

エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼHSの立体構造解析

倉内郁哉¹、大倉和貴¹、細川千絵¹、伊藤和央²、宮原郁子¹
(¹阪公大理、²阪公大生活科)

支援：JST次世代研究者挑戦的研究プログラム

1. 研究概要

エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼHS（エンドHS）はGH85に属しアミノ酸残基数は1009である。この酵素は*N*-結合型糖鎖の**コンプレックス型糖鎖のみを認識**してキトビオース間を**加水分解**することで糖鎖を遊離する。また、適当な水酸基をもった化合物を加えておくことで、糖鎖を化合物に転位できる糖転移反応を起こす（Figure. 1, 2）。本酵素の触媒機構および基質認識機構を解明するため、X線結晶構造解析により**エンドHSの立体構造を決定**した。

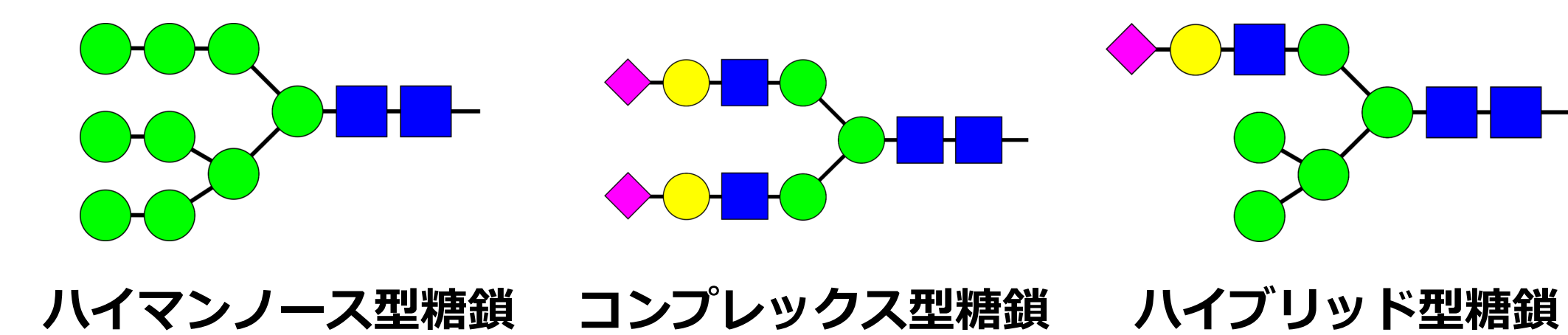


Figure. 1
***N*-結合型糖鎖の構造**
N-結合型糖鎖は五糖コア構造以外の糖鎖構造によって3種類に大別される。

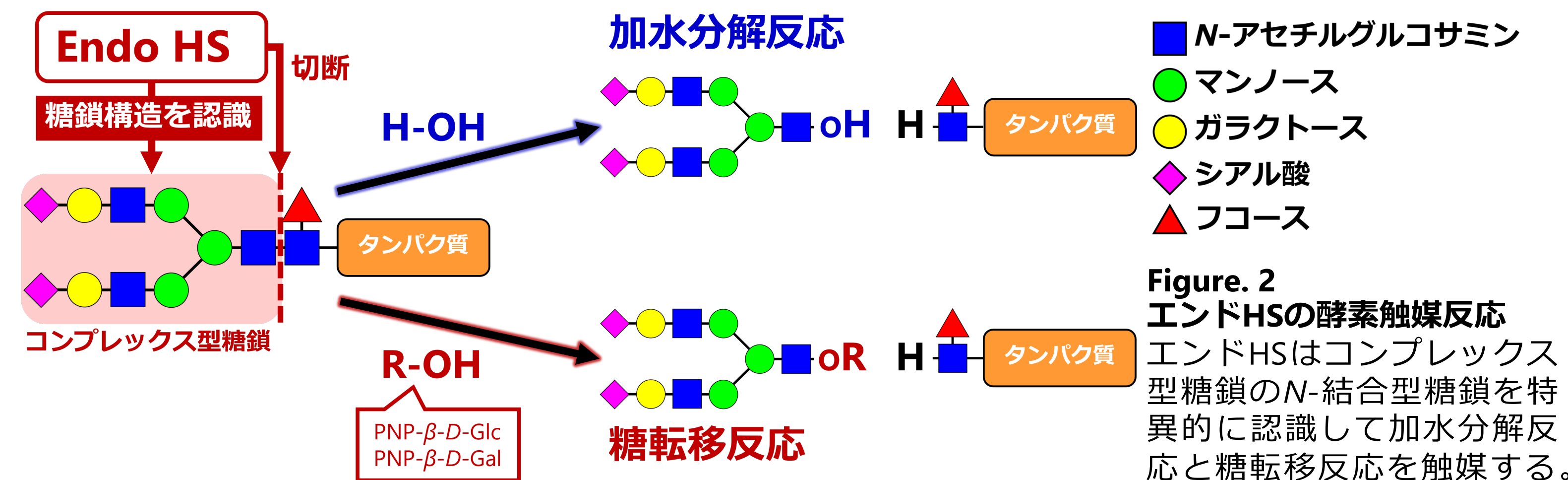


Figure. 2
エンドHSの酵素触媒反応
エンドHSはコンプレックス型糖鎖の*N*-結合型糖鎖を特異的に認識して加水分解反応と糖転移反応を触媒する。

2. X線結晶構造解析

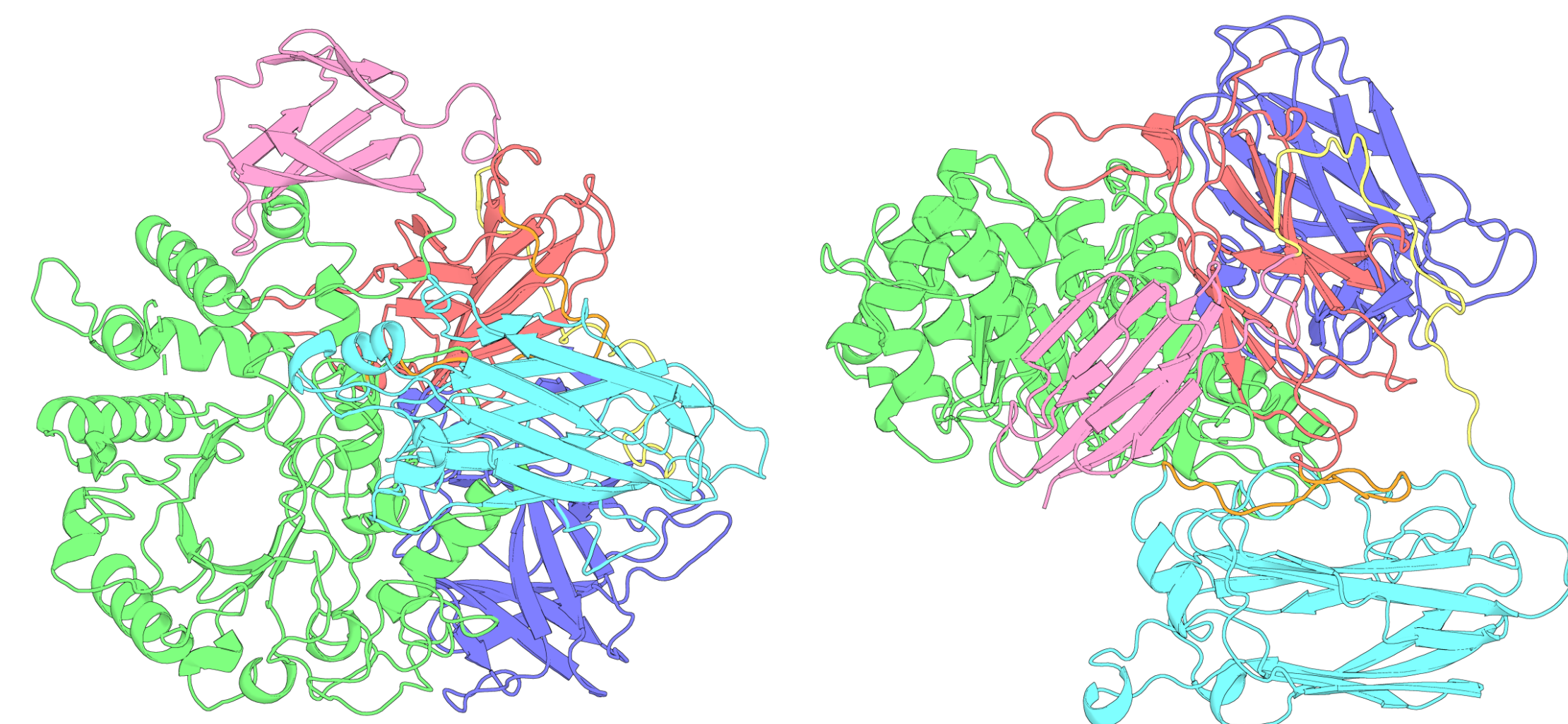


Figure. 3
Endo HSの結晶構造
Endo HSは結晶中で非対称単位内に2分子存在していたが、分子間相互作用は小さく、モノマーであると考えられる。エンドHSは5つドメインで構成されていた。N末端側から順にドメインI（緑）、ドメインII（青）、ドメインIII（赤）、ループ構造（橙）、ドメインIV（水）、ループ構造（黄）、ドメインV（桃）と繋がる。

エンドHSの結晶構造を最終分解能1.8 Åで構築

3. 既知のGH85酵素との立体構造の比較

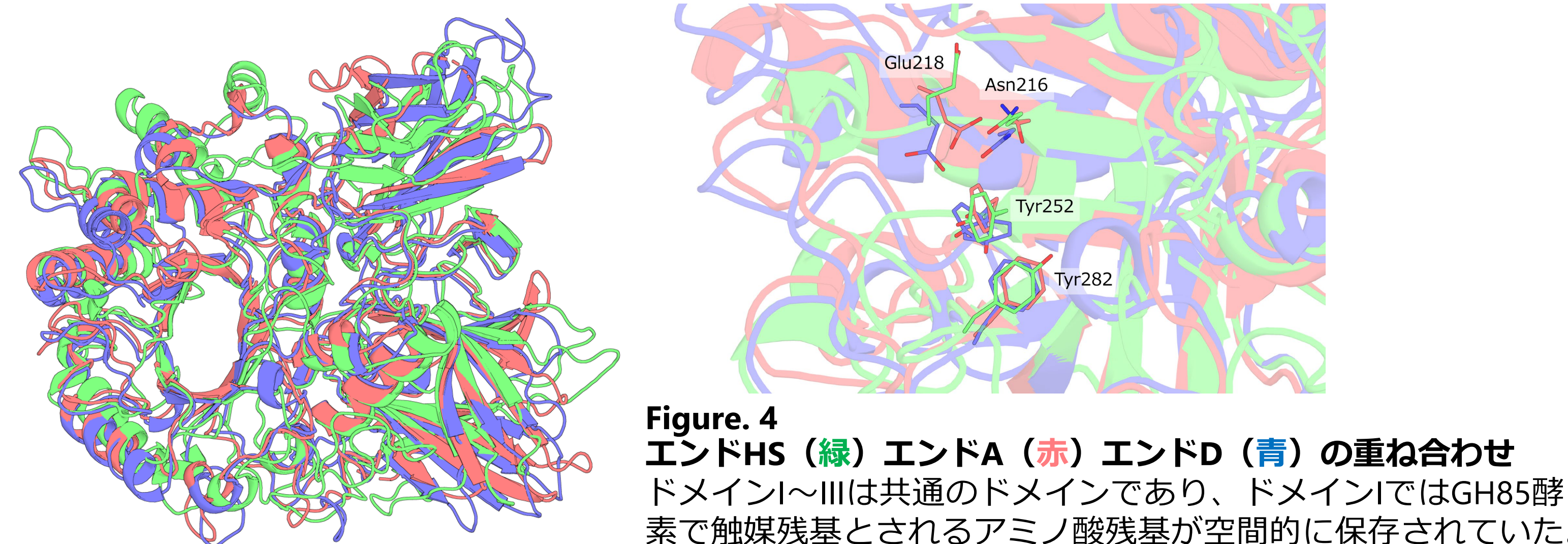


Figure. 4
エンドHS（緑）エンドA（赤）エンドD（青）の重ね合わせ
ドメインI～IIIは共通のドメインであり、ドメインIではGH85酵素で触媒残基とされるアミノ酸残基が空間的に保存されていた。

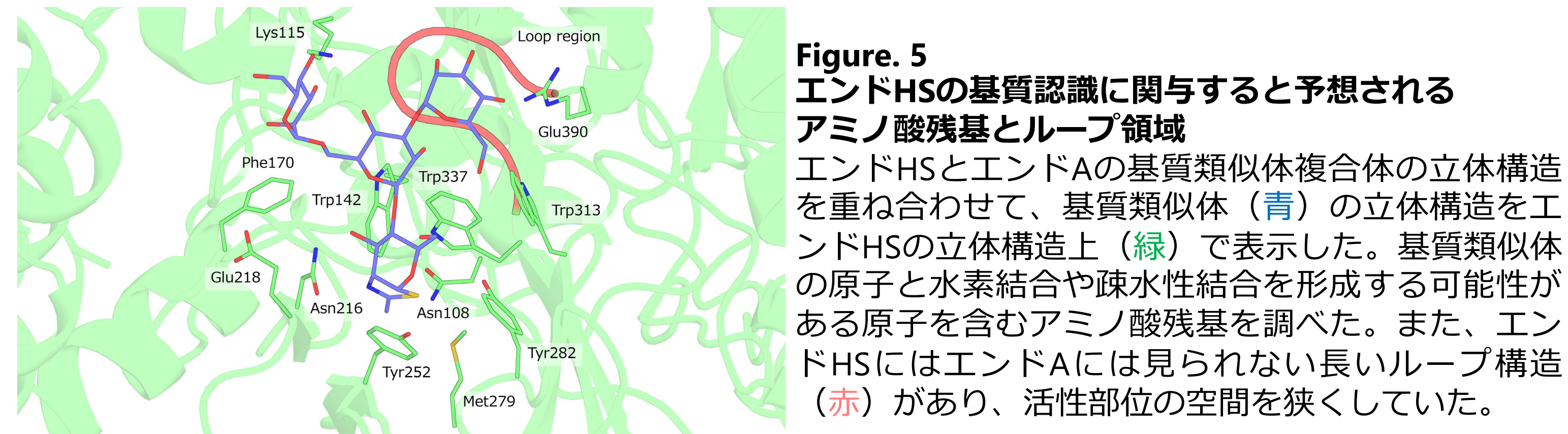


Figure. 5
エンドHSの基質認識に関与すると予想されるアミノ酸残基とループ領域
エンドHSとエンドAの基質類似体複合体の立体構造を重ね合わせて、基質類似体（青）の立体構造をエンドHSの立体構造上（緑）で表示した。基質類似体の原子と水素結合や疎水性結合を形成する可能性のある原子を含むアミノ酸残基を調べた。また、エンドHSにはエンドAには見られない長いループ構造（赤）があり、活性部位の空間を狭くしていた。

基質認識に関与するアミノ酸残基とループ領域を予想

4. ドッキングシミュレーション

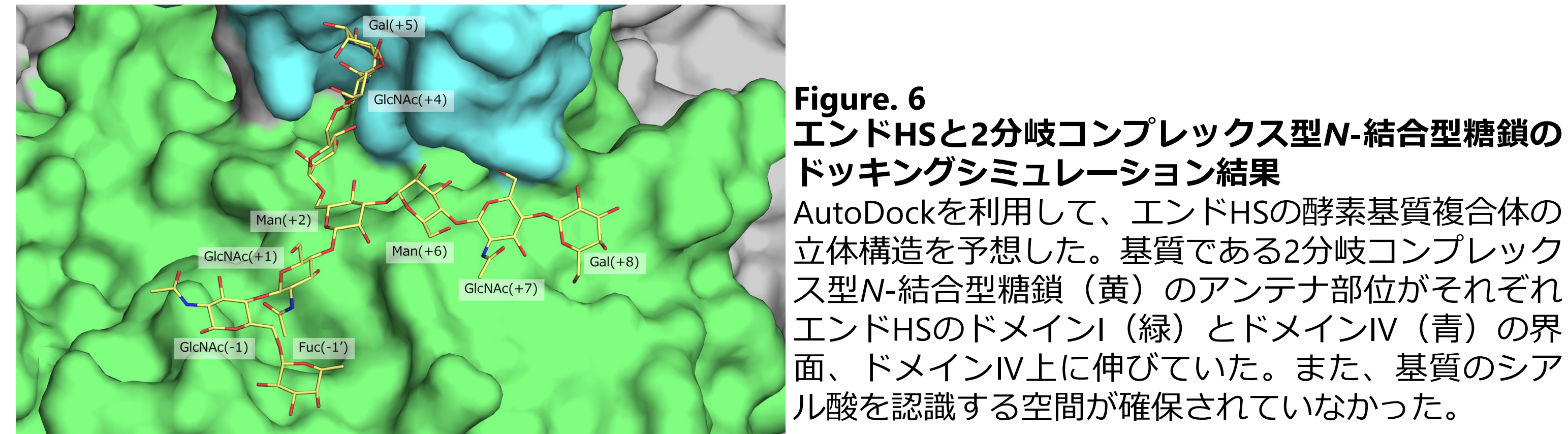


Figure. 6
エンドHSと2分岐コンプレックス型*N*-結合型糖鎖のドッキングシミュレーション結果
AutoDockを利用して、エンドHSの酵素基質複合体の立体構造を予想した。基質である2分岐コンプレックス型*N*-結合型糖鎖（黄）のアンテナ部位がそれぞれエンドHSのドメインI（緑）とドメインIV（青）の界面、ドメインIV上に伸びていた。また、基質のシアル酸を認識する空間が確保されていなかった。

ドメインIVは配置を変化させることで基質認識を行っているとは予想

X線結晶構造解析によってエンドHSの立体構造を決定しその基質認識機能についてドメインI、IVがもつ機能の視点から考察した