

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 中島 将博
指導教員 祥雲 弘文

論文題目 好熱菌由来 α -マンノシダーゼに関する研究

序論

真核生物において糖タンパク質は様々な場面で重要な役割を担っている。糖タンパク質の多くはアスパラギン結合型であり、ポリペプチド鎖と、アミド基に結合したオリゴ糖側鎖や *N*-グリカンで構成されている。生体内では糖タンパク質の糖鎖には多くのバリエーションがあり、細胞接着、糖鎖抗原、糖タンパク質の品質管理、細胞小器官への局在、糖タンパク質の糖鎖のプロセッシングなど生命現象の重要な部分を担っている。

α -マンノシダーゼはこの *N*-グリカンの成熟に関わる酵素であり、アミノ酸一次配列からグリコシドヒドロラーゼ(GH)ファミリーの GH38 と GH47 に分類される。本研究で扱う酵素が属する GH38 はそのアミノ酸配列、機能からゴルジ α -マンノシダーゼ II (GMan)、リソソーム α -マンノシダーゼ (LMan)、小胞体/細胞質 α -マンノシダーゼ(ERCMan)、 α -マンノシダーゼ III、精子 α -マンノシダーゼのサブクラスに分かれている。原核生物の α -マンノシダーゼはそのアミノ酸配列から ERCMan に分類される。原核生物にも真核生物と同様に α -マンノースを構成糖とする糖タンパク質が存在し、 α -マンノースを供給するまたは糖鎖をプロセッシングする α -マンノシダーゼは重要な酵素であると考えられる。

GH38 の酵素は活性中心に金属をもち、金属が反応機構に関わる点が GH ファミリーの中では珍しい。GMan、LMan は構造解析がなされているが、ERCMan とは相同性が非常に低く、また有力な酸塩基触媒残基の候補の周辺配列も異なっており、その機能、構造は興味深い。しかし、ERCMan、特に原核生物の α -マンノシダーゼではまだ、十分に機能、構造が調べられていない。そこで、好熱菌由来 α -マンノシダーゼを材料にその機能、構造を明らかにする目的で本研究を行った。

(1) 2 種の好熱菌由来の α -マンノシダーゼの機能解析

好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* の α -マンノシダーゼは ORF *st1008*、超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* の α -マンノシダーゼは ORF *tm1851* にコードされている。ORF *st1008*、*tm1851* のクローニング、発現、精製をおこない均一な目的タンパク質を得た。ST1008 と TM1851 はともに α -1,2、 α -1,3、 α -1,4、 α -1,6-マンノビオースを加水分解し、他の GH38 酵素と同様に広い基質特異性を示した。また、GH38 の阻害剤であるスワインソニン(SW)に対する K_i 値は ST1008 と TM1851 でそれぞれ 17.5 μ M、0.68 μ M であった。*D. melanogaster* GMan

(DGMan)は $IC_{50}=16.9$ nM、human LMan は $K_i=0.076$ μ M であり、好熱菌由来の両酵素は GMan や LMan より SW により阻害されにくいことが示された。さらに ST1008 と TM1851 は EDTA の添加により完全に活性がなくなり、これに Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} を加えると活性が現れた。このことから、この 2 つの酵素は EDTA の添加によっても金属が外れない DGMan などとは異なり金属との結合が弱いことが示された。ST1008 と TM1851 では最も活性化する金属がそれぞれ Zn^{2+} 、 Co^{2+} と異なり、また前者の方が後者より、広い金属の濃度依存性を示した。したがって、ST1008、TM1851 は金属依存性、阻害剤の効果から GMan や LMan と活性中心付近の構造が異なることが示唆された。

(2) *Thermotoga maritima* 由来 α -マンノシダーゼ(TM1851)の予備的 X 線結晶解析

ST1008 は精製により得られるタンパク質が少なかったので結晶化には収量の多い TM1851 を用いた。オイルバッチ法により 4% PEG6000、0.5 M NaCl、50 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0)、タンパク質 5.3 mg/ml、10mM マンノース、1 mM $ZnCl_2$ の溶液を 25 °C で 1 日インキュベーションすることにより、菱形の板状の結晶を得た。この結晶から分解能 2.9 Å の反射を得た²⁾。DGMan や Bovine LMan (BLMan) の全長、または一部分をサーチモデルとして分子置換を行ったがすべてうまくいかなかった。このことは、TM1851 が新規な構造をもつ可能性を示唆している。また、カドミウム置換体データとネイティブデータとの間の差パターンマップを作成したところ、2 つの強いピークと 1 つの弱いピークが検出された。このことは、TM1851 に金属結合部位が存在することを示している。

(3) TM1851 の酸塩基触媒残基の同定

DGMan には活性中心に 4 個のアスパラギン酸 Asp92、Asp204、Asp341、Asp472 が存在するが、D341N で酵素-基質中間体を得られたこと、D341N の活性が野生型の 200 分の 1 に減少したことなどから Asp341 が酸塩基触媒残基の有力な候補とされている³⁾。DGMan の活性中心の構造と GH38 の酵素のアラインメントから TM1851 では Asp257、Asp367、Asp460、Asp568 が活性中心に存在すると予想される。このうち DGMan の Asp204 は酵素-基質中間体において基質と共有結合する残基、すなわち求核性触媒残基であり、TM1851 の Asp367 の変異体がどれも大幅に活性が低下したことからこれが求核性触媒残基であると思われる。したがって、TM1851 の酸塩基触媒残基の候補は残る 3 残基であると考えられたので、これらの変異体も作製した。驚いたことに、DGMan の Asp341 に相当する TM1851 の Asp460 を Asn に置換してもまったく活性の減少はみられず、 k_{cat} と k_{cat}/K_m の pH profile も野生型とほとんど違いがなかった。このことは Asp460 が触媒残基として機能せず、DGMan と TM1851 で活性中心の構造や反応機構が異なることを示唆している。しかし、D460A や D460G では活性が著しく減少することから Asp460 は活性中心付近に存在し、側鎖が活性に大きく影響していることを示している。

D257G、D568G の変異体については *p*-ニトロフェニル- α -D-マンノピラノシド(pNP-Man)と、2,4-ジニトロフェニル- α -D-マンノピラノシド(DNP-Man)を用いて酵素活性を測定した。DNP-Man はアグリコンであるフェノール置換体の

pK_a が低いために、glycosylation step において酸触媒の補助が不要なまたは少なくてよい基質である。D257G、D568G の DNP-Man に対する k_{cat} は pNP-Man の場合のそれぞれ約 150 倍、90 倍であり、pNP-Man が基質のときは glycosylation step が律速であることが示された。

DNP-Man を基質として D257G と野生型の k_{cat} と k_{cat}/K_m の pH profile を比べると、D257G では塩基性側の pH 依存性が明らかに無くなっていた。pNP-Man に対する k_{cat}/K_m の pH profile の比較でも D257G では塩基性側の pH 依存性が明らかに野生型より緩やかになっていた。塩基性側の pH 依存性は糖加水分解酵素において一般的に酸塩基触媒残基のプロトン化の状態を表しており、これらの結果は Asp257 のカルボキシル基のプロトン化の状態が活性に影響することを、すなわち Asp257 が触媒残基であることを示している。また、pNP-Man を用いて D257G のギ酸ナトリウムによるケミカルレスキューを調べたところ k_{cat} が 30 倍以上になった。これは、glycosylation step が速くなったこと、すなわち、ギ酸のカルボキシル基が glycosylation step において Asp257 の側鎖のカルボキシル基の代わりに酸触媒として機能したことを示している。したがって Asp257 は酸触媒としてはたらいっていると考えられる。

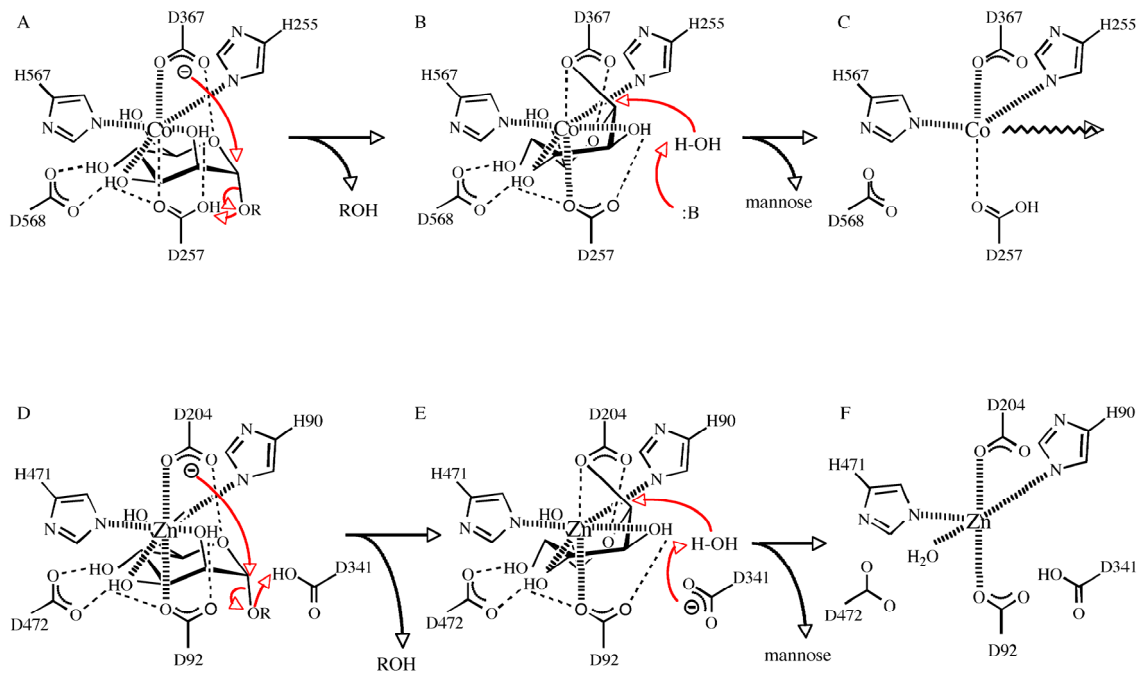
一方、D568G は DNP-Man に対する K_m が野生型の 50 倍であった。DGMan において TM1851 の Asp568 に相当する Asp472 は基質の 6 員環の 3、4 位のヒドロキシル基を認識しており、Asp568 は基質認識に重要であると考えられる。

以上の変異体の解析と DGMan の構造から考えられる TM1851 の反応機構を図に示す。TM1851 で酸(塩基)触媒残基と同定された Asp257 は DGMan では金属に結合する残基であるが、DGMan の酸塩基触媒残基 Asp341 は金属の結合には関与しない。したがって TM1851 と DGMan では反応機構が大きく異なると予想される。

DGMan では、基質の結合による Zn^{2+} の 6 配位の状態が 5 配位より不安定であることにより反応が促進されると説明されている。一方 TM1851 では基質が活性中心に入った段階で酸触媒としてはたらく Asp257 がプロトン化しているために Co^{2+} が図 A のような 5 配位に近い状態をとっていると考えられる。このとき Asp568 は基質の 3、4 位のヒドロキシル基を認識している。そして、Asp367 が基質のアノマー中心を求核攻撃することで環構造の変化がおき、基質-酵素中間体ができる。このとき Asp257 が酸触媒としてプロトンを供給して反応を助ける(glycosylation step)。この段階では図 B のように Co^{2+} と Asp367 の配位結合が弱く、Asp257 との結合が強くなり、5 配位に近い状態が保たれる。そして、何らかの塩基触媒により deglycosylation が進み、図 C のように基質が遊離して Asp257 が再びプロトン化されると、DGMan とは異なり酵素とコバルトイオンの結合が弱くなって Co^{2+} が酵素から外れやすくなる。

まとめ

本研究では同じファミリー内で TM1851 と ST1008 が GMan や LMan と異なる性質をもつことを明らかにした。TM1851 について現時点では立体構造解析は予備的なものにとどまるが、反応機構を検討したところ、求核性触媒残基は Asp367 であり、酸塩基触媒残基はアラインメントから予想される Asp460 ではなく、Asp257 であることが明らかになった。



図、TM1851の推定反応機構 (A-C)とDGManで提唱されている反応機構(D-F) (Numao et al., 2003より改変)

Reference

- 1) M. Nakajima, et al., *Arch Biochem Biophys*, **415**, 87-93 (2003)
- 2) M. Nakajima, et al., *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **62**, 104-5 (2006)
- 3) S. Numao, et al., *J Biol Chem*, **278**, 48074-83 (2003)