

アラビノガラクトタン-プロテイン分解酵素の 基質特異性メカニズムの解明

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所 金子 哲



はじめに

高等植物の細胞表層プロテオグリカンであるアラビノガラクトタン-プロテイン (AGP) は、植物の生長・分化に関わる重要な分子である。増粘多糖類であるガムアラビックやカラマツアラビノガラクトタンはAGPの一種であり、これらは乳化剤、安定剤等として食品、医薬品、工業用途で広く利用されている。AGPは、アラビノースやガラクトースに富む糖鎖が、ヒドロキシプロリンに富んだコアペプチドに O -結合した構造を持つといわれており、糖鎖は分子量の90%以上を占める。本シンポジウムでは、AGP糖鎖に作用する糖質加水分解酵素について、これまでに獲得した種々の酵素の基質特異性メカニズム解明へ向けた取り組みについて紹介する。

AGPの糖鎖構造

AGPの糖鎖構造の詳細は不明であるが、アラビノシドやタイプIIアラビノガラクトタン (β -1, 3-ガラクトタンの主鎖に β -1, 6-ガラクトタンの側鎖が結合し、さらにその末端にアラビノースが結合した構造を持つ多糖類) であるといわれている。全てに共通するのはガラクトタン骨格であり、タイプIIアラビノガラクトタンを加水分解できる酵素は、ガラクトタン骨格に作用できる酵素と、修飾糖に作用できる酵素に分けることができる。

ガラクトタン骨格 (主鎖) に作用する酵素

エキソ- β -1, 3-ガラクタナーゼは、 β -1, 3-結合したガラクトタン鎖のみに特異的に作用し、非還元末端側からガラクトースを遊離するエキソ型酵素であるが、AGP糖鎖に作用する場合には、側鎖ガラクトースの結合した分岐点をバイパスして加水分解し、 β -1, 6-ガラクトオリゴ糖を遊離するという興味深い性質を持つ。筆者らは、*Phanerochaete chrysosporium* より本酵素遺伝子をクローニングし、本酵素が糖質加水分解酵素ファミリー43 (GH43) に属することを明らかにした (文献1)。酵母の組換えタンパク発現系により *P. chrysosporium* 由来の組換え酵素を作製し、特性解析を行った。*P. chrysosporium* 由来の酵素には、 β -1, 3-ガラクトタン結合モジュールが存在し、糖結合モジュールファミリー35 (CBM35) に属するモジュールであることも明らかにした。GH43にはエンド型エキソ型の両酵素、また、アラビナナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、キシロシダーゼなど複数の酵素が分類されている。エキソ- β -1, 3-ガラクタナーゼは基質特異性の厳密な酵素であり、この基質認識のメカニズムを解明したいと考え、組換え酵素の結晶化を行い、両モジュールを含む形での立体構造を解明することに成功した。ガラクトトリオースとの基質複合体構造の解析を行ったところ、GH43とCBM35の各モジュールにガラクトースが一つずつ結合していた。基質認識に重要であると思われるアミノ酸の候補が判明し、これらアミノ酸残基の変異体を作製し、基質認識に重要なアミノ酸残基の特定を進めている。

ガラクトタン骨格 (側鎖) に作用する酵素

エンド- β -1, 6-ガラクタナーゼは、 β -1, 6-ガラクトタンのみに特異的に作用し、 β -1, 6-ガラクトオリゴ糖を遊離するエンド型酵素である。本酵素は糖質加水分解酵素ファミリー5 (GH5) に属する。*Trichoderma viride* 由来の酵素のアミノ酸配列情報を利用し、ゲノム配列が解明されている放線菌 *Streptomyces avermitilis* にも本酵素様配列があることを見出した。*S. avermitilis* より本酵素様遺伝子をクローニングし、大腸菌の組換えタンパク発現系を用いて組換え酵素を作製し、特性解析を行った (文献2)。エンド- β -1, 6-ガラクタナーゼが属するGH5もまた複数の酵素を含むファミリーであり、本酵素は、非常に基質特異性の厳密な酵素である。そこで、基質認識メカニズムを明らかにするため、*S. avermitilis* 由来の組換え酵素の結晶化を行い、立体構造解析に成功した。変異体を作製し、基質認識に重要なアミノ酸残基の特定を進めている。

修飾糖に作用する酵素

放線菌 *S. avermitilis* は、AGP糖鎖の骨格を分解できる2種類の酵素、エキソ-β-1, 3-ガラクトナーゼ (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2745-2750, 2006)、エンド-β-1, 6-ガラクトナーゼ (文献2) を有しており、一連のAGP糖鎖分解酵素を有している可能性が高いと考えられた。そこで、AGPの一種であるガムアラビックを炭素源として本菌を培養したところ、これまで存在が知られていないβ-L-アラビノピラノシダーゼ活性を培養上清に見出した。そこで本酵素活性を示す酵素を精製し、N末端アミノ酸配列を決定し、*S. avermitilis* より本酵素様遺伝子をクローニングした。放線菌の組換えタンパク発現系を用いて組換え酵素を作製することに成功し、特性解析を行って確かにβ-L-アラビノピラノシダーゼであることを明らかにした。本酵素は、糖質加水分解酵素ファミリー27 (GH27) に属する酵素であり、*S. avermitilis* 由来の酵素は、触媒モジュールの他に、糖結合モジュールファミリー13 (CBM13) に含まれるモジュール、さらに、2つの機能未知のモジュールからなる酵素であることが判明した。組換え酵素の結晶化を行い、4つのモジュールを含む形での立体構造解析に成功した (文献3)。GH27はα-D-ガラクトシダーゼが分類されるファミリーである。α-D-ガラクトースとβ-L-アラビノピラノースとの立体構造的な違いは、C6の有無のみであり、イネ由来のα-D-ガラクトシダーゼでC6の認識に関わっているアスパラギン酸が、β-L-アラビノピラノースではグルタミン酸に置換されていた。このグルタミン酸をアスパラギン酸に置換した変異体を作製したところ、変異体はα-D-ガラクトシダーゼ活性を優位に示すようになり、*S. avermitilis* 由来の酵素は、唯一つのアミノ酸変異により、β-L-アラビノピラノシダーゼ活性を示していることが明らかになった。また、糖複合体構造解析を行い、本酵素のCBM13が、アラビノースに特異的に結合する新しいタイプのCBM13であることが明らかになった。

AGPの糖鎖構造として、直鎖のα-L-1, 5-アラビナン鎖の存在を示唆する報告がある。エキソ-1, 5-α-L-アラビノフラノシダーゼは非常に基質特異性が高い酵素であり、この直鎖状のα-L-1, 5-アラビナン鎖にのみ作用し、L-アラビノースを遊離するエキソ型の酵素であり、GH43に属している。*Streptomyces chartreusis* 由来のエキソ-1, 5-α-L-アラビノフラノシダーゼのアミノ酸配列情報より、放線菌 *S. avermitilis* に本酵素様配列があることを見出した。そこで、*S. avermitilis* より本酵素様遺伝子のクローニングし、大腸菌の組換えタンパク発現系を用いて組換え酵素を作製し、特性解析を行った。*S. avermitilis* 由来の酵素は、GH43触媒モジュールとCBM13を有しており、両モジュールを含む形での結晶化、立体構造解析に成功した (文献4)。基質複合体構造解析を行ったところ、GH43には3つのサブサイトがあり、CBM13には3つのサブユニットにそれぞれ一つずつアラビノフラノースが結合することが分かった。種々の変異体の特性解析により、α-L-1, 5-結合に特異的な性質は、サブサイト+1を形成するAsn159, Tyr192, Leu289によるものであると示された。また、GH43に属するエンド型酵素と比較すると、サブサイト-1周辺が異なっており、ループ構造とアミノ酸残基の側鎖によって、エンド型酵素に存在するクレフトにあたる部分が存在しないことにより、エキソ型の性質を示していることが明らかになった。

おわりに

本研究は、AGP糖鎖に作用する糖質加水分解酵素に着目し、酵素の獲得およびその基質特異性を立体構造的に解明することを目的としている。基質特異性の明確な酵素は、ヘテロ多糖複合体であるAGP研究にとって有用な解析ツールとなる。また、増粘多糖類の物性改変、有用オリゴ糖調製などに応用可能である。

文献

- 1) Hitomi Ichinose, Makoto Yoshida, Toshihisa Kotake, Atsushi Kuno, Kiyohiko Igarashi, Yoichi Tsumuraya, Masahiro Samejima, Jun Hirabayashi, Hideyuki Kobayashi, and **Satoshi Kaneko**: An exo-beta-1,3-galactanase having a novel beta-1,3-galactan-binding module from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* (2005) 280, 25820-25829.
- 2) Hitomi Ichinose, Toshihisa Kotake, Yoichi Tsumuraya, and **Satoshi Kaneko**: Characterization of an endo-beta-1,6-galactanase from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893. *Appl. Environ. Microbiol.* (2008) 74, 2379-2383.
- 3) Hitomi Ichinose, Zui Fujimoto, Mariko Honda, Koichi Harazono, Atsuko Uzura, and **Satoshi Kaneko**: A beta-L-arabinopyranosidase from *Streptomyces avermitilis* is a novel member of glycoside hydrolase family 27. *J. Biol. Chem.* (2009) 284, 25097-25106.
- 4) Zui Fujimoto, Hitomi Ichinose, Tomoko Maehara, Mariko Honda, Motomitsu Kitaoka, and **Satoshi Kaneko**: Crystal structure of an exo-1,5-alpha-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces avermitilis* provides insights into the mechanism of substrate discrimination between exo- and endo-type enzymes in glycoside hydrolase family 43. *J. Biol. Chem.* (2010) 285, 34134-34143.