

第 1 章 GH-42 好熱性細菌 *Thermus thermophilus* A4 由来  
耐熱性 $\beta$ -ガラクトシダーゼの X 線結晶構造解析

## 1-1 序

### 1-1-1 $\beta$ -ガラクトシダーゼ

$\beta$ -ガラクトシダーゼ(EC3.2.1.23)は図 1-1 に示すラクトース(Gal- $\beta$ 1,4-Glc)、発色基質 *o*-ニトロフェニル $\beta$ -ガラクトピラノシド(以下 ONP-Gal)、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド(以下 X-Gal)など、 $\beta$ -1,4 ガラクトシド化合物を加水分解する酵素である。細菌から高等動植物にいたるまで多くの生物が $\beta$ -ガラクトシダーゼを有している。CAZy では GH-1、GH-2、GH-35、GH-42 の4つのファミリーに見られる(表 1-1)。

GH-1 は $\beta$ -ガラクトシダーゼをはじめ $\beta$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -マンノシダーゼなど多種の $\beta$ -グリコシド結合を加水分解する酵素が分類されている。 $\beta$ -ガラクトシダーゼは古細菌 *Sulfolobus* 属、*Pyrococcus* 属由来のものが分類されている。GH-1 の立体構造は *Sulfolobus solfataricus* 由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼなどが明らかになっており[1]、その触媒ドメインは TIM バレルフォールドである(TIM バレルフォールドの説明は 1-16 節)。GH-1 の反応は、加水分解の前後でアノマーが保持される保持型機構を取る。

GH-2 は大腸菌をはじめとする細菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼが分類されている。大腸菌由来 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(以下 EC- $\beta$ -Gal)の諸性質については 1-1-2 節に記述する。

GH-35 は細菌から動植物まで多くの生物を由来とする $\beta$ -ガラクトシダーゼが分類される。ヒト由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼも分類されており、これはガングリオシド蓄積症という重篤な症状に関わる酵素であることが知られている。GH-35 酵素の加水分解反応は、アノマーの反転を伴わない保持型機構を取る。2004 年に GH-35 では初めて *Penicillium* 由来 $\beta$ -ガラクトシダーゼの立体構造が明らかになった。その触媒ドメインは TIM バレルフォールドである[2]。

GH-42 については 1-1-6 節に記述する。

### 1-1-2 大腸菌由来 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(EC- $\beta$ -Gal)

$\beta$ -ガラクトシダーゼの中で最も詳細に研究されているのは大腸菌由来のものである。EC- $\beta$ -Gal は大腸菌のラクトースオペロンを形成する *lacZ* の遺伝子産物として知られる。EC- $\beta$ -Gal の活性型は 1023 残基の同一サブユニット 4 つからなる四量体を形成しており、サブユニット間に協同性やアロステリック効果は見られないが、二量体に解離すると失活する。また活性の発現に  $Mg^{2+}$ 、 $Na^{+}$  を必要とする。 $\beta$ -1,4 ガラクトシド結合加水分解活性に加え、アロラクトース(Gal- $\beta$ 1,6-Glc)合成活性を有しており、その触媒残基は部位特異的変異を用いた研究から Glu461、Glu537 の二つのグルタミン酸残基であることが明らかになっ

ている[3, 4]。その反応機構は、反応の前後でアノマーの反転を伴わない保持型機構である。

1994年にJacobsonらにより初めて結晶構造(2.5 Å)が明らかになり[5]、EC- $\beta$ -Galが5つのドメイン構造からなること、触媒残基(Glu461、Glu537)がTIMバレルフォールドを持つドメインにあることが明らかになった。その後高分解能構造(1.7 Å)[6]、基質、反応中間体アナログ、反応生成物の複合体構造が明らかになり[7]、詳細な構造機能相関の知見が得られている。

### 1-1-3 EC- $\beta$ -Galの生化学利用

EC- $\beta$ -Galは生化学の分野で最も利用価値の高い酵素の一つである。その主な利用方法は発色基質であるONP-GalやX-Galの加水分解活性を用いるものである。X-Galを含む固体培地に菌を植えると、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現するコロニーはX-Galを分解し5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル基が析出するため、青色を呈する。この青色を標識としてコロニーの選択が可能になる。菌体やプラスミドの $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子部分に他の遺伝子を組み込み、目的遺伝子の挿入の有無を確認する時などに用いられる。

### 1-1-4 $\beta$ -ガラクトシダーゼの工業利用

$\beta$ -ガラクトシダーゼは主に乳業の分野で工業利用されている。牛乳中に多く含まれるラクトースに対する加水分解活性から乳製品の加工に利用されており、低ラクトース牛乳の生産や、チーズ生産の副産物であるチーズホエイ(主成分はラクトース)分解によるシロップ生産などに用いられている。

工業利用において、耐熱性を有する酵素は、微生物の繁殖しにくい高温条件下で連続反応が可能であるため、衛生的にも経済的にも非常に有用である。そのため、耐熱性の $\beta$ -ガラクトシダーゼの探索と固定化が試みられてきた。

### 1-1-5 *Thermus thermophilus* A4由来 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(A4- $\beta$ -Gal)

*Thermus thermophilus* A4は、静岡県熱川温泉より単離された好気性細菌である。至適生育温度は約70°C、グラム陰性の桿菌という外見的特徴から*Thermus*属に分類され、後に16SrRNAの解析により*Thermus thermophilus* A4として同定された。

*T. thermophilus* A4由来 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(以下A4- $\beta$ -Gal)は、70°Cで20時間以上安定であり、高い耐熱性・好熱性を示す(図1-2)。A4- $\beta$ -Galのアミノ酸配列は大津らにより決定され[8](Genebank Number D85027;登録名は*Thermus* sp A4)、酵素学的性質について報告されている。A4- $\beta$ -Galは645アミノ酸残基か

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

らなる。A4- $\beta$ -Gal と EC- $\beta$ -Gal の諸性質の対比を表 1-2 に示す。A4- $\beta$ -Gal と EC- $\beta$ -Gal はアミノ酸配列に相同性はなく、至適温度に大きな差が見られる。

A4- $\beta$ -Gal はガラクトシドに対する特異性が高いが、その  $K_m$  は ONP-Gal に対して 5.9 mM、ラクトースに対して 19 mM と高く、A4- $\beta$ -Gal が実際に菌体内で糖質分解酵素として働いているのかについては不明である[8]。

### 1-1-6 GH-42

A4- $\beta$ -Gal はアミノ酸配列の相同性より GH-42 に分類される。GH-42 は Henrissat らにより、*Bacillus Stearothermophilus* を由来とする $\beta$ -ガラクトシダーゼが分類され、以後アミノ酸配列の相同性を有する酵素が分類されている。2004年12月現在、56の $\beta$ -ガラクトシダーゼおよび類似配列を持つ Open Reading Frame が分類されている (表 1-3; [http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/GH\\_42.html](http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/GH_42.html))。 *T. thermophilus* A4 や *Thermotoga maritima* [9]などの好熱菌、好塩菌 *Haloferax alicantei* [10]、低温菌 *Arthrobacter* sp. Strain B7 [11]や *Carnobacterium piscicola* BA [12]、胞子を形成する *Bacillus* 属や *Clostridium perfringens* [13]のように、極限環境に生育する微生物を由来とする $\beta$ -ガラクトシダーゼが分類されており、それぞれが生育する極限環境条件下で働く。いずれの酵素も 600~700 残基から成る。

GH-42 の反応は加水分解反応の前後でアノマー保持型、反転型であるのか不明である。また、EC- $\beta$ -Gal (GH-2)は活性の発現に  $Mg^{2+}$ 、 $Na^+$ を必要とするが、GH-42 酵素は必要としないことから、GH-42 は GH-2 と異なる活性中心部位の構造を有すると考えられる。

EC- $\beta$ -Gal は X-Gal に対する加水分解活性から、リポーターシステムとして利用されてきたが、EC- $\beta$ -Gal が失活する高熱、高塩濃度環境下では利用することは不可能であった。近年、GH-42 酵素である *Bacillus stearothermophilus* や *Haloferax alicantei* の $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いた異常環境下のリポーターシステムが構築されている[10, 14]。

### 1-1-7 GH-42 の構造予測

糖加水分解酵素は HCA (Hydrophobic Cluster Analysis)により構造が予測されている。

#### HCA

図 1-3 に示すようにアミノ酸配列を 4 残基ずつずらして並べ、疎水性残基をマークする。マークが横に並ぶ領域は、疎水性残基が 3~4 残基ごとに繰り返し存在していることを表し、 $\alpha$ -ヘリックスの二次構造を形成している可能性が高いことを表す。また、マークが縦に並ぶ領域は、 $\beta$ -構造の可能性が高いことを表す。

HCAにより、GH-42は触媒ドメインとしてTIMバレルフォールドを持つことが予測された[15]。また、GH-42内で高度に保存された2つのグルタミン酸残基が、 $\beta$ バレルを形成する4番目と7番目の $\beta$ シートのC末端部分に存在し(A4- $\beta$ -Galではこれらの残基はGlu141とGlu312に相当)、これらが触媒残基と予測された。この特徴から、GH-42はClan GH-Aに属すると考えられている。

Clan GH-AはGH-5、10、17、26など17のファミリーが属しており、GHの中で最大のclanである。アノマー保持型の反応機構を取り、 $\beta$ -グリコシド結合に作用する。その立体構造は、触媒ドメインとしてTIMバレルフォールドを持ち、触媒残基が4番目と7番目の $\beta$ -シートのC末端部分にあるグルタミン酸であるという共通点があり、4/7スーパーファミリーとも呼ばれる。 $\beta$ -ガラクトシダーゼが含まれているGH-1、GH-2、GH-35はX線結晶構造解析の結果から、いずれもClan GH-Aに分類されている。

#### 1-1-8 本研究の目的

GH-42の立体構造は予測されているものの、実際の構造は未知である。またGH-42の酵素は、ゲノムプロジェクトでアミノ酸配列の一次構造のみが明らかになっているものも多く(e.g. *Yersinia pestis* [16])、機能と構造に関して詳細な知見は得られていない。

A4- $\beta$ -Galはラクトース分解活性と高い耐熱性から特に乳業での実用化が期待される酵素であり、タンパク質工学的手法を用いた生産性・安定性の向上のためには立体構造は必要不可欠な情報である。また、GH-42には様々な極限環境下で働く酵素が分類されているため、その立体構造の解明は、タンパク質の耐熱・耐塩機構に関して構造的基盤を与えることが期待されている。

本章では、まずA4- $\beta$ -Galがアノマー反転型、保持型どちらの酵素であるかを決定するため、 $^1\text{H NMR}$ を用いて反応生成物のアノマーの測定を行った。そして、A4- $\beta$ -Galの耐熱機構および反応特異性の解明、およびGH-42と他の糖質関連酵素との分子進化的関連に関する構造基盤を得ることを目的としてX線結晶構造解析を行った。

## 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

吸光光度計は UVIDEC-320、V-550(以上 JASCO)、DU-7400(BECKMAN)を使用した。恒温条件下で吸光度を測定する場合は、恒温槽からの循環水を利用して温度を制御した。V-550 では付属の温度制御装置を用いた。超音波破碎機は SONIFIER 2500(BRANSON)を使用した。

### 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。

## 1-2 A4- $\beta$ -Gal の大腸菌を用いた大量発現と精製

### 目的

本研究の目的である X 線結晶構造解析では、タンパク質の結晶化のために、高純度で大量のタンパク質が必要となる。本研究の研究対象である A4- $\beta$ -Gal は、大津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構築されており、これを用いて大腸菌を用いた大量発現と精製系の構築を行った。

### 発現ベクター

本研究で用いた A4- $\beta$ -Gal 発現ベクター pEXM9 は pKK223-3 (Amersham) のマルチクローニングサイトに、*EcoRI*、*PstI* で切り出された A4- $\beta$ -Gal の遺伝子 (1935 b.p.) を組み込んだものである (図 1-4)。アンピシリン耐性遺伝子を持つため、pEXM9 を組み込んだ大腸菌を培養する場合は、アンピシリンを添加した。pEXM9 はよつ薬乳業株式会社の大津らにより作成されたものを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。培養は大量培養を除き、試験管で行った。培地に抗生物質を添加する場合、アンピシリンは 100  $\mu$ g/ml、カナマイシンは 20  $\mu$ g/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。

### **宿主菌株**

A4-β-Gal 発現の宿主菌株は JM105 株を用いた。また、A4-β-Gal 遺伝子は 大腸菌におけるアルギニンのマイナーコドンである AGG を 1.6%含むため(大腸菌では 0.15%)、tRNA<sub>AGG</sub> を共発現することで発現量の向上が見られた。そこで プラスミド pArgW2 を組み込み、tRNA<sub>AGG</sub> を共発現した[17]。

pArgW2 (図 1-5) は当研究室の今村博臣氏が作成されたものを提供して いただいた。pArgW2 はカナマイシン耐性遺伝子を持っており、pArgW2 を含む 大腸菌を培養する場合はカナマイシンを添加した。

### **組換え大腸菌の大量培養**

- ① 大腸菌 JM105 株に発現ベクター pEXM9 を形質転換。
- ② ①で作成した組換え大腸菌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。
- ③ 10 ml を 1 liter LB 培地に植菌し本培養開始。培地は 500 ml 容坂口フラスコに 200 ml 入れたものを 5 本使用。本培養開始時に終濃度 50 μM の IPTG を添加。 また、A4-β-Gal は金属を結合しているため(後述)、14 mg/l の FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1 mg/l の ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 金属溶液、および消泡剤 200 μl 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。

### **A4-β-Gal の精製**

- ① 大量培養した組換え大腸菌体を 40 ml の緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mM EDTA)に懸濁し氷冷しながら超音波破碎。出力レベルは 10、Duty 50 %、Pulse 1 秒で 10 分間。
- ② ①を 80°C、30 分間熱処理。熱処理は水槽式インキュベーターで行った。
- ③ ②を 15000 rpm、10 分間遠心。上清の可溶性画分を MILLEX-GP 0.45 μm Filter Unit を用いて微粒子を除去し、粗酵素液とした。

### **・DEAE Sepharose カラム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。

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

- ① DEAE Sepharose Fast Flow のレジンを 20 ml を XK-16/20 カラム(Amersham)に充填し、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)で平衡化。
- ② 熱処理した粗酵素液を①に添加し、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)で非吸着画分を溶出。
- ③ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 0.4 M NaCl を用いて吸着画分を溶出。

### ・MonoQ カラムクロマトグラフィー

以降の精製の制御には FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography)システム (Amersham)を用いた

- ① DEAE Sepharose カラムクロマトグラフィーで分離した吸着画分を、脱塩のため 100 倍量の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)に対して透析。透析後、MILLEX-GP 0.22  $\mu$ m Filter Unit を用いて微粒子を除去。
- ② 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)で平衡化した MonoQ 10/10 に①を添加。
- ③ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)から 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) + 0.4 M NaCl へ、pH と塩濃度のリニアグラジエント法で溶出。

### ・ゲル濾過カラムクロマトグラフィー

- ① Hiload 26/20 Superdex 200 prep grade を、50 mM Tris-HCl (pH 7.0) + 0.15 M NaCl で平衡化。
- ② MonoQ カラムクロマトグラフィーにより分離した画分のうち $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有する画分を、MILLEX-GP 0.22  $\mu$ m Filter Unit を用いて微粒子を除去。
- ③ ②を①に添加し、50 mM Tris-HCl (pH 7.0) + 0.15 M NaCl で溶出。
- ④ フラクシオンを 5 mM Tris-HCl (pH 7.0)に対して透析し、CENTRIPREP-30 (MILLIPORE)を用いて濃縮。

### A4- $\beta$ -Gal の活性測定法

活性測定用反応液の組成: 50 mM MES Buffer pH 6.5、2.8 mM ONP-Gal。

- ① 活性測定用反応液 500  $\mu$ l をキュベット (SARSTEDT)に分注し、パラフィル



ム (American National Can™)で密閉。

- ② ①を 71°C の恒温槽に入れ 10 分間プレインキュベート。
- ③ 温度が 64°C に保たれている分光光度計内に②のキュベットを設置。
- ④ 1 分後、キュベットは設置したままパラフィルムをはずし、酵素液 10  $\mu$ l (0.3 ~ 1.0 mg/ml)添加、ピペットで混合。
- ⑤ 波長 405 nm における吸光度の増加を測定。ONP-Gal のモル吸光係数は、2.26  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (pH 6.5)を用いた。

### タンパク質の定量

タンパク質の定量には Brad-Ford 法に基づいた Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いた。標準タンパク質として Bovine Gamma Globulin を用いた。

### 1-3 A4- $\beta$ -Gal の諸性質の解析

#### 目的

A4- $\beta$ -Gal の基本的な性質は、*Thermus thermophilus* A4 株で発現しているもの(野生型 A4- $\beta$ -Gal)について解析、報告されている[8]。本節では大腸菌を用いて発現した組換え A4- $\beta$ -Gal について、その諸性質を調べた。

#### 分子量測定

野生型 A4- $\beta$ -Gal は SDS-PAGE による分子量約 75 kDa、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる分子量約 85 kDa と見積もられたことから、溶液中で単量体構造をとっていると報告された[8]。組換え A4- $\beta$ -Gal も SDS-PAGE による分子量は約 75 kDa と見積もられ、野生型の結果と一致した。ここでは、Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech.)を用いて組換え型 A4- $\beta$ -Gal の分子量測定を行った。

カラムクロマトグラフィーの制御は FPLC を利用し、室温で行った。タンパク質の検出は 280 nm の吸光を用いた。分子量のマーカーとして MW-GF-1000 Kit (Sigma)から、Thyroglobulin (669 kDa)、Apo ferritin (443 kDa)、 $\beta$ -Amylase (200 kDa)、Bovine Serum Albumin (66 kDa)、Carbonic Anhydrase (29 kDa)を用いた。

- ① Superdex 200 HR 10/30 カラムを 100 mM Tris-HCl (pH 7.0) + 0.15 M NaCl (緩衝液 A)で平衡化。

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

- ② 精製・濃縮した A4- $\beta$ -Gal を緩衝液 A で濃度 1.7 mg/ml に希釈。
- ③ ②200  $\mu$ l を①に添加し、保持時間を測定。

### ・動力学的パラメーター

野生型と組換え型の A4- $\beta$ -Gal では四次構造に違いがあることが確認されたことから、酵素の動力学的パラメーターにも違いがあると考え、組換え型 A4- $\beta$ -Gal の ONP-Gal に対する  $K_m$  および  $k_{cat}$  を測定した。

- ① 活性測定法は 1-2 節の方法に従ったが、大津らの実験に合わせるため、反応温度は 70°C で行った。基質 ONP-Gal の濃度は 1 mM から 10 mM まで変化させた。A4- $\beta$ -Gal は 5 mM Tris-HCl (pH 7.0) を用いて希釈し、濃度 0.4 mg/ml とした。
- ② 各基質濃度  $[S]_0$  における反応速度  $[v]$  から、 $[S]_0/v \sim [S]_0$  の線形プロットを作成し  $K_m$  および  $k_{cat}$  を算出した。

### ・吸収スペクトル

組換え型 A4- $\beta$ -Gal は高濃度 (20 mg/ml 以上) になると赤色を呈した。この赤色の原因を調べるため、極大吸収を示す波長を調べ、吸光度の濃度依存性について調べた。

- ① A4- $\beta$ -Gal を 5 mM Tris-HCl (pH 7.0) を用いて希釈し、10、20、30、40、50 mg/ml に調製。
- ② 波長 300 nm ~ 550 nm の吸光度を測定。

### ・ICP 法による金属定量

吸収スペクトルの結果や、A4- $\beta$ -Gal の活性発現のため特定の補酵素を必要としないことから、赤色の原因を A4- $\beta$ -Gal に結合した金属であると考え、ICP 法による金属定量を行った。

#### ICP (Inductive Coupled Plasma) 法

誘導プラズマ中に噴霧した金属溶液の発光を測定する方法で、各原子特有の波長の発光を計測し、微量金属の検出および定量を行うものである。

ICP の測定は SPS 1200VR plasma spectrometer (Seiko) で行った。

- ① 濃度 43 mg/ml の A4-β-Gal およびその透析外液をそれぞれ 50 μl ずつ 1.5 ml 容チューブ (Bio-Bik)に分注。
- ② ①をチューブの蓋を開けた状態で、Dry Thermo Unit DTU-28 上で乾燥 (80°C)。
- ③ それぞれのチューブに 1 M HNO<sub>3</sub> を 30 μl 分注して蓋をし、80°C で一夜反応。
- ④ 蓋を開けた状態で、80°C で乾固。
- ⑤ それぞれのチューブに 0.1 M HNO<sub>3</sub> を 1 ml 分注し懸濁した後、10000 rpm、1 分間遠心して上清を回収し測定サンプルとした。
- ⑥ 測定は Ca、Mn、Mg、Co、Ni、Zn、Fe について行った。検量線は 0.1 M HNO<sub>3</sub> の 0 点、各金属溶液の標準液を用いて測定した 1 ppm 点の 2 点から作成した。検出量は、A4-β-Gal の測定値から透析外液の値を差し引いたものとした。

#### ・ESR 測定

ICP の結果から、A4-β-Gal は亜鉛または鉄を含むことが示唆された。鉄に関しては、ESR を測定することでタンパク質中の鉄原子の存在状態を調べることができる。

#### ESR (Electron Spin Resonance)

電子スピン共鳴と呼ばれる。電子は、電荷共に、スピン角運動量を持つがため磁気双極子を伴うことになる。従って、自由な電子を磁場中におくと、その磁気双極子が磁場に平行か反平行かで電子の持つエネルギーが違ってくる。このエネルギーの差に相当するエネルギーを持つ電磁波を照射すると、電子が電磁波を吸収して、共鳴現象が観測される。この時、電子が回りの微視的な環境の影響を受けて、共鳴の条件が変わってくる。従って共鳴吸収が起きるときの、磁場の強さ・電磁波の周波数・共鳴の大きさ・幅を調べることで、電子の回りの微視的な環境について知ることができる。

ESR 測定は日本電子株式会社に依頼した。

### 1-4 A4-β-Gal の反応機構の同定

#### 目的

GH 酵素との構造的、進化的な相関関係を調べるためには、A4-β-Gal の加

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

水分解反応がアノマー反転型であるのか、保持型であるのかを決定することは重要である。A4- $\beta$ -Gal の反応機構を特定するため、A4- $\beta$ -Gal の分解産物のアノマーを  $^1\text{H NMR}$  を用いて測定した。

### 方法

- ① 終濃度 10 mM となるように ONP-Gal を  $\text{D}_2\text{O}$  に溶解(反応系に水分子やフリーなプロトンが存在すると、 $^1\text{H NMR}$  のノイズとなるので、緩衝液は用いない)。この時 ONP-Gal 溶液の pD は約 7.5 である。
- ② ①600  $\mu\text{l}$  に対し精製酵素液(10 mg/ml)を 5  $\mu\text{l}$  添加し、NMR 測定用のキャピラリーに入れ、50°C で反応を開始。開始後 0、5、10、15、40 分に  $^1\text{H NMR}$  を測定。 $^1\text{H NMR}$  の測定は JNM-A500 スペクトロメーター(JEOL)500 MHz で行った。

### 1-5 A4- $\beta$ -Gal の結晶化条件の探索

#### 目的

A4- $\beta$ -Gal の結晶化条件を探索するために、Crystal Screening Kit 1、2 (Hampton Research) を用いて Sparse Matrix Screen 法による結晶化のスクリーニングを行った。また、リン酸緩衝液の pH および濃度による Quick Screening Kit (Hampton Research)、沈殿剤と塩濃度の組み合わせによる PEG/ION Screening Kit (Hampton Research) を用いた。

#### **Sparse Matrix Screen 法**

多くのタンパク質の結晶化条件として報告されている緩衝液、塩、沈殿剤の組成を元にしたスクリーニング法である。

結晶化条件の探索は CrystalClear Strips (Hampton Research)を用い、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。シッティングドロップ法の概念を図 1-6 に示す。

#### 方法

- ① 精製・濃縮した A4- $\beta$ -Gal を 5 mM Tris HCl (pH 7.0)を用いて希釈し、5 mg/ml に調製。
- ② CrystalClear Strips に Crystal Screen Kit の各溶液を 80  $\mu\text{l}$  分注し、リザーバー溶液とした。

- ③ CrystalClear Strips のウェルで、①で調製した A4- $\beta$ -Gal 溶液 2 $\mu$ l、リザーバー溶液 2  $\mu$ l を混合。
- ④ Crystal Clear Sealing Tape (Hampton Research) を用いて CrystalClear Strips を密閉。
- ⑤ 4°C、15°C、25°C に静置。
- ⑥ A4- $\beta$ -Gal 溶液とリザーバー溶液を混合時に沈殿を生じたもの、または一両日中に沈殿を生じたウェルについて、リザーバー溶液を MilliQ 水で 2 倍、4 倍に希釈しドロップを作成した。

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。

#### **A4- $\beta$ -Gal の結晶化条件**

**結晶化の方法:** ハンギングドロップ蒸気拡散法(図 1-6)

**結晶化溶液の組成:** 0.2 M 酢酸ナトリウム、20~25%(w/v) ポリエチレングリコール(PEG)8000、0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)

**温度:** 25°C

**ドロップ作成法:**

- ① VDX プレート(Hampton Research)に結晶化溶液を 1 ml 分注。蒸気拡散速度を調節するために、結晶化溶液は Al's oil(Hampton Research) 500  $\mu$ l で覆う。
- ② 3 mg/ml の A4- $\beta$ -Gal 溶液 20  $\mu$ l と結晶化溶液 10  $\mu$ l を混合し、カバーガラスに載せて VDX プレートにセット。

**日数:** 約 1 週間

### 1-6 A4- $\beta$ -Gal セレノメチオニン置換体の作成

#### **目的**

A4- $\beta$ -Gal は、アミノ酸配列に相同性のあるタンパク質について立体構造の情報がないため、X 線結晶構造解析を行うために、X 線の初期位相を決定する必要があった。本研究では、A4- $\beta$ -Gal のセレノメチオニン置換体を用いた多波長異常分散法 (MAD 法) による位相を決定し、構造解析を行った。

**多波長異常分散法(Multiple Wavelength Anomalous Dispersion method; MAD 法)**

タンパク質の結晶に X 線を照射したときに得られる回折像は 1-1 式で表される。

$$F(hkl) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(xyz) \times \exp[2\pi i(hx + ky + lz)] dx dy dz \quad (1-1)$$

ここで  $F$  は構造因子、 $V$  は結晶の単位胞の体積、 $\rho$  は結晶中の点  $(xyz)$  の電子密度、 $\exp$  成分は位相角である。回折像として得られる反射強度  $I(hkl)$  は  $F(hkl)$  の 2 乗に比例する。

測定された  $F(hkl)$  に対し結晶中の各点  $(xyz)$  における電子密度  $\rho(xyz)$  は、 $F(hkl)$  のフーリエ変換として表される。

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

1-2 式右辺の  $F(hkl)$  は回折像から求めることができるが、 $i\alpha(hkl)$  は X 線の位相成分であり、回折像から直接求めることはできない。そのため X 線結晶構造解析では X 線の位相を決定する必要がある。

タンパク質結晶における位相決定法には分子置換法、重原子置換体を用いた多重同形置換法、原子の異常分散効果を利用した多波長異常分散法などがあり、新規構造に対しては多重同形置換法、多波長異常分散法が用いられる。本研究では、多波長異常分散法による位相決定を試みた。

1-1 式で表される  $hkl$  の反射に対し、反対の位相角  $-2\pi(hx + ky + lz)$  を持つものは

$$F(\overline{hkl}) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(xyz) \times \exp[2\pi i(-hx - ky - lz)] dx dy dz \quad (1-3)$$

で表される。一般に  $|F(hkl)| = |F(\overline{hkl})|$  である (図 1-7)。しかし、タンパク質結晶中に特定の原子を含む場合、その原子にある波長の X 線を照射すると  $|F(hkl)| \neq |F(\overline{hkl})|$  となる(異常分散)。この異常分散効果を利用し、X 線の位相を決定することができる [18]。

波長可変のシンクロトロン放射光施設では、1 Å 付近の波長の X 線が利用できる。そのため、1 Å 付近の波長で異常分散効果の大きな原子をタンパク質中に取り込むことは、MAD 法による位相決定に有効である。

セレン(元素記号 Se ; 原子番号 34)は、周期表では S 原子の 1 周期下に位置する原子で、0.979 Å 付近の波長で大きな異常分散効果がある。Se は、S 原子の代わりに Se 原子を持つセレノメチオニンの形でタンパク質中に取り込むことが容易であり、近年セレノメチオニン置換体タンパク質の MAD 法による構造解析が多く報告されている。

一般にセレノメチオニンタンパク質を用いて MAD 法により位相を決定する場合、十分な異常分散効果を得るためには 14 kDa に 1 個の Se が必要であると言われている[19]。また逆に、セレンの数が多すぎる場合には、精密化するパラメーターの数が等比級数的に増加するため、解析が困難になる。A4- $\beta$ -Gal の場合、645 残基(約 75 kDa)中に 7 個のメチオニンが含まれるため、セレノメチオニン置換体を用いた構造解析に適している。

以下、セレノメチオニン置換体 A4- $\beta$ -Gal に対し、置換していないものを Native A4- $\beta$ -Gal と表記する。

#### **A4- $\beta$ -Gal セレノメチオニン置換体の作成**

タンパク質のセレノメチオニン置換体の作成は、菌体自身でメチオニンを合成することのできないメチオニン要求性の*E. coli*菌株を、セレノメチオニンを含む最少培地で培養して行う。この方法では、メチオニン要求性の菌株にタンパク質発現用のプラスミドを形質転換する必要がある。

#### **・*E. coli* B834 DE3 (pEXM9、pArgW2)株を用いた発現**

A4- $\beta$ -Gal の発現用プラスミド pEXM9 および tRNA<sub>AGG</sub> 発現用のプラスミド pArgW2 を、メチオニン要求性である *E. coli* B834 DE3 株に形質転換した菌株を用いた。

- ① グリセロールストックより、50 ml の LB 培地 (+ アンピシリン 100  $\mu$ g/ml、カナマイシン 20  $\mu$ g/ml) に植菌 (200 ml 容坂口フラスコ)。この時、*tac* プロモーターによる A4- $\beta$ -Gal の発現を抑えるため、LB 培地中に終濃度 1 mM のグルコースを添加した。
- ② 37°C、8 時間の振盪培養の後、5000 rpm、10 分間の遠心で集菌。

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

- ③ A 培地 (表 1-4 ; (-)セレノメチオニン) で菌を洗浄し、LB 培地を除去。
- ④ 5000 x g、10 分間の遠心で集菌。
- ⑤ ④を、1 liter の A 培地 (+ アンピシリン 100  $\mu$ g/ml、カナマイシン 20  $\mu$ g/ml、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  14 mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mg/l) に植菌し、37°C、3 時間振盪培養。
- ⑥ 終濃度 100  $\mu$ M の IPTG を添加。
- ⑦ 37°C、15 時間の培養の後、5000 x g、10 分間の遠心で集菌 (湿潤重量 7.8 g)。

### ・A4- $\beta$ -Gal セレノメチオニン置換体の精製

セレノメチオニン置換体の精製は、1-2 節で示した Native A4- $\beta$ -Gal の精製法に従った。

### 1-7 X 線回折データ測定

#### 目的

1-5 節で得られた結晶 (図 1-8) 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、抗凍結剤としてメチルペンタンジオール(MPD)を含む結晶化溶液に結晶を回収した後、データ測定を行った。

#### 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  $\mu$ 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 MPD を加えたものに結晶を移動。抗凍結剤濃度はステップワイズ法により 5%ずつ上昇させ、終濃度 15%(w/v) とした。
- ③ 結晶をクライオループ (Hampton Research) にマウントし、100 K の  $\text{N}_2$  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 BL6A および BL18B、SPring-8(兵庫県佐用郡)の実験ステーション BL-40B2 を利用して結晶に X 線を照射し、回折イメージを測定。

### 1-8 初期構造の決定

データ処理、電子密度マップの表示、精密化計算はグラフィックワークステーション O2 (日本 SGI、OS: IRIX) または PC/AT 互換機 (EPSON Direct 製、OS: LINUX)で行った。

#### A4-β-Gal セレノメチオニン置換体の MAD 測定

セレノメチオニン置換体 A4-β-Gal の回折データ測定は、KEK-PF BL18B で行った。KEK-PF は 2.5 GeV 陽子蓄積リングを有しており、光源は偏光電磁石を利用している。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 4R を用いた。

#### 方法

- ① クライオーループに A4-β-Gal セレノメチオニン置換体溶液 10 mg/ml をのせ、100 K の N<sub>2</sub> ストリーム中にマウントし、0.9790 ~ 0.9800 Å の連続した波長の X 線を照射。イオンチャンバーを用いて XAFS を測定し、異常分散効果の最も大きい波長から MAD データの測定波長を決定。

#### XAFS (X-ray Absorption Fine Structure)

X 線を吸収した原子から放出される光電子が近傍のほかの原子に散乱されて生じる干渉。本研究の場合、セレン原子の特性 X 線の波長付近の X 線を照射することで散乱が起こり、散乱光をイオンチャンバーで測定し、異常分散効果の最も大きな波長を決定する。図 1-9 に示すように MAD 測定で用いる Peak、Edge の波長は非常に近く、また実験装置やタンパク質内のセレンの存在状態により異なる場合があるので、溶液状態の A4-β-Gal の XAFS を測定して MAD の測定波長を決定した。

- ② 異なる 3 波長 (Peak 0.9795 Å、Edge 0.97972 Å、Remote 0.96000 Å) の X 線をセレノメチオニン置換体結晶に照射し MAD データを測定。セレノメチオニン置換体結晶は 1-5 節の条件で Native A4-β-Gal と同様に行った。
- ③ プログラム DPS/Mosflm[20] を用いて回折斑点の指数付け、積分計算、スケーリング (CCP4 SCALA)[21]。プログラムの入力値はデフォルトの値を用いたが、スケーリングの段階で Anomalous の強度は区別して行った。

**CCP4** 結晶構造解析関連プログラム総合パッケージの名称である。

### **MAD データを用いた位相決定**

- ① 処理したデータは積分強度  $I(hkl)$  であるが、1-2 式に表したように電子密度の経産のためには構造因子の値が必要である。積分強度  $I(hkl)$  を構造因子  $F(hkl)$  に変換するため、測定データをプログラム TRUNCATE (CCP4) を用いて積分強度  $I(hkl)$  を構造因子  $F(hkl)$  に変換した。TRUNCATE では異常分散を分離して処理。
- ② プログラム CAD (CCP4) を用い、①で変換した3つのデータを一つに統合。
- ③ プログラム SOLVE [22]を用いて X 線の位相角を決定。SOLVE の入力スクリプトを表 1-5 に示した。
- ④ プログラム DM (CCP4)を用いて溶媒平滑化、ヒストグラムマッチングを行い、位相を改善。

### **溶媒平滑化**

タンパク質結晶中の溶媒領域のピークをノイズと見なし位相を改善する方法で、電子密度マップが改善する方法である。

### **ヒストグラムマッチング**

不明瞭な像の分布を標準的な像の分布に尺度を合わせる方法で、溶媒平滑化と合わせることで位相改善に有効であることが示唆されている[23]。

### **ARP/wARP を用いたモデル構築**

2.3 Å 以上の高分解能の電子密度マップでは、ペプチド鎖を構成する原子が鮮明に区別できるため、プログラムによる主鎖構造構築の自動化が可能である。プログラム ARP/wARP[24]は、電子密度のピークに対してタンパク質の主鎖構造 (N-C $\alpha$ -C=O) および水分子を当てはめて精密化を行い、自動的に構造を構築するプログラムである。

測定した MAD データは分解能 2.0 Å であったため、プログラム ARP/wARP によるモデル構築を試みた。

- ① MAD 測定した3つのデータのうち、Remote の波長 (0.96000 Å)で測定したデータの構造因子と、プログラム DM により改善した位相情報を利用し、プログラム ARP/wARP により主鎖構築を行った。ARP/wARP は  $R_{\text{free}}$  値を無視し

て精密化を行う FAST モードで行った。

② プログラム ARP/wARP の side\_dock.sh で側鎖を構築。

### 1-9 Native A4-β-Gal の構造解析

1-8 節では、A4-β-Gal セレノメチオニン置換体について構造解析を行い、初期構造を得た。本節では、Native A4-β-Gal 結晶を用いて高分解能のデータを測定し、構造の精密化を試みた。

#### Native A4-β-Gal の回折データ測定

1-5 節で得た Native A4-β-Gal 結晶について、SPring-8 (兵庫県)の実験ステーション BL-40B2 で回折データ測定を行った。SPring-8 は 8 GeV の陽子蓄積リングを有しており、光源は偏光電磁石を利用している。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 4R を用いた。

測定データの処理にはプログラム HKL2000 およびプログラム SCALEPACK [25]を用い、測定データの指数付け、積分計算、スケールリングを行った。TRUNCATE (CCP4)は、異常分散を分離せずに行った。

#### 初期構造を用いた Native A4-β-Gal の電子密度マップの作成

1-8 節で作成した A4-β-Gal 構造を利用し、プログラム CNS [26]を用いて Native A4-β-Gal の電子密度マップを作成した。

#### CNS (Crystallography & NMR System)

X 線結晶構造解析および NMR 構造解析のプログラムパッケージで、スクリプトを利用することで様々な精密化および電子密度マップ作製を行うことが可能である。

CNS の使い方は Tutorial に従った。

スクリプト model\_map.inp を用いて Native A4-β-Gal の電子密度マップを作成した。Native A4-β-Gal の構造因子および 1-8 節で作成した初期構造より計算された位相情報を用いて電子密度マップ ( $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップ)を計算した。

#### $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップと $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップ

$2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップは、回折データより計算される構造因子  $F_{\text{obs}}$  を 2 倍したものから、モデル構造より計算される構造因子  $F_{\text{calc}}$  を差し引いたものを構

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

造因子として作成した電子密度マップである。この時の位相はモデル構造から計算される位相を用いる。この電子密度マップは、モデル構造が構築されていない部分の電子密度が強く現れるので、モデル構築の際用いられる電子密度マップである。また、タンパク質の電子密度マップの表示にも一般的に用いられる。

$|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップは、回折データより計算される構造因子  $F_{\text{obs}}$  から、モデル構造より計算される構造因子  $F_{\text{calc}}$  を差し引いたものを構造因子として作成した電子密度マップである。この時の位相はモデル構造から計算される位相を用いる。この電子密度マップは、モデル構造が構築されていない部分の電子密度がポジティブ、本来存在しない箇所にモデルが構築されている部分がネガティブピークとして現れる。リガンドを除いた構造をモデル構造として  $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$  電子密度マップを作成し、リガンド部分の電子密度の形状を表示する時に用いられる。

### モデルの修正と精密化

電子密度マップをプログラム O[27]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。

#### 剛体近似精密化 (スクリプト; rigid.inp)

構造の各部分を剛体として扱い、各原子を個別に精密化するのではなく、集団として精密化する精密化法である。

#### エネルギー精密化 (スクリプト; minimize.inp)

構造の結合距離や結合角などによるエネルギー関数を最小にする精密化法である。

#### Simulated annealing 法 (スクリプト; anneal.inp)

エネルギー精密化の際に構造が local minimum に陥らないよう、エネルギー障壁を越えて精密化できるようにするために、系の温度を 2500 K まで上昇させて徐々に冷却しながらエネルギー関数が最小値になるように精密化を行う方法である。

#### 温度因子

タンパク質の熱振動を表すパラメーターであり結晶中のタンパク質の状態を表す非常に重要なパラメーターである。 **温度因子の精密化 (スクリプト;**

`bindividual.inp`)は構造中の個々の原子について等方性温度因子を精密化する方法である。

温度因子には等方性と異方性がある。本来熱振動は、原子周りにラグビーボール状楕円軌道を持つ異方性の運動しており、その場合精密化するべきパラメーターは  $B_{11}$ 、 $B_{12}$ 、 $B_{13}$ 、 $B_{21}$ 、 $B_{22}$ 、 $B_{23}$  の 6 個である。構造中の全原子に対し、異方性温度因子を精密化するためには測定される反射の数は少ないため、一般的にタンパク質の結晶構造の精密化には、原子は円形の熱振動をすると仮定する等方性温度因子を用いる。

温度因子が高い部分は、その部分の構造が非常に動きやすい(熱運動している)ということを表す。タンパク質の動きやすさや構造の評価に用いられるパラメーターである。

タンパク質結晶構造中には、タンパク質領域のほかに溶媒領域が存在し、水分子が多数含まれる。電子密度マップではこれらの水分子は球状であり、これらの電子密度に CNS のスクリプト `water_pick.inp` を用いて自動的に水分子を当てはめ、精密化を行った。

精密化を行ったスクリプトでは CNS のデフォルトの値を用いた。またタンパク質分子や水分子の結合角や電荷などの束縛条件のパラメーターファイルおよびトポロジーファイルは CNS パッケージ内の値を用いた。

構造の確からしさを表す  $R$  因子および  $R_{\text{free}}$  因子が十分下がるまで、モデルの修正と精密化を繰り返した。

モデル修正の過程で、明らかにタンパク質や水分子とは異なる形状の電子密度に対して、結晶構造中に含まれている可能性のある酢酸分子、MPD 分子、Zn 原子、Cl イオンを当てはめた。これらの分子を含む構造を精密化する際に用いた束縛条件のパラメーターファイルおよびトポロジーファイルは、Hic-Up の値を用いた (<http://xray.bmc.uu.se/hicup/>)。

## 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 [28] を用いて結合角や結合距離の評価を行った。

### 1-10 ガラクトース複合体の構造解析

#### 目的

基質結合部位の同定のため、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの反応産物であるガラクトース複合体の構造解析を行った。ガラクトースは大津らにより A4- $\beta$ -Gal の阻

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

害剤となることが示唆されている[8]。

### 方法

- ① 1-5 節で精密化した A4- $\beta$ -Gal の結晶化で、ドロップ中に 1 mM のガラクトースを加えて結晶化を行った。
- ② ①で成長した結晶を 1-7 節の方法で回収した。このとき回収した結晶化溶液には 1 mM のガラクトースを加えた。以下の処理は 1-7 節の処理に従った。
- ③ X 線回折データの処理は KEK-PF BL18B で行った。データの処理は 1-8 節と同じであるが、異常分散は分離せずに処理した。
- ④ 1-9 節で精密化された Native A4- $\beta$ -Gal 構造から水分子を除いた構造を出発として 1-9 節と同様の方法でガラクトース複合体構造の精密化を行った。精密化の過程でガラクトースと思われる電子密度にガラクトースのモデルを当てはめた。このとき用いたガラクトースの束縛条件のパラメーターファイルおよびトポロジーファイルは Hic-Up の値を用いた。

### 1-11 高活性型変異体 A4- $\beta$ -Gal の構造解析

#### 目的

立体構造情報が得られると、触媒残基や基質特異性を決定している残基に関しての知見が得られる。しかし実際の触媒反応は、酵素全体の構造が関わっているため、触媒能力に関わる残基を特定するのは困難である。大津らは、ランダム変異法を用いて A4- $\beta$ -Gal 全体に変異を導入することで、A4- $\beta$ -Gal の高活性型の獲得に成功した。以下にその原理と方法を記述する。

#### ランダム変異導入法の原理

最も一般的なランダム変異の導入法は、遺伝子の PCR による増幅過程で、DNA ポリメラーゼの Fidelity を下げて、DNA 複製に間違い箇所を導入する方法である。この方法では PCR の反応系に高濃度の Mn を添加して、ポリメラーゼの Fidelity を下げる方法が取られる。

また、ランダム変異の導入法として、DNA 溶液に  $\text{NH}_2\text{OH}$  を加え、シトシンを脱アミノ化によりウラシルに変換する方法がある(図 1-10)。この方法は GC 含量の高い遺伝子に対して有効な方法である。A4- $\beta$ -Gal 遺伝子の GC 含量は 68%と高いため、大津らは後者の方法を用いてランダム変異を導入した。

### 方法（大津らの報告による）

使用した A4-β-Gal 発現用のプラスミド pBGB3 は、pUC119 に A4-β-Gal 遺伝子が挿入されたものであり、1-2 節以降で大量発現に用いた pEXM9 とは異なる。

#### ・一本鎖 DNA の調製

- ① 大腸菌 MV1184 株に pBGB3 を形質転換したものを、2xYT 培地(150 μg/ml のアンピシリンを含む)で 37°C、一晩培養。
- ② ①30 μl と M13K07 フェージ液(約 1010 pfu/ml)を混合し 37°C で 20 分間保温。
- ③ ②全量を 2xYT 培地(150 μg/ml のアンピシリン、70 μg/ml のカナマイシンを含む)3 ml に加え、37°C で 18 時間、振盪培養。
- ④ ③の培養液上清に、5 分の 1 量の 20% PEG、2.5 M NaCl 溶液を加え、室温で 10 分間放置。
- ⑤ 遠心分離して沈殿した一本鎖 DNA を回収。

#### ・ヒドロキシルアミンを用いた変異導入

- ① 培養液 0.75 ml から回収した一本鎖 DNA の沈殿を、0.25 M の塩酸ヒドロキシルアミン溶液(0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)に溶解)1 ml に溶解し、37°C で保温。
- ② 2 時間ごとに 8 時間目まで、100 μl ずつサンプリングし、直ちに 900 μl の滅菌水で希釈の後、250 μl の 20% PEG-2.5 M NaCl 溶液を加えて DNA を沈殿。
- ③ 遠心分離で回収した DNA 沈殿を大腸菌 MV1184 株に形質転換。
- ④ X-Gal を含む平板培地に塗抹し、37°C で一晩培養。
- ⑤ 青色を強く呈しているコロニーを単離し、導入された変異の確認。

### 高活性型変異体の精製と分析

以下の実験は本研究室で行った。

#### ・精製

高活性型変異体 A4-β-Gal の精製は、1-2 節の方法に従い、野生型 A4-β-Gal

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

と同様に行った。

### ・動力学的パラメーターの測定

A4- $\beta$ -Gal の動力学的パラメーターの測定は 1-3 節の方法に従った。

### ・至適温度の測定

至適温度の測定は、測定温度を 30°C から 90°C まで変化させて測定した。

### ・耐熱性の測定

耐熱性の測定は、酵素液(500  $\mu$ l)を 60~95°C のヒートブロック上で 30 分間インキュベートした後、4°C に冷却し、1-3 節の方法に従って 70°C で活性を測定した。

## 高活性型変異体の結晶化と構造解析

変異体の結晶化はオイルバッチ法(図 1-6)を用いて行った。

### オイルバッチ法

沈殿剤濃度が変化しないため、結晶作成の日数の短縮と良質な結晶が作成できることが期待される方法である。

- ① 蒸気拡散法による結晶化から、A4- $\beta$ -Gal の結晶化は沈殿剤 PEG 8000 の濃度が 15~20%(w/v)で起こることが分かっていたので、オイルバッチ用の結晶化溶液として 0.2 M 酢酸ナトリウム、0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)、30%(w/v)PEG8000 を用意。
- ② 結晶化には 72 well MicroBatch Plate (Hampton Research)を使用。MicroBatch Plate に 7~8 ml のパラフィンオイル(Hampton Research)を入れ、各ウェルをオイルで充填。
- ③ 変異型 A4- $\beta$ -Gal 溶液(5 mg/ml)と①を等量混合し、②のウェル中に注入。
- ④ 結晶の回折データ測定と以後の構造解析は 1-7 節の方法に従った。



## 結果と考察

1-12 組換え型 A4- $\beta$ -Gal の精製と諸性質の解析結果A4- $\beta$ -Gal の大量発現と精製

A4- $\beta$ -Gal の大量発現のため、宿主大腸菌株や、培地組成、培養時間などを検討した結果、1-2 節に記した条件で最も多量の A4- $\beta$ -Gal の発現が確認された。

A4- $\beta$ -Gal の大量発現、精製結果を表 1-6 に示す。また、精製度を検定するために行った SDS-PAGE の結果を図 1-11 に示す。1-2 節に示した方法で、SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製できた。精製倍率は 4.1 倍、収率 63% で、1 liter の大腸菌を培養して約 50 mg の精製 A4- $\beta$ -Gal 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。

*T. thermophilus* A4 から精製した A4- $\beta$ -Gal の比活性(48.6 units/mg)は、1-2 節の方法で精製した組換え型 A4- $\beta$ -Gal(90 Units/mg)の約半分であった。この違いは精製過程の違いによる可能性がある。精製過程の検討中、A4- $\beta$ -Gal が疎水的な相互作用を用いてタンパク質を分離する疎水性カラムクロマトグラフィー(Phenyl TOYOPEARL)を用いると活性を失うことが分かった。*T. thermophilus* A4 より直接精製した A4- $\beta$ -Gal は、その過程で Phenyl Superose カラムクロマトグラフィーを使用しており、この精製段階が比活性に影響を与えているかもしれない。疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーによる失活の原因は不明である。

分子量測定結果

*T. thermophilus* A4 より精製した A4- $\beta$ -Gal と組換え型 A4- $\beta$ -Gal の性質の違いを比較するため、組換え型 A4- $\beta$ -Gal の溶液中の分子量を測定した。*T. thermophilus* A4 より精製した A4- $\beta$ -Gal では、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた分子量測定結果から、溶液中で単量体構造をとると報告されている[8]。

標準分子量マーカー、組換え型 A4- $\beta$ -Gal のゲル濾過カラムクロマトグラフィーの溶出パターンを図 1-12 に示し、マーカーと A4- $\beta$ -Gal サンプルの保持時間の関係を図 1-13 にプロットした。保持時間から見積もられた A4- $\beta$ -Gal の分子サイズは 197 kDa であった。

SDS-PAGE より見積もられた組換え型 A4- $\beta$ -Gal の分子量は 75 kDa であったため、組換え型 A4- $\beta$ -Gal は溶液中で二量体または三量体を形成していることが示唆された。また図 1-12 の溶出パターンでは、単一ピークが検出されるため、溶液中で不規則な解離や重合をしていないことが分かった。

四次構造の違いが疎水性カラムクロマトグラフィーの使用の有無に関係するかを調べるため、組換え型 A4- $\beta$ -Gal を Phenyl TOYOPEARL に吸着・溶出し、

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

その画分を分子量測定したが、分子量は変化しなかった。A4- $\beta$ -Gal の四次構造については 1-16 節で考察する。

### 組換え型 A4- $\beta$ -Gal の動力的パラメーター

各基質濃度 $[S]_0$ における反応速度 $[v]$ から、 $[S]_0/v \sim [S]_0$ の線形プロットを図 1-14 に示した。70°C におけるパラメーターは、 $K_m = 5.88 \text{ mM}$ 、 $k_{cat} = 2.8 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ と算出された。野生型と組換え型の A4- $\beta$ -Gal では  $K_m$  に差は見られなかったが (野生型 5.9 mM、組換え型 5.88 mM)、 $k_{cat}$  に大きな差が見られた (野生型  $4.0 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ 、組換え型  $2.8 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ )。分子量測定の結果から、四次構造の違いが動力的パラメーターの違いに影響していると考えられるが、組換え型 A4- $\beta$ -Gal について、すべて単量体に解離した A4- $\beta$ -Gal を調製できていないため、実験的な裏付けは得られていない。

### 吸収スペクトル

各濃度における波長 300 nm から 550 nm の吸収スペクトルを図 1-15a に示す。波長 344 nm および 471 nm で極大の吸光を示した。また各濃度における吸光度をプロットしたところ (図 1-15b)、線形性が見出された。344 nm および 471 nm の吸光度は濃度に比例している。

これらの極大吸収波長に関して、吸光の原因を特定することはできなかった。GH-42 として報告されている他の $\beta$ -ガラクトシダーゼでは、特に補酵素など吸光を有するものを含むという報告はない。しかし、高度に保存されたシステイン残基が存在することから、金属を結合している可能性がある。474 nm 付近の吸収は、A4- $\beta$ -Gal に結合した鉄に由来するものと予想される。

### ICP 法による金属定量

ICP 法による金属定量結果を図 1-16 に示す。この結果、A4- $\beta$ -Gal に結合している金属として鉄、亜鉛の可能性が示唆された。いずれの金属もシステインに結合する金属であり、システインが金属結合クラスターを形成している可能性が高い。

しかし、Brad-Ford 法によるタンパク質定量結果と比較すると、結合している金属量は A4- $\beta$ -Gal 1 分子あたり亜鉛 0.24 個、鉄 0.07 個という結果であった。A4- $\beta$ -Gal 溶液の 280 nm における吸光度を測定し、A4- $\beta$ -Gal の絶対量を求めたところ、Brad-Ford 法に比べ約 2.4 倍低い値が得られた。この結果を基に算出すると、A4- $\beta$ -Gal 1 分子あたり 0.57 個の亜鉛と 0.16 個の鉄を結合しているという結果が得られた。

金属はすべての A4- $\beta$ -Gal に結合しているのではなく、一部の A4- $\beta$ -Gal は金属を保持しない状態で存在していることが示唆された。また、亜鉛と鉄は同じ結合サイトに結合しており、鉄型、亜鉛型の A4- $\beta$ -Gal が混在している可能

性がある。この金属結合サイトに関しては、1-16節で詳しく考察する。

### ESR 測定

図 1-17 に ESR の測定結果を示す。また、タンパク質中の鉄に関して、各存在状態における ESR の例を図 1-17b に示す。A4- $\beta$ -Gal の ESR は、g 値 4.3 にピークがみられ、g 値、波形がルブレドキシンの鉄のデータと一致した。ルブレドキシンの鉄は、4 つのシステインが配位し、金属結合クラスターを形成している。

また、300 mT 付近にピークが見られるが、これは銅のピーク位置である。しかし、ICP 法による金属定量結果では A4- $\beta$ -Gal 中に銅は検出されず、このピークの原因については不明である。なお、ESR では亜鉛のシグナルは検出されないため、亜鉛の存在に関する情報は得ることはできなかった。

### 1-13 A4- $\beta$ -Gal の反応機構

A4- $\beta$ -Gal の活性を持つ pH の範囲は、pH 6~8 である。ONP-Gal 溶液の pH は約 pH 7.5、反応終了後のニトロフェノールおよびガラクトース溶液の pH は約 6.5 であるため、緩衝液を用いなくても反応は完全に進行する。NMR 測定の際、ノイズとなる水分子やプロトンの混入を防ぐため、緩衝液は用いず、ONP-Gal を D<sub>2</sub>O に溶かして反応を測定した。

反応開始後、経時的に測定した <sup>1</sup>H NMR の結果を図 1-18 に示す。基質は反応開始後 20 分で完全に分解されている。反応開始後 5 分の段階では、 $\beta$ -アノマー構造のガラクトースのみが検出されている。その後、 $\alpha$ -アノマー構造のガラクトースの割合が増加している。これは、ONP-Gal が分解した直後は  $\beta$ -アノマーの構造をとっており、その後経時的に溶液中で変旋光して  $\alpha$ -アノマー構造の割合が増えていることを示している。この結果、A4- $\beta$ -Gal の反応は、アノマーを保持するアノマー保持型の機構で起こることが証明された。

### 1-14 A4- $\beta$ -Gal の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、以下の複数の条件で結晶が得られた。

- Crystal Screen Kit 1 #15: 0.2 M Ammonium Sulfate、0.05 M Na Cacodylate pH 6.5、15%(w/v) PEG 8000
- Crystal Screen Kit 1 #25: 0.1M Imidazole pH 6.5、1.0 M Sodium Acetate Trihydrate
- Crystal Screen Kit 1 #28: 0.1 M Sodium Acetate Trihydrate、0.1 M Na Cacodylate pH 6.5、30%(w/v) PEG 8000

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

- Crystal Screen Kit 1 #37: 0.1 M Na Acetate pH 4.6、8%(w/v) PEG 4000
- Crystal Screen Kit 1 #45: 0.05 M Zinc Acetate Dihydrate、25 mM Na Cacodylate pH 6.5、4.5%(w/v) PEG 8000
- Crystal Screen Kit 2 #23: 10% Dioxane、0.1 M MES pH 6.5、1.6 M Ammonium Sulfate
- Quik Screen Kit #A3: 0.8 M Sodium/Potassium Phosphate pH 6.3

これらの結晶に X 線を照射し回折像を撮影したところ、Crystal Screen Kit 1 #28 の結晶(図 1-8)のみ回折像が得られた。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、ハンギングドロップ蒸気拡散法で 1-5 節に示した条件で十分な大きさの結晶を得た。またセレノメチオニン置換体 A4- $\beta$ -Gal も同様の条件で結晶が得られた。

この条件で得られた結晶は、空間群が  $P321$ 、単位胞のパラメーターは  $a = b = 97.70 \pm 0.3$  (Å)、 $c = 129.40 \pm 0.5$  (Å)、 $\alpha = \beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 120^\circ$ であった。

### 1-15 構造解析の結果

#### 初期構造の構築

MAD 測定に用いた波長は、図 1-9 に示した XAFS の測定結果より、Peak 0.9795 Å、Edge 0.97972 Å、Remote 0.96000 Å と決定した。これらの波長を用いて測定し、スケーリングしたデータの統計値を表 1-7 に示す。データの質を表す  $R_{\text{sym}}$  値、S/N 比である Mean  $I/\sigma$  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。

プログラム SOLVE を用いて X 線の初期位相を決定したところ、位相の確からしさを表す Figure of merit (FOM) は 0.439 であった。

#### Figure of Merit (FOM)

計算された位相と真の位相のずれを表すパラメーターで、0~1 の値で表される。全て真の位相の時 1 となる。

プログラム SOLVE により決定した位相をプログラム DM を用いて、溶媒平滑化、ヒストグラムマッチング法により位相を改善し、FOM が 0.737 に上昇した。

プログラム DM により改善された位相と波長 Remote (0.96000 Å) で測定した構造因子から、プログラム ARP/wARP を用いて初期構造を構築した。その結果  $R$  値 16.1% の構造が得られた。この構造は主鎖部分のペプチド鎖構造を構築し、その他の電子密度に  $R$  値を下げるように水分子を当てはめただけの構造な

ので、真の構造ではない。

さらにプログラム ARP/wARP の `side_dock.sh` により側鎖構造を自動的に構築した。この段階で 645 残基中 622 残基の主鎖および側鎖構造が決定した。主鎖構造が構築されなかった部位は、*cis*-ペプチド結合を形成している部位であった (プログラム ARP/wARP はプログラムの特性として *cis*-ペプチド部分の主鎖構造構築ができない)。*cis*-ペプチドは、Phe350-Arg351、Pro499-Pro500、Gly613-Pro614 に存在した。

### Native A4-β-Gal の構造解析

SPRING-8 において、波長 0.9791 Å で測定しスケーリングしたデータの統計値を表 1-7 に示す。データの質を表す  $R_{\text{sym}}$  値、S/N 比である  $\text{Mean } I/\sigma$  値、データの完全性を表す  $\text{completeness}$  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。

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 O を用いてモデルを修正し精密化を進めた。精密化の過程で、酢酸分子×2、MPD 分子×2、亜鉛原子×1、Cl イオン×1 を組み入れた。精密化の結果、図 1-19 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 1-8 に示す。構造の確からしさを表す  $R_{\text{cryst}}$ 、 $R_{\text{free}}$  値はいずれも 20%以下まで下がり、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 A4-β-Gal 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)、91.4%の残基が $\phi/\psi$ 角の“most favored region”にあり、幾何学的に問題ない構造である[28] (図 1-20)。

### ガラクトース複合体の構造解析

KEK PF BL-18B において、波長 1.0000 Å で測定しスケーリングしたデータの統計値を表 1-7 に示す。データの質を表す  $R_{\text{sym}}$  値、S/N 比である  $\text{Mean } I/\sigma$  値、データの完全性を表す  $\text{completeness}$  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。

ガラクトースは TIM バレルドメインの中央に結合しており、図 1-21a に示すように非常に鮮明な電子密度を示し、各 OH 基の配向と共に、 $\alpha$ -アノマー型のコンフォメーションをとっていることが明らかになった。ガラクトースの結合部位、およびガラクトース認識残基に関しては 1-16 節で詳しく考察する。

ガラクトース複合体構造に関して精密化した結果を表 1-8 に示す。構造の確からしさを表す  $R_{\text{cryst}}$  値は 20%以下まで下がり、構造の議論を行うのに十分な質の構造が得られた。

### 1-16 A4-β-Gal の構造に関する考察

### 三量体構造

A4- $\beta$ -Gal は図 1-22 に示す三量体構造を取っていた。1-12 節のゲル濾過クロマトグラフィーを用いた分子量測定結果と一致する。A4- $\beta$ -Gal 結晶の非対称単位は A4- $\beta$ -Gal 一分子からなり、三量体は結晶学的三回軸の周りに円形に並ぶ形で形成されている。そのため、三量体の各サブユニットは結晶学的に全く同じ構造である。三量体は円形に並んでおり、図 1-22 の手前側に直径約 35 Å、奥側に約 5 Å のトンネルが通っているため、植木鉢のような形状を取っている。

### 非対称単位

結晶構造解析における最小の繰り返し単位で、非対称単位中の構造が結晶学的対称性によって繰り返されることで結晶を形成する。A4- $\beta$ -Gal のように、非対称単位中に一分子の A4- $\beta$ -Gal が含まれる場合は、結晶中に含まれる A4- $\beta$ -Gal のサブユニットは全て同じ構造を持つということになる。逆に非対称単位中に複数の同一サブユニットが含まれる場合は、これらのサブユニットは独立した構造を有しており、ループの揺らぎや側鎖の向きなど何らかの構造の違いが生じている。

### 単量体構造

A4- $\beta$ -Gal の単量体構造を図 1-23a に示す。A4- $\beta$ -Gal 単量体は 3 つのドメインで構成されていた。N 末端側から、TIM バレルフォールドを持つドメイン A(1-389)、 $\alpha/\beta$ フォールドを持つドメイン B(390-589)、 $\beta$ -フォールドを持つドメイン C と呼ぶ。ドメインの境界はクレフトを形成しており(図 1-23b)、結晶化に用いた MPD、酢酸分子、ガラクトースが結合していた。クレフトの片方の先は"植木鉢の上側"に向いており、逆側は活性中心部位に至っている(後述)。

### TIM バレルフォールド (Triosephosphate Isomerase バレルフォールド)

( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> バレル、( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> バレルフォールドとも呼ばれる。 $\beta$ -構造と $\alpha$ -ヘリックス構造が交互に 8 回繰り返し、 $\beta$ -シート部分がバレルを、 $\alpha$ -ヘリックスがその外側を覆うフォールドである。8 本の $\beta$ -シートと $\alpha$ -ヘリックスを N 末端側から $\beta$ -1~8、 $\alpha$ -1~8 と表記する。GH 酵素としては最も多く見られるフォールドである。

ドメイン A が TIM バレルフォールドを持つことは HCA による構造予測結果と一致する。Dali サーバー[29]による類似構造検索の結果、A4- $\beta$ -Gal の TIM バレルフォールドは GH-14 *Bacillus cereus* 由来 $\beta$ -アミラーゼ(以下 BCB と表記する) [30]の TIM バレルフォールドと最も類似性が高いことが分かった(図 1-24a、表 1-9)。両方の TIM バレルとも、 $\beta$ -4 と $\alpha$ -4 の間に $\alpha$ -ヘリックスからなるサブドメインが挿入されており、"カンマ状"の構造になっている。

ドメイン B は *Sulfolobus solfataricus* 由来アントラニル酸合成酵素の TrpG サブユニットと最も高い相同性を示した(図 1-25、表 1-10)。TrpG は、グルタミンを分解し、アンモニアを転移する反応を触媒するが、その反応に関わる触媒残基(Cys、His、Glu)に相当する残基は A4- $\beta$ -Gal では全て Pro に置き換わっているため、A4- $\beta$ -Gal は TrpG のような触媒能を持たないと考えられる。

ドメイン C は $\beta$ -シートのみからなる構造を有しているが、類似構造は見つからなかった。ドメイン C は活性中心部位から離れた位置に存在しており、その役割は不明である。

### 金属結合部位

ドメイン A には金属結合サイトが存在した。GH-42 で高度に保存されたシステイン残基(図 1-26)Cys106、Cys150、Cys152、Cys155 が金属結合クラスターを形成していた(図 1-27a)。1-12 節の ICP 金属定量結果から、A4- $\beta$ -Gal には 1 サブユニットあたり 0.57 個の亜鉛と 0.16 個の鉄が結合していることが分かっており、図 1-27a の金属は亜鉛であると考えられる。図 1-27a における金属結合サイトは非常に高い電子密度を示しているが( $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップにおいて  $3\sigma$  以上の高さ)と約  $15 \text{ \AA}^2$  の温度因子)、回折データセットによっては金属結合が見られない場合がある(図 1-27b)。これは、このクラスターの金属結合能力が弱いことを示しており、1 サブユニットあたりの結合金属割合が少なかった ICP の結果と一致する。

結合した亜鉛は、4 つの後述する活性中心部位から離れた位置にあり、また配位子全てがシステインによって占められていることから、触媒反応に関わる金属ではなく、構造の安定化に寄与する金属であると考えられる。しかし、完全に金属が脱離した A4- $\beta$ -Gal を分離できていないため、この金属の役割は不明である。

金属結合サイトはサブドメインの根元に存在するが、BCB のサブドメインの根元には酢酸分子が結合していた[30]。

### サブユニットの相互作用

図 1-23b に、A4- $\beta$ -Gal の分子表面を示す。緑色で示した部分が、隣のサブユニットと接触する部分である。A4- $\beta$ -Gal の分子表面全体のうち 19.4%(4700  $\text{\AA}^2$ )が相互作用に関わっている。サブユニットの接触部は、図 1-23b に示した方向から見て、A4- $\beta$ -Gal の左側と右側の主に 2 箇所であり、左側(TIM バレルドメイン)が隣のサブユニットの右側部分(サブドメインとドメイン B)と接触している。サブユニット間の水素結合を形成する残基を図 1-26 に示す。これら水素結合を形成する残基は耐熱性を有する GH-42 酵素にのみ保存されていることから、

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

これらが耐熱性に関わっていると考えられる。

*T. thermophilus* A4 より精製された A4- $\beta$ -Gal はゲル濾過カラムクロマトグラフィーの分析の結果、単量体であると報告されており、組換え A4- $\beta$ -Gal の構造解析の結果から得られた三量体という結果と異なる。しかし、三量体を形成している強い相互作用を考慮すると、*Thermus* の菌体内でも三量体を形成していると考えられる。*T. thermophilus* A4 より単離された A4- $\beta$ -Gal の分析は、理論段数の低いゲル濾過カラムを用いており、単量体と言う結論は実験誤差である可能性がある。他の GH-42 酵素は二量体または三量体を形成していると報告されており、GH-42 酵素は立体構造の結果分かった植木鉢上の三量体構造を取っていると予想される。

### ガラクトース結合部位と触媒残基

ガラクトース複合体構造では、ガラクトースは TIM バレルドメインに結合していた。結合したガラクトースの  $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$  電子密度マップとガラクトース認識残基を図 1-21a、b、表 1-11 に示す。ガラクトースの各 OH 基は複数のアミノ酸残基によって認識されており、非常に厳密な基質認識機構が働いていると考えられる。

これらの認識残基の中には、隣のサブユニット由来の Trp182 が含まれる。このことから、基質の認識に四次構造の形成が関わっていることが示唆された。

HCA による構造予測から、触媒残基として予測されていた Glu141 および Glu312 はそれぞれ  $\beta$ -4 と  $\beta$ -7 の C 末端部分に位置していた。これらの残基は、ガラクトースの C1 原子に近い位置にある(後述)。

### A4- $\beta$ -Gal と EC- $\beta$ -Gal の比較

A4- $\beta$ -Gal と EC- $\beta$ -Gal は同じ触媒能を持ち、その構造も同じ TIM バレルフォールドからなる。また 1-13 節から、A4- $\beta$ -Gal の加水分解が、EC- $\beta$ -Gal と同じアノマー保持型の反応機構を取ることが証明された。EC- $\beta$ -Gal の TIM バレルフォールドは、図 1-24b に示すように A4- $\beta$ -Gal のものとは大きく形状が異なるが、活性中心部位は類似の構造を有していると考えられる。A4- $\beta$ -Gal の触媒残基と基質特異性、および EC- $\beta$ -Gal との関連を調べるため、A4- $\beta$ -Gal と EC- $\beta$ -Gal を重ね合わせて比較した。構造の重ね合わせは、A4- $\beta$ -Gal の予想される触媒残基 (Glu141、Glu312) を EC- $\beta$ -Gal の実験的に証明されている触媒残基 (Glu461、Glu537) を重ね合わせて行った。この方法で重ね合わせると、TIM バレルフォールド全体も非常によく重なった(図 1-28)。

### 触媒残基

触媒残基を重ねると、結合した糖も結合の方向や角度が一致した(図 1-29)。また触媒残基周りの環境も一致した。EC- $\beta$ -Gal の求核性残基である Glu537 は両



端が Arg388、Tyr503 に挟まれており、これらの残基が、Glu537 が求核基として働くことができるように  $pK_a$  を調節していると考えられている。この特徴は Clan GH-A で見られる構造の特徴の一つである。A4- $\beta$ -Gal の Glu312 も両端を Arg32、Tyr266 で挟まれている(図 1-29b)。この構造の一致から、A4- $\beta$ -Gal の Glu141 を酸/塩基触媒、Glu312 を求核性触媒として同定した。

EC- $\beta$ -Gal では、酸/塩基触媒 Glu461 に  $Mg^{2+}$  が結合し、触媒反応に関与している。A4- $\beta$ -Gal では酸/塩基触媒 Glu141 に結合した金属はなく、Glu264 が  $Mg^{2+}$  と同様の働きをしていると考えられる。

### ・基質認識残基

A4- $\beta$ -Gal と EC- $\beta$ -Gal の基質認識残基を図 1-30 に示す。A4- $\beta$ -Gal と EC- $\beta$ -Gal では、触媒残基を除くと基質認識残基が大きく異なる。EC- $\beta$ -Gal の O6 の認識には  $Na^+$  が関わっているが、A4- $\beta$ -Gal では金属の関与は見られない。この構造の違いが、EC- $\beta$ -Gal と A4- $\beta$ -Gal の金属要求性の違いに繋がっていると考えられる。

EC- $\beta$ -Gal と A4- $\beta$ -Gal では、疎水的な相互作用を形成するアミノ酸残基に関して構造上の共通点が見られた。A4- $\beta$ -Gal に結合したガラクトースのピラノース環は、Phe350 と疎水的な相互作用を形成している(図 1-29b)。一方、EC- $\beta$ -Gal では Trp568 がこれに相当する。これらの残基はいずれも  $\beta$ -8 の C 末端部分に存在し、その主鎖構造は *cis*-ペプチド結合というエネルギー的に不安定な構造を形成している。このような  $\beta$ -8 の C 末端部分に存在する *cis*-ペプチド構造をとる疎水性アミノ酸残基が、糖と疎水的な相互作用を形成しているのは、Clan GH-A の構造に共通して見られる特徴である[31]。

### A4- $\beta$ -Gal と他の Clan GH-A 酵素との比較

A4- $\beta$ -Gal を含む GH-42 酵素は、立体構造予測から Clan GH-A の酵素であると予測されていた。本研究の構造解析結果から、A4- $\beta$ -Gal は Clan GH-A の特徴である

- ・アノマー保持型の反応機構
- ・ $\beta$ -グリコシド結合に作用
- ・触媒ドメインとして TIM バレルフォールドを持ち、触媒残基が 4 番目と 7 番目の  $\beta$ -シートの C 末端部分にあるグルタミン酸

という点を全て満たしており、間違いなく Clan GH-A の酵素であると証明された。ここでは、A4- $\beta$ -Gal と Clan GH-A の酵素との分子進化的な関連を考察する。

### ・三量体形成による活性中心ポケットの形成

Clan GH-A の酵素は触媒能から長い基質(セルロースやキシラン)に作用す

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

るグループ(GH-10、17 など)、短い基質(ラクトースやセロビオース)に作用するグループ(GH-1、2 など)に分けられる。これらの構造の特徴は、前者がクレフト型、後者がポケット型の活性中心部位を有していることである[32] (図 1-31)。

クレフト型の活性中心は、長いセルロースやキシランの結合に適している。ポケット型の活性中心は、ラクトースやセロビオースなどの重合度の小さな基質や、基質を非還元末端側から加水分解するエキソ型の酵素に適した形状である。ポケット型の活性中心の形成は、クレフト型の活性中心に対して新たなドメインや、ループの付加によって獲得されたと考えられている[31]。

A4- $\beta$ -Gal は単量体構造を見ると、活性中心はクレフト型の構造を有している(図 1-32)。このクレフトは、三量体の形成により、隣のサブユニットの Trp182 によって塞がれ、ポケット型に変化している(図 1-32)。このポケット化により、A4- $\beta$ -Gal はラクトースなどの小さな基質に対する特異性を獲得している。このように、触媒ドメイン自身が多量体を形成することでポケット型の活性中心を獲得しているのは、A4- $\beta$ -Gal が初めての発見である。

### ・GH-14 との関係

GH-14 は触媒ドメインが TIM バレルフォールドを持ち、触媒残基が 4 番目と 7 番目の $\beta$ -シートの N 末端に存在することから、4/7 スーパーファミリーに分類される。しかし、反応機構がアノマー反転型機構で、 $\alpha$ -グリコシド結合に作用することから、Clan GH-A には分類されない(そのため、Clan GH-A  $\in$  4/7 スーパーファミリーの関係である)。GH-14 の構造は $\beta$ -4 と $\alpha$ -4 の間にサブドメインを持つが、Clan GH-A の酵素にはこのようなサブドメインがないことから、GH-14 と Clan GH-A の関係は不明な点が多かった。

A4- $\beta$ -Gal の TIM バレルフォールドは $\beta$ -4 と $\alpha$ -4 の間に GH-14 と同じサブドメインを有し、Clan GH-A の酵素よりも GH-14 と最も構造との相同性が高い(表 1-12)。A4- $\beta$ -Gal は活性中心部位が保持型酵素の構造であるものの、TIM バレルフォールドの骨格は反転型酵素の構造を持つことが分かった。この発見により、保持型である Clan GH-A 酵素と反転型酵素である GH-14 酵素の構造的・進化的関連を見出すことができた(図 1-33)。

### 1-17 ランダム変異による高活性型変異体 A4- $\beta$ -Gal の構造機能解析

#### ランダム変異導入による高活性型 A4- $\beta$ -Gal の探索

組換え大腸菌が生育する 37°C で活性が上昇した変異型 A4- $\beta$ -Gal は、高温条件下でも活性の上昇が見られると考え、ランダム変異を導入し活性が上昇した変異体 A4- $\beta$ -Gal のスクリーニングは、X-Gal を含む寒天培地を用いて 37°C で行った。

37°Cにおける活性が上昇した A4- $\beta$ -Gal にランダム導入された変異の一覧を表 1-13 に示す。これらの変異の中で、特に活性の上昇が見られる P317S、H323Y の点変異、および二重変異体について、それぞれ 1-2 節の方法で精製し、1-3 節の方法に従って諸性質を調べた。

### **高活性型 A4- $\beta$ -Gal の諸性質**

#### **・動力学的パラメーター**

1-3 節の方法に従い、変異体の  $K_m$  および  $k_{cat}$  を測定した。結果を表 1-14 に示す。P317S は  $k_{cat}$  が上昇し、H323Y は  $K_m$  が減少した。P317S は触媒能に、H323Y は基質結合能に影響していると思われる。二重変異体ではその両方の影響が合計して現れている。

#### **・好熱性および耐熱性**

各温度における活性測定結果を図 1-34 に、各温度で 30 分間インキュベートした後の残存活性を図 1-35 に示す。野生型、変異体ともに温度が高いほど活性が高い。また変異体の耐熱性が減少していることが分かった。

### **変異型 A4- $\beta$ -Gal の構造解析**

P317S、H323Y の二重変異体についてのみ結晶化に成功した。この結晶について、SPRing-8 BL-40B2 において、波長 0.9860 Å で測定しスケーリングしたデータの統計値を表 1-15 に示す。データの質を表す  $R_{sym}$  値、S/N 比である Mean  $I/\sigma$  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。

変異が導入された 317 番目、323 番目の電子密度マップを図 1-36 に示す。いずれも設計通りのアミノ酸残基に置換されている。

ガラクトース複合体構造に関して精密化した結果を表 1-15 に示す。構造の確からしさを表す  $R_{cryst}$  値は 20 % 以下まで下がり、構造の議論を行うのに十分な質の構造が得られた。

### **変異が導入された部位**

変異が導入された部位のアミノ酸配列のアラインメントと構造の模式図を図 1-37 に示す。変異が導入された部位は、GH-42 で保存性は見られず、また活性中心部位から離れた位置にあるため、触媒反応に直接関わっている残基ではない。そのため、これらの位置に変異を導入した高活性型 A4- $\beta$ -Gal の発見は、ランダム変異を用いた方法でなければ発見できなかったであろう。

変異が導入された 317 番、323 番の残基は、 $\beta$ -7 と  $\alpha$ -7 を結ぶループの根元に存在し、そのループ上には活性中心部位を形成している Trp320 が存在する。

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

Pro317 はループの N 末端側の端に存在している。このプロリン残基は、GH-42 では耐熱性を有する酵素中で保存されており、耐熱性、好熱性に関与していると考えられる。

His323 はループの C 末端部分に存在している。His 側鎖のイミダゾール基は、同一サブユニットの Asp272 および隣のサブユニットの Glu420 と水素結合を形成しており、三量体の形成に関与している。Asp272 は活性中心ポケットの入り口部分を形成しているヘリックス部分に存在する(後述)。

### 変異体 A4- $\beta$ -Gal の構造

P317S、H323Y 二重変異体の構造は、Native A4- $\beta$ -Gal の構造とほぼ同じ構造であった。構造の違いを表す Root mean square distance (RMSD)は平均約 0.3 Å で、これら二つの構造がほぼ同じ構造であるという値を示している。

#### ・Tyr266-Tyr284 領域の動き

二つの A4- $\beta$ -Gal について、各アミノ酸残基の RMSD のプロットを図 1-38 に示す。RMSD の高い部分(構造の差が大きい部分)が二箇所見つかった。Tyr266-Tyr284 部分と変異が導入された P317S-H323Y の部分である。

このうち Tyr266-Tyr284 領域の構造の重ねあわせを図 1-39 に示す。この領域は、約 1 Å 動いている部分も見られるが、この動きは His323 が Tyr に置き換わることで、Tyr266-Tyr284 にある Asp272 との水素結合がなくなったことに起因すると考えられる。

Tyr266-Tyr284 は活性中心ポケットの入り口部分を形成している(図 1-40)。動力学的パラメーターの測定結果から、H323Y の変異は  $K_m$  が減少しており、基質結合に影響していると予想されたが、これは His323-Asp272 の水素結合がなくなったことで Tyr266-Tyr284 部分のフレキシビリティが上昇し、基質の取り込みに影響を与えていると考えることで説明できる。Tyr266-Tyr284 は、耐熱性の GH-42 酵素にのみ見られるヘリックス領域で、この部分は酵素の好熱性、耐熱性にも関与していると考えられる。

#### ・Tyr266 側鎖の動き

Native A- $\beta$ -Gal と二重変異体 A- $\beta$ -Gal の活性中心部分を重ね合わせると、Tyr266 の側鎖が動いていることが確認された(図 1-41)。Tyr266 は、求核性触媒である Glu312 と水素結合を形成しており、Glu312 の  $pK_a$  の調節に関与していると予想される残基である。他の Clan GH-A 酵素でも、求核性触媒と水素結合を形成する Tyr 残基の重要性が考察されており[33]、A4- $\beta$ -Gal の Tyr266 も触媒反応の重要な役割を担っていると考えられる。

この側鎖の動きは P317S によって説明される。Tyr266 は Val318 と疎水的な相互作用を形成しているが、Val318 の隣にある Pro317 が Ser に置き換わった

ことで、この部分のフレキシビリティが上昇し、Val318、Tyr266 がより安定な位置に動いていると考えられる。P317S は  $k_{cat}$  を上昇させることから触媒反応に直接関与していることが示唆されたが、Tyr266 の可動性上昇に関与していると考えられることで説明できる。

### 今後の課題

構造解析の結果から、P317S、H323Y の活性に与える影響と構造変化の関係についての考察を得た。今後、それぞれの単変異体についての構造解析を行い、上記の Tyr266-Tyr284 領域、Tyr266 側鎖の動きがそれぞれ H323Y、P317S の変異に由来するものであることを証明する必要がある。

### 1-18 本章のまとめ

GH-42 に分類される *Thermus thermophilus* A4 由来のβ-ガラクトシダーゼ (A4-β-Gal) について結晶構造解析を行い、GH-42 の酵素として初めての立体構造を明らかにした。

A4-β-Gal の立体構造は触媒ドメインとして TIM バレルフォールドを有しており、活性中心部位は GH-2 に分類される大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ (EC-β-Gal) と多くの構造上の共通点を持つことが分かった。この共通点を基に、A4-β-Gal の触媒残基を Glu141 と Glu312 と同定した。

A4-β-Gal の加水分解反応が、反応の前後でアノマーが保持される保持型機構であることを示した。また A4-β-Gal が、β-グリコシド結合をアノマー保持型機構で加水分解し、触媒残基がβ-4、β-7 の C 末端部分に存在する Clan GH-A の酵素であることを示した。

A4-β-Gal は三量体構造をとっており、この三量体の形成によりラクトースのような鎖長の短い基質に対して有利なポケット型の活性中心部位を獲得していた。多量体形成による活性中心ポケットの獲得は初めての例である。

A4-β-Gal の構造は、活性中心部位は保持型酵素である Clan GH-A 酵素と相同性が高い。一方、TIM バレルフォールド全体は、β-4 とα-4 の間にサブドメインの挿入があり、反転型酵素である GH-14 β-アミラーゼと相同性が高い。A4-β-Gal の立体構造は、反転型酵素と保持型酵素の構造関連を考察する上で非常に興味深い構造であると言える。

A4-β-Gal にランダム変異を導入することで、活性が向上した P317S、H323Y 変

## 第1章 A4- $\beta$ -Galの結晶構造解析

異体について構造解析を行い、P317S は求核性触媒 Glu312 と水素結合を形成する Tyr266 に、H323Y は基質結合ポケットの入り口を形成する Tyr266-Tyr284 ループに影響し、活性の向上に関与していることが示唆された。

### 発表論文

本章の研究内容は、

*Journal of Applied Glycoscience* 49 巻 2 号 175~180 頁 (2002)

「*Thermus thermophilus* A4 株由来・新規耐熱性 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよび基質複合体の X 線結晶構造解析」

*Journal of Molecular Biology* Vol. 322, pp 79-91 (2002)

"Trimeric Crystal Structure of the Glycoside Hydrolase Family 42  $\beta$ -Galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the Structure of its Complex with Galactose"

に発表されている

### Protein Data Bank (PDB)登録

今回解析した A4- $\beta$ -Gal の構造は PDB ID 1K WG (基質フリー)および 1KWK (ガラクトース複合体)に登録されている。