糖質関連酵素化学シンポジウム

酵母 Glycogen Debranching Enzyme の二つの酵素作用と
その触媒残基について中山章文*, 山本恵三¹, 稲岡 心¹, 田端司郎¹

奈良県衛生研究所 (630-8131 奈良市大森町 57-6)

¹ 奈良県立医科大学化学教室 (634-8521 橿原市四条町 840)Two Enzyme Activities of Yeast Glycogen Debranching Enzyme
and Their Catalytic ResiduesAkifumi Nakayama,* Keizo Yamamoto,¹ Kokoro Inaoka¹ and Shiro Tabata¹

Nara Prefecture Institute of Public Health (57-6, Ohmori-cho, Nara 630-8131, Japan)

¹Department of Chemistry, Nara Medical University (840, Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan)

Glycogen debranching enzyme (GDE) from *Saccharomyces cerevisiae* possesses two different catalytic activities, 4- α -glucanotransferase/amylo-1,6-glucosidase, on a single polypeptide chain. To investigate this bifunctional enzyme on the molecule level, GDE gene from *S. cerevisiae* was cloned and expressed into *Escherichia coli*, and the best conditions for the enzyme expression were examined. When the cultivation temperature of recombinant *E. coli* strains was lowered to 25°C and the isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration used for induction was decreased to as low as 0.02 mM, a total of about 33 mg of recombinant GDE can be isolated from a litre culture. We developed an affinity chromatography using β -cyclodextrin immobilized Sepharose-6B (β -CD Sepharose 6B) for purifying GDE. The method requires only a single-step purification and renders an 87% recovery of the enzyme. Moreover, the purified recombinant GDE is a homogeneous protein and possesses the same characteristics as those of *S. cerevisiae*. To elucidate the structure-function relationship of yeast GDE, the catalytic residues of the enzyme were determined by site-directed mutagenesis. Asp535, Glu564 and Asp670 on the N-terminal half, and Asp1086 and Asp1147 on the C-terminal half were chosen by the multiple sequence alignment or the comparison of hydrophobic cluster architectures among related enzymes. Five mutant enzymes, D535N, E564Q, D670N, D1086N and D1147N, were constructed. All the purified mutant enzymes possessed either the transferase activity or glucosidase activity. Three mutants, D535N, E564Q and D670N, lost transferase activity but retained glucosidase activity. On the contrary, the other mutants, D1086N and D1147N, lost glucosidase activity but retained transferase activity. Furthermore, kinetic parameters of the remaining activity of mutants did not vary markedly from those of wild-type enzyme. These results indicate that the residues, Asp535, Glu564 and Asp670, on the N-terminal half are the catalytic residues of transferase activity and the Asp1086 and Asp1147 on the C-terminal half involve glucosidase activity, and provide direct evidence that the transferase and glucosidase of yeast GDE are independent each other.

* Corresponding author (a.nakayama@ihe.pref.nara.jp).

Abbreviation: GDE, glycogen debranching enzyme; transferase, 4- α -glucanotransferase; glucosidase, amylo-1,6-glucosidase; ORF, open reading frame; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; Glc- β -CD, 6-*O*- α -D-glucosyl cyclomaltoheptaose; Glc- β -CD, 6-*O*- α -maltopentaosyl cyclomaltoheptaose; β -CD, cyclomaltoheptaose; SDS, sodium dodecylsulfate; HCA, hydrophobic cluster analysis.

Glycogen debranching enzyme (GDE) は、4- α -glucanotransferase (EC 2.4.1.25, transferase) と amylo-1,6-glucosidase (EC 3.2.1.33, glucosidase) の二つの酵素作用を一本のポリペプチド鎖上に有する二機能酵素である¹⁻³⁾。GDE は、生体内におけるグリコーゲン代謝の重要な酵素として知られ、グリコーゲンホスホリラーゼとの共同作用によってグリコーゲンをグルコースとグルコース-1-リン酸に完全分解する。ヒトにおけるこの酵素の遺伝的欠損は、低脂血症や肝障害、心筋障害などを伴うグリコーゲン蓄積病3型 (GSD III, Cori 病) を生じることが知られている^{4,5)}。GDE は、グリコーゲンやアミロペクチンの α (1 $\rightarrow$ 6) 結合した枝を2段階の反応によって切断する。つまり、第一段階として transferase が、分岐した枝からマルトースまたはマルトリオース単位で他の枝に転移していき、最終的に α (1 $\rightarrow$ 6) 結合したグルコースのみを枝に残す。次に第2段階として、枝に残された α (1 $\rightarrow$ 6) 結合のグルコースを glucosidase が、加水分解によって遊離する。結果として、グリコーゲンやアミロペクチンの α (1 $\rightarrow$ 6) 結合した枝が切断され、外側の α (1 $\rightarrow$ 6) 結合鎖が長くなってヨード反応による呈色の増大がみられる。GDE の transferase と glucosidase の二つの活性については、酵素タンパク質のカルボキシル基の化学修飾による実験や片方の活性に対する特異的阻害剤を用いた阻害実験の結果から、それぞれの活性が別々に存在する可能性が報告されてきた^{6,7)}。しかし、transferase と glucosidase の活性に関する分子レベルでの解析の報告はみられない。

