

GH	由来	Archaea	Bacteria	Fungi	Plant	Animal
1	<i>Sulfolobus solfataricus</i> <i>Pyrococcus woesei</i> など	○				
2	<i>Escherichia coli</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> など		○	○		
35	<i>Homo sapiens</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> (トマト) <i>Penicilium</i> など		○	○	○	○
42	<i>Thermus thermophilus</i> A4 <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Haloferax alicantei</i> など	○	○			

表 1-1 β-ガラクトシダーゼの分類

	A4- $\beta$ -Gal	EC- $\beta$ -Gal
GH	42	2
アミノ酸残基数	645	1023
四次構造	三量体*	四量体
至適温度	90 °C 以上	37 °C
金属要求性	なし	Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup>
$K_m$	5.9 mM	0.19 mM
三次元構造	TIM バレル フォールド	TIM バレル フォールド

表 1-2 *T. thermophilus* A4  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (A4- $\beta$ -Gal)と  
*E. coli*  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (EC- $\beta$ -Gal)の諸性質の比較

\*大津らの報告では単量体[8]。

好熱菌
<i>Thermophilic anaerobe NA10</i> <i>Thermotoga maritima</i> <i>Thermotoga neapolitana</i> <i>Thermus brockianus</i> <i>Thermus thermophilus A4</i> <i>Thermus sp. T2</i>
好塩菌
<i>Haloferax alicantei</i>
低温菌
<i>Arthrobacter sp. (strain B7)</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Carnobacterium piscicola BA</i> <i>Yersinia pestis</i>
孢子形成
<i>Bacillus circulans G1</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Clostridium perfringens</i>
その他
<i>Caldicellulosiruptor sp. 14B</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i> <i>Leuconostoc lactis</i> <i>Planococcus sp. SOS Orange</i> <i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Streptomyces coelicolor A3</i>

表 1-3 GH-42 に分類されるβ-ガラクトシダーゼを保持する生物

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.5 g
Na citrate·2H <sub>2</sub> O	0.5 g
1 M MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0 ml
80 % (v/v) Glycerol	6.25 ml
アミノ酸各種(メチオニンを除く)	それぞれ 40 mg
Adenine, Guanosine, Thimine, Uracil	それぞれ 0.5 g
セレノメチオニン	25 mg
チアミン	2 mg

**表 1-4 A 培地の組成 (1 liter)**

グリセロール、セレノメチオニンを除きオートクレーブ滅菌後、別途オートクレーブ滅菌したグリセロール、滅菌フィルター MILLEX-GP 0.22 μm Filter Unit (MILLIPORE)を用いて滅菌したセレノメチオニン溶液を添加

```

#! /bin/csh -f
# CCP4_OPEN environmental variable set to UNKNOWN so file overwriting will work
setenv CCP4_OPEN UNKNOWN

/solve_directry <<***
logfile solve3.logfile          ! write out most information to this file.
resolution 20 2.00              ! maximum resolution of input file

! get the data from ccp4style.mtz file
labin FPH1=FPH1 SIGFPH1=SIGFPH1 DPH1=DPH1 SIGDPH1=SIGDPH1
labin FPH2=FPH2 SIGFPH2=SIGFPH2 DPH2=DPH2 SIGDPH2=SIGDPH2
labin FPH3=FPH3 SIGFPH3=SIGFPH3 DPH3=DPH3 SIGDPH3=SIGDPH3
hklin ccp4style.mtz

# 12398.235 / lambda = energy (keV)
mad_atom Se
lambda 1
label set 1 with 7 Se atoms, lambda 1
wavelength 0.96000 ! 12.912 eV (remote) ! wavelength value
fprimv_mad -3.2348 ! f' value at this wavelength
fprprv_mad 3.6840 ! f doubleprime value
ATOMNAME Se

lambda 2
wavelength 0.97950 ! 12.655 eV (peak)
fprimv_mad -9.6417
fprprv_mad 3.8438

lambda 3
wavelength 0.97972 ! 12.653 eV (edge)
fprimv_mad -7.9927
fprprv_mad 2.1717 ! (3.8438+0.4996)/2 because of "Edge"
nres 645 ! number of residues in asymmetric unit
nanomalous 7 ! number of Se atom in asymmetric unit
!
scale_mad
analyze_mad
solve
!-----all done-----
.....

```

表 1-5 プログラム SOLVE の入力スクリプト

各波長における f、f' の値はプログラム crossec (CCP4) を用いて計算した

	タンパク質量 (mg)	総活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)	精製倍率 (fold)
菌破碎液	347	7,741	22	100	1.00
熱処理	177	8,516	48	110	2.15
DEAE	140	6,820	50	88	2.24
MonoQ	72	5,419	75	70	3.37
ゲル濾過	53	4,830	90	63	4.08

表 1-6 A4- $\beta$ -Gal の大量発現(1 liter 培養)と精製結果

結晶	セレノメチオニン置換体			Native	ガラクトース複合体
	peak	edge	remote		
波長 (Å)	0.9795	0.9797	0.9600	0.9791	1.0000
測定ビームライン	PF BL-18B			BL-40B2	PF BL-18B
空間群	<i>P</i> 321			<i>P</i> 321	<i>P</i> 321
単位胞パラメーター					
<i>a</i> (Å)	98.00			97.76	97.59
<i>b</i> (Å)	98.00			97.76	97.59
<i>c</i> (Å)	129.83			129.37	128.89
分解能 (Å)	32.44-2.00 (2.11-2.00)			19.73-1.60(1.66-1.60)	28.62-2.20(2.32-2.20)
Measured reflections	849067	846505	859226	2467779	915005
Unique reflections	49268	49260	49279	94451	36658
Completeness (%)	99.9(99.9)	99.9(99.9)	99.9(99.6)	100(99.9)	100(100)
Redundancy	11.0(11.1)	11.0(11.1)	11.0(11.1)	4.4(4.3)	5.3(5.3)
Mean <i>I</i> / $\sigma$	7.1(3.4)	6.8(3.3)	6.7(3.4)	16.2(6.04)	8.3(2.4)
<i>R</i> <sub>sym</sub> (%) *	8.2(21.6)	8.4(21.8)	8.6(21.4)	4.1(28.9)	8.2(32.5)

\*  $R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{sym} |F - \langle F \rangle|}{\sum_{hkl} F}$  括弧内の数字は最高分解能範囲の値

表 1-7 セレノメチオニン置換体、Native、およびガラクトース複合体結晶の X 線回折データ測定結果

結晶	Native	ガラクトース複合体
分解能 (Å)	19.73-1.60	28.62-2.20
No. of residues/No. of waters	644/685	644/344
No. of acetates	2	2
No. of MPDs	2	2
No. of Zincs	1	1
No. of Chlorides	1	1
Average <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )	16.9	28.6
Rms deviation		
bond lengths (Å)	0.005	0.006
bond angles (deg)	1.3	1.3
<i>R</i> <sub>cryst</sub> (%)	16.7	16.9
<i>R</i> <sub>free</sub> * (%)	18.4	20.0

$$*R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$$

表 1-8 Native およびガラクトース複合体の精密化結果



NR.	STRID1	STRID2	Z	RMSD	LALI	LSEQ2	%IDE	REVERS	PERMUT	NFRAG	TOPO	PROTEIN
1:	5989-A	5989-A	68.1	0.0	390	390	100	0	0	1	S	
2:	5989-A	1b9z-A	25.4	3.4	328	516	12	0	0	29	S	beta-amylase
3:	5989-A	1byb	19.8	3.5	309	490	14	0	0	34	S	Beta-amylase reacted with 200 nm maltose and complexed
4:	5989-A	1bhg-A	15.6	2.5	209	611	13	0	0	25	S	beta-glucuronidase (gus gene product) biological_unit
5:	5989-A	1ceo	14.9	3.1	222	332	14	0	0	31	S	cellulase celc (1,4-beta-d-glucan-glucanohydrolase, end
6:	5989-A	1qvb-A	14.8	3.5	238	481	16	0	0	33	S	beta-glycosidase
7:	5989-A	2myr	14.7	3.9	246	499	14	0	0	33	S	
8:	5989-A	1qno-A	14.5	2.9	204	344	14	0	0	30	S	endo-1,4-b-d-mannanase fragment
9:	5989-A	1tax-A	14.2	3.6	227	302	13	0	0	28	S	endo-1,4-beta-xylanase
10:	5989-A	1bgl-A	14.2	3.1	201	997	17	0	0	24	S	beta-galactosidase
11:	5989-A	1ece-A	13.6	3.3	221	358	14	0	0	29	S	endo-cellulase e1 fragment (endo-1,4-beta-d-glucanase)
12:	5989-A	1bqc-A	13.2	3.2	212	302	10	0	0	31	S	beta-mannanase biological_unit
13:	5989-A	1cz1-A	12.3	3.1	208	394	13	0	0	30	S	exo-b-(1,3)-glucanase

表 1-9 Dali による A4-β-Gal ドメイン A の類似構造検索結果

NR.2 が A4-β-Gal ドメイン A と最も相同性の高い構造の *B. cereus* β-アミラーゼ

NR.10 が大腸菌由来β-ガラクトシダーゼ

NR.	STRID1	STRID2	Z	RMSD	LALI	LSEQ2	%IDE	REVERS	PERMUT	NFRAG	TOPO	PROTEIN
1:	5988-A	5988-A	44.2	0.0	253	253	100	0	0	1	S	
2:	5988-A	1qdl-B	10.9	3.0	152	195	14	0	0	17	S	anthranilate synthase (trpe-subunit) fragment anthrani
3:	5988-A	1gpm-A	10.4	4.2	171	501	13	0	0	22	S	gmp synthetase (xmp aminase)
4:	5988-A	1c3o-B	9.7	3.2	148	379	13	0	0	16	S	carbamoyl phosphate synthetase ec carbamoyl phosphate s
5:	5988-A	1g2i-A	7.6	3.1	121	166	15	0	0	11	S	protease i
6:	5988-A	1ctf9-A	7.4	2.7	113	727	16	0	0	12	S	catalase hpii Mutant
7:	5988-A	1qo0-D	6.5	2.9	103	189	10	0	0	9	S	amic fragment amir fragment
8:	5988-A	1tmy	6.4	3.1	101	118	10	0	0	9	S	chey protein (tmy) biological_unit
9:	5988-A	1a04-A	6.4	2.7	97	205	15	0	0	13	S	nitrateNITRITE RESPONSE REGULATOR PROTEIN NARL fragment
10:	5988-A	2dhq-A	6.3	3.4	114	136	13	0	0	13	S	3-dehydroquininate dehydratase (dehydroquinase) biologica
11:	5988-A	1req-A	6.0	3.4	105	727	14	0	0	9	S	methylmalonyl-coa mutase
12:	5988-A	1gca	5.8	3.3	110	309	9	0	0	13	S	GlucoseGALACTOSE-BINDING PROTEIN COMPLEX WITH GALACTOSE
13:	5988-A	1dbw-A	5.8	2.8	97	123	13	0	0	11	S	transcriptional regulatory protein fixj fragment Mutant

表 1-10 Daliによる A4-β-Gal ドメイン B の類似構造検索結果

NR.2 が A4-β-Gal ドメイン B と最も相同性の高い構造を持つ

*S. solfataricus* アントラニル酸合成酵素 TrpG サブユニット

表 1-9 に比べ、相同性の高さを表す Z 値が低く、類似構造が少ない

ガラクトース	直接的な水素結合		水分子を介した認識		
	Protein atom	距離 (Å)	Water atom	Protein atom	距離 (Å)
O1	Glu141 O <sup>δ1</sup>	3.11			
	Glu312 O <sup>ε1</sup>	2.26			
	Tyr266 O <sup>η</sup>	3.46			
O2	Gln140 N <sup>δ2</sup>	2.89	water 1 O	Arg32 N <sup>η1</sup>	2.80
	Glu312 O <sup>ε2</sup>	2.83		Glu35 O <sup>ε1</sup>	2.77
	water 1 O	3.04		Gln140 O <sup>δ1</sup>	2.74
				Glu312 O <sup>ε2</sup>	3.10
O3	Arg102 N <sup>η1</sup>	3.26	water 1 O	Arg32 N <sup>η1</sup>	2.80
	water 1 O	2.56		Glu35 O <sup>ε1</sup>	2.77
	water 2 O	2.91		Gln140 O <sup>δ1</sup>	2.74
				Glu312 O <sup>ε2</sup>	3.10
				water 2 O	Trp182(sym) N <sup>ε1</sup>
			Glu360 O <sup>δ1</sup>	2.94	
O4	Arg102 N <sup>η1</sup>	2.96			
	Arg102 N <sup>η2</sup>	3.08			
	Glu360 O <sup>δ2</sup>	2.41			
O6	Trp320 N <sup>ε1</sup>	2.91			
	His363 N <sup>ε2</sup>	2.83			
疎水相互作用	Phe 350				

表 1-11 ガラクトースの認識残基

GH	PDB コード	酵素名	A4- $\beta$ -Gal		BCB (GH-14)	
			RMSD	Z-score	RMSD	Z-score
14	1b9z	$\beta$ -amylase (BCB)	3.5	25.6	-	-
1	1qvb	$\beta$ -glycosidase	3.5	15.8	4.2	18.1
2	1bhg	$\beta$ -glucuronidase	2.5	15.4	3.1	15.8
	1bgl	$\beta$ -galactosidase (EC- $\beta$ -Gal)	3.0	14.1	3.2	14.2
5	1qno	endo-1,4- $\beta$ -D-mannanase	2.7	19.4	3.0	21.0
10	1tax	endo-1,4- $\beta$ -xylanase	3.5	14.4	3.4	15.8
17	1aq0	1,3-1,4- $\beta$ -glucanase	3.1	12.7	3.6	13.5
26	1j9y	$\beta$ -mannanase	3.4	10.8	3.8	12.8

表 1-12 A4- $\beta$ -Gal、BCB と Clan GH-A 酵素の構造比較

RMSD と Z-scores は、A4- $\beta$ -Gal (残基番号 1-389) と BCB (残基番号 1-417) の TIM バレルフォールドドメインについて、Dali サーバーの類似構造検索結果を示した。

	相対比活性 (%)	変異部位	アミノ酸の変化
1	360	1003 C→T	317 Pro→Ser
2	97	792 C→T	246 Phe→Phe
		1072 C→T	340 Leu→Leu
		1272 C→T	406 Tyr→Tyr
3	340	1003 C→T	317 Pro→Ser
		1792 C→T	580 Leu→Phe
4	230	532 C→T	160 Arg→Trp
		849 C→T	265 Ser→Ser
		1003 C→T	317 Pro→Ser
		1200 C→T	382 Arg→Arg
		1834 C→T	594 Leu→Leu
5	190	672 C→T	206 His→His
		870 C→T	272 Asp→Asp
		932 C→T	293 Ala→Val
		1023 C→T	323 His→His
		1107 C→T	351 Arg→Arg
		1172 C→T	373 Pro→Leu
		1846 C→T	598 Leu→Leu
		1867 A→G	605 Thr→Ala
6	130	940 C→T	296 His→Tyr
		1041 C→T	329 Pro→Pro
		1430 C→T	459 Pro→Leu
7	200	1021 C→T	323 His→Tyr

表 1-13 ランダム変異による変異導入位置と活性の変化

(相対比活性は野生型を 100 とした)

P317S および H323Y に着目して解析を行った

	野生型	P317S	H323Y	P317S、H323Y
$K_m(\text{mM})$	3.9	4.2	<b>2.1</b>	<b>2.7</b>
$k_{\text{cat}}(10^{-5} \text{ min}^{-1})$	1.5	<b>5.0</b>	1.6	<b>5.7</b>
相対 $k_{\text{cat}}/K_m(10^{-5} \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1})$	1	3.1	2	<b>5.5</b>

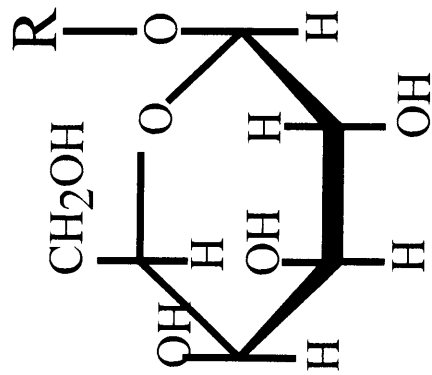
表 1-14 変異体 A4- $\beta$ -Gal の動力的パラメーター

P317S、H323Y	
結晶	二重変異体
波長 (Å)	0.9860
空間群	<i>P</i> 321
単位胞パラメーター	
<i>a=b</i> (Å)	98.25
<i>c</i> (Å)	130.07
分解能 (Å)	19.84-1.81 (1.89-1.81)
Completeness (%)	99.0(97.6)
Mean <i>I</i> / $\sigma$	8.6
<i>R</i> <sub>sym</sub> (%) *	7.6(37.0)

\*  $R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{sym} |F| - \langle F \rangle}{\sum_{hkl} F}$ . 括弧内の数字は最高分解能範囲の値

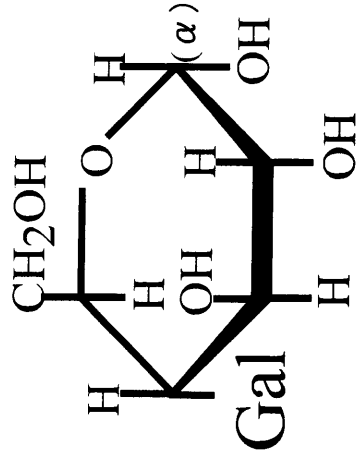
分解能 (Å)	19.84-1.81
No. of residues/No. of waters	644/582
<i>R</i> <sub>cryst</sub> (%)	18.6
<i>R</i> <sub>free</sub> (%)	20.3

表 1-15 変異体 A4- $\beta$ -Gal 結晶の X 線回折データ測定と精密化結果

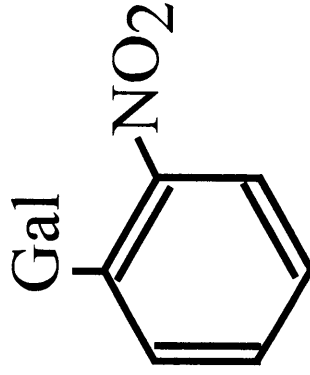


$\beta$ -D-ガラクトシド

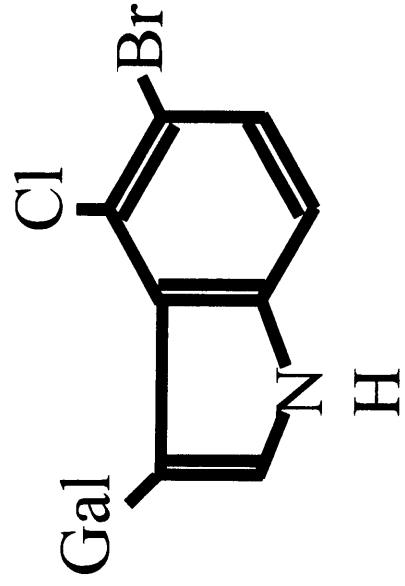
R:



(a)



(b)



(c)

図1-1 ガラクトシド化合物

(a) ラクトース

(b) o-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド  
(ONP-Gal)

(c) 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル  
 $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (X-Gal)



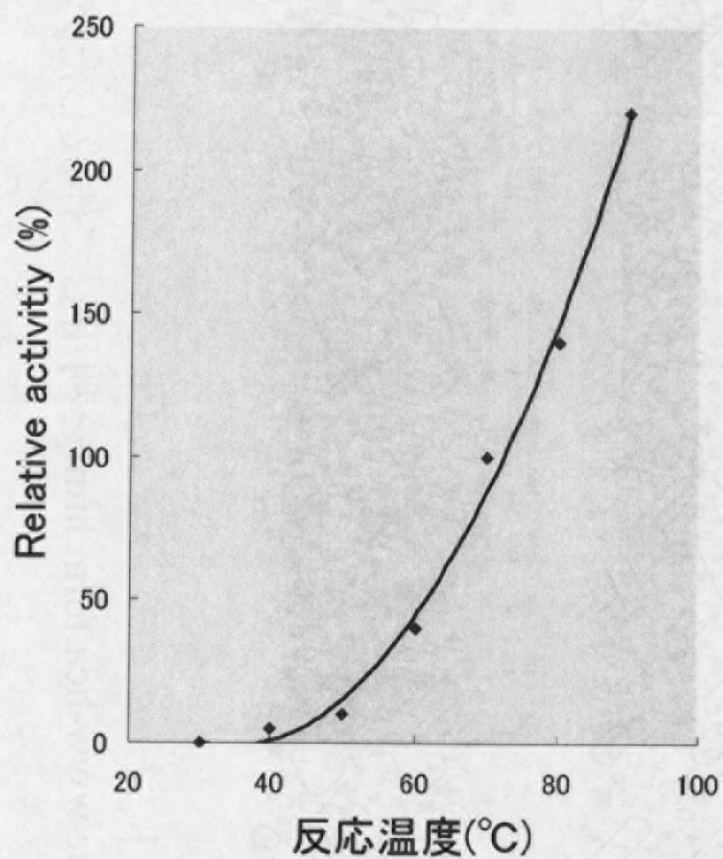


図 1-2 A4- $\beta$ -GalのONP-Galに対する加水分解活性の温度依存性 [8]

70°Cにおける活性を100%としている

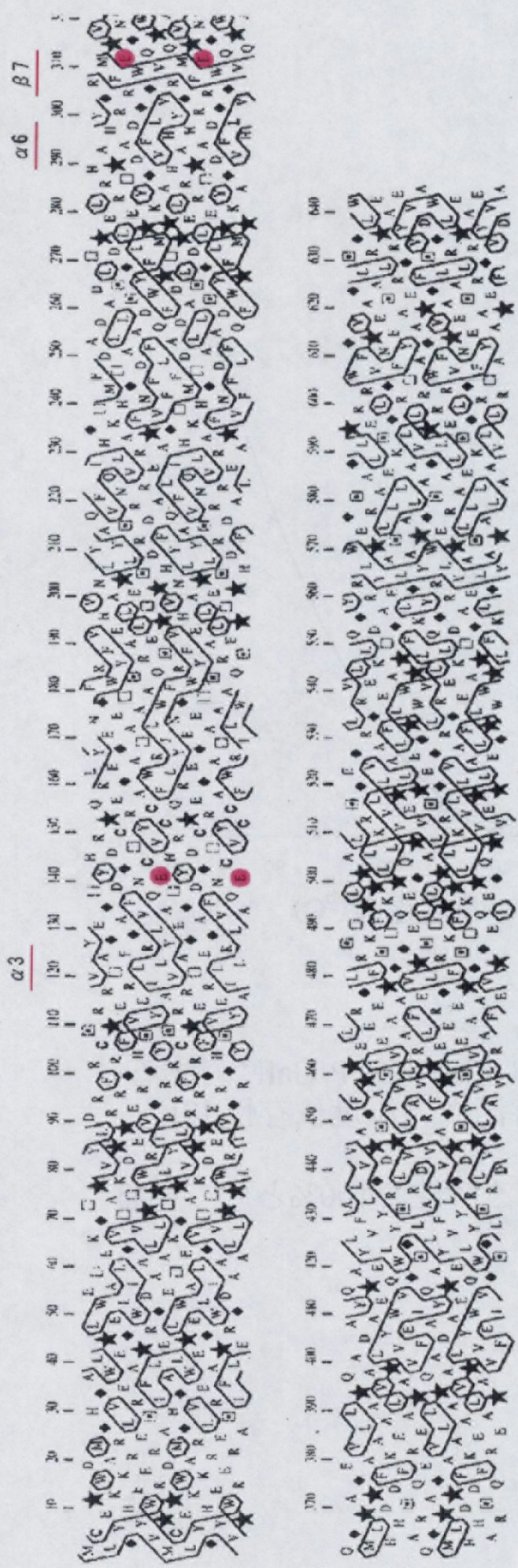


図 1-3 A4- $\beta$ -GalのHCAプロット  
 (<http://www.lmcp.jussieu.fr/~soyer/www-hca.form.html>を利用して作成した)

- ◆ グリシン
- ★ プロリン
- スレオニン
- ◻ セリン を表す

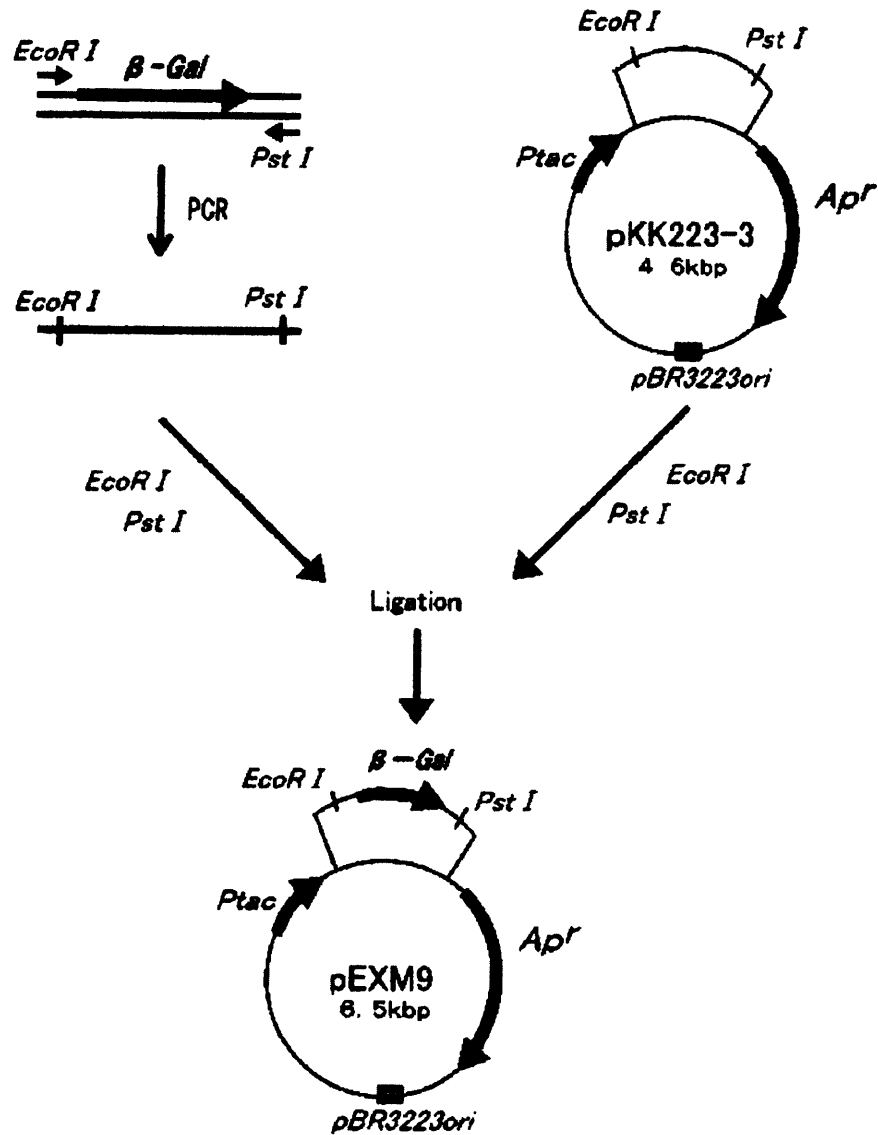


図 1-4 A4- $\beta$ -Gal発現ベクターpEXM9の構築  
(株)よつ葉乳業・大津氏により作成された

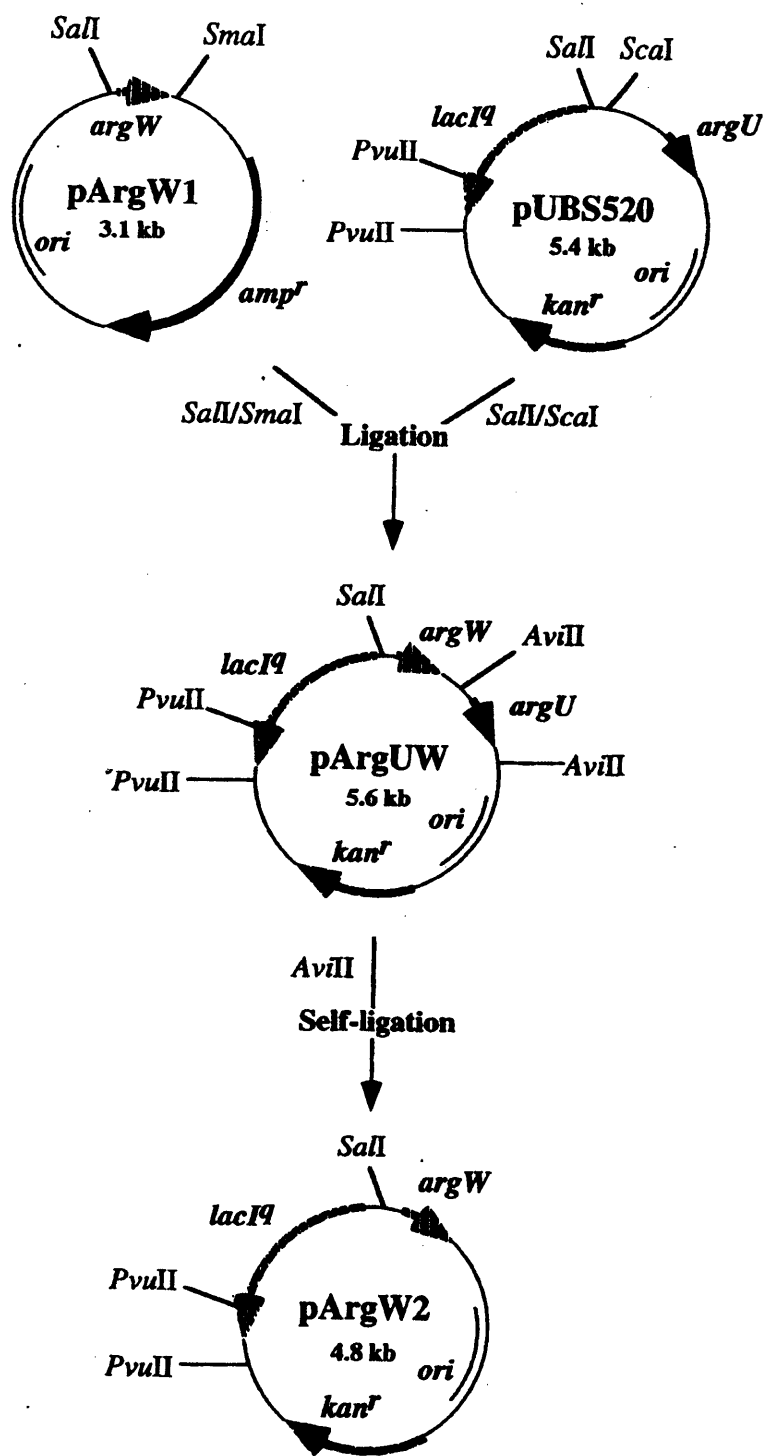
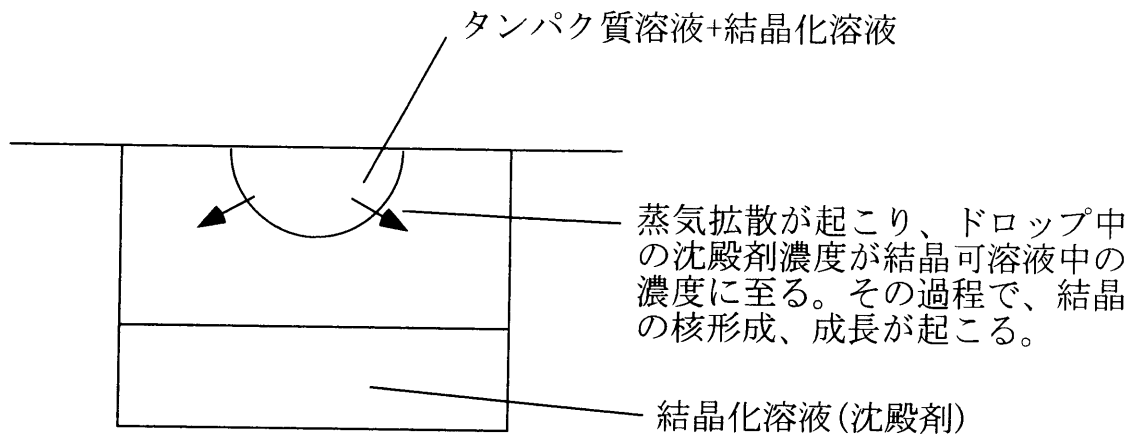


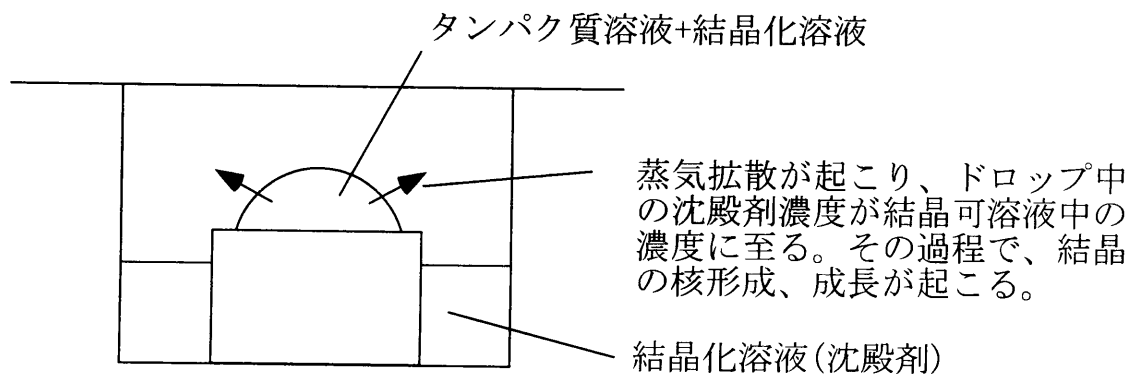
図 1-5 tRNA<sub>AGG</sub> 発現用ベクター pArgW2 の構築 [17]

本研究室の今村により構築された

### ハンギングドロップ蒸気拡散法



### シッティングドロップ蒸気拡散法



### オイルバッチ法

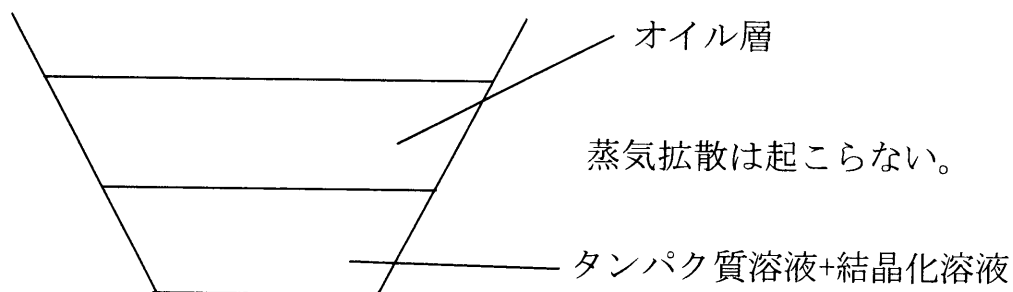
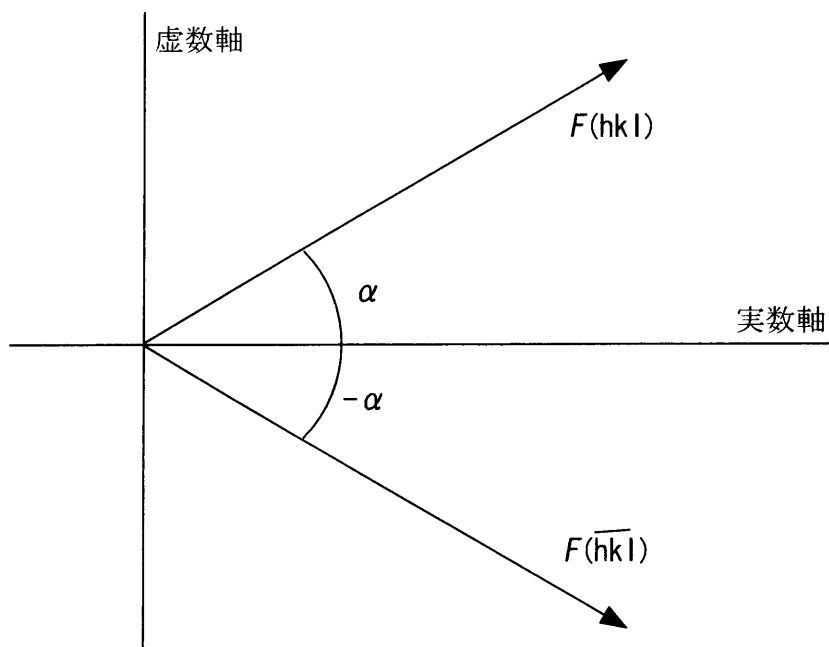
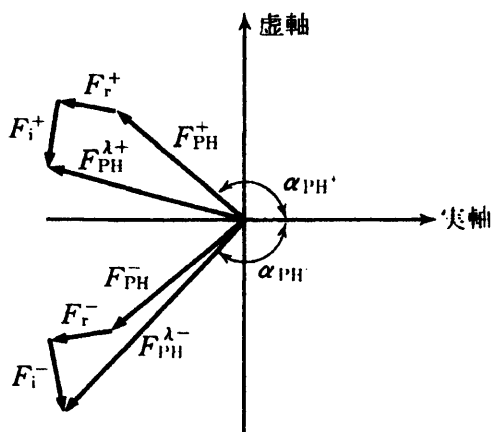


図 1-6 結晶化の概念図





波は一般式  $A\cos\alpha + iA\sin\alpha$  で表される。  
 一般にX線の回折では、反対の位相角を持つ  $F(hkl)$ 、 $F(\overline{hkl})$  は等しい(バイフット対)。  
 X線の回折像として求められるデータからは、位相角  $\alpha$  に関する情報を決定できないため、 $F(hkl)$  を求めることはできない。



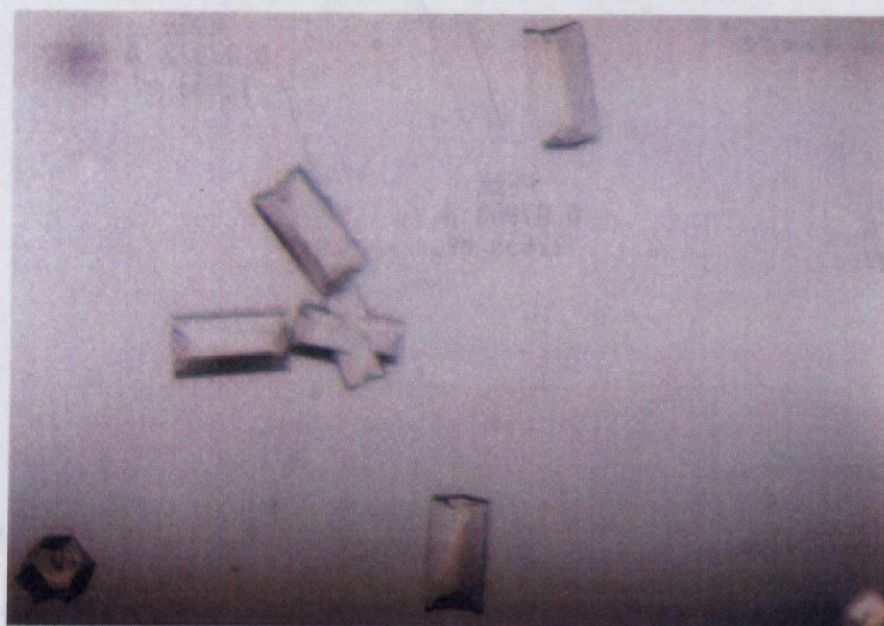
異常分散効果のない (小さい) 波長を用いた時、バイフット対の関係は

$$|F_{PH}^+| = |F_{PH}^-|$$

一方、異常分散効果の大きい波長で測定した時、バイフット対の関係は

$$|F_{PH}^{\lambda+}| \neq |F_{PH}^{\lambda-}|$$

図 1-7 アルゴンド図を用いた異常分散効果の表し方



0.2 mm

図 1-8 A4- $\beta$ -Gal結晶

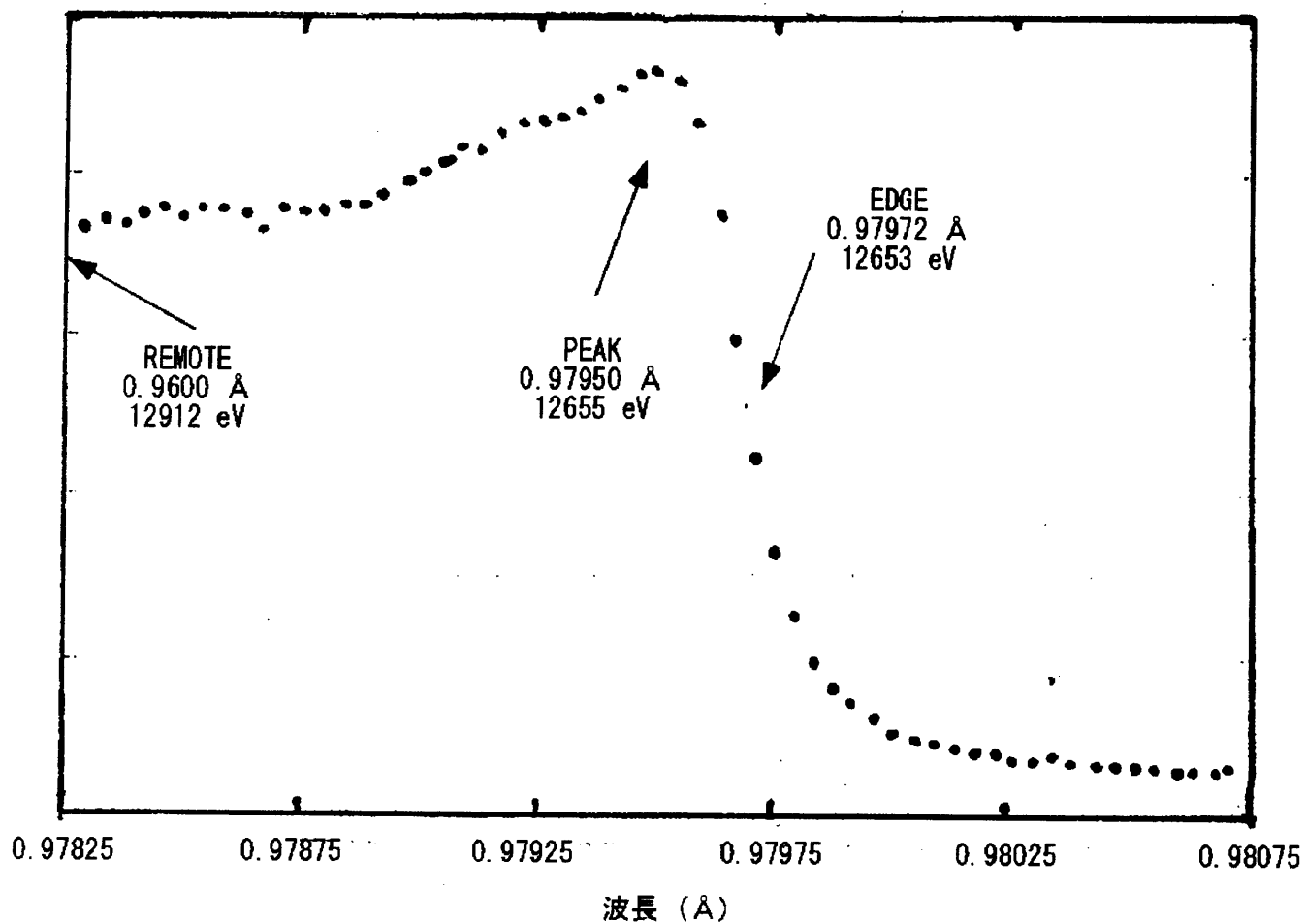
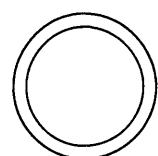


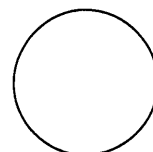
図 1-9 セレノメチオニンA4- $\beta$ -Gal溶液(10 mg/ml)のXAFS測定結果



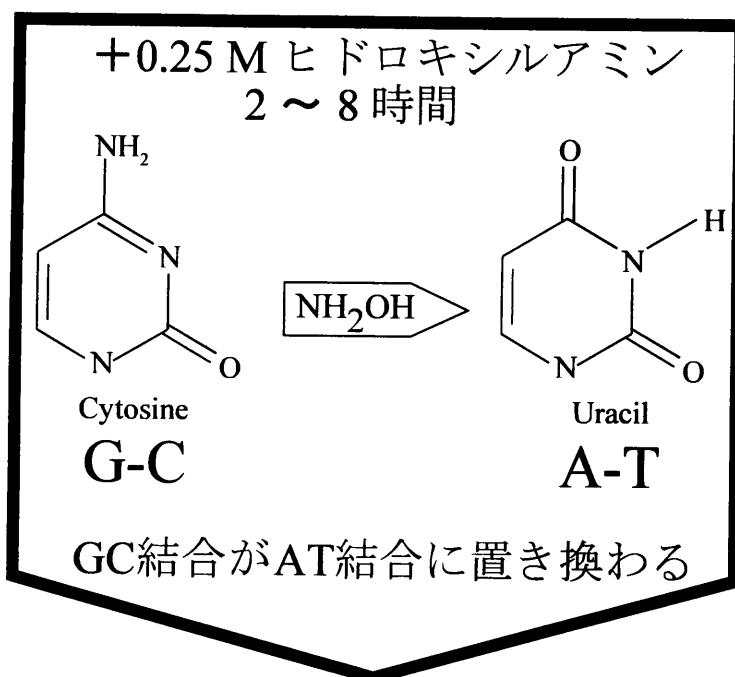


ds DNA

ヘルパーファージ  
M13K07



ss DNA



形質転換

スクリーニング

X-Galを含む寒天培地で培養  
濃い青色を呈するコロニーを選択 (37°C)

図 1-10 ランダム変異導入方法

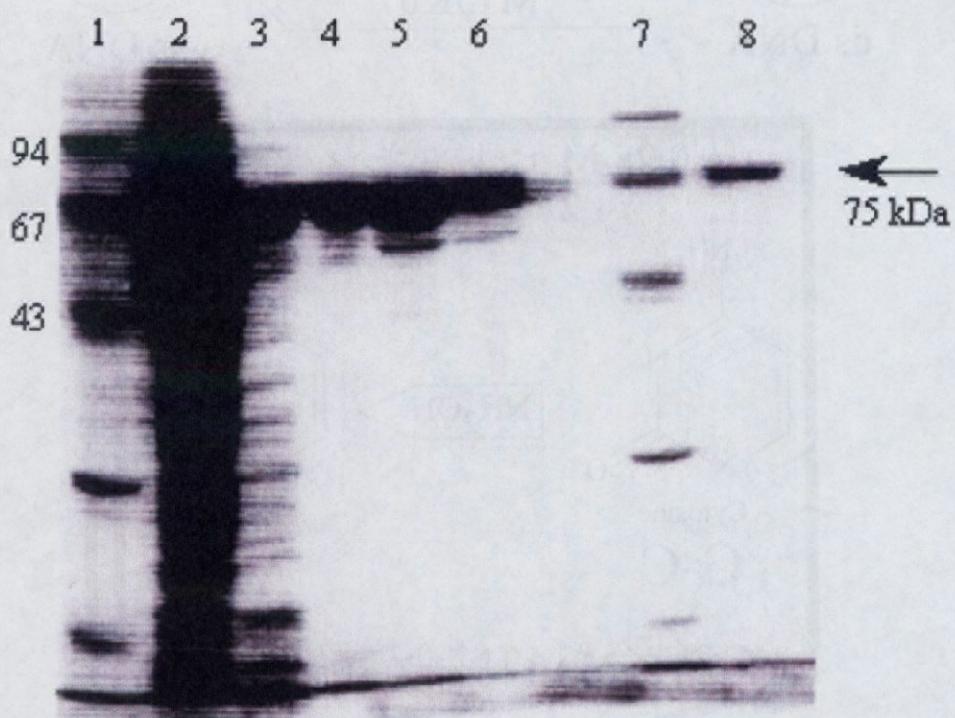


図 1-11 A4- $\beta$ -Galの精製結果 (SDS-PAGE:ゲル濃度8%)

1. マーカー (上から94、67、43 kDa)
2. 菌体破碎液上清
3. 熱処理上清
4. DEAE Sepharoseカラムクロマトグラフィー後
- 5-6. MonoQ
7. マーカー
8. ゲル濾過カラムクロマトグラフィー後

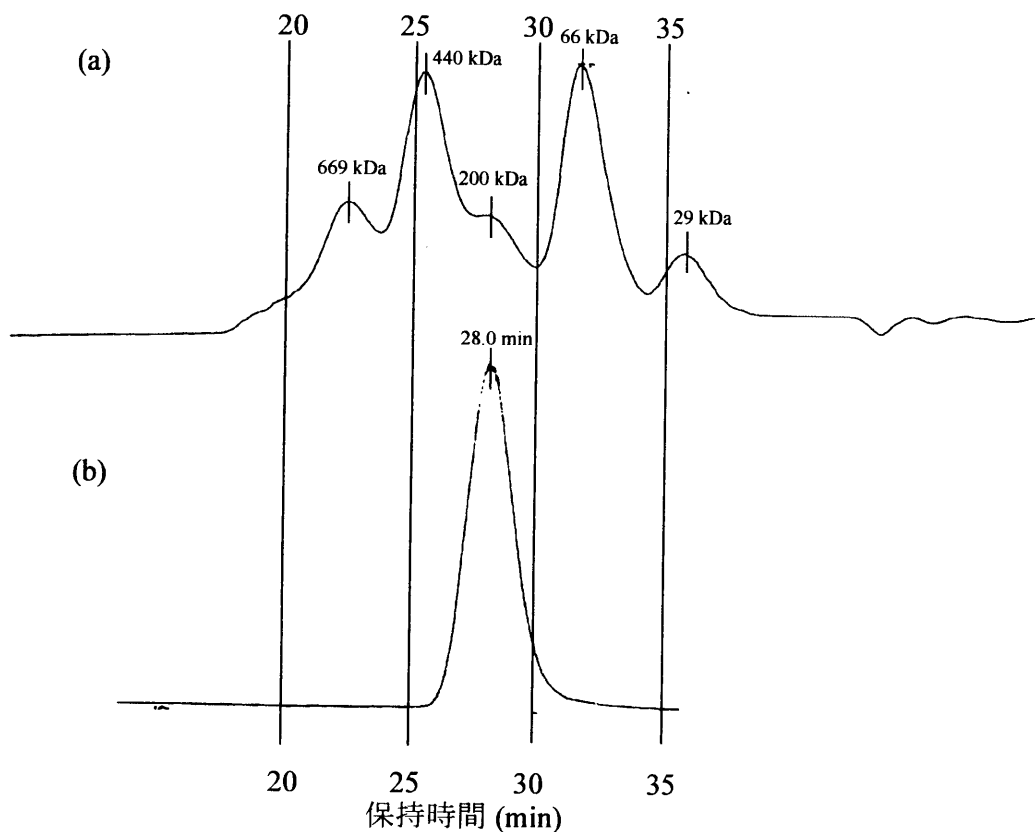


図 1-12 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる分子サイズ測定結果

- (a) 分子量マーカー Thyroglobulin (669 kDa)、  
 Apoferritin (443 kDa)、  
 $\beta$ -Amylase (200 kDa)、  
 Bovine Serum Albumin (66 kDa)、  
 Carbonic Anhydrase (29 kDa)
- (b) A4- $\beta$ -Gal

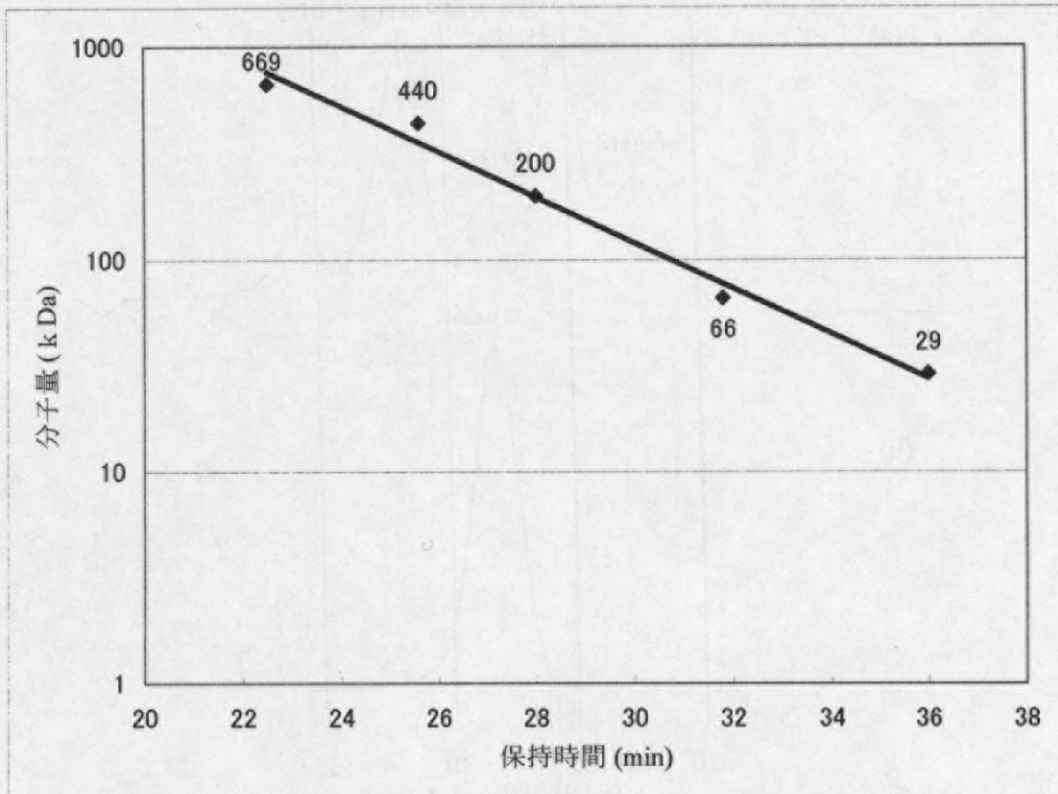


図 1-13 ゲル濾過カラムクロマトグラフィー  
保持時間の対数プロット

このプロットから、A4- $\beta$ -Gal の分子量は

約 170 kDa (保持時間 28.6 分)

と見積もられる

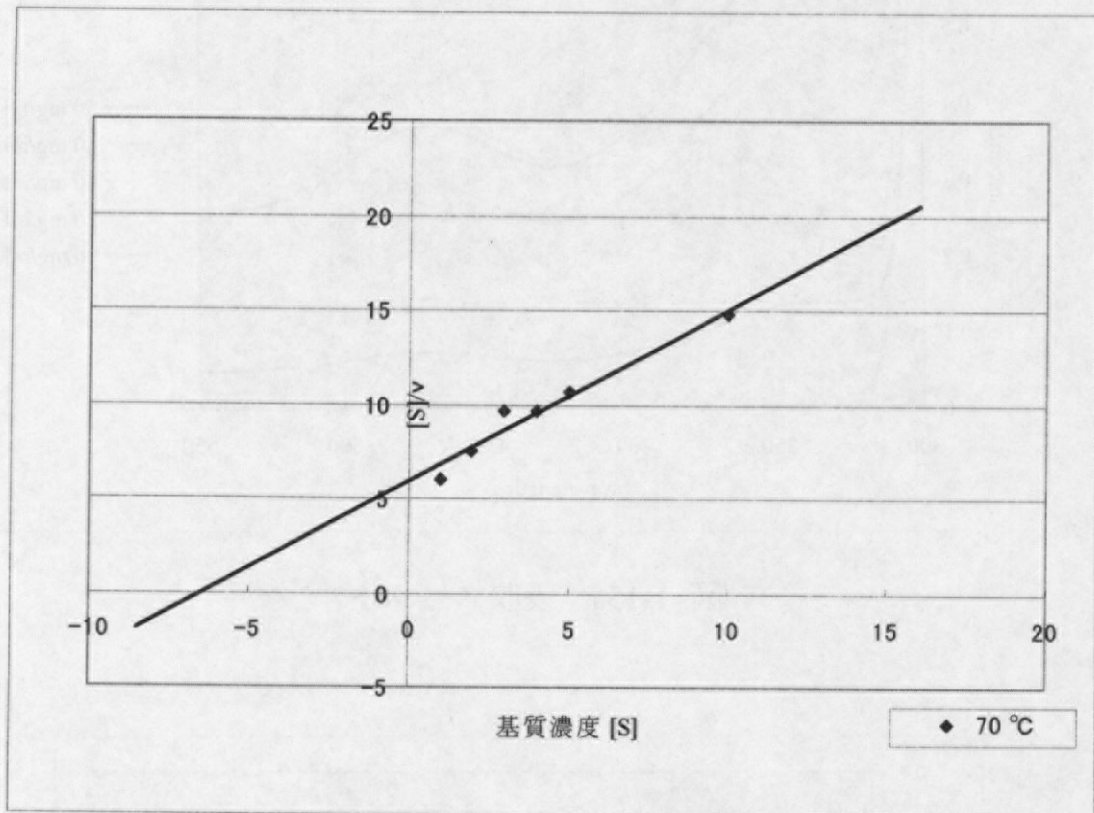


図 1-14  $[S]_0/v \sim [S]_0$  線形プロット

基質 ONP-Gal に対する測定結果  
 $K_m = 5.88 \text{ mM}$ 、 $k_{\text{cat}} = 2.8 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$  (70 °C)



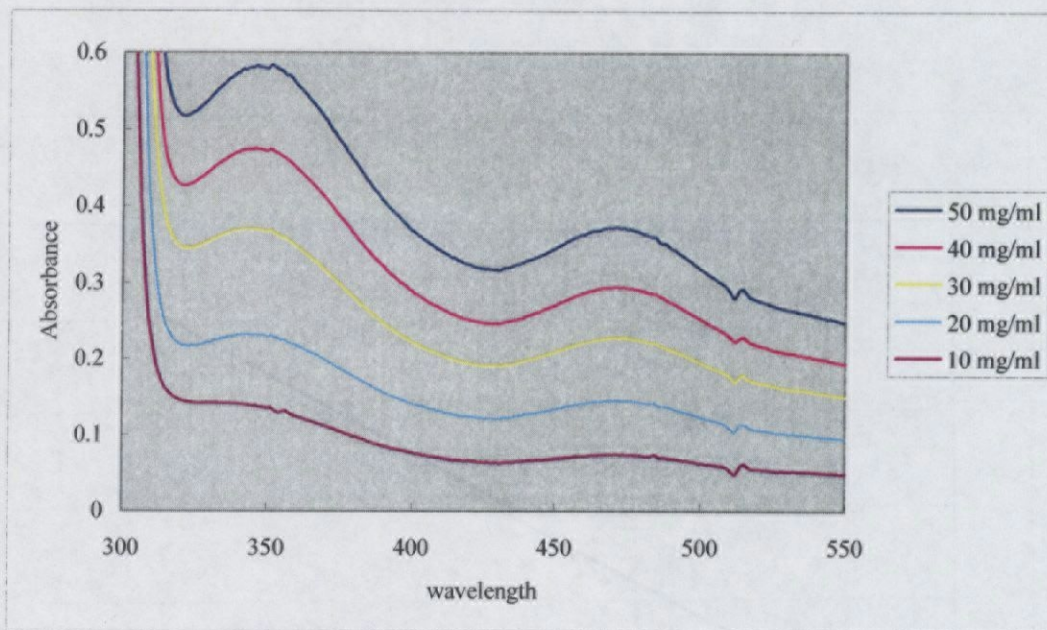


図 1-15a 吸収スペクトル

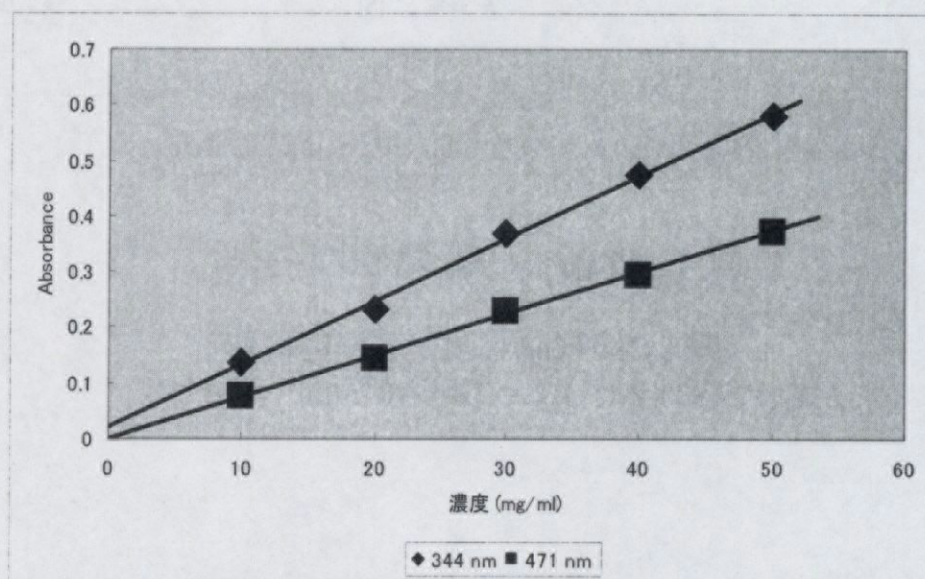


図 1-15b 各濃度における極大吸光度

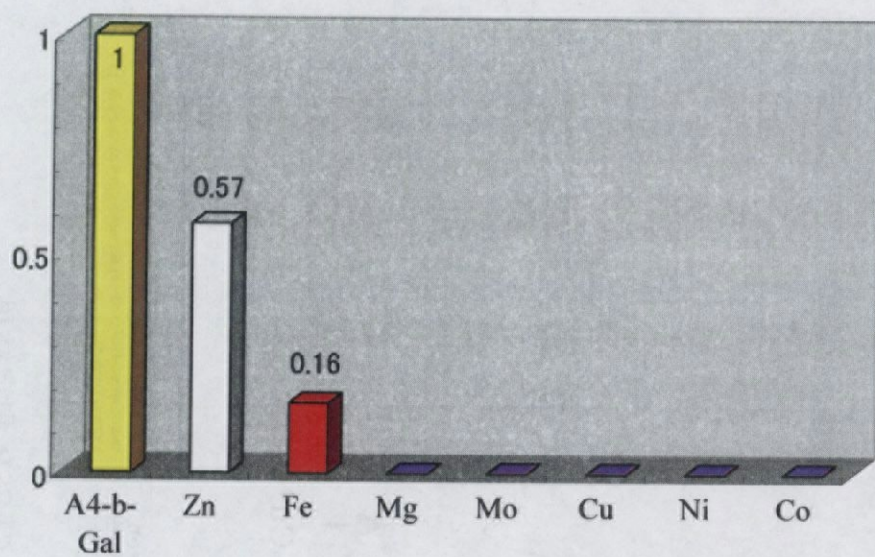


図 1-16 ICP 法による金属定量結果

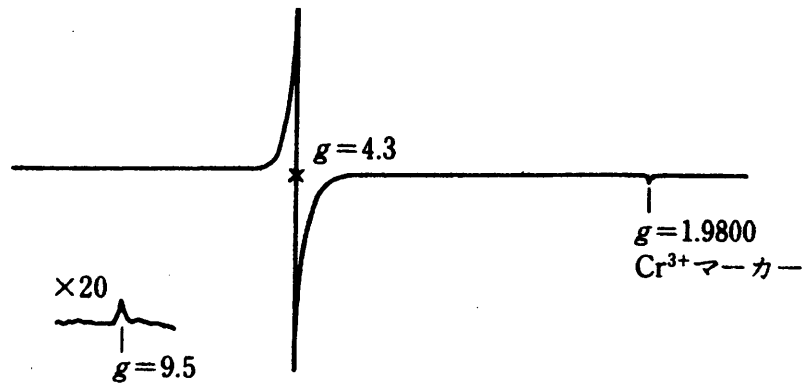
A4-β-Gal 1 分子あたり 0.57 個の Zn 原子と  
0.16 個の Fe 原子が検出された

Mg、Mo、Cu、Ni、Co は検出されなかった



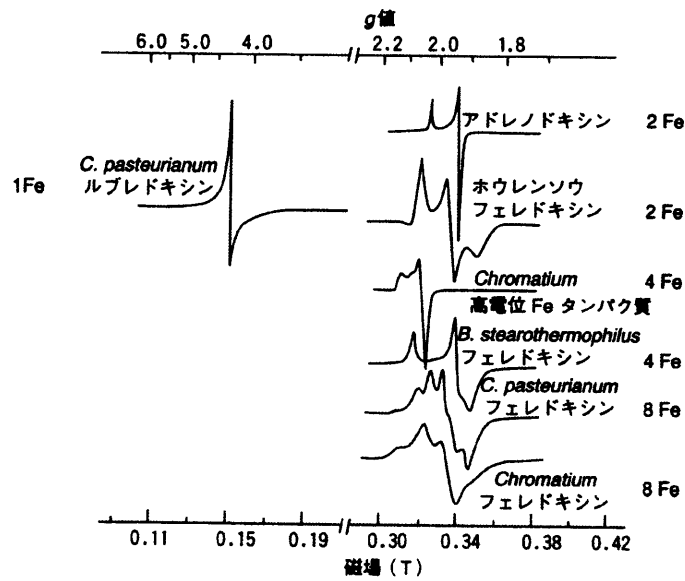






洋液中フリーなFe<sup>3+</sup>のESR

上下対象のピークが検出される



鉄硫黄クラスターを形成する鉄の ESR

ルブレドキシソ型は  $g = 4.3$  で、上下非対称なピークが検出される

図 1-17 (b) 鉄の各存在条件下における ESR

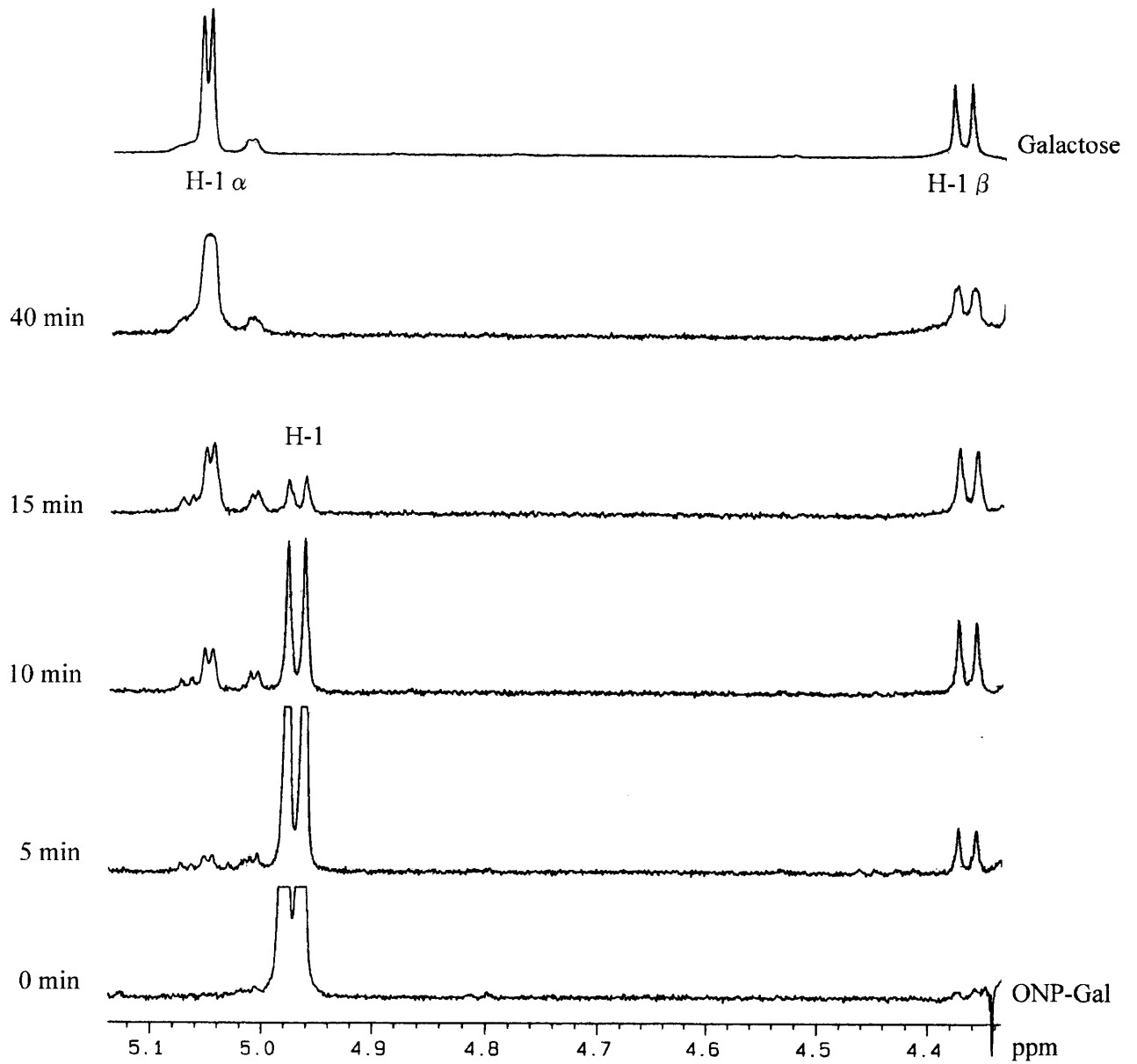


図 1-18  $^1\text{H}$  NMRによるONP-Gal加水分解生成物の  
アノマー分析結果  
(最上段: ガラクトース溶液のNMRパターン)

ONP-Galの $\text{D}_2\text{O}$ 溶液とA4- $\beta$ -Galを混合し経時的に測定した