

博士(水産科学) 熊谷祐也

学位論文題名

水産軟体動物 β -1,3-グルカナーゼの酵素特性と
一次構造に関する研究

学位論文内容の要旨

β -1,3-グルカナーゼ (EC 3.2.1.6) は、ラミナリンなどのグルコースが β -1,3-結合した多糖 (β -1,3-グルカン) を加水分解する酵素である。水産軟体動物は、この酵素により褐藻類や珪藻類に含まれるラミナリンを分解し、ラミナリオリゴ糖やグルコースなどの炭素源を獲得している。ラミナリンは、その起源となる褐藻の種類によって高次構造が大きく異なるが、水産軟体動物の β -1,3-グルカナーゼの作用特性も動物種によって多様である。この酵素の多様性は基質とするラミナリンの高次構造の多様性に対応しているものと予想されるが、それらの間の相関関係については詳しく調べられていない。また、一次構造が解析された軟体動物の β -1,3-グルカナーゼはウバガイやタマキビガイなどの数例しかなく、高次構造と機能の関連についての理解もほとんど進んでいない。そこで本研究では、エゾアワビ、アメフラシ、およびホタテガイの 3 種の水産軟体動物から β -1,3-グルカナーゼを単離し、その生化学的特性を究明するとともに、cDNA クローニングにより一次構造を解析し、本酵素の作用特性と構造上の特徴を明確にすることとした。さらに大腸菌発現系で作出した各種の変異体を用いて触媒活性に影響を与えるアミノ酸残基を特定するとともに、酵素特性の改変を試みた。最後に他種生物の β -1,3-グルカナーゼとの一次構造の比較により分子系統樹を作成し、水産軟体動物 β -1,3-グルカナーゼと他種生物酵素との間の系統類縁関係について推察した。

第 1 章では、エゾアワビの β -1,3-グルカナーゼ HdLam33 の単離および一次構造の解析を行った。HdLam33 はラミナリオリゴ糖、ラミナリン、およびリケナン (β -1,4/1,3-グルカン) を分解することから、エンド-1,3(4)- β -グルカナーゼ (EC 3.2.1.6) と同定された。エゾアワビの β -1,3-グルカナーゼ HdLam33 は糖転移活性を有し、この活性によって単独では分解できないラミナリビオースを分解可能であった。

cDNA 法により HdLam33 の 366 残基のアミノ酸配列が演繹された。その N 末端 38 残基は、開始コドン由来の Met と分泌シグナル領域と推定された。また、HdLam33 成熟体 329 残基のアミノ酸配列は、GHF16 に属する二枚貝や巻貝の β -1,3-グルカナーゼの配列と 39-45% の相同性を示した。このことから

HdLam33 も GHF16 に属すると考えられた。

第 2 章では、アメフラシ (*Aplysia kurodai*) の β -1,3-グルカナーゼの生化学的特性と一次構造について検討した。アメフラシからは 2 種類の酵素、AkLam36 および AkLam33 が得られた。AkLam36 はエンド型の酵素でラミナリンの内部領域のグリコシド結合を分解して最終的に 3 糖、2 糖、および单糖を生じた。一方、AkLam33 はエキソ型の酵素で、ラミナリンの還元末端のグリコシド結合を切断して直接グルコースを遊離した。

cDNA 法により AkLam36 の 450 残基のアミノ酸が演繹されたが、その N 末端から 130 残基部分は成熟体の N 末端には見られなかった。この 130 残基部分は、N 末端から 17 残基部分が開始コドンとシグナルペプチド、それに続く 18-99 残基部分が CBM 様の領域、それに続く 100-130 残基部分がリンカ一領域から成ると推定された。なお、この N 末端伸長領域は、タンパク質の成熟過程あるいは精製の過程でプロテアーゼ分解によって触媒領域から除去された可能性が考えられた。AkLam33 および AkLam36 の触媒領域は、それぞれ 320 および 321 アミノ酸残基からなり、両者間での配列相同性は約 65% であった。また、それらと他の水産無脊椎動物の β -1,3-グルカナーゼとの間の配列相同性は 40-50% であった。AkLam36 および AkLam33 は他の水産軟体動物の β -1,3-グルカナーゼと同様、GHF16 に属すると考えられた。なお、AkLam33 は GHF16 に属する初めてのエキソ型 β -1,3-グルカナーゼであった。

第 3 章では、ホタテガイの β -1,3-グルカナーゼについて検討した。ホタテガイの中腸腺は、養殖生産に伴い未利用部として大量に廃棄されているので、本章では、廃棄中腸腺を出発材料として酵素を調製した。調製したホタテガイの β -1,3-グルカナーゼ PyLam38 は顕著な糖転移活性を有しており、ラミナリトリオースをドナーとし、様々な单糖、糖アルコール、アミノ酸、およびキシロオリゴ糖などの親水性化合物をアクセプターとすることにより、様々なヘテロオリゴ糖を作出できた。このことは、PyLam38 がラミナリオリゴ糖とアルコール性 OH 基をもつ様々な化合物を原料とした新規 β -グルコシドやヘテロオリゴ糖の合成に有用であることを示している。

