グルコアミラーゼ活性部位構造の解析

大 西 正 健*

(昭和 61 年 12 月 19 日受理)

Active-Site Structure of *Rhizopus niveus* Glucoamylase

Masatake OHNISHI

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Kyoto University
(Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan)

On the basis of the "subsite" concept, we tried to elucidate the active-site structure of the glucoamylase from *Rhizopus niveus*: The subsite structure, that is, the arrangement of the subsites and the affinity of each subsite, of the glucoamylase active-site was evaluated using the steady-state kinetic method described by Hiromi *et al.* The binding subsites for glucose, gluconolactone, maltose, isomaltose and some maltooligosaccharides were investigated by means of UV-difference spectrophotometry, fluorescence spectrophotometry, and as to steady-state inhibition-kinetics and stopped-flow kinetics. Based on several lines of evidence, it was concluded that the nonreducing-end-glucose-residue of a substrate (in a productive mode) and gluconolactone, a transition-state analogue are bound at Subsite 1, at which one tryptophan residue is located. The tryptophan residue was clearly discriminated with the stopped-flow chemical modification with *N*-bromosuccinimide.

最近, *Aspergillus* の酵素標品で全一次構造が解析され¹⁾, *Rhizopus* の酵素でもそれに対応する遺伝子の一次構造が解かれた²⁾とはいえ, グルコアミラーゼ (glucoamylase) の構造に関する知見は依然きわめて乏しい。まして, 立体構造の解析にいたっては, X線回折法による研究もまだその緒にもついておらず, 目下鋭意単結晶の作成中であり, 今後の展開が期待されているところである。

私どもは, 酵素に固有な“機能”に着目し, ごく通常な状態—液相—における酵素の構造とのかかわりを調べ, 「活性な構造」とはいったいどんなものなのかを解明しようとした。そこで, 今回, *Rhizopus* グルコアミラーゼを対象とし, “サブサイト (subsite)”に基づいて行ってきた活性部位構造の多面的な解析結果をまとめてみることにしよう。

1. グルコアミラーゼにおける“サブサイト”

鎖長の異なる一連の直鎖短糖を基質としてグルコアミラーゼ (*Rh. niveus*) 解糖活性を観測し, 速度論的手法で評価した速度論量 (Michaelis 定数 K_m , 分子活性 k_0 , 表 1) と廣海³⁾の考えとに基づいてサブサイト構造を解析した⁴⁾。その結果が表 2 である。グルコアミラーゼのサブサイト構造をよくみると, 起源による違いは調べた標品でみるかぎりあまりないことがわかる (図 1)。

さて, ここにいうサブサイト構造は反応生成物を経時的に調べる速度論的な観測と解析の結果に基づいて描かれたものである。そこで, 上記とはまったく異なる手法を用いて, “サブサイト”の実態を明らかにしていこうとした。

2. 分光光度法による解析

グルコアミラーゼにマルトース (maltose) を加えて生じ

* 京都大学農学部食品工学教室 (606 京都市左京区北白川追分町)

表 1. グルコアミラーゼ (*Rhizopus niveus*) の速度論量

基 質	K_m (mM)	k_0 (s ⁻¹)
マルトース, G ₂	1.1~1.8	2.9~4.6
イソマルトース	25	0.12
パノース	6.9	1.6
マルトトリオース, G ₃	0.36~0.40	6.4~12.2
マルトテトラオース, G ₄	0.27	16.7
	0.25	13.0
マルトペンタオース, G ₅	0.11~0.20	20.0~21.1
マルトヘキサオース, G ₆	0.10	16.0
	0.12	23.0
マルトヘプタオース, G ₇	0.12	20.3
	0.11	28
アミロース, n (グルコース 残基数) ≈ 15	0.049 (0.012%) ^{a)}	18.3
アミロース, $n \approx 16$	0.065 (0.016%) ^{a)}	37.0
アミロース, $n \approx 800$	0.0038 (0.050%) ^{a)}	11.7
フェニル α -マルトシド	0.58	4.7
フェニル 6-O-アセチル α -マルトシド	9.3	4.6
p -ニトロフェニル α -マルトシド	0.12	7.5
p -ニトロフェニル α -グルコシド	1.1	0.013
4-メチルウンベリフェリル α -グルコシド ^{b)}	0.34	0.0033
澱粉 (可溶性)	0.016% ^{a)} 0.015% ^{a)}	70

pH 4.5, 25°C, ^{a)} 濃度の単位は重量, ^{b)} 等々力
節子 (1984) 京都大学農学部卒業論文, 未発表, 文
献 16 より.

図 1. グルコアミラーゼのサブサイト構造

a) *Rhizopus niveus*, b) *Rhizopus delemar*,
c) *Cladosporium resinae* (報文資料に基づく計算).
文献 6 より.

図 2. グルコアミラーゼの差吸収スペクトル

A) マルトースの取り込みによって生じた
もの, B) グルコースの取り込みによって生
じたもの. 文献 5 より.

表 2. グルコアミラーゼのサブサイト構造

サブサイト (i)	1	2	3	4	5	6	7
サブサイト親和力 A_i (kcal/mol)	-0.48	4.96	1.36	0.54	0.32	0.23	0.07

k_{int} は 70.1 s⁻¹ であった. 文献 4 より.

る紫外差吸収スペクトル (UV-difference absorption spectrum) は, グルコースによって生じるそれとはまったく異なる (図 2). これは 302 nm 付近に谷 (trough) をもっており, Trp 残基の特定な状態に由来するもので, マルトトリオース (G₃) をはじめ各基質およびグルコノラクトン (glucono-1:5-lactone) によっても観測された⁵⁾. また, 後者はグルコースのほかグルコース

類縁物質などでも観測され, このような差スペクトルの違いはリガンドの取り込まれるサブサイトの違いを反映するものと考えられる. 差吸収 ($\Delta\epsilon$) のリガンド濃度依存性を調べてみると (図 3), これらリガンドがいずれも酵素に取り込まれて複合体を形成することが明らかとなり, 複合体の解離定数 K_d が表 3 のように求まった⁶⁾.

表 3. リガンド・酵素複体の解離定数 K_d (または阻害物質定数 K_i) と最大蛍光変化量 $\Delta F_{\max}$ (または最大吸収変化量 $\Delta \varepsilon_{\max}$)

リ ガ ン ド	K_d (mM)	$\Delta F_{\max}$ (%)	備 考
G ₁	130	20	
	51	760($\Delta \varepsilon_{\max}$)	差 吸 収
	100(K_i)	—	阻 害 実 験
G ₂	1.3	29	
	1.2	1,600($\Delta \varepsilon_{\max}$)	差 吸 収
G ₃	0.29	27	
G ₄	0.14	31	
G ₅	0.082	32	
G ₆	0.10	33	
G ₇	0.097	34	
イソマルトース	18	23	
グルコノラクトン	1.1	32	
	1.5	—	差 吸 収
	1.5(K_i)	—	阻 害 実 験
	3.1	32	(識別修飾酵素標品)
マンノノラクトン	100	—	
	50	1,000($\Delta \varepsilon_{\max}$)	差 吸 収
	60(K_i)	—	阻 害 実 験
メチル α -グルコシド	540	24	
	62(K_i)	—	阻 害 実 験
メチル β -グルコシド	260(K_i)	—	阻 害 実 験
フェニル α -グルコシド	9.4(K_i)	—	阻 害 実 験
フェニル β -グルコシド	11	18	
	32(K_i)	—	阻 害 実 験
デオキシノジリマイシン	0.025	19	
	0.016(K_i)	—	阻 害 実 験

文献 6 より。

図 3. 差吸収のリガンド濃度依存性

A) マルトース, B) グルコース. ●, 285 nm; ○, 292 nm; •, 302 nm. a, b は 292 nm および 285 nm における各リガンドの溶媒効果. 文献 5 より.

図 4. グルコアミラーゼの蛍光スペクトル

グルコノラクトンの取り込みによって生じたもの. 酵素: 0.9 μ M. グルコノラクトン: A (0 mM), B (0.6 mM), C (1.4 mM), D (2.8 mM), E (5.0 mM), F 緩衝液のみ. 文献 7 より.

3. 蛍光光度法による解析

グルコミラーゼにグルコノラクトンを加えると、340 nm 付近に頂 (peak) をもつ蛍光スペクトル (励起波長 292 nm) が変化 (減少) する (図4)⁷⁾。蛍光強度の変化量 (ΔF) をグルコノラクトン濃度に対してプロットすると (図5), 飽和曲線にのり, 酵素と複合体を形成することがわかる。複合体の解離定数 K_d はさきの差吸収スペクトルから求めた値とほぼ等しい (表3)。蛍光変化を指標とし, 各リガンドの共存関係を調べた結果が図6である⁸⁾。実線は各リガンドが拮抗または非拮抗的に取り込まれるとして描いた理論線である。マルトースとグルコノラクトンとは拮抗型, イソマルトースとグルコノラクトンおよびグルコースとグルコノラクトンとは, いずれも非拮抗型で, それぞれ取り込まれると考えられた。

差吸収および蛍光を指標として観測した上の結果を総

図5. 蛍光変化量のグルコノラクトン濃度依存性
挿入図は直線プロット。文献7より。

図6. グルコノラクトン共存下における蛍光変化量の濃度依存性

a) グルコノラクトン-マルトース系, グルコノラクトン, 1.1 mM. b) イソマルトース-グルコノラクトン系, イソマルトース, 18 mM. c) グルコース-グルコノラクトン系, グルコース, 100 mM. 理論曲線: A, 拮抗型; B, 非拮抗型。文献7および8より。

合すると, 各リガンドは図7の様式で各サブサイトに取り込まれる。また, グルコノラクトンとかマルトースの取り込みによって占有されるサブサイトに Trp 残基1個が位置する, と解釈される。

図7. サブサイトに取り込まれるリガンド
各リガンドは固有の様式でサブサイトへ取り込まれる (想定図)。

図8. サブサイトへの取り込みと阻害形式
グルコノラクトン (図の G) がサブサイト1へ取り込まれるならば, 類縁物質-基質-酵素という三重複合体が形成されうる。阻害形式は非拮抗かこれに近い形となる。グルコースがサブサイト2へ取り込まれるならば, 三重複合体は形成されえないから, 拮抗型の阻害となる (想定図)。

図9. 両逆数プロット

A) グルコース, B) グルコンラクトン. a, リガンド共存のとき; b, リガンド共存しないとき. 文献9より.

図10. 基質取り込みの経時変化

基質マルトリオース, 5.0 mM; 酵素, 10.9 μM. ストップフロー法 (303 nm) を用いて観測. 文献10より.

4. 阻害実験による解析

サブサイト構造の特徴 (A_2 が最大で, $A_1 \approx 0$, 表2) に着目すれば, 類縁物質が取り込まれるサブサイトと長鎖糖を基質とするときの阻害形式との間に明確な関係のあることがわかる. いま, グルコンラクトンがサブサイト1, グルコースがサブサイト2に取り込まれるとすれば, 基質および類縁物質の取り込みは図8のようになり, 前者は非拮抗型, 後者は拮抗型の阻害形式を示すことになる. 実験の結果 (図9) はこの予測とよい一致を示している⁹⁾. つまり, さきの結論 (図7) は阻害実験によっても支持されたことになる.

5. 速度論的手法による解析

図3の 302 nm における吸収の減少をストップフロー法で観測した結果が図10である¹⁰⁾. 速度定数 k_{app} を

図11. 速度定数の濃度依存性

実線は二段階機構を想定して描いた理論線. 文献10より.

図12. 二段階機構

二段階機構をサブサイト構造に合うように想定して描いた.

図13. ストップフロー速度論量と基質鎖長との関係

文献4より.

求め, 基質濃度に対してプロットすると飽和曲線型の濃度依存性を示す (図11). 遷移相速度論に基づいて解析すると, このような場合速い2分子過程に遅い1分子過程の続く“二段階機構”で解釈してよいことになる¹¹⁾.

二段階機構をサブサイト構造にむすびつけて解釈してみると図12となる. 鎖長の異なる一連の直鎖短糖

図 14. マルトースとグルコノラクトン取り込みにおける速度論量のグルコース濃度依存性

a) マルトース, b) グルコノラクトン. 文献 12 より.

図 15. グルコース存在下におけるマルトースとグルコノラクトン取り込みのサブサイト機構
ストップフロー速度論の結果に基づいて描いた想定図.

($G_2 \sim G_7$) についても取り込みは二段階機構で解釈してよいことがわかり, 各過程の速度定数 (図 13) が求められた⁴⁾. この結果, K_{-1} と k_{+2} はいずれも鎖長により大きな違いはなく, k_{-2} が鎖長に依存することがわかった. 取り込みの機構が図 12 で解釈してよいならば, 長い鎖長をもつ糖質ほど k_{-2} が小さいことは, それだけ (ES) 量が大きくなり, 鎖長の長さに伴って触媒速度が大きくなることを意味することになって, さきの触媒実験の結果 (表 1, $G_2 \sim G_7$) とも一致する.

グルコースの共存下でマルトースとグルコノラクトンの取り込みをストップフロー法で観測し, 速度論的手法によって解析した (図 14)¹²⁾. 第一段階 (K_{-1}) では,

図 16. 化学修飾によるグルコミラーゼの差吸収変化

挿入図は修飾によって生じる差吸収スペクトル. 文献 13 より.

いずれも同様にグルコース共存の影響 (拮抗) を受けているが, 第二段階 (k_{-2}) は両者で様子がまったく異なっている. マルトースはグルコースの影響を受けず, グルコノラクトンはグルコースが共存するとき k_{-2} が小さくなる. これらリガンドが図 12 のように取り込まれると考えてよいならば, 実験結果は図 15 のモデルで解釈することができる. つまり, 速度論的な解析により, リガンド取り込みの機構 (途中の経過) が知られたことにな

図 17. ストップフロー法で観測した修飾反応

A) intact な酵素, B) 速い相 (Trp¹, Trp²) を修飾した酵素. a, 吸収変化; b, 蛍光変化を指標として観測. 文献 14 より.

表 4. 化学修飾の速度定数に基づくグルコアミラーゼのトリプトファン残基識別

反応の相	速度定数 ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	トリプトファン
速	3.5×10^5	Trp ¹
	8.8×10^4	Trp ²
遅	2.8×10^3	Trp ³
	7.4×10^2	Trp ⁴

ストップフロー法による観測, pH 4.5, 25°C. 文献 13 より.

図 18. 防ぎ修飾

防ぎ物質が取り込まれる部位を修飾から防ぐ本研究では, 防ぎ物質としてグルコノラクトン, マルトースなどが, また修飾試薬には *N*-プロモサクシンイミドが用いられた. 文献 14 より.

り, さきの取り込みに関する結論 (図 7) がここでも支持されたことになる.

6. 化学修飾による解析

グルコアミラーゼを *N*-プロモサクシンイミド(NBS) で修飾すると, 280 nm に谷をもつ Trp 残基由来の差

図 19. グルコノラクトンによる Trp 残基の防ぎ修飾

0 mM, 防ぎ物質なし; 15 mM, グルコノラクトンを防ぎ物質としたとき. 上の図は直線プロット (Guggenheim plot). 文献 15 より.

吸収スペクトル (図 16) が観測される¹³⁾. 差吸収の減少量 ($\Delta\epsilon_{280}$) をプロットすると, 全 10 個のうち最大 4 残基が修飾される. NBS による修飾をストップフロー法を用いて観測してみると, 反応曲線は明らかに 2 相となり, 差吸収から各相に Trp 残基 2 個ずつが含まれること (図 17 (a)), さらに観測の時間軸を適切に設定すると各相の反応が観測できて (図 17 (b)), 結局, 修飾される 4 個の Trp 各残基が固有の速度定数をもつこと (表 4) がわかった. 速度定数の大きいほうから, それぞれ Trp¹, Trp², Trp³, Trp⁴ と呼ぶことにする.

さきの実験から, サブサイトに取り込まれることが予測された糖質 (グルコノラクトン, マルトース) をあらかじめ取り込ませておいて, サブサイトの Trp 残基を NBS による修飾から防ぐこと (“防ぎ修飾”) を試みた (図 18)¹⁴⁾. 図 19 は反応曲線 (遅い相) の 1 例である¹⁵⁾. 直線プロット (Guggenheim plot) から明らかなよう

図 20. グルコアミラーゼのサブサイト構造とリガンドの取り込み

サブサイト 1 に Trp 残基 (Trp³) が存在すると考えられる (想定図)。

に、糖質により防がれて反応曲線の前半部がみえなくなっている。糖質の取り込みによる防ぎ効果は、反応の速い相 (Trp¹, Trp²) ではみられず、遅い相 (Trp³, Trp⁴) でのみ観測された。防ぎ修飾の結果は糖質の取り込みによって Trp³ が NBS 修飾から防がれたことを示している¹⁵⁾。Trp¹ と Trp² を修飾して、遅いほうと識別すること (識別修飾) および識別修飾酵素の characterization にも成功した (図 17 (a)-(B), 表 3)。

以上から、Trp³ がグルコノラクトンとかマルトースの取り込まれるサブサイト、すなわち、サブサイト 1 に存在すると考えられる。

最後になりましたが、今回の受賞に際し、ご尽力くださいました本学会支部長先生ならびに本学部廣海啓太郎先生をはじめ関係の方々へ厚くお礼を申し上げます。また、ここにはページ数の関係で内容のすべてと氏名をご紹介するというわけにはいきませんでした。この研究の多くは本研究室で学士、修士、博士のための研究をした人達によって成されたものであります。敬意を表する意味で、本稿は文章を極力少なくし、各人各様に思いの

込められた図表をできるだけ採用することといたしました。深く謝意を表します。

文 献

- 1) B. SVENSSON, K. LARSEN, I. SVENDSEN and E. BOEL: *Carlsberg Res. Commun.*, **48**, 529~544 (1983).
- 2) T. ASHIKARI, N. NAKAMURA, Y. TANAKA, N. KIUCHI, Y. SHIBANO, T. TANAKA, T. AMACHI and H. YOSHIZUMI: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 957~964 (1984).
- 3) 廣海啓太郎: 化学と生物, **21**, 116~122 (1983).
- 4) A. TANAKA, T. YAMASHITA, M. OHNISHI and K. HIROMI: *J. Biochem.*, **93**, 1037~1043 (1983).
- 5) M. OHNISHI, H. KEGAI and K. HIROMI: *J. Biochem.*, **77**, 695~703 (1975).
- 6) 大西正健: 「アミラーゼ」 (中村道徳監修, 大西正健, 坂野好幸, 谷口 肇編集, 学会出版センター, 東京, 29~36 (1986)).
- 7) K. HIROMI, A. TANAKA and M. OHNISHI: *Biochemistry*, **21**, 102~107 (1982).
- 8) M. OHNISHI, S. WADA, T. YAMADA, A. TANAKA and K. HIROMI: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **30**, 57~61 (1983).
- 9) M. OHNISHI, T. YAMASHITA and K. HIROMI: *J. Biochem.*, **79**, 1007~1012 (1976).
- 10) M. OHNISHI and K. HIROMI: *Carbohydr. Res.*, **61**, 335~344 (1978).
- 11) a) 廣海啓太郎: 「酵素反応解析の実験」, 講談社, 東京, 262~339 (1978); b) 大西正健: 「酵素反応速度論実験入門」, 学会出版センター, 東京 (1987) (印刷中).
- 12) A. TANAKA, M. OHNISHI and K. HIROMI: *Biochemistry*, **21**, 107~113 (1983).
- 13) M. OHNISHI, M. TANIGUCHI and K. HIROMI: *Biochim. Biophys. Acta*, **744**, 64~70 (1983).
- 14) 大西正健: 「酵素科学入門」, 啓学出版, 東京, 127~134 (1984).
- 15) 大西正健: 化学と生物, **21**, 502~512 (1983).
- 16) 大西正健, 岡田巖太郎, 谷口 肇, 坂野好幸: 蛋白質, 核酸, 酵素, **30**, 489~495 (1985).