第 3 章 触媒ドメインの構造とその機能解析

3-A 序

第 2 章では AkAbf54 の構造解析について述べた。AkAbf54 は、結果のところで述べるが、触媒ドメインとアラビノース結合ドメインの二つのドメインに分かれていた。この章では触媒ドメインの構造及び活性中心について主に述べる。活性中心に関するアミノ酸残基の変異体を作成し、その性質を調べた。アラビノース結合ドメインの話については主に第 4 章で記述する。

3-B 目的・材料・方法

3-B-1 全体構造、特に触媒ドメインの解析

明らかになった構造について、解析サーバーを通し、解析した。

用いた解析サーバーなどについて述べる。

解析サーバー

・DALI[3-1] (http://www.ebi.ac.uk/dali/)

似たフォールドを持つものを PDB から検索する。

・SCOP[3-2] (http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/)

フォールドの分類。

・MATRAS[3-3] (http://biunit.aist-nara.ac.jp/Matras/index-j.html)

2 つの構造間の比較、重ね合わせなどを行う。

・CE[3-4] (http://cl.sdsc.edu/ce.html)

2 つの構造間の比較を行う。

図の作成ソフト

PyMOL[3-5]、Molscript[3-6]、Xtalview[3-7]、Raster3D[3-8]、ligplot[3-9]を用いた。

3-B-2 触媒ドメインの変異体の作成

3-B-2-1 目的

結果のところに記述するが、Glu221、Asp297、Cys176、Cys177 が触媒残基と基質認識に関わる残基で特に重要な残基であった。そこで、E221A、D297A、C176A/C177A の 3 種類の変異体を作成することにした。

3-B-2-2 材料

菌株、プラスミドなどは、第2章に示したものを用いた。

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 培地は最少培地であり、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、4×10^{-3}% Histidine、4×10^{-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、4×10^{-3}% Histidine、4×10^{-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、及び水槽式インキュベーター (TAITEC) を利用した。

3-B-2-3 方法

プライマーの設計

部位特異的変異に関して、QuikChange 法により変異を導入することにした。中心に目的の変異を導入したプライマーF を設計した (図 3-1)。また、このプライマーに complementary で 100%マッチするプライマーR も設計した。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。

QuikChange

QuikChange 反応を行った。reaction buffer 5 μl, template (pPICZαC-AkAbf54) 1 μl, プライマ

ーF (10 pmol/μl) 1 μl, プライマーR (10 pmol/μl) 1 μl, dNTP 5 μl, pfuTarbo 1 μl,を混合し、滅菌水を加えて 50 μl にした。

1 cycle (95℃ 30 sec)
18 cycle (95℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 68℃ 10 min)
1 cycle (68℃ 10 min)

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

反応後、制限酵素 *Dpn*I で 37℃、1 時間処理した。反応液で大腸菌 XL10 を形質転換した。コロニーを 1 個選んで、LB 培地 (Sigma)で一晩培養し、プラスミド抽出 (QIAGEN Plasmid Miniprep Kit) を行った。

得られたプラスミドに正しく変異が入っているかどうかを 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

Pichia pastoris GS115 株の形質転換の方法は 2-B-3-3 と同様に行った。5 ml の BMGH 培地で 26℃一晩前培養した。前培養液を 200 ml の BMMH 培地に植菌して、26℃振盪培養した。24 時間毎に 0.5%になるようにメタノールを加えた。

72 時間後に得られた培養液を遠心 (10000 ×*g*, 10 min) して上清を得た。

DEAE-Sepharose

流速の調節は、ペリスタポンプと FPLC (Amersham Pharmacia Biotech.) 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 上清を MILLEX-GP 0.22 μm Filter Unit (MILLIPORE) を用いて微粒子を除去した。塩濃度が高くそのままでは DEAE-Sepharose に吸着しないので、バッファーA で 3 倍希釈した。

② DEAE-Sepharose のレジン (Amersham Pharmacia Biotech.) を約 20 ml になるように C-16/20 カラム (Amersham Pharmacia Biotech.) に詰め、ペリスタを用いて、バッファーA を流速 5 ml/min で約 20 分間流しカラムを平衡化させた。

③ ①の溶液 3 L をペリスタポンプで、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。

④ ペリスタポンプを用い、バッファーB を流速 5 ml/min で流し、280 nm の吸光がある部分を回収した。

⑤　濃縮と透析を行った。

3-B-3 触媒ドメインの機能解析

3-B-3-1 目的

3-B-2 で作成した変異体の機能解析を行った。E221A と D297A に関しては活性が変化するか、C176A/C177A に関しては K_m 値が変化するかを調べた。

3-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。活性測定用の基質として、pNPAF (*p*-ニトロフェニル α-L-アラビノフラノシド) を用いた。

3-B-3-3 方法

比活性測定

測定法は、2-B-1-3 と同じ。

K_m の測定

測定法は、2-B-1-3 と同じ。6 種類の基質濃度で活性測定を行い、カレイダグラフによりプロットすることで K_m 値を求めた。

3-C 結果と考察

3-C-1 触媒ドメインの構造と活性中心

全体構造

非対称単位[17]には 1 分子入っており、モノマーの形で存在するものと思われる。AkAbf54 はゲルろ過での分子量測定の結果と一致する。482 アミノ酸 (Met18-Gly19-Ser499) が電子密度マップ上で完全に見えていた。ちなみに、AkAbf54 の発現の際に、シグナル配列領域 (Met1-Ala18) は除き、代わりに Met18 を導入してある。AkAbf54 はほぼβ-シートで構成されており、N 末側にある触媒ドメイン (Met18-Val335) と C 末側にあるアラビノース結合ドメイン (Gly336-Ser499) の 2 つのドメインから成っていた (図 3-2)。二つのドメイン間にはリンカーなどは見られず、密接に相互作用しあっていた。

・ジスルフィド結合

4つのジスルフィド結合が見られた。触媒ドメインに3つ (Cys21-Cys31、Cys81-Cys86、Cys176-Cys177) とアラビノース結合ドメインに1つ (Cys401-Cys439) であった。GH54酵素ではこれらのシステイン残基はすべて保存されていることから、このジスルフィド結合が保存されていることが予想される。後述するが、Cys176-Cys177は、活性中心にあり、基質認識に関わっていた。

・アラビノース複合体の全体構造

native構造と比較して、構造変化はほとんどなかった (Cα RMSD[20]は0.13)。アラビノースはフラノース型 (アラビノフラノース) で触媒ドメインに1つ結合していた。予想外なことに、その他にもアラビノース結合ドメインに2分子結合していた (図3-2)。アラビノース結合ドメインに関しては第4章で後述する。

・キシロース複合体

一方、キシロース糖である120 mMキシロースや5%キシロオリゴ糖溶液にsoakingしてみたが、それに相当する電子密度は見られなかった。触媒ドメイン及びアラビノース結合ドメインにキシランを結合するサイトがないのだろう。

糖鎖

糖鎖は結晶化を妨げる場合があるため、EndoHなどの酵素で切断して結晶化させるのが良いとされている。本研究では、糖鎖を切断せずに結晶化することに成功したため、このまま構造解析を行った。第2章で述べたようにAsn83とAsn202の2つのアスパラギン残基にN型糖鎖 (図3-3) が付加していることが予想される。N型糖鎖は、還元末端側に二分子のN-アセチルグルコサミンがあり、その先は主にマンノースで構成される。

・Asn83

本結晶構造では、Asn83の先に非常に弱い電子密度が認められたものの、解釈することはできなかった (図3-4A)。この電子密度が糖鎖に相当するのかもしれない。Asn83の側鎖は溶媒に完全に露出しており、少し電子密度が乱れていた。その先の糖鎖部分はおそらく、どの残基とも相互作用を取り得ず、ディスオーダーしているのではないかと思われる。第2章でも述べたように、N83Qは熱安定性が変化しなかったことからAsn83に付加する糖鎖は安定性には寄与しないことが分かっている。

・Asn202

Asn202の側鎖の先には2分子のN-アセチルグルコサミンと思われる電子密度が確認でき

た (図 3-4B)。結晶構造では、その先のマンノース部分を電子密度で確認することはできなかった。この糖鎖はアラビノース結合ドメインと相互作用をしていた。Lys430 の主鎖 N 原子と 2.64 Å の距離で水素結合していた。また、Thr429 及び Lys430 の側鎖と疎水相互作用していた。これらの相互作用が、安定化に寄与しているのかもしれない。第 2 章でも述べたように、糖鎖が付かないような変異体 N202Q は熱安定性が少し低下した。

<u>触媒ドメイン</u>

SCOP[B1-2]では、N 末触媒ドメインはConcanavalin A-like lectins/glucanase に分類された。β-サンドイッチフォールドを取っており、アンチパラレルな 7 つのβ-ストランド (β5, β9, β11-β14, β18) と アンチパラレルな 6 つのβ-ストランド (β1, β10, β15-β17, β19) が中心構造を形成していた (図 3-5)。その外に余分なアンチパラレルな 7 つのβストランド (β2-β4, β6-β8, β20) が見られた。それに加え, 4 つのα-ヘリックス (α1-α4) がβ-シートの外側に見られた。活性中心はβ-シートがジェリーロールのようにくるんでいる小さなポケットにあった。このポケットにはアスパラギン酸やグルタミン酸といった酸性的な残基がかたまって存在しており、強く負に荷電していた (図 3-6)。

・シアリダーゼのレクチン様ドメインとのフォールドの相同性

DALI[B1-1]による触媒ドメインと類似のフォールドを持つタンパク質の検索の結果 (表 3-7)、触媒ドメインは、*Trypanosoma rangeli* 由来のシアリダーゼ[3-10]の非触媒ドメインであるレクチン様ドメインと最もよく似ており (図 3-8)、残基数 217 で RMSD[20]は 3.9 Å であった (DALI Z-score=13.8)。シアリダーゼは活性ドメインであるβ-プロペラドメインとその側面にあるレクチン様ドメインから構成されている。AkAbf54 の触媒ドメインとシアリダーゼのレクチン様ドメインを重ね合わせてみたところ、β-サンドイッチフォールド中心構造の大部分の主鎖構造は一致したが、AkAbf54 の活性中心付近は全く違った構造をとっており、シアリダーゼではその付近に糖が結合しそうなポケットが見当たらない。シアリダーゼのレクチン様ドメインの機能は明らかになっていない。糖質の認識に関係しているなどの仮説があるものの証明されていない[3-10]。

・クラン GH-B とのフォールドの相同性

活性部位を持つ GH のドメインで Dali Z-sore が高かったのが、GH16 のκ-カラギナーゼや GH7 のセロビオヒドロラーゼである (表 3-7)。この GH16 と GH7 は、同じクラン GH-B に属し、共通の祖先を持つと考えられている[3-11]。

GH16の*Pseudoalteromonas carrageenovora*由来のκ-カラギナーゼとのDALI Z-scoreは10.3であった。κ-カラギナーゼは、トンネル様活性中心を持っている[3-11]。そこに基質であるκ-カラギーナン (藻類直鎖含硫多糖類の一種で、D-ガラクトースと硫酸から構成される) が結合し、内部のβ-1,4結合を加水分解する。

また、GH7 の *Hypocrea jecorina* L27 由来セロビオヒドロラーゼ I との DALI Z-score は 7.8 であった。セロビオヒドロラーゼは、約 50 Å の長さのセルロース結合トンネルを持っている[3-12, 13]。

これらの酵素と重ね合わせを行ったところ、κ-カラギナーゼのトンネル様活性中心やセロビオヒドロラーゼのセルロース結合トンネルは、AkAbf54 の活性中心ポケットの近傍を通っていた。触媒残基の片方はほぼ同じ位置にあった (図 3-9, 10)。ただし、もう片方は別の位置にあり、一致しなかった。また、GH54 は、クラン GH-B 酵素に見られる E-X-D-X-X-E モチーフを持っていない。

このように GH54 の AkAbf54 は、これらクラン GH-B の糖質加水分解酵素である GH16 のκ-カラギナーゼや GH7 のセロビオヒドロラーゼなどと全体構造や活性中心の位置などにおいて微妙な類似点を持っていた。さらに、クラン GH-B と GH54 は、共に細胞壁のβ結合を分解する反応を行う。これらのことを考え合わせると、GH54 とクラン GH-B 酵素 (GH7 と GH16) の間には何か進化的関連がある可能性が示唆される。

活性中心

上で記述した高く負に荷電したポケットにアラビノース分子が結合していた。AkAbf54 は、非還元末端にあるアラビノースのアラビノフラノシド結合を切断するため、このアラビノース分子が結合している部分をサブサイト-1 とした。

サブサイト+1 に位置する部分は、AkAbf54 の平らな表面部分に出ていた。サブサイト+1 を認識すると思われるアミノ酸残基はほとんどなく、この部分の認識はゆるいと思われる。このゆるい認識がα-1,2、α-1,3、α-1,5 のアラビノフラノシド結合の切断を可能にしているのだろう。また、本来の基質でない pNPAF が反応できることを説明できる。この平らな表面部分に本来の基質であるアラビノキシランのキシラン主鎖部分が結合するのではないかと思われる。

・O1 部分の電子密度の乱れ

O1 原子の部分の電子密度は全く見られなかった (図 3-11)。電子密度が見えない原因としては、O1 原子がα-アノマーとβ-アノマーの両方のコンフォメーションをとっているため、もしくは O1 原子が還元されたためではないかと考えられる。

・触媒残基

アラビノースの C1 原子の近くにある Glu221 と Asp297 が触媒残基であると思われる (図 3-12)。これら 2 つの残基間の距離は 5.6 Å であった。一般にアノマー保持型機構は二つの触媒残基間の距離が 5.5 Å 程度になり、アノマー反転機構はその距離が 6.5 Å から 9.5 Å の間をとることが分かっている (図 1-6)。このことから、アノマー保持型機構をとることが構造から予想される。Pitson らにより、GH54 の反応機構は、反応物のアノマーを調べた結果、

アノマー保持型機構を取ることが示されており[3-14]、この結果と一致する。

GH51 GsAbfA は、GH54 と同様にアノマー保持機構を取り、求核性残基と酸・塩基触媒が同定されている[3-15]。そこで、GsAbfA と AkAbf54 を、アラビノースを元にして重ね合わせた。すると、触媒残基の位置がほぼ一致した (図 3-13)。Glu221 は GsAbfA では求核性残基に相当する Asp294 と、Asp297 は酸・塩基触媒に相当する Glu175 とほぼ重なった。このことから Glu221 が求核性残基, Asp297 が酸・塩基触媒に相当する残基であると思われる。C1 原子との距離は、それぞれ 3.22 Å, 3.38 Å である。E221A 変異体を作成したところ、活性が検出できず、野生型の 10^{-6} 倍以下に活性が低下した。また、D297A 変異体を作成したところ、10^{-3} 程度に活性が低下した。構造から予想されたとおり、これらの残基がそれぞれ、求核性残基と酸・塩基触媒であることが確認できた。

・アラビノースの認識

活性中心のアラビノースの認識に関わっている残基は、Cys176, Cys177, Met195, Trp206, Asp219, Glu221, Asn222, Asn223, Leu224, Gly296, Asp297 である (図 3-14, 15)。Asn223 を除いてこれらの残基は GH54 で全て保存されている。これらの残基による多くの水素結合と疎水相互作用で認識されていた。

アラビノースの O2 原子は、Glu221 と Asp297 の側鎖のカルボニル基そして Asp297 の主鎖の窒素原子と水素結合していた。O3 及び O5 原子は Asp219 と水素結合を形成しており、Asp219 が結合及び認識に関与していると思われる。近傍にはその他にも酸性残基 (Asp179, Glu184, Asp189) がいくつか見られた。また、O3 原子は Glu221 の側鎖のカルボニル基及び Gly296 と Asp297 の主鎖の N 原子と水素結合していた。O5 原子は Asn222, Asn223 の主鎖窒素原子と水素結合している。C4 原子は Cys176 及び Cys177 の側鎖の S 原子と疎水相互作用を、C5 原子は Cys177 と Met195 の側鎖の S 原子そして Trp206 及び Leu224 とも疎水相互作用していた。

<u>シス結合で連なったシステイン同士が形成するジスルフィド結合</u>

興味深いことに、ジスルフィド結合を作っている Cys176 と Cys177 の間で、AkAbf54 で唯一のシスペプチド結合を形成しているということである (図 3-16, 17)。これらの硫黄原子とアラビノースの C4/C5 原子間の距離は 4 Å 程度であり、このジスルフィド結合が C4 原子及び C5 原子を認識していると思われる。GH51 GsAbfA では、この部分がトリプトファンに置き換わっており、疎水的な認識をしていた[3-15] (図 3-13)。

・シスペプチド+ジスルフィド結合

このように、シスペプチド結合で連なった連続するシステイン残基がジスルフィド結合をしているという例はあまり例がなくメタノールデヒドロゲナーゼ[3-16]や human リボヌクレアーゼインヒビター[3-17, 18]などで報告されているだけである (表 3-18)。

Methylobacterium extorquens 由来のメタノールデヒドロゲナーゼでは、PQQ の近くに存在する Cys103 と Cys104 がジスルフィド結合を形成していた。5 mM DTT で還元すると活性がなくなり、再び酸化が起きると活性が復活すること[3-19]や、このシステインをセリンに置換した変異体では活性を失ったことから、このジスルフィド結合が活性に必須であることが分かっている[3-20]。

しかし、このようにシスペプチド結合で連なった連続するシステインで形成されたジスルフィド結合が基質認識に関わっているという例は報告されていない。これらのシステイン残基からなるジスルフィド結合が本当にアラビノース認識に関わっているかどうかを調べるため、C176A/C177A 変異体を作成した。変異体の活性測定を行ったところ、野生型と比較して K_m 値が 10 倍以上に上昇したことから基質認識に関わっていることが明らかになった (図 3-19)。

・トランスペプチド+ジスルフィド結合

また、トランスペプチド結合で連なった連続するシステイン残基ジスルフィド結合が糖を疎水的に認識しているという例は 2 例報告されている (表 3-18)。一つ目は、*Cellvibrio japonicus* 由来の GH43 アラビナナーゼの Cys241 と Cys242 の間で形成されるジスルフィド結合である[3-21]。AkAbf54 と同じくアラビノースを認識していたが、アラビノースの C1 原子を認識 (Cys241 の S 原子、Cys242 の S 原子との距離はそれぞれ 3.6 Å と 4.0 Å) しており、認識の仕方は異なっていた。もう一つは、*Anguilla anguilla* 由来のアグルチニンの Cys82 と Cys83 の間で形成されるジスルフィド結合である[3-22]。フコースの C1 と C2 の部分を認識していた。フコースの C1 原子と Cys82 の S 原子との距離は 3.9 Å、フコースの C2 原子と Cys83 の S 原子との距離は 3.9 Å であった。

図表

E221A

5'-C TGG ATC ATG GTC GAT ATG GCG AAC AAC CTC TTC TCT G-3'

D297A

5'-G GGT ATT GGT GGT GCT AAC AGC AAC GGG GCC CAA GGT ACC TTC-3'

C176A/C177A

5'-CG CAC TAC AAC GAC GCC GCC GCC TTT GAC TAC GGC AAT GC

図 3-1 QickChange のプライマー設計

赤で示したのが、変異を導入した残基である。complementary なプライマーは記述を省略する。

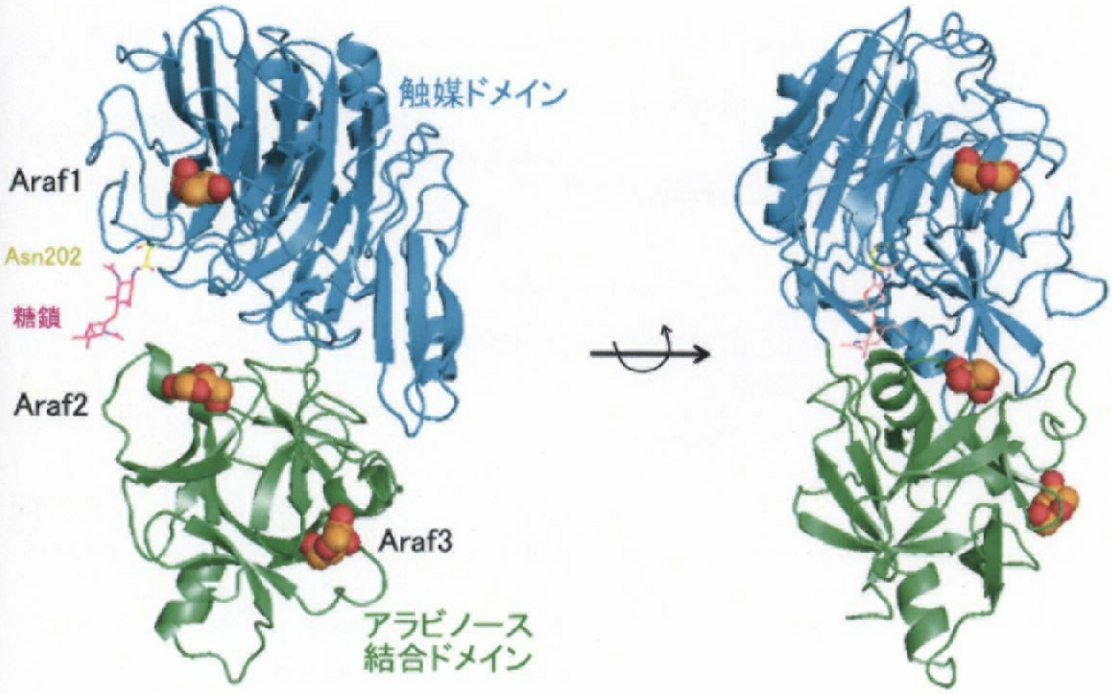

図 3-2 AkAbf54 の全体構造

右の図は、左の図を約 90 度回転したものである。
結合したアラビノース分子を CPK モデルで示した。

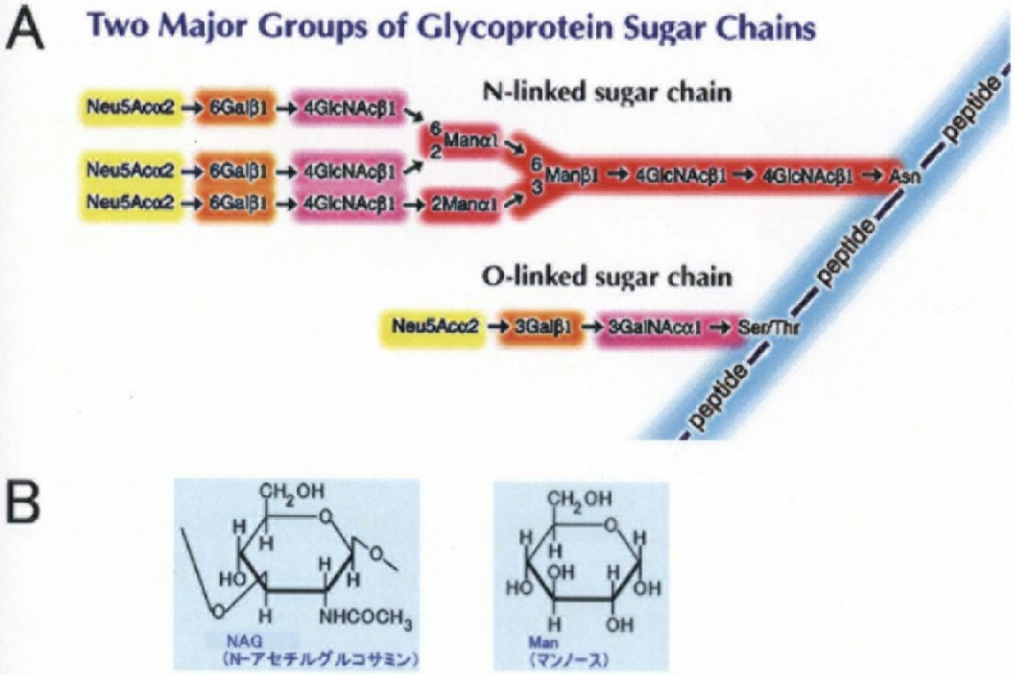

図 3-3 糖鎖に関する図

(A) N 型糖鎖と O 型糖鎖

(B) N 型糖鎖を構成する糖

A は、糖質科学のことば (http://www.gak.co.jp/FCCA/glycoword/GPA00/GPA00J.html) の図を抜粋した。

タンパク質に結合する糖鎖には N 型糖鎖と O 型糖鎖がある。N 型糖鎖は N-X-(S/T)の配列を持つ Asn の側鎖 N 原子に共有結合する。一方、O 型糖鎖は、Ser または Thr の側鎖 O 原子に共有結合する。

N 型糖鎖は、図に示すように根元、すなわち還元末端側の二つの N-アセチルグルコサミン (NAG or GlcNAc) があり、その先は主にマンノースで構成される。

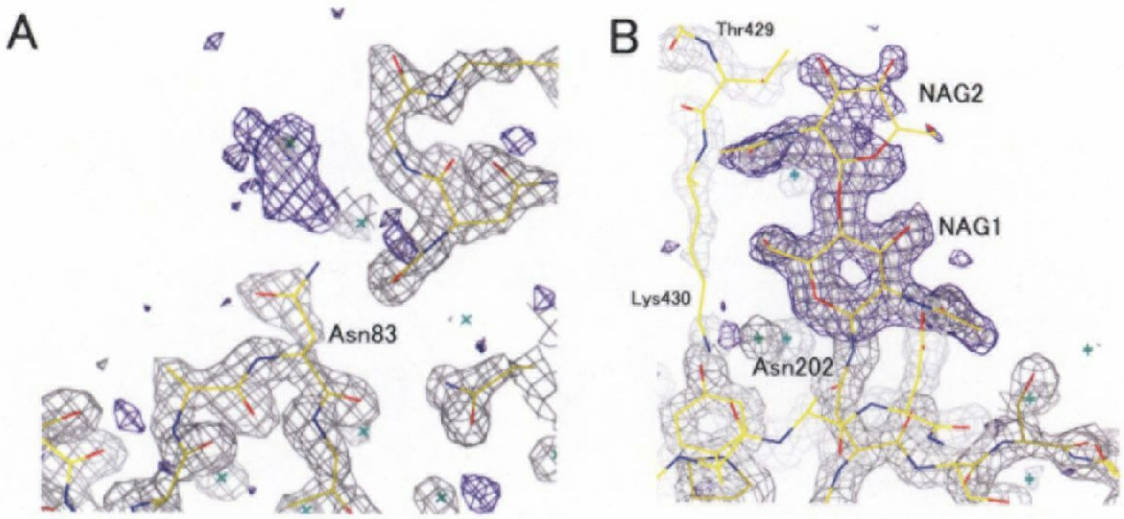

図 3-4 二つの糖鎖付加予想部位の電子密度マップ

紫で示したのが F_o-F_c マップ [16] (3σ)、灰色で示したのが $2F_o$-F_c マップ [15] (2σ)。

A で示すように、Asn83 の側鎖の先には弱い電子密度しか見られず、解釈不能である。一方、B で示すように、Asn202 の側鎖の先には、はっきりと電子密度が確認できる。この電子密度は、N-アセチルグルコサミン二分子に相当すると思われる。つまり、N 型糖鎖の根元の部分が見えていることになる。アラビノース結合ドメインの残基である Thr429 及び Lys430 と相互作用している。

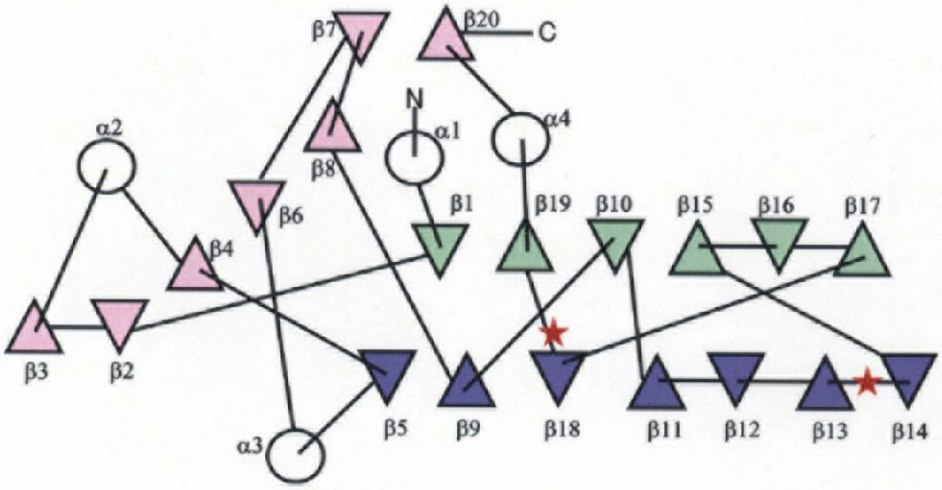

図 3-5 触媒ドメインのフォールドのトポロジー図

緑と青のβ-シートの 2 層がβ-サンドイッチフォールドを形成している。
ピンクで示したβ-シートの層はその外側にある。

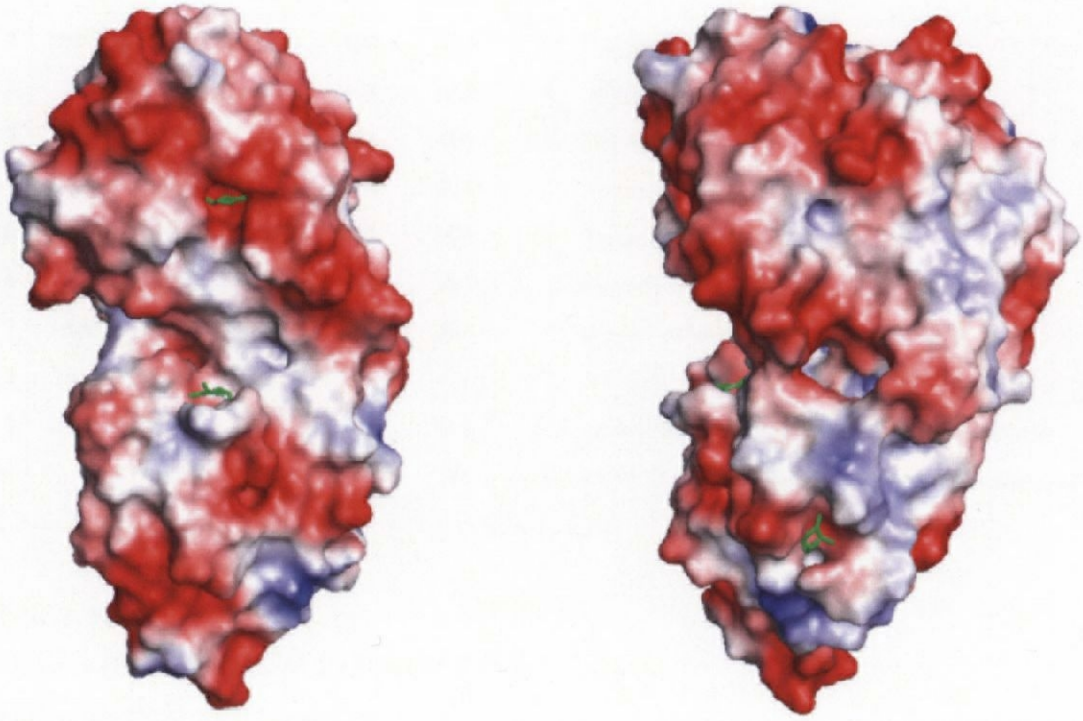

図 3-6 表面電荷図
負に荷電している部分を赤で、正に荷電している部分を青で示す。
結合しているアラビノースを緑で示す。
右の図は、左の図を約 90 度回転したものである。
PyMOL により作成。

	STRID2	Z	RMSD	LALI	LSEQ2	%IDE	PROTEIN
1	1mz5-A	13.8	2.9	192	622	10	sialidase fragment
2	1a8d	12.9	3.1	188	452	6	tetanus neurotoxin fragment Mutant
3	1jhn-A	11.3	3.6	204	380	9	calnexin fragment
4	1dyp-A	10.3	3.2	169	271	7	kappa-carrageenase fragment Mutant
5	1sac-A	10.2	3.1	161	204	9	Serum amyloid p component (sap)
6	1kit	10.1	3.3	158	757	4	sialidase (neuraminidase)
7	1dyk-A	8.9	3.5	142	374	6	laminin alpha 2 chain fragment Mutant
8	1cel-A	7.8	3.7	181	434	7	1,4-beta-d-glucan cellobiohydrolase i (cellulase)
9	1h30-A	7.7	3.5	157	391	6	growth-arrest-specific protein (gas6) fragment
10	1led	7.4	3.6	159	243	9	Lectin (fourth isolated from (griffonia simplicifolia))

表 3-7 触媒ドメインを DALI サーバーにかけた結果

STRID2: PDB code

Z: Z-score (似たフォールドを持つほど値が高くなる)

RMSD: root mean square deviation

LALI: 比べた部分のアミノ酸配列の長さ

LSEQ2: アミノ酸配列の全長

%IDE: 相同性

PROTEIN: そのタンパク質の名前

赤で示したのが、クラン GH-B に属する酵素である。

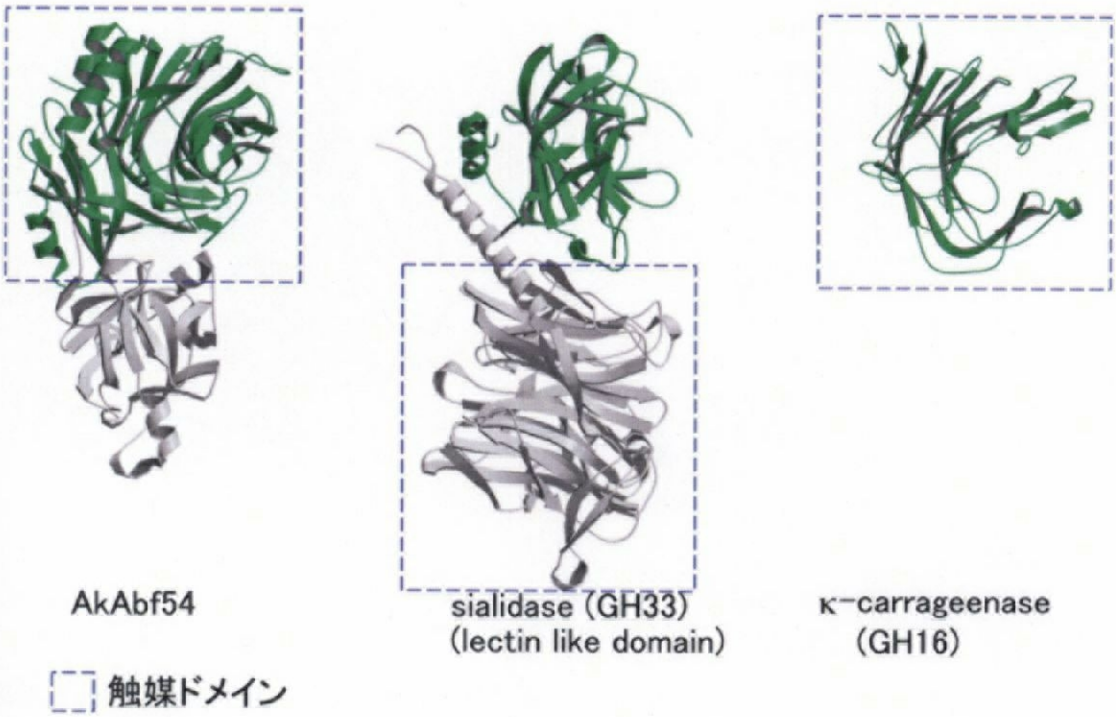

図 3-8 AkAbf54 と似たフォールドを持つタンパク質

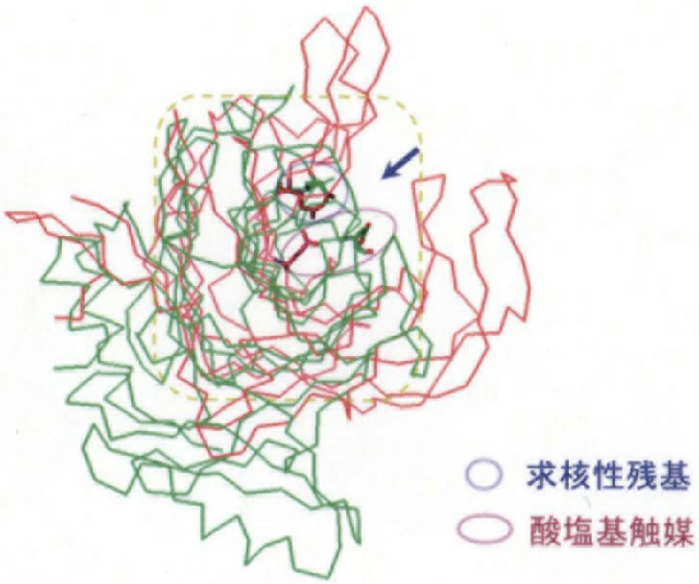

図 3-9 GH16 κ-カラギナーゼ (赤) と AkAbf54 触媒ドメイン (緑) の構造の重ね合わせ

黄色の点線で囲んだ部分が良く重なっている。
青丸で示したように求核性残基は近い位置にあった (3 Å 弱の距離) が、紫丸で示したように酸塩基触媒の位置が大きく異なっていた (10 Å 以上離れている)。

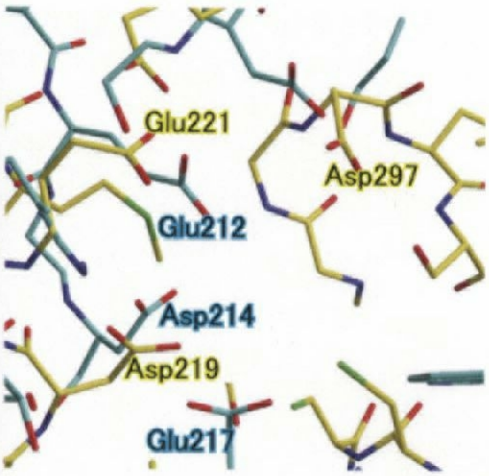

図 3-10 GH7 セロビオヒドロラーゼ (シアン) と AkAbf54 (黄) の活性中心の重ね合わせ

やはり、求核性残基 (Glu212-Glu221) は重なるが、酸塩基触媒 (Glu217-Asp297) の位置は異なる。また、クラン GH-B では求核性残基と水素結合を形成し反応に関わっている残基 (Asp214) がある。AkAbf54 では、基質認識に関わる残基 Asp219 が近くに存在する。ただし、GH7 の Glu212-Asp214 間の主鎖と AkAbf54 間の Asp219-Glu221 の主鎖は逆向きである。Clan GH-B にはモチーフがあり、この場合 E212-X-D214-X-X-E217 である。

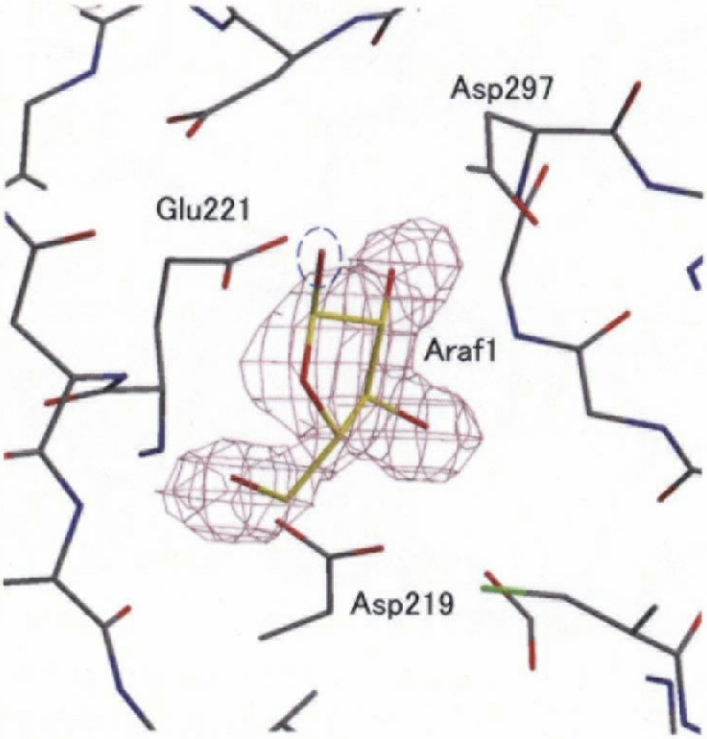

図 3-11 活性中心に結合したアラビノース分子の F_o-F_c マップ [16)]

青丸で囲んだように O1 原子の部分の電子密度が見えない。

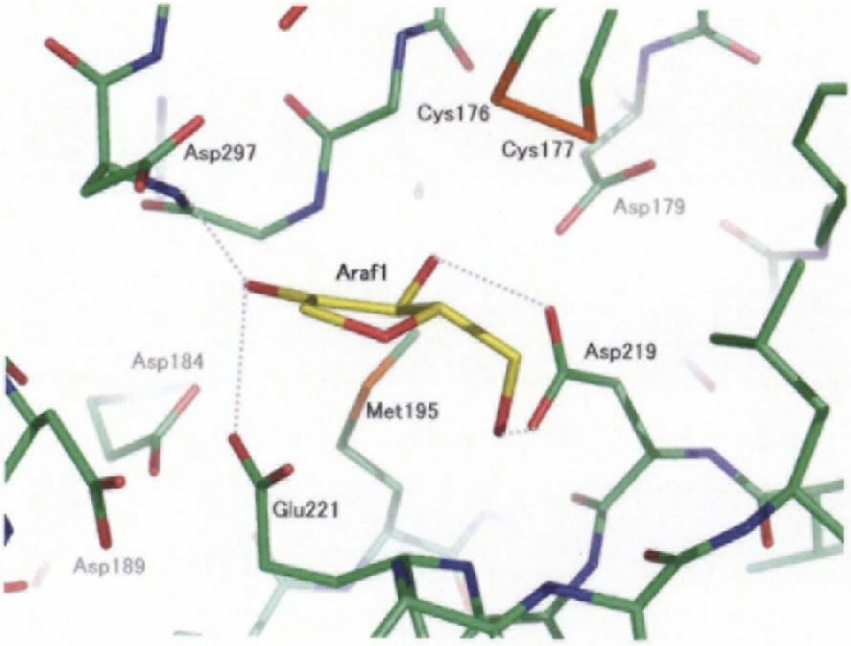

図 3-12 活性中心のアラビノースの認識
水素結合を灰色の点線で示した。

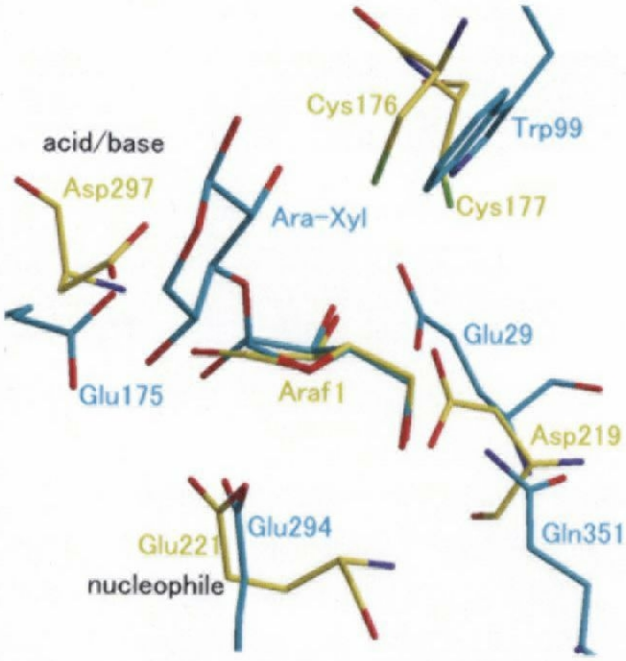

図 3-13 GH51 GsAbfA と AkAbf54 の活性中心の重ね合わせ
GsAbfA をシアンで、AkAbf54 を黄色で示した。GH51 GsAbfA 複合体の図は、native 構造 (PDB:1PZ3) と Ara-a-(1,3)-Xyl E175A 変異体構造 (PDB:1QW8) を組み合わせて作成した。

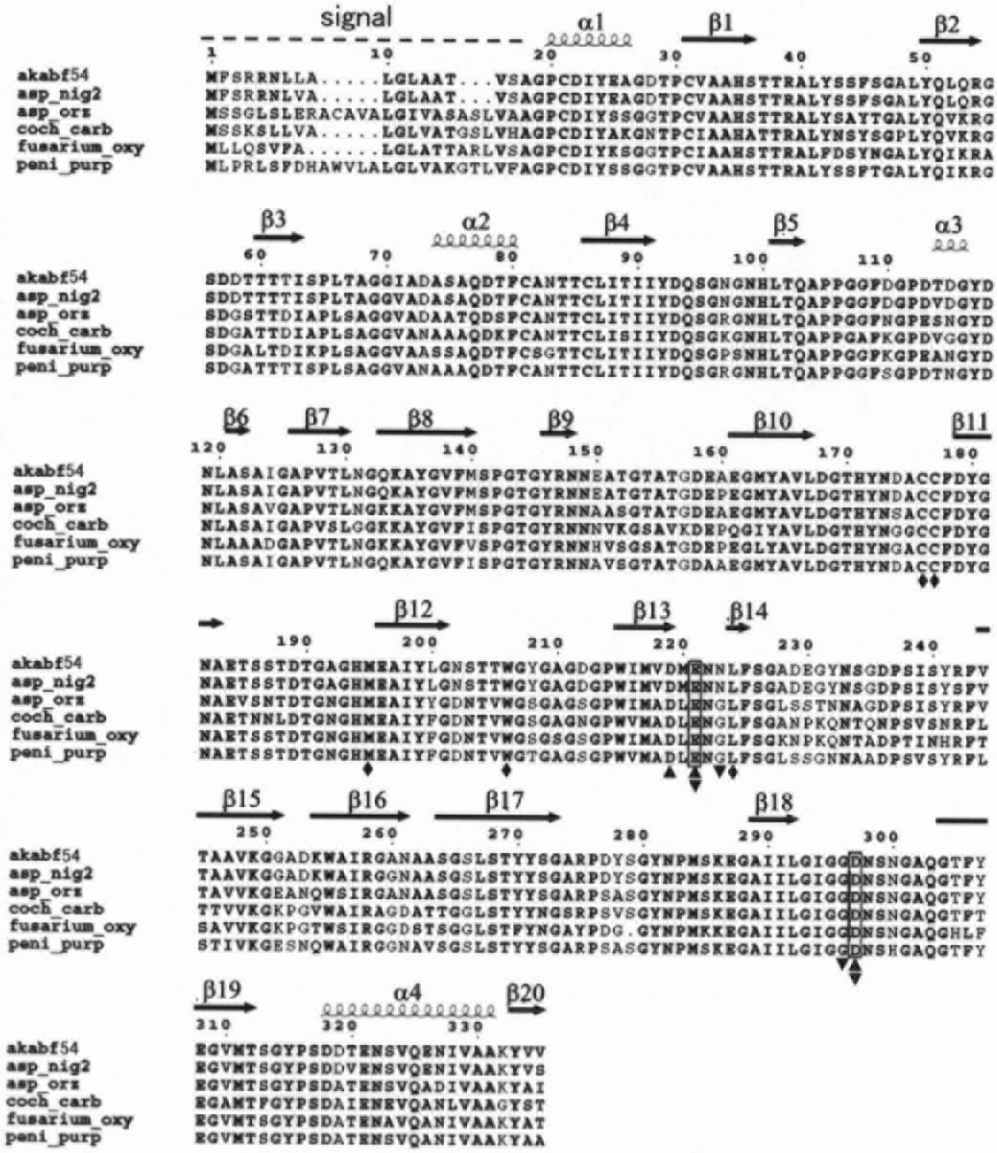

図 3-14 触媒ドメインのアライメント

上三角が AkAbf54 で側鎖がアラビノースと水素結合していた残基、下三角が AkAbf54 で主鎖がアラビノースと水素結合していた残基、ひし形が AkAbf54 でアラビノースと疎水相互作用していた残基、四角で囲んだのが触媒残基。

akabf54: *Aspergillus kawachii* IFO4308, asp_nig2: *Aspergillus niger*, asp_orz: *Aspergillus oryzae* HL15, coch_carb: *Cochliobolus carbonum*, fusarium_oxy: *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi, peni_purp: *Penicillium purpurogenum*

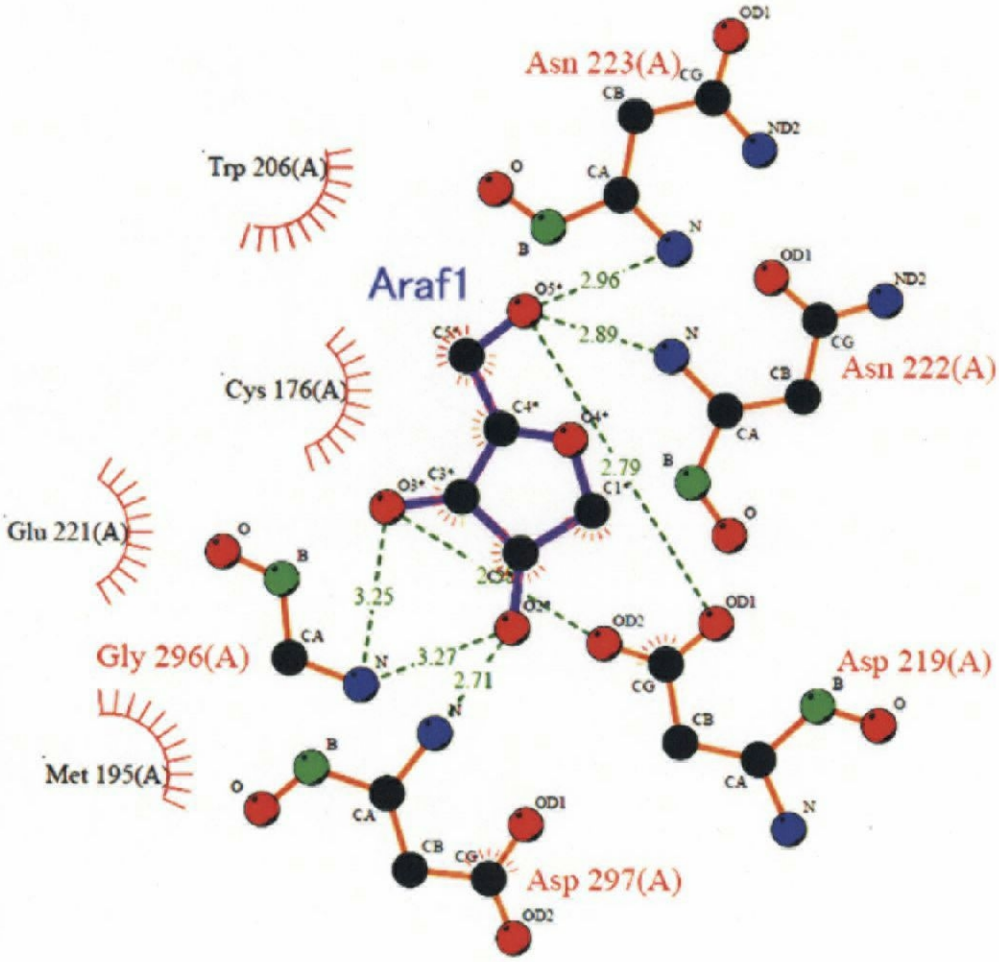

図 3-15 活性中心のアラビノースの認識 (ligplot により作成)

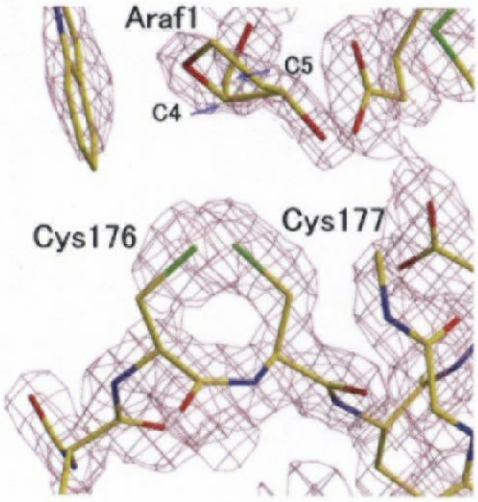

図 3-16 Cys176 と Cys177 間のジスルフィド結合の $2F_o$-F_c 電子密度マップ [15)]

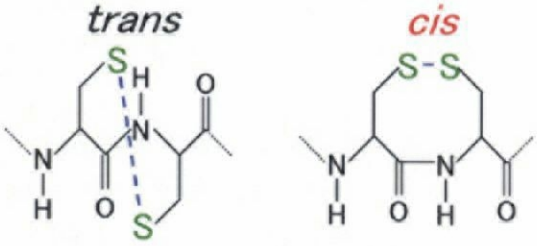

図 3-17 *trans*-ペプチド結合と *cis*-ペプチド結合のコンフォメーションの違い

ペプチド結合	Protein	PDB	Role
cis	メタノールデヒドロゲナーゼ	14HI	触媒に必須
	リボヌクレアーゼインヒビター	1Z7X	酸化抵抗の阻害
	AkAbf54	1WD4	アラビノースの認識
trans	GH43 アラビナナーゼ A	1GYE	アラビノースの認識
	アグルチニン	1K12	フコースの認識
	・・・		

表 3-18 隣り合ってジスルフィド結合を形成するシステイン残基間のペプチド結合の分類

赤で示したのは糖を認識するものである。

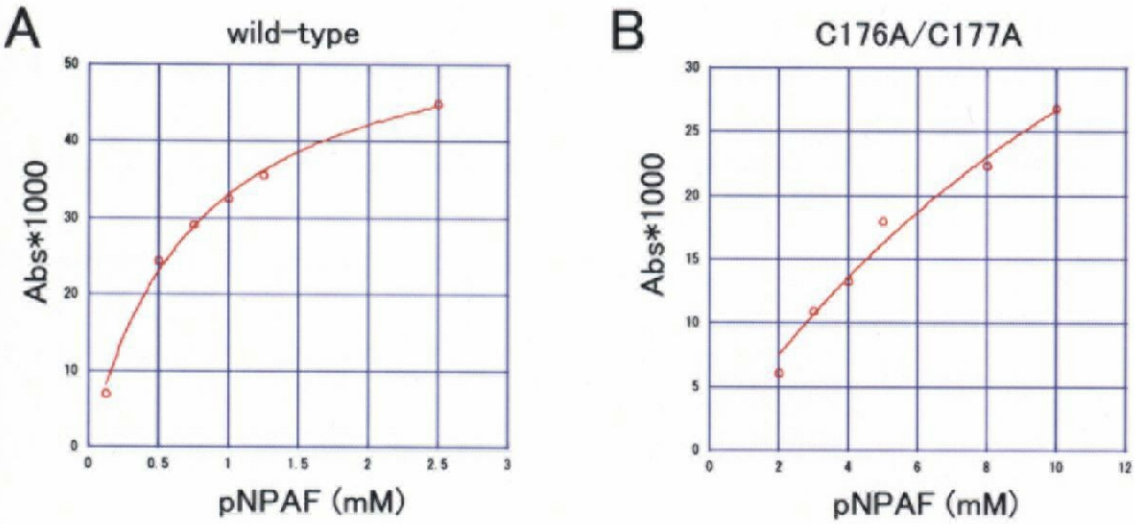

図 3-19 K_m 測定のプロット

wild-type： k_{cat} = 26.8±1.1 (s^{-1})、K_m = 0.76±0.08 (mM)

C176A/C177A： k_{cat} = 3.9±1.0 (s^{-1})、K_m = 17.9±6.2 (mM)

C176A/C177A 変異体の場合は、K_m より小さい基質濃度でしか測定を行っていない (K_m の濃度程には基質 pNPAF が溶解しない) ので K_m の値は信頼できない値ではある。ただ、野生型と比較して 10 倍以上高い値を示した。

第 3 章の引用論文

3-1. Holm, L., and Sander, C. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20,** 478-480

3-2. Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T., and Chothia, C. (1995) *J. Mol. Biol.* **247,** 536-540

3-3. Kawabata, T. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31,** 3367-3369

3-4. Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (1998) *Protein Eng.* **11**, 739-747

3-5. DeLano, W. L. (2004) *Abs. Papers Americ. Chem. Soc.* **228,** U313-U314

3-6. Kraulis, P. J. (1991) *J. Appl. Crystallogr.* **24,** 946-950

3-7. McRee, D. E. (1999) *J. Struct. Biol.* **125,** 156-165

3-8. Merritt, E. A., and Murphy, M. E. P. (1994) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **50,** 869-873

3-9. Wallace, A. C., Laskowski, R. A., and Thornton, J. M. (1995) *Protein Eng.*, **8**, 127-134

3-10. Amaya, M. F., Buschiazzo, A., Nguyen, T., and Alzari, P. M. (2003) *J. Mol. Biol.* **325,** 773-784

3-11. Michel, G., Chantalat, L., Duee, E., Barbeyron, T., Henrissat, B., Kloareg, B., and Dideberg, O. (2001) *Structure* (*Lond.*) **9,** 513-525

3-12. Divne, C., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J. K. C., Teeri, T. T., and Jones, T. A. (1994) *Science* **265,** 524-528

3-13. Divne, C., Stahlberg, J., Teeri, T. T., and Jones, T. A. (1998) *J. Mol. Biol.* **275,** 309-325

3-14. Pitson, S. M., Voragen, A. G., and Beldman, G. (1996) *FEBS Lett.* **398,** 7-11

3-15. Hovel, K., Shallom, D., Niefind, K., Belakhov, V., Shoham, G.., Baasov, T., Shoham, Y., and Schomburg, D. (2003) *EMBO J.* **22,** 4922-4932

3-16. Blake, C. C. F., Ghosh, M., Harlos, K., Avezoux, A., and Anthony, C. (1994) *Nat. Struct. Biol.* **1,** 102-105

3-17. Kim, B. M., Schultz, L. W., and Raines, R. T. (1999) *Protein Sci.* **8,** 430-434

3-18. Papageorgiou, A. C., Shapiro, R., and Acharya, K. R. (1997) *EMBO J.* **16,** 5162-5177

3-19. Avezoux, A., Goldwin, M. G., and Anthony, C. (1995) *Biochem. J.* **307,** 735-741

3-20. Afolabi P. R., Mohammed, F., Amaratunga, K., Majekodunmi, O., Dales, S. L., Gill, R., Thompson, D., Cooper, J. B., Wood, S. P., Goodwin, P. M., and Anthony, C. (2001) *Biochemistry* **40,** 9799-9809

3-21. Nurizzo, D., Turkenburg, J. P., Charnock, S. J., Roberts, S. M., Dodson, E. J., McKie, V. A., Taylor, E. J., Gilbert, H. J. & Davies, G. J. (2002) *Nat. Struct. Biol.* **9,** 665-668

3-22. Bianchet, M. A., Odom, E. W., Vasta, G. R., and Amzel, L. M. (2002) *Nat. Struct. Biol.* **9,** 628-634