

第 2 章 發現・精製・結晶構造解析

2-A 序

第1章に記述したように、AkAbf54の属しているGH54の酵素はまだ構造解析がなされておらず、あまり詳細な研究が進んでいない。そこで、AkAbf54の構造解析を目的として研究を進めた。本章では、AkAbf54の大量発現、結晶化及び構造解析について述べる。

2-B 目的・材料・方法

2-B-1 AkAbf54の大腸菌での発現系の構築、発現条件の検討

2-B-1-1 目的

結晶化には、通常結晶化条件のスクリーニングなどに10 mg程度の高純度のタンパク質を必要とする。元菌（この場合 *Aspergillus kawachii*）から精製して得られるタンパク質は通常少なく結晶化などには十分な量とはいえない。本章ではAkAbf54を結晶化に十分な量得るため、まず大腸菌を用いて発現させることにした。そこで、まず、大腸菌での発現系を構築し、発現しているかを確認した。

2-B-1-2 材料

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またはSIGMAの特級試薬を用いた。

発現ベクター及び菌株

酒類総合研究所の小関博士からAkAbf54のORFをT-ベクターにサブクローニングしたプラスミドを頂き、以下の実験に使用した。

AkABf54を発現させる発現ベクターとしてpET17bを選択した。pET17bは、アンピシリン耐性遺伝子を持っている。N末、C末共にHis-tagは付かない。

発現菌株としてBL21 (DE3) CodonPlus RIL 株 (Stratagene) とAD494 (DE3) 株 (Novagen)を用いた。BL21 (DE3) CodonPlus RIL 株は、大腸菌以外の遺伝子にはマイナーコドンが多く含まれている場合が多いので、それを相補するために、Arg, Ile, Leu のtRNAの遺伝子を增強している。AD494は、チオレドキシンリダクターゼ (trxB) に変異が入っており、ジスルフィド結合のあるタンパク質を発現させるのに向いている。

プラスミド増殖など遺伝子実験用の菌株としてXL10-Gold 株 (Stratagene) を用いた。Hte表現系で形質転換効率が高いのが特徴である。

培地

培地の調製を次のように行い、以下の実験に用いた。

・ LB 培地

2.5% LB (Difco)

培地はオートクレーブ滅菌した。アンピシリン耐性遺伝子を持つ pET17b を発現ベクターとして用いたため、以下この発現ベクターを含む大腸菌の培養の際には、アンピシリンを 100 µg/ml の濃度で添加した。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。

基質

活性測定用の可溶性基質として、pNPAF (*p*-ニトロフェニル α-L-アラビノフラノシド) を用いた。これは、合成基質であり、パラニトロフェノールにアラビノフラノースが結合したものである。アラビノフラノシダーゼにより、アラビノース部分が切断されると、パラニトロフェノールが遊離し、405 nm の吸光を呈する。

2-B-1-3 方法

発現プラスミドの構築

発現系を図 2-1 のように構築することにした。プライマーを図 2-2 のように設計した。制限酵素で切断できるよう N 末側に *Nde*I サイトを、C 末側に *Eco*RI サイトを作った。第 1 章に記したように、N 末端 18 残基がシグナルペプチドであることが予想されており (図 2-3)、元菌の発現の際には実際に切られて発現していた。シグナルペプチドが付加した配列 (Met1-Ser499) と除去した配列 (Met-Gly19-Ser499) の 2 つの配列を作るため、N 末端側のプライマーは 2 種類を設計した。これらプライマーを北海道システムサイエンス (HSS) に注文し、入手した。

Template 0.5 µl、Pfu Turbo (Stratagene) 1 µl、Pfu buffer 5 µl、dNTP mixture 4 µl、primer F 1 µl (2 pmol)、primer R 1 µl (2 pmol) を混合し、滅菌水を加えて 50 µl にした。

1 cycle (95°C 30 sec)
30 cycle (95°C 30 sec, 50°C 1 min, 72°C 3 min)
1 cycle (72°C 7 min)

の条件で PCR Thermal Cycler PERSONAL (Takara) により PCR を行った。

反応液をアガロース電気泳動し、目的のバンド (図 2-4) を切り出した。

PCR 産物及びベクター pET17b をそれぞれ *Nde*I と *Eco*RI で 3 時間制限酵素処理した。エタノール沈殿を行い、滅菌水に溶解させた。PCR 産物とベクター量の比を 10:1 にし、Ligation high (Toyobo) を用い 15°C で 1 時間ライゲーション反応を行った。反応液で大腸菌 XL10-Gold 株 (Stratagene) を形質転換した。LB プレートに出てきたコロニーのうちの 3 個を取って 5 ml の LB 培地で培養した。プラスミド抽出 (QIAGEN Plasmid Miniprep Kit) を行い、得られた

プラスミドをアガロース電気泳動することにより、インサートが挿入されているか確認した。

得られたプラスミドが正しいものであるかどうかを DNA シークエンサーCEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter) を用いて、塩基配列を読むことにより確認した。

発現条件の検討

得られたプラスミド (pET17b-AkAbf54) で大腸菌 BL21 (DE3) CodonPlus RIL 株及び AD494 (DE3) 株を形質転換した。出てきたコロニーのうちのひとつを取って 5 ml の LB 培地で一晩前培養した。このうち一部をとり、グリセロールストックを作り保存した。そして、前培養液を試験管に入った 5 ml の LB 培地に 50 μ l 植菌し、28℃または 37℃で培養した。IPTG を加える場合は OD が 0.5 になったところ (2 時間 30 分~5 時間) で 0.5 mM になるように加え、発現を誘導した。植菌後、37℃の場合は 8 時間、28℃の場合は一晩培養し、得られた培養液を遠心 (10000 \times g, 5 min) して菌体を得た。菌体を 100 mM Sodium Acetate (pH 4.5) または 100 mM HEPES-NaOH (pH7.0) 250 μ l に懸濁して、Bioruptor (COSMO BIO) により超音波破碎を行った。破碎後、遠心 (10000 \times g, 5 min) して上清と沈殿に分けた。上清の活性を調べることで発現しているか調べた。また、上清と沈殿の SDS-PAGE を行い、発現しているかどうかバンドを見た。

活性測定法

- ① 2.5 mM の pNPAF 100 μ l (100 mM Sodium Acetate, pH 4.0) を 37℃で 5 分間プレインキュベートした。
- ② 酵素溶液を 1 μ l 加え、反応を開始させた。37℃で 10 分間、20 分間、30 分間インキュベートした。
- ③ 1 M 炭酸ナトリウムを 40 μ l 加え、反応を停止させた。
- ④ 生成物である *p*-ニトロフェノールの遊離量を 405 nm の吸光を測定した。10 分間、20 分間、30 分間インキュベートしたサンプルをプロットし、傾きを出すことで活性を計算した。

以下の章では、活性測定はここに書いた方法で行ったものとする。

SDS-PAGE

SDS-PAGE は、Laemmli の方法[2-1]に従った。ゲル濃度は 10%とし、電気泳動後のタンパク質の検出には Quick CBB により染色を行った。分子量マーカーは LMW ELECTROPHORESIS CALIBRATION KIT (Amersham) を用いた。以下の章では、SDS-PAGE はここに書いた方法で行ったものとする。

2-B-2 AkAbf54 の大腸菌での大量発現、精製

2-B-2-1 目的

2-B-1 で作成した大腸菌での発現系を用いて、大量発現及び精製を行った。

2-B-2-2 材料

菌株、培地などは、2-B-1-2 に示したものをを用いた。

2-B-2-3 方法

大量培養

2-B-1 で作成したグリセロールストック (大腸菌 BL21 (DE3) CodonPlus RIL 株) から 10 ml の LB 培地で 26℃ 一晩前培養した。1.5 L の LB 培地を 5 L の三角フラスコに入れたものを 2 つ合計 3 L 用意し、前培養液をそれぞれ 5 ml ずつ植菌した。26℃ で一晩振盪培養した。

精製

・ 破碎

得られた培養液を遠心 (5000 ×g, 20 min) して菌体 3 g を得た。菌体を 100 mM Sodium Acetate (pH 5.5) 30 ml に懸濁して、Bioruptor (COSMO BIO) により超音波破碎を行った。破碎後、遠心 (10000 ×g, 20 min) して上清を得た。

・ 熱処理

熱処理は、55℃ で 30 分間行った。遠心 (10000 ×g, 20 min) を行い、上清の可溶性画分を MILLEX-GP 0.22 µm Filter Unit を用いて微粒子を除去した。

・ DEAE-Sepharose

流速の調節は、FPLC (Amersham) を用いた。また、タンパク質は、280 nm の吸光度をモニターした。

使用したバッファー：

バッファーA：20 mM Sodium Acetate (pH 5.5)

バッファーB：1.0 M NaCl, 20 mM Sodium Acetate (pH 5.5)

- ① DEAE-Sepharose Fast Flow のレジン (Amersham) 20 ml を C-16/20 カラム (Amersham) に詰め、バッファーA でカラムを平衡化した。
- ② サンプルをアプライし、流速 2 ml/min でレジンに吸着させた。そして、バッファーA を流速 2 ml/min で非吸着物質が出てこなくなるまで流し続けた。
- ③ バッファーA とバッファーB を用いて NaCl の 0 M から 0.6 M までの linear gradient を流

速 2 ml/min、40 分間でかけた。

- ④ 活性測定を行い活性のある画分を混合した。20 mM Sodium Acetate (pH 5.5) に透析した。

タンパク質の定量

タンパク質の定量は、BCA 法により算出した。BCA working reagent (PIERCE) とサンプルを混合し、60℃で 15 分間 incubate した後、562 nm の吸光を測定した。標準タンパク質としてγ-グロブリンまたは BSA を用い、0 mg/ml、0.1 mg/ml、0.2 mg/ml、0.3 mg/ml、0.4 mg/ml、0.5 mg/ml の濃度で検量線を測定した。以下の章では、タンパク質の定量はここに書いた方法で行ったものとする。

2-B-3 AkAbf54 の酵母での発現と精製

2-B-3-1 目的

酵母 *Pichia pastoris* を用いて、結晶化に十分な量の AkABf54 を発現させることを目的として実験を行った。

2-B-3-2 材料

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、SIGMA の特級試薬を用いた。

発現ベクター及び菌株

酒類総合研究所の小関博士から AkABf54 の *Pichia pastoris* の発現プラスミド (pPICZαC-AkAbf54、図2-5) を頂き、以下の実験に使用した。

pPICZαC-AkAbf54は、pPICZαC (Invitrogen) のマルチクローニングサイトに制限酵素 *Clal* 及び *XbaI* で切り出された AkAbf54 遺伝子 (N末端に見られるシグナル配列18残基を除き、代わりに Met を導入した) を組み込んだものである。N末側にシグナルであるα-ファクターがついており、培地中に分泌発現される。ゼオシン耐性遺伝子を持っている。プロモーターはメタノール存在下でのみ誘導される AOX1 である。SacI 制限酵素サイトを持ち、相同組み換えの際、SacI で制限酵素処理することにより直鎖状にする。直鎖状の方が、相同組み換えの効率が良くなるからである。

プラスミド保持用の菌株は、大腸菌 XL10 株を用いた。

発現菌株は、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* GS115 株 (Invitrogen) を用いた。GS115 株は、ヒスチジン要求株であり、培養する際にヒスチジンを加える。

培地

培地の調製を次のように行い、以下の実験に用いた。LB 培地は大腸菌の培養に、他の培地は酵母の培養に用いた。YPD 培地はプレート培地に、BMGH 培地は酵母の前培養液に、BMMH 培地は酵母の本培養液にそれぞれ用いた。BMGH 培地、BMMH 培地は制限培地であり、グリセロールまたはメタノールを唯一の炭素源とする。

・ LB 培地

2.5% LB (Difco)

・ YPD 培地

1% Yeast extract (Difco)、2% Glucose、2% Peptone (Difco)

・ BMGH 培地

1% 硫酸アンモニウム、0.34% Yeast Nitrogen Base (Difco)、1% グリセロール、 $4 \times 10^{-3}\%$ Histidine、 $4 \times 10^{-5}\%$ Biotin、100 mM Potassium phosphate (pH 6.0)

・ BMMH 培地

1% 硫酸アンモニウム、0.34% Yeast Nitrogen Base (Difco)、0.5% メタノール、 $4 \times 10^{-3}\%$ Histidine、 $4 \times 10^{-5}\%$ Biotin、100 mM Potassium phosphate (pH 6.0)

培地はオートクレーブ滅菌またはフィルター滅菌したものを用いた。抗生物質は、ゼオシン (Invitrogen) を用いた。発現に使用したプラスミド pPICZαC-AkAbf54 にはゼオシン耐性遺伝子が含まれている。大腸菌の培養の際にはゼオシンを 25 μg/ml の濃度で、酵母の培養の際にはゼオシンを 100 μg/ml の濃度で添加した。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。

2-B-3-3 方法

形質転換

頂いたプラスミドで大腸菌 XL10-Gold 株を形質転換した。コロニーを 100 ml の LB 培地に植菌し、一晚培養した。集菌した後、プラスミド抽出 (NUCLEOBOND AX, MACHEREY-NAGEL) を行った。100 ml の LB 培地で培養したのは、酵母の形質転換に大量のプラスミドを必要とするためである。得られたプラスミド溶液をエタノール沈殿により 30 μl 程度に濃縮し、以下の形質転換に用いた。

得られたプラスミドを 37℃で一晚 *SacI* 制限酵素処理を行い、直鎖状にした。制限酵素処理後の溶液をエタノール沈殿により 3 μl 程度に濃縮し、その全てを形質転換に用いた。酵母 *Pichia pastoris* GS115 株をヒートショック法により形質転換を行った。YPD プレート培地に撒き、26℃で3日間インキュベートした。

発現の確認

AkAbf54が酵母できちんと発現するかどうかを確認するため、スモールスケールでの発現を行った。

まず、形質転換で出てきたコロニーを一つ選び、10 mlのBMGH培地に植菌し、28℃で一晩前培養した。このうち、前培養液を一部とり集菌した後、YPD培地に懸濁し、グリセロールストックを作成した。残りの前培養液を遠心 (3000 ×g, 1 min) して集菌した。菌体を50 mlのBMMH培地に懸濁して、28℃で42時間振盪培養した。3時間後、16時間後、22時間後、41時間後に100 µl程度サンプリングした。サンプリングしたものの活性測定及びSDS-PAGEを行い、発現状態を確認した。23時間後に0.5%になるようにメタノールを加えた。

大量培養

グリセロールストックから5 mlのBMGH培地に植菌し、26℃一晩前培養した。前培養液を遠心 (3000 ×g, 1 min) して集菌した。菌体を1 LのBMMH培地に懸濁して、26℃で振盪培養した。24時間毎に5 mlずつメタノールを加えた。

91時間後に得られた培養液を遠心 (5,000 ×g, 10 min) して上清を得た。上清培地成分をMILLEX-GP 0.22 µm Filter Unit を用いて微粒子を除去した。

精製

・DEAE-Sepharose

流速の調節は、ペリスタポンプとFPLC (Amersham) を用いた。また、タンパク質は、280 nmの吸光度をモニターした。

使用したバッファー：

バッファーA：20 mM Sodium Acetate (pH 5.5)

バッファーB：1.0 M NaCl, 20 mM Sodium Acetate (pH 5.5)

- ① 塩濃度が高くそのままではレジンに吸着しないので、バッファーAを2 L加え、3倍に希釈した。
- ② DEAE-Sepharose Fast Flow のレジン 20 ml を C-16/20 カラムに詰め、ペリスタを用いてバッファーAでカラムを平衡化した。
- ③ ①の溶液 3 L を、ペリスタを用いて流速 5 ml/min でレジンに吸着させた。そして、バッファーAを流速 5 ml/min で10分間流した。
- ⑤ FPLCを用いてバッファーAとバッファーBを用いて0 Mから0.5 MまでNaClのlinear gradientを流速 2.5 ml/min、30分間でかけ、その後、バッファーBを流速 2.5 ml/min で20分間流した。
- ⑥ 活性測定を行い活性のある画分を混合した。10 mM Sodium Acetate (pH 5.5) に透析した。Amicon Ultra (Millipore) で濃縮し、20 mg/mlのタンパク質濃度にした。

2-B-4 酵母で発現させた AkAbf54 と大腸菌で発現させた AkAbf54 の性質の比較

2-B-4-1 目的

酵母 *Pichia pastoris* で発現させた AkAbf54 と大腸菌で発現させた AkAbf54 との性質の比較を行った。

2-B-4-2 材料

菌株や培地などは、2-B-3-2 で述べたものを用いた。

2-B-4-3 方法

ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量測定

流速の調節は、FPLC を用いた。また、タンパク質は、280 nm の吸光度をモニターした。カラムは、Superdex 200 HR 10/30 カラム (Amersham) を用いた。

使用したバッファー：

バッファーC：0.15 M NaCl, 20 mM Sodium Acetate (pH 5.5)

- ① Superdex 200 カラムをバッファーC で平衡化させた。
- ② 標準タンパク質として、Blue Dextran (2000 kDa)、Thyroglobulin (669 kDa)、Apo ferritin (443 kDa)、 β -amylase (200 kDa)、Albumin (66 kDa)、Carbonic Anhydrase (29 kDa) を混合して流速 0.7 ml/min で流し、保持時間 (溶出体積) と分子量の関係を用いて検量線を作成した。
- ③ 精製 AkAbf54 を流速 0.7 ml/min で流し、AkAbf54 の保持時間から分子量を計算した。

PAS 染色[2-2]

酵母は真核生物であるため、発現させたタンパク質に糖鎖が付加している可能性がある。そこで、PAS 染色を行い、糖鎖を染色することにより、糖鎖が付加しているかを確認した。

- ① 大腸菌で発現させたサンプルと酵母で発現させたサンプルを SDS-PAGE で泳動した。
- ② 泳動後のゲルを 12.5%トリクロロ酢酸で 30 分振盪し、水でリンスしたあと 1%過ヨウ素酸/3%酢酸で 50 分間振盪した。
- ③ 水で 2 時間振盪し、洗浄した。水は適宜交換した。
- ④ シッフ試薬で 1 時間光が当たらないように振盪した。
- ⑤ 0.5%二亜硫酸ナトリウムで 30 分間振盪行った。10 分ごとに溶液を新しいものに交換した。
- ⑥ バックグラウンドが消えるまで水で振盪した。

熱安定性の測定

大腸菌で発現させた AkABf54 と酵母で発現させた AkABf54 との間で、熱安定性の差が見られるかどうかを調べた。それぞれ各温度 50℃、55℃、60℃、65℃で 30 分間インキュベートし、その後活性測定を行った。

2-B-5 酵母で発現させた AkABf54 の結晶化

2-B-5-1 目的

目的は、AkABf54 の反応機構やフォールドを解明するため、原子レベルでの構造的基盤を X 線結晶構造解析により得ることである。X線結晶構造解析を行うためにまず高分解能の反射を回折する結晶を得る必要がある。そこで、酵母で発現させた AkABf54 を用いて結晶化を試みた。

2-B-5-2 材料

結晶化用のサンプルとして、濃縮サンプルを miliQ で適当なタンパク濃度 (15 mg/ml など) に希釈し、MILLEX-GP 0.22 µm Filter Unit により微粒子を除去したものをを用いた。

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または SIGMA の特級試薬を用いた。

複合体構造を得るため、アラビノース、キシロース、キシロオリゴ糖 (<5%キシロース+50~70%キシロピオース+20~40%キシロトリオース+1~20%キシロテトラオース及びそれより長いキシロオリゴ糖) といった糖を用意した。

2-B-5-3 方法

結晶化条件のスクリーニング

結晶化条件のスクリーニングには、小スケールで行うために Crystal Clear Plate (Hampton Research) を用い、シットティングドロップ法で行った (図 2-6)。

- ① Crystal Clear Plate に、リザーバー溶液を 80 µl 入れる。リザーバー溶液は Crystal Screen I、II のリザーバーのセット (Hampton Research) を利用した。
- ② Crystal Clear Plate のウェルに酵素液 (15 mg/ml) を 2 µl、リザーバー溶液を 2 µl 入れ混合した。
- ③ ドロップ作成直後にドロップを観察し白濁しているものについては、リザーバー溶液を miliQ 水で適当に希釈してやり直した。
- ④ 密閉のためにクリアテープでシールする。25℃のインキュベーター内に静置した。数

日に一回顕微鏡でドロップの様子を観察した。

結晶化条件の精密化

スクリーニングで結晶が得られた条件を初期条件として、より大きく質の良い結晶を得るため、沈殿剤や塩濃度、pH などについて条件の精密化を行った。シットティングドロップ法で、小スケールで行った。リザーバー溶液は、自分で作成した。

シットティングドロップ法は、上記の方法で行った。ただし、Crystal Clear Plate のウェルに酵素液を入れる量を 1~3 μl と変えて行った。

結晶の収穫

ドロップ内の結晶を、ピペットを用いてリザーバー溶液より少し沈殿剤濃度の高い溶液に移した。結晶に抗凍結剤をしみ込ませる為、抗凍結剤濃度を目的の濃度までの間で数段階に刻んだ (沈殿剤濃度のみ少し高めにし、あとはリザーバー溶液と全く同じ組成の溶液) を用意し抗凍結剤濃度の低い方から順に 2 分程度浸して次に移すというステップワイズ法で行った。

反応物であるアラビノースやキシロースやキシロオリゴ糖との複合体を得るため、soaking も行った。ステップワイズ法により抗凍結剤をしみ込ませた結晶を、ピペットを用いて、50 mM L-アラビノースまたは 120 mM D-キシロースまたは 5%キシロオリゴ糖を含む溶液に移し、2 時間程度浸透した。

X 線回折強度データの収集

回折強度データの収集は、実験室放射光室 Raxis IV⁺⁺や高エネルギー加速器研究機構 PF-AR の実験ステーション NW12 や SPring-8 の実験ステーション BL38B1 で行った。

結晶を、抗凍結剤 (25% PEG400) を含む溶液に浸透させた後、クライオループ (Hampton Research) を用いてすくい取り、100 K のクライオストリーム中において瞬間的に冷却して測定した。キャピラリーの場合は室温で行った。

波長は、通常は 1.0000 Å で行った。

回折強度データの処理

得られたデータは、HKL2000 プログラムパッケージを用いて処理した。処理に用いたスクリプトは、HKL2000 プログラムパッケージ[2-3]のマニュアルに従った。

2-B-6 AkAbf54 の構造解析

2-B-6-1 目的

通常、タンパク質の X 線結晶構造解析を行うには、位相情報¹⁾を求める必要がある。そ

のタンパク質と似たアミノ酸配列を持つタンパク質（通常アミノ酸配列の相同性が 30%以上）で構造が明らかになっている場合には、その構造をモデルとして用いて分子置換法²⁾という方法で位相情報を求めることができる。しかし、似た既知構造がない場合には、重原子を用いた MAD 法[2-4]³⁾か、MIR 法[2-5]⁴⁾かにより位相情報を求めてやる必要が生じる。

