

β -アミラーゼのドメイン工学

(研究課題番号 12660077)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書



平成14年3月

研究代表者 三上文三
(京都大学農学研究科・助教授)

はしがき

β -アミラーゼは澱粉の非還元末端より β -アノマーのマルトースを遊離する酵素であり、古くから研究されてきた酵素の一つであり、その研究は1924年のKuhnによる麦芽中の α -アミラーゼと β -アミラーゼの発見に始まる。本酵素は高等植物および微生物に分布し、その起源にかかわらず、SH試薬により失活することより、古くはSH酵素であると考えられたが、SH基の活性への関与は否定されている。多くの起源の β -アミラーゼが分子量約60,000の単量体として存在するのに対し、サツマイモ β -アミラーゼは4量体として存在することが報告されている。また、高等植物起源の酵素の至適pHが5から6の範囲であるのに対し微生物起源の酵素の至適pHは7から8にあり、後者は生澱粉に対する吸着、分解作用を有していることが明らかにされている。 β -アミラーゼは高純度のマルトースの生産に不可欠の酵素であり、 α -アミラーゼとともに澱粉からの工業的マルトースの生産に利用されている。工業的酵素の給源としては熱安定性や至適pHの点で高等植物起源のダイズや小麦起源の酵素が用いられている。また、醸造工業においては、特にビールの製造行程での澱粉の糖化に麦芽中の β -アミラーゼが重用な役割を果たしている。ダイズ、サツマイモ、クリ、ダイコン等の高等植物はその可食部に大量の β -アミラーゼを有し、調理中における甘味形成に大きく関与している。

本酵素の構造と機能に関する研究は、まず、酵素反応速度に関する多くの研究が行われ、本酵素がイクソ型の作用機作を示し、生成物の厳密なアノマー特異性を有することが明らかにされた。また、SH基の化学修飾の研究からSH基は触媒反応には直接関与しないこと、高等植物起源の酵素ではSH試薬による失活の原因となるシステイン残基が2個あるが、微生物起源の酵素には1個しか存在せず、代わりにSS結合が1個存在することが明らかにされている。1980年代以降、本酵素の遺伝子に関する研究が進展し、10種類以上の高等植物および数種の微生物より β -アミラーゼの遺伝子が単離され、クローニングされて、そのアミノ酸配列が推定されている。筆者らは1991年に本酵素と本酵素の阻害剤である α -シクロデキストリンとの複合体の立体構造をX線結晶構造解析により決定した。これにより β -アミラーゼ機能の立体構造レベルでの解析が可能となった。

β -アミラーゼのタンパク質工学に関する研究の目的は本酵素の安定性の強化、高活性化及び多機能化にあり、これらの機能変換を設計、実施するためには β -アミラーゼの高分解能X線結晶構造解析の結果と本酵素遺伝子の大量発現系の確立が不可欠な要素となっている。X線結晶構造解析は一般的には静的な解析法であるため、酵素の機能を明らかにするためには各機能状態にある構造を持つ酵素を結晶内で再現させる必要がある。このためには基質および基質アナログを結晶内に導入して酵素との複合体を形成し、その構造を明らかにしなければならない。

特に、基質との結合によって誘導される酵素側の動的な構造変化等は実際の基質との複合体の構造解析によって初めて明らかにされる場合が多い。また、酵素の触媒作用や

基質との相互作用に関与する個々のアミノ酸残基の役割については化学修飾や遺伝子改変により変異酵素を作成し、その酵素の機能変化と構造変化との相関を明らかにしていく必要がある。現在のX線結晶構造解析技術は数年前に比べ格段に向上し、結晶さえ得られれば短期間に構造を決定することが可能であり、酵素機能の変化を具体的なタンパク質の構造の変化として理解することができる。これらの実験事実の積み重ねにより、新機能酵素の設計が可能になるものと考えられる。この設計の過程には決定された構造を用いたコンピュータによる分子動力学計算によるシミュレーション等に今後の技術的発展が要求されている。

この設計の過程において、タンパク質のドメイン構造の組み合わせによる新機能の設計が有効であり、種々のマルチドメイン酵素の構造解析から、ドメイン構造によるタンパク質機能の分担の例が数多く明らかにされている。

本研究では植物 β -アミラーゼと微生物 β -アミラーゼの構造を比較するために両者の構造解析を行った結果、*Bacillus cereus* 起源の β -アミラーゼにはC末端に分子量約1万のデンプン吸着ドメイン (SBD) が存在し、このドメインには1個のマルトース結合サイトが存在することが明らかになった。次に、このSBD部分のみを大腸菌で大量発現し、精製、結晶化して、その結晶構造を1.95Å分解能で決定した。その結果、本SBDはシクロデキストリン合成酵素のEドメイン及びグルコアミラーゼのC末端に存在するSBDと類似し、二次構造は、ほぼ共通するが、ループ部分の構造が一部異なっていることが判明した。シクロデキストリン合成酵素のEドメイン及びグルコアミラーゼのC末端に存在するSBDでは2個のデンプン吸着サイト(サイト1とサイト2)が知られているが、本SBDではサイト2を構成する2本のループの中で、残基番号460から467のループの構造が2残基の欠損により異なることが構造変化とデンプン吸着能の消失の原因と考えられた。そこで、 β -アミラーゼのデンプン粒分解活性の強化を図るため、残基番号460から8残基の配列をシクロデキストリン合成酵素のEドメイン及びグルコアミラーゼのC末端SBDに置換した変異体を作製し、現在、その解析を行っている。

一方、メインドメインの部分については、ダイズと*B. cereus* 起源の β -アミラーゼの構造比較から、触媒残基の一つである、ダイズ酵素のGlu380周辺のアミノ酸残基に相違があり、これが両者の至適pHの差の原因となっていると予想された。即ち、ダイズ酵素のGlu380にはMet51とAsn340が水素結合を取れる距離にあり、Asn340には更にGlu178が水素結合を取れる位置にあるのに対して*B. cereus* 起源の β -アミラーゼでは、これらの水素結合のネットワークが存在していない。そこで、前年度の研究において、これらの残基を*B. cereus* 型に置換した変異体(M51T, N340T, E178Y)を作製し、その至適pHを調べた結果、それぞれ、0.5-1.0pHユニットアルカリ側にシフトしていることが判明した。これらの変異体を結晶化し、マルトースとの複合体の構造解析を2.0Å分解能で決定した結果、いずれの変異体もほぼ予想通りGlu380との水素結合が消失していた。このことは、ダイズ酵素ではGlu380との水素結合がGlu380の解離型を安定化するため、そのpKaが低下し、至適pHが低下していることを強く示唆している。そこで、本研究においては、逆に*B. cereus* 起源の β -アミラーゼの対応する3個のアミノ酸残基の中で

Tyr164 と Thr328 をそれぞれ、ダイズ酵素型の Glu、および Asn に置換し、その至適 pH に及ぼす影響を検討した。その結果、*B. cereus* β -アミラーゼの至適 pH は酸性側に 1 pH ユニット以上移動し、至適 pH を植物型に変換することができた。但し、比活性は 1/2 及び 1/10 に減少していた。これらの変異に伴う構造変化の詳細を探るため、各変異体を結晶化し、X 線結晶構造解析を行った。それぞれ 2.0 および 2.1 Å で精密化した結果、Thr328Asn の変異体では触媒基である Glu367 の位置が Asn328 の影響により、野生型に比べて約 1 Å 移動していることが明らかになり、このことにより比活性は 1/10 に減少すると考えられた。また、Tyr164Glu の変異体では、Glu164 の側鎖は Thr328 ではなく、より活性部位から離れた位置に存在する Lys162 と水素結合をとっており、Thr328 と触媒基の Glu367 の配置は野生型とほぼ同じであった。これらのことから Glu364 との水素結合の有無は至適 pH の移動に直接関係しているのではないことが示された。そこで、この点を明らかにするために、Tyr164Gln の変異体を作成して、その至適 pH と構造変化を X 線結晶構造解析によって調べた結果、至適 pH はやはり酸性側に移動し、Gln164 と Glu364 の周辺構造は野生型とほぼ同一であった。これらの結果は至適 pH の変換は、触媒残基とその周辺残基との水素結合の有無だけでなく、触媒残基の周辺の静電的環境の変化に依存し、とくに Tyr164 の側鎖の影響が大きいことを示している。

β -アミラーゼそのものの機能解析のためには、ダイズ起源の酵素を用い、触媒残基の変異体、触媒残基周辺の重要と考えられるアミノ酸残基 (Lys295, Thr343) の変異体および活性部位のすぐ近くに存在する 6 残基のフレキシブルループを欠失させた変異体を作成し、その機能解析と X 線結晶構造解析を行った。その結果、それぞれの残基の酵素反応における役割を推定することができ、とくにフレキシブルループが基質のプロダクティブな結合と、生成物の遊離に不可欠であることを示すことができた。

これらの構造解析において、特に比活性の変化等、酵素の微細な構造変化に基づく機能変化を論じる場合、今まで行ってきた 2 Å 前後の X 線結晶構造解析では解析精度が不足し、水素原子を含めた精密なタンパク質構造の決定が不可欠となる。本来、結晶の分解能は結晶の大きさのみならず結晶の質によって制限があり、放射光を用いても分解能の向上が難しいことが多い。分解能の向上のためには、結晶化条件の検討、結晶凍結条件の検討のみならずタンパク質工学による目的タンパク質の部分的な改変も必要となる。このための予備実験として、約 0.5mm 角の結晶を用いてダイズ β -アミラーゼの高分解能データの収集を Spring-8 において試みた結果、マルトース複合体の結晶において 1.3 1.25 Å のデータを収集することができ、SHELX を用いた精密化によって、異方性温度因子の精密化と水素原子を含めたモデルの精密化を行い、R-factor を 11% まで下げることができた。今後、更に結晶化の条件とタンパク質の部分的改変により 1.0 Å 以上の分解能での構造解析を行い、触媒機能における水素原子の関わりについて検討していく必要がある。

以上のように本研究では、植物と微生物起源の β -アミラーゼのドメイン構造の相違を明らかにし、微生物 β -アミラーゼの C 末端 SBD の単独発現に成功した。この単離 SBD の X 線結晶構造解析を行って、他起源の SBD と比較し、 β -アミラーゼのデンプン吸着能

強化の設計を行った。また、触媒ドメインの活性部位の比較から植物型 β -アミラーゼの至適 pH を微生物型に変更することに成功し、その変異体の X 線結晶構造解析により構造上の変化を検証することができた。さらに、 β -アミラーゼの活性発現に重用な役割をするフレキシブルループの改変を行い、マルトース複合体の X 線結晶構造解析を行ってその役割を検討した。

研究組織

研究代表者： 三上文三（京都大学農学研究科 助教授）

研究分担者： な し

研究経費

平成12年度 2, 100 千円

平成13年度 1, 300 千円

計 3, 400 千円

研究発表

(1) 学会誌等

- 1) B. Mikami, M. Adachi, T. Kage, E. Sarikaya, T. Nanmori, R. Shinke, and Utsumi, S: Structure of raw starch-digesting *Bacillus cereus* β -amylase complexed with maltose. *Biochemistry* **38**, 7050-7061 (1999).
- 2) H.-J. Yoon, A. Hirata, M. Adachi, A. Sekine, S. Utsumi, and B. Mikami: Structure of separated starch-binding domain of *Bacillus cereus* β -amylase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 619-623 (1999).
- 3) E. Sarikaya, T. Higasa, M. Adachi, and B. Mikami: Comparison of degradation abilities of α - and β - amylases on raw starch granules. *Process Biochem.*, **35**, (2000).
- 4) E. Sarikaya and B. Mikami. Purification and crystallization of alpha-amylase from mucoid and non-mucoid *B. Amyloliquefaciens* strains. *J. Crystal Growth* **232** 418-420 (2001).

(2) 口頭発表等

- 1) 三上文三, 関根暁史, 安達基泰, 内海 成: ダイズ β -アミラーゼの至適 pH の変更とその X 線結晶構造解析. 日本農芸化学会大会, 平成 12 年 4 月 1 日 (東京).
- 2) 安達基泰, 内海 成, 三上文三: ダイズ β -アミラーゼの変異体 K295A の速度

論的解析とX線結晶構造解析. 日本農芸化学会大会, 平成12年4月1日(東京).

3) 尹 惠珍, 平田 章, 安達基泰, 関根暁史, 内海 成, 三上文三: *Bacillus cereus* β -アミラーゼC末端澱粉吸着ドメインのX線結晶構造解析. 日本農芸化学会大会, 平成12年4月1日(東京).

4) 三上文三: β -アミラーゼのX線結晶構造解析とタンパク質工学. ノボノルディスク酵素シンポジウム, 平成12年9月22日(東京)

5) 平田 章, 安達基泰, 内海 成, 三上文三: *Bacillus cereus* β -アミラーゼの至適pHの変換とそのX線結晶構造解析. 日本農芸化学会関西支部大会, 平成12年10月7日(奈良)

6) M. Adachi, B. Mikami and S. Utsumi: Mutation and X-ray crystallographic analysis of soybean β -amylase. 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii Dec. 16, 2000.

7) B. Mikami, N. Yoshigi, H.-J. Yoon, M. Adatchi, E. Sarikaya, A. Sekine and S. Utsumi: Structural comparison of soybean, barley and *Bacillus cereus* β -amylases. 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii Dec. 16, 2000.

8) H.-J. Yoon, M. Adachi, A. Hirata, T. Kage, E. Sarikaya, S. Utsumi and B. Mikami: X-ray crystallographic analysis of *Bacillus cereus* β -mylase and its C-terminal starch binding domain. 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii Dec. 16, 2000.

9) 安達基泰, 内海 成, 三上文三: X線結晶構造解析から見たダイズ β -アミラーゼ/マルトース複合体のpH依存性. 日本農芸化学会大会, 平成13年3月24日(京都).

10) 平田 章, 安達基泰, 内海 成, 三上文三: *Bacillus cereus* β -アミラーゼの至適pHの変換とそのX線結晶構造解析. 日本農芸化学会大会, 平成13年3月24日(京都).

11) 姜 有那, 安達基泰, 三上文三, 内海 成: アミノ酸置換によるダイズ β -アミラーゼの四量体化の試みとそのX線構造解析. 日本農芸化学会大会, 平成14年3月25日(仙台).

1 2) 三上文三, 安達基泰, 勝矢良雄, 内海 成: ダイズβ-アミラーゼ/マルトース複合体の高分解能 X 線結晶構造解析. 日本農芸化学会大会, 平成 14 年 3 月 25 日 (仙台).

(3) 出版物

1) Bunzo Mikami, Structure of b-amylase: X-ray crystallographic analysis in Glycoenzymes ed. by M. Ohnishi pp. 55-82, (2000) Japan Scientific Societies press and Karger,

研究成果

申請者はβ-アミラーゼの立体構造に基づいた酵素機能変換の可能性を追求し、ドメインに基づいた新機能β-アミラーゼの開発を可能にするために、ダイズβ-アミラーゼ、耐熱化オオムギβ-アミラーゼ、および *Bacillus cereus* β-アミラーゼの X 線結晶構造解析を行い、微生物起源のβ-アミラーゼでは C 末端に分子量約 1 万の澱粉結合ドメインが存在することを明らかにした。それぞれの酵素の触媒ドメインと澱粉結合ドメインの構造比較から部位特異的変異により新機能β-アミラーゼを設計、開発することを目指した。その結果、以下の成果を得た。

1. *Bacillus cereus* 起源のβ-アミラーゼの結晶は $P2_1$ の空間群に属し、非対称単位あたり 1 分子の酵素を含む。多重重原子置換法により、初期モデルを構築し、マルトース複合体について 2.1 Å まで、アポ酵素について 2.5 Å までのデータを用いて構造を精密化した。その結果、本酵素はダイズ酵素とほぼ共通するメインドメイン以外に C 末端に約 100 残基のドメインを持ち、このドメインはグルコアミラーゼ、シクロデキストリン合成酵素の生デンプン吸着ドメインと類似していることが明らかになった。マルトースは活性部位に 2 分子、C 末端ドメインに 1 分子、また、メインドメインの活性部位とは異なる部位に 1 分子結合しているのが明らかになった。後者は微生物β-アミラーゼにだけ保存され、今までに例のない新しいデンプン結合サイトであった。

2. *Bacillus cereus* β-アミラーゼの C 末端に存在する分子量約 1 万の澱粉吸着ドメイン部分の遺伝子を大腸菌で発現し、精製と結晶化を行った。得られた六方晶の結晶は空間群は $P6522$ であり、非対称単位あたり 1 分子の澱粉吸着ドメインを含む。その回折データをマルチワイヤードテクターで測定し、分子置換法によって構造を決定し、1.95 Å 分解能で精密化した。得られた構造をグルコアミラーゼとシクロデキストリン合成酵

素の澱粉吸着ドメインと比較した結果、後者に存在する2個の澱粉結合サイト（サイト1とサイト2）のうちサイト2が *Bacillus cereus* β -アミラーゼの澱粉吸着ドメインではアミノ酸残基の置換によるループ構造の変化のために機能していないことが示唆された。

3. *Bacillus cereus* β -アミラーゼのC末端に存在する分子量約1万の澱粉吸着ドメインの澱粉吸着能の向上を図るため、澱粉結合サイト2を構成するループの一つをシクロデキストリン合成酵素のドメインEあるいはグルコアミラーゼのC末端澱粉吸着ドメインの配列に置換した変異体を作成した。現在、その澱粉吸着能について検討している。

4. ダイズ β -アミラーゼと *Bacillus cereus* β -アミラーゼの触媒ドメインの構造の詳細な比較から、両者の至適pHの差（それぞれ5.4と7.5）は触媒残基周辺のアミノ酸残基の相違によることが推定された。ダイズ酵素の場合、塩基触媒となるGlu 380の側鎖にMet51, Asn 340の側鎖が水素結合を形成し、Asn 340の側鎖に更にGlu 178の側鎖が水素結合する水素結合のネットワークが存在するが、対応する *Bacillus cereus* β -アミラーゼのGlu 367にはこれらの水素結合は存在していない。そこで、ダイズ酵素のMet51, Asn 340, Glu 178をそれぞれ微生物型の残基であるThr, Thr およびTyrに変異した変異酵素を作製し、精製変異酵素の性質を調べた結果それぞれ約1 pH単位至適pHがアルカリ側に移動していることが明らかになった。これらの変異酵素をそれぞれ結晶化し、得られた結晶について2 Å分解能でのX線結晶構造解析を行った結果、それぞれの変異体でThr51とGlu380、Thr340とGlu380との水素結合は形成されず、Tyr178の変異体では、Tyr178のOHがAsn340の側鎖と水素結合を形成するためAsn340とGlu380との水素結合は切断されていることが明らかになった。このことはGlu380のイオン化状態がこれらの残基との水素結合により安定化され、そのpKa値が低下し、そのため至適pHがより酸性側に移行していることを示している。

5. 至適pHの制御をより明確に示すために、逆に *Bacillus cereus* β -アミラーゼのGlu376周辺のアミノ酸残基の変異について検討した。Tyr164とThr328をそれぞれ、ダイズ酵素型のGlu、およびAsnに置換し、その至適pHに及ぼす影響を検討した。その結果、*B. cereus* β -アミラーゼの至適pHは酸性側に1 pHユニット以上移動し、至適pHを植物型に変換することができた。但し、比活性は1/2及び1/10に減少していた。これらの変異に伴う構造変化の詳細を探るため、各変異体を結晶化し、X線結晶構造解析を行った。それぞれ2.0および2.1 Åで精密化した結果、Thr328Asnの変異体では触媒基であるGlu367の位置がAsn328の影響により、野生型に比べて約1 Å移動していることが明らかになり、このことにより比活性は1/10に減少すると考えられた。また、Tyr164Gluの変異体では、Glu164の側鎖はThr328ではなく、より活性部位から離れた位置に存在するLys162と水素結合をとっており、Thr328と触媒基のGlu367の配置は野生型とほぼ同じであった。これらのことからGlu364との水素結合の有無は至適pHの移動

に直接関係しているのではないことが示された。そこで、この点を明らかにするために、Tyr164Glnの変異体を作成して、その至適pHと構造変化をX線結晶構造解析によって調べた結果、至適pHはやはり酸性側に移動し、Gln164とGlu364の周辺構造は野生型とほぼ同一であった。これらの結果は至適pHの変換は、触媒残基とその周辺残基との水素結合の有無だけでなく、触媒残基の周辺の静電的環境の変化に依存し、とくにTyr164の側鎖の影響が大きいことを示している。

6. β -アミラーゼそのものの機能解析のためには、ダイズ起源の酵素を用い、触媒残基の変異体(Glu186およびGlu380)、触媒残基周辺の重要と考えられるアミノ酸残基(Lys295およびThr343)の変異体および活性部位のすぐ近くに存在する6残基のフレキシブルループを欠失させた変異体を作成し、その機能解析とX線結晶構造解析を行った。その結果、それぞれの残基の酵素反応における役割を推定することができ、とくにフレキシブルループが基質のプロダクティブな結合と、生成物の遊離に不可欠であることを示すことができた。

7. これらの構造解析において、特に比活性の変化等、酵素の微細な構造変化に基づく機能変化を論じる場合、今まで行ってきた2Å前後のX線結晶構造解析では解析精度が不足し、水素原子を含めた精密なタンパク質構造の決定が不可欠である。分解能の向上のためには、結晶化条件の検討、結晶凍結条件の検討のみならずタンパク質工学による目的タンパク質の部分的な改変も必要となる。このための予備実験として、約0.5mm角の結晶を用いてダイズ β -アミラーゼの高分解能データの収集をSPring-8において試みた結果、マルトース複合体の結晶において1.3 1.25Åのデータを収集することができ、SHELXを用いた精密化によって、異方性温度因子の精密化と水素原子を含めたモデルの精密化を行い、R-factorを11%まで下げることができた。今後、更に結晶化の条件とタンパク質の部分的改変により1.0Å以上の分解能での構造解析を行い、触媒機能における水素原子の関わりについて検討していく必要がある。

このように植物および微生物起源の β -アミラーゼの構造比較から β -アミラーゼのドメイン工学を行うのに必要な基礎的な知見を明らかにすることができた。個々の研究データについては以下の発表論文のとおりである。