

第 2 章 GT-36 *Vibrio proteolyticus* 由来加リン酸分解酵素  
キトビオースホスホリラーゼの X 線結晶構造解析  
-反転型加リン酸分解酵素の反応機構と GT-36→GH-94 の再分類-

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

### 2-1 序

本章は、GT-36 に分類される加リン酸分解酵素 *Vibrio proteolyticus* 由来キトビオースホスホリラーゼ(以下 ChBP)の X 線結晶構造解析により明らかになった立体構造について、他の GH、GT ファミリーの酵素の構造と比較し、ChBP の反応機構や他の糖質関連酵素との進化的関連について考察する。ChBP を含む GT-36 酵素の基質特異性、反応特異性と構造の相関については、第3章に記述する。

#### 2-1-1 加リン酸分解酵素

加リン酸分解酵素(EC2.4.1.-)は、図 2-1 に示すようなオリゴ糖、多糖のグリコシド結合を切断し、リン酸が付加した糖-リン酸を生成する反応を触媒する。加リン酸分解反応は、本来"ホスホリラーゼ"と呼ぶべき反応であるが、糖質関連酵素では通常、"分解される基質"+"ホスホリラーゼ"という名前がつけられている。糖-リン酸の結合エネルギーは、糖-ヌクレオチドの結合エネルギーほど高くないため、一般的な GT 酵素と異なり、加リン酸分解反応は可逆性を有する。

加リン酸分解酵素も、反応の前後でアノマーの保持、反転により保持型、反転型の二種に分類されている。加リン酸分解酵素は単糖の糖-リン酸を合成反応の基質としており、これを糖供与体と呼ぶ。転移される側を糖受容体と呼ぶ。

#### 2-1-2 加リン酸分解酵素の分類

加リン酸分解酵素は糖-リン酸の結合エネルギーを用いて糖を転移する酵素であるため、EC ナンバー2.4.1.-が与えられている。そのため、加リン酸分解酵素は GT 酵素の一種であると考えられてきた。

加リン酸分解酵素の中で最も詳細な研究が行われてきたのは、グリコーゲンホスホリラーゼである。グリコーゲンホスホリラーゼは、細胞内貯蔵多糖であるグリコーゲン、デンプンの $\alpha$ -グリコシド結合に作用し、グルコース-1-リン酸を生成する酵素である[1]。グリコーゲン、デンプンの合成、分解に関わる酵素であり、動物、植物、微生物の細胞内に存在する[1, 2]。1979年にウサギ筋肉由来酵素の立体構造が報告されており[3, 4]、大腸菌[5]、酵母[6]、ヒト由来のもの立体構造が明らかになった。そのフォールドは GT-B フォールドであることが明らかになっている(GT のフォールドについては序章を参照)。グリコーゲンホスホリラーゼが GT-B のフォールドを持っていたことで、加リン酸分解酵素は立体構造の面からも、GT 酵素の一種であると考えられてきた。グリコーゲンホスホリラーゼは GT-35 に分類されており、その他の加リン酸分解酵素も GT 酵素として GT-4、GT-36 に分類された[7, 8]。

一方、近年 GH 酵素とアミノ酸配列の相同性を持つ加リン酸分解酵素が

発見されている。これらの酵素は、加水分解酵素活性を持たないものの、GH 酵素として分類される。このような加リン酸分解酵素は GH-13、GH-65 に見られる。このように加リン酸分解酵素の分類は GH、GT に混在するため、非常に複雑化している。

### 2-1-2 加リン酸分解酵素の詳細

現在、糖質関連酵素としてデータベース CAZy に登録されている加リン酸分解酵素を表 2-1 にまとめた。全ての知られている加リン酸分解酵素は、非還元末端のグリコシド結合を加リン酸分解するエキソ型の酵素である。本節では、加リン酸分解酵素を

1.  $\alpha$ -グリコシド結合に作用する保持型酵素
2.  $\alpha$ -グリコシド結合に作用する反転型酵素
3.  $\beta$ -グリコシド結合に作用する酵素

の3つに分類して、その詳細について説明する。

#### 1. $\alpha$ -グリコシド結合に作用する保持型酵素

このカテゴリーには GH-13・スクロースホスホリラーゼ(EC 2.4.1.7)、GT-4・トレハロースホスホリラーゼ(EC 2.4.1.64)、GT-35・グリコーゲンホスホリラーゼ(EC 2.4.1.1)が含まれる。

##### ・GH-13

GH-13 は $\alpha$ -アミラーゼファミリーと呼ばれる。このファミリーには $\alpha$ -アミラーゼ( $\alpha$ -グリコシド結合の加水分解酵素)、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(環状糖の合成酵素)、加リン酸分解酵素・スクロースホスホリラーゼ(スクロース + リン酸  $\leftrightarrow$  グルコース-1-リン酸 + フルクトース)など多種の糖質関連酵素が分類されており、GH 酵素中最大のファミリーである。GH-13 の構造は TIM バレルフォールドを持ち、触媒反応は反応の前後でアノマーが保持されるアノマー保持型の機構をとる。GH-13 の多様な基質特異性は、反応中間体であるグリコシル-酵素複合体に対し、様々な求核基(水分子、糖、リン酸)が攻撃できることで生じていると考えられている(図 2-2)。スクロースホスホリラーゼは、リン酸非存在下でも糖転位反応が起こり[9]、本質的にはリン酸も転移することができる $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼと考えられる。

*Bifidobacterium adolescentis* 由来スクロースホスホリラーゼの立体構造が明らかになっているが[10]、糖、リン酸の複合体構造が明らかになっていない。

##### ・GT-4

GT-4 にはトレハロースホスホリラーゼ(Glc- $\alpha$ 1, $\alpha$ 1-Glc + リン酸  $\leftrightarrow$  グル

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

コース-1-リン酸 + グルコース)の他にも、スクロースシンターゼ(UDP グルコース + フルクトース  $\leftrightarrow$  スクロース + UDP)、 $\alpha$ -グリコシルトランスフェラーゼなど様々な $\alpha$ -グリコシド結合に対して作用する酵素が分類されている。GT-4 の立体構造は明らかになっていないが、構造予測から GT-B のフォールドを持つと考えられている(CAZy の記述による)。

### ・GT-35

GT-35 には前述のグリコーゲンホスホリラーゼが分類される。GT-35 酵素は反応にピリドキサルリン酸(PLP)を必要としている。GT-35 酵素の立体構造解析では、PLP、糖、リン酸の複合体構造が解析され、それらの構造から、PLP を介する反応機構が考えられている(図 2-3) [5, 11-13]。2004 年、グリコーゲンホスホリラーゼと同じくグリコーゲンに作用する酵素グリコーゲンシンターゼ(GT-5)の立体構造が明らかになった[14]。これらの構造は、いずれも GT-B の構造を有しており、構造比較の結果、それぞれの糖供与体結合部位が、シンターゼでは糖-ヌクレオチド、ホスホリラーゼでは糖-リン酸に適した形状で、ホスホリラーゼの PLP はシンターゼのヌクレオチド部分に相当する位置にあることが明らかになった(図 2-4) [14, 15]。

### 2. $\alpha$ -グリコシド結合に作用する反転型酵素

GH-65・マルトースホスホリラーゼ(EC 2.4.1.8)が含まれる。マルトースホスホリラーゼはマルトース(Glc- $\alpha$ 1,4-Glc)を加リン酸分解し、 $\beta$ -グルコース-1-リン酸とグルコースを生成する反応を触媒する。本酵素はすべて細菌の菌体内酵素として発見され、マルトースの代謝に関与していると考えられている。マルトースホスホリラーゼはトレハロース(Glc- $\alpha$ 1, $\alpha$ 1-Glc)の加水分解酵素トレハララーゼとアミノ酸配列の相同性を有していることから、GH 酵素として分類されているが、加水分解活性を持たない。*Lactobacillus brevis* 由来マルトースホスホリラーゼ(以下 MalP と表記する)について立体構造が明らかになっており [16]、GT-A、GT-B と異なる( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> バレルフォールドを持っていることが明らかになった。MalP の立体構造については 2-15 節に詳しく記述する。MalP の構造は、リン酸複合体構造が明らかになっているものの、糖複合体構造が不明であるため、反転型の加リン酸分解反応に関する構造的知見は不明である。

### 3. $\beta$ -グリコシド結合に作用する酵素

現在、 $\beta$ -グリコシド結合に作用するアノマー保持型の加リン酸分解酵素は CAZy に登録されていない。また、反転型加リン酸分解酵素も GT-36 のみである。GT-36 については 2-1-6 節に記述する。

このように加リン酸分解酵素は、 $\alpha$ -グリコシド結合に作用する保持型酵素につ

いてのみ詳細な構造の知見が得られているが、 $\beta$ -グリコシド結合に作用する酵素、反転型の加リン酸分解酵素については、構造と反応機構に関する知見が少ない。

### 2-1-3 加リン酸分解酵素の生理的意義

加リン酸分解酵素の生理的意義は、糖を ATP などのエネルギーを使わずにリン酸化することである。糖は解糖系および脂質合成の初発段階としてリン酸化されるが、そのリン酸化には ATP 依存性のグルコキナーゼ、ヘキソキナーゼが関与している。しかし、呼吸による ATP 合成ができず、ATP 生産性が低い嫌気性生物にとって、糖のリン酸化で ATP を消費することはエネルギー的に不利である。そのため、オリゴ糖の加リン酸分解で直接糖-リン酸を生成することで、ATP を節約していると考えられている。事実、加リン酸分解酵素は、嫌気性生物を由来とするものが多い[17]。

また、グリコーゲンホスホリラーゼのように、生体内における糖鎖合成に関与している加リン酸分解酵素もある。

### 2-1-4 加リン酸分解酵素の工業利用

酵素による糖鎖合成研究は、序章に記したように糖-ヌクレオチドを糖供与体とする GT 酵素に着目したことが多い。しかし、糖-ヌクレオチドは高エネルギー物質で不安定であり、基質の取り扱い、合成が困難である。また GT 酵素の多くは、ゴルジ内膜局在型の膜タンパク質であり、不安定なものが多い。そのため、実用的なオリゴ糖、糖鎖合成酵素として GT 酵素を用いるためには、克服すべき問題が山積している。

一方、加リン酸分解酵素は、2-1-1 節に記述したように、その反応は可逆性を有する。この可逆性を利用して、加リン酸分解酵素を実用的なオリゴ糖合成酵素として利用することが可能である。糖供与体となる糖-リン酸は糖-ヌクレオチドに比べて扱いやすく、様々なリン酸化糖を合成することができる。また、加リン酸分解酵素は反応の位置選択性において極めて特異性が高く、特定の位置に結合したグリコシド結合のみに作用する。この特異性の高さは逆反応を用いてオリゴ糖を合成するときにおいて重要な性質である。

2-1-2 節にまとめた加リン酸分解酵素は全て可溶性酵素であり、工業への応用も期待されるが、加リン酸分解酵素の研究は日本の食品総合研究所をはじめ、世界でも数箇所が行っているに過ぎない。しかし、その有用オリゴ糖合成能が多方面から注目される酵素である。実際、GT-36 酵素を用いた有用オリゴ糖合成方法が考案されている[18]。この方法については第3章に記述する。

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

### 2-1-5 *Vibrio proteolyticus* 由来キトビオースホスホリラーゼ(ChBP)

嫌気性の海洋細菌 *Vibrio proteolyticus* は図 2-5 に示すようなキトビオース (GlcNAc- $\beta$ 1,4-GlcNAc) を加リン酸分解し、 $\alpha$ -N-アセチルグルコサミン-1-リン酸 (GlcNAc-1-リン酸) と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を生じる反応を触媒するキトビオースホスホリラーゼ(ChBP)を保持している[19]。ChBP の加リン酸分解はアノマー反転型で起こる。キトビオースホスホリラーゼは多くの *Vibrio* 属の細菌が有しており、GlcNAc の重合体であるキチンの分解に関与する酵素であると考えられている(図 2-6) [20]。

ChBP はアミノ酸配列の相同性から、GT-36 に分類された。ChBP の基質特異性などの酵素学的性質については第 3 章に記述する。

#### キトビオース

キトビオースはグルコサミンの二量体 GlcN- $\beta$ 1,4-GlcN を指し、GlcNAc- $\beta$ 1,4-GlcNAc を di-N-アセチルキトビオースと表記する場合もある。本研究では、GlcNAc- $\beta$ 1,4-GlcNAc をキトビオースとして表記した。

### 2-1-6 GT-36

GT-36 には

- ・セロビオース(Glc- $\beta$ 1,4-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- $\beta$ 1,4-Glc + リン酸  $\leftrightarrow$  Glc- $\alpha$ -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)<sub>n</sub> + リン酸  $\leftrightarrow$  Glc- $\alpha$ -1-リン酸 + (Glc)<sub>n-1</sub>)
- ・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)。このうち、CBP、CDP、キトビオースホスホリラーゼは 800 残基程度の大きさであるが、環状 1,2 グルカンシンターゼは 3000 残基以上の大きさを有しており、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。

GT-36 に含まれる酵素は全て $\beta$ -グリコシド結合に作用し、アノマー反転型の反応でオリゴ糖を加リン酸分解する。その反応には、GT-35 加リン酸分解酵素のように PLP などの補因子を必要としない。GT-36 酵素のアミノ酸配列は、部分的に保存性が見られるものの(図 2-7)、詳細な反応機構は不明で、触媒残基、基質認識残基など全く不明であった。

### 2-1-7 本研究の目的

加リン酸分解酵素は生化学的にも、工業的にも重要な酵素であるが、未だ立体構造情報が少なく、その反応機構や基質特異性に関して構造基盤が不足

している。GT-36のような $\beta$ -グリコシド結合に作用するもの、アノマー反転型機構をとる加リン酸分解酵素は、立体構造が報告されておらず、特に糖との複合体構造の解明は、この研究分野の発展に大きく貢献することが期待される。

本章では、GT-36に分類されるChBPのX線結晶構造解析を行い、ChBPとGlcNAc(基質)、硫酸(リン酸アナログ)との複合体構造を得た。その構造を、既知の糖質関連酵素と比較し、ChBPの反応機構、他の糖質関連酵素との進化的関連について考察した。

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

### 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。

### 2-2 ChBP の大腸菌を用いた大量発現と精製

#### 目的

第2章の A4- $\beta$ -Gal と同様、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。本研究の対象である ChBP は、本多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[19]。本研究ではこの系を基に ChBP 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 ChBP 発現ベクター pET30b-ChBP は pET30b(Novagen)のマルチクローニングサイトに *Nde*I、*Xho*I で切り出された ChBP の遺伝子(2046 b.p.)を組み込んだものである(図 2-8) [19]。ChBP の C 末端に 6 残基のヒスチジンタグが付加されている。カナマイシン耐性遺伝子を持つため、pET30b-ChBP 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。pET30b-ChBP は大腸菌 BL21GOLD(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本多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  $\mu$ 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。



### **組換え大腸菌の大量培養**

- ① pET30b-ChBP を形質転換した大腸菌 BL21GOLD(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  $\mu$ M の IPTG を添加。
- ④ ③を 25°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。

### **ChBP の精製**

pET30b-ChBP により発現された ChBP は、C 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、ChBP 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  $\mu$ 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)のレジンを 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。

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

- 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 ChBP のアミノ酸組成より算出されたモル吸光係数  $166095 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  を用いて計算した。

## 2-3 ChBP 結晶化条件の探索

### 目的

ChBP 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 ChBP 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  $\mu\text{l}$  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 ChBP 溶液 2 $\mu\text{l}$ 、リザーバー溶液 2  $\mu\text{l}$  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。

### ChBP 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:** 0.1 M HEPES NaOH 緩衝液 pH 8.0、0.17 M CaCl<sub>2</sub>、30~40%(v/v)  
PEG400

**温度:** 4°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。
- ② 10 mg/ml の ChBP 溶液 5  $\mu$ l と結晶化溶液 5  $\mu$ l を混合し、カバーグラスに載せて VDX プレートにセット。

**日数:** 約 1 週間

### 2-4 ChBP セレノメチオニン置換体の作成

#### 目的

ChBP 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、ChBP 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。MAD 法の内容は 1-6 節に記述した。以下、セレノメチオニン置換体 ChBP に対し、置換していない ChBP を Native ChBP と表記する。

#### ChBP セレノメチオニン置換体の作成

##### **・E. coli B834 DE3 (pET30b-ChBP)株を用いた発現**

ChBP の発現用プラスミド pET30b-ChBP 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、10 ml の LB 培地(カナマイシン 20  $\mu$ g/ml)に植菌。
- ② 37°C、8 時間の振盪培養の後、5000 rpm、10 分間の遠心で集菌。
- 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 (+カナマイシン 20  $\mu$ g/ml) に植菌し、37°C、3 時間振盪培養。

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

- ⑥ 終濃度 100  $\mu\text{M}$  の IPTG を添加。
- ⑦ 25°C、15 時間の培養の後、5000 x g、10 分間の遠心で集菌。

### ・ChBP 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、2-3 節で示した Native ChBP の精製法に従った。

## 2-5 X 線回折データ測定

### 目的

2-3 節で得られた結晶 (図 2-9) 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は用いずとも、結晶化に用いた高濃度の PEG400 の影響で結晶は凍らなかつた。

### 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  $\mu\text{l}$  入れ、結晶化ドロップより成長した結晶を収穫。
- ② 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。
- ③ 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、BL18B および NW12、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。

## 2-6 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 PC/AT 互換機 (OS: LINUX)で行った。

### ChBP 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 ChBP の回折データ測定は、KEK-PF BL6A で行った。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 ChBP セレノメチオニン置換体結晶をのせ、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 については 1-8 節参照)
- ② 異なる 3 波長 (Peak 0.9785 Å、Edge 0.9796 Å、Remote 0.9712 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 2-3 節の条件で Native ChBP と同様に行った。
- ③ プログラム HKL2000[21]を用いて回折斑点の指数付け、積分計算、スケーリング。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 の強度は区別してスケーリングを行った。

### MAD データを用いた位相決定

HKL2000 で処理したデータを用いて、プログラム SOLVE [22]で X 線の初期位相角を決定。SOLVE の入力スクリプトを表 2-3 に示す。またプログラム RESOLVE を用いて、溶媒平滑化、ヒストグラムマッチングによる位相改善を行った。溶媒平滑化、ヒストグラムマッチングについて、1-8 節に記した。

### ARP/wARP を用いたセレノメチオニン置換体 ChBP の初期構造構築

測定した MAD データは分解能 2.3 Å であったため、プログラム ARP/wARP[23]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 MAD 測定した 3 つのデータのうち、Remote の波長 (0.9712 Å)で測定したデータの構造因子と、プログラム RESOLVE 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  $R_{\text{free}}$  値を考慮して精密化を行う SLOW モードで行った。
- ② プログラム ARP/wARP の `guiside` で側鎖を構築。

### 2-7 Native ChBP の構造解析

2-6 節では、セレノメチオニン置換体 ChBP について構造解析を行い、初期構造を得た。本節では、Native ChBP 結晶を用いて高分解能のデータを測定し、

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

構造の構築を試みた。

### Native ChBP の回折データ測定

2-3 節で得た Native ChBP 結晶について、PF の実験ステーション NW12 で回折データ測定を行った。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 210 を用いた。

測定データの処理にはプログラム HKL2000[21]を用い、測定データの指数付け、積分計算、スケーリングを行った。出力された回折強度データ  $I(hkl)$  はプログラム TRUNCATE (CCP4)を用いて構造因子  $F(hkl)$  に変換した。

### ARP/wARP を用いた Native ChBP の構造構築

2-6 節では、分解能 2.3 Å の初期構造を決定した。この初期構造を利用し、プログラム ARP/wARP[23]を用いて Native ChBP の構造を構築した。

- ① Native ChBP の回折データの構造因子と、セレノメチオニン置換体 ChBP より計算される位相を利用し、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[24]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 [25]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。精密化の詳細は 1-9 節参照。

### 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 [26]を用いて結合角や結合距離の評価を行った。

## 2-8 GlcNAc および硫酸複合体の構造解析

### 目的

基質結合部位、触媒残基、基質認識残基の同定のため、ChBP の基質である GlcNAc 複合体の構造解析を行った。GlcNAc はキトビオースと競合し、競合阻害剤となることが分かっている[19]。阻害の詳細は第 3 章に記述する。

また、本来の基質であるリン酸との複合体構造の解析を試みたが、結晶化溶液に含まれる  $\text{CaCl}_2$  がリン酸と沈殿を形成してしまうため、リン酸との複合体結晶を作成することができなかった。そこで、リン酸と同じ正四面体状の構造を持ち、電荷的にも近い性質である硫酸との複合体構造を作成した。硫酸は、結晶化溶液に硫酸アンモニウムを添加することで導入した。

### 方法

- ① 2-3 節で精密化した ChBP の結晶化条件に対し、GlcNAc 複合体結晶はドロップ中に終濃度 25 mM の GlcNAc を、GlcNAc- $\text{SO}_4$  複合体結晶は 10 mM GlcNAc と 10 mM 硫酸アンモニウムを加えて結晶化を行った。
- ② ①で成長した結晶を 2-5 節の方法で回収した。このとき回収した結晶化溶液にはそれぞれ結晶化ドロップと同じ量の GlcNAc または硫酸アンモニウムを加えた。以下の処理は 2-5 節の処理に従った。
- ③ X 線回折データの処理は KEK-PF NW12 で行った。データの処理は 2-5 節と同じであるが、異常分散は分離せずに処理した。
- ④ 2-7 節で精密化された NativeChBP 構造から水分子を除いた構造を出発として 2-7 節と同様の方法で複合体構造の精密化を行った。精密化の過程で GlcNAc、硫酸と思われる電子密度にそれぞれのモデルを当てはめた。このとき用いた GlcNAc、硫酸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。

### 結果と考察

#### 2-9 ChBP の大量発現と精製

本多により構築された ChBP の大量発現と精製方法[19]に従い ChBP を発現・精製したところ、大腸菌 1 liter 培養あたり約 30 mg の精製 ChBP 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 2-10 に示す。ChBP 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 ChBP が獲得できた。

#### 2-10 ChBP 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 1 #14: 0.1 M HEPES pH 7.5, 0.17 M CaCl<sub>2</sub>, 30~40%(v/v) PEG 400 (4°C)
- ・Crystal Screen Kit 1 #16: 0.1M HEPES pH 7.5、1.5 M Li-sulfate (25°C)
- ・Crystal Screen Kit 1 #36: 0.1 M Tris pH 7.4、8%(w/v) PEG 8000 (25°C)
- ・Crystal Screen Kit 2 #30: 0.1 M HEPES pH 7.5、5%(v/v) MPD、14%(w/v) PEG 6000 (25°C)

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#14 の結晶(図 2-9)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 2-3 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 ChBP 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 C2、単位胞のパラメーターは  $a = 141 \pm 0.1 \text{ \AA}$ 、 $b = 70.5 \pm 0.2 \text{ \AA}$ 、 $c = 80.2 \pm 0.3 \text{ \AA}$ 、 $\beta = 98.4 \pm 0.1^\circ$ であった。

ChBP の結晶は、図 2-9 にあるように薄い結晶が多重の層を形成しており、データ測定の際は、これらを分離し、単結晶を回収してデータ測定した。

#### 2-11 構造解析の結果

##### 初期構造の決定

MAD 測定に用いた波長は、XAFS の測定結果より、Peak 0.9785 Å、Edge 0.9796 Å、Remote 0.9712 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 2-4 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、Figure of Merit の値は 0.348 であった(Figure of Merit の詳細は 1-15 節)。RESOLVE を用いた位相改善により、Figure of Merit 値は 0.549 に向上した。

プログラム ARP/wARP を用いてセレノメチオニン置換体 ChBP の初期構造を決定したところ、801 残基中 750 残基の主鎖および側鎖構造を決定した。セレノメチオニン置換体 ChBP についてはこれ以上の精密化を行わず、Native ChBP の構造解析に進んだ。

### Native ChBP の構造解析

Native ChBP 結晶の回折データ測定結果を表 2-4 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。

セレノメチオニン置換体 ChBP の初期構造から計算される位相と、Native ChBP の回折データから得られた構造因子を組み合わせて初期構造を構築した。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。精密化の過程で、 $\text{Ca}^{2+} \times 3$  を組み入れた。精密化の結果、図 2-11 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 2-5 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、ChBP 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)、89%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[26] (図 2-12)。

### ChBP 基質複合体の構造解析

ChBP-GlcNAc、ChBP-GlcNAc-SO<sub>4</sub> の複合体結晶について回折データ測定結果を表 2-4 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。精密化の結果を表 2-5 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。

### 基質フリー、GlcNAc 複合体、GlcNAc-SO<sub>4</sub> 複合体の構造の差

本研究で明らかにした 3 種類の ChBP の構造(基質フリー、GlcNAc 複合体、GlcNAc-SO<sub>4</sub> 複合体構造)は、ほぼ同じ構造である。構造の差を示す Root Mean Square Distance (RMSD)は、485-499 番の領域を除くと基質フリー-GlcNAc 複合体

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

間で平均 0.159 Å、基質フリー-GlcNAc- SO<sub>4</sub> 複合体間で平均 0.101 Å であり、これら 3 種の構造がほぼ同じであることを示している。しかし、485-499 間の構造は基質結合の有無により大きく変化していた。この構造変化については 2-14 節で考察する。以下、特に記さない限り、最も分解能が高い GlcNAc 複合体の構造について説明する。

### 2-12 ChBP の構造

#### ChBP の二量体構造

ChBP の結晶は非対称単位に 1 サブユニットの ChBP 分子を含んでいた(非対称単位については 1-15 節を参照)。隣の非対称単位に含まれる ChBP と相互作用を調べたところ、ChBP は図 2-13 に示す二量体構造を取っていた。ChBP は溶液中で二量体を形成していると報告されている[19]ので、構造解析の結果と一致する。二量体は結晶学的二回軸の周りに配置しており、完全に同一の構造である。二量体形成の意義については第 3 章で考察する。

#### ChBP の単量体構造

ChBP の単量体構造を図 2-14 に示す。ChBP の構造は 4 つのドメインで構成されていた。N 末端側から N 末端ドメイン(残基番号 1-270)、リンカーヘリックス(271-302)、 $\alpha$ -バレルドメイン(310-724)、C-末端ドメイン(303-309、725-801)と呼ぶ。C 末端に付加した 6 残基の His-Tag は、電子密度が乱れていたため、構造を決定することができなかった。

#### ・N 末端ドメイン(残基番号 1-270)

N 末端ドメインは、18 本の逆平行 $\beta$ -シートが二層に並んでいる $\beta$ -サンドイッチフォールドを形成している。このようなフォールドは、GH-2・大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの N 末端ドメイン[27, 28]、GH-15・グルコアミラーゼの N 末端ドメイン[29]、GH-57・4- $\alpha$ -グルカノトランスフェラーゼの C 末端ドメイン[30]、GH-65・MalP の N 末端ドメインに見られる構造である。これらの酵素において、 $\beta$ -サンドイッチフォールドを有するドメインの機能は不明であるが、糖の転移活性(GH-2、GH-57) [30, 31]、耐熱性や高次構造形成(GH-15)[29]に関与していると考えられている。ChBP の N 末端ドメインの役割については第 3 章で考察する。

#### ・リンカーヘリックス(残基番号 271-302)

271-302 の領域は、N 末端ドメインと $\alpha$ -バレルドメインを結ぶリンカーの役割を果たす領域である。この 2 領域は 2 本の $\alpha$ -ヘリックスから成る。2 本のヘリックスは短いターンで結ばれており、90°の"elbow"を形成している。このよう

なリンカーヘリックスは GH-15、GH-65 の構造に見られる(2-15 節)。

#### ・ $\alpha$ -バレルドメイン(残基番号 310-724)

$\alpha$ -バレルドメインはほとんどの領域が $\alpha$ -ヘリックスで構成されている。このうち 12 本の $\alpha$ -ヘリックスが 2 本ずつ対になって、TIM バレルフォールドのように層を形成しており、 $(\alpha/\alpha)_6$  バレルフォールドと呼ばれるフォールドを形成している。このドメインには、GlcNAc 複合体、GlcNAc-SO<sub>4</sub> 複合体では GlcNAc、SO<sub>4</sub> が結合しており、触媒ドメインとして同定した(2-16 節)。

$(\alpha/\alpha)_6$  バレルフォールドは GT 酵素には見られないが、GH 酵素には GH-8、GH-15、GH-18、GH-65 に見られるフォールドである。

このドメインには、基質フリー、複合体の 3 種類の構造に共通して、Disorder のために構造を決定できない領域があった。

#### Disorder

結晶中のタンパク質分子の振動(動き)や不均一状態のため、本来タンパク質の電子密度が存在すべき場所の電子密度が低くなった領域を表す。その領域は"乱れた"構造であり、モデルを構築することができない。

395-416 の領域は Disorder しているため、3 種類の構造モデルから欠損している。この領域は ChBP にのみ見られる領域で(図 2-7)、活性中心部位から離れた位置にあるため、触媒反応に関係していないと考えられる。

また、基質フリーの構造では 485-499 の領域も乱れた電子密度を示していた(図 2-15)。この領域は主鎖の構築は可能であったが、側鎖構造の信頼度は低い。複合体構造では 485-499 領域は定まった構造を有しており、確度の高い構造を構築できている。この部分の構造の違いについては 2-14 節で考察する。

#### ・C 末端ドメイン(残基番号 303-309、725-801)

C 末端ドメインは 725-801 部分の 7 本の $\beta$ -シートと、リンカーヘリックスの C 末端側に存在する 303-309 部分の $\beta$ -シート、計 8 本が形成する二層の $\beta$ -シートを形成するジェリーロールフォールドを持つ。この領域のアミノ酸配列は GH-65・MalP と低いながらも相同性を有する[16]。C 末端ドメインは GH-15・*Aspergillus niger* 由来グルコアミラーゼのスターチ結合ドメイン[32]と類似の構造であったが、ChBP の C 末端ドメインに糖は結合しない。ChBP の C 末端ドメインの機能は不明である。

### 2-13 結合した Ca<sup>2+</sup>、GlcNAc、硫酸

ChBP の表面には、Ca<sup>2+</sup>が結合していた。また GlcNAc、硫酸は $\alpha$ -バレル

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

ドメインに結合した。結合したこれら原子、分子の $|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップを図 2-16、17 に示した。

### ・Ca<sup>2+</sup>の結合

ChBP の表面付近には図 2-16 に示すような複数の配位子を持つ、水分子とは異なる原子(分子)の電子密度が観測された。結晶化条件などを考慮した結果、この電子密度は Ca<sup>2+</sup>に由来するものであると判断した。これらのイオンは、サブユニット界面に結合している。ChBP は反応に二価金属を必要とせず、またこれら Ca<sup>2+</sup>の結合位置も活性中心部位(2-16 節)から離れているため、触媒反応に直接関与していないと思われる。

### ・GlcNAc の結合

GlcNAc は $\alpha$ -バレルドメインに 2 分子結合していた (図 2-17)。片方の O1 原子と、もう一方の O4 原子が近接しており、それぞれサブサイト(-1)、(+1)に結合している(2-16 節)。前者を GlcNAc(-1)、後者を GlcNAc(+1)と表記する。両方ともいす型のコンフォメーションをとっていた。GlcNAc(-1)は完全な $\beta$ -アノマーの構造、GlcNAc(+1)は $\alpha$ -アノマー型と $\beta$ -アノマー型の混在が見られた。電子密度の強度から算出される $\alpha$ -アノマーと $\beta$ -アノマーの比は 65:35 であった。この比は、溶液中における $\alpha$ -GlcNAc と $\beta$ -GlcNAc の存在比と同じである[33]。

### サブサイト

糖質関連酵素におけるサブサイトは、加水分解または反応が起こるグリコシド結合部位を 0 として、非還元末端側を-、還元末端側を+で表す。

### ・硫酸の結合

硫酸は GlcNAc の近傍に結合していた(図 2-17)。硫酸の周りは Thr731 や Arg333 に囲まれていた。硫酸を含まない GlcNAc 複合体構造では、この位置には水分子とは異なる強度の電子密度が観測された(図 2-17)。結晶化条件や、周囲のアミノ酸残基の環境などから、その電子密度は Cl<sup>-</sup>のものであると判断している。

硫酸の電子密度は比較的 low、硫酸の結合方向を完全に決定することはできなかった。しかし、第 3 章の CBP の構造解析で、硫酸、およびリン酸の結合を同定している。SO<sub>4</sub> の結合については第 3 章に記述する。

硫酸の結合位置は MalP のリン酸結合位置に相当する。そのため、ChBP の硫酸結合部位は、本来リン酸の結合部位であると考えられる(2-16 節)。

## 2-14 基質結合による構造変化

基質の結合の有無により、 $\alpha$ -バレルドメインの 485-499 領域に大きな構造の違いが見られた。基質フリーの構造(図 2-15a)では、Cys424 と Cys493 がジスルフィド結合を形成し、485-499 のループがねじれた構造をとっている。一方、GlcNAc が結合した構造(図 2-15b)では、Cys424-Cys493 間のジスルフィド結合が切断され、基質フリーの構造に見られたループのねじれが解けている。

485-499 のループは触媒残基を含み(2-16 節)、活性中心ポケットの形成に特に重要な領域である。溶液中で ChBP が基質フリー構造のように 424-493 ジスルフィド結合を形成していると仮定すると、基質の結合、触媒反応のためにはこのジスルフィド結合を切断する必要がある。しかし、ChBP の触媒反応は特に還元剤の存在を必要とせず、また還元剤を添加していない GlcNAc 複合体の結晶で GlcNAc が活性中心ポケットに入ったことを考えると、ChBP は溶液中で 424-493 ジスルフィド結合を形成していないと考えられる。そのため、424-493 のジスルフィド結合の形成と 485-499 ループの反転は、結晶化の過程で起きたと考えている。

## 2-15 ChBP の類似構造

### ChBP のドメイン構成

$\beta$ -サンドイッチドメイン、リンカーヘリックス、 $(\alpha/\alpha)_6$  バレルフォールド、 $\beta$ -シートという ChBP のドメイン構成は、 $\alpha/\beta$ フォールドからなる GT-A、GT-B とは全く異なる。一方、GH-15・グルコアミラーゼ、GH-65・MalP と全く同じである。

### GH-15 の構造

GH-15 は $\alpha$ 1,4 結合を加水分解するグルコアミラーゼ、 $\alpha$ 1,6 結合を加水分解するグルコデキストラナーゼが分類される。GH-15 は加水分解反応の前後でアノマーが反転する反転型の酵素である。古細菌から真菌にいたるまで多くの生物が有しているが、生物によってドメイン構成が異なる。

古細菌、細菌由来のグルコアミラーゼは N 末端に $\beta$ -サンドイッチフォールドのドメインを持ち、 $\alpha$ -バレルドメインとの間をリンカーヘリックスが繋いでいる。一方、真菌のグルコアミラーゼは $\beta$ -サンドイッチフォールドのドメインを持たず、 $\alpha$ -バレルドメインのみからなる(図 2-25)。

Dali[34] による類似構造検索の結果、ChBP の構造は細菌 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* を由来とするグルコアミラーゼ(以下 bGA (bacterial Gluco Amylase)と表記する) [29]と最も相同性が高いことが分かった(図 2-18a、表 2-6)。本研究では bGA を対象として ChBP と構造比較を行う。

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

### GH-65 の構造

GH-65 については 2-1-2 節に記した。GH-65 酵素で唯一立体構造が明らかになっている MalP は、ChBP と全く同じドメイン構造を持つ(図 2-18b)。両方とも反転型加リン酸分解酵素であるという共通点が見られるが、作用するグルコシド結合が MalP は $\alpha$ -グリコシド結合、ChBP は $\beta$ -グリコシド結合と逆である。MalP はリン酸との複合体構造が明らかになっているが、リン酸結合部位は ChBP の硫酸結合部位に相当する(2-16 節)。

### Clan GH-L

GH-15 および GH-65 は

- ・触媒ドメインが $(\alpha/\alpha)_6$  バレルフォールドを持つ
- ・触媒残基がトポロジー的に同じ位置にある
- ・ $\alpha$ -グリコシド結合に作用する反転型酵素である

と言う共通点から、clan GH-L に分類される。Clan GH-L は GH-15 と GH-65 の 2 つのファミリーのみ含まれる。これらの酵素を含む $(\alpha/\alpha)_6$  バレルフォールド酵素の進化的関連が示唆されている(2-19 節) [29]。

### 2-16 ChBP の反応機構

本章の目的は、反転型加リン酸分解酵素 ChBP の反応機構を決定することである。そこで、反応機構の詳細が明らかになっている GH-15 $\cdot$ bGA と構造を比較し、反応機構の決定を試みた。

### 反転型加水分解酵素 GH-15 bGA の反応機構

bGA の加水分解反応は、一般的な反転型の加水分解反応で説明される(序章図 8、図 2-22B)。その触媒残基は Glu438 と Glu636 で、Glu438 がグリコシド結合を攻撃する一般酸触媒として働き、Glu636 がオキシカルボニウム中間体を攻撃する水分子からプロトンを引き抜く一般塩基触媒として働く。bGA は、糖アナログであるアカボースとの複合体構造が明らかになっており、反応機構、基質認識と構造の相関について詳細な知見が得られている。

### アカボース

アカボースは $\alpha$ -グリコシド結合を加水分解するグルコアミラーゼに特異的な阻害剤で、図 2-19 の構造を持つ。グルコースが $\alpha$ -1,4 グリコシド結合で四分子重合したマルトテトラオースに似た構造であるが、非還元末端が舟型のコンフォメーションを持つ valienamine 基の構造であり、その隣の糖は 6-デオキシグルコースである。これらの糖間は N-グリコシド結合を形成している。そのため加水分解されない。

### ChBPとbGAの重ね合わせ

bGAのアカボース複合体構造(PDB: 1LF9)とChBPを重ね合わせた。重ね合わせは、それぞれの $\alpha$ -バレルドメインのみ(bGAの295-684とChBPの310-724)を取り出し、ドメイン全体を最小二乗法により重ね合わせた。この計算はDaliサーバーで行った。 $\alpha$ -バレルドメインを重ね合わせたものを図2-20に示す。

#### ・糖の重なり

活性中心部位の重ねあわせを図2-21に示す。bGAに結合したアカボースは、サブサイト(-1)~(+3)を占めており、(-1)にvalienamine基、(+1)に6-デオキシグルコース部分が結合している。ChBPとbGAの重ねあわせでは、ChBPに結合した2分子のGlcNAcは、valienamine基、6-デオキシグルコースと重なる。ChBPのGlcNAcの結合した部位をそれぞれサブサイト(-1)、サブサイト(+1)と同定し、それぞれに結合したGlcNAcをGlcNAc(-1)、GlcNAc(+1)とした。bGAのアカボースとChBPのGlcNAcでは結合方向に違いが見られるが、この違いは2-18節で考察する。

#### ・触媒残基の重なり

bGAの一般酸触媒Glu438は、ChBPのAsp492と重なった。Asp492の前後はGT-36で高度に保存された領域にあり、Asp492はGT-36で完全に保存された残基である(図2-7)[19]。また、MalPの $\alpha$ -バレルドメイン(316-683)も同様に重ね合わせてみると(図2-21b)、MalPの触媒残基として予想されているGlu487もこれらの残基と重なった。そのため、ChBPにおいてもAsp492が活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。食品総合研究所の本多博士に依頼し、D492N、D492Aの変異体の解析を行ったところ、D492N/A変異体は完全に失活した。このことから、ChBPのAsp492は触媒残基の一つであると考えられる。

一方、bGAの一般塩基触媒Glu636は、ChBPのGln690と重なった。MalPにはこれらの残基に相当する残基は見られなかった。酸性残基であるGluは一般塩基触媒残基となり得るが、Glnはなり得ない。ChBPが加水分解活性を持たない理由が、Gluであるべき残基がGlnであるため、という可能性を考え、Q690E変異体の作成と解析を本多博士に依頼したが、今のところ加水分解活性は検出されていない。

#### ・基質認識残基の重なり

bGAをはじめ $\alpha$ -グリコシド結合に作用するアミラーゼの多くは、サブサイト(-1)の糖を認識するためFixerと呼ばれるアミノ酸残基が保存されている[35, 36]。Fixer残基は酸性のアミノ酸残基で、サブサイト(-1)に結合した糖と水素結合を形成しており、GH-13ではこの残基が他のアミノ酸に置換されると活性が

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

失われることが明らかになっている。bGA では Asp344 に相当する。図 2-21 の重ねあわせでは、bGA の Asp344 は ChBP の Asp350 と重なる。また MalP の重ねあわせでは、MalP の Asp359 と重なる。ChBP の Asp350 は GT-36 内で高度に保存された残基であるが、この変異体についての解析は行っていない。bGA と ChBP では、Fixer のアスパラギン酸は同じ位置にあるが、糖の認識部分に違いが見られた。この違いについては 2-18 節で考察する。

### ・求核基の重なり

bGA のアカボース複合体構造では、オキシカルボニウムイオン中間体を求核攻撃する水分子の位置が決定している[29]。この水分子は一般塩基触媒 Glu636 と水素結合を形成している。ChBP の構造では、この水分子に相当する位置に硫酸が結合していた。また MalP の構造では、リン酸が結合していた。硫酸とリン酸は同じような形状とイオン化状態を持っているので、ChBP の硫酸結合部位は、本来リン酸結合部位であると考えられる。

以上、反転型加水分解酵素 bGA と反転型加リン酸分解酵素 ChBP の活性中心部位の重ねあわせを説明したが、その構造は非常に似ていることが明らかになった。bGA の基質-触媒残基のセット Glu-438(一般酸触媒)-基質(アカボース)-求核基(水)-Glu636(一般塩基触媒)のトポロジーは、ChBP の Asp492-糖(GlcNAc)-硫酸(リン酸)-Gln690 のトポロジーと完全に一致している。これら構造の共通点は、反転型加水分解酵素と反転型加リン酸分解酵素の反応機構の共通性を示している。これらの構造比較から、以下の反転型加リン酸分解酵素の反応機構を考えた(図 2-22)。

Asp492 が一般酸触媒としてリン酸と共同して働き、グリコシド結合を攻撃し、オキシカルボニウムイオン中間体が生じる。このオキシカルボニウムイオン中間体に対し、リン酸が直接求核攻撃する。リン酸は元々活性化状態にあるため、一般塩基触媒による脱プロトン化の活性化を必要としない。

この反応機構は、反転型加水分解酵素と比較すると、オキシカルボニウムイオン中間体を攻撃する求核基がリン酸である点を除けば全く同じ反応機構である。この結果、ChBP の反応機構は、グリコーゲンホスホリラーゼのような GT 酵素型の反応機構(図 2-3)ではなく、GH 酵素の反応機構に極めて似ていることが示唆された。

### 2-17 GT-36 の再分類

2-15 節および 2-16 節で、ChBP が GT 酵素ではなく GH 酵素と似ているこ



とが明らかになった。すなわち、

- ・立体構造は GT 酵素のフォールド GT-A、GT-B ではなく、GH 酵素に見られる  $(\alpha/\alpha)_6$  バレルフォールドを持つ。
- ・反応機構は、ほぼ反転型加水分解酵素と同じである。

これらの結果を基に、CAZy で糖質関連酵素の分類を取りまとめている B. Henrissat 博士と議論した結果、GT-36 は新たな GH 酵素、GH-94 としてクラス替えされることになった。これは GT として分類されていた酵素が、立体構造の解明により GH にクラス替えされる最初の例となった。以下、GT-36 は GH-94 と表記する。

### 2-18 ChBP と clan GH-L 酵素との相違点

$(\alpha/\alpha)_6$  バレルフォールドは GH 酵素では GH-8、15、18、65 に見られる構造である。これらは clan GH-L (GH-15、65) と GH-M (GH-8、18) に分けられる。それぞれの clan の構造のトポロジーを図 2-23 に示した。

#### ・Clan GH-L

$\alpha$ -グリコシド結合に作用する酵素である。その触媒残基は、 $(\alpha/\alpha)_6$  バレルを形成する 12 本の  $\alpha$ -ヘリックスの 5-6 番目の間、11-12 番目の間にある。

#### ・Clan GH-M

$\beta$ -グリコシド結合に作用する酵素である。その触媒残基は 2 番目、8 番目の  $\alpha$ -ヘリックス上にある。

このように二つの clan は、同じ  $(\alpha/\alpha)_6$  バレルフォールドを持つものの、基質特異性、触媒残基のトポロジーに違いが見られる。

### ChBP と clan GH-L の相同性

ChBP は  $\beta$ -1,4 グリコシド結合に作用するため、触媒反応の観点からは Clan GH-M に近い。しかし、その触媒残基は Clan GH-L と同じく  $\alpha$ -ヘリックス 5-6 番目の間、11-12 番目の間にある。また Dali サーバーによる構造比較計算でも、clan GH-L の構造に近いことが示されている(表 2-6)。

### ChBP と clan GH-L の基質特異性の違い

ChBP は clan GH-L と似たフォールドを持つにもかかわらず、作用するグリコシド結合が GH-L とは逆の  $\beta$ -グリコシド結合であるのかについて、ChBP の

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

GlcNAc 複合体構造と bGA のアカボース複合体構造を比較して考察する。

ChBP と bGA のそれぞれのサブサイト(+1)に結合した GlcNAc および 6-デオキシグルコースは、同じ方向で結合している(図 2-21a)。一方、サブサイト(-1)部分に結合した GlcNAc および valienamine 基は逆向きに結合している。すなわち、GlcNAc の C1、C2、C3、C4、C5、O5 のピラノース環は、それぞれ valienamine 基の C6、C5、C4、C3、C2、C1 部分に相当する。2-16 節に記したサブサイト(-1)の認識に重要な Fixer 残基は、ChBP の Asp350 は GlcNAc の N2、O3 を、bGA の Asp344 は valienamine 基の O4、O6 という異なる部分を認識している。この認識の模式図を図 2-24 に示す。

このように、ChBP と bGA はサブサイト(-1)の認識する糖が裏表になることで、作用するグリコシド結合が逆になっている。

糖質関連酵素では、 $\alpha$ -結合、 $\beta$ -結合に作用する酵素は、clan GH-L と GH-M のように、全く異なる構造を有していることが一般的である。ChBP と bGA ように構造の相同性が高い酵素間で、作用するグリコシド結合が逆の関係にあるのは、他に GH-4 が報告されているのみである。今回、サブサイト(-1)の糖の認識方向が作用するグリコシド結合の種類を決定していることを示したことで、今後の糖質関連酵素のタンパク質工学的研究への応用が期待される。

### GH-4

糖質関連酵素では、唯一 GH-4 に $\alpha$ -グリコシダーゼと $\beta$ -グリコシダーゼの混在が見られる。このファミリーには $\alpha$ -グルコシダーゼや 6-ホスホ- $\beta$ -グルコシダーゼが分類されている。GH-4 酵素は活性の発現に  $\text{NAD}^+$  を必要としており、一般的な加水分解酵素とは異なる反応機構をとると考えられてきた。最近明らかになった *Bacillus subtilis* 由来ホスホ $\alpha$ -グルコシダーゼの構造解析[37]から、その反応機構が加水分解酵素と異なり、脱水素酵素の反応機構に近いことが明らかになった。そのため、GH-4 は他の糖質関連酵素と一線を画す存在であると認識されている。

### 2-19 ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> バレルフォールド酵素との分子進化的関連

bGA の構造を解析した Aleshin らにより、ChBP や bGA のように $\beta$ -サンドイッチフォールドドメインと( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> バレルフォールドを持つ糖質関連酵素の分子進化的関連が以下のように考察されている(図 2-25)[29]。

$\beta$ -サンドイッチフォールドドメインと( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> バレルフォールドを持つ酵素の祖先型は、N 末端側に $\beta$ -サンドイッチフォールドを持つもの、( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> バレルフォールドを持つものがある。N 末端が( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> バレルフォールドを持つものは多糖リアーゼファミリー(PL)に進化し、PL-5、PL-8 に見られる。一方、N 末端に $\beta$ -サンドイッチフォールド、C 末端側に( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> バレルフォールドを持つものは

GHに進化し、MalPやbGAのような活性を獲得した。また真菌のグルコアミラーゼでは、 $\beta$ -サンドイッチドメインが外れ、 $(\alpha/\alpha)_6$  バレルドメインのみの構造を有するようになった。

構造比較計算の結果、ChBPの構造は、進化上MalPとbGAの間にあることが明らかになった(表 2-6)。そのため、ChBPはMalPからbGAへの進化の過程で分岐したものであると考えられる。この過程で、 $\alpha$ -グリコシド結合作用型から $\beta$ -グリコシド結合作用型に変化したと思われる。このように、 $\alpha$ -グリコシド結合に作用する酵素の分子進化の過程で $\beta$ -グリコシド結合に作用する酵素が派生したことは、糖質関連酵素の分子進化上非常に興味深い発見である。

### 2-20 本章のまとめ

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 X線結晶構造解析を行い、基質フリー、GlcNAc複合体、GlcNAc-SO<sub>4</sub>複合体構造を明らかにした。これは

- ・GT-36の酵素として初めての構造
- ・ $\beta$ -グリコシド結合に作用する加リン酸分解酵素として初めての構造
- ・反転型加リン酸分解酵素として初めての基質複合体構造

である。

ChBPの立体構造はGT酵素に見られるGT-A、GT-Bフォールドではなく、GH酵素GH-15やGH-65に見られる $\beta$ -サンドイッチフォールド、 $(\alpha/\alpha)_6$ バレルフォールドを持つ構造であった。

ChBPと *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* 由来グルコアミラーゼ(bGA)との構造比較から、ChBPの加リン酸分解反応が、求核基がリン酸である点を除けば、反転型加水分解酵素と同じであることを示した。

ChBPとGH-15、GH-65の立体構造、反応機構の相同性から、GT-36は新たなGHファミリー、GH-94に再分類された。GT酵素として分類されていたファミリーがGH酵素として再分類されるのはGH-94が初めてのケースである。

ChBPとClan GH-L(GH-15、GH-65)の比較から、これらの酵素の作用するグリコシド結合の違いが、サブサイト(-1)の糖の認識方向に由来するものであることを示した。

ChBPと $(\alpha/\alpha)_6$ バレルフォールドを持つ糖質関連酵素の構造を比較し、 $\beta$ -グリコ

## 第2章 ChBPの結晶構造解析

シド結合に作用する ChBP が分子進化の過程で、 $\alpha$ -グリコシド結合に作用する GH-65 や GH-15 から派生したものであることを示した。

### 発表論文

本章の研究内容は、

*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 ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> Barrel Fold"

に発表されている

### Protein Data Bank (PDB) 登録

今回解析した ChBP の構造は PDB ID 1V7V (基質フリー)、1V7W (GlcNAc 複合体)、1V7X (GlcNAc-SO<sub>4</sub> 複合体)に登録されている。

クラス	GH		GT	
	GH-13	GH-65	GH-94 (旧 GT-36) ChBP, CBP, CDP	GT-4
ファミリー	スクロース	マルトース		GT-35
酵素	ホスホリラーゼ	ホスホリラーゼ		グリコラーゲン ホスホリラーゼ
加水分解活性	あり	なし (トレハラーゼと相同性)	なし	なし
フォールド	$\alpha$ -アミラーゼ様 ( $\alpha/\beta$ ) <sub>8</sub> バレル	グルコアミラーゼ(GH-15)様 ( $\alpha/\alpha$ ) <sub>6</sub> バレル	グルコアミラーゼ様 ( $\alpha/\alpha$ ) <sub>6</sub> バレル	グリコラーゲン シンターゼ(GT-5)様 GT-B
コアクター要求性	-	-	-	ピリドキサルリン酸
反応機構	保持型	反転型	反転型	保持型 保持型

表 2-1 CAZy に登録されている加リン酸分解酵素

タンパク質名	由来	EC ナンバー
環状β-1,2 グルカンシターゼ	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	2.4.1.-
Atu2730 (ChvB)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	n.d.
AGR_C_4949p	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	n.d.
β-1,2-グルカンシターゼ	<i>Agrobacterium vitis</i> F2/5	n.d.
BH00920	<i>Bartonella henselae</i> str. Houston-1	n.d.
BQ00850	<i>Bartonella quintana</i> str. Toulouse	n.d.
環状β-1,2 グルカンシターゼ	<i>Brucella abortus</i> S19	n.d.
BMEI1837	<i>Brucella melitensis</i> 16M	n.d.
BR0111	<i>Brucella suis</i> 1330	n.d.
セロビオースホスホリラーゼ	<i>Cellulomonas uda</i> DSM 20108	2.4.1.20
セロビオースホスホリラーゼ	<i>Cellvibrio gilvus</i> ATCC13127	2.4.1.20
CAC0609	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	n.d.
セロビオースホスホリラーゼ	<i>Clostridium stercorarium</i>	2.4.1.20
セロデキストリンホスホリラーゼ	<i>Clostridium stercorarium</i>	2.4.1.49
CTC02455	<i>Clostridium tetani</i> E88 Massachusetts	n.d.
セロビオースホスホリラーゼ	<i>Clostridium thermocellum</i>	2.4.1.20
セロビオースホスホリラーゼ	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC27405	2.4.1.49
セロビオースホスホリラーゼ	<i>Clostridium thermocellum</i> YM4	2.4.1.20
セロデキストリンホスホリラーゼ	<i>Clostridium thermocellum</i> YM4	n.d.
Sequence 6291	<i>Enterococcus faecalis</i>	n.d.
Lin1839	<i>Listeria innocua</i>	n.d.
Lmo1728	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	n.d.
LMOF2365_1752	<i>Listeria monocytogenes</i> str. 4b F2365	n.d.
MG06545.4	<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	n.d.
Mlr8325	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	n.d.
MCA1586	<i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath	n.d.
NCU09425.1	<i>Neurospora crassa</i> OR74A	n.d.
PBPRA0517 (CepA)	<i>Photobacterium profundum</i> SS9	n.d.
CP94 (Chvb)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C	n.d.
環状β-1,2 グルカンシターゼ	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	2.4.1.-
TTE2146	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	n.d.
TM1848	<i>Thermotoga maritima</i>	n.d.

セロビオースホスホリラーゼ	<i>Thermotoga neapolitana</i>	2.4.1.20
セロビオースホスホリラーゼ	<i>Thermotoga neapolitana</i>	2.4.1.20
ORF	<i>uncultured Acidobacteria bacterium</i>	n.d.
VC0612	<i>Vibrio cholerae</i> N16961	n.d.
キトビオースホスホリラーゼ	<i>Vibrio furnissii</i>	2.4.1.-
VP2487	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	n.d.
キトビオースホスホリラーゼ	<i>Vibrio proteolyticus</i>	2.4.1.-
VV11665	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	n.d.
VV2742	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016	n.d.
NdvB	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	n.d.
NdvB	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str.	n.d.
YP2928	<i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Mediaevails</i> str. 91001	n.d.
YPO0610	<i>Yersinia pestis</i> CO92	n.d.
Y3568	<i>Yersinia pestis</i> KIM	n.d.
YPTB3445	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953	n.d.

表 2-2 GH-94 (旧 GT-36)に分類されるタンパク質

```

#!/bin/csh -f
# solve a MAD dataset
/localdisk/solve<<EOD > solve.log
logfile solve.logfile
resolution 20 2.3
cell 141.097 70.736 80.171 90.000 98.348 90.000
symfile /locallib/c2.sym
readdenzo          ! readformatted HKL2000
premerged
read_intensities   ! read_intensities/read_amplitudes
refscattfactors    ! fixscattfactors/refscattfactors
mad_atom se       ! the anomalously-scattering atom
lambda 1
label set 1 with 2 se atoms, lambda 1
wavelength 0.9792          ! wavelength value
fprimv_mad  -8            ! f' value at this wavelength
fprprv_mad  4.5           ! f doubleprime value
rawmadfile peak.sca       ! datafile for this wavelength
lambda 2
wavelength 0.9794
fprimv_mad  -10
fprprv_mad  2.1
rawmadfile edge.sca
lambda 3
wavelength 0.9600
fprimv_mad  -3.2348
fprprv_mad  3.6840
rawmadfile remote.sca
nres 800                ! number of residues in asymmetric unit
nanomalous 11          ! number of Se atoms in au
scale_mad
analyze_mad
solve
EOD
# Now run Resolve to do density modification and build a model
setenv SYMOP /locallib /symop.lib
/localdisk/resolve << EOD > resolve.log
solvent_content 0.45      ! solvent fraction
EOD

```

表 2-3 SOLVE の入カスクリプト



結晶	セレノメチオニン置換体			Native	GlcNAc 複合体	GlcNAc SO <sub>4</sub> 複合体
	peak	edge	remote			
波長 (Å)	0.97848	0.97960	0.97120	1.00000	1.00000	1.00000
ビームライン	PF BL-6A			PF NW-12	PF NW-12	PF NW-12
空間群	C2			C2	C2	C2
単位胞パラメーター						
<i>a</i> (Å)	140.9			140.9	141.1	140.9
<i>b</i> (Å)	70.5			70.6	70.7	70.3
<i>c</i> (Å)	80.1			80.0	80.4	79.9
β (deg)	98.3			98.4	98.4	98.4
分解能(Å)	50.00-2.30			50.00-1.80	50.00-1.60	50.0-2.00
	(2.38-2.30)			(1.86-1.80)	(1.66-1.60)	(2.07-2.00)
Measured reflections	260,267	259,637	261,653	271,349	389,627	197,064
Unique reflections	34,975	34,881	34,961	71,854	103,159	52,234
Completeness (%)	100.0(100.0)	100.0(100.0)	100.0(100.0)	98.5(97.6)	97.2(95.7)	99.9(99.9)
Redundancy	3.9(3.6)	3.9(3.6)	3.9(3.6)	2.0(2.0)	2.0(2.0)	1.9(1.8)
Mean <i>I</i> / $\sigma$	(3.11)	(3.00)	(3.21)	(5.33)	(5.37)	(3.31)
<i>R</i> <sub>sym</sub> (%)*	12.3(38.7)	12.5(39.8)	12.1(34.3)	4.9(22.8)	5.3(20.1)	8.7(27.1)

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

表 2-4 セレノメチオニン置換体、Native、GlcNAc複合体、GlcNAc-SO<sub>4</sub>複合体結晶の

X 線回折データ測定結果

Crystal	Native	GlcNAc 複合体	GlcNAc SO <sub>4</sub> 複合体
分解能 (Å)	47.78-1.80	38.87-1.60	47.69-2.0
No. of protein atoms	6224	6224	6224
No. of solvent atoms	676	912	553
No. of heteroatoms	3	34	37
Average <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )			
Protein	17.5	12.6	21.6
Water	28.4	26.5	30.8
GlcNAc	-	12.5	48.6
Chloride/sulfate	-	13.8	47.0
Root mean square deviations			
Bond lengths (Å)	0.005	0.005	0.005
Bond angles (deg)	1.3	1.3	1.3
<i>R</i> -factor/ <i>R</i> <sub>free</sub> * (%)	16.2/18.6	15.7/17.9	16.3/19.5

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

表 2-5 Native、GlcNAc複合体、GlcNAc-SO<sub>4</sub>複合体の精密化結果

## SUMMARY: PDB/chain identifiers and structural alignment statistics

NR.	STRID1	STRID2	Z	RMSD	LALI	LSEQ2	%IDE	REVERS	PERMUT	NFRAG	TOPO	PROTEIN
1:	2502-A	1lf6-A	24.2	4.0	545	674	11	0	0	50	S	glucoamylase (glucan 1,4-alpha-glucosidase, 1,4-alpha-d
2:	2502-A	1ayx	21.3	3.6	316	492	15	0	0	37	S	glucoamylase
3:	2502-A	2sqc-A	16.4	3.8	246	623	12	0	0	36	S	squalene-hopene cyclase Mutant biological_unit
4:	2502-A	1h54-B	16.2	4.3	566	754	11	0	0	52	S	maltose phosphorylase
5:	2502-A	1fp3-A	14.8	3.6	273	402	7	0	0	42	S	n-acyl-d-glucosamine 2-epimerase
6:	2502-A	1nc5-A	13.5	3.7	245	363	8	0	0	38	S	hypothetical protein yter
7:	2502-A	1jov-A	12.2	3.7	191	269	8	0	0	20	S	hi1317
8:	2502-A	1cem	12.2	4.1	252	363	7	0	0	43	S	cellulase cela (1,4-beta-d-glucan-glucanohydrolase) fra
9:	2502-A	117j-B	12.0	3.2	191	338	9	0	0	20	S	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase) Mutant
10:	2502-A	1fce	12.0	4.0	306	629	7	0	0	33	S	cellulase celf fragment
11:	2502-A	1h12-A	10.9	3.7	221	403	10	0	0	42	S	endo-1,4-beta-xylanase
12:	2502-A	1tf4-A	10.8	4.1	254	605	9	0	0	37	S	t. fusca endoEXO-CELLULOSE E4 CATALYTIC DOMAIN and cell
13:	2502-A	1a2v-A	10.6	8.0	207	655	9	0	0	23	S	methylamine oxidase biological_unit
14:	2502-A	1k1w-A	10.2	3.2	172	615	8	0	0	18	S	4-alpha-glucanotransferase
15:	2502-A	1c3d	10.2	3.5	211	294	10	0	0	32	S	c3d Mutant biological_unit
16:	2502-A	1o7d-D	9.6	5.3	169	269	7	0	0	18	S	lysosomal alpha-mannosidase (alpha-b mannosidase, lysos
17:	2502-A	1c1c	9.6	4.2	240	541	10	0	0	35	S	endoglucanase celd (1,4-beta-d-glucan-glucanohydrolase,
18:	2502-A	1dce-B	8.9	4.0	232	329	9	0	0	41	S	rab geranylgeranyltransferase alpha subunit rab geranyl
19:	2502-A	1ft1-B	8.8	4.0	239	416	7	0	0	37	S	protein farnesyltransferase
20:	2502-A	1egu-A	8.3	5.4	201	721	9	0	0	28	S	hyaluronate lyase

表 2-6 Dali サーバーによる類似構造検索結果

NR.1 が bGA、NR.4 が MaIP

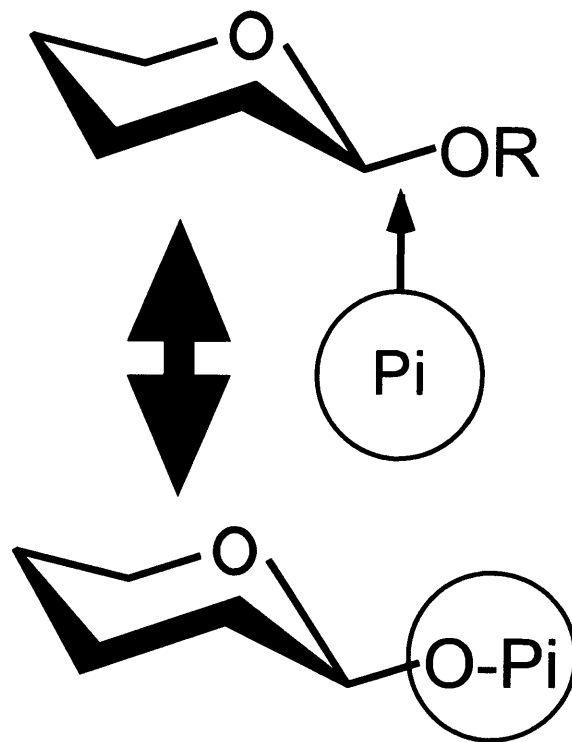


図 2-1 加リン酸分解酵素の反応。加リン酸分解酵素は非還元末端のグリコシド結合に作用する。

## Asp (求核性触媒残基)

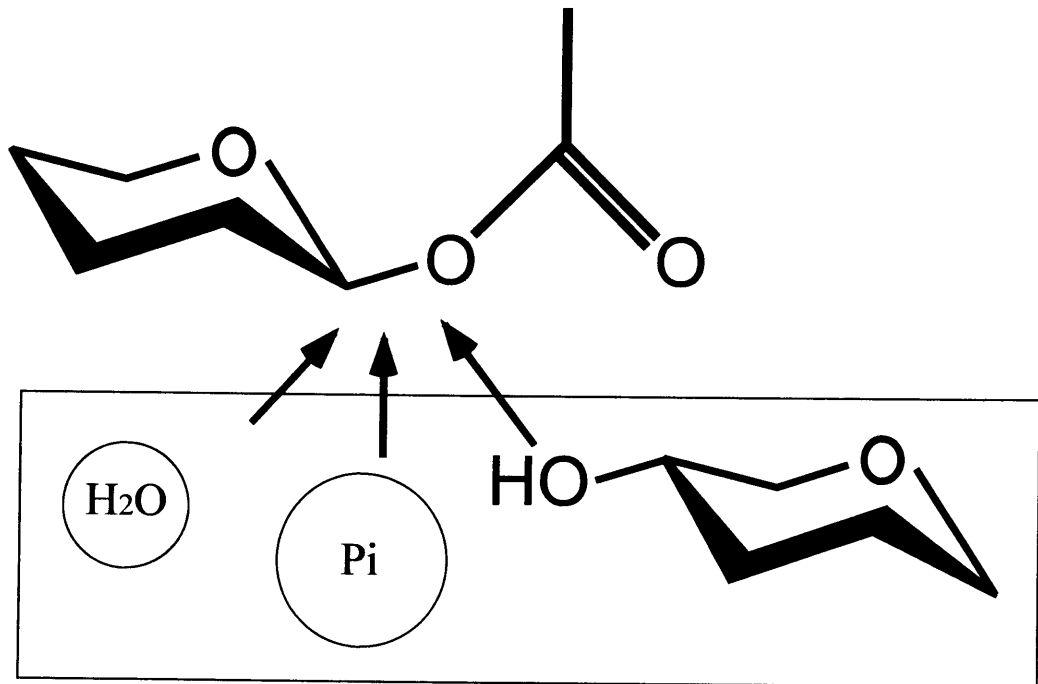


図 2-2 GH-13の反応の多様性。GH-13は糖-酵素中間体を攻撃する分子の特異性により、加水分解(水分子)、加リン酸分解(リン酸)、糖転移(糖)活性を示す。

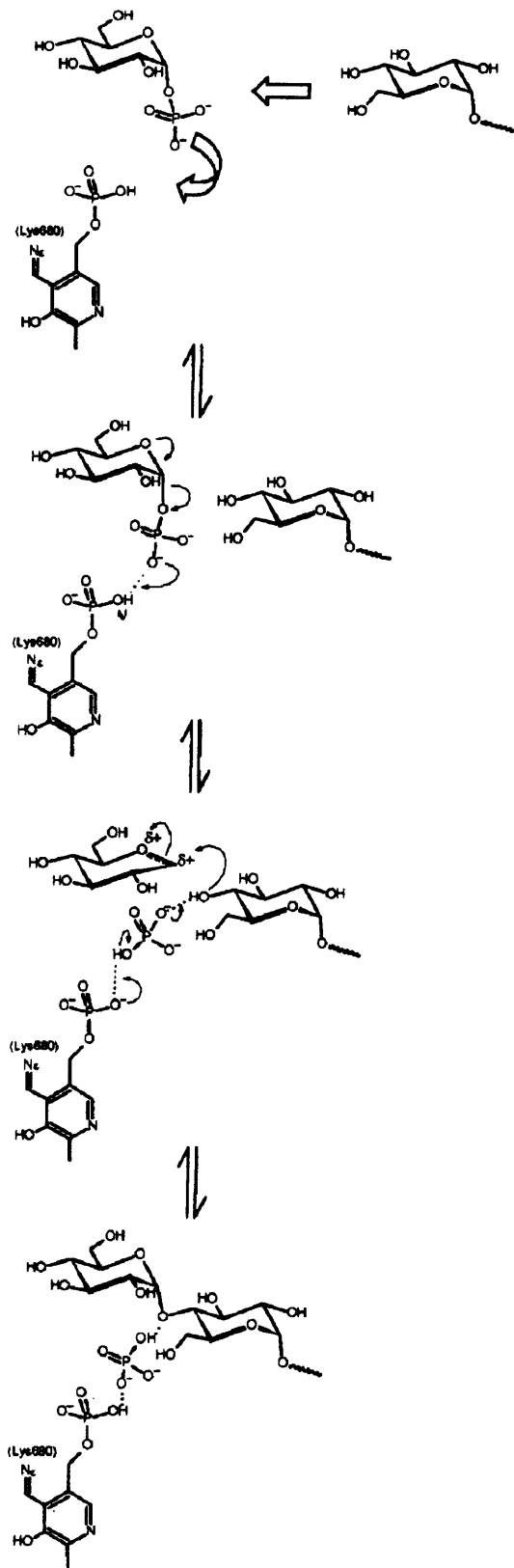


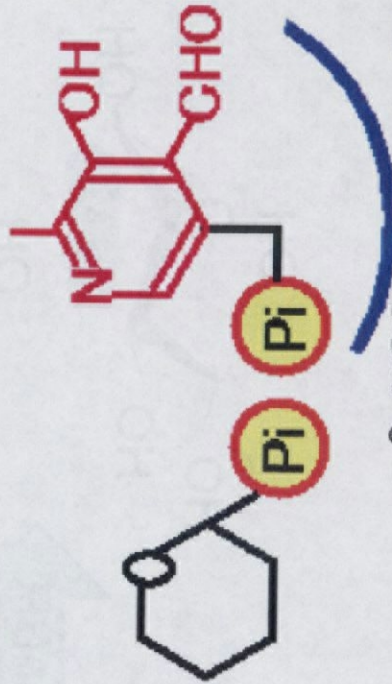
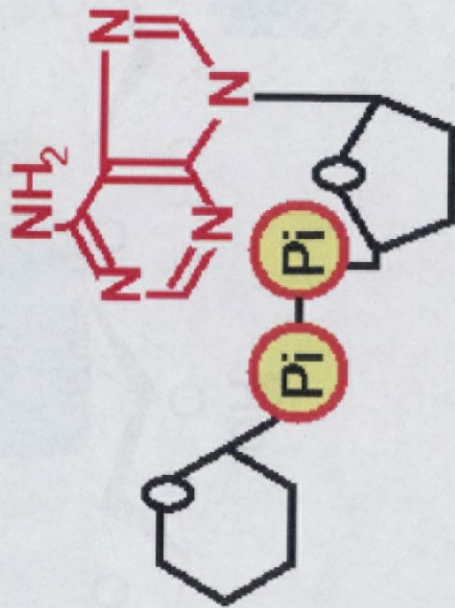
図 2-3 GT-35 グリコーゲンホスホリラーゼのピリドキサルリン酸を介した反応機構[5、11-13]



グリコーゲンシンターゼ



グリコーゲンホスホリラーゼ



ピリドキシサルリン酸

図 2-4 グリコーゲンに作用する酵素、シンターゼ(GT-5)とホスホリラーゼ(GT-35)の構造。いずれもGT-Bのフォールドを持つ。活性中心部位は、シンターゼは糖-ヌクレオチド、ホスホリラーゼは糖+ピリドキシサルリン酸の結合に適した形状である[14、15]。



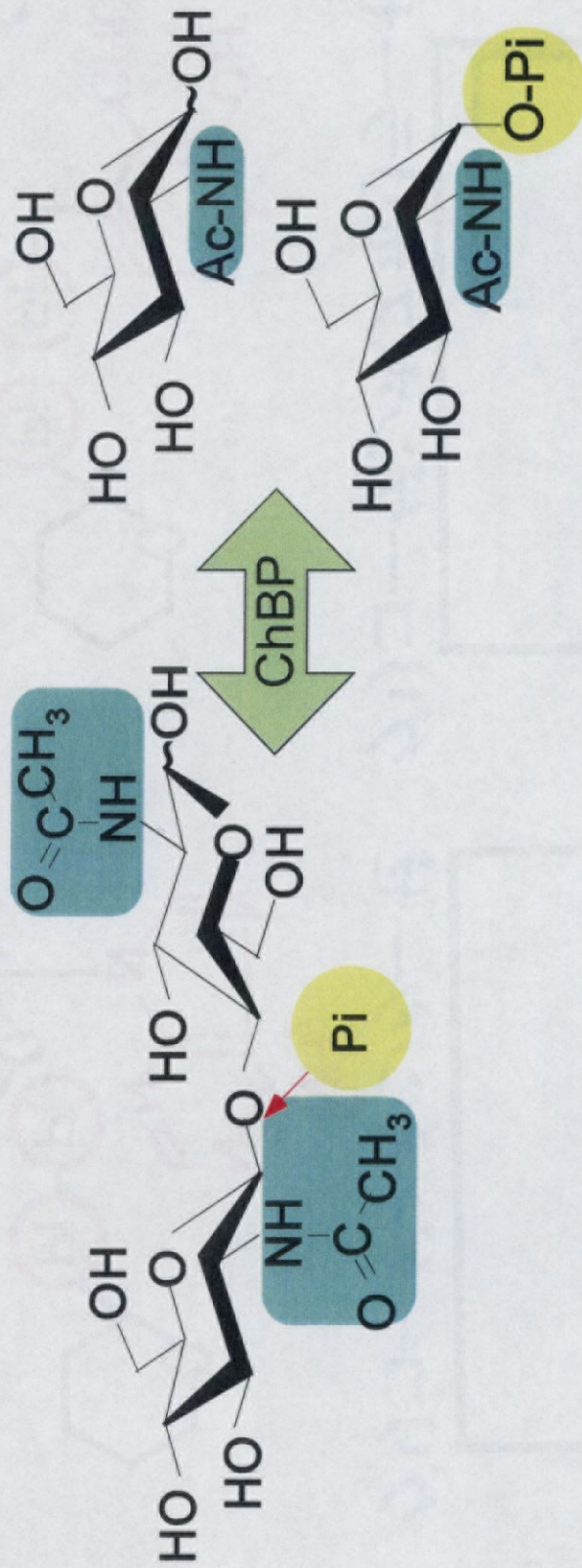


図 2-5 キトビオースホスホリラーゼの反応



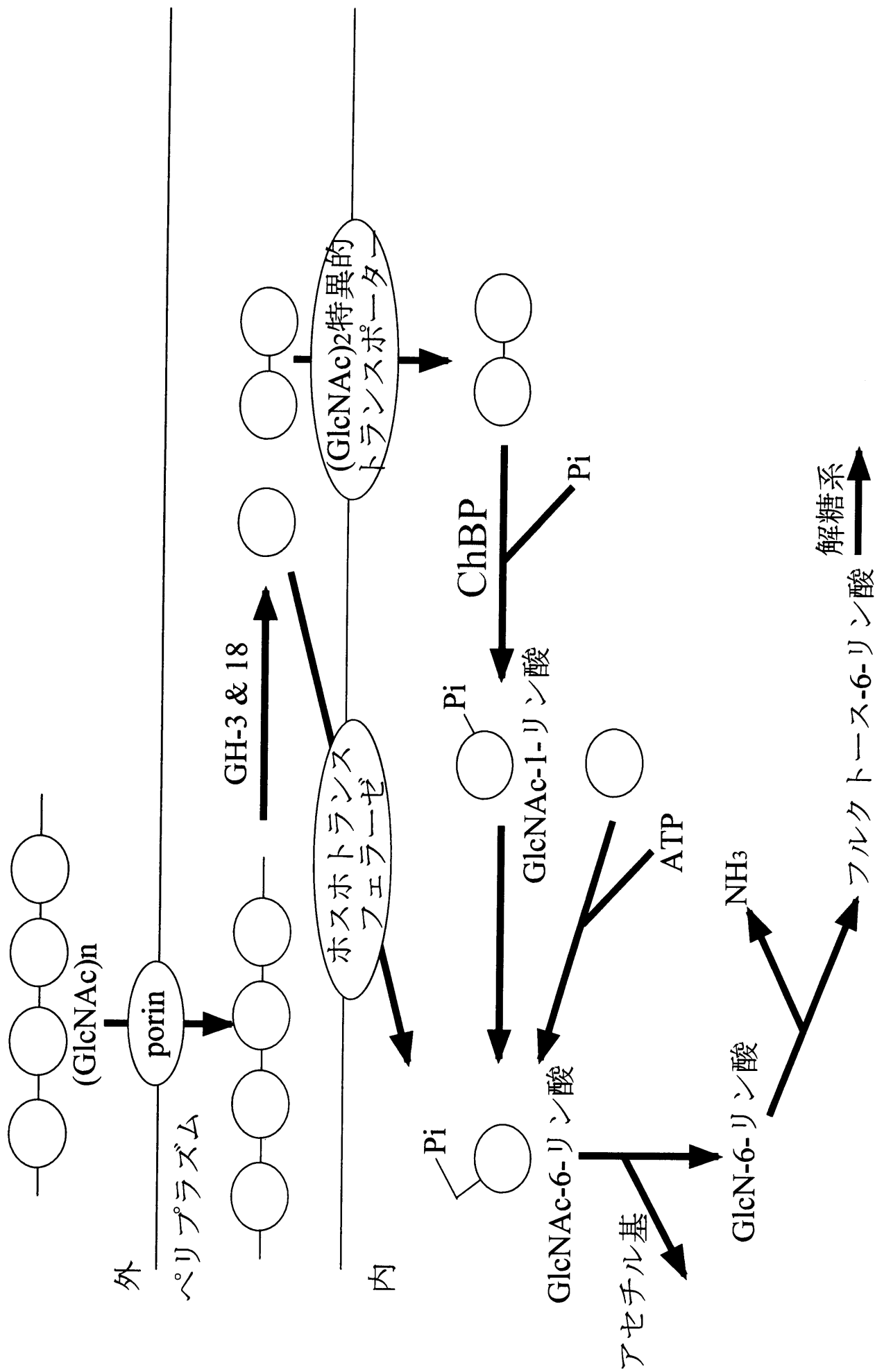


図 2-6 キチンの分解経路[20]

### N terminal domain

ChBP 1 MKYGYFDNDNREYVITRPD...V.P...AP.WT...NYLG.TE...KFCTVISHNA...G.GYSPYNSPEY...  
CBP 1 MRVGFDDAAREYVITTPH...T.P...YP.WI...NYLG.SE...QFFSLSEHA...G.GYSPYRDAKM...  
CDP 76 DRSYCFVEEGQKFYIVLED...G.QKIEVPEDVNKALKATVSVVHK.WA...GYLT.ED...GEHVIDLKPA...P.GPHFYVLLI...  
bGA 30 .....D...T.W...ASAQT.QCVGTANNYSKVWPTLANOA...I.SEVYPTID...  
Ma1P 2 KRIFEVQP...WNVITHTFPDKR...LQ.ESM.TSLG.NG...YMGMR.GDFEEGYSGDSLQGIYLVGGVWYPPDKTRVGNWNG

ChBP 53 .....NRVTKFRPN.ATFDRPGHYVYLRDDDSGDYWSISWQP...VAKSLDEAQYQIRHG...L.SYS  
CBP 53 .....RRLTRYNNIPADAGGRYLVND...GGDVWTFPSWLP...VKADLD...HFEARHG...L.GYS  
CDP 148 .....GNRLGFKRTLQTTPKSVVDRFGROGPRSHAATQVLATRFDMRQERNGPPANRQFFLYLEDGKQIPYSALIDDNIVEATCKHSCN...R.TVI  
bGA 59 .....TADVK...EIKPIVTDG.KSPVPD...ETK...DA...ISKVEKFTDKS...LGY  
Ma1P 74 YPKYFGQVNVAV...NFIKLPIEIN.GEPVD...LA...KDKI...SDFTLDD...MHQGV

ChBP 108 KPQCQDY...NGIHARKTLFVFKGE...DABIWDVVIKNTSDQVRT.ISAFS...FVEF.SFSHIQ...SDNQNEMLYLSAGTATRP...GLIEY  
CBP 105 RITGER...NGLKVELLFFVPLGE...NAEVQKVTVNTSDAPKT.ATLFS...FVEF.CLWNAQ...DDQNTYRQMLSIGEVVEEQ...DGPHGS  
CDP 235 KYKTAC...NLEIRTRTFLVPHKKGFPLATELQRIBKNASDFARN.LSITTYGMFGTG.AVHAIF...RDVTTYNNQSAALYNDK...GEFIGI  
bGA 108 KLVNTD...KKGRYRITKDIIFTDKR...NSLIMKAKFALE.GSIIEDKLYL...AYDP.H.IKN...QG...S.YNEGVIKANNREMLA  
Ma1P 121 NRSFVVERGA...VRVALNFQRFVLSVAQ...PELSVQKVTVKNSLDAEVD.VTLKP...SIDADVMNEEANTYDERFW...D.VLATDQQA...DROSI

ChBP 186 DLYYNT...DDPEG...FYLLASTFD...PDSYDQQR...DRFLGLYRDEANPLAVEQQR.C.SNSAQTCTYNHCSLHKQTLQPGERIRFAYILG  
CBP 184 AIYHKT...EYRERRDHYAVFGVNR...ADGFDTR...DTFYGAYNSLGRASVFRACKS.ADSVASGMYPIGSHSVAVILQPGESRDLYVILGY  
CDP 321 TPDYYP...EFKQDTRFVTMIVRNGDEKSPFCTDY.NDFVGTCTLEHPAGGCLNKK.LNRKGGPFFALG...APFVPEPKIVYIITFTGL  
bGA 182 KR...D...N...V...YTALSSNIG...WKQYSIGYKVDI...MT.DLDENKQMTKHYDSARGNIIEGAEIDLK...NSEFIVLE  
Ma1P 202 VAKTTPNPPGTPRPTS...GMENRLVTD...LKN...VAI.TQPN...EKVEY.TTAYTOKLAPQASAELEKRV.I

### Linker Helices C terminal domain $\alpha$ helical barrel domain

ChBP 268 .....IG...KNGERLREHYTDVANIDAAFAAIKAHWDERCA.KFQVKS.PNCGGLDTMINAWTLYOAE.TCVV...  
CBP 270 LENPDEEKWADDAHQVNV...KAPAHALLGRFATSEQVDAALRALNSYWTLLS.TYSVSS.TDEKLDKRVNINWQYQCM.VTFM...  
CDP 409 ESSKDNENYS...DAVM...LRELDMLLRYFEKSESVEETLNEIINPHENYQK.YFQFNT.GNKLFPDGFNRRLAQLVLT.YQF...  
bGA 250 .....FG...QSDSEAAKTALETGLED.YNNLKNYIDENWKYCNTLNNFN...GKANSLY.YNSMILK.ASED...  
Ma1P 262 .....VVTSRDYDTQESL.TAAMEQLSDKVAQ.SSYEDLLNAHTAIWAQRWE.KSDVVIKODDESQGOI.RFNLFQLFST.YYGEDAR

ChBP 331 W...SFP...ASFIEV...CGH.TGLQYVDTAQ.DAIVSP.HAND.ENTRKRIVDLRQ...VA...AGYQLHLFDDP.WPDEKED  
CBP 349 M...SRS...ASFFET...GIG.RGMGFRDSNQ.DLLGFV.HLIP.RRARRERIDIASTQ...FK...DGSATYHQYF...  
CDP 484 M...SRS...FQGTQK...GYR.EIGFRRIQD.LPASMAY.YFIN.IGYQDFVKELLEFV...TA...NVYKMYANN...  
bGA 311 KTNXGAYIAS...LSIPWQDQRDDNTGCTHLVMSRLYE.VANAFIAAGDV.DSANRSLDYLAQV...KD...NGMIPQNTWISGKPT...  
Ma1P 340 L...NIGPKQFTGEK...YG.GATTY.MTEAPAPPVYL.GITDPKVTNRLLMRYKQLDGAYINAQEQGLKFPVMTV...DG...

ChBP 399 VAPSKSPVTVTPSPDEDKIH..GIK..DT.CSDDLHLWIPTICKYVMEETGETSPFDQMIPYAD..GGEASVYE.HMKALDPSAHY.VG.Q...TGICK  
CBP 408 .....LTERGNND...IG..SG.FNDDPLWLIAGVAAYIKESQDWGLDEPVPFDPNEPGEVPLP.HLTRSFPPTVQN.RC.P...HGLPK  
CDP 543 .....FYVVGKQP...GL.YSDDSLWLLQAYRYIYIKDTSVLNREVPVADGNNEKRAVER.T.KAI.IQYASCIAGVQ.D...HGLPL  
bGA 390 .....WT...GI.QLDEQADGPIILSYRLK...RY...LDYDLSLVKPKDAFIKI.G...PK  
Ma1P 413 .....IECHNEWSEITFEEIERNGDIAFIAYNTYRTTGDSSVYL.HB...GAK.VLTEISRFWADR.VHFKRNNQYMIH

ChBP 485 GLRADNDCLNL...GGGESSMVSFLHFVALQEFIDLAKFLG..KD..QD...VNTYTEMAANVREACET  
CBP 483 IGRADNDCLNLNC...FSTTPQESPTOTTENQAGGVAESVPIAAQFVLYGAEYATLAERRC..LA..DV...ATEARKYVDEVRAAVLE  
CDP 617 LDLADNDCLKIANSIDGATKEKLYEQLKKTNGYGRDFMSDYSSEVMNAFLKLLAIDLRLAETLDN.DT..QL...AQQMSLSKVEVTRIQK  
bGA 432 TG.QERNSE.IG...GYSPTMAAEVAAGLTCAYIAEQNK..DY..ES...AQYQEKADNWQKLDL  
Ma1P 481 GV.TGADSEYENN...V.DNNWDTNMLAQWTLKTYLLEILKQVDQDTAKQLDVSDEKTKWQDVIDRM..YL..

ChBP 545 HLWDD...EG...GWYIRGLTKN...G...DKIG...TAQQQ...EGRVH..LESNTLAVL.S.GIAS.Q  
CBP 562 HGWD...G...QWFLRAYDY...G...NPVG...TDAPK...EGKIW..TEPQGFVW.A.GIGV.G  
CDP 708 HAWKENFFARVLIN...RYKDGSTYTLGAKG...DKLS..ADPNI...DGVPF..LNSFANSVL.S.DVAT.D  
bGA 498 LTTTE...NGLPQNGQYIIRIAGLS...DPDAPFMINIANGGGVYDQK...HE.VD..PSF.LELVYR.L.QVKSADD  
Ma1P 544.PYDK...DL...NIPVQED...GFL...DKDIEPVSSIPADQRPINQNSWDKILRSPIYKQGV.LQCIWDFIDYTY.P

ChBP 592 ERGE...QAMDVDEHLFSPY...GLHLNAPSPSTPNDIDIOFVTR...YQCVKNGAI...SHPNPAWVARTKLGRODRAMKFFDAL  
CBP 607 EGPDDADAPAVKALDSVNEMLGTPH...GLVLQYPAITTYQIELGEVSTY...FFGYKENGQIFCNHNPVWIIAETVVVGRGAQFDYKRI  
CDP 765 QRIA...IMVDVLIKHLITPY...GLRLVTPADLNKLIANDTATGHY...FFGDRENGAVFKASHMNAVALIKAAKXVLDNELAKEM  
bGA 550 PKIL...NTLKVVDSTIKVDTPRGPSTYR.NE...D..GTGEPSTKELYHOAGKG...RLVPLLTGEROMYIAAGKD..ATPYK.A  
Ma1P 618 HQKK...ANFPDYEP...TV...HEHSLSPAIHSVLAADLHYRDXAVELYSRT

### C terminal domain

ChBP 670 N...PYNQNDIEKRIAE.P.YSYVDFING...RDEQDHEGRAN...HPWLE...SGWAYFAVNTYILGVQS...GF...TGLSVDPCIPSDWPGFE  
CBP 692 T...PAYREDISDTKLEP.YVYAGMIAG...KEAYRAGEAK...NSWLTGTAANWFVAVSQYLLGVRP...DY...DGLVVDPIQGVDPVPSY  
CDP 843 ARIAYPMIDLVLVYK.NL.ENPFFVAGMPCICTQYINVTGONI...GPLLSTATWLNLNLS.LAGIEY...TR...DGLSFPNDILREBETQLN  
bGA 624 M...E.K...F.ANEGCIISQVW...EDT.GLPT.DSASPLNWAHAYVILFASNIEKHLVDMPDIVKRYVA...PSF.LELVYR.L.QVKSADD  
Ma1P 655 A...RL.DL...D.N...Y.N...NDTT...DGLHITSMTGAWIYVQGFAGMRV...RD...GQLHYAPFLPKTWTYSY

ChBP 748 VTRQWRGATYHIOVENPDH...VSKQVKS...ITLNCAPIQGR.IPPQAQGSNDQVWVVLG  
CBP 770 VTRVARGATYIITVN.SG...APGARAS...LTVDGAPVDGRTVYAPAGSTVREVEVY  
CDP 927 FTLKAPKCSYKFSITKPVG...FARMESSEYELFVDGQKIDNTVIMYTTDEHEHIVTLKFK  
bGA 711 FRQVFRDLIEVSHADGPHFKLLSGEPLTIDVAGAA...AAAAAAA  
Ma1P

図 2-7 GT-36加リン酸分解酵素と類似構造を持つGH酵素のアラインメント。GT-36酵素を赤色、GH酵素を青色で示した。

GT-36酵素はClustalW\*を用いて並べた。ChBPとGH酵素はMATRAS\*\*を用いて立体構造に基づいて配列した。それぞれの構造の2次構造を下段に記した(矢印:β-ストランド、コイル:α-ヘリックス)。

GT-36の保存配列を赤色で示した。触媒残基を赤色、Fixer残基を青色で示した。ChBPの基質認識に関わる残基をオレンジ色で示した。

CBP: *Cellvibrio gilvus*由来セロビオースホスホリラーゼ

CDP: *Clostridium thermocellum* YM4由来セロデキストリンホスホリラーゼ

bGA: *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*グルコアミラーゼ(GH-15)

MalP: *Lactobacillus brevis*マルトースホスホリラーゼ(GH-65)

\*Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J., (1994). Clustal-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680

\*\*Kawabata, T., and Nishikawa, K. (2000). Protein structure comparison using the Markov transition model of evolution. *Proteins* 41, 108-122.

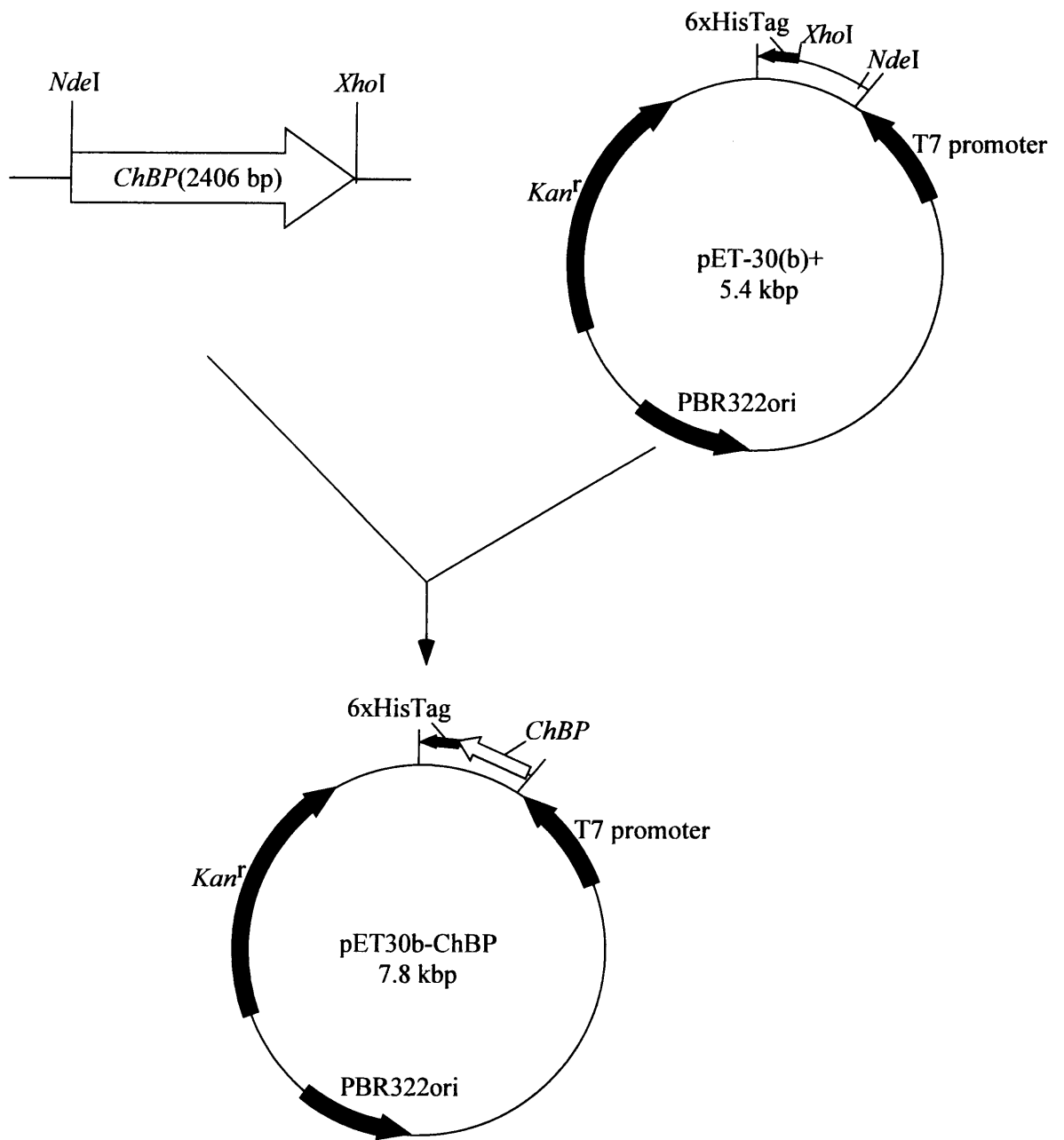


図 2-8 ChBP発現用ベクターpET30b-ChBPの構築[19]



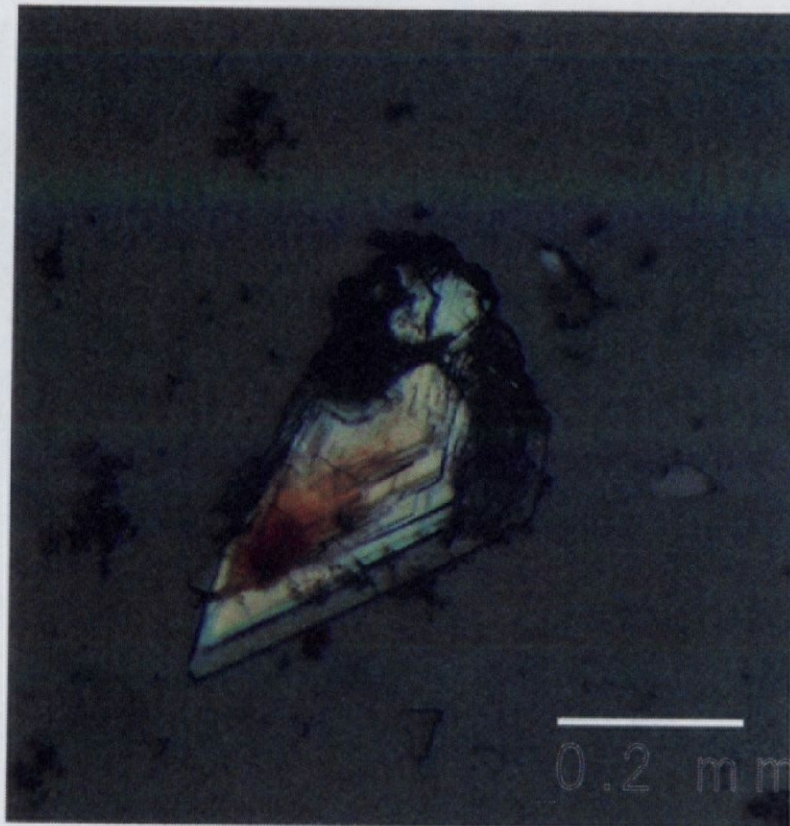


図 2-9 ChBP結晶。薄い結晶が多重の層を形成している。

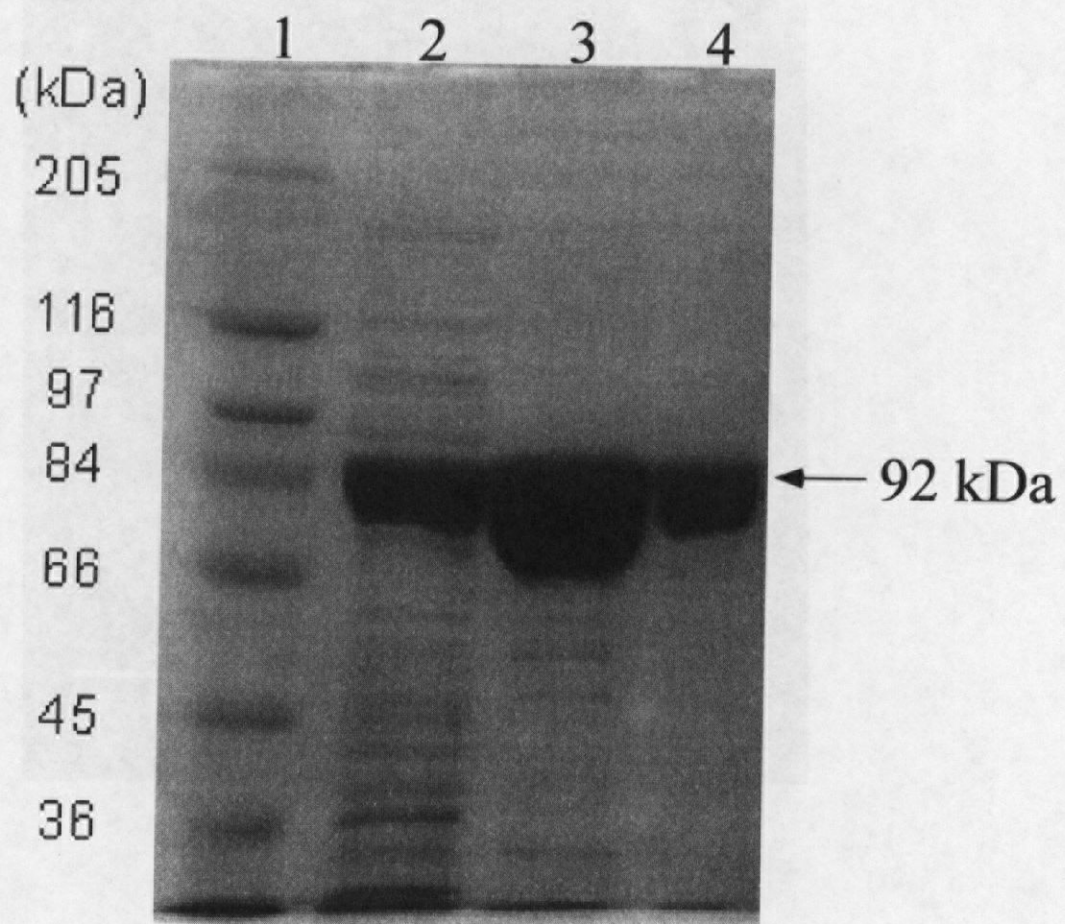


図 2-10 ChBPの大量発現、精製結果。

(SDS-PAGE; ゲル濃度7.5%)

レーン 1: マーカー

レーン 2: 菌体破砕液上清

レーン 3: IMAC後

レーン 4: IMAC後 (レーン3の5倍希釈)