

GH31 ファミリーに属する α -1,4-ガラクトシダーゼの立体構造解析 Structural analysis of two α -1,4-galactosidases belonging to GH31 family

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

糖質加水分解酵素ファミリー31 (GH31) は α -グルコシダーゼや α -キシロシダーゼをはじめとする様々な酵素が属するファミリーである。GH31 の α -ガラクトシダーゼは2015年に初めて見出され、これまでに、*Pseudopedobacter saltans* 由来の酵素 (PsGal31A) と、遺伝性疾患である特発性基底核石灰化症との関連がある MYORG タンパク質の酵素学的性質と立体構造が報告されている[1,2]。さらに、酵素活性スクリーニングプロジェクトによって、上記2種類の酵素とは系統的にやや離れた α -ガラクトシダーゼ (GH31_19) の存在が明らかになってきたが、その詳細な酵素学的性質や立体構造は不明であった[3]。そこで、GH31_19 の酵素学的性質を解析したところ、PsGal31A や MYORG が活性を示さない α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースに対して高い基質特異性を示すことが明らかになった。本研究では、GH31_19 酵素の立体構造と基質特異性の相関を明らかにすることを目的として X 線結晶構造を決定した。

2 実験

Bacteroides salyersiae JCM 12988 由来酵素 (BsGH31_19) および *Flaviumibacter petaseus* NBRC 106054 由来酵素 (FpGH31_19) を His タグ融合タンパク質として大腸菌発現し、Ni アフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾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よって結晶化を行った。BL5A ビームラインにて X 線回折強度測定を行い、初期位相はいずれも AlphaFold2 による予測モデルを用いた分子置換法によって決定した。FpGH31_19 の結晶に 100 mM ガラクトースを含むライオプロテクタントを使用することでガラクトース複合体構造を決定し、求核触媒残基変異体である FpGH31_19 D304A の結晶を 10 mM α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースを含むリザーバー溶液に 20 時間浸漬することで二糖複合体構造を得た。

3 結果および考察

BsGH31_19 のリガンドフリー構造 (PDB 8J53) を 3.5 Å 分解能で決定し、FpGH31_19 のリガンドフリー構造 (PDB 8J50)、ガラクトース複合体構造 (PDB 8J51)、 α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオース複合体構造 (PDB 8J52) を 1.9–2.15 Å 分解能で決定した。BsGH31_19 と FpGH31_19 はそれぞれ空間群 C2 および P1 に属し、結晶学的非対称単位中にそれぞれ 5 分子および 2 分子のタンパク質が存在していたが、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果等から、両者は水溶液中では二量体を形成すると考えられた。また、いずれも GH31 に広く保存されている N-ドメイン、A-ドメイン、proximal C-ドメインを有していたが、distal C-ドメインを欠損していた (図 1)。

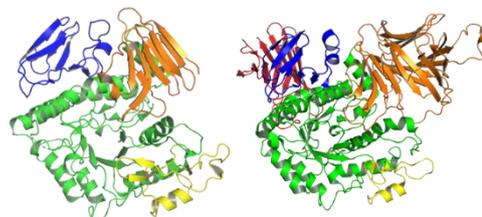


図 1: FpGH31_19 (左)と GH31 α -キシロシダーゼ YicI (PDB 1XSJ) の全体構造 (右)。N-ドメイン, orange; A-ドメイン, green; インサート領域, yellow; proximal C-ドメイン, blue; distal C-ドメイン, red。

FpGH31_19 において、サブサイト+1 の基質と相互作用するアミノ酸残基は PsGal31A および MYORG とは異なっており、これによって基質特異性に差異が生じると考えられた (図 2 A–C)。意外なことに、BsGH31_19 は FpGH31_19 と同様に α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースに基質特異性を示すにも関わらず、サブサイト+1 のガラクトースと水素結合を形成するアミノ酸残基が保存されていなかった。しかし、BsGH31_19 では、FpGH31_19 には見られない Asn67 と Gln381 が基質と相互作用可能な位置に存在しており、これによって両酵素は同じ基質を認識可能であると考えられた (図 2 D)。

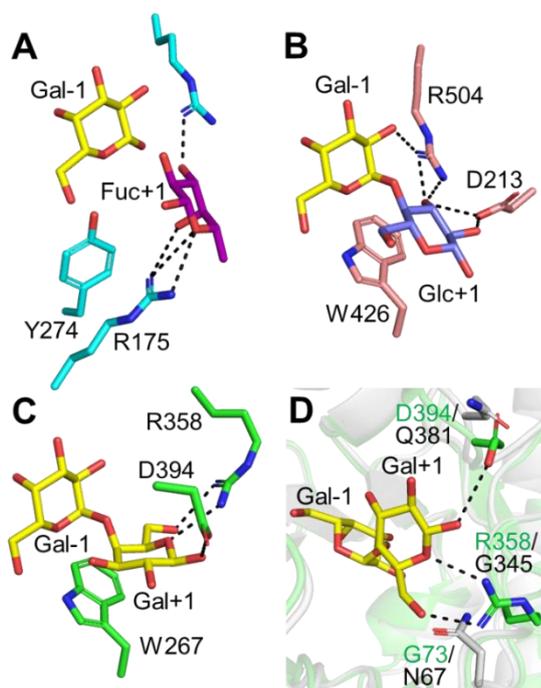


図 2: GH31 α -ガラクトシダーゼの基質結合部位の比較。A) PsGal31A, cyan (PDB 4XPP, 4XPQ)。 B) ヒト由来 MYORG, pink (PDB 7QQH)。 C) FpGH31, green。 D) BsGH31_19 (green)と FpGH31_19 (white) の重ね合わせ。ガラクトース, yellow; フコース, purple; グルコース, blue。

4 まとめ

GH31_19 の 2 種類のホモログの立体構造を決定し、基質認識機構を明らかにするとともに、基質認識に重要なアミノ酸残基に相補的な変異が存在していることを見出した。本研究の内容は、*FEBS journal* 誌に論文発表した (成果 1)。

謝辞

実験をサポートして下さった PF ビームラインスタッフの方々に感謝いたします。

参考文献

- [1] T. Miyazaki *et al.*, *Biochem J.*, **469**, 145–158 (2015).
- [2] R. W. Meek *et al.*, *PLoS Biol.*, **20**, e3001764 (2022).
- [3] W. Helbert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **116**, 6063–6068 (2019).

成果

1. Ikegaya M., Park E. Y., Miyazaki T., Structure-function analysis of bacterial GH31 α -galactosidases specific for α -(1 \rightarrow 4)-galactobiose, *FEBS J.* **290**, 4984–4998 (2023).
2. 池谷 真里奈、朴 龍洙、宮崎 剛亜「GH31 ファミリーに属する機能未知 α -ガラクトシダーゼの基質特異性と立体構造の解析」日本応用糖質科学

会 2022 年度大会、Ap04、口頭発表、2022 年 9 月

3. 池谷 真里奈、朴 龍洙、宮崎 剛亜「日本応用糖質科学会 2022 年度大会 (第 71 回) ポスター賞」受賞、2022 年 9 月
4. 池谷 真里奈、朴 龍洙、宮崎 剛亜「GH31 ファミリーからの新規酵素の探索および構造と機能の解析」第 72 回日本応用糖質科学会大会応用糖質科学シンポジウム、S-1、口頭発表、2023 年 9 月

* miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp