(2000).

- 4) 横山峰幸：植物の生長調節, **40**, 90 (2005).
- 5) M. Yokoyama, S. Yamaguchi, T. Iida, A. Suda, T. Saeda, T. Miwa, K. Ujihara & J. Nishio: *Plant Biotech.*, **22**, 201 (2005).
- 6) 吉原照彦：化学と生物, **41**, 660 (2003).
- 7) F.-J. Kong, J. Abe, K. Takahashi, H. Matsuura, T. Yoshihara & K. Nabeta: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,

336, 1150 (2005).

- 8) M. Suzuki, S. Yamaguchi, T. Iida, I. Hashimoto, H. Teranishi, M. Mizoguchi, F. Yano, Y. Todoroki, N. Watanabe & M. Yokoyama: *Plant Cell Physiol.*, **44**, 35 (2003).

(吉田茂男, (独)理化学研究所植物科学研究センター, 大阪大学大学院工学研究科)

糖質ホスホリラーゼの立体構造からわかる加水分解酵素との進化的関連 —筋縄ではいかないグリコシダーゼの反応機構と分類

少し古い教科書では、リゾチームの反応機構は長寿命のオキシカルベニウムイオン中間体の存在を前提に書かれているが、現在では共有結合中間体を経る機構⁽¹⁾がほぼ確実視されていることはご存知だろうか？（『ヴォート生化学・第3版』では更新されている）アミラーゼもセルラーゼも活性中心は2つのグルタミン酸またはアスパラギン酸残基だが、それはグリコシド結合を分解する酵素（グリコシダーゼ）すべてに当てはまるのだろうか？

糖質に作用する酵素の全体を整理・分類するという野心的な作業を行なっているデータベースが CAZy (Carbohydrate-Active enZymes, <http://www.cazy.org>) である。CAZy では、糖加水分解酵素を中心とした GH (Glycoside Hydrolase), 合成酵素（糖核酸エステル転移酵素）を中心とした GT (Glycosyl Transferase) など、いくつかのクラスが用意されている。たとえば、セルラーゼ系やアミラーゼ系の酵素群はそれぞれ GH1~GH12 と GH13~GH15 に、リゾチームは GH22~GH25 に分類されており、1991 年の時点で 35 のファミリーが登録された⁽²⁾。以降は新たに発見された順にファミリー番号が振られている。グリコシド結合を加水分解する酵素の大部分は活性中心に2つの酸性残基をもち、それらが関与する標準的な2つの反応機構（アノマー保持型の二重置換機構または反転型の単一置換機構）のいずれかに従うが、そこに当てはまらない例外的な酵素も無視できないほど多い。基質自身が求核性触媒となる GH18 キチナーゼや GH20 β -ヘキソサミニダーゼ、チロシン残基が求核性触媒である GH33/34 シアリダーゼなどは比較的名な例であろう。さらに近年、NAD⁺ 依存の酸化還元反応を経るという驚くべき反応機構が GH4 酵素で明らかにされ⁽³⁾、反転型酵素の中には一般塩基触媒が酸性残基ではないと考えられているものも複数ある（GH48,

GH95 など）⁽⁴⁾。

さて、加水分解酵素でも合成酵素でもない第3の酵素が、糖質ホスホリラーゼである。糖質ホスホリラーゼはグリコシド結合にリン酸を付加して切断し糖リン酸を生成する、いわゆる加リン酸分解を行なう。ちなみに、この反応は可逆的であるため、2種類のホスホリラーゼをカップリングすることにより多糖を工業的に生産する技術が開発されている⁽⁵⁾。この酵素の行なう反応は EC 分類では転移反応 (2.4.1.-) だが、CAZy 分類では GH, GT の2つのクラスにまたがっており面倒な存在になっている。糖質ホスホリラーゼの中で最も有名なグリコゲンホスホリラーゼは GT35 に分類されるが、それには理由がある。活性中心に補酵素ピリドキサルリン酸をもち、反応産物グルコース 1-リン酸と並んだ状態で、GT 酵素の基質 UDP-グルコースとよく似た形で結合する⁽⁶⁾。また、その全体構造（フォールド）も他の多くの GT 酵素とよく似ている。

GT35 に続く GT36 には、セロビオースホスホリラーゼやキトビオースホスホリラーゼなどの β 結合を切断する一群の酵素が分類されていた。しかし、2004 年にその立体構造が解明されると、加水分解酵素である GH15 グルコアミラーゼや、GH65 マルトースホスホリラーゼとの構造的・機能的な類似性が明らかになり、新設された GH94 への再分類が決定した⁽⁷⁾。CAZy にはいくつか欠番ファミリーがあるが、GT36 はこのような経緯で削除されたわけである。

表1に示すように、糖質ホスホリラーゼは保持 GT 型、保持 GH 型、反転 GH 型の3種に大別される。保持 GH 型であるスクロースホスホリラーゼは α -アミラーゼと同じ GH13 に分類されているが、保持型加水分解酵素の二重置換機構の2段階目（脱グリコシル化）で水の代

表 1 ■ CAZy データベースにおける糖質ホスホリラーゼ

タイプ	ファミリー	フォールド	酵素 (α または β 結合に作用)
保持 GT 型	GT4	Rossmann $\times 2$	トレハロースホスホリラーゼ (α)
	GT35	Rossmann $\times 2$	グリコーゲンホスホリラーゼ (α)
			スターチホスホリラーゼ (α)
保持 GH 型	GH13	(α/β) ₈ バレル	スクロースホスホリラーゼ (α)
反転 GH 型	GH65	(α/α) ₆ バレル	マルトースホスホリラーゼ (α)
			トレハロースホスホリラーゼ (α)
			コージビオースホスホリラーゼ (α)
	GH94 (旧 GT36)	(α/α) ₆ バレル	セロビオースホスホリラーゼ (β)
			キトビオースホスホリラーゼ (β)
			セロデキストリンホスホリラーゼ (β)
	GH112	(α/β) ₈ バレル	ラクト-N-ビオースホスホリラーゼ (β)
			ガラクト-N-ビオースホスホリラーゼ (β)

図 1 ■ 反転 GH 型ホスホリラーゼと反転型加水分解酵素の反応機構

β 結合型の基質に作用する GH94 セロビオースホスホリラーゼ (左) と、 α 結合型の基質に作用する GH15 グルコアミラーゼ (右) の推定反応機構を比較した。ここに示した位置関係は両酵素で大体重なり合う。

わりにリン酸が求核攻撃を行なうと考えられている。一方、反転 GH 型ホスホリラーゼの反応機構は反転型加水分解酵素とよく似ており、保存されている一般酸触媒残基は同様に働く (図 1)。反転型加水分解酵素では、糖のアノマー炭素に求核攻撃を行なうのは一般塩基触媒残基に活性化された水分子であるが、反転 GH 型ホスホリラーゼでは同じ場所に位置するリン酸イオンであり、一般塩基触媒残基を必要としない。 α 結合に作用する GH15 や GH65 と、 β 結合に作用する GH94 の活性部位が似ていることは一見奇妙である。しかし、基質のほうをよく見てみると、非還元末端側の糖がひっくり返っていることがわかる。このような事実から、 β 結合に作用する反転 GH 型ホスホリラーゼと、 α 結合に作用する反転型加水分解酵素が共通の進化的起源をもつ、という仮説が提唱されている⁽⁸⁾。このような基質のグリコシド結合の回転により、 β 結合に作用する保持型加水分解酵素 (GH1 β -グルコシダーゼなど) と、 α 結合に作用する反転

型加水分解酵素 (GH14 β -アミラーゼなど) の間の進化的関連も推測されている⁽⁸⁾。

本稿執筆時に最新の GH ファミリー GH112 が登録された。ここにはヒトのミルクオリゴ糖やムチン糖鎖の構成二糖に作用するホスホリラーゼが分類されている。このファミリーの立体構造が GH 型であるという情報 (日高ら、未発表) に基づいて GH クラスに振り分けられたと見られる。一方で、ペプチドグリカン合成に関わる糖転移酵素はリゾチームとよく似た立体構造をもち、反応機構も反転 GH 型ホスホリラーゼと似通っているにもかかわらず、GT51 となっている⁽⁹⁾。今後、糖質関連酵素の知見が深まるにつれ、さらに「例外」が増えて分類は混沌としていくのだろうが、そのほうがより「生物らしい」状況かも知れない。

- 1) D. J. Vocadlo, G. J. Davies, R. Laine & S. G. Withers: *Nature*, **412**, 835 (2001).
- 2) B. Henrissat: *Biochem. J.*, **280**, 309 (1991).
- 3) V. L. Y. Yip & S. G. Withers: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 147 (2006).
- 4) M. Nagae, A. Tsuchiya, T. Katayama, K. Yamamoto, S. Wakatsuki & R. Kato: *J. Biol. Chem.*, **282**, 18497 (2007).
- 5) 大段光司, 鷹羽武史, 栗木 隆: 化学と生物, **44**, 430 (2006).
- 6) S. G. Withers, W. W. Wakarchuk & N. C. J. Strynadka: *Chem. Biol.*, **9**, 1270 (2002).
- 7) M. Hidaka, Y. Honda, M. Kitaoka, S. Nirasawa, K. Hayashi, T. Wakagi, H. Shoun & S. Fushinobu: *Structure*, **12**, 937 (2004).
- 8) M. R. Stam, E. Blanc, P. M. Coutinho & B. Henrissat: *Carbohydr. Res.*, **340**, 2728 (2005).
- 9) A. L. Lovering, L. H. de Castro, D. Lim & N. C. J. Strynadka: *Science*, **315**, 1402 (2007).

(伏信進矢*1, 日高将文*2, 北岡本光*2, *1東京大学大学院農学生命科学研究科, *2(独)農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所)