MAD 法³⁾は、波長を変えて重原子同型置換体中の重原子の異常分散を測定することにより位相を解く方法である。普通は、メチオニン要求株（大腸菌では B834 株）を用いて、タンパク質中のメチオニンをセレノメチオニン（メチオニン中の硫黄原子がセレン原子になったもの）に置換したセレノメチオニン置換体を用いる。この場合、メチオニンがほぼ 100%の割合でセレノメチオニンに置換される。しかし、酵母にはメチオニン要求株が得られていないため、この方法は使うことができない。ただ、酵母を培養する際の培地にセレノメチオニンを加えておくと 40%~65%程の置換率でセレノメチオニンになるという報告がある[2-6~8]。しかし、置換率の問題から位相決定は難しい。

MIR 法⁴⁾で位相を解く場合は、よい重原子同型置換体を 2 つから 3 つ程見つける必要がある。よい重原子同型置換体というのは、重原子が結晶中のタンパク質に特異的に比較的高い占有率で結合しており、かつ結晶の同型性が変化していない結晶のことを指す。本研究では、この MIR 法により位相を決定し、構造決定を行った。重原子同型置換体を得るため、数十種類の重原子試薬をスクリーニングした。

2-B-6-2 材料

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、SIGMA の特級試薬を用いた。表 2-7 に示したような重原子試薬を用いた。

構造解析関連ツール

構造解析の際のデータ処理や電子密度マップ表示や精密化計算は、OS として RedHat Linux をインストールした PC 上にて行った。プログラム・構造解析に関する用語の説明を (p165~p168 の 1)~20))の項目に記した。

2-B-6-3 方法

重原子置換体の調製

・重原子の種類について

重原子の種類は、大きく以下の 3 つに分類される。

- ① ソフトイオン:Pt や Hg や Au など。システイン、メチオニン、ヒスチジン残基に covalent に結合することが多い。Pt や Au などは、結合すると結晶に色がつくため、ある程度目

安となる。この中で成功例の多いのは K_2PtCl_4 、 $KAu(CN)_2$ 、 $HgCl_2$ 、PCMB などである。

Hg 系は特に試薬の種類が多い。PCMB と EMTS の化学構造を図 2-8 に示した。

- ② ハードイオン：Sm や Pb など。アスパラギン酸、グルタミン酸残基などとイオンの結合する。
- ③ 希ガス：Xe や Kr。疎水ポケットに入り込んで結合する。

重原子同型置換体の探索には、結晶の数が必要なので、結晶を大量に用意した。

次に、いろいろな重原子溶液を作製した。重原子の濃度は、20 mM または 100%飽和溶液をまず作成した。溶解度が低く 20 mM も溶けない場合は、100%飽和溶液を作製した。重原子溶液の pH をチェックして変化していないことを確認した。数時間から数日ほど作成した重原子溶液に結晶を浸し、重原子置換体を調製した。結晶に亀裂が入る、または、結晶の同型性が損なわれた（重原子が結合したことにより構造変化が起きてしまった）場合には、濃度を下げた。また、Xenon Chamber (Hampton) を用いて、キセノン置換体を作製した。結晶を一時間ほど 0.12 MPa のキセノン気体内に置き、圧力をかけて結晶内にキセノン原子を導入した。置換体作製を試みた重原子の種類を表 2-7 に示す。

X 線回折データの収集

結晶の収穫、回折データの収集、データの処理は同様に行った。

MIR 法⁴⁾は、重原子がタンパク質に特異的に結合することによる反射強度の変化を測定することにより位相¹⁾を決定するが、同型性が下がると位相情報を正確に引き出すことができなくなる。同型性が損なわれていないかどうかは格子定数を見て、判断した。native 結晶の格子定数と比較して 1%以内の差に収まっている場合は、同型性があると見なした。一方、1%以上の差が見られる場合には、同型性が崩れていると判断した。

位相決定の試み

パターソンマップを描いて、重原子のピークを探した。これらは CCP4[2-9]のプログラムを用いて行った。

- ① 重原子置換体の回折データ処理後のファイル (output.sca や ScalAverage.ref など) を mtz file に変更した。
- ② プログラム cad により、native 結晶のデータとひとつにまとめた。
- ③ プログラム scaleit により、scaling を行った (表 2-9)。Scale の値が大きく 1 からはずれていないことを確認した。分解能は、SCALE の値が 1 に収まっているところまでを信頼できる値として、その分解能を最大分解能とした。反射強度の差をあらわす RFAC の値が 10%~30%に収まっていることを確認した。RFAC が 10%以下なら重原子が結合しておらず、30%以上なら同型性が崩れている可能性が高い。
- ④ 差パターソンマップ⁵⁾を描いた。重原子が高い占有率で結合しているなら、差パターソ

ンマップ上に強いピークが現れる。

- ⑤ 強いピークが得られた場合、差パターンマップから重原子サイトの座標を予測し、プログラム MLPHARE[2-10]により、重原子の座標、占有率などを精密化した。
- ⑥ 重原子が低い占有率で結合している場合は、差パターンマップ上にピークが現れない。そこで、低い占有率で重原子が結合しているマイナーサイトを探すため、MLPHAREにより精密化した重原子座標を位相情報として用いて差フーリエマップ⁶⁾を描いた。ここで見つかったマイナーサイトも MLPHARE で精密化した。
- ⑦ ④~⑥により、重原子置換体の評価を行った。その中で優秀であると思われる重原子置換体のデータを用いてプログラム SOLVE[2-11]⁷⁾により位相決定を試みた。その後、プログラム RESOLVE[2-12]⁸⁾により density modification⁹⁾を行い、位相を改善した。RESOLVE の出力したポリアラニンモデルを以下の精密化に用いた。

精密化

以下に示す方法を組み合わせて、構造の精密化を行った。

・ ARP/wARP[2-13]¹⁰⁾

プログラム ARP/wARP によるモデル自動構築を試みた。

- ① RESOLVE⁸⁾の出力したポリアラニンモデルまたその後修正を行ったモデルを利用し、プログラムARP/wARPにより主鎖構築を試みた。ARP/wARPは R_{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で側鎖を構築した。

・ CNS[2-14]¹¹⁾による構造の精密化

- ① プログラム CNS の中の generate.inp を用い、得られた pdb file から mtf file を作成した。
- ② プログラム CNS の中の rigid.inp を用いて、剛体近似精密化¹²⁾を行い、マップとモデルのずれを修正した。なお、この作業を行うのは、最初だけである。
- ③ プログラム CNS の中の minimization.inp を用いてエネルギーの最小化¹³⁾を行った。
- ④ 温度因子¹⁴⁾の精密化をプログラム CNS の中の b_individual.inp を用いて行った。
- ⑤ 十分に精密化されてきた時、プログラム CNS の中の water_pickup.inp を用いて結晶中に含まれている水分子を拾った。

・ 電子密度マップの作成と XtalView/Xfit[2-15]によるモデル構築及び修正

- ① プログラム CNS の中の modelmap.inp とプログラム cns2fsfour を用いて $2F_o-F_c$ マップ¹⁵⁾、 F_o-F_c マップ¹⁶⁾を作成した。
- ② プログラム XtalView/Xfit を用いて、 $2F_o-F_c$ マップとモデルを見比べた。電子密度マップに合うように、モデルを修正・構築した。
- ③ 精密化の最終段階でこのモデルが信頼できるものかどうか、 F_o-F_c マップを見て確認し

た。

2-C. 結果と考察

2-C-1 酵母及び大腸菌での発現

大腸菌での発現について

シグナル配列を除かないと不溶性画分にも可溶性画分にも発現しなかった。シグナル配列を除いて、大腸菌の培養温度を 37℃にした場合は、不溶性画分に大量に封入体として発現した (図 2-10)。37℃で培養した場合はタンパク質の発現のスピードが速すぎて、その折りたたみが追いつかないため、正しい構造をとることができず不溶性のタンパク質として発現してしまうのだろう。可溶性画分には活性測定を行っても、全く活性を認めることができなかった。培養温度を 28℃に下げた場合、可溶性画分に発現が認められた。しかし、発現量はあまり多くなかった。IPTG の添加量や培地などの発現条件をいろいろと検討してみたが、発現量は特に上昇しなかった (図 2-11)。また、破碎の際の懸濁溶液も変えてみたが、特に可溶性に得られる量は変化しなかった (図 2-12)。

発現量が少ない原因としては、以下のことが考えられる。大腸菌ではうまくタンパク質を折りたたむ機構が発達していない。そのため正しいフォールドとることができず不溶化してしまうのだろう。また、AkAbf54 にはアミノ酸配列中に保存されたシステイン残基が 8 個存在しジスルフィド結合を形成している可能性が示唆される。大腸菌体内は還元的でジスルフィド結合がうまく形成されない場合が多い。このため、AkAbf54 中のジスルフィド結合がうまく形成されず、ミスフォールドしてしまう可能性が考えられる。菌体内が比較的酸化的な状態である AD494 株も発現の際に試したが、とくに発現量が上昇すると言うようなことはなかった。

大腸菌での大量発現と精製について

大量発現を行い、熱処理及び DEAE-Sepharose カラムを通し精製を行った (図 2-13)。37 kDa のところに余分なバンドが見られるもののほぼ単一バンドになるまで精製した (図 2-14)。しかし、AkAbf54 は 3 L 培養で 0.3 mg しか得られず、結晶化を行うには不十分な量であった (表 2-15)。

酵母での発現について

一方、酵母である *P. pastoris* を発現ホストとして用いた場合、大腸菌と比較して明らかに発現量が増加した。

培地を 3 時間後、16 時間後、22 時間後、41 時間後にサンプリングして、活性を測定した。培養時間を長くするほど、活性が高くなったことから、じわじわ発現しているといえる (図 2-16)。サンプリングした培地をそのまま SDS-PAGE に流すと、バンドが確認できるほど発

現していた (図 2-17)。

AkAbf54 は真核生物であるカビ由来であるため、発現ホストとして原核生物である大腸菌を用いるのではなく、同じ真核生物である酵母 *P. pastoris* を用いると発現がうまくいくのかもしれない。真核生物のほうがタンパク質の折りたたみを助ける機構が発達している。また、AkAbf54 は、もともと菌体外に分泌される酵素であるが、酵母において分泌発現させたのがよかったのかもしれない。

酵母大腸菌での大量発現と精製について

大量発現を行った。培地上清とバッファーを混合し、DEAE-Sepharose カラムを通し(図 2-18)、単一バンドに精製した (図 2-19)。AkAbf54 は 1 L 培養で 20 mg 程度得ることができ、結晶化を行うには十分な量であった。

大腸菌で発現させた AkAbf54 と酵母で発現させた AkAbf54 の性質

・分子量

酵母で発現させた AkAbf54 は 63 kDa 程度、大腸菌で発現させた AkAbf54 は 58 kDa 程度と、SDS-PAGE 上で分子量に 5 kDa 程差が見られた (図 2-19)。この原因として糖鎖の付加などが考えられる。

ゲルろ過を行って見積もられる分子量は 77 kDa 程度であり (図 2-20)、AkAbf54 がモノマーの状態で存在することが示唆された。

・熱安定性

大腸菌で発現させた AkAbf54 と酵母で発現させた AkAbf54 との間で熱安定性を調べた。両サンプルとも 60℃で 30 分間インキュベートしてもほとんど活性を失わない。65℃では、ほとんど活性がなくなった。ただ、活性の減少度がやや異なった (図 2-21)。大腸菌で発現させた方は残存活性が 13.1%だったが、酵母で発現させた方は残存活性が 37.4%であった。糖鎖の付加が、熱安定性には少し影響しているのかもしれない。

・活性測定

大腸菌で発現させた AkAbf54 と酵母で発現させた AkAbf54 との間で活性を比較した。大腸菌で発現させた AkAbf54 の比活性は 18.7 U/mg、酵母で発現させた AkAbf54 の比活性は 29.3 U/mg となり、大腸菌の方が、比活性はやや低い値を示した。

大腸菌で発現させた AkAbf54 は精製が不十分なため、比活性が低くなったのだろう。他に、大腸菌で発現させた AkAbf54 には糖鎖が付加していないが、そのことが活性に影響を与えている可能性もある。

・糖鎖

AkAbf54 は、N 型糖鎖が付加する可能性のある N-X-(S/T)配列が 2 つ見受けられる (Asn83 と Asn202)。共同研究者である小関博士により元菌 *A. kawachii* で発現された AkAbf54 には糖鎖が付加していることが明らかになっている。そこで酵母で発現させた AkAbf54 と大腸菌で発現させた AkAbf54 とで PAS 染色を行い糖鎖が付加しているかどうかを調べた。PAS 染色の結果、酵母で発現させた AkAbf54 のみバンドが赤く染色され糖鎖が付加していることが示唆された (図 2-22)。

小関博士は、この糖鎖が付く可能性のある 2 つのアスパラギン (Asn83 と Asn202) をグルタミンに変化させた変異体を作成しその性質を調べた[unpublished data]。その結果、N83Q、N202Q 共にバンドの移動度が下に変化した (図 2-23)。このことから、Asn83 及び Asn202 共に糖鎖が付加していると思われる。N83Q 変異体は熱安定性が変化しなかったが、N202Q は熱安定性が低下した (表 2-24)。このことから、Asn202 に付加している糖鎖は、安定化に寄与していると考えられる。このことについては、第 3 章でも考察する。

小関博士によると元菌 *Aspergillus kawachii* で発現する native enzyme でも糖鎖は結合していることがわかっている。ただし、*A. kawachii* で発現する酵素と酵母で発現するレコンビナント酵素で全く同じように糖鎖が結合しているかについては不明である。

2-C-2 結晶化

スクリーニングで得られた結晶化条件

結晶化条件のスクリーニングには、Crystal Screen I, II (Hampton Research) のリザーバー溶液を利用した。このリザーバー溶液の種類計 98 通りを用いて、温度は 25℃で条件検討した。

結晶が得られたリザーバー溶液は、以下の 5 種類の条件であった。

- ① Crystal Screen I #20 : 0.2 M Ammonium Sulfate, 25% PEG 4000, 0.1 M Sodium Acetate pH 4.6
- ② Crystal Screen I #30 : 0.2 M Ammonium Sulfate, 30% PEG 4000
- ③ Crystal Screen I #31 : 0.2 M Ammonium Sulfate, 30% PEG 8000
- ④ Crystal Screen II #13 : 0.2 M Ammonium Sulfate, 30% PEGMME 2000, 0.1 M Sodium Acetate pH 4.6
- ⑤ Crystal Screen II #26 : 0.2 M Ammonium Sulfate, 30% PEGMME 5000, 0.1 M MES pH 6.5

①と④の結晶の写真を図 2-25 に示す。針状の結晶が得られた。

結晶化条件の精密化

次に、①~⑤を初期条件として、結晶化の条件を精密化するため、pH、タンパク濃度、沈殿剤濃度、沈殿剤である PEG の種類などを変えて、細かく条件検討した。その結果、硫酸を除き、PEG6000 を沈殿剤として用いた条件⑥で良質の板状結晶が得られることが分かった (図 2-26)。タンパク質濃度は、15 mg/ml である。

⑥ 30% PEG 6000, 0.1 M MES-NaOH pH 6.0

回折強度データの処理

測定したデータは、空間群は Orthorhombic な $P2_12_12_1$ に属していた (表 2-27)。格子定数は、 $a=39 \text{ \AA}$ 、 $b=98 \text{ \AA}$ 、 $c=144 \text{ \AA}$ 程度であった。非対称単位¹⁷⁾に一分子入っていると仮定した場合の V_M (Matthews coefficient[2-16]) は 2.77、溶媒含量は 55.6% であり妥当な値を示した。このことから非対称単位に一分子入っていると思われる。

2-C-3 AkAbf54 の構造解析

重原子置換体のスクリーニングとその評価

重原子試薬 (11 種類) を試した結果を表 2-7 に示す。

キセノン (Xe) と白金 (K_2PtCl_4) の 2 つの重原子置換体の差パターンマップ⁵⁾で重原子のピークがはっきりと確認できた (図 2-28)。また、水銀 ($HgCl_2$) の重原子置換体のデータで差フーリエマップ⁶⁾を描いたところピークが確認できた。キセノン、白金、水銀のデータ収集を表 2-29 に示す。

これら 3 つの重原子置換体のデータを用いてプログラム SOLVE⁷⁾により初期位相を決定したところ、Figure of Merit⁸⁾の値は 0.38 であった (図 2-30)。RESOLVE⁸⁾を用いた位相改善により、Figure of Merit 値は 0.61 に向上した。

RESOLVE の出力したポリアラニンモデル (図 2-31-①) を見たところ、ヘリックスやベータシートが確認できたので、きちんと位相が付いていると判断して、次の精密化のステップへ進んだ。

モデルの構築と構造の精密化

RESOLVE⁸⁾で得られたモデルは、非対称単位¹⁷⁾中に 1 分子入っていた。最初に、RESOLVE で得られたポリアラニンを初期モデルとして ARP/wARP¹⁰⁾を用いてモデルの自動構築を試みたが成功しなかった。

そこで、 $2F_o-F_c$ マップ¹⁵⁾を作成し、自分の手でモデル構築を進めた。プログラム Xtalview で $2F_o-F_c$ マップをみて、アラニンから本来のアミノ酸への置換、主鎖トレースの修正、構築を行っていった。CNS¹¹⁾による精密化を行った。以後、CNS による精密化と Xtalview によるモデルの構築というステップを数サイクルくり返した。全 482 アミノ酸残基中 131 残基の主鎖及び側鎖構造を決定し、 $R \text{ factor}$ ¹⁹⁾が 45.3%まで下がったモデルを得た (図 2-31-②)。ある程度モデル構築が進んだので、ARP/wARP による自動構築を試みた結果 (図 2-32)、482 残基中 476 残基の主鎖および側鎖構造が決定した。

その後、再び CNS による精密化と Xtalview によるモデルの修正を行った。精密化を行っていくと、詳しくは第 3 章で述べるが、アスパラギン残基の先に N-アセチルグルコサミン

と思われる電子密度が見られた。これらの分子の構造を PDB から入手し、束縛条件であるパラメータファイルとトポロジーファイルをプログラム xplo2d で作成した。

最終的には R factor¹⁹⁾ が 19.1%、 R_{free} が 20.9% (分解能 20.0~1.75 Å) まで精密化されたデータを得た (表 2-27)。完成したモデル分子 (図 2-31-③) を PDB に登録した (PDB code: 1WD3)。ラマチャンドランプロットを図 2-33 に示す。

L-アラビノースとの複合体のデータも同様に精密化を行った。アラビノフラノース (フラノース型アラビノース) に相当する電子密度が見られたので、L-アラビノフラノースをいれて精密化を行った。分子の構造を同様に入手し、パラメータファイルとトポロジーファイルも同様に作成した。同様に完成したモデル分子を、PDB に登録した (PDB code: 1WD4)。

D-キシロース、キシロオリゴ糖の複合体のデータも処理し、精密化を行った。しかし、相当する電子密度は確認できなかった。

図表

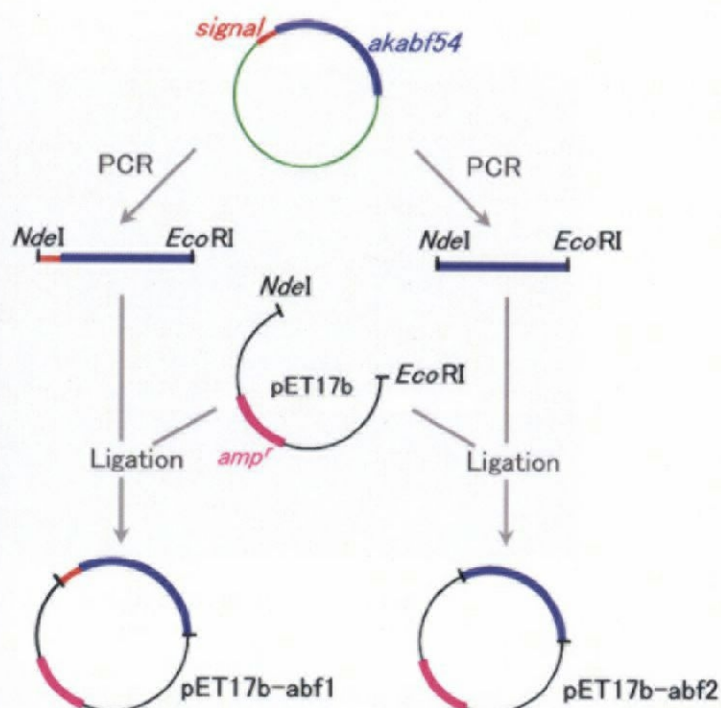


図 2-1 大腸菌での発現プラスミドの構築

primer
 F1 5' cca tcc acc cat ATG TTC TCT CGC CGA AAC 3' (*NdeI*)
 F2 5' gcc acc gtc cat atg GGC CCC TGT GAC ATC 3' (*NdeI*)
 R 5' cc cct aat gAa ttC TCA CGA AGC AAA CGC C 3' (*EcoRI*)

図 2-2 プライマーの設計

F1-R は全長 (abf1)、F2-R はシグナルペプチドが除かれた配列 (abf2)。

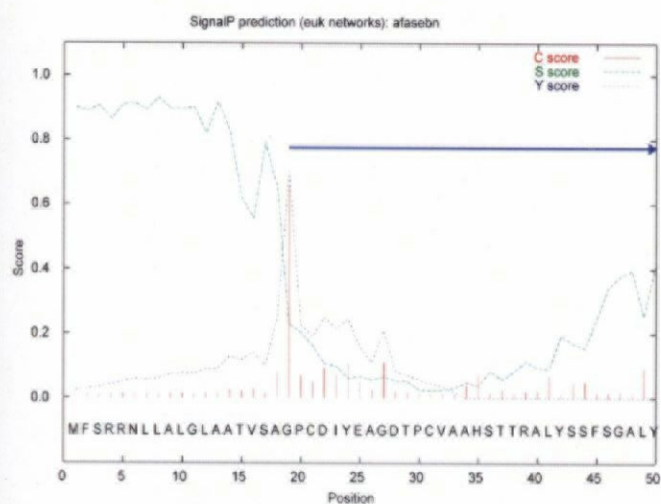


図 2-3 シグナル配列の予測

SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) により作成した。

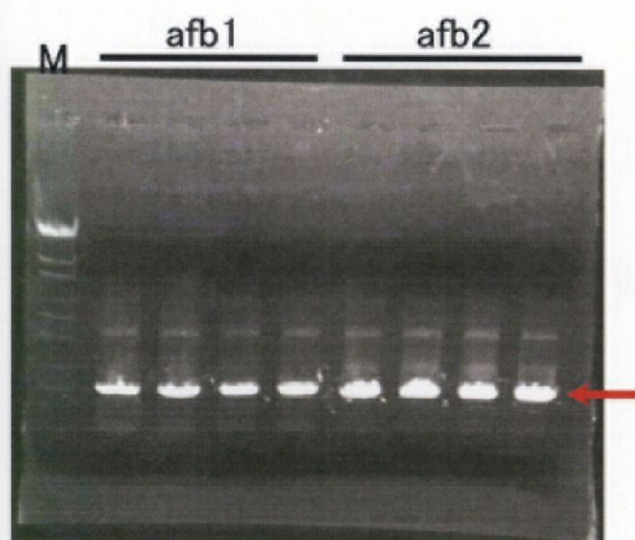


図 2-4 目的産物の PCR による増幅

矢印で示した約 1.5 kbp の部分を切り出し、以下の実験に用いた。

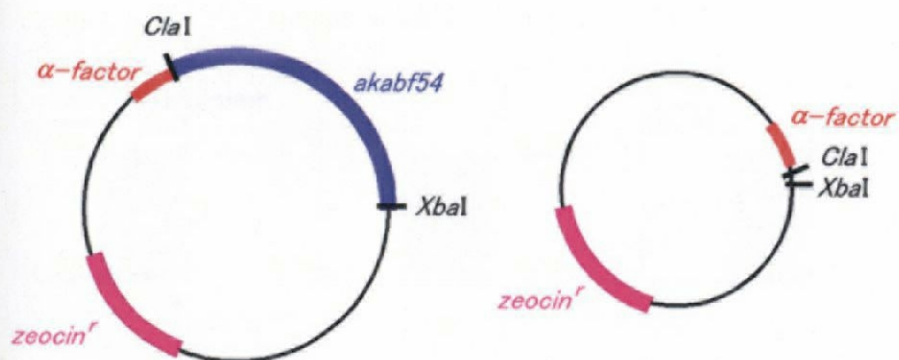


図 2-5 酵母発現プラスミド

右がベクターpPICZαCであり、左がそのベクターに AkAbf54 を挿入した発現用プラスミド pPICZαC-AkAbf54 である。

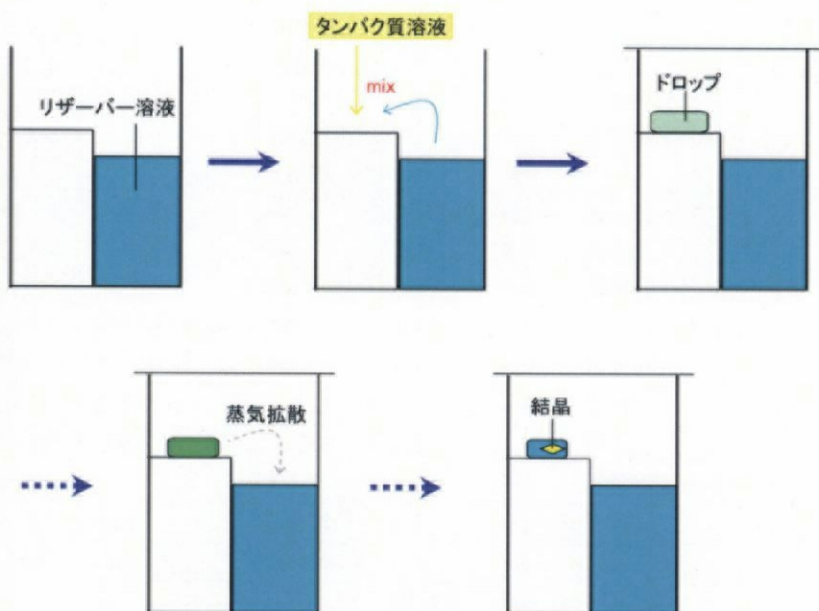


図 2-6 シッティングドロップ法の方法と原理

No.	Reagent	Soaking Conc.	Soaking Time	pH	データ収集 場所	同型性	結晶の 色	dPatt. map
1-1	K ₂ PtCl ₄	3 mM	2 d	4.5	R-axis	△	colorless	×
1-2		15 mM	1 d	6.0	NW12 (MAD)	○	Blown	○
2	K ₂ Pt(CN) ₄	5 mM	1 d	6.0	--	--	colorless	--
3-1	HgCl ₂	sat	2 d	4.5	R-axis	△	colorless	×
3-2		sat	2 d	6.0	R-axis	△	colorless	△
4	K ₂ HgI ₄	sat	1 d	6.0	NW12	○	colorless	×
5	CH ₃ CH ₂ HgCl	sat	3 d	4.5	R-axis	△	colorless	×
6	PCMB	sat	3 d	6.0	R-axis	○	colorless	×
7	EMTS	5 mM	2 d	6.0	NW12	×	colorless	×
8-1	HAuCl ₄	1 mM	2 d	6.0	R-axis	○	colorless	×
8-2		2.5 mM	2 d	6.0	NW12 (MAD)	○	Red	×
9	SmCl ₃	5 mM	2 d	4.5	R-axis	×	colorless	×
10	Pb(NO ₃) ₂	20 mM	2 d	6.0	--	×	colorless	--
11	Xe	0.12 MPa	60 min	6.0	NW12	△	colorless	◎

表 2-7 試した重原子試薬とその結果

pH 4.5: 0.1 M Sodium Acetate buffer, pH 6.0: 0.1 M MES-Na buffer

・白金系の試薬 (1, 2)

1-2 の条件で行ったところ、結晶に茶色い色が付き、重原子が結合していることが予想できた。データを取り、パターソンマップを描いたところ確かに結合していることが分かった。

・水銀系の試薬 (3~7)

あまり調子がよくなかった。3-2 のデータが位相改善に寄与した。PCMB と EMTS の化学構造を次ページの図 2-8 で示す。

・金試薬 (8)

結晶に色が付いたものの、データを取りパターソンマップを描いてもピークらしきものは見られなかった。

・サマリウムや鉛 (9, 10)

結晶の同型性が大きく低下し、データをとることができなかった。

・キセノン (11)

データを取り、パターソンマップを描いてみたところ、非常に明瞭なピークが一つ現れ、キセノン原子が一原子高い占有率で結合していることが予想できた。

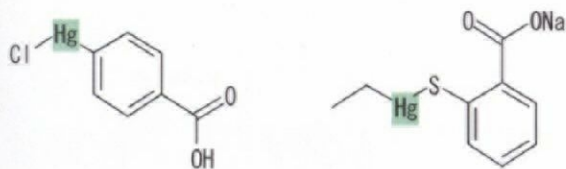


図 2-8 PCMB (左) と EMTS (右) の化学構造

1/resol ²	Res	NRef	<FP*2>	Sc.kraut	SCALE	RFAC	RF ₁	Wted_R	<diso>	max (diso)
0.006	12.6	126	110501.	1.066	1.038	0.166	0.267	0.189	48.2	191
0.019	7.3	657	172111.	1.038	1.016	0.148	0.229	0.209	53.7	246
0.031	5.7	938	153335.	1.043	1.010	0.174	0.280	0.211	60.0	295
0.044	4.8	1124	243685.	1.051	1.020	0.165	0.256	0.207	71.6	353
0.056	4.2	1299	327159.	1.040	1.004	0.176	0.293	0.203	89.4	545
0.069	3.8	1440	300043.	1.032	0.996	0.177	0.287	0.213	85.6	392
0.081	3.5	1579	262766.	1.042	0.997	0.194	0.316	0.212	87.7	541
0.094	3.3	1717	203863.	1.044	0.994	0.205	0.334	0.216	81.2	490
0.106	3.1	1848	157833.	1.048	0.992	0.214	0.346	0.221	74.5	428
0.119	2.9	1933	122485.	1.058	0.994	0.227	0.376	0.225	68.7	621
0.131	2.8	2050	84657.	1.071	1.000	0.236	0.379	0.228	59.4	331
0.144	2.6	2109	72902.	1.068	0.989	0.250	0.412	0.234	58.8	352
0.156	2.5	2247	60575.	1.075	1.000	0.240	0.392	0.225	51.2	371
0.169	2.4	2327	55223.	1.093	1.005	0.260	0.426	0.238	52.5	343
0.181	2.3	2377	48107.	1.079	0.993	0.258	0.421	0.234	49.0	281
0.194	2.3	2511	45416.	1.111	1.011	0.268	0.444	0.241	49.0	311
0.206	2.2	2511	41709.	1.110	1.010	0.272	0.451	0.238	47.7	442
0.219	2.1	2668	38125.	1.108	1.007	0.275	0.447	0.244	46.2	336
0.231	2.1	2659	33760.	1.115	1.006	0.284	0.482	0.244	44.6	282
0.244	2.0	4207	27278.	1.119	1.009	0.282	0.469	0.242	39.7	253
THE TOTALS		38327.	102446.	1.058	1.001	0.225	0.344	0.228	57.8	621.

