

カイコ由来 GH13スクロース分解酵素の構造解析 Structural analysis of silkworm sucrose hydrolase belonging to GH13 family

宮崎剛亜*, 朴龍洙
静岡大学 グリーン科学技術研究所
〒422-8529静岡県静岡市駿河区大谷 836
Takatsugu MIYAZAKI* and Enoch Y. PARK
Research Institute of Green Science and Technology
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan

1 はじめに

スクロースはグルコースとフルクトースからなる二糖であり、多くの生物がエネルギー源として利用することができる。鱗翅目昆虫のモデル生物であるカイコは、スクロースを特異的に分解する酵素を2つ有しており、いずれも中腸で発現する[1,2]。BmSUH および BmSUC1 はアミノ酸配列が全く異なり、それぞれ糖質加水分解酵素ファミリー13 (GH13) と GH32 に分類される。GH13 は α -アミラーゼなどの α -グルコシド結合を加水分解する酵素が分類される巨大なファミリーであり、さまざまな基質特異性を示す酵素が含まれている。GH13 は更に40以上のサブファミリーに分類されており、BmSUHはGH13サブファミリー17 (GH13_17) に分類されている[3]。GH13_17はすべて昆虫由来のタンパク質・酵素で構成されており、そのほとんどはマルトオリゴ糖やスクロースの両方に活性を示す α -グルコシダーゼであるが、BmSUH はマルトオリゴ糖にごく僅かにしか活性を示さない。本研究では、GH13_17 酵素の基質認識の構造基盤を明らかにするため、BmSUH の構造解析を行った。

2 実験

N 末端側の膜貫通領域を除いた BmSUH をコードする DNA 断片を pET28a ベクターへ組み込み、大腸菌 BL21(DE3) で組換え発現した。精製は、His タグを利用したアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーによる。7–10 mg/mL の精製酵素を調製し、12–18% PEG 3350、200 mM 酢酸マグネシウムを含むリザーバー液を用いたハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化した。リガンドとの複合体はすべて共結晶化によって得た。X 線回折測定は BL-5A または AR-NW12A にて行い、*Bacillus licheniformis* 由来 GH13 酵素 (PDB 5BRQ, 配列相同性 32%) を鋳型にした分子置換法によって構造決定した。

3 結果および考察

BmSUH のアポ構造、基質や阻害剤との複合体、共有結合中間体を含め、計 9 つの結晶構造を 1.6–1.85 Å 分解能で決定した (PDB 6LGA, 6LGB, 6LGC, 6LGD, 6LGE, 6LGF, 6LGG, 6LGH, 6LGI)。空間群はい

ずれも $P2_12_12_1$ に属していた。全体構造は、GH13 酵素に共通する domain A, B, C を有し、エキソ型 GH13 に見られる domain B' が存在した (図 1)。結晶学的非対称単位中に 2 分子存在しており、ゲルろ過解析の結果から、本酵素は活性部位が互いに向き合った形をしたホモダイマーであることが示唆された。

複数のリガンドとの複合体構造を比較することにより、BmSUH の加水分解反応における基質の構造変化 (conformational itinerary) を明らかにすることができ、他の GH13 酵素では見られない活性部位の構造変化を観察することができた。さらに、基質であるスクロースおよびマルトオリゴ糖ミミックである阻害剤アカルボースとの複合体構造の比較と変異体の活性解析から、BmSUH の基質特異性に重要なアミノ酸残基 (Gln191, Tyr251, Glu440) を特定した。以上の結果を踏まえ、機能未知を含む GH13_17 に属するタンパク質を俯瞰すると、GH13_17 には昆虫が独自に進化させてきたさまざまな基質特異性を有する酵素が存在することが示唆された。

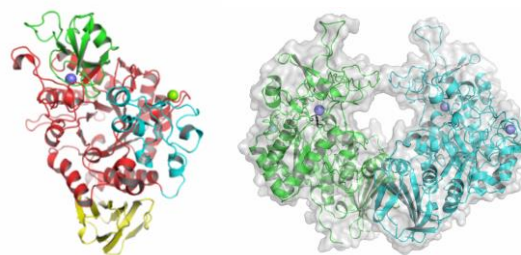


図 1 : BmSUH の単量体 (左) および二量体 (右) の立体構造。(左) domain A, 赤; domain B, 緑; domain B', シアン; domain C, 黄色。Ca²⁺イオンと Mg²⁺イオンが配位している。

4 まとめ

BmSUH のアポ構造およびリガンドとの複合体構造を計 9 つ決定した。基質との複合体構造は GH13_17 として初めての報告であり、本酵素の基質認識および反応メカニズムの構造基盤を明らかにした。

謝辞

X 線回折実験を行うにあたり、ご協力いただきました PF ビームラインスタッフの方々に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] T. Daimon *et al.*, *J. Biol. Chem.* **283**, 15271–15279 (2008).
- [2] H. Wang *et al.*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **61**, 46–52 (2015).
- [3] M.R. Stam *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 555–562 (2006).

成果

1. 宮崎 剛亜, 朴 龍洙 「カイコ由来 GH13_17 スクロース加水分解酵素の X 線結晶構造解析」日本応用糖質科学会 2019 年度大会 (第 68 回), 2019 年 9 月 11 日, じゅうろくプラザ (岐阜県岐阜市)
2. 宮崎 剛亜, 朴 龍洙 「カイコ由来スクロース加水分解酵素の基質および阻害剤との複合体構造解析」日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020 年 3 月 27 日, 九州大学伊都キャンパス (福岡県福岡市)
3. Takatsugu Miyazaki and Enoch Y. Park, Structure–function analysis of silkworm sucrose hydrolase uncovers the mechanism of substrate specificity in GH13 subfamily 17 *exo-α*-glucosidases. *J. Biol. Chem.* **295**, 8784–8797 (2020)
doi: 10.1074/jbc.RA120.013595

* miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp