

学位論文題名

植物 α -glucosidase による長鎖基質認識の構造基盤に
関する研究

学位論文内容の要旨

【背景】糖質加水分解酵素はアミノ酸配列の類似性により glycoside hydrolase (GH) family に分類されている。GH family 31 に属す α -glucosidase (GH31AG) は一般的に α -1,4 グルコシド結合に対して高い特異性を示す。しかし基質の鎖長に対する特異性は酵素の起源によって異なる。これは基質結合部位の構造の違いによるものであると考えられる。基質結合部位はサブサイトと呼ばれる単位からできており、基質のそれぞれの glucose 残基は各々のサブサイトに結合する。切断部位から非還元末端側の glucose 残基結合部位をサブサイト-1、還元末端側結合部位を切断部位から順にサブサイト+1, +2, ..., +n と表す。基質特異性は一般的に速度定数 k_{cat}/K_m の大きさにより評価される。*Aspergillus niger* α -glucosidase (ANG) など真菌類の α -glucosidase は maltose, maltotriose など短鎖基質に対して高い特異性を示し、これらの基質に対する k_{cat}/K_m 値が高い。一方、植物由来 GH31AG の多くは基質の重合度が 4 以上の長鎖基質に対して高い k_{cat}/K_m 値を示す。なかでもテンサイ α -glucosidase (SBG) は顕著な長鎖基質特異性を示し、可溶性デンプンに対して最も高い k_{cat}/K_m 値を示す。本研究ではアミノ酸配列の比較、X 線結晶構造解析、部位特異的変異酵素の速度論的解析により SBG のサブサイト構造を明らかにすることで SBG の長鎖基質特異性の分子機構を解明した。

【基質結合に関与する残基の配列比較による抽出】GH31AG 間でのアミノ酸配列の比較から SBG では N 末端ドメインから突き出たループ (N-loop) 上に位置する Phe236 が基質結合に関与していることを予想した。一般的に芳香環は糖残基との結合によく関与することが知られている。Phe236 を Ala もしくは Ser に置換した変異 SBG (F236A/S) では、重合度 3 以上のマルトオリゴ糖や可溶性デンプンに対する k_{cat}/K_m が野生型酵素の 0.14-0.34 倍に低下した。特に maltotriose, maltotetraose に対する k_{cat}/K_m の減少が顕著であり、Phe236 がサブサイト+2 および+3 の形成に関与していることが示された。

また、短鎖基質に特異性を示す ANG の N-loop 上の Thr228 を Phe に置換することにより ANG の長鎖基質に対する特異性が向上した。すなわち野生型酵素では maltotetraose の k_{cat}/K_m 値が maltose の値の 0.91 倍であったのに対し、Thr228 を Phe に置換した変異酵素 (T228F) では 1.9 倍に上昇した。野生型酵素で負の親和力を示したサブサイト+3 は、T228F では正の親和力に転じ、導入した Phe により新たにサブサイト+3 が形成された。本研究により、N-loop がサブサイト+2 および+3 形成に関与し、Phe のような非極性残基導入により親和力を強化できることが明らかとなった。

【長鎖阻害剤の酵素合成】SBG の遠位サブサイトの構造の解析を目的として、 α -glucosidase 類の阻害剤アカボース (AC4, 疑似 4 糖) の還元末端側マルトオリゴ糖部分を伸長させた阻害剤の酵素合成を行った。すなわち

一連の重合度を有するアカビオシルマルトオリゴ糖を D-酵素 (DPE1) を用い酵素合成した。DPE1 はマルトオリゴ糖を基質とし α -1,4 転移反応を触媒する酵素である。AC4 (100 mM) および maltotetraose 高含有シロップ (7.5%) を基質とし、合成反応最終産物として 6 種のアカボース誘導体が合成された。これら生成物がそれぞれ重合度 5 から 10 の AC5-AC10 (疑似 5-10 糖) であることを ESI-MS および NMR 解析により確認した。この反応により基質 AC4 の 58 % が AC5-AC10 に変換された。また合成反応初期には AC7 が優先的に生成されていたことから、DPE1 は AC4 からアカビオシルグルコース (3 糖) 単位の転移を触媒することがわかった。AC5-AC10 は SBG に対して拮抗阻害剤として働き、それぞれの K_i は 2.7, 1.6, 0.85, 0.89, 0.94 および 1.0 μ M であった。これらの値は AC4 の K_i (15 μ M) より低い値であった。AC5-AC10 は AC4 よりも効果的な SBG の拮抗阻害剤であることがわかった。

【SBG の立体構造とサブサイト形成アミノ酸残基】X 線結晶構造解析により SBG の立体構造を明らかにした。リガンドと結合しないアポ構造に加えて、AC4-AC8 との共結晶をそれぞれ作製し、酵素-阻害剤複合体の X 線結晶構造解析を行った。それぞれの結晶構造を分解能 1.4–2.8 Å で決定した。SBG は他の GH31AG と同様に 4 つの主要なドメインと 2 つのサブドメインから形成されていた。阻害剤の有無による SBG の構造変化は観察されなかった。AC4-AC8 はいずれも活性ポケットにのみ結合していた。SBG のサブサイト-1, +1 は既知の GH31AG と同様の構造であった。サブサイト+2 以降は 2 つの構造因子 (N-loop および subdomain b2) によって形成されていた。N-loop 上の Phe236 と Asn237 がサブサイト+2 および+3 を形成していた。さらにこれらの残基は阻害剤の還元末端側を subdomain b2 の方向へ導く壁のような働きをしていた。N-loop 上の Leu240 と subdomain b2 の Ser497 がサブサイト+4 を形成していた。さらに subdomain b2 上の Arg500 主鎖 O 原子との水素結合ならびに Val501 と Pro502 との非極性相互作用 (van der Waals 力) によりサブサイト+5 から+7 が形成されていた。Asn237, Leu240, Ser497 および Val501 を Ala に置換した変異酵素の速度論的解析により、これら残基のサブサイト形成への寄与を確認した。

【GH31AG における鎖長特異性多様化の機構】本研究の成果により N-loop と subdomain b2 が長鎖基質特異性に関与することが明らかとなった。N-loop, subdomain b2 のアミノ酸配列は植物 GH31AG 間では比較的保存性が高い。長鎖基質に作用する植物 GH31AG では N-loop の Asn237, subdomain b2 の Ser497 や Pro502 に相当するアミノ酸残基が保存されている。これらの酵素では、相当する残基が SBG と同様にプラスサブサイトを形成することで、長鎖基質への作用が可能となると考えられる。一方、植物由来 GH31AG のうち短鎖特異的なオオムギ GH31AG では Asn237 と Ser497 に対応するアミノ酸残基に置換が生じている。また、真菌類 GH31AG では N-loop, subdomain b2 とともに SBG とは配列類似性が低い。これらが短鎖特異性を示す要因であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	森	春 英
副 査	教 授	松 井 博 和	
副 査	教 授	横 田 篤	
副 査	講 師	奥 山 正 幸	

学 位 論 文 題 名

植物 α -glucosidase による長鎖基質認識の構造基盤に関する研究

本論文は和文 180 頁，図 80，表 28，7 章からなり，参考論文 2 編が付されている。

糖質加水分解酵素はアミノ酸配列の類似性により GH ファミリーに分類される。GH ファミリー 31 の α -glucosidase (GH31AG) は一般的にマルトオリゴ糖など α -1,4 グルコシド結合に対して特異性を示すが，基質の重合度に対する特異性（鎖長特異性）は酵素の起源によって異なる。*Aspergillus niger* α -glucosidase (ANG) など真菌類の GH31AG はマルトース，マルトトリオースなど短鎖基質に良く作用するのに対し，テンサイ α -glucosidase (SBG) など植物 GH31AG は重合度 4 およびそれ以上の長鎖基質を好むものが多い。本研究では立体構造解析および変異酵素の機能解析を行い，GH31AG の鎖長特異性を決定する構造因子を明らかにした。

