

自然界に新規 α -L-グルコシダーゼを発見

～天然にグルコースの鏡像異性体が存在する可能性が高まる～

ポイント

- ・自然界に新規 α -L-グルコシド加水分解酵素「 α -L-グルコシダーゼ」を発見。
- ・ α -L-グルコシダーゼを利用して新規の α -L-グルコシドを酵素合成に成功。
- ・ α -L-グルコシド関連酵素解析、 α -L-グルコシドの生理活性解明など新学術領域発展に期待。

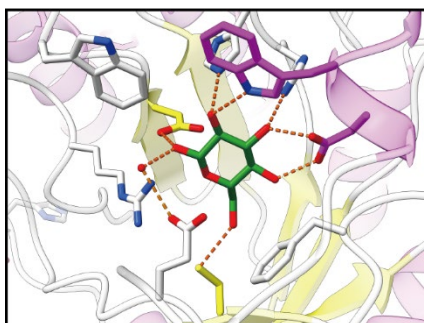
概要

北海道大学大学院農学研究院の奥山正幸教授らの研究グループは、 α -L-グルコシドを加水分解する酵素、 α -L-グルコシダーゼ*1を発見しました。

理論上グルコースには、鏡像関係にある D-グルコースと L-グルコース*2が存在します。自然界には D-グルコースのみが存在しており、L-グルコースは存在しないものとされてきました。またグルコースの多くは、澱粉やグリコーゲン、セルロースのように脱水縮合したグルコシドの形で天然に存在しますが、これらはすべて D-グルコースによって構成されています。

今回発見した α -L-グルコシダーゼは α -L-グルコシドを選択的に加水分解するタンパク質構造と機能を有しています。また本研究では、 α -L-グルコシダーゼを用いた新規 α -L-グルコオリゴ糖の合成にも成功しています。オリゴ糖は腸内環境を整えることで私たちに健康をもたらすプレバイオティクス*3として知られています。 α -L-グルコオリゴ糖にも同様の生理活性が期待されます。本研究によって自然界に α -L-グルコシドやその分解生成物である L-グルコースが存在する可能性が高まりました。今後 α -L-グルコシダーゼに加えて、 α -L-グルコシド分解・合成酵素の探索や機能・構造解析、 α -L-グルコオリゴ糖の生理機能解明研究など、新しい学問分野への発展に繋がることが期待されます。

なお、本研究成果は、2022年12月9日（金）公開の ACS Omega 誌に掲載されました。



α -L-グルコシダーゼの基質結合部位の様子。 α -L-グルコシドを厳密に選択できる立体構造を有している。

【背景】

生体分子の多くを占めるタンパク質や糖質は左右が対称でない立体構造を持つ化合物から構成されています。左右非対称な化合物は D 系列と L 系列に分けられ、互いを鏡像異性体と呼びます。多くの場合天然には、どちらか一方の鏡像異性体^{*4}のみが存在し、タンパク質を構成するアミノ酸では L 系列のアミノ酸 (L-アミノ酸) のみが、澱粉やショ糖の構成糖であるグルコースであれば D 系列のグルコース (D-グルコース) のみが存在するとされています。このように立体化学が偏って存在している現象をホモキラリティーといいます。なぜ自然界にホモキラリティーが存在するのかは、未だ解明されていません。

一方で、近年、様々な生物に遊離 D-アミノ酸が存在し、多様な生理機能を有していることが明らかにされています。糖質に関しては、D 系列と L 系列のアラビノースが自然界に存在することが知られています。前述の通り自然界において L-グルコースの存在は明らかになっていませんが、これを資化できる細菌は土壤中に存在します。すなわち土壤中には L-グルコースが存在しているかもしれません。

また D-グルコースの場合、D-グルコースとしてよりは D-グルコシド結合を介して澱粉やショ糖、乳糖、またステロイド配糖体やフラボノイド配糖体として多く存在します。L-グルコースに関しても L-グルコシド結合を介して自然界に存在している可能性があります。もし L-グルコシド結合を介して存在しているならば、それを L-グルコースに分解する酵素が存在するはずですが。

本研究は α -L-グルコシド加水分解酵素の探索を通じて、D-グルコースではなく L-グルコースから構成される澱粉やショ糖の存在を発見する手がかりを得ることが目的です。また、新規 α -L-グルコオリゴ糖の酵素合成法の開発も目的としました。オリゴ糖は腸内環境を整え、私たちに健康をもたらすプレバイオティクスとして機能を持つことが知られており、 α -L-グルコオリゴ糖にも未知の機能が秘められている可能性があるためです。

【研究手法】

欧州バイオインフォマティクス研究所 (EMBL-EBI) が提供する Pfam に収録されている α -L-フコシダーゼ様アミノ酸配列の網羅的解析によって、 α -L-グルコシダーゼ候補配列を探索しました。生体内には L 系列のホモキラリティーを持つ L-フコースが、グリコシド結合を介して結合した、 α -L-フコシドが存在します。 α -L-フコシドと α -L-グルコシドは構造が類似しており (図 1)、 α -L-フコシドを加水分解する α -L-フコシダーゼの類縁酵素に α -L-グルコシダーゼが存在すると考えました。 α -L-グルコシダーゼ候補の組換えタンパク質を作製し、酵素の機能解析と X 線結晶構造解析^{*5}を行いました。

【研究成果】

配列解析の結果をもとに、多くの α -L-フコシダーゼとは異なるアミノ酸配列を基質結合部位にもつ *Cecembia lonarensis* 由来の二つのタンパク質 (CIAgl29A, CIAgl29B) に着目しました。CIAgl29A と CIAgl29B は α -L-フコシダーゼ類縁酵素ですが、これらの組換え酵素は α -L-フコシドにはほとんど作用せず、 α -L-グルコシドを加水分解して、L-グルコースを遊離しました (図 2A)。基質特異性の指標となる反応速度定数は、 α -L-フコシドよりも α -L-グルコシドに対して 4 倍 (CIAgl29A)、並びに 12 倍 (CIAgl29B) の値を示しました。

これらの結果をもとに CIAgl29A と CIAgl29B を新規酵素 α -L-グルコシダーゼとして報告しました。X 線結晶構造解析により、CIAgl29A と CIAgl29B が α -L-フコシドとの結合よりも α -L-グルコシドとの結合に適した巧妙な基質結合部位を有していることが分かりました。すなわち CIAgl29A と

CIAGl29B は α -L-グルコシドを加水分解するために分子進化した酵素であることが示唆されました。

また数十種類の微生物が CIAGl29A と CIAGl29B と同様の基質結合部位をもつ α -L-グルコシダーゼを保有していることを Pfam データベースの解析によって明らかにしました。これらの結果は、 α -L-グルコシド、その分解生成物である L-グルコースが自然界に存在する可能性を高めるものです。

さらに CIAGl29A、CIAGl29B を用いて新規 α -L-グルコオリゴ糖(α -L-Glc-(1 \rightarrow 3)-L-Glc、 α -L-Glc-(1 \rightarrow 2)-L-Glc、 α -L-Glc-(1 \rightarrow 6)-L-Glc)の合成にも成功しました (図 2B)。

【今後への期待】

今回発見した α -L-グルコシダーゼは、 α -L-グルコシドを厳密に認識して加水分解するタンパク質構造を有していました。この発見によって α -L-グルコシドや L-グルコースが自然界に存在する可能性は高まりました。一方で、 α -L-グルコシダーゼ以外の未解明な酵素である、 α -L-グルコシド分解酵素、合成酵素が存在する可能性があります。今後さらなる α -L-グルコシド関連酵素の探索や機能解析など、新しい学問分野への発展が期待されます。

また本研究で α -L-グルコオリゴ糖の酵素反応による調製が可能となりました。 α -L-グルコオリゴ糖のプレビオティクス様の生理活性解明研究などへの発展にも繋がることが期待されます。

論文情報

論文名	Discovery of α -L-glucosidase raises the possibility of α -L-glucoside in nature (α -L-グルコシダーゼの発見により、自然界に α -L-グルコシドが存在する可能性が出てきた)
著者名	猪内里花子 ^{1(当時)} 、Hyejin Kang ¹ 、田上貴祥 ² 、植田宜孝 ^{1(当時)} 、Weeranuch Lang ² 、木村淳夫 ² 、奥山正幸 ² (¹ 北海道大学大学院農学院、 ² 北海道大学大学院農学研究院)
雑誌名	ACS Omega (アメリカ化学会が発行する化学とその関連分野の専門誌)
DOI	10.1021/acsomega.2c06991
公表日	2022年12月9日(金)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院農学研究院 教授 奥山正幸 (おくやままさゆき)

T E L 011-706-2808 F A X 011-706-2808 メール okuyama@agr.hokudai.ac.jp

U R L <https://sites.google.com/elms.hokudai.ac.jp/molenz>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

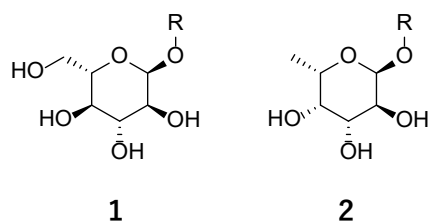


図 1 α -L-グルコシド (1) と α -L-フコシド (2)

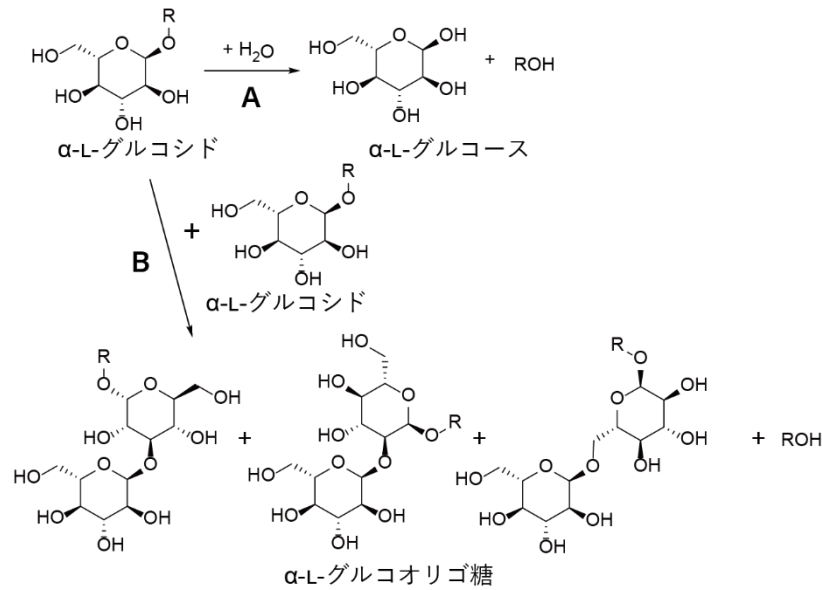


図2 $\alpha\text{-L-グルコシダーゼ}$ が触媒する反応

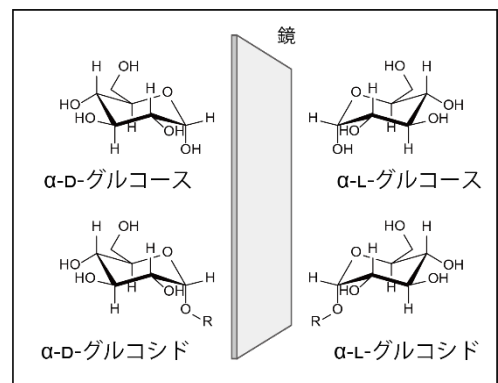
A $\alpha\text{-L-グルコシド}$ を加水分解して $\alpha\text{-L-グルコース}$ を遊離する（加水分解反応）

B $\alpha\text{-L-グルコシド}$ 2分子から $\alpha\text{-L-グルコオリゴ糖}$ を合成する（糖合成反応）

【用語解説】

*1 $\alpha\text{-L-グルコシダーゼ}$ … 非還元末端に存在する $\alpha\text{-L-グルコシド}$ 結合を加水分解する酵素。澱粉やシヨ糖の $\alpha\text{-D-グルコシド}$ を加水分解する $\alpha\text{-D-グルコシダーゼ}$ は、動植物、微生物界に広く存在するが、 $\alpha\text{-L-グルコシダーゼ}$ は、本研究で初めて同定された。

*2 D-グルコースとL-グルコース … D-グルコースはブドウ糖とも呼ばれ、天然に最も広く分布している単糖類である。シヨ糖、麦芽糖、乳糖などのオリゴ糖、澱粉やセルロース、グリコーゲンなどの多糖、また各種配糖体の構成成分として多量に存在する。この際の糖と糖、もしくは糖とその他の化合物の間の結合をD-グルコシド結合といい、このうち α 体のグルコシド結合を $\alpha\text{-D-グルコシド}$ 結合という。L-グルコースはD-グルコースと原子の結合関係は同じであるが、鏡像（鏡に映した像の）関係にあり、重ね合わせすることはできない。



L-グルコースならびに $\alpha\text{-L-グルコシド}$ 結合をもつ化合物は、自然界には存在しないとされている。

*3 プレバイオティクス … 腸内の有益菌を増殖・活性化させることで体の健康に有益な生理効果を与える難消化性食品成分のこと。一方で体に良い影響を与える生きた微生物のことをプロバイオティクスと呼ぶ。

*4 鏡像異性体 … 原子の結合関係は同じであるが、鏡像関係にあって重ね合わせられない分子のこと。対掌体、エナンチオマーとも呼ばれる。右きき用のグローブ（左手に入れるグローブ）に右手を入れられない関係と同じである。

*5 X線結晶構造解析 … 生体高分子の立体構造決定法の一つ。タンパク質の結晶にX線ビームを当てることで得られる反射から電子密度を計算し、電子密度に原子を当てはめて原子の立体的な位置を決定する。