

令和元年6月15日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18685

研究課題名(和文) 澱粉枝作り酵素の作用機序モデルの提唱、検証、および証明

研究課題名(英文) Verification of new mechanistic model of starch branching enzyme

研究代表者

鈴木 龍一郎 (Suzuki, Ryuichiro)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：70632397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：枝作り酵素(BE)は、グリコーゲンおよび澱粉の分岐鎖を形成する鍵酵素である。これまで、BEの活性部位クレフト(サブサイト)は未解明であった。本研究では、澱粉生産性シアノバクテリア *Cyanothece* sp. ATCC 51142株由来BE1に着目して結晶構造解析を行い、サブサイトおよび酵素表面の糖鎖結合部位(SBS)を7ヶ所見出した。サブサイトおよびSBSを形成するアミノ酸残基に変異を導入した変異体解析を行い、これら残基の重要性を証明した。さらに、受容体基質は触媒ドメインに位置している2ヶ所のSBSに結合することを明らかにした。これらの知見に基づいて、詳細なBEの反応機構モデルを発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

澱粉(炭水化物)は人類の主食であり、食品産業・各種工業分野へ応用利用されている。澱粉の構造(分岐パターン)と食味・物性には相関があるが、澱粉の構造を制御する仕組みには未解明の課題が多く残されている。原始的なシアノバクテリアと進化した陸上植物について、澱粉構造の制御メカニズムを解明して比べることは、学術的に重要であり興味深い。応用展開としては、構造を制御した新規澱粉素材の酵素合成技術の確立に向けた第一歩になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Branching enzyme (BE) catalyzes formation of branch points of glycogen and starch. Active site cleft (subsite) of BE has never been reported. In this study, crystal structures of BE1 from starch-producing cyanobacteria *Cyanothece* sp. ATCC 51142 in complex with linear maltooligosaccharides were determined. The crystal structures revealed the location of subsites and the presence of seven surface binding sites (SBSs). Importance of amino acid residues involved in sugar binding at subsites and SBSs in the crystal structures was confirmed by mutational analysis of the residues. In addition, our results suggest that two SBSs in the catalytic domain participate in binding of acceptor substrate. Based on these results, new detailed mechanistic model of BE reaction has been presented.

研究分野：酵素学

キーワード：酵素学 構造生物学 澱粉 枝作り酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 澱粉およびグリコーゲンは、グルコース分子のみから成る貯蔵多糖である。澱粉は規則正しい分岐パターンから成るアミロペクチンを主成分とするが、グリコーゲンの分岐構造はランダムである。これら貯蔵多糖は、澱粉/グリコーゲン合成酵素 (SS/GS, EC 2.4.1.21)、枝作り酵素 (BE, EC 2.4.1.18)、枝切り酵素 (PUL, EC 3.2.1.41; ISA, EC 3.2.1.68) など複数の酵素群によって生合成される (Nakamura *et al.* 2010)。これらの分岐構造は物性や食味に関係しているが、分岐構造を制御する仕組みはわかっていない。BE は、 α -1,4-グルカンに α -1,6-結合の分岐点から成る分岐鎖を作る転移反応を触媒する (Tetlow *et al.* 2014)。すなわち BE は、これら貯蔵多糖の分岐パターンを決める鍵酵素である。

(2) これまでに BE の結晶構造は、*Escherichia coli* 由来 EcBE (Abad *et al.* 2002)、*Mycobacterium tuberculosis* 由来 MtBE (Pal *et al.* 2010)、*Oryza sativa* 由来 OsBE (Noguchi *et al.* 2011) および *Homo sapiens* 由来 HsBE (Froese *et al.* 2015) が解明されている。これらのうち EcBE (Feng *et al.* 2015; 2016)、OsBE (Chaen *et al.* 2012) および HsBE (Froese *et al.* 2015) について、重合度 (DP) 5-7 の糖鎖共存下での構造解析が報告されているが、活性部位クレフトに糖鎖が結合した状態の結晶構造は報告されていなかった。それゆえ、BE の特性を決める構造要因および、触媒反応がどのようにして行われるのか、その作用機序 (反応機構) は未解明であった。

(3) 一般にシアノバクテリアはグリコーゲンを生産するが、*Cyanothece* sp. ATCC 51142 株などの一部の単細胞種は澱粉を生産することが知られている (Suzuki and Suzuki 2013; Suzuki *et al.* 2013)。グリコーゲン生産性シアノバクテリアは、原則として BE 遺伝子を 1 種のみ有するが、澱粉生産性シアノバクテリアは特徴的に 3 種有する。筆者らは、BE アイソザイム数と生産される多糖の構造・物性には相関があると考えている。筆者らはこれまでに、51142 株由来 BE アイソザイム 1 (BE1) の X 線結晶構造解析を行い、リガンドフリー状態およびマルトヘプタオース (G7) 存在下での結晶構造を解明していた。BE1 の結晶構造の活性部位クレフトには糖鎖が結合していなかったが、酵素表面の糖鎖結合部位 (SBS) を 7 ヶ所見出した。これら SBS は、供与体基質と受容体基質の一部である糖鎖が結合する部位を推測する手がかりになると考えた。さらに、BE1 の結晶に G7 などのマルトオリゴ糖のソーキング法を工夫して努力を重ねれば、BE1 の活性部位クレフトに糖鎖が結合した状態の結晶構造解析ができる可能性が十分にあると考えた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、51142 株由来 BE1 の構造機能相関を解明し、それに基づいて BE の詳細な反応機構モデルを提唱し、最終的には BE の触媒特性を制御することを目的とした。

(2) BE1 について変異体解析を行い、反応機構モデルに基づいて特性を制御し、新規な特性を有する改変 BE を創出する。

(3) さらに、BE1 とは触媒特性が異なる他のアイソザイム (51142 株由来 BE3) についても構造機能解析を行い、反応機構モデルが共通であるか検証する。

3. 研究の方法

(1) *Cyanothece* sp. ATCC 51142 株から常法に従ってゲノム DNA を抽出・精製し、PCR によって BE1 (*cce_2248*) および BE3 (*cce_1806*) 遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子断片を pET15b ベクターに別個に連結することで、プラスミド DNA を構築した。BE1 の変異体 (D434A, Y500A, D501A, L541A, W610A, W610N, W655A, Y500A-D501A, L541A-W655A) のプラスミド DNA は、野生型 *cce_2248* 遺伝子を含むプラスミド DNA を鋳型とし、変異を導入したプライマーセットを用いてインバース PCR することで構築した。これらを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、大腸菌内で遺伝子を大量発現させた。得られた組換え酵素は、Ni-アフィニティーカラムおよびゲルろ過カラムを用いて精製し、SDS-PAGE によって精製度と分子量を確認した。

(2) 5 mg/mL ポテト由来アミロペクチンまたは 1 mg/mL 合成アミロースと 0.1 M HEPES-NaOH (pH 7.0) を含む反応液に精製酵素標品を加えて 30 °C で反応させ、基質の構造変化を吸光度変化とみなしてヨウ素染色法によって比活性を測定した。

(3) 各精製酵素標品とイネ *amylose extender* 変異体から精製した *ae*-アミロペクチンを反応させた。反応産物にさらにシュードモナス由来イソアミラーゼ ((株) 林原) を作用させて α -1,6-結合から成る分岐点を加水分解し、得られた産物の還元末端を蛍光試薬である APTS (1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonic acid trisodium salt) でラベル化した。これをキャピラリー電気泳動装置 P/ACE MDQ carbohydrate system で分画することで、鎖長分布解析 (α -グルカンの構造解析) を行った。

