

多分岐デキストラン分解に関与する *Flavobacterium johnsoniae* 由来
糖質加水分解酵素群の構造解析
Structural analysis of *Flavobacterium johnsoniae* glycoside hydrolases involved in
degradation of branched dextran

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

細菌は生息している環境に応じて様々な糖質を分解し、資化することから、動物と比べて非常に多くの種類の糖質加水分解酵素を有している。これまでに、植物や動物由来の多糖の細菌による資化機構は報告されているが、細菌の生産する菌体外多糖の他の細菌による資化機構はほとんど明らかになっていない [1]。我々はこれまでにコージビオース (α -(1→2)-glucobiose) を特異的に分解する酵素 (FjGH65A) を見出した [2]。FjGH65A の遺伝子近傍にはデキストランを分解する酵素、糖結合タンパク質、糖トランスポーターと予想されるタンパク質をコードする遺伝子が存在していた。デキストランは *Leuconostoc* 属などの一部の乳酸菌が合成する菌体外多糖であり、グルコースが α -(1→6) で結合した主鎖で構成されている。また、種や株によっては α -(1→2) や α -(1→3) の分岐を有する多分岐デキストランも合成する。よって、我々はこの遺伝子群が多分岐デキストランの資化に関与すると予想した。そこで、本研究では、この遺伝子群に存在する 4 つの糖質加水分解酵素のうち、推定デキストラナーゼである GH66 酵素 (FjGH66) と FjGH65A の多分岐デキストラン分解機構の構造基盤を明らかにすることを目的とした。

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 FjGH66 遺伝子をクローニングし、pET-28a(+)ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) を発現宿主として His タグ融合タンパク質として発現させた。組換え FjGH66 は Ni アフィニティークロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。精製した組換え FjGH66 を 20 mg/mL に濃縮し、20%(w/v) PEG4000、

0.1 M Tris-HCl バッファー (pH 8.5 または 9.0)、0.2 M 硫酸リチ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。抗凍結剤には 20%(v/v) グリセロールを含むリザーバー液を用い、X 線回折強度測定は BL-5A ビームラインにて行った。位相の決定は FjGH66 の AlphaFold2 モデルを鋳型とした分子置換法で行った。野生型酵素の結晶のグルコース、イソマルトースを含む溶液のソーキング、及びイソマルトトリオースとの共結晶化によってリガンド複合体構造を得た。

FjGH65A は以前の研究と同様の条件で結晶化を行い、イソマルトースを含む溶液のソーキングによってリガンド複合体構造を得た。

3 結果および考察

FjGH66 のリガンドフリー構造 (PDB 8IU8)、グルコース複合体構造 (PDB 8IU9)、イソマルトース複合体構造 (PDB 8IUA)、イソマルトトリオース複合体構造 (PDB 8IUB) を、それぞれ 1.85、1.80、1.80、および 1.18 Å 分解能で決定した。空間群はイソマルトトリオースとの共結晶は $P2_12_12_1$ に属し、他の結晶は $C2$ に属した。また、結晶学的非対称単位中に 1 分子含まれていた。FjGH66 単量体の構造は N 末端側に免疫グロブリン様構造の N-ドメイン、 $(\beta/\alpha)_8$ バレルの触媒ドメインおよび C 末端側の β -サンドイッチ構造の C-ドメインで構成されていた (図 1 左)。また、イソマルトトリオース複合体構造では、活性部位にイソマルトトリオースが結合しており、水素結合および疎水性相互作用によって認識されていることが分かった (図 1 右)。FjGH66 の全体構造は他の GH66 酵素と類似しており、求核触媒残基である Asp293 と一般酸塩基触媒残基である Glu355 は保存されていた。FjGH66 と *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 由来の GH66 デキストラナーゼ (TpDex) のイソマルトヘキサオース複合体構造 (PDB 5AXH) と重ね合わせ

したところ、FjGH66 の基質結合クレフトでは、サブサイト+1 と+2 に α -(1 \rightarrow 2)-分岐を受け入れるスペースがあることが分かった (図 2)。

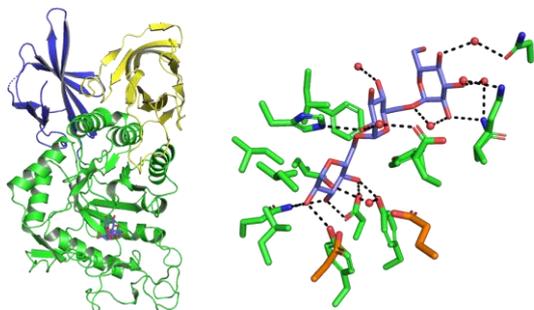


図 1 : FjGH66 の全体構造 (左) と活性部位に結合しているイソマルトトリオース分子 (右)。 (左) N-ドメイン, blue; 触媒ドメイン, green; C-ドメイン, yellow。 (右) イソマルトトリオース, slate blue; イソマルトトリオースと相互作用するアミノ酸残基, green; 触媒残基, orange。

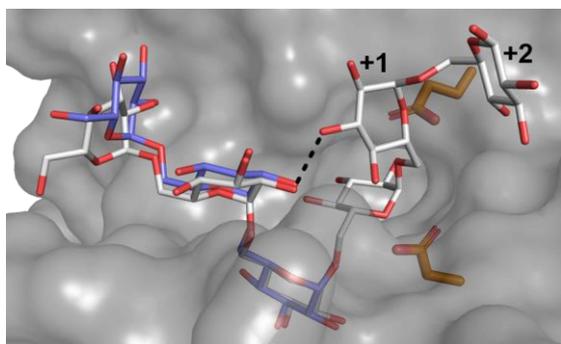


図 2 : FjGH66 と TpDex の基質結合クレフトの重ね合わせ。 FjGH66 の分子表面, gray; FjGH66 に結合したイソマルトトリオース, slate blue; TpDex に結合したイソマルトヘキサオース, white; 触媒残基, orange。

FjGH65A のイソマルトース複合体構造 (8IUC) は 1.56 Å 分解能で決定した。イソマルトースは FjGH65A の活性部位のサブサイト+1 と+2 に結合しており、イソマルトースの非還元末端側のグルコースの O6 は Arg74 によって塞がれていた (図 3)。一方で、同グルコース残基の O2 はサブサイト-1 方向に位置しており、多分岐デキストランの分解物に相当する 6-O-kojibiosylglucose の α -(1 \rightarrow 2) 結合を分解する活性を示すことと一致した。

4 まとめ

FjGH66 のリガンドフリーとリガンド複合体および FjGH65A のイソマルトース複合体構造を決定し、両酵素の構造と機能の相関を明らかにした。この遺伝子群に含まれる他の糖質加水分解酵素および糖結合タンパク質の生化学的性質解析により、これらが多分岐デキストランを分解してグルコースにする一連の機構を明らかにした。本研究は *Journal of Biological Chemistry* に論文として発表した[3]。

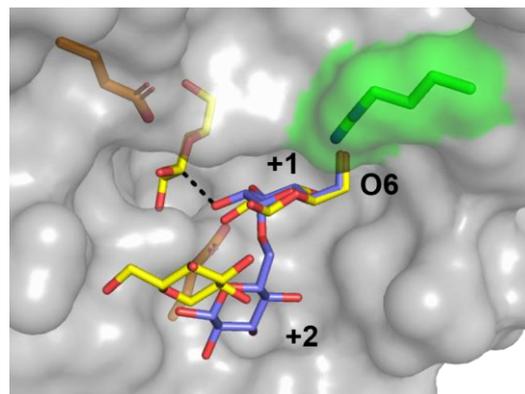


図 3 : FjGH65A のグルコース複合体構造 (PDB 7FE4) とイソマルトース複合体構造の重ね合わせ。 FjGH65A の分子表面, gray; FjGH65A に結合したグルコース, yellow; FjGH65A に結合したイソマルトース, slate blue; Arg74, green; 触媒残基, orange。

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、東京農工大学と山梨大学の共同研究者の方々に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Grondin, J.M et al., *J. Bacteriol.* **199**, e00860-16, 2017.
- [2] Nakamura S et al., *J. Biol. Chem.* **297**, 101366, 2021.
- [3] Nakamura S et al., *J. Biol. Chem.* in press, 104885, 2023.

成果

1. Nakamura S, Kurata R, Tonozuka T, Funane K, Park EY, and Miyazaki T, Bacteroidota polysaccharide utilization system for branched dextran exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.* in press, 104885, 2023
doi: 10.1016/j.jbc.2023.104885
2. 中村駿太郎、倉田陸矢、仁平高則、中井博之、殿塚隆史、舟根和美、朴龍洙、宮崎剛垂、デキストラン資化遺伝子群から発見した GH65 α -1,2-グルコシダーゼと関連酵素の構造機能解析、応用糖質科学、印刷中、2023
3. 中村駿太郎、舟根和美、朴龍洙、宮崎剛垂「デキストラン資化遺伝子群に含まれる 2 種類の糖結合タンパク質の機能解析」日本農芸化学会 2023 年度大会、2023 年 3 月、講演番号 1C08-12、オンライン
4. 中村駿太郎、倉田陸矢、仁平高則、中井博之、殿塚隆史、舟根和美、朴龍洙、宮崎剛垂「デキストラン資化遺伝子群から発見した GH65 α -1,2-グルコシダーゼと関連酵素の構造機能解析」日本応用糖質科学会 2022 年度大会 (第 71 回) 応用糖質科学シンポジウム、2022 年 9 月 2 日、講演番号 S-5、タワーホール船堀

* miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp