

α -グルコシダーゼと相同性を有する *Pedobacter* 由来酵素の立体構造 Structure of an Enzyme Homologous to α -Glucosidase from *Pedobacter* Species

殿塚隆史*, 宮崎剛亜, 石寄雄一, 市川めぐみ, 西河淳

東京農工大学大学院農学府, 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

Takashi Tonozuka*, Takatsugu Miyazaki, Yuichi Ishizaki, Megumi Ichikawa, and Atsushi Nishikawa
Tokyo 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 (GH) ファミリー31 は、現在 4,000 以上の酵素が分類されている大きなファミリーであり、産業上有用な酵素である α -グルコシダーゼが数多く分類されている。本ファミリーには機能の不明な酵素が多数存在し、このような機能未知酵素の中には有用な糖を生産するようなものがあると期待される。我々は GH31 に属する機能未知酵素の立体構造を解析することによって、その性質の一端を解明する研究を行っている。

Pedobacter saltans は、グリコサミノグリカンを分解するさまざまな酵素を生産する細菌として知られている。我々は、本菌より GH31 としては初めての α -ガラクトシダーゼを見出し、*PsGal31A* と命名した。さらに、セレノメチオニン置換結晶から立体構造を明らかにした。今回、*PsGal31A* と各種糖との複合体の結晶構造解析を行った [1]。

2 実験

PsGal31A の野生型および触媒残基の一つである Asp365 を Ala に置換した酵素 D365A をコードする DNA を、pET28 に組み込んだプラスミドを用い、大腸菌によって酵素の生産を行った。酵素は、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で精製した。結晶化の条件は、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル 2000 と、HEPES 緩衝液あるいは Tris 緩衝液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。結晶は、リザーバーにさまざまな糖を溶解した溶液にソーキングした後、X線回折データの収集を行った。これまでに決定した、*PsGal31A* 野生型のリガンドを結合していない構造を鋳型とした分子置換法を行うことによって、どのような糖に結合するか検証した。

3 結果および考察

PsGal31A の構造はホモダイマーを形成し、サブユニット同士は、N 末端側のドメインに挿入されている Loop-N と名付けたループによって相互作用していた (図 1)。

さまざまな糖を結晶にソーキングし、データを収集した結果、野生型酵素と D-ガラクトースの複合体、野生型酵素と L-フコースの複合体 (WT-Fuc)、D365A 変異酵素と *p*-nitrophenyl α -D-galactoside (*p*NP-Gal) との複合体について、立体構造を決定することができた。本酵素は、*p*NP-Gal を加水分解

することから α -ガラクトシダーゼであることが判明しており、D-ガラクトースおよび *p*NP-Gal との複合体の立体構造が得られるのは予想できたが、意外だったのは、L-フコースとの複合体の立体構造が得られたことである。*Pedobacter saltans* において、*PsGal31A* の遺伝子の近傍にはフコシダーゼと推定される GH29 の遺伝子が存在することから、*PsGal31A* の基質の候補としてガラクトシルフコースが考えられた。この糖はこれまで線虫や粘菌において存在の可能性が報告されている。

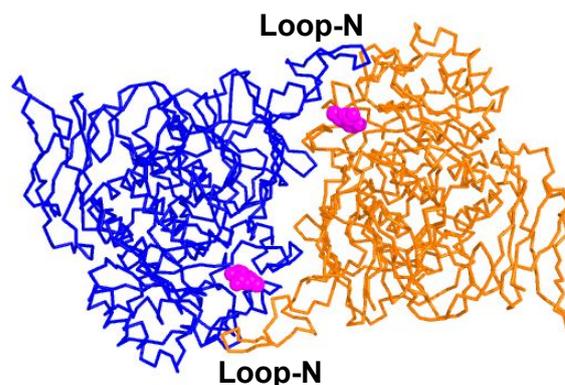


図 1 : WT-Fuc の立体構造。それぞれのサブユニットを青およびオレンジ、活性中心に結合している L-フコースをマゼンタで示し、Loop-N を示した。

4 まとめ

GH31 の主要な酵素は α -グルコシダーゼおよび α -キシロシダーゼであるが、*PsGal31A* は他の GH31 の酵素とは全く異なる糖を基質とすることが示唆された。最近、多糖デキストランに作用する GH31 の酵素が報告される [2] など、GH31 は多様性があることが明らかになり、本研究では GH31 の多様性の一端を立体構造の面から明らかにすることができた。

参考文献

- [1] T. Miyazaki *et al.*, *Biochem. J.*, **469**, 145 (2015).
[2] Y. Gozu *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press (2016).

* tonozuka@cc.tuat.ac.jp