

ボーマン・バーク型インヒビターの  
結晶構造と機能の研究

鈴木淳巨

和 1203513

# 目次

	ページ
1 序論	1
1.1 タンパク性プロテアーゼ・インヒビター	1
1.2 反応部位の概念	2
1.3 インヒビター - プロテアーゼ複合体における相互作用	4
1.4 ボーマン・バーク型インヒビター(BBI)	5
1.5 ピーナッツ・ボーマン・バーク型インヒビターA-II	7
1.6 A-IIの結晶構造解析の意義	8
2 ピーナッツ・ボーマン・バーク型インヒビターA-IIの結晶構造解析	9
2.1 結晶構造解析の手順	9
2.2 A-IIの精製	9
2.3 結晶化	10
2.4 重原子誘導体の調製	10
2.5 X線回折強度データの測定	12
2.5.1 四軸型自動回折計による測定	13
2.5.2 ワイセンベルグカメラによる回折データの測定	15
2.6 データのマージと相対スケールリング	15
2.7 重原子結合サイトの決定	17
2.8 重原子パラメーターの精密化と位相の計算	19
2.9 重原子同型置換法による電子密度図	21
2.9.1 6Å分解能の電子密度図	21
2.9.2 3Å分解能の電子密度図	23
2.10 非結晶学的な2回軸を用いた電子密度図の改良	23
2.11 三次元分子モデルの組み立て	26
2.12 分子モデルの精密化	27
2.13 分子モデルの精度	29
3 A-IIの結晶構造	33
3.1 分子全体の構造	33
3.2 プロテアーゼ阻害部位の構造	35
3.3 結晶構造	37
3.4 非対称単位を形成する2つの分子の比較	37
3.5 温度因子	40

4	A-IIと他のBBIの構造の比較	42
4.1	比較の対象としたBBI	42
4.2	分子全体の構造の比較	43
4.3	反応部位の構造の比較	45
4.4	反応部位の温度因子	45
5	A-IIとトリプシンの相互作用	48
5.1	A-II-トリプシン複合体の結晶構造解析	48
5.1.1	複合体の調製	48
5.1.2	複合体の精製	48
5.1.3	複合体の結晶化	50
5.1.4	複合体の結晶データ	50
5.1.5	結晶化の再現性と精製方法の再考の必要性	52
5.2	A-II-トリプシン複合体の推定構造	53
5.2.1	他のBBIに見られるトリプシンとの相互作用	53
5.2.2	トリプシンの触媒部位の構造	53
5.2.3	BBIとトリプシンの相互作用	56
5.2.4	A-II-トリプシン複合体の推定構造の組み立て	60
5.2.5	A-IIとトリプシンの相互作用	60
6	A-IIとキモトリプシンの相互作用	64
6.1	A-II-キモトリプシン複合体の結晶構造解析	64
6.1.1	複合体の調製と結晶化	64
6.1.2	複合体の結晶データ	64
6.1.3	X線回折データの測定	66
6.1.4	分子置換法による解析	66
6.1.5	複合体分子モデルの組み立てと精密化	67
6.2	キモトリプシンの触媒部位の構造	68
6.3	A-II-キモトリプシン複合体の構造	70
6.4	A-IIの第一阻害部位の分子設計について	73
7	BBIと他のファミリーのインヒビターの構造と機能の比較	74
7.1	比較の対象としたインヒビター	74
7.2	インヒビターの分子全体の構造の比較	75
7.3	プロテアーゼとの水素結合による相互作用	77
7.4	プロテアーゼとの疎水性相互作用	80

参考文献 85

发表論文 88

謝辞

# 1 序論

## 1.1 タンパク性プロテアーゼ・インヒビター

プロテアーゼ・インヒビターとはタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）の酵素作用を阻害する物質の総称である。プロテアーゼ・インヒビターには、人工的に合成されたものと、天然に存在するものがあるが、このうち天然のプロテアーゼ・インヒビターは、動物界、植物界を問わず微生物界にも普遍的に見いだされる物質である。天然に存在するプロテアーゼ・インヒビターは、ペプスタチン、ロイペプチン、アンチパインといった分子量数百の低分子量インヒビターと分子量が数千から数十万に及ぶタンパク性のインヒビターに分類される。このうち、後者の蛋白性のインヒビターは、ターゲットとする特定のプロテアーゼの働きのみを特異的に阻害するように分子設計がなされており、ターゲット以外のプロテアーゼは阻害しない。そこで、タンパク性のインヒビターのこのような高い特異性に興味を持たれ、研究が行われてきた。

タンパク性のインヒビターは、そのターゲットとなるプロテアーゼの種類（プロテアーゼの活性中心の触媒残基の種類）によって、まず大きく以下の4つに分けられる。

1. セリン・プロテアーゼ・インヒビター
2. システイン・プロテアーゼ・インヒビター
3. アスパラギン酸プロテアーゼ・インヒビター
4. 金属プロテアーゼ・インヒビター

このうち、セリン・プロテアーゼ・インヒビターに関する研究は数も多く、現在最も進んでいる。セリン・プロテアーゼ・インヒビターはそのアミノ酸配列の相同性から1980年にLaskowski<sup>(1)</sup>らによって表1.1の様な9つに分類されている。

なお、各インヒビターは名前は長いので分類の右側に示した略号で呼ばれることも多い。

Laskowskiらによる分類の後、セリン・プロテアーゼ・インヒビター全体に対する新たな分類は行われていないが、血液中の $\alpha_1$ アンチトリプシンに代表される分子量5～7万の一群のインヒビターや、分子量3,000前後のウリ（Squash）型のインヒビター、分子量14,000前後の大麥（Barley）型のインヒビターなどは、それぞれ、1つのインヒビター・ファミリーとして分類しても良いと考えられる。

表1.1 セリンプロテアーゼインヒビターの分類

	略号
1. Bovine pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) family	BPTI
2. Pancreatic secretory trypsin inhibitor (kazal) family	PSTI
3. Streptomyces subtilisin inhibitor family	SSI
4. Soybean trypsin inhibitor (kunitz) family	STI
5. Soybean protease inhibitor (Bowman-Birk) family	BBI
6. Potato I inhibitor family	
7. Potato II inhibitor family	
8. Ascaris trypsin inhibitor family	
9. Other family	

## 1.2 反応部位の概念

1966年にLaskowskiらは、セリン・プロテアーゼを競争的に阻害するインヒビターに対して反応部位の概念<sup>(2)</sup>を導入した。即ち、セリン・プロテアーゼ・インヒビターは、分子中に「反応部位」と呼ばれるペプチド結合を持ち、この部位でプロテアーゼの活性中心と基質類似の相互作用をするという概念である。この概念もとでは、インヒビターはプロテアーゼにとって一種の基質として扱われる。即ち、インヒビターは、ミカエリス定数 $K_m$ や反応速度定数 $k_{cat}$ が通常の基質よりも数オーダーも小さく、かつ、 $k_{cat}/K_m$ の値が $10^4-10^6 M^{-1} s^{-1}$ <sup>(3,4)</sup>という大きな値を持つ、トリプシンとの親和性は高いが加水分解速度の遅い基質として扱われるのである。このように加水分解速度が遅いことからインヒビター(I)とプロテアーゼ(E)の間には、見かけ上、



の関係が成り立っているとするのである。ここでEIはインヒビター - プロテアーゼ複合体である。この会合反応の平衡定数Kaは、個々のセリン・プロテアーゼ・インヒビターによって違うが、通常 $10^7$ から $10^{13}$ <sup>(3,4)</sup>という大きな値を持つ。

反応部位のペプチド結合を中心にインヒビター側のアミノ酸残基には記号がつ

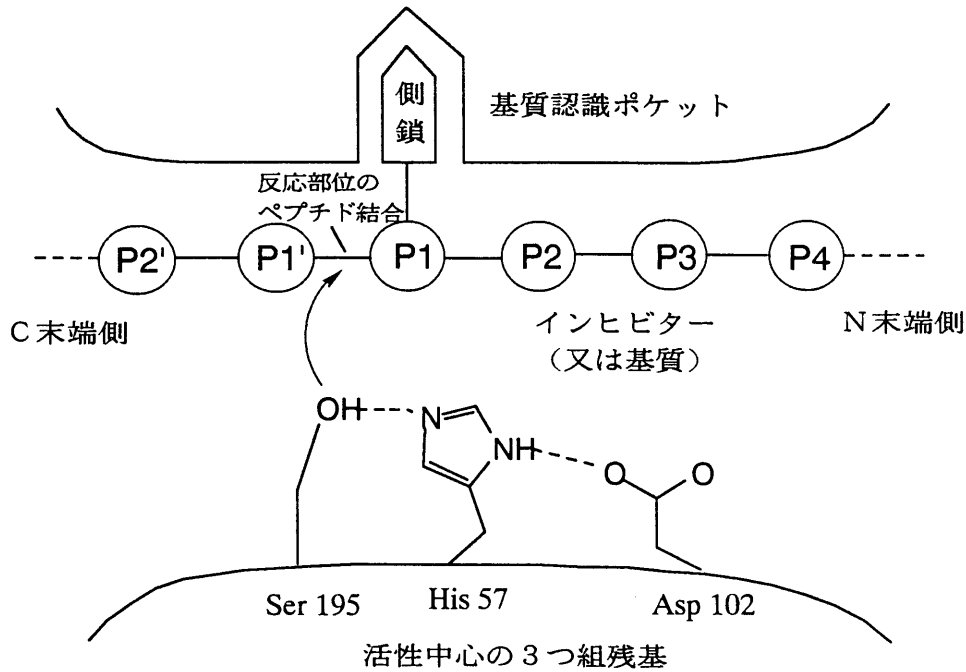


図1-1 セリン・プロテアーゼの酵素活性中心とインヒビターの反応部位との相互作用の概念図

この図は、セリンプロテアーゼの酵素活性中心のある分子表面の溝に、インヒビターが結合しているところを模式的に表している。プロテアーゼの活性中心には、水素結合で結ばれた Asp102、His 57、Ser195からなる酵素活性中心の3つ組残基がある。このうち、触媒中心残基であるSer195の側鎖のOHにより、求核的に攻撃されるインヒビター側のペプチド結合が、切断結合と呼ばれている。インヒビター側のアミノ酸残基には、この切断結合を中心に、N末端側へP1、P2、P3、…、C末端側へP1'、P2'、P3'、…と記号が付けられており、このうち、P1残基の側鎖がプロテアーゼの基質認識ポケットにより認識されるため重要になる。

けられている。即ち、反応部位のペプチド結合からN末端側へ向かって順にP1、P2、P3、P4、…、C末端側へ向かってP1'、P2'、P3'、P4'、… とつけるやり方<sup>(5,6)</sup>である。(図1.1参照) この記号を用いると、インヒビターごとについているアミノ酸残基番号に煩わされずに、インヒビターとプロテアーゼの相互作用を議論できる利点がある。

セリン・プロテアーゼ・インヒビターにおいて反応部位のすぐN末端側にあるP1残基は、プロテアーゼの基質認識ポケットによって認識されるため、インヒビターのプロテアーゼ特異性を決めている。例えば、トリプシンを阻害するインヒビターは、P1残基にArgまたはLysを持っている。また、キモトリプシンを阻害するものは、Trp、Phe、Tyr、Leu、MetなどがP1残基となっていることが多い。これらは、トリプシンやキモトリプシンが特異的に加水分解する基質のP1残基のバ

リエーションに一致する。しかしながら、インヒビターの中には、この法則に合致しないものもある。今回、結晶構造解析を行ったピーナッツインヒビター A-IIもPI残基にArgを持ちながら、キモトリプシンを阻害できる<sup>(7)</sup>。

### 1.3 インヒビター - プロテアーゼ複合体における相互作用

インヒビターが、プロテアーゼの一種の基質として働くならば、インヒビター - プロテアーゼ複合体は、基質と酵素の結合した一種の長寿命反応中間体ということになる。そこで、複合体中でインヒビターとプロテアーゼがどのような相互作用をしているかに興味をもたれ、複合体のX線結晶構造解析が精力的に行われている。その結果これまでに、表1.1の7と9を除く全てと、Squash inhibitor family<sup>(8, 9)</sup>、Barley inhibitor family<sup>(10)</sup>に属するインヒビターの複合体の結晶構造解析が成された。これらの解析から、インヒビターの反応部位とプロテアーゼの活性部位は鍵と鍵穴的な相互作用をしており、Laskowskiらの提案した反応部位の概念が間違っていないことが分子構造の上から確認された。

X線解析の結果は、インヒビター - プロテアーゼ複合体が基質とプロテアーゼの反応におけるどの段階の中間体に相当するかという疑問を投げかけた。セリン・プロテアーゼの加水分解反応における触媒機構<sup>(11)</sup>を図1.2に示す。初期

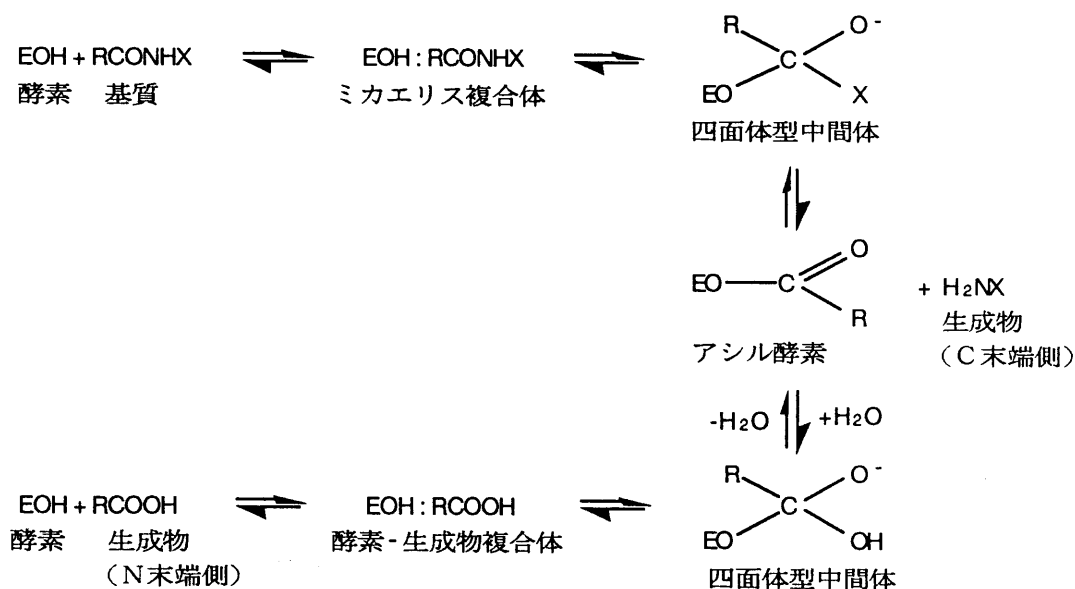


図1-2 セリン・プロテアーゼの触媒反応機構



のSoybean Trypsin Inhibitor(STI)とトリプシンの解析<sup>(12)</sup>ではインヒビターとトリプシンはミカエリス型の間体を通り越して四面体型中間体まで反応が進んでいるとされたが、その後の多くの解析では、活性中心残基Ser195のO $\gamma$ により求核攻撃を受けるペプチド結合のカルボニル基が、四面体型の中間体に近づく方向に少し形を変え、ピラミッド型をしているという結果が出ている<sup>(13)</sup>。この時、Ser195のO $\gamma$ と攻撃を受けるカルボニル炭素との距離は2.7から2.9Åとファン・デル・ワールス接触の距離と共有結合距離の間にあり、この距離とピラミッド型の歪みの大きさとの間には、量子化学的に予想される関係がある。これらのことから、インヒビター - プロテアーゼ複合体は、X線結晶解析の結果からみる限り四面体型中間体に少し近づいたミカエリス型中間体をとっているという結論が得られている。なお、インヒビター - プロテアーゼ複合体のNMRによる解析もミカエリス型中間体をとることを支持している<sup>(14)</sup>。

#### 1.4 ボーマン・バーク型インヒビター(BBI)

ボーマン・バーク型インヒビター(以下BBIと略す)は、セリン・プロテアーゼ・インヒビターの1つに分類されており、1946年にBowman<sup>(15)</sup>によりダイズ中から見いだされ、続いてBirk<sup>(16)</sup>らによってその性質が詳しく調べられたため、この名前が付いている。BBIは多くの豆科の種子中に見いだされており、その特徴としては、以下のものがある。

- 1) 分子量7,000から10,000と比較的低分子量のタンパク質である。
- 2) 保存された7個のS-S結合を持ち、高いシスチン含有率を示す。
- 3) 2つのプロテアーゼを同時にしかも独立に阻害する、2つの反応部位を持っている。(双頭型インヒビター)
- 4) 反応部位を1つずつ含む2つの1次構造上の相同性の高い領域を持ち、これらが、2本のペプチド結合で結ばれている。(図1.4参照)

BBIの持っている1次構造上相同な領域は、遺伝子コードの相同性<sup>(17)</sup>も示されており、これら2つの領域が遺伝子の重複により作られたものであると推論されている。

現在までに、アミノ酸の1次構造が決定されているBBIの1次構造を図1.3に示す<sup>(18)</sup>。

これらのインヒビターのアミノ酸配列で保存されているものは、14個のシステ

	5	10	15	20	25*	30	35	40																																						
AB-I	S	G	H	H	D	E	T	T	D	E	P	S	E	S	S	K	P	C	C	D	Q	C	S	C	T	K	S	H	P	P	-	-	K	C	R	C	S	D	I	R	L	N				
LB-IV	S	G	H	H	E	H	S	T	D	Z	P	S	Z	S	S	K	P	C	(C,B)	H	(C,A)	L	(C)	T	K	S	I	P	P	-	-	Q	C	R	C	(S)	(D)	(F)	R	L	D					
BB												D	D	E	S	S	K	P	C	C	D	Q	C	A	C	T	K	S	H	P	P	-	-	Q	C	R	C	S	D	M	R	L	N			
MA-DE-3		D	H	H	H	S	T	D	E	P	S	E	S	S	K	P	C	C	D	E	C	A	C	T	K	S	I	P	P	-	-	Q	C	R	C	T	D	V	R	L	N					
MA-DE-4		H	E	H	S	S	D	E	S	S	E	S	S	K	P	C	C	D	L	C	T	C	T	K	S	I	P	P	-	-	Q	C	H	C	N	D	M	R	L	N						
AB-IIa	S	V	H	H	H	D	S	S	D	E	P	S	E	S	S	E	P	C	C	D	L	C	L	C	T	K	S	H	P	P	-	-	Q	C	Q	C	A	D	I	R	L	N				
SB-C-II		S	D	H	S	S	S	D	D	E	S	S	K	P	C	C	D	L	C	H	C	T	A	S	H	P	P	-	-	Q	C	H	C	A	D	I	R	L	N							
SB-D-II		S	D	Q	S	S	S	Y	D	D	D	E	Y	S	K	P	C	C	D	L	C	H	C	T	R	S	H	P	P	-	-	Q	C	S	C	E	D	I	R	L	N					
GB-II'												Z	P	S	Z	S	S	P	P	C	C	B	I	C	V	C	T	A	S	I	P	P	-	-	Q	C	(I)	C	T	B	V	R	L	B		
MB												S <sup>(H)</sup>	D	E	P	S	E	S	S	E	P	C	C	D	S	C	D	C	T	K	S	K	P	P	-	-	Q	C	H	C	A	N	I	R	L	N
VA												G	D	D	(Y)	X	S	A	C	C	D	T	C	L	C	T	R	S	Q	P	P	-	-	T	C	R	C	V	D	V	G	-	E			
A-II												E	A	S	S	S	S	D	D	N	V	C	C	N	G	C	L	C	D	R	R	A	P	P	Y	F	E	C	V	C	V	D	T	F	-	D

	45	50	* 55	60	65	70	75	80																																				
AB-I	S	C	H	S	A	C	K	S	C	A	C	T	Y	S	I	P	A	K	C	F	C	T	D	I	N	D	F	-	C	Y	E	P	-	C	K	S	S	R	D	D	D	V	D	N
LB-IV	S	C	H	S	A	C	K	S	C	I	C	T	(F)	S	I	P	A	Q	C	V	(C,T)	B	I	B	D	F	-	C	Y	E	P	-	C	K	S	S	H	S	D	D	D	N	N	N
BB	S	C	H	S	A	C	K	S	C	I	C	A	L	S	Y	P	A	Q	C	F	C	V	D	I	T	D	F	-	C	Y	E	P	-	C	K	(P)	S	E	D	D	K	E	N	
MA-DE-3	S	C	H	S	A	C	(S)	S	C	V	C	T	F	S	I	P	A	Q	C	V	C	V	D	M	K	D	F	-	C	Y	A	P	-	C	K	S	S	H	D	D				
MA-DE-4	S	C	H	S	A	C	K	S	C	I	C	A	L	S	E	P	A	Q	C	F	C	V	D	T	D	F	-	C	Y	K	(S)	-	C	H	N	N	A	E	K	D				
AB-IIa	S	C	H	S	A	C	K	S	C	M	C	T	R	S	M	P	G	Q	C	A	C	L	D	T	H	D	F	-	C	H	K	P	-	C	K	S	R	D	K	N				
SB-C-II	S	C	H	S	A	C	(D)	R	C	A	C	T	R	S	M	P	G	Q	C	R	C	L	D	T	T	D	F	-	C	Y	K	P	-	C	K	S	S	D	E	D	D	D		
SB-D-II	S	C	H	S	(D)	C	K	S	C	M	C	T	R	S	Q	P	G	Q	C	R	C	L	D	T	N	D	F	-	C	Y	K	P	-	C	K	S	R	D	D					
GB-II'	S	C	H	S	A	C	K	S	C	M	C	T	R	S	M	P	G	(K)	C	R	C	L	B	T	T	B	Y	-	C	Y	K	(S)	-	C	K	S	B	S	G	Z	B	B		
MB	S	C	H	S	A	C	K	S	C	I	C	T	R	S	M	P	G	(K)	C	R	C	L	D	T	D	D	F	-	C	Y	K	P	-	C	E	S	M	D	K	D				
VA	R	C	H	S	A	C	(N)	H	C	V	C	N	Y	S	N	P	P	Q	(Q)	C	F	D	T	H	K	F	-	C	Y	K	(A)	-	C	H	S	(S)	E	K	E	E	V	I	K	N
A-II	H	C	P	A	S	C	(N)	S	C	V	C	T	R	S	N	P	P	Q	C	R	C	T	D	K	T	Q	G	R	C	P	V	T	E	C	R	S								

図1-3 ボーマン・パーク型インヒビターのアミノ酸配列

プロテアーゼ阻害部位のP1残基を\*で示してある。インヒビターの略号は次の通り。AB-I, AB-IIa: アズキ由来、LB-IV: Lima bean由来、BB: 大豆から最初に抽出されたいわゆる「ボーマン・パーク・インヒビター」、MA-DE-3, MA-DE-4: *Macrotyloma axillare*由来、SB-C-II, SB-D-II: 大豆由来、GB-II': Garden bean由来、MB: 緑豆(Mung bean)由来、VA: *Vicia angustifolia*由来、A-II: ピーナッツ由来

インを除けば、3つのプロリン(Pro 29, Pro 30, Pro 56)と1つのセリン(Ser 54)、1つのアスパラギン酸(Asp 63)のみである。このほかのアミノ酸残基は保存されておらず、特に反応部位近傍のアミノ酸配列が保存されていないことは注目に値する。このようにタンパク質の機能にとって重要な部位のアミノ酸が保存されていないことは、酵素タンパク質にはみられず、ボーマン・パーク型インヒビターの1つの大きな特徴となっている。したがって、BBIに共通の立体構造があるかどうかについて興味を持たれるところである。

## 1.5 ビーナッツ・ボーマン・バーク型インヒビターA-II

本研究で結晶構造解析を行いその構造と機能について考察したインヒビターは、ビーナッツ・ボーマン・バーク型インヒビターA-II<sup>(18, 19, 20)</sup> (以後A-IIと略す) である。このインヒビターは、分子量7611、アミノ酸残基数70のトリプシン-キモトリプシン・インヒビターである。図1.4にA-IIの1次構造の模式図を示す。

この図で、左側にあるS-S結合により作られたループI、II、IIIの3つのペプチド鎖のループからなる領域が第一ドメイン、右側のループI'、II'、III'からなる領域が第二ドメインとよばれており<sup>(21)</sup>、この2つの領域に、1次構造上の相同性がある。

ループIおよびループI'には、それぞれ第一および第二の反応部位がある。P1残基はそれぞれArg19とArg47である。これらの反応部位の阻害活性特異性は異なっており、第一反応部位はトリプシンとキモトリプシンを、第二反応部位はトリプシンのみを阻害する<sup>(7)</sup>。この結果、トリプシンについては、トリプシン：インヒビターの比が1:1及び1:2の複合体を作ることができ、キモトリプシンに対しては、1:1の複合体を作ってその働きを阻害する。第一反応部位のP1残基が塩基性残基であるArgであるにも関わらず、疎水性の比較的高いP1残基に特異性を示すキモトリプシンを阻害できる点がA-IIの最大の特徴となっている。

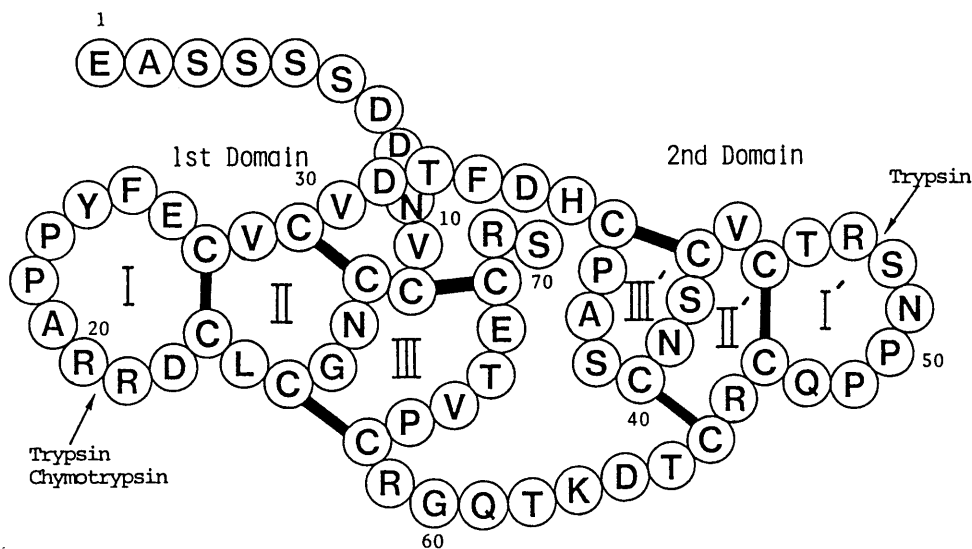


図1-4 ビーナッツ・ボーマン・バーク型インヒビター A-IIの一次構造の模式図

矢印は、反応部位のペプチド結合を表し、黒線は7本のS-S結合を表す。S-S結合により、インヒビターは、ループI、II、III、及び、I'、II'、III'の6つのペプチド鎖のループをもつ。

このA-IIは先にあげたBBIの特徴を全て備えているが、次のような点が他の多くのBBIとは異なっている。

- 1) 典型的なBBIと比較するとアミノ酸4残基の挿入 ( Tyr24, Phe25, Arg62, Glu67 ) 及び1残基の欠失 ( Phe33とAsp34の間 ) がある。このため、ループIは11員環となっている。
- 2) 第一反応部位がトリプシンとキモトリプシンといった2種類のプロテアーゼを阻害できる。(通常は各反応部位は1種類のプロテアーゼしか阻害できない)
- 3) 第一の反応部位のP1およびP1'位置がArg-Argであり、このような例は他にみられない。

#### 1.6 A-IIの結晶構造解析の意義

本論文では、2.3Å分解能のインヒビターA-IIのX線結晶構造解析、3Å分解能のA-II-キモトリプシン複合体のX線結晶構造解析、そして、A-II-トリプシン複合体の推定構造の構築について述べる。

これらの解析により、A-IIの3次元分子構造が詳細に明らかにされ、A-IIがトリプシン/キモトリプシン両プロテアーゼとどの様に相互作用するかが明らかになった。さらに、A-IIに対するこれらの徹底した解析は、A-IIを含めたセリン・プロテアーゼ・インヒビター全体の構造と機能の共通点を明らかにし、特にインヒビターとプロテアーゼ間の疎水性相互作用の重要性を認識させてくれた。

## 2 ピーナッツ・ボーマン・バーク型 インヒビター A-II の結晶構造解析

### 2.1 結晶構造解析の手順

A-IIの結晶構造解析は、図2-1の手順で進められた。なお、A-IIの結晶化は文献(22)に、分子モデルの組立までは文献(23)に、その後の分子モデルの精密化については、文献(24)にまとめて発表している。

### 2.2 A-IIの精製

A-IIの精製は乗岡らの方法<sup>(19)</sup>に従って行い、ピーナッツ4KgからA-II43.9mgを得ている。精製されたA-IIの同定及び純度の検定は、N末端のアミノ酸分析、アミノ酸組成の分析、及び電気泳動により行っており、何ら問題のないことを確認している。

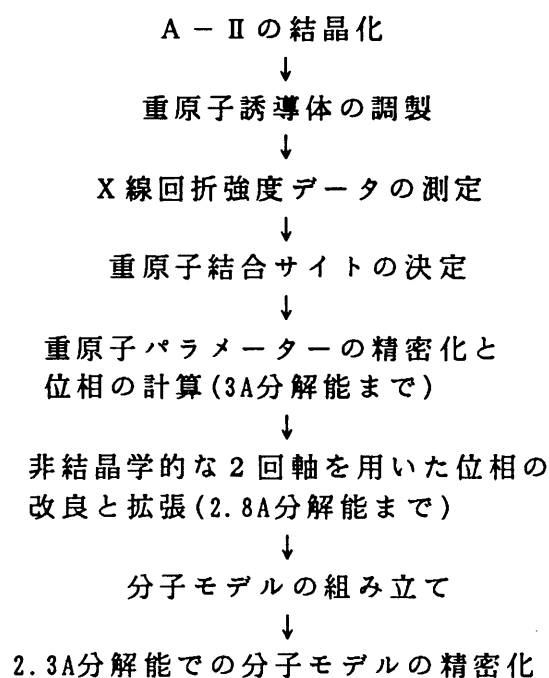


図2-1 A - II の結晶構造解析の手順

表2-1 A-IIの結晶化条件

ドロップ (10 $\mu$ l)	
タンパク質濃度	4.0%
緩衝液	0.025M 酢酸酸ナトリウム (pH3.8)
沈澱剤	0.45M 硫酸アンモニウム
下液 (1ml)	
緩衝液	0.05M 酢酸酸ナトリウム (pH3.8)
沈澱剤	0.9M 硫酸アンモニウム
温度	18°C
結晶化期間	約2週間
結晶サイズ	最大1.5x1.2x0.8mm <sup>3</sup>

### 2.3 結晶化

A-IIの結晶化は、hanging drop 蒸気拡散法により行った。最適な結晶化条件を探したところ、0.8x0.8x0.8mm<sup>3</sup>程度の六方両錐形の結晶がコンスタントにできる条件として、表2-1の条件を得た。結晶の写真を図2-2に示す。

A-IIの結晶学的データを表2-2に示す。また、この結晶のプレセッション写真を図2-3に示す。

### 2.4 重原子誘導体の調製

重原子誘導体の結晶の探索は、以下の様にして行った。

1) 結晶を重原子化合物を含む母液 (0.9M 硫酸 0.05M sodium acetate buffer (pH 3.8 ~4.6)) に、18°Cにおいて数時間から数週間浸す。

(soaking)

2) soakingした結晶のプレセッション写真を撮影し、Nativeの結晶のプレセッション写真と比較して回折パターンの変化を調べ、重原子が結晶中の分子に導入されたかどうかを判定する。このとき、結晶の同型性が保たれているか、また高角におけるX線回折能力が低下していないかも調べる。

3) 重原子化合物の濃度や、soakingの時間、bufferのpHなどを変えることにより最適の調製条件を求める。

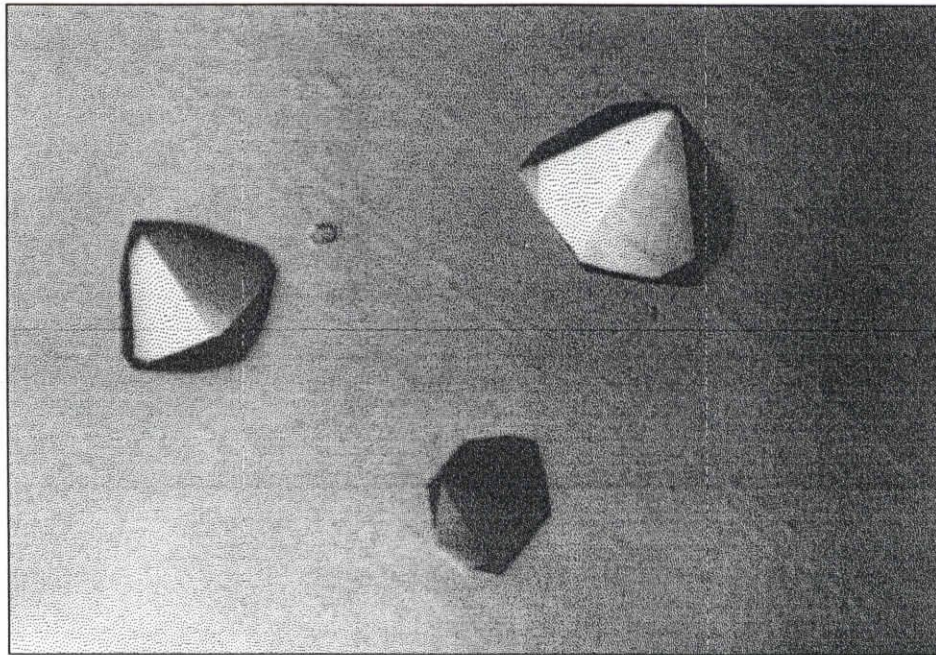
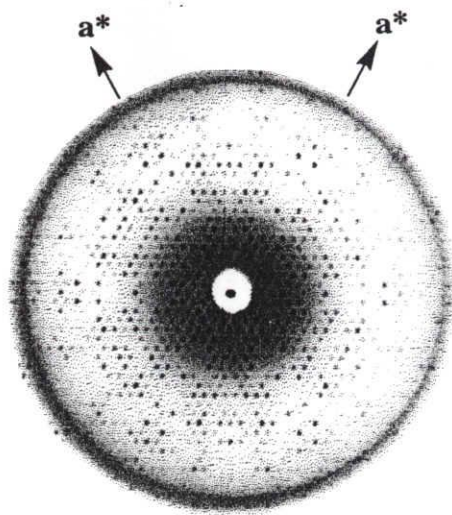


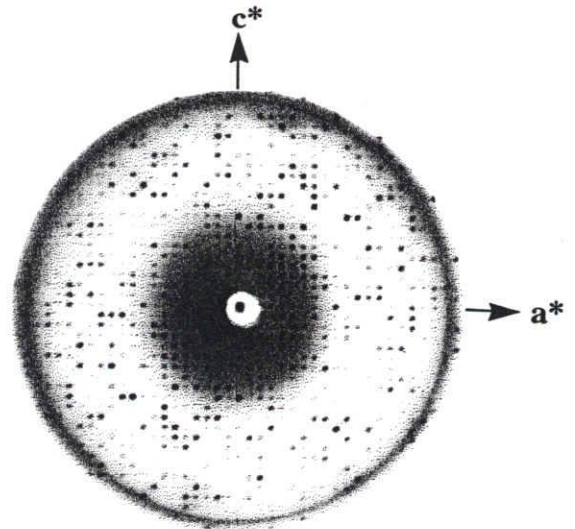
図2-2 A-II結晶の偏光顕微鏡写真

表2-2 A-IIの結晶データ

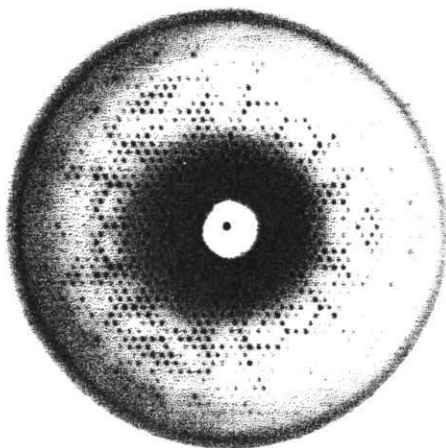
晶系	三方晶
空間群	$P3_121$
格子定数	
a (Å)	71.8
c (Å)	65.8
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	1.36
単位格子中の 分子数	12
溶媒含有率 (%)	61.6



(a)



(b)



(c)

図2-3 A-II結晶のプレセッション写真  
 (a) (h k 0)面、(b) (h 0 l)面、(c) (h k l)面。

合計23種の重原子化合物についてsoakingテストを行った結果、 $\text{Hg}(\text{AcO})_2$  と  $\text{K}_3\text{IrCl}_6$ を用いることにより同型性のよい重原子誘導体結晶が得られた。これらの誘導体の調製条件を表2-3に示す。

## 2.5 X線回折強度データの測定

回折強度データの測定は、Nativeおよび2つの重原子誘導体について次のようにして行った。



表2-3 重原子誘導体結晶の調製

化合物	濃度	soaking期間	pH
Hg(AcO) <sub>2</sub>	100mM	7 days	4.8
K <sub>3</sub> IrCl <sub>6</sub>	50mM	3 days	3.8

まず、Nativeの結晶については回転対陰極型X線発生装置と四軸型自動回折計の組合せにより3個の結晶(N1, N2, N3)を用いて25.0Åから3.3Å分解能までの回折データを収集するとともに、これとは別に高分解能におけるデータの信頼性を上げるために、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線とタンパク質用巨大ワイセンベルグカメラ<sup>(25)</sup>を用いて、2つの結晶からそれぞれ2.8Åと2.3Åまでのデータを測定した。

一方、重原子誘導体については、全て回転対陰極型X線発生装置と四軸型自動回折計の組合せによりデータの収集を行った。Hg誘導体については、6個の結晶(Hg1, Hg2, Hg3, Hg4, Hg5, Hg6)を用いて25.0Åから3.0Å分解能までのバイフット対を含むデータを測定し、Ir誘導体については、1つの結晶(Ir1)から25.0Åから6.0Åまでのバイフット対を含む回折強度データを収集した。

#### 2.5.1 四軸型自動回折計による測定

四軸型自動回折計によるX線回折データの収集は、表2-4の条件で行った。回折データの測定は $\omega$ ステップスキャン法により行った。測定時の $\omega$ のスキャン幅は1°とし、スキャンは0.02°づつ50ステップにわたって行なわれた。そして、回折強度が最大となるところを中心として35ステップが積分され、残りの15ステップがバックグラウンドの測定に用いられた。各結晶から測定したデータの分解能の範囲やデータの個数などを表2-5に示す。

吸収補正は、任意の反射に対して、補正量を $\phi$ だけの関数で近似する方法により行った。この時、 $\chi$ が約90°となる(009)反射が使われた。また、X線損傷による減衰の補正は、(400)、(040)、(009)の3つの反射の強度を100測定反射毎に測定して、その減衰量を使って補正した。これらの補正を含め、ローレンツ因子、

表2-4 四軸型自動回折計によるX線回折データ収集の条件

X線源	リガク回転対陰極型X線発生装置 RU-200 (50KV 50mA)
フォーカスサイズ	0.3x3.0mm <sup>2</sup>
モノクロメーター	グラファイト
波長	1.54Å
コリメーター	内径 1.0mm
回折計	リガク四軸型自動回折計 (AFC-5)
結晶計数管距離	400mm
受光スリット	1/2°
測定方式	ωステップスキャン法 (スキャン幅1°)
測定温度	18 °C

表2-5 四軸型自動回折計によるX線回折データの収集

データセット	分解能 (Å)	測定データ数	独立な反射数	Rmerge* (%)	回折強度の減衰 (%)
Native					
N1	25.0 - 5.0	1023	920	3.0	2.9
N2	5.2 - 4.0	2480	1069	5.2	7.1
N3	4.2 - 3.5	1120	1066	3.1	6.7
Hg-derivative					
Hg1	25.0 - 5.5	1714	772	5.1	14.6
Hg2	5.64 - 3.8	2980	1402	4.9	28.1
Hg3	4.5 - 3.5	3913	1846	6.9	36.4
Hg4	3.82 - 3.2	2923	1378	12.6	27.7
Hg5	3.4 - 3.0	2674	1258	12.2	20.7
Hg6	3.4 - 3.2	1086	504	11.9	8.3
Ir-derivative					
Ir1	25.0 - 6.0	1335	605	4.6	13.8

\*  $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$

偏光因子の補正はBOSSプログラムシステムを用いて行われた。

なお、重原子誘導体結晶からのデータについては、 $F(h\ k\ l)$ と $F(-h\ -k\ -l)$ の間に異常分散によるものではない系統的な差があったため、 $F(h\ k\ l)$ と $F(h\ k\ l)$ との間でスケーリングを行った。各結晶から得られた独立な反射の数とRmergeの値を表2-5に示す。

## 2.5.2 ワイセンベルグカメラによる回折データの測定

Nativeの高分解能のデータの収集のために、高エネルギー物理学研究所放射光施設のビームラインBL6-A<sub>2</sub>において、シンクロトロン放射光とタンパク質用ワイセンベルグカメラを使ってX線回折データの収集を行った。

結晶は、2つ用いられ、それぞれc軸(W1)及びa軸(W2)が回転軸と平行になるようにワイセンベルグカメラにセットされた。フィルムとしては、W1ではKodak DEF-5 X線フィルムを3枚1パックとして使い、W1では、富士写真フィルムのイメージングプレートを用いた。フィルムの黒化度はドラム・スキャナー・デンシトメーターを用いて25 $\mu$ m間隔で読み取り、数値化した。また、イメージングプレートは、富士写真フィルムのBA100イメージングプレート読み取り装置を使い、吸収X線量を数値化した。

フィルム上のX線回折イメージは、WEISプログラムシステム<sup>(26)</sup>を用いて、回折強度に変換された。データの収集条件や反射の数、Rmergeの値などを表2-6に示す。

## 2.6 データのマージと相対スケーリング

回折計により測定した各結晶からのデータおよびワイセンベルグ法によるデータはPROTEIN<sup>(27)</sup>プログラムシステムを用いてマージされ、native及び各重原子誘導体ごとに1つにまとめられた。Nativeの構造振幅のデータは、N1、N2、N3とW1をマージして得られた。このデータは、25.0Åから2.8Å分解能の独立な4110個の反射を含んでおりRmergeは8.7%である。一方、Hg誘導体については、Hg1からHg6までのデータをマージし、25.0Åから3.0Åまでのパイフット対を含む4076個の独立な反射を得た。このときのRmergeは10.0%である。なお、Ir誘導体については、誘導体の同型性が良くなかったため、Ir1の25.0Åから6.0Å分解能までのパイフット対を含む604個の独立な反射しか得ていない。Ir誘導体のデータのRmerge

表2-6 ワイゼンハークカメラによるX線回折データの収集

データセット名	W1	W2
波長 (Å)	1.488	1.00
分解能範囲 (Å)	15.0-2.8	15.0-2.3
フィルムカセット半径 (mm)	143.2	286.5
フィルムタイプ	Kodak DEF-5	Imaging Plate
撮影枚数	4	20
総振動角 (度)	66	92
オーバーラップ (度)	2	0.5
露出時間 (秒/度)	200	15
総測定反射数	14864	40697
独立な反射数	7745	8767
完全性 (%)	84.0	94.5
$R_{merge}^*$ (%)	5.5	6.4

$$* R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$$

は、4.6%である。

これら3つの構造振幅のデータ間のスケールリングは同じく PROTEINシステムを用いて行った。相対スケール因子及び相対温度因子を表2-7に示す。

表2-7 相対スケール因子と相対温度因子

データセット	相対スケール因子	相対温度因子 (Å <sup>2</sup> )
Native	1.000	0.00
Hg-誘導体	1.022	4.77
Ir-誘導体	0.6405	48.2

## 2.7 重原子結合サイトの決定

重原子結合サイトの決定は、PROTEINプログラムシステムを用いて、6Å分解能において以下の手順で行った。

### a) 差パターンソンの計算

Hg、Ir 各重原子誘導体について  $(|F_{PH}| - |F_P|)^2$  を係数とする6Å分解能の差パターンソンを計算した。図2-4にそれぞれの差パターンソンの  $w=1/3$  のハーカー面を示す。

### b) self-vector verification

self-vector verificationとは、単位格子内の任意の点とその等価点との間の差ベクトルを生成し、この差ベクトルを使って、差パターンソンをサーチし、重原子結合サイトを求める方法である。この方法により、Hg、Ir両誘導体とも、重原子サイトが1つずつみつけられた。これらのサイトを、以後Hg1、Ir1と呼ぶ。

### c) cross-vector verification

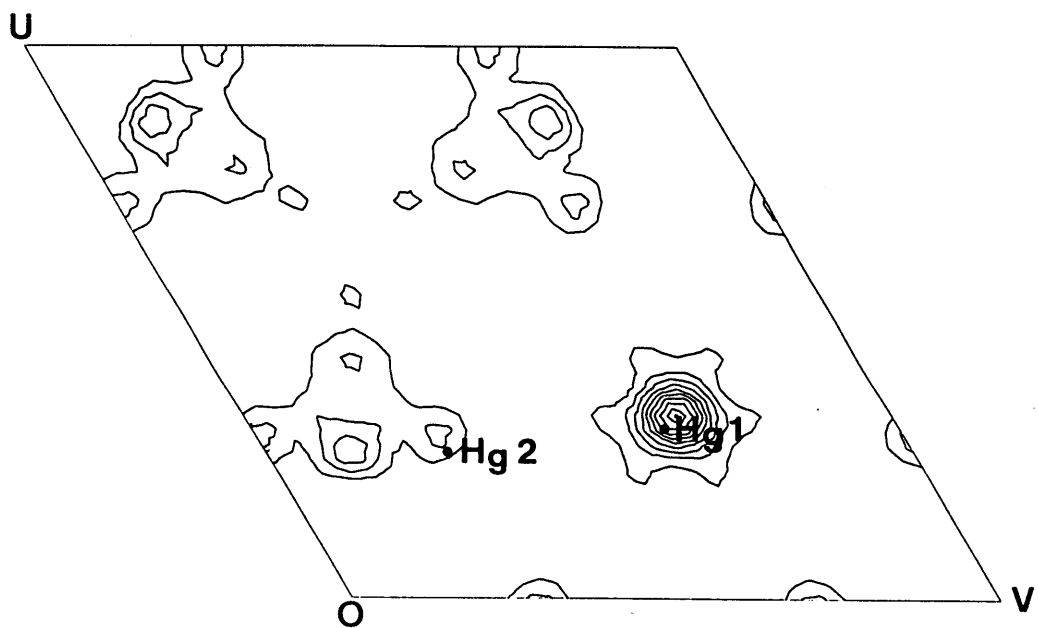
cross-vector verificationとは、既に解っている重原子サイトの位置と任意の点との間の差ベクトルを生成して、この差ベクトルを使って、差パターンソンのサーチを行い、独立な重原子サイト間の差ベクトルを見つけ出し、第二サイト以降の重原子サイトを見つけ出す方法である。cross-vector verificationで見つかった重原子サイトは、self-vector verificationでも見つかったはずなので、両者の結果を比較することにより、より確実に重原子サイトを見つけ出すことができる。cross-vector verificationにより、Hg、Ir両誘導体とも、さらに1つずつ重原子サイトがみつけられた。(Hg2とIr2)

### d) 差パターンソンマップ上での重原子サイトの確認

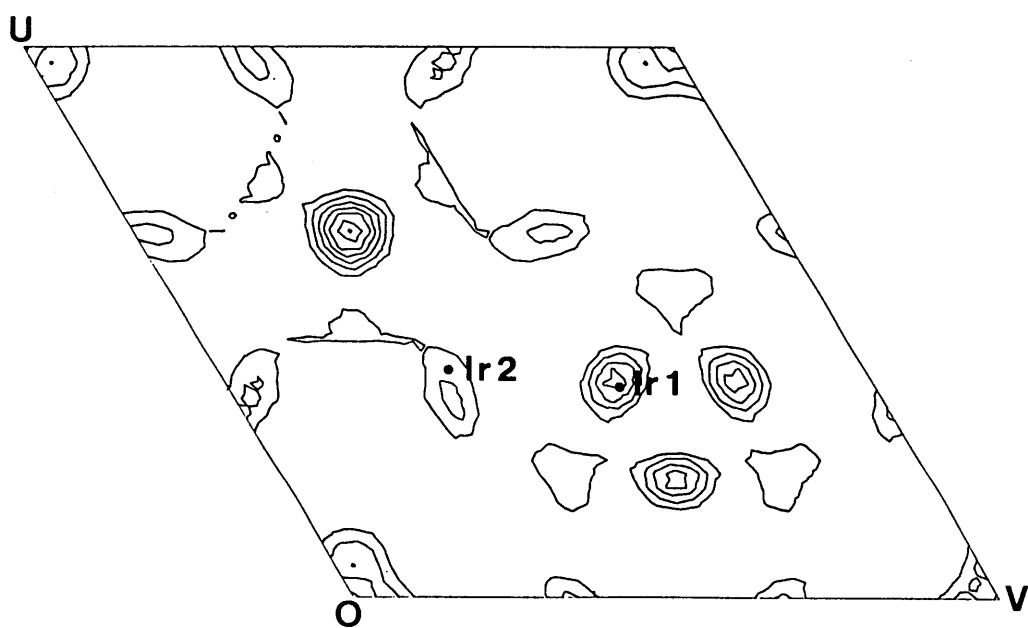
得られた重原子サイトが、差パターンソンマップに現れるピーク、特にハーカー面上のピークの位置を説明できるかを検討した。(図2-4) この結果、Hg、Ir両誘導体とも各重原子サイトに対応するピークが、ハーカー面上に現れていることが確認された。

### e) クロスの差フーリエマップ

見つかった重原子サイトの座標、占有率、温度因子などの重原子パラメーターを精密化し、単一同型置換法 (single isomorphous replacement method : SIR法) による位相 (SIR位相) の計算を試みた。そして、Hg誘導体のSIR位相を使っ



(a)



(b)

図2-4 6Å分解能の差パターソン図 ( $w=1/3$ のハーカー断面)

(a)Hg誘導体、(b)Ir誘導体。精密化された重原子位置より計算した重原子セルフベクトルの位置を図中に●で示す。

て、Ir誘導体の $F_{PH}-F_P$  ( $F_{PH}$  : 重原子誘導体の構造振幅、 $F_P$  : native の構造振幅) を係数とするクロス差フーリエ図を計算した。この差フーリエマップ上には、Ir1, Ir2 の位置に重原子の存在を示すピークが現れ、Hg誘導体及びIr誘導体の重原子サイトの位置が間違っていないことが示された。また、Ir1, Ir2 以外にマイナーサイトも無いことが明らかになった。一方、逆に、Ir誘導体から計算されたSIR位相を使ったHg誘導体の差フーリエマップも描かれ、Hg1, Hg2の位置が確認され、この他にマイナーサイトも無いことが確かめられた。

これらの結果より、Hg, Ir誘導体は、それぞれ2サイトずつ重原子サイトを持つことが確認された。

## 2.8 重原子パラメーターの精密化と位相の計算

Hg, Ir両重原子の位置、占有率、及び温度因子などの重原子パラメーターの精密化と、これらのパラメーターを使ったMIR(multiple isomorphous replacement) およびSIR位相の計算は、PROTEINシステム内のMIRPHプログラムを用いて行った。精密化の過程において占有率と温度因子の精密化は、数サイクルずつ交互に行った。

精密化と位相の計算は、まず25.0Åから6.0Å分解能の範囲で行った。このときエナンチオモルフの決定のため、 $P3_121$ 及び $P3_221$ 両空間群において重原子パラメーターの精密化を行った。Hg, Ir両誘導体の異常分散を含めた計算において、有効度因子<sup>(28)</sup>が、 $P3_121$ では、 $\langle m \rangle = 0.80$ 、 $P3_221$ では、 $\langle m \rangle = 0.76$ となったため、A-11の結晶の空間群は、 $P3_121$ であることが明かとなった。そこで以後全ての計算は、 $P3_121$ の対称のもとで行った。

この6Å分解能までの段階でIr誘導体の同型性の悪さが、重原子パラメーターの精密化の結果(セントリックR値)から明かとなった。そこで、重原子位相の計算は、6Å分解能までは、HgとIrの2つの誘導体を用いたMIR法で、それ以上3.0Å分解能まではHg誘導体のみによるSIR法で行った。

精密化の結果得られた重原子パラメーター、及びに両誘導体のセントリックな反射に対する $R_c$ 値<sup>(29)</sup>、

$$R_c = \frac{\sum |F_{PH}-F_P| - |F_H|}{\sum |F_{PH}-F_P|}$$

( $\Sigma$ はセントリックな反射のみについてとる)

と有効度因子の平均値 $\langle m \rangle$ を表2-8及び表2-9に示す。表2-9より、4Å分解能より上

において、 $R_c$  及び  $\langle m \rangle$  の値が急激に悪くなっており、Hg誘導体の位相の決定能力が低下していることを示している。

表2-8 重原子パラメーター

誘導体	サイト	占有率*	x	y	z	B(A <sup>2</sup> )
Hg-誘導体	Hg1	29.1	0.675	0.017	0.770	62.1
	Hg2	25.9	0.234	0.476	0.062	55.9
Ir-誘導体	Ir1	43.1	0.947	0.676	0.112	136.1
	Ir2	35.1	0.827	0.235	0.167	174.3

\* 占有率は任意のスケール

表2-9 セントリックR値と有効度因子

分解能(A)	13.0	8.8	6.7	5.4	4.5	3.9	3.4	3.0	Total
反射数									
Hg-誘導体	53	118	224	345	491	695	807	713	3435
Ir-誘導体	53	119	226	196	0	0	0	0	594
有効度因子	0.79	0.78	0.80	0.76	0.72	0.64	0.54	0.44	0.62
$R_c$ *									
Hg-誘導体	0.29	0.30	0.29	0.40	0.36	0.55	0.55	0.56	0.39
Ir-誘導体	0.58	0.59	0.69	0.62	-	-	-	-	0.62

\*  $R_c = \frac{\sum |F_{PH} - F_P| - |F_H|}{\sum |F_{PH} - F_P|}$   
 (  $\sum$  はセントリックな反射のみについてとる )



## 2.9 重原子同型置換法による電子密度図

### 2.9.1 6Å分解能の電子密度図

A-IIの分子領域を決めることを目的として、重原子同型置換法による位相を用いた6Å分解能の電子密度図を描いた。この電子密度図は、ノイズの少ない良質なもので、 $z=1/2$ にある結晶学的な2回軸をその中に含む1つの分子領域を求めることが出来た。(図2-5参照) この領域内には、非対称単位の2倍に相当する4個のA-II分子が含まれると考えられたが、c軸方向から電子密度図を見ている限りでは、1つ1つの分子を分離して見ることは出来なかった。

そこで、この領域内に含まれる重原子位置を使って、個々の分子の領域を決めることを試みた。これは、一般に、重原子は、結晶中に存在する全てのタンパク質分子に平等に結合し、その結合位置は、それぞれの分子に対して、ほぼ同じ位置になると予想されるためである。そこで、この領域内に含まれる重原子サイト

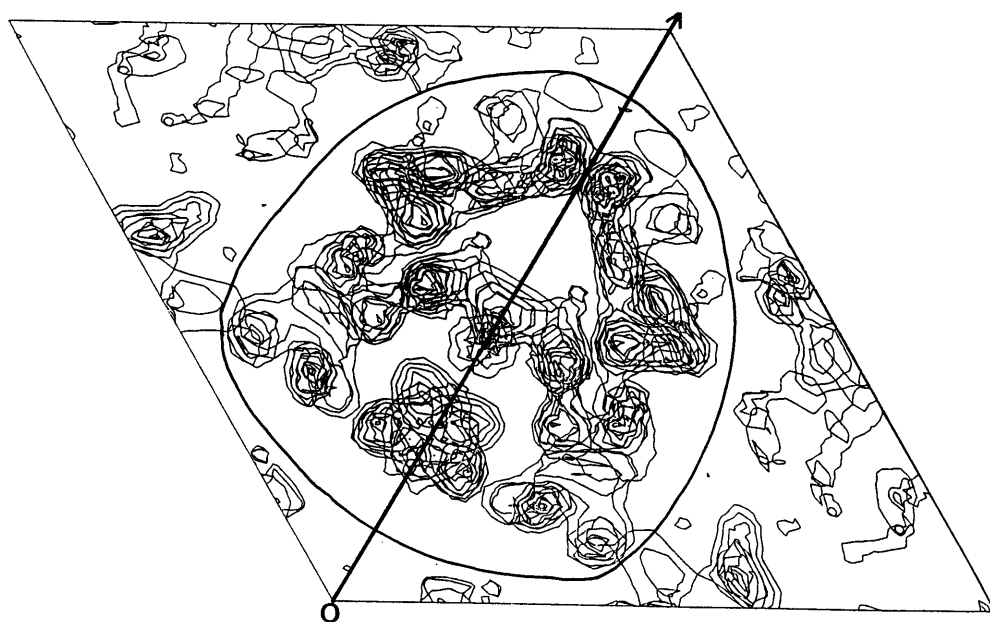


図2-5 6Å分解能の電子密度図

c軸方向から、電子密度図を見たもの。電子密度分布は、等高線で描いてある。単位格子をc軸に垂直な面で36分割し、このうち、 $z=1/2$ を中心とする7セクションを重ねてある。矢印は、結晶学的な2回軸を示しており、線で囲った領域に非対称単位2つ分に相当する4分子のA-IIが含まれている。

の数を調べたところ、Hg、Ir両重原子とも4つずつ含まれていることが判明した。さらに、Hg1とIr1との間の距離は7.7Å、Hg2とIr2との間は8.4Åと6Åという分解能から考えるとほぼ等しいといえることから、Hg1とIr1の組が1つの分子に、そして、Hg2とIr2の組がもう1つの分子に結合していると推定された。そして、結晶学的な2回軸を含む図2-5の領域には、A-II4分子が存在すると推定された。さらに、重原子サイトの位置から非結晶学的な2回軸の存在が予想された。

そこで、その2回軸の方向から電子密度図を見たところ、図2-6のようになり、非結晶学的な2回軸の存在が確認されると共に、個々のA-II分子の領域も決めることができた。また、A-II分子が2つのドメインから成ることも明きらかになった。

後に3Å分解能の電子密度図分布を使ってこの2回軸の位置と向きを精密化したところ、この非結晶学的な2回軸は $x=y=0.495$ 、 $z=0.5$ を通り、C軸方向から $34.1^\circ$ 傾いてはいるが、 $z=1/2$ の位置にある結晶学的な2回軸とは直交していることが判明した。このことより、A-II分子は結晶中では222の対称を持つ4量体を形成していることがわかった。

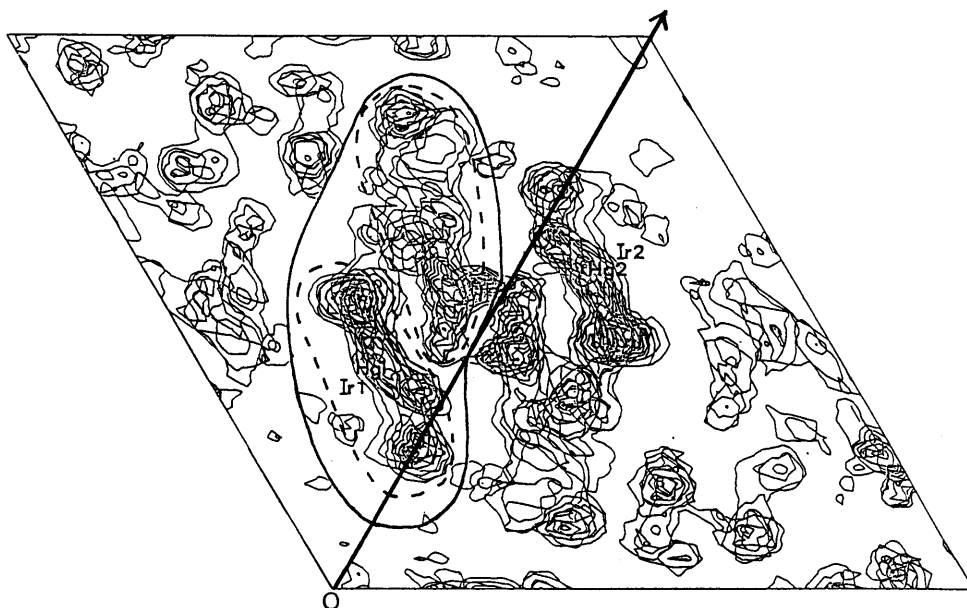


図2-6 非結晶学的2回軸の方向からみた6Å分解能の電子密度図

$z=1/2$ を中心とする7セクション(厚さ12.8Åに相当)の電子密度図を重ねてある。矢印の方向に結晶学的2回軸があり、図の中心には、非結晶学的2回軸が紙面と垂直にある。太線は、1つの分子領域を表し、点線は、A-IIの2つの構造ドメインを表す。なお、Hg/Ir重原子誘導体における重原子サイトの位置をHg1, Hg2, Ir1, Ir2の記号で表してある。

## 2.9.2 3A分解能の電子密度図

6A分解能での結果を踏まえて、分子モデルの組立のために、重原子同型置換法による位相を用いた3A分解能の電子密度図を描いた。ところが、この電子密度図上にはノイズが多く、主鎖のトレースはできなかった。そこで、非結晶学的な2回軸を用いた電子密度の平均化による電子密度図の改善を試みた。

## 2.10 非結晶学的な2回軸を用いた電子密度図の改良

非結晶学的な対称を用いて電子密度図を改良する方法は、Bricogne<sup>(30)</sup>によって提案されたのである。この方法のA-IIへの適用として、以下に示すような操作を繰り返すことにより、3A分解能における位相の改良、及び2.8Aまでの位相の拡張を試みた。

1) 1 サイクル目では重原子法による位相を、その後のサイクルでは前のサイクルで計算された位相を使って、 $2F_o - F_c$ を係数とするフーリエ図（1 サイクル目では、最良フーリエ図）を描く。

2) 非結晶学的な2回軸で関係づけられるA-II2分子を含むmolecular envelopeを作成する。

3) 非結晶学的な2回軸の位置と向きを精密化する。そして、この非結晶学的な対称操作を使って、非対称単位中のA-II2分子を重ね合わせ、2つの分子の電子密度の平均を行う。また、molecular envelope外の電子密度を0にする（solvent flattening）。

4) 平均操作により得られたA-II分子の電子密度分布を使って、単位格子の電子密度を再構成し、これを逆フーリエ変換して $F_c$ を計算する。このステップで構造振幅の測定値 $|F_o|$ と $|F_c|$ との間のR値を計算する。なお、2.8Aまでの位相の拡張は、この $F_c$ を計算するステップで行なった。

5) 1 サイクル目ではこの $F_c$ の位相と重原子同型置換法による位相を組み合わせて次のサイクルの位相とする。2 サイクル目以降では、この位相の組み合わせは行わなわず、 $F_c$ の位相を次のサイクルでは使う。

2) の molecular envelope の作成は、この作業のために開発したプログラム MASMAKEを用いて、PC-9801パーソナル・コンピュータの画面上で行った。なお、

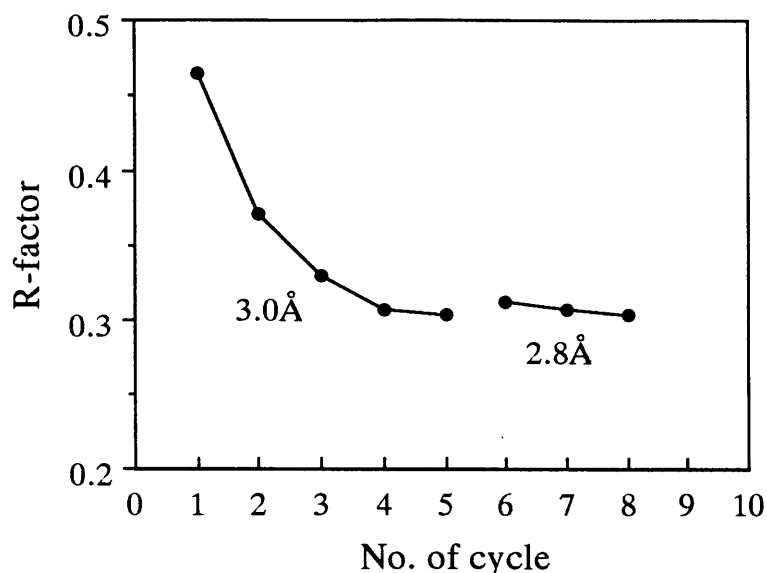


図2-7 非結晶学的2回軸を用いた電子密度図の改良法におけるR値の推移

平均化により得られた電子密度分布より計算された $F_c$ と $F_o$ の間のR値を平均化の各サイクル毎に示す。分解能は6サイクル目において、3.0Åから2.8Åへと上げられた。

molecular envelopeの作成は、重原子同型置換法による3.0Å分解能の電子密度図から1度行っただけで、サイクルの途中で新たなmolecular envelopeの作成は行わなかった。また、4)で $F_c$ の計算に用いたフーリエ図の分割数は、各結晶軸方向とも72分割である。

A-IIの電子密度図の改良は3.0Å分解能において5サイクル行い、6サイクル目に位相を2.8Å分解能まで拡張したのち、更に2.8Å分解能で2サイクルの位相の改良を行った。R値の推移を図2-7に示す。また、電子密度図が改良されていった様子を図2-8に示す。

この非結晶学的な2回軸を用いた電子密度図の改良法によって、溶媒領域のノイズの減少、実質的な分解能の向上など電子密度図の著しい改善がなされた。そして、主鎖のトレースが可能となり、また、大部分の側鎖の向きも決めることが可能となった。しかしながら、非対称単位を構成する2つの分子の電子密度分布には、8サイクル目においても分子の末端付近において差が残った。このことは、非結晶学的な2回軸で関係づけられているA-II 2分子の間に構造の違いのあることを示唆していた。

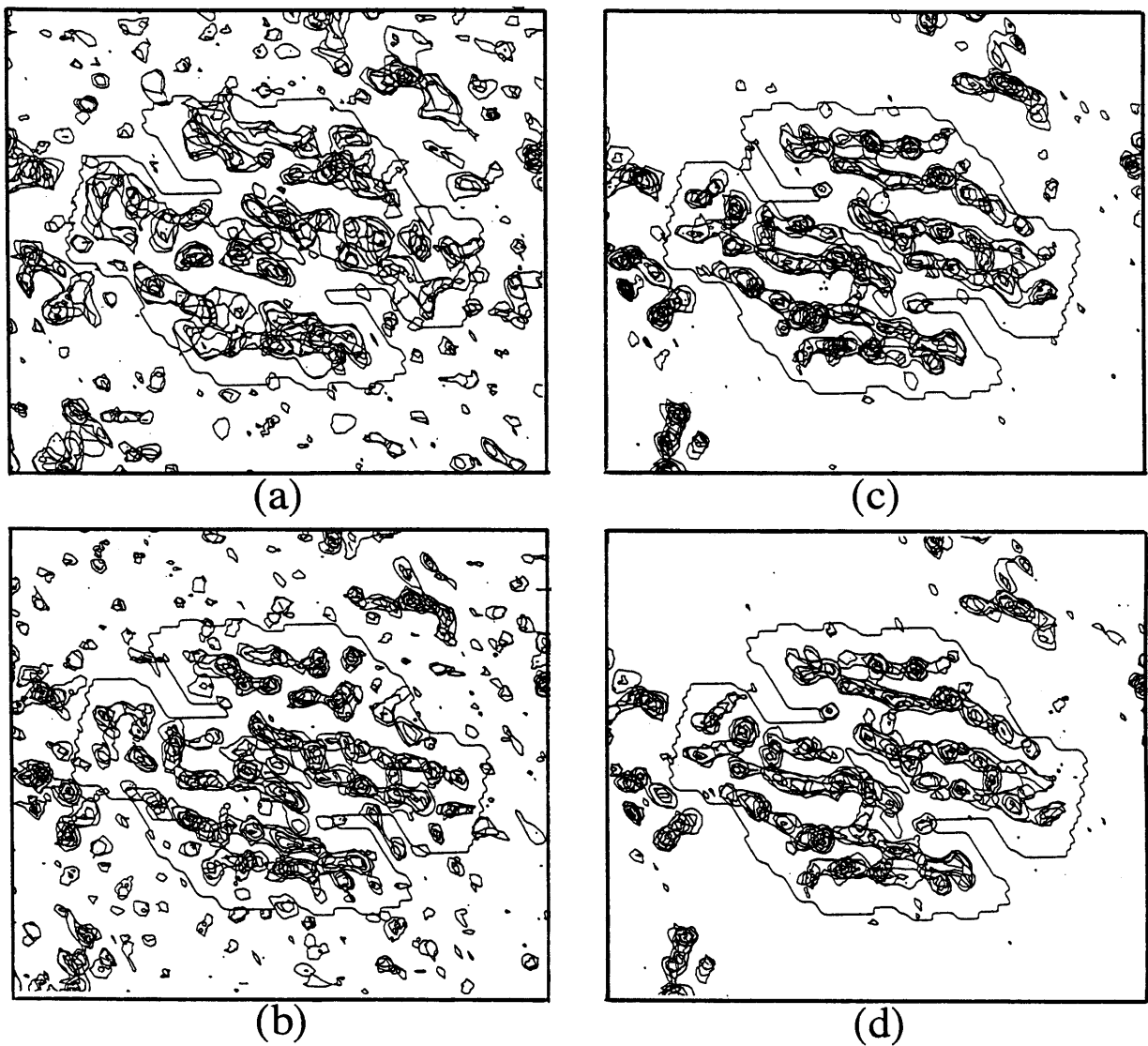


図2-8 非結晶学的2回軸を用いた電子密度図の改良

(a)重原子位相による3.0Å分解能の電子密度図

(b)1サイクル目の3.0Å分解能の電子密度図

(c)5サイクル目の3.0Å分解能の電子密度図

(d)8サイクル目の2.8Å分解能の電子密度図

電子密度図は全て、非結晶学的な2回軸の方向から見ている。また、実線は、使用したmolecular envelopeを示している。

## 2.11 三次元分子モデルの組み立て

電子密度の平均化法により得られた2.8Å分解能の電子密度図を基にA-IIの3次元分子モデルを組み立てた。分子モデルの組み立ては、

- (1) ペプチド主鎖のトレース
- (2) 各アミノ酸残基のC $\alpha$ 原子の位置の決定
- (3) 標準的な立体構造パラメータを使った側鎖の構造の生成
- (4) 電子密度図に合うように主鎖及び側鎖構造を微調整する(分子構造モデルの電子密度図へのフィッティング操作)

の順で行った。これらの操作は、非対称単位を構成するA-II 2分子、分子Aと分子Bに対して独立に行った。

主鎖のトレースは、電子密度分布を非対称単位を構成するA-II二量体のローカルな2回軸方向から見ることでできるミニマップを作って行った。これにより、ローカルな2回対称で関係付けられる2つの分子の電子密度分布を見比べることができるようになり、主鎖のトレースがより容易に且つ確実に行えるようになった。主鎖の電子密度には、途切れているところや関係無い部分とつながっているところがあったが、A-IIの7つのS-S結合によって決められる1次構造のトポロジーと矛盾しないようなトレースを行うことにより、正しい主鎖のトレースに行き着いた。また、S-S結合の存在する部分は、他の部分に比べ電子密度が高かったため、主鎖のトレースにおいて非常に参考になった。

各残基のC $\alpha$ 原子の位置の決定もミニマップ上で行われた。まず、側鎖の電子密度がはっきり現れている残基(Leu16、Phe25、Val30、Phe33などの疎水性残基の側鎖の電子密度は比較的是っきり現れていた)やS-S結合を形成するシステイン残基の部分のC $\alpha$ 原子位置が決められた。そして、つぎに側鎖の電子密度の現れていない残基のC $\alpha$ 原子位置が、隣接する残基間の標準的なC $\alpha$ -C $\alpha$ 間距離3.5Åを使って主鎖の電子密度上に置かれた。

側鎖の構造モデルは、ミニマップから読み取ったおおよそのC $\beta$ 原子の位置と既に読み取ってあるC $\alpha$ 原子位置を基に、アミノ酸の標準的な立体構造パラメータを使って作成した。これには、FRODOプログラムシステムのREFIオプションを用い、このとき同時にC $\alpha$ 以外の主鎖原子座標も生成した。

こうして組み立てられたA-IIの三次元分子モデルは、田中勲氏により開発されたグラフィクスプログラムPMAKERを用いて、電子密度の平均化法により得られた

表2-10 初期分子モデルの組み立て

	分子 A	分子 B
主鎖及び側鎖の構造を構築できた残基数	49	46
主鎖のみ構造を構築できた残基数	11	14
電子密度が無く構造の構築不能な残基数	10	10
計	70	70

2.8Å分解能の電子密度図に合うように修正された。PMAKERは、パーソナルコンピュータPC-9801シリーズ（NEC製）のディスプレイ上に、電子密度図と分子モデルを表示し、分子モデルの電子密度図へのフィティング操作が行えるものである。

最終的に平均化法による2.8Å分解能の電子密度図からは、非対称単位を構成するA-II2分子それぞれについて残基番号9から68までの60残基分の分子モデルを組み上げることができた。残基番号1から8及び69から70に相当する電子密度はこの電子密度図上に現れていなかった。また、電子密度弱く不明瞭で解釈困難であった残基47と48の主鎖の構造には、若干の曖昧さが残った。この時点での分子モデルの組み立て状況を表2-10に示す。

## 2.12 分子モデルの精密化

組み立てたA-IIの分子モデルの精密化は、8つのステージで行われた。最初のステージを除き、各ステージはomit mapを使った分子モデルの手動での修正と、プログラムPROLSQ<sup>(31)</sup>を使った束縛条件下での最小二乗法による分子モデルの精密化の2つのステップからなる。なお、最初のステージではPROLSQによる精密化のみを行った。表2-11に精密化の概要をまとめて示す。

精密化は、最初10.0-3.0Å分解能のX線回折データを用いて始められ、徐々に上限の分解能を上げて行き、最終的には、2.3Å分解能で行われた。

omit mapは、分子モデルをN末端から順に10残基程度ずつのフラグメントに分割し、その各フラグメントを順次omitしていくことにより計算した。こうして、ステージ毎にomit mapによる分子モデル全体にわたる修正が、グラフィクスプロ

表2-11 精密化の概要

Stage	1	2	3	4	5	6	7	8
Omit-map								
Resolution range (Å)	-	10.0-2.3	10.0-2.5	10.0-2.5	10.0-2.5	10.0-2.3	6.0-2.3	6.0-2.3
Fourier coefficient	-	2Fo-Fc	2Fo-Fc	2Fo-Fc	2Fo-Fc	Fo-Fc	Fo-Fc	Fo-Fc
Refinement								
No. of cycles	11	30	41	53	40	36	20	24
No. of atoms								
Protein	855	838	902	868	890	890	890	890
Solvent	0	0	0	0	0	60	52	84
Resolution range (Å)								
Initial	10.0-3.0	10.0-3.0	10.0-3.0	10.0-3.0	6.0-3.0	6.0-2.7	6.0-2.3	6.0-2.3
Final	10.0-3.0	10.0-2.5	10.0-2.5	10.0-2.5	6.0-2.3	6.0-2.3	6.0-2.3	6.0-2.3
No. of data ( $F > 3\sigma(F)$ )								
Initial	3793	3793	3793	3793	3444*	4773*	7697	7697
Final	3793	6117	6117	6117	6973*	6973*	7697	7697
R-factor								
Initial	0.416	0.405	0.377	0.329	0.347	0.320	0.315	0.249
Final	0.344	0.288	0.242	0.250	0.211	0.234	0.224	0.196

\* :  $F > 5\sigma(F)$ 

グラムPMAKERを用いて手動で行われた。omit mapを使用することにより、電子密度の平均化法後の電子密度図において主鎖のトレースに曖昧さの残ったArg47 からSer48の部分にも、正しい分子モデルを構築することができた。

PROLSQによる精密化では、ステージ5,6を除いて $F > 3\sigma(F)$ の反射を用いた。(ステージ5,6では、 $F > 5\sigma(F)$ ) 精密化において、非対称単位中のA-112分子間にローカルな2回対称による束縛はかけなかった。また、分子モデルにかける立体化学的束縛は、最初のステージでは緩くして、結晶学的R値を下げることに重点を置いた。

ステージ4までは、各原子の温度因子は、Wilsonプロット<sup>(32)</sup>で求めた $45\text{Å}^2$ に固定された。そして、ステージ5から8では、各原子の等方性温度因子が精密化された。

タンパク質分子に結合し固定されている水分子は、ステージ5から7において分子モデルに含められた。Fo-Fc フーリエ図及び2Fo-Fcフーリエ図の両方に現れており、タンパク質分子由来のものではない球状のピークが拾い上げられ、この



うち、タンパク質分子と水素結合できる距離（3.5Å以内）にあるもののみが水分子と判断され、分子モデルに含められた。水分子の占有率は1.0に固定し、その位置と温度因子がPROLSQで精密化された。各ステージでの精密化後、温度因子が $60\text{\AA}^2$ を越えるか、 $2F_o-F_c$ フーリエ図にピークを与えなくなった水分子は、分子モデルから除かれた。

精密化によって最終的に、非対称単位を構成する2つのA-II分子それぞれに対して、残基番号10から69までの分子モデルを得ることができた。このうち残基69を除く全ての残基の側鎖の構造も決めることができた。N末端の1から9番目の残基とC末端の70番目の残基に相当する電子密度は、精密化の最終段階においても現れず、これらのペプチド鎖末端部分が結晶中で大きく揺らいだ構造をとっていることが明かとなった。

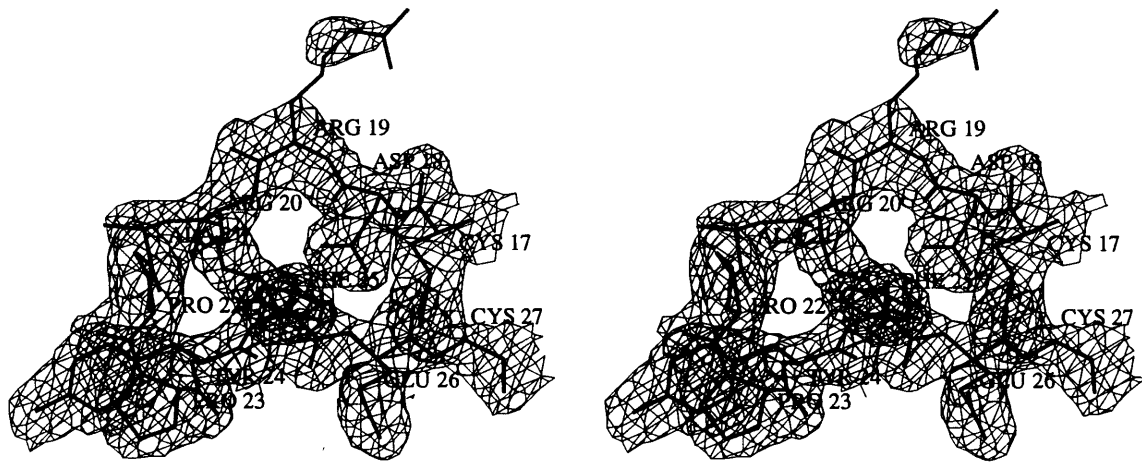
最終的な分子モデルは、A-II 2分子分の890個の非水素原子と84個の水分子（の酸素原子）を含んでおり、6.0から2.3Å分解能の $F > 3\sigma(F)$ の7697個の反射に対する結晶学的R値は0.196である。

### 2.13 分子モデルの精度

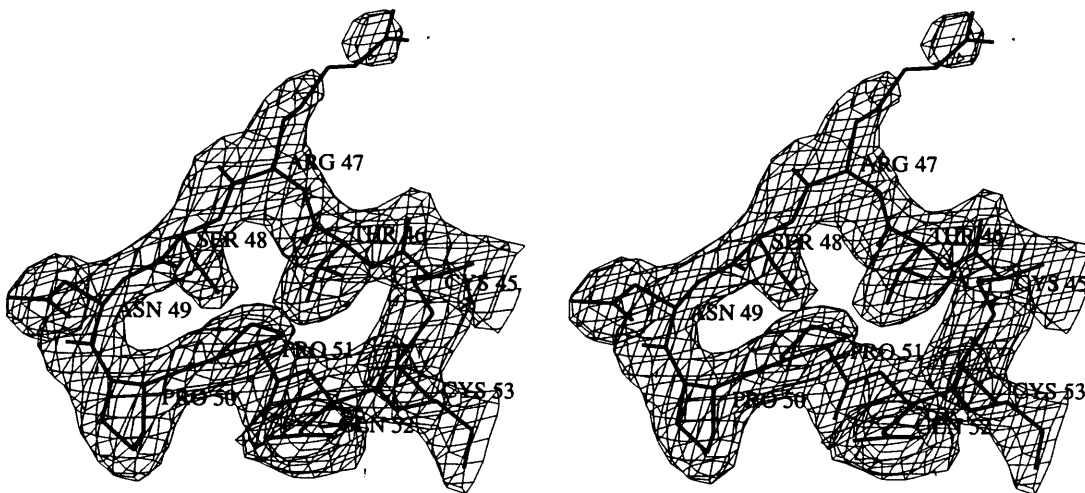
最終的に得られた2.3Å分解能の電子密度図を図2-9に示す。分子モデルを構築した領域では、障害部位のP1残基であるArg19とArg47の側鎖を除き電子密度がはっきりと現れ、分子モデルを一意的に組み立てることができた。Arg19とArg47の側鎖の電子密度は低く若干曖昧で、これらの側鎖が結晶中で複数のコンホメーションをとっていることを示唆していた。従って、今回構築した側鎖のコンホメーションは、それらの複数のコンホメーションの内の1つということになる。

最終分子モデルの立体化学的ジオメトリーの理想的値からのずれの平均値を、表2-11にまとめて示す。また、主鎖のペプチド平面の二面角のRamachandranプロット<sup>(33)</sup>を図2-10に示す。これらの表及び図から、組み立てられた分子モデルが、立体化学的に何ら問題が無いことがわかる。

A-II分子モデルの原子座標の平均誤差は、非セントリックな反射全てを用いたLuzzati<sup>(34)</sup>プロットにより見積った。（図2-11）見積られた平均誤差値は0.27Åである。



(a)



(b)

図2-9 最終的な2.3Å分解能の電子密度図

(a)第一障害部位付近 (b)第二障害部位付近

1 $\sigma$ より高い電子密度を持つ領域をカゴ状の構造で表してある。P1残基であるArg19及びArg47の側鎖の電子密度は低く、これらの側鎖が、結晶中で揺らいでいることを示している。

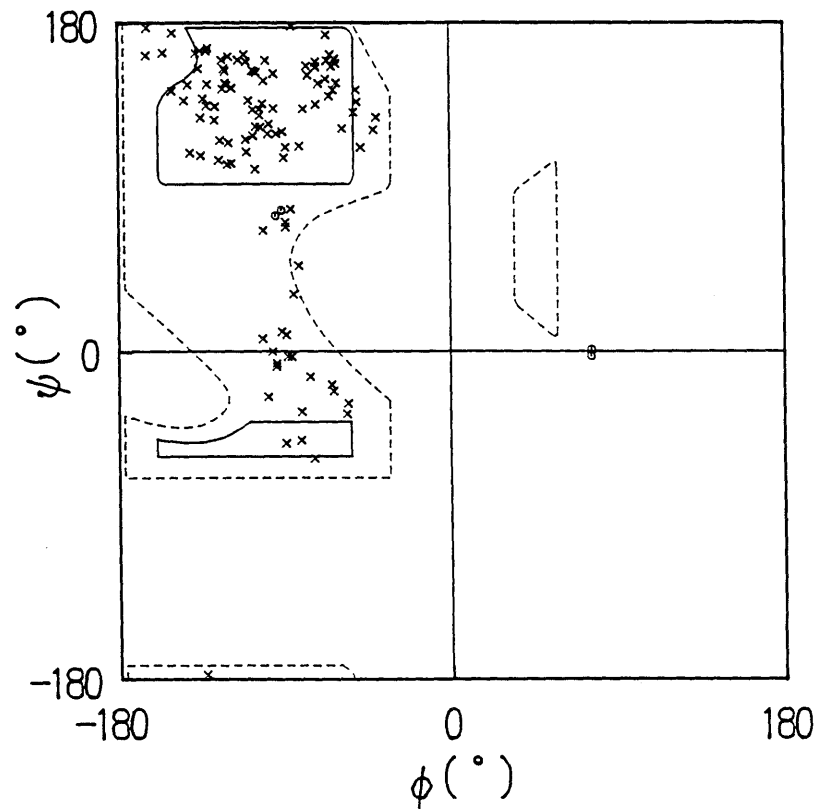


図2-10 A-IIの最終モデルのRamachandranプロット

非対称単位中の2分子のペプチド平面の2面角がプロットしてある。○はグリシン残基を表す。なお、点線は、タンパク質において許容される二面角の範囲を示しており、実線は $\alpha$ -ヘリックス（第3象限）及び $\beta$ -シート（第2象限）中で見られる二面角の範囲を示している。

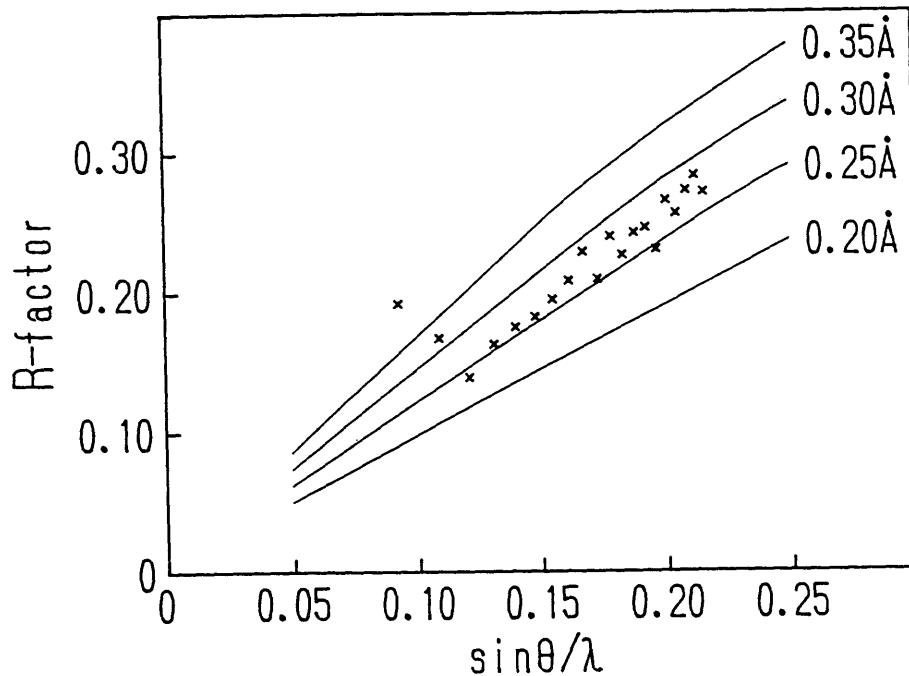


図2-11 A-IIの最終モデルのLuzattiプロット

非セントリックな反射に対するR値を $\sin \theta / \lambda$ に対してプロットしたもの。4本の曲線は、分子モデルの原子座標の平均誤差がそれぞれの値の時の理論的なR値を示す。このプロットより、原子座標の平均誤差は、0.27Åと見積られた。

表2-12 最終的な分子モデルにおける立体化学的ジオメトリの理想的値からの偏差

	Target deviations	r. m. s. deviations	No. of parameters
Distances (A)			
Bond distance	0.020	0.017	922
Angle distance	0.030	0.039	1264
Planar 1-4 distance	0.040	0.039	298
Plane groups (A)	0.020	0.015	786
Chiral volumes (A <sup>3</sup> )	0.150	0.167	138
Non-bonded contacts (A)			
Single torsion contact	0.500	0.195	287
Multiple torsion contact	0.500	0.316	297
Possible hydrogen bond	0.500	0.360	74
Torsion angles (°)			
Peptide plane( $\omega$ )	3.0	2.8	128
Staggered (60/180°)	15.0	21.1	144
Ortho-normal (90°)	20.0	18.4	8
Isotropic thermal factors (A <sup>2</sup> )			
Main chain bond	1.000	0.901	540
Main chain angle	1.500	1.584	706
Side chain bond	1.000	0.867	382
Side chain angle	1.500	1.499	558

### 3 A-IIの結晶構造

#### 3.1 分子全体の構造

A-IIは一つの方向に長く引き伸ばされた構造をとっており、分子のおよその大きさは、 $45\text{Å} \times 22\text{Å} \times 18\text{Å}$ である。図3-1にA-IIの全分子構造を、図3-2にA-IIの主鎖の構造を示す。これら図から解るように、A-IIは明かな分子内疑似2回対称軸を分子の中央部に持っている。そして、Arg19とArg47の2つのプロテアーゼ阻害の中心残基（P1残基）は、長く引き伸ばされた方向の分子の両末端に近くであり、この分子内対称で関係付けられている。2つのP1残基は、お互いに約36Å離れて存在しており、このようにお互いに遠く引き離された配置が2つのプロテアーゼに対する同時阻害を可能にしている。

分子の基本骨格は、分子の底面に広がる4本のペプチド鎖からなる逆平行 $\beta$ -シートである。このシートの1本目のストランドは残基番号14から18の5残基か

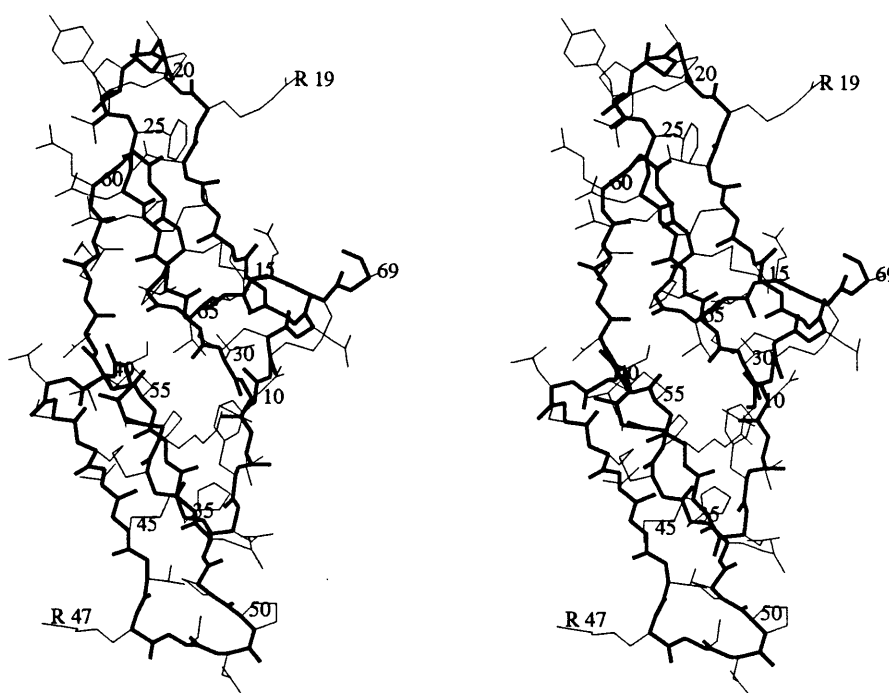


図3-1 A-IIの全分子構造

A-II（非対称単位中の分子A）の全分子構造をワイヤーモデルで表したもの。主鎖は太線で、側鎖は細線で表されている。

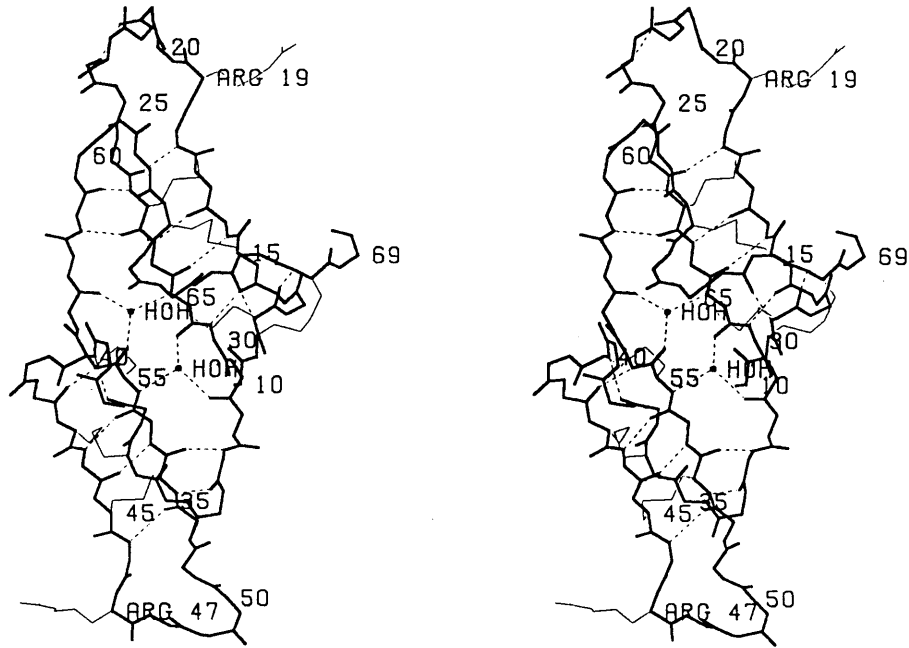


図3-2 A-IIの主鎖の構造

主鎖の構造以外に、阻害部位のP1残基 (Arg19とArg47) の側鎖と7本のS-S結合も細線で示してある。点線は、主鎖間の水素結合を表す。また、HOHは4本鎖逆平行 $\beta$ -シートに組み込まれた2つの水分子を表す。

ら成り、2本目は25から33の9残基、3本目は53から61の9残基、4本目は42から46の5残基から成っている。 $\beta$ -シートの2本目と3本目のストランドの間には、2つの水分子がストランド間を水素結合で結ぶ働きをしている。主鎖間の水素結合はこの $\beta$ -シート部分に集中しており、ここ以外には4本しかない。(図3-2参照)

$\beta$ -シートの面内の方向から分子の姿を眺めてみると分子の別の姿が明らかになる。図3-3はこの方向から分子を眺めたものである。この方向から見ると分子中で $\beta$ -シートの構成に参加していない部分が4本のS-S結合 (Cys12-Cys29、Cys15-Cys63、Cys36-Cys43、Cys40-Cys55) によって、 $\beta$ -シート部分に結び付けられていることが良くわかる。これらのS-S結合が $\beta$ -シート以外の部分の構造の安定化に大きく寄与しているものと考えられる。この4本以外のS-S結合も、Cys17-Cys27とCys45-Cys53が、阻害部位の構造を安定化し、Cys11-Cys68が、構造の揺らぎ易いペプチド鎖のN及びC末端を連結し安定化させるなど、A-IIの分子構造を保つ上で重要な働きをしている。

図3-3では、疎水性の残基も示してある。疎水性の残基は、分子の中心に集まっ

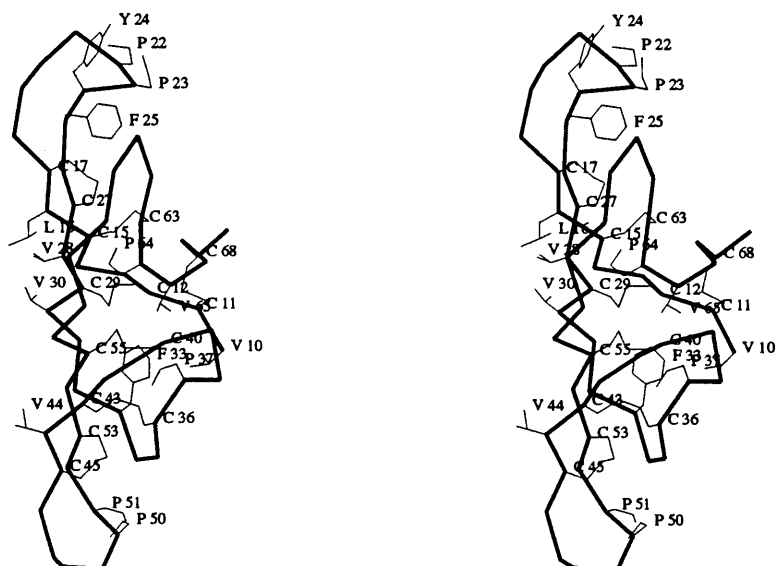


図3-3  $\beta$ -シートの面内の方向から眺めたA-IIの分子構造

主鎖をC $\alpha$ 分子モデルで表し、疎水性の側鎖、S-S結合、阻害部位のP1残基を細線で示してある。S-S結合が主鎖間を架橋し分子を安定化している様子や、阻害部位近傍の分子表面に疎水性の残基が配置されている様子が解る。

て小さな疎水性の核を作っているが、それ以外に分子の両端のプロテアーゼ阻害部位近傍で分子表面に露出しているのが目立つ。後の章で述べるが、これらの残基の内幾つかは、プロテアーゼとの疎水性相互作用に用いられていることが解った。

### 3.2 プロテアーゼ阻害部位の構造

A-IIとプロテアーゼの相互作用は反応部位を中心に起こるため、反応部位の構造は重要である。図3-4に反応部位のあるループI及びループI'の構造を示す。A-IIのループIは11個のアミノ酸残基からなり、ループI'は9残基から成るが、両者が共にプロテアーゼの活性中心といういわゆる同じ鍵穴に合う鍵であり、両者の構造の一致する領域こそが鍵の部分、即ち、プロテアーゼと相補的に結合する部分に相当すると考えられる。そこで、両ループの構造を比較してみる。

両者は共に、P1残基（Arg19及びArg47）を外側に突き出したハート型の構造をとっている。そして、このP1残基を中心にして、反応部位近傍のP3（Cys17、Cys45）からP1'（Arg20、Ser48）にかけての主鎖の構造は、両者でほぼ一致している。また、この部分の背後にあり、この部分とS-S結合や水素結合をしている

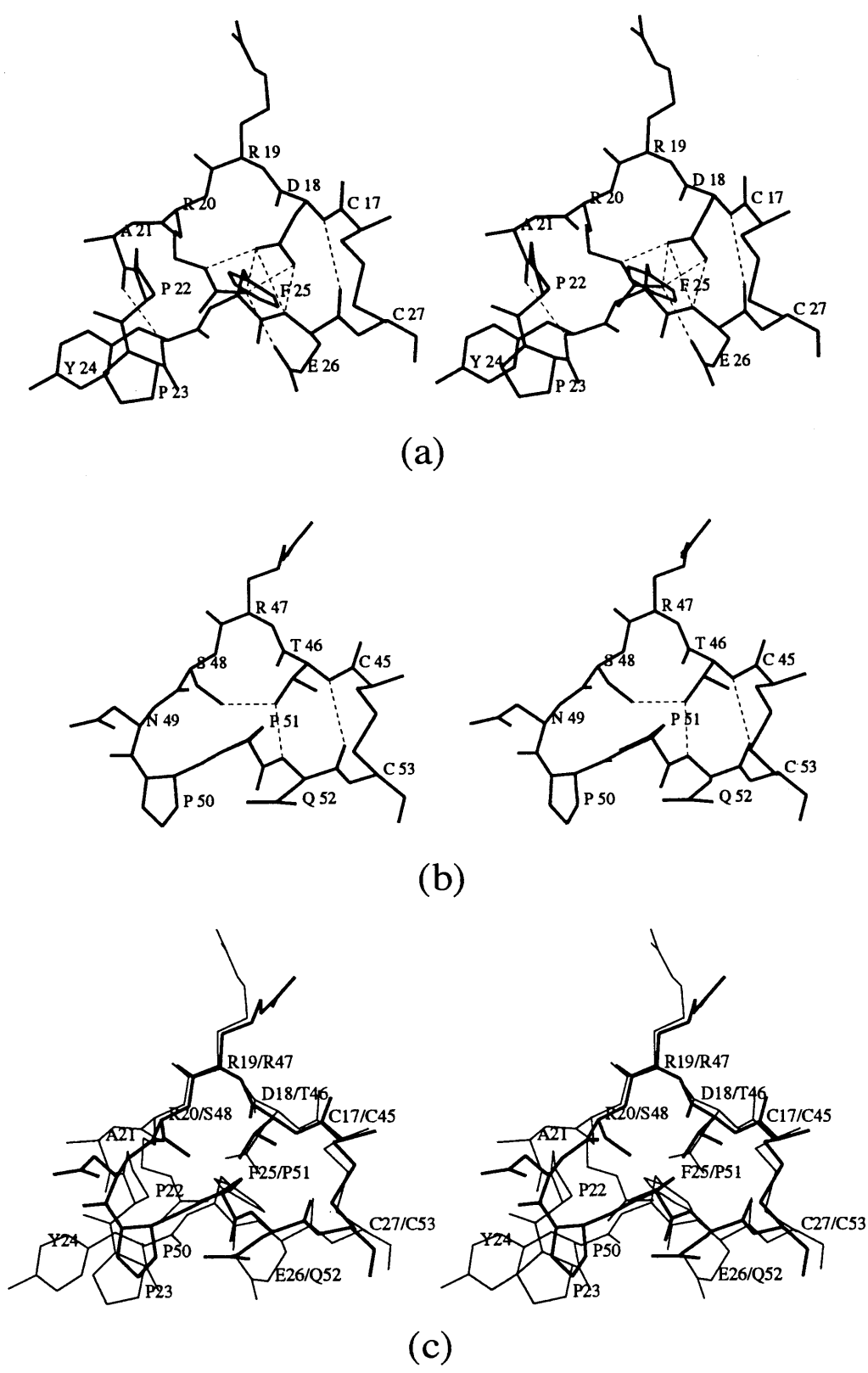


図3-4 A-IIのプロテアーゼ阻害部位の構造  
 (a)第一阻害部位 (b)第二阻害部位 (c)第一、第二阻害部位の構造の比較  
 \*は反応部位のペプチド結合を表し、点線は、水素結合を表す。



部分、即ちループ I ではPhe25からCys17にかけての部分、ループ I' ではPro51からCys53の部分、もお互いに主鎖の構造がほぼ一致している。従って、これらの領域が、プロテアーゼと接触する領域であると予想できる。

ループの構造をもう少し詳しくみると、P2とP1'の側鎖は、ループ内での水素結合に使われており、ループ構造を安定化するのに使われていることがわかる。また、これらの残基の主鎖のカルボニル酸素は、ループの反対側にある疎水性の側鎖（Phe25及びPro51）とファン・デル・ワールス接触をしており、これによりP1残基はループの外側に向けて押し出されているように見える。

両ループ内には1ヶ所ずつcis-ペプチドがある。即ち、Pro23とPro50である。どちらもS-S結合から最も遠いところで、ペプチド鎖を折り返す働きを担っているが、Pro23がPro22-Pro23と続く2つのプロリン残基の後ろ側であるのに対し、Pro50はPro50-Pro51と続く2つのプロリン残基の前側であるという違いがある。

### 3.3 結晶構造

A-IIの結晶の非対称単位は非結晶学的な2回軸で関係付けられる2分子のA-IIで構成されている。この2分子は、 $\beta$ -シートの表面に突き出ている疎水性の残基を挟み込むように、お互いの $\beta$ -シート同士を重ね合わせ、いわゆる $\beta$ -サンドイッチ型の接触をしている。この相互作用によってできたA-IIの2量体は結晶学的2回軸を介して、別の非対称単位を構成するA-II2量体と水素結合を主とする相互作用をしており、この結果A-IIは結晶中で222の対称を持つ直径50Åの球状の4量体を形成している（図3-5参照）この4量体を結晶中での分子のパッキングの基本単位と考えると、A-IIの結晶格子中でのパッキングは理解し易い。すなわち、結晶格子中では1つの4量体を4つの4量体が四面体型に囲むようなパッキングが行われている。（図3-6参照）

### 3.4 非対称単位を形成する2つの分子の比較

非対称単位を構成する2つの分子、分子Aと分子Bの構造には、それらが結晶中でおかれている環境の違いによる若干の違いが現れている。

非対称単位を構成する分子AとBは、結晶中では222の対称を持つ4量体に含まれる。従って、それぞれの分子は4量体を共に構成する他の分子と様々な相互作用を行うが、これらの相互作用は、4量体が222の対称を持つために分子A／

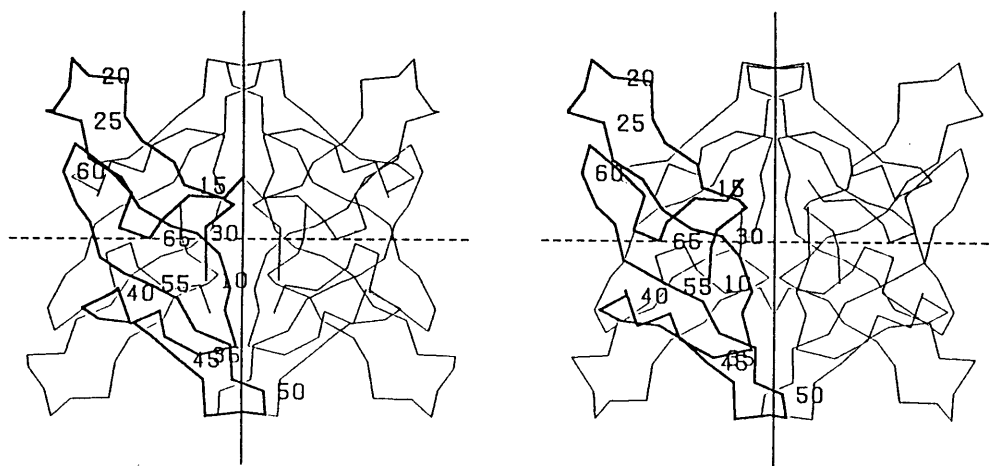


図3-5 結晶中で構成されるA-IIの4量体

縦の実線は結晶学的2回軸を表し、横の点線は非結晶学的な2回軸を表す。両者の交点には、紙面と垂直に、もう1本の非結晶学的な2回軸が存在する。

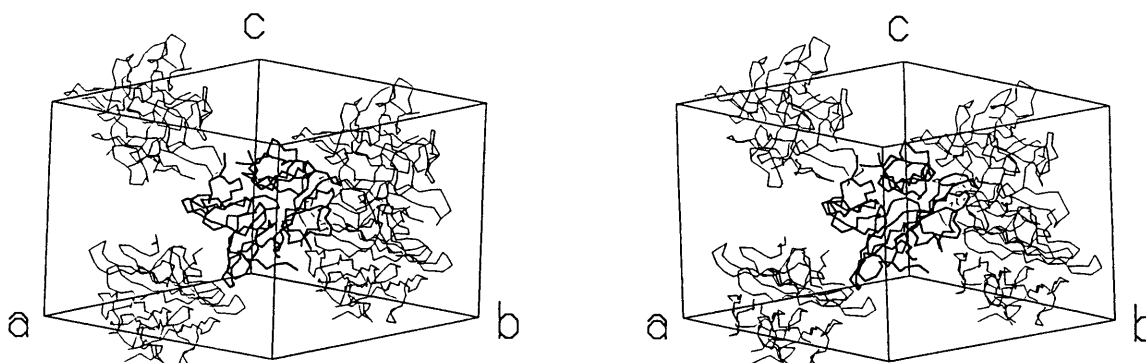


図3-6 単位格子中でのA-IIのパッキング

単位格子の中心にある太線で表した量体を、4つの4量体が四面体型に囲み相互作用している。この相互作用は、各A-IIのループIのところで行われている。

Bに対してほぼ同一である。

しかしながら、結晶中で4量体同士が接触するときに、A B 2つの分子は別々の様式の接触を受け、隣接分子より異なる力を受ける。4量体同士の接触は、疎水性の相互作用で、4量体を構成する4つのインヒビター分子の主にループI付近で起こっている。(図3-6参照) しかしながら、その接触の様式は非対称単位を構成する分子Aと分子Bで異なる。4量体間の接触に使われる残基は、分子Aでは、Arg20、Ala21、Pro23、Tyr24、Pro50、Gln60、Gln62の7残基であり、分子Bでは、Cys17、Phe25、Gln67の3残基である。このように、分子Aは、分子

Bに比べて、数多くの領域で隣接4量体からの相互作用を受けている。

これらの相互作用が分子AとBの構造に及ぼす影響を調べるために、残基番号10から68の主鎖原子236個を使って、非対称単位を構成するこの2分子を最小二乗法により重ね合わせた。図3-7にその様子を示す。また、各残基毎の主鎖及び側鎖原子の根二乗平均偏差を図3-8にグラフで表す。なお、残基番号10から68までの全主鎖原子の位置の根二乗平均偏差は、0.37Åである。

図3-7から解るように、分子A/Bで異なる接触を受けている領域では、主鎖の構造に若干の違いがある。特に、4量体間の接触が起こっているループI付近(残基番号19から24のあたり)でその違いは若干大きくなっている。しかしながら、構造の違いは主鎖原子の根二乗平均偏差で最大0.8Å(Tyr24)、ペプチド平面の2面角のうち $\phi$ で最大 $34^\circ$ 、 $\psi$ で最大 $32^\circ$ 程度であり、有意なものではあるが、それほど大きなものであるとは言えない。別の見方からすれば、外力によるA-II分子の変形の度合が示されているとも言える。

一方、非対称単位を構成する2分子の側鎖の構造の違いについて見てみると、Arg20、Tyr24、Gln60、Arg62に分子間接触の様式の違いによるものと考えられる構造の違いが見られる。しかしながら、その一方で、分子間接触の様式に違いの無

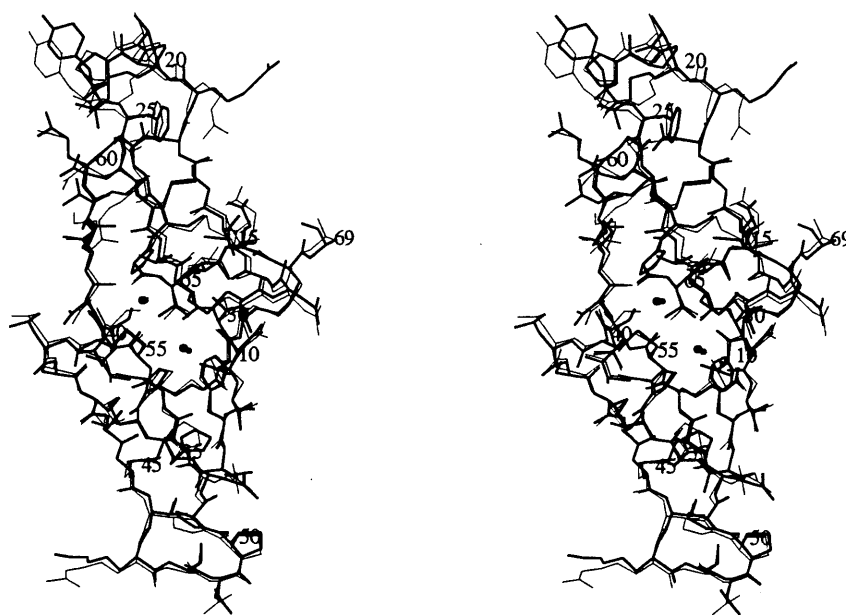


図3-7 非対称単位を構成する2つの分子の構造の比較  
太線は分子Aを、細線は分子Bを表す。

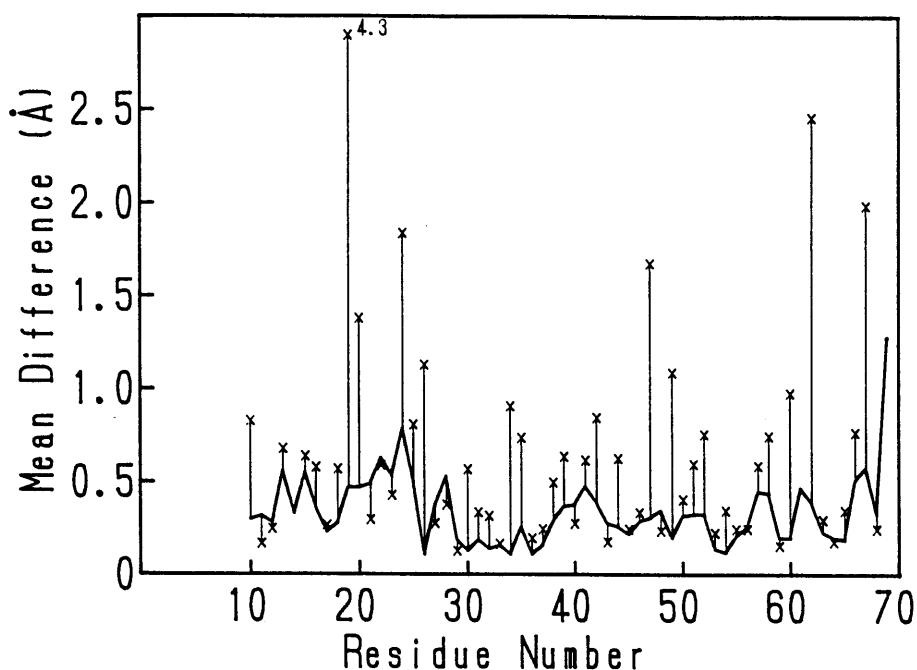


図3-8 非対称単位を構成する2つの分子の構造の違い

残基番号10から68の主鎖原子を使って、非対称単位を構成する2つの分子を最小二乗法により重ね合わせ、この後、残基毎の原子座標の平均偏差を主鎖原子（太線）と側鎖原子（細線とxマーク）で別々に計算しプロットした。

いArg19、Glu26、Arg47にも側鎖の構造に大きな違いが見られる。

分子A/B間で構造の異なる側鎖は、分子表面にあり、親水性で、かつ、比較的長さが長いものである。従って、これらの側鎖の構造の違いは、分子間接触が無くても起こり得ると考えられ、構造の厳密な比較は無意味である。別の見方をすれば、側鎖のとり得る構造の内の2つが現れているに過ぎないとも言える。

### 3.5 温度因子

非対称単位を構成する2つの分子間で、各残基の温度因子の大きさは、若干異なる。図3-9に、非対称単位を構成する分子Aと分子Bの残基毎の主鎖及び側鎖の平均温度因子を示す。

両分子で温度因子は、β-シートの部分で小さく、それ以外のターンのところでは大きいというほぼ共通の傾向を示す。特に反応部位を含むループI、ループI'の所は温度因子が高く、構造が揺らぎ易くなっている。

分子Aと分子Bで温度因子の異なる部分は、両分子で異なる分子間接触を受けている部分である。すなわち、分子Aの Arg20、Ala21、Pro23、Tyr24、Pro50、Gln60、Gln62、分子Bの Cys17、Phe25、Gln67 では、隣接する分子との接触により、接触の無い非対称単位中のもう片方の分子と比べた場合、残基の平均温度因子が有意に下がっている。また、分子Aの方が分子Bよりも多くの隣接分子からの接触を受けているため、分子全体の平均温度因子も、分子Bが45.3Å<sup>2</sup>であるのに対し、分子Aは40.3Å<sup>2</sup>と有意に小さくなっている。(なお、非対称単位を構成するA-II 2分子の平均温度因子は42.6Å<sup>2</sup>である。)

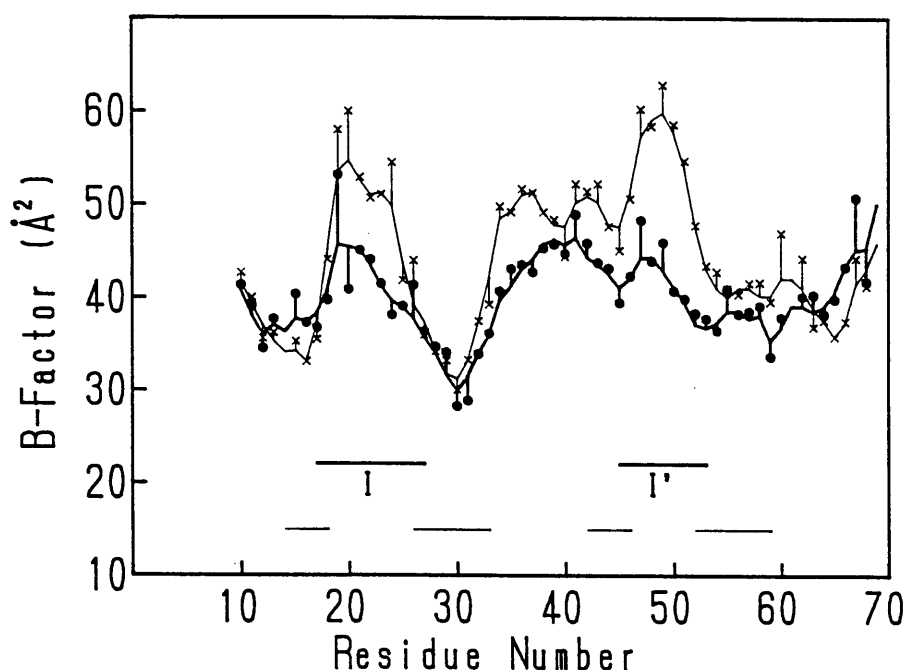


図3-9 A-IIの残基毎の平均温度因子

非対称単位を構成する分子Aと分子Bの残基毎の主鎖及び側鎖原子の平均温度因子を、太線(分子A、主鎖)、細線(分子B、主鎖)、●(分子A、側鎖)、×(分子B、側鎖)で示してある。また、グラフの下には、ループI及びI'の領域を太線で、4本鎖逆平行β-シートの領域を細線で表してある。

## 4 A-I I と他の B B I の構造の比較

### 4.1 比較の対象としたBBI

BBIの結晶構造解析は、A-II以外に、Tracy soybean由来のBBIであるPI-II（大豆(soybean)由来のE-Iとアミノ酸配列が同一）の単独の状態での解析<sup>(35)</sup>と、小豆由来のBBIであるAB-Iとトリプシンの1:1複合体<sup>(36)</sup>、緑豆(Mung bean)のBBIとトリプシンの1:2複合体<sup>(37)</sup>、そして、緑豆BBIのトリプシン阻害部位のアミノ酸配列をまねて合成した22個のアミノ酸残基からなるオリゴペプチドとトリプシンの1:1複合体<sup>(38)</sup>の計4つの解析例がある。これらの解析の分解能や分子モデルの精度などを表4-1に示す。

これらの解析のうち、緑豆インヒビターとトリプシンの1:2複合体では、緑豆インヒビターの持つ高い分子内疑似2回対称性のために、結晶の非対称単位がTa:MaMb:Tb型とTb:MaMb:Ta型（Ta, Tb=非対称単位中でそれぞれ決まった位置を占めるトリプシン、Ma, Mb=緑豆インヒビターの第一、第二阻害部位）という2種類の複合体で構成されてしまい、インヒビター部分の電子密度分布が配向のほぼ180°異なる2つのインヒビターの重ね合わせの像となってしまった。このため、精度の良い分子モデルが組み立てられず、プロテイン・データ・バンクにも原子

表4-1 他のBBIの結晶解析構造解析

インヒビター又は複合体名*1	分解能(A)	R値	理想値からの偏差 結合長(A)	結合角(°)	PDBコード	文献
PI-II	2.5	0.236	0.012	2.8	1PI2	(35)
AB-I - TRP	2.3	0.200	0.027	0.054*2	1TAB	(36)
MBI - pTRP	2.5	0.179	0.020	2.6		(37)
mMBI - TRP	2.1	0.190	0.014	2.71	1SMF	(38)

\*1 略号

AB-I : Adzuki bean Bowman-Birk inhibitor AB-I

MBI : Mung bean Bowman-Birk inhibitor

mMBI : Synthetic peptide based on mimic mung bean Bowman-Birk inhibitor

TRP : Bovine trypsin

pTRP : Porcine trypsin

\*2 2本の結合でつながった3つの原子の1-3原子間の距離。単位はÅ。

座標が登録されていない。そこで、緑豆インヒビターとトリプシンの1:2複合体の解析結果は比較の対象から除外した。

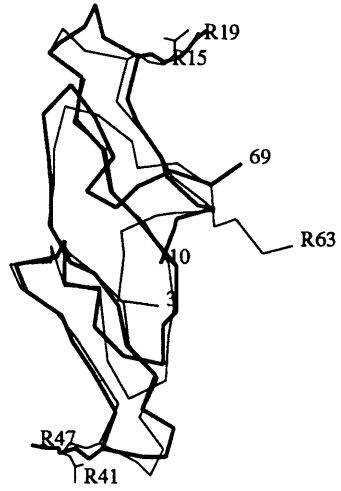
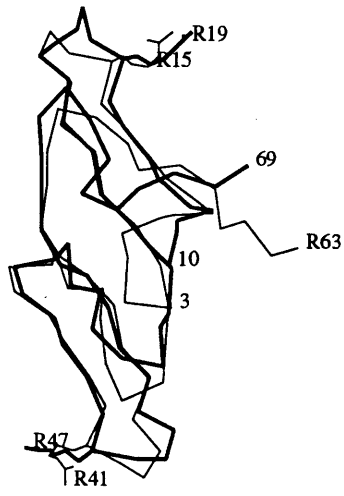
他のBBIの解析例でもA-IIの場合と同様に、分子構造の一部または場合によっては半分近くがdisorderな領域であり、分子全体にわたる完全な3次元構造が得られているわけではない。PI-IIでは、N末端の2残基の構造が求められていない。AB-I-トリプシン複合体で分子モデルが組み立てられているのは、トリプシン結合部位近傍の実であり、分子全体の約半分の部分（全82残基中36残基）にすぎない。緑豆BBI類似オリゴペプチドとトリプシンの複合体の構造解析では、トリプシンに対する反応部位を含む9アミノ酸残基からなるペプチド鎖のループ（ループI）の構造が明らかにされたのみである。従って、A-IIとこれらのBBIの構造の比較は、お互いに分子モデルが組み立てられている領域に限られた。

#### 4.2 分子全体の構造の比較

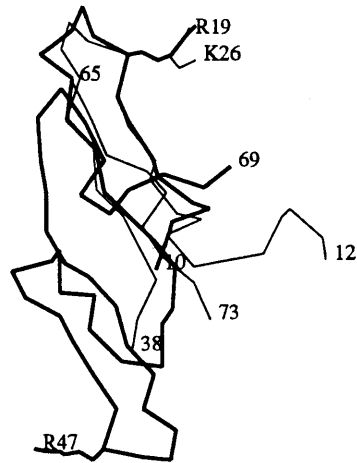
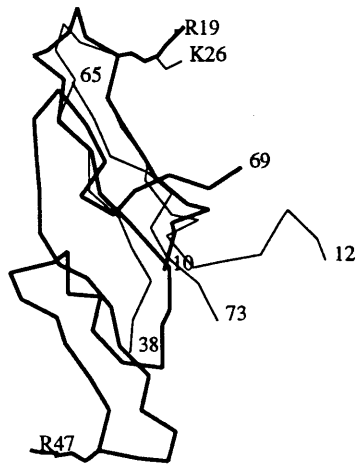
A-IIの主鎖構造をPI-IIまたはAB-Iのそれと重ね合わせることにより、これらの主鎖構造の比較を行った。（図4-1）重ね合わせは、まず、コンピュータグラフィックスを用いておおまかに主鎖構造の重ね合わせを行い、対応付けることが可能な $\alpha$ 炭素を選んだ後、これらの $\alpha$ 炭素を使った最小二乗法による重ね合わせを行った。

図4-1を見る限り、A-II、PI-II、AB-Iの主鎖の折りたたまれ方に大きな違いはない。従って、これらに見られるような主鎖の折りたたまれ方が、全てのBBIに共通のものであるとの予想が立つ。

A-IIとPI-IIの主鎖の重ね合わせでは、4本鎖 $\beta$ -シート部分の構造は良く一致しているが、反応部位を持つループIとループI'付近の構造には違いがあるように見える。一方、A-IIとAB-Iの重ね合わせでは、ループI付近の構造は一致しているが、そこから離れて $\beta$ -シート構造部分になるにしたがって、主鎖の構造に違いが出てきているように見える。しかしながら、これらの現象は、実は、 $\beta$ -シートの捻れ方が各BBIごとに違っているために、 $\beta$ -シートの何処か一部が良く重なるように分子を重ねた場合、シート中の他の部分の重なり具合が悪化することに起因している。 $\beta$ -シートの両端の部分には反応部位があるため、 $\beta$ -シートの捻れ方の違いは、2つの反応部位の相対的配置の違いとなる。従って、BBIの2つの反応部位の相対的配置は、BBIごとに若干ばらつく可能性がある。



(a)



(b)

図4-1 A-IIと他のBBIの主鎖構造の比較

(a)PI-IIとの比較 太線：A-II 細線：PI-II

(b)AB-Iとの比較 太線：A-II 細線：AB-I



### 4.3 反応部位の構造の比較

A-IIの2つの反応部位近傍の構造は基本的には同一である。そこで、第二反応部位(Arg47-Ser48)を含むループI'の構造をPI-IIのループI、AB-IのループI及び緑豆BBI類似オリゴペプチドのループIの構造と重ね合わせて比較してみた。(図4-2)重ね合わせは、それぞれのループ含まれる9アミノ酸残基の $\alpha$ 炭素同士を最小二乗法で重ね合わせるにより行った。

図4-2からA-IIの反応部位を含むループI'の構造とこれら3つのBBIのループの構造がほとんど一致していることが解る。従って、これらのループ構造がBBIに共通の反応部位近傍の構造であることがわかる。

さらに、AB-Iと緑豆BBIのループ構造がトリプシンと結合した状態での反応部位の構造であり、A-IIとPI-IIのものはプロテアーゼと結合していない反応部位の構造であることを考慮に入れると、これらの構造がお互いに良く一致するという事は、プロテアーゼの結合によって、BBIが構造を変えないという証拠である。

P1残基(A-IIではArg47)の側鎖の構造は、比較に用いたBBIごとに若干異っているが、これは、トリプシンフリーの状態ではP1の位置にあるArgやLysといった親水性の長い側鎖は溶媒領域にさらされており、いろいろなコンホメーションをとりうると思われるため、むしろ当然といえる。

### 4.4 反応部位の温度因子

これまでの構造の比較で、BBIはトリプシンと結合してもその反応部位付近の構造を変えないことが解った。しかしながら、反応部位付近の温度因子は、トリプシンと結合している場合としていない場合で大きく異なる。図4-3は、反応部位付近の各残基の主鎖の温度因子をトリプシンフリーのA-IIとトリプシンと結合しているAB-Iで比べたものである。

この図から、AB-IのループIでは、トリプシンと接触している反応部位付近の温度因子が分子の他の部分に比べて小さく、逆にトリプシンフリーのA-IIのループI及びI'では、反応部位付近の温度因子が他の部分に比べて大きくなっていることが解る。このことから、BBIはトリプシンとの結合により、フリーの場合に比べ揺らぎにくい構造をとるようになると言える。

フリーの状態である程度構造に揺らぎがあったほうが、インヒビターとトリプ

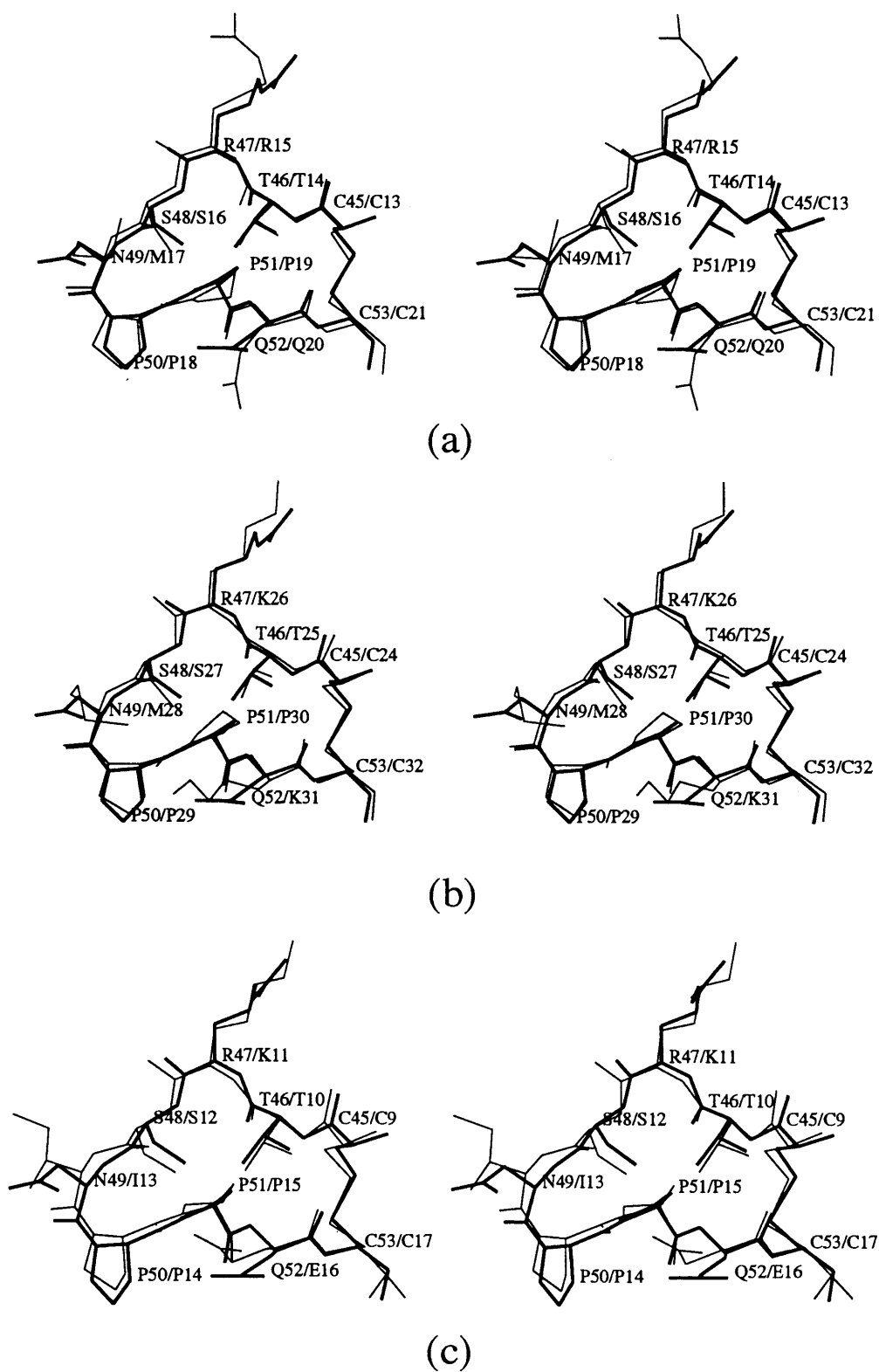


図4-2 A-IIと他のBBIの反応部位の構造の比較

- (a)PI-IIとの比較 太線：A-II 細線：PI-II 残基名は、A-II/PI-IIの順。  
 (b)AB-I との比較 太線：A-II 細線：AB-I 残基名は、A-II/AB-Iの順。  
 (c)MBI との比較 太線：A-II 細線：MBI 残基名は、A-II/MBIの順。

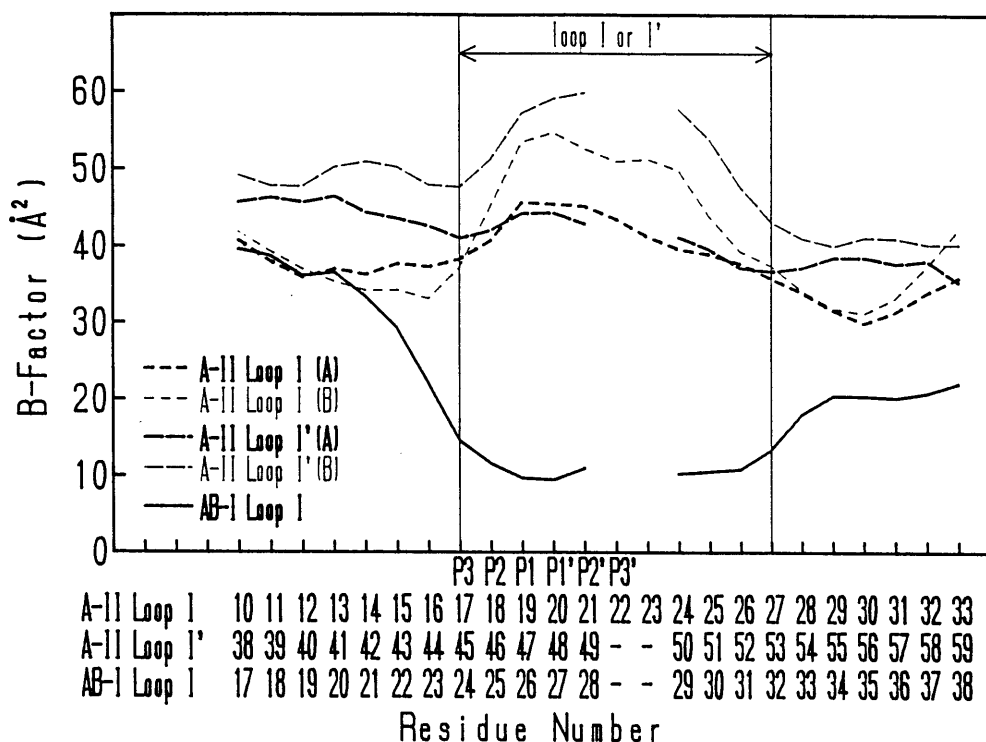


図4-3 A-IIとAB-Iの反応部位の温度因子の比較

AB-Iでは、反応部位が、トリプシンと結合しているため温度因子が小さくなっている。なお、A-IIに対しては、非対称単位を構成する両分子についての反応部位の温度因子をプロットした。A-IIのループ名の後にある括弧は、非対称単位を構成する分子の名前（分子A、分子B）を表す。

シンの相互作用は容易でになると考えられる。また、トリプシンにより、分解されないためには、コンホメーション変化を起こし難い構造、すなわち、構造の揺らぎが小さい構造の方が望ましいと言える。従って、トリプシンと結合する前は揺らぎ易く、結合後は揺らぎ難くなるこのBBIの反応部位付近の構造は、トリプシンを阻害する上で、合理的な構造であると言える。すなわち、トリプシンの触媒部位にフィットする構造をとりながら、触媒部位に結合したときには硬い構造をとるようになることが、インヒビターのトリプシン阻害メカニズムの本質であると言える。

## 5 A-IIとトリプシンの相互作用

### 5.1 A-II-トリプシン複合体の結晶構造解析

A-IIと牛豚臓 $\beta$ -トリプシンは、A-II:トリプシンのモル比が1:1または1:2の複合体をつくる。このうち、1:2複合体の結晶構造解析<sup>(39, 40)</sup>を、曾根辰夫氏、及び伊香賀修治氏と共同で行った。しかしながら、複合体の結晶が再現性良く得られるような複合体の調製・結晶化条件を見い出せず、研究は、複合体結晶の空間群及び格子定数を決めるところまでしか進んでいない。そこまでの研究結果について以下に簡単に述べる。

#### 5.1.1 複合体の調製

A-IIと牛豚臓 $\beta$ -トリプシンの1:2複合体の調製は、0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)中でA-IIと牛豚臓 $\beta$ -トリプシンをモル比で1:1.9(20mg:117mg)で混合し、一晚4°Cで保存することにより行った。この時用いたトリプシンは、市販の牛豚臓トリプシン(SIGMA社製、Type-III)をSchroederらの方法<sup>(41)</sup>に従い、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製したものである。

A-II:トリプシンの混合モル比を1:2とせず1:1.9とした理由は、混合液中の複合体を形成しないトリプシンの濃度を下げて、複合体の精製中に複合体が遊離型トリプシンによって分解されるのを防ぐためである。(A-II/トリプシン混合液中では、遊離型のA-II、A-II-トリプシン1:1複合体、同1:2複合体、遊離型のトリプシンの4者の間で平衡が成り立っており、1:2の混合モル比では、遊離型のトリプシンの濃度が無視できないほど大きくなる。)

#### 5.1.2 複合体の精製

複合体の精製は、ゲル濾過カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により行った。先に調製したA-II/トリプシン混合液は、タンパク質濃度が約4%になるように限外濾過法により濃縮され、このうち2ml(約80mg)がHPLCにかけられた。HPLCの条件を表5-1に、結果を図5-1に示す。HPLCでは、A-II-トリプシン1:2複合体のピーク(溶出液180ml付近)、A-II-トリプシン1:1複合体のピーク(溶出液190ml付近)、遊離型A-IIのピーク(溶出液230ml付近)が得られたが、1:2複合体と1:1複合体のピークの分離は充分ではなかった。そこで、1:2複合体

表5-1 A-II-トリプシン複合体のゲル濾過  
クロマトグラフィーの条件

カラム	東ソー TSK-GEL G3000SWG
サイズ	内径21.5mm x 長さ600mm
緩衝液	0.05M リン酸ナトリウム (pH6.5)
チャージサンプル	2ml (濃度 約4%)
流速	5ml/min
温度	室温

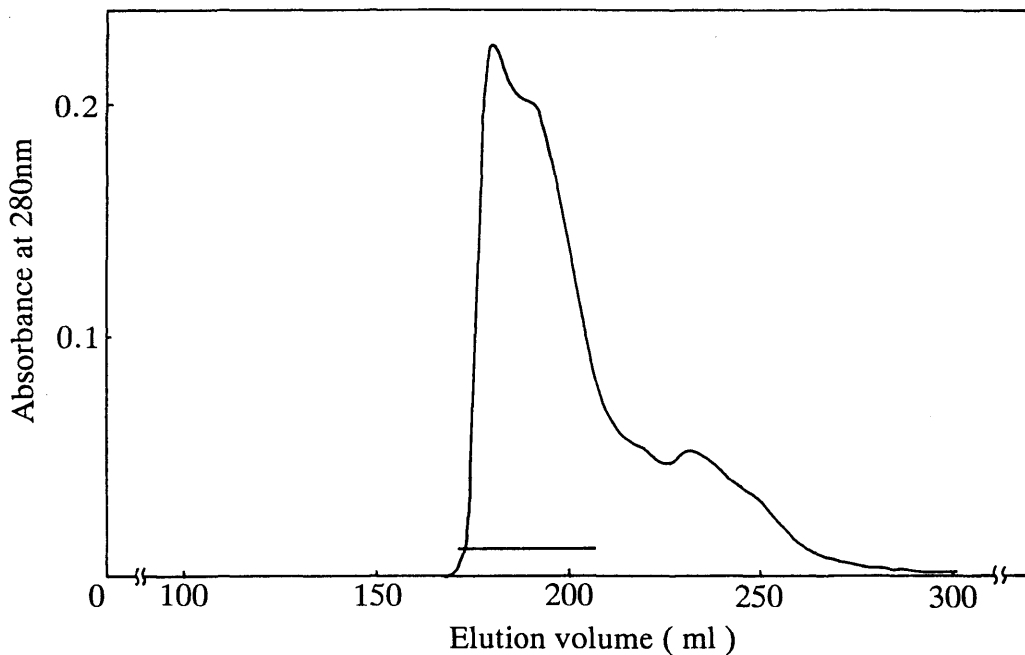


図5-1 A-II-トリプシン複合体のゲル濾過クロマトグラフィー

A-II-トリプシン1:2複合体のピーク (溶出液180ml付近)、A-II-トリプシン1:1複合体のピーク (溶出液190ml付近)、遊離型A-IIのピーク (溶出液230ml付近) が現れている。横線を引いた部分を集め、濃縮後結晶化に用いた。

と1:1複合体の両ピーク部分に相当する溶出液をひとまとめにして回収し、これを限外濾過法により280nmの吸光度が35になるまで濃縮し、結晶化用のサンプルとした。なお、この溶液中のタンパク質全てが1:2複合体 (1%溶液の吸光度13.4) であると仮定すると、この溶液のタンパク質濃度は2.6%となり、1:1複合体 (1%溶液の吸光度12.5) であると仮定すると2.8%、両者の1:1混合物であるとする2.7%となる。

表5-2 A-II-トリプシン複合体の結晶化条件

ドロップ (10 $\mu$ l)	
タンパク質濃度	1.3%*
緩衝液	0.05M リン酸ナトリウム (pH5.5)
沈澱剤	0.45M 硫酸アンモニウム
下液 (1ml)	
緩衝液	0.05M リン酸ナトリウム (pH5.5)
沈澱剤	0.9M 硫酸アンモニウム
温度	18 $^{\circ}$ C
結晶化期間	約2週間
結晶サイズ	最大 0.2x0.2x0.5mm <sup>3</sup>

\*結晶化に用いた溶液がA-II-トリプシン1:2複合体溶液であると仮定したときの濃度

### 5.1.3 複合体の結晶化

複合体の結晶化はhanging drop蒸気拡散法により行った。結晶化条件のサーチは18 $^{\circ}$ Cにおいて、沈澱剤として硫酸アンモニウムを、緩衝液として0.05Mリン酸ナトリウムを用いてpH4.5から7.3の範囲においてなされた。この結果、表5-2の条件で約2週間で、最大0.2x0.2x0.5mm<sup>3</sup>の八面体型の結晶が成長することが見いだされた。図5-2に結晶の偏光顕微鏡写真を示す。この結晶が、A-II-トリプシン1:2複合体の結晶なのか、1:1複合体の結晶なのかは、結晶を溶解してインヒビターの残存活性を測定すれば判定可能であるが、得ることのできた結晶の数が少なすぎてこの活性測定は行えていない。従って、どちらの複合体の結晶なのかの確認はできていない。

### 5.1.4 複合体の結晶データ

複合体結晶の格子定数と空間群は、(h 0 l)面及び(h k 0)面のプレセッション写真 ( $\mu=15^{\circ}$ ) を撮影することにより求めた。また、結晶の密度は、1.8Mの硫酸アンモニウムを含む0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) にショ糖を高濃度に溶かし込んだ溶液を使って浮遊法により求めた。結晶データを表5-3にまとめて

表5-3 A-II-トリプシン複合体の結晶データ

晶系	斜方晶系
空間群	$P2_12_12_1$
格子定数(A)	
a	55.47
b	55.95
c	182.1
密度(g/cm <sup>3</sup> )	1.30
単位格子中の複合体分子数	8 (1:1複合体の場合) 4 (1:2複合体の場合)
結晶中の溶媒含有率(%)	44 (1:1複合体の場合) 51 (1:2複合体の場合)

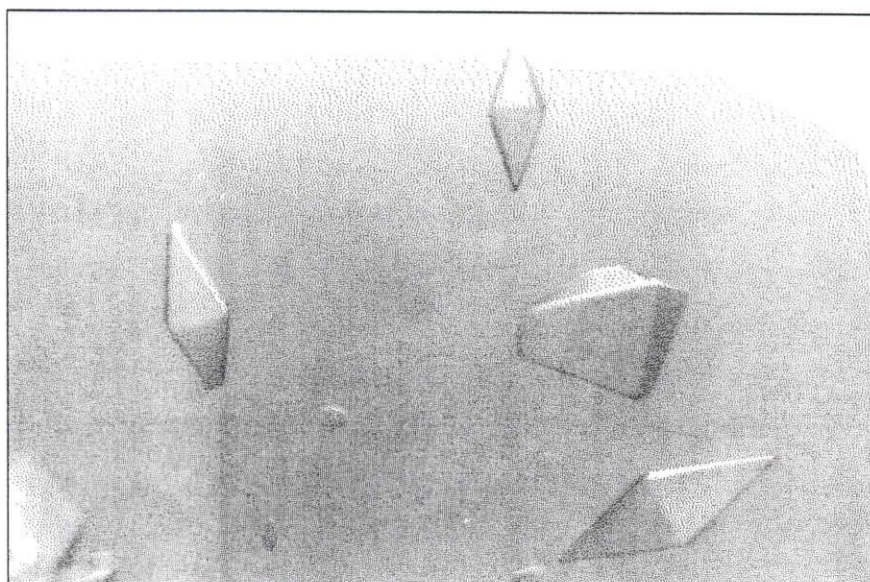


図5-2 A-II-トリプシン複合体の結晶の偏光顕微鏡写真

示す。タンパク質の結晶が通常30%から70%の溶媒を結晶中に含むことを考慮に入れれば、この結晶の単位格子中には、A-II-トリプシン1:2複合体なら4分子が、A-II-トリプシン1:1複合体ならば8分子が含まれることになる。

### 5.1.5 結晶化の再現性と精製方法の再考の必要性

A-II-トリプシン複合体の精製及び結晶化はここで述べたのと同じ条件で繰り返されたが、複合体の結晶は得られなかった。2回目の実験において複合体調製時のA-II:トリプシンの混合モル比は、初回と同じであったが、ゲル濾過クロマトグラフィーにかける時の試料の濃度が若干異なっていた。そして、その溶出液のグラフは1:1複合体と1:2複合体の生成比に初回とは違いがあることを示していた。しかしながら、クロマトグラフィーにおける分離能の不足から、やはり両複合体のピークを分離することはできなかつたため、両複合体のピーク部分をひとまとめにして回収し、結晶化のために用いた。このことから、結晶が再現性良く得られなかった最大の原因は、結晶化に用いた溶液中の1:1複合体/1:2複合体の組成比が、初回とは異なっていることにあると考えられる。そこで、精製の要であるゲル濾過クロマトグラフィーについて再考してみた。

A-IIはトリプシンと2ヶ所の阻害部位で強く結合するが、その結合定数は一方が $10^9\text{M}$ で、もう一方が $10^8\text{M}$ のオーダーにあり両者には約20倍の差があると推定されている<sup>(42)</sup>。従って、モル比でA-IIの2倍を越える過剰なトリプシンを加えれば、A-IIは、ほとんど全てA-II:トリプシン比1:2の複合体を作るが、それ以下のどんな比率でA-IIとトリプシンを混合しても、溶液中にはA-II:トリプシン比1:1と1:2の2つの複合体が化学平衡の状態で混在することになる。このように、1:1複合体と1:2複合体の間に化学平衡が成り立っているため、どんなに分離能の高いゲル濾過クロマトグラフィーでも、1:1複合体のみを単離することは、理論上不可能である。

A-IIが結合定数 $10^9\text{M}$ と $10^8\text{M}$ をもつ2ヶ所の阻害部位で独立にトリプシンを阻害すると仮定した場合、1:1複合体と1:2複合体のモル濃度の比Xは、複合体溶液中に存在する遊離トリプシンのモル濃度Eに依存し、

$$X = [1:1\text{複合体}] / [1:2\text{複合体}] = (10^{-9} + 10^{-8}) / 2E$$

となる。ここで、遊離トリプシンの濃度は、A-II/トリプシン混合比が同じであっても、複合体の絶対濃度が高くなれば高くなることに気をつけなければならない。即ち、結晶化に用いられるような高濃度の複合体溶液では1:2複合体の濃度が高くなるが、ゲル濾過クロマトグラフィーのカラムの中で複合体が分離される時のように、複合体の濃度が下がると1:1複合体の比率が高くなる。

複合体のゲル濾過クロマトグラフィーでは、分子量の違いによる分離に伴って、



カラム各所でのA-II/トリプシンの組成に変化が生じる。そして、それに伴って1:1複合体/1:2複合体の平衡も変化するため、単純に分子量の違いによる複合体の分離が起こっているとはいえない。従って、1つのピークの前半と後半の部分で1:1複合体/1:2複合体の組成比に変化が起こっている可能性がある。さらに、同じA-II/トリプシン混合比の溶液をゲル濾過クロマトグラフィーにかけても、チャージする試料のタンパク質濃度が異なっていると1:1/1:2複合体の存在比が変わり、容出パターンは大きく異なってしまう。以上のことから、A-IIのように異なる結合定数を持つ阻害部位で、複数のプロテアーゼと複合体を作る場合には、ゲル濾過クロマトグラフィーは、複合体の精製に向いていないことがわかる。

そこで、結晶化の再現性を上げるためには、複合体の調製を行ってからこれを精製して純度を上げるのではなく、複合体を形成する前にA-IIとトリプシン両者の精製を充分に行って純度を上げておき、両者を厳密な比率で混合し結晶化用のサンプルとするような方法をとるのが適切ではないかと考えられる。

## 5.2 A-II-トリプシン複合体の推定構造

### 5.2.1 他のBBIに見られるトリプシンとの相互作用

これまでの章でA-IIの構造について検討してきたが、インヒビターとトリプシンの相互作用を検討するためには、トリプシン側の分子構造についても詳細に検討を加える必要がある。そこで、pH8.0、2.4M硫酸アンモニウムの条件で得られたトリプシンの結晶の、1.55Å分解能の結晶解析<sup>(43)</sup>により得られた原子座標をもとに、コンピューターグラフィクスを用いて、インヒビターとの相互作用のおこなわれるトリプシンの触媒部位付近の構造を検討した。

### 5.2.2 トリプシンの触媒部位の構造

トリプシンは、大きさのほぼ等しい2つの半球形のドメインから構成されており、触媒部位は、この2つドメインの接触によって形成される溝の部分にある(図5-3参照)。この溝の長さは約20Åあり、その中央部の一番溝が深くなった部分

にトリプシンの触媒中心残基であるSer195がある。そして、このSer195と酵素活性中心の3つ組残基を構成するHis57及びAsp102は、溝を隔ててSer195とは反対

側のドメインに存在する。

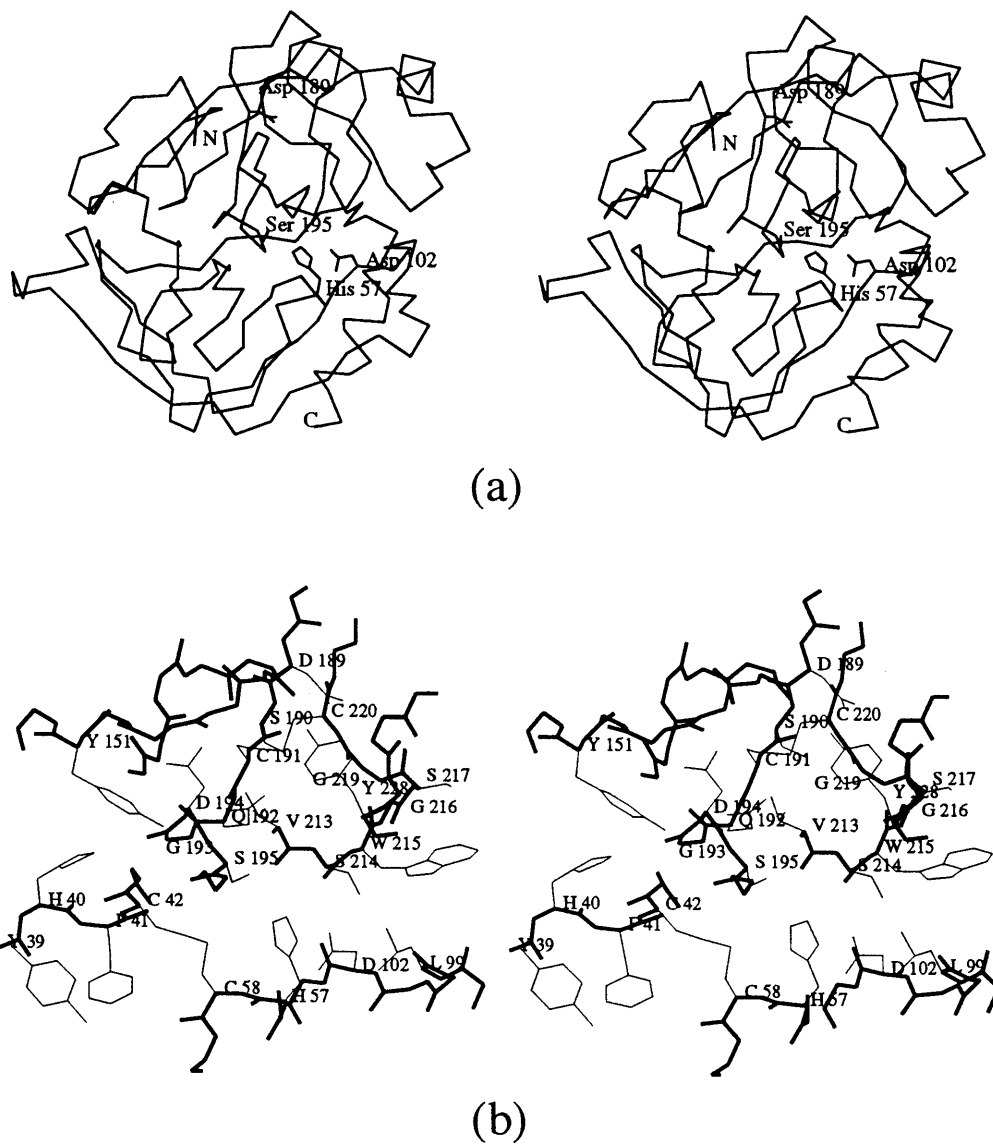


図5-3 トリプシンの触媒部位

(a)トリプシンのC $\alpha$ 分子モデル。酵素活性中心の3つ組残基 (His57, Asp102, Ser195) の側鎖を示してある。

(b)トリプシンの触媒部位付近の詳細図

Ser195の辺りを入口にして、溝とほぼ垂直を成す方向に、基質のP1残基の塩基性側鎖（アルギニンやリジンの側鎖）を認識する洞穴状の基質認識ポケットが伸びている。このポケットは、Asp189からSer194にかけてのペプチド鎖とVal213からTrp228にかけてのペプチド鎖から構成されており、ポケットの一番奥にあるAsp189の負に荷電した側鎖が基質の塩基性側鎖の正に荷電した官能基（アルギニンのグアジニル基またはリジンのアミノ基）と静電的相互作用を行う。なお、ポケットの入口の大きさは、縦がほぼ9Å（Ser195 O $\gamma$ からGly219 Oまでの距離）横がほぼ8Å（Gly216 C $\alpha$ からCys191 C $\alpha$ までの距離）であり、内部はこれよりも若干広い。また、奥行きは、約11Å（Ser195 O $\gamma$ からAsp189 O $\delta$ 2までの距離）である。

基質認識ポケットの入口付近には、Gly193 NとSer195 Nから構成されるオキシアニオンホール（oxyanion hole）と呼ばれる酵素触媒反応において重要な部位がある。この部位は、基質のP1残基の主鎖のカルボニル酸素と水素結合を形成して基質を活性中心に正確に位置づけ、さらに、極性の高い水素結合によってカルボニル基を分極させて、カルボニル炭素の親核性を高める働きがある。また、酵素反応の途中で基質が四面型中間体をとったときに、酸素陰イオンO $^{-}$ （oxyanion）となった元カルボニル酸素と極性相互作用をすることにより、四面体型中間体を安定化する役割をされると考えられている。

基質認識ポケットの内部を除くと触媒部位のある溝の内側には水素結合に寄与することができる原子はあまり露出していない。Ser195 O $\gamma$ から10Å以内の距離に存在する水素結合に寄与可能な原子は、基質認識ポケットの内部を除くとPhe41 O、His57 O、Gln192 O $\epsilon$ 1、Gln192 N $\epsilon$ 2、Gly193 N、Ser195 N、Ser214 O、Gly216 N、Gly216 Oの9個のみである。その一方で、溝の内側には、Tyr39、Phe41、Cys42、Cys58、Leu99、Tyr151、Trp215などの多くの疎水性残基の側鎖が分子表面にさらされている。これらのことから、触媒部位の存在する溝の部分はどちらかというと疎水性の環境にあるといえる。

触媒活性残基であるSer195周辺や、基質認識ポケットの内側には、いくつかの水分子が水素結合により結合している。（図5-4参照）これらの水分子の内、Ser195 O $\gamma$ に水素結合している水分子（Wat702）、Ser214に結合している水分子（Wat710）、及び、基質認識ポケットのほぼ中央に位置する水分子（Wat805）はインヒビターがトリプシンに結合したときに解離し失われる。一方、基質認識ポケット内部にあるその他の水分子（Wat414、Wat416）は、インヒビターが結合して

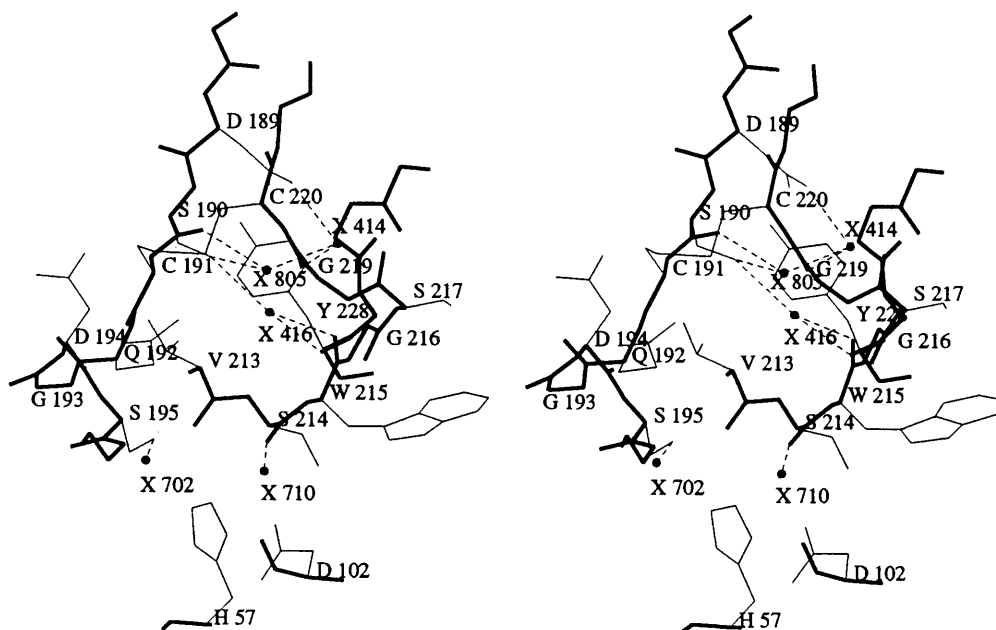


図5-4 トリプシンの基質認識ポケットの中にある水分子  
●は水分子の位置を表し、点線は水素結合を表す。

も多くの場合失われず、インヒビターのP1残基の側鎖と基質認識ポケットとの間の水素結合の橋渡しをすることが知られている。

### 5.2.3 BBIとトリプシンの相互作用

#### (a) モデルとする分子構造の選択

BBI-トリプシン複合体のX線結晶構造解析は、これまでに、小豆由来のBBIであるAB-Iとトリプシンの1:1複合体<sup>(36)</sup>、緑豆(Mung bean)のBBIとトリプシンの1:2複合体<sup>(37)</sup>、そして、緑豆のBBIのトリプシン阻害部位付近のアミノ酸配列に似せて合成した22個のアミノ酸残基からなるオリゴペプチドとトリプシンの1:1複合体<sup>(38)</sup>の3つについて行われている。しかしながら、先の章でも述べたように、これらどの解析の場合にも、BBI-トリプシン複合体全体の完全な三次元分子構造は明らかにされていない。

しかしながら、BBIとトリプシンの相互作用はAB-I-トリプシン複合体の解析により明らかにされており、緑豆BBIに似せて合成したオリゴペプチドとトリプシンの複合体の解析でも、同様の相互作用が確認されている。そこで、AB-I-トリ

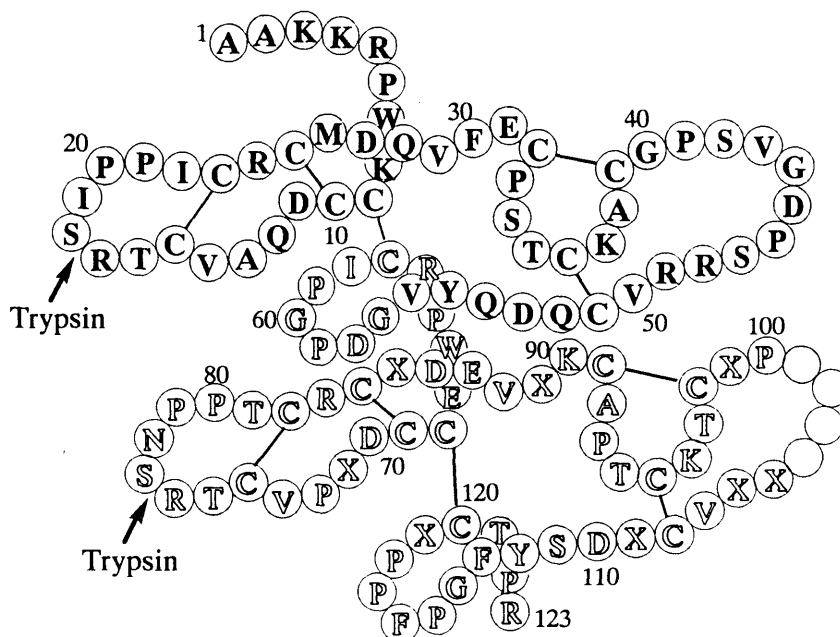


図5-5 小麦胚芽トリプシンインヒビター(WGTI) I-2の1次構造の模式図

トリプシンに対する2つ反応部位を矢印で示し、10本のS-S結合を黒線で表してある。なお、白抜き文字で表した部分は、X線結晶解析により、アミノ酸配列が決められた部分である。(それ以外の部分は、ペプチド鎖を末端から順次加水分解することにより、生化学的にアミノ酸配列が決められた。)

プシン複合体を A-II-トリプシン複合体の推定構造を組み立てるためのモデル構造とすることにした。

しかしながら、AB-Iや緑豆BBIのP1残基はLysであり、A-IIのP1残基であるArgと異なるため、両者のトリプシンとの相互作用は異なる可能性がある。

最近になって、BBIとのアミノ酸配列の相同性の高い小麦胚芽インヒビターI-2とトリプシンの1:2複合体の構造が、同じ研究室の木伏英史氏によって2.3Å分解能で明らかにされ、9.0-2.3Åの20,179個の反射に対してR値0.178まで精密化された<sup>(44)</sup>。このI-2は、反応部位が、BBIと同じS-S結合で作られた9アミノ酸残基からなるペプチド鎖のループ中にあり、ループ部分のアミノ酸配列もBBIとの相同性が高い。(図5-5参照) さらにX線解析の結果、このループ部分の構造がBBIと同一であることが明らかにされた。(図5-6) このI-2のP1残基はArgであるため、A-II-トリプシン複合体のモデル構造として、AB-I-トリプシン複合体と共に用いることにした。

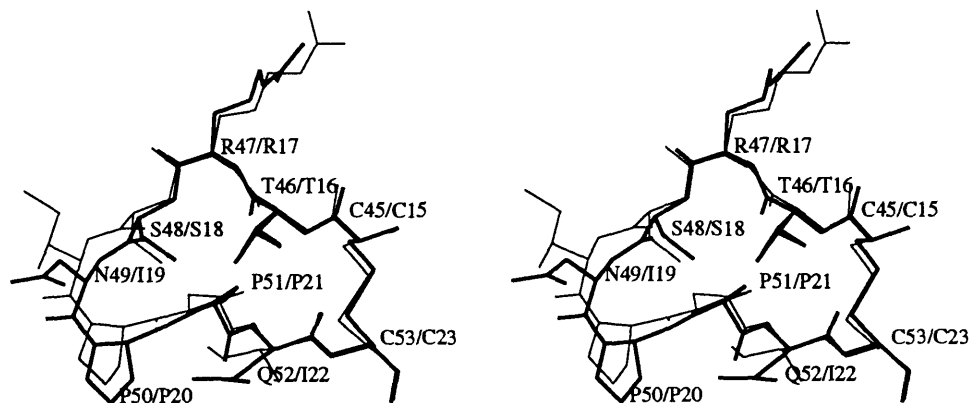


図5-6 小麦胚芽トリプシンインヒビター I-2の反応部位の構造

トリプシンと複合体を作った状態の小麦胚芽トリプシンインヒビター I-2の第一阻害部位の構造（細線）をA-IIの第二阻害部位の構造（太線）と比較している。残基名は、A-II/I-2の順で書かれている。

#### (b) BBIとトリプシンの相互作用

AB-I-トリプシン複合体、小麦胚芽インヒビター I-2-トリプシン複合体とも、インヒビターは反応部位付近の比較的狭い領域でトリプシンと相互作用しているに過ぎない。両複合体でインヒビターとトリプシンが相互作用している部分の構造を図5-7に示す。この図から、AB-I、I-2両インヒビターはトリプシンに対してほとんど同じ相互作用をしていることがわかる。水素結合等の極性相互作用をまとめると以下の様になる。

- (1) P3残基の主鎖のNとOが、トリプシンのGly216の主鎖のOとNに逆平行 $\beta$ -シート状の水素結合をする。
- (2) P1残基の主鎖のNは、トリプシンのSer214のO及びSer195のO $\gamma$ と水素結合をする。
- (3) P1残基の側鎖は、トリプシンの基質認識ポケットに入り込み、その先端のアミノ基またはグアジニル基がポケット奥の Asp189の側鎖のカルボキシル基と静電相互作用をする。また、側鎖の先端は、ポケットの内壁に存在するSer190の主鎖のOや側鎖のO $\gamma$ 、Gly219の主鎖のO（P1がArgの時のみ）などの原子や、ポケット内部に存在する水分子と水素結合を形成する。
- (4) P1残基の主鎖のOは、トリプシンのGly193の主鎖のNとSer195の主鎖のNから構成されるオキシアニオンホールと2本の水素結合を作る。

(5)P2'の主鎖のNはトリプシンのPhe41の主鎖のOと水素結合する。

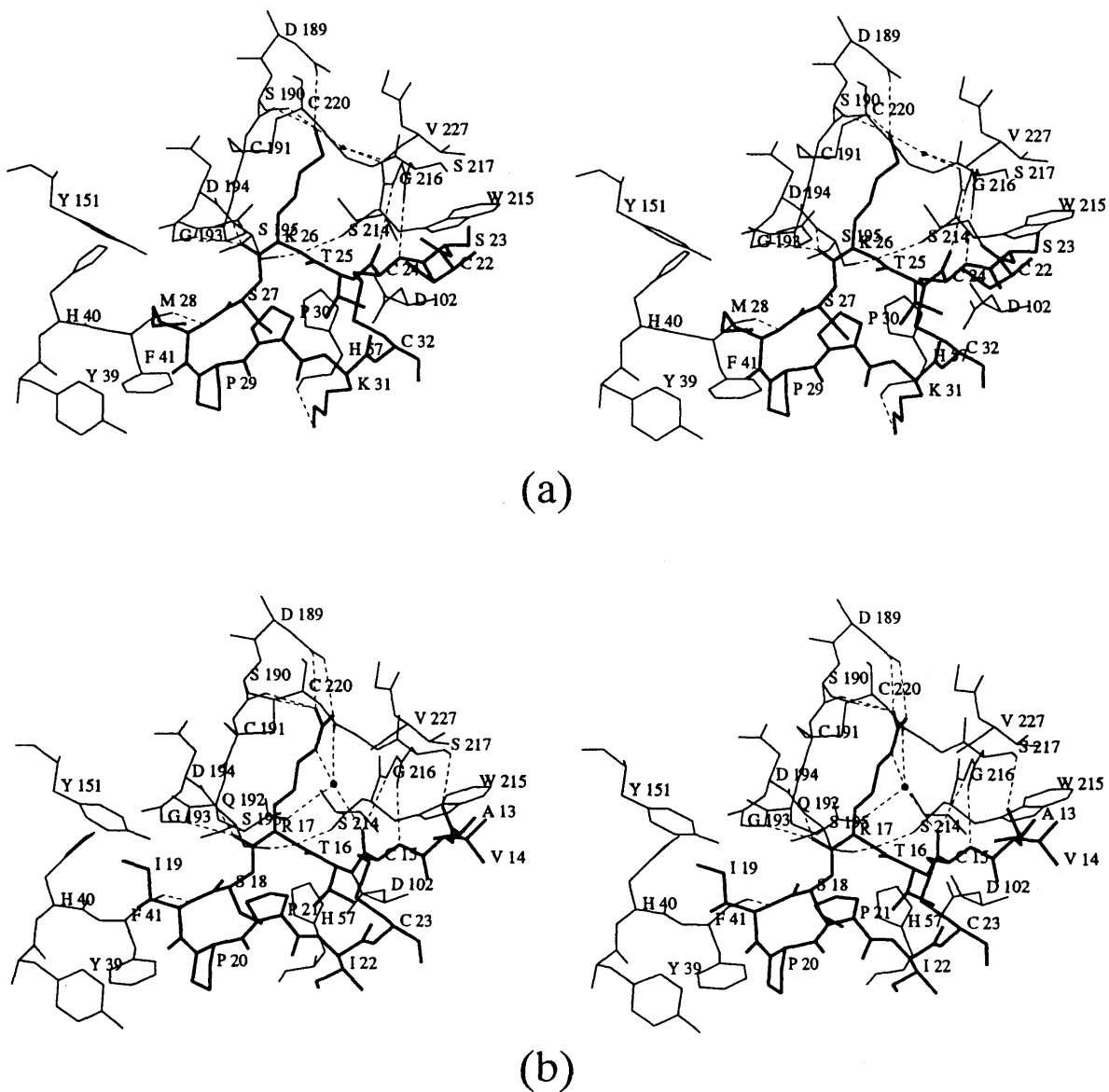


図5-7 BBIとトリプシンの相互作用

(a)小豆のBBIであるAB-1とトリプシンの相互作用

(b)小麦胚芽トリプシンインヒター 1-2とトリプシンの相互作用

インヒター側の構造を太線で、トリプシン側の構造を細線で、両者間の水素結合を点線で表している。なお、●は、水分子を表す。

この様な相互作用の結果、インヒビターは、トリプシンの活性中心付近に存在し水素結合を形成できる原子の全てと水素結合を作っている。別の言い方をすれば、BBIは、水素結合から見る限り、トリプシンの活性中心と鍵と鍵穴的相互作用をしているのである。

#### 5.2.4 A-II-トリプシン複合体の推定構造の組み立て

前の章で述べたように、BBIはトリプシンと複合体を形成するときその構造をほとんど変えない。そこで、A-II単独の結晶解析により得られた分子構造をAB-I-トリプシン複合体中のAB-Iの構造に最小二乗法を使って重ね合わせることにより、A-II-トリプシン複合体の推定構造を組み立てた。A-II-トリプシン複合体としては、A-IIの第一阻害部位がトリプシンに結合したモデルと、第二阻害部位が結合したモデルの2つの推定構造を組み立てた。

A-IIのAB-Iへの重ね合わせは、A-IIの反応部位を含む2つのループIとI'のそれぞれをAB-IのループIに $\alpha$ 炭素を用いて最小二乗法で重ね合わせることにより行った。A-IIのループIの重ね合わせでは、A-IIのループIの残基番号17から20、25から27の7つの $\alpha$ 炭素とAB-IのループIの残基番号24から27、30から32の7つの $\alpha$ 炭素が最小二乗法による重ね合わせに使われた。一方、A-IIのループI'の重ね合わせでは、A-IIのループI'を形成する全ての残基（残基番号45から53）とAB-IのループIの全ての残基（残基番号24から32）が同じく重ね合わせに使われた。

A-IIのループI、ループI'とも、P1残基であるArgの側鎖の構造は、A-II単独で解析された構造のままでは、トリプシンの基質認識ポケットに適合しない。そこで、小麦胚芽インヒビターI-2-トリプシン複合体の構造中に見られるP1残基Arg17の側鎖の構造と一致するようにA-IIのP1残基Arg19とArg47の側鎖のコンホメーションに修正を加えた。こうしてできあがったA-II-トリプシン複合体の推定構造の全体図を図5-8に、A-IIとトリプシンとの相互作用の様子を図5-9に示す。

#### 5.2.5 A-IIとトリプシンの相互作用

組み立てたA-II-トリプシン複合体の推定構造から、A-IIは第一及び第二阻害部位で、A-II単独で解析された構造のままでも、先に示したようなBBIに典型的



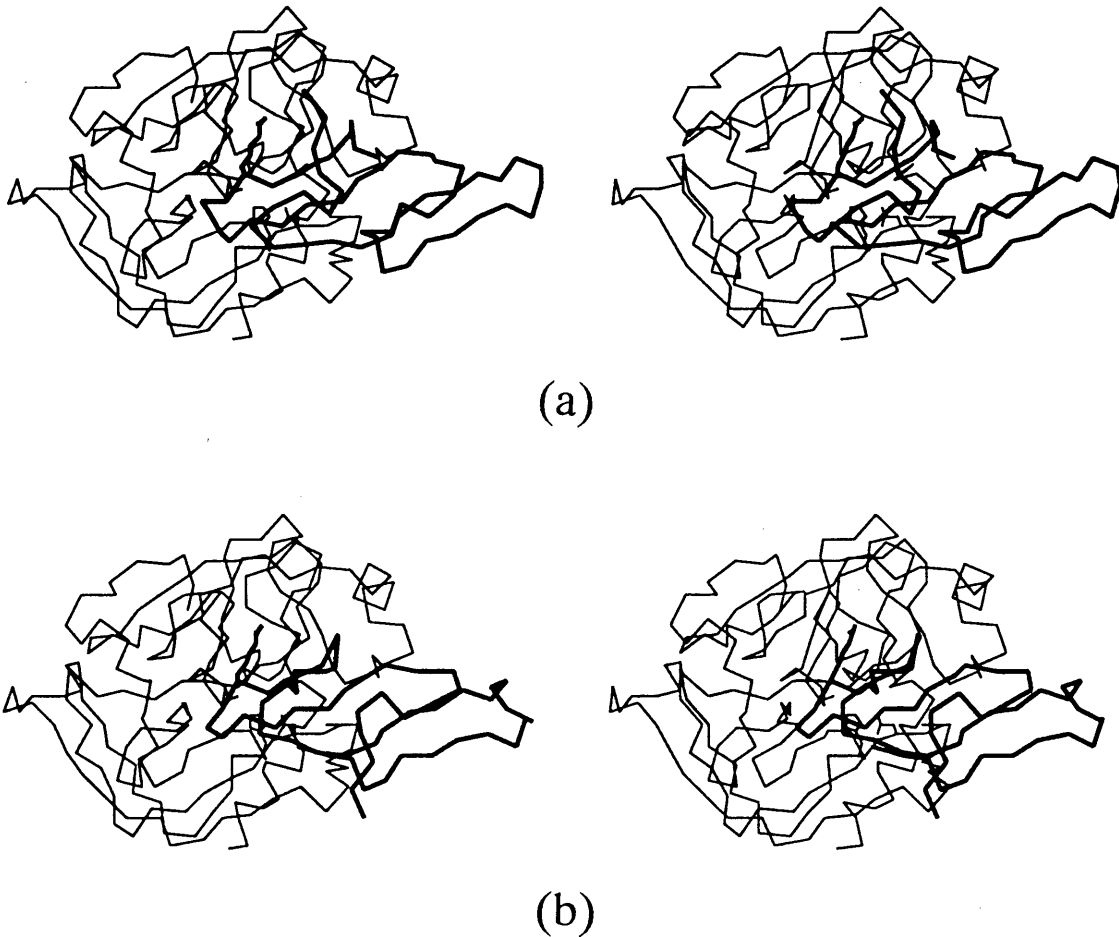


図5-8 A-II-トリプシン複合体の推定構造

(a)第一阻害部位 (P1残基はArg19) でトリプシンと結合して形成された複合体

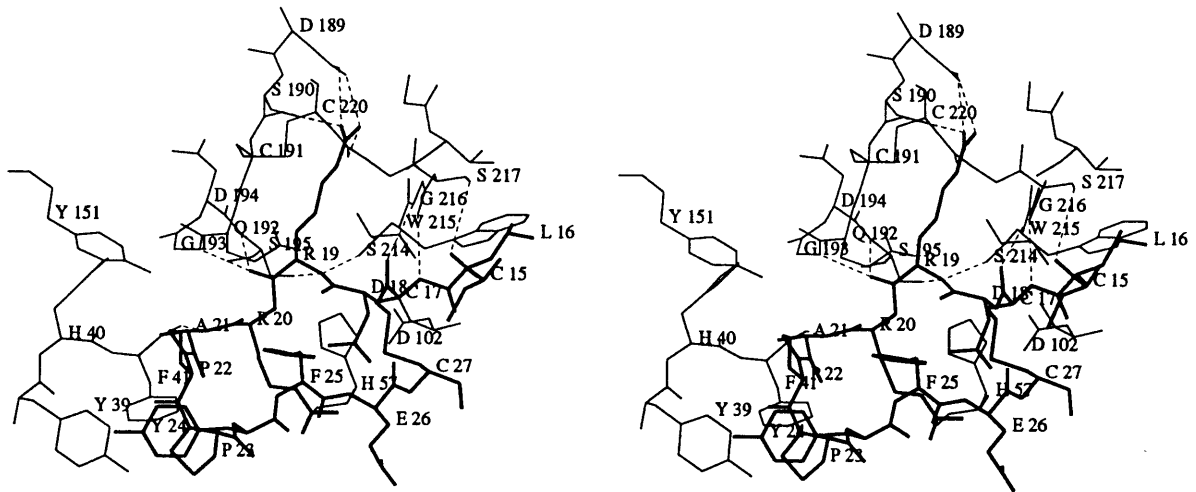
(b)第二阻害部位 (P1残基はArg47) でトリプシンと結合して形成された複合体

複合体の構造はC $\alpha$ 分子モデルで表してあり、インヒビター部分を太線で、トリプシン部分を細線で表してある。インヒビターのP1残基、及び酵素活性中心の3つ組残基 (His57, Asp102, Ser195) については、側鎖も描いてある。

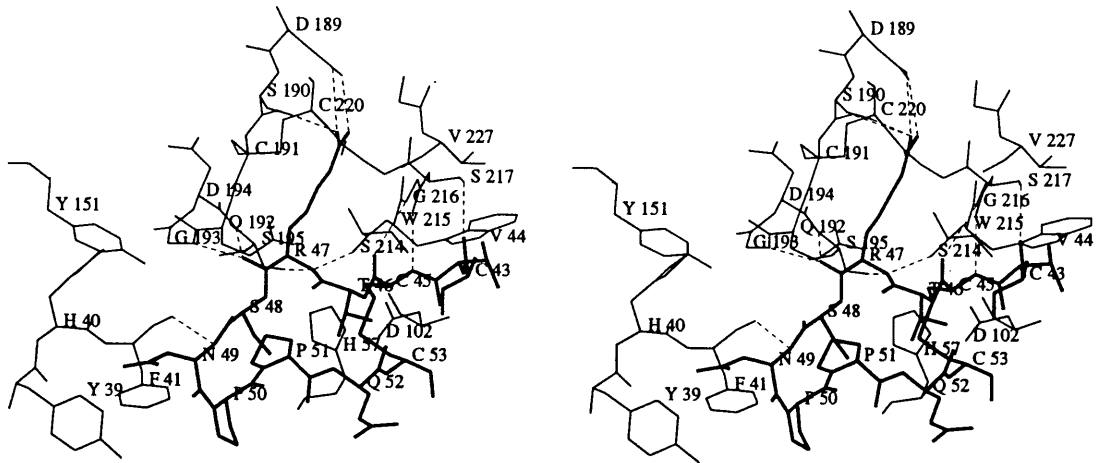
な水素結合をトリプシンとなしうるということが明らかになった。(図5-9参照) そして、水素結合による相互作用という点では、第一阻害部位も第二阻害部位も、全く差が無いであろうことが複合体構造から推定された。

しかしながら、A-IIの2つの阻害部位のトリプシンとの結合定数には約20倍の差があり、一方が $10^9$ の、もう一方が $10^8$ のオーダーにある<sup>(42)</sup>。この差は、両阻害部位における疎水性相互作用の違いから説明できる。

A-IIの第一阻害部位の推定構造では、A-IIのLeu15とトリプシンのTrp215の側鎖間と、A-IIのTyr24とトリプシンのTyr39の側鎖間に疎水性の相互作用が予想さ



(a)



(b)

図5-9 A-IIとトリプシンの推定相互作用

(a) 第一阻害部位 (P1残基はArg19) とトリプシンの相互作用

(b) 第二阻害部位 (P1残基はArg47) とトリプシンの相互作用

A-II側の構造を太線で、トリプシン側の構造を細線で、両者の間の水素結合を点線で表してある。

れる。これに対して、A-IIの第二阻害部位では、A-IIのVal44とトリプシンのTrp 215の間に弱い疎水性相互作用が予想されるに過ぎない。このような疎水性相互作用における大きな違いが、結合定数に20倍の差を生んだに違いない。すなわち、第一阻害部位のトリプシンとの結合定数が $10^9$ のオーダーで、第二阻害部位の結合定数が $10^8$ のオーダーであると、今回のA-II-トリプシン複合体の推定構造から

は結論づけられる。

以上のようにA-II-トリプシン複合体の推定構造の組み立ては、インヒビターとプロテアーゼの相互作用において疎水性の相互作用も重要であることを示した点で非常に意義のあるものとなった。

## 6 A-IIとキモトリプシンの相互作用

### 6.1 A-II-キモトリプシン複合体の結晶構造解析

A-IIと牛膵臓 $\alpha$ -キモトリプシンは、A-IIの第一反応部位でA-II:キモトリプシンのモル比が1:1の複合体をつくる。この複合体の結晶構造解析は、主に沼田淳氏によって行われた<sup>(45)</sup>。A-II-キモトリプシン複合体の結晶解析について以下に簡単に述べる。

#### 6.1.1 複合体の調製と結晶化

A-IIと牛膵臓 $\alpha$ -キモトリプシンの1:1複合体の調製は、0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)中でA-IIと牛膵臓 $\alpha$ -キモトリプシンをモル比で1:1.2で混合し、一晚4°Cで保存することにより行われた。この時用いたキモトリプシンは、市販の牛膵臓キモトリプシン(SIGMA社製 Type II)を陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製したものである。A-II:キモトリプシンの混合モル比を1:1とせず1:1.2としたのは、混合液中に遊離型のキモトリプシンが残存し、複合体が分解することを防ぐためである。複合体は、Sephadex G-50を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより精製されたが、溶出ピークは、複合体に対応するものとインヒビターに対応するものの2つのみで、複合体成分を容易に分離することができた。複合体溶液は限外濾過法により複合体濃度が1%に成るまで濃縮され、結晶化に用いられた。

複合体の結晶化はhanging drop蒸気拡散法により行った。結晶化条件のサーチは18°Cにおいて、沈澱剤としてポリエチレングリコール(PEG)4000を、緩衝液として0.01Mクエン酸-リン酸水素二ナトリウムbufferを用いてpH4.5から9.0の範囲においてなされた。この結果、結晶化に適したpHは7.5~9.0であることが判明した。その後、このpH域に合うようにbufferを0.1M Tris-HClに変え結晶化を続けた結果、表6-1に示した条件で、最大0.5x0.3x0.3mm<sup>3</sup>の直方体型の結晶が得られた。図6-1に結晶の偏光顕微鏡写真を示す。この結晶が、A-II-キモトリプシン複合体の結晶であることは、SDS電気泳動法により確認された。

#### 6.1.2 複合体の結晶データ

結晶の格子定数は、プレセッション写真( $\mu=15^\circ$ )を撮影することにより求め

表6-1 A-II-キモトリブシン複合体の結晶化条件

---

ドロップ (8 $\mu$ l)	
タンパク質濃度	0.5%
緩衝液	0.05M Tris-HCl (pH9.0)
沈澱剤	2.5% PEG4000
下液 (1ml)	
緩衝液	0.1M Tris-HCl (pH9.0)
沈澱剤	5% PEG4000
温度	18°C
結晶化期間	2~3日
結晶サイズ	最大0.5x0.3x0.3mm <sup>3</sup>

---

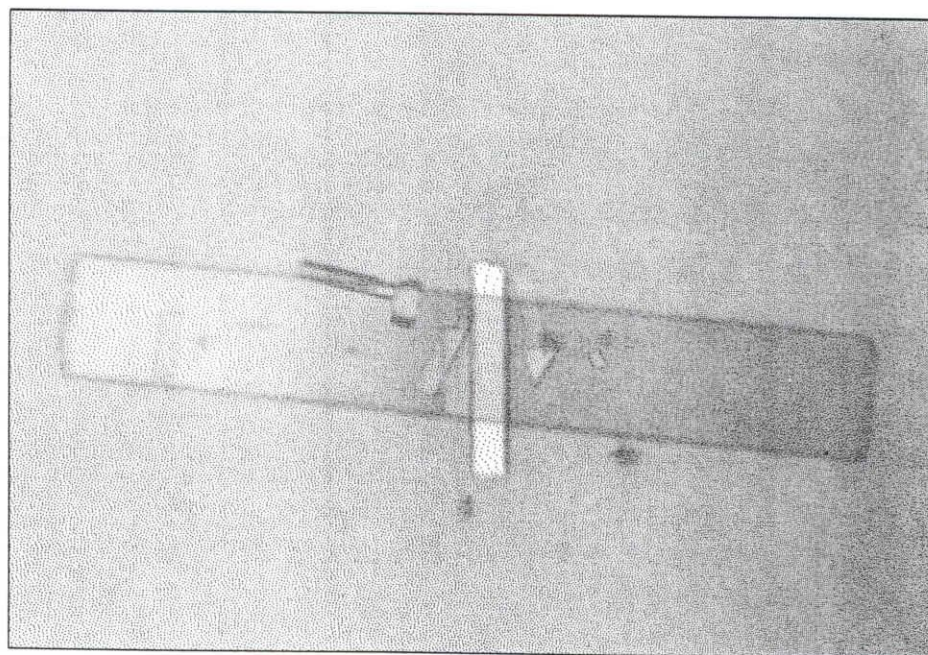


図6-1 A-II-キモトリブシン複合体の結晶の偏光顕微鏡写真

表6-2 A-II-キモトリブシン複合体の  
結晶データ

晶系	斜方晶系
空間群	$P2_12_12$
格子定数 (Å)	
a	73.5
b	120.6
c	70.0
単位格子中の 複合体分子数	4

た。そして後に、互いに90°異なる2方向から撮ったX線静止写真を使って、最小二乗法により精密な値が求められた。格子定数などの結晶データを表6-2にまとめて示す。空間群については、 $a^*$ 軸及び $c^*$ 軸上の反射が弱くプレセッション写真からは決定できなかったが、後の並進サーチの時に $P2_12_12$ であることが判明した。

#### 6.1.3 X線回折データの測定

結晶からのX線回折データは、回転対陰極型X線発生装置（リガク RU-300、 $\text{CuK}\alpha$ 、45kV-120mA）とイメージングプレート自動回折計（振動カメラ、マックスサイエンス(株) DIP-100）の組合せにより3.0Å分解能までのデータを、高エネルギー物理学研究所に置けるシンクロトン放射光X線（波長 1.00Å）とイメージングプレートを使用するタンパク質用ワイセンベルグカメラの組合せで2.5Å分解能までのデータを測定した。表6-3に回折データ収集の結果についてまとめる。

#### 6.1.4 分子置換法による解析

A-II-キモトリブシン複合体の解析は、キモトリブシンをサーチ分子とする分子置換法で進められた。キモトリブシンの原子座標は、1.68Å分解能のX線解析<sup>(46)</sup>（ $R=0.234$ ）によるもので、PDBより入手した。（PDBの参照コード 4CHA）

回転サーチは、CrowtherのFast Rotation Functionの手法<sup>(47)</sup>を使い、6.0か

表6-3 A-II-キモトリプシン複合体のX線回折データ収集

	振動カメラ	ワレハ'ル'カメラ	Total
分解能範囲(A)	40-3.0	30-2.5	40-2.5
測定反射数	8097	20172	13181
独立な反射数	5896	8935	9598
R <sub>merge</sub> * (%)	17.9	19.2	14.1
完全性 (%)	91.0	81.4	87.4

$$* R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$$

ら3.0Å分解能の回折データと、23Åの積分半径を使って行われた。このとき、キモトリプシンは、 $a=b=c=160\text{Å}$ 、 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ のP1格子に置かれた。サーチの結果、2番目のピークに比べ1.69倍の高さのある飛び抜けて高いピークが現れた。そこで、キモトリプシンの正しい配向を求めることができたと考え、この配向を使って並進サーチを行った。

並進サーチでは、CrowtherとBlowの並進関数<sup>(48)</sup>を使い、6.0から3.5Å分解能の複合体の回折データと、 $a=b=c=360\text{Å}$ 、 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ のP1格子中に置かれたキモトリプシンより計算された構造因子が用いられた。サーチを行った時点で、結晶の空間群が未知であったため、並進サーチは、 $x=0, 1/2, y=0, 1/2, z=0, 1/2$ の計6つのハーカセクションで行われた。その結果、 $x=1/2, y=1/2, z=0$ の各セクションに他のピークに比べて飛び抜けて高いピークが現れたため、空間群は、 $P2_12_12$ であることが判明し、また、これらのピークの位置から結晶中でのキモトリプシンの位置が求められた。

こうして求められた配向と位置にキモトリプシンを置き、結晶格子中でのパッキングを見てみると、分子同士の衝突は起こっていなかった。また、キモトリプシンだけでは3次元格子を作れず、A-IIが結晶のパッキングにおいて必須であることが明らかになった。

### 6.1.5 複合体分子モデルの組み立てと精密化

分子置換法の解を使って複合体の格子中に置かれたキモトリプシンの分子構造

は、8.0から3.0Å分解能の $F > 3\sigma(F)$ の4706の反射（DIP-100のデータのみを使用）を用い、プログラムX-PLOR<sup>(49)</sup>を使ったsimulated annealing法により精密化された。この時、3,000Kから300Kへのslow coolingの手法が使われた。この結果、結晶学的R値は、上記の用いた反射に対して0.251まで下がった。

この段階で、3.0Å分解能の2Fo-Fcフーリエ図を描いたが、インヒビター部分の電子密度は低く、A-IIの主鎖のトレースはできなかった。

そこで、精密化されたキモトリプシン構造に、AB-I-トリプシン複合体をトリプシンの $\alpha$ 炭素を使って最小二乗法で重ね合わせ、さらに、重ね合わされた複合体のAB-I分子に単独で解析されたA-II分子モデルを重ね合わせることにより、A-IIとキモトリプシンの複合体の分子モデルが、AB-I-トリプシン複合体の構造を基に組み立てられた。こうして、組み立てられたがA-II部分は、結晶格子中で隣合う2つの互いに離れたキモトリプシン分子間に橋掛けをし、結晶のパッキングをより合理的なものにするにすることが解った。

こうして組み立てられたA-II-キモトリプシン複合体の構造は、X-PLORにより8.0から3.0Å分解能の $F > 3\sigma(F)$ の5626個の反射を用いてキモトリプシン部分の精密化の時と同じ手法で精密化された。精密化は現時点では終わっていないが、複合体の分子モデルは、上記の5626個の反射に対して結晶学的R値0.230まで精密化されている。この構造を用いて、A-IIとキモトリプシンの相互作用を検討した。

## 6.2 キモトリプシンの触媒部位の構造

キモトリプシン触媒部位の構造は、トリプシンのそれとほぼ同じである。図6-2に、キモトリプシンの触媒部位の構造を示す。しかしながら、基質認識ポケットの構造には、キモトリプシンの基質特異性を反映した大きな違いがある。

キモトリプシンでは、基質認識ポケットの入口にある残基192が疎水性のMetになっている。そして、残基218の挿入によりSer217からThr219の主鎖がこのMetの側鎖の方向にせり出すことにより、ポケットが、Ser195により近いところから始まっている。また、ポケットの一番奥に存在する189番目の残基も側鎖が小さく電荷を持たないSerになっている。こうして、基質認識ポケットはトリプシンに比べより疎水的で、かつ、奥行きが深いものとなっている。このことにより、キモトリプシンは、Leu、Met、Phe、Tyr、Trpといった疎水性でかさ高い側鎖を持つアミノ酸残基をこの基質認識ポケットで認識できるのである。なお、基質認識



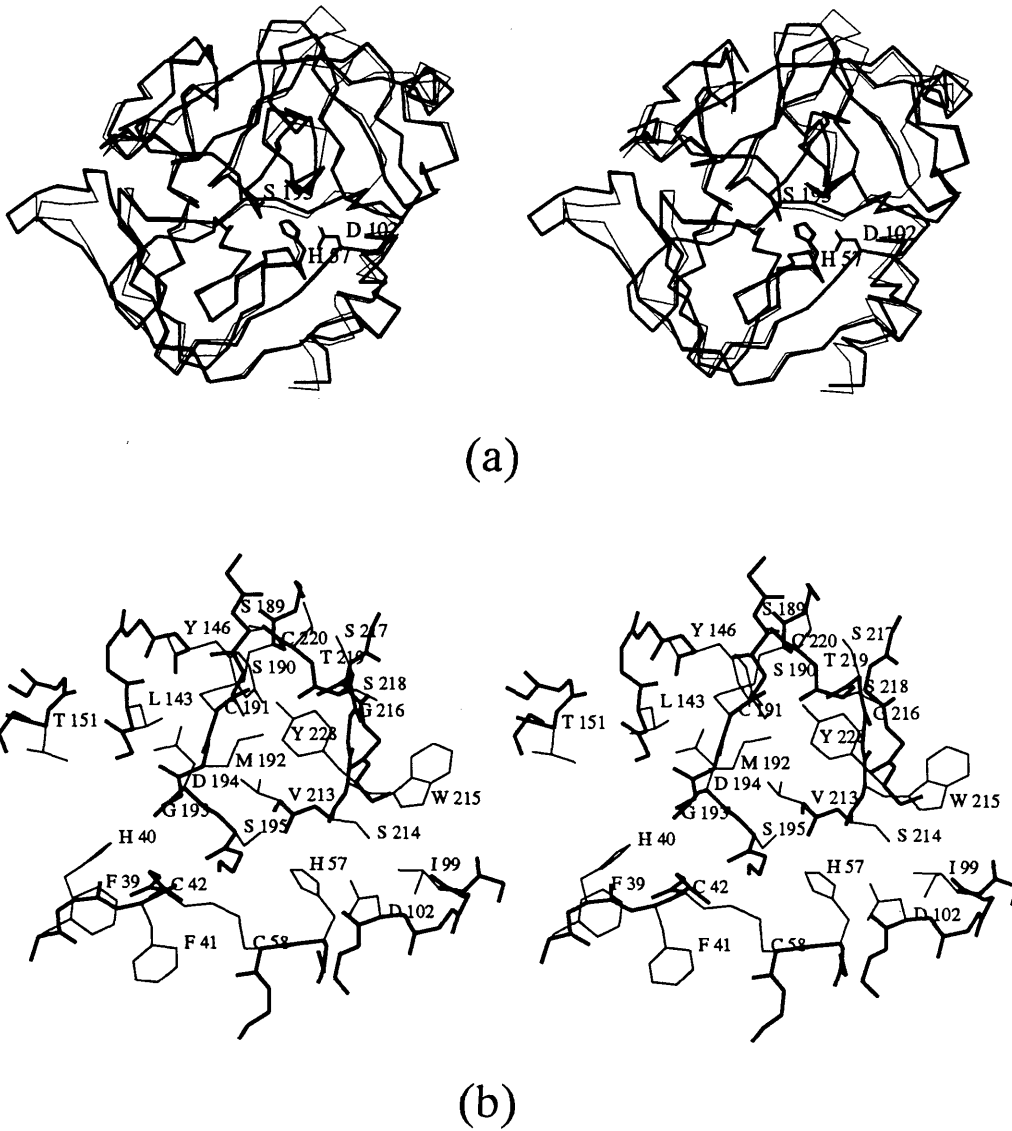


図6-2 キモトリプシンの触媒部位

(a)キモトリプシンのC $\alpha$ 分子モデル。細線で、トリプシンの構造が重ねられている。酵素活性中心の3つ組残基(His57, Asp102, Ser195)は側鎖を示した。活性中心付近の構造がキモトリプシンとトリプシンで良く一致していることが解る。

(b)キモトリプシンの触媒部位付近の詳細図

ポケット入口の大きさは、縦がほぼ10Å (Ser195 O $\gamma$  から Gly217 O までの距離) 横がほぼ8Å (Gly216 C $\alpha$  から Cys191 C $\alpha$  までの距離) であり、奥行きは、約12Å (Ser195 O $\gamma$  から Ser189 O $\gamma$  までの距離) である。

基質認識ポケットの内部を除くと、触媒部位の溝の内側にあり水素結合に寄与することができる原子の数は、192番目の残基がトリプシンのGlnからMetに変化したため、より少なくなっている。すなわち、Ser195 O $\gamma$  から10Å以内の距離に

存在するものとしては、基質認識ポケットの内部を除くとPhe41 O、His57 O、Gly193 N、Ser195 N、Ser214 O、Gly216 N、Gly216 Oの7個のみである。

触媒部位の溝には、トリプシンとほぼ同じような位置に疎水性の残基が存在する。しかしながら、それらの残基には、アミノ酸の置換による若干の違いがある。すなわち、トリプシン→キモトリプシンで、Tyr39→Phe39、Leu99→Ile99、Tyr151→Leu143等の置換が起こっている。その一方で、Phe41、Cys42、Cys58、Trp215は、トリプシンと共通である。

### 6.3 A-II-キモトリプシン複合体の構造

A-IIはキモトリプシンと反応部位付近の比較的狭い領域で接触しているに過ぎない。図6-3にA-II-キモトリプシン複合体のC $\alpha$ 分子モデルを示す。

複合体の形成により、A-IIやキモトリプシンに構造変化が起こっているかどうかは、精密化が終わっておらず、分解能も3Åにすぎない現在の分子モデルからは、判断できない。しかしながら、A-IIとキモトリプシンの相互作用はBBIとトリプシンとの間に一般的に見られる相互作用とほぼ同じであるため、A-IIにもキモトリプシンにも構造変化が起こっていないものと推測される。

インヒビターとプロテアーゼ両分子間に形成される水素結合でみる限り、A-IIとキモトリプシンの相互作用はBBIとトリプシンとの間に一般的に見られる相互作用と基質認識ポケットでの静電的相互作用が無くなっていることを除けば、ほぼ同じである。(図6-4参照) すなわち、

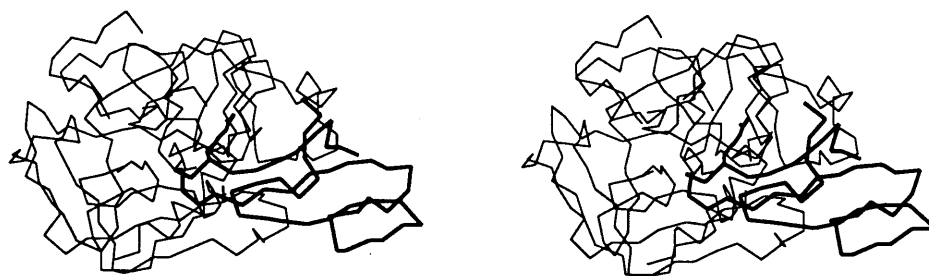


図6-3 A-II-キモトリプシン複合体の構造

複合体の構造はC $\alpha$ 分子モデルで表しており、A-II部分を太線で、キモトリプシン部分を細線で表している。A-IIのP1残基(Arg19)、及び酵素活性中心の3つ組残基(His57, Asp102, Ser195)については、側鎖も描いてある。

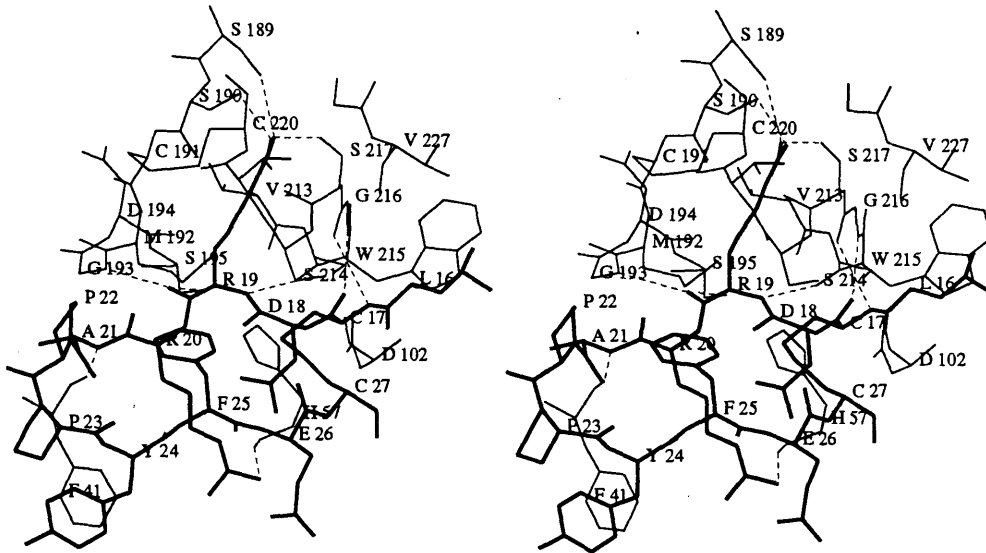


図6-4 A-IIとキモトリプシンの相互作用

A-II側の構造を太線で、トリプシン側の構造を細線で、両者の間の水素結合を点線で表してある。

- (1) P3(Cys17)残基の主鎖のNとOが、キモトリプシンのGly216の主鎖のOとNに逆平行 $\beta$ -シート状の水素結合をする。
- (2) P1(Arg19)残基の主鎖のNは、キモトリプシンのSer214のO及びSer195のO $\gamma$ と水素結合をする。
- (3) P1(Arg19)残基の側鎖は、キモトリプシンの基質認識ポケットに入り込み、その先端のグアジニル基が、ポケット奥のSer189の側鎖のO $\gamma$ やポケットの内壁に存在するSer190の側鎖のO $\gamma$ やSer217の側鎖のO $\gamma$ と水素結合を形成する。
- (4) P1(Arg19)残基の主鎖のOは、キモトリプシンのGly193の主鎖のNとSer195の主鎖のNから構成されるオキシアニオンホールと水素結合を作る。
- (5) P1'(Arg20)の側鎖のグアジニル基は、キモトリプシンのHis57の主鎖のOと水素結合を形成する。
- (6) P2'(Ala21)の主鎖のNはキモトリプシンのPhe41の主鎖のOと水素結合する。

この様に、インヒビターは、水素結合から見る限り、キモトリプシンの活性中心とトリプシンの場合と同様の鍵と鍵穴的相互作用をしている。

しかしながら、A-IIとキモトリプシン間の疎水性相互作用には、このインヒビ

ターに独特のものがある。図6-5にA-IIとキモトリプシンの疎水性相互作用を示す。

A-II以外のBBIのキモトリプシン阻害部位では、P1残基は、側鎖が疎水性のかさ高い官能基であるLeu、Met、PheまたはTyrである。P1残基にこのような疎水性残基を持つBBIとキモトリプシンの複合体の結晶解析は成されていない。しかしながら、BBI以外のファミリーのキモトリプシンインヒビターとキモトリプシンとの複合体の結晶解析から、P1残基がかさ高い疎水性の側鎖である場合、その側鎖は、例外なくキモトリプシンの基質認識ポケットに入り込み、ポケットの入口のMet192や内部のCys191-Cys220のS-S結合と疎水性相互作用をすることが知られている。従って、BBIでも、P1残基が疎水性のかさ高い官能基を持つ場合、P1残基の側鎖はキモトリプシンの基質認識ポケットと疎水性の相互作用を行うと予想される。

しかしながら、A-IIのキモトリプシン阻害部位のP1残基は、側鎖が親水性のArgである。この残基の側鎖も、基質認識ポケットに入り込み、その先端の部分で基質認識ポケット奥の親水性残基と水素結合をし、途中のアルキル鎖の所でポケット入口のMet192や内部のCys191-Cys220と疎水性相互作用をするなど基質認識ポケットとの相互作用を行っている。しかしながら、Arg側鎖のアルキル鎖の部分はかさ高くないため、キモトリプシンの比較的広い基質認識ポケットにあまり良くフィットしているとは言えない。また、側鎖先端の正の電荷を持つグアニル基もポケット内部でトリプシンの場合のような塩橋を作っておらず、電荷が中

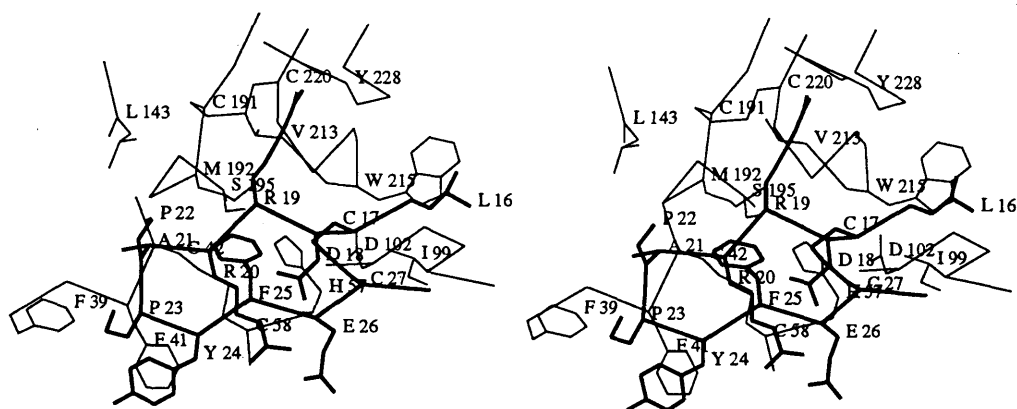


図6-5 A-IIとキモトリプシンの疎水性相互作用

A-II側の構造を太線で、トリプシン側の構造を細線で表してある。分子モデルは、C $\alpha$ モデルに、側鎖の構造を入れたものである。

和されていない。従って、疎水性のかさ高い側鎖を持つP1残基に比べ、ArgというP1残基は、キモトリプシンの基質認識ポケットに対する適合性が劣ると考えられる。

A-IIとキモトリプシンの相互作用において、P1残基と基質認識ポケットとの間このような相互作用の不十分さは、A-II側のPro22、Pro23、Tyr24及びPhe25の側鎖とキモトリプシンの側のMet192、Leu143、Phe39、Phe41の側鎖の間の疎水性相互作用によって補われている。これらの残基間の疎水性相互作用は、A-IIのループIにおいて起こっている2残基のアミノ酸の挿入により可能となったものである。従って、ループIまたはI'が9個のアミノ酸残基でできている他のBBIでは、このような相互作用は起こり得ない。P1残基がArgでありながら反応部位を含むループにアミノ酸の挿入の無いBBIでは、キモトリプシンに対する阻害活性が無いことを考えると、これらの疎水性相互作用がインヒビターの阻害機構において非常に大切であることが解る。

#### 6.4 A-IIの第一阻害部位の分子設計について

A-IIの第一阻害部位は、P1の位置に塩基性のArg残基を持っており、さらに、反応部位付近の構造が、トリプシンを阻害するA-IIの第二阻害部位と同一であるため、この部位が、トリプシンを阻害するように設計されていることは容易に理解できる。しかしながら、Arg側鎖は、先に述べたようにキモトリプシンの基質認識ポケットと余り有効な相互作用はできない。事実、他のキモトリプシンインヒビターでは、P1の位置に側鎖が疎水性でかさ高いLeu、Met、PheやTyrが使われており、これらがキモトリプシンの基質認識ポケットと疎水性相互作用をしている。ところが、このような疎水性のアミノ酸残基は、トリプシンの極性を帯びた基質認識ポケットとは相性が悪い。そこで、A-IIのループIは、トリプシンとキモトリプシンの両方を阻害するために、P1はArgのままにしてトリプシンを阻害できるようにし、キモトリプシンとは、そのかわり他の場所で広範囲の疎水性相互作用が行えるようにして、どちらのプロテアーゼとも十分な相互作用が行えるような設計が成されたものと考えられる。

## 7 BBIと他のファミリーのインヒビターの構造と機能の比較

### 7.1 比較の対象としたインヒビター

BBIの代表としてA-IIの分子構造をBBIとは別のファミリーに属するプロテアーゼインヒビターと比較した。また、インヒビターとトリプシンまたはキモトリプシンとの相互作用についても、A-IIと他のファミリーのインヒビターの場合での比較を行った。特に、相互作用については、水素結合と疎水性相互作用に分けて詳細な比較を行った。

比較の対象にしたインヒビターは、トリプシンまたはキモトリプシンとの相互作用を調べる目的から、これらと複合体を作った状態で結晶解析が行われているものに限定した。比較の対象としたインヒビターの属するファミリー、起源、プロテアーゼに対する特異性などを表7-1に示す。また、これらのインヒビターの結晶解析の分解能や分子モデルの精度などを表7-2に示す。

表7-1 A-IIとの比較を行ったインヒビター

インヒビター*	起源	ファミリー	プロテアーゼ特異性	分子量
BPTI	Bovine pancreas	BPTI	Trypsin	6,500
PSTI	Bovine pancreas	PSTI	Trypsin	6,000
OMTKY3	Turkey egg white	PSTI	Chymotrypsin	6,000
Eglin C	Leech	Potato I	Chymotrypsin	9,300
MCTI	Squash seed	Squash	Trypsin	3,200
WGTI	Wheat germ	Barley	Trypsin	12,600

\* インヒビターの略号

BPTI: Bovine pancreatic trypsin inhibitor  
 PSTI: Pancreatic secretory trypsin inhibitor  
 OMTKY3: Turkey ovomucoid third domain  
 CMTI: Cucurbita Maxima trypsin inhibitor  
 WGTI: Wheat germ trypsin inhibitor (I-2)

表7-2 比較に用いたインヒビター - プロテアーゼ複合体の結晶解析における精度

複合体名*1	分解能(A)	R 値	理想値からの偏差		PDBコード	文献
			結合長(A)	結合角(°)		
BPTI - TRP	1.9	0.187			2PTC	(50)
PSTI - TGN	1.8	0.186			1TGS	(51)
OVOM3 - CHT	1.8	0.168	0.016	0.041*2	1CHO	(52)
Eglin C - CHT	2.0	0.165	0.018	2.97	1ACB	(53)
CMTI - TRP	2.0	0.151	0.020	2.7	1PPE	(9)
WGTI - TRP	2.3	0.178				(44)

\*1 プロテアーゼの略号

TRP : Bovine trypsin

TGN : Bovine trypsinogen

CHT : Bovine chymotrypsin

\*2 2本の結合でつながった3つの原子の 1-3 原子間の距離。単位はÅ。

## 7.2 インヒビターの分子全体の構造の比較

Barleyファミリー(WGTI)を除き、BBIとその他のインヒビターファミリー間で、ペプチド鎖の折れたたみに相同性はない。しかしながら、反応部位周辺の主鎖の構造には著しい一致がみられる。図7-1は、トリプシンまたはキモトリプシンと複合体を形成した状態で解析された各ファミリーのインヒビターの構造を、プロテアーゼ部分の構造を重ね合わせることにより、ひとつに重ね合わせたものである。この図では、反応部位のすぐN末端側のP1残基の側鎖が表してあるが、このP1残基を中心として、P3、P2、P1、P1'、P2'の5残基の $\alpha$ 炭素の位置には著しい一致が見られる。これらの残基の主鎖は、トリプシンまたはキモトリプシンの触媒部位と水素結合による相互作用をする部分なので、触媒部位と鍵と鍵穴式の相互作用ができるこの様な共通の構造をとっているのであろう。この意味で、これらのインヒビターの反応部位の構造は、収束的分子進化の結果、この様な構造をとるようになったといえる。

ところで、BBIとBarleyファミリーのインヒビターであるWGTIには、ペプチド鎖の折れたたみに著しい相同性がある。(図7-2参照) すなわち、WGTIは構造上の相同性の高い2つのドメインからなるが、これらドメインの主鎖の折れたたみ

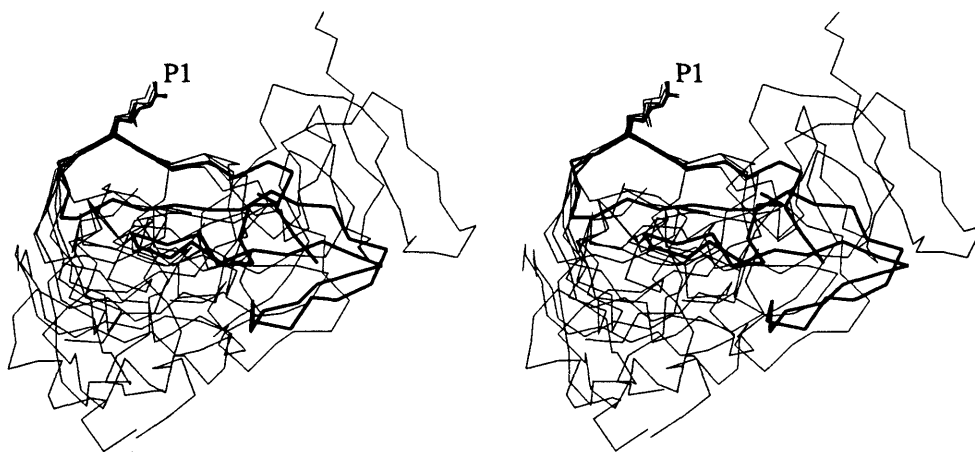


図7-1 各ファミリーのインヒビターの構造の比較。

トリプシンまたはキモトリプシンと複合体を形成した状態で解析された各ファミリーのインヒビターの構造を、プロテアーゼ部分を重ね合わせるにより、重ね合わせた。太線は、A-II-キモトリプシン複合体中のA-IIの構造であり、細線は各インヒビターファミリーに属する6つのインヒビター (BPTI, PSTI, OMTKY3, Eglin C, MCTI, WGTI) のプロテアーゼとの複合体中での構造である。インヒビターの構造は、C $\alpha$ 分子モデルで表したが、P1残基の側鎖のみは、反応部位の位置が解るように加えてある。



図7-2 A-IIとWGTIのペプチド鎖の折れたたみの比較

太線は、A-IIを示し、細線はWGTIを表す。阻害部位のP1残基のArgの側鎖を反応部位の位置が解るように描き加えてある。

は、BBIの分子全体の主鎖の折れたたみとほぼ一致する。ただし、BBIの第二阻害部位のあるループ I' の辺りでは、両者の主鎖の折れたたみに若干違いがある。主鎖の折れたたみにおける相同性は、BBIとBarleyファミリーのインヒビターに分子進化上の何等かの関係があることを示している。



### 7.3 プロテアーゼとの水素結合による相互作用

他のファミリーに属するインヒビターとトリプシンまたはキモトリプシンの相互作用も、水素結合による相互作用についてみるとBBIと基本的には同一である。すなわち、インヒビターとトリプシンまたはキモトリプシン間に以下の水素結合がある。(図7-3参照)

- (1)P3残基の主鎖のNとOが、トリプシンのGly216の主鎖のOとNに逆平行 $\beta$ -シート状の水素結合をする。(BPTIでは、P3がProであるため、その主鎖のNとGly216の主鎖のOとの間の水素結合は失われている。)
- (2)P1残基の主鎖のNは、トリプシンのSer214のO及びSer195のO $\gamma$ と水素結合をする。(BPTIでは、Ser214のOとの水素結合は無い。)
- (3)P1残基の主鎖のOは、トリプシンのGly193の主鎖のNとSer195の主鎖のNから構成されるオキシアニオンホールと2本の水素結合を作る。
- (4)P2'の主鎖のNはトリプシンのPhe41の主鎖のOと水素結合する。

これらの水素結合に加え、トリプシンとの複合体では、基質認識ポケット内の以下の相互作用が加わる。

- (5)P1残基の側鎖は、トリプシンの基質認識ポケットに入り込み、その先端のアミノ基またはグアニル基がポケット奥の Asp189の側鎖のカルボキシル基と静電相互作用をする。また、側鎖の先端は、ポケットの内壁に存在するSer190の主鎖のOや側鎖のO $\gamma$ 、Gly219の主鎖のO(P1がArgの時のみ)などの原子や、ポケット内部に存在する水分子と水素結合を形成する。

従って、トリプシン/キモトリプシンとの水素結合という観点からみれば、BBIに他のインヒビターファミリーと異なる特別なところはない。

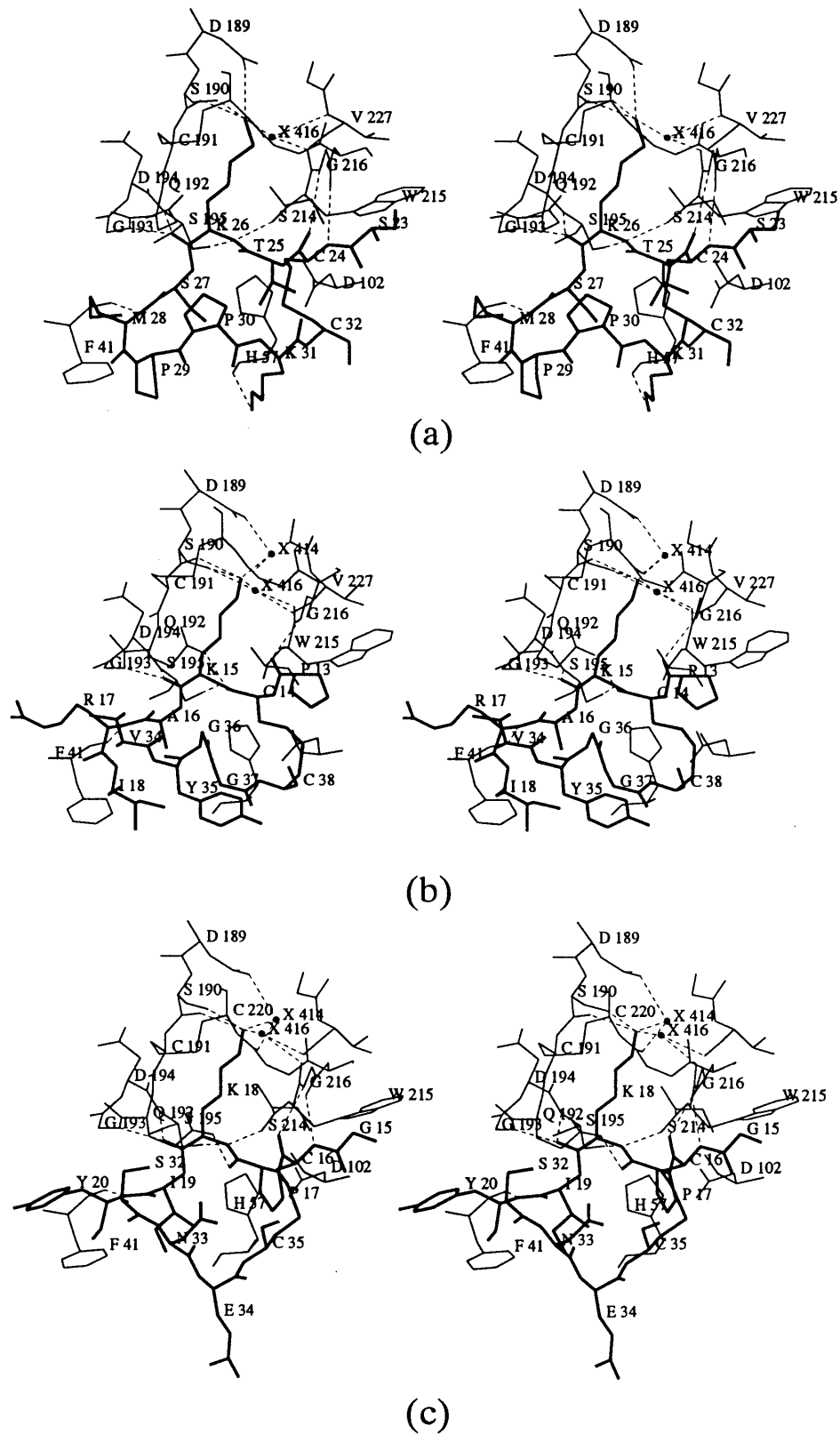
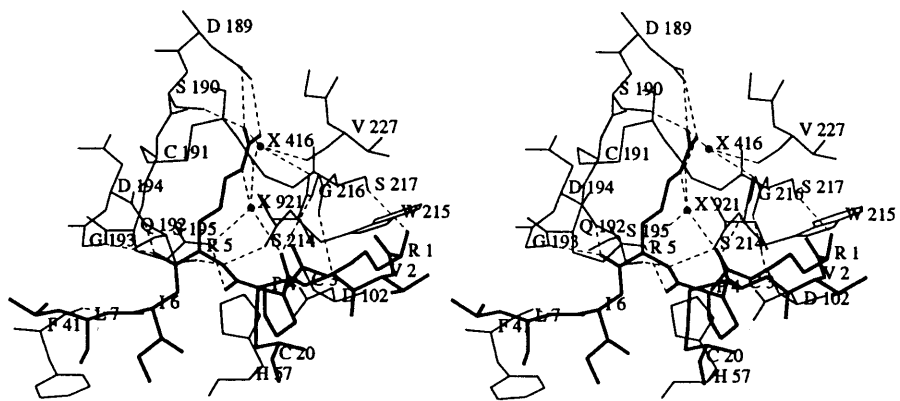


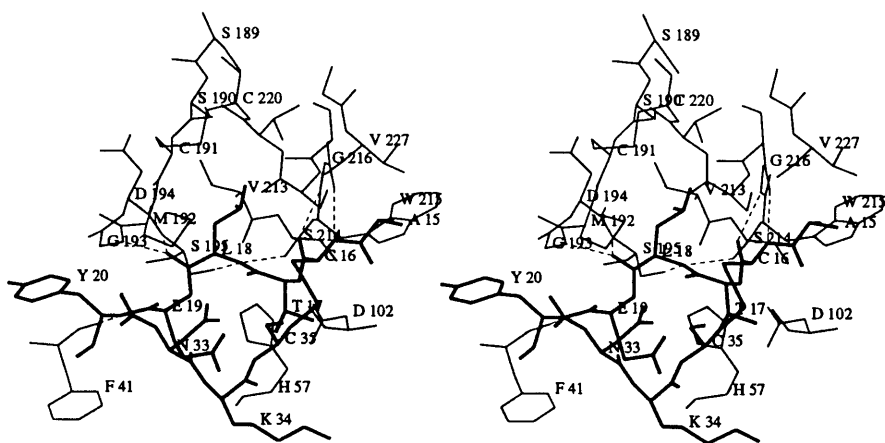
図7-3 インヒターとプロテアーゼの水素結合

- (a) AB-I - トリプシン複合体                      (b) BPTI - トリプシン複合体  
(c) PSTI - トリプシノーゲン複合体              (d) MCTI - トリプシン複合体  
(e) OMTKY3 - キモトリプシン複合体            (f) Eglin c - キモトリプシン複合体

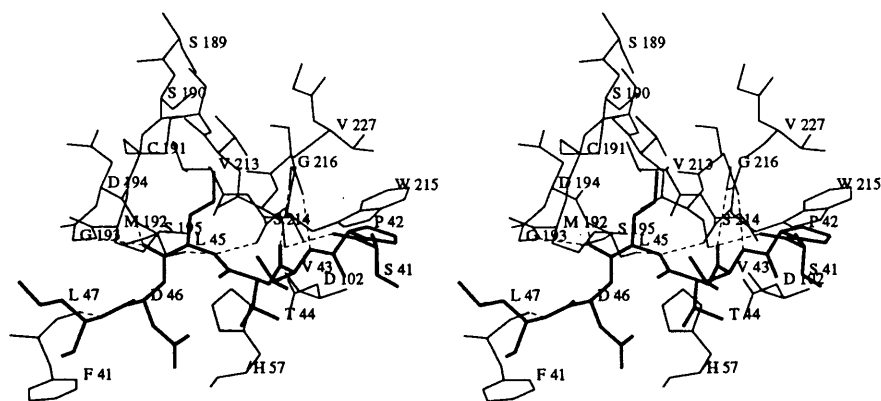
インヒターの略号は、表7-1, 7-2を参照のこと。各図では、インヒター側の構造を太線で、トリプシン側の構造を細線で、両者間の水素結合を点線で表している。なお、●は、水分子を表す。



(d)



(e)



(f)

#### 7.4 プロテアーゼとの疎水性相互作用

BBIとプロテアーゼとの相互作用において、疎水性相互作用の重要性が明らかになった。しかしながら、インヒビターとプロテアーゼ間の疎水性相互作用の重要性を指摘する報告は無い。そこで、他のファミリーのインヒビターについてもインヒビターとプロテアーゼ間の疎水性相互作用を調べてみた。表7-3と表7-4に各インヒビターにおいて疎水性相互作用に使われる残基をまとめて示す。また、図7-4に触媒部位近傍におけるインヒビターとプロテアーゼの疎水性相互作用の様子を示す。

表7-3 トリプシンとの疎水性相互作用に関与するインヒビターの残基

インヒビター*1	Ka (M)	トリプシン側の疎水性残基					
		W215	L99	C42-C58	F41	Y151	Y39
A-II(1)	(10 <sup>-9</sup> )*2	L16(P4)					Y24(P5')
A-II(2)	(10 <sup>-8</sup> )*2	V44(P4)					
AB-I						M28(P2')	M28(P2')
MBI						I13(P2')	
BPTI	10 <sup>11</sup>	P13(P3)	C14(P4) - C38			R17(P2')	R17(P2') I19(P4')
PSTI	10 <sup>10</sup>	V13(P6)	P17(P2)	I19(P1')	I19(P1')	Y20(P2')	P22(P4')
MCTI	1.7x10 <sup>10</sup>		P 4(P2)	I 6(P1')	I 6(P1')	L 7(P2')	Y27
WGTI(1)		V14(P4)				I19(P2')	I19(P2')

##### \*1 インヒビターの略号

- A-II(1) : Reactive site 1 of peanut Bowman-Birk inhibitor A-II
- A-II(2) : Reactive site 2 of peanut Bowman-Birk inhibitor A-II
- AB-I : Reactive site 1 of adzuki bean Bowman-Birk inhibitor AB-I
- MBI : Synthetic peptide based on mimic mung bean Bowman-Birk inhibitor
- BPTI : Bovine pancreatic trypsin inhibitor
- PSTI : Pancreatic secretory trypsin inhibitor
- WGTI(1) : Reactive site 1 of wheat germ trypsin inhibitor I-2

\*2 10<sup>9</sup>と10<sup>8</sup>という2つのKa値が、それぞれA-IIの2つの反応部位のうちのどちらに対応するかは解っていない。反応部位1に対する値と反応部位2に対する値がこの表と逆の可能性もある。

表7-4 キモトリプシンとの疎水性相互作用に關与するインヒビターの残基

インヒビター*	Ka (M)	キモトリプシン側の疎水性残基						
		W172	W215	M192	C191-C220	F41	L143	F39
A-II	$1.2 \times 10^8$	L16(P4)	L16(P4)	R19(P1) P22(P3') F25(P6')	R19(P1)	Y24(P5')	P22(P3')	P23(P4') Y24(P5')
OMTKY3	$1.8 \times 10^{11}$			L18(P1) Y20(P2')	L18(P1)		Y20(P2')	
Eglin C	$3 \times 10^9$ $- 1 \times 10^{10}$	P42(P4)	P42(P4)	L45(P1) L47(P2')	L45(P1)		L47(P2')	L49(P4')

\* インヒビターの略号

A-II : Reactive site 1 of peanut Bowman-Birk inhibitor A-II

OMTKY3 : Turkey ovomucoid third domain

表7-3、7-4や図7-4に見られるとおり、各インヒビターは、P4やP2'という反応部位から少し離れたところに疎水性のアミノ酸残基を配置し、プロテアーゼの活性中心から少し離れたところにある疎水性残基、トリプシンではTrp215、Leu99、Tyr151、Tyr39、キモトリプシンでは Trp172、Trp215、Leu143、Phe39と疎水性の相互作用を行う傾向がある。また、特に、キモトリプシンインヒビターでは、基質認識ポケットの入口にあるMet192とポケットの外側から疎水性の相互作用を行う傾向がある。

表7-3から、トリプシンインヒビターでは、A-IIとトリプシンの相互作用において推定されたとおり、疎水性相互作用が増えるに従って、インヒビターとトリプシンの結合定数Kaが大きくなる傾向があることがわかる。これは、インヒビターとトリプシンの結合定数を決める相互作用エネルギーの内、インヒビターとトリプシン間の水素結合等による極性相互作用エネルギーはどのインヒビターでもほぼ同じであるため、疎水性相互作用エネルギーの差が、全体の相互作用エネルギーの差となり結合定数の差になっているものと解釈できる。

しかしながら、キモトリプシンインヒビターでは、このような疎水性相互作用の大きさと結合定数Kaの間の単純な相関は見られない。(表7-4参照) キモトリプシンインヒビターでも水素結合による相互作用エネルギーは、インヒビター -

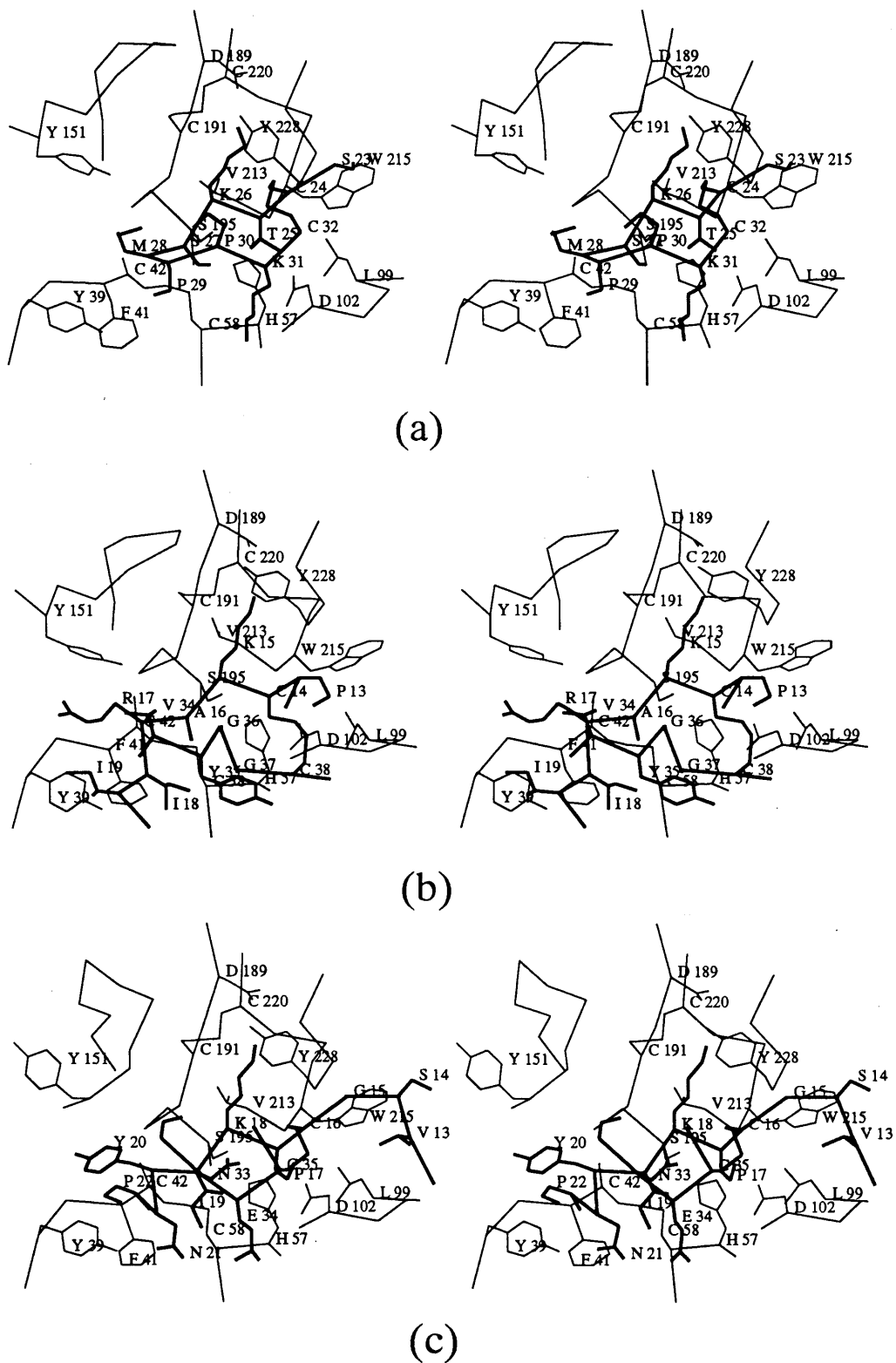


図7-4 インヒビターとプロテアーゼの疎水性相互作用

(a)AB-I - トリプシン複合体

(b)BPTI - トリプシン複合体

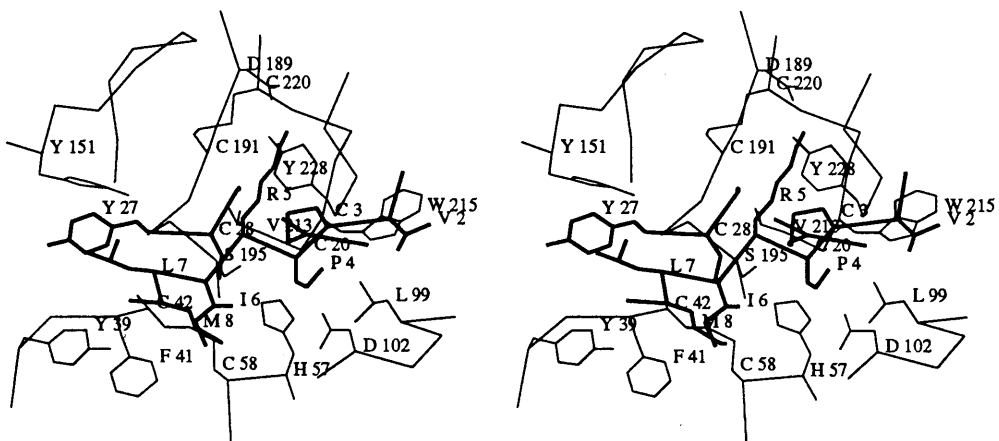
(c)PSTI - トリプシンノーゲン複合体

(d)MCTI - トリプシン複合体

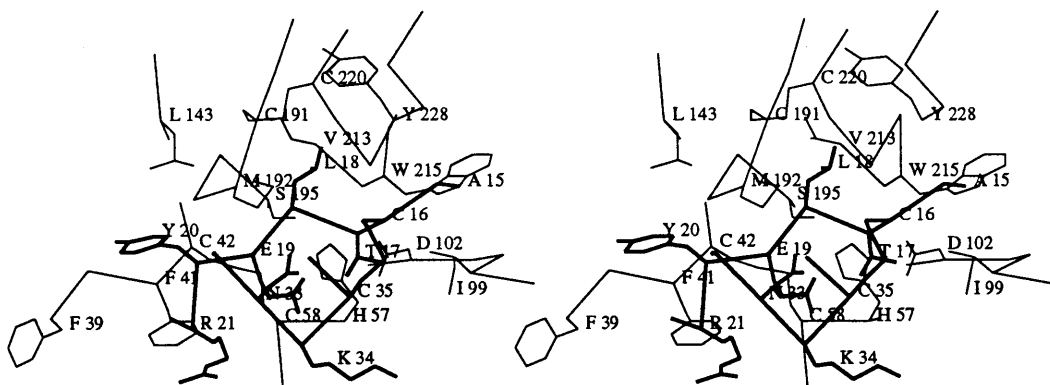
(e)OMTKY3 - キモトリプシン複合体

(f)Eglin c - キモトリプシン複合体

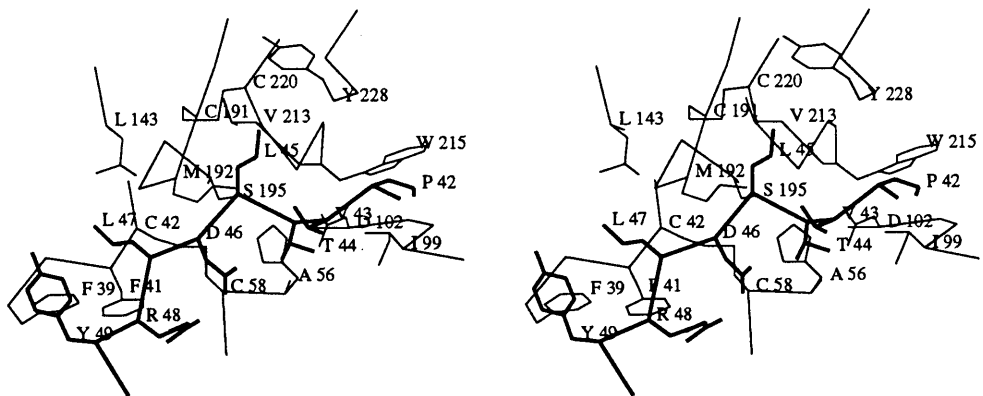
インヒビターの略号は、表7-1, 7-2を参照のこと。各図では、インヒビター側の構造を太線で、トリプシン側の構造を細線で表している。なお、側鎖の相互作用が見やすいように、主鎖の構造はC $\alpha$ 分子モデルで表してある。



(d)



(e)



(f)

キモトリブシン複合体の構造を見る限り、どのインヒビターもそれほど変わらないと考えられる。また、疎水性相互作用も全体の相互作用エネルギーに確実に寄与しているはずである。

現時点では、キモトリブシンとインヒビターの複合体の結晶解析の例が少ないため、相互作用エネルギーへの寄与が水素結合や疎水性相互作用に匹敵するほどの第三の相互作用因子が存在するかどうかは不明である。例えば、水素結合のジオメトリーの僅かな違いや、ファン・デル・ワールス接触面の僅かなミスマッチによる相互作用エネルギーのロスを考慮に入れば、インヒビターとプロテアーゼ間の結合定数のインヒビター毎の違いをもっと良く説明できるようになるのかも知れない。



## 参考文献

1. Laskowski, M. Jr. & Kato, I. (1980) Annu. Rev. Biochem. **49**, 593-626.
2. Ozawa, K. & Laskowski, M. Jr. (1966) J. Biol. Chem. **241**, 3955-3961.
3. Finkenstadt, W. R., Hamid, M. A., Mattis, J.A., Schrode, J., Sealock, R.W., Wang, D., & Laskowski, M. Jr. (1974) Bayer Symp. V, Proteinase Inhibitors, Berlin:Springer. 389-411.
4. Estell, D. A., Wilson, K. A., & Laskowski, M. Jr. (1980) Biochemistry **19**, 131-137.
5. Schechter, I. & Berger, A. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**, 157-162.
6. Schechter, I. & Berger, A. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. **32**, 898-902.
7. Norioka, S. & Ikenaka, T. (1984) J. Biochem. **96**, 1155-1164.
8. Huang, Q., Liu, S., & Tang, Y. (1993) J. Mol. Biol. **229**, 1022-1036.
9. Bode, W., Gretling, H.J., Huber, R., Otlewski, J., & Wilusz, T. (1989) FEBS Lett. **242**, 285-292.
10. 木伏英史 (1994) in 卒業論文 名古屋大学工学部応用化学科
11. Kraul, J. (1977) Annu. Rev. Biochem. **46**, 331-358.
12. Sweet, R. M., Wright, H. T., Janin, J., Chothia, C. H., & Blow, D.M. (1974) Biochemistry **13**, 4212-4228.
13. Marquart, M., Walter, J., Deisenhofer, J., Bode, W., & Huber, R. (1983) Acta Crstallogr. **B39**, 480-490
14. Hunkapiller, M. W., Forgac, M. D., Yu, E. H., & Richards, J. H. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. **87**, 25-31.
15. Bowman, D. E. (1946) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **63**, 547-550.
16. Birk, Y., Gertler, A., & Khalef, S. (1963) Biochem. J. **87**, 281-284.
17. Hammond, R. W., Foard, D.E., & Larkins, B. A. (1984) J. Biol. Chem. **259**, 9883-9890.
18. Norioka, S. & Ikenaka, T. (1983) J. Biochem. **94**, 589-599.
19. Norioka, S. Omichi, K., & Ikenaka, T. (1982) J. Biochem. **91**, 1427-1434.

20. Norioka, S. & Ikenaka, T. (1983) J. Biochem. **93**, 479-485.
21. Norioka, S., Kurokawa, T., & Ikenaka, T. (1987) J. Biochem. **101**, 713-721.
22. Tsunogae, Y., Suzuki, A., Sone, T., Takahashi, K., Tanaka, I., Yamane, T., Ashida, T., Ishikawa, C., Watanabe, K., Nakamura, S. & Takahashi, K. (1983) J. Biochem. **94**, 611-613.
23. Suzuki, A., Tsunogae, Y., Tanaka, I., Yamane, T., Ashida, T., Norioka, S., Hara, S., & Ikenaka, T. (1987) J. Biochem. **101**, 267-274.
24. Suzuki, A., Tanaka, I., Yamane, T., Ashida, T., Norioka, S., Hara, S., & Ikenaka, T. (1993) J. Mol. Biol. **234**, 722-734.
25. Sakabe, N. (1983) J. Appl. Crystallogr. **16**, 542-547.
26. Higashi, T. (1989) J. Appl. Crystallogr. **22**, 9-18.
27. Steigemann, W. (1974) in ph.D. Thesis, Technische Universitaet, Muenchen.
28. blow, D. M. & Crick, F. H. C. (1959) Acta Crystallogr. **12**, 794-799.
29. Cullis, A. F., Muirhead, H., Perutz, M. F., Rossmann, M. G., & North, A. C. T. (1961) Proc. R. Soc. **A265**, 15-21.
30. Bricongne, G. (1976) Acta Crystallogr. **A32**, 832-847.
31. Hendrickson, W. A. & Konnert, J. H. (1980) in Biomolecular Structure, Function, Conformation and Evolution (Srinivasan, R. ed.), vol. 1, 43-57, Pergamon Press, Oxford.
32. Wilson, A. J. C. (1942) Nature **150**, 152.
33. Ramakrishnan, C. & Ramachandran, G. N. (1965) Biophys. J. **5**, 909-933
34. Luzzati, V. (1952) Acta Crystallogr. **5**, 802-810.
35. Chen, P., Rose, J., Love, R., Wei, C. H., & Wang, B. C. (1992) J. Biol. Chem. **267**, 1990-1994.
36. Tsunogae, Y., Tanaka, I., Yamane, T., Kikkawa, J., Ashida, T., Ishikawa, C., Watanabe, K., Nakamura, S., & Takahashi, K. (1986) J. Biochem. **100**, 1637-1646.
37. Lin, G., Bode, W., Huber, R., Chi, C., & Engh, R. A. (1993) Eur. J. Biochem. **212**, 549-555.

38. Li, Y., Huang, Q., Zhang, S., Liu, S., Tang, Y., & Qi, C. to be published.
39. 曾根辰夫 (1986) in 卒業論文 名古屋大学工学部応用化学科
40. 伊加賀修治 (1987) in 卒業論文 名古屋大学工学部応用化学科
41. Schroeder, D. D. & Shaw, E. (1968) J. Mol. Chem. **243**, 2943-2949.
42. 池中徳治 (1982) 蛋白質、核酸、酵素 **27**, 1738-1746.
43. Walter, J., Steigemann, W., Singh, T. P., Bartunik, H., Bode, W., & Huber, R. (1982) Acta Crystallogr. **B38**, 1462-1470.
44. 木伏英史 私信.
45. 沼田 淳 (1994) in 卒業論文 名古屋大学工学部応用化学科
46. Tsukada, H. & Blow, D. M. (1985) J. Mol. Biol. **184**, 703-722.
47. Crowther, R. A. (1972) in The Molecular Replacement Method (Rossmann, M. G., ed.) 173-178, Gordon & Breach, New York.
48. Crowther, R. A. & Blow, D. M. (1967) Acta Crystallogr. **23**, 544-548.
49. Brunger, A. T., Kuriyan, J., & Karplus, M. (1987) Science **235**, 458-460.
50. Roehlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K., & Huber, R. (1973) J. Mol. Biol. **77**, 417-436.
51. Bolognesi, M., Gatti, G., Menegatti, E., Guarneri, M., Marquart, M., Papamokos, E., & Huber, R. (1982) J. Mol. Biol. **162**, 839-868.
52. Fujinaga, M., Sielecki, A. R., Read, R. J., Ardelt, W., Maskowski, M. Jr., & James, M. N. G. (1987) J. Mol. Biol. **195**, 397-418.
53. Bolognesi, M., Pugliese, L., Gatti, G., Frigerio, F., Coda, A., Antolini, L., Schnebli, H. P., Menegatti, E., Amiconi, G., & Ascenzi P. (1990) J. Mol. Recog. **3**, 163-169.

## 発表論文

1. Crystal Structure Analysis of Phospholipase A<sub>2</sub> from *Trimeresurus flavoviridis* (Habu Snake) Venom at 1.5Å Resolution.  
A. Suzuki, E. Matsueda, T. Yamane, T. Ashida, H. Kihara, & M. Ohno  
*J. Biochem.* **117**, (1995), in press.
2. Structure of a New Alkaline Serine Protease (M-Protease) from *Bacillus* sp. KSM-K16.  
T. Yamane, T. Kani, T. Hatanaka, A. Suzuki, & T. Ashida  
*Acta Crystallogr.* **D51**, (1995), in press.
3. Crystallographic Refinement of Bowman-Birk Type Protease Inhibitor A-II from Peanut (*Arachis hypogaea*) at 2.3Å Resolution.  
A. Suzuki, T. Yamane, T. Ashida, S. Norioka, S. Hara, & T. Ikenaka  
*J. Mol. Biol.* **234**, pp. 722-734 (1993).
4. Crystallization and Preliminary X-ray Studies on the Trypsin Inhibitor I-2 from Wheat Germ and Its Complex with Trypsin.  
A. Suzuki, T. Kurasawa, C. Tashiro, K. Hasegawa, T. Yamane, & T. Ashida  
*Acta Crystallogr.* **D49**, pp.594-596 (1993).
5. Crystal Structure of *Streptomyces Erythraeus* Trypsin at 2.7Å Resolution.  
T. Yamane, M. Kobuke, H. Tsutsui, T. Toida, A. Suzuki, T. Ashida, Y. Kawata, & F. Sakiyama  
*J. Biochem.* **110**, pp.945-950 (1991).
6. Crystallization and Preliminary Crystallographic Study of Bacterial  $\alpha$ -Amylases.  
A. Suzuki, T. Yamane, Y. Ito, T. Nishio, H. Fujiwara, & T. Ashida  
*J. Biochem.* **108**, pp.379-381 (1990).
7. Preliminary Crystallographic Study of Phospholipase A<sub>2</sub> from the Venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu Snake).  
Y. Shinoda, A. Shouji, T. Yamane, A. Suzuki, T. Ashida, H. Kihara, & M. Ohno  
*J. Biochem.* **107**, pp.84-86 (1990).
3. The Structure of Bowman-Birk Type Protease Inhibitor A-II from Peanut (*Arachis hypogaea*) at 3.3Å Resolution.  
A. Suzuki, Y. Tsunogae, I. Tanaka, T. Yamane, T. Ashida, S. Norioka, S. Hara, & T. Ikenaka  
*J. Biochem.* **101**, pp.267-274 (1987).

## その他の論文

1. Structure and Function of Bowman-Birk Protease Inhibitor Proteins.  
A. Suzuki, T. Kurasawa, C. Yamamoto, K. Hasegawa, Y. Tsunogae, T. Yamane, & T. Ashida  
Proceedings of 'The Second R. O. C. - Japan Joint Seminar on Crystallography',  
pp.179-188 (1992).
2. Structure of Bowman-Birk Protease Inhibitor and Its Complex with Trypsin.  
A. Suzuki, Y. Tsunogae, T. Yamane, & T. Ashida  
in 'Molecular Conformation and Biological Interactions' (ed. P. Balaram and S. Ramaseshan)  
pp. 171-186, Indian Academy of Sciences, Bangalore (1991).
3. 放線菌トリプシンの構造と機能に関する研究  
山根 隆、鈴木淳巨、芦田玉一  
旭硝子財団研究報告、57, pp.373-384 (1990)
4. プロテイナーゼインヒビターのX線解析.  
鈴木淳巨、山根 隆、芦田玉一  
蛋白質核酸酵素、34, pp.929-938 (1989).
5. Crystallization of Bowman-Birk Type Protease Inhibitor ( Peanut ) and Its Complex with Trypsin.  
Y. Tsunogae, A. Suzuki, I. Tanaka, T. Yamane, T. Ashida, S. Norioka, S. Hara, & T. Ikenaka  
*J. Biochem.* **100**, pp.243-246 (1986).

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご懇切に御指導頂きました芦田玉一 教授に心から感謝致します。

そして、学術上の数々の御助言を頂きました山根 隆 助教授、田中 勳 北海道大学教授に深く感謝致します。

A-IIの研究を進めるに当たり、数々の御助言を頂き、また、初期のインヒビター試料の提供を頂きました乗岡茂巳 大阪大学助教授、原 三郎 京都工芸繊維大学教授、池中徳治 帝塚山学院短期大学教授には感謝の言葉もありません。

また、放射光を使った回折 X 線データ測定にあたって、大変お世話になりました高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の坂部知平 教授、そして中川敦史、渡辺信久の両氏には深く感謝致しております。

本研究を進めるにあたり欠くことのできないA-II-キモトリプシン複合体の原子座標データを快く提供して頂いた芦田研究室の沼田 淳 氏、そして、小麦胚芽インヒビターの論文発表前の貴重な原子座標を御提供頂いた同研究室の木伏英史 氏の両氏には特別の感謝の意を示したいと思います。

A-II-トリプシン複合体の困難な研究を共に行った曾根辰夫 氏、伊加賀 修司 氏にも敬意と感謝の意を表したいと思います。

そしてまた、実験の際の有益な御助言、御協力を頂いた加藤成人氏、公私に渡ってご援助して下さった野津喜美子 氏、実験の現場において、終始親切な御指導をして頂いた角替靖男 博士にも深く感謝しております。

最後に名古屋大学工学部芦田研究室の数多くの先輩、後輩の皆様の御協力があったこそ、この研究が成し遂げられましたことをここに記し、研究室の皆様への深い感謝の意を表したいと思います。

平成 7 年 3 月

鈴木淳巨