

Aspergillus kawachii β -フルクトフラノシダーゼの立体構造解析 Crystal Structure of a β -Fructofuranosidase from *Aspergillus kawachii*

殿塚隆史^{1,*}, 長屋美香¹, 西河淳¹, 平野勝紹², 栃尾巧²

¹東京農工大学大学院農学府, 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

²物産フードサイエンス株式会社研究開発センター, 〒478-0046 知多市北浜町 24-12
Takashi Tonozuka^{1,*}, Mika Nagaya¹, Atsushi Nishikawa¹, Katsuaki Hirano², Takumi Tochio²

¹Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu 183-8509, Japan

²Research & Development Center, B Food Science, 24-12 Kitahama-cho, Chita, 478-0046, Japan

1 はじめに

麹菌 *Aspergillus kawachii* の生産する β -フルクトフラノシダーゼ (以下 *AkFFase*) は、糖質加水分解酵素ファミリー GH32 に分類される酵素である。*Aspergillus* 属の GH32 に属する酵素は強力な糖転移活性を有し、フラクトオリゴ糖の生産に用いられている。フラクトオリゴ糖は、三糖 1-kestose (Fru- β (2 \rightarrow 1)-Fru- β (2 \leftrightarrow 1) α -Glc)、四糖 nystose (Fru- β (2 \rightarrow 1)-Fru- β (2 \rightarrow 1)-Fru- β (2 \leftrightarrow 1) α -Glc) などのフルクトースを構成糖とするオリゴ糖の総称であるが、1-kestose は特にプレバイオティクスの機能が高いことが報告されている。*AkFFase* は特に 1-kestose の生成に優れているという特徴があることから、糖転移反応の機構に興味を持たれる。本研究では、*AkFFase* の X 線結晶構造解析を行った。[1]

2 実験

pET32a を用いた発現プラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3) 株によって *AkFFase* を生産させた。Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行い、SDS-PAGE で単一バンドまで精製されたことを確認した。精製酵素はリザーバーとして 2.6 M ギ酸ナトリウム、0.1 M 酢酸ナトリウム pH5.0 を用いたハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。

リガンドなしのデータは Paratone-N に浸漬した結晶を用いた。またフルクトースとの複合体は、得られた結晶をリザーバーにフルクトースを 35% なるように加えた溶液にソーキングすることにより調製した。X 線回折強度データは、高エネルギー加速器研究機構 PF AR-NW12A ビームラインにて収集した。位相の決定は、*Aspergillus japonicus* の β -フルクトフラノシダーゼを用いた分子置換法による。

3 結果および考察

AkFFase のリガンドなしの構造を 2.3-Å 分解能で、*AkFFase* とフルクトースとの複合体の構造を、2.1-Å 分解能で決定した。*AkFFase* は、N 末端側の小コンポーネント (図 1 の青)、5 枚の β シートから成る β プロペラドメイン (黄)、C 末端側の β サンドイッチ (緑)、および、これらのドメインをつなぐ α ヘリックスから成るリンカー (オレンジ) より構成

されており、これは多くの GH32 に共通して見られる構造であった。フルクトース分子 (図 1 の赤で表したスティックモデル) は活性中心である β プロペラドメインの中心付近、および、酵素の表面にいくつか存在していた。電子密度マップより、活性中心のフルクトース分子はサブサイト -1 および +1 の両方に結合しており、活性中心に結合している糖はフルクトシル β 2 \rightarrow 1 フルクトースとしてモデルを構築できることが判明した。

他の GH32 の酵素と比較したところ、活性中心付近のアミノ酸残基は保存されていたが、サブサイト +2 を構成する Ile46-His147-Trp148 は *Aspergillus* 属の GH32 酵素に特徴的な配列で、糖転移に重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、活性中心から遠い位置に存在する Tyr143、Pro181、Asp299、Asn463 が 1-kestose の生成に関与している可能性が示唆された。

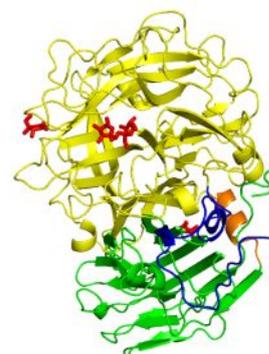


図 1 : *AkFFase* の全体構造

4 まとめ

本研究では、*AkFFase* の立体構造を決定し、他の酵素との立体構造の比較の結果、オリゴ糖生成に必要なアミノ酸残基を推定することができた。

参考文献

[1] Nagaya *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**, 1786 (2017).

* tonozuka@cc.tuat.ac.jp