

糖質加水分解酵素ファミリー31に属する細菌由来 α -1,3-グルコシダーゼの立体構造解析

Structural analysis of a bacterial α -1,3-glucosidase belonging to glycoside hydrolase family 31

池谷真里奈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
Marina IKEGAYA¹, 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(GH)ファミリー31は、マルターゼや小胞体グルコシダーゼ II といった、動物の生存に必須な α -グルコシダーゼが属することで知られるだけでなく、 α -キシロシダーゼや α -ガラクトシダーゼ、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼといった、様々な基質特異性を示す多彩な酵素が発見されてきた巨大なファミリーである[1-6]。我々は、GH31ファミリーから新規酵素の探索を行い、ニゲロオリゴ糖に対して既報の酵素よりも高い基質特異性を示す細菌 *Lactococcus lactis* および真菌 *Cordyceps militaris* 由来 α -1,3-グルコシダーゼ (LIGH31_u1 および CmGH31_u1) を見出した[7]。そこで、LIGH31_u1 の基質特異性と立体構造の相関を明らかにすることを目的とし、X線結晶構造を決定した。

2 実験

乳酸球菌 *Lactococcus lactis* のゲノム DNA から LIGH31_u1 の全長の遺伝子をクローニングし、大腸菌 BL21 (DE3) を宿主として His タグ融合タンパク質として発現させた。組換え LIGH31_u1 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、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化した。BL5A または AR-NW12A ビームラインにて X 線回折強度測定を行った。初期位相は SeMet 置換体を用いた単波長異常分散法によって決定した。野生型酵素の結晶のグルコースを含む溶液へのソーキング、または触媒残基変異体 LIGH31_u1 D394A と各種基質の共結晶化によって基質複合体構造を得た。

3 結果および考察

空間群 $P6_322$ および $P2_1$ に属する 2 種類の結晶が得られ、それぞれ結晶学的非対称単位中に 1 分子または 6 分子の LIGH31_u1 が存在していた。空間群 $P6_322$ および $P2_1$ のリガンドフリー構造 (それぞれ

PDB 7WJ9、7WJA)、空間群 $P6_322$ の各種基質との複合体構造 (グルコース (PDB 7WJB)、ニゲロース (PDB 7WJC)、ニゲロトリオース (PDB 7WJD)、ニゲロテトラオース (PDB 7WJE)、コージビオース (PDB 7WJF)) を 1.75–2.0 Å の分解能で決定した。

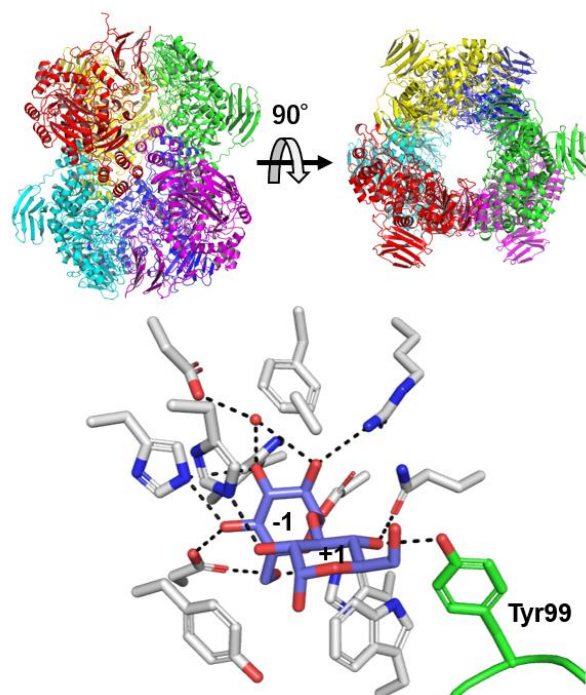


図 1 : LIGH31_u1 の六量体構造 (上段) とニゲロース複合体構造の触媒部位 (下段)。(下段)ニゲロース, slate blue; 触媒部位周辺のアミノ酸残基, white; 隣接するプロトマーの Tyr99, green。

LIGH31_u1 は六量体を形成しており (図 1 上段)、この会合の仕方は構造既知の GH31 酵素とは異なる

ものであった[2,3]。基質複合体構造から、ニゲロース認識に関わるアミノ酸残基が明らかになり、非還元末端側から2糖までのグルコース残基は厳密に認識されているが、それより還元末端側の糖残基の認識は厳密ではないと考えられた。また、六量体の形成によって、隣接する分子の Tyr99 がニゲロースのサブサイト+1のグルコースと水素結合を形成し、基質の認識に関わっている可能性が示唆された(図1下段)。

4 まとめ

LIGH31_u1の立体構造構造を決定し、本酵素のニゲロース認識機構を明らかにした。本研究の内容は、*Journal of Biological Chemistry*に論文として発表した。

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。また、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析においては、クライオ電顕施設の先生方に大変お世話になりました。

参考文献

- [1] Okuyama, M. et al., *Cell Mol. Life Sci.*, **73**, 2727–2751, 2016
- [2] Lovering, A.L. et al., *J. Biol. Chem.*, **280**, 2105–2115, 2005
- [3] Ernst, H.A. et al., *J. Mol. Biol.*, **358** 1106–1124, 2006
- [4] Rahfeld, P. et al., *J. Biol. Chem.*, **294**, 16400–16415, 2019
- [5] Miyazaki, T. and Park, E.Y., *FEBS Lett.*, **594**, 2282–2293, 2020
- [6] Ikegaya, M. et al., *Insect Mol. Biol.*, **30**, 367–378, 2021
- [7] Ikegaya, M. et al., *J. Biol. Chem.*, **298**, 101827, 2022

成果

1. Ikegaya, M., Moriya, T., Adachi, N., Kawasaki, M., Park, E. Y., Miyazaki, T., Structural basis of the strict specificity of a bacterial GH31 α -1,3-glucosidase for nigerooligosaccharides, *J. Biol. Chem.*, **298**, 101827, 2022
2. 池谷真里奈、朴龍洙、宮崎剛亜「糖質加水分解酵素ファミリー31に属する α -1,3-グルコシダーゼの構造と基質特異性の相関の解析」日本農芸化学会2022年度大会、2C06-06、オンライン、2022年3月
3. 池谷真里奈、守屋俊夫、安達成彦、川崎政人、朴龍洙、宮崎剛亜「糖質加水分解酵素ファミリー31に属する α -1,3-グルコシダーゼのX線結晶構造およびクライオ電子顕微鏡構造」2020年度量子ビームサイエンスフェスタ、PC3-46_L-086、オンライン、2022年3月
4. 池谷真里奈、宮崎剛亜「糖質加水分解酵素ファミリー31に属する細菌および真菌由来 α -1,3-グルコシダーゼの機能解析」日本応用糖質科学会中部支部名古屋講演会、オンライン、2021年12月

5. 池谷真里奈、朴龍洙、宮崎剛亜「GH31に属する新規 α -1,3-グルコシダーゼの機能と構造の解析」日本応用糖質科学会2021年度大会、C-12、オンライン、2021年9月

* miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp