

## 学 位 論 文 要 旨

### ファミリー63 に属する糖質加水分解酵素の構造と機能に関する研究 Structure-function relationships of glycoside hydrolases belonging to family 63

応用生命科学専攻 応用生物化学大講座

宮崎 剛亜

糖質はさまざまな生理機能を担っており、エネルギー貯蔵物質としての機能、生体の構成物質としての機能、糖タンパク質・糖脂質の糖鎖など生体分子あるいは細胞間での情報伝達をする機能がある。糖質は構成糖の種類や結合様式、重合度により多様な構造をとり、その生合成や生分解には多種多様な酵素が関わっている。そのため多くの糖質関連酵素が注目され、研究されている。

その一群である糖質加水分解酵素は、その一次構造の相同性に基づいて 130 を超えるファミリーに分類されている。糖質加水分解酵素ファミリー63 (GH63) には、真核生物の翻訳後修飾の一つである *N* 結合型糖鎖のプロセッシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ I が分類されている。プロセッシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ I は小胞体内において新生ポリペプチドに糖鎖  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (Glc, グルコース; Man, マンノース; GlcNAc, *N*-アセチルグルコサミン) が付加された後、末端の  $\alpha$ -1,2-グルコシド結合を加水分解する最初の反応を担う鍵酵素であり、これに続く一連の糖鎖プロセッシングはタンパク質の品質管理機構に関与している。しかしながら、その重要性にも関わらず大量発現系、反応速度論や立体構造に関する詳細な報告は少ない。一方、GH63 には真核生物型の *N* 結合型糖鎖を産生しない古細菌や真正細菌のタンパク質も分類されており、二種類の真正細菌由来タンパク質の立体構造が明らかになっているが、これらの生理機能は不明な部分が多い。

本研究では、GH63 に属する二種類の酵素、糸状菌 *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642 由来プロセッシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ I (*AbPGI*) と大腸菌 K-12 由来機能未知酵素 *YgiK* に着目し、GH63 酵素の構造機能相関を明らかにすることを目的とした。

第 2 章では、*AbPGI* は大腸菌宿主発現系を用いてグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (GST) 融合タ

ンパク質 (GST-*AbPGI*Δ16) として発現させ、天然型糖鎖に対する反応速度論的解析を行った。ピリジルアミノ化による蛍光標識をした天然型糖鎖  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  およびその部分構造である  $\text{Glc}_3\text{Man}_4\text{-PA}$  を基質とし、反応産物を高速液体クロマトグラフィーで定量的解析を行った。*GST-AbPGI*Δ16 は  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  および  $\text{Glc}_3\text{Man}_4\text{-PA}$  の末端グルコースを遊離する活性を示した。これら糖鎖基質に対する  $K_m$  値はいずれも  $\mu\text{M}$  オーダーであり、GH63 と同じ  $(\alpha/\alpha)_6\text{-barrel}$  からなる触媒ドメインを有する GH37 トレハラーゼや GH15 グルコアミラーゼなど、他の  $\alpha$ -グルコシドに作用する酵素と比較して格段に低いことを明らかにした。また、基質の末端構造であるコージビオース ( $\text{Glc-}\alpha(1\rightarrow2)\text{-Glc}$ ) の阻害活性は、強力な阻害剤として知られる 1-デオキシノジリマイシンのそれと同等であることがわかり、本酵素は  $\alpha$ -1,2-グルコシドに高い親和性を有することを明らかにした。

第 3 章では、*AbPGI* の X 線結晶構造解析による反応機構や基質認識の解明を目的とし、結晶化を行った。発現ベクターを変更し、His タグ融合タンパク質として発現させたところ、培地 1 L あたり約 50 mg と結晶化に十分な量のタンパク質を得ることに成功した。結晶化条件スクリーニングの結果、本酵素の単結晶を得ることに成功し、X 線解析強度測定を行った。3.4 Å 分解能の回折データから分子置換法を行うことで、本酵素のおおよそのフォールドを明らかにした。

第 4 章では、*YgjK* の基質特異性を明らかにすることを目的とし、オリゴ糖合成に応用される glycosynthase に変換し、天然の基質を予想した。*YgjK* の一般塩基触媒残基と考えられる Glu727 を Ala に置換した変異体 E727A は、 $\beta$ -glucopyranosyl fluoride ( $\beta$ -GlcF) をドナー基質としてオリゴ糖を生成する glycosynthase 反応を示した。さまざまなアクセプター基質を検討したところ、ガラクトース (Gal) を良いアクセプターとすることがわかった。また、サブサイト -1 において基質結合に関与すると考えられる Asp324 を Asn に置換した変異体 D324N も同様の活性を示した。*YgjK* の基質特異性を立体構造から明らかにするため、E727A と glycosynthase 産物との複合体構造 (E727A-Glc12Gal) を 2.0 Å で決定したところ、E727A の活性部位には glycosynthase 反応で生じた二糖である 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\alpha$ -D-galactopyranose (Glc12Gal) が結合していた。D324N とアクセプター基質となるメリビオース ( $\text{Gal-}\alpha(1\rightarrow6)\text{-Glc}$ ) との複合体構造 (D324N-melibiose) も決定し、E727A-Glc12Gal との立体構造の比較を行った結果、*YgjK* の触媒ドメインが open 型と closed 型の 2 つの構造をとることがわかった。活性部位を形成するアミノ酸残基について比較すると、サブサイト -1 に Glc が結合することにより、一般酸触媒残基と考えられる Asp501 を含む複数の残基が構造変化を起こし、触媒ドメインの closed 型を誘導することが示唆された。よって、*YgjK* は Glc12Gal を認識し加水分解する酵素であることが考えられた。さらに、これまで明らかになっている GH63 タンパク質の立体構造を比較したところ、サブサイト +1 を構成するアミノ酸残基が異なっていることがわかり、これが基質特異性の差異を生んでいるものと考えられた。

以上、GH63 に属する二種類の酵素について構造機能相関に関する新たな知見を得た。*AbPGI* は糖鎖の  $\text{Glc-}\alpha(1\rightarrow2)\text{-Glc}$  に厳密な特異性と高い親和性を有しているのに対し、*YgjK* は glycosynthase の解析と立体構造解析から  $\text{Glc-}\alpha(1\rightarrow2)\text{-Gal}$  に作用する加水分解酵素であると考えられ、同じ GH63 に属する酵素でも真核生物由来のものとは真正細菌由来のものでは基質特異性が全く異なることを活性と立体構造の両面から明らかにした。