タカアミラーゼAの結晶構造解析と 分子構造 (3 Å 分解能)

松浦良樹*・楠木正己*・伊達和嘉子*

原田繁春*・田中信夫*・角戸正夫*

Molecular Structure of Taka-amylase A at 3 Å Resolution

Yoshiki MATSUURA, Masami KUSUNOKI, Wakako DATE,
Shigeharu HARADA, Nobuo TANAKA and Masao KAKUDO

*Institute for Protein Research, Osaka Univ.
(Yamada Kami, Suita 565, Japan)*

われわれはタカアミラーゼA(澱粉の α -アミロースを加水分解する酵素)の結晶解析を進めてきたが(S.52年会で7.4 Å 分解能の結果報告), 最近3 Å 分解能での解析を行い, 分子モデルを作成したので報告する. タカアミラーゼAの結晶は単斜晶系 $P2_1$ に属しているが, 非対称単位 of 3分子は $[101]$ に平行なローカルな 3_1 らせんのまわりに配置している. また同型置換重原子の探索により, 以前に見つかった $UO_2(NO_3)_2$, $HgCl_2$ の他に K_2PtCl_4 , $K_2Pt(CN)_4$, $AgNO_3$, K_2PdCl_4 , $KAu(CN)_2$ が比較的良好な同型置換体を与えることを見出し, 解析に利用した. とくに非対称単位 of 3分子の相対位置は, これらの重原子のタカアミラーゼA分子への結合位置から最小二乗法によってかなり正確に決定することができた. 分子座標系に基づいた非対称単位 of 各分子の電子密度図は, こうして得られた相対座標変換式に従い, 各点の電子密度を結晶座標電子密度から線形補間することによって得られた.

3 Å 分解能の最良電子密度図は, U と Hg の他に Au の置換体を用いて決定した位相 (6~3 Å) と他の重原子も含めて決定した位相 (30~6 Å) とに基づいて計算した. 6~3 Å 分解能での重原子パラメーターの精密化は, $\sin\theta/\lambda$ に対してほぼ均一の反射数を含むように選択した, 総数の約1/4の反射を用いて多重同型置換最小二乗法により行った. 精密化の概略をまとめて表1に示す. リチャーズ箱によるワイヤ分子モデル作成のため, 3つの分子座標上の電子密度図を平均し, XYプロッターで1Å

~2cmのスケールで全体を分子長軸方向に2分割して別々に等高線を描いた. これは約 80×40 Åの分子を 45×45 Å相当のリチャーズ箱を利用して組み立てるためである. このため分子モデル台はレールの上に載せ移動可能とした. 分子全体の電子密度図をこの1/8スケールの積層板に描き, 充分吟味した結果, ポリペプチド鎖の流れを追うことができた. 3分子の電子密度図を平均することにより図は非常に見やすくなった. ワイヤモデル作成(図1)により得られた主な結果は, 1)分子を構成するアミノ酸数は452である(今後, 多少の増減は考えられる). 2)糖鎖は分子の活性部位のうしろ側でポリペプチド鎖から分岐している. 3)4つのジスルフィド結合は明瞭に認められた. 4) α -ヘリックスは全体の約20%である. 5)2か所に β -シート様の二次構造がある. 6)酵素活性部位にはヒスチジン, リジン, アスパラギン酸, チロシンなどが分布している.

表 1.

分解能 (Å)	$\langle m \rangle$	反射数	誘導体数
30~7.4	0.94	3,200 (1,932)*2	7
7.4~6	0.82	2,700 (1,630)*2	4*1
6~3	0.67	39,600 (9,166)*2	3
Total	0.73	45,500 (31,070)*3	

*1 U, Hg については異常分散考慮.

*2 () 内は精密化に用いた反射数.

*3 () 内は best フーリエ合成に用いた反射数.

* 大阪大学蛋白質研究所 (565 吹田市山田上)

図 1. タカアミラーゼ A の分子模型

【質問】 大阪府科学教育センター，大阪府大 小野

TAA の結晶解析のご成功おめでとう存じます。活性中心近傍の基質の入り込むすき間についてですが、さきほどお話ししたマルトースのつかまる場所は、すき間のなかの端の方ですか。それとも中央辺なのでしょうか。われわれは構造不明の期間に速度論的に勝手な推定をしました。それによればすき間は lysozyme の 6 units に対して TAA は 7 units くらいとなっていますが、結晶構造の解析からその数は reasonable でしょうか。

【答】

分子中央には、深い溝と浅い溝がありますが、そのなかの深い溝の中央部にマルトースが結合いたします（次の質問に関しては廣海先生の質問に対する解答と同じ）。

【質問】

東大 中村

1. 今まで α -アミラーゼの一次構造および結晶解析がなされなかったのは、分子量が大きいという理由だけか、それとも特殊な困難の原因があるのでしょうか？

2. 活性基に関係するアミノ酸としてどのようなものが推定されますか？

【答】

1. タカアミラーゼの 1 次構造は、成田教授（阪大蛋白質研）によって研究されており、大部分が決定されております。結晶解析が今まで行われなかったのは、1) 分子量が大きいこと、2) 同一分子が 3 個集まって結晶学的な単位を作っているため、X 線解析で決めなければならない構造が非常に大きくなる。などが理由かと思います。なお、ブタのすい臓の α -アミラーゼの結晶解析がフランスで進行中とのことです。

2. 現在までにわかったところでは、His が α -1, 4-結合の切断位置と推定しているところの近くにあります。その他、Asp, Lys, Glu, Tyr もこの付近にあります。

【質問】

京大農 廣海

溝は直鎖の基質が伸びた形で結合できるような形でしょうか（溝の幅と長さのサイズを教えてください）。

【答】

分子の中央に深い溝があり、続いて浅い溝がありますが、これらを合わせますと、直鎖の glucose が 7 個入ると考えられます。