1) 基質結合に関与する残基の配列比較による抽出

既知の GH31AG の立体構造は 4 ドメインにより構成され，ポケット状の触媒部位は触媒ドメインと N 末端ドメインから突き出た N-loop により形成される。アミノ酸配列の比較に基づき，SBG では N-loop を構成する Phe236 が基質結合に関与すると予想した。Phe236 を Ala または Ser に置換した変異酵素では，マルトースに対する速度に大きな変化はないが，三糖以上の基質に対する k_{cat}/K_m が 0.14-0.34 倍に低下した。特に三糖と四糖に対する k_{cat}/K_m の減少は顕著であり，Phe236 がサブサイト+2 および+3 を構成して基質結合に関与することが示された。

これに対して，ANG の N-loop 上の Thr228 の Phe 置換により，ANG の長鎖基質に対する特異性が向上した。野生型 ANG は四糖に対して二糖の 0.91 倍の速度 (k_{cat}/K_m 値) を示すのに対し，変異酵素では 1.9 倍となり，すなわち変異により ANG に正の親和力を持ったサブサイト+3 が導入された。以上により，N-loop がサブサイト+2 および+3 での基質結合に関与していることが明らかとなった。

2) 長鎖阻害剤の酵素合成

SBG の立体構造において触媒部位から遠位のサブサイトを解析するために，新規の長鎖阻害剤の酵素合成を行った。すなわち α -glucosidase 類の阻害剤であるアカボース (AC4，疑似四糖) の還元末端側マルトオリゴ糖部分をアズキ子葉の D-酵

素 (DPE1) を用いて伸長させた。AC4 とマルトテトラオース高含有シロップを基質とし、6 種のアカボース誘導体 AC5-AC10 (疑似五-十糖) を収率 58 % で合成した。AC5-AC10 の構造は ESI-MS および NMR 解析により確認された。最終生成物ならびに合成反応初期生成物によって、DPE1 はマルトオリゴ糖の鎖長不均化反応とともに、AC4 の AC3 部分をマルトオリゴ糖へ転移する反応を触媒したと判断された。合成した AC5-AC10 はいずれも拮抗的に SBG を阻害した。AC4 よりも良く阻害し、阻害の程度は重合度依存的に増加した。

3) SBG の立体構造とサブサイト形成アミノ酸残基

SBG の X 線結晶構造解析により、リガンドが結合していないアポ構造および AC4-AC8 それぞれとの複合体構造を分解能 1.5 – 2.8 Å で決定した。全体構造およびサブサイト-1, +1 は既知の GH31AG と類似していた。サブサイト+2 以降は N-loop と subdomain b2 によって形成されており、既知の構造とは異なっていた。サブサイト+2 および+3 形成には N-loop の Phe236 と Asn237 の直接的関与が認められた。サブサイト+4 は N-loop の Leu240 と subdomain b2 の Ser497 により形成された。サブサイト+5 から+7 は subdomain b2 表面に形成され、Arg500, Val501 および Pro502 が基質と相互作用していた。Asn237, Leu240, Ser497 および Val501 を Ala に置換した変異酵素の速度論的解析により、これら残基の各サブサイト形成への寄与が確認された。GH31AG は共通構造として N-loop と subdomain b2 を有するが、これらの構造の多様性により多様な鎖長特異性を有すると考えられる。長鎖基質に作用する植物 GH31AG では SBG の Asn237, Ser497 や Pro502 に相当するアミノ酸残基が保存されており、SBG と同様のサブサイト構造により長鎖基質への作用を可能としていると考えられた。

本研究では X 線結晶構造解析ならびに部位特異的変異酵素の解析により SBG の長鎖基質特異性に N-loop と subdomain b2 が寄与していることを明らかにした。subdomain b2 が基質結合に関与していることを明らかにしたのは本研究が初めてである。本研究は GH31AG の鎖長特異性に関わる構造因子についての新たな知見を与えるものである。

よって審査員一同は、田上貴祥氏が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。