

プロテアーゼによりプロセッシングを受けるグルコシル糖転移酵素の立体構造 Structural Analysis of an α -Glucosyltransferase That Is Proteolytically Processed

殿塚隆史¹, 大八木彩子¹, 丁一夫¹, 宮坂祐希¹, 小菌拓馬¹, 西河淳¹, 松本雄治², 安武望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昭和産業(株)基盤技術研究所, 〒273-0015 船橋市日の出 2-20-2

Takashi TONOZUKA^{1,*}, Ayako OYAGI¹, Yifu DING¹, Yuki MIYASAKA¹, Takuma KOZONO¹,
Atsushi NISHIKAWA¹, Yuji MATSUMOTO², and Nozomu YASUTAKE²

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

²RD&E Center, Showa Sangyo Co., Ltd. Hinode 2-20-2, Funabashi 273-0015, Japan

1 はじめに

醤油麹菌 *Aspergillus sojae* 由来の糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 31 に属する α -グルコシダーゼ AsojAgdL は高い糖転移活性を持ち、 α -1,6-グルコシド結合形成によりイソマルトオリゴ糖を生成させる性質を示す[1]。AsojAgdL は 950 アミノ酸残基から成るが、GH31 に属するほとんどの酵素は単一のポリペプチドの酵素であるのに対し、AsojAgdL は成熟の過程でプロテアーゼによりプロセッシングを受け二つのポリペプチドから成る複合体として機能する。プロセッシングを受ける箇所の前後の約 460 番目から 560 番目に至る配列は、立体構造予測では妥当な構造を得ることができないことから AsojAgdL の特徴的な構造に興味を持たれる。本研究では AsojAgdL の立体構造解析を行った。

2 実験

当初、麹菌から得た酵素の結晶化を試みたが、結晶を得ることができなかった。このため、酵母 *Pichia pastoris* による発現系を構築したところ、得られた酵素は麹菌で発現させた酵素と同様の活性を示したため、麹菌で発現させた場合に類似したプロセッシングを受けていると考えられることから、これを結晶化に用いることとした。Ni-NTA カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製し、N 結合型糖鎖を Endo Hf によって切断した後、結晶化した。X線回折強度データは、高エネルギー加速器研究機構 PF BL-5A ビームラインにて収集した。構造の決定はテンサイ α -グルコシダーゼ (PDB ID, 3W38) を鋳型とした分子置換法による。

3 結果および考察

結晶は、当初空間群 $P2_1$ で結晶学的非対称単位中に 4 つの酵素が存在するものとして解析を進めたが、 R_{work} 値が下がらなかった。そこで空間群 $P1$ で 8 つの酵素が存在するものとしたところ、リファインメントを進めることができた。立体構造予測ができない約 100 アミノ酸残基については、N 末端側のポリペプチドは 495 番目までの残基、C 末端側のポリペプチドは 516 番目以降の残基より電子密度を確認することができた。Gly467-Val495 および Ser516-Asn558 は

伸びたコイルのような特徴的な構造であった (図 1)。特に N 末端側ポリペプチド鎖の C 末端側の Gly467-Val495 は、基質結合部位 (図 1 緑矢印) を取り囲むような構造をしており、本酵素の糖転移活性に重要な役割を担っていると推測された。

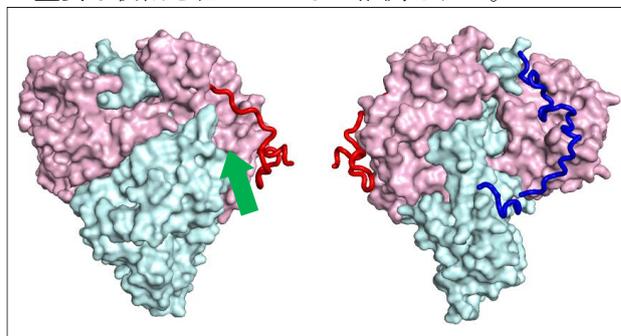


図 1 : AsojAgdL の立体構造

ピンク : N 末端から 466 残基まで (表面モデル)、赤 : 467 残基から 495 残基まで (主鎖モデル)、青 : 516 残基から 558 残基まで (主鎖モデル)、水色 : 559 残基から C 末端まで (表面モデル)。緑の矢印は基質結合部位、左右の図は、構造を異なる二つの方向から見たものを表す。

4 まとめ

AsojAgdL の立体構造解析によって、プロテアーゼによりプロセッシングを受けることにより生成する伸びたコイルのような特徴的な構造は、本酵素の糖転移活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。麹菌においてアミラーゼの発現は α -1,6-グルコシド結合を有する糖によって活性化されることから、本研究は、麹菌の糖代謝は、AsojAgdL がプロテアーゼのプロセッシングを受け複雑な立体構造を形成することにより制御されることを、示唆するものである。

参考文献

[1] A. Kawano *et al.*, J. Appl. Glycosci 66, 73 (2019).

* tonozuka@cc.tuat.ac.jp