

|             |                                                                                                          |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | マレ ドミンクス<br>Malle Dominggus                                                                              |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (農 学)                                                                                                |
| 学 位 記 番 号   | 農 博 第 1616 号                                                                                             |
| 学位授与の日付     | 平 成 19 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 | Structural Studies of Microbial Pullulanases by X-ray<br>Crystallography<br>(X 線結晶解析による微生物プルラナーゼの構造学的研究) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 内 海 成 教 授 三 上 文 三 教 授 松 村 康 生                                                               |

### 論 文 内 容 の 要 旨

プルラナーゼはプルランおよびデンプンの $\alpha$ -1,6グリコシド結合を特異的に加水分解する酵素であり、デンプンからグルコースおよびマルトースを工業的に生産するために利用されている。本酵素は4個あるいは5個のドメインから成り、触媒ドメインには $\alpha$ -アミラーゼファミリーの酵素とアミノ酸配列の相同性があることが知られている。他の $\alpha$ -アミラーゼファミリーの酵素が主にデンプンの $\alpha$ -1,4グリコシド結合を加水分解するのに対して、本酵素は $\alpha$ -1,6グリコシド結合のみを加水分解する。現在までプルラナーゼの立体構造は不明であったために、本酵素の反応機構やデンプンの分岐部位の認識機構には不明な点が多く残されていた。そこで、本論文では、これらの点を明らかにするために、二種類のタイプの異なるプルラナーゼを結晶化し、X線結晶構造解析法によりこれらのプルラナーゼと基質アナログとの複合体の構造を解析した。その内容の主な点は以下の通りである。

1. クレブシラ属由来のプルラナーゼ(KPP)の結晶化とX線結晶構造解析を行った。市販の酵素標品を用いて結晶化を検討し、構造解析に適した単結晶を得た。本結晶の晶系は単斜晶で空間群はC2であり、非対称単位中に1分子の酵素を含有していた。初期位相を重原子同型置換法により決定した後、アポ型とマルトースおよびマルトテトラオース(G4)複合体の立体構造を1.7-1.8 Å分解能で精密化した。得られたG4複合体の最終モデルは1052残基のアミノ酸と1197個の水分子、5個のカルシウムイオンおよび2分子のG4を含んでいた。KPPはN1, N2, N3, A, Cの5個のドメインから成り、触媒部位を含むドメインAは $\alpha$ -アミラーゼの触媒ドメインと構造類似性を持つことが明らかになった。本酵素のドメインN1は他のドメインとの相互作用が弱く、マルトース結合サイトを有することからデンプン結合ドメインとして機能することが推定された。本酵素の活性部位には2個のG4がほぼ平行に結合していた。それぞれ基質であるデンプンの主鎖の結合部位(サブサイト-1', 0', +1, +2)と $\alpha$ -1,6結合によって生じる分岐部分の結合部位(サブサイト-4, -3, -2, -1)に対応しており、本酵素は $\alpha$ -アミラーゼと共通の触媒機構によって $\alpha$ -1,6結合を加水分解すると考えられた。また、 $\alpha$ -アミラーゼではデンプンの主鎖の糖鎖を認識する部位が、プルラナーゼでは分岐部分の糖鎖を認識するために用いられていること、そしてデンプンの主鎖の糖鎖はプルラナーゼに特徴的なループ構造によって認識されていることが明らかになった。

2. パチラスズブチリス168株由来のプルラナーゼ(BSP)はKPPとはタイプが異なり、分子量が小さく、N1ドメインを有さない。BSPを大腸菌で大量発現して、その酵素的性質と結晶化条件を検討した。得られた結晶の晶系は斜方晶で空間群はP2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>であり、非対称単位中に2分子のBSPを含有すると推定された。

3. BSPのアポ型と $\alpha$ -シクロデキストリン(CD)複合体のX線結晶構造解析を行い、その構造を2.1-2.2 Å分解能で精密化した。構造決定は、KPPの構造モデルにおいてBSPと相同性のある領域のみをサーチモデルとする分子置換法によって行った。得られたCD複合体の最終モデルは非対称単位あたり712×2残基のアミノ酸と673個の水分子、2個のカルシウムイオン、2個の酢酸イオンおよび2分子のCDを含んでいた。BSPの構造はN2, N3, AおよびCの4個のドメインから成り、1個のカルシウム結合サイトの位置はKPPのカルシウム結合サイトと類似していた。BSPとKPPではN1

ドメイン以外のドメインは共通であるが、各ドメイン内で多数の挿入や欠損があり、全体の相同性は低かった。また、N2ドメインでは両者が触媒ドメインに対する配置が約 45° 異なっていた。BSP の構造を類縁酵素であるイソアミラーゼの構造と比較したところ、BSP の触媒ドメイン（ドメイン A）は KPP に加えてイソアミラーゼの触媒ドメインにも類似していることが判明した。プルラーゼの拮抗阻害剤である CD はデンプンの主鎖の還元末端側の結合サイト（サブサイト+2）付近に結合して活性クレフトを覆い、CD の空洞には Phe476 の側鎖が結合していた。そこで、Phe476 をグリシンに置換した F476G を作製し、その酵素活性を調べた結果、F476G はプルランに対する活性には変化が無いがアミロペクチンに対する活性が低下していることが判明した。従って、Phe476 はプルラーゼのデンプン基質の認識に重要であり、この部位がプルラーゼには存在するがイソアミラーゼには保存されていないことから、プルラーゼとイソアミラーゼの基質認識の相違に重要な部位であることが推定された。

## 論文審査の結果の要旨

プルラーゼは食品工業において重要な酵素であり、デンプンからグルコースおよびマルトースを生産するために用いられている。本酵素はデンプンの  $\alpha$ -1,6グリコシド結合を特異的に加水分解する酵素であり、デンプンの枝切酵素の一つであるが、その構造と機能に関しては不明な点が多い。その主な理由は X 線結晶構造解析による立体構造の研究が遅れていたことによる。本論文は、プルラーゼの構造と機能の関係を明らかにするためにクレブシラ属およびバチラス属由来の二種類のタイプの異なるプルラーゼを結晶化し、X 線結晶構造解析法によりこれらのプルラーゼと基質アナログとの複合体の構造を解析したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. 現在、工業的に用いられている酵素であるクレブシラ属由来のプルラーゼの結晶化と X 線結晶構造解析を行い、重原子同型置換法を用いて 1.8 Å 分解能でプルラーゼの構造を初めて決定した。その結果、本酵素は 5 個のドメインから成ること、触媒ドメインは  $\alpha$ -アミラーゼファミリーの酵素と類似性を有することを明らかにした。

2. クレブシラ属由来のプルラーゼとマルトースおよびマルトテトラオース複合体の構造解析の結果から本酵素の活性部位を同定した。活性部位に 2 個のマルトテトラオースがほぼ平行に結合し、それらは基質であるデンプンの主鎖と  $\alpha$ -1,6 結合によって生じる分岐部の結合サイトに相当することを明らかにした。さらに、本酵素がデンプンの分岐部位を認識する機構を詳細に解明するとともに、 $\alpha$ -アミラーゼと共通の触媒残基によって  $\alpha$ -1,6 結合を加水分解する機構を明らかにした。

3. クレブシラ属由来のプルラーゼとマルトテトラオース複合体の構造解析の結果から、本酵素の N1 ドメインがデンプン結合ドメインとして機能することを明らかにした。

4. バチラス属由来のプルラーゼの大腸菌での発現系を構築し、本酵素の大量調製を可能にした。

5. バチラス属由来のプルラーゼの結晶化に成功し、クレブシラ属由来のプルラーゼをサーチモデルとする分子置換法によってその構造を決定し、2.1 Å 分解能でその構造を精密化した。その結果、バチラス属由来のプルラーゼは N1 ドメインをもたず、触媒ドメインの構造はクレブシラ属由来のプルラーゼとイソアミラーゼの両者の触媒ドメインに類似していることを明らかにした。

6. バチラス属由来のプルラーゼと  $\alpha$ -シクロデキストリン複合体の構造を 2.2 Å 分解能で精密化した結果、 $\alpha$ -シクロデキストリンとの結合に Phe476 の側鎖が関与することを明らかにした。また、F476G の変異体において、プルランに対する活性は変わらず、デンプンに対する酵素活性が低下していたことから、Phe476 はプルラーゼのデンプン認識に重要な残基であることを明らかにした。

以上のように、本論文は、二種類のタイプの異なるプルラーゼを結晶化し、X 線結晶構造解析法によりこれらのプルラーゼと基質アナログとの複合体の構造を決定し、本酵素の基質認識機構の詳細を明らかにしたものであり、構造生物学、酵素化学さらには食品加工学に寄与するところが多い。

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19年2月15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。