

第3章 GH-94 *Cellvibrio gilvus* 由来加リン酸分解酵素
セロビオースホスホリラーゼのX線結晶構造解析
-GH-94 酵素の構造機能相関-

第3章 CgCBPの結晶構造解析

3-1 序

第2章では、GT-36に分類されていた *Vibrio proteolyticus* 由来キトビオースホスホリラーゼ(ChBP)について立体構造を決定した。その構造を他のファミリーの糖質関連酵素と比較し、ChBPのフォールドや反応機構がGH酵素のものに近いことを示した。この結果を基にGT-36は新たなGHファミリー、GH-94に再分類されることとなった。

本章では、GH-94の酵素 *Cellvibrio gilvus* 由来セロビオースホスホリラーゼ(以下CgCBPと表記する)についてX線結晶構造解析を行い、ChBPとの相違点から、GH-94酵素の基質特異性、反応特異性に関して考察する。

3-1-1 GH-94 加リン酸分解酵素

第2章のChBPの立体構造解析から明らかになったGT-36酵素は、GH-15・グルコアミラーゼ、GH-65・マルトースホスホリラーゼとの構造、反応機構の類似性から、新たなGHファミリー・GH-94に再分類された。このファミリーには2-1-6節に示したように

- ・セロビオース(Glc-β1,4-Glc)を加リン酸分解するセロビオースホスホリラーゼ
(CBP; Glc-β1,4-Glc + リン酸 ↔ Glc-α-1-リン酸 + Glc)
- ・重合度3以上のセロオリゴ糖に特異的なセロデキストリンホスホリラーゼ
(CDP; (Glc)_n + リン酸 ↔ Glc-α-1-リン酸 + (Glc)_{n-1})
- ・キトビオースホスホリラーゼ
- ・環状1,2グルカンシンターゼ

が分類されている(表 2-2)。アミノ酸配列のアラインメントを図 3-1 に、系統樹を図 3-2 に示す。このうち、CBP、CDP、キトビオースホスホリラーゼは800残基程度のアミノ酸で構成されているが、環状1,2グルカンシンターゼは3000残基以上のアミノ酸からなっており、立体構造や性質が大きく異なると思われるため、本研究では特に扱わない。

以下、CBP、CDP、ChBPについて、その諸性質を記述する。

3-1-2 CBP

CBP(EC 2.4.1.20)はセロビオースをα-グルコース-1-リン酸とグルコースに加リン酸分解する可逆反応を触媒する[1]。CBPは、セルロース資化性細菌の菌体内酵素として発見されている[2-5]。CBPの存在意義は、セルラーゼの作用により菌体外に生じたセロビオースの代謝に関与すると考えられる(図 3-3)[6]。

Cellvibrio gilvus 由来 CBP(CgCBP)の反応特異性

本研究で立体構造を明らかにした CgCBP は、GH-94 酵素中最も詳細な解析が行われてきた酵素である[7-14]。その酵素学的性質について記述する。

・CgCBP の基質特異性

CgCBP の基質特異性は、合成方向の反応において、糖受容体・糖供与体の解析から明らかになっている。

糖供与体側の基質特異性は厳密で、 α -Glc-1-リン酸は糖受容体となり得るが、 α -GlcNAc-1-リン酸は糖受容体となり得ない[15]。

糖受容体側はグルコピラノースの O1、O3、O4 位は厳密に認識されるものの、O2、O6 の認識は比較的緩いことが示されている(図 3-4a) [8, 9]。CgCBP は糖還元末端の β -アノマーを特異的に認識するため[10]、3 糖以上のセロオリゴ糖を加リン酸分解することができない。

・CgCBP の拮抗基質阻害

CgCBP の合成方向の反応では、糖受容体としてグルコース、グルコサミン、6-デオキシグルコースを用いた時に、基質阻害現象が見られる[14]。特にグルコースを用いた場合が最も顕著である。この阻害現象は、グルコースがもう一方の基質であるグルコース-1-リン酸を拮抗的に阻害する拮抗基質阻害現象であると考えられている(図 3-5)。図 3-5 に表した反応速度の式において、 $k_{cat} = 120 \text{ sec}^{-1}$ 、 $K_{iA} = 0.5 \text{ mM}$ 、 $K_{mA} = 2.0 \text{ mM}$ 、 $K_{mB} = 2.8 \text{ mM}$ 、 $K_{I1} = 170 \text{ mM}$ 、 $K_{I2} = 3.0 \text{ mM}$ であると見積もられている。

・反応スキーム

CgCBP の反応は、加リン酸分解反応の生成物であるグルコース、グルコース-1-リン酸の阻害様式から(図 3-6a)から、ordered bi bi 機構で起こることが明らかになっている[8, 9]。基質結合は、まずセロビオースが結合し、次にリン酸が結合して加リン酸分解が起こり、グルコース、 α -グルコース-1-リン酸の順番で解離する(図 3-7)。しかし、他の菌を由来とする CBP では、この順番が異なる。

*Clostridium thermocellum*YM4 由来 CBP(以下 CtCBP と表記する)は、CgCBP と同様の阻害実験結果から(図 3-6b)、基質結合の順番がリン酸、セロビオースであることが明らかになっており、CgCBP とは逆である[16]。

Thermotoga maritima 由来 CBP(以下 TmCBP と表記する)は阻害様式から(図 3-6c)、リン酸、セロビオースの結合の順番がランダムであることが示されている[17]。

いずれの酵素も、生成物の解離はグルコース、 α -グルコース-1-リン酸の順番である。CgCBP と CtCBP、TmCBP とのアミノ酸配列の同一性はそれぞれ 63%、62%と高く、基質結合の順番がどのように制御されているのか興味を持た

第3章 CgCBPの結晶構造解析

れる。

3-1-3 CDP

CDP(EC 2.4.1.49)は重合度3以上のセロオリゴ糖を加リン酸分解し α -グルコース-1-リン酸と重合度の一つ少ないセロオリゴ糖を生じる反応を触媒する[18]。CDPはClostridium属細菌の菌体内にCBPとともに見出されている[19]。Clostridium stercorarium由来CDPは780残基からなる酵素で[19]、CBPとは40%程度のアミノ酸配列の同一性を有する。Clostridium thermocellum由来のCDPは980残基のアミノ酸からなり、CBPやChBPに比べるとN末端が70残基ほど長い(図3-1)[20, 21]。CBPとは20%程度の同一性を示すが、特にN末端ドメイン部分の相同性が低い(3-13節)。

・CDPの反応特異性

CBPとは非還元末端のグリコシド結合に作用するという反応の位置選択性において同一であるが、重合度に対する基質特異性は明確に異なる。合成方向の反応において、グルコースは糖受容体となり得ないが、様々なアリアルグルコシドやグルコ2糖を糖受容体にすることができる[18]。

3-1-4 ChBPの反応特異性

第2章で構造を明らかにしたChBPの諸性質を記す。ChBPは801残基からなり、CgCBPと33%のアミノ酸配列の相同性を有する[15]。

・ChBPの基質特異性

ChBPもCgCBPと同様に、合成方向の反応において、糖受容体、糖供与体の特異性が解析されている(図3-4b)[15]。

ChBPは、GlcNAc-1-リン酸、グルコース-1-リン酸を糖供与体として用いることができる。グルコース-1-リン酸のみ利用できるCgCBPとの構造比較に興味もたれる。

一方、糖受容体は単糖GlcNAcを用いることができるが、2糖以上のキトビオース、キトトリオースを受容体とすることはできない。また、グルコサミン、グルコースを受容体とすることができないことから、2位のN-アセチル基に対する特異性が高いことが示されている(図3-4b)。糖受容体のアノマーに対する特異性はなく、 α -GlcNAc、 β -GlcNAcを問わず受容体とすることができる[22]。

・ChBPの拮抗基質阻害

ChBPの合成方向の反応においても、GlcNAcの存在下でCgCBPと同様の

拮抗基質阻害現象が見られる[15]。この阻害現象は GH-94 酵素で普遍的に観測されることが推測される。

・ChBP の反応スキーム

ChBP の GlcNAc、GlcNAc-1-リン酸を用いた阻害様式の決定から(図 3-8)、ChBP の反応も CBP と同様 ordered bi bi 機構で起こることが明らかになっている[15]。しかし、基質結合の順番は特定されていない。

3-1-5 GH-94 のオリゴ糖合成能

GH-94 は加リン酸分解の逆反応によるオリゴ糖合成能を持つ。本節では、各酵素のオリゴ糖合成能と応用面について記述する。

・CgCBP を用いた分岐糖合成

CgCBP は、合成方向の反応における糖受容体の特異性から(図 3-4)、O6 の認識は比較的緩いことが示されている(3-1-2 節)。そのため、グルコースの 6 位に他の糖が結合したものを糖受容体として用いることができる。Glc- α 1,6-Glc(イソマルトース)、Glc- β 1,6-Glc(ゲンチオビオース)、Gal- α 1,6-Glc(メリビオース)を糖受容体とした反応では、還元末端のグルコースの 4 位にグルコースが転移した分岐 3 糖が合成される(図 3-9a) [13]。

・CgCBP を用いた Glc- β 1,4-Xyl の合成

CgCBP を用いると、グルコース-1-リン酸とキシロースから 60%の効率でヘテロ 2 糖 Glc- β 1,4-Xyl が合成される[11]。Glc- β 1,4-Xyl はセロビオースとキシロビオースの中間的な構造であり、その性質も両者の中間的なものである。Glc- β 1,4-Xyl はキシラナーゼの特性解析に有用な基質である(図 3-9b)。

・CgCBP とスクロースホスホリラーゼを組み合わせたセロビオースの合成

CBP を用いれば、高価なセロビオース(¥1800/1 g)を合成することができる。食品総合研究所の北岡博士は、安価なスクロース(¥2/1 g)を出発物質として、セロビオース合成法を開発した(図 3-10)[14]。この方法を、以下に説明する。

1. スクロースを、アノマー保持型のスクロースホスホリラーゼを用いて α -グルコース-1-リン酸とフルクトースに加リン酸分解する
2. 生じたフルクトースを、キシロースイソメラーゼを用いてグルコースに変換する
3. 1.の β -グルコース-1-リン酸と 2.のグルコースから、CgCBP を用いてセロビオースを合成する

第3章 CgCBPの結晶構造解析

この方法では、7日間で純度 98%のセロビオースが収率約 70%で合成される。生成したセロビオースは 4°C に冷却すると析出するため、分離も容易である。またセロビオース分離後の反応液は、新たにスクロースを加えることで連続的に使用することができ、セロビオースの半連続製造が期待される。

・CDP を用いたセルラーゼ阻害剤の合成

CDP は様々なアリアルグルコシドやグルコ 2 糖を糖受容体にすることができる(3-1-3 節)[18]ことから、セルラーゼ阻害剤として有用なセロオリゴ糖アナログ(図 3-11)の合成が行われた[20]。

・ChBP を用いたキトビオース誘導体作成

図 3-4b に示したように、ChBP は GlcNAc の誘導体 GlcNAc-UMB などを糖種溶体とすることができる(図 3-12)。このように合成された GlcNAc- β 1,4-GlcNAc-UMB、GlcNAc- β 1,4-GlcN(TAc)-UMB は、GlcNAc の重合体キチンの加水分解酵素であるキチナーゼの機能解析の有効なプローブとなる[15, 22]。

3-1-6 本研究の目的

第 2 章で立体構造を明らかにした ChBP は、CgCBP に比べて酵素反応に関する知見が少なかった。一方 CgCBP は、既に応用面でも実用化されつつある酵素であり、そのタンパク質工学的応用のために、立体構造の解析が期待されていた。本章では、CgCBP の機能と立体構造の相関を解明するため、CgCBP の X 線結晶構造解析を行った。その結果明らかになった CgCBP の構造について、ChBP と比較し、GH-94 酵素の構造機能相関について考察した。

本研究では、特に以下の点に着目した。

- ・CgCBP と ChBP の基質特異性の違い(グルコースと GlcNAc の認識の違い)
- ・CgCBP と CDP の基質の鎖長に関する特異性の違い
- ・CgCBP、CtCBP、TmCBP の反応スキームの違い

実験の目的と方法

試薬

本研究に用いた試薬は、特に記さない限り和光純薬工業株式会社、半井化学薬品株式会社、生化学工業、SIGMA の特級試薬を用いた。

実験器具

超音波破碎機は COSMO BIO BIORUPTOR UCD-200 型または UCW-201 型を用いた。

遺伝子操作

Molecular Cloning および Current Protocols in Molecular Biology に記されている方法に従った。

3-2 CgCBP の大腸菌を用いた大量発現と精製

目的

本研究の対象である CgCBP は、北岡らにより遺伝子がクローニングされ、大腸菌による発現ベクターが作成されており、大量発現系、精製系が構築されていた。本研究ではこの系を基に CgCBP の大量発現と精製を行った。

発現ベクター

本研究で用いた CgCBP 発現ベクター pET28a-CBP は pET28a(Novagen) のマルチクローニングサイトに *Nde*I、*Hind*III で切り出された CgCBP の遺伝子(2469 b.p.)を組み込んだものである(図 3-13)。CgCBP の N 末端に 6 残基のヒスチジンタグが付加されている。本研究では、CgCBP 本来の N 末端メチオニン部分を 1 番目の残基として表記している。カナマイシン耐性遺伝子を持つため、pET28a-CBP 遺伝子を組み込んだ大腸菌を培養する場合は、カナマイシンを添加した。pET28a-CBP は大腸菌 BL21 (DE3)株に組み込まれており、その株を独立行政法人食品総合研究所の北岡博士に提供していただいた。

培地

大腸菌の培養には LB 培地(DIFCO)を用いた。培地はオートクレーブ滅菌した。培養は 5 liter 容三角フラスコに 1 liter の培地を入れて行った。カナマイシンは 20 µg/ml 添加した。振盪培養は、東京大学農学部 2 号館地下の振盪培養室、および水槽式インキュベーター(TAITEC)を利用した。

第3章 CgCBPの結晶構造解析

組換え大腸菌の大量培養

- ① pET28a-CBP を形質転換した大腸菌 BL21(DE3)株をグリセロールストックより 10 ml LB 培地に植菌、37°C で振盪し前培養。
- ② ①10 ml を 1 liter LB 培地に植菌し本培養開始。37°C で振盪培養。
- ③ 本培養開始後約 3 時間目に、終濃度 100 μ M の IPTG を添加。
- ④ ③を 37°C で振盪培養し、開始から 15 時間後、培養液を回収し 5000 x g、10 分間の遠心で集菌。

CgCBP の精製

pET28a-CBP により発現された CgCBP は、N 末端部分に 6 残基の His 残基が付加されている。このヒスチジンタグを利用し、CgCBP の精製は固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー(Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography; IMAC) 法で行った。

- ① 大量培養した組換え大腸菌体を 40 ml の緩衝液 (50 mM Na-リン酸緩衝液 (pH 8.0)、300 mM NaCl、10 mM イミダゾール)に懸濁し氷冷しながら超音波破碎。出力レベルは High、Duty 50 %、Pulse 1 分で 40 分間。
- ② ①を 15000 rpm、30 分間遠心。上清の可溶性画分を MILLEX-GP 0.45 μ m Filter Unit を用いて微粒子を除去し、粗酵素液とした。

・Ni-NTA SuperFlow クロマトグラフィー

この精製の制御にはペリスタポンプを用いた。

- ① Ni-NTA SuperFlow (QIAGEN)のレジン 10 ml を C-10/10 カラム(Amersham)に充填し、50 mM Na-リン酸緩衝液 (pH 8.0)、300 mM NaCl、10 mM イミダゾールで平衡化。
- ② 粗酵素液を①に添加し、50 mM Na-リン酸緩衝液 (pH 8.0)、300 mM NaCl、10 mM イミダゾールで非吸着画分を溶出。
- ③ 50 mM Na-リン酸緩衝液 (pH 8.0)、300 mM NaCl、250 mM イミダゾールを用いて吸着画分を溶出。
- ④ ChBP の画分を 10 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 に透析。

タンパク質の定量

タンパク質の定量にはCgCBPのアミノ酸組成より算出されたモル吸光係数 $161321 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて計算した。

3-3 CgCBP 結晶化条件の探索

目的

CgCBPの結晶化条件を探索するために、Sparse Matrix Screen法に基づいたCrystal Screening Kit 1および2、Index Screening Kit、リン酸緩衝液のpHおよび濃度によるQuick Screening Kit、沈殿剤と塩濃度の組み合わせによるPEG/ION Screening Kitを用いた(Kitは全てHampton Research)。

結晶化条件の探索はGreiner 96 Well Protein Crystallization Plate (Greiner)を用い、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。

方法

- ① 精製・濃縮したCgCBPを10 mM Tris HCl (pH 8.0)を用いて希釈し、10 mg/mlに調製。
- ② 96 Well Protein Crystallization Plateにスクリーニングキットの各溶液を80 μl 分注し、リザーバー溶液とした。
- ③ 96 Well Protein Crystallization Plateのウェルで、①で調製したCgCBP溶液2 μl 、リザーバー溶液2 μl を混合。
- ④ Clear Seal Film (Hampton Research)を用いて96 Well Protein Crystallization Plateを密閉。
- ⑤ 4°C、15°C、25°Cに静置。

結晶が得られた条件について、沈殿剤濃度、pH、タンパク質濃度、結晶化方法などについて精密化し、最終的に以下の至適結晶化条件で結晶を作成した。結晶は2条件で得られた。それぞれ硫酸アンモニウム、リン酸を沈殿剤として結晶化しているので、これらの結晶を以下CgCBP-SO₄、CgCBP-PO₄と表記する。

CgCBP-SO₄の結晶化条件

第3章 CgCBPの結晶構造解析

結晶化の方法: シットティングドロップ蒸気拡散法(図 1-6)

結晶化溶液の組成: 0.1 M MES NaOH 緩衝液 pH 7.0、0.5 M 硫酸アンモニウム、5 mM グルコース

温度: 25°C

ドロップ作成法:

- ① CrystalClear Strips(Hampton Research)に結晶化溶液を 80 μ l 分注。
- ② 10 mg/ml の CgCBP 溶液 2 μ l と結晶化溶液 2 μ l を混合し、Crystal Clear Sealing Tape (Hampton Research) を用いて CrystalClear Strips を密閉。

日数: 約 10 日間

ChBP-PO₄の結晶化条件

結晶化の方法: シットティングドロップ蒸気拡散法(図 1-6)

結晶化溶液の組成: 0.8 M Na/K リン酸緩衝液 pH 8.2、10 mM グルコース

温度: 4°C

ドロップ作成法:

- ① CrystalClear Strips(Hampton Research)に結晶化溶液を 80 μ l 分注。
- ② 10 mg/ml の CgCBP 溶液 2 μ l と結晶化溶液 2 μ l を混合し、Crystal Clear Sealing Tape (Hampton Research) を用いて CrystalClear Strips を密閉。

日数: 約 10 日間

3-4 X 線回折データ測定

目的

3-2 節で得られた結晶 (図 3-14) について、結晶を回収し X 線を照射して回折イメージを測定した。回折データは結晶の放射線による損傷を防ぐため、95~100 K の低温条件下で測定した。低温条件下で結晶中の溶媒の凍結を防ぐための抗凍結剤としてグリセロールを用いた。

方法

- ① 3 Well Spot Plate (Hampton Research) に結晶化した条件のリザーバー溶液を 100 μ l 入れ、結晶化ドロップより成長した結晶を収穫。
- ② リザーバー溶液の組成に抗凍結剤としてグリセロールを加えたものに結晶を移動。結晶はグリセロール存在下で崩壊するので、抗凍結剤濃度は一度に終濃度(CgCBP-SO₄ は 20%(w/v)、CgCBP-PO₄ は 40%(w/v))まで上げた。

- ③ 結晶をクライオループ (Hampton Research) にマウントし、100 K の N₂ ストリーム中で Flash Freezing により凍結。
- ④ 高エネルギー加速器研究機構 (KEK ; 茨城県つくば市) の放射光施設 Photon Factory (PF) 実験ステーション BL5A (CgCBP-SO₄)、および NW12 (CgCBP-PO₄)を利用して結晶に X 線を照射し、回折イメージを測定。実験にはモノクロメーターを用いて切り出された単色 X 線を利用した。検出器は ADSC Quantum 315 (BL5A)、Quantum 210 (NW12)を用いた。
- ⑤ プログラム HKL2000[23]を用いて回折斑点の指数付け、積分計算、スケールング。プログラムの入力値はデフォルトの値を用いた。

3-5 構造解析

初期構造の決定は CgCBP-SO₄ についてのみ行った。

分子置換による初期構造決定

CgCBP の位相決定は、33%のアミノ酸配列の同一性を有する ChBP の立体構造が明らかになっているため、この構造を基に分子置換法により決定した。

分子置換法

結晶中の電子密度を表す式

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)] \quad (1-2)$$

右辺の位相性分 $i\alpha(hkl)$ を、既知の類似構造から借用する方法である。分子置換法の第 1 段階は、アミノ酸配列の相同性が高い(30%以上)、すなわち類似の構造を持っている可能性が高い既知構造をサーチモデルとして、サーチモデル分子が結晶中でどのように並んでいるのか探す。この時、結晶中に配置されたサーチモデル分子から計算される X 線回折像と、実際に測定された回折像との差が小さくなるように配置する。この配置されたサーチモデルから算出される位相を初期位相とする。

データ処理、電子密度マップの表示、精密化計算は PC/AT 互換機 (OS: LINUX) で行った。

分子置換は、サーチモデルとして ChBP の GlcNAc 複合体構造(分解能 1.6 Å, PDB ID 1V7W)から水分子、糖を除いた構造を用い、CCP4[24]パッケージ中のプログラム Molrep[25]で行った。CgCBP の結晶は非対称単位に 2 分子の CgCBP

第3章 CgCBPの結晶構造解析

を含むので、2分子の ChBP を分子置換した(3-8 節)。

Simulated annealing (SA)法による精密化

Molrep で配置されたタンパク質分子について、プログラム CNS[26]を用いて Simulated Annealing (SA)法により精密化した。この時のタンパク質分子のアミノ酸配列は ChBP のものである。SA 法の際、非結晶学的な対称性を基にした束縛条件を取り入れた。精密化の詳細は 1-9 節参照。

非結晶学的対称性の束縛

非対称単位に同一サブユニットが 2 分子以上入る場合、この 2 分子は結晶学的に異なる構造である(第 1 章)。しかし、元来同じものであるため、それぞれのサブユニットまわりの電子密度は、ほぼ同じ形状になるはずである。非結晶学的対象の束縛は、例えばサブユニットの 100 番目のアミノ酸残基部分と、もう一つのサブユニットの 100 番目のアミノ酸残基部分は同じ電子密度の形状、強さであると仮定し、これらを平均化して精密化する方法である。この方法は、特に分解能の悪いものや電子密度が乱れている領域について効果がある。

ARP/wARP による初期構造構築

SA 法による精密化後の構造から計算される位相と、CgCBP-SO₄ の回折データから得られた構造因子(分解能 2.0 Å)を用いて、プログラム ARP/wARP[27]によるモデル構築を試みた。ARP/wARP の詳細は 1-15 節に記した。

- ① CgCBP-SO₄ の構造因子と、SA により精密化した 2 分子の ChBP から計算される位相情報を利用し、プログラム ARP/wARP により主鎖構築。ARP/wARP は R_{free} 値を考慮して精密化を行う SLOW モードで行った。
- ② プログラム *guiside* で側鎖を構築。

モデルの修正と精密化

電子密度マップをプログラム XtalView[28]を用いて可視化し、電子密度マップに合うように構造モデルを修正した。

修正したモデルについてプログラム CNS を用いて構造の精密化 (剛体近似精密化、エネルギー精密化、Simulated annealing 法、温度因子の精密化)を行った。精密化の際、非結晶学的対称性の束縛は行わなかった。

ChBP-PO₄ の構造決定

ChBP-PO₄ は CgCBP-SO₄ と同型の結晶であったので、精密化した CgCBP-SO₄ を初期構造として、ChBP-PO₄ のモデルの構築、精密化を行った。

構造の評価

最終的に精密化された構造に対して、プログラム PROCHECK [29]を用いて結合角や結合距離の評価を行った。

結果と考察

3-6 CgCBPの大量発現と精製

3-2節の方法でCgCBPを発現・精製したところ、大腸菌1 liter培養あたり約15 mgの精製CgCBPを獲得できた。この量は、X線結晶構造解析を行うための結晶化には十分な量である。SDS-PAGEによる精製度の検定結果を図3-15に示す。CgCBPの精製はIMAC法による一段階の精製であったが、結晶化に十分な精製度のCgCBPが獲得できた。

3-7 CgCBP結晶化条件の探索結果

Hampton Research社のスクリーニングキットによる結晶化条件探索の結果、以下の条件で結晶が得られた。

・Crystal Screen Kit 2 #23: 1.6 M 硫酸アンモニウム、0.1 M MES-NaOH 緩衝液 pH 6.5、10%(v/v)ジオキサソ

この結晶は、結晶化開始後約6カ月の期間で得られた。この結晶にX線を照射し回折像を撮影したところ、約3 Å分解能の回折像が得られた。この結晶化条件について、沈殿剤濃度、pH、塩濃度の結晶化条件の精密化を行った。その結果、シッティングドロップ蒸気拡散法で3-3節に示した条件で十分な大きさの結晶(CgCBP-SO₄: 図3-14a)を得た。この条件で得られた結晶は、空間群がP2₁、単位胞のパラメーターはa = 84.8 Å、b = 98.3 Å、c = 104.0 Å、β = 102.7°であった。

また、CgCBP-SO₄は硫酸アンモニウムを沈殿剤として結晶化していることから、硫酸と同じような形状と電荷状態を持つリン酸でも結晶ができると考え、CgCBP-SO₄結晶化条件の硫酸アンモニウムをNa/Kリン酸緩衝液に置き換えた条件で結晶化条件を探索したところ、3-3節の条件で結晶が得られた(CgCBP-PO₄: 図3-14b)。CgCBP-PO₄はCgCBP-SO₄と同型の結晶であった。

3-8 構造解析の結果

CgCBP-SO₄回折データ測定結果

CgCBP-SO₄結晶について回折データ測定結果を表3-1に示す。データの質を表すR_{sym}値、S/N比であるMean I/σ値、データの完全性を表すcompleteness値はいずれも測定したデータが良質であることを表している。

分子置換の結果

CgCBP-SO₄結晶の非対称単位は、822 残基からなる CgCBP が 1 分子含まれていると仮定した場合の V_M が 4.7 Å³/Da、溶媒含量が 74%、2 分子含まれると仮定した場合の V_M が 2.4 Å³/Da、溶媒含量が 48%であった。その結果、CgCBP-SO₄ の非対称単位には 2 分子の CgCBP 分子が含まれると見積もられた。

非対称単位中のサブユニット数の見積

構造解析の初期段階において、非対称単位中に含まれるサブユニット数は、単位胞の大きさとタンパク質の分子数から算出される V_M 値[30]および溶媒含量を指標として見積もられる。タンパク質結晶の V_M 値は 1.7~3.5 Å³/Da (最も多いのは 2.15 Å³/Da 前後)、溶媒含量は通常 30~70%(多くは 50%前後)である。

ChBP の構造をサーチモデルとして分子置換を行ったところ、表 3-2 に示すように、2 分子の ChBP を非対称単位中に配置した分子置換の解が得られた。

CgCBP-SO₄の構造解析

ChBP2 分子の分子置換の結果、*R factor* は 53%だった。この 2 分子を非結晶学的対称性による束縛条件を加えた精密化(SA 法)で、*R factor* は 40%に改善した。このモデルから計算される位相と、CgCBP-SO₄ の回折データより得られた構造因子を用いて、プログラム ARP/wARP で主鎖構造を構築した。その結果、非対称単位に含まれる 1644 残基(822x2)中、47 本のフラグメントに分かれた 1433 残基の主鎖構造が決定された。プログラム *guiside* による側鎖構築は片方のサブユニットのみ成功し、822 残基中 537 残基の側鎖構造を決定した。この時点で、構造のアミノ酸配列は CgCBP のものに置き換わった。

プログラム CNS により $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップを作成し、プログラム XtalView を用いてモデルを修正し精密化を進めた。精密化の結果、図 3-16 に示す $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップが得られた。精密化の結果を表 3-3 に示す。構造の確からしさを表す $R_{\text{cryst}} = 17.6\%$ 、 $R_{\text{free}} = 21.3\%$ で、構造の議論を行うのに十分な質の構造が得られた。

プログラム PROCHECK を用いて CgCBP のペプチド結合の結合角を評価したところ(ラマチャンドラプロット)、86%の残基が ϕ/ψ 角の“most favored region”にあり、幾何学的に問題ない構造である[29] (図 3-17)。

CgCBP-PO₄の構造解析

CgCBP-PO₄ は CgCBP-SO₄ と全く同じ空間群を持つ結晶であった。その回折データ測定結果を表 3-4 に示す。精密化した CgCBP-SO₄ を初期構造として構造を構築し精密化した(表 3-5)。その結果 $R_{\text{cryst}} = 19.0\%$ 、 $R_{\text{free}} = 22.9\%$ の構造を得

第3章 CgCBPの結晶構造解析

た。

3-9 CgCBP の構造

CgCBP-SO₄ と CgCBP-PO₄

CgCBP-SO₄ と CgCBP-PO₄ の構造は、活性中心部位を除き特筆すべき差は見られなかった。これら構造間の Root Mean Square Distance (RMSD) は 0.14 Å であった。以下、特に記さない限り、高分解能構造の CgCBP-SO₄ について記述する

CgCBP の二量体構造

図 3-18 に解析された CgCBP の非対称単位中の構造を示す。CgCBP は非対称単位中で二量体構造をとっている。この二量体構造は、ChBP の二量体構造と同じ形状で、GH-94 酵素の多くがこのような二量体構造をとっていると推測される。サブユニット間の RMSD 値は、CgCBP-SO₄ で 0.21 Å、CgCBP-PO₄ で 0.16 Å であり、両サブユニットの構造はほぼ同一である。

CgCBP の単量体構造

図 3-19 に CgCBP の単量体構造を示す。単量体構造は、本来の N 末端残基であるメチオニンから 822 残基が含まれている。N 末端に付加したヒスチジンタグ配列は Disorder していた。

CgCBP は ChBP と同様の 4 つのドメイン構造で構成されている。ChBP に倣い N 末端ドメイン(残基番号 1-289)、リンカーヘリックス(290-320)、 α -バレルドメイン(329-735)、C 末端ドメイン(321-328、736-822)と呼ぶ。

N 末端ドメインは、GH-2 大腸菌 β -ガラクトシダーゼ[31, 32]や GH-57 4- α -グルカノトランスフェラーゼ[33]などにも見られる β -サンドイッチフォールドを持つドメインである。ChBP の N 末端ドメインと比較すると、リンカーヘリックスとの間に 20 残基ほどの挿入配列(残基番号 273-279; 図 3-1)があり、ループを形成しているが、活性中心部位から離れた位置にあるため、酵素活性には関与していないと考えられる。

リンカーヘリックス、および C 末端ドメインに関しては、ChBP の構造と特筆すべき差はみられなかった。

α -バレルドメインは、ChBP と同様の(α/α)₆ バレルフォールドを持つ。このドメインは触媒ドメインであり、触媒残基の位置や基質結合部位は ChBP のものと一致する(3-10 節)。ChBP に見られた α -ヘリックスを結ぶ Disorder したループ(残基番号 395-416)は、CgCBP では短い 408-418 ループが結んでおり、明瞭な電子密度が観測された。一方、CgCBP のみに見られる 495-513 ループは非常に

温度因子が高い領域で、基質結合の際コンフォメーションチェンジが起こると考えられる(3-10 節)。

3-10 CgCBP-SO₄の活性中心部位

CgCBP-SO₄は活性中心部位に1分子のグルコースと1分子の硫酸が結合していた。その $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップを図3-20に示す。また、活性中心部位のChBPとの重ねあわせを図3-21に示す。ChBPの触媒残基Asp492とCgCBPのAsp490が重なり、また基質認識に関与する残基もよく重なる(3-12 節)。

グルコースの結合

CgCBPのグルコースは、ChBPのサブサイト(+1)に相当する部分に結合していた。サブサイト(-1)にはグルコースの結合は見られなかった。これは阻害実験から決定されたグルコースの結合能(サブサイト(-1)に対して $K_{11} = 170 \text{ mM}$ とサブサイト(+1)に対して $K_{12} = 3.0 \text{ mM}$)と一致する[14]。結合したグルコースはいす型のコンフォメーションをとっており、ほぼ全てが β -アノマーの構造であることが分かった。ChBPではサブサイト(+1)に結合したGlcNAcは α -アノマー型と β -アノマー型の混在が見られたので、CgCBPは異なる結果である。これは、CgCBPのGlu649がサブサイト(+1)のO1の β -アノマーを厳密に認識していることと関係している(3-12 節)。

硫酸の結合

CgCBP-SO₄に結合した硫酸は、4つのO原子の配向が明瞭に区別できる電子密度を呈しており、ChBP-GlcNAc-SO₄構造では決定できなかった硫酸の結合方向および認識残基を決定した。硫酸の認識残基を模式的に表したものを図3-22aに示す。硫酸の認識にはArg351、His666、T731、T733が深く関与している。これらの残基はGH-94で高度に保存されている。

基質結合部位の形状

CgCBPとChBPの活性中心部位の分子表面モデルを図3-23に示す。ChBPの活性中心部位は分子表面に開けた構造で、外側から基質分子が容易に活性中心部位に到達できる構造である。一方、CgCBPの活性中心部位は閉じた構造をとっている。これは、CgCBPのみに見られる495-513ループ部分が、活性中心部位に蓋をする形で存在するためである。基質が活性中心部位に結合するためには、このループによる蓋が開くコンフォメーションの変化が必要である。CgCBPでは、このループ部分の温度因子が非常に高く(分子全体の温度因子が 22 \AA^2 であるのに対し、このループ部分は 30 \AA^2)結晶構造中에서도動きやすい領域であるとみなすことができる。

第3章 CgCBPの結晶構造解析

3-11 CgCBP-PO₄の活性中心部位

CgCBP-PO₄は活性中心部位に1分子のグルコース、1分子のグリセロール、1分子のリン酸が結合していた。その $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップを図3-24に示す。また、活性中心部位のChBPとの重ねあわせを図3-25に、CgCBP-SO₄との重ねあわせを図3-26に示す。

グルコースの結合

CgCBP-PO₄の活性中心部位には、CgCBP-SO₄と同様にサブサイト(+1)に相当する位置にグルコースが結合していた。このグルコースはCgCBP-SO₄に結合したグルコースとの構造の差はない。

グリセロールの結合

CgCBP-PO₄の沈殿剤濃度(0.8 M Na/K リン酸)はCgCBP-SO₄(1.5 M 硫酸アンモニウム)に比べ低く、抗凍結剤としてCgCBP-SO₄(20%(w/v))より高濃度(40%(w/v))のグリセロールを必要とした。その結果、活性中心部位にグリセロールの結合が見られた。CgCBPを高濃度のNa/Kリン酸で結晶化し、CgCBP-SO₄と同様のグリセロール濃度で凍結・測定したデータ(2.6 Å分解能)の構造では、グリセロールの結合が見られなかったため、このグリセロールの結合は高濃度のグリセロール溶液に結晶を浸漬した結果であると考えられる。

グリセロールはサブサイト(-1)に相当する部分に結合した。その構造は、ChBPのGlcNAc(-1)のC4-O4、C5-O5、C6-O6部分と完全に重なっている。

3-10節に記したように、CgCBP構造中の活性中心部位は495-513ループに蓋をされた形状であるが、グリセロールが活性中心部位に到達したことは、この蓋が結晶中で開き得ることを示唆している。

リン酸の結合

CgCBP-PO₄に結合したリン酸は、4つのO原子の配向が明瞭に区別できる電子密度を呈しており、リン酸の結合方向および認識残基を決定できた。リン酸の認識残基を模式的に表したものを図3-22bに示す。興味深いことに、リン酸の結合方向は硫酸の結合方向と異なっていた(図3-26)。リン酸の認識には、硫酸の認識と同様Arg351、His666、T731、T733が深く関与しているが、水素結合の形成位置が異なる。この違いは以下の理由によると考えられる。

- ・結晶化のpHの違い(CgCBP-SO₄ = pH 6.5、CgCBP-PO₄ = pH 8.2)
- ・結合したグリセロールの影響(CgCBP-PO₄のリン酸はグリセロールと水素結合を形成している)
- ・リン酸と硫酸の静電的な性質の違い

リン酸の複合体解析により、リン酸の基質認識残基を同定した。今後、これらの残基の重要性についてタンパク質工学的手法を用いた解析を行い、生化学的実験による証明を行う予定である。

3-12 CgCBPとChBPの基質認識機構

図 3-27 に CgCBP および ChBP の基質との相互作用を模式的に表した。

糖供与体(サブサイト(-1))の認識

CgCBP と ChBP の糖供与体に対する特異性の違いは、CgCBP がグルコース-1-リン酸のみを供与体とできるのに対し、ChBP がグルコース-1-リン酸と GlcNAc-1-リン酸を供与体とできる点である[15] (3-1 節)。

CgCBP はサブサイト(-1)に糖が結合した構造が得られていないが、ChBP との重ねあわせから、ChBP の基質認識残基に相当する残基を示す(図 3-27)。

CgCBP と ChBP のサブサイト(-1)を形成する残基を比較すると、O3、O4、O6 を認識する Asp368/Asp350 (Fixer 残基: 第 2 章参照)、Arg367/Arg349、Asp490/Asp492 (触媒残基)は完全に一致している(残基番号は(CgCBP)/(ChBP))。また、糖のピラノースリングと疎水的な相互作用を形成する Trp488/Trp492、Phe664/Phe642 も一致している。

一方、2 位の認識には ChBP では Arg343 が関与している。この残基に相当する CgCBP の Arg362 は、ChBP と比べるとアミノ酸配列のアラインメントでは 1 残基ずれた位置にある(図 3-1)。また立体構造を比較すると、ChBP に比べて主鎖部分で 2.4 Å、側鎖部分で約 1.8 Å 糖結合部位に近づいており、GlcNAc の N-アセチル基と立体障害を起こす位置にある(図 3-25、3-27)。この構造の違いにより、CgCBP は GlcNAc-1-リン酸を糖供与体として利用できないと考えられる。

糖受容体側(サブサイト(+1))の認識

CgCBP の糖受容体に対する特異性の特徴は、2 位の OH 基に対しては特異性が高くないものの、N-アセチル基のような大きな置換基を持つものを受容体とできないこと[8, 9]、O1 のβ-アノマーに対しての特異性が高いことである[10]。一方、ChBP では 2 位の N-アセチル基に対する特異性が高く[15]、また O1 のアノマーに対する特異性はない[22] (3-1 節)。以下に CgCBP と ChBP のサブサイト(+1)を比較する。

- ・O1 は CgCBP では Glu649 と水素結合を形成するものの ChBP では認識残基が存在しない。これは O1 のアノマーに対する特異性の違いと一致する。
- ・CgCBP のグルコースの O2 は、Tyr653 と水素結合を形成する。CBP ではこの位置の残基が Tyr に保存されている。一方、ChBP では GlcNAc(+1)の N-アセチル

第3章 CgCBPの結晶構造解析

基が、Val631 と疎水的な相互作用を形成している。Val631 はアラインメント上 Tyr653 と重なる位置にあり、キトビオースホスホリラーゼではこの位置の残基が Val に保存されている。そのため、この Tyr と Val の違いが、CgCBP と ChBP の特異性を決定付けていると考えられる。

- O3 に関して Glu659/Glu637 が認識しており、O3 の OH 基の配向に対する特異性の高さに一致する[8, 9]。
- O4 は糖転移が起こる場所である。
- O6 は両者のとも特に基質認識残基が存在しない。また電子密度マップを確認すると(図 3-28)、O6 周りは開けた空間がある。これは CgCBP が、O6 に対する特異性が低く、6 位に他の糖がした結合した Glc- α 1,6-Glc(イソマルトース)、Glc- β 1,6-Glc(ゲンチオビオース)、Gal- α 1,6-Glc(メリビオース)を糖供与体とできる事実と一致する。

このように、CgCBP と ChBP の基質特異性と構造的特徴は一致していた。

CgCBP、ChBP はともに隣のサブユニットの Gln165/Gln168 と相互作用を形成していた。この相互作用は、3-13 節に説明する。

3-13 鎖長に対する特異性

CgCBP、ChBP は 2 糖までの基質しか加リン酸分解できず、3 糖以上のオリゴ糖を分解することができない。この特異性は、サブユニットの相互作用に起因していると考えられる。

第 1 章の 1-16 節に記したように、基質の鎖長に対する特異性は、活性中心部位の構造に依存している。活性中心がポケット型の酵素は、鎖長が短い糖鎖に作用し、クレフト型の酵素は鎖長が長い糖鎖に作用できる。

CgCBP および ChBP は、活性中心部位の端を隣のサブユニットの N 末端ドメインが接触しており、ポケット型の活性中心部位になっている。CgCBP では Gln165、Tyr186、ChBP では Gln168、Tyr189 が活性中心ポケットを形成している(図 3-29)。これらの残基は二糖に特異的な CBP や ChBP で保存されている。

一方、鎖長の長いセロオリゴ糖に作用する CDP は、CgCBP や ChBP と同様二量体酵素であるが、N 末端ドメインに相当する部分の配列の相同性が低く、数箇所の欠損箇所や挿入箇所が存在する。また、ChBP でみられた Gln と Tyr の保存は見られない。そのため、CDP の二量体は、CgCBP や ChBP と異なる形状であると考えられる。二量体形成による活性中心部位の形状が、鎖長に対する特異性に影響していると考えられる。

また、CgCBP では Glu649 が β -アノマーを認識しており、この相互作用が長い基質の結合を妨げていると考えられる。CDP では CgCBP の Glu649 に相当する残基は Gly/Ala である。

3-14 反応スキームと構造の相関

3-1 節に記したように、CgCBP、CtCBP、TmCBP はアミノ酸配列の相同性が高いものの、基質結合の順番が異なることが分かっている[8, 9, 16, 17]。本節でCgCBPの構造を基に、CtCBPとTmCBPの構造を予想して、その立体構造と反応機構の相関について考察する。

CgCBPの基質結合の順番と立体構造に関する考察

CgCBPの反応スキームは、図3-7に示すように、セロビオース、リン酸の順番で結合して加リン酸分解が起こり、グルコース、グルコース-1-リン酸の順番で解離する。

・生成物の解離の順番

CgCBPの活性中心部位の模式図を図3-30に示す。糖供与体(グルコース-1-リン酸)結合部位(サブサイト(-1))は、ポケットの奥側にあり、サブサイト(+1)が入り口にあるため、サブサイト(+1)に糖が結合した状態では、サブサイト(-1)にはグルコース-1-リン酸は出入りできないと考えられる。そのため、生成物はグルコース、グルコース-1-リン酸の順番で解離すると考えられる。

・基質結合の順番

CgCBPの活性中心部位は、ポケットの奥側にリン酸結合部位、入り口にセロビオース結合部位がある。そのため、入り口にセロビオースが結合した状態では、リン酸の出入りはできないように思われる。これは基質結合の順番がセロビオース、リン酸であるという結果に反する。しかし、CgCBP-PO₄の構造では、サブサイト(+1)に基質が結合した状態でも、サブサイト(-1)にグリセロールが入り込んだ。このことから、グリセロールやリン酸程度の大きさの分子ならば、糖がサブサイト(+1)に結合していても活性中心部位に入り込める可能性がある。

今回の構造解析で得られたCgCBPの構造からは、セロビオース、リン酸の結合の順番を決定している構造的要因は決定できなかった。

CtCBPとTmCBPのホモロジーモデリング

CgCBPの構造を基にSWISS-MODEL [34] サーバーを利用して、CtCBPおよびTmCBPのホモロジーモデリングを行った。このうち、CtCBPについてはモデリングに成功したが、TmCBPはCgCBPとのアミノ酸配列の相同性の低さからモデリングに失敗した。

第3章 CgCBPの結晶構造解析

CtCBP のモデル構造

SWISS-MODEL を利用してモデリングした CtCBP の構造と CgCBP の活性中心部位の重ねあわせを図 3-31 に示す。活性中心部位は、触媒残基および基質認識残基が良く重なっている。この重ねあわせでは、特に活性中心部位の構造の差は見られない。

・生成物解離の順番

3 種の酵素とも、生成物の解離はグルコース、グルコース-1-リン酸という順番である。これは CgCBP の構造から説明されるように、グルコース-1-リン酸の結合部位が、グルコースにより蓋をされるようなポケットの奥側にあるためであると考えられる。

・基質結合の順番

3 種の酵素はそれぞれ基質結合の順番が異なるとされているが、その基質結合の順番の違いについて、構造的知見が得られなかった。

反応機構の再考察

CgCBP および CtCBP の基質結合の順番はそれぞれ図 3-6a、b に示した生成物阻害のパターンから決定されたものである。このパターンについて再考察する。

基質結合の順番と生成物阻害のパターンは図 3-6c に示した通りである。

・CgCBP ではグルコース-1-リン酸の阻害をセロビオースに対して拮抗阻害、リン酸に対して非拮抗阻害、グルコースの阻害をセロビオース、リン酸に対して非拮抗阻害と解釈し、基質の結合の順番をセロビオース、リン酸と決定している[8]。

・CtCBP ではグルコース-1-リン酸の阻害をセロビオースに対して拮抗、リン酸に対して非拮抗、グルコースの阻害をセロビオース、リン酸に対して非拮抗と見ること、基質結合の順番をリン酸、セロビオースと決定している[16]。

しかし、図 3-6a、b に記した線形プロットを見ると、CgCBP、CtCBP 両方ともグルコース-1-リン酸はセロビオース、リン酸に対して拮抗阻害を呈しているようにも解釈し得る。これは、基質の結合がランダムで、生成物の解離の順番が決定している TmCBP のパターンに一致する。

CgCBP、CtCBP はホモロジーモデリングを用いた構造予測では、活性中心部位に差が見られなかった。また、生成物阻害実験の線形プロットを再考察

することで、基質の結合がランダムで起こる可能性が示唆された。そのため、真の反応スキームは、TmCBP を含めた 3 種の酵素とも同じで、

- ・基質セロビオースとリン酸の結合の順番はランダム
- ・生成物の解離はグルコース、グルコース-1-リン酸の順番であると考えられる。

ChBP の反応スキームも、CgCBP と同様基質の結合がランダムで、生成物の解離は順番が決まっていると予想される。

今後、この反応スキームに基づいた酵素反応の再解析が必要である。

3-15 今後の課題

CgCBP は基質特異性、反応特異性に関して詳細な知見が得られている酵素であり、本研究でその立体構造が明らかになった。今後、この立体構造から導かれた知見から、タンパク質工学的解析や、糖鎖合成への実用化へ向けた研究が必要である。

3-16 本章のまとめ

GH-94 に分類される加リン酸分解酵素 *Cellvibrio gilvus* 由来セロビオースホスホリラーゼ(CgCBP)の構造を決定した。

CgCBP の立体構造は *Vibrio proteolyticus* 由来キトビオースホスホリラーゼ(ChBP)と同じドメイン構造を有していた。また ChBP と同様の二量体構造を形成しており、GH-94 酵素の多くが CgCBP、ChBP のような二量体構造を形成していることが示唆された。

CgCBP の立体構造はサブサイト(+1)にグルコースが結合したものが得られた。またリン酸結合部位にリン酸、硫酸が結合したものが得られた。この構造から、リン酸認識残基を同定した。

CgCBP と ChBP の基質認識残基の違いから、それぞれの基質特異性を決定している残基を推定した。糖供与体の 2 位の N-アセチル基に対する特異性は CgCBP の Arg362、ChBP の Arg343 の位置の違いが関係していると思われる。一方、糖受容体の N-アセチル基に対する特異性は、CgCBP の Tyr653、ChBP の Val631 の違いに由来すると考えられる。

CgCBP、ChBP はともに重合度 3 以上のオリゴ糖を加リン酸分解することができないが、これは二量体形成によりポケット型の活性中心部位が形成されている

第3章 CgCBPの結晶構造解析

ためであると考えられる。

CgCBP は、*Clostridium thermocellum*、*Thermotoga maritima* 由来の CBP と基質結合の順番に違いがあると言われていた。これらの CBP の構造を、CgCBP 構造を基にモデリングしたところ、活性中心部位に特に違いがないことが示唆された。基質結合の順番を決定した解析結果を再検討した結果、これらの酵素の反応スキームは同じで、基質セロビオースとリン酸の結合の順番はランダムであり、生成物はグルコース、グルコース-1-リン酸の順番で解離すると考えられる。

発表論文

本章の研究内容の一部は、

Structure Vol. 12, pp 937-947 (2004)

"Chitobiose Phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*, a Member of Glycosyl Transferase Family 36, Has a Clan GH-L-like (α/α)₆ Barrel Fold"

Acta crystallographica Section D Vol. 60, pp 1877-1878

"Crystallization and preliminary X-ray analysis of cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus*"

に発表されている

Crystal	Cg_cbp01
波長 (Å)	1.0000
Beamline	PF BL-5A
空間群	$P2_1$
単位胞パラメーター	
<i>a</i> (Å)	84.84
<i>b</i> (Å)	98.41
<i>c</i> (Å)	104.04
β (deg)	102.71
分解能 (Å)	50.00-2.00 (2.07-2.00)
Measured reflections	392,667
Unique reflections	111,886
Completeness (%)	97.0(92.1)
Redundancy	1.9(1.7)
Mean I/σ	8.1(2.8)
R_{factor} (%)	6.8(30.7)

表 3-1 CgCBP-SO₄のX線回折データ測定結果

·Rotation search

Number of peaks : 10

	theta	phi	chi	alpha	beta	gamma	Rf	Rf/sigma
Sol_RF 1	58.08	-138.98	109.45	167.79	87.73	265.76	443.4	10.29
Sol_RF 2	126.63	125.38	123.56	347.35	90.00	276.59	401.7	9.32
Sol_RF 3	71.10	-77.50	85.74	209.24	80.13	184.24	289.3	6.71
Sol_RF 4	139.84	-150.43	171.64	35.04	80.07	155.89	287.7	6.68
Sol_RF 5	71.28	88.17	85.70	14.75	80.20	18.40	271.7	6.31

·Translation search-1

	alpha	beta	gamma	Xfrac	Yfrac	Zfrac	TF/sig	R-fac	Corr
Sol_TF_2 1	347.35	90.00	276.59	0.573	0.000	0.263	20.08	0.565	0.182
Sol_TF_2 2	347.35	90.00	276.59	0.194	0.000	0.495	7.22	0.576	0.147
Sol_TF_2 3	347.35	90.00	276.59	0.333	0.000	0.065	5.12	0.575	0.144
Sol_TF_2 4	347.35	90.00	276.59	0.084	0.000	0.206	5.08	0.577	0.145
Sol_TF_2 5	347.35	90.00	276.59	0.011	0.000	0.362	5.06	0.578	0.144

·Translation search-2

	alpha	beta	gamma	Xfrac	Yfrac	Zfrac	TF/sig	R-fac	Corr
Sol_TF_1 1	167.79	87.73	265.76	0.076	0.180	0.280	61.12	0.532	0.278
Sol_TF_1 2	167.79	87.73	265.76	0.076	0.127	0.279	25.63	0.563	0.190
Sol_TF_1 3	167.79	87.73	265.76	0.077	0.414	0.279	25.18	0.564	0.188
Sol_TF_1 4	167.79	87.73	265.76	0.077	0.229	0.279	23.96	0.563	0.186
Sol_TF_1 5	167.79	87.73	265.76	0.076	0.367	0.279	22.88	0.563	0.187

表 3-2 分子置換法の結果

本文中にも記したように、分子置換はサーチモデルを配置して、計算される回折データと、実際の回折データと比較する方法である。その第一段階は、サーチモデルを回転してモデルの方向を決める **Rotation search** である。CgCBP の分子置換では、ChBP2 分子の配置を決定するので、**Rotation search** では2つの解が得られた。第二段階は、サーチモデルを平行移動して位置を決める **Translation search** である。**Rotation search** で得られた2つの解について、それぞれ **Translation search** を行い、下線で示す2つの解を得た。

Crystal	CgCBP-SO ₄
分解能 (Å)	49.2-2.0
No. of protein atoms	12856
No. of solvent atoms	1074
No. of heteroatoms	17
Average <i>B</i> -factor (Å ²)	
(サブユニット A/サブユニット B)	
タンパク質	22.6/23.5
水分子	28.2
グルコース	23.5/30.4
硫酸	24.6/24.5
<i>R</i> -factor/ <i>R</i> _{free} (%)	17.6/21.3

表 3-3 CgCBP-SO₄精密化結果

Crystal	CgCBP-PO ₄
波長 (Å)	1.0000
Beamline	PF BL-6A
空間群	<i>P</i> 2 ₁
単位胞パラメーター	
<i>a</i> (Å)	84.27
<i>b</i> (Å)	98.80
<i>c</i> (Å)	105.10
β (deg)	102.53
分解能(Å)	50.00-2.10 (2.18-2.10)
Measured reflections	377,058
Unique reflections	99,298
Completeness (%)	100.0(100.0)
Redundancy	1.9(1.9)
Mean <i>I</i> / σ	8.0(3.3)
<i>R</i> _{factor} (%)	9.4(34.1)
Mosaicity	0.577

表 3-4 CgCBP-PO₄のX線回折データ測定結果

Crystal	CgCBP-PO ₄
分解能 (Å)	41.9-2.1
No. of protein atoms	12856
No. of solvent atoms	938
No. of heteroatoms	29
Average <i>B</i> -factor (Å ²)	
(サブユニット A/サブユニット B)	
タンパク質	21.2/23.2
水分子	27.2
グルコース	24.9/32.5
リン酸	20.1/18.7
グリセロール	25.9/28.6
<i>R</i> -factor/ <i>R</i> _{free} (%)	18.3/22.3

表 3-5 CgCBP-PO₄精密化結果

```

T_nea_CBP      1  .....MKFGG.....
T_nea_CBPA    1  .....MKFGG.....
T_nea_CEPB    1  .....MKFGG.....
T_mar_CBP     1  .....MRFG.....
C_YM4_CBP     1  .....MKFGG.....
C_the_CBP     1  .....MKFGG.....
C_ste_CBP     1  .....MKFGG.....
C_gil_CBP     1  .....MRYG.....
C_ste_CDP     1  .....MRYG.....
V_pro_ChBP    1  .....MKYG.....
V_fur_ChBP    1  .....MKYG.....
C_the_CDP     1  MITKVTARNNKITPVLLNQKFGGNKINLGNFADRVFTDAAFKNVAGIANLPMKAPVMQVLMENCIVSKYL
C_YM4_CDP     1  MITKVTARNNKITPVLLNQKFGGNKINLGNFADAVFTDAAFKNVAGIANLPMKAPVMQVLMENCIVSKYL

```

```

T_nea_CBP      5  .....YFDDKNREYVIVITP.....RTPYPWENYLGT..EDFFSIISHMAG..
T_nea_CBPA    5  .....YFDDKNREYVIVITP.....RTPYPWENYLGT..EDFFSIISHMAG..
T_nea_CEPB    5  .....YFDDKNREYVIVITP.....RTPYPWENYLGT..EDFFSIISHMAG..
T_mar_CBP     5  .....YFDDVNREYVITP.....QTPYPWENYLGT..EDFFSIISHMAG..
C_YM4_CBP     5  .....YFDDANREYVITP.....RTPYPWENYLGT..ENFFSLINTAG..
C_the_CBP     5  .....YFDDANREYVITP.....RTPYPWENYLGT..ENFFSLINTAG..
C_ste_CBP     5  .....YFDDVNREYVITP.....ATPYPWENYLGT..ODFFSLINTSG..
C_gil_CBP     5  .....YFDDAAREYVITP.....HTPYPWENYLGS..POFFSLLSHQAG..
C_ste_CDP     5  .....YFDEKAAREYVITP.....DTPPWNYLGN..CKYGGIVNTGG..
V_pro_ChBP    5  .....YFDNDNREYVITP.....DVPAPWNYLGT..EKFTVISHNAG..
V_fur_ChBP    5  .....YFDNDNREYVITP.....DVPAPWNYLGT..EKFTVISHNAG..
C_the_CDP     71  KQFVPDRSVCFVEEGQKFYIVLEDGQKIEVPEDVNKALKATVSDVKHWAGYLTEDGEHVIALLKFPAGPH
C_YM4_CDP     71  KQFVPDRSVCFVEEGQKFYIVLEDGQKIEVPEDVNKALKATVSDVKHWAGYLTEDGEHVIDLLLPAGPH

```

```

T_nea_CBP      43  .....GYCFYKDARLRRITRFRYNNVPTDA...GGRYFYIREE.DGD
T_nea_CBPA    43  .....GYCFYKDARLRRITRFRYNNVPTDA...GGRYFYIREE.DGD
T_nea_CEPB    43  .....GYCFYKDARLRRITRFRYNNVPTDA...GGRYFYIREE.DGD
T_mar_CBP     43  .....GYCFYKDARLRRITRFRYNNVPTDA...GGRYFYIREE.NGD
C_YM4_CBP     43  .....GYCFYRDARLRRITRFRYNNVPTDA...GGRYFYIREE.NGD
C_the_CBP     43  .....GYCFYRDARLRRITRFRYNNVPTDA...GGRYFYIREE.NGD
C_ste_CBP     43  .....GYCFYRDARLRRITRFRYNNVPTDA...GGRYFYIREE.SGD
C_gil_CBP     43  .....GYSFYRDAKMRRLTRFRYNNVPTDA...GGRYLYVNDG..
C_ste_CDP     43  .....GYSFHKDPQNRRTTRFRYNNVPTDA...PGRYIYVRDRLTGE
V_pro_ChBP    43  .....GYSFYNSPEYNRVTKFRPNATDR...PGHVYLRDRDSGD
V_fur_ChBP    43  .....GYSFYHSPEYNRVTKFRPNATDR...PGHVYLRDRDETGD
C_the_CDP     141  FYVNLLIGNRLGFKRTLQTTPKSVDRFGGSFRSHAATQVLATRFMQENGFPANRQTYYEDKGQI
C_YM4_CDP     141  FYVNLLIGNRLGFKRTLQTTPKSVDRFGGSFRSHAATQVLATRFMQENGFPANRQTYYEDKGQI

```

```

T_nea_CBP      81  FWSPTWMPVRRDLS..FFEARHGLGYKIAGERNGLRATITFFVPRHF...TGEVHHLVLQNRTERPRR
T_nea_CBPA    81  FWSPTWMPVRRDLS..FFEARHGLGYKIAGERNGLRATITFFVPRHF...TGEVHHLVLQNRTERPRR
T_nea_CEPB    81  FWSPTWMPVRRDLS..FFEARHGLGYKIAGINGGLRATITFFVPRHF...TGEVHHLVLQNRTERPRR
T_mar_CBP     81  FWTPTWMPVRRDLS..FFEARHGLGYKIAGERNGLRATITFFVPRHF...TGEVHLVLQNRTERPRR
C_YM4_CBP     80  FWSPGWSPVKRELE..SYECRHGLGYKIAGKRNGIKAEVTFFVPLNY...NGEVQLILKNRGDKKK
C_the_CBP     80  FWSPGWSPVKRELE..SYECRHGLGYKIAGKRNGIKAEVTFFVPLNY...NGEVQLILKNRGDKKK
C_ste_CBP     80  YWTPGWMPVKRELD..RYECRHGLGYKIAGERNGVEVSQLAFVPLNY...NGEVNQVVITNRSGSEKE
C_gil_CBP     80  YWTPSWLPVKADLD..HFEARHGLGYSRITGERNGKVETLFFVPLGE...NAEVQVIVINSDAPKT
C_ste_CDP     82  YWNPGYQPVQRKLD..SYRCRHGMGYTVLGEYKIAADVTYFPDDR...DFEWLQIRNRCHVERN
V_pro_ChBP    81  YWSISWQPVAKSLDEAQYOIRHGLSYSKFCDYNGIHAKTLFVPKGE...DAELWDVIKNRSDQVRT
V_fur_ChBP    81  FWSVSWQPVAKNLDAHYFVRHGLSYSKFCDYNGIVATKTLFVPKGE...DAVDVRIENSDQPRT
C_the_CDP     211  FYSALIDDNIVEAT...CKHSCNRTVIKYKTACNLEITRTIFLVPHKKGFLATEIQREIKNASDKARN
C_YM4_CDP     211  FYSALIDDNIVEAT...CKHSCNRTVIKYKTACNLEITRTIFLVPHKKGFLATEIQREIKNASDKARN

```

```

T_nea_CBP      145  IKLFSFIEFCLWNALDMINFORNYSTGEVHIE...GSVIFHKTEYRRRNHYAFSVNHSIDGFDTD
T_nea_CBPA    145  IKLFSFIEFCLWNALDMINFORNYSTGEVHIE...GSVIFHKTEYRRRNHYAFSVNHSIDGFDTD
T_nea_CEPB    145  IKLFSFIEFCLWNALDMINFORNYSTGEVHIE...GSVIYHKTEYRRRNHYAFSVNHSIDGFDTD
T_mar_CBP     145  IKLFSFIEFCLWNALDMINFORNYSTGEVHIE...GSVIYHKTEYRRRNHYAFSVNHSIDGFDTD
C_YM4_CBP     144  ITLFSFIEFCLWNAYDMINFORNFSIGEVHIE...GSVIYHKTEYRRRNHYAFSVNAKISGFDSD
C_the_CBP     144  ITLFSFIEFCLWNAYDMINFORNFSIGEVHIE...GSVIYHKTEYRRRNHYAFSVNAKISGFDSD
C_ste_CBP     144  IALFSFVEFCLWNAMDMINFORNFSTGEVHIE...GSAIYHKTEYRRRNHYAFWVNSPIDGFDTD
C_gil_CBP     144  ATLFSFVEFCLWNAQDDOTNYORNLSTGEVHIE...GSAIYHKTEYRRRNHYAFGVNTRADGFDTD
C_ste_CDP     146  LQVFSYAEFCFWDAIMDQNVDWVQINGRYED...RLITWHPHHFK...DACAFFATNAEINSFDTN
V_pro_ChBP    147  ISAFSFVEFSFSHIQSDNQNHOMSLYSAGTAYRP...GLIEYDLYNTDDFEGFYLATFDPDSYDGQ
V_fur_ChBP    147  ISAFSFVEFSFSHIASDNQNHOMSLYSAGTAYRP...GVLEYDLYNTDDFEGFYLATFDPDSYDGQ
C_the_CDP     278  LSITYTGMFGTGAVHALFEDVYTNVIMSALALYNDKGEFLGITPDYPEEFKQDRFVTIMIVRNGDEKS
C_YM4_CDP     278  LSITYTGMFGTGAVHALFEDVYTNVIMSALALYNDKGEFLGITPDYPEEFKQDRFVTIMIVRNGDEKS

```

T_nea_CBP 210 R.E.S.F.M.C.L.Y.N.G.F.E.A.P.O.A.V.V.E.G.N.P.R.N.S.V.A.S.G.W.A.P.I.A.S.H.Y.L.E.L.E.I.P.F.L.G.R.K.E.L.I.F.F.I.L.G.Y.V.E.N.P.E.E.E.K.W.E.R.F.P.G
T_nea_CBPA 210 R.E.S.F.M.C.L.Y.N.G.F.E.A.P.O.A.V.V.E.G.N.P.R.N.S.V.A.S.G.W.A.P.I.A.S.H.Y.L.E.L.E.I.P.F.L.G.R.K.E.L.I.F.F.I.L.G.Y.V.E.N.P.E.E.E.K.W.E.R.F.P.G
T_nea_CEPB 210 R.E.S.F.M.C.L.Y.N.G.F.E.A.P.O.A.V.V.E.G.N.P.R.N.S.V.A.S.G.W.A.P.I.A.S.H.Y.L.E.L.E.I.P.F.L.G.R.K.E.L.I.F.F.I.L.G.Y.V.E.N.P.E.E.E.K.W.E.R.F.P.G
T_mar_CBP 210 R.E.S.F.I.G.L.Y.S.G.F.E.A.P.O.A.V.V.E.G.K.P.R.N.S.V.A.S.G.W.A.P.I.A.S.H.Y.L.E.I.E.L.A.P.S.E.K.K.E.L.I.F.F.I.L.G.Y.V.E.N.P.E.E.E.K.W.E.R.F.P.G
C_YM4_CBP 209 R.D.S.F.I.G.L.Y.N.G.F.D.A.P.O.A.V.V.N.G.K.S.N.N.S.V.A.D.G.W.A.P.I.A.S.H.S.I.E.I.E.L.N.P.G.E.Q.K.E.Y.V.F.I.I.G.Y.V.E.N.K.D.E.E.K.W.E.S.K.G
C_the_CBP 209 R.D.S.F.I.G.L.Y.N.G.F.D.A.P.O.A.V.V.N.G.K.S.N.N.S.V.A.D.G.W.A.P.I.A.S.H.S.I.E.I.E.L.N.P.G.E.Q.K.E.Y.V.F.I.I.G.Y.V.E.N.K.D.E.E.K.W.E.S.K.G
C_ste_CBP 209 R.E.S.F.L.G.L.Y.N.G.F.D.S.P.K.N.V.A.G.K.P.T.N.S.I.A.S.G.W.S.P.I.A.S.H.Y.I.K.M.S.L.K.P.C.E.K.R.S.Y.I.F.V.L.G.Y.V.E.N.P.F.F.E.E.K.W.E.R.K.G
C_gil_CBP 214 R.D.T.F.V.G.A.Y.N.S.L.G.E.A.S.V.P.R.A.G.K.S.A.O.S.V.A.S.G.W.Y.P.I.G.S.H.S.V.A.V.T.L.Q.P.G.E.S.R.D.I.V.V.V.L.G.Y.L.E.N.P.D.E.E.K.W.A.D.D.A
C_ste_CDP 209 L.E.A.F.I.G.R.Y.R.C.E.S.N.P.I.A.V.E.T.G.A.C.S.N.S.V.S.Y.R.M.N.G.V.G.A.F.C.I.D.V.N.L.K.P.G.E.R.E.I.I.F.I.L.G.F.T.E.N.....
V_pro_ChBP 213 R.D.R.F.L.G.L.H.R.D.E.A.N.P.L.A.V.E.Q.G.R.C.S.N.S.A.Q.T.C.Y.N.H.C.G.S.L.H.K.Q.F.T.L.Q.P.G.E.B.I.R.F.A.V.I.L.G.....
V_fur_ChBP 213 R.D.A.F.L.G.M.Y.R.D.E.A.N.P.I.A.V.A.N.G.R.C.S.N.S.A.Q.T.C.Y.N.H.C.G.A.L.H.K.Q.F.V.L.Q.P.G.E.K.V.R.F.A.V.I.L.G.....
C_the_CDP 348 E.P.Q.S.F.C.T.D.Y.N.D.F.V.G.T.G.L.E.H.P.A.A.D.V.L.E.Q.Q.A.E.P.Q.R.S.G.I.L.C.P.G.C.A.V.Y.V.E.P.G.K.T.V.I.L.D.T.F.T.G.L.S.S.S.K.D.N.E.N.Y
C_YM4_CDP 348 E.P.Q.S.F.C.T.D.Y.N.D.F.V.G.T.G.L.E.H.P.A.A.G.G.C.N.L.N.K.L.N.R.K.G.F.G.F.A.L.C.A.F.F.T.V.E.P.G.K.T.V.I.L.D.T.F.T.G.L.S.S.S.K.D.N.E.N.Y

T_nea_CBP 279 ..VIN.K.K.R.A.K.E.M.I.E.R.F.K.T.G.E.D.V.E.R.A.L.K.E.L.K.E.Y.W.D.E.L.L.G.R.I.Q.V.E.T.H.D.E.K.N.R.V.N.I.W.N.Q.Y.Q.C.M.V.T.F.N.I.A.R.S
T_nea_CBPA 279 ..VIN.K.K.R.A.K.E.M.I.E.R.F.K.T.G.E.D.V.E.R.A.L.K.E.L.K.E.Y.W.D.E.L.L.G.R.I.Q.V.E.T.H.D.E.K.N.R.V.N.I.W.N.Q.Y.Q.C.M.V.T.F.N.I.A.R.S
T_nea_CEPB 279 ..VIN.K.K.R.A.K.E.M.I.E.R.F.K.T.G.E.D.V.E.R.A.L.K.E.L.K.E.Y.W.D.E.L.L.G.R.I.Q.V.E.T.H.D.E.K.N.R.V.N.I.W.N.Q.Y.Q.C.M.V.T.F.N.I.A.R.S
T_mar_CBP 279 ..VIN.K.K.R.A.K.E.M.I.E.R.F.K.T.G.E.D.V.E.R.A.L.K.E.L.K.E.Y.W.D.E.L.L.G.R.I.Q.V.E.T.H.D.E.K.N.R.V.N.I.W.N.Q.Y.Q.C.M.V.T.F.N.I.A.R.S
C_YM4_CBP 278 ..VIN.K.K.K.A.Y.E.M.I.E.Q.F.N.T.V.E.K.V.D.K.A.F.E.E.L.K.S.Y.W.N.A.L.L.S.K.Y.F.L.E.S.H.D.E.K.N.R.M.V.N.I.W.N.Q.Y.Q.C.M.V.T.F.N.I.S.R.S
C_the_CBP 278 ..VIN.K.K.K.A.Y.E.M.I.E.Q.F.N.T.V.L.K.V.D.K.A.F.E.E.L.K.S.Y.W.N.A.L.L.S.K.Y.F.L.E.S.H.D.E.K.N.R.M.V.N.I.W.N.Q.Y.Q.C.M.V.T.F.N.M.S.R.S
C_ste_CBP 278 ..VIN.K.K.R.A.R.E.M.Q.K.F.I.D.D.T.C.V.E.R.A.F.O.E.L.K.D.Y.W.A.D.L.C.S.K.P.A.L.E.S.H.D.E.K.N.R.M.V.N.I.W.N.Q.Y.Q.C.M.V.T.F.N.M.S.R.S
C_gil_CBP 283 H.Q.V.V.N.K.A.P.A.H.A.L.L.G.R.F.A.T.S.E.Q.V.D.A.A.L.E.A.L.N.S.Y.W.I.N.L.L.S.I.Y.S.V.S.T.D.E.K.L.D.R.M.V.N.I.W.N.Q.Y.Q.C.M.V.T.F.N.M.S.R.S
C_ste_CDP 268K.S.T.I.R.D.R.I.R.D.Y.L.N.V.F.Y.A.K.E.A.L.K.R.I.K.D.S.W.E.E.Y.L.D.K.L.O.T.F.T.P.D.R.E.T.N.I.F.V.N.I.W.N.Q.Y.Q.C.K.I.F.F.N.S.R.F
V_pro_ChBP 268 ...I.G.K.N.G.E.R.L.R.E.H.Y.Q.D.V.A.N.I.D.A.A.F.A.A.I.K.A.H.W.D.E.R.C.A.K.F.O.V.K.S.P.N.Q.G.E.D.T.M.I.N.A.W.I.L.Y.O.A.E.T.C.V.V.S.R.F
V_fur_ChBP 268 ...V.G.K.N.G.E.K.L.R.A.K.Y.O.D.L.S.Q.V.D.A.A.F.A.A.I.K.O.H.W.D.E.R.C.A.K.F.O.V.R.S.P.N.Q.G.E.D.T.M.I.N.A.W.I.L.Y.O.A.E.T.C.V.V.S.R.F
C_the_CDP 417 S.D.A.V.M.L.R.E.L.D.N.L.L.R.Y.F.E.K.S.E.S.V.E.E.T.L.N.E.I.N.F.H.E.N.Y.G.K.Y.F.Q.F.N.P.G.N.R.L.F.D.S.G.F.N.R.N.I.A.L.E.V.L.Y.Q.I.F.M.I.C.S
C_YM4_CDP 418 S.D.A.V.M.L.R.E.L.D.N.L.L.R.Y.F.E.K.S.E.S.V.E.E.T.L.N.E.I.N.F.H.E.N.Y.G.K.Y.F.Q.F.N.T.G.N.R.L.E.D.S.G.E.N.N.I.A.L.F.C.V.L.Y.Q.I.F.M.S.S

T_nea_CBP 346 A.S.Y.F.E.S.G.I.S.R.G.I.G.F.R.D.S.N.Q.D.I.L.G.F.V.H.M.I.P.E.K.A.R.O.R.I.L.D.I.A.S.I.Q.F.E.D.G.S.T.Y.H.O.F.O.P.....
T_nea_CBPA 346 A.S.Y.F.E.S.G.I.S.R.G.I.G.F.R.D.S.N.Q.D.I.L.G.F.V.H.M.I.P.E.K.A.R.O.R.I.L.D.I.A.S.I.Q.F.E.D.G.S.T.Y.H.O.F.O.P.....
T_nea_CEPB 347 S.S.Y.F.E.S.G.I.S.R.G.I.G.F.R.D.S.N.Q.D.I.L.G.F.V.H.M.I.P.E.K.A.R.O.R.I.L.D.I.A.S.I.Q.F.E.D.G.S.T.Y.H.O.F.O.P.....
T_mar_CBP 347 A.S.Y.F.E.S.G.I.S.R.G.I.G.F.R.D.S.N.Q.D.I.L.G.F.V.H.M.I.P.E.K.A.R.O.R.I.L.D.I.A.S.I.Q.F.E.D.G.S.T.Y.H.O.F.O.P.....
C_YM4_CBP 346 A.S.Y.F.E.S.G.I.S.R.G.M.G.F.R.D.S.N.Q.D.L.L.G.F.V.H.Q.P.A.R.A.R.E.R.L.L.D.I.A.T.A.T.Q.L.E.D.G.S.A.Y.H.Q.Y.O.P.....
C_the_CBP 346 A.S.Y.F.E.S.G.I.S.R.G.M.G.F.R.D.S.N.Q.D.L.L.G.F.V.H.Q.P.A.R.A.R.E.R.L.L.D.I.A.T.A.T.Q.L.E.D.G.S.A.Y.H.Q.Y.O.P.....
C_ste_CBP 346 A.S.Y.F.E.S.G.I.S.R.G.M.G.F.R.D.S.N.Q.D.L.L.G.F.V.H.Q.P.A.R.A.R.E.R.L.L.D.I.A.T.A.T.Q.L.E.D.G.S.A.Y.H.Q.Y.O.P.....
C_gil_CBP 353 A.S.F.F.E.T.G.I.G.R.C.M.G.F.R.D.S.N.Q.D.L.L.G.F.V.H.L.P.E.R.A.R.E.R.I.I.D.I.A.S.T.Q.F.A.D.G.S.A.Y.H.Q.Y.O.P.....
C_ste_CDP 333 V.S.M.Y.S.W.G.L.R.G.M.G.F.R.D.S.N.Q.D.L.L.G.V.M.H.S.P.E.L.A.G.G.L.I.K.R.L.I.H.C.Q.Y.I.D.G.R.V.Y.H.L.F.F.P.....
V_pro_ChBP 335 A.S.P.I.E.V.G.R.T.G.T.G.V.R.D.T.A.Q.D.A.I.S.V.P.H.A.N.E.M.T.R.K.R.I.V.D.L.L.R.G.Q.V.K.A.C.Y.G.L.H.L.L.P.D.P.W.F.D.P.E.K.E.D.V.A.P.S.K.S
V_fur_ChBP 335 A.S.P.I.E.V.G.R.T.G.T.G.V.R.D.T.A.Q.D.A.I.S.V.P.H.A.N.E.M.T.R.K.R.I.V.D.L.L.R.G.Q.V.K.A.C.Y.G.L.H.L.L.P.D.P.W.F.D.P.E.K.A.D.V.K.P.S.K.S
C_the_CDP 487 F.G.Q.T.K.G.Y.R.E.T.G.S.G.N.S.G.L.F.A.S.M.Y.Y.F.N.I.G.Y.Q.D.F.V.K.E.L.I.F.E.W.T.A.N.V.Y.K.M.G.Y.A.N.....
C_YM4_CDP 488 F.G.Q.T.K.G.Y.R.E.T.G.S.R.E.I.Q.D.L.F.A.S.M.Y.Y.F.N.I.G.Y.Q.D.F.V.K.E.L.I.F.E.W.T.A.N.V.Y.K.M.G.Y.A.N.....

T_nea_CBP 401 ...L.T.K.K.G.N.N.E.L.G.G.....F.N.D.D.P.L.W.L.I.L.S.T.S.A.Y.I.K.E.T.G.D.W.S.I.L.N.E.E.V.P.H.D.N.D.P.D.K.R.A.T.L.F.E.H.L.K.R.S
T_nea_CBPA 401 ...L.T.K.K.G.N.N.E.L.G.G.....F.N.D.D.P.L.W.L.I.L.S.T.S.A.Y.I.K.E.T.G.D.W.S.I.L.N.E.E.V.P.H.D.N.D.P.D.K.R.A.T.L.F.E.H.L.K.R.S
T_nea_CEPB 402 ...L.T.K.K.G.N.N.E.L.G.G.....F.N.D.D.P.L.W.L.I.L.S.T.S.A.Y.I.K.E.T.G.D.W.S.I.L.N.E.E.V.P.H.D.N.D.P.D.K.R.A.T.L.F.E.H.L.K.R.S
C_YM4_CBP 401 ...L.T.K.K.G.N.N.E.L.G.S.N.....F.N.D.D.P.L.W.L.I.L.A.T.A.A.Y.I.K.E.T.G.D.Y.S.I.L.K.E.O.V.P.F.N.N.D.P.S.K.A.D.T.M.F.E.H.L.T.R.S
C_the_CBP 401 ...L.T.K.K.G.N.N.E.L.G.S.N.....F.N.D.D.P.L.W.L.I.L.A.T.A.A.Y.I.K.E.T.G.D.Y.S.I.L.K.E.O.V.P.F.N.N.D.P.S.K.A.D.T.M.F.E.H.L.T.R.S
C_ste_CBP 401 ...L.T.K.K.G.N.N.D.I.G.S.....F.N.D.D.P.L.W.L.I.L.A.T.A.Q.Y.I.K.E.T.G.D.F.G.I.L.D.E.V.P.H.D.C.D.E.N.K.K.D.T.L.F.E.H.L.K.R.S
C_gil_CBP 408 ...L.T.K.R.G.N.N.D.I.G.S.....F.N.D.D.P.L.W.L.I.A.G.V.A.A.Y.I.K.E.S.G.D.W.G.I.L.D.E.P.V.P.H.D.N.E.P.G.S.E.V.P.L.F.E.H.L.T.R.S
C_ste_CDP 388 ...L.T.G.E.G.G...I.G.D.A.P.V.V.K.F.D.W.S.D.D.H.L.W.L.P.I.A.A.N.A.Y.L.K.E.T.A.N.F.O.F.F.Q.S.V.P.N.D.N.K.T.G.T.V.W.E.H.L.N.R.A
V_pro_ChBP 405 P.T.V.V.P.T.P.S.D.E.D.K.I.H.G...I.K.D.T.C.S.D.D.H.L.W.L.P.T.I.C.K.Y.M.E.T.G.E.T.S.F.I.D.Q.M.I.P.A.D.G.G.E.A.S...V.Y.E.H.M.K.A.A
V_fur_ChBP 405 P.T.V.V.P.T.P.S.D.E.D.K.I.H.G...I.K.D.T.C.S.D.D.H.L.W.I.V.P.T.I.L.N.F.V.K.R.T.G.D.L.S.F.I.D.E.V.P.A.D.G.G.D.A.T...V.Y.O.H.M.M.A.A
C_the_CDP 539H.N.F.Y.L.V.G.K.Q....R.D.C.I.P.M.T.A.C.L.L.Q.A.Y.R.Y:I.Y.T.K.D.T.S.V.L.N.E.E.V.P.H.A.D.G.N.N.E.K.R.A.V.R.E.T.L.K.A.I
C_YM4_CDP 541H.N.F.Y.W.V.G.K.Q....P.G.L.Y.S.D.S.L.L.L.L.Q.A.Y.Y.R.Y:I.Y.T.K.D.T.S.V.L.N.E.E.V.P.H.A.D.G.N.N.E.K.R.A.V.R.E.T.L.K.A.I

T_nea_CBP 461 F.Y.F.T.V.N.N.I.G.P.H.G.L.P.I.G.R.A.D.W.N.D.C.L.N.L.N.C.F.S.K.N.P.D.E.S.F.Q.T.T.V.N.A.L.D.G.R.....V.A.E.S.V.F.T.A.G.L
T_nea_CBPA 461 F.Y.F.T.V.N.N.I.G.P.H.G.L.P.I.G.R.A.D.W.N.D.C.L.N.L.N.C.F.S.K.N.P.D.E.S.F.Q.T.T.V.N.A.L.D.G.R.....V.A.E.S.V.F.T.A.G.L
T_nea_CEPB 462 F.Y.F.T.V.N.N.I.G.P.H.G.L.P.I.G.R.A.D.W.N.D.C.L.N.L.N.C.F.S.K.N.P.D.E.S.F.Q.T.T.V.N.A.L.D.G.R.....V.A.E.S.V.F.T.A.G.L
T_mar_CBP 462 F.Y.F.T.V.N.N.I.G.P.H.G.L.P.I.G.R.A.D.W.N.D.C.L.N.L.N.C.F.S.K.N.P.D.E.S.F.Q.T.T.V.N.A.L.D.G.R.....V.A.E.S.V.F.T.A.G.L
C_YM4_CBP 461 F.Y.H.V.V.N.N.I.G.P.H.G.L.P.I.G.R.A.D.W.N.D.C.L.N.L.N.C.F.S.T.V.P.D.E.S.F.Q.T.T.S.K.D.G.K.....V.A.E.S.V.M.L.A.G.M
C_the_CBP 461 F.Y.H.V.V.N.N.I.G.P.H.G.L.P.I.G.R.A.D.W.N.D.C.L.N.L.N.C.F.S.T.V.P.D.E.S.F.Q.T.T.S.K.D.G.K.....V.A.E.S.V.M.L.A.G.M
C_ste_CBP 461 F.Y.H.V.V.N.N.I.G.P.H.G.L.P.I.G.R.A.D.W.N.D.C.L.N.L.N.C.F.S.T.Q.P.M.N.P.F.T.P.A.D.K.F.E.G.R.....V.A.E.S.V.F.T.A.G.M
C_gil_CBP 468 F.Q.F.T.V.Q.N.R.G.P.H.G.L.P.I.G.R.A.D.W.N.D.C.L.N.L.N.C.F.S.T.T.P.G.E.S.F.Q.T.T.E.N.Q.A.G.G.....V.A.E.S.V.F.T.A.A.Q
C_ste_CDP 452 M.E.F.T.Y.N.H.R.G.F.H.A.L.P.Y.S.R.A.D.W.N.D.C.L.N.L.D.M.G.N.G.....I.A.E.T.L.F.T.S...
V_pro_ChBP 470 L.D.F.S.A.E.Y.V.Q.T.G.I.C.K.L.R.A.D.W.N.D.C.L.N.L.G.....G.G.E.S.S.M.V.S.F.L
V_fur_ChBP 470 L.D.F.S.A.E.Y.V.Q.T.G.I.C.K.L.R.A.D.W.N.D.C.L.N.L.G.....G.G.E.S.S.M.V.S.F.L
C_the_CDP 598 I.Q.Y.S.A.C.I.S.V.G.D.H.G.L.P.L.L.D.A.D.W.N.D.C.L.K.L.D.S.N.S.I.D.G.A.T.K.E.K.L.Y.Y.E.Q.L.K.K.T.N.G.K.Y.G.D.R.F.M.S.D.Y.S.E.S.V.M.N.A.F.L
C_YM4_CDP 601 I.Q.Y.S.A.C.I.S.V.G.D.H.G.L.P.L.L.D.A.D.W.N.D.C.L.K.L.A.S.N.S.I.D.G.A.T.K.E.K.L.Y.Y.E.Q.L.K.K.T.N.G.K.Y.G.D.R.F.M.S.D.Y.S.E.S.V.M.N.A.F.L

T_nea_CBP 519 FVLAGKEFVEICRRRLGLEDEAKFAEKHVKKMTEITLLEYGWD...GWFRLRAYDA...FGRKVGSD
T_nea_CBPA 519 FVLAGKEFVEICRRRLGLEDEAKFAEKHVKKMTEITLLEYGWD...GWFRLRAYDA...FGRKVGSD
T_nea_CEBP 520 FVLAGKEFVEICRRRLGLEDEAKFAEKHVKKMTEITLLEYGWD...GWFRLRAYDA...FGRKVGSD
T_mar_CBP 520 FVLAGKEFVEICRRRLGLEDEAKFAEKHVKKMTEITLLEYGWD...GWFRLRAYDA...FGRKVGSD
C_YM4_CBP 518 FVFIIGKDYVKLCEYMGLSEEARAKAOQHIDAMKEAILKYGYD...GEWFLRAYDD...FGRKVGSD
C_the_CBP 518 FVFIIGKDYVKLCEYMGLSEEARAKAOQHIDAMKEAILKYGYD...GEWFLRAYDD...FGRKVGSD
C_ste_CBP 518 FVLIIGPEYVELCKRRGLSEEAFAEKHIQNMVNAVLTGHD...GEWFLRAYDH...FGRKVGSD
C_gil_CBP 525 FVLYGAEYATLAERRGLADVATEARKYVDEVRAAVLEHGWD...GWFRLRAYDY...YGNPVGTD
C_ste_CDP 491 MLFSEPPLEKRFRCRISDKRIATKYRYWYDEMKAINEWCWD...GEWYIRAFDD...EENVLGSD
V_pro_ChBP 508 HFWALQEFIDLAKFLGKQDQVNTYTEMAANVREACETHLWDD...EGGWYIRGLTK...NGDKIGTD
V_fur_ChBP 508 HFWALQEFIDLAKFLGKQDQVNTYTEMAANVREACETHLWDD...EGGWYIRGLTK...NGDKIGTD
C_the_CDP 668 LKLAIDHLAEIATLDNDTQLAQOMSELSKEVTDRIQKHAWKENFFARVILINRYKDGSYTYLGAKGDKLSA
C_YM4_CDP 671 LKLAIDHLAEIATLDNDTQLAQOMSELSKEVTDRIQKHAWKENFFARVILINRYKDGSYTYLGAKGDKLSA

T_nea_CBP 577 KCEBEGKIFIEPQGMCMVAGIGVNGY...AKKALDSVKKEHLDTPYGLVLCQPAYSRYYIELGEISS
T_nea_CBPA 577 KCEBEGKIFIEPQGMCMVAGIGVNGY...AKKALDSVKKEHLDTPYGLVLCQPAYSRYYIELGEISS
T_nea_CEBP 578 KCEBEGKIFIEPQGMCMVAGIGVNGY...AKKALDSVKKEHLDTPYGLVLCQPAYSRYYIELGEISS
T_mar_CBP 578 KCEBEGKIFIEPQGMCMVAGIGVNGY...AKKALDSVKKEHLDTPYGLVLCQPAYSRYYIELGEISS
C_YM4_CBP 576 KENEBGRIFIESQGFVMAEIGLEDGK...ALKALDSVKKYLDTFYGLVLCQNPAYTRYIEYGEIST
C_the_CBP 576 KENEBGRIFIESQGFVMAEIGLEDGK...ALKALDSVKKYLDTFYGLVLCQNPAYTRYIEYGEIST
C_ste_CBP 576 KESSEGOIFIEPQGMCMVAGIGVNGY...AKKALDSVKKYLDTFYGLVLCQNPAYTRYIEYGEIST
C_gil_CBP 583 DAKPEGKIWIEPQGFVMAEIGLEDGK...ALKALDSVKKYLDTFYGLVLCQNPAYTRYIEYGEIST
C_ste_CDP 549 GKNRYGKIFINQSWAVLSMVAPEFYA...KCKLPSVYRHNTKYGLVLYVYPPAYFPNPKIGGMIT
V_pro_ChBP 568 AQQQGRVHLESNITLAVLSGLASQERG...ECAMDVADEHLETPYGLVLCQNPAYTRYIEYGEIST
V_fur_ChBP 568 FEQQGRVHLESNITLAVLSGLASQERG...ECAMDVADEHLETPYGLVLCQNPAYTRYIEYGEIST
C_the_CDP 738 DPNIDGVYFLNSFAWSVLSVATDEQI...AMVDVTKHLLTPYGLVLCQNPAYTRYIEYGEIST
C_YM4_CDP 741 DPNIDGVYFLNSFAWSVLSVATDEQI...AMVDVTKHLLTPYGLVLCQNPAYTRYIEYGEIST

T_nea_CBP 641 YPPGYKENAGTFCHNNPWVAIAETVIGRQDRAFEIYRKIT...PAYLEDISEIHRTEPYVYACMVAG...
T_nea_CBPA 641 YPPGYKENAGTFCHNNPWVAIAETVIGRQDRAFEIYRKIT...PAYLEDISEIHRTEPYVYACMVAG...
T_nea_CEBP 642 YPPGYKENAGTFCHNNPWVAIAETVIGRQDRAFEIYRKIT...PAYLEDISEIHRTEPYVYACMVAG...
T_mar_CBP 642 YPPGYKENAGTFCHNNPWVAIAETVIGRQDRAFEIYRKIT...PAYLEDISEIHRTEPYVYACMVAG...
C_YM4_CBP 640 YPPGYKENAGTFCHNNPWVAIAETVIGRQDRAFEIYRKIT...PAYLEDISEIHRTEPYVYACMVAG...
C_the_CBP 640 YPPGYKENAGTFCHNNPWVAIAETVIGRQDRAFEIYRKIT...PAYLEDISEIHRTEPYVYACMVAG...
C_ste_CBP 640 YPPGYKENAGTFCHNNPWVAIAETVIGRQDRAFEIYRKIT...PAYLEDISEIHRTEPYVYACMVAG...
C_gil_CBP 653 YPPGYKENGGFCHNNPWVAIAETVIGRQDRAFEIYRKIT...PAYLEDISEIHRTEPYVYACMVAG...
C_ste_CDP 612 YPPGAKENGGFCHNNPWVAIAETVIGRQDRAFEIYRKIT...PAYLEDISEIHRTEPYVYACMVAG...
V_pro_ChBP 631 VYQGVKENGAFSHPNPWVAIAETVIGRQDRAFEIYRKIT...PAYLEDISEIHRTEPYVYACMVAG...
V_fur_ChBP 631 VYQGVKENGAFSHPNPWVAIAETVIGRQDRAFEIYRKIT...PAYLEDISEIHRTEPYVYACMVAG...
C_the_CDP 801 YFFGDRENGAFVFKHASMMVAALIKAAKKVKDNEIAKEMARIAYFMIDLVPYKTFIRSRLCETQ...Y
C_YM4_CDP 804 YFFGDRENGAFVFKHASMMVAALIKAAKKVKDNEIAKEMARIAYFMIDLVPYKTFIRSRLCETQ...Y

T_nea_CBP 705 ..KDAPRHGEAKNSWLTGTAANFSVAITQYILGVRPTYDGLMVDPCIPEDWDGFKLIRFRFGATYEITVK
T_nea_CBPA 705 ..KDAPRHGEAKNSWLTGTAANFSVAITQYILGVRPTYDGLMVDPCIPEDWDGFKLIRFRFGATYEITVK
T_nea_CEBP 706 ..KDAPRHGEAKNSWLTGTAANFSVAITQYILGVRPTYDGLMVDPCIPEDWDGFKLIRFRFGATYEITVK
T_mar_CBP 706 ..KDAPRHGEAKNSWLTGTAANFSVAITQYILGVRPTYDGLMVDPCIPEDWDGFKLIRFRFGATYEITVK
C_YM4_CBP 704 ..KDAKRHGEAKNSWLTGTAANFSVAITQYILGVRPTYDGLMVDPCIPEDWDGFKLIRFRFGATYEITVK
C_the_CBP 704 ..KDAKRHGEAKNSWLTGTAANFSVAITQYILGVRPTYDGLMVDPCIPEDWDGFKLIRFRFGATYEITVK
C_ste_CBP 704 ..RTRWSPGEAKNSWLTGTAANFSVAITQYILGVRPTYDGLMVDPCIPEDWDGFKLIRFRFGATYEITVK
C_gil_CBP 717 ..KEAVRAGEAKNSWLTGTAANFSVAITQYILGVRPTYDGLMVDPCIPEDWDGFKLIRFRFGATYEITVK
C_ste_CDP 676 ..KEHPQFGIGRNSWLTGTAANFSVAITQYILGVRPTYDGLMVDPCIPEDWDGFKLIRFRFGATYEITVK
V_pro_ChBP 695 ..KDHQDHGRANHPWLTGTSWGWAVTNYIIGVRSQSGFTGLSVDPICIPEDWDGFKLIRFRFGATYEITVK
V_fur_ChBP 695 ..KDHQDHGRANHPWLTGTSWGWAVTNYIIGVRSQSGFTGLSVDPICIPEDWDGFKLIRFRFGATYEITVK
C_the_CDP 868 ALNISILTQEKILTFVPPGTATWLNLNLSLACIEYTRDGTISFNPIIREEETQLNFTIKAPKCSYKFSIT
C_YM4_CDP 873 TQYINTDTGENIGPLLSCTATWLNLNLSLACIEYTRDGTISFNPIIREEETQLNFTIKAPKCSYKFSIT

T_nea_CBP 773 NPHHVSKG...VKEITVDGKKIEGQVLPVFNDGKVVHRVEVLMG
T_nea_CBPA 773 NPHHVSKG...VKEITVDGKKIEGQVLPVFNDGKVVHRVEVLMG
T_nea_CEBP 774 NPHHVSKG...VKEITVDGKKIEGQVLPVFNDGKVVHRVEVLMG
T_mar_CBP 774 NPHHVSKG...VKEITVDGKKIEGQVLPVFNDGKVVHRVEVLMG
C_YM4_CBP 772 NPHHVSKG...VAKITVDGNEISGNILPVFNDGKTHKVEVIMG
C_the_CBP 772 NPHHVSKG...VAKITVDGNEISGNILPVFNDGKTHKVEVIMG
C_ste_CBP 772 NPHHVSKG...VAKITVDGNEISGNILPVFNDGKTHKVEVIMG
C_gil_CBP 785 N.PSGAPGA...RASLTVDGAPVQGRVTPYAPAGSTVVRVFTV
C_ste_CDP 744 N.EGVKRC...EKNCRRG...VEIDKIPVKKPAGTVCECVIMG
V_pro_ChBP 763 NPDHVS...VKSITLNGAPIQGRIPPOAQ.GSDNQVVVVLG
V_fur_ChBP 763 NPNGVSKG...VQSLVNGEAVD.AINAQPA.GSENVVIVLG
C_the_CDP 938 KPVGFARMESSYEELVDDGQKLDNTVTPMYTDEKEHIVTLKFK
C_YM4_CDP 942 KPVGFARMESSYEELVDDGQKLDNTVTPMYTDEKEHIVTLKFK

図 3-1 GH-94酵素のアラインメント。

T_nea_CBP: *Thermotoga neapolitana* CBP
T_nea_CBPA: *Thermotoga neapolitana* CBP A
T_nea_CEPB: *Thermotoga neapolitana* CBP B
T_mar_CBP: *Thermotoga maritima* CBP
C_YM4_CBP: *Clostridium thermocellum* YM4 CBP
C_the_CBP: *Clostridium thermocellum* CBP
C_ste_CBP: *Clostridium stercorarium* CBP
C_gil_CBP: *Cellvibrio gilvus* CBP
C_ste_CDP: *Clostridium stercorarium* CDP
V_pro_ChBP: *Vibrio proteolyticus* ChBP
V_fur_ChBP: *Vibrio furnissii* ChBP
C_the_CDP: *Clostridium thermocellum* CDP
C_YM4_CDP: *Clostridium thermocellum* YM4 CDP

- ▲触媒残基
- ▲基質認識に関与する残基
- △CgCBPとChBPの基質特異性の違いに関与すると思われる残基
- △リン酸の認識に関与する残基
- ▲CBPとCDPの特異性の違いに関与すると思われる残基