われわれはすでに、酵母の GDE も哺乳類の酵素と同様に transferase と glucosidase の二つの活性を有していることを報告した^{8,9)}。本研究では酵母 GDE の触媒残基を同定することを目的として、酵母 GDE 遺伝子のクローニングを行い、組換え酵素の大腸菌での大量発現と精製系の確立¹⁰⁾と、GDE 遺伝子に部位特異的変異を導入した変異型酵素の酵素学的性質¹¹⁾の分析を行った。

組換え GDE の作成

酵素遺伝子のクローニングを行うために、*Saccharomyces cerevisiae* D-346 から精製した酵素の N 末端のアミノ酸配列の決定を試みたが、N 末端がブロックされており分析が不可能であった。そこで、lysyl endopeptidase (*Achromobacter* protease I) によって消化したペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、その配列をもとにして、オリゴヌクレオチドプローブを作成

No	Peptide	Synthesized oligonucleotide probe
I	SGKPYEDYQL	GG(AGTC)AA(AG)CC(AGTC)TA(TC)GA(AG)GA(TC)TA(TC)CA(AG)
II	DNVTEPNF	GA(TC)AA(TC)GT(AGTC)AC(AGTC)GA(AG)CC(AGTC)AA(TC)TT(TC)
III	NLVEIHHRD	AA(TC)TC(TC)T(AGTC)GT(AGTC)GA(AG)CA(TC)AT(ATC)CA(TC)CA(GAGTC)GA(TC)
IV	FSDVETQGG	GA(TC)GT(AGTC)GA(AG)AC(AGTC)CA(AG)GA(TC)GG(AGTC)GG
V	LWEYYAVNVQ	TGGGA(AG)TA(TC)TA(TC)GC(AGTC)GT(AGTC)AA(TC)GT(AGTC)CA(AG)

Fig. 1. Partial peptide sequence.

The purified enzyme (650 μ g) was denatured with 4 M urea in 50 mM Tris-HCl, pH 9.0 at 37°C for 1 h and digested with 0.014 U of lysyl endopeptidase (WAKO Pure Chemicals, Japan) at 37°C for 10 h. The peptides were separated by reverse-phase HPLC using linked columns of Cosmosil 5 C 4-300 AR (0.4 $\times$ 15 and 0.4 $\times$ 25 cm, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), and eluted by a linear gradient of 0–35% acetonitrile (solution A was 0.1% aqueous trifluoroacetic acid and solution B was acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid). The obtained peptides were sequenced by automated Edman degradation using an Applied Biosystems gas-liquid phase sequencer Model 470 A.

した (Fig. 1)。酵母 GDE の分子量は約 165,000 と推定され非常に大きく、しかも単量体のタンパク質であることから、これをコードする遺伝子より転写された mRNA の全長をクローニングすることは困難であると考えた。そこで、まず *S. cerevisiae* D-346 の染色体 DNA を種々の制限酵素で分解し、オリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、部分遺伝子の検索を試みた。その結果、*Pst* I で消化した約 3 kb の DNA 断片にシグナルを認め、この DNA 断片を pUC 18 プラスミドベクターにクローニングして塩基配列を決定した。この塩基配列を GenBank に対して相同性検索を行ったところ、*S. cerevisiae* 第 16 番染色体¹²⁾の 902039–906646 に位置する 4608 bp の open reading frame (ORF) に相同的な配列を認めた。しかも、この塩基配列から仮定されるタンパク質の分子量 (174,969) が酵母より精製した GDE の分子量とほぼ一致することから、酵母 GDE の遺伝子は介在配列を含まないものと考えられた。そこで、GenBank より得られた ORF の塩基配列の 5′-および 3′-末端に相補的な配列に、発現ベクター pTrc 99 A に組み込むための *Nco* I および *Kpn* I の認識配列を付加したオリゴヌクレオチドプライマーを作成した。このプライマーを用いて *S. cerevisiae* D-346 の染色体 DNA より取得した GDE 遺伝子を、*Nco* I と *Kpn* I で消化した pTrc 99 A に組込んだ組換えプラスミド (pTrcDBE) で大腸菌 JM 105 を形質転換した。大腸菌に導入した

GDE 遺伝子の発現は、菌体抽出液を 0.3% グリコーゲンを含むポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ヨードによる活性染色によって調べた。その結果、酵母より精製した GDE と同じ移動度に活性バンドを示す陽性クローンを得た (Fig. 2)。pTrcDBE プラスミドの GDE 遺伝子の全塩基配列を pUC 18 および pBluescript にサブクローニングして調べた。この GDE 遺伝子の塩基配列は、GenBank より取得した塩基配列と 99.3% の相同性が認められ、仮定されるアミノ酸は 1536 個であった。

本研究で得られた GDE 発現株は、通常の発現条件では非常に少ない量の組換え酵素しか発現しなかったため、大腸菌の培養温度と発現の誘導に用いる IPTG の濃度について検討を行った。まず、IPTG の濃度を発現ベクター pTrc 99 A の説明書に従って 3 mM に固定して培養温度を変化させてみた。すると、Table 1 に示すように 37°C と 30°C では大腸菌 1 g 当り 0.01 単

位しか発現せず、酵母における発現量 0.09 単位/wet. g よりも少なかった。培養温度を低くすると発現量は増加する傾向がみられたが、培養温度が 20°C では大腸菌の発育が悪く総量としての発現量は増加しなかった。結果として、25°C の培養温度が最も多くの組換え GDE を発現した。そこで、次に培養を 25°C で行い種々の濃度の IPTG による発現の誘導を検討した。その結果、IPTG の濃度を低くするほど発現量が増加し、最終的に 25°C で培養し、終濃度 0.02 mM の IPTG で誘導することによって最初の発現株で得られた組換え型酵素の約 1300 倍に発現量を増加することに成功し (Table 1)、この条件で、1 L の培養によって約 33 mg の組換え酵素の発現がみられた。

組換え GDE の精製と性質

大量発現に成功した組換え GDE を効率的に精製するために、精製法の検討を行った。従来の精製法⁸⁾では、三段階のクロマトグラフィーを用いるために収率が低く最終的に約 33% しか回収できなかった (Table 2A)。そこで、Vretblad¹³⁾および Totsuka ら¹⁴⁾が β -amylase に用いた方法を参考にして、GDE の基質アナログである β -cyclodextrin (β -CD) を Sepharose 6 B に固定したアフィニティーカラムによる精製を試みた。その結果、GDE は、0.3 M の硫酸アンモニウムの濃度で溶出され、活性とタンパク質が一致した単一のピークを示した (Fig. 3)。この活性画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、クマシーブリリアントブルーによって染色したところ、酵母から精製した GDE と同じ位置に単一のバンドとして染色された (Fig. 4)。この精製法を用いることによって、GDE の精製における回収率は 87% にまで上昇した (Table 2B)。また、クロマトグラフィーの条件に比較的高い濃度の硫酸アンモニウムを使用するが、酵素活性に対する影響はみられなかった。また、精製した酵

Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of GDEs for activity staining.

Samples were electrophoresed with 7.5% polyacrylamide disc gel at pH 8.4 containing 0.3% glycogen. The gel was washed with 0.1 M citrate buffer (pH 6.5), at 4°C for two 1-h periods and then was incubated overnight in the same buffer at room temperature. The disc was stained by dipping in 0.01% iodine/0.1% potassium iodide solution. 1, crude cell lysate of recombinant *E. coli* (100 μ g); 2, purified recombinant GDE (1 μ g); 3, purified native GDE from *S. cerevisiae* (1 μ g); 4, cell extract from *E. coli* (negative control) (100 μ g).

Table 1. Effect of growing temperature and IPTG concentration on the GDE expression.

Culture temperature (°C)	37	30	25	25	25	25
Induction (IPTG, mM)	3.0	3.0	3.0	1.0	0.1	0.02
Activity/Cell (U/wet g)	0.01	0.01	0.10	0.22	2.04	12.91
Relative expression	1	1	10	22	204	1291

IPTG induction was initiated when the culture reached a cell density of 0.6 at A_{600} and was carried out for 12 h of cultivation. Glc- β -CD was the substrate used for determining the activity of the crude enzyme lysate.

素試料は、15%のグリセロールを含む20 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に対して透析し、 -80°C で保存することによって少なくとも3カ月間安定であった。さらに、精製酵素のホスホリラーゼ限界デキストリンおよ

Table 2. A comparison of the conventional and single-step purification method for the native and recombinant GDE, respectively.

(A)

Steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Crude extract	2950	9.05	0.0031	100
QAE-TOYOPEARL	110	5.7	0.052	63
ω -Aminobutyl agarose	5.3	4.5	0.85	50
Hydroxyapatite	0.72	3.0	4.2	33

(B)

Steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Crude extract	47.4	16.3	0.34	100
β -CD Sepharose 6 B	2.9	14.2	4.91	87

GDE activity was measured with Glc- β -CD as a substrate. Protein concentration was determined by the method of PIERCE BCA assay (PIERCE a Perstorp Biotec Company) using BSA as a standard. (A) Purification of GDE from *S. cerevisiae* D-346 culture with 100 g wet mass (14); (B) Purification of recombinant GDE from 100 mL *E. coli* culture with 2 g wet mass.

び 6-*O*- α -D-glucosyl cyclomaltoheptaose (Glc- β -CD) に対する K_m 値を酵母由来の GDE と比較したところ、いずれの基質においても同様の値を示した (Table 3).

今回の研究において、酵母 GDE の大腸菌での高発現と一段階精製法の系を確立できたので、次にこのシステムを用いて部位特異的変異による触媒残基の同定を試みた。

Fig. 4. SDS-PAGE of high-level expressed recombinant GDE.

SDS-PAGE was carried out on 7.5% gel according to the method of Laemmli.²⁶⁾ Protein was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1, crude extract from pTrcDBE (15 μg); 2, purified recombinant GDE (0.5 μg); 3, purified native GDE (0.5 μg). Molecular weight markers were indicated on the left side with kDa.

Fig. 3. Affinity chromatogram of recombinant GDE.

The crude lysate (20 mL) was applied to an affinity column of β -CD Sepharose 6 B (1.8 $\times$ 4.0 cm, 10 mL) equilibrated with 20 mM Tris-HCl containing 0.7 M ammonium sulfate (pH 7.5). The column was washed with the same buffer exhaustively and then the enzyme was eluted by a liner gradient of ammonium sulfate (0.7–0 M) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5). Each fraction was 2 mL. ●, activity (U/mL); ○, protein indicated value at A_{280} ; ..., concentration of ammonium sulfate.

Table 3. *K_m* values of native and recombinant GDE for phosphorylase limit dextrin and Glc- β -CD.

Enzyme	Substrate	
	Phosphorylase limit dextrin (mg/mL)	Glc- β -CD (mg/mL)
Native-GDE	3.0	10.5
Recombinant-GDE	2.8	11.2

To various concentration of phosphorylase limit dextrin (1–15 mg/mL) or Glc- β -CD (5–50 mM) in 50 mM citrate buffer (pH 6.5) at 37°C was added 3 μ g of purified enzyme (total volume of 200 μ L). The reaction mixture was kept at 37°C for 10 min, and then heated in a boiling water bath, and an aliquot was used for glucose assay.

部位特異的変異型 GDE の作成

部位特異的変異を導入する標的アミノ酸残基を選定するために、酵母 GDE 遺伝子の塩基配列より仮定されるアミノ酸配列の分析を行った。酵母由来 GDE⁽¹⁰⁾ のアミノ酸配列は、ヒト骨格筋⁽¹⁵⁾およびウサギ骨格筋⁽¹⁶⁾ GDE のアミノ酸配列に対して約 30% の相同性しか示さなかったが、タンパクの N 末端半分に α -amylase family (glycosyl hydrolase family 13⁽¹⁷⁾) に共通して認められる四つの保存領域が存在していた (Fig. 5)。このうちの領域 II, III, IV に含まれる三つの酸性アミノ酸 (二つの Asp と一つの Glu) は、 α -amylase family に属する種々の酵素で触媒残基として同定されている^(18–22)。また、Jespersen ら⁽²³⁾ は、糖質関連酵素の一次および二次構造の分析からヒト骨格筋 GDE のこれに相当する三つの酸性アミノ酸残基は、transferase 活性に関与すると推定した。そこで、酵母 GDE では、これらに相当するアミノ酸残基は Asp535, Glu564 と Asp670 であることから、N 末端半分に存在するこれら三つのアミノ酸残基を transferase の触媒残基を調べるための標的アミノ酸残基として決定した。

一方、C 末端半分のアミノ酸配列は哺乳類の GDE^(15,16) 以外の糖質関連酵素のアミノ酸配列と有意の相同性を示さず、N 末端半分にみられたような保存領域の存在も確認できなかった。そこで、酵母 GDE の C 末端半分の α (1 $\rightarrow$ 6) グルコシド結合の加水分解を触媒し、その触媒残基がすでに同定されている *Bacillus cereus* 由来の oligo-1,6-glucosidase⁽²⁴⁾ と疎水性クラスター分析 (hydrophobic cluster analysis; HCA)⁽²⁵⁾ によって比較し、酵母 GDE の glucosidase 活性に関与する可能性のあるアミノ酸残基の検索を行った。その結

Enzyme	Consensus sequences				
	I	II	III	IV	
TAA	111-GMYLMVDVVANH	201-DGLRIDTV	226-YCIGEVLD	289-LGTFVENHD	
CGT	128-GIKIVIDFAPNH	224-DGIRVDAV	253-FTFGWEFL	320-QVTFIDNHD	
H-GDE	192-NVICITDVVYNH	504-QGVRLDNC	534-YVVAELFT	602-ALFMDITHD	
R-GDE	232-NVLICITDVVYNH	544-QGVRLDNC	574-YVVAELFT	642-ALFMDITHD	
Y-GDE	218-NMLSLTDIVFNH	530-DGFRIDYC	560-YVVAELFS	662-ALFMDCTHD	
		(Asp535)	(Glu564)	(Asp670)	

Fig. 5. Consensus sequences of α -amylase family in GDEs.

The amino acids were numbered from the N-terminal end. Conserved residues are in bold. Asterisks indicate the target amino acid residues on the yeast GDE for site-directed mutagenesis. TAA (Taka-amylase, α -amylase from *Aspergillus oryzae*), CGTase (cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*), H-GDE (Human muscle glycogen debranching enzyme), R-GDE (Rabbit muscle glycogen debranching enzyme), Y-GDE (glycogen debranching enzyme from *Saccharomyces cerevisiae* D-346).

果、*B. cereus* 由来の oligo-1,6-glucosidase の触媒部位と類似した疎水性クラスターのパターンを示す領域を酵母 GDE の C 末端半分に認め、しかもその領域には、*B. cereus* 由来の oligo-1,6-glucosidase の触媒残基である Asp119 と Glu255 に相当する酸性アミノ酸残基の Asp1086 と Asp1147 が存在した (Fig. 6)。また、この二つの Asp は、ヒト骨格筋、ウサギ骨格筋および酵母の三つの GDE のアミノ酸配列の間でよく保存されていた。これらの結果から、酵母 GDE の Asp1086 と Asp1147 を glucosidase 活性の触媒残基を分析するための標的アミノ酸残基として決定した。

GDE 遺伝子の部位特異的変異によって、Asp 535, Glu564, Asp670, Asp1086 および Asp1147 をそれぞれのアミド型に置換した五つの変異型 GDE を作成した。変異型 GDE は、いずれも野生型と同様に大腸菌 JM 105 において高率に発現され、 β -CD Sepharose 6 B アフィニティークロマトグラフィーのパターンにおいても野生型酵素と同様の挙動を示した。これは、変異型酵素の β -CD に対する親和性が野生型酵素と同じであることを示し、野生型酵素への変異の導入に伴う変異型酵素のコンフォメーションへの影響はなかったものと考えられる。精製した変異型酵素を SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動したところ、野生型酵素と同じ移動度に単一のタンパク質バンドとして確認された。これらの変異型酵素を、Asp535 を Asn に置換

Fig. 6. Hydrophobic cluster analysis (HCA) plots of oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus cereus* and C-terminal half of yeast GDE.

HCA plots were obtained from the DrawHCA server (<http://www.lmcp.jussieu.fr/~soyer/www-hca/hca-form.html>). Numbering starts from the first amino acid of the mature protein. The regions showing similarity at the HCA level are boxed. Dark gray circles indicate the catalytic residues of the oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus cereus* and light gray circles show the position corresponding to the putative active site residues of yeast GDE. The protein sequences are written on a duplicated α -helical net and the contour of clusters of hydrophobic residues is automatically drawn. The standard one-letter code for amino acids is used except for proline, glycine, serine and threonine, which are represented by $\star$, $\blacklozenge$, $\blacksquare$ and $\square$, respectively.

Fig. 7. HPLC analysis of the products formed by the action of wild-type and mutant enzymes on Glc₅- β -CD.

(a) HPLC profile of Glc₅- β -CD treated with mutant D535N (E564Q, D670N). A mixture (10 μ L) containing 10 mM Glc₅- β -CD, 25 mM citrate buffer (pH 6.5), and 3 μ g of enzyme was incubated at 37°C for 1 h (5 h for mutant D535N, E564Q and D670N). Ten microliter of the diluted sample (20 nmol as Glc₅- β -CD) was applied to HPLC. (b) HPLC profile of Glc₅- β -CD treated with mutant D1086N (D1147N). Symbols indicate as follows: W, wild-type enzyme; N-M, mutant enzyme D535 (E564Q, D670N); C-M, mutant enzyme D1086N (D1147N). Peaks: Glc, glucose; 0, β -CD; numbers 1-8 indicate the number of glucose residues on the branched chain of the cyclodextrin, Glc- β -CD, Glc₂- β -CD, Glc₃- β -CD and so on.

したものを D535N, Glu564 を Gln に置換したものを E564Q として、以下同様に D670N, D1086N, D1147N とそれぞれ命名した。

変異型 GDE の性質

変異型 GDE の transferase 活性および glucosidase 活

Fig. 8. HPLC analysis of the products from Glc- β -CD treated with wild-type or mutant enzymes.

Sample preparation and conditions for enzyme reaction are as described in Fig. 7 except that Glc- β -CD was used as the substrate. (a) HPLC profile of the sugar products released by the action of mutant enzyme D535N (D564Q, D670N); (b) HPLC profile of the sugar products released by the action of mutant enzyme D1086N (D1147N). Symbols were as described in Fig. 7.

Table 4. Activity of the mutant and wild-type GDEs.

Position	Enzyme	Mutation	Activity	
			Transferase ^a	Glucosidase ^b
	Wild-type	None	Active	Active
N-terminal half	D535N	Asp535-Asn	Inactive	Active
	E564Q	Glu564-Gln	Inactive	Active
	D670N	Asp670-Asn	Inactive	Active
C-terminal half	D1086N	Asp1086-Asn	Active	Inactive
	D1147N	Asp1147-Asn	Active	Inactive

^aActivity against Glc β -CD as a substrate. ^bActivity against Glc- β -CD as a substrate.

性を、6-*O*- α -maltopentaosyl cyclomaltoheptaose (Glc β -CD) と Glc- β -CD の 2 種の branched cyclodextrin を基質に用いて、それぞれの基質より酵素反応によって生じる糖を HPLC で分析して調べた。つまり、Glc β -CD を基質に用いた場合では transferase の maltose および maltotriose 単位の転移作用によって Glc γ - β -CD, Glc δ - β -CD と Glc ϵ - β -CD, Glc ζ - β -CD が生じ、Glc ζ - β -CD からさらに maltose が他に転移されて Glc- β -CD が生じると、glucosidase の作用によって glucose と β -CD が生成される。一方、Glc- β -CD を基質に用いた場合では transferase 活性に関係なく glucosidase 活性のみを調べることができる。

まず、Glc β -CD を基質に用いた transferase 活性の分析では、N 末端半分のアミノ酸に変異を導入した変異型酵素の D535N, E564Q, D670N で同様のクロマトグラムを示し、基質以外のピークを認めず trans-

Table 5. Kinetic parameters of transferase deficient GDE mutants.

Enzyme	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)
Wild-type	16.3	21.7
D535N	16.6	29.4
E564Q	15.9	21.4
D670N	19.3	26.6

Glucosidase activity was measured with glucosyl cyclomaltoheptaose Glc-cG γ as a substrate.¹⁰⁾ The reaction mixture (50 μ L) contained 50 mM citrate buffer (pH 6.5) and appropriate amount of Glc- β -CD. The reaction was initiated by the addition of 10 μ L of enzyme solution and was carried out at 37°C for 10 min. The enzyme reaction was terminated by 30 s boiling over a water bath. The released glucose was determined spectrophotometrically by monitoring the reduction of NADP using hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase.²⁷⁾ One unit of activity was defined as the amount of enzyme catalyzing the release of 1 μ mol glucose/min at 37°C, pH 6.5.

ferase 活性が欠失していた (Fig. 7a)。一方、C 末端半分のアミノ酸に変異を導入した変異型酵素の D1086N と D1147N は、transferase の転移反応によって Glc γ - β -CD, Glc δ - β -CD と Glc ϵ - β -CD, Glc ζ - β -CD が生じていたが、転移反応の産物の一つである Glc- β -CD の glucosidase による分解は認められなかった (Fig. 7b)。

次に Glc- β -CD を基質に用いた実験では、transferase 活性が欠損していた D535N, Glu564, D670N は野生型 GDE と同様に glucose と β -CD を生じ、glu-

Fig. 9. An illustration of the locality of the transferase and glucosidase on the yeast GDE.

Table 6. Kinetic parameters of glucosidase deficient GDE mutants.

Enzyme	K_m (mM)
Wild-type	10.8
D1086N	10.0
D1147N	10.6

Transferase activity was measured with maltopentaose as a substrate.²⁸⁾ The reaction mixture (25 μ L) containing varied concentration of maltopentaose in 40 mM phosphate buffer (pH 6.5) and 5 μ L of enzyme solution was incubated at 37°C for 10 min. The products formed were analyzed by HPLC as described above. Velocity of the transferase activity at 37°C, pH 6.5 was expressed as the sum of the products maltose and maltotriose (nmol/min/ μ L).

cosidase 活性を保持していた (Fig. 8a). 一方, transferase 活性を保持していた D1086N と D1147N は, Glc- β -CD にまったく作用せず glucosidase 活性が欠損していた (Fig. 8b). これらの結果をまとめると, 今回作成した五つの変異型酵素は, transferase 活性と glucosidase 活性のいずれか一方のみの活性を有していた (Table 4). つまり, 変異型酵素のうち, N 末端半分のアミノ酸に変異を導入した D535N, E564Q, D670N は glucosidase 活性のみを有し, C 末端半分のアミノ酸に変異を導入した D1086N と D1147N は, transferase 活性のみを有していた. この結果は, transferase の触媒部位が N 末端半分に存在し, glucosidase の触媒部位は C 末端半分に存在することを示す. そこで, それぞれの変異型酵素の保持された方の活性と野生型酵素の対応する活性との Kinetics を比較した. その結果, Table 5 に示すように transferase 欠損型酵素 (D535N, Glu564, D670N) の glucosidase 活性は, 野生型酵素の glucosidase 活性と同様の K_m 値および k_{cat} を示し,

glucosidase 欠損型酵素 (D1086N, D1147N) の transferase 活性は, 野生型酵素の transferase 活性と同様の K_m 値を示した (Table 6). これは, 酵母 GDE の transferase と glucosidase は互いに独立に機能していることを示す.

以上の結果より, 酵母 GDE の transferase と glucosidase の二つの活性は, N 末端半分と C 末端半分に別々に存在し, transferase の触媒残基は Asp535, Glu564 および Asp670 であり, glucosidase の触媒残基は Asp1086 と Asp1147 であると結論される (Fig. 9). 今回の研究によりヒトの遺伝病である GSDIII の酵素的理解と二機能酵素の有用性に関する研究が進展することが期待される.

