

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成14年度博士課程 進学  
氏名 日高 將文  
指導教員 祥雲 弘文

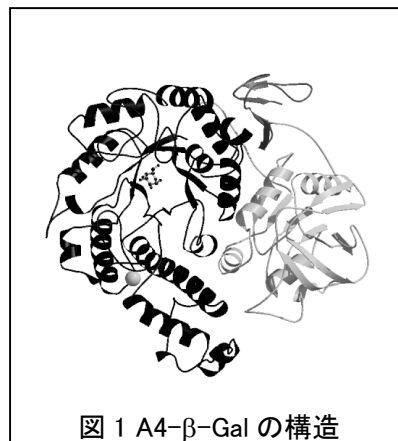
論文題目 新規な構造を有する糖質関連酵素の X 線結晶構造解析

糖質の代謝に関連する酵素(糖質関連酵素)は、触媒能を基に糖加水分解酵素(Glycoside Hydrolase, GH; EC3.2.1 群)、糖転移酵素(Glycosyl Transferase, GT; EC2.4 群)、エステラーゼ、多糖リアーゼの4つのクラスに分類されている。各クラスは、アミノ酸配列に基づいて分類されたファミリーで構成されており、同一ファミリー内に分類される酵素は、立体構造、機能に高い類似性を示すと考えられる。GHは約12000の遺伝子が97のファミリーに、GTは約10000の遺伝子が75のファミリーに分類されている。近年、立体構造の決定や構造予測により、全く異なる機能を有するファミリー間で、立体構造の相同性が見出されてきた。そのため構造未知ファミリーの立体構造を解明することは、そのファミリー内の酵素のみならず、類似構造を有する多くのファミリーに対しても分子進化、触媒反応、基質認識機構などの新たな構造的知見を与えることが期待されている。本研究は、応用面で注目されている構造未知の糖質関連酵素ファミリー GH-42、GT-36 を対象として X 線結晶構造解析を行った。これらの新規構造を構造既知ファミリーと比較し、糖質関連酵素の進化的、構造的関連について興味深い知見を得た。

## 耐熱性β-ガラクトシダーゼ (GH-42)

β-ガラクトシダーゼは、ラクトースをガラクトースとグルコースに加水分解する酵素である。*E. coli* 由来のβ-ガラクトシダーゼは、ラクトースオペロンを形成する *lacZ* 遺伝子の産物として知られ、α相補と呼ばれる特異な性質を応用した実験などに利用されており、有用酵素の一つとして知られている。近年、乳製品中ラクトースの加水分解活性を利用した乳業への応用が試みられ、工業利用を目指した耐熱性のβ-ガラクトシダーゼが注目されている。好熱性細菌 *Thermus thermophilus* A4 由来のβ-ガラクトシダーゼ(A4-β-Gal)は 70°C で 20 時間以上安定な極めて高い耐熱性を有し、アミノ酸配列から GH-42 に分類される。GH-42 は、その有用性にもかかわらず反応機構、立体構造、触媒残基など不明であった。

本研究では <sup>1</sup>H NMR を用いて、A4-β-Gal の反応が、加水分解反応の前後で糖アノマーの反転を伴わないアノマー保持型であることを明らかにした。また A4-β-Gal の立体構造を、多波長異常分散法(MAD 法)を用いて 1.6 Å 分解能で決定した[1]。A4-β-Gal の立体構造は、図 1 に示すような TIM バレルフォールドを有していた。TIM バレルは GH の構造として最も多いフォールドであり、他の TIM バレル型糖質関連酵素との構造比較から触媒残基(Glu141、Glu312)を決定した。A4-β-Gal の TIM バレルフォールドには GH の進化上、以下の極めて興味深い点を見出された。GH 及び GT は、基質と生成物のアノマーの関係から、アノマー反転型と保持型に分けられるが、それぞれ異なる反応機構をとることが知られており、これらの酵素は独立した分子進化を果たしたと考えられてきた。A4-β-Gal は保持型酵素であるが、活性中心部位は保持型酵素、骨格となる TIM バレル構造は反転型酵素の構造を持つ、極めて特殊な形状であった。これは、A4-β-Gal が反転型酵素と保持型酵素の進化の分岐を示しており、保持型・反転型酵素の構造的・進化的な関連を示す初めての発見であった。



## キトビオースホスホリラーゼ (GT-36 → GH-94)

GT は糖-リン酸エステル結合を含む供与体(多くは糖核酸)の高エネルギー結合を利用して受容体にグリコシル基を転移する反応を触媒する。加リン酸分解酵素(EC 2.4.1.-)は、糖鎖にリン酸を付加しつつ切断し、糖リン酸を生成する反

応を触媒するが、糖-リン酸の結合エネルギーは糖-核酸の結合エネルギーほど高くないため、反応は合成方向にも進む可逆性を有する。従って、加リン酸分解酵素は様々な糖鎖合成に応用できる可能性を持つ。加リン酸分解酵素は触媒能からは GT に分類されるべき酵素(GT-4、GT-35、GT-36)であるが、数種の加リン酸分解酵素はアミノ酸配列の相同性から、GH に分類されている(GH-13、GH-65)。そのため加リン酸分解酵素の分類は非常に複雑であり、また立体構造情報が少ないため、その反応機構や GH、GT との関係は不明な部分が多かった。

*Vibrio proteolyticus* 由来のキトビオースホスホリラーゼ(ChBP)はキトビオース(GlcNAc- $\beta$ (1,4)-GlcNAc) + リン酸  $\leftrightarrow$  GlcNAc- $\alpha$ -1-リン酸 + GlcNAc の反応を触媒する反転型の加リン酸分解酵素である。ChBP はセロビオースホスホリラーゼ(CBP; Glc- $\beta$ (1,4)-Glc + リン酸  $\leftrightarrow$  Glc- $\alpha$ -1-リン酸 + Glc)、重合度 3 以上のセロオリゴ糖に特異的なセロデキストリンホスホリラーゼ(CDP; (Glc)<sub>n</sub> + リン酸  $\leftrightarrow$  Glc- $\alpha$ -1-リン酸 + (Glc)<sub>n-1</sub>)とともに GT-36 に分類されていた。GT-36 酵素の多くは、呼吸によりエネルギーを獲得することができない嫌気性生物が有しており、これらの生物では解糖系や脂質合成の初発物質である糖リン酸を、ATP 依存的なグルコキナーゼの代わりに加リン酸分解酵素を用いて生成することで、エネルギーを節約していると考えられている。

本研究では GT-36 の酵素として初めて ChBP の立体構造を、MAD 法を用いて 1.6 Å 分解能で明らかにした[2]。その立体構造は、既知の GT とは全く異なるフォールドを有する一方、GH-15、GH-65 の酵素と相同性を示した(図 2)。

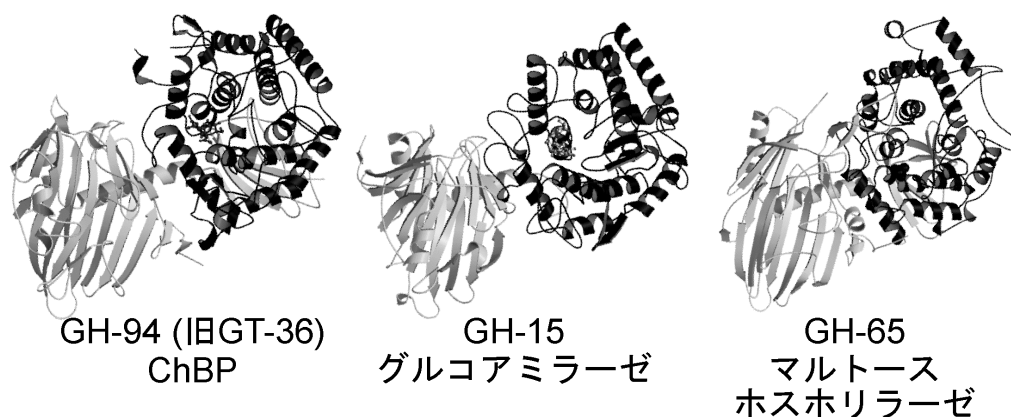
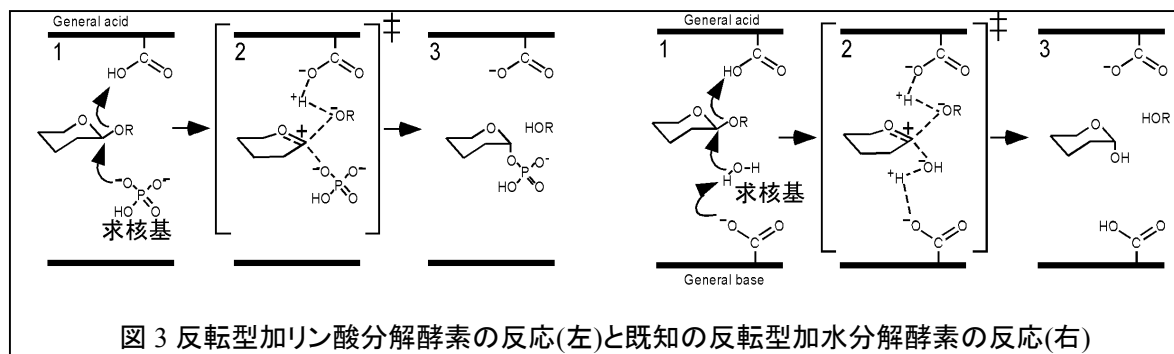


図 2 ChBP の立体構造と類似構造

また、反転型加リン酸分解酵素として初めて基質(GlcNAc)、リン酸アナログ(硫酸)との三者複合体構造を明らかにした。これらの構造的基盤から、反転型加リ

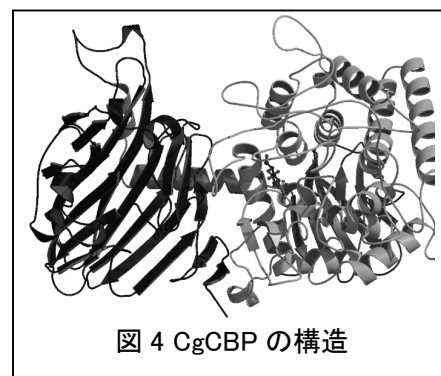
ン酸分解酵素の反応機構(図 3)を明らかにした。この反応機構は、グリコシド結



合を求核攻撃する分子がリン酸である点を除けば、反転型 GH の反応機構と同じである。以上、ChBP と GH の立体構造、及び反応機構の相同性を踏まえて、GT-36は新たに設置されたGHファミリー(GH-94)に再分類されることになった。これは、GTに分類されていた酵素が立体構造の解明によりGHに再分類された最初の例となった。

#### セロビオースホスホリラーゼ (GH-94)

GH-94 に分類される *Cellvibrio gilvus* 由来 CBP(CgCBP)は、反応機構、基質特異性、オリゴ糖合成への応用に関して、GH-94 中最も詳細な解析が行われている酵素である。CgCBP についても結晶化に成功し[3]、ChBP の構造をサーチモデルとした分子置換法を用いて解析を行ったところ、活性中心部位にグルコース、グリセロール、リン酸が結合した立体構造を 2.1 Å 分解能で決定した(図 4)。この立体構造から、ChBP の構造解析では得られなかったリン酸の結合に関する知見が得られた。また、ChBP との立体構造比較から、それぞれの基質特異性を決定している残基が明らかになった。



[1] M. Hidaka et al., *Journal of Molecular Biology*, **322**, 79-91 (2002)

[2] M. Hidaka et al., *Structure*, **12**, 937-947 (2004)

[3] M. Hidaka et al., *Acta crystallographica Section D*, **60**, 1877-1878 (2004)