

Sphingobium sp. SYK-6 株由来 O-脱メチル化
酵素 LigM の X 線結晶構造解析

原田 彩佳

博士 (学術)

総合研究大学院大学
高エネルギー加速器科学研究科
物質構造科学専攻

平成28 (2016) 年度

学位論文

Sphingobium sp. SYK-6 株由来 O-脱メチル化酵素 LigM
の X 線結晶構造解析

2016 年度

総合研究大学院大学
高エネルギー加速器科学研究科
物質構造科学専攻

原田 彩佳

目次

第1章 序論

1-1. 進化学の歴史	2
1-2. タンパク質の立体構造と分子進化	4
1-3. リグニンとその分解代謝	5
1-4. C1 代謝.....	13
1-5. 研究目的	19

第2章 LigM の精製

2-1. コンストラクト作製	22
2-2. 大腸菌による大量培養、集菌と菌体破碎	26
2-3. アフィニティークロマトグラフィーによる精製	29
2-4. サイズ排除クロマトグラフィー	32
2-5. LigM の溶液中での会合状態	35
2章 考察.....	40

第3章 LigM の結晶化

3-1. LigM 溶液の調整	42
3-2. 結晶化条件の探索	44
3-3. micro-seeding による結晶の質の改善	46
3-4. 標準母液と抗凍結剤の作製	48

第4章 初期位相決定

4-1. 重原子誘導体結晶を用いた位相決定	50
4-2. S-SAD 法による位相決定	70
4章 考察.....	88

第5章 複合体結晶構造解析

5-1. 複合体結晶の作製	90
5-2. 複合体結晶の回折強度データ収集と構造決定	94
5-3. LigM 結晶の高分解能回折強度データ収集	98

5-4. 空間群の異なる結晶の位相決定	101
---------------------------	-----

第6章 構造精密化

6-1. 構造精密化	106
6-2. 活性中心に結合している低分子化合物の確認	111

第7章 LigMの立体構造

7-1. LigMの全体構造	115
7-2. LigMの2量体形成	119
7-3. LigMの構造重ねあわせ	123
7-4. 活性中心の構造	126

第8章 T-proteinとLigMとの比較

8-1. LigMとT-proteinの構造比較	135
8-2. 立体構造の比較	142
8章 考察	146

第9章 近縁種におけるシーケンスアライメント

9-1. <i>Sphingobium</i> 属に含まれるLigMのホモログ酵素	152
9-2. <i>Sphingomonadales</i> に含まれるLigM及びT-proteinのホモログ酵素	155
9章 考察	163

まとめと今後の展望	165
-----------------	-----

付録	167
----------	-----

参考文献	200
------------	-----

発表論文	207
------------	-----

謝辞	207
----------	-----

第1章 序論

第1章 序論

1-1. 進化学の歴史

『なぜキリンの首は長いのか?』そんな疑問を一度くらい持ってみたことがあるだろう。また、ヒトの DNA の 98% はチンパンジーの DNA と同じであるとも言われているが、両者の違いはどこにあるのだろうか? (Varki & Altheide, 2005) このような疑問を持った時には、『キリンの祖先の首も長かったのだろうか』『ヒトとチンパンジーはどこから変わっていったのか』など、進化的視点に立って考えることが必要になる。進化学における歴史的なルーツは、Charles Robert Darwin (1809- 1882) にあると言っていい。Darwin は 1859 年に『種の起源』を発表し、進化の理論として自然淘汰説を提唱した(Darwin, 1859)。自然淘汰説とは、『生存競争に少しでも有利な変異を持った個体は、より多くの個体を残し、そのような変異が子孫に伝えられ、生物は時とともに次第に環境へ適応する方向へと変化していく』というものである。遺伝学の基礎とも言える発見は、1866 年に Gregor Johann Mendel (1822-1884) が行ったエンドウマメの交配実験から明らかにされた。Mendel は、両親から受け継ぐ現在の遺伝子に対応する粒子的な遺伝要素が遺伝の本質であり、受け継ぐ一对の要素のうち、一方は優性であり、他方は劣性で両者は決して交わることなく優性の形質にのみだけが表現されることを明らかにした。これはメンデルの法則と呼ばれ現在なら誰も認める法則であるが、当時の人々には認められていなかった。約半世紀経った 1900 年ごろ、Hugo Marie de Vries (1848-1935), Carl Erich Correns (1864-1933), Erich von Tschermak-Seysenegg (1871-1962) の 3 人の遺伝学者によって、メンデルの法則は再発見され、遅ればせながら Mendel の研究成果は認められることとなった。この時代にダーウィンの進化理論とメンデルの遺伝学が合体して集団遺伝学が誕生したが、遺伝的要素が何であるか、またそれがどのように遺伝されるのかについては分かっていなかった。1944 年ごろまで、遺伝物質はタンパク質であると考えられていた。なぜならタンパク質を構成するアミノ酸は 20 種類あるのに対し、核酸には 4 種類しかないため、遺伝物質の複雑さを表現するのにふさわしくないと考えられていたためである。1944 年、Oswald Theodore Avery (1877-1955), Colin Munro MacLeod (1909-1972), Maclyn McCarty (1911-2005) によって、肺炎双球菌を用いた実験から遺伝子の正体は DNA であることが示唆された。また、1952 年 Alfred Day Hershey (1908-1997), Marthys Cowles Chase (1927-2003) の 2 人の遺伝学者によって T2 フェージを用いた実験から遺伝子の正体は DNA であることが裏付けられた。遺伝子の構造が明らかにされたのは、1953 年、James Dewey Watson (1928 -) と Francis Harry Compton Crick (1916 - 2004) によるものであった(Watson and

Crick, 2003)。彼らは、Maurice Hugh Frederick Wilkins (1916-2004), Rosalind Elsie Franklin (1920-1958)によって撮影された DNA の X 線回折写真を利用し、生命にとって最も重要な DNA の構造を明らかにした。それは二本の鎖がお互いに絡み合いながららせん状に伸びた形をしているというものであった。それぞれの鎖はリン酸、糖、塩基から構成されたヌクエオチドが1つの単位になって無数に重合し、直鎖状に伸びている。リン酸と糖でらせんの骨格を形成し、らせん軸に垂直に塩基が積み重なっている。塩基にはアデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)の4つの異なる種類があり、一方の鎖の塩基と他方の鎖の塩基はお互いに水素結合で結ばれている。その結合は特異的で A は T と、G は C と結合する。このことは重要な意味を持つ。両親から子へ遺伝情報が伝達される際に、まず DNA がコピーされる。そのコピーが子へと受け渡される。DNA が複製されるときには、それぞれの鎖を鋳型としてその配列と相補的な配列を持つ鎖を合成するので、出来上がった2つの DNA は完全に同じ塩基の配列を持つことになる。こうして全く同じ遺伝情報を持った DNA が親から子へと伝達されることになる。このように遺伝物質 DNA の構造の解明により、遺伝という現象が分子レベルから説明できることが示された。進化を分子レベルで議論できるようになったのはこの頃からであり、遺伝子やタンパク質といった分子レベルで進化を定量的に研究することが可能になった。それでは、1つの個体に現れた変異はどのようにして広まっていくのだろうか？それは木村資生(1924-1994)の中立説で説明することができる(Kimura, 1968; 1969; Kimura and Ohta, 1974; KIMURA and OHTA, 1971)。中立説とは『分子レベルでの進化は淘汰に有利でも不利でもない、中立な変異が偶然に集団に広まった結果起こるものである』というものである。この考えは淘汰に有利な変異が集団に固定するという Darwin の自然選択説と対立するため激しい論争が巻き起こったが、現在では中立説と自然選択説は並立する概念であることがわかり、大部分の進化生物学者が、両説は両立できるものとして受け入れるに至っている。

1-2. タンパク質の立体構造と分子進化

DNA が複製される時、まれに間違いを起こし、その結果、1つの DNA 塩基が別のものに置き換わったりすることがある。これを突然変異というが、その変異を持った子孫が増えてその種を形成する集団全体に広まる可能性がある。これは、これまで持っていた DNA を別の変異を受けた DNA で置き換えたことを意味し、変異が集団に固定することを進化という。よって DNA は進化の情報をもっていると言えるため、2つの DNA 配列を比較すれば、それぞれの変異が定着した結果を比較していることになるので、分子進化の知見を得ることができる。

タンパク質は 20 種類のアミノ酸が鎖状に多数連結してできた分子であり、合成されるアミノ酸の数や並び方を決める設計図は遺伝子である DNA に暗号化されている。タンパク質やそれをコードしている遺伝子には、その機能の上で重要な部分とそれほど重要でない部分とがあり、機能の上で重要なアミノ酸は進化の過程で変わりにくく、逆に重要でない部分のアミノ酸は比較的变化しやすい。生化学反応を触媒するタンパク質である酵素には、反応に直接関与し活性の中心となる部位、活性中心があるが、こうした部位には特定のアミノ酸だけが存在し、別のアミノ酸に置き換わると大抵の場合本来の活性を失ってしまう。そのためタンパク質の機能にとって重要なアミノ酸は、長い進化の過程で別のアミノ酸に置き換わることなく保存されている。タンパク質は特定の形に折りたたまれて立体的な形をとり、その立体構造がタンパク質の持っている機能と直接関係する。タンパク質が特定の機能を発現する上で、その独特の構造は極めて重要である。酵素の活性中心に参加する部位は立体的にはお互い接近して存在するが、一次的なアミノ酸配列ではお互いに離れていることが多い。こうした重要な部位のアミノ酸がお互いに隣接して正しい場所に位置するようになるべく折りたたまれる必要がある。したがって、タンパク質が持つ機能を維持するためには、その立体的な形が保存されることが重要になる。またタンパク質の機能に直接関与する部位以外の部分でも全体の構造を保存するような制約が働くため、タンパク質として機能が同じであれば重要なアミノ酸は同じであり、全体構造も類似していることが多くなる。

1-3. リグニンとその分解代謝

高温、高 pH, 低 pH, 高塩濃度、高圧力、高放射線などの極限環境下において生育できる好熱菌、好圧菌、放射線耐性菌などがいるように、生育環境に適応するため生物が進化することがある。よって、珍しい環境で生存することのできる生物は独特の代謝経路を持っていることが多い。

1-3.1 木質成分とリグニン

植物の約 90%は細胞壁成分であり、それらは主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンから構成されている。セルロースは D-グルコースが β -1,4 グリコシド結合した直鎖状の多糖であり、約 50%と細胞壁構成成分中で最も多量に存在する。ヘミセルロースは複数の単糖類が β -1,4 あるいは β -1,3 グリコシド結合した無定型の化合物であり、20~40%の割合を占める。これらは紙、パルプ工業等に利用されるとともに、セルロースからの燃料用エタノール生産に関する研究開発が進められている (Ballesteros *et al.*, 2006; Lin and Tanaka, 2006; Nakata *et al.*, 2006)。しかし、リグニンは細胞壁成分の約 30%を占めるが複雑な 3 次構造を形成しているため難分解性であり (Davin and Lewis, 2005)、資源としての利用法確立へ向けて研究が盛んに行われている (図 1-1)。

リグニンは、基本骨格であるフェニルプロパン構造の違いにより針葉樹リグニン、広葉樹リグニン、及びイネ科植物リグニンの 3 種類に分けられる。針葉樹リグニンは、フェノール性水酸基と 1 個のメトキシル基を持つグアイアシル核にプロパン型側鎖の結合した構造(グアイアシルプロパン構造)を基本骨格とした coniferyl alcohol から構成されている。一方、広葉樹リグニンは、フェノール性水酸基と 2 個のメトキシル基を持つシリングルプロパン構造を基本骨格とした sinapyl alcohol と coniferyl alcohol によって構成されている。イネ科植物リグニンは、フェノール性水酸基を持つ *p*-ヒドロキシフェニルプロパン構造を基本骨格とする *p*-coumaryl alcohol、及び coniferyl alcohol、sinapyl alcohol から構成されている (図 1-2-A)。リグニンはこれらモノリグノール類がランダムに脱水素重合することにより生成する高分子であり、炭素-炭素 (C-C) 結合、エーテル (C-O-C) 結合からなる様々な分子間結合を有する (図 1-2-B)。リグニンは生物学的に非常に安定であることから、樹木の耐腐朽性に寄与している。

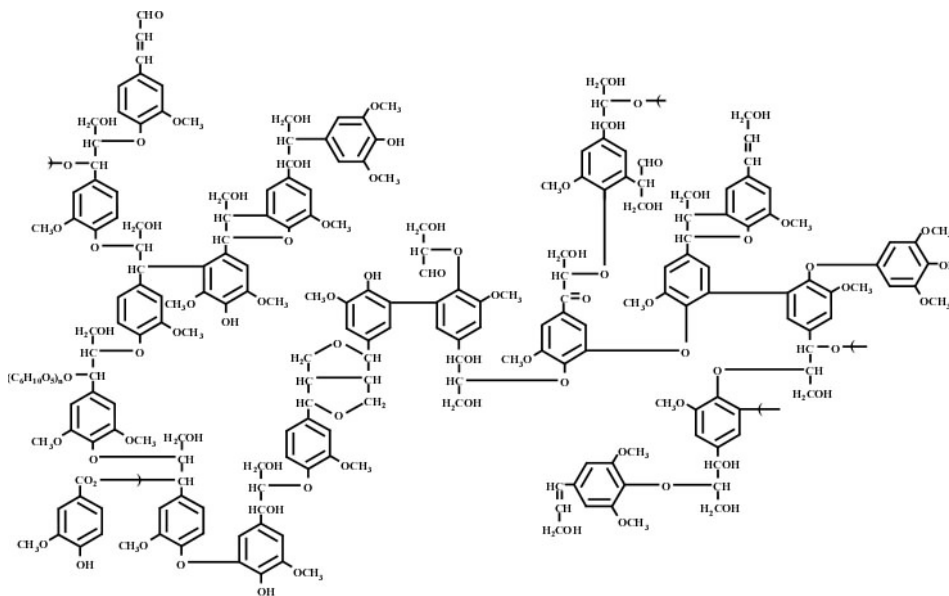


図 1-1. 天然リグニンの推定構造

天然リグニンの推定構造を示す。リグニンは細胞壁成分の約 30% を占めており、複雑な 3 次構造を形成しているため難分解性である。

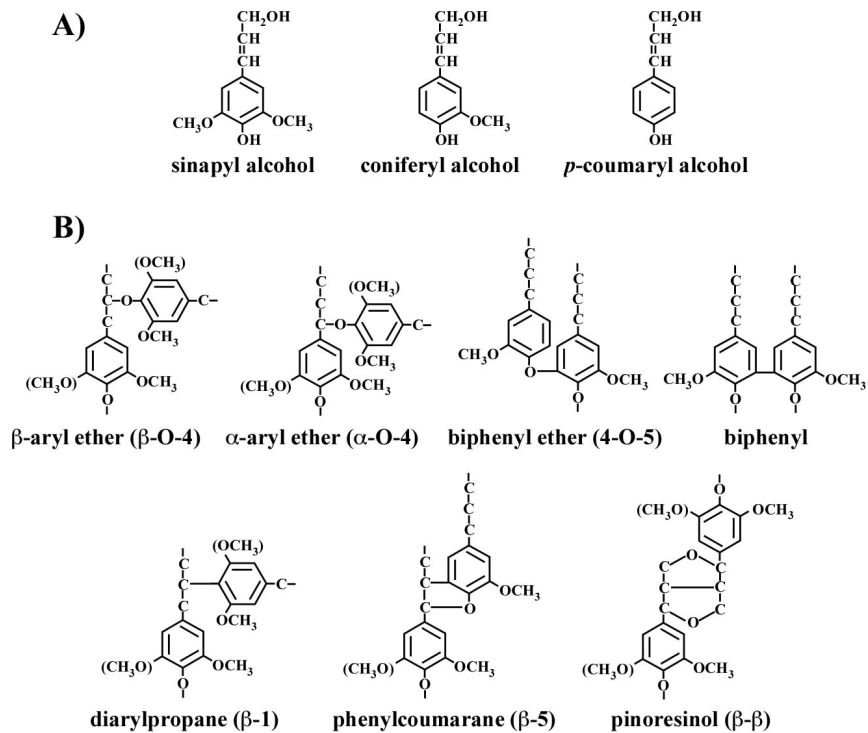


図 1-2. モノリグノールの構造とリグニンの様々な結合様式.

(A)リグニンを構成するモノリグノールの構造、(B)リグニンを形成する結合様式をそれぞれ示す。

1-3.2 リグニンの生分解

微生物による天然リグニンの分解には、白色腐朽菌及びこれと類縁の植物遺体分解菌が主要な役割を果している。白色腐朽菌などによって分解されたリグニンに由来すると考えられる低分子の芳香族化合物（低分子性リグニン誘導体）はバクテリアによって分解され、最終的に TCA 回路に運ばれる(Martinez *et al.*, 2005)。

土壌細菌は高分子リグニンに対する分解能を有するものはほとんど知られていないが、低分子性リグニン誘導体を炭素源として生育するものが存在する。バクテリアはこれらリグニン由来の芳香族化合物を炭素源、エネルギー源として生育するために、数多くの反応段階から構成される特異的な分解酵素系を有する(Vicuña, 1988)。そのため、バクテリアの分解酵素系は、リグニンを特定の化合物へと変換するための極めて重要な道具となり得る。化学処理によって低分子化したリグニンを、バクテリアの分解酵素によって特定の有用物質へと変換することができれば、リグニンの有効利用を確立できる可能性がある。

1-3.3 *Sphingobium* sp. SYK-6 株によるリグニン由来化合物の分解

Sphingobium sp. SYK-6 株（以下、SYK-6）は、クラフトパルプ工場の廃水から分離された細菌であり、エネルギー源として β -アリアルエーテル、ビフェニルやジアリアルプロパンなどの様々な低分子性リグニン誘導体を利用することができる(Katayama *et al.*, 1988) (Masai *et al.*, 1993), (Masai *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 1998; 1999; Sato *et al.*, 2009) (Sonoki *et al.*, 2000) 。SYK-6 は通常の生物が栄養源とするようなグルコースなどの糖類やコハク酸などの有機酸では生育することができず、低分子性リグニン誘導体のみを栄養源としている。このことから、SYK-6 は低分子性リグニン誘導体を分解することができるバクテリアの一種であると考えられている。

長岡技術科学大学の政井研究室では、現在までに SYK-6 株のビフェニル代謝系、 β -アリアルエーテル開裂系などのリグニン二量体化合物の分解に特異的に働く酵素遺伝子群を単離、解析してきた。その結果、グアイアシルプロパン構造又はシリングルプロパン構造を有するリグニン由来化合物は、それぞれバニリン酸 (VNL)、シリング酸 (SYR) を経由して代謝されることが推定された (図 1-3) (Masai *et al.*, 2007)。

VNL 及び SYR は、*O*-脱メチル化されプロトカテク酸 (PCA) 及び 3-*O*-メチルガリク酸 (3MGA) へと変換される。その後、PCA は PCA 4,5-開裂経路を経由して最終的にピルビン酸とオキサロ酢酸に分解され、TCA 回路へ導入される (図 1-3)。一方、3MGA は、さらに脱メチルを受けてガリク酸 (MGA) に変換されるか、もしくは 3MGA 3,4-ジオキシゲナ

ーゼ (DesZ) 及び PCA 4,5-ジオキシゲナーゼ (LigAB) による芳香環開裂を受けて PCA 4,5-開裂経路に合流して代謝されることが推定されている。

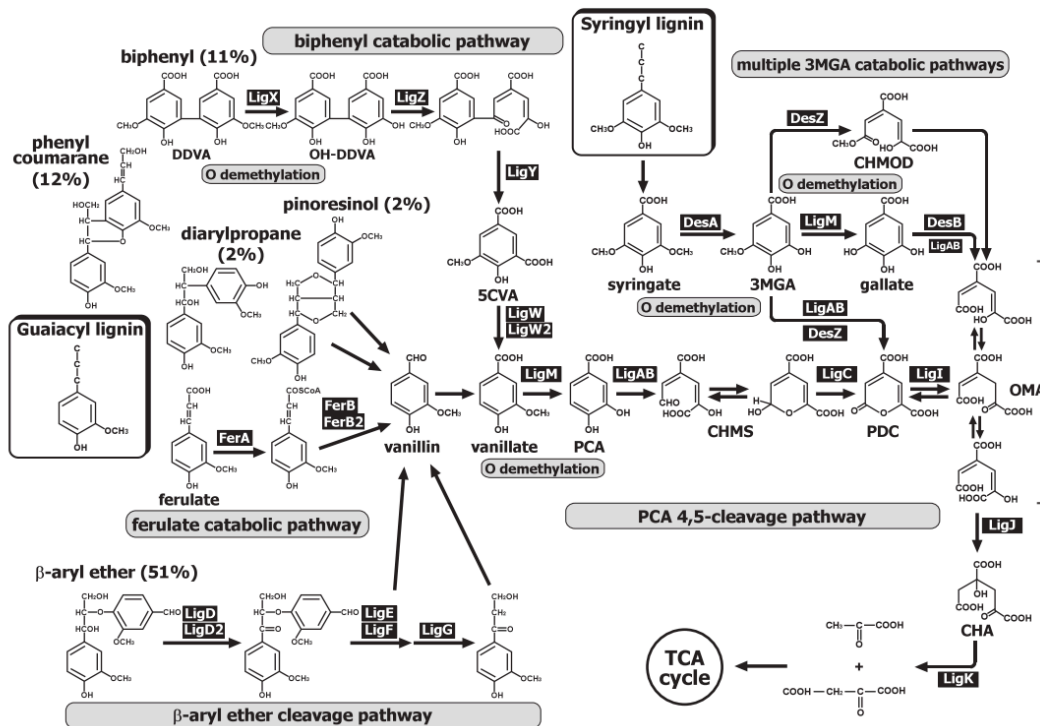


図 1-3. *Spingobium* sp. SYK-6 株のリグニン誘導体低分子化合物の代謝マップ

Masai *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71 (1), 1-15, 2007 より引用。

1-3.4 LigM/DesA による O-脱メチル化

SYK-6 において、O-脱メチル化は低分子性リグニン誘導体に特有なメトキシ基を水酸基へと変換し、芳香環開裂ジオキシゲナーゼの基質となるジオール構造へと導くためにリグニン分解において極めて重要な反応段階であると言える。

SYK-6 における O-脱メチル化は LigM または DesA によって行われる。LigM および DesA はアミノ酸残基の相同性 (identity) が 50 % あり、相同性の高い酵素であると言えるがその基質特異性は異なる。これまでの政井研 (長岡技術科学大学) による結果から、LigM のシリング酸 (SYR) に対する活性は、バニリン酸 (VNL) または 3-O-メチルガリック酸 (3MGA) に対する活性と比較すると低く、逆に DesA の VML と 3MGA に対する活性は SYR よりも低いため、LigM の基質は VNL 及び 3MAG であり、DesA の基質は SYR であることが明らかにされている (図 1-4, 1-5)。しかし、その基質特異性の分子メカニズムについては、未だ解明されていない。

また、LigM/DesA による O-脱メチル化は、補酵素としてテトラヒドロ葉酸 (THF) を利用し、それぞれの基質のメトキシ基のメチル基を THF に転移し、生成物と同時に 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-メチル-THF) 生じる。THF の詳しい記述に関しては 1-4. で述べることにする。

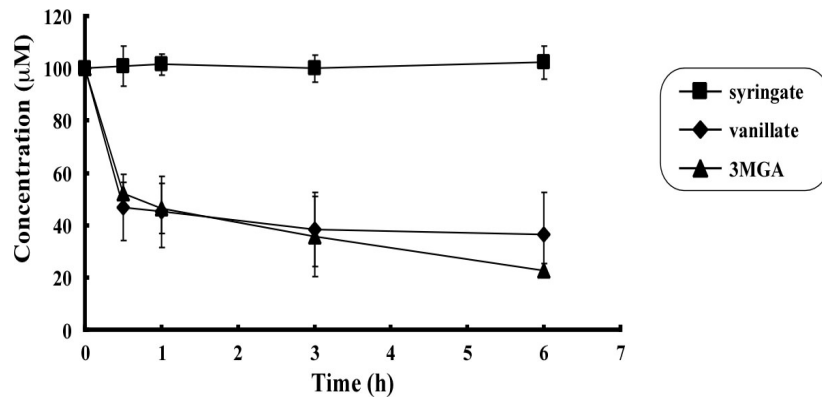


図 1-4. LigM による VNL, 3MGA, SYR の分解

図は阿部（長岡技術科学大学）博士論文より引用した。

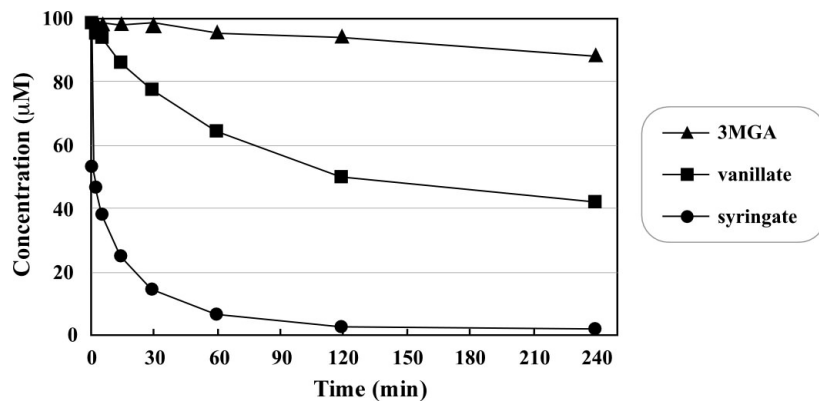


図 1-5. DesA による VNL, 3MGA, SYR の分解

図は阿部（長岡技術科学大学）博士論文より引用した。

1-3.5 バクテリアによる脱メチル化反応

芳香族化合物のメトキシル基からの脱メチル化は、主に酸素添加型とテトラヒドロ葉酸依存型の2つのタイプが知られている。酸素添加型の脱メチルシステムは、2つもしくは3つのコンポーネントから構成されるオキシゲナーゼシステムであり、それらは鉄-硫黄タンパク質やシトクロム P-450、NADH 及び NADPH から電子を伝達するフェレドキシン、フェレドキシンレダクターゼで構成される。シトクロム P-450 タイプではグアイアコールの脱メチルを触媒する *Moraxella* sp. GU2 株のシトクロム P-450 (Dardas *et al.*, 1985)と、4-メトキシベンゾエイトの脱メチルを触媒する *Pseudomonas putida* のモノオキシゲナーゼ (Bernhardt *et al.*, 1988) が報告されている。一方、鉄-硫黄タンパク質タイプとしては、バニリン酸脱メチル酵素遺伝子である *vanA* 及び *vanB* が *Pseudomonas* sp. ATCC 19151 株 (Brunel and Davison, 1988)、*Pseudomonas* sp. HR199 株 (Priefert *et al.*, 1997)、*P. putida* WCS358 株 (Venturi *et al.*, 1998)、*P. fluorescens* BF13 株 (Civolani *et al.*, 2000)、及び *Acinetobacter* sp. ADP1 株 (Dal *et al.*, 2002)から単離されている (図 1-6-A)。

テトラヒドロ葉酸依存型のメチル基転移反応は、フェニルメチルエーテル化合物を単一炭素源として生育することができる偏性嫌気性菌 *Acetobacterium woodii* において初めて報告された (Berman and Frazer, 1992)。その後、3つのコンポーネントが関与するテトラヒドロ葉酸依存型のバニリン酸脱メチル酵素が *Acetobacterium dehalogenans* で報告された (Engelmann *et al.*, 2001) (Kaufmann *et al.*, 1998b) (Kaufmann *et al.*, 1998a)。この反応ではバニリン酸のメトキシル基のメチル部分は、メチルトランスフェラーゼ I によりコリノイドタンパク質へと転移された後、メチルトランスフェラーゼ II によりコリノイドタンパク質からテトラヒドロ葉酸へと転移される (図 1-6-B)。

LigM/DesA による O-脱メチル化においても THF が補酵素として使われるが、コリノイドタンパク質を介さない脱メチル化反応を触媒するため、バクテリアによる新規の脱メチル化酵素であると考えられる。

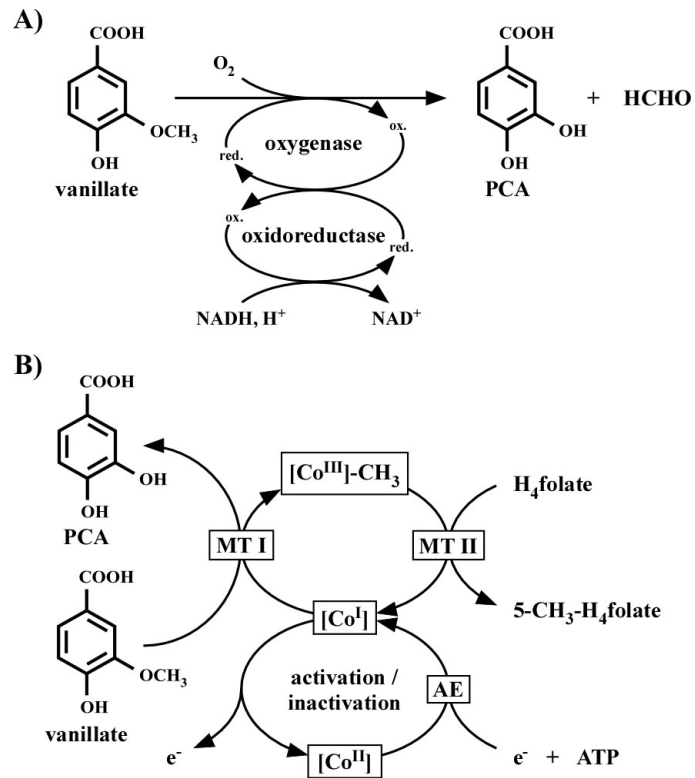


図 1-6. バクテリアによるバニリン酸の脱メチル機構.

(A) *Pseudomonas* sp. ATCC 19151 株の酸素添加型脱メチル酵素 (B) *Acetobacterium dehalogenans* のテトラヒドロ葉酸依存型脱メチル酵素をそれぞれ示す。PCA：プロトカテキ酸、H₄folate：テトラヒドロ葉酸、MT I：メチルトランスフェラーゼ I、MT II：メチルトランスフェラーゼ II、AE：活性化タンパク質を示す。図は阿部（長岡技術科学大学）博士論文より引用

1-4. C1代謝

1-4.1 グリシン開裂系とセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ

アミノ酸代謝と DNA 合成を結ぶ C1 代謝は、THF 誘導体を利用した代謝経路で、生物にとって必要不可欠な代謝である。THF は、グルタミン酸とテトラヒドロプテロイン酸が結合した構造を取り、メチル基、メチレン基、ホルミル基などの C1 単位と結合する (図 1-7)。その C1 単位は THF の N5, N10 または、N5-N10 に結合し、酵素的酸化還元で相互に変換され、様々な誘導体を生成する。THF の誘導体の 1 つである 5,10-メチレン THF は DNA の 1 種であるチミジンを合成するために必要である。また、5-メチル THF は、翻訳を開始するために必要な開始コドンであるメチオニン (Met) の合成に必須である (図 1-8)。

THF がセリンやグリシンを利用し C1 代謝への C1 供給を行った場合、5,10-メチレン THF が生成する。この反応にはグリシン開裂系 (GCS) とセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (SHMT) の 2 つが関与している。

グリシン開裂系は、ピリドキサルリン酸含有タンパク質 (P-protein)、アミノメチルトランスフェラーゼ (T-protein)、ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ (L-protein)、リポ酸含有タンパク質 (H-protein) の 3 つのタンパク質と 1 種の担体タンパク質から構成されているが、これらタンパク質は安定した複合体を形成しておらず、複合体ではなく複雑なシステム (系) と呼ぶ方が適切とされている (Kikuchi *et al.*, 2008)。5,10-メチレン THF の生成は、P-protein によりアミノメチル型となった H-protein が T-protein と相互作用することにより行われ、生成した 5,10-メチレン THF は SHMT によりセリンの合成に使われる (図 1-9, 1-10)。

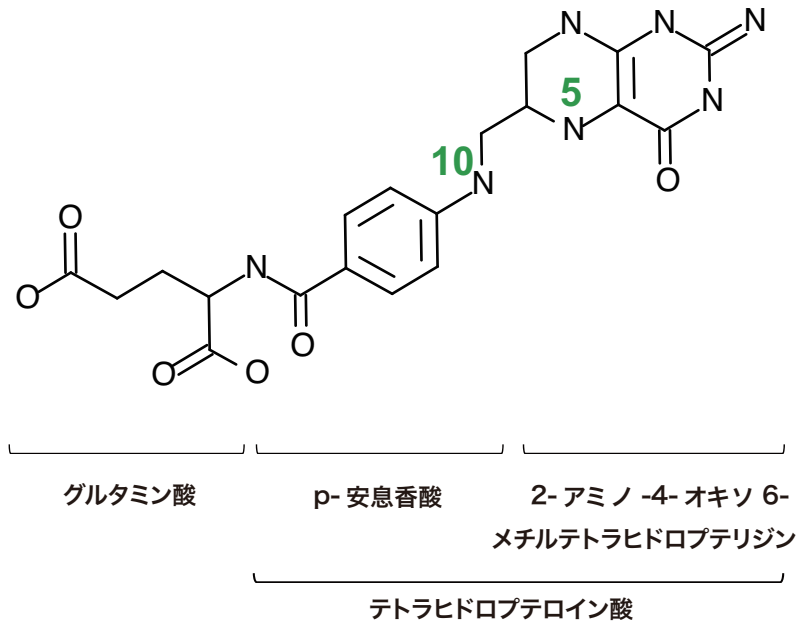


図 1-7. テトラヒドロ葉酸の構造式

テトラヒドロ葉酸 (THF)の構造式を示す。THF は、グルタミン酸とテトラヒドロプテロイン酸が結合した構造を取り、メチル基、メチレン基、ホルミル基などの C1 単位と結合する。その C1 単位は THF の N5, N10 または、N5-N10 に結合し、酵素的酸化還元反応によりチミジン合成を始めとする様々な反応に参与している。

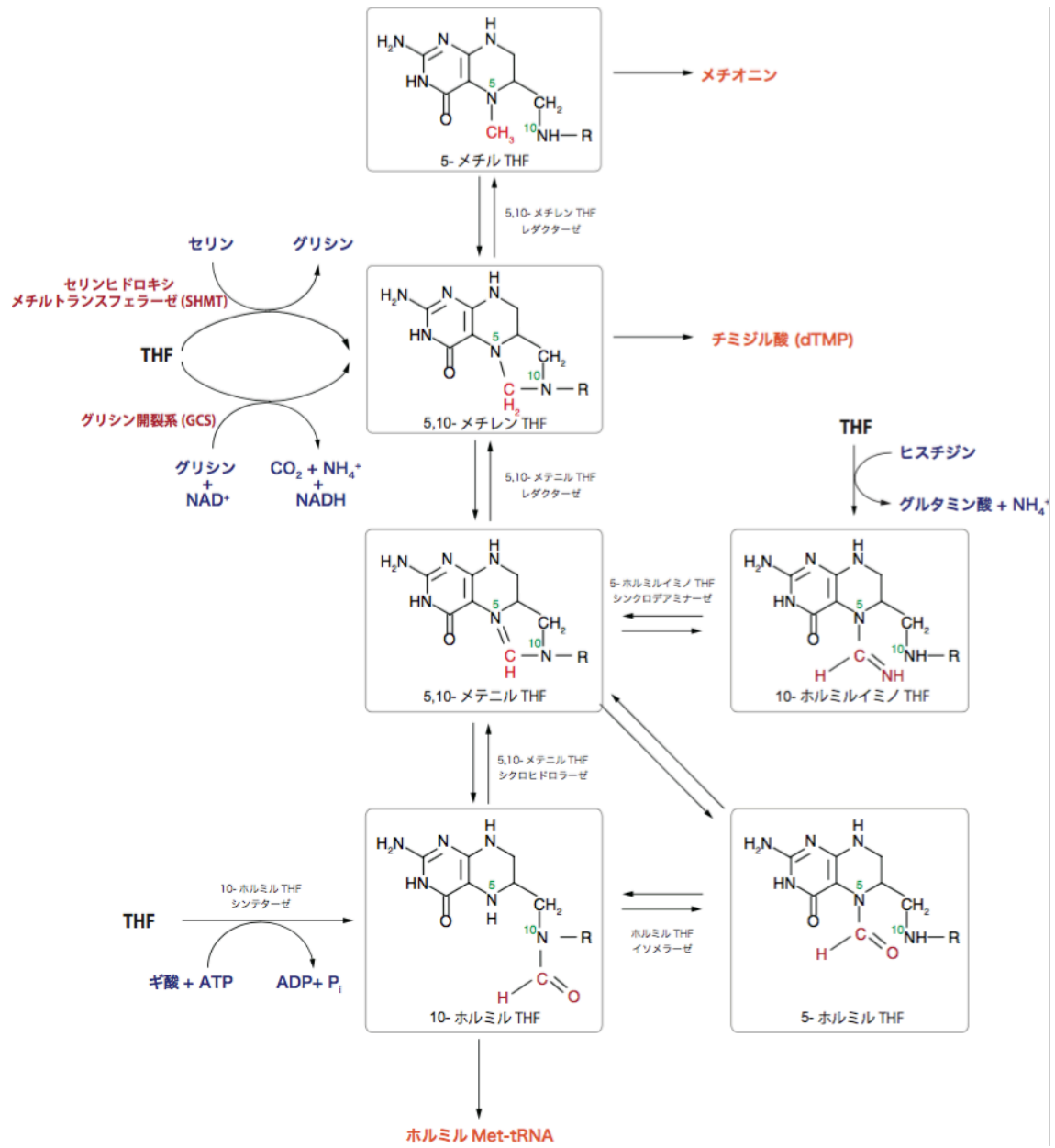


図 1-8. C1 代謝経路

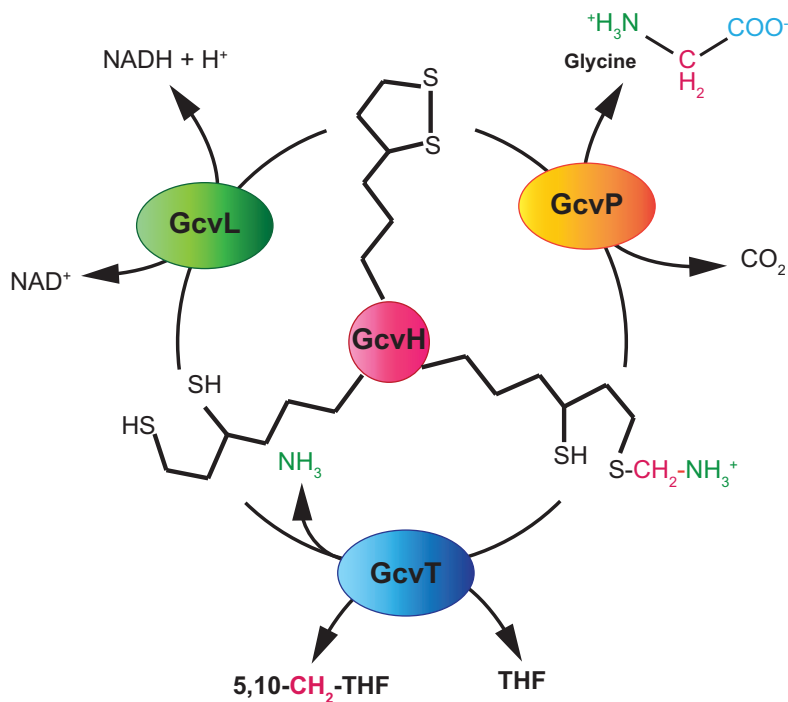


図 1-9. グリシン開裂系 (GCS) の反応

GCS は、1) ピリドキサルリン酸含有タンパク質 (P-protein: オレンジ色) 2) アミノメチルトランスフェラーゼ (T-protein: 青色) 3) ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ (L-protein: 緑色) 4) リポ酸含有タンパク質 (H-protein: ピンク色) の 4 つから構成される複合酵素系である。

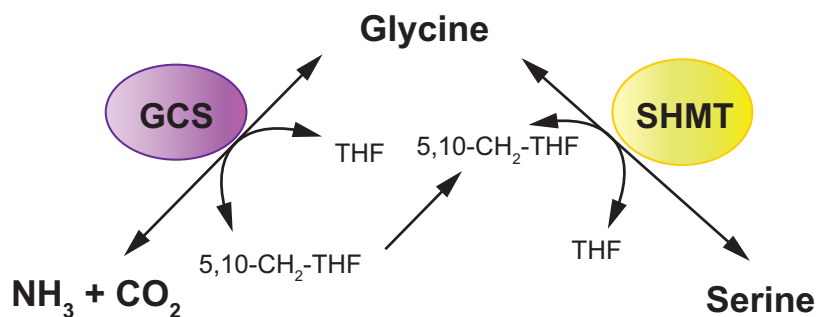


図 1-10. GCS と SHMT の反応のまとめ

GCS によって生成した 5,10-CH₂-THF は SHMT における Serine 生成に使われる。

1-4.2 SYK-6 株における C1 代謝

SYK-6 株の脱メチル化酵素 LigM/DesA は、GCS の T-protein と約 25 %の相同性があり、両者は相同タンパク質であると考えられるが、その基質や生成物は異なる (図 1-4, 1-5)。LigM/DesA は低分子性リグニン誘導体を基質とし、補酵素として THF を利用し *O*-脱メチル化を行い 5-メチル THF を生成する (図 1-11,12)。*O*-脱メチル化によって生成した 5-メチル THF は、5,10-メチレン THF レダクターゼである *metF* により 5,10-メチレン THF へと変換される。

政井研究室におけるこれまでの実験結果から、SYK-6 株における C1 代謝に対する栄養要求性が明らかになっている。SYK-6 株は VNL の *O*-脱メチル化産物である PCA のみでは良好な生育が認められないのに対し、5-メチル THF から生合成されるメチオニン (Met) を PCA とともに培養したところ良好な生育が認められた (Abe *et al.*, 2005)。

また、*metF* 破壊株は VNL 存在下では生育不可であるのに対し PCA+Met 存在下では生育可能であることも明らかになっている (阿部 (長岡技術科学大学)、未公表結果)。これらの結果から *metF* は、5,10-メチレン THF の還元能がない可能性が高いことが示唆されている。よって、Met 生合成に必要な 5-メチル THF を供給するためには、LigM/DesA による低分子性リグニン誘導体を利用した *O*-脱メチル化が必須である可能性が高いと考えられる (図 1-11)。このことは、SYK-6 株がリグニン由来化合物を唯一の炭素源として生育するための独自に代謝系を進化させてきたことを示唆している。

メチオニンの生合成以外、チミジン、プリン、及び *N*-formyl-methionyl tRNA 等の生合成は 5,10-メチレン THF 又は 10-ホルミル-THF を要求する。SYK-6 株は、GCS 遺伝子が欠損しているため GCS の代わりに SHMT のホモログタンパク質を用いて 5,10-メチレン THF を生成し、C1 代謝へ C1 を供給していると考えられている (図 1-11)。

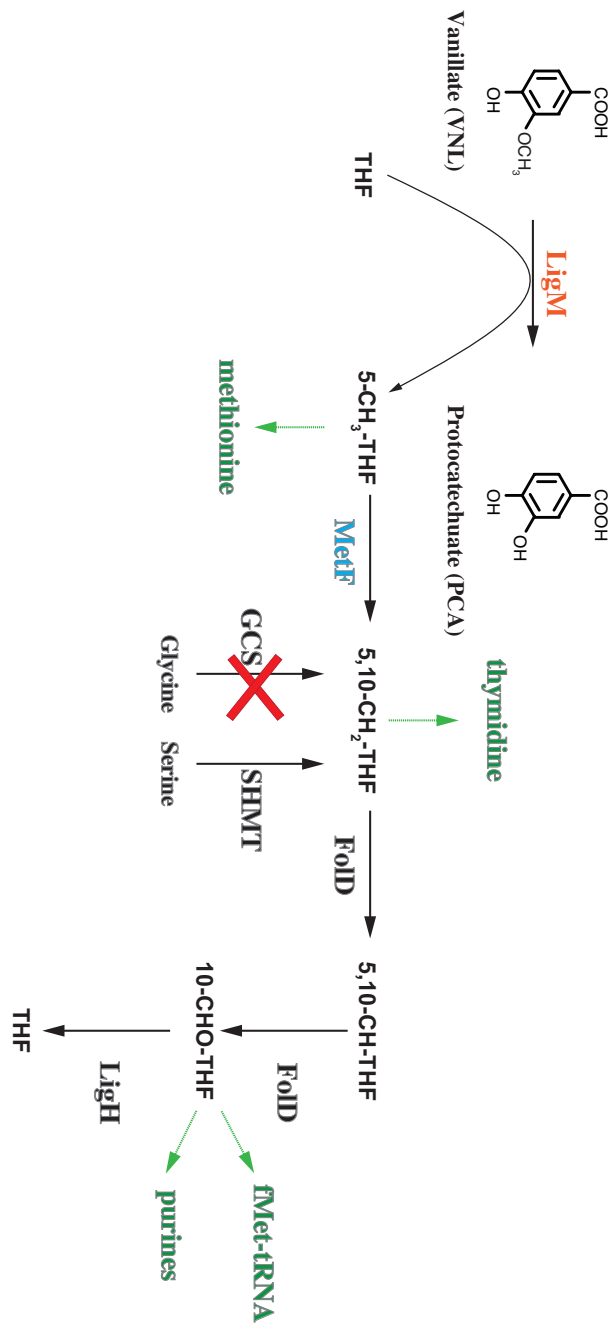


図 1-11. SYK-6 株における C1 代謝の流れ

LigM における O-脱メチル化は、メチオニンの生合成において必須な 5-メチル THF の生成に必須である。

1-5. 研究目的

LigM/DesA は T-protein と約 25 % のアミノ酸配列の相同性があるため、LigM は T-protein の相同タンパク質であると考えられる。しかし、T-protein の基質は H-protein に結合したリポ酸（タンパク質性基質）であり、SYK-6 の基質は低分子性リグニン誘導体である。更に両者の触媒する反応は、類似しているが同一ではない（図 1-12）。よって、LigM は SYK-6 の主要なエネルギー源である低分子性リグニン誘導体を C1 代謝に利用できるように独自に進化してきたと考えられる。

そこで、X 線結晶構造解析法を利用して LigM の結晶構造を決定し、T-protein との 3 次構造比較や 1 次構造比較を行うことで LigM/DesA と T-protein との酵素学的、分子進化的関係を明らかにし、SYK-6 の低分子性リグニンの代謝系の分子進化を考える上での基盤的な知見を得ることを目的とした。

本論文は、以下のように構成される。序論である第 1 章（本章）に続き、第 2 章には LigM の精製、第 3 章では LigM の結晶化について述べた。第 4 章は LigM の立体構造を明らかにするための位相の決定について述べた。第 5 章は LigM の複合体結晶構造の決定について述べた。第 6 章では、第 5 章で決定した立体構造の精密化について述べた。第 7 章では LigM の立体構造の特徴や、決定した LigM 構造の重ねあわせの結果について述べた。第 8 章では、LigM と T-protein との三次構造比較や一次構造比較について述べた。さらに第 9 章では、LigM のホモログタンパク質が類縁のバクテリア内にどのように分布しているのかを解析した。そして最後の第 10 章には、本論文の結論を記した。

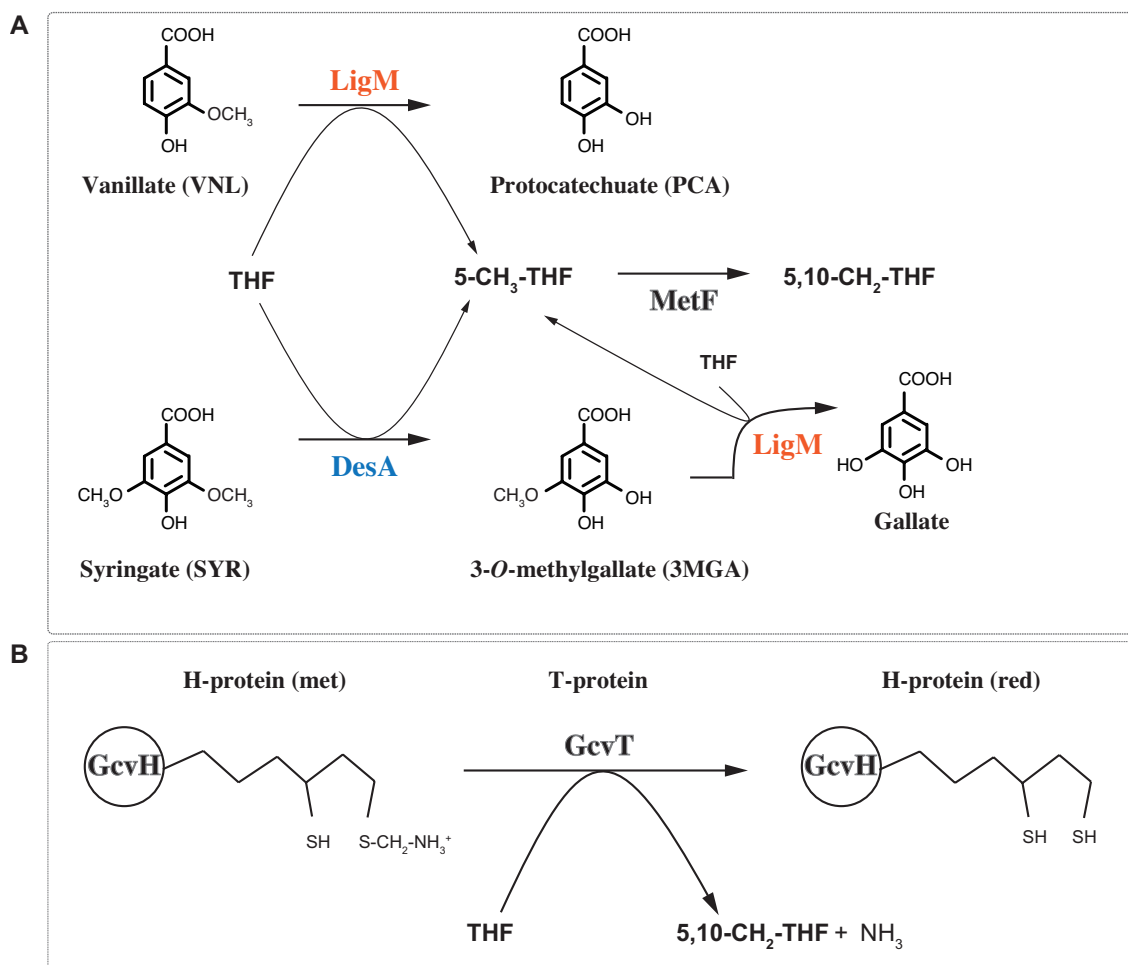


図 1-12. 5,10-メチレン THF 生成機構の違い

LigM/DesA と GCS を用いた 5,10-メチレン THF 生成機構の違いを示す。A) SYK-6 株における *O*-脱メチル化反応を示す。SYK-6 では、LigM/DesA が低分子性リグニン誘導体を基質とし、補酵素として THF を利用し *O*-脱メチル化反応を行うことで、5-メチル THF を生成し、さらに MetF により 5,10-メチレン THF を生成する。 B) T-protein が H-protein (アミノメチル型) を基質とし、補酵素 THF を用いてアミノメチル基転移反応を行うことで 5,10-メチレン THF を生成する。

第2章 LigM の精製

第2章 LigM の精製

LigM の結晶構造解析のための結晶作製には、高純度かつ大量の LigM タンパク質が必要である。よって、組換え LigM のコンストラクト作製、大腸菌を用いた発現、カラムクロマトグラフィーを用いた精製系の確立を行った。

2-1. コンストラクト作製

組換え LigM のコンストラクト作製は以下のような流れで行った (図 2-1)。

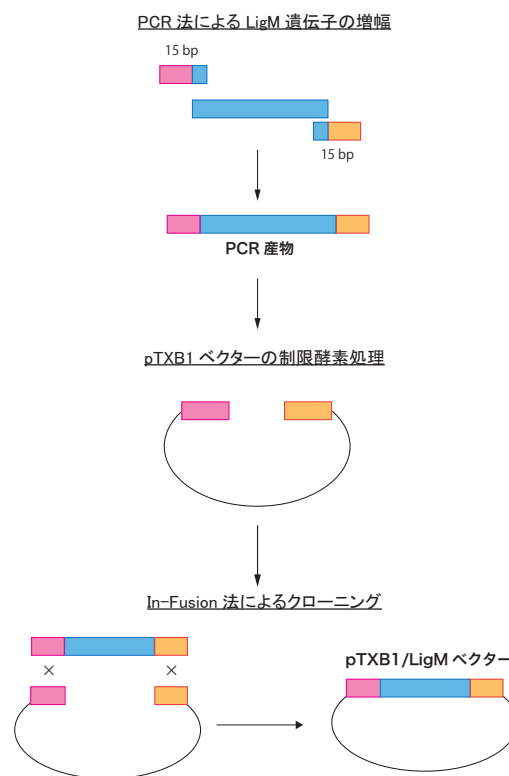


図 2-1. コンストラクト作製の流れ

<目的>

組換え体の LigM を得るための組換え LigM コンストラクトの作製を行う

<必要な器具、装置>

- MyiQ Single-Color Real Time PCR Detection System (BIO-RAD)
- マイクロチューブ
- アガロースゲル電気泳動装置
- E-Gel® iBase™ Power System
- E-Gel® CloneWell Agarose Gels

<必要な試薬>

- In-Fusion 試薬
- DH5α
- LB 培地
- LB 寒天培地 (Ampicillin (Amp) 耐性)

<実験手順>

インサート DNA の調製 (PCR 法)

↓ マイクロチューブに以下の組成の反応液を調製する。

Solution	Volume	Final Conc.
□ 10×Buffer for KOD-Plus-Ver.2	5 μl	1×
□ 2mM dNTPs	5 μl	0.2 mM
□ 25mM MgSO ₄	2 μl	1.0 mM
□ 10 uM primer	1.5 μl	0.3 μM
□ template DNA (pET21a(+)-ligM)	>1 μl	
□ KOD-Plus- (1U/ ul)	1 μl	1U/ 50 μl
□ DMSO	0.5 μl	
□ DW	to 50 μl	

↓ MyiQ Single-Color Real Time PCR Detection System (BIO-RAD)を ON にする。

↓ マイクロチューブをセットする

- ↓ Proxcedure, Denature, Annealing, Extension を以下のように設定する
(Annealing, Extension はともに 30 cycle 繰り返す)

Pre denature	94 °C, 2 min
Denature	98 °C, 10 sec
Annealing	58 °C, 30 sec
Extension	68 °C, 1.4 min

- ↓ マイクロチューブを取り出し、以後の実験を行わない場合は 4 °C で保存する
- ↓ PCR 反応液 1 µl + 10 x Loading buffer 1 µl mix
- ↓ apply to 0.8 % (w/v) Agarose Gel
- ↓ 1 kb DNA marker 3 µl apply to 0.8 % (w/v) Agarose Gel
- ↓ 30 min, 100V
- ↓ 電気泳動槽から 0.8 % Agarose Gel を取り出し、10,000 倍希釈した GelRed 溶液に浸す
- ↓ 30 min 振とう
- ↓ UV 照射

<注意事項>

- ・ PCR 反応液の調製の際、KOD-Plus-(1U/ µl) は一番最後に入れる。
- ・ Extension は 1 kb につき 1 min で行う。

In-Fusion 法による pTXB1/LigM の作製

- ↓ 精製した pTXB1 ベクターを NdeI, SapI を用いて制限酵素処理を行う
- ↓ E-Gel® CloneWell Agarose Gels を用いて、PCR 法によって増幅させて LigM と制限酵素処理したベクターについて電気泳動を行う
- ↓ 20-30 min
- ↓ E-Gel® CloneWell Agarose Gels から、LigM 及び pTXB1 を分取
- ↓ 2 µl premix (In-Fusion 試薬)
- 5 µl pTXB1 ベクター
- 2 µl LigM (pTXB1)
- ↓ 50°C, 15 min
- ↓ DH5α を用いて形質転換
- ↓ コロニーピッキングアップ
- ↓ 5.0 ml LB 培養
- ↓ DNA 精製

- ↓ DNA シークエンスの確認 (ユローフィンジェネティクス株式会社へ委託)
- ↓ DNA シークエンスがあっていたものに関して 50 ml 培養
- ↓ DNA 精製
- ↓ 濃度測定
- ↓ -20°Cへ保存

<注意事項>

- ・コロニーピッキングは、すべてのコロニーに目的タンパク質の DNA が入っているとは限らないので、最低 20 個はしておくこと。
- ・DNA シークエンスの確認についても、最低 3 種類のコロニーから精製した DNA を用いて行う。

<実験結果>

作製した発現ベクターpTXB1/LigM の DNA シークエンスを行った結果、LigM の DNA 配列と作製した発現ベクターpTXB1/LigM の LigM の DNA 配列は同じであった。

2-2. 大腸菌による大量培養、集菌と菌体破碎

<目的>

pTXB1/LigM をタンパク質発現用大腸菌 BL21(DE3)株へ導入し、融合 LigM タンパク質を得る。

<必要な試薬>

- ・ pTXB1/LigM ベクター
- ・ *Escherichia coli* BL21 (DE3)
- ・ SOC 培地
- ・ LB plate (0.2 % (v/v) glycerol, 0.2 % (w/v) glucose, 50 µg/ml carbenicillin)
- ・ 10 ml LB 培地 (0.2 % (v/v) glycerol, 0.2 % (w/v) glucose, 50 µg/ml carbenicillin)
- ・ 2 L LB 培地 (0.2 % (v/v) glycerol, 0.2 % (w/v) glucose, 50 µg/ml carbenicillin)
- ・ 0.1 M IPTG
- ・ Buffer A (20 mM HEPES pH 8.5, 10% (w/v) glycerol, 150 mM NaCl)
- ・ MilliQ 水
- ・ NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen)
- ・ See Blue Plus2 Prestained Protein Marker (Invitrogen)
- ・ CBB 染色液

<必要な器具、装置>

- ・ 形質転換 LB plate
- ・ Himac CR20G (遠心分離器、日立工機)
- ・ 超音波破碎器 (TAITEC)
- ・ 小型遠心分離器 (MX300, TOMY)
- ・ NuPAGE Bis-Tris 4-12% (w/v) Gel (Invitrogen)

<実験方法>

形質転換

- ↓ *Escherichia coli* BL21 (DE3)を-80 °Cから取り出し氷上に置く
- ↓ pTXB1/LigM を 1 µl 分取し、*E. coli* BL21 (DE3)へ加える
- ↓ 30 min, on ice

- ↓ 42 °C, 30 sec
- ↓ 2 min, on ice
- ↓ SOC 培地 1 ml へ形質転換反応溶液を入れる。
- ↓ 37 °C, 1 hr
- ↓ 5,000 g, 10 min
- ↓ 上清を捨てる
- ↓ 100 µl LB plate へまく
- ↓ 37 °Cでインキュベート (over night)

前培養

10 ml LB 培地

- ↓ LB plate からコロニーを取り LB 培地へ入れる
- ↓ 37 °C, 1 hr

本培養

5 L バッフル付きフラスコに 2 L の LB 培地

- ↓ + 前培養 5 ml
- ↓ 37 °C, 110 r.p.m.
- ↓ OD₆₀₀ 0.6-0.8 まで誘導
- ↓ + 0.1 M IPTG (fin. 0.1 mM)
- ↓ 18 °C, 24 hr, 120 r.p.m.

集菌

- ↓ 4 °C, 9,000 r.p.m. , 40 分間遠心
- ↓ 上清を除く
- ↓ 懸濁 Buffer で洗浄
- ↓ 上記 3 ステップを培養液がなくなるまで繰り返す
- ↓ 菌体を -20 °C で保存

※菌体の破碎をすぐに行う場合はこの限りではない。

菌体の破碎 (2L 分の菌体を破碎)

- ↓ + Buffer A, 180 ml
- ↓ 超音波破碎機で破碎する (Duty cycle 60%, output control 6-7, 15 min)
- ↓ 4 °C, 9,000 r.p.m. , 40 分間遠心
- ↓ 上清回収
- ↓ 濃度測定
- ↓ SDS-PAGE により発現を確認

<実験結果>

菌破碎を行った後の上清を SDS-PAGE で分析した結果、分子量 62-98 kDa の範囲に太いバンドを確認した。融合 LigM タンパク質の分子量は約 80kDa 程度あるため、一番多く発現しているタンパク質は融合 LigM タンパク質であると考えられた (図 2-2)。

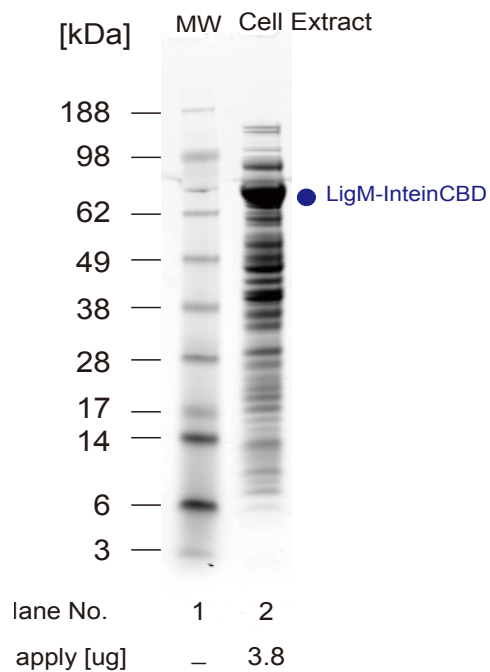


図 2-2. 融合タンパク質の発現確認

1 lane: :分子量マーカー, 2 lane: 菌体破碎後の上清, 青色: 融合タンパク質をそれぞれ示す。
約 80 kDa の融合タンパク質の発現を確認した。

2-3. アフィニティークロマトグラフィーによる精製

<目的>

融合 LigM タンパク質から LigM のみを得るため、1段階目の精製を行う。

<必要な試薬>

- Buffer A (20 mM HEPES pH 8.5, 10% (w/v) glycerol, 150 mM NaCl)
- Buffer B (20 mM HEPES pH 8.5, 10% (w/v) glycerol, 150 mM NaCl, 50 mM DTT)
- Chitin beads (New England Biolabs)
- MilliQ 水
- NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen)
- See Blue Plus2 Pre-stained Protein Marker (Invitrogen)
- CBB 染色液

<必要な器具、装置>

- 小型遠心分離器 (MX300, TOMY)
- NuPAGE Bis-Tris 4-12% (w/v) Gel (Invitrogen)

<実験方法>

Chitin beads の平衡化

- ↓ 50 ml のファルコンチューブ 4 本に Chitin beads 5 ml と MilliQ 水 10 ml を加える。ファルコンチューブを回転させて MilliQ 水で洗う。
- ↓ 遠心機でフラッシュさせ、Chitin beads を底に落とす。氷状にファルコンチューブを挿し、beads が完全に落ちるまで待ち、MilliQ 水をスポイト等で捨てる
- ↓ 上記操作を 2 回繰り返す
- ↓ Chitin beads 5 ml が入っているファルコンチューブに Buffer A 25 ml を加える。ファルコンチューブを回転させてビーズを Buffer A で洗う
- ↓ 遠心機でフラッシュさせ、Chitin beads を底に落とす。氷状にファルコンチューブを挿し、beads が完全に落ちるまで待ち、MilliQ 水をスポイト等で捨てる
- ↓ 上記操作を 3 回繰り返す

Chitin beads アフィニティークロマトグラフィー による精製

- ↓ 平衡化した Chitin beads へ破碎上清を加える
- ↓ 4°C で一時間回転させ、ビーズに目的タンパク質を吸着させる

- ↓ Chitin beads と培養上清を 3 本の centrifuge column (Pierce) に移す
- ↓ オープンカラム方式で 40 ml の Buffer A を用いて Chitin beads を洗浄する。
- ↓ 上記操作を 6 回繰り返す
- ↓ 5 ml の Buffer B で三回洗う
- ↓ 200 μ l の Buffer B を加えて、カラムから液が垂れないよう栓をする。
- ↓ 60 μ l 反応前のレジンを分取 (Reaction before)
- ↓ 20°C, 40 時間, incubation (タグ切断)
- ↓ 40 時間後 3.5 ml の Buffer B を加えて溶出する。この操作を 3 回繰り返す
- ↓ 60 μ l 反応後のレジンを分取 (Reaction after)
- ↓ SDS-PAGE

<実験結果と考察>

破砕上清の液量が多いため、3 本分カラムを用意し Chitin beads による精製を行った。DTT 入りの Buffer B を用いて、融合 LigM タンパク質から Intein-CBD タグ (28 kDa) の切断を行った。タグ切断がそれぞれのカラムで行われているかを確認するため、タグ切断前のレジンを Before reaction; BR、タグ切断後のレジンを After reaction ; AR し、SDS-PAGE により確認を行った。また、それぞれのカラムで Buffer B により溶出を 3 回
行い、各カラムでの溶出サンプルをまとめて Elution1 (3 本分のカラムの 1 回目の溶出)、Elution 2 (3 本分のカラムの 2 回目の溶出)、Elution 3 (3 本分のカラムの 3 回目の溶出) とし、LigM の溶出を SDS-PAGE により確認を行った(図 2-3)。

タグ切断前のレジン(BR1, 2, 3)には、融合 LigM タンパク質のバンドが濃く大きく出ていることから、多くの融合 LigM タンパク質がレジんに吸着していることが分かった。また、SDS-PAGE では、融合 LigM タンパク質の存在以外に、98-188 kDa、50 kDa、28-38 kDa の範囲に別のバンドが確認できた。50 kDa は Buffer B の洗い操作でインキュベーションする前に切断されてしまった LigM、28 kDa は Intein-CBD タグ のバンドであると予測できた。タグ切断後のレジン (AR1,2,3)には、切断しきれなかった融合 LigM タンパク質、溶出されずレジンに残った LigM、Intein-CBD タグのバンドがそれぞれ確認できた。

さらに、Elution 1-3 には分子量 約 50 kDa 程度のタンパク質が溶出されていた。LigM の分子量の理論値は 52.3 kDa であることから、精製されたタンパク質は LigM である可能性が強く示唆された。Elution 1 では最も LigM が多く、Elution 2, Elution 3 では徐々に溶出される LigM が少なくなっていることがわかった。また、Elution1-3 には、LigM 以外に、融合 LigM タンパク質 (80 kDa) および Intein-CBD タグ (28 kDa) と考えられるバンドを確認した(図 2-3)。LigM の結晶化を行うためには、これら不純物を取り除く必要がある。LigM の

分子量は 50kDa 程度であり、不純物の分子量と大きく異なる。よって、2 段階目の精製には、分子量サイズにより分離をおこなうサイズ排除クロマトグラフィーを用いるのが適切であると考えられた。

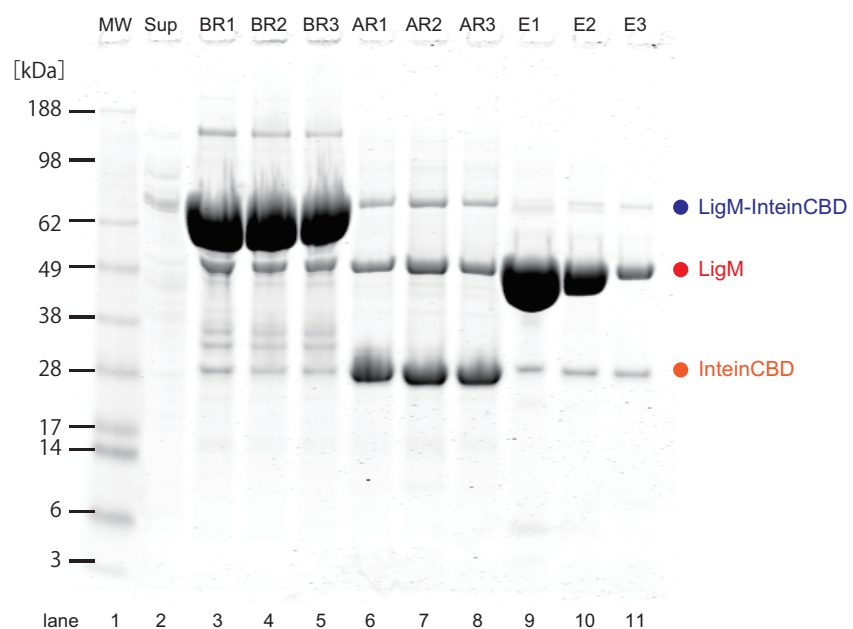


図 2-3. Chitin beads アフィニティークロマトグラフィーの結果

1 lane : 分子量マーカー, 2 lane : 破碎上清, 3 - 5 lane : DTT によるタグ切断前のレジン, 6 - 8 lane : DTT によるタグ切断後のレジン, 9 - 11 lane : Elution 1 から Elution 3, 青色 : 融合タンパク質, 赤色 : LigM, 橙色 : タグ(inteinCBD)をそれぞれ示す。

2-4. サイズ排除クロマトグラフィー

<目的>

1段階目の精製サンプルに含まれる不純物、融合 LigM タンパク質(80 kDa)および Intein-CBD タグ (28 kDa)を取り除き、結晶化へ向けて高純度 (95 %以上)の精製 LigM タンパク質を得る。

<必要な器具、装置>

- ・ AKTA prime (GE Healthcarre)
- ・ HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GE Healthcarre, 120 ml)
- ・ Amicon Ultra-10 (Millipore) (MWCO 10,000)
- ・ NuPAGE Bis-Tris 4-12% Gel (Invitrogen)

<必要な試薬>

- ・ Buffer A (20 mM HEPES pH 8.5, 10% glycerol, 150 mM NaCl)
- ・ NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen)
- ・ See Blue Plus2 Prestained Protein Marker (Invitrogen)
- ・ CBB 染色液

<実験方法>

- ↓ Buffer A を用いて HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GE Healthcarre, 120 ml)を 2 カラム容量分 (2 C.V.) 平衡化しておく
- ↓ Chitin Beads による精製後のサンプルをアプライ
- ↓ カラムの限界圧を超えないように流速を設定 (1.0 ml/ml)
- ↓ A₂₈₀ のピークが現れた部分のサンプルを集める
- ↓ SDS-PAGE

<実験結果と考察>

サイズ排除クロマトグラフィーの結果、溶出容量 75 ml にメジャーピークを確認することができた (図 2-4) 。メジャーピークの部分のフラクションを SDS-PAGE にかけた結果、50 kDa 程度のタンパク質が得られていることがわかった。LigM の分子量の理論値は 52.3 kDa であることから、メジャーピークのタンパク質は LigM であると考えられた。また、メ

ジャーピークのそれぞれのフラクションには、LigM 以外ほとんど不純物が含まれていないことを確認した(図 2-5)。SDS-PAGE に使用した各フラクションの濃度および純度を計算し、最終的に C8-C12 までのフラクションを用い、結晶化のための濃縮を行うこととした。また、一例として、2015 年 10 月 30 日に精製を行った際の Purification Table を表 2-1 に示す。

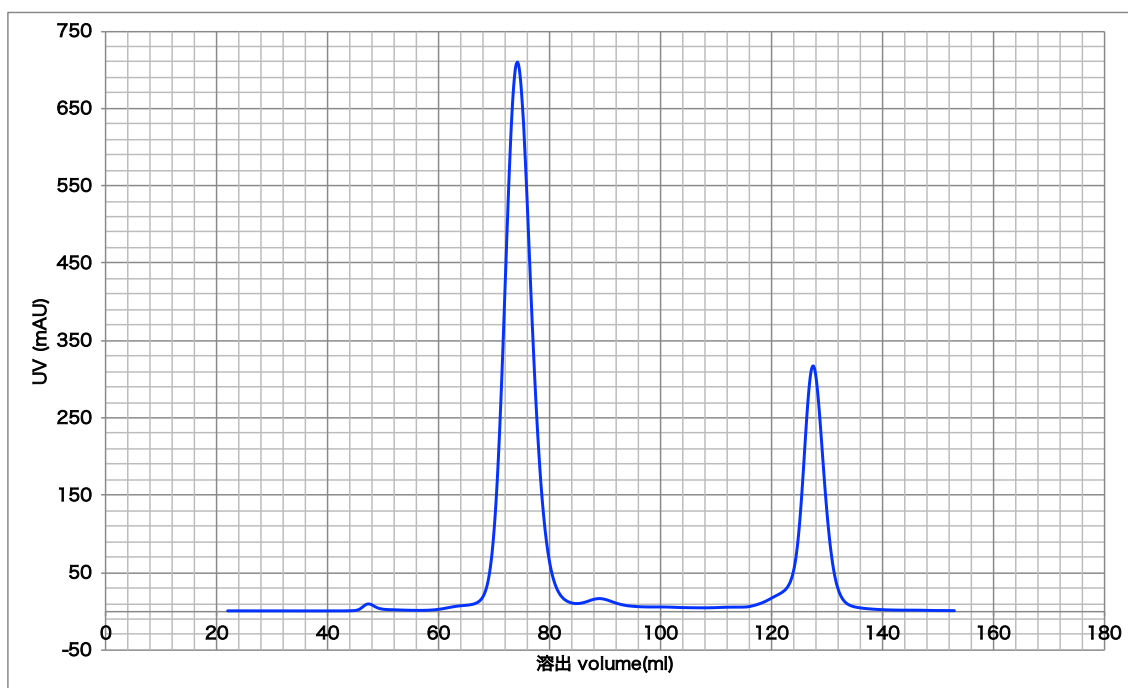


図 2-4. サイズ排除クロマトグラフィーの結果

サイズ排除クロマトグラフィーを用いた精製において、溶出容量 75 ml にメジャーピークを確認した。

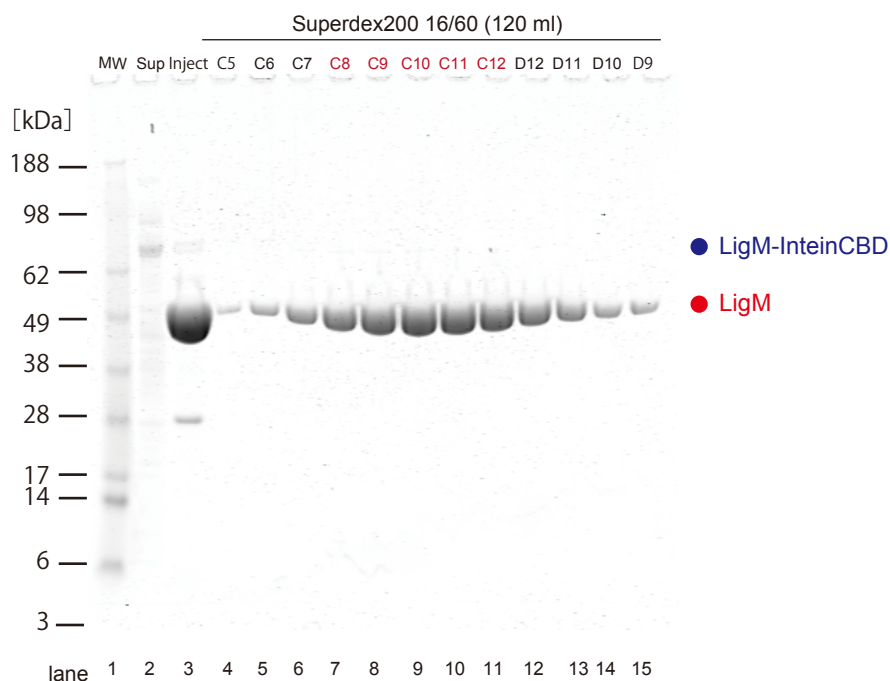


図 2-5. サイズ排除クロマトグラフィーの SDS-PAGE の結果

サイズ排除クロマトグラフィーの SDS-PAGE の結果を示す。C8-C12 までのフラクションを用い、結晶化のための濃縮を行った。

表 2-1. Purification Table

Step	volume [ml]	Protein conc.	Amount [mg]	LigM content	LigM [mg]
Culture	2000.00	-		-	
Cell Extract	180.00	13.4	2408.9	-	
Chitin beads affinity	10.50	2.0	21.0	86.6	18.18
	10.50	0.4	4.7	79.5	3.73
Superdex 200 (16/60)	46.00	0.4	17.0	99.3	16.90
Concentration	0.36	24.7	8.9	99.4	8.83

