

糖質関連酵素と産業上有用酵素の構造と機能に関する研究

伏信 進矢 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

はじめに

酵素は生体のさまざまな反応に関わっている。酵素とひとくちに言ってもその種類は幅広く、それらの構造や機能は全く異なる。私は酵素の持つ多様性に興味を持ち、数多くの酵素の立体構造解析および機能解析を行ってきた。新たな研究対象に触れるたびに、その背景となる生命現象、それらが実際に働く分子メカニズム、そして何よりそれらが持つ「顔」(蛋白質としての立体構造)を知ることになり、その度に感銘を受けている。さらに、酵素(蛋白質)は生物学と物理化学の境目にあたる研究対象であり、その点でも興味は尽きない。酵素の立体構造を「見る」ことで、それがたどってきた分子進化の道筋が浮かび上がってくる。

本研究では、立体構造上の新規性および有用性が高い酵素の立体構造解析と機能解析を行ってきた。特に、糖質関連酵素は多様性に富んでおり、本研究の中心的な対象となっている。さらに、酵素の持つ有用性のポテンシャルという点にも興味を持っている。実際に工業利用されるまでに至った酵素の数は決して多くはないが、基質特異性・反応特異性の高い生体触媒としての酵素は全て応用の可能性を持つと考えており、応用を視野に入れた基礎研究を行ってきた。また、酵素の立体構造を解明することにより、その機能を変換した変異体の分子設計が可能になる場合もある。ここでは、その一部について紹介する。

麹菌の酸性キシラナーゼ

焼酎醸造に用いられている白麹菌は培地に大量のクエン酸を出してその pH を大幅に下げる。白麹菌が培地中に分泌する 3 種の主要なキシラナーゼのうち、キシラナーゼ C は至適 pH が 2.0 で pH 1.0 まで安定な、非常に好酸性・耐酸性のキシラナーゼであり、Glycoside Hydrolase (GH) ファミリーでは GH11 に属する。本酵素の立体構造を決定した結果(1)、活性中心の酸/塩基触媒残基 Glu170 と、その近傍に位置する Asp37 が強い水素結合を形成していることを見出した。至適 pH が 4.5 以下の好酸性キシラナーゼでは Asp37 に相当する残基は必ず Asp であるのに対し、至適 pH が 4.5 以上の中性/アルカリ性キシラナーゼではこれにあたる残基は Asn であり、Glu との距離も比較的離れていた。そこで、Asp37 を Asn に置換した変異体を作成したところ、至適 pH が 5.0 へと大幅にシフトしたことから、この残基の違いが GH11 キシラナーゼの至適 pH を決定する主要因であることを明らかにした (図 1)。また、本酵素の分子表面の静電ポテンシャルを可視化したところ、全体的に強い負電荷を帯びており、特に分子の片側の面に偏って集中していることが分かった。このように極端な表面電荷の存在は他の耐酸性酵素だけでなく、耐塩性酵素、耐アルカリ性酵素などでも知られており、特殊環境で働く酵素の特徴の 1 つと考えられた。

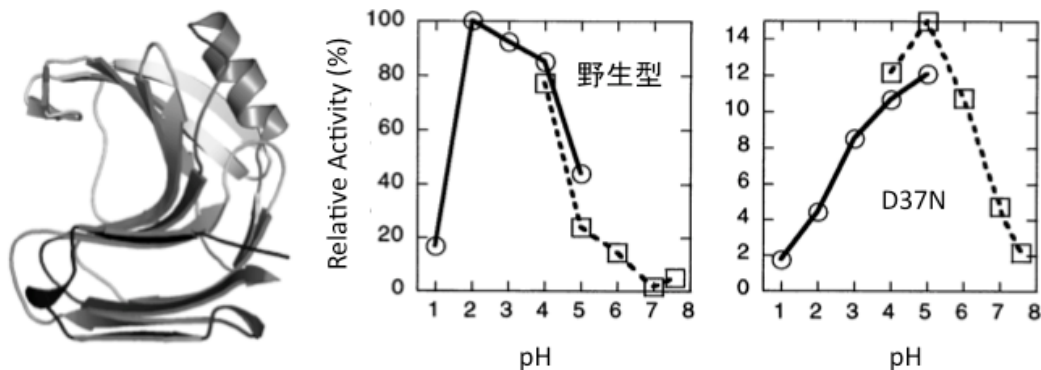


図1 麹菌キシラナーゼCの立体構造（左）と、野生型（中）およびD37N変異体（右）の活性のpH依存性。

還元末端キシロース遊離エキソオリゴキシラナーゼ(Rex)

分岐糖鎖は非還元末端を数多く持つため、通常のエキソ型糖質分解酵素は非還元末端から糖を切り出す。ところが、好アルカリ性土壌細菌 *Bacillus halodurans* が持つ菌体内酵素 BH2105 は、キシロオリゴ糖の還元末端からキシロースを遊離するという非常に変わった活性を持っていることから、還元末端キシロース遊離オリゴキシラナーゼ(REX)と名付けられた。本酵素は GH8 に属する。REX の立体構造を決定し、この酵素の基質結合部位は、-2・-1・+1 の、合計3つのサブサイトからなっていることが分かった(図2)(2)。さらに、還元末端側(+1)の先、+2に当たる部分に存在するループが基質結合クレフトを塞いでいることから、本酵素がユニークな基質特異性を持つ理由が判明した。本研究は反転型糖加水分解酵素としては初となるグライコシターゼ(変異導入型糖鎖合成酵素)の設計の基盤となった(3)。反転型糖加水分解酵素をグライコシターゼ化するには、求核攻撃を行う水分子を保持する残基を変異すればよいということも明らかになった(4)。本研究により、より広範な糖質加水分解酵素を、効率的な糖鎖合成酵素に変換することが可能となった。

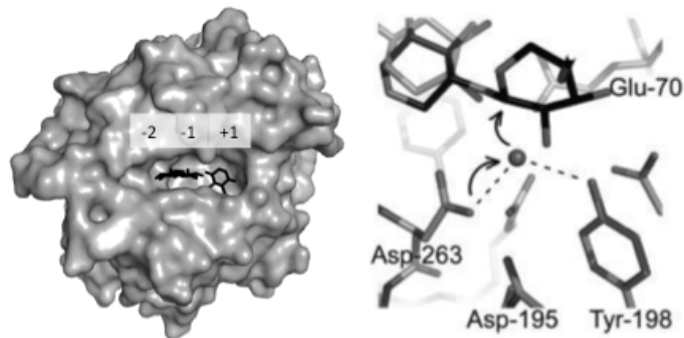


図2 Rex の立体構造（左）。左から右に、サブサイト-2,-1,+1に結合したキシロースを示す。Rex の活性中心（右）。Asp263 および Tyr198 の変異体から、強力なグライコシターゼが得られた。

糖ホスホリラーゼ

糖加リン酸分解酵素(糖ホスホリラーゼ)は、糖鎖に水ではなくリン酸を付加しつつグリコシド結合を切断する酵素であり、その反応可逆性によりオリゴ糖を効率よく合成出来る有用酵素である。ホスホリラーゼはリン酸転位反応を触媒するため、原則的に Glycosyl Transferase (GT)ファミリーに分類されて来た。しかし、当初 GT36 に分類されていたキトビオースホスホリラーゼの立体構造を決定した結果、加水分解酵素で類似していることが明らかになった(5)。そのため GT36 は廃止され、新設ファミリーGH94への再分類が確定した。現在では、糖質ホスホリラーゼは、反応機構や立体構造のGT/GHファミリーへの類似性が、分類において重要な指標となっている(6)。

同じく **GH94** に属するセロビオースホスホリラーゼにおいても結晶構造を解明することに成功した(図3)。さらに、結晶構造を元にして、基質結合部位へのドッキング解析および分子動力学解析を行い、その反応に伴った基質のコンフォメーション変化の詳細を明らかにした(7)。基質(セロビオース)のグリコン部位は、溶液中ではイス型コンフォメーションが安定であるが、酵素-基質複合体の状態では歪んだボート型のコンフォメーションを取ることが分かった。さらに、遷移状態の基質のコンフォメーションも推定することが可能となった。

