

SAXS 法によるタンデムなデンプン結合ドメイン (SBD) / β -シクロデキストリン複合体の構造解析

Structural Analysis of Tandem Starch Binding Domain Complexed with β -cycrodextrin by Small Angle X-ray Scattering.

高橋 良輔^a, 西村 重徳^a
Ryosuke Takahashi^a, Shigenori Nishimura^a

^a大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 応用生命科学専攻

^aDiv. of Appl. Life Sci., Grad. Sch of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.

Starch binding domain (SBD) は、複数の SBD がタンデムな状態で存在することで高デンプン親和力を発揮すると考えられている。我々はタンデムな SBD のデンプン結合様式を解明するために、X 線小角散乱法を用いて、 β -cycrodextrin (β -CD) 結合に伴う *Bacillus polymyxa* 由来 β/α -アミラーゼのタンデムな SBD (SBD3) の構造変化を観察した。その結果、SBD3 は β -CD と結合することで構造が大きくなることが示唆された。

キーワード： X 線小角散乱, starch binding domain

背景と研究目的：

Starch binding domain (SBD) は、多くのアミラーゼに存在する約 100 アミノ酸残基からなる独立したドメインであり、デンプンおよびマルトオリゴ糖との結合能を持ち、アミラーゼと基質との結合を仲介する機能を持っている。SBD は単独ではデンプンに対する親和力が低く、複数の SBD がタンデムな状態で存在することで高い親和力を発揮する例が報告されている。SBD 単独の立体構造に関する研究は数多く報告されているにもかかわらず、タンデムな SBD に関する研究報告はほとんど例がない。そこで、本研究では、タンデムな SBD の構造解析を行うとともに、デンプンとの複合体構造の解析を目的とした。本実験には、*Bacillus polymyxa* 由来 β/α -アミラーゼのタンデムな SBD を用いた。本酵素は、N 末端側から β -アミラーゼ、SBD1、SBD2、 α -アミラーゼが 1 本のポリペプチド鎖上に連なっており、タンデムな SBD の構造と機能を研究するのに適している。我々はすでに溶液 NMR 法を用いて、SBD1 と SBD2 の各々の立体構造を決定している。さらに、SBD1 と SBD2 が 6 残基のリンカーで連なったタンデムな SBD (SBD3) の溶液 NMR 測定を行った結果、2 つの SBD は酷似した構造をもつために、NMR シグナルが重なり合い、スペクトルの解析が困難であることがわかった。そこで、X 線小角散乱法 (SAXS 法) による、SBD3 の構造解析を試みた。最終的には、SBD3 の溶液中における立体構造とデンプン認識機構を解明し、SBD をタンパク質工学的に改変することで、高分解効率でデンプンを分解することができるアミラーゼの創出を目指す。

実験：

溶液散乱実験は BL40B2 で行った。単色化された X 線を集光ミラーによって集光後、スリットで整形し、試料に入射した。X 線の波長は 1.0 Å を用いた。検出器は、ビームラインに設置されている自動読み取り型イメージングプレート (R-AXIS VII system) を用いた。測定は pH 5.5 25 °C の条件で行った。リガンドにはデンプンアナログである β -cyclodextrin (β -CD, Mr : 1135, Hayashibara) を用い、SBD3 と 1:6 のモル比で混合し、実験に用いた。さらに、得られた散乱曲線から In-direct 法による動径分布関数計算ソフト GNOM[1]によって $P(r)$ 関数を求めた。

結果および考察：

Fig.1 に溶液中における SBD3 および SBD3 と β -CD の複合体 (SBD3/ β -CD) の X 線溶液散乱パターンを、Fig.2 に SBD3 および SBD3/ β -CD の $P(r)$ 関数をそれぞれ示す。得られた $P(r)$ 関数は、SBD3 がダンベル様構造であることを示した。NMR 法を用いて決定した SBD1 と SBD2 の立体構造の分子最大長 D_{\max} が 40 Å であることから、20 Å と 42 Å に存在するピークは、それぞれ SBD3 の各ドメインの半径と中心間距離に対応すると考えられる。また、SBD3 および SBD3/ β -CD の散乱パターンは広角領域において一致しなかった。SBD3 と SBD3/ β -CD は $P(r)$ 関数においても一致しておらず、さらに D_{\max} がそれぞれ 82 Å, 85 Å と求められたことから、SBD3 は β -CD と結合することで、各ドメインを繋ぐリンカーが伸び、構造が大きくなることが示唆された。

今後の課題：

SBD1 と SBD2 の立体構造を用い、相互の配向の動的平衡を仮定したモデルを用いてシミュレーションした散乱曲線を SBD3 の散乱曲線に最適化することで SBD3 の構造を決定する。また、 β -CD 結合による散乱曲線の変化が、どのような構造変化によるものなのかを明らかにする。

参考文献：

[1] Svergun, D.I., J. Appl. Cryst. **42**, 892–900 (1992)

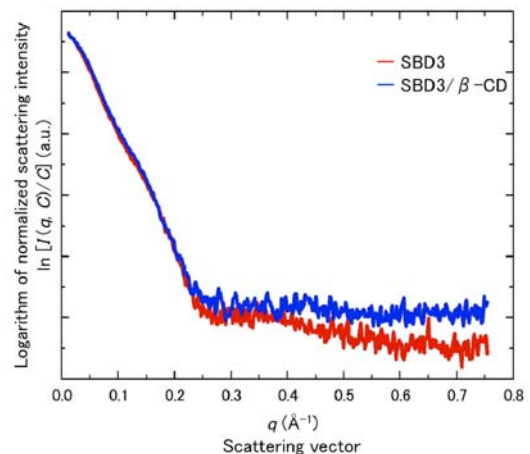


Fig.1 SAXS profiles of SBD3 and SBD3/ β -CD complex.

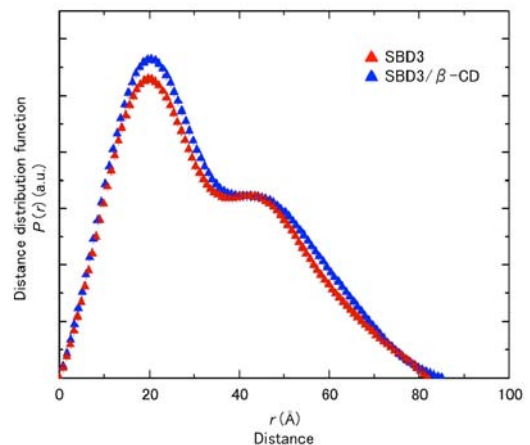


Fig.2 Distance distribution function $P(r)$