

氏名	ひら 平 田 章 あきら
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1423 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科農学専攻
学位論文題目	Studies on the Structure and Function of Mutant $\beta$ -Amylases with Altered pH Optimum (至適 pH を変換した $\beta$ -アミラーゼ変異体の構造と機能に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 内 海 成 教授 廣 瀬 正 明 助教授 三 上 文 三

### 論 文 内 容 の 要 旨

糖質加水分解酵素の一つである  $\beta$ -アミラーゼは、澱粉の非還元末端から、 $\beta$ -アノマーのマルトースを遊離するイクソ型の酵素である。 $\beta$ -アミラーゼは植物に広く分布しており、主に植物由来のものが工業的に高純度マルトースを生産するのに利用されている。また、微生物でも *Bacillus* 属、*Clostridium* 属において発見されており、それらの性質が調べられてきた。その結果、至適 pH が植物起源では酸性側 (pH5~6) にあるのに対して、微生物の酵素では、中性付近 (pH7) にあることがわかっている。 $\beta$ -アミラーゼを含む反転酵素の至適 pH は、酸及び塩基触媒残基の解離状態によって制御されている。ダイズ  $\beta$ -アミラーゼ (SBA) と *Bacillus cereus*  $\beta$ -アミラーゼ (BCB) の至適 pH はそれぞれ pH5.4 と pH6.7 であるが、その触媒残基の配置は同じであるため、両酵素の至適 pH の違いは、酸塩基触媒残基の解離状態に影響を及ぼす周辺環境の変化によると推測されている。

本論文では、SBA と BCB の至適 pH の調節機構を解明するため、第一章では両酵素の高分解能での結晶構造を、触媒残基を中心に比較し、その周辺環境の構造の相違を見出し、その知見を基に第二章及び第三章では至適 pH を変換した変異体の結晶構造を詳細に検討した。それらの主な内容は以下の通りである。

1. BCB とマルトースの複合体の X 線結晶構造解析を 1.29Å の分解能で行い、異方性温度因子を含めてその構造を精密化した。この複合体の立体構造から、澱粉の吸着に関わる新しい 4 つのマルトース結合サイトを見出した。これらの新しい結合サイトは、マルトースとの結合能が弱いにもかかわらず、他の結合サイトとともに、BCB の生澱粉への吸着、分解活性に関与していることが明らかになった。また、既報の 1.30Å 分解能の SBA の結晶構造と比較した結果、酸触媒残基の周辺構造はよく類似していたが、SBA の塩基触媒である Glu380 の周辺では Glu380 を含む側鎖間の水素結合のネットワークが見られるのに対して、BCB の塩基触媒である Glu367 の周辺では、SBA とアミノ酸残基が異なり、水分子を介した水素結合のネットワークが見られた。すなわち、SBA の Glu380 の周辺は、水分子が存在せず疎水的環境であるのに対して、BCB の Glu367 の周辺は、二つの水分子 (W1 と W2) が存在し SBA より親水的環境にあった。これらのことは、SBA と BCB の至適 pH の相違が塩基触媒残基の周辺構造の違いに起因していることを強く示唆した。

2. SBA の塩基触媒である Glu380 は、近接する Met51, Glu178, Asn340 と水素結合のネットワークを形成しており、このネットワークが SBA の至適 pH を制御している可能性が考えられた。そこで Met51 を Thr, Glu178 を Tyr, Asn340 を Thr に置換した BCB タイプの三つの変異体 M51T, E178Y, N340T を作製した。その結果、各変異体の至適 pH は 5.4 から 6.0~6.6 に上昇し、主に塩基触媒残基の  $pK_a$  が SBA の野生型に比べて上昇していた。各変異体とマルトースの複合体の結晶構造では、Glu380 を含む側鎖間の水素結合が消失していた。従って、Glu380 を含む側鎖間の水素結合が Glu380 の  $pK_a$  を低下させるため、SBA の至適 pH は酸性側にあることが明らかになった。

3. 塩基触媒である Glu367 に及ぼす静電的効果が BCB の至適 pH にどのような影響を与えているのか調べるため、Glu367 の周辺にある Tyr164 を SBA タイプの Glu, また、Phe, His, Gln に置換した 4 つのシングル変異体 (Y164E, Y164F,

Y164H, Y164Q) を作製した。さらに、BCBのアミノ酸残基をSBAタイプに置換した三重変異体 (T47M/Y164E/T328N) を作製した。各シングル変異体の至適pHは、予想に反してSBA (pH5.4) よりも低い4.8から4.0付近の酸性側に移行していた。これらの変異体の至適pHが酸性側に移行した原因は、置換した残基の静電的効果の違いによるのではないことを示した。一方、三重変異体の至適pHは6.0付近で、SBAの変異体 (N340T, E178Y) と非常に似たpHプロファイルを示した。各変異体の $k_{cat}$ 値は野生型より減少したが、Y164E, Y164FはSBAとほぼ同程度だった。Y164E, Y164Fとマルトース複合体の結晶構造では、Glu367とTyr164の水分子W1を介した水素結合が消失し、T47M/Y164E/T328NではMet47の導入によりGlu367に水素結合していた二つの水分子 (W1とW2) が消失し、SBAのGlu380と同様の疎水的環境に近づいた。このことから、BCBの至適pHが中性側にあるのは、親水的環境下でGlu367の側鎖が水分子を介した水素結合をTyr164の側鎖と形成し、Glu367の $pK_a$ を上昇させていることによると推定された。

## 論文審査の結果の要旨

酵素の触媒機能を工業的に有効利用するために、工業的用途に応じた至適pHの変換が望まれている。しかしながら、至適pHの変換を目的とした酵素の分子設計に関する知見は乏しく、また、至適pHの調節機構に関しても詳細に明らかにされていないのが現状である。

$\beta$ -アミラーゼは、その至適pHが酸性側 (pH5~6) にある植物由来のもの、中性側 (pH7) にある微生物由来のものが、工業的な高純度マルトースの生産には植物由来の酵素が利用されている。両 $\beta$ -アミラーゼの至適pHの相違の原因を解明することは、微生物 $\beta$ -アミラーゼの工業的利用の観点のみならず、タンパク質工学を中心にした研究分野に与えるインパクトが非常に大きい。本論文では、至適pHが酸性側 (pH5.4) にあるダイズ $\beta$ -アミラーゼと中性側 (pH6.7) にある*Bacillus cereus*  $\beta$ -アミラーゼの1.30及び1.29Å分解能の結晶構造の比較を行い、塩基触媒残基の周辺構造の相違が両酵素の至適pHの違いであること、また、生澱粉の吸着分解活性に関与する新規のマルトース結合サイトを見出している。さらに、ダイズ及び*Bacillus cereus*  $\beta$ -アミラーゼの至適pHを中性側及び酸性側にそれぞれ変換した変異体を作製することに成功し、それらの変異体のX線結晶構造解析から、両酵素の至適pHの調節機構を明らかにするとともに、酵素の至適pHを変換するための分子設計基盤を提示している。評価される主な点は以下の通りである。

1. *Bacillus cereus*  $\beta$ -アミラーゼ/マルトース複合体の高分解能 (1.29Å) X線結晶構造解析を行い、新規のマルトース結合部位を発見し、これらの結合部位が*Bacillus cereus*  $\beta$ -アミラーゼの生澱粉への吸着及び分解に関与することを示した。また、*Bacillus cereus*  $\beta$ -アミラーゼとダイズ $\beta$ -アミラーゼの高分解能の立体構造の比較により、それぞれの至適pHの相違は、塩基触媒残基の周辺構造の違いに起因することを見出した。

2. ダイズ $\beta$ -アミラーゼの至適pHを酸性側から中性側に変換した変異体を3種類作製し、そのX線結晶構造解析を行った。その結果、塩基触媒残基であるGlu380の側鎖が疎水的環境下においてAsn340と水素結合を形成することによってGlu380の $pK_a$ が下がるために、ダイズ $\beta$ -アミラーゼの至適pHは酸性側にあることを明らかにした。

3. *Bacillus cereus*  $\beta$ -アミラーゼの至適pHを中性側からダイズ酵素より低い酸性側に変換した変異体を5種類作製し、それらの変異体のX線結晶構造解析を行った。その結果、塩基触媒残基であるGlu367が親水的環境下において水分子を介した水素結合をTyr164と形成し、Glu367の $pK_a$ を上げているために、*Bacillus cereus*  $\beta$ -アミラーゼの至適pHは中性側にあることを示した。

以上のように本論文は、ダイズ及び*Bacillus cereus*  $\beta$ -アミラーゼを用いて、それらの至適pHの調節機構を分子構造レベルで解明することによって、酵素の至適pHを酸性側及び中性側に変換するための分子設計基盤を確立している。したがって、酵素機能変換学、応用構造生物学、品質設計開発学などに寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年2月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。