

海産性好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* 由来イソアミラーゼの精製, 性質検討及びX線結晶構造解析

立花亜紀子・田村 隆・今田 勝巳^{a)}・木下 実紀^{a)}
 難波 啓一^{a)}・堤 紀子^{b)}・橋田みよ子^{b)}・坂口 博脩^{b)}
 稲垣 賢二
 (農芸化学コース)

Purification, Characterization and Crystal Structure of Isoamylase from Thermophilic Bacteria *Rhodothermus marinus*

Akiko Tachibana, Takashi Tamura, Katsumi Imada^{a)}
 Miki Kinoshita^{a)}, Keiichi Namba^{a)}, Noriko Tsutsumi^{b)}
 Miyoko Hashida^{b)}, Hiromichi Sakaguchi^{b)} and Kenji Inagaki
 (Course of Agrochemical Bioscience)

The isoamylase gene from *Rhodothermus marinus* was cloned into and expressed in *Escherichia coli* Top 10. As a result of characterization of purified *R. marinus* isoamylase, the enzyme had an optimum pH of 4.0 and optimum temperature of 70°C. Thermal inactivation studies of the purified *R. marinus* isoamylase revealed the enzymatic activity to be uninfluenced after one hour incubation at 60°C. These results suggest that *R. marinus* isoamylase has high thermostability. The crystallization and crystal structure analysis of *R. marinus* isoamylase was performed. The three-dimensional structure at 1.9Å resolution was determined in complex with the panose. *R. marinus* isoamylase is composed of three domains N, A and C, and has a $(\beta/\alpha)_8$ -barrel in domain A. The secondary structural alignments of the *R. marinus* isoamylase and *P. amyloclavata* isoamylase was carried out. They have the four active-site consensus regions characteristic of the α -amylase family. And the essential residue of the α -amylase family (D359, E395, and D467) was conserved in these enzymes. *R. marinus* isoamylase has shorter loops than *P. amyloclavata* isoamylase. And *R. marinus* isoamylase had no Ca²⁺ binding site. These results are thought to be factors of thermostability of *R. marinus* isoamylase.

Key words : isoamylase, *Rhodothermus marinus*, crystal structure, thermostability

緒 言

コーン・ポテト・小麦・マニオク・米などに含まれる澱粉は、グルコース（ブドウ糖）の鎖から構成されている。アミラーゼを用いてこの鎖を切断するとグルコースやマルトースなど様々な糖類を作ることができる。グルコースは、飲料・菓子などの食品の甘味料として用いられる他、医療用輸液のエネルギー源、化学工業の原料など様々な分野で使用されている。

澱粉からグルコースを生産するに当たり、従来の澱粉変換プロセス（澱粉を液化、糖化（デブランチング）処理することによりグルコースを生産する）では、グルコアミラーゼの逆反応や転移反応によるパノースなどの副産物の生成は、糖化後のグルコース収量に大きな影響を与える^{1,2)}。

プルラナーゼはマルトースをパノース前駆体（6. sup. 2-a-maltosylmaltose）に縮合する傾向があるのに対し、

イソアミラーゼはイソマルトースやパノースの生成を抑えることができるので非常に有用である³⁾。

液化中に α -アミラーゼと共に耐熱性イソアミラーゼを使用すると、同時に液化とデブランチングを行えるので、パノース前駆体が生成することなしに液化時間を延長する事が可能となる。液化終了時点でのパノース前駆体が減少すると、糖化終了時のパノースの割合が低下し、グルコース収量は上昇する。また、この方法では α -アミラーゼを不活性化させる必要はなくなるので糖化時間も有意に減少させる事が可能になると考えられる³⁾。

澱粉加工に利用できる耐熱性の高いイソアミラーゼを

Received October 1, 2007

a) 大阪大学大学院生命機能研究科

(Department of Frontier Biosciences, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University)

b) ノボザイムズ ジャパン

(Novozymes Japan Ltd.)

得るために、好熱菌を対象として耐熱性イソアミラーゼ遺伝子を有する微生物をスクリーニングした。その結果、*Rhodothermus marinus* という好熱性細菌が耐熱性イソアミラーゼ遺伝子を有することが判明した³⁾。

イソアミラーゼ (glycogen 6-glucanohydrolase ; E.C. 3.2.1.68) は α -アミラーゼファミリー (α -アミラーゼファミリーの特徴: 1) α -グルコシド結合に作用, 2) 加水分解もしくは糖転移反応により α -アノマーのオリゴ糖や新たな α -グルコシド結合を形成する, 3) 一次構造中に 4 つの保存領域が存在する, 4) 触媒部位として 1 つのグルタミン酸, 2 つのアスパラギン酸が存在する) に属し、澱粉, アミロペクチン, グリコーゲンなどグルコースの α -1, 4-グルコシド結合の連鎖に枝分かれを有する澱粉系多糖の分岐点となっている α -1, 6-グルコシド結合を特異的に加水分解する酵素である。

イソアミラーゼの特徴はプルラーゼと異なり、プルランにはほとんど作用しない。一方、プルラーゼはアミロペクチンとその限界デキストリンは分解できるが、グリコーゲンとその限界デキストリンにはあまり作用できない。この両者の基質特異性の違いは非常に興味深いところである。

また、結晶構造解析がなされているイソアミラーゼは *Pseudomonas amyloclavata* のみなので⁴⁾、耐熱性の高い *R. marinus* 由来イソアミラーゼと *P. amyloclavata* 由来のイソアミラーゼそれぞれの立体構造にどのような違いが存在するかという点は大変興味深いところである。また、本酵素の立体構造解析を行うことにより、本酵素についての様々な知見が得られることも期待される。

方 法

1. 好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* 由来イソアミラーゼの精製

Rhodothermus marinus 耐熱性イソアミラーゼ遺伝子オープンリーディングフレーム (ORF) を組み込んだ pBAD/Myc-HisB (pBX 2) を持つ大腸菌 Top10 株より、イソアミラーゼを精製し、精製酵素を調製した。まず 30 g の湿菌体を 1 mg/ml リゾチムを含有した 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) に懸濁し 4 °C で 1 時間インキュベートを行った。次に、160 W で 20 分間超音波破碎を行い、遠心分離して上清 (110 ml) をとった。これに対し 80 °C で 10 分間熱処理を施し、遠心分離して得られた上清画分を使用して硫酸分画 (50%) を行い、沈殿画分を回収し、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) で透析を行った。透析後のサンプルを DEAE-トヨパール 650 M イオン交換カラムクロマトグラフィーに吸着させ、0–400 mM NaCl でリニアグラジエント溶出を行った。酵素活性の高い画分を回収した後、濃縮を行い、さらに Hydroxyapatite Type I カラムクロマトグラフィーに供

してイソアミラーゼを精製した。

2. イソアミラーゼの活性測定

本酵素活性は以下に示すヨウ素法、プレートアッセイ、DNS (3,5-dinitro salicylic acid) 法にて測定した。

a) ヨウ素法⁵⁾

1 % アミロペクチン 0.5 ml に 0.5 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を 0.1 ml 添加し、さらに酵素液 0.1 ml を混合して 60 °C で 15 分反応を行う。ついで、反応溶液から 0.5 ml をサンプリングし、サンプリングした溶液と等量の 0.01 N ヨウ素–0.1 N ヨウ化カリウム溶液と混合した後、蒸留水で 12.5 ml に定容する。室温に 15 分放置後、1 cm 幅のセルを用いて 610 nm の吸光度を測定する。ブランクは加熱処理により失活させた酵素液を用いて同様に操作する。上記の方法で 1 時間に 610 nm の吸光度 (ブランク値との差) を 0.1 増加させる酵素量を 1 単位 (U) とする。

b) プレートアッセイ

1 % アミロペクチンを含有したプレートに穴を開けて酵素をアプライし、60 °C で over night インキュベートする。翌日、プレートにヨウ素粒子をいれたプレートの蓋をかぶせるとイソアミラーゼ活性が存在すれば、紫色のハローが確認できる。

c) DNS 法 (ジニトロサリチル酸法)⁵⁾

本酵素反応により生成する還元糖量を定量することにより活性測定を行う。1 % アミロペクチン 1.6 ml に 0.5 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) を 0.2 ml 添加し、さらに酵素液 0.2 ml を混合して 60 °C で 15 分反応を行う。ついで、反応溶液から 0.5 ml をサンプリングし、そこに DNS 試薬を 1 ml 加え、5 分間煮沸する。水冷後、脱塩水 4.5 ml を加えて 525 nm の吸光度を測定する。50–200 μ g のグルコース当量が定量できる。上記の方法で 1 分間に 1 μ mol グルコース還元力に相当する還元糖を生成する酵素量を 1 単位 (U) とする。(DNS 試薬: 2 N NaOH に 3, 5-ジニトロサリチル酸 0.5 g を溶かし、ついでロッシェル塩 30 g を加えて攪拌し、脱塩水で 100 ml にメスアップする) 本研究において本酵素の性質検討はこの方法にて行った。

3. 結晶化・X線結晶構造構造解析

本精製酵素の結晶化はスパース-マトリックススクリーニングキットを使用し、PEG8000 を沈殿剤として、4 °C でシッピングドロップ蒸気拡散法にて行った。そして兵庫県西播磨 SPring-8 の BL41XU ビームラインで得られた結晶の回折データを収集し加工を行った。結晶の様々な部分に対して作成された電子密度マップへの構造モデルのフィッティングは O プログラム及び COOT プログラムで行い、精密化は CNS solve プログラムを用いて行った。

結果と考察

酵素の精製

大腸菌 Top10/pBX 2 の菌体30 g を用いて酵素精製を行った。Table 1 に示した精製ステップを踏むことにより収率は19%，約36倍にまで精製することができた。精製酵素10 μ g を用いて SDS-PAGE を行ったところほぼ単一のバンドが確認された (Fig. 1)。また、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、活性染色した結果、このバンドがイソアミラーゼであることが確認された。よってここで精製を終了し、諸性質検討及び結晶化・X線結晶構造解析を行った。

精製酵素の性質検討

本酵素の諸性質検討を行い、現在産業利用されている *Pseudomonas amyloclavata* 由来イソアミラーゼと比較した。活性測定溶液を50~100°C で10分インキュベートし、酵素を溶解させている緩衝液10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6) で希釈した酵素溶液を添加し、活性測定を行い、各温度における相対活性を求めた。その結果、本酵素は *P. amyloclavata* イソアミラーゼより20°C 高い70°C で最大の活性を示した (Fig. 2 A)。

また、pH 3.0~10の50mM緩衝液 (ブリトロンロビンソン緩衝液) で希釈した酵素溶液と、pH 3.0~10に調製した活性測定溶液を用いて本酵素の活性測定を行った結果、最適反応 pH は4で *P. amyloclavata* イソアミラーゼと同様、酸性側での反応性が高いことが判明した (Fig. 2 B)。

酵素溶液を50~100°C で0~60分間インキュベート後の残存活性を測定した結果、*P. amyloclavata* イソアミラーゼは50°C や60°C では顕著な活性の低下が確認されたのに対し、本酵素は60°C まで安定に存在することから、本酵素は *P. amyloclavata* イソアミラーゼに比べて非常に高い熱安定性を有することが判明した (Fig. 3)。

活性測定の基質にイソアミラーゼの活性に影響を与えると考えられる因子である各種金属イオン・阻害剤の検討を行った。各種因子 (塩化ナトリウム、塩化カリウム、

塩化マグネシウム、硫酸銅、塩化ニッケル、塩化マンガン、塩化カルシウム、アカボース、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、モリブデン酸アンモニウム) を終濃度1~5 mMになるように添加して活性測定を行い、各種因子を加えなかった場合と比較してどれだけ反応が阻害されたかを比較した。その結果、5 mMの銅イオン・アカボース、1 mMのモリブデン酸アンモニウム (*P. amyloclavata* 由来イソアミラーゼは阻害しない^{6,7)}) により本酵素は阻害されることが判明した (Table 2)。ま

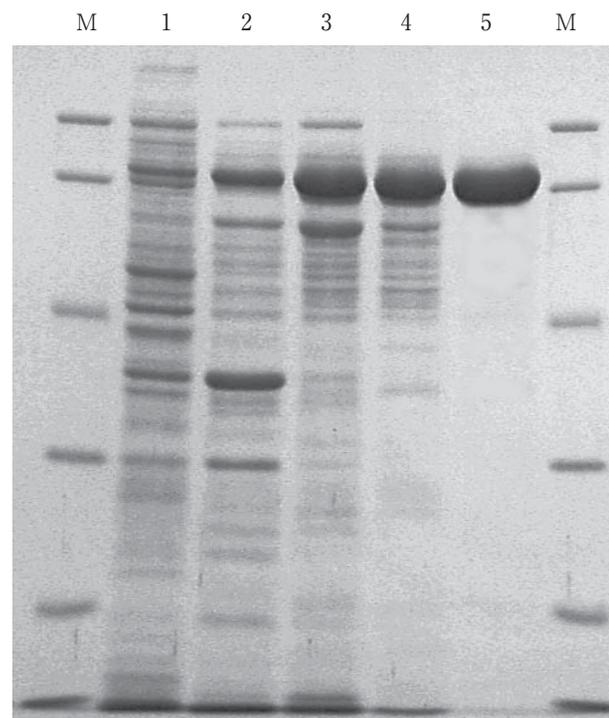


Fig. 1 SDS-PAGE (12%) of fractions from the isoamylase preparation.

Lanes M: molecular mass marker proteins, Lane 1: Crude extract, Lane 2: Heat treatment, Lane 3: Ammonium sulfate precipitation, Lane 4: DEAE-Toyopearl column, Lane 5: Hydroxyapatite column. Protein was 10 μ g in each lane.

Table 1 Purification of Isoamylase from *R. marinus*

Purification step	Total enzymatic activity (U)	Volume activity (U/ml)	Total Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Overall purification (fold)
Crude	135000	1220	2860	47	100	1
Heat treatment (80 °C)	151000	3020	573	264	112	5.61
Ammonium sulfate	107000	14400	148	719	79.1	15.3
DEAE-Toyopearl	81200	14800	87.4	929	60.3	19.7
Hydroxyapatite	25900	21600	15.4	1690	19.2	35.8

Enzyme assay was performed by iodine method.

た、カルシウムイオン (α アミラーゼと結合し、その活性を上昇させる働きがある)・エチレンジアミン四酢酸 (Ca^{2+} とキレートを形成し、アミラーゼの活性を低下させる)を添加しても何も加えない状態と活性がほとんど変わらなかった (Table 2). このことから、本酵素は活性にカルシウムイオンを必要としないと考えられた。

結晶化・X線結晶構造解析

結晶化・X線結晶構造解析を行い、分解能1.9Åで $R_w = 21.2\%$, $R_{\text{free}} = 23.7\%$ にまで精密化を進めた (Table 3).

構造解析の結果、本酵素は *P. amylocladus* 由来イソアミラーゼと同様⁶⁾, β サンドウィッチ構造を有するNドメイン, Cドメイン, (α/β)₈ バレル構造を有し、活性ドメインであるAドメインの3つのドメインから構

Table 2 Effects of various reagents on *R. marinus* isoamylase activity

Reagent	Final conc (mM)	Inhibition (%)
NaCl	5	17.5
KCl	5	23.1
MgCl ₂	5	13.1
CuSO ₄ · 5H ₂ O	5	54.6
NiCl ₂	5	8.46
MnCl ₂ · 4H ₂ O	5	6.15
CaCl ₂	5	0
acarbose	5	92.3
EDTA	5	0
ammonium molybdate	1	100

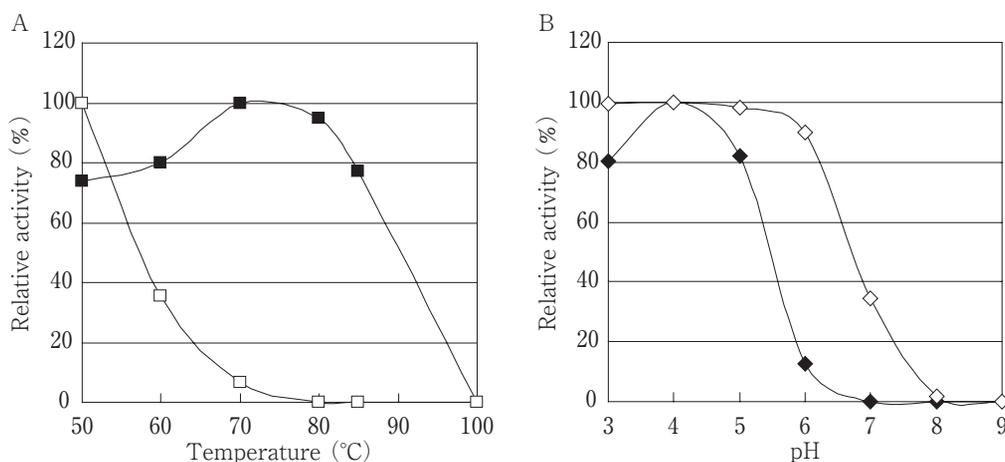


Fig. 2 Effect of temperature and pH on enzyme activity.

(A) Enzyme activity was measured in a 2ml reaction mixture containing 1.8 ml Sodium citrate (pH 5.0), 0.1 ml 30 mM D-isocitrate and 0.1 ml enzyme solution at various temperatures. (■): *R. marinus* isoamylase, (□): *P. amylocladus* isoamylase. (B) Enzyme activity was measured in the following buffer. : 100 mM Britton-Robinson buffer (pH 3-9). (◆): *R. marinus* isoamylase, (◇): *P. amylocladus* isoamylase.

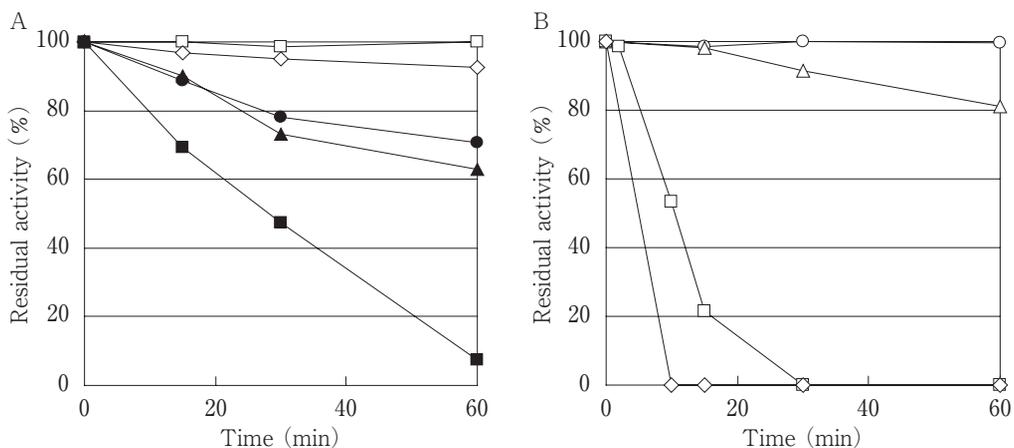


Fig. 3 Thermal inactivation of isoamylases.

(○): 30 °C, (△): 40 °C, (□): 50 °C, (◇): 60 °C, (●): 70 °C, (▲): 80 °C, (■): 85 °C.

(A) Thermostability of *R. marinus* isoamylase. (B) Thermostability of *P. amylocladus* isoamylase.

成されていた (Fig. 4).

R. marinus 由来イソアミラーゼ, *P. amyloclavata* 由来イソアミラーゼのマルチプル構造アラインメントを MATRAS サーバー (<http://biunit.naist.jp/matras/index.html>) を利用して行った. その結果, 本酵素は α

アミラーゼファミリーに特有の4つの保存領域 (Region 1-4), プルラーゼ・イソアミラーゼの共通配列, イソアミラーゼ特有のループ (L4, L7) が存在することが判明した. また, 本酵素はL4ループをはじめ, ループの長さが全体的に *P. amyloclavata* 由来イソアミ

Table 3 Data Collection and Refinement Statistics

	Native		Native
Data collection		No. of reflections test	2,894 (458)
Space group	<i>I</i> 222	Rw (%)	21.2 (28.4)
Unit Cell dimensions (Å)		Rfree (%)	23.7 (32.7)
a	99.31	Rms deviation bond length (Å)	0.007
b	126.53	Rms deviation Bond angle (°)	1.4
c	138.29	Ramachandran plot (%)	
Wavelength (Å)	1.000	Most favored	88.1
Resolution range	57-1.9	Additionally allowed	11.4
Observations	290,267	Generously allowed	0.5
Unique reflections	57,130	Disallowed	0
Completeness (%)	97.0	No. of protein atoms	5,640
Redundancy	5.1	No. of ligand atoms	23
L/s(I)	6.7	No. of solvent atoms	659
Rsym (%)	7.0	Average B for protein	31.4
Refinement		Average B for ligand	50.0
Resolution range (Å)	40.34-1.9(2.13-2.0)	Average B for solvent	51.7
No. of reflections working	57,120 (8,814)	Wilson B	28.5

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

$R_{sym} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$

$R_{ano} = \sum | \langle I+ \rangle - \langle I- \rangle | / \sum (\langle I+ \rangle + \langle I- \rangle)$

$R_w = \sum \|F_o\| - \|F_c\| / \sum \|F_o\|$, $R_{free} = \sum \|F_o\| - \|F_c\| / \sum \|F_o\|$

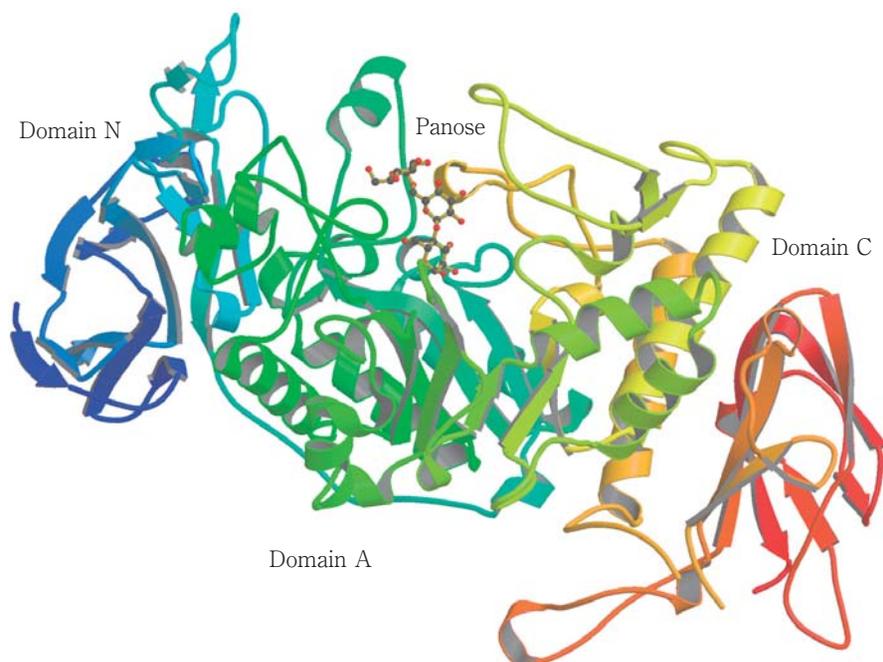


Fig. 4 Overall structure of the *R. marinus* isoamylase with panose.

R. marinus isoamylase was composed of three domains N, A and C, and had a $(\alpha/\beta)_8$ -barrel in domain A.

ラーゼに比べて短く、ループのショートカットが起こっていた。このことは本酵素の耐熱性の一因であると考えられた。

他生物由来イソアミラーゼ、プルラナーゼと本酵素の活性中心周辺のアミノ酸残基の比較を行った結果、活性残基、誘導適合（プルラナーゼ、ネオプルラナーゼなどで見られる、基質が結合することによる酵素の構造変化）に関わる可能性がある残基を始めとして、活性中心付近のアミノ酸残基が高度に保存されていた⁸⁻¹⁰。

P. amylocleramosa イソアミラーゼにはドメインNとドメインAの境界にカルシウムイオン結合サイトが存在する⁹が本酵素ではそのようなカルシウムイオン結合サイトは存在せず（各種金属イオン・阻害剤の検討結果からもこのことが示唆された）、*P. amylocleramosa* イソアミラーゼのカルシウムイオン結合サイトに相当する部位はプロリンなどの疎水性の高いアミノ酸残基に置換され、疎水性の高い構造をとっていた。このことも本酵素の耐熱性が高い一因であると考えられた。

要 約

Rhodothermus marinus 由来イソアミラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミド pBX 2 を使用し、大腸菌 Top10 株を形質転換し、16時間の前培養、24時間の本培養後、菌

体破碎し、得られた無細胞抽出液を熱処理（80℃，10 min），50%硫酸分画，陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（DEAE-トヨパール），ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーに供して本酵素の精製を行った。本精製酵素の性質検討を行った結果，本酵素の最適反応温度は70℃，pH 4 であり，また本酵素は60℃で1時間処理しても活性が低下することが無く，*Pseudomonas amylocleramosa* 由来イソアミラーゼよりも高い耐熱性を有することが判明した。本酵素の結晶化・X線結晶構造解析を行った結果，本酵素は *P. amylocleramosa* 由来イソアミラーゼと同様Nドメイン・AドメインCドメインの3つのドメインから構成されており，活性残基（D359，E395，D467）など活性中心付近のアミノ酸残基も *P. amylocleramosa* 由来イソアミラーゼと同様，高度に保存されていた。本酵素の熱安定性が *P. amylocleramosa* 由来イソアミラーゼよりも高い要因として，*P. amylocleramosa* 由来イソアミラーゼよりもループの長さが全体的に短いことと，カルシウムイオン結合サイトの欠如が挙げられた。今後さらに構造解析を進めることにより，本酵素の熱安定性機構，反応機構など更なる知見が得られることが期待される。

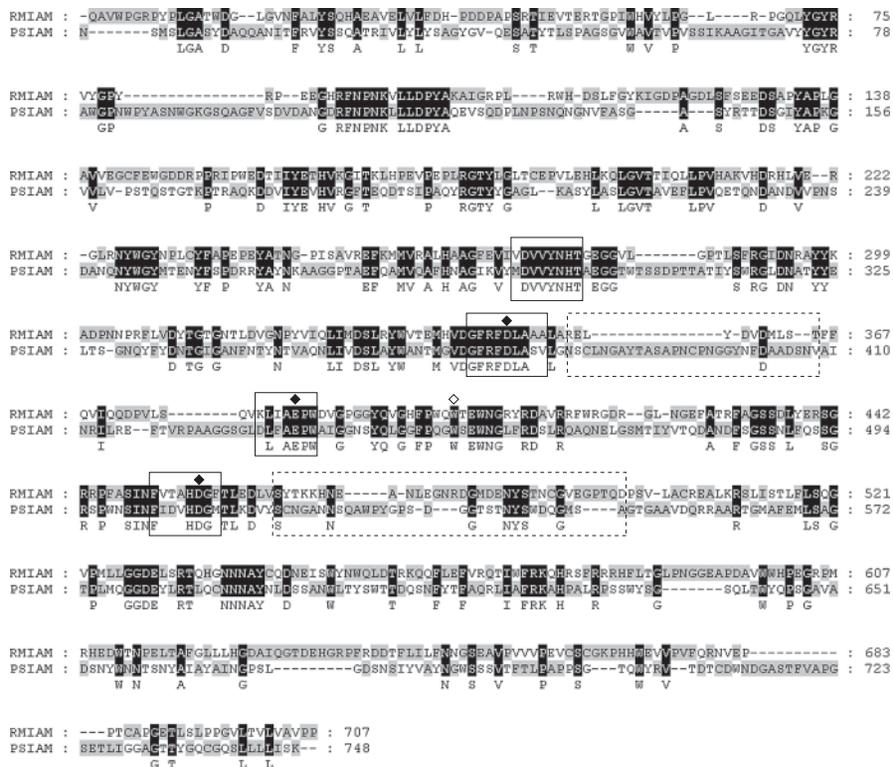


Fig. 5 Second structure alignment of the *R. marinus* isoamylase and *P. amylocleramosa* isoamylase.

RMIA: *R. marinus* isoamylase, PSIA: *P. amylocleramosa* isoamylase, □: amylase family highly conserved region, [---]: isoamylase specific loop, ◆: active residue, ◇: concerned with the induced fit.

文 献

- 1) 中村道徳・鈴木繁男：澱粉科学ハンドブック．地人書館，東京（1977）
- 2) 小崎道雄・相沢考亮・小野正之・手塚隆久・柳田藤治：酵素利用ハンドブック．地人書館，東京（1980）
- 3) Tsutsumi, N., E. Hirayama, H. Bisgaard-Frantzen and M. Hashida : Thermostable isoamylase from *Rhodothermus marinus*. United States Patent, US6448049, Sep 10, (2002)
- 4) Katsuya, Y., Y. Mezaki, M. Kubota and Y. Matsuura : Three-dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2 Å resolution. J. Mol. Biol., **281**, 885-897 (1998)
- 5) 中村道徳・貝沼圭二：生物化学実験法25澱粉・関連糖質酵素実験法．学会出版センター，東京（1989）
- 6) Harada, T., A. Misaki, H. Akai, K. Yokobayashi and K. Sugimoto : Characterization of *Pseudomonas* isoamylase by its actions on Amylopectin and Glycogen : Comparison with *Aerobacter* Pullulanase. Biochim. Biophys. Acta, 497-505 (1971)
- 7) 横溝康之： *Pseudomonas* のイソミラーゼに関する研究．大阪大学博士論文，(1973)
- 8) Abe, J., C. Ushijima and S. Hizukuri : Expression of the Isoamylase Gene of *Flavobacterium odoratum* KU in *Escherichia coli* and Identification of Essential Residues of the Enzyme by Site-Directed Mutagenesis. Appl. Environ. Microbiol., **65**, 4163-4170 (1999)
- 9) Hondoh, H., T. Kuriki and Y. Matsuura : Three-dimensional Structure and Substrate Binding of *Bacillus stearothermophilus* Neopullulanase. J. Mol. Biol., **326**, 177-188 (2003)
- 10) Mikami, B., H. Iwamoto, D. Malle, H. Yoon, E. Demirkan-Sarikaya, Y. Mezaki and Y. Katsuya : Crystal Structure of Pullulanase : Evidence for Parallel Binding of Oligosaccharides in the Active Site. J. Mol. Biol., **359**, 690-707 (2006)