[J. Appl. Glycosci., Vol. 49, No. 2, p. 211-219 (2002)]

糖質関連酵素化学シンポジウム

Family II に属する α -Glucosidase のプロトン供与体としての触媒アミノ酸残基

奥山正幸, 森 春英, 木村淳夫*, 千葉誠哉

北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目)

Catalytic Amino Acid Residue Providing Proton Donor in α -Glucosidase Family II

Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura* and Seiya Chiba

Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University
(Kita-9, Nishi-9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan)

cDNA encoding *Schizosaccharomyces pombe* α -glucosidase was cloned, and expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. The deduced amino acid sequence categorized under the α -glucosidase family II showed a high homology to those of α -glucosidase from molds, plants and mammals. By site direct mutagenesis, Asp481, Glu484, and Asp647 residues were confirmed to be essential in the catalytic reaction. The carboxyl group (-COOH) of the Asp647 residue was for the first time pointed out to be the candidate of proton donor in the α -glucosidase of family II. The carboxylate group (-COO⁻) of the Asp481 residue was assumed to be the secondary carboxylate group, which stabilize the oxocarbenium ion through electrostatic interaction, and the Asp481 was considered to be modified by the chemical modification with conduritol B epoxide. The role of the Glu484 residue, which was the third residue, was presumed to be to fix the reaction intermediate of substrates.

α -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20) は基質の非還元末端から α -グルコシド結合を加水分解し α -グルコースを遊離させるエキソ型の酵素である。 α -グルコシダーゼは微生物から哺乳類まで生物全般に広く存在しており¹⁾, 多くの一次構造が遺伝子クローニングにより明らかにされている。それらの情報から α -グルコシダーゼは二つのグループ, α -グルコシダーゼファミリー I, ファミリー II に分類できる²⁾。B. Henrissat の glycoside hydrolase の分類^{3,4)}ではファミリー I は glucoside hydrolase family 13, ファミリー II の酵素は glucoside hydrolase family 31 と相同性がある。

ファミリー I とファミリー II との間にアミノ酸配列の相同性は見られず, 触媒残基はそれぞれのファミリーで別個であると推測できる。したがって個別に構造と機能を研究せねばならない。これまでそれぞれのファミリーにおいて次のような研究がなされてきた。

ファミリー I は α -アミラーゼファミリー酵素群に共通して保存されている 4 領域を有している⁵⁾。 α -アミラーゼファミリーの酵素はこの 4 領域に, 触媒残基を含むことが知られており, ファミリー I の α -グルコシダーゼでも, これらの領域の中に触媒残基が含まれていると推定されている。実際に *Bacillus cereus* オリゴ-1,6-グルコシダーゼでは部位特異的変異により Asp 199, Glu 255, Asp 329 が触媒残基であることが示されており⁶⁾, 報告された立体構造には (β/α)₈ バレルの構造が存在する⁷⁾。一方でファミリー II の酵素では立体構造は未知であり, また α -アミラーゼファミリーの特徴も有しておらず, 構造と機能に関する情報は不十分である。唯一わかっている知見は自殺基質コンズリトール B エポキシド (CBE) により修飾される触媒残基の Asp だけである⁸⁻¹¹⁾。そこでわれわれはファミリー II に含まれる酵素 *Schizosaccharomyces pombe* α -グルコシダーゼ (SPGase) を用いて触媒残基の決定を計画した¹²⁾。そのために, まず SPGase

* Corresponding author (kimura@abs.agr.hokudai.ac.jp).

cDNA のクローニングを行い、*Saccharomyces cerevisiae* の系で発現させた。次に部位特異的変異の手法を用い、触媒反応に必須な酸性アミノ酸の決定を行った。加えてこの触媒残基近傍に保存されたトリプトファン残基の役割をその変異酵素の性質から考察した。

SPGase の一次構造

SPGase cDNA のクローニングを行い、一次構造の推定を行った (DDBJ accession number AB045751)¹²⁾。SPGase のアミノ酸配列は糸状菌、酵母起源の α -グルコシダーゼ¹³⁻¹⁸⁾ と高い相同性を示し、なかでも *Aspergillus niger*^{14,15)}、*Schwanniomyces occidentalis*¹³⁾ に対しそれぞれ 47% と 45% の相同性を示した。植物起源¹⁹⁻²³⁾ や哺乳類起源²⁴⁻²⁸⁾ の酵素とは 35% 前後の相同性を示した。以上のことは SPGase が α -グルコシダーゼファミリー II に属することを意味する。N 末端から約 150 残基、C 末端から約 90 残基は相同性が低いが、*Bacillus thermoamyloliquefaciens* α -グルコシダーゼ II²⁹⁾ で示されているファミリー II で共通の 7 個の保存領域を SPGase では 355-359, 437-440, 477-486, 644-648, 676-680, 696-705, 732-737 に保持している。また SPGase でアミノ酸残基 489-567 の配列は微生物 (カビ、酵母) 由来の α -グルコシダーゼで特有であり、その他のファミリー II の α -グルコシダーゼにはない配列である。

