

学 位 論 文 題 名

デキストラン合成酵素と分解酵素の
構造と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

dextran は α -1,6 グルコシド結合を主鎖とする細菌性多糖であり、代用血漿やクロマトグラフィー担体として医薬や基礎研究の分野で使用されている。誘導体の dextran sulfate や carboxymethyl dextran はそれぞれ高脂血症剤や化粧品に用いられる。また dextran の加水分解物である isomaltooligosaccharide はプレバイオティクス効果を持つことから食品や飲料などで広く活用されている。本研究では、 α -1,4 結合からなる maltodextrin の非還元末端から順次 glucosyl 基を転移することにより dextran を合成する *Acetobacter capsulatum* 由来 dextrin dextranase (DDase) と dextran や isomaltooligosaccharide の非還元末端グルコース残基を加水分解する *Streptococcus mutans* 由来 dextran glucosidase (DGase) の反応機構を解明するため、両酵素の構造と機能の関係究明を行った。

(1) dextran 分解酵素 (DGase) の構造と機能に関する研究

1. 長鎖基質を認識する構造

DGase は長鎖基質に対して高い活性を示す。類似酵素との構造比較から Trp238 および短い $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 4 に着目した。Trp238 を置換した酵素および長い $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 4 を導入した酵素を作製し、両構造が長鎖基質の認識に重要であることを明らかにした。Trp238 と $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 4 による長鎖基質の認識機構を提案した。

1. 基質特異性を制御する構造

DGase は α -1,6 結合に極めて高い特異性を示す。本結合の認識に Val195 が重要であると推定し、Val195 の置換酵素を作製した。変異酵素の中で Val195Ala および Val195Ser はそれぞれ α -1,4 および α -1,3 結合に対する高い活性を獲得したことから、本残基が基質の結合特異性を制御することが認められた。

1. 三糖基質を認識する構造

Met198 は立体構造上で Val195 と Trp238 の間に位置し、基質との相互作用が予想された。本残基を全てのアミノ酸に置換した酵素 (19 種) を作製した。変異酵素は、野生型酵素と異なる三糖基質特異性 (isomaltotriose と panose) を示した。負電荷を持つアミノ酸を導入した変異酵素では還元末端側の α -1,6 結合 (isomaltotriose) に対する親和力が低下し、正電荷を持つアミノ酸に置換した酵素では還元末端側の α -1,4 結合 (panose) に対する親和力が高くなった。DGase は panose に最も高い活性を示すため、Met198 は重要な残基であることが認められた。また、芳香族アミノ酸

を導入した変異酵素では、isomaltose に対する反応において高基質濃度における活性化が認められた。

1. 糖転移酵素への変換

求核触媒残基の Asp194 を Cys に置換後に、KI により酸化することによりシステインスルフィン酸に変換した。変異酵素は、野生型酵素に比べヘテロシド基質 (aryl α -glucoside) やホロシド基質 (isomaltose) に対し極めて高い糖転移活性を示した。

2. 酸塩基触媒の置換酵素による効率的オリゴ糖合成

一般酸塩基触媒を置換した酵素は、高い遊離基を持つ基質 (α -glucosyl fluoride) に対しては作用できるが、持たない基質に対してほとんど作用しないことが知られている。一般酸塩基触媒である Glu236 を Ser に置換した酵素を用い、 α -glucosyl fluoride を基質として糖転移反応を行った。その結果、転移糖が分解されずに蓄積し、高い収率が得られた。

3. 1,5-anhydrofructose (AF) に対する水和反応の解析

α -glucosidase には、D-glucal を水和し 2-deoxyglucose を与える酵素と水和反応を触媒しない酵素が存在する。D-glucal の 2 位に水酸基を持つ AF に対する DGase および各種 α -glucosidase の反応を解析した。全ての酵素は AF をトランスに水和し、 α -glucose を生成した。本反応の速度は極めて低く、これは AF の互変異性や水溶液中での自動水和で、基質となる 1,2-エノール体の存在濃度が低いためと考えられた。可溶性デンプンと α -1,4-glucan lyase の反応で遊離した 1,2-エノール体に DGase を反応させると、高い反応速度が得られた。

(2) dextran 合成酵素 (DDase) の構造と機能に関する研究

1. 初速度測定法の確立

maltopentaose を基質に用い dextran 合成反応の経時変化を解析した。本多糖が合成される段階では基質がほぼ完全に消失していた。これまで DDase の活性は dextran 合成量から求めていた。しかし、本手法で正確な初速度を測定できないことが判明したので、maltopentaose から遊離する maltotetraose を定量する方法を確立した。新たな測定法を用いて DDase の諸性質を解析した。

2. DDase 遺伝子の単離と大腸菌による組換え酵素の生産

A. capsulatum から DDase 遺伝子を単離した。得られた DDase 遺伝子は 3,855 bp からなり、アミノ酸配列中に精製酵素の N 末端および内部配列の全てを確認することができた。本遺伝子の発現を大腸菌で行った。組換え酵素のほとんどは不溶性タンパク質として生産されたが、大腸菌の無細胞抽出液に dextran 合成活性を認めた。このことから本遺伝子が DDase をコードすることを確認できた。

3. DDase の機能領域の決定と触媒部位の推定

二次構造予測を行い、本酵素の構造を「 β ストランドが多い N 末端領域、 α ヘリックスに富む中間領域および β ストランドが主な C 末端領域」の 3 領域からなると推定した。これらの領域の機能を明らかにするために、N 末端および C 末端をそれぞれ欠失させた変異酵素を作製した。N 末端領域を僅かに欠失した酵素は、活性を示さなかった。C 末端領域を全て欠失しても酵素活性を保持したが、中間領域を含む部分まで欠失を行うと活性を失うことが明らかになった。従って、DDase 活性には N 末端および中間領域が重要であることが示された。また中間領域は、基質の立体配置

が反応後に反転する糖質加水分解酵素である glucoamylase と配列類似性を示した。このことから DDase の中間領域は glucoamylase に認められるような $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造を形成することが推定された。このバレル構造を構成する α ヘリックスの前後のループに存在し、触媒や基質との結合に重要であり、高度に保存されるアミノ酸残基のほとんどを DDase で見出すことができた。この配列比較に基づき、DDase の Glu671 および Glu846 が触媒残基であると推定した。以上の構造解析から、DDase は α -グルカンから α -グルカンを生成する保持型酵素でありながら、反転型酵素である glucoamylase とよく似た構造を有すると推定した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 淳 夫

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 助 教 授 森 春 英

学 位 論 文 題 名

デキストラン合成酵素と分解酵素の 構造と機能に関する研究

本論文は、和文 119 頁、図 63、表 26、11 章からなり、参考論文 5 編が添えられている。

dextran は α -1,6 グルコシド結合を主鎖とする多糖であり、研究分野や医薬、食品、化粧品などの産業分野で利用がある。本研究では、dextran や isomaltooligosaccharide の非還元末端グルコース残基を加水分解する *Streptococcus mutans* 由来 dextran glucosidase (DGase と略) および α -1,4 結合からなる maltodextrin の非還元末端から順次 glucosyl 基を転移し dextran を合成する *Acetobacter capsulatum* 由来 dextrin dextranase (DDase と略) の反応機構を解明するため、両酵素の構造と機能の関係究明を行った。

(1) dextran 分解酵素の構造と機能に関する研究

DGase の Trp238、 $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 4、Val195 と Met198 の機能を明らかにした。Trp238 および短い $\beta \rightarrow \alpha$ ループ 4 が、本酵素の長鎖基質に対する高い活性に重要であることを明らかにし、両構造による長鎖基質の認識機構を提案した。Val195 置換酵素の解析から α -1,6 グルコシド結合の認識に Val195 が関与することを証明した。 α -1,4 や α -1,3 結合に高い活性を示す Val195 変異酵素も得られた。Met198 の置換酵素は、野生型酵素と異なる三糖基質特異性を示した。従って、Met198 はサブサイト+1 と+2 によるグルコシド結合の認識に関与することが明らかになった。また、芳香族アミノ酸への変異では高基質濃度における活性化を認めた。

求核触媒残基の Asp194 を Cys に置換後に、KI を用いて酸化することによりシステインスルフィン酸に導いた。変異酵素は、野生型酵素に比べ極めて高い糖転移活性を示した。また、一般酸塩基触媒である Glu236 を Ser に置換した酵素を用い、 α -glucosyl fluoride を

基質として糖転移反応を行った。転移糖が分解されずに蓄積し、高い収率が得られた。

D-glucal の 2 位に水酸基を持つ 1,5-anhydrofructose (AF と略) に対する DGase および各種 α -glucosidase の反応を解析し、全ての酵素が AF をトランスに水和し、 α -glucose を生成することを見出した。可溶性デンプンと α -1,4-glucan lyase の反応で遊離する AF の 1,2-エノール体に DGase を反応させると、高い反応速度が得られた。

(2) dextran 合成酵素の構造と機能に関する研究

DDase の初速度を正確に測定する方法を確立した。新たな測定法を用いて DDase の諸性質を解析した。*A. capsulatum* から DDase 遺伝子の単離に成功した。本遺伝子は 3,855 bp からなり、推定アミノ酸配列中に N 末端および内部配列の全てを確認した。酵素遺伝子の発現を大腸菌で行い、菌体破碎液に dextran 合成活性を認めた。このことから本遺伝子が DDase をコードすることを確認した。

二次構造予測から本酵素の構造を「 β ストランドが多い N 末端領域、 α ヘリックスに富む中間領域および β ストランドが主な C 末端領域」の 3 領域からなると推定した。3 領域の機能を明らかにするために、N 末端および C 末端をそれぞれ欠失させた変異酵素を作製した。N 末端領域の欠失は、酵素活性を消失させた。C 末端領域を全て欠失させても酵素活性を保持したが、中間領域を含む部分まで欠失を行うと活性を失った。従って、DDase 活性には N 末端および中間領域が重要であることが示された。中間領域は、基質の立体配置が反転させる glucoamylase と配列類似性を示した。glucoamylase の作用に重要な残基の殆どを DDase で見出すことができた。以上の構造解析から、DDase は α -グルカンから α -グルカンを生成する保持型酵素でありながら、反転型酵素である glucoamylase に類似する構造を有すると推定した。

以上のように本研究は、dextran 分解酵素の活性部位に存在する構造エレメントの機能を初めて明らかにし、触媒残基の置換で糖転移反応が飛躍的に高まる現象を 2 種類取得した。一方、dextran 合成酵素においては、初めて酵素遺伝子の単離と異種宿主発現、3 ドメイン構造の推定に成功し、アノメリック構造の保持型酵素と反転型酵素の触媒部位アミノ酸が類似することを見出した。これらの点は、糖質の分解酵素や合成酵素に関し学術的に重要な基礎的知見を提供した。

よって審査員一同は、佐分利亘が博士（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。