最後に, 本研究を進めるにあたり貴重な酵素基質の恵与ならびにご教示いただいた鹿児島大学農学部名誉教授の檜作 進先生に深く感謝申し上げます. また, 実験の進行にご協力いただいた奈良県立医科大学の山本由香氏に感謝いたします.

文 献

- 1) E.Y.C. Lee and W.J. Whelan: Glycogen and starch debranching enzyme. in *The Enzymes*, P.D. Boyer, ed., 3rd Ed., vol. 5, Academic Press, New York, pp. 191-234 (1971).
- 2) C. Taylor, A.J. Cox, J.C. Kernohan and P. Cohen: Debranching enzyme from rabbit skeletal muscle; purification, properties and physiological role. *Eur. J. Biochem.*, **51**, 105-115 (1975).
- 3) E.J. Bates, G.M. Heaton, C. Taylor, J.C. Kernohan and P. Cohen: Debranching enzyme from rabbit skeletal muscle: Evidence for the location of two active centers on a single polypeptide chain. *FEBS Lett.*, **58**, 181-185 (1975).
- 4) F. Van Hoof and H.G. Hers: The subgroups of type III glycogenosis. *Eur. J. Biochem.*, **2**, 265-270 (1967).

- 5) Y.T. Chen and A. Burechell: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C.R. Scriver, A. L. Beaudet, W.S. Sly and D. Valle, eds., McGraw-Hill, New York, pp. 935-965 (1995).
- 6) B.K. Gillard and T.E. Nelson: Amylo-1,6-glucosidase/4- α -glucanotransferase; Use of reversible substrate model inhibitors to study the binding and active sites of rabbit muscle debranching enzyme. *Biochemistry*, **16**, 3978-3987 (1977).
- 7) W. Liu, N.B. Madsen, C. Braun and S.G. Withers: Reassessment of the catalytic mechanism of glycogen debranching enzyme. *Biochemistry*, **30**, 1419-1424 (1991).
- 8) S. Tabata and S. Hizukuri: Properties of yeast debranching enzyme and its specificity toward branched cyclodextrins. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 345-348 (1992).
- 9) 田端司郎, 中山章文, 檜作 進: 酵母 Debranching Enzyme について—分岐デキストリン, 高分子グルカンに対する作用—. *応用糖質科学*, **42**, 193-202 (1995).
- 10) A. Nakayama, K. Yamamoto and S. Tabata: High expression of glycogen-debranching enzyme in *Escherichia coli* and its competent purification method. *Protein Exp. Purif.*, **19**, 298-303 (2000).
- 11) A. Nakayama, K. Yamamoto and S. Tabata: Identification of the catalytic residues of bifunctional glycogen debranching enzyme. *J. Biol. Chem.*, **276**, 28824-28828 (2001).
- 12) H. Bussey *et al.*: The yeast genome directory: The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XVI. *Nature*, **387**, Suppl., 103-105 (1997).
- 13) P. Vretblad: Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl group: The cyclohexaamylose- β -amylase system. *FEBS Lett.*, **47**, 86-89 (1974).
- 14) A. Totsuka and C. Fukazawa: Affinity purification of β -amylases originating from plant using cyclomaltohexaose-immobilized Sepharose 6 B in the presence of ammonium sulfate. *Protein Exp. Purif.*, **4**, 333-336 (1993).
- 15) B.Z. Yang, J.H. Ding, J.J. Enghild, Y. Bao and Y.T. Chen: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding human muscle glycogen debranching enzyme. *J. Biol. Chem.*, **267**, 9294-9299 (1992).
- 16) W. Liu, M.L. De Castro, J. Takrama, P.T. Bilous, T. Vinayagamoorthy, N.B. Madsen and R.C. Bleackley: Molecular cloning, sequencing, and analysis of the cDNA for rabbit muscle glycogen debranching enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **306**, 232-239 (1993).
- 17) B. Henrissat: A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **280**, 309-316 (1991).
- 18) Y. Matsuura, M. Kusunoki, W. Harada and M. Kakudo: Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J. Biochem. (Tokyo)*, **95**, 697-702 (1984).
- 19) G. Buisson, E. Duee, R. Haser and F. Payan: Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO J.*, **6**, 3909-3916 (1987).
- 20) C. Klein and G.E. Schulz: Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **217**, 737-750 (1991).
- 21) C. Klein, J. Hollender, H. Bender and G.E. Schulz: Catalytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from X-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **31**, 8740-8746 (1992).
- 22) A. Nakamura, K. Haga, S. Ogawa, K. Kuwano, K. Kimura and K. Yamane: Functional relationships between cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* and alpha-amylases. Site-directed mutagenesis of the conserved two Asp and one Glu residues. *FEBS Lett.*, **296**, 37-40 (1992).
- 23) H.M. Jespersen, E.A. MacGregor, B. Henrissat, M.R. Sierks and B. Svensson: Starch and glycogen-debranching and branching enzymes: Prediction of structural features of the catalytic (α/β)₈-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J. Protein Chem.*, **12**, 791-805 (1993).
- 24) K. Watanabe, Y. Hata, H. Kizaki, Y. Katsube and Y. Suzuki: The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution; structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J. Mol. Biol.*, **269**, 142-153 (1997).
- 25) V.L. Lemesle, B. Henrissat, C. Gaboriaud, V. Bisseret, A. Morgat and J.P. Mornon: Hydrophobic cluster analysis: Procedures to derive structural and functional information from 2D-representation of protein sequences. *Biochimie*, **72**, 555-574 (1990).
- 26) U.K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 27) A. Kunst, B. Draeger and J. Ziegenhorn: *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmeyer, ed., 3rd Ed., vol. VI, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 163-172 (1984).
- 28) S. Tabata and Y. Dohi: An assay for oligo-(1,4)-(1,4)-glucantransferase activity in the glycogen debranching enzyme system by using HPLC with a pulsed amperometric detector. *Carbohydr. Res.*, **230**, 179-183 (1992).

【質 問】

江崎グリコ 栗木

1950年代に酵母抽出液中にアミロシンテースなる酵素が存在すると報告され、これが枝切り酵素である

と故小林恒夫先生らは証明したとなっております。その枝切り酵素は、今回の酵母由来の glycogen debranching enzyme でありイソアミラーゼあるいは他の枝切り酵素 (pullulanase あるいは limit dextrinase (R-enzyme)) でないと思われますか？

【答】

デンプンに酵母抽出液を加えると、ヨード呈色を増大することからアミロースを合成する酵素と考えられていたのを、小林先生がこの現象は枝切りであることを証明され、この酵素をイソアミラーゼと命名されました。この酵素が私達の今回の glycogen debranching enzyme と同じかどうかはわかりません。数年前のこのシンポジウムで発表しましたように (文献9) $\alpha(1 \rightarrow 6)$ 結合を枝切りする酵素を Direct と Indirect の debranching enzyme に分けるときに、これを識別する基質に branched cyclodextrin を用いると、酵母から抽出される酵素は indirect に属する酵素であるということです。また、*Pseudomonas* のイソアミラーゼや *Aerobacter* のプルラナーゼは direct debranching でありま

【質 問】

北大 千葉

Transferase の反応は、反応機構としては anomer 'retaining' 酵素であるが、amyl α -1,6-glucosidase の反応は、anomer 'inverting' 酵素である。したがって、anomer 'retaining' と 'inverting' 反応を一つの活性中心で触媒することはあり得ないので glucosidase の反応が生成する glucose の anomer 型を調べれば、活性中心が一つか否かは容易にわかるのではないか。

【答】

先生のおっしゃるように活性中心が一つでないことはわかります。現に酵母由来の glycogen debranching enzyme の 1,6-glucosidase 活性が anomer 'retaining' であることについては、旋光度計を用いた活性測定によって確かめています。また、ウサギ由来の glycogen debranching enzyme においては、同様の実験結果から活性中心が異なると結論しています。しかしながら、glycogen debranching enzyme における論点の一つは、活性中心のアミノ酸残基が一次構造上どこに存在するかであったため、今回示したような変異型酵素を作成して活性中心のアミノ酸残基を特定するとともに、こ

れらの離れて存在するアミノ酸残基が三次元構造をとったときにどのような位置関係にあるかに興味をもっています。

【質 問】

北大 松井

酵母や哺乳類の Glycogen debranching enzyme は、植物の Starch debranching enzyme のように一段階で枝切りするものは存在しないのですか。Starch debranching enzyme は、澱粉の生合成において、branching enzyme の作った余分な枝を切るというトレミングをしていることも知られている。Glycogen の合成における本酵素の関与はいかがでしょうか。

【答】

私の知る限りでは、酵母、哺乳類においては1段階でグリコーゲンの $\alpha(1 \rightarrow 6)$ 結合を切断する活性を有する酵素は1995年以降報告されていないと思います。Glycogen の合成に対する本酵素の関与については調べておりません。

【質 問】

食総研 林

一つの酵素分子の中にN末端ドメインとC末端ドメインが存在し、さらにN末端ドメインにトランスグリコシダーゼの活性中心が、C末端ドメインにはグリコシダーゼ活性中心が存在することが明確に提示されている。そこで、プロテアーゼ等により天然酵素を切断すると二つの活性を分けられないか。

あるいはN末端、あるいはC末端のデリーションミュータントにより単一活性の酵素が得られないか。

【答】

ウサギの酵素での報告はありましたが、あまりクリアカットにできていません。われわれもいくつかのプロテアーゼで分解してみましたが、いずれか一方の活性だけが残るような結果はでませんでした。

C末端側の deletion mutant を作成して glucosidase 活性を欠失した変異型酵素を作成しようと試みましたが、得られた変異型酵素を大腸菌中で発現させると不溶性になりましたのでそれ以上は検討しておりません。

(2001年11月20日受付)