この特徴的な配列中に α -アミラーゼファミリーの保存領域 region 3 と region 4 様配列 (504-EPLV と 575-EQGNHD, それぞれ region 3 と 4 に相当) が認められ、さらに SPGase 配列中には region 1 様配列 (383-DLVSNH) も存在した。region 3 と 4 との相同域は *A. niger* や *A. oryzae* 酵素にも見出されている (*A. niger* P2 サブユニット, 255-EPGD と 316-YVINHD; *A. oryzae*, 523-EPGN と 583-YVINHV)。これらの領域が活性に関与するならば SPGase の His388, Glu504, His579, Asp580 は触媒作用や基質結合に重要なアミノ酸残基となる。後述の発現系を用いて H388N, E504V, H579S および D580N 変異酵素を作製し、活性を測定した。それぞれ野生型の 69, 182, 12, 167% の活性を有するため、これらのアミノ酸残基は触媒作用に必須ではなく SPGase と 2 種の糸状菌酵素はファミリー I に属しないと結論できた³⁰⁾。この結果は配列中に α -アミラーゼファミリーの保存領域が存在してもそれらが実際に機能しているか (あるいは α -アミラーゼファミリーに分類できるか) については部位特異的変異な

どのデータも含めて、慎重に判断せねばならないことを意味している。

Asn 結合型糖鎖のグルコース残基トリミング酵素である小胞体に局在するグルコシダーゼ II α -サブユニット (哺乳類起源)³¹⁾ と SPGase は約 27% の相同性を示した。 α -グルコシダーゼのほかにも glucosidase hydrolase family 31 に含まれる α -キシロシダーゼ³²⁾ と約 35% の相同性が、 α -1,4-グルカンリアーゼ³³⁾ と約 20% の相同性が認められた。 α -1,4-グルカンリアーゼは加水分解酵素ではないが、最近ではグルコシダーゼ II が副産物として 1,5-アンハイドロフラクトースを生成することが示され、加水分解反応と α -1,4-グルカンリアーゼの反応が似た機構で進行することが推定されている^{33,34)}。

S. cerevisiae での発現

SPGase の構造改変を自由に行えるような異種細胞での発現系の構築を試みた。最初は大腸菌での発現を試みたが活性を示す組換え酵素を得られなかったので、酵母の発現系を選んだ。大腸菌で活性型酵素が得られなかったことは、糖鎖が付加されないためにタンパク質が正確に折り畳まれないことを示唆する。同様にヒトリソソーム α -グルコシダーゼの場合も、大腸菌で発現された組換え酵素は抗体とは反応するが活性を持たない、という報告がある³⁵⁾。この例も糖鎖が活性型構造の形成に関与していることを示すが、植物²³⁾、糸状菌¹⁸⁾、細菌²⁹⁾ および始原菌³⁶⁾ のファミリー II 酵素で大腸菌発現に成功している例があることから

Table 1. Properties of native and recombinant α -glucosidases.

	Recombinant	Native
Specific activity	45 U/mg protein ^a	21 U/mg protein ^b
Optimum pH	4.5	4.5
pH stability	4-8	3-8
Temperature stability	$\leq 40^{\circ}\text{C}$	$\leq 40^{\circ}\text{C}$
Sugar content as mannose	55%	78%
Michaelis constant		
Maltose	8.3 mM	6.2 mM
Soluble starch	39.1 mM	33.5 mM
Phenyl α -glucoside	12.3 mM	9.7 mM
Isomaltose	12.9 mM	14 mM

^aProtein concentration was calculated with the assumption that $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 6.58. ^bProtein concentration was calculated on the basis of result that $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 1.74.

糖鎖の構造への寄与は普遍的なものではない。

S. cerevisiae での発現を発現ベクター pYES 2 を用いて行った¹²⁾。培養液 1 L あたり 16 mg の組換え酵素を無細胞抽出液中に得た。陰イオン交換、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、比活性 45 U/mg の電気泳動的に単一の標品取得した。Native 酵素と性質を比較するとほぼ同じであったが、比活性が異なっていた。これは糖含量の相違、すなわち酵素 1 mg 中の酵素分子数の違いによるものと判断できる (Table 1)。

触媒残基の推定

SPGase の活性発現に必須なアミノ酸残基の決定を行った¹²⁾。一般的にグリコシダーゼでは、活性中心に二つの酸性アミノ酸残基が保存されており、これらの残基が協同的に働く反応機構が提唱されている。そこでまず、酵素反応の速度に対する pH の影響を調べることで活性解離基の種類を確認した。それらの p*K*_a, 解離基の解離熱 ΔH_e , また反応を 20% メタノール中で行うことで活性解離基の解離に伴う荷電変化の型を推定した。これらの値から活性解離基は二つのカルボキシル基であると推定できた (Table 2)。

次に、触媒残基である酸性アミノ酸残基を決定するために、17 種類のファミリー II 酵素で保存された酸性アミノ酸残基 Asp218, Asp287, Asp355, Asp481, Glu484, Asp647, Glu714, Asp877 に変異を導入した変異酵素を *S. cerevisiae* で発現させ、無細胞抽出液中のマルターゼ活性を測定した (Table 3)。D287N, E714Q 変異酵素では野生型酵素の 70, 26% の活性を示したが D218N, D355N, D481N, E484Q, D647N, および D877N 変異酵素は野生型の 0.3, 0.1% にまで活性が低下した。このことから Asp218, Asp355, Asp481, Glu484, Asp647, Asp877 中の二つが活性に必須な酸性アミノ酸残基であると考え、次にこれらの変異酵素を精製しそのマルターゼ活性を調べた (Table 4)。D218N, D355N, および D877N は野生型の 0.06, 0.1, 0.2% の活性を示すのに対し、D481N, D481A, E484Q, E484A, および D647N, D647A は、野生型の 0.009, 0.001, 0.001, 0.002, 0.001, 0.0002% まで活性が大きく低下していることがわかった。よって Asp481, Glu484, および Asp647 を SPGase の活性に必須なアミノ酸残基と判断した。

残りの Asp218, Asp355, Asp877 も活性に必須ではないが、基質結合や触媒残基との相互作用に関与している可能性がある。たとえば 0.06% のマルターゼ活性を示す D218N は *p*-ニトロフェニル α -グルコシド分

Table 2. Characterization of essential ionizable groups of *S. pombe* α -glucosidase.

