

腸球菌 *Enterococcus faecalis* 由来 GH31 α -N-acetylgalactosaminidase の構造解析 Structural analysis of *Enterococcus faecalis* GH31 α -N-acetylgalactosaminidase

宮崎剛壱, 朴龍洙

静岡大学 グリーン科学技術研究所

〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 836

Takatsugu MIYAZAKI* and Enoch Y. PARK

Research Institute of Green Science and Technology

836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan

1 はじめに

糖質加水分解酵素ファミリー-31 (GH31) は、 α -glucosidase や α -xylosidase など、さまざまな糖質の α -グリコシド結合を加水分解する酵素が分類される大きな酵素ファミリーである。ここ数年の研究により、GH31 に属する新たな活性を示す酵素が次々に報告されており[1-4]、有用な酵素がまだ眠っていると考えられる。RahfeldらはムチンなどのO型糖鎖に作用する GH31 α -N-acetylgalactosaminidase (α GalNAcase) を腸内細菌メタゲノムライブラリーから見出した[5]。本研究では、GH31 α GalNAcase の基質認識機構の構造基盤を明らかにするため、腸内細菌である *Enterococcus faecalis* 由来酵素 (EfNag31A) の X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

EfNag31A の N 末端側のシグナルペプチドおよび C 末端側の非酵素ドメインを除いた領域 (以下、EfGH31) をコードする DNA 断片を pET28a ベクターへ組み込み、大腸菌 BL21(DE3) で組換え発現した。精製は、His タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによった。16 mg/mL の精製酵素を調製し、25% PEG 3350、200 mM クエン酸三アンモニウムを含むリザーバー液を用いたハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化した。N-acetylgalactosamine (GalNAc) との複合体は共結晶化によって得た。X 線回折測定は BL-5A にて行い、同条件で作製した SeMet 置換体結晶を用いた単波長異常分散法によって位相決定した。

3 結果および考察

SeMet 置換体結晶を測定したところ 1.8 Å の分解能の回折を得ることができ、PHENIX AutoSol によって位相を決定した。EfGH31 のアポ構造および GalNAc との複合体構造をそれぞれ 1.4 Å および 1.9 Å 分解能で決定した。空間群はいずれも $P2_12_12_1$ に属しており、結晶学的非対称単位中に 1 分子の EfGH31 を含んでいた。全体構造は、GH31 酵素に広く保存されている N-, A-, proximal C-, distal C-domain を有しており、EfGH31 に特徴的な A'-subdomain が触媒ドメインである A-domain に挿入されていた (図 1 左)。また、

C 末端側に fibronectin type 3 (FN3) domain が存在していた。

GalNAc 複合体構造では、活性部位に β アノマーの GalNAc が結合しており、水素結合および疎水性相互作用によって厳密に認識されていることが分かった (図 1 右)。触媒残基である 2 つの Asp 残基を除き、活性部位を構成するアミノ酸残基は、他の GH31 酵素と大きく異なることが分かった。アポ構造と GalNAc 複合体構造を比較すると、求核触媒残基 Asp455 を含む活性部位のコンフォメーションが異なることが分かり、GalNAc を認識するのに適した構造変化を呈することが示唆された。このような活性部位の構造変化を示す GH31 酵素は他にみられず、初めての報告である。

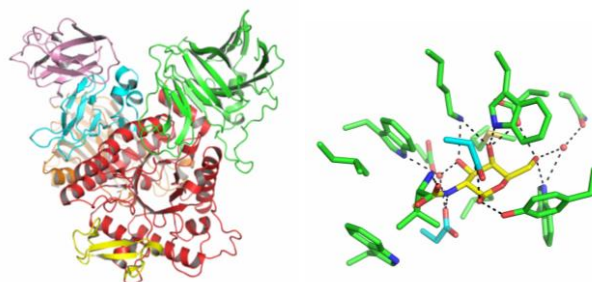


図 1 : (左) EfGH31 の立体構造。N-domain, 緑; A-domain, 赤; A'-subdomain, 黄色; proximal C-domain, シアン; distal C-domain, オレンジ; FN3 domain, ピンク。(右) GalNAc (黄色) を認識する活性部位のアミノ酸残基。触媒残基 Asp455 と Asp508 はシアンで示した。

4 まとめ

EfNag31A の酵素活性領域 EfGH31 のアポ構造および GalNAc との複合体構造を GH31 α GalNAcase として初めて決定し、本酵素の基質認識機構を明らかにした。

謝辞

X 線回折実験を行うにあたり、ご協力いただきました PF ビームラインスタッフの方々に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] T. Miyazaki *et al.*, *Biochem. J.* **469**, 145–158 (2015)
- [2] G. Speciale *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **12**, 215–217 (2016)
- [3] S.H. Light *et al.*, *Nat. Microbiol.* **2**, 16202 (2016)
- [4] Y. Gozu *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 1562–1567 (2016)
- [5] P. Rahfeld *et al.*, *J. Biol. Chem.* **294**, 16400–16415 (2019).

成果

1. Takatsugu Miyazaki and Enoch Y. Park, Crystal structure of the *Enterococcus faecalis* α -*N*-acetylgalactosaminidase, a member of the glycoside hydrolase family 31. *FEBS Lett.* in press (2020)
doi: 10.1002/1873-3468.13804

* miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp