

題目：X線結晶構造解析によって酵素の働きは解明できるのか？ - β -アミラーゼを例として -

発表者：三上 文三 (生存圏研究所・特任教授)

関連ミッション：ミッション2 (太陽エネルギー変換・高度利用)

要旨：

現在、多くの酵素の立体構造が X 線結晶構造解析によって明らかにされ、その機能が検討されている。しかし、結晶構造には様々なアーチファクトが含まれている。第一に、目的タンパク質の結晶内でのパッキングによっては、正常な基質複合体の形成が困難なことがある。第二に、凍結結晶を用いた構造解析では凍結と凍結保護剤の影響が無視できない場合が多い。一般に凍結により、結晶格子の収縮と結晶のモザイク性の増大が生じる。その結果、リガンドとの結合に変化が生じることがある。さらに、pH 変化を追跡する場合、結晶格子の収縮も含めて凍結結晶の pH を再現することが難しい。凍結の関係する問題についてはキャピラリー測定等の非凍結測定法を用いると解決できる。発表者らはダイズ β -アミラーゼの非凍結結晶を用いて基質アナログ複合体の pH 変化の解析を行って、本酵素の反応機構について検討した。 β -アミラーゼはデンプンの非還元末端から β -アノマーのマルトースを遊離する酵素で、ダイズ酵素の触媒残基は酸触媒の Glu186 と塩基触媒の Glu380 である。活性部位にはフレキシブルループ (96-104) とインナーループ (341-344) および可動な側鎖を持つ Lys295 が存在する (図 1)。これらの可動部位の役割を明らかにするために、G1 (グルコース)、G2 (マルトース) および G5 (マルトペンタオース) を用いて、pH と基質アナログ濃度を変化させて構造解析を行った。G1 は pH3~4 では、サブサイト-2 と +2 の 2 個所に結合するが、pH5 以上ではサブサイト-2, +1, +2 の 3 個所に結合する。サブサイト+1 への G1 の結合はインナーループのアポ型から複合体型への構造変化と同期し、その pH 依存性から塩基触媒である Glu380 ($pK_a = 3.6$) の関与が示唆された。G2 はサブサイト-2~-1 と +1~+2 および +2~+3 に連続して結合し、-1 サイトの Glc 残基は pH3~4 では、 α/β のアノマーの 4G_1 のイス型の構造を取るのに対して、pH5 以上では α アノマーの 1,4B のボート型の構造を取る。イス型からボート型への構造変化の pH 依存性から Glu380 の解離が関係すると推定された。次に E380A 変異体を用いて基質である G5 との結合の pH 依存性を調べた。G5 はサブサイト-2~+3 に結合するが、pH によってサブサイト-1 の Glc 残基の結合位置が変化し、その変化には酸触媒である Glu186 ($pK_a = 8.1$) が関与すると推定された。以上の結果から、触媒残基の 2 つの Glu 残基の解離状態が酵素と基質の構造変化に大きく関わり、触媒反応の前後でサブサイトの親和力を変化させて酵素反応を有利に進めることが明らかになった。

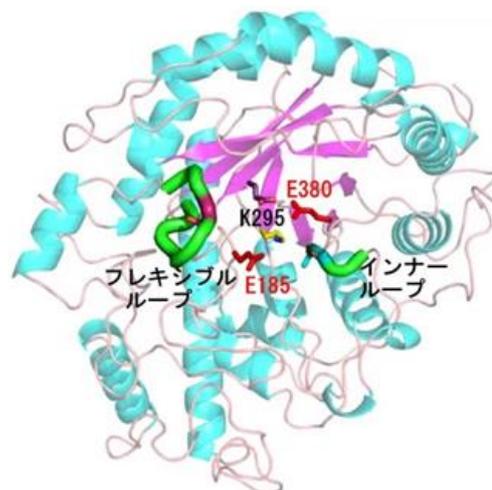


図1 β -アミラーゼの可動部位