	Ionized group 1	Ionized group 2
p <i>K</i> _a (35°C)	3.9	5.6
ΔH_e (kcal/mol)	-3.6	2.9
ΔpK_a (in 20% methanol)	+0.1	+0.1
	-COO ⁻	-COOH

Table 3. Maltase activity of SPGase mutant in the cell-free extract.

Position and type of mutation	Maltase activity	
	(U/mg protein) ^a	(%) ^b
Wille-type	0.20	100
Control (<i>S. cerevisiae</i>) ^c	0.00026	0.13
218 D→N	0.0012	0.60
287 D→N	0.14	70
355 D→N	0.00060	0.30
355 D→E	0.00060	0.30
481 D→N	0.00040	0.20
481 D→E	0.00020	0.10
481 D→A	0.00032	0.16
484 E→Q	0.00026	0.13
484 E→D	0.018	9.0
484 E→A	0.00040	0.20
647 D→N	0.00026	0.13
647 D→E	0.00020	0.10
647 D→A	0.00016	0.08
676 D→N	0.0040	2.0
714 E→Q	0.052	26
877 D→N	0.00080	0.40

^a The protein concentration was measured by the Bradford method. ^b The activities were compared with the wild-type. ^c *S. cerevisiae* not carrying pYES/SPGase.

Table 4. Maltase and D-glucal hydration activity of purified SPGase mutant.

Position of mutation	Maltase activity		D-Glucal hydration (%) ^b
	(U/mg protein) ^a	(%) ^b	
Wild-type	45	100	100
218 D→N	2.9×10^{-2}	0.06	
355 D→N	4.8×10^{-2}	0.1	
877 D→N	7.0×10^{-2}	0.2	
481 D→N	4.1×10^{-3}	0.009	
D→A	4.4×10^{-4}	0.001	0.03 >
484 E→Q	6.4×10^{-4}	0.001	
E→A	8.2×10^{-4}	0.002	5.0
647 D→N	6.4×10^{-4}	0.001	
D→A	7.3×10^{-5}	0.0002	0.03 >

^a The protein concentration was calculated with assumption that $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 6.58. ^b The specific activities were compared with the wild-type.

解を野生型の 10% で行うため Asp218 は基質結合にかかわっていることが予想できる。

次に Asp481, Glu484, および Asp647 の役割について考察する。現在、アノマー保持型のグリコシダーゼで考えられている反応機構では、反応に直接関わる活性発現に必須な酸性アミノ酸残基は「基質のグリコシド結合の酸素原子にプロトンを供与する酸塩基触媒残基（プロトンドナー）」、「基質の還元末端側のグループがはずれた後に形成されるオキソカルベニウムイオンの安定化に関わる残基」の二つである。また反応機構において「オキソカルベニウムイオンを静電的相互作用のみにより安定化する経路」²⁾と「その後共有結合を形成する経路」^{37,38)}の二つが考えられているが、本プロシーディングス中では「共有結合を経ない機構」によるものとして考察する。

1. Asp481

Asp481 をオキソカルベニウムイオンを安定化する残基であると考えた。Asp481 はウサギ小腸シュークラゼ・イソマルターゼ複合体⁸⁾、ヒトリソソーム⁹⁾、テンサイ¹⁰⁾、*A. niger*¹¹⁾ α -グルコシダーゼで決定された自殺基質 CBE により修飾される Asp と相同な部位に存在する残基である。SPGase では失活の速度論的解析の結果から活性中心に位置するユニークな残基に CBE 対酵素が 1 対 1 で結合することで活性が消失する¹²⁾。この失活は相同な Asp481 に CBE が結合することで引き起こされていると考えられる。一方 CBE により修飾される Asp 残基のカルボキシル基は負に荷電していることが、失活反応の pH 依存性、速度論的解析の結果から推測されている¹¹⁾。すなわち Asp481 は触媒反応においてマイナスチャージし、オキソカルベニウムイオンの安定化に関わる残基であることが推定でき、変異酵素 D481N, D481A の活性が野生型の 0.009, 0.001% まで低下していることはこれを支持する。

2. Glu484

Glu484 の役割を変異酵素 E484A が加水分解活性を失うのに対し、D-グルカールの水和反応を触媒することから考察した。ファミリー II 型の α -グルコシダーゼは D-グルカールの二重結合を水和して 2-デオキシグルコースを生成することが知られている³⁹⁾。生成物のアノマー型が加水分解反応の生成物と同じく α -グルコシダーゼでは α -アノマー、グルコアミラーゼでは β -アノマーを形成することから水和反応は通常の酵素反応に準ずると考えられている。

