

細菌 *Rhodothermus marinus* の澱粉に作用する  
マルチドメイン糖転移酵素の立体構造  
Structure of a multi-domain glucosyltransferase acting on starch  
from a bacterium *Rhodothermus marinus*

殿塚隆史\*, 宮坂祐希, 小菌拓馬, 西河淳

東京農工大学大学院農学府, 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

Takashi Tonozuka\*, Yuki Miyasaka, Takuma Kozono, Atsushi Nishikawa

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

## 1 はじめに

オリゴ糖は整腸作用などの機能を有し、高齢化社会を迎えた現代において需要が高まっている。澱粉に作用する $\alpha$ -アミラーゼを初めとする主要な酵素は、糖質加水分解酵素ファミリーGH13に分類される。我々はGH13の酵素ファミリーの中から、オリゴ糖を生成する酵素の探索を行ったところ、細菌 *Rhodothermus marinus* の Rmar\_0285 と番号づけられた酵素は糖転移活性を示し、澱粉を基質としオリゴ糖を生成させることを見出した。Rmar\_0285の立体構造予測を行いドメイン構成を推定したところ、GH13の基本ドメイン構成であるドメインA、B、Cに加え、N末端側に3つのドメイン（以降N1、N2、N3）、C末端側に1つのドメイン（以降D）が存在することが推定され、N1-N2-N3-A-B-C-Dというマルチドメインで構成された糖転移酵素であると考えられた。大腸菌による発現系の構築を行ったところ、酵素全長は良好な発現を得ることができなかったが、N3-A-B-Cというドメイン構成の酵素をpET32a(+)に組み込んだもので良好な発現が得られた。本研究では、オリゴ糖生成機構を解明する目的で、Rmar\_0285 N3-A-B-Cの立体構造を決定した。

## 2 実験

精製はNi-NTAアガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーで行った。得られたタンパク質はチオレドキシンの融合タンパク質であるため、スロンビンプロテアーゼにより切断を行い、Q-Sepharoseを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法による。結晶を酢酸鉛にソーキングし、AR NE-3Aビームラインで回折データを収集した。X線のプロセスはソフトウェアXDSで行った。位相の決定は、ソフトウェアPhenix.autosolを用いた単波長異常分散法による。モデルの構築および精密化はソフトウェアCootおよびRefmacを用いた。

## 3 結果および考察

Rmar\_0285 N3-A-B-Cの立体構造は、 $\beta$ サンドイッチから成るドメインN3、 $(\beta/\alpha)_8$ バレルから成るドメインA、ドメインAの途中から飛び出したコンポー

ネントであるドメインB、 $\beta$ サンドイッチから成るドメインCより構成されていた（図1左）。ドメインN3は糖結合モジュールCBM48に分類されるドメインである。全体構造をDALIサーバーで解析したところ、*Bacillus acidopullulyticus*のプルラナーゼや*Bacillus stearothermophilus*のネオプルラナーゼとの相同性が最も高かった。

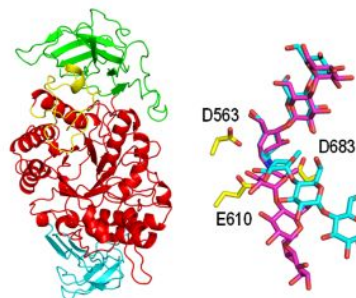


図1 Rmar\_0285 N3-A-B-Cの立体構造

左：全体構造、各ドメインの色は、緑：N3、赤：A、黄：B、シアン：C。右：アカルボース由来擬似6糖のRmar\_0285 N3-A-B-C（マゼンタ）およびブタ膵臓アミラーゼ（シアン）における結合の比較。黄色はRmar\_0285の触媒残基

アミラーゼの阻害剤であるアカルボースをソーキングし、立体構造解析を行った（図1右）。解析の結果、触媒残基近傍に擬似6糖が結合していた。擬似6糖はアカルボースの非還元末端側にマルトースが $\alpha$ -1,4-結合で結合している構造であった。この擬似6糖は、ブタ膵臓アミラーゼとアカルボースとの複合体でも得られている（PDB番号1XH0）。両者を重ねると、触媒残基より非還元末端側（サブサイトマイナス側）はよく重なるが、還元末端側（サブサイトプラス側）はかなり異なることが分かった。

## 4 まとめ

本研究ではマルチドメイン糖転移酵素 Rmar\_0285 の N3-A-B-C の立体構造を決定した。本酵素は、サブサイトプラス側の糖の結合が、GH13の $\alpha$ -アミラーゼと比較し特徴的であることを明らかにした。

\* tonozuka@cc.tuat.ac.jp