

平成22年 5月14日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2009

課題番号：20780068

研究課題名（和文）糖質加水分解酵素の触媒メカニズムの改変

研究課題名（英文）Conversion of catalytic mechanism of glycoside hydrolases

研究代表者

奥山 正幸 (OKUYAMA MASAYUKI)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：00344490

研究成果の概要（和文）：アミノ酸配列・立体構造の類似した糖質加水分解酵素が異なる触媒機構を示す原因を立体構造解析・部位特異的変異酵素の解析により明らかにした。触媒機構の保持型酵素と反転型機構の相互変換することを試みた。しかし活性を有する変異酵素を得ることをできなかった。この結果は進化の過程のかなり早い段階で触媒残基の置換が起こり、さらに二つの触媒機構を有する酵素群は分子進化してきているものと考えることができた。

研究成果の概要（英文）：I discovered an unique glycoside hydrolases family which contains inverting- and retaining-catalytic enzymes. This divergence was due to the simple difference of the position of catalytic residues. We attempted to convert the catalytic mechanism of these enzyme each other. However, the attempt was failed. These results indicated that two similar enzymes diverged from a common ancestor in early stage of evolution and each enzyme evolved in different ways.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：糖質加水分解酵素，触媒機構，タンパク質工学

## 1. 研究開始当初の背景

糖質加水分解酵素はその触媒機構からアノマー保持型酵素，アノマー反転型酵素の二種類に大別される。アノマー保持型酵素とは加水分解反応の過程でアノマー型が保持されるように触媒する酵素であり，アノマー反転型酵素は基質に対して生成物のアノマー

型が反転した生成物を生成する酵素である（図1）。一方，アミノ酸配列が類似したタンパク質群は類似した立体構造を有し，さらに類似した機能を有するというのが一般的であり，“ファミリー”として分類される。糖質加水分解酵素もアミノ酸配列の類似性により100を超えるファミリーに分類されて

おり、同一ファミリーの酵素は類似した立体構造、保存された触媒機構を有するというのが一般的である。しかし、私は同一ファミリーにアノマー反転型酵素とアノマー保持型酵素の二種類の酵素が混在することを発見した。そこで、なぜ類似したアミノ酸配列を有していながら触媒機構が異なるのか、またそれぞれの相互変換は可能なのか、すなわち類似したアミノ酸配列を有している酵素群の触媒機構をアノマー反転型から保持型、保持型から反転型へ変換することは可能であるのか、といったことが本研究のモチベーションとなった。

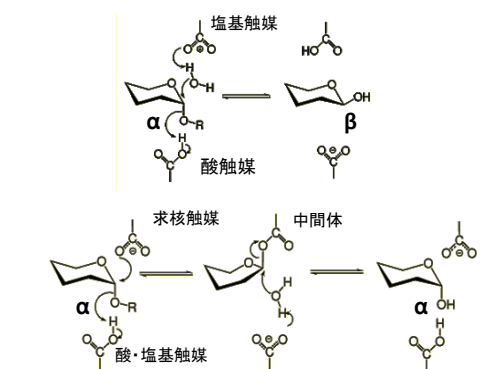


図1. 上) 反転型, 下) 保持型

## 2. 研究の目的

本研究は糖質加水分解酵素の2つの触媒機構であるアノマー保持型機構とアノマー反転型機構の相互変換を目的とした。そのために、まず、なぜ類似したアミノ酸配列を有していながら、触媒機構が異なるのかを明らかにする。

アノマー保持型と反転型を比較した場合、保持型に特徴的なのは加水分解反応に加えて糖転移反応を触媒することである。この糖転移反応は産業上でも利用される反応である。プレバイオティクスとして注目を浴びるオリゴ糖の多くは糖転移反応により生産されている。アノマー反転型酵素を保持型に変換することができれば、これまでユニークな基質特異性を持っていながら糖転移反応に利用できなかった酵素に糖転移反応を付与することができ、ユニークな構造を持つオリゴ糖を合成できるようになる。一方で、アノマー保持型酵素では糖転移反応により高基質濃度条件において糖転移反応を触媒してしまうため、加水分解反応を主目的とする場合（セルラーゼによるセルロースの分解など）、高収率で分解生成物を得ることが困難である。触媒機構を保持型から糖転移を触媒しない反転型に変換できれば、この問題を解決できる。

また本研究は糖質加水分解酵素の2つの触媒機構を理解する上で学術的に有意のものである。

## 3. 研究の方法

アノマー反転型酵素、保持型酵素の組み換え酵素を大腸菌により生産した。組み換え酵素には Histidine-tag を付加した。Ni-キレートアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーにより組み換え酵素を精製した。

立体構造解析のためにタンパク質の結晶をハンギングドロップ法により作製した。

アノマー反転型酵素の構造解析を S-SAD 法により行った。アノマー保持型酵素の構造解析をアノマー反転型酵素を鋳型とした分子置換法により行った。

部位特異的変異の導入には、メガプライマー法、オーバーラップエクステンション PCR 法、Primestar mutagenesis 法を用いた。変異酵素発現プラスミドにより大腸菌を形質転換後、定法に従って組み換え酵素の誘導・生産し、Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

変異酵素の活性測定の前には *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside、もしくは *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-galactopyranoside を用い、*p*-nitrophenol の遊離を波長 400 nm の吸光度により測定した。活性を pH 4 から pH 7 の範囲で測定した。

Saturation mutagenesis では変異導入箇所の塩基を NNK とし、Primestar mutagenesis 法により変異を導入した。スクリーニングを 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\alpha$ -D-グルコピラノシドを含む固体培地に菌体を播種し活性を有する青色コロニーの検出することにより行った。約 3000 形質転換体をスクリーニングした。

糖転移反応の生成物を薄層クロマトグラフィーもしくは HPLC により分析した。HPLC により糖転移産物を分離後、ESI-MS により分子質量を測定した。

## 4. 研究成果

まず、なぜアミノ酸配列の類似した糖質加水分解酵素が異なる触媒機構を示すのか？ということ立体構造解析・部位特異的変異酵素の解析により明らかにした。アノマー保持型機構と反転型機構は元来全く異なる触媒機構である。反転型酵素では触媒基として塩基触媒基と酸触媒基を有する。一方、保持型酵素では求核触媒基と酸・塩基触媒基により構成されている。(図1)

ふたつの酵素の立体構造を解析すると、非常によく似た構造を有していた(図2)。

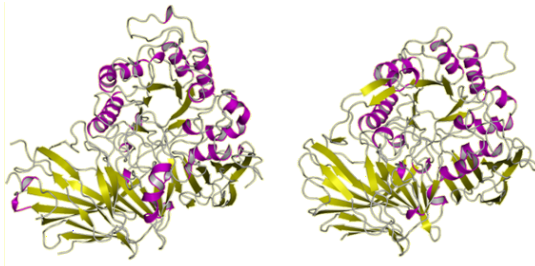


図 2. 解析した二つの酵素の立体構造  
左) 反転型酵素 右) 保持型酵素

アミノ酸配列のみならず非常に類似した立体構造を有するにもかかわらず、触媒機構が異なるのは、触媒中心の局所的構造の違いにより基質のアノマー炭素を求核攻撃する分子種が異なる結果であることを明らかとした (図 3)。すなわち、反転型酵素では、水分子が直接求核攻撃できるように触媒残基が配置されおり、そのためアノマー型が反転した生成物を生成する (図 3 左, 図 1 上)。それに対し、アノマー保持型機構では、酵素がアノマー炭素を求核攻撃するのに適した位置にカルボキシ基が配置されており、これにより中間体が形成される。その後、水分子がアノマー炭素を求核攻撃するため、アノマー型が保持される (図 3 右, 図 1 下) ことを明らかとした。

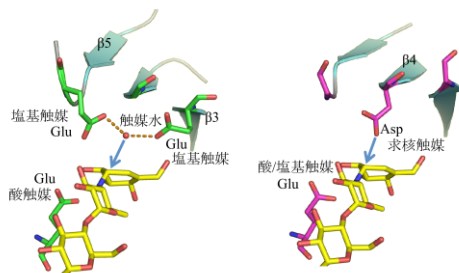


図 3. 二つの酵素の触媒中心  
左) 反転型酵素 右) 保持型酵素

これら 2 つの酵素は  $(\beta/\alpha)_8$  バレル構造と呼ばれる  $\beta$ -ストランドと  $\alpha$ -ヘリックスから構成される触媒ドメインを有する。一般的に  $(\beta/\alpha)_8$  バレル構造では  $\beta$ -ストランドの C 末端に触媒残基を有する。本研究対象の 2 つの酵素も例外ではなく、 $\beta$ -ストランドの C 末端に触媒残基を有するが、位置が異なり、反転型酵素では  $\beta_3, \beta_5, \beta_6$ 、保持型酵素では  $\beta_4, \beta_6$  の C 末端に触媒残基が位置する (図 3)。同一ファミリーでの触媒機構の違いは、進化の過程において触媒残基が  $\beta$ -ストランド上を移動する **catalytic residue hopping** によるものであると結論付けた。これらの結果を学会発表、投稿論文で発表した。

次にアノマー反転型酵素を保持型酵素に変換することを試みた。先にも述べたとおり

反転型酵素では触媒基は塩基触媒基と酸触媒基により構成されている。一方、保持型酵素では求核触媒基と酸/塩基触媒基により構成されている。保持型酵素に倣い、反転型酵素の塩基触媒基を取り除き、求核触媒基を導入した。しかし、この変異酵素は変異酵素活性を有さなかった。そこで、求核触媒基が求核触媒基として働くことができるような環境を整えることを試みた。保持型酵素の立体構造を元に、求核触媒基と相互作用を取り得るアミノ酸残基を選定した。導入した求核触媒残基が正しいオリエンテーションをとることができるように求核基の隣の残基を嵩の大きいアミノ酸に置換した (Val→Phe)。また求核触媒基の求核性を高めるために求核基のカルボキシ基と相互作用しうる位置に Tyr 残基を導入した。このほかにカルボキシ基近傍と予想されるアミノ酸残基を置換した変異酵素を数種作製した。また触媒中心近傍に "saturation mutagenesis" を導入した。この際のスクリーニングでは 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル  $\alpha$ -D-グルコピラノシド (X-Glc) を基質とし、プレート上でアッセイを行った。しかしいずれの作業においても触媒活性を有する変異酵素作製には至らなかった。

一方で保持型酵素の反転型酵素への変換を試みた。求核触媒基を除いたのちの塩基触媒基の導入、また触媒残基周辺残基のアミノ酸置換で保持型酵素の反転型酵素への改変を試みたが、触媒活性をもつ酵素を得られなかった。さらに反応の遷移状態を安定化させるようなアミノ酸残基の導入を行った。糖質加水分解酵素での反応の遷移状態は反転型でも保持型でもオキソカルベニウム様構造であると考えられている。このオキソカルベニウムイオンは電子不足状態である。保持型酵素では求核触媒残基のカルボキシ基の酸素原子の孤立電子対が電子不足状態の遷移状態を安定化していると考えられている。求核触媒残基を失っている変異酵素の反応の遷移状態を安定化させるため、孤立電子対をもつ Tyr を基質結合部位の底に導入したが、この変異酵素も活性を有さなかった。

保持型酵素を反転型酵素に置換する過程で、求核触媒基を取り除いた変異酵素がフッ化糖を基質して用いると糖転移反応を効率よく触媒することを発見した (図 4)。このメカニズムを解明するために、求核触媒残基変異酵素の結晶化条件を決定した。また反応中間体、反応生成物を調べることで触媒機構を以下のように解明した。失われた求核残基を反応液中の酢酸イオンが相補することで反応が進行し、グリコシルアセテートを生成し、これが疑似中間体として働く。さらにこの中間体に対して受容体が求核攻撃することで糖転移産物を生成している、という機構



である (図 5)。また求核触媒残基変異酵素であるため、生成物が加水分解されず蓄積する結果、高収率でオリゴ糖を生産できた。

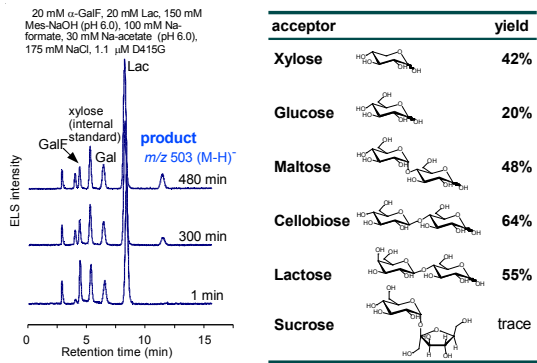


図 4.糖転移反応の HPLC 解析と各受容体からの生成物の収率

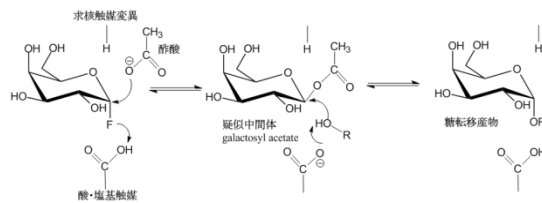


図 5. 求核触媒を除いた酵素の糖転移反応機構

単純な触媒残基の置換、触媒残基周辺のアミノ酸置換により、活性をもった変異酵素を得ることができなかった結果から、進化の過程のかなり早い段階で触媒残基の置換 (catalytic residue hopping) が起こり、さらに二つの触媒機構を有する酵素がそれぞれ分子進化を果たしてきているものと考えることができた。

また本研究に役立てるためアノマー反転型酵素の触媒過程におけるカルシウムイオンの必要性を反応速度論的に解析した (図 6)。またカルシウム非存在下の酵素の立体構造解析を行った。

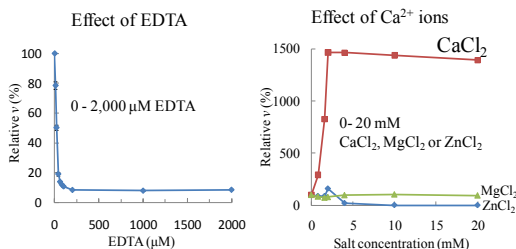


図 6.アノマー反転型酵素のカルシウム依存性 (左) キレート剤 EDTA による活性の阻害 (右) カルシウムイオンによる活性化

この酵素は厳密にカルシウムイオンの有無で活性発現が制御されている。また、培養、

精製過程においてカルシウムイオンを加えなくとも、酵素がカルシウムイオンを補足している結果も併せて、この酵素をカルシウムセンサーとして利用できる可能性が示唆された。

また本申請研究と遠縁の関係にある酵素の触媒メカニズム、反応特異性について解析し、報告した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1: Mori H, Lee JH, Okuyama M, 他 5 名  
Catalytic reaction mechanism based on  $\alpha$ -secondary deuterium isotope effects in hydrolysis of trehalose by European honeybee trehalase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2009) 73, 2466-2473. 査読有

2: Kang MS, Okuyama M, Mori H, Kimura A.  
The first  $\alpha$ -1,3-glucosidase from bacterial origin belonging to glycoside hydrolase family 31. *Biochimie* (2009) 91, 1434-1442. 査読有

3: Okuyama M, Kitamura M, Hondoh H, 他 5 名

Catalytic mechanism of retaining  $\alpha$ -galactosidase belonging to glycoside hydrolase family 97. *J. Mol. Biol.* (2009) 392, 1232-1241. 査読有

4: Kitamura M, Okuyama M, 他 7 名  
Structural and functional analysis of a glycoside hydrolase family 97 enzyme from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Biol. Chem.* (2008) 283, 36328-36337. 査読有

5: Hondoh H, Saburi W, Mori H, Okuyama M, Nakada T, Matsuura Y, Kimura A.  
Substrate recognition mechanism of  $\alpha$ -1,6-glucosidic linkage hydrolyzing enzyme, dextran glucosidase from *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* (2008) 378, 913-922. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 奥山 正幸,  $\alpha$ -グリコシダーゼの機能と構造, 日本農芸化学会農芸化学奨励賞受賞講演, 2010/3/27, 東京大学, 東京都

2. 奥山 正幸他, 糖質加水分解酵素ファミリー-97 の配列類似性と機能類似性の関係, 日本農芸化学会北海道支部合同学術講演会, 2009/11/28, とちがちプラザ, 帯広市, 北海道

3. 吉田 拓弥, 奥山 正幸他, *Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 SusB の触媒反応における  $\text{Ca}^{2+}$  の役割, 応用糖質科学会 21 年度大会, 2009/9/17, 弘前大, 青森県

4. 奥山 正幸他, Glycoside hydrolase

family 97 アノマー保持型酵素の触媒機構, 応用糖質科学会 20 年度大会, 2008/9/18, 琉球大, 沖縄県

5. Okuyama M *et al*, Functional and Structural Analysis of Glycoside Hydrolase Family 97 Enzyme from *Bacteroides thetaiotaomicron*, XXIV International Carbohydrate Symposium, 2008/7/27-2008/8/1, Oslo, Norway.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥山 正幸 (OKUYAMA MASAYUKI)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号 : 00344490