

令和元年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04909

研究課題名(和文)食糧関連タンパク質・酵素の機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of food proteins and food-related enzymes.

研究代表者

三上 文三(Mikami, Bunzo)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：40135611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の機能はタンパク質の構造変化によって発揮される。タンパク質の構造変化を研究する手段としてはX線結晶構造解析が有効であるが、構造変化を見るためには対象部位の構造変化を観察できる結晶を選択し、pHや基質アナログの濃度等の変化による構造変化を定量的に捉える必要がある。このためには凍結法のみならずキャピラリーを用いた非凍結法を用いる必要がある。本研究では食糧関連酵素として-アマラーゼ、プルラナーゼ、プロテイングルタミナーゼ等を取り上げ、変異体を用いて基質アナログの濃度変化とpH変化に伴う酵素の構造変化を定量的に捉えることにより、これらの酵素の新たな機能の解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までに数多くのタンパク質や酵素の構造がX線結晶構造解析によって決定されているが、その働きを理解するためには、実際にタンパク質や酵素が働くところ、つまりタンパク質の構造変化を正しく捕らえる必要がある。本研究では、凍結法のみならず非凍結状態での構造解析を行うことによって食品加工に関連する酵素(-アマラーゼ、プルラナーゼおよびプロテイングルタミナーゼ)の今まで知られていなかった機能を明らかにすることができた。酵素の働きを正しく理解することによって、より優れた酵素の設計が可能になる。

研究成果の概要(英文)：Proteins and enzymes can work through their conformational changes during interaction with substrate and ligands. These conformational changes can be detected by X-ray crystal analysis. But sometimes it is difficult to study about the conformational change owing to bad packing in the crystal lattice. It is also affected by "freezing of protein crystals" and cryo-protectants that usually interact with protein active site. We have to use non-freezing structure especially to observe the effect of pH. In the present work, I have studied about the function of food-related enzymes such as beta-amylase, pullulanase and protein glutaminase by X-ray crystal analysis with freezing and non-freezing (capillary) methods. I could get the fine structure changes in the active site of beta-amylase/substrate complexes caused by pH. The functions of pullulanase and protein glutaminase were also studied using mutant and complex crystals.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 タンパク質工学 酵素工学 X線結晶構造解析 アミラーゼ プルラナーゼ プロテイングルタミナーゼ

1. 研究開始当初の背景

申請者はこの25年間に数多くの食糧関連酵素および食糧タンパク質の立体構造を明らかにしてきた。その結果、これらのタンパク質の機能発現にはドメインや可動ループ部分の構造変化が大きく関わっていることが判明し、タンパク質の構造変化のメカニズムの解明とその応用についての研究が必要であることを痛感した。構造変化する部分はそれぞれのタンパク質の中で様々な形態を持ち、特有の機能を担っている。タンパク質の構造変化は様々な条件での結晶を用いた解析により見つかることが多く、結晶中でのタンパク質の配置によっては構造変化の検出が困難なことも多い。構造変化を研究するためには可動部位が自由に動くことのできる空間配置を持つ結晶を調製する必要があり、構造変化とその要因となるリガンド濃度やpHとの定量的な関係を明らかにする必要がある。現在の結晶構造解析のほとんどは、より高い分解能を得るため凍結結晶を用いて行われているが、凍結結晶を用いた解析では結晶格子の縮小やpH変化のため構造変化を評価することが難しく、非凍結結晶を用いた解析と併用することが必要である。本研究は結晶構造解析を単に構造を決定する手段ではなく、結晶中の酵素反応を直接見る方法、つまり酵素の機能解析法として用いる点で特色があり、非凍結結晶を用いた解析を行い、タンパク質の構造変化を正しく捉えることに注力し、今まで解明できなかった食品関連タンパク質および酵素の構造と機能についての謎を明らかにする。

2. 研究の目的

タンパク質の機能はタンパク質の構造変化によって発揮される。タンパク質の構造変化を研究する手段としてはX線結晶構造解析が最も有効であるが、タンパク質は結晶中に固定されるために、構造変化を見るためには対象部位の構造変化が観察できる結晶を調製し、pHや濃度変化した多数の測定を行って構造変化を定量的に捉える必要がある。本研究では食糧関連酵素としてβ-アミラーゼ、プルラーゼ、プロテイングルタミナーゼ、及び食糧タンパク質としてS-オボアルブミンとオボトランスフェリンを取り上げ、これらの酵素の構造変化と機能との関連を非凍結法(キャピラリー法)と凍結法を駆使して解明し、新機能設計を行うことを目的とする。これらの酵素とタンパク質は実際に食品産業において用いられているものであり、その機能強化が必要とされていることから、本研究の成果は直ちに応用研究に利用できるものである。

(1) ダイズβ-アミラーゼ (SBA)

β-アミラーゼはデンプンからマルトースの工業的生産に不可欠な酵素である。ダイズ由来の酵素[1,2]は(α/β)₈バレルを基本骨格とし、Glu186(酸触媒)とGlu380(塩基触媒)の触媒残基がサブサイト-1と+1の間に配置され、グリコシド結合の加水分解によりデンプンの非還元末端よりマルトースを遊離する。本酵素の活性部位にはGly96からAsn104までの9残基のフレキシブルループとAsn340からGlu345までの6残基のインナーループの2種類の可動ループが存在し(図1)、これらが順に動いて酵素反応が進行すると考えられている。インナーループの上の残基であるThr342の変異体の機能解析によって、インナーループの構造変化は基質の切断によって引き起こされ、アポ型ではサブサイト-1のグルコース残基を固定し、触媒残基のGlu186を安定化すること、プロダクト型では生成物の遊離を促進するが、サブサイト+1のグルコース残基との相互作用は維持し、基質の連続的な分解に役立つことが推定された[2]。一方、フレキシブルループはより大きな構造変化を起こし、閉じた状態で触媒部位を溶媒と遮断し、ループ上のAsp101とVal199の側鎖がそれぞれサブサイト-2と+2のグルコース残基と相互作用して基質を固定すると考えられている。また、ループが閉じた状態では生成物のマルトースは遊離できず、フレキシブルループの開閉は酵素反応に同期すると推定される。本研究では、これらのループが結晶中で自由に動くことのできる三方晶の結晶を用い、結晶中での酵素の挙動を基質濃度とpHを変数として徹底的に調べ、本酵素のループ開閉の機構と触媒機構の全容を明らかにする。

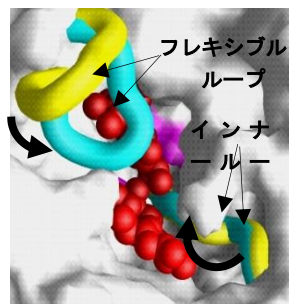


図1. β-アミラーゼの活性部位。赤は結合している2分子のマルトースを、左上と右下はフレキシブルループとインナーループを示し、その動きを黄色と水色で示している。

(2) プロテイングルタミナーゼ (PG)

PGはシステインプロテアーゼと同様のCys-His-Aspの活性中心を持ち、タンパク質のGln側鎖をGluに加水分解する酵素である。PGは食品タンパク質の物性改善に利用されている。本酵素は、不活性なプロ型酵素として生合成された後にプロ領域が除去されて成熟酵素となる。申請者らは成熟体とプロ体の構造を明らかにし、活性ポケットの上部に位置するプロ領域のループ上のAla47をGlnに変異することで、基質複合体構造を明らかにした[3](図2)。これらの知見を基に変異体を系統的に作製して、本酵素の触媒機構を解明する。

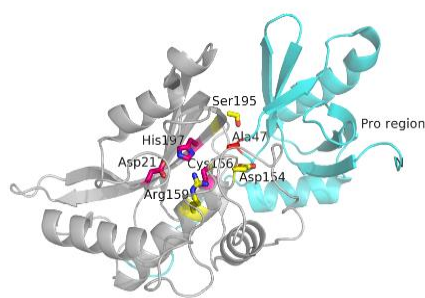


図2 PGのプロ体の構造。プロ領域は水色で示す。活性部位はCys156、His97およびAsp21から成る。活性部位の入口に存在するAsp154とSer195、内部のCys159に近いArg159に変異を導入した。Ala47は以前の変異アミノ酸である。

(3) プルラーゼ

申請者らは*Klebsiella pneumoniae*由来のプルラーゼ(KPP)の立体構造を初めて明らかにし、オリゴ糖との複合体の構造からプルラーゼの基質認識と反応機構について推定した(図3)[4]。しかし、この際に用いた結晶では、シクロデキストリン(CD)との複合体は得られず、本酵素とβ-CDとの特異な相互作用

について調べることはできなかった。また、複合体で見出された本酵素の induced-fit motion については、不明な点が多いことから本酵素の変異体と基質との複合体を用いてこれらの点を解明する。

3. 研究の方法

(1) β -アミラーゼの反応機構の解析
SBA の結晶は凍結法によって 1.0 Å 分解能まで解析できることを明らかにしている。申請者は野生型の酵素についてマルトース (G2、生成物) を基質アナログとして用い、G2 の濃度を変化させて回折データを収集し、G2 とそれぞれのループの状態の占有率を精密化することによってループの構造変化を正確に決定した。しかし、結晶中の pH を変化させた実験を行ったところ、凍結結晶から得られた構造の pH 変化には再現性が無く、凍結結晶を用いた解析は不適切であることが示された。そこで、キャピラリー結晶を用いて構造の pH 依存性を調べたところ、その構造変化は pH 変化を正しく反映していた。今回、非凍結結晶を用いた解析を異なる基質と多数の変異体を用いて行い、本酵素反応機構の謎を解明する。回折データの収集のために既設のマルチワイヤーデテクターを用いて結晶の選別を行い、実際の測定は高輝度光科学研究センター (SPring-8) の共用ビームライン (BL26B1 と BL38B1) で行う。データ処理の効率化と構造の精密化計算の効率化を図るために高速コンピュータシステムを購入する。

(2) プロテイングルタミナーゼ (PG)

PG の成熟体の活性ポケットは狭く、その底には触媒残基の Cys156 が配置され、基質タンパク質の Gln 側鎖がこのポケットに入り込み、Glu 側鎖に変換される (図 2)。申請者は、プロ領域のループ上の Ala47 を Gln に置換した Gln47 のカルバミド基が Cys156 の S 原子と共有結合を形成することを明らかにした [3]。さらに、一連の構造解析から、結晶化条件にアンモニアイオンを含まない場合は S-アシル中間体は形成されず、Gln 側鎖との ES 複合体が形成されていること、Ala47 を Glu に置換した酵素の場合も同様の結果が得られることを明らかにした。この結果は、本酵素の活性ポケットの中では逆反応が生じていることを示している。従って、活性ポケット入口周辺の残基が本酵素の生成物選択性を決定し、その変更により逆反応を触媒する酵素の設計が可能になると考えられた。活性ポケット入口に存在する Asp54、Ser195 およびポケット内部の Arg159 の変異体を作製し、その活性と構造を明らかにする。本研究は京都大学農学研究科の修士 2 年生の田中智紀が担当する。

(4) プルラーナーゼの CD 阻害と induced-fit motion の解析

以前に報告した KPP の結晶は C2 の空間群に属する結晶であり [4]、結晶内でのパッキングにより、CD の結合が困難なことが推定された。そこで、 α 、 β 、 γ -CD との共結晶化のスクリーニングを行う。これら 3 種類の中で β -CD が本酵素を強く阻害し、その結合は β 、 γ -CD よりも 100 倍以上強いことが報告されている。この理由を探るために各 CD の濃度を変化させて本酵素との共結晶化を行い、得られた結晶の構造解析を行う。また、本酵素の酸触媒残基の Glu706 を含む数残基のループが induced-fit motion を生じる [4] が、このループ部分に存在する Leu が他のプルラーナーゼでは Gly である点に着目して、KPP の大腸菌での発現系を構築し、Leu680 を Gly に変異した酵素 (Pu1A-G680) の結晶化と G3 複合体の結晶構造解析を行う。本研究は京都大学農学研究科の博士課程在学の坂直樹が担当する。

4. 研究成果

(1) SBA と基質アナログ複合体の構造変化の pH 依存性

① G2 複合体の pH による構造変化

前述したように野生型についての解析は完了したので、変異体酵素を用いて同様の実験を行った。本酵素のインナーループの動きに重要な Thr342 の変異体である T342V およびサブサイト -2 に存在する活性に重要な残基である Lys295 の変異体である K295A を用いて同様の実験を行った結果、図 4 に示すように K295A 変異体では野生型に比べて、pH 変化がより中性側にシフトし、T342V 変異体では pH 変化は消失する。この結果は、-1 サイトに結合する糖のイス型からボート型への構造変化には、活性部位の productive な構造が重要であることを示している。図 4 に示すボート型の O1 の位置は触媒水の結合する位置と 0.6 Å の距離で一致している。野生型で見出された $pK_a=4.3$ の変化は塩基触媒残基の解離を示している可能性が高い。また、K295 の側鎖は -1 サイトに結合するグルコース残基の O6 および Glu380 の側鎖と水素結合を形成し、Glu380 の pK_a の低下に寄与し、そのため K295A では Glu380 の pK_a が 6.4 まで上昇すると考えられる。一方、Thr342 の主鎖の O と側鎖の O γ 1 は Glu186 の側鎖と水素結合を形成する。さらに Cy2 は Glu380 の側鎖とファンデアワールス相互作用する。T342V 変異体ではインナーループがプロダクト型に固定され、酵素活性は 8% まで低下し、-2~-1 サイトに結合する G2 への親和力が 10 倍以上低下する。このためボート型への変化は生じないと考えられる。

② E380A 変異体と G5 との複合体の pH による構造変化

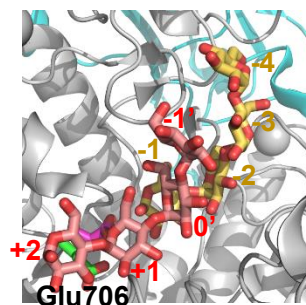


図 3. プルラーナーゼと G4 複合体の構造。2 分子の G4 分子がサブサイト+2~-1' と -1~-4 に結合している。酵素の切断部位は+1 と-1 の間にある。酸触媒残基である Glu706 の側鎖はアポ型 (緑) から基質結合型 (紫) へ構造変化する。

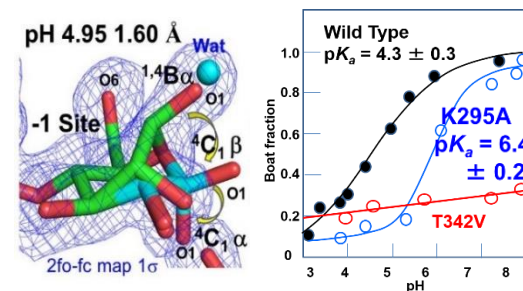


図 4 SBA/G2 複合体の-1 サイトに結合する糖の構造変化と pH 依存性に及ぼすアミノ酸変異の影響

実際の基質であるマルトペンタオース (G5) を用いて複合体の pH 依存性を調べた。この場合は野生型酵素を用いることができないので、E380A 変異体を用いて実験を行った。その結果、高い pH で -1 サイトに結合するグルコース残基の位置が異なることが明らかになった。+1 サイトのグルコース残基の O4 の結合位置を pH3.80 を基準として pH に対してプロットすると pH8.68 では約 2.0 Å 移動していることがわかり、この構造変化には $pK_a=7.9$ の解離基が関与していることが判明した (図 5)。 $pK_a=7.9$ の残基は、その値から、本酵素活性の pH 依存性から推定されている酸触媒残基である Glu186 ($pK_a=8.1$) であると推定された。この結果は、-1 サイトに結合する基質のグルコース残基の productive な結合には酸触媒残基の非解離状態が必要であることを示している。

③ Glc 複合体の pH による構造変化

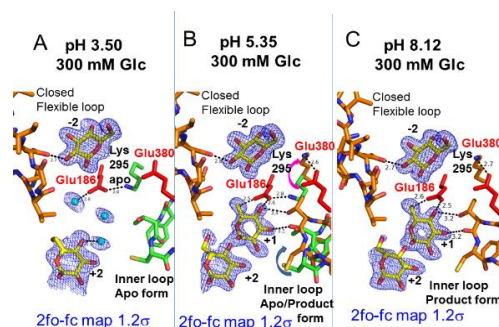


図 6 野生型酵素と G1 の複合体の構造に及ぼす pH の影響。A は pH3.50、B は pH5.35、C は pH8.12 の結果

SBA と Glc との結合は pH の影響を強く受けることが明らかになった。図 6 に複合体の pH による構造変化を示す。pH3.50 では Glc は -2 と +2 サイトに結合し、インナーリングはアポ型であるのに対して、pH5.35 では G1 は -2、+1 および +2 サイトに結合するようになり、インナーリングはアポ型とプロダクト型の両方の構造が見えている。さらに、pH8.12 では Glc は -2、+1 および +2 サイトに結合し、インナーリングはプロダクト型のみになる。このことは +1 への G1 の結合とインナーリングのアポ型からプロダクト型への構造変化が関連し、両者が共通の解離基の影響を受けていることを示唆する。多数の pH で測定した結果 (図 7) の結果から $pK_a=3.9$ の残基が両者の構造変化を制御し、それは塩基触媒残基である Glu380 であると推定された。SBA の基質アナログの結合と pH 変化による実験結果をまとめると図 8 のようになり、G2 複合体では pH によって -1 サイトに結合したグルコース残基のイス型からボート型への構造変化見られ、この変化 ($pK_a=4.3$) には塩基触媒残基である Glu380 の解離が関係すると推定された。また、E380A 変異体と G5 との複合体の pH による構造変化の影響から $pK_a=7.9$ の酸触媒残基が -1/+1 サイトの構造変化に関与することが推定された。さらに Glc 複合体の解析によって +1 サイトへの Glc の結合とインナーリングの構造変化は $pK_a=3.9$ の塩基触媒残基の影響を強く受けていることが推定された。

(3) プロテイングルタミナーゼ (PG)

PG の触媒ポケット入口で基質認識に関わると考えられる Asp154 と Ser195 および内部にあって反応機構に関係する Arg159 (図 2) の変異体として、D154A、D154S、D154N、S195A、S195N、R159A、R159E の結晶化を行い、構造の精密化を 1.7~2.6 Å 分解能で行った。その結果、Asp154 と Ser195 の変異体では大きな構造の変化は見られなかったが、Arg159 変異体では野生型とは異なる水分子との水素結合が見られた。プロ体 PG のプロ領域をトリプシンにより切断した後、精製し、各変異体 PG の酵素活性を調べた結果 (表 1)、Asp154 変異体では全変異体において活性の低下が見られた。このことから、Asp154 の負電荷が PG の反応を進める上で重要な役割を果たしていることが示唆された。また、Arg159 変異体においても活性の低下が見られ、基質のグルタミン残基と触媒ポケット内の水分子の距離が重要であると推定された。一方、Ser195 変異体では活性の大きな違いは見られなかった、PG の逆反応については野生型及び作製した各変異体について活性の有無を調べた結果、野生型及び変異体では逆反応活性は認められなかった。

(4) プルラーナーゼの CD 阻害と induced-fit motion の解明

① KPP と CD の相互作用様式の解明

KPP/CD 複合体結晶の空間群は従来の $C2$ とは異なり $P4_32_12$ であった。構造解析の結果、CD は KPP の N 末端に存在する CBM41 と A ドメインの活性部位の二か所に結合した (図 9A)。CBM41 との相互作用は CD の種類と濃度によって差はない。活性部位には α と γ -CD は 10mM の濃度でのみ結合するが、 β -CD は 0.1mM の濃度でも結合していた。いずれの CD も活性クレフトに存在する Phe746

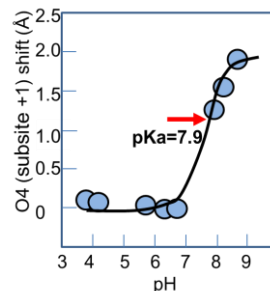


図 5 E380A/G5 複合体の pH 変化による +1 サイトの O4 の位置の変異

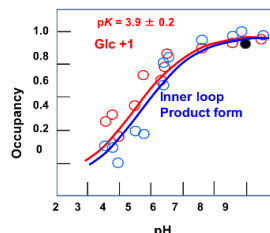


図 7 SBA/G1 複合体の構造に及ぼす pH の影響。赤は +1 サイトに結合する G1 の占有率を青はプロダクト型のインナーリングの占有率を示す。

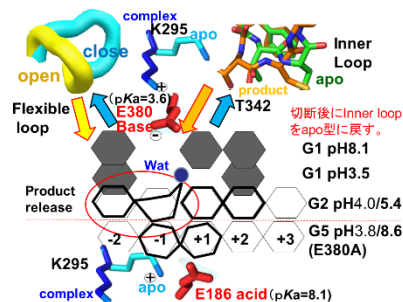


図 8 β -アミラーゼにおける基質アナログの結合と pH 変化による構造変化のまとめ

表 1 PG 変異体酵素の酵素活性

Enzyme	k_{cat} (min^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), %
Wild	2690	2.06	1310 100
D154A	N. D.	N. D.	N. D. N. D.
D154S	1020	14.2	71.9 5.51
D154N	1216	1.99	611 46.8
S195A	2460	2.91	846 64.8
S195N	2275	2.33	978 74.9
R159A	N. D.	N. D.	N. D. N. D.
R159E	259	1.97	131, 10.1

の側鎖を CD の環の中に包接するが、その相互作用は CD の環の大きさに依存する。 α -CD は Phe746 の側鎖と多くの衝突をし (図 9B)、 γ -CD はほとんど相互作用をとらない (図 9D) のに対して、 β -CD は環の内部と多くの適切な相互作用をとっていることが明らかになった (図 9C)。この結果を検証するために、Pu1A とその F746A 変異体を作製して CD の阻害定数を求めた結果、F746A では全ての CD の阻害定数が大きくなり、特に β -CD では 1000 倍以上大きくなった。以上より、 β -CD が KPP を強く阻害する理由は β -CD と Phe746 との最適な相互作用に起因することを明らかにした。

②KPP の induced-fit motion の解析

KPP の induced-fit motion を示すループ 706-710 のすぐ近くに存在する Leu680 が他のプルラーナーゼでは Gly で保存されていることから、Pu1A-G680 および Pu1A-L680 を大腸菌で発現させた。結晶構造解析から Pu1A-G680 はループ構造がアポ体と G3 複合体で変化しないが、Pu1A-L680 ではアポ型においてループ構造が異なっていた。Gly680 は Glu706 と Ser710 とのみ相互作用していた (図 10 A, B) が、Leu680 はループの全ての残基と衝突する距離にあることが判明した (図 10 C, D)。以上より、ループ 706-710 の構造変化は KPP に存在する Leu680 とループとの相互作用に起因することを明らかにした。

<引用文献>

- Kang Y.N., Adachi M., Utsumi S., Mikami B. The roles of Glu186 and Glu380 in the catalytic reaction of soybean beta-amylase. *J. Mol. Biol.*, **339**, 1129-1140 (2004).
- Kang Y.N., A. Tanabe A., Adachi M., Utsumi S., Mikami B. Structural analysis of threonine 342 mutants of soybean beta-amylase role of a conformational change of the inner loop in the catalytic mechanism. *Biochemistry*, **44**, 5106-5116 (2005).
- Hashizume R., Maki Y., Mizutani K., Takahashi N., Matsubara H., Sugita A., Sato K., Yamaguchi S., Mikami B. Crystal structures of protein-glutaminase and its pro forms converted into enzyme-substrate complex. *J. Biol. Chem.*, **286**, 38691-38702 (2011).
- Mikami B., Iwamoto H., Malle D., Yoon H.J., Demirkan-Sarikaya E., Mezaki Y., Katsuya Y. Crystal structure of pull-ulanase: evidence for parallel binding of oligosaccharides in the active site. *J. Mol. Biol.* **359**, 690-707 (2006).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文等] (計 12 件)

- Nakamichi Y., Oiki S., Mikami B., Murata K., Hashimoto W. Conformational Change in the Active Site of Streptococcal Unsaturated Glucuronidase Through Site-Directed Mutagenesis at Asp-115. *Protein J.* 査読有 **35**, 300-309 (2016). DOI: 10.1007/s10930-016-9673-y.
- Zhang S., Zang J., Zhang X., Chen H., Mikami B., Zhao G. "Silent" Amino Acid Residues at Key Subunit Interfaces Regulate the Geometry of Protein Nanocages. *ACS Nano*. 査読有 **10**, 10382-10388 (2016). DOI: 10.1021/acsnano.6b06235.
- Kobayashi J., Yoshida H., Yagi T., Kamitori S., Hayashi H., Mizutani K., Takahashi N., Mikami B. Role of the Tyr270 residue in 2-methyl-3-hydroxy-pyridine-5-carboxylic acid oxygen-nase from *Mesorhizobium loti*. *J Biosci. Bioeng.*, 査読有 **123**, 154-162 (2017). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016. 07. 022.
- Oiki S., Kamochi R., Mikami B., Murata K., Hashimoto W. Alternative substrate-bound conformation of bacterial solute-binding protein involved in the import of mammalian host glycol-saminoglycans. *Sci. Rep.* 査読有 **7**, 17005 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-16801-8.
- Oda M., Inaba S., Kamiya N., Bekker G.J., Mikami B. Structural and thermodynamic characterization of endo-1,3- β -glucanase: Insights into the substrate recognition mechanism. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 査読有 **1866**, 415-425 (2018). DOI: 10.1016/j.bbapap.2017. 12. 004.
- Uchida H., Mikami B., Yamane-Tanabe A., Ito A., Hirano K., Oki M. Crystal structure of an aldehyde oxidase from *Methylobacillus* sp. KY4400. *J. Biochem.* 査読有 **163**, 321-328 (2018). DOI: 10.1093/jb/mvy004.
- Saka N., Iwamoto H., Malle D., Takahashi N., Mizutani K., Mikami B. Elucidation of the mechanism of interaction between *Klebsiella pneumoniae* pullulanase and cyclodextrin. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 査読有 **74**, 1115-1123 (2018). DOI: 10.1107/S2059798318014523.
- Wan Osman W.H., Mikami B., Saka N., Kondo K., Nagata T., Katahira M. Structure of a serine-type glutathione S-transferase of *Ceriporiopsis subvermispota* and identification of the enzymatically important non-canonical residues by functional

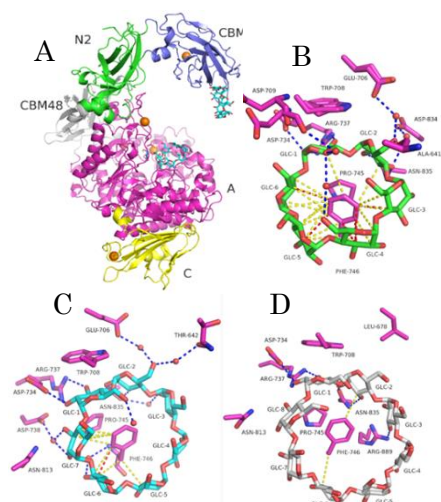


図 9 KPP/ β -CD 複合体の結晶構造 (A)。 α -CD (B)、 β -CD (C) および γ -CD (D) と活性部位との相互作用。破線 青:水素結合, 赤:衝突, 黄:Van der Waals 相互作用。

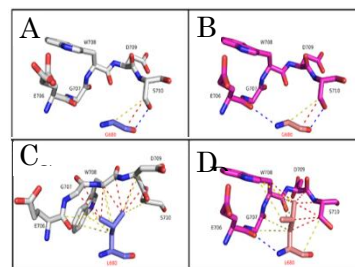


図 10 680 番目の残基とループとの相互作用 (白:アポ体、マゼンタ:G3 複合体)。Pu1A-G680 (A) アポ体, (B) G3 複合体。Pu1A-L680 (C) アポ体, (D) G3 複合体。破線 青:水素結合, 赤:衝突, 黄:Van der Waals 相互作用。

mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 510, 177-183 (2019). DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.01.076.

- ⑨ Doubayashi D., Oki M., Mikami B., Uchida H. The microenvironment surrounding FAD mediates its conversion to 8-formyl-FAD in *Aspergillus oryzae* RIB40 formate oxidase. *J. Biochem.* 査読有 Feb. 1 (2019). DOI 10.1093/jb/mvz009.
- ⑩ Osman W.H.W., Mikami B., Saka N., Kondo K., Lin M.I., Nagata T., Katahira M. Identification of key residues for activities of atypical glutathione S-transferase of *Ceriporia-opsis subvermisporea*, a selective degrader of lignin in woody biomass, by crystallography and functional mutagenesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 査読有 132, 222-229 (2019). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.199.
- ⑪ Nomura T., Iwase H., Saka N., Takahashi N., Mikami B., Mizutani K. High-resolution crystal structures of the glycoside hydrolase family 45 endoglucanase EG27II from the snail *Ampullaria crosseana*. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 査読有 75, 426-436 (2019). DOI:10.1107/S2059798319003000
- ⑫ Saka N., Iwamoto H., Malle D., Takahashi N., Mizutani K., Mikami B. Study of the relationship between conformation change of induced-fit loop and activity of *Klebsiella pneumoniae* pullulanase. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 査読有 in press (2019).

[学会発表] (計 18 件)

- ① 坂直樹 他 4 名、*Klebsiella pneumoniae* 由来 Pullulanase- cyclodextrin 複合体の相互作用様式の解明、第 65 回日本応用糖質科学会大会、2016 年 9 月 14 日、福山大学宮地記念館
- ② 坂直樹 他 4 名、*Klebsiella pneumoniae* Pullulanase/Cyclodextrin 複合体の相互作用の解明、平成 28 年度日本結晶学会年会、2016 年 11 月 17 日、茨城県立県民文化センター、水戸市
- ③ 坂直樹 他 4 名、*Klebsiella pneumoniae* プルラーナーゼとシクロデキストリンの相互作用様式の解明、第 18 回関西グライコサイエンスフォーラム、2017 年 5 月 13 日、京都大学
- ④ 坂直樹 他 4 名、*Klebsiella pneumoniae* 由来 pullulanase の活性部位におけるループ構造の変化に関する研究、平成 29 年度日本結晶学会年会、2017 年 11 月 24 日、JMS アステールプラザ、広島市
- ⑤ 三上文三 他 5 名、非凍結結晶を用いた β -アミラーゼ/基質複合体の pH による構造変化の解析、2017 年度農芸化学学会大会、2017 年 3 月 18 日、京都女子大学
- ⑥ 野村泰介 他 4 名、貝類由来セルラーゼ EG27II の X 線結晶構造解析および機能解析、2017 年度農芸化学学会大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学
- ⑦ 竹原清日 他 4 名、ジベレリン生合成および代謝酵素の構造解析と機能解析、2017 年度農芸化学学会大会、2017 年 3 月 18 日、京都女子大学
- ⑧ 光本麻佑子 他 4 名、甘味タンパク質ソーマチンの甘味発現機構、2017 年農芸化学学会大会、2017 年 3 月 18 日、京都女子大学
- ⑨ Mikami Bunzo, et al. pH Dependent conformational change of bound maltose observed in the crystal of β -amylase at room temperature. 30th Meeting of the European Crystallographic Association, Aug. 29, 2017 Basel, Switzerland
- ⑩ 三上文三 他 4 名、非凍結結晶を用いた β -アミラーゼ (E380A) と基質との複合体の pH 変化の解析、2018 年度農芸化学学会大会、2018 年 3 月 17 日、名城大学
- ⑪ 坂直樹 他 6 名、*Klebsiella pneumoniae* pullulanase と cyclodextrin との相互作用様式の解明、2018 年度農芸化学学会大会、2018 年 3 月 16 日、名城大学
- ⑫ 竹原清日 他 4 名、MD シミュレーションにより明らかとなったイネジベレリン代謝酵素の活性機構、2018 年度農芸化学学会大会、2018 年 3 月 16 日、名城大学
- ⑬ 老木紗予子 他 5 名、グリコサミノグリカンの輸送に関わる細菌タンパク質は二種類の基質結合型 closed 構造をとる、2018 年度農芸化学学会大会、2018 年 3 月 16 日、名城大学
- ⑭ 光本麻佑子 他 3 名、ループ領域がソーマチンの甘味、熱安定性に与える影響、2018 年度農芸化学学会大会、2018 年 3 月 17 日、名城大学
- ⑮ 増田太郎 他 4 名、似て非なる二種のタイプ 3 銅タンパク質・フェノールオキシダーゼとヘモシアニン、2018 年度農芸化学学会大会、2018 年 3 月 17 日、名城大学
- ⑯ 田中智紀 他 4 名、X 線結晶構造解析と部位特異的変異に基づくプロテイングルタミナーゼの機能解明、日本農芸化学会関西支部例会 (第 502 回講演会)、2018 年 2 月 3 日、京都大学百周年時計台記念館
- ⑰ Mikami Bunzo, et al. pH Dependent conformational changes of β -amylase/glucose complex crystal measured at room temperature. 31th Meeting of the European Crystallographic Association, Aug. 26, 2018, Oviedo, Spain
- ⑱ 三上文三 他 4 名、結晶構造解析によるアミラーゼの反応機構の解明、2019 年度農芸化学学会大会、2019 年 3 月 27 日、東京農業大学

[図書] (計 1 件)

- ① 三上文三 和訳、レーニンジャーの生化学 [第 7 版] ー生化学と分子生物学の基本原理ー (川寄敏祐 監修 中山和久 編集)、第 4 章 タンパク質の三次元構造 2019 年 3 月、159-218 廣川書店

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.structure.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 無し
- (2) 研究協力者 無し
- (3) 連携研究者 無し

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。