

称号及び氏名 博士（農学）今村 香代

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 31 日

論文名 「馬鈴薯由来 D-酵素の立体構造に基づく触媒機能の研究」

論文審査委員 主査 教授 新田 康則  
副査 教授 北村 進一  
副査 教授 西村 勁一郎  
副査 教授 鷹羽 武史  
(連携大学院)

## 論文要旨

### 序論

Disproportionating 酵素 (D-酵素、4- $\alpha$ -glucanotransferase ; EC.2.4.1.25) は、1956 年 Peat らによって馬鈴薯塊茎からマルトオリゴ糖の重合度を不均化する酵素として初めて発見された。現在、D-酵素は種子、塊茎、果実、緑葉などの様々な植物の澱粉貯蔵組織に広く存在していることが確認されている。一方、良く似た機能を持つバクテリア由来の 4- $\alpha$ -glucanotransferase は 1987 年に大腸菌から初めて発見され、アミロマルターゼと呼ばれている。1993 年鷹羽らによって D-酵素はクローニングされ、1996 年に D-酵素とアミロマルターゼは共に  $\alpha$ -1,4-グルカン を基質とし分子間転移反応と分子内転移反応によって直鎖のグルカン を大環状グルカンにする事が明らかにされた。環状化反応を触媒する酵素としてよく知られている Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) の場合は主に重合度 6 から 8 の環状グルカン (シクロデキストリン) を生成するが、馬鈴薯由来 D-酵素や好熱菌 *Thermus Aquaticus* 由来のアミロマルターゼは、それぞれ重合度 17

および 22 以上の大環状グルカン(シクロアミロース)を生成する。また、CGTase とアミロマルターゼは主に転移反応を触媒するが、マルトオリゴ糖に対する加水分解活性も持つ。これに対して馬鈴薯由来 D-酵素は、加水分解活性がほとんど無く(タカアミラーゼの 3 万分の 1 以下)、専ら転移反応を触媒する酵素である。これら 3 つの酵素は共に  $\alpha$  アミラーゼファミリーに属している。好熱菌 (Thermus Aquaticus) 由来アミロマルターゼの立体構造は、2000 年に X 線結晶構造解析によって明らかにされているが、馬鈴薯由来の D-酵素の立体構造はまだ報告されていない。

そこで本研究では、糖転移酵素の中でも最も転移作用に特化した機能を持つ酵素と考えられる馬鈴薯由来の D-酵素について、その立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにし、分子レベルでその機能発現機構を明らかにしようとした。

## 第 1 章 大量発現系の構築と精製方法の確立

組換え酵素を大量発現するために pET system を用いた大腸菌発現系を構築した。PKK388-DPE2 をテンプレートとし、ベクター (pET21-d) に野生型の遺伝子を挿入したプラスミド pDEPW を作製し、これを大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。60 時間、18°C で誘導培養をし、得られた菌体を超音波破碎後、遠心分離した上清の粗酵素液を各種クロマトグラフィーによって目的たんぱく質が単一になるまで精製を行った。

## 第 2 章 D-酵素の立体構造解析

X 線結晶構造解析法により D-酵素の立体構造を明らかにするために酵素のメチオニンをセレン化し、多波長異常分散法 (MAD) で位相を決定した。セレン

化はメチオニン要求株である大腸菌 B831 (DE3) にプラスミド pDEPW を導入して行い、位相決定に用いた波長は 1.000 Å (remote)、0.9794 Å (peak)、0.9791 Å (edge)である。

D-酵素の結晶化はハンギングドロップ法で行った。セレノメチオニン化酵素の結晶データは 2.0 Å分解能までの反射を用いて処理を行った。結晶構造は空間群 C2221 に属し、結晶学的 R-値は 0.187、フリーR-値が 0.217 になるまで精密化を行った。N 末端のアラニン残基のモデル化が出来ず、最終モデルは 523 残基であった。また、セレン化をおこなっていない酵素 (野生型酵素) の結晶構造と同じであることを確認した。

結晶構造解析の結果、本酵素は結晶中でダイマー構造をとっていることが確認された。結晶学的対称軸とダイマーの対称軸が一致しており、各サブユニットは等価であることが分かった。非対称単位内に 1 個のサブユニット、1 個のカルシウムイオン、グリセロール 5 分子及び 613 個の水分子が存在していた。各サブユニットは基本的に 1 つのドメインから構成されており、そのドメインは  $\alpha$ -アミラーゼファミリーに属する酵素でみられる ( $\alpha/\alpha$ )<sub>8</sub> バレル構造をとっていた。各サブユニットは、N 末端から 25 残基がもう一方のサブユニットと主に疎水性相互作用をしていた。この N 末端 25 残基は、温度因子が酵素全体の平均値に比べて高く、もう一方のサブユニットと強く固定された状態ではなかった。

好熱菌 (Thermus Aquaticus) 由来のアミロマルターゼはモノマー構造をとり、本酵素のサブユニットとは主鎖構造に関してはほぼ同じ構造であった。他の  $\alpha$ -アミラーゼとの一次配列の比較から、推測される 3 つの触媒残基は Asp321 (求核基)、Glu368 (酸/塩基触媒基)、Asp421 であり、それらの相対的な位置は他の  $\alpha$ -アミラーゼと同様によく保存されていたが、基質フリーの  $\alpha$ -アミラーゼ酵素の構造中で見られる Glu368 と Asp421 との間の水素結合が見られなかった。活性

部位は酵素分子のクレフトに存在し、その活性部位には不凍剤として用いたグリセロールが3分子存在し、触媒残基と水素結合していた。

また、本酵素の分子量を TOF-MASS、熱測定、動的光散乱法で測定した結果、本酵素は水溶液中においても、結晶構造と同じくダイマー構造を取っていることが分かった。

### 第3章 基質アナログ acarbose と wild 酵素との複合体構造と反応機構の解析

D-酵素の活性部位構造についての知見を得るため、 $\alpha$ -アミラーゼファミリーの酵素に特異的な阻害剤として知られている acarbose

(O-4,6-dideoxy-4-[[[(1S,4R,5S,6S)-3-(hydroxymethyl)-2-cyclohexene-1-yl]amino]- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose)と D-酵素との複合体の X 線結晶構造解析を行った。酵素の活性部位には、acarbose の還元末端グルコースが1分子切断された形で、残った3残基がサブサイト-3 ~ -1 を占有して結合していた。また、触媒残基と推定される Asp321 (求核基) のカルボキシル基酸素原子とサブサイト-1 を占有するグルコース残基のアノメリック炭素原子間の距離は 1.45 Å であり、Asp321 とサブサイト-1 を占有するグルコース残基のアノメリック炭素は共有結合していることが分かった。また、サブサイト-1 にあるグルコース残基のアノメリック炭素原子の 4 Å 以内に加水分解に必要と考えられる水分子が観測されなかった。このことは、本酵素の加水分解活性が極めて低い理由の1つと考えられる。

以上の結果から、本酵素の触媒する不均化反応において、acarbose が本来の基質と同様に結合し、還元末端グルコースが切断され、残る糖残基との共有結合中間体に至ったと推定することができる。引き続いて転移反応が起こらなかったのは、acarbose の非還元末端が valienamine 基で、アクセプターとして不適當

な構造であるためであり、グルコースやマルトトリオースなどのアクセプターが存在する場合、反応中間体を経て反応が進行すると考えられる。そこで、acarbose と D-酵素の混合液にアクセプターとしてマルトトリオースを共存させ、生成物を HPAEC によって分析した。その結果、(1) acarbose と D-酵素の混合液からは acarbose から切断されたグルコースのみが生成したが、(2) acarbose と D-酵素にマルトトリオースを添加した場合は、転移反応が起こり、acarbose をドナーとした転移生成物が観測された。この実験結果は、D-酵素と acarbose との共有結合中間体に対してアクセプターが適切な位置を占めることによって転移反応が起こったことを示している。即ち、以上の結果は、本酵素による転移反応が D-酵素と基質との共有結合中間体を経た SN2 反応機構で起こる強い証拠と考えることが出来る。

#### 第 4 章 シクロアミロースと wild 酵素との複合体結晶構造

重合度 26 のシクロアミロース (CA26) は、酵素によって切断されてもアクセプターには成り得ない。したがって、本酵素と CA26 との複合体の結晶構造は、前章の結果から CA26 の環が切断されて Asp321 との共有結合中間体として観測されると推測し、その結合状態を得るために CA26 との複合体の X 線結晶構造解析を行った。しかし予想に反して、サブサイト-1 と +1 との間で CA26 が切断されず、CA26 のグルコース残基のうち 13 個がプラス側サブサイトに 8 残基とマイナス側サブサイトに 5 残基が結合した状態が観測された。これは、カップリング反応のドナーとして結合しているか、あるいは、分子内転移反応によって鎖状のアミロースから環状の CA26 が合成された状態に相当すると考えられる。

総括

D-酵素の X 線結晶構造解析によって立体構造を明らかにし、結晶中および溶液中で等価なダイマーとして存在することを明らかにした。

D-酵素と acarbose との複合体の X 線結晶構造解析において、共有結合中間体が観測された。 $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤である acarbose はアクセプターには成り得ないが、不均化反応のドナーとしては挙動した。このような wild 酵素と基質の共有結合中間体が見つかった例は、 $\alpha$ -アミラーゼファミリー酵素において初めてであり、更に転移の継続反応が進行することを明らかにしたことは糖質関連酵素で初めてである。現在、 $\alpha$ -アミラーゼファミリー酵素の触媒反応機構は、SN1 型と SN2 型の 2 通りが考えられており、両者は共有結合中間体を取るか否かで区別されている。その触媒反応機構がどちらで進行するかはまだ明白ではない。本研究の結果は、本酵素および  $\alpha$ -アミラーゼファミリーの酵素の触媒反応機構が SN2 型であることを支持する知見である。また、本酵素と大環状アミロース CA26 との複合体の X 線結晶構造解析の結果、CA26 が切断されず、CA26 のグルコース残基のうち 13 個がプラス側サブサイトに 8 残基とマイナス側サブサイトに 5 残基が結合していることを明らかにした。

## 審査結果の要旨

D-酵素(Disproportionating enzyme, 4- $\alpha$ -glucanotransferase, [EC 2.4.1.25])は1948年に大腸菌から初めて発見され、植物由来のD-酵素は1956年にPeatらにより、馬鈴薯塊茎からマルトオリゴ糖の重合度を不均化する酵素として初めて発見された。これらは共に $\alpha$ -1,4-グルカンを基質とし、分子間転移反応と分子内転移反応を触媒するが加水分解活性はほとんど持たない。特に馬鈴薯由来のD-酵素は極めて低く、転移活性にその機能が特化された酵素である。また、D-酵素は直鎖のグルカンからグルコース重合度17~22以上の非常に水に対する溶解度が高い大環状グルカン(シクロアミロース)を生成する事も大きな特長である。これに対して、主にグルコース重合度6~8の環状グルカン( $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリン)を生成することで知られているCGTase(Cyclodextrin glucanotransferase, [EC 2.4.1.19])は、転移活性と共に弱い加水分解活性を持っている。

これらは工業用糖質酵素として重要な酵素であるが、専ら転移反応を触媒するD-酵素の機能発現機構に関する研究は、同じ $\alpha$ -アミラーゼファミリーに属する $\alpha$ -アミラーゼやCGTaseなどの加水分解と転移反応を触媒する酵素に比べて遅れている。また、欠くことのできない基礎的知見を与えるX線結晶構造解析法による立体構造解析は、植物由来のD-酵素について、未だ、行われていない。本研究は、馬鈴薯由来のD-酵素(Mr 59,200)の機能発現機構を解明する事を目的として、free酵素およびacarboseあるいはシクロアミロース(CA26)と酵素との複合体のX線結晶構造解析を行った。各状態の酵素の立体構造解析に成功し、基質の結合や触媒機構に関する極めて重要な知見を得ている。本論文の内容は以下のように要約される。

1. X線結晶構造解析における本酵素の結晶化と機能解析の研究には、多量の酵素を必要とするためpET System (Novagen)を用いた大腸菌での大量発現系(発現誘導した酵素収量: 約20 mg/l culture)を構築した。

2. 馬鈴薯由来のD-酵素の立体構造を1.8 Å分解能で決定し、等価な2つのサブユニットからなる二量体構造をとっていることを明らかにした。そのサブユニットのドメイン構造や活性部位クレフトの構造など本酵素の分子構造を明らかにし、三つの触媒残基を推定した。また、本酵素が水溶液中においても二量体構造を取っていることも明らかにした。

3. アミラーゼファミリーの酵素に対する基質アナログで強い阻害剤として知られるacarboseと馬鈴薯由来のD-酵素の複合体結晶構造を2.0 Å分解能で決定した。その結果、acarboseは酵素の活性クレフトに存在し、還元末端glucose残基が切断された形で、求核触媒残基Asp321と共有結合していた。このAsp321とacarboseとの共有結合の状態が、酵素が触媒する不均化反応の共有結合中間体と考えられることを、アクセプターとしてglucoseやmaltotrioseを用いて明らかにし、本酵素の反応機構は、二重置換(SN2)触媒機構であると指摘した。

4. 本酵素の環状化反応の生成物であり、かつ、カップリング反応の基質ともなるシク

ロアミロース (CA26) との複合体の結晶構造を 2.0 Å 分解能で決定した。その結果、CA26 が活性部位のクレフトに沿ってサブドメイン (B1) を巻くように結合し、触媒部位をまたいで glucose 残基が負のサブサイト側に 5 残基、正のサブサイト側に 8 残基が連結して結合した状態で観測された。また、CA26 の残り半分の glucose 残基は観測できず結合していなかった。また、上記の結果と溶液反応の実験から、酵素がドナー分子とアクセプター分子を同時に認識できなければ、転移反応 (カップリング反応) が開始しないと推定した。

## 審査委員会の所見

本研究は、植物由来 D-酵素として初めての立体構造の解析例である。D-酵素と acarbose との反応において、求核触媒残基 Asp321 との共有結合中間体を観測し、さらに、この中間体は、酵素が触媒する不均化反応の反応中間体であることを示した。この知見は、糖質酵素において、初めて明確に共有結合反応中間体をとらえ、本酵素が触媒機構として二重置換 (SN2) 反応機構を取る貴重な証拠を示したことを意味する。加えて、本酵素とシクロアミロース (CA26) との複合体の X 線結晶構造解析にも成功し、CA26 が分解されることなく、分子の半分が触媒部位を跨いで活性部位クレフトに結合していることを明らかにし、アクセプター分子の結合により転移反応が開始することを溶液反応の実験により確認した。本論文の成果は、馬鈴薯由来 D-酵素の触媒反応機構の解明に大きく寄与し、また、他の糖質関連酵素の研究にもインパクトを与え、その酵素化学的研究の進展に寄与するものである。よって、最終試験の結果と併せて、博士 (農学) の学位を授与することを適当と認める。