

マルトヘキサオース生成 α -アミラーゼの結晶構造 Crystal structure of maltohexaose-producing α -amylase

藤本瑞*, 岸根尚美, 門間充

農業・食品産業技術総合研究機構 高度分析研究センター,
〒305-8518 茨城県つくば市観音台 2-1-2

Zui FUJIMOTO, Naomi KISHINE and Mitsuru MOMMA

Research Center for Advanced Analysis, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, Japan

1 はじめに

Klebsiella pneumoniae 由来マルトヘキサオース生成アミラーゼ (KpG6Amy) は、酵素反応の初期段階でデンプンや短鎖アミロース等の基質の非還元末端からマルトヘキサオース単位で α -1,4 結合を切断する GH13 ファミリー α -アミラーゼ様酵素である。本酵素の基質認識や、一般的な α -アミラーゼとは異なる Exo-type の反応機構を明らかにすることを目的として X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

大腸菌で生産した KpG6Amy の結晶を用いて KEK-PF で X 線回折測定を行い、native 結晶で分解能 2.2Å のデータを取得した。重原子テルビウムの誘導体結晶を作製し SAD 法による位相付けを行い、立体構造を決定した。さらに N ドメイン欠損 KpG6Amy (KpG6Amy Δ N) にマルトヘキサオースをソーキングして得た複合体の構造解析も行った。

3 結果および考察

KpG6Amy は他の GH13 に属する α -アミラーゼと同様のドメイン構造 A,B,C に加え、 β -シートよりなる本酵素に特徴的な N ドメインを含めた 4 ドメイン構造を有していた (図 1 A)。非結晶単位には酵素 2 分子が存在し、基質結合部位が相互作用して結晶中での基質の結合を阻害していたため、異なる晶系の KpG6Amy Δ N 結晶を用いたマルトヘキサオースとの複合体構造解析により、糖の結合構造が決定された (図 B)。

加水分解が起こる触媒部位より 6 グルコース分離れた位置にマルトヘキサオースの非還元末端のグルコースの結合が観察された。この基質結合クレフトは通常より長い B ドメインにより形成されていた。

N ドメインは、 α -グルカンを認識することで知られる CBM69 と共通の構造的特徴を有しながらも、他の酵素で見られる糖結合アミノ酸は保存されておらず、複合体構造でも糖の結合は見られなかった。

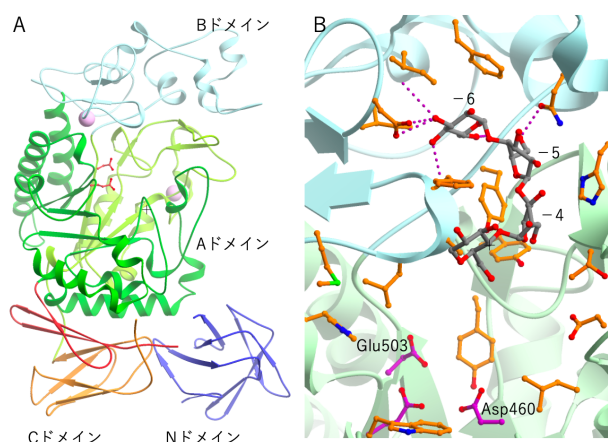


図 1 : KpG6Amy の結晶構造

A : KpG6Amy のリボンモデル。触媒アミノ酸を赤、カルシウムイオンをピンクで示す。

B : マルトヘキサオース結合構造。非還元末端の 4 グルコースが観察された。

4 まとめ

KpG6Amy の特長的な生成物特異性は、基質の非還元末端の 6 グルコース単位を認識するサブサイト構造に起因することが明らかとなった。

謝辞

X 線回折データ測定においては PF スタッフの方々に大変お世話になりました。ここに感謝致します。

参考文献

- [1] M. Momma and Z. Fujimoto, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **60**, 2352-2354 (2004)
- [2] Z. Fujimoto *et al.*, *J. Biochem.* (2025) doi: 10.1093/jb/mvaf034

* zui@affrc.go.jp