

Flavobacterium johnsoniae 由来 GH65 α -1,2-グルコシダーゼの構造解析 Structural analysis of *Flavobacterium johnsoniae* α -1,2-glucosidase belonging to GH65 family

中村駿太郎¹, 宮崎剛壱^{1,2*}

¹ 静岡大学 創造科学技術大学院 自然科学系教育部 バイオサイエンス専攻,
〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 836

² 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

Shuntaro NAKAMURA¹, and Takatsugu MIYAZAKI^{1,2*}

¹Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University,
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, Japan

²Reserach Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University,
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, Japan

1 はじめに

糖質加水分解酵素ファミリー-65 (GH65) は α -グルコシド結合に作用する糖質加リン酸分解酵素と糖質加水分解酵素の両方が属するファミリーである。逆反応によりオリゴ糖合成が可能であることから、これまでさまざまな基質特異性の GH65 加リン酸分解酵素が報告されており、これらはすべて細菌由来である。一方で、GH65 加水分解酵素は真核生物由来の酵素の報告に限られている[1,2]。また、GH65 酵素の立体構造の報告は加リン酸分解酵素のみである。我々は土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae* 由来の GH65 酵素 (FjGH65A) がコージビオース (α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)-D-Glc) を特異的に加水分解する新規な α -1,2-グルコシダーゼであることを明らかにした[3]。本研究では、この酵素の構造機能相関を明らかにするために、FjGH65A の構造解析を行った。

2 実験

F. johnsoniae NBRC 14942 のゲノム DNA から N 末端側のシグナル配列を除いた FjGH65A 遺伝子をクローニングし、大腸菌 BL21 (DE3) を発現宿主とし、His タグ融合タンパク質として発現させた。組換え FjGH65A は Ni 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て精製した。精製した組換え FjGH65A を 30 mg/mL に濃縮し、12%(w/v) PEG3350、0.3 M クエン酸アンモニウムバッファー (pH 7.0)、10 mM tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride 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。抗凍結剤には 20%(v/v) エチレングリコールまたは 30%(w/v) グルコースを含むリザーバー液を用い、X 線回折強度測定は BL5A または AR-NW12A ビームラインにて行った。位相の決定は KAuCl₄ にソーキングした単結晶を用いた単波長異常分散法により行った。

3 結果および考察

FjGH65A のリガンドフリー構造 (PDB 7FE3) とグルコース複合体構造 (PDB 7FE4) を、それぞれ 1.54 および 1.40 Å 分解能で決定した。空間群はいずれも C2 に属し、結晶学的非対称単位中に 3 分子含まれていた。FjGH65A 単量体の構造は N 末端側に β -サンドイッチ構造の N-ドメイン、(α/α)₆ バレルの触媒ドメインおよび C 末端側の β -シートドメインで構成されていた(図 1 左)。また、グルコース複合体構造では、活性部位にグルコースが 3 分子結合しており、水素結合および疎水性相互作用によって認識されていることが分かった(図 1 右)。

FjGH65A の全体構造は他の GH65 酵素と類似しており、一般酸触媒残基である Glu472 は保存されていた。しかし、GH65 糖質加リン酸分解酵素のリン酸結合部位周辺のアミノ酸残基は保存されておらず、代わりに一般塩基触媒残基である Glu616 を有していた。

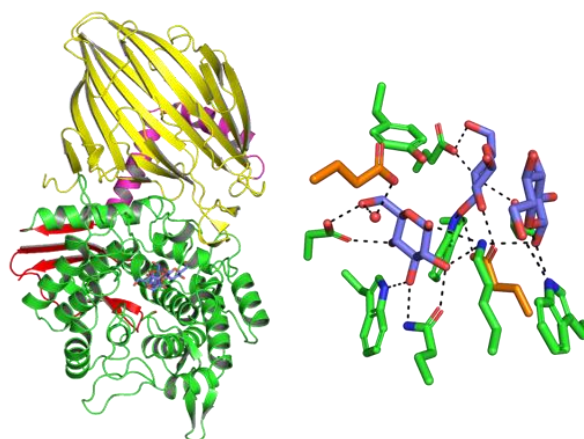


図 1; FjGH65A の全体構造 (左) と活性部位に結合しているグルコース分子 (右)。 (左) N-ドメイン, yellow; リンカー領域, magenta; 触媒ドメイン, green; C-ドメイン, red。 (右) グルコース, slate blue; グルコースと相互作用するアミノ酸残基, green; 触媒残基, orange。

4 まとめ

FjGH65A のアポ構造とグルコース複合体構造を決定し、本酵素における構造と機能の相関を明らかにした。本研究は、細菌由来 GH65 酵素として初の加水分解酵素の発見であり、初めての立体構造の報告である。本研究は *Journal of Biological Chemistry* に論文として発表した[3]。

謝辞

実験をサポートしてくださいました PF ビームラインスタッフの方々、そして、新潟大学と山梨大学の皆様をはじめとする共同研究者の方々に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Kitaoka M, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 8377–8390, 2015
- [2] Hamazaki H and Horikawa-Hamazaki M, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **469**, 357–362, 2016
- [3] Nakamura S et al., *J. Biol. Chem.*, **297**, 101366, 2011.

成果

1. Nakamura S, Nihira T, Kurata R, Nakai H, Funane K, Park EY, and Miyazaki T, Structure of a bacterial α -1,2-glucosidase defines mechanisms of hydrolysis and substrate specificity GH65 family hydrolases. *J. Biol. Chem.*, **297**, 101366, 2021
doi: 10.1016/j.jbc.2021.101366
2. Nakamura S, Functional and structural analysis of novel α -1,2-glucosidase belonging to glycoside hydrolase family 65 from *Flavobacterium johnsoniae*. International Conference on Green Science and Technology 2021, SP-19, Online, September 2021
3. 中村駿太郎、中井博之、朴龍洙、宮崎剛亜
「GH65 α -1,2-グルコシダーゼの多分岐デキストランおよびその部分構造に対する活性」日本応用糖質科学会 2021 年度大会、C-09、オンライン、2021 年 9 月
4. 中村駿太郎、中井博之、朴龍洙、宮崎剛亜
「*Flavobacterium johnsoniae* 由来 α -1,2-グルコシダーゼの立体構造解析」日本農芸化学会 2021 年度大会、4G03-01、オンライン、2021 年 3 月
5. 中村駿太郎、宮崎剛亜「糖質加水分解酵素ファミリー65に属する α -1,2-グルコシダーゼの基質認識機構の解明」2020 年度量子ビームサイエンスフェスタ、P3-123L、オンライン、2021 年 3 月
6. 中村駿太郎、宮崎剛亜、朴龍洙「*Flavobacterium johnsoniae* 由来新奇 α -1,2-グルコシダーゼの性質解析」日本応用糖質科学会 2020 年度大会、C-06、オンライン、2020 年 9 月
7. 中村駿太郎、宮崎剛亜、朴龍洙「日本応用糖質科学会 2020 年度大会 (第 69 回) ポスター賞」、受賞、2020 年 9 月