

藻食性腹足類のアルギン酸分解酵素の X 線結晶構造解析 X-ray crystallography of alginate lyase form Herbivorous marine gastropods

宮川拓也, 田之倉優*

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

Takuya Miyakawa, Masaru Tanokura*

Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

1 はじめに

アルギン酸は海藻に豊富に含まれる酸性多糖であり、マンヌロン酸とグルロン酸から構成される。海藻を主食とする腹足類は、主にマンヌロン酸鎖を分解し、生成した不飽和単糖をエネルギー代謝に利用する。アルギン酸分解はアルギン酸リアーゼと呼ばれる酵素により触媒され、その分解機構として β 脱離反応が提唱されている。アミノ酸配列の特徴からアルギン酸リアーゼは 7 つの Polysaccharide Lyase (PL) ファミリーに分類されるが、腹足類がもつアルギン酸リアーゼは PL-14 ファミリーに属しており、その触媒反応機構やマンヌロン酸に対する基質特異性のメカニズムについては十分に理解されていない。本研究では、腹足類のアメフラシ (*Aplysia kurodai*) に由来する PL-14 アルギン酸リアーゼ AkAly30 の結晶構造を決定し、それに基づく結合シミュレーションと各種変異体の酵素活性から触媒反応と基質特異性に寄与する構造基盤を解析した。

2 実験

大腸菌発現系を用いて AkAly30 とセレノメチオン (SeMet) 置換体を生産し、精製後に polyethylene glycol 3350 を沈殿剤とする条件で蒸気拡散法により結晶を得た。AkAly30 の X 線回折データは AR-NW12A ビームラインにて波長 1.000 Å で収集した。一方、SeMet 置換体については、AR-NE3A ビームラインで波長 0.979 Å の異常分散データを収集した。結晶構造は単波長異常分散法により解析した。

3 結果および考察

AkAly30 の結晶構造は分解能 1.77 Å で決定した[1]。AkAly30 は 2 つの逆平行 β シートを 1 つの α ヘリックスと 4 つの 3_{10} -ヘリックスが取り囲む β -jelly roll fold をとっていた (図 1)。また、分子表面には正電荷を帯びた溝が形成されており、この溝が負電荷をもつアルギン酸の結合部位であることが推定された。AkAly30 はマンヌロン酸鎖に対して高い切断活性をもつため、正電荷を帯びた溝に対してマンヌロン酸鎖の結合モデルを構築した。その結果、AkAly30 の β 脱離反応における触媒残基として Y140 が同定され (図 1)、Y140 の空間配置からマ

ンヌロン酸鎖が結合したときに効率よく反応が進行することが示唆された。一方、基質結合部位を構成する η_2 ループ (図 1) もマンヌロン酸鎖に対する基質特異性に影響することが明らかとなった。AkAly30 はアルギン酸分解でマンヌロン酸の二糖や三糖を生成するが、 η_2 ループ上でジスルフィド結合を形成する Cys 残基 (C115 及び C124) やループの先端に位置する Gly 残基 (G118) の変異体では、グルロン酸を含む二糖や三糖も同時に生成され、基質特異性が低下していることが示された。このことは、 η_2 ループが接する糖結合部位へのマンヌロン酸残基の適切な配置が AkAly30 のマンヌロン酸鎖に対する基質特異性を高めていることを示唆している。

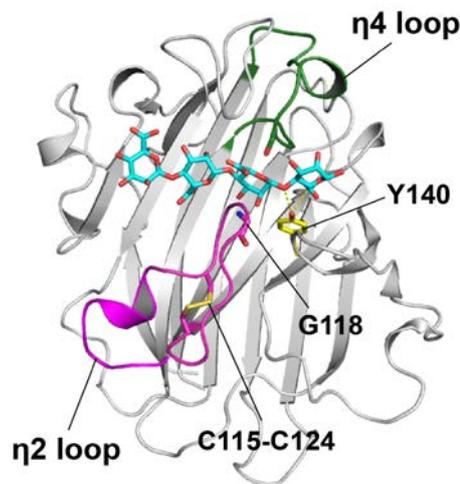


図 1 : AkAly30 のマンヌロン酸鎖結合モデル

4 まとめ

本研究は藻食性腹足類のもつアルギン酸リアーゼの立体構造を初めて解明し、マンヌロン酸を多く含む海藻のアルギン酸が効率的に分解されるメカニズムの一端を明らかにした。

参考文献

- [1] Qin, H.-M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **292**, 2182-2190 (2017).

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