糖質関連酵素化学シンポジウム

Thermus thermophilus A4 株由来・新規耐熱性 β -ガラクトシダーゼ
および基質複合体のX線結晶構造解析日高將文, 伏信進矢*, 大津奈穂美¹, 元島英雅¹松澤 洋², 祥雲弘文, 若木高善

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 (113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)

¹ よつ葉乳業株式会社・リサーチセンター (061-1264 北海道北広島市輪厚 465-1)² 青森大学工学部生物工学科 (030-0943 青森市幸畑 2-3-1)X-ray Crystallography of a Novel Thermostable β -Galactosidase
from *Thermus thermophilus* A4, and Its Complex Structure with GalactoseMasafumi Hidaka, Shinya Fushinobu,* Naomi Ohtsu,¹ Hidemasa Motoshima,¹Hiroshi Matsuzawa,² Hirofumi Shoun and Takayoshi Wakagi

Department of Biotechnology, University of Tokyo (1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan)

¹ Research Center, Yotsuba Milk Products Co., Ltd. (465-1, Wattsu, Kitahiroshima, Hokkaido 061-1264, Japan)² Department of Bioscience and Biotechnology, Aomori University (2-3-1, Kohbata, Aomori 030-0943, Japan)

β -Galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 (A4- β -Gal) is stable at 70°C for 20 h. It belongs to the glycosyl hydrolase family (GF) 42, and enzymes in GF-42 are stable under extreme circumstances such as high temperature or high salt concentration. In order to obtain the structural basis of its reaction mechanism and stability, we conducted X-ray crystallography of the enzyme. We identified the structure of free and galactose-bound A4- β -Gal at 1.6 Å and 2.2 Å resolution, respectively. The A4- β -Gal has a “flower pot-like” trimeric structure. The monomer structure of A4- β -Gal is composed of three domains. N-terminal domain (domain A) contains a galactose binding site and has a TIM barrel fold. We identified the residues interacting with the galactose. Since Trp182, a residue related to molecular symmetry, constitutes a part of the active site pocket, the trimeric conformation is necessary for A4- β -Gal to retain enzyme activity. We also identified Glu141 and Glu312 as catalytic residues for A4- β -Gal on the basis of the structural evidence. Glu 141 and Glu312 are located close to the C-termini of the fourth and seventh β -strands of the barrel structure, indicating that GF-42 belongs to 4/7 superfamily.

β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23) は β -D-(1,4)-ガラクトシル結合を加水分解する酵素である。微生物から動植物に至る多くの生物が有しており、アミノ酸配列の相同性に基づき、グリコシルヒドロラーゼファミリー (GF) 1, 2, 35, 42 に分類されている^{1,2)}。古くから研究の対象となってきた大腸菌の 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ており、GF-2 に属している。近年X線結晶構造解析により立体構造が明らかになり、反応機構や活性部位などに関する詳細な知見が得られている³⁾。大腸菌 β -ガラクトシダーゼは、発色基質である 5-ブロモ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド (X-gal) に対する加水分解活性を示すことから、遺伝子工学の分野で最も利用されている酵素の一つである。

一方、ラクトースに対する加水分解活性から、 β -ガラクトシダーゼは乳製品の加工に利用されており、

* Corresponding author (asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp).

低ラクトース牛乳の生産や、チーズ生産の副産物であるチーズホエイ（主成分はラクトース）分解によるシロップ生産などに利用されている。このような工業利用において、耐熱性を有する酵素は、微生物の繁殖できない高温条件下における連続反応が可能であり、衛生的にも経済的にも非常に有用である。そのため、耐熱性の β -ガラクトシダーゼの探索と固定化が試みられてきた。

静岡県熱川温泉より単離された *Thermus thermophilus* A4 は、生育温度約 70°C の好気性の細菌で、その β -ガラクトシダーゼ (A4- β -Gal) は 70°C で 20 時間以上安定であり、高い耐熱性を有する。A4- β -Gal はアミノ酸配列の相同性から GF-42 に分類されている⁴⁾。GF-42 は、好熱菌の他に、好塩菌 *Haloferax alicantae*⁵⁾、低温菌 *Carnobacterium piscicola* BA⁶⁾ などの極限環境に生育する微生物に由来する β -ガラクトシダーゼを含むため、これらの立体構造の解明は、分子進化上の観点からも非常に興味深い。GF-42 の立体構造に関しては、Hydrophobic Cluster Analysis (HCA 法) により、活性部位として TIM バレル構造を持つことが予測されていたが、立体構造は未知であった⁷⁾。また GF-42 は GF-2 と一次構造上の相同性はなく、反応機構や活性中心残基に関する知見は得られていない。本研究では、A4- β -Gal の耐熱機構や反応機構の解明、および GF-42 の耐熱・耐塩機構に関して、原子レベルでの構造的基盤を得ることを目的として X 線結晶構造解析を行った。

A4- β -Gal の X 線結晶構造解析

A4- β -Gal の X 線結晶構造解析は、セレンメチオニン置換体の結晶を用いた多波長異常分散法により行った。データ収集は高エネルギー加速器研究機構の BL-18 B で行い、タンパク質中に導入したセレン原子に対する異常分散効果の異なる 3 波長の X 線を用いた。また Native 結晶の高分解能のデータ収集は SPring-8 の BL 40 B 2 で行った。

プログラム SOLVE⁸⁾ により X 線の初期位相を決定し、さらにプログラム DM⁹⁾ により位相を改善した後、プログラム ARP/wARP¹⁰⁾ を用いてモデルの構築を行った。A4- β -Gal 構造の精密化は Native 構造と、ガラクトースを含む複合体構造について行い、それぞれ分解能 1.6 Å, 2.2 Å の構造を得た。

四次構造

A4- β -Gal は結晶中で 3 量体を形成しており (Fig. 1)、これはゲル濾過による分子量予測とほぼ一致した。3 量体中央の 3 回軸が結晶学的 3 回軸と一致しており、各サブユニットは結晶学的にすべて同じ構造である。サブユニットの接触面は密接で、その接触面積は約 4700 Å² (モノマー全体の 19.4%) であった。三つのサブユニットはリング状に配置しており、底に穴があいているため、3 量体は植木鉢様の構造となっている。

Fig. 1. Stereoview of the molecular surface of A4- β -Gal trimer.

The trimer of A4- β -Gal resembles to a shape of “flower pot.” The structure of the three monomers are crystallographically identical.

Fig. 2. Comparison of three-dimensional structures of GF-42, GF-14 and GF-2.

All structures are shown in a ribbon models. (a) Overall structure of A4- β -Gal monomer. A bound galactose and a zinc atom are shown as ball-and-stick and sphere, respectively. (b) Overall structure of *Bacillus cereus* β -amylase (GF-14) and bound maltose molecules are shown as ball-and-stick. (c) Structure of TIM barrel domain (domain 3) of *E. coli* β -galactosidase (GF-2).

単量体構造

A 4- β -Gal の単量体構造は N 末端側から、ドメイン A (1-389)、ドメイン B (390-589)、ドメイン C (590-643) の三つのドメインからなっていた (Fig. 2a)。ドメイン A は (α/β)₈ の TIM バレル構造で、ガラクトース結合部位を有しているため活性中心ドメインであると考えられる。ドメイン B は α/β 混合構造で、ドメイン C は β シートのみの構造となっている。ドメインの境界が、3 量体分子の上端から中央のガラクトース結合部位に続くクレフトを形成している。

A4- β -Gal は HCA 法による予測通り、活性ドメインとして TIM バレル構造を持っていた。A4- β -Gal の TIM バレル構造 (ドメイン A) は、ヘリックス $\alpha 4$ が突出しているため、“6” の字の形に見える形をしている。DALI サーバー⁽¹¹⁾によりドメイン A の類似構造を検索したところ、GF-14 に属する *Bacillus cereus* の β -アミラーゼ⁽¹²⁾ が立体構造上最も相同性が高いことが明らかになった (Fig. 2b)。このことから、GF-14 と GF-42 は進化的に関係あるファミリーと考えられる。ドメイン A には、GF-42 で高度に保存されたシステイン領域が存在しており、四つのシステインが金属に配位していた。ICP 法による金属定量結果や金属原子への配位型式から、この金属は亜鉛であることが示唆されており、A4- β -Gal 分子の安定化に寄与していると考えられる。

