

## Glycoside hydrolase family 97 subfamily 97c に属する酵素の機能解析

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学 菊池 麻子

### 1. 背景と目的

Glycoside hydrolase family 97 (GH97) に属する酵素はアミノ酸配列が多様であり, 系統解析に基づき, さらに5つのサブファミリー (subfamily 97a-e) に分類されている。これまでに subfamily 97a には反転型  $\alpha$ -glucoside hydrolase が, subfamily 97b には保持型  $\alpha$ -galactosidase が含まれていることが報告されている。Glycoside hydrolase family ではファミリー内で触媒機構が保存されているのが一般である。しかし, 触媒機構が異なる反転型・保持型酵素が混在している点で GH97 はユニークなファミリーであるといえる。本研究では subfamily 97c に属する酵素の機能を明らかにすることを目的とした。subfamily 97c に分類される *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 由来 BT\_3661 および BT\_3664 の遺伝子産物, BT3661 および BT3664 の解析を行った。

### 2. 方法と結果

大腸菌を用いて組換え BT3661 および BT3664 を生産し, Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。これらタンパク質について基質特異性を評価した。BT3661 の pNP  $\beta$ -L-arabinopyranoside (pNP Ara) と pNP  $\alpha$ -D-galactopyranoside (pNP Gal) に対する加水分解速度定数 ( $k_{cat}/K_m$ ) は, それぞれ  $0.41 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ,  $0.14 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  であり, pNP Ara と pNP Gal に対して同程度の特異性を示した。一方, BT3664 の pNP Ara と pNP Gal に対する  $k_{cat}/K_m$  はそれぞれ  $1.9 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ,  $0.076 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  であり, pNP Gal の方が pNP Ara よりも 25 倍大きかった。これらより, BT3661 を bifunctional な  $\beta$ -L-arabinopyranosidase/ $\alpha$ -galactosidase, BT3664 を  $\alpha$ -galactosidase と同定した。

これまでに GH97 で報告のないユニークな基質特異性を有する BT3661 の天然基質の候補としてアカシア由来 gum arabic, カラマツ由来 arabinogalactan が考えられた。これら多糖は, その非還元末端に  $\beta$ -L-arabinopyranoside,  $\alpha$ -galactoside を有していることが知られている。BT3661 を gum arabic および arabinogalactan と反応させ, 生成物を TLC および HPAEC-PAD を用い解析した。生成物として arabinose または galactose が観察され, BT3661 がこれら多糖の代謝に関与することが示唆された。

BT3661 のユニークな基質特異性の構造-機能相関を明らかにする目的で X 線結晶構造解析を行った。得られた構造を, 既知の subfamily 97b 保持型  $\alpha$ -galactosidase と比較した。両酵素の活性中心を構成するアミノ酸残基はよく保存されていた。しかし, 基質である  $\alpha$ -galactoside の 6 位水酸基に対する認識に差異があることが分かった。subfamily 97b  $\alpha$ -galactosidase では Glu351 が 6 位水酸基と水素結合を形成し  $\alpha$ -galactoside を安定化しているが, BT3661 の相当する箇所に Glu は存在せず, Asn338 が位置していた。そこで, Asn を他の GH97 酵素に見られる Glu, Ala および Asp に置換した変異酵素 N338E, N338A および N338D を作製し, 基質特異性を評価した。また, Asn338 に近接する Gln378 が基質特異性にどのような影響を及ぼすか調べるため Gln を Ala に置換した変異酵素 Q378A ならびに二重置換変異酵素 N338E/Q378A および N338D/Q378A を作製した。変異酵素 N338E では  $\beta$ -L-arabinopyranosidase 活性が野生型の 1.3 倍に上昇し,  $\alpha$ -galactosidase 活性が 5.8 倍に減少した。一方, N338A では  $\alpha$ -galactosidase 活性が野生型の 7.9 倍に上昇し,  $\beta$ -L-arabinopyranosidase 活性が 27 倍に減少した。また, N338D と Q378A に顕著な基質特異性の変化は見られなかった。N338E/Q378A と N338D/Q378A はそれぞれ N338E, N338D と同様の基質特異性を示した。