

博士論文（要約）

乳児型ビフィズス菌の腸管内増殖に関わる
菌体内糖代謝酵素の構造生物学的解析

佐藤 真与

目次

略語表.....	1
----------	---

序章

0. はじめに.....	5
0.1 腸内細菌とビフィズス菌.....	5
0.2. ビフィズス菌の糖代謝経路.....	5
0.2.1. ビフィズス菌の糖質源	
0.2.2. ビフィドシヤント	
0.2.3. GNB/LNB 経路	
0.2.4. ムチン糖タンパク質代謝経路	
0.3. 本論文の研究目的.....	14

第 1 章

Bifidobacterium bifidum JCM1254 株由来 α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (NagBb) に関する 構造生物学的・生化学的解析

1.1. はじめに.....	16
1.1.1. 糖質加水分解酵素について	
1.1.2. GH の反応機構	
1.1.3. NagBb について	
1.2. 本研究の目的.....	22
1.3. 方法.....	23
1.3.1. NagBb の発現・精製	
1.3.2. X 線回折データ測定・構造決定・構造精密化	
1.3.3. NagBb 変異体作製・発現精製	

1.3.4. 活性測定	
1.3.5. 金属定量	
1.3.6. CD スペクトル測定	
1.4. 結果	32
1.4.1. NagBb の発現・精製・結晶化	
1.4.2. NagBb の全体構造	
1.4.3. NagBb の活性中心	
1.4.4. NagBb の金属サイトに関する構造生物学的解析	
1.4.5. 活性測定	
1.4.6. 金属定量	
1.4.7. CD スペクトル解析	
1.5. 考察	56
1.5.1. NagBb の構造比較	
1.5.2. GH101 endo- α - <i>N</i> -アセチルガラクトサミニダーゼとの比較	
1.5.3. GH129 ファミリーの酵素との構造比較	
1.5.4. NagBb の金属について	
1.5.5. NagBb の触媒機構について	

第 2 章

Bifidobacterium longum JCM1217 株由来

UDP-グルコース-ヘキソース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (GalT_{Bl}) に関する 構造生物学的・生化学的解析

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

総括

.....114

引用文献

.....117

謝辭

.....123

略語表

- ABC トランスポーター : ATP-binding cassette transporter、ATP 結合カセット輸送体
- ADP : Adenosine di-phosphate、アデノシン 2-リン酸
- ATP : Adenosine tri-phosphate、アデノシン 3-リン酸
- BCA : Bicinchoninic acid assay、ビシンコニン酸法 (タンパク質定量法)
- BL : Beam line、ビームライン
- BSA : Bovine serum albumin、ウシ血清アルブミン
- CAZy : Carbohydrate-activate enzymes、糖質関連酵素データベース
- CBB : Coomassie brilliant blue、クーマシーブリリアントブルー
- CBM : Carbohydrate binding module、糖質結合モジュール
- CE : Carbohydrate esterase、炭水化物エステラーゼ
- EC 番号 : Enzyme commission numbers、酵素番号
- EMP 経路 : Embden-Meyerhof-Parnas pathway、エムデン-マイヤーホフ-パルナス経路
- Fuc : Fucose、フコース
- Gal : Galactose、ガラクトース
- Gal1P : Galactose-1-phosphate、ガラクトース-1-リン酸
- GalE : Galactose-4-epimerase、ガラクトース-4-異性化酵素
- GalE_{BI} : Galactose-4-epimerase from *Bifidobacterium longum* JCM1217、*Bifidobacterium longum* JCM1217 由来ガラクトース 4-異性化酵素
- GalK : Galactokinase、ガラクトキナーゼ
- GalM : Galactose mutarotase、ガラクトースムタロターゼ
- GalNAc : *N*-acetylgalactosamine、*N*-アセチルガラクトサミン
- GalNAc1P : *N*-acetylgalactosamine 1-phosphate、*N*-アセチルガラクトサミン 1-リン酸
- GalT : Galactose-1-phosphate uridylyltransferase、ガラクトース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ
- GalT_{BI} : UDP-Glucose-hexose-1-phosphate uridylyltransferase from *Bifidobacterium longum* JCM1217、*Bifidobacterium longum* JCM1217 由来 UDP-グルコース-ヘキソース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ
- GH : Glycoside hydrolase、糖質加水分解酵素
- GL-BP : Galacto-*N*-biose/Lacto-*N*-biose binding protein、ガラクト-*N*-ビオース/ラクト-*N*-ビオース結合タンパク質
- GLNBP : Galacto-*N*-biose/Lacto-*N*-biose phosphorylase、ガラクト-*N*-ビオース/ラクト-*N*-ビオースホスホリラーゼ
- Glc : Glucose、グルコース
- Glc1P : Glucose-1-phosphate、グルコース-1-リン酸

GlcNAc : *N*-acetylglucosamine、*N*-アセチルグルコサミン
GlcNAc1P : *N*-acetylglucosamine-1-phosphate、*N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸
GNB : Galacto-*N*-biose、ガラクト-*N*-ビオース
GNBase : Galacto-*N*-biosidase、ガラクト-*N*-ビオシダーゼ
GNBP : Galacto-*N*-biose phosphorylase、ガラクト-*N*-ビオースホスホリラーゼ
GT : Glycosyltransferase、糖転移酵素
HEPES : 4-(2-Hydroxy ethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid、へぺス
HexNAc : *N*-acetylhexosamine、*N*-アセチルヘキソサミン (*N*-アセチル化された六単糖)
HMO : Human milk oligosaccharide、ヒトミルクオリゴ糖
IPTG : Isopropyl- β -D(-)-thio galactopyranoside
KEK : 高エネルギー加速器研究機構
Lac : Lactose、ラクトース
LacNAc : *N*-acetylglucosamine、*N*-アセチルラクトサミン
LB : Luria-Bertani (培地の種類)
LNB : Lacto-*N*-biose、ラクト-*N*-ビオース
LNBase : Lacto-*N*-biosidase、ラクト-*N*-ビオシダーゼ
LNBP : Lacto-*N*-biose phosphorylase、ラクト-*N*-ビオースホスホリラーゼ
Man : Mannose、マンノース
Man1P : Mannose-1-phosphate、マンノース-1-リン酸
ManNAc : *N*-acetylmannosamine、*N*-アセチルマンノサミン
MCA : Multi channel analyzer
NagBb : α -*N*-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* JCM1254、
Bifidobacterium bifidum JCM1254 由来 α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ
NahK : *N*-acetylhexosamine 1-kinase from *Bifidobacterium bifidum* JCM1217、
Bifidobacterium bifidum JCM1217 由来 *N*-アセチルヘキソサミン 1-キナーゼ
NDP : Nucleotide di-phosphate、ヌクレオチド 2-リン酸
Neu5Ac : *N*-acetylneuraminic acid、*N*-アセチルノイラミン酸
OD : Optical density、光学密度
PCT : Pre-crystallization test kit
PDB : Protein data bank、タンパク質構造データベース
PEG : Poly ethylene glycol、ポリエチレングリコール
PF : Photon factory、放射光施設
Pfam : Database of protein families
PKA : Protein kinase A、プロテインキナーゼ A
PL : Polysaccharide lyase、多糖リアーゼ
PMSF : Phenyl methyl sulfonyl fluoride、フッ化フェニルメチルスルホニル

*p*NP : *p*-Nitrophenyl、パラニトロフェニル

RMSD : Root mean square deviation、平均二乗偏差

SAD : Single-wavelength anomalous dispersion、単波長異常分散

SDS-PAGE : ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動

SeMet : Selenomethionine、セレノメチオニン

Sia : Sialic acid、シアル酸

Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane、トリスヒドロキシメチルアミノメタン

UMP : Uridine mono-phosphate、ウリジン 1-リン酸

UDP : Uridine di-phosphate、ウリジン 2-リン酸

UTP : Uridine tri-phosphate、ウリジン 3-リン酸

UV : Ultra violet、紫外線

XAFS : X-ray absorption fine structure、X 線吸収微細構造

序章

0. はじめに

本研究では、乳児型ビフィズス菌のヒト腸管内における増殖に関わる 2 種類の糖代謝酵素に関する構造生物学的解析を行った。第 1 章では *Bifidobacterium bifidum* 由来のムチン糖タンパク質糖鎖の糖鎖-ペプチド間を加水分解する酵素である α -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (NagBb) の構造機能解析と触媒に関わる金属についての生化学的解析を行った。第 2 章では *Bifidobacterium longum* 由来のヒトミルクオリゴ糖またはムチン型糖タンパク質糖鎖の代謝経路において、糖の交換反応を行う酵素である UDP-グルコース-ヘキソース-1リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (GalTBl) の構造機能解析を行った。

序章では本研究で扱う 2 種の酵素の由来生物であるビフィズス菌と、その糖代謝経路について概説し、最後に本論文の研究目的を述べる。

0.1. 腸内細菌とビフィズス菌

腸内細菌は、ヒトの腸管内に 1000 種類以上、乾燥糞便 1 g あたり約 1 兆個と非常に多く棲息している。近年の研究によって、腸内細菌が宿主の健康に及ぼす影響は非常に多岐にわたることが次々と明らかにされてきた。

その中でもいわゆる「善玉菌」、すなわち、宿主に良い効果をもたらす生きた微生物（またはその成分）はプロバイオティクスと呼ばれる¹。プロバイオティクスとしては、乳酸菌 (*Lactobacillus* 属など) や、ビフィズス菌 (*Bifidobacterium* 属)、納豆菌 (*Bacillus subtilis natto*) などがよく知られている。ビフィズス菌はこのプロバイオティクスの代表例であり、免疫力の向上²、高コレステロール血症におけるコレステロールの減少³、悪玉菌の感染予防効果⁴、過敏性腸症候群の症状改善⁵、アレルギー症状の緩和⁶などの作用が報告されている。また、プロバイオティクス腸内細菌を増殖させる効果を持つ難消化性食物繊維およびオリゴ糖などの物質を、プレバイオティクスという。

ビフィズス菌は、健康な成人や乳幼児において、小腸下部から大腸にかけて棲息する、グラム陽性の偏性嫌気性菌である。宿主が摂取した糖質のうち、デンプンなどの易消化性糖質は、宿主の消化吸収作用や消化管上部に棲息する腸内細菌によって消化・吸収されるため、ビフィズス菌の棲息する消化管下部には容易に分解し吸収し得る糖質はほとんど届かない。これに対応して、ビフィズス菌は独自の糖代謝経路（後述）を複数有することにより、貧栄養環境中でも難消化性の糖を分解し利用して生育することが可能となっている。

0.2. ビフィズス菌の糖代謝経路

ビフィズス菌は、貧栄養環境での生育のため、独特な糖代謝経路を有することが明らかにされてきた。種や株により異なるバリエーションを持つものもいるが、ここでは一般的な概略を述べ、必要がある場合は明記する。

0.2.1. ビフィズス菌の糖質源

0.2.1.1. ヒトミルクオリゴ糖 (HMO)

ヒトの母乳は 3-5%の脂質、0.8-0.9%のタンパク質、0.2%のミネラル、そして、6.9-7.2%の糖質から成っている⁷。その糖質の構成は、80%はラクトース (Galβ1-4Glc ; Lactose ; Lac)、20%はヒトミルクオリゴ糖 (Human Milk Oligosaccharides ; HMO) と呼ばれる 100種類以上ものオリゴ糖である⁸。HMO は腸の低い pH にも耐えられ、また、ヒトの消化酵素によって分解を受けないことにより、そのまま消化管下部まで到達して腸内細菌に利用されうる⁹。

HMO には 12 のコアグループが知られている (図 0.2.1.)¹⁰。コア構造は、Lac に、ラクト-*N*-ビオース (Galβ1-3GlcNAc ; Lacto-*N*-Biose ; LNB) または *N*-アセチルラクトサミン (Galβ1-4GlcNAc ; *N*-acetylactosamine ; LacNAc) が結合したものの組み合わせで構成され、これらにシアル酸 (Sialic acid ; Sia) またはフコース (Fucose ; Fuc) が結合することで、100 種類以上もの HMO となる。LNB を含むオリゴ糖を type I と呼び、LacNAc を含むオリゴ糖を type II と呼ぶが、ヒトの母乳は type I オリゴ糖の含有量の方が type II よりも高い¹¹。これはヒトにおける HMO に際立った特徴であり、近縁種のチンパンジー、ボノボ、オランウータンでは type II の方が多く、ゴリラ、フクロテナガザルや霊長類以外の哺乳動物では、LNB を含むオリゴ糖はそもそも見られない。

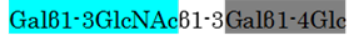
ビフィズス菌は、乳幼児の健康にとって特に重要で、腸内に定着して下痢などの病気を引き起こす病原性細菌の感染を防ぐ役割を果たす¹²。母乳栄養乳児では腸内フローラの優占種がビフィズス菌になるが、人工栄養乳児ではビフィズス菌の定着率が低いことが知られていた (なお、研究の進んだ現在では、人工オリゴ糖の添加により改善されている)¹³。母乳と、牛乳をもとにして作られた人工乳 (ほぼ Lac のみが含まれる) との違いは、HMO が含まれているかどうかであった。このことから、HMO がビフィズス菌の増殖因子、すなわちビフィズス因子ではないかと考えられてきた。しかし、100 種以上もあり、複雑な構造を有する HMO のうち、どの部分が真のビフィズス因子として働いているのかは不明であった。GNB/LNB 経路 (後述) の発見¹⁴により、LNB が真のビフィズス因子であることが示唆され、type I の乳 (母乳) によるビフィズス菌の優占的な生育が裏付けられた。これに伴い、乳児で見られるビフィズス菌種である *Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* が LNB を資化して増殖することが生育試験により明らかにされた¹⁵。さらに近年、LNB を含む HMO の代謝の鍵となる酵素ラクト-*N*-ビオシダーゼ (Lacto-*N*-biosidase ; LNBBase) に関する研

究が進んでいる。

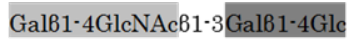
ラクトース



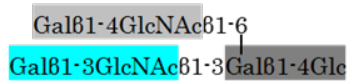
ラクト・*N*テトラオース



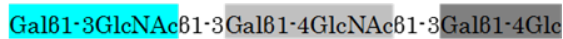
ラクト・*N*ネオテトラオース



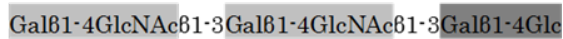
ラクト・*N*ネオヘキサオース



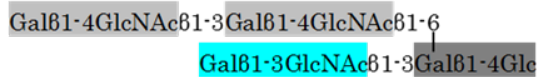
パララクト・*N*ヘキサオース



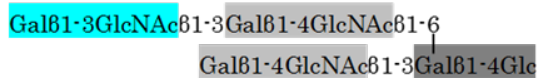
パララクト・*N*ネオヘキサオース



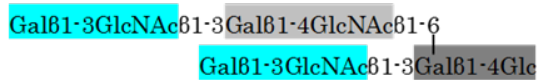
ラクト・*N*オクタオース



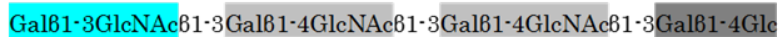
ラクト・*N*ネオオクタオース



イソラクト・*N*オクタオース



パララクト・*N*オクタオース



ラクト・*N*デカオース

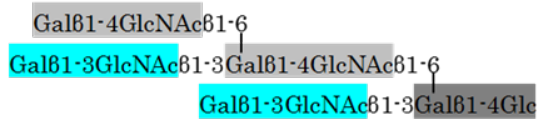


図 0.2.1. ヒトミルクオリゴ糖のコア構造

10をもとに作成。**Galβ1-4Glc** がラクトース、**Galβ1-3GlcNAc** がラクト-*N*-ビオース (LNB ; type I)、**Galβ1-4GlcNAc** が *N*-アセチルラクトサミン (LacNAc ; type II) を示す。

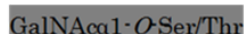
0.2.1.2. ヒト消化管由来ムチン型糖タンパクの糖鎖

ヒトの気管、胃腸などの消化管、生殖腺などの上皮は、ムチンを主成分とした粘液に覆われている。ムチンは、糖を多量に含む糖タンパク質であり、*O*-グリコシド結合を介してコアタンパク質のポリペプチド (アポムチン) に無数の糖鎖が結合している。ムチンに結合した種々の糖鎖は抗原性を有し、有名なものには、ABO 式血液型がある。糖鎖が短くなることでも抗原性が生じ、癌細胞の指標にもなる¹⁶。

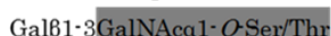
ムチンは、ほとんどが糖鎖の GalNAc とコアタンパク質の Ser または Thr 残基のヒドロキシ基とで α -*O*-グリコシド結合により連結している (ムチン型糖鎖)¹⁶。糖鎖の種類と結合の仕方によりコア構造が定められており、コア 1 からコア 8 まで知られている (図 0.2.2.)。これらの組み合わせで母核構造を作る。基幹領域は二糖 : Galβ1-3GlcNAc (type I)、Galβ1-4GlcNAc (type II) からなる。さらに GalNAc の結合により枝分かかれし、 α -結合した Gal、GalNAc、Fuc、あるいは Sia で終結する。

ムチン糖鎖の主構造は消化管の部位により異なっている。消化管上部 (胃・十二指腸) ではコア 1 ; Galβ1-3GalNAc (ガラクト-*N*-ビオース ; Galacto-*N*-Biiose ; GNB) が主である。一方消化管下部 (小腸) ではシアリル/ガラクトシル-コア 3 ; Galβ1-3/4GlcNAcβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAcα1-Ser/Thr がムチン糖鎖の主構造である¹⁷。ビフィズス菌はこれらの糖鎖を加水分解する酵素群を有することが知られている¹⁸。

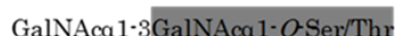
Tn antigen



Core 1 (T antigen)



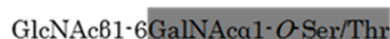
Core 5



Core 2



Core 6



Core 3



Core 7



Core 4



Core 8

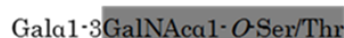


図 0.2.2. ムチン型糖鎖のコア構造

GalNAcα1-O-Ser/Thr が Tn 抗原を示す。

0.2.1.3. 食物繊維

ヒトの消化酵素により消化されない、食物に含まれる難消化性成分の総称である。主に植物や海藻、菌類（きのこ）などの細胞壁を構成する成分に由来する。ビフィズス菌は、植物の細胞壁に存在する構造タンパク質であるエクステンシンやプロリンリッチタンパク質などを分解する酵素も有することが明らかになっている¹⁹。

0.2.2. ビフィドシャント

ビフィズス菌では、多くの生物のグルコース代謝経路である Embden-Meyerhof-Parnas 経路 (EMP 経路) のいくつかの酵素が欠損しており、成立していない¹⁰。グルコースを効率よく代謝する EMP 経路を失っても、消化管下部の環境に特化して棲息してきたことは、独自の糖代謝経路である、ビフィドシャントの存在による (図 0.2.3.)。ビフィドシャントはペントースリン酸経路のいくつかの酵素 (トランスケトラーゼ、トランスアルドラーゼ) からなるが、最も特徴的なのは、ホスホケトラーゼという、ほぼビフィズス菌にしか存在しない酵素があることである²⁰。Bergey's manual (バージェイ細菌分類便覧)²¹でも、菌体内にホスホケトラーゼ活性があることがビフィズス菌の菌種同定における生化学的判断項目のひとつになっている。ホスホケトラーゼはフルクトース-6-リン酸またはキシロース-5-リン酸を、無機リン酸を利用して切断 (加リン酸分解) し、産物のひとつとしてアセチルリン酸を生成する。アセチルリン酸からは酢酸キナーゼにより ATP が 1 分子作られるので、ビフィドシャンではホスホケトラーゼによりグルコース 1 分子あたり 2.5 個の ATP が作られる。つまり、グルコース 1 分子あたり 2 個の ATP が作られる EMP 経路より、1.25 倍効率がよい。

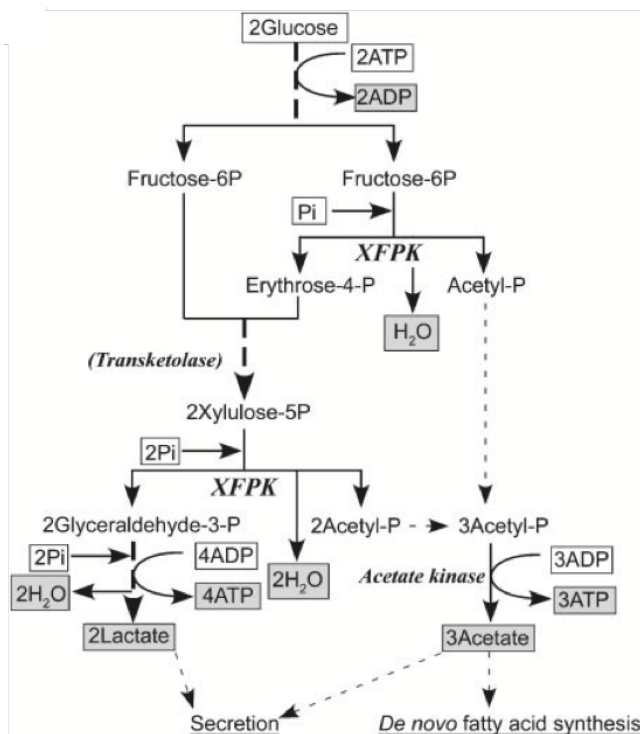


図 0.2.3. ビフィドシヤント

まとめると、 $2 \text{ glucose} + 5 \text{ Pi} + 5 \text{ ADP} \rightarrow 3 \text{ acetate} + 2 \text{ lactate} + 5 \text{ ATP} + 5 \text{ H}_2\text{O}$ の反応が起こる。²⁰より転載。

0.2.3. GNB/LNB 経路

ビフィズス菌に特有な、HMO やムチンに由来する LNB や GNB 糖の代謝経路である。*B. longum* NCC2705 株、JCM1217 株において、GNB/LNB 経路の全貌が初めて明らかにされた^{14,22} (図 0.2.4.、図 0.2.5.)。関連タンパク質群は遺伝子 *bl1638-bl1644* によりコードされ、クラスターを形成している。BL1638-BL1640 は ABC トランスポーター構成タンパク質、BL1641 はガラクト-*N*-ビオース/ラクト-*N*-ビオースホスホリラーゼ (GNB/LNB phosphorylase ; GLNBP)、BL1642 は *N*-アセチルヘキソサミン 1-キナーゼ (*N*-acetylhexosamine 1-kinase ; NahK)、BL1643 は UDP-グルコースヘキソース 1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (UDP-glucose hexose 1-phosphate uridylyltransferase ; GalT_{Bl})、BL1644 は UDP-グルコース 4-エピメラーゼ (UDP-glucose 4-epimerase ; GalE_{Bl}) と同定された。

0.2.3.1. 菌体外での GNB/LNB の切り出し

ビフィズス菌は様々な加水分解酵素を菌体外に分泌し、HMO またはムチン型糖鎖から構

成要素である LNB、または GNB の二糖を切り出してくる。例えば、HMO の主要成分はラクト-*N*-テトラオースやラクト-*N*-フコペンタオースなどであるが、ここから α -L-フコシダーゼ²³によりフコシル基の切断が行われ、さらにラクト-*N*-ビオシダーゼ²⁴により Gal β 1-3GlcNAc (LNB) 構造が切り出されてくる。また、ムチン型糖鎖に対しては、コア 1 構造の糖-ペプチド間を加水分解し Gal β 1-3GalNAc (GNB) 構造を切り出すエンド α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (EngBF)²⁵や、種々のシアリダーゼによるシアル酸除去、ラクト-*N*-ビオシダーゼによる LNB の遊離などが行われている (後述)。これらの酵素はビフィズス菌に特有であるものが多い。

0.2.3.2. 菌体内 GNB/LNB 経路

遊離された GNB または LNB は、BL1638-BL1640 によりコードされた ABC トランスポーターにより取り込まれる¹⁰。BL1638 によりコードされている基質結合タンパク質が基質認識において重要な役割を果たす。取り込まれた GNB、LNB は GLNBP によりガラクトース 1-リン酸 (Gal1P) と GalNAc または GlcNAc に加リン酸分解される。GLNBP はガラクトシドである GNB および LNB にのみ作用する酵素である。ここで、分解された GlcNAc または GalNAc の 1 位ヒドロキシ基を ATP によりリン酸化するのが NahK であり、GlcNAc 1-リン酸 (GlcNAc1P) または GalNAc 1-リン酸 (GalNAc1P) を生成する。先に GLNBP により遊離された GalNAc1P は、さらに本研究の対象である GalT_{BI}により UDP-GlcNAc との UMP 基の交換反応が行われ、UDP-GalNAc になる。これらは GalE_{BI}により異性化され、UDP-GlcNAc になる。そして再度 GalT_{BI}により GlcNAc1P に変換される。ここに出てくる GalT_{BI}、GalE_{BI}はヒトなども有する Leloir 経路 (後述) 中で働く酵素として一般的に知られている GalT、GalE とは異なり、*N*-アセチルヘキソサミンに対しても特異的活性を持つ、ビフィズス菌特有のものである。以上のような代謝経路により、一分子の GNB または LNB は共に、最終的には一分子の Glc1P (Leloir 経路による Gal1P の代謝産物、後述) と一分子の GlcNAc1P の形となり、下流の代謝系に入っていく。

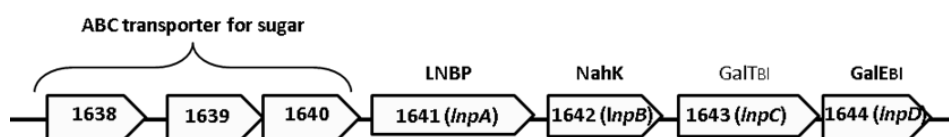


図 0.2.4. *B. longum* における GNB/LNB 経路の遺伝子クラスター

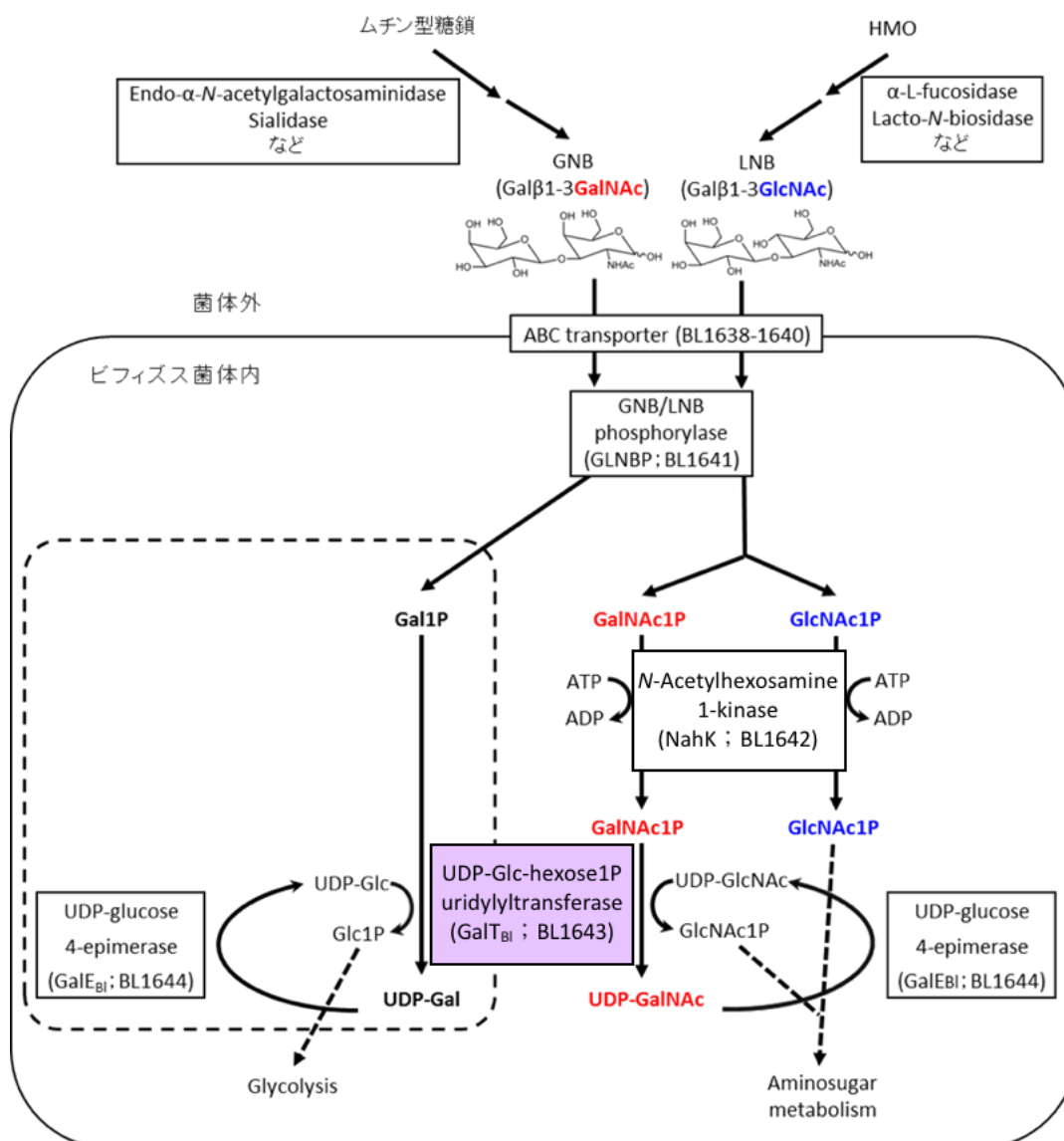


図 0.2.5. *B. longum* の GNB/LNB 経路

0.2.3.3. GNB/LNB 経路の意義

ほとんどの生物では、ガラクトースは Leloir 経路 (図 0.2.6.) により Glc1P へと変換される。Leloir 経路で働く酵素は 4 種類で、まず、ガラクトースムタローゼ (GalM) により β-Gal は α-Gal へ変換され、ガラクトキナーゼ (GalK) により α-Gal から Gal1P へリン酸化され、GalT により Gal1P から UDP-Gal へ、GalE により UDP-Gal から UDP-Glc へ、再び GalT により UDP-Glc から Glc1P へ、と変換される。GNB/LNB 経路とこの Leloir 経路は似ているが、最大の違いは、GNB/LNB 経路では *N*-アセチルヘキソサミンも代謝できる点である。また、Leloir 経路では Gal から ATP を 1 分子用いて Glc1P に変換するが、GNB/LNB 経路では二糖を GLNBP により Gal1P と *N*-アセチルヘキソサミンに無機リン酸を用いた加リン酸分解をし、その後 ATP 1 分子を用いて最終的に Glc1P と GlcNAc1P に

変換する。つまり GNB/LNB 経路では ATP 1 分子の消費で 2 つの糖 1-リン酸が得られるので、エネルギー効率がよく有利であると考えられている。また、ビフィズス菌ゲノムに Leloir 経路中の酵素 GalM と GalE (GalE_{B1}ではない) は見られなかったことから²²、ビフィズス菌はガラクトース代謝を一部 GNB/LNB 経路に兼用させて行っていると考えられている。

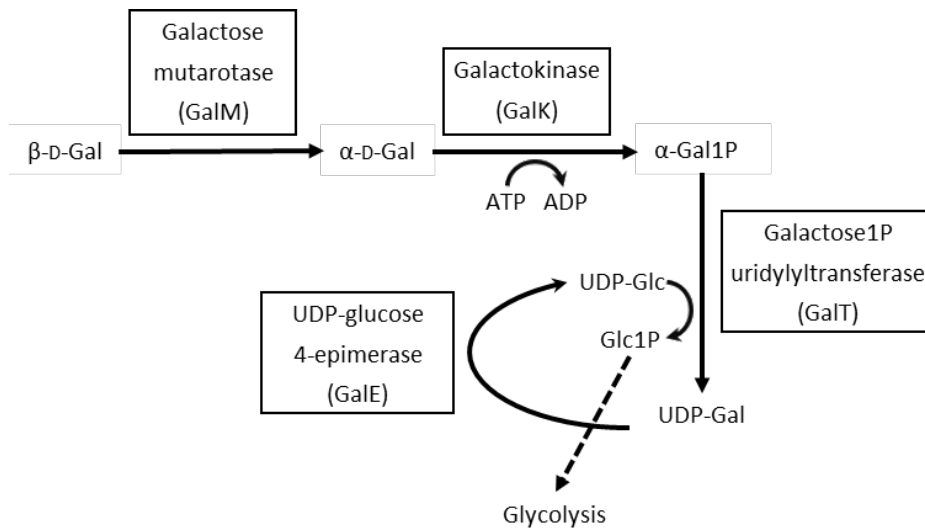


図 0.2.6. Leloir 経路

0.2.4. ムチン糖タンパク質代謝経路

新たに見つかった、ムチン型糖鎖由来の糖ペプチドに対する代謝経路である。この経路の存在は、本研究で扱う NagBb の発見・同定により *B. bifidum* JCM1254 株において明らかにされたものである²⁶。

0.2.4.1. 菌体外での Tn 抗原の切り出し

ビフィズス菌はムチン型糖鎖に対する加水分解酵素も数多く有している。ムチンの糖鎖は部位により発現量や種類が異なるが、ビフィズス菌の棲息する消化管下部（小腸）で主要なムチン糖鎖は、シアリル/ガラクトシル-コア 3 ; Galβ1-3/4GlcNAcβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAcα1-Ser/Thr である。この糖鎖の *B. bifidum* JCM1254 株における代謝の例を図 0.2.6.に示す。シアラ酸はエキソ α-シアリダーゼ (SiaBb2)²⁷により切断される。Type I の Galβ1-3GlcNAcβ1-3GalNAcα1-Ser/Thr は、ラクト-N-ビオシダーゼにより非還元末端側の LNB が遊離され、LNB は上記の GNB/LNB 経路に入り、ムチンのコアタンパクに結合した形で GalNAcα1-Ser/Thr (Tn 抗原)が残る。一方 Type II の Galβ1-3GlcNAcβ1-3GalNAcα1-Ser/Thr は、β-ガラクトシダーゼ (BbgIII)、β-N-アセチルヘキソサミニダーゼ I または II (BbhI/BbhII)²⁸により非還元末端側の Gal、GlcNAc が順次遊離されていき、最終的にム

チンのコアタンパクに結合した形で GalNAcα1-Ser/Thr (Tn 抗原) が残る。

以上のようにしてコアタンパクに結合して残った α-GalNAc は、何らかのペプチダーゼによりコアタンパクごと分解を受けることで、GalNAc が結合したペプチド断片として遊離される。

0.2.4.2. 菌体内での Tn 抗原の代謝

Tn 抗原を含むペプチド断片は *dppA1* という遺伝子によりコードされるオリゴペプチドトランスポーターにより菌体内に取り込まれると考えられている。ここでペプチド鎖中の Ser または Thr と O 結合でつながった α-GalNAc を加水分解により遊離するのが NagBb である。その後 GalNAc、ペプチド断片はそれぞれ代謝されていく。

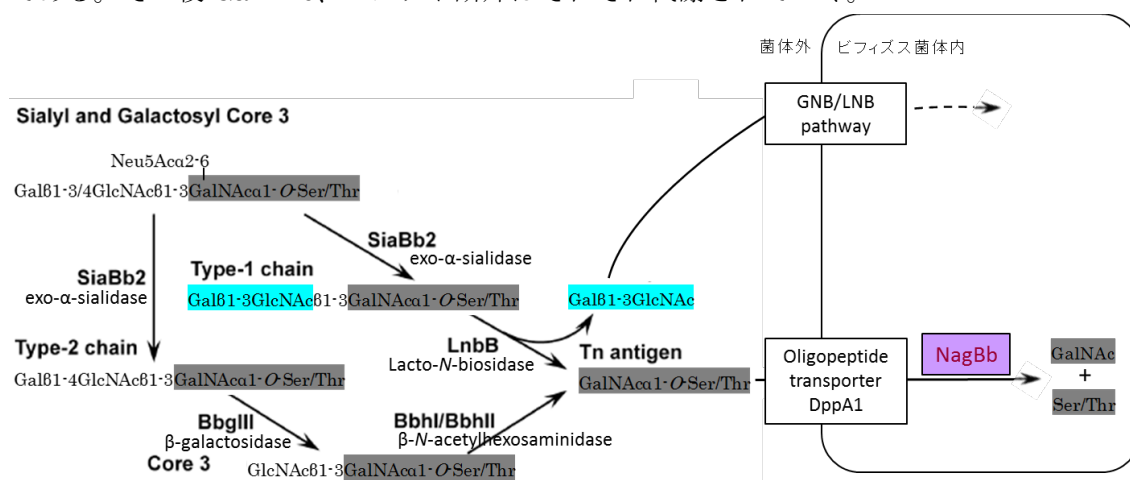


図 0.2.7. *B. bifidum* JCM1254 株のムチン型糖タンパク質代謝経路

26 をもとに作成。

0.3. 本論文の研究目的

ビフィズス菌に特有なヒト糖鎖代謝経路の起源に迫り、より深い知見を得るため、X 線結晶構造解析と生化学的解析を用いることにより、ビフィズス菌のヒト糖鎖代謝経路で働く特徴的な 2 つの酵素、NagBb と GalT_{BI} に関する研究を行った。

NagBb に関しては、筆者の修士課程時の研究によって立体構造の取得には成功していたが、触媒に重要な金属サイトに関する実験をメインに、さらなる解析を行った。

GalT_{BI} に関しては、Class II に属する初の GalT の立体構造解明を目指して、X 線結晶構造解析と生化学的解析を行った。

第 1 章

Bifidobacterium bifidum JCM1254 株由来

α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (NagBb) に関する

構造生物学的・生化学的解析

1.1. はじめに

本章では、ビフィズス菌特有の酵素である *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株由来 α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (NagBb) の構造生物学的解析と、生化学的解析を行った。

1.1.1. 糖質加水分解酵素について

生体で働く糖質は、様々な種類の単糖の組み合わせから成り、結合の仕方も多様である。これらを厳密に認識し作用する酵素にも、非常に多くの種類が存在しており、世界中で盛んに研究が進められている。糖質の分解や転移などに関わる酵素は糖質関連酵素と呼ばれ、糖質関連酵素のデータベース CAZy (Carbohydrate-Active enZymes)^{29 30}では、これらを触媒する反応および機能にもとづき以下の 5 クラスに分類している；糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase ; GH)、糖転移酵素 (Glycosyl Transferase ; GT)、多糖リアーゼ (Polysaccharide Lyase ; PL)、炭水化物エステラーゼ (Carbohydrate Esterase ; CE)、糖質結合モジュール (Carbohydrate-Binding Module、CBM)。その中でも、NagBb が属する GH は糖質関連酵素の中で最大のクラスである。主に糖質加水分解酵素を含んでおり、糖と糖間、糖と非糖間のグリコシド結合の加水分解を触媒する酵素群である。GH には他に、糖転移反応の活性が高いトランスグリコシダーゼや、加リン酸分解反応を行うホスホリラーゼなどが含まれている。GH ファミリーは GH1-156 (2018 年 12 月現在) まで分類されている。

1.1.2. GH の反応機構

糖質加水分解酵素はその加水分解機構の立体化学的性質に基づいて、アノマー保持型 (retaining ; 図 1.1.1.) あるいはアノマー反転型 (invertinng ; 図 1.1.2.) に分類される (一部例外あり)。活性中心はほとんどの場合 2 つの酸性残基 (アスパラギン酸またはグルタミン酸) である。

1.1.2.1. アノマー保持型 (Retaining mechanism)

アノマー保持型反応機構は、2 つのステップで反応を触媒する。それぞれのステップでアノマー炭素の結合を反転させるため、結果的にもとの構造を保持する。反応には 2 つの酸性残基が、1 つは求核性触媒残基、もう 1 つは酸/塩基触媒残基として働く。

最初のステップでは求核性触媒残基はアノマー中心部に求核攻撃し、酸/塩基触媒残基がプロトンを供与する。この時、求核性触媒残基と糖が共有結合を形成し、グリコシル-酵素中間体を生成する。次のステップでは、プロトンを奪われた酸/塩基触媒残基が塩基として

水分子からプロトンを引き抜き、この水が中間体を求核攻撃することで加水分解する反応が起こる。この反応の第2段階において、水以外の分子が求核基として働くと糖の転移反応が起こる。基質自身が求核基として働くことで基質の重合反応が起こる。

上述のように、アノマー保持型の反応機構は、求核基による基質へのアタックが2回起こるため、**double displacement mechanism** と呼ばれる。2つの触媒残基間距離は、酸/塩基触媒-基質-求核性触媒となるため約 5.5 \AA ³⁰ である。

Retaining mechanism for an α -glycosidase:

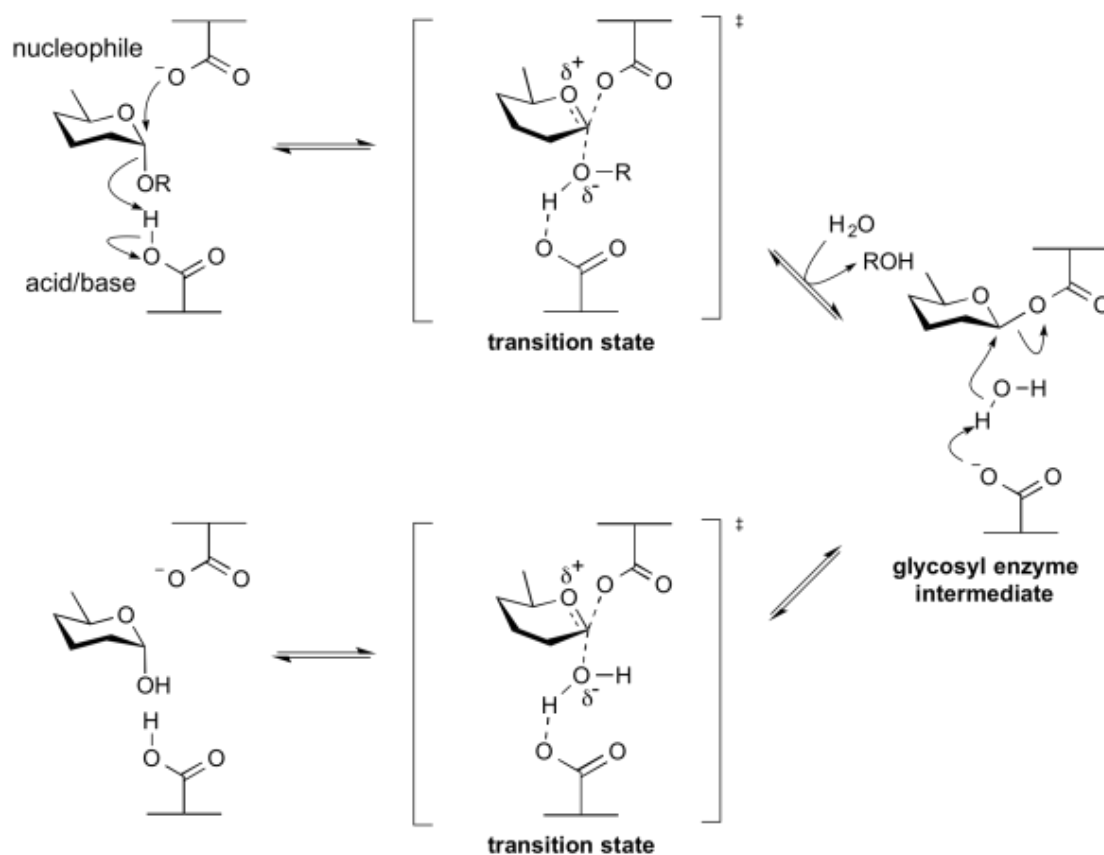


図 1.1.1. アノマー保持型 α -グリコシダーゼの反応機構

Cazypedia³⁰ より転載。

1.1.2.2. アノマー反転型 (Inverting mechanism)

アノマー反転型反応機構でも、2つの酸性残基がそれぞれ一般塩基触媒、一般酸触媒残基として働く。グリコシド結合に対し、一般酸触媒がプロトンを供与し、一般塩基触媒による脱プロトン化で活性化した水分子が求核攻撃する。その時、オキソカルベニウムイオンと呼ばれる中間体を経て、アノマーが反転する。アノマー反転型反応機構は、求核攻撃が1回のみ起こることにより、**single displacement mechanism** と呼ばれる。2つの触媒

残基間距離は、一般酸触媒-基質-水（求核剤）-一般塩基触媒となるため約 6-11 Å³⁰である。

Inverting mechanism for an α -glycosidase:

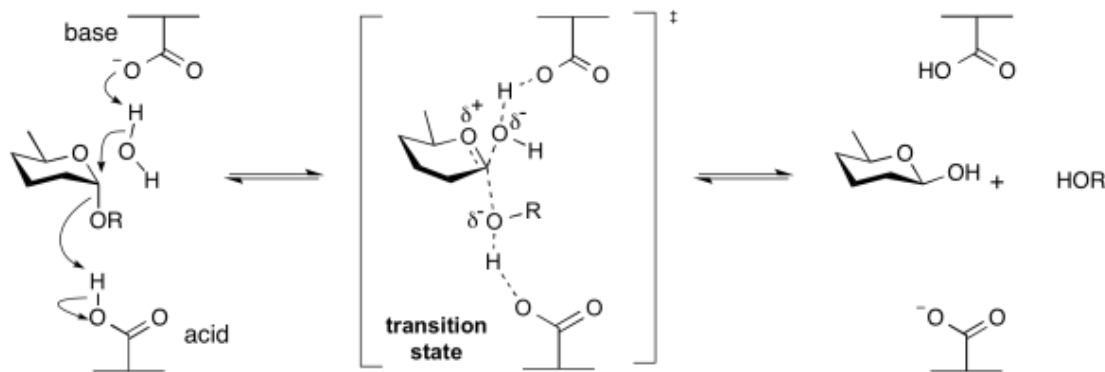


図 1.1.2. アノマー反転型 α -グリコシダーゼの反応機構

Cazypedia³⁰ より転載。

1.1.2.3. GH の反応機構の例外

GH には上記の 2 つの反応型には当てはまらないものもわずかながら存在する³¹。例外としては、活性中心が 2 つの酸性残基ではなく他の残基 (Tyr など) であるファミリー³² や、アノマー保持型でなおかつ基質が *N*-アセチルヘキソサミンの場合に起こる基質補助型 (substrate-assisted) 反応を起こすもの³³、さらに、アノマー保持型、反転型、ともに見られる、1 つ多い水分子が反応に関与する Grotthuss 機構³⁴ という反応機構を持つものなどがある。

1.1.2.4. GH の反応様式

上記の反応機構の分類とは別に、GH は、糖鎖のどの部分に作用するかによってエンド (endo) 型とエキソ (exo) 型に分類される (図 1.1.3.)。エンド型加水分解酵素は、糖鎖にランダムに作用して加水分解する酵素である。一方、エキソ型加水分解酵素は、糖鎖の非還元末端または還元末端に作用して順番に糖を切り出す酵素である。

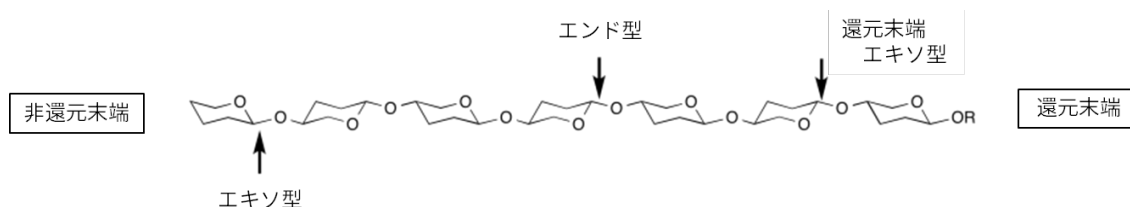


図 1.1.3. GH の反応様式

³⁵をもとに作成。

1.1.3. NagBb について

NagBb (α -*N*-acetylgalactosaminidase ; EC 3.2.1.49) は *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株のドラフトゲノム配列において、EngBF (*B. longum* JCM1217 株由来 endo- α -*N*-acetylgalactosaminidase) ²⁵ の遺伝子配列をもとに見つけられた *nagBb* 遺伝子としてクローニングされ、機能同定がなされた ²⁶。ビフィズス菌の糖ペプチド代謝経路中で、*O*-結合によりムチンのコアタンパク中の Ser または Thr と結合した α -GalNAc に対し、その間の結合を切断し α -GalNAc とペプチドに加水分解する酵素である (図 1.1.4.)。図 1.1.1.のようなアノマー保持型の反応機構を示す。

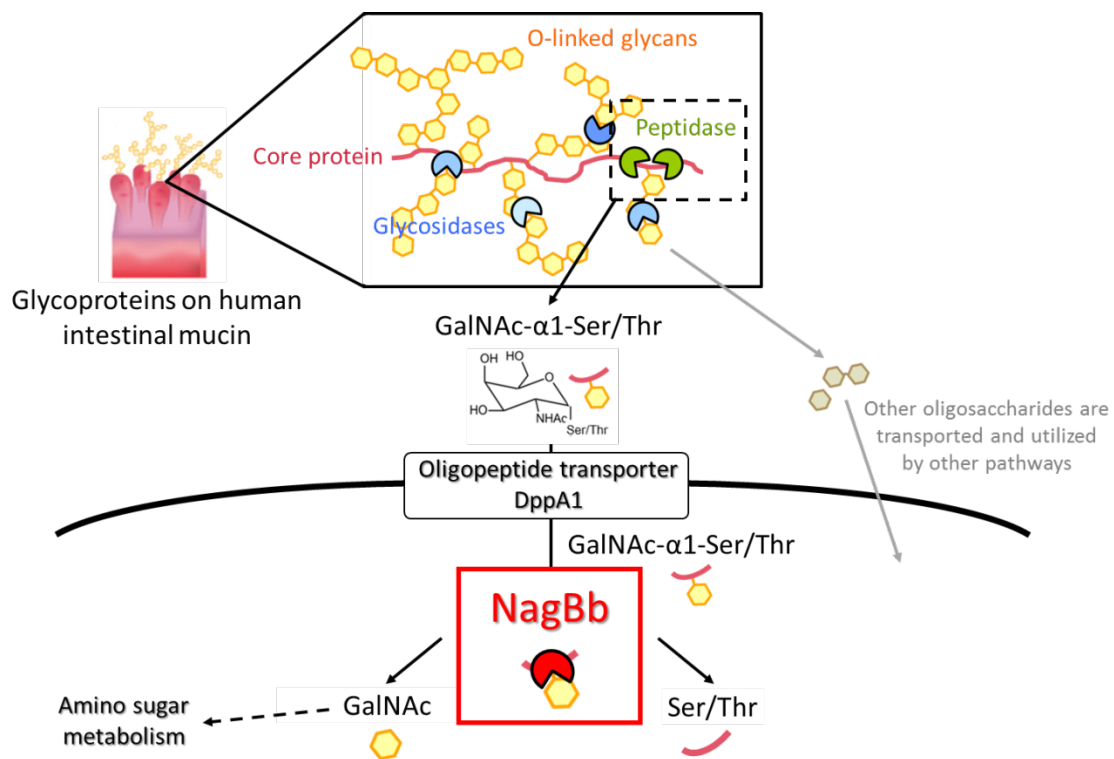


図 1.1.4. *NagBb* の *B. bifidum* 菌体内での反応模式図

α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼと呼ばれる酵素は、CAZy データベース ²⁹³⁰ では、GH27、GH36、GH101、GH109、GH129 に分類されている ²⁶。このうち、*NagBb* が属しているのは GH129 であり、本酵素によって新しく作られた GH ファミリーである。これらのファミリーのうち GH101 にはエンド型の endo- α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (EC 3.2.1.97) が属しており、GH27、GH36、GH109 にはエキソ型の exo- α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (EC 3.2.1.49) が属している。GH27 には、真核生物リソソーム由来の各種 α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼが含まれており、広い特異性を示すのが特徴である。GH36 の α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼとしては、*C. perfringens* 由来の

AagA [69]のみが属している。GH27、GH36 ともに多種の α -ガラクトシダーゼを含んでおり、類似の触媒機構を示す。GH109 には、反応に NAD⁺を必要とする特殊な α -N-アセチルガラクトサミニダーゼが属している。NagBb は、エキソ型の活性に加え、弱いエンド型の活性も持っていることと、既存の酵素との配列相同性が見られないこと、基質特異性が極めて異なること（後述）から、新規ファミリーGH129 に登録された。

NagBb は GH101 に属する EngBF²⁵ の配列を元にクローニングされたが、NagBb と EngBF との配列相同性は約 15-25%であった（図 1.1.5.）。EngBF とは異なり N 末端の分泌シグナルと C 末端の膜貫通領域がなかったことから、NagBb は菌体内酵素であると推定された。また、EngBF との比較により、NagBb における求核性触媒残基は Asp435、基質結合に重要な残基（anchor）は Asp330 であることが推定された²⁶。しかし、酸/塩基触媒残基は不明であるため、特定には立体構造解析が必要であった。

NagBb は 634aa から成る、約 71 kDa の酵素で、溶液中では単量体で働く。NagBb は pH 3.0-11.0 において安定、至適 pH は 5.0 ± 0.5 であった。また、55 °Cまで安定で、至適温度は 45 °Cであった。

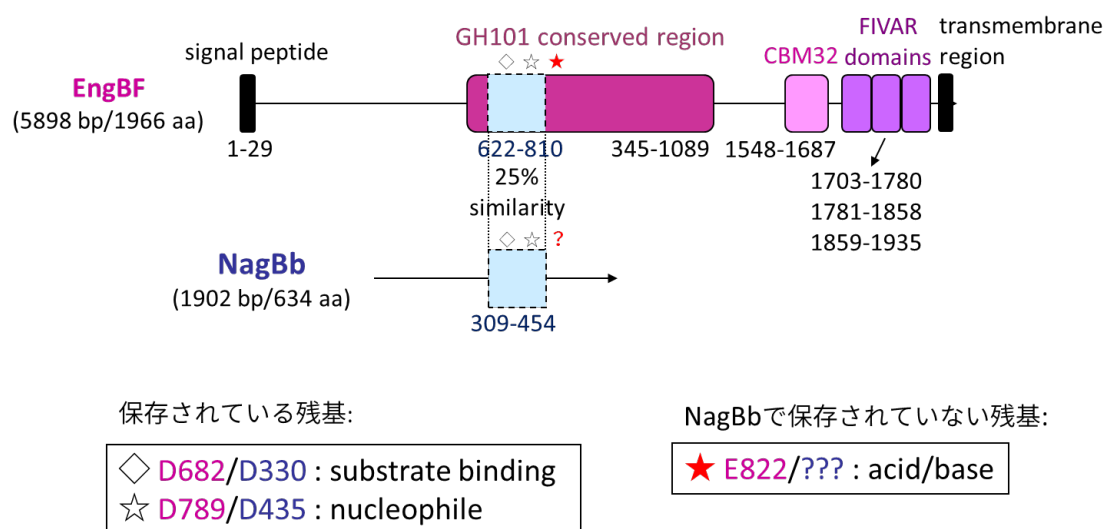


図 1.1.5. NagBb と EngBF のアミノ酸配列構成比較

1.1.3.1. NagBb の基質特異性²⁶

NagBb の主反応はエキソ型加水分解であるが、弱いエンド型加水分解作用も持つ（表 1.1.1.）。主な基質は GalNAc α 1-Ser/Thr（Tn 抗原）である。非還元末端に GalNAc を α 1 結合で持つ基質に対しては、ほぼ全て活性を示す（エキソ型活性）。しかし、A 型血液型高原である GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal に対しては、活性を示さなかった。一方エンド型活性に関しては、還元末端側に GalNAc を α 1 結合で持つ基質に対して、弱い活性が見られたものもあった。例えば、ムチン構造のコア 1 である T 抗原の pNP 基質；Gal β 1-

3GalNAc α 1-*p*NP に対しては、GalNAc が非還元末端にある GalNAc α 1-*p*NP に対する活性に比べ約 1/27 ではあるが、活性を示した。糖質加水分解酵素は、逆反応として糖転移活性を持つものもあるが、NagBb は GalNAc α 1-*p*NP と Ser から、GalNAc α 1-Ser を合成できる微弱な活性を持つことが明らかにされている。

表 1.1.1. NagBb の基質特異性

Substrate	Alternative name	Hydrolysis	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)
GalNAc α 1-Ser	Tn antigen	+	21.6
Neu5Ac2-6GalNAc1-Ser	Sialyl Tn antigen	-	
GalNAc α 1-3Gal β 1-4Glc		+	0.03
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal	A trisaccharide	-	
GalNAc α 1- <i>p</i> NP			
Gal β 1-3GalNAc α 1- <i>p</i> NP	Core-1, T antigen	+	0.08
Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1- <i>p</i> NP	Core-2	-	
GlcNAc β 1-3GalNAc α 1- <i>p</i> NP	Core-3	+	0.03
GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1- <i>p</i> NP	Core-4	-	
GalNAc α 1-3GalNAc α 1- <i>p</i> NP	Core-5	-	
GlcNAc β 1-6GalNAc α 1- <i>p</i> NP	Core-6	-	
GalNAc α 1-6GalNAc α 1- <i>p</i> NP	Core-7	+	*
Gal α 1-3GalNAc α 1- <i>p</i> NP	Core-8	+	<0.01

* : 非還元末端側からエキソ型活性により徐々に加水分解された。

²⁶をもとに作成。

1.1.3.2. GH129

GH129 は本研究の NagBb の同定により 2012 年に設立された比較的新しいファミリーである。GH129 に分類されているタンパクは 73 配列 (2018 年 12 月現在) あり、全てが細菌由来である。このうち 61 配列がビフィズス菌由来である。残りの配列の由来菌は、*Cellulophaga lytica*、*Clostridium saccharolyticum*、*Clostridium sphenoides*、*Flammeovirga* sp.、*Flavobacterium faecale*、*Niabella ginsenosidivorans*、

Paenibacillus mucilaginosus, *Victivallales bacterium*, *Zobellia galactanivorans* である。研究開始当時、このファミリーにおいて機能同定されている酵素は NagBb のみであり、立体構造が解かれているものはなかった。しかし、筆者の研究により 2017 年 5 月に 1 つめの立体構造が³⁶、次いで同年 11 月にフランスの研究グループにより 2 つめの立体構造が報告された³⁷。

1.2. 本研究の目的

本研究では、ビフィズス菌特有の新規ファミリー GH129 に属する NagBb について、初の立体構造情報を得ることにより触媒残基を同定し、その起源に迫りたいと考えた。

1.3. 方法

本研究における試薬は特に記さない限り、和光純薬工業株式会社または SIGMA-aldrich 社の特級試薬を用いた。また、以下の記述においてスモールスケールでの培養は Bio Shaker BR-43FL (TAITEC) を使用し、大量培養の場合は低温恒温槽付回転式振盪培養機 (高杉製作所) を使用した。遠心機は himac CR 20G (HITACHI) または MX-300 (TOMY) を用いた。

1.3.1. NagBb の発現・精製

1.3.1.1. 発現ベクター・宿主菌株

本研究で用いた NagBb は、京都大学 (当時) の清原正志博士らにより遺伝子クローニングがなされ、大腸菌用の発現ベクターが作製された。提供された発現用プラスミド pET23b-NagBb は、pET23 のマルチクローニングサイトに、5'-EcoRI、3'-XhoI で NagBb 遺伝子 (1905 bp) が組み込まれたものであり、C 末端に His₆-Tag が付加されている。pET23b はアンピシリン耐性である。プラスミド保持用菌株は *E. coli* XL10-Gold (Agilent technologies)、発現用菌株は *E. coli* C43 (DE3) (Stratagene) を用いた。

1.3.1.2. 組換え大腸菌の培養

NagBb の組換え大腸菌のグリセロールストックをピペットの先でピクルし、終濃度 100 µg/mL アンピシリンを添加した 5 mL LB 培地 (Luria-Bertani 培地; ナカライテスク; 以下同様) に植菌し、30 °C で一晩振盪し、前培養とした。この前培養液全量を終濃度 100 µg/mL アンピシリンを添加した 200 mL LB 培地に加え、37 °C で振盪し、本培養をした。OD (Optical Density) 600 が約 0.6 になった時点 (約 1.5 時間) で、終濃度 1 mM の IPTG を添加した。その後 25 °C で約 10 時間、発現誘導を行った。培養液を回収し、6,000 g、25 分間の遠心で集菌した。

1.3.1.3. 菌体破碎

回収した菌体を約 0.1 g/mL となるよう 50 mM Tris-HCl pH 7.8 + 0.1 mM PMSF に懸濁し、氷冷しながら超音波破碎を行った。超音波破碎器は Sonifier 250D (BRANSON) を用い、出力レベル 4、Duty 50%、Pulse 1 秒で約 0.2 min/mL 行った。12,000 g、30 分間の遠心により上清のみを採取した。その後、Minisart Syringe filter, hydrophilic 0.45 µm (Sartorius stedim) を用いて微粒子を除去し、粗酵素液を得た。

1.3.1.4. Ni アフィニティークロマトグラフィー

この精製の制御にはペリスタポンプ (BIO-RAD) を用いた。流速は 4 mL/min で行っ

た。UV 検出器は Bio-MiniUV Monitor AC-5100L (ATTO)、出力には Electronic Polyrecorder (TOA) を用いた。Ni-NTA SuperFlow (QIAGEN) のレジン 5 mL を C-16/20 カラム (Amersham) に充填し、50 mM Tris-HCl pH 7.8 で平衡化した。粗酵素液 (Crude) 全量をレジンに吸着させた後、再び 50 mM Tris-HCl pH 7.8 に戻し、UV 吸収が安定するまで流した (Through)。50 mM Tris-HCl pH 7.8 + 30 mM Imidazole (Wash buffer) を用いて、非吸着画分を溶出した (Wash)。UV 吸収が安定するまで流した後、50 mM Tris-HCl pH 7.8 + 500 mM Imidazole (Elute buffer) を用いて、吸着画分を溶出し、酵素液を得た (Elute)。Amicon Ultra centrifugal filter device MWCO 50,000 (Millipore) を用いて、分離した酵素液を濃縮した。

1.3.1.5. Lys メチル化

タンパク質の表面に出ている Lys 残基は電荷を持ち、タンパク質の溶解度を高める反面、正電荷同士で反発し合い、結晶化を阻害するケースもある。NagBb は Phyre2 サーバー³⁷による構造予測 (図 1.3.1.) において、6 つの Lys 残基のうち構造予測された 5 つの Lys 残基全てが分子表面に突き出ており、これが結晶化を妨げているのではないかと考えた。そこで Lys を安定化させ分子間の反発力を弱め、結晶化させることを目的として、Lys のメチル化処理³⁸を行った。

Amicon Ultra centrifugal filter device を用いて、Ni アフィニティークロマトグラフィーにより回収された酵素液を 50 mM HEPES-NaOH pH 8.0 + 250 mM NaCl で置換し (Tris バッファーなどのアミン系バッファーは試薬と反応してしまうため)、1 mg/mL 以下となるよう希釈した。1 M ジメチルアミンボラン 20 μ L/mL、1 M ホルムアルデヒド 40 μ L/mL を加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。再度 1 M ジメチルアミンボラン 20 μ L/mL、1 M ホルムアルデヒド 40 μ L/mL を加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。さらに 1 M ジメチルアミンボラン 10 μ L/mL を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。これを Amicon Ultra centrifugal filter device を用いて濃縮し、Tris バッファーにより平衡化したゲル濾過に供することで反応を停止させた。

ただし、活性測定 (1.3.4.節) で用いる野生型酵素は、変異型酵素と条件を揃えるため、本 1.3.1.5.節ならびに 1.3.1.6.節の過程は省略し、10 mM Tris-HCl pH 7.8 でバッファー置換し、最終的な精製酵素とし、1.3.1.7.節へと進んだ。

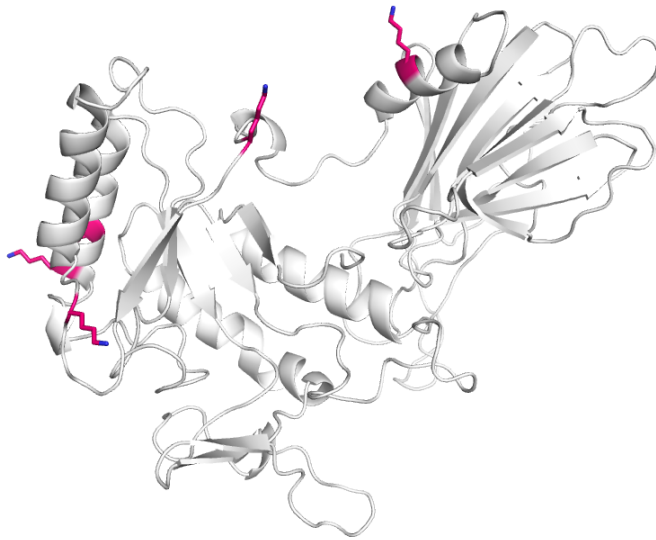


図 1.3.1. NagBb の立体構造予測

Phyre2 サーバー³⁹により予測されたモデル。Lys 残基を色付きで表示した。

1.3.1.6. ゲル濾過カラムクロマトグラフィー

精製の制御には ÄKTA FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) システム (GE Healthcare Bioscience) を用いた。流速は 1 mL/min で行った。Hiload 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare Bioscience) を、20 mM Tris-HCl pH 7.8 + 150 mM NaCl で平衡化した。Ultrafree-MC 0.45 µm Filter Unit (Millipore) に通し微粒子を取り除いた酵素液をカラムに添加し、20 mM Tris-HCl pH 7.8 + 150 mM NaCl で溶出した。目的のピーク画分を Amicon Ultra centrifugal filter device を用い脱塩濃縮し、10 mM Tris-HCl pH 7.8 でバッファー置換した。Ultrafree-MC 0.22 µm Filter Unit (Millipore) に通し、微粒子を取り除き、最終的な精製酵素を得た。

酵素の純度は 10% SDS-PAGE で確認した。泳動したゲルは Quick-CBB を用いて染色した。分子量マーカーは Protein Molecular Weight Marker Broad (TaKaRa) を用いた。

1.3.1.7. サンプル濃度測定

サンプル濃度測定 (タンパク質定量) は、BCA (Bicinchoninic acid) 法により行った。BCA working reagent (PIERCE) をサンプルと 20 : 1 で混合し、60 °C で 30 分間反応させ、Benchmark Plus (BIO-RAD) で 562 nm の吸光度を測定した。標準タンパク質として BSA (Bovine Serum Albumin) の 0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.5 mg/mL 検量線を描くことで、サンプルの濃度を算出した。

1.3.1.8. 結晶化条件のスクリーニング

結晶化キット (JCSG core I ~ IV、JCSG core + suite ; QIAGEN) を用いてスクリーニングを行った。結晶化プレート (Intelli-Plate 96 well ; Art Robbins Instruments) にスクリーニングキットの各溶液を 30 μ L ずつ分注し、リザーバー溶液とした。結晶化プレートの各ウェルにタンパク質溶液を 0.5 μ L 分注し、リザーバー溶液を 1 : 1 となるように入れ、混合した。タイタースティック HC (カジックス株式会社) を用いて結晶化プレートを密閉し、20 $^{\circ}$ C または 4 $^{\circ}$ C で静置した。

スクリーニングは、様々なタンパク質濃度 (10-40 mg/mL) と、2 つの基質条件 (基質なし、GalNAc)、2 つの温度条件 (20 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C) を組み合わせて行った。

1.3.1.9. 結晶化条件の最適化

スクリーニングにより結晶が得られた条件について、沈殿剤濃度、バッファー濃度と pH、塩濃度、タンパク質濃度、基質濃度、温度条件、結晶化方法についてそれぞれ精密化した。さらに Additive Screen (Hampton Research) をドロップの容量に対し 1/10 量を添加することで、結晶の質の向上を図った。以上により結晶化条件を確立した。また、GalNAc 複合体で確立した結晶化条件を、基質フリー、HHDH-A 変異体、Gal-NHAc-DNJ 複合体の結晶化にも適用した。

1.3.2. X 線回折データ測定・構造決定・構造精密化

X 線回折データ測定は、つくば・高エネルギー加速器研究機構 (KEK) の放射光施設 Photon Factory (PF) 実験ステーション PF BL-1A、PF-AR NW-12A にて行った。

1.3.1.9 節で得られた結晶を回収し、X 線を照射して回折イメージを測定した。回折データ測定は、結晶の放射線による損傷を防ぐため 95-100 K の N₂ ストリーム中で行った。低温での凍結を防ぐため、抗凍結剤として 20% エチレングリコールを添加した結晶化溶液に結晶を浸透させ、データ測定を行った。

1.3.2.1. X 線回折データ測定

NagBb の結晶をより波長 1.9 \AA または 2.7 \AA で回折データの測定を行い、データセットを取得した。

1.3.2.2. NagBb 初期構造の決定

上で得られたデータに対して ShelxD⁴⁰ により位相を決定した。Phenix⁴¹ AutoSol により、初期モデルを構築した。データ測定と初期構造の決定は Photon Factory の山田悠介博士と Dorothee Liebschner 博士により、共同研究としてなされた。

1.3.2.3. NagBb の構造精密化

1.3.2.1.-1.3.2.2.節で得られたデータは長波長で取得したデータで分解能も低かったため、native-NagBb-GalNAc 複合体の X 線回折データを測定し、1.3.2.2.節で得られた NagBb の構造を鋳型として、**ccp4i Phaser MR**⁴²を行うことにより分子置換をし、初期モデルを得た。さらに **ccp4i Refmac5**⁴³により、自動精密化を行った。また **Coot**⁴⁴を用いて手動で精密化を行った。これらを繰り返し、最終的な構造を得た。基質フリー、HHDHA 変異体、Gal-NHAc-DNJ 複合体もこれに倣った。

1.3.2.4. MCA スキャン・XAFS 測定

金属種の特定のため、MCA スキャンと XAFS 測定を行った。MCA は **Multi Channel Analyzer** の略であり、この測定ではある程度の波長の幅を持った X 線を照射する。その範囲内に吸収端を持つ金属が含まれていた際には、特性 X 線を放出するため、入射光と異なる波長ピークが観測される。

一方、XAFS は **X-ray Absorption Fine Structure** の略であり、物質に X 線を照射し、波長を連続的に変化させていくことで、その吸収スペクトルを解析する。入射 X 線のエネルギーを徐々に上げていき、X 線吸収原子の内殻電子の結合エネルギーに相当するエネルギーで X 線の吸収係数が急激に上昇すると、その金属が含まれていることが分かる。

2 つの野生型の NagBb 結晶を使用し、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} の 6 種類の金属に関してこれらの測定を行った。

1.3.2.5. 亜鉛イオン異常分散データの取得

XAFS 測定より NagBb は亜鉛イオンを有すると推定されたので、 Zn^{2+} の peak 波長である 1.283 \AA と low energy 波長である 1.290 \AA で測定を行い、データセットを取得した。その後の処理は上と同様に行った。

1.3.2.6. カルシウムイオン異常分散データの取得

NagBb の M1 サイトの金属はカルシウムイオンであると推定されたので、カルシウムの吸収端である 3.0704 \AA の前後の波長、high energy 波長 2.700 \AA と low energy 波長 3.150 \AA で測定を行い、データセットを取得した。その後の処理は上と同様に行った。

1.3.3. NagBb 変異体作製・発現精製

NagBb-D435A、D435N、E478A、E478Q、D330A、D330N、W398A、H271A、H320A、D322A、H366A プラスミドは、NagBb-pET23b のプラスミドを鋳型として、PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) を用いた PCR 法により作

製した。PrimeSTAR® Max Premix (2×) 1×、プライマー (fw、rv) 0.2 μM、鋳型プラスミド 10-20 ng、となるように調製し、PCR は *TaKaRa PCR Thermal Cycler* (TaKaRa) により 98 °C 10 秒、65 °C 15 秒、72 °C 35 秒を 20 サイクルで行った。用いたプライマーは以下の通りである (fw プライマーのみ示す) ; 5'-TATCTGGCCGTGTTACCTGCAATGAA-3' (D435A、下線は変異導入後の配列を示す、配列は 5'→3'、以下同様)、5'-TATCTGAACGTGTTACCTGCAATGAA-3' (D435N)、5'-TCGTCCCGGAGGTGTCCGACTGGGCG-3' (E478A)、5'-TCGTCCCAGAGGTGTCCGACTGGGCG-3' (E478Q)、5'-GGCTACCCAACGGCCATCCCGACTAT-3' (D330A)、5'-GGCTACACAAACGGCCATCCCGACTAT-3' (D330N)、5'-GCGATGCGGCCGGCGGGCGCCAAACG-3' (W398A)、5'-TGGGTGCTTGTCGGTATCAAGACGAAC-3' (H271A)、5'-TACCTGGCTCTGGACGGCTGGGCGCAG-3' (H320A)、5'-CATCTGGCCGGCTGGGCGCAGCCCGGC-3' (D322A)、5'-GGCACGCTGACCAATACCGCGACTAT-3' (H366A)。NagBb-H271A/H320A/D322A/H366A プラスミドは、上記の H271A、H366A プライマーと、H320A/D322A プライマー ; 5'-TACCTGGCTCTGGCCGGCTGGGCGCAGCCCGGC-3' (H320A/D322A-fw)、5'-CCAGCCGCCAGAGCCAGGTACAGCCCGCCCGGC-3' (H320A/D322A-rv) を用いて、順次変異を導入することにより作製された。このようにして得られた PCR 産物を形質転換により *E. coli* XL10-Gold に導入し、プラスミドを増幅させた。QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) によりプラスミドを抽出した。得られたプラスミドの ORF 配列は Pre-Mix シーケンスサービス (macrogen) により全てシーケンス解析を行い、目的の導入変異以外の変異がないことを確認した。このプラスミドを形質転換により *E. coli* C43 (DE3) に導入した。得られたコロニーを爪楊枝でピッキングし、以降は野生型 NagBb (1.3.1.節) と同様に前培養、本培養、発現誘導を行い、菌体を回収し、精製・サンプル濃度測定を行った。

1.3.4. 活性測定

1.3.4.1. 活性測定条件

活性測定は、*pNP-α-GalNAc* (4-Nitrophenyl α-D-galactopyranoside ; Santa Cruz Biotechnology) を基質として用い、*pNP* の遊離による 405 nm 吸光度上昇を測定することにより行った。標準測定溶液 (計 50 μL) の組成は、50 mM MES pH 6.5、0.25 mM *pNP-α-GalNAc*、NagBb 0.25 μg とした (全て終濃度)。NagBb 酵素液 10 μL とその他の混合溶液 40 μL を別々に 37 °C で 10 分間プレインキュベートし、これらを混ぜ合わせるこ

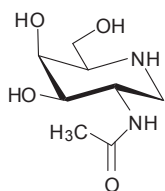
とにより反応を開始させた。測定溶液は 96 穴透明平底マイクロプレート#9018 (Corning) に仕込み、これを Benchmark plus マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) により 37 °C でモニタリングした。pNP の生成量を 405 nm の吸光度上昇として 10 秒間隔で 20 分間測定した。この間反応の直線性が保たれるように (初速度をモニターできるように) 酵素濃度を設定したが、基質を消費し尽くし反応が途中で終了したものや反応開始直後でうまく混ざっていなかったりして直線性が保てていなかったものに関しては、直線性のある部分のみを抜粋してデータとして用いた。pNP の終濃度 0、0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.0、2.0、4.0 mM で検量線を作製し、吸光度と pNP 量との相関を得た。得られたデータを Excel で読み込み、吸光度減少の傾きを求めた。動学的パラメータ算出の際にはカレイダグラフ (Synergy) を用いた。

1.3.4.2. 各種金属と EDTA を添加した活性測定

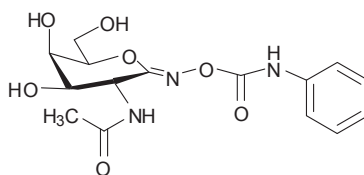
10 mM Tris-HCl pH 7.8 で保存した NagBb 野生型酵素に対して、終濃度 10 mM となるように EDTA を加え、4 °C で 30 分間インキュベートした。Amicon Ultra centrifugal filter device を用い 10 mM Tris-HCl pH 7.8 にバッファー置換を行うことで、EDTA を除去した。その後 BCA 法によりタンパク濃度を再測定した (1.3.1.7.節参照)。標準測定溶液 (1.3.4.1.節参照) に、終濃度を 1 μM - 1 mM まで変化させ、EDTA、Fe²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ の各々の溶液を添加することで測定を行った。

1.3.2.3. 阻害剤の活性測定

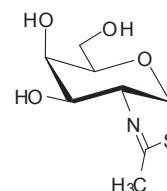
西オーストラリア大学の Keith A. Stubbs 博士より NagBb の阻害剤となりうる化合物 3 種の提供を受けた。1. Gal-NHAc-DNJ (1-deoxynojirimycin 様化合物)、2. Gal-PUGNAc (PUGNAc 様化合物)、3. Gal-NAG-thiazoline であり、その構造式を図 1.3.2. に示す。標準測定溶液 (1.3.4.1.節参照) に、終濃度 100 μM の化合物を添加することで初期の測定を行った。阻害が見られた化合物に関しては、基質である pNP-α-GalNAc の濃度を 0.25 mM、0.5 mM とし、それぞれで阻害剤の濃度を 10 nM、50 nM、100 nM、500 nM と変化させ、Dixon プロットを取ることで阻害定数 *K_i* を算出した。



1 Gal-NHAc-DNJ



2 Gal-PUGNAc



3 Gal-NAG-thiazoline

図 1.3.2. NagBb の阻害剤となりうる化合物

1.3.5. 金属定量

タンパク質に含まれる金属原子を定量するために行った。測定はプラズマ発光分光分析装置 ICP-8100（島津製作所）を用いた（筑波大学 研究基盤総合センター分析部門にて装置をお借りした）。この装置では、霧状にした試料をアルゴンプラズマに導入し励起させることで、原子固有の発光スペクトルが得られ、この発光スペクトルの波長、強度を測定することで、試料に含まれる元素種の同定や定量が行える。

なお、本節で用いた溶液は全て超純水で調製した。また、タンパク試料は超純水で作製した 10 mM Tris-HCl pH 7.8 に置換し、BCA 法によりタンパク濃度を再測定した（1.3.1.7.節参照）。

1.3.5.1. 検量線用の試料調製

0.08 N HNO₃ + 2 ppb In（インジウム）溶液を 1.5 g 正確に量り取った。1000 ppm の Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、V²⁺（バナジウム）、Cr²⁺（クロム）原液を 1.5 mg ずつ量り取り、各々 1 ppm（1000 ppb）の溶液を作製した。この溶液を、Ca²⁺と Mg²⁺に関しては 100 ppb、他の金属は 20 ppb となるよう 0.08 N HNO₃ + 2 ppb In 溶液で希釈した。この溶液を順次 1/5 に希釈し、5 点で検量線を引けるように溶液を調製した。

1.3.5.2. タンパク試料調製

バッファーからの持ち込みの誤差を無くするため、試料濃度に関わりなく等量の試料を用いて、測定後に濃度よりタンパク一分子あたりの金属量を計算した。タンパクは野生型 NagBb と NagBb-HHDH-A 四重変異体を用いた。

15 mL ファルコンチューブの底に 50 μ L の 2% HNO₃ をアプライし、30 μ L の試料溶液を添加し、ボルテックスにより十分に懸濁した。ここに 0.08N HNO₃ + 2 ppb In を 5 mL ずつ加え、0.22 μ m フィルターを通すことにより夾雑物を取り除いた。このサンプルを順次 1/5 に希釈し、1 サンプルにつき 3 つの希釈系列で測定を行った。バッファーのみを全く同様に各希釈系列を作り、ブランクとしてそれぞれ差を取った。この希釈系列のうち、測定に適した強度のものを選び測定を行うとともに、希釈によるブレも確認した。

測定結果は、希釈倍率やタンパク分子量、金属の原子量などを計算し、タンパク : 金属 = 1 : x（モル比）となるように算出した。

1.3.6. CD スペクトル測定

野生型 NagBb と変異体酵素を、Amicon Ultra centrifugal filter device を用いて 10 mM リン酸バッファー pH 7.8 にバッファー交換し、0.1 mg/mL となるよう希釈した。測定には Jasco spectropolarimeter J-820 (Jasco) を用い、光路長 1.0 mm、キュベット温度は室温 (25 °C) で測定した。J-820 を立ち上げ、光路系内部の空気を窒素ガスで置換した。ランプを点灯し、機器の安定化を行った。測定毎にキュベット洗浄をバッファー→ミリ Q→バッファーの順で行った。測定は 190-240 nm、0.2 nm 間隔で 100 nm/min、応答時間 0.5 秒、バンド幅 1 nm で行った。CD シグナルは平均モル残基楕円率 $[\theta]$ ($\text{degree} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{residue}^{-1}$) に変換することでスペクトルを得た。

1.4. 結果

1.4.1. NagBb の発現・精製・結晶化

1.4.1.1. NagBb の発現・精製

LB 培地を用いた培養で約 2 g/200 mL の菌体を得られ、最終的に約 40 mg/L の精製酵素が安定して得られた。精製純度を示す SDS-PAGE を図 1.4.1. に示す。2 段階の精製により結晶化に十分な精製度の NagBb を得ることができた。

また、ゲル濾過クロマトグラフィーでは native 体では主に約 77 mL で溶出した (図 1.4.2. (上))。結晶化に用いた Lys メチル化処理後サンプルも約 77 mL で溶出し (図 1.4.2. (下))、違いは見られなかった。このピークを用いて結晶化を行った。

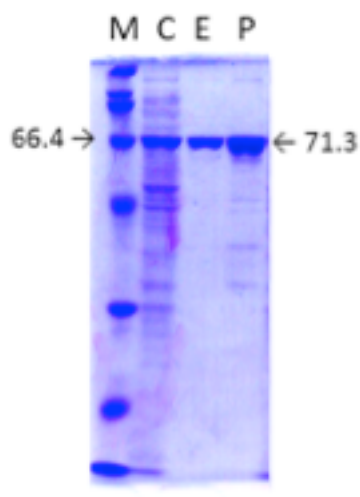


図 1.4.1. SDS-PAGE の結果

レーン M はマーカーであり、Protein Molecular Weight Marker Broad (TaKaRa) を使用した。C は Ni カラムクロマトグラフィーに供する前の crude 溶液、E が Ni アフィニティークロマトグラフィー後の elute 画分であり、これをゲル濾過クロマトグラフィーに供し、P が最終的な精製 NagBb として結晶化に用いた画分。

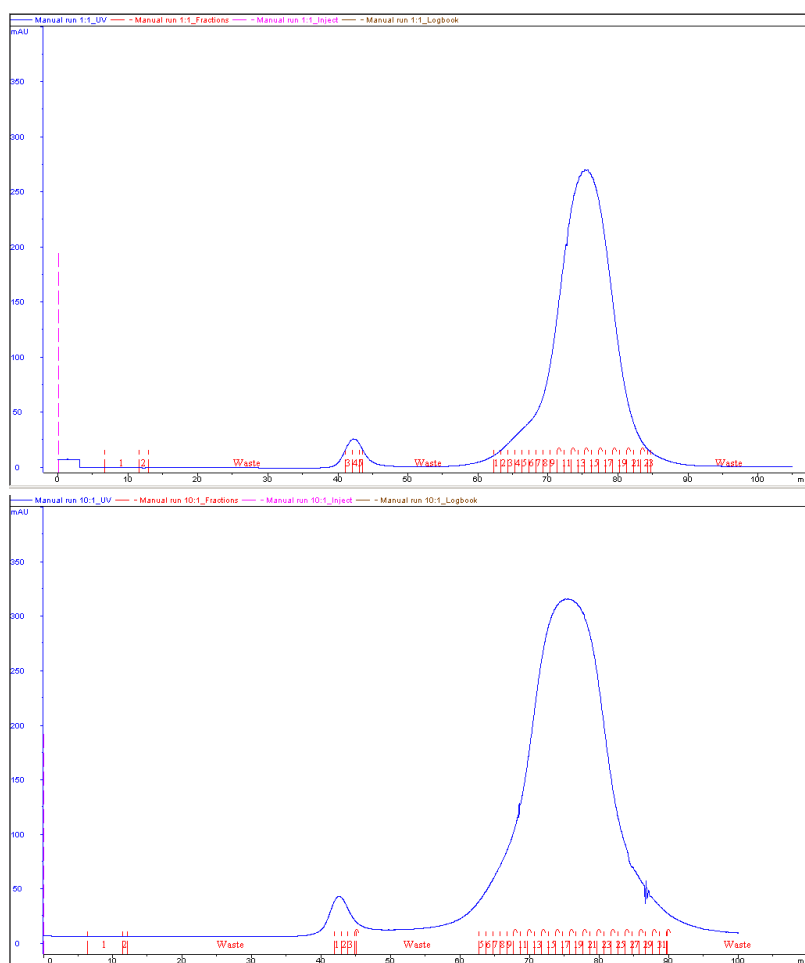


図 1.4.2. NagBb のゲル濾過の結果

(上) Native-NagBb。(下) Lys メチル化処理後 NagBb。

1.4.1.2. NagBb の結晶化

精製した NagBb を用いて、結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、そのままではどの条件を変えても結晶を得ることはできなかったが、Lys メチル化処理をしたサンプルを用いることで、9つの条件で結晶が得られた。似た条件なども含まれていたため、外見的に質の良い結晶の出た条件を選んだ。結晶化条件の組成は以下の通りである；JCSG core +suite #74；0.02 M Magnesium chloride, 0.1 M HEPES pH 7.5, 20% Polyacrylic acid 8000。この条件をもとに、広く最適化を行った。沈殿剤はポリアクリル酸では再現が取れなかったが、Polyethylene glycol (PEG) に変えることで結晶が得られるようになった。PEG を用いて最適化を行った結果を図 1.4.3.に示す。これより、最終的に以下の条件を決定した；0.02 M Magnesium chloride, 0.1 M HEPES pH 6.5, 7.5% PEG 3,350。タンパク濃度は 15 mg/mL が最適であった。また、この条件は 20 mM GalNAc 入りで決定された条件であった。同様の条件で 50 mM GalNAc 入り結晶と基質フリーの結晶を得た。なお、基質フリーの結晶は GalNAc 入りの結晶よりも小さく薄く、結晶が出にくかった。

original condition

- salt : 0.02 M Magnesium chloride
- sample : 15 mg / mL + 10 mM GaINAc
- buffer : 0.1 M HEPES pH 7.5
- condition : 20 °C, sitting drop
- precipitant : 22% Polyacrylic acid 5100



PEG / pH	PEG 6000						PEG 5000					
	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
5%		◆	◆	◆	◆	◆		◆	◆	◆	◆	◆
7.5%			◆	◆	◆	◆			◆	◆	◆	◆
10%						◆				◆		◆
12.5%												
15%												
17.5%												
20%												
22.5%												

PEG / pH	PEG 4000						PEG 3350					
	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
5%							◆	◆				◆
7.5%							◆	◆	◆	◆	◆	◆
10%							◆	◆	◆	◆	◆	◆
12.5%							◆	◆	◆	◆	◆	◆
15%								◆	◆	◆	◆	◆
17.5%									◆	◆	◆	◆
20%											◆	◆
22.5%												

better shape & larger

better shape & larger

BEST!!!

PEG / pH	PEG 1000					
	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
5%						
7.5%	◆					
10%						
12.5%						
15%						
17.5%						
20%						
22.5%						

protein concentration	
5 mg/mL	small, bad shape
10 mg/mL	small, bad shape
15 mg/mL	BEST
20 mg/mL	large, bad shape
25 mg/mL	large, bad shape
30 mg/mL	very large, badshape

salt concentration (MgCl2)	
0 mM	no crystal
5 mM	no crystal
10 mM	large, bad shape
15 mM	good!
20 mM	BEST!!!
25 mM	small, bad shape
30 mM	small, bad shape

図 1.4.3. NagBb の結晶化条件の最適化

PEG の種類、濃度、バッファーpH、塩濃度、タンパク濃度について最適化を行った。

1.4.1.3. NagBb の X 線回折データ測定

得られた結晶を用いて X 線回折データを取得した。得られたデータセットを表 1.4.1. に示す。NagBb の構造は、硫黄原子の単波長異常分散法 (single-wavelength anomalous dispersion; SAD 法) により決定された。通常 SAD 法ではセレン (Se) 原子を硫黄原子の代わりに導入した Se 置換体タンパクを用いた結晶を用いて Se の異常分散を測定し、タン

パク中の Se 原子の位置を特定することで位相を決定する Se-SAD が主に行われる。しかし、本研究では野生型タンパクを用いて、長波長 (1.9 Å, 2.7 Å) の X 線で多数測定を行い、データをマージすることで、タンパク中に含まれる硫黄の弱い異常分散を検出して原子の位置を特定し、位相を決定する S-SAD 法を用いた。これにより初期モデルが構築された。非対称単位には二分子 (chain A, chain B) が入り、空間群は $P2_12_12_1$ であった。この初期モデルをもとに、GalNAc 複合体の構造と基質フリーの構造を、分子置換法によりそれぞれ 2.10 Å, 2.65 Å で決定した。なお、20 mM GalNAc 存在下で共結晶化した結晶構造では GalNAc の電子密度が不明確であったため、50 mM GalNAc 存在下で共結晶化した結晶を測定することで GalNAc 複合体構造を得た。

結晶構造においては非対称単位中に 2 分子の NagBb が見られたが、精製の段階までは単量体であり、結晶化のパッキング相互作用によるものであると考えられる。

表 1.4.1. データセットと構造精密化の統計値

Dataset	S-SAD 1.9 Å	S-SAD 2.7 Å	GalNAc complex	Ligand free
Data collection statistics				
Beamline	BL1A	BL1A	BL1A	AR-NW12A
Wavelength (Å)	1.900	2.700	1.000	1.000
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Unit cell (Å)	$a = 62.75$ $b = 127.23$ $c = 176.17$	$a = 63.06$ $b = 127.97$ $c = 176.92$	$a = 65.64$ $b = 127.62$ $c = 176.82$	$a = 63.64$ $b = 127.76$ $c = 176.76$
Resolution (Å) ^a	47.43–2.26 (2.31–2.26)	47.66–2.40 (2.48–2.40)	50.0–2.10 (2.14–2.10)	50.0–2.65 (2.70–2.65)
Total reflections	9,659,079	6,820,294	525,023	297,103
Unique reflections	66,294	49,581	87,389	42,830
Completeness (%) ^a	99.2 (92.1)	87.3 (42.4)	99.9 (99.7)	99.6 (99.2)
Anomalous completeness (%) ^a	99.1 (91.5)	86.9 (41.6)		
Redundancy ^a	145.7 (48.1)	137.6 (70.5)	6.0 (5.7)	6.9 (6.6)
Anomalous redundancy ^a	74.9 (23.4)	70.8 (33.9)		
Mean $I/\sigma(I)$ ^a	42.4 (2.5)	50.9 (2.4)	24.1 (2.5)	18.3 (1.9)
R_{merge} (%) ^a	16.4 (194.9)	11.3 (245.9)	6.6 (37.2)	8.6 (62.7)
$CC_{1/2}$ ^a	(0.732)	(0.913)	(0.943)	(0.849)
Refinement statistics				
Resolution range (Å)			44.29–2.10	103.55–2.64

No. of reflections	82,971	40,656
R -factor/ R_{free} (%)	19.4/24.6	23.1/31.1
RMSD from ideal values		
Bond lengths (Å)	0.024	0.037
Bond angles (°)	1.777	1.713
Coordinate error (Å) ^b	0.186	0.409
Average B -factor (Å ²)		
Protein (chain A/B)	39.5/46.3	60.8/70.3
Ligand (chain A/B)	35.7/44.1	—
GalNAc		
M1-site metal (chain A/B)	21.7/31.9	55.8/36.3
M2-site metal (chain A/B)	27.3/33.0	51.4/57.4
Water	42.3	47.2
Ramachandran plot (%)		
Favored	95.1	92.6
Allowed	4.5	6.2
Outlier	0.4	1.2

^a ()内は最外殻での値。

^b R_{free} 値に基づく推定値。

^c RAMPAGE サーバー⁴⁵ における計算値。

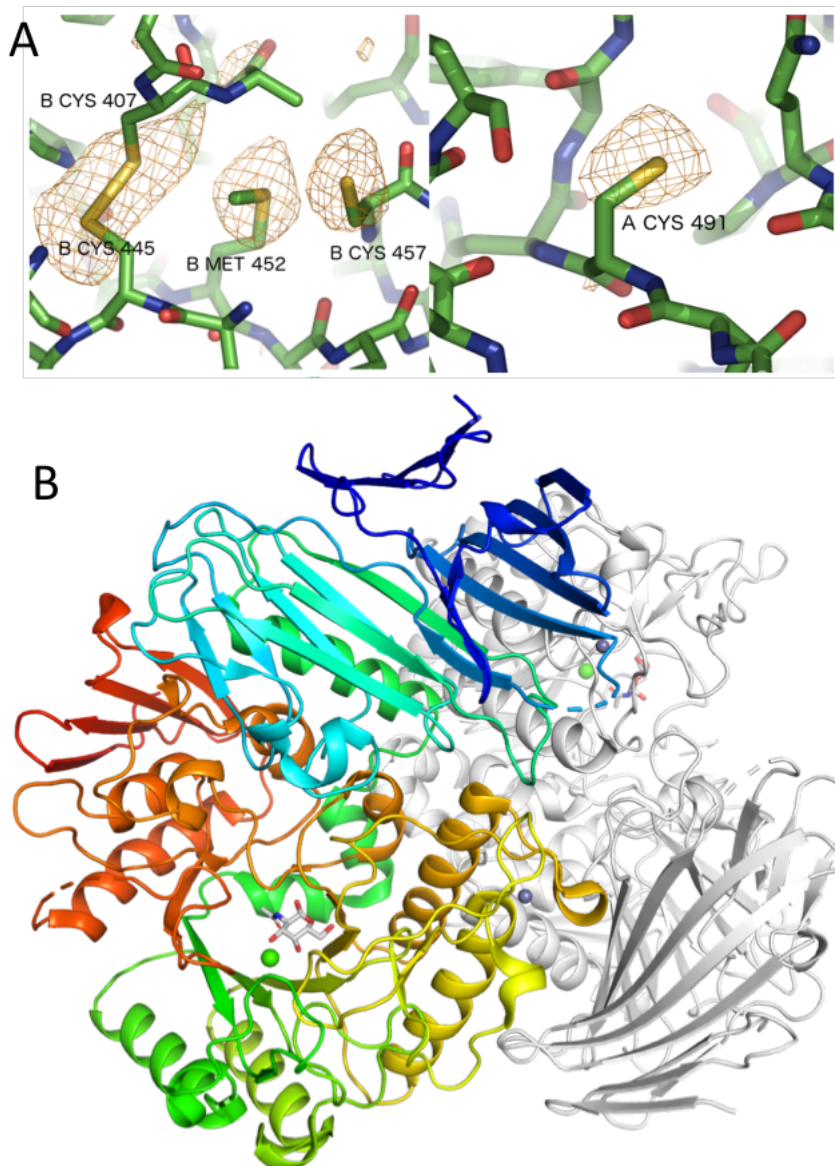


図 1.4.4. S-SAD のピークと NagBb の全体構造

(A) 位相決定に用いた 2.7 Å で取得した S-SAD のデータセットにおける異常分散ピーク。左は Chain B の Cys と Met 残基 (3 σ)、右は Cys 残基 (4 σ) を例として示す。(B) 非対称単位中に GalT_{B1} は 2 分子含まれていた。Chain A をレインボーで (N 末が青、C 末が赤)、Chain B を白で表示した。

1.4.2. NagBb の全体構造

NagBb は大きく分けて 3 つのドメインから成っていた。N ドメイン (1-227)、A ドメイン (228-591)、C ドメイン (592-634) である (図 1.4.5)。N ドメインは β サンドイッチ

構造であり、18本の β ストランドから成る2つの逆平行 β シートで構成されていた。Aドメインはコアとなり活性中心のある部位で、(α/β)₈-barrel様の構造を有しており、GH13 α -アミラーゼファミリーに似ていた。 α -アミラーゼファミリーは完全な(α/β)₈-barrel構造であるが、NagBbでは $\beta 6$ - $\beta 8$ と $\alpha 6$ - $\alpha 8$ が形成されておらず、壊れた構造となっていた。 α -アミラーゼファミリーでは $\beta 3$ と $\alpha 3$ の間に挿入された構造(ドメインB)が保存されているが、NagBbでもこの挿入構造が見られたので、このサブドメインをBドメイン(376-407)とした。また、NagBbにはもう一つ、 $\beta 1$ と $\alpha 1$ の間に挿入された構造が見られたので、これをDドメインとした(274-296)。Cドメインは β -サンドイッチ構造であり、4本の逆平行 β ストランドで構成されていた。NagBbの構造にはdisorderしている部位があり、C末側の数残基からHisタグは見え、また以下の数残基は見えなかった; GalNAc複合体 chain A: 571、572、633~634、chain B: 631~634。基質フリーはGalNAc複合体よりは構造の安定性が低く、見えていない部位も多かった; chain A: 75、76、103~108、560~571、631~634、chain B: 104~108、560~573、631~634。構造の揺らぎを示す温度因子、*B*-factorの値がGalNAc複合体では40.7(chain A)、47.8(chain B)に対し、基質フリーでは61.1(chain A)、70.9(chain B)であることから、基質フリーの構造の方が揺らぎが大きいことが示された。しかし、上記のディスオーダー領域を除いてGalNAc複合体と基質フリーの構造で大きく異なる部位は見られず、重ね合わせた際のr.m.s.d.は0.304 Å (7909 atoms)であった。

結晶構造中には2種類の金属、カルシウムイオンと亜鉛イオンが見られた(後述)。なお、Lys残基はメチル化処理を行っていたが、メチル基の電子密度は観察されなかった。

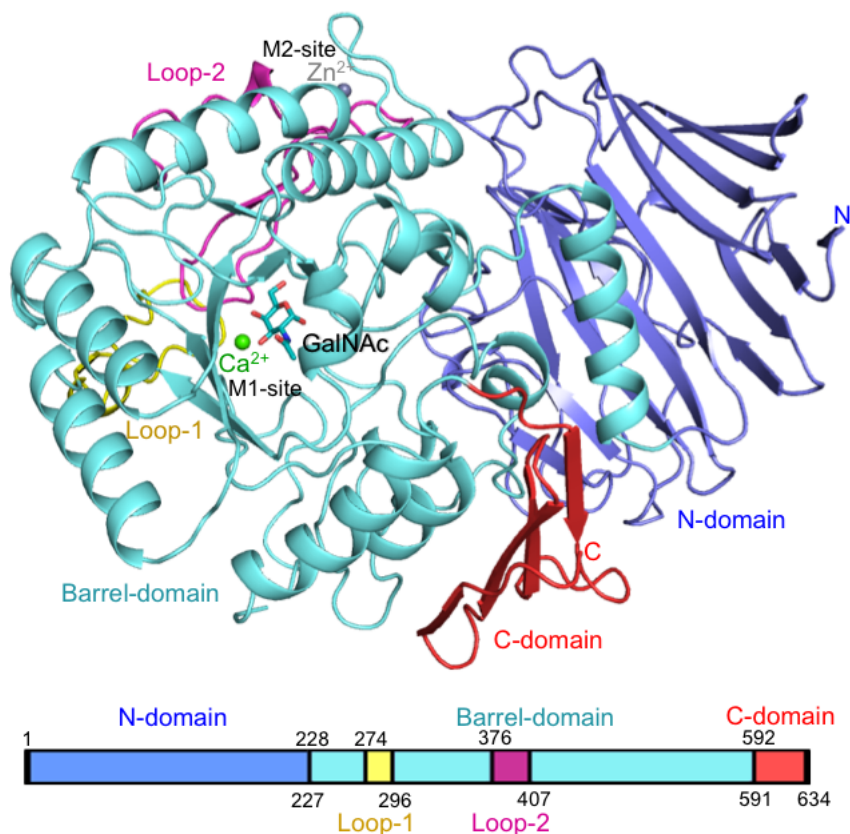


図 1.4.5. NagBb の全体構造とドメイン分け

Chain A を色付き (ドメイン別)、chain B を白色で示した。N-ドメイン (1-227) : 青、A-ドメイン (228-273、297-375、408-591) : 水色、D-ドメイン (274-296) : 黄色、B-ドメイン (376-407) : 紫、C-ドメイン (592-634) : 赤で示した。

1.4.3. NagBb の活性中心

高濃度で共結晶化した α -GalNAc は、A ドメインの中心部に明確な電子密度が見えていた (図 1.4.6. (A) ; *mFo*-*DFc* オミット電子密度マップ、 4.0σ)。GalNAc の C1 付近には、2 つの残基が見られた。1 つめは求核触媒残基と予測されていた Asp435 であり、C1 炭素との距離は 3.1 \AA で求核触媒残基としては理想的な距離であった。2 つめは Glu478 であり、C1 ヒドロキシ基と水素結合を形成しており、その距離は 2.7 \AA であった。結合距離や求核触媒残基、基質との位置からも、Glu478 が酸/塩基触媒残基であることが明らかとなった (活性については後述)。Asp435 は $\beta 4$ と $\alpha 4$ の間に、Glu478 は $\beta 5$ と $\alpha 5$ の間に、バレルの中心に側鎖が向くように位置していた。他に GalNAc と直接水素結合を形成して基質認識に関わっていた残基は、Tyr329 ; O3 と O4、Asp330 (anchor) ; O4、Asp371 ; O5、Tyr433 ; C2 *N*-アセチル基のカルボニル O 原子、Asp435 (acid/base) ; O4、Asp561 ; C2 *N*-アセチ

ル基のアミノ基の N 原子と O3、であった (図 1.4.6. (C))。特徴的なのは、*N*-アセチル基の先に認識に関わる金属サイトが見られたことである (図 1.4.6. (B)、M1 サイト；後述)。

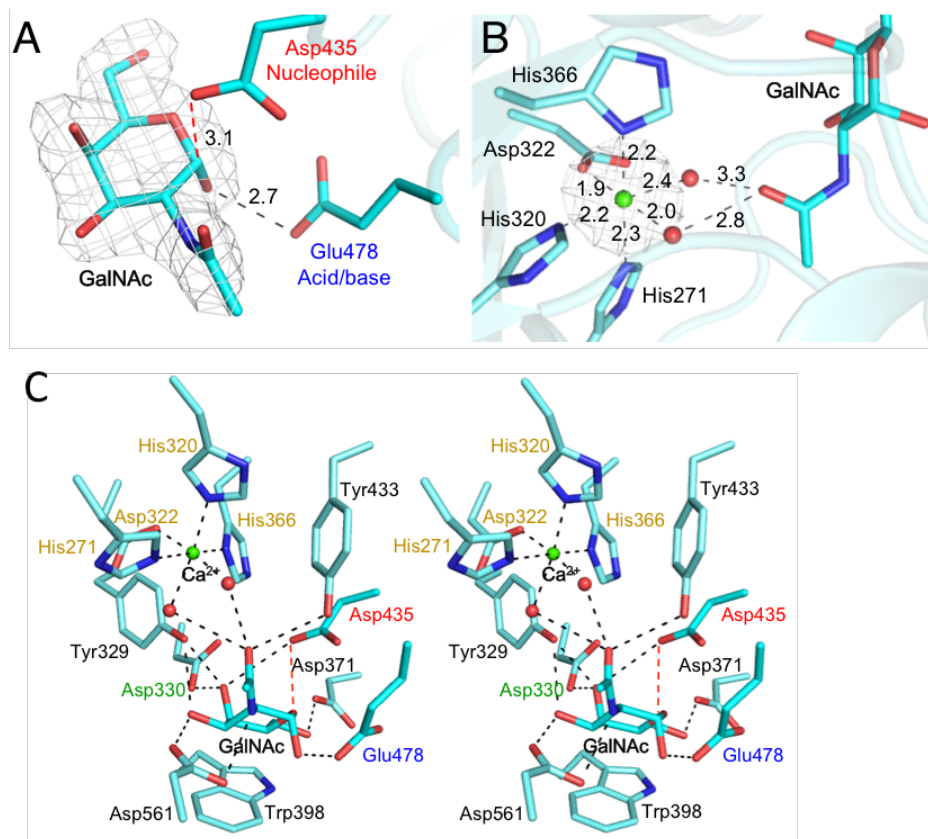


図 1.4.6. NagBb の活性中心

(A) GalNAc の *mFo*-*DFc* オミット電子密度マップ (4.0 σ 、灰色のメッシュ表示)。M1 サイト金属の *mFo*-*DFc* オミット電子密度マップ (6.0 σ 、灰色のメッシュ表示)。金属を緑、水分子を赤のボールで示す。(C) 活性中心のステレオ図。

1.4.4. NagBb の金属サイトに関する構造生物学的解析

1.4.4.1. NagBb 結晶中の金属サイトの解析

活性中心で基質認識に関わっていた金属イオンは、正八面体形の 6 配位を取っており 3 つのヒスチジン残基 His271、His320、His366 の側鎖とアスパラギン酸 Asp320 の側鎖、そして 2 つの水分子を配位していた。2 つの水分子はさらに *N*-アセチル基のカルボニル O 原子と水素結合を形成していた。このことから、NagBb は基質認識 (糖の *N*-アセチル基の認識) に金属イオンを用いることが明らかになった。この結晶中で見られた金属は、電子密度の過不足や配位から、生体由来のカルシウムイオンではないかと推測される。温度因子 *B*-factor の値も、他の 2 価原子 (Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+}) を置いた際

の値より確かからなかった。

また、NagBbにはもう1つ金属サイトが存在し(M2サイト)、活性中心からは離れた分子表面に位置していた。金属はCys407とCys445の側鎖(硫黄原子)、His450の側鎖と主鎖のカルボニル基のO原子、を配位しており、正四面体形の4配位であった。

表 1.4.2. NagBb-GalNAc 複合体結晶構造中の金属の結合距離

Coordination type	Coordination atom	Distance (Å, A/B)
M1-N	His-271 Nε2	2.28/2.33
M1-N	His-320 Nδ1	2.17/2.16
M1-N	His-366 Nδ1	2.17/2.36
M1-O	Asp-322 Oδ1	1.93/2.19
M1-O	water 1 ^c	2.36/2.31
M1-O	water 2 ^c	2.00/2.14
M2-N	His-450 Nδ1	1.99/2.08
M2-O	His-450 carbonyl O	1.96/2.05
M2-S	Cys-407 Sy	2.14/1.78
M2-S	Cys-445 Sy	1.86/1.91

^c water 1 : Asp322 の反対側に位置する水分子、water 2 : 3つのHisと同じ面に位置する水分子。

表 1.4.3. NagBb-GalNAc 複合体結晶構造中の *B*-factor

Average <i>B</i> -factor (Å ²)	
Protein (chain A/chain B)	40.7/47.8
Active site ligand (A/B)	36.0/44.6
	(GalNAc)
Ca ²⁺ (M1-site, A/B)	22.0/32.4
Zn ²⁺ (M2-site, A/B)	28.0/33.7
Water	42.7

1.4.4.2. XAFS 測定

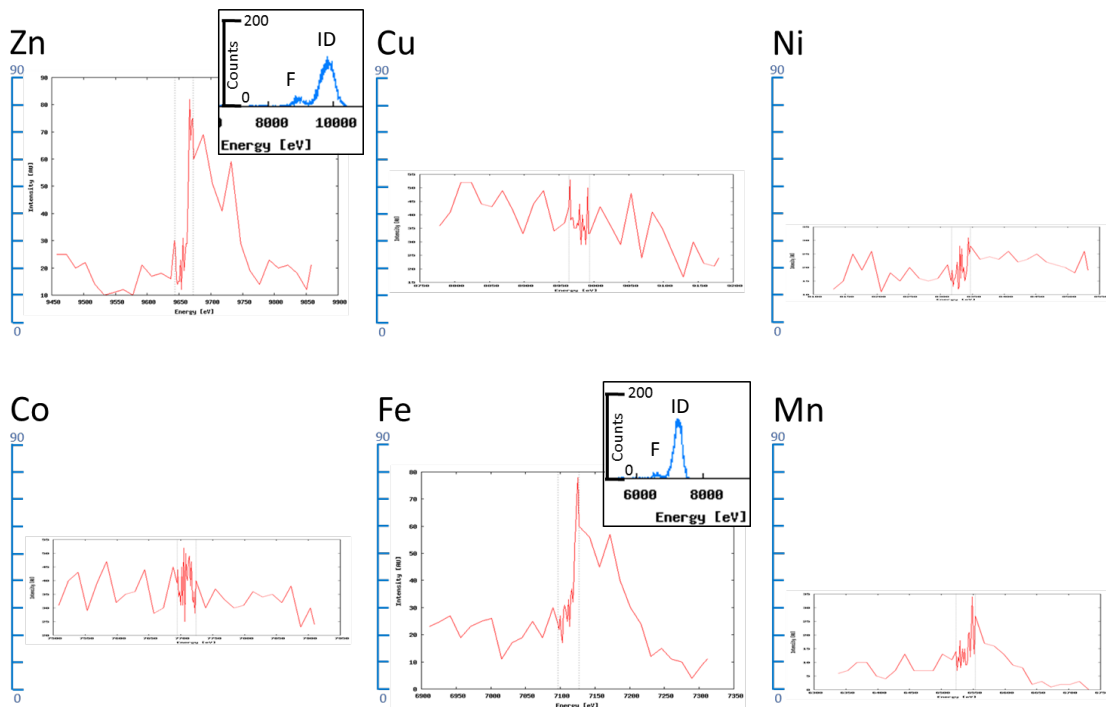
金属種の特定のため、KEK-PFのビームラインに設置してあるXAFS装置を用いて、X線蛍光測定による波長スキャン解析(MCAスキャン)とXAFS測定を行った。結果を図1.4.7.に示す。

1つ目の結晶(図1.4.7.上)では、Zn²⁺とFe²⁺に関してMCAスキャンのピークとXAFS

のピークが観測された。一方、2つ目の結晶（図 1.4.7.下）では、 Zn^{2+} に関して MCA スキャンのピークと XAFS のピークが観測されたが、 Fe^{2+} に関しては MCA スキャンのピークの時点でピークが観測されなかった（XAFS 測定は未実行）。

この結果より、野生型 NagBb の結晶中には、 Zn^{2+} 原子が含まれており、 Fe^{2+} 原子はコンタミネーションとして含まれる可能性があり、その他の金属が含まれる可能性は極めて低いことが明らかとなった。なお、 Mg^{2+} (K edge ; 1.305 keV/9.5 Å) と Ca^{2+} (K edge ; 4.0381 keV/3.07 Å) は PF の構造生物学ビームラインに設置されている装置の MCA スキャンや XAFS では測定のできない範囲の波長であった。

Native Protein Crystal 1



Native Protein Crystal 2

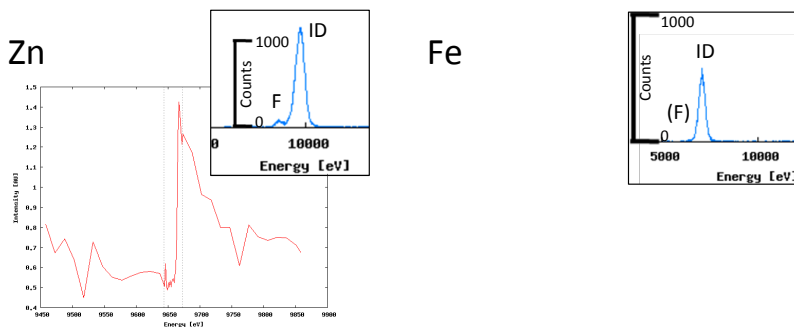


図 1.4.7. 野生型 NagBb 結晶に関する XAFS 測定結果

横軸はエネルギー (単位は eV、X 線波長変化)、縦軸は X 線の吸収量を表す。Zn²⁺ と Fe²⁺ に関しては MCA スキャンの結果も示した。ID は入射光のピーク (Incident beam)、F は低エネルギー側の蛍光 X 線 (fluorescence) を示す。結晶 1 のグラフでは、縦軸の目盛りを合わせるために拡大・縮小している。

1.4.4.3. 亜鉛イオン異常分散データの測定

XAFS 測定の結果に基づき、peak 波長 (異常散乱原子の吸収極大) : 1.28242 Å と low energy 波長 (低エネルギー側で異常散乱が起こらない遠隔点) : 1.29000 Å の 2 点においてデータを測定した (表 1.4.4.)。その結果、M2 サイトにおいて、Zn²⁺ の異常分散効果が大きく見られる peak 波長で測定したデータでは、強い異常分散効果により 11.0 σ から電子密度が見えはじめた。一方、low energy 波長で測定したデータでは 3.0 σ でようやく不明確な電子密度が見えはじめた。以上より結晶中で M2 サイトに結合している金属は Zn²⁺ であることが示された。なお、M1 サイトには Zn²⁺ の peak 波長、low energy 波長ともに強い電子密度が見られたことより、M1 サイトの金属は Zn²⁺ ではないことも示された。

表 1.4.4. Zn²⁺ と Ca²⁺ の異常分散に関するデータセット

Dataset	Zn ²⁺ peak	Zn ²⁺ low energy	Ca ²⁺ high energy	Ca ²⁺ low energy
Data collection				
statistics				
Beamline	AR-NW12A	AR-NW12A	BL1A	BL1A
Wavelength (Å)	1.283	1.290	2.700	3.150
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell (Å)	<i>a</i> = 65.810	<i>a</i> = 65.790	<i>a</i> = 64.03	<i>a</i> = 64.09
	<i>b</i> = 128.21	<i>b</i> = 128.18	<i>b</i> = 126.70	<i>b</i> = 126.84
	<i>c</i> = 176.86	<i>c</i> = 176.85	<i>c</i> = 175.50	<i>c</i> = 175.61
Resolution (Å) ^a	50.0-3.00	50.00-3.20	50.00-2.61	50.00-3.20
	(3.05-3.00)	(3.26-3.20)	(2.75-2.61)	(3.38-3.20)
Total reflections	204,414	167,605	441,314	246,371
Unique reflections	30,385	25,229	38,234	42,346
Completeness (%) ^a	100.0 (100.0)	99.9 (100.0)		
Anom. completeness (%) ^a	100.0 (100.0)	99.8 (99.9)	83.3 (25.6)	90.4 (50.4)
Redundancy ^a	6.7 (6.4)	6.6 (6.5)	13.6 (8.5)	13.0 (8.4)

Anom. redundancy ^a	3.6 (3.4)	3.6 (3.4)	11.5 (4.1)	5.8 (2.7)
Mean $I/\sigma(I)$ ^a	6.4 (0.7)	8.7 (1.4)	13.6 (1.6)	12.0 (4.5)
R_{merge} (%) ^a	29.1 (228)	23.2 (147)	11.9 (70.9)	11.5 (20.1)
CC _{1/2}	(0.510)	(0.615)	(0.909)	(0.975)
Peak height (σ) ^b				
M1 (chain A/chain B)	5.1/6.2	6.5/5.4	5.0/3.8	2.2/3.0
M2 (A/B)	12.3/9.6	—/—	12.8/10.3 ^d	10.3/9.0 ^d

^a ()内は最外殻での値。

^b 異常分散電子密度マップにおけるピークの高さ。

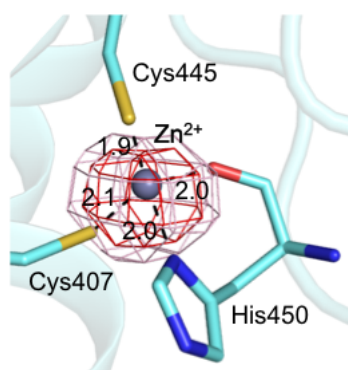


図 1.4.8. M2 サイトの金属に関する異常分散差フーリエ電子密度マップ

波長 1.283 Å における電子密度マップを、4.5 σ (ピンク) と 6.0 σ (赤) のメッシュで示す。

1.4.4.4. カルシウムイオン異常分散データの測定

配位の状態より、M1 サイトの金属はカルシウムイオンであると推定され、また、1.4.4.2. 節の XAFS 測定の結果よりも改めて M2 サイトの Zn²⁺以外の金属種が含まれていないことが明らかになった。そこで、Ca²⁺の吸収端である 3.0704 Å の前後の波長、high energy 波長 : 2.700 Å と low energy 波長 : 3.150 Å で直接測定を行い、データセットを取得した (表 1.4.4.)。

M1 サイト金属の異常分散差フーリエピークは、カルシウムの吸収端である 3.0704 Å より短波長側では常に見られたが (図 1.4.9.)、それより長波長側の 3.15 Å で取得したデータでは、金属サイトに重なる位置に明瞭なピークは観察されなかった。以上より結晶中で M1 サイトに結合している金属は Ca²⁺であることが示された。

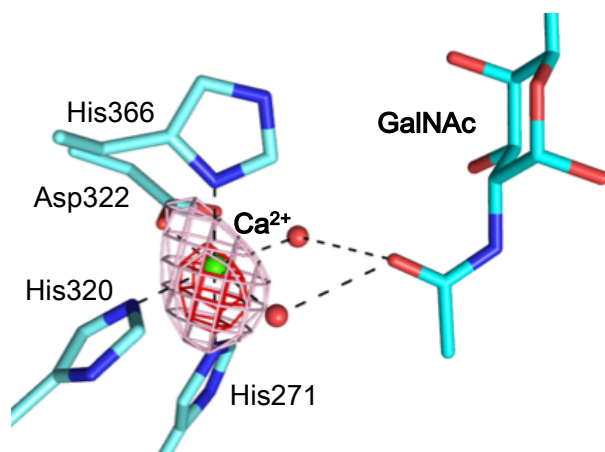


図 1.4.9. M1 サイトの金属に関する異常分散差フーリエ電子密度マップ

波長 2.700 Å における電子密度マップを、 3.5σ (ピンク) と 4.5σ (赤) のメッシュで示す。

1.4.4.5. NagBb-HHDH-A 変異体の結晶構造

NagBb-HHDH-A は、四重変異体 H271A/H320A/D322A/H366A であり、金属 M1 サイトを形成する 4 残基を全てアラニン残基に変異させたものである。この変異体を結晶化したところ、1.9 Å の分解能で X 線データが得られた (表 1.4.5.)。全体構造は主鎖の C α 原子の r.m.s.d. = 0.22 Å (8096 原子) と、GalNAc 複合体構造と大きく変わらなかった。活性中心では、変異させた 4 つのアラニン側鎖の電子密度が明確に見られた (図 1.4.10.)。野生型の構造で M1 サイトの金属の電子密度が見られる場所には何も見えず、金属は失われていた。この結晶は野生型 NagBb の結晶化の際と同様に GalNAc と共結晶化していたが、GalNAc の電子密度も観察されなかった。一方、GalNAc の C4-C5-C6 炭素に当たる部位にちょうど重なるように、抗凍結剤として添加していたグリセロールの電子密度が観測された。これにより、金属イオンが糖基質の GalNAc の認識に不可欠であることが示された。

表 1.4.5. データセットと構造精密化の統計値

Dataset	HHDH-A mutant Gal-NHAc-DNJ complex	
Data collection statistics		
Beamline	BL1A	BL1A
Wavelength (Å)	1.100	1.100
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Unit cell (Å)	$a = 62.890$	$a = 64.630$
	$b = 127.84$	$b = 128.48$
	$c = 176.36$	$c = 176.89$
Resolution (Å) ^a	103.51-1.90	103.95-2.79

	(1.93-1.90)	(2.85-2.80)
Total reflections	200,484	235,268
Unique reflections	77,231	37,110
Completeness (%) ^a	68.7 (85.4)	99.7 (100.0)
Redundancy ^a	2.6 (3.3)	6.3 (6.7)
Mean $I/\sigma(I)$ ^a	13.7 (2.4)	19.6 (2.4)
R_{merge} (%) ^a	5.7 (43.9)	5.7 (51.8)
CC _{1/2}	(0.921)	(0.979)
Refinement statistics		
Resolution range (Å)	103.51-1.90	103.95-2.79
No. of reflections	73,352	35,202
R -factor/ R_{free} (%)	16.7/22.0	22.9/31.3
RMSD from ideal values		
Bond lengths (Å)	0.015	0.009
Bond angles (°)	1.784	1.461
Coordinate error (Å) ^b	0.107	0.459
Average B -factor (Å ²)		
Protein (chain A/chain B)	18.9/22.6	75.4/86.0
Active site ligand (A/B)	23.1/23.1 (Glycerol)	50.4/65.0 (Gal-NHAc-DNJ)
Ca ²⁺ (M1-site, A/B)	–	37.3/50.0
Zn ²⁺ (M2-site, A/B)	11.8/13.8	50.9/56.5
Water	27.1	56.1
Ramachandran plot (%)		
Favored	93.94	86.68
Allowed	3.52	8.29
Outlier	2.54	5.02

^a ()内は最外殻での値。

^b Maximum likelihood に基づいた推定値。

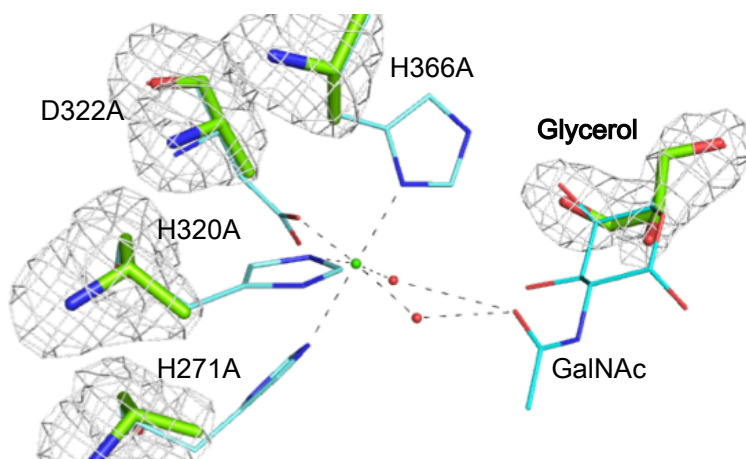


図 1.4.10. NagBb-HHDH-A 変異体の活性中心と野生型との重ね合わせ

HHDH-A 変異体の 4 つのアラニン残基とグリセロールに関する *mFo-DFc* オミットマップを 4.0σ で灰色のメッシュで示す。変異体の構造は黄緑のスティック表示で、野生型の構造はシアンライン表示で示す。金属イオン（黄緑の球）と水分子（赤の球）は野生型の構造由来。

1.4.5. 活性測定

先行研究では、NagBb の安定な pH は 3.0-11.0、至適 pH は 5.0 付近であると報告されていた[27]。しかし、本研究で発現・精製した NagBb では、pH 4.5-6.0 において、バッファーによらず凝集が見られた。そのため、本研究における NagBb の活性測定は至適 pH からは外れるが凝集しない pH 6.5 (MES バッファー) で行った。

1.4.5.1. 野生型 NagBb と変異体の活性測定

NagBb の *pNP-α-GalNAc* に対する動学的パラメータは、 $K_m 2.06 \pm 0.23$ mM、 $k_{cat} 11.01 \pm 0.40$ s⁻¹、 $k_{cat}/K_m 5.34$ s⁻¹mM⁻¹であった。しかし、*pNP-α-GalNAc* は貴重な基質であるため、以下アッセイバッファー中での *pNP-α-GalNAc* の濃度 0.25 mM を基準として固定し、この濃度での活性を測定し比較した。この濃度における NagBb の比活性は 628 ± 60 mU/mg であった。求核触媒残基の変異体 D435A、D435N、酸/塩基触媒残基の変異体 E478A、E478Q、基質認識に重要な anchor の変異体 D330A、D330N ではどれも大幅な活性の低下が見られ、野生型酵素に対して、約 1/100-1/1000 以下であった (表 1.4.6.)。

求核触媒残基 Asp435 の変異体に関しては活性が非常に低く、D435A は 0.6 mU/mg 以下であり、正確な値を定めることができなかった。D435N は 0.7 ± 0.1 U/mg で野生型の約 1/1000 に低下しており、この結果より求核触媒残基の反応における重要性が確認された。

酸/塩基触媒残基 Glu478 の変異体では他の 2 つの Asp 残基に比べると活性が残存しており、野生型の約 1/100 であった。糖質加水分解酵素ではこのようなケースもまれにある。例えば、GH54 に属する α -L-アラビノフラノシダーゼは、求核触媒残基 Glu221 の変異体 E221A の活性は野生型の約 10^{-6} になったが、酸/塩基触媒残基 Asp297 の変異体 D297A の活性は野生型の約 10^{-3} しか低下せず低下の度合いが低かった⁴⁶。GH101 に属する *Streptococcus pneumoniae* 由来 *N*-アセチルガラクトサミニダーゼでは、求核触媒残基 Asp764 の変異体 D764A は k_{cat} は野生型の約 1/700 になったが、酸/塩基触媒残基 Glu796 の変異体では E796A、E796Q とともに k_{cat} は野生型の約 1/30 しか低下せず、 k_{cat}/K_m は野生型とほぼ同じ値であった⁴⁷。このような結果となるのは、用いている基質が、酸触媒の助けがなくてもよく脱離する基を持つものであるからかもしれない。

また、基質認識に重要な anchor Asp330 の変異体 D330A は野生型の約 1/500、D330N は約 1/300 となった。従って、この基質認識残基も反応において非常に重要であることが明らかとなった。

次に、活性部位に近い金属 M1 サイトを構成する 4 つのアミノ酸残基; His271、His320、Asp322、His366 それぞれを Ala に変異させた H271A、H320A、D322A、H366A と、4 つの残基すべてを Ala に変異させた四重変異体 H271A/H320A/D322A/H366A (以下四重変異体と呼ぶ)、計 5 種類の変異体を作製し、活性を測定した。H271A と H320A に関しては、pH 6.5 では凝集し、測定できなかった。pH 7.0 の MES バッファーに懸濁すると、凝集は起こらなかった。そのため、これら 2 つの変異体の活性測定は pH 7.0 で行った。なお、野生型酵素の pH 7.0 での活性も測定したが、活性は pH 6.5 の際の約 1/2 の 0.274 ± 0.026 U/mg であった。H271A も H320A も pH 7.0 での測定にも関わらず、他の 2 つの 1 点変異体よりは活性が残っていた。しかしそれでも野生型の約 1/30 であった。D322A、H366A は野生型の約 1/200 まで低下した。また四重変異体では約 1/1000 となり、最も活性が低下した。以上よりすべての変異体において活性が低下することから、M1 サイトの金属イオンの重要性が示された。

表 1.4.6. NagBb の各種変異体の活性測定

Enzyme	pH	Relative activity (mU/mg) ^a	Ratio (%)	Note
Wild type	6.5	628 ± 60	100	
Wild type	7.0	274 ± 26	43.7	
D435A	6.5	< 0.6	–	Nucleophile
D435N	6.5	0.7 ± 0.1	0.11	Nucleophile
E478A	6.5	8.6 ± 0.6	1.4	Acid/base
E478Q	6.5	8.8 ± 1.5	1.4	Acid/base

D330A	6.5	1.3 ± 0.0	0.21	Anchor
D330N	6.5	2.2 ± 0.6	0.35	Anchor
H271A	7.0	19 ± 1	3.0	Metal binding
H320A	7.0	19 ± 1	3.0	Metal binding
D322A	6.5	3.1 ± 0.3	0.50	Metal binding
H366A	6.5	2.6 ± 0.2	0.41	Metal binding
HHDHA ^b	6.5	0.6 ± 0.1	0.09	Metal binding
W398A	6.5	< 0.6	–	Subsite –1

^a MES-NaOH (pH 6.5 または 7.0) 、37°C、0.25 mM *p*NP- α -GalNAc において測定した値。

^b HHDHA は H271A/H320A/D322A/H366A の四重変異を示す。

1.4.5.2. 各種金属と EDTA を添加した活性測定

EDTA でキレートした NagBb 酵素を用いて、各種金属を添加した活性測定を行った。その結果を図 1.4.11. に示す。EDTA 処理を行った NagBb は、処理をしない native-NagBb に対し、活性が約 50% に低下した。ここに様々な濃度の金属または EDTA を加えていくことにより活性を測定した。

EDTA の添加に関しては、1 mM まで増加させると、さらなる活性の低下が見られた。

Fe²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Ni²⁺ の添加に関しては、低濃度では 20% ほどのわずかな活性の回復が見られたが、高濃度では阻害的に、あるいはタンパクを凝集させるように作用した。その他の Cu²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ に関しては、濃度に関わらず阻害的に作用した。

EDTA 処理により活性が低下したことから、活性には金属が関わっていることが示唆された。しかし、今回の実験を行った範囲内では完全に活性が回復するものは見られなかった。1.4.4.3. 節の結果より M2 サイトに入っている金属は Zn²⁺ であると同定されたが、Zn²⁺ を添加しても活性が回復することはなかった。活性測定溶液中に含まれたタンパク量が 0.07 μ M であったのに対し、実験では金属の終濃度を 1 μ M までしか下げなかったため、もう少し低い濃度まで下げるべきだったかもしれない。また、金属サイトが 2 か所あることにより、1 種類ずつの金属を添加する実験では測定が難しいのではないかと考えられる。

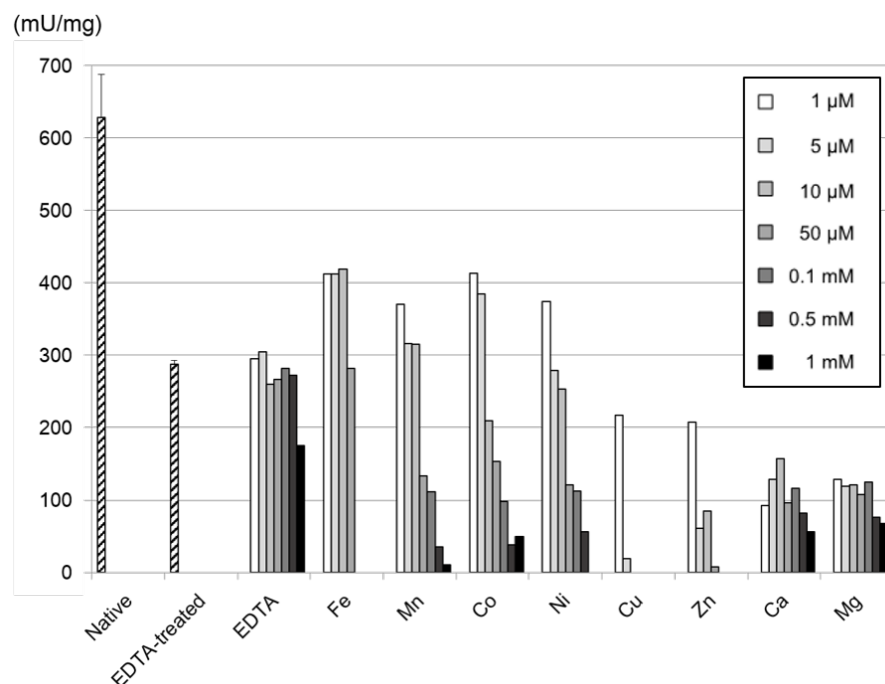
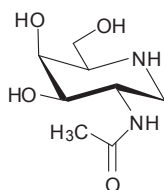


図 1.4.11. 各種金属と EDTA を添加した活性測定結果

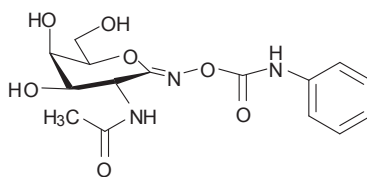
EDTA-treated が EDTA 処理を行った酵素 (1.3.2.3.節) であり、ここに様々な濃度の金属または EDTA を添加した。バーがないもの (Fe^{2+} の $\geq 0.1 \text{ mM}$ 、 Cu^{2+} の $\geq 10 \mu\text{M}$ 、 Zn^{2+} の $\geq 0.1 \text{ mM}$) は NagBb のタンパクが凝集し、測定できなかった。

1.4.5.3. 阻害剤の活性測定

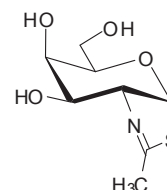
西オーストラリア大学の Keith A. Stubbs 博士より NagBb の阻害剤となりうる化合物 3 種の提供を受け、測定を行った。結果を図 1.4.12. に示す。標準測定溶液 (1.3.2.1.節参照) に、終濃度 $100 \mu\text{M}$ の化合物を添加することで初期の測定を行ったところ、阻害剤を加えない活性に対し、残存活性は、Gal-NHAc-DNJ が 0.1%、Gal-PUGNAc が 70%、Gal-NAG-thiazoline が 97%であった。Gal-NHAc-DNJ は、1-deoxynojirimycin 様化合物であり、 α -グリコシダーゼ阻害剤として知られるタイプの化合物である。 α -GalNAcase である NagBb が Gal-NHAc-DNJ で阻害を受けることは、理論に基づいた結果である。Gal-PUGNAc は、PUGNAc 様化合物であり、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ阻害剤として知られるタイプの化合物である。Gal-PUGNAc に関しては、NagBb が β -グリコシダーゼではない点と、アグリコン結合部位が大きなフェニルカルバネート基を受容できなかったために、大きな阻害が見られなかったと考えられる。Gal-NAG-thiazoline は、チアゾリンタイプの化合物である。これは β -N-アセチルヘキソサミニダーゼの阻害剤で、基質補助型反応機構 (1.0.2.3.節) を取る酵素の場合に阻害を示す。この測定結果は、NagBb が基質補助型反応機構ではないことを明確に示すものである。



1 Gal-NHAc-DNJ
(0.1%)
 $K_i = 51 \text{ nM}$



2 Gal-PUGNAc
(70%)



3 Gal-NAG-thiazoline
(97%)

図 1.4.12. 各阻害剤に対する NagBb の活性

() 内は阻害剤なしの活性に対する比活性。pH 6.5 における 0.25 mM *p*NP- α -GalNAc の条件で、阻害剤を 100 μ M 添加して測定した。

阻害が見られた Gal-NHAc-DNJ に関しては、基質である *p*NP- α -GalNAc の濃度を 0.25 mM、0.5 mM とし、それぞれで阻害剤の濃度を 10 nM、50 nM、100 nM、500 nM と変化させ、Dixon プロットを取ることで阻害定数 K_i を算出した。この結果を図 1.4.13. に示す。これにより NagBb に対する Gal-NHAc-DNJ の K_i は 51 nM と算出された。

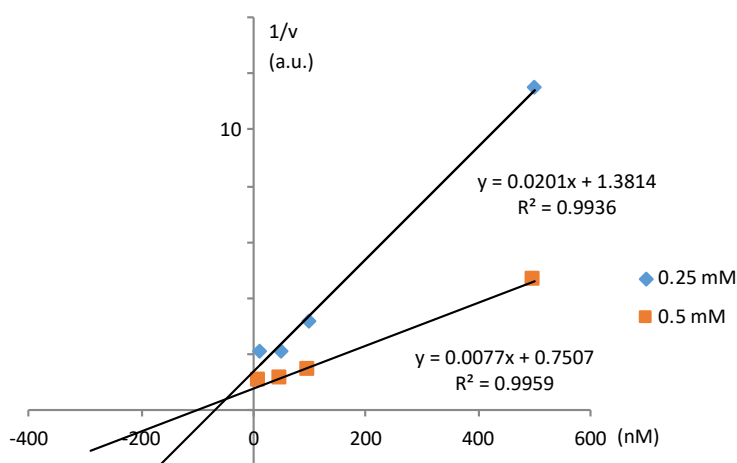


図 1.4.13. NagBb に対する Gal-NHAc-DNJ 阻害剤の Dixon プロット

◆は GalNAc 0.25 mM、■は 0.5 mM で測定した各点を示す。

1.4.5.4. 阻害剤 Gal-NHAc-DNJ との複合体構造

前 1.4.5.3. 節で Gal-NHAc-DNJ が NagBb の阻害剤となることが明らかとなったので、複合体結晶構造を得た。データセットは表 1.4.5. に示した。この構造の活性中心を図 1.4.14. に示す。全体構造は主鎖の Ca 原子の r.m.s.d. = 0.28 Å (8849 原子) と、GalNAc 複合体構造と大きく変わらず、触媒部位の糖の結合もほぼ同じであった。

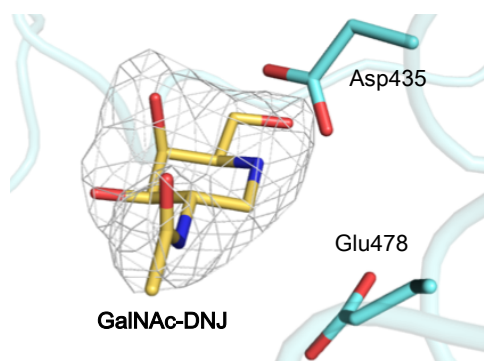


図 1.4.14. Gal-NHAc-DNJ との複合体の活性中心

Gal-NHAc-DNJ の *mFo-DFc* オミットマップを 3.5σ で灰色のメッシュで示す。

1.4.6. 金属定量

タンパク質に含まれる金属原子を定量するために金属定量を行った。結果を図 1.4.15.に示す。

Zn^{2+} に関しては野生型 NagBb、NagBb-HHDH-A 変異体ともに 1 mol あたり約 0.5~0.8 mol と、やや少なめではあるが、ほぼタンパク:金属が 1:1 で結合している結果が得られた。

一方、 Ca^{2+} に関しては、希釈倍率によって大きく異なり、野生型がタンパク 1 mol あたり約 2~4 mol、変異体が 1 mol あたり約 0.1~2 mol であった。また、Mg はほぼ 0 かマイナスの値が示された。

この測定は何度か繰り返したが、 Zn^{2+} は常に 1 付近の値が観測されたのに対し、 Ca^{2+} は値に大きなバラつきが見られた。 Mg^{2+} に関してもバラつきがあり、検出されないことも多かった。

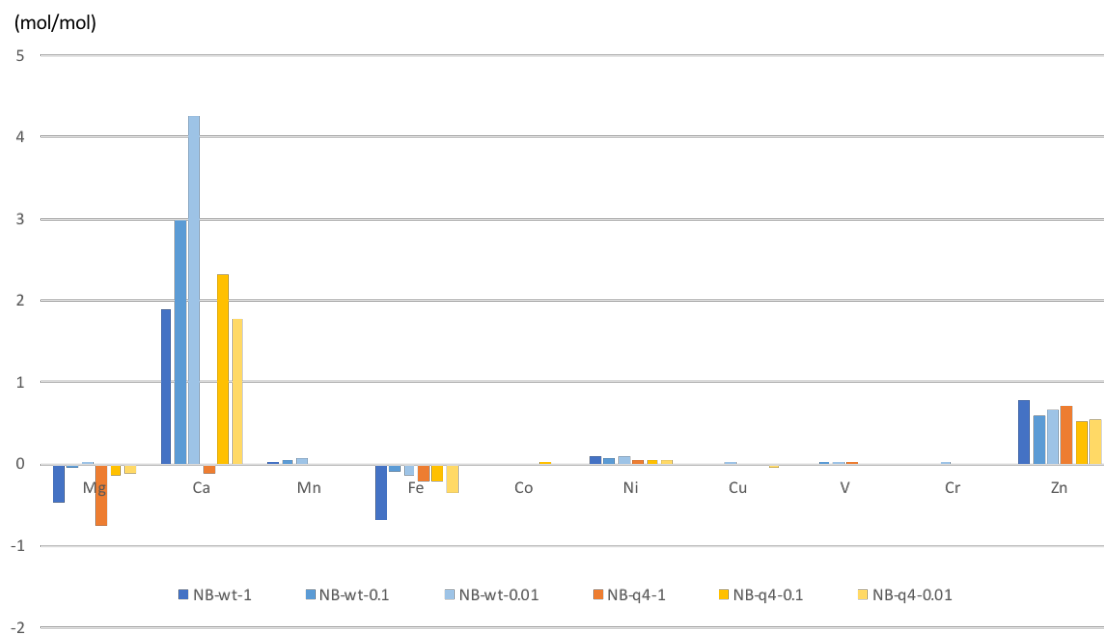


図 1.4.15. 金属定量結果

タンパク : 金属 = 1 : x (モル比) となるように算出してある。縦軸は 1mol (あるいは 1 分子) のタンパクに対する金属の mol 数 (あるいは分子の数) を示す。NB-wt が野生型 NagBb、NB-q4 が NagBb-HHDH-A 変異体を表す。-1 が希釈倍率 1 倍、-0.1 が希釈倍率 0.1 倍、-0.01 が希釈倍率 0.01 倍のデータを示す。

表 1.4.7. 金属測定の結果

Protein	①WT	②Q4	③WT	④Q4	①-③ ^b	②-④ ^b	WT	Q4
			-buffer ^a	-buffer ^a			mol/mol ^c	mol/mol ^c
n								
conc.	3.85	3.15						
x1	0.096	0.079						
x1/5	0.019	0.016						
x1/25	0.004	0.003						
x1	①WT	②Q4	③WT	④Q4	①-③	②-④	WT	Q4
			-buffer	-buffer			mol/mol	mol/mol
Mg ²⁺	4.97	5.37	8.05	9.42	-3.09	-4.05	-0.48	-0.76
Ca ²⁺	159.39	115.10	136.91	116.32	22.48	-1.21	1.89	-0.12

Mn ²⁺	1.47	0.27	1.31	0.35	0.16	-0.08	0.01	-0.01
Fe ²⁺	24.25	21.71	34.55	24.18	-10.30	-2.47	-0.68	-0.20
Co ²⁺	0.01	0.01	0.03	0.01	-0.02	0.00	0.00	0.00
Ni ²⁺	1.81	0.90	0.42	0.36	1.39	0.55	0.09	0.04
Cu ²⁺	1.70	1.63	1.89	1.73	-0.19	-0.11	-0.01	-0.01
V ²⁺	0.01	0.03	0.04	0.02	-0.03	0.01	0.00	0.00
Cr ²⁺	0.19	0.20	0.20	0.24	-0.01	-0.04	0.00	0.00
Zn ²⁺	15.23	12.11	4.24	3.86	10.99	8.24	0.78	0.72
x1/5	①WT	②Q4	③WT	④Q4	①-③	②-④	WT	Q4
			-buffer	-buffer			mol/mol	mol/mol
Mg ²⁺	1.23	1.30	1.29	1.46	-0.06	-0.15	-0.05	-0.15
Ca ²⁺	32.13	26.74	25.07	22.25	7.06	4.49	2.97	2.31
Mn ²⁺	0.29	0.06	0.11	0.06	0.18	0.00	0.06	0.00
Fe ²⁺	4.77	4.33	5.03	4.87	-0.27	-0.54	-0.09	-0.22
Co ²⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ni ²⁺	0.34	0.18	0.09	0.08	0.25	0.11	0.08	0.04
Cu ²⁺	0.70	0.58	0.73	0.63	-0.03	-0.05	-0.01	-0.02
V ²⁺	0.01	0.01	-0.01	0.01	0.02	0.00	0.01	0.00
Cr ²⁺	0.03	0.04	0.03	0.05	0.00	-0.01	0.00	0.00
Zn ²⁺	3.25	2.55	1.17	1.10	2.09	1.45	0.60	0.51
x1/25	①WT	②Q4	③WT	④Q4	①-③	②-④	WT	Q4
			-buffer	-buffer			mol/mol	mol/mol
Mg ²⁺	0.37	0.38	0.36	0.40	0.01	-0.03	0.03	-0.12
Ca ²⁺	9.74	7.97	7.72	7.28	2.02	0.69	4.26	1.79
Mn ²⁺	0.06	0.01	0.02	0.01	0.04	0.00	0.07	0.00
Fe ²⁺	1.02	0.92	1.11	1.09	-0.09	-0.17	-0.15	-0.35
Co ²⁺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ni ²⁺	0.08	0.04	0.02	0.02	0.06	0.02	0.08	0.04
Cu ²⁺	0.14	0.12	0.13	0.14	0.00	-0.03	0.00	-0.04
V ²⁺	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	-0.01	0.00	-0.01
Cr ²⁺	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Zn ²⁺	0.68	0.52	0.23	0.22	0.45	0.30	0.66	0.54

^aそれぞれのタンパクを溶かし込んでいたバッファーの値。

b タンパクの測定値 (①または②) から、バッファの測定値 (③または④) を引いた値。
c タンパクの含有量と質量、それぞれの金属の原子量より、タンパク 1 mol あたりの値を算出した値。

1.4.7. CD スペクトル解析

野生型 NagBb および NagBb-HHDH-A 変異体、および EDTA 処理をした野生型 NagBb の far-UV CD スペクトルの測定を行った。結果を図 1.4.16.に示す。各変異体の CD スペクトルは、野生型酵素に対して大きな変化はしておらず、変異導入による立体構造の異変は起こっていないことを確認した。

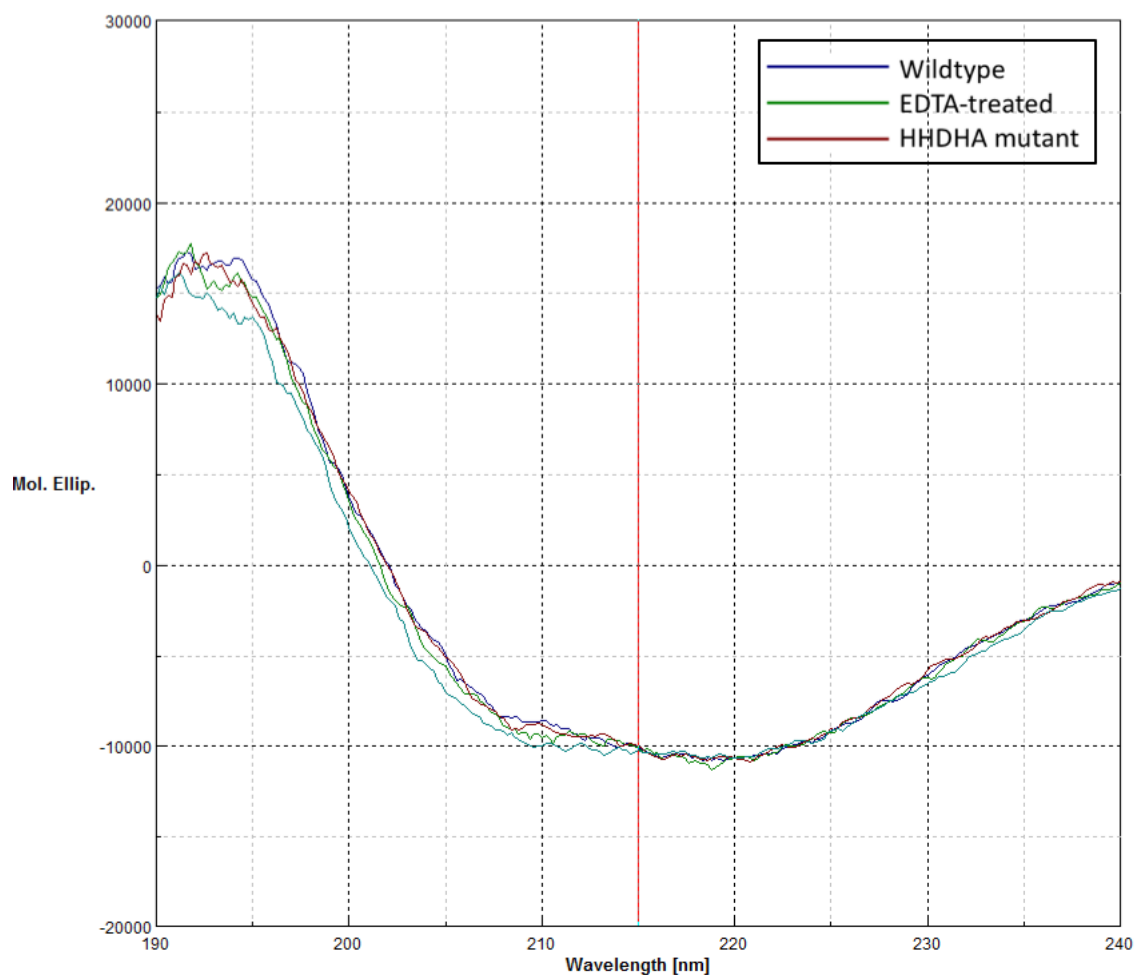


図 1.4.16. NagBb 野生型と HHDH-A 変異体、EDTA 処理野生型 NagBb の CD スペクトル

1.5. 考察

1.5.1. NagBb の構造比較

*DALI*サーバー⁴⁸による類似構造検索の結果の一部を、表 1.5.1.に示す。

表 1.5.1. *DALI*サーバーによる NagBb-GalNAc 複合体に関する類似構造検索結果（上位 8 種）

	Z score ^a	R.m.s.d.	N res. ^b	PDB	Origin	Protein
1	30.8	3.2	549	5OPQ	<i>Zobellia galactanivorans</i>	3,6-Anhydro-D-galactosidase ³⁷
2	17.0	4.8	449	5M1I	<i>Thermotoga martima</i>	GH36 α -Galactosidase ⁴⁹
3*	15.6	3.1	202	3K25	<i>Synechocystis</i> sp.	SLR1438 protein Structural genomics
4	14.9	5.3	361	4AEE	<i>Staphylothermus marinus</i>	GH13 α -Amyrase I ⁵⁰
5*	14.9	3.0	204	3OS7	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Galactose mutarotase-like protein Structural genomics
6	14.8	13.0	251	5XQ3	<i>Penicillium chrysogenum</i>	PL26 Exo-rhamnogalacturonan lyase ⁵¹
7*	14.7	3.0	193	3NRE	<i>Escherichia coli</i>	Aldose 1-epimerase Structural genomics
8	14.5	6.7	455	3ECQ	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GH101 Endo- α -N-acetylgalactosaminidase

52

^a類似性を示すスコア。この値が高いほど上位にくる。

^bアラインした残基数。

* N ドメインのみ重なっていたもの。

1.5.2. GH101 endo- α -Nアセチルガラクトサミニダーゼの比較

GH101 endo- α -Nアセチルガラクトサミニダーゼは、NagBb をクローニングした際の元の配列である。そこで、この酵素との構造を比較した。

1.5.2.1. NagBb と GH101 endo- α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼとの全体構造比較

GH101 endo- α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼとは、*S. pneumoniae* 由来 (5A59)⁴⁷、*B. longum* 由来 (2ZXQ)⁵³、共に活性ドメインの scaffold である(α/β)₈-barrel を重ね合わせると、中心部のみよく重なった (図 1.5.1. (上) ; r.m.s.d. 2.564 Å、704 atoms (5A59)、図 1.5.1. (下) r.m.s.d. 9.382 Å、1119 atoms (2ZXQ))。

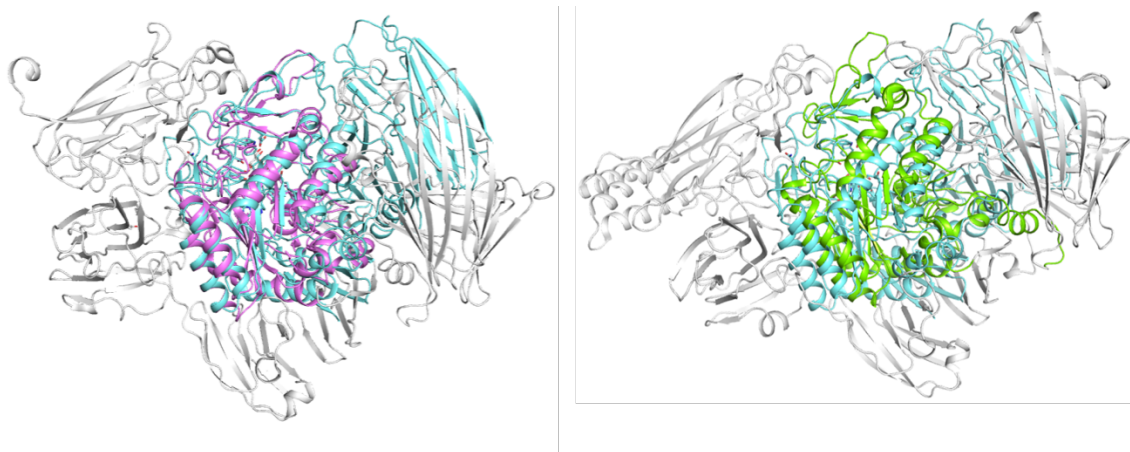


図 1.5.1. NagBb と GH101 endo- α -GalNAcase との比較

(上) *S. pneumoniae* 由来 SpGH101 (5A59)、(下) *B. longum* 由来 EngBF (2ZXQ) との重ね合わせ。NagBb の全体をシアンで、GH101 酵素は NagBb と重なるコア部分を色 (上 : 紫、下 : 緑) で、それ以外の部位を白で示した。

1.5.2.2. NagBb と SpGH101 との活性中心比較

NagBb と *S. pneumoniae* 由来 endo- α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (SpGH101 ; 5A59) の T 抗原 (Gal β 1-3GalNAc) 複合体の活性中心を比較した (図 1.5.2.)。2 つの活性中心では、GalNAc 同士が近い位置に来るように位置していた。触媒残基に関しては、求核触媒、酸/塩基触媒ともに近い位置にあった。酸/塩基触媒残基はアミノ酸配列上では前述の EngBF と同様 SpGH101 でも配列比較ではアラインしなかったが、残基の位置と基質との位置関係は同様であった。加えて、同一 GH ファミリーにおいては触媒残基は一般的に保存されるが、GH129 に属するビフィズス菌以外の全ての細菌種由来のタンパクとのアミノ酸配列アライメント (図 1.5.3.) においても、NagBb における E478 の部位の Glu 残基は全てアラインしていた。以上より、NagBb の酸/塩基触媒は Glu478 であると言える。Anchor である Asp330 も SpGH101 とほぼ同じ位置にあった。その他 NagBb において GalNAc の認識に関わっていた残基は、多くが保存されていた。しかし、NagBb において C2 *N*-アセチル基のアミノ基の N 原子と O3 を認識していた Asp561 は SpGH101 では保存されておらず、逆に、SpGH101 において T 抗原のガラクトース側を認識する残基 Gln868、Lys1156、Glu1253、Asp1254 は NagBb では保存されていなかった。また、NagBb で見られた金属

サイトは SpGH101 では見られず、NagBb で His366 の位置の His694 が残っているだけであった。

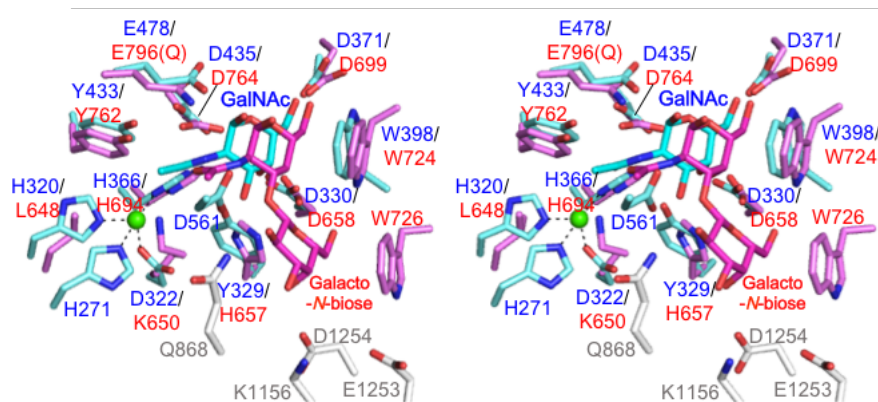


図 1.5.2. NagBb と SpGH101 との活性中心の比較 (ステレオ図)

NagBb の残基と基質 GalNAc をシアン、SpGH101 の残基と基質 galacto-*N*-biose をマゼンタと白で示した。



図 1.5.3. NagBb と GH129 に属するタンパクのアミノ酸配列アライメント (一部)

NagBb における求核触媒残基を赤矢印、酸/塩基触媒残基を青矢印、アンカー残基を緑矢印、M1 サイトを形成する残基を黄矢印、基質認識に関わるその他の残基を白矢印で示す。

1.5.2.3. GH101 の反応機構

GH101 は GH129 と同様に反応前後で糖のコンフィギュレーションを変えない保持型グリコシダーゼであるが、その反応機構としては、やや珍しい Grothuss 機構³⁴ で水を介した反応を行うことが提唱されている (図 1.5.4)。一般的な保持型機構では酸/塩基触媒が直接糖の O1 にプロトンを受け渡しグリコシル-酵素中間体となるが、Grothuss 機構ではここで糖と酸/塩基触媒の間に水が入り、水分子を介したプロトンの受け渡しが行われる。また、解離の際には普通 1 つの水分子が入り込むが、Grothuss 機構ではここに 2 つの水分子が入り、プロトン伝達リレーが行われる。GH101 では酸/塩基触媒残基と GalNAc の 1 位ヒドロキシ基の距離が 4.3 Å と遠く、また多くの場合結晶構造中で酸/塩基触媒残基と

GalNAc の 1 位ヒドロキシ基の間に水分子が見られる (図 1.5.5.)。したがって、GH101 は Grotthuss 機構と言われている。NagBb ではこの水分子は観測されず、酸/塩基触媒残基も GalNAc も SpGH101 と同じような場所に位置していたが、少しずつずれており、酸/塩基触媒残基と GalNAc の 1 位ヒドロキシ基の距離は 2.7 Å と一般的な水素結合距離であった。したがって、NagBb は GH101 の近縁ではあるが、Grotthuss 機構ではなく、一般的な保持型グリコシダーゼの反応機構を持つことが示唆された。

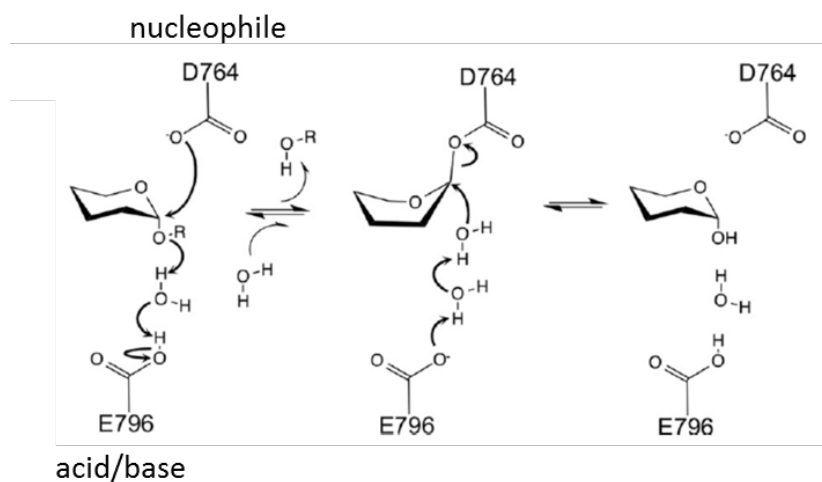


図 1.5.4. GH101 で提唱されている Grotthuss 機構の反応メカニズム
47 より引用。

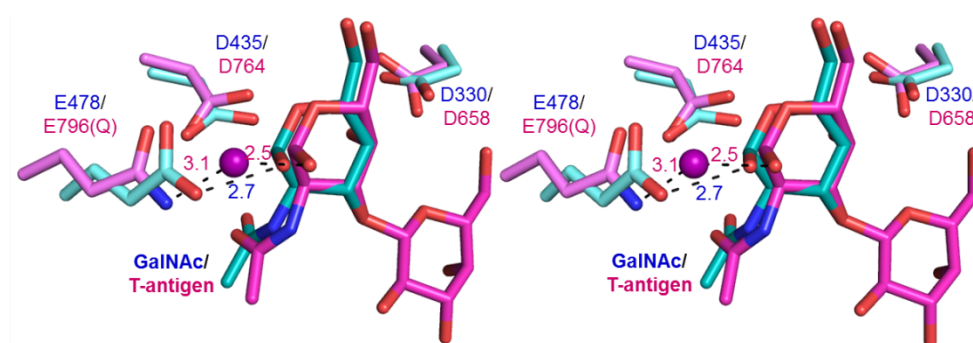


図 1.5.5. NagBb と SpGH101 との触媒残基の比較 (ステレオ図)

NagBb をシアンで、SpGH101 をマゼンタで示した。紫の球は SpGH101 の構造において見られた水分子。数字は水素結合距離を示す。

1.5.2.4. Trp 残基の重要性

GH101 において重要とされるのは、活性中心に保存された 2 つの Trp 残基である。これらが基質侵入とともに部分的な構造変化を起こし、close 型となって基質を押さえることで反応に非常に重要な役割を果たすことが提唱されている⁵³。NagBb では、このうちの 1 つ、

GalNAcに近い方の Trp398 のみが保存されていた。GH101 においても、こちらの変異体の方がもう一方の Trp の変異体よりも活性の低下が大きく、より重要性が高いことが示されている。NagBb においても一方の Trp にあたる残基は Gly 残基に変異されており、この代わりとなるような残基が見られることもなかった。また、NagBb ではこれらの部位における糖基質結合による構造の変化は見られなかった。NagBb における Trp398 の役割を確認するため W398A の活性測定を行ったところ (表 1.4.6.)、活性は 0.6 U/mg 以下と非常に低く、正確な値を定めることはできなかった。これは一番活性の低下した求核触媒 Asp435 の D435A の変異体と同程度まで活性が低下していたことを示す。この結果より、NagBb では二つの Trp のうち一方しか保存されていないにも関わらず、Trp398 が非常に重要な役割を担っていることが明らかとなった。Trp398 は NagBb の構造中 (図 1.5.6.) では、基質ポケットの上部で蓋のような位置で基質を押さえ、反応に適した位置に固定するように働いていると考えられる。

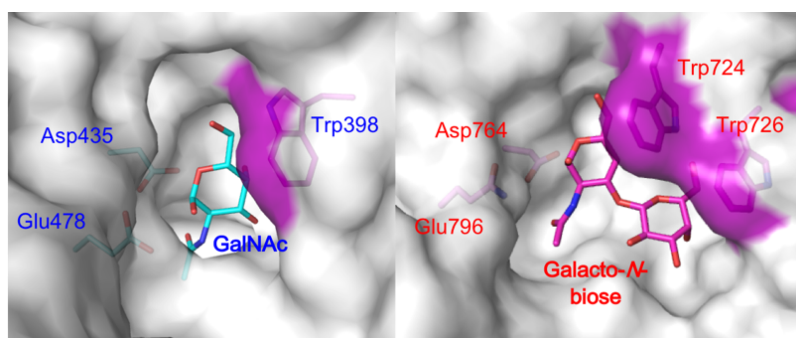


図 1.5.6. NagBb と SpGH101 の基質ポケットにおける Trp 残基

(左) GalNAc、Asp435 と Glu478 の側鎖をシアンで、Trp398 を紫で、それ以外は表面電荷を示した。(右) Galacto-*N*-biose、Asp764 と Glu796 の側鎖をシアンで、Trp724 と Trp726 を紫で、それ以外は表面電荷を示した。

1.5.3. GH129 ファミリーの酵素との構造比較

本研究の NagBb の立体構造は GH129 ファミリー初の立体構造として 2017 年 5 月に論文として報告したが、2017 年 11 月に、同じ GH129 に属する酵素 DagB の立体構造を報告する論文が発表された³⁷。論文中では NagBb の酵素自体には言及されていたが、立体構造については触れられていなかった。*DALI*の結果でも最も類似性の高い値を示した。ここで比較することで、GH129 ファミリーの立体構造についてより深く考察を行う。

1.5.3.1. DagB の概要

DagB は *Zoebellia galactanivorans* 由来の酵素で、カラギーナン分解系の PUL (Polysaccharide Utilization Locus ; 多糖を分解する一連の酵素群) に含まれている。カラ

ギーナンの主鎖は [3,6-anhydro-D-galactose- α -1,3-D-galactose- β 1,4-] を繰り返し単位として持つ構造である。DagBはこのオリゴ糖の非還元末端側の α -1,3結合に作用し、3,6-アノヒドロ-D-ガラクトースを遊離する3,6-アノヒドロ-D-ガラクトシダーゼ(3,6-anhydro-D-galactosidase)として同定された³⁷。

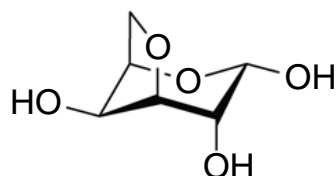


図 1.5.7. 3,6-Anhydro-D-galactose の構造

³⁷より引用。

1.5.3.2. NagBb と DagB との全体構造比較

NagBb と DagB の立体構造を図 1.5.8. に示す。全体構造の重ね合わせは r.m.s.d. = 2.3 Å (1864 原子) と非常に類似した全体構造を取っていた。N 末ドメインは β -サンドイッチ構造、中心ドメインはコアとなり活性中心のある部位で、壊れた(α/β) s -barrel 様の構造を有しており、C 末ドメインは β -サンドイッチ構造であった。ただし、NagBb は溶液中で単量体であるのに対し、DagB は 2 量体を形成していた。

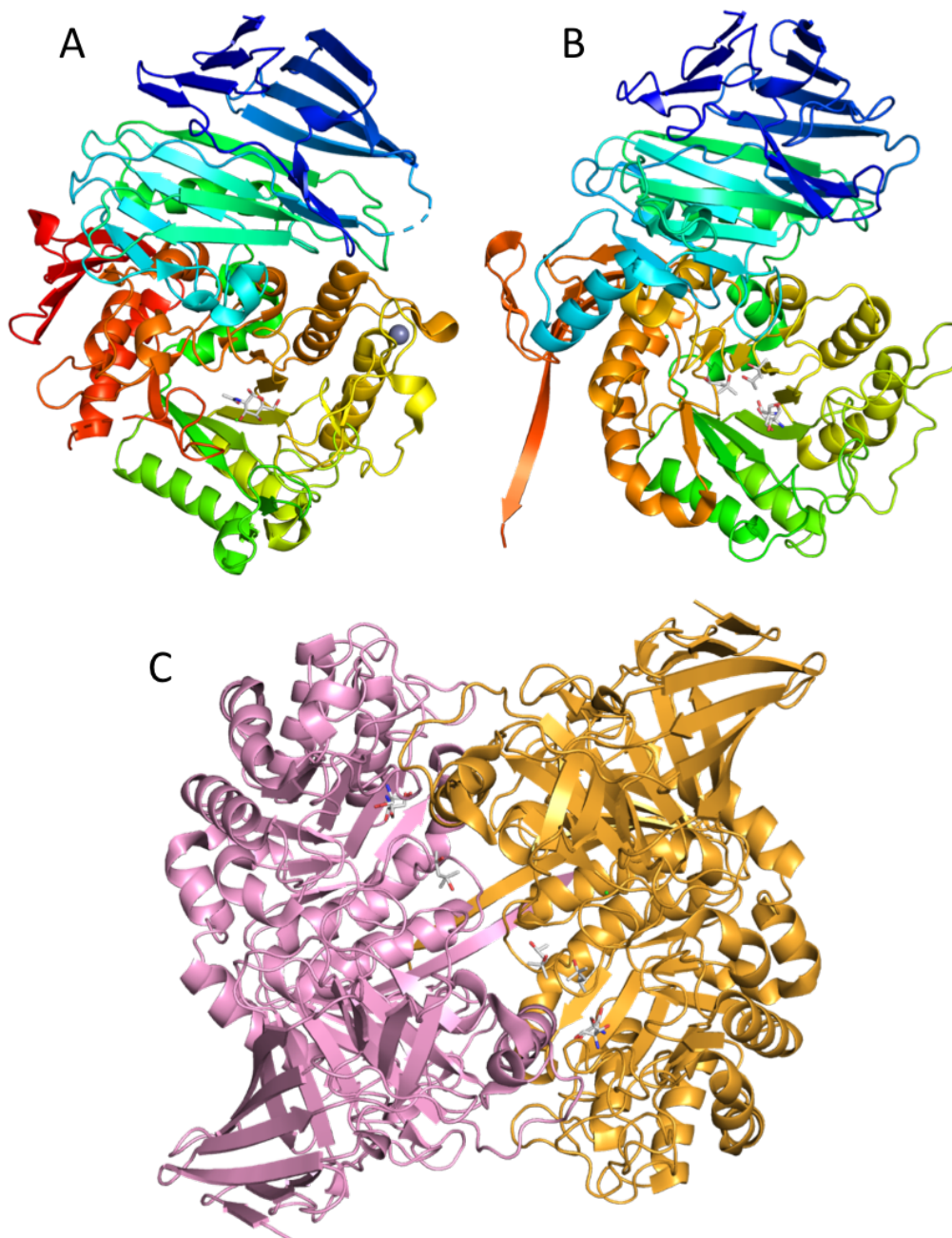


図 1.5.8. NagBb と DagB の全体構造

(A) NagBb の全体構造、N 末側が青、C 末側が赤のレインボーで表示している。(B) DagB の全体構造 (chain A のみ)、N 末側が青、C 末側が赤のレインボーで表示している。(C) DagB の全体構造 (二量体)、chain A をオレンジ、chain B をピンクで示している。

1.5.3.3. NagBb と DagB との活性中心比較

DagB の活性中心には基質が入っておらず、代わりにバッファー由来の Tris 分子が見られた。そのため論文では、アライメントの配列保存性より触媒残基の候補を Asp202、Asp486、

Glu517 としていた。NagBb と構造を比較すると、求核触媒残基は Asp486、酸/塩基触媒残基は Glu517 であると推測される。

NagBb と DagB の触媒する基質の共通点としては、1 位が α 型の糖である点と、4 位の OH が axial であるガラクトース型である点が考えられるが、NagBb において 4 位を認識する重要なアンカー残基 Asp330 は、DagB では保存されていなかった。また同様に 4 位を認識する Tyr329 も保存されていなかった。

また、特徴的なのは、NagBb はモノマーで活性部位が完結しているのに対し、DagB は基質認識部位の近傍に 2 量体を形成する他の chain 由来の残基 (Cys198、Asp202) が位置していたことである。これらの残基は NagBb において基質認識に非常に重要な役割を持つ Trp398 のあたりに位置しており、基質認識に関わっている可能性が高いと考えられる。

また、NagBb における金属 M1 サイトは DagB においては見られず、その位置に Trp382 が位置していた。金属サイトを形成する 4 残基も、His320 に対応する His380 の他は全て保存されていなかった (図 1.5.3. のアライメントも参照)。NagBb における金属サイトは、糖の *N*-アセチル基の認識に関わっている。しかし、DagB は 3,6-アンヒドロ-D-ガラクトシダーゼと同定されており、3,6-アンヒドロ-D-ガラクトースの 2 位は OH であり、*N*-アセチル基は存在しない。そのため、金属サイトは必要なかったと考えられる。

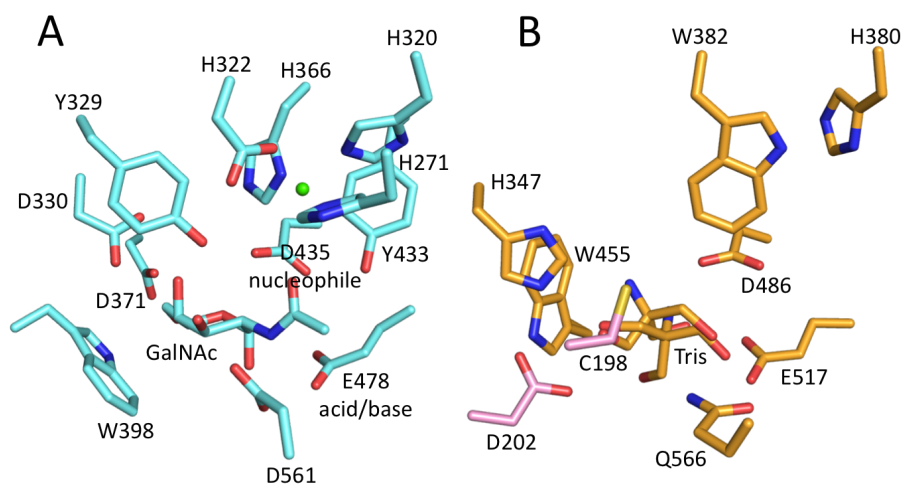


図 1.5.9. NagBb と DagB の活性中心

(A) NagBb の活性中心。(B) DagB の活性中心、オレンジが chain A、ピンクが chain B。

1.5.3.4. NagBb と DagB の構造比較より

全体として、NagBb と DagB は配列相同性が約 16% であり、同じファミリーといえども配列相同性は極めて低く、また、触媒する反応も異なる。CAZy データベース^{29,30}では基本的に配列を元にファミリー分類がなされるが、同じファミリーに属するかどうかの境界線にあるのではないかと考えられる。NagBb の活性中心は、1.5.2. 節で比較した GH101 endo- α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼの方が、触媒残基をはじめ、アンカー残基、基質認識に

重要な Trp、その他の基質認識残基など、DagB よりも類似性が高い。これは、NagBb の起源や GH129 の起源を考える際、非常に興味深い示唆を与える。

DagB の由来菌である *Zoebellia galactanivorans* は、海洋細菌であり、紅藻類に含まれるポルフィランを分解する酵素を持つという研究が行われた⁵⁴。紅藻類は、海苔の原料として知られている。この研究によると、このポルフィラン分解酵素は、他には、日本人に特異的に存在する *Bacteroides plebeius* の種のみが有していることが明らかとなり、過去の日本人において、どこかの時点でヒトの腸内で、この酵素をコードする遺伝子が、*Z. galactanivorans* から *B. plebeius* に遺伝子の水平伝播により入り込んだと結論された。

この例のように、食べ物を介した腸内細菌による遺伝子の水平伝播により GH129 ファミリー酵素が共有され、合目的的に金属サイトなどが分子進化により形成されてきた可能性がある。いずれにせよ、NagBb における金属 M1 サイトは非常に限られた種（ほぼビフィズス菌）のみが保持していると考えられ、非常にユニークな基質認識機構であった。

1.5.4. NagBb の金属について

NagBb は金属イオンが関わる、極めて新規性の高い活性中心の基質認識機構を持つことが明らかになった。構造情報からこの M1 サイトの金属はカルシウムイオンであると推測されたが、この仮説を裏付ける実験データをできる限り多く収集し、科学的根拠を充実させることを目指した。

1.5.4.1. NagBb における金属イオンに関する種々の実験結果について

カルシウムイオン異常分散データの測定を行った結果より、M1 サイト金属の異常分散差フーリエピークは、Ca²⁺の吸収端である 3.0704 Å より短波長側では常に見られたが、それより長波長側の 3.15 Å で取得したデータでは明瞭なピークは観察されなかった。これは M1 サイトの金属イオンがカルシウムであることを示す結果であった。

また、四重変異体 NagBb-HHDH-A の構造解析では、M1 サイトの金属イオンの電子密度は観察されず、金属は失われていた。また、20 mM GalNAc 存在下で結晶化したにも関わらず GalNAc はサイトに入っておらず、その代わりに、ちょうど C4-C5-C6 炭素に当たる部位に、抗凍結剤のグリセロールが見られた。これより、金属イオンが糖基質の GalNAc の認識に不可欠であることが明らかになった。

活性測定では、EDTA 処理により活性が低下したことから、活性には金属が関わっていることが示唆された。しかし、今回の実験を行った範囲内では完全に活性が回復するものは見られなかった。金属サイトが 2 か所あることは、1 種類ずつの金属を添加する実験ではそもそも測定が難しいのではないかと考えられた。

金属定量では Zn²⁺は常にタンパク 1 mol あたり 1 : 1 付近の値が観測されたことより、

Zn²⁺に関する金属定量の測定結果は、構造から得られたデータと一致し、確からしいと考えられる。一方、Ca²⁺とMg²⁺は測定毎にバラつきが見られ、特にCa²⁺のバラつきは大きかった。また、測定値自体も他の金属とは一桁ほど違っており、また、希釈による変動も大きかった。Ca²⁺は水に混入しやすいためコンタミネーションが考えられ、milli Q水や超純水で測定を行うなど工夫を重ねたが、確からしい実験結果は得られなかった。ICP-MS装置によるCa²⁺およびMg²⁺の測定は困難であると判断した。

1.5.4.2. GHの結晶構造中で金属イオンを配位する例

他のGHファミリーでは、GH38、GH47、GH92の反転型 α -マンノシダーゼでCa²⁺またはZn²⁺がサブサイト-1のマンノースの2位OHと3位OHを認識し、ブリッジすることで基質認識に関わっている^{55 56 57}。また、反応中の糖のコンフォメーションを安定化させる役割も果たすことが知られている^{57 58}。他に直接的に基質の認識や触媒反応に金属イオン(Ca²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺)が関わる例として、GH4⁵⁹、GH43⁶⁰、GH62⁶¹、GH97⁶²、GH106⁶²、GH127⁶³のファミリーに属するものが知られている。GH43 endo-1,5- α -L-アラビナナーゼ⁶⁰と、GH62 α -L-アラビナナーゼ⁶¹では、八配位または六配位を取る金属はCa²⁺であると同定された。これらの酵素をEDTAで処理したところ、活性に大きな変化は見られなかった。しかし、配位に関わるHis残基の変異体では、活性が著しく低下した。その他のGHファミリーでは、GH13 α -アミラーゼ⁶⁴に見られるように活性中心から離れたところに金属サイトが存在するケースはあるが、これらは構造安定性に寄与していると考えられている。NagBbのようにGHにおいて金属イオンがN-アセチル基の認識に関わっている例は、初めての知見である。

1.5.5. NagBbの触媒機構について

以上の結果をふまえて、考えられるNagBbの反応機構を図1.5.11.に示す。反応機構は典型的なアノマー保持型 α -グリコシダーゼと同様であり、求核触媒残基はD435、酸塩基触媒残基はE478である。基質の認識には金属イオンの存在が重要であり、GalNAcの2位のN-アセチル基の酸素原子を認識している。

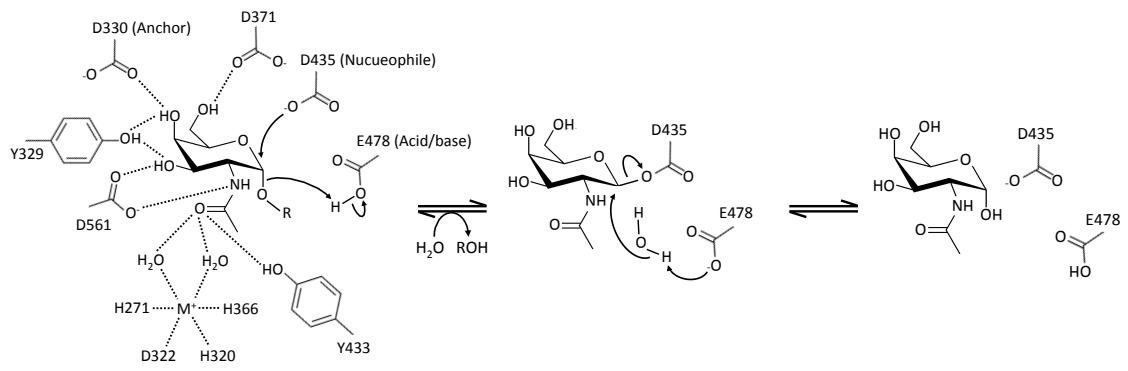


図 1.5.11. NagBb の反応機構

第 2 章

Bifidobacterium longum JCM1217 株由来

UDP-グルコース-ヘキソース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (GalT_{Bl}) に関する

構造生物学的・生化学的解析

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内
に出版予定。

総括

本研究では、ビフィズス菌に特有なヒト糖鎖代謝経路の起源に迫り、より深い知見を得るため、X線結晶構造解析と生化学的解析を用いることで、ビフィズス菌のヒト糖鎖代謝経路で働く特徴的な2つの酵素 NagBb、GalT_{BI}の構造と機能の解明を試みた。

第1章では、NagBbのX線結晶構造解析により、GH129ファミリー酵素の立体構造と基質複合体を初めて明らかにした。NagBbの全体構造はbroken-(α / β)₈-barrel様構造を取っていること、求核触媒残基はAsp435、酸/塩基触媒残基はGlu478であることを同定し、基質認識に重要なTrp398の存在と、*N*-アセチル基認識に関わる金属サイト(M1サイト)の存在を明らかにした。M1サイトではGalNAcの*N*-アセチル基の酸素が2つの水に結合する形で認識され、GHファミリーにおいては活性部位におけるこのような様式は初めての知見であった。

M1サイトの中心金属イオンについて、配位状況からはCa²⁺であると推測された。X線蛍光測定による波長スキャン解析とXAFS測定、EDTA処理にて金属を取り除いたNagBb酵素に対して様々な金属イオンを添加した活性測定、ICP-MS装置を用いた金属定量、と種々の手法を用いて解析を行った。Ca²⁺の吸収端波長(3.07 Å)をまたぐ2つの波長におけるX線結晶回折データの取得により、短波長側(high energy 波長 2.70 Å)では金属の異常分散差フーリエピークが見られたが、長波長側(low energy 波長 3.15 Å)で取得したデータではM1サイトに重なる位置に明瞭なピークは観察されなかったことで、M1サイトの金属イオンがCa²⁺であることを示す結果が得られた。また、金属配位子であるHis271、His320、Asp322、His366のAlaへの四重変異体の立体構造では、M1サイトの金属異常分散ピークは消失し、基質と共結晶化したにも関わらず基質の電子密度も見られなかったことから、M1サイトの中心金属が、*N*-アセチル糖認識に重大な貢献をすることが明らかになった。

阻害剤を用いた結晶学および酵素学的解析を加え、NagBbの触媒機構を推定した。GH129ファミリーに属する別の菌種由来の酵素との立体構造の比較を行うことにより、M1サイトがビフィズス菌由来のGH129酵素に特有の構造であることが明らかになり、ビフィズス菌のGalNAc含有オリゴ糖代謝系を構成する酵素として*N*-アセチル基認識の重要性がより明確になった。

第2章では、GalT_{BI}のX線結晶構造解析により、Class II GalTの立体構造を初めて明らかにした。不明瞭な電子密度ながらも得られたUDP-ガラクトース基質の複合体構造により、酵素の糖認識に関する示唆が得られた。この周囲の残基のAla変異体について活性測定を行い、これらの残基が触媒反応に関わっている可能性が極めて高いことが示された。本研究により、GalT酵素の糖認識における示唆が新たに得られた。Class IのGalTは、糖基質側の認識は、ホモ二量体を形成するもう一方のプロトマーの残基によりなされるが、単量体で機能するGalT_{BI}はAuxiliary 2ドメイン中の残基により糖が認識されるこ

とが明らかになった。

野生型 GalT_{BI}について、酵素学的パラメータを算出した結果、Gal1P に対する K_m が 2.56 mM であるのに対し、GalNAc1P に対する K_m が 0.0492 mM と、約 50 倍高い親和性を示すことが分かった。一方 GalT1 は Gal1P を基質とするものの、GalNAc1P は基質にできないことが分かっている。この結果は、GalT_{BI} が GalNAc1P を基質とするように適応していることを示しており、*N*-アセチル基およびその認識が GalT2 を保有するビフィズス菌の資化において非常に重要であることを示している。

しかし、本研究では GalNAc または GlcNAc といった *N*-アセチル基を有する糖との複合体構造は得られておらず、どの残基が *N*-アセチル基の認識に関わっているのかは推測の域を出ない。また、UDP を認識する残基も明らかではない。また、Zn²⁺を含むと推測される金属サイトの存在が推測されるが、結晶構造や X 線による解析では見出すことができず、この金属の役割も明らかではない。これらを完全に解明するにはよりよい結晶化条件を追求していく必要があり、今後明らかにされることが強く望まれる。

本研究により、これら 2 つの酵素はビフィズス菌に特有であり、ヒト腸内での増殖のために、ビフィズス菌がこれらの酵素機能を独自に獲得してきた証拠が示された。NagBb や GalT_{BI} からは、特に、GalNAc 基質の *N*-アセチル基の認識を独自に進化させてきたと思われる痕跡が見出された。本研究により、ビフィズス菌の増殖因子に関する新たな知見が得られ、今後のヒト腸管内におけるビフィズス菌の定着に役立つことが期待される。

参考文献

1. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365–378 (1989).
2. 荒木和子, 篠崎立彦, 入江嘉子 & 宮澤幸久. ビフィズス菌のロタウイルス感染に対する予防効果の検討. *感染症学雑誌* **73**, 305–310 (1998).
3. Rerksuppaphol, S. & Rerksuppaphol, L. A randomized double-blind controlled trial of *Lactobacillus acidophilus* plus *bifidobacterium bifidum* versus placebo in patients with hypercholesterolemia. *J. Clin. Diagnostic Res.* **9**, 1–4 (2015).
4. Johnston, B.C., Ma, S.S.Y., Goldenberg, J.Z., Thorlund, K., Vandvik, P.O., Loeb, M. and Guyatt, G. H. Review Annals of Internal Medicine Probiotics for the Prevention of *Clostridium difficile* – Associated. *Ann. Intern. Med.* (2013).
doi:10.1016/j.sorms.2014.09.001
5. Drouault-Holowacz, S. *et al.* A double blind randomized controlled trial of a probiotic combination in 100 patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **32**, 147–152 (2008).
6. Yeşilova, Y., Çalka, Ö., Akdeniz, N. & Berktas, M. Effect of probiotics on the treatment of children with atopic dermatitis. *Ann. Dermatol.* **24**, 189–193 (2012).
7. Jenness, R. The composition of human milk. *Semin Perinatol* **3**, 225–239 (1979).
8. Park, Y. W. & Haenlein, G. F. W. *Milk and dairy products in human nutrition - production, composition and health.* (Wiley-Blackwell, 2013).
9. Bode, L. Recent Advances on Structure, Metabolism, and Function of Human Milk Oligosaccharides. *J. Nutr.* **136**, 2127–2130 (2006).
10. 日本乳酸菌学会. 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス. (京都大学学術出版会, 2010).
11. Urashima, T. *et al.* Chemical characterization of oligosaccharides in chimpanzee, bonobo, gorilla, orangutan, and siamang milk or colostrum. *Glycobiology* **19**, 499–508 (2009).
12. Picard, C. *et al.* Review article: Bifidobacteria as probiotic agents - Physiological effects and clinical benefits. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **22**, 495–512 (2005).
13. Wind, D. *et al.* Intestinal microbiology in early life: specific prebiotics can have similar functionalities as human-milk oligosaccharides. *Am. J. Clin. Nutr.* **98**, 561S–571S (2013).
14. Kitaoka, M., Tian, J. & Nishimoto, M. Novel Putative Galactose Operon Involving Lacto-N-Biose Phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3158–3162 (2005).
15. Xiao, J. Z. *et al.* Distribution of In Vitro fermentation ability of lacto-N-Biose I, a major building block of human milk oligosaccharides, in bifidobacteria! strains. *Appl.*

- Environ. Microbiol.* (2010). doi:10.1128/AEM.01683-09
16. Glycoforum: Glycoprotein 癌化とムチン. (2018). Available at: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycoprotein/GPA06J.html>.
 17. Larsson, J. M. H., Karlsson, H., Sjövall, H. & Hansson, G. C. A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiology* **19**, 756–766 (2009).
 18. Fushinobu, S. Unique Sugar Metabolic Pathways of Bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 2374–2384 (2010).
 19. Fujita, K. *et al.* Molecular cloning and characterization of a β -L-arabinobiosidase in *Bifidobacterium longum* that belongs to a novel glycoside hydrolase family. *J. Biol. Chem.* **286**, 5143–5150 (2011).
 20. Fushinobu, S. Unique Sugar Metabolic Pathways of Bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 2374–2384 (2010).
 21. Bergey, D. H., Harrison, F. C., Breed, R. S., Hammer, B. W. & Huntoon, F. M. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (BMSAB)*. (2015).
 22. Nishimoto, M. & Kitaoka, M. Identification of N-acetylhexosamine 1-kinase in the complete lacto-N-biose I/galacto-N-biose metabolic pathway in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6444–6449 (2007).
 23. Katayama, T. *et al.* Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). *J. Bacteriol.* **186**, 4885–4893 (2004).
 24. Wada, J. *et al.* *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3996–4004 (2008).
 25. Fujita, K. *et al.* Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type O-glycan-specific endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J. Biol. Chem.* **280**, 37415–37422 (2005).
 26. Kiyohara, M. *et al.* α -N-acetylgalactosaminidase from infant-associated bifidobacteria belonging to novel glycoside hydrolase family 129 is implicated in alternative mucin degradation pathway. *J. Biol. Chem.* **287**, 693–700 (2012).
 27. Kiyohara, M. *et al.* An exo - Sialidase from bifidobacteria involved in the degradation of sialyloligosaccharides in human milk and intestinal glycoconjugates. *Glycobiology* **21**, 437–447 (2011).
 28. Miwa, M. *et al.* Cooperation of β -galactosidase and β -N-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. *Glycobiology* **20**, 1402–1409 (2010).

29. Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **280**, 309–316 (1991).
30. Henrissat, B. & Bairoch, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**, 781–788 (1993).
31. Jongkees, S. A. K. & Withers, S. G. Unusual enzymatic glycoside cleavage mechanisms. *Acc. Chem. Res.* **47**, 226–235 (2014).
32. Watts, A. G. *et al.* Trypanosoma cruzi trans-sialidase operates through a covalent sialyl-enzyme intermediate: Tyrosine is the catalytic nucleophile. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7532–7533 (2003).
33. Terwisscha van Scheltinga, A. C. *et al.* Stereochemistry of Chitin Hydrolysis by a Plant Chitinase/Lysozyme and X-ray Structure of a Complex with Allosamidin: Evidence for Substrate Assisted Catalysis. *Biochemistry* **34**, 15619–15623 (1995).
34. Koivula, A. *et al.* The active site of cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei*: The roles of aspartic acids D221 and D175. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10015–10024 (2002).
35. CAZypedia: GLYCOSIDE HYDROLASES. (2018). Available at: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases.
36. Sato, M. *et al.* The first crystal structure of a family 129 glycoside hydrolase from a probiotic bacterium reveals critical residues and metal cofactors. *J. Biol. Chem.* **292**, 12126–12138 (2017).
37. Ficko-Blean, E. *et al.* Carrageenan catabolism is encoded by a complex regulon in marine heterotrophic bacteria. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
38. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 生体高分子構造学 大木 出: タンパク質の化学修飾による¹³C ラベル導入法 ～リジン残基のメチル化～. (2018). Available at: <http://bsw3.naist.jp/kojima/images/contents/557/lysine-13c-methylation.pdf>.
39. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. E. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**, 845–858 (2015).
40. Schneider, T. R. & Sheldrick, G. M. Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1772–1779 (2002).
41. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
42. Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M. & Dodson, E. A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **59**, 1131–1137

- (2003).
43. Vagin, A. A. *et al.* REFMAC5 dictionary: Organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2184–2195 (2004).
 44. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
 45. RAMPAGE. (2018). Available at: <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>.
 46. Miyanaga, A. *et al.* Crystal structure of a family 54 α -L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. *J. Biol. Chem.* **279**, 44907–44914 (2004).
 47. Gregg, K. J., Suits, M. D. L., Deng, L., Vocadlo, D. J. & Boraston, A. B. Structural analysis of a family 101 glycoside hydrolase in complex with carbohydrates reveals insights into its mechanism. *J. Biol. Chem.* **290**, 25657–25669 (2015).
 48. DALI Protein structure comparison server. (2018).
 49. Adamson, C. *et al.* Structural Snapshots for Mechanism-Based Inactivation of a Glycoside Hydrolase by Cyclopropyl Carbasugars. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 14978–14982 (2016).
 50. Jung, T. Y. *et al.* Association of novel domain in active site of archaic hyperthermophilic maltogenic amylase from *Staphylothermus marinus*. *J. Biol. Chem.* **287**, 7979–7989 (2012).
 51. Kunishige, Y. *et al.* Crystal structure of exo-rhamnogalacturonan lyase from *Penicillium chrysogenum* as a member of polysaccharide lyase family 26. *FEBS Lett.* **592**, 1378–1388 (2018).
 52. Caines, M. E. C. *et al.* The structural basis for T-antigen hydrolysis by streptococcus pneumoniae: A target for structure-based vaccine design. *J. Biol. Chem.* **283**, 31279–31283 (2008).
 53. Suzuki, R. *et al.* Crystallographic and mutational analyses of substrate recognition of endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J. Biochem.* **146**, 389–398 (2009).
 54. Hehemann, J. H. *et al.* Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* **464**, 908–912 (2010).
 55. Lipari, F., Yip, P., Sleno, B., Herscovics, A. & Howell, P. L. Crystal structure of a class I α 1, 2-mannosidase involved in N-glycan processing and endoplasmic reticulum quality control. *EMBO J.* **19**, 581–588 (2000).
 56. Elsen, J. M. H. Van Den, Kuntz, D. A. & Rose, D. R. Structure of Golgi α -

- mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *EMBO J.* **20**, (2001).
57. Zhu, Y. *et al.* Mechanistic insights into a Ca²⁺-dependent family of α -mannosidases in a human gut symbiont. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 125–132 (2010).
 58. Mulakala, C. & Reilly, P. J. Understanding Protein Structure-Function Relationships in Family 47 α -1, 2-Mannosidases through Computational Docking of Ligands. *PROTEINS Struct. Funct. Genet.* **49**, 125–134 (2002).
 59. Varrot, A. *et al.* NAD⁺ and Metal-ion Dependent Hydrolysis by Family 4 Glycosidases: Structural Insight into Specificity for Phospho- β -D-glucosides. *J. Mol. Biol.* **346**, 423–435 (2005).
 60. De Sanctis, D., Inácio, J. M., Lindley, P. F., De Sá-Nogueira, I. & Bento, I. New evidence for the role of calcium in the glycosidase reaction of GH43 arabinanases. *FEBS J.* **277**, 4562–4574 (2010).
 61. Siguier, B. *et al.* First structural insights into α -L-Arabinofuranosidases from the two GH62 glycoside hydrolase subfamilies. *J. Biol. Chem.* **289**, 5261–5273 (2014).
 62. Okuyama, M., Yoshida, T., Hondoh, H., Mori, H. & Yao, M. Catalytic role of the calcium ion in GH97 inverting glycoside hydrolase. *FEBS Lett.* **588**, 3213–3217 (2014).
 63. Ito, T. *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications Crystal structure of glycoside hydrolase family 127 b - L -arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **447**, 32–37 (2014).
 64. Sciences, M. L. & Fitter, J. Cellular and Molecular Life Sciences Structural and dynamical features contributing to thermostability in α -amylases. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1925–1937 (2005).
 65. Brenner, C. Hint, Fhit, and GalT: Function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry* **41**, 9003–9014 (2002).
 66. Kijas, A. W., Harris, J. L., Harris, J. M. & Lavin, M. F. Aprataxin forms a discrete branch in the HIT (Histidine Triad) superfamily of proteins with both DNA/RNA binding and nucleotide hydrolase activities. *J. Biol. Chem.* **281**, 13939–13948 (2006).
 67. Hou, W. T., Li, W. Z., Chen, Y., Jiang, Y. L. & Zhou, C. Z. Structures of yeast Apa2 reveal catalytic insights into a canonical Ap4A phosphorylase of the histidine triad superfamily. *J. Mol. Biol.* **425**, 2687–2698 (2013).
 68. De Bruyn, F., Beauprez, J., Maertens, J., Soetaert, W. & De Mey, M. Unraveling the leloir pathway of *Bifidobacterium bifidum*: Significance of the uridylyltransferases. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 7028–7035 (2013).

69. Timson, D. J. The molecular basis of galactosemia — Past, present and future. *Gene* **589**, 133–141 (2016).
70. Tyfield, L. *et al.* Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridylyl transferase (GALT) gene. *Hum. Mutat.* **13**, 417–430 (1999).
71. GALT database. (2018).
72. Wedekind, J. E., Frey, P. A. & Rayment, I. Three-Dimensional Structure of Galactose-1-phosphate Uridylyltransferase from *Escherichia coli* at 1.8 Å Resolution. *Biochemistry* **34**, 11049–11061 (1995).
73. Thoden, J. B., Ruzicka, F. J., Frey, P. A., Rayment, I. & Holden, H. M. Structural analysis of the H166G site-directed mutant of galactose-1-phosphate uridylyltransferase complexed with either UDP-glucose or UDP-galactose: Detailed description of the nucleotide sugar binding site. *Biochemistry* **36**, 1212–1222 (1997).
74. McCoy, J. G. *et al.* Structure and mechanism of an ADP-glucose phosphorylase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* **45**, 3154–3162 (2006).
75. McCorvie, T. J. *et al.* Molecular basis of classic galactosemia from the structure of human galactose 1-phosphate uridylyltransferase. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 2234–2244 (2016).
76. Sato, M. *et al.* Open-close structural change upon ligand binding and two magnesium ions required for the catalysis of N-acetylhexosamine 1-kinase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1854**, 333–340 (2015).
77. 中村努 & 石川一彦. メチオニン要求株を使わないセレノメチオニン標識蛋白質のつくりかた. 蛋白質科学会アーカイブ **045**, 1–7 (2008).
78. Geeganage, S. & Frey, P. A. Significance of metal ions in galactose-1-phosphate uridylyltransferase: An essential structural zinc and a nonessential structural iron. *Biochemistry* **38**, 13398–13406 (1999).
79. Clustal Omega. (2018). Available at: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.
80. Levin, E. J., Kondrashov, D. A., Wesenberg, G. E. & Jr, G. N. P. Ensemble refinement of protein crystal structures: validation and application. *Structure* **15**, 1040–1052 (2007).
81. Coelho, A. I., Rubio-gozalbo, M. E., Vicente, J. B. & Rivera, I. Sweet and sour : an update on classic galactosemia. 325–342 (2017). doi:10.1007/s10545-017-0029-3

謝辞

研究を行うにあたり多くの方々にお世話になりました。感謝の気持ちでいっぱいです。

伏信進矢教授は、本研究テーマを与えてくださり、いつも熱心に温かくご指導くださいました。ともすると弱気になりがちな私を力強く励ましてくださり、何度も勇気づけられて、色々なことを乗り越えることができました。先生の研究への情熱・愛情、学問に対する姿勢は心から尊敬しております。本当にありがとうございました。

荒川孝俊助教は、研究や実験について、細かい部分まで丁寧に指導してくださいました。実験で行き詰った時などに相談すると、先生の豊富な経験や知識に基づいたアドバイスで、魔法のように解決してしまうことが多々ありました。6年間同じ部屋で一番身近に色々なこととお話しできたのも印象に残っています。本当にありがとうございました。

山田千早助教は、私が研究室に所属してからずっと、心から頼りにしていた先輩でした。研究からプライベートまで相談に乗ってくださり、またいつもさりげなくフォローしてください、本当に心強かったです。やりたいことをまっすぐ追求していく姿は、とてもかっこよく、同じ女性としても憧れの人生の先輩でした。本当にありがとうございました。

また、秘書の黒木成子さんとも、趣味の話などができて和みました。いつもサポートしてください、本当にありがとうございました。

本研究は、近畿大学の芦田久先生、食品総合研究所の北岡本光博士、西本完博士、にサンプル・データの提供や実験のご指導をいただきました。心から感謝しております。芦田先生は、学会などでお会いした際や、メールなどでもいつも笑顔で暖かく応援してください、大変勇気づけられました。北岡先生には、4年生の時に実験を教えてください最後の最後で大失敗したことは未だに申し訳なく忘れられませんが、ユーモア溢れるお人柄やとんでもない知識と知恵の深さには本当に敬服しております。高エネルギー加速器研究機構の千田俊哉先生、松垣直宏先生、山田悠介先生、Dorothee Liebscher 博士（当時）は、データ測定と構造決定を引き受けてくださり、本当にありがとうございました。また、はるばるオーストラリアより阻害剤を提供して下さった Keith Stubbs 先生と学生さんにも、非常に感謝しております。また、成果としては載せられませんでした。京都大学の片山高嶺先生にもサンプル提供や実験のご指導など、非常にお世話になりました。講演会でお話を伺うたびに、この分野の研究の魅力を再認識させられていました。

第1章の前任者である伊藤佑博士は、新入生の私にゼロから実験のすべてを教えてください、感謝してもしきれません。博士号取得のかかった時期に貴重な時間を割いて指導してください、どんなに初歩的な質問でも嫌な顔一つせず優しく教えてくださいました。本当にありがとうございました。

第 2 章の前任者である南煥祐先輩は、日頃から研究の進み具合を気にかけて声をかけてくださいました。熱心な引き継ぎ指導や結晶化に関する様々な助言をくださり、感謝しております。

阿部紘一先輩、河野正樹先輩は、いつもとても頼もしく、進むべき道を示してくださった偉大な先輩方でした。佐藤優太くんとは、波長が近くて、色々な相談に乗ってもらい、いつも助けてもらいました。澤野孝太くんとは、研究をはじめ色々話しましたが、本質をズバリ突いていていつも楽しかったです。関陽香ちゃんは、いつも頼りにしてくれて、明るく可愛い後輩に恵まれて嬉しかったです。

6年間という長い研究生活の中で、様々な方々と知り合いお世話になりました。ここに書ききれなかったたくさんの先生方、先輩方、同期、後輩方、研究を通して関わりを持った全ての方々との出会いに心から感謝しております。

最後に、これまでどんな時でも応援して支えてくれ、いつも私を笑顔にして励ましてくれた家族に、心より感謝します。いつもいつも本当にありがとう。

2018年12月