

α -ガラクトシダーゼの構造と機能 II

小林 秀行¹

¹ 鯉淵学園農業栄養専門学校 食品栄養科

キーワード：ガラクトマンノオリゴ糖，基質特異性，立体構造，相互作用

I 緒言

α -ガラクトシダーゼ (α Gal) は，ガラクトオリゴ糖，例えばラフィノースとスタキオースを加水分解してガラクトースとスクロースを生成し，糖脂質，例えばグロボトリアオシルセラミドに作用して，ガラクトースとラクツシルセラミドを生成する酵素であり，高分子ガラクトマンナンから α -1,6-ガラクトシル残基を加水分解する酵素である。

ヒト α -ガラクトシダーゼ A (α Gal A) は，糖脂質および糖タンパク質から末端の α -ガラクトシル残基を切断するリソゾーマルエキソグリコシダーゼである。 α GalA 遺伝子の変異は，糖脂質の不完全な分解を引き起こし，ファブリー病（糖脂質代謝異常）を引き起こす¹⁾。組換え α Gal A は，この疾患の治療のために開発されている。

血液型は赤血球の表面に存在する糖鎖構造の違いによって決定されるが，O 抗原と B 抗原の違いである α 結合した末端ガラクトースを α Gal が除去することができるため，植物由来の α Gal が，B 型血液から O 型血液を得るために開発されている²⁾。

さらに， α Gal は，多くのバイオテクノロジー関連の用途に利用されている。甜菜中のラフィノースの含有量は，貯蔵中に徐々に増加するため，甜菜糖業界では，ラフィノースは甜菜糖の結晶化の障害として知られている。6～10% 存在する甜菜糖蜜中のラフィノースを除去できれば，甜菜糖の結晶化効率を向上させることができる。そのために，*Mortierella vinacea* α Gal は，甜菜糖製造プロセスで使用されてきた。

α -ガラクトシダーゼ (α Gal) は微生物，植物，動物に広く存在し，それらのいくつかは精製され，性質が解明されている³⁾。Dey らは α Gal が，その基質特異性に基づいて2つのグループに分類されることを示した。1つのグループは，pNPGal (p-ニトロフェニル- α -D-ガラクトシド) やラフィノースファミリー (メリビオース，スタキオース) などの低分子ガラクトシドに特異的に作用し，他のグループの α Gal は多糖であるガラクトマンナンに作用するとともに低分子基質を様々な程度に加水分解する⁴⁾。

今回，*Penicillium purpurogenum*, *Mortierella vinacea*, そしてイネ α Gal の基質特異性を含む構造機能の研究を通じて，新たな α Gal の分類について知見を得たのでまとめてみたい。

II CAZy データベース

グリコシルヒドロラーゼ（糖質加水分解酵素）は，それらのアミノ酸配列の相同性（疎水性コアパターン）に従って CAZy データベースで171の異なるファミリーに分類されている⁵⁾。また，グリコシダーゼはグリコシド性ヒドロキシル基の α , β -アノマー保持及びアノマー反転の2つの触媒機構に分けられている。保持型グリコシダーゼは二重変位触媒機構を介して基質のアノマー立体構造を保つが，反転グリコシダーゼはワンステップ反応でアノマーの反転を誘導する。それらのほとんどは，基質のグリコシド酸素を囲む2つのカルボキシレート（グルタミン酸またはアスパラギン酸）を有し，そのうちの1つはプロトンドナーとして作用し，もう1つは求核剤として作用すると言われている⁶⁾（表1）。

多くの真核生物の α -ガラクトシダーゼ (α Gal) は，グリコシルヒドロラーゼファミリー 27 (GH27)

¹ 〒319-0323 茨城県水戸市鯉淵町 5965

表 1. グリコシドヒドロラーゼファミリー 27 の特徴

Glycoside Hydrolase Family 27	
Known Activities	α -galactosidase (EC 3.2.1.22), α -N-acetylgalactosaminidase (EC 3.2.1.49) isomalto-dextranase (EC 3.2.1.94)
Mechanism	Retaining
Catalytic Nucleophile (求核剤)	Asp
Catalytic Proton Donor (プロトンドナー)	Asp
3D Structure Satus	Available (β/α) 8 Fold
Clan*	GH-D

*: タンパク質の構造をもとにした分類で、ファミリーの上位の分類。

に分類される。このファミリー内のすべての酵素はアノマー保持機構を有し、2つのアスパラギン酸が触媒残基である。 α Gal は、同じファミリー 27 に属する α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (EC 3.2.1.49)、およびイソマルトデキストラナーゼ (EC 3.2.1.94) と高い一次構造上の類似性を有する。細菌由来の他の α Gal は、主にファミリー 36 に分類され、両ファミリー (27 と 36) は、ファミリー 31 と共に、Clan GH-D に分類される⁷⁾。

Ⅲ 基質特異性

α -ガラクトシダーゼの基質特異性を調べるために

ガラクトオリゴ糖 (メリピオース, ラフィノース, スタキオース) およびガラクトマンナンが通常使用されるが、今回はガラクトマンナンの β -マンナナーゼによる加水分解産物であるガラクトマンノオリゴ糖も基質として使用した。ホワイトコプラミールの放線菌 β -マンナナーゼ消化物からガラクトマンノオリゴ糖混合物を調製し、混合物から“側鎖 α -ガラクトシル残基”を有するガラクトマンノオリゴ糖 (Gal3Man4) と“末端 α -ガラクトシル残基”を有するガラクトマンノオリゴ糖 (Gal3Man3) を活性炭カラムにより分離した。これらのガラクトマンノオリゴ糖の構造を図 1 に示した。

