

学 位 論 文 題 名

放線菌 *Streptomyces* sp. No.35の生産する
 β -Glucosidase アイソザイムの構造と機能

学位論文内容の要旨

β -グルコシダーゼ (β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) は、 β -グルコシド結合を有する基質を非還元末端側から加水分解し、 β -グルコースを遊離するエキソ型酵素である。微生物・植物・動物に普遍的に存在し、セルロース・配糖体・細胞膜の糖脂質などの代謝に関与する重要な糖質加水分解酵素の一つである。特に、セルロースは年間 1,000 億トン以上も生産される有望な糖質資源として注目されている。その分解において最終的にグルコースに導く酵素は β -グルコシダーゼである。高濃度の生成物（グルコース）存在下でも阻害を受けず、基質に作用する酵素はセルロース利用を促進させる上で重要である。*Streptomyces* sp. No. 35 は高グルコース濃度で阻害を受けにくい酵素生産株として取得された。本菌は 3 種の β -グルコシダーゼ (F_1 、 F_2 、 F_3 と略称) を産し、 F_3 はグルコース (0.1 M 濃度) により活性が上昇することが見いだされた。 F_1 は通常の β -グルコシダーゼと同様にグルコースで阻害される。

本研究は、 F_3 が示す特徴的な現象の機構究明を目的とした。 F_1 と F_3 の基質への作用を詳細に解析比較した結果、 F_3 がグルコースによる活性化だけでなく、基質の種類により負の協同性（基質濃度の上昇に伴う活性化）を示した。 F_3 は反応中に大きな構造変化を生じる履歴酵素 (hysteretic enzyme、アロステリック酵素の一種) の性質を与え、報告例が極めて少ない単量体アロステリック酵素であると考えられた。 F_3 遺伝子のクローニングと大腸菌での発現に成功し、ポケット状の活性中心入り口に存在する Met-356 変異酵素の作製を行い、 F_3 の示す協同性に対し解析を行った。

(1) β -グルコシダーゼ F_1 および F_3 の諸性質の比較

菌体破碎液から F_1 と F_3 の精製を行い、電気泳動的に単一な酵素標品を得た。両者は分子量 51,000 の単量体酵素であるが、pH や温度に対する至適値や安定領域に相違が認められた。基質（アリル β -グルコシド、 β -グルコ二糖類、ラミナリオリゴ糖）に対する特異性も異なり、N 末端 (F_1 , AVEGLPADFV; F_3 , ADTSFPPGFV) や内部アミノ酸配列も完全には一致しなかった。従って、両酵素は性質や構造の異なるアイソザイムであり、遺伝子はゲノム上で別個の部位に存在することが判明した。また、 F_1 は通常酵素に見られるミカエリス-メンテン型の作

用様式で基質を分解し、0.1 M グルコース共存下で活性が阻害された。 F_3 は約 1.2 倍に活性化され、基質（アリル β -グルコシド、セロビオース、ラミナリ-ビオース、-トリオース、-テトラオース）に対し負の協同性を示した。さらに、 F_3 には履歴酵素の性質（反応初期に遅い構造変化に起因する数秒から数十秒の立ち上がりや立ち遅れを与える）が見い出され、基質やグルコース分子により構造変化を生じる単量体アロステリック酵素と考えられた。なお、3 酵素は菌体内のプロテアーゼにより限定消化を受けることが観察された。

（2） β -グルコシダーゼ F_3 遺伝子の解析および大腸菌での発現

ゲノム DNA から F_3 遺伝子のクローニングを行った。ORF の全長は 1458 bp であり、485 アミノ酸をコードしていた。本酵素は N 末端の 13 アミノ酸残基を欠いており、Ala-14 からの配列であった。欠落した 13 アミノ酸残基は、その特徴からシグナル配列ではないと予想された。ORF 5' 上流には糖の輸送タンパクとセロ-ビオース/-トリオース結合タンパクと予測される ORF が、3' 下流には *lac* L ファミリーの転写制御タンパクと相同性の高い ORF が存在した。これら ORF の転写方向はすべて同じであり、プロモーター様配列がないためシストロンを形成すると推定された。従って、 F_3 は菌体内に取り込まれたセロ-ビオースや-トリオースの分解に関与することが示唆された。 F_3 のアミノ酸配列と最も保存性が高く（43%）、立体構造既知である *Bacillus circulans* β -グルコシダーゼの情報を利用してホモロジーモデリングを行い、 $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造および greek key motif（ループ C に相当する Ser-311 から Asp-361 の 50 残基の領域、基質分子の取り込みに伴い倒れ込んで活性部位を覆う）の存在が示唆された。

Ala-14 を N 末端とする遺伝子発現プラスミドを構築し、大腸菌に導入した。誘導発現を行い、培養液 1 L 当たり 44 mg の酵素量（本放線菌の 22 倍）を得た。電気泳動的に単一に精製した組換え酵素は、放線菌酵素と比較して僅かに pH と温度安定性が低下したが、他の性質は一致した。グルコース活性化や負の協同性が観察された。

（3）Glu-178 変異酵素、Glu-385 変異酵素および Met-356 変異酵素の性質

相同酵素の立体構造や阻害剤の実験結果から、 F_3 の一般酸塩基触媒残基および求核触媒残基は、Glu-178 および Glu-385 と予想された。確認のため、それぞれを Gln あるいは Ala に置換した変異酵素を作製・精製した。Glu-178-Gln/Ala は野生型酵素の $1/10^3$ 、Glu-385-Gln/Ala は $1/10^5$ の残存活性となり、Glu-178 と Glu-385 が触媒残基と推定した。ホモロジーモデリングにより F_3 の活性部位入り口に位置し、倒れ込んだループ C との相互作用が予想される Met-356 を、Ile、Gln、Glu、Lys、Phe および Gly に置換した酵素を作成した。各変異酵素を精製し、種々の基質に対する反応パラメーターを測定した。また、協同性を示すものについては、Hill 係数を求めた。Glu、Lys および Gly 置換酵素は各基質に対する反応効率が野生型酵素の $1/10^2$ 以下に低下し、Met-356 が酵素活性発現について重要な機能を示すことが明らかになった。Met-356-Ile/Gln/Phe に対する解析の結果、Met-356 がサブサイト 3 および 4 における親和力に影響を与えていることが認められた。また、負の協同性の度合いが増減し、Met-356

がアロステリック作用に関与することが示唆された。以上の結果から、基質やグルコース分子によって引き起こされる大きな構造変化（ループ C の倒れ込みと想像される）が活性部位入り口近傍に発生し、アロステリック現象が生じる作用機構を提唱した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 淳 夫

副 査 教 授 内 藤 哲

副 査 教 授 米 山 道 男 (留学生センター)

副 査 助教授 森 春 英

学 位 論 文 題 名

放線菌 *Streptomyces* sp. No.35の生産する

β -Glucosidase アイソザイムの構造と機能

本論文は、7章からなり、図 93、表 22、文献 266を含む総頁数 235 の日本語論文であり、別に参考論文 2 編が付されている。

β -グルコシダーゼ (β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) は、 β -グルコシド結合を有する基質を非還元末端から分解し、 β -グルコースを与えるエキソ型酵素である。生物界に普遍的に存在し、セルロース・配糖体・細胞膜の糖脂質などの代謝に関与する重要な糖質加水分解酵素の一つである。特に、セルロースは年間 1,000 億トン以上も生産される有望な糖質資源あり、その分解において最終的にグルコースに導く酵素は β -グルコシダーゼである。高濃度の生成物 (グルコース) 存在下でも阻害を受けず基質に作用する酵素は、セルロース利用を促進させる上で重要である。*Streptomyces* sp. No. 35 は高グルコース濃度で阻害を受けにくい酵素生産株として取得された。本菌は 3 種の β -グルコシダーゼ (F_1 、 F_2 、 F_3 と略称) を産し、 F_3 はグルコース (0.1 M 濃度) により活性が上昇する。 F_1 は通常酵素と同様にグルコースで阻害される。本研究の主な目的は、 F_3 が示す特徴的な現象 (グルコース活性化や基質に対する負の協同性) の機構究明である。

1. β -グルコシダーゼ F_1 および F_3 の諸性質の比較

菌体破碎液から F_1 と F_3 の精製を行った。両者は分子量 51,000 の単量体酵素であるが、pH や温度に対する至適値や安定領域に相違が認められた。基質に対する特異性も異なり、N 末端や内部アミノ酸配列も一致しなかった。従って、両酵素は性質や構造の異なるアイソザイムであり、遺伝子はゲノム上で別の部位に存在することが判明した。 F_1 は通常酵素と同様にミカエリス-メンテン型の様式で基質を分解し、0.1 M グルコース共存下で活性が阻害された。 F_3 は約 1.2 倍に活性化され、8 種の基質に対し負の協同性を示した。さらに、 F_3 には履歴酵素の

性質が見い出され、基質やグルコース分子により構造変化を生じる単量体アロステリック酵素と考えられた。なお、3 酵素は菌体内プロテアーゼにより限定消化を受けることが観察された。

2. β -グルコシダーゼ F_3 遺伝子の解析および大腸菌での発現

ゲノム DNA から F_3 遺伝子をクローニングした。ORF の全長は 1458 bp であり、485 アミノ酸をコードしていた。本酵素は N 末端の 13 アミノ酸残基を欠いており、Ala-14 からの配列であった。欠落した 13 アミノ酸残基はシグナル配列ではないと考えられた。ORF 5' 上流に糖の輸送蛋白とセロ-ビオース/-トリオース結合蛋白と予測される ORF が、3' 下流に *lac* L ファミリーの転写制御蛋白と相同性の高い ORF が存在し、オペロンを形成すると推定された。従って、 F_3 は菌体内に取り込まれたセロ-ビオースや-トリオースを分解することが示唆された。 F_3 のアミノ酸配列と最も保存性が高く、立体構造既知である *Bacillus circulans* β -グルコシダーゼの情報を利用してホモロジーモデリングを行い、 $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造および greek key motif (ループ C に相当する Ser-311 から Asp-361 の領域、基質分子の取り込みに伴い倒れ込んで活性部位を覆う) の存在が示唆された。遺伝子発現プラスミドを構築後、大腸菌に導入し、発現に成功した。精製した組換え酵素は、放線菌酵素と比較して僅かに pH と温度安定性が低下したが、他の性質は一致した。グルコース活性化や負の協同性が観察された。

3. Glu-178 変異酵素、Glu-385 変異酵素および Met-356 変異酵素の性質

相同酵素の立体構造や阻害剤の実験結果から、 F_3 の一般酸塩基触媒残基および求核触媒残基は、Glu-178 および Glu-385 と予想されたため、それぞれを Gln あるいは Ala に置換した変異酵素を作製し、Glu-178 と Glu-385 が触媒残基と推定した。ホモロジーモデリングにより F_3 の活性部位入り口に位置し、倒れ込んだループ C との相互作用が予想される Met-356 を、Ile、Gln、Glu、Lys、Phe および Gly に置換した酵素を作製し、種々の基質に対する反応パラメーターや Hill 係数を求めた。Glu、Lys および Gly 置換酵素の反応効率は大きく低下し、Met-356 が重要な機能を持つことが明らかになった。Met-356-Ile/Gln/Phe に対する解析の結果、Met-356 がサブサイト 3 および 4 における親和力に影響を与えていることが認められた。また、負の協同性の度合いが増減し、Met-356 がアロステリック作用に関与することが示唆された。以上の結果から、基質やグルコース分子によって引き起こされる大きな構造変化（ループ C の倒れ込みと想像される）が活性部位入り口近傍に発生し、アロステリック現象が生じる作用機構を提唱した。

以上のように本研究は、*Streptomyces* sp. No. 35 が産する 2 種の β -グルコシダーゼ (F_1 と F_3)、特に F_3 の反応機構、一次構造、触媒アミノ酸残基の推定を行ったものであり、報告例が極めて少ない単量体アロステリック酵素の作用機作を考える上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、福田健二が博士（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。