

Arthrobacter globiformis T6 由来 isomalto-dextranase の 活性部位の特定および構造と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

デキストランは、工業的に生産される重要な細菌性グルカンであり、血漿増量剤や抗血液凝固剤、クロマトグラフィーの担体に利用されるなど医薬あるいは生化学の分野で広く利用されている。また、デキストランを部分加水分解して得られるイソマルトオリゴ糖は、ビフィズス菌など有用腸内細菌の増殖に著効を示すため、機能性オリゴ糖として食品分野においても広く利用されている。

Arthrobacter globiformis T6 由来 isomalto-dextranase (IMD; EC 3.2.1.94) はデキストランの非還元末端側から順次グリコシド結合を切断し、 α -イソマルトースのみを遊離する *exo* 型加水分解反応を触媒する。糖質分解酵素の立体構造は α -amylase をはじめ数多くの酵素で解析されてきたが、デキストラン加水分解酵素に関しては 2 例しか報告されておらず、dextranase の構造と機能の相関は未だ不明である。また、現在までに IMD のアミノ酸配列と高い相同性を有するタンパク質はデータベース上には存在しないため、近縁酵素を用いたタンパク質構造の類推は困難となっていた。そのため本研究では、IMD の活性アミノ酸残基の特定と立体構造の推定を目的とした。

(1) *imd* 遺伝子の大腸菌発現系の構築と IMD の加水分解反応の触媒部位の特定

以降の実験において酵素の調製等の迅速化を図るため、*imd* 遺伝子の塩基配列情報を改定し、大腸菌での *imd* 遺伝子の大量発現系を構築した。続いて、部位特異的変異導入法を用い、加水分解を直接触媒するカルボキシル基を有するアミノ酸残基の特定を試みた。IMD のアミノ酸配列を、Glycoside hydrolase family (GH family) 27 に属している立体構造既知の α -galactosidase (GAL) と *N*-acetyl- α -D-galactosaminidase (NAG) のアミノ酸配列と整列させた。8 つのアスパラギン酸残基と 1 つのグルタミン酸残基がすべての酵素で保存されていた。これら 9 ヶ所のアミノ酸残基をアラニンへ置換した変異酵素を作製したところ、227 と 342 番目のアスパラギン酸をアラ

ニンに置換した変異酵素 (D227A および D342A) は活性を示さなかった。また, D227 および D342 をアスパラギン, グルタミン酸およびグルタミンに置換した変異酵素を作製したが, いずれも活性を検出できなかった。さらに, これらの変異体を CD スペクトル分析したところ, 変異導入による大きな構造の変化は認められなかったことから, D227 および D342 が IMD の触媒アミノ酸残基であることが明らかとなった。

(2) *Sphingobacterium* sp. 由来新規デキストラン分解タンパク質 (DHP) の酵素化学的特性と活性アミノ酸残基の特定

Sphingobacterium sp. V-54 株のゲノム DNA 中に見いだされた IMD と高い相同性 (40% の一致性) を示すオープンリーディングフレーム (ORF) の機能を明らかにする目的で, 大腸菌組換えタンパク質を調製した。種々の解析から, この組換えタンパク質が, デキストランを *endo* 型に加水分解する新規配列を有する dextranase (dextran hydrolyzing protein; DHP) であることを明らかにした。また, DHP の触媒アミノ酸残基の特定を試みた。GAL, NAG および IMD の触媒アミノ酸残基の情報から, DHP の D201, D270 および D318 をアラニンに置換した変異酵素を作製したところ, D270 および D318 を置換した酵素には活性が見いだされなかったことから, これらが DHP の触媒アミノ酸残基であると考えられた。

(3) IMD の C 末端ドメインの機能の解明

IMD の C 末端領域に見いだされた Carbohydrate binding module family 6 (CBM6) と相同な推定ドメイン構造の機能を推定した。IMD の C 末端欠失酵素の作製を試みたが, 発現タンパク質を得ることはできなかった。DHP にはこの配列は存在しないことから, IMD の C 末端領域を DHP の C 末端に付加したキメラ酵素を作製した。精製したキメラ酵素は, デキストランを *endo* 型に加水分解した。また, デキストランに対する速度パラメーターを算出したところ, DHP と同じ K_m 値を示したが, V_{max} は DHP の 5 倍以上であった。これらのことから, IMD の C 末端領域は基質の親和性や反応様式には影響せず, デキストランに対する CBM として, 触媒活性を上昇させる機能をもつと考えられた。

以上の知見ならびに IMD の構造予測の結果から, IMD は3つのドメイン (ドメイン 1, 2 および 3) から構成されていると推定した。ドメイン 1 は $(\beta/\alpha)_8$ -バレル構造を持つ触媒ドメインとして機能し, ドメイン 3 は CBM としてデキストランとの相互作用に関与すると考えられたが, β -ストランドのみからなるドメイン 2 の機能は

不明のままである。今後、ドメイン構造のシャッフルなどにより、糖質加水分解酵素の種々のドメインの機能が明らかになり、また、新しい機能を持つ酵素の創製などが可能になることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 井 博 和

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 教 授 木 村 淳 夫

副 査 助 教 授 伊 藤 浩 之

学 位 論 文 題 名

Arthrobacter globiformis T6 由来 isomalto-dextranase の 活性部位の特定および構造と機能に関する研究

本論文は、図 38, 表 14, 引用文献 115 を含み、6 章からなる総ページ 117 の和文論文である。別に参考論文 3 編が添えられている。

デキストラン加水分解酵素は、デキストランに対する加水分解様式の相違により、*endo*-dextranase と *exo*-dextranase に大別される。*isomalto*-dextranase (IMD; EC 3.2.1.94) は、土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* T6 株が菌体外に生産するデキストラン加水分解酵素であり、デキストランの非還元末端から 2 番目の α -1,6 グルコシド結合を順次加水分解し、 α -イソマルトースを遊離する *exo*-dextranase である。アミノ酸配列の相同性に基づく糖質加水分解酵素の分類では、IMD は glycoside hydrolase family 27 (GH27) に属している。しかし、GH27 の他のメンバーである α -galactosidase (GAL) や N-acetyl- α -galactosaminidase (NAG) との相同性は高くない (最大でも 19% の一致性)。rice GAL や chicken NAG の立体構造は解析されているものの、相同性の低さから分子モデリングによる IMD の構造予測は難しい。本研究では、IMD の構造と機能に関する基礎的知見を得ることを目的とし、触媒に直接関与する活性アミノ酸残基の特定とドメイン構造の推定を行った。

(1) *imd* 遺伝子の大腸菌発現系の構築と IMD の加水分解反応の触媒部位の特定

IMD をコードする遺伝子を pET-23 ベクターに組み込み、組換え IMD を効率的に生産する系を構築した。精製した組換え IMD は、*A. globiformis* T6 培養液から調製した天然型 IMD と同様の酵素化学的性質を示したため、この系を以降の実験で使用した。

多くの糖質加水分解酵素では、活性解離基はアスパラギン酸あるいはグルタミン酸のカルボキシル基であることが知られている。GH27 の rice GAL と chicken NAG では立体構造から、活性アミノ酸残基として 2 つのアスパラギン酸が特定されている。IMD に関しては、反応速度論的解析から 2 つのカルボキシル基が活性解離基であることが報告されているが、特定には至っていない。そこで、IMD のアミノ酸配列を rice GAL および chicken NAG と整列させたところ、8 カ所のアスパラギン酸残基と 1 カ所のグルタミン酸残基が 3 者で保存されていた。これらをアラニンに置換した変異酵素を作製したところ、227 と 342 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異酵素 (D227A および D342A) は、デキストラン水

解活性を示さなかった。また、D227 および D342 をアスパラギン、グルタミンならびにグルタミン酸に置換した変異酵素も活性を示さなかった。さらに、D227A および D342A 変異酵素を CD スペクトル分析に供したところ、変異導入による大きな構造の変化は認められなかった。これらのことから、IMD のデキストラン水解反応における活性アミノ酸残基は、D227 および D342 であることが明らかとなった。

(2) *Sphingobacterium* sp. 由来新規デキストラン分解タンパク質 (DHP) の酵素化学的特性と活性アミノ酸残基の特定

多分岐デキストラン加水分解酵素生産菌として分離された *Sphingobacterium* sp. V-54 株のゲノム DNA 上、IMD と高い相同性 (アミノ酸レベルで 40% の一致性) を示すオープンリーディングフレームを見いだした。この遺伝子にコードされた IMD 相同タンパク質の機能を明らかにするため、pET-23 ベクターに IMD 相同タンパク質をコードする領域を組み込み、組換えタンパク質として発現させた。精製した組換えタンパク質が、デキストランを加水分解する新規の dextranase (dextran hydrolyzing protein; DHP) であることを明らかにした。また種々の多糖およびオリゴ糖に対する水解活性を検討した結果、Dextran T2000 ならびに重合度 6 以上のイソマルトオリゴ糖に対しては生成物を与えたが、その他の糖質については生成物が検出されなかった。Dextran T2000 を基質としたときの加水分解生成物を TLC で調べたところ、グルコースおよびイソマルトオリゴ糖を与えたため、DHP はデキストランに対し *endo* 型に作用すると考えられた。また、rice GAL および IMD の活性アミノ酸残基の情報から、DHP の D201, D270 および D318 をアラニンに置換した変異酵素を作製したところ、D270 および D318 に対する変異酵素には活性が見いだされなかったことから、これら 2 残基が DHP の活性アミノ酸残基であると考えられた。

(3) IMD の C 末端ドメインの機能の解明

IMD の C 末端領域には、DHP に存在しない carbohydrate binding module family 6 および 35 (CBM6 & CBM35) と相同性を示す領域が存在する。この領域の機能を明らかにする目的で、IMD の C 末端領域を欠失させた 3 種類の変異酵素の作製を試みたが、いずれも可溶性画分として発現タンパク質を得ることができなかった。そこで、IMD の C 末端領域を DHP の C 末端側に付加したキメラ酵素を作製した。精製したキメラ酵素は、デキストランを *endo* 型に加水分解したことから、IMD の C 末端領域は加水分解の作用様式に影響しないと考えられた。また、このキメラ酵素のデキストランに対する速度パラメーターを算出したところ、DHP の野生型酵素と同じ K_m 値を示した一方で、 V_{max} は DHP の 5 倍以上の値を示した。これらのことから、IMD の C 末端領域は基質の親和性や反応様式には影響せず、デキストランに対する触媒効率を上昇させる機能をもつと考えられた。

(4) IMD のドメイン構造の予測

以上の知見ならびに IMD の構造予測の結果から、IMD は 3 つのドメイン (ドメイン 1, 2 および 3) から構成されていると推定した。ドメイン 1 は $(\beta/\alpha)_8$ -バレル構造を持つ触媒ドメインとして機能し、ドメイン 3 はデキストランとの相互作用に関与する CBM 様ドメインとして機能すると考えられたが、 β -ストランドのみからなるドメイン 2 の機能は不明のままである。

本研究では、はじめて IMD と相同性を示すタンパク質 (DHP) を見だし、デキストラン水解活性をもつことを明らかにした。また、両酵素の活性アミノ酸残基を遺伝子工学的手法を駆使し特定するとともに、ドメイン構造を推定した。さらに、IMD の C 末端領域にはじめてデキストランと結合するドメインの存在を証明した。これらの成果は学術的に高い価値

をもつだけでなく、今後、ドメイン構造のシャッフルなどによる新しい機能を持つ酵素創製が期待され、タンパク質工学的な応用へも大いに貢献するものと判断した。

よって審査員一同は、申請者である栃原孝志氏が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。