

糖質加水分解酵素ファミリー31サブファミリー15および19に属する酵素の構造と機能に関する研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2024-06-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 池谷, 真里奈 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/0002000668

学位論文

糖質加水分解酵素ファミリー31 サブファミリー15 および 19 に属する

酵素の構造と機能に関する研究

2023年12月

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

池谷真里奈

目次

略語一覧.....	1
化合物一覧.....	2
第一章 緒論.....	4
1-1. 糖質関連酵素.....	4
1-2. GH31 ファミリー.....	4
1-3. 新規糖加水分解酵素の探索.....	9
1-4. 研究の目的.....	10
第二章 GH31 α -グルコシダーゼの機能と構造の解析.....	12
2-1. 緒言.....	12
2-2. 実験方法.....	13
2-2-1. タンパク質の大腸菌異種発現と精製.....	13
2-2-2. 組換えタンパク質の発現とアフィニティータグ精製.....	19
2-2-3. 加水分解活性の解析.....	22
2-2-4. LIGH31_u1 の結晶化と X 線回折像の解析.....	26
2-2-5. クライオ電子顕微鏡による LIGH31_u1 の構造解析.....	29
2-3. 結果.....	31
2-3-1. タンパク質の大腸菌異種発現と各種クロマトグラフィによる精製.....	31
2-3-2. 基質特異性の解析.....	34
2-3-3. 酵素学的性質の解析.....	35
2-3-4. LIGH31_u1 の X 線結晶構造解析.....	40
2-3-5. LIGH31_u1 の全体構造.....	43
2-3-6. LIGH31_u1 のリガンド複合体構造.....	47
2-3-7. クライオ電子顕微鏡構造.....	53
2-3-8. LIGH31_u1 の Tyr99 変異体の解析.....	57
2-4. 考察.....	59
2-4-1. 基質特異性.....	59
2-4-2. LIGH31_u1 の結晶構造と Cryo-EM 構造の比較.....	61
2-4-3. LIGH31_u1 と他の GH31 酵素との基質認識機構の比較.....	64
2-4-4. LIGH31_u1 の生理機能.....	68
2-5. 小括.....	71
第三章 GH31 α -ガラクトシダーゼの機能解析.....	72
3-1 緒言.....	72
3-2. 実験方法.....	75
3-2-1. 組換えタンパク質の発現系の構築.....	75

3-2-2. 組換えタンパク質の精製.....	79
2-2-3. 加水分解活性の解析.....	79
2-2-4. FpGH31_19 および BsGH31_19 の X 線結晶構造解析	82
2-2-5. 遺伝子クラスター解析.....	83
3-3 結果.....	84
3-3-1. 組換え GH31_19 タンパク質の発現と精製.....	84
3-3-2. 酵素学的性質の解析.....	85
3-2-3. 結晶構造解析.....	89
3-2-4. FpGH31_19 と BsGH31_19 の全体構造	92
3-2-5. FpGH31_19 の基質複合体構造.....	96
3-4. 考察.....	103
3-4-1. 酵素学的性質.....	103
3-4-2. 立体構造と進化的関係の相関	105
3-4-3. GH31_19 酵素間の比較.....	107
3-4-4. GH31_19 の天然の基質に関する考察	107
3-5. 小括.....	109
第四章 総括.....	110
参考文献.....	113
謝辞.....	123

略語一覧

4-MU- α -Gal, 4-methylumbelliferyl α -galactopyranoside
BsGH31_19, GH31_19 from *Bacteroides salyersiae*
CAZy, Carbohydrate-active enzyme
CBB, Coomassie Brilliant Blue
CmGH31_u1, GH31_u1 from *Cordyceps militaris*
Cryo-EM, クライオ電子顕微鏡, Cryogenic electron microscopy
CV, column volume
EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid
FpGH31_19, GH31_19 from *Flaviumibacter petaseus*
Fuc, fucose
Gal, galactopyranose
Gb3, globotriose
GH, glycoside hydrolase
Glc, glucopyranose
GOD-POD, glucose oxidase-peroxidase
IPTG, isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
LB, Luria Bertani
LlGH31_u1, GH31_u1 from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*
Man, mannose
MYORG, myogenesis-regulating glycosidase
OD, optical density
PCR, polymerase chain reaction
PDB, Protein Data Bank
PEG, polyethylene glycol
pNP, *para*-nitrophenyl
PsGal31A, Gal31A (GH31 subfamily 14) from *Pseudopedobacter saltans*
PUL, polysaccharide utilization loci

RMSD, Root-mean-square deviation

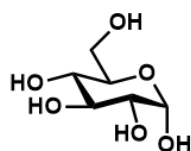
SeMet, Selenomethionine

TB, transformation buffer

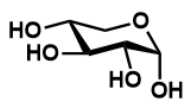
TLC, thin layer chromatography

WT, wild type

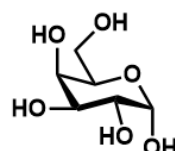
化合物一覧



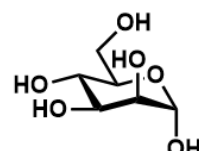
α -グルコース
(α -Glc)



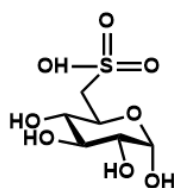
α -キシロース
(α -Xyl)



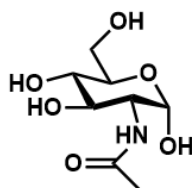
α -ガラクトース
(α -Gal)



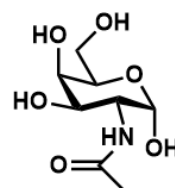
α -マンノース
(α -Man)



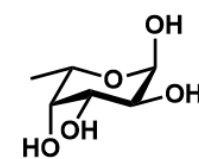
α -スルホキノボース



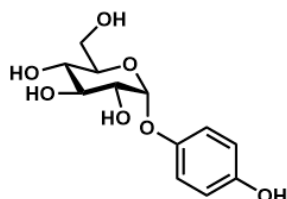
α -N-アセチル
グルコサミン
(α -GlcNAc)



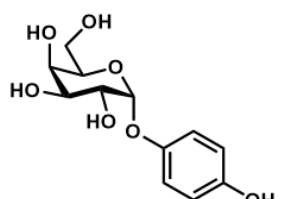
α -N-アセチル
ガラクトサミン
(α -GalNAc)



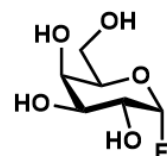
α -フコース
(α -Fuc)



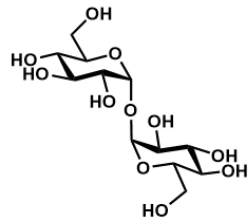
pNP- α -グルコシド



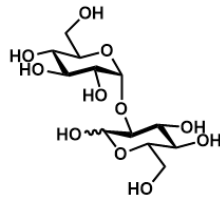
pNP- α -ガラクトシド



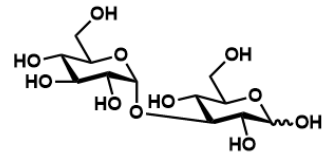
フッ化
 α -ガラクトース



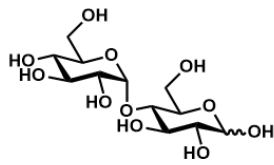
トレハロース



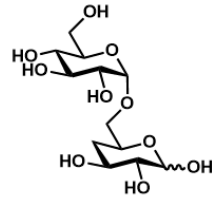
コジビオース



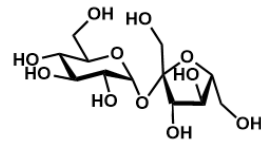
ニゲロース



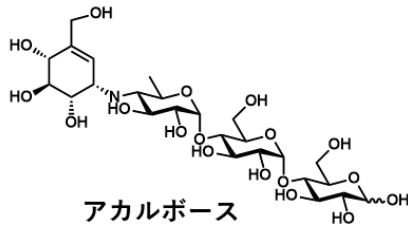
マルトース



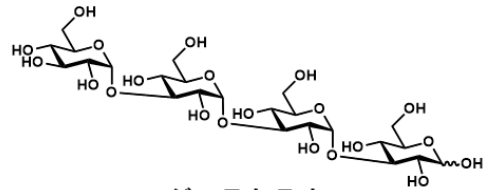
イソマルトース



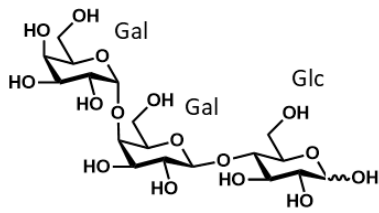
スクロース



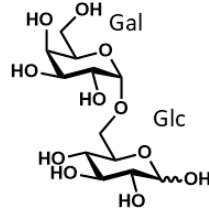
アカルボース



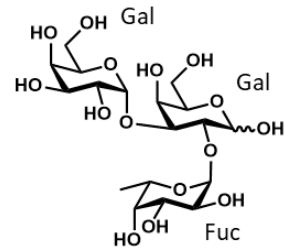
ニゲロテトラオース



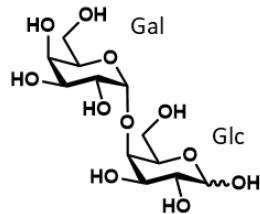
グロボトリオース
(Gb3)



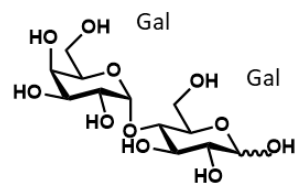
メリビオース



血液型B抗原三糖



Gal- α (1 \rightarrow 4)-Gal



Gal- α (1 \rightarrow 4)-Glc

第一章 緒論

1-1. 糖質関連酵素

天然には多様な糖質が存在する。グルコ二糖を例にとってみても、グルコースが α および β の二種類のアノマーを取り、還元末端側の糖の1、2、3、4、6位のヒドロキシ基とグリコシド結合を形成することができるため、理論上、 α -(1 \leftrightarrow 1)、 α -(1,2)、 α -(1,3)、 α -(1,4)、 α -(1,6)、 β -(1 \leftrightarrow 1)、 β -(1,2)、 β -(1,3)、 β -(1,4)、 β -(1,6)、(α 1 \leftrightarrow β 1)の11種類の二糖が存在できる。単糖にも様々な種類が存在するため、糖質の構造は多岐にわたり、実際に天然に存在する糖質の種類も膨大である。このような糖質の多様性を反映して、糖質の合成、分解に関わるタンパク質の種類も膨大なものとなっている。糖質関連酵素は、Carbohydrate-Active enZymes Database (CAZy データベース, <http://www.cazy.org/>) において、アミノ酸配列の相同性に基づいて多数のファミリーに分類されている。糖質関連酵素の分類には、糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase (GH)) 糖転移酵素、(GlycosylTransferase (GT))、多糖リアーゼ (Polysaccharide Lyase (PL))、糖質エステラーゼ (Carbohydrate Esterases (CE))、Auxiliary Activities (AA) の五つがあり、非酵素タンパク質の分類として糖結合モジュール (Carbohydrate-Binding Module (CBM)) が設けられている。同一ファミリーに分類される酵素は、その触媒機構や作用するアノマーが同じであることが多い。

1-2. GH31 ファミリー

CAZy によるファミリー分類は、タンパク質の機能を推定する上で有効であるが、同一ファミリー内に基質特異性や活性が異なる酵素が属するファミリーも多い。多様化が進んだファミリーとしては、乳糖の分解に関わる β -ガラクトシダーゼが属する GH2 や、セルラーゼが属する GH5、デンプンの消化に関わるアミラーゼが属する GH13 などが知られている。これらのファミリーには代表的な活性の酵素のみではなく、多様な基質特異性を有する酵素も含まれており、未だ機能解析が行われていない酵素も多い。

GH31 も、そのような多様性に富んだファミリーの一つである。GH31 ファミリーは動物の生命維持に重要な α -グルコシダーゼが属していることで古くから知られており、糖タンパク質の品質管理機構である小胞体関連分解に関わる小胞体グリコシダーゼ II (Okuyama et al., 2017; Satoh et al., 2016)、リソソームでグリコーゲンの分解に関わる酸性 α -グルコシダーゼ (Cupler et al., 2012)、小腸で

発現し、食物に含まれるスクロース (β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glcp) やマルトオリゴ糖の分解を行うスクラーゼ-イソマルターゼ (Gray et al., 1979)、マルターゼ-グルコアミラーゼ (Ren et al., 2011; Sim et al., 2008) などがある。

一方で、バクテリア由来の GH31 酵素は、動物由来の GH31 酵素と全体構造や触媒残基が共通しているにもかかわらず、高度に多様化が進んでいる。バクテリア由来の酵素では、 α -グルコシダーゼに加え、 α -キシロシダーゼ (Lovering et al., 2005)、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (Ikegaya et al., 2021; Miyazaki and Park., 2020)、スルホキノボシダーゼ (Speciale et al., 2016)、 α -ガラクトシダーゼ (Miyazaki et al., 2015)、特殊な反応機構により、加水分解ではなく脱離反応を触媒する α -グルカンリアーゼ (Rozeboom et al., 2013) などが存在する。また、GH31 の酵素のほとんどはオリゴ糖または多糖の非還元末端側から単糖を遊離するエキソ型の活性を示すが、デキストランからオリゴ糖を遊離するエンド型の酵素も報告されている (図 1-1) (Gozu et al., 2016; Tsutsumi et al., 2019)。加えて、古細菌からは α -1,4-グルコシダーゼおよび α -キシロシダーゼが報告されている。このような多様性を反映して、GH31 ファミリーは 2023 年に 20 のサブファミリー (GH31_1~GH31_20) に細分化された (表 1-1) (Arumapperuma et al., 2023)。このように、GH31 からは近年も新しい酵素が見出されていることから (Gozu et al., 2016; Ikegaya et al., 2021; Miyazaki et al., 2015; Miyazaki and Park., 2020;), このファミリーにはまだ新しい酵素が眠っていると考え、本研究の対象とした。

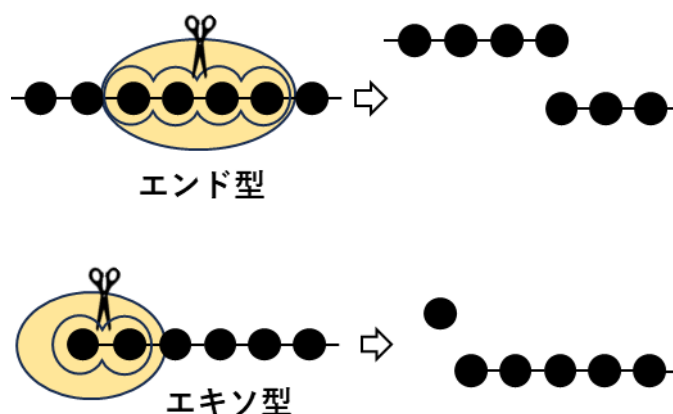


図 1-1. エンド型およびエキソ型の酵素の模式図

糖を黒丸で、酵素をオレンジ色で示した。加水分解点はハサミのマークで示した。

各酵素の基質特異性や活性が異なるにもかかわらず、GH31 の全体構造はよく保存されており、このファミリーに分類されるタンパク質のほとんどが共通して N 末端ドメイン (N-ドメイン)、 $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造からなる A-ドメイン、2 個の C 末端ドメイン (proximal C-ドメインと distal C-ドメイン) を持つ (図 1-2)。また、GH31 の酵素は、図に示すアノマー保持型機構によって加水分解反応を行う (図 1-3)。反応に関わる求核触媒残基および一般酸塩基触媒残基の一組のアスパラギン酸はアミノ酸配列のアラインメント上で高度に保存されている。

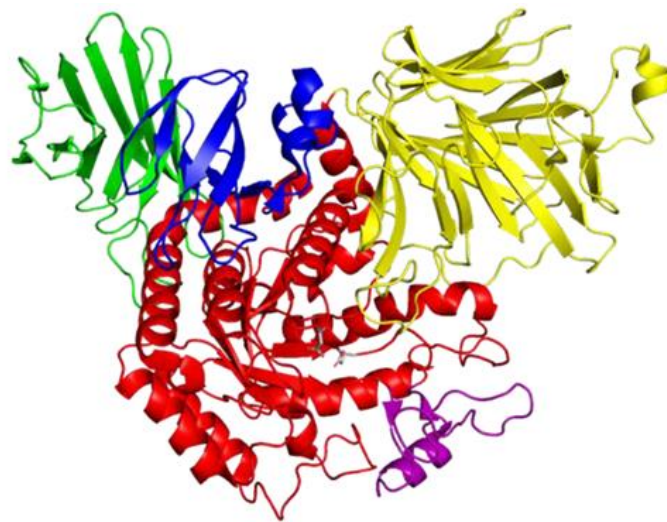


図 1-2. GH31 キシロシダーゼ YicI の立体構造

Escherichia coli 由来 GH31 α -キシロシダーゼ YicI の立体構造 (PDB, 1WE5, Lovering et al., 2005) を示した。黄, N 末端ドメイン (残基番号 1–245)、赤, 触媒ドメイン (残基番号 245–349 および 387–588)、紫, 触媒ドメインインサート (残基番号 349–387)、青, proximal-C 末端ドメイン (残基番号 588 – 665)、緑, distal-C 末端ドメイン (残基番号 665–772)。

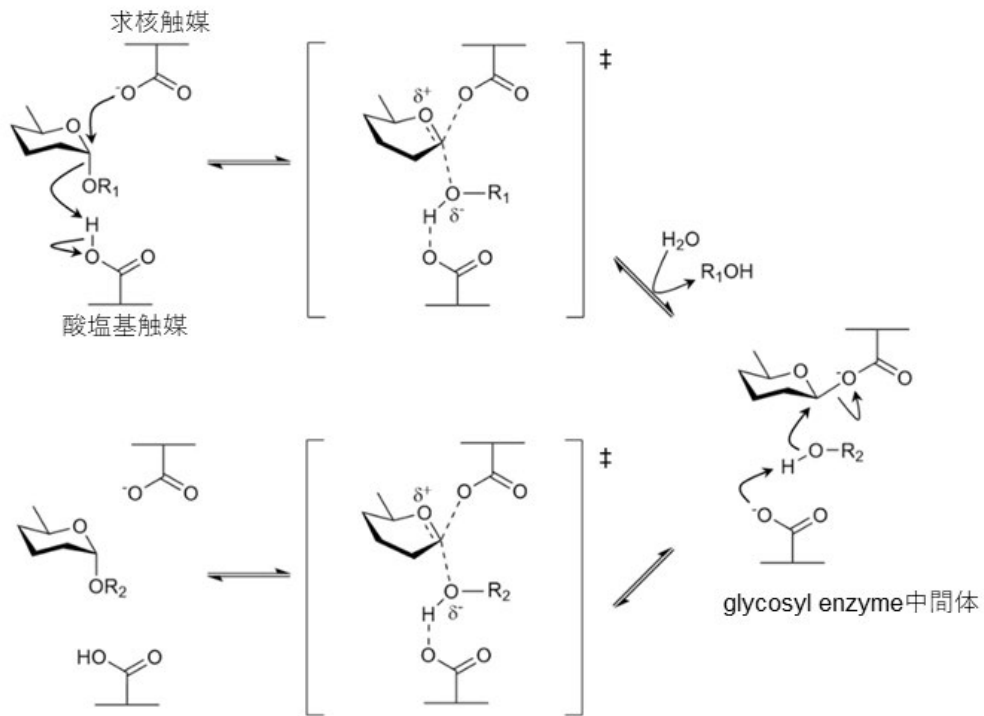


図 1-3. 典型的 Koshland 保持型反応機構

α -グリコシドに対するアノマー保持型反応機構を示す。まず、アスパラギン酸が求核触媒となってアノマー炭素を求核攻撃し、glycosyl enzyme 中間体を形成する (グリコシル化)。次にもう一方のアスパラギン酸が酸触媒としてグリコシド結合を形成する酸素にプロトンを供与し、結合を切断した後、最初に酸触媒残基として働いたアスパラギンが塩基触媒として働いて水を脱プロトン化することで、活性化状態になった水分子が glycosyl enzyme 中間体を攻撃し、加水分解が起こる (脱グリコシル化)。

表 1-1. GH31 サブファミリー (Arumapperuma et al., 2023)

サブファミリー番号	EC 番号	分類学的多様性	報告のある酵素活性	立体構造 (登録タンパク質数 ^{a)})
1	3.2.1.10 3.2.1.11 3.2.1.20 3.2.1.24 3.2.1.48 3.2.1.84 3.2.1.177 2.4.1.24 2.4.1.161	MUL ^b	sucrase-isomaltase, dextranase, α -xylosidase, α -glucosidase, sucrase-isomaltase, α -1,3-glucosidase, α -glucosidase with α -mannosidase activity, oligosaccharide α -1,4-glucosyltransferase	11
2		MUL		-
3	3.2.1.20 3.2.1.177	MUL	α -glucosidase α -xylosidase	2
4	3.2.1.177	MUL	α -xylosidase	4
5	3.2.1.177	Eukaryota	α -xylosidase	1
6		Proteobacteria		-
7	2.4.1.387 3.2.1.304	Bacteria	3- α -isomaltosyltransferase cycloalternan-specific α -1,3-glucosidase	3
8	4.2.2.13	MUL	exo- α -(1 \rightarrow 4)-glucan lyase	-
9		Bacteroidetes		-
10	2.4.1.24	Bacteria	1,4- α -glucan 6- α -glucosyltransferase	1
11	4.2.2.13	MUL	exo- α -(1 \rightarrow 4)-glucan lyase	1
12	2.4.1.24	Bacteria	1,4- α -glucan 6- α -glucosyltransferase	-
13	3.2.1.199	MUL	sulfoquinovosidase	2
14	3.2.1.22	Bacteria	α -galactosidase	1
15	3.2.1.84	MUL	α-1,3-glucosidase^c	1
16		Bacteria		-
17		Bacteria		-
18	3.2.1.217	MUL	exo-acting protein- α -N-acetylgalactosaminidase	1
19	3.2.1.22	Bacteria	α-1,4-galactosidase^c	1
20	3.2.1.22	Metazoa	α -galactosidase	1

^a 2023 年 9 月 21 日時点。

^b MUL は複数のドメインの生物に分布していることを示す。

^c 本研究で報告する酵素を太字で示した。

1-3. 新規糖加水分解酵素の探索

既報の酵素と配列相同性が低いタンパク質は、一次構造からその基質特異性などの活性を予測することが困難である。そのようなタンパク質の中に新規活性を持つ酵素が眠っている可能性は高く、データベースから探索は新規酵素発見のための有用な手法である。しかし、糖質関連酵素が非常に多様であるだけでなく、現在公開されているデータベースに登録されている糖質関連酵素の配列情報は膨大な数にのぼり、全体を俯瞰することが困難である。そのため、膨大な配列データを活用するための様々なツールの開発も進んでいる。

SACCHARIS (Jones et al., 2018) は、CAZy データベースに登録されているアミノ酸配列の取得と dbCAN (Barrett et al., 2020) による糖質関連酵素ドメインのアノテーション、系統樹作成を行うプログラムである。配列の系統解析によるデータマイニングは、新規酵素の探索のための有力な手法であり、SACCHARIS の開発グループによって、系統解析によるタンパク質の探索を行うことで、新規な活性を持つタンパク質を見出した例が示されている (Jones et al., 2018)。また、データベース上の配列の解析によって既報の酵素と配列相同性が低いタンパク質を特定し、タンパク質の網羅的な異種発現と活性のスクリーニングを行うことで、新規ファミリーおよび新規ファミリー候補の 11 のタンパク質が見いだされた例もある (Helbert et al., 2019)。

また、同一ファミリーあるいは同一サブファミリー内に基質特異性が異なる酵素が存在するという問題に対しては、CUPP (Barrett and Lange, 2019) や eCAMI (Xu et al., 2020) といったファミリーをサブグループ単位にクラスタリングする手法が提案されている。いずれの手法も、アミノ酸配列中から、サブグループ内で保存されたポリペプチドの配列を抽出し、どのポリペプチドの配列を保持しているかによって高速に配列のサブグループ分類を行うことが可能になっている。

1-4. 研究の目的

我々のグループは、これまでに系統解析に基づく手法で GH31 ファミリーからの新規酵素の探索を行い、このファミリーで初めて α -N-アセチルガラクトサミニダーゼを見出し、その構造を明らかにした (Miyazaki and Park 2020)。また、GH31 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼがバクテリアと鱗翅目昆虫のみに分布していることから、鱗翅目のモデル生物であるカイコ由来のホモログ (BmNag31) の酵素活性と遺伝子発現の解析を行い、BmNag31 がバクテリア由来の Nag31 と同等の加水分解活性を有し、蛹期間中にその発現量が増加する事を明らかにした (Ikegaya et al., 2021)。近年、腸内細菌叢がヒトの健康に重要な役割を果たすことが明らかになってきているが、腸内細菌による宿主由来の O 糖鎖の分解は、ヒトと腸内細菌の重要な相互作用の一つである (Yamaguchi and Yamamoto, 2023)。GH31 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの発見によって、一部のバクテリアのゲノム上では GH31 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの近傍に糖トランスポーターや他の加水分解酵素が存在し、これら酵素が協働して O 型糖鎖分解に関わっている可能性が示唆された (Rahfeld et al., 2019)。このように、機能未知の酵素の性質が明らかになることによって、その酵素が関与する糖の資化・代謝機構が明らかになる場合も多い。

さらに、新たな酵素の発見は、新規な糖質素材の酵素合成や、バイオマス利用などの応用に繋がる可能性がある。例えば、糖転移能の高い GH31 ファミリーの酵素は安価なデンプンを原料として希少なオリゴ糖を合成することができ (Song et al., 2013)、 α -1,4-glucan 6- α -glucosyltransferase と cycloalternan-forming enzyme を用いた環状四糖 (シクロニゲロシルニゲロース) の合成手法は実際に工業的に用いられている (Matsuoka et al., 2022)。また、GH31 の α -キシロシダーゼは、植物細胞壁に含まれるセルラーゼでの分解が困難なヘミセルロースの分解を促進することが知られており、このような酵素機能を理解することは、植物由来資源の効率的な利用にもつながる (Cao et al., 2020)。

これまでの研究から、データベースからの新規酵素の探索が有用な手法であることが示されたため、本研究では更なる新規酵素の探索のため、これまで報告したタンパク質とは異なるクラスター (図 1-4 の赤枠) に属するタンパク質に着目し、それらの酵素学および構造生物学的性質を解析した。

本研究で標的とした GH31_u1 クラスターに関しては第二章で、GH31_19 クラスターに関しては第三章で述べる。

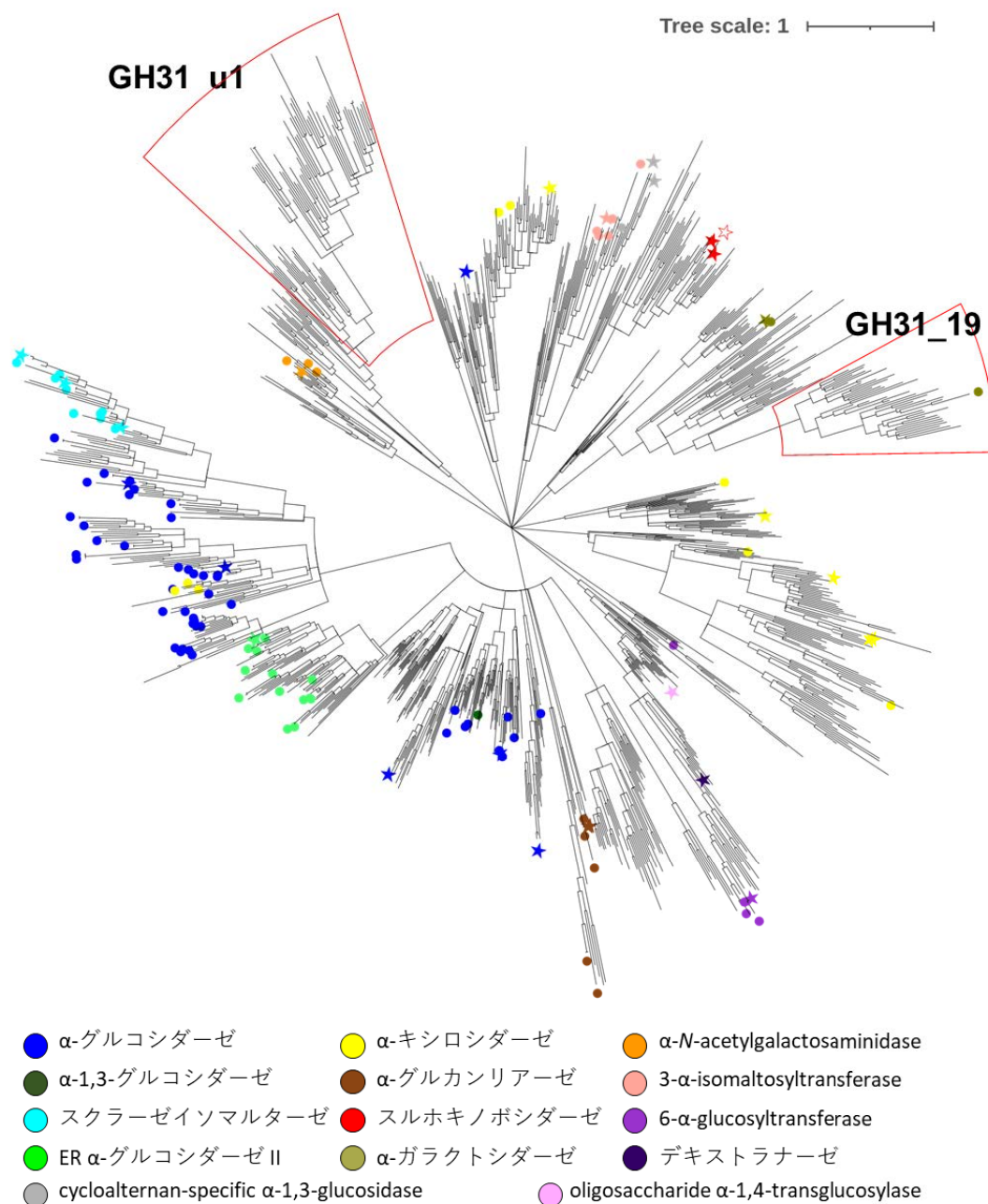


図 1-4. Cazy データベースに登録されている GH31 タンパク質の分子系統樹

GH31 に登録されているアミノ酸配列から相同性が 70%以上のものを除き、触媒ドメインの配列に基いた分子系統樹を作成した。系統樹の作成は MEGA-X (Kumar et al, 2018) を使用して最尤法で行い、系統樹の描画は iTOL (Letunic and Bork, 2016) で行った。配列の取得および触媒ドメインの抽出は SACCHARIS プログラムを用いて行い、X 線結晶構造の報告のある酵素には★を記した。

第二章 GH31 α -グルコシダーゼの機能と構造の解析

2-1. 緒言

本章では、第一章 図 1-4 で GH31_u1 と示したクラスターの酵素の研究に関して述べる。このクラスターには、バクテリアおよび真菌由来のタンパク質が属しており、CAZy のサブファミリー分類では GH31_u1 は GH31_15 に分類される。GH31_u1 は、様々な生物種に保存されているにもかかわらず、その活性に関しては文献報告がなかった。

そこで、本研究では、広く研究がなされており入手可能な生物種である *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* および *Cordyceps militaris* 由来のタンパク質 (それぞれ LIGH31_u1 および CmGH31_u1) の機能と構造の解析を行うこととした。*L. lactis* はチーズなどの発酵食品からよく検出される通性嫌気性の乳酸球菌である。食品の製造に利用される他、食品グレードの組み換えタンパク質の発現宿主としても用いられている (Zhou et al., 2006)。また、*C. militaris* は、サナギタケとも呼ばれる冬虫夏草の一種であり、鱗翅目の幼虫や蛹から発生する。薬効成分であるコルジセピンを含んでいることからその生産方法の研究がなされている。LIGH31_u1 と CmGH31_u1 のアミノ酸配列相同性は 37.5%であり、既報の GH31 酵素とのアミノ酸配列相同性は 25%以下であった。また、本研究で用いた *L. lactis* は GH31 酵素として LIGH31_u1 のみを有していたのに対し、ゲノム既読株の *C. militaris* CM01 は CmGH31_u1 以外にも三種類の GH31 酵素 (GenBank ID EGX90322.1、EGX90708.1、EGX93552.1) を有していた。既報の酵素の中では EGX90322.1 は、真菌 *Podospira anserin* 由来の α -1,3-グルコシダーゼ (CAP72574.1, Song et al., 2013) と 39.5%のアミノ酸配列相同性を示し、EGX90708.1 は真菌 *Chaetomium thermophilum* var. *thermophilum* 由来の小胞体グルコシダーゼ II (EGS17181.1, Satoh et al., 2016) と 32.7%の相同性を示した。EGX93552.1 は、系統的に近い酵素の機能の報告はなく、バクテリア *Listeria monocytogenes* 由来環状四糖合成酵素 (CAD00524.1, Light et al., 2016) との相同性が 27%と最も高かったが、アミノ酸配列相同性からの EGX93552.1 の機能推定は難しいと考えられた。

2-2. 実験方法

2-2-1. タンパク質の大腸菌異種発現と精製

試薬は特に指定がない限り富士フイルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入したものを使用した。

LIGH31_u1 および CmGH31_u1 はいずれも単独の GH31 ドメインからなり、SignalP 5.0 サーバー(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)による予測ではシグナル配列は検出されなかったため、全長の配列を pET28a ベクターに組み込み、N 末端に 6 × His タグおよび Thrombin 認識配列 (MGSSHHHHHSSGLVPRGS) を付加した組み換えタンパク質として大腸菌発現させた。LIGH31_u1 および CmGH31_u1 の遺伝子がクローニングされた発現プラスミド pET28a-LIGH31_u1 および pET28a-CmGH31_u1 は当研究室の宮崎剛亜博士が本研究に先立って作製した。LIGH31_u1 (llmg_1836, GenBank CAL98407.1) の遺伝子は、*L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (NITE BioResource Center, Tokyo Japan) のゲノムよりサブクローニングし、CmGH31_u1 遺伝子は、ゲノム既読株とは別株の *C. militaris* NBRC 103752 (NITE BioResource Center) の cDNA よりサブクローニングした。また、得られた塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースに LC660181 として登録した。タンパク質の発現コンストラクトは、図 2-1 に示す通りである。

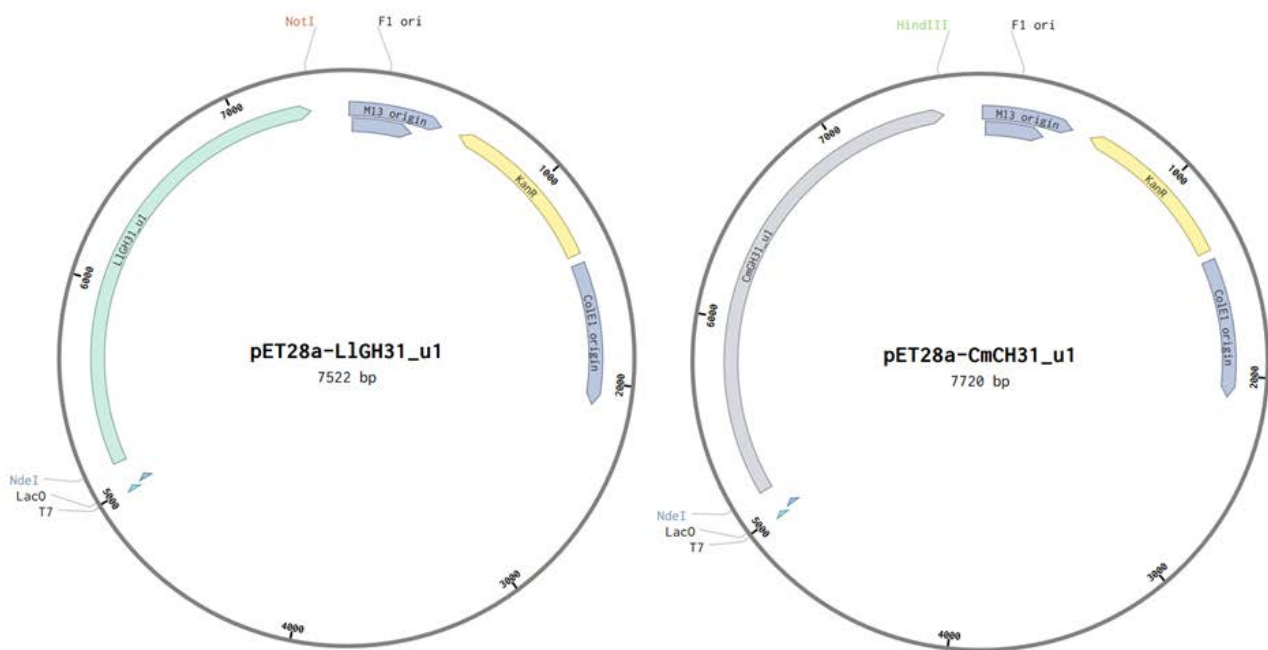


図 2-1. 大腸菌発現のためのプラスミドマップ

LIGH31_u1 (左)および CmGH31_u1 (右)の大腸菌発現ベクター。図は Benchling (<https://www.benchling.com/>) によって作成した。

インバース PCR によって、LIGH31_u1 酵素に変異を導入した。用いたプライマーの配列は表 2-1 に示した。求核触媒残基をアラニンに置換した変異体 (LIGH31_u1_D341A) の作製にはプライマー LIGH31u1_D341A_F および LIGH31u1_D341A_R を用いた。酸塩基触媒残基をアラニンに置換した変異体 (LIGH31_u1_D394A) の作製のためにはプライマー LIGH31u1_D394A_F および LIGH31u1_D394A_R を用いた。Tyr99 を Phe に置換した変異体作製のためにはプライマー LIGH31u1_Y99F_F と LIGH31u1_Y99F_R を用いた。

表 2-1. プライマーの名称と配列

名称	配列 (5' to 3') ^a	使用用途
LIGH31u1_NdeI_F	CGGCAGCC <u>CA</u> TATGGTCAAGTGAATTAGAAAAGTAAA	LIGH31u1 の pET28a ベクターへのサブク ローニング
LIGH31u1_NotI_R	CGAGT <u>GCGGCCG</u> CTATTTTCCACTGTAAAGTAATTC	
CmGH31u1_NdeI_F	CGGCAGCC <u>CA</u> TATGCCATCATCCGCCTTCGTTGGTG	CmGH31u1 の pET28a ベクターへのサブク ローニング
CmGH31u1_HindIII_R	GCCGCA <u>AAGCTT</u> CTAGGATCGGCTGTCGGCTAGGAAG	
LIGH31u1_D394A_F	TCGGGAG <u>C</u> TCAGTCATTTTCATGGGCA	LIGH31u1_D394A 変 異体作製
LIGH31u1_D394A_R	GACTGA <u>AG</u> CTCCCGAAAATCCTAAAGG	
LIGH31u1_D341A_F	TGGATT <u>G</u> CTTGGCAACAAGGGGCAATC	LIGH31u1_D341A 変 異体作製
LIGH31u1_D341A_R	TTGCCA <u>AG</u> CAATCCACCAAAAAATCAAC	
LIGH31u1_Y99F_F	TCTGTTT <u>T</u> CCAAATCGCTGGTATTTTG	LIGH31u1_Y99F 変異 体作製
LIGH31u1_Y99F_R	GATTTGG <u>AAA</u> ACAGAAAAGTTAAATTT	
LIGH31u1_Y99A_F	TCTGTT <u>G</u> CTTCAAATCGCTGGTATTTT	LIGH31u1_Y99A 変異 体作製
LIGH31u1_Y99A_R	ATTTGA <u>AG</u> CAACAGAAAAGTTAAATTT	
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	LIGH31u1 シークエンス 解析
T7 terminator	ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	
LIGH31_u1_seq1_F	TTATATTTATTTGCTTATGG	LIGH31u1 シークエンス 解析
LIGH31_u1_seq2_R	CTGGAAACCAAACCTCCACA	
CmGH31_u1_seq2_F	GACACGTTCAAGGACAAGCG	CmGH31u1 シークエン ス解析

^a 下線は制限酵素サイトを示し、下波線は置換したアミノ酸のコドンに対応する塩基を示す。

PCR には、ポリメラーゼとして KOD-One (TOYOBO, Osaka, Japan) を用い、テンプレートとして pET28a-L1GH31_u1 (180 ng/μL) を用いた。反応液組成は KOD-One のマニュアルに従い、反応系の総量を 20 μL とした (表 2-2)。反応条件は、どちらも変性を 98°C 10 秒、アニーリングを 55°C 30 秒、伸長を 68°C 40 秒とし、25 サイクル行った。

表 2-2. KOD-One ポリメラーゼを用いた PCR 反応液組成

試薬	量
KOD-One ポリメラーゼ	10 μL
10 μM Forward primer	0.6 μL
10 μM Reverse primer	0.6 μL
テンプレート溶液	0.2 μL
dH ₂ O	up to 20 μL

PCR 産物は、0.5%のアガロースゲル電気泳動によって増幅を確認した。アガロースゲルは TAE バッファー (20 mM 酢酸、50 mM EDTA、40 mM Tris) にアガロースを 0.5% (w/v) となるよう加え、電子レンジで加熱して、アガロースを溶解させた後、60°C 程度まで冷却してから 10 mg/ml のエチジウムブロマイドをゲル 100 mL 当たり 1 μL 加え、コームを挿した容器に入れて室温で冷却した。泳動サンプルは 6×ローディングダイ Gel Loading Dye, Purple (6X) (R0176S, NEB, Massachusetts, USA) と混合し、ウェルにアプライした。電気泳動は TAE バッファー中でローディングダイの色素がゲルの中間まで流れる程度行った。泳動後、ゲルに UV を照射することによってバンドを検出した。

DNA の増幅が確認できた PCR 産物は、制限酵素 DpnI (NEB) で処理し、37°C で 1 時間インキュベートした後、大腸菌 DH5α に形質転換した。

2-2-1-1. 大腸菌 DH5 α 株のコンピテントセルの作製と形質転換

コンピテントセル作製のために、大腸菌 DH5 α 株をグリセロールストックから LB プレート培地に画線培養し、シングルコロニーを 3 mL の LB 培地で一晩培養した。この前培養液 500 μ L を 50 mL の SOB 培地 (2% Peptone, 0.5% Yeast Extract, 0.05 % NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) に加え、20°C で OD₆₀₀ が 0.4~0.6 になるまで培養した。

氷上で、培養液を 50 mL の遠沈管 2 本に 25 mL ずつ分注し、遠心分離 (4°C, 1,000 \times g, 15 分) し、上清をデカンテーションで捨てた。それぞれの遠沈管に、ディスポーサブルのホールピペットを使って冷却した Transformation Buffer (TB, 10 mM Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic Acid) (PIPES), 15 mM CaCl₂·2H₂O, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂·4H₂O) を 10 mL 加え、優しく懸濁し、氷上で 10 分間静置した。静置後、遠心分離 (4°C, 1,000 \times g, 15 分) し、上清をデカンテーションで捨てた。その後、TB をそれぞれの遠沈管に 4 mL ずつ加え、さらに Dimethyl Sulfoxide を 300 μ L ずつ加えて優しく懸濁し、氷上で 10 分間静置した。これをチューブに 100 μ L ずつ分注し、液体窒素によって急速凍結させ、-80°C で保存した。

形質転換を行う際は、コンピテントセルを氷上でゆっくり解凍し、プラスミドを含むサンプルを加え、20 分間氷上で静置した後、42°C で 45 秒間ヒートショックした。その後 1 mL の SOC 培地 (2% Peptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) を加え、37°C で 1 時間インキュベートした後、100 μ L の培地を、カナマイシン (20 μ g/mL) を添加した LB プレートに植菌し、37°C で一晩培養した。

2-2-1-2. プラスミドの発現用大腸菌株への形質転換とタンパク質発現確認

シングルコロニーを 3 mL の LB 液体培地で培養し、FastGene Plasmid Mini Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) を用いてプラスミドを抽出した。プラスミドは、Fasmac (Kanagawa, Japan) にサンガー法によるシーケンス解析を依頼して、目的の塩基配列が挿入されたことを確認した。

通常 of タンパク質発現宿主として、大腸菌 BL21 (DE3) Competent Cells–Novagen (Merck Massachusetts, US) より継代した大腸菌株を用いた。また、X 線結晶構造解析の位相の決定に用いる LIGH31_u1 のセレノメチオニン (SeMet) 置

換体を得るためには大腸菌 B834 株 (Merck) を用いた。

コンピテントセル作製のために、大腸菌を 3 mL の LB 培地で OD₆₀₀ が 0.4 になるまで培養し、培養液全量を遠心分離 (4°C, 5,000 × g, 5 分) し、上清を捨て、氷冷した 50 mM 塩化カルシウム溶液を加え、ピペッティングで菌体を懸濁した。この作業を計 3 回繰り返した後、再度遠心分離 (5,000 × g, 5 分) し、20% グリセロールを含む 50 mM 塩化カルシウム 200 μL を加え、穏やかにピペッティングし、20 μL ずつ 1.5 mL チューブに分注した。ここにプラスミド約 50 ng を加え、20 分間氷上で静置した後、42°C で 45 秒間ヒートショックした。その後 200 μL の SOC 培地を加え、37°C で 1 時間インキュベートした後、100 μL の培地を、カナマイシン (20 μg/mL) を添加した LB プレートに植菌し、37°C で一晩培養した。培養後、生じたコロニー拾ってカナマイシンを含む 3 mL の LB 培地で前培養した。

タンパク質の発現確認のため、前培養液 30 μL を 3 mL の LB 培地に加え、OD₆₀₀ が 0.6 になるまで培養し、終濃度 1 mM となるように isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Merck) を加え、37°C または 20°C で一晩培養した。1 mL の培地を集菌し、200 μL のバッファー (300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 20 mM イミダゾール, pH 8.0) を加え、超音波破碎し、遠心分離 (12,000 rpm, 5 分) した。沈殿に再度 200 μL のバッファーを加え、沈殿を懸濁し、サンプルと等量の 2×SDS サンプルバッファー (0.625 M Tris-HCl, 20% SDS, 20% glycerol, 0.05% bromophenol blue (BPB), 50% 2-mercaptoethanol) を加え、100°C で 5 分間加熱して SDS-PAGE および CBB 染色に供した。

SDS-PAGE は、8% (w/v) のポリアクリルアミドゲルを使用し、質量マーカーは、ExcelBand All Blue Broad Range Plus Protein Marker (PM1700, SMOBiO Technology, Hsinchu, Taiwan)、泳動層には AE-6500 (ATTO) を用いた。電気泳動バッファー (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% w/v SDS) を用い、ゲル板一枚当たり 25 mA の定電流で泳動を行った。

電気泳動終了後、CBB 染色を行い、目的の位置にバンドが確認された株は、前培養液 700 μL を 300 μL の 50% グリセロール溶液に加え、-80°C で保存し、以降の実験に用いた。

2-2-2. 組換えタンパク質の発現とアフィニティータグ精製

2-2-2-1. 大腸菌の培養

タンパク質の精製のため、培養のスケールアップを行った。容器は 200 mL または 1 L のバッフル付きフラスコを用い、カナマイシン (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む LB 培地に培地の 1/100 量の大腸菌前培養液を加え、 OD_{600} が 0.8 になるまでシェーカー (Bio-Shaker BR-3000LF, TIETECH, Tokyo, Japan) あるいは Bio-Shaker BR-53FP, TIETECH) を用いて 37°C、130 rpm で振盪培養した。LB 培地は、Thermo Fisher Scientific の LB Broth Base (Lennox) をイオン交換水に溶解して作製した。その後培地を氷冷し、プラスミド pET28a-LIGH31_u1 および pET28a-LIGH31_u1_Y99F を保持する大腸菌 BL21 株に対しては IPTG を終濃度が 0.1 mM になるように加え、pET28a-LIGH31_u1_D394A を保持する大腸菌 BL21 株に対しては IPTG を終濃度が 0.5 mM となるよう加え、20°C で 20–24 時間培養した。pET28a-LIGH31_u1 を保持する大腸菌 B834 株は、セレノメチオニン (SeMet) を含む LeMaster 培地で培養し、0.1 mM の IPTG で発現誘導した。LeMaster 培地の作製は、表に示す Pre-medium をオートクレーブし、試薬を溶解させた後、冷却して pH を 7.5 に合わせ、前培養用に 40 mL、懸濁、洗浄用に 60 mL を分取し、前培養液には 2 g の LB broth base (Lennox) (Thermo Fisher Scientific) を加え、それぞれオートクレーブした。Non-outoclavable portion は、表の組成に従って作成し、0.2 μm のフィルター (Sartorius AG, Göttingen, Germany) を用いて無菌濾過を行った。オートクレーブ後の Pre-medium 1L に対し、100 mL の Non-outoclavable portion およびビタミン Kao and Michayluk Vitamin Solution (Merck) を 100 \times 溶液を 10 mL/1L となるように加え、培養の直前に、25 mM の L-SeMet を加えた。

すべての培養液は遠心分離 (5,000 \times g、4°C、10 分) によって回収し、菌体を -20°C で保存した。

表 2-3. Pre-medium の組成

試薬	量
Alanine	0.50 g
Arginine HCl	0.58 g
Asparatic acid	0.40 g
Cystine	0.03 g
Glutamic acid	0.67 g
Glutamine	0.33 g
Glycine	0.54 g
Histidine	0.06 g
Isoleucine	0.23 g
Leucine	0.23 g
Lysine HCl	0.42 g
Phenylalanine	0.13 g
Proline	0.10 g
Serine	2.08 g
Threonine	0.23 g
Tyrosine	0.17 g
Valine	0.23 g
Adenine	0.50 g
Guanosine	0.67 g
Thymine	0.17 g
Uracil	0.50 g
Sodium acetate	1.50 g
Succinic acid	1.50 g
Ammonium Cl	0.75 g
Sodium hydroxide	1.08 g
K ₂ HPO ₄	10.50 g
H ₂ O	1 L

表 2-4. Non-outoclavable portion の組成

試薬	量
Glucose	10 g
MgSO ₄	0.25 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.18 mg
H ₂ SO ₄	8.3 μL
H ₂ O	100 mL

2-2-2-2. Ni アフィニティクロマトグラフィ精製

His タグを利用した Ni アフィニティクロマトグラフィ精製を行った。凍結保存した菌体を氷上で解凍し、培地 200 mL 当たり 10 mL の平衡化バッファー (300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 20 mM イミダゾール, pH 7.5) を加えボルテックスで懸濁した。菌体を超音波ホモジナイザー (LUH150, 大和科学株式会社、Tokyo, Japan) を用いて出力 40% で 15 秒 ON 15 秒 OFF をくり返ししながら 20 分間超音波破碎した後、遠心分離 (12,000 rpm、20 分) を行い、上清を精製に用いた。クロマトグラフィの担体として 5 mL の Ni-NTA Agarose (Qiagen、Manchester、UK) を用いた。クロマトグラフィは室温で行い、使用するサンプルとバッファーは氷上で冷却したものを使用した。平衡化バッファーでカラムを平衡化した後、サンプルをカラムに添加した。同じバッファーでカラムを洗浄し、タンパク質の溶出がなくなったことを NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) を用い 280 nm の吸光度を測定することで確認した。その後、50 mM のイミダゾールを含むバッファー (300 mM NaCl、50 mM Na₂HPO₄、50 mM イミダゾール、pH 7.5) をカラムに添加し、タンパク質を溶出させた。タンパク質の溶出がなくなったことを吸光度測定によって確認したのち、100 mM、250 mM のイミダゾールを含むバッファーを順にカラムに添加し、同様の操作を行った。各画分は、SDS-PAGE 電気泳動を行った後、CBB 染色によって目的のタンパク質の純度を確認した。また、得られたタンパク質の濃度は、280 nm の吸光度を測定し、各タンパク質のアミノ酸配列から推定されるモル吸光係数 (LIGH31_u1, 161,120 M⁻¹ cm⁻¹; CmGH31_u1, 186,670 M⁻¹ cm⁻¹) より算出した。

2-2-2-3. ゲル濾過クロマトグラフィ

Ni アフィニティクロマトグラフィによって精製したタンパク質をアミコンウルトラ 30K (Merck) を用いた限外濾過によって濃縮し、ゲル濾過クロマトグラフィに用いるバッファー (300 mM NaCl、50 mM Na₂HPO₄) に置換した。

カラムは、質量の測定のためには HiLoad 16/60 Superdex™ 200 prep grade (GE Healthcare Life Sciences) を使い、流速 1 mL/min で 1.2 カラム体積分溶出した。タンパク質の純度向上のためには、Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare Life Sciences) を使い、流速 0.6 mL/min で 1.5 カラム体積分溶出した。クロマトグラフィは、ÄKTA explorer 10S (GE Healthcare Life Sciences) を用いて行った。精製後のタンパク質は SDS-PAGE および CBB 染色によって確認した。

2-2-3. 加水分解活性の解析

2-2-3-1. 様々な pNP 化糖に対する活性の解析

GH31_u1 の基質特異性の解析のため、基質として、*p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (Merck), *p*-nitrophenyl α -D-xylopyranoside (Carbosynth, Berksher, UK), *p*-nitrophenyl α -D-mannopyranoside (Merck), *p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside (TCI, Tokyo, Japan), *p*-nitrophenyl α -L-fucopyranoside (N3628, Merck), *p*-nitrophenyl-N-acetyl- α -D-galactosaminide (Cayman Chemical, Michigan, USA), *p*-nitrophenyl α -L-rhamnopyranoside (Carbosynth) を用いた。

以降の pNP 化糖を基質とする活性測定ではすべて、反応液の総量を 50 μ L とし、酵素以外を混合した溶液 45 μ L に酵素溶液 5 μ L を加えることで反応を開始させ、100 μ L の 1 M 炭酸ナトリウムを加えて反応を停止した。その後、遊離 pNP に由来する 405 nm の吸光度を測定することで定量を行った。検量線の作成は、0–200 μ M の pNP 溶液 50 μ L に 100 μ L の 1 M 炭酸ナトリウムを加えて 405 nm の吸光度を測定し、x 軸に吸光度、y 軸に pNP 濃度をプロットして行った ($y = 155.2x$, $R^2=0.9982$)。

反応液の組成は、0.5 mM pNP 化糖、20 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0)、酵素 (LIGH31_u1 終濃度 34 μ g/mL、CmGH31_u1 終濃度 18 μ g/mL) とし、30°Cで一晩インキュベートした後に 405 nm の吸光度を測定した。

2-2-3-2. 薄層クロマトグラフィによる様々な糖に対する活性の解析

基質のスクリーニングのため、トレハロース (Nacalai Tesque)、コージビオース (Carbosynth)、ニゲロース (Carbosynth)、マルトース (Hayashibara, Okayama, Japan)、イソマルトース (TCI)、スクロースを用いた。10 mM の各種オリゴ糖に対し、0.1 mg/mL の酵素を 30°C、1 時間反応させた後、2 μ L の反応溶液を薄層クロマトグラフィ (thin layer chromatography, TLC) に供し生成物を確認した。酵素反応液の組成は表 2-5 に示した。

TLC は、サンプルを Silica Gel 60 F₂₅₄ アルミプレート (Merck) にスポットし、1-ブタノール:エタノール:水=10:5:2 の溶媒を用いて二回展開した。その後、ドライヤーでプレートを乾燥させ、5% (v/v) H₂SO₄ を含むメタノールを噴霧した後、ドライヤーで溶媒を揮発させ、ホットプレート (Corning, Tokyo, Japan) で加熱し、糖を検出した。

表 2-5. TLC 解析のための酵素反応液組成

試薬	液量	終濃度
100 mM 各種オリゴ糖	1 μ L	10 mM
100 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0)	2 μ L	20 mM
1 mg/mL 酵素溶液	1 μ L	0.1 mg/mL
超純水	6 μ L	-
計	10 μ L	

2-2-3-3. 遊離グルコース量の定量

グルコオリゴ糖を基質とした場合の加水分解反応の定量は、グルコースオキシダーゼ・ペルオキシダーゼ法 (GOD-POD 法) によって行った。2×バッファー (100 mM Na₂HPO₄) と基質の溶液、および酵素溶液をあらかじめ 30°C でインキュベートし、5 μ L の基質溶液に 5 μ L の酵素溶液を加えることで反応を開始した。ニゲロースの β -脱離による分解 (Chiku et al., 2020) を防ぐため、反応停止は 0.5 M の炭酸ナトリウム (pH 10.0) 10 μ L を加えることで行った。反応停止後、20 μ L の反応液に 100 μ L のグルコース CII テストキットを加えて、37°C で 15 分インキュベートした後、505 nm の吸光度を測定した。

2-2-3-4. 反応速度論値、温度・pH の影響の解析

GH31_u1 の酵素学的性質の評価には、基質として pNP- α -グルコシド (pNP- α -Glc) を用いた。

至適 pH の測定

反応液の組成は 40 μ g/mL の L1GH31_u1 または CmGH31_u1、0.5 mM pNP- α -Glc、50 mM McIlvaine バッファー (pH 3.0–8.0) またはグリシン-HCl バッファー (pH 9.0–10.0) とし、20 μ L の反応系で 30°C、5 分間酵素反応を行った (表 2-6)。

表 2-6. 至適 pH の測定のための酵素反応液組成

試薬	液量	終濃度
5 mM pNP- α -Glc	5 μ L	0.5 mM
62.5 mM バッファー	40 μ L	50 mM
400 μ g/mL L1GH31_u1 または CmGH31_u1	5 μ L	40 μ g/mL
計	50 μ L	

至適温度の測定

反応液の組成は 30 μ g/mL の L1GH31_u1 または 34 μ g/mL の CmGH31_u1、0.5 mM pNP- α -Glc、50 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0) とし、20 μ L の反応系で 25–55°C の間で 5 分間酵素反応を行った (表 2-7)。

表 2-7. 至適温度の測定のための酵素反応液組成

試薬	液量	終濃度
5 mM pNP- α -Glc	5 μ L	0.5 mM
500 mM バッファー	5 μ L	50 mM
300 μ g/mL L1GH31_u1 または 340 μ g/mL CmGH31_u1	5 μ L	-
超純水	35 μ L	-
計	50 μ L	

pH・温度安定性の測定

pH安定性の測定のため、500 µg/mLのLIGH31_u1を50mM McIlvaineバッファ (pH 3-8) またはグリシン-HClバッファ (pH 9.0-10.0) 中で4°C、24時間インキュベートした。

温度安定性の測定のため、300 µg/mLのLIGH31_u1を50 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0) 中で4-45°C、30分間インキュベートした。

その後、各条件にさらしたサンプルを用い、30 µg/mL LIGH31_u1、0.5 mM pNP-α-Glc、50 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0) で30°C、5分間酵素反応を行った。反応液の組成は酵素濃度以外表2-6に従った。

反応速度論値の測定

酵素濃度は、LIGH31_u1はニゲロースまたはニゲロテトラオースに対し62.0 nM、ニゲロトリオースに対し32.0 nM、マルトースに対し611 nM、マルトトリオースに対し1.55 µM、コージビオースに対し310 nM、pNP-α-Glcに対し49.0 nM、CmGH31_u1はニゲロースまたはニゲロトリオースに対し620 nM、pNP-α-Glcに対し124 nMとした。バッファはLIGH31_u1ではpH7.0、CmGH31_u1ではpH6.0の50 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄を用いた。基質濃度は、pNP-α-Glcは1、2、4、8、16 mM、ニゲロースは0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 mM、ニゲロトリオースおよびニゲロテトラオースは0.2、0.5、1、2、5、10 mM、マルトースおよびマルトテトラオースは1、2、5、10、20 mMとした。反応液は酵素以外の反応液の3.5倍以上の量を一度に混合した後、分注して用い、n≥3で行った。反応液の組成は表2-8と2-9に示す。カレイダグラフソフトウェア (Synergy Software) を用いて初速度 (v) をミカエリス・メンテン式に回帰し、反応速度論値を算出した (式1)。ここで、[S]は基質濃度、V_{max}は基質濃度が無限大のときの反応速度、K_mはv=V_{max}/2を与える基質濃度を表す。

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad \dots \text{式1}$$

表 2-8. pNP-Glc を基質とする反応速度論値測定のための酵素反応液組成

基質終濃度 (mM)	1	2	4	8	16
試薬					
20 mM pNP-Glc	2.5 μ L	5 μ L	10 μ L	20 μ L	40 μ L
100 mM buffer	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L
超純水	37.5 μ L	35 μ L	30 μ L	20 μ L	-
酵素溶液	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L
計	50 μ L				

表 2-9. オリゴ糖を基質とする反応速度論値測定のための酵素反応液組成

基質終濃度 (mM)	0.5	1	2	2.5	5	10	20
試薬							
100 mM 基質	-	-	-	-	-	-	2 μ L
50 mM 基質	-	-	-	-	1 μ L	2 μ L	-
10 mM 基質	-	1 μ L	2 μ L	2.5 μ L	-	-	-
2 mM 基質	2.5 μ L	-	-	-	-	-	-
100 mM buffer	2.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L
超純水	-	7.5 μ L	2.5 μ L	-	7.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L
酵素溶液	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L
計	10 μ L						

2-2-4. LIGH31_u1 の結晶化と X 線回折像の解析

アフィニティークロマトグラフィおよびゲル濾過クロマトグラフィによって精製した LIGH31_u1 を限外濾過によって 10 mM HEPES-NaOH (PH 7.0) にバッファ交換および濃縮 (10–20 mg/mL) し、結晶化用のサンプルとした。結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて行なった。はじめに、スクリーニングキット Crystal Screen kit, Crystal Screen 2 kit, PEG/Ion Screen kit, PEG/Ion 2 Screen kit (Hampton Research, California, USA) を用いて結晶化条件のスクリーニングを行

った。24 ウェルプレートに 200 μL のリザーバー溶液を入れ、シリコナイズしたスライドガラス上に 0.5 μL の酵素溶液と 0.5 μL のリザーバー溶液を混合したドロップを作り、グリスを用いてプレートとスライドガラスの間を密封した。プレートは、20°Cでインキュベートし、ドロップの様子を光学顕微鏡によって観察した。

スクリーニングによって結晶が得られた条件に関しては、同一組成または各化合物の濃度を少しずつ変えた溶液を調整し、酵素溶液とリザーバー溶液の体積比を 1 μL : 1 μL として同様に結晶化を行った。さらにそれらの条件に加え、Additive Screen (Hampton Research) を用いて添加剤の検討を行った。揮発性の添加剤に関しては、リザーバーおよびドロップの両方に 1/10 量の添加剤を加え、それ以外の添加剤はドロップのみにドロップの 1/10 量の添加剤を加えた。

結晶に X 線を照射する実験は、高エネルギー加速器研究機構ビームライン PF-AR NW12A および BL5A を利用して行なった。X 線照射による結晶の損傷を低減するため、-180°C の窒素ガスを吹き付けながら測定を行った。重原子を含まない結晶の測定条件は、測定温度約 100 K、X 線の波長 1.0000Å、露光時間 1 秒もしくは 0.5 秒、振動角 0.5°、合計撮影枚数 720 枚とした。抗凍結剤としては、リザーバーの組成に 35% PEG 3,350 または 20%のエチレングリコールまたは 20% グリセロールを含むものを検討した。

位相の決定を目的としたタンパク質の重原子標識のため、LIGH31_u1 の SeMet 置換体の結晶は、X 線の波長 0.9791 Å、露光時間 1 秒で、他の条件は同一として行った。また、野生型 LIGH31 の結晶を各種の重原子を含むリザーバー溶液に数分から 16 時間浸漬し、それらの原子に対応する X 線の波長で測定を行った。重原子試薬は HR2-442, HR2-444, HR2-446, HR2-448, HR2-450 (Heavy Atom Screens, Hampton Research) を用いた。

野生型酵素のグルコース複合体構造を得るために、100 mM グルコースを含むリザーバー溶液に結晶を 3 分-16 時間浸漬し、リザーバーの組成に 20%のエチレングリコールを含む溶液を抗凍結剤として用い、同じ測定条件で X 線を照射した。

オリゴ糖との複合体構造を得るため、精製した LIGH31_u1_D394A タンパク質を用いた。12-17 % PEG3,300、0.4 M クエン酸アンモニウム溶液に 10 mM のニゲロース、ニゲロトリオース、ニゲロテトラオース、コージビオース、マルトースのいずれかを含む溶液をリザーバーとして用い、酵素溶液とリザーバー溶

液の比を 1 μ L : 1 μ L として同様に結晶化を行った。

得られたデータは XDS (Kabsch, 2010) を用いて処理した。初期位相は、CCP4 に搭載されている Crank2 プログラム (Winn et al., 2011) を用いて、SeMet 置換 LIGH31_u1 の単一波長異常分散データセットを用いて計算した。その他の構造は、精密化した SeMet-LIGH31_u1 の座標を探索モデルとして、MOLREP (Vagin et al., 2010) を用いた分子置換法により決定した。構造の精密化とマニュアルモデル構築は CCP4i の REFMAC5 (Murshudov et al., 2011) および COOT (Emsley et al., 2010) を用いた。構造の評価には MolProbity サーバー (Williams et al., 2018) を利用した。分子モデルの描画には PyMOL ソフトウェア (<https://pymol.org/>) を利用した。

2-2-5. クライオ電子顕微鏡による LIGH31_u1 の構造解析

グリッドの作製から電子顕微鏡画像収集までは、主に高エネルギー加速器研究機構の安達 成彦 博士と川崎 政人 博士に行って頂き、画像の処理およびマップの構築は、主に守屋 俊夫 博士に行って頂いた。

300 mM の NaCl を含む 20 mM のリン酸ナトリウムバッファ (pH 7.0) に溶解した LIGH31_u1 (1.13 μ M、6 量体として計算) サンプル 3 μ L を、カーボングリッド (Quantifoil、Cu、R1.2/1.3、300 メッシュ) に塗布した。カーボングリッドは、PIB-10 を用いて空気中で 11 mA の電流で 30 秒間グロー放電を行い、親水性にしてから使用した。このグリッドを 18°C、湿度 100%、ブロット力 15 で 5 秒間ブロットし、Vitrobot Mark IV (FEI) を用いて液体エタンで瞬間凍結した。

200 kV で動作する Talos Arctica (FEI) 顕微鏡と自動データ収集用の EPU ソフトウェアを使用して、491 枚 (2021 年 6 月 10 日撮影) と 504 枚 (2021 年 6 月 13 日撮影)、合計 995 枚の顕微鏡画像を取得した。両セッションとも、動画フレームは、nominal magnification 120,000 倍で、electron counting モードで 4 k \times 4 k Falcon 3 の direct electron detector により収集し、ピクセルサイズは 0.88 \AA /ピクセルとした。1 \AA^2 あたり 1.00 電子の露光で、50e⁻/ \AA^2 の総露光量に相当する 50 フレームの動画を記録した。デフォーカス・ステップは -0.8, -1.2, -1.6, -2.0 μ m とした。

電子顕微鏡画像データの処理

動画フレームの位置合わせ、重み付け、平均化は MotionCor2 (Zheng et al., 2017) (RELION3.1 (Zivanov et al., 2018) に実装されているバージョン) を用いて行った。動画は、5 \times 5 フレームのアライメントを行い、B-factor 200 を適用してビームによる対象の動きを補正し、exposure-dependent フィルターを用いて放射線損傷を補正した。積算モーションが 60 \AA を超えた顕微鏡写真は廃棄した。重み付け前の動画を Gctf (Zhang 2016) プログラム (ボックスサイズ 512 ピクセル、最小分解能 30 \AA 、最大分解能 4 \AA 、振幅コントラスト 0.10) による CTF 推定によって処理し、線量重み付けを行い、以降の画像処理に使用した。まず、CTF の最大解像度が 5.5 \AA 以上の画像を選択した。粒子は、一般化モデル (Wagner et al., 2019; Moriya et al., 2017) を用いた SPHIRE crYOLO を用いて、0.1 のしきい値を用いて収集した。その後の 2 次元分類、*ab initio* 再構成、3 次元分類、3 次元精密化、CTF 精密化、ベイズ研磨、局所分解能推定は RELION3.1 を用いて行った。

各 3D 精密化後の global resolution の推定には、0.143 を基準とするゴールドスタンダード FSC 解像度 (Rosenthal and Henderson 2003) を使用し、ソルベントマスク (Chen et al., 2013) によるアーティファクトな解像度の向上を考慮した位相ランダム化を行った。model-to-map マップの FSC 解像度は phenix.mtriage (Afonine et al., 2018) を用いて計算した。出力された 2D/3D 画像を可視化するために、UCSF Chimera と EMAN2 (Tang et al., 2007) の e2display.py を使用した。SPARX/SPHIRE (Penczek et al., 2014; Hohn et al., 2007) に実装されている ctflimit 関数 (Hohn et al., 2007) を使用して、データセットの最大デフォーカス値に対して予想される解像度までの逆数空間において、CTF エイリアシングが発生しないことを保証する最小のボックスサイズを計算した。

上記の手法で得られたマップにフィットするモデルの構築は、phenix ソフトウェアを用いて行い、構造の評価には MolProbity (Williams et al., 2018) を利用した。

2-3. 結果

2-3-1. タンパク質の大腸菌異種発現と各種クロマトグラフィーによる精製

LIGH31_u1 および CmGH31_u1 は Ni アフィニティークロマトグラフィーによって精製することができた(図 2-2)。LIGH31_u1 に関しては、50–100 mM のイミダゾールを含むバッファーによって溶出され、大腸菌培養液 1 L あたり 3–5 mg のタンパク質 (ゲル濾過後の収量) が得られた。CmGH31_u1 は 250 mM のイミダゾールを含むバッファーによって溶出された画分でのみ単一のバンドが確認され、収量は Ni アフィニティークロマトグラフィー後の段階で大腸菌培養液 1 L あたり約 0.1 mg と非常に低かった (図 2-2 D)。

Ni アフィニティークロマトグラフィーによって得られた LIGH31_u1 をゲル濾過クロマトグラフィーに供した結果、LIGH31_u1 のアミノ酸配列から計算される質量が 86 kDa であるのに対し、ゲル濾過クロマトグラフィーによって計測された質量は 453 kDa (モノマーの 5.26 倍) であった (図 2-3 A)。

結晶化実験に用いるため、触媒残基に変異を導入した不活性化変異体である LIGH31_D341A、LIGH31_D394A の精製を試みた結果、両者は 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することができたゲル濾過クロマトグラフィーの結果、LIGH31_D341A は複数のピークが見られ、変異導入が高次構造の形成に影響を与えたと考えられたため、LIGH31_D394A 変異体のみを実験に使用した。(図 2-3 B)。

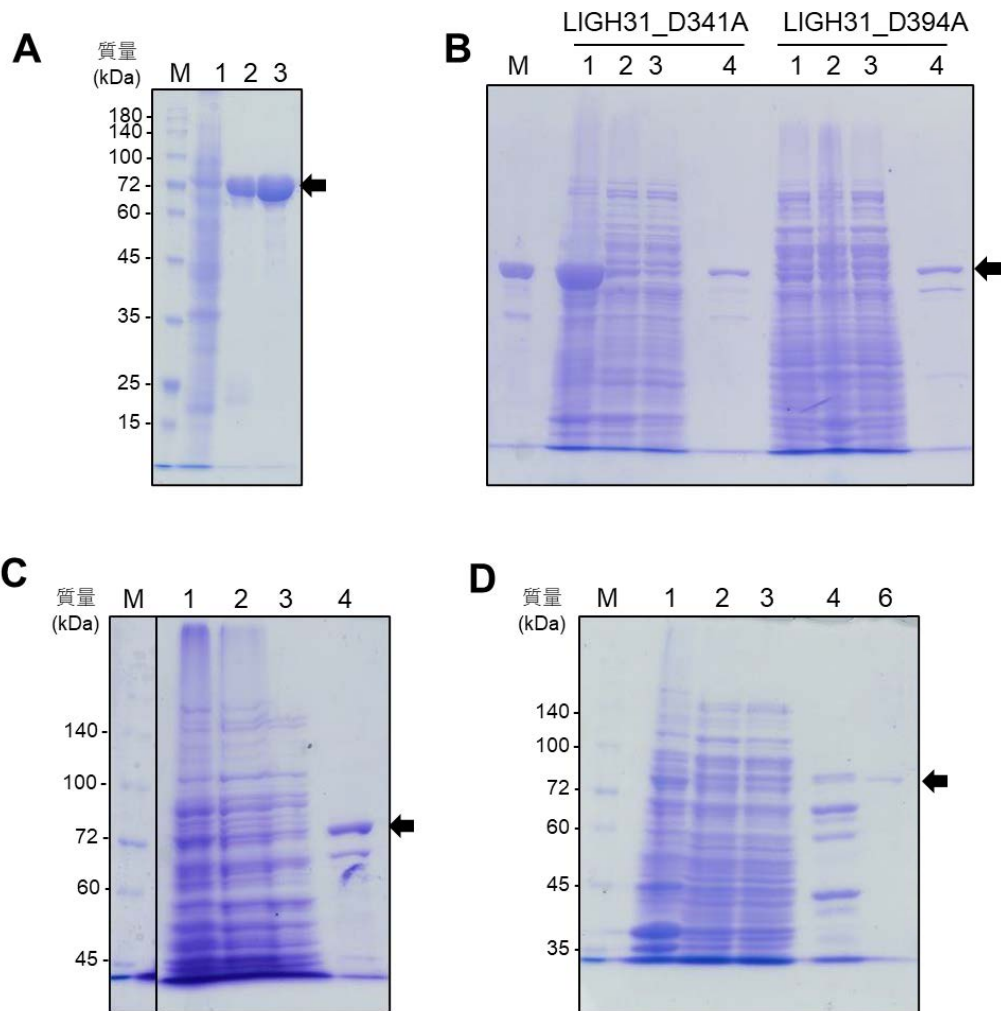


図 2-2. GH31_u1 の精製

A) LIGH31_u1 の精製画分。理論上の質量は 85.7 kDa である。M, 質量マーカー; 1, 大腸菌破碎液上清; 2, Ni アフィニティークロマトグラフィ 100 mM イミダゾール溶出画分; 3, ゲル濾過クロマトグラフィによる精製後のサンプル。B) LIGH31_u1 触媒残基変異体の精製画分。M, LIGH31_u1 WT 精製標品; 1, 大腸菌破碎液上清; 2, 大腸菌破碎液沈殿; 3, Ni アフィニティークロマトグラフィ素通り画分; 4, 100 mM イミダゾール溶出画分。C) LIGH31_Y99F の精製画分。M, 質量マーカー; 1, 大腸菌破碎液上清; 2, 大腸菌破碎液沈殿; 3, Ni アフィニティークロマトグラフィ素通り画分; 4, 100 mM イミダゾール溶出画分。D) CmGH31_u1 の精製画分。理論上の質量は 90.7 kDa である M, 質量マーカー; 1, 大腸菌破碎液上清; 2, 大腸菌破碎液沈殿; 3, Ni アフィニティークロマトグラフィ素通り画分; 4, 100 mM イミダゾール溶出画分; 5, 250 mM イミダゾール溶出画分。質量マーカーは PM1700 を用いた。

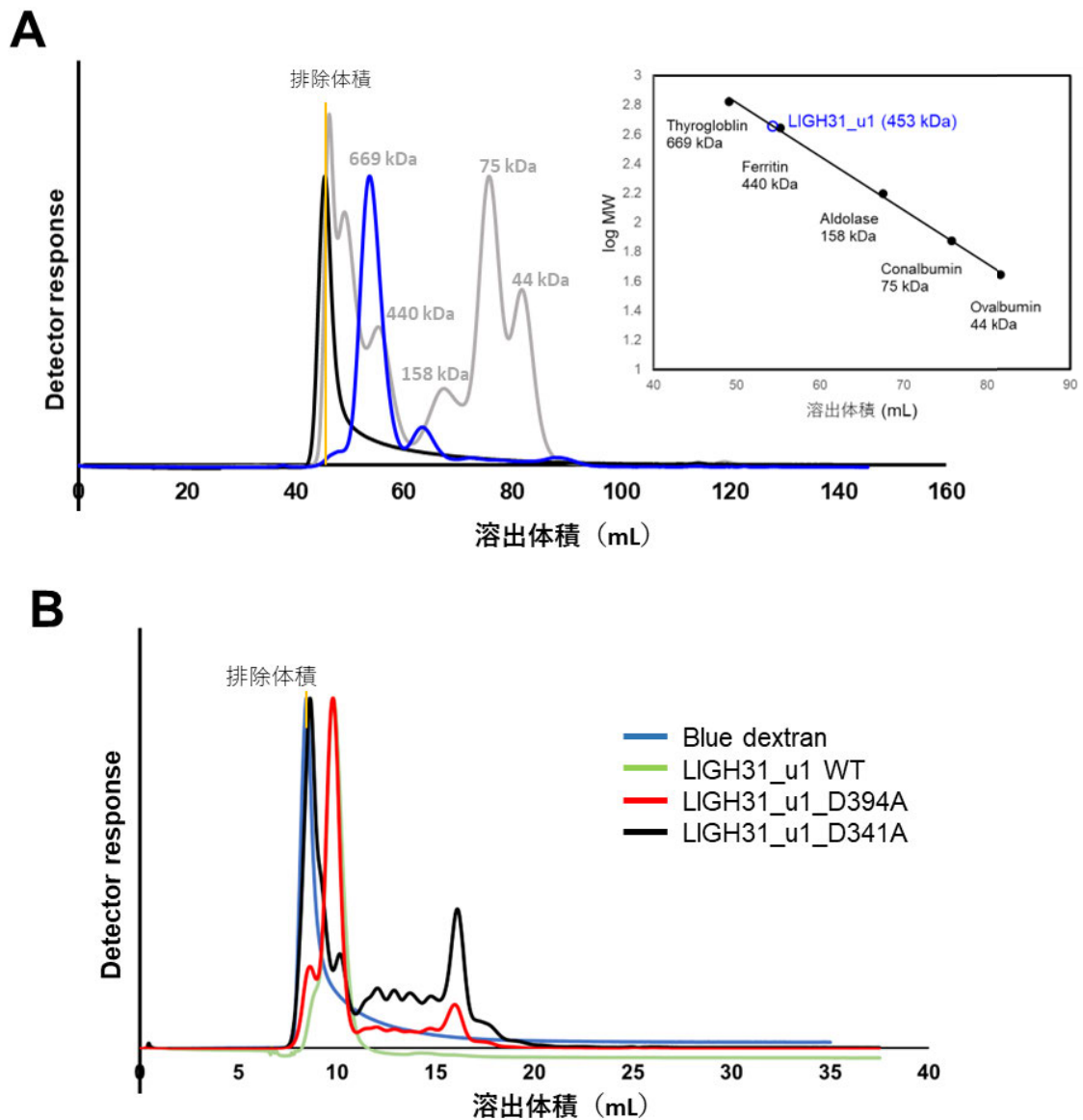


図 2-3. ゲル濾過クロマトグラムと検量線

A) LIGH31_u1 WT のゲル濾過クロマトグラム。カラムは HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade を用いた。線の色とサンプルの対応は以下の通りである。LIGH31_u1 WT, 青; ブルーデキストラン 2000, 黒; 質量マーカー (thyroglobulin, ferritin, aldolase, conalbumin, ovalbumin), 灰色。B) LIGH31_u1 WT、LIGH31_u1 D394A、LIGH31_u1 D341A のクロマトグラム。カラムは Superdex 200 Increase 10/300 を用いた。

