

# 解 説

## デンプン結合ドメインの変性とジスルフィド結合の効果

田中 晶善

三重大学 生物資源学研究所

(受取日：2019年1月9日，受理日：2019年1月21日)

### Effects of a Disulfide Bond on the Unfolding of the Starch-Binding Domain of Glucoamylase

Akiyoshi Tanaka

Graduate School of Bioresources, Mie University

(Received Jan. 9, 2019; Accepted Jan. 21, 2019)

The starch-binding domain (SBD) of glucoamylase from *Aspergillus niger* consists of 110 amino acid residues. There is one disulfide bond, between Cys3 and Cys98. This article summarizes the thermodynamic and kinetic effects of the disulfide bond on the stability and structure of SBD as determined by calorimetric and spectroscopic studies of wild-type SBD and two disulfide-deficient mutants. Deletion of the disulfide bond did not change the native-state structure or the binding ability of SBD with  $\beta$ -cyclodextrin, a substrate analog. Rather, the disulfide bond stabilized the protein mainly by reducing the entropy of the unfolded state. In addition, the disulfide bond prevented SBD from forming a native-like and kinetically-trapped intermediate state. This possibly misfolded intermediate state was formed when the disulfide-deficient mutants were rapidly cooled from a high temperature, and had a long half-life of 11 h at 5 °C. The binding parameters of the native and intermediate states with  $\beta$ -cyclodextrin were essentially the same.

Keywords: calorimetry, disulfide bond, kinetically-trapped intermediate, starch-binding domain, thermal unfolding

#### 1. はじめに

アミラーゼ，セルラーゼ，キシラーゼなど不溶性多糖類加水分解酵素の分子は一般に，加水分解を行う触媒ドメインに加えて，各酵素に特異的な基質が結合する糖質結合モジュール carbohydrate-binding module (CBM) を一個以上持つ。CBMはその一次構造から多数のファミリーに分類される(2019年1月現在で84)，系統的な研究対象とされている(<http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html>)。

デンプンを加水分解して $\beta$ -グルコースを生成する酵素であるグルコアミラーゼ<sup>1,2)</sup>もCBMを持つ酵素の例である。本解説で取り上げるのはクロウジカビ *Aspergillus niger* のグルコアミラーゼであり，全長616アミノ酸残基の分子のC末端側110アミノ酸残基が，ファミリー20に属するCBMを構成する。<sup>3,4)</sup> このCBMはその機能から，デンプン結合ドメイン starch-binding domain (SBD) と呼ばれる。

触媒ドメインとCBMの相互作用については，種々の点から興味を持たれるが，クロウジカビのグルコアミラーゼの場合は，独立した二個の球状タンパク質がリンカーでつながっているだけのような挙動をする。たとえば触媒ドメインの熱変性は不可逆であるがデンプン結合ドメインは可逆であり，全長タンパク質を一旦高温で熱変性させた後冷却するとデンプン結合ドメインのみが天然構造に巻き戻

る。<sup>5)</sup> 各ドメインへの特異的リガンドの結合においても，ドメイン間相互作用はない。<sup>5-7)</sup>

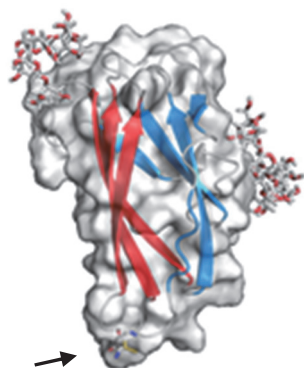
市販のクロウジカビのグルコアミラーゼ標品には，デンプン結合ドメインが欠落した分子種も含まれている。<sup>3,5)</sup> 本酵素の全長タンパク質の立体構造としては，ボウリングのピンを思わせる低分解能の構造<sup>8)</sup> が知られているものの詳細な構造解析は今のところ成功していない。構造解析のための結晶化を試みても，その過程でデンプン結合ドメインが欠落する，という報告もある。<sup>9)</sup>

このような性質もあって，デンプン結合ドメインのみを110アミノ酸残基(分子量12,100)のタンパク質として容易に調製することができ，<sup>10,11)</sup> これは小型球状タンパク質の物理化学的諸性質を探る良好なモデルとなる。(以下，「デンプン結合ドメイン」，あるいはその略号としての「SBD」は，この110アミノ酸残基のタンパク質を指す。)

本稿ではこのデンプン結合ドメインを対象として，分子中に一か所存在するジスルフィド結合が変性の熱力学量に与える影響や，ジスルフィド結合を欠損させたデンプン結合ドメインを高温から急冷すると，天然状態と似ているが異なる構造の準安定な中間体を形成することなど，本タンパク質の変性に関連して得られたいくつかの知見を簡潔に紹介する。

## 2. デンプン結合ドメインの構造

デンプン結合ドメインの立体構造を **Fig.1** に示す。β-シートを骨格とする CBM に特徴的な構造であり、8本のβストランドが二枚のβシートを形成している。一本のポリペプチド鎖のほぼ両端を結ぶようにジスルフィド結合 Cys3-Cys98 がある (**Fig.1** の矢印で示した部位)。立体構造の解析は NMR<sup>12)</sup> と X線<sup>13)</sup> を用いて行われており、その結果は両者でほぼ同じであった。いずれの場合でもジスルフィド結合周辺の構造は不明瞭であり、構造のゆらぎが大きいことを示している。分子中には基質であるデンプンを認識する部位が2か所あり、<sup>14)</sup> 基質アナログであるβ-シクロデキストリンがそれぞれに結合する (**Fig.1**)。



**Fig.1** Structure of the starch-binding domain of *A. niger* glucoamylase. The Cys3-Cys98 disulfide bond is indicated by an arrow. Two β-cyclodextrin molecules are shown as stick models. This figure was drawn using PyMOL and Protein Data Bank file 1AC0.

### 2.1 ジスルフィド結合欠損型デンプン結合ドメインの調製

ジスルフィド結合の効果調べるために、ジスルフィド結合欠損変異型デンプン結合ドメインを二種類調製した。すなわち野生型の Cys3 と Cys98 をいずれも Gly で置換した Cys3Gly/Cys98Gly、および、いずれも Ser で置換した Cys3Ser/Cys98Ser である。以下、デンプン結合ドメインを SBD、野生型 SBD を WT、Gly 置換変異体を GG、また Ser 置換変異体を SS と適宜略記する。

これら三種の SBD の紫外部円二色性スペクトル (以下、CD スペクトル) に差はなく<sup>15)</sup>、また後述の二次元 NMR では、WT と GG の天然状態で差は見られなかった。<sup>16)</sup> さらにβ-シクロデキストリン (β-CD) との結合を等温滴定熱量計 ITC で測定して結合の熱力学量を評価すると、三種の SBD でほぼ同じであり (**Table 1**)、GG と SS の間でも差がなかった (すなわちアミノ酸側鎖の性質の違いによる影響がない)。<sup>15)</sup> これらのことから、このジスルフィド結合の有無は、天然状態での SBD の高次構造に有意の差異をもたらさないと考えられる。

**Table 1** Thermodynamic parameters for the binding of β-Cyclodextrin with three forms of SBD as determined using ITC at 25 °C, pH7.<sup>15)</sup>

Protein <sup>a</sup>	<i>n</i> <sup>b</sup>	<i>K<sub>d</sub></i> /μM	Δ <i>H</i> /kJ mol <sup>-1</sup>	<i>T</i> Δ <i>S</i> <sup>0</sup> /kJ mol <sup>-1</sup>
WT	1.8	21.3	-58.5	-31.8
GG	1.8	20.7	-55.2	-28.5
SS	1.8	20.4	-56.5	-29.7

<sup>a</sup> WT: Wild type, GG: Cys3Gly/Cys98Gly, SS: Cys3Ser/Cys98Ser.

<sup>b</sup> The number of β-CD molecules bound to each protein.

## 3. 変性の熱力学量への影響

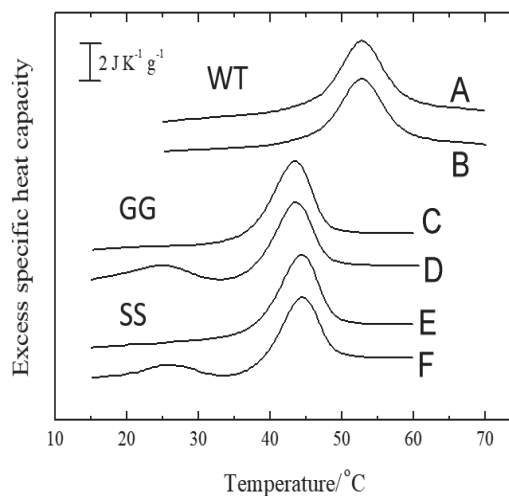
### 3.1 熱変性の熱力学量

野生型および変異型 SBD の熱変性を断熱型 DSC で測定した結果を **Fig.2** に示す。<sup>15)</sup> 野生型の場合、吸熱ピークは 53 °C 付近にあった (走査 A)。走査後ただちに DSC 装置内で溶液を急冷し (降温過程を一次反応で近似すると半減期は 2 分程度)、すぐに再走査すると、初回と同じ DSC 曲線が得られ (B)、変性は完全に可逆的であった。この DSC 曲線を単純な二状態転移モデル  $N \rightleftharpoons U$  (*N* は天然状態、*U* は変性状態) で解析した結果を **Table 2** に示す。*t*<sub>1/2</sub> は、変性が半分終了する温度 ([*U*]/[*N*] = 1 で変性の標準ギブズエネルギー変化 Δ*G*<sup>0</sup> = 0 となる温度) である。これらの結果に基づいて Gibbs-Helmholtz の式、

$$\Delta G^0 = \Delta H_{cal} \left( 1 - \frac{T}{T_{1/2}} \right) - \Delta C_p \left( T_{1/2} - T + T \ln \frac{T}{T_{1/2}} \right) \quad (1)$$

から Δ*G*<sup>0</sup> の温度依存性を求め、**Fig.3** (WT) を得た (Δ*H*<sub>cal</sub> および Δ*C*<sub>p</sub> は Δ*h*<sub>cal</sub> および Δ*c*<sub>p</sub> に基づくそれぞれ 1 mol あたりの値、*T* は絶対温度、また *T*<sub>1/2</sub>/K = *t*<sub>1/2</sub>/°C + 273.15 である)。グラフが直線ではなくやや上に湾曲しているのは、変性の前後での比熱の差 Δ*c*<sub>p</sub> が正であることによる。

ジスルフィド結合を欠損させた二種の変異型タンパク質の熱変性を DSC で測定した例を **Fig.2** (C, E) に示す。変異型 SBD は野生型に比べて、変性温度 (ピーク温度) が約 10 °C 低下した。二種の変異型 SBD の間で変性の熱力学量



**Fig.2** DSC traces of the wild type (WT) starch-binding domain (A, B) and two disulfide-deficient mutants, GG (C, D) and SS (E, F). B, D, and F are rescans of A, C, and E, respectively, after rapid cooling. Observed at pH 7.<sup>15)</sup>

**Table 2** Thermodynamic Parameters for the Thermal Unfolding of the Wild-Type and two Mutant Forms of SBD at pH7.<sup>15)</sup>

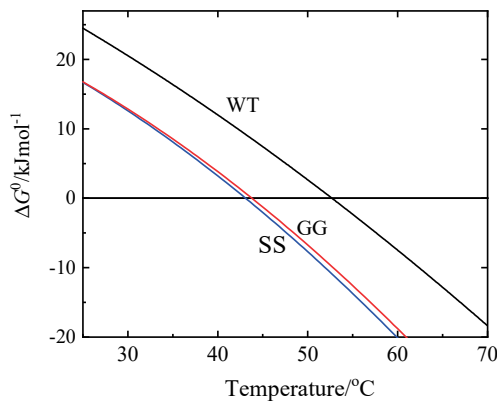
Protein	<i>t</i> <sub>1/2</sub> /°C <sup>a</sup>	Δ <i>h</i> <sub>cal</sub> /J g <sup>-1</sup> <sup>b</sup>	Δ <i>c</i> <sub>p</sub> /J K <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> <sup>c</sup>	Δ <i>H</i> <sub>vH</sub> /kJ mol <sup>-1</sup> <sup>d</sup>
WT	52.7±0.1	26.8±2.1	0.21±0.10	457
GG	43.1±0.1	27.8±1.4	0.40±0.10	474
SS	43.8±0.2	27.2±1.3	0.35±0.17	477

<sup>a</sup> Temperature at which the unfolding is half completed.

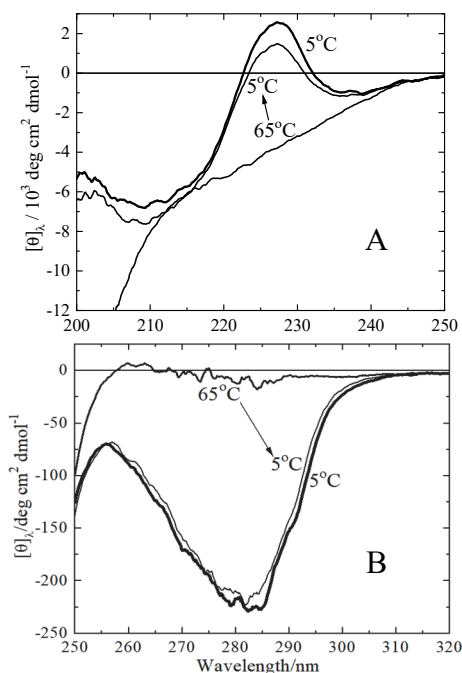
<sup>b</sup> Specific calorimetric enthalpy of unfolding.

<sup>c</sup> Difference in heat capacity between the native and unfolded states at *t*<sub>1/2</sub>.

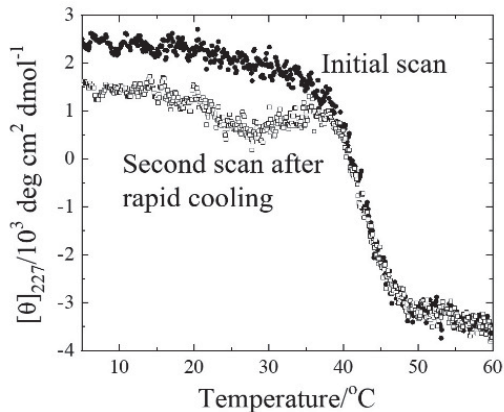
<sup>d</sup> The van't Hoff enthalpy of unfolding.



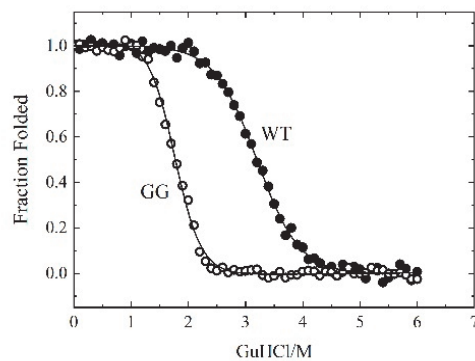
**Fig.3** Temperature dependence of the standard Gibbs energy change  $\Delta G^0$  for the unfolding of wild type (WT) and the disulfide-deficient mutants GG and SS, as evaluated by DSC. pH 7.<sup>17)</sup>



**Fig.4** Ultraviolet CD spectra of the GG mutant protein at 5 °C (bold lines, native state), 65 °C (unfolded state), and 5 °C after rapid cooling from 65 °C (thin lines; intermediate state).<sup>17)</sup>



**Fig.5** Thermal unfolding of the GG mutant protein monitored by the change in ellipticity at 227 nm,  $[\theta]_{227}$ , as the temperature was increased. Observed at pH7.<sup>17)</sup>



**Fig.6** Guanidine-hydrochloride (GuHCl) concentration dependence of the ratio of the native (folded) state wild type (WT) and GG proteins as evaluated by changes in ellipticity at 227 nm.<sup>18)</sup>

に有意の差はなかった(**Table 2**)。エンタルピー変化は、変異型でいずれも野生型よりやや大きく、また天然状態と変性状態の比熱の差  $\Delta c_p$  の値は、変異型では野生型の概ね二倍であった。

DSC 測定で得られた値に基づいて変性の熱力学量を求め、WT の変性温度付近で比較すると、変異型ではエンタルピー変化もエントロピー変化も増大し、その大きさは、前者でおよそ 50 kJ mol<sup>-1</sup>、後者では  $T\Delta S^0$  としておよそ 60 kJ mol<sup>-1</sup> であり、その結果、変性のギブズエネルギー変化  $\Delta G^0$  としておよそ 10 kJ mol<sup>-1</sup> の減少となった (**Fig.3**)。すなわち、SBD のジスルフィド結合の欠損はエンタルピー的にはむしろ安定化に寄与し、これを上回るエントロピー項の増大 (不安定化) があり、それらの相殺の結果として不安定化が起きていることがわかった。

遠紫外部および近紫外部の、天然状態 (5 °C) における CD スペクトルを **Fig.4** (太い実線) に示す。<sup>17)</sup> (この図に示したものは変異型 GG の結果であるが、三種の SBD いずれでも遠紫外部で 227 nm 付近に正のピークを持つ、ほぼ同一の特徴的なスペクトルが得られた。<sup>15)</sup> 温度上昇に伴う 227 nm のモル楕円率  $[\theta]_{227}$  の減少を指標として熱変性を測定した結果を **Fig.5** に示す (●)。この測定に基づいて評価した  $t_{1/2}$  や  $\Delta H_{\text{NH}}$  の値は DSC による結果と大きな差はなく、<sup>15,17)</sup> 変性の平衡論的の中間体はないものと推定された。

### 3.2 変性剤変性に対する効果

変性に伴う  $[\theta]_{227}$  の減少を指標として、塩酸グアニジン (GuHCl) 濃度の増大に伴う天然状態の分子種の割合の減少を WT と GG について評価した。<sup>18,19)</sup> その結果を **Fig.6** に示す。熱変性の場合と同様にジスルフィド結合の欠損が不安定化をもたらし、変性の中間濃度が WT で 3.8 M であったのに対して GG では 1.8 M であった。この結果から変性の  $\Delta G^0$  の値を各濃度で求め、水溶液 (塩酸グアニジン濃度 0 M) に直線補外すると、WT では 23 kJ mol<sup>-1</sup>、GG では 17 kJ mol<sup>-1</sup> がそれぞれ得られた。これらの値は、**Fig.3** に示した DSC による値、24 kJ mol<sup>-1</sup> (WT)、および 17 kJ mol<sup>-1</sup> (GG) と整合する。

変性剤濃度に対する  $\Delta G^0$  の傾き  $m$  の値<sup>20,21)</sup> は、WT では -6.8 kJ mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>、GG では -9.4 kJ mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> であった。すなわち GG の値は WT の約 1.4 倍であり、変性に際して溶媒に露出する面積が WT より大きいことが示された。これは熱変性で得られた  $\Delta c_p$  の値が、変異型で野生型より大きいことと整合する。

高濃度塩酸グアニジン (4.2 および 6.6M) 共存下での野生型 SBD の X 線小角散乱の測定からは、変性状態での慣性半径  $R_G$  の値として約 26 Å が得られた。<sup>22)</sup> ジスルフィド



結合や補欠分子族を持たないアミノ酸残基数  $n$  のタンパク質がランダムコイルをとる時に期待される  $R_G$  は一般に次式で与えられる。<sup>23)</sup>

$$R_G = 1.927 \times n^{0.598} \text{ \AA} \quad (2)$$

これに SBD での値  $n=110$  を代入すると  $32 \text{ \AA}$  が得られ、実測値  $26 \text{ \AA}$  はこの値より有意に小さい。このことは、変異型に比べて野生型では熱変性における  $\Delta S^0$  や  $\Delta C_p$  が小さいこと、および塩酸グアニジン変性における  $m$  値が小さいことに対応しており、SBD 分子のほぼ両端にかかるジスルフィド結合が変性状態での分子の広がり（コンフォメーションの自由度）を制限していることを反映していると考えられる。

ジスルフィド結合がタンパク質の安定化におよぼす熱力学的効果については、変性状態へ影響するのか天然状態であるのか、エントロピーの効果かエンタルピーか、等の視点から数々の実験と議論が重ねられてきているが、デンブリン結合ドメインの場合は、ジスルフィド結合は主として変性状態に影響し、変性状態のエントロピーを小さくすることによって変性状態を不安定化させ、相対的に天然状態を安定化する（変性の  $\Delta G^0$  を大きくする）という古典的な例<sup>24)</sup> に属すると考えられる。

#### 4. 変異型 SBD の中間体形成

##### 4.1 急冷後の変異型 SBD の構造

DSC 測定 (Fig.2) において、高温までの走査後急冷し、ただちに再走査すると、WT では初回と同じ結果が得られたが (B)、変異型の場合は、いずれの場合も  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  付近に新たな小さいピークが観測された (D, F)。<sup>15,17,25)</sup> この小ピークは、初回走査後、高温から毎分  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  でゆっくり冷却した後で再走査した場合や、急冷後に  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  で  $24 \text{ 時間}$  保持してから再走査した場合は消失し、いずれも初回走査と同じ DSC 曲線が得られた。<sup>17)</sup>

変異型タンパク質 GG について、 $227 \text{ nm}$  のモル楕円率を指標として同様の実験を行うと (Fig.5)、初回昇温走査では前述のように単純な S 字状の温度依存性が見られたが (●)、急冷後ただちに再走査すると、モル楕円率が天然状態より小さい値から出発し、 $25 \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$  で負のピークが見られた後、 $35 \text{ }^\circ\text{C}$  付近からは初回走査をなぞった (○)。<sup>17)</sup> (Fig.4-A に示すように、急冷後の遠紫外 CD スペクトルは天然状態と似ているが異なる。)

以上の結果から、ジスルフィド結合を欠く変異型 SBD では、高温から急冷すると少なくとも一部の分子は天然状態とは異なる準安定な状態になることが示唆され、これを確かめるために、天然状態と急冷後の GG 溶液を核磁気共鳴実験に供した。

Fig.7 は GG について得られた  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (部分) である。<sup>16)</sup> 上段は  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  で測定したもので、低磁場側の  $10.75$ ,  $10.5$ , および  $10.12 \text{ ppm}$  のピークは、後述の  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$  HSQC の結果とも併せて、それぞれ Trp109, Trp84, および Trp37 に帰属された。下段は  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  に昇温後急冷して  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  で測定した場合の結果である。ピークはそれぞれ  $10.75 \rightarrow 10.5 \text{ ppm}$ ,  $10.5 \rightarrow 10.4 \text{ ppm}$ , および  $10.12 \rightarrow 10.17 \text{ ppm}$  にシフトし、両者で明確に異なるスペクトルが得られた。また、この急冷溶液を一旦  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  で  $1 \text{ 時間}$  保持してから再度  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  で測定すると天然状態 (上段) と全く同じスペクトルが得られた。

これらのことから、変異型タンパク質では高温から急冷すると、"天然状態と構造が類似であるが異なり、エネルギー的に準安定な状態 (中間体 I) " にトラップされることが明らかとなった。DSC の再走査 (Fig.2 の D および F) で観測された  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  付近の小ピークは、昇温に伴って I が N に移行する過程を反映しているものと考えられる。<sup>17)</sup>

##### 4.2 急冷 GG 溶液の二次元 NMR 測定

上記で同定された中間体の性質を詳しく調べるために、二次元 NMR 測定が杉本らによって行われた。<sup>15)</sup> Fig.8 (上段) は、急冷後  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  に保持したときの  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの経時変化を示すもので、典型例として Ala17 の主鎖アミド基に帰属されたシグナル部分を拡大したものである。急冷直後は中間体 I に由来するシグナルのみが見られるが、時間経過に伴って徐々に I のシグナルが消失する一方、天然状態 N に由来するシグナルが出現して、その強度が徐々に増大していった。シグナル強度の経時変化を Fig.8 の下段に示す。I から N への転移の半減期は、I 由来シグナルの消失速度、N 由来シグナル出現速度のいずれによって評価してもおよそ  $11 \text{ 時間}$  であり、中間体としては例外的に大きい値であった。また、この値は分子内の  $21$  か所の主鎖 NH およびトリプトファン残基側鎖 NH について調べた範囲で共通であり、I から N への転移が分子の広範囲にわたる協同的变化であることが示された。半減期  $11 \text{ 時間}$  は活性化ギブズエネルギー  $-\Delta G^\ddagger$  としておよそ  $100 \text{ kJ mol}^{-1}$  に相当しこの大きな  $\Delta G^\ddagger$  という壁によって急冷後の GG 分子は準安定な中間体 I にトラップされる。

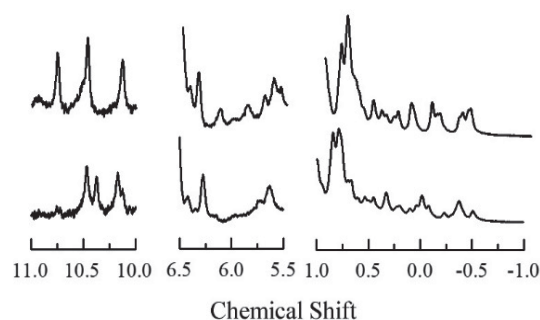


Fig.7  $^1\text{H-NMR}$  spectra of GG at  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  (upper spectra; native state) and at  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  after rapid cooling from  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  (lower spectra; intermediate state). Observed at pH 7.<sup>17)</sup>

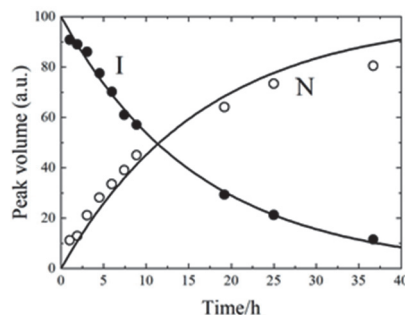
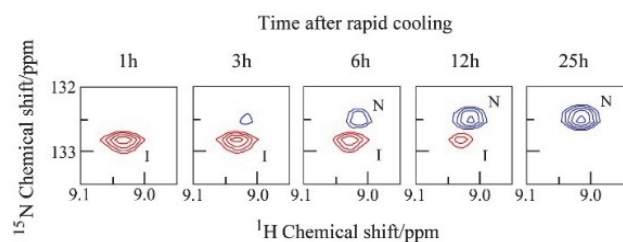
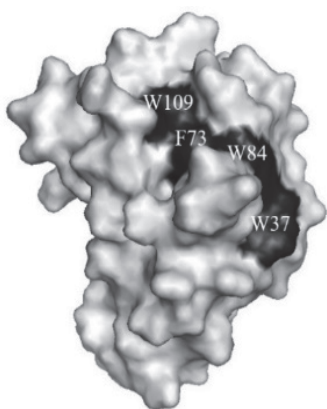
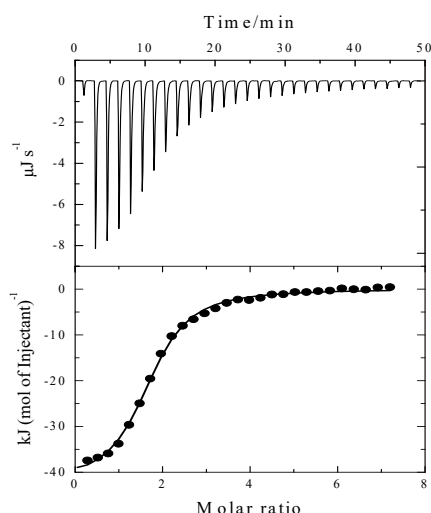


Fig.8 Upper figure: Changes in the  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$  HSQC spectra of the backbone-amide proton of Ala17 during the transition from the intermediate state (I) to the native state (N) of GG. Lower figure: Time courses of the peak-signal amplitude of I and N. Observed at  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  for  $40 \text{ 時間}$  after rapid cooling from  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ .<sup>16)</sup>



**Fig.9** Aromatic residues in the solvent-exposed hydrophobic cluster whose packing characteristics differ between the native and the intermediate states.<sup>16)</sup>



**Fig.10** Isothermal titration calorimetry of the binding of  $\beta$ -CD with the intermediate state of GG, observed at 5 °C after rapid temperature decrease from 65 °C (see Table III). pH 7.<sup>16)</sup>

前述のように、初回 DSC 測定後の GG 溶液を急冷したあと、5 °C で 24 時間保持した後に再走査をした場合は 25 °C 近辺の小ピークが見られなかったが、このことは、24 時間の保持中に大半の中間体が天然状態に巻き戻ったことによる、と説明できる。

この中間体がどのような構造をとっているのか興味を持たれるが、HSQC および NOESY スペクトルの測定から、この中間体では、Phe13, Tyr50, Trp57, Tyr71 など分子内部にある疎水性コアのパッキングは天然状態と同様に硬いものに対して、Trp37, Phe73, Trp84, Trp109 など分子表面に存在する疎水性クラスター (Fig.9 の黒い部分) のパッキングが異なっている (緩んでいる) ことが判明した。<sup>16)</sup>

### 4.3 中間体 I の諸性質

中間体 I は低温で比較的長時間安定に存在することから、 $\beta$ -CD との結合を ITC によって測定することができた (Fig.10)。<sup>17)</sup> これから得られた結合の熱力学諸量は、中間体と天然状態で大きな差はなかった (Table 3)。基質結合サイトの疎水性残基を Ala に置換した変異型 SBD を用いて

**Table 3** Thermodynamic parameters for the binding of  $\beta$ -Cyclodextrin with GG at 5 °C and pH7.<sup>17)</sup>

State	<i>n</i>	<i>K<sub>d</sub></i> / $\mu$ M	$\Delta H$ /kJ mol <sup>-1</sup>	$T\Delta S^0$ /kJ mol <sup>-1</sup>
Native	2.07	4.22	-42.0	-13.4
Intermediate <sup>a</sup>	1.69	8.61	-42.4	-15.4

<sup>a</sup> The protein solution was kept at 65 °C for 1min in the ITC cell, rapidly cooled to 5 °C, and then titrated with  $\beta$ -cyclodextrin.

$\beta$ -CD との結合を調べた実験からは、Trp37, Trp84 は結合に不可欠であることがわかっているが、<sup>7)</sup>  $\beta$ -CD の結合はそれらの配向には敏感ではないものとみられる。

分子内部の疎水性コアが天然状態と同様であること、近紫外部の CD スペクトルは天然状態と中間状態でほぼ同じであること (Fig.4-B) も考えあわせると、中間状態は天然状態と同等レベルの三次構造を形成しており、いわゆるモルテングロビュール<sup>25)</sup>とは性質を異にすると考えられる。

中間体 I を形成した低温の GG 溶液を 30 °C に上昇させて CD スペクトルを経時的に測定すると、天然状態 N のスペクトルに直接移行するのではなく、227 nm 付近のシグナルが一旦大きく減少して変性状態 U のスペクトルに近づき、その後、徐々に天然状態のスペクトルに移行していくことが知られている。<sup>17)</sup> I から N への転移が分子の広範囲にわたる変化であることも考え合わせると、中間体 I は、一般的な  $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$  という経路内中間体ではなく、 $I \rightleftharpoons U \rightleftharpoons N$  のように U  $\rightarrow$  N の経路の外にある経路外中間体である可能性も示唆される。前者の場合、この中間体は天然状態を形成するのに必ず經由せねばならないが、後者の場合、中間体 I はミスフォールド状態に相当する。

### おわりに

本解説では、グルコアミラーゼのデンブリン結合ドメインを対象として、そのジスルフィド結合の役割に関して筆者らが得たいくつかの知見を述べた。その役割を端的にまとめると、変性状態のエントロピーを減少させることによる天然状態の相対的安定化と、天然状態形成を邪魔する中間体形成を防ぐことである。

冒頭で述べたように、デンブリン結合ドメインをはじめとした糖質結合モジュール CBM は、不溶性多糖類加水分解酵素の共通構造として酵素化学的関心をひくが、一連の CBM 自体が物理化学的研究対象として興味深い性質を持つ。球状タンパク質の物性、特に変性や再生のモデルとしてはリゾチームをはじめとしたいくつかのタンパク質が有名であるが、CBM はモデルタンパク質としてそれらに伍する可能性を持っており、タンパク質の一次構造と立体構造や機能の相関という古典的難問 (久保亮五の分類<sup>27)</sup> を流用すると「第 0 族」、既知の難問の理解のための好個の試料となり得る。本解説がその趣旨で CBM への関心を呼ぶ機会の一つとなれば幸いである。

### 謝 辞

研究対象としてのアミラーゼ、研究手法としての熱測定それぞれの面白さを教えていただいた、故廣海啓太郎先生、故 Julian. M. Sturtevant 先生に深謝いたします。

## 文 献

- 1) K. Hiromi, M. Ohnishi, and A. Tanaka, *Mol. Cell. Biochem.* **511**, 79-95 (1983).
- 2) P. M. Coutinho and P. J. Reilly, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **29**, 334-347(1997).
- 3) B. Svensson, T. G. Pedersen, I. Svendsen, T. Sakai, and M. Ottesen, *Carlsberg Res. Commun.* **47**, 55-69 (1982).
- 4) C. Christiansen, M. A. Hachem, S. Janecek, A. Viksø-Nielsen, A. Blennow, and B. Svensson, *FEBS J.* **276**, 5006-5029 (2009).
- 5) A. Tanaka, H. Fukada, and K. Takahashi, *J. Biochem.* **117**, 1024-1028 (1995).
- 6) A. Tanaka, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 2055-2058 (1996).
- 7) Y. Masuda, H. Miyake, A. Tanaka, and H. Sugimoto, *Netsu Sokutei* **44**, 135-138 (2017).
- 8) A. D. Jørgensen, J. Nøhr, J. S. Kastrup, M. Gajhede, B. W. Sigurskjold, J. Sauer, D. I. Svergun, B. Svensson, and B. Vestergaard, *J. Biol. Chem.* **283**, 14772-14780 (2008).
- 9) C. Roth, O. V. Moroz, A. Ariza, L. K. Skov, K. Ayabe, G. J. Davies, and K. S. Wilson, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **74**, 463-470 (2018).
- 10) N. J. Belshaw and G. Williamson, *Eur. J. Biochem.* **211**, 717-724 (1993).
- 11) A. Tanaka, S. Karita, Y. Kosuge, K. Senoo, H. Obata, and N. Kitamoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 2127-2132 (1998).
- 12) K. Sorimachi, A. J. Jacks, M. F. Le Gal-Coëffet, G. Williamson, D. B. Arche, and M. P. Williamson, *J. Mol. Biol.* **259**, 970-87 (1996).
- 13) Y. Suyama, N. Muraki, M. Kusunoki, and H. Miyake, *Acta Crystallogr. F Struct Biol. Commun.* **73**, 550-554 (2017).
- 14) T. Giardina, A. P. Gunning, N. Juge, C. B. Faulds, C. S. M. Furniss, B. Svensson, V. J. Morris, and G. Williamson, *J. Mol. Biol.* **313**, 1149-1159 (2001).
- 15) H. Sugimoto, M. Nakaura, Y. Kosuge, K. Imai, H. Miyake, S. Karita, and A. Tanaka, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1535-1541 (2007).
- 16) H. Sugimoto, Y. Noda, and S. Segawa, *J. Mol. Biol.* **412**, 304-315 (2011).
- 17) H. Sugimoto, M. Nakaura, S. Nishimura, S. Karita, H. Miyake, and A. Tanaka, *Protein Sci.* **18**, 1715-1723 (2009).
- 18) 橋口晋弥, 三重大学修士論文 (2012).
- 19) 北澤桃子, 三重大学学士論文 (2014).
- 20) J. A. Schellman *Biopolymers* **17**, 1305-1322 (1978).
- 21) C. N. Pace, B. A. Shirley, and J. A. Thomson, in *Protein Structure: A Practical Approach* (T. E. Creighton, ed.), pp. 311-330, IRL Press Limited, Oxford (1989).
- 22) C. Ota, M. Ikegami, A. Tanaka, and D. Hamada, *Biochim Biophys Acta* **1864**, 1464-1772 (2016).
- 23) J. E. Kohn, I. S. Millett, J. Jacob, B. Zagrovic, T. M. Dillon, N. Cingel, R. S. Dothager, S. Seifert, P. Thiyagarajan, T. R. Sosnick, M. Z. Hasan, V. S. Pande, I. Ruczinski, S. Doniach, and K. W. Plaxco, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12491-12496 (2004).
- 24) P. J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5222-5235 (1956).
- 25) 田中晶善, 荻田修一, 小菅芳栄, 妹尾啓史, 小畑仁, 熱測定 **26**, 136-140 (1999).
- 26) M. Ohgushi and A. Wada, *FEBS Lett.* **164**, 21-24 (1983).
- 27) 久保亮五, 「固体物理学の歩み」p.15, 岩波書店 (1962).



田中 晶善  
Akiyoshi Tanaka  
E-mail: akiyoshi@bio.mie-u.ac.jp