

Short Report

シアノバクテリアが蓄積する貯蔵多糖の生合成に必要な酵素群の

結晶構造解析の試み

澱粉研究における構造生物学の発展に向けて

鈴木龍一郎, 黒木みほ, 鈴木英治

秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科

澱粉およびグリコーゲンはグルコース分子のみから構成される貯蔵多糖であり、前者は規則正しい分岐を伴ったアミロペクチン分子を主成分としているが、後者は基本構造を持たない。シアノバクテリアは一般にグリコーゲンを蓄積するが、一部の種は澱粉を蓄積する。枝作り酵素 (BE) は、これら貯蔵多糖の分岐を作る反応を触媒する酵素で、貯蔵多糖生合成系の鍵酵素である。シアノバクテリアが蓄積する貯蔵多糖の特性と BE の遺伝子数には、強い相関がある。グリコーゲンを蓄積する種は BE 遺伝子を 1 種 (BE1) または 2 種 (BE1, BE2) 持つが、澱粉を蓄積する種は BE 遺伝子を 3 種 (BE1, BE2, BE3) 持つ。シアノバクテリアにおける貯蔵多糖生合成系の解明には、これら BE の諸性質および立体構造解析が必要である。本研究では、これら貯蔵多糖の生合成に関わる BE の諸性質の解明および結晶化を行った。BE3 の比活性、基質特異性、反応産物の鎖長分布は、BE1 および BE2 と比べて、著しく異なっていた。

キーワード: シアノバクテリア, 貯蔵多糖, 枝作り酵素, 結晶化, 澱粉

貯蔵多糖 (澱粉およびグリコーゲン) は、グルコース分子のみから構成され、直鎖伸長酵素 (Glycogen/Starch synthase; GS/SS), 枝作り酵素 (Branching enzyme; BE), および枝切り酵素 (Debranching enzyme: DBE) など複数の酵素群の共同作用によって生合成されることがわかっているが (Nakamura *et al.*, 2010), 生合成系の詳細は未解明である。緑色植物が産生する澱粉は、規則正しい分岐を伴ったアミロペクチンを主成分としている。一方、動物やバクテリアが産生するグリコーゲンは、基本構造を持たない (図 1)。澱粉アミロペクチン生合成に関わる酵素群のうち BE は、分岐を作る酵素である。澱粉アミロペクチンとグリコーゲンの構造の決定的な違いは、分岐パターンである (図 1)。それゆえ澱粉アミロペクチンとグリコーゲン間の差異は、両者の生合成に関わる BE 間の差異に起因する

部分が大きいと考えられる。

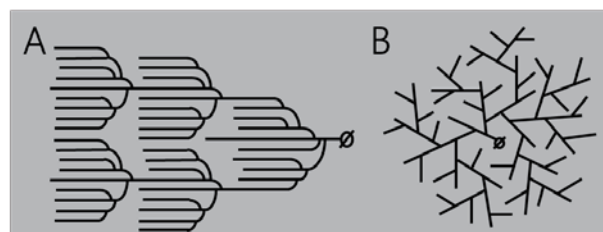


図 1 貯蔵多糖の構造

A. 澱粉アミロペクチン. B. グリコーゲン.

黒線は α -1,4 グルカン鎖を, 分岐は α -1,6 結合を, ϕ は還元末端を示す.

シアノバクテリアは、種の違いに応じてグリコーゲンおよび澱粉のいずれかを蓄積することが知られている (Nakamura *et al.*, 2005; Suzuki E., *et al.*, 2013). グリコーゲン生産性および澱粉生産性シアノバクテ

リア間には、BE 遺伝子の数に差異が見られる (表 1; Suzuki E., *et al.*, 2013). グリコーゲン生産性のシアノバクテリアは、1 種類の BE 遺伝子 (BE1) を有している (表 1). 一方澱粉生産性シアノバクテリアは、3 種類の BE 遺伝子 (BE1, BE2, BE3) を有している (表 1; Suzuki E., *et al.*, 2013). BE1 はグリコーゲン生産性シアノバクテリアにも普遍的に存在するため、これら 3 種の BE のうち BE2 もしくは BE3 が澱粉アミロペクチンの生合成に関わっていることが予想される. グリコーゲンおよび澱粉アミロペクチンの生合成系を解明するためには、関連酵素群の役割を明確にする必要がある. しかしながら現状では、これら酵素の特性・立体構造・生理的役割は、未解明である. 本研究では、シアノバクテリア種において遺伝子数が異なる BE の特性を明らかにし、これら酵素の結晶化を行うことを目的とした.

表 1 シアノバクテリアが持つ BE の遺伝子数

生物種	貯蔵多糖	BE 遺伝子
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	グリコーゲン	BE1
<i>Cyanobacterium</i> sp. NBRC 102756	澱粉	BE1, BE2, BE3
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	澱粉	BE1, BE2, BE3

材料と実験方法

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (7942), *Cyanobacterium* sp. NBRC 102756 (NBRC) もしくは *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (51142) 株由来ゲノム DNA を鋳型として、BE1, BE2, および BE3 遺伝子をそれぞれ特異的なプライマーを用いて PCR 法によって増幅した. 得られた PCR 産物を pET15b ベクターに連結し、大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換し、リコンビナント酵素を N 末端側ヒスチジンタグ融合タンパク質として大量発現させた. LB 培地を用いて液体培養後、菌体を遠心によって沈澱させ、緩衝液に再懸濁し、超音波破碎した. 遠心によって細胞破片等を分離し、上清を粗抽出液とした. 粗抽出液を Ni アフィニティーカラムおよびゲルろ過カラムによって、SDS-PAGE ゲル上で単一バンドになるまで精製した.

BE 活性は、基質として 1 mg/ml potato amylose type III および 5 mg/ml potato amylopectin を用い、ヨウ素

染色法によって OD₅₄₀ もしくは OD₆₄₀ を測定することで検出した. 1 U は、酵素反応を 30°C で行った際に 1 分あたり OD₆₄₀ を 0.1 減少させる酵素量として定義した (Suzuki R., *et al.*, 2015). また、多糖標品をイソアミラーゼ処理後、キャピラリー電気泳動装置 P/ACE MDQ carbohydrate system で分画することにより、BE の反応産物である α グルカンの構造 (鎖長分布) 解析を行った (Nakamura *et al.*, 2011).

酵素の結晶化は、シッティングドロップおよびハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて 15°C もしくは 20°C で行った. X 線回折データは、大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設フォトンファクトリー (KEK PF) において収集した. プログラム HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997) を用いて回折データを処理し、空間群を決定した.

結果と考察

7 種類の BE 遺伝子 (表 1) の大腸菌内での大量発現系を構築し、精製酵素標品を得ることができた. アミロースおよびアミロペクチンを基質として活性検出を試みた結果、表 1 に示した 7 種類全てのリコンビナント酵素について活性が確認できた (図 2).

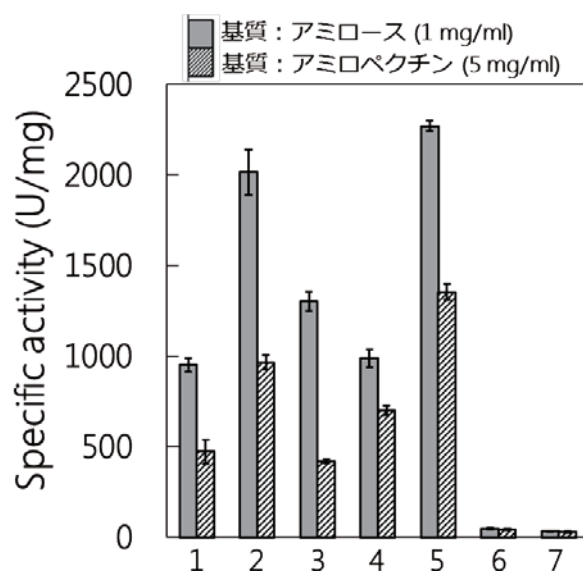


図 2 各生物種由来 BE1, BE2, BE3 の比活性測定結果

1. NBRC BE1. 2. 51142 BE1. 3. 7942 BE1. 4. NBRC BE2. 5. 51142 BE2. 6. NBRC BE3. 7. 51142 BE3.

NBRC および 51142 株由来 BE3 の比活性は、いずれの基質に対しても BE1 および BE2 と比べて顕著に低い結果となった (図 2). これは、活性測定に用いた基質が BE3 の本来の基質でないため、あるいは BE3 本来の性質であると予想された (Hayashi *et al.*, *in press*; Suzuki R., *et al.*, 2015). BE1 および BE2 はアミロースに対して高い活性を示し、アミロペクチンに対してはアミロースに対する活性と比べて 3 割から 7 割の活性しか示さなかった (図 2). このことから BE1 および BE2 は、分岐の無い基質もしくは長鎖の基質を好むことが明らかになった. 一方 BE3 のアミロペクチンに対する活性は、アミロースに対する活性と比べて 9 割の値を示した. これらのことから BE3 の基質特異性は、BE1 および BE2 とは異なると考えられた.

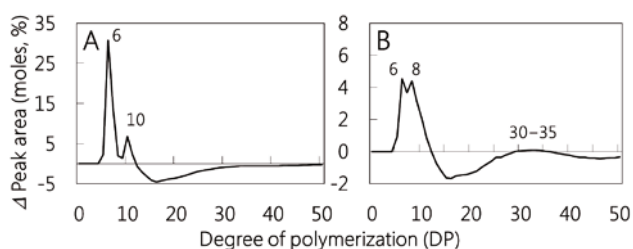


図 3 BE 反応産物である α グルカン構造 (鎖長分布) の解析結果

BE 反応産物の鎖長分布から基質の鎖長分布を引いた差分グラフとして示した.

A. 51142 BE1 の鎖長分布. B. 51142 BE3 の鎖長分布.

次いで、キャピラリー電気泳動装置を用いて BE の反応産物である α グルカンの構造 (鎖長分布) 解析を行った. 51142 株由来 BE1 反応産物の鎖長分布は、DP6 に明確なピークを示した (図 3A). 7942 株由来 BE1, 51142 株由来 BE2, および NBRC 株由来 BE1, BE2 は、これとほぼ同一の鎖長分布を示した. 一方 51142 株由来 BE3 反応産物の鎖長分布は (図 3B), DP6 と DP8 に小さなピークが見られたが、DP6 に明確なピークは見られなかった. また、わずかに DP30~DP35 の長鎖 (図 3B) を生産した. NBRC 株由来 BE3 においても、ほぼ同一の鎖長分布

を示した. BE3 はこれらの点で、BE1 および BE2 とは異なる触媒特性を示すことが明らかになった (Hayashi *et al.*, *in press*; Suzuki R., *et al.*, 2015). BE2 のアミノ酸配列は、全てのシアノバクテリアに普遍的に存在する BE1 と相同性が高く (56~60%), 酵素特性も似ていた. 一方 BE3 は、BE1 および BE2 とはアミノ酸配列相同性が低いため (27~29%), 異なる特性 (比活性・基質特異性・鎖長分布パターン) を示したと考えられた.

さらに、これら BE の特性の差異を立体構造から説明することを目的として、BE1, BE2, および BE3 の結晶化を行ったところ、51142 株由来 BE1 および BE3 について結晶を得ることができた (図 4). それ以外の酵素については、精製酵素標品の濃度、結晶化温度、リガンドの有無など多くのパラメータを検討したにもかかわらず、現在まで結晶化条件は見つかっていない. BE1 (図 4A) および BE3 (図 4B) の結晶を用いて X 線回折実験を行った結果、それぞれ分解能が 1.85 Å および 2.2 Å のデータセットを収集できた. データ解析の結果、BE1 および BE3 の結晶の空間群は、それぞれ $P4_12_12_1$ および $P2_12_12_1$ と決定できた (Hayashi *et al.*, *in press*). これらのデータセットを用いて分子置換法によって立体構造解析を試みているのが現状である.

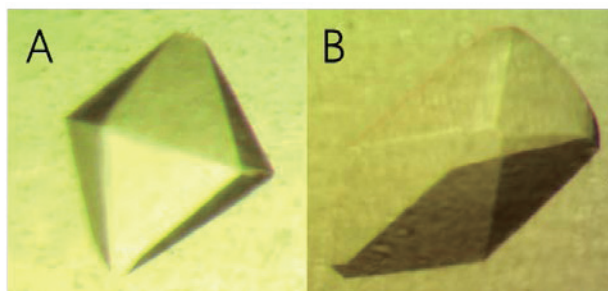


図 4 BE の結晶

A. BE1 の結晶. B. BE3 の結晶

本研究では、BE3 が BE1 および BE2 と比べて、比活性、基質特異性、および反応産物の鎖長分布において、異なる特性を有することを明らかにした. また、BE1 および BE3 の結晶化に成功した. BE3 の立体構造は既報の BE の立体構造である大腸菌由来 BE (Abad *et al.*, 2002) と比べて、活性中心付近のル

ープ構造などが異なるためにユニークな特性を示したと予想された。以上のことから、BE3 がシアノバクテリアの澱粉アミロペクチン生合成において BE1 および BE2 とは異なる役割を担うことが強く示唆された (Suzuki R., *et al.*, 2015)。しかしながら、シアノバクテリアの澱粉アミロペクチン生合成における役割を明確にするためには、これら BE 遺伝子を欠損したシアノバクテリア変異株を作製し、蓄積する貯蔵多糖を調べる研究が必要であると考えている。

今後これら 3 種類の BE の立体構造を解明し、構造機能相関を明らかにすることで、シアノバクテリアにおける澱粉アミロペクチンおよびグリコーゲンの生合成メカニズム解明に貢献する知見が得られると期待される。また、得られた構造基盤を有効利用し、改変酵素の設計と解析を行う予定である。将来的には、付加価値の高い澱粉の酵素合成もしくは澱粉の新しい酵素糖化法の開発に向けた研究基盤の構築につなげていくことを考えている。

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成 26 年度学長プロジェクト (創造的研究費) および (公財) 島津科学技術振興財団第 32 回島津科学技術研究開発助成金によって行われた。また、KEK PF のビームラインスタッフの方々には大変お世話になりました。ここに謝意を表します。

文献

Abad, M. C., Binderup, K., Rios-Steiner, J., Arni, R. K., Preiss, J., & Geiger, J. H. (2002). The X-ray crystallographic structure of *Escherichia coli* branching enzyme. *J. Biol. Chem.* 277(44), 42164-42170.

Hayashi, M., Suzuki, R., Colleoni, C., Ball, S., Fujita, N., & Suzuki, E. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of branching enzymes from *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, in press.

Nakamura, Y., Sawada, T., Ohdan, T., Aihara, S., & Fujita, N. (2011). New assay method for starch branching enzyme and starch synthase by the chain-length distribution analysis. *J. Appl. Glycosci.*, 58(3), 119-123.

Nakamura, Y., Takahashi, J., Sakurai, A., Inaba, Y., Suzuki, E., Nihei, S., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., Miyashita, H., Ikemoto, H., Kawachi, M., Sekiguchi, H., & Kurano, N. (2005). Some cyanobacteria synthesize semi-amylopectin type alpha-polyglucans instead of glycogen. *Plant Cell Physiol.*, 46(3), 539-545.

Nakamura, Y., Utsumi, Y., Sawada, T., Aihara, S., Utsumi, C., Yoshida, M., & Kitamura, S. (2010). Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. *Plant Cell Physiol.*, 51(5), 776-794.

Otwinowski, Z., & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307-326.

Suzuki, E., Onoda, M., Colleoni, C., Ball, S., Fujita, N., & Nakamura, Y. (2013). Physicochemical variation of cyanobacterial starch, the insoluble α -glucans in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.*, 54(4), 465-473.

Suzuki, R., Koide, K., Hayashi, M., Suzuki, T., Sawada, T., Ohdan, T., Takahashi, H., Nakamura, Y., Fujita, N., & Suzuki, E. (2015). Functional characterization of three (GH13) branching enzymes involved in cyanobacterial starch biosynthesis from *Cyanobacterium* sp. NBRC 102756. *Biochim. Biophys. Acta*, 1854(5), 476-484.

〔平成 27 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 27 年 7 月 31 日受理〕

Biochemical characterization and crystallization of enzymes responsible for the biosynthesis of storage polysaccharide in cyanobacteria

Toward structural biology for research in starch metabolism

Ryuichiro Suzuki, Miho Kuroki, Eiji Suzuki

Department of Biological Production, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

Starch and glycogen are common reserve polysaccharides solely composed of glucose. Starch primarily consists of an amylopectin molecule with an ordered branching pattern, whereas glycogen is randomly branched. A limited number of cyanobacterial species accumulate starch and the remaining species produce glycogen. Branching enzyme (BE) catalyzes the formation of new branching points and plays a pivotal role in determining the branched structure of storage polysaccharides. Glycogen-producing cyanobacteria have one (BE1) or two BE genes (BE1 and BE2), whereas starch-producing cyanobacteria have three BE genes (BE1, BE2, and BE3). The number of BE genes is intimately associated with starch-producing traits. However, characterization of these BE isoforms has not been reported to date and their roles in starch biosynthesis remain obscure. In the present study, these BE isoforms were biochemically characterized. BE3 showed different specific activity, substrate preference, and catalytic specificity compared with BE1 and BE2. Some of these proteins have been crystallized for structural analysis.

Keywords: Cyanobacteria, Storage polysaccharide, Branching enzyme, Crystallization, Starch