

シロイヌナズナ由来 GH1  $\beta$ -グルコシダーゼ AtBGlu42 に関する研究

応用生物科学専攻 生命分子化学講座

生物化学 堀越 秀

## 1. 背景と目的

Glycoside hydrolase family 1 (GH1) に分類される  $\beta$ -グルコシダーゼ (BGlu) は  $\beta$ -グルコシド結合を加水分解するアノマー保持型糖質加水分解酵素である。GH1 に属す植物 BGlu は多様な基質特異性を持ち、種々のオリゴ糖や配糖体に作用する。また、細胞局在および発現レベルの調節を受け、細胞壁代謝や生理活性物質の活性化などを行うとされる。しかし、植物 GH1 BGlu のほとんどは、生理機能に関連した構造基盤が不十分である。40 種類のシロイヌナズナ由来 GH1 BGlu のうち、AtBGlu42 はシグナルペプチドを持たず、細胞質に局在すると予想される数少ない BGlu である。AtBGlu42 遺伝子は鉄欠乏条件下で誘導され、ストレス応答に関与するとされる。本研究では組換え AtBGlu42 の酵素化学的諸性質と立体構造を明らかにし、長鎖セロオリゴ糖加水分解酵素として良く研究されているイネ由来 GH1 BGlu である Os3BGlu7 と比較した。

## 2. 方法、結果および考察

N 末端に Trx タグおよび His タグを付加した AtBGlu42 組換え酵素を大腸菌で生産して Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。培養液 1 L から精製標品 8 mg を得た。分子質量は SDS-PAGE により 70 kDa と求められた。本酵素は 35°C 以下 (pH 7.0, 15 分間処理), pH 6.3–9.3 (4°C, 24 時間処理) で安定であった。また、至適条件は 40°C, pH 6.8 であった。この至適 pH は、多くの既知植物 GH1 BGlu と比較して高く、細胞質での活性発現に適する。様々な  $\beta$ -グリコシドに対する  $k_{\text{cat}}/K_m$  を求めた。p-ニトロフェノール (pNP) 配糖体 (D-グルコシド, D-フコシド, D-ガラクトシド, D-マンノシドおよび D-キシロシド) のうち、D-グルコシドを最も良い基質とした ( $70.6 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )。グルコ2糖ではラミナリビオースおよびソホロースを良い基質とした (それぞれ  $94.6 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ,  $13.8 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )。ラミナリオリゴ糖は2糖に、セロオリゴ糖では3糖 ( $85.8 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) に対して最も高い  $k_{\text{cat}}/K_m$  を示した。天然配糖体のサリシン、ヘリシン、サリチル酸グルコシド、エスクリンおよびフロリジンに対して加水分解活性を示し、ヘリシンに最も良く作用した ( $160 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )。また、AtBGlu42 は pNP-Glc を基質として糖転移を触媒し、pNP-セロビオシドを生成した。この糖転移反応において pNP 遊離速度 (全反応速度), Glc 遊離速度 (加水分解速度) および二つの速度差である糖転移速度は、グルコシル酵素中間体経由の糖転移反応の理論式によくしたがった。糖転移率 (糖転移と全反応の速度比) 50%を与える基質濃度である  $K_{\text{TG}}$  は 6.56 mM であり、同様に pNP-セロビオシドを生成する Os3BGlu7 の  $K_{\text{TG}}$  (49.2 mM) と比較して良い糖転移能を示した。SPRING-8 において X 線回折データを収集し、リガンドフリー構造を分解能 1.7 Å で決定した。既存の GH1 酵素と比べ、全体構造は同様の ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> バレルフォールドで、サブサイト-1 を形成するアミノ酸残基および触媒残基は空間的によく保存されていた。セロオリゴ糖に対する +5 までのサブサイト構造を持つ Os3BGlu7 の基質結合ポケットと比較した。Os3BGlu7 においてサブサイト+1 および+2 を形成する Trp358 は AtBGlu42 で保存されていた。一方、サブサイト+3 を形成する Tyr341 は AtBGlu42 において Arg342 であった。Arg342 が4糖の還元末端残基に対する立体障害となり、AtBGlu42 の3糖に対する高い特異性に関与すると考えられた。