

β -アミラーゼのドメイン工学

(研究課題番号 10660084)

平成10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12年3月

研究代表者 三 上 文 三
(京都大学食糧科学研究所・助教授)

京 都 大 学 図 書



9810044945

附 属 図 書 館

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高分解能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ュミ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1.95 Å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、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、0.5-1.0 pH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2.0 Å分解能で決定した。その結果、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。

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（京都大学食糧科学研究所 助教授）

研究分担者： なし

研究経費

平成8年度 2,500千円

平成9年度 1,300千円

計 3,800千円

研究発表

(1) 学会誌等

- 1) Motoyasu Adachi, Bunzo Mikami and Sigeru Utsumi: Crystal structures of recombinant soybean β -amylase complexed with β -cyclodextrin, *J. Biol. Chem.* **273**, 19859-19865 (1998).
- 2) Bunzo Mikami, Motoyasu Adachi, Takihiro Kage, Elif Sarikaya, Takashi Nanmori, Ryu Shinke and Shigeru: Structure of raw starch digesting *Bacillus cereus* β -amylase complexed with maltose. *Biochemistry* **38**, 7050-7061 (1999).
- 3) Bunzo Mikami, Hye-Jin Toon and Naohiro Yoshigi: The crystal structure of sevenfold-mutant of barley β -amylase with increased thermostability at 2.5 Å. *Biochemistry* **38**, 1235-1243 (1999).
- 4) Hye-Jin Yoon, Akira Hirata, Motoyasu Adachi, Atsusi Sekine, Shigery Utsumi, and Bunzo Mikami. Structure of separated starch-binding domain of *Bacillus cereus* β -amylase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9** 619-623 (1999).
- 5) 三上文三： β -アミラーゼのタンパク質工学 -オオムギ耐熱化 β -アミラーゼ及び微生物 β -アミラーゼの構造解析-, 京都大学食糧科学研究所報告, **61**, 62-64 (1998).

(2) 口頭発表等

- 1) 三上文三, 鹿毛滝博, 安達基泰, 内海 成, 南森隆司, 新家 龍:
Bacillus cereus β -アミラーゼ/マルトース複合体のX線結晶構造解析.
日本農芸化学会大会、平成10年4月1日 (名古屋) .
- 2) 三上文三 : 植物及び微生物 β -アミラーゼの構造と機能. 第20回
糖質シンポジウム, 平成10年7月15日 (札幌) .
- 3) 安達基泰, 三上文三, 尹 惠珍, 内海 成 : ダイズ β -アミラーゼL3loop1
欠損酵素のX線結晶構造解析. 日本農芸化学会大会, 平成11年3月31日
(福岡) .
- 4) 安達基泰, 内海 成, 三上文三, : ダイズ β -アミラーゼE186A及びE380AのX
線結晶構造解析. 日本農芸化学会大会, 平成11年3月31日 (福岡) .
- 5) Hye-Jin Yoon, Bunzo Mikami, Sekine Atsushi, Motoyasu Adachi and Shigeru
Utsumi : X-ray crystallographic analysis of isolated starch-binding domain from
Bacillus cereus β -amylase. Meeting of the Korean Society for Food Science. June. 5,
1999 Seoul, Korea.
- 6) Bunzo Mikami : Structure and Function of β -amylase studied by protein engineering
and X-ray crystallography. Fall Meeting of the Korean Society for Applied
Microbiology. Oct. 30, 1999 Kyongsan, Korea.
- 7) 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) .
- 8) 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) .
- 9) 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) .

(3) 出版物

- 1) Bunzo Mikami, Structure of β -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、触媒ドメインと澱粉結合ドメインのそれぞれの構造比較から新機能 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. サッポロビール株式会社の吉儀らによって開発された耐熱化オオムギ β -アミラーゼの結晶化を試みた結果、空間群 $P4_32_12$ の正方晶の結晶が得られた。本酵素のX線結晶構造解析をダイズ β -アミラーゼをモデルとする分子置換法により行い、2.5 Å分解能での構造を明らかにすることができた。ダイズとオオムギの β -アミラーゼは約80%の一次構造上での相同生があり、両者の立体構造もC末端部分を除いてはほぼ同様であることから、7ヶ所の部位特異的変異により達成された耐熱性の構造的知見を得ることができた。

2. *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。

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。得られた六方晶の回折データをマルチワイヤーデテクターで測定し、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。

4. *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。

5. 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）は触媒残基周囲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高分解能での X 線結晶構造解析を行う予定である。

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。