ドメイン B は、*Sulfolobus solfataricus* のアントラニ

ル酸合成酵素の TrpG サブユニット⁽¹³⁾と立体構造上の相同性を有していた。TrpG サブユニットはグルタミン加水分解およびアンモニア転移活性を有しているが、A4- β -Gal のドメイン B では、TrpG サブユニットの活性中心残基 (システイン、ヒスチジン、グルタミン酸) に相当する残基が全てプロリンであるため、酵素活性は有していないと考えられる。ドメイン B、およびドメイン C の A4- β -Gal における機能は不明であるが、後述するように活性中心のポケット化および耐熱化のための 3 量体形成に関わっていると推測される。

A4- β -Gal の活性中心部位

ガラクトースとの複合体構造から、A4- β -Gal の活性中心部位を同定することができた。ガラクトースは Fig. 3a に示すように非常に鮮明な電子密度を示し、各 OH 基の配向とともに、 α -アノマー型のコンフォメーションをとっていることが明らかになった。ガラクトース結合部位は植木鉢型構造の内壁に存在し、非常に奥まった環境にあることがわかった。

ガラクトースは β -ガラクトシダーゼの基質として認識される部分であり、予測どおり厳密な基質認識機構が存在していた。Fig. 3b に示すように、各 OH 基に対し、それぞれ複数の基質認識残基が存在している。このうち、O1 を認識している Glu 141、Glu 312 が活性中心残基であると考えられる。これら二つのグルタミン酸残基は、HCA 法で活性中心残基であると予測

Fig. 3. Active site of A4- β -Gal.

(a) Wireframe model of A4- β -Gal and $|F_o|-|F_c|$ electron density of the bound galactose molecule.
 (b) Schematic drawing of the surrounding amino acid residues interacting with the galactose. Glu141 and Glu312 are seemed to be catalytic residues. The side chain of Trp182 from the next subunit recognizes O3 of the galactose via a water molecule.

された残基であり、これらの相対的な位置関係は、大腸菌の β -ガラクトシダーゼを含む多くのグリコシドヒドロラーゼの活性中心残基の位置関係と一致している¹⁴⁾。しかし、GF-2の大腸菌 β -ガラクトシダーゼの活性中心ドメインであるTIMバレル構造とA4- β -GalのTIMバレル構造は大きく異なっており (Fig. 2c)、基質認識機構には大きな違いがあると考えられる¹⁵⁾。Fig. 3bに示した基質認識残基のうち、O3を水を介して認識している Trp 182 は、3量体の形成により隣のサブユニットから伸びてきている残基であり、これを含む隣のサブユニットのループ部分が基質結合部位を形成している。このことから、3量体の形成はA4- β -Galの基質認識に重要であることは明らかである。

一般に糖加水分解反応において、二つの触媒残基間の距離は retaining 機構では約 5.5 Å, inverting 機構では約 10 Åであるといわれている¹⁶⁾。触媒残基として同定した Glu 141 と Glu 312 の側鎖のO原子間距離は約 4.8 Åであり、A4- β -Galが retaining 機構により加水分解を行うことを示唆している。

4/7 スーパーファミリー

GFは立体構造の類似性に基づき、ファミリー間のアミノ酸配列の相同性が低い場合でも、さらに大きなスーパーファミリーに分類することが可能である。4/7 スーパーファミリーは、いずれもTIMバレル構造を持ち、活性中心残基となるグルタミン酸が4番目

Fig. 4. Hypothetical model for the formation of the active site pocket of A4- β -Gal through addition of domain(s) and trimerization.

