

アノマー反転型グリコシド分解酵素の糖鎖合成酵素への変換

石川県立大学生物資源環境学部食品科学科 本多裕司



【略歴】

- 2000年3月 大阪府立大学大学院生命科学研究科応用生命化学専攻博士後期課程 修了
ならびに 博士(農学)の学位を取得
- 2000年4月 生物系特定産業技術研究推進機構、科学技術事業振興団、日本学術振興会などの特別研究員 (勤務先 旧 独立行政法人 食品総合研究所 酵素機能研究室)
- 2006年4月～現在 石川県立大学生物資源環境学部食品科学科 (助手、助教、准教授)

はじめに

一般的に、グリコシド結合を加水分解する酵素は反応機構の違いから、「アノマー保持型酵素」と「アノマー反転型酵素」の2種に大別される。通常グリコシド分解酵素を用いて糖鎖を合成するには、その対象となる酵素に糖転移反応を触媒する能力が必須であった。しかし、グリコシド分解酵素の1/3は糖転移反応を触媒しないアノマー反転型酵素である。これまでに糖鎖合成上で有益な基質特異性を持つアノマー反転型酵素を発見しても、その酵素は糖鎖合成ツールの枠外にあった。

しかし、筆者らはアノマー反転型酵素の触媒基を不活性化した変異型酵素とフッ化糖を用いることで、糖鎖合成酵素 (Glycosynthase) に変換する事に成功した。本手法を用いると、糖転移反応を触媒しない酵素でも糖鎖合成に使えることを報告した。実際に、アノマー反転型酵素である Rex (還元末端オリゴキシラナーゼ)、1,2- α -L-フコシダーゼ、およびキチナーゼに対して本手法を適用し、キシロオリゴ糖、2'-フコシルラクトース、およびキチンオリゴ糖などの合成に成功した。

本講演では、キシロオリゴ糖の還元末端からキシロースを遊離させる Rex の糖鎖合成酵素化を中心に、アノマー反転型グリコシド分解酵素の糖鎖合成酵素化について紹介する。

還元末端オリゴキシラナーゼ (Rex) の糖鎖合成酵素化

1981年、アノマー反転型グリコシド分解酵素であるグルコアミラーゼに β -グリコシルフルオリド (β -Glc-F) を作用させると、 β -グルコース (β -Glc) とフッ素イオンが生成される事が Hehre らのグループによって報告された (図1, [1])。これは $[\beta\text{-Glc-F} + \beta\text{-Glc-F} \rightarrow (\beta\text{-G2F} + \text{HF}) \rightarrow \beta\text{-Glc} + \beta\text{-Glc-F} + \text{HF}]$ という反応が起こっており、中間体の β -マルトシルフルオリド (β -G2F) が生成された後に、アノマー反転型の加水分解を受けて β -Glc と β -Glc-F に分解される反応であった。この反応はグリコシド分解酵素の糖鎖合成酵素化につながる重大な発見であり、後に、このような反応は Hehre resynthesis hydrolysis と呼ばれるようになった。

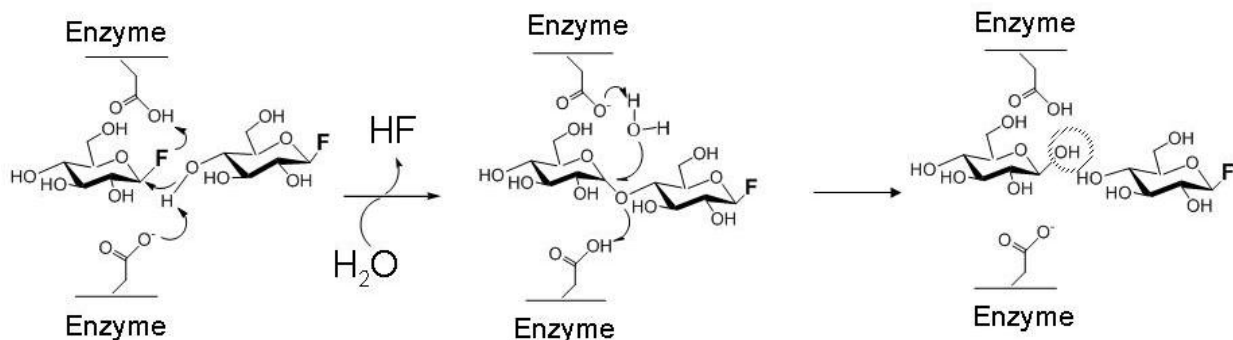


図1. グルコアミラーゼによる Hehre resynthesis hydrolysis 反応 (Kitahata et al. 1981)

