澱粉枝つけ酵素の構造と機能†

栗木 隆*,**, Han-Ping Guan**, Jack Preiss**

(*江崎グリコ生物化学研究所, **Department of Biochemistry, Michigan State University)

植物の澱粉枝つけ酵素 [(1→4)- α -D-glucan : (1→4)- α -D-glucan 6-glucosyltransferase, EC 2.4.1.18] は生成したあるいは生成過程にあるアミロース鎖の α -(1→4)-グルコシド結合を切断し, α -(1→6)-グルコシド結合を新たに形成する酵素であり, アミロペクチンの α -(1→6)-分岐の形成に必須な酵素である. 各種澱粉の物理化学的性質の大部分を決定する因子は i) アミロースとアミロペクチンの比率, ii) アミロペクチンの α -(1→6)-分岐の数と稠密さ, iii) アミロペクチンにおける枝分れしたグルコースチェーンの鎖長であるといえる. 澱粉枝つけ酵素は, これら i)~iii) の因子に直接かわっており, 生合成の過程において澱粉の性質を決定する酵素の1つであるといえる. 微生物あるいは動物におけるグリコーゲン枝つけ酵素も澱粉枝つけ酵素と同じ分類であるが, 前者はアミロペクチンよりも α -(1→6)-分岐がさらに緻密になったグリコーゲンを生合成する点で特異性が異なる.

このように澱粉枝つけ酵素は澱粉の性質を決定する大きな役割を持っていることから, 澱粉生合成の分子機構解明のために, 盛んに研究がされてきた. しかし, 今後の研究のもう1つの焦点は以下に述べるような本酵素の触媒機構の面白さであると私達は考えている. 図1に示したように澱粉あるいはグリコーゲン枝つけ酵素の反応機構としては分子間 α -(1→6)-転移と分子内 α -(1→6)-転移が考えられる. 枝つけ酵素が分子間転移を触媒することは還元性末端を放射性炭素で標識した実験によって以前に確かめられている⁽¹⁾. これに対して, 本酵素が分

子内転移を行うことを明らかに証明した報告はない. しかし, いずれにしても本酵素は α -(1→4)-グルコシド結合の切断と α -(1→6)-グルコシド結合を新たに形成する転移との2つの反応を触媒していることが明らかである. ここで興味を引かれるのは, 枝つけ酵素がどのような機構でこの2つの反応を触媒しているかである.

枝つけ酵素の一次構造が初めて報告されたのは Baecker ら⁽²⁾による *Escherichia coli* のグリコーゲン枝つけ酵素である. 続いて同研究室の Romeo ら⁽³⁾は本酵素の一次構造が α -アミラーゼ, プルラーゼ, あるいはサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (以下, CGTase) 等の澱粉加水分解酵素のそれらと相同性があることを示唆していることは注目される. しかしながら, これらの酵素間の相同性をきわめて明解に指摘したのは馬場ら⁽⁴⁾である. 彼らは枝つけ酵素にも α -アミラーゼ, プルラーゼ, あるいは CGTase 等の一次構造上によく保存されている4つの領域^(5,6)が存在することを指摘し, 枝つけ酵素が澱粉加水分解酵素のファミリーであると示した. また本報告は, 初めて植物由来 (トウモロコシ) の澱粉枝つけ酵素の一次構造を明らかにした例でもある. 現在までに原核生物としては *Synechococcus* sp., *Bacillus stearothermophilus*, *Butyrivibrio fibriosolvens*, および *Bacillus caldolyticus* 由来のグリコーゲン枝つけ酵素の一次構造が明らかになっている. 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来のグリコーゲン枝つけ酵素および植物ではトウモロコシのほかにジャガイモあるいはイネ由来の澱粉枝つけ酵素の一次構造も 1992 年以降になり報告されている (文献7を参照). これらすべての酵素において, 馬場らが指摘した相同領域がみられるが, 最近, 高田ら⁽⁷⁾は触媒基の1つと推定される Glu を含む3番目の領域 (以下, 領域3) を部位特異的変異操作によるアミノ酸置換の導入により再確認し, 馬場らの報告した位置よりもカルボキシル末端側にあることを

† Structure and Function of Starch Branching Enzyme.

Takashi KURIKI,*** Han-Ping GUAN,** and Jack PREISS** (*Biochemical Research Laboratories, Ezaki Glico Co., Ltd., Osaka 555, **Department of Biochemistry, Michigan State University, East Lansing, Michigan)

の構造は α -アミラーゼを中心とした澱粉加水分解酵素と類似していることが強く示唆される。二次構造予測からも両者が類似した主ドメインを持っていることが推定されている⁽¹⁰⁾。

では興味の対象である枝つけ酵素の触媒機構はどうであらうか。先にも述べたように枝つけ酵素は α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコシド結合の切断と α -(1 $\rightarrow$ 6)-グルコシド結合を新たに形成する転移との2つの反応を触媒する。本酵素と構造上および触媒残基の共通性が示唆される α -アミラーゼ、プルラーゼ、および CGTase はそれぞれ α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコシド結合の加水分解、 α -(1 $\rightarrow$ 6)-グルコシド結合の加水分解、および α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコシド結合を新たに形成する転移反応を触媒する。異なった反応をそれぞれ触媒するこれらの酵素間に触媒機構の共通性はあるだろうか。私達は以下に述べる理由から共通性はあると考えている。私達は同一の触媒活性中心において α -(1 $\rightarrow$ 4)-ならびに α -(1 $\rightarrow$ 6)-グルコシド結合の加水分解および α -(1 $\rightarrow$ 4)-ならびに α -(1 $\rightarrow$ 6)-グルコシド結合を新たに形成する転移反応を触媒するネオプルラーゼ⁽¹¹⁾を題材に研究を行ってきた。これら4つの反応は本酵素の同一の触媒活性中心においてなされていることが証明されている^(12,13)。すなわち、枝つけ酵素の触媒する2つの反応、 α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコシド結合の切断と α -(1 $\rightarrow$ 6)-グルコシド結合を新たに形成する転移、は同一の触

a.

Donor chain

Acceptor chain

b.

図 1 枝つけ酵素が触媒する反応. a, 分子間転移反応; b, 分子内転移反応, O, グルコース; ●, 還元末端グルコース; —, α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコシド結合; ↓, α -(1 $\rightarrow$ 6)-グルコシド結合.

図 2 3種の枝つけ酵素間の一次構造比較。a, 4つの相同領域とその前後のアミノ酸残基数。b, 4つの相同領域内のアミノ酸配列と相同領域間の距離。触媒部位と推定されるアミノ酸残基は太字で示した。R1~4は相同領域1~4を示す。a.a., アミノ酸残基。

媒活性中心により触媒されることが、ネオプルラーゼを題材に用いた研究により明らかになっている。したがって、枝つけ酵素も α -アミラーゼあるいはネオプルラーゼと同様の3つのアミノ酸残基(領域2および4の Asp および領域3の Glu) が触媒部位として働き、基本的には同様の触媒機構により反応を進行させるものと私達は考えている⁽¹⁴⁾。ではなぜ、枝つけ酵素はアミロースの α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコシド結合を切断したところで反応が止らず、切断された還元末端側のアミロース鎖を α -(1 $\rightarrow$ 6)-グルコシド結合を介して他のアミロース鎖に繋ぎ変えるところまで触媒するのか。これについては以下のような推定が成り立つ。まず、枝つけ酵素が基質アミロースに結合し、触媒残基のカルボキシル基の水素イオンの攻撃により α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコシド結合は切断され、還元末端側のアミロース鎖は切り離される。ここで還元末端側のアミロース鎖はカルボニウムカチオン中間体として酵素分子と複合体を形成したままである。ここで水分子が触媒活性中心に導入されれば α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコシド結合の加水分解として反応は終了するが、枝つけ酵素においては水分子は導入されず、他のアミロース鎖のグルコースの C-6 水酸基がカルボニウムカチオン中間体と反応する位置に導入される。そして最終的には新たな α -(1 $\rightarrow$ 6)-グルコシド結合が形成される。ここに述べた触媒機構は松浦ら⁽¹⁵⁾の推定しているタカアミラーゼ A による α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコシド結合の加水分解の機構を参考に述べた。なぜ水分子が導入されず、他のアミロース鎖のグルコースの C-6 水酸基が触媒基の近くに導入されるのかは今後の研究を待たねばならないが、この点のみが枝つけ酵素と α -アミラーゼの特異性の違いを決定している点であると私達は考えている。この仮説を支持する結果として、私達はネオプルラーゼの触媒活性中心付近の加水分解に関与すると思われる水分子の位置を推定し、アミノ酸置換を導入することによりその周辺の疎水性を上昇させ、これによりその水分子の進入をある程度妨げ、本酵素の転移活性を向上させようことをすでに示している⁽¹⁶⁾。今後は枝つけ酵素を用いた実験により本酵素の触媒機構を明らかにしていきたい。

さて、種々の枝つけ酵素間での特異性と構造に注目してみたい。私達はトウモロコシ由来の特異性の異なる2種の澱粉枝つけ酵素(以下、BE I および BE II)を用いて研究を進めている。先に述べたとおり、これらの一次構造上には4つの相同性の高い領域が存在し、これらの

領域が触媒活性中心を形成していると推定される(図2)。ここでは *E. coli* 由来のグリコーゲン枝つけ酵素(以下 EcoBE) も参考のために示してみた。図2bに示したように BE I と BE II の領域1, 2, 3, および4のアミノ酸配列は同一であり、これらの一次構造上の距離もきわめて似ている。EcoBE ではかなりアミノ酸配列が異なってくるものの、相同領域間の距離は似通っている。これに対して、相同領域1~4のアミノ末端側あるいはカルボキシル末端側ではアミノ酸残基の数も大きく異なり、また一次構造上の相同性も大きく低下する⁽¹⁷⁾。竹田ら⁽¹⁸⁾がすでに明らかにしているように、BE I と BE II の基質特異性は異なり、前者はアミロースに対して、後者はアミロペクチンに対して特異性が高い。もちろん、EcoBE はアミロペクチンよりもさらに α -(1 $\rightarrow$ 6) 分岐が密になったグリコーゲンを生成する点で特異性が異なる。この特異性の違いとアミノ末端側あるいはカルボキシル末端側での一次構造の違いがどのように関係しているのかが非常に興味を持たれる。私達はこれらの領域を交換したキメラ酵素をつくることにより、この関係を明らかにしていく方向で実験を進めている。

以上のように枝つけ酵素は澱粉生合成酵素のなかで、構造および触媒機構の点において α -アミラーゼなどの澱粉加水分解酵素と比較して議論できる、特異な酵素である。私達は本酵素が糖鎖の加水分解と転移の両方の反応機構と酵素構造の関係を解き明かす鍵になるのではないかと期待している。また、アミロペクチンの分岐頻度には枝つけ酵素のみならず枝切り酵素も関与しているのではないかという議論もなされており⁽¹⁹⁾、これらの酵素の発現を調節すること、あるいは特異性を変換した枝つけ酵素を発現させることにより、将来は性質の異なる澱粉を植物に合成させうる時代も来るのではないかと考えている。

- (1) D. Borovsky, E. E. Smith, and W. J. Whelan : *Eur. J. Biochem.*, **62**, 307—312 (1976).
- (2) P. A. Baecker, E. Greenberg, and J. Preiss : *J. Biol. Chem.*, **261**, 8738—8743 (1986).
- (3) T. Romeo, A. Kumar, and J. Preiss : *Gene*, **70**, 363—376 (1988).
- (4) T. Baba, K. Kimura, K. Mizuno, H. Etoh, Y. Ishida, O. Shida, and Y. Arai : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 87—94 (1991).
- (5) R. Nakajima, T. Imanaka, and S. Aiba : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 355—360 (1986).

- (6) T. Kuriki and T. Imanaka : *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1521—1528 (1989).
- (7) H. Takata, T. Takaha, T. Kuriki, S. Okada, M. Takagi, and T. Imanaka : *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3096—3104 (1994).
- (8) H. M. Jespersen, E. A. MacGregor, B. Henriksat, M. R. Sierks, and B. Svensson : *J. Protein Chem.*, **12**, 791—805 (1993).
- (9) H.-P. Guan, T. Baba, and J. Preiss : *Plant Physiol.*, **104**, 1449—1453 (1994).
- (10) H. M. Jespersen, E. A. MacGregor, M. R. Sierks, and B. Svensson : *Biochem. J.*, **280**, 51—55 (1991).
- (11) T. Kuriki, S. Okada, and T. Imanaka : *J. Bacteriol.*, **170**, 1554—1559 (1988).
- (12) T. Kuriki, H. Takata, S. Okada, and T. Imanaka : *J. Bacteriol.*, **173**, 6147—6152 (1991).
- (13) H. Takata, T. Kuriki, S. Okada, Y. Takesada, M. Iizuka, N. Minamiura, and T. Imanaka : *J. Biol. Chem.*, **267**, 18447—18452 (1992).
- (14) T. Kuriki : *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **4**, 567—572 (1992).
- (15) Y. Matsuura, M. Kusunoki, and M. Kaku-do : *Denpun Kagaku*, **38**, 137—139 (1991).
- (16) 金子寛生, 栗木 隆, 柳瀬美千代, 半田 亨, 高田洋樹, 島田次郎, 高田俊和, 岡田茂孝 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, 東京, 1994, 4月, p. 33.
- (17) H.-P. Guan, T. Baba, and J. Preiss : *Cell. Mol. Biol.*, **40**, 981—985 (1994).
- (18) Y. Takeda, H.-P. Guan, and J. Preiss : *Carbohydr. Res.*, **240**, 253—263 (1993).
- (19) 中村保典 : 化学と生物, **31**, 283—285 (1993).