と7番目の β シートのC末端に存在する¹⁷⁾。さまざまな構造比較の計算結果から、最初に提唱されたGF-1, 2, 5, 10, 17に加え、GF-14を加えた六つのファミリーが、進化的に非常に近い関係にあることが示唆されている¹⁴⁾。本研究で解明したA4- β -Galの立体構造も4/7スーパーファミリーに共通の特徴を有しており、GF-42もこれに属するといえる。

4/7スーパーファミリーに属する酵素の基質は、鎖長の長い多糖から短い二糖類まで酵素によりさまざまであり、酵素それぞれは特異的な基質に応じた特徴的な活性部位の構造を持っている。短い基質を分解する大腸菌 β -ガラクトシダーゼや β -グルコシダーゼなどはポケット型の活性部位を持っている¹⁴⁾。現在報告されているポケット型の構造を持つ4/7スーパーファミリーの酵素は、クレフト型の活性部位がドメインの付加やループの付加によってポケット化したものである。A4- β -Galでも同様に、元々クレフト型のTIMバレルにドメインが付加し、サブユニット同士が重合することで、それぞれのクレフトの端を塞ぎ、活性部位がポケット化していることが見てとれる (Fig. 4)。

本酵素の構造解析を行うにあたり、データ測定の機会を与えていただきました静岡県立大学の井深章子博士に感謝いたします。また、高エネルギー加速器研究機構におけるデータの測定において大変お世話になりました。坂部知平名誉教授、鈴木 守博士、五十嵐教之博士に感謝いたします。

文 献

- 1) B. Henrissat: A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **280**, 309-316 (1991).
- 2) B. Henrissat and A. Bairoch: New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **293**, 781-788 (1993).
- 3) D.H. Juers, R.H. Jacobson, D. Wigley, X.J. Zhang, R.E. Huber, D.E. Tronrud and B.W. Matthews: High resolution refinement of β -galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for α -complementation. *Protein Sci.*, **9**, 1685-1699 (2000).
- 4) N. Ohtsu, H. Motoshima, K. Goto, F. Tsukasaka and H. Matsuzawa: Thermostable β -galactosidase from an extreme thermophile, *Thermus* sp. A 4: Enzyme purification and characterization, and gene cloning and sequencing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1539-1545 (1998).
- 5) M.L. Holmes, R.K. Scopes, R.L. Moritz, R.J. Simpson, C. Englert, F. Pfeifer and M.L. Dyall-Smith: Purification and analysis of an extremely halophilic β -galactosidase from *Haloflex alicantei*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1337**, 276-286 (1997).
- 6) J.M. Coombs and J.E. Brenchley: Biochemical and phylogenetic analyses of a cold-active β -galactosidase from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* BA. *Appl. Environ. Microb.*, **65**, 5443-5450 (1999).
- 7) B. Henrissat, I. Callebaut, S. Fabrega, P. Lehn, J. Mornon and G. Davies: Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7090-7094 (1995).
- 8) T.C. Terwilliger and J. Berendzen: Automated structure solution for MIR and MAD. *Acta Crystal. D*, **55**, 849-861 (1999).
- 9) N. Collaborative Computational Project: The CCP 4 Suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystal. D*, **50**, 760-763 (1994).
- 10) A. Perrakis, R.J. Morris and V.S. Lamzin: Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.*, **6**, 458-463 (1999).
- 11) L. Holm and C. Sander: Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.*, **233**, 123-138 (1993).
- 12) B. Mikami, M. Adachi, T. Kage, E. Sarikaya, T. Nanmori, R. Shinke and S. Utsumi: Structure of raw starch-digesting *Bacillus cereus* β -amylase complexed with maltose. *Biochemistry*, **38**, 7050-7061 (1999).
- 13) T. Knochel, A. Ivens, G. Hester, A. Gonzalez, R. Bauerle, M. Wilmanns, K. Kirschner and J.N. Jansonius: The crystal structure of anthranilate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: Functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9479-9484 (1999).
- 14) D.H. Juers, R.E. Huber and B.W. Matthews: Structural comparisons of TIM barrel proteins suggest functional and evolutionary relationships between β -galactosidase and other glycohydrolases. *Protein Sci.*, **8**, 122-136 (1999).
- 15) R.H. Jacobson, X.-J. Zhang, R.F. DuBose and B.W. Matthews: Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. *Nature*, **369**, 761-766 (1994).
- 16) G. Davies and B. Henrissat: Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, **3**, 853-859 (1995).
- 17) J. Jenkins, L.L. Leggio, G. Harris and R. Pickersgill: β -Glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold β/α architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. *FEBS Letters*, **362**, 281-285 (1995).

【質 問】

江崎グリコ 栗木

1) 4/7 スーパーファミリーという考え方は、いつ頃から提唱されるようになりましたか。β-4 および β-7 の C 末端側に触媒残基の Glu があるという構造の共通性とその周辺のアミノ酸配列の相同性が高いということは、触媒機構と一般的な酵素構造から考えるとスーパーファミリーというほどでもないと考えますがいかがですか。

2) 共結晶で得られたガラクトースがα-アノマー型でしたが、このβ-ガラクトシダーゼがβ→β retaining enzyme であることと矛盾しませんか。

3) 本酵素は3量体でないと活性発現しませんか。

【答】

1) 4/7 スーパーファミリーの考え方は、1995 年に Jenkins らによって提唱されたものです。活性ドメインとして TIM バレル構造を持ち、触媒残基である酸性残基がβ-4, β-7 の C 末端にあることから 4/7 スーパーファミリーと呼ばれております。スーパーファミリーに属する酵素間でアミノ酸配列の相同性はありませんが、触媒残基となる酸性残基の配列上の位置と、構造上の位置は高度に保存されています。また、cis-ペプチド結合と芳香環を持つ残基も保存されています。TIM バレル構造を持つグリコシドヒドロラーゼの構造比較計算を行いますと、4/7 スーパーファミリーに属するものは、他の TIM バレル構造とは離れて一つのクラスターを形成することが明らかになっております。そのため、4/7 スーパーファミリーは関連のある酵素群であると考えられています。

2) おっしゃるように retaining 機構における酵素基質複合体では、C1 と触媒残基が共有結合するアシル化の段階で C1-O1 の結合が外れると考えられているため、その場合 O1 原子は存在しません。しかし、共結晶に用いたのは単糖のガラクトース分子であり、溶液中ではα-アノマー型が優位に存在していると考えられます。本来はβ-アノマー型の基質が結合し、アシル中間体の構造はα-アノマー型の配座をとることになりますが、ここでは加えたα-アノマー型のガラクトースがそのまま結合していると考えられます。実際、O1 原子と Glu 312 の O 原子の距離は 2.2 Å と

異常に近く、この部分においては多少歪んだ形で結合しているようです。しかし、他の OH 基の厳密な認識機構を考えますと、結合しているガラクトースの配向は、本来の酵素基質複合体と同じであると考えております。

3) 単量体に解離した状態のものを分離できておりませんのでわかりませんが、活性部位の一部の形成を隣のサブユニットが担っているため、私たちは3量体化が活性発現に必須であると考えています。

【質 問】

京都府大 大西

3 量体を形成することが酵素機能にどう関わるのか。各サブユニットに活性部位が一つずつあるにもかかわらず、3 量体を形成することの意味は何か。耐熱性もその意味の一つか。どういう要因が耐熱化に関わっているのか。

【答】

活性中心ポケットの形成に、隣のサブユニットのループ部分に関わっておりますので、3 量体の形成が酵素活性に影響を与えていると考えておりますが、単量体に解離した状態で酵素活性がどうなるのか不明です。

3 量体の形成は、耐熱化に関連していると考えております。一般的な TIM バレル構造は、βシートとαヘリックスの間のループ部分が長いのが特徴です。ループ部分は熱による振動で最も変性の起こりやすい部位であり、ループの可動性を下げることによりエントロピー効果で耐熱性が上がると考えられております。A 4-β-Gal では、TIM バレルのループ部分がサブユニットの接触面に存在するため、相互作用によって可動性が下がり、耐熱性を上昇させていると考えられます。またサブユニット接触面に水素結合が多数存在しますが、GF-42 のうち好熱菌を由来とするものは、この水素結合を形成する残基が多く保存され、低温菌由来のものはあまり保存されておられません。このように、水素結合によるサブユニット間相互作用の強化も耐熱性に影響していると考えられます。

(2001 年 11 月 22 日受付)