

Rhodothermus marinus α -アミラーゼ RmGH13_47 と 反応生成混合物との立体構造解析 Structural analysis of *Rhodothermus marinus* α -amylase RmGH13_47 soaked with a mixture of reaction products

殿塚隆史*, 宮坂祐希, 横山 紘平, 小菌拓馬, 西河淳

東京農工大学大学院農学府, 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

Takashi Tonozuka*, Yuki Miyasaka, Kohei Yokoyama, Takuma Kozono, Atsushi Nishikawa
Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu 183-8509, Japan

1 はじめに

好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* の α -アミラーゼ RmGH13_47 は、澱粉を分解する活性のみならず、多糖プルランを分解する活性や α -1,6-グルコシル転移活性を示す、多機能な性質を持つ酵素である。RmGH13_47 の属する糖質加水分解酵素ファミリー 13 サブファミリー-47 (GH13_47) は、2023年に設けられた GH13 の新規なサブファミリーで、その構造機能相関の報告は少ない。

RmGH13_47 はマルトテトラオース以上の重合度のマルトオリゴ糖を基質として糖転移反応を進行させ、オリゴ糖の混合物を生成する。オリゴ糖の混合物を精製分離しそれぞれを解析するのは手間がかかるため、ここでは、酵素の触媒残基に変異を導入した結晶を作製し、反応で生成した混合物をそのままソーキングすることで、酵素反応の解析を試みた。

2 実験

RmGH13_47 はドメインが N1-N2-N3-A-B-C-D と名付けられたマルチドメインで構成されている。ドメイン N1、N2、D を削除した酵素 RmGH13_47 N3ABC の構造解析は、PF Activity Report 2022 で報告した [1]。ここでは、RmGH13_47 N3ABC の触媒残基 Asp563 を Ala に置換した酵素の結晶を作製した。RmGH13_47 N3ABC をマルトテトラオースに作用させ、得られた反応生成混合物をクライオプロテクト剤に添加したものに結晶をソーキングし、AR NE-3A ビームラインで収集した回折データにより立体構造を決定した [2]。

3 結果および考察

RmGH13_47 N3ABC D563A には、二つの糖の電子密度が観察された。一つは分岐 5 糖 6^2 - α -maltosyl-maltotriose (以下 B5) がドメイン A と B の間の活性中心のポケットに結合していた。もう一つは、マルトトリオース (以下 G3) がドメイン A に結合していた。立体構造中に観察された B5 は、恐らく RmGH13_47 N3ABC の α -1,4-結合分解活性と α -1,6-グルコシル転移活性により生じたものと考えられた。

分岐 5 糖 B5 は、マイナス側のサブサイトに結合しており、プラス側のサブサイトには電子密度は見られなかった。B5 はマルトトリオースとマルトースが α -1,6-結合でつながった構造であり、マルトトリオース部分を認識するサブサイトは -1、-2、-3、マルトース部分を認識するサブサイトは -3'、-4' と表記できる (図 1)。B5 と相互作用するアミノ酸残基は、サブサイト -3' (図 1 の緑)、-4' (オレンジ) では多数存在するが、サブサイト -3 のグルコースユニットと相互作用するアミノ酸残基は Phe530 のみ (青) であった。

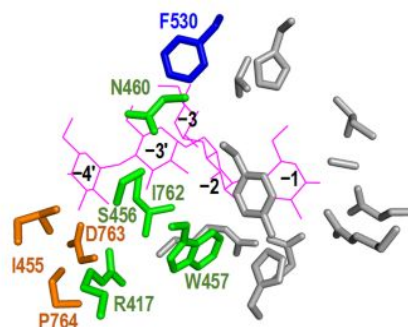


図 1 : 分岐 5 糖 B5 (マゼンタ) およびこの糖と相互作用するアミノ酸残基

サブサイト -1 および -2 と相互作用するアミノ酸残基はグレーで示した

4 まとめ

B5 を認識するアミノ酸残基は、サブサイト -3' および -4' では多数存在するのに対し、サブサイト -3 では 1 残基しか認められなかった。このことから、RmGH13_47 は α -1,6-結合を持つ分岐グルカン鎖に特異性を示す酵素であると推測された。

参考文献

- [1] T. Tonozuka *et al.*, PF Activity Report 2022, 52 (2023).
[2] Y. Miyasaka *et al.*, *Proteins*, doi: 10.1002/prot.26695 (2024).

* tonozuka@cc.tuat.ac.jp