

触媒機能を指標にした自然界からの酵素探索研究： セサミノール配糖体分解酵素の探索を例として

山下 哲¹・下山 武文²・高橋 征司³・山口 雅篤⁴・中山 亨⁵

触媒機能を指標にした自然界からの酵素の探索は、いわば自然界に眠る酵素の潜在能力を見いだす研究であり、その目指すところは、進化的手法や理論的分子設計に基づく酵素機能のタンパク質工学的改変と相通ずるものがある。その成功に研究者独自の工夫と試行錯誤を要する点は両アプローチで同じであるが、探索研究の方はその基盤に普遍的な技術原理があるわけではなく、また「運・鈍・根」が必要などともいわれ、ともすれば労多くして益の少ない「宝探し」的な印象を与えがちである。このため、酵素機能のタンパク質工学的改変研究の隆盛とは裏腹に、探索研究は以前ほど積極的には行われなくなったように見える。しかしながら、より優れた酵素機能の探求において、自然界からの酵素の探索とそのタンパク質工学的改変は、本来、車の両輪をなすべきものであろう。利用目的に照らしてできるだけすぐれた性質を示す酵素の原石を自然界から見だし、タンパク質工学技術によってそれに磨きをかけるのが正攻法であるとするれば、優れた原石を見いだす努力も同様に積極的になされるべきである。また食品工業など、遺伝子組換え生物由来の酵素よりは野生型酵素の利用が歓迎される酵素の応用分野も依然として存在する。興味深い新奇な酵素が自然界から見つかる事例は依然として多く、機能を指標にした自然界からの酵素探索研究の重要性が失われたわけではない。本稿では、最近のわれわれの探索研究を振り返りながら、そのような事例を紹介する。

研究の背景

ゴマ種子には、この植物に特有のさまざまなリグナン化合物（桂皮酸誘導体から導かれる植物二次代謝産物）が含まれ、それらをゴマリグナンと総称する¹⁾。ゴマリグナンのうち、セサミンの健康機能は詳細に解明され、健康補助食品の成分として大きな市場が形成されている。一方、別のゴマリグナンであるセサミノール（図1）は、セサミンにヒドロキシ基が一つ結合した構造をもち、ゴマ種子中では主として三つのグルコース残基が分岐状に結合したセサミノールトリグルコシド（STG、図1）として存在する²⁾。肝臓で部分的な代謝を受けることによってはじめて抗酸化作用を発現するセサミンとは異なり、セサミノールはそれ自体で強い抗酸化活性を示す。セサミノールには変性LDLの生成抑制作用³⁾やDNAの

酸化障害抑制作用⁴⁾などがあり、またヒト白血病細胞のアポトーシス誘発活性を有することから抗がん作用も期待されている⁵⁾。こうしたことからセサミノールは、セサミンとは異なる生理活性をもつことが期待され、健康食品素材や化粧品素材として高い注目を集めてきた。

セサミノールのこうした生理活性は、STGなどの配糖体の形でなく、遊離の形で強く発現される。したがって、STGはセサミノールの生理活性がマスクされた形態であるといえる。STGは水溶性が高いため、ゴマ種子中のSTGはゴマ油製造工程で油脂から取り除かれ、その大部分はゴマ搾り粕に移行する。このゴマ搾り粕は現在、家畜飼料や肥料として利用されているが、STGの安価な給源となりうる。このSTGを酵素的あるいは微生物的に分解してセサミノールを生産する試みが古くから検討されてきた^{6,7)}。しかしながら、おそらくSTGのグリコン部分の分岐構造やセサミノールの嵩高い構造のために、STGの酵素的分解は著しく困難であった。そこでわれわれは、STGからセサミノールへの効率の良い変換系を確立することを目的として、STG分解酵素生産微生物の探索を行った⁸⁾。なお、既往のβ-グルコシダーゼのタンパク質工学的改変により目的に叶った性質をもつ酵素を取得する戦略も考えられたが、STG分解酵素（微生物）の応用の将来展開（食品や化粧品の素材としてのセサミノールの製造）を見据え、このアプローチは最初から採用しなかった。

