

多糖代謝に関わる酵素群の構造生物学的研究 Structural biology of enzymes related on polysaccharide metabolism

加藤 公児^{1,2,*}, 藤原 孝彰², 小林 桃子², 沈 興², 姚 閔^{1,2}

¹北海道大学大学院先端生命科学研究院、²北海道大学大学院生命科学研究院
〒060-0810 北海道札幌市北区北 10 条西 8

Koji Kato^{1,*}, Takaaki Fujiwara¹, Momoko Kobayashi¹, Xing Shen¹, Min Yao¹

¹Faculty of Advanced Life Science, ²Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Kita-ku, Kita-10, Nishi-8, Sapporo 060-0810, Japan

1 はじめに

糖質は、エネルギー源、細胞骨格を成す主要な構成成分、芳香族アミノ酸の生合成過程における前駆体など、生物の生命維持にとって必要不可欠であり、生命現象の根幹に関わる重要な機能を果たす。自然界には、鎖長や置換基の違いにより膨大な種類の糖が存在し、それに対応して、糖の合成、修飾、変換を行う非常に多くの糖質関連酵素が存在する。生体内での糖の代謝は、酸化、還元、置換、加水分解、糖鎖重合、異性化などの様々な反応を触媒する酵素の存在下で、特定の基質に対してのみ厳密に進行する。糖質は、生体にとって重要であるだけでなく、機能性物質や生体高分子材料としての利用を通して、我々の生活にも密接に関連している。これらの有用物質の効率的かつ大規模な獲得を目的として、酵素を利用する他、微生物自身を生産系として利用することも期待されている。本研究では、新規産業材料として利用される機能性糖質の生成に利用される *Rhodothermus marinus* 由来セロビオース 2-エピメラゼ (RmCE)、基質の還元末端を認識し α -1,6-グルコシド結合特異的な加水分解および糖転移反応を触媒する *Streptococcus mutans* 由来デキストラングルコシダーゼ (SmDG) そして α -1,4-グルコシド結合特異的な加水分解および糖転移反応を触媒する *Halomonas* sp. H11 由来 α グルコシダーゼ (HaG) の X 線結晶構造解析および機能解析を行った。

2 実験

それぞれの野生型、変異型酵素は大腸菌を用いて発現し、各種クロマトグラフィーを用いて高純度に精製した。結晶化は蒸気拡散法により、下記のリザーバー溶液と酵素溶液を 1:1 で加えることにより、それぞれの酵素単体及び基質複体の結晶を得た。

RmCE: 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 1.2 M ammonium hydrogen phosphate

SmDG: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM calcium chloride and 18% PEG6000

HaG: 0.1 M HEPES-NaOH buffer pH 7.0, 0.02 M magnesium chloride and 20% polyacrylic acid (PAA) 5100 sodium salt

X 線回折実験は BL-1A, NW-12A そして BL-17A で行い、RmCE: 2.2-1.5Å 分解能、SmDG: 2.4-2.1Å 分解能、HaG: 3.0-1.5Å 分解能の回折データを収集し、分子置換法にて位相決定し、構造を決定した。

3 結果および考察

RmCE と二糖との複合体の構造において、基質結合部位には、生成物であるグルコシルマンノースまたはエピラクトースの明瞭な電子密度が観測された (図 1)。還元末端側の糖は、保存性 Trp322 によるスタッキングと、保存性 Arg66 による水素結合により厳密に認識される一方、非還元末端側の糖は、CE にのみ保存された Trp385 によるスタッキングで結合していた。これら結合様式は、非還元末端側の糖が異なる二糖に対して作用する CE にとって合理的であると考えられる。

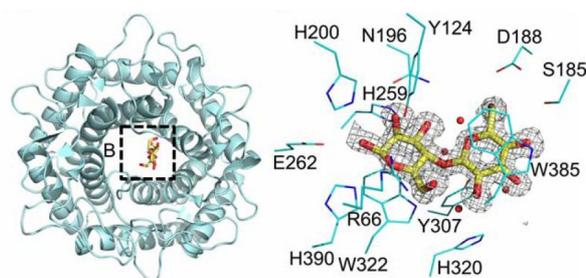


図 1 : RmCE とグルコシルマンノースの相互作用

CE ファミリー酵素では、基質結合部位に酸/塩基触媒として機能する 2 つの His 残基が配置しており、CE でも同様の位置に 2 つの His 残基 (RmCE では His259 と His390) が存在していた。2 つの His 残基に加えて、非修飾糖を基質とする CE では、活性部位にもう一つ別の His 残基 (RmCE では His200) が存在していた。変異体解析の結果、この His 残基は、CE の活性に必須であることが証明された。我々は、この His 残基が、異性化反応中の還元末端側の糖の 2'-OH の分極を

促すことで、不斉中心である C2 位からの脱プロトン化を促進するはたらきがあると予想し、3 つの His 残基が関与する CE の反応機構を提唱した [1]。

また、SmDG のリガンドフリー体と共有結合中間体そして基質複合体の構造比較から求核触媒残基 Asp194、一般酸塩基触媒残基 Gln236、及び基質結合部位のサブサイト+1/+2 を構成する Trp238 の構造変化が起こることが分かった。興味深いことにリガンドフリー体、基質複合体、中間体の3つの構造中で Trp238 側鎖は異なるコンフォメーション (free 型、closed 型、open 型) を形成しており、Trp238 の柔軟性を示唆した (図 2)。

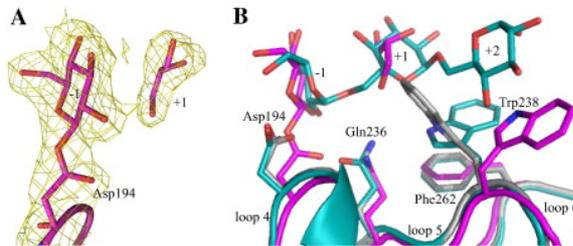


図 2 : SmDG の活性部位の構造 (A) 共有結合中間体の Fo-Fc map、(B) リガンドフリー体 (グレー) と共有結合中間体 (マゼンタ) そして基質複合体 (シアン) の構造

変異体解析の結果から、Trp238 の柔軟性は糖転移反応に重要であることが示唆された。すなわち、糖との共有結合形成により配向変化した触媒残基の影響を受け、Trp238 は closed 型から open 型と

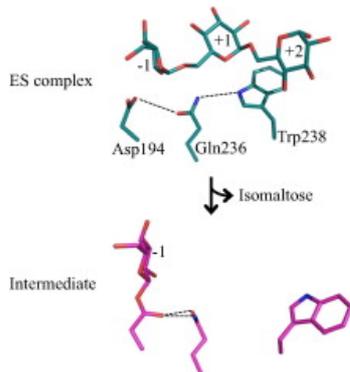


図 3 : SmDG の活性部位の構造変化

なる。その後、アクセプター糖を受け入れる際に Trp238 が open 型から再び closed 型へ戻ることが、安定な中間体を破壊しその後の反応を促進している可能性が考えられる (図 3) [2]。

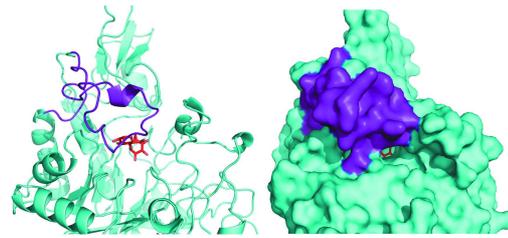


図 4 : HaG の活性部位。β-αループ 4 を紫で示す。

さらに HaG のリガンドフリー体と共有結合中間体そして基質複合体構造から、活性部位は 15 残基のアミノ酸から成り、GH13 ファミリータンパク質で保存性の高い求核触媒残基 Asp202 そして一般酸塩基触媒残基 Gln271 が確認された。また HaG において特徴的な長いβ-αループ 4 は厳密な基質認識に重要であることが示唆された (図 4)。さらにそれらの構造を基に HaG の反応メカニズムを提唱した [3]。

4 まとめ

本研究では機能性糖質の生成に利用される 3 種類の酵素 (RmCE、SmDG そして HaG) の構造、機能解析を行うことにより新たな知見が得られた。これらの情報を活用して、より付加価値の高い機能性糖質が効率的に生産されることが期待される。

謝辞

X 線回折強度データ測定においては、PF スタッフの方々に大変お世話になりました。ここに感謝致します。

参考文献

- [1] T. Fujiwara *et al.*, *JBC* **289**, 3405 (2014).
- [2] M. Kobayashi *et al.*, *FEBS letters* **589**, 484 (2015).
- [3] X. Shen *et al.*, *Acta Cryst. D* **71**, 1382 (2015).

* kato@castor.sci.hokudai.ac.jp