

氏名(国籍)	ドウジル スウド (モンゴル)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第2547号		
学位授与年月日	平成13年3月23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	農学研究科		
学位論文題目	Crystallographic Study of <i>Bacillus stearothermophilus</i> α -Amylase (バチルスステアロサーモフィラス由来 α -アミラーゼの結晶構造学的研究)		
主査	筑波大学教授	工学博士	松村正利
副査	筑波大学併任教授 (農業生物資源研究所)	薬学博士	水野洋
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場忠
副査	筑波大学教授	理学博士	藤村達人

論文の内容の要旨

蛋白質の熱安定性との関係は、詳細な立体構造を調べることにより、塩橋、水素結合、疎水性結合など熱安定性に起因する因子が色々と提案されている。しかし、一定の規則はなく、個々の蛋白質の立体構造を調べなければならぬのが現状である。デンプンやマルトオリゴ糖の α -1,4結合を分解する酵素 α -アミラーゼについては、*Bacillus licheniformis* (BLA), *Bacillus stearothermophilus* (BSTA), *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA) が高度好熱菌由来のものである。熱安定性はBLAが最も高く、続いてBSTA, BAAの順であり、至適温度は、それぞれ90℃, 75℃, 60℃である。このうち、BLAのみがX線解析により、その3次元構造が明らかにされている。BLAとBSTAのアミノ酸配列の相同性は高く、65%である。従ってお互いの立体構造は良く似ていると考えられるが、残りの35%のアミノ酸残基の違いが熱安定性の違いを反映していると思われる。アミノ酸残基の違いが、どのように立体構造形成にかかわり、熱安定性の違いを説明できるのかを調べるためにBSTAのX線解析実験を行い、BLAの立体構造との比較を行った。得られた成果は以下に示す通りである。

枯草菌発現系を用いて*Bacillus stearothermophilus* A631株由来の組換え型 α -アミラーゼの大量培養、精製を行った。精製の段階で、クロマトフォーカシングを行い、複数個のイソフォームがあることが判明した。このうち、pI8.2型の α -アミラーゼについて結晶化することに成功した。結晶は単斜晶系に属し、格子定数は、 $a = 53.5$, $b = 92.8$, $c = 53.1$ Å, $\beta = 109.4^\circ$ であった。X線強度データは高エネルギー加速器研究機構の放射光施設のビームラインBL-6Aにおいて、巨大分子用ワイセンベルグカメラを使用して測定した。得られたX線強度データをコンピュータ処理したところ、分解能2.0 Åであり、反射数は183,694個で、このうち独立な反射数は29,849個であった。

これらのX線反射データを用いて、以下に示す構造解析を行った。まず、位相決定は、プログラムAmoReを使用して構造既知のBLAの原子座標を用いた分子置換法により行い、一つの解を得た。分解能2.5 Åのデータを用いた剛体精密化によりR因子が0.424となり、分子置換法の解が正しいことを確認することができた。構造の精密化はプログラムXPLORを使用して行い、分解能を徐々に上げながら、精密化を繰り返し、最終的には分解能2.0 ÅにおいてR因子0.156を得ることが出来た。

BSUA全体の分子構造は、 $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造をもつAドメイン、長いループと β ストランドとでつくられた

Bドメイン及びグリークキーモチーフをもつCドメインからなっている。この構造は、他の α -アミラーゼにも見られる共通の構造である。BSUAのC α 原子をBLAのそれに重ね合わせた時の平均二乗偏差 (RMSD) は0.83 Åとなり、両構造は非常に良く似ている。 α -ヘリックス、 β -ストランド等二次構造部分はよく重なり、ループ領域での多少のギャップが見られ、アミノ酸1-2残基の挿入あるいは欠損が見られる。これらの違いや、アミノ酸側鎖の違いによって生じる構造が、BSUAとBLAとの熱安定性の違いを反映していると考えられるので、その構造の違いを詳細に検討し、以下に示す熱安定性との関係を見いだすことができた。1) BSTAのIle181-Gly182の2残基挿入は、隣接するAsp204を押しやり、その結果Asp204はCa²⁺と結合できなくなった。2) 構造全体では、BLAの水素結合の数はBSTAよりも9本多く、従ってBSTAの方が熱安定性が低いと説明できる。3) BSTAに見られる(β/α)₈パレルのヘリックス領域のキャビティーはヘリックス間のつまり具合を減少させる。4) BLAの分子表面に広がる電荷の面積はBSTAの約2倍あり溶媒和に有利である。

本研究を通して、BSUAの立体構造を明らかにし、他の α -アミラーゼの構造と比較することによって α -アミラーゼの熱安定性の違いを立体構造の立場から明らかにすることができた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来の α -アミラーゼ (BSTA) を結晶化し、X線構造解析を行い、分解能2.0 Åという比較的高い分解能における立体構造を明らかにしたものである。この構造と、さらに熱安定性の高い *Bacillus licheniformis* 由来の α -アミラーゼ (BLA) の構造とを比較することによって、熱安定性の違いを立体構造の立場から説明することが可能となった。この両者の違いを詳細に検討した結果、BSTAのIle181-Gly182の2残基挿入によるCa²⁺結合様式の変更、水素結合の合計数の違い、キャビティーの有無、分子表面電荷の面積の大きさの違い等が、両酵素の熱安定性の違いに関連していることをつきとめたことは大きな成果であるといえる。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。