探 索

STGを効率よく分解してセサミノールを生成することのできる微生物を自然界から幅広く探索した。多くの試行錯誤のなかで、STG分解微生物は次のような経緯で見いだされた⁸⁾。自然環境中に放置された多数のゴマ搾り粕サンプルをクロロホルムで抽出し、抽出物中のセサミノールの存在を高速液体クロマトグラフィーで分析した。前述のようにゴマ搾り粕はゴマ油製造における副生物であるが、セサミノールは脂溶性であってそのほとんどはゴマ油（製品）の方に移行するため、新鮮なゴマ搾り粕の中には存在しない。セサミノールがゴマ搾り粕に検出されれば、それはそこに含まれるSTGから微生物分解によって生成した可能性が高い。分析の結果、KB0549と命名したゴマ搾り粕サンプル中に微量のセサ

* 著者紹介 ¹ 東北大学大学院工学研究科（助教） E-mail: yamashita@seika.che.tohoku.ac.jp

² 東北大学大学院工学研究科（助教） ³ 東北大学大学院工学研究科（准教授） ⁴ 南九州大学環境園芸学部（教授）

⁵ 東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻（教授） E-mail: nakayama@seika.che.tohoku.ac.jp

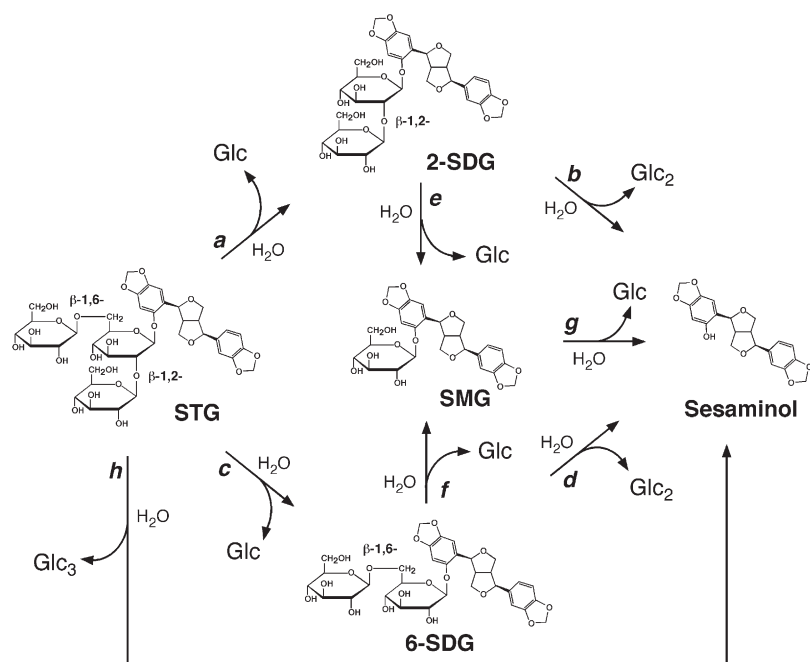


図1. セサミノール配糖体の構造と酵素的変換 (文献8からの引用). STG, セサミノールトリグルコシド (2,6-*O*-ジ(β -D-グルコシル)- β -D-グルコシルセサミノール); 2-SDG, 2-*O*-(β -D-グルコシル)- β -D-グルコシルセサミノール; 6-SDG, 6-*O*-(β -D-グルコシル)- β -D-グルコシルセサミノール; SMG, β -D-グルコシルセサミノール.

ミノールが含まれることがわかった. そこで, この KB0549 サンプルを新鮮なゴマ搾り粕とともに培養液に懸濁し, 振盪培養することによってSTG分解微生物の集積を試みた. その培養物中に含まれるSTG分解微生物は当初, 数種の異なる微生物の混合培養系 (複合微生物系) を構成しているように思われたが, 単離操作を粘り強く繰り返すことによって最終的に単一の微生物種として分離することができた. リボソーム小サブユニットRNA遺伝子の塩基配列相同性検索の結果, この微生物は *Paenibacillus* の一種であると推定され, さらに詳細な分類学的解析によって同属の新種であることが判明し, *P. relictisesami* KB0549 株と命名された (relicti-, 残渣の; sesami, ゴマ)⁹⁾. KB0549 株のSTG分解酵素活性は培地中にゴマ搾り粕抽出液を添加することによって増大することから, 同酵素の生理機能は同株によるSTGなどのリグナン配糖体の資化に関連すると考えられた. STG分解酵素生産微生物 (KB0549 株) がSTGを多量に含むゴマ搾り粕から得られたのは, 結果を知れば当たり前のようにも思われるが, そのような微生物が長年にわたって探し求められながらも得られなかったのは事実であり, 「コロンブスの卵」であるといえる.

得られた酵素の性質⁸⁾

この微生物のSTG分解酵素活性を調べた結果, 同活性の中には, 単独でSTGを分解できる酵素の活性が含まれていることが強く示唆された. そこでわれわれは,

この酵素を *Paenibacillus* STG-degrading glucohydrolase (PSTG) と命名し, 同酵素の遺伝子単離と機能解析を行った. KB0549 株の細胞抽出液から精製されたPSTGや組換え型酵素 (rPSTG) は, 分子質量およそ 80 kDa のサブユニットタンパク質からなるホモ4量体酵素であった. 各種の合成基質を用いてrPSTGの基質特異性を調べたところ, 同酵素は β -D-グルコシドに対してもっとも高い特異性定数を示す β -グルコシダーゼ (EC3.2.1.21) であることがわかった. PSTG 遺伝子は 753 アミノ酸残基から構成されるタンパク質をコードし, その推定アミノ酸配列は, 同属の別の微生物 (TS12 株) が生産するグルコセレブロシダーゼ (glucocerebrosidase)¹⁰⁾ の配列と もっとも高い類似性 (同一性 63%) を示した. しかしながらPSTGにはグルコセレブロシダーゼ活性は認められなかった. PSTGはまた, 好熱性細菌 *Thermotoga neapolitana* の耐熱性 β -グルコシダーゼ TnBgl3B¹¹⁾ と も高い類似性を示した.

アミノ酸配列に基づく系統解析の結果, 同酵素はグリコシドヒドロラーゼ (GH) ファミリー3のメンバーであることがわかった. GHファミリーとはグリコシダーゼをアミノ酸配列の類似性に基づいてファミリー単位に分類したもので, 現在 130 以上のファミリーが知られている. GH3ファミリーは中でも大きな部類に属するファミリーであり, β -グルコシダーゼの他にも β -キシロシダーゼ, α -アラビノフラノシダーゼ, *N*-アセチル- β -グルコサミニダーゼなどを含み, グリコン特異性

は多様である¹²⁾。こうした多様性を反映して、同ファミリーの個々の酵素の生理学的役割も多岐にわたることが予想されるが、生理機能解析が行われているメンバーはそれほど多くなく未解明の点も多い。

いくつかのGH3 ファミリーグリコシダーゼについてその立体構造が明らかにされ、また多くのメンバーについてアミノ酸配列に基づく構造予測が行われた結果、このファミリーのメンバーの全体構造にいくつかの類型が見いだされている。結晶構造が明らかにされているGH3 グリコシダーゼの中でPSTGと配列類似性のもっとも高いTnBgl3Bは3ドメインタイプであり、N末端側から順に(α/β)8バレルドメイン、 α/β サンドイッチドメイン、およびフィブロンネクチンタイプIIIドメインから構成される。PSTGの立体構造はまだ解明されていないが、アミノ酸配列の類似性からその全体構造はTnBgl3Bと同様な3ドメイン構造をもつと推定される(後述)。親和性標識実験をはじめとするこれまでの研究で、グルコセレブロシダーゼの触媒重要残基としてAsp223(求核性触媒基)とGlu411(一般酸塩基触媒基)が同定され¹³⁾、またTnBgl3Bでは対応するアミノ酸残基としてAsp242とGlu458が同定された¹¹⁾。これらのアミノ酸残基はPSTGのアミノ酸配列中にも保存されている(それぞれAsp233とGlu421)。また、TnBgl3Bの酵素基質複合体の結晶構造においてグルコース残基との相互作用が認められるアミノ酸残基も、PSTGのアミノ酸配列中に高度に保存されている。PSTGがTnBgl3BとGH3 ファミリー内で同じクラスターに属し、TnBgl3Bと同様に β -グルコシド特異的な酵素であることを考慮すると、これらのアミノ酸残基はPSTGにおいてもグルコース残基の認識に重要な役割を果たすと推定される。

さて、前述のように、PSTGはそれ単独でSTGからセサミノールを生成しうる酵素としてユニークである。図1にSTGの酵素的分解の可能な経路を示す。PSTGによるSTGからのセサミノール生成反応が、これらのどの経路によって進行するかについて調べられた。その結果、PSTGによるSTG分解反応の過程で、反応系に少量のSMGと比較的多量の6-SDGが一過的に蓄積し、またグルコースの2量体や3量体を生成することなく単量体グルコースのみが蓄積することがわかった。したがって、本酵素によるSTGからのセサミノール生成は、糖鎖のグルコース残基を一つずつ切り離していく β -グルコシダーゼ活性によるものであることが強く示唆され、これは基質特異性解析の結果やアミノ酸配列から推定される酵素の特性と矛盾しなかった。PSTGのSTG分解活性を100%としたとき、2-SDGと6-SDGに対する分解速度比はそれぞれ124%と53%であった。以上の結果を総合すると、PSTGによるSTG分解は、図1に示した可能な反応経路のなかでc $\rightarrow$ f $\rightarrow$ gを主たる経路とし、a $\rightarrow$ e $\rightarrow$ gをマイナーな経路として進行することが示唆される。

特異性と構造との相関

冒頭で述べたように、STGの酵素的分解が困難であることの一因は、STGのグリコン部分の分岐構造やセサミノールの高高い構造にあると推定されていた。STGを効率よく分解するPSTGのユニークな特異性を立体構造の上から理解するため、その立体構造モデルをホモロジーモデリング(SWISS-MODEL, www.swissmodel.expasy.org)により作製した。SWISS-MODELによってモデリングの鋳型として最適と判断されたのは、前出のTnBgl3B(PDB code: 2X41)であった。TnBgl3Bは721アミノ酸残基からなり、753アミノ酸残基からなるPSTGとの配列相同性は44%である。また、TnBgl3Bのグルコース複合体結晶構造などから推定されているグルコース結合残基(8アミノ酸残基)は、PSTGの一次配列上にすべて保存されていた。TnBgl3Bを鋳型としたモデリングの結果、TnBgl3Bの構造的な特徴である三つのドメインが保存されたPSTGの立体構造モデルが得られた(図2A)。このため、PSTGのモデルは全体的にTnBgl3Bの構造と類似性が高く、(α/β)8バレルドメインにおける推定グルコース結合残基は、TnBgl3Bの対応するアミノ酸残基とほぼ重なりあうように配置していた(図2B)。しかし、いくつかのループにおいては、構造類似性が低いと考えられる領域が存在し(図3A)、特に活性部位(TnBgl3Bのグルコース結合部位)周辺における構造的な差異によって、TnBgl3BはPSTGよりも活性部位への入り口が狭くなっており、高高い基質を受け付けにくいことが推定された(図3A, 3B)。そこで、PSTGの構造モデルとTnBgl3Bの構造を標的として、PSTGの基質分子のドッキングシミュレーションを試みた。SwissDock(www.swissdock.ch)を用い、各種セサミノール配糖体(STG, 6-SDG, 2-SDG)をリガンドとして計算させたところ、6-SDGがPSTGモデルの推定活性部位付近に結合する解が、自由エネルギーを指標としたスコア上位に得られた。この結果をTnBgl3Bのグルコース複合体構造と重ね合わせた場合、6-SDGとグルコースが非常に近接して配置され(図3B, 左)、STGがPSTGによって分解される場合に、6-SDGとグルコースがこのような立体配置をとる可能性が示唆された。標的をTnBgl3Bとした場合の同様な計算からは、活性部位付近に6-SDGが配置するような解は得られず、TnBgl3Bの活性部位周辺はセサミノール配糖体基質に対して、大きな立体障害を持つことが示唆された(図3B, 右)。以上のことから、PSTGのユニークな基質特異性は、STGの立体構造にフィットし高高い基質を収容しうる広い基質結合ポケット構造によって、少なくとも部分的には説明できるものと考えられた。

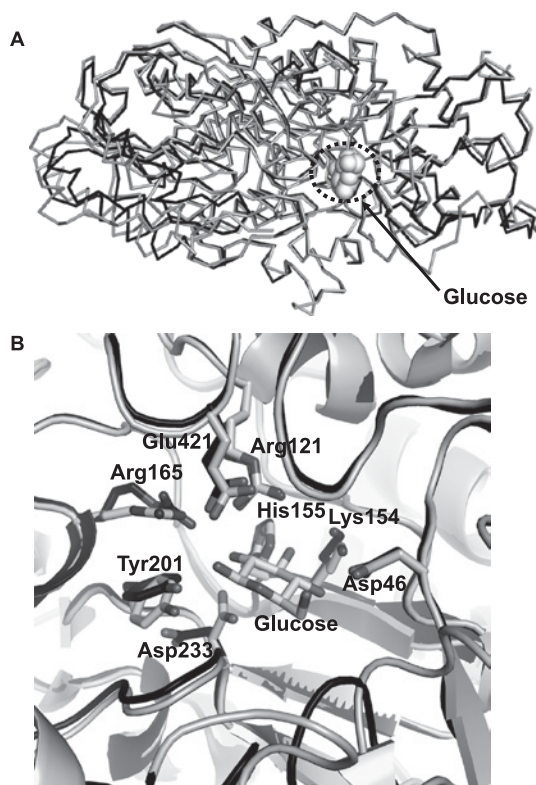


図2. PSTGの構造モデル(黒色)とTnBgl3Bの結晶構造(灰色)の重ね合わせ。A, TnBgl3Bの活性部位に結合したグルコース分子(点線部)を空間充填モデルで示した。B, グルコース結合部位の拡大図。TnBgl3Bのグルコース結合に関与するアミノ酸残基(灰色の側鎖)と、それに対応するPSTGの保存残基(黒色の側鎖)を示した。アミノ酸側鎖のラベルは、PSTGのものを示している。

おわりに

民間企業において長年にわたり洗剤用酵素の研究・開発に従事した伊藤(現・琉球大)は、以前、本誌の生物工学基礎講座「バイオよもやま話」欄で、産業利用を目的とした酵素の開発において「出藍の誉れに敵うものはない」と喝破した¹⁴⁾。これは自然界に存在する酵素「原石」のポテンシャルの高さとそれを見いだす探索研究の重要性を物語る言葉として、酵素の産業利用を志す研究者は肝に銘じておくべきではないだろうか。

自然は人類にとって常に、未知のリソースの宝庫であり新しい発見の源である。将来の酵素分子設計の指標となるような、「出藍の誉れ」を地で行く優れた機能や構造的特徴をもつ酵素の原石が、まだ多数、人類に発見されないまま眠っているに違いない。わが国のバイオの特色あるお家芸である探索研究の伝統が今後も生物工学分野で脈々と受け継がれ、そうしたユニークな酵素がわが国において数多く見いだされることによって、わが国の酵素研究が応用面でも基礎理学的な面でもますます発展していくことを願っている。

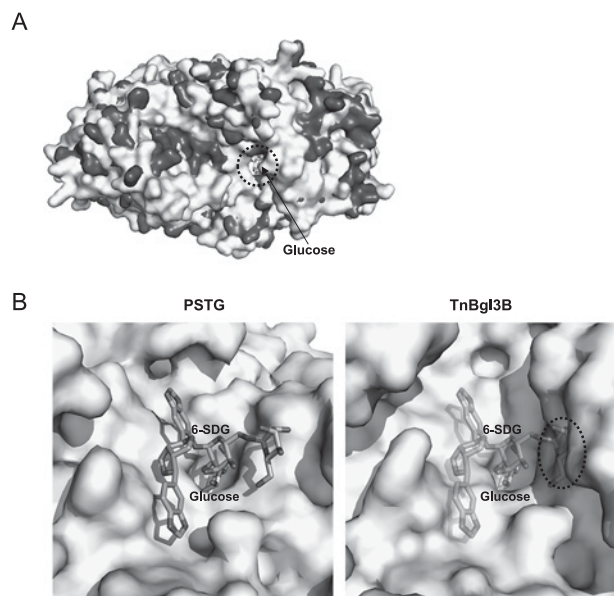


図3. PSTG構造モデルから推定される、酵素の基質認識機構。A, PSTG構造モデル(黒)とTnBgl3B構造(白)の空間充填モデルの重ね合わせ。活性部位付近(点線)では白色の表面が露出し、TnBgl3Bの方が嵩高いと推定される。B, ドッキングシミュレーションによるPSTG:グルコース:6-SDG複合体(左)とTnBgl3Bの対応する部位(右)。それぞれの空間充填モデルにスティックモデルで表示されている基質分子(灰色:6-SDG, 白色:グルコース)は、PSTG:グルコース:6-SDG複合体モデルとTnBgl3B:グルコース複合体を重ね合わせた場合の座標に示しており、TnBgl3Bの酵素表面と6-SDGは衝突している(点線部)。

謝 辞

本研究の一部は(独)科学技術振興機構 A-STEP探索タイプの助成を受けて行われた。

文 献

- 1) 並木満夫編著:ゴマ その科学と機能性, 丸善出版(1998).
- 2) Katsuzaki, H. *et al.*: *Heterocycles*, **36**, 933 (1993).
- 3) Kang, M. H. *et al.*: *Life Sci.*, **66**, 161 (2000).
- 4) Osawa, T.: *Mech. Ageing Dev.*, **111**, 133 (1999).
- 5) Miyahara, Y. *et al.*: *Int. J. Mol. Med.*, **7**, 485 (2001).
- 6) 栗山健一, 無類井建夫: 農化誌, **67**, 701 (1993).
- 7) 特開平7-145066, リグナン配糖体およびリグナン類の製造法
- 8) Nair, A. *et al.*: *PLoS ONE*, **8**, e60538 (2013).
- 9) Shimoyama, T.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, doi: 10.1099/ijs.0.057133-0.
- 10) Sumida, T. *et al.*: *J. Biochem.*, **132**, 237 (2002).
- 11) Pozzo, T. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **397**, 724 (2010).
- 12) Harvey, A. J. *et al.*: *Proteins: Struct. Func. Genet.*, **41**, 257 (2000).
- 13) Paal, K. *et al.*: *Biochem. J.*, **378**, 141 (2004).
- 14) 伊藤 進, 日本生物工学会編: 生物工学よもやま話—実験の基礎原理から応用まで—, p. 307, 学進出版(2013).