

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05956

研究課題名（和文）澱粉に作用する新規マルチドメイン糖転移酵素の構造機能相関と糖認識機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the structure-function relationship and the sugar-recognition mechanism of novel multidomain transglucosidases acting on starch

研究代表者

殿塚 隆史（Tonozuka, Takashi）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：50285194

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、澱粉に作用する二種類のマルチドメイン酵素の構造機能相関の解析を行い、酵素を用いた応用につなげることを目標とする。両酵素とも、糖質加水分解酵素ファミリーGH13に属する糖転移酵素で、N1、N2、N3、A、B、C、Dの各ドメインから構成される。本研究では、N3-A-B-CおよびN1について発現系の構築を行い、構造および性質の解析を行った。その結果、これら酵素は α -1,6-グルコシル糖転移活性を示し、ドメインN1は澱粉に結合するコンポーネントとして機能することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

澱粉は、植物が生産する主要な栄養貯蔵物質であるとともに、人間にとって重要な食糧であり。澱粉の利用や検出技術の開発は、食品や農学に関する分野の発展に貢献できる。本研究では、二種類のマルチドメイン酵素が、オリゴ糖製造や澱粉の構造の特定に利用できる可能性があることを示した。

研究成果の概要（英文）：This study focuses on analyzing the structure-function relationship of two multi-domain enzymes that act on starch, which aims to develop applications using the enzymes. Both enzymes are glucosyltransferases belonging to the carbohydrate hydrolase family GH13 and consist of N1, N2, N3, A, B, C and D domains. We constructed expression systems for N3-A-B-C and N1, and analyzed the structures and properties. The results indicate that the enzymes have α -1,6-transglucosylation activity, and domains N1 function as starch-binding components.

研究分野：応用糖質科学

キーワード：糖転移酵素 マルチドメイン酵素 GH13 澱粉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

澱粉は、植物が生産する主要な栄養貯蔵物質であり、また、人間にとって重要な食糧である。このことから、澱粉に作用する酵素の研究は社会的ニーズが高い課題である。澱粉に作用する主要な酵素は α -アミラーゼファミリーと呼ばれる酵素ファミリーに属し、さらにその大半が糖質加水分解酵素ファミリーGH13 に分類される。この GH13 は 2023 年現在 15 万以上の配列が分類されている巨大な酵素ファミリーである。近年、さまざまな生物のゲノム解析により、既知 GH13 酵素とはアミノ酸配列の相同性が低い機能未知酵素が多数存在することが判明しており、これらの酵素は澱粉に作用する新規な酵素であることが予測される。GH13 に属する酵素で特によく調べられている麹菌のタカアミラーゼ A は 499 アミノ酸残基(シグナル配列含む)から成り、ドメイン A、B、C の 3 つのドメインより構成されている。GH13 の酵素にはこれらの基本的なドメインの他に、糖結合モジュールを持つものが多くあり、上記の新規 GH13 の酵素の中には、新規な結合特異性を持つ糖結合モジュールを持つ酵素が存在すると期待される。

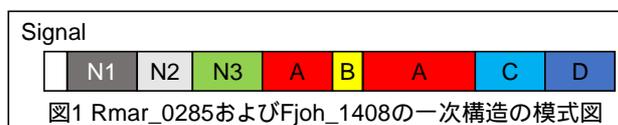
澱粉は、グルコースだけで構成された多糖であるが、複雑な構造を形成しており、 α -1,6-結合の分岐が多い部分と α -1,4-結合の直鎖から成る房の部分から構成され、房を構成する鎖はからみあって二重らせんを形成している。これまでの澱粉に作用する酵素の研究は、研究のやりやすさから、可溶性澱粉を基質としたものがほとんどである。このため、GH13 の糖結合モジュールの研究はあまり進んでいない。タンパク質によるイメージング技術が発展を遂げた今日、どのような糖結合モジュールが澱粉のどのような構造を認識するかといった研究が求められる。

2. 研究の目的

本研究では、GH13 に属する二種類の細菌由来新規マルチドメイン糖転移酵素の構造機能相関の研究を目的とする。

細菌 *Rhodothermus marinus* の Rmar_0285 と番号づけられた酵素、および、細菌 *Flavobacterium johnsoniae* の Fjoh_1408 と番号づけられた酵素は、それぞれ 990 および 957 アミノ酸残基から成り、GH13 として大きな酵素であり、マルチドメイン酵素である。Rmar_0285 と Fjoh_1408 の相同性は 36% であるものの配列の全体にわたって相同性がある。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、C 末端側に 1 つのドメインが存在することが推定され、ここで、N 末端側の 3 つのドメインを N1、N2、N3 ドメイン、C 末端側のドメインを D と命名した(図 1)。

