糖質加水分解酵素ファミリー内の機能の保存性と多様性

奥山正幸

北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門

はじめに

タンパク質の機能解析研究において、機能や立体構造未知のタンパク質配列が与えられたとき、私たちは相同性検索によりその機能、構造を推定する。これは、類似した配列は類似した機能、立体構造を有するという経験則に立脚する。多様なタンパク質をコードする遺伝子は、それぞれ独立に生じたわけではなく、ある共通の祖先遺伝子から分岐してきたものが数多く存在する。祖先遺伝子を共有する一群のタンパク質、いわゆる相同タンパク質は進化の過程において、アミノ酸置換、挿入／欠失などの変異を受け、現在に至っている。しかし、これらの変異はでたために許容されるわけではなく、構造的、機能的な制約を受けながら変異が受容されている。たとえば、球状タンパク質内部の疎水コア領域でのアミノ酸残基への変異はタンパク質構造の安定性を低下させる。そのため疎水コアを形成するアミノ酸残基への変異は少なく、保存的である。また活性中心のアミノ酸残基は機能的な制約が強く、これらへの変異は許容されない。結果として、類似した配列は類似した立体構造、機能を有すると考えられている。

相同タンパク質のなかでも相互の配列類似性が高い一群はファミリーと呼ばれる。Henrissatらは170,000を超える膨大な数の糖質加水分解酵素の配列をそれらの配列類似性をもとに、130程度の糖質加水分解酵素ファミ

リー (glycoside hydrolase family; GHファミリー) として分類している⁽¹⁾。ファミリー内の相同タンパク質は機能や構造を保存していると考えられるので、この分類により膨大な数の糖質加水分解酵素を約130にまで減少させて考えることができることになる。言い換えると、ファミリー内のすべてのタンパク質の機能や立体構造はファミリー内で明らかとなっているタンパク質のそれらと類似していると言える。そのため立体構造や触媒機構の不明な酵素も、その酵素がどのGHファミリーに分類されるのかを知ることができれば、それらを容易に類推できることになる。各々のファミリーの特徴、すなわち、そのファミリーにはどのような特異性をもつ酵素が含まれるのか、触媒機構、立体構造情報はCarbohydrate Active enzyme database (CAZy database, <http://www.cazy.org/>) にまとめられている。

一方で、同一GHファミリーに分類される酵素でも、機能がファミリー内で多様化している例がいくつかある。これらを知っておくことは配列類似性をもとに構造や機能を類推するうえで有用であると考えられる。本稿では α -グルコシドに作用するファミリーである糖質加水分解酵素ファミリー13, 31, 97 (GH13, 31, 97) を例にファミリー内での機能、なかでも触媒機構の保存性と多様性について紹介したい。

糖質加水分解酵素の触媒機構

ここではまず糖質加水分解酵素の触媒機構について触れる。糖質加水分解酵素のすべてが同じ触媒機構でグリコシド結合を加水分解するわけではない。糖質加水分解酵素は触媒機構の違いに起因して、大きく2種類、すなわちアノマー反転型酵素、アノマー保持型酵素に大別することができる(図1)。アノマー反転型酵素では生成物の糖分子のアノマー型が基質のそれと反転し、アノマー保持型酵素では生成物のアノマー型が基質に対して保持される。反転型酵素では、活性中心に一般酸触媒と一般塩基触媒が配置されており、一般的には2つのカルボキシル基がこれらを担う。一般酸触媒は基質のグリコシド酸素にプロトンを供与し、グリコシド結合の正電荷を増加させ、脱離基の遊離を促す。一方で一般塩基触媒は、アノマー炭素を求核攻撃する水分子を活性化す。この水分子はグリコシド結合とは反対側から求核攻撃するため、生成物のアノマー型は反転される。保持型酵素の触媒機構としては、古くから知られる二重置換機構、基質の2位炭素に*N*-アセチル基を有する基質において、このアセチル基が触媒を補助するsubstrate-assisted機構、酸化・還元反応を伴った脱離・水和反応によりグリコシド結合を分解するNAD⁺依存型機構が知られている。ここでは本稿に関係のある二重置換機構について紹介する。二重置換機構では触媒過程がグリコシル化段階、脱グリコシル化段階に分けられる。活性中心には一般酸塩基触媒、求核触媒が配置されており、多くの場合、これらをカルボキシル基が担う。グリコシル化段階では一般酸塩基触媒が一般酸触媒として働くことにより、グリコシド結合にプロトンを転移し、脱離基の遊離を促す。これと同時に求核触媒はアノマー炭素を背面攻撃し、基質-酵素中間体を形成する。この中間体は一般酸塩基触媒の一般塩基触媒としての働きにより活性化された水分子の背面攻撃によって分解され、生成物となる。2回の背面攻撃により、生成物のアノマー型は結果的に基質に対して保持されることになる。また二重置換機構では、加水分解反応に加えて糖転移反応を触媒する。これは水分子に代わって糖分子などのアルコールが基質-酵素中間体を攻撃することにより起こる。これら触媒機構は相同タンパク質の一群であるファミリーでは保存されているのが一般的である。

糖質加水分解酵素ファミリー13 (GH13)

GH13には α -1,4-グルコシド結合を加水分解する α -アミ

(a) アノマー反転型機構

(b) アノマー保持型機構

図1 ■ (a) アノマー反転型機構と (b) アノマー保持型機構

アノマー保持型機構においてR₂=Hの場合には加水分解反応を触媒し、R₂≠Hのとき、すなわち糖などアルコール分子の場合には糖転移反応を触媒する。またCD合成酵素では同一分子の非還元末端グルコシドの4位水酸基が反応することでCDが合成される。

図2 ■ GH13酵素の触媒反応模式図とGH13酵素の活性中心の重ね合わせ

(a) α -アミラーゼ, (b) CD合成酵素, (c) イソアミラーゼ, (d) 枝づくり酵素, 作用点を▼で示した。 (e) α -アミラーゼ (緑; pdb id, 7TAA), CD合成酵素 (シアン; 1CDG), イソアミラーゼ (マゼンタ; 1BF2), 枝づくり酵素 (黄; 1M7X) の活性中心。基質・反応特異性が異なるこれらの酵素であるが、活性中心の構造は類似している。 (f) CD合成活性を支配する3残基 (Phe184, Ala231, Phe260; 緑)。これら残基を置換した変異型CD合成酵素 (F184Q/A231V/F260W) はアミラーゼ様活性を示す。触媒残基、基質類似体の炭素原子をそれぞれシアン、黄で示した (PDB id, 1A47)。

ラーゼ、 α -1,6-グルコシド結合を加水分解するイソミラーゼやプルラーゼ、また加水分解反応ではなく α -1,4-グルコシド結合合成を触媒するシクロデキストリン (CD) 合成酵素や α -1,6-グルコシド結合合成を触媒する枝づくり酵素などが含まれる (図2(a-d)). そのほか、イソマルトオリゴ糖の非還元末端の α -1,6-グルコシド結合に作用するオリゴ-1,6-グルコシダーゼ、スクロースに作用するアミロスクラーゼやスクロース加リン酸分解酵素などのエキソ型酵素も含まれる。一見すると、これらの酵素は異なる立体構造や触媒機構を有しているようである。しかし、これらの酵素は共通して $(\beta/\alpha)_8$ バレルフォールドを触媒ドメインとして有し、活性中心の構造もよく保存されている (図2(e)). 触媒機構はいずれの酵素も二重置換機構をとる。CD合成酵素や枝づくり酵素などのグルコシド結合合成酵素では、二重置換機構において加水分解反応よりも糖転移反応が優先的に起きているためにグルコシド結合合成を触媒している。CD合成酵素では、優先的な糖転移反応が基質結合部位の構造により説明されている⁽²⁾。すなわちCD合成活性は基質結合部位の3アミノ酸残基により支配されており、これらの置換でCD合成活性は1/300以下に減少し、加水分解活性 (アミラーゼ様活性) が11倍増加することが示されている (図2(f)). α -アミラーゼとイソアミラーゼの基質特異性の違いも基質結合部位の違いにより説明できるはずである。いくつかのGH13酵素では基質結合部位に変異を導入することで、 α -1,4, α -1,6-グルコシド結

合に対する特異性に変化が生じることがわかっている^(3,4)。

GH13酵素の基質結合部位は、 $(\beta/\alpha)_8$ バレルフォールドの β -ストランドと α -ヘリックスをつなぐ表面ループ領域に位置する。ループ領域はタンパク質のフォールドに影響を及ぼすことなく、多様な変異を許容できるため、分子進化の過程において、このように基質特異性、反応特異性を大きく変化させることができたと考えられる。GH13は、配列類似性により分類されたファミリーにおいて、触媒機構や立体構造がいかに保存されているかを示す典型的な例である。

糖質加水分解酵素ファミリー31 (GH31)

GH13の例は、基質特異性と触媒反応を比較すると、基質特異性のほうが変化を受けやすいというタンパク質の分子進化の特徴を表している。一方、GH31は触媒反応が分子進化した酵素群を含むファミリーである。このファミリーには α -グルコシダーゼなど加水分解酵素とともに、脱離酵素である α -グルカンリアーゼが含まれる (図3(a)). α -グルコシダーゼと α -グルカンリアーゼでは基質特異性は保存されており、共通して非還元末端の α -1,4-グルコシド結合を基質とする。保持型加水分解酵素である α -グルコシダーゼはこれを加水分解し α -グルコースを遊離する。一方の α -グルカンリアーゼはこれを脱離反応で分解し、二重結合を残した1,5-アンヒドロフ

図3 ■ GH31 α -グルカンリアーゼと α -グルコシダーゼの比較

(a) α -グルコシダーゼ反応 (上段) と α -グルカンリアーゼ反応 (下段), (b) 予想される α -グルカンリアーゼの触媒機構, (c) α -グルコシダーゼ (緑, 3W37) と α -グルカンリアーゼ (黄, 4AMW) の活性中心の比較と Glu 残基の保存性。星印が両酵素間で多様化している残基を示す。配列アライメント中の GLase, AGase はそれぞれ α -グルカンリアーゼ、 α -グルコシダーゼを示す。

ルクトースを生成物とする。最近明らかとなった α -グルカンリアーゼの立体構造は α -グルコシダーゼのそれと大差なく、求核触媒残基や酸塩基触媒残基を含む多くのアミノ酸残基が α -グルコシダーゼと同様に保存されている。それにもかかわらず異なる触媒反応機構は、 α -グルカンリアーゼでは求核触媒として働き、脱グリコシル化段階では塩基触媒として働くことで基質グリコシルの2位炭素からプロトンを引き抜くことができるためであると考えられている(図3(b))⁶⁾。求核触媒残基がなぜ塩基触媒として働くことができるのかに関して、詳細な報告はまだなされていない。しかし α -グルコシダーゼで活性中心近傍に保存されているGlu残基が、 α -グルカンリアーゼではThrもしくはValに置換されていることが原因の一つであるとの報告がある⁶⁾。このアミノ酸置換が求核触媒の pK_a 調節に間接的に影響しているために、 α -グルカンリアーゼでは求核触媒残基が塩基触媒として働くことができると考えられている。すなわち、これらのアミノ酸残基の違いが、求核触媒カルボキシ基の pK_a 調節を担うArg残基の側鎖 Guanidino 基の pK_a に影響し、結果として求核触媒の pK_a にも影響を及ぼしていることが原因であると考えられている。これまで知られている α -グルカンリアーゼは α -グルコシダーゼとグローバルな配列類似性が比較的低く、分子系統樹を描くことで、 α -グルコシダー

ゼと区別することが可能である。一方で、ローカルに前述のGlu残基の保存性を調べることで触媒反応を推定できるかもしれない。

糖質加水分解酵素ファミリー97

GH97は、通常ファミリーとは異なり、アノマー反転型酵素とアノマー保持型酵素の両方を含む。GH97にこれら2つの触媒機構を有する酵素が混在することは *Bacteroides thetaiotaomicron* の2つの遺伝子 *susB*, *BT_1871* がコードするタンパク質の酵素化学的解析と立体構造解析によって明らかとなった⁶⁻⁸⁾。これらの研究は筆者が携わったものであるため以下で簡単に紹介したい。*SusB*は $(\beta/\alpha)_8$ バレルフォールドをコアドメインとして有するアノマー反転型の α -グルコシド結合加水分解酵素である。活性中心は $(\beta/\alpha)_8$ バレルを形成する β -ストランドのC末端側に位置する。6番目の β -ストランドと6番目の α -ヘリックスをつなぐループ領域(ループ6)のGlu532のカルボキシ基が一般酸触媒として働く。またループ3とループ5にそれぞれ位置するGlu439とGlu508のカルボキシ基がアノマー炭素を求核攻撃する水分子と相互作用しており、いずれかが一般塩基触媒としての役割を、もう一方が水分子を固定する役割を担っていると考えられる(図4)。しかし、現時点でどちら

図4 ■ アノマー炭素を攻撃する求核種の違いが触媒機構の違いにつながる

*SusB*と*BtGH97b*の活性中心を重ね合わせると*SusB*(緑)において一般塩基触媒残基(Glu439, Glu508のカルボキシ基)に挟まれた触媒水と*BtGH97b*(黄)の求核触媒残基(Asp415のカルボキシ基)の位置が空間的に一致することがわかる。この関係はアノマー保持型機構のカルボキシ基がアノマー炭素を求核攻撃できることを意味し、この機構の反応中間体は、オキソカルベニウムイオンではなくカルボキシ基と共有結合を形成したグリコシル中間体であることを示唆する。図下部にオキソカルベニウムイオン中間体を経由する触媒機構を示した。

図5 ■ GH97内での多様性と clan GH-D の関係

GH97の反転型酵素と保持型酵素, clan GH-Dの保持型酵素の立体構造ならびに触媒残基がどのループ上に位置するかを模式的に示した。四角は α -ヘリックスを、矢印は β -ストランドを示している。その下の番号は $(\beta/\alpha)_8$ パレフォールドの $\beta \rightarrow \alpha$ モチーフの番号を示している。GH97の2種類の酵素は配列類似性を有するが、触媒残基の位置が異なる。GH97保持型酵素とGH-D酵素の配列類似性は微弱だが、触媒残基の位置は保存されている。微弱な配列類似性をもとに触媒機構を推定できることがあることを示している。

がその役割を担っているかを決定するには至っておらず、ここでは2つのアミノ酸側鎖を一般塩基触媒として考える。興味深いのはこれら触媒アミノ酸残基のうち一般塩基触媒として働くGlu439ならびにGlu508がファミリー内で保存されておらず、約半数の配列でこれらのアミノ酸残基はGly残基に置換されていることである。では、これら塩基触媒残基を有さない酵素はどのような触媒活性を有しているであろうか。筆者らの研究において、これを解くヒントとなったのは、SusBの立体構造がGH27, 31, 36などのアノマー保持型酵素とよく類似していたことである(図5)。これらアノマー保持型酵素では、ループ4に求核触媒として働くAsp残基を共通して有している。改めて配列を確認すると、塩基触媒残基がGlyで置換されていた配列群がループ4にAspを保存していることがわかり、これらの配列群がアノマー保持型酵素であると予想できた。これらの配列群のうち*B. thetaiotaomicron*ゲノム上のBT_1871がコードするタンパク質(*BtGH97b*)は予想どおりアノマー保持型機構で α -ガラクトシドを加水分解することがわかった^(6, 7)。これらの結果はファミリーを超えた構造類似性により、触媒機構を予想できたことを示す。このように配列類似性は微弱であっても、立体構造や機能が保存されている酵素群はスーパーファミリーとして括られる。GHファミリーの概念では、これをclanとして定義しており、前述のGH27, 31, および36はclan GH-Dとして括られる。タンパク質の分子進化ではアミノ酸配列よりも立体構造のほうが保存されやすいのが一般的であり、GH97酵素とclan GH-D酵素の配列類似性は低い。しかし数回のPSI-BLASTでヒットする程度に類似性を示す。よってこれらは共通の進化的起源を有していると考えられ、ここからGH27, 31, 36と保持型GH97酵素、反転型GH97酵素に分子進化したと予想できる。ただし、祖先が反転

型酵素で、ここから保持型GH97, GH27, GH36, GH31へと分子進化したのか、保持型酵素からGH97, GH27, GH36, GH31へと進化し、GH97内で反転型へ分子進化したのかは不明である。

以上のことは、タンパク質の構造や機能を類推するためには、ファミリーを超えた微弱な配列類似性も重要な手がかりとなることを示す。また、たとえある配列がグローバルな配列類似性をもとにGH97に含まれたとしても、その触媒機構を推定できないことを示す。ローカルな配列類似性を調べて初めて触媒機構を推定できる。すなわちループ3とループ5にGlu残基を保存していれば反転型機構、ループ4にAsp残基が保存されていれば保持型酵素であることを推測できることになる。

ところでSusBと*BtGH97b*の立体構造を比較すると、反転型酵素SusBの一般塩基触媒(Glu439, Glu508のカルボキシ基)に挟まれた水分子と保持型酵素*BtGH97b*の求核触媒(Asp415のカルボキシ基)の酸素原子の空間配置がよく一致していることがわかる(図4)。ここからアノマー炭素を求核攻撃する分子種の違いが、GH97の各触媒機構を決定しているであろうことが見てくる。反転型酵素では水分子がアノマー炭素を求核攻撃して、アノマー型の反転した生成物が作られるのに対し、保持型酵素では求核触媒がアノマー炭素を求核攻撃し、アノマーの反転した中間体を形成すると考えられる。この中間体は水による背面攻撃を受け、速やかに基質に対してアノマー型が保持された生成物に変化するはずである。アノマー保持型酵素の触媒機構において難しい問題の一つに、求核性カルボキシ基が基質と共有結合を介した中間体を形成するか否か、というものがある。共有結合を介さない場合、カルボキシ基は求核性触媒ではなく静電触媒として働き、反応中間体はオキソカルベニウムイオンになる(図4)。GH97での触媒機構の多様

図6 ■ α/β 加水分解酵素ファミリーの触媒残基の配置

Asp/Gluがループ上を移動している (catalytic residue hopping). (a) 一般的なセリンエステラーゼ, (b) 哺乳類セリンエステラーゼ, (c) リボタンパク質リパーゼの触媒残基の配置を示す.

化機構は, “求核攻撃する” 分子種の違いによるものと考えられ, 保持型酵素のカルボキシ基はアノマー炭素を求核攻撃して共有結合を形成しているであろうことを後押しする.

GH97酵素群では分子進化の過程において, 基質分子のA面に位置する触媒残基があたかも (β/α)₈パレルのループ領域をループからループへ移動しているかのように見える. このようにループからループへ触媒残基が移動している現象は, catalytic residue hoppingやactive site migrationと呼ばれ, GH97以外でも見られる. よく知られたものとして, Serを触媒残基として有するエステラーゼやリパーゼのグループである α/β 加水分解酵素セリンエステラーゼでのcatalytic residue hoppingを挙げられる (図6). セリンエステラーゼはSer, Asp/GluとHis残基を触媒残基として有する. Serのヒドロキシ基は求核触媒として, Asp/Gluのカルボキシ基とHisのイミダゾール基は協同して一般塩基触媒, 一般酸触媒として働く. これら酵素ではSer残基を β -ストランド5の後ろに, His残基を β -ストランド8の後ろに保存している. 一方でAsp/Glu残基の位置が多様化している. 多くのエステラーゼやリパーゼでは β -ストランド7に続くループ領域にAsp/Gluを有する. しかし, ヒトをはじめとした哺乳類の膵臓リパーゼでは, 触媒残基のAsp残基が β -ストランド6の後のループに位置している. β -ストランド7の後ろにもAspを有しているが, その側鎖はHis残基と協同的に作用できる方向に向いていない. リボタンパク質リパーゼも β -ストランド6の後のループ

にAsp残基を有している. こちらは β -ストランド7の後ろにAsp残基は有していない. これらから言えることは, 触媒残基の一つである酸性アミノ酸残基Asp/Gluが分子進化の過程においてcatalytic residue hoppingによりループ上を移動していること, また哺乳類膵臓リパーゼはその移動の中間状態であることを示している⁽⁹⁾. しかし, これらのセリンエステラーゼでのcatalytic residue hoppingは触媒機構の変化を伴っておらず, 触媒残基の移動により触媒機構が変化している点でGH97でのcatalytic residue hoppingはユニークであると言える.

おわりに

糖質加水分解酵素をファミリーに分類し, 系統立てて考えることで, この分野の研究は飛躍的に進歩し, また進歩し続けていると言える. しかし, 本稿で示したように, 同一ファミリーに含まれる酵素であっても, 触媒反応や触媒機構が異なる例もある. ゲノム解析によって多くのゲノム配列が明らかとなり, GHファミリーはまだ増大し続けそうな勢いである. そして増えれば増えるほど, 分子進化の例外が登場する機会も増えるであろう. また, 糖質加水分解酵素のみならず, ゲノム上に予測された多くの遺伝子のアノテーションは類縁配列の同定によって行われることが多い. しかし, 単純な配列比較では, 間違ったアノテーションをしてしまう可能性があることを本稿は示す. グローバルな配列類似性だけではなく, 触媒残基などローカルな配列の保存性, ファミリーを超えた微弱な配列類似性を精査することで, この間違いを防ぐことができるかもしれない. また, これらに留意することは, 新しい機能を有する酵素の発見につながるかもしれない.

文献

- 1) V. Lombard, H. R. Ramulu, E. Drula, P. M. Coutinho & B. Henrissat: *Nucleic Acids Res.*, **42** (Database issue), D490 (2013).
- 2) R. M. Kelly, H. Leemhuis & L. Dijkhuizen: *Biochemistry*, **46**, 11216 (2007).
- 3) K. Ito, S. Ito, K. Ishino, A. S. Ibuka & H. Sakai: *Biochim. Biophys. Acta*, **1774**, 443 (2007).
- 4) K. Yamamoto, H. Miyake, M. Kusunoki & S. Osaki: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 545 (2011).
- 5) H. J. Rozeboom, S. Yu, S. Madrid, K. H. Kalk, R. Zhang & B. W. Dijkstra: *J. Biol. Chem.*, **288**, 26764 (2013).
- 6) T. M. Gloster, J. P. Turkenburg, J. R. Potts, B. Henrissat & G. J. Davies: *Chem. Biol.*, **15**, 1058 (2008).
- 7) M. Kitamura, M. Okuyama, F. Tanzawa, H. Mori, Y. Kitago, N. Watanabe, A. Kimura, I. Tanaka & M. Yao: *J. Biol. Chem.*, **283**, 36328 (2008).

- 8) M. Okuyama, M. Kitamura, H. Hondoh, M. S. Kang, H. Mori, A. Kimura, I. Tanaka & M. Yao: *J. Mol. Biol.*, **392**, 1232 (2009).
- 9) A. E. Todd, C. A. Orengo & J. M. Thornton: *J. Mol. Biol.*, **307**, 1113 (2001).

プロフィール

奥山 正幸 (Masayuki OKUYAMA)

＜略歴＞2001年北海道大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士後期課程修了／同大学農学部助手，助教を経て，現在同大学大学院農学研究院応用生命科学部門講師＜研究テーマと抱負＞糖質関連酵素における触媒機能の解明とそれら酵素の応用利用．酵素はなぜ特異性を発揮できるのか？ 触媒部位や基質結合部位では何が起きているのか？ 立体構造に基づいてタンパク質機能を上手くデザインできないことが多いのはなぜか？ そして，酵素を扱っているからには，それらを私たちの暮らしに役立てられる触媒として応用したい＜趣味＞ジャンルを問わないスポーツ観戦，子どもと遊ぶこと

Copyright © 2015 公益社団法人日本農芸化学会