

## Beijerinckia indica 由来 GH68 フルクトース転移酵素の立体構造解析 Crystal Structure of a GH68 Fructosyltransferase from *Beijerinckia indica*

殿塚隆史<sup>1,\*</sup>, 北村純一<sup>1</sup>, 長屋美香<sup>1</sup>, 西河淳<sup>1</sup>, 平野勝紹<sup>2</sup>, 藤井匡<sup>2</sup>, 栃尾巧<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京農工大学大学院農学府, 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

<sup>2</sup> 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<sup>1,\*</sup>, Junichi Kitamura<sup>1</sup>, Mika Nagaya<sup>1</sup>, Atsushi Nishikawa<sup>1</sup>, Katsuaki Hirano<sup>2</sup>,  
Tadashi Fujii<sup>2</sup>, Takumi Tochio<sup>2</sup>

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

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

### 1 はじめに

糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 68 に属する酵素は、主にスクロースに作用し、糖転移活性を示すものが多いことが知られている。細菌 *Beijerinckia indica* subsp. *indica* 由来の GH68 に属するフルクトース転移酵素 (以下 BiBftA) はスクロースを基質とし、機能性オリゴ糖として知られる三糖 1-kestose を始めとするフラクトオリゴ糖を生成させる酵素である。我々は、これまでにいくつかのフラクトオリゴ糖生成酵素の機能解析を行っており[1]、今回 BiBftA の立体構造を決定したので、以下報告する。

### 2 実験

当初 BiBftA の全長の大腸菌発現系を構築、精製し結晶化を試みたが、結晶を得ることができなかった。すでに立体構造が決定されており相同性が高い GH68 酵素と比較したところ、C 末端側の 522 残基以降の配列および 199~203 残基の 5 アミノ酸残基は他の酵素では保存されていないことが分かった。これらの配列はフレキシブルな構造で結晶化を妨げていると予想し、この部分を削除した変異酵素を作製したところ、結晶を得ることができた。

X線回折強度データは、高エネルギー加速器研究機構 PF BL-17A ビームラインにて収集し、結晶としてフルクトース溶液にソーキングしたものを用いた。構造の決定は *Gluconacetobacter diazotrophicus* レバンスクラージェ (PDB ID, 1W18) を鋳型とした分子置換法による。

### 3 結果および考察

BiBftA の構造は他の GH68 酵素と同様、5 葉の  $\beta$ -プロペラドメインおよびこのドメインを取り巻くサブコンポーネントより構成されていた (図 1)。これまでの GH68 酵素とフルクトースとの複合体の構造では、活性中心ではフルクトースは  $\beta$ -フルクトフラノースの形として存在することが報告されており、 $\beta$ -フルクトピラノースとして結合することの報告はなかった。今回予想外なことに、BiBftA とフルクトースとの複合体では  $\beta$ -フルクトフラノース

一つと  $\beta$ -フルクトピラノース一つが活性中心のポケットに結合していた。

さらに、 $\beta$ -フルクトフラノースの方向は、ほとんどの GH68 酵素で報告されているものとは異なっていた。*Microbacterium saccharophilum* の GH68 酵素とフルクトースの複合体[2]において同じ部位 (サブサイト-1) に結合している  $\beta$ -フルクトフラノースと比較すると、フラノース環が  $125^\circ$  ほど傾いていた。このような、活性中心のサブサイト-1 に結合している糖の方向について、全く異なる二つのモードがあるような糖質加水分解酵素の報告は他にはほとんど知られていない。GH68 の反応機構についてはよく分からない点が多く、さらなる解析が必要であると考えられる。



図 1 : BiBftA の立体構造

グレー:  $\beta$ -プロペラドメイン, 緑: サブコンポーネント, 赤:  $\beta$ -フルクトフラノース, 青:  $\beta$ -フルクトピラノース

### 参考文献

- [1] T. Fujii *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**, 1599 (2018).  
[2] T. Tonozuka *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.* **51**, 359 (2012).

\* tonozuka@cc.tuat.ac.jp