

本研究で使⽤したプログラムおよびURL

・糖質関連酵素のデータベース

CAZy (Carbohydrate Active enZymes) [1]
(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>)

・アミノ酸配列のアラインメント

ClustalW [2]
(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)

本研究の X 線結晶構造解析、および図の作成は以下のプログラムを使用した。

・X 線回折データ測定

DPS/Mosflm[3]、HKL2000[4]

・X 線回折データ処理

CCP4[5]、SOLVE/RESOLVE [6]、MOLREP[7]

・構造構築

ARP/wARP [8]、O[9]、XtalView [10]

・構造の精密化

CNS [11]

・非タンパク質分子のトポロジー

HIC-Up
(<http://xray.bmc.uu.se/hicup/>)

・構造評価

PROCHECK[12]

・構造比較

Dali[13]
(<http://www.ebi.ac.uk/dali/>)
MATRAS [14]
(<http://biunit.aist-nara.ac.jp/Matras/>)

・作図

DSSP[15]、ESPrpt[16]、LIGPLOT[17]、MOLSCRIPT[18]、Raster3D [19]、SPOCK[20]、Weblab Viewer

・ホモロジーモデリング

SWISS-MODEL[21]

(<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>)

・構造情報の登録

PDB (Protein Data Bank)

(<http://www.rcsb.org/pdb/>)

参考文献

1. Coutinho, P.M. and B. Henrissat, Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering" (Gilbert, H.J., Davies, G., Henrissat, B., and Svensson, B., eds). *The Royal Society of Chemistry, Cambridge*, 1999: p. 3-12.
2. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position- Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, 1994. **22**(22): p. 4673-4680.
3. Leslie, A.G.W., Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB newsletter on protein crystallography*, 1992. **26**.
4. Otwinowski, Z. and W. Minor, *Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode*, in *Macromolecular Crystallography, Pt A*. 1997. p. 307-326.
5. Bailey, S., The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 1994. **50**: p. 760-763.
6. Terwilliger, T.C. and J. Berendzen, Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 1999. **55**: p. 849-861.
7. Vagin, A. and A. Teplyakov, MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography*, 1997. **30**: p. 1022-1025.
8. Perrakis, A., R. Morris, and V.S. Lamzin, Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Structural Biology*, 1999. **6**(5): p. 458-463.
9. Jones, T.A., et al., Improved Methods for Building Protein Models in Electron-

- Density Maps and the Location of Errors in These Models. *Acta Crystallographica Section A*, 1991. **47**: p. 110-119.
10. McRee, D.E., XtalView Xfit - A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *Journal of Structural Biology*, 1999. **125**(2-3): p. 156-165.
 11. Brunger, A.T., et al., Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 1998. **54**: p. 905-921.
 12. Laskowski, R.A., et al., Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, 1993. **26**: p. 283-291.
 13. Holm, L. and C. Sander, Protein-Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices. *Journal of Molecular Biology*, 1993. **233**(1): p. 123-138.
 14. Kawabata, T. and K. Nishikawa, Protein structure comparison using the Markov transition model of evolution. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 2000. **41**(1): p. 108-122.
 15. Kabsch, W. and C. Sander, Dictionary of Protein Secondary Structure - Pattern-Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers*, 1983. **22**(12): p. 2577-2637.
 16. Gouet, P., et al., ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, 1999. **15**(4): p. 305-308.
 17. Wallace, A.C., R.A. Laskowski, and J.M. Thornton, Ligplot - a Program to Generate Schematic Diagrams of Protein Ligand Interactions. *Protein Engineering*, 1995. **8**(2): p. 127-134.
 18. Kraulis, P.J., Molscript - a Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, 1991. **24**: p. 946-950.
 19. Merritt, E.A. and D.J. Bacon, *Raster3D: Photorealistic molecular graphics*, in *Macromolecular Crystallography, Pt B*. 1997. p. 505-524.
 20. Christopher, J.A. and T.O. Baldwin, SPOCK: Real-time collaborative molecular modeling. *Journal of molecular Graphics and Modelling*, 1998. **16**: p. 285.
 21. Schwede, T., et al., SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(13): p. 3381-5.

謝辞

私の所属する酵素学研究室において、本研究の指導に当たってくださいました祥雲弘文教授に感謝いたします。私が当研究室に配属されたときから、このような研究の場とテーマを与えてくださいました若木高善助教授に感謝いたします。6年間の長きに渡り、いつも懇切丁寧に指導してくださいました伏信進矢助手に心から感謝いたします。

ビームラインアシスタントとして放射光施設で研究に従事する機会を与えてくださいました坂部知平・名誉教授に感謝いたします。高エネルギー加速器研究機構・SPring-8 におけるデータ測定で大変お世話になりました、若槻壮市教授、鈴木守・現大阪大助教授、五十嵐教之博士、松垣直宏博士、三浦圭子博士に感謝いたします。

A4- β -Gal の結晶構造解析は(株)よつ葉乳業の藤本(旧姓 大津)奈穂美氏、元島英雅氏、ならびに松澤洋・現青森大学教授との共同研究で行われました。また東京大学農学生命科学研究科の降旗一夫先生には ^1H NMR の測定で、産業技術総合研究所の長野希美博士には A4- β -Gal の立体構造の進化的考察に関して、大変お世話になりました。

ChBP ならびに CgCBP の結晶構造解析は、(独)食品総合研究所の林清博士、北岡本光博士、菑澤悟博士、本多裕司博士との共同研究で行われました。私はただ立体構造を解析したに過ぎませんが、先生方の 10 年にわたる詳細な機能解析の結果と御助言のおかげで、有意義な研究結果とすることができました。共同研究者の皆様に感謝いたします。

当研究室の偉大な先輩である今村博臣博士、伊藤創平博士、そして後輩の宮永顕正君には、研究に関して多くのサポートをいただきました。同期の中島将博君とは 7 年間、ともに研究に勤しんできましたが、彼の存在は私の研究そして人生に新鮮な驚きと発見をもたらしてくれました。園田智明君をはじめ後輩達には、鬱屈したストレスの発散先になってもらいました。心から感謝いたしております。そして謝りたいと思います。

最後に、私の長い学生生活を支え、研究に集中する環境を与えてくれた家族に感謝いたします。

2005 年 1 月

索引

英数字

- $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップ 43
4/7 スーパーファミリー 29
- A4- β -Gal** 27
-の活性測定 32
-の基質認識残基 57
-の金属結合部位 55
-の結晶化条件 37
-の三量体構造 54、100
-の触媒残基 56
-の諸性質の解析結果 49
-の単量体構造 54、101
-の発現・精製 30
-の反応機構 51
-のランダム変異 46、87
- ARP/wARP** 42
- BCB** 54、102
bGA 145、178
- CAZy** 8
CBP 190
CCP4 42
CDP 192
-の応用 194、234
- CE (炭水化物エステラーゼ)** 4、16
CgCBP 191
-の応用 193、231-233
-の基質特異性 191、224
-の基質認識残基 207、250
-の拮抗基質阻害 191、225
-の結晶化条件 197
-の単量体構造 204、242
-の二量体構造 204、241
- の発現・精製 196
-の反応スキーム
191、209、226、229
- ChBP** 130、164
-の応用 194、235
-の結晶化条件 134
-の基質特異性 192、224
-の基質認識残基 207、250
-の拮抗基質阻害 192、230
-の単量体構造 142、174
-の二量体構造 142、173
-の発現・精製 133
-の反応機構 146、182
-の反応スキーム 193
- Clan** 7
Clan GH-A 7、29、57
Clan GH-L 146、183
Clan GH-M 183
CtCBP の反応スキーム
191、209、227、229
CtCBP のホモロジーモデリング
209、254
- CNS** 43
CNS による精密化 44
- Disorder** 143
- EC- β -Gal** 26、102
ESR 35、94-95
- Fixer** 147
 $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップ 44
FOM (Figure Of Merit) 52

- GH (糖質加水分解酵素)** 3、13
 -の Clan 10
 -の構造 7、20
 -の反応機構 5、17-18
 -ファミリー 5
- GH-4** 150
GH-13 127、161
GH-42 28
GH-65 128
GH-94 130、190、218-222
GH-94 酵素のオリゴ糖合成能
 193、232-235
- GT (糖転移酵素)** 4、14
 -の Clan 12
 -の構造 7、21
 -の反応機構 5、17-18
 -ファミリー 5
- GT-4** 127
GT-35 128
GT-36 (GH-94) 130
- HCA** 28、80
- ICP 法** 34
- MAD 法** 38
MalP 128、178
- ONP-Gal** 26、78
- pArgW2** 31、82
pET28a-CBP 195、236
pET30b-ChBP 132、168
pEXM9 30、81
PL (多糖リアーゼ) 4、15
- Simulated annealing 法** 44
Sparse Matrix Screen 法 36
- Thermus thermophilus* A4** 27
TIM バレルフォールド 54
TmCBP の反応スキーム
 191、209、228-229
- XAFS** 41
X-Gal 26、78
- ア行**
 アカボース 146、179
 エネルギー精密化 44
 オイルバッチ法 48、83
 温度因子 44
- カ行**
 活性中心の形状と基質特異性の関係
 57、109
 β-ガラクトシダーゼ 26
 β-ガラクトシダーゼの工業利用 27
 加リン酸分解酵素 126、160
 加リン酸分解酵素による糖質合成
 193、232-235
 キチンの分解経路 165
 キトビオース 130
 グリコーゲンホスホリラーゼ
 126、128
 -の反応機構 162
 クレフト型活性中心部位 57、109
 結晶化の方法 83
 剛体近似精密化 44
- サ行**
 サブサイト 144
 シッティングドロップ法 83
 精密化
Simulated annealing 法 44

エネルギー精密化	44
温度因子の精密化	45
剛体近似精密化	44
セルロースの分解経路	223

タ行

大腸菌 β -ガラクトシダーゼ(EC- β -Gal)

26

多糖リアーゼ (PL) 4、15

多波長異常分散法(MAD法) 38

炭水化物エステラーゼ (CE) 4、16

糖質 2

-構造の多様性 2

-の合成 3、12

-の役割 2

糖質関連酵素 3

-の反応 5、17-18

-の構造 7

-の分類 9

糖質加水分解酵素 (GH) 3、13

糖転移酵素 (GT) 4、14

ハ行

ハンギングドロップ法 83

ヒストグラムマッチング 42

非結晶学的対称性の束縛 200

非対称単位 54

非対称単位中の分子数 203

分子置換法 199

ポケット型活性中心部位 57、109

マ行

マルトースホスホリラーゼ 128

ヤ行

溶媒平滑化 42