

解糖系酵素の構造と機能

(課題番号 03303014)

平成4年度科学研究費補助金(総合研究(A))
研究成果報告書

平成5年3月

研究代表者 山 根 隆
(名古屋大学工学部)

研究発表

(1) 学会誌等

1. A. Suzuki, T. Nishio, C. Yamamoto, T. Yamane, T. Ashida and S. Udaka, "Crystal structure of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase", 発表予定.
2. Yoshiki Matsuura, "AUTOMR: an automatic processing program system for the molecular replacement method", *J. Appl. Cryst.*, 24, 1063-1066 (1991).
3. Y. Morishita, Y. Matsuura, M. Kubota, M. Sato, S. Sasaki and Y. Katsube, "Crystal structure of the catalytic domain of the maltotetraose forming *exo*-amylase from *P. stutzeri*", 発表予定.
4. Y. Matsuura, M. Kusunoki and M. Kakudo, "Structure and catalytic implications of Taka-amylase A", *Denpun Kagaku*, 38, 137-139 (1991).
5. 久保田倫夫, 勝部幸輝, 松浦良樹, 境修造, "シクロデキストリン合成酵素の立体構造と基質結合部位解析", *澱粉科学*, 38, 141-146 (1991)

6. 佐藤能雅, "シンクロトロン放射光と蛋白質結晶解析", 蛋白質核酸酵素, 37, 567-579 (1992).

7. Longyin Chen, "Crystal structure of an electron-transfer complex between methylamine dehydrogenase and amicyanin", Biochemistry, 31, 4959-4964 (1992).

(2) 口頭発表

1. 西尾寿浩, 山本知恵子, 鈴木淳巨, 山根隆, 芦田玉一, 鶴高重三,
"バクテリア由来 α -アミラーゼの立体構造と耐熱化機構",
発表予定

平成3年度文部省科学研究費補助金（総合研究（A））

研究成果報告書

課題番号 03303014

研究課題 解糖系酵素の構造と機能

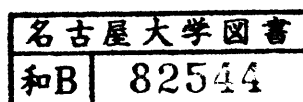
研究代表者 山根 隆（名古屋大学工学部）

研究分担者

飯島信司（名古屋大学工学部 教授）
佐藤能雅（東京大学薬学部 教授）
田中 勳（北海道大学理学部 助教授）
畑 安雄（京都大学化学研究所助教授）
濱田賢作（島根大学理学部 ）
原田繁春（大阪大学工学部 講師）
樋口芳樹（姫路工業大学理学部講師）
福山恵一（大阪大学理学部 助教授）
松浦良樹（大阪大学蛋白質研究所助教授）
松本 治（東京工業大学生命理学部助手）
森本幸生（徳島大学工学部 助教授）
森山英明（東京工業大学生命理学部助手）

研究経費 平成3年度 5,600千円

平成4年度 3,900千円



序

デンプンとグリコーゲンは地球上の生物にとって主要な栄養源であり、多くの生物がこれを分解・利用することによって生命を維持している。デンプンやグリコーゲンの加水分解のために生物が持っている酵素が、解糖系酵素の代表である各種のアミラーゼである。アミラーゼは、ヒトはもちろんほとんどの生物に存在し、それらの生物のエネルギー獲得に重要な役割を果たしている。一方、アミラーゼは食品工業、繊維工業、医薬製造などの分野で広く利用されてもいる。従ってアミラーゼは学術的にも、実用的にも、非常に興味のあるかつきわめて重要な研究対象であると言える。

現在までにいくつかの α -アミラーゼについて結晶化が成功しているが、X線回折によって立体構造が解析されたアミラーゼは、コウジカビ由来の3.0分解能の *Aspergillus oryzae* α -アミラーゼ（タカアミラーゼA）、2.1分解能の *Aspergillus niger* Acid α -アミラーゼと、2.9分解能のブタ膵臓 α -アミラーゼだけであり、細菌由来のアミラーゼについてはこれまでに構造解析が行われていなかった。

また、近年新しいエネルギー資源としてバイオマスが注目されている。セルロースなどのバイオマスは工業原料としても重要である。これらの資源を有効利用するためには、セルラーゼなどの解糖系酵素の性質や機能の改良が必要であるが、これらは精製が困難な酵素が多くその立体構造は殆ど知られていない。

以上の点から筆者は解糖系酵素に着目し、細菌由来のアミラーゼやセルラーゼの構造解析を試みてきた。また、解糖系酵素の構造解析を進行中あるいは進めようとしている研究者も多数いた情勢の中で、総合研究を申請し、平成3年度には幸いにも採択された。

今回研究組織に加わって頂いた班員の方々の万全の準備状況と努力により、僅か2年という期間ではあったが研究は大きく進展した。例を挙げればG4アミラーゼの構造決定と機能の解明が進行し、アミラーゼインヒビターの構造解析も順調に進展し始めている。またキシラーゼやセルラーゼのフォールディングも明らかにされた。その他、数種類の解糖系に關与する酵素の構造が決定されている。

平成4年度の活動としては、平成5年1月11-12日に以下に示すプログラムで班会議を開催し、研究成果の公表と解析や結晶化についてのノウハウの交換を行った。その結果、結晶化や解析のマニュアル化、各種ノウハウのまとめと公開を以後の総合研究などを通じて行う方針が了承された。また、今回の総合研究による成果を秋の学会でシンポジウムなどの形で行うべく準備を進めることとなった。研究を組織したものとしては望外の喜びであり、研究分担者として参加して頂いた方々に深く感謝する次第である。

名古屋大学工学部

山根 隆

総合研究（A）山根班平成4年度班会議議事録

山根班班会議開催要項

日時 平成5年1月11日（月）13:00～

1月12日（火）12:40

場所 愛知県蒲郡市港町21番4号

公立学校共催組合蒲郡保養所 蒲郡荘

Tel 0533-68-2188

下記のプログラムに従い会議を行った。

11日13:00～

13:00（山根）挨拶

13:10 田中 勳（DNA結合蛋白質HUの分子置換法による解析）

14:40 畑 安雄（セルラーゼの分子構造）

14:10 松浦良樹（G4アミラーゼの構造と基質結合）

14:40 福山恵一（アミラーゼインヒビターの結晶化とX線解析）

15:10-15:20 休憩

15:20 飯島信司（セロビオヒドロラーゼの遺伝子工学）

15:50 森本幸生（IPによる巨大分子複合体のデータ収集

—結晶のミスオリエンテーションについて）

16:20 樋口芳樹（ヒドロゲナーゼの構造解析）

16:50 松本 治（リポアミドデヒドロゲナーゼの立体構造解析）

17:10 森山英明（キメラ酵素の熱安定性と構造の研究）

17:50-18:00 第1日のまとめ（山根）

18:15-20:00 懇親会

11日参加者

飯島，田中，畑，浜田，原田，樋口，福山，松浦，森本，森山，松本，
山根，安岡（姫路工大），渡辺（高エ研）

第1日の成果およびコメント

田中により，非対称単位中に6分子（3個の2量体）を含む結晶の分子置換法による構造解析の成功例が報告された。

畑は，前年度のキシラナーゼに続きセルラーゼの構造解析に成功し，両解糖

系酵素の立体構造の相同性を示した。

松浦は、G4アミラーゼの結晶構造を同型置換法により決定し、その基質結合様式を検討した。

福山は、アミラーゼインヒビターの結晶化と重原子置換体の調整に成功し、分子境界を検討中であり、構造決定の近いことが報告された。

飯島は、微生物による再生可能資源エネルギー変換のためのセロビオヒドロラーゼの微生物による発現の成功について報告した。

森本は、高エ研・放射光実験施設でのワイセンベルグカメラで収集したデータの自動解析システムについて報告した。

樋口は、ヒドロゲナーゼの結晶化の再検討と重原子置換体の調整について報告した。

松本は、リポアミドデヒドロゲナーゼの分子置換法による構造解析の再検討結果について報告した。

森山は、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼのキメラ化による熱安定性と立体構造の相関を明らかにした。

分子置換法や結晶化について活発な質疑応答が行われ、ノウハウの蓄積と共にその公開の必要性と公開手段などについての意見が出された。

12日 9:00~12:40

9:00 山根 隆 (α アミラーゼの構造解析および蛋白質構造解析への分子置換法の適用について)

9:30 原田繁春 (CRYSTAL SCREENによる結晶化と蛋白質の結晶化のためのデータベース)

10:00 濱田賢作 (異常分散を利用した金属蛋白質のX線構造解析)

10:30-10:40 休憩

10:40-11:40 依頼講演 渡辺信久 (高エ研)
(時分割X線結晶構造解析)

11:40-12:10 話題提供 安岡則武 (姫路工大)
(タンパク質結晶構造解析のフローチャート化について)

12:10-12:40 討論(司会 山根)

12日参加者

原田, 福山, 松浦, 畑, 森本, 飯島, 田中, 浜田, 樋口, 山根,
安岡, 渡辺 (12名)

山根は、 α アミラーゼの重原子法とソルベントフラッタリング法の適用による6 Å分解能での構造解析について報告した。また、非対称単位中に2分子含まれる結晶の分子置換法による構造決定の成功例とノウハウを報告した。原田は、結晶化の成功する条件の特異性と、結晶化のマニュアル化の必要性提起した。

浜田は、鉄クラスターを含む酵素の異常分散を利用した構造解析の成功例とソルベントフラッタリング法の適用とその評価についても話題を提供した。招待講演で渡辺は、時分割結晶構造解析における反応開始及び制御上の満足すべき要求とその問題点を整理し、テーマ選択の重要性を改めて認識させてくれた。

安岡は、構造解析のフローチャートの作成とマニュアル化について、興味ある話題を提供した。

最後の総合討論では、ノウハウのマニュアル化と、各種学会でのシンポジウム等の開催などが検討された。

佐藤能雅（東大薬）氏は今回都合がつかず欠席であった。

名古屋大学の大学院生2名には、会場の準備、後片付け、スライドプロジェクターや照明操作のために、会場係として手伝って頂いた。

総合研究（A）山根班平成3年度班会議 実施報告

日時 平成3年12月3日（火）13:00～

12月4日（水）14:30

場所 名古屋市中区三の丸一丁目5-1

KKR名古屋三の丸

プログラム

3日13:00

13:10（原田）St. erythraeusリゾチームの分子構造

13:35（福山）小麦0.39 α アミラーゼインヒビターの構造解析

14:00（松浦）アミラーゼとそれに関連した酵素の構造と機能

14:25（畑）キシラナーゼの構造と機能

14:50-15:10 休憩

15:10（松本）リポアミドデヒドロゲナーゼのX線結晶構造解析

15:35（森山）MAD法のためのデータ収集について

16:00（森本）イメージングプレートによるX線反射強度測定

およびそのデータ処理

16:25（飯島）好熱菌 β ガラクトシダーゼの構造について

17:00-17:30 討論

18:00-20:00 懇親会（三の丸会館にて）

4日 9:00（田中）蛋白質回折データ収集ソフトウェアの開発

9:25（佐藤）イメージングプレート振動カメラの試作と処理系

9:50（浜田）マルトオリゴ糖G5生成酵素の結晶化

10:15（月原）分子置換法による構造解析

10:40-11:00 休憩

11:00-12:00（藤井）XPLOREを用いた蛋白質構造の精密化

12:00-13:00 昼食

13:00（山根） α アミラーゼの結晶学的研究

13:25-14:30 討論（話題提供，坂部，安岡）

参加者

研究分担者に加えて，

藤井敏（大阪大学薬学部）

坂部知平（高エネルギー物理学研究所放射光実験施設教授）

坂部貴和子（名古屋大学理学部）

鈴木淳巨（名古屋大学工学部）

安岡則武（姫路工業大学理学部教授）

の諸氏に参加して頂いた。

目 次

		ページ
1. α -アミラーゼの構造解析および 蛋白質構造解析への分子置換法の 適用について	山根 隆 (名大工)	1
2. セルロース分解酵素のパン酵母からの 分泌生産 —アミノ酸置換の分泌性への影響—	飯島信司 (名大工)	10
3. 回転対陰極型 X 線発生装置を利用する 蛋白質結晶のラウエ回折法の可能性	佐藤能雅 (東大薬)	17
4. HUタイプ DNA 結合蛋白質の構造解析 (非対称単位中に複数の分子がある 場合の分子置換法の適用)	田中 勳 (北大理)	22
5. セルラーゼの分子構造	畑 安雄 (京大化研)	27
6. 異常分散を利用した金属蛋白質の X 線構造解析	濱田賢作 (島根大理)	32
7. <i>Streptomyces globisporus</i> が産出する バクテリア型リゾチームの X 線構造解析	原田繁春 (阪大工)	36
8. ヒドロゲナーゼの X 線結晶構造解析	樋口芳樹 (姫工大理)	40
9. 小麦の 0.19- α アミラーゼインヒビター の結晶化と X 線解析	福山恵一 (阪大理)	44

10. P. stutzeri G 4 - アミラーゼの
構造と複合体における基質結合様式 松浦良樹 (阪大蛋白研) 49
11. リポアミド・デヒドロゲナーゼの
立体構造解析 松本 治 (東工大生命理) 57
12. イメージングプレートによる
X線反射強度測定およびそのデータ
処理 森本幸生 (徳島大工) 61
13. キメラ酵素を用いた酵素蛋白質の
耐熱化機構の研究 森山英明 (東工大生命理) 67

(共著者名は省略させていただいた)

α -アミラーゼの構造解析および蛋白質構造解析への分子置換法の適用について

名古屋大学工学部 山根 隆

I 細菌由来 α -アミラーゼの構造解析

【はじめに】

本研究では細菌由来の α -アミラーゼを、研究対象に選んだ。一つは *B. amyloliquefaciens* の産出する α -アミラーゼ（以後 BAA）である。この α -アミラーゼの分子量は 54,972（483 残基）であり、また至適 pH は微酸性である。その一次構造を別の *B. licheniformis* α -アミラーゼ（以後 BAL、耐熱性 α -アミラーゼ、BAA とのアミノ酸配列の相同性は 80.5%）とともに Fig. 1-1 に示す。他の α -アミラーゼと比較すると、アミノ酸配列の 99-111, 225-235, 322-330 はタカアミラーゼ A やブタ膵臓 α -アミラーゼの触媒活性中心や基質結合部位のアミノ酸配列とも相同性が高く、この領域が酵素活性発現に関与している可能性が高い。

これまでに解析された α -アミラーゼには、 $(\alpha/\beta)_8$ folding がみられ、この構造は triose phosphate isomerase (TIM) をはじめ 17 種類のタンパク質に存在して、TIM barrel と呼ばれている。本研究に用いた BAA にも同様な構造が存在すると予想されるが、一次構造をタカアミラーゼなどと比較すると、相同性は BAL に比べてかなり低い。このことから、BAA はタカアミラーゼの立体構造とは異なる部分が多いと考えられる。

【実験】

BAA 結晶には、2 つの晶系が存在する。結晶学データを Table 1-1 に示す。構造解析には、非対称単位中の分子数の少ない斜方晶の結晶を用いている。

Fig. I-1 細菌由来 α -アミラーゼのアミノ酸配列

	1	20	40
<i>B. licheniformis</i>	<u>ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWKRLQNDSAYLAEHGITAVWI PPAYKGT</u> <u>S</u>		
<i>B. amyloliquefaciens</i>	--V	T	AEH SDI L
	60	80	100
	<u>QADVGYGAYDLYDLGEFHQKGTVRTKYGTKGELQSAIKSLHSRDINVYGDVVINHKG</u> <u>GADATEDVTAVEV</u>		
	S N P	Q S D G NVQ	L A
	130	150	170
	<u>DPADRNRV I SG EHR I KAWTHFHFPGRG</u> <u>STYSDFKWHWHYHFDGTDWDESRKLNRIYKFQ</u> <u>--GKAWDWEVSNEN</u>		
	N N QET E YQ	D R N	A I S F RGE S
	200	220	240
	<u>GNYDYLMYADI DYDHPDVAAE I KRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWVNHVREKTGKEMFTVA</u>		
	V	V T K I S I A	QA QA
	270	290	310
	<u>EYWQNDLGALENYLNKTNFNH</u> <u>SVFDVPLHYQFHAASTQGGGYDMRKL</u> <u>LLNSTVVSKHPLKAVTFVDNHDTQ</u>		
	NA K	S Q FNLQ S	R DG R E E
	340	360	380
	<u>PGQSLESTVQTWFKPLAYAFIL</u> <u>TRESGYPQVFYGDMYG</u> <u>TKGDSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYGAQH</u>		
		T PK S DM	E P
	410	430	450
	<u>DYFDHHDIVGWTREGDSSVAN</u> <u>SGLAALITDGGGAKRMYVGRQNAGETWHDITGNRSE</u> <u>PVVINSEGWGEF</u>		
	I P VI	A K S A LK	Y DT K G D
	480		
	<u>HVNGGSVSIYVQR</u>		
	D		K

Table I-1 BAAの結晶学データ

Crystal system	Orthorhombic	Monoclinic
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2
a	91.41	141
b	149.94	88.8
c	77.07	142
β	---	125.5
Density (g/cm ³)	1.31	1.31
Z	8	8 or 12
(Asymmetric unit)	2	4 or 6
Solvent content(%)	47.0	61.5 or 51.8

BAA の構造解析は、重原子同型置換法により進めている。これまでに、Tl誘導体で4サイト、Pt誘導体で5サイトの重原子サイトが見つけれられている。しかし、各誘導体からのMIR位相を用いて電子密度図を計算したが、位相の精度がまだ不十分なため、分子領域と溶媒領域を明確に区別することはできていない。今回は、別の重原子誘導体結晶を調整し、位相の精度を上げることを試みた。これまでに調整されている2種の誘導体と、新たに調整した3種の誘導体の調整条件を以下に示す。

- CH₃COOTl 5mM 3days soaking
- Pt(NH₃)₂Cl₂ 3mM 5days soaking

今回調整した誘導体

- Thimerosal 0.2mM 2days soaking
- KAu(CN)₂ 0.2mM 2days soaking
- " " 3days soaking

X線データ収集は、高エネルギー物理学研究所放射光実験施設で、ワイセンベルグカメラ法により行った。データ処理結果をTable I-2 に示す。

Table I-2 WEISデータ処理結果

	Native	Pb(AcO) ₂	K ₂ O _s Cl ₆	CH ₃ COOTl	KAu(CN) ₂
Resolution	~ 2.2	~ 2.7	~ 2.7	~ 2.2	~ 2.7
Total reflection	110,815	83,832	84,917	118,215	79,946
Independent ref.	39,229	47,672*	48,307*	70,006*	45,908*
mergung R (%)	8.0	6.3	4.8	4.1	3.6
Cell const. a	91.41	91.40	91.41	91.61	91.65
b	149.94	149.75	150.03	149.80	149.87
c	77.07	77.08	77.07	76.75	77.24
< I _{ph} -I _p > **		0.070	0.065	0.066	0.074
		(31525)	(34781)	(41773)	(34163)
< I(+)-I(-) > **		0.051	0.045	0.033	0.032
		14273)	(16123)	(19140)	(15974)

* バイフィット対を含む。

**Tl: ~2.2Å, Pb, Os, Au: ~2.7で比較。括弧内は比較に用いた反射の数。

差パターン関数や差フーリエ図の計算より、Au誘導体については、1箇所の重原子サイトを決定した。3種類の誘導体の重原子パラメーターを精密化することにより、8~5Å分解能の3181反射に対し<m>は0.68に改良された。このMIR位相を用いてフーリエ図を計算したが、分子領域と溶媒領域を明確に区別できなかつたので、solvent flattening法の適用を試みた。

【solvent flattening】

solvent flatteningは、8~5Å分解能で行い、溶媒含有率(Solv)40%からスタートし、Solv=45%の段階で、Rは0.372から0.260へ、<m>は0.826から0.874へと改良された。最終サイクルの前サイクルとの平均位相差は25.4°である。しかしながら、電子密度図を検討したところ、分子領域まで溶媒領域と見なして平にされたように思われた。そこで、溶媒含有率を低くして再度、solvent flatteningを行った。(計算からは47%であるが、

20%からスタートした)。結果をTable I-3 に示す。

Table I-3 Solvent flattening の過程

Solv. (%)	Stage	Cycle	Flattening Map	R	Mean Phase	<m> difference	Map(new)
20	8	1	ORG*	0.302	30.54	0.838	S8C1
		2	S8C1	0.245	17.80	0.877	S8C2**
	9	1	S8C2	0.216	14.43	0.884	S9C1
		2	S9C1	0.190	13.53	0.896	S9C2**
25	10	1	ORG*	0.319	31.55	0.838	S10C1
		2	S10C1	0.247	19.66	0.878	S10C2**
	11	1	S10C2	0.214	15.86	0.884	S11C1
		2	S11C1	0.198	15.26	0.894	S11C2**
30	12	1	ORG*	0.333	32.73	0.835	S12C1
		2	S12C1	0.253	21.46	0.876	S12C2**
	13	1	S12C2	0.223	17.52	0.881	S13C1
		2	S13C1	0.204	16.33	0.892	S13C2

* MIR位相より計算した差フーリエ図

** 次の Stage の Mask の計算に使用

最終の電子密度図（溶媒含有率30%）を検討しても、分子1個に相当する領域を決定することはできなかつた。また、重原子座標の位置関係から非対称単位中の2分子に相当する領域の決定も試みたが、明確にカットすることはできなかつた。溶媒含有率の選択をもう少し細かく検討する必要があるのかも知れない。また、タカアミラーゼAの立体構造を用いて分子置換法による構造決定を試みてもいるが、非対称単位中に2分子含まれるためにまだユニークな解が得られていないのが現状である。

II 蛋白質構造解析への分子置換法の適用についてのコメント

分子置換法による蛋白質の構造解析は、非対称単位中に1個しかターゲット分子を含まない結晶では、成功例も多く、有望な解析手段となっている。しかし、非対称単位中に1で報告した α -アミラーゼの様に2個以上のターゲット分子を含む結晶に分子置換法を適用することは、未だ多くの問題があり成功例は比較的少ない。

本稿では、非対称単位中に2個のターゲット分子を含む結晶への分子置換法の適用に、差-パターンソン (difference Patterson) 関数を用いて成功した例を紹介する。この様なノウハウの情報交換や蓄積においても総合研究の果たしている役割は大きい。

[試量] 小麦胚芽インヒビター (I-2) -トリプシン複合体

小麦胚芽より小谷らの方法によりインヒビター I-2 を精製し、¹⁾ I-2 と牛トリプシンを 1 : 2 で混合し複合体を調整した後、表 II-1 の条件で結晶を得た。結晶学データを表 II-2 に示す。非対称単位中に複合体 1 単位 (合計分子量 60,100) が含まれている。

[実験]

X線データは放射光実験施設で坂部の巨大分子用ワイセンベルグカメラにより、イメージングプレート (IP) を用いて収集した (データセット W1, W2)。フィルムカセット半径は 287mm, コリメーター径は 0.1mm である。その他の測定条件と処理結果を表 II-3 に示す。低分解能のデータをカバーするために4軸型回折計でもデータ収集を行った (表 II-4)。これら3組のデータをマージすることにより得られた 2.3Å 分解能までの独立な 26,565 反射を以後の構造解析に使用した。マージング R は 0.130 である。

[構造解析]

この複合体は既に構造が決定されている牛トリプシン (BT) を含んでいる。そこで蛋白質構造データベース (PDB) より得られる BT (PDB 登録番号 4PTP) の分子構造をモデル分子として、複合体結晶中のトリプシン分子 (それぞれ R1, R2 とする) の配向と位置を、分子置換法により決定した。R1

の配向は回転関数²⁾により容易に決定された(表II-5)。しかしながら、第2ピーク以下はノイズレベルであり、当初はR2の配向を決定することはできなかった。回転関数より得られたR1の配向を精密化して、並進関数³⁾を計算したところ第2ピークなどと比べて有意に高い第1ピークが得られ配向も決定できた。従って、正しい配向と位置を基にR1分子のみによる構造因子(F_{cal}(R1))を計算することが可能であるので、

$$(|F_o| - k |F_{cal}(R1)|)^2$$

をフーリエ係数とする差-パターン関数を計算した。これにBTをモデル分子として回転関数、並進関数を計算することによりR2の配向がユニークに決定できた(表II-5)。この段階での結晶学R因子は0.380であった。但し、スケール因子kは

$$(\sum |F_o| / \sum |F_{cal}(R1)|) \times (\text{BTの分子量} / \text{複合体の分子量})$$

で求めている。

References

1. S. Odani, T. Koide and T. Ono: J. Biochem., 100, 975-983 (1986).
2. R. A. Crowther: The Molecular Replacement Method (M. G. Rossmann ed.), Gordon and Breach, New York, pp.173-178 (1972).
3. R. A. Crowther and D. M. Blow: Acta Crystallogr., 23, 544- (1967).

Table II-1. Crystallization conditions

Method	hanging drop vapor diffusion
Buffer	50 mM sodium phosphate (pH 7.0-8.0)
Precipitant solution	8.0-10.0 %(w/v) PEG 4000 (polyethylene glycol 4000) (containing 1.0-3.0 %(w/v) 1,4-dioxane)
Protein solution	15 mg/ml complex
Reservoir	precipitant solution 1 ml
Drop	precipitant solution 5 μ l + protein solution 5 μ l
Temperature	18 $^{\circ}$ C
Period	one month
Size of crystal (maximum)	0.2 x 0.2 x 1.2 mm ³

Table II-2. Crystal data

Crystal system	orthorhombic
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell constant	a= 73.49 \AA b=120.56 \AA c= 70.04 \AA
Z	4
Solvent content	49.7 %

Table II-4. A summary of data collection by AFC-5

Wavelength (\AA)	1.5418(CuK α)
Total reflections (independent)	4072 3902
Resolution (\AA)	25.0 - 4.5
Merging R	0.092

Table II-3. A summary of data collection and processing by the synchrotron radiaton and Weissenberg camera at the Photon Factory

	W1	W2
Wavelength (\AA)	1.00	1.00
Rotation axis	c*	b*
Oscillation angle (deg.)	7 - 2	5
Overlap angle (deg.)	0.5	0.5
Total rotation angle (deg.)	90	90
Exposure time (sec./deg.)	10	4 - 8
Number of films	27	21
Total reflections	66,175	77,492
(independent)	21,704	23,849
Resolution (\AA)	2.4	2.3
Merging R	0.075	0.082

Table II-5. Results of rotation-function calculation of trypsin-I-2 (2:1) complex. Resolution range was between 6 and 3.5 Å. Radius of cut-off sphere in the Patterson function calculation was fixed to 20.4 Å.

Dataset	W1				W1 + AFC				W1 + W2 + AFC				Fo(mod)				W2			
No. of reflections used	Fc	68,996			Fc	68,996			Fc	68,996			Fc	68,996			Fc	68,996		
	Fo	12,148			Fo	12,373			Fo	12,665			Fo	12,665			Fo	12,164		
Rotation angle (deg.) ^{*1}	ψ	ϕ	χ	p. h. ^{*2}	ψ	ϕ	χ	p. h.	ψ	ϕ	χ	p. h.	ψ	ϕ	χ	p. h.	ψ	ϕ	χ	p. h.
Relative peak value	90	200	45	100.0 ^{*2}	90	200	45	100.0	85	200	45	100.0	90	200	45	44.4	90	200	45	100.0
R1 ^{*3}	25	110	180	98.2	25	110	180	94.3	25	110	180	95.8	20	110	180	43.7	25	110	180	97.2
	80	0	135	85.5	80	0	135	82.1	80	0	135	81.9	80	0	135	27.8	80	0	135	83.1
	65	270	195	80.9	70	270	195	84.9	70	270	195	84.7	70	270	195	42.9	65	270	195	85.3
R2 ^{*3}	20	35	210	53.6	20	40	210	36.8	20	40	210	44.4	20	35	210	97.6	20	35	210	70.1
	50	125	50	52.7	55	130	50	38.7	50	125	50	42.4	50	120	45	100.0	55	130	50	68.4
	75	195	200	53.6	75	195	205	38.7	75	195	205	44.4	75	195	205	92.1	75	195	205	67.8
	80	285	150	52.7	75	285	150	36.3	75	285	150	39.6	80	285	150	88.9	75	285	150	61.6
1st ^{*4}	50	250	75	88.2	40	265	195	54.2	65	215	225	46.5	40	70	185	64.3	45	35	325	69.5
noise	30	160	225	83.6	85	10	260	53.8	45	135	95	45.8	85	160	80	64.3	15	120	155	67.2
	65	25	160	76.4	50	100	175	53.3	40	45	240	45.1	70	185	250	62.7	80	255	195	65.5
	80	295	230	75.5	75	355	80	49.5	65	305	135	45.1	55	275	150	57.9	85	345	155	55.9
2nd ^{*4}	30	350	290	68.2	60	330	295	52.8	30	60	145	45.1	75	130	100	64.3	20	85	120	57.6
noise	20	80	120	66.4	30	60	145	51.9	60	330	295	45.1	55	290	115	61.9	30	355	290	56.5
	75	235	175	61.8	75	160	225	51.9	75	160	230	44.4	50	200	235	61.1	75	235	175	48.6
	85	150	210	60.0	65	250	155	48.1	65	250	150	44.4	50	40	205	60.3	90	330	145	47.5

*1 Polar rotation coordinates (Rossmann & Blow, 1962).

*2 Relative peak height in the map. The maximum is normalized to 100.0.

*3 R1 and R2 denote the correct orientation of first and second trypsin molecule, respectively. The four peaks are related to each other by the crystallographic symmetries.

*4 First and second noise mean the highest and the next peak pairs except for those of the correct orientations, respectively. The order is according to the average value of four symmetrically related peak heights.

セルロース分解酵素のパン酵母からの分泌生産

—— アミノ酸置換の分泌性への影響 ——

名古屋大学工学部 飯島信司

要旨 好熱嫌気性セルロース資化性菌NA10株からクローン化したセロピオヒドロラーゼ遺伝子のN末端塩基配列を決定した。つづいてこの遺伝子を *Saccharomyces diastaticus* 由来のグルコアミラーゼのプロモーター、さらにこの酵素の分泌をつかさどるリーダー配列とT-S領域（スレオニン、セリンに富む領域）の下流に連結しパン酵母に導入したところ、この遺伝子は効率的に発現し、セロピオヒドロラーゼの60%は培地中に分泌された。分泌された酵素は糖鎖が附加されていたが、菌体内に残った酵素には糖鎖が附加されておらず、またT-S領域が、セロピオヒドロラーゼから切断されていた。そこでこの切断により分泌が阻害されると考え、インフレーションに *Xho* 及び *Bam*H1 リンカーを導入し、切断部位のアミノ酸配列を変化させたところ酵素の生産性は飛躍的に増大したが分泌性に変化はなかった。

緒言 バイオマスからのエタノールの生産は、バイオエネルギーの生産法として注目されている。一方、エタノール生産酵母はセルロース系バイオマスを分解できないので遺伝子工学的手法によりセルロース分解系酵素（セルラーゼ）遺伝子を導入する試みがなされている。もしこれができればセルロース系バイオマスからエタノールが生産できることになる。この場合セルロースは高分子物質であり酵母菌体内にとり込まれることがないので、逆にセルラーゼを培地中に分泌させる必要があるが、酵母はタンパク質をあまり分泌しないことが知られている。そこで本研究ではセルラーゼ遺伝子に最近発見された効率的分泌を可能とするシグナル（T-S領域）を結合し、その効果について調べた。

結果及び考察 セロピオヒドロラーゼ遺伝子のDNA塩基配列を決定した。さらにN末端プロモーター領域及び7アミノ酸を欠失した遺伝子DNA（pRK22）を作製し、このプラスミッドのセロピオヒドロラーゼ遺伝子を含む *Xho*I-*Hind*III断片を *S. diastaticus* 由来のグルコアミラーゼのプロモーター、リーダー配列、T-S領域を含むDNAフラグメント（pIY152）とインフレーションに連結した（図1,2）。プラスミッドpIY152はグルコアミ

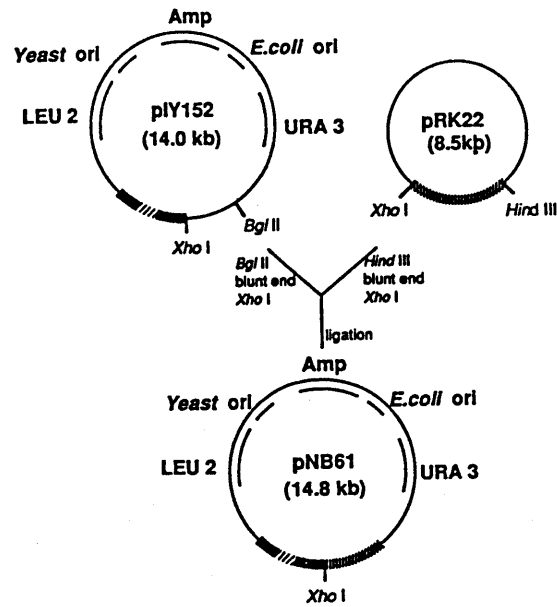


FIG. 1. Construction of plasmid pNB61. Symbols: , glucoamylase promoter; , signal peptide sequence; ; T-S region sequence; , cellobiohydrolase gene.

TABLE 1. Activity of cellobiohydrolase in the medium secreted by various recombinants and NA10.

Strain	Cellobiohydrolase activity ^a in the medium (U/L)	References
<i>S. cerevisiae</i> YIY345/pNB61	13.1	this study
<i>S. cerevisiae</i> 2230/pNBY1	0.5	13)
<i>S. cerevisiae</i> YIY345/pIY152	0.1	this study
NA10	5.7	9)

^a PNPC was used as a substrate in this reaction.

ラーゼ遺伝子を Bal31 で部分的に切り縮め XhoI リンカーを接続して作製した。このようにして作製したセロピオヒドロラーゼ分泌ベクター (pNB61) をパン酵母に導入した。Table 1 にはこの組換えパン酵母、また、以前作製したパン酵母で機能するプロモーターや分泌シグナルを持たない組換え酵母のセロピオヒドロラーゼの分泌生産能を示す。グルコアミラーゼの分泌シグナル、T-S 領域を用いることにより分泌能が著しく高まることが明らかとなった。また菌体内及び培地中に分泌生産されたセロピオヒドロラーゼを SDS ゲル電気泳動及び活性染色により調べたところ、菌体内、培地中ともに 36 K のセロピオヒドロラーゼのバンドと、37~130 K に分布する活性を有する幅広いバンドが見られた (図 3)。一方、180 K のバンドは培地中のみ観察され、PAS 染色よりこのバンドは糖鎖が附加していると考えられる。細胞内画分の 36 K のバンドを切り出し、DBM ペーパーにプロットした後 N 末端アミノ酸配列を決定したところ、このセロピオヒドロラーゼは T-S 領域とセロピオヒドロラーゼの連結部で切断されていた (図 2)。

この結果より、細胞内画分にある 36 K のセロピオヒドロラーゼは T-S 領域が切断されてしまったため分泌されなかった可能性が示唆された。そこで T-S 領域とセロピオヒドロラーゼの接続領域の XhoI サイトに 8 塩基よりなる BamHI 又は BglIII リンカーを導入し、プラスミッド pNB62 及び 63 を構築した。BamHI 及び BalIII リンカー挿入により Leu-Glu がそれぞれ Leu-Asp-Gly-Ser-Val-Glu、Leu-Asp-Arg-Ser-Val-Glu に変換された (図 4)。図 5 には、これらのプラスミッドを持つパン酵母のセロピオヒドロラーゼの生産を培養経過をおって測定した結果を示す。リンカーの挿入により全体の生産量は増加し、BamHI リンカーを挿入した pNB62 では 2.5 倍、BglIII リンカーを挿入した pNB63 の場合は 3.5 倍生産されていた。図 6 にはこれらの酵母の細胞を分画し、細胞内、ペリプラズム、培地中の活性の分布を測定した結果を示すが、これら 3 画分におけるセロピオヒドロラーゼの割合は、リンカー挿入をしていないものと同じであり、分泌能が増強されているということはない。

現在までの所、なぜリンカーの挿入により生産量が上昇したかはまったく不明である。今後、セルラーゼの分泌能を高めるべくアミノ酸置換の効果調べる予定である。

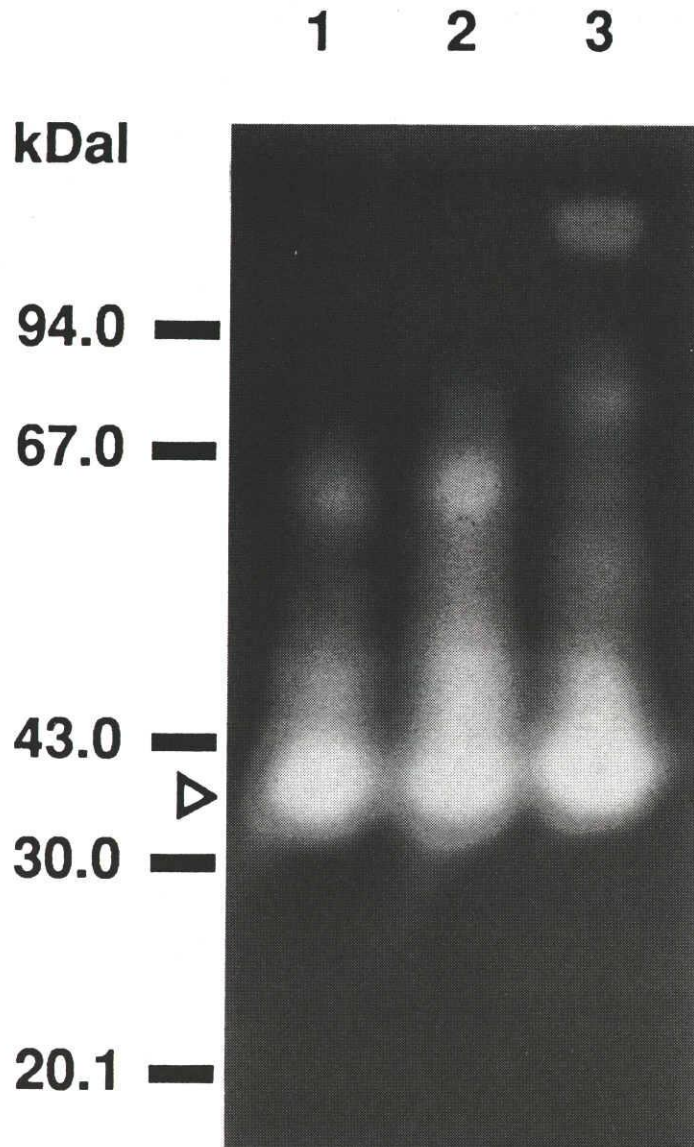


FIG. 3. Cellobiohydrolase active stain of cellular fractions prepared from the recombinant yeast, *S. cerevisiae* Y1Y345/pNB61 after SDS-PAGE. Lane 1, intracellular (cytosolic and periplasmic) fraction, lane 2, intracellular fraction after heat treatment, lane 3, the fraction in the medium. Triangle (36 kDal) indicates the cellobiohydrolase activity which was prepared for amino acid sequence analysis from intracellular crude enzyme solution (lane 1) as described in Materials and Methods.

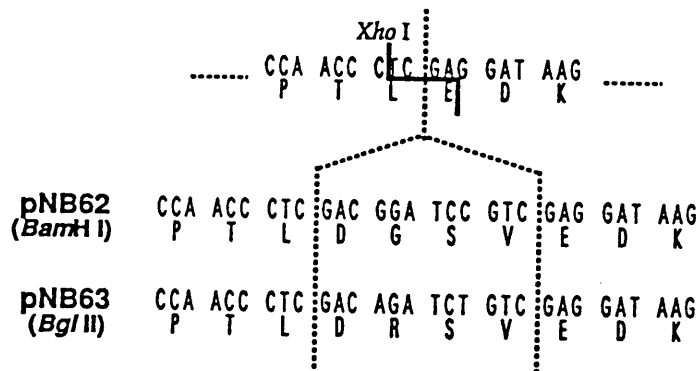


FIG. 4 Construction of linker-inserted plasmids, pNB62 and pNB63. The unique *Xho*I site of pNB61 was blunt-ended, and then ligated with non-phosphorylated 8-mer of *Bam*HI and *Bgl*II linkers, respectively. The resultant plasmids were introduced into *S. cerevisiae* YIY345.

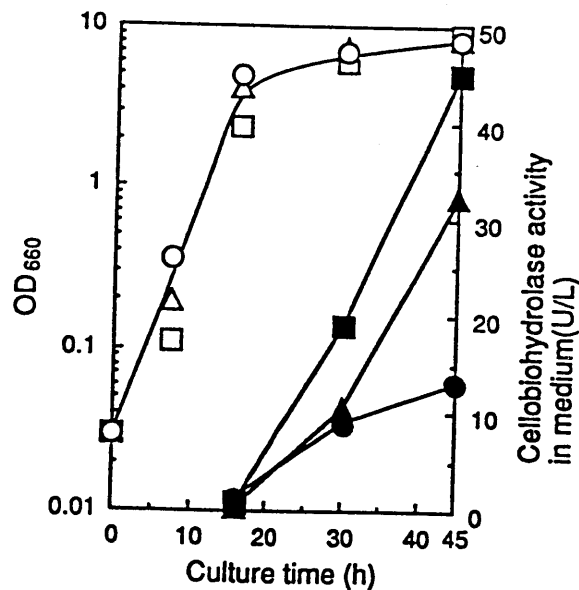


FIG. 5 The cellobiohydrolase activity in the medium of *S. cerevisiae* YIY345/pNB61 (circle), pNB62 (triangle) and pNB63 (square). Open and closed symbols indicate cell growth and cellobiohydrolase activity in medium, respectively.

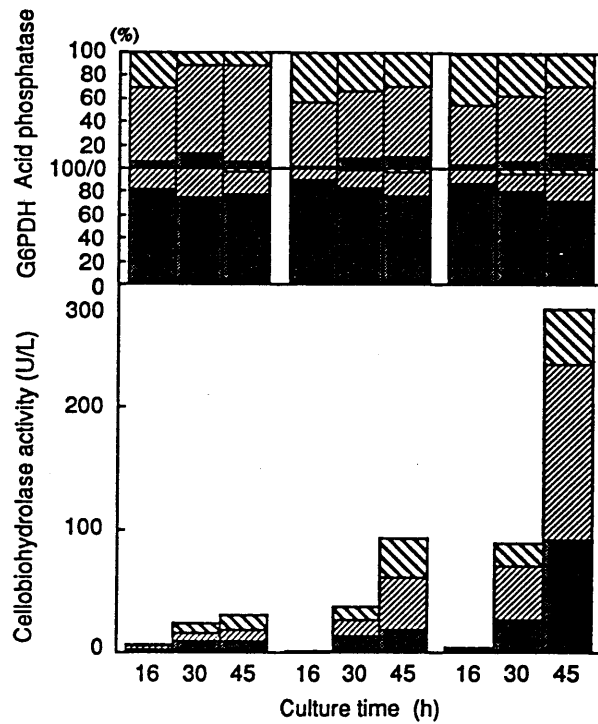


FIG. 6 Localization of the cellobiohydrolase in *S. cerevisiae* YIY345/pNB61 (left), *S. cerevisiae* YIY345/pNB62 (center) or *S. cerevisiae* YIY345/pNB63 (right). Percentage of activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase, acid phosphatase and the cellobiohydrolase in the recombinant yeast was measured. Symbols: ■, cytosol; ▨, periplasmic space; ▩, medium.

回転対陰極型X線発生装置を利用する蛋白質結晶のラウエ回折法の可能性

佐藤能雅，今井啓之，中迫雅由（東京大学薬学部）

蛋白質結晶の構造の変化を時間の経過とともに解析するため、シンクロトロン放射光の白色X線成分を利用するラウエ回折法の開発が近年急速に進展しつつあり、ミリ秒さらにマイクロ秒のオーダーの短時間のX線照射で回折像が得られるに至っている。ラウエ回折法の利点としては、このような時分割実験はもちろん、波長可変のデータが得られること、短波長成分による回折データでは試料等による吸収が少ないことが挙げられる。

一方、通常の実験室レベルで用いられるX線管では白色X線の成分の強度は低く、放射光に比してせいぜい約 10^{-4} 倍程度である。そのスペクトル分布では 0.5 \AA 近辺にピークがあり、ラウエ回折法で有効な 1 \AA から 2 \AA の領域では回折強度は著しく低下する。したがって実験室レベルでのラウエ法は有効な回折データ収集法とは考えられなかった。その理由としては従来用いられてきた写真フィルムの感度が短波長では著しく低下することも挙げられる。しかし、波長可変データによる多波長異常分散法等の適用を目的とする場合や、吸収が少ない短波長データを用いることによる解析精度の向上を目的とする場合には、露光の時間的な要素はあまり重要ではなく、実験室レベルでラウエ回折法を実現することは意義がある。また、1分程度で回折像を得ることができれば、分オーダーの構造ダイナミクスの研究が実験室レベルで随時可能となる。しかも放射光の利用にはマシンタイムの制約があり、実験室で予備的なラウエ回折実験が可能となれば放射光利用のミリ秒オーダーの構造ダイナミクス研究にも有用である。

本研究では、多波長データおよび短波長データを通常の実験室レベルで収集することを目的とし、また、単色X線による振動写真法よりもX線露光時間が短ければデータ収集法として有望と考えられることから、実験室レベルのX線源を用いるラウエ回折法の検討を行った。X線検出器としては短波長でも感度が高いイメージングプレートを用いた。

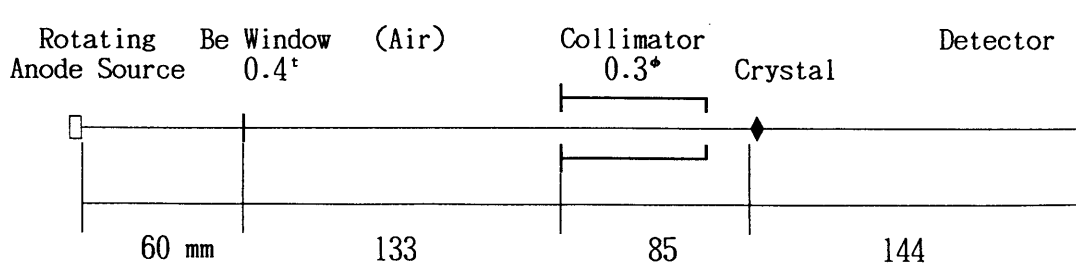


図1. 実験で用いたX線光学系の配置

1. 実験配置と結果

今回は図1に示す配置で、通常は2重収束ミラーと振動カメラを銅ターゲットの微小焦点の回転対陰極X線発生装置に組み合わせた光学系から2重収束ミラーを取り払い、回折像をイメージングプレート検出器に記録した。検出器は回折像を平板状のプレート（富士写真フィルム社BAS-III）に露光し、このプレートを円筒状のドラムに装填して読み取るスキャナー型の試作品を用いた。読み取りのピクセルサイズは縦横とも100 μmである。

結晶試料としてはニワトリ卵白リゾチーム（結晶の大きさは約0.6 mm）を用い、X線源の実効的な焦点サイズは縦横とも約0.4 mmであり、管電圧を55 kV、管電流を80 mAに設定し、回折像を得た。図2に5分間の露光で得た回折像を示す（バックグラウンドの計数値を差し引いて斑点を鮮明化してある）。なお、結晶の方位はa軸がX線ビームに平行で、c軸が上方に向いている。図3はc軸をX線ビームと平行にしたときの回折像であり（グラフィクスのハードコピーの制約で縦方向に縮小されている）、厚さ15 μmのニッケルと厚さ10 μmの銅のフィルターを用いて露光した回折像をそれぞれ併せて示す（露光時間はいずれも5分間）。

図4に回折像のシミュレーションによるパターンを示す。これは次式により期待される平均の回折強度を見積もり、最も高い平均回折強度に対する比が0.03までの反射をプロットしたものである。

$$I_{\text{ave}} = Q(\lambda) \cdot I_0(\lambda) \cdot \lambda^2 \cdot f^2(\sin\theta/\lambda) \cdot \exp(-2B \sin^2\theta/\lambda^2)$$

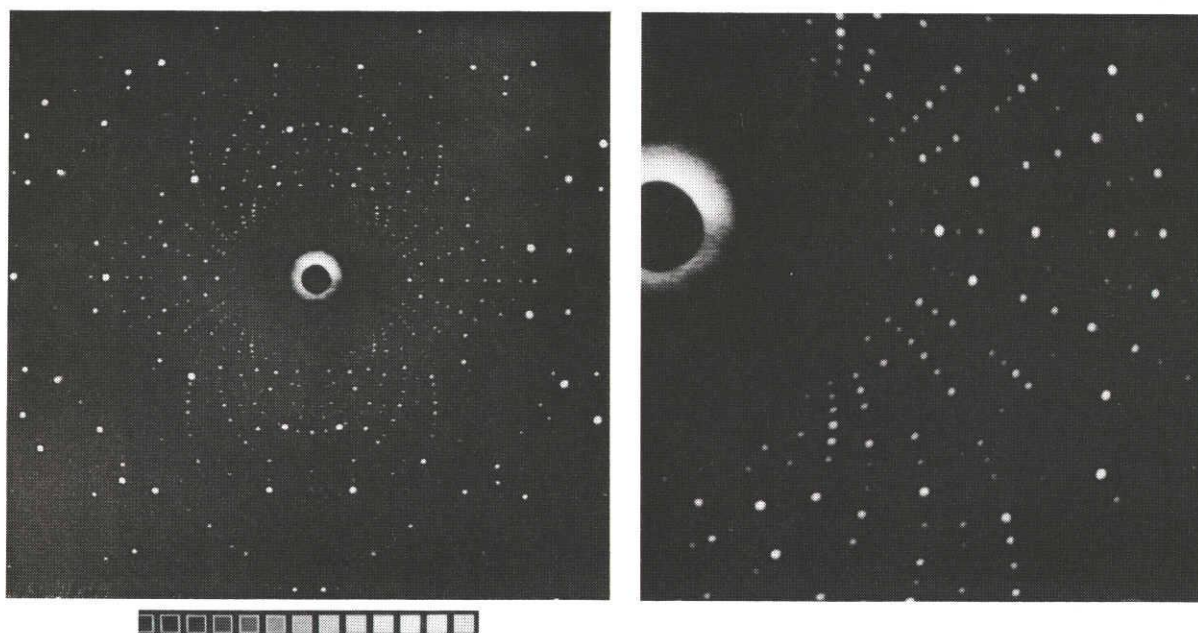


図2. 卵白リゾチームのラウエ回折像（右方は左方の回折像の中心部を拡大したもの）。

ここで、 Q は波長 λ での検出器の感度、 I_0 は波長 λ でのX線源のスペクトル分布、 f は蛋白質を構成する原子の平均的な原子散乱因子、 θ はブラッグ角、 B は平均の温度因子である。このように平均強度を考慮すれば実際の回折像によりよく対応するシミュレーションの回折像が得られる。

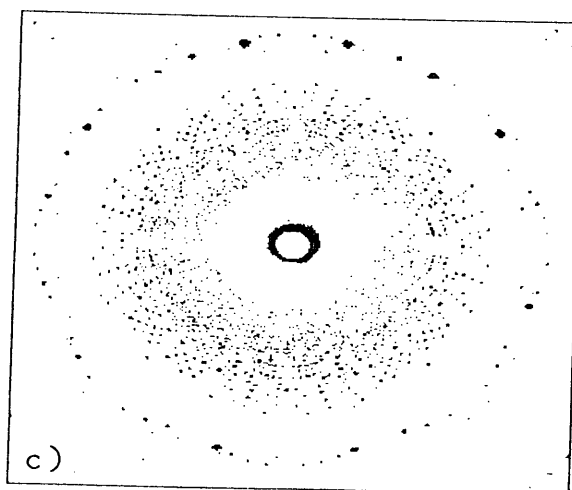
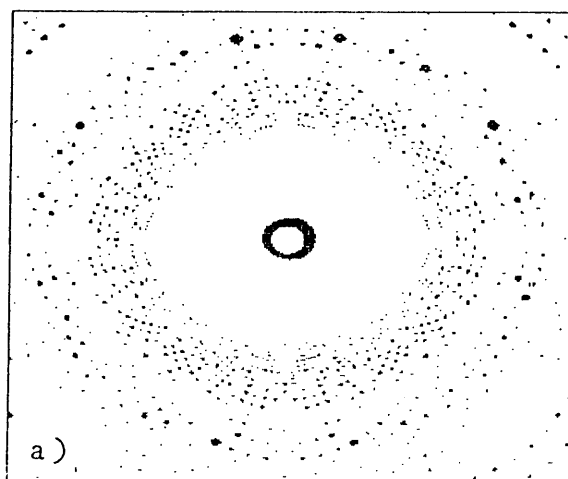
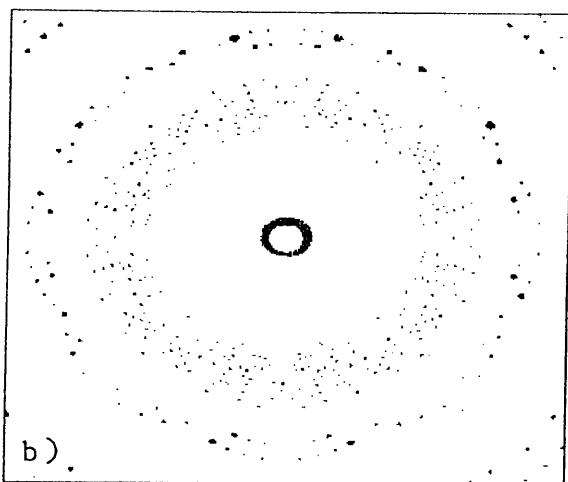
2. 実験室X線源によるラウエ法の可能性

図2を見ると回折斑点の形状は振動写真法での形状と同様に良好であり、またカメラ長が短いのに拘わらず鮮明に分離している。記録されている反射数は約2千と多い。中央には多くの反射が見られ、特性X線による反射は30分の1程度と少ない。

図3では、ニッケルのフィルターを用いて顕著に現れている斑点が銅の $K\alpha$ 線によるものであり、銅のフィルターでは $K\alpha$ 線と $K\beta$ 線による反射が強調されている。これらフィルターを用いた両方の回折像の差分をとると、 $K\alpha$ 線と $K\beta$ 線間の波長による回折像が得られ、振動写真

図3. 卵白リゾチームのラウエ回折像。

a) はフィルター無し、b) では厚さ $10\mu\text{m}$ の銅のフィルターを、c) では厚さ $15\mu\text{m}$ のニッケルのフィルターを用いた。



に似た回折像が得られることになる。この手法は放射光利用の実験で結晶の方位の調整に役立つと考えられる。得られた回折像では反射の面間隔が概ね 3 Å より小さい反射は少なく、0.3 Å 以下の短波長の成分による反射も極めて少ない。反射の大多数は 1 Å 以下の短波長成分によるものであり、積分強度は数千光子に相当し、強度の一致度も良好である。

本検討では全反射の積分強度を得るには至っていないが、記録された回折斑点の形状と分離は良好であり、微小焦点の X 線管に試料をより接近させるなど実験配置を工夫すれば、1 分以内で回折像を得ることが可能であることを示している。銅ターゲットでは回折に寄与する白色成分と特性線の波長が重なっているが、表 1 に示すように銀では短波長、クロームでは長波長の側に特性線が現れ、ビーム取り出し角、管電圧と管電流などを最適化すればより最適な波長分布が得られると期待できる。白色成分の強度として銀が有利であるが、特性線が短波長側に現れるの強度を低下させずに特性線を除去することはモリブデンなどの全反射ミラーを用いたとしても困難である。一方、クロームではチタンをフィルターとすれば特性線を除去でき、有効な波長域での減衰も少ない。今回の検討では電流値を増やすことができなかつたため高い管電圧を印加したが、電流を多くして電圧を低く押えればスペクトルの長波長側のビーム強度を高めて回折強度を増大させることは可能である。このように実験室レベルでのラウエ回折法の実用化の見込みは有り、多波長または短波長での回折データの収集、反応が分オーダーで進行する現象の時分割実験では適用が可能と考えられる。

実用化に際しては、白色成分のスペクトルに特性 X 線が混入するような元素の存在が問題となる。とくに、ターゲット材に不純物が無いこと、フィラメント材からタングステン（表 1 の金に近い L 線が多く現れる）などをターゲット面へ沈着させないことが必須である。また、ベリリウムなどビーム取り出し用の窓材やミラー材にも使用するスペクトル域に吸収を生じる元素が含まれないことも重要である。

表 1. 対陰極ターゲットと特性 X 線の波長

Target materials	Cu	Mo	Ag	Cr	Co	Ni	Fe	Au
Maximum loads for typical anodes; kW (0.3×0.3mm ² focus)	5.4	5.4	5.4	4.5	3.6	3.6	1.3	3.6
Emission lines; Å								
α K	1.54	0.71	0.56	2.29	1.79	1.66	1.93	0.18
β K	1.39	0.62	0.49	2.08	1.61	1.49	1.75	0.15
β L _I			3.83~7					1.07~10
β L _{II}			3.93					1.08
α L _{III}			4.16					1.28
β L _{III}			3.80					1.04~11
β L _I			3.60					1.02

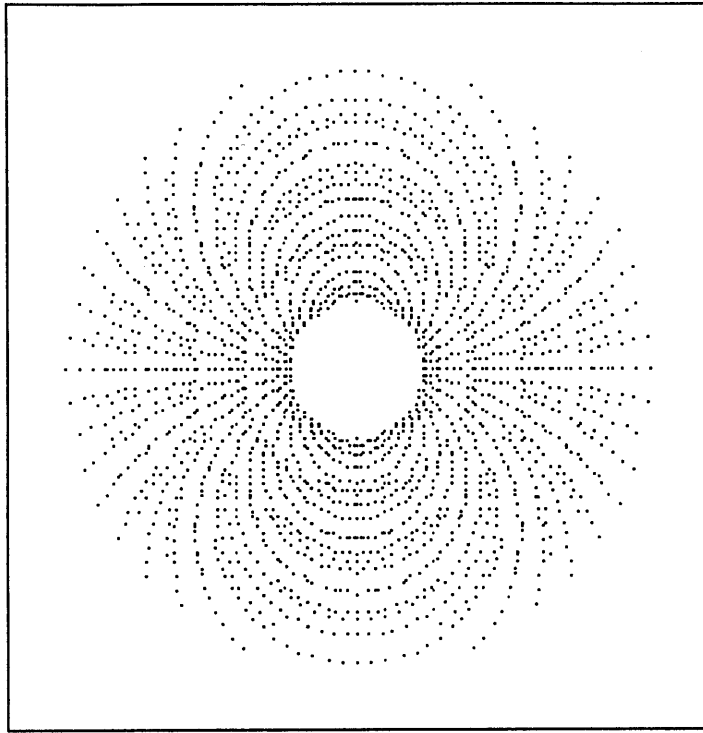


図4. 図2の回折像に相当するシミュレーション回折像。

H UタイプDNA結合蛋白質の構造解析
(非対称単位中に複数の分子がある場合の分子置換法の適用)

北海道大学理学部 田中勲

【はじめに】 DNA結合蛋白質HUは原核生物の細胞中に普遍的に存在し、DNAに超らせんをつくることで知られている蛋白質である。単量体あたりの分子量は9,500で細胞中では2量体として存在している。Bacillus stearothermophilus から精製したHU蛋白質はいくつかの異なる結晶型に結晶化する。すでに私たちはP2結晶の構造解析を行っているが、今回は硫酸から結晶化したP2₁結晶の構造解析を行った。表1に両結晶の結晶学的データを示した。P2結晶では、非対称単位に3個のサブユニットが存在し、それぞれ、この空間群の持つ2回軸で2量体を形成している。P2₁結晶はP2結晶の約2倍の体積を持つことから、非対称単位中には6個のサブユニット、つまり、3個の2量体が存在すると考えられた。HU蛋白質は、疎水結合により非常に強固な2量体を形成しているので、P2結晶中の2量体構造をリジッドモデルとして、分子置換法による構造解析を適用した。

空間群	格子定数	V _m (Z)
P2	a=65.5, b=37.3, c=65.5Å, β=114.5°	2.50(6)
P2 ₁	a=53.4, b=132.3, c=36.6Å, β=97.4°	2.20(12)

表1 Bacillus stearothermophilus HUの2つの結晶型

非対称単位中に複数個の分子が存在する場合の分子置換法は、そうでない場合に比べてはるかに困難になる。それは、単に決めるべきパラメータの数が増加することだけによるのではなく、パターン関数をサーチする場合に、決めようとする分子以外の分子からの寄与がすべてノイズとして働き、

そのために個々のサーチがクリヤーな結果を与えないことにもよる。一般に、分子置換法で構造解析を行う場合には、まず分子の方位を決定し、しかる後に格子中の分子の位置を決定する。しかし、複数の分子が非対称単位に存在する場合には、複数の分子のパラメータの決定順序をどうするかによって、解析の手順はいく通りも考えられる。

【分子置換法一般的なアプローチ】

非対称単位に3個の2量体を持つこの結晶の解析にあたり、まず、一般的な分子置換法を試みた。すなわち、2量体をリジッドモデルとして、分子の方位を決定すべくサーチして、得られたピークについてそれぞれ並進サーチをし、さらにリジッドボディリファインメント(CORELS)を行った。その結果を表2に示した。構造因子の計算に含めることのできるモデルが、全体の構造に比して小さいために、並進サーチの計算結果は、明瞭なピークを与えなかった。この段階でこの方法は断念した。

回転サーチ (ピーク値)	並進サーチ (相関係数)	CORELS (R値)	2量体軸の方向 (a,b,c 軸となす角)
A (24)	A-1 (0.082)	0.528	66,53,138
	A-2 (0.072)	0.504	
B (23)	B-1 (0.105)	0.514	95,47,42
C (25)	C-1 (0.129)	0.504	47,71,138
	C-2 (0.126)	0.506	
	C-3 (0.120)	0.524	
D (21)	D-1 (0.102)	0.492	41,85,137
	D-2 (0.094)	0.495	
E (20)	E-1 (0.175)	0.506	97,91,1
	E-2 (0.168)	0.507	
	E-3 (0.162)	0.516	
	E-4 (0.160)	0.497	
F (17)	F-1 (0.117)	0.505	12,102,93
	F-2 (0.112)	0.502	
G (23)	G-1 (0.106)	0.514	122,78,138
H (17)	H-1 (0.142)	0.473	12,102,97
I (22)	I-1 (0.071)	0.509	104,55,138
J (24)	J-1 (0.083)	0.524	91,49,138
K (20)	K-1 (0.151)	0.507	89,102,167
	K-2 (0.133)	0.498	
L (23)	L-1 (0.084)	0.524	138,80,43
M (22)	M-1 (0.072)	0.512	91,49,42

表2 分子置換法(一般的アプローチ)の結果 Eが正解の方位の1つ

表2にあるように、振り返って見たとき、正解の方位については並進サーチで高い相関係数を与えている。しかし、正しい分子の方位は1つしか得られておらず、また、並進サーチで残っていたピークの中に正解は1つもなかった。つまり、かなり低いピークまで使わなければ正解にたどりつかないことを示している。従って最終的な解に至るまでには、非常に多くの組合せについてチェックしなければならないことを意味しており、これは不可能ではないまでも、非常に多くの計算を要する。

【結晶の特徴を利用した分子置換法】 結局、この結晶の解析は結晶の持つ特徴を利用することによって成功に導くことができた。P2結晶ではb軸の長さは37Åであり、この方向に2量体分子は2回軸を平行にしてスタッキングしている。P2₁結晶ではc軸がこれに相当する長さを持っている。また、表2の結果からも、c軸方向に分子の2回軸があるように見えた。そこで、まず、これを確認するために self rotation search の計算を行った。この計算には図1aで定義される polar rotation matrix を利用した。図2は、この結晶がc軸方向、a*軸方向に2回軸を持ち、b軸方向の結晶学的な2回軸と共に、222の回転対称を持っていることを示している。図3はc軸方向まわりの回転対称を調べたものである。c軸方向には2回軸のみならず4回軸に相当するピークもあることを示している。

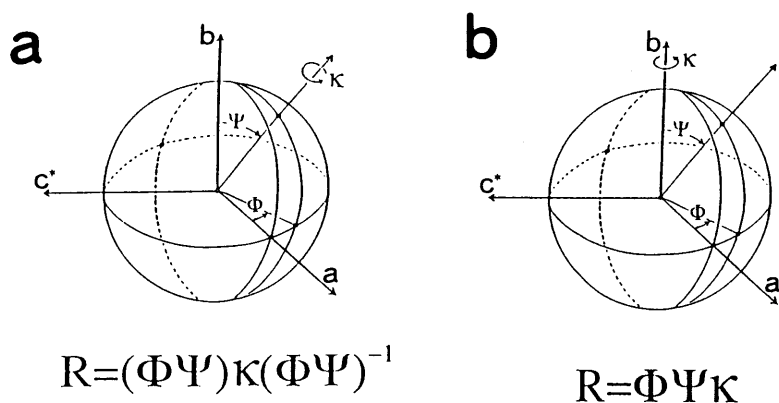


図1 セルフ回転関数 (a)
クロス回転関数 (b)
に利用したマトリクス

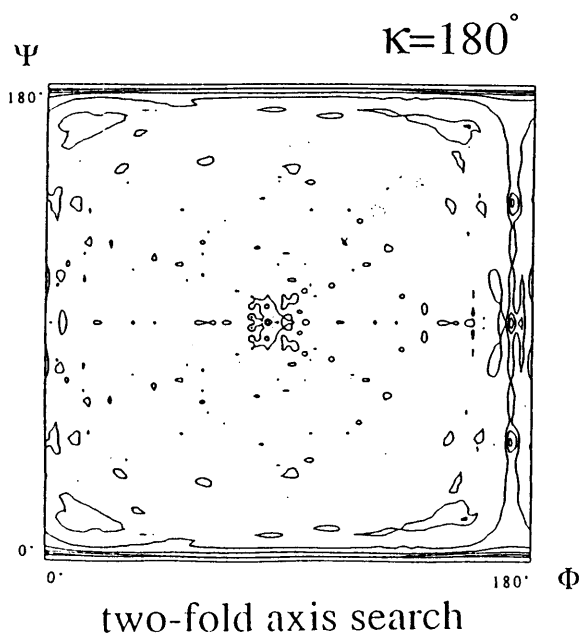


図2 セルフ回転関数 (2回軸のサーチ)

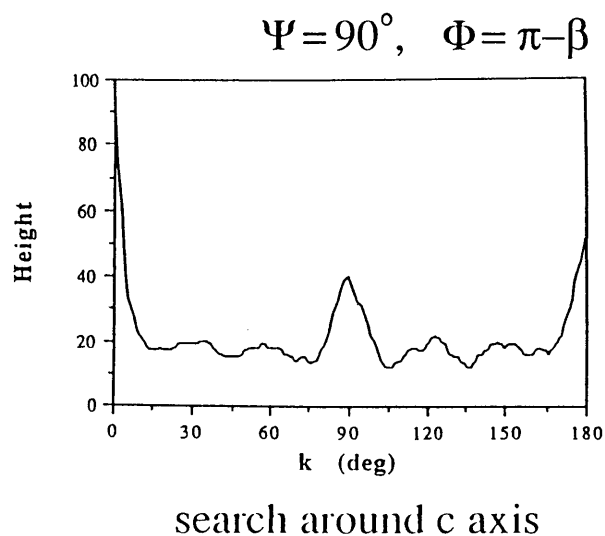
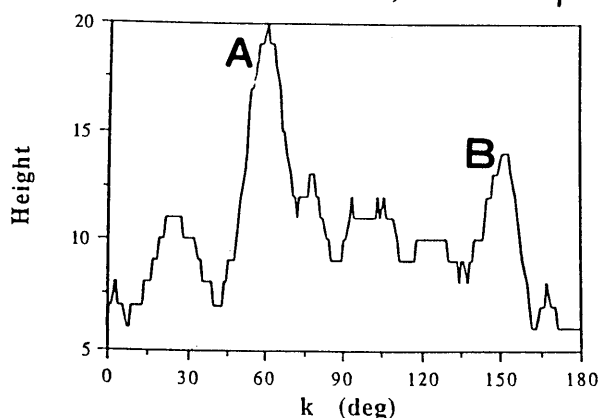


図3 セルフ回転関数 (c軸まわりの回転)

次に2量体モデルを使った cross rotation search を行った。このためには図1 bで定義した rotation matrix を使用した。モデル分子の2回軸をb軸方向に向け、このマトリクスで回転すれば、 (ϕ, ψ) で示される回転で、分子の2回軸の方向が self rotation searchの際の (ϕ, ψ) で定義された回転軸と同じ方向を向くようになる。分子置換法の一般的なアプローチで数多くのピークが得られたように、この場合でも3次元のマップには多くのピークが存在する。しかし、c軸回りの回転に相当する1次元のマップ

(図4)には、明瞭な1つのピーク(A)の他に、これの半分程度のピーク(B)とそれ以外の小さなピークしか存在しない。(A)から90度離れた(B)を2つ目の方位と考えることで、c軸回りの4回回転対称を説明できる。3つ目の明瞭なピークが存在しないことから、(A)のピークは縮退しているのではないかと考えた。もし、それが正しいのなら、ネイティブのパターソン関数に、方位をそろえた分子の間のベクトルが見られるはずである。事実、パターソン図を計算すると、非常に大きなピークが1つのセクションに存在した(図5)。

$$\Psi = 90^\circ, \quad \Phi = \pi - \beta$$



search around c axis

図4 クロス回転関数(c軸回転)

この段階で、3つの2量体分子の方位のみならずその中の2つの分子の相対位置が求められたことになる。この事は並進サーチを非常に簡単なものにする。すなわち並進サーチでは、2つの2量体分子をつないだものをモデルとして使うことができる。計算に使ったモデルが全体の3分の2に及ぶため、計算の結果、表3に示すとおりの明瞭なピーク

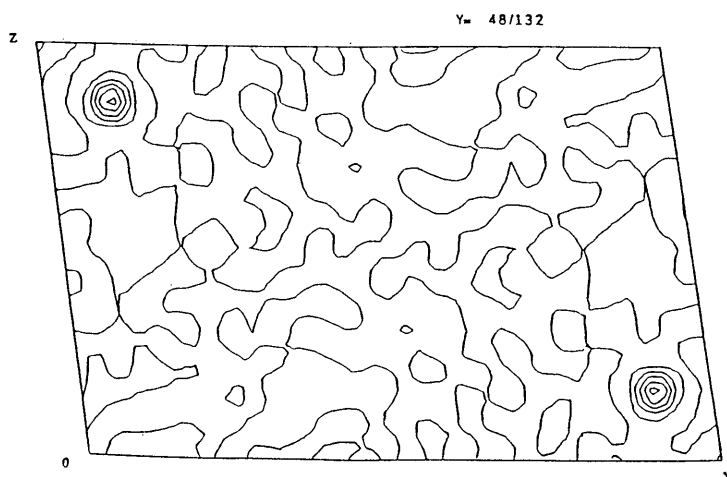


図5 パターソン関数

クを与えた。モデルの座標が、y軸方向の広い範囲に渡っているために、パッキング可能な範囲はかなり狭い範囲 ($0.26 < x < 0.36$) に限定される。No.1のピークはこれを満足している。3分子目のサーチには、はじめに求めた2分子を固定して、その構造因子を予め計算しておき、3分子目を3次元空間で並進して、構造因子の実測値との間の相関係数を計算することによって行った。その結果を表4に示す。パッキングチェックは、分子を直接3次元グラフィクス画面に表示することで行った。No.1のピークのみが満足するパッキングを与えた(図6)。

	correlation	x	z
→ No.1	0.234	0.290	0.470
No.2	0.215	0.160	0.470
No.3	0.209	0.310	0.200
No.4	0.208	0.220	0.260

表3 first two molecules search

	correlation	x	y	z
→ No.1	0.330	0.726	0.183	0.541
No.2	0.300	0.000	0.740	0.090
No.3	0.289	0.560	0.250	0.360
No.4	0.286	0.560	0.340	0.180

表4 third molecule search

【精密化】
 一般に分子置換法が成功したかどうかの判定は、得られた構造を精密化した後に始めて可能になる。得られた座標は、まずPCリファインメントにかけた後に、プログラム X-PLOR Ver2.1 を使って精密化した。3 Åの分解能で、結晶学的なR値 22%を得たことにより、分子置換法で正しい解に到達したと判定できる。

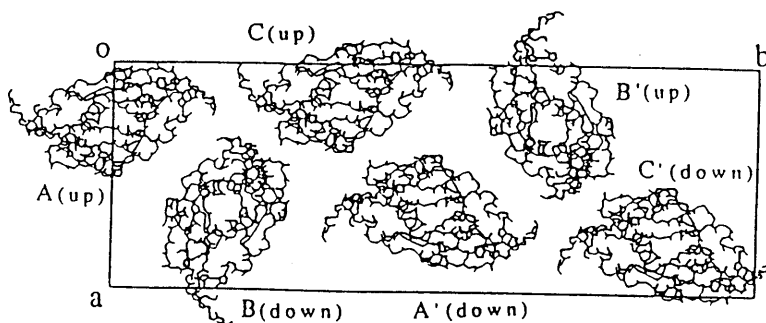


図6 c軸から見たパッキング図
 A, B, Cは独立な3分子
 up, down は分子2回軸の
 相対的な方向を示す。

セルラーゼの分子構造

京都大学化学研究所 畑 安雄

【はじめに】

バイオマス（生物資源）の大部分を占める不溶性多糖を有効利用するには、加水分解して可溶性低分子にする過程が不可欠である。この過程を有効な微生物由来の加水分解酵素を利用して効率よく行うことが、バイオマス資化反応の全過程の制御に繋がる。セルラーゼやキシラナーゼは、この加水分解過程において重要な役割を担う酵素として注目されている。これらの酵素の機能と構造については、よく研究されている糖加水分解酵素のリゾチームと対比されるが、セルラーゼやキシラナーゼには、高分子量酵素と低分子量酵素が存在することが知られている以外にその立体構造に関する情報は殆どなかった。そこで、これらの酵素機能を構造から理解するために低分子量酵素である *Bacillus pumilus* IPO由来のキシラナーゼ（分子量22500、アミノ酸残基数201）と *Aspergillus aculeatus* 由来のFI-CMセルラーゼ（分子量23900、アミノ酸残基数221）に着目し、これら酵素の構造と機能の関係についてX線結晶構造解析による立体構造決定を主としたタンパク質工学的手法を用

いて研究してきた。表1 CM-セルラーゼの物理化学的性質

<i>Bacillus pumilus</i> IPO 由来キシラナーゼの構造と機能については昨年度すでに報告した。本年度は <i>Aspergillus aculeatus</i> 由来FI-CMセルラーゼの立体構造をX線結晶解析により明らかにし、キシラナーゼの構造と比較しながらその構造と機能について考察する。本FI-CMセルラーゼの物理化学的性質は、表1に示す。	分子量	23,900
	アミノ酸残基数	221 a.a.
	等電点	4.8
	安定pH領域	2~9
	至適pH	5.5
	熱安定性	45℃
	至適温度	50℃
	S-S結合	1
		Cys 6-Cys 34

【構造解析】

Aspergillus aculeatus 由来FI-CMセルラーゼの結晶化は、硫酸アンモ

ニウムを沈澱剤とする sitting drop 蒸気拡散法で行われた。0.56%タンパク質溶液50 μ lと等量のリザーバー溶液（30%飽和の硫酸アンモニウム、5 mM CaCl₂、50 mM H₃PO₄ / KH₂PO₄、pH 3.5）を混合して調整した100 μ lの試料溶液を入れた6穴の反応板と1mlのリザーバー溶液を入れた小ビーカー4個をサンドイッチ箱に収納して24℃で2週間放置すると、約1.5 x 0.7 x 0.5 mmの板状結晶が得られた。この結晶は、空間群 $P2_12_12_1$ 、 $Z = 4$ で、格子定数 $a = 52.79$ 、 $b = 106.4$ 、 $c = 33.15 \text{ \AA}$ の斜方晶の結晶で、37%の溶媒を含むものであった。表2に示す条件でウランと白金の2種類の誘導体結晶を調製した。回折強度データは、native結晶については2 \AA 分解能まで、誘導体結晶については分解能2.5 \AA までの反射について四軸回折計で測定した。重原子同型置換法で各反射の位相を決定し、それを用いて計算した電子密度図は、平均の figure of merit が0.796の明瞭なものであった。この電子密度図を基に、グラフィック・

表2 重原子誘導体結晶の調製条件

重原子試薬	UO ₂ (NO ₃) ₂	K ₂ PtCl ₄
試薬濃度	飽和溶液	0.05 mM
Soaking 時間	4 days	6 days
Soaking 溶液	pH 3.5 酢酸溶液	pH 3.5 リン酸溶液 (37.5 % sat. (NH ₄) ₂ SO ₄)
変化率	22.8 %	11.9 %
Site 数	4	1
占有率	Site 1 75.2 % Site 1 66.1 % Site 1 48.3 % Site 1 25.6 %	Site 1 41.1 %
R _{Centric}	0.383	0.583
R _{Kraut}	0.066	0.073

ディスプレイ PS390上で起動する FRODOで分子構造モデルを構築した。得られた構造は、分子動力学法に基づく X-PLORを用いて図 1 に示す手順で精密化した。2 Å 分解能での最終の R 値は 17.5%であった。得られた FI-CMセルラーゼ分子の立体構造を図 2 に示す。

【分子構造と機能】

Aspergillus aculeatus 由来の FI-CMセルラーゼ分子は、45x35x30 Å の卵形をしていて、中央に基質を結合できる溝を有する。

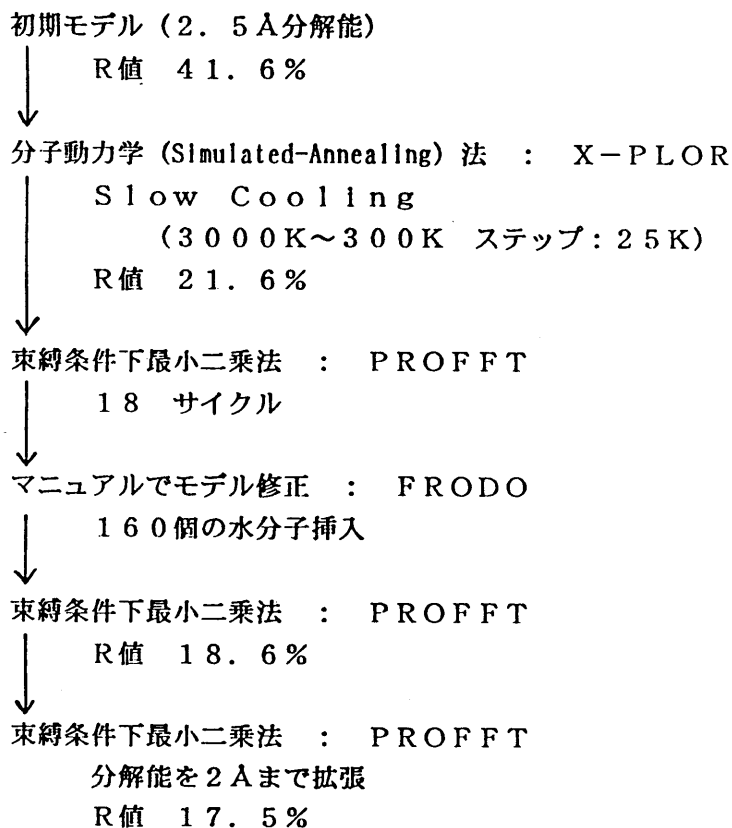


図 1 分子構造の精密化手順

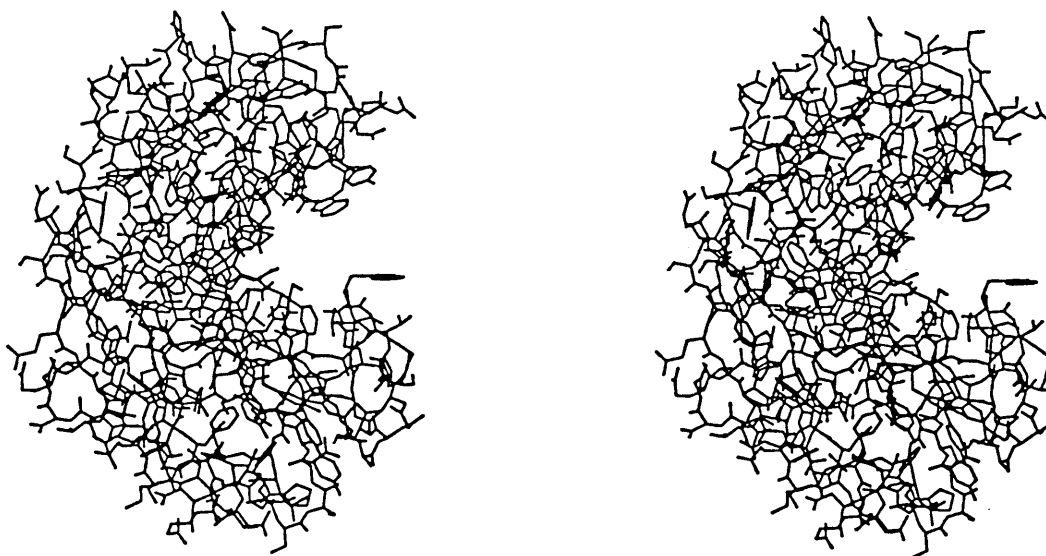


図 2 CM-セルラーゼ分子構造の立体図

この概形上の特徴は、先に解析した *Bacillus pumilus* IPO 由来のキシラナーゼ分子のものと似ているが、図 3 に示すように、二次構造のトポロジー

からみた両酵素の主鎖のフォールディングも類似している。本FI-CMセルラーゼは、 β シート4枚と α ヘリックス1本からなる二次構造に富んだ構造をとっている。N末端側の2枚の大きな逆平行 β シート（B1、B2）は、疎水性残基を内側にして平行に重なり合って安定した構造を形成し、他の大きな β シート（B3）は、 α ヘリックスとの間で疎水的相互作用で安定構造を形成している。これらの両構造領域は、 β シートB2とB3の間で大きく開いて活性部位を含む溝を形成している。ジスルフィド結合や β シート中の短い β 鎖の有無に多少の差異はあるが、主鎖のフォールディングの類似性は極めて高い。これまでのタンパク質の構造研究の結果、アミノ酸配列における類似性の高いタンパク質間では、その立体構造も類似していることが知られている。しかし、一次構造の類似性が18.6%と低い *Bacillus pumilus* IPO由来のキシラナーゼと *Aspergillus aculeatus*由来のFI-CMセルラーゼにおいて立体構造上の類似性が認められることは、興味深い。FI-CMセルラーゼの活性残基の候補としては、活性部を含む溝に側鎖を向けている酸性残基である β シートB2上のAsp97とGlu202 および β シートB3上のAsp101とGlu118に限定することができる。

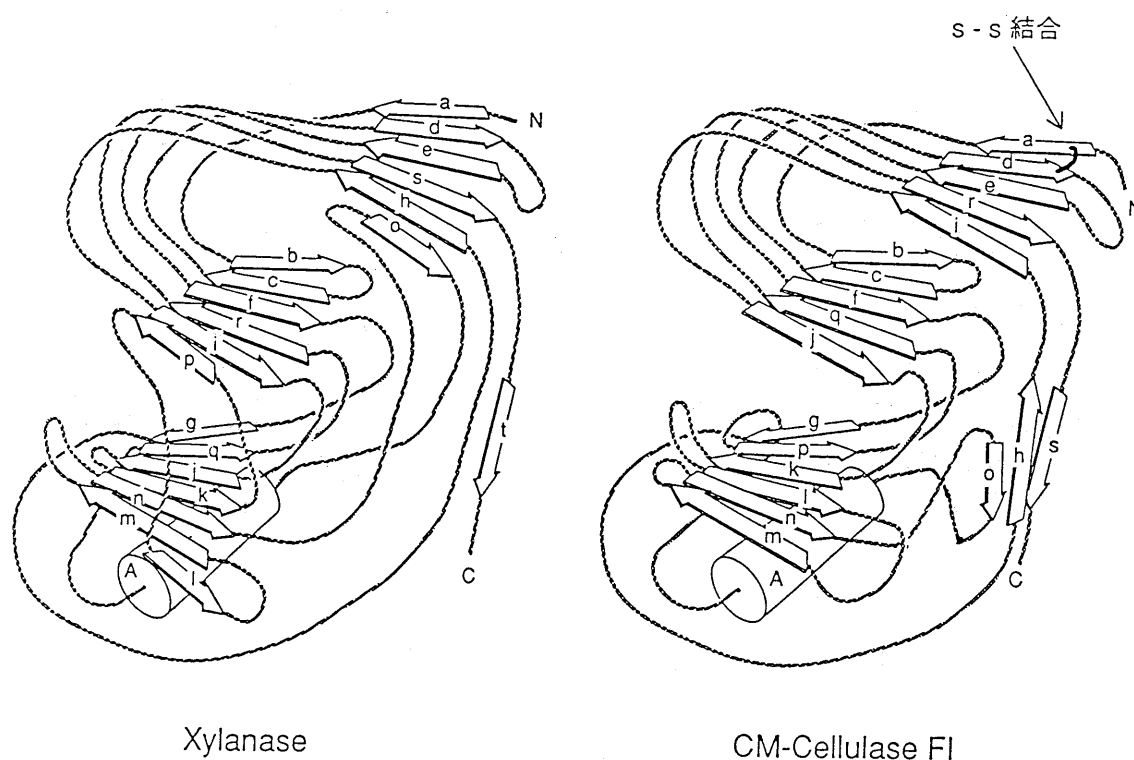


図3 CM-セルラーゼとキシラナーゼの二次構造比較

活性残基が Glu93およびGlu182である *Bacillus pumilus* IPO由来のキシラナーゼとの立体構造の類似性からGlu118とGlu202であると期待される。図4に示すように、これら残基の周辺でのアミノ酸配列の保存性も他の2残基に比べると高い。現在、部位特異的変異法による活性残基の同定実験を進めているところである。

```

          ****          ****          ****          ****
AA : <QQAQLCDQYATYTGGVYTI NNNLWGKD - AGSGSQCTTVNSASSAG 44
AK : <QT - - MCSQYDSASSPPYSVNQNLWG - EYQGTGSQCVYVDKLSSSG 42
EC : ASSSNDADKLYFGNNKY YLFNNVWGKD - EIKGWQQT - IFYNSPIS 43

          ****          ****          ****          ****
AA : TSWSTKWNWSGGENS VKSYANSGLT - FNKKLV - SQISQIPTTARW 87
AK : ASWHTKWTWSGGEGTVKSYNSGLT - FDKKLV - SDVSSIPTSVTW 85
EC : MGWNWHWPSST - - HSVKAYP - SLVSGWHWTAGYTENSGLPIQLSS 85

          97          101          118
-****          ****          ****          ****
AA : SYDNT - GIRADVA - - - - - YDLFTAADINHVTW - - SG - DYELM 120
AK : SQDDT - NVQADVS - - - - - YDLFTAANADHAT - - SSG - DYELM 118
EC : NKSLTSNVTYSIKATGTYNAAYDIWFHT - TDKANWDS SPTD - ELM 128

-***          ****          ****          ****
AA : IWLARYGGVQPIGSQ - IATA TVDGGT WELWYGAN - - - GS - QKTY 159
AK : IWLARYGSVQPIGKQ - IATA TVGGKSWEVWYGTS - TQAGAEQKTY 161
EC : IWLND - TNAGPAG - DYIETVFLGDS SWNVFKGWINADNGGWNVF 171

-****          ****          ****          ****          202
AA : SFVAPTPTITSFQGDVNDFFKYL TQNHGF PASSQYLI - TLQFGTEP 203
AK : SFVAGSPINSWSGDIKDFFN YLTQNGGF PASSQHLI - TLQCGTEP 205
EC : SFVHTSGTNSASLNIRHFTDYL VQTKQW - MSDEKYI SSVPEPTEI 216

          ****          ****
AA : FTGGPATLSVSNWSASVQ 221
AK : FTGGPATFTVDNWTASVN 223
EC : F - GGDGQIDITEWRVDVK 232

```

[*;beta-sheet #;alpha-helix]

Alignment of cellulase amino acid sequences.

AA: *Aspergillus aculeatus* FI-CMCCase (Ooi et al., Curr Genet., 18, 217 (1990))
 AK: *Aspergillus kawachii* CMCCase-I (Sakamoto et al., unpublished data)
 EC: *Erwinia carotovora* CelS (Saarilahti et al., Gene.,90, 9 (1990))

図4 セルラーゼのアミノ酸配列の比較

異常分散を利用した金属蛋白質の X 線構造解析

島根大学 理学部 濱田 賢作

【はじめに】

金属原子・イオン（おもに Fe, Cu, Zn）を含む金属蛋白質の X 線結晶構造解析は、従来ほとんど多重同型置換法で行われ、これらの金属の X 線異常分散効果は X 線結晶構造解析に利用されることはなかった。これは通常の X 線発生装置で得られるそれら金属の異常分散効果は小さく、データ測定、解析が困難であったためである。しかし、放射光 X 線を用いると、異常分散効果の寄与が大きな波長を選択でき、これらの金属の異常分散効果が X 線結晶構造解析に利用できるようになってきた。

蚕の腸管からのセラチア菌が産生する Zn を活性部位に含むセラチアプロテアーゼ（470 アミノ酸残基）¹⁾ の構造解析に Zn の異常分散効果を積極的に適用して良い結果を得たのでこの解析について報告する。

【回折強度測定】

セラチアプロテアーゼの結晶は空間群 $P2_12_12_1$ 、格子定数 $a=109.1$, $b=150.9$, $c=42.6$ Å、溶媒占有率 0.63 である。²⁾ Native 結晶の回折強度は高エネルギー物理学研究所放射光施設において放射光 X 線と巨大分子用ワイセンベルグカメラ³⁾を用いて測定した。測定に使用した波長は 1.000 Å と Zn の吸収端付近の 1.283 Å である。測定データは WEIS プログラム⁴⁾で処理した。Sm-誘導体の回折強度データは理学電機 R-AXIS IIc で収集した。表 1 にデータの処理結果を示す。

【構造解析】

亜鉛の異常分散効果の大きい波長 1.283 Å を用いて得たデータ（NAT-2）による異常分散差パターン関数を計算し、ハーカー面に有為に高い 1 つのピークを得た（図 1）。そして、これは Sm-誘導体からの位相情報による NAT-2 のバイフット差フーリエ合成の結果と矛盾しないことより Zn の位置を決定した。Zn 及び Sm-誘導体からの位相情報を 4 Å 分解能で結合し、Solvent Flatteninig⁵⁾により位相を改善し、3 Å 分解能まで徐々に拡張した

(図2)。14661 ($F > 3\sigma F$) 反射にたいして R 因子は 22.6%, Figure of merit 0.79 であった。これから計算された 3 Å 分解能の電子密度をもとにして、PRODR⁶⁾ を使用して分子モデルの作成を試みた。

表1 回折強度データの処理結果

	Native SR	Native SR	Sm-derivative RU200
X-ray Source	SR	SR	RU200
Wavelength (Å)	1.000	1.283	1.542
No. of crystal used	2	1	1
Axis parallel to spindle	a^*, c^*	c^*	$-a^*$
Resolution limit (Å)	1.8	2.3	2.4
No. of observed reflections	80,539	41,041	65,766
No. of independent reflections	49,531	14,691	22,815
No. of anomalous dispersion reflections		10,890	12,742
Completeness to 3.0 Å (%)	100.0	53.0	91.7
R-merge for all reflections (%)	4.76	3.59	8.74

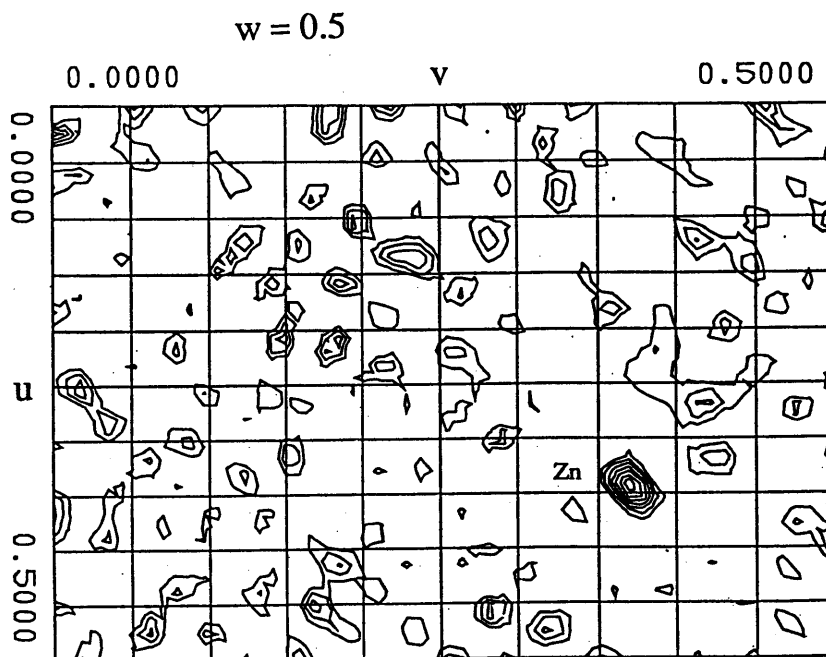


図2 Native結晶の異常分散差パターン図のハーカー面

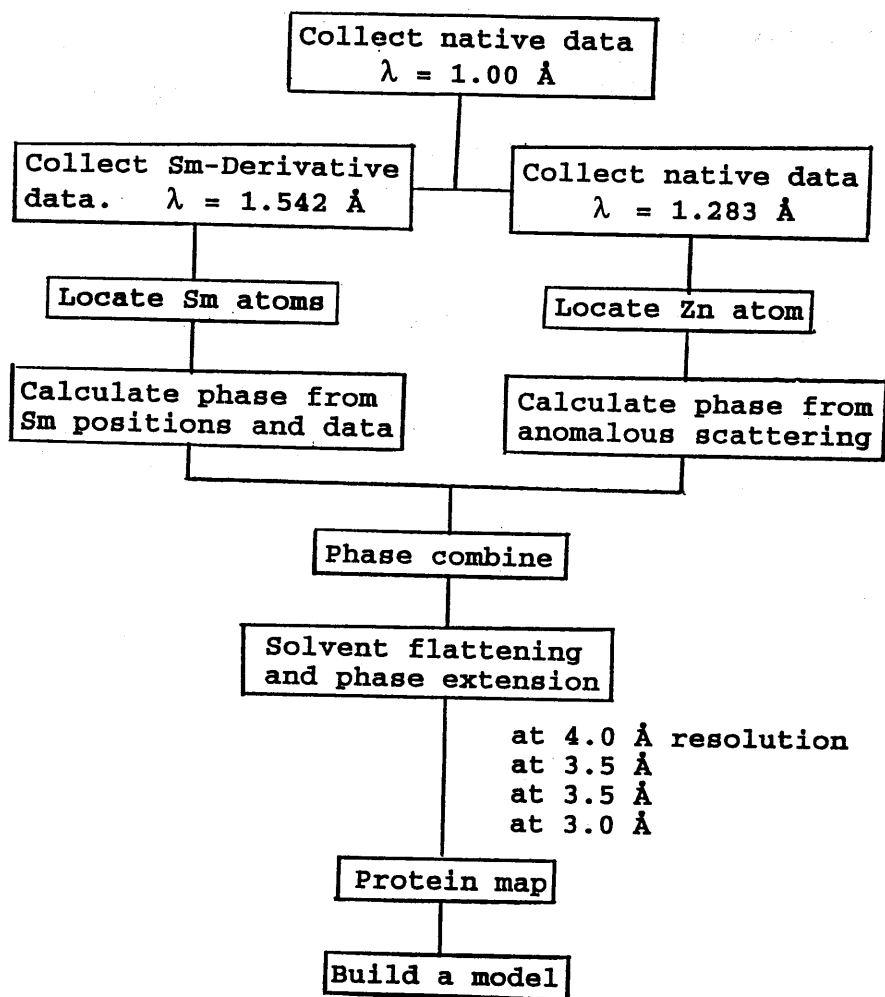


図2 構造解析のフローシート

【結果】

現在までに作成されたモデルを図3に示す。分子は二つのドメインからできている。亜鉛は一つのドメインのまん中近くの溝に位置している（図3の矢印）。このドメインの構造はサーモリシンの構造⁷⁾とよく似ている。このドメイン領域においては電子密度図に主鎖モデルをトレースすることは容易であった。しかし他方のドメイン領域（図3の左側）においては電子密度図がそれほどきれいではなく、現在のモデルではあいまいな部分が多くつがある。Sm-誘導体だけは困難であった解析がZnの異常分散効果を精度良く測定し、解析に適用することにより可能となった。今後、さらに種々の手法により位相の改善を行い、また分解能を上げることにより、詳細な

分子モデルを得る予定である。



図3 現在得られている分子モデル

【参考文献】

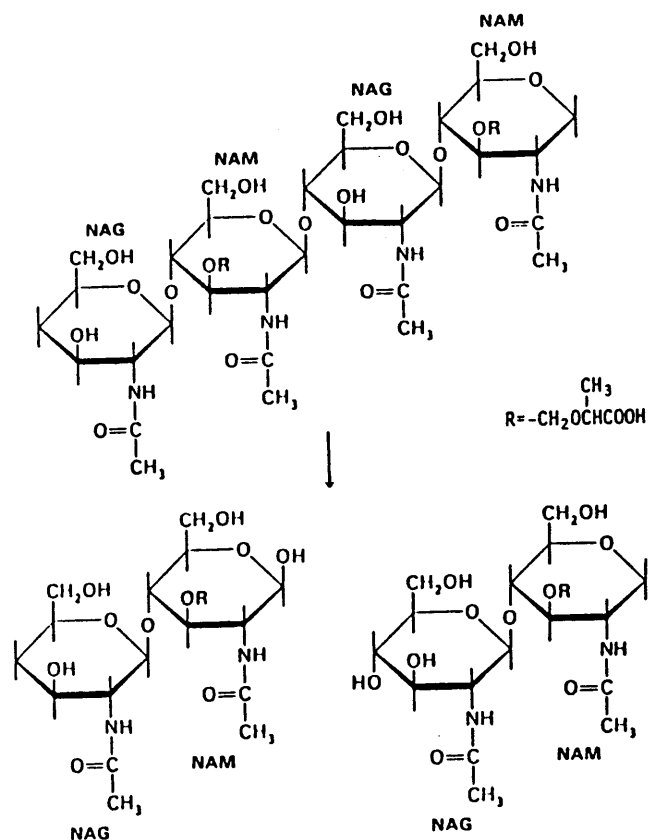
- 1) K. Miyata, K. Tomoda and M. Isono, *Agri. Biol. Chem.* **35**, 460 (1970).
- 2) Y. Katsuya, K. Hamada, Y. Hata, N. Tanaka, M. Sato, Y. Katsube, K. Kakiuch and K. Miyata, *J. Biochem.* **98**, 1139 (1985).
- 3) N. Sakabe, *J. Appl. Cryst.* **16**, 542 (1983).
- 4) T. Higashi, *J. Appl. Cryst.* **22**, 9 (1989).
- 5) B. C. Wang, *Methods Enzymol.* **115**, 90 (1985).
- 6) T. A. Jones, *J. Appl. Cryst.* **11**, 268 (1978).
- 7) B. W. Matthes, J. N. Jansonius, P. M. Colman, B. P. Schoenborn and D. Duporquet, *Nature New Biol.* **238**, 37 (1972).

Streptomyces globisporus が産出する バクテリア型リゾチームのX線構造解析

大阪大学工学部 原田繁春

[序論]

リゾチームはペプチドグリカンと呼ばれる細菌の細胞壁多糖中の β -(1 \rightarrow 4)グリコシド結合を加水分解し溶菌を引き起こす酵素である。このようにリゾチームは細菌の感染に対する防御の役割を担っていることから生物界に広く分布しており、分子量・アミノ酸配列の相同性から4つのグループに分類することが出来る(ニワトリ卵白型、ファージ型、ガチョウ卵白型、バクテリア型)。本研究ではこれまでにバクテリア型に属する

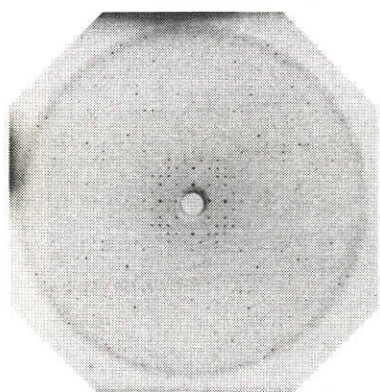
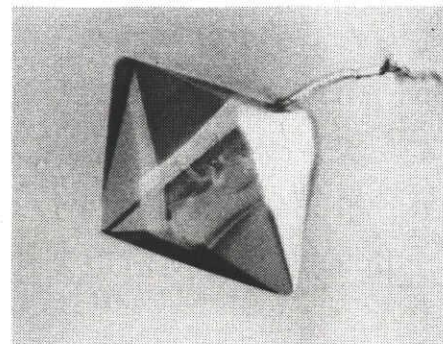


Streptomyces erythraeus のリゾチームの結晶構造解析を行ない他のタイプのリゾチームとは立体構造が全く異なることを明らかにしてきたが、今回 *Streptomyces globisporus* が産出するリゾチームの結晶が得られたのでそのX線結晶構造解析に着手した。尚、このリゾチームはアミノ酸配列がまだ明らかにされていないが、恐らくバクテリア型に属すると考えている。

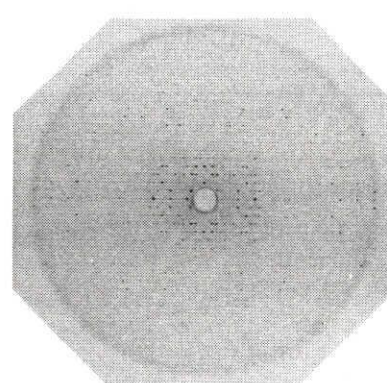
[結晶化・結晶学的データ]

結晶は 0.48M クエン酸ナトリウムを沈殿剤とし hanging drop vapor diffusion 法で得ることが出来た。しかし、再現性が良くなかったので最

初に得られた結晶を砕いて種とし種結晶化法で実験に必要な結晶を調製した。ところがこのようにして得られた結晶は十分な大きさに成長しないので、結晶の成長が止った段階で drop に蛋白質水溶液を加え、結晶の表面を少し溶かし fresh な面をだすことによって大きな結晶を得ることが出来るようになった。空間群は $P 4_1 2_1 2$ ($P 4_3 2_1 2$)、格子定数は $a = b = 63.0$ 、 $c = 121.4$ Å で、非対称単位中に 1 個の分子を含んでいると思われる ($V_m = 2.97 \text{ \AA}^3 / \text{dalton}$)。



hk0 面



h01 面

プレセッション写真 ($\mu = 15^\circ$)

[構造解析]

多重同形置換法による構造解析を行なうため重原子誘導体の検索を行なった。重原子試薬の溶液に soaking したとき溶けたり割れたりしなかった結晶についてプレセッション写真を撮影して、native 結晶からの回折強度変化を調べたところ、2 種の水銀誘導体 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$ 、mersalyl acid) と 1 種の白金誘導体 (K_2PtCl_4) で有為な変化が認められた。そこで高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の巨大分子用ワイセンベルグカメラで、native 結晶と 2 種の水銀誘導体について 2.5 Å 分解能までのデータ収集を行なった。このうち mersalyl acid については回折強度の変化が非常に大きく、同形性が悪かったので $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$ 誘導体のみを使って異常分散効果を

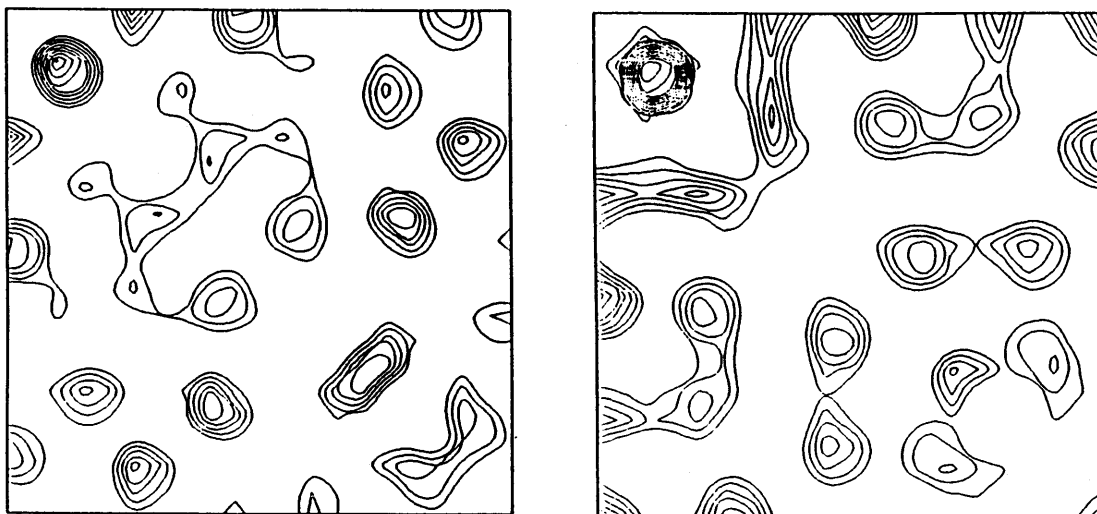
利用した単一同形置換法による構造解析を行なった。native との差パターン関数、異常分散効果を利用した差パターン関数から 重原子位置を求め、重原子パラメーターを精密化し差フーリエ図から minor site を見つけた。5 Å 分解能までの反射の位相角を計算したところ平均の figure of merit は 0.51 であった。結晶格子中の分子境界は 5 Å 分解能の電子密度図から決定することが出来た。しかし、現在得られている重原子誘導体では高分解能の構造解析を行なうことには無理があるので、*Streptomyces erythraeus* の立体構造を利用して分子置換法で構造解析を行なっている所である。

Data Collection Statistics

	Native	C ₂ H ₅ HgCl Derivative	mersalyl acid Derivative
Resolution (Å)	2.5	2.5	2.5
No. of imaging plates used	32	22	15
No. of crystals used	1	1	1
Total number of measurement	61326	50695	34755
No. of unique reflections	8740	15800**	13620**
Completeness of the data (%)	99.1	89.8	76.4
R _{merge} (%)*	7.1	8.5	7.5

$$*R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$$

**These data sets include Bijvoet pair reflections.

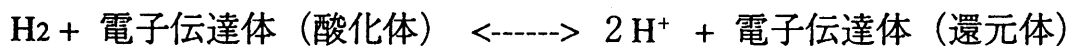


C_2H_5HgCl 誘導体の 5 \AA 分解能の差パターン関数 (左) と異常分散効果を利用したパターン関数 (右) のハーカー面 (ともに $w=1/2$)

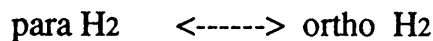
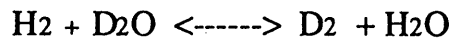
ヒドロゲナーゼのX線結晶構造解析

(姫工大理) 樋口芳樹、安岡則武

微生物が水素の酸化還元を触媒する酵素・ヒドロゲナーゼを持っていることは古くから知られており、将来この水素の発生および分解のメカニズムの工業的利用の可能性が期待されている。この酵素は微生物中の膜表面で電子伝達を伴いながら分子状の水素の酸化還元を触媒する。



また電子伝達を伴わずに下式のように同位体変換反応やパラ・オルト水素転換反応等の触媒能を持つ。



土壤中に生息する偏性嫌気性菌である硫酸還元菌については既に20種類以上の菌株がヒドロゲナーゼを持つことが確認されている。硫酸還元菌ヒドロゲナーゼはその補欠分子族の数、種類やサブユニット構造の違いにより大きく3種類に分類されている。それらは全て鉄・イオウのクラスターをその活性部位に持つが、それに加えてニッケルを持つもの、セレンウムを持つものとクラスター以外には特別の金属原子をもたないものの3種類である。セレンウムやニッケルを持たないヒドロゲナーゼは電子伝達タンパク質のフェレドキシンの部分一次構造を持つことが分かっているが、他の2種類はフェレドキシンと類似した一次構造を持っていない。Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F株のヒドロゲナーゼは分子量91258の膜結合性タンパク質である。活性部位は3個の鉄・イオウのクラスターと1個のニッケル原子で構

成されている。その一次構造は既にVoordouw等のグループにより解析されており長さの違う2本のポリペプチド鎖(分子量28763と62495)から構成されている。活性部位の鉄・イオウのクラスターはシステイン残基の含量の多い、小さな方のサブユニットに保持されているのではないかと報告されている。この分子は硫酸還元菌中で硫酸塩の最終還元物質(硫化水素)の生成のための電子の供給や電子伝達と共役したATP合成に深く関与していると考えられており、この細菌のエネルギー代謝のシステムで重要な役割を果たしている。このための電子伝達体として働くタンパク質は現在のところチトクロムC₃が見つかっている。

我々はこの膜結合性のヒドロゲナーゼを消化酵素トリプシンにより膜表面から抽出して精製、結晶化し重原子多重同型置換法により結晶構造解析にとり組んできている。

結晶は当初、ポリエチレングリコールを沈殿剤としてつくり、ウラン、鉛、水銀、金、白金、イリジウム、タンゲステン、ユーロピウム、サマリウム、ランタン、イットリウム等の重原子の計30種類の試薬について重原子誘導体の調製を試みたが良好な重原子誘導体を得られなかった。そこで沈殿剤を2-メチル2,4-ペンタンジオールにかえたところ水銀の誘導体を調製することに成功した。ポリエチレングリコールおよび2-メチル2,4-ペンタンジオール(MPD)で結晶化した結晶の結晶学的データを表1に示す。両沈殿剤で調製した

表1 沈殿剤による結晶学的データの違い

	PEG1000	MPD
Space Group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a (Å)	102.1	99.9
b (Å)	126.8	128.7
c (Å)	66.9	67.1
Volume (Å ³)	8.66×10 ³	8.63×10 ³
V _M (Å ³ /dalton)	2.43	2.42
V _{solv}	0.49	0.49

結晶は a 軸、b 軸の長さが 2 Å ほど異なるだけで結晶全体の容積や溶媒含量には大きな差はなかった。しかし、結晶性はポリエチレングリコールから析出したほうが良く、1.8 Å 以上の分解能の反射データの測定が可能であった。水銀の誘導体とネイティブ結晶の差パターン図から得た重原子位置 (図 1) を精密化して求めた位相をもとに他の誘導体とネイティブ結晶の 6 Å 分解能の差フーリエ図を計算したところ水銀ほど高い占有率ではないがさらに 5 種類 (水銀 2 種、ウラン、白金、イリジウム) の誘導体についてそれぞれの結合位置を求めることができた。

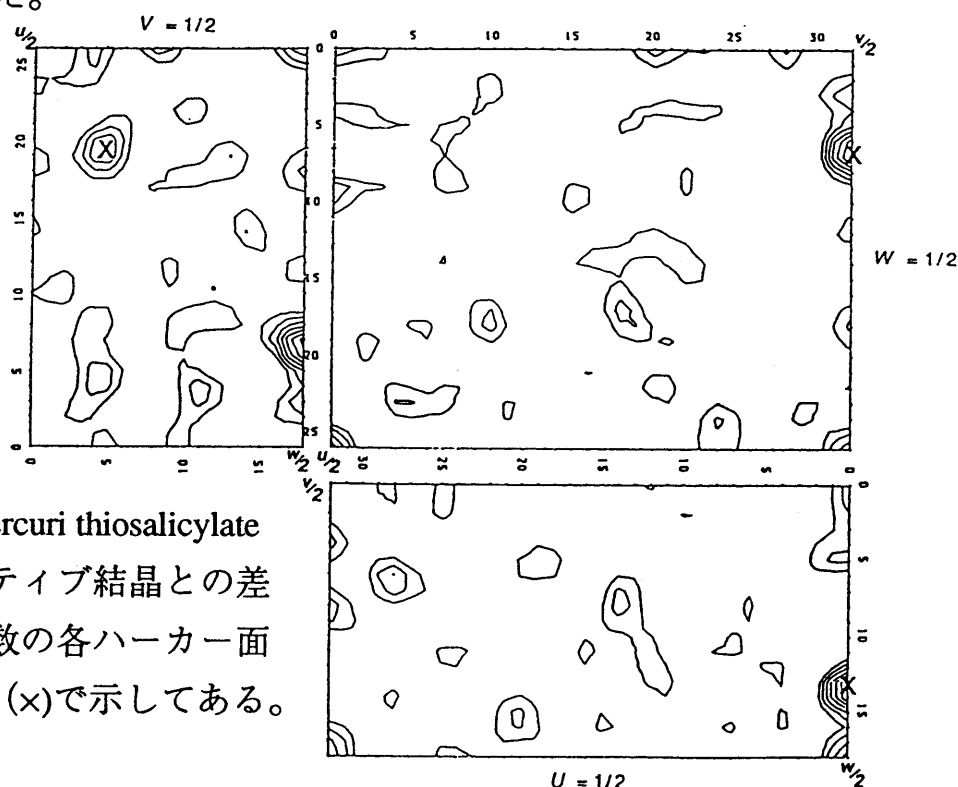


図 1 Etyhl mercuri thiosalicylate 誘導体とネイティブ結晶との差パターン関数の各ハーカ面重原子位置を (x) で示してある。

イリジウムの誘導体結晶の回折データは 4 軸回折計で収集したもので他の誘導体は文部省高エネルギー物理学研究所の放射光施設の巨大分子用ワイセンベルグカメラで測定したものである。それぞれ誘導体の重原子パラメータを表 2 に示す。重原子位置の絶対配置については 6 種の誘導体のうち 5 種類の回折データの異常分散効果を考慮して重原子結合位置を精密化した結果、figure of merit 等の統計的データから正しいと思われるものを決定することができた。これらをもとにネ

イティブ・タンパク質の位相を求め 6 Åにおける電子密度図を計算したところ、分子の境界と活性部位の鉄-イオウのクラスターの候補位置を決定することができた。

表 2

重原子	結合位置(x/a, y/b, z/c)			占有率 ¹	温度因子
EMTS (Ethyl mercuri thiosalicylate)					
EMTS-1	0.684	0.245	0.182	14.5	7.71
EMTS-2	0.177	0.092	0.397	2.50	46.1
EMTS-3	0.615	0.373	0.293	1.44	95.8
K ₃ UO ₂ F ₅					
KUOF-1	0.208	0.188	0.393	18.8	19.4
KUOF-2	0.110	0.086	0.316	6.79	77.1
KUOF-3	0.888	0.222	0.031	6.51	19.2
Mersalyl (Na salt)					
MERS-1	0.177	0.094	0.400	20.5	27.8
MERS-2	0.680	0.246	0.188	6.29	31.7
MERS-3	0.475	0.109	0.321	10.9	47.5
MERS-4	0.414	0.061	0.444	15.8	31.7
K ₃ IrCl ₆					
K3IR-1	0.038	0.267	0.242	7.62	77.6
K3IR-2	0.208	0.188	0.383	6.74	5.71
K3IR-3	0.543	0.352	0.068	2.63	23.4
Phenyl murcuri acetate					
PHHG-1	0.681	0.246	0.183	6.73	5.00
PHHG-2	0.184	0.087	0.400	4.79	19.9
K ₂ PtCl ₄					
KPTC-1	0.199	0.125	0.192	3.61	10.6
KPTC-2	0.616	0.202	0.285	2.58	57.4
KPTC-3	0.218	0.183	0.388	2.65	10.6

1 絶対スケールではない。

小麦の0.19- α アミラーゼインヒビターの結晶化とX線解析

大阪大学 理学部 生物学科 福山 恵一

日清製粉(株) 食品研究所 宮崎 俊之

1. はじめに

α -アミラーゼを阻害するタンパク質、 α -アミラーゼインヒビター(AMI)、は植物界に広く分布することが知られている(1)。それらの α -アミラーゼに対する阻害特異性は様々で、自分自身もつ α -アミラーゼを阻害するもの、昆虫、鳥類や哺乳類の α -アミラーゼを阻害するものが知られている。後者のAMIには、大きく3つのファミリーがあり、異なった阻害特異性をもっている。分子量13kのものはモノマー、26kは同じポリペプチド鎖2本からなるダイマー、50kはテトラマーである。それぞれのファミリーの中に何種類かのAMIが含まれ、それらはクロマトグラフィーなどで分離できる。それぞれのファミリー内のAMIは分子量だけでなく、一次構造も互いに似ている。またファミリー間でも一次構造に低いながら相同性が見られる。従ってこれらのAMIは全て基本的に同じ立体構造をとっていると考えられる。これらのAMIは多くのジスルフィド結合を持っており、一般に熱に対して安定である。

昨年0.39-AMIの一次構造の決定と、その結晶の初期的なX線回折実験について報告したが、今回結晶化の再現性がより高い0.19-AMIをとりあげた。0.19-AMIは124残基からなり、その一次構造は既に決定されている(2)。0.19-AMIは5本のジスルフィド結合を持ち、生理条件下ではダイマーになっている。ここでは0.19-AMIの結晶化とこの結晶についてこれまでに行なったX線解析の結果について報告する。

2. 結晶化

小麦より精製した0.19-AMIを10 mg/mlに濃縮し、100 mM NaClを含む20 mM PIPES 緩衝液(pH 7.0)に放置しておくこと、3角又は6角柱状結晶が析出する(図1)。この結晶のプレセッション写真を図2に示す。本結晶は三方晶系、空間群 $P3_1$ 又は $P3_2$ に属し、格子定数は $a=b=79.3 \text{ \AA}$, $c=60.8 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ である。非対称単位中にダイマーが2個含まれているとすると、 $V_m=2.0 \text{ \AA}^3/\text{dalton}$ となる。本結晶は少なくとも 2 \AA 分解能までの回折を与え、高分解能解析に適している。

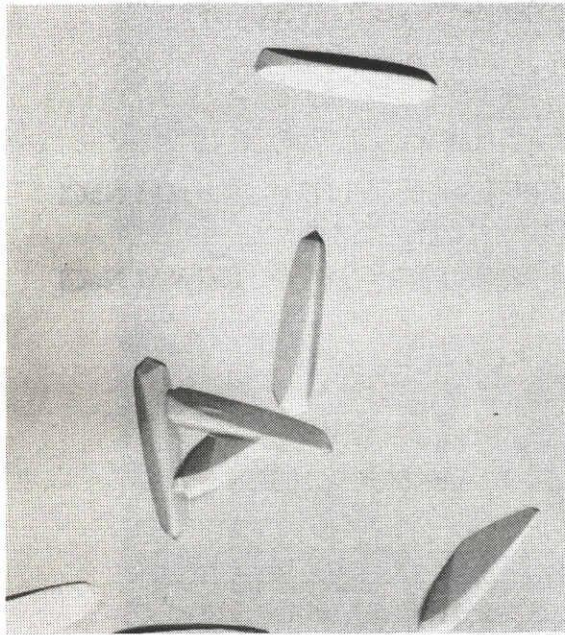


図 1. 0.19-AMIの結晶

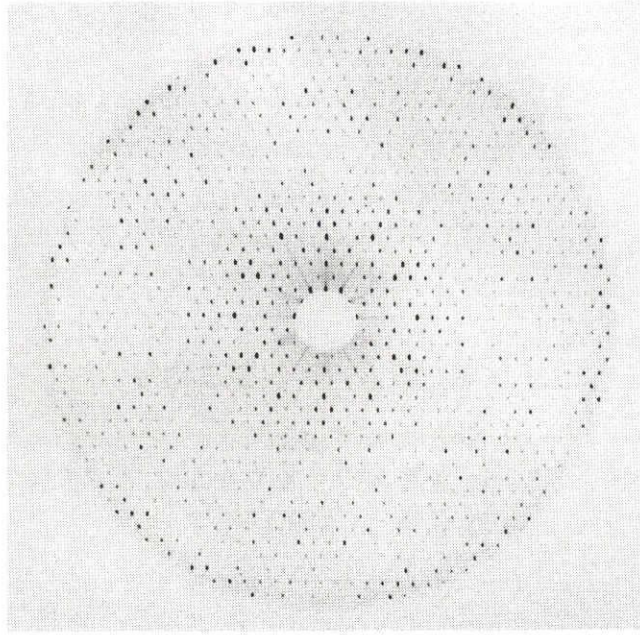


図 2. プレセッション写真 ($hk0$, $\mu=12^\circ$)

3. X線解析

表 1 に重原子誘導体の調製条件と、回折強度の測定条件と結果をまとめた。重原子同型置換結晶は soaking 法で調製した。結晶化母液に各重原子試薬の他、硫酸アンモニウムを加え重原子化溶液とした。回折強度の変化の有無は主に4軸型回折計で調べ、回折強度に変化が見られた結晶については、ひき続き低分解能の回折強度を測定した。Native および誘導体結晶のいずれの場合も c 軸が回折計の ϕ 軸に平行になるようにマウントし、 ϕ による (006) の強度変化をもとに North らの方法 (3) で吸収補正を行なった。結晶のX線による損傷は、測定前後で測定した約 200 個の ($hk0$) 反射強度の $(\sin\theta/\lambda)^2$ に対するプロットより見積り、各回折点の補正值は、測定が始まってからの経過時間と $(\sin\theta/\lambda)^2$ から求めた(4)。

いくつかの重原子試薬を試したところ、これまでに塩化第2水銀と酢酸ウラニル溶液中で結晶を soak すると、有為な強度変化を起こすことがわかった。ウラン誘導体結晶は、強度測定中に除々に native 結晶に戻ることが観測された。なお塩化第2水銀の場合、硫酸アンモニウムを加えないと回折強度の変化が非常に大きく、タンパクの多数の部位に重原子が結合しているようである。

高分解能のX線回折データは放射光と巨大分子用ワイセンベルクカメラを用いて測定した(5)。これらをWEISプログラムシステム(6)で回折強度に変換し、等価な反射強度を平均した。これらの強度と回折計による強度をさらに平均した。

表 1. 重原子同型置換結晶の調製と回折強度測定

(a) 重原子同型置換結晶の調製

- 3mM HgCl₂, soaking 時間 >2 hrs
18 % 飽和硫酸アンモニウム, 20 m M PIPES buffer (pH7.0), 100 mM NaCl
- 5 mM UO₂Ac₂, soaking 時間 約 2 hrs
15 % 飽和硫酸アンモニウム, 20 m M PIPES buffer (pH7.0), 100 mM NaCl

(b) 4 軸型回折計による強度測定

- Ni-filtered CuK α
- ω -スキャン, スキャンスピード; 3°/min, バックグラウンド; 5 s
- 吸収補正, 損傷補正

	Native	Hg-derivative	U-derivative
用いた結晶の数	3	2	3
分解能	3.3 Å	4.4 Å	4.4 Å
測定反射数	12,624	6,501	8,953
独立な反射数	6,270	2,767	2,764
R-value	4.1 %	3.6 %	4.5 %

$$R\text{-value} = \frac{\sum \sum |F - \langle F \rangle|}{\sum \sum \langle F \rangle} \text{ for reflections with } F > 3\sigma_F$$

(c) 放射光による強度測定

	Native	Hg-deriv.	U-deriv.
回転軸	c	c	c
波長 (Å)	1.00	1.00	1.04
振動角 (°)	6.3	6.3	6.3
カップリング定数 (%/mm)	1.5	1.5	1.5
露出時間 (s/IP)	126	126	84
IPの枚数	12	15	15 (10)
分解能 (Å)	2.2	2.4	2.4
測定反射数	25,851	31,340	30,735 (20,510)
独立な反射数	12,870	11,951	11,527 (11,129)
R _{merge} (%)	6.3	5.8	5.8 (4.8)

ウラン誘導体のカッコ内の数字は最初の10枚のIPによる。

水銀の位置は差のパターソン関数から求めた (図 3)。非対称単位中に AMI サブユニットが 4 個含まれていると考えられるが、水銀の major site は 1 個である。重原子パラメータはプログラム LS3D (7) で精密化した。水銀の minor site およびウラン原子の位置は、逐次 D フーリエ合成および DD フーリエ合成により求めた。

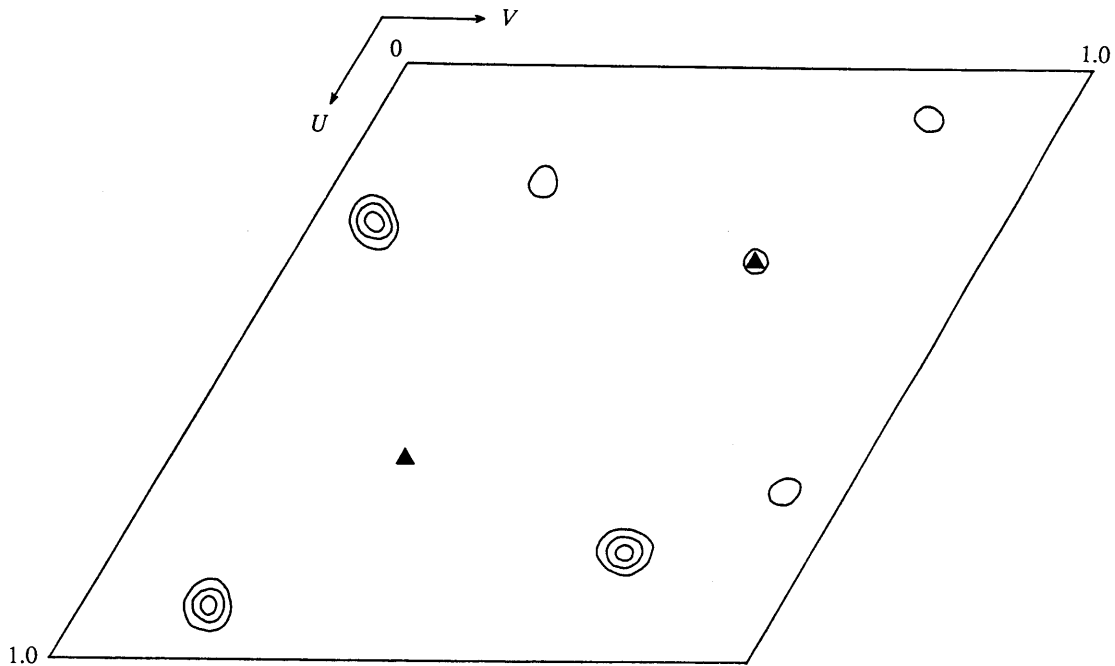


図 3. Native-水銀誘導体の差パターソン関数 ($w=1/3$ のハーカー断面)
15.0 - 4.5 Å分解能の反射を使用

図 4 に 3.5 Å 分解能のデータを用いて行なった重原子パラメータの精密化の結果を示した。平均の figure of merit は 0.639 となった。この結果得られた電子密度には、タンパク領域と溶媒領域の区別が表れた。AMI サブユニット間の相対的配置は現在検討中である。

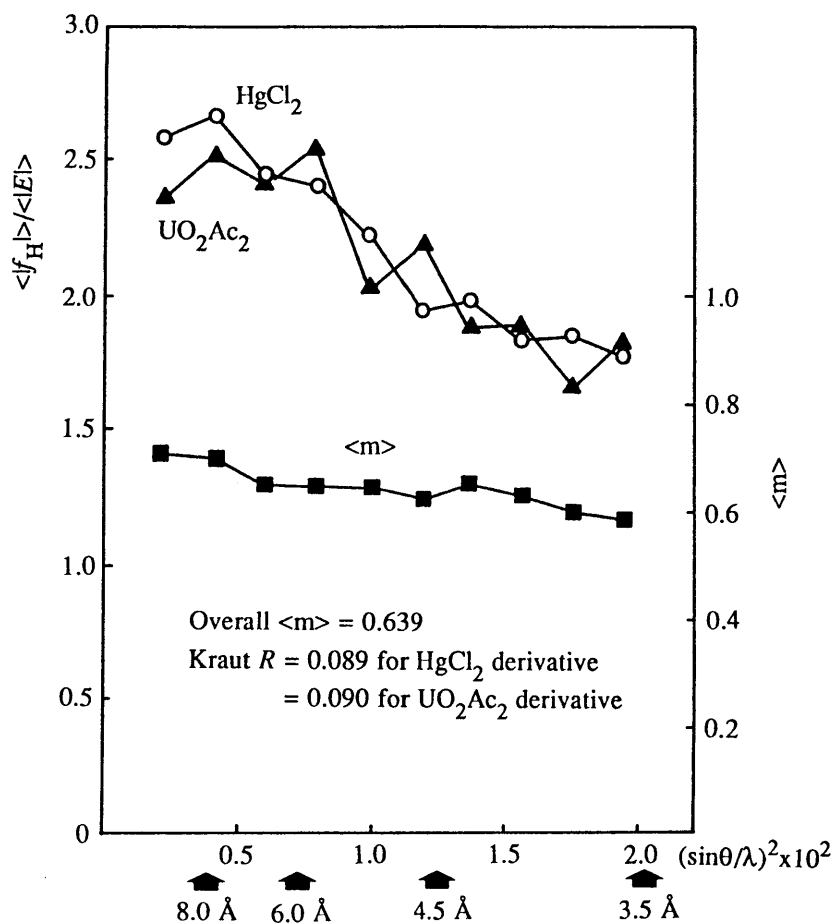


図4. 重原子パラメータの精密化の結果

文献

- (1) V. Buonocore and V. Silano, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 199, 483-507 (1986).
- (2) K. Maeda, S. Wakabayashi, and H. Matsubara, *Biochem. Biophys. Acta*, 828, 213-221 (1985).
- (3) A. C. T. North, D. C. Phillips, and F. S. Mathews, *Acta Crystallogr.*, A24, 351-359 (1968).
- (4) K. Fukuyama, S. Wakabayashi, H. Matsubara, L. J. Rogers, *J. Biol. Chem.* 265, 15804-15812 (1990).
- (5) N. Sakbe, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. A* 303, 448-463 (1991).
- (6) T. Higashi, *J. Appl. Cryst.* 22, 9-18 (1989).
- (7) LS3D, 蛋白質研究所プログラムマニュアル, 大阪大学

1、はじめに

*Pseudomonas stutzeri*のG 4 アミラーゼはでんぷんなどの α -1,4グルカンに作用し、その非還元末端から4ユニットのグルコース(マルトテトラオース)を遊離するexo-型の α アミラーゼである。endo-型の α -アミラーゼについてはすでに、タカアミラーゼ⁽¹⁾(TAA)、ブタすい臓アミラーゼ⁽²⁾(PPA)などの立体構造が明らかにされ、その基質結合モデル及び可能な触媒活性残基も提唱されていた。触媒残基については部位特異的突然変異により活性変化が調べられ、その結果X線解析から予測されたGlu230, Asp297およびAsp206(TAA numbering)をそれぞれ他のアミノ酸に変えると酵素活性が殆ど失われることが確認された。本研究ではこれらのendo-型アミラーゼとの活性部位構造の比較、及び酵素と基質との複合体の構造解析を行い、アミラーゼの活性機構についてのより深い知見を得ることを目的とした。

2、実験

2-1、G 4 アミラーゼ(単独)

G 4 アミラーゼ単独の結晶化は20mg/mlの酵素溶液(20mM TrisHCl, pH7.5)を同じバッファの0.9M硫酸アンモニウム溶液と1:1で混合し、ハンギングドロップ法で行うことにより得られた。結晶学的データを表1に示す。構造解析は同型置換法により、 $K_3UO_2F_6$ と $SmCl_3$ 誘導体についてRAXIS-IIc⁽³⁾により回折データを測定し2.5Å分解能の電子密度図(Figure of merit = 0.72)を得た。分子モデルはFRODO⁽⁴⁾を用いて作成し、精密化は2.2Å分解能のデータに対してXPLOR⁽⁵⁾とPROFFT⁽⁶⁾により行った。その結果17.4%のR値を得た。全アミノ酸残基429個のうち、C末端12残基がdisorderしており、精密化に含めなかった。また66-72番目の残基は活性クレフトの一端に位置しておりdisorderしていたが精密化に含めた。精密化の過程を図1に示す。

2-2、G4アミラーゼ (E219Q mutant) マルトテトラオース複合体

結晶化は酵素 (E219Q) の20mg/ml溶液 (20mM TrisHCl, pH7.5) を10mg/mlのマルトペンタオースと共に、0.9Mの硫酸アンモニウム溶液と1:1で混合し、ハンギングドロップ法により行った。同じドロップ中に外形の異なる2種類の結晶が生成し、X線回折写真より異なる種類の結晶であることが判明した。これらの結晶学的データを表1に示す。X線回折データはどちらの結晶についても1.9Å分解能まで収集した。解析はIの結晶についてはプログラムAUTOMR⁽⁷⁾を用いた分子置換法により、またIIの結晶については同型性を利用して、どちらも2Fo-Fcマップ上でマルトテトラオースが活性クレフト内に結合していることがわかった。現在、マルトテトラオースを含めて、Iについては1.9Å分解能の精密化をほぼ終了し (R=16%)、IIについては2.5Åで精密化の途中である (R=20%)。

3、構造の記述

3-1、G4アミラーゼ⁽⁸⁾

G4アミラーゼのポリペプチド鎖の折れたたまり方はTAAやPPAのそれに類似しており、(β/α)₈バレル構造を主体としたドメインAと、逆平行 β バレルから成るドメインBに分けることができる。ドメインAは残基1-360、Bは361-429までを含む。ドメインAには(β/α)₈バレルとの間にバレルから分岐した領域 (残基117-168) が存在する。これらの構造も他の α アミラーゼに類似している。ドメインBはG4アミラーゼでは5本鎖の逆平行 β シートであるが、これはTAAなどが8本から成るのとは異なっている。またドメインBのC末端の12残基は溶媒中でdisorderして見えない。 α -炭素モデルを図2に示した。2つのカルシウムイオンと2つのジスルフィド結合 (140-150、216-251対) が存在している。2次構造のトポロジーを図3に示した。トポロジーから見るとドメインBの4番目の β 鎖がTAAの4本の逆平行 β 鎖と置きかわった関係になっている。主鎖の平均温度因子の分布を見ると、2次構造の間に存在するループ部で一般に大きな値を示している。とくに残基66-72のループは大きく、ほぼdisorderしていることがわかった。このループはちょうど基質糖鎖の非還元末端が結合する部位に近く、exo型を決定する末端認識に関与している可能性もある。2つあるカルシウム

結合サイトのうち、1番目は α アミラーゼに共通して存在する位置にあり、活性クレフトの構造を安定化することに寄与していると考えられる。サイト2は(β/α)₈バレルの底付近、N-末端アミノ酸が関与する位置にあり、温度因子も大きい。 α アミラーゼにおいては2番目のカルシウムの位置は保存されていないことが多い。カルシウム配位構造を表2に示した。サイト1は7配位、サイト2は6配位で、後者にはヒスチジンのN原子の配位が見られ、カルシウムへの配位原子としては蛋白質としては珍しい。また塩橋はドメインAの各所に見られ、全部で18個を数えた。結合水は全部で88個見いだされたが、埋もれて主鎖原子と水素結合しているものは26個を数えた。活性クレフトの詳細な構造を図4に示した。Glu219, Asp294, Asp193は触媒活性残基と考えられるもので、いずれもクレフトの奥に位置している。クレフトのみぞに沿う両側には芳香族の残基が多く、糖との疎水結合に関与すると考えられる。またクレフトの下端にあるAsp160と3つの活性残基は糖との水素結合に関与すると考えられる。とくにAsp160は66-72ループの向い側にあり、非還元末端認識に関与する可能性が高い。クレフトの奥に存在する結合水WAT430と477は活性残基を架橋する形で水素結合している。

3-2、マルトテトラオース複合体

酵素と基質の複合体の構造を解析することをねらって、酵素活性を喪失した変異体(E219Q)とマルトペンタオースの共結晶を試みた。すなわち、TAAの解析で考えた酵素基質複合体モデルを実際に検証するためである。このねらいが当たれば

マルトペンタオースが切断されないまま酵素に結合する姿を見ることができると考えられる。しかし、結論的には結合していたのは、すでに切断された基質(マルトテトラオース)であることがわかった。これを確認するためにE219Q変異体の活性を高濃度の酵素を用いて測定した結果、微量ではあるが基質を切断することがわかった。結晶中では蛋白質が高濃度であり、基質との接触も充分に行われると考えられることから、本複合体結晶は生成物マルトテトラオースとの間のものであると結論してよい。酵素部分の全体的な構造はもとのG4アミラーゼと比べて殆ど変化がない。しかし、Iの複合体結晶においては、単独結晶においてdisorderしていた66-7

2のループが電子密度図の上で明瞭に見ることができ、ゆらぎが固定されている。これは初め基質結合に伴う構造変化と思われたが、IIの結晶においては、このループがやはりdisorderしていることから、両者の差異は結晶中での分子パッキングの差異によるものと考えられる。実際この部分はIの結晶中では他の分子に接触する位置にある。 マルトテトラオースが結合した活性クレフトの構造の詳細を図5に示す。 マルトテトラオースは全体として孤を描くような構造で、これはアミロースが溶液中でらせん状にコイルする傾向を有することを考慮すると、安定なコンフォメーションだと思われる。 4つのグルコース残基は側鎖のO6の方向もほぼ同じ向きであり、同様な構造をとっているが、非還元末端のグルコース残基は2、3番目にくらべてグルコシド結合のまわりに大きく回転させられている。これは表3に示したように、糖と蛋白質との間の水素結合をみた場合、とくに4番目のグルコースに多くの水素結合が存在し、これが束縛となって向きが規定されたと考えられる。 exo-型を決定する非還元末端の認識は図5、表3に示されるように、糖1のO4がAsp160のOD1とGly158のNと、またO6がAsp160のOD2と水素結合していることにより主として行われていると思われる。 G4アミラーゼ単独ではdisorderしていた66-72のループについては、Trp66が糖2のC1に非常に近いが、ファンデルワールス接触と考えられ、ループと糖の間の強い相互作用はなさそうである。 糖の結合に伴って結合水の状態に変化が生じている。 図5に示される水分子のうち、WAT487, 488, 481, 483, 506, 558, 559, 485は新たに結合しWAT496, 482, 521はほぼ保存されている。 また単独酵素に結合していた水分子(図4)のうち、WAT430, 477は糖の結合に伴って除かれている。 水素結合の数は糖4(還元末端)においてとくに多く、蛋白質分子との間に12、水分子との間で2個見られる。 糖2では2個の水分子との間以外に蛋白質分子との間で水素結合は見られず、主としてファンデルワールス力により結合していると思われる。 糖3ではGln305のNE2との間以外に水分子のクラスタ(WAT481, 482, 483)のそれぞれと水素結合している。

糖の結合に伴う蛋白質分子の構造変化はあまり多くないが、活性クレフト付近では、Asp294の側鎖に目立った動きが見られた。 すなわちAsp294の側が糖4に近づくように動き(OD1 1.6Å, OD2 2.4Å)、OD1がO2と、OD2がO3と水素結合して、糖の結合に強く関与している。

活性3残基Gln219(Glu219), Asp294, Asp193の側鎖は還元末端のグルコシド結合C1-O1を三方から取り囲むように配置している。O1との間には、水素結合距離範囲内にそれぞれの側鎖原子が存在するが距離はあまり近くない。Asp193の側鎖は糖4のO6と水素結合し、またO5とも近い距離にある。糖のO5は水素結合能は強くないが、グルコースの結晶中などでは水素結合が観測されている。Asp193から分子内部に向けて、保存性の高い残基Arg191, Asp112が配列し、塩橋または水素結合が起こっていると考えられる。これらの残基の配置はAsp193の性質を決めるのに重要と思われる、活性機構との関連で興味深い。活性機構の理解は活性3残基の役割を明確にすることであるが、立体構造からは現在のところ決定的なことを言える段階ではない。一般酸塩基触媒機構に基づいて解釈すると、Glu219がプロトン酸触媒として働き、Asp294かAsp193が塩基触媒として働くというのが最も考えられる役割である。しかし部位特異的突然変異によって示されたように、3残基がどれも重要な働きをするとすれば、もう少し複雑な機構を考える必要があるように思われる。

参考文献

1. Matsuura et al., J. Biochem. 95, 697-702(1984).
2. Buisson et al., EMBO J. 6, 3909-3916(1987).
3. Sato et al., J. Appl. Cryst. 25, 348-357(1992).
4. Jones, J. Appl. Cryst. 11, 268-272(1978).
5. Brunger et al., Science 235, 458-460(1987).
6. Finzel et al., J. Appl. Cryst. 20, 53-55(1987).
7. Matsuura, J. Appl. Cryst. 24, 1063-1066(1991).
8. Morishita et al., J. Mol. Biol., submitted.

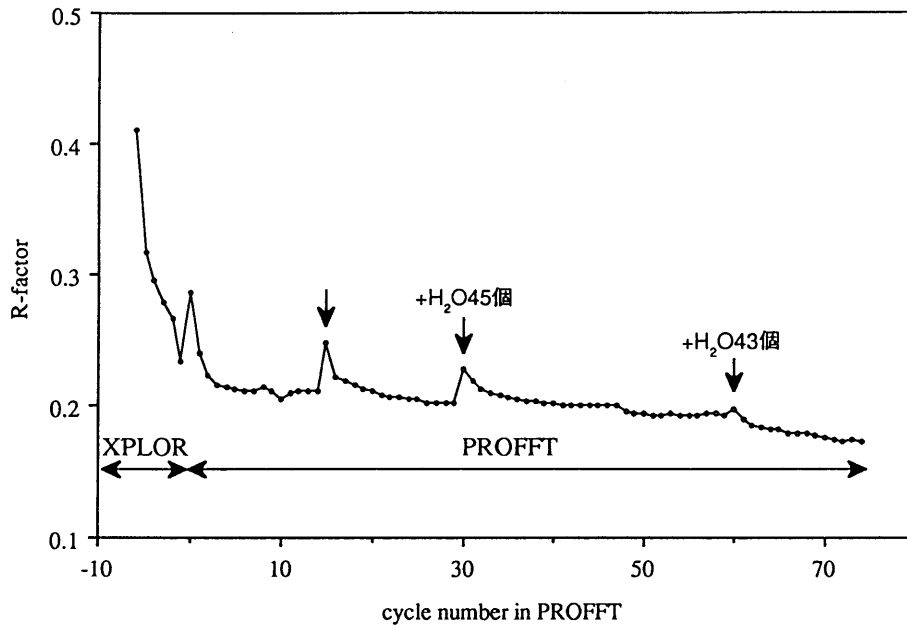


図 1
精密化過程

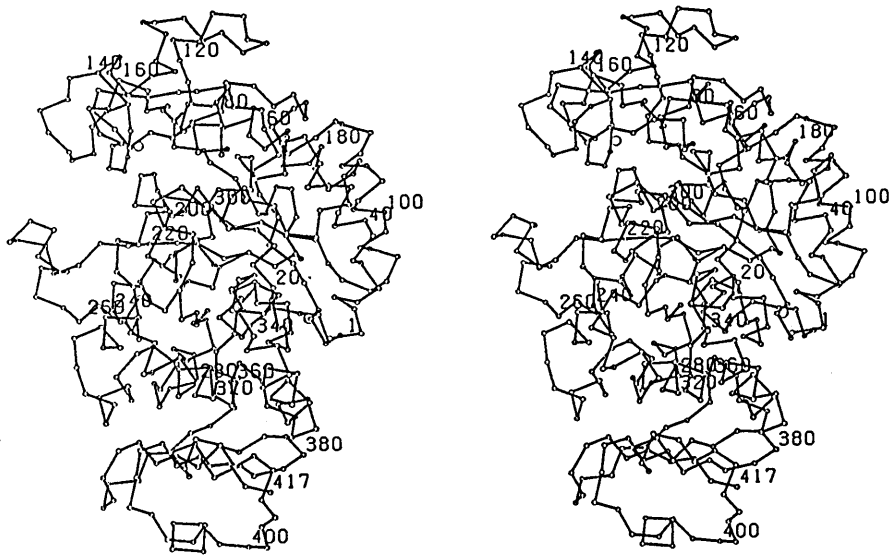


図 2
C- α モデル

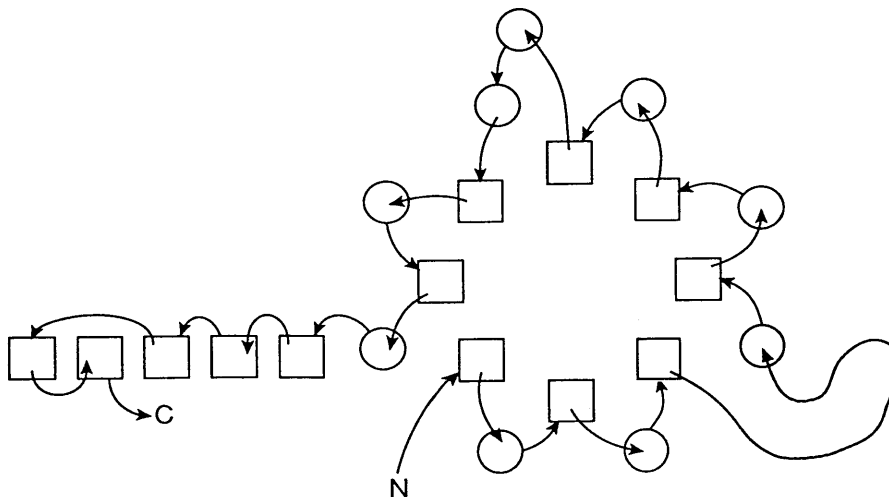


図 3
トポロジー

図4
活性クレフト

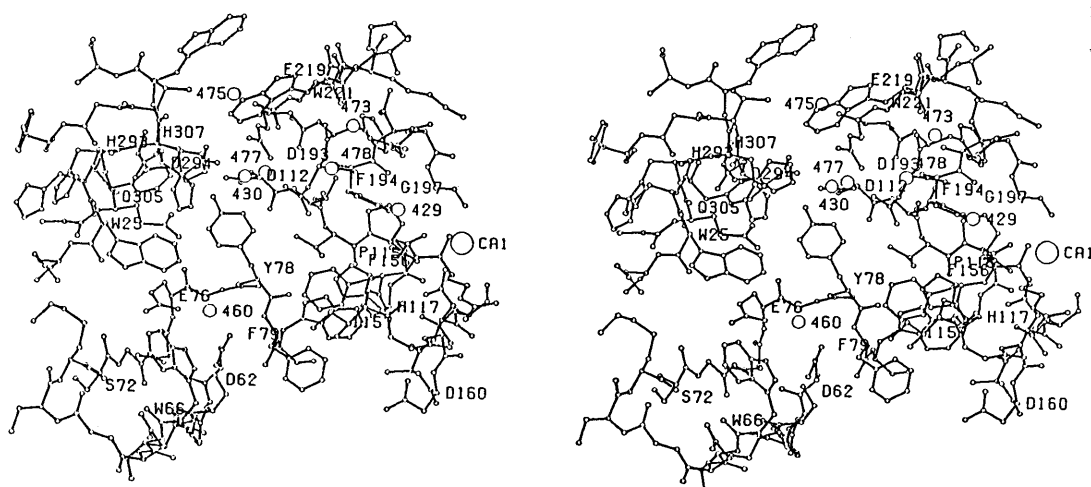


図5
マルチテトラ
オースの結合

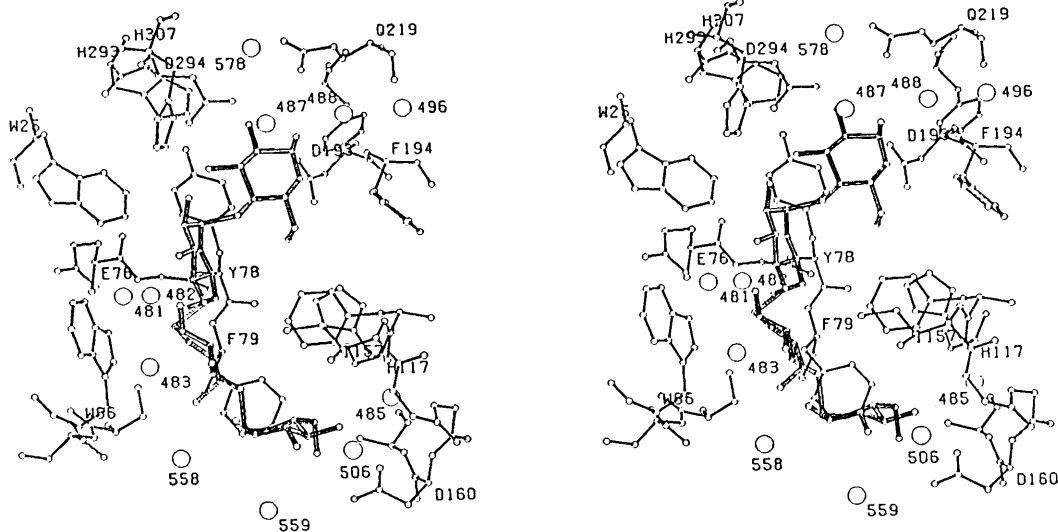


表1、結晶学的データ

	Native	Complex	
		I	II
Crystal system	Orthorhombic	Orthorhombic	Orthorhombic
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>a</i> /Å	65.6	65.1	65.8
<i>b</i> /Å	170.5	138.4	171.2
<i>c</i> /Å	46.7	50.7	46.8
<i>Z</i>	4	4	4
<i>V_m</i> /Å ³	2.77	2.39	2.75
<i>V_s</i>	0.56	0.49	0.55

表 2、カルシウム配位

	Residue	Atom	Distance (Å)
(a) Ca-1			
	Asn116	OD1	2.53
	Asp151	OD1	2.35
		OD2	2.66
	Asp154	O	2.39
	Asp162	OD1	2.19
	Gly197	O	2.43
	WAT467	O	2.51
(b) Ca-2			
	Asp1	OD1	2.20
	Glu2	O	2.87
	His13	O	2.74
		ND1	2.54
	Asp16	OD2	2.54
	Glu17	OE1	2.51

表 3、糖との水素結合

Glc 1					
	O3	WAT	506	O	2.66
	O4	Gly	158	N	3.13
		Asp	160	OD1	2.77
	O6	Asp	160	OD2	2.74
Glc 2					
	O6	WAT	483	O	2.08
		WAT	558	O	2.71
Glc 3					
	O2	Gln	305	NE2	2.66
	O6	WAT	481	O	3.10
		WAT	482	O	2.62
		WAT	483	O	3.25
Glc 4					
	O1	Glu	219	OE2	3.21
		Asp	294	OD1	3.38
		WAT	487	O	3.16
		WAT	488	O	2.44
	O2	Arg	191	NH2	3.05
		His	293	NE2	3.08
		Asp	294	OD2	2.66
	O3	His	293	NE2	3.39
		Asp	193	OD1	3.17
	O5	Asp	193	OD1	3.17
	O6	His	117	NE2	3.33
		Asp	193	OD2	3.10

リポアミド・デヒドロゲナーゼの立体構造解析

東京工業大学 生命理工学部
豊田友彦・松本 治・竹中章郎

【はじめに】

解糖系とクエン酸回路を結び付けるために、ピルビン酸を酸化的脱炭酸により acetyl CoAへ変換する必要がある。この複雑な反応は pyruvate dehydrogenase multienzyme complexにより触媒される(図1)。この酵素複合体は3種類の酵素 pyruvate decarboxylase (E. C. 1.2.4.1), dihydrolipoyl transacetylase (E. C. 2.3.1.12) と今回取り上げた lipoamide dehydrogenase (以下LPDHと略記) (dihydrolipoyl dehydrogenase) (E. C. 1.8.1.4)で構成され、図2に示す幾つかの酵素反応を効率的に行えるように高度に組織化されている¹⁾。yeastより抽出したLPDHは glutathione reductase(以下GRと略記)と高い相同性(約30%)を持つので(図3)、この解析結果²⁾を分子モデルとして分子置換法を適応し結晶構造解析を進めている。前回報告した様にLPDHを分子置換法プログラム・パッケージ MERLOT³⁾で新たに解いた。しかし、その解は以前別のプログラム⁴⁾で計算された回転関数の解とは一致するが、並進関数の解とは矛盾した。そのために、さらに別の2種類の分子置換法プログラムを用いて再度検討した。

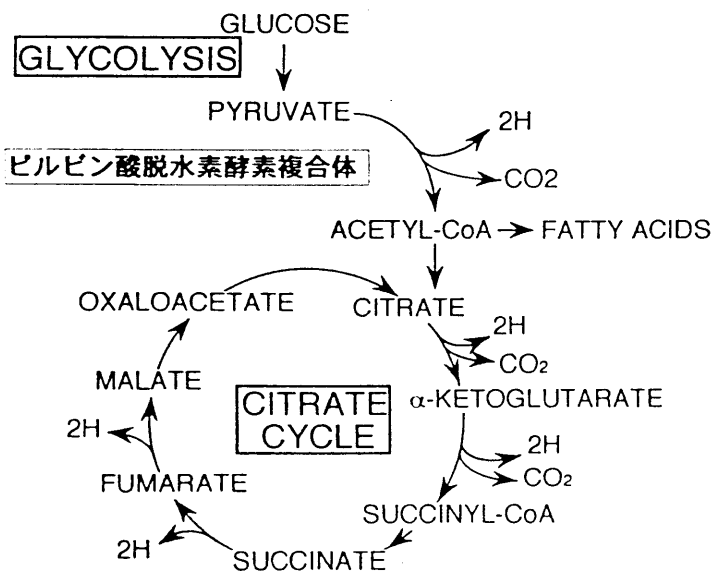


図1. ピルビン酸脱水素酵素複合体の役割

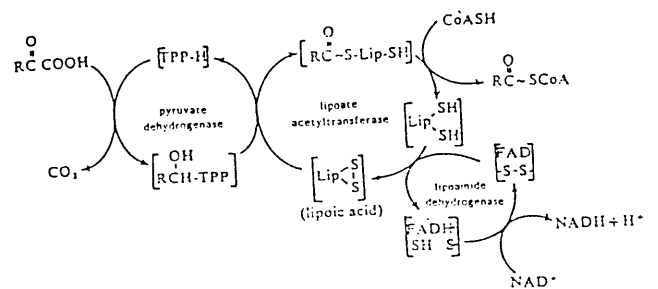


図2. ピルビン酸脱水素酵素複合体の反応機構

【X線結晶構造解析】

(I) データ収集

以前と同様に脱塩で析出させた結晶の回折データを高エネルギー物理学研究所フォトンファクトリーの巨大分子用ワイセンベルグ・カメラ⁵⁾で収集した。R_{sym}=3.7 ~ 6.6 %, R_{merge}=6.4 %で、2.49Å分解能での測定可能な反射の65 %を収集できた。このとき、4軸自動回折計で以前収集した4.5Å分解能でのデータと比較すると、次のことが分かった。

1. 格子定数の変化 空間群P2₁2₁2₁は変わらなかったがPFデータ:a=97.1, b=158.6, c=68.0Åに対し、4軸データは a=98.6(2), b=162.0(2), c=69.4(2)Åとb軸方向に3.4Åの差が見られた。

2. R_{merge} 両者の構造因子を比較するとR=14.7 %となり、その差はかなり大きいことが分かった。

(II) 構造決定

先の項より、4軸データの結晶とPFデータの結晶のパッキングが異なっていることが示唆された。そのため、いままで逆空間で計算されていたものをもう一度、X-PLORの分子置換法プログラム⁶⁾を用いて実空間で計算し直した(図4)。その結果、MERLOTの解と一致した。さらに、以前、4軸データを用いて構造決定を行った時用いたプログラムMOLREP⁴⁾で再度、PFデータを用い計算したところ、同じ解を得た。この場合、MERLOTでの計算結果が用いた反射の分解能により多少不安定化したのに比べ、解は安定していた。

(III) 精密化

引き続き、X-PLORの "positional" procedureによるエネルギー最小化アルゴリズムを用いた精密化を行った。

1. 5.0 - 30 Å; 310 steps R=48.7 -----> 26.7 %
2. 4.5 - 30 Å; 300 steps R=34.7 -----> 27.5 %
3. 4.0 - 30 Å; 300 steps R=35.1 -----> 30.5 %
4. 3.0 - 30 Å; 300 steps R=38.7 -----> 34.4 %

【LPDHの立体構造】

2Fo-Fcマップを見ると、容易に主鎖をたどることが出来た。図3のGRとの相同性よりさほど大きな構造の差が見られないと考えられる。実際、GRを初期座標として4Å分解能のデータで精密化した結果、図5に示すとおりとなった。ドメイン間に大きな差は無く、インサクション、デリーションを補うように主鎖のコンフォメーション変化が観察された。活性中心と考えられる部位を見ると、立体構造がよく保存されていたが補酵素FADのピークは確認出来なかった。

【参考文献】

- 1)Mattevi, A. et al., SCIENCE (1992). 255, 1544
- 2)Schulz, G. E. et al., J. Mol. Biol. (1987). 195, 701
- 3)Fitzgerald, P. M. D., J. Appl. Cryst. (1988). 21, 273
- 4)Takenaka, A. et al., J. Biochem. (1988). 103, 468
- 5)Sakabe, N., Nuclear Instruments & Methods in Physics Research (1991) A303, 448
- 6)Brünger, A. T., Acta Cryst. (1990). A46, 46

①GR. PDB (GR dimerの座標, all ALA)

②generate (XPLOR用座標ファイル及びパラメータ・ファイルの作成)

③rotation

(1)7-30 Å resolution <結果>
t1:0-180° t1=132.5°
t2:0-180° =====> t2=42.5°
t3:0-360° t3=295°
2.5° 刻み

(2)7-30 Å resolution 変換後 MERLOT MOLREP
t1:127-138° t1=133° 155° $\alpha = 154.6^\circ$ 155.0°
t2: 37- 47° =====> t2= 42° 42° $\beta = 42.0^\circ$ 43.8°
t3:290-300° t3=295° 137° $\gamma = 135.8^\circ$ 135.0°
1° 刻み

$$\begin{aligned}\alpha &= -t_3 + 90^\circ \\ \beta &= t_2 \\ \gamma &= -t_1 - 90^\circ\end{aligned}$$

④translation

7-30 Å resolution

約 1 Å gridを使用

angle (t1, t2, t3)=(133, 42, 295)

x, y, z 全て 0-0.5(fractional coordinate)の範囲で計算

<結果> (x, y, z)=(0.385, 0.378, 0.218) (fractional coordinate) R=47.1%

MERLOT=(0.373, 0.374, 0.220)

MOLREP=(0.425, 0.391, 0.225)

⑤dimerの座標ファイルを 2つのmonomerに分割

⑥generate

⑦rigid (rigid body refinement)

5-30 Å resolution

50 steps

<結果>R: 50.5 ----> 48.7%

rotation, translation search で得られた解からのずれ

monomer1 rot (t1, t2, t3)=(-0.69° , 1.10° , 0.85°)

trans (x, y, z)=(-0.42, 0.88, -0.66) (Å)

monomer2 rot (t1, t2, t3)=(-0.54° , 0.03° , 1.69°)

trans (x, y, z)=(0.26, -0.83, 0.17) (Å)

図4. X-PLOR中の分子置換法プログラムの計算の流れ

```

      30      40      50      60      70      80      90
GR      SYDYLVI GGGSGGLASARRAAELGARA AVVESH KLGTCVNVGCVPKVHMNTAVHSEFHHDHADYGFPSCEGKFNWRV
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LPDH(YEAST)SHDVVIIGGGPAGYVAAIKAAQLGFENTACVEKRGKLGTCVNVGCVPKVHMNTAVHSEFHHDHADYGFPSCEGKFNWRV
      10      20      30      40      50      60      70      80
      110      120      130      140      150      160      170
      IK EK RDAYVSRNLNAIYQNNLTKSHIEIIRGHAFTSDPKPTIE VSG K KYTAPHILIAATGMPSTPHE SQIPGAS
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      ANFQAKDDAVKQLTGGIELLFKKNKVTYYKGNCSFEDETKIRVTPVDGLEGTVKEDHILDVKNIIIVATGSEVTPFPPIE
      90      100      110      120      130      140      150      160
      180      190      200      210      220      230      240
      LG I TSDGFFQLEELPGRSVIVGAGYIIVEMAGILSALGSKTSLMIRHDKVLRSDSMISTNCTEELNAGVEVLKF
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      IDEEKIVSSIGALSKEIPKRLTIIGGGIIGLEMGSVYSRLGSKVTVVEFQPIGASHDGEVAKATQKFLKKQGLD FKL
      170      180      190      200      210      220      230      240
      260      270      280      290      300      310      320
      S QVKEVKTLSGLEVSHVTAVPGRLPVMTIIPDVDCLLWAIGRVPNTKDLSLNKLGITDDKGHIIVDE FQNTNVKGI
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      STKVISAKRN DDKNVVEIVVEDTKTKNQENL EAEVLLVAVGRRPYIAGLGAEKIGLEVDKRGRLLVIDDQF NSKFPPI
      250      260      270      280      290      300      310      320
      330      340      350      360      370      380      390      400
      YAVGDVCGKALLTPVAIAAGRKLAHRLFYKEDSKLDYNNIPTVVFSIHPPIGTVGLTEDEAIHKYGIENVKTYSTSTFPM
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      KVVGDYTFGPHLAHKAEEEGIAAVENL K TGHGHVNYNNIPSYMYSHPYAVVGVKTEEQ LKEAGIDY KIGKFPFAAN
      330      340      350      360      370      380      390
      410      420      430      440      450      460      470
      YHAVTKRRTKCVMHKVCANKEEKVVGIMHQLGCDEMLQGFVAVKMGATKADFDNTVAIHPTSSSEL
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      SRAKTNQDTEGFVKILIDSKTERILGAHIIGPNAGEMIAEAGLAEVYGASAEEDVARVCHAPTILSEAF
      400      410      420      430      440      450      460

```

図3. GRとの相同性

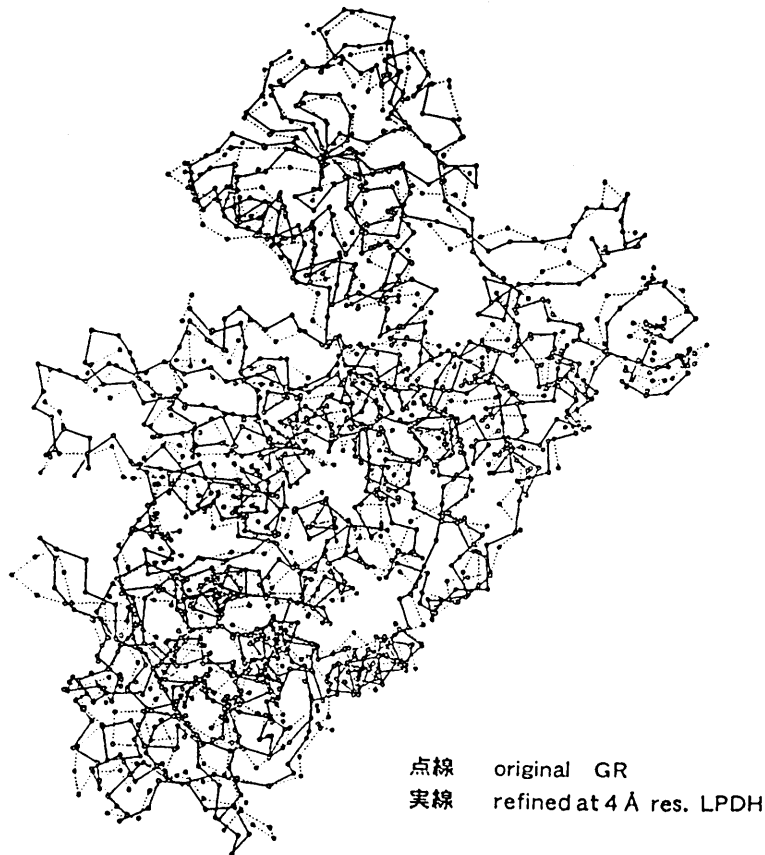


図5. LPDHとGRとの比較

イメージングプレートによる X 線反射強度測定およびそのデータ処理
徳島大学 工学部 森本幸生

蛋白質や外部からの刺激によってラジカルを発生するような不安定な物質の X 線結晶構造解析では、X 線反射強度測定中にその構造が変化することがあり、できるだけ短時間に測定を完了することが望まれる。これには二次元検出器を用いた写真法による測定が適していると考えられる。そこで感度・空間分解能・ダイナミックレンジ等の基本的な性能において従来の X 線フィルムより優れているイメージングプレートを用いた写真法により (1) 低分子有機化合物、(2) 膜蛋白質やウイルス等の巨大分子複合体結晶の X 線反射強度測定を行い、(1) についてはデータ収集および解析結果、(2) についてはデータ処理を行う際の新しい方法について報告する。

(1) タウリン(C₂H₇NO₃S)結晶の迅速 X 線反射強度測定

理学電機製回転対陰極型 X 線発生装置およびマックスサイエンス製積分型二次元検出装置を用いて、タウリン(C₂H₇NO₃S)結晶の X 線反射強度測定を行った。表 1 にその結果を示す。1 枚の画像に記録される反

射の数は約 100 個で計 10 枚の画像データを収集した。X 線露出時間は合計 5 時間であった。同じ数の反射を 4 軸自動回折計で測定すると約 16 時間となる。反射強度データの質は R merge = 4.3% で、回折計によるデータと比較して良好な値であり、直接法により分子構造を決定することができた。

ラジカル化合物などの不安定な物質の解析には長時間の X 線露出は構造変化をまねくことがある。

Table 1. Experimental Conditions and Results of Taurin Crystal

Sample	Taurin (C ₂ H ₇ NO ₃ S)
Space group	P2 ₁ /a
Cell dimension	a=7.940Å, b=11.654Å, c=5.288Å, β=94.12°
X-ray source	MoKα (50kV-260mA)
Collimater	0.5mmφ
Monochrometer	graphite
Camera length	75mm
Rotation axis	b*
Oscillation angle	20°
Number of rotation	5
Rotation speed	0.066°/sec
Number of frames	10
Exposure time	1515.15 sec/frame
Number of reflections	
Observed	1167
Rejected	21
Independent	382
Rmerge(total)	4.32%
maximum spacing	1.0 Å
Observed/Theoretical	50%

従ってこのように短時間で測定できるシステムは有効な手段であると考えられる。また同一の検出面を同じ条件で用いるため、構造変化に伴う回折斑点の経時変化を追跡でき、分子の動的な動きを解析することも可能であると考えられる。

(2) 膜蛋白質やウイルス等の巨大分子複合体結晶におけるデータ処理平行性の良い放射光とカメラ半径の大きい巨大分子用ワイセンベルグカメラを用いることで格子定数が 300Å 以上の巨大分子結晶の逆格子斑点も効率よく測定することができる。しかしながら写真法による測定のため、構造因子を求めるためには得られた X 線写真に相当する画像データから積分反射強度の見積を行わなければならない、これには結晶の方位と回折点の関係が明らかにされている必要がある。比較的格子定数が小さな蛋白質結晶の場合や、撮影時の結晶の方位が分かっている場合はそれほど大きな問題にはならないが、格子定数が非常に大きな結晶すなわち逆格子点 が密に詰まっているような結晶や結晶の方位と回折点の関係が不明な場合は回折点の指数付けに誤りを起こしやすい。従って全く方位の分かっていない結晶の方位を決める方法を確立する必要がある。そのために結晶の mis-orientation を定義するパラメータを自動的に変化させ、最適な方位を決定するプログラムを作成し、巨大分子複合体であるチトクロム酸化酵素およびウイルス結晶のデータ処理に応用した。

プログラムは巨大分子用ワイセンベルグカメラのデータ処理用である WEIS (UNIX version) を書換え Personal IRIS 上で用いた。まず Search Grid Size を決定するために ϕ_x 、 ϕ_y 、 ϕ_z の Step size が 1° 、 2° 、 3° 、 4° の場合について Search を行った結果、c 軸が 282.3Å のチトクロム酸化酵素の場合、Step size は少なくとも 3° 以下にする必要があることが明かとなった。

チトクロム酸化酵素結晶は、格子定数 $a=b=208.7\text{\AA}$ 、 $c=282.3\text{\AA}$ 、 $\gamma=120^\circ$ であり、カメラ半径 430mm を用いた場合の逆格子点の距離は最小で 0.3mm となる。図 1 に ϕ_x 、 ϕ_y をそれぞれ 1° ずつ 60° の幅で変化させ結晶の方位を search した時の指数付けのできた割合、記録された回折斑点とシミュレーションパターンとのフィルムの縦および横方向のず

れの大きさについての等高線を示す。中央に正解のピークがあり、 ϕ_y の動きに比べて ϕ_x の方が敏感であることが分かる。また ϕ_x が約 15° ずれても比較的一致の良くなるところがある。このことは ϕ_x の約 15° のずれによって配向の精密化が local minimum に落ち込む可能性を示しており、反射強度の指数付けに誤りをもたらすことを意味する。

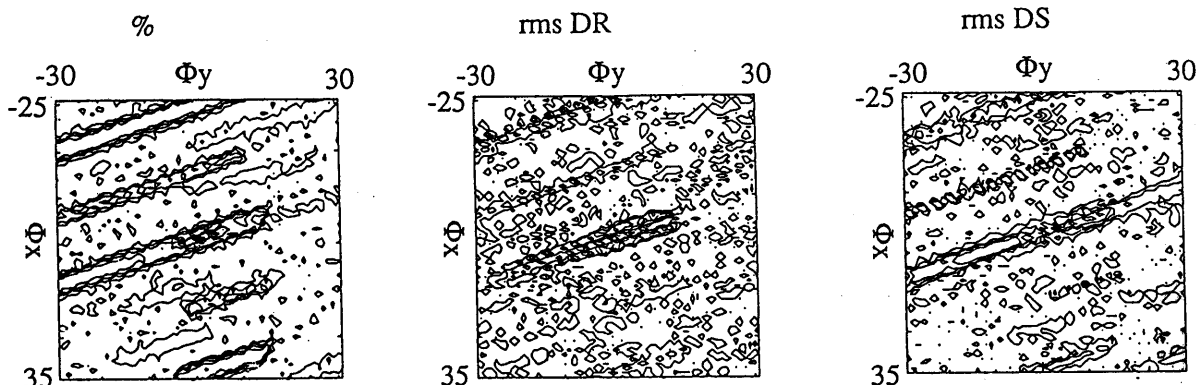


図1 Orientation search の等高線図
 $\Phi_z = -0.5^\circ$ section

図1からも分かるように、配向の一致を示すピークの幅は必ずしも一定ではなく、 ϕ_x 、 ϕ_y 、 ϕ_z の方向に依存している。言い替えると三次元の等高線を描いたときにイメージングプレート(IP)毎にピークが大きさが一定ではなく、ある幅を持っていることになる。十数枚のIPデータをmergeする場合、この配向のずれは指数づけの間違いや相関係数の低下をもたらす。従って、IP毎に配向のsearchを行ったときに、必ずしも最大のピーク値を持つ ϕ_x 、 ϕ_y 、 ϕ_z 角を正解とせず、そのピークの半値幅から求められるピークの中心値をその結晶の配向とすることが望ましい。図2-a,b,cに ϕ_x 、 ϕ_y 、 ϕ_z の等高断面図を示す。

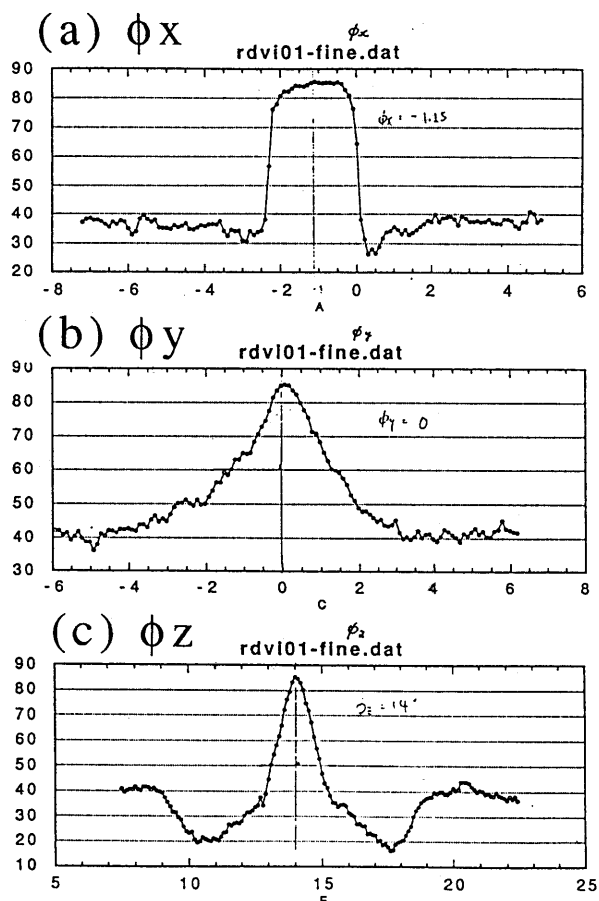


図2 ϕ_x 、 ϕ_y 、 ϕ_z の等高断面図

この例では ϕ_x 方向で約 2° のずれがあっても配向が一致することを示しており、このようなときにピークの最大値のみをもって配向の決定を行うことは危険である。このようなピークの広がりには結晶性、特に結晶の *mosaicity* に大きく依存すると考えられる。格子定数が比較的小さくワイセンベルグカメラでの振動角を大きくして測定できる場合は、*mosaicity* を約 0.3° として *partial reflection* を無視することも可能であるが、後に述べるウィルス結晶のように格子定数が大きく振動角を約 1° しかとれないような場合は、図2での ϕ_x 方向の約 2° のずれは *partial, whole reflection* の見積もりばかりではなく、指数付けを完全に間違える可能性を示しているといえる。従って、配向決定の際の midpoint をとる方法は、格子定数が大きい場合はもちろん、通常の蛋白質結晶でのデータ処理にも有効であるものと考えられる。

WEISを用いた結晶の配向決定では従来多くのCPU時間が必要であった。現在 *diffraction* の位置をあらかじめファイルに格納し、それを参照することにより配向決定のルーチンの高速化を計った。このとき用いる *diffraction* は、入射X線近傍の低角の数個の反射を用いることでより一層の高速化が可能となった。

以下に新しく付け加えたWEISの主なコマンドを示す。

```
901 ; auto-search (slow)
902 ; auto-search with diffraction positions (fast)
903 ; find diffraction positions for 902
904 ; set  $\phi_x$ ,  $\phi_y$ ,  $\phi_z$ 
905 ; change search-grid size
906 ; set minimum % of work file
907 ; change trap area for 902
908 ; 902 + 901 + 909
909 ; find  $\phi_x$ ,  $\phi_y$ ,  $\phi_z$  with maximum ratio
931 ; search angle around the  $\phi_x$ ,  $\phi_y$ ,  $\phi_z$ 
932 ; find middle point
933 ; set middle point
934 ; make 2-D contour map
935 ; calculate the vector of spindle and X-ray axes
```

これらのプログラムおよびデータ処理方法を用いて、以下に示すイネ萎縮病ウイルス(RDV)のX線結晶構造解析を行った。

表2 Crystal data

Cell Dimension	: $a = b = c = 789.0 \text{ \AA}$
Space Group	: Cubic, $I23$
Two particles / Unit cell	

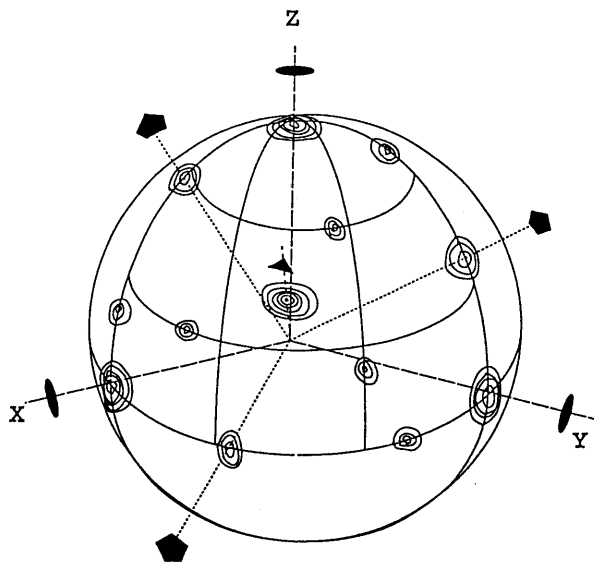
RDVの結晶学的データを表2に示す。X線反射強度データはNative 3種類について先に述べたWEISにより結晶の配向決定を行い10Å分解能まで421,143個の測定データを得た。独立な反射の completeness は84%であった。表3に得られたデータと統計量を示す。

表3

Crystals	No. of Reflections		Rmerge ($>1\sigma(I)$)	Completeness 200-10Å
	Observed	Independent		
RDV-H	168,016	39,420	22.4	70.5
RDV-I	169,488	26,143	19.5	51.0
RDV-N	83,639	29,905	22.1	52.4
Merged	117,248	41,245	20.2	83.7

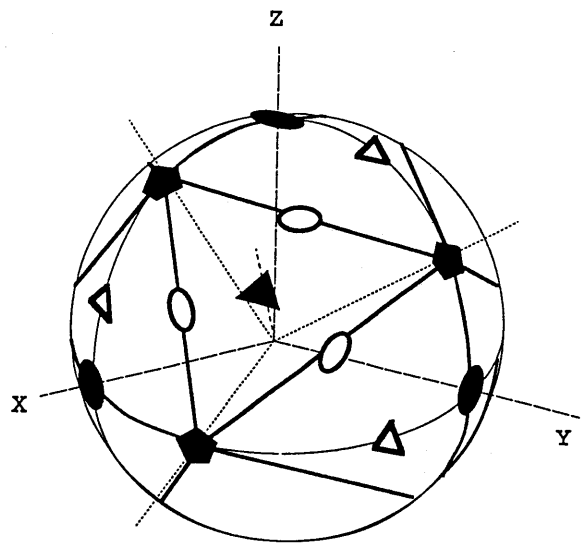
得られたデータを用いて高速回転関数法による自己回転関数を計算した。結晶のc軸を極座標系のZ軸と一致させて計算したところ、X、Y、Z軸に平行に結晶学的2回軸、(1 1 1)の方向に結晶学的3回軸があることが明らかとなり、Z軸から35°傾いたところに非結晶学的5回軸があることがわかった。また、これらの対称を全て満足するように2回および3回対称が存在した。この結果を図3に示す。これはRDV粒子が図4に示したような正二十面体対称を持っていることを示している。

RDV粒子が正二十面体対称を持つことと、結晶の空間群が $I23$ であることを考えると、RDV粒子は結晶中では Wyckoff notation "a" に従って図5に示すような packing をしていると考えられる。



Self rotation map on the polar coordinates
Resolution = 70-20 Å
Integration sphere range = 70-100 Å

図3 R D V 自己回転関数

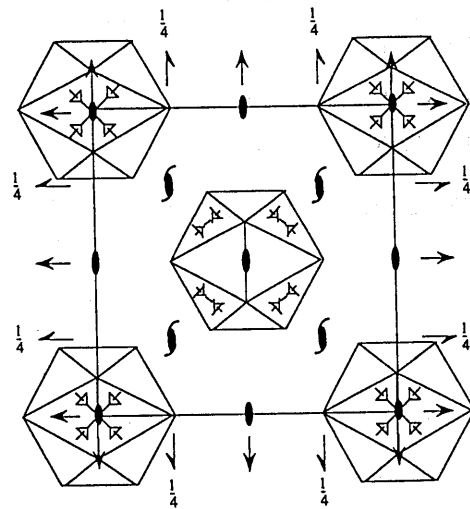


Icosahedral symmetry of the RDV particle.
Symmetry operations derived from the results of self-rotation function

図4 正二十面体対称*

RDVはcoat protein を二重に持つウイルス粒子である。この二重の殻が同じ正二十面体対称を持つのか、持つとすれば同じ方向を向いているのか？

現在、自己回転関数の積分半径を変えて計算を行っており、またモデル粒子との比較を行いながら検討している。



The resultant packing of RDV particles in the unit cell.

図5 単位格子中での R D V 粒子の Packing

図4* 白く抜いてある対称操作は、正二十面体対称から導かれる2回および3回対称を示している。

キメラ酵素を用いた酵素蛋白質の耐熱化機構の研究

東京工業大学生命理工学部生命理学科

櫻井正博, 森山英明, 田中信夫

タンパク質の熱に対する耐性は広い工業的な利用とタンパク質の分子構築を解明のために、ひとつの重要な課題である。これまで好熱菌のタンパク質と常温菌のその一次構造、そして三次元構造の比較がなされてきている。これらの研究により、好熱性タンパク質の安定性の分子機構が多種多様にわたる要求があることが分かった。たとえば、疎水相互作用や静電相互作用の増加や、システイン残基の除去などである。

これらの研究の手法の一つとしてキメラ酵素の応用は有用であると考えられる。好熱菌由来と常温菌由来の酵素の構造的な研究は構造と安定性の関係を解明するために非常に興味深い。これは多くのアミノ酸残基が変わり、両方の似た機能を示すからである。この実験は好熱菌由来（または常温菌由来）のあるいくらかの部分が耐熱性を決定する役割があるであろうという考えに基づいている。またこの手法と Site-directed mutagenesis とを組み合わせることで実験を行うことによって、つまり常温菌由来の部分の1あるいは2残基を好熱菌由来のものに置換することによって耐熱性の決定する部位で最も影響を与えるアミノ酸残基を解明することが出来ると考えられる。

本研究で用いた3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ [EC 1.1.1.85] (IPMDH) はロイシン生合成系の酵素の一つである。この酵素は次のような反応を触媒する： $3\text{-isopropylmarate} + \text{NAD}^+ \rightarrow 2\text{-ketoisocaproate} + \text{NADH} + \text{CO}_2$ 。この酵素のさまざまな菌の遺伝子がクローニングされ、一次構造が決定されている。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の IPMDH の三次元構造が 2.2 Å 分解能で決定されている。これによると IPMDH は α/β タイプの酵素で、2つの同一なサブユニットからなり、各サブユニットは2つのドメインからなっている。

さまざまなキメラ IPMDH が常温菌 *Bacillus subtilis* (以下 M) の遺伝子と高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 (以下 T) の遺伝子を遺伝子融合によって作られた。いままで作られたキメラ酵素として第一に N 末端から約 40% を常温菌由来残りの C 末端の 60% を好熱菌由来のものにした "4M6T" が作られた。そ

してまた好熱菌IPMDHのN末端から20-40%部分を常温菌由来にした“2T2M6T”も作られた。これらのキメラ酵素の熱処理後の残存活性が測定されていて、2T2M6Tは4M6TよりT部分が多いのも関わらず、4M6Tより耐熱性が低下していたことが分かった。この事実により2T2M6Tのいわゆる2M部分が熱安定性に重要な役割を果たしていると考えられた。キメラ酵素2T2M6Tの2M部分の中でアミノ酸残基が実際に置換されているのは59残基中23残基である。これら置換された残基のうち1-2残基を好熱菌の配列のものに戻した変異酵素がSite-directed mutagenesisなどによって作られた。これらの残存活性を測定した結果、その中で耐熱性が2T2M6Tよりも向上したものがあつた。

そのうちのひとつとして2T2M6T-I93Lがある。この変異酵素は2T2M6Tの遺伝子を好熱菌に組換えて進化的に耐熱化したものである。2T2M6TのIle 93がLeuに置換されたもので、側鎖の形状がsec-ブチル基からイソブチル基に変わったものである。Ile 93は α ヘリックス内に位置しており、2T2M6Tの2T部分のPhe 53方向に突き出している。もう一つ耐熱性の向上した2T2M6Tの変異酵素に2T2M6T-S82Rがある。この変異酵素は2T2M6TのSer 82がArgに置換されたもので、側鎖が長いものになって、しかも極性残基から陽イオン化する残基になっている。2T2M6TのSer 82は β シートと α ヘリックスの間の17残基からなる長いループのほぼ中間に位置しており、この領域は分子表面で大きくゆらいでいるところである。また残基の溶媒に対するAccessibilityも大きく、側鎖が水和されている可能性もある。

本研究ではこれらの酵素の耐熱性を原子構造の視点から研究する為にX線結晶学を用いてキメラ酵素2T2M6Tの2種類の変異酵素2T2M6T-I93Lと2T2M6T-S82Rの三次元構造を決定し、酵素の耐熱性に関する知見を得た。

変異酵素の結晶化および構造解析：本学の大島研究室で精製された変異IPMDHを結晶化した。タンパク質溶液を約20mg/mlまで濃縮し、この溶液と、pH 6.0 - 8.5, 1.0 - 1.8 Mの硫酸アンモニウムを同様の緩衝液に溶かした溶液を加えたものを1つのドロップレットとしてリザーバーと平衡化した。pH6.5 - 8.5で10Tと同型の六角両錐型の結晶解析に適した結晶が得られた(0.5 x 0.5 x 1.0 mm)。キメラ酵素のデータ収集はイメージングプレートを検出器としてつかった振動写真法 (RIGAKU R-AXIS IIc)で、回転対陰極型X線発生装置 (RIGAKU RU-200)をX線源としておこなった。40kV/100mAでX

線を発生させ、発生したCu-K α 線はNiフィルターで単色化し、ダブルミラー系で集光した。結晶はC軸をカメラの回転軸（スピンドル軸）に合わせてセットし、h 0 1面が入射X線に垂直となる位置を0°とした。振動範囲は、振動写真データ1枚につき、1.5°にした。集められたデータは、ただちにパッケージプログラムPROCESSによって指数のついた強度データに変換した。全体のデータはFox & Holmesの方法によりマージ、およびスケールングを行った。強度データは両者とも1.93Å分解能のデータが収集できた。これら変異酵素とキメラ酵素の全反射データについてのconsistency factorは0.12 (2T2M6T-S82R), 0.14 (2T2M6T-I93L)であった。これらはどちらもアミノ酸の置換によって構造の変化が起こったことを示している。2T2M6T-I93L, 2T2M6T-S82Rの初期構造には精密化を行った2T2M6Tの構造を用いた。ただし人工変異により置換された残基は、Alaに置き換えた。初期構造の結晶学的R因子は2T2M6T-I93Lは25.2%, 2T2M6T-S82Rは24.5%であった(5-3Å分解能)。アミノ酸残基の置換を含めたモデルの構築は電子密度図を用いて行った。電子密度図はパッケージプログラムPROTEINを用いて計算し、モデル構築はグラフィック装置PS390上でプログラムFRODOを用いて行った。分子モデルの精密化はおもにプログラムPROLSQによる構造化束縛最小二乗法を用いた。2T2M6T-I93Lに関しては、初めに分子モデルを10T IPMDHの2つのドメインにしたがって3つの部分(残基番号 1-99, 100-251, 252-345)に分割しプログラムX-PLORによるRigid-body refinementを行った。2.2Å分解能で結晶学的R因子が20%以下になったときに電子密度図のピーク探査を行い、蛋白分子の極性原子との距離から溶媒分子と思われるものを水分子としてモデルに加えさらに精密化を行った。そして、温度因子が65を越えたものは除外して精密化を繰り返した。現在のところ溶媒分子の数はそれぞれ32 (2T2M6T-I93L), 37 (2T2M6T-S82R)である。また、結晶学的R値は2T2M6T-I93Lは18.5% (7.0-2.1, 2T2M6T-S82Rは17.9% (7.0-2.1Å)であった。

モデルの評価をつぎの3種類の方法で行った。まず最初にLuzatti plotを行った。この結果から、誤差の上限は2T2M6T-I93Lは0.35Å, 2T2M6T-S82Rは0.3Åであることが分かった。精密化プログラムPROLSQの結果を評価すると両方のモデルも各r.m.s.偏差がtarget sigmaとよい一致を示した。Ramachandran plotの結果、ほとんどの非グリシン残基はふつう許容される

位置を満足している。いくつかの外れている残基が見いだされるが、それらのうち3箇所 (Arg 176, Asp 231, Ile 284) は10Tの構造にも見られ、他の部位 (Ser 111など) は2T2M6Tにも見られ、この部位が耐熱性に影響を与えていることが指し示されてた。

変異酵素の構造： 2T2M6T-S82R, 2T2M6T-I93Lとも、10T, および2T2M6Tの構造と非常によく似ており二次構造の位置も以前解析された10Tとほぼ同じである。2T2M6Tの主鎖のR.M.S.のずれは、2T2M6T-S82Rとでは0.17Å。また2T2M6T-I93Lとでは0.16Åであった。また主鎖の温度因子の分布は10T, 2T2M6Tと同じだが、I93Lが2T2M6Tの温度因子よりも低い傾向を示していた。

2T2M6TのIle 93はPhe 53との反発によって、主鎖のArg 94と立体反発が起こっている。またそれを避けようとして側鎖の二面角が理想値から離れて側鎖内の反発も起こっていた。一方I93LはLeuに置換することによってPhe 53と主鎖との接触もなくなり、側鎖の二面角も ϕ_2 が 80° になっているが、Cd1, Cd2がともに他のC原子の近くにないので2T2M6Tほどの側鎖内の立体反発は大きくない。このような立体反発の解消によって、蛋白の構造の安定化が起こり、耐熱性に影響を与えていると考えられる。

2T2M6Tの82番の残基はSerでS82RではSerよりも側鎖の長いArgに置換している。変異部位は β シートと α ヘリックスの間にある17残基からなる大きなループのほぼ中間に位置している。またこの部分の温度因子が高く82番では主鎖では71-76(Å), 側鎖では72-80(Å)であり、非常に揺らいでいる箇所でもある。S82Rの変異部位の構造を見ると、Arg 82のNh1原子と、Glu 87のOe2とが水分子を介して水素結合できる距離にある。一方2T2M6Tでは82番がSerで側鎖が届かず、このような結合が形成できない。また2T2M6TにもあるArg 85のグアニジノ基とPro 80付近の主鎖のカルボニル基も水素結合を形成する距離にある。これらの水素結合が80番付近のループ部分を固くし、構造の安定化のために耐熱性が向上したものと現在のところ考えられる。しかし、この部位は温度因子が高いことなどを考えるとその他の安定化因子(たとえば溶媒エントロピーの影響)が考えられる。

本研究では2つのキメラ酵素2T2M6Tの耐熱性獲得変異酵素、2T2M6T-I93L, 2T2M6T-S82Rの構造解析を行った。この結果、これらの酵素の耐熱化機

構は次のように解釈された。I93Lはその残基の化学構造上、側鎖の形状が変化している。そのために、側鎖同士の不利な立体反発が無くなったうえに、その立体反発を避けることによって起こった側鎖内部での反発が無くなることにより構造の不安定性が排除されたと考えられた。また、S82Rではアミノ酸残基が置換されたことによって側鎖同士の水分子を介した水素結合の出現によりループ部分の構造が固くなり安定性が増したと考えられた。しかし、側鎖の溶媒に対するaccessibilityも大きく、ゆらぎの大きいところでもあるためにそのほかの影響も考慮しなければならない。

分子構造をこのように細かく見たとき、立体反発など構造的に不安定化を引き起こす要因を除くことは分子設計上ひとつの示唆を与えるものである。それでは分子の持つエネルギーから見て、これらIPMDHの結晶構造はもっともエネルギー的に低いという観点から好ましい状態を取っているのだろうか。パッケージプログラムX-PLORを用いてX線構造解析によって得られたIPMDHの構造から分子のエネルギーの最小化を行った。最小化した構造と結晶構造のCaの変位を比較すると主に第1ドメインの70番付近のループ部分(a)およびC末端の部分(b)が大きく変位していた。このことからこの酵素が熱エネルギーを与えられたとき、aおよびbの領域に熱振動の増加の影響を強く受けると推定された。

これらの構造情報や計算に基づくと、より安定なIPMDHを設計するには次のような示唆を行うことができる。

1. 基本的には熱振動の大きな領域に分子内架橋をすることにより耐熱性が向上すると考えられる。
2. 二次構造部分と隣接する領域のストレスの解消も有効であると考えられる。もう一つの2T2M6Tの耐熱性獲得変異酵素である2T2M6T-N125Gがこの例に当てはまると思われる。この変異酵素はbシートの一つ前の残基で、AsnがGlyに置換されている。これにより、この部分の二面角がある程度自由になり、構造のストレスが除かれるか、bシートと他の部分がほどよい相互作用が採れる位置にくることが考えられる。この変異酵素はすでに結晶化されて、データの収集を行っている。
3. 80番付近の17残基からなるループで、Arg 85の側鎖による橋掛け構造がキメラ酵素で見いだされた。10TはSer 85であるのでこの残基をArgに置き換えた10T-S85Rは10Tよりも耐熱性が向上するものと思われる。

4. 10Tとキメラ酵素の主鎖の変位で大きくずれていた110番付近のループは109番からPGLEという10Tの配列からESLSという配列に置換されている。4M6Tおよび2T2M6Tの構造解析により10Tのループに存在したGlu 112側鎖による橋掛構造は、Serに置換されたことにより無くなっている。またPro 109, Gly 110の部分も置換されており主鎖のコンフォメーションに影響を与えている。これらの構造変化がキメラ酵素の耐熱性を低下させていると考えられている。したがって、この部位のキメラ酵素の変異酵素2T2M6T(あるいは4M6T)-S112E, または三重変異させた E109P/S110G/S112Eという変異酵素を作れば、キメラ酵素が耐熱性を獲得すると思われる。

5. 4M6Tと2T2M6Tを比較すると、2T2M6TではIle 93とPhe 53が接触しIleの側鎖内部での反発が起こっていた。一方4M6TはPhe 53の位置にPheよりも小さい側鎖のLeuに置換されている。これにより、Ileの側鎖の二面角によるストレスが解消されており、4M6Tが2T2M6Tよりも耐熱性が向上している原因の1つと思われる。よって、2T2M6TのPhe 53をLeuに置換した、2T2M6T-F53Lという変異酵素を作成すると2T2M6Tよりも耐熱性が向上すると思われる。

以上のような構造から耐熱性に対して示唆ができるようになったが、まだIPMDHの構造的な研究の方でもなされなければならない課題が大量にある。まず、側鎖の向きなどの細部にわたる議論をする上で現在の分解能のデータでは限界があるのでさらに高分解能のデータを収集しなければならない。つぎに、キメラのもう一つの親酵素である*B. subtilis*のIPMDHや他のキメラ酵素、たとえば片方のドメインが好熱菌由来でもう一方のドメインが常温菌由来のヘテロドメインキメラの構造的な研究も耐熱性に関する重要な情報が得られるであろう。残存活性での測定では確かに耐熱性が向上していると考えられるが、物理学的な測定、たとえばCDによるmelting pointやDSCによる熱測定では大して差がない変異酵素がある。この場合変異がタンパク質の安定性よりも酵素の活性に対する影響が大きいことが考えられる。このIPMDHに関しては活性部位、IPMやNAD⁺の結合部位に関しては予測はされているが、構造的には決定されていない。耐熱性に寄与する残基と活性に寄与するものとを区別するためにIPMDHの活性部位の決定、すなわち酵素と基質またはその類似物質との複合体の構造解析を行わなければならない。