



Title	Structure Analyses of Bacillus stearothermophilus Neopullulanase and its Substrate Complexes
Author(s)	本同, 宏成
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44066">https://hdl.handle.net/11094/44066</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">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="#"></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	ほん どう ひろ のり 本 同 宏 成
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 17557 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 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	Structure Analyses of <i>Bacillus stearothermophilus</i> Neopullulanase and its Substrate Complexes (ネオプルラナーゼの立体構造と基質認識)
論文審査委員	(主査) 教授 月原 富武 (副査) 教授 後藤 祐児 助教授 松浦 良樹 助教授 金子 文俊

#### 論 文 内 容 の 要 旨

ネオプルラナーゼは中程度高熱菌由来の酵素で、プルランを加水分解しパノース、マルトース、グルコースを 3 : 1 : 1 の割合で生成する。また、 $\alpha$ -1,4 グルコシド結合のみならず、 $\alpha$ -1,6 グルコシド結合をも分解可能である。さらには $\alpha$ -1,4、1,6 グルコシド結合の合成反応を触媒する。このようにネオプルラナーゼは広い基質及び反応特異性を示すユニークな酵素である。本研究では、このネオプルラナーゼについて、単体及びパノース、マルトテトラオース、イソパノースの 3 種類の基質複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により決定し、その基質認識機構を明らかにした。

構造解析の結果、ネオプルラナーゼは 4 つのドメインから構成されていた。 $\alpha$  アミラーゼファミリーにおいて保存されている  $(\beta/\alpha)_8$  バレル構造からなる A ドメインと、 $\alpha$  ヘリクスをひとつ含む B ドメイン、 $\beta$  シート構造からなる C ドメインに加え、本酵素に特徴的な N ドメインが存在していた。N ドメインは約 120 残基から成り、 $\beta$  シート構造をとっていた。活性部位は A ドメインと B ドメインの間に存在し、酵素一分子に対しひとつのカルシウムイオンが結合していた。またネオプルラナーゼは結晶中でダイマーを形成していた。このダイマー形成において、N ドメインが重要な役割を果たしていることが分かった。また遠心平衡法による溶液中の分子量測定の結果、本酵素は溶液中でもダイマーを形成していることが明らかとなった。これらに加えて、基質複合体の構造解析の結果から基質結合様式が明らかとなった。3 種類の複合体すべてにおいて、基質はサブサイト・1 及び・2 に結合していた。このことはネオプルラナーゼがマルトース単位で基質を認識していることを示す。またパノース複合体において、活性クレフトの入り口は広く開いており、非還元末端のグルコースと酵素の間にほとんど相互作用が見られなかった。このことよりネオプルラナーゼはプルランと結合する際にプルランを認識しているのではなく、マルトース単位でプルランと結合し、他の部位とは立体障害を持たないような構造をしているといえる。さらにマルトテトラオースとイソパノース複合体の構造から、サブサイト+1 では基質認識に重要と考えられる水素結合が欠損しており、疎水的な環境であることが明らかとなった。このことにより、ネオプルラナーゼは基質認識が曖昧になり、 $\alpha$ -1,4、1,6 グルコシド結合の両方を加水分解可能となっていることがわかった。また、活性部位近傍にマルトースと思われる電子密度が見出された。このマルトースは転移合成反応のアクセプターであると考えられる。このように、アクセプター結合部位を持つことでネオプルラナーゼは高い活性で合成反応を触媒すると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本同君の論文は、デンプンの1種であるプルランを加水分解し、パノース、マルトース、グルコースを精製する酵素であるネオプルナーゼの結晶学的研究による基質認識機構に関するものである。この酵素は、 $\alpha$ -1,4 グルコシド結合のみならず $\alpha$ -1,6 グルコシド結合も加水分解するだけでなく、これらの結合の転位反応をも触媒するという、極めて広い基質及び反応特異性を示すユニークな酵素である。

本酵素の単体のX線結晶構造解析に成功し、4つのドメイン構造から成り、それらが強固な2量体を形成して機能していることを明らかにした。さらに、パノース、マルトテトラオース、イソパノースの3種の糖複合体のX線結晶構造解析を行い、その特異な基質認識機構を明らかにすることが出来た。この研究は、酵素による基質認識という酵素を特徴付けるのもっとも重要な働きを原子レベルで理解することに成功した点で注目されている。よって、この論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。