(4) 精製酵素標品（野生型 BE1 および BE3）を 5 mM HEPES-NaOH (pH 7.0) に溶解し、それぞれ 15 mg/mL および 25 mg/mL になるまで濃縮した。精製酵素溶液 2 μ L とリザーバー液 2 μ L を混合し、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって 20 $^{\circ}$ C で結晶化した。野生型 BE1 および W610N 変異体について、0.1 M HEPES-NaOH (pH 7.9)、8% EtOH、0.2 M MgCl₂ のリザーバー液の条件で十分な X 線回折像を与える単結晶が得られた。この単結晶に 300 mM の G7 をソーキングすることで、G7 が結合した状態の野生型および W610N の結晶構造を決定した。

4. 研究成果

(1) 野生型 BE1 の結晶構造の活性部位クレフト（サブサイト）には糖鎖が結合していなかったため、サブサイトと予測される部位周辺のアミノ酸残基を他の残基に置換した変異体を構築・解析し、野生型 BE1 と同等の比活性を維持している W610N 変異体を得た（図 1）。W610N の反応産物の鎖長分布パターンは、野生型 BE1 と比べて DP6 の生産割合が減少し、DP7 を優先的に生産するように変化していた。W610N の結晶に G7 をソーキングし、サブサイト-1~7 に G7 が結合した状態の結晶構造を決定できた（図 2）。これは、G7 に対する W610N のサブサイトの親和性が向上したためと考えられた。

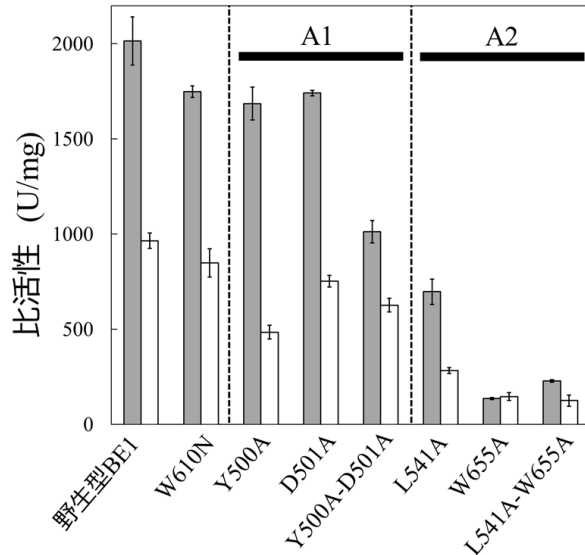
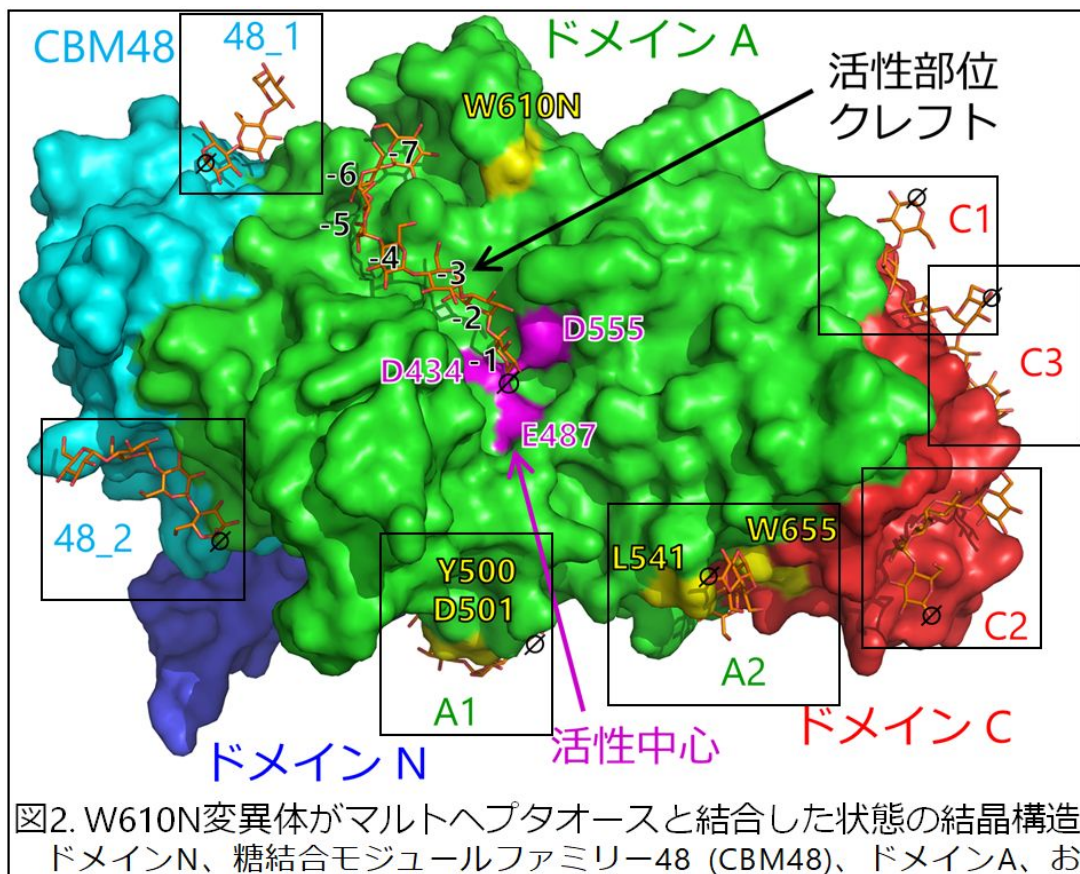


