

新規な活性中心を有する植物糖鎖分解酵素の構造解析 Crystallography of a plant glycan-degrading enzyme having a novel catalytic center

丸山瞬, 斎藤圭太, Lixia Pan, 伊藤佑, 荒川孝俊, 伏信進矢*

東京大学大学院農学生命科学研究科、〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Shun Maruyama, Keita Saito, Lixia Pan, Tasuku Ito, Takatoshi Arakawa and Shinya Fushinobu*
Department of Biotechnology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657,
Japan

1 はじめに

ビフィズス菌は「善玉」乳酸菌として有名であり、ヒトの健康への寄与が科学的に解明されつつある。ビフィズス菌が棲息する小腸下部から大腸の腸管には、澱粉などの分解されやすい糖質はほとんど届かないため、難分解性糖質を利用するための、多様な糖質分解酵素を有する。鹿児島大の藤田らは、*Bifidobacterium longum* JCM1217 株から、植物のβ-アラビノオリゴ糖代謝に関わる遺伝子群を発見した [1, 2]。ジャガイモ・トマトなどのナス科植物のレクチンや、植物の細胞壁に豊富に存在するエクステンシン様タンパク質など、ヒドロキシプロリン(Hyp)に富む糖タンパク質には、主にβ-結合からなるアラビノフラノオリゴ糖鎖が Hyp に付加している。このような糖タンパク質は野菜などから日常的に摂食されているにも関わらず、β-アラビノオリゴ糖を分解する酵素はこれまで全く知られていなかった。一方、α-アラビノオリゴ糖に作用する酵素は多数知られており、よく研究されている。本研究では、この分解系を構成する糖質分解酵素とトランスポーターの X 線結晶構造解析を行い、これらの分子機構を原子レベルで詳細に解明することを目的とした。

2 実験

ビフィズス菌のβ-アラビノオリゴ糖分解経路に属する GH127 HypBA1 の結晶化を行い、KEK-PF の構造生物学ビームラインを利用して回折測定実験を行った。また、その他のβ-アラビノオリゴ糖分解経路の酵素(タンパク質)として、GH121 HypBA2、トランスポーターの基質結合ドメイン、さらに HypBA1 ホモログである BLL3 の結晶化と予備的データ測定も行った。

3 結果および考察

HypBA1 の基質との複合体構造を得るために、活性中心残基の変異体を作成し、基質との共結晶化およびソーキングを行なった。その結果、分解能 2.6 Å で基質との複合体構造のデータ測定に成功した。電子密度マップでは基質にあたる部分にピークが見られ、リガンドを置くことが可能であった。今後、基質との相互作用をより詳細に決定するために、高

分解能のデータ測定を目指す。また、共同研究者とともに阻害剤の開発を行い、複合体構造の取得を目指す。

HypBA2 では昨年度、2.8 Å 分解能の native データセットを得ていた。本年度は 2.2 Å 分解能の native データセットと Se-Met 置換体の SAD データセットを測定し、位相決定および構造決定に成功した。しかし、活性部位の周辺と N 末端ドメインで何箇所か電子密度マップが不明瞭な領域が見られたため、基質認識および反応機構の同定には至っていない。今後は、反応産物であるβ-Ara2 などの結合した構造の決定を目指す。

β-アラビノオリゴ糖分解経路のトランスポーターの基質結合ドメインは昨年度までに結晶構造を決定したので、現在論文化を勧めている。また、BLL3 は分解能 1.75 Å の native データセットと Se-Met 置換体のデータセットを測定し、これらを用いて構造決定に成功した。現在精密化を進めている。

4 まとめ

糖質加水分解酵素として初めて、活性中心にシステインを持つと考えられる HypBA1 の構造に続き、HypBA2、トランスポーター、さらに HypBA1 ホモログの構造決定に成功した。

謝辞

実験をサポートして下さった KEK および PF のみなさん、共同研究者の若木高善先生、鹿児島大の藤田清貴先生、理研の伊藤幸成先生、石渡明弘先生、Sophon Kaothip 博士に感謝いたします。

参考文献

- [1] Fujita *et al.*, *JBC* **286**, 5143 (2011)
- [2] Fujita *et al.*, *JBC* **289**, 5240 (2014)

成果

- 1. Ito *et al.*, *BBRC* **447**, 32 (2014)
- 2. Hattie *et al.*, *Chem. Commun.* **51**, 15008 (2015)

* asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp