

新規な環状糖の合成・代謝に関わる酵素の構造解析

Crystallography of enzymes for synthesis and degradation of novel cyclic glucans

河野正樹^{1,2}, 荒川孝俊^{1,3}, 伏信進矢^{1,3*}¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科、〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1² 株式会社 林原 研究部門、〒702-8006 岡山市中区藤崎 675-1Masaki KOHNO^{1,2}, Tetsuya MORI², Tomoyuki NISHIMOTO², Takatoshi ARAKAWA¹ and Shinya FUSHINOBU^{1,*}¹Department of Biotechnology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan²R&D Division, HAYASHIBARA Co., LTD³Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

1 はじめに

酵素技術の発展や健康志向の高まりから、各種オリゴ糖などの機能性糖質が注目されている。しかし、一般的な糖質は還元力を有するため、アミノ基共存下においてアミノカルボニル反応を引き起こし、品質劣化をもたらす場合がある。このような問題を改善するため、非還元性オリゴ糖として、グルコースの還元末端同士が結合したトレハロースや、環状オリゴ糖であるサイクロデキストリンなどが開発されている。特に環状オリゴ糖は、近年においても様々な種類が発見され、それぞれの特性による多分野への応用が期待されている。

株式会社林原では、2005年に *Arthrobacter globiformis* M6 株の培養上清を澱粉に作用させることによって、2分子のマルトースが α -1,6結合で環化した新規環状四糖、環状 α -1,6-マルトシルマルトース (CMM) を得た (図1) [1]。

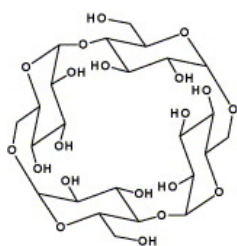


図1 : CMM の化学構造

この CMM に関連する酵素として、培養上清中に CMM 生成酵素である 6- α -maltosyltransferase が、無細胞抽出液中に CMM 分解酵素である CMM hydrolase (CMMase) の存在がそれぞれ示されている [2-4]。両者はともに glycoside hydrolase (GH) family 13 に分類されることが明らかとなっている。特に、CMMase は、GH13 の中のサブファミリー 20 (GH13_20) に属することがわかっている。さらに、M6 株における CMM 関連遺伝子のクローニングにより、菌体内への CMM 取り込みに関与する推定 ABC トランスポーターの存在が明らかとなった。以

上のことから、新たな環状糖を経由した澱粉資化経路の存在が M6 株に見出された [5]。

本研究では CMM の取り込みおよび分解に関わる酵素・タンパク質の構造解析を行うことで、それらの分子メカニズムについて明らかにし、その代謝経路の存在意義および機能の解明を試みた。

2 実験

CMMase の結晶構造を、リガンドフリー状態 (2.4 Å)、マルトース複合体 (2.1 Å)、パノース複合体 (1.94 Å)、CMM 複合体 (1.60 Å) の 4 状態で決定した (括弧内は分解能)。なお、CMM 複合体の構造決定には触媒部位である Asp201 を Asn に置換した変異体を用いた。

3 結果および考察

CMMase はユニークな羽状のダイマー構造をとっていた (図2)

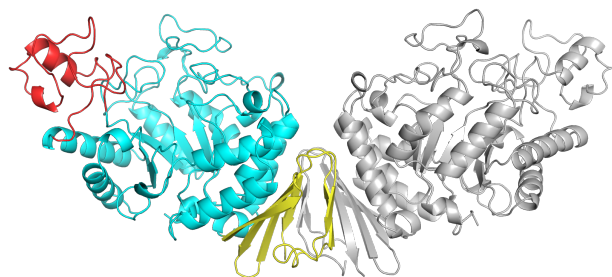


図2 : CMMase のダイマー構造

モノマー構造は GH13 および α -amylase 関連酵素の一般的なコア構造である三つのドメインから構成されていた (図3)。CMM は触媒ドメイン (ドメイン A) の中央に結合していた。

CMM が結合するポケットは CMM がぴったりと当てはまるような形になっていた (図4)。環状四

糖のそれぞれの糖を認識する部位として、-3'、-2、-1 および+1' と名付けた4つの特徴的なサブサイトが同定された。このポケットはPYF、CS (および Y からなり、ネオプルラーゼなど他のGH13_20 に属する酵素とは全く異なっていた。CMMase のこの三箇所のアミノ酸をネオプルラーゼと同じものに変えたところ、CMM を分解する効率が著しく低下することを確認した。したがって、CMMase の CMM に対する特異性はこの三箇所のアミノ酸によってつくられた触媒ポケットの全体的な形状によって支えられていることがわかった。

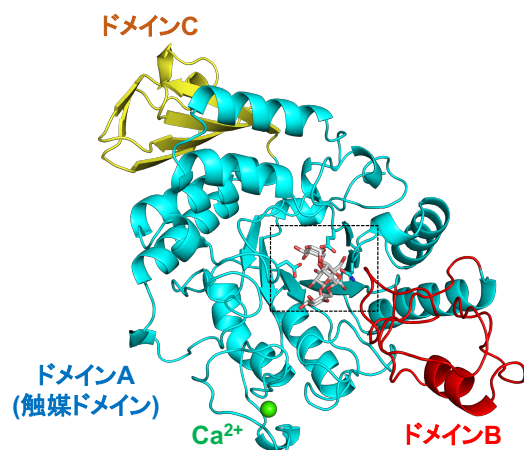


図3 : CMMase (CMM 複合体) のモノマー構造

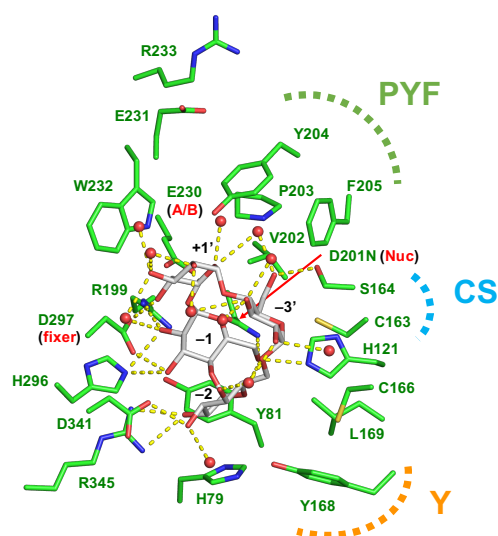


図4 : CMMase に結合した CMM と基質認識部位

4 まとめ

新規な環状四糖である CMM を特異的に加水分解する酵素 CMMase の立体構造と基質認識の様子を詳細に明らかにすることに成功した。さらに、変異体解析などの結果により、環状四糖に対する特異性は触媒ポケットの全体的な形状によって支えられていることが明らかとなった。本研究成果は、*J. Biol. Chem.*誌に掲載された。

謝辞

実験をサポートして下さった KEK および PF のみなさん、森哲也氏、西本友之氏 (株式会社林原) をはじめとする共同研究者のみなさんに感謝いたします。

参考文献

- [1] Mukai *et al.*, *Carbohydr. Res.* **340**, 1469 (2005)
- [2] Mukai *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1065 (2006)
- [3] Mori *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 1673 (2008)
- [4] Mori *et al.*, *J. Appl. Glycosci.* **58**, 39 (2011)
- [5] Mori *et al.*, *J. Appl. Glycosci.* **56**, 127 (2009)

成果

1. Kohno *et al.* *J. Biol. Chem.* **293**, 16874-16888 (2018)
2. 河野正樹、荒川孝俊、大田弘道、森哲也、西本友之、牛尾慎平、伏信進矢「*Arthrobacter* 属細菌の環状 α -1, 6-マルトシルマルトース代謝経路に関わる酵素・タンパク質の構造解析」平成 30 年度応用糖質科学シンポジウム、2018 年 9 月 12 日、秋田拠点センターALVE(アルヴェ) (秋田県・秋田市)
3. 河野正樹、荒川孝俊、大田弘道、森哲也、西本友之、牛尾慎平、伏信進矢「環状 α -1, 6-マルトシルマルトース (CMM) の認識および分解に重要な *Arthrobacter* 属細菌由来 CMM 分解酵素の構造的特徴」*応用糖質科学* **9** (2), 103-112, 2019

* asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp