

Paenibacillus sp. 598K α -1,6-グルコシルトランスフェラーゼの結晶構造 Crystal structure of *Paenibacillus* sp. 598K α -1,6-glucosyltransferase

藤本瑞^{1,2,*}, 鈴木喜大², 岸根尚美^{1,2}, 舟根和美³

¹ (国) 農業・食品産業技術総合研究機構高度解析センター,
〒305-8602 つくば市観音台 2-1-2

² (国) 農業生物資源研究所, 〒305-8602 つくば市観音台 2-1-2

³ (国) 農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所,
〒305-8642 つくば市観音台 2-1-12

Zui Fujimoto^{1,2,*}, Nobuhiro Suzuki², Naomi Kishine^{1,2} and Kazumi Funane³

¹Advanced Analysis Center, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-2 Kannondai, Tsukuba, 305-8602, Japan

²National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, 305-8602, Japan

³Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-2 Kannondai, Tsukuba, 305-8602, Japan

1 はじめに

環状イソマルトオリゴ糖 (CI) 生産菌である *Paenibacillus* sp. 598K 株は、デキストランまたは澱粉を基質として CI を生産する。CI 生産を司る環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ (CITase) はデキストランから CI を生産するが、澱粉から CI を生産することはできず、CITase 以外に澱粉からイソマルトオリゴ糖を生産する α -1,6-グルコシルトランスフェラーゼ (PsTG31) が必要であることがわかり、このタンパク質を同定、クローニングし、組換え酵素を作製して特性解析を行った [1]。

PsTG31 は α -グルコシダーゼ活性を有し、トレハロース以外の α 結合グルコ二糖を分解した。しかし、マルトオリゴ糖やイソマルトオリゴ糖と反応させた場合には、これらを不均化し元の基質よりも長いオリゴ糖を生成した。PsTG31 とイソマルトテトラオースの反応では、反応初期において分解産物と共にイソマルトペンタオースが生成し、PsTG31 は糖転移により α -1,6-結合を生成する活性を有することが示された。PsTG31 とマルトペンタオースを反応させると、最長で重合度 10 の非還元末端側に α -1,6-結合鎖を持つオリゴ糖を生成した。各産物と CITase を反応させたところ、非還元末端側に重合度 4 以上の α -1,6-結合鎖を持つオリゴ糖を含む産物を基質とした場合に、CI 生産が認められた。PsTG31 が澱粉を分解し、不均化反応により澱粉に新たに α -1,6-結合鎖を付加し、澱粉から CITase の基質を作り出すことが明らかになった。

そこで、PsTG31 のユニークな反応機構を解明するために PsTG31 の結晶構造解析に取り掛かった。

2 実験

大腸菌で発現させた PsTG31 の結晶を作製し、高エネルギー加速器研究機構放射光施設 (PF) において X 線回折データを取得した。テルビウム誘導体結晶を用いた多波長異常分散法により立体構造を決定した。反応機構及び糖認識機構を解明するため、酵素の基質となるマルトオリゴ糖、生産物であるイソマルトオリゴ糖、及び阻害剤であるアカボースの結晶へのソーキングを行い、複合体構造を決定した。

3 結果および考察

PsTG31 は β/α バレルの触媒ドメインと、その N 末側に一つ、C 末側に 5 つの β ドメインを持つ、合計 7 つの構造ドメインを有するマルチドメイン構造を有していた (図 1)。リガンド複合体構造解析では、触媒ドメイン、N 末ドメインと C 末側の 3 つのドメインに糖鎖、アカボースの結合が確認された。

触媒ドメインには、アカボースや、オリゴ糖の結合が見られた。そのうち触媒ドメインの中心にはアカボースの結合が見られ、オリゴ糖の複合体ではグルコース分子も観察されたことから、活性中心が同定された。グルコース分子が見られた部位は触媒ポケットであり、 α -グルコシダーゼに通常見られる構造を有していた。その一方で、マルトオリゴ糖やアカボースが結合する部位と、イソマルトオリゴ糖が結合する部位が異なることから、転移反応の際に基質と反応受容体が結合する位置が異なる可能性が示唆された。



図1 PsTG31 のリボンモデル。触媒ドメイン（中心）とN末ドメイン（右上）、左側には3つのCBMが存在する。

触媒ドメイン以外に糖の結合が見られたN末ドメインとC末側の3つの β ドメインは糖結合モジュール(CBM)であることが示唆された。N末ドメインとC末側の3つのドメインのうちの1番目と3番目のドメインにはアカボースやマルトオリゴ糖との結合が見られたため、基質を認識するCBMであると考えられた。一方、C末側の3つのドメインのうちの真ん中のドメインはイソマルトオリゴ糖への結合が見られたため、転移反応における受容体を結合するCBMであると考えられた。

4 まとめ

PsTG31 は7つの構造ドメインを持つ立体構造を有していた。そのうち一つは触媒ドメインであったが、4つのドメインがマルトオリゴ糖、あるいはイソマルトオリゴ糖を認識するCBMであることが明らかとなった。基質および生産物を特異的に認識するCBMを利用することで、効率よく澱粉からCITaseの基質となるイソマルトオリゴ糖を生産する可能性が示唆された。

謝辞

本研究は、一部農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援のもとで行われた。

X線データ測定においてはPFスタッフの方々に変えてお世話になりました。感謝致します。

参考文献

- [1] H. Ichinose *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 4115 (2017).
- [2] Z. Fujimoto *et al.*, *Biochemical. J.* **in press** (2017).