



Title	タカアミラーゼAの3.0 Å 分解能でのX線構造解析
Author(s)	楠木, 正巳
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32625">https://hdl.handle.net/11094/32625</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	楠 木 正 巳
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	第 4 8 5 9 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 3 月 25 日
学位授与の要件	理学研究科 高分子学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	タカアミラーゼ A の 3.0 Å 分解能での X 線構造解析
論文審査委員	(主査) 教 授 角 戸 正 夫 (副査) 教 授 田 所 宏 行 教 授 藤 田 博 助教授 田 中 信 夫

## 論 文 内 容 の 要 旨

タカアミラーゼ A (以後 TAA と略す) はコウジカビ (*Aspergillus oryzae*) の産生する  $\alpha$ -アミラーゼで、デンプンなどの  $\alpha$ -1, 4-glucosidic linkage, phenyl- $\alpha$ -maltoside などの maltosidic linkage を加水分解する分子量約 5 万の蛋白質である。本研究では TAA の重原子同型置換法による X 線結晶解析を行なった。

TAA はタカジアスターゼより抽出、精製し、硫酸で結晶化した。空間群は  $P2_1$ 、格子定数は  $a=91.9\text{\AA}$ ,  $b=133.3$ ,  $c=94.3$ ,  $\beta=102.7^\circ$  で非対称単位中に TAA 分子 3 個が含まれる。非対称単位の大きさ、すなわち独立な Bragg 反射の数は現在まで高分解能で解析された蛋白質結晶の中では最大である。3 Å 分解能の解析には 3 種類の重原子置換結晶を用いた。X 線回折データの収集には 117 個の結晶を使い、約 30 万個の反射を測定した。反射の数が膨大で、その測定に非常に時間がかかるため、測定装置のソフトウェアを根本的に作り直した。これによってデータの測定時間が 3 分の 1 に圧縮された。重原子の位置は差のパターソン関数、差のフーリエ合成で決定した。最小自乗法によるパラメータの精密化を行ない、3 Å 分解能の電子密度図を得た。平均の figure of merit は 0.73 であった。TAA1 分子上に結合する十数個の重原子の位置から結晶学的に独立な 3 分子の位置関係を決定し、3 分子密度図を平均して、非常にノイズの少ないフーリエ図を得た。これに基づき分子の骨格モデルを作製し、その三次元構造を解明した。TAA の分子構造の特徴は次のとおりである。分子の大きさは  $35\times 45\times 80\text{\AA}$  で 2 つの domain, main domain と C-terminal domain から構成されている。9 本の  $\alpha$ -helix が main domain は、4 本の  $\beta$ -sheet が C-terminal domain に含まれている。2 本の短い  $3_{10}$  helix と 21 個の reverse turn がある。main domain に約  $25\times 15\text{\AA}$  の cleft があり、アミラーゼの活性

部位がこの中にある。現在までに約100個のアミノ酸側鎖を、特に活性部周辺を重点的に一次構造の情報に基づき assign した。

アミラーゼのX線解析は今回の研究が初めてである。リゾチームなどではX線解析の結果に基づいた様々な生化学的研究が行なわれているが、アミラーゼの研究も本論文の成果により加速度的に進歩することが期待される。

## 論文の審査結果の要旨

楠木君の論文は、コウジカビ (*Aspergillus oryzae*) の産生する  $\alpha$ -アミラーゼ、タカアミラーゼ A (TAA) のX線結晶解析による分子骨格構造決定に関する研究をまとめたものである。TAAはデンプンなどの  $\alpha$ -1,4-glucosidic linkage, phenyl- $\alpha$ -maltoside などの maltosidic linkage を加水分解する分子量約5万の蛋白質で、本研究ではその3 Å分解能における解析を実行した。

TAAはタカジアスターゼより抽出、精製し、硫酸で結晶化した。空間群はP2<sub>1</sub>、格子定数は $a=91.9\text{Å}$ ,  $b=133.3$ ,  $c=94.3$ ,  $\beta=102.7^\circ$ で非対称単位中にTAA分子3個が含まれる。非対称単位の大きさ、すなわち独立なBragg反射の数は現在まで高分解能で解析された蛋白質結晶の中では最大である。3 Å分解能で解析には3種類の重原子置換結晶を用い、そのX線回折データの収集には全部で117個の結晶を使い、約30万個の反射を測定した。反射の数が膨大で、しかもその精度も要求されることから、先ずその測定装置のソフトウェアを根本的に作り直している。重原子の位置は差のパターン関数、差のフーリエ合成、及び最小自乗法によるパラメータの精密化を行ない、次いで最良位相の決定から3 Å分解能の電子密度図を得た。平均の figure of meritは0.73であった。また別にTAA 1分子上に結合する十数個の重原子の位置から結晶学的に独立な3分子の相対位置を決定し、3分子の電子密度図を平均して、非常にノイズの少ないフーリエ図を得るなど独得の工夫を成功させている。作成されたTAAの分子構造モデルの特徴は、(1)分子の大きさは $35\times45\times80\text{Å}$ で2つのdomain, main domainとC-terminal domainから構成されており、(2)9本の $\alpha$ -helixがmain domainに、4本の $\beta$ -sheetがC-terminal domainに含まれ、(3)2本の短い $3_{10}$  helixと21個のreverse turnがある。(4) main domainに約 $25\times15\text{Å}$ のclefがあり、アミラーゼの活性部位がこの中にある。またこれら分子骨格の概要は、triose phosphate isomeraseの構造と極めて類似していることが示され、興味ある発見となった。

以上、同君の研究は、世界で最初のアミラーゼ分子骨格の発見であり、今後の生化学的研究に重要な資料を加えたもので、理学博士の学位論文として十分の価値あるものと認める。