

カイコ由来 GH32 β -フルクトフラノシダーゼの構造解析 Structural analysis of silkworm β -fructofuranosidase belonging to GH32 family

宮崎剛壘^{1,2,*}, 大場望美², 朴龍洙^{1,2}

¹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

²静岡大学 農学部 応用生命科学科, 〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 836

Takatsugu MIYAZAKI^{1,2,*}, Nozomi OBA² and Enoch Y. PARK^{1,2}

¹Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University,
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan

²Department of Applied Life Sciences, Faculty of Agriculture, Shizuoka University,
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan

1 はじめに

カイコは古くから絹糸の生産のために完全に家畜化された昆虫であり、現在でも鱗翅目昆虫のモデル生物としてさまざまな遺伝学的研究や生理学的研究の対象である。カイコのゲノム中にはバクテリアからの水平伝播に由来すると考えられる遺伝子が複数存在することが明らかになっており、そのいくつかは重要な生理機能を担っている。

カイコはスクロースを特異的に加水分解する酵素 BmSUC1 および BmSUH を有しており、BmSUC1 は中腸と絹糸腺[1]、BmSUH は中腸で発現している[2]。BmSUC1 と BmSUH はアミノ酸配列が異なり、それぞれ糖質加水分解酵素ファミリー32 (GH32) と GH13 に分類され、反応機構も異なる。BmSUC1 は分子系統解析によるとバクテリアからの水平伝播によるものと推定されており、カイコの餌となるクワの葉に高濃度に含まれる糖類似アルカロイドである 1-deoxynojirimicin に酵素活性阻害されないことから、アルカロイド耐性に寄与していると考えられている[1]。我々は、これらの酵素の構造機能相関を明らかにするため、先駆けて GH13 BmSUH の立体構造を報告した[3]。本研究では、GH32 BmSUC1 の構造解析を行った。

2 実験

N 末端側の分泌シグナル配列を除いた BmSUC1 をコードする DNA を pET28a ベクターへ組み込み、大腸菌 BL21(DE3) で His タグ融合タンパク質として組換え発現した。精製は、Ni-NTA アガロースアフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによって高純度の組換えタンパク質を得た。精製酵素を 25 mg/mL まで濃縮し、20% PEG3350, 40 mM クエン酸, 60 mM Bis-Tris propane 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。抗凍結剤には 20%(v/v) エチレングリコールを含むリザーバー液を用い、X線回折強度測定は BL5A または AR-NW12A ビームラインにて行い、*Thermotoga maritima* 由来 GH32 酵素 (PDB 1UYP, 配列相同性 34%) を鋳型にした分子置換法によ

って構造決定した。スクロースとの複合体は、求核触媒残基 (Asp63) 変異体 D63A を同様に結晶化し、抗凍結剤に 30%(w/v) スクロースを含むリザーバー液を用いることで調製し解析した。

3 結果および考察

BmSUC1 のアポ構造 (PDB 7BWB) および D63A-スクロース複合体構造 (PDB 7BWC) を、それぞれ 1.85 および 1.90 Å 分解能で決定した。空間群はいずれも C222₁ に属し、結晶学的非対称単位中に 1 分子含まれていた。全体構造は典型的な GH32 酵素のドメイン構成であり、N 末端側の five-bladed β -propeller 触媒ドメインと C 末端側の β -sandwich ドメインから構成されていた (図 1 左)。また、最も N 末端側に特徴的な 1 本の α -ヘリックス構造を有しており、これは既報の真核生物由来 GH32 酵素では見られず、一部のバクテリア由来 GH32 β -fructofuranosidase に見られる構造であった。

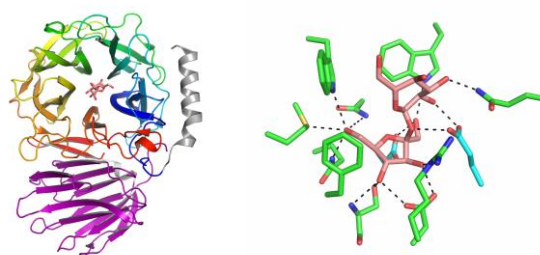


図 1 : BmSUC1 の全体構造 (左) と活性部位に結合しているスクロース分子 (右)。(左) N 末端ヘリックス, gray; 触媒ドメイン, rainbow (from blue to red); C 末端ドメイン, purple。触媒ドメインの中央にスクロース (pink) が結合している。(右) スクロースと相互作用するアミノ酸残基 (green) と触媒残基 (cyan)。

スクロース複合体では、活性中心にスクロースが 1 分子結合しており、周囲のアミノ酸残基によって水素結合や疎水性相互作用を介して認識されていた (図 1 右)。また、BmSUC1 はスクロース以外にラ

フィノースにも同等の加水分解活性を示し、それより低いながらも 1-kestose、ニストースといったオリゴ糖やイヌリン、レバンといった多糖（フルクタン）にも作用することが明らかになっている[4]。BmSUC1 の活性中心ポケットはスクロースを認識する部位より溶媒側が広く開けており、広い基質特異性を示す要因であることが分かった。また、クワの葉に含まれるアルカロイドの一つである 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol に拮抗的に阻害され、本酵素の立体構造を用いたドッキングシミュレーションによって、活性部位に結合しうると考えられた。BmSUC1 オルソログはクワの葉を餌としない他の鱗翅目昆虫にも存在することから、植物由来のフルクトオリゴ糖やフルクタンの分解にも寄与している可能性が考えられた。

4 まとめ

BmSUC1 のアポ構造およびスクロースとの複合体構造を決定し、本酵素における構造と基質特異性の相関を明らかにした。本研究は、昆虫を含む動物界で初の GH32 酵素の立体構造の報告であり、昆虫生化学の国際学術誌 *Insect Biochem. Mol. Biol.* に論文として発表した[4]。

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] T. Miyazaki and E.Y. Park, *J. Biol. Chem.* **295**, 8784–8797 (2020).
- [4] T. Miyazaki *et al.*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **127**, 103494 (2020)

成果

1. Takatsugu Miyazaki, Nozomi Oba, and Enoch Y. Park, Structural insight into the substrate specificity of *Bombyx mori* β -fructofuranosidase belonging to the glycoside hydrolase family 32. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **127**, 103494 (2020)

* miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp