

〈短報〉

## ヒト膵臓 $\alpha$ -アミラーゼと合成基質 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- $\beta$ -D-galactopyranosylmaltoside との反応性結合の構造的予測

西矢 芳昭<sup>1)</sup>

### Structural prediction of 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- $\beta$ -D-galactopyranosylmaltoside binding in the active site of human pancreatic $\alpha$ -amylase

Yoshiaki Nishiya<sup>1)</sup>

**Summary** Human pancreatic  $\alpha$ -amylase (HPA) has been found to leak into the bloodstream when the pancreas is damaged. Several functional clinical assays for detecting HPA activity in serum (P-AMY) are performed using artificial substrates, such as 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- $\beta$ -D-galactopyranosylmaltoside (GalG2CNP). In this study, the binding mode of GalG2CNP in the active site of HPA was predicted based on the tertiary structure of nitrite-activated HPA complexed with the HPA mediated rearrangement product of the inhibitor acarbose (PDB ID: 2QV4). A P-AMY assay requires high concentrations of chloride and thiocyanate. Therefore, the model structure substituted a chloride ion for a nitrite ion, and contained a thiocyanate ion based on another solved HPA structure complexed with azide (PDB ID: 3BAW). After energy minimization, the constructed model structurally explains functional kinetic data of HPA's reaction with GalG2CNP, its release of the chromogen CNP, and the effect of thiocyanate.

**Key words:** Amylase, Pancreas, Artificial substrate, GalG2CNP, Active site binding

#### I. 緒言

ヒト膵臓  $\alpha$ -アミラーゼ [Human pancreatic  $\alpha$ -amylase (HPA),  $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanohydrolase,

EC 3.2.1.1] は血清中の逸脱酵素のひとつで、臨床検査では急性膵炎、慢性膵炎などの膵臓疾患、膵障害等の指標として測定される<sup>1-3)</sup>。ヒト血清中逸脱酵素には唾液腺  $\alpha$ -アミラーゼ

<sup>1)</sup> 摂南大学理工学部生命科学科  
〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17-8

<sup>1)</sup> Department of Life Science, Faculty of Science and Engineering, Setsunan University, 17-8 Ikedanaka-machi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan

連絡先：西矢芳昭  
摂南大学理工学部生命科学科  
Tel: +81-72-800-1151  
Fax: +81-72-838-6599  
E-mail: nishiya@lif.setsunan.ac.jp

受付日：2021年4月8日  
採択日：2021年5月7日

[Human salivary  $\alpha$ -amylase (HSA)] もあり、簡易に検査する場合はHPAとHSAを合わせた総 $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定する(検査項目名: AMY)。さらにHPA活性を正確に測定する場合(検査項目名: P-AMY)は、HSA特異的不活化抗体を検査薬に添加する。

2-chloro-4-nitrophenyl-4-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosylmaltoside (GalG2CNP) は、臨床検査でAMYやP-AMYに使用されている人工合成基質である<sup>4)</sup>。また、唾液中のHSA活性はストレスマーカーとなるため、GalG2CNPを用いたHSA測定モニターが既に実用化されている<sup>5)</sup>。

$\alpha$ -アミラーゼ活性測定用基質としてはデンプンが一般的だが、高重合度基質は酵素反応が複雑となり精密測定には不向きである。また、マルトヘキサオースやマルトペンタオース、マルトテトラオースなどのグルコースオリゴマーを基質とすることも可能だが、分解産物の定量系が必要である<sup>6)</sup>。

そこで、糖とニトロフェノール系色素を結合したさまざまな人工合成基質が開発され、それぞれの基質のHSA加水分解反応による切断位置が調査された。そのうち、2-chloro-4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltoheptaosideや2-chloro-4-nitrophenyl-D-maltopentaosideなどは、 $\alpha$ -アミラーゼ反応後に色素CNPを切り出すため $\alpha$ -グルコシダーゼや $\beta$ -グルコシダーゼを追随酵素として必要とする<sup>7,8)</sup>。2-chloro-4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotrioside (G3CNP) は追随酵素を必要としないが<sup>9)</sup>、酵素反応時に $\alpha$ -アミラーゼの糖転移反応の影響を否定できない。

GalG2CNPはG3CNPの改良版で、非還元末端をガラクトースに置換しているため $\alpha$ -アミラーゼによる糖転移を考慮する必要が無い。そして測定条件下で、切断部位はグルコースとCNP間の結合に限定される。これにより、厳密な酵素活性の測定が可能となった<sup>4)</sup>。しかしながら、GalG2CNPとHPAの反応は構造的に解析されおらず、反応様式を立体構造に基づき検討した研究は見当たらない。また、一般に人工合成基質の反応切断位置は $\alpha$ -アミラーゼの基質結合様式、いわゆるサブサイトから特徴付けられるが、GalG2CNPの切断位置は構造的に類似の4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotriosideと全く異なっている<sup>10)</sup>。理由として、GalG2CNP試薬に含まれ

る高濃度チオシアン酸塩の影響が考えられるが、詳細は不明である。

本研究では、既知のHPA立体構造を用い、GalG2CNPとの反応性結合を予測した。結果として、CNP-glucose間の*O*-グリコシド結合に対する反応様式やチオシアン酸イオンの役割などが推定され、 $\alpha$ -アミラーゼの臨床検査に対する理論的裏付けの一助となったので報告する。

## II. 材料及び方法

HPAおよびGalG2CNPの立体構造は、データベースProtein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) およびPubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) よりそれぞれ得た。

基質の立体配座解析や分子の重ね合わせ、酵素-基質複合体構造の構築、およびドッキングシミュレーションは、ソフトウェアMOE (ver 2019.01, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada) を用いて行った<sup>11,12)</sup>。配座解析はLowModeMD (分子動力学計算による分子配座の発生) にて、Energy Window: 15に設定して実施した。アカルボース再構成体[acarviosine- $\alpha$ -D-maltotrioside (AcaG3, PDB ID: 2QV4)] とGalG2CNP分子との重ね合わせは、グリコシド結合部位および隣接する各ユニットC1炭素の計6箇所にてsuperposeを行った。HPA-GalG2CNP複合体構造は、Protein Data Bankに掲載のHPAとアカルボース再構成体AcaG3との複合体構造(PDB ID: 2QV4)<sup>13)</sup>を用いて構築した。2QV4は、ラマチャンドラプロットに基づくアウトライヤー修正など異常の修正を行い使用した。3Dプロトネーション、部分電荷の付加とエネルギー最小化処理は、MOEの初期値を用いて行った。プロトネーション条件は、GalG2CNP反応条件に合わせ、310K、pH 6.0、塩濃度0.45 mol/Lとした。ドッキングシミュレーションはCNPをテンプレートとし、Induced Fit、Rescoring: GBVI/WSAにて実施した。

## III. 結果及び考察

HPAとGalG2CNPの反応性結合構造を予測するにあたって、まずGalG2CNPの立体配座解析を行った。計算条件にてGalG2CNPの可能な配

座は517種類と極めて多様で、全てをCNP固定で重ね合わせた結果をFig. 1Aに示す。もっとも安定な構造は末端同士が水素結合した環状様配座だが、酵素との結合は連続したサブサイト構造が基質の各ユニットを安定化するため、さまざまな配座を採り得る。反応性結合の構造的予測は、リガンドフリーのHPA立体構造を用いたドッキングシミュレーションでは難しいと判断した。すでにHPAによるGalG2CNPの切断位置は実験結果より、CNP-glucose間のO-グリコシド結合と判明している。したがって、HPAのリガンド結合構造の中から、HPA-GalG2CNP反応性結合に類似性の高い構造を選択、使用することでの構造予測を試みた。