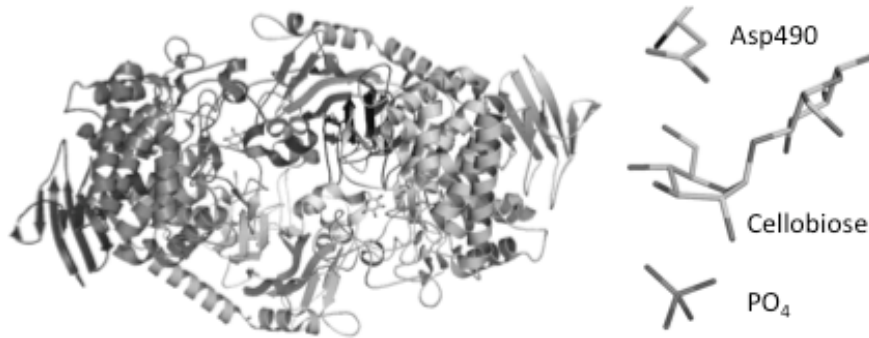


図3 セロビオースホスホリラーゼの立体構造(左)と、ドッキング解析により得られた基質セロビオースとの複合体構造(右)。

ラクトNビオースホスホリラーゼ

近年、人乳に含まれるオリゴ糖の構成成分の一つであるラクトNビオースを特異的に代謝する酵素群がビフィズス菌から発見された(8)。ラクトNビオースは新規なプレバイオティクスとして注目を浴びており、その効率的な大量合成法も確立されている(9)。本酵素はラクトNビオースを加リン酸分解する酵素であり、逆反応を利用したラクトNビオース製造法の鍵酵素として構造情報の提供が望まれていた。本研究ではラクトNビオースホスホリラーゼの構造解析を行い、**GH112**としては初めて立体構造を明らかにした(10)。いくつかの複合体構造の決定に成功し、その基質特異性の構造基盤を明らかにした。本酵素は、基質結合に伴って前例のないほどの大きな構造変化を起こすことが分かり(図4)、その立体構造は、乳糖分解酵素(β -ガラクトシダーゼ)と部分的に類似していることが分かった。本酵素は、ビフィズス菌が人乳中のオリゴ糖を利用するために特殊な分子進化を経ていることが示唆された。

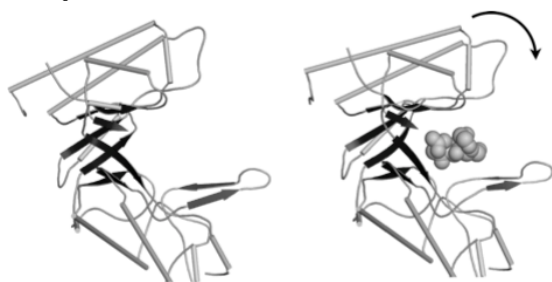


図4 ラクトNビオースホスホリラーゼの基質結合にともなう構造変化。基質が結合していない開いた構造(左)に対し、基質の結合した状態では閉じた構造(右)をとる。

謝辞

本受賞にあたり、日本農芸化学会から推薦をいただきました。関係の諸先生方に御礼申し上げます。本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻酵素学研究室で行われたものです。同研究室においてご指導を賜りました太田隆久先生、松沢洋先生、酒井坦先生、田口速男先生、祥雲弘文先生、若木高善先生に深甚なる感謝の意を表します。また本研究は同研究室で研究を行われた多くの皆様にご協力頂きました。日高將文博士、宮永顕正博士をはじめご協力いただきました全ての卒業生、在学生、在籍者の皆様に厚く御礼申し上げます。伊藤清先生、北岡本光先生、小関卓也先生、今野美智子先生、Peter J. Reilly先生をはじめ全ての共同研究者の皆様へ深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Fushinobu S, Ito K, Konno M, Wakagi T, and Matsuzawa H (1998) Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH *Protein Eng*, **11**, 1121-1128.
- 2) Fushinobu S, Hidaka M, Honda Y, Wakagi T, Shoun H, and Kitaoka M (2005) Structural basis for the specificity of the reducing end xylose-releasing exo-oligoxyylanase from *Bacillus halodurans* C-125 *J Biol Chem*, **280**, 17180-17186.
- 3) Honda Y, Fushinobu S, Hidaka M, Wakagi T, Shoun H, Taniguchi H, and Kitaoka M (2008) Alternative strategy for converting an inverting glycoside hydrolase into a glycosynthase *Glycobiology*, **18**, 325-330.
- 4) Hidaka M, Fushinobu S, Honda Y, Wakagi T, Shoun H, and Kitaoka M (2010) Structural explanation for the acquisition of glycosynthase activity *J Biochem*, **147**, 237-244.
- 5) Hidaka M, Honda Y, Kitaoka M, Nirasawa S, Hayashi K, Wakagi T, Shoun H, and Fushinobu S (2004) Chitobiose phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*, a member of glycosyl transferase family 36, has a clan GH-L-like (α/α)₆ barrel fold *Structure*, **12**, 937-947.
- 6) Fushinobu S, Hidaka M, Miyanaga A, and Imamura H (2007) New structural insights on carbohydrate-active enzymes *J. Appl. Glycosci.*, **54**, 95-102.
- 7) Fushinobu S, Mertz B, Hill AD, Hidaka M, Kitaoka M, and Reilly PJ (2008) Computational analyses of the conformational itinerary along the reaction pathway of GH94 cellobiose phosphorylase *Carbohydr Res*, **343**, 1023-1033.
- 8) Kitaoka M, Tian J, and Nishimoto M (2005) Novel putative galactose operon involving lacto-*N*-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum* *Appl Environ Microbiol*, **71**, 3158-3162.
- 9) Nishimoto M and Kitaoka M (2007) Practical preparation of lacto-*N*-biose I, a candidate for the bifidus factor in human milk *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**, 2101-2104.
- 10) Hidaka M, Nishimoto M, Kitaoka M, Wakagi T, Shoun H, and Fushinobu S (2009) The crystal structure of galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose I phosphorylase: a large deformation of a TIM barrel scaffold *J Biol Chem*, **284**, 7273-7283.

Structural and functional studies on carbohydrate-active and industrially useful enzymes

Shinya Fushinobu (The University of Tokyo)

asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp