

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780082

研究課題名（和文）小胞体局在グルコシダーゼ II とその類縁酵素の基質認識機構の解明とその応用

研究課題名（英文）Substrate recognition of glucosidase II in ER and its related enzymes

研究代表者

奥山 正幸 (OKUYAMA MASAYUKI)

北海道大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号：00344490

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は生物全般に分布する α -グルコシダーゼ酵素群の基質特異性の分子進化を明らかとすることである。小胞体内で α -1,3-グルコシドを加水分解する役割をもつ酵素が、 α -1,4結合にも作用することを明らかとした。植物種子に局在する α -グルコシダーゼでは活性中心の外側を覆うループ構造が特異性に関与していた。酵母 α -グルコシダーゼ活性ポケットのTrp残基が基質特異性に関与していた。 α -1,3結合に特異性を示す細菌由来の新しい α -グルコシダーゼを発見した。本研究の結果から対象とした類縁酵素群は元来 α -1,3結合に特異性を示す同一祖先が分子進化により様々な特異性を獲得していることが示唆された。また類縁酵素内には新規機能を持つタンパク質がまだまだ埋もれていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project was to clarify molecular evolution of α -glucosidases distributed largely in organisms. An α -glucosidase, which hydrolyzes α -1,3-glucosidic linkage in endoplasmic reticulum, also showed specificity for α -1,4-glucosidic linkage. Structural studies of an α -glucosidase indicated that the loop structure, which covers the active pocket, was involved in substrate recognition. Trp residue in the active pocket of a yeast α -glucosidase had important role for substrate specificity. Novel α -glucosidase, which preferred α -1,3-glucosidic linkage, was discovered from bacteria. It seems that an ancestor enzyme originally had α -1,3 specificity and its derivatives have acquired various specificity during the molecular evolution. Moreover, it appears that protein with a new function remained in the related family.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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： α -グルコシダーゼ、基質特異性、分子進化

1. 研究開始当初の背景

真核生物の小胞体に局在する glucosidase II は新生タンパク質に付加される N 型糖鎖の末端に付加された 2 つの α -1,3-グルコシド結合を

加水分解する役割を有する。glucosidase II によりグルコシル残基が除去されたタンパク質のうち、適切にフォールディングされたタンパク質は、ゴルジ体へと輸送される。一方、

フォールディングが不適切な場合、グルコシル残基が再び付加され、フォールディングが適切であるタンパク質のみが glucosidase II により糖鎖が除去されゴルジ体へ輸送される。すなわち glucosidase II は新生タンパク質の品質管理の鍵酵素のひとつである。glucosidase II は触媒サブユニットとレクチン様ドメインからなるヘテロダイマーである。触媒サブユニットはデンブリンならびにその加水分解物であるマルトオリゴ糖の代謝に関わる α -glucosidase の相同タンパク質であり、糖質加水分解酵素ファミリー31 (GH family 31) に属する。glucosidase II には α -1,3-glucosidase として EC 番号 (EC 3.2.1.84) が与えられており、 α -1,3-glucoside 結合に特異性を示すものと考えられていた。一方、糖質代謝に関わる GH family 31 α -glucosidase は一般的に α -1,4-glucoside 結合に高い特異性を有する。glucosidase II は本当に α -1,3-glucosidase なのか？もしそうであるなら、同一 GH family に属する2つの酵素が何故、どのような機構で異なる基質特異性を発揮するのか、が研究動機である。また glucosidase II は前述の通り新生タンパク質の品質管理鍵酵素であるにもかかわらず、構造・機能相関が未知であり、興味を持たれた。

2. 研究の目的

小胞体 glucosidase II の基質特異性を解析することを目的とした。glucosidase II の立体構造解析により基質特異性を決定する構造因子の特定することを目的とした。また GH family 31 α -glucosidase は細菌、酵母、カビ、植物、動物に広く分布している。本酵素は細菌類を祖先とし分子進化してきたものと考えられる。生命維持の観点からは小胞体 glucosidase II は糖質代謝に関わる α -glucosidase よりも重要であると考えられ、真核生物は進化の早い段階で小胞体 glucosidase II を獲得していると予想できる。GH family 31 α -glucosidase の基質特異性は細菌類からどのように分子進化してきたのかを、様々な起源の α -glucosidase の基質特異性を解析することで明らかにすることを目的とした。 α -glucosidase は加水分解とともに糖転移反応を触媒する。この糖転移反応は産業的にオリゴ糖合成に利用されている。得られた知見をもとに基質特異性の改変を行い、新たな糖質合成を目指した。

3. 研究の方法

(1) 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 小胞体局在 glucosidase II

S. pombe より glucosidase II 触媒サブユニット遺伝子、レクチン様サブユニット遺伝子をそれぞれクローニングし、大腸菌もしくは *Pichia pastoris* を宿主とし、組換え酵素の生産を行った。それぞれのサブユニットのみ、も

しくは両サブユニットの共発現を行った。得られた組換え酵素を用いて、酵素の性質、基質特異性の解析を行った。

(2) 植物由来 α -glucosidase

植物種子から α -glucosidase を生成して用いた。タンパク質結晶を作成し、X 線結晶構造解析を行った。また部位特異的変異酵素の作成には *P. pastoris* を宿主とした組換え酵素を用いた。部位特異的変異を PCR により導入した。

(3) 酵母 *Schwanniomyces occidentalis* α -glucosidase

P. pastoris を宿主とした組換え酵素を用いた。部位特異的変異を PCR により導入した。

(4) 糸状菌 *Podospora anserina* α -glucosidase

P. pastoris を宿主とした組換え酵素を用いた。

(5) 糸状菌 *Aspergillus niger* α -glucosidase

P. pastoris を宿主とした組換え酵素を用いた。

(6) 細菌由来 GH family 31 α -glucosidase 様タンパク質

Escherichia coli, *Streptococcus mutans* より遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いてタンパク質を大量に生産した。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母 *S. pombe* 小胞体局在 glucosidase II の機能解析

S. pombe 小胞体局在 glucosidase II 触媒サブユニット、レクチン様サブユニットを、それぞれのサブユニットのみ、もしくは両サブユニットの共発現させた。大腸菌もしくは *Pichia pastoris* を宿主として生産した。これらの中で組換え酵素を有意に得られたものは、触媒サブユニットの大腸菌での生産のみである。この場合も多くの組換えタンパク質は不溶性として得られた。培養条件を検討することで、可溶性画分を増加させることに成功した。得られた組換えタンパク質は水溶液中で不安定であったが、10% (v/v) 程度のグリセロールを添加することでタンパク質の安定性が増加することを明らかとした。一般的に膜タンパク質ではその安定性のためにグリセロールが添加されることがあるが、水溶性タンパク質でもグリセロール添加が効果的なケースがあることを明らかとした。glucosidase II 触媒サブユニットの性質を解析した。最適 pH は 7.5 であり、特徴として、温度に対する安定性が 27°C まででと低いということがあげられる。ニゲロース (α 1 \rightarrow 3 グルコ二糖)、マルトース (α 1 \rightarrow 4 グルコ二糖) に対する反応速度を調べることで基質特異性を評価した。glucosidase II 触媒サブユニットは α -1,4 結合に対しても α -1,3 結合と同等に加水分解する能力を有していることが解った。本研究では組換え酵素の取得に手間取り、当初予定していた X 線結晶構造解析を行うことができなかった。今後、構造解析により更なる機能/構造相関を明らかにできるものと期待され

る。

(2) 植物 α -glucosidase の解析

植物由来 α -glucosidase はマルトースのみならずニゲロースに対しても加水分解能を有することは古くから知られている。またデンプンなどの長鎖基質をよく加水分解する。これらの特異性因子を解明する目的で X 線結晶解析を行った。1.8 Å で構造解析に成功した。植物由来 α -glucosidase の結晶構造解析は世界初である。ニゲロースに対する特異性因子の同定には至らなかったが、長鎖基質に対する特異性因子は、活性ポケットを覆うループ構造によるものであることを解明した。

(3) 酵母 *Schwanniomyces occidentalis* α -glucosidase の解析

本酵素は加水分解では広い基質特異性を有することが特徴である。最も良い基質は α -1,4-グルコシドであるが、 α -1,3-, α -1,2-, α -1,6-グルコシドも加水分解できる。類縁酵素の立体構造とアミノ酸配列多重アライメントの結果から、活性ポケット入口付近を形成する残基のうち Trp 残基に多様性があることを発見し、ここに部位特異的変異を導入した (図 1)。部位特異的変異酵素は α -1,6 結合を加水分解する特異性を失った。すなわちこの Trp 残基が広い特異性に関与していることを明らかとした。またこの変異酵素は糖転移反応において、野生型酵素が生成しない分岐糖を生産することを明らかとした。

(4) 糸状菌 *Podospora anserina* α -glucosidase

P. pastoris を宿主として組換え酵素生産を培養上清に分泌させた。分泌された組換え酵素はプロテオリシスされることが明らかとなった。培地に 2% カザミノ酸を添加し、また培地の pH を上げることでプロテオリシスの回避でき、また生産量を増加させることに成功した。組換え酵素は α -1,3-グルコシド結合に高い特異性を示した。糖転移反応においても α -1,3-グルコシド結合を生成することが解った。また反応速度を HPAEC-PAD システムを用いて測定することで詳細なキネティクス解析を行った。その結果、本酵素は非常に高い糖転移能を有していることが明らかとなった。

(5) 糸状菌 *Aspergillus niger* α -glucosidase の解析

P. pastoris を宿主として組換え酵素生産を培養上清に分泌させた。この酵素が最も好む基質は α -1,4-グルコシドである。類縁酵素の立体構造とアミノ酸配列多重アライメントの結果から、活性ポケット近傍に位置する His 残基が基質結合に関与していることが予想された (図 1)。His \rightarrow Lys の置換により α -1,3-グルコシド結合特異性を上昇させることができた。

(6) 細菌由来 GH family 31 α -glucosidase 様タンパク質の解析

Streptococcus mutans, *Escherichia coli* のゲノム中にコードされた GH family 31 α -glucosidase 様タンパク質遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いてタンパク質を大量に生産した。*S. mutans* の GH family 31 様タンパク質はニゲロースに高い特異性を示すことがわかった。一方、*E. coli* の GH family 31 様タンパク質は α -glucosidase 活性を有さず、また、既報の GH family 31 酵素の活性 (α -glucan lyase, isomaltosyltransferase, 6-glucosyl transferase) も示さなかった。新たな機能を有している可能性が示唆された。

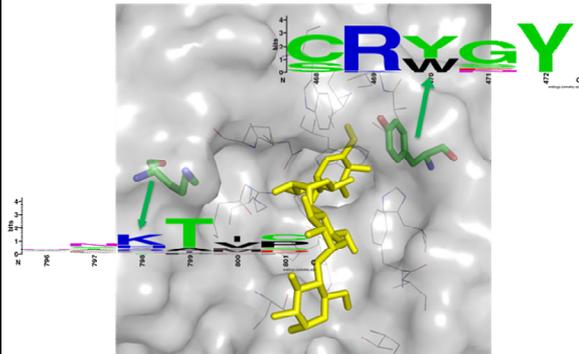


図 1. 類縁酵素活性ポケット近傍の構造とターゲットアミノ酸残基 (Trp & His) の保存性

(7) GH family 31 α -glucosidase の基質特異性の分子進化

本研究の成果より GH family 31 α -glucosidase の基質特異性の分子進化を以下のようにまとめた。GH family 31 α -glucosidase は元来 α -1,3-glucoside 結合に高い特異性を有する酵素群であった。祖先遺伝子に近いと考えられる細菌由来の GH family 31 α -glucosidase は α -1,3 特異性を示すことが本研究で明らかとなり、また以前の我々の研究においても *Lactobacillus* 属の GH family 31 α -glucosidase が α -1,3 特異性を示すことを明らかにしている。GH family 31 α -glucosidase は真核生物に引き継がれるが、その際、生命維持に重要な小胞体 glucosidase II として引き継がれた。この酵素は種分化に伴い α -1,3、 α -1,4 結合に対して同等の特異性を示すように進化した。更に遺伝子重複によって発生した糖質代謝に関わる GH family 31 α -glucosidase は特異性が α -1,4 特異的に分子進化した。一方で α -1,3 特異性を残したままの真核生物も存在する。本研究では糸状菌 *P. anserina* α -glucosidase がそれに相当する。細菌類の多くが α -1,4 グルコシド結合に作用する酵素として GH family 31 α -glucosidase ではなく異なるファミリーの GH family 13 酵素を有していることも本仮説を支持する。

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9件)

- ① Kim YM, Kiso Y, Muraki T, Kang MS, Nakai H, Saburi W, Lang W, Kang HK, Okuyama M, Mori H, Suzuki R, Funane K, Suzuki N, Momma M, Fujimoto Z, Oguma T, Kobayashi M, Kim D, Kimura A. Novel dextranase catalyzing cycloisomaltooligosaccharide-formation and identification of catalytic amino acids and their functions using chemical rescue approach. *J Biol Chem.* 2012; 印刷中, doi:10.1074/jbc.M111.339036 査読有
- ② Chantarudee A, Phuwapraisrisan P, Kimura K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Chanchao C. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 印刷中, doi:10.1186/1472-6882-12-45 査読有
- ③ Teerasriprecha D, Phuwapraisrisan P, Puthong S, Kimura K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Chanchao C. In vitro antiproliferative / cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 印刷中, doi:10.1186/1472-6882-12-27 査読有
- ④ Suzuki N, Kim YM, Fujimoto Z, Momma M, Okuyama M, Mori H, Funane K, Kimura A. Structural elucidation of dextran degradation mechanism by *Streptococcus mutans* dextranase belonging to glycoside hydrolase family 66. *J Biol Chem.* 2012; 印刷中, doi:10.1074/jbc.M112.342444 査読有
- ⑤ Okuyama M. Function and structure studies of GH family 31 and 97 α -glycosidases. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(12):2269-2277, doi:10.1271/bbb.110610 査読有
- ⑥ Suzuki N, Kim YM, Fujimoto Z, Momma M, Kang HK, Funane K, Okuyama M, Mori H, Kimura A. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of dextranase from *Streptococcus mutans*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2011; 67(12): 1542-1544, doi:10.1107/S1744309111038425 査読有
- ⑦ 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(8):1557-63,

doi:10.1271/bbb.110256 査読有

- ⑧ Kim YM, Shimizu R, Nakai H, Mori H, Okuyama M, Kang MS, Fujimoto Z, Funane K, Kim D, Kimura A. Truncation of N- and C-terminal regions of *Streptococcus mutans* dextranase enhances catalytic activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;91(2):329-39, doi:10.1007/s00253-011-3201-y 査読有
- ⑨ Kang HK, Kim YM, Nakai H, Kang MS, Hakamada W, Okuyama M, Mori H, Nishio T, Kimura A. Suicide substrate-based inactivation of endodextranase by ω -epoxyalkyl α -D-glucopyranosides. *J Appl Glycosci.* 2010; 57(4):269-272, doi:10.5458/jag.57.269 査読有

[学会発表] (計15件)

- ①渡辺 健一、*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 α -galactosidase の求核残基変異酵素が触媒する糖転移反応の解析、日本農芸化学会、2012年3月23日、京都女子大学(京都)
- ②Kyung Mo Song、Alteration of regioselectivity and synthesis of novel transglycosylation product by mutant α -glucosidase from *Schwanniomyces occidentalis*、日本農芸化学会、2012年3月23日、京都女子大学(京都)
- ③Lukana Ngiwsara、Functional implication of amino acid residues in conserved region II of European honeybee α -glucosidase on substrate specificity, transglucosylation and substrate inhibition、日本農芸化学会、2012年3月23日、京都女子大学(京都)
- ④奥山 正幸、糖質加水分解酵素の機能と構造、日本生化学会北海道支部、日本生物物理学会北海道支部、北海道分子生物研究会 合同シンポジウム(招待講演)、2011年11月11日、北海道大学 理学部 大講堂(札幌)
- ⑤平内 亨、アノマー反転型トレハラーゼ変異体により合成された新規非還元二糖の構造、日本応用糖質科学会、2011年9月23日、北海道大学 学術交流会館(札幌)
- ⑥Kyung Mo Song、Production and investigation of recombinant α -glucosidase from *Podospira anserina*、日本応用糖質科学会、2011年9月23日、北海道大学 学術交流会館(札幌)
- ⑦田上 貴祥、GH family 31 に属する *Aspergillus niger* 由来 α -glucosidase の鎖長特異性の改変、日本応用糖質科学会、2011年9月23日、北海道大学 学術交流会館(札幌)
- ⑧青山 泰、Isomaltoligosaccharide 6- α -glucosyltransferase サブサイト+1 変異酵素の機能解析、日本応用糖質科学会、2011年9月23日、北海道大学 学術交流会館(札幌)
- ⑨小林 桃子、Dextran glucosidase (DexB) ウォーターパス改変体の機能と構造、日本応用糖質科学会、2011年9月23日、北海道大学 学術交流会館(札幌)

⑩齋藤 みどり、環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼの $\beta \rightarrow \alpha$ ループ2は CI-8 の優先的生成に寄与する、日本応用糖質科学会、2011年9月23日、北海道大学 学術交流会館(札幌)

⑪Song Kyung-Mo, Improvement of production conditions of recombinant *Podospora anserina* α -glucosidase、日本農芸化学会、2011年3月26日、京都女子大(京都)

⑫奥山 正幸、 α -グリコシダーゼの機能と構造に関する研究、若手研究者のための有機化学札幌セミナー(招待講演)、2010年10月27日、北海道大学(札幌)

⑬田上貴祥、*Aspergillus niger* α -glucosidase のサブサイト+1 の改変、日本応用糖質科学会、2010年9月27日、グランシップ静岡(静岡)

⑭奥山 正幸、 α -グリコシダーゼの機能と構造に関する研究、日本農芸化学会東北支部・北海道支部合同支部大会(招待講演)、2010年9月27日、東北大学(仙台)

⑮奥山 正幸、 α -グリコシダーゼの機能と構造に関する研究、日本農芸化学北海道支部大会(招待講演)、2010年7月23日、北海道大学(札幌)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号：00344490

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥山 正幸 (OKUYAMA MASAYUKI)