

## Proteins without Enzymatic Function with Sequence Relatedness to the $\alpha$ -Amylase Family

$\alpha$ -アミラーゼファミリーと類似したアミノ酸配列を有し酵素的機能を持たないタンパク質

Janeček, Štefan

Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbrauská cesta 21, SK-84251 Bratislava, Slovakia  
FAX: + 421 7 5477 3649; E-MAIL: umikstef@savba.sk

**Key Words :** *alpha-amylase family, transport proteins, 4F2 antigens, protein evolution*

### Abstract

At present the  $\alpha$ -amylase enzyme family covers 27 different enzyme specificities from hydrolases (EC 3), transferases (EC 2) and isomerases (EC 5). They belong to the three glycoside hydrolase Families 13, 70 and 77, forming a clan GH-H in the frame of the sequence-based classification of glycosidases. There is also a glycoside hydrolase Family 57 containing some  $\alpha$ -amylases and related enzymes especially from hyperextremophiles, which however, have sequences, according to present knowledge, unrelated to those from the main Family 13. The proteins without catalytic function that exhibit clear sequence similarities to the enzymes from the  $\alpha$ -amylase Family 13 are the main subject of this article. They are the mammalian proteins inducing transport of dibasic and neutral amino acids across cell membranes and the mammalian 4F2 heavy-chain cell surface antigens, *i.e.*, proteins without any functional relatedness to amylolytic enzymes. Nevertheless, from the structural and evolutionary points of view, these proteins may form with the enzymes common to the  $\alpha$ -amylase protein family. Analogous examples from other protein families (*e.g.* chitinases, aldo-keto reductases) are also provided.

### 要約

現在、 $\alpha$ -アミラーゼファミリーに属する酵素は27種類の異なる酵素群にわたり、ハイドロラーゼ(EC 3)、トランスフェラーゼ(EC 2)、およびイソメラーゼ(EC 5)に分類される。これらはグライコサイドハイドロラーゼファミリー 13、70、および77に属し、アミノ酸配列に基づいた分類によるGH-H族を形成している。また、特に超極限微生物由来のいくつかの $\alpha$ -アミラーゼとその関連酵素を含めたグライコサイドハイドロラーゼのファミリー57も存在するが、現在の知見ではこれらはファミリー13とアミノ酸配列上は関係がない。ここでは主に、 $\alpha$ -アミラーゼファミリー13に属する酵素とアミノ酸配列が明らかに似ているが触媒活性はもたないタンパク質について採りあげることとする。これらのタンパク質には、ほ乳類の二塩基性または中性アミノ酸膜輸送誘導タンパク質や、細胞表面抗原の4F2H鎖といったものがあり、澱粉分解酵素とは機能的に全く関連がない。しかしながら、構造と進化という観点にたてばこれらは酵素とともに同じ $\alpha$ -アミラーゼタンパク質ファミリーに属するといえるだろう。本レビューではこれと似た例として他のタンパク質ファミリーに属するキチナーゼおよびアルド-ケト-レダクターゼについても紹介する。

### A. Introduction

Due to their fascinating structural and functional diversity oligo- and polysaccharides provide almost unlimited possibilities for the existence of enzymes (1) responsible for their cleavage (glycosidases, polysaccharide lyases), modifications (transglycosylases), biosynthesis (glycosyltransferases), and removing the non-saccharidic side-chains (carbohydrate esterases). In other words, there are large numbers of various enzymes in nature that cope in some way with carbohydrates.

Starch, besides the cellulose, belongs to one of the most widely distributed polysaccharides on Earth. It is an important source of energy for animals and higher plants, and especially for microorganisms. Due to the rather complex structure of starch ( $\alpha$ -D-glucose bound by  $\alpha$ -1,4-bonds with the  $\alpha$ -1,6-branching points) and its related polysaccharides (*e.g.* glycogen and pullulan) there exists a set of enzymes, generally called starch

### A. 序論

オリゴ糖や多糖はその構造と機能が非常に多様であるがゆえに、それらに關与する酵素には分解(グライコシダーゼや多糖リアーゼ)、修飾(トランスグライコシダーゼ)、生合成(グライコシルトランスフェラーゼ)、そして非糖質性側鎖除去(炭水化物エステラーゼ)などに關与する酵素のほとんど無限の可能性が存在する(1)。言い換えると、自然界には何らかの形で炭水化物に作用する酵素は驚くべく多数存在する。

澱粉はセルロースと同様に地球上に最も多岐にわたり分布する多糖のひとつであり、動物、高等植物、特に微生物の重要なエネルギー源である。澱粉( $\alpha$ -D-グルコースが $\alpha$ -1,4結合でつながっており、それに $\alpha$ -1,6の分岐を持つ)や関連の多糖(グリコーゲンやプルラン)はやや複雑な構造を持つため、これらの基質をグルコースにまで完全に分解する一連の酵素群が存在し、一般的には澱粉加水分解酵素およびその関連酵素群と呼ばれ

hydrolases and related enzymes, that are able to degrade these substrates completely to glucose. Almost every living organism contains in its genome the genetic coding for the enzymes capable of hydrolysing these glycosidic bonds. The best known enzymes operating on starch are the three amylases:  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase and glucoamylase. They are, however, quite different with respect to their primary and tertiary structures, reaction mechanism and catalytic machinery which indicates a quite independent evolutionary history for each of these amylases (2-4).

The main aim of this article is to give a recent overview of the  $\alpha$ -amylase family which was best known in past years as the Family 13 of glycoside hydrolases. Currently, however, the  $\alpha$ -amylases and related enzymes cover three families in the classification of glycosidases, the Families 13, 70 and 77, forming thus a large clan named clan GH-H with almost 30 different specificities (5). Special attention is paid to the non-enzymatic members of the  $\alpha$ -amylase superfamily (or clan), namely the mammalian proteins that are responsible for the transport of dibasic and neutral amino acids across cell membranes, as well as the mammalian 4F2 heavy-chain cell surface antigens. The glycoside hydrolase Family 57 consisting of a few amylolytic specificities with no clear sequence similarity to the main Family 13 is also briefly described.

## B. $\alpha$ -Amylase Family: Superfamily or Clan ?

While both  $\beta$ -amylase and glucoamylase form in the sequence-based classification of glycoside hydrolases their own independent families with only one specificity ( $\beta$ -amylase constitutes Family 14 with the specificity EC 3.2.1.2 and glucoamylase forms Family 15 with the specificity EC 3.2.1.3), the family known as the  $\alpha$ -amylase family ranks among the largest families of glycosidases (1,5). It has been well-known under the name Family 13 of glycoside hydrolases (6,7). However, at present it covers a clan, called GH-H (1), including Families 70 and 77 in addition to the original Family 13 (Table I). All the members of this  $\alpha$ -amylase clan should have in common the  $\alpha$ -amylase-type catalytic ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel, catalytic machinery with the catalytic Asp, Glu and Asp residues at strands  $\beta$ 4,  $\beta$ 5 and  $\beta$ 7, respectively, and a retaining reaction mechanism (1,7,11-15).

From the time when the sequence-based classification system of glycoside hydrolases was established (6) Family 13 was satisfactory for the entire  $\alpha$ -amylase family for several years. The existence of some amino acid sequences derived especially from extremophilic microorganisms, having the  $\alpha$ -amylase activity, but with no clear homology to the sequences of Family 13 (16,17), led to the definition of a new family, Family 57, of glycoside hydrolases (18). At present, besides the  $\alpha$ -amylases, Family 57 contains also the 4- $\alpha$ -glucanotransferase and amylopullulanase specificities as well as a few open reading frames which belong to the putative enzymatic members (1,5).

ほとんど全ての生物はゲノム上に、このグライコシル結合を加水分解する酵素遺伝子をコードしている。澱粉の分解をつかさどる酵素として最も良く知られているのが  $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、およびグルコアミラーゼの3つのアミラーゼであるが、これら3酵素は1次構造、3次構造、反応機構、そして触媒をつかさどるための装置が大きく異なっており、その違いは各アミラーゼの進化の歴史に深い関係があると考えられる(2-4)。

本レビューでは主に、グライコサイドヒドロラーゼのうちこれまでにファミリー13として最も良く知られている  $\alpha$ -アミラーゼファミリーについての最近の概観について述べることにする。しかしながら、目下のところ  $\alpha$ -アミラーゼとその関連酵素は、グライコシダーゼの分類上ファミリー13、70、および77の3ファミリーにまたがり、30もの異なる特異性を持ったGH-H族と呼ぶある大集団を形成している。このような  $\alpha$ -アミラーゼスーパーファミリー(もしくは  $\alpha$ -アミラーゼ族)のなかで、酵素ではないもの、例えばば乳類の二塩基性または中性アミノ酸膜輸送誘導タンパク質や、細胞表面抗原の4F2H鎖などに特に焦点を当ててみたい。また、ファミリー13に属する酵素と1次配列のホモロジーは低いがいくつかの澱粉分解特性を持っている、グライコサイドヒドロラーゼファミリー57についても若干触れることにする。

### B. $\alpha$ -アミラーゼファミリー：スーパーファミリーか族か？

$\beta$ -アミラーゼとグルコアミラーゼは、いずれもアミノ酸配列を基にした分類上それぞれただひとつの特異性からなる独立のファミリーを形成している( $\beta$ -アミラーゼはファミリー14を形成し、その特異性はEC 3.2.1.2、グルコアミラーゼはファミリー15を形成し、その特異性はEC 3.2.1.3である)。一方、 $\alpha$ -アミラーゼファミリーはグライコシダーゼ中で最も大きなファミリーに分類される(1,5)。 $\alpha$ -アミラーゼファミリーは、グライコサイドヒドロラーゼのファミリー13という名で良く知られてきたが、現在ではファミリー13に加えファミリー70および77も含めたいわゆるGH-H族を形成している(Table I)。この  $\alpha$ -アミラーゼ族に属する酵素は全て、 $\alpha$ -アミラーゼに共通の( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-バレルと、 $\beta$ 4-、 $\beta$ 5-、 $\beta$ 7-ストランドそれぞれに存在する触媒残基 Asp, Glu, Asp、さらにはアノマー保持型反応機構を有している(1,7,11-15)。

グライコサイドヒドロラーゼをアミノ酸配列を基に分類する方法(6)が確立されて以来数年間、ファミリー13は  $\alpha$ -アミラーゼファミリー全体を指す語として使用された。しかし、 $\alpha$ -アミラーゼ活性を持つがファミリー13のアミノ酸配列と明確なホモロジーを持たないような極限微生物由来のタンパク質が存在することがわかると、新たにファミリー57を定義するようになった(18)。現在では  $\alpha$ -アミラーゼの他に4- $\alpha$ -グルカノトランスフェラーゼやアミロプルランナーゼをはじめ、酵素群を形成すると推定される数種のオープンリーディングフレームもファミリー57に属する(1,5)。ファミリー13とファミリー57はど

**Table I. The  $\alpha$ -amylase protein family.**

Enzyme class <sup>a</sup>	Enzyme name	EC number	GH family <sup>b</sup>	
Hydrolases	$\alpha$ -Amylase	3.2.1.1	13	
	Oligo-1,6-glucosidase	3.2.1.10	13	
	$\alpha$ -Glucosidase	3.2.1.20	13	
	Pullulanase	3.2.1.41	13	
	Amylopullulanase	3.2.1.1/41	13	
	Cyclomaltodextrinase	3.2.1.54	13	
	Maltotetrahydrolase	3.2.1.60	13	
	Isoamylase	3.2.1.68	13	
	Dextran glucosidase	3.2.1.70	13	
	Trehalose-6-phosphate hydrolase	3.2.1.93	13	
	Maltohexaohydrolase	3.2.1.98	13	
	Maltotriohydrolase	3.2.1.116	13	
	Maltogenic amylase	3.2.1.133	13	
	Neopullulanase	3.2.1.135	13	
	Maltooligosyltrehalose hydrolase	3.2.1.141	13	
	Maltopentaohydrolase	3.2.1.-	13	
Transferases	Amylosucrase	2.4.1.4	13	
	Glucosyltransferase	2.4.1.5	70	
	Sucrose phosphorylase	2.4.1.7	13	
	Glucan branching enzyme	2.4.1.18	13	
	Cyclodextrin glucanotransferase	2.4.1.19	13	
	Amylomaltase (4- $\alpha$ -Glucanotransferase)	2.4.1.25	13,77	
	Glucan debranching enzyme	2.4.1.25/3.2.1.33	13	
	Alternansucrase	2.4.1.140	70	
	Maltosyltransferase	2.4.1.-	13	
	Isomerases	Maltooligosyltrehalose synthase	5.4.99.15	13
		Trehalose synthase	5.4.99.16	13
Proteins	Amino acid transport proteins	—	13	
	4F2 Heavy-chain antigens	—	13	

<sup>a</sup> Based on the close sequence similarities with oligo-1,6-glucosidases, the mammalian proteins inducing transport of dibasic and neutral amino acids across cell membranes as well as the mammalian 4F2 heavy-chain cell surface antigens (both without any enzymatic activity) have been shown to be in close primary-structural and evolutionary relationships with the  $\alpha$ -amylase family enzymes (8–10) thus forming together one protein structural family.

<sup>b</sup> Glycoside hydrolase families according to CAZy server (1).

Although both Families 13 and 57 use a common retaining reaction mechanism (1,13,19), the attempts aimed at revealing the eventual evolutionary relatedness between these families (20,21) have not been confirmed yet. To achieve the final answer concerning the relatedness of the  $\alpha$ -amylase Families 13 and 57, results of site-directed mutagenesis and crystallographic studies are necessary (15).

In 1996 MacGregor *et al.* (22) published an important prediction study which revealed that sucrose-utilising glucosyltransferases should contain catalytic ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel characteristic of the  $\alpha$ -amylase, however, with a circularly permuted order of secondary structure elements. The barrel in transferases starts with an  $\alpha$ -helix equivalent to helix  $\alpha$ 3 in the  $\alpha$ -amylases. The  $\beta$ -strands appear to occur in the sequence (from the N-terminal end of the glucosyltransferase)  $\beta$ 4 to  $\beta$ 8,  $\beta$ 1 to  $\beta$ 3 as compared to  $\beta$ 1 to  $\beta$ 8 for an  $\alpha$ -amylase (22). The alternative

ちらもアノマー保持型の反応機構を示す (1, 13, 19) が、両ファミリー間の進化的関連を明らかにするのを目的に出された推論 (20, 21) はまだ検証されるにいたっていない。α-アミラーゼファミリー 13 と 57 の関係について最終的な解答を得るには部位特異的変異と結晶構造解析の結果を待たねばならない (15)。

1996 年、MacGregor ら (22) が重要な論文を出した。彼女らによるとスクロースを基質とするグルコシルトランスフェラーゼには、2 次構造因子が順々に置き換わる形で α-アミラーゼの ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-バレル構造が存在しているという。トランスフェラーゼのバレル構造は α-アミラーゼの  $\alpha$ 3 に相当する  $\alpha$ -ヘリックスから始まる。β-ストランドは酵素の N 末端から順に β-4 から β-8 までおよび β-1 から β-3 まででありこれが α-アミラーゼでは β-1 から β-8 までに相当する (22)。この循環的置換 (23) を考慮せず

structural proposal, which does not take into account the circular permutation (23), seems to be less probable because, for example, the circularly non-permuted sequence of dextran sucrose from *Leuconostoc mesenteroides* (24) would start by the strand  $\beta 3$  (strands  $\beta 1$  and  $\beta 2$  would be missing), while, on the other hand, at least the well-conserved strand  $\beta 2$  is easily identifiable behind the strand  $\beta 8$  if permutation is considered (5). The importance of the paper (23), which does not involve any circular permutations in the prediction of the  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel in glycosyltransferase with respect to the  $\alpha$ -amylase-type of barrel, was that it identified by site-directed mutagenesis the three glycosyltransferase catalytic residues common to the  $\alpha$ -amylase family enzymes. Although the permutation events in the glycosyltransferases have not yet been verified by their X-ray structures, these enzymes have constituted the new family in the classification of glycoside hydrolases, Family 70, and are proposed to form the clan GH-H with the main  $\alpha$ -amylase Family 13 (1,5).

Very recently a new family, numbered Family 77, has been opened (1) containing only one enzyme specificity, amylomaltase (or 4- $\alpha$ -glucanotransferase), isolated up to now from bacteria and plants. The reason for this new family was that the amino acid sequences of the amylomaltases resemble less those of "classical"  $\alpha$ -amylases and related enzymes from Family 13. Amylomaltase may belong to one of the most distantly related members of the entire  $\alpha$ -amylase family covering now the three Families 13, 70 and 77 of glycoside hydrolases (7). Nevertheless, as evidenced by the crystal structure of amylomaltase from *Thermus aquaticus* (25), these enzymes, currently classified in Family 77 (1), satisfy all the criteria for being members of the  $\alpha$ -amylase superfamily (26).

The  $\alpha$ -amylase enzyme family can thus be considered as a superfamily or a clan of the three structurally, mechanistically and functionally related Families 13, 70 and 77 of glycoside hydrolases (clan GH-H) covering about 500 different complete sequences (5). Moreover, there is another  $\alpha$ -amylase Family 57, containing about 10 sequences, with as yet neither confirmed nor disproved relatedness to the main clan GH-H.

### C. Proteins and Antigens Having Sequence Relatedness to the $\alpha$ -Amylase Family

In the original concept proposed by Takata *et al.* (26), the  $\alpha$ -amylase family was proposed as a family of enzymes exhibiting structural similarity and common catalytic mechanism. The  $\alpha$ -amylases and related enzymes were classified as belonging to the family if satisfied the following four requirements: (i) they act on  $\alpha$ -1,4- and  $\alpha$ -1,6-glycosidic linkages; (ii) they hydrolyse  $\alpha$ -glycosidic linkages to produce  $\alpha$ -anomeric mono- and oligo-saccharides or form  $\alpha$ -glycosidic linkages by transglycosylations; (iii) they have four highly conserved sequence regions containing all the catalytic residues and most of

に構造を提案するのは現実的ではない。なぜならこの循環的置換のおこらない *Leuconostoc mesenteroides* 由来デキストランスクラーゼ (24) は  $\beta$ -3 ストランドから始まる ( $\beta$ -1 と  $\beta$ -2 が存在しない)。しかしながら一方で、少なくとも保存性の高い  $\beta$ -2 はこの置換を考慮すると  $\beta$ -8 ストランドのあとに簡単に存在が確認できると考えられるからである。この論文 (23) では、 $\alpha$ -アミラーゼ型パレル構造については、グライコシルトランスフェラーゼの  $(\beta/\alpha)_8$ -パレルを予測するにあたり、この循環的置換を全く用いていない。しかしこの論文で重要なのは、 $\alpha$ -アミラーゼファミリーの酵素が共通して有する 3 つの触媒残基を部位特異的変異により同定したことである。グルコシルトランスフェラーゼにおけるこの置換は X 線構造による証明がまだ成されていないが、これらの酵素はグライコサイドヒドロラーゼの分類において新たな分類、ファミリー 70 を形成しており、主な  $\alpha$ -アミラーゼファミリー 13 とともに GH-H 族を提案することができる (1,5)。

近年、新たなファミリー、ファミリー 77 が誕生した (1)。これには今のところバクテリアと植物由来のアミロマルターゼ (4- $\alpha$ -グルカノトランスフェラーゼ) だけが属する。この新しいファミリーが生まれた理由は、アミロマルターゼのアミノ酸配列が "古典的"  $\alpha$ -アミラーゼとそれに関連したファミリー 13 の酵素との間で相同性が低いためである。アミロマルターゼは、ファミリー 13、70、および 77 の 3 つを含めた  $\alpha$ -アミラーゼファミリー全体にわたるグライコサイドヒドロラーゼの中で最も遠縁のものに属するであろう (7)。しかしながら、*Thermus aquaticus* 由来アミロマルターゼ (25) の結晶構造解析から明らかのように、ファミリー 77 (1) に現在のところ分類されている酵素は  $\alpha$ -アミラーゼスーパーファミリーに属するための基準を全て満たしている (26)。

このように  $\alpha$ -アミラーゼファミリーとは、構造、機構、機能の 3 つが類似したファミリー 13、70、および 77 といった 500 もの異なるアミノ酸配列をカバーするグライコサイドヒドロラーゼ (GH-H 族) のスーパーファミリーあるいは族とみなすことができる (5)。さらに、もうひとつ別の  $\alpha$ -アミラーゼファミリー 57 も存在する。このファミリーは 10 種類のタンパク質から成り、今のところ主な GH-H 族との関係は明らかではない。

### C. $\alpha$ -アミラーゼファミリーとホモロジーのあるタンパク質および抗原

最初に高田らが提唱した  $\alpha$ -アミラーゼファミリーの概念 (26) は、構造の類似性および共通した触媒機構をもつ酵素のファミリーである。すなわち、 $\alpha$ -アミラーゼとその関連酵素は以下の条件を満たすものが  $\alpha$ -アミラーゼファミリーに分類されるという。(i)  $\alpha$ -1,4 グルコシド結合および  $\alpha$ -1,6 グルコシド結合に作用する、(ii)  $\alpha$ -グルコシド結合を加水分解し  $\alpha$ -アノマー型のオリゴ糖を生成するもしくは糖転移反応により新たな  $\alpha$ -グルコシド結合を形成する、(iii) 全ての触媒残基と基質結合部位のほとんどを含む 4 つの高度に保存された領域を持つ、(iv)

the substrate binding sites; and (iv) they possess Asp, Glu and Asp residues as catalytic sites corresponding to Asp206, Glu230 and Asp297 of Taka-amylase A (14,26-28). Now, however, as the number of different sequences and specificities of these enzymes has enormously increased (see, e.g., Table I), enzymes with other than  $\alpha$ -1,4- and  $\alpha$ -1,6-linkage specificities have been recognised as belonging to the  $\alpha$ -amylase family, e.g. the enzymes acting on trehalose and sucrose (5,15). This necessarily indicates that the definition of the  $\alpha$ -amylase family should be more flexible even in the case where the family is considered as the pure enzyme family.

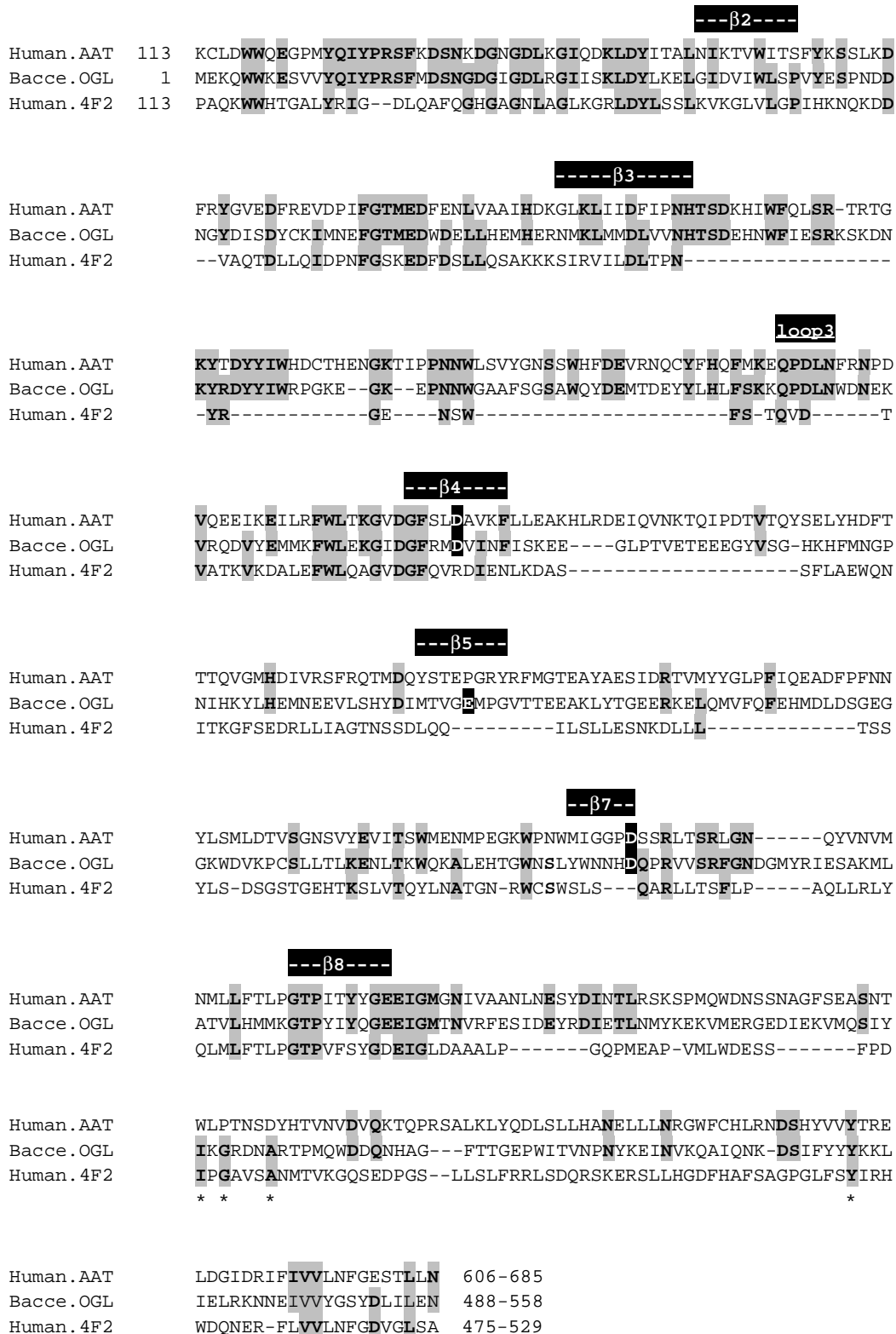
The situation may be completely different if the  $\alpha$ -amylase family is taken from the structural and evolutionary points of view. In 1992, two independent studies were published by Wells and Hediger (8) and Bertran *et al.* (9), who reported on cloning and sequencing of cDNAs from rat and rabbit kidney that stimulate transport of dibasic and neutral amino acids across cell membranes. Very remarkably these amino acid transport-related proteins were revealed to exhibit sequence similarities with some members of the  $\alpha$ -amylase enzyme family, especially with oligo-1,6-glucosidases and  $\alpha$ -glucosidases (8,9). On the other hand, the transport proteins present clear sequence similarities with the 4F2 heavy-chain cell surface antigens. Both these proteins, the transport ones as well as the antigens, are of mammalian origin only (1,5), such as mouse, rat, rabbit and human (8,9,29-31). Janeček *et al.* (10) presented a detailed comparison of the enzymatic members of the  $\alpha$ -amylase family with the non-enzymatic relatives. It was found that, from the primary structure (and thus also evolutionary) point of view, the amino acid transport-related proteins are most closely similar (related) to the oligo-1,6-glucosidase group of enzymes from the  $\alpha$ -amylase family (Fig. 1). This group could involve  $\alpha$ -glucosidase, dextran glucosidase, trehalose-6-phosphate hydrolase, sucrose phosphorylase, trehalose synthase and a few  $\alpha$ -amylases, as well as cyclomaltoamylase, neopullulanase and maltogenic amylase, in addition to oligo-1,6-glucosidase (7,10,15).

Amino acid sequence alignment of the oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus cereus* (32) with the human amino acid transport protein (31) and human 4F2 heavy-chain antigen (30), shown in Fig. 1, clearly demonstrates the existence of sequence similarities between the enzyme and the two proteins. The degree of similarity is high especially in the parts around the strands  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 and  $\beta$ 8 of the catalytic  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel of the oligo-1,6-glucosidase for which the three-dimensional structure is known (33). On the other hand, the strands  $\beta$ 5 and  $\beta$ 7 are not easily identifiable, especially for the antigen. Both proteins lack at least some of the amino acid residues that are essential for the enzymatic (amylolytic) function (Fig. 1). These are Arg in the  $\beta$ 4 region and, more importantly, perhaps, catalytic Glu in the  $\beta$ 5 region for the transport protein, while, as far

Taka-アミラーゼの Asp206、Glu230、Asp297 (14,26-28) に相当する Asp、Glu、Asp 残基を有する。しかしながら、今日では  $\alpha$ -アミラーゼファミリーと呼べる酵素のアミノ酸配列や特異性は大変多く (Table I)、 $\alpha$ -1,4 結合と  $\alpha$ -1,6 結合に特異的でない酵素、例えばトレハロースやスクロースに作用する酵素 (5,15) も  $\alpha$ -アミラーゼファミリーに属するとみなされるようになった。これはまさに、 $\alpha$ -アミラーゼファミリーを純粋な酵素群にするのではなく  $\alpha$ -アミラーゼファミリーの定義に柔軟性を持たせる必要が出てきたということである。

もし  $\alpha$ -アミラーゼファミリーを構造と進化の観点からとらえるのなら状況は全く違ってくる。1992 年、ラットおよびウサギ由来の二塩基性および中性アミノ酸膜輸送誘導タンパク質遺伝子のクローニングと塩基配列について Wells と Hediger (8) および Bertran (9) らの研究がそれぞれ発表された。注目すべきは、このようなアミノ酸輸送に参与するタンパク質が、オリゴ-1,6-グルコシダーゼや  $\alpha$ -グルコシダーゼ (8,9) といった  $\alpha$ -アミラーゼファミリーの酵素と類似性を持つことが示された点である。一方、それらの輸送タンパク質は細胞表面抗原の 4F2 H 鎖と明らかに相同性を有する。これらのタンパク質はどちらも、ラット、マウス、ウサギおよびヒトといったほ乳類のみに由来するタンパク質である (8,9,29-31)。私たちは  $\alpha$ -アミラーゼファミリーに属する酵素タンパク質と、非酵素的タンパク質とを詳細に比較検討した。その結果、1 次構造および進化的な観点からアミノ酸輸送関連タンパク質は  $\alpha$ -アミラーゼファミリーのひとつオリゴ-1,6-グルコシダーゼグループの酵素と最も相同性が高い(似ている)ことがわかった (図 1)。このグループには、オリゴ-1,6-グルコシダーゼに加えて、サイクロマルトデキストリナーゼ、ネオプルラナーゼ、マルトジェニックアミラーゼのみならず、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、デキストラングルコシダーゼ、トレハロース-6-フォスフェイトヒドロラーゼ、スクロースフォスフォリラーゼ、トレハロースシンターゼ、そしていくつかの  $\alpha$ -アミラーゼが含まれる (7,10,15)。

*Bacillus cereus* 由来オリゴ-1,6-グルコシダーゼ (32) とヒト由来アミノ酸輸送タンパク質 (31) およびヒトの 4F2 H 鎖 (30) のアミノ酸配列のアライメントを図 1 に示す。これを見ると明らかに、これら 3 種類のアミノ酸配列に相同性が存在する。3 次元構造の明らかなオリゴ-1,6-グルコシダーゼでいうと、 $(\beta/\alpha)_8$ -バレル中の  $\beta$ 3-ストランド、 $\beta$ 4-ストランド、および  $\beta$ 8-ストランド付近のホモロジーが特に高い (33)。一方、 $\beta$ 5-ストランドおよび  $\beta$ 7-ストランドは特に 4F2 H 鎖でホモロジーが低い。4F2 H 鎖とアミノ酸輸送タンパク質はどちらも(澱粉分解)活性に必須のアミノ酸残基を欠失している (図 1)。その残基とは、アミノ酸輸送タンパク質では  $\beta$ 4-ストランド中に Arg、おそらくさらに重要な  $\beta$ 5-ストランド中に Glu を欠失しており、4F2 H 鎖では  $\beta$ 3-ス



**Fig. 1. Amino acid sequence alignment of enzymatic and non-enzymatic members of the  $\alpha$ -amylase family.** Bacce.OGL, oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus cereus* (32); Human.AAT, amino acid transport-related protein from *Homo sapiens* (31); and Human.4F2, 4F2 heavy-chain cell surface antigen from *Homo sapiens* (30). The alignment covers the part corresponding with the catalytic ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel domain of oligo-1,6-glucosidase (33). Identical residues are highlighted in gray and signified by bold. The three catalytic residues of oligo-1,6-glucosidase (Asp in  $\beta$ 4, Glu in  $\beta$ 5 and Asp in  $\beta$ 7) and their eventual correspondencies are highlighted in black-and-white inversion. The best conserved sequence regions are indicated above the alignment blocks.

as the antigen is concerned, it misses the His and Arg in the  $\beta 3$  and  $\beta 4$  regions, respectively, and perhaps all the three catalytic residues in the regions  $\beta 4$ ,  $\beta 5$  and  $\beta 7$ . With regard to domain B protruding out of the catalytic  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel between the strand  $\beta 3$  and helix  $\alpha 3$ , the transport protein contains a segment that goes in sequence very well with the sequence of domain B from oligo-1,6-glucosidase, including also the short conserved sequence stretch (167\_QPDLN) near its C-terminus (Fig. 1). The 4F2 antigen seems either to lack domain B or contain only parts thereof (10).

Based on the sequence similarities shown in Fig. 1, it is relevant to expect that the three-dimensional structure of at least the amino acid transport-related proteins will be close to the structure of enzyme members from the  $\alpha$ -amylase family. Probably both the transport proteins and the 4F2 heavy-chain antigens will rank among the  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel enzymes, although the antigens evidently lack substantial parts of domain B which is characteristic of all enzymatic members of the  $\alpha$ -amylase family (10). On the other hand, the amino acid transport-related proteins will very probably contain a domain closely related to domain B of the oligo-1,6-glucosidase (cf. Fig. 1). At present the structure of neither the transport protein nor the antigen is known. For example, the single N-terminal transmembrane domain of the 4F2 antigen was predicted (34), but without further structural details concerning the rest of its polypeptide chain, which is sequentially similar to the  $\alpha$ -amylase-type  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel (Fig. 1). Thus, the final decision on whether or not the mammalian transport-related proteins and 4F2 heavy-chain antigens do constitute one protein structural family with the  $\alpha$ -amylase enzyme family needs to be supported by the crystal structures of the potential non-enzymatic members.

#### D. Conclusions - Further Examples

Whatever the eventual membership of the transport proteins and antigens in the  $\alpha$ -amylase family turns out to be, it is worth mentioning that examples of proteins forming a structural family with enzymes are not so rare. The glycoside hydrolase Family 18, chitinases, is one of the most convincing examples (6). This enzyme family, similar to the  $\alpha$ -amylase family, ranks among the  $(\beta/\alpha)_8$ -barrels (35-38). Remarkably, it contains a few protein members without enzymatic (chitinolytic) activity functioning as storage proteins. These are narbonin (39), concanavalin B (40) and nodulin (41). It was proposed that, e.g., concanavalin B has lost its enzymatic ability due to a possible mutation of the Family 18 chitinases catalytic glutamic acid to glutamine (35,40,42). Another example may be offered by the aldo-keto reductase family (43), which is also a family of  $(\beta/\alpha)_8$ -barrels, containing a non-enzymatic protein induced by fibroblast growth factor-1, structurally homologous and evolutionarily related to the enzymes from this family (44).

In the framework of the  $\alpha$ -amylase family, Da Lage *et*

トランド中に His、 $\beta 4$ -strand 中に Arg、そして  $\beta 4$ -, 5-, 7-ストランド中の 3 つの触媒残基全てを欠失している。アミノ酸輸送タンパク質中には、オリゴ-1,6-グルコシダーゼの B ドメイン( $(\beta/\alpha)_8$ -バレル中の  $\beta 3$  と  $\alpha 3$  の間から突き出た形をしている)とアミノ酸配列の非常に類似した部分が存在し、また、ドメインの C 末端近くには短い保存配列 (167-QPDLN) も存在する (図 1)。4F2 H 鎖には B ドメインは存在しないか、もしくはごく一部を含むのみかである (10)。

図 1 に示したアミノ酸配列の相同性を基にすると、少なくともアミノ酸輸送タンパク質の 3 次元構造が  $\alpha$ -アミラーゼファミリーに属する酵素の構造に近いと考えることができる。4F2 H 鎖は  $\alpha$ -アミラーゼファミリーに属する酵素の特徴である B ドメインの重要部分を明らかに欠失してはいるが、おそらく両タンパク質は、 $(\beta/\alpha)_8$ -バレル酵素群の中に入れられるであろう (10)。逆に、もしかするとアミノ酸輸送関連タンパク質は、オリゴ-1,6-グルコシダーゼの B ドメインに似たドメインを含んでいる可能性が高い (図 1 参照)。今のところアミノ酸輸送タンパク質も 4F2 H 鎖も構造は明らかでない。4F2 H 鎖の N 末端部の膜貫通ドメインの構造が予測されているが (34) 残りのペプチド鎖については、 $(\beta/\alpha)_8$ -バレル構造である  $\alpha$ -アミラーゼファミリーと相同性はあるが (図 1)、構造の詳細については明らかにされていない。このように、ほ乳類のアミノ酸膜輸送促進タンパク質や 4F2 H 鎖が、 $\alpha$ -アミラーゼ酵素ファミリーとともに構造上 1 つのタンパク質ファミリーを形成するかどうかの最終的な判断を下すには、非酵素的タンパク質の結晶構造を知る必要がある。

#### D. 結論および課題

輸送タンパクや抗原といったものを  $\alpha$ -アミラーゼファミリーに入れてしまっているのかという問いに対しては、こう答えるでしょう、すなわち、「酵素と構造的にファミリーを形成するタンパク質の例はそれ程珍しくないことは述べるに値する」。グライコサイドヒドロラーゼファミリー 18 のキチナーゼが最も納得できる例である (6)。このファミリーは  $\alpha$ -アミラーゼファミリーと同様に、 $(\beta/\alpha)_8$ -バレルタンパク質のひとつである (35-38)。驚いたことにこのファミリーの中にはキチン分解活性を持たずに蓄積タンパクとして機能するタンパク質がいくつか含まれている。Narbonin (39)、concanavalin B (40)、そして nodulin (41) がそれである。concanavalin B は、ファミリー 18 のキチナーゼの触媒グルタミン酸がグルタミンに変異した結果、酵素活性が無くなったと考えられている (35, 40, 42)。他の例として、aldo-keto reductase ファミリー (43) を挙げることができる。このファミリーもまた fibroblast growth factor-1 により誘導を受ける非酵素的タンパク質を含む  $(\beta/\alpha)_8$ -バレルタンパク質であり、構造の類似性と進化上関連が深い (44)。

$\alpha$ -アミラーゼファミリーの中では、Da Lage ら (45) はシヨ

al. (45) discovered a gene from a fruit fly *Drosophila melanogaster*, named *Amyrel*, which is related to but strikingly divergent from the insect  $\alpha$ -amylase gene (46). Although the *Amyrel* protein has not been detected yet, the *Amyrel* gene has a full-length coding sequence. The cysteine residues involved in disulphide bridges of animal  $\alpha$ -amylases (47) are perfectly conserved in the *Amyrel* amino acid sequence, suggesting that *Amyrel* may be an  $\alpha$ -amylase. However, two additional cysteines, which are not present in the animal  $\alpha$ -amylases, may create a new disulphide bridge and, eventually, a different tertiary structure (46).

The last example worth mentioning is the binding protein of mosquito larvae which serves as the receptor for the binary toxin from *Bacillus sphaericus* crystals (48). Sequencing of the partially purified internal amino acid fragments of the receptor from *Culex pipiens* and its biochemical characterisation revealed that this insect receptor protein may be an  $\alpha$ -glucosidase, sequentially belonging to the  $\alpha$ -amylase family (49).

In conclusion, it should be taken into account that protein mechanism and protein structure might have evolved at different rates, the mechanism having evolved much more quickly than the three-dimensional structure (50).

### Acknowledgement

The author thanks the Slovak Literary Fund, FEBS (Short-term fellowship) and VEGA (grant No. 2/6045/99) for financial support.

### References

1. Coutinho, P.M., and Henrissat, B. (2000) <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/ghf.html>
2. Janeček, Š. (1994) FEBS Lett. **353**, 119–123
3. Pujadas, G., Ramírez, F.M., Valero, R., and Palau, J. (1996) Proteins **25**, 456–472
4. Coutinho, P.M., and Reilly, P.J. (1997) Proteins **29**, 334–347
5. Janeček, Š., MacGregor, E.A., and Svensson, B. (2000) <http://alamy.savba.sk>
6. Henrissat, B. (1991) Biochem. J. **280**, 309–316
7. Janeček, Š. (1997) Progr. Biophys. Mol. Biol. **67**, 67–97
8. Wells, R.G., and Hediger, M.A. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 5596–5600
9. Bertran, J., Werner, A., Moore, M.L., Stange, G., Markovich, D., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Palacin, M., and Murer, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 5601–5605
10. Janeček, Š., Svensson, B., and Henrissat, B. (1997) J. Mol. Evol. **45**, 322–331
11. MacGregor, E.A. (1993) Starch **45**, 232–237
12. Svensson, B. (1994) Plant Mol. Biol. **25**, 141–157
13. Henrissat, B., Davies, G. (1997) Curr. Opin. Struct. Biol. **7**, 637–644
14. Kuriki, T., and Imanaka, T. (1999) J. Biosci. Bioeng. **87**, 557–565
15. Janeček, Š. (2000) In: Glycoenzymes (Ohnishi, M., Hayashi, T., Ishijima, S., and Kuriki, T., eds.), pp. 19–54, Japan Scientific Societies Press, Tokyo
16. Fukusumi, S., Kamizono, A., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1988) Eur. J. Biochem. **174**, 15–21
17. Laderman, K.A., Asada, K., Uemori, T., Mukai, H., Taguchi, Y., Kato, I., and Anfinsen, C.B. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 24402–24407
18. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1996) Biochem. J. **316**, 695–696
19. McCarter, J.D., and Withers, S.G. (1994) Curr. Opin. Struct. Biol. **4**, 885–892
20. Dong, G., Vieille, C., and Zeikus, J.G. (1997) Appl. Environ. Microbiol. **63**, 3577–3584
21. Janeček, Š. (1998) Folia Microbiol. **43**, 123–128
22. MacGregor, E.A., Jespersen, H.M., and Svensson, B. (1996) FEBS Lett. **378**, 263–266
23. Devulapalle, K.S., Goodman, S.D., Gao, Q., Hemsley, A., and Mooser, G. (1997) Protein Sci. **6**, 2489–2493
24. Monchois, V., Willemot, R.M., Remaud-Simeon, M., Croux, C., and Monsan, P. (1996) Gene **182**, 23–32
25. Przylas, I., Tomoo, K., Terada, Y., Takaha, T., Fujii, K., Saenger, W., and Strater, N. (2000) J. Mol. Biol. **296**, 873–886

ウジヨウバエの *Drosophila melanogaster* 由来の遺伝子で昆虫の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子と関連はあるが明らかに異なる遺伝子 (*Amyrel*と命名)を  $\alpha$ -アミラーゼファミリー内に見出した(46)。 *Amyrel* のタンパク質は検出されていないが、その遺伝子は *Amyrel* 全長をコードしている。動物の  $\alpha$ -アミラーゼ中のジスルフィド架橋に關する Cys 残基は *Amyrel* のアミノ酸配列中で完全に保存されていることから、*Amyrel* は  $\alpha$ -アミラーゼである可能性が示唆される。しかし、動物  $\alpha$ -アミラーゼ中に存在しないさらなる 2 つの Cys 残基が新たなジスルフィド架橋を形成し、その結果 *Amyrel* と動物  $\alpha$ -アミラーゼの 3 次構造は異なっていると考えられる (46)。

特筆すべき例として挙げるとすれば、*Bacillus sphaericus* 由来結晶性双性毒素のレセプターとしてはたらく蚊の幼虫の結合タンパク質がある (48)。 *Culex pipiens* 由来のレセプターの部分アミノ酸配列およびその生化学的性質から、おそらくこのレセプタータンパク質は  $\alpha$ -グルコシダーゼであり、したがって  $\alpha$ -アミラーゼファミリーに属するといえるであろう (49)。

最後に、「タンパク質の機構」と「タンパク質の構造」は違った速度で進化してきたが、前者は後者よりはるかに速く進化しているのだということを考慮に入れるべきである。

### 謝 辞

助成金をいただいた、Slovak Literary 基金、FEBS (Short-term fellowship)、および VEGA (grant No.2 /6045/20) に感謝いたします。

江崎グリコ(株)生物化学研究所  
大段 光司 訳



26. Takata, H., Kuriki, T., Okada, S., Takesada, Y., Iizuka, M., Minamiura, N., and Imanaka, T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18447–18452
27. Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W., and Kakudo, M. (1984) *J. Biochem.* **95**, 697–702
28. Nakajima, R., Imanaka, T., and Aiba, S. (1986) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 355–360
29. Teixeira, S., DiGrandi, S., and Kühn, L.C. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 9574–9580
30. Gottesdiener, K.M., Karpinski, B.A., Lindsten, T., Strominger, J.L., Jones, N.H., Thompson, C.B., and Leiden, J.M. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3809–3819
31. Bertran, J., Werner, A., Chillaron, J., Nunes, V., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Estivill, X., Murer, H., and Palacin, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14842–14849
32. Watanabe, K., Kitamura, K., Iha, H., and Suzuki, Y. (1990) *Eur. J. Biochem.* **192**, 609–620
33. Watanabe, K., Hata, Y., Kizaki, H., Katsube, Y., and Suzuki, Y. (1997) *J. Mol. Biol.* **269**, 142–153
34. Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P.J., Loffing, J., Shoemaker, C.B., and Verrey, F. (1998) *Nature* **395**, 288–291
35. Coulson, A.F.W. (1994) *FEBS Lett.* **354**, 41–44
36. Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., and Vorgias, C.E. (1994) *Structure* **2**, 1169–1180
37. Farber, G.K., and Petsko, G.A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 228–234
38. Pujadas, G., and Palau, J. (1999) *Biologia, Bratislava* **54**, 231–254 (URL: <http://argo.urv.es/~pujadas/TIM>)
39. Hennig, M., Schlesier, B., Dauter, Z., Pfeffer, S., Betzel, C., Höhne, W.E., and Wilson, K.S. (1992) *FEBS Lett.* **306**, 80–84
40. Hennig, M., Jansonius, J.N., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Dijkstra, B.W., and Schlesier, B. (1995) *J. Mol. Biol.* **254**, 237–246
41. Perlick, A.M., Frühling, M., Schröder, G., Frosch, S.C., and Pühler, A. (1996) *Plant Physiol.* **110**, 147–154
42. Terwisscha van Scheltinga, A.C., Hennig, M., and Dijkstra, B.W. (1995) *J. Mol. Biol.* **262**, 243–257
43. Jez, J.M., Bennett, M.J., Schlegel, B.P., Lewis, M., and Penning, T.M. (1997) *Biochem. J.* **326**, 625–636
44. Wilson, D.K., Nakano, T., Petrash, J.M., Quioco, F.A. (1995) *Biochemistry* **34**, 14323–14330
45. Da Lage, J.-L., Wegnez, M., and Cariou, M.-L. (1996) *J. Mol. Evol.* **43**, 334–347
46. Da Lage, J.-L., Renard, E., Chartois, F., Lemeunier, F., and Cariou, M.-L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6848–6853
47. Janeček, Š. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**, 519–524
48. Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., and Charles, J.-F. (1997) *Eur. J. Biochem.* **247**, 754–761
49. Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., and Charles, J.-F. (1999) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 711–721
50. Banerjee, S., Anderson, F., and Farber, G.K. (1995) *Protein Eng.* **8**, 1189–1195

Received on April 24, 2000, accepted on May 15, 2000

#### Profile of the Author



**Štefan Janeček** was born in 1966 and graduated in Biotechnology at the Slovak Technical University, Bratislava, Slovakia. He obtained his Ph.D. in 1993 from the Department of Biochemical Technology at the same university. The title of his thesis was “Analysis of Amino Acid Sequences of  $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel Enzymes from the Evolutionary and Structure-Stability Points of View.” He had two stays supported by the FEBS Short-Term Fellowships: in 1996 at CERMAV, CNRS, Grenoble, France (under the supervision of Dr. Bernard Henrissat), and in 2000 at Carlsberg Laboratory, Copenhagen, Valby, Denmark (under the supervision of Dr. Birte Svensson). In 1997 he was awarded a Prize by the Slovak Academy of Sciences in the category of young research fellows for his work “Evolutionary Relationships of the Enzymes from the  $\alpha$ -Amylase Family and an Approach to the Question of Evolution of All  $(\alpha/\beta)_8$ -Barrels.” Currently he is a research scientist at the Institute of Molecular Biology of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia. He is interested in the enzymes and proteins from the  $\alpha$ -amylase family, especially in their structure-function, structure-stability and evolutionary relationships, and, in a wider sense, his interests are focused also on the entire family of  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel proteins.