表 2-9 キセノンの scaling データ

見るべき点は、SCALE の値が 1 で収束しているかと RFAC が 10~30%の間の値を示しているかである。

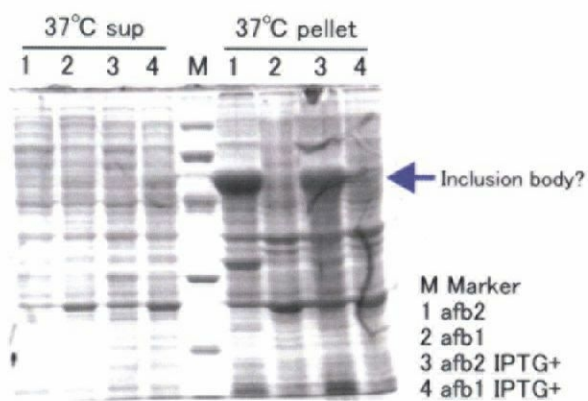


図 2-10 封入体の形成

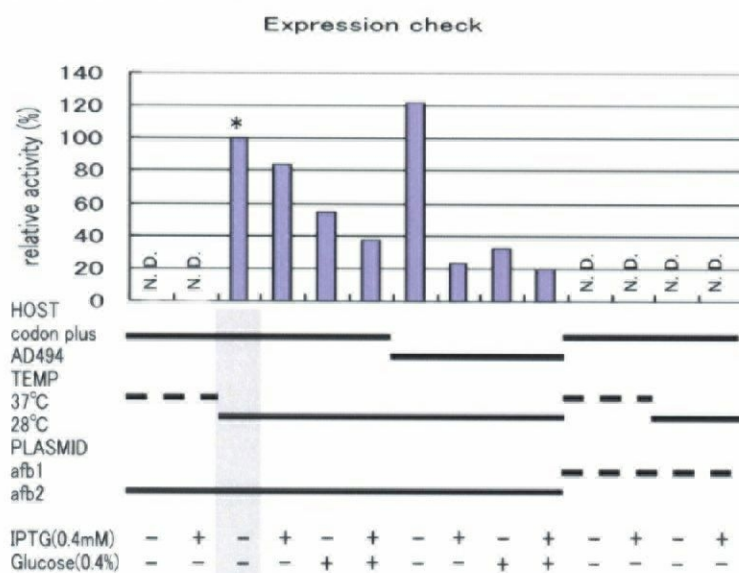


図 2-11 発現条件の検討

シグナル配列を除き、温度を 28 度にした時のみ可溶性に発現した。

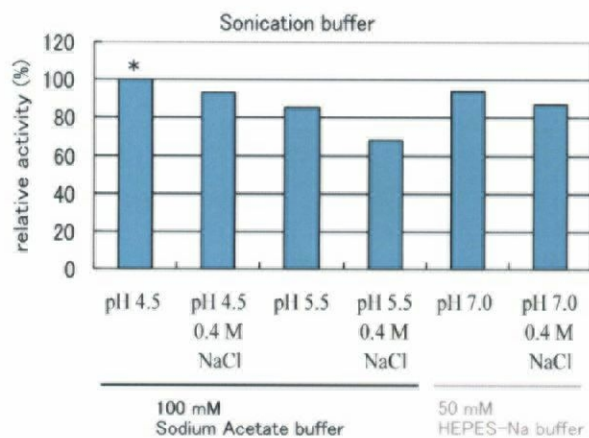


図 2-12 破碎の際のバッファの検討

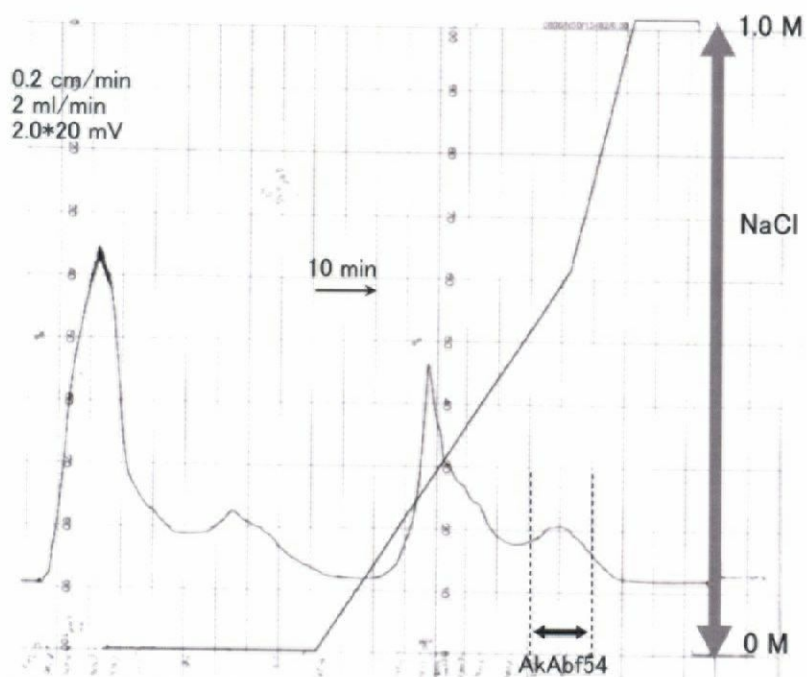


図 2-13 大腸菌で発現させた AkAbf54 の DEAE-Sepharose での精製チャート

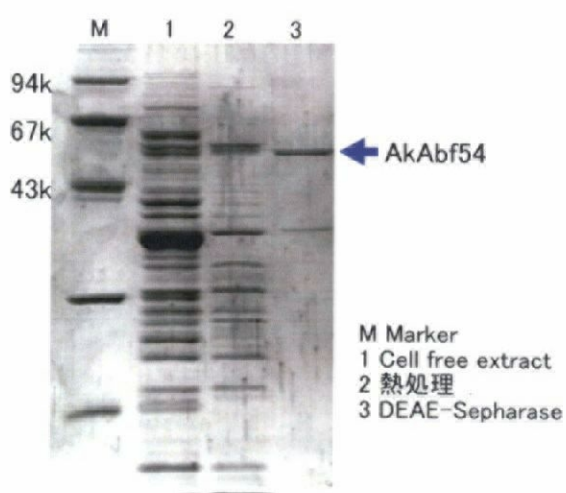


図 2-14 各精製段階での SDS-PAGE

	units	protein (mg)	units/mg
Cell free extract	8.9	150	0.059
熱処理	8.5	70	0.12
DEAE-Sepharose	5.6	0.3	18.7

表 2-15 精製表

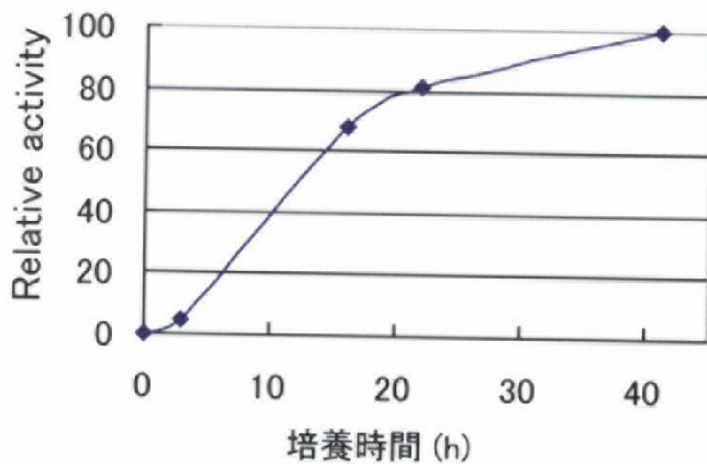


図 2-16 酵母での発現-各培養時間での培地上清の活性

41 時間の活性 (U/ml) を 100%とした。

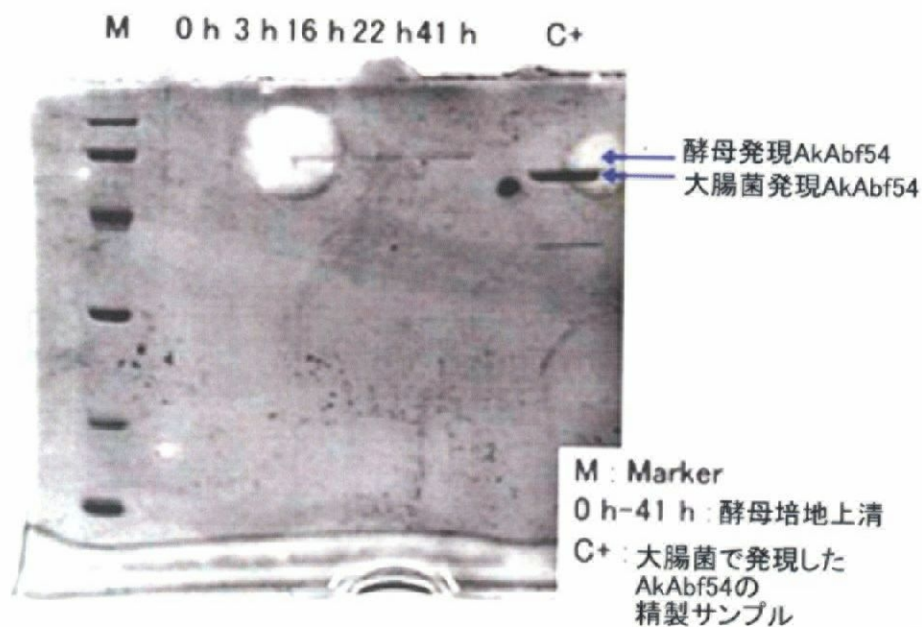


図 2-17 酵母での発現-各培養時間での培地上清の SDS-PAGE

サンプリングした培地上清 10 μ l を SDS-PAGE に load した。バンドが見えるほど発現していることがわかる。

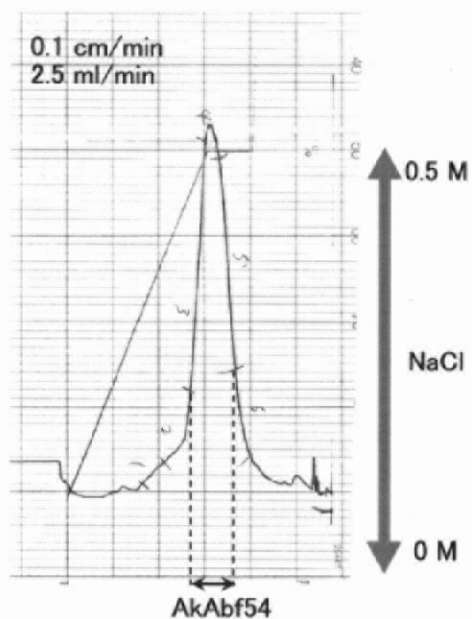


図 2-18 酵母で発現させた AkAbf54 の DEAE-Sepharose での精製チャート

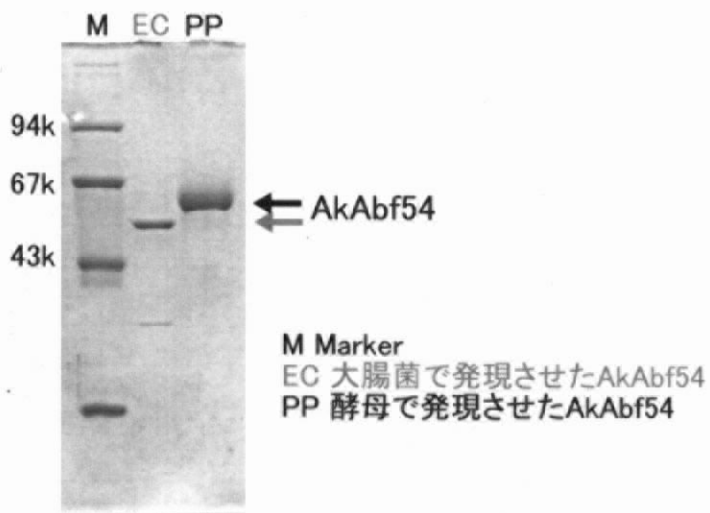


図 2-19 大腸菌で発現させた AkAbf54 と酵母で発現させた AkAbf54 の SDS-PAGE

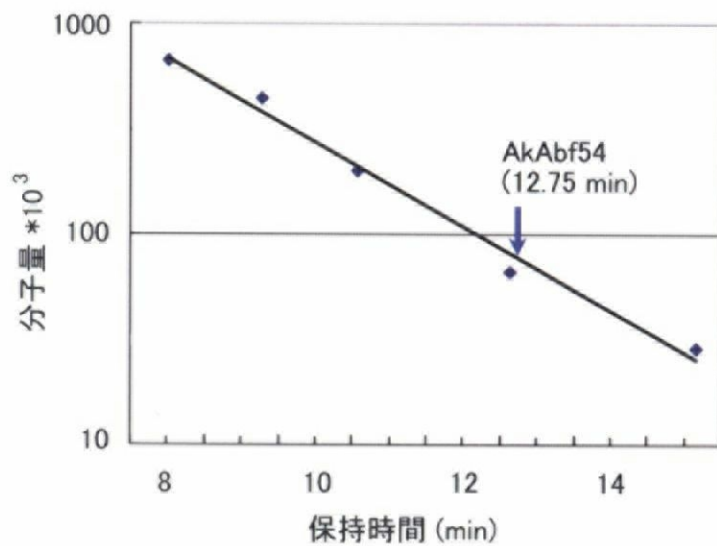


図 2-20 ゲルろ過カラムを用いた分子量測定 (対数グラフ)

分子量マーカー

Blue dextran 7.249 (2000k)

Thyroglobin 8.019 (669k)

Apoferritin 9.280 (443k)

β -amylase 10.571 (200k)

Albumin 12.624 (66k)

Carbonic anhydrase 15.176 (29k)

AkAbf54 12.748 (77.6k)

保持時間と分子量を示した。

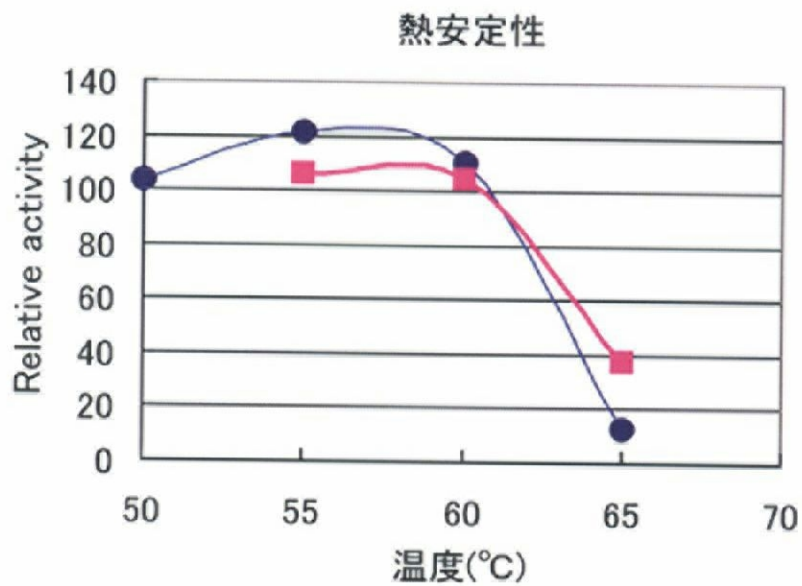


図 2-21 AkAbf54 の熱安定性の比較

・大腸菌で発現させた AkAbf54 (●: 藍色)

60℃ インキュベート 残存活性 110.7%

65℃ インキュベート 残存活性 13.1%

・酵母で発現させた AkAbf54 (■: ピンク)

60℃ インキュベート 残存活性 104.4%

65℃ インキュベート 残存活性 37.4%

それぞれ、インキュベートしなかったサンプルの活性を 100 とした。

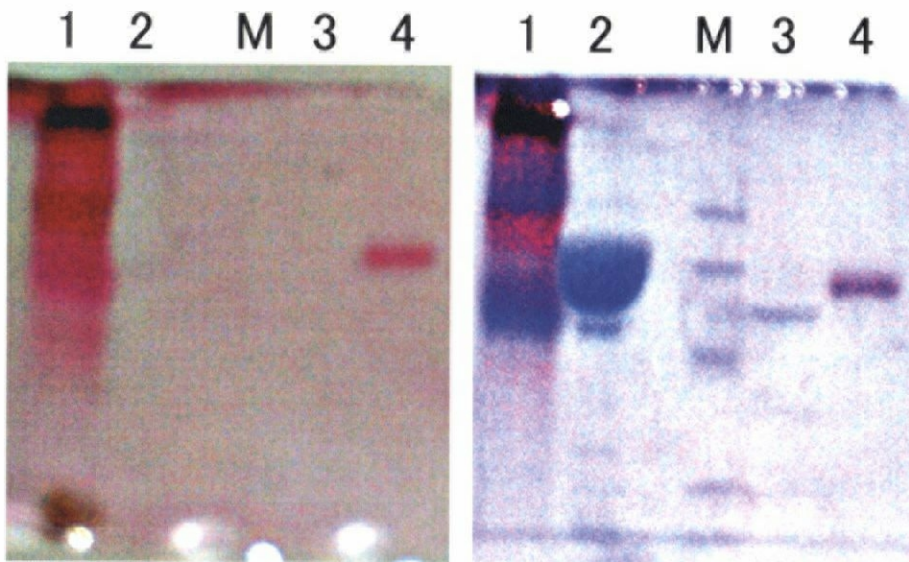


図 2-22 PAS 染色

左は、SDS-PAGE 後のゲルを PAS 染色したもの

右は、左の PAS 染色後のゲルを CBB 染色したもの

1. Phytase (糖鎖の付いたコントロールタンパク質)

2. Phenylalanine ammonia lyase (糖鎖の付いていないコントロールタンパク質)

M. Marker

3. 大腸菌で発現させた AkAbf54

4. 酵母で発現させた AkAbf54

大腸菌で発現させた AkAbf54 には糖鎖が結合していないが、酵母で発現させた AkAbf54 には糖鎖が結合していることが分かる。

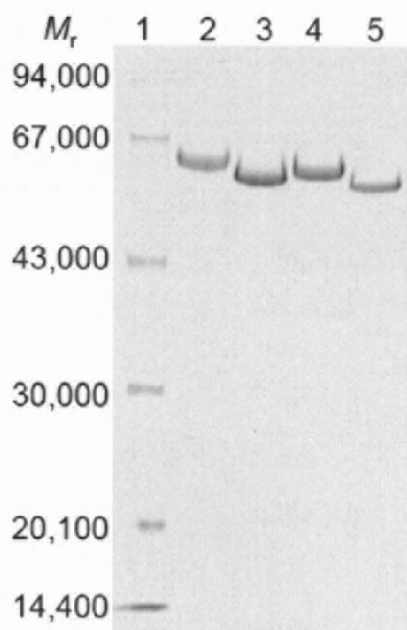


図 2-23 AkAbf54 野生型と糖鎖関連変異体の SDS-PAGE

1. Marker、2. wild-type、3. N83Q、4. N202Q、5. N83Q/N202Q

	T_{50} (°C)	ΔT_{50} (°C)
wild-type	63.3±0.11	—
N83Q	62.2±0.11	-1.1
N202Q	60.1±0.21	-3.2
N83Q/N202Q	60.1±0.25	-3.2

表 2-24 AkAbf54 の野生型と変異体の熱安定性の比較

ΔT_{50} is the change in T_{50} value of the mutant enzymes relative to the wild-type. Values are means of two independent determinations \pm standard deviations.

図 2-23 と表 2-24 は、小関博士未発表データによる



図 2-25 スクリーニングの段階で出た結晶

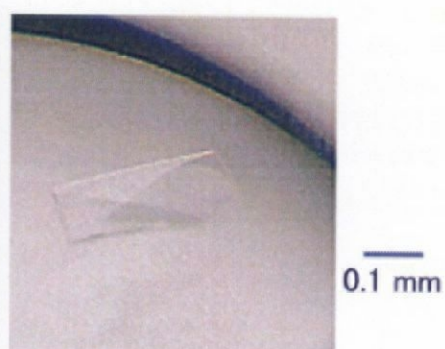


図 2-26 精密化条件で出た結晶

Data set	Native-1	アラビノース	キシロース	キシロオリゴ糖
Data collection				
Date	2003/6/23	2003/11/22	2003/11/22	2003/12/6
Place	PF-AR NW12	PF-AR NW12	PF-AR NW12	PF-AR NW12
Wavelength (Å)	1.0	1.0	1.0	1.0
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit-cell parameters				
<i>a</i> (Å)	39.5	39.5	39.5	39.4
<i>b</i> (Å)	96.9	98.8	98.5	98.2
<i>c</i> (Å)	145.9	144.3	144.1	144.5
Resolution (Å)	20.0-1.75 (1.81-1.75)	20.0-2.07 (2.14-2.07)	50.0-1.98 (2.05-1.98)	50.0-2.16 (2.24-2.16)
Unique reflections	57,830	35,261	40,160	30,913
Completeness (%)	99.0 (95.2)	88.3 (87.2)	99.3 (98.5)	92.4 (86.4)
<i>R</i> _{merge} (%)	0.058 (0.152)	0.049 (0.149)	0.057 (0.194)	0.048 (0.084)
Mean < <i>I</i> /σ(<i>I</i>)>	12.5 (7.4)	13.8 (5.6)	27.4 (6.6)	32.3 (13.5)
Refinement				
R _{fac} (%)	19.1	18.9	24.5	23.5
R _{free} (%)	20.9	22.1	26.9	26.9
No. of waters	362	230	np	np
No. of arabinose		3		
Average B-factors (Å ²)				
protein	16.5	23.4	nd	nd
solvent	26.0	29.2	nd	nd
NAG	24.3	37.4	nd	nd
Ara1		27.6		
Ara2		23.7		
Ara3		28.2		
RMSD (Cα)		0.133	nd	nd

表 2-27 Statistics of data collection and refinement for AkAbf54 complex structures

nd: not determined、np: not picked

キシロース複合体、キシロオリゴ糖複合体のデータについては、リガンドの結合が認められなかったため、途中で精密化を止めた。

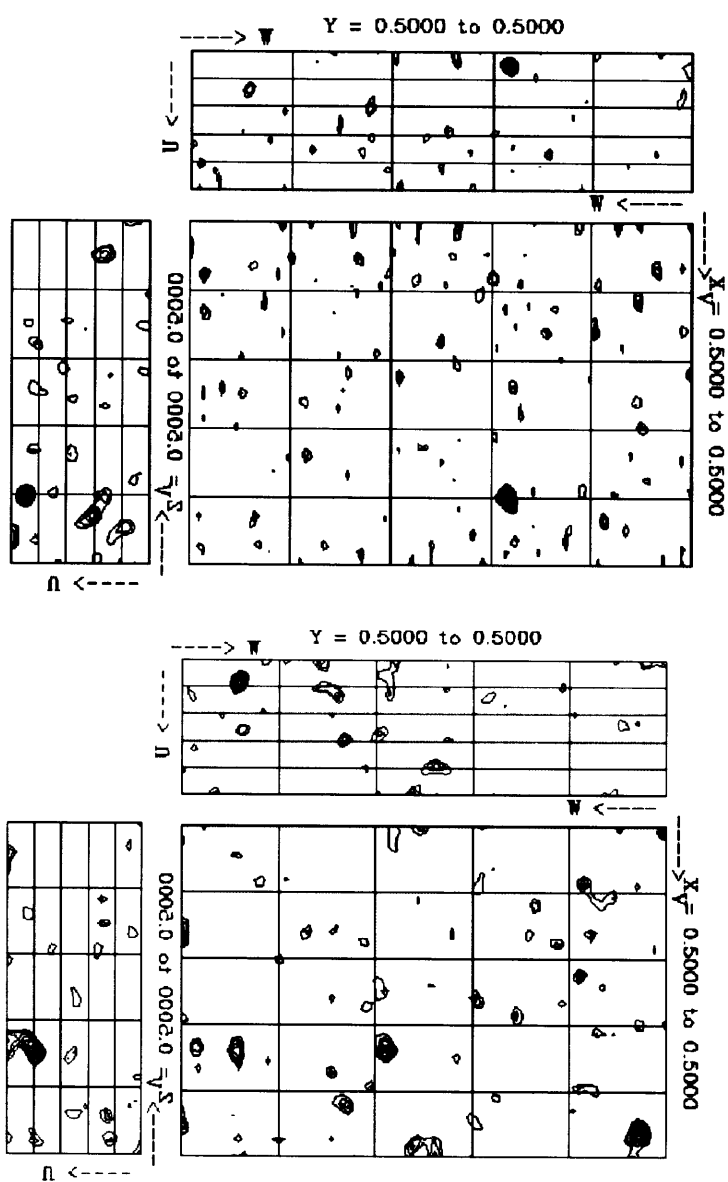


図 2-28 ハーカーセクションの差パターソンマップ⁵⁾

(上) キセノン置換体

(下) 白金置換体

キセノンのデータはしっかりとしたピークが一つずつ見えている。白金もいくつかのピークが見えている。

Data set	Native-2	Xe	K ₂ PtCl ₄	HgCl ₂	K ₂ PtCl ₄ -2
Date	2003/10/17	2003/10/17	2003/10/17	2003/9/17	2003/11/2
Place	NW12	NW12	NW12	R-axis	SPring-8 40B2
Wavelength (Å)	1.1	1.05	1.07176	1.54	1.0717
Unit-cell parameters					
<i>a</i> (Å)	39.5	39.5	39.5	39.5	39.5
<i>b</i> (Å)	98.2	98.8	97.9	97.3	99.0
<i>c</i> (Å)	144.0	144.3	143.7	144.0	144.2
Resolution (Å)	50.0-1.82 (1.89-1.82)	50.0-2.00 (2.07-2.00)	50.0-2.60 (2.69-2.60)	72.0-2.80 (2.90-2.80)	50.0-2.70 (2.80-2.70)
Completeness (%)	99.3 (99.6)	99.3 (99.1)	98.1 (92.8)	84.9 (85.6)	99.8 (99.8)
<i>R</i> _{merge} (%)	0.049 (0.123)	0.047 (0.079)	0.091 (0.184)	0.109 (0.242)	0.082 (0.155)
Mean <I/σ(I)>	16.2 (9.2)	16.9 (14.2)	7.9 (5.3)	10.7 (6.1)	7.9 (7.5)
Phasing power					
acentric/ centric		0.68/0.51	0.84/0.75	0.72/0.66	0.55/0.46
<i>R</i> _{cullis} acentric/ centric		0.93/0.86	0.90/0.79	0.90/0.81	0.94/0.86
Figure of merit		0.21	0.24	0.22	0.18
重原子サイトの数		1	3	2	3

表 2-29 各重原子置換体のデータ

Phasing power：その重原子の位相決定への寄与を示す値。大きくなるほど良く、1 以上になるのが望ましい。

*R*_{cullis}：重原子の精密化が良好に行われたかを示す値。小さくなるほど良く、0.9 以下になるのが望ましい。

Native のデータは、分解能 1.75 Å のものがとられているが、格子定数が他のものと若干異なっていた。そこで、新たにデータを取り直し、分解能 1.82 Å のデータを得たところ、格子定数も他のものとほぼ同じであったため、このデータを MIR⁴⁾に用いた。

```

                SOLVE STATUS      4-nov-03 01:01:20

TIME ELAPSED:    2 HR

-----
CURRENT STEP: SOLVE MAIN PROGRAM
STATUS:  DONE
-----

---TOP SOLUTION FOUND BY SOLVE (<m> = 0.38; score = 29.64) ---

Deriv    X        Y        Z        OCCUP    B        HEIGHT/SIGMA

  1      0.525    0.951    0.092    0.494    17.5        35.4

  2      0.434    0.040    0.170    0.166    40.9        19.0
  2      0.953    0.579    0.143    0.302    52.7        30.4
  2      0.034    0.087    0.087    0.112    15.2        24.6

  3      0.950    0.581    0.141    0.291    27.7        25.6
  3      0.421    0.040    0.162    0.245    53.3        19.9

  4      0.090    0.069    0.088    0.447    43.5        30.5
  4      0.086    0.025    0.091    0.203     8.1        25.4
  4      0.985    0.566    0.112    0.271    34.8        23.4

                TIME REQUIRED TO OBTAIN THIS SOLUTION:    36 MIN

-----
CURRENT RESOLUTION:    2.3 A.    FINAL RESOLUTION:    2.3 A.

```

図 2-30 SOLVE⁷⁾の出力ファイル

Deriv1: Xe 置換体
 Deriv2: K₂PtCl₄ 置換体
 Deriv3: HgCl₂ 置換体
 Deriv4: K₂PtCl₄ 置換体

<m>は Figure of merit¹⁸⁾を、score は Z-score を示す。

XYZ は重原子が結合している位置であり、OCCUP は占有率を示す。

B は温度因子¹⁴⁾、HEIGHT/SIGMA はピークの強さを示す。

例えば、キセノンのデータは、キセノン原子が一つ、約半分の占有率で結合しており、HEIGHT/SIGMA の値も高いことからいいデータであるといえる。

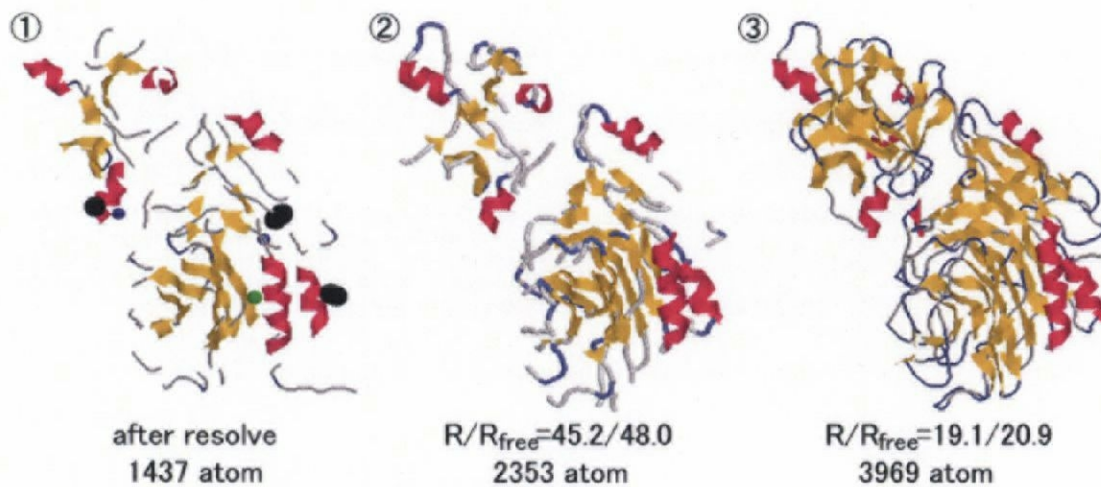


図 2-31 精密化の各過程でのモデルの構築度

- ① RESOLVE⁸⁾後のポリアラニンモデル
- ② RESOLVE 後のモデルを修正・構築したもの、ARP/wARP¹⁰⁾前
- ③ 完成モデル

①の緑の球は Xe を、青の球は Pt を、黒の球は Hg を示す。

57105 reflections (98.78 % complete) and 2281 restraints for refining 2439 atoms.
Observations/parameters ratio is 5.85

Cycle 1: After refmac, R = 0.420 (Rfree = 0.000).
Found 35 (35 requested) and removed 17 (17 requested) atoms.

Cycle 10: After refmac, R = 0.346 (Rfree = 0.000).
Found 39 (39 requested) and removed 7 (19 requested) atoms.

Will skip this building...

57105 reflections (98.78 % complete) and 2190 restraints for refining 2743 atoms.
Observations/parameters ratio is 5.20

Cycle 11: After refmac, R = 0.339 (Rfree = 0.000).
Found 39 (39 requested) and removed 8 (19 requested) atoms.

Cycle 20: After refmac, R = 0.283 (Rfree = 0.000).
Found 44 (44 requested) and removed 5 (22 requested) atoms.

Building Cycle 2

Round 1: 334 peptides in 23 chains.

Round 2: 337 peptides in 23 chains.

Chains 21, Residues 309, Connectivity Index 0.86

57105 reflections (98.78 % complete) and 2007 restraints for refining 3463 atoms.
Observations/parameters ratio is 4.12

Cycle 21: After refmac, R = 0.287 (Rfree = 0.000).
Found 50 (50 requested) and removed 25 (25 requested) atoms.

Cycle 30: After refmac, R = 0.200 (Rfree = 0.000).
Found 54 (54 requested) and removed 11 (27 requested) atoms.

Building Cycle 3

Round 1: 437 peptides in 14 chains.

Round 2: 453 peptides in 10 chains.

Chains 9, Residues 440, Connectivity Index 0.96

57105 reflections (98.78 % complete) and 2833 restraints for refining 4118 atoms.
Observations/parameters ratio is 3.47

Cycle 31: After refmac, R = 0.223 (Rfree = 0.000).
Found 60 (60 requested) and removed 30 (30 requested) atoms.

Cycle 40: After refmac, R = 0.157 (Rfree = 0.000).
Found 64 (64 requested) and removed 38 (47 requested) atoms.

Building Cycle 4

Round 1: 478 peptides in 7 chains.

Round 2: 478 peptides in 5 chains.

Chains 5, Residues 473, Connectivity Index 0.98

57105 reflections (98.78 % complete) and 3054 restraints for refining 4618 atoms.
Observations/parameters ratio is 3.09

Cycle 41: After refmac, R = 0.189 (Rfree = 0.000).
Found 33 (33 requested) and removed 71 (71 requested) atoms.

Cycle 50: After refmac, R = 0.148 (Rfree = 0.000).
Found 33 (33 requested) and removed 66 (68 requested) atoms.

Building Cycle 5

Round 1: 480 peptides in 6 chains.

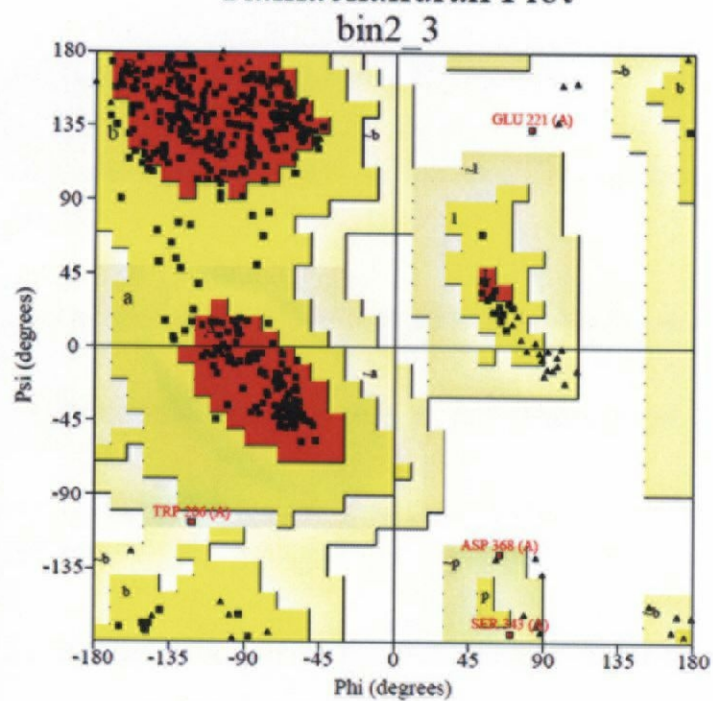
Round 2: 480 peptides in 4 chains.

Chains 4, Residues 476, Connectivity Index 0.98

図 2-32 ARP/wARP¹⁰⁾のログ

476 残基/482, Connectivity Index が 0.98 とほぼペプチド鎖がつながった状態まで構築できた。

Ramachandran Plot



In most favoured regions: 85.7%
 In additional allowed regions: 13.3%
 In generously allowed regions: 0.7%
 In disallowed regions: 0.2%

図 2-33 ラマチャンドランプロット

disallowed region には一残基しか当てはまらなかった。

第2章の引用論文

- 2-1. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- 2-2. Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H., and Woodlock, J. J. (1969). *Anal. Biochem.* **30**, 148-152
- 2-3. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307-326
- 2-4. Hendrickson, W. A., Horton, J. R., and LeMaster, D. M. (1990) *EMBO J.* **9**, 1665-1672
- 2-5. Green, D. W., Ingram, V. M., and Perutz, M. F. (1954). *Proc. R. Soc. London Ser. A*, **225**, 287-307.
- 2-6. Bushnell, D. A., Cramer, P., and Kornberg, R. D. (2001) *Structure* **9**, R11-R14
- 2-7. Larsson, A. M., Stahelberg, J., and Jones, T. A. (2002) *Acta Cryst.* **D58**, 346-348
- 2-8. Xu, B., Munoz, I. G., Janson, J.-C., and Stahlberg, J. (2002) *Acta Cryst.* **D58**, 542-545.
- 2-9. Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760-763
- 2-10. Otwinowski, Z. (1991) In *Isomorphous Replacement and Anomalous Scattering Proceedings of CCP4 Study Weekend*, edited by W. Wolf, P.R. Evans, and A.G.W. Leslie., pp. 80-86. Daresbury, UK: Science and Engineering Research Council
- 2-11. Terwilliger, T. C., and Berendzen, J. (1999) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **55**, 849-861
- 2-12. Terwilliger, T. C. (2000) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **56**, 965-972
- 2-13. Morris, R. J., Perrakis, A., and Lamzin, V. S. (2002) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **58**, 968-975
- 2-14. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W.,

Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905-921

2-15. McRee, D. E. (1999) *J. Struct. Biol.* **125**, 156-165

2-16. Matthews, B. W. (1968) *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497