

## 耐熱化 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの立体構造解析 Structural characterization of a thermostabilized $\beta$ -fructofuranosidase

殿塚隆史<sup>1,\*</sup>, 横井岳<sup>1</sup>, 盛まりな<sup>1</sup>, 佐藤祥名<sup>1</sup>, 宮崎剛亜<sup>1</sup>, 西河淳<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京農工大学大学院農学府, 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

Takashi Tonozuka<sup>1,\*</sup>, Gaku Yokoi<sup>1</sup>, Marina Mori<sup>1</sup>, Shona Sato<sup>1</sup>, Takatsugu Miyazaki<sup>1</sup>, and Atsushi Nishikawa<sup>1</sup>

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

### 1 はじめに

酵素の温度安定性の向上は、酵素の産業利用の観点からニーズの高い課題であると言える。特に、多くのタンパク質の立体構造のデータが利用できる現在、立体構造情報をもとに、部位特異的変異を導入し酵素を耐熱化する簡便な方法の開発が望まれる。

我々は、*Microbacterium saccharophilum* の生産する  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ (以下 MsFFase) の立体構造を報告している[1]。海洋研究開発機構と塩水港精糖のグループにおいて、MsFFase にランダム変異を導入して耐熱化酵素を取得し、最も耐熱性が向上した酵素では 60°Cにおける温度安定性が野生型の 16.5 倍となった。本研究では、耐熱化 MsFFase の立体構造解析を行い、その耐熱化機構を解明することを目的とした。

### 2 実験

耐熱化 MsFFase では、5つのアミノ酸残基について野生型とは異なる残基に置換されていた。これらの変異は Thr47→Ser、Ser200→Thr、Phe447→Val または Pro、Phe470→Tyr、Pro500→Ser である。本研究では 4 重変異体 T47S/F447V/F470Y/P500S および T47S/S200T/F447V/P500S、最も耐熱性が向上した酵素である 5 重変異体 T47S/S200T/F447P/F470Y/P500S について、大腸菌で発現させ精製、結晶化を行い、立体構造を決定した。

### 3 結果および考察

MsFFase は、 $\beta$ -プロペラより成る触媒ドメイン、および、C 末端側に  $\alpha$ -ヘリックスから成る小ドメインから構成されている。5 つの変異のうち、Thr47→Ser、Phe447→Val/Pro、Pro500→Ser は触媒ドメインに存在する活性中心から離れた残基の変異であり、Ser200→Thr、Phe470→Tyr は活性中心を形成するクレフト内の残基の変異であった。

耐熱化機構は各変異によってさまざまであり、Thr47→Ser は表面に露出する疎水性領域の減少、Ser200→Thr は側鎖のゆらぎの解消、Phe470→Tyr および Pro500→Ser は近傍の残基や水分子との新たな水素結合の形成によるものと考えられた。

変異の中で最も特徴的なのが、Phe447 の変異である。Phe447→Val においては、447 番目のアミノ酸残基に近接する His477 のコンフォメーションが変化

し、その結果、His477 と Pro445 の間に水素結合が新たに形成されることが分かった (図 1)。さらに、Phe447→Pro においては、His477 と Pro445 の間の水素結合の形成に加え、447 番目の残基を Pro に置換したことにより  $\beta$  ターンが安定化することにより、さらなる耐熱化に至るものと考えられた[2]。

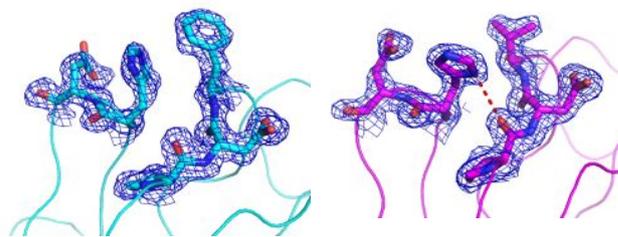


図 1 : 野生型 (シアン) および Phe447→Val (マゼンタ) の立体構造。Phe447→Val では隣接するペプチド鎖間に赤で示す水素結合が形成されることが分かった。

### 4 まとめ

耐熱化 MsFFase の立体構造から、耐熱化の機構を解明することに成功した。今後、酵素の耐熱化を立体構造情報よりデザインする際に、本研究成果の活用が期待される。

### 謝辞

本研究は、海洋研究開発機構の太田ゆかり、秦田勇二、日高 祐子、嶋根康弘、臼井けい子、および塩水港精糖の伊藤哲也、藤田孝輝 (以上敬称略) のグループに酵素をご提供いただきましたので、ここでお礼申し上げます。

### 参考文献

- [1] T. Tonozuka et al., *Enzyme Microb. Technol.* **51**, 359 (2012).  
[2] Y. Ohta et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press (2014). DOI 10.1007/s00253-014-5645-3

\*tonozuka@cc.tuat.ac.jp