

学 位 論 文 題 名

Molecular mechanism and application of
bacterial glycosidases

(細菌由来糖質分解酵素の分子機構および応用に関する研究)

学位論文内容の要旨

Based on amino acid sequence similarity, two bacterial enzymes, *Escherichia coli* α -xylosidase (YicI) and *Lactobacillus johansonii* α -1,3-glucosidase (LJAG31), belong to glycoside hydrolase family (GH) 31, containing many important human enzymes. Up to now, only a few bacterial GH 31 enzymes have been characterized. The molecular mechanism, physiological role, and applicability of the two bacterial GH 31 enzymes were studied by analyzing reaction products, kinetics, and structures of the recombinant enzymes in combination with site-directed mutagenesis works.

1. Aglycone specificity of YicI investigated by transxylosylation

The specificity of the aglycone-binding site of YicI was characterized by examining transxylosylation-catalyzing property of the enzyme. Acceptor specificity and regioselectivity were investigated using various sugars as acceptor substrates and α -xylosyl fluoride as the donor substrate. Comparison of the rate of transfer product formation and its yield using various acceptor substrates showed that glucose was the best complementary acceptor at the aglycone-binding site. YicI preferred aldopyranosyl sugars with an equatorial 4-OH as the acceptor substrate, such as glucose, mannose, and allose, resulting in transfer products. This observation suggests that 4-OH in the acceptor sugar ring made an essential contribution to transxylosylation catalysis. The disaccharide transfer products formed by YicI, α -D-Xylp-(1 \rightarrow 6)-D-Manp, α -D-Xylp-(1 \rightarrow 6)-D-Fruf, and α -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)-D-Frup, are novel oligosaccharides that have never been reported. Of the transxylosylation products, α -D-Xylp-(1 \rightarrow 6)-D-Manp and α -D-Xylp-(1 \rightarrow 6)-D-Fruf inhibited intestinal α -glucosidases moderately.

2. Characterization of LJAG31 and its efficient overproduction in *E. coli*

The heterologous production of LJAG31 in *E. coli* was so poor due to the formation of inclusion body. To overcome this problem, high salt induced-osmolyte accumulation, external-osmolyte addition, benzyl alcohol induced-chaperone secretion, and plasmided chaperone coexpression were tested. High-salt concentration, addition of benzyl alcohol, and chaperone coexpression were effective in preventing inclusion body formation.

LJAG31 was an α -glucosidase with broad substrate specificity toward both homogeneous and heterogeneous substrates. This enzyme displayed higher specificity (in terms of k_{cat}/K_m) toward nigerose, maltulose, and kojibiose than other natural substrates having an α -glucosidic linkage at the non-reducing end, which suggests that these sugars are candidates for prebiotics contributing to the growth of *L. johnsonii*. By western blot using antibody to the recombinant enzyme, the carbon source effect on LJAG31 expression level in *L. johnsonii* was verified, and it was found that LJAG31 was constitutively expressed. To our knowledge, LJAG31 is the first bacterial α -1,3-glucosidase to be characterized with a high k_{cat}/K_m value for nigerose [α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-D-Glcp]. Based on the comparison between LJAG31 and α -1,4 linkage-specific glucosidase belonging to GH31, a distinguishing structural feature of LJAG31, putatively involved in specificity, was detected.

3. Chemical rescue and glycosynthase reactions derived from LJAG31

D409 residue in LJAG31 was thought to be a catalytic nucleophile based on the sequence alignments of GH 31 enzymes. By mutating this residue with Gly, Ala, Ser, or Cys, the chemical rescue and glycosynthase reactions were monitored with the mutant enzymes. All D409 mutants showed a drastic decrease in the velocity of fluoride liberation from α -glucosyl fluorides, but D409G among these mutants showed the restoration of fluoride-liberating activity by externally added sodium azide. The β -glucosyl azide was found in the reaction mixture containing 0.8 M sodium azide and 2 mM α -glucosyl fluoride incubated with D409G mutant. This finding demonstrates that D409 is the catalytic nucleophile in LJAG31 because azide ions performed the nucleophilic attack to anomeric carbon of α -glucosyl fluoride instead of D409G. In addition, glycosynthase activity of those D409 mutants was verified with β -glucosyl fluoride as a donor substrate and 4-nitrophenyl α -glucoside (*p*NP-Glc) as an acceptor substrate. Of the mutants, D409G, D409S, and D409C showed α -glucosynthase activity, producing 4-nitrophenyl α -nigeroside [α -Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -Glcp-*p*NP] and *p*-nitrophenyl α -isomaltoside [α -Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -Glcp-*p*NP]. D409S showed the highest glycosynthase activity, suggesting that Ser residue favorably interacted with fluorine group of β -glucosyl fluoride.

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 准教授 森 春 英
副 査 助 教 奥 山 正 幸

学 位 論 文 題 名

Molecular mechanism and application of bacterial glycosidases

(細菌由来糖質分解酵素の分子機構および応用に関する研究)

本論文は、英文 172 頁、図 46、表 14、5 章からなり、参考論文 5 編が添えられている。

2 つの細菌酵素、すなわち *Escherichia coli* α -キシロシダーゼ (YicI) と *Lactobacillus johansonii* α -1,3-グルコシダーゼ (LJAG31) は、アミノ酸配列の類似性からグルコシド ヒドラーゼ ファミリー (GH) 13 に分類される。現在まで細菌由来の GH13 糖質酵素に関する研究は極めて少なく、分子機構の解析は基礎・応用研究において重要である。本研究では、細菌由来の GH13 糖質酵素である YicI と LJAG31 に関し反応機構の解明ならびに利用を目的にし、両酵素の構造と機能の関係究明を行った。

(1) 糖転移作用の解析による YicI のアグリコン特異性の究明

YicI の基質認識、特にアグリコン結合部位 (プラス側サブサイト) の基質認識を調べるため、糖転移作用を解析した。すなわち供与体に α -キシロシル フルオリドを、受容体に各種糖類を用い、転移生成物の合成速度を比較した。受容体に単糖を用いてサブサイト + 1 の認識を調べた。グルコースが最も良い受容体であり、マンノースやアロースも認識することから、C4 位の水酸基がエカトリアルであることを要求した。生成された転移 2 糖のうち α -D-Xylp-(1 \rightarrow 6)-D-Manp、 α -D-Xylp-(1 \rightarrow 6)-D-Fruf および α -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)-D-Fruf が新規であり、 α -D-Xylp-(1 \rightarrow 6)-D-Manp と α -D-Xylp-(1 \rightarrow 6)-D-Fruf が小腸 α -グルコシダーゼ活性を阻害した。次に 2 糖や 3 糖を受容体に用い、サブサイト + 2 と + 3 の認識を調べた。セロオリゴ糖がマルトオリゴ糖より良い受容体であり、3 糖の方が高い転移活性を与えることから、サブサイト + 2 と + 3 は β -アノメリック構造を好み、サブサイト + 3 の親和力が高いことが認められた。この認識は、本酵素の天然基質であるキシログルカンオリゴ糖の分解に寄与する。

(2) LJAG31 の効率的な異種宿主生産と諸性質の解明

LJAG31 の異種宿主発現を大腸菌で行ったが、封入体が形成され生産量が極めて低かった。培地の塩濃度を上げ、ベンジルアルコールを添加し、シャペロン分子の共発現を行うと、封入体形成が認められなくなり、活性のある組換え酵素を得ることができた。

生産された LJAG31 は α -グルコシダーゼ活性を示した。広い基質特異性を持つが、天然基質としてニゲロース、マルチュロースやコジビオースに良く作用した。*L. johansonii* はオリゴ糖投与で増殖が望まれる腸内細菌であることから、LJAG31 がこれら有用オリゴ糖を分解することで本乳酸菌が生育することが考えられた。特にニゲロースに対する分解活性が高く、細菌で初めて見出された α -1,3-グルコシダーゼであることが判明した。また、 α -1,3-グルコシド結合に高い特異性を発揮する構造エレメントを推定した。

(3) LJAG31 が示すグライコシンターゼ反応とケミカル・レスキュー反応

LJAG31 の触媒残基を明らかにするため、本酵素のケミカル・レスキュー反応とグライコシンターゼ反応を調べた。GH31 酵素との配列比較から触媒残基の 1 つは Asp409 と予想された。本アミノ酸の点置換酵素を作製し両反応の有無を確かめた。

Asp409 の置換体を α -グルコシル フルオリドに作用させたが、分解反応（フッ化物イオンの遊離）は認められなかった。NaN₃を加えると濃度依存的なフッ化物イオンの遊離が D409G において見られ、反応生成物が観察された。生成物の構造を解析し β -グルコシル アザイドと決定した。Asp409 の Gly 置換で構築された空間にアザイドイオン (N₃⁻) が侵入し、Asp409 のカルボキシレートイオン (-COO⁻) の代用を行うことが推定され、ケミカル・レスキュー反応の確認に成功した。

親酵素および Asp409 の点置換酵素は、 β -グルコシル フルオリドに対し分解作用を示さなかった。本反応に 4-ニトロフェニル α -グルコシドなどの合成配糖体を加えると、D409G、D409S や D409C においてフッ化物イオンの遊離が認められた。D409S が最も高い遊離を示した。生成物は、4-ニトロフェニル α -ニゲロシドと 4-ニトロフェニル α -イソマルトシドであった。本現象は典型的なグライコシンターゼ反応であり、 α -1,3-グルコシダーゼで初めて見出された。D409S は加水分解活性がなく、オリゴ糖の合成反応のみを触媒する。特にニゲロシド構造やイソマルトシド構造の画期的な合成手法となる。Asp409 の点置換体にケミカル・レスキュー反応とグライコシンターゼ反応が観察されたことから、本アミノ酸が LJAG31 の触媒残基であることが判明した。

本研究は、2 つの細菌由来の GH13 糖質酵素 (YicI と LJAG31) を取り上げ、YicI については糖転移作用からアグライコン結合特異性を究明し、3 種の新規なオリゴ糖を取得した。LJAG31 についてはその異種宿主生産に成功し、細菌において初めて見出された α -1,3-グルコシダーゼであること、Asp409 置換体にケミカル・レスキュー反応とグライコシンターゼ反応を観察し Asp409 が α -1,3-グルコシダーゼの触媒アミノ酸であることを証明した。特にグライコシンターゼ反応はオリゴ糖合成の理論収率が 100%であることから高い応用性を有する。以上のように本研究は、細菌由来の GH13 酵素に関し、学術的ならびに産業的に重要な多くの新知見を提供した。

よって審査員一同は、Min-Sun Kang 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。