

2P-041 アメフラシ β -グルコシダーゼのクローニング

○白石 将孝, 桑村 修司, 大島 美紀, 馬庭 沙織, 湯浅 恵造, 辻 明彦
(徳島大院・ソシオ)
tsuji@bio.tokushima-u.ac.jp

褐藻類の貯蔵多糖であるラミナランはグルコースが β 1,3結合、 β 1,6結合した構造で、その分解機構は十分に解明されていない。これまでに我々は海藻を主食とするアメフラシの消化液から2種類の新規 β -グルコシダーゼ(110K-BGL、210K-BGL)を同定した。これらBGLはオリゴセルロースだけでなく、ラミナラン、乳糖にも活性を有する多機能酵素である。110K-BGLの反応機構解明の1歩として、クローニングによる全アミノ酸配列の推定を目的とした。

本研究では、精製110K-BGLのリジルエンドペプチダーゼ分解ペプチド解析より決定したアミノ酸配列からプライマーを設計し、アメフラシ肝臓cDNAからPCRによってクローニングを行った。

クローニングの結果、2952bp(984アミノ酸)の110K-BGL全長cDNAが得られた。得られたcDNAから推定されるアミノ酸配列はリジルエンドペプチダーゼフラグメントのアミノ酸配列と一致し、このcDNAは110K-BGLをコードするcDNAであると考えられた。110K-BGLはシジミBGL(CjCel1A, 107kDa)推定アミノ酸配列と高い相同性を示したが、ヒトクターゼ-フロリジンヒドロラーゼ(LPH、220kDa)とも高い相同性を示した。110K-BGLはGHF1(Glycoside Hydrolase Family1)に属し、2つの触媒ドメインを持つ構造であると予想された。N-グリコシド結合可能なAsn(N)はN末端ドメインに3つ、C末端ドメインに3つあることを確認した。また、LPHで同定された4つの活性基と周辺のアミノ酸配列は非常に高度に保存されていた。アミノ酸配列比較により、N末端ドメインよりC末端ドメインの方が昆虫やバクテリアのBGLと相同性が高かった。

Cloning of 110kDa β -Glucosidase from *Aplysia kurodai*

○Masataka Shiraiishi, Suji Kuwamura, Miki Oshima, Saori Maniwa, Keizo Yuasa, Akihiko Tsuji
(Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima)

Key words *Aplysia kurodai*, beta-glucosidase, laminaran

2P-043 イネ由来 α -アミラーゼの内毒素中和作用の解析

○渡邊 和史, 落合 秋人, 菅井 寛, 田中 孝明, 谷口 正之
(新潟大・自然研)
ottie@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】内毒素は、細菌の細胞壁を構成する主要な成分であり、グラム陰性菌のリポ多糖(LPS)とグラム陽性菌のリポテイコ酸(LTA)が知られている。これらは細胞が破壊されると大量に放出され、ヒト体内に入ると細胞や組織の炎症などを誘発する。これまでの研究において、*Oryza sativa* (イネ)由来の α -アミラーゼ(AmyI-1)が内毒素を中和する(結合する)ことを見出した。本研究では、生体分子相互作用解析と構造生物学的知見から、その結合メカニズムを解明することを目的とした。

【方法と結果】表面プラズモン共鳴(SPR)を用いた生体分子相互作用解析により、AmyI-1と内毒素(LPS/LTA)との結合を評価した。その結果、並行した2種類の結合反応によって、AmyI-1はLPS/LTAと結合することを明らかにした。また、オオムギ由来 α -アミラーゼ(AMY1)において、2箇所の糖鎖結合部位が報告されている。AmyI-1とAMY1の立体構造を比較した結果、これらの糖鎖結合部位を構成する主要なアミノ酸残基が立体構造的にほぼ保存されていた。また、トリプトファン蛍光の消光実験によって、LPS/LTAの結合にはAmyI-1分子表面の芳香族アミノ酸残基が関与していることがわかった。そこで、糖鎖結合部位を構成する2つのアミノ酸残基における変異体W302AとY403Aをそれぞれ調製し、LPS/LTAとの相互作用を解析した。その結果、それぞれに対する解離定数が5~1000倍増大し、結合能力が大きく低下することが明らかになった。AmyI-1の内毒素への結合には、これらの糖鎖結合部位が関与していることが立証された。

Functional analysis of endotoxin-neutralizing effect of α -amylase from *Oryza sativa*

○Kazuhiro Watanabe, Akihito Ochiai, Hiroshi Sugai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words lipopolysaccharide, lipoteichoic acid, alpha-amylase, *Oryza sativa*

2P-042 イネ由来 α -アミラーゼ AmyI-1 の X 線結晶構造解析

○落合 秋人, 菅井 寛, 原田 計, 伊東 孝祐, 内海 利男, 田中 孝明, 谷口 正之, ツツ井 敏明
(新潟大・自然研)
ottie@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】*Oryza sativa* (イネ)由来の α -アミラーゼ(AmyI-1)は、様々な組織や成長段階において重要な役割を担っている。AmyI-1はN結合型糖鎖を持つ糖タンパク質であり、この特徴は植物アミラーゼのなかでもAmyI-1に固有の特徴である。本研究では、AmyI-1の生理学的機能の理解を深めるため、その立体構造をX線結晶構造解析により決定したことで報告する。

【方法】大腸菌発現系を用いて、AmyI-1の組換えタンパク質を調製した。発現ベクターおよび宿主として、それぞれpET21bと*Escherichia coli* HMS174(DE3)株を使用した。発現・精製したAmyI-1を、沈殿剤としてPolyethylene glycol 3350を含む条件で結晶化し、大型放射光施設(Photon Factory)においてX線回折実験を行った。

【結果】AmyI-1の立体構造を2.2Å分解能において決定した。AmyI-1は、Glycoside hydrolase ファミリー13に属する大部分の α -アミラーゼにおいて高度に保存されている(β/α)₈-barrel構造を有していた。AmyI-1と既報のオオムギ由来 α -アミラーゼ(AMY1)の立体構造を比較した結果、触媒ドメインと糖鎖(デンブロン)結合に関わるドメインには大きな構造の相違はなかった。一方、AmyI-1のAsn-263, Thr-307, Asn-342, Pro-373, Ala-374などのアミノ酸残基から構成されるN結合型糖鎖の結合サイト近傍では、両アミラーゼ間の立体構造に相違が認められた。これらの残基はAMY1では保存されていないことから、AmyI-1に対する糖鎖付加と糖鎖構造を含む立体構造の維持に必要であることが示唆された。

Crystal Structure of α -Amylase AmyI-1 from *Oryza sativa*

○Akihito Ochiai, Hiroshi Sugai, Kazuki Harada, Kousuke Itoh, Toshio Uchiumi, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi, Toshiaki Mitsui
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words rice, *Oryza sativa*, alpha-amylase, X-ray crystallography

2P-044 X 線結晶構造解析によるイネ由来 α -アミラーゼの内毒素中和作用の解析

○菅井 寛, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
(新潟大・自然研)
ottie@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】グラム陰性菌のリポ多糖(LPS)やグラム陽性菌のリポテイコ酸(LTA)などの内毒素は細菌の細胞壁を構成する主要な成分であり、ヒト体内に入ると細胞や組織の炎症などを誘発する。当研究室の最近の研究において、*Oryza sativa* (イネ)由来の α -アミラーゼ(AmyI-1)が内毒素を中和する(結合する)ことを見出した。また、X線結晶構造解析により、AmyI-1の立体構造を明らかにしている。本研究では、AmyI-1による内毒素の認識機構をX線結晶構造解析を用いて解析した。

【方法】大腸菌発現系を用いて調製した組換えAmyI-1を3段階のカラムクロマトグラフィーにより精製し、Polyethylene glycol 3350を沈殿剤として含む条件において結晶化させた。得られた結晶を2.5 mg/mlの内毒素(LPS/LTA)を含む結晶化溶液に移してソーキングを行うことにより、AmyI-1とLPS/LTAとの複合体結晶を調製した。X線回折実験は大型放射光施設(Photon Factory)を利用した。

【結果】AmyI-1/LPS複合体およびAmyI-1/LTA複合体の立体構造は、それぞれ1.89 Åおよび2.40 Å分解能において決定した。AmyI-1/LTA複合体において、LTAのN-アセチルグルコサミン部がAmyI-1の活性中心に埋め込まれるように結合していた。また、AmyI-1の糖鎖結合部位にもLTA由来の電子密度マップが確認された。AmyI-1/LPS複合体においては、糖鎖結合部位にのみLPS由来の電子密度マップが確認された。電子密度マップの形状から、それぞれの内毒素のlipid A部もしくはO抗原中の糖鎖部がAmyI-1に結合していると推測された。

Analysis of interaction between endotoxin and α -amylase from *oryza sativa*

○Hiroshi Sugai, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words *Oryza sativa*, endotoxin, alpha-amylase, X-ray crystallography