Liu Y, Goetz R, Fu L, Jayaraman S, Hu MC, Moe OW, Liang G, Li X, Mohammadi M. α -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature* 2018;**553**:461-466.
- Chuankhayan P, Hua Y, Svasti J, Sakdarat S, Sullivan PA, Ketudat Cairns JR. Purification of an isoflavonoid 7-O- β -apiosyl-glucoside β -glycosidase and its substrates from *Dalbergia nigrescens* Kurz. *Phytochemistry* 2005;**66**:1880-1889.

- Chuenchor W, Pengthaisong S, Robinson RC, Yuvaniyama J, Oonant W, Bevan DR, Esen A, Chen CJ, Opassiri R, Svasti J, Cairns JR. Structural insights into rice BGlu1 β -glucosidase oligosaccharide hydrolysis and transglycosylation. *J Mol Biol* 2008;**377**:1200-1215.
- Chuenchor W, Pengthaisong S, Robinson RC, Yuvaniyama J, Svasti J, Cairns JR. The structural basis of oligosaccharide binding by rice BGlu1 beta-glucosidase. *J Struct Biol* 2011;**173**:169-179.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 2004;**14**:1188-1190.
- Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Bevan DR, Henrissat B, Esen A. The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:13555-13560.
- Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Burmeister WP, Bevan DR, Henrissat B, Esen A. Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) β -glucosidase and a model of its complex with *p*-nitrophenyl β -D-thioglucoside. *Biochem J* 2001;**354**:37-46.
- Drula E, Garron ML, Dogan S, Lombard V, Henrissat B, Terrapon N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res* 2021;**50**:D571-D577.
- Emsley P, Cowtan K. *Coot*: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;**60**:2126-2132.
- Escamilla-Treviño LL, Chen W, Card ML, Shih MC, Cheng CL, Poulton JE. *Arabidopsis thaliana* β -glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. *Phytochemistry* 2006;**67**:1651-1660.
- Esen A. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β -glucosidase. *Plant Physiol* 1992;**98**:174-182.

- Ettlinger MG, Dateo GP Jr, Harrison BW, Mabry TJ, Thompson CP. Vitamin C as a coenzyme: the hydrolysis of mustard oil glucosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1961;**47**:1875-1880.
- Falk A, Rask L. Expression of a zeatin-*O*-glucoside-degrading β -glucosidase in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 1995;**108**:1369-1377.
- Fourage L, Dion M, Colas B. Kinetic study of a thermostable β -glucosidase of *Thermus thermophilus*. Effects of temperature and glucose on hydrolysis and transglycosylation reactions. *Glycoconj J* 2000;**17**:377-383.
- Fukui K, Saburi W, Ibuki M, Tsumura K, Mori H. Preliminary evaluation of colorimetric and HPLC-based methods for quantifying β -(1 \rightarrow 4)-mannobiose in a crude material. *Food Sci Technol Res* 2021;**27**:249-257.
- Furlong ST, Mauger RC, Strimpler AM, Liu YP, Morris FX, Edwards PD. Synthesis and physical characterization of a P1 arginine combinatorial library, and its application to the determination of the substrate specificity of serine peptidases. *Bioorg Med Chem* 2002;**10**:3637-3647.
- Gatt S. Enzymic hydrolysis of sphingolipids: Hydrolysis of ceramide glucoside by an enzyme from ox brain. *Biochem J* 1966;**101**:687-691.
- Gerasimenko I, Sheludko Y, Ma X, Stöckigt J. Heterologous expression of a *Rauvolfia* cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to over 2000 monoterpenoid indole alkaloids. *Eur J Biochem* 2002;**269**:2204-2213.
- Gloster TM, Roberts S, Ducros VM, Perugino G, Rossi M, Hoos R, Moracci M, Vasella A, Davies GJ. Structural studies of the β -glucosidase from *Sulfolobus solfataricus* in complex with covalently and noncovalently bound inhibitors. *Biochemistry* 2004;**43**:6101-6109.
- Gloster TM, Roberts S, Perugino G, Rossi M, Moracci M, Panday N, Terinek M, Vasella A, Davies GJ. Structural, kinetic, and thermodynamic analysis of glucoimidazole-derived glycosidase inhibitors. *Biochemistry* 2006;**45**:11879-11884.

- Gryniewicz G, Achmatowicz O, Hennig J, Indulski J, Klessig D. Synthesis and characterization of the salicylic acid β -D-glucopyranoside. *Pol J Chem* 1993;**67**:1251-1254.
- Gu NY, Kim JL, Kim HJ, You DJ, Kim HW, Jeon SJ. Gene cloning and enzymatic properties of hyperthermostable β -glucosidase from *Thermus thermophilus* HJ6. *J Biosci Bioeng* 2009;**107**:21-26.
- Hancock SM, Corbett K, Fordham-Skelton AP, Gatehouse JA, Davis BG. Developing promiscuous glycosidases for glycoside synthesis: residues W433 and E432 in *Sulfolobus solfataricus* β -glucosidase are important glucoside- and galactoside-specificity determinants. *Chembiochem* 2005;**6**:866-875.
- Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornon JP, Davies G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**:7090-7094.
- 姫野 奈美 (2013) 修士論文 「イネ由来ツベロン酸グルコシドグルコシダーゼの基質認識機構の解析」
- Himeno N, Saburi W, Wakuta S, Takeda R, Matsuura H, Nabeta K, Sansenya S, Ketudat Cairns JR, Mori H, Imai R, Matsui H. Identification of rice β -glucosidase with high hydrolytic activity towards salicylic acid β -D-glucoside. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013;**77**:934-939.
- 日野 信一郎 (2018) 修士論文 「好熱性細菌由来 β -1,4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼの機能とマンノオリゴ糖合成への利用に関する研究」
- Hiromi K, Nitta Y, Numata C, Ono S. Subsite affinities of glucoamylase: examination of the validity of the subsite theory. *Biochim Biophys Acta* 1973;**302**:362-375.
- Hong MR, Kim YS, Park CS, Lee JK, Kim YS, Oh DK. Characterization of a recombinant β -glucosidase from the thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *J Biosci Bioeng* 2009;**108**:36-40.
- Hösel W, Fiedler-Preiss A, Borgmann E. Relationship of coniferin β -glucosidase to lignification in various plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1981;**1**:137-148.

- Hösel W, Surholt E, Borgmann E. Characterization of β -glucosidase isoenzymes possibly involved in lignification from chick pea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *Eur J Biochem* 1978;**84**:487-492.
- Hösel W, Todenhagen R. Characterization of a β -glucosidase from *Glycine max* which hydrolyses coniferin and syringin. *Phytochemistry* 1980;**19**:1349-1353.
- Hösel W, Tober I, Eklund SH, Conn EE. Characterization of β -glucosidases with high specificity for the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench seedlings. *Arch Biochem Biophys* 1987;**252**:152-162.
- Hrmova M, Burton RA, Biely P, Lahnstein J, Fincher GB. Hydrolysis of (1,4)- β -D-mannans in barley (*Hordeum vulgare* L.) is mediated by the concerted action of (1,4)- β -D-mannan endohydrolase and β -D-mannosidase. *Biochem J* 2006;**399**:77-90.
- Hua Y, Sansenya S, Saetang C, Wakuta S, Ketudat Cairns JR. Enzymatic and structural characterization of hydrolysis of gibberellin A4 glucosyl ester by a rice β -D-glucosidase. *Arch Biochem Biophys* 2013;**537**:39-48.
- Hua Y, Ekkhara W, Sansenya S, Srisomsap C, Roytrakul S, Saburi W, Takeda R, Matsuura H, Mori H, Ketudat Cairns JR. Identification of rice Os4BGlu13 as a β -glucosidase which hydrolyzes gibberellin A4 1-O- β -D-glucosyl ester, in addition to tuberonic acid glucoside and salicylic acid derivative glucosides. *Arch Biochem Biophys* 2015;**583**:36-46.
- Hughes MA, Brown K, Pancoro A, Murray BS, Oxtoby E, Hughes J. A molecular and biochemical analysis of the structure of the cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Cranz). *Arch Biochem Biophys* 1992;**295**:273-279.
- Hwa KY, Subramani B, Shen ST, Lee YM. Exchange of active site residues alters substrate specificity in extremely thermostable β -glycosidase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Enzyme Microb Technol* 2015;**77**:14-20.

- Jeng WY, Wang NC, Lin MH, Lin CT, Liaw YC, Chang WJ, Liu CI, Liang PH, Wang AH. Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *J Struct Biol* 2011;**173**:46-56.
- Jeng WY, Wang NC, Lin CT, Chang WJ, Liu CI, Wang AH. High-resolution structures of *Neotermes koshunensis* β -glucosidase mutants provide insights into the catalytic mechanism and the synthesis of glucoconjugates. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2012;**68**:829-838.
- Jenkins J, Lo Leggio L, Harris G, Pickersgill R. β -Glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold β/α architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. *FEBS Lett* 1995;**362**:281-285.
- Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;**66**:125-132.
- Kai K, Shimizu B, Mizutani M, Watanabe K, Sakata K. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 2006;**67**:379-386.
- Kaper T, van Heusden HH, van Loo B, Vasella A, van der Oost J, de Vos WM. Substrate specificity engineering of β -mannosidase and β -glucosidase from *Pyrococcus* by exchange of unique active site residues. *Biochemistry* 2002;**41**:4147-4155.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform* 2019;**20**:1160-1166.
- 川原 良介 (2012) 修士論文 「*Ruminococcus albus* NE1 株が生産する 2 つの 4-O- β -D-mannosyl-D-glucose phosphorylase アイソザイムの酵素化学的諸性質の解明」
- Kempton JB, Withers SG. Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic studies. *Biochemistry* 1992;**31**:9961-9969.
- Ketudat Cairns JR, Esen A. β -Glucosidases. *Cell Mol Life Sci* 2010;**67**:3389-3405.

- Ketudat Cairns JR, Pengthaisong S, Luang S, Sansenya S, Tankrathok A, Svasti J. Protein-carbohydrate interactions leading to hydrolysis and transglycosylation in plant glycoside hydrolase family 1 enzymes. *J Appl Glycosci* 2012;**59**:51-62.
- Ketudat Cairns JR, Mahong B, Baiya S, Jeon JS. β -Glucosidases: Multitasking, moonlighting or simply misunderstood? *Plant Sci* 2015;**241**:246-259.
- Kim HJ, Park AR, Lee JK, Oh DK. Characterization of an acid-labile, thermostable β -glycosidase from *Thermoplasma acidophilum*. *Biotechnol Lett* 2009;**31**:1457-1462.
- Kobayashi M, Hondoh H, Mori H, Saburi W, Okuyama M, Kimura A. Calcium ion-dependent increase in thermostability of dextran glucosidase from *Streptococcus mutans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011;**75**:1557-1563.
- Kuntothom T, Luang S, Harvey AJ, Fincher GB, Opassiri R, Hrmova M, Ketudat Cairns JR. Rice family GH1 glycoside hydrolases with β -D-glucosidase and β -D-mannosidase activities. *Arch Biochem Biophys* 2009;**491**:85-95.
- Kuroki G, Lizotte P, Poulton J. Catabolism of (*R*)-amygdalin and (*R*)-vicianin by partially purified β -glycosidases from *Prunus serotina* Ehrh. and *Davallia trichomanoides*. *Z Naturforsch C* 1984;**39**:232-239.
- LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio Technol* 1993;**11**:187-193.
- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ, Hwang I. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 2006;**126**:1109-1120.
- Lee S, Choi J, Mohanty J, Sousa LP, Tome F, Pardon E, Steyaert J, Lemmon MA, Lax I, Schlessinger J. Structures of β -klotho reveal a 'zip code'-like mechanism for endocrine FGF signalling. *Nature* 2018;**553**:501-505.

- Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* 2021;**49**:W293-W296.
- Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:D490-495.
- Luang S, Cho JI, Mahong B, Opassiri R, Akiyama T, Phasai K, Komvongsa J, Sasaki N, Hua YL, Matsuba Y, Ozeki Y, Jeon JS, Ketudat Cairns JR. Rice Os9BGlu31 is a transglucosidase with the capacity to equilibrate phenylpropanoid, flavonoid, and phytohormone glycoconjugates. *J Biol Chem* 2013;**288**:10111-10123.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. *Phaser* crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 2007;**40**:658-674.
- Marana SR, Terra WR, Ferreira C. The role of amino-acid residues Q39 and E451 in the determination of substrate specificity of the *Spodoptera frugiperda* β -glycosidase. *Eur J Biochem* 2002;**269**:3705-3714.
- Marana SR, Mendonça LM, Andrade EH, Terra WR, Ferreira C. The role of residues R97 and Y331 in modulating the pH optimum of an insect β -glycosidase of family 1. *Eur J Biochem* 2003;**270**:4866-4875.
- Marana SR. Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases. *IUBMB Life* 2006;**58**:63-73.
- Marcinowski S, Grisebach H. Enzymology of lignification. Cell-wall bound β -glucosidase for coniferin from spruce (*Picea abies*) seedlings. *Eur J Biochem* 1978;**87**:37-44.
- Marques AR, Coutinho PM, Videira P, Fialho AM, Sá-Correia I. *Sphingomonas paucimobilis* β -glucosidase Bgl1: a member of a new bacterial subfamily in glycoside hydrolase family 1. *Biochem J* 2003;**370**:793-804.

- Matsuba Y, Sasaki N, Tera M, Okamura M, Abe Y, Okamoto E, Nakamura H, Funabashi H, Takatsu M, Saito M, Matsuoka H, Nagasawa K, Ozeki Y. A novel glucosylation reaction on anthocyanins catalyzed by acyl-glucose-dependent glucosyltransferase in the petals of carnation and delphinium. *Plant Cell* 2010;**22**:3374-3389.
- Matsuura H, Ohmori F, Kobayashi M, Sakurai A, Yoshihara T. Qualitative and quantitative analysis of endogenous jasmonoids in potato plant (*Solanum tuberosum* L.). *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;**64**:2380-2387.
- Matsushima R, Fukao Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I. NAI1 gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *Plant Cell* 2004;**16**:1536-1549.
- Matsuzawa T, Jo T, Uchiyama T, Manninen JA, Arakawa T, Miyazaki K, Fushinobu S, Yaoi K. Crystal structure and identification of a key amino acid for glucose tolerance, substrate specificity, and transglycosylation activity of metagenomic β -glucosidase Td2F2. *FEBS J* 2016;**283**:2340-2353.
- Matthews BW. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* 1968;**33**:491-497.
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 1999;**281**:249-254.
- Mendonça LM, Marana SR. The role in the substrate specificity and catalysis of residues forming the substrate aglycone-binding site of a β -glucosidase. *FEBS J* 2008;**275**:2536-2547.
- Mendonça LM, Marana SR. Single mutations outside the active site affect the substrate specificity in a β -glucosidase. *Biochim Biophys Acta* 2011;**1814**:1616-1623.
- Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold-Making protein folding accessible to all. *BioRxiv* 2021, doi:10.1101/2021.08.15.456425
- Miyahara T, Sakiyama R, Ozeki Y, Sasaki N. Acyl-glucose-dependent glucosyltransferase catalyzes the final step of anthocyanin formation in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol* 2013;**170**:619-624.

- Miwa I, Okudo J, Maeda K, Okuda G. Mutarotase effect on colorimetric determination of blood glucose with D-glucose oxidase. *Clin Chim Acta* 1972;**37**:538-540.
- Mo B, Bewley JD. β -Mannosidase (EC 3.2.1.25) activity during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. Purification, cloning and characterization. *Planta* 2002;**215**:141-152.
- Moellering ER, Muthan B, Benning C. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science* 2010;**330**:226-228.
- Moore S, Stein WH. Partition chromatography of amino acids on starch. *Ann N Y Acad Sci* 1948;**49**:265-278.
- Morant AV, Jørgensen K, Jørgensen C, Paquette SM, Sánchez-Pérez R, Møller BL, Bak S. β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* 2008;**69**:1795-1813.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**:680-685.
- Lipka V, Dittgen J, Bednarek P, Bhat R, Wiermer M, Stein M, Landtag J, Brandt W, Rosahl S, Scheel D, Llorente F, Molina A, Parker J, Somerville S, Schulze-Lefert P. Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science* 2005;**310**:1180-1183.
- Nakano RT, Piślewska-Bednarek M, Yamada K, Edger PP, Miyahara M, Kondo M, Böttcher C, Mori M, Nishimura M, Schulze-Lefert P, Hara-Nishimura I, Bednarek P. PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2017;**89**:204-220.
- Namchuk MN, Withers SG. Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic analysis of the role of noncovalent enzyme/substrate interactions. *Biochemistry* 1995;**34**:16194-16202.

- Nutho B, Pengthaisong S, Tankrathok A, Lee VS, Ketudat Cairns JR, Rungrotmongkol T, Hannongbua S. Structural basis of specific glucoimidazole and mannoimidazole binding by Os3BGlu7. *Biomolecules* 2020;**10**:907.
- Olsen KM, Slimestad R, Lea US, Brede C, Løvdaal T, Ruoff P, Verheul M, Lillo C. Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies. *Plant Cell Environ* 2009;**32**:286-299.
- Opassiri R, Ketudat Cairns JR, Akiyama T, Wara-Aswapati O, Svasti J, Esen A. Characterization of a rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. *Plant Science* 2003;**165**:627-638.
- Opassiri R, Hua Y, Wara-Aswapati O, Akiyama T, Svasti J, Esen A, Ketudat Cairns JR. β -Glucosidase, exo- β -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlu1. *Biochem J* 2004;**379**:125-131.
- Opassiri R, Pomthong B, Onkoksoong T, Akiyama T, Esen A, Ketudat Cairns JR. Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 β -glucosidase. *BMC Plant Biol* 2006;**6**:33.
- Opassiri R, Maneesan J, Akiyama T, Pomthong B, Jin S, Kimura A, Ketudat Cairns JR. Rice Os4BGlu12 is a wound-induced β -glucosidase that hydrolyzes cell wall- β -glucan-derived oligosaccharides and glycosides. *Plant Sci* 2010;**179**:273-280.
- Park AR, Kim HJ, Lee JK, Oh DK. Hydrolysis and transglycosylation activity of a thermostable recombinant β -glycosidase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;**160**:2236-2247.
- Park SH, Park KH, Oh BC, Alli I, Lee BH. Expression and characterization of an extremely thermostable β -glycosidase (mannosidase) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* DSM3638. *N Biotechnol* 2011;**28**:639-648.
- Pearce PJ, Simkins RJJ. Acid strengths of some substituted picric acids. *Can J Chem* 1968;**46**:241-248.

- Pengthaisong S, Withers SG, Kuaprasert B, Svasti J, Ketudat Cairns JR. The role of the oligosaccharide binding cleft of rice BGlu1 in hydrolysis of cellooligosaccharides and in their synthesis by rice BGlu1 glycosynthase. *Protein Sci* 2012;**21**:362-372.
- Pengthaisong S, Ketudat Cairns JR. Effects of active site cleft residues on oligosaccharide binding, hydrolysis, and glycosynthase activities of rice BGlu1 and its mutants. *Protein Sci* 2014;**23**:1738-1752.
- Poreddy S, Mitra S, Schöttner M, Chandran J, Schneider B, Baldwin IT, Kumar P, Pandit SS. Detoxification of hostplant's chemical defence rather than its anti-predator co-option drives β -glucosidase-mediated lepidopteran counteradaptation. *Nat Commun* 2015;**6**:8525.
- Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:W320-W324.
- Roepke J, Bozzo GG. *Arabidopsis thaliana* β -glucosidase BGLU15 attacks flavonol 3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnosides. *Phytochemistry* 2015;**109**:14-24.
- Rouyi C, Baiya S, Lee SK, Mahong B, Jeon JS, Ketudat Cairns JR, Ketudat Cairns M. Recombinant expression and characterization of the cytoplasmic rice β -glucosidase Os1BGlu4. *PLoS One* 2014;**9**:e96712.
- Rye CS, Withers SG. Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 2000;**4**:573-580.
- Sabir S, Kandri Rodi Y, Misbahi K, Plusquellec D. A novel route to deoxygenated sugars from unprotected substrates. *J Mar Chim Heterocycl* 2010;**9**:74-85.
- Saburi W, Mori H, Saito S, Okuyama M, Kimura A. Structural elements in dextran glucosidase responsible for high specificity to long chain substrate. *Biochim Biophys Acta* 2006;**1764**:688-698.
- Saburi W, Kobayashi M, Mori H, Okuyama M, Kimura A. Replacement of the catalytic nucleophile aspartyl residue of dextran glucosidase by cysteine sulfinate enhances transglycosylation activity. *J Biol Chem* 2013;**288**:31670-31677.

- Saino H, Shimizu T, Hiratake J, Nakatsu T, Kato H, Sakata K, Mizutani M. Crystal structures of β -primeverosidase in complex with disaccharide amidine inhibitors. *J Biol Chem* 2014;**289**:16826-16834.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition*. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001.
- Sánchez-Pérez R, Belmonte FS, Borch J, Dicenta F, Møller BL, Jørgensen K. Prunasin hydrolases during fruit development in sweet and bitter almonds. *Plant Physiol* 2012;**158**:1916-1932.
- Sansanya S, Opassiri R, Kuaprasert B, Chen CJ, Ketudat Cairns JR. The crystal structure of rice (*Oryza sativa* L.) Os4BGlu12, an oligosaccharide and tuberonic acid glucoside-hydrolyzing β -glucosidase with significant thioglucohydrolase activity. *Arch Biochem Biophys* 2011;**510**:62-72.
- Sansanya S, Maneesan J, Cairns JR. Exchanging a single amino acid residue generates or weakens a +2 celooligosaccharide binding subsite in rice β -glucosidases. *Carbohydr Res* 2012;**351**:130-133.
- Schliemann W. Hydrolysis of conjugated gibberellins by β -glucosidases from dwarf rice (*Oryza sativa* L. cv. «Tan-ginbozu»). *J Plant Physiol* 1984;**116**:123-132.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* 2005;**37**:501-506.
- Seshadri S, Akiyama T, Opassiri R, Kuaprasert B, Ketudat Cairns JR. Structural and enzymatic characterization of Os3BGlu6, a rice β -glucosidase hydrolyzing hydrophobic glycosides and (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 2)-linked disaccharides. *Plant Physiol* 2009;**151**:47-58.
- Serjeant EP, Dempsey B. *Ionisation constants of organic acids in aqueous solution (IUPAC chemical data series No. 23)*. New York: Pergamon Press, 1979.
- Shen J, Zeng Y, Zhuang X, Sun L, Yao X, Pimpl P, Jiang L. Organelle pH in the *Arabidopsis* endomembrane system. *Mol Plant* 2013;**6**:1419-1437.

- Sherameti I, Venus Y, Drzewiecki C, Tripathi S, Dan VM, Nitz I, Varma A, Grundler FM, Oelmüller R. PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmatic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant J* 2008;**54**:428-439.
- Shewale JG. β -Glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *Int J Biochem* 1982;**14**:435-443.
- Shim SH, Mahong B, Lee SK, Kongdin M, Lee C, Kim YJ, Qu G, Zhang D, Ketudat Cairns JR, Jeon JS. Rice β -glucosidase Os12BGlu38 is required for synthesis of intine cell wall and pollen fertility. *J Exp Bot* 2022;**73**:784-800.
- Souza VP, Ikegami CM, Arantes GM, Marana SR. Mutations close to a hub residue affect the distant active site of a GH1 β -glucosidase. *PLoS One* 2018;**13**:e0198696.
- Strazzulli A, Perugino G, Mazzone M, Rossi M, Withers SG, Moracci M. Probing the role of an invariant active site His in family GH1 β -glycosidases. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2019;**34**:973-980.
- Stringlis IA, Yu K, Feussner K, de Jonge R, Van Bentum S, Van Verk MC, Berendsen RL, Bakker PAHM, Feussner I, Pieterse CMJ. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;**115**:E5213-5222.
- Sue M, Ishihara A, Iwamura H. Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. *Plant Sci* 2000a;**155**:67-74.
- Sue M, Ishihara A, Iwamura H. Purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside β -glucosidase from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Planta* 2000b;**210**:432-438.
- Sue M, Yamazaki K, Yajima S, Nomura T, Matsukawa T, Iwamura H, Miyamoto T. Molecular and structural characterization of hexameric β -D-glucosidases in wheat and rye. *Plant Physiol* 2006;**141**:1237-1247.

Sue M, Nakamura C, Miyamoto T, Yajima S. Active-site architecture of benzoxazinone-glucoside β -D-glucosidases in Triticeae. *Plant Sci* 2011;**180**:268-275.

菅原 好美 (2016) 修士論文 「シロイヌナズナ由来 β -グルコシダーゼ Bglu13, Bglu15 および Bglu16 のグライコシターゼ化および基質特異性に関する研究」

武田 遼介 (2015) 修士論文 「イネ由来ジャスモン酸類代謝酵素 TAGG2 の生理機能に関する研究」

竹松 知紀 (2015) 修士論文 「傷害時のイネにおけるサリチル酸グルコシドを糖ドナーとするツベロン酸への糖転移反応」

Tamaki FK, Souza DP, Souza VP, Ikegami CM, Farah CS, Marana SR. Using the amino acid network to modulate the hydrolytic activity of β -glycosidases. *PLoS One* 2016;**11**:e0167978.

谷口 沙希 (2014) 修士論文 「植物ホルモンの代謝に関連するシロイヌナズナ由来 β -グルコシダーゼおよびモノオキシゲナーゼの機能・発現に関する研究」

Tankrathok A, Iglesias-Fernández J, Luang S, Robinson RC, Kimura A, Rovira C, Hrmova M, Ketudat Cairns JR. Structural analysis and insights into the glycon specificity of the rice GH1 Os7BGlu26 β -D-mannosidase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2013;**69**:2124-2135.

Tankrathok A, Iglesias-Fernández J, Williams RJ, Pengthaisong S, Baiya S, Hakki Z, Robinson RC, Hrmova M, Rovira C, Williams SJ, Ketudat Cairns JR. A single glycosidase harnesses different pyranoside ring transition state conformations for hydrolysis of mannosides and glucosides. *ACS Catal* 2015;**5**:6041-6051.

Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010;**31**:455-461.

Uchiyama T, Miyazaki K, Yaoi K. Characterization of a novel β -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. *J Biol Chem* 2013;**288**:18325-18334.

- Vallmitjana M, Ferrer-Navarro M, Planell R, Abel M, Ausin C, Querol E, Planas A, Pérez-Pons JA. Mechanism of the family 1 β -glucosidase from *Streptomyces* sp: catalytic residues and kinetic studies. *Biochemistry* 2001;**40**:5975-5982.
- Verdoucq L, Czjzek M, Moriniere J, Bevan DR, Esen A. Mutational and structural analysis of aglycone specificity in maize and sorghum β -glucosidases. *J Biol Chem* 2003;**278**:25055-25062.
- Verdoucq L, Morinière J, Bevan DR, Esen A, Vasella A, Henrissat B, Czjze M. Structural determinants of substrate specificity in family 1 β -glucosidases: novel insights from the crystal structure of *sorghum* dhurrinase-1, a plant β -glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate. *J Biol Chem* 2004;**279**:31796-31803.
- Waffenschmidt S, Jaenicke L. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bicinchoninate. *Anal Biochem* 1987;**165**:337-340.
- Wakuta S, Hamada S, Ito H, Matsuura H, Nabeta K, Matsui H. Identification of a β -glucosidase hydrolyzing tuberonic acid glucoside in rice (*Oryza sativa* L.). *Phytochemistry* 2010;**71**:1280-1288.
- Wakuta S, Hamada S, Ito H, Imai R, Mori H, Matsuura H, Nabeta K, Matsui H. Comparison of enzymatic properties and gene expression profiles of two tuberonic acid glucoside β -glucosidases from *Oryza sativa* L. *J Appl Glycosci* 2011;**58**:67-70
- 和久田 真司 (2011) 博士論文 「植物の病傷害応答に関する β -glucosidase の酵素機能ならびに生理機能に関する研究」
- Wang C, Ye F, Chang C, Liu X, Wang J, Wang J, Yan XF, Fu Q, Zhou J, Chen S, Gao YG, Zhang LH. Agrobacteria reprogram virulence gene expression by controlled release of host-conjugated signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;**116**:22331-22340.
- Wang TM, Hojo T, Ran FX, Wang RF, Wang RQ, Chen HB, Cui JR, Shang MY, Cai SQ. Cardenolides from *Saussurea stella* with cytotoxicity toward cancer cells. *J Nat Prod* 2007;**70**:1429-1433.

- Warzecha H, Obitz P, Stöckigt J. Purification, partial amino acid sequence and structure of the product of raucaffricine-*O*- β -D-glucosidase from plant cell cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Phytochemistry* 1999;**50**:1099-1109.
- Warzecha H, Gerasimenko I, Kutchan TM, Stöckigt J. Molecular cloning and functional bacterial expression of a plant glucosidase specifically involved in alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 2000;**54**:657-666.
- Withers SG, Dombroski D, Berven LA, Kilburn DG, Miller RC Jr, Warren RA, Gilkes NR. Direct ¹H N.M.R. determination of the stereochemical course of hydrolyses catalysed by glucanase components of the cellulase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;**139**:487-494.
- Xia L, Ruppert M, Wang M, Panjekar S, Lin H, Rajendran C, Barleben L, Stöckigt J. Structures of alkaloid biosynthetic glucosidases decode substrate specificity. *ACS Chem Biol* 2012;**7**:226-234.
- Xu Z, Escamilla-Treviño LL, Zeng L *et al.* Xu Z, Escamilla-Treviño LL, Zeng L, Lalgondar M, Bevan D, Winkel B, Mohamed A, Cheng CL, Shih MC, Poulton J, Esen A. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol Biol* 2004;**55**:343-367.
- Xu ZY, Lee KH, Dong T, Jeong JC, Jin JB, Kanno Y, Kim DH, Kim SY, Seo M, Bressan RA, Yun DJ, Hwang I. A vacuolar β -glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2012;**24**:2184-2199.
- Zamioudis C, Hanson J, Pieterse CMJ. β -Glucosidase BGLU42 is a MYB72-dependent key regulator of rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *New Phytol* 2014;**204**:368-379.
- Zechel DL, Withers SG. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc Chem Res* 2000;**33**:11-18.

Zechel DL, Boraston AB, Gloster T, Boraston CM, Macdonald JM, Tilbrook DM, Stick RV, Davies GJ.

Iminosugar glycosidase inhibitors: structural and thermodynamic dissection of the binding of isofagomine and 1-deoxynojirimycin to β -glucosidases. *J Am Chem Soc* 2003;**125**:14313-14323.

Zhou C, Tokuhsa JG, Bevan DR, Esen A. Properties of β -thioglucoside hydrolases (TGG1 and TGG2)

from leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 2012;**191-192**:82-92.

謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました本学大学院農学研究院 生物化学研究室 森春英 教授、佐分利亘 准教授に心より厚く御礼申し上げます。

本論文の御閲覧ならびに有用な御助言を賜り、また貴重な試薬を御恵与頂きました本学大学院農学研究院 生物有機化学研究室 松浦英幸 教授に厚く感謝申し上げます。

本論文の御閲覧ならびに有用な御助言を賜りました本学大学院農学研究院 分子酵素学研究室 奥山正幸 講師に深く御礼申し上げます。

AtBGlu42 の構造解析にあたり、X 線回折実験を実施して頂きました本学大学院先端生命科学研究院生命融合科学コース X 線構造生物学研究室 姚閔 教授および于健 特任助教に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、植物 β -グルコシダーゼ研究の第一人者として有用な御助言を賜りました、タイ王国スラナリー工科大学 James R. Ketudat Cairns 教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、有用な御助言を賜りました農研機構・生物機能利用研究部門 作物ゲノム編集研究領域 ゲノム編集作物開発グループ グループ長 今井亮三 博士に感謝申し上げます。

NMR 分析を実施して頂きました本学大学院農学院 GC-MS &NMR 測定室 福土江里 博士、質量分析、アミノ酸組成分析を実施して頂きました本学創成研究機構 グローバルファシリティーセンター 機器分析受託部門 廣瀬知弘 氏、武田希美 氏に厚く御礼申し上げます。

農研機構・生物機能利用研究部門 研究員 手塚大介 博士、中外製薬株式会社 研究員 田口陽大 博士をはじめ、研究室の先輩方、同期および在校生の皆様には多大なるご支援、ご協力を賜りました。心から感謝申し上げます。

最後に、長い学生生活を経済的に支えて頂きました両親に深く感謝いたします。

2022 年 1 月

堀越 秀