

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成11年度博士課程進学
氏名 今村 博臣
指導教官名 祥雲 弘文

論文題目

Structure and function of the family 57 of glycoside hydrolases
(Glycoside hydrolase ファミリー 57 の立体構造と機能)

Thermococcus litoralis は至適生育温度を 85°C に持つ超好熱性の球形古細菌であり、通常の生物とは異なる解糖系（変形 EM 経路）を持っているのが特徴である。超好熱性古細菌の生育環境は原始地球環境に類似していると考えられるため、これらは原始生命体の名残をとどめていると考えられ、生命の進化を探る上で興味深い研究対象である。また、超好熱性古細菌の生産する酵素は非常に熱安定性が高く、工業的利用価値も高い。*T. litoralis* 4- α -グルカノトランスフェラーゼ (TLGT) は glycoside hydrolase ファミリー 57 に属し、*in vivo* では細胞外から輸送されたマルトースに作用して分子間転移反応を触媒し、グルコースと高重合度のマルトオリゴ糖に変換すると考えられている。一方、*in vitro* ではアミロースに作用して分子内転移反応を触媒し、高重合度の環状 α -1,4-グルカン（シクロアミロース）を生成する。高重合度シクロアミロースは、近年その存在が明らかとなった新規糖質で、性質・機能の解明および産業分野における用途開発が期待されている。ファミリー 57 の酵素は一部の例外を除いて超好熱性古細菌にのみ見られ、触媒する反応は α -アミラーゼファミリー（ファミリー 13、70、77）の酵素と類似しているものの、その一次構造は全く異なる。また立体構造や触媒残基等は全く明らかになっていない。本研究では、TLGT の X 線結晶構造解析を中心として、ファミリー 57 の酵素の構造と機能を明らかにする事を目的とした。

(1) マイナーアルギニン tRNA/GroELS 共発現系を用いた TLGT の大腸菌での大量発現系の構築

大腸菌のコドン使用頻度は他の生物と大きく異なることが知られている。特に AGA、AGG コドンは真核生物や古細菌では使用頻度の高いアルギニンコド

ンであるのに対し、大腸菌では全コドン中最も使用頻度が低い。大腸菌では $tRNA_{AGA}$ 、 $tRNA_{AGG}$ の細胞内存在量は他の $tRNA$ と比較して著しく低く、そのために AGA、AGG コドンを含む外来遺伝子が大腸菌で発現する際に、フレームシフトやアミノ酸の誤った取り込み、未成熟な状態でのポリペプチド鎖伸長の停止、低発現量といった問題が起こることが知られている。TLGT の遺伝子中には 659 個の全コドンの内、AGA が 19 個、AGG が 10 個存在していた。そこで、 $tRNA_{AGA}$ および $tRNA_{AGG}$ を TLGT 遺伝子と共発現させ、酵素の発現量に与える影響を調べた。

まず、TLGT 遺伝子を $tRNA_{AGA}$ および $tRNA_{AGG}$ と共発現させたところ、TLGT の発現量は上昇したものの大部分が不溶性画分に蓄積してしまった。そこで、 $tRNA_{AGA}$ および $tRNA_{AGG}$ に加えて大腸菌のシャペロニンである GroELS を、TLGT 遺伝子と共発現させたところ、TLGT の発現量は更に増加し、その 35~40% が可溶性に回収された。可溶性画分の酵素活性は、 $tRNA_{AGA}/tRNA_{AGG}/GroELS$ 共発現系では TLGT 遺伝子のみ発現させた場合よりもおよそ 5 倍活性が上昇していた。

(2) TLGT の活性中心残基の決定

Glycoside hydrolase の反応機構は大きく 2 つに分けられる。一方は生成物のアノマー型を保持する retaining メカニズム、もう一方はアノマー型が反転する inverting メカニズムである。TLGT は α -アノマー保持型酵素であるため、retaining メカニズムで反応が進むと考えられるが、この反応では反応途中で求核性触媒残基と基質が共有結合したグリコシル酵素中間体を形成する求核二重置換モデルが提唱されている。このグリコシル酵素中間体をトラップして解析すれば、TLGT の求核性触媒残基を明らかに出来ると考えた。解析には人工基質 3-ketobutylydene- β -2-chloro-4-nitrophenyl-maltopentaoside (3KBG5CNP) を用いた。3KBG5CNP はマルトペンタオースの非還元末端がブロックされているため、糖転移反応の受容体とはならず、供与体にのみなる。グルコースを受容体として 60°C で反応を解析したところ、TLGT の糖転移反応は Ping-Pong Bi Bi 機構で進むことが示された。また、TLGT の加水分解活性はほとんど無視できるレベルであった。このことから、受容体基質非存在下で TLGT と 3KBG5CNP を反応させた場合、グリコシル酵素中間体が蓄積すると予想された。触媒残基の解析は以下のように行った。

まず、TLGT と 3KBG5CNP を混合し、短時間反応させた後に、すぐに酸変性させ、更にペプシンで酵素を完全に分解した。この分解物を MALDI-TOFMS によって解析した。その結果、3KBG5CNP を加えたときのマススペクトルでは加えないときには見られなかった $m/z = 1824.7$ のシグナルが現れていた。このシグナルは基質が結合したペプチドに由来するものと考えられた。そこで MALDI-TOFMS に内蔵されている timed-ion-selector によってこのシグナルだけを単離し、Post-sourced decay (PSD) 解析を行った。PSD のシグナルのフラグメント解析と TLGT の一次配列情報から、 $m/z = 1824.7$ のシグナルは Leu121-Leu130

の 10 残基からなるペプチドに基質が共有結合したものであることが示された。このペプチド内に存在する Glu123 はファミリー-57 内で完全に保存されており、また、このグルタミン酸をグルタミンに置換すると活性が大幅に減少することから、この残基が TLGT の求核性触媒残基として働いていることが明らかとなった。

(3) TLGT の X線結晶構造解析

TLGT は 2 つの全く異なる条件で結晶化した。硫酸アンモニウムおよび PEG400 を沈殿剤として成長した結晶 (Form I) は六方晶系 ($P6_422$) に属し、格子定数は $a = b = 125 \text{ \AA}$, $c = 247 \text{ \AA}$ であった。一方、MPD を沈殿剤として成長した結晶 (Form II) は斜方晶系 ($P2_12_12$) に属し、格子定数は $a = 138 \text{ \AA}$, $b = 161 \text{ \AA}$, $c = 70 \text{ \AA}$ であった。ファミリー-57 の酵素の立体構造はこれまでに明らかになっていなかったため、セレノメチオニンラベルした Form I 結晶を用い、多波長異常分散法によって位相を決定した。この初期位相を基にモデルを構築し、分解能 2.8 \AA で立体構造を決定した。一方、Form I の立体構造を初期モデルとし、Form II の立体構造を分子置換法によって分解能 2.4 \AA で決定した。この結果、TLGT は N 末端側のドメイン I と C 末端側のドメイン II の 2 つのドメインから構成されることが明らかとなった。また、その全体構造は α -アミラーゼファミリーの酵素とは異なっていた。

ドメイン I のコア部分は、TIM バレルに似た構造を持っていたが、TIM バレルが $(\beta/\alpha)_8$ -フォールドであるのに対し、TLGT のバレルは新規の $(\beta/\alpha)_7$ -フォールドを有していた。バレルとそれに続く α ヘリックス領域の間にはクレフトが形成されており、触媒残基である Glu123 がこの内部に存在することからこのクレフトが活性中心クレフトであると示唆された。一方、ドメイン II は 2 つの大きな β シートが平行に重なった β サンドイッチ構造をとっており、2 本の短い α ヘリックスを除き、 β ストランドのみから形成されていた。ドメイン II 内にはカルシウム結合部位が 1 つ存在し、1 分子のカルシウムイオンが結合していた。しかし、ドメイン II はカルシウム結合部位を含め、大部分が活性中心から離れており、その機能は不明である。

続いて、阻害剤であるアカボースとの複合体の構造解析も行った。複合体の結晶は Form II 結晶をアカボースを含む溶液中に soaking することで得た。この複合体の構造から、Asp214 が TLGT の酸/塩基触媒残基として働くことが示された。更に、基質結合に関わる残基も明らかとなった。また、活性中心クレフトを覆うループ部分と活性中心から離れた場所に存在する基質結合部位が、重合度の低いシクロアミロースの生成を妨げ、重合度の高いシクロアミロースの生成に重要な役割をしていることが示唆された。

ゲル濾過クロマトグラフィーの結果から、これまで TLGT は単量体であると考えられていたが、結晶構造は二量体である事を示唆していた。そこで単量体間の相互作用に関わっていると考えられる残基に変異を加えたところ、TLGT の熱安定性は大幅に低下した。これらの結果から TLGT は二量体であり、二量体化が熱安定性に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(4) *T. litoralis* 細胞外アミロプルラナーゼとマルトデキストリントランスポーター

近年、いくつかの超好熱性古細菌からファミリー 57 に属する細胞外アミロプルラナーゼが報告されている。*T. litoralis* でのアミロプルラナーゼの存在を確認するため、これまで報告されたアミロプルラナーゼの consensus 配列を利用してプライマーを作製し、*T. litoralis* ゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。その結果、目的の大きさのバンドが増幅されアミロプルラナーゼ遺伝子の存在が確認された。この PCR 産物をプローブとしてサザンハイブリダーゼーションを行い、2.5 kb *EcoRI* 断片をクローニングした。この断片にはアミロプルラナーゼ遺伝子の一部しか含まれていなかったため、周辺領域を PCR によって direct sequencing し、先の 2.5 kb *EcoRI* 断片と合わせて計 8.9 kb の配列を読んだ。この中にはアミロプルラナーゼ遺伝子を含めて 6 個の ORF が含まれており、そのうち 4 個の ORF の産物は細菌のマルトーストランスポーターの構成サブユニットと相同性を有していた。

大腸菌で *T. litoralis* アミロプルラナーゼ (TLAPU) を発現して精製し、その活性を調べた。TLAPU をスターチに作用させたところ、スターチの α -1,4 および α -1,6-結合を加水分解して、グルコースと様々な長さのマルトデキストリンを生成した。このことから、TLAPU 遺伝子と gene cluster を形成している ABC トランスポーターは、TLAPU の生成物であるマルトデキストリンを細胞外から細胞内へと輸送するマルトデキストリントランスポーターであると予想された。

(5) まとめ

本研究によって、初めて glycoside hydrolase ファミリー 57 の酵素の立体構造、触媒残基、そして基質結合残基が決定され、 α -アミラーゼファミリーとの違いが詳細に明らかになった。TLGT の立体構造からはシクロアミロースの重合度を決定する機構についても知見が得られ、今後、目的の重合度を持つシクロアミロースを生成する変異体の設計が期待される。また、4- α -グルカノトランスフェラーゼとアミロプルラナーゼという 2 つのファミリー 57 に属する酵素が *T. litoralis* の糖代謝で働いていることが示唆された。*T. litoralis* の解糖系は、特徴的な変形 EM 経路であるが、その前段階においても通常の生物とは異なる酵素を利用していることが示された。

1, Imamura, H., Jeon, B.S., Wakagi, T. and Matsuzawa, H. (1999). *FEBS Lett.* **457**, pp. 393-396.

2, Imamura, H., Fushinobu, S., Jeon, B.S., Wakagi, T. and Matsuzawa, H. (2001). *Biochemistry* **40**, pp. 12400-12406.