

酵素の構造、機能、アロステリック制御
に関する研究

伏 信 進 矢

①

博士論文

酵素の構造、機能、アロステリック制御に関する研究

伏信 進矢

目次

略語表	1
URL一覧	3
緒言	4

第1部

X線結晶構造解析による白麹菌キシラナーゼの好酸性・耐酸性機構に関する研究

第1部 序論	6
表	10
図	12
第1章 キシラナーゼCの結晶化	
序	15
実験方法	15
結果と考察	16
表	19
第2章 分子置換法による構造決定	
序	23
実験方法	23
結果と考察	24
表	27
図	31
第3章 シンクロトロン放射光及び巨大分子用ワイセンベルグカメラによる回折強度データの収集	
序	33
実験方法	33
結果と考察	34
表	36
図	40
第4章 構造の精密化	
序	46
実験方法	46
結果と考察	49
表	53
図	57

第5章 精密化された構造の詳細な解析	
序	66
実験方法	66
結果と考察	66
表	74
図	79
第6章 キシラナーゼCのアスパラギン酸37変異体の解析	
序	97
実験方法	97
結果と考察	100
表	104
図	109
第1部 総合討論	121
図	125

第2部

ハイブリッド酵素を用いたアロステリックL-乳酸脱水素酵素のサブユニット間相互作用に関する研究

第2部 序論	127
材料と方法	130
図表	133
第1章 <i>in vivo</i> でのハイブリッドLDHの形成とその分離系の確立	
序	140
結果	140
考察	143
図表	145
第2章 FBP脱感作型サブユニットを用いたヘテロトロピック活性化機構の解析	
序	157
結果	157
考察	161
図表	166

第3章	基質特異性変異型サブユニットを用いたホモトロピック活性化機構の解析	
序		191
結果		191
考察		194
	図表	199
第4章	<i>in vitro</i> でのハイブリッドFLDH形成	
序		212
結果		213
考察		215
	図表	217
第5章	不活性型サブユニットを用いた基質阻害の機構の解析	
序		223
結果		224
考察		225
	図表	226
第2部	総合討論	231
	図表	238
第1部	文献	242
第2部	文献	247
	論文の内容の要旨	251
	発表論文	255
	謝辞	256

略語表

XynC	<i>Aspergillus kawachii</i> xylanase C
ANXI	<i>Aspergillus niger</i> xylanase I
BCX	<i>Bacillus circulans</i> xylanase
TRXI	<i>Trichoderma reesei</i> XYN I
TRXII	<i>Trichoderma reesei</i> XYN II
BSXJ	<i>Bacillus</i> sp. strain 41M-1 xylanase J
PF	Photon Factory (高エネルギー加速器研究機構 放射光施設)
USF	Uppsala Software Factory
CCP4	Collaborative Computational Project, Number 4
Rfree	フリーR因子
SCOP	Structural Classification Of Proteins
CATH	Class (fold), Architecture (subfold), Topology, Homologous
superfamily	
rms	根平均自乗
rmsd	rms deviation
NCS	non-crystallographic symmetry (非結晶学的対称)
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
TOF-MS	Time Of Flight-Mass Spectrum
CD	Circular Dichroism
SA	Simulated Annealing
LDH	L-乳酸脱水素酵素
BLLDH	<i>Bifidobacterium longum</i> LDH
BSLDH	<i>Bacillus stearothermophilus</i> LDH
TCLDH	<i>Thermus caldophilus</i> LDH
LCLDH	<i>Lactobacillus casei</i> LDH
MDH	L-リンゴ酸脱水素酵素
TFMDH	<i>Thermus flavus</i> MDH
ATCase	アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ
R状態	基質に対し高親和性状態
T状態	基質に対し低親和性状態
KNFモデル	Koshland, Nemethy, Filmerの逐次的モデル
MWCモデル	Monod, Wyman, Changeuxの協奏的モデル
FBP	フルクトース 1,6-二リン酸
NAD ⁺	酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NADH	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
Pyr	ピルビン酸

Oxa	オキザム酸
OAA	オキサロ酢酸
DNase I	Deoxyribonuclease I
MES	2-(N-Morpholino)ethane sulfonic acid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
SDS	Sodium lauryl sulfate
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
Ap	アンピシリン
SD配列	Shine-Dargano配列
ORF	オープンリーディングフレーム
bp	base pair
kb	kilo base pair
O. D.	Optical Density (吸光度)

URL一覧

本研究に用いたソフトウェア、データバンク、解析サーバに関するURLを以下に示す。(1999年1月現在)

データバンク

PDB <http://www.rcsb.org/>
GenomeNet <http://www.genome.ad.jp/>

ソフトウェア

USF <http://alpha2.bmc.uu.se/~gerard/manuals/>
HKL program package (denzo, scalepack)
<http://www.hkl-xray.com/>
CCP4 <http://www.dl.ac.uk/CCP/CCP4/>
O <http://imsb.au.dk/~mok/o/>
X-PLOR <http://xplor.csb.yale.edu/>
Rasmol <ftp://ftp.dcs.ed.ac.uk>
<http://www.glaxowellcome.co.uk/science/software/index.html>
Molscript <http://www.avatar.se/molscript/>
Raster3D <http://brie.bmsc.washington.edu/raster3d/>
WHAT-CHECK <http://www.sander.embl-heidelberg.de/whatcheck/>
DSSP <http://www.sander.embl-heidelberg.de/dssp/>
pattern <http://gamma.mbb.ki.se/~guoguang/pattern.html>

解析サーバ

SCOP <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>
CATH <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath/>
CLUSTAL W <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>

緒言

蛋白質は生物の個体を構成する重要な分子であり、細胞骨格の維持から化学反応の触媒まで多様な機能を持つ。特に、生体内で起こる生命維持に必要な様々な反応は蛋白質である酵素により触媒されている。基本的に20種類のアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質がこのように多くの種類の反応を触媒し得るのは、アミノ酸の鎖が折りたたまれ特異的な立体構造を持つことによる。蛋白質の立体構造と機能の相互関係は生命現象の根本であり大変興味深い。

現在、X線結晶構造解析は蛋白質の立体構造を決定する方法として最も一般的であり、急速に発展しつつある手法である。生体を維持するさまざまな巨大な分子の「かたち」を、手に取るように見せるこの手法が生命科学一般に与えるインパクトの大きさは計りしれない。

以前は、一部の「結晶学者」のみがなしえる "state of art" であり、非常に困難であったが、ここ数年の状況は、PDBに登録される座標情報が指数関数的に増加している状況からかんがみても、一変していることは明らかである。本研究の第1部では、このX線結晶構造解析により、極度の低pHで機能する酵素の機能発現機構の解明を試みた。

X線結晶構造解析は生体マクロ分子の構造を知るには強力であるが、基本的には、結晶格子中に閉じ込められた多数の分子のアンサンプルとしての構造を見ていることになり、実際はダイナミックに働いている蛋白質の「動き」を見ることは原理的に困難である。現在は、白色光を使ったラウエ法などで短時間にデータ測定を行うことにより、局所的な動的構造を得るのに成功した例はいくつかあるものの、いまだにさまざまな困難がつきまとうのが現状である。第2部では、分子全体の四次構造変化をともなって活性を制御しているアロステリック酵素の溶液中での相互作用を解明するために、ハイブリッド酵素を用いた解析を行った。

第1部

X線結晶構造解析による白麹菌キシラナーゼの好酸性・耐酸性機構に関する研究

第1部 序論

植物のバイオマスの分解・変換は、自然界中の生物圏の炭素循環において重要な位置を占めている。バイオマスの乾燥重量の平均値は、23%がリグニン、40%がセルロース、33%がヘミセルロースからなり、ヘミセルロースの主成分はキシランである(1)。キシランは、キシロピラノース単位が100~200個 β -1,4-結合で連なってできた主鎖構造をしており、その由来となる植物に応じて、L-アラビノース、4-O-メチル-D-グルクロン酸、酢酸、O-アセチル基等の、様々な側鎖の修飾を受けている(図1-1)。キシランの主鎖のキシロースは5炭糖であるが、6炭糖であるグルコースと比較して、メチレン基が1つない以外は同じ立体配座を持ち、キシランの主鎖とセルロースは非常によく似た構造をしている。キシランも、セルロースと同様、繊維状の多糖である。キシラナーゼ、セルラーゼ、エンドグルカナーゼ等の植物細胞壁溶解酵素は一般にmulti enzyme systemを構成し、性質の異なった、あるいは、類似した酵素が同時に生産され、協調的に働くことが知られている。

ヘミセルロースを分解する酵素群の総称をヘミセルラーゼと呼ぶ。キシラン分解酵素(pentosanaseと呼ばれることがある)は、ヘミセルラーゼの1グループで、このように様々な修飾を受けたキシランの様々な結合を加水分解する。その中でキシラン分解において最も重要なのが、主鎖の β -1,4-結合をエンド型で切断するキシラナーゼ(1,4- β -D-xylan-xylanohydrolase; EC 3.2.1.8)である(2)。キシラン分解酵素には他にも、 α -アラビノフラノシダーゼ、 α -グルクロニダーゼ、アセチルキシランエステラーゼ等の側鎖を切断する酵素群が含まれる(図1-1)(3)。

ヘミセルラーゼ、特にキシラナーゼは、非常に有用な酵素である。例えば、農業・畜産業においては、飼料作物の栄養利用価を高めて、反芻動物の消化を助けたり、肥料のコンポスト化を促進するために用いられている。一方、製紙業界において、糸状菌のキシラナーゼを利用してパルプを漂白する「バイオブリーチング(生物漂白)」は、エネルギーコストの面で有利であり、使用する化学物質の量を減らすことができる。特に、本研究で用いた好酸性キシラナーゼはパルプの漂白に有用である(4)。これは、低いpHでの漂白で金属イオンを除くことができるために、EDTAなどのキレート試薬を用いる必要がないためである。また、食品工業においては、シリアルフードのbakingにおける α -アミラーゼとプロテアーゼの有用性は10~20年前に確立されたが、ヘミセルラーゼの有用性に関してはここ10年ほどで知られるようになってきた(5)。その他、バイオマスの糖化、ジュースやワインの清澄化などの利用法がある。

本研究の第1部では、焼酎の醸造に用いられている白麹菌 *Aspergillus kawchii* IFO4308の生産する酸性キシラナーゼCに関する研究を行った。

焼酎市場において麦焼酎は最大の規模を占めているが、一般に麦焼酎もろみは米

焼酎もろみに比べて溶解が悪く、発酵速度及び発酵歩合も悪いことが問題となっている。これは、大麦のデンプンがセルロース、ヘミセルロース等でガードされているため、溶解を促進するためにはこれらを分解する酵素が有効である(6-8)。沖縄で泡盛焼酎の醸造に用いられる黒麹菌 *A. awamori* とその variant である白麹菌は、本州で従来から用いられてきた黄麹菌と異なり、培地に大量のクエン酸を出してそのpHを下げる(最終的にpHは3程度になる)。酸性条件での醸造は、亜熱帯域の比較的湿度の高い条件でも雑菌の繁殖を防げるという利点がある。白麹菌が生産・分泌する酵素はこのような低pH条件でも失活することなく有効に作用する(9, 10)。

白麹菌が生産する3種の主要なキシラナーゼA、B、Cの一般的性質を表1-1に、活性のpH依存性およびpH安定性を図1-2に示す(11-13)。キシラナーゼA、B、Cの至適pHはそれぞれ5.5、4.5、2である。発酵の初期の段階でpHが低くないうちはキシラナーゼA、Bが多く生産されるが、発酵が進んで培地のpHが下がると、キシラナーゼCが多く生産される(14, 15)。これら3種のキシラナーゼはどれもpH3~9程度まで比較的広い範囲のpHで安定である。中でも、キシラナーゼCは至適pHが2でpH11まで安定な、非常に好酸性・耐酸性のキシラナーゼである。本研究の第1部では、このキシラナーゼCの特異な性質の獲得機構を明らかにすることを目的としてさまざまな実験を行った。

微生物のキシラナーゼはよく研究されており、さまざまな菌から、多数のキシラナーゼが単離・同定されている(2)。1989年にHenrissatらはhydrophobic cluster法によりセルラーゼ/キシラナーゼの全体をいくつかのファミリーに分類し、そのうち、キシラナーゼは主にFとGの2つのファミリーに分類できることを示した(16)。その後、同じくHenrissatらは、その手法をグルコシル・ヒドロラーゼ(グリコシダーゼ)全体に拡張した(17)。その結果、キシラナーゼのファミリーFとGはそれぞれファミリー10と11に分類し直された。現在でも、以前のファミリーF/Gの表記を用いることもあるが、本論文では、ファミリー10/11の表記を主に用いる。

グルコシル・ヒドロラーゼは、一般に活性中心は2つのカルボキシル基を持つアミノ酸(グルタミン酸およびアスパラギン酸)からなる。加水分解反応は、グリコシド結合の不斉炭素のキラリティが反応後も保存される(α -結合から α -アノマー、または β -結合から β -アノマーを生成する)Retainingな反応と、反応後に反転するInvertingな反応の2種類ある。この反応機構の違いは、2つのカルボキシル基の距離の違いに由来し、遠いと前者に、近いと後者になると言われている(18)。キシラナーゼは、ファミリー10, 11ともに、Retaining Mechanismに従い(19)、 β -1,4結合から β アノマーを生成する。キシラナーゼの反応機構(20-21)について、図1-3に示す。この反応は、片方のグルタミン酸(求核性触媒: nucleophile)が基質のC1炭素を求核攻撃してアシル中間体を作ることから始まる。この際に、もう一方のグルタミン酸(酸・塩基触媒: acid/base catalyst)は

酸触媒としてプロトンを渡してこの反応を助ける。次の段階では、アシル中間体が加水分解されて反応が終了する。その際、酸・塩基触媒のグルタミン酸が今度は塩基触媒としてプロトンを受け取って水分子を活性化することにより、この反応を助ける。*B. subtilis* のキシラナーゼにおいて、求核性触媒がグルタミン酸78であることが明らかにされており(22)。他のファミリー11キシラナーゼでも同様の位置にある保存されたグルタミン酸(本酵素ではグルタミン酸79)が求核性触媒である。また、もう一つの保存されたグルタミン酸(本酵素ではグルタミン酸170)が酸・塩基触媒であることを支持するデータが多くの種類のファミリー11キシラナーゼで得られており、その反応機構については、特に*Bacillus* 属のキシラナーゼでよく研究されている。(23-27)。*B. circulans* のキシラナーゼ(BCX)では、 C^{13} NMRにより、求核性触媒と酸・塩基触媒のグルタミン酸のpKaはそれぞれ4.6、6.7と測定されている(28)。(現在では、この酵素の全てのカルボキシル基およびイミダゾール環のpKaが測定されている(29)) McIntoshらは、Retaining Mechanismの反応の最初には、求核性触媒はイオン化状態で、酸・塩基触媒はプロトン化した状態である必要があることと、この酵素(BCX)はpH 4.6~6.7で活性が高いことから、これらのpKaが活性pHの下限と上限を決定していると結論付けている。酸・塩基触媒のグルタミン酸のpKaは6.7とカルボキシル基にしては異常に高いが、これは近傍に位置する求核性触媒のグルタミン酸の負電荷との静電的相互作用によるものだと言われている(30)。

本研究の主要な課題として、キシラナーゼCの好酸性機構に注目したが、その結果、キシラナーゼCのアスパラギン酸37が好酸性に重要であることを明らかにした。各キシラナーゼで報告されている至適pHと、本酵素のアスパラギン酸37にあたる残基について、表1-2にまとめた。興味深いことに、この残基は、至適pH4.5以下の酸性キシラナーゼはアスパラギン酸、至適pH4.5以上の中性/アルカリ性キシラナーゼはアスパラギンになっている。従って、以降、本論文では、至適pHが4.5以下でこの残基がアスパラギン酸のものを「酸性キシラナーゼ」、至適pHが4.5以上でこの残基がアスパラギンのものを「中性キシラナーゼ」、中でも特に至適pHが高い*Bacillus* sp. strain 41-M-1 xylanase J (BSXJ)を「アルカリ性キシラナーゼ」と呼ぶことにする。酸性キシラナーゼの例はあまり多く知られていないが、*A. niger* xylanase I (ANXI)(31)、*Aureobasidium pullulans* xylanase A(32)、*Cryptococcus* sp. S-2 (xyn-CS2)(33)などのアミノ酸配列が明らかにされている。

ファミリー11キシラナーゼの立体構造は、ただ1本の α ヘリックスを除いてほとんどが β シートからなる構造(β サンドイッチ、またはジェリーロールと呼ばれる1群に属する)であり、一方、ファミリー10キシラナーゼは(α/β)₈バレル(TIMバレル)構造をとっていることが分かっている(34, 18, 35)。ファミリー11キシラナーゼの結晶構造は、現在では、多くの種類の酵素で報告されている(*B. pumilus* IPO (36, 37)、*B. circulans* (BCX)(23)、*Trichoderma harzianum* (38)、*T.*

reesei XYNI (TRXII) (39), *T. reesei* XYNI (TRXI) (40), *A. niger* xylanase I (ANXI) (31), *Bacillus* strain D3 (41), *Thermomyces lanuginosus* (42)。その中でも、BCXでは、酸・塩基触媒のグルタミン酸をシステインに置換した Glu172Cys 変異体にキシロテトラオース: (Xyl)₄ が結合した複合体 (実際に見えているのはキシロビオース: (Xyl)₂) の構造が、また、TRXII では、さまざまな長さのアルキル鎖を持つエポキシアルキルキシロシドが反応して共有結合している結晶構造が得られている(26)。同じジェリーロール fold を持つ *B. macerans* 1,3-1,4-β-グルカナーゼの配列に、*B. subtilis* キシラナーゼが挿入されている、非常に変わった結晶構造の報告もある(43)。さらに、結晶化とプレミナリな測定の報告は、ファミリーが10か11か不明なものもいくつかある(44-46)。一方、NMRによるBCXの二次構造のアサインメントや(47)、結晶構造解析とは独立に行われたBCXのHomology modelingの結果(48)などの構造的情報および解析もある。

ファミリー11キシラナーゼにおいては、一次構造だけでなく、立体構造の保存性も非常に高い。その全体の構造は、1-5-5節で詳しく述べるように、右手の形になぞらえて説明されている(49)。なお、ファミリー11キシラナーゼは、ファミリーHセルラーゼ (*Aspergillus aculeatus* F1-CMCase)、*B. macerans* 1,3-1,4-β-glucanase などと立体構造上、多少のホモロジーがあることが知られている(50)。

一方、ファミリー10キシラナーゼについてもいくつかの酵素で立体構造が得られている(51-55)。

本論文の第1部の第1～5章では、白麹菌の酸性キシラナーゼCのX線結晶構造解析をおこない、その立体構造について詳細に議論した。第6章では、アスパラギン酸37の変異体を作成して、その解析を行った。

Property	XynA	XynB	XynC
Molecular weight ¹ (kDa)	35	26	29
Molecular weight ² (Da)	32,731	20,116	19,888
Sugar content (%)	—	17.6	—
Isoelectric point	6.7	4.4	3.5
OD ₂₈₀ of 1% soln.	8.7	17.8	31.7
Optimum temperature (°C)	60	55	50
Optimum pH	5.5	4.5	2.0
pH stability	3~10	3~10	1~9
CMCase activity ³	+	+—	—
Family in glycosidases	10/F	11/G	11/G

表1-1 白麹菌キシラナーゼの一般的性質

¹SDS-PAGE による。

²アミノ酸配列から予想される値

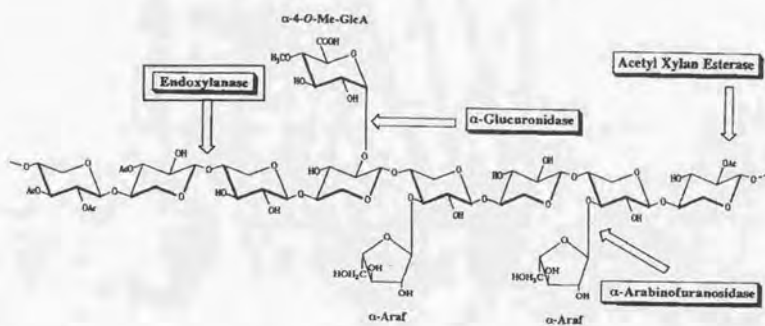
³セルラーゼ活性

Organism		Optimum pH	Asp37に 相当する残基
<i>Aspergillus kawachii</i>	XynC	2.0	D
<i>Aspergillus niger</i> ¹	XynI	3.0	D
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	Xyn	2.0	D
<i>Aureobasidium pullulans</i>	XynA	4.5	D
<i>Trichoderma reesei</i> ¹	XYNI	3.0 - 4.0	D
<i>Trichoderma reesei</i> ¹	XYNII	5.0 - 5.5	N
<i>Aspergillus kawachii</i>	XynB	4.5	N
<i>Aspergillus niger</i>	XynNB	5.0	N
<i>Bacillus circulans</i> ¹	XynA	6.0	N
<i>Bacillus pumilus</i> IPO ¹	XynA	6.5	N
<i>Bacillus subtilis</i>	XynA	6.2	N
<i>Bacillus</i> sp. strain 41M-1	XynJ	9.0	N
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	XynA/B	6.0	N
<i>Clostridium stercorarium</i>	XynA(N)	6.5	N
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	XynA(N)	5.5 - 6.5	N
<i>Streptomyces lividans</i>	XlnB	6.5	N
<i>Schizophyllum commune</i>	XynA	5.0	N
<i>Trichoderma harzianum</i> ¹	Xyn	4.5 - 5.0	N

表1-2 各キシラナーゼの至適pHと
本酵素のアスパラギン酸37に相当する残基

¹結晶構造が報告されているキシラナーゼ

a



b

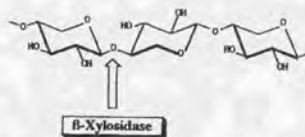
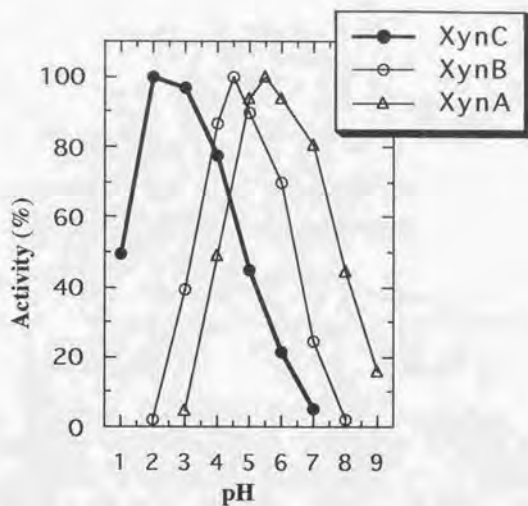


図1-1 キシランを分解する様々な酵素

- a キシランの分解に関わる酵素。Ac: アセチル基、 α -Araf: α -アラビノフラノース、 α -4-O-Me-GlcA: α -4-O-メチルグルクロン酸
 b β -キシロシダーゼによるキシロオリゴ糖の加水分解

a



b

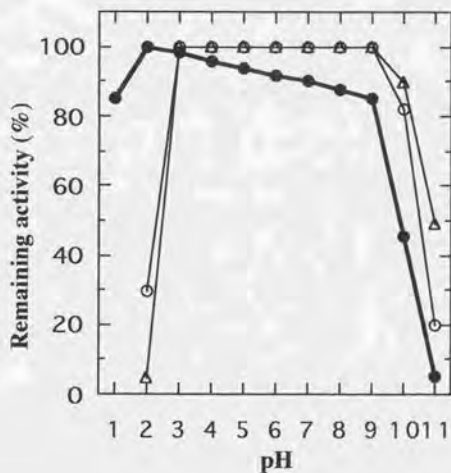


図1-2 白麹菌由来の3種のキシラナーゼの活性のpH依存性およびpH安定性

文献(11)による

a Mcllvainバッファー中での活性

b Mcllvainバッファー中で30℃、1時間インキュベートした後の残存活性

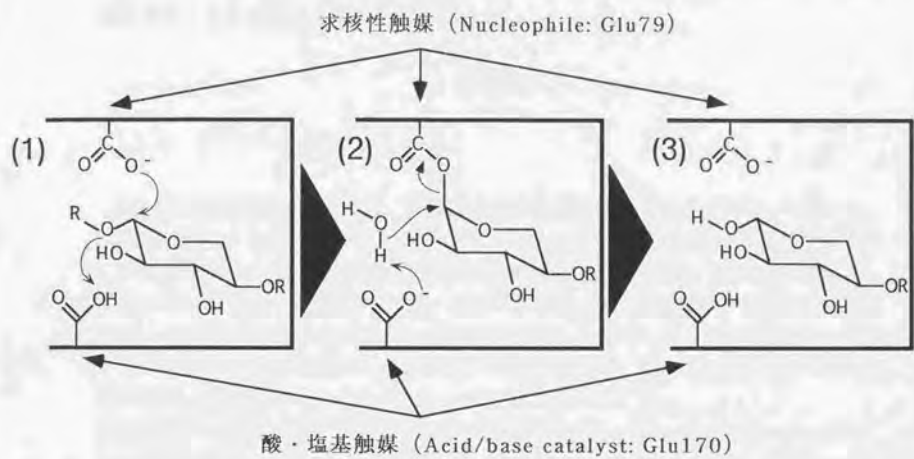


図1-3 Retaining Mechanismの説明

第1部 第1章 キシラナーゼCの結晶化

序

キシラナーゼCのX線結晶構造解析を行うために、構造解析に耐えうる良質な結晶を得ることを目的として結晶化を行った。

実験方法

1-1-1 サンプルの調製

結晶構造解析用のサンプルは、国税庁醸造研究所の伊藤清博士に調製して頂いた。結晶化に用いた大量のキシラナーゼC (約100 mg) は、本酵素の遺伝子を染色体に多コピー導入した白麹菌(15)の培養液中から精製して用いた。本酵素の精製は、(11)に従った。精製後のサンプル (溶媒: 20 mM Na-acetate, pH 5.0, 0.5 M NaCl, 濃度: 約1.5 mg/ml) は、-20℃で凍結して保存した。結晶化に用いたサンプルのSDS-PAGEを図1-1-1に示す。SDS-PAGEは、Laemmliの方法に従った(第2部の文献49)。

蛋白質の定量は、水溶液中での280nmの吸光度から、1 mg/mlの時、 $A_{280}=3.17$ として測定した。

酵素液は、5 mM acetic acid (pH 約3.5)に透析してバッファー交換した後、セントリコン-10 (amicon)を用いて10 mg/ml以上の濃度になるまで濃縮した。本酵素は低温で溶解度が減少し、濃縮したサンプルは沈殿が起きるので、室温で操作を行った。濃縮後のサンプルは、0.45 μ mのメンブレンフィルター (マイレクス HV 4mm, Millipore) を通して除粒子を行った。

1-1-2 結晶化

蒸気平衡拡散法により結晶化を行った。結晶化には、CrystalClear Strips (シッティングドロップ法)、VDX plate (ハンギングドロップ法)、およびVDX plate 中でのシリコナイズしたMicro-Bridges (シッティングドロップ法) (いずれも Hampton Research)のいずれかを用いて行った。CrystalClear Stripsは、クリアテープ CH-12 (Scotch)でシールした。VDX plateのwellには、シリコナイズしたガラス製の円形カバーガラス (径21mm, 厚さ No.1: 0.12-0.17 mm、MATSUNAMI) を乗せ、シリコングリースKS-64 (信越化学)により密閉した。器具のシリコナイズには、シリコフィルム (nacalai tesque) または、シリコナイズL-25 (富士システムズ)を用いた。結晶化に用いた器具を図1-1-2aに示す。

各器具を用いた場合の結晶化法について、以下にまとめた。

CrystalClear Strips	Sitting drop	Drop: 2~4 μ l, リザーバ: 50 μ l
VDX plate	Hanging drop	Drop: 10~20 μ l, リザーバ: 1 ml
VDX plate + Micro-bridges	Sitting drop	Drop: 30~40 μ l, リザーバ: 1 ml

結晶化に用いたバッファー、沈殿剤などの溶液は、全て0.2 μ mのフィルターで滅菌、除粒子して用いた。蛋白質溶液とリザーバ溶液を等量混合して、ドロップを作った。結晶を仕込む際の作業は、粉塵の混入を防ぐため、クリーンベンチ内で行った。

結晶化の温度は、4℃、15℃、25℃のいずれかで、振動のできるだけ少ない条件で行った。15℃、25℃での結晶化は、インキュベーターIN600（ヤマト科学）で行った。

初期の結晶化条件のスクリーニングは、各種リザーバ溶液のセットであるCrystal Screen I, II (Hampton Research)を用いて、CrystalClear Plateによるシッティングドロップ法で行った。蛋白質溶液（10 mg/ml）とリザーバ溶液を混合した際にすぐに沈殿が出た場合は、リザーバ溶液を水で2倍に薄めてやり直した。2倍でも沈殿が出る場合には3倍に薄めた。

データ測定を行うための結晶を作成する場合には、VDX plateによるハンギングドロップ法、またはMicro-Bridgesによるシッティングドロップ法を用いた。

1-1-3 結晶のキャピラリー中への封入

結晶は、直径1.0 mmのガラスキャピラリー中に封入して、測定に用いた。キャピラリーへの封入の方法は、(56)に従った。キャピラリーの両端は、ライターで熱して封をした。結晶のキャピラリーへの封入に用いた器具は、図1-1-2bに示す。

1-1-4 キシラナーゼCの結晶の結晶学的データの決定

結晶の回折データの測定は、お茶の水女子大学理学部化学科の理学電気製R-axis IIcカメラで行った。X線発生装置（40kV, 100mA）により発生するCuK α 線をニッケル箔のフィルターを通して用い、角度を変えて3枚のステル写真を撮った（ $\omega = 0, 45, 90^\circ$ ）。露光時間はそれぞれ30分とした。結晶格子の決定は、R-axis IIc付属のプログラムPROCESSで行った。

結果と考察

1-1-5 キシラナーゼCの結晶化

Crystal Screenによるスクリーニングでは、以下の条件で、いずれも針状の結晶が数日～1週間程で現れた。

Crystal Screen I

	Precipitant	Buffer	Salts
No. 4	2.0 M Ammonium sulfate	0.1 M Tris HCl pH 8.5	none
No. 39	2% w/w PEG 400 & 2.0 M Ammonium sulfate	0.1 M Na HEPES pH 7.5	none

Crystal Screen II

	Precipitant	Buffer	Salts
No. 25	1.8 M Ammonium sulfate	0.1 M MES pH 6.5	0.01 M CoCl ₂
No. 32	1.6 M Ammonium sulfate	0.1 M HEPES pH 7.5	0.1 M NaCl

いずれも、沈殿剤は硫酸アンモニウム、pHが6.5以上の場合に針状の結晶が出ていた。また、沈殿剤がPEG、MPDの場合は、全く結晶は現れなかった。従って、沈殿剤として硫酸アンモニウム、pH 5.0～8.2までの各種バッファー（濃度0.06～0.1 M）を用いた各種条件下で結晶化条件の探索を行ったが、同様の針状結晶しか得られなかった。

そこで、硫酸アンモニウム以外の各種の塩類を沈殿剤として用いて結晶化条件を検討した結果、硫酸ナトリウムとコハク酸ナトリウムを沈殿剤として用いた場合に、柱状の良好な結晶が得られた。

さらに条件を検討した結果、蛋白質溶液の濃度が5～10 mg/ml、リザーバ溶液に1.5 M 硫酸ナトリウム、0.1 M HEPES pH 7.5を用いた場合に、最も再現性高く、十分な大きさの結晶が得られることが分かった。結晶は柱状をしており、長い軸で数mm程度、太さが0.2～0.4mm程度まで成長した。この結晶の外見を図1-1-3に示す。

1-1-6 キシラナーゼC結晶の結晶学的パラメータ測定

本酵素はpH 7.0以上ではほとんど活性を持たないが、今回の硫酸ナトリウムを用いた結晶条件では、pH 7.0以上でしか良質な結晶は得られなかった。そこで、pH 7.5で得られた結晶を、本酵素がわずかながら活性を持つ（最大活性を持つpH 2.0に対して、約10%）pH 6.5のバッファー（1.75 M 硫酸ナトリウム、0.06 M MES pH 6.5）に収穫してから、キャピラリーに封入してデータ測定を行った。なお、pHが6.5より低いバッファーに収穫した場合は、1時間以内に、結晶にひびが入って崩壊した。

R-axisによる測定に用いた結晶の外形およびサイズを図1-1-4に示す。R-axis

IIC付属のプログラムPROCESSに組み込まれているAuto Indexingプログラムから、この結晶は正方晶系に属し空間群は $P4_12_12$ または $P4_32_12$ （後に $P4_32_12$ と決定された）であると推定された。結晶の格子定数は $a=b=62.1 \text{ \AA}$, $c=113.3 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ であった。この結晶は非対称単位中に1分子のモノマーを含む（単位格子中には8分子）と推定された。溶媒含量は55%、 V_m の値は $2.7 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ とMatthewsによって示された標準的な蛋白質の値に相当する(57)。

また、結晶の外見と、auto indexingにより決定されたmissetting angleから、結晶の長い軸が c 軸に、柱状結晶の側面の法線が a/b 軸の対角に相当することが分かった（図1-1-4）。

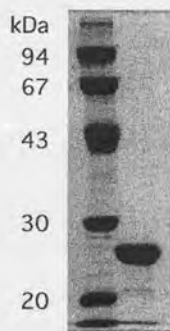


図1-1-1 結晶化に用いたサンプルのSDS-PAGE

ゲル濃度 10%

クーマシーブリリアントブルーで染色した。

a



b



図1-1-2 結晶化およびキャピラリーへの封入に用いた器具

a 結晶化に用いた器具

後列左から、ゴム製グローブ、VDXplate、除粒子に用いるクリーンスプレー
前列左から、カバーガラス、CrystalClear Strips、Micro-Bridges、サンプル除粒子用の
フィルター、ピンセット、シリコングリースのに入ったシリンジ

b キャピラリーへの封入に用いた器具

後列左から、ガラスキャピラリー、Micro-Tools
前列左から、ピンセット、円形のウェルのついた厚手のスライドガラス、
キャピラリー操作用シリコンチューブ、1mlシリンジ、ライター

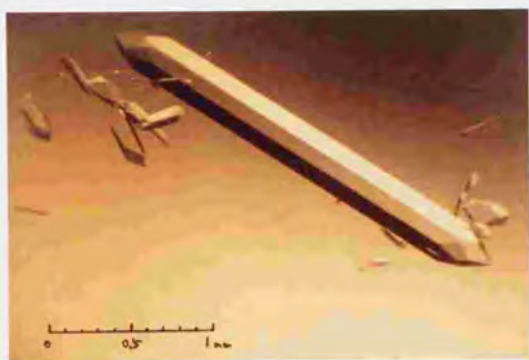


図1-1-3 キシラナーゼCの結晶の写真

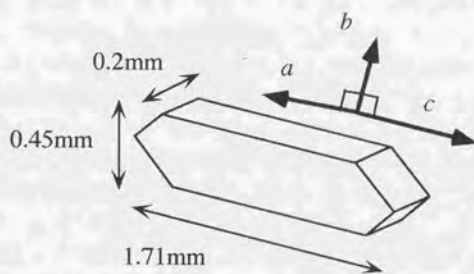


図1-1-4 データ測定に用いた結晶の外形と格子の向き

第1部 第2章
分子置換法による構造決定

序

蛋白質の結晶構造解析の最初の段階として、初期位相を求める必要がある。新規の構造の初期位相を得るためには、現在、重原子同形置換法(MIR, SIR)、多波長異常分散法(MAD)などの方法がある(58, 59)。一方、立体構造が相同な蛋白質の構造がある場合は、分子置換法により初期位相を求めることができる。ここでは、実験室レベルの装置で得られた回折データをもとにして、分子置換法でキシラナーゼCの結晶構造の初期位相を求めた。

実験方法

1-2-1 R-axis IIcによるデータ測定および処理

1-1-4節と同じ装置(R-axis IIc)を用いて、データ測定を行った。データの処理は、R-axis IIc付属のプログラムPROCESSで行った。

1-2-2 分子置換法

分子置換法は、類似の立体構造を持つ別の蛋白質の構造がすでに決定されている場合に、初期モデルを得る方法である(60)。相同な立体構造を持つ2つの分子は回転と並進の操作によって重ね合わせることができる。2つの分子を共通の直行座標系におき、2つの分子中の等価な点へのベクトルをそれぞれ X_1 、 X_2 で定義すると次の関係式が成立する。

$$X_2 = [\Omega]X_1 + t$$

ここで、 $[\Omega]$ は回転行列、 t は並進ベクトルである。分子置換法では、 $[\Omega]$ をrotation function(61)、 t をtranslation function(62)によって決定し構造解析の初期モデルとする。

解析はグラフィックワークステーションIndigo2 (Silicon Graphics)上でプログラムX-PLOR(63)を用いて行った。解析の手順は、X-PLORのマニュアルに従って行った。

Translation searchの範囲はチェンジャー群(64)に基づいて決定するのが常法であるが、ここでは、X-PLORのマニュアルに従って、まずdelta (Translation searchの間隔)を大きく設定して単位格子全体の粗いマップを描いて確認し、そのうち独立な(繰り返しのない)範囲をTranslation searchの範囲とした。

1-2-3 分子置換に使用したモデル分子

分子置換法に取り組んだ当時、本酵素と相同な蛋白質のうち、PDBに登録されていた構造は、*Bacillus circulans*のキシラナーゼ、*Trichoderma reesei* XYNII、*Trichoderma harzianum*のキシラナーゼの3種であった。このうち、*B. circulans*のキシラナーゼ(BCX)のGlu172Cys変異体とキシロテトラオースの複合体の結晶構造(PDB code 1bcx)を元にモデル分子を作成した。図1-2-1に示したように、本酵素とBCXのアミノ酸配列の相同性は46.2%であり、アミノ酸の欠失、挿入も少ない。

Cross-Rotation search、PC-refinementおよびTranslation searchには、この構造を元に、グリシン以外の全てのアミノ酸をアラニンに置換したモデルを用いた。アラニン置換には、お茶の水女子大学大学院(現:三菱化学)の杉浦郁子博士に頂いたFortranプログラム(chala.f)を使用した。

Cross-Rotation searchに用いたモデル分子は、プログラムO(65)により、単位格子の原点近くに重心が来るように移動したものをを用いた。

結果と考察

1-2-4 分子置換に使用したデータ

分子置換による構造決定には、R-axis IIcで測定したデータを用いた。表1-2-1に、R-axis IIcによるデータ測定の結果をまとめた。

1-2-5 Cross-rotation functionによる分子配向の解析

Cross rotation functionは、HuberとSteigemannの実空間パターンサーチ(66)に基づいて行った。モデル分子には、BCXをアラニン置換したものをを用いた。

Cross-rotation functionの空間群を考慮して、サーチする範囲を決定した(67)。Cross-rotation functionの大きい解を順に3,000個取りだし、その中で 10° 以内にある解は同一のクラスターとみなした。表1-2-2aにCross-rotation searchを行った条件を示す。

Cross-rotation searchの結果、47個の解が得られた、表1-2-2bに、上位6個の解を示す。これら47個の解を、以下のPC-refinementにかけた。

1-2-6 PC-refinementによるrotation functionの解の精密化

Cross-rotation functionの解を初期値として与え、PC-refinement法(68)により、分子の配向の精密化を行った。モデル分子は、BCXをアラニン置換したものをを用い、パターン関数の分解能は $15.0-4.0\text{\AA}$ とした。

図1-2-2にCross-rotationの解の精密化後の関数の値、表1-2-3に精密化後のモデル分子の配向を示す。Cross-rotation functionの解析で6番目に大きな値を示した解がPC-refinement後に最大値を示し、また他のピークがこの解の近傍に収束していることから、 $(\theta 1, \theta 2, \theta 3) = (100.59^\circ, 63.244^\circ, 65.727^\circ)$ の解がモデル分子の配向を示すと考えられる。

1-2-7 Translation functionによる並進ベクトルの決定

PC-refinementによって精密化された解 $(\theta 1, \theta 2, \theta 3) = (100.59^\circ, 63.244^\circ, 65.727^\circ)$ を分子の配向とし、Translation function(68)によって並進ベクトルの決定を試みた。

表1-2-4aにTranslation searchを行った条件を示す。モデル分子はBCXをアラニン置換したものをを用い、パターンソン関数の分解能は15.0-4.0 Åとした。PC-refinementにより決定された配向を持つモデル分子を、結晶格子の $0 < x < 1.0, 0 < y < 0.5, 0 < z < 0.5$ の範囲で1.0 Åづつ並進させ、Translation functionおよびPacking functionを計算した。Packing functionは、単位格子中におけるモデル分子(および結晶学的対称位置にある分子)の占める割合である。この値が小さい場合は、結晶学的対称分子同士が大きく重なりあっており、Packingに大きな障害があると考えられる。

第1章で、この結晶の空間群は $P4_12_12$ または $P4_32_12$ と決定されたため、この2種の空間群でTranslation searchを行った。その両方の空間群において、計算されたTranslation functionの大きい解(上位6個)をそのPacking functionの値と共に表1-2-4b, cに示す。 $P4_12_12$ でのTranslation functionの最大値は0.2574であったが、 $P4_32_12$ ではTranslation functionの最大値は0.3287と $P4_12_12$ の場合に比べて顕著に高く、Packing functionも、0.2623と全体の解のPacking functionに比べて大きかった。また、プログラムOで対称分子のPackingを可視的に確認したところ、分子同士が大きく重なり合う部分はなかった。

以上の結果から、空間群 $P4_32_12$ の解 $(x, y, z) = (0.513, 0.214, 0.295)$ が正解であると考えて、以下のRigid-body refinementを行った。

1-2-8 Translation functionの解からの精密化

以上はモデル分子としてアラニン置換したBCXを用いたが、ここからは、側鎖も含むBCX分子をモデル分子として、精密化を行った。キシラナーゼCとBCXの相同性は46.2%であるが、分子位置が正しいならば、BCXの側鎖を持つモデル分子でもある程度R因子が低下するはずであると考えたためである。

まず、Rigid-body refinementを行った。空間群 $P4_32_12$ 、分子配向 $(\theta 1, \theta 2, \theta 3) = (100.59^\circ, 63.244^\circ, 65.727^\circ)$ 、分子位置 $(x, y, z) = (0.513, 0.214,$

0.295)、分解能8.0–4.0 Å、20サイクルの精密化を行った結果、R因子は47.0%まで低下した。

さらに、X-PLORのスクリプトcheck.inpを用いて、分解能5.0–2.8 Åでの E_{XREF} と $E_{EMPIRICAL}$ の重み付け因子 W_A (第4章参照)を70243.5と決定した。

続いて、positional refinement (第4章参照)により、精密化を行った。Rigid-body refinement後のモデル分子から、分解能5.0–2.8 Å、500サイクルの精密化を行った結果、R因子は29.3%まで低下した。また、この段階で電子密度マップを描いてみたところ、 β シートにあたる電子密度パターンが現れた。

BCXをモデル分子として精密化した場合でも、R因子は大きく低下した。ただし、側鎖の一部が異なるモデル分子であり、over-refinementを行っていると思われる。この段階ではこの解が正解であるとは断定できない。しかし、第4章以降で述べるように、モデル分子を正しく設定し、R-freeおよびomit mapなどによる評価を併用して精密化を行った結果、この解が正解であることが明らかとなった。

a

X-ray source	Cu K α (40 kV, 100 mA)
No. of data sets	1
No. of frames	30
$\Delta \psi$	2.0° (no overlap)
Total rotation angle	60°
Spindle axis / X-ray axis	c^* / a
Missetting angles ¹	$\psi_x=3.099^\circ$, $\psi_y=7.893$, $\psi_z=21.744$
Resolution limit	2.06 Å
No. of total observed reflections	79898
No. of independent reflections ($F > 2\sigma(F)$)	13145
Completeness ($F > 2\sigma(F)$)	51.6 %
R-merge ($F > 2\sigma(F)$)	3.90 %

b

resolution range (Å)		%Completeness	%Accum. completeness
3.98	15.00	92.5047	92.5047
3.17	3.98	89.1688	90.8869
2.77	3.17	74.4571	85.6147
2.52	2.77	54.7004	78.0987
2.34	2.52	35.5844	69.8220
2.20	2.34	26.3603	62.8385
2.09	2.20	18.2344	56.6355
2.00	2.09	4.9206	50.3596

表1-2-1 R-axis Ilc での測定

a データ測定の条件および統計値

¹プログラムPROCESSの定義に基づく。 ψ_z は、spindle axis(ψ)の周りの回転を表す。 $\psi = -21.744^\circ$ で c^* 軸がspindle axisに、 a^* 軸がX-ray axisにそれぞれほぼ平行になるので、 $\psi = -20^\circ$ からデータ測定を行った。

b 各分解能での完全性($F > 2\sigma(F)$)でカットオフ後)

a

model structure		alanine substituted BCX
maximum patterson vector		20.0 Å
minimum patterson vector		5.0 Å
resolution		15.0 - 4.0 Å
No. of peaks on patterson map P1 used		3,000
range of rotation ¹	θ 1	0° - 360°
	θ 2	0° - 90°
	θ 3	0° - 90°
delta ²		2.5°

b

! index, theta1, theta2, theta3, RF-function (Epsilon= 0.25)				
1	95.000	50.000	55.000	3.3941
28	100.000	57.500	65.000	3.3077
95	142.500	70.000	87.500	3.2277
166	137.500	77.500	5.000	3.1763
229	95.000	47.500	45.000	3.1435
355	102.500	62.500	72.500	3.0843
...

表1-2-2 Cross-rotation search

a Cross-rotation searchを行った条件

¹オイラーの角を用いて表記した。

²Rotation searchの間隔

b Cross-rotation searchの結果。3000個の解のうち、上位6個を示す。

Peak index	RP-results (deg)			Refined orientation (deg)			PC function	Rank of the PC function
	$\theta 1$	$\theta 2$	$\theta 3$	$\theta 1$	$\theta 2$	$\theta 3$		
1	95	50	55	98.348	49.072	53.167	0.0626353	
28	100	57.5	65	100.98	64.836	68.615	0.0719970	5
95	142.5	70	87.5	140.77	69.99	86.992	0.0676395	
166	137.5	77.5	5	137.56	79.667	6.9556	0.0645201	
229	95	47.5	45	96.712	49.758	43.87	0.0523055	
355	102.5	62.5	72.5	100.59	63.244	65.727	0.0768110	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—
586	95	60	57.5	97.289	59.172	58.999	0.0678436	6
2497	95	57.5	47.5	99.572	64.368	63.895	0.0735713	4
4348	105	52.5	70	102.23	63.487	65.731	0.0752739	3
4398	102.5	67.5	62.5	101.37	62.743	65.429	0.0762011	2

表1-2-3 PC-refinement によって精密化された分子の配向

Rotation functionの解(精密化前)の順に並べてある。

上位6個の解と、精密化後に上位6位以内になった解を示す(図1-2-2 に対応している)。

Rotation functionでは6番目の解(peak index 355)が、

PC-refinement 後に最も上位となっている。

a

model structure:	alanine substituted BCX	
resolution	15.0 - 4.0 Å	
Initial angle	100.59°, 63.244°, 65.727°	
range of translation ¹	x	0 - 1.0
	y	0 - 0.5
	z	0 - 0.5
delta ²	1.0 Å	
number of grid points	370386	

b

<i>P</i> 4 ₃ 2 ₁ 2	
mean of T-function= 0.084	sigma of T-function= 0.026
maximum of T-function= 0.257	minimum of T-function= -0.027
Orthogonal A coordinates	Fractional coordinates
T=(31.227 12.713 33.455)	TF=(0.504 0.205 0.295) T= 0.2574 P= 0.2481
T=(31.775 12.713 33.455)	TF=(0.513 0.205 0.295) T= 0.2522 P= 0.2469
T=(31.227 13.266 33.455)	TF=(0.504 0.214 0.295) T= 0.2475 P= 0.2483
T=(31.775 13.266 33.455)	TF=(0.513 0.214 0.295) T= 0.2459 P= 0.2486
T=(31.775 13.266 5.069)	TF=(0.513 0.214 0.045) T= 0.2428 P= 0.2501
T=(31.227 12.713 5.069)	TF=(0.504 0.205 0.045) T= 0.2365 P= 0.2489

c

<i>P</i> 4 ₃ 2 ₁ 2	
mean of T-function= 0.085	sigma of T-function= 0.026
maximum of T-function= 0.329	minimum of T-function= -0.017
Orthogonal A coordinates	Fractional coordinates
T=(31.775 13.266 33.455)	TF=(0.513 0.214 0.295) T= 0.3287 P= 0.2623
T=(31.775 12.713 33.455)	TF=(0.513 0.205 0.295) T= 0.3177 P= 0.2611
T=(31.227 13.266 33.455)	TF=(0.504 0.214 0.295) T= 0.3104 P= 0.2615
T=(31.227 12.713 33.455)	TF=(0.504 0.205 0.295) T= 0.3039 P= 0.2618
T=(32.323 13.266 33.455)	TF=(0.522 0.214 0.295) T= 0.2970 P= 0.2623
T=(32.323 12.713 33.455)	TF=(0.522 0.205 0.295) T= 0.2866 P= 0.2619

表1-2-4 Translation search

a Translation searchを行った条件

¹Fractional coordinates (単位胞に対する相対的な値) で示した。²Translation searchの間隔b 空間群*P*4₃2₁2でのTranslation searchの結果。上位6個を示す。c 空間群*P*4₃2₁2でのTranslation searchの結果。上位6個を示す。

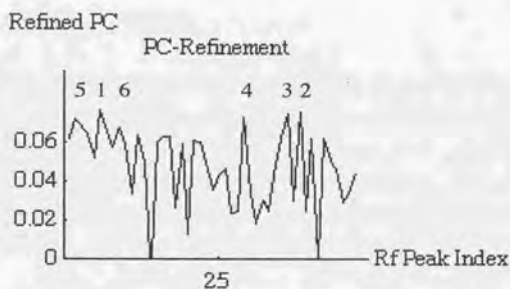


図1-2-2 Rotation functionの解をPC-refinementによって精密化したときの、refinement後の関数の値

横軸のRf Peak Indexは、精密化前の値の順に並んでいる。表1-2-3に対応している。

精密化後のPCの高い順に、上に番号を振ってある。

Rotation functionで6番目の解が、PC-refinement後には最大の解となっている。

第1部 第3章

シンクロトロン放射光及び巨大分子用ワイセンベルグカメラによる 回折強度データの収集

序

キシラーゼCの結晶から、原子分解能の構造解析を行うのに必要な高分解能の回折データを収集するために、シンクロトロン放射光の強力なX線を用いて測定を行った。

実験方法

1-3-1 シンクロトロン放射光

シンクロトロン放射光は赤外線からγ線に至るまでの連続的なスペクトル分布を持つ強力な光源である。蛋白質のX線結晶構造解析に有効な領域を全てカバーしており指向性も極めてよいなどの優れた特性を有していることから、近年蛋白質の結晶構造解析に広く用いられている(69, 70)。回折強度データの収集は、高エネルギー加速器研究機構、放射光実験施設(KEK-PF)の2.5GeV陽電子蓄積リングに設置された実験ステーションBL6Aで行った(71)。図1-3-1にBL6A2の光学系を示す。測定波長は1.000Åを用いた。

1-3-2 回折強度データの収集

坂部により開発された巨大分子用ワイセンベルグカメラを用いるシステムにより回折強度データの収集を行った。検出器として、富士フィルムの小型イメージングプレート(200 mm × 400 mm)を用いた。角形コリメータは、0.1 mm × 0.1 mmの開口のものを使用した。カメラは、半径286.5 mmでIP1枚のもの(Type 2A)、または、IP2枚をセットできるもの(Type 2B)を用いた。空気散乱によるバックグラウンドノイズ及び空気によるX線の吸収を低減させるために内部をヘリウムガスにより置換した。測定温度は約20℃である。図1-3-2に、IP上に記録されたワイセンベルグ写真の例を示す。

IPに記録されたデータは、バイオイメージアナライザーシステムBAS2000(富士フィルム)によって、デジタル化された画像データとして読みだした。BAS2000によるデータ読み出しの条件は、ピクセルサイズ0.1 mm × 0.1 mm、感度10,000、ダイナミックレンジ10,000及び階調256とした。

今回データ測定に用いた結晶はc軸方向に細長い柱状をしており、c*軸以外の方向をspindle axisとしてキャピラリーに封入することが困難であった。そこで、a*/b*軸をspindle axisとする場合には、Micro-tools (Hampton Research) (図1-1-2b)を用いて結晶を顕微鏡下で切断したものをを用いた。

1-3-3 データの処理

得られたデータは、グラフィックワークステーションIndigo2 (Silicon Graphics)上で、HKLプログラムパッケージ (プログラムDenzo、XDisplayPおよびScalepack) (72)を用いて処理した。処理に用いたスクリプトは、東京大学大学院理学系研究科の濡木理博士により頂いたものと、HKLプログラムパッケージのマニュアルを参考に作成した。データ処理の手順に関しては、全般にわたって、HKLプログラムパッケージのマニュアルに従った。

オシレーション写真を用いて結晶の方位を決定(auto indexing)した後、ワイゼンベルグ写真から強度データの収集を行った。Denzoの積分強度の収集はプロファイルフィッティング法に基づいている(73)。Denzoでのデータ処理に用いたパラメータを、表1-3-1aにまとめた。

Denzoにより収集した回折強度データは、プログラムScalepackによりスケールリングを行った。estimated errorは最も低分解能のshellのlinear R-factorと同程度に、error scale factorは全体での χ^2 factorが1程度になるように、それぞれ設定した。ポストリファインメントは、10サイクル行った。その際、格子定数は複数のデータセットで共通、結晶方位およびmosaicityは各データセットで別々に精密化した。Scalepackでのデータ処理に用いたパラメータを、表1-3-1bにまとめた。スケールリングは、一致の悪い反射を除きつつ、除く反射がなくなるまで、繰り返し行った。

Scalepackの出力である.scaファイル (強度データファイル) は、CCP4 program suite (ver. 3.1 後に、ver. 3.4を用いた) (74)のプログラム群を用いて、後に精密化を行うX-PLORの構造因子データファイルに変換した。

変換スクリプトは、東京大学大学院理学系研究科の濡木理博士により頂いたスクリプトを元に作成した。このスクリプトは、プログラムrotaprepにより.scaファイルを.mtzファイル (CCP4の標準反射データファイル) に変換し、プログラムsortmtzで反射をHKLの順にソート、プログラムagrovataで反射をrejectionし、プログラムtruncateでwilson plotに基づいて絶対スケールを求め、truncateプロシージャ(75)に従って強度データ(I)を構造因子(F)に変換し、プログラムfreerflagでfree Rフラグを作成し、プログラムmtz2variousでテキスト形式であるX-PLORの構造因子データファイルに変換する。

結果と考察

1-3-4 キシラナーゼCの結晶から収集された回折強度データ

表1-3-2に、今回使用したデータの測定条件をまとめた。データセット1は、c*軸をspindle axisにして、Type 2Bのカメラを用い、IPを2枚横並べて使用した。データセット2は、a*軸をspindle axisにした状態からX-ray axisの周りに約30°回転した向きに結晶を置き、Type 2AのカメラでIPを1枚用いた。

Denzoにより1.8 Åまでの回折強度の測定を行った後、Scalepackにより、全てのIPのデータについてスケールリングおよびポストリファインメントを行った。スケールリングは、

2.0Åまでのデータで行った。図1-3-3に全てのIPのデータにおける相対的なスケール因子および温度因子の差を示す。スケール因子の推移から、結晶のX線による損傷はさほど大きくなかったことが分かる。

表1-3-3にポストリファインメントの結果を、図1-3-4にDenzoにおける結晶方位を表すmissetting angleの定義をそれぞれ示した。2つのデータセットには異なる結晶を用いたが、mosaicityにはさほど違いがなかった。

表1-3-4にスケーリングにおける統計値を示した。十分良いredundancy、completeness、 I/σ 、R-mergeが得られたことが分かる。

測定した反射の数は87,782個、独立な反射の数は15,428個、80Å-2.0Åの完全性は98.4%、R-mergeは7.3%であった。

1-3-5 絶対スケールおよび温度因子の見積もり

プログラムtruncate(CCP4)を用いて、絶対スケールおよび温度因子を見積もり、強度データ(I)を構造因子(F)に変換した。スケーリングには5.0-2.0Åの反射を用いた。Wilson plotを、図1-3-5に示す。温度因子は、Wilson plotの傾きの絶対値から、 27.884 \AA^2 、絶対スケール因子は、y切片のexponentialの逆数から、0.00302と見積もられた。

処理後の反射データを、プログラムpattern(76)により可視化したものを図1-3-6に示す。これは、プレセッション写真に相当するものであり、 $h=0$ 面および $l=0$ 面について表した。全領域にわたってデータが得られており、いわゆるblind regionがないことが分かる。

a

X線に関するパラメータ

Wavelength 1.0000
monochromator 0.92
Air absorption length 150000
overlap spot
Error density 1.00
error systematic 5.0 partiality 0.1 positional 0.04
weak level 1.0

プロフィールフィッティング及びメジャーメントボックスに関するパラメータ

profile fitting radius 20.0
Box print 1.3 1.3
spot elliptical 0.4 0.4
background elliptical 0.5 0.5

b

rejection probability 0.0001
write rejection file 0.9
sigma cutoff 0.1

表1-3-1 HKL プログラムパッケージでの処理に用いたパラメータ

a プログラムDenzoでの処理

b プログラムScalepackでの処理

Data set	Rotation axis	$\delta \omega$ (deg)	overlap (deg)	W.c.c. ¹ (deg/mm)	Oscill. times	oscill. speed (deg/sec)	No. of IP	Total rotation angle (deg)	Total exposure time	Average ring-current (mA)
1	c*	4.6	0.4	2.0	10	2.0	11 x 2 (left & right)	46.2	8'26"	155
2	- ²	8.8	0.4	2.0	8	2.0	13	109.2	14'50"	321

表1-3-2 収集したデータの測定条件

¹ワイセンベルグカップリングコンスタント (フィルムを1mm動かす間の結晶の回転角度)

²軸立ては行わなかった。

Data set	cell constant (Å)		missetting angles ¹ (deg)			mosaicity
	a/b	c	rotx	roty	rotz	
1	62.065	113.289	170.676	0.079	0.359	0.127
2	62.065	113.289	-9.772	150.068	78.810	0.141

表1-3-3 ポストリファインメントの結果

¹spindle axis を c^* 、vertical axis (spindle axis と beam axis に共に垂直な軸) を a^* とした場合からのずれで表した (図1-3-4 参照)。

a

Shell		Summary of observation redundancies by shells:												
Lower limit	Upper limit	No. of reflections with given No. of observations										>19	total	total(%)
		0	1	2	3	4	5-6	7-8	9-12	13-19				
80.00	4.31	53	62	86	156	181	291	396	466	48	0	1686	97.0	
4.31	3.42	7	7	23	53	106	242	374	712	86	0	1603	99.6	
3.42	2.99	6	8	24	54	113	274	410	621	54	0	1558	99.6	
2.99	2.71	11	26	72	140	135	453	417	306	6	0	1555	99.3	
2.71	2.52	15	55	111	176	226	509	343	113	0	0	1533	99.0	
2.52	2.37	25	72	175	224	253	465	274	62	0	0	1525	98.4	
2.37	2.25	34	98	182	216	263	431	242	70	0	0	1502	97.8	
2.25	2.15	25	109	204	260	254	386	209	73	0	0	1495	98.4	
2.15	2.07	27	141	224	259	264	362	183	68	0	0	1501	98.2	
2.07	2.00	42	146	233	316	261	325	143	46	0	0	1470	97.2	
All hkl		245	724	1334	1854	2056	3738	2991	2537	194	0	15428	98.4	

測定した反射の数: 87,782 独立な反射の数: 15,428

b

Shell		I/Sigma in resolution shells:								
Lower limit	Upper limit	No. of reflections with I / Sigma less than							total	
		0	1	2	3	5	10	20		>20
80.00	4.31	0	19	47	57	73	105	215	1471	1686
4.31	3.42	0	11	38	56	85	142	276	1327	1603
3.42	2.99	0	12	45	75	135	268	555	1003	1558
2.99	2.71	0	45	141	216	342	608	1029	526	1555
2.71	2.52	0	86	224	351	554	930	1291	242	1533
2.52	2.37	0	110	335	519	786	1155	1419	106	1525
2.37	2.25	0	134	414	643	899	1210	1414	98	1502
2.25	2.15	0	170	530	773	1031	1306	1453	42	1495
2.15	2.07	0	224	627	900	1129	1348	1471	30	1501
2.07	2.00	0	265	702	971	1210	1377	1460	10	1470
All hkl		0	1076	3103	4561	6244	8449	10583	4845	15428

c

Summary of reflections intensities and R-factors by shells							
Shell limit	Lower limit	Upper limit	Average I	Average error	stat. Chi**2	Linear R-fac	Square R-fac
80.00	4.31	2901.6	70.4	40.3	0.992	0.035	0.041
4.31	3.42	2270.6	49.3	31.8	1.253	0.047	0.049
3.42	2.99	1045.6	31.2	24.9	1.268	0.071	0.070
2.99	2.71	510.9	28.3	25.8	1.082	0.106	0.100
2.71	2.52	312.8	29.2	27.9	0.974	0.149	0.139
2.52	2.37	217.5	31.3	30.5	0.907	0.201	0.191
2.37	2.25	196.5	35.9	35.2	0.949	0.242	0.257
2.25	2.15	159.7	41.1	40.7	0.938	0.305	0.348
2.15	2.07	148.7	47.4	47.0	0.829	0.329	0.377
2.07	2.00	129.2	52.8	52.6	0.882	0.397	0.527
All reflections		824.1	41.9	35.6	1.052	0.073	0.057

$$R \text{ linear} = \frac{\sum (ABS(I - \langle I \rangle))}{\sum (I)}$$

$$R \text{ square} = \frac{\sum (I - \langle I \rangle)^2}{\sum (I^2)}$$

$$Chi^{**2} = \frac{\sum (I - \langle I \rangle)^2}{(Error^2 * N / (N-1))}$$

表1-3-4 スケーリングにおける統計値

各resolution shell ごとの、

a Redundancy (同一の反射を何回測定したか)

b I/σ

c χ^2 、Linear R-factor (R-merge)、Square R-factor

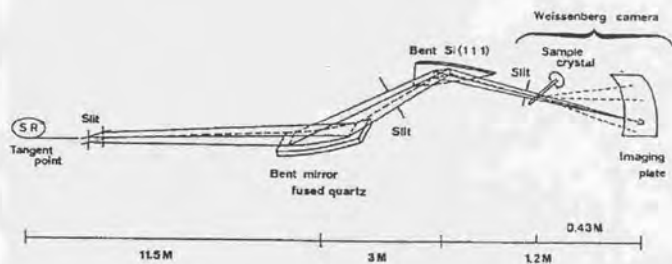


図1-3-1 BL6A2の光学系

B6ベンディングマグネットからのX線は湾曲熔融石英ミラー及び三角カットのSi(111)モノクロメーターにより集光及び単色化されカメラに導かれる。

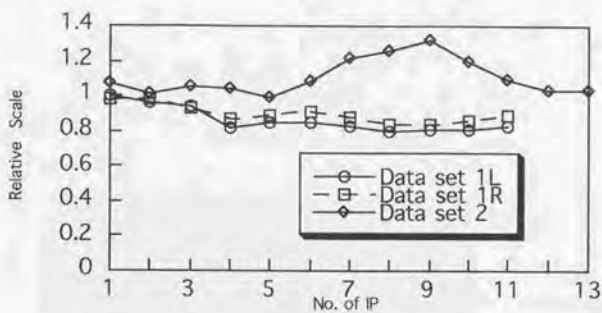


図1-3-2 ワイセンベルグ写真の例

プログラムXdisplayFによって表示された画面

この写真はデータセット1の1枚目のLeft (X線入射方向から向かって左側のIP) である。

a



b

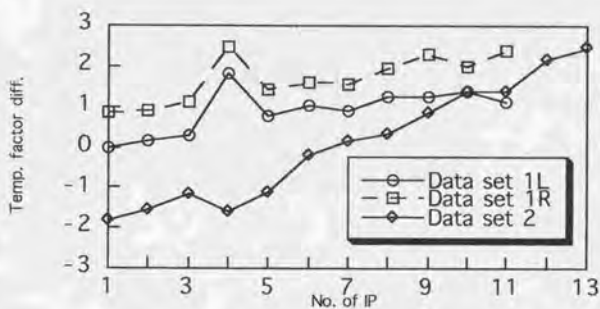


図1-3-3 相対的なスケール因子および温度因子の差

a 相対的なスケール因子

データセット1 Left の一枚目の値を1とした

b 温度因子の差

データセット1 Left の一枚目の値からの差

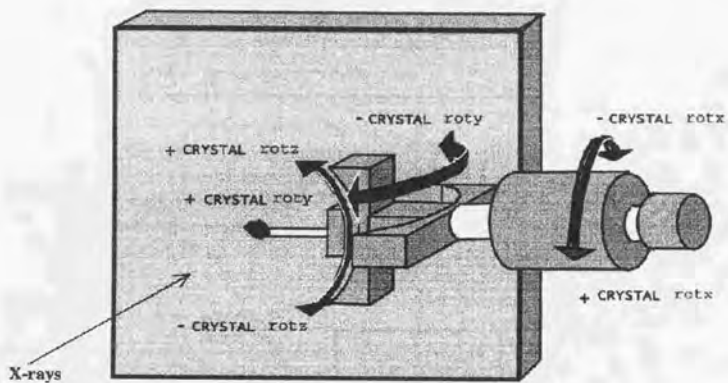


図1-3-4 プログラムDenzoにおけるmissetting angleの定義

spindle axisを c^* 、vertical axis(spindle axisとbeam axisに共に垂直な軸)を a^* とした場合からのずれで表す。

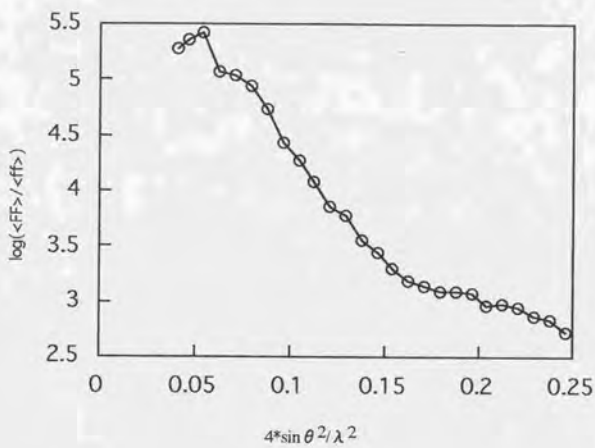


図1-3-5 Wilson plot

プログラムtruncateの出力による

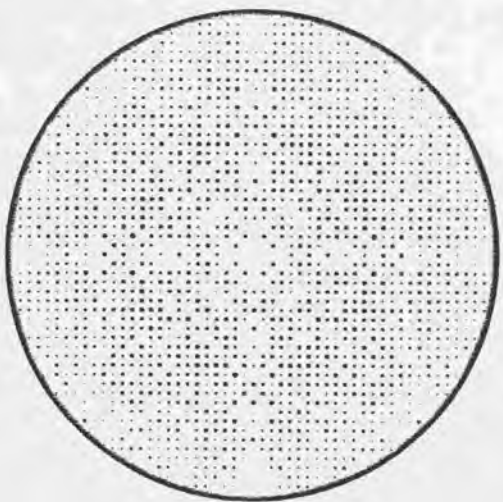
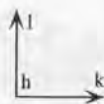
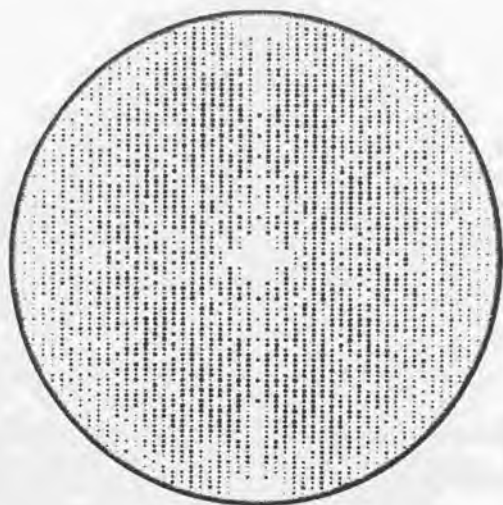


図1-3-6 処理後の反射データ

プログラム Δ patternにより、 2.4\AA まで表示した。
 a $h=0$ (k, l 面) b $l=0$ (h, k 面)

第1部 第4章 構造の精密化

序

第2章で求めた初期位相と、第3章で測定した高分解能の回折データを用いて、キシラナーゼCの結晶構造の精密化を行った。

実験方法

1-4-1 T. reesei XYNI (TRXI) をモデル分子とした分子置換

モデル分子として、TRXIの結晶構造 (PDB code 1xyn) をアラニン置換して、第2章で分子置換に用いたBCXの立体構造に重ね合わせたものを用いた。最小自乗法による構造の重ね合わせには、CCP4のプログラムlsqkabを用いた。

アラニン置換、分子置換などは、第2章と同様の方法で行った。

図1-4-1に、キシラナーゼCとTRXIのアミノ酸配列のアラインメントを示す。図中に示した二次構造の名称は、(40)に従った。

1-4-2 精密化に用いたモデル分子の作成

精密化には、TRXIの結晶構造を元に作成したモデル分子を用いた。TRXIの側鎖のうち、キシラナーゼCと異なる側鎖のアラニン置換を、Uppsala Software Factory (USF)のseaman(77)を用いて行った。その他、PDBファイルの簡単な修正、電子密度マップファイルの変換などに、USFのソフトウェア群 (moleman, moleman2, mapman等) を用いた。ループ部分などのモデル分子からの削除は、PDBファイルを直接編集することによって行った。

1-4-3 プログラムX-PLORによる構造の精密化

分子置換法による結晶構造モデルは誤差が含まれている。その原因としては次の4点があげられる。

- (1) 分子モデルが電子密度に適切に入っていないこと。
- (2) 溶媒分子が考慮されていないこと。
- (3) 分子の熱振動が考慮されていないこと。
- (4) 単位胞間の構造のばらつきが考慮されていないこと。

通常、X線結晶構造解析においては観測値 I_{obs} から直接的に求めることのできる構造因

子の振幅 $|F_{obs}|$ に対し、モデルから計算される $|F_{calc}|$ が最も一致するように精密化を行う。本酵素の結晶構造の精密化にはBrungerらの開発した制限付き最小自乗法プログラムX-PLOR(78)を用いた。

一般的な低分子の構造解析では、次の値を最小にするように最小自乗法を行う。

$$\epsilon^2 = \sum_j W_j |F_j(obs) - F_j(calc)|^2$$

ここで W_j は各反射に対する重みであり、通常は $1/\sigma^2(F)$ が用いられる。

この場合観測点の数はパラメータの10倍程度必要である。しかし高分解能データを得にくい蛋白質結晶ではこの条件を満足しない。例えば、本結晶の場合約1,500個の独立な原子に対する精密化されるべきパラメータの数はその4倍(等方性温度因子を用いる場合)の約6,000である。これに対し測定された反射数は2.0 Åの分解能までで15,428個に過ぎない。従って、通常低分子の精密化に用いているような最小自乗法により構造を精密化することは出来ない。

制限付き最小自乗法は観測関数にその立体構造に関する項(原子間距離、結合角、平面性、光学異性中心、Van der Waals接触、温度因子および非結晶学的対称等)を加えたものである。この方法では立体化学的な各観測値に対する理想値を必要とするが、それらは既に構造解析を行われたアミノ酸、ペプチド等の構造をもとに決められている。制限付き最小自乗法では、各重みを調整して結晶学的 R 因子

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F(obs) - kF(calc)|}{\sum_{hkl} |F(obs)|}$$

を、立体化学的に適切な構造を維持したまま下げていくことを行う。 k は尺度因子である。最小化する目的関数は反射に基づくエネルギー項(結晶学的 R 因子に関する項) E_{XREF} と経験的なエネルギー項(いくつかの立体化学的な項) $E_{EMPIRICAL}$ から構成されている。この際の重み w 、すなわち、 E_{XREF} と $E_{EMPIRICAL}$ との間の重みは、スクリプトcheck.inpにより決定する。このスクリプトは、 E_{XREF} を除いた条件での短い分子動力学の計算を行い、次に、 $E_{EMPIRICAL}$ の勾配と E_{XREF} の勾配を比べる。

Positional refinement(Powell minimization または Conjugate gradient minimizationとも呼ばれる)は、以上のようなターゲット関数に対して、従来通りの最小自乗法を用いた精密化法である。

しかし、最小自乗法を用いた構造の精密化においては、しばしば局所的な極小値に陥る。この問題を克服するためX-PLORではsimulated annealing法(SA法)(79)を用いて精密化を行うことができる。この方法は最初に系の温度を上げて(1,000~4,000K)ランダムな熱運動を与えた状態で分子動力学的計算を行い、系の温度を徐々に下げていくことにより局所的な極小値にトラップされるのを防いでいる。

1-4-4 プログラムOによるモデル分子構築および修正

構造解析を行う分子には、分子置換を行ったモデル分子にはない部分、または異なる

部分が存在する。また、1-4-3節で述べたようなsimulated annealing等の方法を用いて精密化しても全ての原子において誤った極小値に陥るのを防ぐことは出来ない。このため電子密度マップを描いて可視的に確認しつつ、モデルの構築および修正を行う必要がある。この目的には2F_o-F_c電子密度マップ、F_o-F_c電子密度マップ（共に位相としてはモデルから計算される α cを用いた）及びSubtractedフーリエ合成図（以下omit mapと呼ぶ）をプログラムX-PLORにより計算し、グラフィックワークステーションIndigo2 (Silicon Graphics)上でプログラムO(65)により分子モデルの構築および修正を行った。これとX-PLORによる精密化を交互に繰り返すことにより精密化を進めた。X-PLORにより計算した電子密度マップは、USFのプログラムmapmanを用いて正規化した後、Oで読み込める形式に変換した。

水分子の導入は、精密化が進んで十分な分解能が得られた段階で行った。まず、CCP4のサンプルスクリプトwatpeak.examを元にしたスクリプトを用いて、2F_o-F_cマップとF_o-F_cマップを平均化したマップ上で1.5 σ 以上のピークを選んだ。次に、プログラムOのwater_pekpikコマンドを用いてこれらの中から以下の条件を全て満たすものを水分子とした。

- ・2F_o-F_cマップ (1.0 σ) およびF_o-F_cマップ (2.5 σ) で共に確認されるもの
- ・酸素または窒素原子に近い距離にあるもの

精密化した後、温度因子が75 Å²を越える水分子、および電子密度が消滅した水分子はモデルから除去した。

1-4-5 Cross-validationとしてのフリーR因子の利用

蛋白質の構造の精密化において、パラメータ数を多く取りすぎた場合には、間違った構造モデルでも、普通の結晶学的R因子は精密化によって低い値になる場合がある。このような状況に陥らないための評価（Cross-validationと呼ばれる）基準として、フリーR因子(R_{free})(80, 81)を導入した。観測反射のうちランダムに選んだ5%をテストセット(T)に、残りの反射を作業セット(W)にした。この作業は、CCP4のプログラムfreerflagで行った（1-3-3節参照）。フリーR因子は、テストセットの反射のみを用いて以下のように計算する。

$$R_{free} = \sum_{hkl \in T} |F(obs) - k|F(calc)| / \sum_{hkl \in T} |F(obs)|$$

ここで、hkl ∈ Tはテストセットに属する全ての反射を意味する。

1-4-6 DNAシーケンシング

DNAシーケンシングには、ABI 373A DNAシーケンサー（Applied Biosystems Inc.：現在は、Perkin Elmer, ABI division (PE ABI)）を用いて行った。シーケンシング反応には、Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction kit (PE ABI)

を、サーマルサイクラーとして、Progam Temp. Control System PC-700 (ASTEC)を用いた。

キシラナーゼCのcDNAをpUC118のマルチクローニングサイトにクローニングしたプラスミド (lacプロモーターに対して正向き: XynC cDNA-1、逆向き: XynC cDNA-2) は、醸造研の伊藤清博士に頂いた(15)。

Thr53の部分の確認には、キシラナーゼC変異体を作成した際にDNA配列の確認に用いたプライマー (1-6-2節参照) を用いた。

シグナル配列部分およびGly15の部分の確認には、XynC cDNA-2をSacIで切断、セルフライゲーションを行って、挿入配列を遺伝子前半の約250bpに縮めたプラスミドに対して、ユニバーサルプライマー: -21 M13 primer(PE-ABI)、および逆方向からのユニバーサルプライマー: M13 Primer RV (宝酒造) を用いて両方向からシーケンシングを行った。

1-4-7 精密化後の構造の評価

精密化後の構造の妥当性の評価(Validation)には、X-PLORのスクリプトgeomanal.inp、CCP4のプログラムPROCHECK(82)、プログラムWHAT-CHECK(83)を用いた。

結果と考察

1-4-8 *T. reesei* XYNIをモデル分子として用いた分子置換

第2章で分子置換に用いたBCXより相同性の高い(50.8%: 図1-4-1) *T. reesei* XYNI(TRXI)をモデル分子として、同じ反射データを用いて再度分子置換を行った。

モデル分子は、TRXIのグリシン以外の残基を全てアラニン置換して、第2章での分子置換に用いたBCXのモデル分子と同じ位置に、最小自乗法を用いて重ね合わせたものを用いた。これで、第2章と同様のアラニン置換モデルで、同じ位置からの分子置換を、BCXとTRXIで比較したことになる。

表1-4-1に、PC-refinement後のそれぞれの上位7位までの解を、表1-4-2に $P_{4_1,2,2}$ 、 $P_{4_3,2,2}$ の両方のTranslation functionの上位6位までの解を示す。TRXIでも、BCXと同じ解が得られた。また、PC-refinement、Translation function共に、TRXIの方が高い値を示しており、TRXIの方が、主鎖の構造がキシラナーゼCに近く、よいモデル分子であることが示唆された。従って、以下の精密化には、TRXIをモデル分子として用いることにした。

1-4-9 精密化に用いたモデル分子

精密化には、*Trichoderma reesei* XYNIの結晶構造(PDB code 1xyn)をもとに作

成したモデル分子を用いた。図1-4-1に示したように、本酵素とTRXIのアミノ酸配列の相同性は50.8%であり、アミノ酸の欠失、挿入も少ない。TRXIの側鎖のうち、キシラナーゼCと異なる側鎖のみをアラニン置換して、挿入および欠失がある部分は除いたものをモデル分子として用いた。

1-4-10 精密化のサイクル

まず、分子置換後の分子を8.0-3.0Åの反射を用いてrigid-body refinementした結果、R因子が45.8%となった。この段階で10残基ごとにomit mapを描いて、電子密度を確認した。β-ストランド部分の多くで電子密度が確認された。例として、Ile52付近の電子密度を図1-4-2に示す。

構造の精密化は、X-PLORによる精密化と、Oによる電子密度の可視化に基づく分子モデルの構築、修正を交互に行うことにより進めた。各ステップの詳細を表1-4-3にまとめた。

構造解析の初期の段階では、10残基ごとにomit mapを描いてモデルの妥当性を確認しつつ、モデル構築/修正を行った。その際、アラニン置換した側鎖に、本来のキシラナーゼCの側鎖の電子密度が確認された場合に側鎖の構築を行った。例として、図1-4-3に、精密化前（分子置換後）と精密化後の電子密度マップを示す。精密化前の図で、アラニン置換した28番目の残基の側鎖（本来はメチオニン）が見えている。この電子密度に合うように、側鎖の構築を行った。

精密化を進めてもN末端の1残基とC末端の1残基については電子密度が見られなかったため、モデルの構築は行わなかった。

精密化のステップから、水分子を導入した。最終的に、111個の水分子を導入した。

1-4-11 TRXIと主鎖構造が異なる部分について

分子置換のモデル分子であるTRXIと主鎖構造が異なる部分は、以下に述べる5箇所のみであった。これらの部分のモデル構築、修正は、精密化の際に電子密度が解釈できた段階で行った（表1-4-3）。なお、これらの部分の一次構造上の位置は、図1-4-1に下線を引いて表している。図1-4-4、図1-4-5に、TRXIとの主鎖構造の違いを示した。

(1) Asn11-Gly15 (図1-4-4a)

β-ストランドB2とA2の間のループ部分。TRXIに比較して1残基分の欠失があり、短い 3_{10} ヘリックスを形成している。

(2) Asp20-Gly24 (図1-4-4b)

β-ストランドA2とA3の間のループ部分。TRXIに比較して2残基分の挿入があり、短い 3_{10} ヘリックスを形成している。

(3) Glu31-Gly33 (図1-4-5a)

β ストランドA3とB3の間のループ部分。TRXIに比較して2残基分の挿入があり、外に突き出したターン構造を形成している。

(4) Gly87-Ala95

ジスルフィド結合の存在するコード部分 (TRXIにはジスルフィド結合は存在しない)。短いヘリックス様部分が存在する。この部分については、後に1-5-6節で詳しく述べる。

(5) Ala153-Asp161 (図1-4-5b)

ただ一本存在するヘリックスの直後の部分。この部分の相違は、結晶のパッキングの違いに起因するものと思われる。

1-4-12 電子密度マップからのアミノ酸配列の訂正

精密化の途中で、以下の2カ所において、既に発表されていたDNA配列(13)に基づくアミノ酸配列と異なる電子密度マップが現れてきた (図1-4-6)。これらの部分には、次の節で述べるように、クローニングされたキシラナーゼCのDNA配列をシーケンシングして確認した後、正しいアミノ酸のモデル分子を入れた (表1-4-3)。

(1) Ser53Thr

モデル分子を修正する前の2Fo-FcマップおよびFo-Fcマップを図1-4-6a, bに示す。セリンのヒドロキシル基の部分は本来スレオニンのメチル基が入り、スレオニンのヒドロキシル基にあたる電子密度が両方のマップに現れている。

(2) Ala15Gly

モデル分子を修正する前の2Fo-Fcマップを図1-4-6cに示す。アラニンのメチル基に当たる電子密度が存在しない。また、Tyr29の主鎖のカルボキシル基の酸素原子との距離が近すぎる。後に、この残基はグリシンであることが明らかになった。

1-4-13 DNAシーケンシングによるDNA配列およびアミノ酸配列の訂正

キシラナーゼCのcDNAの入ったプラスミドに対し、シーケンシングを行った。その結果、Ser53、Ala15はそれぞれスレオニン、グリシンであることが確認された。また、図1-4-7に示すように、シグナルペプチド部分にも、いくつか配列の間違ひがあることが分かった。

1-4-14 精密化後の構造の評価

精密化した構造の立体化学的な構造の妥当性は、プログラムX-PLORのスク립ト

geomanal.inp、CCP4のプログラムPROCHECK、プログラムWHAT-CHECKを用いて評価した。

精密化の後半の段階（表1-4-3のstep h以降）においては、プログラムPROCHECKおよびWHAT-CHECKで指摘された部分について、プログラムOを用いてモデル分子の修正を行った。

精密化が終了した時点でのRamachandran plot、結晶学的パラメータをそれぞれ図1-4-8、表1-4-4に示す。また、活性中心残基付近での電子密度マップを図1-4-9に示す。

精密化終了時のR因子、フリーR因子はそれぞれ19.4%、25.9%であった。反射の数は、6.0-2.0 Åの15,698個の反射のうち、12,530個（3σカットオフ）（ N_{obs} ）、水素以外の原子の数は1,505（ $N_{par}/4$ ）であった。Dodsonらによると(84)、これらの値から予想されるRfreeの値は、以下の式で計算される。

$$EFRF = \sqrt{\frac{N_{obs}}{N_{obs} - N_{par}}} \times R$$

ただし、EFRF: Expected value of the free R factor, Nobs: No. of observed parameters, Npar: No. of parameters, R: R-factor

この式で計算した、予想されるフリーR因子の値は26.98%となり、予想の値より低いフリーR因子であったことが分かる。

1-4-15 PDBへのデータの登録

得られた結晶構造の座標データ、反射データなどの情報を、PDB (Protein Data Bank)へ登録した。PDBへの登録は、PDBのホームページから、WWW上のプログラムAutoDep2を用いて行った。

登録は1998年6月中に行い、ID codeは1bk1、Tracking NumberはT15887が割り当てられた。

a

Result of <i>B. circulans</i> xylanase			
Theta1	Theta2	Theta3	refined PC
<u>100.59</u>	<u>63.244</u>	<u>65.727</u>	<u>0.076881</u>
101.37	62.743	65.429	0.076201
102.23	63.487	65.731	0.075274
99.572	64.368	63.895	0.073571
100.98	64.836	68.615	0.071997
97.289	59.172	58.999	0.067844
140.77	69.990	86.992	0.067639

b

Result of <i>T. reesei</i> XYNI			
Theta1	Theta2	Theta3	refined PC
<u>100.56</u>	<u>59.812</u>	<u>64.997</u>	<u>0.086320</u>
101.56	59.687	64.782	0.083992
99.846	59.372	68.662	0.078018
100.92	62.095	69.085	0.077870
103.04	60.825	62.945	0.076515
102.69	65.230	71.748	0.075055
102.01	67.434	73.806	0.072294

表1-4-1 BCXとTRXIでのPC-refinementの結果の比較

第2章と同じ条件で分子置換を行った。最も上位の解に下線を引いてある。

a BCXをアラニン置換したものをモデル分子として用いた。

b TRXIをアラニン置換して、BCXと同じ位置に置いたものをモデル分子として用いた。

a

P4 ₁ 2 ₁ 2			mean of T-function= 0.084								
sigma of T-function= 0.026			minimum of T-function= -0.027								
Orthogonal A coordinates			Fractional coordinates								
T=(31.227	12.713	33.455)	TF=(0.504	0.205	0.295)	T=	0.2574	P=	0.2481
T=(31.775	12.713	33.455)	TF=(0.513	0.205	0.295)	T=	0.2522	P=	0.2469
T=(31.227	13.266	33.455)	TF=(0.504	0.214	0.295)	T=	0.2475	P=	0.2483
T=(31.775	13.266	33.455)	TF=(0.513	0.214	0.295)	T=	0.2459	P=	0.2486
T=(31.775	13.266	5.069)	TF=(0.513	0.214	0.045)	T=	0.2428	P=	0.2501
T=(31.227	12.713	5.069)	TF=(0.504	0.205	0.045)	T=	0.2365	P=	0.2489

P4 ₃ 2 ₁ 2			mean of T-function= 0.085								
sigma of T-function= 0.026			minimum of T-function= -0.017								
Orthogonal A coordinates			Fractional coordinates								
T=(31.775	13.266	33.455)	TF=(0.513	0.214	0.295)	T=	0.3287	P=	0.2623
T=(31.775	12.713	33.455)	TF=(0.513	0.205	0.295)	T=	0.3177	P=	0.2611
T=(31.227	13.266	33.455)	TF=(0.504	0.214	0.295)	T=	0.3104	P=	0.2616
T=(31.227	12.713	33.455)	TF=(0.504	0.205	0.295)	T=	0.3039	P=	0.2618
T=(32.323	13.266	33.455)	TF=(0.522	0.214	0.295)	T=	0.2970	P=	0.2623
T=(32.323	12.713	33.455)	TF=(0.522	0.205	0.295)	T=	0.2866	P=	0.2619

b

P4 ₁ 2 ₁ 2			mean of T-function= 0.090								
sigma of T-function= 0.026			minimum of T-function= -0.016								
Orthogonal A coordinates			Fractional coordinates								
T=(30.755	12.190	33.413)	TF=(0.496	0.196	0.295)	T=	0.2306	P=	0.2344
T=(31.305	12.190	33.413)	TF=(0.504	0.196	0.295)	T=	0.2146	P=	0.2352
T=(36.247	3.879	48.600)	TF=(0.584	0.062	0.429)	T=	0.2057	P=	0.2285
T=(35.698	3.325	48.600)	TF=(0.575	0.054	0.429)	T=	0.2053	P=	0.2290
T=(36.247	3.325	48.600)	TF=(0.584	0.054	0.429)	T=	0.2044	P=	0.2287
T=(30.755	12.744	5.062)	TF=(0.496	0.205	0.045)	T=	0.2026	P=	0.2388

P4 ₃ 2 ₁ 2			mean of T-function= 0.090								
sigma of T-function= 0.027			minimum of T-function= -0.026								
Orthogonal A coordinates			Fractional coordinates								
T=(30.755	12.190	33.413)	TF=(0.496	0.196	0.295)	T=	0.3527	P=	0.2485
T=(30.755	12.744	33.413)	TF=(0.496	0.205	0.295)	T=	0.3272	P=	0.2490
T=(31.305	12.190	33.413)	TF=(0.504	0.196	0.295)	T=	0.3188	P=	0.2497
T=(30.206	12.190	33.413)	TF=(0.487	0.196	0.295)	T=	0.3091	P=	0.2499
T=(31.305	12.744	33.413)	TF=(0.504	0.205	0.295)	T=	0.3046	P=	0.2480
T=(30.755	11.636	33.413)	TF=(0.496	0.187	0.295)	T=	0.2944	P=	0.2493

表1-4-2 BCXとTRXIでのTranslation functionの比較

第2章と同じ条件で分子置換を行った。

a BCXをアラニン置換したものをモデル分子として用いた。

b TRXIをアラニン置換して、BCXと同じ位置に置いたものをモデル分子として用いた。

Step	Resol.	reflections ¹	No. of waters	Method	R (%)	R _{free} (%)	Model building ²
a	8-2.8	Data set 1 (1.8 Å)	—	rigid(40), SA ³ (2,000K), positional(120), B ⁴ (20)	28.70	42.24	
b			—	SA(2,000K), positional(120), B(20)	24.79	36.29	
c	6-2.5		—	positional(160), B(20)	24.87	32.72	
d			—	positional(80), B(20)	24.39	33.53	154-160変更
e		Data set 1&2 (1.8 Å)	—	SA(3,000K), positional(120), B(20)	23.61	33.35	
f	6-2.3		—	positional(30), B(15)	24.44	32.64	pep_flip ⁵ , 89-92とSS 結合構築
g			—	positional(160), B(15)	24.21	31.98	31-33構築
h	6-2.0		—	positional(160), B(15)	24.25	31.41	12-25構築/修正, Ser53Thr
i			—	positional(160), B(15)	23.47	27.64	
j			77	positional(160), B(15)	21.71	28.47	
k			110	positional(120), B(15)	21.26	28.06	
l			180	positional(160), B(15)	19.51	26.36	
m			123	positional(160), B(15)	18.86	25.79	
n			113	B(15)	18.74	25.93	Ala15Gly
o		Data set 1&2 (2.0 Å)	111	positional(40), B(10)	19.45	26.04	

表1-4-3 精密化の各ステップ

Rigid body refinement、Positional refinement、B-factor refinementの後の括弧の中にはそれぞれのサイクル数を、SA法の後には初期状態に与えた系の温度を示す。

¹反射ファイルは、最初は、Data set 1のみのもの(1.8 Åまでスケールした)を用いた。その後、Data set 1 & 2 (~1.8 Å)を、最後のステップでは、Data set 1 & 2を2.0 Åまでスケールしたものをを用いた。

²各ステップの後にプログラムOを用いて行ったモデル構築/修正。毎回行った側鎖および主鎖の構築、修正などは省略し、特に重要なものを付記した。数字は、残基番号を表す。

³Simulated annealing

⁴各原子ごとの等方性温度因子の精密化(Individual B-factor refinement)

⁵プログラムOによる、ペプチド結合の修正

Unit cell dimensions	$a = b = 62.065 \text{ \AA}$ $c = 113.291 \text{ \AA}$
Resolution range	6.0–2.0 \AA
Reflections used ($F > 3\sigma$)	15,230
Completeness	79.6 %
of final shell (2.09–2.00 \AA)	26.6 %
<i>R</i> -factor	19.4 %
<i>R</i> _{free}	25.9 %
No. of molecules per asymmetric unit	1
No. of non-hydrogen atoms	1,505
No. of residues	182 out of 184
No. of waters	111
R.m.s. deviations from ideal values ¹	
Bond length	0.010 \AA
Bond angle	2.3°
Dihedral angle	26.6°
Improper angle	0.9°

表1-4-4 精密化後の各種統計値

¹X-PLOR のスクリプト geomanal.inp を用いて計算した。

Upper: A. kawachii XynC 184 aa
 [50.8% / 183 aa]

Lower: T. reesei XynI 178 aa

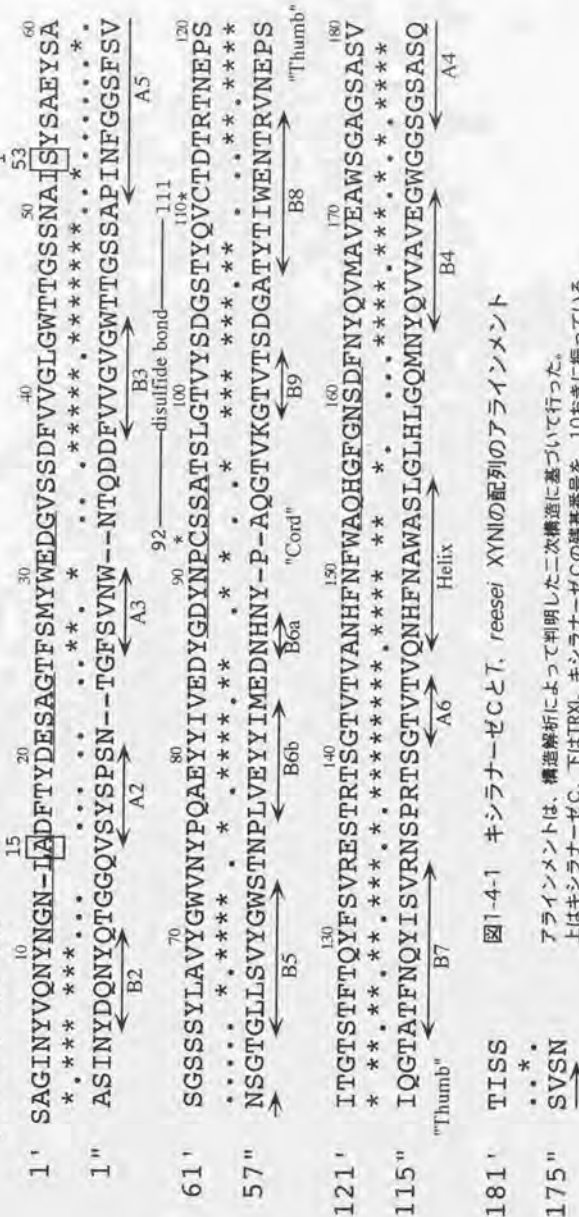


図1-4-1 キシラナーゼCと7, reesei XynIの配列のアラインメント

アラインメントは、構造解析によって判明した二次構造に基づいて行った。上はキシラナーゼC、下はTRXII。キシラナーゼCの残基番号を、10おきに振っている。両配列の間で保存されている残基に「*」を、同系統の残基に「.」の印をつけた。キシラナーゼCの配列上で、TRXIIと主鎖の構造が異なる部分に下線を引いた(1-4-11節参照)。構造解析の過程で配列の誤りが判明した部分(Ala15Gly, Ser53Thr)は、固みで示した。TRXIIの下に、二次構造(β ストランドの名称等)を示した(二次構造の名称については、本文1-4-1節を参照)。Cys92-Cys111のジスルフィド結合も示した。

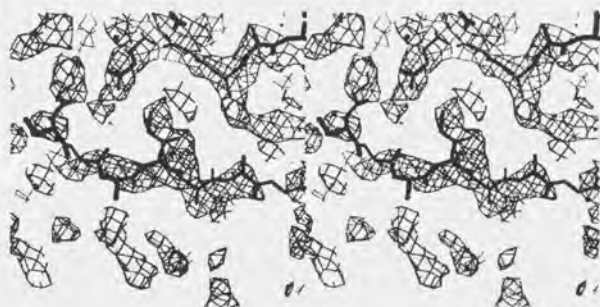


図1-4-2 Omit mapの例

lle52近辺の部分ステレオ図で示す。
分子置換、rigid-body refinement(8.0-3.0Å)後のomit map(45-54をomitした)。
この段階でのモデル分子をワイヤーフレームで示した。

a



b



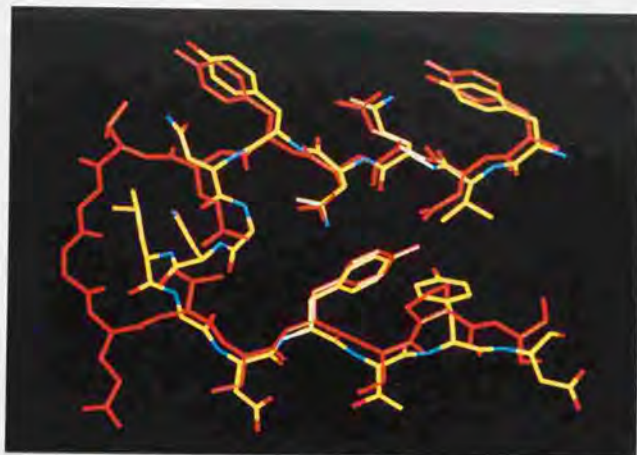
図1-4-3 精密化にともなった電子密度の改善の例

Ser27, Met28, Tyr29の部分をステレオ図で示す。主鎖は右から左に向かっている。
2Fo-Fcマップを示した(1.2σ)。

a 分子置換直後の状態。R=48.5% (8.0-2.8Å)。Met28およびTyr29の側鎖が見えている。

b 精密化の最終段階。R=19.5% (6.0-2.0Å)。Ser27のrotamerに変化が見られる。

a



b

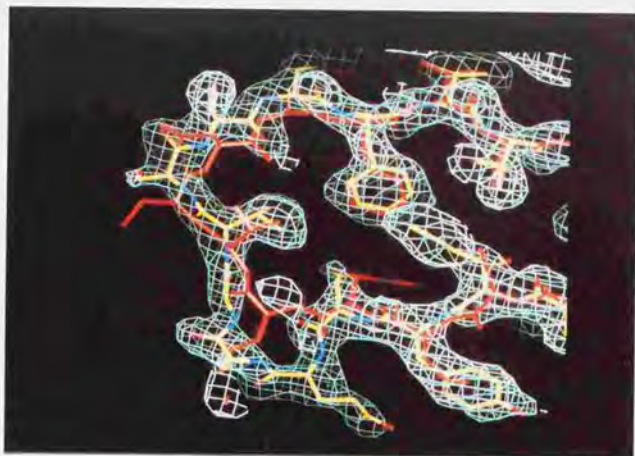


図1-4-4 TRXIと主鎖構造が異なる部分-1

キシラーゼCを黄色(酸素原子は赤、窒素原子は青)で、TRXIを赤色で表した。
以下の残基番号は全てキシラーゼCのもの。

- a Asn11-Gly15部分が異なる。右上がTyr6、右下がGlu20。
b Asp20-Gly24部分が異なる。右下がThr18、右上がSer27。
精密化後の $2F_o - F_c$ 電子密度マップ(1.2σ)も示した。

a



b

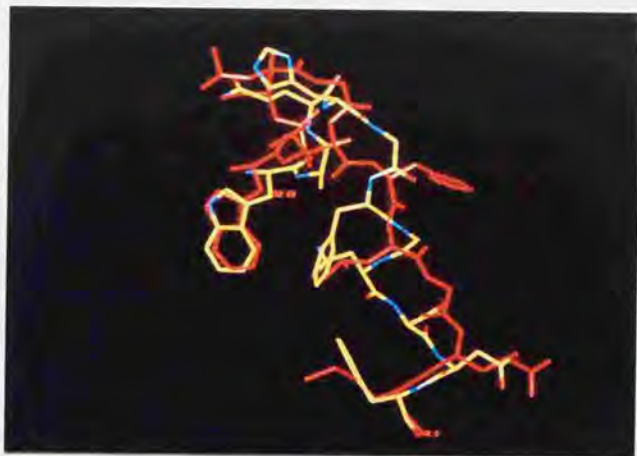


図1-4-5 TRXIと主鎖構造が異なる部分-2

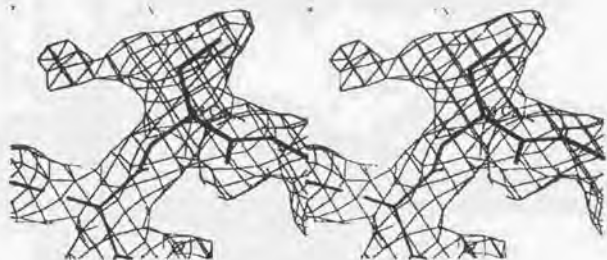
キシラナーゼCを黄色(酸素原子は赤、窒素原子は青、硫黄原子は緑)で、TRXIを赤色で表した。
以下の残基番号は全てキシラナーゼCのもの。

a Glu31-Gly33部分が異なる。右下がMet28、右上がVal40。

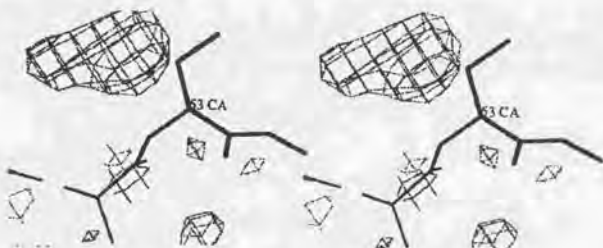
精密化後の2Fo-Fc電子密度マップ(1.2 σ)も示した。

b Ala153-Asp161部分が異なる。左上がTrp152、右下がPhe162。

a



b



c

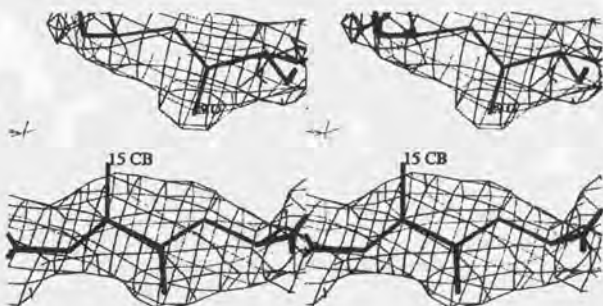


図1-4-6 精密化の途中でアミノ酸配列を訂正した部分

精密化の途中のモデル分子および電子密度マップを示した。

a, b Ser53付近 (Thrに変更)。

a 2Fo-Fc電子密度マップ(1.2 σ)。b Fo-Fc電子密度マップ (3.0 σ)

c Ala15付近 (Glyに変更)。2Fo-Fc電子密度マップ(1.2 σ)。

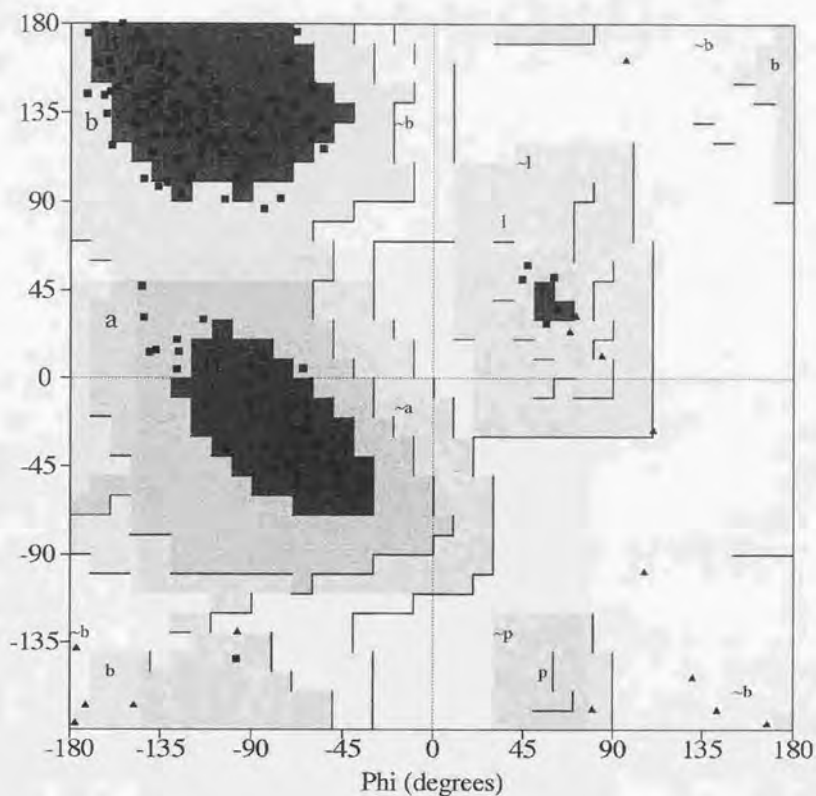
-27-26-25-24-23-22-21-20-19-18-17-16-15-14-13-12-11-10-9-8
 ATGAAGGTCACTGCGGCTTCTGCGGGTCTACTTGGTCACGCATTGCGCGCTCCTGTGCCG
 MetLysValThrAlaAlaSerAlaGlyLeuLeuGlyHisAlaPheAlaAlaProValPro
 TTTGCAGGTCTTTTGGTCACGGCA
 PheAlaGlyLeuLeuValThrAla

-7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
 CAACCTGTTCTGGTGTGCGGAAGTGCTGGTATTAACACTACGTGCAAACTACAACGGCAAC
 GlnProValLeuValSerArgSerAlaGlyIleAsnTyrValGlnAsnTyrAsnGlyAsn
 GAA
Glu

14 15 16 17 18 19 20
 CTTGCTGATTCACCTATGAC
 LeuAlaAspPheThrTyrAsp
 CTTGGT
LeuGly

図1-4-7 DNAシーケンシングにより訂正された配列

一番上に、アミノ酸の残基番号（シグナルペプチド部分は、マイナスで表した）を振った。
 発表されているDNA配列およびアミノ酸配列の下に、今回訂正した配列を示した。
 元の配列と異なっている部分に、下線を引いた。



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	130	82.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,I,p]	28	17.7%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-I,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	158	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	113	
Number of glycine residues (shown as triangles)	19	
Number of proline residues	3	

Total number of residues	293	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

图1-4-8 Ramachandran plot



図1-4-9 精密化最終段階の電子密度マップ

活性中心のGlu79（上）とGlu170（下）付近の2Fo-Fc電子密度マップ（ 1.2σ ）。

第1部 第5章
精密化された構造の詳細な解析

序

第4章で得られたキシラナーゼCの結晶構造について、さまざまな解析プログラムを利用して、他のキシラナーゼとの構造の比較を詳細に行った。

実験方法

1-5-1 さまざまな解析に用いたプログラム

LuzzatiプロットはX-PLORのLuzzati.inpを用いてプロットファイルを作成し、Macintosh上のプログラムMathematicaで表示した。

温度因子の計算は、USFのプログラムmolemanで行った。

二次構造の解析はプログラムDSSPで行った。

リボンモデルの表示は、プログラムrasmol(85)、またはrasmolにより出力されたスクリプトを元にプログラムmolscript(86)を用いて行った。

構造の表示には、プログラムrasmol、O、molscriptを用いた。

ジスルフィド結合の結合長、結合角、二面角などの計算は、USFのプログラムmolemanで行った。

他のキシラナーゼとの最小自乗法による構造の重ね合わせには、CCP4のプログラムlsqkabを用いた。活性中心部位の構造の差異を見る場合には、活性中心付近の残基のうち、各キシラナーゼで保存性が高くほとんど動かない残基（キシラナーゼCではGlu79, Glu170, Tyr70, Trp72, Tyr81, (Arg115), Tyr164) 同士について重ね合わせを行った。これらの残基は、いずれもキシラナーゼ活性に重要であると報告されている残基でもある。

反射データからプレセッション写真に相当する図を描くために、プログラムpatternを用いた。

複数のアミノ酸配列のアラインメントには、プログラムCLUSTAL W(87, 88)を用いた。

分子のバックギングなど、結晶中での原子間の接触の解析には、CCP4のプログラムcontactを用いた。

静電ポテンシャルおよび分子表面の計算・可視化は、プログラムgrasp(89)を用いて行った。静電ポテンシャルの計算のための電荷を記述したファイルは、full.crg（リジン、アルギニン、ヒスチジンの電荷を+1、アスパラギン酸、グルタミン酸、カルボキシル末端の電荷を-1としている）を用いた。

結果と考察

1-5-2 Luzzatiプロット

Luzzatiプロットを図1-5-1に示す。この図から、座標の誤差は0.25~0.30 Åと見積もられる。

1-5-3 構造全体における統計値

プログラムmolemanにより計算した座標および温度因子の統計値を表1-5-1に、温度因子の半径分布を図1-5-2に、各残基ごとの平均の温度因子を、主鎖と側鎖と残基全体にわけて表したものを図1-5-3に示す。

蛋白質部分の温度因子の平均は 28.529 \AA^2 、水分子も含めると 31.128 \AA^2 であった。これは、wilson plotにより求められた温度因子 (27.884 \AA^2 ; 1-3-5節) とさほど違いない値であると考えられる。

温度因子の半径分布を見ると、重心から離れるに従って温度因子が上昇していることから、通常の分布を示していることが分かる。

残基ごとの温度因子の分布を見ると、全般に表面に露出している部分で温度因子が高かったが、最も高い部分は、後に述べる「コード」の後半部分である、Ser93、Ser94であった。

1-5-4 二次構造

キシラナーゼCの二次構造をプログラムDSSPで解析した結果を表1-5-2に示す。DSSPは、Kabshらによって提案された方法(90)に基づいて二次構造を規定している。

キシラナーゼCの二次構造は、これまでに構造解析されたファミリー11キシラナーゼとほぼ同じであった。全体で2つの β シート (AとB) からなり、シートAはストランドA2~A6、シートBはストランドB2~B9からなっている (図1-4-1)。ストランドの命名は立体的なトポロジーに基づいて行われている(39)。このうち、一つの平行 β シート (Ala78-Val83とThr128-Val133) を除いて、ほとんどが逆平行 β シートである。 α ヘリックス (Val145-Gly156) はただ一つであり、このヘリックスの後半 (Ala153-His155) は 3_{10} ヘリックスになっている。TRXIと主鎖構造が異なる部分であった (1-4-11節) Asn11-Gly15とAsp20-Gly24の部分も 3_{10} ヘリックスを形成している。また、「コード」部分 (後述) であるGly87-Ala95は、その中央部分 (Pro91-Ser94) がヘリックス様のターン構造をとっている。

1-5-5 三次構造および全体構造

キシラナーゼCの全体構造を図1-5-4aに示す。キシラナーゼCの三次構造および全体構造は、これまでに構造解析されたファミリー11キシラナーゼとほぼ同じであった。

SCOP (Structural Classification of Proteins)(91) および CATH (Class (fold), Architecture (subfold), Topology, Homologous superfamily)(92)で、どのような構造ファミリーに分類されるかを調べた(表1-5-3)結果、scopではConA-like lectins/glucanasesのFoldおよびFamilyに、CATHではJelly RollsのTopologyにそれぞれ分類されている。

ファミリー11キシラナーゼの構造は、右手の形(図1-5-4b)になぞらえて説明されている(39)。すなわち、2枚の β シートは疎水的な残基を中にして折り重なることにより「親指(Thumb)」以外の4本の「指(Fingers)」を形成しており、中央ではほぼ90度に折れ曲がって「手のひら(Palm)」にあたる基質結合クレフトを形成している。なお、「手のひら」の側に当たる β シートBは、折れ曲がった部分で2枚の β シートに分かれており、全体で3枚の β シートからなるという意見もある(93)。「親指」は、他の指と反対側からクレフトを覆う、きつく折れ曲がったループであり、その「爪」にあたる先端には、保存されたプロリン残基が存在している。ただ1本存在する α ヘリックスは「手首」につながる位置である、 β シートBの裏側に存在している。クレフトの端を縦に走る長いループは「コード」(cord/chord、ひも/弦の意)と呼ばれている(39)。「コード」は、「右手」の「親指と人さし指の間をつなぐ弦」のような位置に存在することになる。

1-4-11節で述べた、TRXIと主鎖構造が異なる部分のうち、Asn11-Gly15、Asp20-Gly24、Glu31-Gly33は、それぞれ、「小指の先」、「小指の付け根」、「薬指の先」にあたる。

1-5-6 ジスルフィド結合および「コード」

「コード」(Gly87-Als95)の中央付近のヘリックス様構造にあるCys92と、 β ストランドB8上のCys111との間に、ジスルフィド結合が形成されていた(図1-5-5)。

このジスルフィド結合の結合長、結合角、二面角についてまとめたものを表1-5-4に示す。Cys92C β -Cys92S γ -Cys111S γ -Cys111C β の二面角が -82.7° であることから、このジスルフィド結合は左巻き(left-handed)であることがわかる。

現在PDBに登録されているファミリー11キシラナーゼの構造には、ANXIを除いて、この位置にジスルフィド結合を持つものはない。他のキシラナーゼと「コード」部分を比較した結果を図1-5-6に示す。この部分は各キシラナーゼで多少異なる構造を持つが、ジスルフィド結合を持たない*T. reesei* XYNII (TRXII)がキシラナーゼCと同様のヘリックス様構造をとっていることは興味深い。また、この部分は明確な2次構造を持たないにもかかわらず、ほとんどのキシラナーゼで明確な電子密度を示している(23, 40)。これは、ここに存在する保存されたプロリン(図1-5-7)が構造を安定化しているためと考えられている。キシラナーゼCでは、さらにジスルフィド結合が加わって、「コード」の構造を安定化しているようである。温度因子も、これらシステイン残基の部分だけ周囲に比べて低い(図1-5-3)。

本研究においてキシラナーゼCの結晶構造を精密化している段階で、*A. niger* xylanase I (ANXI)の2.4 Å分解能の結晶構造(pdb ID code 1ukr)が報告された(31)。キシラナーゼCとANXIのアミノ酸配列で異なるのはわずか3残基である。キシラナーゼCのSer64、Glu154、Met167が、ANXIでは、それぞれAla64、His154、Val167になっている(図1-5-8)。しかし、両酵素の結晶の性質は明らかに異なっている。ANXIでは、キシラナーゼCと同様に硫酸ナトリウムを主な沈殿剤として、いくつかの異なる空間群($P2_1$, $P2_12_1$, $P4_3$)に属する結晶が得られており、クライオストリームによる瞬間凍結やマクロシーディングなどにより、その中で別の結晶系に変換するという現象が起きている(94)。精密化された構造は、斜方晶系の $P2_12_12_1$ のものについてののみ報告されている。これらの結晶形はいずれも、結晶格子中での分子の配向(パッキング)は非常によく似ており、 $P2_1$ と $P2_12_12_1$ の結晶には、疑似の 4_3 らせん軸が存在していた。ANXIの $P2_12_12_1$ の結晶構造の格子定数は $a=84.3$ Å、 $b=85.3$ Å、 $c=113.8$ Åであり、 c 軸は、キシラナーゼCと同じ長さを持っている。また、 a 軸と b 軸は 4_3 らせん軸が壊れていることともなわずかに異なっている。この a/b 軸の値は、キシラナーゼCの a/b 軸(62.065 Å)の対角($\sqrt{2}$ 倍)とほぼ同じになっている。非対称単位には4分子のモノマーが存在している。PDBを通じて得た、ANXIの結晶構造を求める際に用いられた構造因子ファイルから、プレセッション写真に相当する図をプログラムpatternで描いたものを図1-5-9に示す。ANXIの構造解析に使用された反射は、 c^* 軸周辺の反射がblind regionとなつて欠けている。

一方、キシラナーゼCの場合は、これらより高い対称性を持つ空間群($P4_32_12$)に属し、より高い分解能まで反射の得られる結晶が、ANXIと同様であるがより簡単な結晶化条件で得られた。キシラナーゼCの結晶のパッキングもANXIとほぼ同様であったが、分子の配向がわずかにずれることにより、結晶学的 4_3 らせん軸が存在していた。

キシラナーゼCとANXIの各非結晶学的対称(NCS)分子のrms deviation(rmsd)を表1-5-5に示す。ANXIの4分子の間では、主鎖はほぼ同一で、いくつかの残基の側鎖のみが違っていた。これは、ANXIの構造の精密化の際に、最終段階までstrictなNCSの束縛をかけておき、最後にこれらの側鎖についてのみ束縛を解いたものと思われる。ANXIのNCS分子間で側鎖構造が異なる9残基(Tyr10, Asn13, Glu31, Glu57, Ser61, Gly62, Asp88, Thr107, Asn117)を図1-5-10aに示す。これらの残基のうち、側鎖がNCS分子と直接に接触しているのはThr107の C_γ 原子のみである(キシラナーゼCでは、Ile121の主鎖の酸素原子と3.48 Åの距離にある。キシラナーゼCのパッキングの詳細については、1-5-12節で詳しく述べる)。これらの残基が、ANXIの結晶学的対称の性質に与える影響について詳細は不明である。

また、キシラナーゼCとANXIでアミノ酸が異なる3残基の、対称分子に対しての位置を図1-5-10bに示す。Ser64、Met167は対称分子と離れた位置に存在しており、Glu154も最も近い原子との距離は5.3 Åとやや離れている。しかし、この残基がHisに置換した場合、結晶化のpH(7.5以上)では正に帯電していると考えられ、結晶形成に

何らかの影響を与える可能性がある。

ANXIの至適pHは3.0であると報告されており(31)、本酵素の至適pH(2.0)と異なる。しかし、ANXIの活性測定条件の詳細は報告されておらず、本酵素と至適pHが本当に異なるかどうかは現在のところ不明である。

ANXIは、活性が全くない、高いpHであるpH 8.0で結晶化、構造解析されている。一方、本研究(キシラナーゼC)でも同様に高いpH(7.5)で結晶化を行ったが、結晶を比較的低いpH(6.5)のバッファーに浸した後に測定を行っている。しかし、このようなpHの違いにもかかわらず、両酵素での構造に顕著な違いは見られなかった。なお、TRXIIでは、pH5.0と6.5で酸/塩基触媒のグルタミン酸の側鎖の配向に大きな変化が観測されている(39)。

1-5-8 他のキシラナーゼとの一次構造および立体構造のアラインメント

他のファミリー11キシラナーゼとのアミノ酸配列(一次構造)のアラインメントを行った結果を図1-5-11に示す。ここに示したように、ファミリー11キシラナーゼはファミリー全体で相同性が高いことが分かる。

立体構造のアラインメントの例として、キシラナーゼCとTRXIIの結晶構造を、プログラムOを用いてC α 原子の最小自乗法によって重ね合わせた場合の、各残基でのC α 原子間の距離を、図1-5-12に示す。最も距離の離れた場所は、前半(N末端側)の挿入および欠失のある部分の直前または直後であるが、その間の β シート部分では非常によく重なり合っている。後半(C末端側)では、「コード」部分(87-93)、「親指」の部分(116-126)、ヘリックス直後の部分(154-160)で、特徴的にピークが見られる。

このように、立体構造でも、分子全体を通じてよく重ね合わせることができることが分かったが、今後、他のキシラナーゼとの活性部位の構造の差異などをみる場合には、実験方法(1-5-1節)に示したように、一部の、よく保存されていて、活性に重要であり、各キシラナーゼ間で立体構造上で差がない残基のみを選んで、最小自乗法による重ね合わせを行ったものを用いた。

1-5-9 基質結合クレフトと活性部位

キシラナーゼCの基質結合クレフト

キシラナーゼCの基質結合クレフトを正面から見た図を図1-5-13aに、側面のサブサイト+3側から見た図を図1-5-13bに示す。キシラナーゼCの活性部位クレフトは、大きく開いた溝の内壁に並んだ芳香環を持つ残基(黄色とオレンジで表した)からなる。サブサイトは、非還元末端から還元末端に向かって、-2, -1, +1, +2, +3と定義されている(95, 40)。図1-5-13では、BCXのE172C変異体(酸・塩基触媒のグルタミン酸がシステインに置換されている)の基質(キシロテトラオースをソーキングしたもの、キシロース環はサブサイト-2と-1の2つしか見えていない)とのコンプレックスをも

どにして組み込んだキシロビオースのモデルをシアンで示している。

他のキシラナーゼとの比較

サブサイトを形成している芳香環を持つ残基について、他のキシラナーゼの立体構造と比較した結果を図1-5-14に模式的に示す。この図からわかるように、キシラナーゼCのチロシン10、フェニルアラニン131、トリプトファン172の3つの残基は、酸性キシラナーゼと中性／塩基性キシラナーゼで特徴的な差が見られる。酸性キシラナーゼでは、これらの残基はチロシン、フェニルアラニン／イソロイシン、トリプトファン／フェニルアラニンであるが、中性／塩基性キシラナーゼではトリプトファン、トリプトファン、チロシンである（図1-5-11ではシアンで表した）。特に、酸性キシラナーゼのトリプトファン残基はクレフトの内側に折れ曲がっているが、それに対応する塩基性キシラナーゼのチロシン残基は溶液中に突き出している（図1-5-15）。その他の、図1-5-13で黄色で示した残基は、全てのキシラナーゼで保存されているが、酸性キシラナーゼと中性／アルカリ性キシラナーゼの間で、特徴的な違いが見られなかったものである。

チロシン89に当たる残基に関しては基質結合に重要であることが*Schizophyllum commune*のキシラナーゼAで明らかになっている(96)。また、BCXにおいては、チロシン70, 81にあたる残基をフェニルアラニンに置換すると活性が大幅に低下するが、チロシン164に当たる残基をフェニルアラニンに置換しても活性に大きな影響はないことが明らかになっている(23)。

このクレフトは入り口が閉じたコンフォメーションをしており、このままでは基質が結合できないが、TRXIIの結晶構造では、クレフトがわずかに開いた構造をしている。基質の結合の際には、クレフトの開閉を伴う構造変化が起こっていると予想されており、TRXIIでは、分子動力学的計算により、この予想を支持する結果が得られている(97)。

1-5-10 活性中心残基

活性中心のグルタミン酸

2つの活性中心のグルタミン酸(Glu79, Glu170)を、図1-5-13では赤色で示した。グルタミン酸79は上に、グルタミン酸170は下にして示す。これらの残基は、両側からその側鎖をクレフトの底に向けて延ばしている。グルタミン酸79の近傍の2つの残基(Arg115とGln129)をそれぞれ青と緑で表した。これらの残基はほぼ完全に保存されている(図1-5-11)が、触媒における機能はあまりよく分かっていない。しかし、BCXの変異体の解析から、アルギニン残基は活性に必須ではないことが分かっている(23)。後で述べる、クレフトの周辺の負電荷に寄与しているグルタミン酸118は、ピンクで表した。

アスパラギン酸37

活性中心付近で最も特徴的であったのは、酸・塩基触媒のグルタミン酸170の近傍にあるアスパラギン酸37である。図1-5-16では、TRXIIと重ね合わせて示した。中性／アルカリ性キシラナーゼではこの残基はアスパラギンであり、アスパラギン側鎖のNの2原子と酸・塩基触媒のグルタミン酸のOの原子との距離は、TRXII(1xyp: molecule A)

で3.52 Å、野生型BCX(1xnb)で3.08 Åである。一方、酸性キシラナーゼではこの残基は全てアスパラギン酸であり、アスパラギン酸側鎖のO δ 原子と酸・塩基触媒のグルタミン酸のO ϵ 原子との距離は、白麹菌のキシラナーゼCで2.81 Å、ANXI(1ukr: molecule A)で2.84 Å、TRXI(1xyn)で2.87 Åであった。つまり、中性キシラナーゼではアスパラギンで、距離も3.0 Å以上であるのにならして、酸性キシラナーゼではアスパラギン酸で、距離は3.0 Å以下であるという明らかな傾向が見られた。キシラナーゼCの2.81 Åという距離は、十分強い水素結合が存在していることを示している。従って、この残基の種類(アスパラギン/アスパラギン酸)と、酸・塩基触媒のグルタミン酸との距離は、キシラナーゼの活性のpH依存性に重要であると考えられた(31)。ただし、TRXIIはクレフトが少し開いた構造に固定されているため(97)、主鎖も少し動いて、両者の距離を広げる一因となっていると考えられる。

1-5-11 分子表面の静電的性質

基質結合クレフト

プログラムgraspを用いて、キシラナーゼCの分子表面の性質を、他のキシラナーゼと比較した結果を図1-5-17に示す。図1-5-17a-dは、基質結合クレフトを、図1-5-13aと同じ向きから見ている。全てのキシラナーゼの活性部位は、活性中心が2つのグルタミン酸であるために、負電荷を帯びている。しかし、酸性キシラナーゼは中性キシラナーゼに比べて、より負電荷が強い。これは、クレフトの入り口付近に存在する酸性残基のためである。ここには、アスパラギン酸残基(図1-5-17abでは、下側に位置する。キシラナーゼCはAsp37、TRXIはAsp33)と、その反対側(図1-5-17abでは、上側に位置する)に、グルタミン酸残基(キシラナーゼCではGlu118、TRXIIではGlu112)が存在している。アスパラギン酸37の保存性に関しては、1-5-10節で触れたとおりであるが、グルタミン酸118に当たる残基は、酸性キシラナーゼではGlu/Glnであり、塩基性キシラナーゼではGln/Alaである(図1-5-11では紫で表した)。

セリン・スレオニン表面

図1-5-17a-dでは下向きで、図1-5-17e-hで手前に向いている表面は、「セリン・スレオニン表面(Ser/Thr surface)」と呼ばれている(39)。この面は β シートAが形成する比較的平らで凸な面であり、その名のとおり、多くのキシラナーゼではセリンとスレオニン残基が多く存在する、電気的に中性な表面である。図1-5-17f-hに示したように、キシラナーゼC以外の全てのキシラナーゼでは、この保存された「セリン・スレオニン表面」を持っている。しかし、興味深いことに、キシラナーゼCでは、「セリン・スレオニン表面」という名称は適当ではないほどに、強い負電荷を帯びていた。この面の酸性残基はAsp16, Asp20, Glu21, Glu31, Asp32, Glu57であり(図1-5-11ではマゼンタで表した)、ほとんどの残基は、 β シート間の短いヘリックス状構造をとっている部分(Asn11-Gly15, Asp20-Gly24, Glu31-Gly33)に存在していた。このような静電的特徴を反映して、キシラナーゼCのpIは3.5と低い(表1-1)。ところが、このような負電荷が集中している面は、クレフト付近と、この面以外には存在しなかった。例として、

図1-5-17i-1に「セリン・スレオニン表面」の反対側の面を示したが、キシラナーゼCにおいても負電荷はあまり存在しない。

1-5-12 結晶格子中での分子のパッキング

プログラム contact を用いて、キシラナーゼCの結晶中でのパッキングの様子を調べた。3.6 Å以内の接触をリストアップした結果、結晶中で接触している対称分子は、主に以下の3分子であることが分かった。

(A) 対称操作 $3(1/2+Y, 1/2-X, 1/4+Z)$

(B) 対称操作 $2(1/2-Y, 1/2+X, 3/4+Z) + (0, -b, -c)$

(C) 対称操作 $7(Y, X, -Z) + (a, b, 0)$

これらの対称分子間の接触を、図1-5-18に示す。対称分子A、B、C、をそれぞれ黄色、紫、緑で表した。対称分子A、B、C、と接触している面をそれぞれA面、B面、C面とすると、この接触はA面とB面の間での接触と、C面同士の接触の2種類に分類される(対称分子Cとの間に結晶学的2回軸が存在する)。

キシラナーゼCは分子表面に酸性残基が多く存在しており、結晶化のpH(7.5)ではこれらはほとんどイオン化していると予想されるが、静電的な反発は起こらず、隣接する分子と接触して結晶化していた。これは、図1-5-18に示したように、酸性残基の多い部分のほとんどは結晶格子の間隙の溶液中に露出しており、分子間接触付近に存在するいくつかの酸性残基も、アルギニンまたはヒスチジン残基が近傍に存在しているためだと思われる。また、ほとんどの分子間接触は水分子を介していた。

キシラナーゼCと同様に表面に酸性残基が多く存在する *Haloarcula marismortui* のフェレドキシンの結晶構造では、溶媒の電子密度のうち、6個をカリウムイオンとして同定している(98)。一方、キシラナーゼCにおいては、今回水分子とした溶媒の電子密度のうち、水分子にしては大きな電子密度を示して、水素結合のパターンも水分子と異なると思われるものがあつた。結晶化母液および収穫母液中にあるイオンとしてはナトリウムイオン、硫酸イオン、HEPESおよびMES(バッファー)、蛋白質溶液から持ち込んだ酢酸イオンしか存在しないため、これらはナトリウムイオンか硫酸イオンである可能性がある。しかし、今回の構造解析では、これらの溶媒分子を確実に同定するには十分な分解能が得られていないと考えて、すべて水分子とした。

a

Item	Average	St.Dev	Min	Max
X-coord	27.487	8.734	7.660	51.691
Y-coord	10.689	7.985	-10.040	28.442
Z-coord	35.727	9.255	14.566	57.930
B-factor	30.128	11.971	6.020	74.070
Radius of gyration (A) :		15.02		
Sum of masses ¹ :		20222.879		
Centre-of-mass :	27.48	10.71	35.71	

b

Atom type	Number	Average B	Maximum B
Protein main chain	728	28.334	58.270
Protein side chain	666	28.743	69.550
Protein all atoms	1394	28.529	69.550
Water molecules	111	50.200	74.070
All atoms	1505	30.128	74.070

表1-5-1 座標および温度因子の統計値

プログラムmolemanを用いて計算した。

a 座標および温度因子の統計値

¹水分子も含めての値

b 温度因子の統計値

1-70

```

1 -AGINYVQNY NGNLGDFTYD ESAGTFSMYW EDGVSSDFVV GLGWTGSSN AITYSAEYSA SGSSSYLAVY
2 EEEEE SGGSEEEEE GGTEEEEE EEESS EEE EEESS S EEEEEEE TTSSEEEEE
3 >>3<< > >3<< > 33< > 33<
4 > 444<
5 > 5555<
6 S S SSS SSS SS SS SS S SSSS
7 AAAAA HHHHH HHHHH AA AAA JJJJ CCCCC
8 AAAAA BBBB BBBB I BBB BBB KKKKK DDDDD
9 AAAAA BBBB BBBB B AAA AAA BBBB BBB AAAAA

```

71-140

```

1 GWVNYQAEY YIVEDYGDYN PCSSATSLGT VYSDGSTYQV CTDTRTNEPS ITGTSTFTQY FSVRESTRTS
2 EETTTTEEE EEEEEESS TTTTSEEEEE EETTTEEEEE EEEEEEEEE TTEEEEEEE EEESS SE
3 > 33< >33< > 33<
4 >444<
5 >5555<
6 SSS SS SS SSSSS SSS S SSSS SS SS
7 C C DDD DDD DD FF FF FFF FFFFF FF eee eee J
8 DDD eee eee GGG GGGGG GGG GGG GGG GGG
9 AAA AAA AAA AA AA AA AAA AAAAA AAAAA AAA AAA AAA AAA B

```

141-184

```

1 GTVTVANHFN FWAQHGFNGS DFNYQVMAVE AWSGAGSASV TIS-
2 EEE HHHHH HHGGGT S SEEEEEEEEE ESSEEEEEEE EE
3 >>3<< >>><<<
4 >>>>XX< <<<
5 >5555<
6 S SSSSSS SSSSS S S SSS
7 JJJ BBBB B I IIII I
8 C CCCCC C KKKK KK
9 BBB A AAAAA A B BBBB BB

```

表1-5-2 キシラナーゼCの二次構造

各行の意味は、以下の通り。

1 アミノ酸配列

2 二次構造 (H: α ヘリックス, B: β -ブリッジ (ストランド2本からなる β シート), E: β -ラダー (ストランド3本以上からなる β シート), G: 3_{10} ヘリックス, I: π ヘリックス, T: 水素結合したターン, S: ベンド)

3-5: 3-, 4-, 5- ターンまたはヘリックス。それぞれ、3- ターンは 3_{10} ヘリックス。4- ターンは α ヘリックスの水素結合パターンである。

6 Geometrical bend, 屈曲している部分を"S"で表した。

7, 8: β ブリッジのラベル。小文字が平行 β ブリッジ、大文字が逆平行 β ブリッジ。

9: β シートラベル

a

Class	All beta
Fold	ConA-like lectins/glucanases sandwich; 12-14 strands in 2 sheets; complex topology
Family	ConA-like lectins/glucanases
Superfamily	Xylanase II

b

Class	2 Mainly Beta
Architecture	60 Sandwich
Topology	120 Jelly Rolls
Homologous superfamily	180 1xnb (<i>B. circulans</i> xylanase)

表1-5-3 キシラナーゼCの構造ファミリー

a SCOPによる
b CATHによる

原子間距離					
SG-SG	CB-CB	CA-CA			
2.02	3.77	5.54			
結合角					
SG1-SG2-CB2	SG2-SG1-CB1	SG1-CB1-CA1	SG2-CB2-CA2	CB1-CA1-N1	CB2-CA2-N2
106.2	104.6	114.4	113.8	112.3	111.7
二面角					
N1-CA1-CB1-SG1	CA1-CB1-SG1-SG2	CB1-SG1-SG2-CB2	N2-CA2-CB2-SG2	CA2-CB2-SG2-SG1	
-65.7	-38.3	-82.7	58.1	-97.9	

表1-5-4 キシラナーゼCのジスルフィド結合について

上からそれぞれの原子に対する原子間距離(Å)、結合角(deg)、二面角(deg)。
 ただし、1、2に当たる残基はそれぞれCys92、Cys111。

	XynC	ANXI molA	ANXI molB	ANXI molC	ANXI molD
XynC	—	0.553/4.813	0.595/4.813	0.582/4.566	0.555/3.682
ANXI molA		—	0.172/3.575	0.160/2.316	0.201/3.195
ANXI molB			—	0.139/1.860	0.211/4.168
ANXI molC				—	0.214/3.966

表1-5-5 キシラナーゼCとANXIのrms deviation

キシラナーゼCとANXIの各NCS分子の間での、側鎖も含めたrmsd/Maximum rmsd(単位はÅ)。
キシラナーゼCとANXIの分子AのC α 原子間のrmsd/Maximum rmsdは、0.227/0.817 Åであった。
ANXIのNCS分子同士でのC α 原子間のrmsdは0Åであり、まったく相違がなかった。

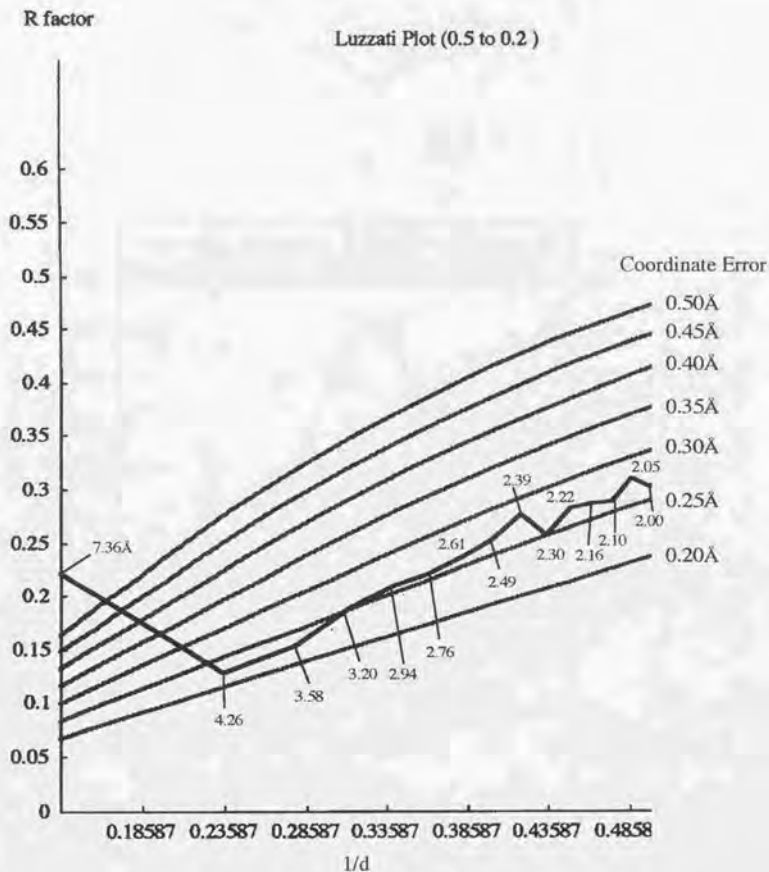


図1-5-1 Luzzatiプロット

横軸は分解能の逆数、縦軸はその分解能範囲でのR因子。
 このプロットにより見積もられる座標のエラーのめやすとなる
 曲線を0.2Åから0.5Åまで0.05Åごとに表した。
 Luzzatiプロットの折れ線の上に、対応する分解能をÅで表した。

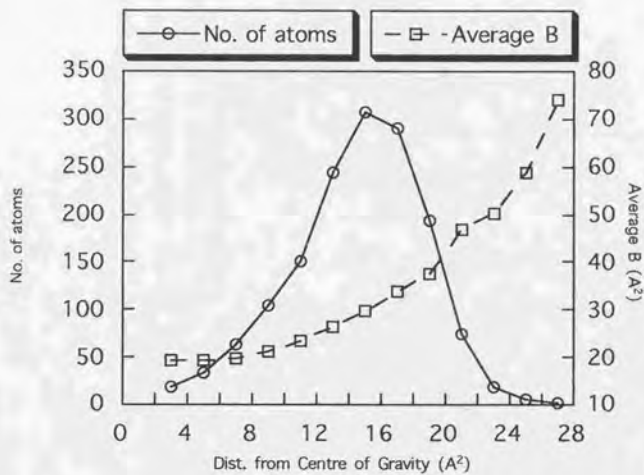


図1-5-2 温度因子の半径分布

molemanを用いて計算した。

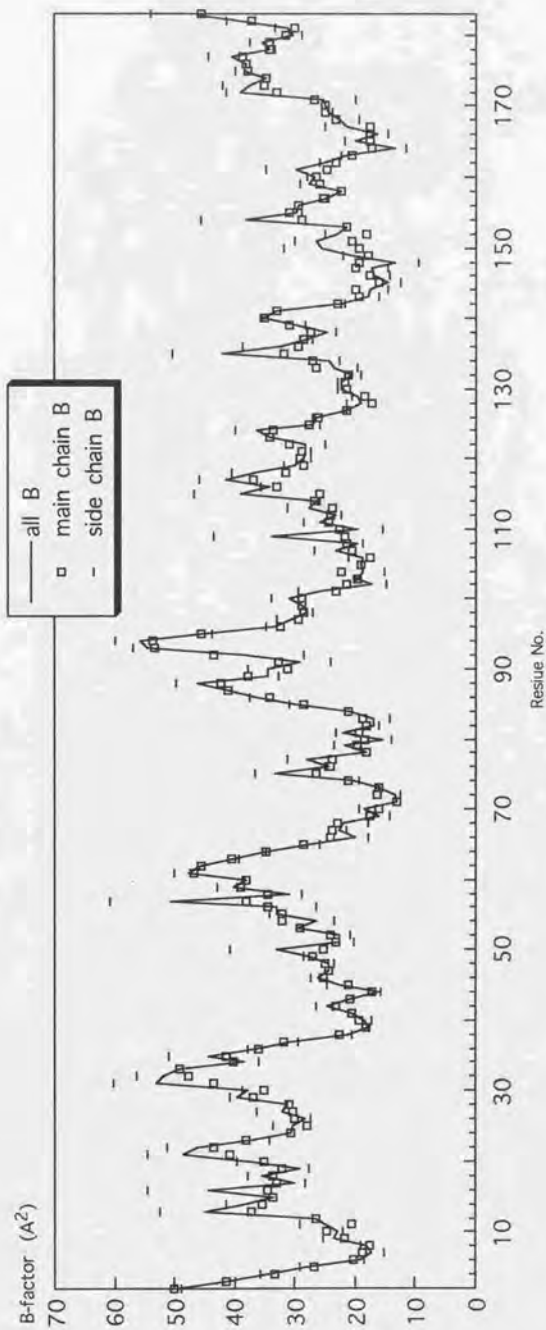
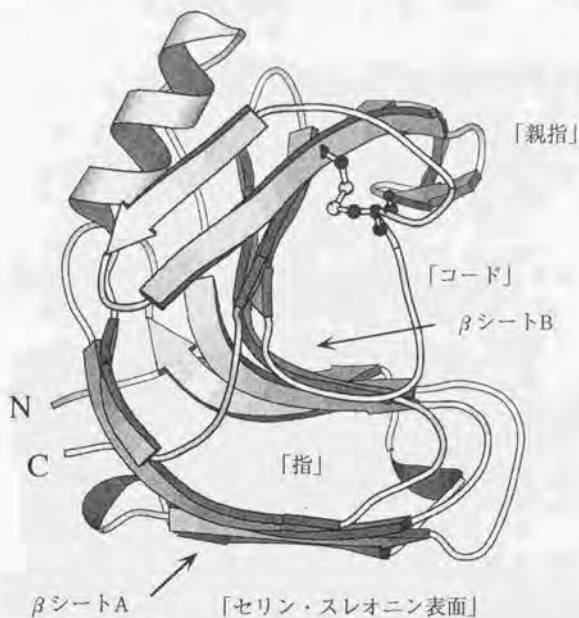


図1-5-3 残基ごとの温度因子

各残基全体の平均値、主鎖の平均値、側鎖の平均値をそれぞれ示した。

a



b



図1-5-4 キシラナーゼCの全体構造

- a キシラナーゼCの構造をmolscripを用いてリボンモデルで表した。
 Cys92とCys111の間のジスルフィド結合はball-and-stickモデルで表した。
 β シートA、Bと、ファミリー11キシラナーゼで共通に使われている名前も示した。
 b ファミリー11キシラナーゼの「右手」との構造的類推を模式的に表した図。

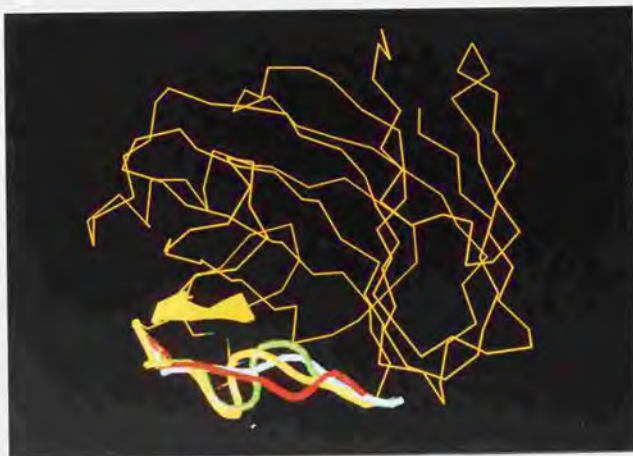


図1-5-5 キシラナーゼCのジスルフィド結合付近の電子密度

2Fo-Fc電子密度マップ (1.0 σ)。

右側が「コード」上のCys92。左側が β ストランドB8上のCys111

a



b

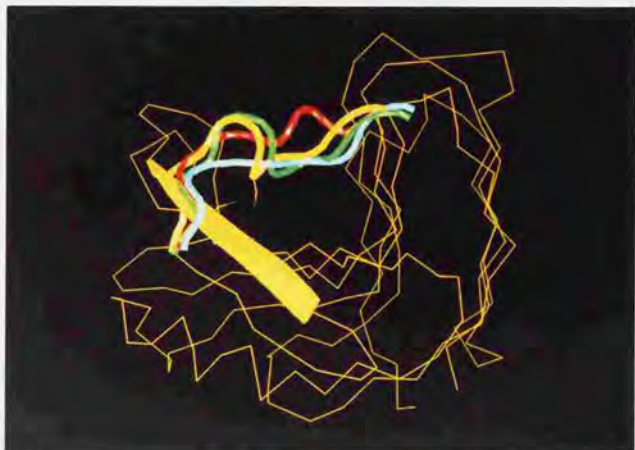


図1-5-6 他のキシラーナーゼとの「コード」の構造の比較

プログラムOを用いて表示した。

キシラーナーゼCの主鎖 ($C\alpha$)、 β ストランドB8を黄色で表した。

「コード」の部分は太くした。

キシラーナーゼCのジスルフィド結合も示した (硫黄原子は緑色)。

TRXIは赤色、TRXIIは緑色、BCXは水色でそれぞれ表した。

a 活性部位クレフト正面からの図。

b 分子の側面からの図。図1-5-4aと同じ方向から見た。

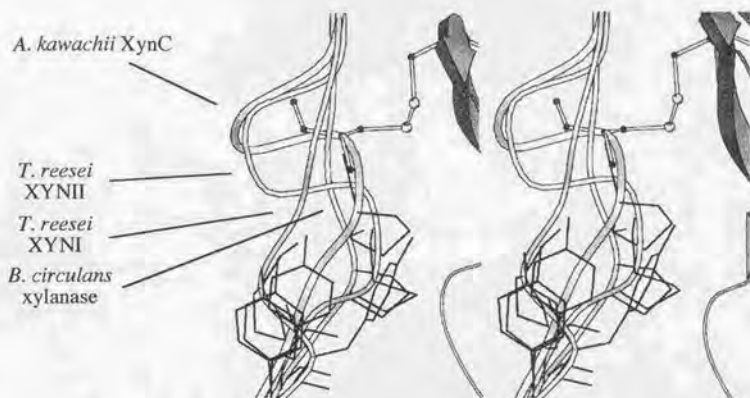


図1-5-7 「コード」上に保存されたプロリンとチロシン

プログラムmolscriptを用いてステレオ図で表示した。

キシラーゼC、TRXI、TRXII、BCXのC α 主鎖を重ね合わせた。

キシラーゼCのCys92-Cys111間のジスルフィド結合をball-and-stickモデルで表した。

保存されたプロリンおよびチロシン側鎖はワイヤーフレームモデルで表した。

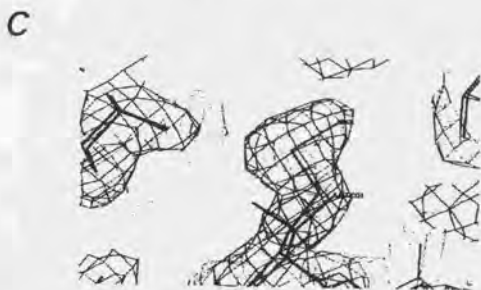
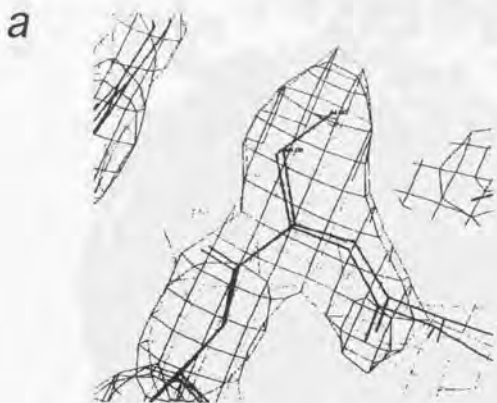
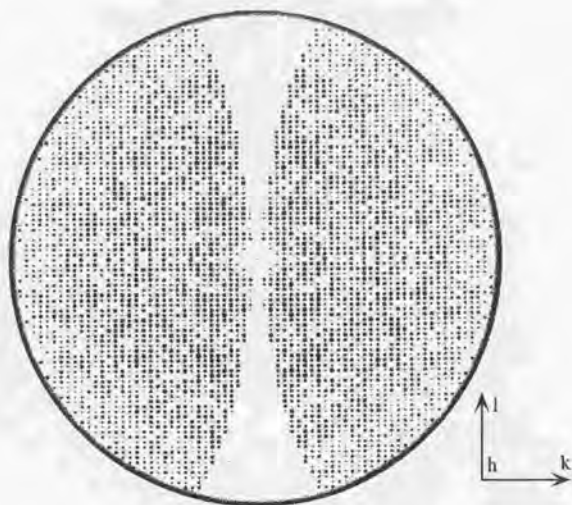


図1-5-8 キシラナーゼCとANXIで異なる3残基

キシラナーゼCおよびANXIの構造を重ね合わせてワイヤーフレームモデルで表した。
キシラナーゼCの2Fo-Fc電子密度マップ (1.2σ) も示した。

a Ser64 (ANXIではAla) b Glu154(ANXIではHis) c Met167 (ANXIではVal)
キシラナーゼCでは、これらの残基は明らかにSer, Glu, Metであることが分かる。

a



b

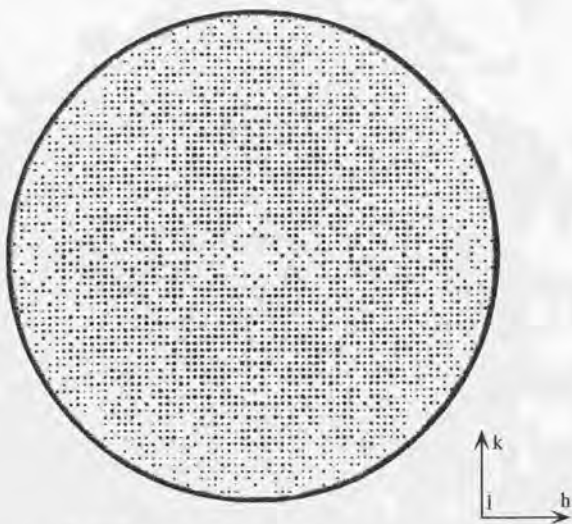


図1-5-9 ANXIの反射データ

PDBよりデータを得た(PDB code 1ukr)。
プログラムpatternにより、2.4 Åまで表示した。
a $h=0$ (k, l面) b $l=0$ (h, k面)
c*周辺の反射が欠けている。

a



b

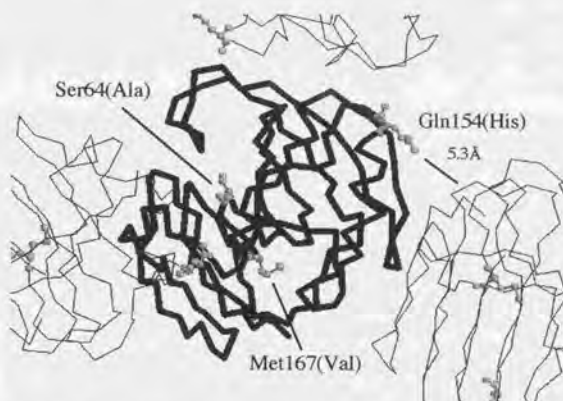


図1-5-10 キシラーゼCとANXIのパッキングの違いに
関与している可能性のある残基

キシラーゼCの分子のパッキングを、C α 主鎖構造を示すことにより表した。
ANXIの分子のパッキングも、キシラーゼCとほぼ同じである。

- a ANXIのNCS分子間で側鎖が異なる構造をとっている残基
(Tyr10, Asn13, Glu31, Glu57, Ser61, Gly62, Asp88, Thr107, Asn117)
をball-and-stickモデルで表した。
- b キシラーゼCとANXIでアミノ酸側鎖が異なる3残基をball-and-stickモデルで表した。
括弧の中は、ANXIでのアミノ酸残基。

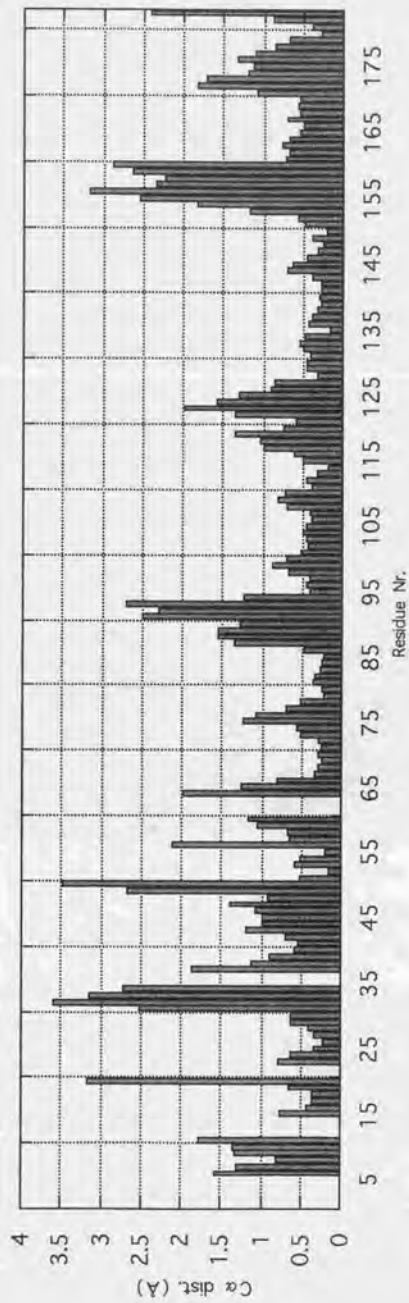


図1-5-12 キンラナーゼとTRXIIを重ね合わせた場合のC α 原子間距離

挿入、欠失などで対応がつかない部分は比較を行わなかったため、原子間距離は示していない。
キンラナーゼCの残基番号を横軸にとった。

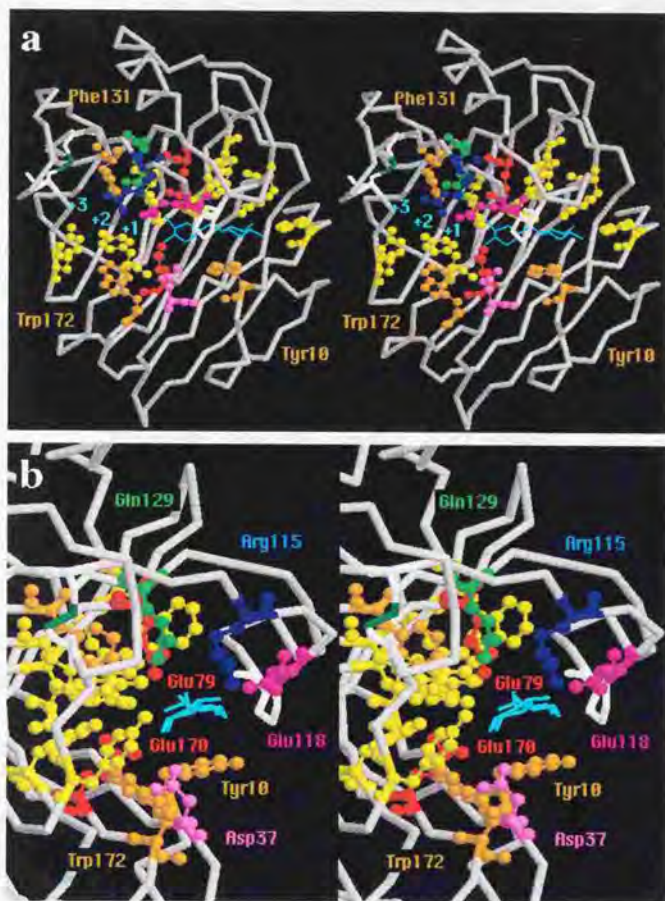


図1-5-13 キシラーゼCの基質結合クレフト

ステレオ図で表した。C α バックボーンを示している。基質結合および触媒に寄与していると思われる残基をball-and-stickモデルで示した。Tyr89, Tyr66, Tyr81, Tyr70, Trp72, Tyr164, Tyr6 (図aの左から右に並ぶ順に示した)は黄色で示した。「親指」の保存されているプロリン119は白いスティックで、Cyr92-Cys111のSS結合は濃緑色で表した。BCXの、サブサイト-2と-1に結合したキシロピオースをシアンで表して重ね合わせた。サブサイト+1~+3はシアンで示した。好酸性に寄与している可能性のある芳香環を持つ残基をオレンジで、活性中心のグルタミン酸を赤で、それぞれ示した。その他、重要と思われる残基はそれぞれ色を変えて表してある。

a クレフト正面から見た図。3つの芳香環を持つ残基名を示した。

b クレフト側面をサブサイト+3の側から-2に向かって見た図。親水性の残基と、Tyr10, Trp172の残基の名称を示した。

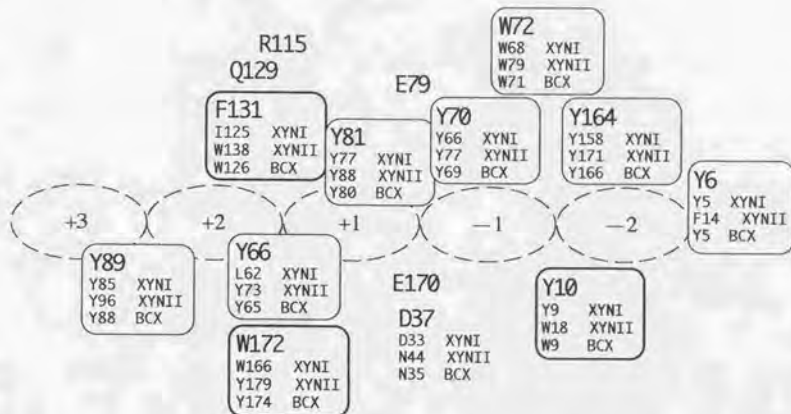


図1-5-14 各キシラーゼのサブサイトを形成する芳香環を持つ側鎖

キシラーゼCにおける残基の種類および番号の下に、各キシラーゼについて示した。活性中心のグルタミン酸およびアスパラギン酸37に当たる残基も示した。

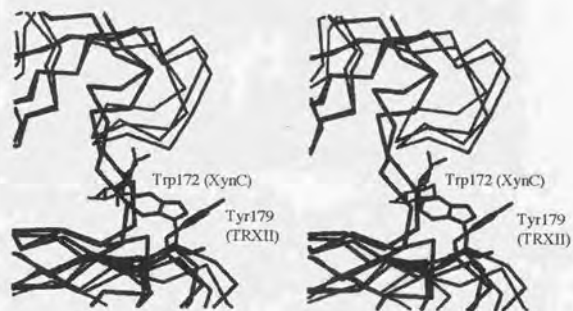


図1-5-15 トリプトファン172の構造

キシラナーゼCとTRXIIの構造を重ね合わせて示した。
 C α backbone、キシロビオースのモデル分子に加えて、キシラナーゼCの
 トリプトファン172と、TRXII(1xyp: molecule A)のチロシン179は側鎖を表示した。

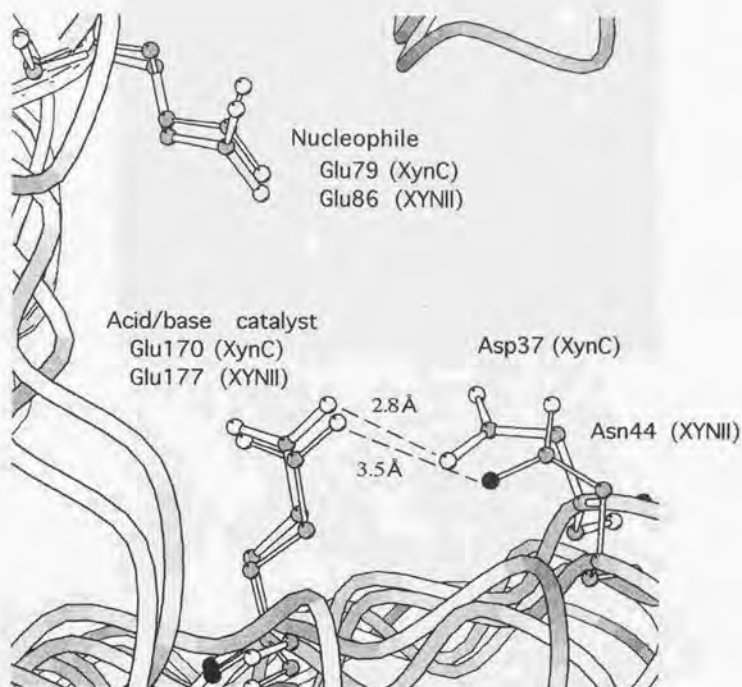


図1-5-16 キシラナーゼCのアスパラギン酸37と*T. reesei* XYNIIのアスパラギン44

両酵素の構造を重ね合わせて示した。活性中心残基を、ball-and-stickモデルで示した。キシラナーゼCの結合の方を太く表してある。酸素、窒素、炭素原子をそれぞれ白、黒、灰色で表した。C α backboneも表示した。

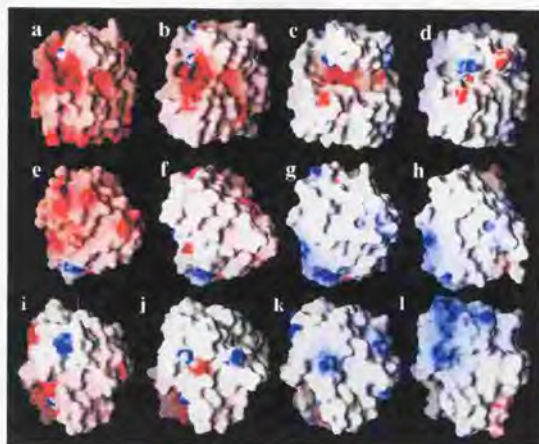


図1-5-17 各キシラーナーゼの分子表面の静電ポテンシャル

静電ポテンシャルに従って、負電荷を赤で、正電荷を青で示した。

a-d 基質結合クレフトから見た図（図1-5-13aと同じ向き）

a キシラーナーゼC、b TRXI、c TRXII、d BCX(E172C)とキシロビオース

e-h 「セリン・スレオニン表面」。a-dを水平な軸に90°回転して、

下の面を前に持ってきた。e-hは、それぞれ、a-dと同じ分子である。

i-l 「セリン・スレオニン表面」の反対側。a-dを、水平な軸に対してe-hとは

逆の向きに90°回転して、上の面を前に持ってきた。i-lは、それぞれ、

a-dと同じ分子である。

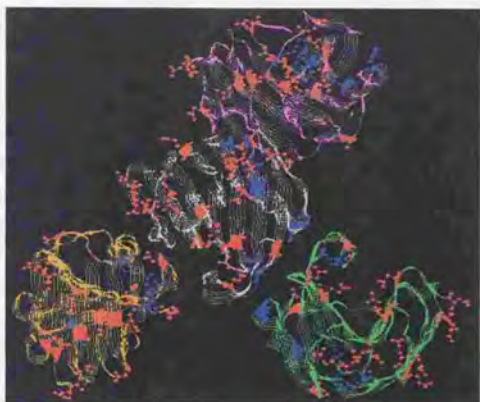


図1-5-18 結晶中で接触している対称分子。

XynCの結晶中で接触している対称分子(A, B, C)を黄、紫、緑でそれぞれ表した。
酸性残基は赤、塩基性残基は青のball and stickで示した。
負電荷同士が近接しないようにパッキングしている。

第1部 第6章
キシラナーゼCのアスパラギン酸37変異体の解析

序

キシラナーゼCの結晶構造から、好酸性に寄与していると思われたアスパラギン酸37の置換変異体 (D37変異体と呼ぶ) を作成して、さまざまな解析を行った。

実験方法

1-6-1 材料、遺伝子操作法等

実験に用いた試薬は、主に和光純薬工業または半井化学薬品の特級試薬を用いた。Nelson Somogyi法に用いた試薬は、和光純薬工業のものを用いた。遺伝子操作に用いた制限酵素、DNA修飾酵素等は宝酒造、東洋紡績、New England及びBoehringer Mannheimから購入し、反応条件についてはその説明書に従った。

部位指定変異はQuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて行なった。DNAシーケンシングは1-4-6節で示した方法に従って行った。その他の遺伝子操作は主にMolecular Cloning(99)に従った。

大腸菌で発現させた蛋白質の精製におけるカラムクロマトグラフィーは、FPLC (ファルマシア)を用いて行った。

1-6-2 部位特異的変異の導入と遺伝子操作

D37N, D37S, D37E, D37K変異体の作成は、図1-6-1aに示したようなオリゴDNAを用いて行った。アスパラギン酸37のコドンは、元々存在するAsp1の認識配列の一部であるため、変異の導入は、Asp1サイトの消失を目安に行うことが可能であった。また、野生型遺伝子と各変異体の場合に、Asp1サイトに加えて、TspEIとApoIサイトの存在の有無から、D37EとD37K以外の全ての種類の配列を区別することが可能である (図1-6-1b)。遺伝子操作の最終段階では、これらの制限酵素の切断による確認も併せて行った。

すでにクローニングされているキシラナーゼCのcDNA(15)に部位特異的変異を加えた。キシラナーゼCのcDNAは、EcoRIアダプターを介してpUC118にインサートした状態であった。これに部位特異的変異を加え、0.7kbのSacI-SacI断片内の塩基配列を確認した後、この断片を元のプラスミドに乗せ変えた (図1-6-1c)。

DNAシーケンシングによる変異の導入の確認の際、ユニバーサルプライマーと、逆方向からのユニバーサルプライマーに加えて、以下の4種のプライマーを合成して用いた。

XCSQ0 TTC ACC TAT GAC GAG AGT G

XCSQ1 CGG AAC ATT TTC CAT GTA C
XCSQ2 GAG GAT TAC GGT GAT TAC A
XCSQ3 TGC CAA CCA TTT CAA CTT C

1-6-3 D37変異体の酵母での発現、精製

野生型キシラナーゼCおよび各変異体の、作成した変異体のプラスミド(pUCXC mutants)から酵母での発現ベクターへの乗せかえ、酵母での発現、精製は、国税庁醸造研究所の伊藤清博士によって行われた。

キシラナーゼCの酵母での発現ベクター(15)は、pGNco (YEP-like 2 μ タイプのベクターで、グリセルアルデヒド3リン酸(GPD)のプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)のターミネーター、TRP1(Trp要求性)の選択マーカーを持つ。pG3(113)から作られた)に、キシラナーゼC遺伝子の両端の(リンカー由来) NcoI-NcoI断片を挿入して得られた発現ベクター-pGXc1から、5'領域の一部を欠失したpGMUTAを用いた。この5'領域の欠失はキシラナーゼCのシグナル配列を短くする変異であり、酵母での発現において、発現したキシラナーゼC蛋白質の菌体外への分泌量が多くなる。

発現株は、Yeast *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 (ura3, lys2, ade2, trp1, his3, leu2)株を用いた。その他、RBB (Remazol Brilliant Blue) xylan重層法も含め、酵母での発現、蛋白質の精製に関しては、全て(15)に従った。

1-6-4 D37変異体の活性測定

精製した蛋白質の定量は、第1章と同様に、280 nmの吸光度で測定した。

活性測定は以下のように行った。

2% beechwood xylan (Sigma)の懸濁液は、沸騰水中で10分インキュベートすることにより可溶化した。各pHに調製した2倍濃度のWalpoleバッファーまたはMcIlvaineバッファーと等液量混合することにより、1% xylan溶液(液量400 μ l)を調整し、その中で、40 $^{\circ}$ C、30分の反応を行った。各変異、各pHの比活性によって、適当な濃度の酵素を加えることにより反応を開始した。遊離した還元糖を、Nelson Somogyi法(100)により測定した。Walpoleバッファー(x1)は、200 mM 酢酸ナトリウムに対して塩酸の濃度を変えることによって調製した。McIlvaineバッファー(x1)は、Na₂HPO₄とクエン酸の濃度比を変えることによって調製した。バッファーのpHは、pHメーターにより確認した。1分間に、キシロース1 μ mol相当の還元糖を精製する活性を1 unitとした。酵素液を入れずにブランクと、1 μ Mキシロースを入れた標準液は、バッファー系、pHなどによって発色の程度が異なるため、それぞれの条件で用意した。

1-6-5 D37変異体の大腸菌での大量発現および結晶化

大腸菌での発現ベクターの作成は、まず、キシラナーゼC蛋白質の成熟酵素部分のみ

(ただし、N末端にMetが一つ付加する)が発現するように、NdeIサイトの導入を行った(図1-6-2a)。DNAシーケンシングで塩基配列を確認した後、NdeI-EcoRI断片(0.8 kb)をT7プロモーターを持つpET17bベクター(Novagen)に挿入して発現系を作成した(図1-6-2b)。

D37N変異体の大腸菌での大量発現、精製および結晶化のための調製は、発現ベクターpETXC-N(アンピシリン耐性)と、GroEL/ES遺伝子の発現ベクターpTgroE(クロラムフェニコール耐性)(101)を両方持つ大腸菌BL21 DE3株を用いて、以下のとおり行った。

- ・グリセロールストックから75 ml LBに植菌、37°C、overnight振盪培養(100 μ g/ml アンピシリン(Ap) + 34 μ g/ml クロラムフェニコール(Cm))
- ・1.5 L SB培地(100 μ g/ml Ap + 20 μ g/ml Cm)に5% Seedして、30°Cで、4~5時間振盪培養
- ・O.D.660が0.6~1.0になったら、IPTGを添加(終濃度1.0 mM)
- ・26.5°Cで4時間振盪培養
- ・遠心(集菌)
- ・菌体湿潤重量の10倍量程度の50 mM Na-citrate+HCl (pH 3.5)バッファーに懸濁
- ・超音波破碎、遠心(上清)
- ・50 mM Na-acetate (pH 5.0)に透析
- ・DEAE-Sephrose FF カラム (NaCl 勾配溶出: 0~500 mM)
- ・50 mM Na-acetate (pH 5.0)に透析
- ・Poros HQ/H カラム (NaCl 勾配溶出: 0~1 M)
- ・5 mM acetate (pH about 3.5)に透析
- ・Centricon 10で濃縮

D37N変異体の結晶化は、第1章で述べた方法と同様に行った。

1-6-6 TOF-MSの測定

TOF-MSによる分子量の測定は、REFLEX(BRUKER)を用いて行った。白麹菌由来のキシラナーゼC native酵素は、精製後の酵素を5 mM Acetate (pH約3.5)にバッファー置換して、濃度0.13mg/mlにしたサンプルを用いた。大腸菌で発現させたD37Nは、一度結晶化したものをイオン交換水に溶解して、濃度を0.1 mg/mlにしたものを用いた。その他の詳しい条件は、図中に示した。

1-6-7 CDスペクトルの測定

CDスペクトルの測定は、JASCO J-720 Spectropolarimeter(日本分光)で行った。どちらも、精製後の酵素を10 mMリン酸バッファー(pH6.0)にバッファー置換して、蛋白質濃度は、0.5 mM(モル平均残基濃度:モル濃度に残基数184をかけたもの)のサンプル

ルを用いた。その他の詳しい条件は図中に示した。

1-6-8 D37N変異体のX線結晶構造解析

X線結晶構造解析および回折強度データの収集は、野生型キシラナーゼCの場合とほぼ同様に行った。ただし、放射光施設でのデータ測定は、BL6Aに加えて、BL18Bでも行った。また、プログラムscalepackの出力である回折強度データを構造因子データに変換し、CCP4のmtzファイルおよびプログラムX-PLORのファイルとして出力するスクリプトは、CCP4のバージョンが3.4に上がったことにもなって、1-3-3節とは別のものを用いた。このスクリプトは、プログラムscalepack2mtzにより.scaファイルを、mtzファイルに変換し、プログラムtruncateで絶対スケールを求めるとともに強度データ(I)を構造因子(F)に変換し、プログラムfreerflagでfree Rフラグを作成し、プログラムcadで反射をHKLの順にソートし、プログラムmtz2variousでテキスト形式であるX-PLORの構造因子データファイルに変換する。

その後のプログラムX-PLORおよびOを主に用いた精密化も野生型キシラナーゼの場合とほぼ同様に行ったが、Oはバージョン5.10.3から6.2.2に、X-PLORはバージョン3.1から3.851にそれぞれ上がったものを用いた。bulk solvent collection(102)は、X-PLOR ver. 3.851のサンプルスクリプトsetup_bulksol.inpをもとにして行った。simulated annealing omit mapは、サンプルスクリプトsa_omit_map.inpをもとにして行った。

結果と考察

1-6-9 D37変異体の解析

1-5-10節で述べたように、キシラナーゼCのアスパラギン酸37は、好酸性に重要であると考えられた。従って、この残基を、アスパラギン(D37N)、セリン(D37S)、グルタミン酸(D37E)、リジン(D37K)にそれぞれ置換した変異体を作成し、野生型とともに酵母で発現させた。酵母での発現系は菌体外への分泌を促進するためにシグナル部分を短くしたものを用いたが、この系ではシグナル配列のプロセッシングは正しい位置でなされ、生産される組み換え酵素は、白麹菌の生産するキシラナーゼCと同じ性質を持つことが分かっている。RBB xylan 重層法によってプレート上でのキシラナーゼ活性の測定を行った結果、野生型、D37S、D37N、D37Eの順の大きさでハローの形成が観察された(図1-6-3)。一方、D37Kはハローを形成しなかった。

これらの野生型および変異型キシラナーゼを発現、精製した。ただし、D37Kは精製を試みたものの、蛋白質自体が得られなかったため、この変異体は安定性が低くなっていたか、何らかの原因で発現しなかったものと思われる。

精製後の酵素を用いて、さまざまなpHで活性測定を行った結果を図1-6-4に示す。野生型キシラナーゼCの最大比活性(pH 2.0で204 U/mg protein)を100%として表

した。D37Nでは最大比活性は野生型の約15%に低下したが、至適pHは5.0にシフトしていた。D37Sも同様に、比活性が低下(約10%)していたが高い至適pH(4.0~5.0)を示していた。グルタミン酸残基はカルボキシル基を持っているにも関わらず、D37Eは非常に低い活性を示し(約1.5%)、至適pHは3.0~4.0と思われるが、バッファー系の相違などによるものと考えられる誤差によって不明確となっていた。

また、野生型酵素とD37Nの耐酸性を調べた結果、変異体酵素の耐酸性は低下しておらず、低いpHでの比活性の低下は失活によるものではないことが分かった(図1-6-5)。

以上の結果から、キシラナーゼCの好酸性において、37位がアスパラギン酸であることの重要性が明らかになった。D37Nの至適pHについては予想通りアルカリ性側にシフトしたが、これは、酸性pH(2~4)での活性が大幅に低下しただけの結果ともとれる。この位置がアスパラギンまたはセリンになった場合の変化についての考察は、後に総合討論で述べる。D37Eの活性が大幅に低下した理由は不明であるが、メチレン基1つ分長いグルタミン酸の側鎖では、カルボキシル基が酸・塩基触媒のグルタミン酸と正しい位置で相互作用できないか、クレフトの入り口で立体障害になり基質の結合を阻害しているためと思われる。

1-6-10 D37N変異体の大腸菌での大量発現

D37N変異体のX線結晶構造解析のために、大量発現系の構築を行った。まず、酵母での発現系を用いて大量発現を試みたが、培地に分泌される酵素量が少なく、1Lの培養液から得られた精製酵素は0.4~0.8 mg程度で、結晶化および構造解析には不十分であることが分かった。そこで、大腸菌での大量発現系を構築することにした。

大腸菌での発現ベクターは、T7プロモーターを持つpET17bを用いて、GroEL/ESとの共発現系(101)で発現させた。大腸菌の場合には、白麹菌のシグナル配列は機能しないと予想されたので、シグナル配列部分を除いて、N末端にメチオニンが付加しただけの、ほぼ成熟酵素と同じ蛋白質が菌体内に発現するように設計した。

異常な高発現による封入体(Inclusion body)の蓄積を押さえるため、IPTGによる誘導後は培養温度を26.5℃にした。D37Nは耐酸性を有するので、菌体を破碎するバッファーに50 mM Na-citrate+HCl(pH 3.5)を用いることにより、大腸菌由来のほとんどの蛋白質を酸変性させることが可能であった。その後、DEAE-Sepharose FFカラム、Poros HQ/H カラムの順に精製を行った。精製の各段階におけるSDS-PAGEを図1-6-6に示す。1.5Lの培養から、4.7mgの精製酵素が得られた。なお、D37N変異体酵素の精製の際には、pH2.0および5.0で活性測定を行い、pH5.0の方が活性が高いことを確認した。

得られた精製酵素と、白麹菌由来のキシラナーゼC native酵素のCDスペクトルを図1-6-7に示す。その結果、変異酵素であり、かつ組換え体のD37Nも、native酵素と同様の2次構造をとっていることを確認した。

この酵素を、native酵素と同様の条件で結晶化したところ、野生型とほぼ同じ外見の結晶が得られた。この結晶を再びイオン交換水に溶解して、白麹菌由来のキシラナー

ゼC native酵素とともに、TOF-MSにより分子量の測定を行った(図1-6-8)。その結果、native酵素の分子量は19,872、D37Nは19,884であると測定された。native酵素の、遺伝子からの分子量の予測値は19,888である。一方、組換え体D37Nはメチオニンが付加したままの状態では20,016、メチオニンが除かれた場合は19,885である。TOF-MSによる測定精度の限界のために、組換え体にメチオニンが付加されているかははっきりとは言えないが、ほぼ予想通りの分子量であることが分かった。なお、今回の例のように、メチオニンの次の残基がセリンのような小さな側鎖を持つアミノ酸の場合は、高い効率でメチオニンが除かれることが分かっている(114)。

1-6-11 D37N変異体結晶の結晶化およびデータ収集

精製したD37N変異体の結晶化を行った結果、野生型の酵素と同様の条件で同様の結晶が成長することが分かった。

これらの結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構、放射光施設のビームラインBL6Aで2データセット(データセット2および3)、BL18Bで1データセット(データセット4)測定した(表1-6-1)。これらのデータセットを処理した際の統計的データを、3つ同時に処理した場合と、データセット4のみ処理した場合の両方示す(表1-6-2,表1-6-3,表1-6-4)。また、3つ同時に処理した場合の、各IPごとの相対的スケール因子と温度因子の差を図1-6-9に示す。データセット2および3は、温度因子の上昇が激しく、データセット4に比較して、あまり良くないデータであった。データセット2は17枚測定したが、後半のデータの質が悪いため、最初の12枚のみしか用いなかった。

次に、CCP4のプログラムtruncateによりwilson plotに基づいて温度因子を求めた結果、データセット2-4では 33.780 \AA^2 、データセット4のみでは 28.488 \AA^2 であった。

1-6-12 D37N変異体結晶構造の精密化

D37N変異体結晶構造の精密化の各段階を、表1-6-5に示した。

最初は、37番目の残基をアラニンにして精密化を行ったが、ステップ2の後に、アスパラギンの側鎖を加えた。ステップ2の後の2Fo-FcマップとFo-Fcマップを図1-6-10に示す。このマップから、アスパラギン側鎖の向きは、野生型と同じであると判断した。

構造の精密化においては、ステップ1-4ではデータセット2-4の反射を用いたが、最後のステップ5ではデータセット4のみの場合も行った。その結果、データセット4のみを用いた場合の方がR因子、フリーR因子ともに低く、電子密度マップもさほど違いがなかったため、今後の解析にはデータセット4のみの反射を用いて精密化したものを用いた。

1-6-13 D37N変異体の結晶構造

精密化後の2Fo-Fcマップ、および、野生型酵素との重ね合わせを、図1-6-11に示す。アスパラギン37のN δ 原子とグルタミン酸170のO ϵ 原子の距離は、野生型の場合(Asp37O δ -Glu170O ϵ で2.81Å)に比べて、若干離れた、2.99Åであった。しかし、Luzzatiプロットにより求めたD37N変異体結晶構造の座標の誤差は約0.3Åと見積もられるため、この距離の差は有意ではないと思われる。ただし、この距離は、今まで知られているどの酸性キシルナーゼのAsp37O δ -Glu170O ϵ 間距離よりも長い(1-5-10節参照)。

D37N変異体の2Fo-Fcマップ(図1-6-11a)では、アスパラギンの側鎖のC γ 原子あたりに、別向きの側鎖に当たるとされる電子密度が若干見られた。

37番目の残基をモデルから除外して計算したSA-omitマップを、野生型結晶の場合とD37N結晶の場合の双方で示す(図1-6-12)。野生型酵素ではSA-omitマップでもアスパラギン酸側鎖がはっきりと見えているのに対し、D37Nではアスパラギン側鎖の電子密度がほとんど見えなくなっており、C α -O δ 原子あたりに若干電子密度が見えるだけであった。これらの結果から、D37N変異体のアスパラギン37側鎖はグルタミン酸170との水素結合が弱くなっており、側鎖のコンフォメーションは比較的固定されていないことが示唆された。

Data set	Beam line	Camera length	Rotation axis	$\delta \omega$ (deg)	overlap (deg)	W.c.e. ¹ (deg/mm)	Oscill. times	Oscill. speed (deg/sec)	No. of IP	Total rotation angle (deg)	Average ring current (mA)
2	BL6A	286.5	— ²	6.4	0.4	2.0	15	2.0	17	102.4	300
3	BL6A	286.5	c'	4.4	0.4	2.0	15	2.0	16	64.4	345
4	BL18B	429.7	c'	6.0	0.5	2.0	20	2.0	11	59	277

表1-6-1 D37N変異体結晶について収集したデータの測定条件

¹ワイセンベルグカップリングコンスタント (フィルムを1mm動かす間の結晶の回転角度)

²a/b軸の対角とrotation axisをほぼ平行にした。

Data set	cell constant (Å)		missetting angles ¹ (deg)			mosaicity
	a/b	c	rotx	roty	rotz	
2 ²	61.974	113.343	-0.048	33.103	-78.192	0.291
3 ²	61.974	113.343	-36.636	-10.599	174.575	0.276
4 ²	61.974	113.343	-21.595	-2.326	178.439	0.070
4 ³	62.064	113.382	-21.601	-2.322	178.442	0.069

表1-6-2 D37N変異体のデータのポストリファインメントの結果

¹spindle axis を α 、vertical axis (spindle axis と beam axis に共に垂直な軸) を β とした場合からのずれで表した (図1-3-4 参照)。

²データセット2~4全てを同時に処理した場合。

³データセット4のみで処理した場合。

a

Shell		Summary of observation redundancies by shells:											
Lower	Upper	No. of reflections with given No. of observations											
limit	limit	0	1	2	3	4	5-6	7-8	9-12	13-19	>19	total	total(%)
80.00	4.31	10	7	27	17	30	119	173	394	869	92	1728	99.4
4.31	3.42	3	7	7	8	15	65	125	311	943	116	1597	99.8
3.42	2.99	3	4	5	11	22	66	96	328	908	126	1566	99.8
2.99	2.71	4	7	15	27	36	84	109	344	875	53	1550	99.7
2.71	2.52	2	10	26	36	54	119	148	396	743	14	1546	99.9
2.52	2.37	4	14	37	36	66	136	201	426	609	4	1529	99.7
2.37	2.25	3	20	37	50	88	181	222	451	497	0	1546	99.8
2.25	2.15	3	22	36	51	92	222	259	486	335	0	1503	99.8
2.15	2.07	9	24	43	73	109	265	311	502	190	0	1517	99.4
2.07	2.00	11	19	56	85	118	329	357	483	84	0	1501	99.3
All hkl		52	134	289	394	630	1586	2001	4091	6053	405	15583	99.7

測定した反射の数: 229,904 独立な反射の数: 15,583

b

Shell		I/Sigma in resolution shells:								
Lower	Upper	No. of reflections with I / Sigma less than								
limit	limit	0	1	2	3	5	10	20	>20	total
80.00	4.31	0	18	39	53	69	96	144	1584	1728
4.31	3.42	0	6	31	44	70	124	223	1374	1597
3.42	2.99	0	4	35	62	110	214	415	1151	1566
2.99	2.71	0	24	86	143	256	471	774	776	1550
2.71	2.52	0	33	135	258	430	722	1068	478	1546
2.52	2.37	0	38	193	364	628	957	1241	288	1529
2.37	2.25	0	57	231	458	747	1078	1324	222	1546
2.25	2.15	0	63	290	575	881	1158	1387	116	1503
2.15	2.07	0	88	357	675	1009	1278	1462	55	1517
2.07	2.00	0	90	425	808	1142	1380	1488	13	1501
All hkl		0	421	1822	3440	5342	7478	9526	6057	15583

c

Summary of reflections intensities and R-factors by shells										
Shell	Lower	Upper	Average	Average	Norm.	Linear	Square			
limit	Angstrom	I	error	stat.	Chi**2	R-fac	R-fac			
80.00	4.31	3547.5	59.6	26.1	1.380	0.048	0.061			
4.31	3.42	2353.2	39.8	20.8	1.723	0.061	0.070			
3.42	2.99	1028.9	22.8	16.0	1.566	0.083	0.087			
2.99	2.71	482.8	17.7	15.1	1.166	0.119	0.120			
2.71	2.52	288.2	17.0	15.6	0.987	0.165	0.165			
2.52	2.37	197.0	17.6	16.8	0.867	0.225	0.226			
2.37	2.25	174.2	20.6	19.9	0.826	0.272	0.327			
2.25	2.15	146.7	23.7	23.0	0.780	0.345	0.479			
2.15	2.07	131.2	27.0	26.6	0.731	0.403	0.567			
2.07	2.00	112.3	30.8	30.5	0.704	0.482	0.857			
All reflections		888.9	28.1	21.0	1.159	0.083	0.073			

$$R \text{ linear} = \frac{\text{SUM} (\text{ABS}(I - \langle I \rangle))}{\text{SUM} (I)}$$

$$R \text{ square} = \frac{\text{SUM} ((I - \langle I \rangle) ** 2)}{\text{SUM} (I ** 2)}$$

$$\text{Chi**2} = \frac{\text{SUM} ((I - \langle I \rangle) ** 2)}{(\text{Error} ** 2 * N / (N-1))}$$

表1-6-3 D37N変異体データセット2,3,4のスケールングにおける統計値

各resolution shell ことの.

a Redundancy (同一の反射を何回測定したか)

b I/σ

c χ^2 , Linear R-factor (R-merge), Square R-factor

a

Shell		Summary of observation redundancies by shells:											
Lower	Upper	No. of reflections with given No. of observations										total	total(%)
limit	limit	0	1	2	3	4	5-6	7-8	9-12	>13			
80.00	4.31	59	38	232	122	384	531	218	55	0	1680	96.6	
4.31	3.42	31	41	148	87	287	737	271	8	0	1579	98.1	
3.42	2.99	21	21	146	97	253	758	261	10	0	1546	98.7	
2.99	2.71	32	33	157	94	266	705	271	8	0	1534	98.0	
2.71	2.52	33	47	150	139	257	703	213	6	0	1515	97.9	
2.52	2.37	53	68	151	127	259	701	190	4	0	1500	96.6	
2.37	2.25	78	68	168	185	289	581	167	3	0	1461	94.9	
2.25	2.15	93	81	221	215	280	461	158	3	0	1419	93.8	
2.15	2.07	152	95	231	231	302	413	102	6	0	1380	90.1	
2.07	2.00	207	99	223	270	294	336	82	0	0	1304	86.3	
All hkl		759	591	1827	1567	2871	6026	1933	103	0	14918	95.2	

測定した反射の数: 80,520 独立な反射の数: 14,918

b

Shell		I/Sigma in resolution shells:									
Lower	Upper	No. of reflections with I / Sigma less than									
limit	limit	0	1	2	3	5	10	20	>20	total	
80.00	4.31	0	16	37	53	71	101	173	1507	1680	
4.31	3.42	0	16	41	57	85	141	249	1330	1579	
3.42	2.99	0	17	49	79	137	263	489	1057	1546	
2.99	2.71	0	29	101	176	300	520	843	591	1534	
2.71	2.52	0	48	174	289	474	771	1085	430	1515	
2.52	2.37	0	67	229	419	685	994	1246	254	1500	
2.37	2.25	0	83	286	513	778	1063	1270	191	1461	
2.25	2.15	0	90	347	614	880	1130	1312	107	1419	
2.15	2.07	0	121	424	702	1004	1209	1338	42	1380	
2.07	2.00	0	139	491	786	1069	1223	1296	8	1304	
All hkl		0	626	2179	3688	5483	7415	9301	5617	14918	

c

Summary of reflections intensities and R-factors by shells							
Shell	Lower	Upper	Average	Average	Norm.	Linear	Square
limit	Angstrom	I	error	stat.	Chi**2	R-fac	R-fac
80.00	4.31	14155.5	192.8	138.2	1.046	0.018	0.019
4.31	3.42	9605.1	152.0	118.6	1.265	0.025	0.025
3.42	2.99	4228.9	98.0	87.4	1.299	0.040	0.041
2.99	2.71	1945.2	78.5	75.1	1.183	0.067	0.059
2.71	2.52	1149.3	74.9	73.3	1.156	0.101	0.084
2.52	2.37	753.3	78.1	77.2	1.084	0.147	0.117
2.37	2.25	641.6	86.5	86.0	1.049	0.179	0.160
2.25	2.15	531.8	100.1	99.7	0.965	0.226	0.214
2.15	2.07	435.2	114.5	114.3	0.890	0.287	0.306
2.07	2.00	365.3	128.5	128.4	0.824	0.359	0.410
All reflections		3627.1	111.3	99.8	1.099	0.041	0.027

$$R \text{ linear} = \text{SUM} (\text{ABS}(I - \langle I \rangle)) / \text{SUM} (I)$$

$$R \text{ square} = \text{SUM} ((I - \langle I \rangle) ** 2) / \text{SUM} (I ** 2)$$

$$\text{Chi**2} = \text{SUM} ((I - \langle I \rangle) ** 2) / (\text{Error} ** 2 * N / (N-1))$$

表1-6-4 D37N変異体データセット4のスケーリングにおける統計値

各resolution shell ごとの、

a Redundancy (同一の反射を何回測定したか)

b I/σ c χ^2 、Linear R-factor (R-merge)、Square R-factor

Step	Resol.	reflections ¹	No. of waters	Method	R (%)	R _{free} (%)	Model building ²
1	8-2.5	Data set 2-4	—	rigid(20), positional(80)	SA ³ (2,000K),	26.1	36.4
2	8-2.2		—	rigid(10), positional(80), B ⁴ (15)	SA(2,000K),	25.32	32.24 Ala37→Asn
3			36	positional(40), B(15)		23.25	30.11
4	6-2.2		70	positional(40), B(15)		22.29	27.91
5a	80 2.2	Data set 2-4	86	positional(40), B(20), positional(20), B(20)	BSC ⁵ ,	20.57	26.79
5b	80 2.2	Data set 4	86	positional(40), B(20), positional(20), B(20)	BSC ⁵ ,	19.28	26.24

表1-6-5 精密化の各ステップ

¹反射ファイルは、最初はData set 2-4 を用いた。最後のステップ5では、Data set 2-4 (5a)とData set 4のみ(5b)の両方で行った。

²各ステップの後にプログラムOを用いて行ったモデル構築/修正。毎回行った側鎖および主鎖の構築、修正などは省略し、特に重要なものを付記した。

³Simulated annealing

⁴各原子ごとの等方性温度因子の精密化(Individual B-factor refinement)

⁵Bulk solvent collection

a

SacI 37 AspI

GATGGAGTGAGCTCCGACTTTGTCGTTGGTCTG

AspGlyValSerSerAspPheValValGlyLeu

GAGTGAGCTCCAAATTTGTCGTTGG D37N

GAGTGAGCTCCTCTTTGTCGTTGG D37S

GAGTGAGCTCCGAATTTGTCGTTGG D37E

GAGTGAGCTCCAAATTTGTCGTTGG D37K

b

	AspI	TspEI	ApoI
WT	○	×	×
D37N	×	○	×
D37S	×	×	×
D37E	×	○	○
D37K	×	○	○

AspI GACNNGTC
TspEI AATT
ApoI RAATTY

c

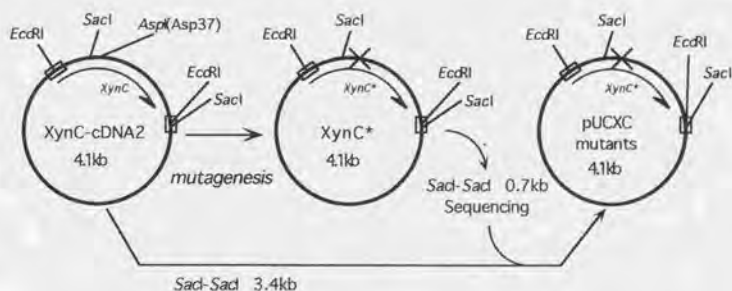


図1-6-1 部位特異的変異によるD37変異の導入

a野生型cDNAの配列と、変異を導入した際に用いたオリゴDNA。実際には、それらの相補的な配列を加えて、計8種のオリゴDNAを用いた。

b 変異の確認に用いた制限酵素の認識配列と、各変異体での切断の様子。

c 部位特異的変異導入とその後の乗せかえの概念図

a

Underline: signal

ProValLeuValSerArgSerAlaGlyIleAsn

Original CTGTGTTCTGGTGTCCGCGAAGTGCTGGTATTAAC

Primer1 XCNDE11 CTGTGTTCTGGTGCATATGAGTGCTGGTATTAAC

Nde I

Produced N-term

MetSerAlaGlyIleAsn

b

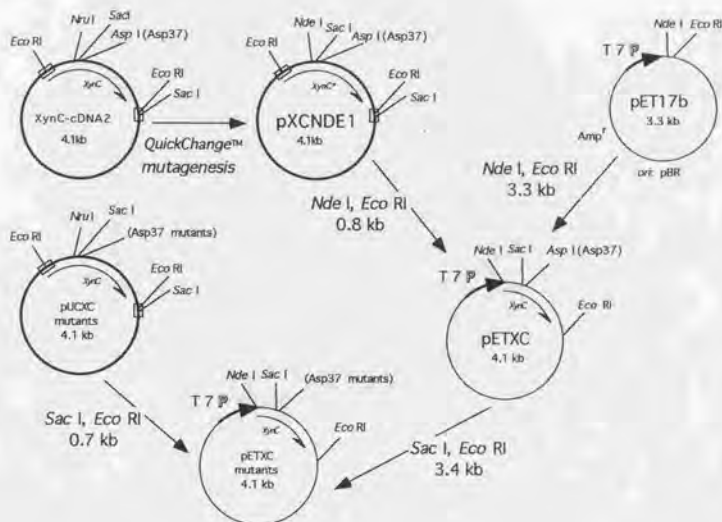


図1-6-2 大腸菌における発現系の構築

a 野生型cDNAの配列と、NdeI変異を導入した際に用いたオリゴDNA (XCNDE11)。

これと相補的な配列のオリゴDNAも用いた。

b 部位特異的変異導入とその後の乗せかえの概念図

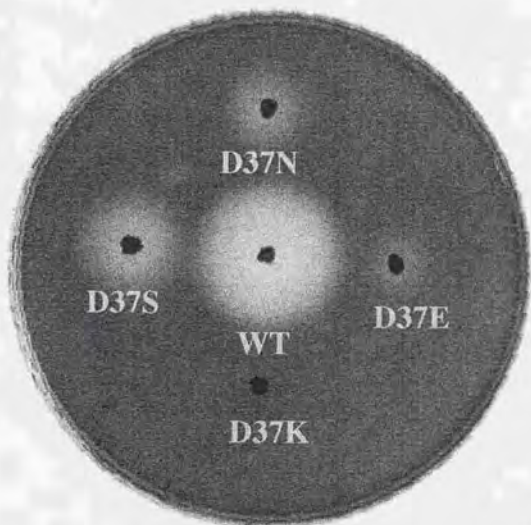


図1-6-3 野生型および各変異体の酵母での発現

RBB xylan重層法により、形成されるハローを観察した。

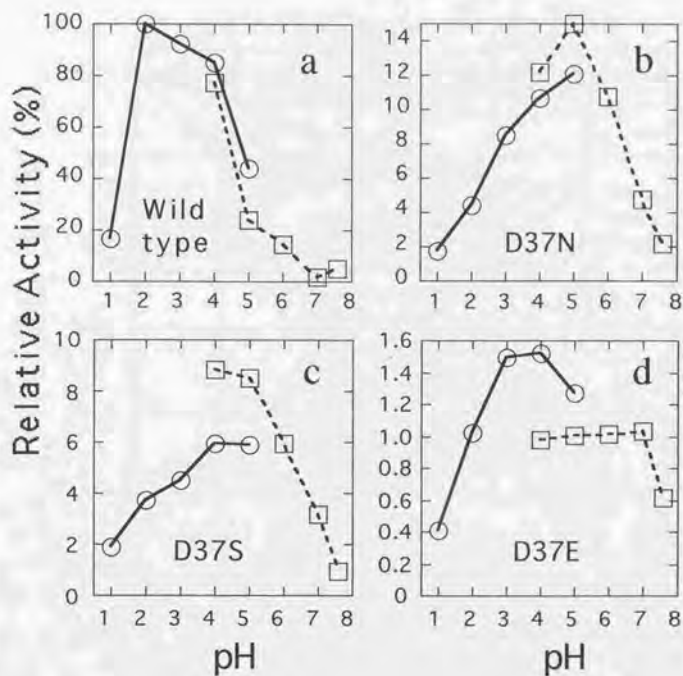


図1-6-4 野生型および各変異体の活性のpH依存性

野生型キシラナーゼCの比活性を100%として表した。

pH 1.0~5.0ではWalpoleバッファーを、pH4.0~7.5ではMcIlvainバッファーを用いた。

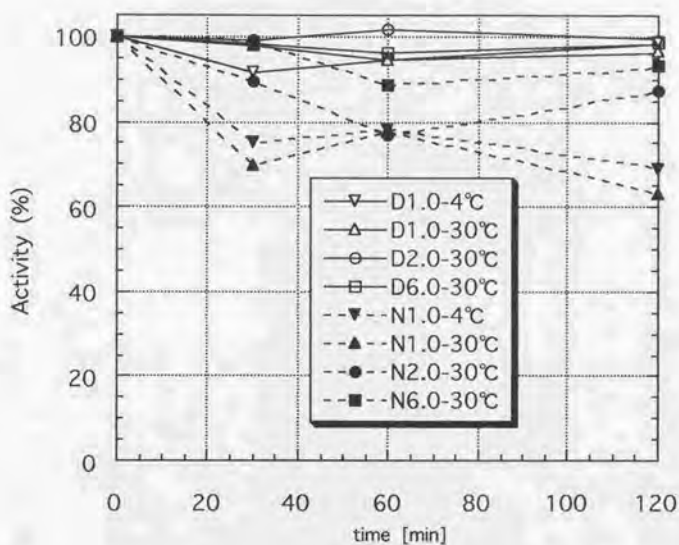


図1-6-5 野生型およびD37Nの各pHでの安定性

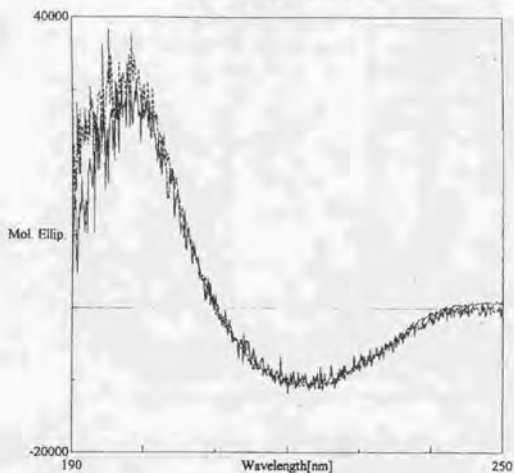
酵母で発現させた野生型キシラナーゼC(D)およびD37N(N)を、pH1.0, 2.0, 6.0, 4°Cまたは30°Cで、各時間インキュベートした後の活性を測った。
pH1.0と2.0にはWalpoleバッファーを、pH6.0にはMcIlvaineバッファーを用いた。



図1-6-6 大腸菌で発現させたD37N変異体の精製

左から、(1)マーカー、(2)菌体破碎後の不溶性画分、(3)可溶性画分、
(4)DEAE後、(5)Poros後

CD Spectra of WT XynC & XynC D37N (Recombinant)



— WT XynC
 - - - XynC D37N (Recombinant)

Filename : xc_jen
 Sample : WT XynC
 Cell Length : 0.1 cm
 Concentration : 0.0005 M
 Solvent : 10mM phosphate 6.0
 Temperature : Room Temp.
 Operator : Fushi
 Organization : Kousoken
 Comment :

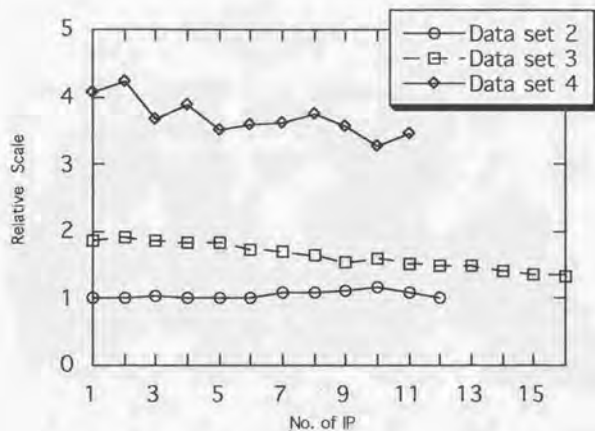
Data mode :	Mol. Ellip.	Band width :	1.0 nm
CH2-mode :	HT	Response :	0.125 sec
Range :	250 - 184 nm	Speed :	50 nm/min
Sensitivity :	20 mdeg		
Resolution :	0.1 nm		
Accumulation :	4		

図1-6-7 CDスペクトル

測定条件は下に示した。

白麹菌由来のキシラナーゼC native酵素（実線）と大腸菌で発現させたD37N（破線）のスペクトルを重ね合わせて表示した。

a



b

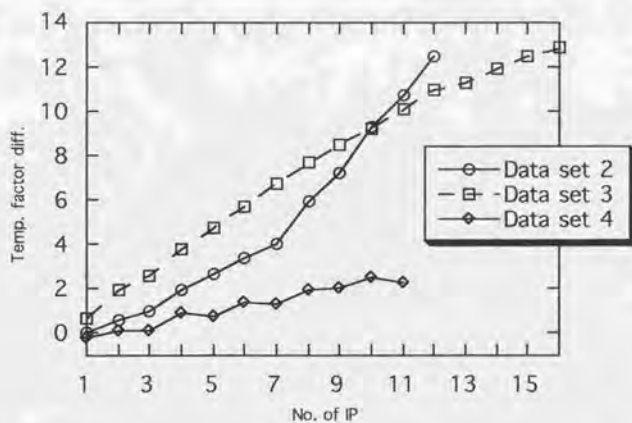


図1-6-9 D37N結晶のデータの相対的なスケール因子および温度因子の差

データセット2,3,4を同時に処理した場合の値。

a 相対的なスケール因子

データセット2の1枚目に対する相対的な値。

b 温度因子の差

データセット2の1枚目との差。

a



b

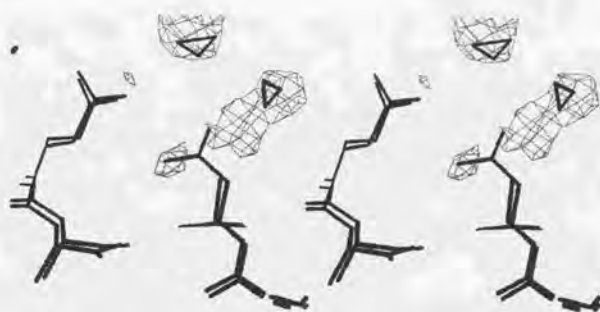
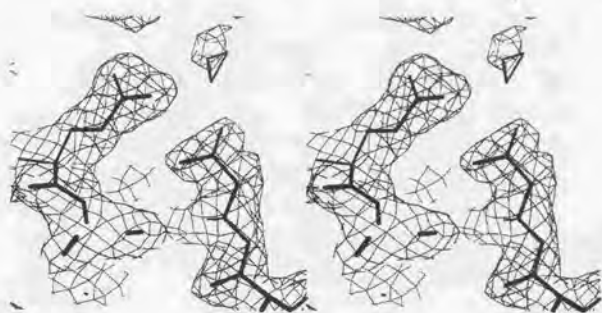


図1-6-10 D37N結晶の精密化ステップ2における電子密度マップ

D37N変異体のモデル分子 (Ala37) と、野生型キシラナーゼCのモデル分子 (Asp37)を重ね合わせて示した。

a 2Fo-Fcマップ、b Fo-Fcマップ。

a



b

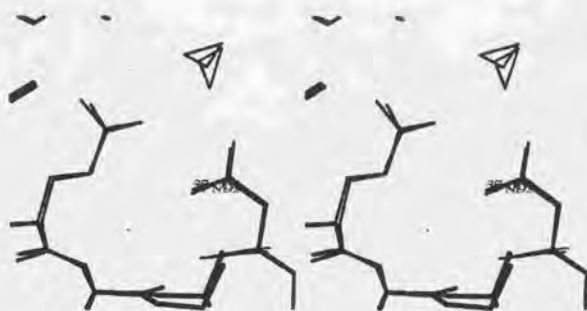


図1-6-11 D37N結晶の精密化（ステップ5b）後の結果

ステレオ図で表した。

a D37N変異体のモデル分子とその $2F_o-F_c$ マップ (1.0σ)。

b D37N変異体と野生型キシラナーゼCの重ね合わせ。

a



b

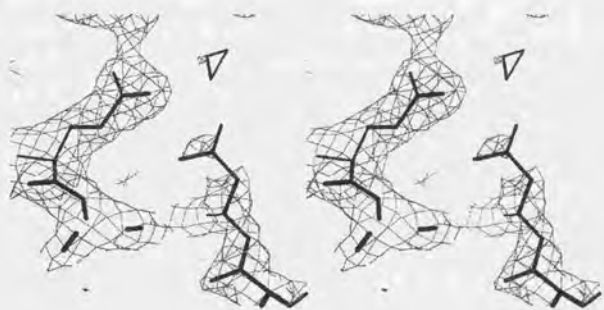


図1-6-12 SA-omit マップの比較

ステレオ図で表した。

a 野生型キシラナーゼC結晶のSA-omitマップ (1.0σ)

b D37N変異体結晶のSA-omitマップ (1.0σ)

キシラナーゼの活性のpH依存性について

キシラナーゼCのアスパラギン酸37変異酵素の解析により、37番目の残基がアスパラギン酸であることが、低いpHで高い活性を持つために必要であることが明らかとなった。D37Nの至適pHの上へのシフトは、アミノ酸配列の比較からの予想と一致していた。D37Sの、D37Nと同様な結果については、もともとこの部位にセリンをもつキシラナーゼが存在しないために、興味深い。セリン残基は、アスパラギン残基と同様の位置で、水素結合のproton donorとしてのみ機能するため、アスパラギンも同様にNH₂基の側をグルタミン酸に向けて、proton donorとして寄与しているのではないと思われる。

なぜ、酸・塩基触媒のグルタミン酸の近傍のアスパラギン酸が低いpHでの活性を上昇させて、アスパラギンではそれがおこなえないかという理由については未だに議論の余地がある。序論で述べた通り、酸・塩基触媒のグルタミン酸はBCXでは6.7と異常に高いpKaを持っており、求核性触媒のグルタミン酸のpKa (BCXでは4.6) と、それぞれ、活性pHの上限と下限を決定していると考えられている(28)。しかし、このBCXにおける知見は、酸性キシラナーゼには適用できない。なぜなら、酸・塩基触媒のグルタミン酸170と相互作用しているアスパラギン酸37の変異は低いpHでの活性を大幅に下げ、見掛け上、活性pHの下限に作用していたからである。

酵素反応の最初の段階では、グルタミン酸170は酸触媒として基質の酸素原子にプロトンを渡す必要がある(図1-7-1)。グルタミン酸170のプロトン化状態は、アスパラギン酸37との水素結合によって安定化されている。2つのカルボキシル基の間の水素結合は、片方が解離した状態に比べて、両方がプロトン化している状態の方が弱いことが、定量的に示されている(103)。従って、アスパラギン酸が低いpHでのみ、グルタミン酸170は容易に解離して反応を助けると考えられる。

アスパラギン酸残基のかわりに、アスパラギン残基が存在するキシラナーゼの場合には、このようなpH効果は見られない。さらに、中性キシラナーゼの結晶構造では、アスパラギン残基は酸・塩基触媒のグルタミン酸との距離が遠く、強い水素結合は作っていないために中性pHの活性が高く、求核性触媒のグルタミン酸のpKaの影響が活性pHの下限を決定している。しかし、キシラナーゼCのD37N変異体の構造解析から、この水素結合は若干弱くなっていると示唆されたため、D37NとD37Sの活性が低下していたことはこの残基の影響だけでは説明できない。従って、これらの変異体の活性の低下は、アスパラギン/セリン37の周辺が中性キシラナーゼと異なっているためであると思われる。

1-5-9節と1-5-11節では、他のキシラナーゼの結晶構造との比較から、基質結合クレフトの入り口に存在する酸性残基と、クレフトを形成する芳香環を持つ残基のうちいくつか、キシラナーゼCの好酸性に寄与している可能性が示唆された。Torrönenらは、酢酸、グルクロン酸などで修飾されたキシラン分子の認識と基質特異性に、活性部位の負電荷が重要であると述べている(49)。しかし、クレフトの負電荷は活性のpH依存性に

も寄与している可能性がある。カルボキシル基がプロトン化する低いpHでは、クレフトとキシランとの間の静電的反発が弱まるはずである。さらに、プロトン化したカルボキシル基は水分子の結合力が弱まるので、基質の結合が容易になると思われる。

サブサイトを形成する芳香環を持つ残基の寄与も、今後、変異体の解析等を通じて検証する必要がある。特に、BCXのキシロピオースとの複合体構造(23)およびTRXIIのエポキシアルキルキシロシドとの複合体構造(26)では、キシラナーゼCのチロシン10にあたるトリプトファン残基がキシロース環とサブサイト-2でスタッキング相互作用している。さらに、チロシン10/トリプトファンと、トリプトファン172/チロシン残基はアスパラギン酸37/アスパラギン酸残基の近傍に位置している。トリプトファンの大きな芳香環は、触媒サイクル中に起こる可能性のあるアスパラギン酸37/アスパラギン残基の構造変化の立体障害になる可能性がある。また、トリプトファン172と、それにあたるチロシン残基のコンフォメーションの違いや、サブサイト+1に位置しているフェニルアラニン131と、完全に保存されているグルタミン129、求核性触媒のグルタミン酸79が順に相互作用をしていることなどは、これらの残基の重要性を示唆するものである。

Bacillus sp. 41M-1のアルカリ性キシラナーゼJは、アスパラギン酸20→アスパラギン、あるいはトリプトファン144→フェニルアラニンの置換により、至適pHが9.0から6.0へとシフトすることが報告されている(104)。キシラナーゼJと本酵素のN末端部分の相同性は低いために、前者の置換については詳細は不明である。しかし、後者の置換は本酵素のフェニルアラニン131に当たる残基であり(図1-5-11)、キシラナーゼCでのフェニルアラニン131→トリプトファンの変異体がどのような活性を示すのか興味深い。

ジスルフィド結合について

キシラナーゼCはほとんどのキシラナーゼには見られないジスルフィド結合を持っていた。しかし、ジスルフィド結合の導入によるキシラナーゼの耐熱化の例や(105, 106)、ジスルフィド結合を持つ耐熱性キシラナーゼの報告(42)はあるが、これらはどれもキシラナーゼCのジスルフィド結合とは異なる位置に存在している。一方、キシラナーゼCの耐熱性は普通(40℃まで安定(11))であり、その間に存在するアミノ酸配列も18残基ほどの短い部分であるため、ジスルフィド結合の耐熱性への寄与は小さいと思われる。同様の位置にジスルフィド結合を持つ*Cryptococcus* sp. S-2の酸性キシラナーゼで部位特異的変異によりこれを除いた場合には、耐酸性にはあまり変化はなく、好酸性が若干落ちるといった結果が得られた(Iefuji:私信)。この結果から、耐酸性についてもジスルフィド結合の寄与は低いと考えられる。

キシラナーゼCの耐酸性について

キシラナーゼCの「セリン・スレオニン表面」が負電荷に覆われていたという事実は、アミノ酸配列からは予測が困難であった。なぜなら、この表面の酸性残基は、ほとんどが、保存性が低く挿入/欠失の多いN末端のヘリックス状の部分に存在していたからである。このような負電荷に覆われた表面は、キシラナーゼC(およびANXI)のみが持

つ特徴であった(ただし、ANXIの結晶構造の報告には、この特徴については触れられていない)。このような構造的な特徴は、キシラナーゼCの耐酸性機構の、主要な原因ではないかと考えられる。

豚のペプシンは、pH2.0以下で高い活性を持ち安定であり、よく研究されている酵素である(107, 108)。ペプシンは、キシラナーゼCのように塩基性残基に比べて多くの酸性残基を持つ蛋白質であるが、キシラナーゼC (pI3.5)に比べて、非常に低いpIを持つ(pI1.0以下)。これは、ペプシンのカルボキシル基のいくつかはその異常な水素結合の環境により低いpKaを持つために、非常に低いpHでも全体で負に帯電しているものと考えられている。このように低いpIは、ペプシンの耐酸性に寄与していると考えられている。すなわち、低pHでカルボキシル基の多くがプロトン化しても、通常のpIを持つ蛋白質のような正電荷同士の反発が起こらないために変性が起こらないと説明されている。

一方、キシラナーゼCでは、9個のアスパラギン酸と8個のグルタミン酸にC末端の計18個のカルボキシル基が存在するが、このような異常な水素結合の環境を持ち低いpKaを持つ可能性がある酸性残基はわずか3残基(Glu79, Glu84, Asp104)しか見つからなかった。分子内に埋め込まれたヒスチジン148は異常に低いpKa値を示すため(109)、キシラナーゼCは、酸性pHでは少なくとも5つの正電荷をもつ残基がある。これらは、N末端のアミノ酸と、溶媒に露出したヒスチジン(His155)と、3つのアルギニン(Arg115, Arg134, Arg138)である(リジンは存在しない)。トータルで、pH3.5以下ではキシラナーゼCは正に帯電している。しかし、正電荷の反発は変性を引き起こすほど激しくないとと思われる。

電荷の反発と蛋白質の安定性という点から考えると、表面に塩基性残基より酸性残基が多く存在する分子の場合は、中性pHでは負電荷同士の反発が起こるために不安定になるはずである。ペプシンの場合はこれがあてはまり、pH6.5以上で急速に失活する。しかし、同様に酸性残基の多いキシラナーゼCはpH9.0程度まで安定である。このような中性pHでの安定性の違いは酸性残基の表面上での分布の違いに由来すると思われる。キシラナーゼCの酸性残基は、「セリン・スレオニン表面」と基質結合部位クレフトの周辺に集中しているために、これらの酸性残基のうちいくつかは、お互いの静電的相互作用のために通常より高いpKaを持つはずである。

興味深いことに、2種類の耐塩性蛋白質の結晶構造でも表面に酸性残基が多く存在しており、それらが高塩濃度での安定性に寄与しているという報告がある(110, 98)。特に、*Haloarcula marismortui*のフェレドキシンの結晶構造では、多くの負電荷を持つ2つのヘリックスが新たに見つかった。この構造の回折データは低温条件(100K)で測定されたため、蛋白質に結合している水分子は通常の蛋白質の場合に比べてより多くの水素結合を作っており、表面のカルボキシル基は特に水分子が多く結合していた。Frolowらは、これらの負電荷を持ったカルボキシル基は、飽和塩中での多量の無機陽イオン中においても蛋白質をより水和した状態に保ち、蛋白質同士の凝集(self-aggregation)を防ぐとしている。しかし、酸性残基はイオン化した状態では多くの水を結合するが、低いpHでプロトン化した状態では水の結合力は落ちる(111)。従って、キシラナーゼCに

結合した水が酸変性を防ぐという説明は、不適當である。なお、キシラナーゼCの回折データは室温で測定したために、分子表面の酸性残基の側鎖の多くはdisorderしており、これら酸性残基の近くに水分子はほとんど見られなかった。

逆に、非常に高いpHでの蛋白質の安定性に関する報告もある。pH 12.3に至適pHを持つサチライシンファミリーのプロテアーゼでは、分子の片側に多くのアルギニン残基が偏在していることが分かっている(112)。これは、分子系統樹による解析から、酸性残基とリジン残基の減少が、アルギニン残基と中性な親水性アミノ酸（ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン）の増加に伴って起こっていることが明らかにされている。

極限的なpH条件や塩濃度で安定に存在する蛋白質の分子表面に電荷を持つ残基が偏在していることは普遍的なものであると思われるが、その安定化機構については未だに詳しいことは分かっていないのが現状である。

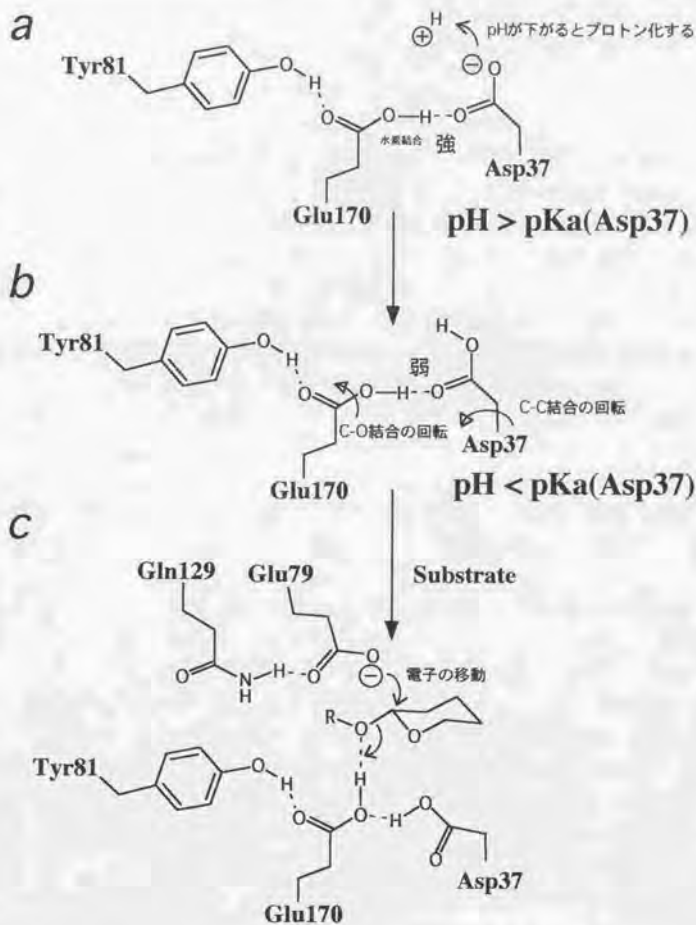


図1-7-1 酸性キシラーゼの反応機構

以下に示す条件において、酸/塩基触媒のグルタミン酸の近傍に存在すると予想される水素結合を、保存されているチロシン81も含めて表した。

a 高いpHでアスパラギン酸37が解離している場合。

b 低いpHでアスパラギン酸37がプロトン化した場合。

c 基質結合後のアシル中間体の形成における求核攻撃および酸触媒aにおけるアスパラギン酸とグルタミン酸間の水素結合は、bに比べて強いために、グルタミン酸がプロトンを渡しにくくなっている。

第2部

ハイブリッド酵素を用いたアロステリックラー乳酸脱水素酵素のサブユニット間相互作用に関する研究

現在、蛋白質の立体構造を決定する方法としては、NMRとX線結晶構造解析が主な方法である。だが、NMRでは大きな蛋白質分子の構造を決定するのは難しい。一方、X線結晶構造解析によって決定される構造は、一般には結晶中の静的な構造しか得られない。実際の蛋白質は非常に柔軟な構造をとっており、それが誘導適合やアロステリック調節などにおいて主要な役割を果たしていることを考えると、蛋白質の機能を知るためには、その結晶構造に加えて、溶液中での動的な挙動を知ることが必要である。

本研究の対象となったアロステリック酵素は、構造変化と共にその活性を大きく変化させる蛋白質である。アロステリック酵素は生体内反応の調節に重要な働きをしており、古くからよく研究されている。近年、そのいくつかで高活性状態と低活性状態の両方の構造があいついで決定され[1-3]、アロステリック機構の研究は大きな進歩を遂げたといわれている[1,4,5]。しかし、それらの構造を得た現在でも実際の構造変化と機能調節の機構は不明な点が多いため、アロステリック機構の研究は新たな局面を迎えたとも考えられる。

本研究では、ピフィズス菌 *Bifidobacterium longum* のL-乳酸脱水素酵素 (LDH) を対象とした。LDHは解糖系の最終反応を触媒する酵素であり、細菌から脊椎動物に至るまで多岐にわたってその存在が確認されている。LDHはNADH/NAD⁺を補酵素とし、ピルビン酸/乳酸の間の酸化還元反応を触媒する(図2-1)。この反応はTCAサイクルやアルコール発酵への分岐点に当たるので、LDHの調節は代謝系全体の制御にとっても重要である。LDHはその性質の違いによって二種類に分けられる。一つは、主として脊椎動物など高等生物の生産するLDHであり、アロステリックな調節因子は存在せず常に活性型を示す[6]。これに対してもう一方は主として細菌の生産する酵素にみられるもので、フルクトース-1,6-二リン酸(FBP)で活性化されるアロステリックな酵素である[7]。FBPは解糖系の中間体であり、そのFBPが解糖系の最終段階を触媒するLDHをアロステリックに制御することによって代謝系の制御が行なわれている。

脊椎動物型LDHは組織によって異なったアイソザイムが優勢に存在している。嫌気的な骨格筋のM型と好気的な心筋のH型はともに四量体で、サブユニット組成の異なる5種類の四量体が電気泳動で識別できることはよく知られている。構造、機能解析についてはRossmannらのツノザメ筋肉LDHのX線結晶解析やHolbrookらによる反応機構の解析などが行なわれており、リガンドの結合部位、反応機構などの知見が得られている[6]。細菌LDHについては、*Bacillus stearothermophilus* (BSLDH)[8-10]、*Lactobacillus casei*(LCLDH)[11-13]及び*Thermus*由来の酵素[14-23]で研究が進められている。これらの研究から脊椎動物のLDHと細菌のLDHの一次構造は35~40%の高い相同性があり、またBSLDH[24-26]、LCLDH[27]について行なわれた結晶構造解析により高次構造にも高い相同性があることが分かっている。このようにアロステリックLDHは、構造のよく似た非アロステリック型LDHに関する膨大な知見を基礎とでき、アロステリック転移機構の解析に適した材料と考えられる。

*Bifidobacterium longum*由来のLDH(BLLDH)は、本研究室の岩田、箕輪により初めて単離精製、及びクローニングされた[28-31]。そのLDHは他の細菌LDHと同様四量体のアロステリック酵素であり、FBPによるヘテロトロピックな活性化と基質によるホモトロピックな活性化を受ける(図2-2)。さらに、高濃度のピルビン酸条件下で活性が低下する現象である、基質阻害も受ける。基質阻害は脊椎動物型LDHを含め全てのLDHで普遍的に存在する現象である。ピフィズス菌は特殊な代謝経路をしており、アルドラーゼを持たずFBPは糖代謝系の中継体ではないが(図2-3)[33,34]、そのLDHは*in vitro*の実験において非常に低濃度のFBPによって活性化されることが分かっている[30]。

タンパク質のアロステリック特性を説明するモデルには、1)タンパク質分子の構造変化は常に対称的であり、高親和性状態(R状態)と低親和性状態(T状態)の間の変化は一斉に起こると仮定するMonod, Wyman, Changeuxの協奏的アロステリックモデル(MWCモデル)[35]と、2)T状態からR状態への変化は逐次的であると仮定するKoshland, Nemethy, Filmerの逐次モデル(KNFモデル)[36]の2つが考えられてきた。本酵素のような4量体でT-R状態の平衡において存在する全ての分子種を考えると図2-4の様になり、MWCモデルは図の両端を、KNFモデルは図の対角線上を動く場合と考えられる。

本酵素は基質ピルビン酸に対する高親和性型(R状態)および非親和性型(T状態)の両方の四量体が同一結晶格子中に存在する構造が明らかにされており[2,37]、それらの構造から、MWCモデルに従ったアロステリック転移機構が提唱されている。図2-5、図2-6にT状態およびR状態の三次構造及び四次構造を示す。本酵素の四量体は両状態とも、脊椎動物LDHと同様P, Q, Rと呼ばれる3本の2回回転軸で関係づけられる222対称性を有しており、サブユニット内の構造は大変よく似ている。しかし両構造間には、サブユニット間の回転による四次構造の変化がみられる。FBP結合部位は、P軸サブユニット結合部に存在しFBPの結合により四次構造変化に影響をもたらす。活性部位はQ軸サブユニット結合部に存在し、四次構造変化の影響を受けて構造が変化することで活性が制御されている。特に、基質のカルボキシル基と結合するため活性部位に不可欠なArg171はその側鎖の位置を大きく変化させ、T状態では基質と結合できない構造をとっている(図2-7)。今まで構造解析されたほとんどのアロステリック酵素においても、四次構造の変化に基づくサブユニット間の回転によるアロステリック転移機構が示されており[3,38-40]、四次構造の変化がアロステリック酵素の基本的なメカニズムであると考えられる。

さらに本研究室の鎌田によって、野生型酵素及びFBP結合部位を構成するアミノ酸残基を置換した変異型酵素のアロステリック転移機構が詳細に調べられた[32]。その結果、NADHの蛍光強度の測定と変異型酵素のX線結晶構造解析によって、本酵素のアロステリック特性が基本的に岩田らの提唱したモデルに従うことが明らかになった。さらに、基質だけでなくNADHの結合にも協同性が見いだされた。これはNADHの結合部位がほとんど変化していない結晶構造からは予測できなかったことである。

以上のように、本酵素のアロステリック転移機構は主に四次構造変化によるものであり、サブユニット間相互作用が重要な役割を担っていると考えられる。また、結晶構

造から得られたモデルは2つの対極的な静止像にすぎず、実際の活性化機構は完全に解明されたとはいえない。従って本研究では、2種類の異なるサブユニットが混在するハイブリッドLDHを用いることにより、溶液中でのサブユニット間相互作用を調べることに主眼をおいた。

ハイブリッド酵素を用いる実験は、Gibbonsらのアスパラギン酸トランスカルバミラーゼ(ATCase)を用いた先駆的な実験によって[41]アロステリック機構を解明するのに有用な方法であることが示された。本酵素においてもT、R両状態の結晶構造が得られる以前、本研究室の横田、北村らによる変異型酵素とのハイブリッドLDHを用いた実験が行なわれており、アロステリック機構について解析している[42-44]。本研究では横田らの方法を結晶構造に基づいて一部改良した系を確立して、ほぼ同様の実験を行なったが、全く異なる結果を得た。(横田らの結果と異なる点に関しては、総合討論で議論する。)

さらに、ハイブリッド酵素を用いた実験は、アロステリック機構の解析の他にも、さまざまなサブユニット間相互作用を調べるのに有用な方法である。例えば、脊椎動物型LDHアイソザイムの研究では、2種のアイソザイムLDHを*in vitro*で混合して、形成されるハイブリッドLDHを解析することにより、サブユニット間の相互作用の解析が行なわれてきた[45]。

本研究では、まず、2種のサブユニットが混在するハイブリッドLDHを*in vivo*で形成し、分離する系を確立した。そして、さまざまな変異体同士を組み合わせたハイブリッドLDHを解析することにより、アロステリックな活性化を中心とした本酵素の諸性質に対するサブユニット間相互作用の役割を調べた。さらに、*in vitro*でサブユニットを組み替えてハイブリッドLDHを作る条件から、サブユニット界面の相互作用の強さおよび性質について検討した。

本論文は6章からなる。第1章では、*in vivo*でのハイブリッドLDHの形成およびその分離系を確立した。第2章では、FBP脱感作型サブユニットを用いて本酵素のヘテロトロピック活性化機構の解析を行なった。第3章では、基質特異性変異型サブユニットを用いてホモトロピック活性化機構の解析を行なった。第4章では、*in vitro*でのハイブリッドLDH形成の実験を行なった。第5章では、不活性型サブユニットを用いて基質阻害の機構の解析を行なった。第6章では、本研究室で以前に行なわれたハイブリッドLDHによる研究との相違点について論じるとともに、本研究で得た新たな知見に基づいてアロステリックな活性化の機構について考察した。

注：LDHには、その一次構造の高い相同性により、N-システムという各LDHに共通の残基番号が考案されている[46]。本論文でも特記しない限りN-システムによる残基番号に従った。

材料と方法

1) 試薬と酵素

実験に用いた試薬は、全て和光純薬工業株式会社または半井化学薬品株式会社の特級試薬を用いた。ピルビン酸ナトリウムとNADHはそれぞれBoehringer Mannheim及びライフテック・オリエンタル社から購入した。遺伝子操作に用いた制限酵素、DNA修飾酵素、DNase Iは宝酒造、東洋紡績及びBoehringer Mannheimから購入し、反応条件についてはその説明書に従った。

2) 遺伝子操作

合成DNAは全てアプライドバイオシステムのDNAシンセサイザー380Bにより合成し、後処理後、260nmの吸光度により定量して用いた。部位指定変異はBio-Rad社のキット(MUTA-GENE *in vitro* mutagenesis kit)を用いて、Kunkel[47]の方法に従って行ない、DNA断片はアプライドバイオシステムのDNAシーケンサー373Aにより変異の導入を確認した。その他の遺伝子操作は全てMolecular Cloning[48]に従った。

今回使用した野生型を含む全ての変異型LDHはCys210BをSerに置換することにより、空気酸化に耐性を持たせてある。この変異型LDHはpH 6、ピルビン酸2 mM、20 mMの条件において、比活性、FBPによる活性化の特性ともに全く野生型酵素と同一であることが確認されているので以後この酵素を野生型として扱った。以前の岩田、横田、北村、鎌田らの研究においても、この変異体LDHは野生型として扱われている。

3) 各種ldh遺伝子の大腸菌内での発現

酵素の大腸菌での発現は、*Escherichia coli* MV1184株を宿主として行なった。3 ml、100 ml、1リットル培養には、それぞれ試験管、500 ml坂口フラスコ、5リットル瘤付き三角フラスコを用いた。2xYT培地(アンピシリン 50 μ g/ml)にトランスフォームされた大腸菌の一夜培養液を1%加え37°Cで濁度(660 nm)が約0.8になるまで振盪培養後、終濃度0.5 mMとなるようにIPTGを加えさらに3時間培養後集菌した。

4) 各種LDHの精製

大腸菌を集菌後、菌体の5~10倍量の0.1 mM PMSF、10 ppm DNase I、0.1 mM FBPを含む20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁し、氷浴中でBranson sonifierにより菌体を超音波破碎し、遠心分離の上清を取り抽出液とした。この抽出液を熱処理(65°C、30 min)し、その可溶性画分をファルマシア社のFPLCを用いて、下記の担体と条件によりカラムクロマトグラフィーを行なった。カラムにかけるサンプルは平衡バッファーで透析した。以下に平衡バッファー、溶出バッファーを示す。

ブチルトヨバル650 S

平衡バッファー Tris-HCl (20mM, pH7.0) 硫酸30%飽和

溶出バッファー Tris-HCl (20mM, pH7.0)

溶出は硫酸30~0%飽和の直線濃度勾配による。またカラムにかけるサンプルは事前の透析をせず、30%飽和になるように硫酸を入れた後沈殿を遠心分離により除いて用いた。

Blueセファロース(Pharmacia)

平衡バッファー Tris-HCl (20mM, pH7.0)

溶出バッファー Tris-HCl (20mM, pH7.0), KCl (0.5M), NADH (0.1mM)

陰イオン交換カラム Mono Q (Pharmacia)
平衡バッファー Tris-HCl (20mM, pH7.0)
溶出バッファー Tris-HCl (20mM, pH7.0), KCl (0.5M)
溶出は流速1.0ml/minでKCl 0-0.6Mの直線濃度勾配による。

5) 蛋白定量

BCAキット(Pierce)を使用した。精製された酵素については、0.1 NaOH中での280 nmの吸光度により定量した (Tyr, Trpのモル吸光係数をそれぞれ1576, 5225 M⁻¹cm⁻¹とした)。

6) 活性測定法

標準活性測定は箕輪、岩田らの方法に従った。活性測定溶液 (MES-NaOH 50mM, pH6.0, NADH 200 μM, Pyr 2mM, FBP 0.1mM) 500 μlをプラスチック製マイクロセルに入れ30℃で10分間保温した後、酵素溶液5 μl (終濃度4.3 nM・四量体ではなくサブユニットで計算した値。0.148 μg/mlに相当する。)を加え、分光光度計を用いてNADHの340nmの減少を測定した。1分間に1 μmolのNADHの酸化を触媒する活性を1unitとした。。ビルビン酸、オキサロ酢酸、FBP、オキサム酸などの飽和曲線の測定では、特に示さない場合、上記の標準活性測定法をもとにそれぞれの試薬の濃度を変化させて活性を測定した。

7) 飽和曲線のフィッティング

V_{max}, S1/2(Pyr) (ビルビン酸のS1/2) およびnH (ヒル係数) は、Hill equationに従って計算した。。

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{(\text{pyruvate})^{nH}}{(\text{pyruvate})^{nH} + (S_{1/2})^{nH}}$$

ただし、活性のあるサブユニットが一つしかないハイブリッドLDHの場合および双線型の飽和曲線のフィッティングはMichaelis equationに従った。なお、Michaelis equationのK_mも、S1/2と表した。

S1/2(FBP) (FBPのS1/2) はMichaelis equationに従って計算した。

曲線のフィッティングはKaleidagraph (Abelbeck Software)で行った。

8) SDS-PAGE

SDS-PAGEは、Laemmliの方法に従った[49]。

9) Native-PAGE

Native-PAGE(非変性条件下のPAGE)は、ゲルおよびバッファー中からSDSおよびβ-メルカプトエタノールを除いた以外、Laemmliの方法に従った。ゲル濃度は5%のものを用いた。ゲルを作る際、Lower Gelが固まって上に乗せておいた水を捨てた後、Lower Gelの上面をUpper Gel溶液(過硫酸アンモニウムとTEMEDを入れる前)で共洗いすることにより、Lower GelとUpper Gelの界面での条件を一定にした。サンプルバッファー(Glycerol 10%, Upper Gel Buffer 1/4 vol., Bromophenol blue 0.002%)をサンプルと約10 μlづつ等量混合して泳動に用いた。活性染色の場合以外は、クーマジール染色を行なった。

10) Native-PAGE後の活性染色法

LDHの活性染色については、基本的に横田の方法に従った[42]。以下に活性染色

法を示す。

・Native-PAGE後、ゲルを(50mM MES-NaOH(pH6.0))中でゆっくりと10分間振とう。

・活性測定溶液(50mM MES-NaOH(pH6.0), NADH(0.2mM), Pyr(5mM), FBP(0.1mM))中でゆっくりと10分間振とう。

・ゲルをガラス上に広げ、乾燥しないようにラップをかけ、室温で放置。時間は、酵素活性による。

・紫外線照射によるバンドの確認。(紫外線を照射するとLDH活性をもつバンドはNADHの蛍光がなくなることにより黒く抜ける。)

1 1) Native-PAGEの画像解析

クーマジー染色したバンドの定量には、乾燥させたゲルを用いた。スキャンした画像はソフトウェアNIH-Imageにより解析した。

等間隔に分離された各ハイブリッドLDHのバンドを含む、矩形の一定面積の濃度の積算値からバックグラウンドを引いた値を用いた。同じゲルで標準量の精製LDHを流して、検量線の線形性の確認も行なった。

1 2) 蛍光測定

基本的に鎌田[32]の方法に従った。測定条件は図に示した。

1 3) CDスペクトルの測定

CDスペクトルは、日本分光のJ-720 Spectropolarimeterで測定した。測定条件は、以下の通りである。

光路長	0.1cm	蛋白質濃度	0.5918 mM
バッファー	10 mM リン酸バッファー (pH 7.0)		
温度	25℃		
Ch2-mode	HT	Sensitivity	10 mdeg
Accumulation		8回	バンド幅 1.0 nm
Response	0.125秒	Speed	50 nm/min

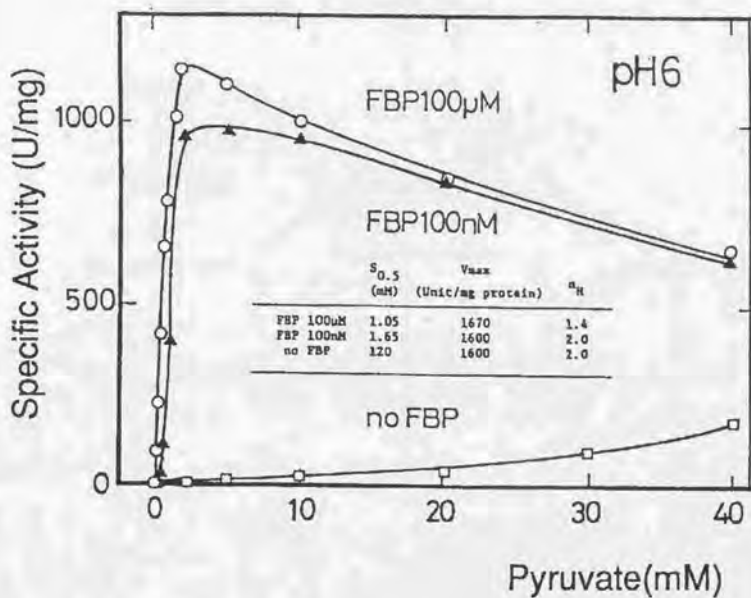


図2-2 野生型BLDHのピルビン酸飽和曲線

FBPによるヘテロトロピックな活性化により、
 FBPの添加で強く活性化される。
 基質(ピルビン酸)によるホモトロピックな活性化により、
 FBP非存在下での飽和曲線はシグモイダルになる。
 高濃度の基質存在下では基質阻害が起こる。

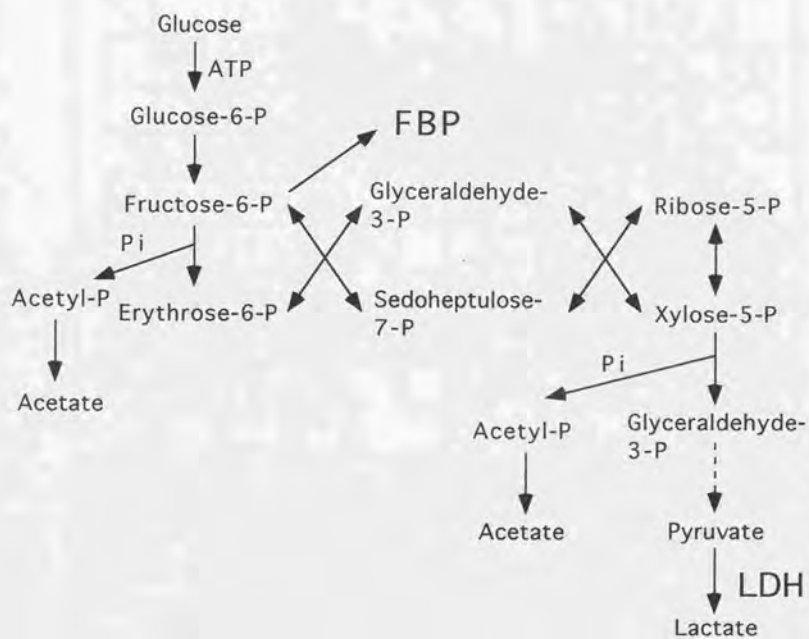


図2-3 ビフィズス菌の糖代謝

FBPは糖代謝系の中問体ではない。

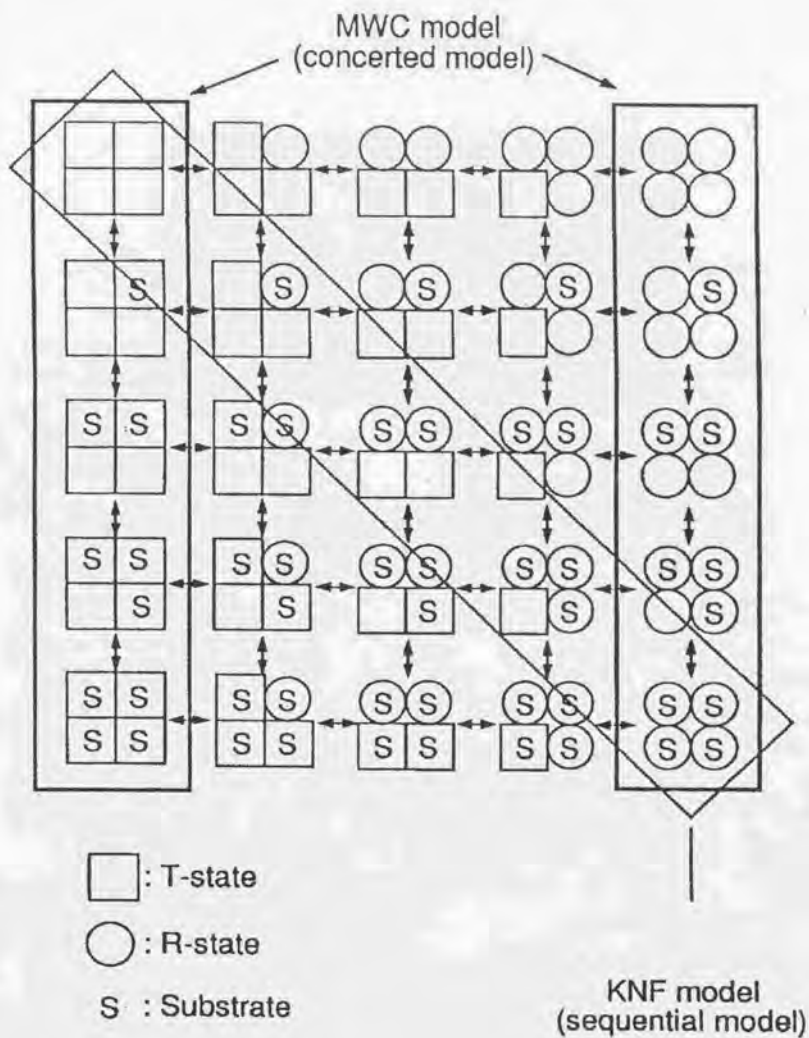


図2-4 四量体酵素の構造変化の一般的モデル

MWCモデルは図の両端を、
KNFモデルは図の対角線上を
動くとして説明できる。

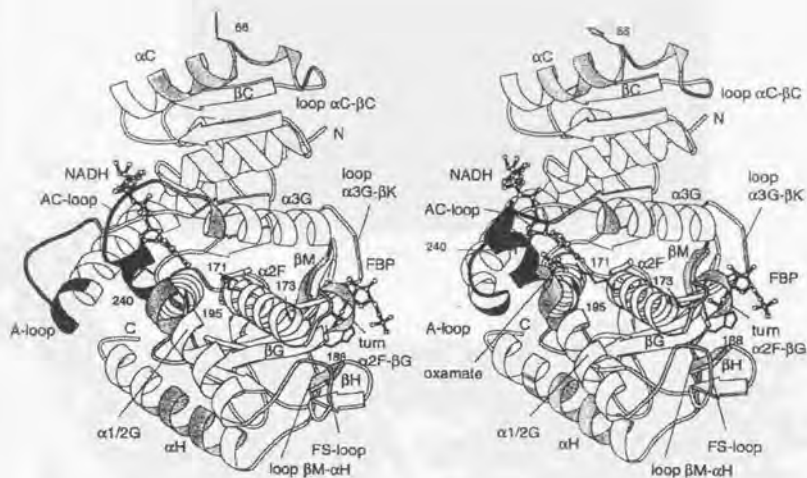
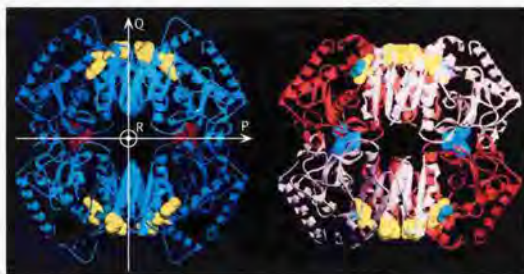


図2-5 岩田によって解かれた*B. longum*のLDHのT状態(左)及びR状態(右)の三次構造

C α を最小二乗法で重ね合わせたときのrms deviation
 によって色分けしてある。
 (<1.0Åが白、1.0~1.9Åが灰色、>1.9Åが黒)

a



b

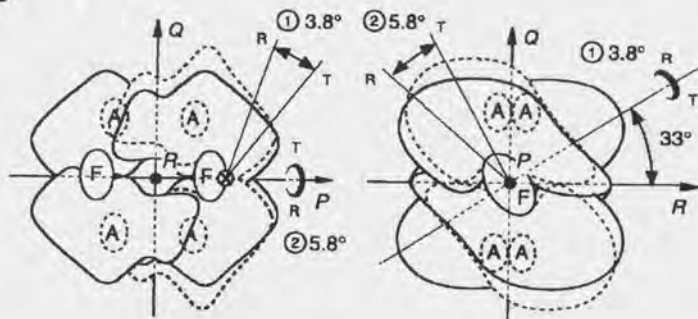


図2-6 岩田によって解かれた*B. longum*のLDHの四次構造

a T状態(左)及びR状態(右)のリボンモデル。
NADH(黄色), FBP(左:マゼンタ, 右:青), オキサム酸(基質アナログ)(緑)は、CPKモデルで示した。

b 四次構造の変化を示す模式図。
T状態(点線)及びR状態(実線)の構造を重ね合わせた。
左はR軸、右はP軸方向から見た。
活性部位はA, FBP結合部位はFで表わした。
それぞれの軸のまわりの回転を示した。

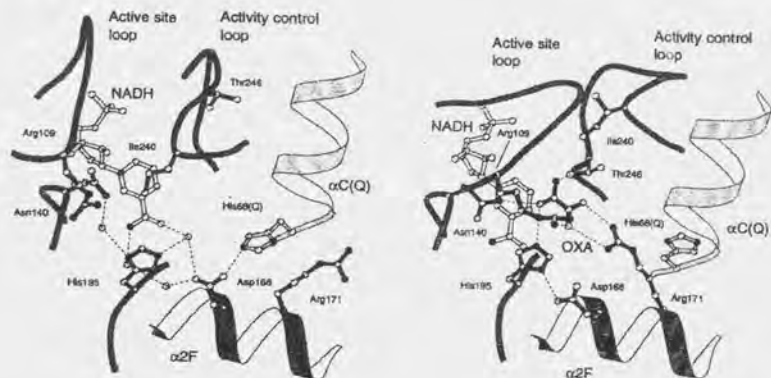


図2-7 T状態およびR状態での活性部位の構造

(Q)は、Q軸で関係づけられた隣のサブユニットの残基を示す。
両状態では、Arg171の位置が大きく異なっている。

序

ほとんどの脊椎動物は性質の異なるM型とH型（その他のアイソザイムも知られている）のLDHアイソザイムを有しており、器官によってその比率を変えることで異なる代謝要求に応じている。生体内ではそれらのアイソザイムがハイブリッドLDHを形成しており、イオン交換カラムやデンブengel電気泳動によって分離が可能であった[50]。しかし、これはM型とH型のアイソザイムLDHの電荷が大きく異なっていたためであり、本論文で分離が要求されるのは、野生型LDHおよびその変異体である。そこで第1章では表面に存在する残基の電荷を逆転させることにより分離マーカーとした電荷導入型LDHを作製し、その性質を調べた。また、大腸菌内でハイブリッドLDHを生産、精製、分離する系の構築を行なった。

本章で構築した*in vivo*でのハイブリッドLDH形成の概略図を図2-1-1に示す。2種のLDHの遺伝子がタンデムに乗った発現ベクターを構築し、その片方のLDHには電荷のタグをつけておいた。それらが大腸菌内で同時に発現させることにより、ハイブリッドLDHを形成させた。その後、大腸菌の抽出液からハイブリッドLDHの精製を行い、その最終段階であるMonoQ（陰イオン交換クロマトグラフィー）によって、タグによる表面電荷の違いをもとにそれぞれのハイブリッドLDHを分離した。

結果

2-1-1 電荷導入型LDHの作製およびその性質の解析

2-1-1-1 電荷導入型LDHの作製計画

ハイブリッドLDHを形成すると多くのハイブリッドLDHの混合物として得られるため、最終的にはそれぞれのハイブリッドLDHを互いに分離することが必要である。しかし、そのままでは分離が困難であるのは序論で述べた通りである。そこで、ハイブリッドを形成する2種のサブユニットの片方に、イオン交換カラムや電気泳動で分離できるように電荷のタグをつけることにした。タグの備えるべき条件は2つである。

- 1) 野生型LDHとの電荷の違いが大きく、有効に分離される。
- 2) LDHの性質（特に触媒活性とアロステリック特性）を変えない。

そこで、最もC末端よりの α -ヘリックスである α Hのうち、溶媒に露出している2残基を部位特異的変異により置換して電荷を逆転させることにより、以下の3種の電荷導入型LDHを作製することにした。

- 1) K316E/R317D（野生型LDHに比べてマイナス電荷を持つ）
- 2) E320R/E324K（野生型LDHに比べてプラス電荷を持つ）
- 3) E320K/E324K（野生型LDHに比べてプラス電荷を持つ）

Lys316, Arg317, Glu320, Glu324の結晶構造での位置を図2-1-2に示す。これらの残基を選んだ理由は以下の通りである。

- 1) 活性部位およびFBP結合部位から遠くサブユニット界面でもないため、触媒活性、ハイブリッド形成およびアロステリック特性に影響を与えないと考えられる。
- 2) 溶媒に露出している残基のために、電荷の導入が効果的な分離につながると考えられる。
- 3) C末端部分に存在することと、両親媒性ヘリックスの親水側残基をやはり同じ親水性残基に置換するため、foldingに影響が少ないと考えられる。
- 4) 各種のLDHの間での保存性が低い(図2-1-3)。

2-1-1-2 部位特異的変異導入

部位特異的変異導入はKunkel法で行なった。(材料と方法を参照) 各変異体の変異導入に用いたオリゴDNAと変異導入の確認のために入れた制限酵素サイトを図2-1-4に、各変異体の発現ベクターの作製法を図2-1-5に示す。まず、lacプロモーターと逆向きに*ldh*遺伝子が乗っているベクターであるpUBM2*[31,42]に3種の変異、K316E/R317D、E320R/E324K、E320K/E324Kをそれぞれ導入して、pUBM201、pUBM202、pUBM203をそれぞれ作製した。次に、それらの変異を含む0.5kbのPmaCI, SacI断片を、野生型LDHの発現ベクターであるpUBM9*[31,42]に乗せ替えることにより、pUBM901、pUBM902、pUBM903をそれぞれ作製した。変異の確認は、乗せ換えた0.5kbの断片部分のDNAシーケンスの決定により行なった。

2-1-1-3 各電荷導入型LDHの大腸菌中での発現

それぞれの電荷導入型LDHを大腸菌の3 ml cultureで発現させた。その粗酵素液と熱処理(65°C, 10分)後の上清を用いて、SDS-PAGE、Native-PAGE及び活性測定をおこなった(図2-1-6)。野生型LDHはもともと酸性蛋白質であり、非変性下の条件であるNative-PAGE(分離ゲル(Lower Gel)のpHは8.8)では、陽極に向かって流れる。従って、負電荷を導入したK316E/R317Dは野生型より下に、正電荷を導入したE320R/E324KおよびE320K/E324Kは野生型より上にバンドが現れることが期待される。

K316E/R317Dの発現量は、野生型LDHの30-40%あり、野生型と同等の熱安定性を示していた(図2-1-6c)。また、Native-PAGEにより、野生型に比べて下にバンドが現れた(図2-1-6b)。この変異体は負電荷を導入してあるので、電気泳動(Native-PAGE)においては期待した通りの分離能を持つことが確認された。しかし、この変異体はSDS-PAGEのバンドで分子量が大きく出ている(図2-1-6a)。原因は不明であるが、DNA配列によればこのように大きな分子量の変化は起こっていないと思われる。なお、野生型LDHにおいても、実際の分子量は約34,000であるのに対して、SDS-PAGEのバンドはそれよりも少し上の位置に出ている。

E320R/E324Kは野生型とほぼ等量発現していたが(図2-1-6a)、活性が低かった。65°C、10分の熱処理で活性が熱処理前の36%に減少し(図2-1-6c)、SDS-PAGEのバ

ンドも減少していたことから、この変異体は熱安定性が低いと思われる。

E320R/E324Kは全く発現していなかった。

これらの結果から、負電荷導入型変異体LDHであるK316E/R317Dは、十分な量発現して、野生型と同等の熱安定を持ち、Native-PAGEで野生型と分離可能なことが分かった。また、Glu320とGlu324の電荷を正電荷に逆転させた2種の変異体は、両方とも安定に発現しなかった。

以下の実験ではK316E/R317Dを電荷導入型LDHとして用い、その精製を行なって性質を調べた。

2-1-1-4 電荷導入型LDHの精製 (図2-1-7)

K316E/R317Dを野生型LDHと同じ条件で精製した。精製の各段階でのSDS-PAGEを図1-7に示す。100 ml cultureから精製した蛋白量は、野生型LDH、K316E/R317Dにおいてそれぞれ6.14 mg, 2.41 mgであった。従って、この電荷導入型LDHは野生型LDHの約40%が得られることが分かった。

また、陰イオン交換カラムMonoQによる分離の際のチャートを(図2-1-8)に示す。負電荷導入型変異体LDHであるK316E/R317Dは、MonoQに対して野生型よりも強い親和性を持つため、ピークの位置が後になった。従って、この変異は各種ハイブリッドLDHの分離のためのタグとして使えることが予想された。

2-1-1-5 電荷導入型LDHの性質

野生型LDHおよびK316E/R317Dの飽和曲線とpH profile (図2-1-9)を示す。

K316E/R317Dの飽和曲線は、野生型LDHとほぼ同じ形をしていた。すなわち、FBP存在下では大きく活性化され、飽和曲線はほぼ双曲線型(ミカエリス-メンテン型)になる。また、FBP非存在下では飽和曲線がシグモイダルになる。これらの結果により、FBPによるヘテロトロピックな活性化と、基質であるビルビン酸によるホモトロピックな活性化の双方は保たれていることが確認された。さらに、基質阻害の程度にも大きな変化は見られなかった。ただし、FBP非存在下でのビルビン酸に対する見かけのKm値が小さくなっており、より少ないビルビン酸で活性化されている。

pH profileも野生型LDHとK316E/R317Dではほとんど違いは見られなかった。

2-1-2 *in vivo*でのハイブリッドLDHの形成

大腸菌内でのハイブリッド形成が効果的に行われることを確認するために、まず、以下の2つの組み合わせを試した。

- 1) MDH型変異体LDH(Q102R) と 電荷導入型LDH(K316E/R317D)
- 2) FBP脱感作型LDH(R173Q/H188Y) と 電荷導入型LDH(K316E/R317D)

1) は第3章で、2) は第2章の前半でそれぞれ使用した組み合わせである。MDH型変異体、FBP脱感作型LDHおよびここで得られたそれぞれのハイブリッドの性質に関しては後の章で詳しく述べる。本章では、電荷導入型LDHと各種の変異型LDHが*in vivo*でハイブリッド形成することの確認のみを行った。

2-1-2-1 タンデムに遺伝子を並べたベクターの作製

上で示した2つの組み合わせを行うために、それぞれの発現ベクターを作製した(図2-1-10、図2-1-11)。2種のLDH遺伝子をタンデムに並べた発現ベクターを作製するために、以降の全ての組み合わせについて、以下と同様の方法をとった。

野生型LDHを含む全ての変異体において、pUBM9*をもとにした発現ベクターが作製してある。これらは、tacプロモーターの上流にBamHIが、ldh遺伝子の下流の転写のターミネーターの後ろにPvuIIがそれぞれユニークサイトとして存在しており、約1.6kbのBamHI-PvuII断片はLDHの遺伝子を発現するのに必要な配列を全て含んでいる。この断片を切り出し、末端の平滑化をした後、別のLDHの発現ベクターのPvuIIサイトに挿入する。これにより、断片として挿入した方のldh遺伝子が後ろに来るようなハイブリッド発現ベクターが作られる。ベクターの構築、発現はすべてrecA⁻であるMV1184株で行ったため、ldh遺伝子同士の組み替えは起こらないと思われる。

MDH型変異体LDH(Q102R)と電荷導入型LDH(K316E/R317D)の組み合わせ(pUBH205)では電荷導入型LDHの遺伝子の方が下流に(図2-1-10)、FBP脱感作型LDH(R173Q/H188Y)と電荷導入型LDH(K316E/R317D)の組み合わせ(pUBH201)では電荷導入型LDHの遺伝子が上流になるように構築した(図2-1-11)。MDH型変異体LDH(Q102R)およびFBP脱感作型LDH(R173Q/H188Y)の発現ベクター(pUBM9m, pUBM9d)はすでに作られたものを使用した[42]。

2-1-2-2 大腸菌内でのハイブリッドLDH形成の確認(図2-1-12)

pUBH205およびpUBH201で形質転換した大腸菌を3 ml cultureで発現させた。65℃、30分の熱処理による部分的な精製後、Native-PAGEにかけてクーマジー染色したものを図2-1-12aに示す。各ハイブリッドLDHはその電荷導入型サブユニットの数により等間隔に分離された。

Native-PAGEのそれぞれのバンドの濃さを測定することにより得た量比と、計算値を図2-1-12bに示す。それぞれ、いちばん上のバンドを1とした場合の比で表してある。計算値はそれぞれ、MDH型変異体LDH(Q102R)と電荷導入型LDH(K316E/R317D)の組み合わせ(pUBH205)の場合は1:0.32、FBP脱感作型LDH(R173Q/H188Y)と電荷導入型LDH(K316E/R317D)の組み合わせ(pUBH201)の場合では1:0.49の割合で存在するサブユニットが、確率論的に会合した場合のものである。

考察

電荷導入型LDHの作製

本章の前半では、表面電荷に関与している残基を逆の電荷を持つアミノ酸に置換することによって電荷導入型LDHを作製した。

K316E/R317Dの変異体については、アロステリック特性および基質阻害には大き

な変化を与えずに、表面電荷による分離を可能にした変異体を十分量得ることに成功した。また、この電荷導入型LDHは野生型に比べて発現量が約40%であるが、同等の熱安定性を示し、同様に精製が可能であることが明らかとなった。

ただし、FBP非存在下でのピルビン酸に対する見かけのKm値が小さくなって、少し活性化されたようになっている。これは、この変異体ではT状態とR状態の平衡が野生型に比べて少しR状態に寄っているためではないかと考えている。本酵素のT状態およびR状態の構造では(図2-5)この部分(α Hの付け根の部分)は1Å以上動いているため(灰色で示されている)、両状態の安定性の差を多少変化させることは十分考え得ることである。NADH飽和条件下、FBP非存在下での野生型LDHの両状態の自由エネルギー差は5.0 kcal/molしかないため[32]、わずかな変化がこのような差を生み出し得るのではないだろうか。ただし、このように平衡定数が多少異なっても、アロステリック特性および基質阻害に大きな影響はなく、これ以降この電荷導入型LDHを野生型として扱っても問題ないと思われる。

pH依存性は野生型のものとは大きな違いはなく、意図したとおり、変異の導入は酵素の触媒能には大きな影響は与えなかったと思われる。

一方、Glu320、Glu324の電荷を共に正電荷に逆転させた変異体は安定に得られなかった。その原因は不明であるが、この二つの残基は α Hのひとつと巻き分にあたる隣合った位置ではほぼ同じ向きに配向しているため(図2-1-2)、立体的に近い二つの正電荷の反発が不安定化の要因になっているとも考えられる。なお、Lys316とArg317は一次構造上は隣合っているものの、立体構造上ではヘリックスの一部なので、別の向きに配向している。

*in vivo*でのハイブリッドLDH形成

本章の後半では、*in vivo*でハイブリッド形成を行なう系を確立した。各ハイブリッドLDHが等間隔に分離されたことから、

- 1) それぞれのハイブリッドLDH間の電荷の差が一定である。
- 2) 全てのハイブリッドLDHのstokes半径が等しい。

と考えられる。また、いずれの場合も各バンドがほぼbinomialな(=二項式にしたがった)分布を示したことから、大腸菌内で2種のサブユニットが確率論的に会合する、効果的なハイブリッド形成が起こっていることが確認された。

今回試した2つの組み合わせでは両方とも電荷導入型LDHの方が発現量が少なかった。MDH型変異体との組み合わせでは電荷導入型LDHの方が下流に、FBP脱感作型LDHとの組み合わせでは上流になっていたことから、この発現量の差が遺伝子の位置の違いによるものではなく、電荷の導入によるものであることは明らかである。

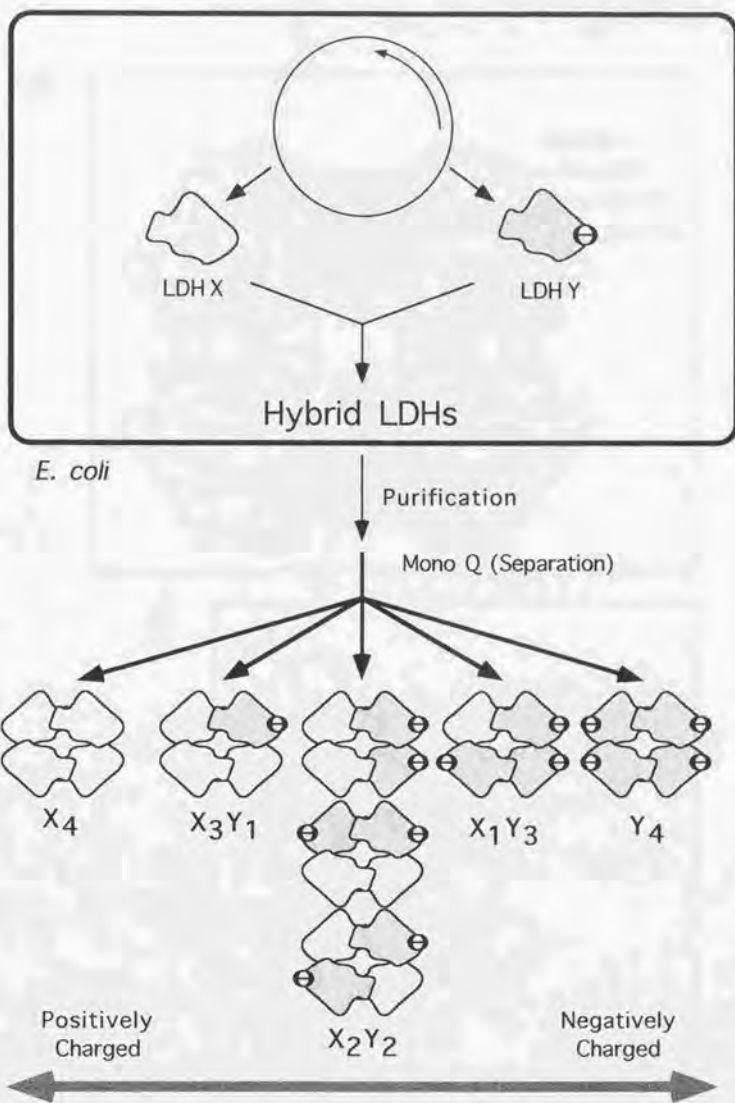
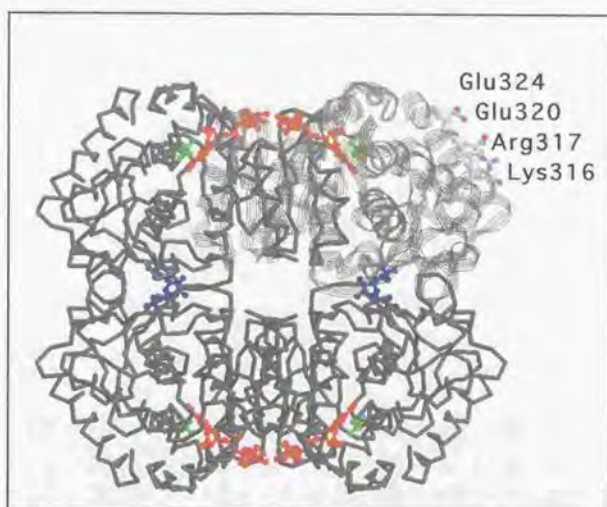


図2-1-1 *in vivo*でのハイブリッド形成の概念図

LDH XとLDH Yのハイブリッドを作成する場合。
Yの方に、負電荷のタグを導入している。

a



b

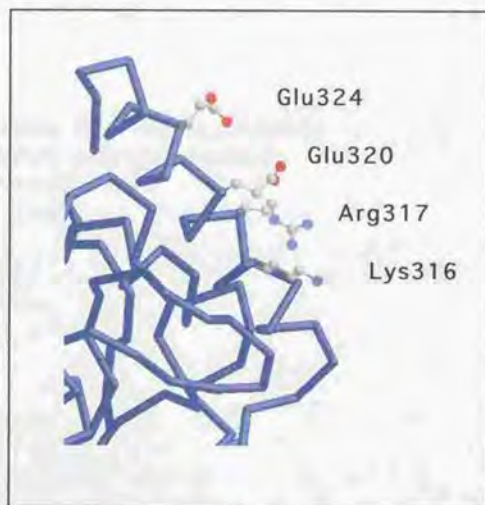


図2-1-2 電荷を導入するタグの位置

a 四次構造上での位置

NADH (赤), オキサム酸(緑), FBP(青)

b 拡大図 N原子は青で、O原子は赤で表わした。



BL, *B. longum*; TC, *Thermus caldophilus*
 BST, *Bacillus stearothermophilus*
 LC, *Lactobacillus casei*
 DFM, ツノザメ筋肉

図2-1-3 αH付近のアミノ酸の保存性

BLLDHと同一のアミノ酸を枠で囲んだ。
 今回変異させた残基の上に印がつけてある。

Mutant I (-) K316E/R317D

316317
 CTCGCCGCTCTGAAGCGCTCTGCCGAGACGCTGAAGGAAACCGCG
 LeuAlaAlaLeuLysArgSerAlaGluThrLeuLysGluThrAla

XhoI
 5'-CTCGCCGCTCTCGAGGACTCTGCCGAGACG-3' 29mer
 LeuAlaAlaLeuGluAspSerAlaGluThr

Mutant II(+) E320R/E324K

320 324
 CTCGCCGCTCTGAAGCGCTCTGCCGAGACGCTGAAGGAAACCGCG
 LeuAlaAlaLeuLysArgSerAlaGluThrLeuLysGluThrAla

Spl
 33mer 5'-AGCGCTCTGCCCGTACGCTGAAGAAAACCGCGG-3'
 LysArgSerAlaArgThrLeuLysLysThrAlaAla

Mutant III(+) E320K/E324K

320 324
 CTCGCCGCTCTGAAGCGCTCTGCCGAGACGCTGAAGGAAACCGCG
 LeuAlaAlaLeuLysArgSerAlaGluThrLeuLysGluThrAla

AfIII
 31mer 5'-CGCTCTGCCAAGACGCTTAAGAAAACCGCGG-3'
 ArgSerAlaLysThrLeuLysLysThrAla

図2-1-4 電荷導入型変異体の作成-1

それぞれ上段は野生型LDHの配列で、下段は変異体の配列。
 部位特異的変異に用いたオリゴDNAは下段と同一である。
 変異導入の確認のために入れた制限酵素サイトも示した。

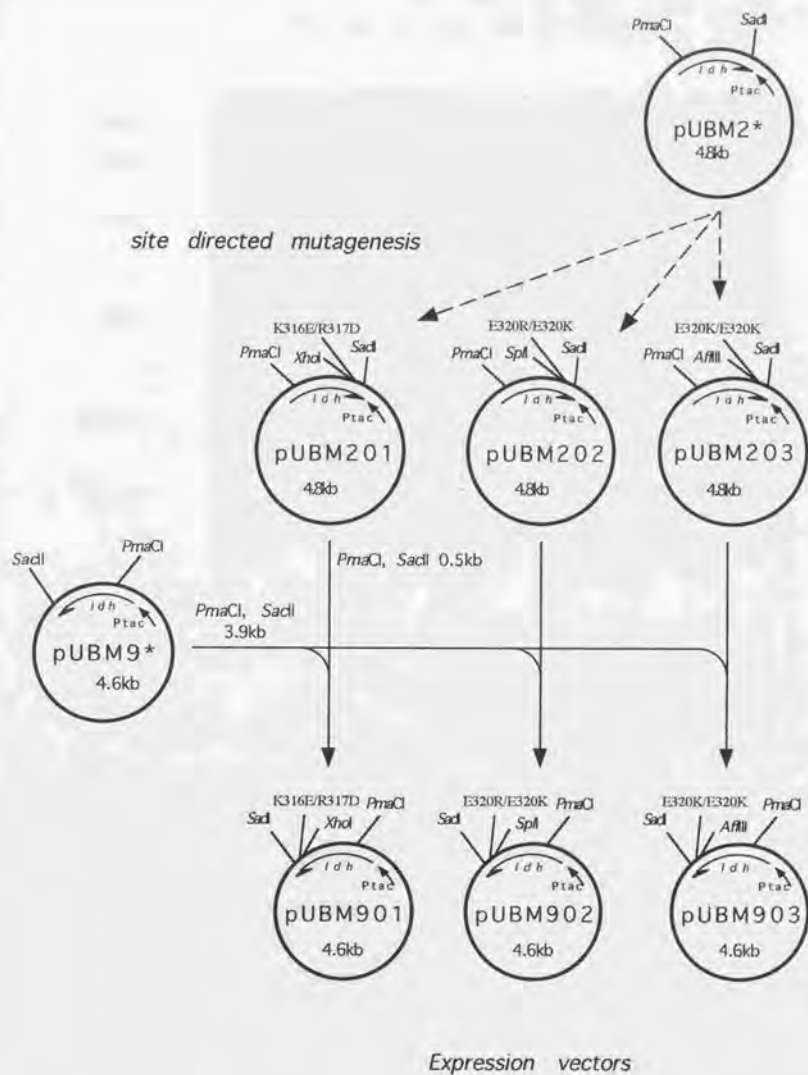
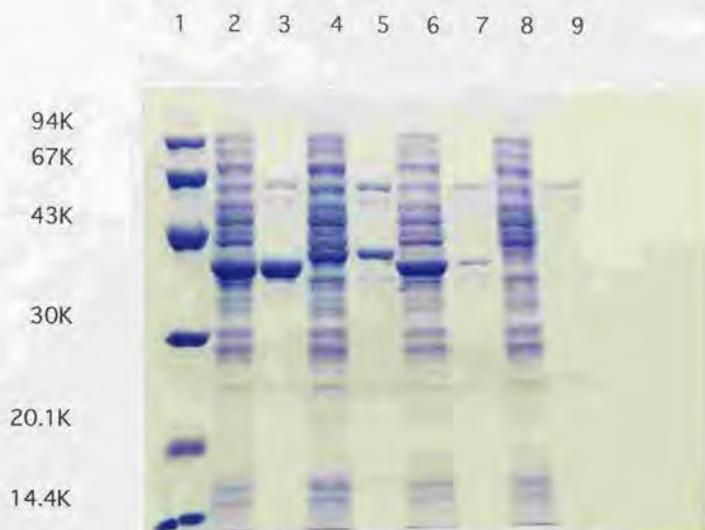
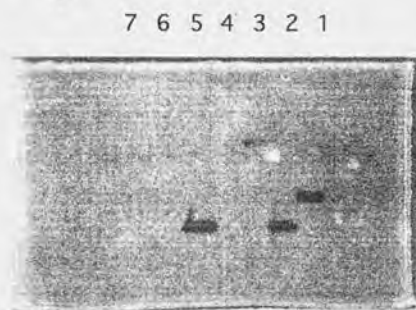


図2-1-5 電荷導入型変異体の作製-2

a



b



c

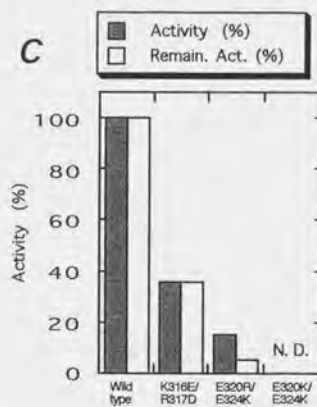


図2-1-6 電荷導入型変異体の 3ml cultureでの発見

a SDS-PAGE後クーマジー染色 ゲル濃度は10%

それぞれ、左が粗酵素液、右が熱処理後(65°C, 10分) 1: 分子量マーカー
2, 3: 野生型LDH; 4, 5: K316E/R317D; 6, 7: E320R/E324K; 8, 9: E320K/E324K

b Native-PAGE後活性染色

レーン2-4は粗酵素液、5-7は熱処理後(65°C, 10分)

1: 野生型LDH; 2, 5: K316E/R317D; 3, 6: E320R/E324K; 4, 7: E320K/E324K

c 粗酵素液と熱処理後(65°C, 10分)の上清の活性

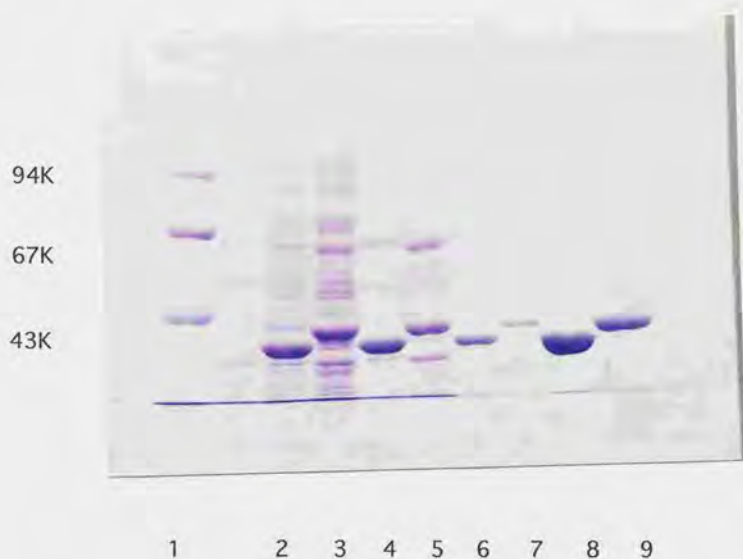
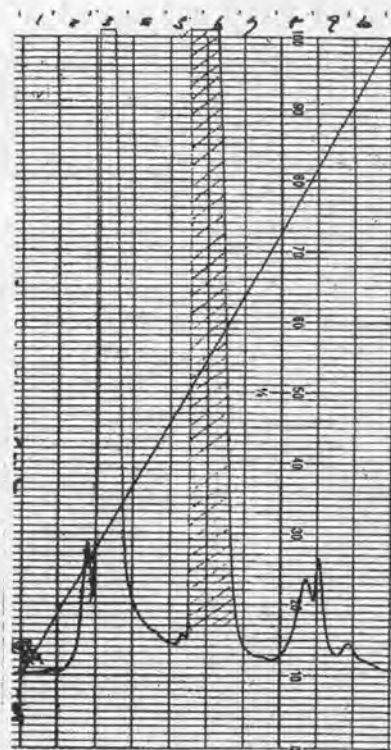
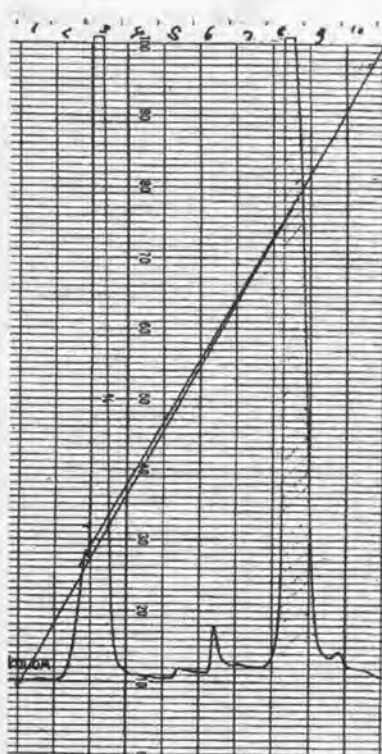


図2-1-7 電荷導入型変異体K316E/R317Dの精製 (SDS-PAGE)

ゲル濃度は7.5%。それぞれ左が野生型LDH、右がK316E/R317D
 1: 分子量マーカー; 2, 3: 粗酵素液; 4, 5: 熱処理(65°C, 15分)
 6, 7: Blue-Sepharose後; 8, 9: MonoQ後



野生型LDH



K316E/R317D

図2-1-8 電荷導入型変異体K316E/R317Dの精製 (MonoQのチャート)

KCl 0-0.5 Mの直線型グラジエントによる溶出(流速 1.0 ml/min, 20分)を行なった。縦軸のレンジ幅は280 nmのO.D.で2.0である。LDHのピークは斜線で示した。その前のピークはNADHによるものである。

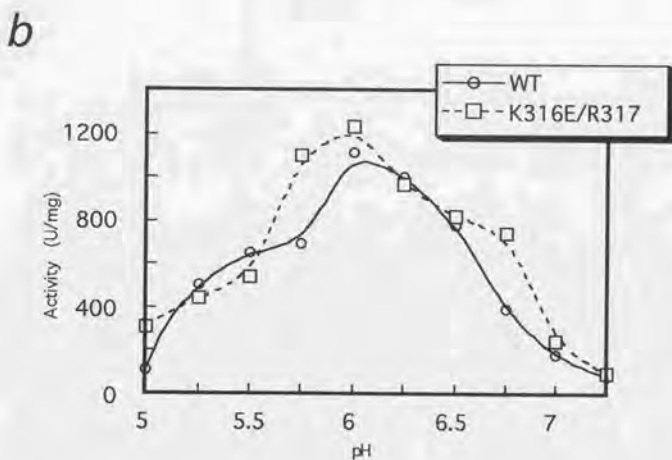
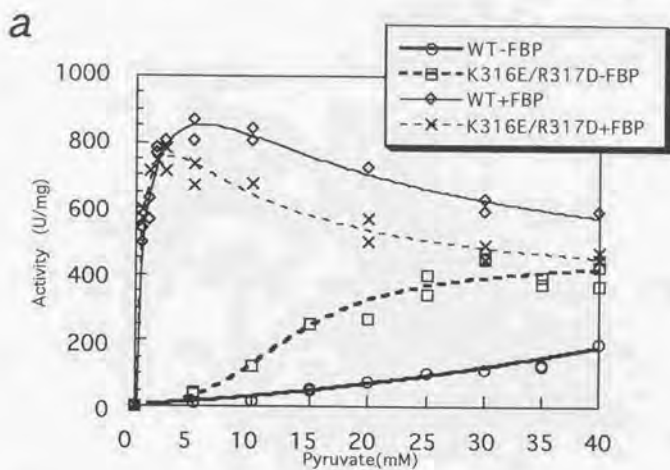


図2-1-9 電荷導入型変異体K316E/R317Dの性質

a FBP非存在下およびFBP存在下(0.1 mM)でのピルビン酸飽和曲線

b FBP存在下でのpH依存性

50 mM MES-NaOH(pH 5.0-7.25)によりpHを変化させた。

それ以外は、方法に示した標準活性測定法に従った。

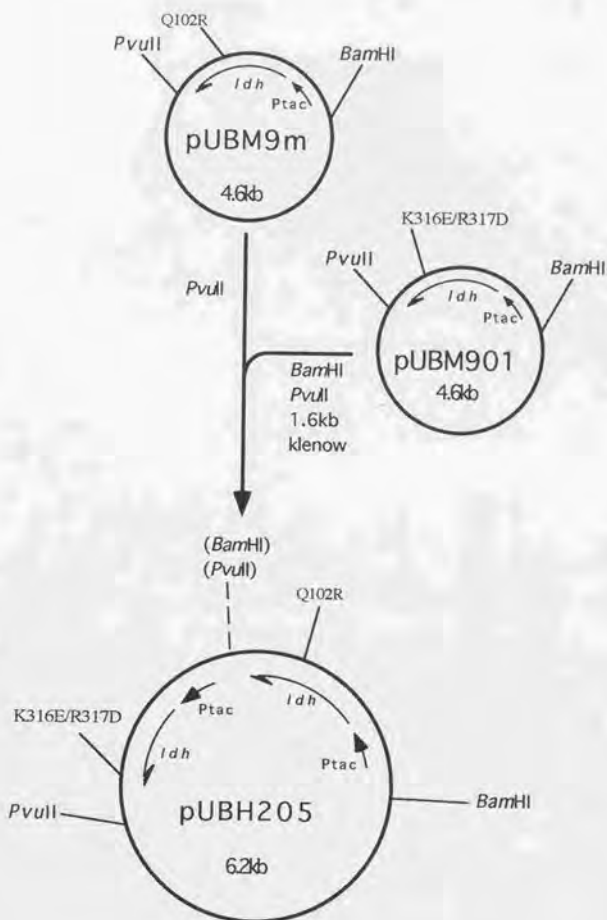


図2-1-10 MDH型変異体LDH(Q102R)と電荷導入型LDH(K316E/R317D)のハイブリッドLDH発現ベクターの作製

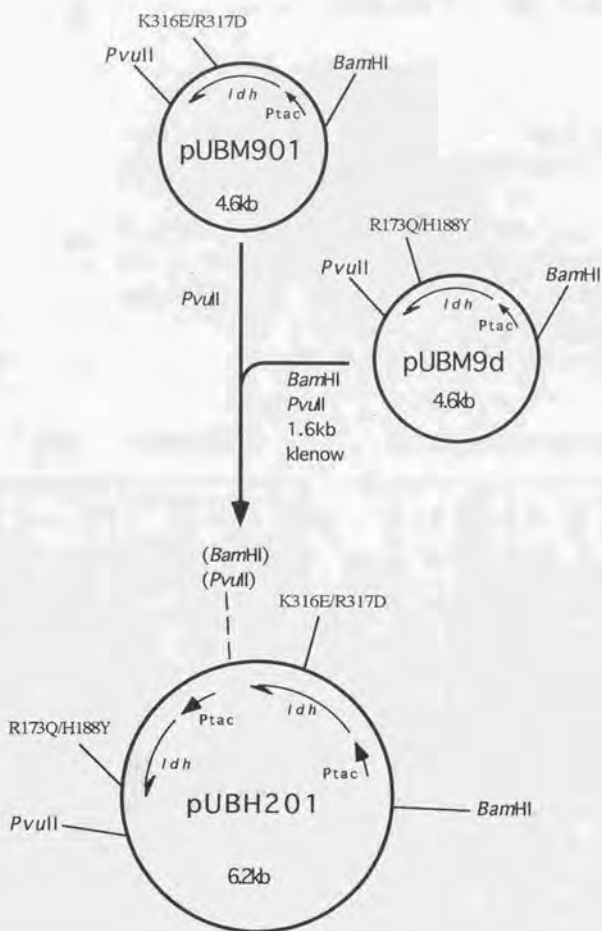


図2-1-11 脱感作型LDH(R173Q/H188Y)と電荷導入型LDH(K316E/R317D)のハイブリッドLDH発現ベクターの作製

a



1 2

b

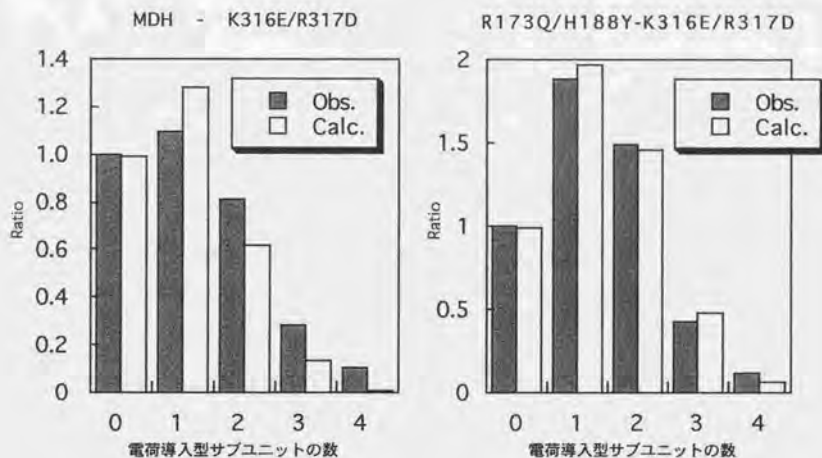


図2-1-12 大腸菌内(*in vivo*)でのハイブリッド形成

a Native-PAGE; レーン1: MDH型変異体LDH(Q102R)と電荷導入型LDH(K316E/R317D); レーン2: 脱感作型LDH(R173Q/H188Y)と電荷導入型LDH(K316E/R317D)それぞれ、熱処理(65°C, 30分)のサンプルを3 ml培養の1/100量づつ流した。

b 各バンドの量比の測定値と計算値

バンドの量比の測定および理論値の計算は、本文および方法を参照。

第2部 第2章

FBP脱感作型サブユニットを用いたヘテロトロピック活性化機構の解析

序

序論で述べた通り、本酵素は非常に低濃度のFBPにより強く活性化される。このアロステリックな活性化は生体内の調節作用において最も重要な役割を担っていると考えられる。

FBP結合部位に存在しFBPのリン酸基と結合する2残基(Arg173とHis188)を置換した変異体R173Q/H188YはFBPにより活性化されない脱感作型酵素となる[31]。ここでは、前章で構築した*in vivo*でのハイブリッドLDH形成および分離の系を用いて、FBP脱感作型LDHとのハイブリッドLDHを解析することにより、本酵素の最も重要な特性であるFBPによるヘテロトロピックな活性化の機構を解析した。

結果

2-2-1 FBP脱感作型サブユニット (D) と野生型サブユニット (W) からなるハイブリッドLDH (D-Wハイブリッド) の解析および分離されたハイブリッドLDHの立体配置の決定

まず、前章で構築したFBP脱感作型LDH(R173Q/H188Y)と野生型(電荷導入型)LDH(K316E/R317D)の遺伝子がタンデムに並んだ発現ベクターからハイブリッドLDHを大量発現、精製、分離し、それぞれの解析を行なった。簡便のため、ここではFBP脱感作型サブユニットをDサブユニット、野生型サブユニットをWサブユニットと表すことにする(図2-2-1)。これらのサブユニットからなるハイブリッドは「D-Wハイブリッド」と表す。

FBP結合部位は図6および図2-21に示したようにサブユニットの界面に存在しており、2回回転軸で位置づけられたそれら2つのサブユニットから構成されている。FBPはO2原子の違いだけの疑似の2回対称を持っており、結晶中でも2種の向きで結合したFBPの混合した電子密度で存在すると考えられている。

今回のハイブリッドLDHによって、2つのサブユニットの片方が脱感作型となるFBP結合部位を持つものが得られるため、このような「半分の」FBP結合部位の機能の解析が期待される。

2-2-1-1 D-WハイブリッドLDHの発現、精製およびMonoQによる分離

pUBM201(図2-1-11)を持つ大腸菌の1リットル培養から、「材料と方法」に述べた方法に従って、ハイブリッドLDHを発現、精製および分離した。大腸菌抽出液の精製は、

- 1) 熱処理 (65°C, 30分)

- 2) 硫安分画 (30%飽和の上清)
- 3) Butyl Toyopearlカラム (疎水クロマトグラフィー)
- 4) Blue Sepharoseカラム (アフィニティクロマトグラフィー)
- 5) Mono Qカラム (陰イオン交換クロマトグラフィー)

の各段階を経た。(詳しくは、方法を参照)

図2-2-2に、MonoQカラムによるハイブリッドLDHの分離の結果を示す。図2-2-2bはMonoQのチャートであり、図2-2-2aは分離された各ピークのNative-PAGEである。各レーンの対応は矢印で示した。図2-2-2aの両端のレーンはMonoQにかける前 (Blue Sepharose後) のサンプルである。

MonoQにかける前のサンプルはDとWのサブユニット比にして約2:1の二項的な分布を示しており、Blue Sepharoseまでの精製段階では各ハイブリッドLDHは分離されなかったことが分かる。

驚くべきことに、ハイブリッドLDHはMonoQカラムによって6つのピークに分離された。これらのピークをそれぞれD4、D3W1、D2W2-QR、D2W2-P、D1W3、W4と名付けた。この名前は、MonoQクロマトグラフィー、Native-PAGEおよびそれらの速度論的性質 (特にFBPに対する活性化の違い) から予想される組成および立体配置に対応している (図2-2-3)。

D2W2のハイブリッドLDHは、図2-2-3に示したように3種の立体配置をもつ「異性体」が存在する。D2W2-QRとD2W2-PはNative-PAGEの移動度が全く同じでありMonoQクロマトグラフィーのピーク面積は約2:1 (図2-2-2bのピーク3と4では、1.7:1) であった。これら2つのピークのMonoQでの再クロマトグラフィーをそれぞれ行なった結果、どちらも同じ位置にただ1本のピークが現れた。(data not shown) これらの結果とFBPに対する活性化の違いから、D2W2-PはP軸で関係づけられた2つの野生型サブユニットを持ち完全なFBP結合部位を一つ持つハイブリッドLDHであり、D2W2-QRはその他2種の「異性体」の混合物であると決定した (図2-2-3)。このような決定の根拠およびD2W2がMonoQにより2つのピークに分離できた理由については、後に考察する。

なお、20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0~0.6 M NaClの条件下 (各ハイブリッドの分離以降はこの条件内で扱った) では本酵素の四量体構造は安定であり、溶液中でのサブユニット交換は起こらないことが確認されている (第4章参照)。

2-2-1-2 D-WハイブリッドLDHの速度論的性質

分離された各ハイブリッドLDHのFBP非存在下およびFBP存在下でのビルビン酸飽和曲線は、図2-2-4~図2-2-6に示したように、FBP結合部位の数によって3種に分類される。

図2-2-4に、完全なFBP結合部位を一つも持たないD4、D3W1、D2W2-QRの飽和曲線を示した。これらはすべてFBPに脱感作されており、すべて同様の性質を示した。これらの飽和曲線はつねにシグモイダルであった。

D2W2-P、D1W3およびW4はFBPにより強く活性化されたが、これらはさ

らに2つのタイプに分類される。図2-2-5に完全なFBP結合部位を一つだけ持つD2W2-PおよびD1W3の飽和曲線を、図2-2-6に完全なFBP結合部位を2つ持つW4(野生型LDH)の飽和曲線をそれぞれ示した。D2W2-PおよびD1W3の飽和曲線は飽和量のFBP存在下でもシグモイダルであるが、W4はほぼ双曲線型(ミカエリス型)になった。

FBPにより活性化された3種のハイブリッドLDHのFBPに対する飽和曲線を図2-7に示した。

以上の速度論的解析によって得られたパラメーターを表2-2-8にまとめた。また、各ハイブリッドLDHのS1/2(Pyr)を図2-2-9に示した。

2-2-2 FBP脱感作型サブユニット(D)と不活性型サブユニット(I)からなるハイブリッドLDH(D-Iハイブリッド)の解析

前節では、分離したD-Wハイブリッドの立体配置を決定し、D2W2-PおよびD1W3がFBPによる活性化を受けることが分かった。しかし、これらのハイブリッドLDHではWサブユニットが活性を持っており、DサブユニットがFBPの結合に伴う四次構造変化に従って活性化を受けるかどうかははっきり分からなかった。そこで、ここではWサブユニットの活性をつぶすことにより、Dサブユニットの活性のみを測定して、アロステリックな相互作用を調べることにした。言い替えば、これは、FBPによる活性化がそれぞれのサブユニット内でのみ起こるのか(サブユニット内での活性化)、四次構造変化を通して別のサブユニットに伝わるのか(サブユニット間での活性化)を調べることになる。

His195は活性部位の必須な残基であり、酸/塩基触媒として本酵素の酸化還元反応に反応に直接関与することが知られている[6]。まず、このHis195をAsnに置換した変異体である不活性型LDH(H195N)とそれにタグをつけた不活性型LDH(H195N/K316E/R317D)を作製し、活性を失っていることを確かめた。

そして、FBP脱感作型LDH(R173Q/H188Y)と不活性型(電荷導入型)LDH(H195N/K316E/R317D)のハイブリッドLDHを前回と同様に発現、精製、分離し、それぞれの解析を行なった。ここでは、FBP脱感作型サブユニットをDサブユニット、不活性型サブユニットをIサブユニットと表す(図2-2-10)。これらのサブユニットからなるハイブリッドLDHは「D-Iハイブリッド」と表す。

2-2-2-1 不活性型(電荷導入型)LDH(H195N/K316E/R317D)の作製

His195からAsnへの部位特異的変異導入は2-1-1-2と同様の方法で行なった(図2-2-11)。発現ベクターへの乗せ替えは約350bpのS α II断片で行い、この部分のDNAシーケンスの決定により変異の導入の確認を行なった。さらに、不活性型LDH(H195N)の発現ベクター(pUBM904)のS α II断片を電荷導入型LDHの発現ベクター(pUBM901)に乗せ替えることにより、不活性型(電荷導入型)LDH(H195N/K316E/R317D)の発現ベクター(pUBM905)を作製した。

不活性型 LDH(H195N) および不活性型 (電荷導入型) LDH(H195N/K316E/R317D)をそれらの発現ベクター (pUBM904およびpUBM905)によりそれぞれ発現、精製した結果、どちらも野生型LDHと同様の条件で精製できることが分かった。ただし、不活性型 (電荷導入型) LDHは、その電荷のタグによりMonoQのピークが野生型LDHや不活性型LDHに比べて後になった。精製した酵素の活性を測定した結果、それらの比活性はともに0.04 U/mg以下であり、野生型酵素 (比活性は約1000 U/mg) に比べて無視できるほど減少していることが確認できた。(data not shown)

2-2-2-2 D-IハイブリッドLDHの発現、精製および分離

D-Iハイブリッドの発現ベクターは、D-Wハイブリッドと同様に、FBP脱感作型 LDH(R173Q/H188Y)の発現ベクターに不活性型 (電荷導入型) LDH(H195N/K316E/R317D)の遺伝子のカセットを挿入することにより得られた (pUBM202) (図2-2-12)。

D-Iハイブリッドの発現、精製はD-Wハイブリッドと同様に行われ、D4、D3I1、D2I2-QR、D2I2-P、D1I3、I4の6つのピークが得られた。MonoQクロマトグラフィーでの分離のピークおよびNative-PAGEの結果も、D-Wハイブリッドとはほぼ同様であった。(data not shown) 従って、D-IハイブリッドLDHの組成および立体配置もD-Wハイブリッドと同様に決定された (図2-2-13)。

2-2-2-3 D-IハイブリッドLDHの速度論的性質

分離された各ハイブリッドLDHのFBP非存在下およびFBP存在下でのビルビン酸飽和曲線を図2-2-14~図2-2-16に示した。

図2-2-14に、完全なFBP結合部位を一つも持たないD4、D3I1、D2I2-QRの飽和曲線を示した。これらはすべてFBPに脱感作されていた。また、これらの飽和曲線はつねにシグモイダルであった。一方、D2I2-PおよびD1I3はFBPにより活性化された (図2-2-15、図2-2-16)。I4は活性がほとんどなかった。

FBPにより活性化された2種のハイブリッドLDHのFBPに対する飽和曲線を図2-2-17に示した。

以上の速度論的解析によって得られたパラメーターを表2-2-18にまとめた。また、各ハイブリッドのVmaxとヒル係数(nH)、S1/2(Pyr)をそれぞれ図2-2-19、図2-2-20に示した。

各ハイブリッドは活性部位の減少に対応してVmaxが下がっている (図2-2-19)。そして、活性部位の減少にしたがって、シグモイダルな飽和曲線から双曲線型 (ミカエリス型) になっている。これは、ヒル係数 (nH) の減少に対応しており (図2-2-19)、活性部位が1つしかないD1I3では完全にミカエリス型(nH=1)になった。

分離された各ハイブリッドの立体配置の決定について

今回、D2W2-QRおよびD2W2-Pと名付けられた2つのピークは、3種の「異性体」の混合物が、図2-2-3に示したようなサブユニットの立体的な配置の違いによって分離されたと結論した。これは、以下に述べるように、速度論的解析と結晶構造の知見から、DサブユニットとWサブユニットからなる不完全なFBP結合部位がFBP結合能を失っていると結論されたからである。

不完全な(DサブユニットとWサブユニットからなる)FBP結合部位を一つもつD3W1はFBPに対して完全に脱感作していた(図2-2-4、なお、本実験で加えている0.1 mM FBPは過剰飽和量である)。従って、不完全なFBP結合部位は全く機能しないことが明らかである。さらに、D1W3はFBPにより活性化されたため、少なくとも一つの完全なFBP結合部位があれば、そこに結合したFBPに活性化されることが明らかである。そこで、D2W2に当たる2つのピークのうち、1/3のピーク面積を持ちFBPに活性化される方がただ一つの機能するFBP結合部位を持つものであり、脱感作された残りの2/3は不完全なFBP部位しかもたないものであると結論した。この後述べるように、今回得られた全てのハイブリッドLDHのより詳細な速度論的解析も、今回決定した立体配置とそのFBP結合部位の数によく対応している。

一方、本酵素のFBP結合部位はさまざまな条件における結晶構造が得られており、変異体の速度論的解析と合わせて非常によく研究されている。まず、岩田らのT-R状態の結晶から、FBPの結合した野生型酵素のFBP結合部位の構造がT、R状態の双方で得られている(図2-2-21a) [2]。さらに、それ以前に得られたT状態のみの結晶からは、FBPの結合していない構造も得られている(図2-2-21b) [51]。その後、本研究室の鎌田によって、FBP結合部位を構成する残基のさまざまな変異体の結晶構造が得られた[32]。図2-2-21cに本研究で用いた脱感作型LDH(R173Q/H188Y)のT状態およびR状態のFBP結合部位の構造を重ね合わせて示す。図2-2-21aに示した通り、FBP結合部位は、Arg173, Lys185, Asn186, His188, Tyr190及びこれとP軸を介して2回対称の位置にある隣サブユニットの残基によって構成されており、FBPは両側のサブユニットから伸びた側鎖に挟まれるようにして、それらと特異的結合を作っている。特にArg173とHis188はすべてのアロステリックLDHで保存されている重要な残基である。P軸で関係づけられた2つのHis188は、FBPのフルクトース環の面と同じ向きでイミダゾール環を合わせており、その2つの窒素原子はFBPの両方のリン酸基と近い位置にある。一方、Arg173はFBPの方向に大きく伸びてリン酸基を一つづつ両側からおさえている構造をとっている。野生型のFBPの結合していないT状態の構造(図2-2-21b)では、Arg173は別の向きを向いている。His188をTyrに置換した変異体(H188Y)はFBPに対して完全に脱感作され、Arg173をGlnに置換した変異体(R173Q)はFBPに対する感受性が非常に落ちる($A_{1/2}(\text{FBP}) = 2.47 \text{ mM}$ 。同じ条件で野生型は $A_{1/2}(\text{FBP}) = 11.75 \mu\text{M}$) [31,32]。脱感作型LDH(R173Q/H188Y)のFBP結合部位の構造から(図2-2-21c)、

Hisから置換されたTyr188は、T構造とR構造でその配置を大きく変えていることが分かる。野生型酵素のFBPの結合していないT状態の構造では、His188はこのように大きくは動いていない。一方、Argから置換されたGln173は、その側鎖が短くなった上に正電荷を失っているために、FBPのリン酸基とはもはや結合できなくなっている。

今回得られたハイブリッドLDHの不完全な(DとWサブユニットからなる)FBP結合部位は、その片側はHis188とArg173であり、もう一方がTyr188とGln173となったものである。以上のように、FBP結合部位は両側の側鎖が密接に相互作用を行っており、R173Q/H188Yの変異はその相互作用を完璧に破壊していることから、このような不完全なFBP結合部位はその結合能を失っているものと思われる。まず、片側がGln173になっているため、FBPのリン酸基の片方をおさえることができなくなっている。さらにHis188は両側からFBPをはさむことにより機能することから、片側だけではFBPをおさえることは不可能であると考えられる。その上、もう片方のTyr188は側鎖を大きく動かしてFBPの結合を阻害している可能性がある。

以上のように、Native-PAGE、陰イオン交換クロマトグラフィー(MonoQ)、速度論的解析および結晶構造の知見から、各ピークがそれぞれ図2-2-3に示したような立体配置を持つハイブリッドLDHであると結論するのが最も適切である。なお、MonoQで分離されるD2W2の2つのピークが異なる立体配置を持つハイブリッドLDHであり、本来同じ分子種のピークが割れたものではないことは、再クロマトグラフィーの結果と、第4章で述べる*in vitro*でのハイブリッド形成の結果から、明らかである。しかし、各ハイブリッドの立体配置については完全に証明されたとは言えず、何らかの実験的な証拠が必要なことは否定できない。

では、分子全体の電荷は同じであるにもかかわらず、なぜD2W2がその立体配置の違いによって陰イオン交換クロマトグラフィーで分離されたのだろうか？ D2W2だけでなく、D2I2やこの後の章で実験を行なった全ての組み合わせにおいて、K316E/R317Dの電荷のタグを持つハイブリッドLDHは同様に分離されたことから、この分離はFBPに対する感受性の違いなどによるものではなく、タグの持つ性質によることが明らかである。最も妥当な解釈として、図2-2-22に示したようなタグの位置の違いが考えられる。タグを持つ2つのサブユニットがP軸で向かい合っているようなハイブリッドLDH(D2W2-PおよびD2I2-P)では、その他の2種の「異性体」(D2W2-QRおよびD2I2-QR)に比べて、表面電荷が片寄って存在している。今回導入したタグの位置はP軸に近い位置に存在しており、P軸、Q軸およびR軸で関係づけられたそれらのタグの距離は、それぞれ4.5 Å、7.0 Å、8.0 Åである。その距離に加えて、P軸で関係づけられたタグは、酵素表面の同じ側に存在している。今回使用した陰イオン交換カラムMonoQの担体であるmono beadsは、直径約10 μmの均一な球形であり、直径が100 Å以下である本酵素に比べて圧倒的に大きいため、酵素はその表面の一部分でMonoQ担体と相互作用するはずである。従って、表面の片側に負の電荷の片寄ったハイブリッドLDHの方がMonoQとの相互作用が強く、後の方のピークとなって溶出したと考えられる。

それとは別に、タグの変異導入(K316E/R317D)やハイブリッド形成などによって何らかの構造変化が起こって、その結果カラムとの相互作用が変化したとも考えることができる。しかし、以下に述べるような理由から、この考えは適当でないと思われる。

1) Native-PAGEの5つのバンドは等間隔に並び、D2W2-QRとD2W2-Pは同じ移動度を示した。これは全てのハイブリッドLDHのstokes半径が同じであることを示している。

2) すべてのハイブリッドLDHが安定に形成されることと、これらがすべて通常の酵素活性を持っていることから、少なくともサブユニット界面と活性部位の付近では構造変化は起こってないと考えられる。

3) 今回用いた全ての変異体LDHのCDスペクトルはほぼ同一であることから、大きな二次構造変化は起こっていないことが分かる(図2-2-23)。

不活性型LDHも、その活性を失っているものの、CDスペクトルおよび熱安定性、各カラムとの相互作用などの精製条件が変わらなかったことから、野生型LDHとほぼ同じ構造を保っていると考えられる。さらに、不活性型LDHを加えると野生型LDHと同様にNADHの蛍光が増大したことから、補酵素との結合能が保たれていることが明らかとなった(図2-2-24)。野生型LDHはさらに基質のアナログであるオキザム酸を加えることにより蛍光の減少が観測されるが(FBP存在下では、図のように4mM加えるとほぼ飽和する)。野生型LDHのオキザム酸に対する解離定数は鎌田によって詳しく研究されている[32]、不活性型LDHはオキザム酸を15mM加えても変化がなかった。これは、基質との結合能は失っていることを示している。

D-Wハイブリッドの速度論的性質について

本酵素では、他のLDHと同様に、基質が高濃度になると活性が低下する現象である基質阻害を受ける。従って、本論文では全て、活性が低下するより低い基質濃度においてHill equationを用いて各パラメーターを計算した。

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{(\text{pyruvate})^{nH}}{(\text{pyruvate})^{nH} + (S_{1/2})^{nH}}$$

それぞれVmaxは最大の反応速度、S1/2は最大活性の半分を与える基質濃度、nHはヒル係数である。ヒル係数は飽和曲線がシグモイダルになるに従って大きくなり、最大値はその酵素のサブユニット数(本酵素では4)である。飽和曲線が双曲線型になるにしたがってヒル係数は減少し、最少値である1になった時に、Hill equationはミカエリス-メンテンの式と同一になる。

本酵素のピルビン酸の飽和曲線のMWCモデルに従ったフィッティングは基質阻害のために信頼性にかけることから、本論文ではあえてこの式を用いなかった。これ以降は、FBP結合部位の数やサブユニットの数などの変化と、Hill equationによる各パラメーターの変化がMWCモデルに合うかどうか、半定量的に議論する。

6つのピークの前半の3つであるD4、D3W1、D2W2-QRは、FBPに対し

て完全に脱感作されており、それらの速度論的パラメーターは実質上同じであった。S1/2(Pyr)は、その大きなエラーにより、正確に求めることができなかつた(図2-2-9、エラーバー参照)。それらの飽和曲線がシグモイダルでヒル係数がどれも2以上であることから、脱感作したハイブリッドLDHも基質によるホモトロピックな活性化を受けることが分かる。これは、脱感作型ハイブリッドLDHはFBPに対する結合能を失っているものの、T状態とR状態間の構造転移は起こることを示している。

次のピークであるD2W2-Pは、FBP非存在下ではD2W2-QRとほぼ同じビルビン酸飽和曲線を示す。しかし、0.1mMのFBPを加えることにより強く活性化され、S1/2(Pyr)は大きく減少し、精度よく決定することができるようになる(図2-2-9)。飽和曲線はかなり双曲線型に近づくが、やはりシグモイダルな形をしている。D1W3は、D2W2-Pとほぼ同じ性質を示した。

最後のピークであるW4は、野生型(電荷導入型)LDHである。これはD2W2-PおよびD1W3と同様にFBPによって強く活性化されるが、S1/2(Pyr)はこれらに比べて明らかに減少する(図2-2-9)。ヒル係数もこれらに比べて減少し($n_H=1.3$)、飽和曲線はほぼ双曲線型になる。

FBPによって活性化される最後の3つのハイブリッドLDHでは、S1/2(FBP)は大きく違わなかつたことから(表2-2-8)、FBP結合部位の感受性に変化がないことが分かる。

(FBP結合部位が2つあるため、W4は他の2つに比べてある程度はシグモイダルになり得る。しかし、FBPはT状態とR状態の両方にはほぼ同じ強い親和性を示す上に[32]、5mMビルビン酸という高い基質濃度で測定しているために、W4のFBP飽和曲線の協同性は隠されて、双曲線型になっている。)

FBPで活性化されるハイブリッドLDHのうち、前者2つ(D2W2-PとD1W3)はW4に対して、S1/2(Pyr)およびヒル係数の値により明らかに区別される。この分類は、それらが持つ完全なFBP結合部位の数に対応している。この結果は、岩田らが結晶構造をもとにして提唱したモデルによって矛盾なく説明できる。このモデルでは、FBPの結合がP軸界面に存在する正電荷の反発を打ち消すことにより、この界面がより近づいた状態であるR状態が安定化され、T-R平衡がR状態に移動するとしている。まともなFBP結合部位が一つしかないD2W2-PおよびD1W3はこの電荷の反発を完全に打ち消すことができず、平衡の移動が野生型LDH(W4)に比べて中間の位置にとどまると考えられる。なお、脱感作型LDH(R173Q/H188Y)はそれ自体P軸界面に存在する正電荷が減っているが、それらの変異がT-R状態のエネルギー差にもたらす寄与は0.8 kcal/mol程度であり、FBPの結合によるものより十分小さなものであることが分かっている[32]。

FBPによる活性化は主にS1/2(Pyr)の減少としてあらわれ(図2-2-9)、 V_{max} はあまり増大しなかつた(表2-2-8)。この結果もMWCモデルの提唱するT-R平衡の移動によって説明がつく。

D-Iハイブリッドの速度論的性質について

FBP非存在下では、各ハイブリッドの V_{max} はDサブユニットの数に比例しており、I 4の活性は非常に低かった(図2-2-19)。これにより、Iサブユニットの活性は測定されないことが確認された。D 1 I 3は活性サブユニット(D)をただ一つしか持っていないため、ミカエリス-メンテンの式でフィッティングした。

完全なFBP結合部位を持たないD 4、D 3 I 1およびD 2 I 2-QRは、予想通り脱感作されていた(図2-2-14)。一方、D 2 I 2-PおよびD 1 I 3はFBPにより明らかに活性化された(図2-2-15、図2-2-16)。ここではDサブユニットの活性のみを測定していることに注目してほしい。すなわちこれは、図2-2-5に示すように、FBPによる活性化がIサブユニットからDサブユニットにQ軸界面のサブユニット間相互作用を通じて伝わったことを直接観測している非常に興味深い結果である。なお、FBP結合部位はP軸界面にまたがって存在しているために、本酵素ではP軸界面を伝わるヘテロトロピックな活性化を観測することはできない。

D 2 I 2-PとD 1 I 3の $S1/2(FBP)$ は野生型LDHよりも若干大きかった(表2-2-18)。しかし、これはFBP非存在下および存在下での活性の差がこの条件(5 mMピルビン酸)ではあまり大きくないことによるものであり(図2-17)、FBP結合部位の感受性は本質的には変わっていないと考えられる。

FBPによる活性化は主に $S1/2(Pyr)$ に影響している(図2-2-20)。 V_{max} も大きくなっているが、2倍以上にはなっていない(表2-2-18)。この結果もMWCモデルのT-R平衡の移動によって説明がつく。

Dサブユニットの数が減少するに従って、ヒル係数は減少して1に近づく(図2-2-19)。そして、 $S1/2(Pyr)$ も減少している(図2-2-20)。ヒル係数の減少はMWCモデルに一致しているが、 $S1/2(Pyr)$ の減少はそのままではモデルと合わない結果である。MWCモデルでは、T状態とR状態の平衡定数である $L(L=[T]/[R])$ が一定ならば、活性サブユニット(リガンドの結合可能なサブユニット)の減少に従って $S1/2$ が大きくなる。つまり、Iサブユニットには基質は結合しないため、Dサブユニットの少ないハイブリッドLDHは、これをR状態で飽和するのにより多くの基質を必要とするはずである[35,43]。これをうまく説明するには、Iサブユニットが増えるに従って平衡がRに寄っている(L が小さくなっている)と考えるしかない。His195はQ軸界面の近くに存在している残基であるため、これをAsnに置換したIサブユニットはQ軸界面の性質が変化している可能性がある。岩田らは、Q軸界面の疎水性相互作用をする面積のT-R状態での差異も、P軸界面の反発とともに両状態のエネルギーバランスに寄与していると述べている[2]。NADH飽和条件下、FBP非存在下での野生型LDHの両状態の自由エネルギー差は5.0 kcal/molしかないことから[32]、このような1残基の変異でも平衡を大きく動かすには十分であると考えられる。

本酵素の活性化モデルとの、構造をもとにしたさらに詳細な検証は、次の章のホモトロピックな活性化に関する解析結果と併せて、第6章の総合討論で述べる。

脱感作型LDH
(R173Q/H188Y)
Dサブユニット

野生型(電荷導入型)LDH
(K316E/R317D)
Wサブユニット

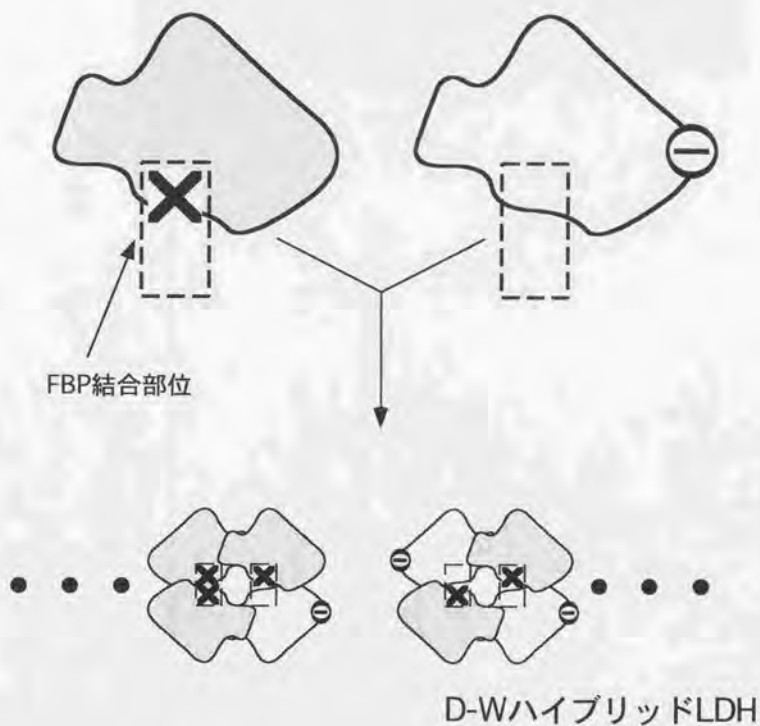


図2-2-1 FBP脱感作型LDH(R173Q/H188Y) (Dサブユニット) と
野生型(電荷導入型)LDH(K316E/R317D) (Wサブユニット)
からなるハイブリッドLDH (D-Wハイブリッド)

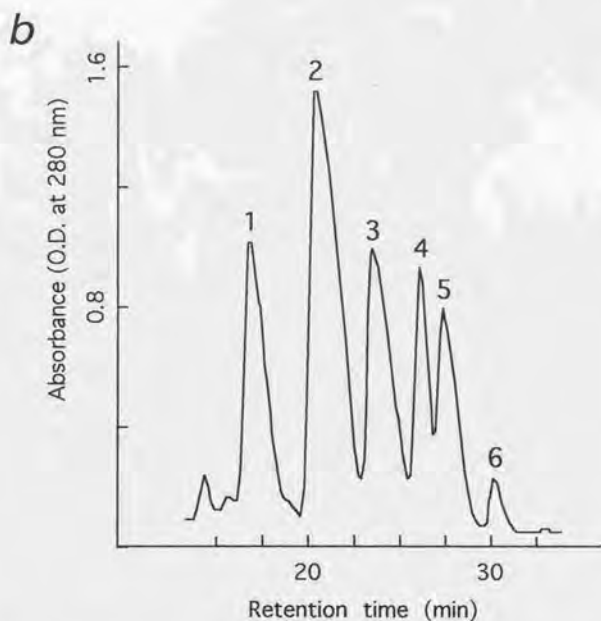


図2-2-2 MonoQによるD-Wハイブリッドの分離

a Native-PAGE; 各レーンの番号はbのピークの番号に対応している。
レーン0は分離前のサンプル

b MonoQのチャート

KCl 0-0.6 Mの直線型グラジエントによる溶出(40分)を行なった。

流速 1.0 ml/min

FBPによる活性化

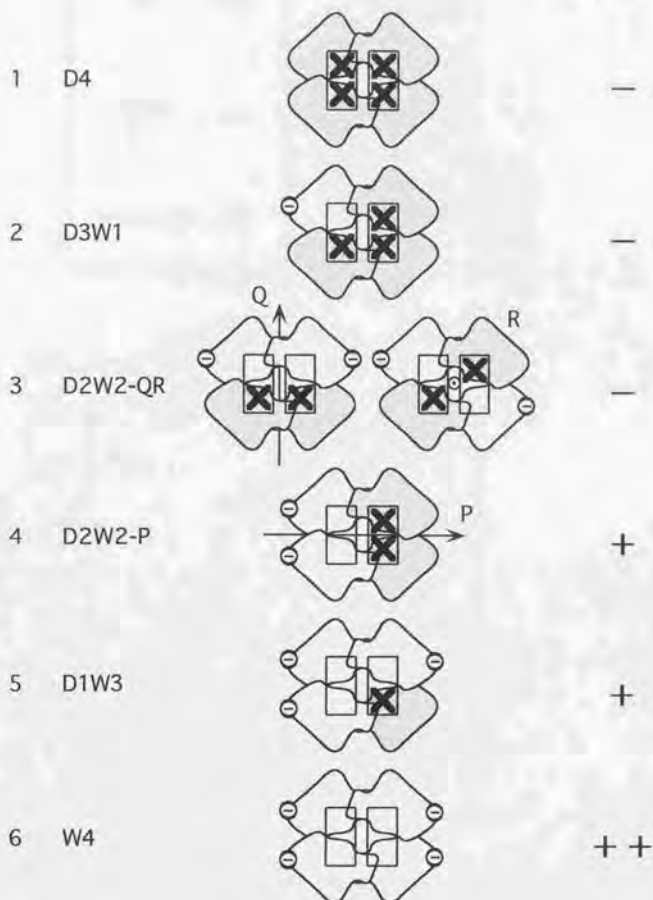


図2-2-3 分離されたD-Wハイブリッドの立体配置およびFBPによる活性化の違い
それぞれ、図2-2bの1-6のピークに対応している。

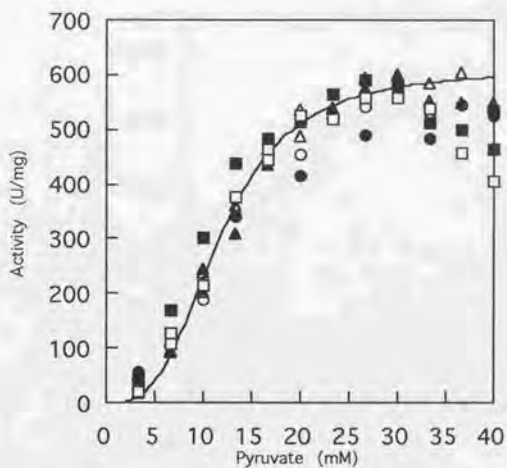
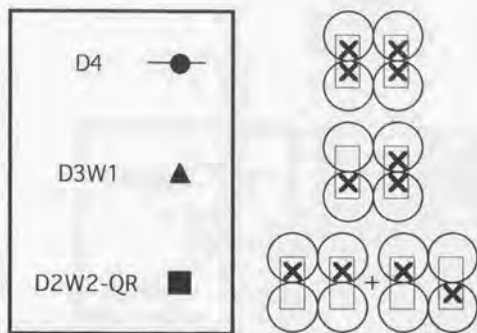


図2-2-4 D4, D3W1, D2W2-QRのピルビン酸飽和曲線

これらのハイブリッドLDHは完全なFBP結合部位を一つも持たない。FBP非存在下の場合は黒で、0.1 mM FBP存在下の場合は白ぬきでそれぞれあらわした。

測定条件は、ピルビン酸およびFBP濃度を変化させた以外は、方法で示した標準活性測定法に従った。

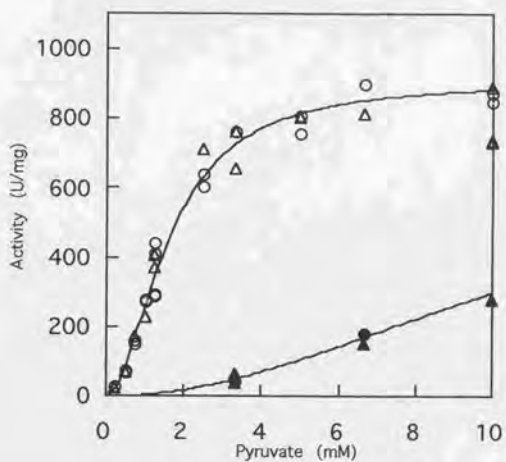
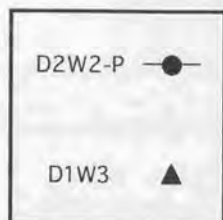


図2-2-5 D2W2-P, D1W3のピルビン酸飽和曲線

これらは完全なFBP結合部位を1つ持つ。
 FBP非存在下の場合は黒で、0.1 mM FBP存在下の場合は白ぬき
 でそれぞれあらわした。

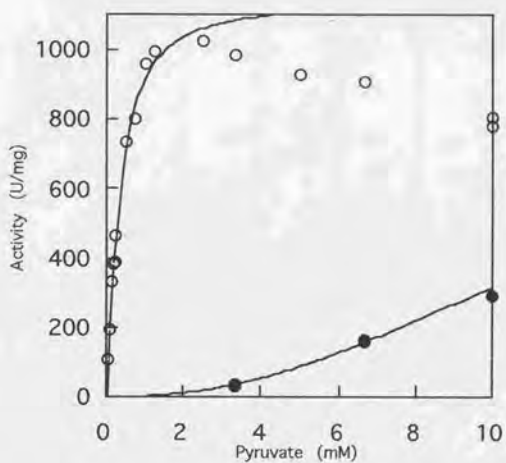
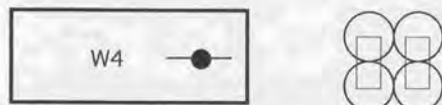


図2-2-6 W4（野生型LDH）のピルビン酸飽和曲線

W4（野生型LDH）は完全なFBP結合部位を2つ持つ。
 FBP非存在下の場合黒で、0.1 mM FBP存在下の場合白ぬき
 でそれぞれあらわした。

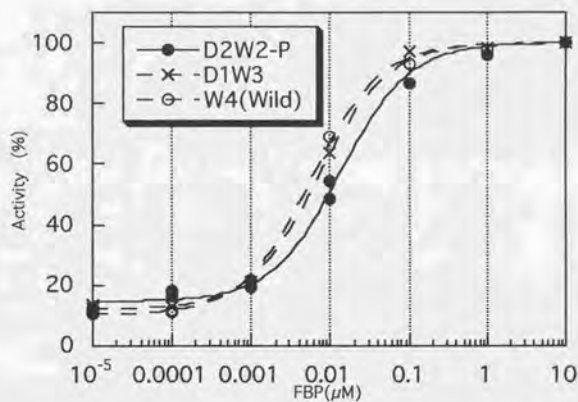


図2-2-7 D2W2-P, D1W3, W4のFBPによる飽和曲線

ピルビン酸濃度は5 mMで測定した。

その他の条件は方法で示した標準活性測定法に従った。

Hybrids		Vmax (U/mg)	S1/2(Pyr) (mM)	ヒル係数(nH)	S1/2(FBP) (nM)
D4	-FBP	560(25)	220(130)	2.2(0.3)	-
	+FBP	550(14)	2700(2200)	3.2(0.3)	
D3W1	-FBP	700(51)	390(210)	2.3(0.3)	-
	+FBP	630(20)	1500(660)	2.9(0.2)	
D2W2-QR	-FBP	640(20)	270(82)	2.4(0.2)	-
	+FBP	610(30)	1100(640)	2.9(0.3)	
D2W2-P	-FBP	680(45)	160(91)	2.1(0.3)	13
	+FBP	910(25)	2.5(0.2)	1.9(0.2)	
D1W3	-FBP	750(53)	300(200)	2.3(0.3)	7
	+FBP	800(25)	2.0(0.3)	2.7(0.4)	
W4	-FBP	890(40)	390(160)	2.3(0.2)	6
	+FBP	1100(66)	0.25(0.075)	1.3(0.2)	

表2-2-8 D-Wハイブリッドの速度論的パラメーター

図2-2-4 ~ 図2-2-6 で示した測定値を元に計算した。

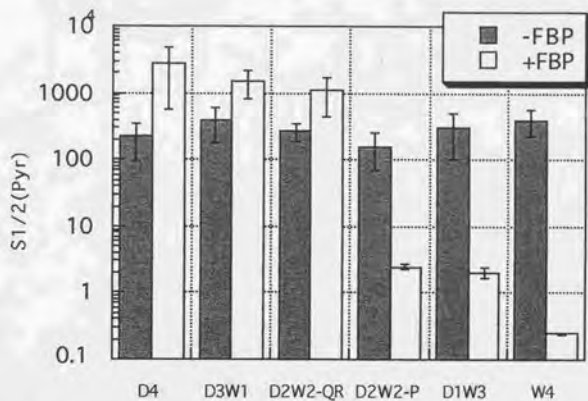


図2-2-9 D-WハイブリッドのS1/2(Pyr)

表2-2-8の値をグラフに表した。

脱感作型LDH
(R173Q/H188Y)
Dサブユニット

不活性型(電荷導入型)LDH
(H195N/K316E/R317D)
Iサブユニット

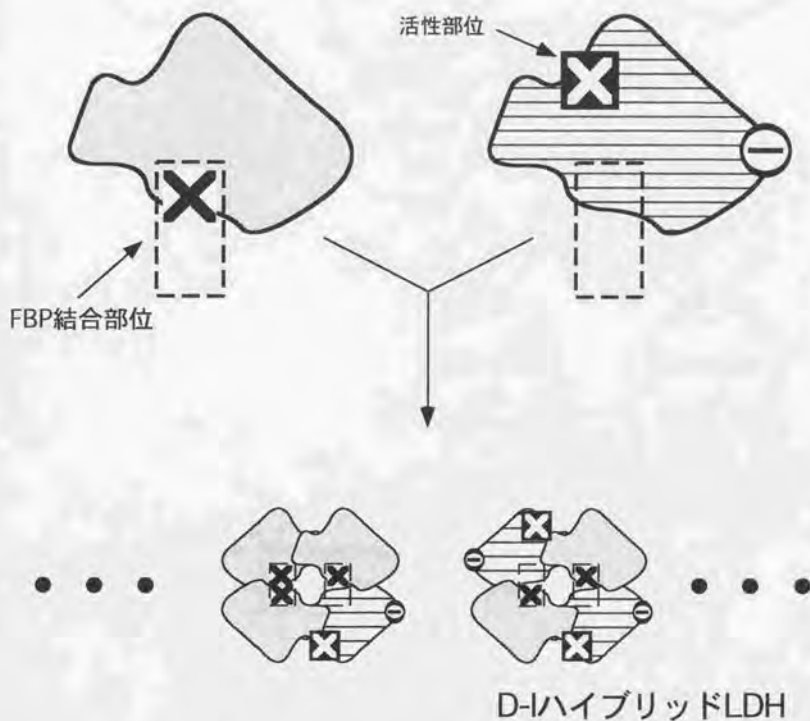


図2-2-10 FBP脱感作型LDH(R173Q/H188Y) (Dサブユニット) と
不活性型(電荷導入型) LDH(H195N/K316E/R317D)
(Iサブユニット) からなるハイブリッドLDH
(D-Iハイブリッド)

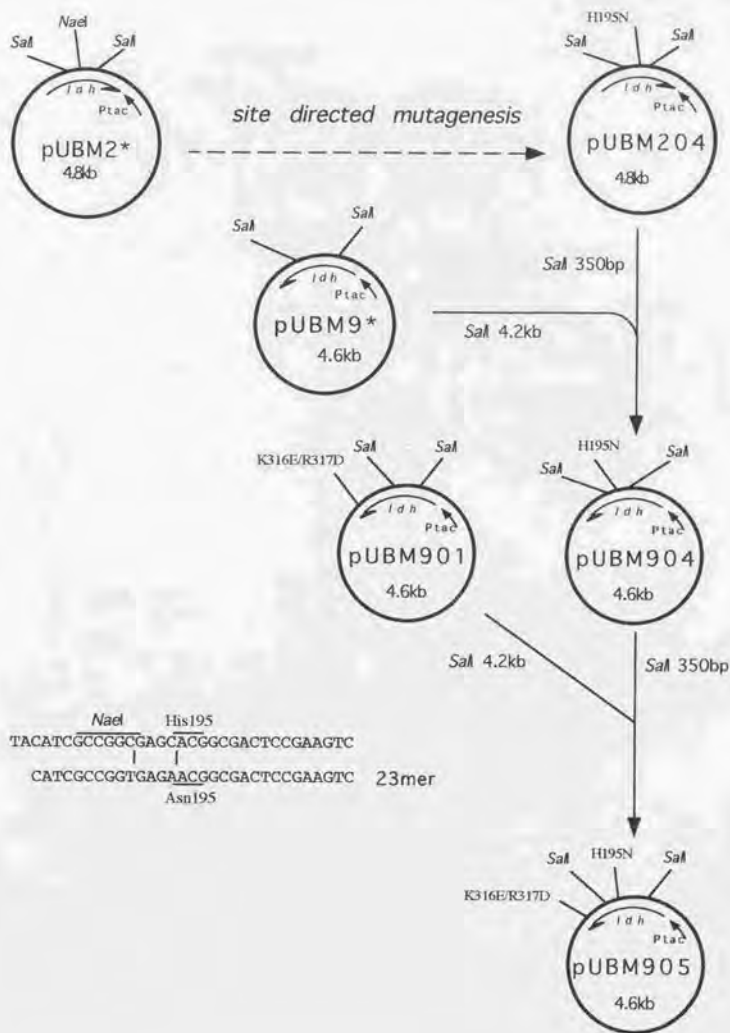


図2-2-11 不活性型LDH(H195N)と
 不活性型(電荷導入型)LDH(H195N/K316E/R317D)の作製

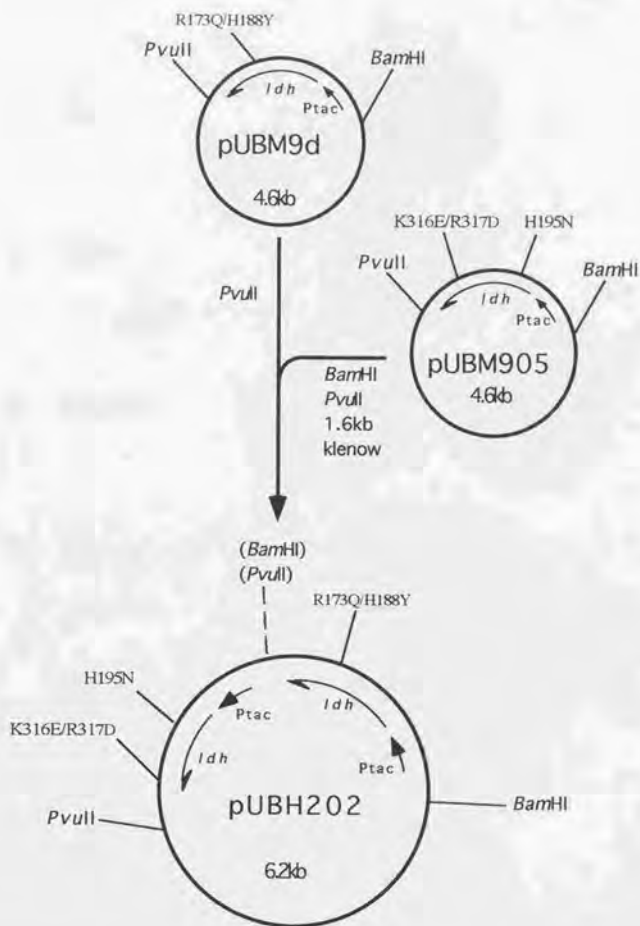


図2-2-12 脱感作型LDH(R173Q/H188Y)と不活性型(電荷導入型)LDH(H195N/K316E/R317D)のハイブリッドLDH発現ベクターの作製

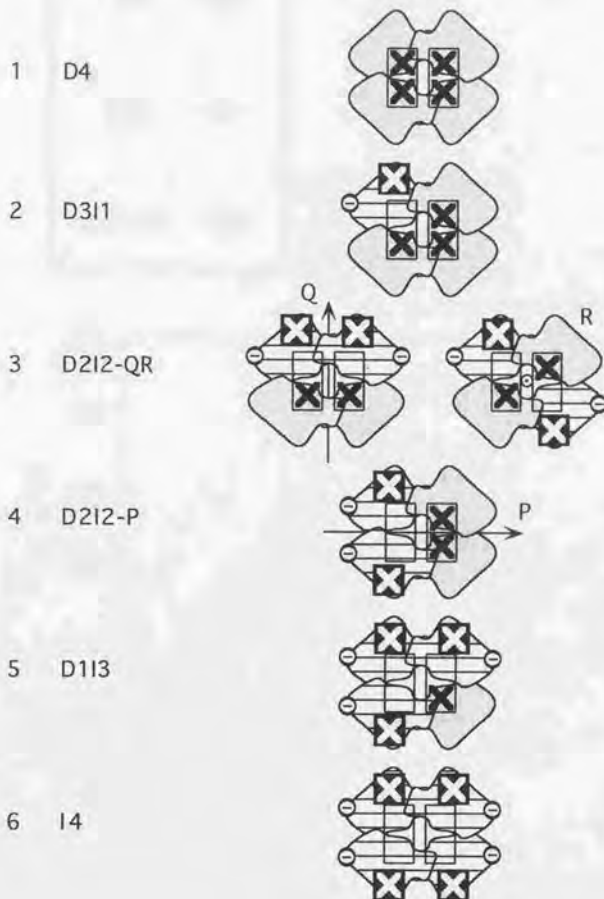


図2-2-13 分離されたD-Iハイブリッドの立体配置

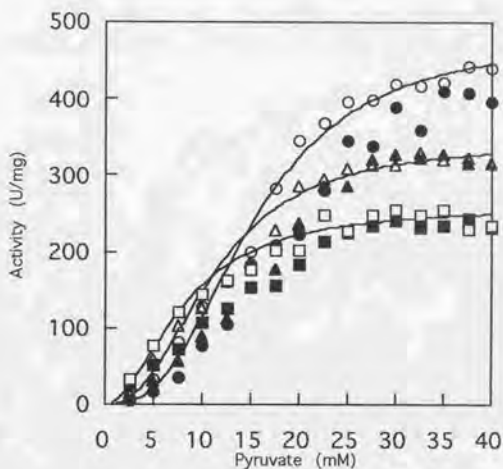
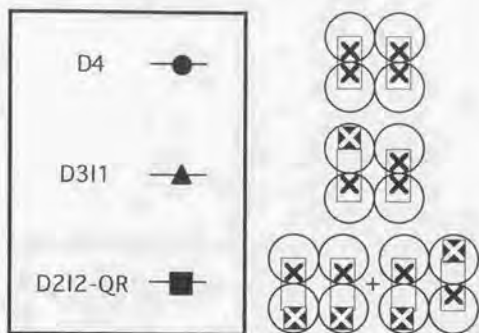


図2-2-14 D4, D311, D212-QRのピルビン酸飽和曲線

これらのハイブリッドLDHは完全なFBP結合部位を持たない。FBP非存在下の場合は黒で、0.1 mM FBP存在下の場合は白ぬきでそれぞれあらわした。

測定条件は、ピルビン酸およびFBP濃度を变化させた以外は、方法で示した標準活性測定法に従った。

D212-P —●—

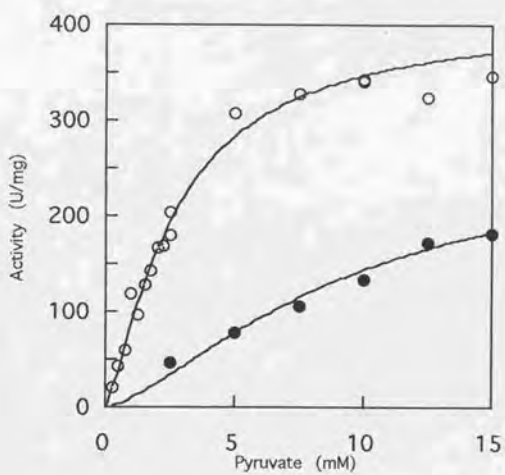
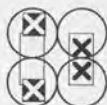


図2-2-15 D212-Pのピルビン酸飽和曲線

FBP非存在下の場合は黒で、0.1 mM FBP存在下の場合は白ぬきでそれぞれあらわした。

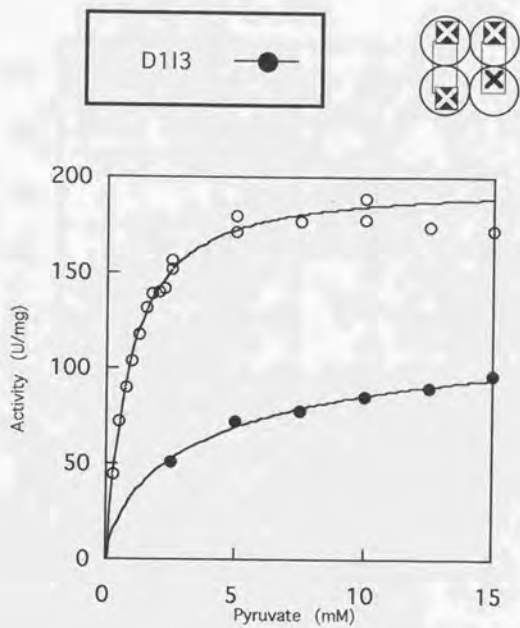


図2-2-16 D113のピルビン酸飽和曲線

FBP非存在下の場合黒で、0.1 mM FBP存在下の場合白ぬきでそれぞれあらわした。

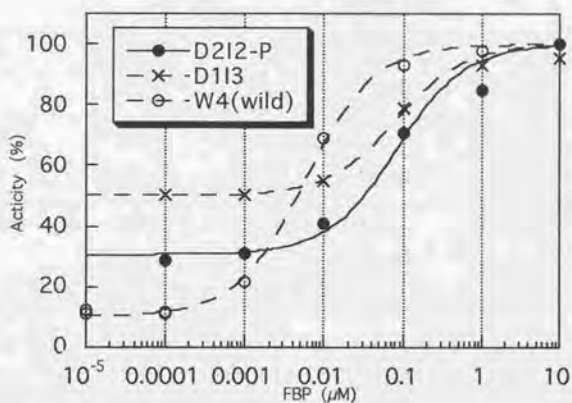


図2-2-17 D2I2-P, D1I3, W4(control)のFBPによる飽和曲線

controlとして、W4(野生型LDH)の測定点も同時に示している。
 ピルビン酸濃度は5 mMで測定した。
 その他の条件は方法で示した標準活性測定法に従った。

Hybrids		Vmax (U/mg)	S1/2(Pyr) (mM)	ヒル係数(nH)	S1/2(FBP) (nM)
D4	-FBP	470(30)	3000(2500)	2.8(0.2)	-
	+FBP	480(18)	1600(1000)	2.7(0.3)	
D3II	-FBP	360(20)	2200(2200)	2.8(0.4)	-
	+FBP	340(12)	330(180)	2.4(0.3)	
D2I2-QR	-FBP	270(18)	95(47)	1.8(0.3)	-
	+FBP	260(12)	58(37)	1.9(0.4)	
D2I2-P	-FBP	270(13)	28(7.8)	1.5(0.2)	80
	+FBP	410(30)	3.7(0.3)	1.3(0.2)	
DII3	-FBP	120(4)	3.3(0.5)	1.0	80
	+FBP	200(3)	0.87(0.05)	1.0	

表2-2-18 D-I ハイブリッドの速度論的パラメーター

図2-2-14 ~図2-2-16 で示した測定値を元に計算した。

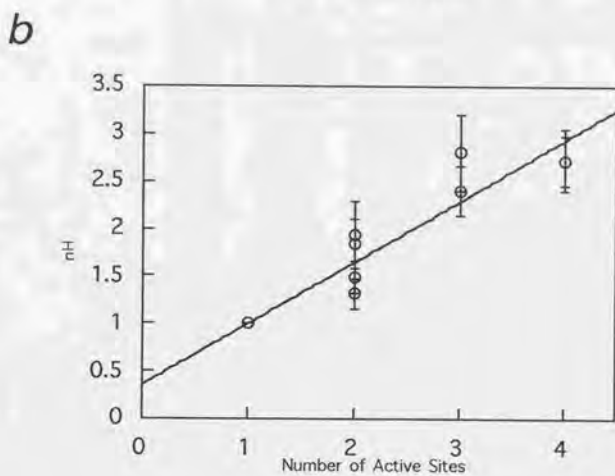
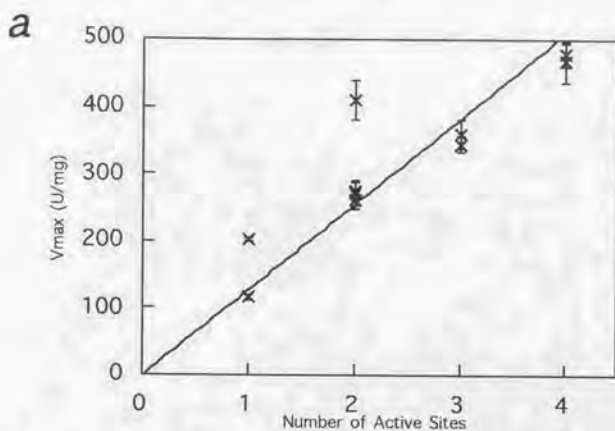


図2-2-19 D-ハイブリッドにおける
Dサブユニットの数に対するVmaxおよびヒル係数の変化
表2-2-18の値をグラフに表した。

a Vmaxの変化

Dサブユニットが1および2の場合に上に出ている点は、

D2I2-PおよびD1I3がFBPIにより活性化された場合の値である。

b ヒル係数(nH)の変化

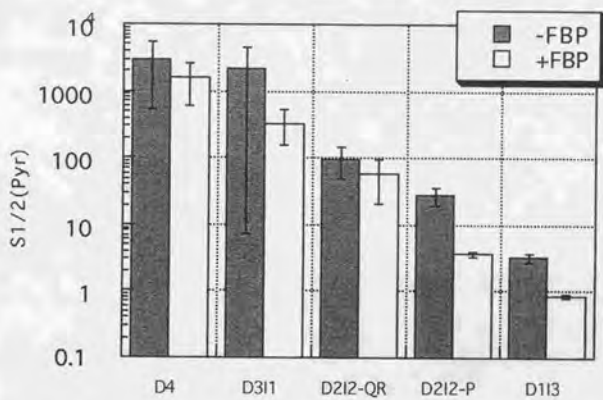


図2-2-20 D-IハイブリッドのS1/2(Pyr)

表2-2-18の値をグラフに表した。

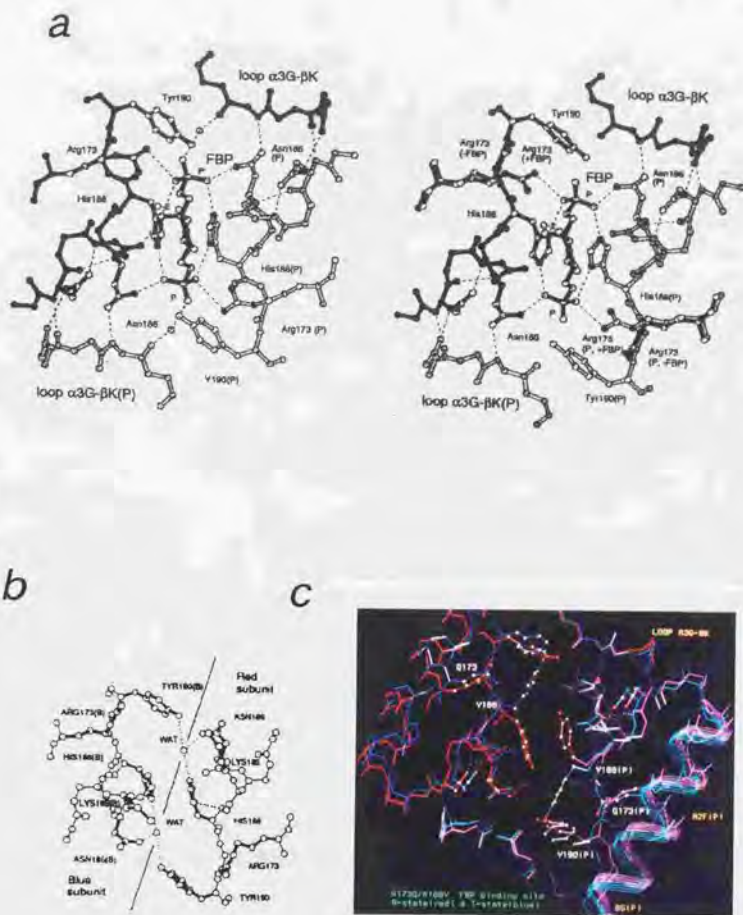


図2-2-21 BLLDHのFBP結合部位の構造

a T状態（左）およびR状態（右）で、FBPが結合している構造

b T状態で、FBPが結合していない構造

c FBP脱感作型LDH(R173Q/H188Y)のT状態とR状態の構造

青色及び水色で示したT状態と、赤色及びマゼンタで示したR状態の構造を重ね合せてある。

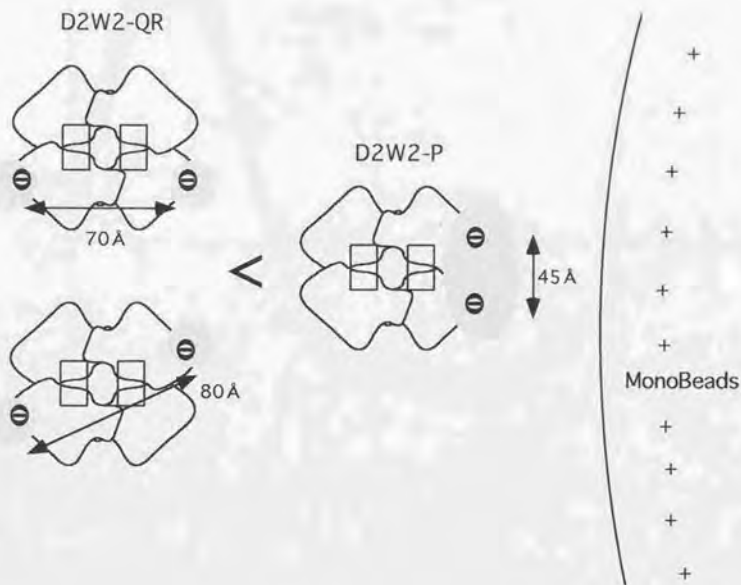


図2-2-22 D2W2-QRおよびD2W2-Pのタグの位置の違いと陰イオン交換担体との相互作用の違い

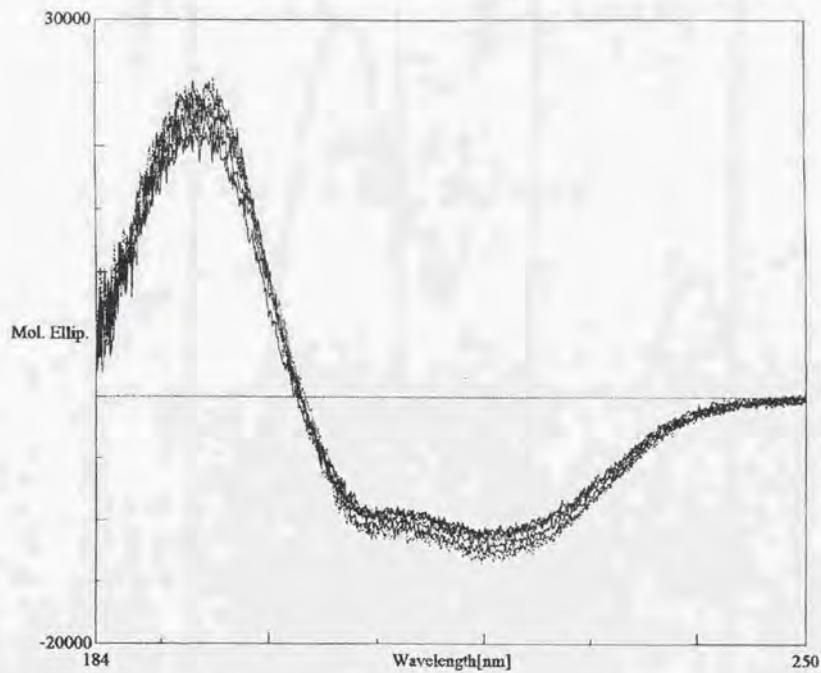


図2-2-23 今回使用したすべての変異体のCDスペクトル

測定条件は方法に記した。

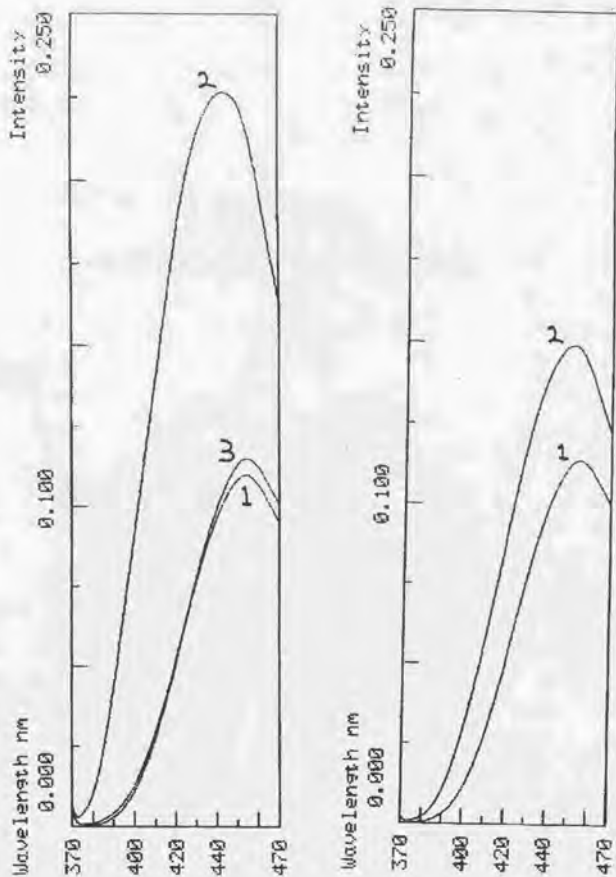


図2-2-24 野生型LDH および不活性型LDH(H195N)における、
NADHの蛍光変化 (励起波長 360 nm)

250 mM MES-NaOH Buffer (pH6.5), FBP 0.1 mM, NADH 0.2 mM
酵素 終濃度20 μ M

- 左 1: NADHのみ; 2: 野生型LDHを加えた
3: さらにオキザム酸 (4 mM final)を加えた
- 右 1: NADHのみ; 2: 不活性型LDHを加えた
さらにオキザム酸 を15 mMになるまで加えても
変化はなかった

FBPによる
ヘテロトロピックな活性化

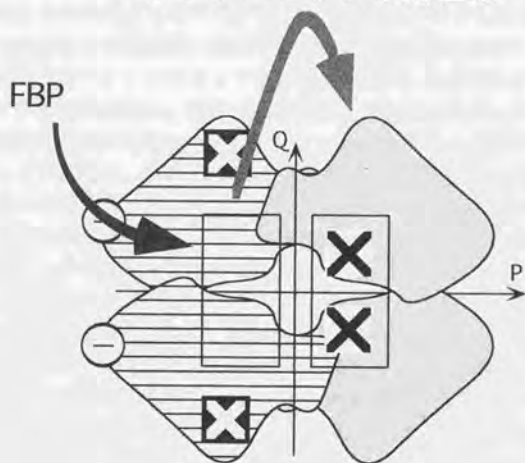


図2-2-25 D2I2-Pを用いて観測された、Q軸サブユニット界面を伝わる
FBPによる活性化

第2部 第3章

基質特異性変異型サブユニットを用いたホモトロピック活性化機構の解析

序

前章ではFBP脱感作型サブユニットと不活性型サブユニットのハイブリッドLDHを用いて、Q軸界面を伝わるヘテロトロピックな活性化を直接観測することができた。しかし、FBP結合部位はP軸界面にまたがって存在しているために、P軸界面を伝わる活性化を観測することはできなかった。このようなサブユニット同士の協同性がP軸界面にも存在するかどうかは興味深い問題である。本酵素のアロステリックな活性化の様式として、FBPによるヘテロトロピックな活性化の他に、基質であるピルビン酸によるホモトロピックな活性化がある。前章で観測したような活性化が、ホモトロピックなものに関しても同様に存在するのにも興味深い。また、基質結合部位は各サブユニットにそれぞれ存在しているため、ヘテロトロピックな活性化では観測不可能だったP軸を伝わる活性化についても調べることができる。

LDHの活性部位については触媒に關する残基およびその基質認識に關する残基が知られており、その詳細な触媒機構が解明されている(図2-3-1) [6,52]。基質結合部位に存在する残基の多くはLDHと同じファミリーの酵素であるリンゴ酸脱水素酵素(MDH)についても保存されており、同様の立体配置で存在していることが知られている[53]が、そのうち、LDHではGln102にあたる部分はMDHではArgになっている。このArgは基質であるオキサロ酢酸/リンゴ酸のカルボキシル基をおさえる位置にある。BSLDHにおいてGln102をArgに置換した結果(Q102R)、基質特異性がLDH(ピルビン酸/乳酸)からMDH(オキサロ酢酸/リンゴ酸)に変化して、その基質特異性は天然に存在するMDHよりも強いものであった[10,54,55]。BSLDHでは、さらに多くのGln102の変異体がとられて、それらの基質特異性の変化に関する詳細な研究が行なわれている[56,57]。本酵素でもこのQ102Rの変異体が作製され、それがBSLDHと同様に基質特異性の強いMDH活性を持つことが確認されている[42,43]。

本章では、基質特異性の変化したMDH型変異体酵素(Q102R)と野生型LDHのハイブリッドLDHを第2章と同様に作製し、それらの速度論的解析を行なうことによって本酵素の基質によるホモトロピックな活性化機構を解析することを試みた。

なお、本章で用いるオキサム酸はLDHの基質アナログであり、基質と同様に結合するが触媒されない。本酵素のT状態は基質の結合できない構造になっており[51]、オキサム酸が活性部位に結合するとその構造はR状態になる。

結果

第1章(2-1-2)で構築した、MDH型変異体酵素(Q102R)と野生型(電荷導入型)LDH(K316E/R317D)の遺伝子がタンデムに並んだ発現ベクター(pUBH205)(図2-1-10)からハイブリッドLDHを発現、精製、分離し、それぞれの解析を行なった。

ここではMDH型サブユニットをMサブユニット、野生型サブユニットをLサブユニットと表すことにする(図2-3-2)。なお、Lサブユニットは、2-1でWサブユニットと呼んでいたものと同一である。これらのサブユニットからなるハイブリッドは「M-Lハイブリッド」と表す。

M-Lハイブリッドの発現、精製、分離は第2章のD-WハイブリッドおよびD-1ハイブリッドと同様に行われ、M4、M3L1、M2L2-QR、M2L2-P、M1L3、L4の6つのピークが得られた。図2-3-3にMonoQクロマトグラフィーとNative-PAGEの結果を示す。これらの結果も第2章とほぼ同様であったため、M-Lハイブリッドの組成および立体配置もこれまでと同様に決定された(図2-3-4)。

その後、分離された各ハイブリッドの速度論的性質を調べた。測定条件は、各リガンドの濃度を变化した以外は、方法に示した標準活性測定法に従った。

まず、MサブユニットおよびLサブユニットのLDH活性およびMDH活性について調べた。

図2-3-5abに、FBP非存在下(図2-3-5a)およびFBP存在下(図2-3-5b)でのビルビン酸飽和曲線(LDH活性)を示す。MサブユニットにはLDH活性がほとんどないことが分かる。

次に、FBP存在下でのオキサロ酢酸飽和曲線(MDH活性)を図2-3-6bに示す。Lサブユニットにも若干MDH活性があることが分かる。なお、FBP非存在下では、どのハイブリッドも(M4も)ほとんど活性がなかった(図2-3-6a)。

次に、LDH活性およびMDH活性に対するオキサム酸による阻害を調べた。

図2-3-7aにLDH活性に対するオキサム酸の阻害を調べた結果を示す。FBP存在下、ビルビン酸2mMの条件で、オキサム酸濃度を变化して測定している。オキサム酸はLDHの基質アナログ(競争阻害剤)であるため、LDHの活性を強く阻害している。

図2-3-7bにMDH活性に対するオキサム酸の阻害を調べた結果を示した。FBP存在下、オキサロ酢酸2mMの条件で、オキサム酸濃度を变化して測定している。M4はほとんど阻害を受けていないが、約350 U/mgあったL4のMDH活性は、オキサム酸の結合によって強く阻害をうけた。これはオキサム酸はMサブユニットにはほとんど結合しないことを示している。

次に、Lサブユニットへのオキサム酸の結合が、MサブユニットのMDH活性にどのような影響を与えるか調べた。

図2-3-8aに、FBP非存在下、オキサロ酢酸2mM(一定)の条件で、オキサム酸濃度を变化して測定した結果を示した。オキサム酸が存在しないときはすべてのハイブリッドにおいて活性がほとんどないが、オキサム酸を加えていくことにより、MとLサブユニットの両方を含むハイブリッド(M3L1、M2L2-QR、M2L2-P、M1L

3) は活性が大きく上昇した。これは、Lサブユニットにオキサム酸が結合してそれをR状態にすることにより、Mサブユニットをホモトロピックに活性化したことを明らかに示している (図2-3-12)。

図2-3-9aにオキサム酸の添加によりオキサロ酢酸飽和曲線 (MDH活性) がどのように変化するか調べた結果を示した。FBP非存在下、オキサム酸濃度を10 mMおよび50 mMに固定した条件で、オキサロ酢酸濃度を変化して測定している。オキサム酸濃度が10 mMおよび50 mMの場合をそれぞれ白ぬきと黒のシンボルで表している。前に示したとおり、オキサム酸非存在下ではこの飽和曲線 (FBP非存在下でのオキサロ酢酸飽和曲線) はほとんど活性がないが、オキサム酸の添加により、MとLサブユニットの両方を含むハイブリッド (M3L1、M2L2-QR、M2L2-P、M1L3) は活性を示し、双曲線型の飽和曲線を示した。

また、ここであげた全ての条件において、M2L2-QRとM2L2-Pはその立体配置の違いにも関わらず全く同じ性質を示した。これは、本酵素の活性変化が全てのサブユニットの対称性を完全に保ちつつ起こることを示している。(詳しくは、後で考察する) なお、今回はFBP結合部位には変異を加えておらず、M2L2-QRとM2L2-PはFBPによるヘテロトロピックな活性化の違いはなかった。これは、基質結合部位の変異およびそのサブユニットの立体配置の違いはFBPの結合およびそれにもなう活性化には影響を与えないことを示している。

これらの飽和曲線を第2章と同様な方法でHill equationによるフィッティングを行い、その結果得られたパラメーターを表2-3-10、表2-3-11にまとめた。ただし、双曲線型の曲線に関しては、ミカエリス-メンテンの式 (Hill equationにおいて $nH=1$ としたもの) によってフィッティングした。オキサム酸による阻害は、その活性が半分になるオキサム酸濃度である $I_{1/2}(\text{Oxa})$ を求めた。M3L1、M2L2-QR、M2L2-P、M1L3のMDH活性に対するオキサム酸の阻害に関しては (図2-3-7b)、Mサブユニットの阻害は全く起こらずLサブユニットのMDH活性のみが阻害されると仮定して、オキサム酸による阻害が飽和の半分になる値を計算して $I_{1/2}(\text{Oxa})$ とした (表2-3-10b)。

また、これらのパラメーターのMおよびLサブユニットの数に従う変化を図2-3-5c、図2-3-6cd、図2-3-8b、図2-3-9bにまとめた。図2-3-5cではピルビン酸飽和曲線 (LDH活性) の V_{\max} および $S_{1/2}(\text{Pyr})$ を、図2-3-6cdではオキサロ酢酸飽和曲線 (MDH活性) の V_{\max} 、 $S_{1/2}(\text{OAA})$ およびヒル係数を、図2-3-8bではFBP非存在下、オキサロ酢酸2 mMでのオキサム酸飽和曲線の V_{\max} 、 $S_{1/2}(\text{Oxa})$ を、図2-3-9bではオキサロ酢酸飽和曲線のオキサム酸添加による変化に関して V_{\max} 、 $S_{1/2}(\text{OAA})$ をそれぞれ示した。

考察

M-Lハイブリッドの速度論的性質について

A Mサブユニット及びLサブユニットに対する各リガンドの親和性 (図2-3-5~図2-3-7)

図2-3-5~図2-3-7に示した実験により、MサブユニットおよびLサブユニットの、オキサム酸、ピルビン酸およびオキサロ酢酸に対する親和性の違いが明らかに示されている。すなわち、Lサブユニットはオキサム酸およびピルビン酸に強い親和性を持つが、オキサロ酢酸にも弱いながらも親和性がある。一方、Mサブユニットはオキサロ酢酸に対して強い親和性を持つが、オキサム酸およびピルビン酸にはほとんど親和性がない (図2-3-2)。

B L4のオキサム酸による阻害 (図2-3-7a)

表2-3-10に示した通り、L4のLDH活性に対する $I_1/2(\text{Oxa})$ は0.40 mMであった。NADHの蛍光変化によって精度よく求められた本酵素のオキサム酸に対する解離定数は0.51 mMであることが分かっている[32]。この解離定数を用いてオキサム酸が基質の競争阻害剤であると仮定した場合($E \rightarrow EI$ の結合はするが $ES \rightarrow ESI$ の結合はしない)、ピルビン酸がほぼ飽和しているこの条件では(2 mMで、 K_m の約8倍)、 $I_1/2(\text{Oxa})$ はこれよりずっと大きく3.6 mMになると計算される。これは、実際にはオキサム酸は触媒が終わって乳酸を放出したコンプレックス(酵素 \cdot NAD $^+$)にも結合して阻害するためではないかと考えられる。なお、脊椎動物LDHのH4アイソザイムにおいてはこのようなコンプレックス(LDH \cdot NAD $^+$ \cdot オキサム酸)が形成することが知られている[105]。本酵素の基質阻害の機構として(オキサム酸のかわりに)ピルビン酸がこのような「アポタイプ \cdot コンプレックス」とよばれるコンプレックスを形成することが提唱されており(第5章参照)、この場合も基質阻害のような様式で阻害を行なっていることから低い $I_1/2(\text{Oxa})$ を示しているのではないかと考えられる。

C 各ハイブリッドでのLDH活性およびMDH活性 (図2-3-5、図2-3-6)

LDH活性はやはりLサブユニットが多い方が高かった(図2-3-5ab)。FBP非存在下ではLサブユニットが3つ以上ないと活性を持たなかった。FBP存在下では、Lサブユニットが1つ以上ならば活性が見られた。FBP非存在下および存在下にかかわらず、Lサブユニットが増えるに従って V_{max} は上昇し、 $S_1/2(\text{Pyr})$ は減少している(図2-3-5c)。FBP非存在下ではシグモイドな曲線であり、ヒル係数も2.5程度であるが、FBP存在下ではどれもほぼMichaelis型の双曲線になった。 V_{max} および $S_1/2(\text{Pyr})$ の傾向は、活性サブユニットであるLサブユニットの数が増えるに従って活性の強い飽和曲

線に変化することを示している。

MDH活性はFBP非存在下ではM4に至ってもほとんどなかった。FBP存在下ではL4でもMDH活性は存在した(図2-3-6ab)。また、MDH活性の基質阻害はLDHよりも強く、オキサロ酢酸濃度が2 mMのあたりから活性の低下が起こっている。Mサブユニットが増えるに従ってVmaxは上昇し(M4では少し下がる)、S1/2(OAA)は減少している(図2-3-6c)。飽和曲線を見る限りM4とM3L1の活性はほぼ同じように見えるが、これはMサブユニットの強い基質阻害により見かけのVmaxが減少するためであると考えられる。S1/2(OAA)はM4の方が小さいことから、本来はM3L1よりも活性が高いことが推測される。VmaxおよびS1/2(OAA)はLDH活性の場合と同様に、活性サブユニットであるMサブユニットが多い方が活性の強い傾向を示している。ヒル係数は基質の結合するMサブユニットが増えるに従って上昇している(図2-3-6d)。

D Lサブユニットへのオキサム酸の結合によるMサブユニットの活性化(図2-3-8、図2-3-9)

D-1 オキサロ酢酸一定(2 mM)でオキサム酸を変化(0~50 mM)させた場合(図2-3-8)

図2-3-8に示したように、FBP非存在下、一定のオキサロ酢酸2 mM(MDH活性)の条件では、オキサム酸が存在しないときはすべてのハイブリッドにおいて活性がほとんどないが、オキサム酸を加えていくことにより、MとLサブユニットの両方を含むハイブリッド(M3L1、M2L2-QR、M2L2-P、M1L3)は活性が大きく上昇した。つまり、Lサブユニット(以降、調節サブユニットとも呼ぶ)にオキサム酸が結合してそれをR状態にすることにより、Mサブユニット(以降、活性サブユニットとも呼ぶ)を活性化したことになる。これは、第2章で観測したヘテロトロピックな活性化に対して、ホモトロピックな活性化の直接的な観測である(図2-3-12)。なお、同様なハイブリッドによるホモトロピックな活性化は横田の研究によってすでに観測されている[42]。本研究との相違点などについては総合討論で詳しく紹介する。また、本研究で行ったように基質特異性の異なるサブユニットのハイブリッドを用いなくとも、低い基質濃度における阻害剤の添加による活性化から、ホモトロピックな効果は観測されている[106,107]。

M2L2-QR、M2L2-P、M1L3では、オキサム酸の飽和が早く、高濃度のオキサム酸では活性が落ち始めている。これは、Mサブユニットの活性をオキサム酸が阻害していることによると思われる。表2-3-10に示したとおり、Mサブユニットに対するオキサム酸の阻害パラメータ1/2(Oxa)は約40mMである。

図2-3-8bに示したように、VmaxはM2L2-QRおよびM2L2-Pで高く、M3L1およびM1L3で低くなっている。活性サブユニット(M)が多いM3L1が本来は最も大きいVmaxを持つと考えられるが、これは、M3L1を活性化するのに必要なオキサム酸濃度が非常に高く(S1/2(Oxa)は約23mM)、オキサム酸による阻害の影響が出て見掛け上Vmaxが低くなっていると思われる。S1/2(Oxa)は、Lサブユニットが

増えるに従って減少している。このような傾向（調節サブユニット（L）が少ない方が飽和に多くのオキサム酸を必要とすること）は北村の行ったシミュレーションと一致しており[43]、飽和曲線上（図2-3-8a）でもM1L3、M2L2-QRおよびM2L2-P、M3L1の順で飽和することが見て取れる。ヒル係数は、オキサム酸の結合する調節サブユニット（L）の多い方が大きくなり、飽和曲線もシグモイダルになっている。

D-2 オキサム酸一定(10, 50 mM)でオキサロ酢酸を変化(0~5 mM)させた場合 (図2-3-9)

図2-3-9aに示したように、MとLサブユニットの両方を含むハイブリッド（M3L1、M2L2-QR、M2L2-P、M1L3）では、FBP非存在下で10 mMおよび50 mMのオキサム酸をそれぞれ添加することにより、オキサロ酢酸飽和曲線（MDH活性）は活性化によりシフトアップした。

表2-3-11bに、これらのオキサロ酢酸飽和曲線の速度論的パラメーターについてまとめてある。まず注目すべきは、これらの飽和曲線がすべて双曲線型でミカエリスメンテンの式によりフィッティングできたことである。しかし、これは測定点をとる範囲が不適当なために、本来のS字型曲線を見いだすことができなかった可能性もある。すなわち、M3L1ではもっと高いオキサロ酢酸濃度で、M2L2-QR、M2L2-PおよびM1L3ではもっと低いオキサロ酢酸濃度で測定を行なう必要があると思われる（図2-3-9a）。ただし、今回得られた測定点だけでもM2L2-QR、M2L2-PおよびM1L3に関してはそれがほぼ双曲線型であることが分かる。M3L1に関しては上で述べたとおりオキサム酸による活性化が不十分なため、もっと高い濃度の測定点を集めればシグモイダルになる可能性がある。しかし、オキサロ酢酸10 mMの測定点では、オキサム酸10 mMの場合で7.7 U/mgと基質阻害により非常に減少している。このような強い基質阻害により、 $S_1/2(OAA)$ の高いM1L3の飽和曲線ではHill equationにより信頼できるフィッティングを行なうことは難しいと思われる。

図2-3-9bに、これらのパラメーターの傾向をグラフにして示した。まず、Mサブユニットの数の変化によるパラメーターの挙動について議論する。10 mM、50 mMの両方のオキサム酸濃度で V_{max} はMサブユニットが減るに従って減少している。これは、活性サブユニットの数と活性が対応しており、妥当な結果である。一方、 $S_1/2(OAA)$ もMサブユニットが減るに従って減少している。この傾向も、北村によって行なわれたシミュレーションの結果に一致している。すなわち、図2-3-8aで示したように、調節サブユニットが少ない場合は（M3L1）飽和に多くのオキサム酸が必要で活性化が不十分なため、曲線の立ち上がりが遅くなって $S_1/2(OAA)$ が大きくなると考えられる。

次に、オキサム酸濃度が10 mMから50 mMに変化することによるパラメーターの挙動について議論する。M3L1ではオキサム酸濃度が上がると V_{max} も約2倍に上昇するが、M2L2-QR、M2L2-Pではその上昇は小さくなり、M1L3では逆に減少する。これは、調節サブユニットが少ない場合は（M3L1）10 mMのオキサム酸濃度ではまだ飽和していないことによる。M1L3では過剰飽和量のオキサム酸は逆に V_{max} を下げる結果となる。この傾向は、 $S_1/2(OAA)$ の挙動にも当てはまる。すなわち、

調節サブユニットの少ないM3L1はオキサム酸濃度が上がることによりS1/2(OAA)が下がって活性化されるが、調節サブユニットの多いL2M2-QR、M2L2-PおよびM1L3では逆に過剰飽和量のオキサム酸が阻害的に働いてS1/2(OAA)を上げてしまう。

これらをまとめると、調節サブユニット(L)の少ないM3L1についてはオキサム酸濃度が10 mMから50 mMに上がることはさらなる活性化につながってVmaxの上昇とS1/2(OAA)の減少を引き起こすが、調節サブユニットの多いM1L3では逆に過剰飽和量のオキサム酸濃度(50 mM)ではVmaxの減少とS1/2(OAA)の増大による阻害となる。それらの中間であるM2L2-QRおよびM2L2-PではVmaxおよびS1/2(OAA)は共に少し上昇する。これは、過剰量のオキサム酸の添加が、低いオキサロ酢酸濃度では活性を下げる方向に、高いオキサロ酢酸濃度では活性を上げる方向に働くことをあらわしているが、これは、高いオキサム酸濃度ではオキサム酸がオキサロ酢酸と競争阻害していることによると思われる。

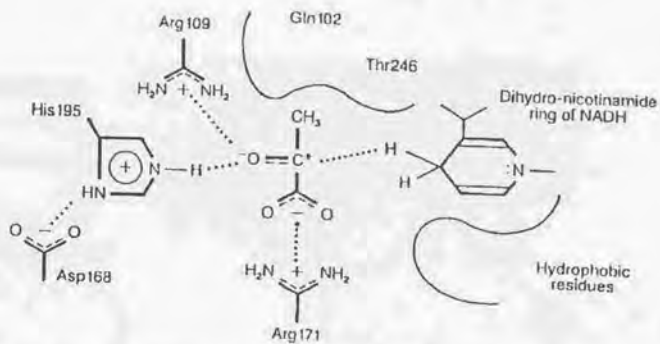
M2L2-QRとM2L2-Pの同一な速度論的性質とMWCモデル

M2L2-QRとM2L2-Pは、今回測定した全ての条件で全く同一の速度論的性質を持つことが分かった。図2-3-5～図2-3-9に示した飽和曲線の全ての点はほぼ同じであり、それらから計算されたパラメーター(表2-3-10、表2-3-11)の違いもエラーの範囲内である。サブユニットの立体配置が違うM2L2-QRとM2L2-Pが全く同じ速度論的性質を持つということは、本酵素が常に対称性を保つことを示し、MWC(協奏型)モデルを強く支持する結果である(図2-3-13a)。一方、同一分子内にT状態とR状態の両方が存在する(サブユニットの状態が非対称である)KNF(逐次型)モデルでは、このような結果が起こるとは考えにくい。MWCモデルでは、T状態およびR状態の基質の結合定数と、両状態間の平衡定数の3つのパラメーターしかないのに対して、KNFモデルでは、四量体の場合、最初の基質から4番目の基質の結合定数まで4つのパラメーターがあり、MWCモデルに比べて自由度が高い(図2-4) [35,36]。従って、KNFモデルでもその特殊な場合においては今回の結果を説明することが可能であるが、結晶構造からの考察も併せて考えると、今回の結果は本酵素のアロステリック転移における対称性を示しているものと結論づけられる。

別の観点、すなわち立体構造的な観点からこの結果を考えると、ホモトロピックな活性化において、P軸サブユニット界面を伝わる活性化とQ軸界面を伝わる活性化が同等であるということにもなる(図2-3-13b)。M2L2-PはQ軸界面、M2L2-QはP軸界面、M2L2-RはP軸界面とQ軸界面の両方の相互作用でそれぞれ活性化を伝えていることになる。従って、M2L2-QRではQ軸界面とP軸界面の相互作用の両方、M2L2-PではQ軸界面の相互作用をそれぞれ観測していることになり、それらが同等であるということは、P軸界面とQ軸界面の相互作用が同じ強さで存在し、共に本酵素の対称性に関与していることを示している。

本酵素の活性化モデルについては、前章のヘテロトロピックな活性化に関する解析

結果と結晶構造の知見と併せて、総合討論で述べる。



オキザム酸もこれと同様に結合する

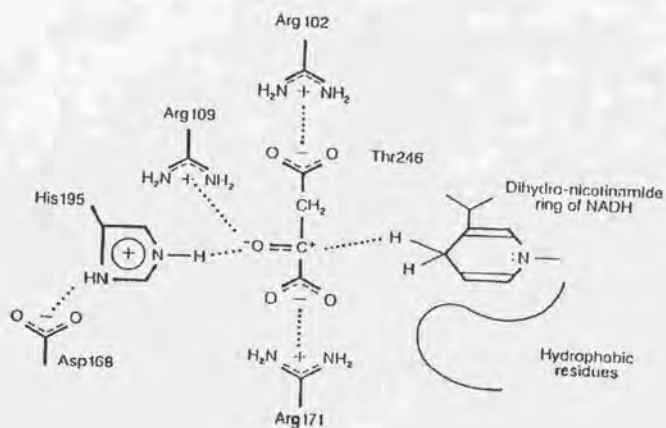


図2-3-1 活性中心の構造

上: LDHの基質(ピルビン酸)結合の模式図

下: MDH型変異体(Q102R)の基質(オキザロ酢酸)結合の模式図

MDH型変異体
(Q102R)
Mサブユニット



オキサロ酢酸(OAA)
MDHの基質

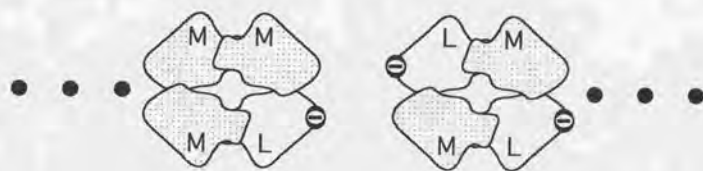
野生型 (電荷導入型) LDH
(K316E/R317D)
Lサブユニット



ピルビン酸(Pyr)
LDHの基質

オキサム酸(Oxa)
LDHの阻害剤

※LDHは、オキサロ酢酸に対しても
多少活性がある



M-LハイブリッドLDH

図2-3-2 MDH型変異体(Q102R) (Mサブユニット) と
野生型 (電荷導入型) LDH(K316E/R317D) (Lサブユニット)
からなるハイブリッドLDH (M-Lハイブリッド)

a



b

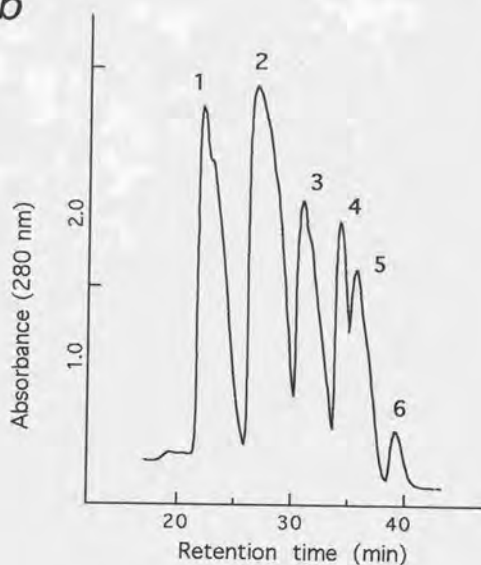


図2-3-3 MonoQによるM-Lハイブリッドの分離

a Native-PAGE; 各レーンの番号はbのピークの番号に対応している。

b MonoQのチャート

KCl 0-0.6 Mの直線型グラジエントによる溶出
(流速 1.0 ml/min, 40分)を行なった。

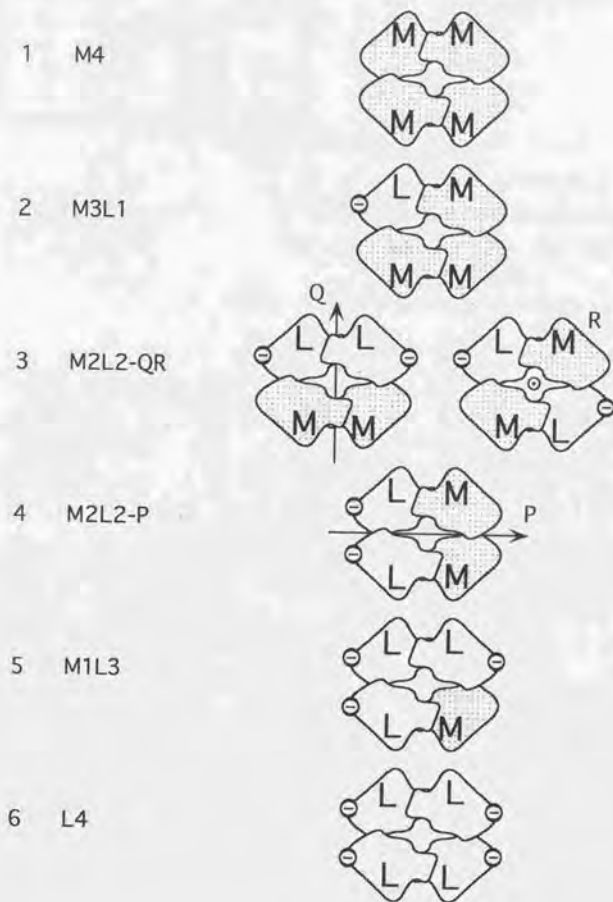
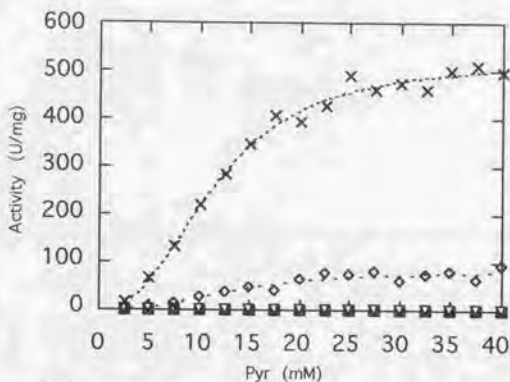
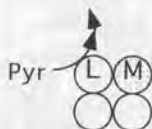
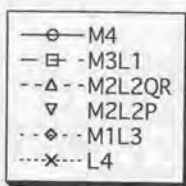


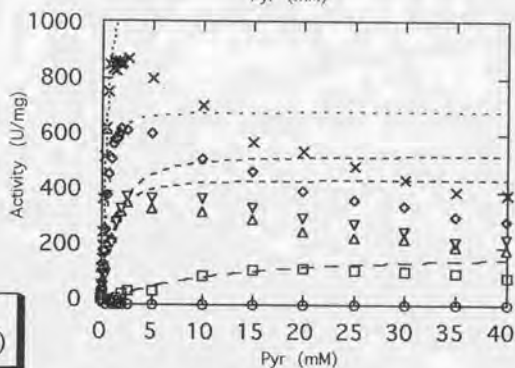
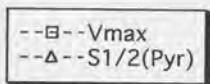
図2-3-4 分離されたM-Lハイブリッドの立体配置

それぞれ、図2-3-3bの1-6のピークに対応している。

a



b



c

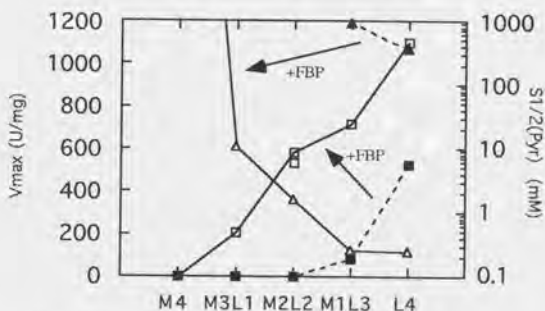


図2-3-5 M-LハイブリッドのLDH活性

a FBP非存在下のピルビン酸飽和曲線

b 0.1 mM FBP存在下のピルビン酸飽和曲線

c V_{max} および $S_{1/2}(\text{Pyr})$

FBP非存在下を黒い点で、FBP存在下を白抜き点で、それぞれ表した。

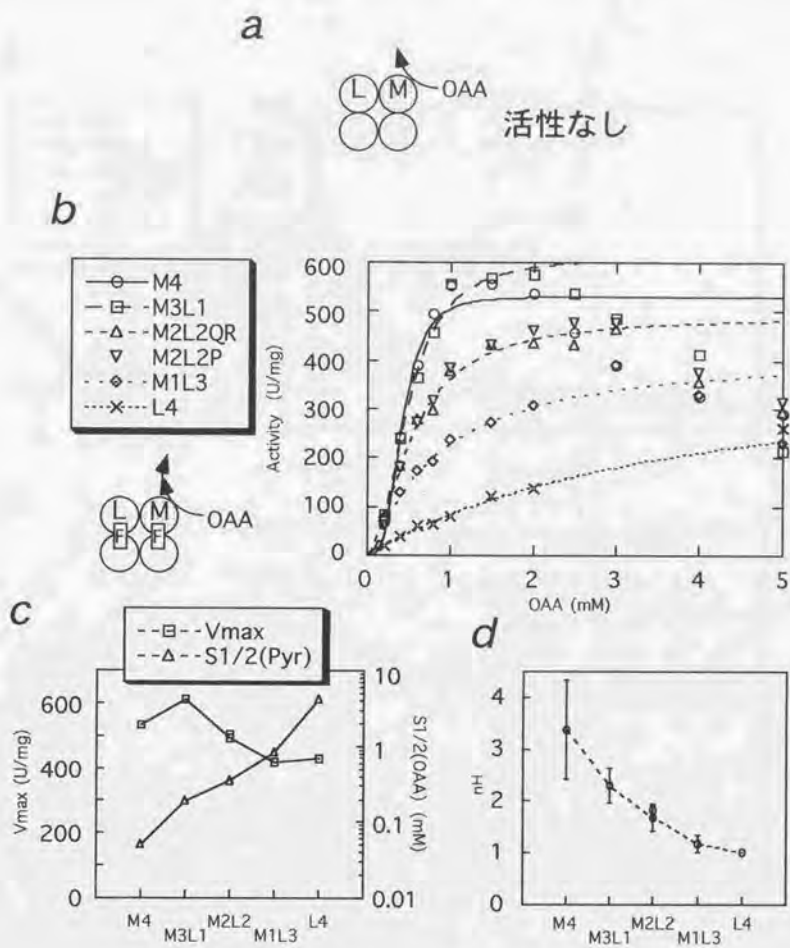


図2-3-6 M-LハイブリッドのMDH活性

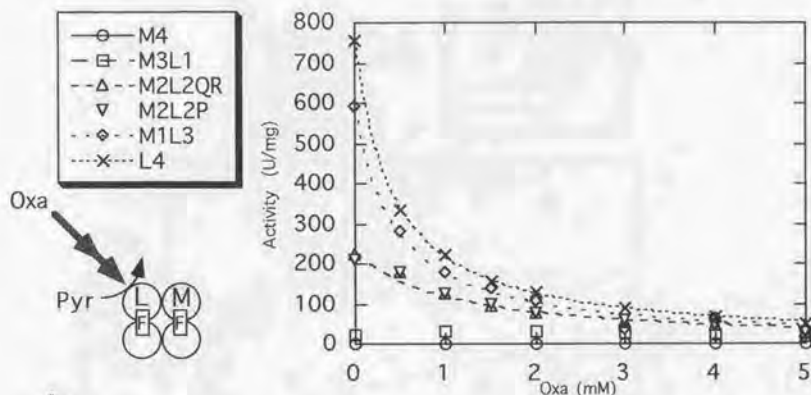
a FBP非存在下のMDH活性 (活性はほとんどなかった)

b 0.1 mM FBP存在下のオキザロ酢酸飽和曲線

c V_{max} および $S_{1/2}(OAA)$

d ヒル係数

a



b

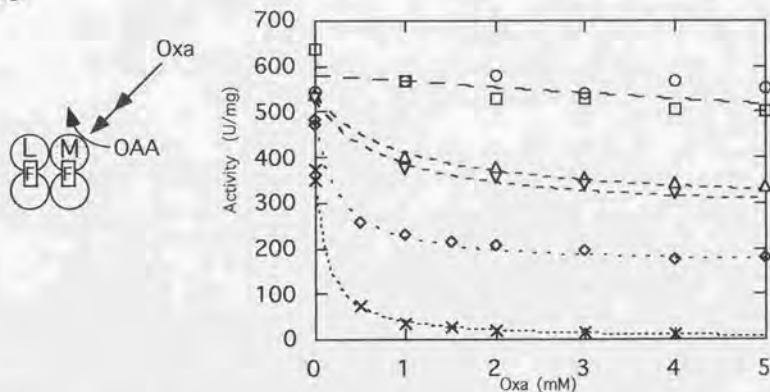


図2-3-7 M-Lハイブリッドのオキザム酸による
LDH活性およびMDH活性の阻害

- a オキザム酸によるLDH活性の阻害
0.1 mM FBP, 2 mM Pyr
- b オキザム酸によるMDH活性の阻害
0.1 mM FBP, 2 mM OAA

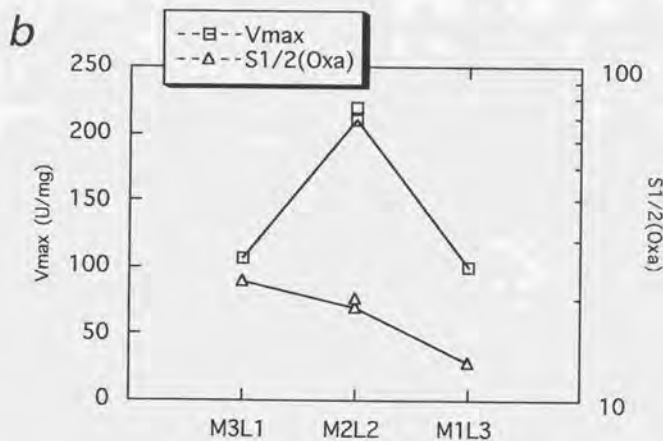
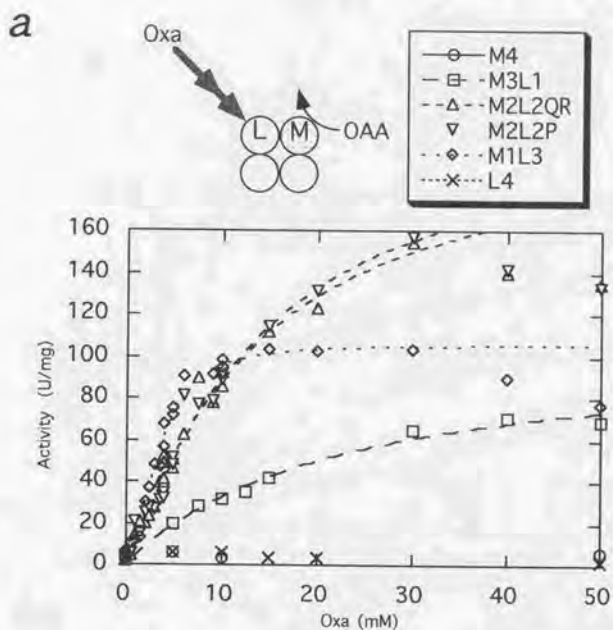


図2-3-8 M-Lハイブリッドのオキザム酸によるMDH活性の上昇 (オキザム酸濃度を变化させた)

a オキザム酸飽和曲線 (FBP非存在下, 2 mM OAA)

b VmaxおよびS1/2(Oxa)

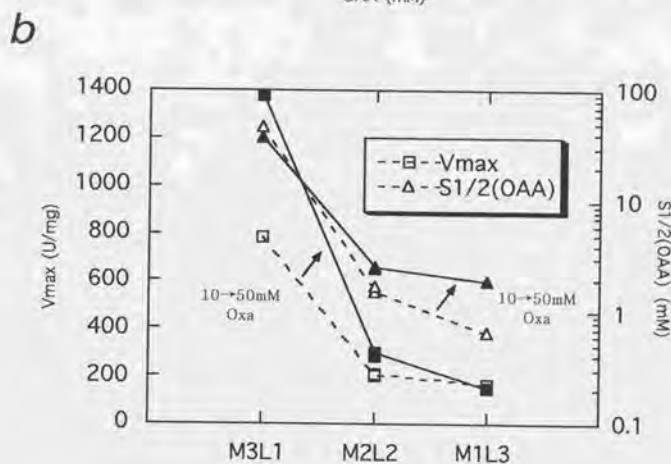
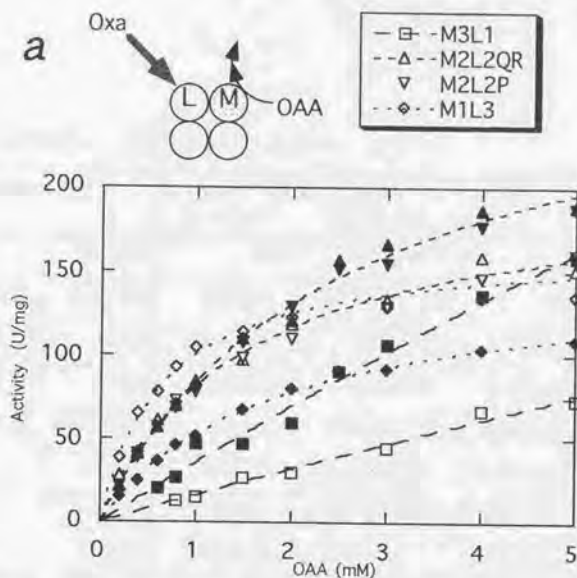


図2-3-9 M-Lハイブリッドのオキザム酸によるMDH活性の上昇（オキザロ酢酸濃度を变化させた）

a オキザロ酢酸飽和曲線（FBP非存在下、オキザム酸 10, 50 mM）

b VmaxおよびS1/2(OAA)

オキザム酸 10mMの場合を白抜き点で、

オキザム酸 50mMの場合を黒の点でそれぞれ表した。

a LDH活性 (図2-3-5, 図2-3-7a)

Hybrids	Vmax (U/mg)	S1/2 (Pyr) (mM)	ヒル係数	I1/2 (Oxa) (mM)
M4 +FBP	~0	-	-	-
M3L1 +FBP	200(30)	10(3)	1.0	-
M2L2-QR +FBP	580(220)	1.6(1.0)	1.0(0.3)	1.0(0.1)
M2L2-P +FBP	530(40)	1.5(0.2)	1.4(0.1)	1.2(0.2)
M1L3 -FBP	84(10)	920(1800)	2.6(0.8)	0.42(0.03)
+FBP	680(9)	0.33(0.02)	1.7(0.04)	
L4 -FBP	520(14)	360(170)	2.4(0.2)	0.4(0.007)
+FBP	1100(60)	0.25(0.05)	1.3(0.07)	

b MDH活性 (図2-3-6, 図2-3-7b)

Hybrids	Vmax (U/mg)	S1/2 (OAA) (mM)	ヒル係数	I1/2 (Oxa) ¹ (mM)
M4 +FBP	530(27)	0.051(0.046)	3.4(1.0)	41(3)
M3L1 +FBP	610(29)	0.19(0.06)	2.3(0.3)	31(3)
M2L2-QR +FBP	490(37)	0.36(0.12)	1.7(0.3)	1.0(0.2)
M2L2-P +FBP	500(9)	0.35(0.03)	1.9(0.1)	0.8(0.22)
M1L3 +FBP	420(53)	0.81(0.25)	1.2(0.2)	0.25(0.04)
L4 +FBP	430(90)	4.1(1.2)	1.0	0.13(0.01)

表2-3-10 M-LハイブリッドのLDH活性およびMDH活性の
速度論的パラメーター

図2-3-5 ~ 図2-3-7 に示した測定値を元に計算した。

¹I1/2(Oxa) のフィッティングに関しては本文を参照。

a オキザム酸濃度を変化させた場合 (図2-3-8)

Hybrids	Vmax (U/mg)	S1/2 (Oxa) (mM)	ヒル係数
M3L1	110(8)	23(3.6)	1.0
M2L22-QR	210(30)	19(2)	1.2(0.1)
M2L22-P	220(30)	20(3)	1.2(0.1)
M1L3	100(3)	13(3)	2.1(0.2)

b オキサロ酢酸濃度を変化させた場合 (図2-3-9)

Hybrids	オキザム 酸濃度	Vmax (U/mg)	S1/2 (OAA) (mM)	ヒル係数
M3L1	10 mM	780(890)	47(58)	1.0
	50 mM	1400(1200)	38(35)	1.0
M2L2-QR	10 mM	200(9)	1.5(0.16)	1.0
	50 mM	290(16)	2.5(0.3)	1.0
M2L2-P	10 mM	210(6)	1.7(0.1)	1.0
	50 mM	280(8)	2.4(0.1)	1.0
M1L3	10 mM	170(15)	0.65(0.11)	1.0
	50 mM	150(4)	1.9(0.1)	1.0

表2-3-11 M-Lハイブリッドにおいて、オキザム酸によって
上昇したMDH活性の速度論的パラメーター

図2-3-8 および図2-3-9 に示した測定値を元に計算した。

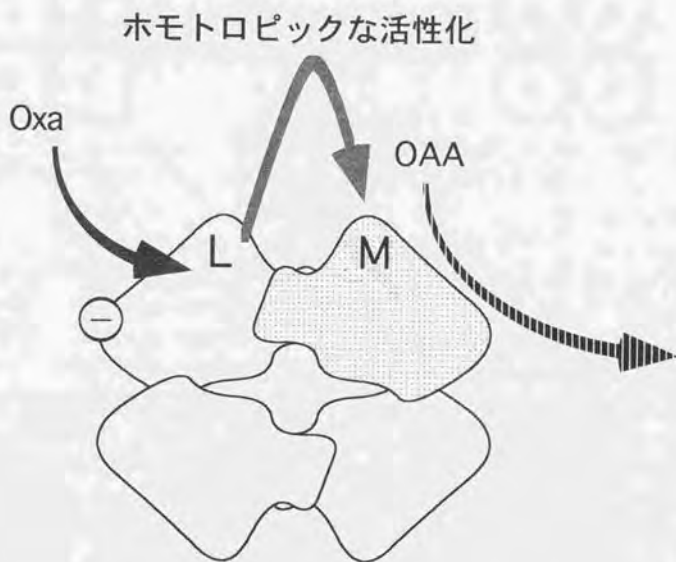


図2-3-12 M-Lハイブリッドを用いて観測された、
LサブユニットからMサブユニットに伝わる
ホモトロピックな活性化

オキサザム酸の添加によりMDH活性が上昇した。

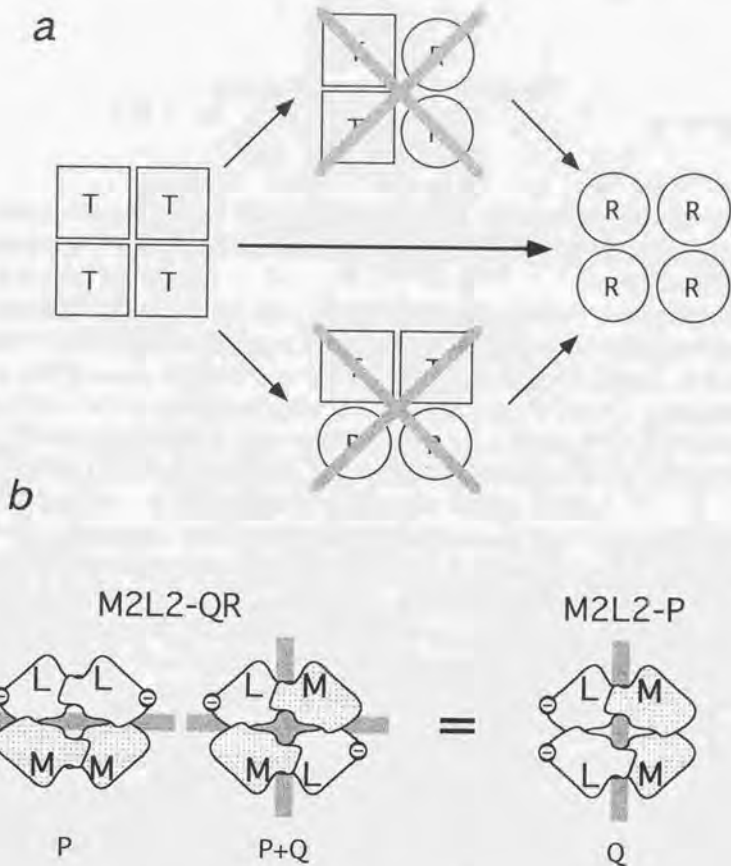


図2-3-13 本酵素のアロステリック転移の対称性

- a M2L2-QRとM2L2-Pが同一の速度論的性質を示したことから、本酵素のアロステリック転移における完全な対称性が示された。同一分子内にT状態とR状態のサブユニットが同時に存在することはない。
- b M2L2のそれぞれのハイブリッドLDHにおける、サブユニット間相互作用

第2部 第4章
*in vitro*でのハイブリッドLDH形成

序

本論文の第2部 第1～3章および第5章では、*in vivo*で形成したハイブリッドLDHの解析を行なっているが、本章では*in vitro*でのハイブリッドLDH形成に関する実験を行なった。

序論および第1章で述べた通り、脊椎動物ではM型とH型のアイソザイムLDHが*in vivo*でハイブリッドLDHを形成しており、それらは電気泳動やイオン交換カラムによって異なるサブユニット組成をもつハイブリッドLDHに分離できる[50]。さらに、*in vitro*でのハイブリッドLDH形成実験においてもM型とH型サブユニットは凍結融解、希釈、軽い蛋白質変性によって互いに組み替えを起こして再びハイブリッドLDHを生じることが確認されている[45,58-60]。この結果は、LDHの各サブユニットが以上のような条件下ではその一部が解離を起こして交換することを示している。

一方、本酵素では、酵素活性が酵素濃度に依存しないことやゲルろ過での分子量から、通常の条件では安定な四量体構造で存在することが知られている[29]。しかし、大部分が溶液中で四量体として存在していても、その一部分が解離していればサブユニット交換によるハイブリッドLDH形成は行なわれるはずである。また、さまざまな溶液条件におけるハイブリッドLDH形成の程度を観測することにより、本酵素のサブユニット間結合力の強さおよび性質に関する知見を得ることが期待できる。図2-6に示した通り、本酵素の四量体の各サブユニットはP軸およびQ軸をはさむ界面で接触しているが、R軸での接触はない。(脊椎動物型LDHではN末端のアーム部分でR軸の接触を持っている[61]) そして、P軸およびQ軸界面の相互作用は本酵素のアロステリック制御にとって非常に重要な役割を担っていると考えられている。従って、二量体同士が組変わる限定的な条件、すなわち2つの界面のどちらかのみで解離が起こる条件を見いだすことができれば、その界面での相互作用について何らかの知見が得られるはずである。

本章ではまず、本酵素が*in vitro*で組み替えを行なう条件について調べた。次に、第2章の前半で用いた脱感作型サブユニット(D)と野生型サブユニット(W)のハイブリッドLDHを*in vitro*で形成して解析することにより、二量体同士の組み替えが起こる条件がP軸およびQ軸界面のどちらの解離によるものであるかを決定した。さらに、第3章で用いた、*in vivo*で形成してMonoQで分離されたMDH型サブユニット(M)と野生型サブユニット(L)の各ハイブリッドLDH(M-Lハイブリッド)を*in vitro*でもう一度組み替えることにより、M2L2の2つのピークが確かにその立体配置の違いによって分離されていることを証明した。

結果

2-4-1 本酵素の四量体構造の安定性と *in vitro*でのハイブリッドLDH形成条件

*in vitro*でのハイブリッドLDH形成実験の概略を図2-4-1に示す。野生型LDHおよび第1章で作製した電荷導入型LDH(K316E/R317D)をそれぞれ別々に発現、精製させて、さまざまな条件下で混合した。一定時間置いた後に、電気泳動(Native-PAGE)で分離を行なった。塩濃度が高い条件の場合は、分離の前に透析または限外ろ過膜による遠心(セントリコン30およびマイクロコン30)で脱塩した。

以下の条件の範囲内で実験を行なった結果、10日経過してもハイブリッドLDHの形成は全く見られなかった。(data not shown)

バッファー	: 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)
蛋白濃度	: 0.2~2.0 mg/ml
(野生型LDHと電荷導入型LDHは等量混合してあるため、各LDHの濃度はその半分)	
塩濃度	: 0~2 M NaCl
温度	: 4℃

しかし、この条件内であるにもかかわらず(蛋白濃度は0.58 mg/ml)、蛋白質の混合液を高塩濃度の溶液(2~4 M NaCl)を加えた後、混合による均一化を行わずに塩濃度の違う界面を残しておいた結果、図2-4-2に示すように、一晩でハイブリッドLDH形成が起こり、Native-PAGEで3本のバンドとなつてあらわれた。これは、この条件でP軸もしくはQ軸サブユニット界面のみでの解離が起こることにより、二量体同士の限定的なハイブリッドLDH形成が起こっていることを示している。

2-4-2 脱感作型サブユニット(D)と野生型サブユニット(W)を用いた *in vitro*でのハイブリッドLDH形成

2-4-1節では二量体同士のハイブリッドLDHの形成が起こる条件を得た。ここでは、それがP軸およびQ軸界面のどちらの解離によるものであるかを調べた。

第2章では脱感作型サブユニット(D)と野生型サブユニット(W)のハイブリッドLDHを *in vivo*で形成し、MonoQで分離されたそれらのハイブリッドLDHの立体配置の決定を行なった。その際、D2W2は2つのピークに分離され、D2W2-PはFBPに活性化されたが、D2W2-QRはFBPに活性化されなかった(図2-2-4、図2-2-5)。つまり、DサブユニットとWサブユニットの二量体同士のハイブリッドは、その立体配置によって速度論的性質が異なることが分かっている。

そこで、2-2-1節と同じ組み合わせである、脱感作型LDHと野生型(電荷導入型)LDHで *in vitro*でのハイブリッド形成を行ない、その速度論的解析により、解離する界面の同定を行なった。

2-4-2-1 *in vitro*でのD-Wハイブリッドの形成および分離

脱感作型LDH(R173Q/H188Y)(D)と野生型(電荷導入型)

LDH(K316E/R317D) (W) の *in vitro*でのハイブリッド形成および分離の概略を図2-4-3に示す。まず、両LDHをそれぞれ別々に発現、精製した後、これらを混合した。この両LDHの混合液は酵素濃度が1.0 mg/ml (各0.5 mg/ml)で、液量は30 mlであった。等量の4 M NaCl溶液にこれを加えて、かき混ぜない条件で塩濃度の界面を残して4°Cで3日間静置した。その後、バッファーで透析して脱塩してからMonoQカラムにかけた。図2-4-4にそのMonoQチャートと、分離前及び後のサンプルのNative-PAGEを示す。二量体同士のハイブリッドLDHの形成が起こっており、それらが分離されたことが分かる。これらのピークのうち、両側はそれぞれ脱感作型LDH (D4)、野生型(電荷導入型)LDH (W4)であるが、その間のピークを「D-W二量体ハイブリッドLDH」と呼ぶことにする。

2-4-2-2 *in vitro*で形成されたD-Wハイブリッドの速度論的解析

2-4-2-1節で分離された各ピークのうち、D-W二量体ハイブリッドLDHのピルビン酸飽和曲線を図2-4-5に示す。D-W二量体ハイブリッドLDHはFBPに活性化されており ($S_{1/2}(\text{FBP}) = 57\text{nM}$)、D2W2-Pと同一の速度論的性質を示していることから、D2W2-Pと同じ立体配置を持つと決定された。すなわち、*in vitro*でのハイブリッドLDH形成はQ軸サブユニット界面の解離および会合によるものであることが分かった。

2-4-3 *in vitro*でのハイブリッド形成実験による、M2L2-QRおよびM2L2-Pの解析

第3章ではM-Lハイブリッドを *in vivo*で形成して、MonoQで分離し、各ハイブリッドLDHの速度論的解析を行なった。その結果、分離されたM2L2-QRおよびM2L2-Pが全く同じ速度論的性質を示したことから、本酵素が対称性を持って活性化されるという結論を得た(図2-3-13)。しかし、これはM2L2-QRとM2L2-Pが異なる立体配置を持つ「異性体」が図3-4のように分離されているものであることが前提となっている。第2章では、このような立体配置を持つとする結論の妥当性について論じたが、ここでは、*in vitro*でのハイブリッド形成実験により、これを裏付ける証拠を得ることを試みた。

サンプルは、第3章で得られたM4、M3L1、M2L2-QR、M2L2-P、M1L3、L4を用いた。これらをそれぞれ別々に、*in vitro*で二量体同士の限定的な組み替えを行なわせた結果を図2-4-6aのNative-PAGEに示した。

M4およびL4は全く変化がなかった。M3L1は *in vitro*での組み替えにより、M4およびM2L2の位置にバンドがあらわれた。M1L3も同様にM2L2およびL4の位置にバンドがあらわれた。特筆すべきはM2L2-QRとM2L2-Pの違いである。M2L2-QRは全く変化がなかったのに対して、M2L2-Pは *in vitro*での組み替えによりM4およびL4の位置にバンドがあらわれた。この結果は図2-4-6bに示

すように、M2L2-QRおよびM2L2-Pがその立体配置により分離されていることを証明するものである。

考察

*in vitro*でのハイブリッド形成と2種のサブユニット界面での相互作用

本章ではまず、*in vitro*での四量体構造が安定な条件および解離によって二量体同士の限定的な組み替えが起こる条件について調べた。

本酵素の四量体構造は通常条件では非常に安定であり、サブユニットの解離およびそれに伴うサブユニット交換は全く起こらない。なお、他の章での実験では、各ハイブリッドは分離以降この条件内で扱っている。

しかし、高塩濃度の溶液を加えた後、混合せずに塩濃度の異なる界面を残しておくことにより、二量体同士の限定的なハイブリッド形成が起こることが分かった。また、脱感作型LDHと野生型（電荷導入型）LDHの二量体ハイブリッドの速度論的解析を行なうことにより、この組み替えがQ軸界面の解離によるものであることが明らかとなった。図2-4-4に示したMonoQのチャートにおいても、D-W二量体ハイブリッドのピークはD2W2-Pと同様、W4に近い位置に出ている。この結果は、塩濃度の異なる溶液との界面において、Q軸サブユニット界面のみが解離することを示している。

本酵素の結晶構造から、Q軸サブユニット界面は主にヘリックスの疎水的な面同士の相互作用によって結合しているのに対し、P軸界面はループ同士の親水的な相互作用が主であることが明らかになっている[2]。P軸界面はアロステリック転移によってもあまり大きく動かないのに対して、Q軸界面はそのヘリックスの疎水面同士をすべらせることによってヘリックス半ピッチ分の大きなずれを生じることが知られている。これは、非特異的な疎水的結合によっているQ軸界面の方がP軸界面よりも動きやすいことを示している。また、P軸界面に結合するFBPはその界面における正電荷同士の反発を打ち消して、安定化すると考えられている。

今回のハイブリッド形成は塩濃度差の界面という特殊な条件で起こっており、それが疎水のおよび親水的な結合に与える影響に関しては不明である。しかし、より動きやすく非特異的な結合によっているQ軸界面の方がこの条件では解離しやすかったのではないだろうか。一方、P軸界面に関しては、今回の条件はFBP非存在下であったため正電荷による反発は残っていると考えられるが、解離は起こらなかった。

本酵素と同じく細菌由来のアロステリックLDHである *Bacillus stearothermophilus* LDH(BSLDH)では、P軸サブユニット界面が解離して活性を失った二量体になることが知られている[8,62-64]。この解離はFBP非存在下で起こるため、P軸サブユニット界面の正電荷同士の反発によるものであると考えられている。その後、BSLDHのP軸界面のループ部分を安定な二量体であるMDHのループの配列に変えることにより、安定な二量体で存在する変異体が得られた[65]。その変異体のX線結晶構造解析も行なわれている[26]。

今回の結果はBSLDHとは異なるサブユニット界面で解離が起こっており、非常に興味深い結果であると思われる。従来の考え方では接触面積も小さく正電荷による反発もあるためP軸サブユニット界面の方が解離しやすいとされていたが、アロステリック転移において大きく動く疎水的なQ軸サブユニット界面のみが解離する条件が存在することが明らかとなった。しかし、今回の実験はさらに詳細な議論をするには不十分であり、FBP存在下や異なるpHなどさまざまな条件でのハイブリッド形成実験を行なう必要があると思われる。

*in vitro*でのハイブリッド形成による第3章の結果の裏付け

本章の最後では、*in vitro*で再びハイブリッド形成を行なうことにより、M-Lハイブリッドの各ピークの立体配置の違いを裏付けた。図2-4-6bに示した通りM2L2-QRはQ軸界面で解離して組み替わっても、もとと同じものしか形成されない。一方、M2L2-PはQ軸界面の解離による組み替えにより、M4およびL4が形成され得る。この結果により、M2L2-QRおよびM2L2-Pが（P軸またはQ軸のどちらの違いによるものかは分からないものの）、対称軸の異なる立体配置を持つハイブリッドLDHであることを証明できた。P軸またはQ軸の違いは第2章におけるD-WハイブリッドのFBP感受性の違いに基づいて決定されているが、これがどちらであったとしても、第3章で示したような対称性の証明には影響がない。すなわち、これらがM2L2-PRおよびM2L2-Qであったとしても、基質による活性化に対して同一の性質を持つことが示されれば、対称性を示していることには変わりない。

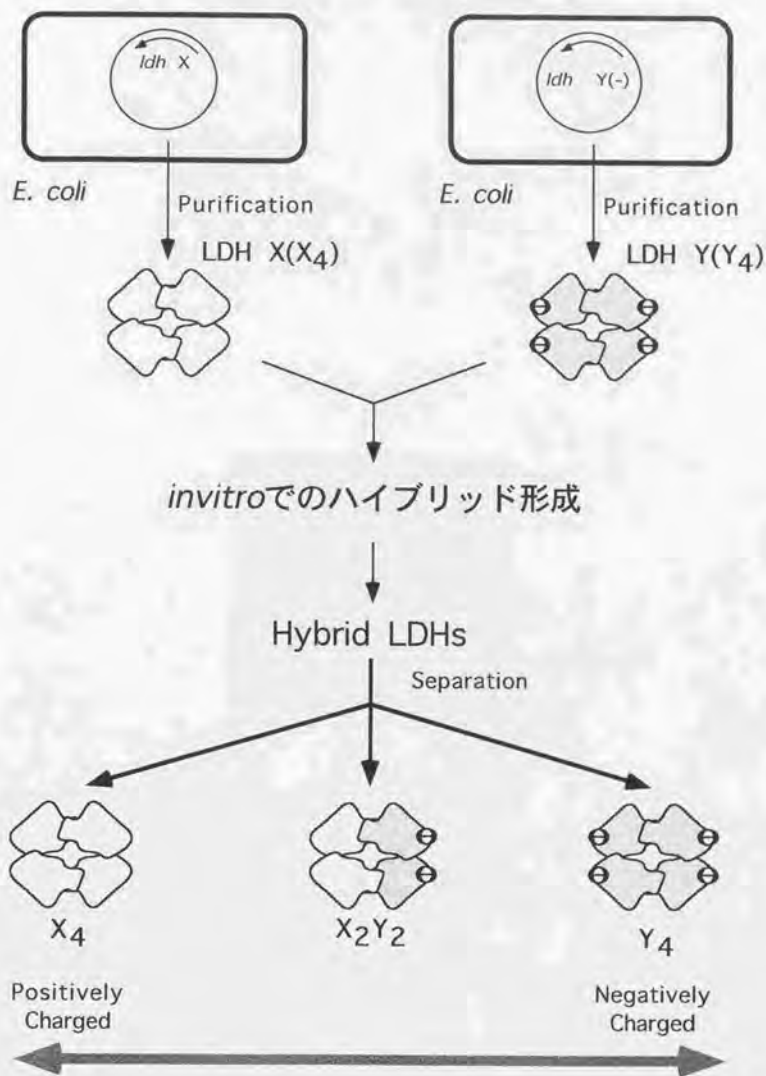


図2-4-1 *in vitro*でのハイブリッド形成の概念図

LDH XとLDH Yのハイブリッドを作成する場合。
P軸またはQ軸サブユニット界面のどちらかのみで
解離する条件ならば、図のように特定の立体配置を
持った二量体同士のハイブリッドLDHが得られる。

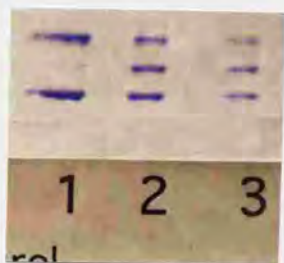


図2-4-2 *in vitro*でハイブリッド形成が起こる条件

- レーン1: 直前に混ぜたサンプル(control)
2, 3: それぞれ2 M, 4 MのNaCl溶液を等量加えた後、
かき混ぜないで一晩置いたもの。

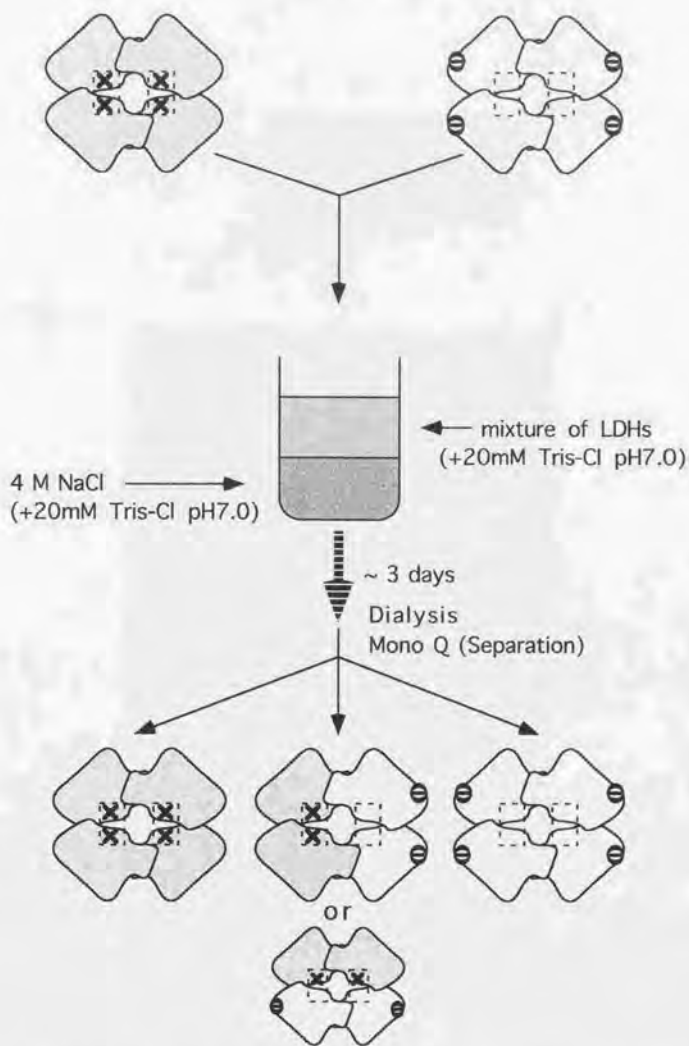


図2-4-3 脱感作型サブユニット (D) と野生型サブユニット (W) を用いた *in vitro* でのハイブリッドLDH形成

分離されたD-W二量体ハイブリッドLDHのFBPに対する活性化の違いから、解離の起こるサブユニット界面が分かる。

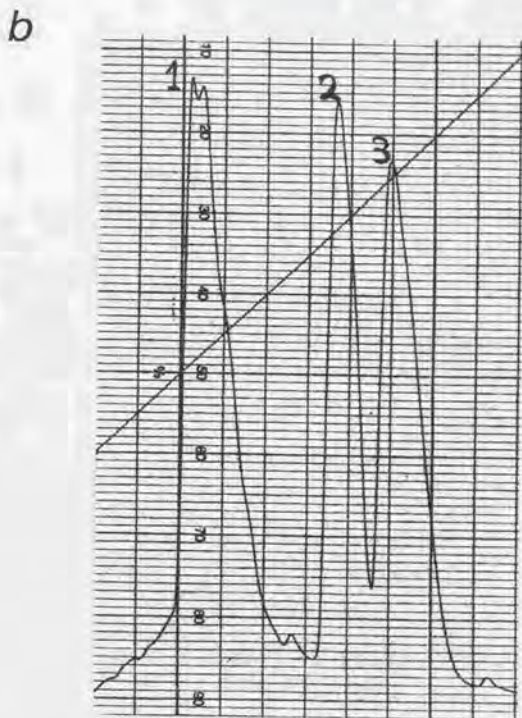
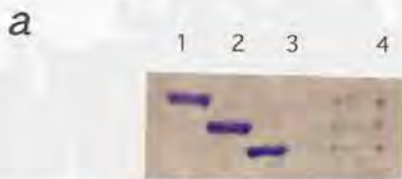


図2-4-4 MonoQによるD-W二量体ハイブリッドの分離

a Native-PAGE; 各レーンの番号はbのピークの番号に対応している。
レーン4は分離前のサンプル

b MonoQのチャート

KCl 0-0.6 Mの直線型グラジエントによる溶出
(流速 1.0 ml/min, 40分)を行なった。縦軸のレンジ幅(0-100)は
280nmのO.D.で2.0である。横軸は一目盛2分。

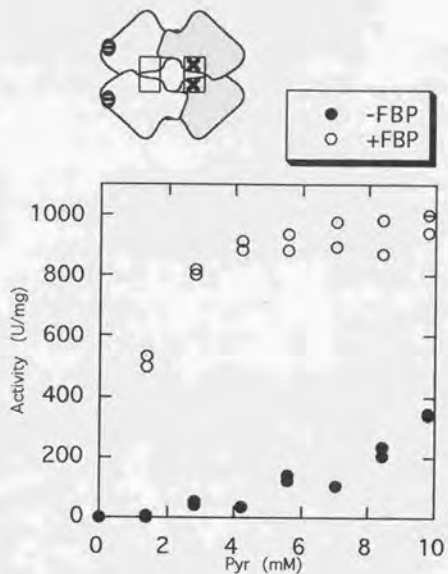


図2-4-5 分離されたD-W二量体ハイブリッドLDHの
ピルビン酸飽和曲線

D2W2-Pのもの（図2-2-5）とほぼ同一である。

a



b

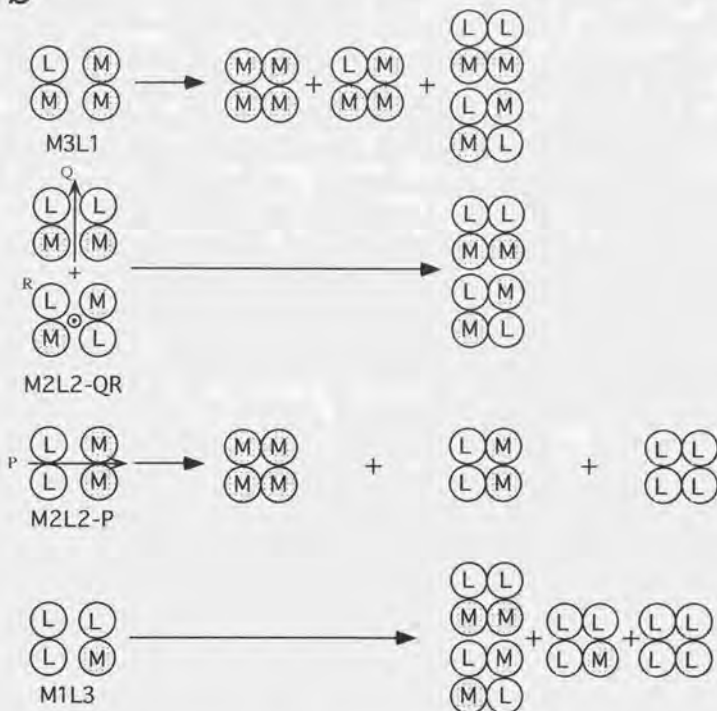


図2-4-6 M-Lハイブリッドの*in vitro*での再度のハイブリッド形成

a Native-PAGE; 1: M4, 2: M3L2, 3: M2L2-QR, 4: M2L2-P, 5: M1L3, 6:L4

b *in vitro*での再度の組み替えによる、サブユニット交換
M2L2-QRは、組み替わっても元のM2L2-QRしか形成されない。
M2L2-Pは、組み替えにより、M4とL4が形成される。

序

本酵素には他のLDHと同様、高濃度の基質存在下でその活性が低下する現象、いわゆる基質阻害が観測される(図2-2)。LDHの基質阻害については昔から知られており、現在までに単離された全てのLDHに共通の性質である。この酵素を工業的に利用する場合、基質阻害は酵素の使いやすさの点から大きな問題であり、LDHアイソザイムの研究においても基質阻害がLDHアイソザイムが存在する一つの原因だと考えられてきた[66]。

リンゴ酸脱水素酵素(MDH)はLDHと立体構造的モチーフは基本的に同じであり、活性中心など酵素の本質に関わる部位の残基はよく保存されていることが知られている[53]が、好熱菌由来のMDHである*Thermus flavus* MDH(TFMDH) (BLLDHとのアミノ酸配列のホモロジーは16%) について、基質阻害のかからない変異体の解析がなされている[67]。TFMDHのThr190を他のアミノ酸に置換したところ、もともと有していた基質阻害の性質を失うことが確認され、この残基が基質阻害に影響を及ぼしていることが示唆された。BLLDHでもこの研究を参考にして、TFMDHのThr190に相当すると考えられる2残基(Ser198とSer318)の変異体の研究がなされた[43]。その結果、S198D, S318T, S318Vの3種の変異体では基質阻害がかからなくなっていたが、同時にピルビン酸に対する親和性も下がっていた。このように、基質阻害のかからない変異体についての解析は行なわれているものの、その機構については未だに解明されていない。

従来のLDHの基質阻害についての解釈は次のようなものであった。すなわちLDHの触媒機構はordered bi-biであり、まず補酵素NADHが酵素に結合し、次に基質ピルビン酸が結合すると触媒反応が起こって乳酸を放出し、最後にNAD⁺を放出して反応はひとまわりする。しかしLDHの反応機構ではNAD⁺の解離が律速段階であるため、高濃度の基質存在下では、最後にNAD⁺を放出するより速くピルビン酸が活性中心に入り込んで来て、安定なアポ-ティブコンプレックスを形成してしまうことによりLDH活性が阻害される、というモデルである(図2-5-1) [6]。脊椎動物型LDHではこのモデルにより基質阻害が起こることを示唆する結果が得られている[68,69]。

一方、細菌型LDHのBLLDHについては単純なアポ-ティブコンプレックス機構ではなく、サブユニット間相互作用も関与していることが示唆されている。すなわち、*Thermus caldophilus* LDH(TCLDH)および本酵素の研究では「Q軸界面で向かい合った2つのサブユニットの両方に基質が結合するとそのkcatが低下する」と仮定したモデル(図2-5-2a)に従った関数で基質阻害のかかった飽和曲線をきれいに最適化できている[29,70]。これは、活性部位がQ軸界面付近に存在しているため、触媒反応にともなう基質結合ループの動きが隣のサブユニットの活性を阻害するのではないかという、構造的な推測に基づいている(図2-5-2b)。

ここでは、本酵素の基質阻害の機構にサブユニット間相互作用が関わっているかど

うかを調べるため、野生型LDHと不活性型LDHで、タグをつけるサブユニットの違いにより以下のような2つの組み合わせのハイブリッドLDHを作製して、速度論的性質を調べた(図2-5-3)。

1) 不活性型LDHにタグをつけたもの (W-I⁻ハイブリッド)

野生型LDH (W) と不活性型(電荷導入型) LDH(H195N/K316E/R317D) (I⁻)

2) 野生型LDHにタグをつけたもの (I-W⁻ハイブリッド)

不活性型LDH(H195N) (I⁻) と野生型(電荷導入型) LDH(K316E/R317D) (W⁻)

不活性型LDHは、第2章で示したように、補酵素は結合するものの基質は結合しないことが分かっている。従って、もし基質阻害にサブユニット間相互作用が関与しているならば、ハイブリッドLDHのうち不活性型サブユニットが多いものは基質阻害がかからなくなると予想される。

結果

野生型LDH、不活性型(電荷導入型) LDH(H195N/K316E/R317D)、野生型(電荷導入型) LDH(K316E/R317D)、不活性型LDH(H195N)の発現ベクターはそれぞれ、これまでに作製してある(pUBM9, pUBM905, pUBM901, pUBM904)。

各ハイブリッドの発現ベクター(pUBH203, pUBH204)は、これまでと同様に、片方の発現ベクターにもう片方の遺伝子のカセットを挿入することにより得られた(図2-5-4)。

これらのハイブリッドの発現、精製は第2、3章と同様に行われた。W-I⁻ハイブリッドではW⁴、W³I⁻1、W²I⁻2-QR、W²I⁻2-P、W¹I⁻3、I⁻4の6つのピークが、I-W⁻ハイブリッドでもI⁴、I³W⁻1、I²W⁻2-QR、I²W⁻2-P、I³W⁻1、W⁻4の6つのピークがこれまでと同様に得られた。(data not shown)

このようにして得られた各ハイブリッドLDHのFBP存在下、高ピルビン酸濃度での活性測定の結果を図2-5-5aに示す。I⁻4およびI⁴の活性はほとんどなかった。図2-5-5bでは、縦軸を活性サブユニットあたりのユニット数で表した。

各ハイブリッドは不活性サブユニットが増えても基質阻害には全く影響がなかったことから、基質阻害にはサブユニット間相互作用は全く関与していないことが分かった。

考察

本章の実験の結果、本酵素の基質阻害にはサブユニット間相互作用は全く関与しておらず、各サブユニットが独立に基質阻害をうけることが明らかとなった。また、W²I⁻2-QRとW²I⁻2-PおよびI²W⁻2-QRとI²W⁻2-Pの間でも基質阻害に差はなく、特定のサブユニット界面の関与も否定された。文献[29,70]で示された

ようにサブユニット間相互作用を考慮した基質阻害のフィッティングが合うのは、そのメカニズムを反映した結果ではないと考えられる。

なお、本研究室の横田によっても、LDH型（野生型）サブユニットとMDH型サブユニットのハイブリッドLDH（本研究のM-Lハイブリッドに相当する）は、ピルビン酸飽和条件下でさらにオキサロ酢酸を加えていってもその活性は下がらないことから、基質阻害におけるサブユニット間相互作用の関与はないことが示唆されている[42]。

本研究では否定的な結果しか得られていないため確かな議論はできないが、基質阻害はサブユニット内での現象であるという今回の結果と、基質阻害のかからない変異体はピルビン酸の親和性も落ちているという知見から、LDHの基質阻害はアポーターコンプレックスのように基質ピルビン酸が活性部位で反応できない複合体を形成する現象に起因すると考えられる。

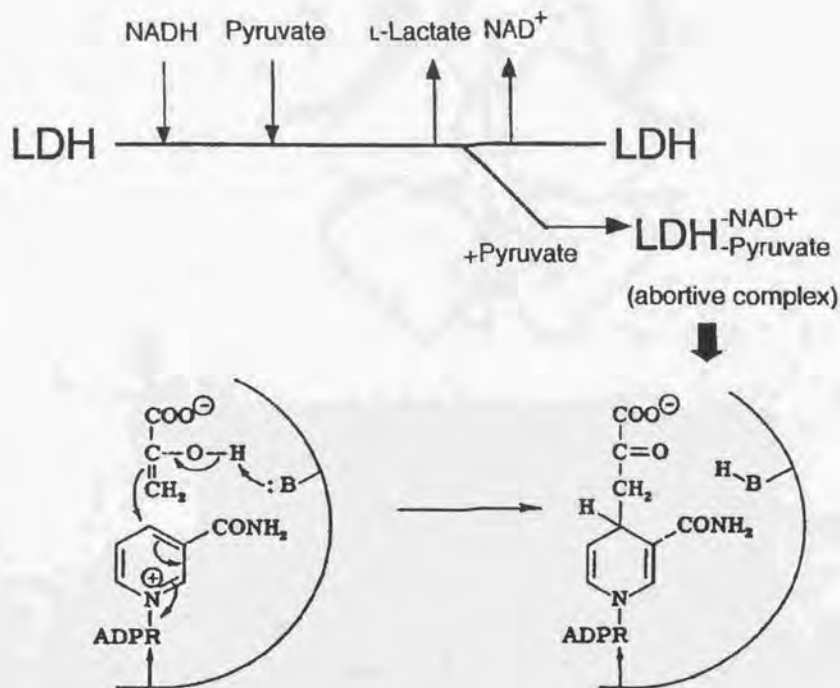


図2-5-1 LDHの反応機構とアボーティブコンプレックスの構造

このモデルでは、各サブユニットが独立に基質阻害を受ける。

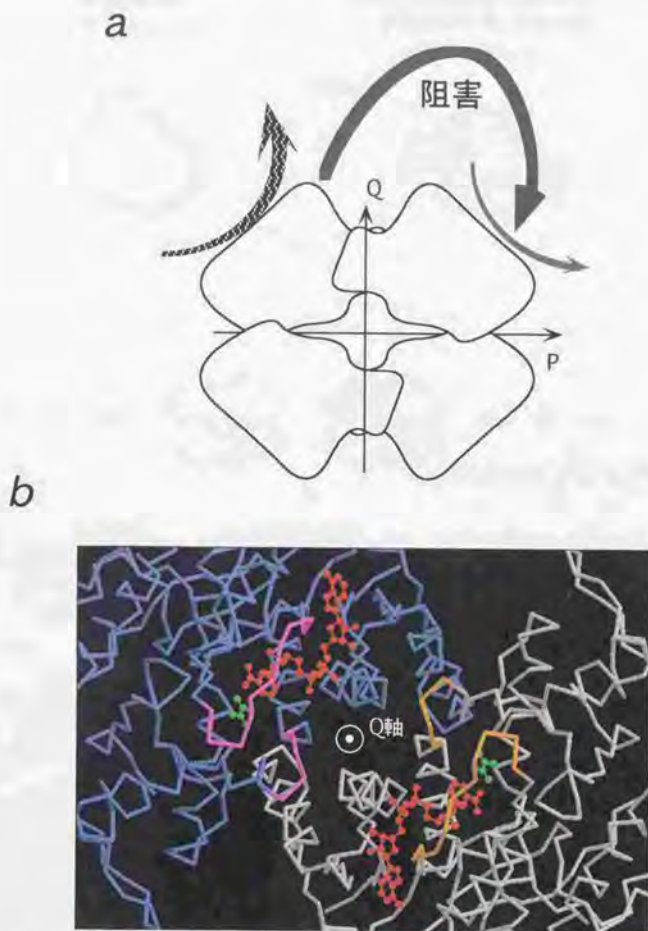


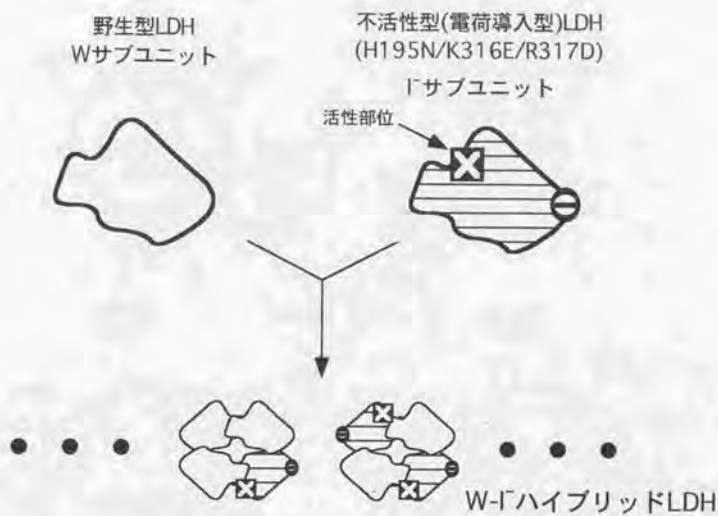
図2-5-2 Q軸界面で向かい合ったサブユニット同士が阻害しあうモデル

a 模式図

b Q軸界面付近に存在する活性部位

Q軸で向かい合った2つのサブユニットの主鎖をそれぞれ別の色で示した。Active site loopとニコチンアミド結合ループの部分は色が変えてある。NADH(赤), オキサム酸(緑)。

a



b

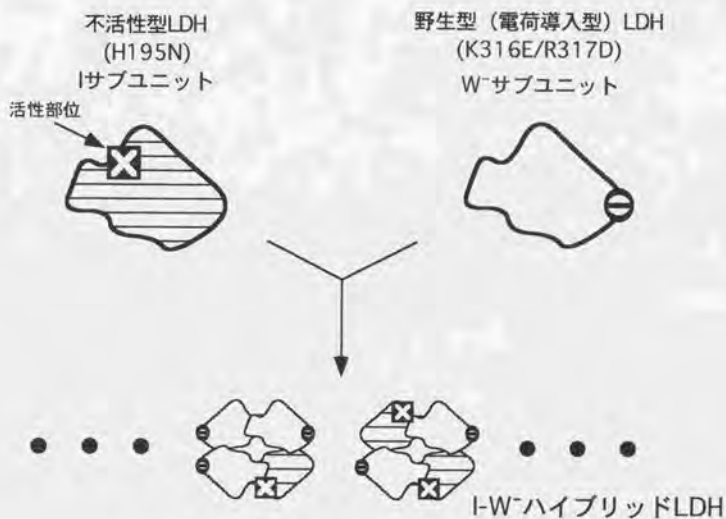


図2-5-3 野生型LDHと不活性型LDHの2つの組み合わせ

a 野生型LDH (W) と不活性型 (電荷導入型)

LDH(H195N/K316E/R317D) (I-) (W-Iハイブリッド)

b 不活性型LDH(H195N) (I) と野生型 (電荷導入型)

LDH(K316E/R317D) (W-) (I-Wハイブリッド)

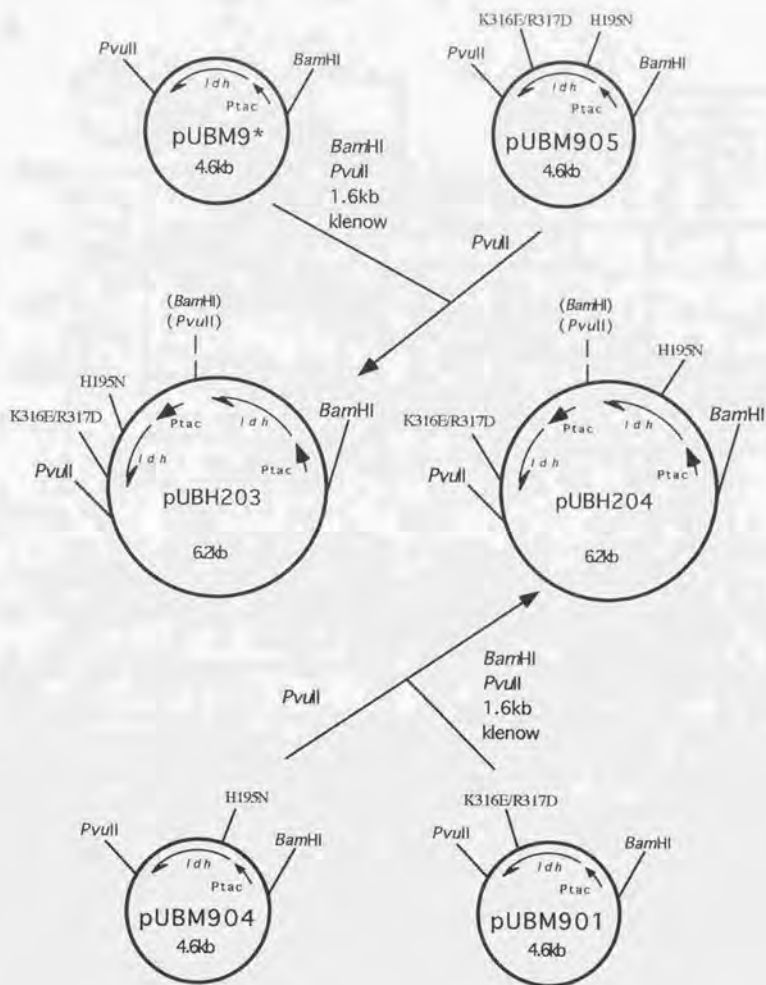


図2-5-4 野生型LDHと不活性型LDHの
ハイブリッドLDH発現ベクターの作製

pUBH203: 野生型LDHと不活性型（電荷導入型）LDH(H195N/K316E/R317D)
pUBH204: 不活性型LDH(H195N)と野生型（電荷導入型）LDH(K316E/R317D)

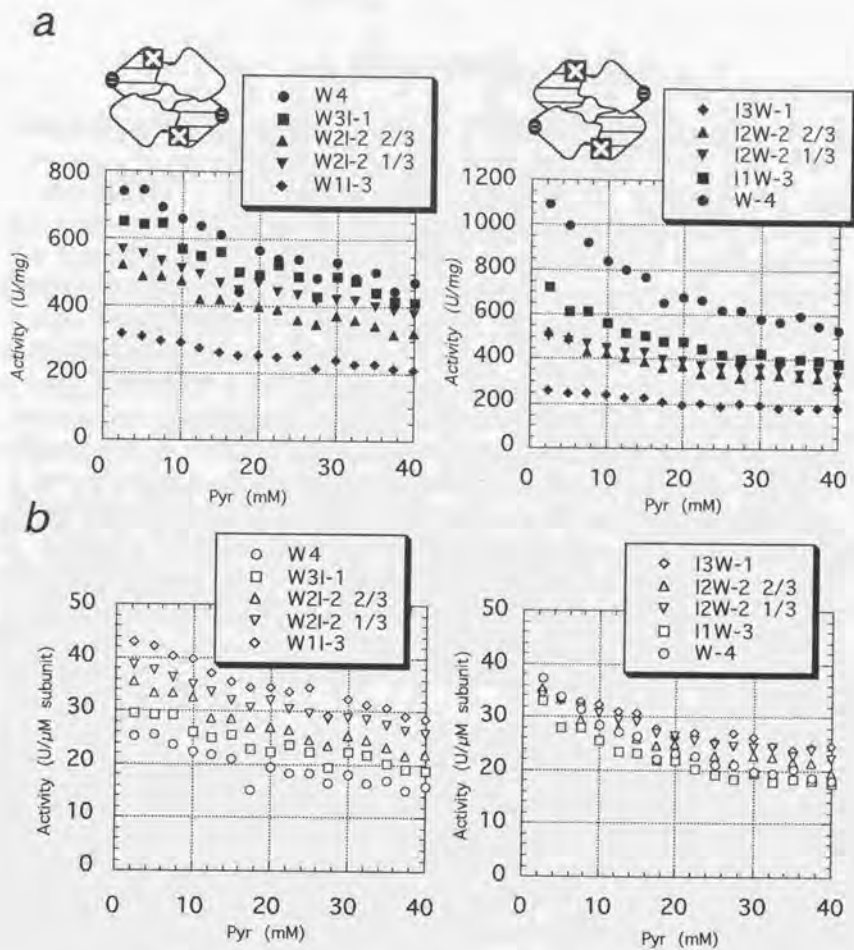


図2-5-5 野生型LDHと不活性型LDHの2つの組み合わせのハイブリッドLDHにおける、ピルビン酸飽和曲線

a 比活性（四量体あたりの活性）

b サブユニットあたりの活性（aの活性を、活性サブユニットの数で割ったもの）

左側にW-1ハイブリッド、右側に1-Wハイブリッドをそれぞれ示した。また、基質阻害を調べるために、高いピルビン酸濃度でのみ測定した。

本酵素で以前に行なわれた同様なハイブリッドLDHを用いた研究との比較

本酵素において、T、R両状態の結晶構造が得られる以前、本研究室の横田、北村らによるハイブリッドLDHを用いたほぼ同様な研究が行なわれている[42-44]。ハイブリッドLDHの組み合わせは、本研究の第2章および第3章と同じく、脱感作型LDHと野生型LDH、およびMDH型変異体と野生型LDHであり、ヘテロトロピックおよびホモトロピックな活性化についてそれぞれ調べられた。実験系および方法における本研究との相違点は主に2つである(図2-6-1)。

まず、*in vivo*でハイブリッドLDHを生産する方法が異なっている。2種の*ldh*遺伝子は、アンピシリン耐性ベクターとクロラムフェニコール耐性ベクターにそれぞれ別々に乗せる。そして、大腸菌にそれらのベクターを両方入れることによりダブルトランスフォーマントを作製して、*in vivo*でのハイブリッド形成を行なった。

電荷のタグは、C末端に2残基分のアミノ酸をつけ加えることにより行なった。また、ハイブリッドLDHの組み合わせの両方に逆の電荷を持つタグを加えている。すなわち、AとBの組み合わせならば、A⁻とB⁺⁺のように、それぞれC末端にタグをつけ加えて行なった。なお、負電荷の場合はGluとAspを、正電荷の場合はLysを2個つけ加えている。

しかし、方法は本研究と大きな違いはないものの、得られた結果はさまざまな点で異なっていた。

まず、ダブルトランスフォーマントによる方法を用いたことにより、タンデムに並んだ遺伝子を用いた本研究に比べて、ハイブリッドLDHの生産が不安定なものであった。すなわち、アンピシリン耐性ベクターとクロラムフェニコール耐性ベクターが共にpUC系のプラスミドであったためにプラスミド不和合性が起こり、ダブルトランスフォーマントの生育が遅く、生育しないこともしばしばであった。また、クロラムフェニコール耐性ベクターに乗っている方のLDHの発現はアンピシリン耐性ベクターのものに比べて少なく(約50%に減少する)、抗生物質の濃度(特にクロラムフェニコール)によって両者の発現量の比は大きく変わった。本研究でも最初はダブルトランスフォーマントを用いてハイブリッドLDHを生産しようと試みたが、以上のような理由から断念した。

一方、電荷のタグの違いにより、結果にさまざまな違いがあらわれている。

1) 電荷のタグを導入した変異体では、発現量が約5%に減少する。このこととダブルトランスフォーマントによる方法を用いたことにより、大量のハイブリッドLDHを安定に得ることが困難であった。

2) 各サブユニットを2つづつ持つハイブリッドLDHはMonoQでただ1本のピークとなり、本研究におけるD2W2-QRとD2W2-Pのように分離できなかった。

3) 各ハイブリッドLDHのNative-PAGEにおけるバンドが等間隔になっていない。特に、正電荷のタグを加えたものは、バンドが予想される位置よりもさらに上に出ている。

4) 脱感作LDHに正電荷のタグを加えたもの(Ld++)は脱感作の性質を失って、FBPにより活性化されるようになった。一方、脱感作型LDHに負電荷を加えたLd-は、脱感作していた。

5) 脱感作型LDHと野生型LDHの組み合わせでは、脱感作型LDHに負電荷を加えたLd-と、野生型LDHに正電荷を加えたL++を用いた。その結果、Ld-が一つ以上入ったハイブリッドLDHは全て脱感作されており脱感作型LDHとほぼ同じビルビン酸飽和曲線を示した(図2-6-2)。

5)の結果は、本研究で得られた結果と最も大きく異なる部分である。これは、電荷のタグの導入が何らかの構造変化を及ぼしたためと考えられる。3)および4)の違いも、タグの導入による構造変化を示唆している。図2-6-3に示したように、本酵素のC末端部分は活性に重要であるActive Site Loopおよびヘリックス $\alpha D/\alpha E$ に非常に近い位置にある。Active Site Loopは基質および補酵素のターンオーバーに際して大きく動くと考えられている[71]。本酵素のT状態およびR状態においてもこのループは大きく構造を変えている(図2-5)。さらに、脊椎動物LDHのアポ酵素(補酵素の結合した状態)とホモ酵素(補酵素が結合していない状態)を比較したとき、このループの他にC末端部分も大きく構造変化している可能性を示すデータもある[72]。従って、このようにC末端に追加したアミノ酸により、脱感作サブユニットが四次構造変化によるヘテロトロピックな活性化を阻害している可能性がある。アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ(ATCase)を用いた研究でも同様に、四次構造変化に制約を加えることにより分子全体の構造変化を阻害する("Negative Complementation"と呼ばれている)ハイブリッド酵素の研究が行なわれている[73]。

ホモトロピックな活性化に関する研究は、この系を用いてMDH型変異体と野生型LDHのハイブリッドLDHを作製することにより、北村によってさらに詳細に行なわれた。その結果は、基本的に本研究と変わらないものであった。すなわち、LサブユニットとMサブユニットを両方持つハイブリッドLDHはオキサム酸の添加によりそのMDH活性が上がったことにより、ホモトロピックな活性化が別のサブユニットに伝わる現象は本研究と同様に観測された。ただし、M2L2が分離できなかったことから、対称性の証明には至らなかった。オキサム酸およびオキサロ酢酸の飽和曲線のパラメーターにいくつか相違点はあるものの、調節サブユニットが少ない方が飽和に多くのオキサム酸を必要とするという傾向も同じであった。

同じタグを用いたにも関わらず、ヘテロトロピックな活性化とホモトロピックな活性化で異なる結果を得たのは興味深い現象である。また、脱感作サブユニットが入っているためにFBPに脱感作されたハイブリッドLDHの飽和曲線がみなシングモイダルであることも、これらがホモトロピックな活性化は受けることを示している。MWCモデルではホモトロピックな活性化とヘテロトロピックな活性化の機構は同じものであるとされているが、これらの結果から、ヘテロトロピックな活性化とホモトロピックな活性化の機構が異なる可能性も示唆される。

まず、本研究室の岩田および鎌田によって提唱されている活性化モデル[2,32]を、P軸およびQ軸サブユニット界面の性質の違いを中心に紹介する。

P軸サブユニット界面はループ部分の親水的、静電的かつ特異的な結合によっており、両側のサブユニットからの正電荷同士が向かい合っていることによる反発がある。一方、Q軸サブユニット界面はそこに並んだヘリックスの疎水的かつ非特異的な結合によっている。P軸界面にFBPが結合すると、そこに存在する正電荷が中和されることにより、P軸界面で向かい合うサブユニットがわずか1.0 Å程度近づきあう。これはP軸界面付近を中心としたサブユニットの回転を伴うものであり、中心から約30 Å離れたQ軸サブユニット界面ではヘリックス半ピッチ分(約2.9 Å)の大きな動きとなる。そこに存在するHis68はその動きによりQ軸界面で隣合ったサブユニットの活性部位から引き出され、その活性部位の基質結合に必要な残基であるArg171が正常な配置をとれるようになる。以上で述べた順序ではFBPが結合することによりT状態からR状態へ移行した場合の構造変化に従った。

T状態とR状態の主な違いはサブユニットの回転(四次構造変化)である。P軸界面は特異的な結合によっており、T状態とR状態ではあまり大きく動かない。一方、Q軸界面の非特異的な疎水面はヘリックスのすべりによって大きく動くことが可能となっている。

このモデルの活性化機構はMWCモデルに従っており、T状態とR状態間の平衡によって説明される。つまり、FBPの結合によりP軸界面の正電荷の反発が解消されて、P軸界面でサブユニット同士が少し近づくR状態が優勢となる。一方、FBP非存在下では、Q軸界面の疎水面の溶媒への露出がより少ないT状態が優勢に存在する。基質によるホモトロピックな活性化は分子の対称性(各サブユニットはすべてT状態またはR状態で存在し、その両方が混在することはない)に由来する。すなわち、基質が結合することにより協同的にR状態のサブユニットが増える(R状態に平衡が移動する)ためと考えられる。

このモデルはさまざまな状態の結晶構造およびリガンドの結合にともなうNADHの蛍光変化を測定することにより得られている。本研究では、それをサブユニット間相互作用の観点から検証することを主な目的とした。

第2章ではD-WハイブリッドがFBP結合部位の数によってはっきり三種に分類できた。FBP結合部位が一つしかない場合(D2W2-PおよびD1W3)はFBP存在下でも飽和曲線が少しシグモイダルであった。これは、P軸界面での正電荷の解消が十分でないため、R状態への平衡の移動が完全に起こらなかったことを示している。また、D2I2-PがFBPにより活性化されたことから、FBPによるヘテトロピックな活性化がQ軸界面を通じて伝わる事が明らかとなった。FBP結合部位から別のサブユニットの活性部位までは約40 Å離れており、このような長距離の活性化を説明するには、サ

サブユニットの回転による四次構造変化が最も適当な解釈といえる。この結果は、活性の制御にはQ軸で向かい合う両方のサブユニットの残基が関わっていることにも矛盾しない。

第3章では、まず、Lサブユニットへのオキサム酸の結合によりMサブユニットのMDH活性が上昇したことから、ホモトロピックな活性化も別のサブユニットに伝わる事が明らかとなった。さらに、M2L2-QRとM2L2-Pが、その立体配置の違いにも関わらず全く同一の速度論的性質を示したことから、本酵素が対称性を保ってアロステリック転移を行なうことを示した。これらの結果から、ホモトロピックな活性化も四次構造変化によるものであることが示された。また、P軸界面およびQ軸界面はともにその対称性に関与することが分かった。

そして、第2章および第3章で得られた全てのハイブリッドにおいて、それらの速度論的パラメーターの挙動のほとんどがMWCモデルに矛盾しないことが半定量的に確かめられた。

本酵素のアロステリック転移機構は、図2-6-4に模式的に示したように、差動ギアの動作に似た四次構造変化による。P軸界面およびQ軸界面での相互作用を、それぞれ形の異なる歯車で表わしている。これらの相互作用のために、4つのサブユニットの回転は同時に起こる。本論文では、これらの相互作用により「活性化が伝わる」と表現したが、これはハイブリッドの速度論的解析により観測された見かけの現象である。結晶構造の知見に照らし合わせると、「活性化が伝わる」というよりも、「活性化が全てのサブユニットで同時に起こる」という表現の方が実際の構造変化をよく表わしている。第2章のヘテロトロピックな活性化ではQ軸界面の、第3章のホモトロピックな活性化ではP軸界面とQ軸界面での相互作用を観測し、さらに、そのアロステリック転移(サブユニットの回転)が、(定常状態での速度論のタイムスケールでは)同時に起こっていることを示したことになる。

以上のように、サブユニット相互作用の観点からも、提唱されたモデルが基本的に本酵素のアロステリック転移機構を説明できることが分かった。しかし、基質阻害が存在するためにMWCモデルとの完全なフィッティングは行なえなかった。また、ここでは対称性を示したものの、MWCモデルに完全に従うことを証明したわけではない。すなわち、MWCモデルではT状態とR状態の二状態であると仮定しているが、その中間的な状態の存在は否定できない。つまり、T状態とR状態の中間的なX状態が全てのサブユニットの対称性を保って存在することはありえるということである。以前に行なわれた本酵素のハイブリッドLDHの研究との相違点からはヘテロトロピックな活性化とホモトロピックな活性化が異なる機構によるものであることが示唆されており、蛍光を用いた実験でも、FBP非存在下とFBP存在下ではオキサム酸の解離定数が異なっている[32]。しかし、FBPの結合していない脱感作型LDH(R173Q/H188Y)のR状態の結晶構造(ホモトロピックに活性化された構造と考えられる)が鎌田によって得られおり、その構造はFBPの結合したR状態とあまり変化していなかった[32]。このように、ヘテロトロピックな活性化とホモトロピックな活性化の機構の違い並びに第三の状態の存在に関しては

定まった知見が得られておらず、今後の課題といえる。

他のアロステリック酵素との比較

本酵素だけでなく、同じく細菌由来のアロステリックLDHである *Bacillus stearothermophilus* LDH(BSLDH)においてもそのアロステリック機構がよく研究されている。本酵素の四量体構造は安定であるが、BSLDHはFBP非存在下などの条件で二量体に解離し、活性を失うことが知られている[8,62-64]。また、P軸界面のループに変異を入れることにより四量体への会合を防ぎ、安定な二量体で存在する変異体の結晶構造解析が行われた[26,65]。この変異体は活性を失った二量体であり、彼らはこの構造をT状態であるとしている。その構造をすでに得られていたBSLDHのR構造と比較した結果、サブユニットはほとんど回転していなかったことから、四次構造変化はFBPによる活性化に重要ではないと結論している。そのかわりに、FBPに結合するArg173がその残基が存在する α 2Fヘリックスを動かすことにより、活性部位の重要な残基であるArg171とAsp168（これらも α 2Fヘリックス上に存在する）が正しい位置に動くという、サブユニット内での活性化モデルを提唱している。しかし、BLLDHを用いた本研究では、このようなサブユニット内での三次構造変化に基づく活性化モデルは否定された。すなわち、FBP結合部位はP軸サブユニット界面に存在するために、第2章の実験で明らかとなったQ軸サブユニット界面を伝わる活性化はこのモデルでは説明できない。この相違はBSLDHとBLLDHの違いによるものであるか、または彼らの用いた変異体が何らかのアーティファクトを招いたことによるものと思われる。彼らのモデルのようなFBPの結合によるサブユニット内での動きがR状態の構造をより最適なものに微調整することにより、本酵素におけるヘテロトロピックな活性化とホモトロピックな活性化の違いを与える原因となっていることは考えられる。しかし、いずれにしても、四次構造変化が本酵素の活性制御の主要因であることは間違いない。

細菌型LDH以外にも数多くのアロステリック酵素の研究が行なわれている。その代表的なものであるヘモグロビン、ATCaseおよびホスホフルクトキナーゼにおいても、多少の異論はあるものの、本酵素と同様に基本的にMWCモデルに従っており、分子の対称性を保ちつつ四次構造変化によるアロステリック転移をすると考えられている[1]。さらに最近、大腸菌由来のアロステリックなピルビン酸キナーゼのT状態と考えられる構造が得られ[3]、すでに得られていたネコ筋肉およびウサギ筋肉由来の非アロステリックピルビン酸キナーゼの構造（これはR状態と考えられている）比較することにより、アロステリック転移についての知見が得られている。この酵素の場合には、ドメイン間の動きによる三次構造変化で活性が制御されると考えられている。しかし、サブユニット間の動きによる大きな四次構造変化も伴っており、本酵素と同様に対称性が保たれている。しかし、一部のアロステリック酵素においては非対称性が存在することが示されており[74]、L-2-ヒドロキシイソカプロン酸デヒドロゲナーゼでは、各サブユニットが非対称に存在する結晶構造が得られている[75]。また、インシュリンの六量体は、その

三量体づつが別々に対称性を持ってアロステリック転移をすることが知られている[76,77]。アロステリック蛋白質における対称性がどの程度普遍的なものであるかという問題は、今後さまざまな材料を用いた研究により解明されるものと期待される。

他のハイブリッド酵素を用いた研究について

*in vitro*でのハイブリッド酵素の形成は、遺伝子操作が発達する以前からの古典的な研究法であった。LDHのアイソザイムの研究の他にも、いくつかの蛋白質でそのサブユニット間の結合力に関する研究が行なわれている[45,78,79]。また、もともと*in vivo*で相同な酵素同士がハイブリッドを形成している場合、それらのサブユニット組成を調べる方法としても用いられている[80-84]。

一方、遺伝子操作により、もとの生体内では起こらない組み合わせのハイブリッド酵素を*in vivo*で形成する実験も行なわれている。これらの実験は、主に生体内で生成するハイブリッド酵素の相補性を調べる方法として用いられている[85-88]。

ハイブリッドを用いたアロステリック機構の研究の例は少ないが、その中でもATCaseは最も精力的に研究されており、Schachmanらのグループを中心に数多くの知見が得られている[41,73,89-94]。その中でも、Gibbonsらによる先駆的な研究では、*in vitro*で不活性サブユニットとのさまざまなハイブリッドATCaseを作製して速度論的解析を行ない、本研究と同様なアロステリック転移における対称性を示している[41]。この場合、不活性化および分離のための電荷のタグは化学修飾によって行われている。最もよく研究されているアロステリック蛋白質の一つであるヘモグロビンでも、ハイブリッドを用いた研究が行なわれている。Ackersらは、リガンドの結合状態の違う2種のヘモグロビンのサブユニットが結合してできるハイブリッドの平衡定数から、さまざまなアロステリック状態間のエネルギー差を計算している[95-98]。

サブユニット間のアロステリックな相互作用の観測も、その多くは二量体であり、本研究で行われたように活性を直接測定した例は少ないものの、いくつか報告されている。ATCaseでは、化学修飾によって分光学的プローブを導入した不活性型サブユニットと野生型サブユニットのハイブリッド酵素を用いて、野生型サブユニットに基質が結合することによって引き起こされた構造変化を分光学的に測定している[93,94]。DNAトポイソメラーゼIIでは、抗体で感知できるようなタグ配列を持つフュージョンサブユニットとATPの結合できないサブユニットのハイブリッド二量体を作製し、それらのATPによるアロステリックな相互作用をプロテアーゼによる限定分解およびトポイソメラーゼ活性で観測した[99]。アントラニル酸シンターゼでは、不活性サブユニットと阻害剤であるL-トリプトファンに脱感作されたサブユニットとのハイブリッド二量体を作製し、それが阻害剤によって活性が低下することを報告している[100]。その他、2種のヘテロダイマー酵素において、分光学的方法および同位体効果を用いてそれらのサブユニット間のアロステリックな相互作用が観測されている[101,102]。

ハイブリッド酵素を用いた研究の有用性

MWCモデルやKNFモデルといった古典的なアロステリックモデルに加えて、最近ではサブユニットの解離および会合を考慮に入れた新しいモデルがいくつか提唱されている[103,104]。このようなモデルの検証にも、本研究で用いたような*in vitro*でのハイブリッド形成実験が有用であると考えられる。

本研究では、*in vivo*で全ての組み合わせのハイブリッドLDHを作ることにより、アロステリックな活性化および基質阻害におけるサブユニット間相互作用の役割を調べることができた。また、*in vitro*で二量体同士の限定的な組み替えを行う条件を見つけることにより、サブユニット界面の結合力に新たな知見を加えるとともに、*in vivo*で行った実験の裏付けも行った。このように、*in vivo*でのハイブリッド形成の利点は、*in vitro*でのハイブリッド形成の条件を探する必要がなく、全ての組み合わせのハイブリッドを簡単に得られることである。一方、*in vitro*でのハイブリッド形成の利点は、条件をコントロールできるため、限定的な解離条件によって特定のサブユニット界面での結合力の強さと性質を調べられることと、特定の立体配置を持ったハイブリッドを得られることである。本研究のように、*in vivo*と*in vitro*の方法の両方を用いることは、お互いの手法によって得られた知見を補完しあうことを可能にするといえる。

遺伝子工学の発達により、性質の異なる変異体や、分離のためのタグの導入は非常に簡単になっている。さらに、結晶構造が得られていれば、機能を壊さないタグの設計も容易となり、本研究のように立体配置によりハイブリッド酵素を分離できるようなタグの設計ができる可能性も広がる。従って、本研究で行なったようなハイブリッドを用いた研究は、アロステリック酵素だけでなく、ホモオリゴマー蛋白質全般に関して、それらの機能およびサブユニット間相互作用の解析などに幅広く応用できると考えられる。

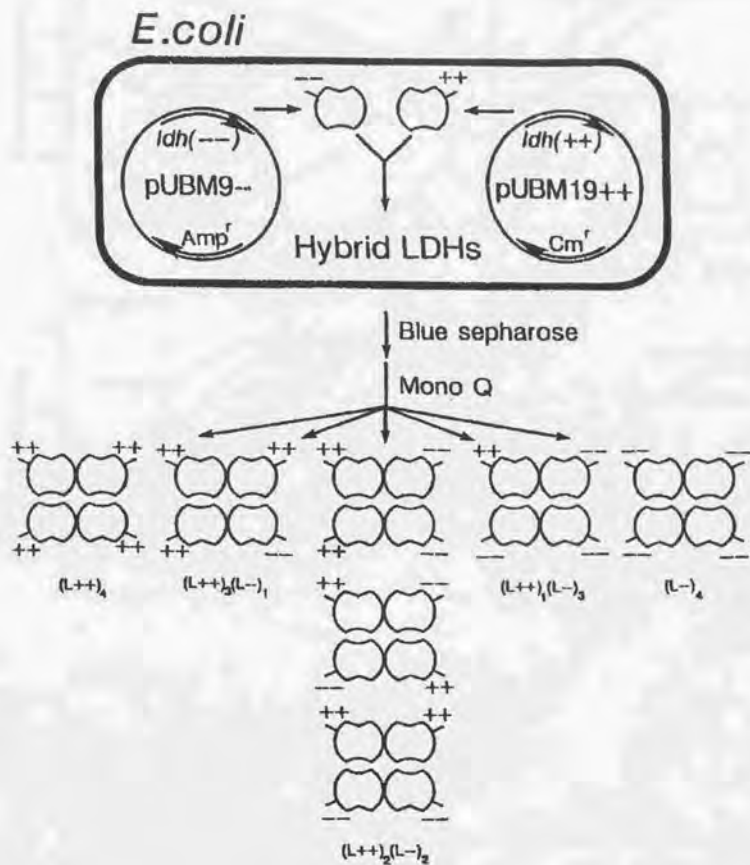


図2-6-1 横田および北村によって行われた実験の概略図

L++とL--とのハイブリッドLDHの場合。ハイブリッド形成に二種のベクターを同時に形質転換させた大腸菌（ダブルトランスフォーマント）を用いた点と、電荷のタグが両サブユニットのC末端に付加された正および負の電荷を持つ2残基である点が本研究と異なっている。

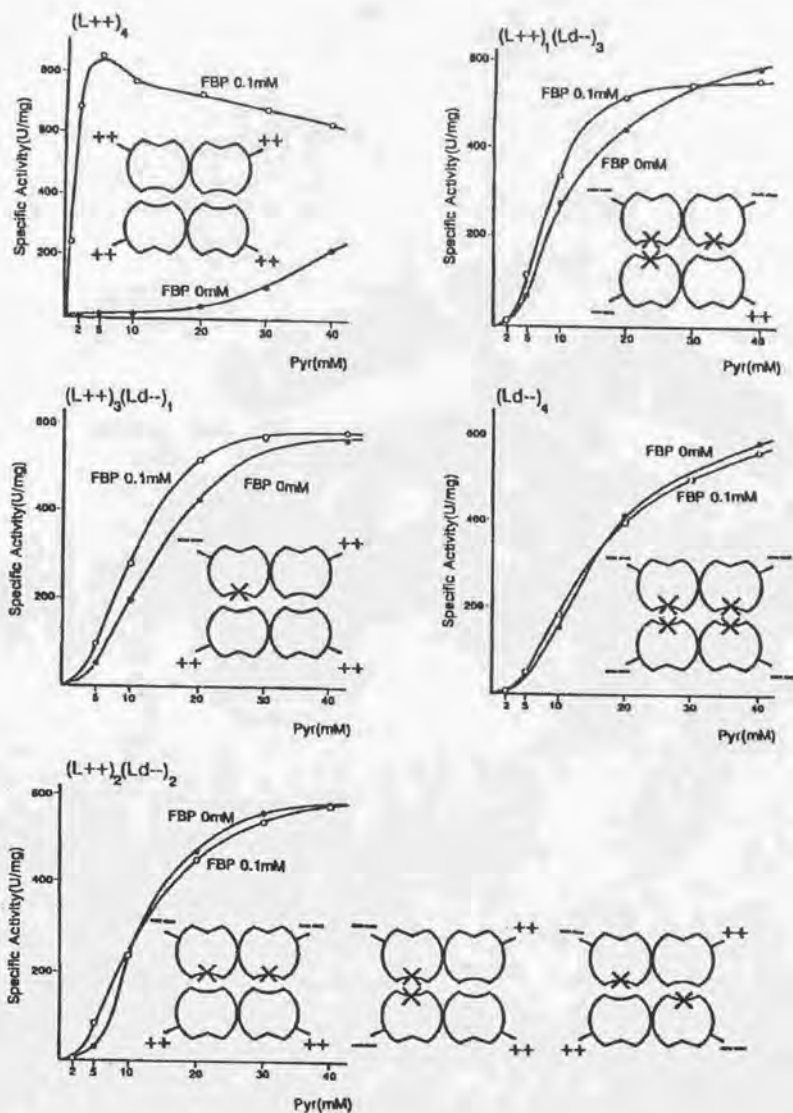


図2-6-2 横田の実験における脱感作型LDHと野生型LDHのハイブリッドLDHの性質

脱感作型LDH(Ld++)と野生型LDH(Ld-)の各ハイブリッドLDHのピルビン酸飽和曲線。測定条件は、本研究と同じである。本研究で行われたD-Wハイブリッドの結果(図2-4~図2-6)と異なり、脱感作サブユニットが一つでも存在すると、脱感作型LDHと同じ飽和曲線となる。

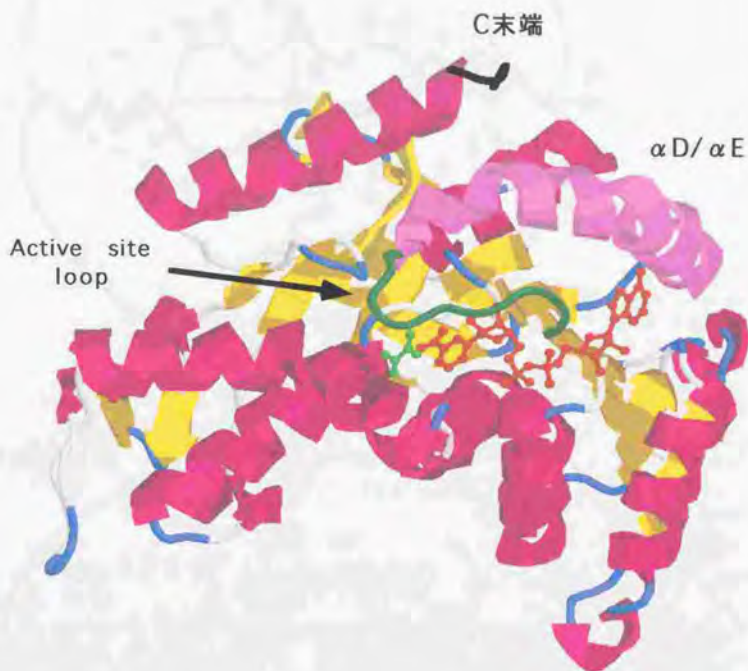


図2-6-3 立体構造上における、C末端部分と活性部位の位置

C末端部分と活性に重要とされているActive site loop
 および $\alpha D/\alpha E$ は、近い位置にある。
 NADH(赤), オキザム酸(緑)

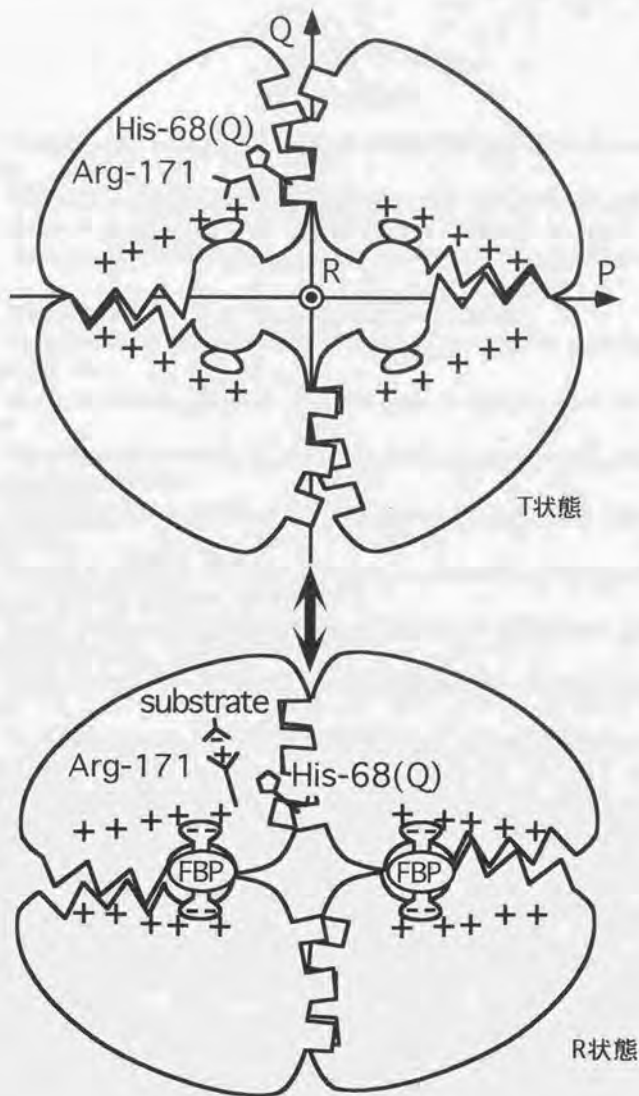


図2-6-4 本酵素のアロステリック転移の模式図

本酵素のアロステリック転移機構は、差動ギアの動きによって類推される。
サブユニットの回転はそれぞれのサブユニット間相互作用によって同時に起こる。

第1部 文献-1

1. Coughlan, M. P., and Hazlewood, G. P. (1993) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**, 259-289
2. Gilbert, H. J., and Hazlewood, G. P. (1993) *J. Gen. Microbiol.* **139**, 187-194
3. Sunna, A., and Antranikian, G. (1997) *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**, 39-67
4. Tenkanen, M., Viikari, L., and Buchert, J. (1997) *Biotechnol. Techniques* **11**, 935-938
5. Poutanen, K. (1997) *Trends Food Sci. Technol.* **8**, 300-306
6. Iwano, K., Mikami, S., Fukuda, S., Shiinoki, S., and Shimada, T. (1986) *J. Brew. Soc. Jpn.* **81**, 554
7. Iwano, K., Mikami, S., Ishida, K., and Shiinoki, S. (1988) *J. Brew. Soc. Jpn.* **83**, 491-495
8. Ogasawara, H., Takahashi, K., Iitsuka, K., Ito, K., and Ishikawa, T. (1991) *J. Brew. Soc. Jpn.* **86**, 304-307
9. Mikami, S., Iwano, K., Shiinoki, S., and Shimada, T. (1987) *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2495-2501
10. Kaneko, A., Sudo, S., Takayasu-Sakamoto, Y., Tamura, G., Ishikawa, T., and Oba, T. (1996) *J. Ferment. Bioengng.* **81**, 292-298
11. Ito, K., Ogasawara, H., Sugimoto, T., and Ishikawa, T. (1992) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 547-550
12. Ito, K., Ikemasu, T., and Ishikawa, T. (1992) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 906-912
13. Ito, K., Iwashita, K., and Iwano, K. (1992) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1338-1340
14. Ito, K. (1993) *J. Brew. Soc. Jpn.* **88**, 920-928
15. Ito, K. PhD thesis 1993, The University of Tokyo, Tokyo, Japan
16. Henrissat, B., Claeysens, M., Tomme, P., Lemesle, L., and Mornon, J.-P. (1989) *Gene* **81**, 83-95
17. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1993) *Biochem J.* **293**, 781-788
18. Davies, G., and Henrissat, B. (1995) *Structure* **3**, 853-859
19. Biely, P., Kremnický, L., Alföldi, J., and Tenkanen, M. (1994) *FEBS Letters* **356**, 137-140
20. McCarter, J. D., and Withers, S. G. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 885-892
21. Birsan, C., Johnson, P., Joshi, M., MacLeod, A., McIntosh, L., Monem, V., Nitz, M., Rose, D. R., Tull, D., Wakarchuk, W. W., Wang, Q., Warren, R. A. J., White, A., and Withers, S. G. (1998) *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 156-160
22. Miao, S., Ziser, L., Aebersold, R., and Withers, S. G. (1994) *Biochemistry* **33**, 7027-7032
23. Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Sung, W. L., Davoodi, J., and Yaguchi, M. (1994) *Protein Sci* **3**, 467-475
24. Lawson, S. L., Wakarchuk, W. W., and Withers, S. G. (1996) *Biochemistry* **35**, 10110-10118
25. Lawson, S. L., Wakarchuk, W. W., and Withers, S. G. (1997) *Biochemistry* **36**,

2257-2265

26. Havukainen, R., Törrönen, A., Laitinen, T., and Rouvinen, J. (1996) *Biochemistry* **35**, 9617-9624
27. Zechel, D. L., Konermann, L., Withers, S. G., and Douglas, D. J. (1998) *Biochemistry* **37**, 7664-7669
28. McIntosh, L. P., Hand, G., Johnson, P. E., Joshi, M. D., Körner, M., Plesniak, L. A., Ziser, L., Wakarchuk, W. W., and Withers, S. G. (1996) *Biochemistry* **35**, 9958-9966
29. Joshi, M. D., Hedberg, A., and McIntosh, L. P. (1997) *Protein Sci.* **6**, 2667-2670
30. Davoodi, J., Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Carey, P. R., and Surewicz, W. K. (1995) *Eur. J. Biochem.* **232**, 839-843
31. Kregel, U., and Dijkstra, B. W. (1996) *J. Mol. Biol.* **263**, 70-78
32. Li, X. L., and Ljungdahl, L. G. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3160-3166
33. Iefuji, H., Chino, M., Kato, M., and Iimura, Y. (1996) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1331-1338
34. Himmel, M., Karplus, P. A., Sakon, J., Adney, W. S., Baker, J. O., and Thomas, S. R. (1997) *Appl. Biochem. Biotech.* **63-65**, 315-325
35. Jenkins, J., Leggio, L. L., Harris, G., and Pickersgill, R. (1995) *FEBS Lett.* **362**, 281-285
36. Katsube, Y., Hata, Y., Yamaguchi, H., Moriyama, H., Shinmyo, A., and Okada, H. (1990) *Protein Engng.* **3**, 289-290
37. Arase, A., Yomo, T., Urabe, I., Hata, Y., Katsube, Y., and Okada, H. (1993) *FEBS Lett.* **316**, 123-127
38. Campbell, R. L., Rose, D. R., Wakarchuk, W. W., To, R., Sung, W., and Yaguchi, M. (1993) *Found. Biotechnol. Ind. Ferment. Res. Publ.* **8**, 63-72
39. Törrönen, A., Harkki, A., and Rouvinen, J. (1994) *EMBO J.* **13**, 2493-2501
40. Törrönen, A., and Rouvinen, J. (1995) *Biochemistry* **34**, 847-856
41. Harris, G. W., Pickersgill, R. W., Connerton, I., Debeire, P., Touzel, J.-P., Breton, C., and Pérez, S. (1997) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **29**, 77-86
42. Gruber, K., Klintschar, G., Hayn, M., Schlacher, A., Steiner, W., and Kratky, C. (1998) *Biochemistry* **37**, 13475-13485
43. Aÿ, J., Götz, F., Borriss, R., and Heinemann, U. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6613-6618
44. Viswamitra, M. A., Bhanumoorthy, P., Ramakumar, S., Manjula, M. B., Vithayathil, P. J., Murthy, S. K., and Naren, A. P. (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 987-988
45. Eswaramoorthy, S., Vithayathil, P. J., and Viswamitra, M. A. (1994) *J. Mol. Biol.* **243**, 806-808
46. Rosa, A. P. B., Day, J., Larson, S. B., Keene, N., and McPherson, A. (1997) *Acta Cryst.* **D53**, 256-261
47. Plesniak, L. A., Wakarchuk, W. W., and McIntosh, L. P. (1996) *Protein Sci.* **5**, 1118-1135
48. Chen, X., Whitmire, D., and Bowen, J. P. (1996) *Protein Sci.* **5**, 705-708
49. Törrönen, A., and Rouvinen, J. (1997) *J. Biotechnol.* **57**, 137-149
50. Törrönen, A., Kubicek, C. P., and Henrissat, B. (1993) *FEBS Lett.* **321**, 135-139

第1部 文献-3

51. Harris, G. W., Jenkins, J. A., Connerton, I., Cummings, N., Leggio, L. L., Scott, M., Hazlewood, G. P., Laurie, J. I., Gilbert, H. J., and Pickersgill, R. W. (1994) *Structure* **2**, 1107-1116
52. Harris, G. W., Jenkins, J. A., Connerton, I., and Pickersgill, R. W. (1996) *Acta Cryst.* **D52**, 393-401
53. Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D., and Derewenda, Z. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 20811-20814
54. Schmidt, A., Schlacher, A., Steiner, W., Schwab, H., and Kratky, C. (1998) *Protein Sci.* **7**, 2081-2088
55. Notenboom, V., Birsan, C., Nitz, M., Rose, D. R., Warren, A. J., and Withers, S. G. (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**, 812-818
56. Ducruix, A., and R. G. (1992) *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford
57. Matthews, B. W. (1968) *J. Mol. Biol.* **33**, 491
58. Blundell, T. L., and Johnson, L. N. (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, London
59. Drenth, J. (1994) *Principles of Protein X-ray Crystallography*, Springer-Verlag, New York
60. Rossman, M. G., and Blow, D. M. (1962) *Acta Cryst.* **15**, 24-31
61. Tanaka, N. (1977) *J. Cryst. Soc. Japan* **19**, 277
62. Harada, Y., Lifchitz, A., and Berthou, J. (1980) *J. Cryst. Soc. Japan* **22**, 358
63. Brünger, A. T. (1993) *X-PLOR Version 3.1. A system for X-ray crystallography and NMR*, Yale University Press, New Haven
64. Hirshfeld, F. L. (1968) *Acta Cryst.* **A24**, 301-311
65. Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Cryst.* **A47**, 110-119
66. Huber, R. (1985) in *Molecular Replacement (Machin, P. A., comp.), Proceedings of the Daresbury Study Weekend, Science and Engineering Research Council*, pp. 58-61, The Librarian, Daresbury Laboratory, Daresbury, United Kingdom
67. Rao, S. N., Jih, J.-H., and Hartsuck, J. A. (1980) *Acta Cryst.* **A36**, 878-884
68. Brünger, A. T. (1991) *Acta Cryst.* **A47**, 195-204
69. Ealick, S. E., and Walter, R. L. (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 725-736
70. Chance, B., Deisenhofer, J., Ebashi, S., Goodhead, D. T., Helliwell, J. R., Huxley, H. E., Iizuka, T., Kirz, J., Mitsui, T., Rubenstein, E., Sakabe, N., Sasaki, T., Schmah, G., Stuhmann, H. B., Wüthrich, K., and Zaccari, G. (1994) *Synchrotron radiation in the biosciences*, Oxford University Press, Oxford
71. Sakabe, N., Ikemizu, S., Sakabe, K., Higashi, T., Nakagawa, A., Watanabe, N., Adachi, S., and Sasaki, K. (1995) *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 1276-1281
72. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307-326
73. Gewirth, D. (1995) *The MacDenzo Manual*, Yale University, New Haven, CT
74. CCP4 (1994) *Acta Cryst.* **D50**, 760-763
75. French, G. S., and Wilson, K. S. (1978) *Acta Cryst.* **A34**, 517

第1部 文献-4

76. Lu, G. (1998) *J. Appl. Cryst.* in press
77. Kleywegt, G. J. (1996) *ESF/CCP4 Newsletter* **32**, 32-36
78. Brünger, A. T., Kuriyan, J., and Karplus, M. (1987) *Science* **235**, 458-460
79. Brünger, A. T., Krukowski, A., and Erickson, J. (1990) *Acta Cryst.* **A46**, 585-593
80. Brünger, A. T. (1992) *Nature* **355**, 472-475
81. Brünger, A. T. (1993) *Acta Cryst.* **D49**, 24-36
82. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283-291
83. Hooft, R. W. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996) *Nature* **381**, 272
84. Dodson, E., Kleywegt, G. J., and Wilson, K. (1996) *Acta Cryst.* **D52**, 228-234
85. Sayle, R. A., and Milner-White, E. J. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 374-376
86. Kraulis, P. J. (1991) *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950
87. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680
88. Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 403-405
89. Nicholls, A., Sharp, K. A., and Honig, B. (1991) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **11**, 281-296
90. Kabsh, W., and Sander, C. (1983) *Biopolymers* **22**, 2577-2637
91. Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T., and Chothia, C. (1995) *J. Mol. Biol.* **247**, 536-540
92. Orengo, C. A., Michie, A. D., Jones, S., Jones, D. T., Swindells, M. B., and Thornton, J. M. (1997) *Structure* **5**, 1093-1108
93. Campbell, R. L., Rose, D. R., Wakarchuk, W. W., To, R., Sung, W., and Yaguchi, M. *A Comparison of the structures of the 20 kd xylanases from Trichoderma harzianum and Bacillus circulans* 1-63-72 (Helsinki, 1993).
94. Kregel, U., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., and Dijkstra, B. W. (1996) *Acta Cryst.* **D52**, 571-576
95. Bray, M. R., and Clarke, A. J. (1992) *Eur. J. Biochem.* **204**, 191-196
96. Bray, M. R., and Clarke, A. J. (1995) *Biochemistry* **34**, 2006-2014
97. Muilu, J., Törrönen, A., M., P., and Rouvinen, J. (1998) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **31**, 434-444
98. Frolow, F., Harel, M., Sussman, J. L., Mevarech, M., and Shoham, M. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 452-458
99. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
100. Somogyi, M. (1952) *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23
101. Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T., and Ishii, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **43**, 25328-25331
102. Jiang, J.-S., and Brünger, A. T. (1994) *J. Mol. Biol.* **243**, 100-115
103. Schwartz, B., and Drueckhammer, D. G. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11902-11905
104. Nakamura, S. (1998) *J. Appl. Glycosci.* **45**, 147-154

第1部 文献-5

105. Wakarchuk, W. W., Sung, W. L., Campbell, R. L., Cunningham, A., Watson, D. C., and Yaguchi, M. (1994) *Protein Engng.* **7**, 1379-1386
106. Davoodi, J., Wakarchuk, W. W., Surewicz, W. K., and Carey, P. R. (1998) *Protein Sci.* **7**, 1538-1544
107. Sielecki, A. R., Fedorov, A. A., Boodhoo, A., Andreeva, N. S., and James, M. N. G. (1990) *J. Mol. Biol.* **214**, 143-170
108. Andreeva, N. S., and James, M. N. G. (1991) in *Structure and Function of the Aspartic Proteinases* (Dunn, B. M., ed.), pp. 39-45, Plenum Press, New York
109. Plesniak, L. A., Connelly, G. P., Wakarchuk, W. W., and McIntosh, L. P. (1996) *Protein Sci.* **5**, 2319-2328
110. Dym, O., Mevarech, M., and Sussman, J. L. (1995) *Science* **267**, 1344-1346
111. Kuntz, I. D. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 514-516
112. Shirai, T., Suzuki, A., Yamane, T., Ashida, T., Kobayashi, T., Hitomi, J., and Ito, S. (1997) *Protein Engng.* **10**, 627-634
113. Schena, M., Picard, D., and Yamamoto, K. R. (1991) *Methods in Enzymology* **194**, 389-398
114. Hirel, P.-H., Schmitter, J.-M., Dessen, P., Fayat, G., and Blanquet, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8247-8251

第2部 文献-1

1. Perutz, M.F. (1989) *Mechanism of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins*, Cambridge University Press, Cambridge, England
2. Iwata, S., Kamata, K., Yoshida, S., Minowa, T. & Ohta, T. (1994) *Nature Structural Biol.* **1**, 176-184
3. Mattevi, A., et al. (1995) *Structure* **3**, 729-741
4. Herve, G. (1992) *Allosteric Enzymes*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
5. Neet, K.E. (1995) *Methods In Enzymology* **249**, 519-567
6. Holbrook, J.J., Liliyas, A., Steindel, S.J. & Rossmann, M.G. (1975) in *The Enzymes*, 3rd ed., (Boyer, P.D., ed) Vol. 11, pp. 191-292, Academic Press, New York
7. Garvie, E.I. (1980) *Microbiol. Rev.* **44**, 106-139
8. Clarke, A.R., Evington, J.R.N., Dunn, C.R., Atkinson, T. & Holbrook, J.J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **870**, 112
9. Clarke, A.R., et al. (1986) *Nature* **324**, 699-702
10. Clarke, A.R., Atkinson, T. & Holbrook, J.J. (1989) *Trends Biochem Sci* **14**, 145-148
11. Mayr, U., et al. (1982) *Eur. J. Biochem.* **126**, 549
12. Mayr, U., Hensel, R. & Kandler, O. (1980) *Eur. J. Biochem.* **110**, 527
13. Taguchi, H. & Ohta, T. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 451-458
14. Taguchi, H., Yamashita, M., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1982) *J Biochem (Tokyo)* **91**, 1343-8
15. Taguchi, H., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1984) *Eur J Biochem* **145**, 283-90
16. Machida, M., Yokoyama, S., Matsuzawa, H., Miyazawa, T. & Ohta, T. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 16143-7
17. Machida, M., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1985) *J Biochem (Tokyo)* **97**, 899-909
18. Schroeder, G., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1988) *Biochem Biophys Res Commun* **152**, 1236-41
19. Kunai, K., Machida, M., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1986) *Eur J Biochem* **160**, 433-40
20. Matsuzawa, H., Machida, M., Kunai, K., Ito, Y. & Ohta, T. (1988) *FEBS Lett.* **233**, 375-378
21. Ono, M., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1990) *J Biochem (Tokyo)* **107**, 21-6
22. Koide, S., Yokoyama, S., Matsuzawa, H., Miyazawa, T. & Ohta, T. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 8676-9
23. Koide, S., Yokoyama, S., Matsuzawa, H., Miyazawa, T. & Ohta, T. (1992) *Biochemistry* **31**, 5362-8
24. Piontek, K., Chakrabarti, P., Schoer, H.-P., Rossman, H.G. & Zuber, H. (1990) *Proteins* **7**, 74
25. Wigley, D.B., et al. (1992) *J. Mol. Biol.* **223**, 317-35
26. Cameron, A.D., et al. (1994) *J. Mol. Biol.* **238**, 615-625

27. Buehner, M. & Hecht, H.-J. (1982) *J. Mol. Biol.* **162**, 819-838
28. Iwata, S., Minowa, T., Sakai, H. & Ohta, T. (1989) *Agric. Biol. Chem.* **53**, 3365-3366
29. Iwata, S. PhD Thesis 1991, The University of Tokyo
30. Minowa, T., Iwata, S., Sakai, H., Masaki, H. & Ohta, T. (1989) *Gene* **85**, 161-168
31. Minowa, T. PhD Thesis 1990, The University of Tokyo
32. Kamata, K. PhD Thesis 1995, The University of Tokyo
33. Vries, W.D., Gerbrandy, S.J. & Stouthamer, A.H. (1967) *Biochem. Biophys. Acta* **136**, 415-425
34. Vries, W. & Stouthamer, A.H. (1967) *J. Bacteriol.* **93**, 574-576
35. Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.P. (1965) *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118
36. Koshland, D.E., Nemethy, G. & Filmer, D. (1966) *Biochemistry* **5**, 365-385
37. Iwata, S., Yoshida, S. & Ohta, T. (1994) *J. Mol. Biol.* **236**, 958-9
38. Schirmer, T. & Evans, P.R. (1990) *Nature* **343**, 140
39. Barford, D. & Johnson, L.N. (1989) *Nature* **340**, 609
40. Kantrowitz, E.R. & Lipscomb, W.N. (1988) *Science* **241**, 669
41. Gibbons, I., Ritchey, J.M. & Schachman, H.K. (1976) *Biochemistry* **15**, 1324-1330
42. Yokota, K. MsC Thesis 1988, The University of Tokyo
43. Kitamura, H. MsC Thesis 1991, The University of Tokyo
44. Ohta, T., Yokota, K., Minowa, T. & Iwata, S. (1992) *Faraday Discuss.* **93**, 153-161
45. Hermann, R., Rudolph, R. & Jaenicke, R. (1982) *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **363**, 1259-65
46. Eventoff, W., et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 2677-2681
47. Kunkel, T.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488-492
48. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
49. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
50. Salthe, S.N., Chilson, O.P. & Kaplan, N.O. (1965) *Nature* **207**, 723
51. Iwata, S. & Ohta, T. (1993) *J. Mol. Biol.* **230**, 21-7
52. Grau, U.M., Trommer, W.E. & Rossman, M.G. (1973) *J. Mol. Biol.* **151**, 519-531
53. Goward, C.R. & Nicholls, D.J. (1994) *Protein Science* **3**, 1883-1888
54. Clarke, A.R., Atkinson, T. & Holbrook, J.J. (1989) *Trends Biochem Sci* **14**, 101-105
55. Wilks, H.M., et al. (1988) *Science* **242**, 1541-4
56. Nicholls, D.J., et al. (1994) *J Protein Chem* **13**, 129-33
57. Hogan, J.K., Pittol, C.A., Jones, J.B. & Gold, M. (1995) *Biochemistry* **34**, 4225-4230
58. Goldberg, E. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.* **109**, 134-141
59. Markert, C.L. (1963) *Science* **140**, 1329-1330
60. Chilson, O.P., Costello, L.A. & Kaplan, N.O. (1965) *Biochemistry* **4**, 271-281
61. Rossmann, M.G., et al. (1973) *J. Mol. Biol.* **76**, 533-537

第2部 文献-3

62. Clarke, A.R., Waldman, A.D., Munro, I. & Holbrook, J.J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **828**, 375-9
63. Clarke, A.R., Atkinson, T., Campbell, J.W. & Holbrook, J.J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **829**, 287-396
64. Clarke, A.R., *et al.* (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **913**, 72-80
65. Jackson, G.S., *et al.* (1992) *Biochemistry* **31**, 8307-8314
66. Kaplan, K.O. (1968) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **151**, 382
67. Nishiyama, M., Shimada, K., Horinouchi, S. & Beppu, T. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 14294-14299
68. Whitaker, J.R., Yates, D.W., Bennett, N.G., Holbrook, J.J. & Gutfreund, H. (1974) *Biochem J* **139**, 677-97
69. Holbrook, J.J. & Gutfreund, H. (1973) *Febs Lett.* **31**, 157
70. Koide, S. PhD Thesis 1991, The University of Tokyo
71. Philippopoulos, M., Xiang, Y. & Lim, C. (1995) *Protein Eng.* **8**, 565-573
72. Adams, M.J., Liljas, A. & Rossmann, M.G. (1973) *J. Mol. Biol.* **76**, 519-531
73. Eisenstein, E., *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22148-22155
74. Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Horjales, E. & Calcagno, M.L. (1995) *Biochemistry* **34**, 6074-6082
75. Niefind, K., Hecht, H.J. & Schomburg, D. (1995) *J. Mol. Biol.* **251**, 256-281
76. Brzovic, P.S., Choi, W.E., Borchardt, D., Kaarsholm, N.C. & Dunn, M.F. (1994) *Biochemistry* **33**, 13057-13069
77. Bloom, C.R., *et al.* (1995) *J. Mol. Biol.* **245**, 324-330
78. Yang, Y.R. & Schachman, H.K. (1987) *Anal. Biochem.* **163**, 188-195
79. Sun, A.Q., Yuksel, K.U. & Gracy, R.W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20168-74
80. Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S. & Creighton, T.E. (1995) *Biochemistry* **34**, 5075-89
81. Cousineau, J. & Meighen, E. (1976) *Biochemistry* **15**, 4992-5000
82. Higgins, R.C. & Gottlieb, L.D. (1984) *Biochem Genet* **22**, 957-79
83. Hayes, J.D. (1984) *Biochem J* **224**, 839-52
84. Singh, S.V., *et al.* (1985) *Biochem J* **232**, 781-90
85. Pookanjanatavip, M., Yuthavong, Y., Greene, P.J. & Santi, D.V. (1992) *Biochemistry* **31**, 10303-10309
86. Foltermann, K.F., Beck, D.A. & Wild, J.R. (1986) *J. Bacteriol.* **167**, 285-290
87. Wenthe, S.R. & Schachman, H.K. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 31-35
88. Chen, Z., *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 17124-17132
89. Gibbons, I., Yang, Y.R. & Schachman, H.K. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4452-4456
90. Hensley, P., Yang, Y.R. & Schachman, H.K. (1981) *J. Mol. Biol.* **152**, 131-52
91. Schachman, H.K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18583-18586
92. Chan, W.W.C. & Enns, C.A. (1981) *Can. J. Biochem.* **59**, 461-468

第2部 文献-4

93. Wang, C., Yang, Y.R., Hu, C.Y. & Schachman, H.K. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7028-34
94. Yang, Y.R. & Schachman, H.K. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5187-91
95. Ackers, G.K. & Hazzard, J.H. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 385-390
96. Ackers, G.K., Doyle, M.L., Myers, D. & Daugherty, M.A. (1992) *Science* **255**, 54-63
97. Turner, G.J., *et al.* (1992) *Proteins* **14**, 333-350
98. Perrella, M., Benazzi, L., Shea, M.A. & Ackers, G.K. (1990) *Biophys Chem* **35**, 97-103
99. Lindsley, J.E. & Wang, J.C. (1993) *Nature* **361**, 749-750
100. Caligiuri, M.G. & Bauerle, R. (1991) *Science* **252**, 1845-1848
101. Houben, K.F. & Dunn, M.F. (1990) *Biochemistry* **29**, 2421-2429
102. Leja, C.A., Woehl, E.U. & Dunn, M.F. (1995) *Biochemistry* **34**, 6552-6561
103. Ricard, J. (1992) in *Allosteric Enzymes*, (Herve, G., ed) Vol. pp. 1-25, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
104. Horovits, A. (1995) *Proc. R. Soc. Lond. B* **259**, 85-87
105. Novoa, W.B. & Schwert, G.W. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 2150
106. Foote, J. & Schachman, H.K. (1985) *J. Mol. Biol.* **186**, 175-184
107. Taguchi, H. PhD Thesis 1982, The University of Tokyo

論文の内容の要旨

論文題目 酵素の構造、機能、アロステリック制御に関する研究

氏名 伏 信 進 矢

第1部

X線結晶構造解析による白麹菌キシラナーゼの好酸性・耐酸性機構に関する研究

極端な温度、pH、高い塩濃度のような異常環境で働く酵素は、その安定性を維持するために、独自の機構を持っていると考えられる。さらに、異常なpHで活性を発現する酵素の触媒機構にも興味を持たれる。

焼酎の醸造に用いられる白麹菌 *Aspergillus kawachii* が分泌する数種のキシラナーゼのうち、キシラナーゼCは、至適pHが2.0で、pH 1.0でも失活しない、非常に好酸性、耐酸性のキシラナーゼである。キシラナーゼCの好酸性および耐酸性機構の解明における原子レベルでの構造的基礎を得るために、X線結晶構造解析を行った。

第1章 キシラナーゼCの結晶化

蒸気平衡拡散法により、 $0.2 \times 0.2 \times 2.0 \text{ mm}^3$ 程度まで成長する良質の結晶（空間群 $P4_32_12$ 、格子定数 $a=b=62.1 \text{ \AA}$ 、 $c=113.3 \text{ \AA}$ ）を得た。

第2章 分子置換法による構造決定

*Trichoderma reesei*のキシラナーゼXYNIをモデル分子として、分子置換法によって初期位相の決定を行った。

第3章 シンクロトン放射光及び巨大分子用ワイセンベルグカメラによる 回折強度データの収集

高エネルギー加速器研究機構・放射光施設で2.0 Åまでの回折強度データ(R-merge=7.3%)を収集した。

第4章 構造の精密化

キシラナーゼCの結晶構造を精密化した結果、現在、6.0-2.0 Åのデータに対して、結晶学的R値が19.5%、Rfreeが25.8%の構造を得ている。

第5章 精密化された構造の詳細な解析

キシラナーゼCの結晶構造を、至適pHが中性近辺であるキシラナーゼ(*Bacillus circulans*のキシラナーゼおよび*T. reesei*のキシラナーゼXYNII)の構造と比較した結果、活性中心残基である酸/塩基触媒のグルタミン酸の近傍の残基がキシラナーゼCではアスパラギンではなくアスパラギン酸になっており、その間の距離は約0.7 Å近づいて、2.8 Åと水素結合を形成する位置にあることが分かった。

また、キシラナーゼCの構造において、活性部位クレフト周辺と、他のキシラナーゼでセリン・スレオニン表面とよばれる面に酸性残基が集中していることを見出した。セリン・スレオニン表面には、セリンおよびスレオニンが多く存在しているが、耐酸性であるキシラナーゼCにおいてのみ、その多くがアスパラギン酸およびグルタミン酸に置換されていた。好塩菌由来の耐塩性酵素および耐アルカリ性プロテアーゼの構造的特徴との比較から、これらの表面に偏在する酸性残基がキシラナーゼCの耐酸性に重要であることが示唆された。

第6章 キシラナーゼCのアスパラギン酸37変異体の解析

このアスパラギン酸がキシラナーゼCの至適pHを決定するのに重要であると考えて、この残基を種々のアミノ酸に置換した変異体を作製、解析した結果、アスパラギンおよびセリン変異体においては、至適pHが2.0から5.0へと上昇していた。さらに、キシラナーゼCの構造を中性近辺に至適pHを持つ他のキシラナーゼの構造と比較した結果、活性中心付近の残基で、活性のpH依存性に寄与している可能性のある残基がいくつか見出された。そして、これらの変異体のうちアスパラギン変異体の構造解析を行った結果、アスパラギンに置換された残基の側鎖の電子密度はSA-オミットマップ上で消失しており、この側鎖が一定の配向をとっていないことが強く示唆された。

第2部

ハイブリッド酵素を用いたアロステリックL-乳酸脱水素酵素のサブユニット間相互作用に関する研究

L-乳酸脱水素酵素(以下LDH)はNADH/NAD⁺を補酵素としてピルビン酸/乳酸の間の酸化還元反応を触媒する。LDHには脊椎動物由来の非アロステリック型酵素と、フルクトース-1,6-二リン酸(FBP)で活性化される細菌由来のアロステリック型酵素が存在する。本研究で用いたLDHは乳酸菌 *Bifidobacterium longum* 由来のもの(以下BLLDH)であり、基質によるホモトロピックな活性化と、FBPによるヘテロトロピックな活性化をうける典型的なアロステリック酵素である。

BLLDHでは、基質ピルビン酸に対する高親和性型(R状態)および非親和性型(T状態)の両方の四量体が同一結晶格子中に存在する構造が明らかにされている。各サブユニットはそれぞれP,Q,Rと呼ばれる3本の2回軸で位置づけられており、P軸とQ軸をはさんだ界面で接触しているが、R軸の接触はない。また、FBPはP軸界面の二量体にはさまれた結合部位に2サブユニットあたり1分子結合する。T状態とR状態の結晶構造の比較により、Monod-Wyman-Changeux型の協奏的アロステリック機構(MWCモデル)に基づいたアロステリック活性化モデルが提唱されている。すなわち、サブユニットの回転による四次構造変化の結果、四量体の各サブユニットが対称性を保ったまま両状態間を移行すると考えられる。

本研究では、まず、2種のサブユニットが混在するハイブリッドFLDHを*in vivo*で形成し、分離する系を確立した。そして、さまざまな変異体同士を組み合わせたハイブリッドLDHを解析することにより、アロステリックな活性化に対するサブユニット間相互作用の役割を調べた。さらに、*in vitro*でサブユニットを組み替えてハイブリッドLDHを作る条件から、サブユニット界面の相互作用の強さおよび性質について検討した。

第1章 *in vivo*でのハイブリッドLDHの形成とその分離系の確立

分離のためのタグとして、LDHの表面に存在する2残基(Lys316とArg317)をそれぞれGluとAspに置換することにより、野生型LDHより負の電荷を持つ変異型酵素を作成した。この負電荷の導入によりLDHのアロステリックな性質が大きく変わらないことと、Native PAGEや陰イオン交換カラムにより野生型酵素と分離が可能であることを確認した。以降のハイブリッドLDHの組み合わせでは、片方にこの負電荷のタグをつけた。また、2種のLDH遺伝子をタンデムに並べた発現ベクターにより、大腸菌内でハイブリッドLDH形成が行なわれることを確認した。

第2章 FBP脱感作型サブユニットを用いたヘテロトロピック活性化機構の解析

1. 分離された各ハイブリッドLDHの立体配置の決定とFBP結合部位の解析

FBP結合部位に存在しFBPのリン酸基と結合する2残基(Arg173とHis188)を置換した変異体R173Q/H188YはFBPにより活性化されない脱感作型酵素となる。脱感作型LDH(R173Q/H188Y)(D)と野生型LDH(W)のハイブリッドLDHは、陰イオン交換カラ

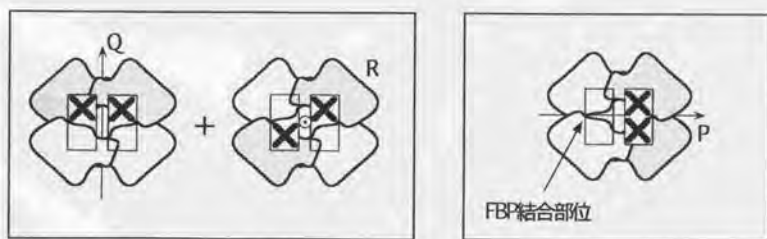
ムによりD4, D3W1, D2W2-QR, D2W2-P, D1W3, W4の6つのピークに分離された。Native PAGEの結果およびFBPに対する活性化の違いから、D2W2の2つのピークの立体配置は図のように決定された。これらの速度論的解析から、FBP結合部位はそれを構成する2つのサブユニットの両方が野生型である場合にのみ機能することが明らかになった。

2. サブユニット間相互作用を介したFBPによる活性化

触媒残基His195を置換した変異体H195Nは触媒活性を失う。この不活性型LDH(H195N)(I)と2-1で用いた脱感作型LDH(R173Q/H188Y)(D)のハイブリッドLDHを2-1と同様に形成、分離した。その結果、D2I2-PのハイブリッドLDHはFBPで活性化された。すなわち、不活性型サブユニットのFBP結合部位にFBPが結合したために、脱感作型サブユニットの活性が上昇したことになる。これより、FBPによるヘテロロピックな活性化がQ軸をはさむ界面を通じて別のサブユニットに伝わることを明らかになった。

第3章 基質特異性変異型サブユニットを用いたホモロピック活性化機構の解析

基質結合部位に存在し基質認識に関与する残基Gln102を置換した変異体Q102Rは、乳酸脱水素酵素(LDH)からリンゴ酸脱水素酵素(MDH)に基質特異性が変化する。このMDH型サブユニット(Q102R)(M)と野生型LDHサブユニット(L)のハイブリッドLDHも2-1と同様に形成、分離できた。両方のサブユニットを含むハイブリッドは全て、LDHの競争阻害剤であるオキサム酸によりMDH活性が増加したことから、基質によるホモロピックな活性化も別のサブユニットに伝わることを明らかになった。さらに、M2L2-QRとM2L2-Pは、その立体配置の違いにも関わらず、測定した全ての条件で同一の速度論的性質を示したことから、4つのサブユニットが対称性を保って活性化される、MWCモデルに従うことを証明した。



D2W2-QR

D2W2-P

FBPによる
活性化

—

+

発表論文

- 1) Fushinobu, S., Kamata, K., Iwata, S., Sakai, H., Ohta, T., and Matsuzawa, H. *J. Biol. Chem.* 271, 25611-25616, 1996.
- 2) Fushinobu, S., Ohta, T., and Matsuzawa, H. *J. Biol. Chem.* 273, 2971-2976, 1998.
- 3) Fushinobu, S., Ito, K., Konno, M., Wakagi, T., and Matsuzawa, H. *Protein Engineering*, 11, 1121-1128, 1998.
- 4) 伏信 進矢、伊藤 清、今野 美智子、松澤 洋 *応用糖質科学* 45, 139-145, 1998.
- 5) 伏信 進矢、松沢 洋 *バイオサイエンスとインダストリー* 56 (10), 685-686, 1998.

謝辞

本研究のテーマを私に与えて下さり、その後もご教授いただいた松澤洋教授（現：青森大学工学部教授）、工学院大学工学部の太田隆久教授（東京大学名誉教授）に感謝いたします。細かい実験技術から研究の取り組み方まで多くを御指導頂いた、若木高善助教授、静岡県立大学の酒井担教授、田口速男助教授に感謝いたします。サンプルの提供だけでなく、多くを御指導頂いた伊藤清博士に感謝いたします。X線結晶構造解析の全般にわたって親切に御指導して下さいましたお茶の水女子大学大学院人間文化研究科の今野美智子助教授に感謝いたします。

未熟な私に研究の方向を示して下さい、また多くの貴重な助言をくださった萬有製菓の鎌田健司博士、Sweden Uppsala大学の岩田想博士、三菱化学の杉浦郁子博士、東京大学大学院理学系研究科の瀧木理博士に感謝いたします。

高エネルギー加速器研究機構での測定では、同機構放射光施設物質構造科学研究所の坂部知平教授、渡邊信久博士、鈴木守博士、五十嵐教之博士、池水信二博士、ビームラインアシスタントのみなさん、そして坂部先生の秘書の早瀬さんに大変お世話になりました。本研究のデータ測定は、高エネルギー加速器研究機構での共同利用実験（課題番号96G197）として行われました。御尽力頂いた関係者の方々に感謝いたします。夜を徹しての測定だけでなく、いろいろお手伝いならびに御助言いただいたお茶の水女子大学理学部化学科今野研の学生のみなさん、東京大学大学院理学系研究科横山研の学生の皆さんに感謝いたします。

酵素学研究室内でのX線結晶構造解析の立ち上げから苦楽をともにしてきた、井深章子さんと内木場裕之君、酵素学研究室の構造解析グループの皆さんに感謝いたします。

本研究の理論的な部分で有意義なディスカッションをして下さったサントリー生物有機科学研究所の石黒正路博士、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻生物情報工学研究室の清水青史君、中村周吾博士に感謝いたします。

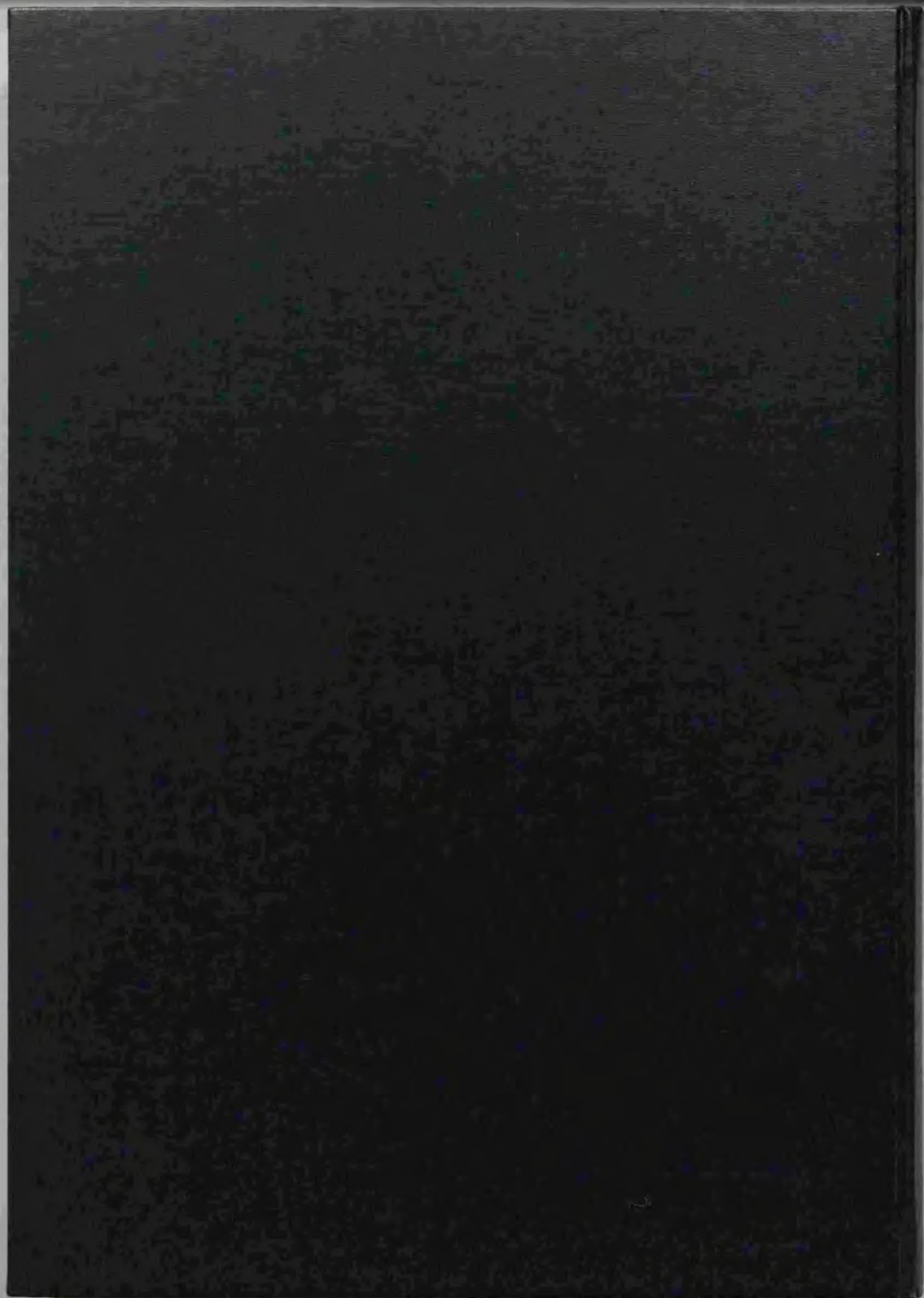
国税庁醸造研での実験には、遺伝子工学研究室のみなさんに大変お世話になりました。

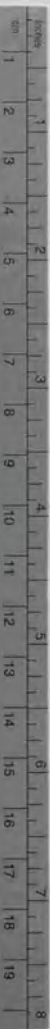
研究だけでなく色々なことに関して力を貸して下さいました先輩のみなさんと、励まして、助けてくれた同級生および後輩の諸君に感謝いたします。

最後に27年間私を見守り、支援してくれた両親に心から感謝いたします。

1999年 4月

著者





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

