

Thermus thermophilus HB8 由来プルラナーゼ(TTHA1563)の結晶構造解析
Crystal Structure of a Pullulanase (TTHA1563) from *Thermus thermophilus* HB8

丹羽英明¹, 嶋田睦¹, 松永笑子¹, 倉光成紀^{1,2}, 横山茂之^{1,3,4}
 Hideaki Niwa¹, Atsushi Shimada¹, Emiko Matsunaga¹, Seiki Kuramitsu^{1,2},
 Shigeyuki Yokoyama^{1,3,4}

(¹理研播磨, ²阪大院理, ³理研 GSC, ⁴東大院理)

(¹RIKEN SPring-8 Center, ²Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., ³RIKEN GSC,
⁴Grad. Sch. Sci., Univ. of Tokyo)

e-mail: h.niwa@spring8.or.jp

プルラナーゼは、プルランやアミロペクチンなどの糖鎖の分枝部分である $\alpha(1,6)$ 結合を加水分解する酵素であり、脱分枝酵素とも呼ばれる。好熱菌由来プルラナーゼは糖質分解酵素の 1 つとして、糖質・食品産業界において重要な役割を果たしている。

Thermus thermophilus 由来 TTHA1563 (475 残基・分子量 53.8kDa) は、アミノ酸配列で *Bacillus flavocaldarius* KP1228 由来プルラナーゼ¹⁾と高い相同性 (472/475) があり、糖鎖の $\alpha(1,6)$ 結合のみを特異的に分解する I 型プルラナーゼ (E.C.3.2.1.41) であると推定される。この酵素は $(\beta/\alpha)_8$ -バレル構造のドメイン A と、ドメイン A から突出した小ドメイン B、および C 末端側に存在する β -ストランドのみのドメイン C から構成される。これはプルラナーゼが属する α -アミラーゼファミリーの基本ドメイン構成であり、N 末端側にさらにドメインが存在する同ファミリーに属する構造既知のプルラナーゼとドメイン構成が異なっている。

TTHA1563 の構造を、阻害剤として機能することが知られている β -シクロデキストリンとの複合体で決定した。結晶は空間群 $P2_1$ に属し ($a = 67.1\text{\AA}$, $b = 96.9\text{\AA}$, $c = 140.6\text{\AA}$, $\beta = 94.4^\circ$)、非対称単位にタンパク質 4 分子が存在する。位相は 41% の配列相同性をもつ *B. stearothermophilus* 由来ネオプルラナーゼの対応部分の構造を用い、分子置換法により決定した。構造は分解能 2.3\AA で精密化した ($R_{\text{work}} = 0.185$, $R_{\text{free}} = 0.235$)。 β -シクロデキストリンは活性部位の +1 副部位を中心に結合していることが電子密度で観察できた。さらに、結晶化溶液中には含まれていなかったマルトトリオースが -1~-3 副部位に結合していることが観察された。本酵素の全体そして活性部位の構造を、相同タンパク質の構造と比較し考察する。

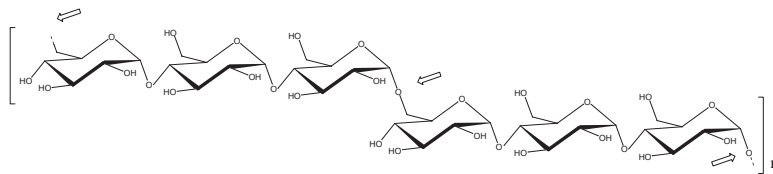


図 1 プルランの構造。 $\alpha(1,6)$ グリコシド結合を矢印で示す。

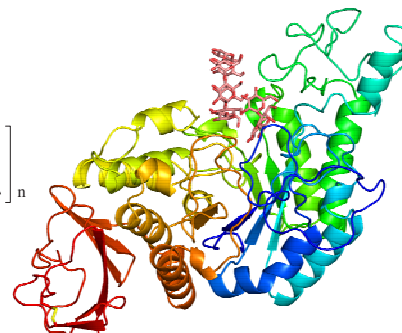


図 2 TTHA1563 の立体構造。

Reference

- [1] Kashiwabara, S., Ogawa, S., Miyoshi, N., Oda, M.
 & Suzuki, Y. (1999) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1736-1748.