2-3-2. 基質特異性の解析

LIGH31_u1 および CmGH31_u1 を様々な pNP 化糖に作用させた結果、いずれも pNP- α -Glc に対してのみ加水分解活性を示した。そこで、収率が高かった LIGH31_u1 を、二分子のグルコースが α -(1 \leftrightarrow 1)- α で結合したトレハロース、 α -(1 \rightarrow 2)で結合したコージビオース、 α -(1 \rightarrow 3)で結合したニゲロース、 α -(1 \rightarrow 4)で結合したマルトース、 α -(1 \rightarrow 6)で結合したイソマルトース、スクロース (β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glcp) に対して作用させ、TLC にて反応産物を確認したところ、ニゲロースに最も高い活性を示し、コージビオース、マルトースの加水分解も確認された (図 2-4)。

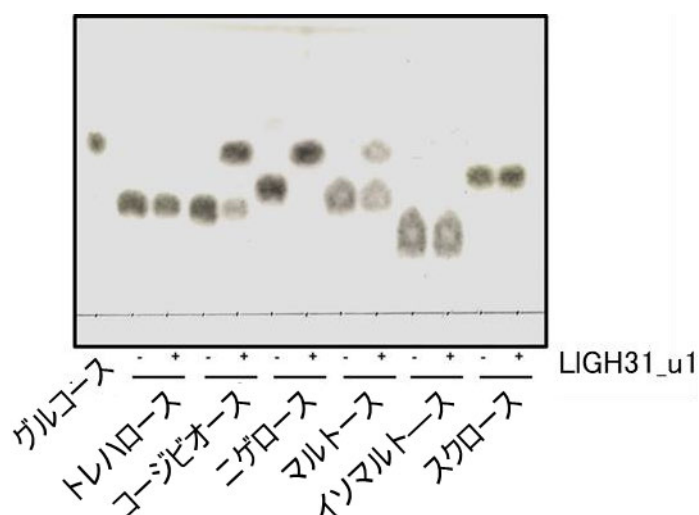


図 2-4. LIGH31 の各種二糖に対する加水分解活

LIGH31_u1 (0.1 mg/ml) を 10 mM の二糖 (トレハロース、コージビオース、ニゲロース、マルトース、イソマルトース、スクロース (冒頭の化合物一覧参照)) と共に 30 °C で 1 時間インキュベートした。グルコース標準品と反応混合物を 1-ブタノール/エタノール/水 (10:5:2, vol/vol) で TLC プレート上に展開し、5% H₂SO₄ を含むメタノールを噴霧した後加熱して発色させた。

また、いずれの酵素も、ニゲロースに加え、ニゲロトリオース (三糖)、ニゲロテトラオース (四糖) をよく加水分解した。マルトオリゴ糖に対して酵素反応を行った結果、反応の初期段階でグルコースを遊離したことから、LIGH31_u1 は非還元末端からグルコースを遊離する、エキソ型の酵素であることが明らか

になった (図 2-5)。そこで、グルコースオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ (GOD-POD) 法によって遊離したグルコースの量を測定することにより、オリゴ糖に対する活性の定量を行う事とした。

LIGH31_u1 および CmGH31_u1 を、 α -(1 \rightarrow 3)-結合と α -(1 \rightarrow 4)-結合でグルコースが連なった不溶性の多糖であるニゲランに作用させたところ、TLC、GOD-POD 法のいずれの手法によっても糖の遊離は確認されなかった。

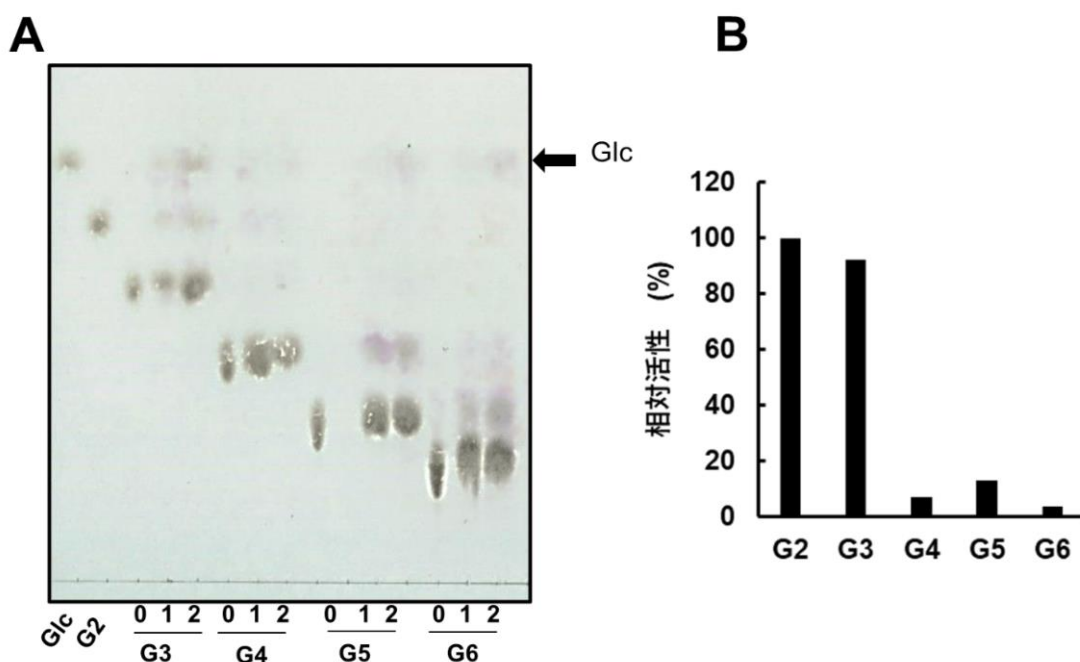


図 2-5. マルトオリゴ糖に対する LIGH31_u1 の加水分解活性

A) TLC による反応産物の解析。1, 酵素なし; 2, 10 分反応; 3, 30 分反応。グルコースのスポットを赤矢印で示した。B) GOD-POD 法による加水分解活性の定量結果。マルトースに対する活性を 100%としてグラフを作成した。G2, マルトース; G3, マルトトリオース; G4, マルトテトラオース; G5, マルトペンタオース; G6, マルトヘキサオース

2-3-3. 酵素学的性質の解析

酵素に対する温度と pH の影響を測定したところ、LIGH31_u1 は、pH7.0、35°Cで最も高い活性を示した。安定性を測定した結果、pH5-8 の間では 80%以

上の活性を保持し、30°Cで30分インキュベートした後は4°Cで保存した時と同等の活性を保持していた(図2-6)。CmGH31_u1は、pH6.0、40°Cで最も高い活性を示した(図2-7)。

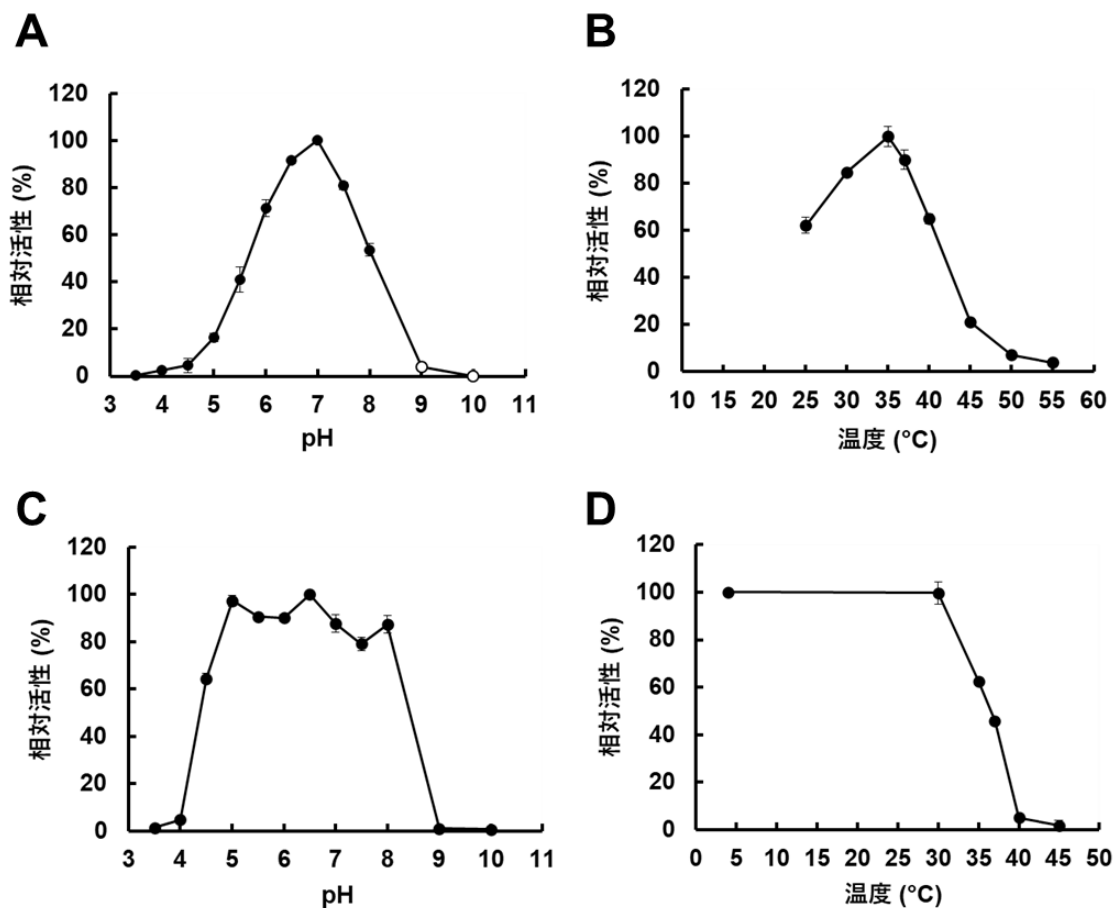


図 2-6. LIGH31_u1 の活性に対する温度と pH の影響

pNP- α -Glc を基質として、LIGH31_u1 の pH 依存性 (A)、温度依存性 (B)、pH 安定性 (C)、熱安定性 (D) を測定した。pH 依存性は pH3.5–8.0 の McIlvaine バッファー中 (黒点)、または pH9.0–10 のグリシン-HCl バッファー中 (白点) で測定した。温度依存性は 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.0)、25°C–55°C で評価した。pH 安定性は pH3.5–8.0 の McIlvaine バッファーまたは pH9.0–10、4°C のグリシン-HCl バッファー中で 24 時間インキュベート後、30°C で測定した。耐熱性は 50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) 中 4°C–45°C でインキュベート後、30°C で測定した。

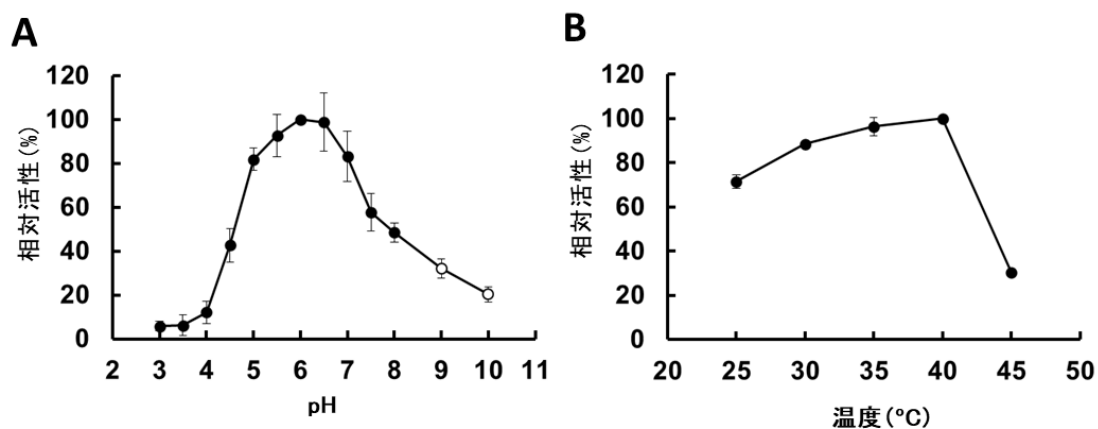


図 2-7. CmGH31_u1 の活性に対する温度と pH の影響

pNP- α -Glc を基質として、CmGH31_u1 の pH 依存性 (A) と温度依存性 (B) を測定した。pH 依存性は pH3.5–8.0 の McIlvaine バッファー (黒点)、または pH9–10 のグリシン-HCl バッファー (白点) で測定した。温度依存性は 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.0)、25°C–55°C で測定した。

至適 pH、至適温度条件における LIGH31_u1 および CmGH31_u1 の各種グルコ二糖およびスクロースに対する活性を測定した結果、いずれもニゲロースに対してのみ高い比活性を示し、その他の糖に対しては、低い活性しか示さなかった (表 2-10)。

表 2-10. 各種 α グルコ二糖に対する GH31_u1 酵素の活性

基質	LIGH31_u1 WT		CmGH31_u1	
	比活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	相対活性 ^a (%)	比活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	相対活性 (%)
トレハロース	ND ^b	ND	ND	ND
コージビオース	0.34 ± 0.02	5.2	$(2.4 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	4.2
ニゲロース	6.3 ± 0.5	100	$(5.6 \pm 0.7) \times 10^{-2}$	100
マルトース	$(10 \pm 0.8) \times 10^{-3}$	0.16	$(8.2 \pm 3.8) \times 10^{-3}$	1.47
イソマルトース	$(2.9 \pm 3.5) \times 10^{-3}$	0.045	$(8.4 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	1.52
スクロース	ND	ND	ND	ND

^a 各酵素のニゲロースに対する活性を 100%とした。

^b ND, not detected.

続いて、両酵素が活性を示した基質に対して、至適 pH、至適温度条件における反応速度論値を測定した (表 2-11)。その結果、LIGH31_u1 のニゲロースに対する K_m 値は 9.2 ± 0.6 mM、 k_{cat} 値は 9.7 ± 0.3 s⁻¹であった。一方で、コージビオースに対しては、 K_m 値はニゲロースとほぼ同等だったものの、 k_{cat} 値が約 1/10 程度となっており、触媒効率 (k_{cat}/K_m) が約 1/10 となっていた。また、マルトースに対しては、 K_m 値に加え k_{cat} 値も低くなっており、その結果、触媒効率がニゲロースの 2%程度となっていた。

鎖長特異性に関しては、LIGH31_u1 はニゲロトリオース (三糖) >ニゲロテトラオース (四糖) >ニゲロース (二糖) の順に高い触媒効率を示した。一方で、マルトオリゴ糖に対しては、鎖長が長くなる程触媒効率が低くなった (表 2-11)。

また、CmGH31_u1 は、pNP- α -Glc やその他の基質に対して LIGH31_u1 の 1/100 程度の活性しか示さなかったが、 K_m 値は、ニゲロースに対して 6.3 ± 0.6 mM と、LIGH31_u1 と同等の値を示した。

表 2-11. 各種基質に対する GH31_u1 酵素の反応速度論値

酵素	基質	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} mM^{-1}$)	Relative k_{cat}/K_m (%) ^a
LIGH31_u1 WT	pNP- α -Glc	20 ± 0.8	31 ± 0.7	1.5 ± 0.08	145
	ニゲロース	9.2 ± 0.6	9.7 ± 0.3	1.1 ± 0.2	100
	ニゲロ トリオース	3.1 ± 0.4	8.1 ± 0.4	2.6 ± 0.3	246
	ニゲロ テトラオース	2.9 ± 0.2	5.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2	182
	コージビオース	8.2 ± 0.4	1.1 ± 0.02	$(1.4 \pm 0.05) \times 10^{-1}$	13
	マルトース	36 ± 1.9	$(7.9 \pm 0.2) \times 10^{-1}$	$(2.2 \pm 0.03) \times 10^{-2}$	2.1
	マルト トリオース	39 ± 2.7	$(6.2 \pm 0.2) \times 10^{-1}$	$(1.6 \pm 0.09) \times 10^{-2}$	1.5
	マルト テトラオース	82 ± 17	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-1}$	$(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	0.2
CmGH31_u1	pNP- α -Glc	4.7 ± 0.8	4.1 ± 0.3	$(8.9 \pm 2) \times 10^{-1}$	
	ニゲロース	6.3 ± 0.6	$(4.5 \pm 0.3) \times 10^{-1}$	$(7.2 \pm 1) \times 10^{-2}$	
	ニゲロ トリオース	2.0 ± 0.6	$(4.7 \pm 0.3) \times 10^{-1}$	$(2.3 \pm 0.4) \times 10^{-1}$	

^a 野生型 LIGH31_u1 の k_{cat}/K_m 値を 100% とした。

2-3-4. LIGH31_u1 の X 線結晶構造解析

タンパク質の結晶化条件のスクリーニングの結果、塩として 0.2 M のクエン酸ナトリウム、クエン酸リチウム、クエン酸カリウム、クエン酸アンモニウムのいずれかを用い、pH は 7–8、沈殿剤として 12–20% (w/v) の PEG3,500 を用いる条件で、羽状の結晶 (図 2-8 A) が生じた。また、添加剤のスクリーニングの結果、終濃度 3% (w/v) のキシリトール、エリスリトール、グルコース、または、終濃度 0.1 M の NaCl、KCl、LiCl を添加すると直方体の結晶 (図 2-8 B) が生じやすくなった。さらに、塩濃度を 0.4 M にした条件では、添加剤の有無に関わらず結晶形は六角形となった (図 2-8 C)。

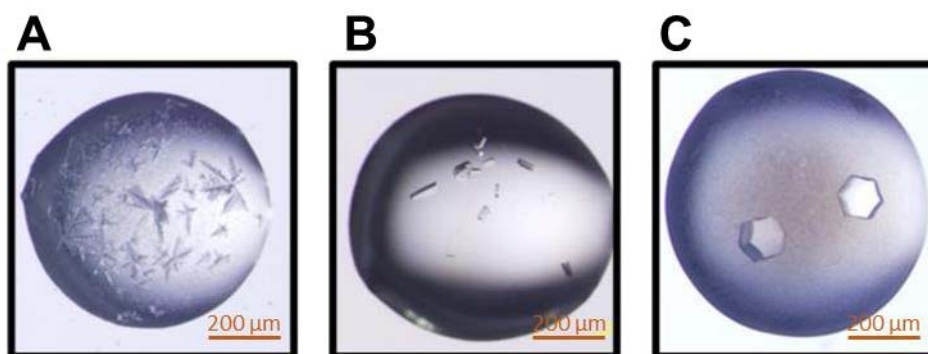


図 2-8. LIGH31_u1 の結晶

A) 0.2M クエン酸リチウム 17% PEG3350 の条件で得られた結晶。B) クエン酸アンモニウム 0.2M、17% PEG3350、3% (w/v) キシリトールの条件で得られた結晶。C) 0.4M クエン酸アンモニウム 12% PEG3350 の条件で得られた結晶。

高エネルギー加速器研究機構の設備を利用し、得られた結晶の X 線回折像を得た。17%, PEG3350, 0.2 M クエン酸アンモニウム (pH 7.0)、3%キシリトールの条件で生じた四角形の結晶を 20%のエチレングリコールを含むリザーバー溶液を抗凍結剤として用いたもの (条件 2、四角形) で分解能 2 Å のデータが得られた。また、12% PEG3350、0.4 M クエン酸リチウム、3%エリスリトールの条件で生じた結晶を、20%のエチレングリコールを含むリザーバー溶液を抗凍結剤として用いたもの (条件 1、六角形) で、再現良く良好な回折像が得られた。両

者の空間群と格子定数は異なり、六角形の結晶は空間群 $P6_322$ 、四角形の結晶は空間群 $P2_1$ に属していた (表 2-12)。

様々な重原子標識を試みた結果、SeMet 置換体結晶より得られた回折像を用いて、単波長異常分散法によって位相を決定することができた。得られた構造 (WT_SeMet) を鋳型にした分子置換法によって、アポ構造 (WT_ $P6_322$ 、分解能 1.75 Å)、グルコース複合体構造 (WT_Glc、2.00 Å)、ニゲロース複合体構造 (D394A-Nig2、1.75 Å)、ニゲロトリオース複合体構造 (D394A_Nig3、1.80 Å)、ニゲロテトラオース複合体構造 (D394A_Nig4、1.80 Å)、コージビオース複合体構造 (D394A_Koj2、1.80 Å) の構造を決定した。データ収集と精密化の指標は表 2-12 に示した。マルトースおよびフッ化グルコースとの共結晶化を行ったサンプルからも 2.00 Å 前後の分解能の回折像が得られ、モデルの構築が可能であったが、目的とするマルトースおよび共有結合中間体の電子密度が確認できなかったため、精密化を行わなかった。

表 2-12. データコレクションとリファインメント統計値

	WT_SeMet	WT_P2 ₁	WT_P6 ₃ 22	WT_Glc	D394A-Nig2	D394A-Nig3	D394A-Nig4	D394A-Koj2
Data collection								
Beamline	AR-NW12A	AR-NW12A	AR-NW12A	AR-NW12A	BL5A	BL5A	AR-NW12A	AR-NW12A
Wavelength (Å)	0.9791	0.9791	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Space group	<i>P</i> _{6₃22}	<i>P</i> _{2₁}	<i>P</i> _{6₃22}	<i>P</i> _{6₃22}	<i>P</i> _{6₃22}	<i>P</i> _{6₃22}	<i>P</i> _{6₃22}	<i>P</i> _{6₃22}
Cell dimensions								
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	151.9, 151.9, 177.3	115.4, 207.9, 117.9	151.6, 151.6, 176.6	151.4, 151.4, 177.3	151.4, 151.4, 177.2	152.0, 152.2, 117.7	151.8, 151.8, 177.7	151.7, 151.7, 177.7
α , β , γ (°)	90, 90, 120	90, 103.6, 90	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120
Resolution range (Å)	50–2.05 (2.16–2.05)	50–1.75 (1.84–1.75)	50–1.85 (1.95–1.85)	50–2.00 (2.11–2.00)	50–1.75 (1.84–1.75)	50–1.80 (1.90–1.80)	50–1.80 (1.90–1.80)	50–1.80 (1.90–1.80)
Measured reflections	3,040,423	3,635,745	2,006,600	3,211,165	2,381,021	2,192,135	2,190,359	2,192,732
Unique reflections	75,900	529,214	101,843	81,029	120,135	111,675	111,334	111,324
Completeness (%)	100 (100) ^a	98.0 (97.0)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)
Redundancy	40.1 (40.6)	6.9 (6.9)	19.7 (18.6)	39.6 (40.3)	19.8 (20.0)	19.6 (20.2)	19.7 (18.9)	19.7 (18.9)
Mean <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	33.5 (5.6)	13.6 (1.5)	24.7 (3.0)	42.0 (4.7)	30.4 (2.9)	30.5 (2.6)	22.2 (3.3)	25.0 (2.8)
<i>R</i> _{merge}	0.123 (0.962)	0.092 (1.240)	0.091 (1.144)	0.091 (1.151)	0.067 (1.191)	0.072 (1.505)	0.095 (1.068)	0.090 (1.235)
CC _{1/2} (7)	1.000 (0.950)	0.999 (0.642)	1.000 (0.882)	1.000 (0.947)	1.000 (0.869)	1.000 (0.841)	1.000 (0.882)	1.000 (0.848)
Refinement statistics								
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}		0.185/0.216	0.161/0.184	0.181/0.208	0.166/0.190	0.176/0.194	0.167/0.189	0.170/0.191
RMSD ^b								
Bond length (Å)		0.010	0.010	0.012	0.011	0.010	0.010	0.010
Bond angles (°)		1.640	1.577	1.695	1.613	1.595	1.575	1.563
Number of atoms								
Protein		36,097	6,023	6,025	6,017	6,003	6,014	6,017
Ligand		107	27	43	62	53	65	55
Water		2879	577	351	552	480	638	580
Average <i>B</i> (Å ²)								
Protein		31.6	33.7	41.0	34.0	37.5	31.6	32.3
Ligands		30.3	54.5	45.3	43.2	37.9	42.9	40.8
Water		33.6	39.5	39.5	37.7	38.7	36.9	36.3
Ramachandran plot								
Favored (%)		95.38	95.25	94.92	96.46	96.97	96.30	96.15
Outliers (%)		0.02	0.14	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00
Clash score		2.47	1.35	1.51	1.59	1.51	1.34	1.26
PDB codes		7WJ9	7WJA	7WJB	7WJC	7WJD	7WJE	7WJF

^a 最高分解能のシェルのパラメータを括弧内に示した。

^b Root mean square deviation.

2-3-5. LIGH31_u1 の全体構造

空間群 $P6_322$ の結晶構造 (WT_ $P6_322$) では、タンパク質分子は、結晶学的非対称単位中に一分子存在していた。空間群 $P2_1$ の結晶構造 (WT_ $P2_1$) では、結晶学的非対称単位中に 6 分子の LIGH31_u1 が存在しており、そのモノマーの立体構造は、空間群 $P6_322$ の構造とほぼ同一であった (図 2-9 A)。また、活性部位には、添加剤として加えたキシリトールの電子密度が見られたため、キシリトールが結合した状態のモデルを作成した。

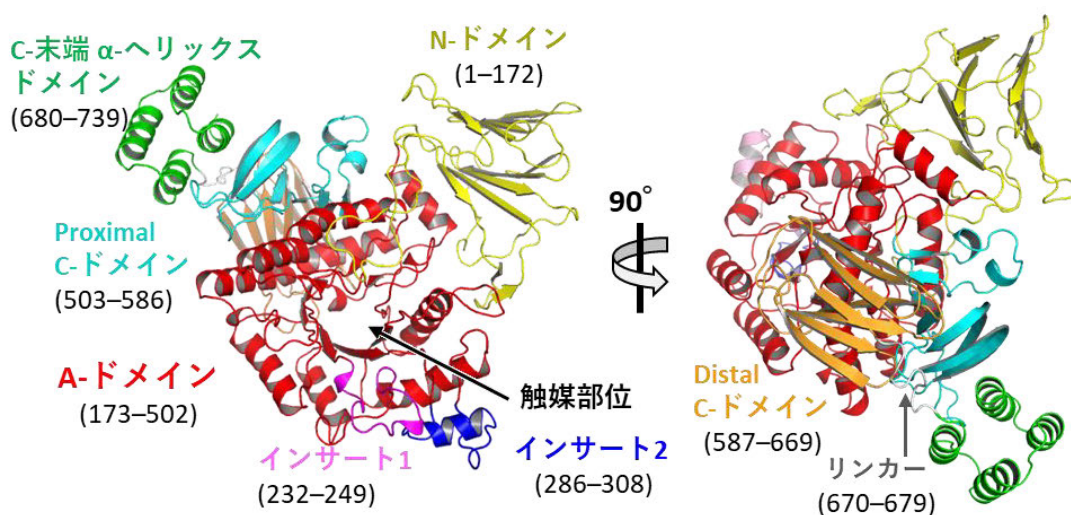


図 2-9. LIGH31_u1 の全体構造

ドメインの色分けは以下の通りである。N-ドメイン (残基番号 1-172), 黄色; A-ドメイン (残基番号 173-502); インサート 1 (残基番号 232-249); インサート 2 (残基番号 286-308), 赤; proximal C-ドメイン (残基番号 503-586), シアン; distal C-ドメイン (残基番号 587-669) オレンジ; C末端の α -ヘリックスドメイン (残基番号 680-739)

結晶学的非対称単位中に一分子しか存在しなかった $P6_322$ 空間群の結晶構造も、対称軸に対する回転操作によって $P2_1$ の結晶構造と同一の六量体を形成した。PBDePISA サーバー (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/pistart.html>) を用いた安定性評価の結果、LIGH31_u1 は 6 量体状態で単量体よりも安定することが示され、この結果はゲル濾過クロマトグラフィの結果とも一致した。

GH31 ファミリーでは、大腸菌の α -キシロシダーゼ YicI と *Sulfolobus solfataricus* の α -グルコシダーゼ MalA は 6 量体を形成していると報告されている (Lovering et al., 2005; Ernst et al., 2006)。しかし、LIGH31_u1 の 6 量体の会合はそれらとは異なっていた (図 2-10 B, C)。

LIGH31_u1 の単量体の表面積は、 29597 \AA^2 で、六量体を形成した場合、そのうち 5265 \AA^2 が六量体形成に関わると見積もられた。また、C 末端の α -ヘリックスドメイン同士は疎水性相互作用および水素結合によって相互作用しており、このドメインは 6 量体形成に重要であると考えられた (図 2-11)。

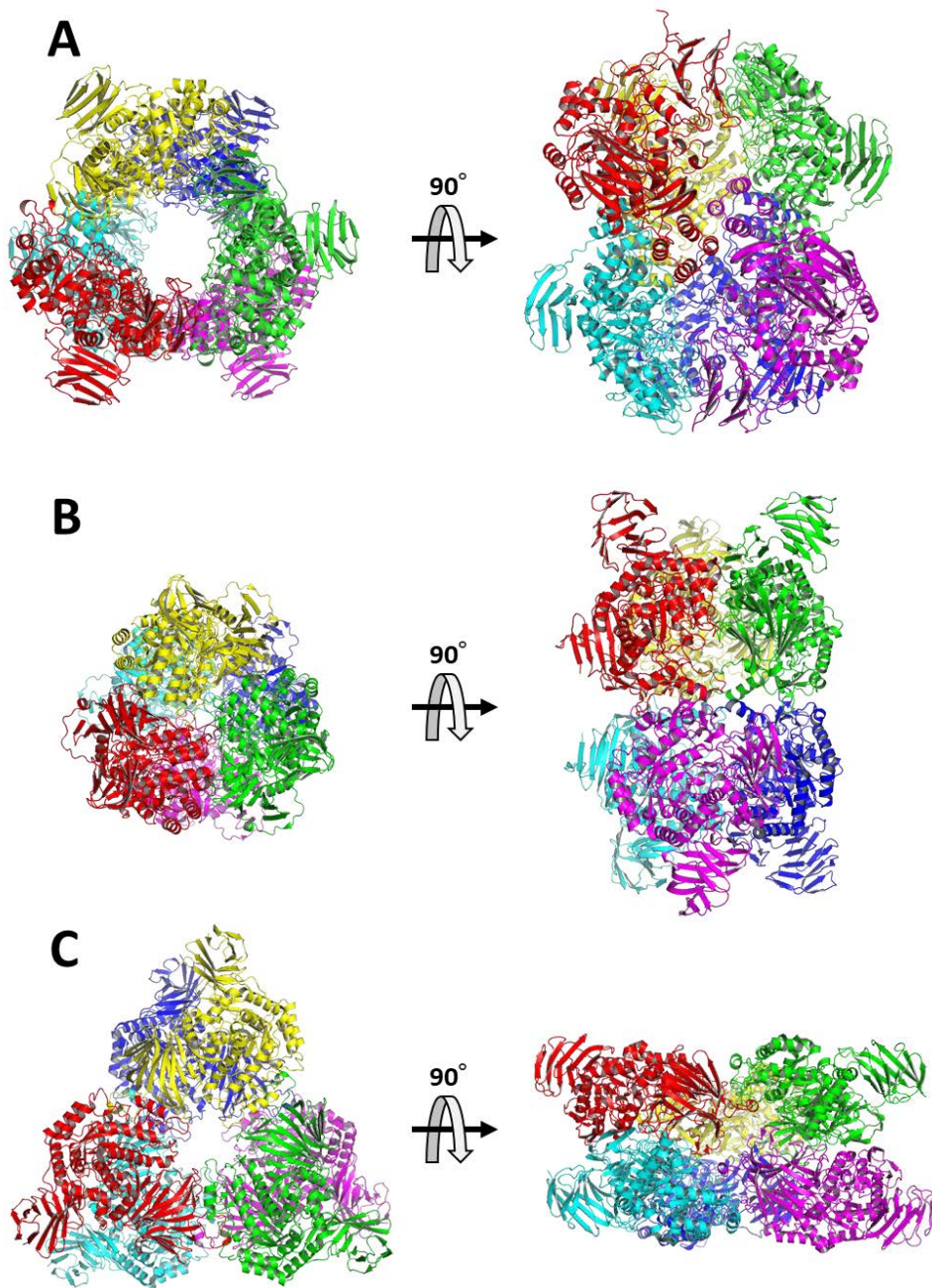


図 2-10. LIGH31_u1 の六量体構造と他の GH31 六量体酵素の比較

A) 空間群 $P2_1$ の結晶の LIGH31_u1 六量体構造。Chain A (赤色) のみにおいて N 末端のポリペプチド鎖 (SKYMN) の電子密度が確認された。B) *S. solfataricus* 由来 MalA (PDB 2G3M)。C) *E. coli* 由来 YicI (PDB 1XSJ)。

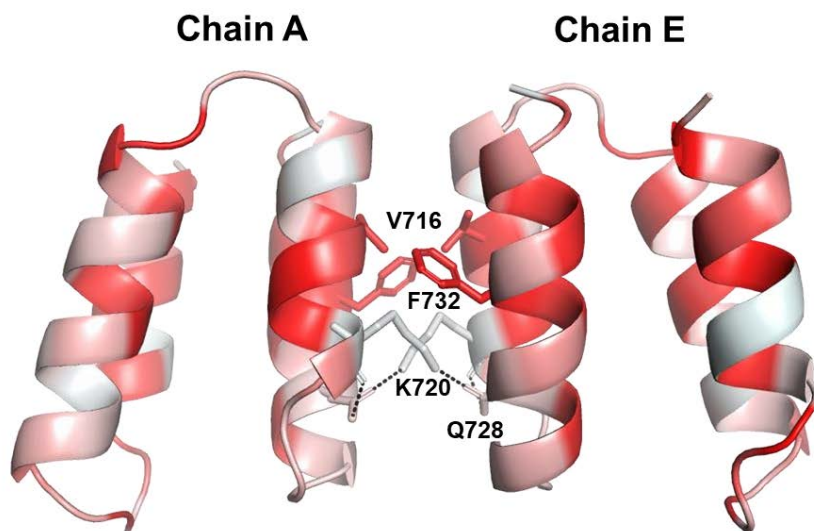


図 2-11. C 末端 α ヘリックスドメイン同士の界面

C 末端 α ヘリックスドメインの構造をリボンモデルで示し、水素結合 (Lys720 と Gln728) と疎水性相互作用 (Val716 と Phe732) を形成するアミノ酸残基の側鎖をスティックモデルで示した。破線は水素結合を示す。アミノ酸残基は PyMOL color h スクリプト (https://pymolwiki.org/index.php/Color_h) を用いて疎水性に基づいて色付けした。

LIGH31_u1 は、GH31 に共通してみられる β -サンドウィッチ構造の N 末端ドメイン (N ドメイン, 残基番号 1–172)、 $(\beta/\alpha)_8$ -バレル構造の触媒ドメイン (A-ドメイン, 残基番号 173–502)、proximal C-ドメイン (残基番号 680–739)、distal C-ドメイン (残基番号 587–669) に加え、C 末端に 4 本の α -ヘリックスからなる、他の GH31 に見られないドメイン (残基番号 680–739) を有していた。また、A-ドメインには、インサート 1 (残基番号 232–249) インサート 2 (残基番号 286–308) の二か所の挿入部位が存在した。

空間群 $P6_322$ の結晶構造をクエリーとして DALI サーバー (Holm et al., 2010) で構造類似性検索を行ったところ、*Bacteroides ovatus* 由来の α -キシロシダーゼ (BoGH31; PDB 5JOV; Z = 33.1; アミノ酸配列相同性 = 23%) の Z スコアが最も高く、次いで *Trueperella pyogenes* 由来の環状四糖 (シクロニゲロシルニゲロース) 分解酵素 (TpCADE; PDB 5I0G; Z = 32.1; 同一性 = 19%) と他の GH31 酵素がヒッ

トした。DALI の結果には、GH31 ファミリーに属する *Chaetomium thermophilum* var. *thermophilum* 由来の小胞体 α -グルコシダーゼ II (CtGII, 5DKY, Z = 28.1; 相同性 = 19%) も含まれていた。

C 末端 α -helix ドメインのみをクエリーとして DALI 検索を行った結果、毛髪や光受容細胞に発現し、音や光の知覚に必須な whirlin タンパク質の harmonin homology ドメイン 2 (PDB 6FDD, Z = 5.8) と最も高い構造類似性を持つことが明らかになった。しかし、両者のアミノ酸配列相同性は 12% と低かった。また、cerebral cavernous malformations 2 タンパク質の harmonin homology ドメイン (PDB 4FQN) は、二量体形成に関与していることが報告されている (Fisher et al, 2013)。これらのタンパク質は LIGH31_u1 とは活性は全く異なっているが、 α -ヘリックスドメインがオリゴマー形成に寄与している点が類似していた。

2-4-6. LIGH31_u1 のリガンド複合体構造

2-4-6-1. グルコース複合体構造

以降は、Davis らの定義に基づき、オリゴ糖の加水分解点より非還元末端の糖が結合する部位をサブサイト-側、還元末端側をサブサイト+側と呼び、サブサイト-1、サブサイト+1、サブサイト+2、サブサイト+3 のように表記する (Davis et al 1997)。また、対応するサブサイトに結合したグルコース残基をそれぞれ Glc-1、Glc+1、Glc+2、Glc+3 と呼ぶ (図 2-12)。

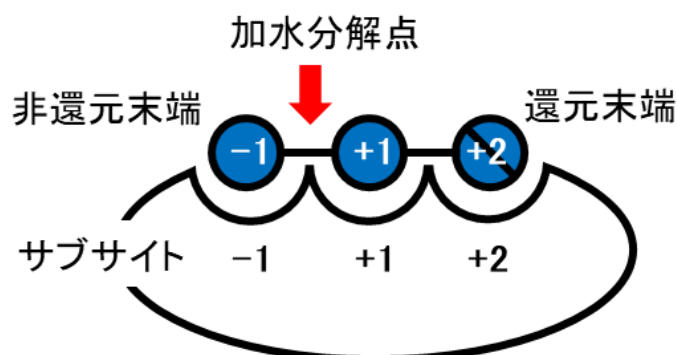


図 2-12. サブサイトの模式図

グルコースは青色の丸で示し、還元末端のグルコースに斜線を記した。

結晶を 100 mM のグルコースを含む溶液に浸漬することによって、野生型 LIGH31_u1 とグルコースの複合体構造を 2 Å の分解能で決定した。活性部位には、 α 、 β 両方のアノマーの電子密度が見られたため、両方のモデルを構築して精密化を行なった (図 2-13 A)。

グルコースの C1 原子近傍に位置する Asp341 と Asp394 は、他の GH31 酵素と同様に、それぞれ求核触媒残基、酸/塩基触媒残基と考えられた (図 2-13 B)。また、LIGH31_u1 の変異体 D341A および D394A を作製し、pNP- α -Glc に対する活性を測定したところ、WT の 1% に活性が低下していた。

リガンドが分解されるのを防ぐため、D394A 変異体を用いて結晶化実験を行い、以降のリガンド複合体構造の決定を行った。

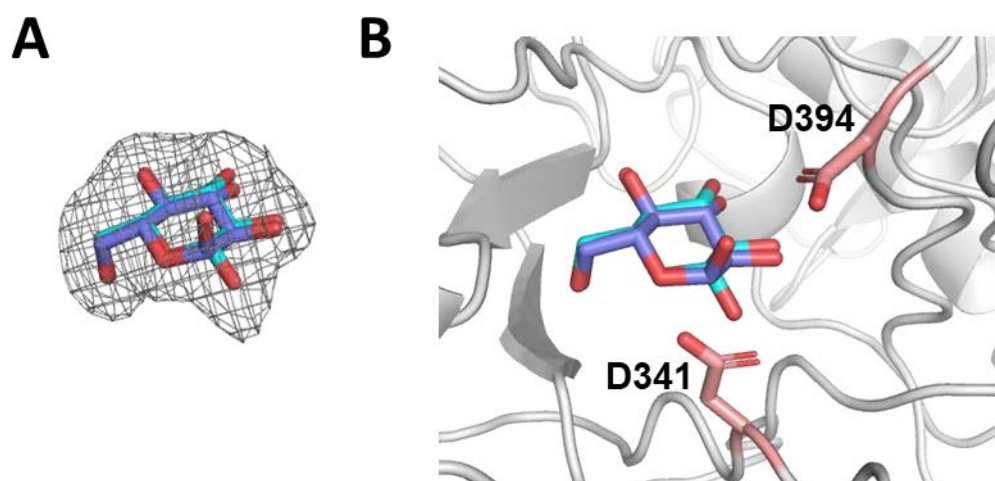


図 2-13. WT_Glc の活性部位周辺の構造

A) グルコースの電子密度マップ。B) WT_Glc の活性部位周辺。グルコースの α -アノマーを青色、 β -アノマーをシアンスティックモデルで示した。

2-4-6-2. D394A 変異体のリガンド複合体構造

酸塩基触媒残基変異体 (D394A) では WT と同じ条件で再現良く結晶が得られたため、これを用いてニゲロース (D394A-Nig2)、ニゲロトリオース (D394A-Nig3)、ニゲロテトラオース (D394A-Nig4)、コージビオース (D394A-Koj2) との複合体の構造を決定した (図 2-14)。また、リガンド結合の有無によってタンパク質の構造に大きな変化は生じなかった二乗平均平方根偏差 (RMSD) は 0.083–0.106 Å。

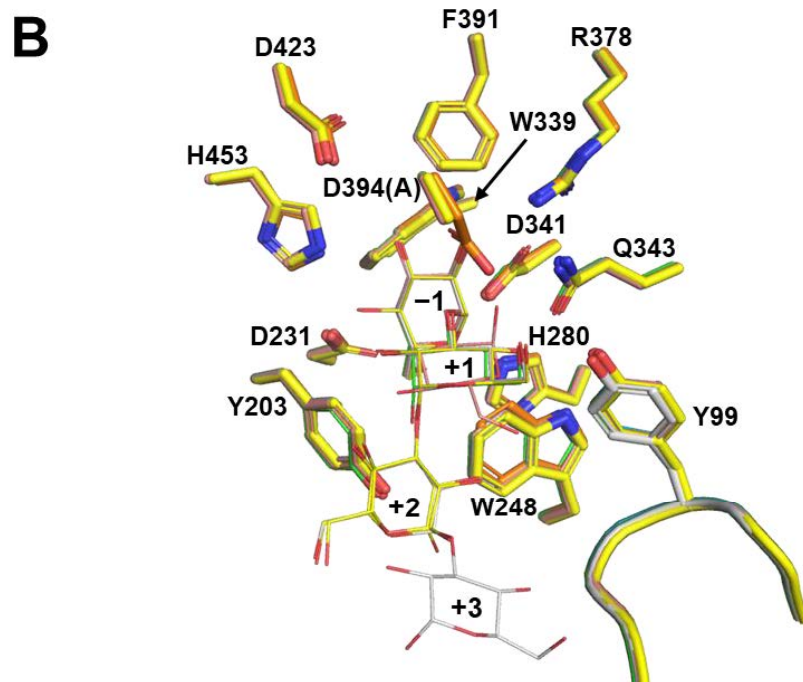
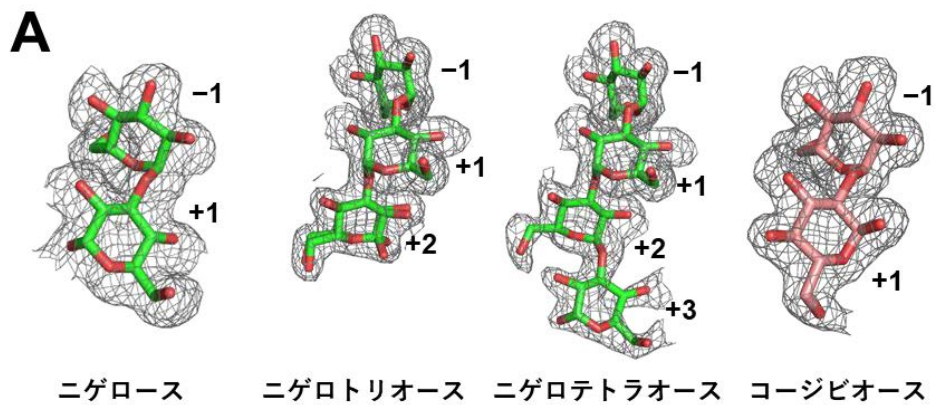


図 2-14. リガンド複合体構造

A) D394A 変異体の各複合体に結合したリガンドのスティックモデルとその電子密度マップ。数字は、後述のサブサイトに対応している。B) WT_P6₃22 (オレンジ)、WT_Glc (シアン)、D394A_Nig2 (緑)、D394A_Nig3 (黄)、D394A_Nig4 (白)、D394A_Koj2 (ピンク) の結晶構造の重ね合わせ。基質認識に関与する残基はスティックモデルで示した。

2-4-6-3. ニゲロオリゴ糖複合体構造

サブサイト-1 においては、すべてのリガンド (グルコース、ニゲロース、ニゲロトリオース、ニゲロテトラオース、コージビオース) の Glc-1 がほぼ同じように活性部位ポケットに収容され、図 2-15 A に示すような水素結合と疎水性相互作用を介して周囲の残基によって認識されていた。

サブサイト+1 では、A-ドメインの触媒部位との 3 つの水素結合に加え、隣接するプロトマーの N-ドメイン上の Tyr99 がニゲロオリゴ糖の Glc+1 の 4-OH 基と水素結合を形成していた (図 2-15 A)。

WT_P2₁ の単量体および D394A-Nig3 のリガンド複合体構造では、Ser455 の 2 つの異なるロタマーの電子密度が観察された。そのうち一方のロタマーはリガンドと相互作用しないが、他方は Glc+1 の 2-OH および Glc+2 の 4-OH と水素結合を形成していた (図 2-15 A)。

一方、D394-Nig4 の構造においては、ニゲロテトラオースの Glc+3 は触媒ポケットからはみ出していた (図 2-15 B)。このことから、LIGH31_u1 のサブサイト+3 には厳密には基質を認識しないと考えられた。

LIGH31_u1 が Glc+2 とも相互作用していたことは、ニゲロースよりも、ニゲロトリオースとニゲロテトラオースに対して低い K_m 値を示したことと合致している。

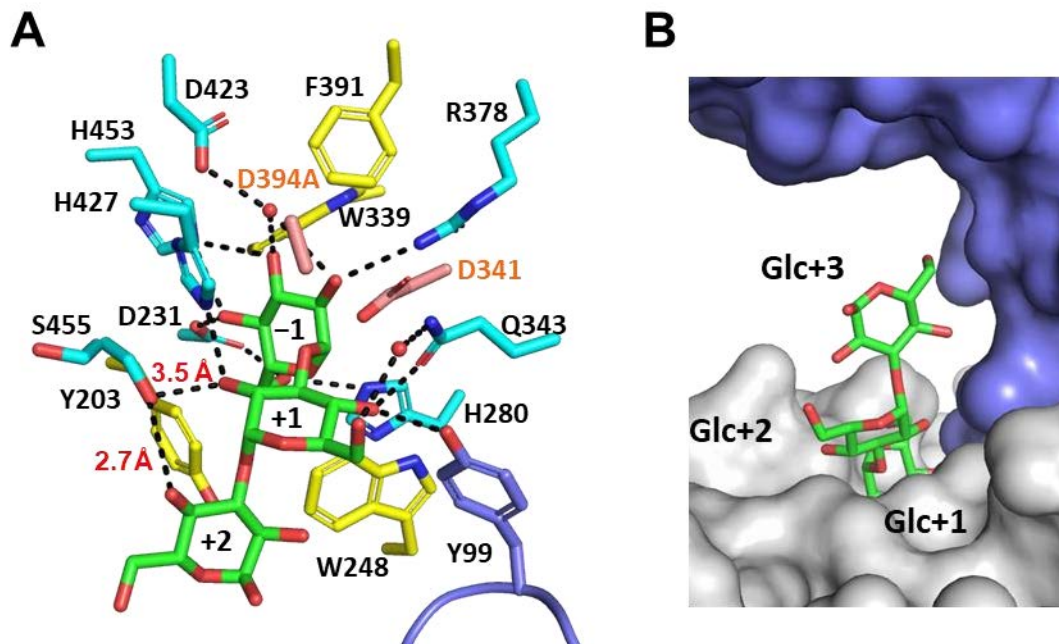


図 2-15. ニゲロオリゴ糖複合体構造

A) D394A-Nig3 の活性部位。ニゲロトリオースと相互作用するアミノ酸残基の側鎖をスティックモデルで示す。水素結合を形成する残基はシアン、疎水性環境を形成する残基は黄色、ニゲロトリオースは緑色で示した。水分子は赤い球モデルで、水素結合は破線で示した。B) D394A-Nig4 の表面モデル。ニゲロテトラオースを緑のスティックモデルで、隣接するプロトマーを青色で示した。

2-4-6-4. コージビオース複合体構造

D394A-Koj2 構造では、Glc+1 は D394A-Nig2 と同じ 4C_1 コンフォメーションをとっているが、その糖の環が反転した形になっている (図 2-16)。そのため、ニゲロース複合体において Glc+1 の 2 位ヒドロキシ基と相互作用していた His427 が、コージビオース複合体では Glc+1 の 3-ヒドロキシ基と水素結合を形成していた。また、ニゲロース複合体において Glc+1 の 2 位ヒドロキシ基と水素結合を形成する Gln343 は、ニゲロース複合体において α -コージビオース Glc+1 の軸上の 1-OH 基と相互作用する。しかし、隣接するサブユニットの Tyr99 とコージビオースとの相互作用は見られなかった。

以上のことから、D394A-Koj2 構造においてニゲロースが活性部位に結合する上で立体障壁は認められなかった。しかし、D394A-Koj2 と WT_P6322 を重ね合わせると、Asp394 とコージビオースの 1-O 間の距離は 1.2Å と推定され、立体障害が生じることが示された。コージビオースが WT の触媒部位にどのように結合するかは不明であるが、 β -コージビオースが WT の酵素に結合するか、あるいはコージビオースのグリコシド結合がプロトンの受容に適した位置になく、その結果代謝回転数が低くなっている可能性が示唆される。

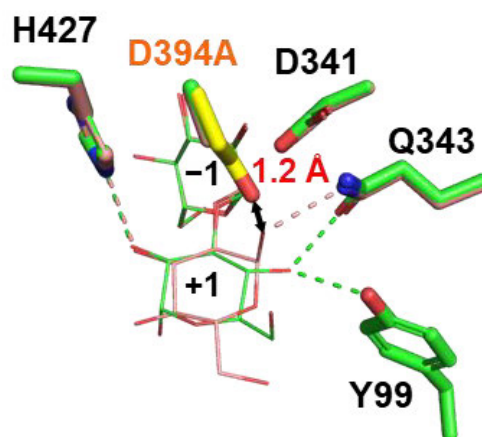


図 2-16. D394A-Nig2 と D394A-Koj2 の重ね合わせ

D394A-Nig2 を緑、D394A-Koj2 をピンクで示し、WT_P6322 の一般的酸/塩基 Asp394 (黄色) の側鎖も重ねて示した。リガンドは細いスティックモデルで示し、Glc+1 と水素結合を形成するアミノ酸残基は太いスティックモデルで示した。Asp394 の OD2 原子とコージビオースの Glc+1、O1 原子間の距離 (1.2Å) を二重矢印で示した。

2-3-7. クライオ電子顕微鏡構造

22.8 μM のタンパク質溶液サンプルを用いクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) 画像を撮影したところ粒子の形がはっきりと見える電子顕微鏡画像が得られたが、タンパク質粒子同士の間隔が狭く、同一の向きの粒子が多いため、解析には適さなかった (図 2-17 A, B)。タンパク質濃度を検討した結果、タンパク質濃度を 1/20 の 1.11 μM にすることでタンパク質の向きが改善され、様々な角度の粒子の画像が得られたため、この条件で連続測定を行ない、合計 995 枚の画像を得た。さらに、画像処理によってノイズを除くことで図 2-17 C のような画像が得られた。

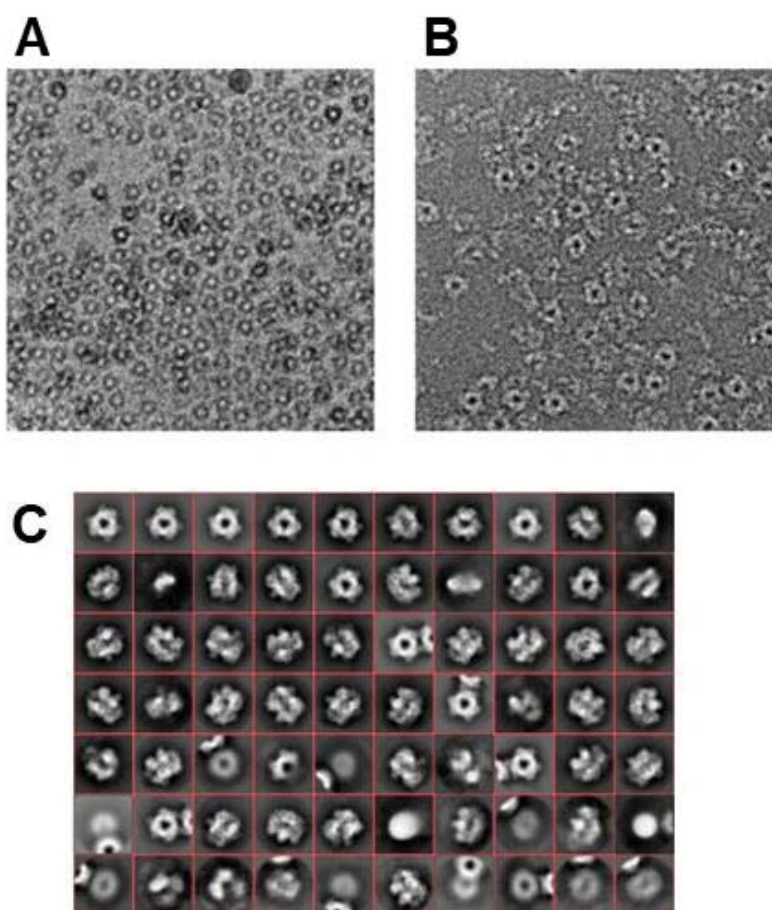


図 2-17. LIGH31_u1 の Cryo-EM 画像

A) タンパク質濃度 22.8 μM の電子顕微鏡画像。 B) タンパク質濃度 1.11 μM の電子顕微鏡画像; C) 画像処理によってノイズが除かれた粒子。

最終的に 44,606 粒子を使い、D3 対称性を導入した処理によって平均分解能 2.73Å のマップが得られた。フーリエシェルの相関 (FSC) プロットおよびマップの分解能を図 2-18 に示した。

得られたマップを用いて LIGH31_u1 のアポ構造のモデルから、クライオ電顕構造のモデルを構築した。リファインメントの指標は表 2-13 に示した。

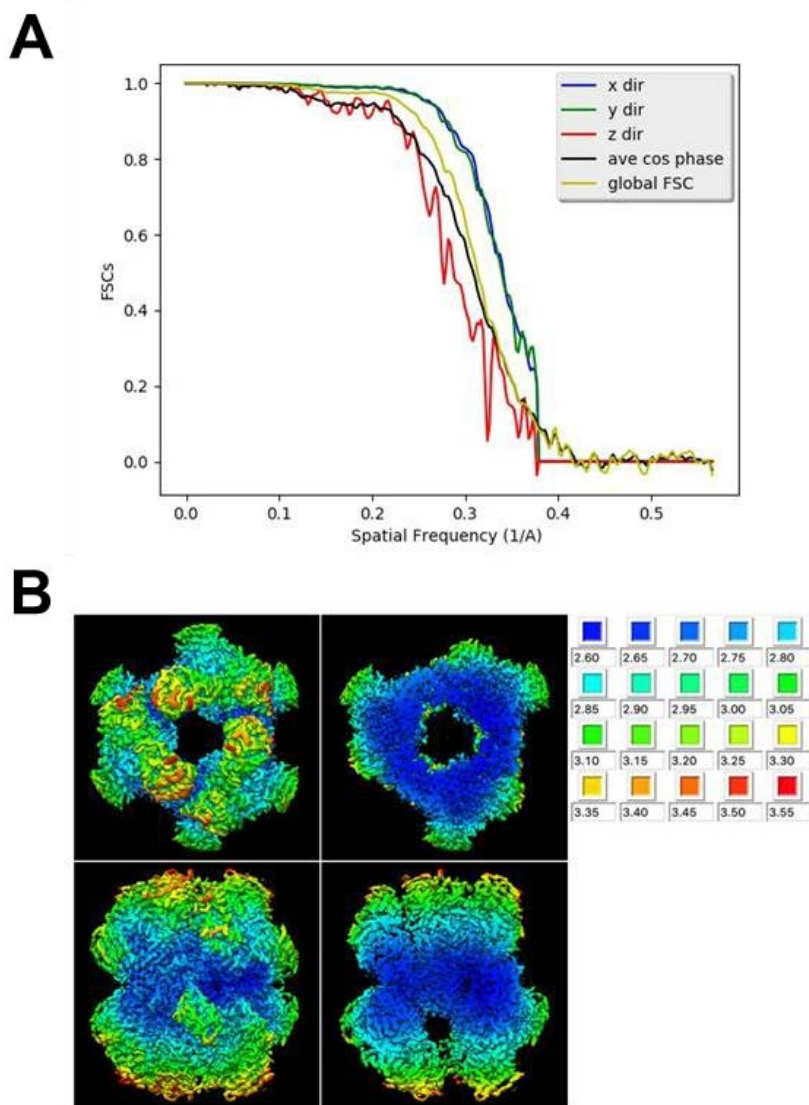


図 2-18. Cryo-EM による単粒子解析の指標

A) LSC プロット。線の色とプロットの対応は以下の通りである。緑, Unmasked Maps; 青, Masked Maps; Phase Randomized Masked Maps。B) 局所分解能マップ。

表 2-13. Cryo-EM 構造のリファインメント指標

(EMDB/PDB ID)	LIGH31_u1 (EMDB-32571/7WLG)
Data collection and processing	
Microscope	Talos Arctica
Voltage (kV)	200
Detector	Falcon 3EC
Magnification	120,000
Pixel size (Å)	0.88
Automation software	EPU
Total exposure (e-/Å ²)	50
Exposure rate (e-/Å ² frames)	1.00
Number of frames	50
Defocus range (µm)	-0.8, -1.2, -1.6, -2.0
Number of collected micrograph	995 (491 + 504)
Number of particles for Class2D	267,294 (139,450 + 127,844)
Number of particles for Class3D	244,657 (127,990 + 116,667)
Number of particles for Refine3D	44,606
Symmetry imposed	D3
Map resolution (Å)	2.73
FSC threshold	0.143
Map resolution range (Å)	2.60-5.04
Refinement	
Initial model used (PDB code)	7WJA
Model composition	
Non-hydrogen atoms	35928
Protein residues	4368
Ligands	0
<i>B</i> factors (Å ²)	
Protein	53.8
Ligand	0
Map-model CC	
CC (mask)	0.87
CC (box)	0.78
CC (peaks)	0.74
CC (volume)	0.84
R.M.S. deviations	
Bond lengths (Å)	0.003
Bond angles (°)	0.495
Validation	
MolProbity score	1.55
Clash score	6.1
Rotamer outliers (%)	0.0
Ramachandran plot	
Favored (%)	96.7
Allowed (%)	3.4
Outliers (%)	0.0

Cryo-EM 構造でも、LIGH31_u1 は六量体構造を取っていた (図 2-19)。Cryo-EM 構造と結晶構造は類似しており、両者の $C\alpha$ 原子間の二乗平均平方根偏差 (RMSD) は 1.340 Å であった。

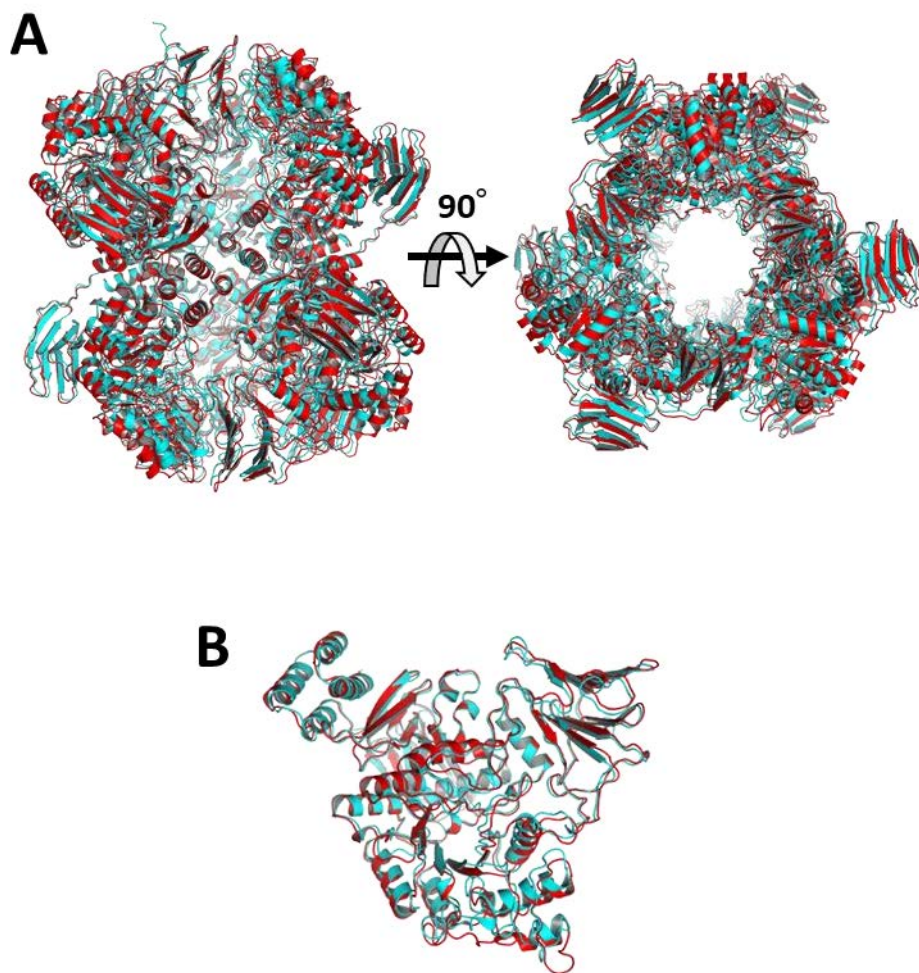


図 2-19. LIGH31_u1 の Cryo-EM 構造と結晶構造

LIGH31_u1 の Cryo-EM 構造 (赤) と空間群 $P2_1$ の結晶構造 (シアン) の重ね合わせ。A, 六量体; B, 単量体

2-3-8. LIGH31_u1 の Tyr99 変異体の解析

構造解析の結果から、Tyr99 がニゲロースと相互作用し、基質認識に関与していると考えられたため、Tyr99 をフェニルアラニンに置換した変異体 (LIGH31_u1_Y99F) を作製し、精製を行った。Y99F も大腸菌発現を行い、WT 酵素と同じ方法で精製することが出来た。精製した酵素を用いて、まず初めに様々な基質に対する活性を測定したところ、LIGH31_u1_Y99F 変異体のニゲロースに対する相対活性は、WT の約 1/2 に低下していた。しかし、予想に反して、Y99F は WT 酵素と同じ基質を好んで加水分解した。すなわち、ニゲロース >> コージビオース > マルトース > イソマルトースに活性を示し、トレハロースとスクロースに対しては活性を示さなかった (表 2-14)。

表 2-14. LIGH31_u1 Y99F 変異体の各種基質に対する比活性

基質	LIGH31_u1 WT		LIGH31_u1 Y99F	
	比活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	相対活性 ^a (%)	比活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	相対 活性 (%)
トレハロース	ND ^b	ND	ND	ND
コージビオース	0.34 ± 0.02	5.2	$(49 \pm 0.7) \times 10^{-3}$	1.3
ニゲロース	6.3 ± 0.5	100	3.9 ± 0.2	100
マルトース	$(10 \pm 0.8) \times 10^{-3}$	0.16	$(20 \pm 11) \times 10^{-3}$	0.53
イソマルトース	$(2.9 \pm 3.5) \times 10^{-3}$	0.045	$(5.4 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	0.15
スクロース	ND	ND	ND	ND

^a 各酵素のニゲロースに対する活性を 100%とした。

^b ND, not detected.

続いて、LIGH31_u1_Y99F が活性を示した pNP- α -Glc、ニゲロース、ニゲロトリオースに対する反応速度論値を測定した (表 2-15)。その結果、LIGH31_u1_Y99F のニゲロースに対する K_m 値に大きな変化は見られず、 k_{cat} が約 1/2 になっていた。このため LIGH31_u1_Y99F では、ニゲロースに対する活性が低くなったと考えられ、表 2-12 の比活性測定の結果と合致する (表 2-15)。

一方で、LIGH31_u1_Y99F は pNP α -Glc に対しては K_m にほとんど変化がないものの k_{cat} 値が上昇しており、WT よりも高い相対活性を示した。

表 2-15. 各種基質に対する GH31_u1_Y99 酵素の反応速度論値

酵素	基質	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} mM^{-1}$)	相対活性 k_{cat}/K_m (%) ^a
LIGH31_u1 Y99F	pNP- α -Glc	28 ± 0.8	59 ± 0.8	2.1 ± 0.02	204
	ニゲロース	12 ± 2.0	5.2 ± 0.4	$(4.3 \pm 0.2) \times 10^{-1}$	38
	ニゲロトリオース	2.0 ± 0.2	4.9 ± 0.4	2.3 ± 0.9	221
LIGH31_u1 WT	pNP- α -Glc	20 ± 0.8	31 ± 0.7	1.5 ± 0.08	145
	ニゲロース	9.2 ± 0.6	9.7 ± 0.3	1.1 ± 0.2	100
	ニゲロトリオース	3.1 ± 0.4	8.1 ± 0.4	2.6 ± 0.3	246

^a 野生型酵素のニゲロースに対する k_{cat}/K_m を 100%とした。

2-4. 考察

2-4-1. 基質特異性

CAZy データベースによれば、 α -グルコシダーゼは GH4、13、31、63、76、97、122 のファミリーより報告があるが、その中でも α -1,3-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.84) は GH31 および 63 にのみ報告がある。しかし、GH63 の α -1,3-glucosidase である YgjK はニゲロースに対する K_m 値が 230 ± 90 mM と高いことや、そのリガンド複合体の結晶構造から、Ygjk の α -1,3-glucosidase 活性は副次的なものであると示唆されている (Kurakata et al, 2008; Miyazaki et al., 2013)。

GH31 ファミリーでは、小胞体グルコシダーゼ II、バクテリア *Lactobacillus johnsonii* 由来の GH31 酵素である LjAG31 (Kang et al., 2009)、環状四糖加水分解酵素 (CADE) (Tagami et al., 2016; Light et al., 2016) が α -(1 \rightarrow 3)グルコシド結合に高い特異性を持つ加水分解酵素として知られている。

小胞体グルコシダーゼ II は、小胞体において新生糖タンパク質に付加された N 型糖鎖の非還元末端 Glc- α -(1 \rightarrow 3)-Glc および Glc- α -(1 \rightarrow 3)-Man のグルコシド結合を加水分解する酵素であり (図 2-20)、ニゲロースに対しても加水分解活性を示すが、マルトースに対しても 27-50%の活性を示すことが知られている (Caputo et al., 2016, Okuyama et al., 2017)。これは、小胞体グルコシダーゼ II がマルターゼ等の消化酵素と同一起源を有し、小胞体内に α -(1 \rightarrow 4)-グルコシド結合が存在せず、 α -(1 \rightarrow 4)-結合への活性を失わせる選択圧がかからなかったことがその理由であると考えられる (Nichols et al., 2003; Caputo et al., 2016)。バクテリア由来の LjAG31 は、ニゲロースに対して高い加水分解活性を示すが、マルツロース (α -Glc-(1 \rightarrow 4)-Fru) に対してニゲロースの 73%、コージビオースに対しては 61%の活性を示し、ニゲロース以外のグルコ二糖もよく加水分解する (Kang et al., 2009)。CADE は、環状四糖 (シクロニゲロシルニゲロース) 中の α -(1 \rightarrow 3)-結合に高い基質特異性を示し、ニゲロースに対する活性は極めて低い酵素である (Tagami et al., 2016)。これに対し、LIGH31_u1 はマルトースに対する加水分解活性が約 2%、ニゲロースに対する活性が約 13%と極めて低く、 α -(1 \rightarrow 3)-グルコシド結合に対してこれまで知られている加水分解酵素よりも高い基質特異性を示した。このことから、GH31_u1 は既報の酵素よりも α -(1 \rightarrow 3)-グルコシド結合への特異性が高い新規な酵素であると言える。

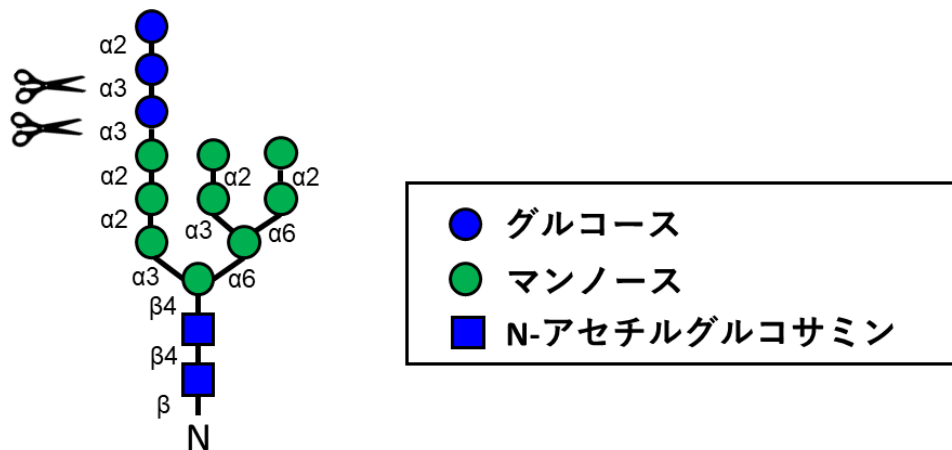


図 2-20. 小胞体グルコシダーゼ II の活性

小胞体グルコシダーゼ II が加水分解する部位を鋏のマークで示した。小胞体グルコシダーゼ II は、小胞体グルコシダーゼ I によって α -(1 \rightarrow 2)-結合のグルコースが加水分解された糖鎖に対して作用し、エキソ型に α -(1 \rightarrow 3)-結合のグルコースを加水分解する。

続いて、Tyr99 の機能に関して考察する。LIGH31_u1 の立体構造から Tyr99 が Glc+1 と水素結合を形成することが示唆されたため、Y99F 変異体ではニゲロースに対する基質特異性が低下するのではないかと予想した。しかし、Y99F 変異体を作製し、酵素学的性質の解析を行った結果、pNP-Glc、ニゲロース、ニゲロトリオースに対する K_m 値には大きな変化がなく、ニゲロースに対する k_{cat} 値が低下していた。pNP-Glc に対する k_{cat} 値は上昇していたことから、この k_{cat} 値の変化は変異導入が酵素のフォールディングに影響を与えたとは考えにくく、Tyr99 はニゲロースに対する代謝回転数を維持するために重要なアミノ酸残基であると考えられた。

一方で、pNP-Glc に対する k_{cat} 値が上昇したことに関しては、Tyr99 をより親水性の高い Phe に置換したことにより、サブサイト+1 周辺の疎水性が高まり、疎水性の高い *para*-nitrophenyl 基に対する相互作用が増加したためではないかと推測された。

Tyr99 に相当するアミノ酸残基は、すべての GH31_u1 酵素で保存されている

訳ではなく、CmGH31_u1 もこの Tyr 残基を持たない。以上のことから、Tyr99 は LIGH31_u1 においてはニゲロースを効率的に加水分解するのに重要な役割を果たしているが、酵素が α -(1→3)-結合特異性を示すためには必須ではない可能性が示唆された。

2-4-2. LIGH31_u1 の結晶構造と Cryo-EM 構造の比較

LIGH31_u1 の Cryo-EM 構造と結晶構造の間の $C\alpha$ の二乗平均平方根偏差 (RMSD) は 1.340 Å であり、よく類似していた。両方の構造において、六量体界面のほとんどのアミノ酸残基は同一であったことから、溶液中でも結晶構造で見られたのと同様の会合を取ると考えられた (図 2-21 A)。また、六量体形成に重要であると考えられる C 末端 α ヘリックスドメインのアミノ酸残基の側鎖の Cryo-EM 構造は、結晶構造のものと同様であった (図 2-21 B-D)

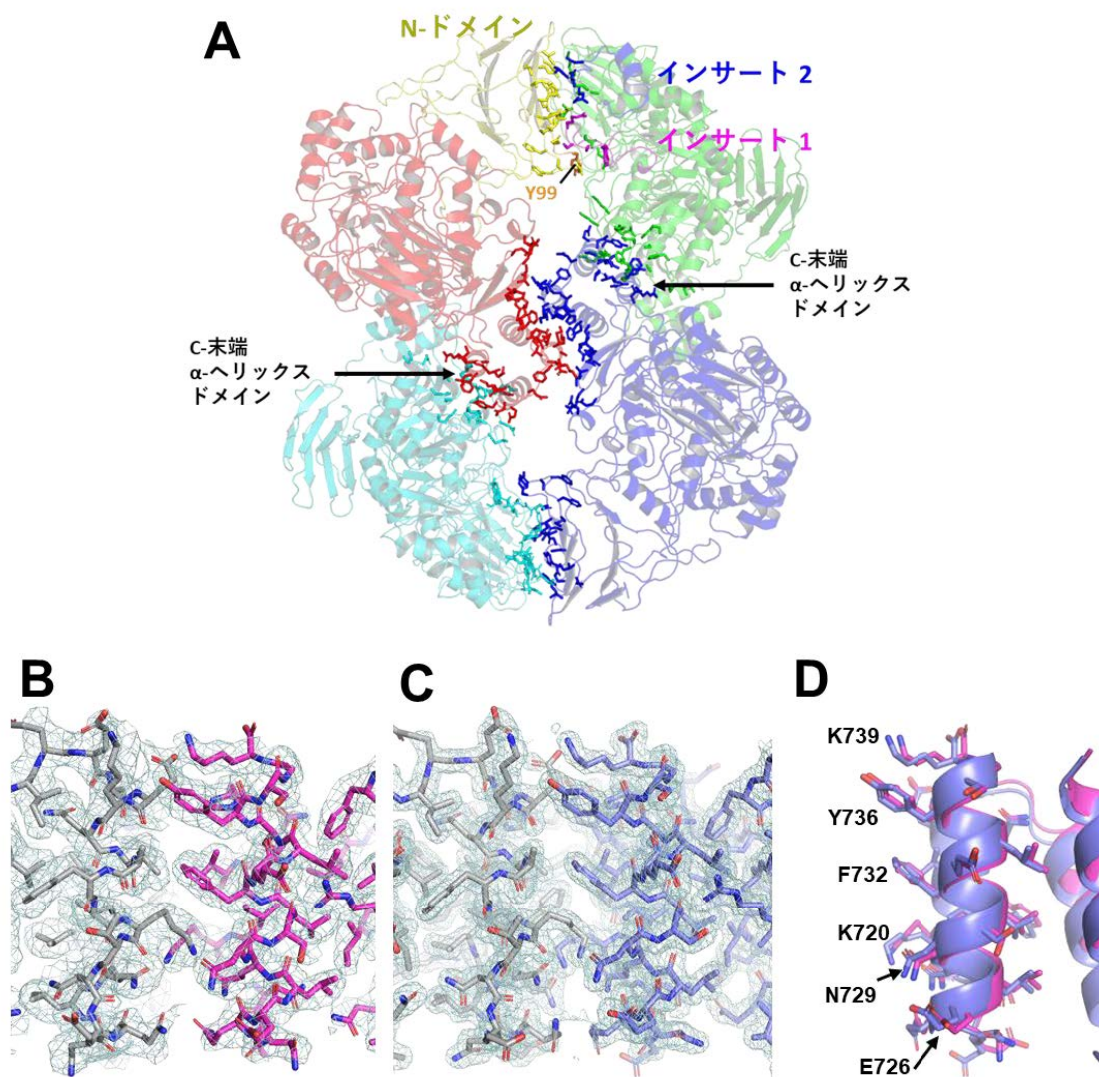


図 2-21. LIGH31_u1 六量体の界面にあるアミノ酸残基

A) Cryo-EM 構造の 4 つのプロトマー (chain A (赤色)、chain C (緑色)、chain D (シアン)、chain E (青色)) をリボンモデルで示した。六量体形成に関与する残基はスティックモデルで示した。Chain A の N-ドメインは黄色、Tyr99 は橙色で示した。Chain C のインサート 1 とインサート 2 はそれぞれマゼンタと青で示した。B) C 末端 α ヘリックスドメインの Cryo-EM マップ (5σ)。C) 結晶構造の C 末端 α ヘリックスドメインの $2F_o-F_c$ マップ (1σ)。D) Cryo-EM 構造 (マゼンタ) と結晶構造 (青色) における C 末端 α ヘリックスドメインの側鎖 (スティックモデル) の重ね合わせ。界面に位置する側鎖には残基番号を記した。

一方で、A-ドメインに存在するインサート1とインサート2、およびN-ドメイン上の Tyr99 を含むループの局所分解能は他の領域よりも低く、これらの側鎖の Cryo-EM マップは不明瞭であった (図 2-22)。しかし、結晶構造では、インサート1とインサート2の平均 B-Factor はそれぞれ 30.2 \AA^2 と 33.5 \AA^2 、全体の B-Factor の平均値は 33.7 \AA^2 と、インサート領域も低い B-Factor の値で決定されている。また、Tyr99 を含むループも同様に、結晶構造では低い B-Factor 値を示したが、Cryo-EM 構造ではマップが不明瞭であった。このことから、結晶のパッキングがない状態ではインサート1とインサート2、Tyr99 周辺が柔軟である可能性が示唆された。

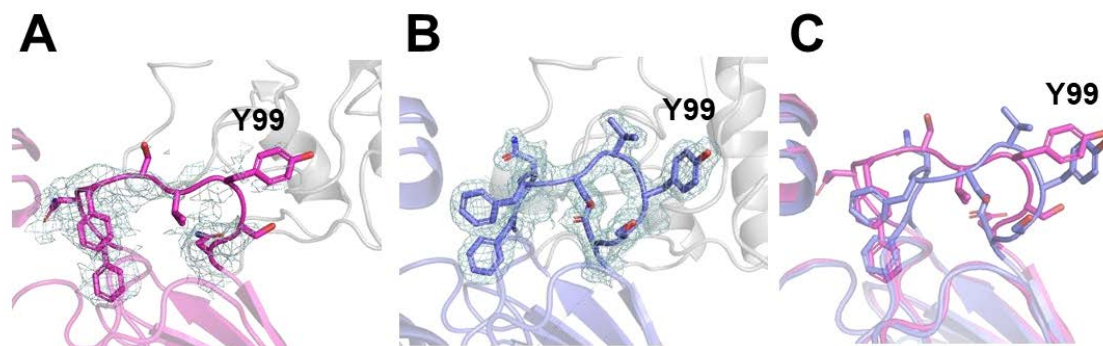


図 2-22. Tyr99 との周辺の比較

A) Tyr99 が存在するループの Cryo-EM マップ (5σ)。B) Tyr99 が存在するループの $2F_o - F_c$ マップ (1σ)。C) Cryo-EM 構造 (マゼンタ) と結晶構造 (青色) の重ね合わせ。

2-4-3. LIGH31_u1 と他の GH31 酵素との基質認識機構の比較

LIGH31_u1 がグルコシダーゼ II よりもニゲロースに対する基質特異性が高い構造的要因を考察するため、D394A-Nig2 の活性部位を CtGII (PDB コード 5DKZ) と比較した。

まず、サブサイト-1 では、一对の触媒残基に加えて、Glc-1 を認識する残基である Asp443、Trp554、Asp662、His691 が LIGH31_u1 と CtGII の間で保存されていた (図 2-23 および 2-24)。また、CtGII の Trp630 は LIGH31_u1 では Phe391 に置換されていたが、残基の芳香環は同じような位置にあり、疎水性環境の形成に関与していた。Glc-1 の 6-OH 基は、CtGII では水分子を介して Asp482 および Trp517 と相互作用するが、LIGH31_u1 では His280 と直接水素結合を形成していた (図 2-23)。以上から、サブサイト-1 における、LIGH31_u1 と CtGII のグルコース認識機構は類似していると言える。

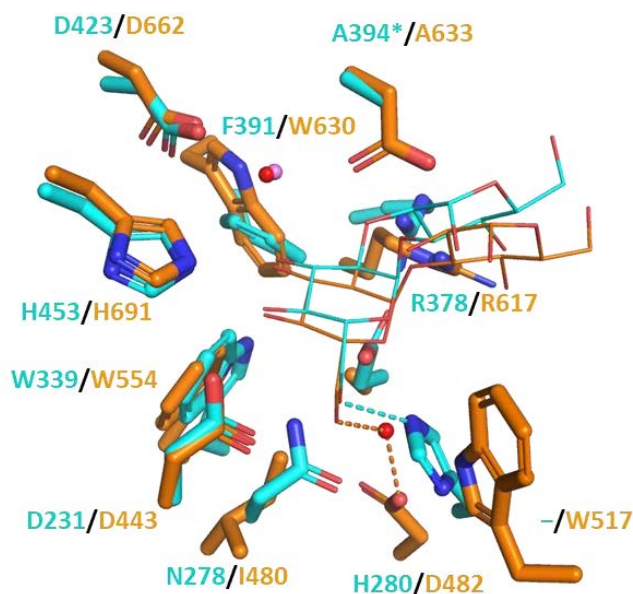


図 2-23. LIGH31_u1 と CtGII の活性部位の比較

A) CtGII とニゲロース (PDB 5DKZ、オレンジ色) および D394A-Nig2 (シアン色) の複合体の重ね合わせ。サブサイト-1 のアミノ酸残基とニゲロースの側鎖は、それぞれ太いスティックモデルと細いスティックモデルで示した。CtGII と LIGH31_u1 の水分子は、それぞれ赤と紫の球モデルで示した。Glc-1 の O6 との水素結合は破線で示した。アスタリスクは変異を導入した残基 (Asp394→Ala) を示す。

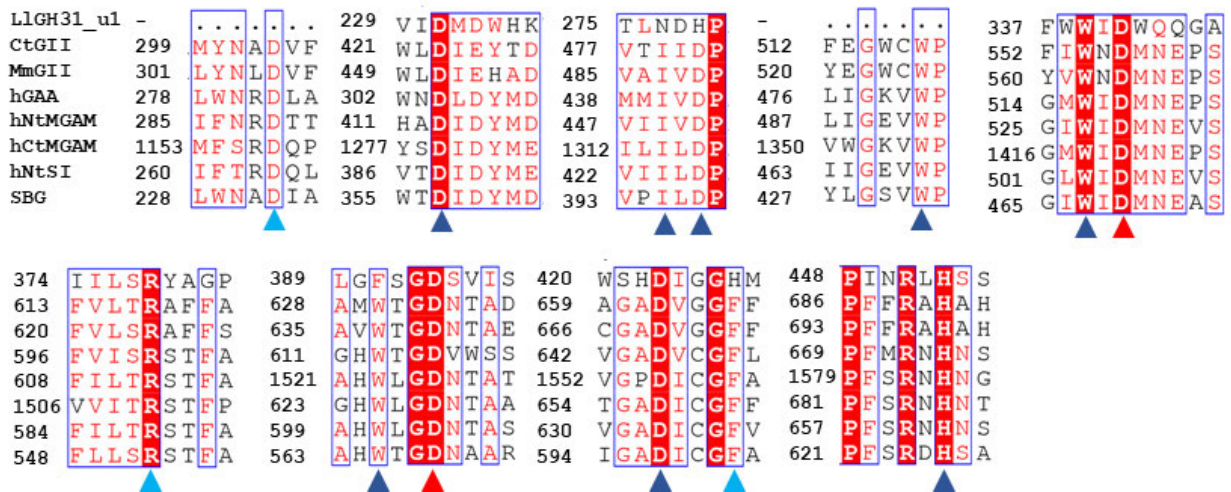


図 2-24. LIGH31_u1 と α -グルコシダーゼのアミノ酸配列アラインメント

LIGH31_u1 と立体構造が決定されている真核生物の α -グルコシダーゼのアミノ酸配列アラインメント。用いた酵素は以下に示す通りである。CtGII (GenBank ID、EGS17181.1); MmGII, マウス由来小胞体 α -グルコシダーゼ II (AAC53182.1); hGAA, ヒト由来酸性 α -グルコシダーゼ (CAA68763.1); ヒト MGAM (AAC39568.2) の C 末端 (Ct) および N 末端 (Nt) ドメイン; hNtSI, ヒトスクラーゼイソマルターゼの N 末端スクラーゼドメイン (AAT18166.1); SBG, テンサイ (*Beta vulgaris*) 由来の α -グルコシダーゼ (BAM74081.1)。赤い三角形は触媒残基を示す。青色の三角形は Glc-1 と相互作用する残基を示し、水色の三角形は Glc-1 および Glc+1 と相互作用する残基を示す。

一方、サブサイト+1 では、CtGII と LIGH31_u1 の間でグルコース認識に関与するアミノ酸残基が異なっており、CtGII では、Glc+1 の 4-OH が Asp303 と Arg617 によって認識されるが、LIGH31_u1 では隣接するプロトマーの Gln343 と Tyr99 によって認識されていた。また LIGH31_u1 の His427 は CtGII では Phe666 に置換されているため、Glc+1 の 2-OH との水素結合は形成されていなかった (図 2-25)。このように、グルコシダーゼ II では、Glc+1 の二個のヒドロキシ基が酵素と水素結合を形成していたのに対し、LIGH31_u1 では、三個のヒドロキシ基が酵素と水素結合していた。

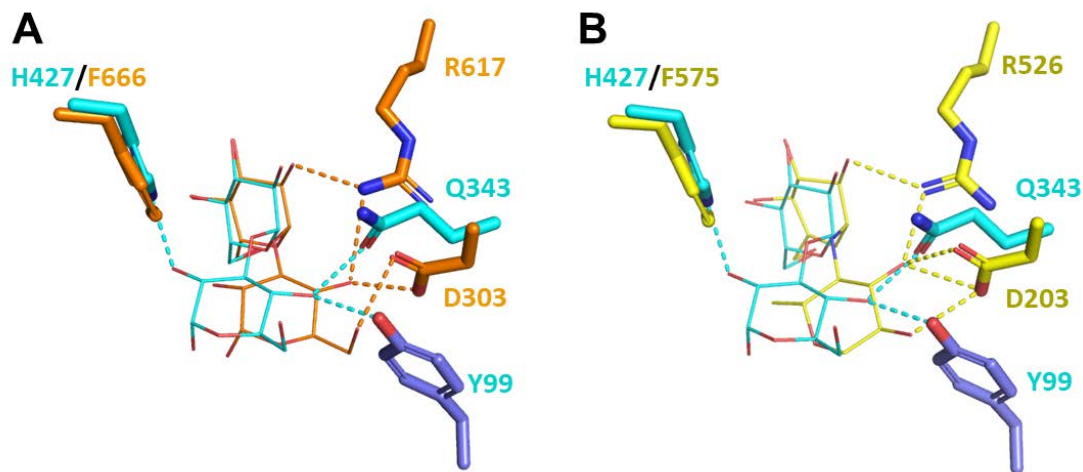


図 2-25. サブサイト+1 を認識するアミノ酸残基の比較

A) CtGII のニゲロース (オレンジ) 複合体と D394A-Nig2 (シアン) のサブサイト+2 の比較。ニゲロースとサブサイト+1 残基間の水素結合を破線で示す。D394A-Nig2 の隣接するプロトマーの Tyr99 側鎖は、青色のスティックモデルで示した。B) NtMGAM のアカルボース (黄色) 複合体と D394A-Nig2 (シアン) のサブサイト+1 の比較。アカルボースのアカルピオシン部分のみを示した。いずれもリガンドは細いスティックモデルで示した。基質とタンパク質間の水素結合は、NtMGAM では黄色の破線で、LIGH31_u1 では水色の破線で示した。

さらに、LIGH31_u1 のマルトオリゴ糖に対する活性が低い理由を考察するため、ヒトマルターゼ-グルコアミラーゼの N 末端マルターゼドメイン (NtMGAM) とマルトテトラオースのアナログであるアカルボースの複合体構造 (PDB: 2QMJ, Sim et al., 2008) を比較した。意外なことに、基質特異性が異なるにもかかわらず、 α -1,3-グルコシダーゼである小胞体 α -グルコシダーゼ II と、 α -1,4-グルコシダーゼである NtMGAM を含む真核生物の α -グルコシダーゼ間で、基質の Glc+1 と相互作用する残基も保存されていた(図 2-24)。

NtMGAM-アカルボース複合体においては、サブサイト+1 に結合する α -D-6-デオキシ-グルコピラノース残基は D394A-Nig2 のニゲロースの Glc+1 と同じ 4C_1 コンフォメーションをとるが、ピラノース環が反転していた。サブサイト+1 の α -D-6-デオキシ-グルコピラノースはマルトースに存在する 6 位のヒドロキシ基を持たないが、NtMGAM に結合したアカルボースのメチル基の周囲には

空間が存在し、マルトオリゴ糖の Glc+1 の 6-OH 基を受け入れることができると考えられる (図 2-26 A)。一方、マルトースがアカルボースと同様の形で LIGH31_u1 に結合するならば、LIGH31_u1 にはマルトースの 6-OH 基を受け入れる空間がないため、マルトース触媒ポケットに入りにくいと考えられた。さらに、マルトオリゴ糖の鎖長が長くなると、LIGH31_u1 の Met122 と Asn429 も立体障害となる可能性があった (図 2-26)。また、小胞体 α -グルコシダーゼ II もアカルボースに対して同様の立体障害を生じることが示唆されている (Sato et al., 2015)。

以上のことから、立体構造から得られた知見も、LIGH31_u1 がマルトオリゴ糖に対してより低い活性を示すという酵素学的実験の結果を支持するものと言える。

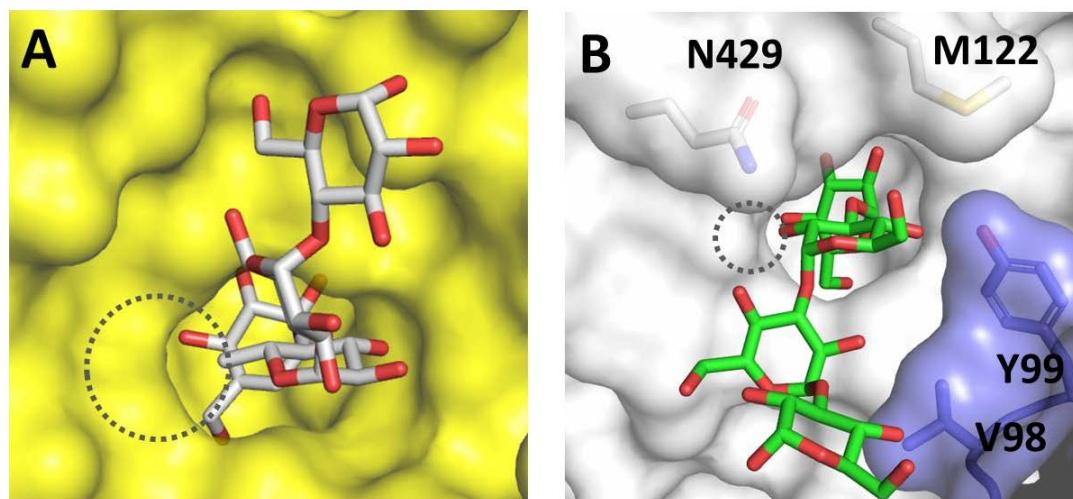


図 2-26. NtMGAM と LIGH31_u1 の活性部位の表面モデル

A) NtMGAM とアカルボースの複合体の表面モデル。アカルボースは白いスティックモデルで示した。B) D394A-Nig4 の表面モデル。ニゲロテトラオースは緑色のスティックモデルで示し、隣接するプロトマーは青色で示す。点線の丸はアカルボースのメチル基周辺空間とニゲロオリゴ糖の Glc+1 の 2-OH 基周辺空間を示す。

2-4-4. LIGH31_u1 の生理機能

GH31_u1 は、真核生物だけでなく、バクテリアにも広く分布していることから、自然界では小胞体グルコシダーゼ II が基質とする N 型糖鎖とは異なる糖を分解する役割を担っている可能性が高い。そこで、本節では GH31_u1 の生体内での役割と基質に関して考察する。

LIGH31_u1 の基質となる可能性のある糖の一つはムタンなどの α -(1→3)-グルカンである。ムタンは、*Streptococcus mutans* が生産する、グルコースが α -(1→6) 結合と α -(1→3)-結合で直鎖状に連なった菌体外多糖で、GH70 ファミリーに属する 3 つの異なるグルカンスクラーゼによって合成される。*S. mutans* のゲノムには GH31_u1 がコードされており、この菌の代謝に関与している可能性がある (図 2-27)。また、乳酸菌の中には、グルコースが α -(1→6) 結合で連なり、部分的に α -(1→6) 結合を含む細胞外多糖を合成するものもある (Bounaix and Koo, 2011)。しかし、これまでに *Lactococcus* 属の菌が α -(1→3) 結合を持つグルカンの合成するという報告はなく、*L. lactis* ゲノム中には GH70 グルカンクラーゼと推定される遺伝子は存在しない。

Aspergillus 属の糸状菌類が産生する α -(1→3)-グルカンもまた、GH31_u1 の基質となりうる天然の多糖である。糸状菌の細胞壁は、グルコースが α -(1→3)-結合で直鎖状に連なり、部分的に α -(1→4)-結合を含む不溶性多糖である α -(1→3)-グルカンを主成分の一つとしている (Yoshimi et al., 2016)。真菌は、GH31_u1 以外にも α -1,3 グルコシダーゼを有しており、*Aspergillus niger* 由来の GH31 酵素である AgdA や、Crystalline α -Glucosidase はニゲロースにも作用することが知られているが、最も活性が高い基質はマルトオリゴ糖である (Kita et al., 1991; Ma et al., 2019)。CmGH31_u1 がニゲロースに対して高い基質特異性を示したことから、真菌由来の GH31_u1 酵素は、 α -(1→3)-グルカンの代謝に関わっている可能性がある。しかし、LIGH31_u1 は不溶性多糖であるニゲランに対して加水分解活性を示さなかったことから、GH31_u1 が多糖の分解に関わるためには、不溶性多糖をオリゴ糖まで分解できるエンド型酵素が必要であると考えられる。真菌の持つエンド型 α -1,3-グルカナーゼとしては、GH71 ファミリータンパク質が知られており、*C. millitalis* も GH71 タンパク質をコードする遺伝子を持っている。また、*Talaromyces verruculosus* 由来の GH31_u1 は、GH71 ドメインと融合していた (GenBank, KUL90319.1)。従って、真菌の GH31_u1 酵素は GH71 酵素と協力して細胞壁 α -1,3-グルカンの分解に関与している可能性がある。

また、加水分解酵素ではないが、ニゲロースに高い基質特異性を有する他の酵素として、ニゲロースを加リン酸分解する GH65 ファミリーのニゲロースホスホリラーゼが知られている。*Lachnoclostridium phytofermentans* のゲノム上では、ニゲロースホスホリラーゼ (locus tag: Cphy1874) の近傍に推定 GH87 エンド- α -1,3-グルカナーゼが存在し、ニゲロース分解への関与が提唱されている (Nihira et al., 2012)。また、GH31_u1 (locus tag: Cphy_1877) はニゲロースホスホリラーゼと同じ遺伝子クラスターに位置し(図 2-27)、ABC トランスポータータンパク質や LacI ファミリーの転写制御因子の遺伝子とともに存在していた。従って、このクラスター中では、GH31_u1 と GH65 ニゲロースホスホリラーゼは、オリゴ糖を単糖 (リン酸化糖) にまで分解するという類似した機能を担っていると考えられる。

L. lactis のゲノムにおいても、LIGH31_u1 は ABC トランスポータータンパク質および LacI ファミリー転写制御因子と遺伝子クラスターを形成していた。また、*S. mutans* も *L. lactis* と同様の遺伝子クラスターを持つが、ABC トランスポーター系の代わりにホストトランスフェラーゼシステムの遺伝子を持っていた (Deutscher et al., 2006; Ajdic et al., 2013)。

また、我々は、非還元末端に α -(1 \rightarrow 3) 結合でグルコースが結合した N 型糖鎖は、タンパク質のプロセッシングの際に小胞体グルコシダーゼ II によって切断されるため、バクテリアがアクセスできる糖タンパク質のほとんどは α -(1 \rightarrow 3) 結合のグルコースを持たず、GH31_u1 の基質になる可能性は低いのではないかと予想していた。しかし、近年、乳酸菌 *Bifidobacterium longum* の LIGH31_u1 遺伝子が含まれる遺伝子クラスターが N 型糖鎖分解に関わるものであるという報告がなされたことから、LIGH31_u1 タンパク質が、被食などによって個体が死亡した結果細胞外に放出された未成熟な N 型糖鎖の分解にも関わっている可能性が示唆された (Cordeiro et al., 2023)。

加えて、GH31_u1 を保有する他の細菌種には、GH31_u1 の近傍に様々な GH や糖利用タンパク質遺伝子を保有しているものがあつた (図 2-27)。これらのことから、GH31_u1 は広範な生物種で様々な糖の分解系に関与している可能性示唆される。LIGH31_u1 の真の天然基質は不明であるが、*L. lactis* は、乳製品、発酵食品、植物、土壌など様々な供給源から単離されている菌であり (Siezen et al., 2011)、*L. lactis* が LIGH31_u1 を用いて、他の生物によって生産された多糖類由来のオリゴ糖を取り込み、細胞内でグルコースまで分解し利用する可能性

があると考えられる。

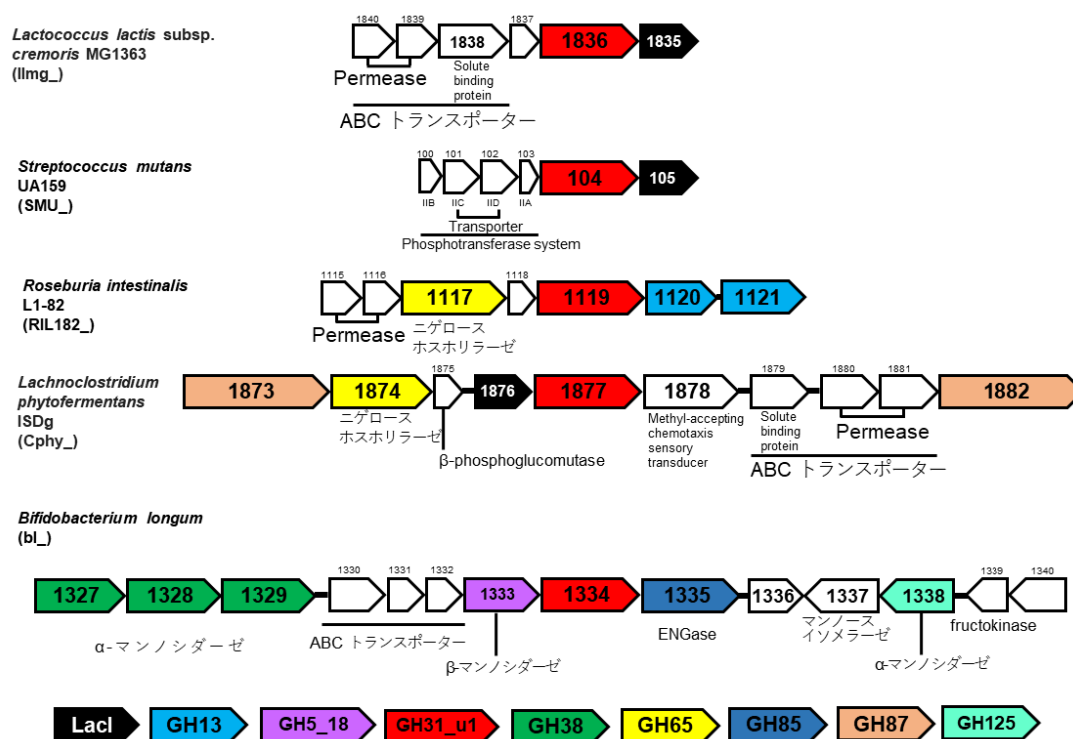


図 2-27. 細菌における GH31_u1 を含む遺伝子クラスター

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* MG1363 (GenBank ID, CAL98407.1)、*Streptococcus mutans* UA159 (AN57886.1)、*Roseburia intestinalis* L1-82 (VCV21248.1)、*Lachnoclostridium phytofermentans* ISDg (ABX42246.1)、*Bacteroides cellulosilyticus* WH2 (CCP32040.1)、*Bifidobacterium longum* の遺伝子クラスターを示す。オープンリーディングフレームは矢印で示し、色と酵素ファミリーの対応は遺伝子クラスターの下に記載した。LacI は LacI-like 転写制御因子を示す。

2-5. 小括

本研究では、微生物由来の GH31_u1 酵素が、他の GH31 酵素よりも α -1,3-グルコシドに対して厳密な特異性を示すことを見いだした。X 線結晶構造解析と Cryo-EM による構造解析の結果、LIGH31_u1 は 6 量体を形成し、他の GH31 酵素では観察されていない C 末端の α ヘリックスドメインが 6 量体形成に関与していることが明らかになった。さらに、LIGH31_u1 のサブサイト+1 を形成するアミノ酸残基 (隣接するプロトマー上の Tyr99 残基を含む) は、他の GH31 α -1,4-グルコシダーゼや小胞体グルコシダーゼ II の残基とは異なっており、 α -1,3-グルコシド結合を厳密に認識するのに重要であることがわかった。また、LIGH31_u1 とそのホモログは、様々な微生物種においてニゲロオリゴ糖の分解に関与している可能性が高く、GH31_u1 酵素が関与する糖質分解の全経路を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

第三章 GH31 α -ガラクトシダーゼの機能解析

3-1 緒言

D-ガラクトピラノース (Gal) は、自然界ではオリゴ糖、多糖、糖タンパク質、糖脂質の中によく見られるが、 α -結合だけでも α -(1 \rightarrow 2)、 α -(1 \rightarrow 3)、 α -(1 \rightarrow 4)、 α -(1 \rightarrow 6) の異なる結合様式が存在し、様々な糖の構成要素となっている。

α -(1 \rightarrow 6) 結合した Gal 残基を含むオリゴ糖や多糖は、多くの植物によって生産され、その例としてメリビオース [α -Gal-(1 \rightarrow 6)-Glc]、ラフィノースファミリーオリゴ糖 (ラフィノース、スタキオース、バーバスコースなど)、ガラクトマンナンなどが挙げられる。ラフィノースファミリーオリゴ糖は、適合溶質およびシグナル伝達分子として機能し、ストレス耐性機構において重要な役割を果たしている (ElSayed, Rafudeen, and Golldack 2014)。ガラクトマンナンはグアーガムやローカストビーンガムの主要成分で、 β -(1 \rightarrow 4)-マンナン主鎖に Gal- α -(1 \rightarrow 6) の分岐が存在し、ガラクトマンナンを構成するマンノースとガラクトースの比によって、その物性が異なる種々の多糖が知られている (Prajapati et al., 2013)。

α -(1 \rightarrow 4)-結合の Gal は動物細胞の重要な構成成分であるグロボトリオシルセラミドに見られる構造で、細胞間相互作用、細胞間シグナル伝達、分化、宿主と病原体の相互作用など、様々な細胞プロセスに関わっている (Celi et al., 2022)。 α -(1 \rightarrow 3)-結合の Gal は、血液型 B 群抗原の糖鎖の非還元末端に見られ、血液型糖鎖の性質を決める重要な部分構造である (Clausen and Hakomori 1989)。 α -(1 \rightarrow 2)-結合の Gal は、病原性細菌である肺炎球菌の莢膜に存在する多糖中に存在することが確認されている (Jones and Lemercinier 2005)。

このようなオリゴ糖や多糖の分解は、 α -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.22) によって行われる。 α -ガラクトシダーゼは、糖の非還元末端側から α -Gal を加水分解し、単糖を遊離する酵素であり、CAZy の分類によると GH ファミリー4、27、31、36、57、97、110 より報告がある (Drula et al., 2021)。このうち、GH27 には主に真核生物の α -ガラクトシダーゼが含まれ、GH31 と GH36 には細菌と真核生物の両方の α -ガラクトシダーゼが含まれる。そして、GH4、GH57、GH97 に属する α -ガラクトシダーゼは主に原核生物に分布している。GH27 の酸性 α -ガラクトシダーゼは、リソソームで不要となったスフィンゴ糖脂質を分解する役割を担っており、この酵素の機能不全は、リソソーム蓄積病の一つであるファブリー病の原因となる (Aerts et al., 2019)。また、既報の α -ガラクトシダーゼは、

ラフィノースファミリーオリゴ糖やガラクトマンナンに存在する α -(1→6) 結合を標的とするものに関する報告が過半数を占める。

第一章で述べた通り、 α -ガラクトシダーゼは GH31 サブファミリーにも存在している。しかし、GH27、GH36 の α -ガラクトシダーゼがよく研究されているのに対し、GH31 α -ガラクトシダーゼの機能や構造の報告例は少ない。GH31 α -ガラクトシダーゼは、最初に *Pseudopedobacter saltans* と *Pedobacter heparinus* より見出された (Miyazaki et al., 2015)。これらのタンパク質は、pNP- α -ガラクトシドに対して弱い活性を示し、フッ化 α -ガラクトースに対して高い加水分解活性を示したことから α -ガラクトシダーゼとして同定された。また、*P. saltans* 由来の酵素 (PsGal31A) の立体構造解析と単糖による活性阻害の立体構造の研究から、この酵素は、 α -Gal と L-フコースを含む多糖類を基質としている可能性が示唆されているが、天然の基質は未だ不明である。

2022 年には、GH31 サブファミリー 20 (GH31_20) に属するヒト由来 myogenesis-regulating glycosidase (MYORG) が、 α -Gal-(1→4)-Glc 二糖に特異的な α -ガラクトシダーゼであることが明らかになった (Meek et al., 2022)。MYORG は、当初は筋分化に関与するタンパク質として同定されたが、後に MYORG の機能不全が、希少疾患である特発性基底核石灰化症の原因となることが明らかになり、医学分野でも注目されている (Yao et al., 2018; Datta, Guan, and Gerace 2009)。

もう一つのバクテリア由来 GH31 α -ガラクトシダーゼは、腸内細菌 *Bacteroides salyersiae* CL02T12C01 より糖質関連酵素の活性スクリーニングプロジェクトを通して見出されたタンパク質 (BsGH31_19) であり、現在 GH31_19 サブファミリー分類されている。BsGH31_19 は、*H. sapiens* 由来の MYORG (22.1%) に対して PsGal31A (19.5%) よりもわずかに高い配列相同性を示し、系統解析から GH31_19 サブファミリーと GH31_20 サブファミリーが比較的近縁であることが示唆されている (Arumapperuma, et al., 2023)。しかし、これまでに BsGH31_19 に関しては pNP- α -Gal に対して加水分解活性を有することしか明らかにされておらず、この酵素の詳細な酵素学的性質および立体構造は未だ不明である (Helbert, et al., 2019)。

これら三つのサブファミリーを比較すると、MYORG が主に小胞体に局在して働くのに対し、GH31_19 遺伝子を保持するバクテリアは細胞小器官をもたないことから、GH31_19 の機能は、GH31_20 とは異なっている可能性が高いと推測

された。そこで、本研究では、先行研究で α -ガラクトシダーゼ活性を有することが報告されている BsGH31_19 と、土壌細菌 *Flaviumibacter petaseus* (Zhang et al., 2010) 由来のもう一つの GH31_19 タンパク質の構造と機能を解析し、それらの構造機能相関を明らかにすることを目指した。

3-2. 実験方法

3-2-1. 組換えタンパク質の発現系の構築

試薬は特に指定がない限り富士フイルム和光純薬株式会社(Wako) (Osaka, Japan)から購入したものを使用した。

FpGH31_19 および BsGH31_19 は、SignalP 5.0 サーバー (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)による予測によって N 末端に分泌シグナル配列を有すると予想されたため、シグナル配列を除き N 末端に 6×His タグおよび Thrombin 認識配列 (MGSSHHHHHSSGLVPRGS) を付加した組み換えタンパク質の大腸菌発現を行った。FpGH31_19 (llmg_1836, GenBank GAO41131.1) の遺伝子は、*F. petaseus* NBRC 106054 (NITE BioResource Center) のゲノム DNA よりサブクロニングし、BsGH31_u1 (GenBank EOA48331.1) 遺伝子は、論文報告のあるもの (Helbert, et al., 2019) とは別株の *B. salyersiae* JCM 12988 (NITE BioResource Center) のゲノム DNA よりサブクロニングした。発現用プラスミドの配列マップを図 3-1 に示す。

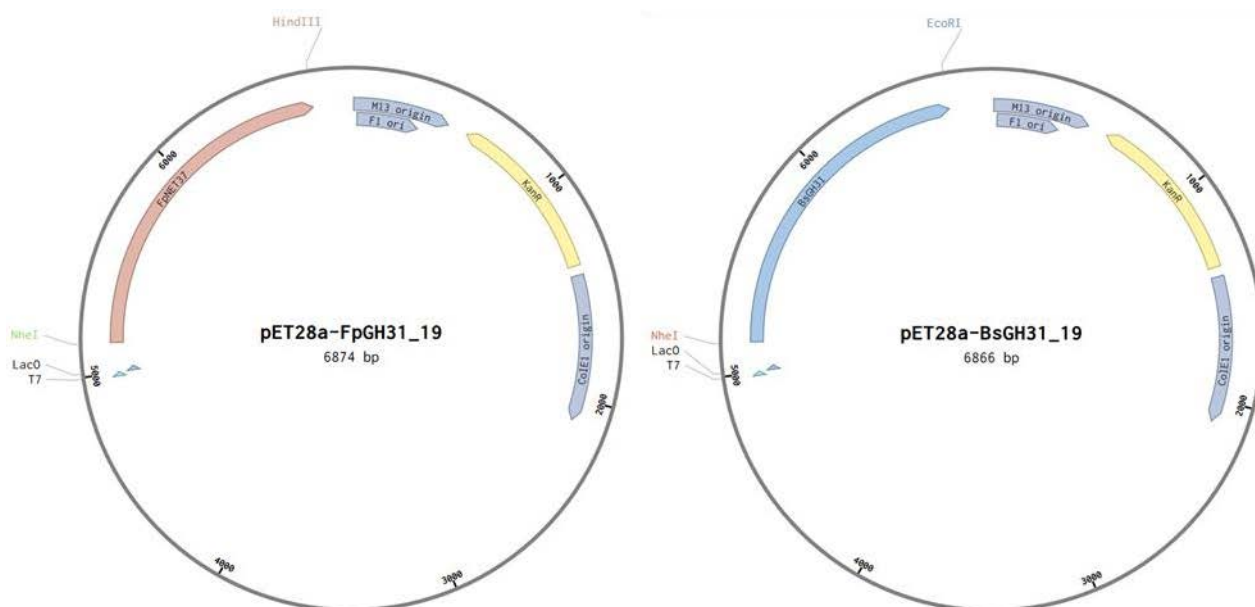


図 3-1. 大腸菌発現のためのプラスミドマップ

FpGH31_19 (左)および BsGH31_19 (右)の大腸菌発現ベクター。図は Benchling (<https://www.benchling.com/>)によって作成した。

まず、Ex Taq ポリメラーゼ (Takara Bio) を用い、*F. petaseus* NBRC 106054 の菌体 (NITE BioResource Center) をテンプレートとしたコロニーダイレクト PCR によって FpGH31_19 の配列を増幅した。プライマーは、FPE01S_01_01430_(-54)_F および FPE01S_01_01430_(+32)_R を用いた (表 3-1)。

表 3-1. プライマーの名称と配列

名称	配列 ^a	使用用途
FPE01S_01_01430_(-54)_F	TACCTGGGAAGAAACGACGG	pMD19 ベクターへの FpGH31_19 のサブクローニング
FPE01S_01_01430_(+32)_R	AGACAAACGACATGCGTAGC	
FPE01S_01_01430_Δ27_NheI_F	TTTT <u>GCTAGCC</u> CAGCAGGCAAGGCAGCAATC-	pET28a ベクターへの FpGH31_19 のサブクローニング
FPE01S_01_01430_HindIII_R	TTTT <u>AAGCTT</u> TCATGTTGTTCTTTTGAAACAG	
FPE01S_01_01430_insertG_F	AGGCAAGGCAGCAATCCTTGCATATTC	FpGH31_19 へ欠損していた G の挿入
FPE01S_01_01430_insertG_R	ATTGCTGCCTTGCTGCTGGCTAGCCA	
FpGH31_D304A_F	AAGTT <u>IGCTGC</u> AGGCGATGCGGAATTC	FpGH31_19_D304A の作製
FpGH31_D304A_R	GCCTGCAGCAAACCTTAAACCCATCGATG	
BsGH31_Δ23_NheI_F	TTTT <u>GCTAGCC</u> CAGCAGGCAAGGCAGCAATC	pET28a ベクターへの BsGH31_19 のサブクローニング
BsGH31_EcoRI_R	TTTT <u>AAGCTT</u> TCATGTTGTTCTTTTGAAACAG	
M13(-40)-F	GTTTTCCCAGTCACGAC	pMD19 ベクターのコロニーPCR
M13(-20)-R	GTAAAACGACGGCCAG	
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	pET28a ベクターのコロニーPCR 及び
T7 terminator	ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	シーケンス解析
FpGH31_seq1_F	ACTGGTTTCCATACTATGGC	シーケンス解析
BsGH31_seq1	GGATAGCGCCTTATGTATCG	

^a 下線は制限酵素サイトを示し、下波線は置換したアミノ酸のコドンを示す。

PCR 反応液の組成はキットの条件に従い、反応液量を 20 μ L とした (表 3-2)。PCR 反応は、変性を 98°C 10 秒、アニーリングを 55°C 30 秒、伸長を 72°C 2 分とし、25 サイクル行った。

表 3-2. Ex Taq ポリメラーゼを用いた PCR 反応液組成

試薬	量
Ex Taq ポリメラーゼ	0.1 μ L
10 \times Ex Taq Buffer	2 μ L
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	1.6 μ L
10 μ M Forward primer	2 μ L
10 μ M Reverse primer	2 μ L
菌体懸濁液	1 μ L
dH ₂ O	up to 20 μ L

PCR 産物 1 μ L を 2-2-1 に示した方法で 0.5%アガロースゲル電気泳動に供し、目的のサイズのバンドが得られたことを確認したのち、PCR 産物を FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPONGenetics, Tokyo, Japan) を用いて精製した。

PCR 産物は、T-ベクター (pMD19 プラスミド, Takara Bio) に TA クローニングを行った。アンピシリンを用いて大腸菌を選択し、GoTaq ポリメラーゼを用いたコロニーダイレクト PCR によってインサートの挿入を確認した。反応液組成は GoTaq Green Master Mix (Promega, Wisconsin, United States) のマニュアルに従い反応液の総量を 5 μ L とした (表 3-3)。プライマー M13(-40)-F および M13(-20)-R を使い、PCR 反応液に滅菌した爪楊枝で菌体を掻きとって加え、テンプレートとした。反応条件は、変性を 95°C 10 秒、アニーリングを 55°C 30 秒、伸長を 72°C 2 分とし、30 サイクル行った。PCR 産物全量を 0.5%アガロースゲル電気泳動に供し、目的のサイズのバンドが得られたことを確認した。

表 3-3. Go Taq ポリメラーゼを用いたコロニーダイレクト PCR 反応液組成

試薬	量
2 x GoTaq® GreenMaster Mix	2.5 μ L
10 μ M Forward primer	0.5 μ L
10 μ M Reverse primer	0.5 μ L
dH ₂ O	up to 5 μ L

大腸菌からプラスミド pMD19-FpGH31_19 を抽出し、これをテンプレートとして KOD-One ポリメラーゼとプライマー FPE01S_01_01430_Δ27_NheI_F、FPE01S_01_01430_HindIII_R (表 3-1) を用いて PCR を行い、分泌シグナルを除いた FpGH31_19 の配列を増幅した。KOD-One ポリメラーゼを用いた PCR 反応の方法は伸長を 68°C 10 秒とした以外は 2-2-1 と同様である。PCR 産物の精製後、インサート DNA とベクター-pET28a を制限酵素 HindIII、NheI (NEB) によって処理し、ライゲーションおよび形質転換を行った。得られたプラスミドのシーケンス解析を行ったところ、プライマー配列部分に一塩基の欠失があったため、プライマー FPE01S_01_01430_insertG_F および FPE01S_01_01430_insertG_R を用いて 2-2-1 と同様の手法でインバース PCR を行い、欠失した部分に塩基を挿入した。同様に、プライマー FpGH31_D304A_F および FpGH31_D304A_R を用いたインバース PCR によって触媒残基変異体 FpGH31_D304A のプラスミドを作製した。

BsGH31_19 は TA クローニングを省略し、N 末端シグナルペプチド (残基番号 1-24) を除いた配列をプライマー BsGH31_Δ23_NheI_F、BsGH31_EcoRI_R (表 3-1) を用いて KOD-One ポリメラーゼを用いた *B. salyersiae* DNA JCM 12988 のゲノム (NITE BioResource Center) をテンプレートとして PCR によって増幅した。PCR 反応の方法は伸長を 68°C 10 秒とした以外は 2-2-1 と同様である。PCR 産物の精製後、制限酵素 NheI と EcoRI で処理し、pET28a ベクターにライゲーションした。

構築したプラスミドの確認は、上記と同様の手法で、プライマー T7 promoter および T7 terminator を用いてコロニー-PCR によって行った。

作製したプラスミドは、2-2-1 と同様の手法で大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換を行い、カナマイシン (20 μg/mL) を含むプレート培地で選択した後、3mL の LB 培地で OD が 0.6 になるまで 37°C で培養してから IPTG を終濃度 0.1mM とするように加え、さらに 20°C で一晩培養した。菌体を遠心分離によって回収し、超音波破碎後、SDS-PAGE に供し、目的タンパク質の発現が確認できた株を以降の実験に使用した。SDS-PAGE には 10% (w/v) のポリアクリルアミドゲルを使用し、質量マーカーは、タンパク質マーカー (10 倍濃縮) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いた。

3-2-2. 組換えタンパク質の精製

3-2-1 で作製した大腸菌株を、200 mL または 1 L のスケールで培養し、遠心分離によって回収した後、アフィニティークロマトグラフィによって 2-2-2-1 と同様の方法によって精製を行った。FpGH31_19 に関しては、すべての精製用バッファーに 10% (v/v) グリセロールを添加した。Ni アフィニティークロマトグラフィによって精製した FpGH31_19 および BsGH31_19 アミコンウルトラ 30 K (Merck) を用いて濃縮しゲル濾過クロマトグラフィに供した。

ゲル濾過クロマトグラフィのカラムは Superdex 200 Increase 10/300 (28-9909-44, GE Healthcare Life Sciences) を使い、バッファーには、300 mM NaCl、50 mM Na₂HPO₄、10% glycerol を使い、流速 0.6 mL/min で 1.2 CV 分溶出した。クロマトグラフィは、ÄKTAexplorer 10S (GE Healthcare Life Sciences) を用いて行った。精製後のタンパク質は、SDS-PAGE および CBB 染色によって確認した。また、得られたタンパク質の濃度は、280 nm の吸光度を測定し、各タンパク質のアミノ酸配列から推定されるモル吸光係数 (BsGH31_19, 113,220 M⁻¹ cm⁻¹; BsGH31_19, 114,710 M⁻¹ cm⁻¹) より算出した。

2-2-3. 加水分解活性の解析

2-2-3-1. 様々な基質に対する特異性の解析

アフィニティークロマトグラフィによって精製した FpGH31_19 を用いて、2-2-3-1 節と同様の方法で pNP 化糖に対する加水分解活性の評価を行った。

また、様々な天然に存在する糖に対する加水分解活性を解析した。酵素濃度 0.5 mg/ml の FpGH31_19 または BsGH31_19、20mM リン酸バッファー (pH7.0) と、10 mM グロボトリオース (Gb3) [α -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc] (G0479, TCI)、0.5% (w/v) グアーガム (β -1,4-マンノース主鎖に、マンノース二分子に一分子の α -1,6-ガラクトース側鎖を持つ多糖) (079-04612, Wako)、0.5% ローカストビーンガムのいずれかを混合し、30°C で一晩反応させた (表 3-4)。反応産物 2 μ L をアルミプレートにスポットし、または 1-ブタノール:エタノール:水 = 10:5:2 の溶媒を用いて二回展開した。その後、ドライヤーでプレートを乾燥させ、5% H₂SO₄ を含むメタノールを噴霧した後、ドライヤーで溶媒を揮発させ、ホットプレートで加熱し、糖を検出した。

表 3-4. TLC 解析のための酵素反応液組成

試薬	液量	終濃度
100 mM 各種オリゴ糖 / 5%多糖	1 μ L	10 mM/0.5%
100 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0)	2 μ L	20 mM
5 mg/mL 酵素溶液	1 μ L	0.5 mg/mL
超純水	6 μ L	-
計	10 μ L	

2-2-3-2. 遊離ガラクトース量の定量

α -ガラクトシドを基質とした場合の酵素反応は、各種基質を含むクエン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0)、および酵素溶液をあらかじめ 30°C でインキュベートし、15 μ L の基質溶液に 5 μ L の酵素溶液を加えることで反応を開始した。反応停止は 100°C で 3 分間加熱することにより行った。遊離ガラクトース濃度の定量は、Lactose/Galactose (Rapid) test kit (Megazyme, Wicklow, Ireland) を用いて行い、20 μ L の反応液にキットのマニュアルに従って混合した NAD⁺、ガラクトースムタロターゼ、 β ガラクトースデヒドロゲナーゼを含む溶液 220 μ L を加え、30°C で 10 min インキュベートした。その後、NADH に由来する 340 nm の吸光度を測定することによって、遊離 Gal 量を算出した。

2-2-3-3. 反応速度論値、温度と pH の影響

BsGH31_19 と FpGH31_19 の温度・pH の影響の評価には、基質として pNP- α -Gal (0.5 mM) を用いた。

至適 pH の測定

50 mM の McIlvaine バッファー (pH 3.5–8.0)、クエン酸ナトリウムバッファー (pH 4.0–6.0)、酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.0–5.5)、MES–NaOH バッファー (pH 5.5–6.5)、グリシン-HCl バッファー (pH 9.0–10) のいずれかを用い、BsGH31_19 (100 μ g/mL) または FpGH31_19 (30 μ g/mL) を用いて 30°C、10 分間酵素反応を行った。反応液の組成は、加えた酵素溶液を 1000 μ g/mL BsGH31_19 または 300 μ g/mL FpGH31_19 とした以外は第 2 章 表 2-6 従った。

至適温度の測定

BsGH31_19 (100 µg/mL) に対しては 50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5)、FpGH31_19 (30 µg/mL) に対してはクエン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) を用い、30–70°Cの間で5分間酵素反応を行った。反応液の組成は、加えた酵素溶液を 1,000 µg/mL BsGH31_19 または 300 µg/mL FpGH31_19 とした以外は第二章表 2-7 に従った。

反応速度論値の解析

BsGH31_19、FpGH31_19 とともにクエン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) を用い、酵素濃度は、BsGH31_19 は pNP- α -Gal に対しては 109 nM、Gb3 に対しては 4.1 nM、 α -(1→4)-ガラクトビオースに対しては 2.1 nM で行い FpGH31_19 は pNP- α -Gal に対しては 47.4 nM、Gb3 および α -(1→4)-ガラクトビオースに対しては 2.4 nM で行った。基質濃度は、pNP- α -Gal は 0.125、0.25、0.5、1、2、5、10 mM、Gb3 と α -(1→4)-ガラクトビオースは、0.2、0.5、1、2、4 mM とした。反応液は酵素以外の反応複数回分のサンプルを一度に混合した後、分注して用い、 $n \geq 3$ で行った。反応液の組成は表 3-5 と 3-6 に示す。酵素反応は、それぞれ 37 °C・6 分まで反応速度が直線性を保つことを確認したため、反応初速度の測定を 37 °C、3 min 行い、カレイダグラフソフトウェア (Synergy Software) を用いてミカエリス・メンテン式に回帰し、反応速度論値を算出した。

表 3-5. pNP-Gal を基質とする反応速度論値測定の酵素反応液組成

基質終濃度 (mM)	0.2	0.5	1	2	4
試薬					
5 mM pNP-Gal	2 µL	5 µL	10 µL	20 µL	40 µL
500 mM buffer	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
超純水	38 µL	35 µL	30 µL	20 µL	-
酵素溶液	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
計			50 µL		

表 3-6. オリゴ糖を基質とする反応速度論値測定の際の酵素反応液組成

試薬	液量	終濃度
0.4–8 mM オリゴ糖	7.5 μ L	-
100 mM buffer	7.5 μ L	50 mM
酵素溶液	5 μ L	
計	20 μ L	

2-2-4. FpGH31_19 および BsGH31_19 の X 線結晶構造解析

FpGH31_19 の立体構造解析のため、結晶化条件の検討を行った。アフィニティクロマトグラフィおよびゲル濾過クロマトグラフィによって精製した His-FpGH31_19 を限外濾過によって 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.0) にバッファー交換および 14 mg/mL になるまで濃縮したサンプルを用いて、2-2-5 と同様の方法でキットによるスクリーニングを行った。結晶が生じた条件に関しては、精製した FpGH31_19 のバッファーを 10 mM HEPES-NaOH (pH7.0)、10% glycerol に交換したものをを用いて、同じまたは各化合物の濃度を少しずつ変えた溶液を調整し、酵素溶液とリザーバー溶液の比を 1 μ L:1 μ L として同様に結晶化を行った。

結晶に X 線を照射する実験は、高エネルギー加速器研究機構ビームライン BL5A を利用して 2-2-5 と同様の方法で行なった。

FpGH31_19 D304A のリガンド複合体構造は、FpGH31_19 D304A の結晶を 10 mM の α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースに 20 時間浸漬することで決定した。FpGH31_19 WT 酵素のガラクトース複合体構造は、100 mM Gal、22% (v/v) エチレングリコールを含むリザーバーをクライオプロテクタントとして使用することで決定した。その他すべての結晶については、リザーバー溶液にエチレングリコールを最終濃度 22% (v/v) 添加したものをクライオプロテクタントとした。

収集したデータは XDS ソフトウェア (Kabsch, 2010) を用いて処理し、CCP4i2 ソフトウェア (Winn et al., 2011) を用いて以降の解析を行った。FpGH31_19 および BsGH31_19 の構造は、AlphaFold2 (ColabFold) (Jumper et al., 2021) で予測した構造を鋳型として、MOLREP ソフトウェア (Vagin et al., 2010) を用いた分子置換法によって決定した。精密化とマニュアルでのモデル構築は、それぞれ REFMAC5 (Murshudov et al., 2011) と COOT (Emsley et al., 2010) を用いて行った。

得られたモデルは MolProbity (Williams et al., 2018)を用いて評価した。

2-2-5. 遺伝子クラスター解析

GH31_19 遺伝子を有するバクテリアのゲノム配列を NCBI から入手し、遺伝子クラスター推定は dbCAN3 を用いて CGC 距離 (糖質関連酵素遺伝子に存在する遺伝子) の値を 5、その他のパラメーターは dbCAN3 のデフォルト設定で行った (Zheng et al., 2023)。GH31_19 の配列は CUPP プログラム (Barrett and Lange, 2019) を用いてアノテーションした。GH31_19 遺伝子を持つ合計 47 のバクテリアゲノムから、40 の遺伝子クラスターが抽出された。

3-3 結果

3-3-1. 組換え GH31_19 タンパク質の発現と精製

BsGH31_19、FpGH31_19、FpGH31_19 D304A は Ni アフィニティークロマトグラフィによって精製することができ (図 3-2)、いずれも 100 mM イミダゾール画分において溶出が確認された。Ni アフィニティークロマトグラフィによって精製したタンパク質をゲル濾過クロマトグラフィに供した結果、いずれも単一のピークとして溶出された。ゲル濾過クロマトグラフィによって計測された質量は BsGH31_19 は 125 kDa、FpGH31_19 は 140 kDa であった。BsGH31_19 および FpGH31_19 のアミノ酸配列から計算される質量はそれぞれ 61.1 kDa および 60.9 kDa であったことから、両タンパク質は水溶液中で二量体を形成していると考えられた。

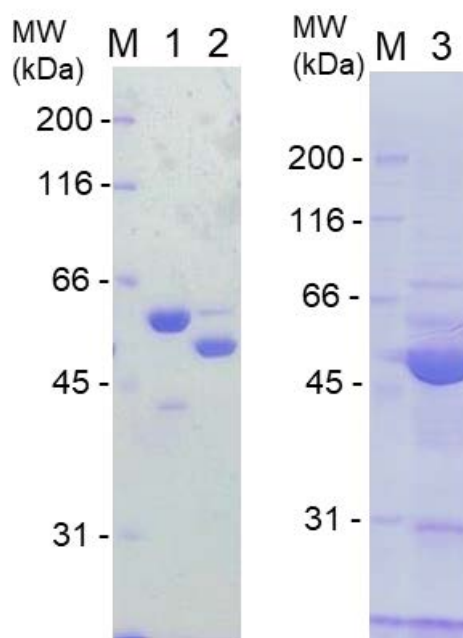


図 3-2. GH31_19 タンパク質の精製

M, 質量マーカー; 1, BsGH31_19 (理論上の質量 61.1 kDa); 2, FpGH31_19 (理論上の質量 60.0); いずれもゲル濾過クロマトグラフィによって精製した後のタンパク質である。3, FpGH31_19 D304A 変異体の Ni アフィニティ精製後のタンパク質。質量マーカーは、タンパク質マーカー (10 倍濃縮) (Nacalai Tesque) を用いた。

3-3-2. 酵素学的性質の解析

BsGH31_19 および FpGH31_19 を様々な pNP 化糖に作用させた結果、いずれも pNP- α -galactoside (pNP- α -Gal) に対してのみ加水分解活性を示した。

そこで、pNP- α -Gal を基質として、両酵素の pH および温度の影響を測定したところ、BsGH31_19 の至適 pH および温度はそれぞれ pH 5.5、45°C であった。また、FpGH31_19 では pH 6.0、40°C で最も高い活性を示した (図 3-3)。

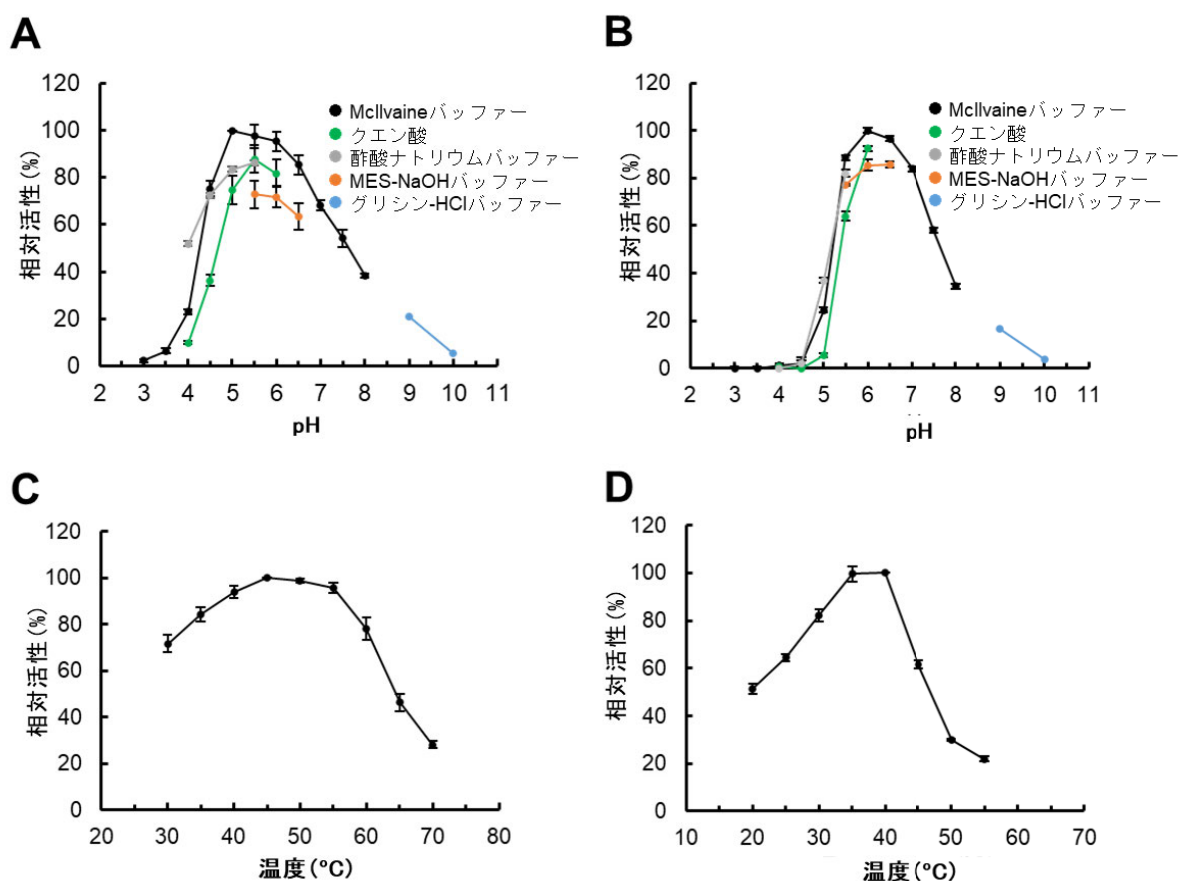


図 3-3. BsGH31_19 と FpGH31_19 の加水分解活性に対する pH と温度の影響
pNP- α -Gal を基質として、BsGH31_19 の pH 依存性 (A) と温度依存性 (B)、および FpGH31_19 の pH 依存性 (C) と温度依存性 (D) を測定した。pH 依存性は pH 3.5–8.0 の McIlvaine バッファー、pH 4.0–6.0 のクエン酸ナトリウムバッファー、pH 4.0–5.5 の酢酸ナトリウムバッファー、pH 5.5–6.5 の MES-NaOH バッファー、または pH 9.0–10 のグリシン-HCl バッファー中で測定した。BsGH31_19 および FpGH31_19 の温度依存性は、それぞれ 50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) またはクエン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) 中、25°C–55°C で評価した。

続いて、天然の基質の探索のため、グロボトリオース (Gal- α (1 \rightarrow 4)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glc)、血液型 B 抗原三糖 (α -Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)]-Gal)、メリビオース (α -Gal-(1 \rightarrow 6)-Glc)、主鎖がマンノース (Man)、側鎖が α -1,6-Gal で構成された多糖であるグアーガム (Gal:Man = 1:2) を基質として酵素反応を行い、TLC にて反応産物を確認したところ、グロボトリオース (Gb3) を基質とした場合にのみ、ガラクトースとラクトースと思われるスポットが確認された (図 3-4)。このことから、GH31_19 は Gal- α -(1 \rightarrow 4)-Gal のグリコシド結合を特異的に加水分解することが示唆された。

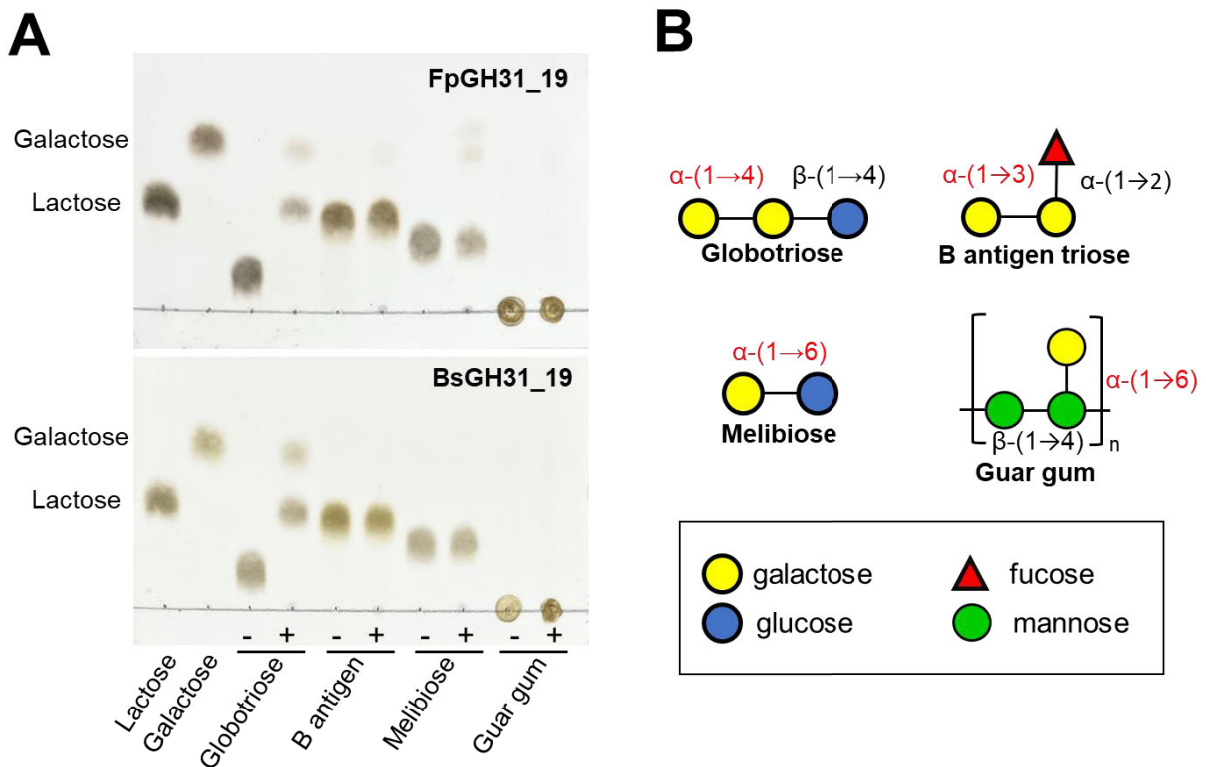


図 3-4. FpGH31_19 および BsGH31_19 の各種二糖に対する加水分解活性

A) FpGH31_19 (上段) または BsGH31_19 (下段) を 10 mM のオリゴ糖あるいは 0.4% (w/v) グアーガムと二時間反応させたサンプルを 2 μ L スポットした。マーカーとして 10 mM の Gal とラクトースを 1 μ L をスポットし、5% H₂SO₄ を含むメタノールを噴霧した後加熱して発色させた。B) TLC に用いた基質。ガラクトースの結合様式を赤字で示した。

活性を定量的に評価するため、BsGH31_19 と FpGH31_19 の様々なオリゴ糖と多糖に対する酵素活性をガラクトース定量キットによって測定した。いずれの酵素も、Gb3 に加えて、 α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースに対しても加水分解活性を示した。しかし、MYORG が活性を示す α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc や、メリビオース、血液型 B 抗原三糖、グアーガムに対する活性は弱く、 α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal に対する活性の 1% 以下であった (表 3-6)。これらの結果から、BsGH31_19 と FpGH31_19 は、 α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal に対する高い基質特異性を有していることがわかった。

表 3-6. GH31_19 酵素の α -ガラクトース含有糖に対する活性

基質	FpGH31_19		BsGH31_19	
	比活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	相対活性 (%)	比活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	相対活性 (%)
α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal	120 \pm 10	100	92 \pm 6	100
Gb3	170 \pm 5	130 \pm 4	50 \pm 2	59 \pm 2
pNP- α -Gal	(1.5 \pm 0.1) $\times 10^{-1}$	(1.3 \pm 0.1) $\times 10^{-1}$	(3.5 \pm 0.2) $\times 10^{-1}$	(3.8 \pm 0.2) $\times 10^{-1}$
α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc	(3.3 \pm 0.4) $\times 10^{-1}$	(2.5 \pm 0.3) $\times 10^{-1}$	(7.0 \pm 1.0) $\times 10^{-1}$	(8.1 \pm 1.0) $\times 10^{-1}$
α -Gal-(1 \rightarrow 3)-Gal	(9.2 \pm 0.3) $\times 10^{-2}$	(6.9 \pm 0.3) $\times 10^{-2}$	(1.0 \pm 0.1) $\times 10^{-1}$	(1.2 \pm 0.7) $\times 10^{-2}$
B antigen triose	(5.6 \pm 0.2) $\times 10^{-2}$	(4.0 \pm 0.1) $\times 10^{-2}$	(1.2 \pm 0.1) $\times 10^{-1}$	(1.4 \pm 0.1) $\times 10^{-1}$
Melibiose	(2.2 \pm 0.1) $\times 10^{-2}$	(1.6 \pm 0.9) $\times 10^{-2}$	(8.6 \pm 0.8) $\times 10^{-1}$	(1.0 \pm 0.1) $\times 10^{-1}$
Guar gum	N. D. ^b	N. D.	N. D.	N. D.

^a α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースに対する活性を 100%とした。

^b Not detected.

BsGH31_19 と FpGH31_19 が高い活性を示すことが明らかになった pNP- α -Gal、 α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオース、Gb3 に関しては、速度論的パラメータを決定した。

まず、両酵素の至適条件に近い pH 6.0、37°C で pNP- α -Gal を基質として反応

速度論値を決定したところ、BsGH31_19の K_m 値は 2.4 ± 0.1 mM、 k_{cat} 値は 0.74 ± 0.08 S⁻¹、FpGH31_19は K_m 値が 2.3 ± 0.3 mM、 k_{cat} 値は 1.9 ± 0.1 S⁻¹ と、両酵素とも同等の値を示した。

さらに、両酵素ともに、 α -(1→4)-ガラクトビオースに対して、Gb3 よりも低い K_m 値を示し、触媒効率 (k_{cat}/K_m) も α -(1→4)-ガラクトビオースを基質とする場合の方が高いことが明らかになった。また、FpGH31_19の α -(1→4)-ガラクトビオースに対する K_m 値は、 8.4×10^{-2} mM と非常に低く、これは BsGH31_19 の 1/7 程度の値であった (表 3-8)。

表 3-8. α -ガラクトシドに対する反応速度論値

酵素	基質	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	相対活性 k_{cat}/K_m (%) ^a
	pNP- α -Gal	2.4 ± 0.1	$(7.4 \pm 0.08) \times 10^{-1}$	3.1×10^{-1}	1.1×10^{-1}
BsGH31_19	Gb3	$(7.7 \pm 0.2) \times 10^{-1}$	173 ± 1.3	225	78
	α -Gal-(1→4)-Gal	$(5.6 \pm 0.2) \times 10^{-1}$	161 ± 1.7	288	100
	pNP- α -Gal	2.3 ± 0.3	1.9 ± 0.1	0.84	6.8×10^{-2}
FpGH31_19	Gb3	$(8.1 \pm 0.9) \times 10^{-1}$	67 ± 4	83	6.8
	α -Gal-(1→4)-Gal	$(8.4 \pm 0.8) \times 10^{-2}$	10 ± 3	1230	100

^a α -Gal-(1→4)-Gal に対する k_{cat}/K_m 値を 100% とした。

3-2-3. 結晶構造解析

タンパク質の結晶化条件のスクリーニングの結果、BsGH31_19 は PEG3,350 を沈殿剤とし、有機酸 (Citric acid、succinic acid、DL malonic acid) と Tris (Tris、Bis tris、Bis tris propane) のモル比 = 7:3–2:8 (有機酸と Tris を合わせた終濃度 100 mM) の条件で平行六面体の結晶を生じた。FpGH31_19 は 1 M NaCl、0.1 M MES (pH 5.5–7.5) の条件で棒状の結晶を生じた (図 3-5 A)。BsGH31_19 結晶の分解能は最大でも 3.5Å あったが、FpGH31_19 結晶では最大 1.9Å の分解能の回折像が再現良く得られた (図 3-5 B)。BsGH31_19、FpGH31_19 のいずれも AlphaFold2 による予測モデルを鋳型とする分子置換法によって位相を決定した。

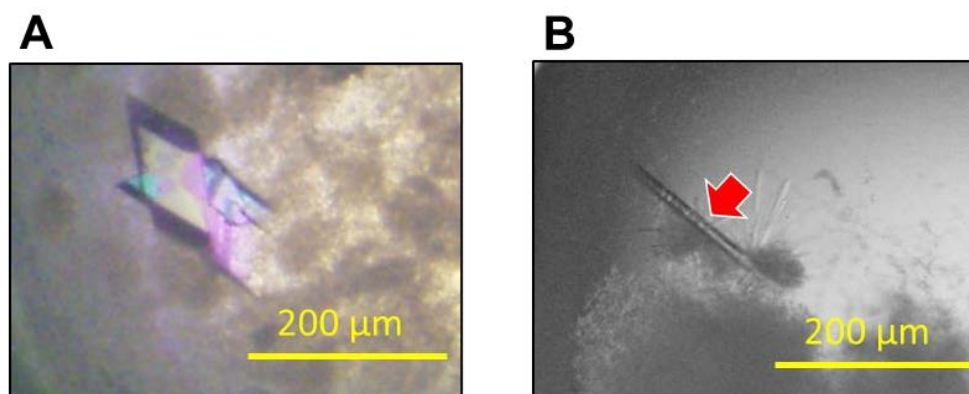


図 3-5. BsGH31_19 および FpGH31_19 の結晶化

BsGH31_19 (A) および FpGH31_19 (B) の結晶。赤矢印は FpGH31_19 の結晶を示す。

BsGH31_19 と FpGH31_19 の結晶はそれぞれ空間群 $C2$ と $P1$ に属し、結晶学的非対称単位中には、それぞれ 5 分子と 2 分子のタンパク質が含まれていた (表 3-9)。

リガンドフリーの FpGH31_19 の構造は 1.9 Å の分解能で決定され、Gln33 から Thr545 までのほぼすべてのアミノ酸の連続した電子密度マップ ($2F_o - F_c$, 1σ) が認められたが、一部 $A\beta 7$ と $A\alpha 7$ の間のループ領域を形成する 399-402 番目の残基では不明瞭なマップしか得られなかった。そのため、この部分を除いたモデルを構築した。また、100 mM Gal および 22% (v/v) エチレングリコールを含

むりザーバー溶液を抗凍結剤として用いることで、FpGH31_19 の Gal 複合体構造を得た。さらに、求核触媒残基をアラニンに変異させた変異体を、10 mM α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースに 20 時間浸漬することでミカエリス複合体構造を得た。

BsGH31_19 の構造は、3.5 Å の分解能で決定され、Chein B の 386–390 番目の残基と Chein E の 387–389 番目の残基を除いてモデルを構築した。

表 3-9. データコレクションとリファインメント統計値

	FpGH31_19			BsGH31_19
	Unliganded	Gal	D304A α -Gal-(1 \rightarrow 4)- Gal	
Data collection				
Beamline	PF-BL5A	PF-BL5A	PF-BL5A	PF-BL5A
Wavelength (\AA)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Space group	<i>P</i> 1	<i>P</i> 1	<i>P</i> 1	<i>C</i> 2
Cell dimensions				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (\AA)	71.7, 72.4, 81.1	71.6, 73.8, 81.6	71.5, 72.6, 81.3	149.0, 48.4, 76.7
α , β , γ ($^\circ$)	101.7, 105.0, 103.7	101.8, 103.3, 103.8	101.9, 104.4, 103.7	90.0, 95.0, 90.0
Resolution range (\AA)	46.09–1.9 (1.93–1.90) ^a	46.01–2.15 (2.19–2.15)	46.00–1.90 (1.93–1.90)	48.59–3.50 (3.62–3.50)
Measured reflections	390,364	273,342	399,519	311,253
Unique reflections	111,441	77,597	113,161	45,955
Completeness (%)	96.4 (77.4)	98.0 (97.1)	97.4 (95.8)	99.9 (100)
Redundancy	3.5 (3.3)	3.5 (3.5)	3.5 (3.6)	6.8 (7.0)
Mean <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	6.4 (1.5)	9.9 (2.1)	7.8 (1.6)	9.3 (2.0)
<i>R</i> _{merge}	0.079 (0.437)	0.097 (0.487)	0.087 (0.591)	0.168 (1.050)
CC _{1/2}	(0.770)	(0.739)	0.997 (0.769)	1.000 (0.947)
Refinement statistics				
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.136/0.181	0.152/0.222	0.136/0.192	0.257/0.313
RMSD ^b				
Bond length (\AA)	0.0119	0.0077	0.0129	0.0085
Bond angles ($^\circ$)	1.620	1.439	1.623	1.498
Number of atoms				
Protein	8,123	8,123	8,108	20,611
Ions	2	2	2	–
Ligand	72	96	90	–
Water	654	386	794	–
Average <i>B</i> (\AA^2)				
Protein	29.41	35.81	25.75	103.18
Ions	32.53	47.76	27.63	–
Ligands	38.09	41.6	31.15	–
Water	34.2	37.86	31.44	–
Ramachandran plot				
Favored (%)	97.23	97.23	97.03	93.07
Outliers (%)	1.06	0.70	0.40	0.48
Clash score	2.03	1.90	1.97	9.45
PDB codes	8J50	8J51	8J52	8J53

^a 最大分解能のシェルのパラメータを括弧中に示した。

^b Root mean square deviation

3-2-4. FpGH31_19 と BsGH31_19 の全体構造

3-2-4-1. 単量体構造

FpGH31_19 および BsGH31_19 は、N末端の β サンドイッチドメイン (Nドメイン、残基 29-117)、A β 3 と A α 3 の間にインサート領域 (残基番号 225-276) を有する (β/α)₈バレル構造の触媒ドメイン (Aドメイン、残基 118-469)、およびC末端の β サンドイッチ構造のドメイン (proximal C-ドメイン、残基 470-546) から構成されており、GH31 酵素で一般的に保存されている distal C-ドメインを欠損していた(図 3-6 A)。これまでに、distal-Cドメインをもない GH31 酵素としては、*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来の α -glucosidase BT_0339 (GH31_3, (Chaudet and Rose 2016))、*Aspergillus niger* 由来の α -キシロシダーゼ (GH31_5 (Light et al., 2017))、環状四糖分解酵素 (GH31_7 (Light et al., 2017))、スルホキノボシダーゼ (GH31_13 (Speciale, et al., 2016; Abayakoon et al., 2018))、MYORG (GH31_20 (Meek, et al., 2022)) の構造が報告されている。

Dali サーバー (Holm and Rosenström 2010) を用いた構造相同性検索の結果、FpGH31_19 は既知の GH31 酵素の中で MYORG (PDB 5HPO) に対する Zスコアが 37.4 と最も高く、細菌の α -ガラクトシダーゼ PsGal31A (PDB 4XPO) に対する Zスコアは 27.5 と低かった。

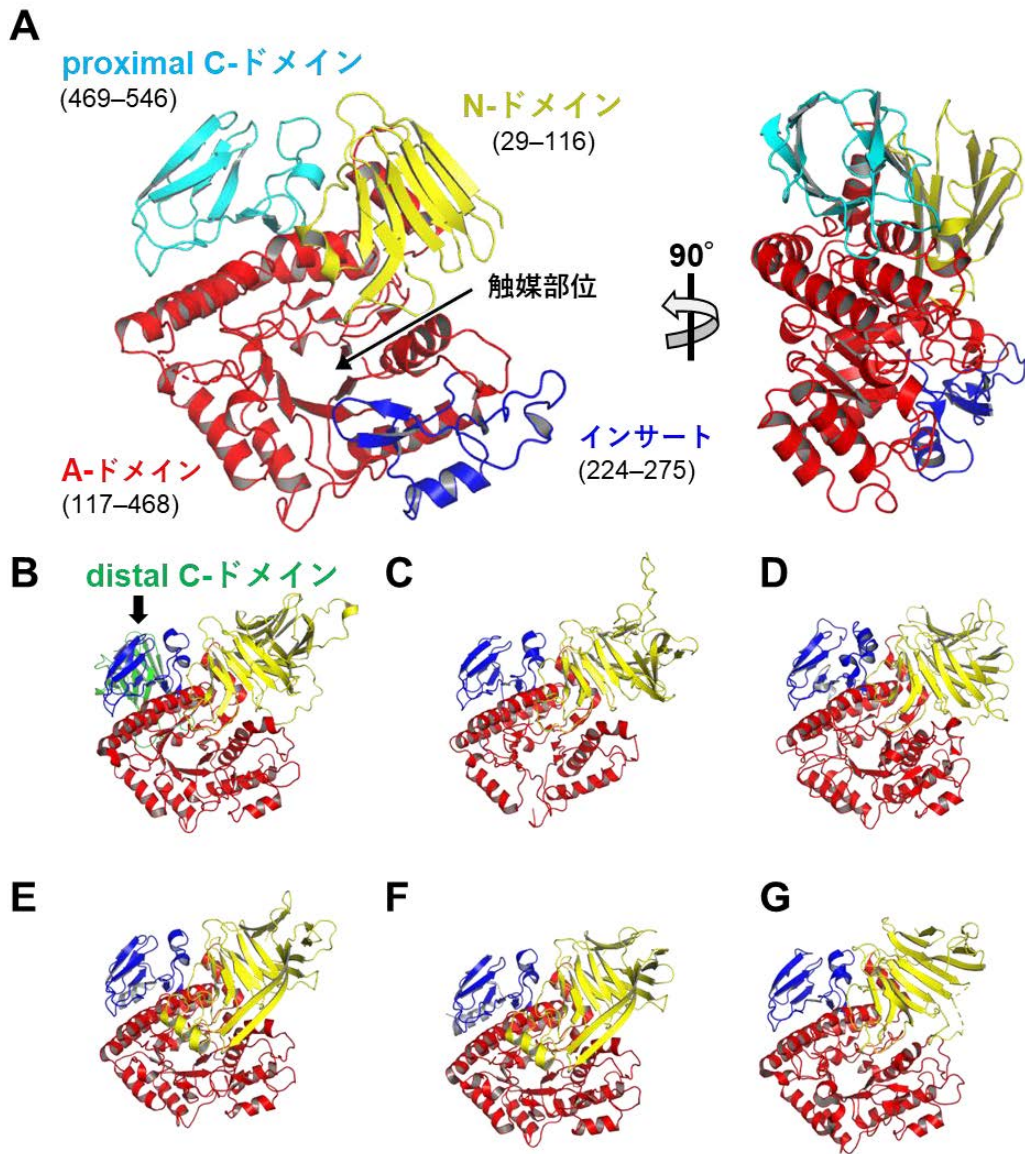


図 3-6. FpGH31_19 と GH31 酵素の全体構造

A) FpGH31_19 の全体構造。ドメインの色分けは以下の通りである。N-ドメイン (残基番号 29–117), 赤色; Aドメイン (残基番号 173–502); A-ドメインインサート, 黄色 (残基番号 224–275); proximal C-ドメイン (残基番号 469–549), シアン B) *E. coli*. 由来 α -キシロシダーゼ YicI (PDB 1WE5)。C) *B. thetaiotaomicron* 由来 BT_0339 α -グルコシダーゼ(PDB 5F7C)。D) *Aspergillus niger* 由来 α -キシロシダーゼ (PDB 6DRU)。E) *Trueperella pyogenes* TP6375 由来環状四糖分解酵素 (PDB 5F7S)。F) *Agathobacter rectalis* ATCC 33656 由来スルホキノボシダーゼ (PDB 6PNR)。G) *H. sapiens* 由来 MYORG (PDB 7QQF)。

3-2-4-2. 二量体構造

FpGH31_19 は、結晶学的非対称単位中の二分子が二量体を形成していると考えられた。また、BsGH31_19 は、結晶学的非対称単位中に 2 つの二量体 (chain A、B、D、E) と 1 つの単量体 (chain C) が含まれていたが、chain C の分子は、結晶学的二回回転対象の分子と 2 量体を形成していた (図 3-7)。このため、両酵素はともに二量体であると考えられ、この結果はゲル濾過クロマトグラフィーの結果とも合致する。

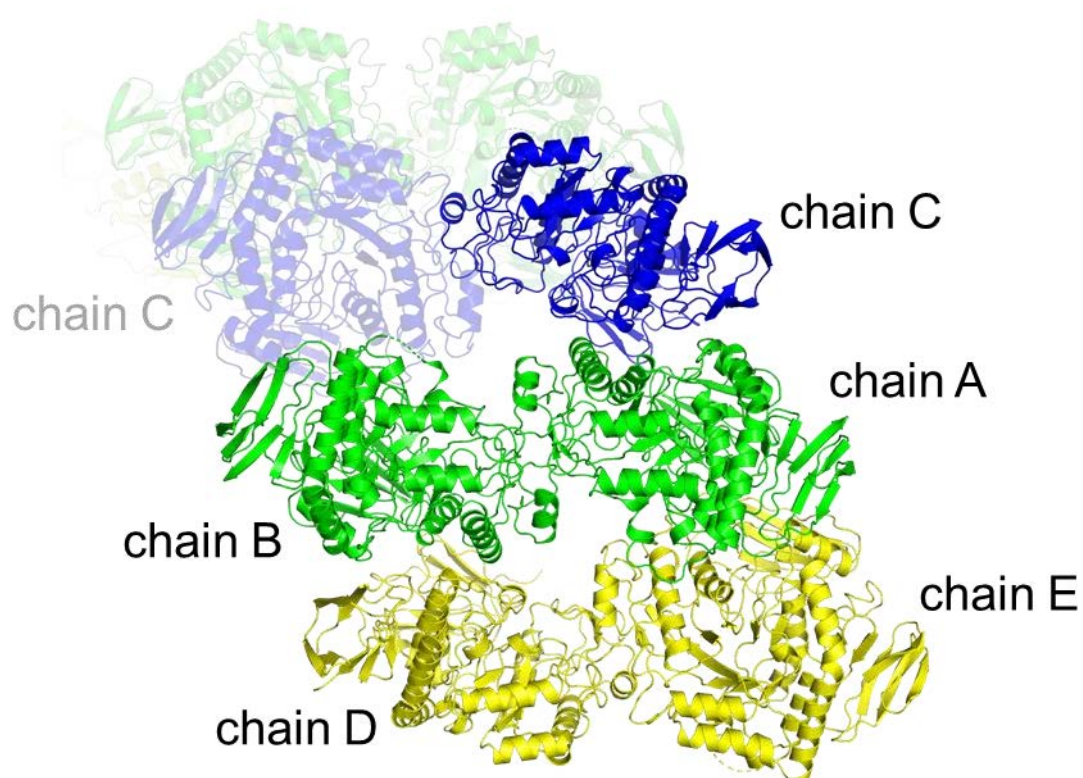


図 3-7. BsGH31_19 の結晶学的非対称単位中の分子

二量体を形成している分子は同じ色で示し、対称の分子は透明色で示した。

BsGH31_19 と FpGH31_19 の二量体中の各酵素分子は、A ドメインのインサート領域で互いに接触していた (図 3-8 B および C)。また、MYORG もインサート領域を介して二量体化するが、BsGH31_19 と FpGH31_19 ではインサート

領域に加えて、A β 2-A α 2 間、A β 1-A α 1 間のループと A-ドメインとの相互作用の寄与も大きかった (図 3-8 D)。このため、BsGH31_19 (chain A と chain B) と FpGH31_19 の界面の面積それぞれ 936Å² と 1101Å² と MYORG (639Å²) よりも大きかった (Meek et al., 2022)。

また、PsGal31A も二量体を形成するが、PsGal31A は N-ドメインに存在するインサート領域が二量体形成に重要な役割を果たしており (Miyazaki et al., 2015)、その会合の仕方は GH31_19 や MYORG とは大きく異なっていた (図 3-8 D)。

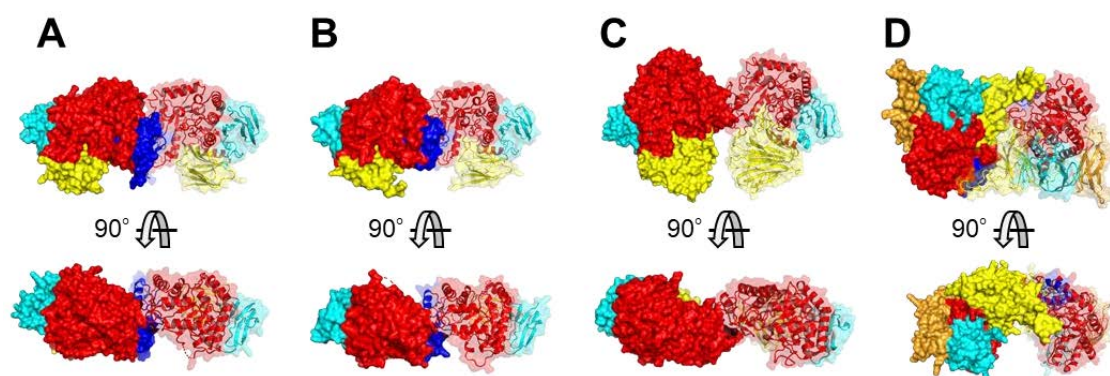


図 3-8. BsGH31_19 の二量体構造

BsGH31_19 (A)、FpGH31_19 (B)、ヒト MYORG (C)、PsGal31A (D) の二量体構造を示した。ドメインの色分けは以下の通りである。N-ドメイン, 黄色; A-ドメイン, 赤色; インサート, 青色; proximal C-ドメイン, シアン; distal-C ドメイン (PsGal31A), 橙色。

3-2-5. FpGH31_19 の基質複合体構造

3-2-5-1. Gal 複合体構造

本章でも第二章と同様にサブサイトを定義し、対応するサブサイトに結合した糖残基をそれぞれ Gal-1、Gal+1 のように呼ぶ (図 2-12)。

野生型 FpGH31_19 酵素と Gal との複合体の結晶構造は、2.15Å の分解能で決定できた。この構造では、サブサイト-1 に α -Gal と β -Gal に対応する明確な電子密度が観察されたため、両アノマーのモデルを構築した (図 3-9 A)。また、求核触媒残基、一般酸/塩基触媒残基と考えられる Asp304 残基と Asp359 残基は Gal-1 分子の C1 原子付近に位置しており、触媒残基として電子の授受が可能と思われる位置に存在していた (図 3-9 B)。そこで FpGH31_u1 の D304A 変異体を作製し、pNP- α -Gal に対する活性を測定したところ、WT の 0.5% に活性が低下した。また、触媒残基を含む FpGH31_19 のサブサイト-1 の構造は、BsGH31_19 と非常に類似していた (図 3-9 C)。

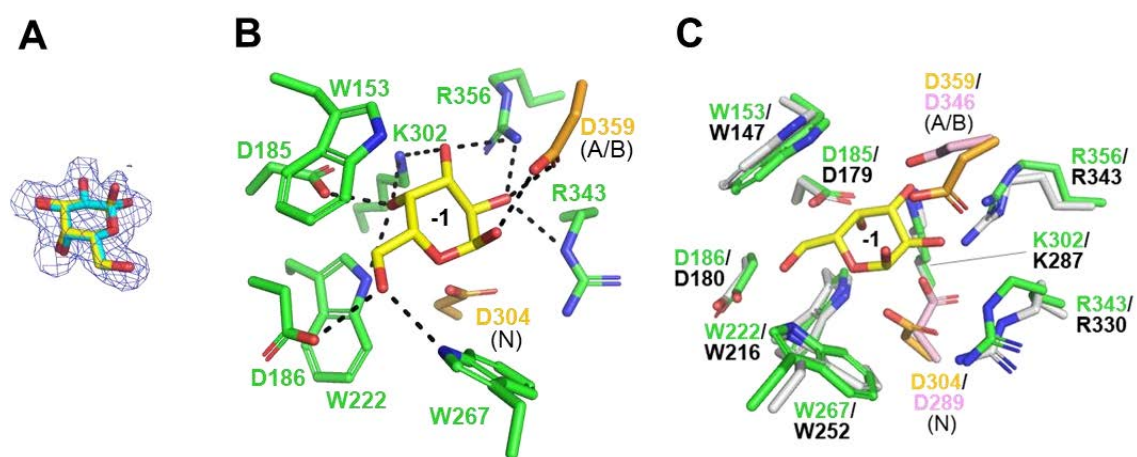


図 3-9. FpGH31_19 のサブサイト-1

A) FpGH31_19 WT に結合した α -Gal を黄色、 β -Gal をシアンのスティックモデルで示し、 $F_o - F_c$ マップを 2σ で描いた。B) FpGH31_19 Gal のサブサイト-1。 α -Gal を黄色、 α -Gal と相互作用する側鎖を緑色、触媒残基を橙色のスティックモデルで示した。C) BsGH31_19 と FpGH31_19 のサブサイト-1 の重ね合わせ。 FpGH31_19 の α -Gal (黄色) と相互作用するアミノ酸残基の側鎖 (緑) と BsGH31_19 の対応する残基 (白) をスティックモデルで示し、BsGH31_19 と FpGH31_19 の触媒残基をそれぞれピンクとオレンジで示した。

3-2-5-2. α -(1→4)-ガラクトビオース複合体構造

FpGH31_19-D304A 変異体の結晶を 10 mM の α -(1→4)-ガラクトビオースまたは Gb3 を含む溶液に 20 時間浸漬し、構造解析を行った結果、明瞭な α -(1→4)-ガラクトビオースの電子密度が観測された。一方で、Gb3 に浸漬しても α -(1→4)-ガラクトビオースの電子密度のみが観測され、還元末端グルコース残基の電子密度は不明瞭で、モデルを構築することができなかった。そのため、 α -(1→4)-ガラクトビオースとの複合体結晶構造のみを 1.9 Å の分解能で決定した。

α -(1→4)-ガラクトビオースの複合体においても、サブサイト-1 の Gal 残基は Gal 複合体と同じく 4C_1 コンフォメーションをとっていた (図 3-10)。

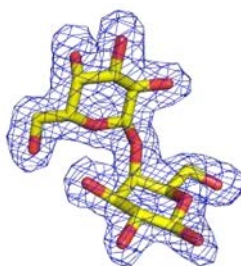


図 3-10. α -(1→4)-ガラクトビオースの電子密度マップ

FpGH31_19 D304A に結合した α -(1→4)-ガラクトビオースを黄色のスティックモデルで示し、 F_o-F_c マップを 2σ で描いた。

3-2-5-3. GH31 α -ガラクトシダーゼとの比較

FpGH31_19、BsGH31_19、MYORG の構造を比較すると、サブサイト-1 を構成するアミノ酸残基の種類はほぼ同じであった (図 3-11)。しかし、サブサイト-1 の Gal 残基 (Gal-1) の 2 位のヒドロキシ基と相互作用するアルギニン残基 (Arg343) のコンフォメーションには顕著な違いがあり、MYORG では、対応するアルギニン (Arg504) の $N\eta$ が Gal-1 の 2 位のヒドロキシ基と水素結合を形成している一方、FpGH31_19 では、Arg343 の $N\epsilon$ がこの役割を果たしていた (図 3-11)。また、FpGH31_19 における Arg343 側鎖のコンフォメーションは、リガンドの有無に関わらず同じであった。このアルギニン酸残基のコンフォメーションの違いは、FpGH31_19 では Asp307 と塩橋が形成されていることによって生じており、MYORG では Asp307 に対応するアミノ酸残基が Glu466 に置換されていたため、この塩橋は見られなかった。

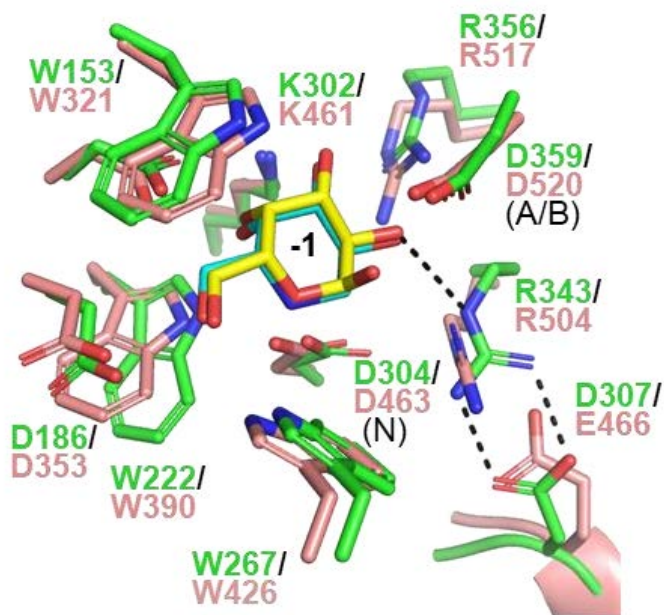


図 3-11. FpGH31_19 と MYORG のサブサイト+1 の重ね合わせ

FpGH31_19 (緑) と Gal (黄色) の複合体および MYORG (PDB 7QQG、ピンク) と 1-deoxygalactonojirimycin (シアン) の複合体の重ね合わせ。水素結合と塩橋を破線で示す。N は求核触媒残基、A/B は酸/塩基触媒残基を示す。

また、この Arg343 残基 (MYORG では Arg505) は、サブサイト+1 側の環境形成にも寄与しており、MYORG では、Gal-1 と相互作用していた Arg505 が Glc+1 の 4 位ヒドロキシ基とも水素結合を形成していた。一方、FpGH31_19 では、Arg343 が MYORG とは異なるコンフォメーションを取るため、サブサイト+1 側の基とは水素結合を形成していなかった。

Glc と Gal の違いは、4 位ヒドロキシ基がエクアトリアルに結合しているか、アキシアルかのみであり、 α -(1 \rightarrow 4)-結合した Gal+1 と Glc+1 は、六員環が反転した形でそれぞれ酵素に結合していた。そのため、FpGH31_19 の Gal+1 では、MYORG の Glc+1 において 3 位のヒドロキシ基が位置していた場所に、6 位のヒドロキシ基が位置することになるが、Arg343 のコンフォメーションの違いによって Gal+1 の 6 位のヒドロキシ基を受け入れるスペースが生じていた (図 3-11)。

また、FpGH31_19 のサブサイト+1 では、Trp267 が Gal+1 のピラノース環と

相互作用する疎水性環境を形成しており、この残基は MYORG では保存されているが、PsGal31A では保存されていなかった (図 3-12 A および B)。

FpGH31_19 と他の GH31 α -ガラクトシダーゼとの最も大きな差異として、Asp394 および Arg358 残基が挙げられる。Asp394 はサブサイト+1 の α -ガラクトピオースの 1 位ヒドロキシ基と水素結合を形成し、Arg358 は 6 位ヒドロキシ基およびヘミアセタール酸素 O5 と水素結合を形成する。これらの残基は MYORG と PsGal31A では保存されておらず、基質特異性の違いに寄与している可能性が高い (図 3-12)。

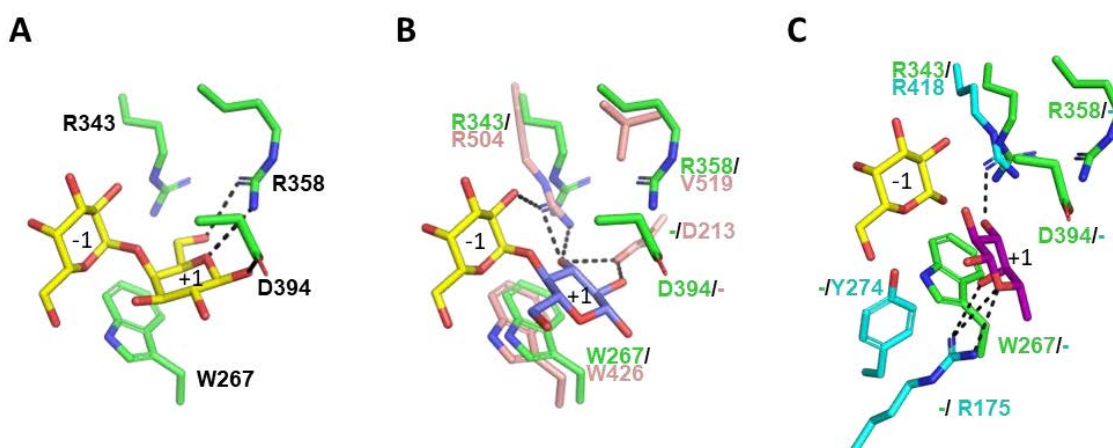


図 3-12. FpGH31_19 と他の GH31 α -ガラクトシダーゼのサブサイト+1 の比較

(A) FpGH31_19 (緑) と α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal との複合体。 (B) および MYORG (ピンク) と α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc (PDB 7QQH) との複合体。 (C) PsGal31A (シアン) と Gal (PDB 4XPP) および L-フコース (PDB 4XPQ) との複合体。グルコース、Gal、L-フコースはそれぞれ黄色、水色、紫色のスティックモデルで示した。

さらに、FpGH31_19 と MYORG の α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc 複合体構造との比較から、MYORG に α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトピオースが結合しようとしても、Asp213 と Tyr215 が Gal+1 と立体障害を起こすことが示唆された。これらの残基が存在しているループは、FpGH31_19 では短く、これらの残基は FpGH31_19 の構造には観察されなかった (図 3-13 A, B)。

また、 α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトシドに活性のある α -ガラクトシダーゼは、GH27 ファ

ミリーより報告があるため、GH27 のヒト α -ガラクトシダーゼ A と構造の比較を行った。ヒト α -ガラクトシダーゼ A はグロボ系糖鎖だけでなく、メリビオースにもわずかに活性を示し、メリビオースが活性部位に結合できることが知られているが、 α -ガラクトシダーゼ A は、FpGH31_19 よりも浅い基質結合ポケットを有していた。(図 3-13 C)。

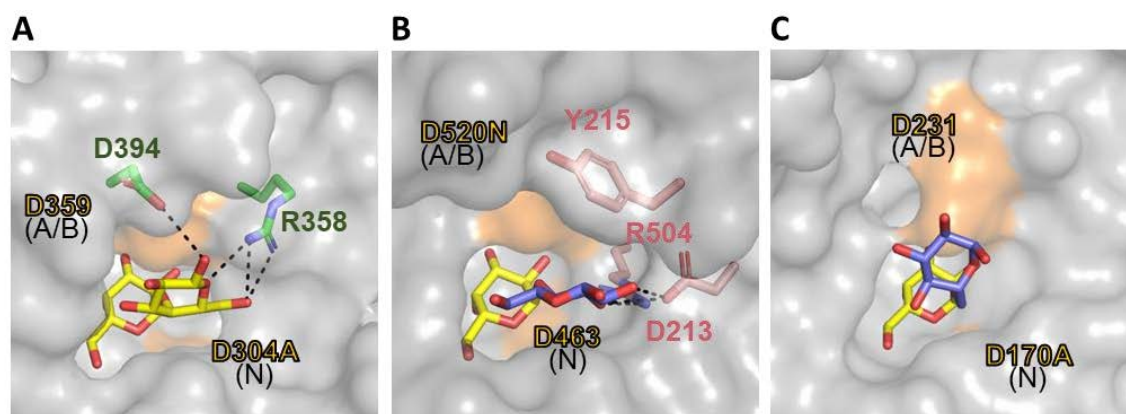


図 3-13. FpGH31_19 と他の GH31 α -ガラクトシダーゼの分子表面の比較

A) FpGH31 と α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal との複合体。B) ヒト MYORG と α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc との複合体 (PDB 7QQH)。C) ヒト GH27 α -ガラクトシダーゼ A とメリビオースとの複合体 (PDB 3HG3)。

続いて、FpGH31_19 と BsGH31_19 の構造の比較を行った。意外なことに、両酵素は α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal に高い基質特異性を示すにもかかわらず、FpGH31_19 において Gal+1 と水素結合を形成する残基 (Asp394 と Arg358) は BsGH31_19 では保存されていなかった。すなわち、FpGH31_19 の Asp394 と Arg358 は BsGH31_19 ではそれぞれ Gln381 と Gly345 に置換されていた。Asp394 に関しては、BsGH31_19 では、Gln381 が Asp 残基と同様に水素結合を形成可能であると考えられた。一方、Arg358 は、Gly345 に置換されていたが、その代わりに FpGH31_19 の Gly73 が、BsGH31_19 では Asn67 に置換され、基質と相互作用すると考えられた。従って、FpGH31_19 の Asp394 と Arg358 に相当する残基は、BsGH31_19 では Asn67 と Gln381 によって補われている可能性が示唆された (図 3-14)。

BsGH31_19 と FpGH31_19 の活性部位の構造は、サブサイト+1 以外にも差異が認められた。FpGH31_19 においては、 α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースの α -アノマーの先のサブサイト+2 に相当する空間には Tyr361 残基が存在し、Gb3 のグルコース残基のわずかな立体障害を引き起こす可能性が示唆された。一方 BsGH31_19 では、このチロシン残基は Asp348 に置換されており、サブサイト+2 と推定される空間がやや広がっていた。

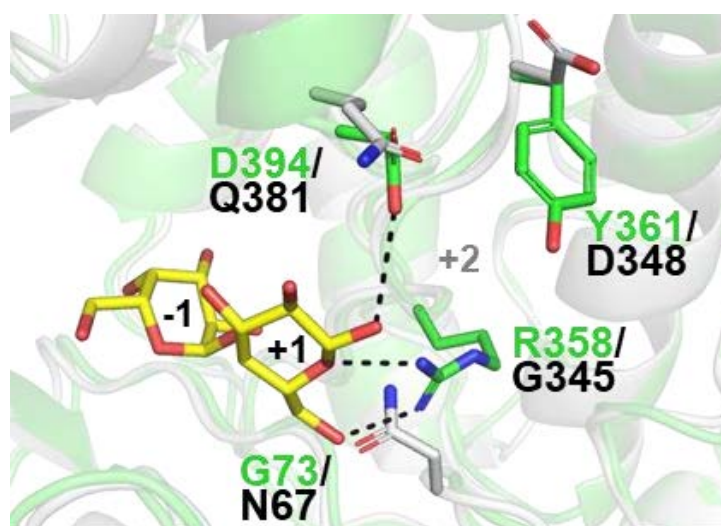


図 3-14. FpGH31_19 と BsGH31_19 の活性部位の比較

FpGH31_19 (緑) と α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal との複合体およびリガンドを含まない BsGH31_19 (白) の重ね合わせ。水素結合は破線で示す。

BsGH31_19 と FpGH31_19 で異なっていたサブサイト+1 の認識に関与するアミノ酸残基の保存性を調べるために、アミノ酸配列アラインメントを行った(図 3-15)。BsGH31_19 と FpGH31_19 に近縁なタンパク質のほとんどは、Asn と Gly のペア (例えば BsGH31_19 の Asn67/Gly345) または Gly と Arg のペア (例えば FpGH31_19 の Gly73/Arg358) を持っていたのに加え、FpGH31_19 の Asp394 と BsGH31_19 の Gln932 には Gln、Glu、Asn、Asp、または Ser のような極性アミノ酸がアラインされた。また、触媒残基ペアは GH31_19 タンパク質間で高度に保存されていた。しかしながら、GH31_19 全体では Asp/Gly あるいは Gly/Arg のペアは普遍的に保存されている訳ではなく、このアミノ酸残基ペアを持たないタンパク質も多く存在した。

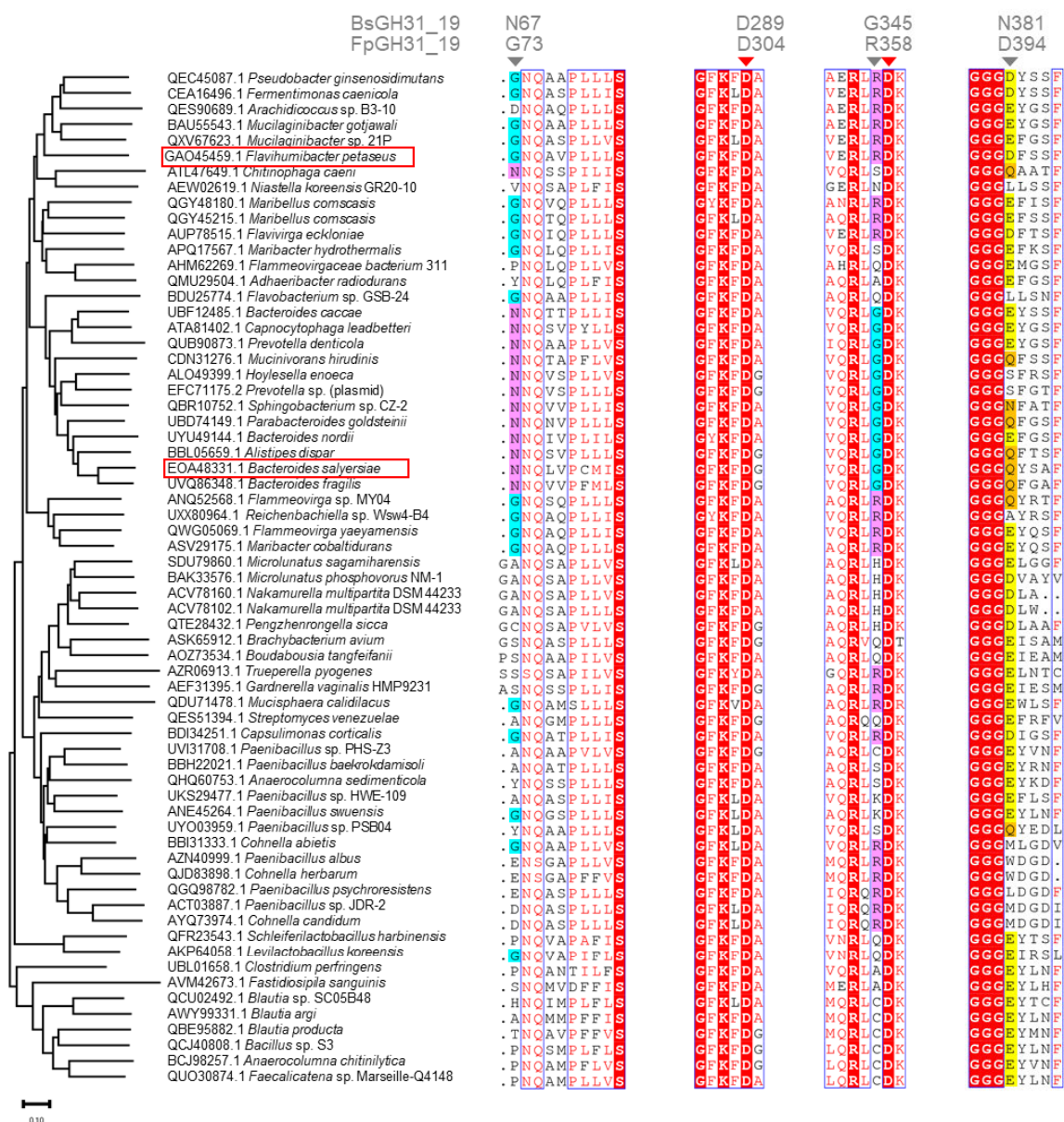


図 3-15. GH31_19 の配列アラインメント

GH31_19 タンパク質の配列は、CAZy データベースから NCBI accession number を取得し、冗長性を除去するために CD-HIT を用いて 70% の配列類似度でクラスタリングし、MUSCLE によってアラインメントした。系統関係は neighbor-joining 法により推定した。図は ESPrnt で作成した。触媒残基と基質認識に関与する残基をそれぞれ赤と灰色の三角形で示す。BsGH31_19 の Asn67 と FpGH31_19 の Arg358 に対応する残基はピンクで、グリシンで置換された残基は青でハイライトした。FpGH31_19 の Asp394 とアラインされたアミノ酸残基のうち、アミド基を持つ残基 (Asn と Gln) はオレンジ色で、カルボキシ基を持つ残基 (Asp と Glu) は黄色でそれぞれ表示した。

3-4. 考察

3-4-1. 酵素学的性質

本研究では、GH31_19 α -ガラクトシダーゼである BsGH31_19 と FpGH31_19 が α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal 結合に対して基質特異性を示すこと見出し、その X 線結晶構造を明らかにした。

α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal に作用する酵素としてよく知られたものには、リソソームで働く GH27 ファミリーの α -ガラクトシダーゼ A がある。この酵素は、 α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal 部分を加水分解することにより、グロボトリアオシルセラミドの分解に参与する (Dean and Sweeley 1979)。ヒト由来 α -ガラクトシダーゼ A は、GH31_19 と異なり、 α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースよりも Gb3 に対して高い親和性を示す (表 3-10)。また、ヒト由来 α -ガラクトシダーゼ A の基質結合ポケットはメリビオースも結合可能で、メリビオースに対しても活性を示すが、メリビオースに対する K_m 値は合成基質である 4-methylumbelliferyl α -galactopyranoside に対する K_m 値よりも約 10 倍高い (表 3-10) (Beutler and Kuhl 1972)。

一方、FpGH31_19 と BsGH31_19 は Gb3 よりも α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースに対して高い活性を示し、メリビオースに対してほとんど活性を示さない。グロボ系のスフィンゴ糖脂質は動物細胞に多く存在するが、他の生物には存在しないため、バクテリアが α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal に基質特異性が高い α -ガラクトシダーゼを有していたことは興味深い。

動物以外の種に由来する α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal に対して活性を持つ α -ガラクトシダーゼは、GH27 ファミリーや GH36 ファミリーから報告がある。例えば、タバコ (*Nicotiana benthamiana*) の GH27 α -ガラクトシダーゼ A1.1 は、ヒト由来 α -ガラクトシダーゼ A と同等の活性をスフィンゴ糖脂質基質に対して示す (Kytidou et al., 2018)。また、タロイモ (*Colocasia esculenta*) 由来の GH27 α -ガラクトシダーゼと乳酸菌 *Bifidobacterium breve* UCC2003 由来の GH36 α -ガラクトシダーゼ MelE も α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal に対して活性を示す。しかし、これらの酵素は α -1,3-ガラクトシド結合にも高い活性を持つ (O'Connell et al., 2013; Chien and Lin-Chu 1991)。

これまでに報告されている Gb3 に対する基質特異性を持つ酵素は GH27 ファミリーに属し、他のファミリーからは Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal に対して厳密な特異性を持つ酵素は報告されていない。このことから、GH31 の GH31_19 は独立して α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal に対する活性を獲得した可能性が示された。

表 3-10. α -ガラクトシダーゼの α -(1→4)-ガラクトシドに対する反応速度論値

酵素	基質	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} mM^{-1}$)	相対活性 k_{cat}/K_m (%) ^a	参考文献
	pNP- α -Gal	2.4 ± 0.1	$(7.4 \pm 0.08) \times 10^{-1}$	3.1×10^{-1}	1.1×10^{-1}	
BsGH31_19	Gb3	$(7.7 \pm 0.2) \times 10^{-1}$	173 ± 1.3	225	78	本研究
	α -Gal-(1→4)-Gal	$(5.6 \pm 0.2) \times 10^{-1}$	161 ± 1.7	288	100	
	pNP- α -Gal	2.3 ± 0.3	1.9 ± 0.1	0.84	6.8×10^{-2}	
FpGH31_19	Gb3	$(8.1 \pm 0.9) \times 10^{-1}$	67 ± 4	83	6.8	本研究
	α -Gal-(1→4)-Gal	$(8.4 \pm 0.8) \times 10^{-2}$	10 ± 3	1230	100	
MYORG	4-MU- α -Gal	N. A.	N. A.	7.2×10^{-3}	883	(Meek et al., 2022)
	α -Gal-(1→4)-Glc	$(9.8 \pm 0.7) \times 10^{-1}$	$(8.1 \pm 0.5) \times 10^{-4}$	8.2×10^{-4}	100	
	4-MU- α -Gal	2.9	N. A.	N. A.	N. A.	
	Gb3	4.1	N. A.	N. A.	N. A.	(Dean and Sweeley 1979)
Galactosidase A	α -Gal-(1→4)-Gal	5.5	N. A.	N. A.	N. A.	
	Globotriasylyceramide	1.8×10^{-3}	N. A.	N. A.	N. A.	
	Melibiose	40.6	N. A.	N. A.	N. A.	(Beutler and Kuhl 1972)

^a α -Gal-(1→4)-Gal に対する k_{cat}/K_m 値を 100%とした。

^b 4-Methylumbelliferyl α -galactopyranoside.

^c Not available.

3-4-2. 立体構造と進化的関係の相関

BsGH31_19 および FpGH31_19 は、細菌由来の α -ガラクトシダーゼ PsGal31A (GH31_14, 配列相同性 19.5% および 18.8%) よりも、ヒト由来の MYORG (GH31_20, 配列相同性 22.1% および 20.2%) とわずかに高い配列相同性を示した。これは、BsGH31_19 および FpGH31_19 の立体構造が PsGal31A よりも MYORG と高い類似性を示したと合致し、FpGH31_19 と MYORG が進化的に近いことを支持する。

また、FpGH31_19 と PsGal31A を比較すると、両者のサブサイト-1 のガラクトースと相互作用する一部のアミノ酸残基に違いが見られた。中でも、興味深い点として、ガラクトースの C4 原子の α 面と疎水性相互作用する Trp 残基の相違が挙げられる。PsGal31A ではこの Trp 残基 (Trp153) は A-ドメインの A α 8 と A β 8 の間のループ上に存在していたのに対し、BsGH31_19 と FpGH31_19 では A α 1 と A β 1 の間のループ上に存在していた (図 3-16)。

GH27 と GH36、およびそれらと系統的に近いことが示唆されている GH97 の α -ガラクトシダーゼは、GH31 ファミリーと同じく $(\beta/\alpha)_8$ barrel 構造の触媒ドメインを持つため (Okuyama et al., 2017)、それらのファミリーの構造既知酵素との比較を行ったところ、すべての酵素が GH31_19 と同じループ上に Trp 残基を有していた。このため、PsGal31A が GH31_19 とは独立に別の位置にトリプトファン残基を獲得した可能性が示唆された。

以上のことから本研究において、PsGal31A が分類されるサブファミリー GH31_14 が、GH31_19 から系統的に離れている一方、GH31_19 と GH31_20 が近縁の共通祖先を持つことが示唆されるが、これは GH31 のサブファミリーを定義した先行研究で示唆された系統的關係とも合致する (Arumapperuma, et al., 2023)。

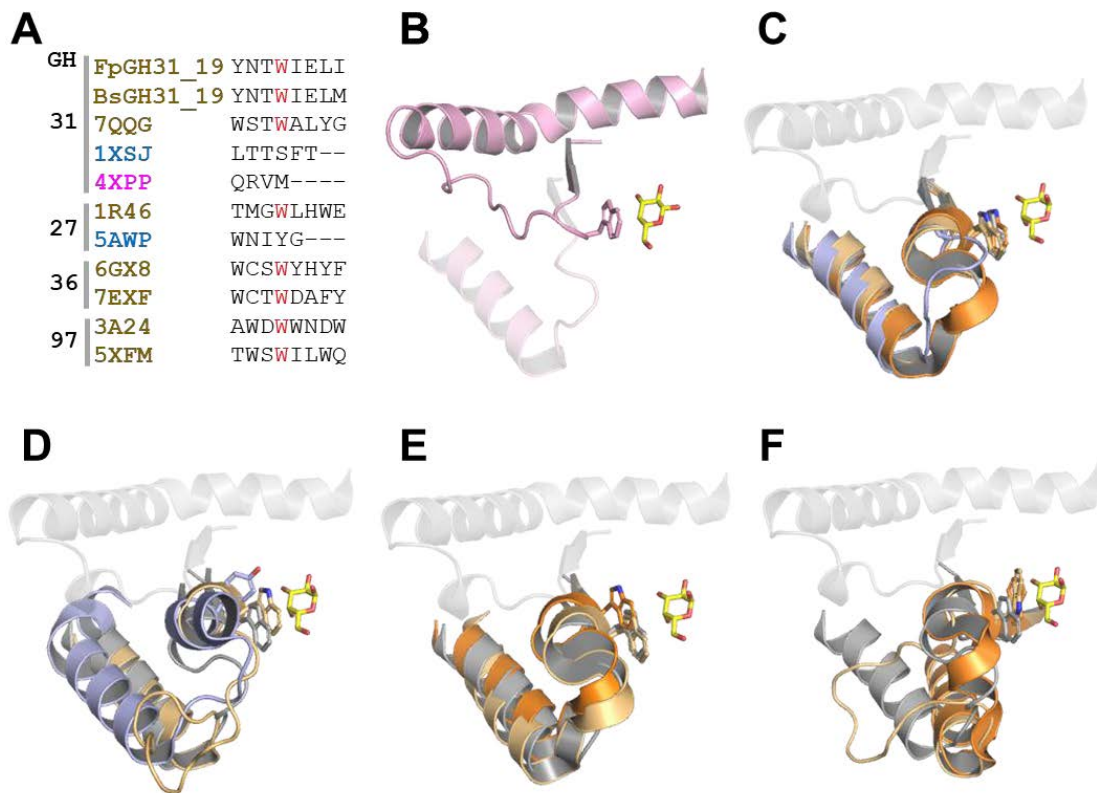


図 3-16. ガラクトースの C4 原子の α 面と疎水性相互作用する Trp 残基の位置の相違

A) GH31、GH27、GH36、GH97 酵素の A β 1 と A α 1 の間のループの 3D アライメント。アライメントは PROMALS3D web server (Pei et al., 2008) を用いて計算し、5AWO の配列のずれは手動で修正した。B) PsGal31A (PDB4XPP、ピンク) とその Gal リガンド (黄色)。C) FpGH31_19 (灰色) とその Gal リガンド (黄色) を BsGH31_19 (淡橙色)、MYORG (PDB 7QQG、橙色)、大腸菌由来 GH31 α -キシロシダーゼ (PDB 1XSJ、淡青色)。D) ヒト由来 GH27 α -ガラクトシダーゼ A (PDB 1R46、淡橙色)、*Arthrobacter globiformis* T6 由来イソマルト-デキストラナーゼ (PDB 5AWP、淡青色)。E) *Thermotoga maritima* MSB8 由来 GH36 α -ガラクトシダーゼ (PDB 6GX8、淡橙色)、*Arabidopsis thaliana* 由来 α -ガラクトシダーゼ (PDB 7EXF、橙色)。F) *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 由来 GH97 α -ガラクトシダーゼ (PDB 3A24、淡橙色)、*B. thetaiotaomicron* VPI-5482 由来 β -L-アラビノピラノシダーゼ/ α -D-ガラクトシダーゼ (PDB 5XFM、橙色)。

3-4-3. GH31_19 酵素間の比較

本研究では、 α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオース複合体構造から、Gal+1 と水素結合を形成する FpGH31_19 のアミノ酸残基 Asp394 および Arg358 は BsGH31_19 では保存されておらず、その代わりに、BsGH31_19 では Gln381 と Asn67 がこれらの残基を補っていることが示唆された。BsGH31_19 と FpGH31_19 の速度論値に関して、両酵素の Gb3 および pNP- α -Gal に対するはほぼ同等だが、 α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースに対しては、FpGH31_19 の K_m 値が BsGH31_19 の約 1/7 と低いことが明らかになったが、このアミノ酸残基の違いにより、 α -ガラクトビオースに対する親和性が異なっている可能性が示唆された。

しかし、これらのアミノ酸残基の組み合わせが保存されていない GH31_19 配列も多く、GH31_19 酵素間でサブサイト+1 の構造に多様性があることが示唆された。このため、GH31_19 には、サブサイト+1 の基質特異性が異なる酵素が存在している可能性がある。

3-4-4. GH31_19 の天然の基質に関する考察

FpGH31_19 と BsGH31_19 の基質結合ポケットが浅いことや、細菌がグロボ系のスフィンゴ糖脂質を生産しないことから、この酵素はグロボオリゴ糖だけでなく、一部の細菌が産生する菌体外多糖 (Andersson et al., 1993; Hidalgo-Cantabrana et al., 2014) や特定の微生物細胞壁 (Vinogradov et al., 2013) のような α -Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal 構造を含む多糖の部分構造にも作用できる可能性がある。

多糖を利用するバクテリアの遺伝子は、ゲノム上で遺伝子クラスターを形成している場合が多いことから、GH31_19 の天然の基質に関する知見を得るため、GH31_19 に関連する遺伝子座を比較した (図 3-17)。

FpGH31_19 の遺伝子クラスターには、オリゴ糖の認識と輸送を行うことで知られている SusC 様タンパク質および SusD 様タンパク質をコードする遺伝子群が見いだされ、多糖資化遺伝子群 (PUL) を形成していると考えられた (Terrapon et al., 2015)。一方、BsGH31_19 の近傍には明らかな糖トランスポーター遺伝子は存在しなかった。しかし、BsGH31_19 遺伝子クラスターには、*Bacteroides fragilis* NCTC 9343 (GenBank CAJ33351.1) 由来の α -1,3-ガラクトシダーゼと最も高い配列相同性を持つ GH110 タンパク質が含まれており、BsGH31_19 と α -1,3-ガラクトシダーゼが協働して働く可能性が示唆された。

さらに、他の細菌の GH31_19 遺伝子を含む遺伝子クラスターを解析したところ、糖トランスポーター遺伝子とよく共起していたものの、他の糖質関連酵素との有意な共起は観察されなかった (図 3-17 B)。このことから、自然界における GH31_19 タンパク質の生理的役割や基質が多様である可能性が示唆される。

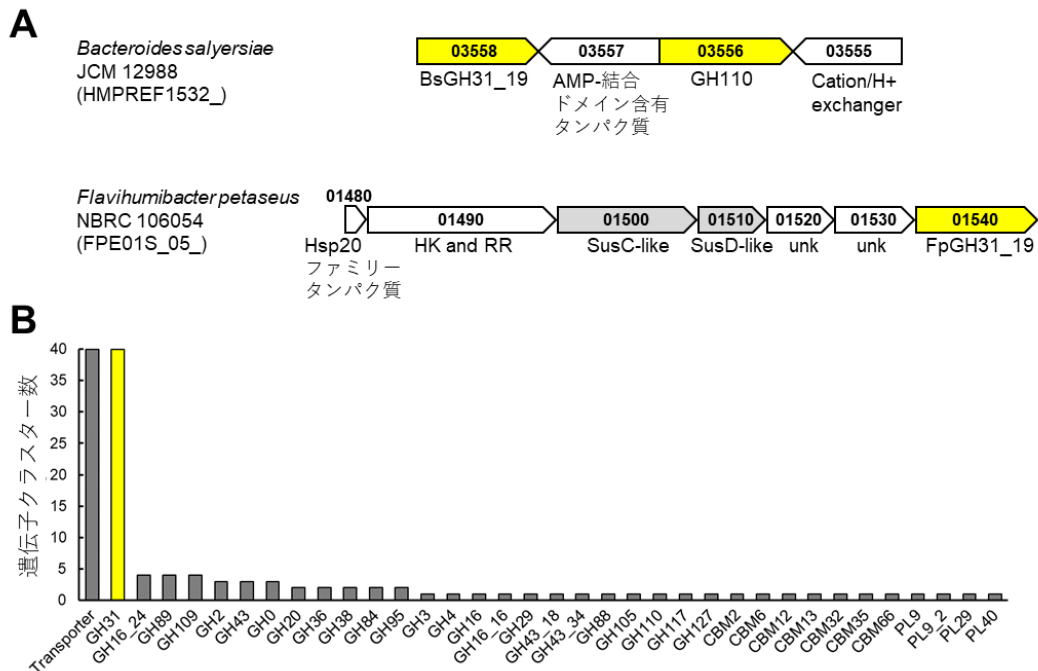


図 3-17. GH31_19 遺伝子近傍の遺伝子

A) BsGH31_19 と FpGH31_19 の遺伝子クラスター。オープンリーディングフレームの遺伝子クラスターを矢印で示した。略号は以下の通りである：hsp、熱ショックタンパク質；HK、センサーヒスチジンキナーゼ；RR、HKに関連する応答制御因子；unk、機能不明タンパク質。B) GH31_19 遺伝子と共起する CAZyme 遺伝子。遺伝子クラスターの推定には dbCAN3 プログラムを用い、CGC 距離値を 5、その他のデフォルト設定を適用した (Zheng et al., 2023)。

3-5. 小括

BsGH31_19 と FpGH31_19 は α -Gal-(1→4)-Gal に対する基質特異性を示し、PsGal31A や MYORG のような既報の GH31 α -ガラクトシダーゼとは異なる酵素であることが明らかになった。

BsGH31_19 と FpGH31_19 の構造解析を行ったことによって、GH31_19 サブファミリーや他の GH31 α -ガラクトシダーゼの特異性や進化的関係性についての知見が得られた。

GH31_19 は、糖トランスポーターとともに遺伝子クラスターを形成している場合が多かったことから、グロボ系糖鎖だけでなく、生物種によっては多糖分解する役割を果たしている可能性が示唆されたが、具体的な多糖の種類は不明である。そのため、同じ遺伝子クラスターに存在する他の酵素を解析することによって、GH31_19 α -ガラクトシダーゼの生理学的機能を理解することができると考えられる。

本研究によって、GH31_19 酵素の構造と機能の多様性が示唆された。

第四章 総括

本研究では、ファミリー内での多様化が高度に進んでいる糖質加水分解酵素ファミリー31に着目し、系統解析に基づいて既報の酵素とは配列相同性が低い遺伝子クラスターを見出した。そして、二つのサブファミリーGH31_15 および GH31_19 に分類される酵素について、酵素学および構造生物学的な解析を行った。

第二章では、これまでに文献報告のある酵素が一つも属していないタンパク質クラスターである GH31_u1 (GH31_15) を標的とした。このクラスターに属する乳酸球菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 由来のタンパク質 (LIGH31_u1) および真菌 *Cordyceps militaris* 由来のタンパク質 (CmGH31_u1) の大腸菌発現と酵素学的性質の評価を行い、両酵素が、 α -(1 \rightarrow 3)-結合のグルコ二糖であるニゲロースに対して高い加水分解活性を示すことを明らかにした。また、LIGH31_u1 のコージビオース (α -(1 \rightarrow 2)-結合) およびマルトース (α -(1 \rightarrow 4)-結合) に対する k_{cat}/K_m 値は、ニゲロースに対する値の 13% および 2.1% であり、そのニゲロースに対する基質特異性は、小胞体グルコシダーゼ II を含む既報の GH31 酵素よりも高かった。さらに、LIGH31_u1 の立体構造を、X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡による単粒子解析によって決定した。両方の構造から、LIGH31_u1 が六量体を形成し、4つの α -ヘリックスを含む C 末端ドメインを有することが明らかになり、それが六量体化に寄与していることが示唆された。また、ニゲロオリゴ糖およびコージビオースとの複合体の結晶構造と変異体解析の結果から、この酵素の基質認識に関与するアミノ酸残基を明らかにした。本研究は、細菌由来 GH31 α -1,3-グルコシダーゼの最初の立体構造の報告であり、細菌および真菌の GH31_u1 の生理学的機能について新たな知見を提供した。

第三章では、*Pseudopedobacter saltans* 由来の PsGal31A や myogenesis-regulating glycosidase (MYORG) と配列相同性が低く、異なる性質を持つことが予想された GH31 α -ガラクトシダーゼ (GH31_19) を標的とし、*Bacteroides salyersiae* 由来のタンパク質 (BsGH31_19) および *Flaviumibacter petaseus* 由来のタンパク質 (FpGH31_19) の解析を行った。大腸菌発現と酵素学的性質の評価の結果、両酵素は α -(1 \rightarrow 4)-ガラクトビオースやグロボトリオース [α -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc] の α -(1 \rightarrow 4)-結合に対して高い基質特異性を示し、既報の GH31 α -ガラクトシダーゼとは異なる基質特異性を示すことが明らかになった。また、

BsGH31_19 と FpGH31_19 の結晶構造解析を行い、両タンパク質のリガンドフリー構造に加え、FpGH31_19 のガラクトース複合体構造および α -(1→4)-ガラクトビオース複合体構造を決定した。これにより、サブサイト+1 のガラクトース残基を認識するアミノ酸残基は FpGH31_19 と BsGH31_19 の間で保存されていないが、互いに補い合うように存在するアミノ酸残基が Gal+1 と水素結合を形成し、同じ基質を認識することが示唆された。加えて、ガラクトースの C4 原子の α 面と疎水性相互作用するトリプトファン残基が、GH31_19、MYORG (GH31_20)、GH27、GH36、GH97 では A ドメインの A α 1 と A β 1 の間に存在しており、PsGal31A では例外的に A α 8 と A β 8 の間のループに存在することを明らかにした。これらの結果は、GH31 α -ガラクトシダーゼサブファミリーと他の α -ガラクトシダーゼファミリーの基質特異性の多様性と進化的関係について、構造生物学的な知見を提供するものである。

また、本研究で見出した酵素の基質は、いずれも天然に希少な糖であり、安価な合成方法が未だ確立されていない。しかし、ニゲロースやニゲロオリゴ糖は、清酒や味噌など、麴を用いた発酵食品に微量に含まれ、食味改善作用や免疫賦活作用がある機能性オリゴ糖として知られており、食品添加物としての需要がある (Murosaki et al., 2002)。GH31 の酵素は、アノマー保持型機構によって加水分解反応を行うため、水の代わりに糖などのヒドロキシ基が共有結合中間体を攻撃することで糖転移反応を生じる。この性質を利用して、糖転移能の高い GH31 酵素をニゲロオリゴ糖合成に応用する研究もなされている (Ma et al., 2019)。そのため、 α -(1→3)-結合の認識に関わる構造的要因を明らかにすることは、目的のオリゴ糖の生産量を向上に向けた応用研究にも繋がると考えられる。

Gal- α -(1→4)-Gal 構造は、グロボ系スフィンゴ糖脂質の部分構造としてよく知られているが、一部の細菌が産生する多糖においても報告がある (Andersson et al., 1993; Hidalgo-Cantabrana et al., 2014; Vinogradov et al., 2013)。しかし、このような糖を微生物がどのように合成、分解しているか関してはあまり報告がない。そのため、マイナーな糖の生合成・分解に関しては今後更なる研究が必要である。本研究で見出した GH31_19 とその周辺に存在する酵素の解析を行うことで、Gal- α -(1→4)-Gal 構造を持つ多糖の資化経路に関する新たな知見が得られると考えられる。

Ikegaya, M., Park, E. Y., Miyazaki, T., "Structure-function analysis of bacterial GH31 α -galactosidases specific for α -(1 \rightarrow 4)-galactobiose." 2023, *FEBS J.* 290, 4984-4998.

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." 2022, *J. Biol. Chem.*, 298, 101827.

その他関連論文

Ikegaya, M., Miyazaki, T., Park, E. Y., "Biochemical characterization of *Bombyx mori* α -N-acetylgalactosaminidase belonging to the glycoside hydrolase family 31" 2021, *Insect Mol. Biol.*, 30, 367-378.

Oka, N., Mori, S., Ikegaya, M., Park, E. Y., Miyazaki, T., "Crystal structure and sugar-binding ability of the C-terminal domain of N-acetylglucosaminyltransferase IV establish a new carbohydrate-binding module family" 2022, *Glycobiology*, 32, 1153-1163.

Miyazaki, T., Ikegaya, M., Alonso-Gil, S., "Structural and mechanistic insights into the substrate specificity and hydrolysis of GH31 α -N-acetylgalactosaminidase" 2022, *Biochimie*, 195, 90-99.

Miyazaki, T., Miyashita, R., Nakamura, S., Ikegaya, M., Kato, T., Park, E. Y. "Biochemical characterization and mutational analysis of silkworm *Bombyx mori* β -1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase and insight into the substrate specificity of β -1,4-galactosyltransferase family enzymes" 2019, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 115, 103254.

参考文献

- Abayakoon, P., Y. Jin, J. P. Lingford, M. Petricevic, A. John, E. Ryan, J. Wai-Ying Mui, D. E. V. Pires, D. B. Ascher, G. J. Davies, E. D. Goddard-Borger, and S. J. Williams. 2018. "Structural and biochemical insights into the function and evolution of sulfoquinovosidases." *ACS Cent. Sci.*, 4, 1266-1273.
- Aerts, J., C.L. Kuo, L.T. Lelieveld, D.E.C. Boer, M.J.C. van der Lienden, H.S. Overkleeft, and M. Artola. 2019 "Glycosphingolipids and lysosomal storage disorders as illustrated by gaucher disease" *Curr. Opin. Chem. Biol.* 53, 204-215.
- Ajdic, D., and Z. Chen. 2013. "A novel phosphotransferase system of *Streptococcus mutans* is responsible for transport of carbohydrates with α -1,3 linkage." *Mol. Oral. Microbiol.*, 28, 114-128.
- Afonine, P. V., B. P. Klaholz, N. W. Moriarty, B. K. Poon, O. V. Sobolev, T. C. Terwilliger, P. D. Adams, and A. Urzhumtsev. 2018. "New tools for the analysis and validation of Cryo-EM Maps and atomic models." *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, 74, 814-840.
- Andersson, M., S. Ratnayake, L. Kenne, L. Ericsson, and R.J. Stack. 1993. "Structural studies of the extracellular polysaccharide from *Butyrivibrio fibrisolvens* strain X6C61", *Carbohydr. Res.*, 246, 291-301.
- Arumapperuma, T., J. Li, B. Hornung, N. M. Soler, E. D. Goddard-Borger, N. Terrapon, and S. J. Williams. 2023. "A subfamily classification to choreograph the diverse activities within glycoside hydrolase family 31." *J. Biol. Chem.*, 299, 103038.
- Barker, S.A., E.J. Bourne, D.M. O'Mant, and M. Stacey. 1957. "Studies of *Aspergillus Niger*. Part vi. the separation and structures of oligosaccharides from nigeran." *J. Chem. Soc.*, 3084-3090.
- Barrett, K., and L. Lange. 2019. "Peptide-based functional annotation of carbohydrate-active enzymes by conserved unique peptide patterns (CUPP)." *Biotechnol. Biofuels*, 12, 102.
- Beutler, E., and W. Kuhl. 1972. "Purification and properties of human α -galactosidases." *J. Biol. Chem.*, 247, 7195-7200.
- Bowen, W. H., and Koo, H. 2011 "Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms." *Caries. Research.*, 45, 69-86.
- Cao, H., Walton, J.D., Brumm, P., Phillips Jr., G.N., 2020 "Crystal structure of α -xylosidase from *Aspergillus Niger* in complex with a hydrolyzed xyloglucan product and new

- insights in accurately predicting substrate specificities of GH31 family glycosidases.” *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 8, 2540–2547.
- Caputo, A. T., D. S. Alonzi, L. Marti, I. B. Reca, J. L. Kiappes, W. B. Struwe, A. Cross, S. Basu, E. D. Lowe, B. Darlot, A. Santino, P. Roversi, and N. Zitzmann. 2016. "Structures of mammalian ER α -glucosidase II capture the binding modes of broad-spectrum iminosugar antivirals." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 113, E4630-8.
- Celi, A. B., J. Goldstein, M. V. Rosato-Siri, and A. Pinto. 2022. "Role of globotriaosylceramide in physiology and pathology." *Front Mol. Biosci.*, 9, 813637.
- Chaudet, M. M., and D. R. Rose. 2016. "Suggested alternative starch utilization system from the human gut bacterium *Bacteroides Thetaiotaomicron*." *Biochem. Cell Biol.*, 94, 241-246.
- Chen, S., G. McMullan, A. R. Faruqi, G. N. Murshudov, J. M. Short, S. H. Scheres, and R. Henderson. 2013. "High-resolution noise substitution to measure overfitting and validate resolution in 3D structure determination by single particle electron cryomicroscopy." *Ultramicroscopy*, 135, 24-35.
- Chien, S. F., and M. Lin-Chu. 1991. "The conversion of group B red blood cells into group O by an α -D-galactosidase from taro (*Colocasia Esculenta*)." *Carbohydr. Res.*, 217, 191-200.
- Chiku, K., R. Tsukasaki, Y. Teshima, M. Yoshida, H. Aramasa, T. Nihira, H. Nakai, H. Ono, and M. Kitaoka. 2020. "Alkoxy carbonyl elimination of 3-O-substituted glucose and fructose by heat treatment under neutral pH." *Carbohydr. Res.*, 496, 108129.
- Clausen, H., and S. Hakomori. 1989. "ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution." *Vox Sang.*, 56, 1-20.
- Cordeiro, R.L., Santos, C.R., Domingues, M.N., Lima, T.B., Pirolla, R.A.S., Morais, M.A.B., Colombari, F.M., Miyamoto, R.Y., Persinoti, G.F., Borges, A.C., de Farias, M.A., Stoffel, F., Li, C., Gozzo, F.C., van Heel, M., Guerin, M.E., Sundberg, E.J., Wang, L.X., Portugal, R.V., Giuseppe, P.O., Murakami, M.T., 2023. "Mechanism of high-mannose N-glycan breakdown and metabolism by *Bifidobacterium longum*." *Nat. Chem. Biol.*, 19, 218-229.
- Datta, K., T. Guan, and L. Gerace. 2009. "NET37, a nuclear envelope transmembrane protein with glycosidase homology, is involved in myoblast differentiation." *J. Biol. Chem.*, 284, 29666-29676.

- Davies, G. J., K. S. Wilson, and B. Henrissat. 1997. "Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases." *Biochem. J.*, 321, 557-559.
- Dean, K. J., and C. C. Sweeley. 1979. "Studies on human liver alpha-galactosidases. I. purification of alpha-galactosidase a and its enzymatic properties with glycolipid and oligosaccharide substrates." *J. Biol. Chem.*, 254, 9994-10000.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P. W. 2006. "How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria". *Microbiol Mol Biol. Rev.*, 70, 939-1031.
- Drula, E., M. L. Garron, S. Dogan, V. Lombard, B. Henrissat, and N. Terrapon. 2021. "The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature." *Nucleic Acids Res.*, 50, D571-D577.
- ElSayed, A. I., M. S. Rafudeen, and D. Golldack. 2014. "Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress." *Plant Biol.*, 16, 1-8.
- Ernst, H. A., L. Lo Leggio, M. Willemoës, G. Leonard, P. Blum, and S. Larsen. 2006. "Structure of the *Sulfolobus Solfataricus* α -glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31." *J. Mol. Biol.*, 358, 1106-1124.
- Fisher, O. S., R. Zhang, X. Li, J. W. Murphy, B. Demeler, and T. J. Boggon. 2013. "Structural studies of cerebral cavernous malformations 2 (CCM2) reveal a folded helical domain at its C-terminus." *FEBS Lett.*, 587, 272-277.
- Gozu, Y., Ishizaki, Y., Hosoyama, Y., Miyazaki, T., Nishikawa, A., and Tono-zuka, T. 2016. "A glycoside hydrolase family 31 dextranase with high transglucosylation activity from *Flavobacterium johnsoniae*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80, 1562-1567.
- Gray, G. M., B. C. Lally, and K. A. Conklin. 1979. "Action of intestinal sucrase-isomaltase and its free monomers on an α -limit dextrin." *J. Biol. Chem.*, 254, 6038-6043.
- Helbert, W., L. Poulet, S. Drouillard, S. Mathieu, M. Loiodice, M. Couturier, V. Lombard, N. Terrapon, J. Turchetto, R. Vincentelli, and B. Henrissat. 2019. "Discovery of novel carbohydrate-active enzymes through the rational exploration of the protein sequences space." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 116, 6063-6068.
- Hidalgo-Cantabrana, C., Sánchez, B., Milani, C., Ventura, M., Margolles, A. and Ruas-Madiedo, P. 2014 "Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp." *Appl. Environ Microbiol.*, 80, 9-18.

- Hohn, M., G. Tang, G. Goodyear, P. R. Baldwin, Z. Huang, P. A. Penczek, C. Yang, R. M. Glaeser, P. D. Adams, and S. J. Ludtke. 2007. "SPARX, a new environment for Cryo-EM image processing." *J. Struct. Biol.*, 157, 47-55.
- Holm, L., and P. Rosenström. 2010. "DALI server: conservation mapping in 3D." *Nucleic Acids Res.*, 38, W545-W549.
- Ikegaya, M., T. Miyazaki, and E. Y. Park. 2021. "Biochemical characterization of *Bombyx mori* α -N-acetylgalactosaminidase belonging to the glycoside hydrolase family 31." *Insect Mol. Biol.*, 30, 367-378.
- Jones, C., and X. Lemercinier. 2005. "Full NMR assignment and revised structure for the capsular polysaccharide from streptococcus pneumoniae type 15B." *Carbohydr. Res.*, 340, 403-409.
- Jones, D. R., D. Thomas, N. Alger, A. Ghavidel, G. D. Inglis, and D. W. Abbott. 2018. "SACCHARIS: an automated pipeline to streamline discovery of carbohydrate active enzyme activities within polyspecific families and de novo sequence datasets." *Biotechnol. Biofuels.*, 11, 27.
- Jumper, J., R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S.A. A. Kohli, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, and D. Hassabis. 2021. "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold." *Nature*, 596, 583-589.
- Kabsch, W. 2010. "XDS" *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66, 125-132.
- Kang, M. S., M. Okuyama, H. Mori, and A. Kimura. 2009. "The first α -1,3-glucosidase from bacterial origin belonging to glycoside hydrolase family 31." *Biochimie*, 91, 1434-1442.
- Kita, A., Matsui, H., Somoto, A., Kimura, A., Takata, M., and Chiba, S., 1991. "Substrate specificity and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*" *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2327-2335.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. "MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms." *Mol. Biol. Evol.*, 35, 1547-1549.

- Kurakata, Y., A. Uechi, H. Yoshida, S. Kamitori, Y. Sakano, A. Nishikawa, and T. Tonozuka. 2008. "Structural insights into the substrate specificity and function of *Escherichia coli* K12 YgjK, a glucosidase belonging to the glycoside hydrolase family 63." *J. Mol. Biol.*, 381, 116-128.
- Kytidou, K., J. Beekwilder, M. Artola, E. van Meel, R. H. P. Wilbers, G. F. Moolenaar, N. Goosen, M. J. Ferraz, R. Katzy, P. Voskamp, B. I. Florea, C. H. Hokke, H. S. Overkleeft, A. Schots, D. Bosch, N. Pannu, and J. F. M. G. Aerts. 2018. "*Nicotiana Benthamiana* A-Galactosidase A1.1 can functionally complement human α -galactosidase a deficiency associated with fabry disease." *J. Biol. Chem.*, 293, 10042-10058.
- Latgé, J. P. 2007. "The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell." *Mol. Microbiol.*, 66, 279-290.
- Letunic, I., and P. Bork. 2016. "Interactive tree of life (iTOL) V3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees." *Nucleic Acids Res.*, 44, W242- W245.
- Light, S. H., L. A. Cahoon, A. S. Halavaty, N. E. Freitag, and W. F. Anderson. 2016. "Structure to function of an α -glucan metabolic pathway that promotes listeria monocytogenes pathogenesis." *Nat. Microbiol.*, 2, 16202.
- Light, S. H., L. A. Cahoon, K. V. Mahasenan, M. Lee, B. Boggess, A. S. Halavaty, S. Mobashery, N. E. Freitag, and W. F. Anderson. 2017. "Transferase versus hydrolase: the role of conformational flexibility in reaction specificity." *Structure*, 25, 295-304.
- Lovering, A. L., S. S. Lee, Y. W. Kim, S. G. Withers, and N. C. Strynadka. 2005. "Mechanistic and structural analysis of a family 31 α -glycosidase and its glycosyl-enzyme intermediate." *J. Biol. Chem.*, 280, 2105-2115.
- Ma, M., M. Okuyama, T. Tagami, A. Kikuchi, P. Klahan, A. Kimura, 2019. "Novel α -1,3/ α -1,4-glucosidase from *Aspergillus niger* exhibits unique transglucosylation to generate high levels of nigerose and kojibiose." *J. Agrc. Food Chem.*, 67, 3380-3388.
- Matsuoka, K., D. Endo, R. Adachi, T. Kayama, T. Matsushita, K. Hatano. 2022. "Chemical modification of CNN 1. Complete protection of CNN." *Tetrahedron Lett.*, 103, 153986.
- Meek, R. W., J. Brockerman, O. B. Fordwour, W. F. Zandberg, G. J. Davies, and D. J. Vocadlo. 2022. "The primary familial brain calcification-associated protein myorg is an α -galactosidase with restricted substrate specificity." *PLoS Biol.*, 20, e3001764.

- Miyazaki, T., M. Ichikawa, G. Yokoi, M. Kitaoka, H. Mori, Y. Kitano, A. Nishikawa, and T. Tonozuka. 2013. "Structure of a bacterial glycoside hydrolase family 63 enzyme in complex with its glycosynthase product, and insights into the substrate specificity." *FEBS J.*, 280, 4560-4571.
- Miyazaki, T., Y. Ishizaki, M. Ichikawa, A. Nishikawa, and T. Tonozuka. 2015. "Structural and biochemical characterization of novel bacterial α -galactosidases belonging to glycoside hydrolase family 31." *Biochem. J.*, 469, 145-158.
- Miyazaki, T., and E. Y. Park. 2020. "Crystal structure of the *Enterococcus faecalis* α -N-acetylgalactosaminidase, a member of the glycoside hydrolase family 31." *FEBS Lett.*, 594, 2282-2293.
- Moriya, T., M. Saur, M. Stabrin, F. Merino, H. Voicu, Z. Huang, P. A. Penczek, S. Raunser, and C. Gatsogiannis. 2017. "High-resolution single particle analysis from electron cryo-microscopy images using sphire." *J. Vis. Exp.*, e55448.
- Murosaki, S., K. Muroyama, Y. Yamamoto, T. Liu, Y. and Yoshikai. 2002. "Nigerooligosaccharides augments natural killer activity of hepatic mononuclear cells in mice" *Int. Immunopharm.*, 2, 151-159.
- Murshudov, G. N., P. Skubák, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long, and A. A. Vagin. 2011. "REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures." *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 67, 355-367.
- Nichols, B. L., S. Avery, P. Sen, D. M. Swallow, D. Hahn, and E. Sterchi. 2003. "The maltase-glucoamylase gene: common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 1432-1427.
- Nihira, T., Nakai, H., Chiku, K., and Kitaoka, M. 2012 "Discovery of nigerose phosphorylase from *Clostridium phytofermentans*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 1513-1522.
- O'Connell, K. J., M. O'Connell Motherway, J. O'Callaghan, G. F. Fitzgerald, R. P. Ross, M. Ventura, C. Stanton, and D. van Sinderen. 2013. "Metabolism of four α -glycosidic linkage-containing oligosaccharides by *Bifidobacterium Breve* UCC2003." *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 6280-6292.
- Okazaki, K., T. Amano, T. Morimoto, T. Iemoto, T. Kawabata, S. Hayakawa, and K. Akimitsu. 2001. "Cloning and nucleotide sequence of the mycodextranase gene from *Streptomyces* sp. J-13-3." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 1684-1687.

- Okuyama, M. 2011. "Function and structure studies of GH family 31 and 97 α -glycosidases." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 2269-2277.
- Okuyama, M., M. Miyamoto, I. Matsuo, S. Iwamoto, R. Serizawa, M. Tanuma, M. Ma, P. Klahan, Y. Kumagai, T. Tagami, and A. Kimura. 2017. "Substrate recognition of the catalytic α -subunit of glucosidase II from *Schizosaccharomyces Pombe*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81, 1503-1511.
- Okuyama, M., Matsunaga, K., Watanabe, K. I., Yamashita, K., Tagami, T., Kikuchi, A., Ma, M., Klahan, P., Mori, H., Yao, M. and Kimura, A. 2017. "Efficient synthesis of α -galactosyl oligosaccharides using a mutant *Bacteroides thetaiotaomicron* retaining α -galactosidase (BtGH97b)", *FEBS J.*, 284, 766-783.
- Okuyama, M., W. Saburi, H. Mori, and A. Kimura. 2016. " α -Glucosidases and α -1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions." *Cell Mol. Life. Sci.*, 73, 2727-2751.
- Penczek, P. A., J. Fang, X. Li, Y. Cheng, J. Loerke, and C. M. Spahn. 2014. "CTER-rapid estimation of CTF parameters with error assessment." *Ultramicroscopy*, 140, 9-19.
- Prajapati, V. D., G. K. Jani, N. G. Moradiya, N. P. Randeria, B. J. Nagar, N. N. Naikwadi, and B. C. Variya. 2013. "Galactomannan: a versatile biodegradable seed polysaccharide." *Int. J. Biol. Macromol.*, 60, 83-92.
- Rahfeld, P., J.F. Wardman, K.D. Mehr, D. Huff, C. Morgan-Lang, H. Chen, S.J. Hallam, and S.G. Withers. 2019 "Prospecting for microbial α -N-acetylgalactosaminidases yields a new class of GH31 O-glycanase." *J. Biol. Chem.*, 294, 16400-16415.
- Ren, L., X. Qin, X. Cao, L. Wang, F. Bai, G. Bai, and Y. Shen. 2011. "Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase." *Protein. Cell*, 2, 827-836.
- Pei, J., B. H. Kim, and N. V. Grishin. 2008. "PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments" *Nucleic. Acids. Res.*, 36, 2295-2300.
- Rosenthal, P. B., and R. Henderson. 2003. "Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy." *J. Mol. Biol.*, 333, 721-745.
- Rozeboom, H. J., S. Yu, S. Madrid, K. H. Kalk, R. Zhang, and B. W. Dijkstra. 2013. "Crystal structure of α -1,4-glucan lyase, a unique glycoside hydrolase family member with a novel catalytic mechanism." *J. Biol. Chem.*, 288, 26764-26774.

- Satoh, T., T. Toshimori, G. Yan, T. Yamaguchi, and K. Kato. 2016. "Structural basis for two-step glucose trimming by glucosidase II involved in er glycoprotein quality control." *Sci. Rep.*, 6, 20575.
- Siezen, R. J., J. R. Bayjanov, G. E. Felis, M. R. van der Sijde, M. Starrenburg, D. Molenaar, M. Wels, S. A. van Hijum, and J. E. van Hylekama Vlieg. 2011. "Genome-scale diversity and niche adaptation analysis of *Lactococcus lactis* by comparative genome hybridization using multi-strain arrays." *Microb. Biotechnol.*, 4, 383-402.
- Sim, L., R. Quezada-Calvillo, E. E. Sterchi, B. L. Nichols, and D. R. Rose. 2008. "Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity." *J. Mol. Biol.*, 375, 782-792.
- Sim, L., C. Willemsma, S. Mohan, H. Y. Naim, B. M. Pinto, and D. R. Rose. 2010. "Structural basis for substrate selectivity in human maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase N-terminal domains." *J. Biol. Chem.*, 285, 17763-17770.
- Song, K., M. Okuyama., K. Kobayashi, H. Mori, and A. Kimura. 2013 "Characterization of a glycoside hydrolase family 31 α -glucosidase involved in starch utilization in *Podospora anserina*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 2117-2124.
- Speciale, G., Y. Jin, G. J. Davies, S. J. Williams, and E. D. Goddard-Borger. 2016. "YihQ is a sulfoquinovosidase that cleaves sulfoquinovosyl diacylglyceride sulfolipids." *Nat. Chem. Biol.*, 12, 215-217.
- Suyotha, W., H. Fujiki, V. Cherdvorapong, K. Takagi, S. Yano, and M. Wakayama. 2017. "A Novel thermostable α -1,3-glucanase from streptomyces thermodiastaticus HF 3-3." *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 63, 296-304.
- Tagami, T., E. Miyano, J. Sadahiro, M. Okuyama, T. Iwasaki, and A. Kimura. 2016. "Two novel glycoside hydrolases responsible for the catabolism of cyclobis-(1 \rightarrow 6)- α -nigerosyl." *J. Biol. Chem.*, 291, 16438-16447.
- Tang, G., L. Peng, P. R. Baldwin, D. S. Mann, W. Jiang, I. Rees, and S. J. Ludtke. 2007. "EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy." *J. Struct. Biol.*, 157, 38-46.
- Terrapon, N., Lombard, V., Gilbert, H. J. and Henrissat, B. 2015 "Automatic prediction of polysaccharide utilization loci in *Bacteroidetes* species." *Bioinformatics*, 31, 647-655.

- Tsutsumi, K., Y. Gozu, A. Nishikawa, and T. Tono-zuka. 2020. "Structural insights into polysaccharide recognition by *Flavobacterium johnsoniae* dextranase, a member of glycoside hydrolase family 31." *FEBS J.*, 287, 1195-1207.
- Vagin, A. and Teplyakov, A. 2010 "Molecular replacement with MOLREP." *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66, 22-25.
- Vinogradov, E., Valence, F., Maes, E., Jebava, I., Chuat, V., Lortal, S., Grard, T., Guerardel, Y., and Sadovskaya, I. 2013. "Structural studies of the cell wall polysaccharides from three strains of *Lactobacillus helveticus* with different autolytic properties: DPC4571, BROI, and LH1." *Carbohydr. Res.*, 379, 7-12.
- Wagner, T., F. Merino, M. Stabrin, T. Moriya, C. Antoni, A. Apelbaum, P. Hagel, O. Sitsel, T. Raisch, D. Prumbaum, D. Quentin, D. Roderer, S. Tacke, B. Siebolds, E. Schubert, T. R. Shaikh, P. Lill, C. Gatsogiannis, and S. Raunser. 2019. "Sphire-cryolo is a fast and accurate fully automated particle picker for Cryo-EM." *Commun. Biol.*, 2, 218.
- Williams, C. J., J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. G. Prisant, L. L. Videau, L. N. Deis, V. Verma, D. A. Keedy, B. J. Hintze, V. B. Chen, S. Jain, S. M. Lewis, W. B. Arendall, 3rd, J. Snoeyink, P. D. Adams, S. C. Lovell, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. 2018. "Molprobity: more and better reference data for improved all-atom structure validation." *Protein Sci.*, 27, 293-315.
- Winn, M. D., C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, and K. S. Wilson. 2011. "Overview of the CCP4 suite and current developments." *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 67, 235-242.
- Xu, J., H. Zhang, J. Zheng, P. Dovoedo, and Y. Yin. 2020. "eCAMI: simultaneous classification and motif identification for enzyme annotation." *Bioinformatics*, 36, 2068-2075.
- Yamaguchi, M., Yamamoto, K., 2023 "Mucin glycans and their degradation by gut microbiota" *Glycoconjugate J.*, 40 493-512.
- Yao, X. P., X. Cheng, C. Wang, M. Zhao, X. X. Guo, H. Z. Su, L. L. Lai, X. H. Zou, X. J. Chen, Y. Zhao, E. L. Dong, Y. Q. Lu, S. Wu, X. Li, G. Fan, H. Yu, J. Xu, N. Wang, Z. Q. Xiong, and W. J. Chen. 2018. "Biallelic mutations in myorg cause autosomal recessive primary familial brain calcification." *Neuron*, 98, 1116-1123.

- Yoshimi, A., K. Miyazawa, and K. Abe. 2016. "Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus Species*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80, 1700-1711.
- Zhang, K. 2016. "Gctf: real-time CTF determination and correction." *J Struct Biol* 193, 1-12.
- Zhang, N. N., J. H. Qu, H. L. Yuan, Y. M. Sun, and J. S. Yang. 2010. "*Flaviumibacter petaseus* gen. nov., sp. nov., isolated from soil of a subtropical rainforest." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 1609-1612.
- Zheng, J., Ge, Q., Yan, Y., Zhang, X., Huang, L. and Yin, Y. 2023. "dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation." *Nucleic. Acids. Res.*, 51, W115-W121.
- Zheng, S. Q., E. Palovcak, J. P. Armache, K. A. Verba, Y. Cheng, and D. A. Agard. 2017. "MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy." *Nat. Methods.*, 14, 331-332.
- Zhou, X. X., W. F. Li, G. X. Ma, and Y. J. Pan. 2006. "The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements." *Biotechnol. Adv.*, 24, 285-295.
- Zivanov, J., T. Nakane, B. O. Forsberg, D. Kimanius, W. J. Hagen, E. Lindahl, and S. H. Scheres. 2018. "New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3." *Elife*, 7, 7e42166.

謝辞

本研究を行うにあたり、静岡大学グリーン科学技術研究所 准教授 宮崎剛亜先生には、学部4年から博士課程までの6年間に渡り、研究全般に関する多大なるご指導とご鞭撻を頂きました。宮崎先生の受け持つ第一期の4年生として実験を一から教えて頂き、研究者として育てて頂いたことに、深く感謝申し上げます。同研究所 教授 朴龍洙 先生、同研究所 教授 加藤竜也 先生には、原著論文の執筆や、文章の作成に関して大変参考になるご助言を頂いただけでなく、研究室生活においても大変お世話になりました。同研究所 教授 木村浩之 先生には本研究に関する有益なご助言とご討論を頂きました。厚く御礼申し上げます。

Ahmad Suparmin 博士には、*C. militaris* の cDNA を調整して頂きました。高エネルギー加速器研究機構 特任准教授 守屋俊夫 先生、同機構 特任准教授 安達成彦 先生、同機構 准教授 川崎政人 先生にはクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行って頂きました。また、GH31_u1 に関する原著論文執筆の際は、クライオ電子顕微鏡に関連するデータだけでなく、論文全般に渡るディスカッションをして頂きました。厚く御礼申し上げます。

井伊篤彦さんをはじめとする異業種データサイエンス研究会®の皆様には、糖質関連酵素の系統解析についてご相談をさせて頂いたことを初めとし、データ解析を直接的・間接的にサポートして頂きました。また、勉強会を通じて社会で活躍する研究者の方々と交流し、様々な経験をさせて頂きました。皆様に出会わなければ私は博士課程に進学していなかったと思います。心より感謝申し上げます。

同期の中村駿太郎君には、6年間の研究室生活の様々な局面で助けて頂きました。彼が居なければ私は大学院を規定の年数で卒業できていないと思います。まことにありがとうございました。また、科学について語れる友人達に恵まれたことが何より大きな心の支えとなりました。この場を借りて感謝致します。

最後に、金銭的、精神的に支えてくれた家族に感謝致します。