

# 酵素群 GH130\_2 に属するマンノシドホスホリラーゼの 基質特異性に関わる構造による分類

共生基盤学専攻 食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学 播磨 晃帆

## 1. 背景と目的

糖質加水分解酵素ファミリーGH130 は  $\beta$ -マンノシドホスホリラーゼを含む酵素群であり, GH130\_1, 2 および NC に分類される。いずれも 4 つの逆平行  $\beta$ -シートからなるブレード 5 つからなる 5-ブレード  $\beta$ -プロペラ構造の触媒ドメインを持つ。酵素群 GH130\_2 には  $\beta$ -1,4-マンノシル-*N*-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ (MNP) および  $\beta$ -1,4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼ (MOP) が含まれる。いずれもホモ六量体を形成し, 基質結合部位が 2 つのサブユニットの界面に存在する。MNP のサブサイト+1 は GlcNAc に特異的であり, *N*-グリカンコアの Man $\beta$ 1-4GlcNAc 構造を加リン酸分解すると予測される。MOP は  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-マンノオリゴ糖を加リン酸分解する。MOP はサブサイト+1 の特異性が異なる 2 つの酵素が報告されている。すなわち, サブサイト+1 で Man に特異的な *Thermotoga maritima* 由来 MOP (TmMOP) と, サブサイト+1 で Glc, Man および GlcNAc に同等に作用する *Ruminococcus albus* 由来 MOP (RaMP2) である。本研究では GH130\_2 酵素の基質特異性に関与するアミノ酸残基を明らかにし, それに基づき GH130\_2 酵素を分類した。

## 2. 結果と考察

*Bacteroides* sp. 由来 MNP Uhgb\_MP の基質複合体構造から, ブレード 1 $\beta$ 3 (B1- $\beta$ 3) 上の Met67, 隣接サブユニットの Loop3 (ブレード 3 と 4 を繋ぐ) 上の Phe203 および隣接サブユニットのブレード 4 $\beta$ 2 (B4- $\beta$ 2) 上の Leu234 が疎水性ポケットを形成し, サブサイト+1 で GlcNAc への高い特異性に寄与すると推測された。これら 3 残基に注目して GH130\_2 酵素の一次構造を比較すると以下の 3 群に分類された。B1- $\beta$ 3 上の Met, Loop3 上の Phe および B4- $\beta$ 2 上の Leu (Ile) を持つ A 群, B1- $\beta$ 3 上の Met, B4- $\beta$ 2 上の Leu (Ile) を持ち, Loop3 上の Phe を持たない B 群, いずれの相当アミノ酸残基も持たない C 群。既知 MNP は A 群, RaMP2 は B 群, TmMOP は C 群に含まれた。それぞれの群に属する野生型および部位特異的変異酵素の 10 mM  $\alpha$ -Man1P 存在下での各種受容体基質との  $\beta$ -マンノシド合成反応の  $k_{cat(app)}/K_m(app)$  によって基質特異性を評価した。A 群酵素である *Bacteroides fragilis* 由来 MNP BF9343\_1252 の Met72, Phe208 および Leu239 変異酵素 (M72A, F208A および L239T) は野生型と比べて GlcNAc に対する特異性が低く, これら 3 残基の GlcNAc 特異性への重要性が確認された。B 群酵素 RaMP2 の Met75 および Leu234 変異酵素 (M75A, M75P および L234T) も野生型と比べて GlcNAc に対する特異性が低下した。また RaMP2 の Loop3 を Uhgb\_MP の Loop3 に置換した変異酵素は高い GlcNAc 特異性を示し, A 群酵素で確認したアミノ酸残基の導入により MNP 活性が付与された。いくつかの B 群酵素遺伝子は *N*-グリカン代謝遺伝子クラスター内に存在した。その 1 つである *Paenibacillus borealis* 由来 PBOR\_25915 は MNP 活性を示し, B 群には MOP と MNP が混在することが示された。C 群酵素は酵素-基質複合体構造が明らかではなかったため, X 線回折実験により TmMOP の Man<sub>3</sub> 複合体構造を決定した。Loop3 上の Trp207 がサブサイト+1 および+2 の基質と相互作用し得る位置に存在し, この Trp は C 群酵素に保存されていた。Trp207 変異酵素 (W207A) は野生型と比べて Man に対する特異性が低く, 野生型が受容体としない GlcNAc をも受容体とし, Trp207 がサブサイト+1 の Man 特異性に重要と示された。以上より, 酵素群 GH130\_2 は MNP から成る A 群, MOP および MNP から成る B 群, MOP から成る C 群の 3 つに分類された。