筆者らは、野生型 Rex に対して、 α -X2-F (α -キシロビオシル フルオリド) と X1 (キシロース) を作用させると同様の反応が起こることを見いだした [α -X2-F + X1 \rightarrow (X3+HF) \rightarrow X2+X1+ HF] (図 2)。本反応の際に X3 が中間生成物として生成されていることが示唆されたので、加水分解反応を抑制すれば X3 が蓄積されると考えられた (図 2)。

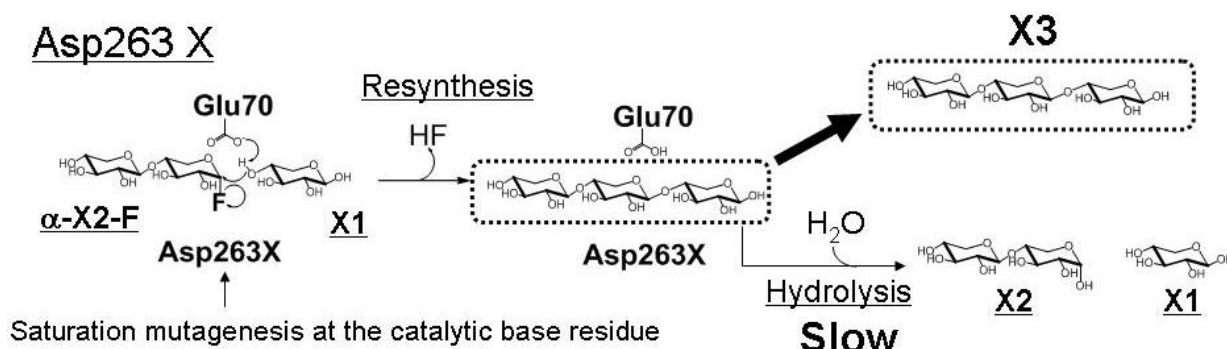


図 2. Rex の糖鎖合成酵素化の戦略 (Honda and Kitaoka 2006)

最初に、触媒部位に存在する一般塩基触媒残基である D263 に様々な変異を導入することにより Rex を糖鎖合成酵素化することを試みた[2]。その結果、D263C および D263N が α -X2F と X1 と作用して X3 を生成したが、著量の加水分解産物 X2 が同時に生成した。D263 変異酵素はフッ素遊離能が野生型酵素よりも低下していると同時に、微弱な加水分解活性が残存していた。この結果から糖鎖合成反応を高効率化するには、フッ素遊離能を落とさずに、加水分解活性を低下させる変異導入が重要な鍵になると考えられた。その後、筆者らは加水分解反応の求核性水分子と相互作用しているアミノ酸残基 (Y198) に変異を導入すると、加水分解を抑制してフッ素遊離活性を上昇させることを見出した[3, 4]。

様々なアノマー反転型グリコシド分解酵素の糖鎖合成酵素化

アノマー反転型グリコシド分解酵素を糖鎖合成酵素化するには、加水分解に寄与する求核性の水分子と相互作用するアミノ酸残基に変異を導入することが重要であった。この手法を用いて、グリコシド分解酵素ファミリー 19 に属するアノマー反転型のキチナーゼとファミリー 95 に属する α -1, 2-L-フコシダーゼを糖鎖合成酵素化することに成功した[5, 6]。最近、筆者らは深海性細菌から新規なアノマー反転型エキソ- β -D-グルコサミニダーゼを発見したが[7]、この酵素についても糖鎖合成化することに成功した。

おわりに

最近まで、ユニークなグリコシド結合を分解する酵素を発見しても、その酵素が糖転移反応を示さなければ、糖鎖合成への展開はできなかった。しかし、本研究で見出した手法を用いれば、そのようなグリコシド分解酵素にも糖鎖合成能を付加することが可能になってきた。アノマー反転型グリコシド分解酵素の糖鎖合成化は始まったばかりである。新規なアノマー反転型グリコシド分解酵素を発見した際には、本研究を思い出していただけただけなら幸いである。

参考文献

- [1] S. Kitahata et al. *J. Biol. Chem.* **256** 6017 (1981)
- [2] Y. Honda and M. Kitaoka *J. Biol. Chem.* **281**, 1426 (2006)
- [3] Y. Honda et al. *Glycobiology* **18**, 325 (2008)
- [4] M. Hidaka et al. *J. Biochem.* **147**, 237 (2010)
- [5] T. Ohnuma et al. *Biochem. J.* **444**, 437 (2012)
- [6] J. Wada et al. *FEBS Lett.* **582**, 3739 (2008)
- [7] Y. Honda et al. *Glycobiology* **21**, 503 (2011)