SPGase も D-グルカールを水和し 2-デオキシグルコースを生成する。そこで加水分解反応で必須である

Asp481, Glu484, Asp647 の変異酵素 D481A, E484A および D647A を用いて水和活性を調べた。D481A, D647A は野生型酵素と比較して 0.03% 以下まで水和活性が低下するのに対し E484A は野生型の 5% 活性を残存していることがわかった。このことは E484A が基質にプロトンを供与できていることを示し、E484D がマルターゼ活性を示すことと併せて、Glu484 が酸塩基触媒残基ではないことを示唆する¹²⁾。また前項の結果からオキソカルベニウムイオンを安定化する残基でもないことがわかる。

E484Q, E484A が著しく加水分解活性を失うにもかかわらず、オキソカルベニウムイオンを安定化する残基でも酸塩基触媒残基でもないとするならば Glu484 の働きは何であろうか？E484A が D-グルカールの水和反応を触媒できたことと D-グルカールの構造から、Glu484 の役割を基質に歪みを与える、もしくはそれを固定するような働きをしているのでないかと推測した。グリコシダーゼでは基質のヘキソース環に歪みを与え、不安定な半イス型配座をとらせることで、基質のエントロピーを小さくしていると考えられている。例を挙げると *Pseudomonas stutzeri* マルトテトラオース生成型 α -アミラーゼでは α -アミラーゼファミリーで共通して保存されている region 4 の Asp294 (タカアミラーゼ A, Asp297) に基質の歪みを固定する働きがあることが示されている⁴⁰⁾。SPGase の場合は、触媒中心に進入してきた基質は Glu484 により歪みを与えられ、加水分解反応が正常に進行する (Fig. 1A)。しかし、変異酵素 E484A はその機能を失い、それ以降の反応が進まない (Fig. 1B)。一方、D-グルカールの場合、1 番炭素と 2 番炭素は二重結合であり、最初から半イス型に近い歪んだ構造となっているために変異酵素 E484A であっても D-グルカールを水和することが可能になる (Fig. 1C)。

前述のマルトテトラオース生成型 α -アミラーゼでは Asp294 のカルボキシル基がグルコース残基の 2 番炭素、3 番炭素の酸素原子を水素結合で固定する。SPGase でも同様な作用を行っていると考えられる。また Table 3 においてカルボキシル基を残す変異酵素 E484D が野生型の 9% の活性を残存していたことから、この位置におけるカルボキシル基の存在が重要であると判断できる。ヒトリソソーム α -グルコシダーゼでも SPGase の Glu484 に対応する Glu512 の変異酵素 E512K, E512Q, E512D のうち E512D だけが活性を残存するという報告があり、この結果と符合する⁴¹⁾。

3. Asp 647

変異酵素で著しく活性の低下が見られ活性に必須であると判断した3残基のうち Asp481 をオキソカルベニウムイオンの安定化に関わる残基, Glu484 を基質に歪みを与える, もしくはそれを固定するような働き

をしている残基であると推定した. 残る Asp647 が基質のグルコシド結合の酸素原子にプロトンを供与する酸塩基触媒残基の最有力候補である. Asp647 の近傍には基質の結合にかかわるとされる Trp 残基も保存されており, このことも Asp647 が触媒残基であること

A

B

C

Fig. 1. Assumed role of Glu484 in hydrolysis and hydration.

A, hydrolytic reaction by wild-type SPGase; B, hydrolytic reaction by E484A SPGase; C, hydration of D-glucal by E484A SPGase. In this panel, it is not elucidated that the carboxyl group of Glu484 is protonated or charged.

を支持する。

Asp647に隣接するAsn648はN型糖鎖で修飾されるモチーフAsn-His-Serにあたる。この周辺領域をいくつかのファミリーIIの酵素とアライメントすると*A. niger*, *A. oryzae*, *M. javanicus*, ラットSIのシュークラゼドメインで糖鎖付加モチーフが存在する。*A. niger* α -グルコシダーゼはその一次構造をエドマン法により解析しており、糖鎖の結合位置が明らかになっている。それによるとSPGaseのAsn648に対応するAsn415は糖鎖修飾が免れている⁴²⁾。SPGaseと*A. niger* α -グルコシダーゼの一次構造中の糖鎖付加モチーフの位置を比較すると、対応する位置に糖鎖が付加されており、したがってSPGaseのAsn648にも糖鎖が結合していない可能性が高い。すなわちAsp647の近傍において、糖鎖による立体障害は回避されていることが示唆され、このことはAsp647が触媒残基であることを支持している。

α -グルコシダーゼファミリーIIではこれまでヒトリソソーム α -グルコシダーゼの遺伝的欠損症の患者から得られたアミノ酸置換の情報⁴³⁻⁴⁵⁾から酸塩基触媒残基の候補としてAsp645が挙げられていた²⁾。しかしSPGaseでこれに対応するAsp676の変異酵素D676Nは活性を野生型の2%有していたこと¹²⁾、またヒトリソソーム α -グルコシダーゼでも発現に用いる宿主によっては変異酵素D645Eが野生型の33%の活性を残存する報告があり⁴⁶⁾、Asp645が酸塩基触媒残基では

ないことがわかった¹²⁾。しかし、Asp645を含む領域はglucoside hydrolases family 31のコンセンサスパターンとしてPROSITEでsignature region 2 (G-[AV]-D-[LIVMTA]-C-G-[FY]-x(3)-[ST]-x(3)-L-C-x-R-W-x(2)-[LV]-[GSA]-[SA]-F-x-P-F-x-R-[DN])にあげられるほど保存されている領域であり⁴⁷⁾、またヒトリソソーム α -グルコシダーゼでこの領域に含まれるGly 643のArgへの変異⁴⁸⁾、Cys647のTrpへの変異⁴⁹⁾は酵素活性を著しく低下させる報告がある。Asp645は触媒残基ではないが基質結合など重要な作用を行う可能性がある⁵⁰⁾。

