

Schizosaccharomyces pombe α -Glucosidase の 構造と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

α -glucosidase (α -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.20) は、 α -glucoside 結合を持つ基質の非還元末端から加水分解によって α -D-glucose を遊離させるエキソ型の酵素である。微生物から動物、植物に至るまで広く分布し、その基質特異性は起源により多様で、合成配糖体もしくはマルトオリゴ糖のような低分子の基質のみに作用するものから、澱粉やグリコーゲンのような高分子に作用するものまで存在する。

α -glucosidase のアミノ酸配列を比較すると、 α -glucosidase family I、family II に分類することができ、それぞれのファミリー内で共通のアミノ酸配列を有している。family I に属する酵素には α -amylase family の特徴が認められる。 α -amylase family とは一次構造上に活性中心を形成する相同性の高い4つの領域をもち、また触媒ドメインが $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造をとるといった構造の類似性に併せて、触媒機構にも共通性をもつ糖質加水分解および関連酵素群である。一方、family II に属する酵素は α -amylase family の特徴を有せず、機能と構造に関する知見はほとんどない。触媒残基は一般酸塩基触媒反応における求核残基が自殺基質で明らかにされているのみであり、立体構造も決定されていない。

本研究ではまず *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase cDNA クローニングによりアミノ酸配列を推定し、本酵素が family II に属することを調べた。次に *S. pombe* α -glucosidase cDNA を *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris* で発現させ、部位特異的変異の手法を用いて、触媒活性に必須なアミノ酸残基を推定した。またそれらの近傍に保存されている Trp 残基を置換した変異酵素を作製しその役割を考察した。

1) *S. pombe* α -glucosidase cDNA およびゲノム遺伝子の単離と構造

S. pombe α -glucosidase cDNA をそのライブラリーからスクリーニングした。プローブにはアミノ酸配列から合成したオリゴヌクレオチドプライマーでの RT-PCR 産物を用いた。cDNA は全長 4,176 bp からなり、5'-UTR、1,037 bp、2,910 bp、970 コドンの ORF、157 bp、3'-UTR、72 bp、poly(A) を含んでいた。ORF から推定されるアミノ酸配列は α -glucosidase family II 酵素と相同性のあるものであった。また α -glucosidase の他に α -xylosidase、 α -1,4-glucan lyase とも相同性を示し、glucoside hydrolase family 31 に属することが明らかになった。

S. pombe α -glucosidase 遺伝子を含むゲノム DNA 断片を PCR により単離した。遺伝子にはイントロンが含まれなかった。3'下流には ABC superfamily transporter 類似タンパク質がコードされ

ていた。5'上流には *S. cerevisiae* や *Aspergillus* 属などでカタボライトリプレッションタンパク質が結合する配列 GC-box 様配列 (CCGGGG) が見出された。*S. pombe* α -glucosidase 遺伝子の発現量は培地中の glucose の濃度により転写レベルで制御されていた。glucose 高濃度で発現は抑制されたが、おそらくその制御は cAMP 非依存性であることを考察した。

2) *S. pombe* α -glucosidase cDNA の *S. cerevisiae* および *P. pasris* での発現

S. cerevisiae 発現系では培養液 1 ml あたり無細胞抽出液から 0.6 U の組み換え酵素が得られた。*S. cerevisiae* 組み換え酵素を無細胞抽出液から精製した。性質は *S. pombe* から精製された酵素 (Native 酵素) とほぼ同じ性質を示した。*P. pasris* 発現系では培養液 1 ml あたり培養上清から 1.0 U、無細胞抽出液から 2.5 U の酵素が得られた。*P. pasris* 組み換え酵素を培養上清から精製した。性質は Native 酵素とほぼ同じ性質を示したが、分子量は Native 酵素 210 kDa に対して *P. pasris* 組み換え酵素は 173 kDa であった。これは *P. pasris* が *S. pombe*、*S. cerevisiae* よりも過度の糖鎖付加を行わないことが原因であると考えられた。

3) *S. pombe* α -glucosidase 活性中心の推定

酵素反応に対する pH の影響から *S. pombe* α -glucosidase の活性解離基は 2 つのカルボキシル基であると推定した。そこで α -glucosidase family II に属する 17 種の酵素で完全に保存されたカルボキシル基に部位特異的変異を導入し、*S. cerevisiae* で発現させたところ Asp-481、Glu-484、Asp-647 が活性に必須であることが明らかとなった。

Asp-481 は触媒反応における求核残基であると予想できた。*S. pombe* α -glucosidase が自殺基質 conduritol B epoxide (CBE) と 1 対 1 で結合することで失活し、Asp-481 が他起源 α -glucosidase で CBE により修飾される Asp 残基と相同であること、また Asp-481 変異酵素 (Asp \rightarrow Asn, Ala, or Glu) が活性を失うことから推測した。

Glu-484 は Gln、Ala への変異では maltase 活性を失うのに対し、Glu への変異では野生型の 10% の maltase 活性を示した。Asp-481 近傍でのカルボキシル基の提供が加水分解反応に必須であることが明らかとなった。Glu-484 の Ala への変異酵素は maltose を加水分解することはできないが、D-glucal を水和できた。従ってこの残基は触媒残基ではないと結論した。D-glucal が通常基質より遷移状態に近い構造をもつことから Glu-484 は基質に歪みを与える役割を果たしていると推定した。

Asp-647 変異酵素 (Asp \rightarrow Asn, Ala, or Glu) はいずれの変異でも触媒活性を失った。よって Asp-647 が触媒活性の酸塩基触媒残基の最有力候補であることをはじめて明らかにした。またこれら 3 残基近傍は α -glucosidase family II において非常に保存された領域であり、 α -glucosidase family II における触媒残基を含む保存領域 Region A、Region B として提案した。

4) *S. pombe* α -glucosidase 活性中心近傍の芳香族アミノ酸残基の役割

活性中心近傍に保存された Trp 残基、Trp-479、Trp-644、Trp-652 のそれぞれの Ala 変異酵素を作製し、それらの各種基質に対する速度パラメーターを求めた。すべての変異酵素で k_0 値が大幅に減少した。よってこれらの残基が触媒活性には必須ではないが重要であることがわかった。Trp 変異酵素の K_m 値の変化から、Trp-479 はサブサイト 2、Trp-644 がサブサイト 3 に貢献していると推測した。また Trp-652 は Ala 変異酵素の pH 活性曲線がアルカリ側にシフトしたことから、他の Trp-479、Trp-644 より活性中心に近い位置で触媒活性に貢献していることを考察した。

N-bromosuccinimide による化学修飾の結果、この3つの Trp 残基以外にも活性発現に関与する Trp 残基が存在することが明らかとなった。それは活性中心以外の部位で高次構造維持に貢献していると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 内 藤 哲

副 査 助 教 授 木 村 淳 夫

学 位 論 文 題 名

Schizosaccharomyces pombe α -Glucosidase の

構造と機能に関する研究

本論文は、和文171頁、図66、表20、6章からなり、他に参考論文2篇が付されている。

α -glucosidase (EC3,2,1,20) は、微生物、植物、動物に至るまで生物界に広く分布しており、その基質特異性や一次構造からfamily I およびII の二つのグループに分けられる。本酵素は、 α -グルコシド結合をもつ基質の非還元末端から加水分解によって α -glucoseを遊離させるが、その基質特異性は起源によりきわめて多様である。*Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidaseは、その基質特異性からはfamily II に属する酵素とみなされるが、構造と機能に関する知見はきわめて乏しい。

本研究は、*S. pombe* α -glucosidase のcDNAクローニングによりその一次構造の解析、異種宿主細胞における発現、部位特異的変異による触媒活性に必須のアミノ酸残基の推定を意図してなされたものであり、研究の結果は以下のように要約される。

1) 精製酵素の部分アミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、*S. pombe* α -glucosidase cDNAをそのライブラリーからスクリーニングした。そのcDNAは、全長4,176bpからなり、ORFは2910bp、970コドンを含んでいた。ORFから推定された全アミノ酸969の配列は、family II 酵素群と相同性が高く、一次構造の面からも本酵素はfamily II に属することが確認された。

S. pombe α -glucosidase cDNA遺伝子を含むゲノムDNA断片をPCR法により単離、解析した結果、その遺伝子にはイントロンが含まれていないことを明らかにした。

2) *S. pombe* cDNAの*Saccharomyces cerevisiae* および*Pichia pastoris* での発現を試みた。*S. cerevisiae* 発現系では、培養液1mlに含まれる細胞の抽出液から0.6単位の組換え酵素が得られ、精製した組換え酵素は*S. pombe* から精製された酵素（オリジナル酵

素) とほとんど同じ性質を示した。 *P. pastris* 発現系では、培養液1mlあたりの上清液から1.0単位、細胞の抽出液から2.5単位の組換え酵素が得られた。精製した組換え酵素もまたオリジナル酵素とほとんど同じ性質を示したが、オリジナル酵素の分子量が210kDaであるのに対して *P. pastris* 組換え酵素では173kDaであり、両者の分子量に違いが認められ、 *P. pastris* 発現系では糖鎖の付加が少ないと考えられた。

3) *S. pombe* α -glucosidaseの加水分解反応に対するpHの影響について反応動学的解析による活性解離基の検討を行い、触媒活性に必須な解離基を二つのカルボキシル基(一つは解離型)であると推定した。続いて、 α -glucosidase family IIに属する17種の酵素で完全に保存されたカルボキシル基をもつアミノ酸残基(AspまたはGlu残基)に部位特異的変異を導入し、*S. cerevisiae*により発現させた酵素の活性の検討結果から、Asp481、Glu484およびAsp647が触媒活性発現に必須であることを明らかにした。*S. pombe* α -glucosidaseが自殺基質conduritol B epoxide (CBE)と1:1モル比で結合して失活すること、Asp481が他起源の α -glucosidaseにおいてもCBEにより修飾されるAsp残基に相当すること、Asp481Asn、Asp481Ala、Asp481Glu変異酵素が失活することから、Asp481は触媒反応に必須な解離型カルボキシル基であると推定した。

Glu484の役割に関しては、Glu484Gln、Glu484Ala変異酵素は失活したが、Glu484Asp変異酵素ではオリジナル酵素の10%の活性を示した。しかしGlu484Ala変異酵素は、通常の基質とは異なった遷移状態に近い構造をもD-glucalに対する水和反応を触媒することからGlu484は触媒反応の際に基質に歪みを与えることにより反応を促進させるのに必須であると推定した。

Asp647Asn、Asp647Gln、Asp647Alaはいずれも触媒活性を失った。 α -glucosidase family IIに属する17種の α -glucosidaseの一次構造において、Asp647に相当するAsp残基は高度に保存されたアミノ酸残基であり、この酵素についての結果から、従来不明であったfamily IIに属する酵素群の触媒反応に必須のプロトン供与体としてのカルボキシル基をもつアミノ酸残基をはじめて明らかにした。

4) 活性中心近傍に保存されたTrp残基の役割を検討した。Trp479、Trp644、Trp652の加水に関する反応動学的解析を行った。その結果に基づいて、Trp479およびTrp644はそれぞれ活性部位のサブサイト2およびサブサイト3において基質の結合に関与し、Trp652は他の二つのTrp残基よりも触媒部位により近い位置で触媒活性に関与していると推定した。

以上のように本研究は、*S. pombe* α -glucosidaseのcDNAクローニングによる一次構造の推定、ゲノム遺伝子の構造解析、従来不明であった触媒活性に直接関与しているプロトン供与体としてのアミノ酸残基の推定を行ったものであり、 α -glucosidaseの触媒反応

機構を考えるうえで学術的に貴重な基礎的知見を提供している。

よって審査員一同は、奥山正幸が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。