

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380064

研究課題名（和文） 食糧関連酵素のループ機能の解明

研究課題名（英文） Elucidation of mobile loop functions in food-related enzymes

研究代表者

三上 文三（MIKAMI BUNZO）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：40135611

研究成果の概要（和文）：タンパク質の機能はループ領域の構造変化によって発揮されることが多い。食糧関連酵素の機能に重要な可動ループの機能を解明するために、 β -アミラーゼとアルギン酸リアーゼの基質の取り込みと生成物の放出に重要な可動ループの構造と機能をアミノ酸変異体を利用して解析した。プロテイングルタミナーゼとトランスグルタミナーゼについては、プロ領域のループ上の変異を利用し、プロテイングルタミナーゼの変異体である A47Q が活性部位においてミカエリス型の複合体と共有結合中間体である S-アシル酵素を生成することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The functions of proteins are usually expressed by conformational changes in loop regions. We have investigated the mobile loops in food-related enzymes that are used in food industry. The mobile loops in the active sites of β -amylase and alginate lyase that are important for incorporation of substrate and release of product are analyzed by X-ray crystal analyses of their mutant enzymes. In order to reveal the enzyme mechanism of protein-glutaminase, a mutant of pro protein-glutaminase (A47Q) was prepared. It was found that the mutated Gln47 formed Michaelis complex and S-acyl covalent intermediate with a catalytic cysteine residue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用生物化学

キーワード：タンパク質工学、応用構造生物学、X線結晶構造解析、酵素反応機構

1. 研究開始当初の背景

申請者は最近 10 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に存在する可動ループ部分とそのタンパク質の機能に大きく関わっていることが

明らかになり、タンパク質中の可動ループ部位の検出、その構造と機能の解明、可動ループの構造変化のメカニズムの解明および新たな可動ループの設計についての研究が必要であることを痛感した。可動ループ部分の理解なくしては新機能を有するタンパク質

の設計は不可能であると考えている。各可動ループはそれぞれのタンパク質の中で特有の機能を担い、その構造的形態も様々である。これらの可動ループはX線結晶構造解析によりその存在が始めて明らかになり、その主な構造研究手段は現在のところX線結晶構造解析以外にない。X線結晶構造解析は元来、結晶内の全てのタンパク質分子の時間平均構造を与えるものであり、可動ループの構造変化を探るためには様々な条件での結晶構造解析が必要である。また、結晶中での分子の配置には制限があり、可動部位およびその周辺が隣接分子との相互作用に関わる場合には可動部位の構造変化を見ることは困難であり、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用いる必要がある。このような理由によりタンパク質の機能の担い手である可動ループに関する研究は立ち遅れている。本研究では食糧関連酵素として β -アミラーゼ、アルギン酸リアーゼ、プロテイングルタミナーゼおよびトランスグルタミナーゼを取り上げ、3年間でこれらの酵素の可動ループの構造と機能を徹底的に解明し、それぞれの酵素の可動ループおよびプロ型阻害ループのタンパク質工学を可能にし、これらの酵素の機能解析と新機能タンパク質の設計に役立てることを目的とした。

2. 研究の目的

(1) β -アミラーゼ

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用いられている酵素であり、ダイズ、オオムギおよび*B. cereus*由来の酵素の立体構造が申請者らにより明らかにされている。本酵素は $(\alpha/\beta)_8$ バレルを基本骨格とする分子量 56,000 のタンパク質であり、 α -アミラーゼファミリーの酵素とは異なる構造を有している。本酵素の触媒残基はGlu186(酸触媒)とGlu380(塩基触媒)であり、サブサイト-1 と+1 の間に位置し、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、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。ループの動く大きさはフレキシブルループで約12Å、インナーループで約4Åである。これら2箇所の可動ループは β -アミラーゼにおいて高度に保存されている部位であり、本酵素の活性に不可欠であることは既に報告されている。インナーループの中心残基である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ている。本研究では、フレキシブルループが結晶中で自由に動くことのできる三方晶のダイズ β -アミラーゼを用い、結晶中でのループ上の変異体の挙動を徹底的に調べて、ループ開閉の機構を検討し、最終的にループの開閉が酵素反応と同期していることを明らかにする。

(2) アルギン酸リアーゼ

アルギン酸リアーゼは海藻および微生物の生産する酸性多糖であり、マンヌロン酸とグルロン酸から構成されている。申請者らはスフィンゴモナス属細菌由来のマンヌロン酸部位を選択的に切断するアルギン酸リアーゼA1-IIIの立体構造を決定し、本酵素が (α/α) バレルの基本骨格を持つこと、生成物との複合体の構造解析からその触媒残基がTyr246であることを報告している。また、最近の研究結果から本酵素中の約30残基から成るリッドループ部分が基質複合体形成時に最大13Å動き、酵素活性に深く関わることを明らかにした。リッドループはヘリックスの途中から折れ曲がり活性部位を覆う。リッドループの動きは得られた多数の結晶より結晶内で、このループが動ける空間群の結晶を用いることで初めて明らかにすることができた。本研究ではリッドループ上の残基とループの動きに関わる残基の変異体と基質との複合体のX線結晶構造解析を行った。

(3) プロテイングルタミナーゼとトランスグルタミナーゼ

プロテイングルタミナーゼ(PG)はタンパク質表面のグルタミン残基をグルタミン酸に変換する酵素であり、食品タンパク質の物性改善への応用が期待されている。申請者らはアミノエンザイムとの共同研究により、ごく最近その立体構造を初めて解明した。本酵素は分子量2万のシングルドメインのタンパク質であり、そのフォールドは新規なものであった。また分子量3万の本酵素プロ型の予備的な構造解析(3Å分解能)を行い、その構造の概略を明らかにしている。一方、微生物由来のトランスグルタミナーゼ(MTG)はタンパク質間の架橋反応を触媒する分子量5万の酵素で、すり身やハムなどの食品タンパク質の物性改善に幅広く使用されている。トランスグルタミナーゼについても、アミノエンザイムとの共同研究により、プロ型不活性型の酵素とプロ配列が一部残存している中間型の構造解析を行っている。PGとMTGの全体構造は全く異なるが、触媒残基のシステイン周辺の構造には類似性がある。成熟型MTGの立体構造は既に決定されているが、基質がタンパク質であるために酵素と基質との複合

体の構造解析は未だ報告されていない。これらの酵素のプロ体においてループの一部が活性部位クレフトを覆い、酵素を不活性型にしていることが推定されている。そこでこれらの酵素のプロ体の変異体を系統的に作製し、その変異体の構造解析を行うことによって、これらの酵素の触媒機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) β -アミラーゼ

β -アミラーゼのフレキシブルループは9残基と比較的短く、その構造変化のメカニズムも比較的単純であると考えられる。そこで、本酵素についてはループの機能とループの動きに関係する全てのアミノ酸残基を系統的に変異し、ループの動きと酵素活性に及ぼす各変異の影響を明らかにし、フレキシブルループが最適化されているのかどうかを検討した。また、得られた変異体は全てX線結晶構造解析によってアポ型と基質（基質アナログ）との複合体の構造を決定した。 β -アミラーゼの結晶は現在1.05Å分解能まで解析できることを明らかにしている。このことは異方性温度因子と水素原子の位置の精密化を行うことにより高精度で構造が精密化できること示している。そこで、全ての変異体についてマルトース（生成物）を基質アナログとして用い、マルトース濃度を変化させて回折データを収集し、それぞれのループの位置の占有率と精密化することによってループの状態変化を正確に決定した。同様の実験をループレス酵素、ループ上の基質との相互作用に重要な残基であるAsp101とVal99の変異体、およびループのヒンジ部分の残基であるGly96、Gly97とIle102の変異体（G96A、G96S、G96V、G97A、G97S、G97V、I102V、I102A）について行い、変異のループの動きに対する影響を検討した。回折データの収集は京都大学農学研究科に設置されている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）のビームライン（BL26B1、BL38B1、BL41XU）において行った。実験室でのデータ測定の効率化を図るため、測定用コンピューター装置を購入した。変異体の作成および結晶化の実験には京都大学農学研究科の修士学生の山田荘介と奥村覚二が担当した。また、変異体精製のために液体クロマトグラフィーシステムを導入した。

(2) アルギン酸リアーゼ

アルギン酸リアーゼA1-IIIの結晶化は比較的容易であるが、リッドループが結晶中で動くことのできる結晶は斜方晶の結晶のみであり、凍結状態では基質が酵素から解離する。従って、まず非凍結結晶を用い、Y246F

およびH192Aの不活性変異体と基質との複合体のX線結晶構造解析を行った。また、リッドループ上の変異体として、Y68F、Y86F、R67A、R88Aを準備して、これらの変異体と基質（基質アナログ）との複合体の構造解析を行い、変異のループの動きにおよぼす影響を検討した。過去に凍結できたアポ型の結晶では1.1Å程度の分解能まで解析できることが分かっているため、凍結条件が決まれば基質複合体の高分解能での解析が可能である。このため斜方晶の結晶を用いて種々の凍結条件で結晶の凍結を試みた。変異体の作成および結晶化の実験には京都大学農学研究科の修士学生の吉岡宗嗣と農学部4年生1名が担当した。

(3) プロテイングルタミナーゼ(PG)

PGについてはプロ型の構造解析を進め、その変異体の結晶構造から酵素の反応機構を明らかにすることを試みた。成熟型PGの立体構造は既に1.1Å分解能で解析を終了した（PDB：2ZKQ）のでプロ型の構造解析を行った。成熟体の活性ポケットは狭く、その底には触媒残基と考えられるCys156（成熟体の番号は42）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側鎖に変換されると考えられている。阻害ループはこのポケットを覆い、ループ上のAla47の側鎖がCys156の側鎖と3.5Åの距離で対面している。このAla残基をGlnに置換したコンピューターシミュレーションによると、置換したGln残基のカルバミド基はCys156のS原子と共有結合を形成する距離まで近づくことが示された。そこで、Ala47をGln、Glu、Asp、Asn、Leu、Lysに変異した変異体を作成し、各変異体のプロセシング前後の活性測定と高分解能X線結晶構造解析を行った。また、各変異体のプロテアーゼによる消化物の中からCys156を含むペプチドをペプチドマップにより同定、単離して、MSスペクトルによりその化学構造を同定することを試みた。本研究は京都大学農学研究科の修士学生の橋爪亮太と牧由紀子が担当した。

(4) トランスグルタミナーゼ(MTG)

MTGの中間型およびプロ型の構造解析の結果から、プロ領域のヘリックス構造をとっている部分が活性部位のクレフトにはまり込こむことによってプロ体が不活性になることが示されている。中間型はプロ領域の阻害ヘリックスが非共有結合状態で残存しており、成熟体よりも熱や酸化に対して安定な性質を持つ。中間型は成熟型と同程度の活性を有しているため、この阻害ヘリックスは基質存在下では解離すると考えられている。触媒残基と考えられるCys140と阻害ヘリックスとの距離は約6Åあり、PGのように基質アナ

ログとして作用してはいない。本酵素の酸化による失活は Cys140 が酸化されることによって生じると考えられ、酸化安定化の強化は本酵素の応用上急務となっている。そこで、MTG については、阻害ヘリックス上の残基の変異により、本酵素の酸化安定性を強化することを試みる。そのためにまず、本酵素プロ体の大腸菌での発現系を構築し、Cys140 に最も近い阻害ヘリックス上の Asn60 をより大きな残基に系統的に変異してその中間型の活性に及ぼす影響と、それぞれの変異体の中間体の構造解析を試みた。本研究は京都大学農学研究科の修士学生の吉村卓也と森光平が担当した。

4. 研究成果

(1) β -アミラーゼ

①フレキシブルループの機能解析

野生型の酵素の結晶を用いてソーキングするマルトース濃度を 0~200mM の間で変化させて、それらの構造解析を行ってループの占有率を計算した結果、マルトース濃度に依存して、closed 型のループの割合が上昇するが、変化は緩慢で、200mM マルトース存在下でも closed 型が 100%になるわけでは無いことが判明した (図 1)。このことはフレキシブルループは常に open 型と closed 型の間で平衡関係にあり、マルトース存在下では平衡がより open 型に傾くことを示している。つまり、open 型と closed 型の構造変化は速く、常に置き換わっていることを示している。また、本酵素に基質が取り込まれる場合と生成物が遊離するためにはフレキシブルループが open 型になる必要があることから、このフレキシブルループの動きが酵素反応に同期することが示唆された。そこで、ループレス酵素とループ上で基質と相互作用する残基である Asp101 と Val199 の各種変異体を作成して、酵素活性と結晶構造を調べた。その結果、ループレス酵素では活性が 1000 分の 1 以下に低下し、Asp101 の変異体では 100 分の 1 以下に、Val199 の変異体では 50%以下に低下した。それぞれの結晶構造中のループの構造変化のマルトース依存性を調べた結果、ループレス酵素、D101E と D101N ではサブサイ

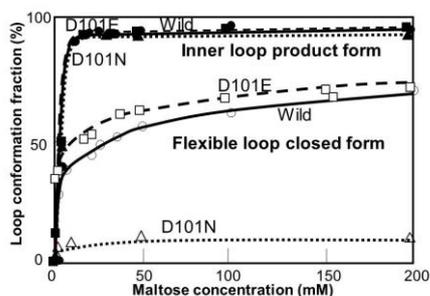


図 1. フレキシブルループ (○、△、□) とインナーループ (●、▲、■) の構造のマルトース濃度依存性。野生型 (○、●)、D101E (□、■)、D101N (△、▲)

ト-2 に結合するマルトースの結合が極端に低下していた。フレキシブルループの構造は D101N ではマルトース存在下でもほぼ open 型であったのに対して、D101E は野生型以上に closed 型の割合が増加する (図 1)。D101E ではサブサイト-2 に凍結保護剤に用いたグリセロールが強く結合し、その結合に closed 型の Glu101 の側鎖が用いられることから、D101E のフレキシブルループは closed 型で存在しやすくなると考えられた。一方、Val199 の変異体である V99I では活性の低下は約 50% であり、その影響はサブサイト+2 付近に限定される。このことは基質としてマルトトライオースを用いた場合、逆に活性が 2 倍に上昇することから確認できた。

②インナーループの機能解析

フレキシブルループに対してインナーループの動きは速く、サブサイト+1 と+2 へのマルトースの結合に一致してアポ型からプロダクト型へ構造が切り替わる (図 1)。インナーループの構造変化より求めたマルトースの解離定数の値は、サブサイト+1 と+2 へのマルトースの結合から求めた値と一致した。インナーループ上の Thr342 の変異体 (T342S、T342G) ではこの構造変化が見られなくなる。インナーループの構造変化は基質の加水分解に対応していると考えられるので、今後の実験により、基質の構造変化を検討し、この構造変化の役割について明らかにしていく。

(2) アルギン酸リアーゼ

触媒残基の候補である Y246 と H192 の変異体である Y246F および H192A の不活性変異体を用いて様々な条件で結晶化を行った結果、残基番号 64-85 のリッドループが結晶中で構造変化可能な斜方晶の結晶を得ることができた。しかし、基質としてアルギン酸 4 糖をソーキング後に結晶を凍結すると基質が遊離してしまうため、非凍結状態で回折データを収集し、2.1Å 分解能で構造解析を行い、リッドループの構造変化と本酵素の触媒機構を明らかにした (図 2)。リッドループの

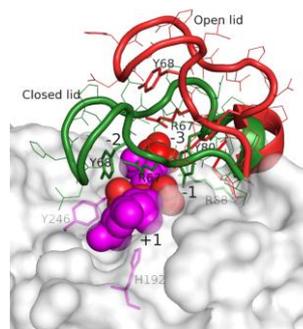


図 2. アルギン酸リアーゼのリッドループの構造変化。赤はアポ酵素での open 型の緑はホロ型での closed 型のリッドループを示す。基質の 4 糖アルギン酸は充填モデルで示す。

構造変化は β -アミラーゼのフレキシブルループのような ω ループの構造変化に比べて α ヘリックスの折れ曲がりを含む、より規模が大きい変化で、最大で13Åの変位を生じる。リッドループ上のArg67とTyr80の側鎖はclosed型で基質と相互作用する。また、Tyr68の側鎖はclosed型で触媒残基であるTyr246の側鎖と水素結合を形成している。これらの残基の変異体であるR67A、Y68F、Y80Fの変異酵素はそれぞれ野生型に比べて、7.5%、5.1%、35.6%の活性しか持たないことからリッドループの構造変化の重要性が確認できた。一方、基質としてソーキングしたアルギン酸4糖はY246FとH192Aのいずれの変異酵素においても活性部位のサブサイト+1~-3に結合し、触媒部位である+1と-1の構造の詳細を明らかにすることができた。即ち、H192AのTyr246の側鎖は+1サイトのC5とグリコシド結合の-1サイトのO4と近い(3.0~3.3Å)のに対して、Y246FのHis192の側鎖は+1サイトのC5にのみ近く(3.4Å)、サブサイト+1のマヌロン酸の構造からC5の水素はHis192ではなくTyr246の方向に向いていることが判明した。従って、+1サイトのC5から水素を引き抜いてグリコシド結合の-1サイトのO4に水素を渡すことができるのはTyr246の側鎖のみであることが結論された。また、Arg67、Tyr68とTyr80は同一ファミリー内で保存されていることから、リッドループの構造変化はファミリー内の酵素に共通の酵素反応機構であると推定した。

(3) プロテイングルタミナーゼ(PG)

本酵素の反応機構を理解して、より高機能な酵素の設計を行うためには本酵素と基質との複合体の構造解析が不可欠である。しかし、PGの基質はタンパク質であり、複合体結晶の調製が困難であることが予想された。申請者らは成熟型とプロ型のPGの構造を決定した。プロ型の酵素ではプロ領域のループが活性部位と相互作用し、基質であるタンパク質と同様の構造をとっていることが判明した。そこで、活性ポケットの入口に存在しているAla47を基質であるGln47に変異したプロ酵素を調製し、結晶化のスクリーニングを行った結果、Gln47の構造の異なる2種類の結晶(A47Q-1とA47Q-2)を得ることができた。A47Q-1の結晶ではGln47の側鎖は活性ポケットに入り込み、ミカエリス複合体型の酵素-基質複合体を形成していた。一方、A47Q-2ではGln47の側鎖はポケットの底に位置する触媒残基のCys156とS-アシル共有結合中間体を形成していた(図1)。PGの活性部位はトランスグルタミナーゼやシステインプロテアーゼと同様にCys、His、Aspのトライアッドが保存され、その触媒反応にも共通性が

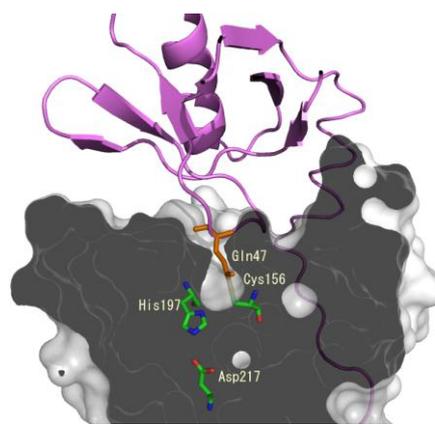


図3. プロ型プロテイングルタミナーゼの構造と変異酵素による活性部位におけるS-アシル共有結合中間体の形成。成熟酵素の部分分子表面モデルで示し、プロ領域をピンク色で示した。活性部位のポケットにGln47の側鎖が結合し、Cys156の側鎖とS-アシル共有結合中間体を形成している。

認められている。PGの場合、タンパク質のGln側鎖を基質として認識し、S-アシル中間体を攻撃するのがトランスグルタミナーゼと異なりアミノ基ではなく水分子であり、Glu側鎖を生成物として生じる。A47Q-1とA47Q-2の生成条件については現在検討中である。今後、結晶化条件を更に検討することで四面体中間体等の反応中間体のトラップを行っていく予定である。

(4) トランスグルタミナーゼ(MTG)

MTGについては中間体のX線結晶構造解析を終了し、プロ酵素の大腸菌での発現系の構築を行い、現在得られたプロ酵素を成熟型に変換するプロセッシングの最適化を検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Mikami B., Ban M., Suzuki S., Yoon H.Y., Miyake O., Yamasaki M., Maruyama Y., Hashimoto W., Murata K. Induced fit motion of a lid loop involved in catalysis of alginate lyase Al III. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Cryst.* 査読有 in press (2012).
- ② Maruyama Y., Itoh T., Nishitani Y., Mikami B., Hashimoto W., Murata K. Crystallization and preliminary X-ray analysis of alginate importer from *Sphingomonas* sp. Al. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 査読有 68, 317-320 (2012).

DOI: 10.1107/S1744309112001893

- ③ Mizutani K., Toyoda M., Mikami B. X-ray structures of transferrins and related proteins. *Biochim Biophys Acta*. 査読有 **1820**, 203-211 (2011). DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.08.003
- ④ 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.* 査読有 **286**, 38691-38702 (2011). DOI: 10.1074/jbc.M111.255133

[学会発表] (計7件)

- ① 三上文三 他5名、X線結晶構造解析によるダイズβ-アミラーゼの反応機構の解明、2012年度農芸化学学会大会、2012年3月24日、京都女子大学
- ② 牧由起子 他8名、プロ酵素の変異体(A47Q)の構造に基づいたプロテイングルタミンナーゼの触媒機構の解明、第11回日本蛋白質科学会年会、2011年6月9日、ホテル阪急エキスポパーク(大阪府)
- ③ 牧由起子 他7名、結晶構造に基づくプロテイングルタミンナーゼの酵素機能解析、2011年度農芸化学学会大会、2011年3月27日、京都女子大学(トピックス賞受賞)
- ④ 三上文三 他3名、結晶構造に基づくβ-アミラーゼの活性部位ループの機能解析、2011年度農芸化学学会大会、2011年3月26日、京都女子大学
- ⑤ 三上文三、結晶構造に基づいたアミラーゼの触媒機能の解明、第11回関西グライコサイエンスフォーラム、2010年5月15日、大阪市立大学(招待講演)
- ⑥ 三上文三 他3名、ダイズβ-アミラーゼのフレキシブルループ変異体の結晶構造、2010年度農芸化学学会大会、2010年3月28日、東京大学
- ⑦ 橋爪亮太 他6名、Protein-glutaminaseのX線結晶構造解析と作用機序の解明、第56回日本生化学会近畿支部例会、2009年7月18日、大阪医科大学

[図書] (計1件)

- ① 三上文三、丸山伸之、内海 成、大豆のすべて(喜多村啓介他編集)第4章2節2グロブリンタンパク質、2010年、115-12サイエンスフォーラム

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上文三 (MIKAMI BUNZO)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 40135611

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: