

氏名(本籍)	かな い りゅう た 金井隆太(埼玉県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第3509号		
学位授与年月日	平成16年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on the Reaction Mechanism of Cyclodextrin Glycosyltransferase and Malto-hexaose Forming Amylase on the Basis of X-ray Crystallographic and Protein Engineering Analyses (シクロデキストリン合成酵素とマルトヘキサオース生成アミラーゼの反応機構のX線結晶構造学的・蛋白質工学的解析)		
主査	筑波大学教授	理学博士	山根國男
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田治
副査	産業技術総合研究所統括研究員	理学博士	原田一明

論文の内容の要旨

シクロデキストリン合成酵素 (CGTase) は α -アミラーゼファミリーに属し, α -1, 4-グルカンから, 環形成反応によって, 環状のマルトオリゴ糖 (6-8糖) であるシクロデキストリン (CD) を生成する。CD の産業的有用性から, その環形成機構は盛んに研究されてきたが, 基質結合や環形成過程の詳細は不明であった。一方, マルトヘキサオース生成アミラーゼ (G6-アミラーゼ) も同様に α -アミラーゼファミリーの属し, α -1, 4-グルカンから直鎖マルトヘキサオースを優位に生成する。両酵素は配列相同性から r 類似した触媒機構を持っていると推定され, また, 同じ基質から特定の長さのオリゴ糖を生成する点では共通であるが, 生成物が CGTase では環状オリゴ糖, G6-アミラーゼでは直鎖オリゴ糖である点で大きく異なり, その基質結合にかかわるサブサイト構造, および生成機構に差異があると推定される。そこで, 本研究では両酵素の反応機構の解明を最終目標として, それらの X 線結晶構造学的・タンパク質工学的解析を行った。

まず, 好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp.1011 由来 CGTase と, その反応阻害剤であるアカボースと 1-デオキシノジリマイシンの複合体構造をそれぞれ決定し, その阻害メカニズムと CGTase の基質結合様式の特徴を明らかにした。CGTase のアカボース複合体では活性部位にアカボースとは異なる擬似マルトテトラオースが結合して, その N-グリコシド結合がサブサイト +1 と -1 の間に位置しており, 切断反応が起こらないことによって, 酵素反応が阻害されていると考えられた。また, その擬似マルトテトラオースは CGTase の触媒部位を挟むようにしてサブサイト -2 から +2 の位置に結合して, 基質結合に複数のサブサイトが関わっていることが示唆された。さらに, CGTase に特異的に保存されている Phe183, Phe259 が還元末端側の糖残基とスタック相互作用しており, シクロデキストリンを生成する上で非還元末端側の糖をアクセプター部位に引き込むのに重要であると推定された。1-デオキシノジリマイシン複合体構造では, 非還元末端側で触媒残基に隣接しているサブサイト -1 に 1 分子存在するだけであった。従って, 1-デオキシノジリマイシンの阻害効果は触媒反応のブロックによるのではなく, 基質結合のブロックによることが明らかになった。さらにアカボース複合体のサブサイト -1 に位置する糖残基の六員環は Tyr100 の芳香環と平行なスタック相

相互作用していたが、1-デオキシノジリマイシンは垂直の関係で異なる結合様式であった。このような結果から、CGTaseの基質結合様式の特徴として、適当な長さのオリゴ糖と結合したときに、個々のサブサイト-糖残基間の結合は弱いですが、互いに隣接するサブサイト-糖残基の結合を支持し、基質分子全体としては安定にCGTaseと結合していると考察された。

次に、CGTase特異的に保存されている芳香族アミノ酸Phe283の酵素反応における役割を明らかにするために、そのロイシン変異型酵素F283Lの単独構造、およびアカボース複合体の結晶構造解析を行った。その結果、F283Lではサブサイト+1から+3を形成している257-266領域の主鎖構造が野生型酵素に比べて1Å以上移動し、F283L単独のその領域の温度因子は約 20\AA^2 上昇し、さらにF283Lアカボース複合体では単独時に比べて約 20\AA^2 上昇していた。これらの変化はその領域の構造が変異導入、基質結合に伴って構造的柔軟性が上昇したことを示している。特に、Phe259の側鎖の配向が野生型に比べて大きく異なり(1Å以上シフト)、側鎖の電子密度は変異導入に伴って弱くなり、構造的柔軟性の上昇が強く示された。野生型酵素において、Phe283の芳香環はPhe259とスタック相互作用しており、これら一連の変化はロイシン変異によってその相互作用が消失したために生じたと考えられる。しかし、Phe259は構造的に大きく変化しているにもかかわらず、野生型酵素と同様に、サブサイト+2の糖残基とスタック相互作用していた。このことは構造的柔軟性の高い直鎖基質に対してF283L変異型CGTaseは安定に結合できると推測された。これは既に報告されている生化学的解析の結果とも一致した。一方、CDは直鎖オリゴ糖に比べて構造的柔軟性が制限されるため、F283LではPhe259をはじめとするサブサイト+1, +2と安定に相互作用できず、環形成されにくいと考えられた。以上のことから、Phe283は直接、糖残基と相互作用していないが、Phe259とのスタック相互作用によって、Phe259、およびその周辺構造を規定し、効率的な環形成反応に寄与していると結論付けられた。

また、G6-アミラーゼの基質結合様式の特徴を明らかにするために、好アルカリ性細菌*Bacillus* sp.707由来G6-アミラーゼの単独構造および擬似マルトノオース複合体の結晶解析を行った。その結果、本酵素には-6から+3の9つのサブサイトが存在し、非還元末端側6つのサブサイトの存在し、特に、Trp140の芳香環がサブサイト-6, -5の糖残基と疎水的なスタック相互作用を形成しており、この認識によってマルトヘキサオースが優位に生成されると同時に、非生産的結合によって分解を防いでいると考えられた。配列・構造的保存性が低い大麦 α -アミラーゼと構造比較したところ、G6-アミラーゼのサブサイト-6のTrp140と等価な位置にTyr140が存在していたことから、サブサイト-6の芳香族アミノ酸はマルトヘキサオース生成に重要であることが推定された。またCGTaseとG6アミラーゼの構造を比較することによって、環状シクロデキストリンと直鎖G6の生成機構を推定し、議論することができた。

審査の結果の要旨

本研究はCGTaseに対する阻害剤アカボース、1-デオキシノジリマイシンの阻害メカニズム、およびCGTaseのサブサイト構造、特異的に保存されているPhe283の酵素反応における役割、また、G6-アミラーゼのサブサイト構造とマルトヘキサオース生成におけるサブサイト-6の芳香族アミノ酸の重要性を構造的に明らかにした。今後は構造的に明らかになったそれらの知見を生化学的に立証することが期待される。本研究の結果はアミラーゼ系酵素の特異的な生成物の生成機構の解明に寄与し、産業的に利用価値の高いオリゴ糖を効率的に生成する酵素デザインに重要な知見を提供するものである。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。