第 4 章では、ホタテガイ β -1,3-グルカナーゼ PyLam38 の点変異体を用いた機能解析を行った。先ず、ホタテガイ β -1,3-グルカナーゼ PyLam38 の立体構造を、*Nocardiopsis* sp. stain 96 の β -1,3-グルカナーゼ (PDB code, 2HYK) をテンプレートとしたホモジーモデリングにより予測した。それによれば、PyLam38 のサブサイト +1 を構成するアミノ酸は、Q182 (N 末端から 182 番目の Glu、以下同様に略記する)、S184、および W196 と推定された。それらのうち、Q182 が *Fibrobacter succinogenes* の β -1,3-グルカナーゼとの比較により、最も大きく活性に影響を与えるアミノ酸であると推定された。そこで、この Q182 を他のアミノ酸に置換することで酵素特性を変換できるか検討した。すなわち、ホタテガイ

β -1,3-グルカナーゼ PyLam38 の組換え体 rPyLam38 を、pCold I vector と Rosetta gami 2 を用いることで作出し、さらに点変異体として Q182 を非極性の Ala および Leu、極性の Ser、Asn、および Glu に置換した点変異体（以後 WT、Q182A、Q182L、Q182S、Q182N、および Q182E と略記する）を作出した。それらの変異体の酵素パラメーターをラミナリトリオースを基質として調べた結果、Q182A および Q182L のような疎水性アミノ酸へ置換した変異体では、反応効率 ($s^{-1}(mg/mL)^{-1}$) がそれぞれ 0.38 および 0.76 となり、WT の 2.8 に比べ大きく減少していることが明らかになった。一方、Q182E および Q182N のような親水性アミノ酸への置換では、反応効率はそれぞれ 3.0 および 2.6 で、ほとんど変化しないことが明らかになった。これらの結果は、182 番目の残基が親水性であることが高い触媒効率を示すために重要であることを示している。

次に、Q182 の変異が PyLam38 の糖転移活性にどのような影響を与えるかについて検討した。なお、糖転移活性は、ラミナリトリオースをドナー、ラミナリビオースをアクセプターとして測定した。それによれば、Q182S の糖転移活性は WT と同レベルにあるが、Q182L、Q182N、および Q182E の糖転移活性は、WT に比べ約 30% 低下していることがわかった。なお、Q182A の糖転移活性はほぼ失われていた。これらの結果から、Q182 を Ala へ置換すると、サブサイト+1 領域が疎水性となり、ラミナリビオースをアクセプター基質として利用できなくなることが考えられた。なお、Q182L の糖転移活性が失われていないのは、Ala に比べ Leu の側鎖のサイズが大きく、サブサイト+1 に存在するグルコピラノース環内部の疎水領域との結合性が保存されているためと推定した。

Q182A については親水性アクセプターではなく、疎水性アクセプターの取り込み効率について検討した。すなわち、疎水性アクセプターとしてフェノール環を有するオイゲノールを用い、その取り込みは MALDI-TOF MS により分析した。その結果、WT では全く転移反応が起こらなかったオイゲノールが、Q182A ではラミナリトリオースとの間で転移反応を起こすことが明らかになった。このことから、Q182 を Ala に置換することにより、疎水性の化合物を糖転移反応のアクセプターとして利用可能な性質に酵素特性を改変できることがわかった。

本研究で決定した軟体動物 β -1,3-グルカナーゼの一次構造と既報の酵素の一次構造を用いて分子系統樹を作成した。その結果、水産軟体動物の酵素遺伝子は、原核生物と真核生物の分岐前の生物に既に存在し、その後の生物進化に伴って褐藻類の貯蔵多糖ラミナリンを糖化するのに適する形で分子進化してきたと推定された。

以上、本研究では水産軟体動物の β -1,3-グルカナーゼの生化学的特性と一次構造、および触媒活性に影響を与えるサブサイト+1 のアミノ酸残基に関して詳細な解析を加えた。それにより、水産軟体動物の

β-1,3-グルカナーゼの酵素特性や生理的役割に関する理解を深めることができた。さらに本酵素の利用に際して必要となる基質特異性や糖転移能に関する新たな知見を提示することができた。

学位論文審査の要旨

主査教授 尾島孝男
副査教授 今野久仁彦
副査教授 澤辺智雄
副査准教授 井上晶

学位論文題名

水産軟体動物 β -1,3-グルカナーゼの酵素特性と 一次構造に関する研究

β -1,3-グルカナーゼ (EC 3.2.1.6) は、ラミナリンなどのグルコースが β -1,3-結合した多糖 (β -1,3-グルカン) を加水分解する酵素である。水産軟体動物は、この酵素により褐藻類や珪藻類に含まれるラミナリンを分解し、ラミナリオリゴ糖やグルコースなどの炭素源を獲得している。ラミナリンは、その起源となる褐藻の種類によって高次構造が大きく異なるが、水産軟体動物の β -1,3-グルカナーゼの作用特性も動物種によって多様である。この酵素の多様性は基質とするラミナリンの高次構造の多様性に対応しているものと予想されるが、それらの間の相関関係については詳しく調べられていない。また、一次構造が解析された軟体動物の β -1,3-グルカナーゼはウバガイやタマキビガイなどの数例しかなく、高次構造と機能の関連についての理解もほとんど進んでいない。このような状況下で、本研究はエゾアワビ、アメフラシ、およびホタテガイの 3 種の水産軟体動物から β -1,3-グルカナーゼを単離し、その生化学的特性を阐明するとともに、cDNA クローニングにより一次構造を解析し、本酵素の作用特性と構造上の特徴を明確にしたものである。さらに大腸菌発現系で作出した各種の変異体を用いて触媒活性に影響を与えるアミノ酸残基を特定し、酵素特性の改変を試みた。得られた研究成果は以下の通りである。

1. エゾアワビの消化液から、各種のクロマトグラフィーを用いて分子量 33,000 の β -1,3-グルカナーゼ HdLam33 を単離することに成功した。同様の方法により、アメフラシの消化液から分子量 33,000 および 36,000 の酵素 AkLam33 および AkLam36 を、ホタテガイの中腸腺からは分子量 38,000 の酵素 PyLam38 を単離することに成功した。これらの軟体動物の β -1,3-グルカナーゼは、褐藻の貯蔵多糖であるラミナリン (β -1,3/1,6-グルカン) を加水分解してラミナリビオースとグルコースを生ずることを明らかにした。また、これらの酵素はいずれも高い糖転移活性を有していることを明らかにし、この活性を利用すれば様々な单糖、オリゴ糖、アルコール、アミノ酸をラミナリオリゴ糖に導入した新規のヘテロオリゴ糖および配糖体の作出が可能であることを明らかにした。なお、AkLam33 は他の酵素とは異なりエキソ型に作用する β -1,3-グルカナーゼであった。これまで水産

無脊椎動物からエキソ型の β -1,3-グルカナーゼが得られたという報告は無いので、AkLam33 は新規のエキソ型の β -1,3-グルカナーゼであると考えられた。

2. cDNA 法により HdLam33, AkLam33, AkLam36, および PyLam38 の一次構造を解析した。それによれば、これら水産軟体動物の β -1,3-グルカナーゼはいずれも 320~330 アミノ酸残基から成り、その配列の特徴からいずれも glycosyl hydrolase family 16 (GHF16) に分類されることを明らかにした。AkLam33 および AkLam36 の間での配列相同性は約 65% であるが、それらと他の水産無脊椎動物の酵素との間では 40~50% とやや低かった。しかしながら、GHF16 の活性部位を構成する特徴的な配列モチーフ SGEIDIMESR は上記酵素で完全に保存されていた。
3. ホタテガイ β -1,3-グルカナーゼ PyLam38 の点変異体を用いた機能解析を行った。先ず、ホタテガイ β -1,3-グルカナーゼ PyLam38 の立体構造を、*Nocardiosis* sp. stain 96 の β -1,3-グルカナーゼ (PDB code, 2HYK) をテンプレートとしたホモジーモデリングにより予測した。それにより、PyLam38 のサブサイト+1 を構成するアミノ酸は、Gln182 (N末端から 182 番目の Gln、以下同様に略記する)、Ser184、および Trp196 であると推定した。次いでホタテガイ PyLam38 の cDNA を用いて大腸菌低温誘導発現系を構築し、組換え酵素を発現生産した。さらに、この発現系を利用して PyLam38 の活性部位を構成するアミノ酸の一つである Gln182 を様々なアミノ酸に置換した変異体を作出し、それらの酵素パラメーターおよび糖転移活性を調べた。その結果、Gln182 を Ala に置換することにより芳香族化合物がラミナリオリゴ糖に導入されるようになることを明らかにした。この変異体を利用すれば芳香族化合物を含む新規の配糖体を合成できることを証明した。

以上、本研究は水産軟体動物の β -1,3-グルカナーゼの酵素特性と一次構造を明らかにしただけでなく、タンパク質工学的手法で酵素特性を改変できることを示した独創的なものとして高く評価できる。よって審査員一同は、本論文が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。