

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880043

研究課題名（和文） デキストラン合成酵素の結晶構造解析による糖転移及び多糖認識機構の解明

研究課題名（英文） Structure analyses of dextran synthases

研究代表者

本同 宏成 (HONDOH HIRONORI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・講師

研究者番号：10368003

研究成果の概要（和文）：

本研究では、イソマルトオリゴ糖を合成もしくは分解する酵素のそれぞれの構造の違いから、酵素の基質認識機構を明らかにすることを目的としている。イソマルトオリゴ糖を分解する DGase では、立体構造解析から活性ポケットに水分子の通り道が予測されている。この通り道周辺に存在するアミノ酸残基に部位特異的変異を導入し、活性に与える影響を明らかにした。変異の導入は、酵素の構造には影響しないにもかかわらず、加水分解速度が大幅に低下した。

研究成果の概要（英文）：

We aimed to reveal the substrate recognition mechanism of isomaltooligosaccharide synthases and hydrolases with their crystal structures. With the crystal structure of DGase, isomaltooligosaccharide hydrolase, it is proposed that the water drain structure at the bottom of the active pocket. We study the effect of the site-directed mutagenesis in this water drain on the hydrolysis activity of this enzyme. The hydrolysis activity was decreased significantly without any difference in its structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,140,000	342,000	1,482,000
2011年度	890,000	267,000	1,157,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,030,000	609,000	2,639,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：糖質関連酵素 基質特異性

## 1. 研究開始当初の背景

イソマルトオリゴ糖はグルコースが $\alpha$ -1,6 グルコシド結合により結合した多糖で、デンプンを加水分解する一般的な $\alpha$ -アミラーゼでは加水分解されない特徴を持つ。近年、重合度が高いイソマルトオリゴ糖の合成に成功し、その機能性について研究が進められている。この新規の多糖の合成にはいくつかの酵素が用いられているが、それぞれの酵素がど

のように糖を認識し、向きを制御し、合成反応を触媒しているのかに関しては不明な点が多い。一般的に糖転移酵素の構造-機能相関は不明な点が多く、特に $\alpha$ -1,6 結合を合成する酵素に関してはほとんど研究されていない。また、長鎖複合体の構造解析例もほとんど報告されておらず、糖質認識機構の解明により多くの知見が期待されている。糖質加水分解酵素群 Glycoside hydrolase (GH) ファ

ミリー13 はアルファアミラーゼファミリーとしても知られ、多くのデンプン分解酵素が属している。 *Bacillus sp.* Isomaltooligosaccharide

6- $\alpha$ -glucosyltransferase (I6GT)も1次配列よりGH13に分類されるが、その基質及び反応特異性はユニークである。I6GTはグルコースが $\alpha$ -1,6 グルコシド結合により繋がったオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖を基質とし、その非還元末端グルコシル基をアクセプタへ連続的に $\alpha$ -1,6 転移し、様々な重合度のイソマルトオリゴ糖を生成する。GH13では、シクロデキストリン合成酵素が糖転移酵素として良く研究されているが、シクロデキストリン合成酵素は $\alpha$ -1,4 結合を分子内転移する酵素であり、I6GTとは基質認識機構が大きく異なる。I6GTは、同様にイソマルトオリゴ糖を基質とし、非還元末端よりグルコースを遊離する加水分解酵素、*Streptococcus mutans* dextran glucosidase (DGase)と49%の1次構造類似性を示す。このようにI6GTとDGaseは高い類似性を持ちながら糖転移と加水分解という異なる反応を触媒することから、反応を制御している構造的要因の研究に最適な酵素である。

## 2. 研究の目的

DGase, I6GT 及び *Gluconobacter oxydans* ATCC 11894 Dextrin dextranase (DDase)は、それぞれGHファミリー13, 15に属する酵素であるにも係わらず、糖転移反応を触媒し、グルコースが $\alpha$ -1,6 グルコシド結合により繋がった多糖、デキストランを生成する。本研究では、これら酵素と長鎖アクセプタ複合体のX線結晶構造解析により、

(1). GHファミリーに分類されながら糖転移反応を触媒する構造的特徴

(2). 多糖をアクセプタとして認識する結合様式

(3). 異なるファミリーに属しながら、同様な基質及び反応特異性を示す構造的特徴の3点を明らかにすることを目的とする。

DGaseは、その天然基質複合体の結晶構造より、基質認識機構について研究が進んでいる酵素である。結晶構造をもとに、加水分解-糖転移反応の制御に係わると思われる特徴を見出し、部位特異的変異を導入することにより、DGaseの糖転移能を高めることに成功している。しかしながらその転移能はI6GTに及ばないことから、糖転移メカニズムの解明にはI6GTの立体構造を明らかにし、構造をより詳細に比較する必要がある。我々はこれまでに、I6GTの結晶化を試み、板状結晶を得ることに成功した。またこの結晶を用いて実験室系X線発生器により回折データを収集したところ、約3Å分解能のデータ収集に成功した。現在精密化を終え、I6GTの全体

構造を得ている。DGaseとの比較では、非常によく似た構造を示しているが、分解能が低いことから詳細な議論には至っていない。特に、加水分解-糖転移反応において重要な、水分子の構造精密化に至っていないことから、今後結晶化条件を精密化し、より高分解能での構造決定をする必要がある。より高分解能の構造解析により水分子の位置を決定し、I6GTの糖転移メカニズムの解明を目指す

## 3. 研究の方法

研究に用いるI6GT及びDDaseは、北海道大学のグループよりプラスミドもしくは精製品を提供してもらおう。サンプル純度が不十分で結晶が得られない場合、申請者自身によりさらに高純度に精製し、結晶化実験に用いる。初年度はすでに得られているI6GTの結晶化条件をより精密化し、高分解能の回折を示す結晶を得る。また比較のため、高い糖転移能を示すDGase変異体についても構造解析を行う。得られた結晶を用いて回折データを収集し、水分子について十分議論できる2.0Å以上の分解能で構造を決定する。同時にDDaseの結晶化条件を探索し、結晶化条件を得る。次年度にはI6GT及びDDaseと10以上の重合度をもつ長鎖基質との複合体結晶を作成する。基質の重合度を変えながら、共結晶化及びソーキング法を試み、基質複合体結晶を得る。データ収集は実験室系のX線発生器を用い、複合体については2.5Å以上の分解能を目指す。

## 4. 研究成果

イソマルトオリゴ糖を分解するDGaseでは、立体構造解析から活性ポケットに水分子の通り道が予測されている。この水分子の通り道は、活性ポケットの底に位置し、立体構造から、ポケット内の水分子を排水する役割があると考えられている。この通り道周辺に存在するアミノ酸残基に部位特異的変異を導入し、活性に与える影響を明らかにした。水の通り道を構成するアミノ酸残基の一残基変異体Y15W, I370F および R402W/H を作製し機能解析を行った。また、Y15WおよびR402Wの立体構造をそれぞれ1.8Å, 2.4Åの分解能で構造決定した。Y15WおよびR402Wの触媒残基や基質結合に関与する残基の配向は野生型と同様であり、水の通り道およびその周辺の水分子の位置と数のみに変化が見られた。変異の導入は、酵素の構造には影響しないにもかかわらず、加水分解速度が大幅に低下した。結合している水分子の位置に変化が見られたことから、水分子がこの道を通りポケットに出入りする可能性が支持された。同様の水の通り道は、ポケットをもつ酵素に広くみられることから、多くの酵素

に共通のメカニズムであると考えられる。また野生型およびCa<sup>2+</sup>と相互作用するアミノ酸残基変異体に対するCa<sup>2+</sup>の影響を酵素活性およびDSCにより測定した。β→α loop 1上のCa<sup>2+</sup>と相互作用するN23をS/V、D25をE/I/Sにそれぞれ置換した変異体を作製し、その他の2箇所についてはD151LおよびD419Lを作製した。その結果、3つのCa<sup>2+</sup>のうちβ→α loop 1上のCa<sup>2+</sup>結合サイトがDGaseのpHおよび熱安定性の増加に寄与することがわかった。野生型およびCa<sup>2+</sup>と相互作用するアミノ酸残基変異体の熱安定性解析から、β→α loop 1上のCa<sup>2+</sup>結合サイトはDGaseの2段階の熱変性過程に関与することが考察された。β→α loop 1上のCa<sup>2+</sup>結合サイトは類縁酵素群で保存された構造であり、本研究で推察および証明した機能は類縁酵素群全体で保存されていることが示唆される。イソマルトオリゴ糖を合成するI6GTについては、GH13保存領域IIおよびIIIに存在しているアミノ酸残基のうち、保存性が低く、かつサブサイト+1に存在する3つのアミノ酸残基に着目し、変異を導入した。I6GTの基質結合モデルから、サブサイト+1においてVal200, Lys292およびGlu386がIGNとの結合に関与すると予想された。これら3残基をAlaに置換した一重変異酵素3種および3残基全てをAlaに置換した三重変異酵素を調製し、4 mMの各種二糖(トレハロース、コージビオース、ニゲロース、マルトース、スクロースおよびイソマルトース)に対する速度をWTと比較した。イソマルトースに対する速度は、全ての変異酵素で低下した(V200A, 10%; K292A, 0.03%; E386A および三重変異酵素, 0.07%)。一方、IG2以外の二糖に対する速度はV200Aおよび三重変異酵素で大きく上昇した(V200A, 12-240倍; 三重変異酵素, 5-100倍)。三重変異酵素は二糖に対してはα-1,6結合(イソマルトース)特異性を低下させたが、イソマルトトリオースおよびイソマルトテトラオースに対する反応速度は鎖長に依存して大きく上昇した。そこで、サブサイト+3においてIGNとの結合が予想されるTrp221に注目した。三重変異酵素にW221Aの変異を導入した四重変異酵素ではイソマルトトリオースおよびイソマルトテトラオースに対する速度の上昇は見られなかった。すなわち、Trp221はIGN特異性を欠失させた三重変異酵素においてもIGN(n≥3)に対する親和性に寄与することが明らかになった。その結果、変異酵素は転移反応よりも加水分解反応を触媒し、またα-1,6グルコシド結合への特異性も失われた。このことから、これらのアミノ酸残基が基質特異性を決める構造要因の一つであることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Momoko KOBAYASHI, Hironori HONDOH, Haruhide MORI, Wataru SABURI, Masayuki OKUYAMA, Atsuo KIMURA, Calcium ion-dependent increase in thermostability of dextran glucosidase from *Streptococcus mutans*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有り, 75巻: 2011年:1557-1563 ページ. DOI: 10.1271/bbb.110256

2. Yoshihisa Suzuki, Emi Konda, Hironori Hondoh, Katsuhiko Tamura, Effects of temperature, pressure, and pH on the solubility of tricin lysozyme crystals, 査読有り, 318巻: 2011年: 1085-1088 ページ. DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2010.11.107

[学会発表] (計4件)

1. 青山泰, 西村崇志, 鐘ヶ江倫世, 本同宏成, 奥山正幸, 森春英, 木村淳夫, Isomaltoligosaccharide 6-α-glucosyltransferase サブサイト+1変異酵素の機能解析, 日本応用糖質科学会平成23年度大会, 2011年9月28日, 北海道大学

2. 小林桃子, 山下恵太郎, 田上貴祥, 本同宏成, 森春英, 奥山正幸, 姚関, 木村淳夫, Dextran glucosidase (DexB) ウォーターパス改変体の機能と構造, 日本応用糖質科学会平成23年度大会, 2011年9月28日, 北海道大学

3. 小林桃子, 本同宏成, 奥山正幸, 森春英, 木村淳夫, Dextran glucosidase (DexB) のウォーターパス改変酵素の機能解析, 日本農芸化学会2011年度大会, 2011年3月26日, 京都女子大

4. 西村崇志, 鐘ヶ江倫世, 本同宏成, 奥山正幸, 森春英, 木村淳夫, Isomaltoligosaccharide 6-α-glucosyltransferase のサブサイト+1変異酵素の機能解析, 日本応用糖質科学会平成22年度大会, 2010年9月15日, 静岡県コンベンションアーツセンター

[図書] (計1件)

1. 松村康生・松宮健太郎・小川晃弘: 食品の界面制御技術と応用 — 開発現場と研究最前線を繋ぐ —, シーエムシー出版, 2011年, 90-104ページ

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本同 宏成 (HONDOH HIRONORI)  
広島大学・大学院生物圏科学研究科・講師  
研究者番号：10368003

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：