

機能未知エンドマンノシダーゼおよび α -グルコシダーゼの結晶化 Crystallization of Uncharacterized Endomannosidases and α -Glucosidases

殿塚隆史^{1,*}, 宮崎剛壘¹, 市川めぐみ¹, 横井岳¹, 西河淳¹

¹東京農工大学大学院農学府, 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

Takashi Tonozuka^{1,*}, Takatsugu Miyazaki¹, Megumi Ichikawa¹, Gaku Yokoi¹, and Atsushi Nishikawa¹

¹ Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu 183-8509, Japan

1 はじめに

タンパク質へのN結合型糖鎖の付加およびそれに続く糖鎖プロセッシングは、真核生物の代表的なタンパク質の翻訳後修飾に関係する過程である。N結合型糖鎖のプロセッシングの初期段階では、図1に示した糖鎖が、プロセッシング α -グルコシダーゼ I (矢印A) およびプロセッシング α -グルコシダーゼ II (矢印B) によって刈り込まれる。また、これらの過程をバイパスするエンドマンノシダーゼ (矢印C) が存在する。

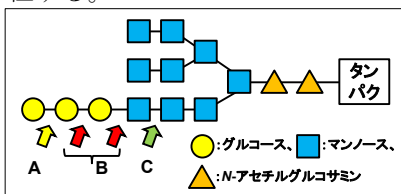


図1: N結合型糖鎖のプロセッシング酵素の初期段階に作用する酵素

さまざまな生物種の全ゲノムが明らかとなるにつれ、興味深いことに、細菌や古細菌に真核生物のN結合型糖鎖に作用する酵素と相同性が認められるタンパク質の遺伝子が多数存在することが分かった。細菌や古細菌には真核生物のようなタイプのN結合型糖鎖は存在しないので、これらのタンパク質がどのような機能を果たしているのか興味を持たれる。本研究では、これらの酵素の機能を推定する手掛かりとして、エンドマンノシダーゼおよびプロセッシング α -グルコシダーゼ I・II と相同性を有する細菌・古細菌由来の機能未知酵素の結晶化を試みた。

2 実験

酵素は His タグ融合タンパク質として大腸菌で発現させ、Ni-NTA カラムによるアフィニティークロマトグラフィーで精製し、必要な場合はさらにイオン交換クロマトグラフィーを行うことによって、SDS-PAGE で均一なバンドになるまで精製した。精製酵素を用いて、結晶化を行った。

3 結果および考察

エンドマンノシダーゼについては、*Shewanella amazonensis* 由来酵素についての結晶化を行った。スクリーニングを行った結果、リザーバーに 0.1 M HEPES (pH7.5)、10% (v/v) イソプロパノール、20% (w/v) ポリエチレングリコール 4000、2 mM ジ

チオスレイトールという条件で、図2のような結晶が得られた。AR-NW12A ビームラインにて回折強度測定を行ったが、空間群を決定するのに十分な回折強度を得ることができなかった。

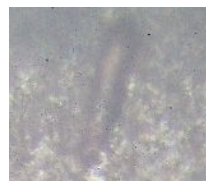


図2: *S. amazonensis* エンドマンノシダーゼの結晶

このため、別のエンドマンノシダーゼとして好熱菌 *Aeropyrum pernix* 由来の二種類のエンドマンノシダーゼ APE_0536 および APE_0727 の研究を行った。APE_0727 については、発現系の構築および精製には成功したが、結晶を得るまでには至らなかった。

グルコシダーゼ類似酵素についても結晶化を行った。プロセッシング α -グルコシダーゼ I と相同性を有する酵素については、大腸菌 YgiK について変異酵素とリガンドとの構造を決定することができた[1]。また、プロセッシング α -グルコシダーゼ II と相同性を有する酵素については、*Pedobacter saltans* 由来酵素 Pedsa_3617 について AR-NW12A ビームラインにおいて 3.0 Å 分解能で回折を得ることができた。

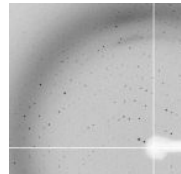


図3: Pedsa_3617 の回折

4 まとめ

本研究では、3種類のエンドマンノシダーゼのうち、*S. amazonensis* 由来酵素については結晶を得るまでに至ったが、良好な回折強度を得るまでには至らなかった。グルコシダーゼ類似酵素についてはプロセッシング α -グルコシダーゼ I 類似酵素 YgiK について立体構造を明らかにし、また、プロセッシング α -グルコシダーゼ II 類似酵素 Pedsa_3617 について、回折を得ることができた。現在、Pedsa_3617 について位相を決定するため、セレンメチオニン置換結晶の作製を行っている。

参考文献

[1] T. Miyazaki *et al.*, *FEBS J.* **280**, 4560 (2013).

*tonozuka@cc.tuat.ac.jp