九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Dynamical and Structural Analysis of Archaeal Oligosaccharyltransferase Using High-speed AFM and Electron Microscopy

川﨑, 由貴

https://hdl.handle.net/2324/4474955

出版情報：Kyushu University, 2020, 博士（システム生命科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

（様式３）

氏　　名　：川﨑　由貴

論 文 名　：Dynamical and Structural Analysis of Archaeal Oligosaccharyltransferase Using High-speed AFM and Electron Microscopy
（高速 AFM と電子顕微鏡を用いた古細菌オリゴ糖転移酵素の動的構造解析）

区　　分　：甲

論　文　内　容　の　要　旨

N 型糖鎖転移反応は、最も重要なタンパク質の翻訳後修飾の 1 つである。オリゴ糖転移酵素は、新生ポリペプチド鎖の糖鎖付加配列を認識し、脂質膜上に組み立てられた糖鎖をアスパラギン残基へ転移する反応を触媒する膜タンパク質酵素である。本研究では、結晶構造解析で得られた構造情報をもとに、高速 AFM や電子顕微鏡を用いて古細菌オリゴ糖転移酵素の構造解析を行った。

高速 AFM を用いると、生体分子の構造変化をリアルタイムに観察することができる。高速 AFM 観察を行うためには、観察対象とする生体分子の特性に応じて適切な系を用いる必要がある。オリゴ糖転移酵素は膜タンパク質であるため、 AFM の観察ステージへの一定の向きでの固定と脂質二重膜の形成が必要であった。オリゴ糖転移酵素の球状ドメインの構造変化を観察するため、膜貫通領域の細胞質側にビオチン修飾を加えた。AFM の観察ステージ上のマイカ基板にタマビジン二次元結晶を形成し、界面活性剤で可溶化したオリゴ糖転移酵素を球状ドメインが上になるように固定した。オリゴ糖転移酵素固定後に界面活性剤を加えたリポソームをのせて脂質二重膜を形成した。この系を使ってオリゴ糖転移酵素の高さの変化を測定した結果、1.8 nm の振れ幅で二状態を行き来する大きな構造変化が起こることが明らかになった。高さが高い状態を”State 1”, 低い状態を”State 2”としてサバイバルプロットを行うと、単一指数関数の曲線へフィッティングできたことから、オリゴ糖転移酵素の本質的な構造変化を捉えることができたと考える。NMR の解析でもオリゴ糖転移酵素に二状態あることが示唆された。State1 は結晶構造に近い構造で継続時間が長かったのに対し、State2 は結晶構造よりコンパクトな構造で継続時間は短かった。脂質二重膜中にドナー基質である LLO を加えると、State1 が安定化された。AFM で新たに観察された State2 の構造はオリゴ糖転移酵素が酵素反応でできた糖ペプチドをすばやく離して、酵素サイクルを効率的にまわすのに役立つ可能性があると考える。

古細菌オリゴ糖転移酵素の結晶構造解析では、可溶化に界面活性剤が用いられてきた。本研究では、アンフィポールで可溶化した状態とナノディスクの脂質二重膜中に再構成した状態とで電子顕微鏡単粒子解析を行った。その結果、アンフィポールで可溶化した状態のオリゴ糖転移酵素の構造は結晶構造と同等であったが、ナノディスクに埋め込んだオリゴ糖転移酵素の膜貫通領域と球状ドメインの間が開いた構造をとることが明らかとなった。このナノディスク中オリゴ糖転移酵素の構造は結晶構造とも高速 AFM で観察された State2 とも異なる構造であった。

高速 AFM と NMR を用いた動的解析と電子顕微鏡を用いた構造解析により、オリゴ糖転移酵素の膜貫通領域と球状ドメインの配向が非常に可塑的であることが明らかになった。2 つのドメイン間の大きな構造変化がオリゴ糖転移酵素の活性に重要であると考える。