

## 澱粉枝作り酵素および澱粉枝切り酵素の構造と機能の解明 Elucidation of structure-function relationships of starch branching enzyme and starch debranching enzyme

鈴木龍一郎\*, 鈴木英治

秋田県立大学生物資源科学部, 〒 010-0195 秋田市下新城野字街道端西 241-438

Mari Hayashi, Ryuichiro Suzuki\*, Eiji Suzuki

Department of Biological Production, Akita prefectural university, 241-438, Kaidobata-nishi  
Shimoshinjo-nakano, Akita, 010-0195, Japan

### 1 はじめに

枝作り酵素 (BE; EC 2.4.1.18) は $\alpha$ -グルカン (澱粉およびグリコーゲン) を基質として $\alpha$ -1,4-結合を切断し, グルコースの 6 位の水酸基に転移することで $\alpha$ -1,6-結合から成る分岐点を作る分子内または分子間転移反応を触媒する。BE は $\alpha$ -グルカン生合成系の鍵酵素である。これまでに大腸菌由来 BE [1], 結核菌由来 BE [2], イネ由来 BE [3], ヒト由来 BE [4]の結晶構造が報告されており, 反応機構は保持型であることが知られている。しかし, 活性部位に糖鎖が結合した状態の構造は未解明であり, 基質認識機構や作用機序は不明であった。

最近我々は, 澱粉様貯蔵多糖を蓄積するシアノバクテリア *Cyanothece* sp. ATCC 51142 株由来 BE1 の結晶化に成功した [5]。本研究では, BE1 の活性部位に糖鎖が結合した状態での構造解析を目的とした。

### 2 実験

野生型 BE1 と同一条件 [5] で W610N を結晶化した。W610N の結晶に, 終濃度 300 mM のマルトヘプタオース (G7) を室温で 30 分間ソーキングし, 回折データを収集した。構造解析は, リガンドフリー状態の BE1 の結晶構造 (PDB ID: 5GQU) を用いて分子置換法で行った。

### 3 結果および考察

野生型 BE1 の活性部位に糖鎖が結合した状態での構造解析を試みたが, 複合体構造は得られなかった。活性部位と糖鎖の親和性を改変するため, 活性部位を形成していると予想されるアミノ酸残基に変異を導入し, 触媒特性が変化した変異体 (W610N) を創出した。W610N の構造解析を行ったところ, リガンドフリー状態の W610N と活性部位 (図 1, 赤矢印) に G7 が結合した状態の結晶構造 (W610N-G7) をそれぞれ分解能 1.8 Å と 2.3 Å で決定することに成功した。さらに, 7 ヶ所の酵素表面の糖鎖結合部位 (SBS) を同定することができた (図 1)。これら SBS のうちドメイン A の 2 ヶ所 (図 1, 赤丸部分) は, 活性部位近傍に位置していることから, 触媒反応に関わる可能性があると推測された。

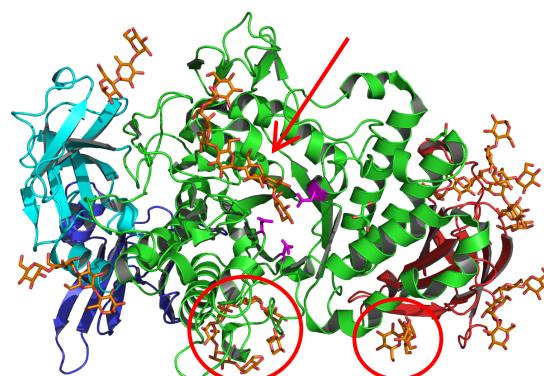


図 1 : W610N-G7 の全体構造 (PDB ID: 5GQX)

ドメイン N, CBM48, ドメイン A (活性部位を含む), ドメイン C はそれぞれ青, シアン, 緑, 赤で, ドメイン A の 3 つの触媒残基はマゼンタ, 結合した糖鎖はオレンジで表示した。赤矢印は活性部位, 赤丸はドメイン A の SBS を示す。

### 謝辞

本研究は, 島津科学技術振興財団研究開発助成金および一部文部科学省科学研究費補助金の支援のもとで行われた。

実験をサポートして下さった KEK-PF スタッフの方々, 農研機構の藤本瑞先生, 東京大の五十嵐圭日子先生および石田卓也先生, 静岡県立大の伊藤剛平先生に感謝いたします。

### 参考文献

- [1] M.C. Abad, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **277**, 42164-42170 (2002).
- [2] K. Pal *et al.*, *J. Biol. Chem.* **285**, 20897-20903 (2010).
- [3] J. Noguchi, *et al.*, *Glycobiology* **21**, 1108-1116 (2011).
- [4] D.S. Froese, *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **24**, 5667-5676 (2015).
- [5] M. Hayashi *et al.*, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **71**, 1109-1113 (2015).

### 成果

1. M. Hayashi and R. Suzuki *et al.*, *J. Biol. Chem.* **292**, 5465-5475 (2017).

\* ryuichi@akita-pu.ac.jp