ミニレビュー

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol.69, No.8, pp.1050~1054, 1995]

 α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼ†

千葉誠哉

(北海道大学農学部)

1. はじめに

1980年代に入り、 α -アミラーゼの三次構造⁽¹⁻⁴⁾が明らかにされ、続いてサイクロデキストリン合成酵素⁽⁵⁻⁷⁾、最近になり β -アミラーゼ⁽⁸⁻¹⁰⁾、グルコアミラーゼ⁽¹¹⁾あるいは α -グルコシダーゼ⁽¹²⁾等についても三次構造の解析がなされ、 α -グルコシル結合によって構成される多糖あるいは少糖分解酵素についても漸く立体構造に基づいた議論が可能となってきた。 α -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)およびグルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3)は、いずれも α -グルコシル結合をもつ基質の非還元末端側からグルコースを遊離させる典型的なエキソ型の酵素である。これらの酵素の反応は図1に示すような反応モードによって進行すると考えられるが、このモードは、グルコシル残基が加水分解では水のプロトンと、糖転移反応では受容体のプロトンとの交換反応であり、現象的には加水分解反応もまた水が受容体となった一種の糖転移反応とみなされている。しかし、糖転移反応では酵素によって受容体に対する選択性(受容体特異性)があり、加水分解における水および糖転移反応における受容体と酵素の活性部位における挙動は異なると考えられ、反応モード上はそうであっても、水を単純に糖転移反応の受容体と同一視するのは妥当ではない。

上述のような反応様式(図1)により α -グルコシル結合を切断してグルコースを遊離させるという意味では α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼは見掛け上ほとんど区別できない。しかし、両酵素は生成物のアノマー型の違いによって明確に区別される。図1に示すように、グルコアミラーゼは β -グルコースを、 α -グルコシダーゼは α -グルコースを生成する。すなわち、基質の α -グルコシル結合のG₁-O原子間が切断されて、

そのアノマーの立体配置が“保持”されるか“反転”するかの違いによって本質的に反応機構が異なる酵素として区別される。

糖質分解酵素によるすべての加水分解および糖転移反応は、基質のグリコシル-O結合のアノマー配置が生成物に保持されるか($\alpha \rightarrow \alpha$ または $\beta \rightarrow \beta$)あるいは保持されずに反転するか($\alpha \rightarrow \beta$ または $\beta \rightarrow \alpha$)のいずれかである。が、アノマーが反転する反応では加水分解反応のみであり糖転移反応は起こらない。なぜならば、図1に示すようなグルコアミラーゼの反応により仮に糖転移反応が起こったとすると、その生成物は β -アノマーとなる。通常、この種の反応は可逆反応であるので、グルコアミラーゼはその逆反応によって β -グルコシル結合も分解しなくてはならないことになり、 α -結合とともに β -結合をも分解—基質(α -アノマー) $\rightleftharpoons$ 生成物(β -アノマー)—する酵素となってしまう。したがってもしグルコアミラーゼの反応において少糖が生成したとすると、それは逆反応(縮合反応)による生成物である。

2. 基質特異性

α -グルコシダーゼは、低分子基質のみに作用しデンプンのような高分子の基質にはほとんど作用しないタイプと低分子から高分子の基質まで広く分解できるタイプに大別できる⁽¹³⁾。前者のタイプとグルコアミラーゼの相違は明確であるが、後者のタイプの高分子基質に対する加水分解力は弱いものから比較的強いものまで連続的に異っており、グルコアミラーゼとの相違は見掛上かならずしも明瞭ではない。両酵素の基質特異性の差異を *Paecilomyces varioti* グルコアミラーゼと *Aspergillus niger* α -グルコシダーゼの加水分解速度パラメーター(K_m , k_o および k_o/K_m)に基づいて比較したのが表1であるが、 α -グルコシダーゼでは低分子基質に対して k_o と k_o/K_m 値に顕著な差はみられない。一方、グルコアミラーゼではマルトースとマルトトリオ

† α -Glucosidase and Glucoamylase

Seiya CHIBA (Faculty of Agriculture Hokkaido University)

図1 グルコアミラーゼ (A) と α -グルコシダーゼ (B) の反応模式
R, 還元末端側糖残基またはアグリコン; H-OA, 受容体; -----, 切断点

表1 グルコアミラーゼ⁽¹⁵⁾ と α -グルコシダーゼ⁽¹⁶⁾ の反応速度パラメーター

基 質	<i>P. varioti</i> グルコアミラーゼ			<i>A. niger</i> α -グルコシダーゼ		
	K_m (mM)	k_o (sec ⁻¹)	k_o/K_m (mM ⁻¹ ·sec ⁻¹)	K_m (mM)	k_o (sec ⁻¹)	k_o/K_m (mM ⁻¹ ·sec ⁻¹)
マルトース	1.2	7.2	6	0.75	144	192
マルトトリオース	0.26	27.2	105	0.69	181	262
マルトテトラオース	0.14	43.4	310	1.1	193	175
マルトペンタオース	0.13	41.1	316	1.9	147	77.4
マルトヘキサオース	0.12	41.6	347	3.2	170	53.1
マルトヘプタオース	0.11	46.6	429	4.9	146	29.8
可溶性デンプン	0.0011 ^a	49.1	446×10 ²	4.3 ^a	163	37.9

^a 非還元末端グルコース残基の mM

図2 *A. niger* α -グルコシダーゼと *P. varioti* グルコアミラーゼのサブサイト親和力

□: α -グルコシダーゼ, ■: グルコアミラーゼ

ース以上の重合度の大きい基質との間に k_o と k_o/K_m 値に極端な差がみられ, さらに可溶性デンプンに対して圧倒的に大きな k_o/K_m 値をもっている。両酵素間の低分子基質に関する基質特異性の相違は, 図2に示されるような活性部位におけるサブサイト親和力⁽¹⁴⁾ (A_i) の差によって合理的に説明されている^(15,16)。図2のシストグラムにみられるようにグルコアミラーゼでは第1番目サブサイトの A_i 値が第3番目サブサイトのそれよりも小さく, マルトースのような最小重合度の基質は第1と第2番目サブサイトの間に存在する触媒部位を跨ぐ“Productive”な結合様式よりは, それ以外の結合様式, たとえば第2と第3番目サブサイトに結合する“Nonproductive”な結合様式をとりやすい。したがって, より重合度の高い基質に比べてマルトースが“Productive”に結合する確率が低くなり分解されづらいことがよく説明できる。これに対して, α -グルコシ

ダーゼでは図2から容易に理解できるように、第1番目サブサイトの A_i 値が第3番目のそれよりも大きく基質の重合度の如何にかかわらず触媒部位を跨ぐ“Productive”な結合様式をとる確率が高く、各基質に対する分解力(k_0 値)に極端に大きな差がみられない。

3. 一次構造

最近までに約14種のグルコアミラーゼの一次構造⁽¹⁷⁾が明らかにされている。それらの一次構造にはグルコアミラーゼどうしでそれぞれ高い相同性がみられるが、サイクロデキストリン合成酵素の一次構造の一部の領域(デンブリン結合部位)にわずかな相同性がみられることを除けば α -アミラーゼ、 β -アミラーゼあるいは α -グルコシダーゼ等の他のいずれの酵素とも一次構造上の類似性は認められない。三次構造においても α -アミラーゼをはじめ他の酵素では(β/α)。バレル構造をとっているが、グルコアミラーゼでは(α/α)。バレル構造⁽¹¹⁾をとり構造上においても大きな違いがある。

Asp. awamori グルコアミラーゼの三次構造の解析から加水分解活性に直接関与しているアミノ酸残基はGlu 179およびGlu 400と推定され、他のグルコアミラーゼにおいても一次構造上の相同性の高い二つのGluが活性発現に直接関与するアミノ酸残基であることが推定されている^(18,19)。ただ、*Saccharomyces diastaticus*および*cerevisiae*グルコアミラーゼ^(20,21)については上記のGlu 400に相当するGluが認められず一次構造上他のグルコアミラーゼとは少し異なっているといわれているが、ごく最近これら酵母のグルコアミラーゼにGlu 400に相当するGluを欠いているのは遺伝子解読上の誤りによるフレームシフトに起因している可能性があることが示唆されている⁽²²⁾。また、*Schwanniomycetes occidentalis*グルコアミラーゼ⁽²³⁾は他のいずれのグルコ

アミラーゼとも一次構造上の相同性がないといわれているが、後述の*Asp. niger* α -グルコシダーゼ⁽²⁴⁾の一次構造と高い相同性がみられ、このグルコアミラーゼは α -グルコシダーゼであると思われる。

α -グルコシダーゼに関しては、これまで約10種の酵素について一次構造の解析がなされているが、はじめて一次構造が明らかにされた*Sacch. carlsbergensis* α -グルコシダーゼ⁽²⁵⁾は、最近三次構造が解析された*Bacillus cereus* α -グルコシダーゼ⁽²⁶⁾と一次構造に高い相同性がみられ、一つのグループを形成している。これに対して、哺乳動物の各組織に分布している α -グルコシダーゼ⁽²⁷⁻²⁹⁾や*Asp. niger* α -グルコシダーゼ⁽²⁴⁾は、前者のグループとは一次構造上全く相同性がなく別のグループを形成している。

α -アミラーゼをはじめとして α -グルカン分解酵素の多くはその一次構造上に共通した四つの保存領域の存在が知られている⁽³⁰⁾。表2には代謝的な α -アミラーゼのもつその四つの保存領域のアミノ酸配列を示したが、*Sacch. carlsbergensis* α -グルコシダーゼにみられるように α -アミラーゼと一次構造全体の相同性がみられなくても四つの保存領域(I~IV)は存在している。しかしながら、*Asp. niger* α -グルコシダーゼ(P2サブユニット)⁽²⁴⁾ではIを欠いており、さらに哺乳動 α -グルコシダーゼではIIのみであり、I、III、およびIVを欠いている。表2に示したように、 α -グルコシダーゼでは保存領域のAspが活発発現に直接関与しているアミノ酸残基であることが確認されている。

4. 反応機構

はじめにも述べたように、加水分解反応においてグルコアミラーゼは基質の α -アノマーを反転させ生じる生成物は β -アノマーである。これに反して α -グルコシ

表2 α -アミラーゼ⁽³⁰⁾と α -グルコシダーゼの一次構造における保存領域

酵 素	保 存 領 域			
	I	II	III	IV
α -アミラーゼ(<i>A. oryzae</i>)	¹⁷⁷ DVVANH	²⁰² CLR I DTVKH	²³⁰ EVL D	²⁹² FVENHD
α -アミラーゼ(ヒト唾液)	⁹⁹ DAVINH	¹⁹⁶ GFRLDASKH	²³⁶ EVID	²⁹² FVDNHD
α -アミラーゼ(大麦)	⁸⁸ DIVINH	¹¹⁴ DGRLDWGPH	²⁰⁵ EVWD	²⁸⁶ FVDNHD
α -グルコシダーゼ(<i>S. carlsbergensis</i>)	¹⁰⁶ DLVVNH	²¹⁰ GFRIDTAGL	²⁹³ EVSE	³⁴⁴ YIENHD
α -グルコシダーゼ(<i>A. niger</i>)	—	²²⁰ GVWYDMSEV	²⁵⁵ EPGD	³¹⁶ YVINHD
α -グルコシダーゼ(ヒト小腸)	—	⁵⁰¹ GLWIDMNEV	—	—
α -グルコシダーゼ(ヒト胎盤)	—	⁵¹⁴ GMWIDMNEP	—	—

アンダーラインのある残基は活性発現に直接関与するアミノ酸。

図3 カーボニウムイオン反応機構と求核二重置換反応機構
(A), オキソカーボニウムイオン中間体; (B) β -カルボキシアセタール中間体

ダーゼでは基質のアノマー型が保持されるが、このことは両酵素の間で反応機構が本質的に異なっていることを示している。古くから糖質分解酵素に関してさまざまな反応機構モデルが提案されてきたが、その加水分解反応を統一的に説明できる合理的な反応機構モデルは確立していない。これまでに提案されてきた反応機構モデルのうち代表的なモデルは、求核二重置換反応機構とカーボニウムイオン機構を挙げることができると思われる。

通常、この種の加水分解反応は一般酸塩基触媒機構に基づいて進行すると考えられているが、図3に示すように酸を Asp あるいは Glu のカルボキシル基 (His のイミダゾール基の可能性もある) および塩基を解離したカルボキシル基とすると、求核二重置換反応機構ではまずカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) がグルコシル-O 原子を求電子攻撃することによりグルコシル結合が切断され、同時にカルボキシレート基 ($-\text{COO}^-$) の求核攻撃により一回の置換が起こり共有結合されるグルコシル-酵素複合体が生じ、続いて逆方向からの水の水酸基によって置換され反応が終了する。このような反応機構を支持するいくつかの実験結果が報告されているが、この機構によってアノマーが反転する反応を説明するには求電子攻撃によって解離型となったカルボキ

シル基によるさらに一回の置換を考慮しなくてはならない。はたして三回もの置換反応が起こっているであろうか。

一方、カーボニウムイオン機構では二つの活性解離基が協同的に働き、カルボキシレート基はグルコン残基がオキソカーボニウムイオンとなることを促進し、カルボキシル基によりグルコシル-O 結合が切断されグルコシル残基はカーボニウムイオン中間を形成する (図3)。このような中間体 (ピラノース環の $\text{C}_2-\text{C}_1-\text{O}-\text{C}_5$ はほぼ同一平面) の C_1 を上側から置換基、水の OH^- が求核攻撃したときは β -アノマーを、下側から攻撃すれば α -アノマーを生成すると説明される。この反応機構は、基質のアノマーが反応後も保持されるとき、反転するときもいずれの場合の説明にも適用できる。このような反応機構を支持するような実験結果もまた多く報告されているが、カーボニウムイオン中間体の直接的証明は難しい。最近三次構造が明らかにされた *Asp. awamori* グルコアミラーゼでは Glu 400 (塩基) と Glu 179 (酸) が基質を上下に挟むように配置されていることが示されている^(11,19)。図3には α -グルコシダーゼの反応にみられるような基質のアノマーが保持される反応機構を挙げているが、アノマーが反転する反応では水分子からの水酸基 (OH^-) はピラノース環 ($\text{C}_2-\text{O}_1-\text{O}-\text{C}_5$ 面) の上側から求核攻撃によって入ってくると想像される。したがって、グルコアミラーゼの反応では上側から進入する水から生ずるプロトン (H^+) を上側に配置されているカルボキシレートが受取ると考えられている^(19,31)。しかし、反応が終了したときこの水のプロトンは、グルコシル-O 結合切断の求電子反応に関与し解離型となった下側のカルボキシレート基—*Asp. awamori* グルコアミラーゼでは Glu 179—をもとのカルボキシル基に戻すためのプロトンでなくてはならない。ピラノース環の上側から入る水のプロトンがどのような機構によって下側のカルボキシル基から抜けたプロトンを埋め合わせるのか。この説明が合理的になされたとき、糖質分解酵素による加水分解反応の機構がはじめて理解されたといえるであろう。 α -アミラーゼにおいては、表2に示したようなアミノ酸配列上の共通保存領域 (I~IV) のうち II~IV の領域に含まれる Glu および Asp (アンダーライン) の三つの残基のいずれもが活性発現に関与していることが点突然変異によるアミノ酸置換によって示されているが、反

応機構として一般酸塩基触媒機構を考える限りグルコシル-O 結合切断反応のプロトン供与体として直接関与するカルボキシル基が一個あれば切断反応が起り得るのであり、合理的な反応機構をどのように構築できるか興味深い。

- (1) Y. Matsuura, M. Kusunoki, W. Harada, N. Tanaka, Y. Iga, N. Yasuoka, H. Toda, K. Narita, and M. Kakudo : *J. Biochem.*, **87**, 1555-1558 (1980).
- (2) Y. Matsuura, M. Kusunoki, W. Harada and M. Kakudo : *J. Biochem.*, **95**, 697-702 (1984).
- (3) G. Buisson, E. Duee, R. Haser, and F. Payan : *EMBO J.*, **6**, 3909-3916 (1987).
- (4) A. Kadziola, J. Abe, B. Svensson, and R. Haser : *J. Mol. Biol.*, **239**, 104-121 (1994).
- (5) B.F. Hofmann, H. Bender, and G. Schulz : *J. Mol. Biol.*, **209**, 793-800 (1989).
- (6) 久保田倫夫, 松浦良樹, 堺 修造, 勝部幸輝 : 澱粉科学, **38**, 141-146 (1991).
- (7) 久保田倫夫, 松浦良樹, 堺 修造, 勝部幸輝 : 澱粉科学, **41**, 245-253 (1994).
- (8) 三上文三, 柴田 功, 広瀬正明, 相原茂夫, 佐藤衛, 勝部幸輝, 森田雄平 : 澱粉科学, **38**, 147-151 (1991).
- (9) B. Mikami, M. Sato, T. Shibata, M. Hirose, S. Aibara, Y. Katsube, and Y. Morita : *J. Biochem.*, **112**, 541-546 (1992).
- (10) B. Mikami, E.J. Hehre, M. Sato, Y. Katsube, M. Hirose, Y. Morita, and J.C. Sacchettini : *Biochemistry*, **33**, 7779-7787 (1994).
- (11) A. Aleshin, A. Golubev, L.M. Firsov, and R. B. Honzatko : *J. Biol. Chem.*, **267**, 19291-19298 (1992).
- (12) H. Kizaki, Y. Hata, K. Watanabe, Y. Katsube, and Y. Suzuki : *J. Biochem.*, **113**, 646-649 (1993).
- (13) 千葉誠哉 : 澱粉科学, **35**, 69-77 (1988).
- (14) K. Hiromi, Y. Nitta, C. Numata, and S. Ono : *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 362-375 (1973).
- (15) Y. Takada, H. Matsui, M. Tanida, S. Takao, and S. Chiba : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1633-1641 (1985).
- (16) A. Kita, H. Matsui, A. Somoto, A. Kimura, M. Takata, and S. Chiba : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2327-2335 (1991).
- (17) P.M. Coutinho and P.J. Reilly : *Protein Engng.*, **7**, 749-760 (1994).
- (18) M.R. Sierks, C. Ford, P.J. Reilly, and B. Svensson : *Protein Engng.*, **6**, 75-79 (1993).
- (19) P.M. Coutinho and P.J. Reilly : *Protein Engng.*, **7**, 393-400 (1994).
- (20) I. Yamashita, K. Suzuki, and S. Fukui : *J. Bacteriol.*, **161**, 567-573 (1985).
- (21) I. Yamashita, M. Nakamura, and S. Fukui : *J. Bacteriol.*, **169**, 2142-2149 (1987).
- (22) B. Henrissat, P.M. Coutinho, and P.J. Reilly : *Protein Engng.*, **7**, 1281-1282 (1994).
- (23) H.Y. Naim, T. Niermann, U. Kleinhans, C. P. Hollenberg, and A.W. Strasser : *FEBS Lett.*, **294**, 109-112 (1991).
- (24) A. Kimura, M. Takata, O. Sakai, H. Matsui, N. Takai, T. Takayanagi, I. Nishimura, T. Uozumi, and S. Chiba : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1368-1370 (1992).
- (25) S.H. Hong and J. Marmur : *Gene*, **41**, 75-84 (1986).
- (26) K. Watanabe, K. Kitamura, H. Iha, and Y. Suzuki : *Eur. J. Biochem.*, **192**, 609-620 (1990).
- (27) W. Hunzuiker, M. Spiess, G. Semenza, and H.F. Lodish : *Cell*, **46**, 227-234 (1986).
- (28) F. Green, Y. Edwards, H.-P. Hauri, S. Povey, M.W. Ho, M. Pinto, and D. Swallow, *Gene*, **57**, 101-110 (1987).
- (29) L.H. Hoefsloot, M. Hoogeveen-Westerveld, M.A. Kroos, J. van Beeumen, A.J.J. Reuser, and B.A. Oostra, *EMBO J.*, **7**, 1697-1704 (1988).
- (30) T. Tonozuka, M. Ohtsuka, S. Mogi, H. Sakai, T. Ohta, and Y. Sakano : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 395-401 (1993).
- (31) M.R. Sierks, C. Ford, P.J. Reilly, and B. Svensson : *Protein Engng.*, **6**, 75-79 (1993).
- (32) H. Ohnishi, H. Matsumoto, H. Sakai, and T. Ohta : *J. Biol. Chem.*, **269**, 3503-3510 (1994).