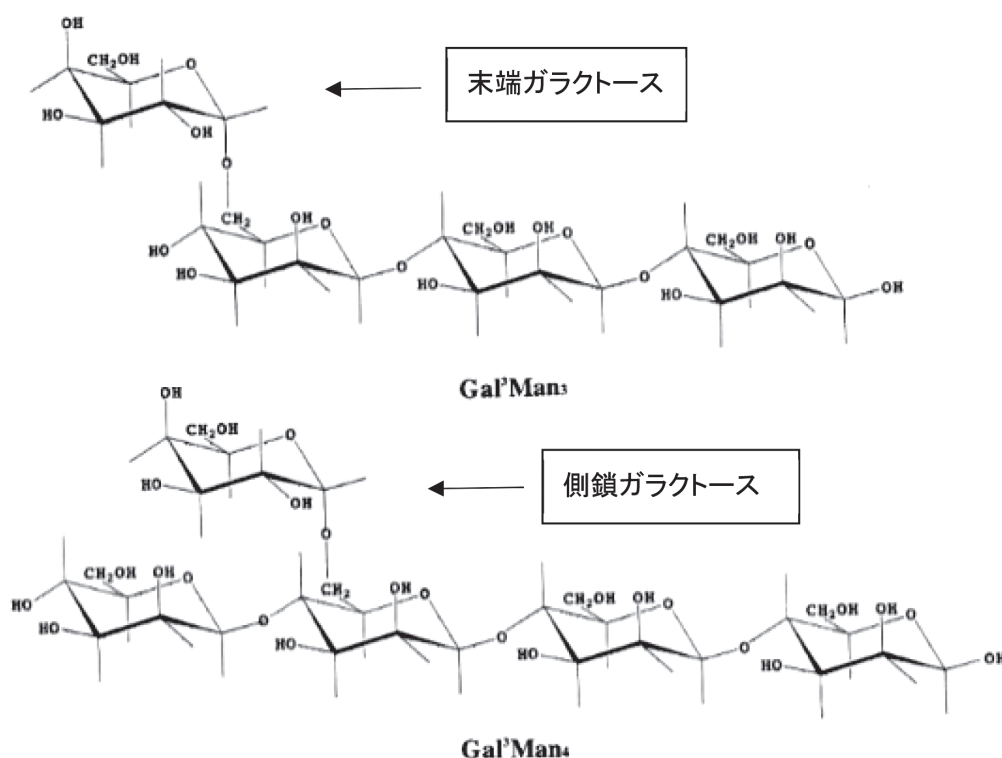


図 1. ガラクトマンノオリゴ糖の構造

IV α-ガラクトシダーゼ (αGal) の精製, 1 次構造, 基質特異性

1. *Penicillium purpurogenum* α-ガラクトシダーゼ

(1) 精製

Penicillium purpurogenum を, ブラウンコプラミールを含む培地で培養し⁸⁾, 得られた培養ろ液を粗酵素液とした。粗酵素液を限外ろ過により濃縮し, DEAE-セルロースおよび SE-セルロースカラムに供した。これらの手順により, 酵素は 76% の収率で, 約 450 倍に精製された。精製された酵素 (天然型 αGal) は, SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) で均一であると判断され, 精製された酵素の分子量は, 67kDa であった。PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレンにブロッティングした後, N 末端アミノ酸配列をエドマン分解により同定したところ, L-I-L-P-D-D-V-G-X-L-P-A-L-G-X-N-S-X-X-A- (X は未決定アミノ酸を示す) の配列が決定された⁹⁾。

(2) 1 次構造

P. purpurogenum αGal をコードする cDNA をクローニングし, その塩基配列を決定した。本酵素は, 19 アミノ酸のシグナル配列と 420 アミノ酸の成熟 αGal で構成され, 分子量は 46.3kDa であった。配列中に 9 つの N 型糖鎖結合部位 (N-X-S/T) が存在し, これは天然型 αGal が 67kDa であることと, コンカナバリン A と反応することと一致している。

*Trichoderma reesei*¹⁰⁾, *Saccharomyces calbergensis*¹¹⁾, *M. vinacea*^{12,13)}, コーヒー¹⁴⁾, およびヒト¹⁵⁾ αGal のアミノ酸配列と *P. purpurogenum* αGal のアミノ酸配列の比較をしたところ, *P. purpurogenum* αGal は, これらの酵素と相同性を示し, 特に *T. reesei* αGal (AGL1) とはこれらの中で最も高い値を示した (57%)。

(3) 発現

P. purpurogenum αGal cDNA を, *GAL10* プロモーターの制御下で *S. cerevisiae* を用いて発現させた。組換え αGal は培地に分泌され, 活性は 216 時間で約 63U/mL に達した (精製酵素 0.21g/L 培地に相当)。本酵素 (組換え *P. purpurogenum* αGal) は, 3 つのクロマトグラフィーステップで均一に精製され, 100mL の培地から, 6.75mg の精製 αGal が 33 % の回収率で得られた。

(4) 基質特異性

図 2 から明らかなように *P. purpurogenum* αGal は天然型, 組換え型共に末端ガラクトースを持つ Gal3Man3 には作用せず, 側鎖ガラクトースを持つ Gal3Man4 に作用した。また, データは示していないが, 本酵素は多糖であるガラクトマンナンには作用しなかった。

2. *Mortierella vinacea* α-ガラクトシダーゼ

(1) *M. vinacea* αGal I

1) 精製

M. vinacea を 30℃ で 3 日間培養し, α-ガラクトシダーゼ I (αGal I) を鈴木ら¹⁶⁾ の方法に従って

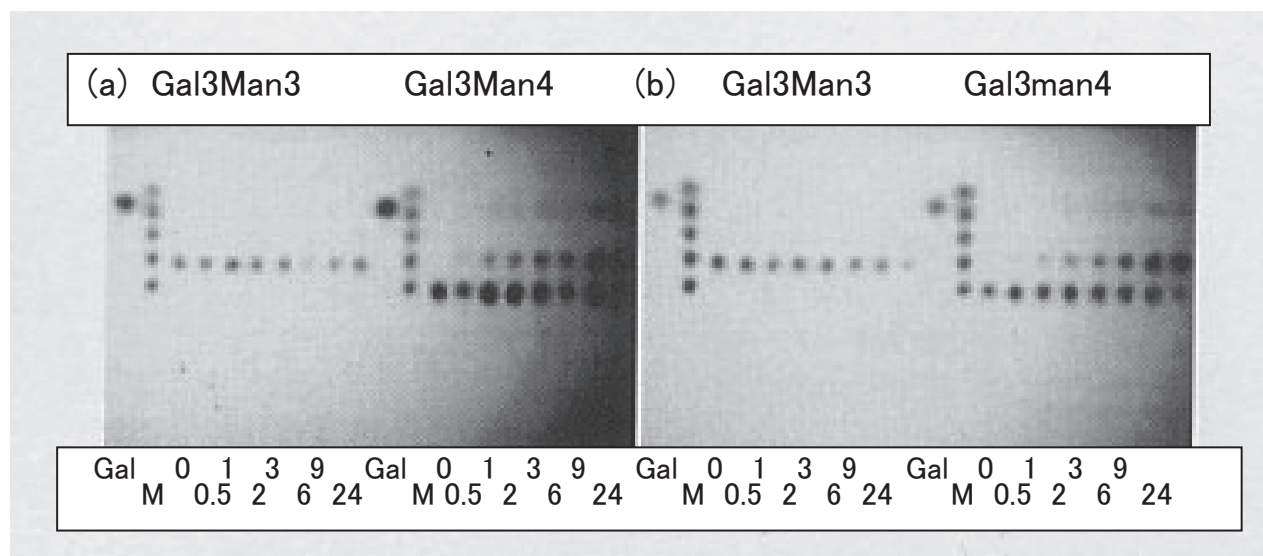


図 2. *P. purpurogenum* αGal のガラクトマンノオリゴ糖に対する特異性

(a) 天然型 *P. purpurogenum* αGal, (b) 組換え *P. purpurogenum* αGal

Gal: ガラクトース, M: マンノース, マンノビオース, マンノトリオース, マンノテトラオース, マンノペンタオース

精製した。最終標品は SDS-PAGE で分子量 52kDa の単一のタンパク質バンドを示した。Con A (コンカナバリン A) との反応性から、この酵素分子内に N 型糖鎖が存在することが示唆された。*M. vinacea* αGal I のタンパク質部分のサイズを推定するために、エンド-β-グリコシダーゼ F で処理した後、酵素を SDS-PAGE に供した。タンパク質バンド (50, 46, および 43kDa) を検出し、Con A は、分子量 50 および 46kDa のタンパク質バンドと 52 kDa の成熟酵素と反応したが、43kDa のバンドとは反応しなかったことから、*M. vinacea* αGal I は 43 kDa のタンパク質部分と、8 ~ 9kDa のオリゴ糖鎖からなると考えられた。また、本酵素のゲルろ過の結果 (精製酵素の分子量は 160 ~ 200kDa) から、本酵素は溶液中で 4 量体として存在していると考えられた。

精製した αGal I と V8 プロテイナーゼで消化した酵素を SDS-PAGE に供し、PVDF メンブレンにブロッティングした後、それぞれの N 末端アミノ酸配列を分析したところ、それぞれ S-N-N-G-L-A-I-T-P-Q-M-G-X-N-T-X-N-K-Y-G-X-N-I-Q-L-I-L-D-A-A-K-A-I-V-S-S-G-L と I-I-M-N-D-E-V-I-A-V-N-Q-D-S-S-Y-S-P-A-V と同定された。

2) 一次構造

Mortierella vinacea αGal I をコードする遺伝子を RT-PCR 法によりクローニングし、ヌクレオチド配列を決定した結果、エドマン分解によって同定された αGal I の N 末端および内部アミノ酸配列が本酵素のアミノ酸配列中に存在した。この酵素は、20 アミノ酸のシグナル配列と 397 アミノ酸の成熟 αGal の 417 アミノ酸残基で構成されていた。成熟 αGal I のサイズは、44kDa と計算され、脱グリコシル化された αGal I のサイズ (43kDa) とほぼ一致した。シークエンス内に 5 つの推定 N 型糖鎖結合部位 (N-X-S/T) が確認され、これは ConA との反応性と一致している。

M. vinacea αGal I のアミノ酸配列と、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の αGal、グアー (*Cyamopsis tetragonoloba*) 由来の αGal I⁷⁾ およびヒト αGal A¹⁵⁾ のアミノ酸配列の比較を行ったところ、相同性は、それぞれ 47%, 43%, および 34% であった。

(2) *M. vinacea* αGal II

1) 精製

M. vinacea の培養ろ液から、新規 αGal を単離し αGal II と名付けた。精製された αGal II は、SDS-PAGE で単一のタンパク質バンドを示し、αGal II の分子量は、SDS-PAGE で 51 ~ 62kDa, Superdex 200HR 10/30 カラムを用いたゲルろ過で 60kDa と算出され、本酵素が溶液中では単量体で存在していることが示唆された。

2) 一次構造

精製された αGal II, およびリジルエンドペプチダーゼで消化した酵素タンパク質を SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンにブロッティングした後、精製酵素とフラグメントの N 末端アミノ酸配列を同定した。それぞれ I-I-D-P-S-L-A-T-P-Q-M-G-W-N-S-W-N-K- および N-V-S-R-P-Y-F-F-S-L- と決定した。

本酵素 cDNA をクローニングし、そのヌクレオチド配列 (1240bp) を決定した。エドマン分解によって同定された αGal II の N 末端および内部アミノ酸配列が推定アミノ酸配列中に見出された。本酵素は 20 アミノ酸残基からなるシグナル配列を含む 396 アミノ酸残基を有し、成熟酵素は 376 アミノ酸残基で、その分子の大きさは 41kDa であった。推定されたアミノ酸配列は、他の起源の αGal の配列と 31-49% の相同性を示した¹³⁾。

(3) 基質特異性

αGal I と αGal II の基質特異性をガラクトオリゴ糖、ガラクトマンノオリゴ糖を用いて検討した。

図 3 に示すように、αGal II はメリビオース、ラフィノース、スタキオース、および Gal3Man3 や Gal3Man4 などのガラクトマンノオリゴ糖を加水分解したが、αGal I は Gal3Man4 を加水分解できなかった¹⁸⁾。αGal II はさらに高分子であるガラクトマンナンにも効果的に作用した (図 4 a)。

これらの結果から αGal は、ガラクトマンノオリゴ糖に対する特異性から 3 つのグループに分けることができる。即ち 1 つ目のグループは *P. purpureogenum* αGal のように側鎖ガラクトースのみに作用する αGal, 2 つ目のグループは *M. vinacea* αGal I のように末端ガラクトースのみに作用する αGal, 3 つ目のグループは *M. vinacea* αGal II のように両方のガラクトースに作用する αGal である。

グアーガムとローカストビーンガムは、食品業界

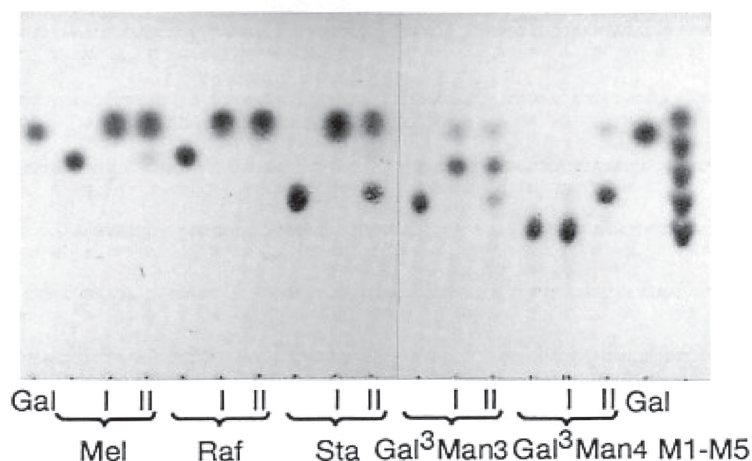


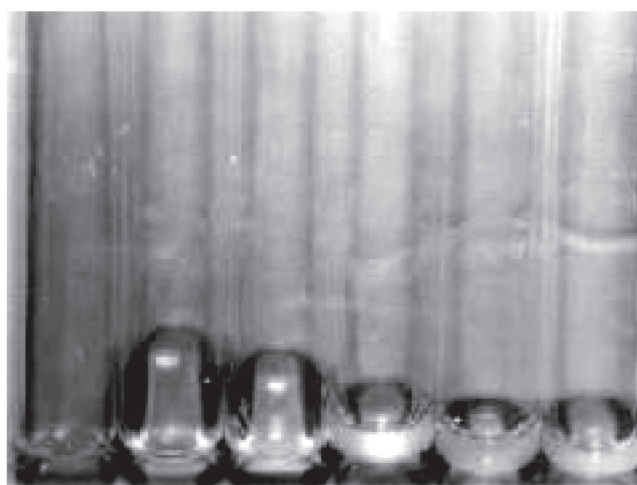
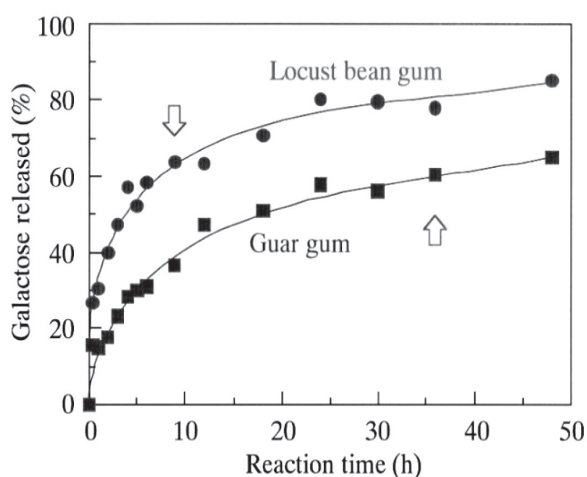
図 3. *M. vinacea* α Gal I and α Gal II のガラクトオリゴ糖及びガラクトマンノオリゴ糖に対する特異性

I: *M. vinacea* α Gal I, II: *M. vinacea* α Gal II

Gal: ガラクトース, Mel: メリビオース, Raf: ラフィノース, Sta: スタキオース, Gal³Man³: 6³-a-D-ガラクトマンノトリオース, Gal³Man⁴: 6³-a-D-ガラクトマンノペンタオース, M1-M5: マンノース, マンノビオース, マンノトリオース, マンノテトラオース, マンノペンタオース

(a)

(b)



GG 2 7.5 15 24 LBG
反応時間 (h)

図 4. ガラクトマンナンに対する *M. vinacea* α Gal II の作用 (a) 及びキサンタンガムのゲル化に対する酵素処理の影響 (b)

(a) ガラクトマンナンに *M. vinacea* α Gal II を作用させた時のガラクトースの遊離率の経時変化

矢印: 沈殿が生成した時点

(b) キサンタンガムにそれぞれの時間酵素処理したグアーガムを加えた時のゲル化の状態

GG: グアーガム (無処理), 2h: 2h 処理, 7.5h: 7.5h 処理, 15h: 15h 処理, 24h: 24h 処理, LBG: ローカストビーンガム (無処理)

で増粘剤として広く使用されている。ローカストビーンガム (Gal/Man = 1/4) は、カラギーナンやキサンタンガムなどの多糖類と混合することにより、ゲルを形成するが³⁾、グアーガム (Gal/Man = 1/2) はゲル化多糖類と混合してもゲルができない。グアーガムはローカストビーンガムよりかなり安

価であり、安定的に供給可能なため、 α -ガラクトシダーゼによりガラクトース部分を除去してローカストビーンガム様の修飾ガラクトマンナンを調製することができれば、ゲル化能を有する多糖を得ることができる。

コーヒー、グアー、および *P. ochlochloron* からの

α Gal は、ガラクトマンナンからガラクトースを除去することが報告されているが、これらの酵素を使用するためには共存する β -マンナーゼ活性を除く必要がある。 β -マンナーゼ活性が存在することは、マンナン主鎖の加水分解によりガラクトマンナンの粘性を低下させ、かつゲル化能を失うことにつながる。

M. vinacea の α Gal 活性はラクトースの添加により誘導されるため¹⁹⁾、 β -マンナーゼ活性のない α Gal 画分は、簡単な精製ステップによって培養ろ液から得られた。 α Gal I はガラクトマンナンにほとんど作用せず、 α Gal II はガラクトマンナンを効果的に加水分解し、ポリマーのガラクトース含有量を効果的に減少させた (図 4a)。キサンタンガムと混合し、ゲル化能を検討したところ無処理のグアーガムはゲル化しなかったが、*M. vinacea* α Gal II で 15 h 以上処理したグアーガムはローカストビーンガムの場合と同等のゲル化能が確認できた (図 4b)。

(4) 組換え α Gal I と α Gal II

M. vinacea α Gal I と α Gal II の cDNA を *GAL10* プロモーターの制御下で *S. cerevisiae* で発現させた。組換え α Gal I は、初めは主にペリプラズムに局在し、200 時間の培養後にペリプラズムと同じ濃度で培地に分泌された。対照的に、組換え α Gal II は培養初期から主に培地に分泌され、総活性は α Gal I の 3 ~ 4 倍であった。これらの事実は、 α Gal I および II の局在がこれらのタンパク質の構造特性によって決定されていることを示している。

S. cerevisiae のインペルターゼは 2 つの状態で存在する。1 つは 50% (w/w) の炭水化物を含むグリコシル化された細胞外部に分泌される形態であり、もう 1 つはグリコシル化されていない細胞内部に存在する形態である²⁰⁾。ツニカマイシンによるグ

リコシル化の阻害は、インペルターゼの細胞内蓄積をもたらした²¹⁾、この結果は、オリゴ糖鎖が組換え α Gal の分泌に重要であることを示唆している。

溶液中の組換え α Gal II は、Superdex 200HR カラムで 200kDa、SDS-PAGE で 150-200kDa の分子サイズを示し、糖鎖含量は 73-80% であり、酵素は単量体 (モノマー) として存在した。一方、 α Gal I は Superdex 200HR カラムで 240kDa、SDS-PAGE で 58-67kDa であり、糖鎖含量は 24-34% であった。SDS-PAGE でのサイズの増大は、付加された N 型糖鎖のサイズによっており、タンパク質の分泌が糖鎖含量に影響されていることを示している (表 2)。

組換え α Gal の基質特異性を、Gal3Man3、Gal3Man4 を用いて調べた²²⁾。組換え α Gal I は Gal3Man3 のみを切断し、組換え α Gal II は Gal3Man3 および Gal3Man4 の両方を加水分解した。即ち、組換え酵素がガラクトマンノオリゴ糖に対して天然酵素と同じ特異性を示すことが確認された。

3. イネ (*Oryza sativa* L. Nipponbare) α -ガラクトシダーゼ

(1) 精製

イネ α -ガラクトシダーゼ (イネ α Gal I) を、イネ細胞の培養ろ液から精製した。図 5 に示すように、精製された α Gal I は SDS-PAGE で均一であり、酵素の分子量は、SDS-PAGE で 41 kDa、Sephacryl S-200 でのゲルろ過で 40 kDa と推定され、酵素が溶液中にモノマーの形で存在することを示している。また、ConA との反応性がない (データは示していない) ため N 型糖鎖を含まない酵素であると考えられる。

(2) 一次構造

イネ α Gal I cDNA をクローニングし、その塩基配

表 2. 組換え *M. vinacea* α Gal I and α Gal II の性質

	I	II
Molecular mass (kDa) SDS-PAGE*	58 ~ 67	150 ~ 200
Optimum pH (至適 pH)	4.0	4.0
Optimum temperature (至適温度)	60°C	60°C
pH stability (pH 安定性)	6.0 ~	2.0 ~ 7.0
Heat stability (熱安定性)	~ 50°C	~ 50°C (native ~ 30 °C)
Substrate specificity (基質特異性)		
Gal3Man3	+	+
Gal3Man4	-	+

*SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

列からアミノ酸配列を推定した。BLAST (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を使用してタンパク質および核酸データベースで利用可能な配列と比較した結果、最も類似性の高いコーヒー α Gal (*C. arabica* α Gal) は、アミノ酸配列全体でイネ α Gal I と 73% の相同性を示した。N 末端から中央部にかけて相同領域がいくつか存在するが、C 末端部分はこれらの酵素の類似性が低かった。イネ α Gal I には N 型糖鎖結合部位 (N-X-S/T) が認められず、ConA との反応性の欠如の結果と一致している。

イネ α Gal I には 7 つの Cys 残基があり、そのうちファミリー 27 α Gal 間で共通に保存されている N 末端領域には 5 つの Cys 残基がある。一部の α Gal は、pCMB (p-chloromercuribenzoate) などの SH 試薬によって阻害されることが報告されているが、1mM pCMB で 30°C、30 分間処理するとイネ α Gal I は完全に不活化された (対照の 2% 未満)。このことから、本酵素にも基質結合部位近傍に遊離 Cys が存在し、pCMB や Hg^{2+} によって修飾され、基質結合が阻害されると考えられる²³⁾。

(3) 基質特異性

イネ α Gal I cDNA を大腸菌 *origami* と pET-32a (+)

を用いて発現させた。イネ α Gal I は、ラフィノース>メリピオース>スタキオースの順に加水分解した。更に Gal3Man3 と Gal3Man4 は、*M. vinacea* α Gal II¹³⁾ と同様にイネ α Gal I (図 5) によっても加水分解された。前述のように、 α Gal はガラクトマンノオリゴ糖への特異性に応じて 3 つのグループに分類でき、ガラクトマンノオリゴ糖で得られた結果から、イネの α Gal I が α Gal の 3 番目のカテゴリーに分類されることを示した。このカテゴリーに属する酵素は高分子基質にも作用した²⁴⁾。

イネ α Gal I によるローカストビーンガムとグアーガムからのガラクトース除去の上限は、それぞれ 32% と 24% であった。植物 α Gal は、ガラクトマンナンにさまざまな程度で作用することが報告されている^{25, 26)}。イネの α Gal I は、他の植物、微生物の酵素で報告されているようにグアーガムよりもローカストビーンガムに速く作用した²⁷⁾。

4. α Gal のアミノ酸配列の比較 (図 6)

P. purpurogenum α Gal と *T. reesei* α Gal (AGL1) は、高い相同性を示した (57%) が、*P. purpurogenum* α Gal の残基 150 から 183 間にユニークな 34 アミノ酸の挿入があり、*T. reesei* α Gal (AGL1) の配列でも確認された。これらの 2 つの酵素には、N 末端領域に α Gal に共通な 4 つの Cys が存在し、挿入領域と C 末端領域にそれぞれ 2 つの Cys 残基を含むなど、同一の位置に 9 つの Cys 残基を保持していた。この事はこれらの酵素の三次構造がかなり類似している事を示唆している²⁴⁾。

M. vinacea α Gal I と酵母の α Gal には、9 つのシステイン残基が含まれている。9 つの残基のうち 5 つのシステイン残基 (21, 53, 101, 131, および 166 番目の残基) は N 末端ドメインにあり、これらのシステイン残基がすべての酵素間でよく保存されていることは各 α Gal の三次構造を構築するためにこれらが重要であることを意味する。

M. vinacea α Gal I には 196-215 付近に 20 アミノ酸の挿入ループが存在し、*S. cerevisiae* α Gal にも同様の挿入ループが存在した。*M. vinacea* α Gal I のこのループに位置する 4 つのシステイン残基は、*S. cerevisiae* α Gal や *S. carlsbergensis* α Gal にも存在し¹¹⁾、2 つの S-S 架橋がこれらの酵素の安定性に関わっていると考えられる。

M. vinacea α Gal II には挿入ループ配列は確認され

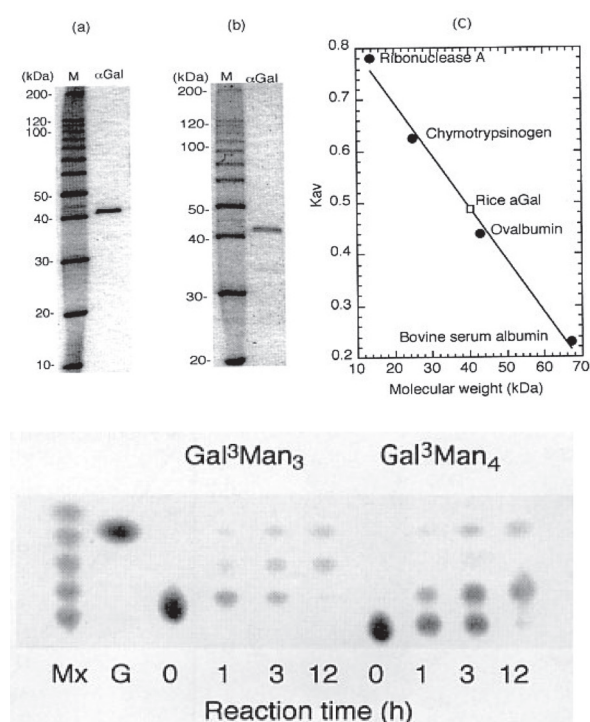


図 5. 天然型 (a) と組換え (b) イネ α Gal I の SDS-PAGE, ゲルろ過 (c), とガラクトマンノオリゴ糖に対する組換えイネ α Gal I の基質特異性

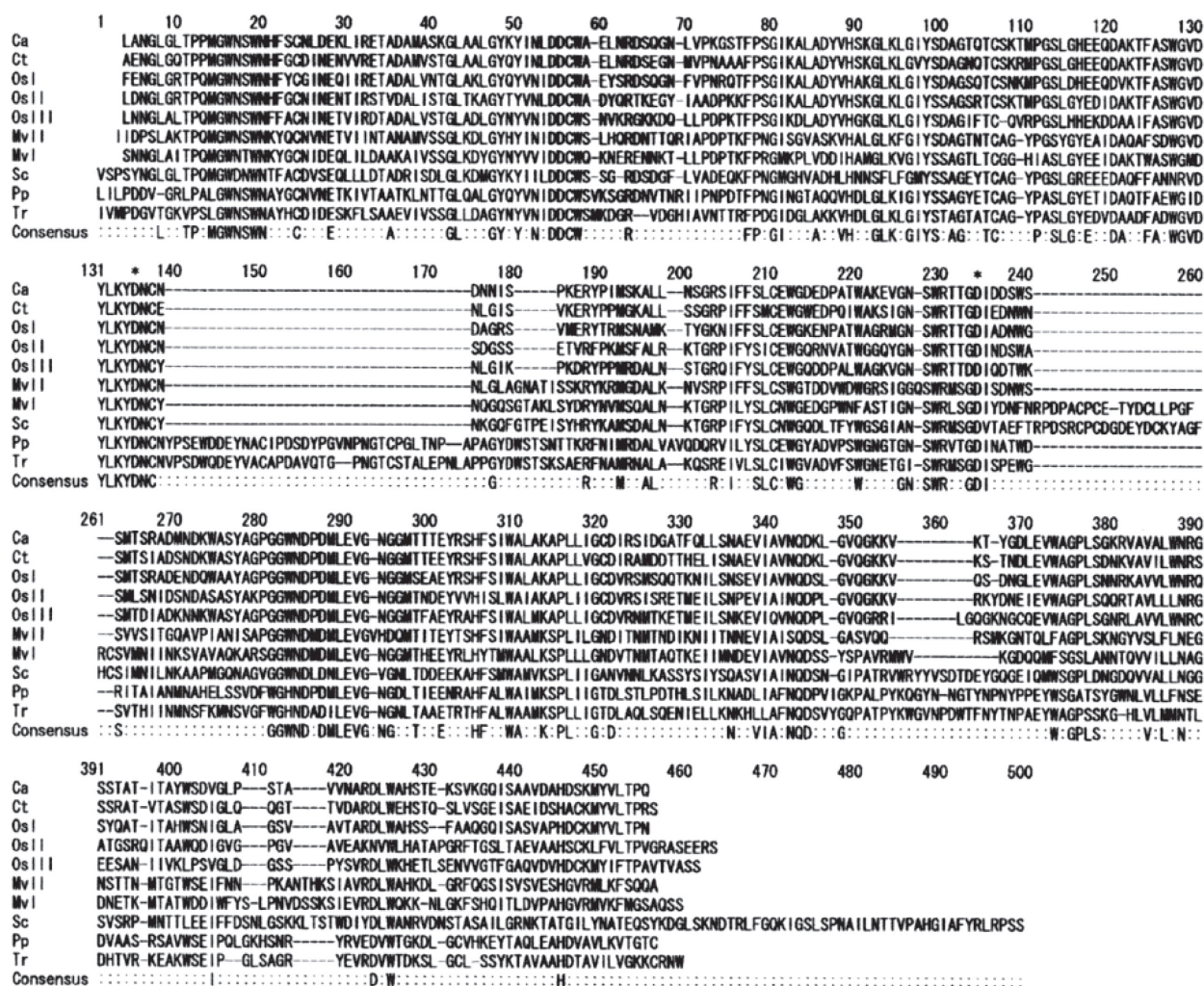


図 6. 種々起源 α Gal のアミノ酸配列の相同性

各 α Gal のアミノ酸配列を Multialin (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) を用いて類似性が最大となるようにアライメントをとった。触媒残基はアスタリスク*によって示した。10 配列中 8 配列が同一である場合 consensus とした。Ca, *Coffea arabica* (coffee) α Gal (CAI47559); Ct, *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) α Gal (CAA32772); OsI, *Oryza sativa* (rice) α Gal I (BAB12570); OsII, *Oryza sativa* α Gal II; OsIII, *Oryza sativa* α Gal III (BAC79549); Mv II, *Mortierella vinacea* α Gal II (BAA33931); Mv I, *Mortierella vinacea* α Gal I (AAB35252); Sc, *Saccharomyces cerevisiae* α Gal (AAA34700); Pp, *Penicillium purpurgenum* α Gal (BAA22992); Tr, *Trichoderma reesei* α Gal (CAA93244).

ず、5つのシステイン残基と9つの推定N型糖鎖結合部位が配列中に存在した。

イネ α Gal I には *M. vinacea* α Gal II と同様に挿入ループ配列は確認されず、7つのシステイン残基が確認されたが、N型糖鎖結合部位 (N-X-S/T) は確認されなかった。

V 基質認識、特性と高次構造

1. イネ α -ガラクトシダーゼ I (イネ α Gal I)

エキソグリコシダーゼの構造と機能の関係をよりよく理解するために、イネ α Gal I を精製し、ハンギングドロップ蒸気拡散法による単結晶調製を行った。イネ α Gal の結晶は、15mg/ml の濃度の $5\mu\text{l}$ の

タンパク質溶液を $5\mu\text{l}$ のリザーバー溶液 (5% D-ガラクトース, 5% イソプロパノール, 0.1M 硫酸アンモニウム, 0.1M 酢酸緩衝液 pH4.5) と混合し、 20°C , 2 週間で得られた。

(1) イネ α Gal I の全体構造

イネ α Gal I の結晶構造は、水銀および金誘導体を使用した MIR (Multiple Isomorphous Replacement, 多重同形置換) 法により $1.5\text{\AA}$ の分解能で決定された。イネ α Gal I は触媒 (N 末端) ドメイン (1 ~ 278) と C 末端ドメイン (279 ~ 362) を持つ 362 アミノ酸で構成されていたが、これはトリオースリン酸イソメラーゼ²⁸⁾ で以前に観察され、現在では多くのグリコシド加水分解酵素の共通のモチーフとなってい

る。結晶化中に添加された D-ガラクトース分子が結合リガンドとして同定され、活性部位ポケットは触媒ドメインの中央βバレルの C 末端側に見られた。2つのジスルフィド結合が触媒ポケットの近くにあり、C 末端ドメインは、8本のβストランドで構成されていた。N 末端、C 末端2つのドメイン間のインターフェースは、主に疎水性相互作用であった²⁹⁾ (図 7)。

(2) 活性部位と基質

イネ αGal I の結晶構造は D-ガラクトースとの複合体として解かれたが、1.5Å 分解能での電子密度図により、糖環の立体配座とヒドロキシル基の配向が明確に識別された。アノマー C1 炭素では、α-アノマーとβ-アノマーの両方の O1 ヒドロキシル基に対応するマルチコンフォメーション電子密度が明確に観察され、D-ガラクトース分子が2つのアノマー形態の混合物として結合したことを示している。密度の強さから、α-アノマーとβ-アノマーはそれぞれ 0.3 と 0.7 の比率で存在すると推定された。これは、ガラクトピラノースの溶液状態の天然存在比 0.36 / 0.64 と類似している。α-アノマーヒドロキシル基は外側に突き出ていたが、β-アノマーヒドロキシル基はアクティブポケットの側面を指していた。

イネ αGal I に見られる触媒残基は、図 6 中*で示したようにストランド 4 の末端にある Asp130 とストランド 6 の後の Asp185 である。Asp130 はβ-アノマー O1 ヒドロキシル酸素に水素結合し、ガラクトース分子の O5 原子と水素結合できる距離内に

存在した。別の触媒残基である Asp-185 は、α-アノマー O1 ヒドロキシルおよび O2 ヒドロキシル酸素原子に水素結合していた。この酵素による触媒作用は二重置換メカニズムであると考えられ、イネ αGal I では、Asp185 はプロトンドナーとして機能し、Asp130 はガラクトースのアノマー炭素 C1 原子 (2.5Å) の近くにあるため、求核剤として機能する。Asp185 はα-アノマーヒドロキシル O1 原子の近くにあり、これは基質への α-1,6-グリコシド結合の酸素原子に対応する。

触媒残基に加えて、周りの他の残基はリガンドに対して親水性および疎水性相互作用を示し、Arg181, Trp164, Cys162, および Asp185 は、ガラクトースの O2 酸素原子と水素結合を形成していた。Lys128 は、2つのヒドロキシル酸素 O3 および O4 原子に水素結合し、Asp51 はヒドロキシル酸素 O4 原子に水素結合し、Asp52 は O6 原子に水素結合していた。さらに、残基 Trp16, Cys101, および Met217 で疎水性相互作用が観察された。ガラクトース結合タンパク質とレクチン³⁰⁾ の間でみられるように Trp16 の芳香族インドール環は糖環に面しておらず、結合したガラクトースの O3, C3, C4, C5, C6, および O6 原子によって形成される一種の平らな表面に面していた。Cys101 は、2つのジスルフィド架橋のうちの1つを Cys132 と形成した。合計 10 残基がガラクトース結合に関与していた。

pCMB と反応する活性部位近傍の Cys 残基は Cys162 と考えられ、その側鎖の向きも活性中心に向かっていているため、pCMB と反応すると立体障害により基質が近づけなくなり活性が失われると考えられる。

(3) ガラクトマンノオリゴ糖に対する特異性

ファミリー 27 酵素のアラインメント (図 6) とイネ αGal I の三次構造から、黒矢印の挿入と白矢印の挿入が活性部位のすぐ隣にあることがわかる (図 7)。挿入のないグループ (イネ αGal) は末端ガラクトースと側鎖ガラクトースの両方に作用し、黒矢印の挿入のあるグループは側鎖ガラクトースに作用できず、白矢印の挿入のあるグループは末端ガラクトースに作用できない。このような性質から挿入部の基質特異性に及ぼす機能の1つは基質結合の妨害であると考えられる。

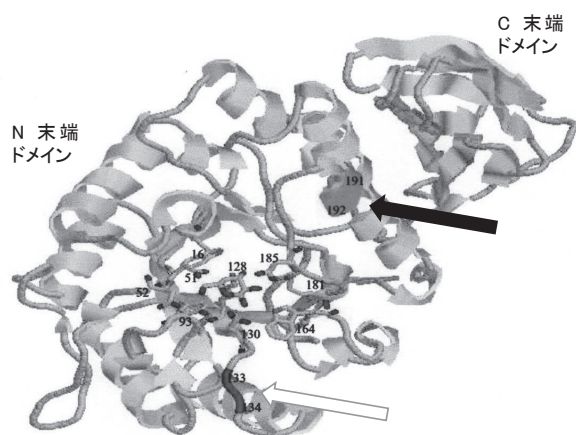


図 7. イネ (*O. sativa*) αGal I の単量体構造と挿入ループの位置

M. vinacea αGal I の 196-215 の挿入ループと *P. purpureogenum* αGal の 150-183 の挿入ループの位置をそれぞれ黒矢印と白矢印で示した。

2. *M. vinacea* α -ガラクトシダーゼ I

(1) 構造解析

構造解析は、イネ α -ガラクトシダーゼの構造モデル (PDB, Protein Data Bank, タンパク質データバンクコード 1UAS, 39%の相同性) を検索モデルとして使用し、プログラム MOLREP を使用した分子置換法によって実行した³⁰⁾。解析はプログラム Refmac5 を使用してシミュレーテッドアニーリング法を用い、モデル構築は自動モデリングプログラム ARP/wARP を使用して行った^{31,32)}。

(2) サブユニット構造

M. vinacea α Gal I の結晶構造は 2.0Å の分解能で決定され、各ユニットには、397 アミノ酸残基の 1 つのペプチド鎖、3 個の N 型糖鎖、556 個の水分子、および 1 個の Tris と 4 個の PEG400 分子が含まれていた。酵素は分泌真菌タンパク質として産生されたため、N 結合型糖鎖をもつ糖タンパク質であった。4 つのジスルフィド架橋 (Cys21-Cys53, Cys101-Cys131, Cys201-Cys215, および Cys203-Cys208) が触媒ドメインに存在した。

挿入領域の Cys 残基が偶数であることは興味深い。たとえば、*P. purpurogenum* α Gal の残基 147~180 (*T. reesei* の 146~180) には 2 つの Cys 残基が含まれ、酵母 α Gal の残基 198 ~ 219 および *M. vinacea* α Gal I の残基 196 ~ 215 には 4 つの Cys 残基が含まれる。これらの Cys 残基は、分子内に S-S ブリッジを形成することにより、これらの酵素の安定性を維持する役割を果たしていると考えられる。

モノマー構造は、既知の GH27 α Gal の構造と類似していた。イネの α Gal と比較して、触媒ドメインと C 末端ドメインの基本的な二次構造はよく保存されていた。*M. vinacea* α Gal I には 3 つの注目すべき挿入ペプチドがあった。すなわち、ペプチド 137-141 (挿入 1) と 196-215 (挿入 2) は (β/α) 8 バレルのアクティブな裂け目の周りにあり、ペプチド 346-351 (挿入 3) は C 末端ドメインに位置していた。(β/α) 8 バレルの 6 番目の β シートの後に位置する最大のペプチド 196-215 は、20 個のアミノ酸で構成され、ねじれたペプチドの中に 2 つのジスルフィド架橋を含んでおり、(Cys201-Cys215 および Cys203-Cys208)、触媒ポケットの前に位置する小さな球状ドメインを形成した。

酵素の触媒ポケットは、触媒ドメインの中央の β バレルの C 末端側に位置していた。求核剤および

プロトンドナーとしてそれぞれ作用する 2 つの触媒残基、Asp129 および Asp189 は、触媒ポケットの上部と下部に 6.3Å の距離で配置されていた。触媒ポケット内のほとんどのアミノ酸は、イネの α Gal I のアミノ酸と同一であった。イネの α Gal I の構造に基づいて、Trp16 とジスルフィド架橋 Cys101-Cys131 はポケットの疎水性表面を形成しており、Cys166, Trp168, および Arg185 はガラクトース分子の C-2 ヒドロキシル基を認識していた。

(3) 4 量体構造

化学的な分析により、*M. vinacea* α Gal I は 4 量体構造を形成していると考えられ¹⁰⁾、その予備的な結晶学的研究もこの仮説を支持した³³⁾。4 量体構造は平らな円筒形で、100Å の直径で、厚さは 75Å である。4 量体界面は主に隣接する分子の触媒ドメイン間に位置し、ファンデルワールス相互作用、9 つの水素結合相互作用、および水媒相相互作用によって構成されていた。Asn155 に結合した N 型糖鎖と隣接するタンパク質分子との間に 3 つの水素結合が見られた。

触媒ポケットは 4 量体の接触面に埋もれており、触媒ポケットを構成している Trp168 の側鎖は、隣接する分子の Lys230 の 4.5Å の位置にあり 4 量体形成に関与していた。触媒ポケットの近くに、挿入されたペプチド 196-215 (挿入 2) があり、そこから 9 つのアミノ酸残基が 4 量体接触面の形成に関与していた。図 8 に示すように、この挿入は 4 (fold axis) 倍軸の周りに集まり、隣接する分子と相互作用して、4 量体界面を形成した。同様に、他の 2 つの挿入も 4 量体界面に存在していた。したがって、これらの挿入は、この酵素の安定した 4 量体を形成する上で重要な役割を果たしていると考えられる。

レイロらは、Gal4Man4 の構造をもとに *S. cerevisiae* α Gal を用いて、ドッキングシミュレーションを行い、20 アミノ酸の挿入が末端ガラクトースを持つ Gal4Man4 を基質認識部位にフィットさせ、Gal 部分が活性部位に深く入り込んでいることを確認した³⁴⁾。この結果は、*M. vinacea* α Gal I が Gal3Man3 に対して効果的に作用することを説明できる。

M. vinacea α Gal I 分子の N 型糖鎖が結合しているアスパラギンは、Asn155, Asn276, および Asn371 であった。これらの中の 2 つ (Asn155 と Asn276) は触媒ドメインにあり、Asn371 は C 末端ドメインに存在した。

Asn155 に結合した糖鎖の糖鎖部分が 3 本の鎖の中で最もよく観察され、糖鎖の構造は高マンノース型であると判断された。Asn155 に結合した糖鎖は、(β/α) 8 バレルの触媒部位の裏側に位置し、隣接する単量体分子まで伸びており、3 つの水素結合相互作用を介して四量体形成に関与していた。Asn276 および Asn371 に結合した糖鎖は溶媒領域に伸びていた。

グリコシル化は、その不均一性と柔軟性のために、タンパク質の結晶化を妨げることがあるが、*M. vinacea* αGal I は容易に結晶化した。これは、*M. vinacea* αGal I が、結晶パッキングに適用できる 4 回対称の安定した 4 量体構造を持っているためと考えられる。さらに、*M. vinacea* αGal I の 4 量体化は、その基質特異性を変化させ、安定性を高めていると考えられる。*M. vinacea* αGal I の 4 量体化の生物学的意味については今後の検討課題である。

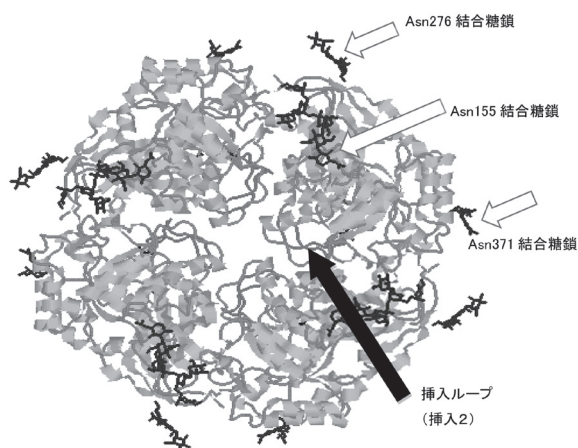


図 8. *M. vinacea* αGal I の 4 量体構造
黒矢印は 196-215 の挿入ループを示し、白矢は N-結合型糖鎖を示す。挿入ループと Asn155 に結合した糖鎖は、他のサブユニットと相互作用することにより 4 量体形成に必要な役割を果たしている。

VI まとめ

1. 基質特異性による分類

α-ガラクトシダーゼは、表 3 のように 3 つのグループに分けることができる。

ガラクトマンノオリゴ糖の側鎖状に結合したガラクトースのみに作用する A グループと、末端に結合したガラクトースのみに作用する B グループ、そして側鎖、末端関係なく作用する特異性の広い C グループである。

A グループの酵素は、溶液中でモノマー (単量体) として存在し、150 番目前後に約 30 アミノ酸残基の挿入を持っているのが特徴である。この挿入は活性部位周辺に存在し、挿入部分には S-S 結合が存在し、A グループ独特のループ構造を示しており、これらの酵素の基質特異性と関わっていると考えられる。

B グループの酵素は、溶液中でテトラマー (4 量体) として存在し、200 番前後に 20 アミノ酸残基の挿入ループを持つ。このループは Gal3Man3 に対して効果的に作用することに加え³⁴⁾、Gal3Man4 の基質結合を妨げるように作用すると思われる。また、B グループの酵素については、挿入部分が多量体化と密接な関係があることが示唆されており、活性部位を中心に 4 量体が形成されているため、高分子基質は活性部位に接触することができない。一方で、A グループの酵素は単量体であるが、高分子基質には作用できない。この点については詳細な検討が必要である。

C グループの酵素については、多糖を含むすべての基質に作用する広い基質特異性を示す。溶液中ではモノマーとして存在し、A、B グループの酵素と比べて、挿入がないために基質を選ばない広い特異性を示しているのであろう。ポリマーに対して効率

表 3. 種々起源 α-ガラクトシダーゼの基質特異性と構造的特徴

Group	起源	基質	挿入	高次構造	活性部位 (Asp, Asp)	N 型糖鎖
A	<i>P. purpurogenum</i> (<i>T. reesei</i>)	Gal3Man4	34 a.a.	単量体	D134 (Nnucleophile) D228 (Proton donor)	9 個 (9 個)
B	<i>M. vinacea</i> I (<i>S. cerevisiae</i>)	Gal3Man3	20 a.a.	4 量体	D129 (Nnucleophile) D189 (Proton donor)	5 個 (9 個)
C	<i>M. vinacea</i> II <i>O. sativa</i>	Gal3Man3 Gal3Man4 polymer	none	単量体	D130 (Nnucleophile) D185 (Proton donor)	9 個 0 個

的に作用するこのグループの酵素の性質は食品素材の高付加価値化ともつながる可能性が考えられる。

グアーガムとローカストビーンガムは前述のように増粘剤として食品業界で広く使用されている。ローカストビーンガムは、カラギーナンやキシランタンガムなどの酸性多糖類と混合するとゲル化するが、グアーガムにはゲル化能は認められない。グアーガムはローカストビーンガムより容易かつ安定して入手可能であり、はるかに安価であるため、*M. vinacea* αGal II や植物酵素によるグアーガムの脱ガラクトシル化による優れた機能特性を備えた修飾ガラクトマンナン製造への利用の可能性に期待したい。

Ⅶ 引用文献

- 1) H. Sakuraba *et al.* (2006), Corrective effect on Fabry mice of yeast recombinant human alpha-galactosidase with N-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. *J. Hum. Genet.* **51**: 341-352.
- 2) J. Wang *et al.* (2007), PCR-based strategy for construction of multi-site-saturation mutagenic expression library. *J. Microbiol. Methods* **71**: 225-230.
- 3) P.M. Dey *et al.* (2007), 1984. α-Galactosidase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **56**: 141-249.
- 4) P.M. Dey *et al.* (1993), Induction of α-galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) gum. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**: 361-371.
- 5) B.L. Cantarel *et al.* (2009), The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**: D233-D238.
- 6) H. Ly and S. Withers (1999), Mutagenesis of glycosidases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 487-522.
- 7) <http://www.cazy.org/GH27.html> (参照 2021-10-26)
- 8) G.G. Park *et al.* (1987), Purification and some properties of β-mannanase from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2709-2716.
- 9) H. Shibuya *et al.* (1995), Purification and some properties of α-galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 2333-2335.
- 10) E.M. Margolles-clark *et al.* (1996), Three α-galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **240**: 104-111.
- 11) M. Sumner-Smith *et al.* (1985), Analysis of the inducible MEL1 gene of *Saccharomyces carlsbergensis* and its secreted product, α-galactosidase. *Gene* **36**: 333-340.
- 12) H. Shibuya *et al.* (1995), Nucleotide Sequence of α-Galactosidase cDNA from *Mortierella vinacea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 1345-1348.
- 13) H. Shibuya *et al.* (1997), Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel α-galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 592-598.
- 14) A. Zhu and J. Goldstein (1994), Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean α-galactosidase. *Gene* **140**: 227-231.
- 15) F.F. Bishop *et al.* (1986), Human α-galactosidase A: nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the mature enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4859-4863.
- 16) H. Suzuki *et al.* (1970), α-Galactosidase from *Mortierella vinacea*, crystallization and properties. *J. Biol. Chem.* **245**: 781-786.
- 17) N. Overbeek *et al.* (1989), Cloning and nucleotide sequence of the alpha-galactosidase cDNA from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar). *Plant Mol. Biol.* **13**: 541-550.
- 18) R. Kaneko *et al.* (1990), Substrate specificity of α-galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 237-238.
- 19) T. Shibata *et al.* (1989), Effect of β-galactosidase on production of α-galactosidase by *Mortierella vinacea*. *Seito Gijyutu Kenkyu Kaishi* **37**: 47-53.
- 20) V.A. Reddy *et al.* (1988), Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase. *J. Biol. Chem.* **263**: 6978-6985.
- 21) G. Gallili and J.O. Lampen (1977), Large and small invertase and the yeast cell cycle: pattern of synthesis and sensitivity to tunicamycin. *Biochem. Biophys. Acta.* **475**: 113-122.
- 22) H. Shibuya *et al.* (1999), Purification and characterization of recombinant *Mortierella vinacea* α-galactosidases I and II expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 1096-1099.
- 23) W.D. Kim *et al.* (2002), α-Galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa*) cells. *Phytochemistry* **61**: 621-630.
- 24) H. Shibuya *et al.* (1998), Cloning and high-level expression of α-galactosidase cDNA from *Penicillium purpurogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4489-4494.
- 25) D. Barham *et al.* (1971), Studies on the distribution of α-galactosidases in seeds. *Phytochemistry* **10**: 1759-1763.
- 26) J.E. Courtois and F. Petek (1966), Alpha-galactosidase from coffee beans, In Neufeld, E.F., Ginsburg, V. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol.8, Academic Press, New York, pp. 565-571.
- 27) V. Puchart *et al.* (2000), Purification and characterization of α-galactosidase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1524**: 27-37.
- 28) D.W. Banner *et al.* (1975), Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**: 609-614.
- 29) Z. Fujimoto *et al.* (2003), Crystal structure of rice α-galactosidase complexed with D-galactose. *J. Biol. Chem.* **278**: 20313-20318.
- 30) S. Elgavish and B. Shaanan (1997), Lectin-carbohydrate

- interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 462-467.
- 31) G.N. Murshudov *et al.* (1997), Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* **53**: 240-255.
- 32) S.X. Cohen *et al.* (2004), Towards complete validated models in the next generation of ARP/wARP. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**: 2222-2229.
- 33) Z. Fujimoto *et al.* (2003), Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of alpha-galactosidase I from *Mortierella vinacea*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **59**: 2289-2291.
- 34) R. Fernandez-Leiro *et al.* (2010), Structural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* α -galactosidase and its complexes with natural substrates reveals new insights into substrate specificity of GH27 glycosidases. *J. Biol. Chem.* **285**: 28020-28033.