

新規 GH ファミリー (GH162) に属する 真核生物由来 β -1,2-グルカナーゼの結晶構造及び 反応機構の解析

Analyses of crystal structure and the reaction mechanism of a fungal β -1,2-glucanase belonging a new glycoside hydrolase family (GH162)

田中信清¹, *中島将博¹, 宮永顕正², 中井博之³, 田口速男¹

¹東京理科大学理工学部応用生物科学科, 〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

²東京工業大学理学院, 〒152-8551 東京都目黒区大岡山 2-12-1-E1-1

³新潟大学農学部応用生物化学科, 〒950-2181 新潟県西区五十嵐 2 の町 8050 番地

Nobukiyo Tanaka¹, Masahiro Nakajima¹, Akimasa Miyanaga², Hiroyuki Nakai³ and Hayao Taguchi¹
¹Department of Applied Bioscience, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba, 278-8510, Japan

²Department of Chemistry, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1-E1-1, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo, 152-8551, Japan

³Graduate School of Science & Technology, Niigata University, 2-8050, Ikarashi, Nishi-ku, Niigata, 950-2181, Japan

1 はじめに

β -1,2-グルカンは主に環状糖として天然に存在している希少な多糖である。近年、 β -1,2-グルカンを内部より加水分解する原核生物由来の β -1,2-グルカナーゼ (SGL) が単離され、新規糖質加水分解酵素ファミリー (GH144) を設立した [1]。しかし、近縁酵素には真核生物由来のものがないことから、原核生物と真核生物で SGL の起源は全く異なると考えられる。我々は、これまでに真核生物である *Talaromyces funiculosus* 由来 SGL (*Tj*SGL) の単離同定及び機能解析に成功しているが、その構造及び反応機構は全くの未知であった。

本研究では、*Tj*SGL の新規構造決定を目指すと共に、ミカエリス複合体構造等を取得することで *Tj*SGL の反応機構の推定を行った。

2 実験

*Tj*SGL には立体構造既知のホモログがない。そこで、ヨウ素の異常分散効果を利用して位相決定を行うために *Tj*SGL のヨウ素化誘導体結晶を作成した。

また、野生型 *Tj*SGL 結晶をソホロース (分解産物) に、非活性型 *Tj*SGL 変異体結晶を β -1,2-グルカン (基質) にそれぞれソーキングすることでソホロースとの複合体及びミカエリス複合体構造の取得を行った。得られた全ての結晶は、KEK-PF の構造生物学ビームラインにおいて回折データを取得後、位相決定及び解析を行った。

3 結果および考察

*Tj*SGL のヨウ素化誘導体結晶より本酵素の位相を決定した。また、分解能 2.0 Å にて *Tj*SGL のアポ型構造、ソホロースとの複合体構造及びミカエリス複合体構造を決定した。

本酵素は (α/α)₆ toroid の全体構造をとっており、ミカエリス複合体の基質ポケットでは、 β -1,2-グルカンの 6 糖部分の電子密度が明確に観察された。この複合体構造から、本酵素の一般塩基触媒残基 (D446) がサブサイト-1 のアノマー位炭素原子に対して求核攻撃を行う求核水とは別の水分子を介して作用することが明らかとなった。さらに、切断部位の酸素原子に対して、D177 及び E262 がそれぞれ基質の 3 位水酸基を介して作用するという触媒経路が推定された。最終的に、この解析結果を踏まえて調製した基質誘導体 [2] を用いた機能解析により、本酵素の一般酸触媒残基 (E262) の決定、すなわち反応機構の決定にも成功した。これにより、本酵素とその

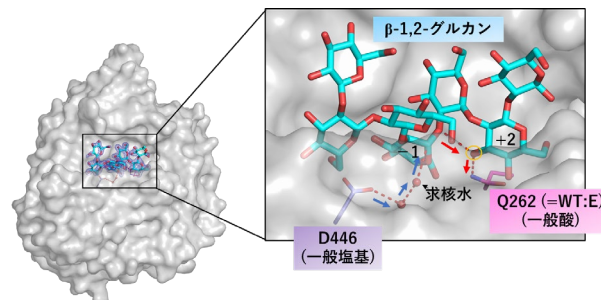


図 1 : *Tj*SGL の非活性型変異体 E262Q と β -1,2-グルカンの複合体構造 (ミカエリス複合体)

ホモログを含む新規なファミリーとして GH162 が設立された。本酵素の構造解析結果は、*The Journal of biological chemistry* 誌に掲載された [3]。

* m-nakajima@rs.tus.ac.jp

謝辞

実験をサポートして下さった PF スタッフの方々に感謝いたします。

参考文献

- [1] K. Abe *et al.*, *J Biol Chem* **292**, 7487-7506 (2017).
- [2] N. Tanaka *et al.*, *Carbohydr Res* **468**, 13-22 (2018).
- [3] N. Tanaka *et al.*, *J Biol Chem* **294**, 7942-7965 (2019).

成果

1. 論文

- N. Tanaka, M. Nakajima, M. Narukawa-Nara, H. Matsunaga, S. Kamisuki, H. Aramasa, Y. Takahashi, N. Sugimoto, K. Abe, T. Terada, A. Miyanaga, T. Yamashita, F. Sugawara, T. Kamakura, S. Komba, H. Nakai, and H. Taguchi.
- Identification, characterization, and structural analyses of a fungal endo- β -1,2-glucanase reveal a new glycoside hydrolase family.
- *J Biol Chem* **294**, 7942-7965 (2019)

2. 学会発表

田中信清、今場司朗、中井博之、宮永顕正、中島将博、田口速男
真核生物由来 β -1,2-グルカナーゼのユニークな反応機構
日本応用糖質科学会 平成 30 年度大会

3. 学会発表

中島将博、阿部紘一、田中信清、宮永顕正、中井博之、伏信進矢、五十嵐圭日子、北岡本光、鮫島正浩、田口速男
 β -1,2-グルカン関連酵素群の機能と構造
日本応用糖質科学会 平成 29 年度大会

4. 学会発表

田中信清、阿部紘一、中島将博、中井博之、宮永顕正、田口速男
Talaromyces funiculosus 由来 β -1,2-グルカナーゼの複合体構造
日本農芸化学会 2017 年度京都大会

5. 学会発表

田中信清、中島将博、中井博之、宮永顕正、田口速男
新規配列を有する糸状菌由来 β -1,2-グルカナーゼの構造解析
日本応用糖質科学会 平成 28 年度大会