

澱粉枝作り酵素および枝切り酵素の糖鎖結合部位と反応機構の解明 Elucidation of surface binding site and reaction mechanism of branching enzyme and debranching enzyme involved in starch biosynthesis

田村 救, 鈴木 龍一郎*, 鈴木 英治
秋田県立大学生物資源科学部, 〒010-0195 秋田市下新城野字街道端西 241-438
Tasuku Tamura, Ryuichiro Suzuki*, Eiji Suzuki
Department of Biological Production, Akita prefectural university, 241-438, Kaidobata-nishi
Shimoshinjo-nakano, Akita, 010-0195, Japan

1 はじめに

枝作り酵素 (BE; EC 2.4.1.18) は澱粉およびグリコーゲンを基質として、 α -1,4-結合から成るグルカン直鎖を切断し、 α -1,6-結合で分子内または分子間転移反応を触媒することで、新しい分岐鎖を生産する。BE はこれら多糖の分岐パターンを決める鍵酵素である。澱粉生産性シアノバクテリア *Crocospaera subtropica* ATCC 51142 株は3種の BE アイソザイム (BE1, BE2, BE3) を持つ。これまでに BE1 の構造と機能が解明され、BE が転移する分岐鎖の長さは活性部位クレフトの壁構造 (図 1, 矢印) が決めることが示されている [1]。BE1 と BE2 の生成物特異性は共通しており [2], 両者には壁構造に対応するアミノ酸残基が保存されていた。それに対して BE3 は、壁構造に対応するアミノ酸残基を持たず、生成物特異性は BE1/BE2 とは異なるが [2], これまでに構造は解明されていなかった。そこで本研究では、BE3 の構造を明らかにすることを目的とした。

2 実験

51142 株由来 BE3 の大腸菌内での大量発現系を構築し、アフィニティーおよびゲルろ過クロマトグラフィーで精製した。得られた精製酵素を結晶化し、51142 株由来 BE1 の結晶構造 (PDB ID: 5GQU) [1] を用いた分子置換法で構造を決定した。

3 結果および考察

野生型 BE3 のリガンドフリー状態での結晶構造を分解能 2.50 Å で解明した。BE3 の立体構造は、CBM48 (図 1, シアン), ドメイン A (触媒ドメイン; 図 1, 緑), およびドメイン C (図 1, 赤) から構成されていた。BE3 には、壁構造は保存されていなかった (図 1, 黒丸部分)。BE3 がマルトオリゴ糖と複合体を形成した状態の構造は得られなかったため、BE1 の構造 (PDB ID: 5GQV) に結合したマルトヘキサオース (G6) を BE3 の構造に重ね合わせたモデルを作成した (図 1B)。G6 (転移鎖) は BE3 の活性部位クレフトの溝に結合しており、非還元末端側のグルコース残基 (図 1B, 6) の 4 位の水酸基はフリーであった。このことから BE3 は、長い分岐鎖を生産

できると考えられ、これまでに明らかにされている生成物特異性と一致していた。

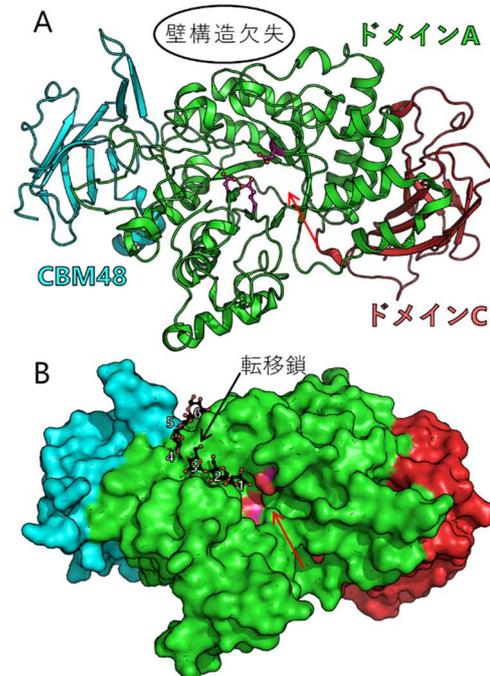


図 1 : BE3 の全体構造 (PDB ID: 7XSY) 結合した G6 は黒で表示した。赤矢印は活性部位を示す。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金の支援のもとで行われた。実験をサポートくださった KEK-PF スタッフの方々に感謝いたします。

参考文献

- [1] M. Hayashi and R. Suzuki *et al. J. Biol. Chem.* **292**, 5465–5475 (2017).
- [2] M. Hayashi *et al. Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **71**, 1109–1113 (2015).

成果

1. 田村救, 鈴木龍一郎, 藤田直子, 鈴木英治, 日本応用糖質学会令和3年度大会, 2021年8月26日
* ryuichi@akita-pu.ac.jp