

Thermus thermophilus HB8 由来マンノシル/グルコシルグリセリン酸分解酵素 とリガンドとの複合体の立体構造解析

Crystal structure of *Thermus thermophilus* HB8 mannosyl/glucosylglycerate hydrolase in complex with ligands

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 Tonozuka^{1,*}

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

1 はじめに

糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 63 に属する酵素は、細菌から真核生物に至るまで多くの生物に存在している。真核生物の酵素は、その多くが *N* 結合型糖鎖に作用する酵素であるプロセシング α -グルコシダーゼ I であると同定されている。一方、細菌由来の酵素は、グルコシル- α -1,2-ガラクトース分解酵素やマンノシル/グルコシルグリセリン酸分解酵素など特徴的な糖を分解する酵素であることが、近年報告された。我々はこれまでに、GH63 に属する糖鎖分解酵素の研究を行っており、本研究では GH63 に属する好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来のマンノシル/グルコシルグリセリン酸分解酵素 (以下 *Tt*8MGH) と基質との複合体の立体構造を解析した。

2 実験

*Tt*8MGH の大腸菌における発現プラスミドは、理研バイオリソースセンター (RIKEN BRC) から入手した[1]。精製は、70°C 10 分の熱処理、疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーによって行った。結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって行った。リガンドなしの結晶化は、リザーバーに 20~35% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール、100 mM Tris 緩衝液 (pH5.5~6.5) を用いた。グルコースとの複合体の結晶化は、リザーバーに 20~35% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール、100 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8~6.0)、10 mM グルコースを用いた共結晶化による。グリセリン酸との複合体の結晶化は、リザーバーに 0.4~0.7 M 酒石酸ナトリウムカリウム、100 mM HEPES-NaOH (pH7.0~8.0)、50 mM 塩化カルシウム、10 mM グリセリン酸を用いた共結晶化による。

3 結果および考察

*Tt*8MGH のリガンドなし、グルコースとの複合体、およびグリセリン酸との複合体の立体構造を、それぞれ 1.67 Å、1.77 Å および 2.10 Å 分解能で決定した[2]。*Tt*8MGH は (α/α)₆ バレルから成る触媒ドメイン、および、A'領域と呼ばれるサブドメインから構成されており、これは他の GH63 の酵素においても見られる構造である。

*Tt*8MGH の立体構造において最も特徴的なのは、触媒ドメインに 3 つのループ、Loop-A (残基番号 23-30)、-B (残基番号 75-96)、-C (残基番号 177-199) が存在することである。リガンドなし、*Tt*8MGH-グルコース複合体、*Tt*8MGH-グリセリン酸複合体でこれらのループのコンフォメーションは異なっていることが判明し (図 1)、3 つのループのコンフォメーション変化が酵素活性に重要であると推測された。

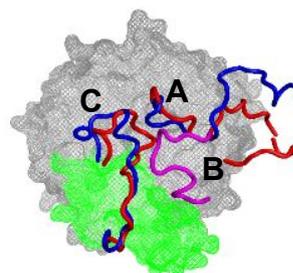


図 1 : *Tt*8MGH の 3 つのループを A、B、C で表す。A と C には 2 つのコンフォメーション (青と赤)、B には 3 つのコンフォメーション (青、赤、マゼンタ) が存在する。A'領域は緑で表す。

4 まとめ

*Tt*8MGH のリガンドなし、グルコースとの複合体、およびグリセリン酸との複合体の立体構造を決定し、3 つのループのコンフォメーションがこれらの構造で異なっていることを明らかにした。

謝辞

本研究を進めるにあたりお世話になった飯野均博士およびご助言をいただいた倉光成紀先生 (大阪大学) に感謝いたします。

参考文献

- [1] S. Yokoyama *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* **7**, 943 (2000).
[2] T. Miyazaki *et al.*, *J. Struct. Biol.* **190**, 21 (2015).

* tonozuka@cc.tuat.ac.jp