本研究ではSPGaseの活性発現に必須なアミノ酸残基Asp481, Glu484およびAsp647を部位特異的変異によるアミノ酸置換で決定し役割を考察した。なかでもAsp 647はこれまでヒトリソソーム α -グルコシダーゼでもその変異は報告がなく、ファミリーIIに含まれる酵素ではじめて推定されたプロトンドナーである。Asp481, Glu484, Asp647を含む周辺の領域は α -グルコシダーゼファミリーIIにおいて高度に保存された領域であり、これらをファミリーIIの触媒アミノ酸残基を含む保存領域Region A, B (Table 5)として提唱した¹²⁾。

活性中心近傍の芳香族アミノ酸残基の役割

糖質関連酵素においてTrp残基は基質との結合に関わると考えられている。Region A, Bにはファミリー

Table 5. Two conservative regions, Regions A and B, including essential residues of SPGase^a.

Origin	Region A		Region B		Reference
<i>S. pombe</i>	476	<u>SGI</u> <u>W</u> <u>DM</u> <u>NEP</u> <u>SS</u> <u>F</u>	488	641 <u>GA</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>W</u>	12
<i>A. niger</i> (P 2 subunit)	219	<u>DG</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>DM</u> <u>SE</u> <u>V</u> <u>SS</u> <u>F</u>	231	408 <u>AG</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>W</u>	11,14,15
<i>A. oryzae</i>	487	<u>DG</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>DM</u> <u>AE</u> <u>V</u> <u>SS</u> <u>F</u>	499	654 <u>AG</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>W</u>	16
<i>C. tsukubaensis</i>	521	<u>SGI</u> <u>W</u> <u>LD</u> <u>M</u> <u>NEP</u> <u>SS</u> <u>F</u>	533	724 <u>TG</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>W</u>	17
<i>M. javanicus</i>	425	<u>DGL</u> <u>W</u> <u>ID</u> <u>M</u> <u>NEP</u> <u>AS</u> <u>F</u>	437	561 <u>VGH</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>W</u>	18
<i>S. occidentalis</i>	465	<u>DGI</u> <u>W</u> <u>AD</u> <u>M</u> <u>NE</u> <u>V</u> <u>SS</u> <u>F</u>	477	632 <u>TG</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>AD</u> <u>W</u>	13
Sugar beet	464	<u>DGI</u> <u>W</u> <u>ID</u> <u>M</u> <u>NE</u> <u>AS</u> <u>NF</u>	476	562 <u>TA</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>NA</u> <u>AT</u> <u>W</u>	10,21
Barley	432	<u>DGL</u> <u>W</u> <u>ID</u> <u>M</u> <u>NE</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>NF</u>	444	528 <u>TAY</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>NA</u> <u>AT</u> <u>W</u>	19
Spinach	460	<u>DGL</u> <u>W</u> <u>ID</u> <u>M</u> <u>NE</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>NF</u>	472	558 <u>TA</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>NA</u> <u>AT</u> <u>W</u>	22
Human	513	<u>DGM</u> <u>W</u> <u>ID</u> <u>M</u> <u>NE</u> <u>PS</u> <u>NF</u>	525	610 <u>AG</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>SS</u> <u>W</u>	9,24
Rabbit (sucrase)	1389	<u>DGL</u> <u>W</u> <u>ID</u> <u>M</u> <u>NEP</u> <u>SS</u> <u>F</u>	1401	1494 <u>AG</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>AR</u> <u>W</u>	8,25
Rabbit (isomaltase)	500	<u>DGL</u> <u>W</u> <u>ID</u> <u>M</u> <u>NE</u> <u>V</u> <u>SS</u> <u>F</u>	512	598 <u>AA</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>AT</u> <u>W</u>	8,25
Human (sucrase)	1389	<u>DGL</u> <u>W</u> <u>ID</u> <u>M</u> <u>NEP</u> <u>SS</u> <u>F</u>	1401	1494 <u>GG</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>AR</u> <u>W</u>	26
Human (isomaltase)	500	<u>DGL</u> <u>W</u> <u>ID</u> <u>M</u> <u>NE</u> <u>V</u> <u>SS</u> <u>F</u>	512	598 <u>AA</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>AS</u> <u>W</u>	26
Rat (sucrase)	1394	<u>DGL</u> <u>W</u> <u>ID</u> <u>M</u> <u>NE</u> <u>V</u> <u>SS</u> <u>F</u>	1406	1506 <u>GG</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>AT</u> <u>W</u>	27
Rat (isomaltase)	509	<u>DGL</u> <u>W</u> <u>ID</u> <u>M</u> <u>NE</u> <u>V</u> <u>SS</u> <u>F</u>	521	609 <u>AN</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>AS</u> <u>W</u>	27
Consensus		dG W <u>DM</u> E s F		hW <u>GD</u> n W	

^aAmino acid residues which are identical to all or the majority of the sequences are indicated by capitals and lower-case letters, respectively. Asp identified to be labelled by CBE are underlined. Bold Asp and Glu are interpreted as critical residues for catalysis. The N-glycosylated motif, NXS (or T), is double-underlined.

II の酵素で高度に保存されているアミノ酸残基が多く存在しており, その中には Trp479, Trp 644, Trp652 が含まれる. そこでこれらの変異酵素 W479A, W644A, W652A を作製し, 酵素作用に対する影響を調べた.

その結果すべての変異酵素で k_0 , k_0/K_m が大きく減少した. このことは三つの Trp 残基が活性に必須ではないが重要な働きをしていること, すなわち基質との結合や遷移状態の安定化に関わっていることなどが考えられた. K_m 値をそれぞれの変異酵素で個別に見ると W479A では二糖類, 三糖類に対して値が大きくなり, Trp479 がサブサイト 2 付近で基質の結合に関わっていることが予想できた. W644A で K_m が増加するのは三糖類, 四糖類に対してであるため Trp644 はサブサイト 3 付近で基質との結合に関わっていると考えた. W652A では K_m には大きな変化が見られず, k_0/K_m に大きな変化が見られたことから Trp652 は遷移状態での安定性に関わっているものと想像できる. また W652A では酸性側の pK_a , 最適 pH がアルカリ側に移動していた. 酸性側の pK_a はオキソカルベニウムイオンの安定化に関わる残基 (Asp 481) のプロトン解離によると考えると Trp652 は Asp481 の近傍に存在し, 作用している可能性がある. しかしこれらの Trp 残基の機能を明らかにするには立体構造の情報が必要である.

ま と め

SPGase の変異酵素を作製することにより, 活性に必要な酸性アミノ酸残基やその近傍に保存された Trp 残基についてその役割を調べた. Asp481 をオキソカルベニウムイオンの安定化に関わる残基と推定した. Asp647 を触媒反応においてプロトン供与体として働く酸塩基触媒残基, Glu484 は基質に歪みを与える役割を担っている残基と推定した. Trp479 はサブサイト 2, Trp644 はサブサイト 3 付近で基質結合に関わっていると考えられた.

文 献

- 1) S. Chiba: α -glucosidase. in *Handbook of Amylases and Related Enzymes*, The Amylase Research Society of Japan, ed., Pergamon Press, Oxford, pp. 104–116 (1988).
- 2) S. Chiba: Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1233–1239 (1997).
- 3) B. Henrissat and G. Davies: Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 637–644 (1997).
- 4) B. Henrissat: Glycosidase families. *Biochem. Soc. Trans.*, **26**, 153–156 (1998).
- 5) H. Takata, T. Kuriki, S. Okada, Y. Takesada, M. Iizuka, N. Minamiura and T. Imanaka: Action of neopullulanase: Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at α -(1 $\rightarrow$ 4)- and α -(1 $\rightarrow$ 6)-glucosidic linkages. *J. Biol. Chem.*, **267**, 18447–18452 (1992).
- 6) K. Watanabe, K. Miyake and Y. Suzuki: Identification of catalytic and substrate-binding site residues in *Bacillus cereus* ATCC 7064 oligo-1,6-glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2058–2064 (2001).
- 7) 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).
- 8) A. Quaroni and G. Semenza: Partial amino acid sequences around the essential carboxylate in the active sites of the intestinal sucrase-isomaltase complex. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3250–3253 (1976).
- 9) M.M.P. Hermans, M.A. Kroos, J. van Beeumen, B. A. Oostra and A.J.J. Reuser: Human lysosomal α -glucosidase: Characterization of the catalytic site. *J. Biol. Chem.*, **266**, 13507–13512 (1991).
- 10) S. Iwanami, H. Matsui, A. Kimura, H. Ito, H. Mori, M. Honma and S. Chiba: Chemical modification and amino acid sequence of active site in sugar beet α -glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 459–463 (1995).
- 11) A. Kimura, M. Takata, Y. Fukushi, H. Mori, H. Matsui and S. Chiba: A catalytic amino acid and primary structure of active site in α -glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1091–1098 (1997).
- 12) M. Okuyama, A. Okuno, N. Shimizu, H. Mori, A. Kimura and S. Chiba: Carboxyl group of residue Asp 647 as possible proton donor in catalytic reaction of α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2270–2280 (2001).
- 13) H.Y. Naim, T. Niermann, U. Kleinhans, C.P. Hollenberg and A.W.M. Strasser: Striking structural and functional similarities suggest that intestinal sucrase-isomaltase, human lysosomal α -glucosidase and *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase are derived from a common ancestral gene. *FEBS Lett.*, **294**, 109–112 (1991).
- 14) A. Kimura, M. Takata, O. Sakai, H. Matsui, N. Takai, T. Takayanagi, I. Nishimura, T. Uozumi and S. Chiba: Complete amino acid sequence of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1368–1370 (1992).
- 15) A. Nakamura, I. Nishimura, A. Yokoyama, D.G. Lee, M. Hidaka, H. Masaki, A. Kimura, S. Chiba and T. Uozumi: Cloning and sequencing of an α -glucosidase gene from *Aspergillus niger* and its ex-

- pression in *A. nidulans*. *J. Biotechnol.*, **53**, 75–84 (1997).
- 16) T. Minetoki, K. Gomi, K. Kitamoto, C. Kumagai and G. Tamura: Nucleotide sequence and expression of α -glucosidase-encoding gene (*agdA*) from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1516–1521 (1995).
 - 17) B.T. Kinsella, S. Hogan, A. Larkin and B.A. Cantwell: Primary structure and processing of the *Candida tsukubaensis* α -glucosidase: Homology with the rabbit intestinal sucrase-isomaltase complex and human lysosomal α -glucosidase. *Eur. J. Biochem.*, **202**, 657–664 (1991).
 - 18) M. Sugimoto and Y. Suzuki: Molecular cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding α -glucosidase from *Mucor javanicus*. *J. Biochem.*, **119**, 500–505 (1996).
 - 19) B.K. Tibbot and R.W. Skadsen: Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. *Plant Mol. Biol.*, **30**, 229–241 (1996).
 - 20) T. P. Frandsen, F. Lok, E. Mirgorodskaya, P. Roepstorff and B. Svensson: Purification, enzymatic characterization, and nucleotide sequence of a high-isoelectric-point α -glucosidase from barley malt. *Plant Physiol.*, **123**, 275–286 (2000).
 - 21) H. Matsui, S. Iwanami, H. Ito, H. Mori, M. Honma and S. Chiba: Cloning and sequencing of a cDNA encoding α -glucosidase from sugar beet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 875–880 (1997).
 - 22) M. Sugimoto, S. Furui and Y. Suzuki: Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding α -glucosidase from spinach. *Plant Mol. Biol.*, **33**, 765–768 (1997).
 - 23) M.A. Taylor, H.A. Ross, D. McRae, F. Wright, R. Viola and H.V. Davies: Copy-DNA cloning and characterisation of a potato α -glucosidase: Expression in *Escherichia coli* and effects of down-regulation in transgenic potato. *Planta*, **213**, 258–264 (2001).
 - 24) L.H. Hoefsloot, M.H. Westerveld, M.A. Kroos, J. van Beeumen, A.J.J. Reuser and B.A. Oostra: Primary structure and processing of lysosomal α -glucosidase; homology with the intestinal sucrase-isomaltase complex. *EMBO J.*, **7**, 1697–1704 (1988).
 - 25) W. Hunziker, M. Spiess, G. Semenza and H.F. Lodish: The sucrase-isomaltase complex: Primary structure, membrane-orientation, and evolution of a stalked, intrinsic brush border protein. *Cell*, **46**, 227–234 (1986).
 - 26) F. Green, Y. Edwards, H.P. Hauri, S. Povey, M.W. Ho, M. Pinto and D. Swallow: Isolation of a cDNA probe for a human jejunal brush-border hydrolase, sucrase-isomaltase, and assignment of the gene locus to chromosome 3. *Gene*, **57**, 101–110 (1987).
 - 27) G. Chandrasena, D.E. Osterholm, I. Sunitha and S.J. Henning: Cloning and sequencing of a full-length rat sucrase-isomaltase-encoding cDNA. *Gene*, **150**, 355–360 (1994).
 - 28) B. L. Nichols, J. Eldering, S. Avery, D. Hahn, A. Quaroni and E. Sterchi: Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning: Homology to sucrase-isomaltase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3076–3081 (1998).
 - 29) S. Kashiwabara, S. Azuma, M. Tsuduki and Y. Suzuki: The primary structure of the subunit in *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP 1071 molecular weight 540,000 homohexameric α -glucosidase II belonging to the glycosyl hydrolase family 31. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1379–1393 (2000).
 - 30) 奥山正幸, 奥野 愛, 森 春英, 木村淳夫, 千葉誠哉: *Schizosaccharomyces pombe* α -Glucosidase の活性発現に必須な酸性アミノ酸残基の決定. 応用糖質科学 (講演要旨), **46**, 335 (1999).
 - 31) C. W. Arendt and H. L. Ostergaard: Identification of the CD 45-associated 116-kDa and 80-kDa proteins as the α - and β -subunits of α -glucosidase II. *J. Biol. Chem.*, **272**, 13117–13125 (1997).
 - 32) J. Sampedro, C. Sieiro, G. Revilla, T. Gonzalez-Villa and I. Zarra: Cloning and expression pattern of a gene encoding an α -xylosidase active against xyloglucan oligosaccharides from Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **126**, 910–920 (2001).
 - 33) K. Bojsen, S. Yu, K. M. Kragh and J. Marcussen: A group of α -1,4-glucan lyases and their genes from the red alga *Gracilaria lemaneiformis*: Purification, cloning, and heterologous expression. *Biochim. Biophys. Acta*, **1430**, 396–402 (1999).
 - 34) K. Hirano, M. Ziak, K. Kamoshita, Y. Sukenaga, S. Kametani, Y. Shiga, J. Roth and H. Akanuma: *N*-linked oligosaccharide processing enzyme glucosidase II produces 1,5-anhydrofructose as a side product. *Glycobiology*, **10**, 1283–1289 (2000).
 - 35) F. Martiniuk, S. Tzall and A. Chen: Recombinant human acid α -glucosidase generated in bacteria: Antigenic, but enzymatically inactive. *DNA Cell Biol.*, **11**, 701–706 (1992).
 - 36) M. Rolfmeier, C. Haseltine, E. Bini, A. Clark and P. Blum: Molecular characterization of the α -glucosidase gene (*malA*) from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.*, **180**, 1287–1295 (1998).
 - 37) C.S. Rye and S. G. Withers: Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 573–580 (2000).
 - 38) S.S. Lee, S. He and S.G. Withers: Identification of the catalytic nucleophile of the Family 31 α -glucosidase from *Aspergillus niger* via trapping of a 5-fluoroglycosyl-enzyme intermediate. *Biochem. J.*, **359**, 381–386 (2001).
 - 39) S. Chiba, C.F. Brewer, G. Okada, H. Matsui and E.J. Hehre: Stereochemical studies of D-glucal hydration by α -glucosidases and exo- α -glucanases: Indication of plastic and conserved phases in catalysis by glycosidases. *Biochemistry*, **27**, 1546–1569 (1988).
 - 40) K. Hasegawa, M. Kubota and Y. Matsuura: Roles of

- catalytic residues in α -amylases as evidenced by the structures of the product-complexed mutants of a maltotetraose-forming amylase. *Protein Eng.*, **12**, 819-824 (1999).
- 41) M.M.P. Hermans, E. de Graaff, M.A. Kroos, H.A. Wisselaar, B.A. Oostra and A.J.J. Reuser: Identification of a point mutation in the human lysosomal α -glucosidase gene causing infantile glycogen disease type II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 919-926 (1991).
- 42) T. Takayanagi, A. Kimura, S. Chiba and K. Ajisaka: Novel structures of N-linked high-mannose type oligosaccharides containing α -D-galactofuranosyl linkages in *Aspergillus niger* α -D-glucosidase. *Carbohydr Res.*, **256**, 149-158 (1994).
- 43) C.Y. Lin, B. Hwang, K. J. Hsiao and Y. R. Jin: Pompe's disease in Chinese and prenatal diagnosis by determination of α -glucosidase activity. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **10**, 11-17 (1987).
- 44) M.M.P. Hermans, E. de Graaff, M.A. Kroos, H.A. Wisselaar, R. Willemsen, B.A. Oostra and A.J.J. Reuser: The conservative substitution Asp-645 Glu in lysosomal α -glucosidase affects transport and phosphorylation of the enzyme in an adult patient with glycogen-storage disease type II. *Biochem. J.*, **289**, 687-693 (1993).
- 45) C.Y. Lin and J. J. Shieh: Identification of A *de novo* point mutation resulting and in infantile form of Pompe's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 886-893 (1991).
- 46) F. Martiniuk, M. Mehler, M. Bodkin, S. Tzall, K. Hirschhorn, N. Zhong and R. Hirschhorn: Identification of a missense mutation in an adult-onset patient with glycogenosis type II expressing only one allele. *DNA Cell Biol.*, **10**, 681-687 (1991).
- 47) A. Bairoch, P. Bucher and K. Hofmann: The PROSITE database, its status in 1995. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 189-196 (1996).
- 48) M.M. Hermans, M.A. Kroos, E. de Graaff, B.A. Oostra and A.J. Reuser: Two mutations affecting the transport and maturation of lysosomal α -glucosidase in an adult case of glycogen storage disease type II. *Hum. Mutat.*, **2**, 268-273 (1993).
- 49) M. L. Huie, A.S. Chen, S.S. Brooks, A. Grix and R. Hirschhorn: A *de novo* 13 nt deletion, a newly identified C647W missense mutation and a deletion of exon 18 in infantile onset glycogen storage disease type II (GSDII). *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 1081-1087 (1994).
- 50) T.P. Frandsen and B. Svensson: Plant α -glucosidases of the glycoside hydrolase family 31: Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Mol. Biol.*, **37**, 1-13 (1998).

【質 問】

江崎グリコ 栗木

1) α -アミラーゼファミリーの触媒機構として私たちは Region 3 の Glu (プロトドナー) と Region 4 の Asp が協調して加水分解に使われると推定していますがファミリー I に属する α -グルコシダーゼにおいても Region 4 に存在する Asp は今回の Glu 484 と同様にグルコースのコンフォメーションの distortion に使われていると考えられますか。

2) この Glu 484 の働きは松浦先生が G 4-amylase で提案されている Region 4 の Asp に対応する働き (C_2 -OH および C_3 -OH との水素結合) と同様に考えてよろしいですか？

3) Asp 481 を nucleophile と呼ぶことについて、CBE 修飾のときは確かに Asp 481 は nucleophile ですが oxocarbenium ion 中間体を経て進行する反応モデルにおいて「nucleophile」と呼ぶことは正しいでしょうか。

【答】

1) SPGase の Glu 484 同様に、ファミリー I の酵素でも Region 4 に存在する Asp が基質の歪みに関わっているかどうかは今のところわかりません。ファミリー I 酵素の Region 4 に存在する Asp 残基の変異酵素を作製し、D-グルカールのようなすでに歪んだものを基質として、反応が進行するか否かを確認したいと思います。

2) 考え方としては同じですが、ファミリー II の酵素は立体構造が求められていませんので、どのようにグルコース環を捕捉しているかはわかりません。

3) ご指摘のとおり、静電的作用で中間体を安定化している場合、これに関わる残基を求核残基、nucleophile と呼ぶのは正しくないと思います。本プロシーディングス中では求核残基を改め、「オキシカルベニウムイオンの安定化に関わる残基」といたしました。ただし、共有結合とイオン結合はカルボキシル基の酸素原子とグルコース残基のアノメリック炭素の距離と考えることもでき、結合は共有結合とイオン結合の中間的なものになる可能性もあります。その場合、松浦先生のご指摘にもありますが、両者 (静電効果残基と求核残基) が明確に区別できないことになります。

(2001 年 11 月 22 日受付)