

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	<a href="https://doi.org/10.14945/0002000668">https://doi.org/10.14945/0002000668</a>

(課程博士・様式7)

# 学位論文要旨

専攻：バイオサイエンス

氏名：池谷真里奈

論文題目：糖質加水分解酵素ファミリー31に属する微生物由来酵素の構造機能解析

論文要旨：天然には多様な糖質が存在しており、それに伴って糖質の合成・分解を担う糖質関連酵素の種類も膨大なものとなっている。それら糖質関連酵素は、アミノ酸配列相同性に基いて多数のファミリーに分類されているが、同一ファミリー内でさらに多様化が進んでいる場合も多い。糖質加水分解酵素ファミリー31 (GH31) は、高度に多様化したファミリーの一つであり、このファミリーからは小腸で働くマルターゼや、小胞体  $\alpha$ -グルコシダーゼ II などの動物の生命維持に必須な  $\alpha$ -グルコシダーゼを始めとし、 $\alpha$ -キシロシダーゼや、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼなどの様々な基質特異性を示す酵素、加水分解ではなく脱離反応を触媒する  $\alpha$ -グルカンリアーゼ等が報告されている。現在、糖質関連酵素データベース (CAZy) において、2 万を超えるタンパク質のアミノ酸配列が GH31 として登録されているが、その内で機能解析済みのタンパク質は 130 個程しかない。そのため、このファミリーには未だ知られていない新しい酵素が存在している可能性が高いと考えられる。そこで、本研究では、GH31 ファミリーのタンパク質の分子系統解析を行って機能未知酵素群を見出し、その内の二つのクラスター (GH31\_u1 および GH31\_19) に属する酵素の機能と構造の解析を行った。

まず、GH31\_u1 の解析を行った。このクラスターは、真菌とバクテリア由来のタンパク質から構成されていたため、バクテリア *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* 由来酵素 (LIGH31\_u1) 及び真菌 *Cordyceps militaris* 由来酵素 (CmGH31\_u1) を標的とした。両酵素は His タグ融合タンパク質として大腸菌発現と精製を行った。様々な基質に対して酵素を作用させた結果、いずれの酵素もグルコースが  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-結合したニゲロースやニゲロオリゴ糖に対して高い基質特異性を示し、次いで  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-結合のコージビオース、 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-結合のマルトースにも弱い活性を示した。また、反応速度論値を測定したところ、既報の  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グルコシド結合を加水分解する酵素はマルトースに対しても 25-75%程度の活性 (相対  $k_{cat}/K_m$  値) を示すのに対し、GH31\_u1 酵素はコージビオースに対してニゲロースの約 10%、マルトースに対して約 2%の活性しか示さず、既報の  $\alpha$ -1,3-グルコシダーゼよりも厳密な基質特異性を有することが明らかになった。

そこで、本酵素の構造・機能相関を明らかにするために、収率の高かった LIGH31\_u1 を用いて X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡による立体構造解析を行った。立体構造解析およびゲル濾過クロマトグラフィーの結果から、LIGH31\_u1 は水溶液中で六量体を

形成していることが明らかになった。また、六量体を形成することで、隣接する分子に存在する Tyr99 がニゲロースと水素結合を形成し、基質の認識に関わっていることが示唆された。この Tyr99 は、リガンドの有無に関わらず、結晶構造では低い B-factor を示したのに対し、電顕構造では不明瞭なマップが観察された。このことから、結晶のパッキングの影響を受けない状態では、Tyr99 とその周辺が揺れ動く可能性が示唆された。また、マルトースを基質とする場合は、還元末端側のグルコースの 6 位水酸基が LIGH31\_u1 と立体障害を生じることで、活性が低くなっていると考えられた。

続いて、GH31\_19 の解析を行った。これまでに、腸内細菌 *Bacteroides salyersiae* 由来の GH31\_19 タンパク質 (BsGH31\_19) が、*para* nitrophenyl- $\alpha$ -galactoside に加水分解活性を示すという報告があったが、その天然の基質等は不明であった。そこで、本研究では BsGH31\_19 および土壌細菌 *Flaviumibacter petaseus* 由来の酵素 (FpGH31\_19) を標的とした。両酵素を His タグ融合タンパク質として大腸菌発現と精製を行い、様々な糖に作用させたところ、いずれもグロボトリオース (Gal- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glc) および  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-ガラクトビオースのみを加水分解し、他の糖に対しては 1%以下の活性しか示さなかった。これまでに、GH31\_19 以外では二種類の GH31  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの報告があるが、そのいずれもグロボトリオースには活性を示さなかったことから、GH31\_19 は新規な GH31 酵素であった。

BsGH31\_19 と FpGH31\_19 の X 線結晶構造解析を試み、FpGH31\_19 の立体構造を 1.9–2.15Å の分解能で決定した。FpGH31\_19 と構造既知の二種類の GH31 ファミリー  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの比較を行うと、基質と水素結合を形成する Arg358 および Asp394 が他の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼには保存されておらず、これが FpGH31\_19 の基質特異性を生じる理由であると考えられた。しかし、同じ基質に作用する酵素であるにも関わらず、BsGH31\_19 においては Arg358 と Asp394 に相当するアミノ酸残基は保存されていなかった。Asp394 に関しては、BsGH31\_19 では、Asp394 と同様に基質と水素結合を形成可能な極性アミノ酸の Gln381 に置換されていた。一方、Arg358 は、Gly345 に置換されていた。しかし、その代わりに FpGH31\_19 の活性部位周辺に存在する 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。このように相補的なアミノ酸残基の置換が生じた結果、BsGH31\_19 と FpGH31\_19 は  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-ガラクトビオースに対する特異性を示すと考えられた。

以上より、本研究で見出した二種類の酵素は、いずれも天然に希少な糖を基質とする加水分解酵素であった。LIGH31\_u1 の基質であるニゲロースやニゲロオリゴ糖は清酒や味噌等の食品に微量に含まれ、食味改善効果や免疫賦活作用がある機能性オリゴ糖として知られているが、安価な合成法が確立されておらず非常に高価である。そのため、糖転移活性の高い GH31 酵素を用いた酵素合成が研究されている。Gal- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal は、グロボ系の糖脂質だけでなく、一部の微生物が合成する多糖にも含まれている構造であるが、微生物由来の  $\alpha$ -ガラクトース含有糖の分解系に関する研究は未だ少ない。本研究で見出した二種類の酵素の解析から得られた知見は、今後、天然に存在量が少ない糖の合成や分解の研究に繋がると考えられる。