2QV4は、HPAと亜硝酸塩および阻害剤アカルボースとの複合体構造であり、実際の結晶構造ではアカルボースが加水分解や転移反応により変化したアカルボース再構成体AcaG3が活性中心に結合している<sup>13,14</sup>。AcaG3の構成ユニットは5つで、その結合様式はサブサイト-4から+1までとなっている。そのため、実験結果から結合様式がサブサイト-3から+1までと分かっているGalG2CNPの反応性結合構造予測には、2QV4ベースが相応しいと考えられた。

そこで、AcaG3分子中の原子間距離を4箇所測定し、GalG2CNP配座の対応する原子間距離

と比較することで、517の配座から最終的に1配座に絞り込んだ。この配座はポテンシャルエネルギー順位が第261位で、最安定配座のポテンシャルエネルギーと比較して約11 kcal/mol高値であった。この配座とAcaG3との重ね合わせの結果をFig. 1Bに示す。両者の立体構造の類似性が明確となったので、2QV4を用いてGalG2CNPの反応性結合モデルを以下のように構築した。

まず、方法欄に記載の流れで2QV4の異常修正、プロトネーション、部分電荷付加、エネルギー最小化を行った。次に、リガンドのAcaG3とGalG2CNPの絞り込み配座とをsuperposeし入れ替えた。この状態でクラッシュが認められる水分子4分子を消去し、エネルギー最小化計算を実施した。その後、亜硝酸イオンを塩素イオンへ置換した。以前の構造比較研究より、亜硝酸イオンや硝酸イオンと塩素イオンが同座標位置に存在すると証明されている<sup>13</sup>。そして、HPAとアジ化物イオンの複合体構造 (PDB ID: 3BAW) をsuperposeすることで、アジ化物イオンを置いた<sup>13</sup>。さらに、アジ化物イオンをチオシアン酸イオンに置換した。両イオンは類似する直鎖状アニオンで、HPAやHSAはこれらのイオンによる高活性化が知られている<sup>4</sup>。したがって、GalG2CNPやG3CNPによる実用的なHPA活性測定には、高濃度のチオシアン酸イオンが

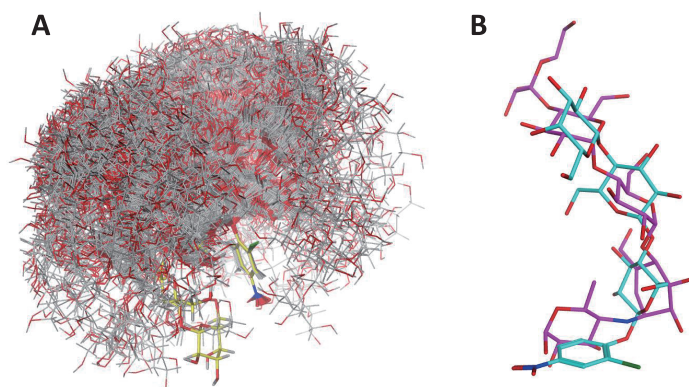


Fig. 1 Conformational analysis of GalG2CNP. (A) 517 GalG2CNP conformations predicted by molecular dynamics. All conformations are superimposed by their CNP regions and shown as stick representations. The most stable structure is colored yellow. (B) Superimposition of a GalG2CNP conformation (cyan) on AcaG3 (magenta), the rearrangement product of the inhibitor acarbose, found in the HPA-ligand complex (PDB ID: 2QV4).

添加される。最後に、再度エネルギー最小化計算を行い、最適化構造を完成した。

構築したHPA-GalG2CNP反応性結合構造をFig. 2に示す。Fig. 2AはHPAの全体表面構造(正負電荷を青赤表示)で、活性中心に結合するGalG2CNPとチオシアン酸イオンを球体モデルで示している。Fig. 2Bは活性中心のクローズアップ(基質結合ポケットをシート状表示)、さらにFig. 2CはGalG2CNPの加水分解部位(矢印で表示)とその周辺をクローズアップしている。CNPがサブサイト+1に入ること、GalG2CNPの反応性結合が形成されている。また、チオシアン酸イオンが活性中心の負電荷に富む空間に位置することで、GalG2CNPが反応性結合へと

導かれると示唆される(Fig. 2A, 2B)。基質結合ポケットは親水性に富み、酸塩基触媒残基E233と求核残基D197、そしてD300と、HPAの反応性に重要な3つのカルボン酸側鎖が加水分解部位周辺に存在する(Fig. 2B, 2C)<sup>6,14-16</sup>。Fig. 2Bに示すように、基質結合ポケットの周辺には可塑性に富むFlexible loopが存在し、ターンオーバーに重要な役割を果たすことが知られている<sup>17</sup>。

GalG2CNPとAcaG3のHPA結合時の体積は、それぞれ522および673 Å<sup>3</sup>と算出された。GalG2CNPは基質結合ポケットに対し占有体積が小さいため、チオシアン酸イオンの補助が必要なかもしれない。また、HPAと各リガンドとの相互作用

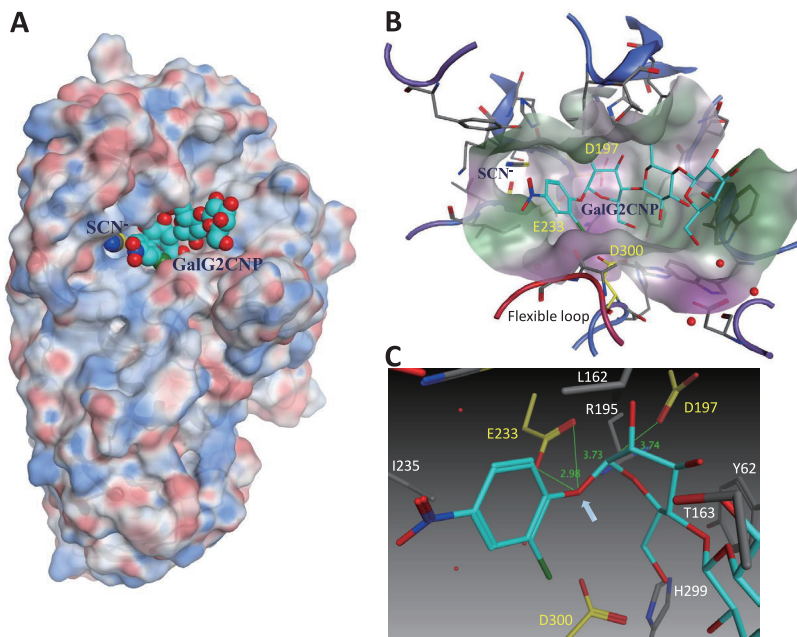


Fig. 2 Structural model of GalG2CNP bound in the active site of HPA. (A) The overall structure shown in ribbon and transparent surface representations. Positively and negatively charged regions are colored blue and red, respectively. GalG2CNP (cyan) and a thiocyanate ion bound in the active center are shown in space-filling models. (B) Close-up view of the HPA active center. Stick representations of GalG2CNP (cyan), a thiocyanate ion, and active site amino acid residues are shown. The substrate binding pocket is shown as a transparent sheet of enzyme surface. Hydrophilic and hydrophobic regions are colored green and purple, respectively. The main chain is shown in ribbon representation, colored by B-factor levels [from blue (low) to red (high)]. The three catalytic residues are indicated with yellow letters. (C) Close-up view of the hydrolytic site and its surrounding area. The hydrolytic site is indicated with an arrow. Atomic distances between the hydrolysis site and the catalytic residues (Å) are also indicated.

用エネルギーを確認したところ、E233とGalG2CNPおよびAcaG3では、それぞれ-0.5と-1.0 kcal/molであった。その他にも、GalG2CNPはD300、T163、W59と高い相互作用を示した(それぞれ-1.7、-1.6、-0.8 kcal/mol)。

続いて、チオシアン酸イオンのGalG2CNP反応性結合への重要性を確認するため、チオシアン酸イオン有り無しの2構造について、方法欄に記載の条件にてドッキングシミュレーションをそれぞれ実施した (Fig. 3)。チオシアン酸イオン有りでは反応性結合に収束しているが (Fig. 3A)、チオシアン酸イオンを除いて同様のシミュレーションを行うと、CNP部分がチオシアン酸イオン不存在の空間へシフトし、反応性結合を維持できなくなった (Fig. 3B)。

基質以外のリガンドとして、塩素イオンとカルシウムイオンはHPAや他の哺乳動物由来 $\alpha$ -アミラーゼの活性化および安定な活性化構造の形成にそれぞれ必要である<sup>13,15</sup>。この性質を利用し、 $\alpha$ -アミラーゼとGalG2CNPの組み合わせは血清中カルシウムイオン濃度測定や塩素イオン濃度測定の臨床検査にも応用されている<sup>18,19</sup>。今回の知見は、これらの検査項目に対する知識の向上にも貢献するであろう。

HPAとHSAのシグナル配列を除くアミノ酸配列一致率は97.2%、HPAとアイソザイム2Bのアミノ酸配列一致率は98.8%である。また、HPA

とイヌおよびネコ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼのアミノ酸配列一致率は、それぞれ90.5%および89.5%である。これら酵素とHPAとの相同性は極めて高く、GalG2CNPとのドッキング様式はHPAと同様と推察される。本研究で得られた知見は、ヒト唾液中のアミラーゼ測定やペットの血中アミラーゼ測定などにも理論的基盤の一助となるものと期待される<sup>5,20</sup>。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

## 謝辞

本研究の一部は、JSPS科学研究費補助金(科研費) 18KT06616の助成を受けたものである。

## 文献

- 1) M Winslet, C Hall, N J London, and JP Neoptolemos: Relation of diagnostic serum amylase levels to aetiology and severity of acute pancreatitis. *Gut*, 33: 982-986, 1992.
- 2) Zhuang L, Su J, Zhang X, Huang H, Zhao L, and Xu F: Serum amylase levels in relation to islet  $\beta$  cell function in patients with early type 2 diabetes. *PLoS ONE*, 11: 1-14, 2016
- 3) Wang Q, Wang H, Yang X, Wang K, Liu R, Lia Q, and Ou J: A sensitive one-step method for quantitative detection of  $\alpha$ -amylase in serum and urine using a

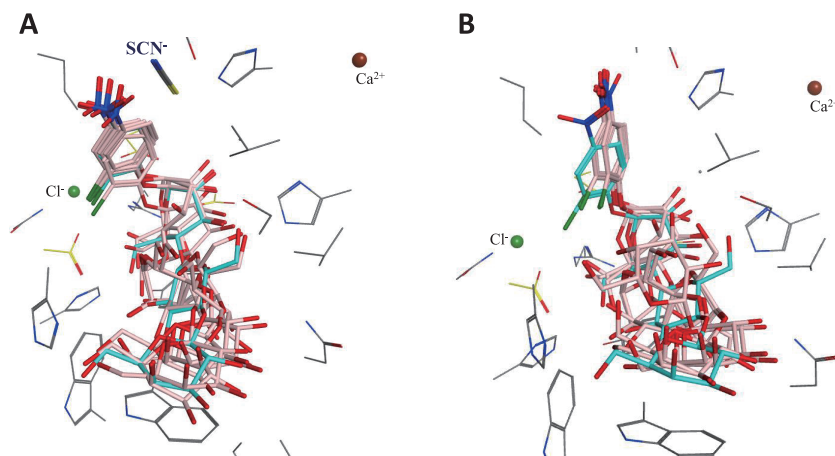


Fig. 3 GalG2CNP docking simulation. Results were calculated in the presence (A) and absence (B) of a thiocyanate ion. The active site-bound GalG2CNP predicted by this study and the simulated conformations are colored in cyan and light pink, respectively.

- personal glucose meter. *Analyst*, 140: 1161-1165, 2015.
- 4) Morishita Y, Inuma Y, Nakashima N, Majima K, Mizuguchi K, and Kawamura Y: Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- $\beta$ -D-galactopyranosylmaltoside. *Clin Chem*, 46: 928-933, 2000.
  - 5) Shetty V, Zigler C, Robles TF, Elashoff D, and Yamaguchi M: Developmental validation of a point-of-care, salivary  $\alpha$ -amylase biosensor. *Psychoneuroendocrinology*, 36: 193-199, 2011.
  - 6) Brayer GD, Sidhu G, Maurus R, Rydberg EH, Braun C, Wang Y, Nguyen NT, Overall CM, and Withers SG: Subsite mapping of the human pancreatic  $\alpha$ -amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques. *Biochemistry*, 39: 4778-4791, 2000.
  - 7) 小川善資, 伊藤 啓: 血清酵素測定の標準化の動向. *生物物理化学*, 42: 295-298, 1998.
  - 8) Kandra L:  $\alpha$ -Amylases of medical and industrial importance. *Theochem*, 666-667: 487-498, 2003.
  - 9) Gella FJ, Guberna G, Vidalc R, and Canalias F: Determination of total and pancreatic  $\alpha$ -amylase in human serum with 2-chloro-4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotriose as substrate. *Clin Chim Acta*, 259: 147-160, 1997.
  - 10) Okada M, Ogawa K, and Usui T: Substrate specificity of human and bovine pancreatic  $\alpha$ -amylases using end-blocked maltooligosaccharide. *J Appl Glycosci*, 47: 35-44, 2000.
  - 11) 西矢芳昭: 酵素立体構造および反応予測に基づく尿素窒素のダブルカイネティックアッセイの考察. *生物試料分析*, 41: 162-167, 2018.
  - 12) Shimozawa Y, Aiba H, and Nishiya Y: Structural prediction and analysis of the highly reactive alkaline phosphatase from *Shewanella* sp. T3-3. *Int J Anal Bio-Sci*, 8: 39-43, 2020.
  - 13) Maurus R, Begum A, Williams LK, Fredriksen JR, Zhang R, Withers SG, and Brayer GD: Alternative catalytic anions differentially modulate human  $\alpha$ -amylase activity and specificity. *Biochemistry*, 47: 3332-3344, 2008.
  - 14) Li C, Begum A, Numao S, Park KH, Withers SG, and Brayer GD: Acarbose rearrangement mechanism implied by the kinetic and structural analysis of human pancreatic  $\alpha$ -amylase in complex with analogues and their elongated counterparts. *Biochemistry*, 44: 3347-3357, 2005.
  - 15) Qian M, Haser R, Buisson G, Duée E, and Payan F: The active center of a mammalian  $\alpha$ -amylase. Structure of the complex of a pancreatic  $\alpha$ -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-Å resolution. *Biochemistry*, 33: 6284-6294, 1994.
  - 16) Goldbach L, Vermeulen BJA, Caner S, Liu M, Tysoe C, Gijzel L, Yoshisada R, Trellet M, Ingen H, Brayer GD, Bonvin AMJJ, and Jongkees SAK: Folding then binding vs folding through binding in macrocyclic peptide inhibitors of human pancreatic  $\alpha$ -amylase. *ACS Chem Biol*, 14: 1751-1759, 2019.
  - 17) Ramasubbu N, Raguath C, and Mishra PJ: Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase. *J Mol Biol*, 325: 1061-1076, 2003.
  - 18) Kayamori Y and Katayama Y: Enzymatic method for assaying calcium in serum and urine with porcine pancreatic alpha-amylase. *Clin Chem*, 40: 781-784, 1994.
  - 19) Ono T, Taniguchi J, Mitsumaki H, Takahata F, Shibuya A, Kasahara Y, and Koshimizu F: A new enzymatic assay of chloride in serum. *Clin Chem*, 34: 552-553, 1988.
  - 20) 阿部又信: -新NRC飼養標準(2006)より-イヌ・ネコにおける炭水化物・繊維の役割: 【前編】可吸収炭水化物、可消化炭水化物、および発酵性炭水化物. *ペット栄養学会誌*, 10: 21-38, 2007.