



Title	Structural Studies on α -Cyclodextrin Glucanotransferase from <i>Bacillus stearothermophilus</i>
Author(s)	久保田, 優夫
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42535
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	久保田 優夫
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 16002 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	Structural Studies on α -Cyclodextrin Glucanotransferase from <i>Bacillus stearothermophilus</i> (中等度好熱菌由来 α -シクロデキストリン合成酵素の構造研究)
論文審査委員	(主査) 教授 月原 富武
	(副査) 教授 後藤 裕児 助教授 松浦 良樹

論文内容の要旨

バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) TC91株の培養上清からシクロデキストリン合成酵素 (CGTase) を均一に精製した。本酵素の分子量は SDS ゲル電気泳動法で 70,000 ダルトン、等電点は 5.0 であった。反応の最適 pH と最適温度は 5.0 と 75°C であった。pH 安定性および温度安定性は 5.5~9.0 および 70°C までであった。反応初期に α -シクロデキストリンを優勢的に生成することから、耐熱性 α -CGTase であることがわかった。本酵素は生澱粉に対して強い吸着性と分解能を示すこともわかった。

遺伝子 DNA から推定したところ、本酵素のアミノ酸一次配列は、31 残基の分泌シグナル配列に続く、680 残基であることがわかった。典型的な α -CGTase であるバチルス・マセランス (*B. macerans*) 酵素についても同様にアミノ酸一次配列を調べたところ、両 α -CGTase 間で 58.9% の相同性が認められた。他の CGTase と比較することによって、本酵素はマセランス酵素よりもむしろサーモアナエロバクター (*Thermoanaerobacter*) 属由来の耐熱性 β -CGTase と高い相同性 (67.7%) を示すことがわかった。アミノ酸一次配列の N-末端側には α -アミラーゼ・ファミリー間で保存する 4 つの領域を有しており、それら領域のアミノ酸残基が本酵素の触媒や基質結合に関与すると示唆された。C-末端約 100 残基は生澱粉吸着・分解性のアミラーゼの C-末端と相同性を示すことがわかり、この C-末端領域が生澱粉吸着に関与していることが示唆された。

酵素蛋白を硫安溶液中で単結晶化し、その結晶を用いて X 線結晶解析を行い 2.0 Å 分解能で立体構造を決定した。結晶学的 R 値は 17.4% であった。最終構造モデルは全アミノ酸 680 残基以外に 2 個のカルシウムイオンと 351 個の水分子を含んでいた。本酵素は 5 つのドメインからなっており、タカアミラーゼ A と類似した N-末端側 A-C ドメインと、その C-末端側に付加された D、E ドメインであった。基本的な骨格構造は β -CGTase と類似していたが、A ドメインのヘリックス構造やいくつかのループ構造などに重要な違いが認められた。A、B ドメインには活性クレフトが形成しており、そのクレフト中に存在する 3 つの酸性残基 (Asp225, Glu253, Asp324) が本酵素の触媒基と同定された。

ソーキング法で作製した酵素・マルトース複合体結晶を用いて X 線解析したところ、活性クレフト中と E ドメイン上の 2ヶ所にマルトース結合部位を見出した。活性クレフトでのマルトース結合には、触媒基を含めた α -アミラーゼ類似モチーフと、CGTase に特有な Phe179、Phe191、Phe255 などが関与すると考えられた。これらフェニルアラニン残基の基質結合を含め、本酵素のシクロデキストリン合成メカニズムが提案された。C-末端 E ドメインのマルトー

ス結合部位は本酵素の生澱粉吸着能に関与していると推定された。

論文審査の結果の要旨

久保田君の論文は中等度好熱菌由来のシクロデキストリン合成酵素に関する構造研究であり、酵素タンパク質及び基質・酵素タンパク質複合体のX線結晶構造解析を行った。この研究によって、特異な環状構造を持つシクロデキストリンが合成される仕組みを原子レベルで解明した。よって、この論文は（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。