

α -グルコシダーゼと相同性を有する *Pedobacter* 由来機能未知酵素の構造解析 Crystal Structure of an Uncharacterized Enzyme Homologous to α -Glucosidase from *Pedobacter* Species

宮崎剛垂¹, 市川めぐみ¹, 西河淳¹, 殿塚隆史^{1,*}

¹東京農工大学大学院農学府, 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

Takatsugu Miyazaki¹, Megumi Ichikawa¹, Atsushi Nishikawa¹, Takashi Tonzuka^{1,*},

¹Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu 183-8509, Japan

1 はじめに

我々は、グルコシダーゼと相同性を有する機能未知酵素について、立体構造を解析することによって、その性質を明らかにしようとする研究を行っている[1]。 α -グルコシダーゼは、マルトオリゴ糖の α -1,4-結合を加水分解する酵素で、デンプンの分解において重要な役割を果たしている。 α -グルコシダーゼは、糖質に作用する酵素のデータベースである CAZy において糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 31 に分類されている。GH31 には α -グルコシダーゼの他に、 α -キシロシダーゼ、 α -グルカンリアーゼ、 α -1,3-グルコシダーゼなど多様な酵素が分類されている。GH31 には現在 3000 以上の遺伝子が分類されており、この中の機能未知なものには、新規な活性を有する酵素遺伝子が存在するものと考えられる。

本課題では、*Pedobacter heparinus* NBRC12017 および *Pedobacter saltans* NBRC100064 より、既知 α -グルコシダーゼと 20%程度の相同性を有する機能未知酵素 Phep_2697 および Pedsa_3617 に着目した。これらの酵素を大腸菌で発現させ活性を測定したところ、 α -グルコシダーゼの基質である *p*-ニトロフェニル α -グルコシドには全く作用せず、 α -ガラクトシダーゼの基質である *p*-ニトロフェニル α -ガラクトシドを加水分解することが判明した。これまでに GH31 では α -ガラクトシダーゼが存在するという報告はなされておらず、全く新規な酵素であることが明らかになった。さらにこれらの酵素の結晶化を行ったところ、Pedsa_3617 について結晶を得ることに成功しており、以下本酵素を *PsGal31A* と記載する。本課題では、立体構造を決定するため、回折データの収集を行った。

2 実験

PsGal31A の遺伝子を pET28a に組み込んだプラスミドで大腸菌を形質転換し、この大腸菌を培養することによって *PsGal31A* を発現させた。超音波破碎機によって酵素を抽出し、Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーによって酵素を精製した。

結晶化は、15~25% (v/v) ポリエチレングリコールモノメチルエーテル 2000、100 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH7.5~8.5) あるいは 100 mM Tris-HCl 緩

衝液 (pH8.0~9.0) をリザーバーとしたハンギングドロップ蒸気拡散法によって行った。

3 結果および考察

PsGal31A の結晶の回折を測定したところ、2.28 Å 分解能のデータが得られ、空間群は正方晶系であることが判明した。また、立体構造を決定するため、セレンメチオニン置換結晶を同様の方法で作製した結晶について回折の収集を行ったところ、2.39 Å 分解能のデータを得ることができた。PHENIX ソフトウェアの AutoSol プログラムで構造を決定し、空間群は $P4_32_12$ であった。

PsGal31A は、4つのドメイン、N、A、C、D から構成されていた。触媒ドメインであるドメイン A は (β/α)₈ バレルで構成されており、(β/α)₈ バレルの途中に長いループが挿入されていた。また、ドメイン N についても途中に長いループが挿入されていた (図 1)。

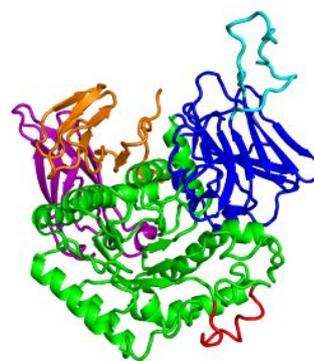


図 1 : *PsGal31A* の全体構造

ドメイン N、A、C、D はそれぞれ青、緑、オレンジ、紫で、ドメイン N のループはシアン、ドメイン A のループ赤で表示した。

4 まとめ

本課題では、*PsGal31A* の結晶について回折データを収集し、立体構造を決定することができた。

参考文献

[1] T. Miyazaki *et al.*, *FEBS J.* **280**, 4560 (2013).

* tonozuka@cc.tuat.ac.jp