

GH ファミリー63 に属する酵素 YgjK と糖転移反応で生じた二糖との複合体構造解析

Complex structure of GH63 enzyme YgjK with disaccharide synthesized by glycosynthase reaction

○ 宮崎剛亜、倉方悠馬、市川めぐみ、松田佳奈、西河淳、殿塚隆史
(東京農工大学大学院 農学府 応用生命化学専攻)

糖質加水分解酵素ファミリー63(GH63)には、真核生物由来の *N* 結合型糖鎖プロセシング酵素の一つであるプロセシング α -グルコシダーゼ I (EC 3.2.1.106)のほか、多数の真正細菌由来のタンパク質が分類されている。その一つである大腸菌 K-12 株由来 YgjK は、我々のグループがニゲロース(Glc- α (1 \rightarrow 3)-Glc)を加水分解するグルコシダーゼとして同定したが、種々の単糖との複合体構造解析により、その活性クレフトにはグルコースだけでなくマンノースやガラクトースが結合できることが明らかとなっている(Kurakata, et al., J. Mol. Biol., 2008)。

グライコシンターゼ(glycosynthase)は、変異導入により加水分解活性を低下させ、フッ化糖をドナーとし、アクセプターである任意の糖へ転移させてグリコシドを形成する糖質加水分解酵素変異体の呼称である。YgjK は、立体構造解析から明らかになった活性クレフトにおける糖結合能から多様な組み合わせのオリゴ糖が合成できることが期待された。我々は食品素材として有用な新規オリゴ糖の創出を目的とし、YgjK のグライコシンターゼ化に着手した。

本研究では、立体構造における知見をもとに変異体を作製し、糖転移活性を有する変異体とその転移反応により生じたオリゴ糖との複合体構造解析を行った。

活性に重要である Asp324 と一般塩基触媒残基である Glu727 をそれぞれアスパラギンとアラニンに置換した変異体 D324N と E727A を作製し、大腸菌宿主発現系により酵素を調製した。精製酵素を β -グルコシルフルオリドと各種糖と反応させたところ、ガラクトースをアクセプターとしてオリゴ糖が生成した。薄層クロマトグラフィーによりそのオリゴ糖を単離し、ソーキングにより E727A との複合体結晶を作製した。X線結晶構造解析により、本酵素の活性部位にグルコースとガラクトースからなるヘテロ二糖が結合していることが分かり、その構造を同定した。