図1. 野生型BE1と変異型BEの比活性

基質としてポテトアミロペクチンおよび合成アミロースを用い、野生型 BE1、W610N、A1 (Y500A、D501A、Y500A-D501A)、および A2 (L541A、W655A、L541A-W655A) の比活性を測定した。ポテトアミロペクチンおよび合成アミロースは、それぞれ白色および灰色の棒で示す。



(2) W610Nの結晶構造には、サブサイト-1~7に加えて7ヶ所のSBS(48_1、48_2、A1、A2、C1、C2、C3)に糖鎖が結合していた。これらのうちA1とA2は、活性中心に最も近く位置していた(図2)。A1では、Tyr500とAsp501が糖鎖とそれぞれスタッキング相互作用と水素結合を形成していた。A2では、Leu541とTrp655が糖鎖と疎水性相互作用を形成していた(図2)。これら4種の残基をアラニンに置換した変異体(野生型BE1を親とした)の比活性は、野生型BE1と比べていずれも低下したことから(図1)、これらの残基は糖鎖との結合に重要であることがわかった。さらに、A2変異体L541Aの鎖長分布は野生型BE1のもの比べてDP10の生産割合が減少したことから、DP10の受容体基質がA2に優先的に結合すると考えられた。これらの結果から、A1とA2はそれぞれ供与体基質と受容体基質に結合し、触媒反応に参与している可能性が示された。

(3) 本研究成果に基づいて、BEの反応機構モデルを発表した(図3)。1段階目の反応では、供与体基質がA1からサブサイト-1~-6まで結合する(図3A)。サブサイト-1に結合したグルコース(Glc1)のアノマー炭素は、求核種Asp434(D434)のカルボキシ基の酸素原子によって求核攻撃され、D434の酸素原子と共有結合を形成する(図3B)。サブサイト-1~-6に結合しているDP6の転移鎖は共有結合中間体として留まり(野生型BE1は主にDP6を転移する)それ以外の糖鎖は遊離する(図3B)。2段階目の反応では、受容体基質がA1からA2まで結合する(図3C)。D434と共有結合しているグルコース(Glc1)のアノマー炭素は、受容体基質のグルコース(Glc3)の6位にあるヒドロキシ基の酸素原子による求核攻撃を受け、D434との共有結合が切断されてGlc3と α -1,6-結合から成る共有結合を形成し、反応産物が遊離する(図3D)。BEの作用によって実際に生成する多糖の分岐構造は、このモデルによって矛盾なく説明できる。

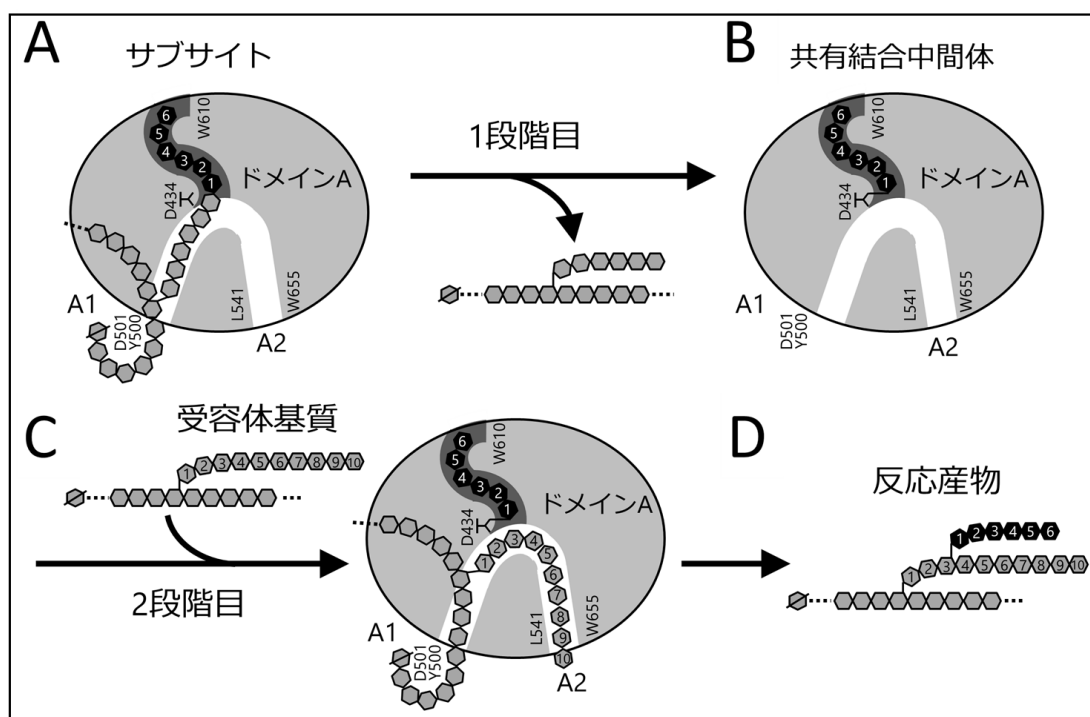


図3. BEの反応機構モデル

BE1のドメインAとグルコースは、それぞれ楕円形と六角形で模式的に示す。還元末端のグルコースは、斜線入りの六角形で示す。転移鎖は、黒色の六角形で示す。活性部位クレフトは、灰色で示す。まず、供与体基質が結合し(A)、1段階目の反応が起こり、共有結合中間体を形成する(B)。次いで受容体基質が結合し(C)、2段階目の反応が起こり、反応産物が遊離する(D)。

本研究ではBE1の構造機能解析を行い、これまで不明であったサブサイトを解明し、BEの詳細な反応機構モデルを発表した。今後BEおよび関連酵素の研究をさらに進めることで、澱粉合成系の解明および多糖の構造制御への応用に繋がると期待している。

<引用文献>

Nakamura, Y., Utsumi, Y., Sawada, T., Aihara, S., Utsumi, C., Yoshida, M., and Kitamura, S. (2010) Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. *Plant Cell Physiol.* **51**, 776-794

Tetlow, I. J., and Emes, M. J. (2014) A review of starch-branching enzymes and their role in amylopectin biosynthesis. *IUBMB Life* **66**, 546-558

- Abad, M. C., Binderup, K., Rios-Steiner, J., Arni, R. K., Preiss, J., and Geiger, J. H. (2002) The X-ray crystallographic structure of *Escherichia coli* branching enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**, 42164-42170
- Pal, K., Kumar, S., Sharma, S., Garg, S. K., Alam, M. S., Xu, H. E., Agrawal, P., and Swaminathan, K. (2010) Crystal structure of full-length *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv glycogen branching enzyme: insights of N-terminal β -sandwich in substrate specificity and enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **285**, 20897-20903
- Noguchi, J., Chaen, K., Vu, N. T., Akasaka, T., Shimada, H., Nakashima, T., Nishi, A., Satoh, H., Omori, T., Kakuta, Y., and Kimura, M. (2011) Crystal structure of the branching enzyme I (BEI) from *Oryza sativa* L with implications for catalysis and substrate binding. *Glycobiology* **21**, 1108-1116
- Froese, D. S., Michaeli, A., McCorvie, T. J., Krojer, T., Sasi, M., Melaev, E., Goldblum, A., Zatsepin, M., Lossos, A., Álvarez, R., Escribá, P. V., Minassian, B. A., von Delft, F., Kakhlon, O., and Yue, W. W. (2015) Structural basis of glycogen branching enzyme deficiency and pharmacologic rescue by rational peptide design. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 5667-5676
- Feng, L., Fawaz, R., Hovde, S., Gilbert, L., Chiou, J., and Geiger, J. H. (2015) Crystal Structures of *Escherichia coli* branching enzyme bound to linear oligosaccharides. *Biochemistry* **54**, 6207-6218
- Feng, L., Fawaz, R., Hovde, S., Sheng, F., Nosrati, M., and Geiger, J. H. (2016) Crystal structures of *Escherichia coli* branching enzyme in complex with cyclodextrins. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **72**, 641-647
- Chaen, K., Noguchi, J., Omori, T., Kakuta, Y., and Kimura, M. (2012) Crystal structure of the rice branching enzyme I (BEI) in complex with maltopentaose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **424**, 508-511
- Suzuki, E., and Suzuki, R. (2013) Variation of storage polysaccharides in phototrophic microorganisms. *J. Appl. Glycosci.* **60**, 21-27
- Suzuki, E., Onoda, M., Colleoni, C., Ball, S., Fujita, N., and Nakamura, Y. (2013) Physicochemical variation of cyanobacterial starch, the insoluble α -glucans in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* **54**, 465-473

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- Hayashi, M., Suzuki, R., Colleoni, C., Ball, S., Fujita, N., and Suzuki, E. (2015) Crystallization and crystallographic analysis of branching enzymes from *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **71**, 1109-1113
- Suzuki, E., and Suzuki, R. (2016) Distribution of glucan-branching enzymes among prokaryotes. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2643-2660
- Hayashi, M., Suzuki, R., Colleoni, C., Ball, S., Fujita, N., and Suzuki, E. (2017) Bound Substrate in the Structure of Cyanobacterial Branching Enzyme Supports a New Mechanistic Model. *J. Biol. Chem.* **292**, 5465-5475

〔学会発表〕(計 7 件)

- 鈴木龍一郎、木村友亮、Christophe Colleoni、Steven G. Ball、藤田直子、鈴木英治 (2016) 「新規特性を有する枝切り酵素の構造機能解析」日本応用糖質科学会平成 28 年度大会
- 鈴木龍一郎、林真里、黒木みほ、木村友亮、佐々木柁秀、藤田直子、鈴木英治 (2016) 「貯蔵多糖特性の異なるシアノバクテリア由来枝作り酵素および枝切り酵素の構造と機能」日本応用糖質科学会平成 28 年度大会
- 鈴木龍一郎、木村友亮、佐々木柁秀、Christophe Colleoni、Steven G. Ball、藤田直子、鈴木英治 (2017) 「シアノバクテリア由来枝切り酵素の構造機能解析」日本応用糖質科学会平成 29 年度大会

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dbp.akita-pu.ac.jp/~plant-physiol/naiyou6.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。