

イソプルラーゼの立体構造と反応機構の解明

東京農工大学 大学院共生科学技術研究院 殿塚隆史

【1. はじめに】

デンプンおよび関連する糖を分解する酵素は、食品産業において種々の糖を製造するのに必須である。イソプルラーゼ（以下 IPU）は、多糖プルラン（マルトトリオースが α -1,6-グルコシド結合で重合した多糖）の特定の α -1,4-グルコシド結合を分解し、三糖イソパノースを生成する酵素として見出された（図1）。IPU はデンプンの部分構造である $\text{Glc } \alpha$ -(1 \rightarrow 6)- $\text{Glc } \alpha$ -(1 \rightarrow 4)- Glc という構造を持つオリゴ糖の α -1,4-グルコシド結合を分解するが、デンプンそのものには作用しない。IPU はこのような性質により、固有の EC 番号（EC 3.2.1.57）を有し、きわめて特徴的な基質特異性を持つ酵素である。

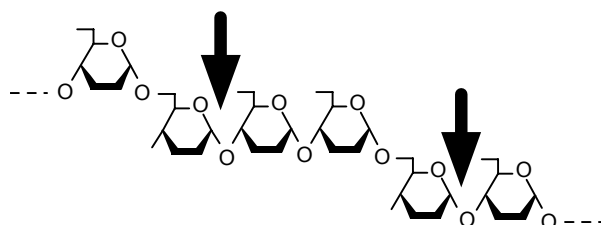


図1. プルランの模式図および IPU の作用様式

グルコースは模式的に表した。矢印は IPU の加水分解箇所である。

【2. IPU の一次構造および性質の特徴について】

IPU 遺伝子のクローニングおよび詳細な性質の解析を行い、他の酵素との比較を行った。多糖プルランを分解する酵素は IPU の他に、*Thermoactinomyces vulgaris* 由来 α -アミラーゼ（TVA）やネオプルラーゼ（IPU とは異なり、両酵素ともプルランよりパノースという三糖を生成する）、および、プルラーゼ（プルランの α -1,6-グルコシド結合を分解しマルトトリオースを生成する）が報告されている。しかしながら、一次構造の相同性による Glycoside Hydrolase ファミリー（GH）と称される系統的な分類法によると、TVA、ネオプルラーゼ、プルラーゼはすべてデンプンを分解する代表的な酵素である α -アミラーゼと同じファミリーである GH13 に分類されるのに対し、唯一 IPU のみ GH49 に分類され、他のプルラン分解酵素と一次構造上の相同性が全く認められないことが明らかとなった。

さらに、GH49 に属する酵素は、IPU を除いてすべて多糖デキストラン（グルコースが主に α -1,6-グルコシド結合で重合した多糖）を分解する酵素であるが、唯一 IPU のみデキストランを全く分解できないことが判明した。このような、IPU の特徴的な反応機構を解明するため、立体構造の決定を行った。

【3. 発現系の構築、精製、結晶化と立体構造解析】

IPU の生産は、大腸菌の宿主ベクター系では活性を持つ酵素を得ることができなかったため、酵母 *Pichia pastoris* の宿主ベクター系を用い、効率的な発現系の構築に成功した。後述するように、IPU は糖タンパク質であり多数の糖鎖が付加している。

しかしながら、糖鎖の存在は結晶化の妨げとなるので、いったん精製を行った後、Endo Hf で処理を行って *N*-アセチルグルコサミン 1 残基以外の糖鎖を除去し、さらに陰イオン交換クロマトグラフィーで精製し結晶化に供した。リザーバー溶液として PEG 8000 を含む酢酸緩衝液を用いたハンギングドロップ蒸気拡散法により、単結晶を得ることに成功した。

X線結晶構造解析により IPU の立体構造を決定した (図 2)。IPU の全体構造は *N* 末端側の約 200 残基からなるドメイン *N* と、*C* 末端側の約 400 残基からなるドメイン *C* の 2 つのドメインから構成されていた。ドメイン *N* は逆平行 β -シート、ドメイン *C* は 3 本の β -ストランドによって 1 コイルが形成され、それが 10 個連なった β -ヘリックス構造をとっていた。IPU には *N* 結合型糖鎖が付加しうる配列 (Asn-X-Ser/Thr) が 15 箇所含まれており、その内 11 箇所の Asn 側鎖に *N*-アセチルグルコサミン残基の電子密度を確認することができた。



図 2 IPU の立体構造

黒はドメイン *N*、白はドメイン *C* である。図中には、*N*-アセチルグルコサミン残基を示してある。

【 4. IPU と生成物との複合体の立体構造】

IPU の結晶にいくつかのリガンドをソーキングし、X線結晶構造解析を行った結果、生成物であるイソパノースとの複合体について良好なデータを得ることができた。IPU とデキストラナーゼは全体的に類似した構造を有するが、サブサイト+側 (基質の加水分解を受ける α -1,4-グルコシド結合より還元末端側の部分を認識する部位) を構成するループは異なる構造であることが判明し、イソパノースはその IPU 特有のループに結合していた。

部位指定変異による研究より、Trp31 および Glu273 に変異を導入すると長鎖の基質に対する活性に影響を及ぼすことが判明している。今回、立体構造解析により、これらのアミノ酸はドメイン *N* とドメイン *C* の境界に位置し、サブサイト+側と結合するループの位置に影響を与えている可能性が考えられた。また、IPU とデキストラナーゼの活性クレフトの形状は大きく異なっており、この活性クレフトの違いが基質特異性に関与していると考えられた。