

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440038

研究課題名(和文) イネ顆粒結合型デンプン合成酵素によるデンプン合成反応機構の解明

研究課題名(英文) Structural analysis of rice granule-bound starch synthase

研究代表者

藤本 瑞 (Fujimoto, Zui)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度解析センター・上級研究員

研究者番号：20370679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：顆粒結合型デンプン合成酵素I (GBSSI: granule-bound starch synthase I) は、植物デンプンのアミロース生合成に関与する生化学上重要な酵素である。GBSSIの基質認識機構をX線結晶構造解析により明らかにするため、イネのGBSSIの大腸菌による大量発現系を用いてGBSSIの調製を行い、生産物であるアミロースの部分構造を持つマルトオリゴ糖との複合体の立体構造決定を試みた。GBSSIには2つのドメインがあり、触媒反応部位はドメインの間の窪みに存在し、近傍のフレキシブルなループが伸長するデンプンの結合部位であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Granule-bound starch synthase I (GBSSI) catalyze the amylose (-1,4-linked glucose chain) elongation process by adding glucose from nucleotide diphosphate glucose. We conducted the structural analysis of rice GBSSI in complex with maltooligosaccharides having the -1,4-linked glucose moieties to clarify the substrate-recognition mechanism of the plant enzyme. The structures had two Rossmann fold N- and C-domains, connected by the canonical two hinge peptides, and an interdomain disulfide bond that appears to be conserved in the Poaceae plant family. The catalytic site appeared to be located in the concave of two domains, and the flexible loop regions near the catalytic concave appeared to be the carbohydrate-binding site.

研究分野：構造生物化学

キーワード：イネ 顆粒結合型デンプン合成酵素 アミロース X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

デンプンは、グルコースが α 1-4結合および α 1-6結合で連なった高分子化合物である。主に α 1-4結合でできた直鎖状のものをアミロース、 α 1-6結合を含み枝分かれの多いものをアミロペクチンと呼ぶ。デンプンは植物によって合成され、植物自身のみならず微生物から人類にいたる多くの生物の重要なエネルギー源となっている。食品製造、製紙工業やバイオエタノール生産等の原料としても利用されている。

デンプンの生合成はグルコースを起点とし、グルコース-1-リン酸やグルコース-6-リン酸を経てADP-グルコースとなり、デンプン合成酵素 (starch synthase, EC 2.4.1.21) によりアミロースやアミロペクチンの非還元末端のグルコース残基との α -1,4グルコシド結合を介して取り込まれる (図1)。デンプン合成酵素は顆粒結合型デンプン合成酵素 (GBSS: granule-bound starch synthase) と可溶性デンプン合成酵素 (SSS: soluble starch synthase) に大別される。GBSSはアミロースの生合成に関与し、SSSは枝分かれ酵素 (BE; branching enzyme, EC 2.4.1.18) とともにアミロペクチンの合成にかかわる。数種類のデンプン合成酵素のうち、これまでにアミロペクチンの生合成に関与するSSS、BEを中心にして生化学的・分子生物学的研究を含めた多くの研究が行われてきた。SSS、BEが酵素複合体を形成して、アミロペクチンの生合成を行っているという報告もある。その一方で、顆粒結合型で植物からの酵素の単離や組換えタンパク質の発現が困難であるGBSSの生化学的研究は、SSS、BEのものに対して著しく少ない。

しかし、育種学的には、GBSSは重要な研究対象となっている。モチ米はGBSSの欠損により表現型を発現するため、GBSSがアミロース生合成にかかわっていることが明らかになり、GBSSの欠損変異はwaxy (ワキシー) と呼ばれる劣性変異遺伝子として広く知られている。イネのみならず、イネ科の穀物である小麦やトウモロコシでも同様にGBSSの欠損によりモチ性をもつことが知られており、こしの強い穀物の創出にむけたGBSS欠損品種の作出

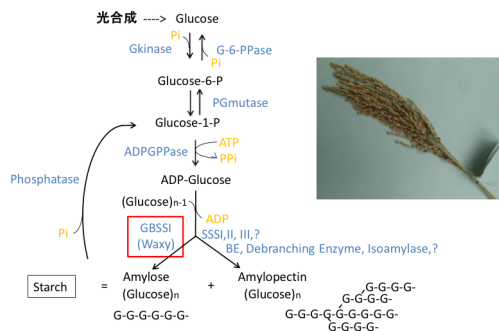


図1 澱粉生合成経路

は盛んに行われている。また、GBSSに欠損ではない変異の入った品種であるミルキークイーンなどの低アミロース米は、ウルチ米よりも粘り強く食味が良いため近年人気品種になっており、GBSSは穀物品種育種上の重要なターゲットとなっている。GBSSには2種類のアイソザイムGBSSIとGBSSIIが存在し、GBSSIがアミロース合成の主酵素と位置づけられている。

我々はデンプン生合成分子機構解明の一環として、イネのGBSSIの大腸菌によるタンパク質大量発現系の構築に成功した。イネGBSSIは糖転移酵素ファミリー5に属する酵素に属し、微生物由来のグリコーゲン合成酵素 (glycogen synthase EC 2.4.1.11) と同源性を持つ。GSはN末、C末に2つのRossmannフォールドを持つ立体構造を有している。そこで、GBSSIのデンプン合成機構を明らかにすることを目的として、本研究に取り組むことにした。

2. 研究の目的

今後のイネGBSSI研究で、GBSSIのデンプン合成機構の詳細解明およびGBSSIのイネ品種表現型とのかかわりを明らかにすることを研究の最終目標とするが、イネの表現型解析は相応の技術と時間が必要であるため、本研究課題では、先行しているイネGBSSIの大腸菌による組換えタンパク質を利用した構造生物学研究を遂行する。

構造生物学研究ではGBSSIのデンプン合成分子機構解明のため、酵素反応複合体の立体構造を決定する。

生化学研究では、本酵素に特徴的な挿入ループなどがどのような役割を担っているのか、酵素構造機能相関を種々の変異体酵素を作製し明らかにする。

3. 研究の方法

GBSSI結晶化に用いるイネGBSSIタンパク質サンプルとして、当研究機関で整備してきたイネcDNAクローンライブラリ(1)から取得した当該遺伝子クローンのN末端82アミノ酸に対応する配列を削り、タンパク質発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現した。大腸菌体を酵素または超音波で破碎後、ヒスタジンタグアフィニティーカラム、およびゲル濾過カラムで精製した。結晶化は、既に確立されている条件をベースに、沈殿剤として硫酸リチウムを利用したハンギングドロップ蒸気拡散法と、シッティングドロップ蒸気拡散法を利用して行った。また、イネGBSSIとADPグルコース、デンプン又はマルトオリゴ糖との複合体の構造決定のため、酵素とリガンドとの複合体の結晶化は、現在得られている結晶化条件にリガンドを加え、結晶化条件下で複合体を調製する方法と、複合体形成後に結晶化条件を検討する方法の両方を行った。共結晶化では新たに結晶化条件スクリーニング

を行った。結晶化に触媒部位に変異を導入した不活化変異酵素や、C末端の領域を削ったC末端欠如変異体などを作製し結晶化を試みたが、これらについては結晶を得ることはできなかった。

X線回折データは高エネルギー加速器研究機構放射光施設の放射光施設(PF, PF-AR)で測定を行った。結晶はクライオループでつくい、図2(a)の条件の結晶では、30%グリセロールを含む溶液に浸漬したのち、その他の条件ではそのまま低温窒素気流下にマウントした。ビームラインはPF BL-5A, PF-AR NW-12A, NE-3Aなどを利用し、データの測定は備え付けのCCD検出器を利用した。

構造解析は、大腸菌由来グリコーゲン合成酵素の立体構造モデル(2)を鋳型とした分子置換法によりまずNative結晶の構造を決定した。その後、Native結晶構造を元に、リガンドとの共結晶や、リガンドをソーキングした結晶のデータの構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 結晶化

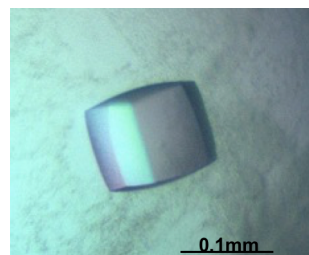
イネ GBSSI の結晶は、まず沈殿剤として硫酸リチウムを利用した条件で作製し、図2(b)のような球状多面体結晶を得た。この条件をベースに、マルトオリゴ糖との共結晶化での条件を進めていった結果、マルトテトラオースとの共結晶化により図2(a)のような立方体の結晶を得ることができた。さらに、結晶化条件のスクリーニングを進めることにより、新たにポリエチレングリコール3350(PEG3350)を沈殿剤とする条件を確立した(図2(b, c))。塩として硫酸リチウムを加えた条件では図2(b)のような球状多面体結晶が多く出現し、塩として硫酸アンモニウムを加えた条件では、球状多面体結晶の他、図2(c)のような球状の結晶も出現した。

(2) データ測定

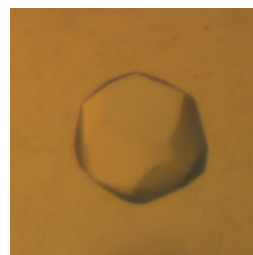
Native結晶のデータは2.7 Å分解能、ADP複合体は3.0 Å分解能のデータを取得した。また、マルトテトラオースとの共結晶のデータは2.8 Å分解能、マルトペンタオースとの共結晶のデータは3.5 Å分解能、マルトトリオースをソーキングした結晶のデータは3.2 Å分解能、マルトテトラオースをソーキングした結晶のデータは3.2 Å分解能、マルトペンタオースをソーキングした結晶のデータは3.5 Å分解能でそれぞれ取得した。その他の結晶については、十分なX線回折データは得られなかった。

結晶は、図2に示したものはいずれも立方晶系の空間群P432に属していた。形状の違いによる空間群や格子長の差は見られなかった。しかし、立方体の結晶は1辺の長さが最長0.1 mmほどしかなく、それ以上の結晶成長を行うことができなかった。一方、球状多面体結晶や球状結晶はそれ以上の大きさへ成長するものがあつた。回折データの分解能は、結晶の大きさに依存的する傾向にあり、データセッ

(a)



(b)



(c)



図2 イネ GBSSI の結晶

- (a) 結晶化条件 1.5M Lithium Sulfate
0.1M HEPES-Na (pH 7.5)
(b) 25% PEG3350, 0.2 M Lithium Sulfate,
0.1 M HEPES-Na (pH 7.5)
(c) 25% PEG3350, 0.2 M Ammonium
Sulfate, 0.1 M HEPES-Na (pH 7.5)

トを取得することができた結晶は、いずれも球状多面体結晶であった。また、球状多面体結晶の中には空間群がP432ではなくP422系の正方晶系に属する結晶が幾つか観察されたが、この結晶については再現性が取れず、回折データの分解能も伸びず、構造解析には至らなかった。

(3) 立体構造解析

イネ GBSSI の結晶の立体構造は、2.7 Å分解能のNative結晶のデータを用いて、大腸菌由来グリコーゲン合成酵素の立体構造モデル(2)を鋳型とした分子置換法により決定した(3)。N末、C末に2つのRossmannフォールドを持つ全体構造であり、その2つのドメインの間が触媒部位である(図3)。タンパク質発現で削り込んだN末82アミノ酸の他、N側ドメインにあるループ領域(アミノ酸番号で

174-191) と、C 末の 24 アミノ酸は電子密度が構造解析時に観察されず、構造がディスオーダーしていると考えられた。ADP をソーキングした結晶化から ADP 結合構造が得られたが、ADP はこの 2 つのドメインの間の溝の中心に結合しており、分子はタンパク質にほとんど覆われていた (図 4)。ADP のリン酸基が溝の入口に位置しており、そこがグルコース結合

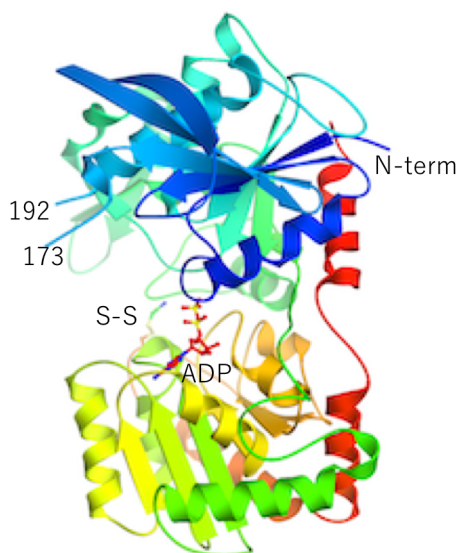


図 3 イネ GBSSI の結晶構造
ADP 複合体のリボンモデルを示す。174-191 のペプチド鎖は構造欠落しており、その部分を点線で示す。Cys337-Cys529 の間には S-S ジスルフィド結合が存在する。図はプログラム CueMol2 で作成した。

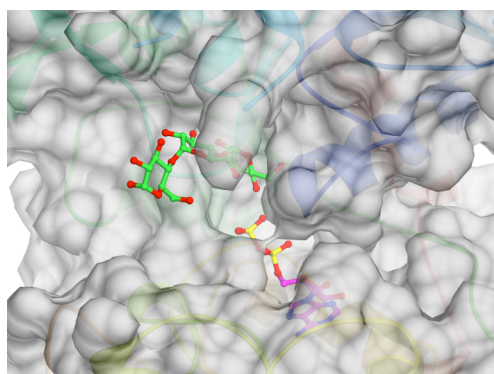


図 4 イネ GBSSI の触媒部位の表面構造
ADP 複合体の構造のタンパク質部分の表面モデル。緑で示したマルトトリオースは、大腸菌グリコーゲン合成酵素のマルトトリオース複合体構造(PDB code: 2QZS)と重ね合わせた際の位置にある。図はプログラム CueMol2 で作成した。

部位となり、反応中心になると考えられた。その先の溝は大きく開いていた。さらに近傍には構造がディスオーダーしているループ部分が存在している。この構造欠落ループは、大腸菌のグリコーゲン合成酵素とマルトトリオースの複合体では構造が観察され、ループが折りたたまれてドメイン間の溝を覆うように位置し結合したマルトトリオースと相互作用していたことから、酵素反応のアクセプターとなるアミロースを結合する役割がイネ GBSSI にもあると考えられる。そこで、ソーキングと共結晶によりマルトオリゴ糖との複合体の結晶構造解析に取り掛かった。

マルトオリゴ糖を加えた結晶の X 線回折データの電子密度を分子置換法により計算したところ、これまで同様のドメイン閉鎖型立体構造が得られたが、マルトオリゴ糖の結合は見られなかった。また、より安定な結晶作製を目的に、アポ型構造で構造情報が欠落している C 末端を削り込んだ変異体を作製することを試みた。しかし、C 末削除体ともに大腸菌による発現の際タンパク質が不溶化してしまった。従って、GBSSI の N 末ペプチド、C 末ペプチドは、立体構造上は特定の構造を持たなくてもタンパク質の安定性に寄与している可能性が示された。また、アポ型立体構造の触媒部位、N、C 末部位の位置関係から、GBSSI の糖鎖認識には触媒部位と N 末ペプチドの双方がかかわっている可能性が示唆された。

イネ GBSSI には N ドメインと C 末ドメインの間に 2 つのシステイン残基による SS 結合が存在した (図 3)。この結合に関わるシステインは、イネ、ムギ、トウモロコシなどの穀物植物にのみ存在し、イモ、マメ、野菜などには存在しなかったことから、この結合がアミロース合成に優位に働いている可能性が示唆されたが、今回の解析ではそれ以上のことはわからなかった。

ADP グルコースとの共結晶化では、これまで得られている結晶化条件で結晶が得られなかったことから、タンパク質の構造変化の可能性があり、目的の複合体が得られている可能性が考えられた。現在、この結晶を得ることはできていないが、GBSSI の触媒機構解明のための足がかりとして構造解析の取り組みを続けたい。

<引用文献>

- ① Kikuchi, S. et al, Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice, *Science*, 301, 376-379, 2003
- ② Cuesta-Seijo, J. A. et al, Structure of starch synthase I from barley: insight into regulatory mechanisms of starch synthase activity, *Acta Crystallogr D*, 69, 1013-1025, 2013
- ③ Momma, M. et al, Interdomain disulfide bridge in the rice granule bound starch synthase I catalytic domain as elucidated by X-ray structure analysis, *Biosci.*

Biotechnol. Biochem., 76, 1591-1595, 2012

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

・イネ顆粒結合型澱粉合成酵素の糖鎖複合体
構造解析

藤本瑞、岸根尚美、門間充

量子ビームサイエンスフェスタ(2017年3月
14日)

つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 瑞 (FUJIMOTO, Zui)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・高度解析センター・上級研究員

研究者番号： 20370679