本研究では、構造および性質とも未知である Rmar_0285 および Fjoh_1408 について、立体構造および酵素化学的性質を解明し、どのような糖を生成するのか解明するとともに、N 末端側のドメインの澱粉に対する認識を解析することを目的とした。



3. 研究の方法

(1) Rmar_0285 および Fjoh_1408 の発現系の構築および変異の導入

Rmar_0285 および Fjoh_1408 の遺伝子は、*Rhodothermus marinus* および *Flavobacterium johnsoniae* の菌体を用いたコロニーPCRにより増幅した。当初全長の発現系の構築を試みたが、精製まで至るのが難しかったため、いくつかのドメインに分け発現系の構築を行った。PCR プライマーは Rmar_0285 および Fjoh_1408 の配列に制限酵素サイトの配列がつながったものを作製し、増幅断片を制限酵素で切断した後、大腸菌のプラスミド pET28a(+)あるいは pET32a(+)のマルチクローニングサイトに組み込んだ。これを大腸菌 BL21(DE3)にトランスフォーメーションすることにより、発現系を構築した。変異の導入は、PCR と制限酵素 DpnI による消化を組み合わせた方法による。

(2) タンパク質の精製

pET28a(+)および pET32a(+)に組み込んだタンパク質は His タグとの融合タンパク質になるため、タンパク質の精製は Ni-NTA アガロース(富士フィルム和光)を用いたアフィニティークロマトグラフィーで行った。イミダゾールを含む緩衝液で溶出させ、SDS-PAGE により確認を行った。pET32a(+)に組み込んだ場合は、可溶化タグであるチオレドキシンの融合タンパク質になるため、スロンピンプロテアーゼによりチオレドキシンの切断を行った。チオレドキシ処理後は、Q-Sepharose (Cytiva)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。

(3) 結晶化と立体構造解析

精製したタンパク質は、Amicon Ultra-15 限外濾過ユニット(Merck Millipore)を用いて濃縮した。精製タンパク質の濃度は、Expasy ProtParam サーバーによって計算した吸光係数

用いて 280 nm での吸光度を測定することによって決定した。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法によって、20 のインキュベーターに静置することで行った。X線回折は高エネルギー加速器研究機構シンクロトロン放射光施設にて収集した。X線回折データ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およびソフトウェア Molrep を用いた分子置換法によった。モデルの構築および精密化はソフトウェア Coot および Refmac によった。

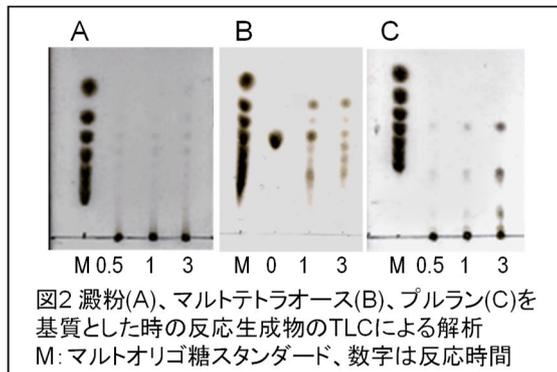
(4) 活性測定方法

糖の分解活性は、還元力の増加を Nelson-Somogyi 法を用いて検出した。糖転移反応の解析は、薄層クロマトグラフィー (TLC) および $^1\text{H-NMR}$ (JEOLECA-600) によった。糖との結合活性の検出は Native-PAGE を用い、澱粉を含まないゲルおよび 1% 澱粉を含むゲルで泳動し、結果を比較することによった。

4. 研究成果

(1) 酵素の発現系の構築

当初 Rmar_0285 および Fjoh_1408 の全長の発現系の構築を行ったが、良好な発現を得ることができなかった。立体構造予測では、ドメイン D は他のドメインから孤立していると予想され、おそらく菌体との結合など、酵素活性とは直接関係のない機能を担っていると考えられた。試行錯誤を重ねた結果、Rmar_0285 のドメイン N1 を pET28a(+) に組み込んだもの、Fjoh_1408 のドメイン N1 を pET28a(+) に組み込んだもの、Rmar_0285 の N3-A-B-C ドメインを pET32a(+) に組み込んだもので良好な発現が得られ、精製までに至った。以下これらのタンパク質は Rmar_0285 N1、Fjoh_1408 N1、Rmar_0285 N3-A-B-C と記載する。

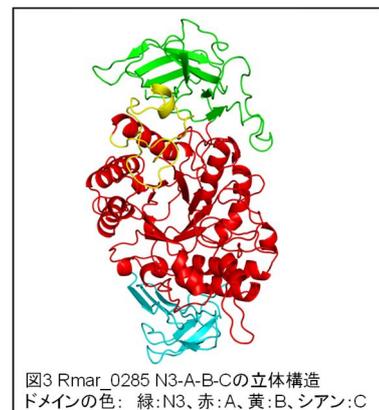


(2) Rmar_0285 N3-A-B-C の酵素科学的性質

Rmar_0285 N3-A-B-C を精製し、酵素科学的性質を解析した。澱粉を基質として測定すると、至適 pH は 6.0、温度安定性は 30 分の熱処理では 50°C まで安定であった。*Rhodothermus marinus* は温泉から単離された好熱菌であるが、今回ドメイン N1、N2、D を欠失させているので、全長の酵素より温度安定性は低いものと考えられる。

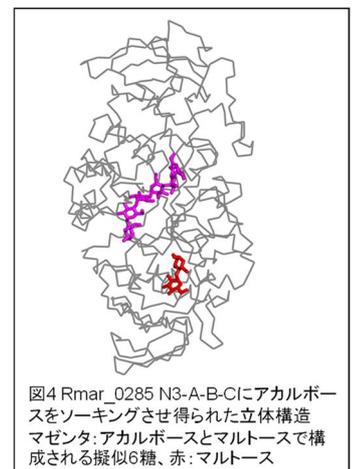
各種糖に Rmar_0285 N3-A-B-C を反応させ、TLC で生成物を解析した (図 2)。澱粉やマルトテトラオースと反応させるとオリゴ糖が生成した (図 2A、B)。この結果から、本酵素は糖転移酵素であることが明らかになった。マルトテトラオースに対する反応生成物の TLC のパターンからは、主にマルトオリゴ糖が生成していると考えられた。しかしながら、マルトテトラオースの生成物を $^1\text{H-NMR}$ により解析したところ、 α -1,4-結合のシグナルに加え α -1,6-結合のシグナルが反応時間とともに大きくなることが分かった。このことから、Rmar_0285 は、 α -1,4-結合および α -1,6-結合の両方の糖転移を触媒すると考えられる。

多糖プルランを基質とした場合は三糖パノース (Glc- α -1,6-Glc- α -1,4-Glc) が生成することが分かった (図 2C)。プルランは、グルコース 3 つが α -1,4-結合でつながったマルトトリオースが α -1,6-結合で重合した多糖である。Rmar_0285 N3-A-B-C はプルランの α -1,4-結合をネオプルラナーゼのような様式で分解することが判明した。



(3) Rmar_0285 N3-A-B-C および関連オリゴ糖生成酵素の立体構造解析

Rmar_0285 N3-A-B-C の立体構造は、結晶を酢酸鉛にソーキングし、単波長異常分散法により、1.55-Å 分解能で決定した (図 3)。立体構造は、 β 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、 β サンドイッチから成るドメイン C より構成されていた。ドメイン N3 は糖結合モジュール CBM48 に分類され、プルラーゼ、イソアミラーゼ、グリコーゲン分枝酵素に見られるドメインである。立体構造の相同性を検索する DALI サーバーで解析したところ、*Bacillus acidopullulyticus* のプルラーゼや *Bacillus stearothermophilus* のネオプルラーゼとの相同性が最も高かった。GH13 酵素では求核触媒残基、酸塩基触媒残基、遷移状態安定化残基の 3 つの触媒残基が存在することが知られている。Rmar_0285 では、触媒残基はそれぞれ Asp563、Glu610、Asp683 であると同定された。

アミラーゼの阻害剤としてよく知られるアカルボースをソーキングし、立体構造解析を行った。アカルボースはマルトテトラオースを模した擬似 4 糖で、バリエナミン、デオキシ糖、マルトース、の各ユニットから構成される。解析の結果、触媒残基近傍に擬似 6 糖、ドメイン A とドメイン C の境界にマルトースが結合していた(図 4)。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 α -1,4-結合で結合している構造であった。擬似 6 糖の結合部位とマルトースの結合部位の間にはクレフトが存在し、このクレフトには糖が結合する可能性が考えられる。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。

触媒残基の 1 つである Asp563 を Ala に置換した改変酵素 Rmar_0285 N3-A-B-C D563A を作製し、精製、結晶化を行った。触媒残基を改変していない Rmar_0285 N3-A-B-C をマルトテトラオースに作用させて得られた糖を Rmar_0285 N3-A-B-C D563A の結晶にソーキングし、結合した糖の構造を解析した(図 6)。その結果、6²- α -マルトシルマルトトリオースという分岐 5 糖であると決定された。この結果は、Rmar_0285 が α -1,6-結合への糖転移活性を持つことを裏付けるものである。

本研究では Rmar_0285 のほかに、オリゴ糖生成酵素として糸状菌 *Aspergillus sojae* の -1,6-グルコシル転移酵素、細菌 *Frischella perrara* の -フルクトフラノシダーゼ、細菌 *Beijerinckia indica* の -フルクトシル転移酵素の立体構造を決定した。

(4) Rmar_0285 N1 および Fjoh_1408 N1 の性質の解析

Rmar_0285 N1 および Fjoh_1408 N1 については、結晶化条件のスクリーニングを行ったが、Fjoh_1408 N1 では結晶は得られなかった。Rmar_0285 N1 については結晶が得られたものの、X線回折強度測定に適したサイズの結晶は得られなかった。

Native PAGE により、澱粉を 1% になるよう加えたものと加えていないものでポリアクリルアミドゲルを作製し、電気泳動を行うことにより、澱粉に対する結合性を調べた(図 7)。その結果、澱粉を加えていないゲルによる泳動と比較し Rmar_0285 N1、Fjoh_1408 N1 とともにバンドがシフトしたことから、ドメイン N1 は新規な澱粉結合ドメインであることが明らかになった。

(5) 総括

本研究では、澱粉に作用するマルチドメイン酵素として Rmar_0285 および Fjoh_1408 の研究を行い、Rmar_0285 N3-A-B-C の構造と機能、Rmar_0285 N1 および Fjoh_1408 N1 の糖結合について解析した。Rmar_0285 は、澱粉およびマルトオリゴ糖を基質として -1,6-グルコシド結合を持つオリゴ糖を生成する酵素であることを明らかにした。また、Rmar_0285 および Fjoh_1408 の N 末端側のドメインは澱粉結合能があることを明らかにした。今後は、全長の立体構造および各ドメインの糖認識に関するさらなる解明が望まれる。

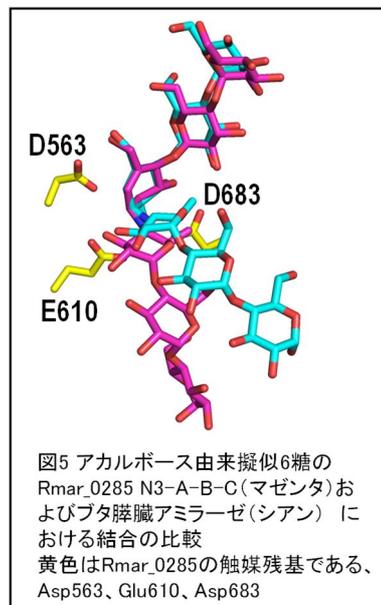


図5 アカルボース由来擬似6糖の Rmar_0285 N3-A-B-C(マゼンタ)およびブタ膵臓アミラーゼ(シアン)における結合の比較
黄色はRmar_0285の触媒残基である、Asp563、Glu610、Asp683

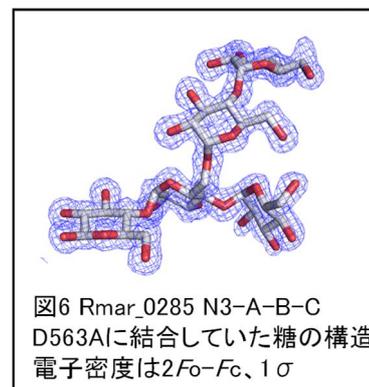


図6 Rmar_0285 N3-A-B-C D563Aに結合していた糖の構造
電子密度は2F_o-F_c、1 σ

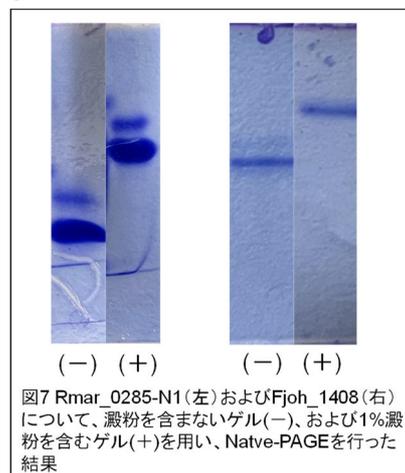


図7 Rmar_0285-N1(左)およびFjoh_1408(右)について、澱粉を含まないゲル(-)、および1%澱粉を含むゲル(+)を用い、Native-PAGEを行った結果

全長の立体構造および各ドメイン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ding Yifu, Oyagi Ayako, Miyasaka Yuki, Kozono Takuma, Sasaki Nobumitsu, Kojima Yuka, Yoshida Makoto, Matsumoto Yuji, Yasutake Nozomu, Nishikawa Atsushi, Tonozuka Takashi	4. 巻 214
2. 論文標題 Structural basis for proteolytic processing of <i>Aspergillus sojae</i> -glucosidase L with strong transglucosylation activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Structural Biology	6. 最初と最後の頁 107874 ~ 107874
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jsb.2022.107874	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kubota Arisa, Kawai Reika, Li Ding, Kozono Takuma, Sasaki Nobumitsu, Nishikawa Atsushi, Fujii Tadashi, Tochio Takumi, Tonozuka Takashi	4. 巻 106
2. 論文標題 Enzymatic and structural characterization of -fructofuranosidase from the honeybee gut bacterium <i>Frischella perrara</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2455 ~ 2470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-022-11863-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tonozuka Takashi, Kitamura Junichi, Nagaya Mika, Kawai Reika, Nishikawa Atsushi, Hirano Katsuaki, Tamura Keisuke, Fujii Tadashi, Tochio Takumi	4. 巻 84
2. 論文標題 Crystal structure of a glycoside hydrolase family 68 -fructosyltransferase from <i>Beijerinckia indica</i> subsp. <i>indica</i> in complex with fructose	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2508 ~ 2520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1804317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ding Li, Yuki Miyasaka, Arisa Kubota, Takuma Kozono, Yoshikazu Kitano, Nobumitsu Sasaki, Tadashi Fujii, Takumi Tochio, Yoshihiro Kadota, Atsushi Nishikawa, Takashi Tonozuka	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization and alteration of product specificity of <i>Beijerinckia indica</i> subsp. <i>indica</i> -fructosyltransferase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbad074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Li Ding、松浦明香、窪田有紗、藤井匡、栃尾巧、西河淳、殿塚隆史
2. 発表標題 Beijerinckia indica GH68 -フルクトシルトランスフェラーゼのフラクトオリゴ糖生成活性の測定
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮坂祐希、小園拓馬、西河淳、殿塚隆史
2. 発表標題 Rhodothermus marinus由来グルコシル糖転移酵素Rmar_0285の立体構造解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮坂祐希、小園拓馬、西河淳、殿塚隆史
2. 発表標題 Rhodothermus marinus由来グルコシル糖転移酵素のアカルボースとの複合体構造の解析
3. 学会等名 2021年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山紘平、宮坂祐希、小園拓馬、西河淳、酒匂拓海、坂口政吉、殿塚隆史
2. 発表標題 好酸性アーケアThermoplasma volcanium GH15トレハラーゼの立体構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田有紗、川合礼華、松浦明香、小園拓馬、西河淳、藤井匡、栃尾巧、殿塚隆史
2. 発表標題 ミツバチ腸内細菌 <i>Frischella perrara</i> GH32 -フルクトフラノシダーゼの基質選択性の改変
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本紗央、内田和、西河淳、吉田誠、殿塚隆史
2. 発表標題 担子菌 <i>Coprinopsis cinerea</i> 由来 -アラビノフラノシダーゼとアラビノースとの複合体の立体構造解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田有紗、川合礼華、松浦明香、藤井匡、栃尾巧、西河淳、殿塚隆史
2. 発表標題 フラクトオリゴ糖を分解するGH32酵素とフルクトースとの複合体の立体構造解析
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮坂祐希、大八木彩子、西河淳、松本雄治、安武望、殿塚隆史
2. 発表標題 <i>Aspergillus sojae</i> -グルコシダーゼAsojAgdLの立体構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ding Yifu、宮坂祐希、小園拓馬、西河淳、松本雄治、安武望、殿塚隆史
2. 発表標題 Aspergillus sojae -グルコシダーゼAsojAgdLとアカルボースとの複合体の立体構造解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田有紗、松浦明香、小園拓馬、西河淳、遠藤明仁、藤井匡、栃尾巧、殿塚隆史
2. 発表標題 Faecalibacterium duncaniae -フルクトフラノシダーゼの立体構造解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 風間理之、山本紗央、小園拓馬、吉田誠、西河淳、殿塚隆史
2. 発表標題 担子菌Coprinopsis cinerea由来 -L-アラビノフラノシダーゼCcAbf62Cの立体構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	徳安 健 (Tokuyasu Ken)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・ユニット長 (82111)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松木 順子 (Matsuki Junko)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員 (82111)	
研究協力者	佐々木 信光 (Sasaki Nobumitsu)	東京農工大学・大学院農学研究院・准教授 (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関