

# Clan GH-D に属する酵素、イソマルトデキストラナーゼの立体構造解析 Crystal Structure of Isomalto-dextranase, a Member of Clan GH-D

殿塚隆史\*, 岡沢唯香, 宮崎剛亜, 石寄雄一, 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\*, Yuka Okazawa, Takatsugu Miyazaki, Yuichi Ishizaki, and Atsushi Nishikawa  
Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu 183-8509, Japan

## 1 はじめに

イソマルトデキストラナーゼ (IMD) は、グルコースが  $\alpha$ -1,6-結合で重合した多糖であるデキストランを加水分解し、非還元末端側からイソマルトースを遊離させる酵素である。グルコースが重合した多糖として最も知られている澱粉は、アミラーゼによって加水分解される。このため、IMD の構造は、 $\alpha$ -アミラーゼのような酵素と同じファミリーに分類されると思われるが、実際には IMD は糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 27 に分類され、GH13 に分類される  $\alpha$ -アミラーゼとはアミノ酸配列の相同性はない。この GH27 には、主に  $\alpha$ -ガラクトシダーゼが分類されており、また GH27 とともに clan GH-D と称するスーパーファミリーを形成する GH31 には主に  $\alpha$ -グルコシダーゼが分類されている。これら  $\alpha$ -ガラクトシダーゼや  $\alpha$ -グルコシダーゼは二糖からオリゴ糖のような比較的小さい糖を分解する酵素であり、なぜ IMD が多糖を分解する酵素であるにもかかわらず、clan GH-D に分類されるのか興味を持たれる。

我々は  $\alpha$ -グルコシダーゼと相同性を有する酵素の研究を行っており、本研究では、 $\alpha$ -グルコシダーゼおよび関連酵素のアミノ酸配列の系統樹において特徴的な位置に存在する IMD について、立体構造を決定した[1]。

## 2 実験

細菌 *Arthrobacter globiformis* 由来の IMD (以下 AgIMD) 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。結晶化は、ポリエチレングリコール 8000、酢酸ナトリウム緩衝液緩衝液、リン酸カリウム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、いったんリン酸カリウムの存在しないリザーバー溶液にソーキングした後、酢酸鉛を溶解したリザーバー溶液にソーキングし、回折データを収集した。位相決定は、鉛を用いた SAD 法による。

## 3 結果および考察

AgIMD は  $(\beta/\alpha)_8$  バレルから成るドメイン A、および主に  $\beta$  シートから成るドメイン C とドメイン D より構成されていた。ドメイン A およびドメイン C

は GH27 の酵素に共通して見られる構造である。これに対しドメイン D は糖結合モジュール (CBM) 35 に分類され、GH27 の酵素としては唯一 AgIMD に見られることが判明した。

ドメイン A には触媒残基が存在しており、AgIMD において最も重要な役割を担っている。ドメイン A を GH27 のヒト  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (hGAL) の触媒ドメインと比較したところ、AgIMD にはサブドメイン B、loop-1、loop-2 という、hGAL には存在しない特徴的な構造を有していることが分かった。サブドメイン B は、GH13 や GH31 の触媒ドメインにも存在しており、GH13 と GH31 とのアミノ酸配列レベルの相同性はないが、サブドメイン B のフォールドは類似していることが分かった。また、loop-1 に存在している Asp207 は、デキストランの認識に重要であることが分かった。

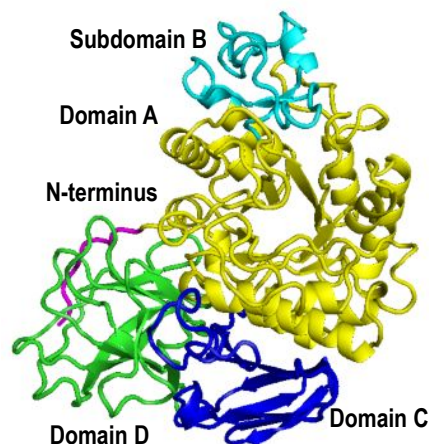


図 1 : AgIMD の立体構造

## 4 まとめ

AgIMD の立体構造は、触媒ドメインは GH27  $\alpha$ -ガラクトシダーゼに似ているものの、ドメイン D、サブドメイン B、ドメイン A 中のループなど特徴的な構造が存在し、これらは多糖デキストランの認識に重要であると考えられた。

## 参考文献

[1] Y. Okazawa *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **290**, 26339 (2015).

\* tonozuka@cc.tuat.ac.jp