

α -アミラーゼ TVA I 改変酵素におけるドメイン B のコンフォメーション変化 Conformational change in domain B of α -amylase TVA I mutant enzyme

殿塚隆史^{1,*}, 西河淳¹, 神鳥成弘²

¹ 東京農工大学大学院農学府, 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

² 香川大学総合生命科学研究センター, 〒761-0793 木田郡三木町池戸 1750-1

Takashi Tonozuka^{1,*}, Atsushi Nishikawa¹, Shigehiro Kamitori²

¹ Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu 183-8509, Japan

² Life Science Research Center, Kagawa University, 1750-1 Ikenobe, Miki-cho 761-0793, Japan

1 はじめに

α -アミラーゼは澱粉をエンド型で加水分解する酵素で、幅広い生物種に存在する。大多数の α -アミラーゼは糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 13 に属し、 $(\beta/\alpha)_8$ バレルから成り触媒残基が存在するドメイン A、 β -サンドイッチから成るドメイン C および、ドメイン A のフォールドの途中から飛び出した小コンポーネントのドメイン B の 3 つのドメインから構成されている。ドメイン B はドメイン A から飛び出したような構造のため、基質の澱粉鎖の結合に伴い動く予測されているが、これまでドメイン B の動きを明確に示した報告はなかった。

放線菌 *Thermoactinomyces vulgaris* 由来の α -アミラーゼ TVA I は、CAZy データベースで GH13 に属し、 α -1,4 および α -1,6-グルコシド結合の両方を加水分解する酵素である。これまでに我々は、Ala363 から Asn373 までの 11 残基 (以下 Loop-11 と記載) を欠失させた、Del11 と命名した改変酵素を作製した。性質の解析の結果、 α -1,4-グルコシド結合に対する Del11 の活性は、野生型 TVA I に比べて減少したが、 α -1,6-グルコシド結合に対する Del11 の活性は、それほど大きな減少は認められなかった。Loop-11 は活性中心から遠い場所に存在するため、なぜ性質が変化したのかを調べる目的で、改変酵素の立体構造解析を行った [1]。

2 実験

TVA I の変異酵素 Del11 は、これまでに報告した野生型の調製法と同様の方法で精製、結晶化した。X 線回折強度測定は、高エネルギー加速器研究機構 PF-AR NW12A で行った。決定した構造は 5Z0U として Protein Data Bank に登録した。

3 結果および考察

TVA I Del11 変異酵素の立体構造を、1.37-Å 分解能で決定した。TVA I の構造は、ドメイン A、B、C のほか、N 末端側に存在するドメイン N から構成される。Loop-11 はドメイン A の一部であり、野生型酵素においてはドメイン B を構成するアミノ酸残基と水素結合で相互作用している (図 1A)。Loop-11 を

欠失させた酵素である Del11 の構造を野生型酵素と比較すると、ドメイン B が大きく動いていることが分かった。ドメイン B は、ドメイン A の 3 番目の β ストランド ($\beta 3$) と 3 番目の α ヘリックス ($\alpha 3$) の間に存在する。両構造を $\beta 3$ および $\alpha 3$ を基準として重ねたところ、ドメイン B はリジッドボディとして動き、最大で 1.7 Å 程度移動した (図 1B)。

Del11 ではドメイン B のコンフォメーションが変化することにより活性中心のクレフトが野生型に比べ狭くなっており、このため酵素の性質が変化したと考えられる。

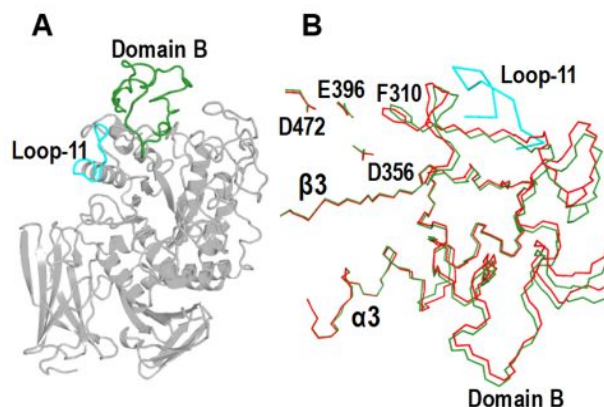


図 1 : (A) TVA I 野生型の立体構造; 水色, Loop-11; 緑, ドメイン B (B) ドメイン B の野生型 (緑) と Del11 (赤) の比較; 水色, 野生型の Loop-11, 活性中心に存在する触媒三残基 (Asp356, Glu396, Asp472) および Phe310 を示した。

4 まとめ

本研究では、TVA I 改変酵素において、ドメイン B のコンフォメーションが野生型とは異なることを示した。このようなドメイン B のリジッドボディとしての動きは、 α -アミラーゼが活性を発揮する際にも起こっている可能性が考えられる。

参考文献

[1] T. Tonozuka *et al.*, *Amylase* (De Gruyter), 2, 1 (2018).

* tonozuka@cc.tuat.ac.jp