Cell extract では夾雑物が多く含まれているため、1 Abs = 1 mg/ml 換算でタンパク質濃度の測定を行った。Chitin beads affinity 精製後はモル吸光係数(M-1cm-1)及び分子量を用いてタンパク質濃度の測定を行った。SDS-PAGE ゲルの画像を Odyssey (エムエステクノシステムズ)を用いて取り込み、バックグラウンドを基準に蛍光強度を測定し、バンド間の相対的なシグナル強度からバンドに含まれる LigM の含有量(%)を計算した。

2-5. LigM の溶液中での会合状態

<目的>

LigM の溶液中での会合状態をサイズ排除クロマトグラフィー多角度光散乱測定システム (size exclusion chromatography-multi angle light scattering, SEC-MALS)用いて測定する。

<必要な装置、器具>

- ・ WTC-030S5 (Wyatt Tech)
- ・ 50 μ l 用シリンジ(Hamilton)
- ・ DAWN HELEOSII (SHOKO Science)
- ・ ASTRA 6 (Wyatt Tech)

<必要な試薬>

- ・ Buffer C (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl ^(1*))
- ・ 洗浄用 MilliQ ^(1*)
- ・ マーカートンパク質濃度 BSA 2 mg/ml ^(2*)
- ・ サンプルタンパク質濃度 2 mg/ml 以上

<注意事項>

- 1* 使用する前に必ずフィルター濾過及び脱気を行う。
- 2* 使用する直前に 0.1 μ m \cdot 1 ml の UltraFree (UFC30VV25: 5,000 rpm \times 2 min) を使用して粒子を除去
- 3* 2 mg/ml 以上が理想, マーカーと同様に粒子を除去

<実験方法>

サイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography)は溶出体積を基にタンパク質の分子量を測定する方法であり、簡単、短時間で測定できるのが長所である。一方で SEC はタンパク質を球状タンパク質であると仮定しているため、解析対象のタンパク質が球状タンパク質と大きく異なる場合、タンパク質分子が担体と相互作用する場合などにおいては、真の絶対分子量が得られないことがある。このような欠点を補うために、サイズ排除クロマトグラフィーから溶出するタンパク質の検出に多角度光散乱検出器 (Multi Angle Light Scattering)と示差屈折率計を用いることで、分子量を正確に測定することができる。MALS では溶出タンパク質の分子量及び濃度に比例する値が、示差屈折率計では溶出タン

パク質の濃度に比例する値が測定できる。光散乱の理論式は以下の通りである(Wen et al., 1996)。

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \frac{1}{M} \left[1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \langle r_g^2 \rangle \sin^2(\theta/2) + \dots \right] + 2A_2c$$

$K^* = 4\pi^2(dn/dc)^2 n_o^2 / N_a \lambda_o^4$: 光学定数

n_o : 溶媒の屈折率

N_a : アボガドロ定数

λ_o : 真空中の入射光の波長

$R(\theta)$: 過剰還元光散乱強度

c : 試料濃度

M : 重量平均分子量

A_2 : 第二ビリアル係数

r_g : RMS 回転半径

SECで用いる希薄なタンパク質濃度 (1 mg/ml)では、 $2A_2c$ の項は無視することができる。

よって、(1)式より $K^*c/R(\theta)$ を縦軸に、 $\sin^2(\theta/2)$ を横軸にプロットを行い $\sin^2(\theta/2) \rightarrow 0$ 外挿すれば y 切片から分子量 M を、傾きから RMS 半径 r_g を求めることができる (図 2-6)。

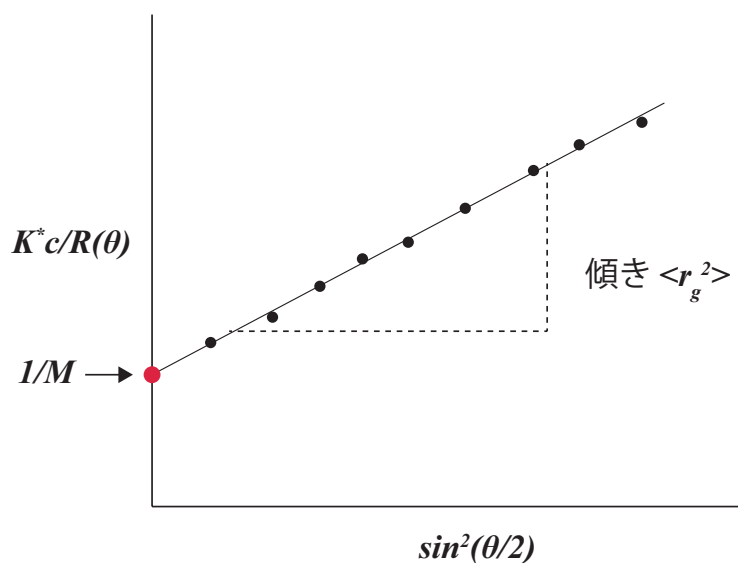


図 2-6. SEC-MALS を用いた分子量測定の方法

<実験手順>

カラムの洗浄

- ↓ MilliQ による洗浄: 0.5 m/min で 2 C.V. (一晩行う場合は 0.1 ml/min)
- ↓ Buffer による洗浄: 0.5 m/min で 2 C.V. (40 分)
- ↓ カラムを洗浄している間に 5 ml のシリンジ(Hamilton)の先にプラスチックのアダプターをつけて 5 ml の水とバッファーで 2 回ずつ Inject と Load を洗う. PC で制御していない場合、ループ部分のサンプルは廃液に流れる

RI detector (Shodex) と LS detector (HELEOS II) の立ち上げ

- ↓ RI detector と LS detector の電源を入れる。
- ↓ DAWN に LS のチャートが表示される. 1-10 mV 以下にレーザーが安定するまで待つ(通常は 30 分)

ASTRA 6 の立ち上げ

- ↓ Desktop の ASTRA6 をクリック
- ↓ File => New => Experiment from Method を選択
- ↓ New from Existing から UV-LS-RI2012-0-12 Final を選択
- ↓ Genetic Pump => Solvent を選択し, Buffer の Name を記入後, apply
- ↓ Injector→Sample を選択し Name, Concentration を変更し apply

サンプルインジェクション

- ↓ レバーが Load 側 (上側) の位置になっていることを確認
- ↓ ASTRA 6 の validate button をクリック後、run experiment を押す。サンプルを打ちこむ準備完了というメッセージが表示される
- ↓ サンプルを 30-40 μ l 打ち込み, 黒いレバーを Load から下に時計回りに下げる. 自動的にデータ測定が始まる

実験終了後

- ↓ Laser 装置の TAB で Laser を選択し Enter で"OFF"にする
- ↓ Laser 装置の TAB で COMET を選択し, Enter で"On"にする
- ↓ 2. の動作の時に同時に UV 装置の"Purge"を選択し, "Purge"が点灯することを確認する
- ↓ 最低 30 min を COMET, Purge を"On"にする
- ↓ COMET および Purge を"Off"にする
- ↓ Buffer で 2 C.V., D.W.で 2 C.V.洗浄する
- ↓ 電源を切る

データ解析

- ↓ SEC による A_{280} のピークを確認

- ↓ Procedures の”Baseline”を選択し, Base line を確認 => apply & OK を押す
- ↓ Procedures の”Peaks”を選択し, Peak を囲む
- ↓ このときの Peak の選択は手動でもよいが”Autofind Peaks”を使用しても可
- ↓ Procedures の”Molar Mass & Radius from LS”を選択し, 下にある Enabled Detector から計算に用いる LS の No.を選択 => OK
- ↓ Result の”Report summary”を選択し, Mw を確認。

<実験結果>

精製した組換え LigM を用い SEC-MALS を用いて LigM の会合状態の解析を行った結果、LigM は溶出容量 約 16.5 ml の位置に単一ピークを示した (図 2-7)。また、ASTRA6 による分子量解析の結果、LigM の数平均分子量 Mn、重量平均分子量 Mw はそれぞれ 104.4 ± 7.6 kDa、 104.5 ± 7.7 kDa であることがわかった (表 2-2)。

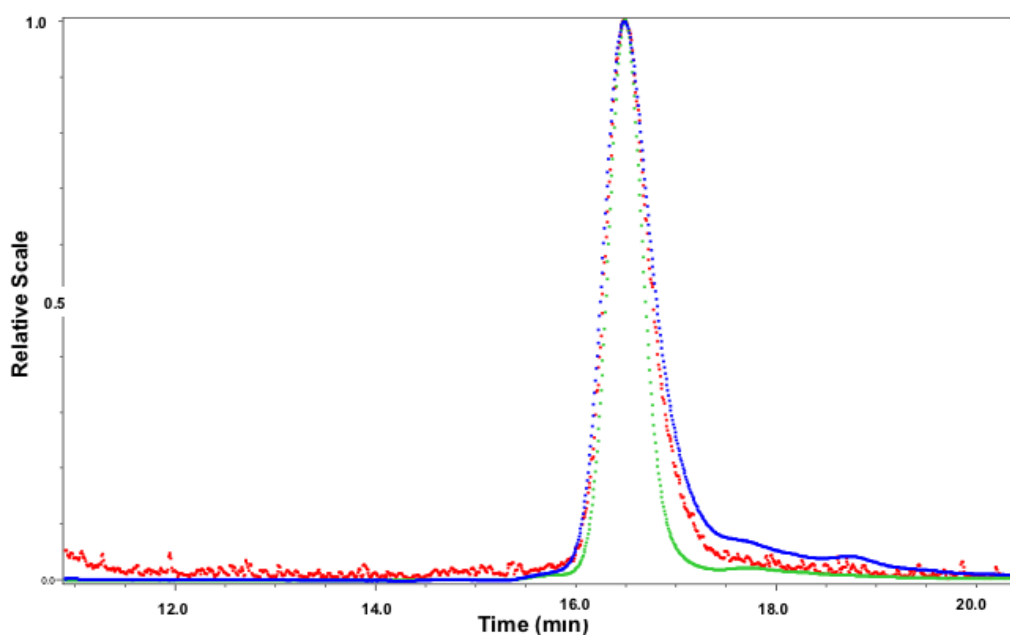


図 2-7. SEC-MALS による溶出ピーク

緑色：溶出ピークに対する UV (Ultra Violet: UV) の強度, 赤色：静的光散乱 (Light Scattering: LS) の強度, 青色：示差屈折率 (Refractive index: RI) の強度をそれぞれ示した。

表 2-2. SEC-MALS による溶液中の分子量

Masses		
	Calculated Mass (μg)	8.72
Molar mass moments (g/mol)		
Mn	1.044×10^5	($\pm 7.674\%$)
Mp	1.071×10^5	($\pm 9.278\%$)
Mv	n/a	
Mw	1.045×10^5	($\pm 7.721\%$)
Mz	1.046×10^5	($\pm 17.307\%$)
Mw/Mn	1.001	($\pm 10.886\%$)
Mz/Mn	1.002	($\pm 18.932\%$)

Mn: 数平均分子量; Mp: ピークトップ分子量; Mv: 粘度平均分子量; Mw: 重量平均分子量;
Mz: Z 平均分子量

2章 考察

精製した組換え LigM を用い、SEC-MALS を用いて LigM の会合状態の解析を行った。ASTRA 6 による分子量解析の結果、LigM の数平均分子量 M_n 、重量平均分子量 M_w はそれぞれ 104.4 ± 7.6 kDa、 104.5 ± 7.7 kDa であり、計算方法の違いによる分子量変化はなかった。また、均一な stoichiometry である場合、 M_n/M_w の値は 1.0 となるため、解析に使用した精製 LigM は均一な stoichiometry であると考えられた。ExPASy プロテオミクスサーバーの ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)を用いて LigM の分子量の理論値を計算すると 52.3 kDa であることから、LigM は溶液中で 2 量体として存在することが強く示唆された。

第3章 LigMの結晶化

第3章 LigM の結晶化

タンパク質を結晶化するためには、精製したタンパク質溶液を濃縮する必要がある。タンパク質の結晶化に適した濃度はサンプルの種類によって異なるが、LigM の場合は最終濃度が 15-20 mg/ml になるように濃縮を行い、結晶化を行った。

3-1. LigM 溶液の調製

<目的>

結晶化に使用する LigM の溶液を調製する。

<実験方法>

2章において、精製を行った LigM を 280 nm の波長を使って定量をおこなった。LigM のモル吸光係数 ($\epsilon=108,750 \text{ M cm}^{-1}$) は、ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/) の Compute pI/MW を用いて算出した。濃縮は、Amicon Ultra-10 (Molecular Weight Cut Off (MWCO) = 10 K) に 10 ml 注ぎ入れ、5000 rpm, 4°C の遠心条件でタンパク質溶液が 500 μl になるまで濃縮を進めた。タンパク質溶液が 500 μl まで濃縮されたところで、Buffer A を 10 ml 足し、5,000 rpm, 4°C の遠心条件で濃縮を進めた。この操作を 4 回繰り返すことで、終濃度 15-20 mg/ml になるまで濃縮した。その後、SDS-PAGE を行い最終的な純度を計算した。

<実験結果>

濃縮の際、膜への吸着は少なく回収率については毎回 90 % 以上であった。また、濃縮後のタンパク質溶液を SDS-PAGE にかけて純度を計算したところ、約 99 % であった (図 3-1)。よって、濃縮後のタンパク質溶液を最終精製標品とし、結晶化に使用することにした。

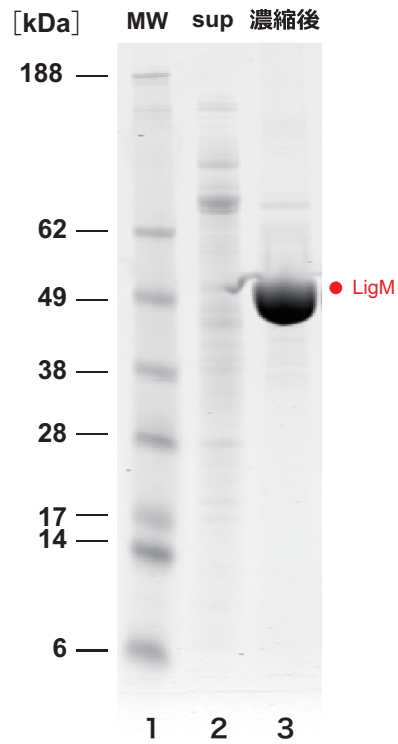


図 3-1. 結晶化に用いた LigM の SDS-PAGE

結晶化に用いた LigM の SDS-PAGE を示した。lane 1: マーカートンパク質, lane 2: 菌体破碎後の上清, lane 3: 結晶化に使用した濃縮後の LigM をそれぞれ示す。Lane 3 において、LigM 以外に含まれるタンパク質がほとんどないことから、lane 3 のサンプルを結晶化へ使用した。

3-2. 結晶化条件の探索

<目的>

LigM の回折強度データを収集するための結晶化条件探索を行う。

<実験方法>

3-1. の方法でタンパク質溶液を調製する。試料を調製した後、構造生物学研究センター内にある大規模結晶化装置(PXS)¹を用いて、Crystal Screen 1,2 (Hampton Research)(Jancarik & Kim, 1991)、PEG/Ion 1,2 (Hampton Research) (Mcpherson, 2001)、Crystal Screen Cryo 1,2 (Hampton Research)、Wizard I, II (Emerald Biosystems)、MembFac (Hampton Research) (Mcpherson, 1990)、FootPrint (Molecular Dimensions) 、PEGs II (QIAGEN)、Protein Complex (QIAGEN)の結晶化条件で初期スクリーニングを行った。結晶化方法は、180 μ l ザーバー溶液、150 nl タンパク質溶液と 150 nl リザーバー溶液を混合して 20°Cで sitting-drop 蒸気拡散法を用いて行った。

<実験結果>

初期スクリーニングの結果、Crystal Screen 1 No. 18 (100 mM MES, pH 6.5, 200 mM magnesium acetate tetrahydrate and 20% (w/v) PEG 8000)、PEGs II condition No. 83 (100 mM Tris, pH 8.5, 500 mM LiCl and 28% (w/v) PEG 6000)の条件から結晶を得ることができた。これらの条件をもとに、bufferの種類 (MES, Bis-Tris, Tris)、pH (7.0-8.5)、LiCl濃度 (0.1 – 1.5 M) および PEGの種類 (PEG 2000 MME, PEG 4000, PEG 6000 and PEG 8000)を検討した。結果、0.1 M Tris, pH 7.5-8.5, 0.4-0.8 M LiCl and 30-35% (w/v) PEG 4000 の条件で針状結晶を得ることができた (図 3-2)。

また、得られた針状結晶を用いて回折強度データの収集を行ったところ、空間群 $P3_121$ (or $P3_221$)、格子定数 $a = b = 112.5 \text{ \AA}$, $c = 219.5 \text{ \AA}$ であった。しかし、POINTLESS (Evans, 2011)による L-test の解析の結果、全 78 データセット内 36 データセット分が twin であり、twin fraction は平均して 0.21 であることが分かった。さらに、空間群 $P3_121$ (or $P3_221$)における平均分解能は 2.9 \AA であることが分かった (図 3-3)。

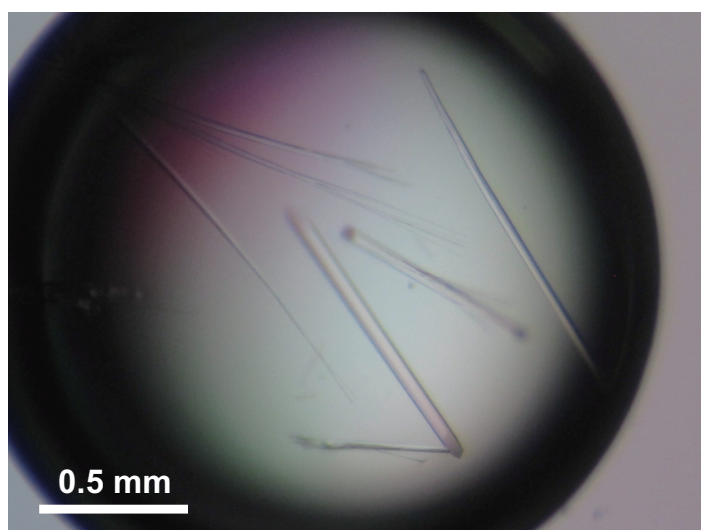


図 3-2. LigM の結晶（針状結晶）

0.1 M Tris, pH 7.5-8.5, 0.4-0.8 M LiCl and 30-35% (w/v) PEG 4000 において得られた LigM 結晶を示す。大きさは $1.0 \times 0.05 \times 0.01 \text{ mm}^3$ 程度であった。

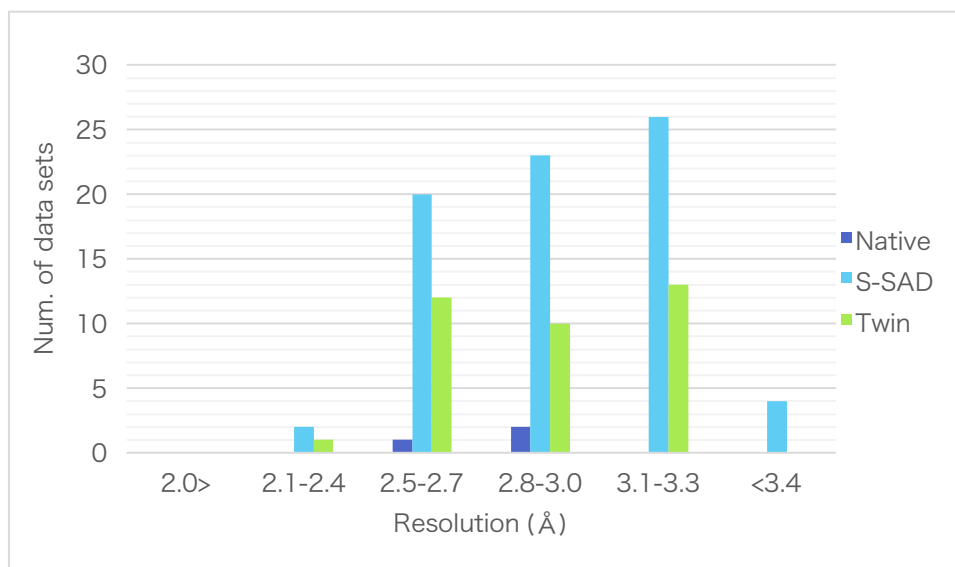


図 3-3. 針状結晶を用いた回折強度データの分解能分布

空間群 $P3_121$ ($P3_221$) の針状結晶を用いた回折強度データの分解能分布を示す。濃青色は native データ、水色は native データ(長波長使用)、緑色は twin データを示す。収集した全 78 データの内、36 データ分で twin を確認し、平均分解能は 2.9 Å であった。

3-3. Micro-seeding による結晶の質の改善

<目的>

3-2.において得られた結晶の質を改善するため、micro-seeding を行う。

<実験方法>

針状結晶（空間群 $P3_121$ (or $P3_221$)）が得られた結晶化溶液(0.1 M Tris, pH 7.5-8.5, 0.4-0.8 mM LiCl , 30-35% (w/v) PEG 4000) 950 μL に、 $0.5 \times 0.05 \times 0.01 \text{ mm}^3$ の針状結晶 10 個を移し、VCX-130 sonication machine (Sonics & Materials Inc.; output 50%, 10 sec \times 6 times at 20 sec interval)を用いて超音波破砕を行った。得られた溶液を seed-stock 溶液($\times 1$)とし、さらに 100 倍希釈したものを結晶化に使用した。結晶化条件は、1 μL タンパク質溶液、1 μL リザーバー溶液および 0.2 μL micro-seed 溶液を混合して 20 $^\circ\text{C}$ で hanging-drop 蒸気拡散法を用いて行った。

<実験結果>

針状結晶（空間群 $P3_121$ (or $P3_221$)）が得られた結晶化条件をもとに、PEG の種類 (PEG2000 MME, PEG4000, PEG6000, and PEG8000)、LiCl 濃度 (0.1 – 1.0 M) および buffer pH (7.0 – 8.5)などの条件検討を行った。ほとんどの結晶化条件で空間群 $P3_121$ (or $P3_221$)であると予測される針状結晶が確認できたが、PEG8000 を用いた条件(0.1 M Tris, pH 8.0, 0.1 M LiCl and 20-25% (w/v) PEG 8000)において、平板状結晶 ($0.3 \times 0.3 \times 0.02 \text{ mm}^3$) を得ることができた (図 3-4)。また、新しく得られた平板状結晶を用いて回折強度データの収集を行ったところ、空間群 $P2_12_12$ を示したため twin を解消することができた。

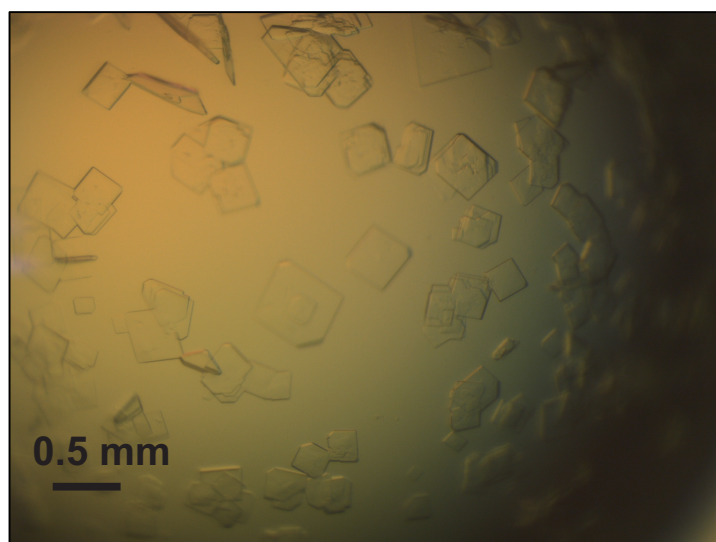


図 3-4. LigM の結晶（平板状結晶）

針状結晶（空間群 $P3_121$ (or $P3_221$)）を seed とし、0.1 M Tris pH 8.0, 0.1 M LiCl, 20 % (w/v) PEG 8000 の結晶化条件によって得られた LigM 結晶を示す。大きさは $0.3 \times 0.3 \times 0.02 \text{ mm}^3$ 程度であった。

3-4. 標準母液(Standard buffer)と抗凍結剤(Cryoprotectant)の作製

<目的>

標準母液とは、結晶をその溶液に浸したときに結晶が壊れない、溶けない状態を維持できる溶液のことである。また、回折強度データの収集は結晶を液体窒素で凍結した状態で行うため、凍結条件が悪いとタンパク質からの回折に氷からの回折が重なり、回折強度データの質が悪くなる。抗凍結剤は水をアモルファス状に凍らせることで氷の結晶が生成するのを防ぐ役割がある。よって、LigM に適した標準母液と抗凍結剤の探索を行う。

<実験方法>

標準母液

標準母液は、一般的に結晶が得られた条件の沈殿剤の濃度をリザーバー溶液よりも若干高くすることで作製する。

抗凍結剤

抗凍結剤は標準母液にグリセロールや糖類 (グルコース、キシリトール等)、ポリマー (PEG 2000, PEG 4000 等) などを最終濃度 20-30 % (w/v)になるように加えることで作製する。抗凍結剤の探索は CryoPro (Hampton Research) (Boutron, 1988)を使い、全 48 種類の中から 20 % (v/v) Glycerol, 20 % (v/v) Ethylene glycol, 25 % (v/v) Diethylene glycol, 20 % (v/v) PEG200, 20% (v/v) PEG400, 25% (v/v) Polyvinylpyrrolidone K15, 18% (v/v) D-sucrose, 18 % (v/v) D-sorbitol を選択し標準母液へ添加した。クライオループを使って、抗凍結剤含有の標準母液に結晶を 10 秒から 20 秒ほど浸した後凍結を行った。結晶に X 線を照射し、測定した回折像の分解能、回折点の分離、モザイク性などを指標に評価を行い、抗凍結剤の良否を判断した。

<実験結果と考察>

標準母液

LigM の結晶化条件には 20 % (w/v) PEG 8000 が含まれている。よって、PEG 8000 の濃度を少し高くした 25 % (w/v) PEG 8000 を用いて標準母液を作製した。LigM 結晶をこの標準母液に浸けたところ、少なくとも 3 時間の間に結晶が溶けた、あるいは結晶が壊れたなどの現象が見られなかった。よって、LigM の標準母液は、0.1 M Tris pH 8.0, 0.1 M LiCl, 25 % (w/v) PEG 8000 に決定した。

抗凍結剤

1 種類の抗凍結剤に対し 3~4 個の結晶を使用し、それぞれの結晶について snapshot を撮り、回折像の最高分解能(Å)の比較をおこなった(表 4-1)。結果、20 % (v/v) Ethylene glycol を抗凍結剤として用いることにより最も良い分解能 (2.8Å)を得ることができた。よって、20 % (v/v) Ethylene glycol を抗凍結剤と使用することで、回折強度データ収集においても分解能(Å)の良いデータが得られる可能性が高いと考えられるため、LigM の抗凍結剤は 0.1 M Tris pH 8.0, 0.1 M LiCl, 25 % (w/v) PEG 8000, 20 % (v/v) Ethylene glycol に決定した。

表 4-1. 抗凍結剤の種類と分解能 (Å)の関係

抗凍結剤濃度(v/v)	抗凍結剤の種類	snapshot の分解能(Å)
20%	Glycerol	2.3 - 3.0
20%	Ethylene glycol	2.0 - 2.5
25%	Diethylene glycol	3.0 - 3.3
20%	PEG200	3.0 - 3.2
20%	PEG400	2.8 - 3.0
25%	Polyvinylpyrrolidone K-15	2.6 - 3.0
18%	D-sucrose	3.3 -
18%	D-sorbitol	2.8 - 3.0

第 4 章 初期位相決定

第4章 初期位相決定

結晶中の電子密度は構造因子をフーリエ変換することによって得られる。

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} |F(hkl)| \exp \{-2\pi i (hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)\}$$

ここで、 $|F(hkl)|$ は反射(hkl)の温度因子を考慮した構造因子振幅、また $\alpha(hkl)$ は、位相角である。 x,y,z は単位胞における原子の座標値である。回折強度に L (Lorentz 因子), P (偏光因子) および A (吸収因子) の補正を施すことによって、 $I(hkl)$ の値が得られる。また、 $I(hkl) = |F(hkl)|^2$ から、構造因子振幅 $|F(hkl)|$ を求めることができる。しかし、回折像からは位相角 $\alpha(hkl)$ の情報は得られない。現在では、この位相問題を解くには大きく分けて、1. 分子置換法、2. 重原子の異常分散を利用する方法の2つが主に使われている。

分子置換法 (Rossmann *et al.*, 1962)とは、類似のアミノ酸配列を持つ別タンパク質の構造がある場合に、その既知構造を結晶構造の初期構造(モデル分子)とし、モデル分子に回転と併進を施して目的分子の単位格子中での配置を決定し、そこから得られる位相の計算値を初期位相として精密化を進める方法である。この方法は、『アミノ酸配列がお互いに類似しているタンパク質は、両者のポリペプチド鎖の折りたたまれ方も互いに似ている』という仮定に基づいている。既知構造との相溶性が低い場合などは、もう1つの方法である重原子の異常分散を用いた位相決定法を用いなければならない。

重原子の異常分散を利用する方法には、SAD法(単波長異常分散法)、MAD法(多波長異常分散法)などの方法がある。SAD/MAD法では1個の結晶を使い、照射するX線の波長を変えることで、タンパク質中に含まれる原子の異常散乱効果を大きくし(もしくは変化させ)、X線の波長変化による異常散乱効果の変化(MAD法)、もしくは異常散乱効果によるフリーデルの法則の破れを利用し(SAD/MAD法)位相決定を行う方法である。この方法の原理はすでに古くから考えられていたが(Crick and Magdoff, 1956)、波長可変であるシンクロトロン放射光の出現によって、初めてタンパク質構造決定に応用できるようになった(Hendrickson *et al.*, 1988)。

本研究では、LigMの初期位相決定に2通りの方法を用いた。1つは重原子試薬を使ったSAD法、2つ目はネイティブ結晶を使ったS-SAD法である。4-1.に重原子試薬を用いたSAD法による位相決定について、4-2.にS-SAD法における位相決定について述べた。

4-1. 重原子誘導体結晶を用いた位相決定

4-1.1 重原子誘導体結晶の作製

<目的>

これまで複数のアミノメチルトランスフェラーゼ (GcvT)の構造が解かれているが、LigM とその他の酵素とのアミノ酸配列の相同性 (identity)は 25 %以下と低い。よって LigM の結晶構造を決定する方法として、SAD 法を用いることにした。よって LigM 結晶へ導入するのに適した重原子試薬の探索を行った。

<実験方法>

重原子誘導体結晶の作製には、ソーキング法 (重原子溶液に Native 結晶を浸すことで重原子誘導体結晶を作製する方法)を用いることが多い。重原子試薬は Heavy Atom Screens (Hampton Research) (Garman and Murray, 2003) (Agniswamy *et al.*, 2008)に含まれる試薬を使用した。

Pt 系、Au 系、Hg 系などの重原子試薬が含まれているが、LigM にはシステインが含まれていないためシステイン残基に結合する Hg を含む試薬は適さない。そこで、当研究室で成績の良かった K_2PtCl_4 、 $(NH_4)_2PtCl_4$ 、 $K_2Pt(CN)_4 \cdot xH_2O$ 、 $AuCl_3$ 、 $Sm(O_2C_2H_3)_3 \cdot xH_2O$ を選びそれぞれ最終濃度が 5 mM になるように標準母液に溶かし、30 分間ソーキングを行った。ソーキング中に結晶が壊れず、かつ結晶に X 線を照射した際の測定した回折像の分解能、回折点の分離、モザイク性などを指標に評価を行い、重原子誘導体結晶の良否を判断した。

<実験結果と考察>

1 種類の重原子試薬に対し 2~3 個の LigM 結晶を使用し、それぞれソーキング法により重原子を LigM 結晶へ導入した。各 LigM 結晶について snapshot を撮り、回折像の最高分解能 (Å)の比較をおこなった (表 4-1)。

$AuCl_3$ へのソーキングでは、結晶を浸した瞬間から結晶がすぐに崩壊していく様子が見られたため、snapshot の撮影は行わなかった。また、 $K_2Pt(CN)_4 \cdot xH_2O$ 、 $Sm(O_2C_2H_3)_3 \cdot xH_2O$ を用いた場合には、30 分間のソーキング中に見た目のダメージはあまり見られなかった。しかし、回折像において回折点を確認できなかったことから、試薬濃度が高く結晶へ相当のダメージがあったと判断できた。

試した重原子試薬の中で、 $(NH_4)_2PtCl_4$ を用いた条件が、ソーキング中に結晶が壊れずまた、snapshot で最も良い分解能 (2.8Å)を示した。メチオニン中の S 原子は Pt 化合物に対す

る良い結合部位となるので、30分間の短いソーキング時間でもS原子に結合できたと考えられる。重原子試薬の濃度が高くなると、タンパク質の多くの部分に結合し結晶崩壊の機会が多くなってしまう。LigMには14個のメチオニンが含まれているが、その全てにPt原子が結合してるとは考えにくい。全部ではなくとも数個は結合していると予測されるため、LigM結晶の位相決定には重原子試薬(NH₄)₂PtCl₄を用いた異常分散効果を利用することにした。

表 4-1. 重原子試薬の種類と分解能 (Å)の関係

重原子試薬の種類	snapshotの分解能 (Å)
K ₂ PtCl ₄	3.0 - 4.0
(NH ₄) ₂ PtCl ₄	2.6 - 2.8
K ₂ Pt(CN) ₄ · xH ₂ O	回折なし
AuCl ₃	ソーキング時に結晶が壊れたため、snapshot撮れず
Sm(O ₂ C ₂ H ₃) ₃ · xH ₂ O	回折なし

4-1.2 Pt 原子の XAFS 測定

<目的>

SAD データ測定を行うにあたり、Pt 原子の吸収端波長の最適化を行うため Pt 誘導体 LigM 結晶を用いて XAFS (X-ray Absorption Fine Structure) 測定を行う。

<実験方法>

吸収端は XAFS 測定を行うことにより決定する。Pt 原子からの異常分散を MCA (Multi channel analyzer) を用いて分析した結果、散乱 X 線、Pt 原子からの蛍光 X 線の 2 つのピークが得られた。その後、Pt 原子の吸収端付近で X 線吸収スペクトルを測定し、peak の波長、 f' 及び f'' を決定した。

<実験結果と考察>

XAFS 測定を行い、Pt 原子の吸収端付近で X 線吸収スペクトルを測定し peak (1.0717 Å) の波長と、波長 1.0717 Å での $f' = -16.8$ 及び $f'' = 13.4$ を決定した (図 4-1)。

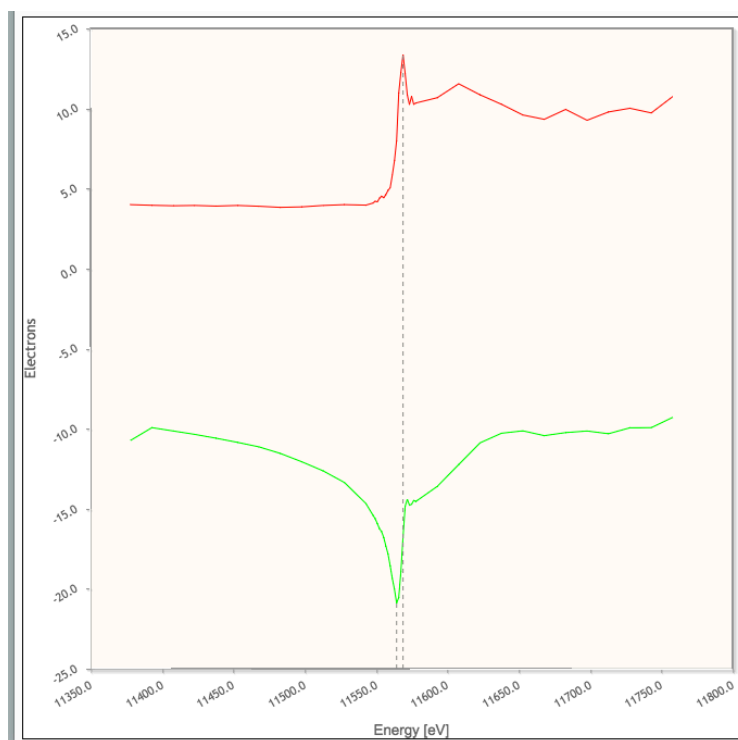


図 4-1. Pt 原子誘導体 LigM 結晶の XAFS 測定

LigM-Pt 原子誘導体結晶を用いて XAFS 測定を行った。Pt 原子の吸収端付近で X 線吸収スペクトルを測定し peak (1.0717 Å) の波長と波長 1.0717 Å での $f' = -16.8$ 及び $f'' = 13.4$ を決定した。

4-1.3 回折強度データの収集

<目的>

位相決定のための Pt 原子誘導体 LigM 結晶の回折強度データを収集する。

<実験方法>

位相決定のための回折強度データは、茨城県つくば市にある放射光実験施設 Photon Factory で行った。センタリングした結晶を 0.5° ずつ回転させながら、露光時間 0.2 秒、X 線透過率 50 % で、0-360°分の回折強度データを 4 周分収集した。回折強度データは XDS を用いて処理した。

<実験結果と考察>

LigM の Pt 原子誘導体結晶における回折強度データ収集条件を表 4-2 に示す。得られた各回折強度データについて XDS (Kabsch, 2010) を用いて処理を行った結果、結晶学的パラメーターを得ることができた (表 4-3)。ligm277-osc1 の X 線回折像を図 4-2 に示す。さらに CCP4 の POINTLESS (Evans and Murshudov, 2013) を用いて空間群を決定した。ラウエ群は *Pmmm* であり、*a* 軸上の反射は $h=2n$ 、*b* 軸上の反射は $k=2n$ のみに観測されたことから空間群は *P2₁2₁2* であると決定した。また、Matthews の式 (Matthews, 1968) から見積もられる非対称単位中の分子数は 3 分子であると推定された (表 4-3)。

表 4-2. Pt 原子誘導 LigM 結晶における回折強度データ収集条件

Diffraction source	PF AR-NE3A
Wavelength (Å)	1.0717
Temperature (K)	95
Detector	PIRATUS 2M-F
Crystal-detector distance (mm)	313
Rotation range per image (°)	0.5
Total rotation range (°)	0-360
Exposure time per image (s)	0.2

表 4-3. Pt 原子誘導 LigM 結晶の結晶学的パラメーター

Space group	$P2_12_12$
Cell parameters	$a = 102.0, b = 117.3, c = 128.1$
	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$
No. of subunits/asymmetric unit	3
Solvent content [%]	51

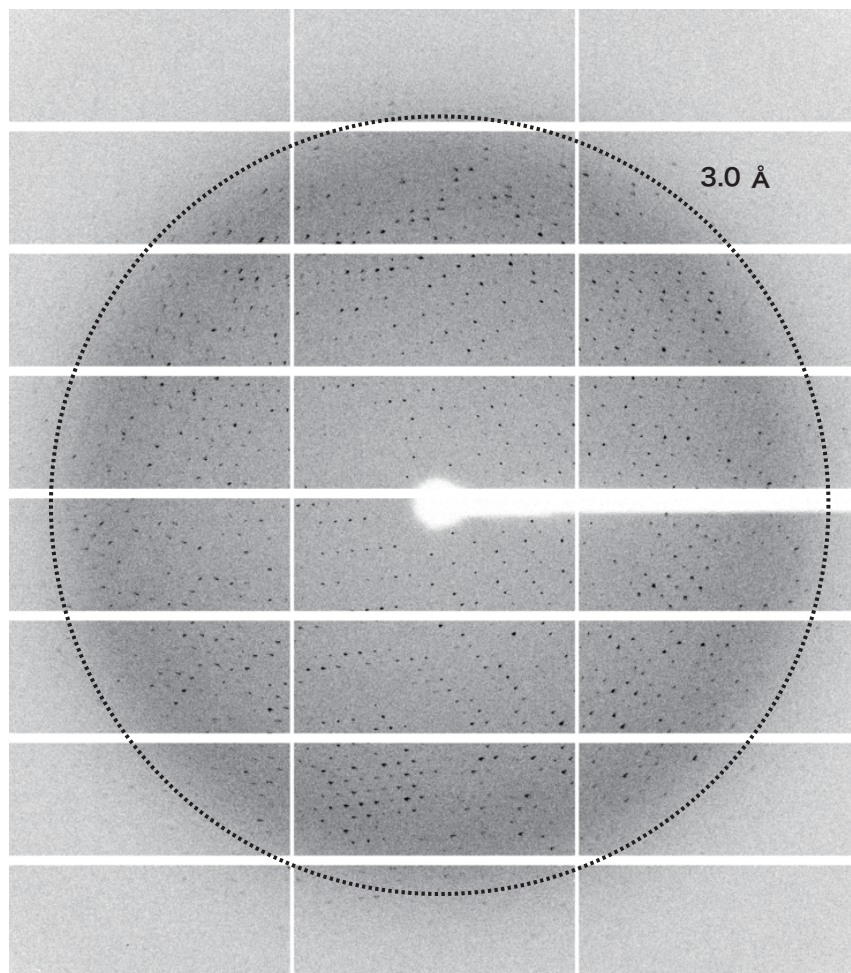


図 4-2. Pt 原子誘導 LigM 結晶から得られた回折パターン

Photon Factory NE-3A にて波長 1.0717\AA を用い、センタリングした LigM 結晶を 0.5° ずつ回転させながら、露光時間 0.2 秒の条件で回折強度データの収集を行った。破線は分解能 3.0\AA を示す。

4-1.4 SHELXC/D/E を用いた構造計算

<目的>

SHELXC/D/E (Sheldrick, 2010)を用いて、LigM タンパク質(Native)中に存在する Pt 原子座標を決定し、求めた Pt 原子座標位置から LigM の初期位相が得られるかどうか検討した。

<実験方法>

構造計算に用いた回折強度データは、*XDS* で処理を行い、4 データセットをマージして *XSCALE* (Kabsch, 2010)を用いてスケーリングを行ったものを使用した。スケーリングの分解能はデータの精度を表す R-factor が、Highest shell で 50%以下を示すことを基準に設定した。*SHELXC* では、substructure に相当する構造因子を計算する。 $I/\sigma(I)$, completeness (%)のほかに $\Delta F/\sigma(\Delta F)$, CC_{anom} という統計値を得ることができ、データの精度を確認することができる。

異常散乱法による位相決定とは、観測された構造因子である F_+ と F_- の差である ΔF を利用する方法である。 ΔF が異常分散シグナルの大きさに相当するため、測定した回折強度データから計算される ΔF が位相決定に必要な精度があるかどうかを見積もる必要がある。 CC_{anom} と $\Delta F/\sigma(\Delta F)$ は、その見積もりに必要な統計値である。

CC_{anom} は、回折強度データセットをランダムに2つのサブデータセットに分け、それぞれのサブデータセットで ΔF を計算し、その相関係数を計算することで得られる。回折強度が精度よく測定できていれば、相関係数は1に近くなる。

また、 $\Delta F/\sigma(\Delta F)$ は異常散乱の差の構造因子に対する S/N 比を示す。*SHELXD* (Schneider and Sheldrick, 2002)を用いた substructure 探索では、 $\Delta F/\sigma(\Delta F)=1.2$ 程度を満たす分解能であれば substructure を見つけることができる可能性が高いといわれている(Derewenda et al., 2000)。よって、*SHELXD* を用いて、 $\Delta F/\sigma(\Delta F)=1.2$ を満たす分解能で 100 回の substructure 探索の試行を行い、LigM の substructure (Pt 原子)の位置を求めた。

SHELXD では、規格化構造因子の実測値 E_{calc} と計算値 E_{obs} の相関係数 CC で substructure の探索が上手くいっているか否かの評価を行っている。全反射を使った CC 値 (CC_{all})と強度の弱い反射のみを使った CC 値 (CC_{weak}) の相関プロットを確認し、相関プロットで2つの群を綺麗に確認することができれば正解が見つけられているとされている。正解が見つけられている場合には CC_{all} は 30 以上であることが多いため、 CC_{all} の値が 30 を超えるものを正解と判断した (Schneider and Sheldrick, 2002)。*SHELXE* は *SHELXD* で決定した Pt 原子の位置から初期位相を計算し、位相の改良及びモデルの構築を行う。位相の改良は、溶媒平滑化法で行われる。十分に精密化されたタンパク質結晶構造はタンパク質分子間にある溶

媒領域にある電子密度が平坦であることが知られている。よって、タンパク質分子の占める領域を特定できれば、溶媒領域にあるピークはノイズとみなせるので、その領域の電子密度を一定の低い値で置き換えることによってノイズを取り除くことができる。位相の改良は通常 20 サイクル行われ、2 次構造の自動トレースは 3 サイクル行われる。位相の改良が進んでいるかの指標は”Contrast vs Cycle”のプロットで判断することができる。*SHELXD* が決定した original の座標が 20 サイクル後に 50%近くまで到達し二次構造の自動トレース終了後には 60 %近くまで到達していることが多い。Inverted と original の Contrast に差が出ていれば位相改良がうまくいっていると判断して良い。よって、Pt 原子座標の確からしさは”Contrast vs Cycle” で Inverted と original の Contrast に差が出ているかどうかで判断した。

<実験結果>

XSCALE の結果、R-factor が、Highest shell で 50%以下を示す条件を満たす分解能は、14-3.2 Å の範囲であることがわかった (表 4-4)。 *SHLEXC* の結果から $\Delta F/\sigma(\Delta F)=1.2$ 程度の条件を満たす最高分解能は 3.7Å であることがわかった。 $\Delta F/\sigma(\Delta F)$ を分解能に対してプロットしたものを図 4-3 に示す。*SHELXD* を用いて 3.7Å 分解能で 100 回の試行を行った結果、 CC_{all} と CC_{weak} の相関プロットで CC_{all} が 30 以上を示したため、正しい Pt 原子座標が得られている可能性が高いと判断した (図 4-4)。また、*SHELXE* における Contrast vs Cycle の結果を図 4-5 に示す。Inverted と original の Contrast に差が出ていることから位相の改良はうまくいっていると判断した。しかし、モデルの構築については、 α ヘリックスや β シートを十分に見つけることができていなかった (図 4-6)。

表 4-4. XSCALE によるスケーリングの結果

RESO LIMIT	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS	R-FACTOR		R-FACTOR COMPARED	I/SIGMA	R-meas	CC(1/2)	Anomal	SigAno	Nano
	OBSERVED	UNIQUE	POSSIBLE		observed	expected							
14.31	14279	371	589	63.00%	4.20%	4.50%	14279	89.96	4.30%	100.0*	98*	7.896	146
10.12	40379	1086	1086	100.00%	4.40%	4.60%	40379	91.95	4.40%	100.0*	95*	5.628	463
8.26	45542	1372	1372	100.00%	5.40%	5.50%	45542	70.65	5.50%	100.0*	89*	3.914	608
7.16	56367	1649	1649	100.00%	8.20%	8.30%	56367	51.68	8.30%	100.0*	85*	2.985	745
6.4	67242	1871	1871	100.00%	11.50%	11.60%	67242	41.26	11.70%	99.9*	78*	2.601	855
5.84	76457	2069	2069	100.00%	12.40%	12.80%	76457	38.89	12.60%	99.9*	74*	2.285	955
5.41	82229	2219	2219	100.00%	12.90%	13.20%	82229	38.5	13.10%	99.9*	67*	2.026	1033
5.06	87832	2425	2425	100.00%	11.10%	11.40%	87832	42.44	11.30%	99.9*	62*	1.844	1130
4.77	86749	2583	2583	100.00%	10.90%	10.90%	86749	43.65	11.00%	99.9*	55*	1.621	1212
4.53	88100	2706	2706	100.00%	10.90%	10.80%	88100	42.39	11.00%	99.9*	48*	1.56	1273
4.31	94921	2837	2837	100.00%	11.50%	11.40%	94921	40.76	11.70%	99.9*	44*	1.448	1339
4.13	103516	2962	2962	100.00%	13.50%	13.60%	103516	35.86	13.70%	99.9*	43*	1.412	1401
3.97	110967	3120	3120	100.00%	16.70%	16.70%	110967	29.78	16.90%	99.8*	44*	1.3	1482
3.82	114976	3217	3217	100.00%	19.70%	19.70%	114976	25.91	20.00%	99.7*	57*	1.324	1526
3.7	120845	3366	3366	100.00%	23.40%	23.40%	120845	22.23	23.80%	99.6*	50*	1.246	1605
3.58	125283	3465	3465	100.00%	25.90%	25.80%	125283	20.27	26.30%	99.5*	47*	1.215	1654
3.47	128809	3566	3566	100.00%	27.90%	28.00%	128809	18.19	28.30%	99.5*	29*	1.132	1702
3.37	126681	3680	3680	100.00%	33.50%	33.50%	126681	14.77	34.00%	99.2*	37*	1.143	1758
3.28	126735	3760	3760	100.00%	41.00%	41.20%	126735	11.72	41.70%	98.9*	23*	1.038	1800
3.2	128909	3899	3899	100.00%	45.30%	45.20%	128909	10.39	46.00%	98.6*	21*	1.013	1870
total	1826818	52223	52441	99.60%	16.60%	16.60%	1826818	31.32	16.80%	99.8*	54*	1.648	24557

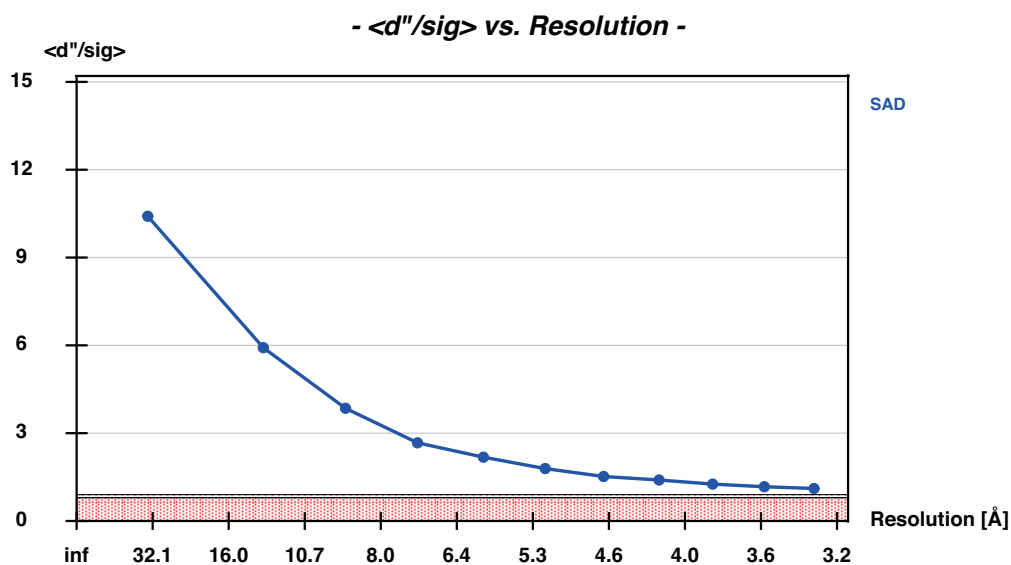


図 4-3. 分解能に対する $\Delta F / \sigma(\Delta F)$

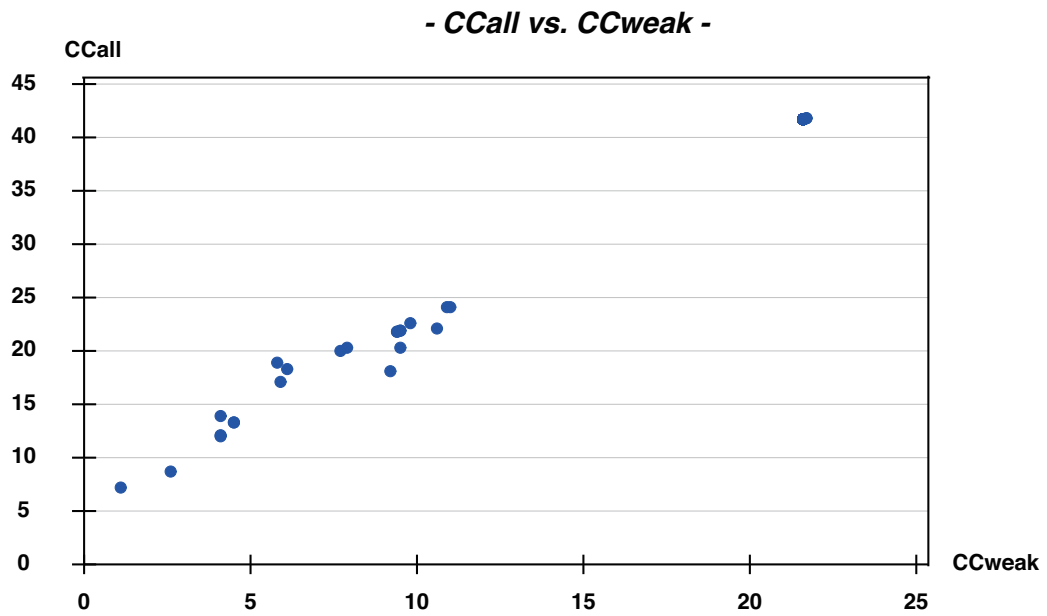


図 4-4. SHELXD の結果

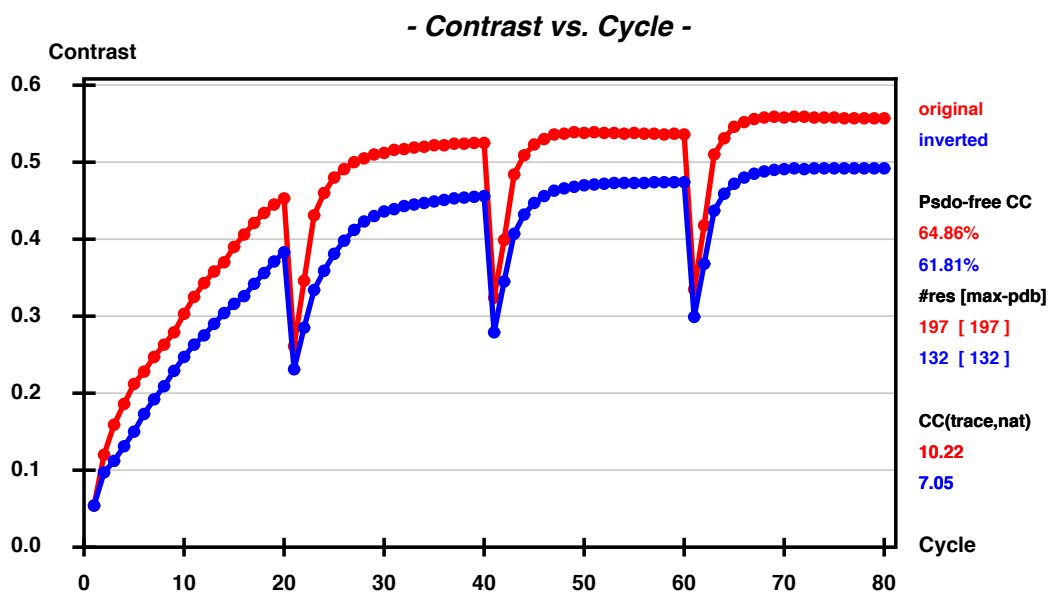


図 4-5. SHELXE の結果

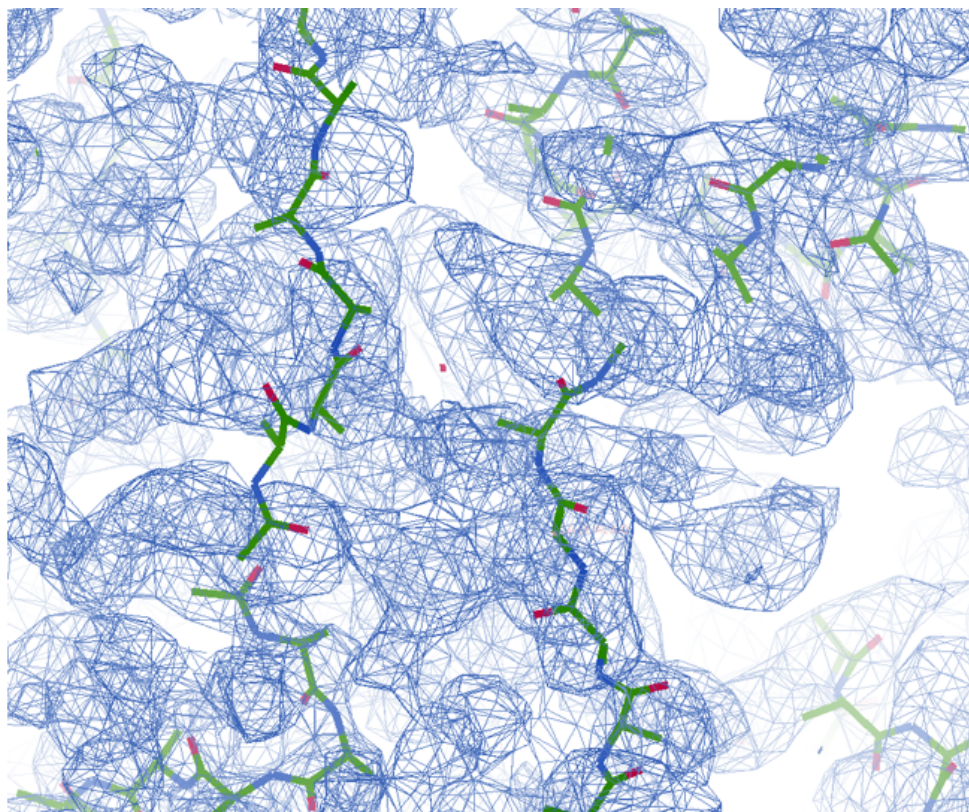


図 4-6. SHELXD により決定した Pt 原子座標を SHELXE で精密化して初期位相を計算した電子密度分布とモデル(1.1 σ)

4-1.5. autoSHARP を用いた構造計算

<目的>

SHELX プログラムと別のアルゴリズムを持つプログラムを用いた場合、位相決定の精度が異なるか検証するため *autoSHARP* を用いて比較を行う。*autoSHARP* (Vonrhein *et al.*, 2007) は、重原子の探索に *RANTAN* (Yao, 1981) と *SHELXD* を併用し、初期位相の決定は *SHARP* (La Fortelle and Bricogne, 1997) が行う。また、電子密度の改良は *SOLOMON* (Abrahams and Leslie, 1996)、モデル構築は *ARP/wARP* (Perrakis *et al.*, 1999) が行っている。*SHARP* が優れている点は、重原子パラメータの精密化に最尤推定法 (Bricogne, 1988) を用いている点にある。最尤推定法とは、重原子パラメータの尤度を観測値とその分布関数から求めているため、*SHELXD* で行う計算よりも取り扱うパラメータが多い分、得られる結果の精度もより上がると考えられる。

<実験方法>

autoSHARP による LigM のモデル構築ができるかどうか検討する。*autoSHARP* は ccp4i の Experimental Phasing から選択し、LigM のシーケンス配列及び、スケーリングを行った回折データ (.mtz 形式) を入力し、解析を行った。

<実験結果と考察>

SHARP における Phasing statistic として、Phasing power を表 4-6、FOM を表 4-7 にそれぞれ載せた。Phasing power は異常散乱の差の値に依存し、Overall で 0.853、高角側で 0.26 であった。

FOM は figure of merit のことで、位相角の質を示すパラメータである。FOM は 1.0 に近いほど位相角の質は良いものと判断することができ、Overall で 0.32 を示した。FOM = 0.45 以上であれば位相角の質は相当良いものと言えるが、0.25–0.45 の値であれば十分位相は決まるものとする。

SOLOMON による位相改良後の電子密度分布の様子を図 4-7 に示す。得られた電子密度の解釈は十分可能なものであった。位相角の精度が良いため、位相改良も正しい方向へ進んだと考えられる。

V_M 値の計算から、LigM は非対称単位に 3 分子含まれているため、471 残基×3 分子=1,413 残基分モデル構築を行うことができれば良い。*autoSHARP* は位相改良とモデル構築を 5 回行う。1 回目から 5 回目までのモデル構築の状況を表 4-8 に示す。位相角の精度が良いため

か、最初の 2 回で全体の 90 %をモデル構築できたため、その後モデル構築は行われなかった。

最終的に図 4-8 に示すように、90 %以上 LigM の構造を構築することができた。よって、*SHELXD* を用いた位相決定よりも、*SHARP* を用いて位相決定を行う方が位相角の精度が良いと判断できた。

表 4-5. Cullis R-factor

BIN	Dmin	Dmax	ANOMALOUS			
			Nacen	Ncen	RC_acen	RC_cen
1	47.38	12.93	281	0	0.385	0
2	12.93	9.32	541	0	0.251	0
3	9.32	7.66	704	0	0.347	0
4	7.66	6.66	850	0	0.416	0
5	6.66	5.96	972	0	0.492	0
6	5.96	5.45	1087	0	0.526	0
7	5.45	5.05	1190	0	0.583	0
8	5.05	4.73	1279	0	0.648	0
9	4.73	4.46	1354	0	0.71	0
10	4.46	4.23	1463	0	0.738	0
11	4.23	4.04	1513	0	0.786	0
12	4.04	3.87	1595	0	0.852	0
13	3.87	3.72	1677	0	0.887	0
14	3.72	3.58	1748	0	0.912	0
15	3.58	3.46	1799	0	0.932	0
16	3.46	3.35	1857	0	0.943	0
17	3.35	3.25	1934	0	0.968	0
18	3.25	3.16	1998	0	0.968	0
19	3.16	3.08	2043	0	0.974	0
20	3.08	3	2095	0	0.98	0
		OVERALL	27980	0	0.86	0

BIN: resolution bin number

Dmin : lowest resolution of the bin (in Angstrom)

Dmax : highest resolution of the bin (in Angstrom)

Nace n: Number of acentric reflexions in this bin

Ncen : Number of centric reflexions in this bin

RC_acen : R-Cullis for acentric reflexions in this bin

RC_cen : R-Cullis for centric reflexions in this bin

表 4-6. Phasing Power

BIN	Dmin	Dmax	ANOMALOUS			
			Nacen	Ncen	PP_acen	PP_cen
1	47.38	12.93	281	0	3.325	0
2	12.93	9.32	541	0	5.46	0
3	9.32	7.66	704	0	4.273	0
4	7.66	6.66	850	0	3.278	0
5	6.66	5.96	972	0	2.539	0
6	5.96	5.45	1087	0	2.295	0
7	5.45	5.05	1190	0	1.953	0
8	5.05	4.73	1279	0	1.736	0
9	4.73	4.46	1354	0	1.419	0
10	4.46	4.23	1463	0	1.296	0
11	4.23	4.04	1513	0	1.118	0
12	4.04	3.87	1595	0	0.892	0
13	3.87	3.72	1677	0	0.744	0
14	3.72	3.58	1748	0	0.654	0
15	3.58	3.46	1799	0	0.566	0
16	3.46	3.35	1857	0	0.498	0
17	3.35	3.25	1934	0	0.38	0
18	3.25	3.16	1998	0	0.339	0
19	3.16	3.08	2043	0	0.286	0
20	3.08	3	2095	0	0.267	0
		OVERALL	27980	0	0.853	0

BIN : resolution bin number

Dmin : lowest resolution of the bin (in Angstrom)

Dmax : highest resolution of the bin (in Angstrom)

Nacen : Number of acentric reflexions in this bin

Ncen : Number of centric reflexions in this bin

PP_acen : phasing power for acentric reflexions in this bin

PP_cen : phasing power for centric reflexions in this bin

表4-7. FOM

BIN	Dmin	Dmax	Nacen	FOMacen	Ncen	FOMcen
1	47.38	12.93	281	0.66126	164	0.15616
2	12.93	9.32	541	0.6437	174	0.11919
3	9.32	7.66	704	0.58985	173	0.10172
4	7.66	6.66	850	0.57032	174	0.14359
5	6.66	5.96	972	0.54089	170	0.12109
6	5.96	5.45	1087	0.53004	171	0.11655
7	5.45	5.05	1190	0.4966	176	0.06844
8	5.05	4.73	1279	0.44936	169	0.07134
9	4.73	4.46	1354	0.43278	168	0.06763
10	4.46	4.23	1463	0.40166	178	0.05658
11	4.23	4.04	1513	0.37399	172	0.05366
12	4.04	3.87	1595	0.32451	176	0.05306
13	3.87	3.72	1677	0.29047	173	0.05027
14	3.72	3.58	1748	0.27151	172	0.05716
15	3.58	3.46	1799	0.24059	166	0.05963
16	3.46	3.35	1857	0.21404	176	0.04554
17	3.35	3.25	1934	0.17859	181	0.05452
18	3.25	3.16	1998	0.16808	168	0.05355
19	3.16	3.08	2043	0.15337	173	0.06301
20	3.08	3	2095	0.13656	166	0.05642
		OVERALL	27980	0.32278	3440	0.07823

BIN : resolution bin number

Dmin : lowest resolution of the bin (in Angstrom)

Dmax : highest resolution of the bin (in Angstrom)

Nacen : number of acentric reflexions in this bin

FOMacen : mean 2D figure of merit for acentric reflexions in this bin

Ncen : number of centric reflexions in this bin

FOMcen : mean 2D figure of merit for centric reflexions in this bin

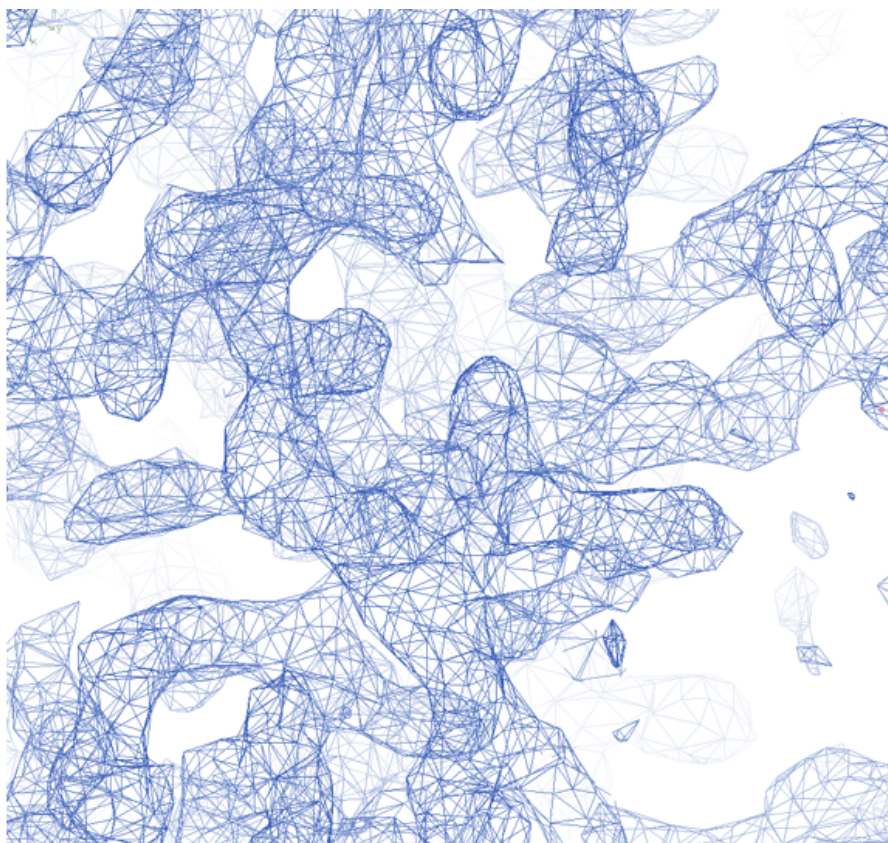


図 4-7. autoSHARP 計算により得られた電子密度分布 (1.2σ)

表 4-8. ARP/wARP によるモデル構築の状況

Arp/wARP run	モデル構築した 残基数	シーケンスと一致した 残基数	モデル構築の割合 (%)
1st	1366	1356	95.6
2nd	1360	1281	90.4
3rd	-	-	-
4th	-	-	-
5th	-	-	-

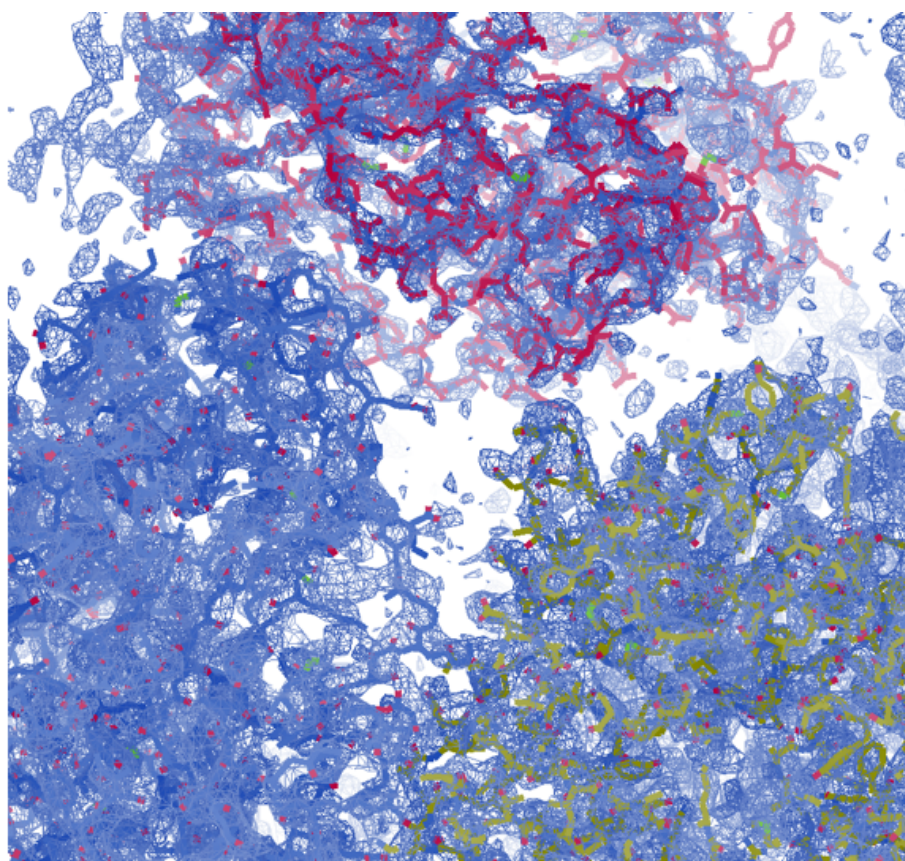


図 4-8. autoSHARP でのモデル構築の結果 (1.2σ)

4-2. S-SAD 法による位相決定

S-SAD 法とは、タンパク質中に含まれる硫黄原子(Sulfur)の異常散乱を利用して位相角を決定する方法で、1981 年には Hendrickson と Teeter らが、この方法を用いてクランピンという小さなタンパク質の結晶構造を決定している(Hendrickson and Teeter, 1981)。タンパク質に含まれている炭素、窒素、酸素などの軽原子は、位相角の決定に利用できる程度の異常散乱を示すことはないが、これに対し硫黄は弱いながらも位相決定可能な程度に異常散乱を示すため、測定精度を上げていけば構造解析に使用することができると考えられてきた。

S-SAD 法は、従来から頻繁に用いられている SAD 法とは異なり、結晶中への重原子の導入や、蛋白質中のメチオニンをセレノメチオニンに置換した誘導体などを調製する必要がなく、新規構造の迅速で簡便な決定法として期待を集めている手法である。しかし、S-SAD 法による位相角の決定が難しいとされている理由が主に 2 つある(Liu *et al.*, 2012) (Liu *et al.*, 2013)。

1 つ目は硫黄原子の K 吸収端(f' が極大となる波長)が 5.0155Å 付近と非常に長波長側にあるという点である。0.8 から 2.0 Å というシンクロトロン放射光でよく使われる波長領域からはかなり離れているため、通常の波長を用いた場合、硫黄原子の異常分散効果が微弱になるため高い測定精度が必要で、解析が難しくなる(図 4-9)。

2 つ目は、長波長であればあるほど異常分散効果は大きくなるものの、空気や溶媒の吸収効果による影響が大きくなり、測定誤差が大きくなる。この問題を解決するため Photon Factory の BL-1A では 2014 年秋頃からヘリウムチャンバーを導入した。1.0Å 付近で行われる通常の測定系では、空気散乱による X 線強度の低下、及びクライオガス(窒素ガス)からの散乱によるノイズの増加が問題となる。図 4-10 に X 線透過率と X 線のエネルギーの関係を示した。空気の場合、低エネルギーであるほど X 線透過率が下がっているが、ヘリウムを用いた場合は透過率が下がることはなく、X 線強度の低下を防ぐことができる(Liu *et al.*, 2013)。また、通常結晶への吹きつけには窒素ガスを用いているが、ヘリウムガスを用いることで、窒素ガスによる散乱の影響はなくなる。

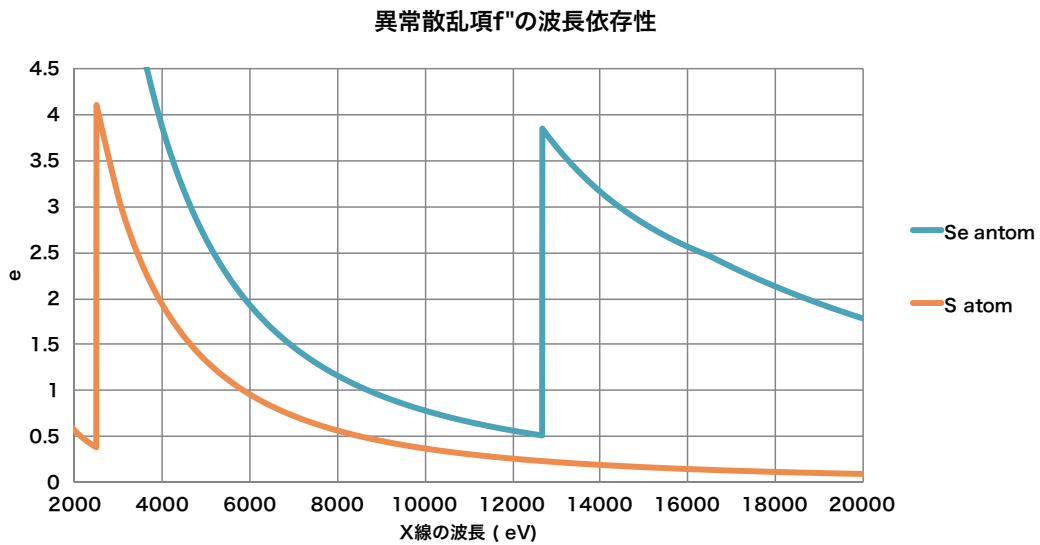


図4-9. セレン原子と硫黄原子の異常散乱項の波長依存性

青色：セレン原子，オレンジ色：硫黄原子をそれぞれ示す。セレン原子の場合は約 1 \AA (12.658 keV)付近に吸収端があるが、硫黄原子の場合は約 5 \AA (2.4797 keV)付近に吸収端がある。

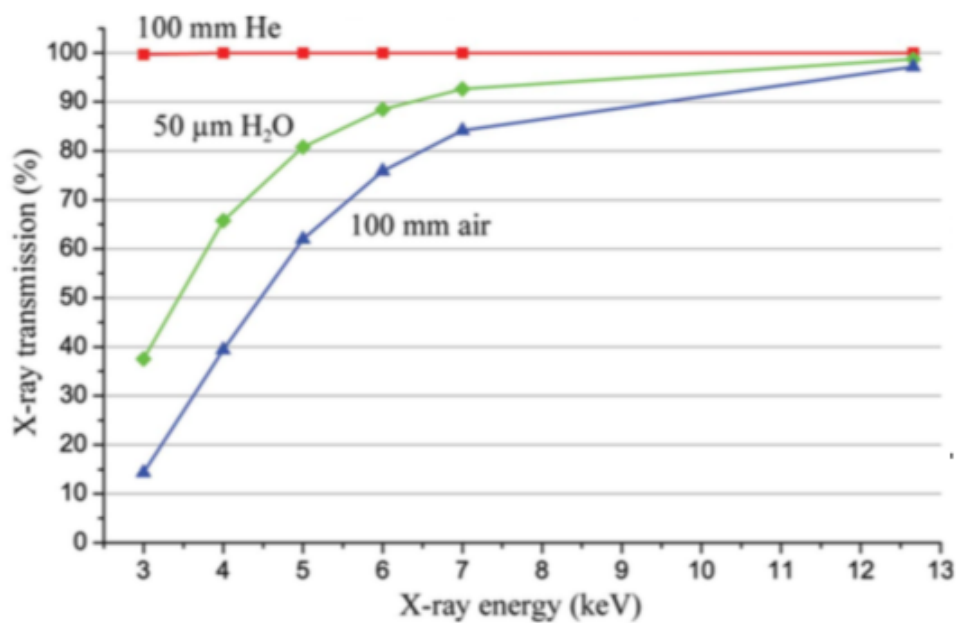


図4-10. 波長エネルギーに対するX線透過率(%) (Liu et al., 2013 より)

波長 2.7 \AA (4.5920 keV) の場合、空気は He の約半分の X 線しか透過しない。波長 1.9 \AA (6.5255 keV) の場合であっても空気の場合は He の 8 割ほどにしかない。

4-2.1 異常分散シグナルの見積もり

<目的>

位相決定を行うタンパク質の異常分散シグナルがどれほどの大きさが見込まれるのかの異常分散シグナルの見積もりを行う。また、S-SAD 法における位相決定の場合、異常分散シグナルが 0.6% 以下である場合、位相決定は困難であるとされる (Wang limit)。よって、Wang limit よりも大きい値であるかの確認を行う。

<実験方法>

Bijvoet ratio $\langle |F_{anom}| \rangle / \langle |F| \rangle$ を計算し、波長 2.7 Å 及び 1.9 Å における LigM の異常分散シグナルの見積もりを行う (Hendrickson and Teeter, 1981)。

$$\frac{\langle |F_{anom}| \rangle}{\langle |F| \rangle} = 2^{1/2} \times \frac{(N_A)^{1/2} \times f''}{(N_T)^{1/2} \times Z_{eff}}$$

ここで、 N_A ；異常散乱原子の数、 N_T ；1 分子中に含まれる原子の数、 f'' ；測定波長における異常分散の寄与、 Z_{eff} ；平均的なタンパク質原子の電子数 (6.7) を示す。LigM は、アミノ酸 471 残基からなり分子中に 14 個の硫黄原子を持つ (図 4-11)。よって、上記の式に代入し、Bijvoet ratio (%) を見積もった。

<実験結果と考察>

波長 2.7 Å 及び、1.9 Å における Bijvoet ratio (%) を表 4-9 に示した。硫黄原子の吸収端 5.02 Å で回折強度データ測定を行った場合は、セレノメチオン置換タンパク質を利用した場合と同じぐらいの異常分散シグナルが得られる。実際の測定波長である波長 2.7 Å において Bijvoet ratio は 1.98% と計算され、シグナルが 2 エレクトロン程度の大きさしかないことがわかったが、それでも S-SAD 法の限界値といわれる Bijvoet ratio 0.6% より大きな値を示した (Wang, 1985)。よって、S-SAD 法による LigM の位相決定は可能であると言える。

```

      10      20      30      40      50
MSAPTNLEQV LAAGGNTVEM LRNSQIGAYV YPVVAPEFSN WRTEQWAWRN
      60      70      80      90     100
SAVLFDQTHH MVDLYIRGKD ALKLLSDTMI NSPKGWEPNK AKQYVPVTPY
      110     120     130     140     150
GHVIGDGIIF YLAEEEFVYV GRAPAAWLM YHAQTGGYV DIVHDDRSPS
      160     170     180     190     200
RPMGKPVQRI SWRFQIQGPK AWDVIEKLHG GTLEKLFKN MAEMNIAGMK
      210     220     230     240     250
IRTLRHGMAG APGLEIWGPY ETQEKARNAI LEAGKEFLI PVGSRAYPSN
      260     270     280     290     300
TLESGWIPSP LPAIYTGDKL KAYREWLPAN SYEASGAIGG SFVSSNIEDY
      310     320     330     340     350
YVNPYEIGYG PFVKFDHDFI GRDALEAIDP ATQRKKVTLA WNGDDMAKIY
      360     370     380     390     400
ASLFDTEADA HYKFFDLPLA NYANTNADAV LDAAGNVVGM SMFTGYSYNE
      410     420     430     440     450
KRALSLATID HEIPVGTALT VLWGEENGGT RKTTPVEPHKQ MAVRAVVSPV
      460     470
PYSVTARETY EGGWRKAAVT A

```

図 4-11. LigM のアミノ酸配列

LigM のアミノ酸配列を示す。LigM の分子中に含まれている硫黄原子はメチオニン由来であるのでメチオニン残基を緑色で示した。

表 4-9. LigM の各波長における Bijvoet ratio (%)

Anomalous Atom	λ [Å]	f''	Bijvoet ratio [%]
Se	0.9795	3.96	5.19
S	5.0155	4.17	5.47
	2.7000	1.51	1.98
	1.9000	0.81	1.06

LigM の各波長における異常分散シグナルの大きさを計算した。

4-2.2 LigM の結晶化条件と凍結方法

<実験結果>

S-SAD 法に使用した LigM 結晶作製のための組換え LigM タンパク質の発現、精製、結晶化法については、第 2 章、第 3 章を参照されたい。結晶化初期条件からスクリーニングを行った結果、0.1 M Acetate pH 3.8, 0.2 M Mg acetate, 20 % (w/v) PEG 4000 で針状結晶を得ることができた (図 4-11)。LigM 結晶を抗凍結剤 (20 % (v/v) ethyleneglycol) の標準母液に 20-30 sec 浸けた後、Litho Loop (Protein Wave 社) を用いて結晶をすくい上げ、液体窒素で凍結を行った。ループで結晶を拾う際には、ループ上の溶媒量をできるだけ少なくするために下から上にループを持ち上げるように動かすのではなく、溶媒を切るようにハンドリング操作を工夫した (図 4-12)。

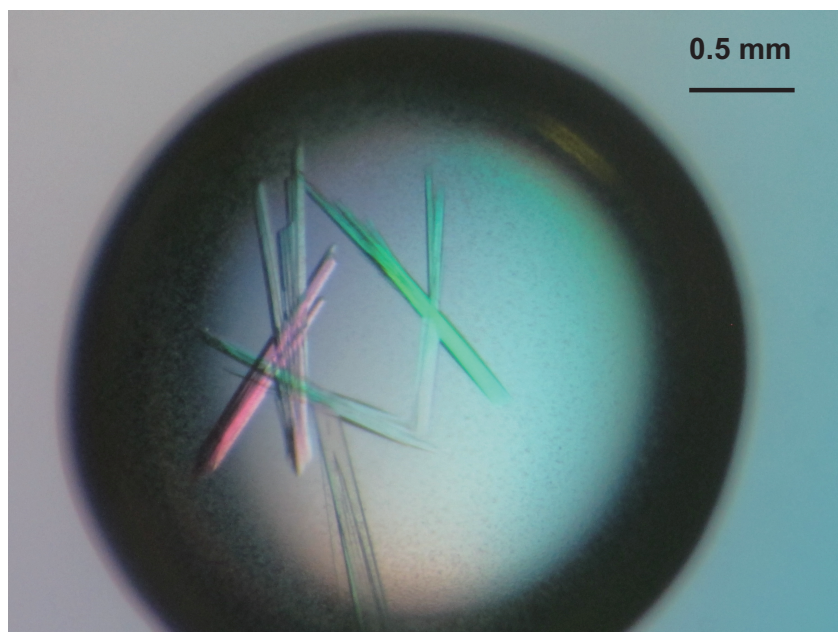


図 4-11. LigM (ネイティブ) 結晶

0.1 M Acetate pH 3.8, 0.2 M Mg acetate, 20 % (w/v) PEG 4000 によって得られた針状結晶。

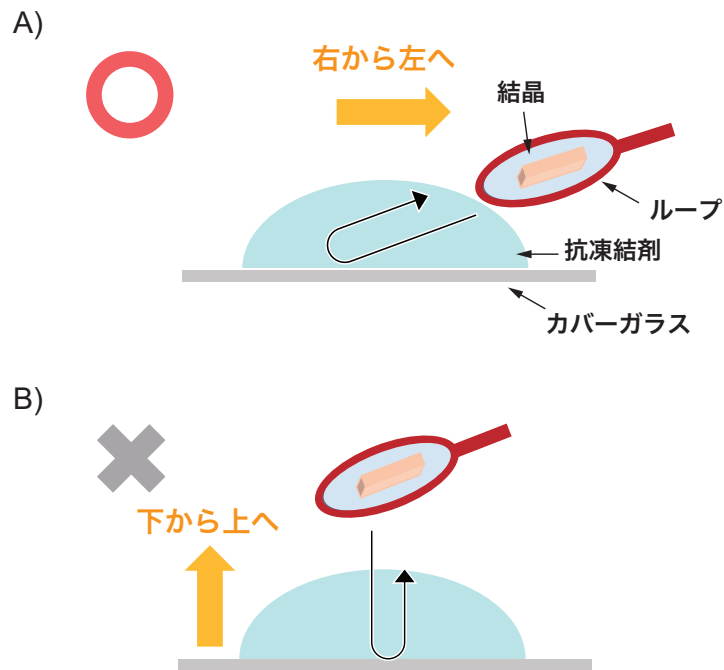


図 4-12. 結晶凍結時のハンドリング方法

S-SAD 法に使用する結晶を凍結する際には溶媒が少なくなるようハンドリングに注意した。

A) 推奨型。ループと抗凍結剤の液面とがなるべく並行になるように右から左へループを抜く。B) 非推奨型。抗凍結剤からループをすくうように、下から上へと抜く方法。この方法を用いると、多量の溶媒がループに乗ってしまう。

4-2.3 長波長 X 線を用いた回折強度データ収集

<目的>

LigM (ネイティブ)結晶を利用し、Photon Factory BL-1A にて波長 2.7Å における回折強度データの収集を行う。

<実験方法>

S-SAD 法による位相決定のための回折強度データの収集は、Photon Factory BL-1A にて波長 2.7 Å を使用して行った。しかし、データ収集時にはヘリウムチャンバーがまだ導入されておらず、X 線の減衰を軽減するため結晶-検出器間の距離を 60 mm 固定(最大分解能 2.43Å)にしなければならなかった。よって、2.4 Å 以上の分解能が得られても回折強度データの収集は 2.43 Å で行わざるを得なかった。検出器は PILATUS 2M-F を用いた。

また、データの S/N 比を上げるため、低い X 線透過率(%)で 0-360°分のデータセットを多く収集する方法を採用した。

Litho loop の付け根、真中、先端とスナップショットを取り、分解能を比較した。振動角 1.0°、露光時間 1.0 秒、X 線透過率 1% で、0-360°分の回折強度データを 7 か所 (Position A-G)から 30 周分収集した。回折強度データの処理は XDS (Kabsch, 2010) を用いて行った。また、異常分散法ではフリーデルの法則が成り立たないため ($|F(hkl)| \neq |F(\bar{h}\bar{k}\bar{l})|$)、XDS.INP の 'FRIEDEL'S_LAW=FALSE' とする必要がある。

<実験結果>

マウントされた LigM 結晶上で一番良い分解能が出る場所をスクリーニングしたところ、Litho loop の先端部分で分解能 2.6Å を示した。よって、Litho loop の先端を中心に回折強度データを収集した。LigM 結晶から得られた回折強度データについて XDS を用いて処理を行った。また、回折パターンを図 4-13 に示す。さらに CCP4 の POINTLESS (Evans and Murshudov, 2013)を用いて空間群を決定した。ラウエ群は $Pmmm$ であり、 a 軸上の反射は $h=2n$ 、 b 軸上の反射は $k=2n$ 、 c 軸上の反射は $l=2n$ のみに観測されたことから空間群は $P2_12_12_1$ であると決定した。また、格子定数は $a=112.7, b=126.5, c=155.1$ Å であった。

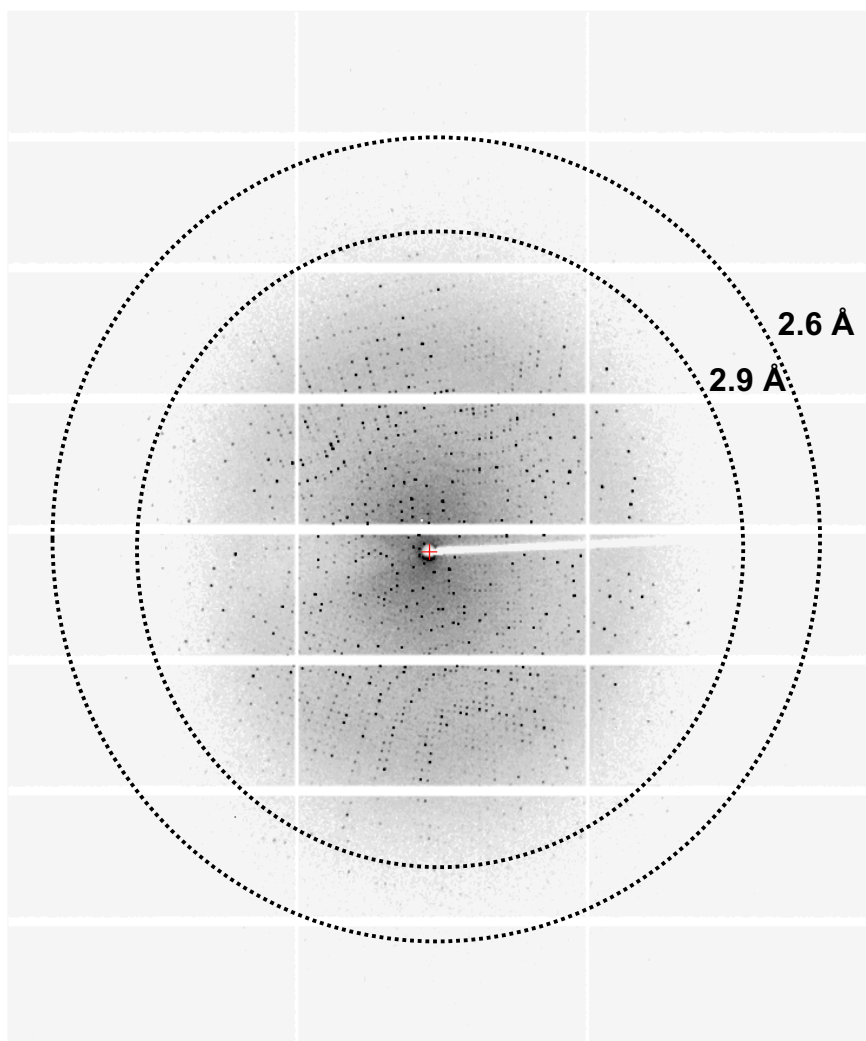


図 4-13. LigM (ネイティブ)結晶から得られた回折パターン

Photon Factory BL-1A にて波長 2.7000Å を用い、センタリングした LigM 結晶を 1.0° ずつ回転させながら、露光時間 1.0 秒、X 線透過率 1% の条件で回折強度データの収集を行った。内側の破線は 2.9Å 分解能、外側の破線は 2.6Å 分解能をそれぞれ示す。

4-2.4 SHELXC/D/E を用いた構造計算

<目的>

SHELXC/D/E (Sheldrick, 2010)を用いて、LigM中に存在するS原子座標を決定し、求めたS原子座標位置からLigM結晶からの回折データに関する初期位相が得られるかどうか検討した。

<実験方法>

基本的な実験方法やスケーリングの際の分解能設定の基準については、4-1. 重原子誘導体結晶を用いた位相決定に記述してある。

<実験結果>

*XSCALE*の結果、R-factorが、Highest shellで50%以下を示す条件を満たす分解能は、13-2.9Åの範囲であることがわかった(表4-11)。*SHLEXC*の結果から $\Delta F/\sigma(\Delta F)=1.2$ 程度の条件を満たす最高分解能は3.4Å程度であることがわかった。 $\Delta F/\sigma(\Delta F)$ を分解能に対してプロットしたものを図4-14に示す。溶媒含量の計算から、空間群 $P2_12_12_1$ にはLigMは4分子含まれると推定されるため、結晶構造中に含まれるS原子の数は合計56個となる。*SHELXD* (Schneider and Sheldrick, 2002)を用いて3.4Å分解能でS原子座標56個探すという10,000回の試行を行った結果、 CC_{all} と CC_{weak} の相関プロット(図4-15)で CC_{all} が30以上を示したが、プロット上において2つの群が確認できないことから、正しいS原子座標が得られている可能性は低いと判断した。また、その後の*SHELXE* (Sheldrick, 2002)における位相改良の段階でoriginalとinvertとの間に差が出なかった(図4-16)。よって、 $\Delta F/\sigma(\Delta F)=1.2$ 以上を示す分解能にて*SHELXD*を用いてS原子探索を行ったが、正しい解は得られなかった。

表 4-11. XSCALE の結果

RESOLUTION LIMIT	NUMBER OF REFLECTIONS			COMPLETENESS OF DATA	R-FACTOR	R-FACTOR COMPARED	I/SIGMA	R-meas	CC(1/2)	Anomal	SigAno	Nano	
	OBSERVED	UNIQUE	POSSIBLE		observed	expected							Corr
12.97	154549	760	1047	72.60%	8.80%	10.30%	154549	72.97	8.90%	100.0°	83°	3.459	315
9.17	420257	1913	1913	100.00%	9.60%	10.80%	420257	77.5	9.60%	100.0°	76°	2.851	840
7.49	560765	2496	2496	100.00%	12.60%	12.90%	560765	72.06	12.60%	100.0°	73°	2.736	1131
6.48	670916	2961	2961	100.00%	16.90%	17.20%	670916	59.01	16.90%	100.0°	75°	2.547	1363
5.8	714831	3334	3334	100.00%	18.80%	18.90%	714831	53.86	18.90%	100.0°	68°	2.364	1551
5.29	707577	3681	3681	100.00%	18.40%	18.20%	707577	52.44	18.40%	100.0°	65°	2.106	1722
4.9	838393	4016	4017	100.00%	16.30%	16.20%	838393	60.28	16.40%	100.0°	64°	2.162	1890
4.59	903430	4294	4303	99.80%	15.40%	15.10%	903429	64.52	15.40%	100.0°	61°	1.985	2029
4.32	864760	4566	4574	99.80%	15.40%	15.10%	864760	61.79	15.40%	100.0°	54°	1.873	2168
4.1	908748	4847	4894	99.00%	16.40%	16.20%	908748	57.07	16.40%	100.0°	53°	1.797	2305
3.91	998263	5044	5082	99.30%	18.50%	18.50%	998263	52.53	18.50%	100.0°	42°	1.673	2400
3.74	1064492	5295	5330	99.30%	21.00%	21.30%	1064491	47.11	21.10%	100.0°	39°	1.475	2531
3.6	1125219	5520	5586	98.80%	23.20%	23.70%	1125219	44.25	23.20%	100.0°	34°	1.389	2648
3.47	1166390	5725	5807	98.60%	24.30%	25.20%	1166390	41.52	24.30%	100.0°	35°	1.345	2748
3.35	1203716	5901	6008	98.20%	26.00%	26.70%	1203715	40.16	26.10%	100.0°	32°	1.329	2832
3.24	1091963	6044	6169	98.00%	29.30%	30.10%	1091961	34.04	29.30%	99.9°	31°	1.236	2903
3.15	1176174	6261	6410	97.70%	32.20%	33.50%	1176172	31.46	32.30%	99.9°	30°	1.201	3003
3.06	1233407	6397	6582	97.20%	35.10%	36.40%	1233406	29.47	35.20%	99.9°	26°	1.142	3071
2.98	1148927	6580	6803	96.70%	40.80%	42.30%	1148926	24.48	40.90%	99.9°	28°	1.111	3156
2.9	1183409	6637	6896	96.20%	47.00%	48.50%	1183407	21.46	47.10%	99.8°	31°	1.128	3191
total	18136186	92272	93893	98.30%	22.50%	22.90%	18136175	44.83	22.50%	100.0°	46°	1.606	43797

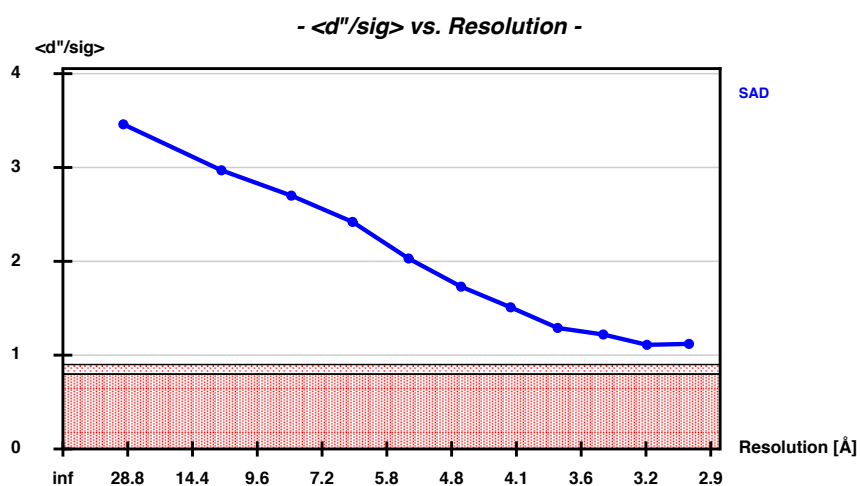


図 4-14. 分解能に対する $\Delta F/\sigma(\Delta F)$ のプロット

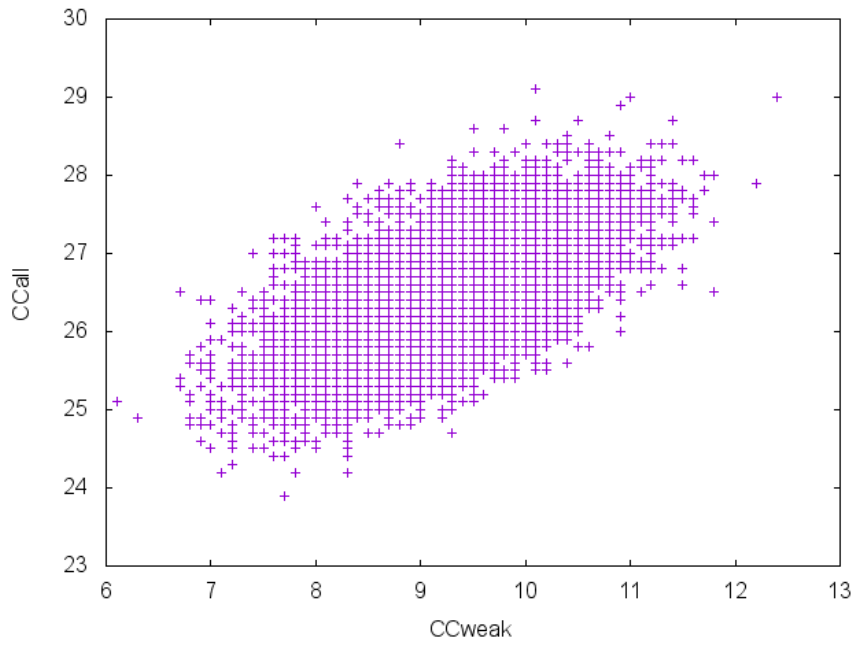


図 4-15. CC_{all} と CC_{weak} の相関プロット

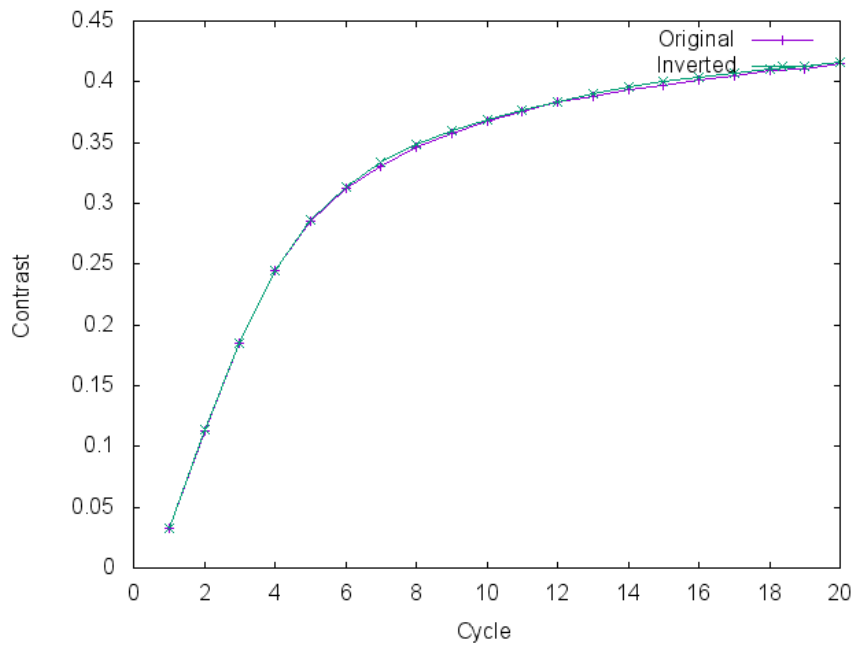


図 4-16. SHELXE における Cycle に対する Contrast のプロット

4-2.5 SHELXD (Grid Search)

異常散乱の差の構造因子に対する S/N 比である $\Delta F/\sigma(\Delta F)$ が 1.2 以上の基準で *SHELXD* をかけても S 原子座標位置を見つけることはできなかった。よって、*SHELXD* における分解能と S 原子の個数の組み合わせを幅広く試してみることにした(*SHELXD-Grid Search*) (Busby *et al.*, 2016) (Olieric *et al.*, 2016)。

<目的>

分解能と S 原子の個数の組み合わせを幅広く試すことで、S 原子座標位置をみつけることができるかどうか検証する。

<実験方法>

SHELXD の分解能を 2.9 から 4.0 まで 0.1Å、S 原子の個数を 12 個から 56 個まで、合計 96 通りの組み合わせをそれぞれ 10,000 回の試行で解析を行った。正しい S 原子座標位置が得られていると考えられる基準は、 CC_{all} と CC_{weak} の相関プロットにおいて 2 つの群が確認できるかどうかで判断した。

<実験結果>

SHELXD の分解能を 2.9 から 4.0 まで 0.1Å ずつ、S 原子の個数を 12 個から 56 個まで、合計 96 通りの組み合わせをそれぞれ 10,000 回の試行で解析を行った結果を図 4-17 に示す。横列が探索を行った S 原子の個数、縦列が分解能としている。図 4-17 に示した各 CC_{all} と CC_{weak} の相関プロットから、分解能 2.9 と 3.0Å においては S 原子数 24 個以上、分解能 3.3Å の場合は、S 原子数 42 個以上であれば *SHELXD* を使って S 原子の座標位置を正しく拾っていると判断した。よって、分解能と S 原子の探索個数の条件を細く設定することで、解を得られることができる場合があることがわかった。S 原子の個数が 12 個、14 個、及び分解能 3.4Å 以上ではいずれの組み合わせにおいても解を見つけることはできなかったため、図 4-17 からは省略してある。*SHELXD-Grid Search* で解が得られた条件では、 CC_{all} と CC_{weak} の相関プロットで CC_{all} 値が 30 以上であることが多かった。

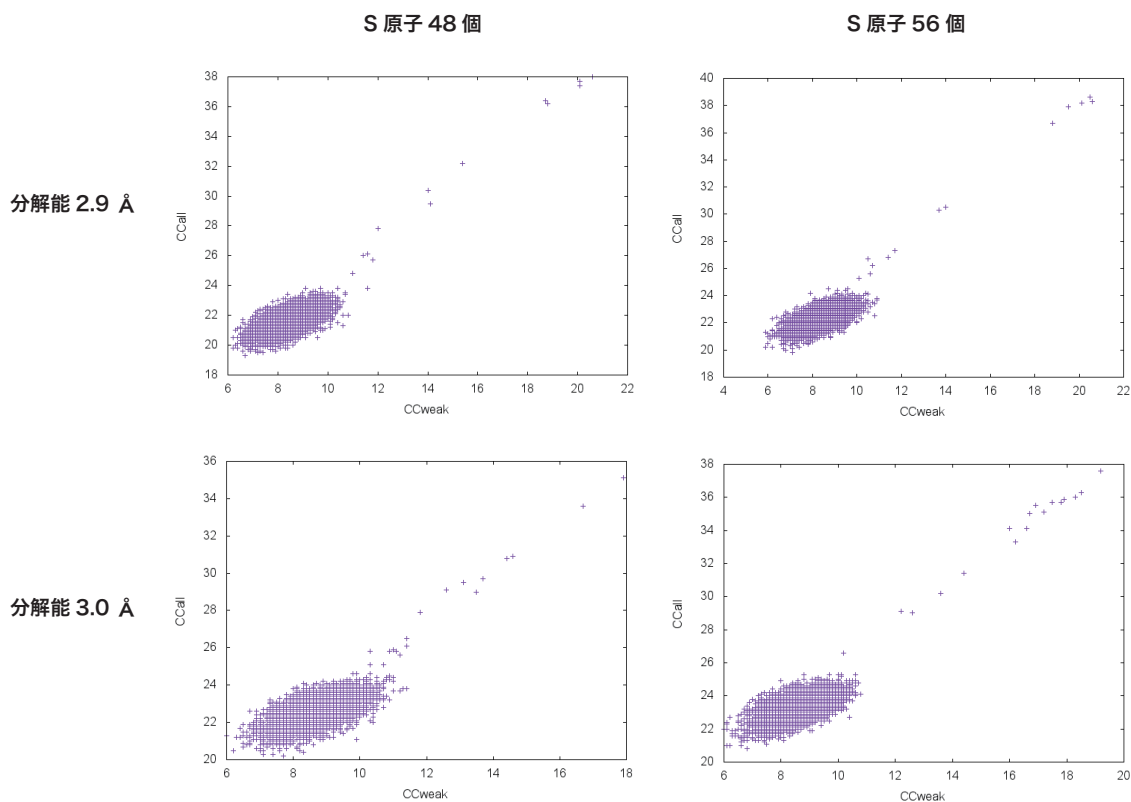


図 4-17. SHELXD-Grid Search の結果

SHELXD の分解能を 2.9 から 4.0 まで 0.1Å ずつ、S 原子の個数を 12 個から 56 個まで、合計 96 通りの組み合わせをそれぞれ 10,000 回の試行で *SHELXD* による解析を行った。その中から、sub-structure search が上手くいった典型例を表示する。CC_{all} と CC_{weak} の相関プロットを縦に分解能、横に S 原子の個数を表示し並べた。

4-2.6 autoSHARP を用いた構造計算

<目的>

4-1.5 と同様に、*SHELX* ではなく位相決定に *SHARP* を用いた場合、得られる位相角の精度が異なるかを検証する。

<実験方法>

autoSHARP による LigM のモデル構築ができるかどうか検討する。*autoSHARP* は ccp4i の Experimental Phasing から選択し、LigM のシーケンス配列及び、スケーリングを行った回折データ(.mtz 形式)を入力し、解析を行った。

<実験結果>

SHARP における Phasing statistic として、Cullis R-factor を表 4-12、Phasing power を表 4-13、FOM を表 4-14 にそれぞれ載せた。Phasing power は異常散乱の差の値に依存し、Overall で 0.951、高角側で 0.57 であった。FOM は Overall で 0.31 を示した。

SOLOMON による位相改良後の電子密度分布の様子を図 4-18 に示す。得られた電子密度の解釈は十分可能なものであった。位相角の精度が良いため、位相改良も正しい方向へ進んだと考えられる。

V_M 値の計算から、非対称単位に LigM は 4 分子含まれているため、471 残基×4 分子=1,884 残基分モデル構築を行うことができれば良い。*Arp/wArp* を用いたモデル構築の結果、全体の 96 % (1816/1884 残基中)のモデル構築することができた。

表 4-12. Cullis R-factor

BIN	Dmin	Dmax	ANOMALOUS			
			Nacen	Ncen	RC_acen	RC_cen
1	19.98	10.96	612	0	0.556	0
2	10.96	8.41	946	0	0.613	0
3	8.41	7.08	1185	0	0.577	0
4	7.08	6.23	1400	0	0.636	0
5	6.23	5.62	1577	0	0.651	0
6	5.62	5.17	1745	0	0.66	0
7	5.17	4.81	1891	0	0.676	0
8	4.81	4.51	2025	0	0.75	0
9	4.51	4.27	2159	0	0.747	0
10	4.27	4.06	2255	0	0.751	0
11	4.06	3.88	2402	0	0.786	0
12	3.88	3.72	2492	0	0.824	0
13	3.72	3.58	2589	0	0.839	0
14	3.58	3.45	2712	0	0.871	0
15	3.45	3.34	2783	0	0.861	0
16	3.34	3.23	2850	0	0.891	0
17	3.23	3.14	2947	0	0.901	0
18	3.14	3.05	3014	0	0.915	0
19	3.05	2.97	3094	0	0.922	0
20	2.97	2.9	3130	0	0.921	0
		OVERALL	43808	0	0.829	0

BIN : resolution bin number

Dmin: lowest resolution of the bin (in Angstrom)

Dmax: highest resolution of the bin (in Angstrom)

Nacen: Number of acentric reflexions in this bin

Ncen: Number of centric reflexions in this bin

RC_acen: R-Cullis for acentric reflexions in this bin

RC_cen : R-Cullis for centric reflexions in this bin

表 4-13. Phasing Power

BIN	Dmin	Dmax	ANOMALOUS			
			Nacen	Ncen	PP_acen	PP_cen
1	19.98	10.96	612	0	1.983	0
2	10.96	8.41	946	0	1.921	0
3	8.41	7.08	1185	0	2.033	0
4	7.08	6.23	1400	0	1.773	0
5	6.23	5.62	1577	0	1.706	0
6	5.62	5.17	1745	0	1.599	0
7	5.17	4.81	1891	0	1.504	0
8	4.81	4.51	2025	0	1.21	0
9	4.51	4.27	2159	0	1.191	0
10	4.27	4.06	2255	0	1.213	0
11	4.06	3.88	2402	0	1.048	0
12	3.88	3.72	2492	0	0.974	0
13	3.72	3.58	2589	0	0.919	0
14	3.58	3.45	2712	0	0.768	0
15	3.45	3.34	2783	0	0.79	0
16	3.34	3.23	2850	0	0.746	0
17	3.23	3.14	2947	0	0.688	0
18	3.14	3.05	3014	0	0.674	0
19	3.05	2.97	3094	0	0.617	0
20	2.97	2.9	3130	0	0.573	0
		OVERALL	43808	0	0.951	0

BIN : resolution bin number

Dmin : lowest resolution of the bin (in Angstrom)

Dmax : highest resolution of the bin (in Angstrom)

Nacen : Number of acentric reflexions in this bin

Ncen : Number of centric reflexions in this bin

PP_acen : phasing power for acentric reflexions in this bin

PP_cen : phasing power for centric reflexions in this bin

表 4-14. FOM

BIN	Dmin	Dmax	Nacen	FOMacen	Ncen	FOMcen
1	19.98	10.96	612	0.43218	229	0.12692
2	10.96	8.41	946	0.43263	225	0.1225
3	8.41	7.08	1185	0.43686	223	0.10605
4	7.08	6.23	1400	0.43265	232	0.12258
5	6.23	5.62	1577	0.41874	228	0.11345
6	5.62	5.17	1745	0.4067	233	0.08387
7	5.17	4.81	1891	0.39989	234	0.0746
8	4.81	4.51	2030	0.37824	223	0.08219
9	4.51	4.27	2163	0.36687	221	0.04835
10	4.27	4.06	2272	0.35609	225	0.0663
11	4.06	3.88	2410	0.33646	222	0.06397
12	3.88	3.72	2500	0.30479	213	0.05375
13	3.72	3.58	2594	0.28469	221	0.07286
14	3.58	3.45	2721	0.27696	209	0.05941
15	3.45	3.34	2799	0.27231	220	0.05525
16	3.34	3.23	2871	0.2516	206	0.0575
17	3.23	3.14	2973	0.24491	214	0.05536
18	3.14	3.05	3053	0.22855	216	0.06164
19	3.05	2.97	3144	0.22364	209	0.05749
20	2.97	2.9	3179	0.21892	198	0.08057
		OVERALL	44065	0.31018	4401	0.0788

BIN : resolution bin number

Dmin : lowest resolution of the bin (in Angstrom)

Dmax : highest resolution of the bin (in Angstrom)

Nacen : number of acentric reflexions in this bin

FOMacen : mean 2D figure of merit for acentric reflexions in this bin

Ncen : number of centric reflexions in this bin

FOMcen : mean 2D figure of merit for centric reflexions in this bin

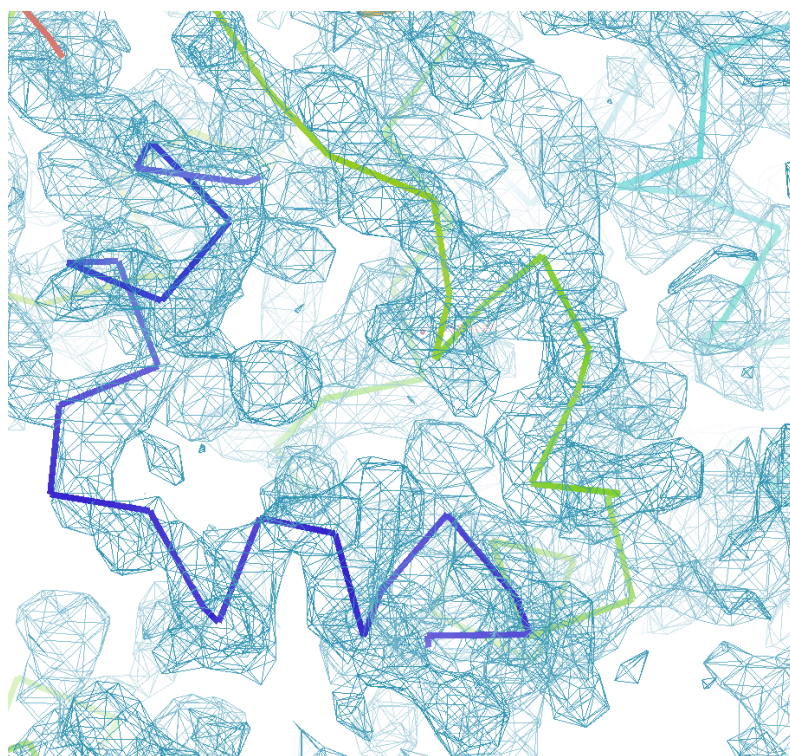


図 4-18. 位相改良後の電子密度分布

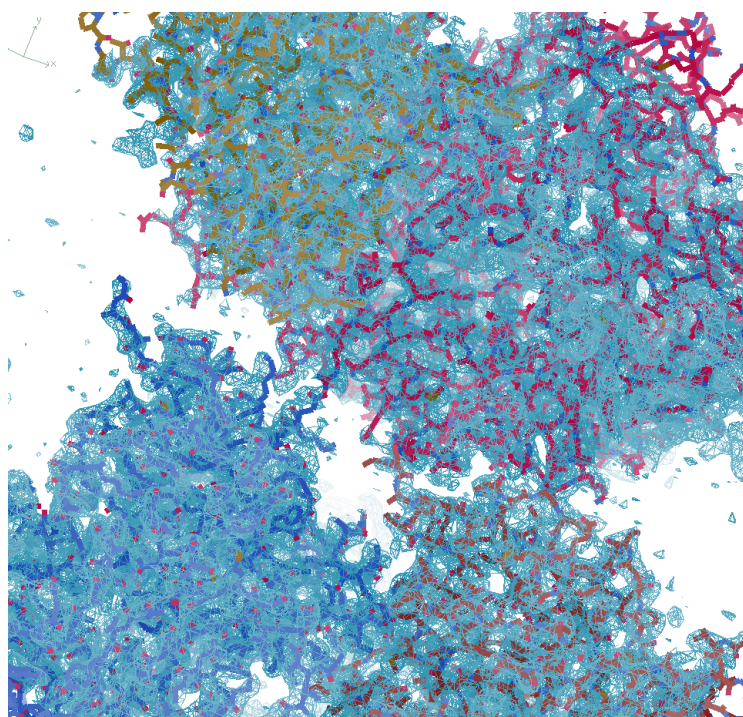


図 4-19. ARP/wARP によるモデル構築の結果

4章 考察

S-SAD 法による位相決定のため、Photon Factory BL-1A において波長 2.7000 Å を用いて、1 つの LigM 結晶から 30 データセットの回折強度データを収集した。30 データセットすべてを *XSCALE* によりスケールリングし、分解能と S 原子の個数の条件を幅広くふる *SHELXD-Grid Search* を行った。 CC_{all} と CC_{weak} の相関プロットにおいて、幾つかの条件で正しい S 原子座標が得られている可能性が高いと判断できる条件が幾つかあったが、*SHELXE* によるモデル構築はできなかつた。しかし、*SHELXD* において正しい S 原子座標が得られている可能性が高いと判断できる条件を用いて *autoSHARP* による位相決定を行ったところ、非対称単位に含まれる 4 分子ともモデルを構築することができた。同じ条件を用いた解析結果に違いが出るのは、プログラムの採用しているアルゴリズムの差によるものと考えられる。しかし、両プログラムのどの段階で違いが生じるのかについてはさらなる検討が必要であるため、今後の課題としたい。

第 5 章 複合体結晶構造解析

第5章 複合体結晶構造解析

立体構造の観点から、LigM の基質特異性や触媒反応機構などを論ずる場合、タンパク質の構造だけではなく反応を受ける基質分子、補酵素、基質アナログ分子が結合した LigM の立体構造も必要となる。すでに決定した基質非結合型の構造を用いて複合体結晶構造の決定を行った。LigM の基質分子は2種類あり、バニリン酸 (VNL)と 3-メチルガリック酸 (3MGA)である。また LigM は補酵素としてテトラヒドロ葉酸 (THF)を必要とする。よって LigM-VNL 複合体結晶、LigM-3MGA 複合体結晶、LigM-THF 複合体結晶をソーキング法によって用意する。また、基質分子と補酵素を LigM 結晶へソーキングした場合、酵素反応が進む可能性がある。よって、反応中間体(類似体)結晶を得る場合には、基質分子と補酵素分子のどちらかをアナログ分子と置き換えソーキングに使用する必要がある。

まず、基質分子をアナログ分子と置き換える場合、3つのパターンが考えられる。1つは VNL を基質とした場合の生成物であるプロトカテク酸 (PCA)をアナログ分子とする場合、2つ目は 3MGA を基質とした場合の生成物であるガリック酸 (MGA)をアナログ分子とする場合、3つ目は DesA の基質であるシリング酸(SYR)を用いる場合である。一方、補酵素分子をアナログ分子と置き換える場合には、5-CH₃-THF などを用いる。今回は PCA を基質アナログ分子として使用し、LigM-PCA-THF 複合体結晶をソーキング法によって用意することにした。

5-1. 複合体結晶の作製

<目的>

複合体結晶構造を決定し、基質や補酵素認識に関わるアミノ酸を同定するため、まずソーキング法によって、基質複合体、補酵素複合体および基質-補酵素複合体結晶を作製する。

<実験方法と結果>

すべての複合体結晶作製に使用した、標準母液及びクライオプロテクタントの組成は表 5-1 から表 5-4 に記載する。また、回折強度データ収集の条件は後述する。

5-1.1 LigM-VNL 複合体結晶の作製

基質非結合型の標準母液 (0.1 M Tris pH 8.0, 0.1 M LiCl, 25 % (w/v) PEG 8000) に、最終濃度が 10 mM になるように VNL を溶かし、10 mM VNL 入り標準母液を作製した。次に 10 mM VNL 入り標準母液へ LigM 結晶を 1-6 hr ソーキングを行った。さらに、10 mM VNL 入り標準母液に抗凍結剤として 20 % (v/v) ethyleneglycol を加え、クライオプロテクタントとし、ソーキング後の LigM 結晶を 10-20 sec 浸し LithoLoop を用いて凍結した。

VNL が LigM に結合しているか否かは回折強度データを収集し、位相決定後の電子密度図確認するまで判断することができない。よって、回折強度データの処理を行い VNL の結合が確認できなかった場合、VNL の濃度を 20, 30, 50 mM と VNL 濃度を上げた標準母液を用意し、再度回折強度データを収集する必要がある。しかし、10 mM VNL (nacalai) を含んだ標準母液に 6 hr ソーキングを行った結晶を用いて回折強度データ収集を行った結果、2Fo-Fc map において、活性中心に VNL と考えられる形の電子密度を 1.2σ 以上で確認することができたため、VNL 濃度を上げたソーキング実験は行わなかった。

5-1.2 LigM-3MGA 複合体結晶の作製

5-1.1 と同様の基準で、ソーキング法により LigM-3MGA 複合体結晶を作製した。10 mM 3MGA を用いたソーキング実験では、3MGA の電子密度を確認できなかった。よって、3MGA 濃度を 20 mM や 50 mM へ上げた標準母液を用意しソーキング実験を行い、再度回折強度データを収集した。最終的に 50 mM 3MGA (Astatech. Inc) を含んだ標準母液に Native 結晶を 2.5 hr ソーキングを行うことで LigM-3MGA 複合体結晶を得ることができた。

VNL とは異なり、10 mM 3MGA を用いてソーキングを行ったが 3MGA の活性中心への結合が確認できなかった。よって LigM への 3MGA の親和性は VNL に対するよりも低いことが予測された。

5-1.3 LigM-THF 複合体結晶の作製

5-1.1 と同様の基準で、ソーキング法により LigM-THF 複合体結晶を作製した。5 mM THF を用いたソーキング実験では、THF の電子密度を確認できなかった。よって、THF 濃度を段階的に上げた標準母液を用意し、ソーキング実験を行い、再度回折強度データを収集した。しかし、50 mM THF を用いると標準母液に THF が溶けず、黄色く濁り沈殿も析出してしまった。よって、沈殿が析出しない 30 mM THF が限界であると判断した。最終的に 20 mM THF (SIGMA)を含んだ標準母液に Native 結晶を 2.5 hr ソーキングを行うことで LigM-THF 複合体結晶を得ることができた。

5-1.4 LigM-PCA-THF 複合体結晶の作製

5-1.1 と同様の基準で、ソーキング法により反応中間体 (類似体) 結晶 (LigM-PCA-THF 複合体結晶)を作製した。5-1.3 での実験から、THF 濃度は高めに設定しソーキングを行った。まず、THF 濃度と PCA 濃度をそれぞれ 20 mM : 10 mM、30 mM : 10 mM と、THF 濃度の比率を上げてソーキングを試したが、THF の電子密度を確認できなかった。最終的に 50 mM THF (SIGMA)と 10 mM PCA (nacalai)を含んだ標準母液に Native 結晶を 2.5 hr ソーキングを行うことで LigM-PCA-THF 複合体結晶得ることができた。

表 5-1. LigM-VNL 複合体結晶作製の条件

標準母液	0.1 M Tris pH 8.0, 0.1 M LiCl, 25 % (w/v) PEG 8000, 10 mM VNL
クライオプロテクタント	0.1 M Tris pH 8.0, 0.1 M LiCl, 25 % (w/v) PEG 8000, 10 mM VNL, 20 % (v/v) ethyleneglycol

表 5-2. LigM-3MGA 複合体結晶作製の条件

標準母液	0.1 M Tris pH 8.5, 0.1 M LiCl, 30 % (w/v) PEG 8000, 50 mM 3MGA
クライオプロテクタント	0.1 M Tris pH 8.5, 0.1 M LiCl, 30 % (w/v) PEG 8000, 50 mM 3 MGA, 20 % (v/v) ethyleneglycol

表 5-3. LigM-THF 複合体結晶の作製条件

標準母液	0.1 M Tris pH 8.5, 0.1 M LiCl, 30 % (w/v) PEG 8000, 20 mM THF
クライオプロテクタント	0.1 M Tris pH 8.5, 0.1 M LiCl, 30 % (w/v) PEG 8000, 20 mM THF, 20 % (v/v) ethyleneglycol

表 5-4. LigM-PCA-THF 複合体結晶の作製条件

標準母液	0.1 M Tris pH 8.5, 0.1 M LiCl, 25 % (w/v) PEG 8000, 10 mM PCA, 50 mM THF
クライオプロテクタント	0.1 M Tris pH 8.5, 0.1 M LiCl, 25 % (w/v) PEG 8000, 10 mM VNL, 50 mM THF, 20 % (v/v) ethyleneglycol

5-2. 複合体結晶の回折強度データの収集と構造決定

<目的>

シンクロトロン放射光施設において、複合体結晶の回折強度データを収集する。さらに、基質非結合型の結晶構造を用いて、分子置換法により複合体結晶構造を決定する。

<実験方法>

5-1. において作製した複合体結晶の回折強度データを収集した。各複合体結晶構造の回折強度データの収集条件はそれぞれ後述する。回折強度データは *XDS* を用いて処理を行い、*AIMLESS* (Evans and Murshudov, 2013) を用いてスケーリングを行った。リガンドの活性中心への結合をより詳細に知るため、スケーリングの分解能はできるだけ高分解能の条件 (*OuterShell* での $I/\sigma(I) > 1.5$) で分解能カットを行った。

分子置換法に用いる初期モデルは、すでに決定してある基質非結合型の *LigM* の構造を用いた。基質非結合型 *LigM* は、空間群 $P2_12_12$ であり、非対称単位に 3 分子 *LigM* が含まれていた。しかし、複合体結晶構造の 3 分子の配向が、基質非結合型と同じとは限らないので、分子置換を行う際の初期モデルは 1 分子分にしておく必要がある。よって、3 分子中の *chian A* を用い、それを初期モデルとして使用した。

分子置換法は、*PHENIX* の *phaserMR* (McCoy et al., 2007) を用いた。複合体結晶であることを確認するため、*2Fo-Fc map* において活性中心にリガンドの電子密度が見えるか否かで複合体結晶構造であるかないかを判断した。

5-2.1 *LigM*- VNL 複合体結晶の回折強度データ収集

5-1.1 の方法で作製した *LigM*- VNL 複合体結晶を用いて、5 つの回折強度データを収集した。回折強度データ処理及び、*PHENIX* の *phaserMR* による分子置換を行った。1 回目の精密化後、*2Fo-Fc map* において 1.2σ 以上で VNL と思われる電子密度を確認することができた。その後、VNL を入れずに数回精密化を行ったのち、VNL の座標を入れ更に精密化を行った。このように VNL の結合確認を行った上で、*2Fo-Fc map* において 1.2σ 以上の電子密度が確認され、かつ最も分解能が高いデータは *ligm302* のデータセットであった (図 5-1)。

ligm302 の回折強度データは、Advanced Photon Source (APS) 23 ID-B (イリノイ州 アルゴン アメリカ合衆国)にて収集した。波長 1.0332 \AA 、振動角 0.5° 露光時間 1.0 sec の条件で 270 枚の反射データを収集した。結晶の晶系は *orthorhombic* に属し、空間群 $P2_12_12$ 、格子定数

は $a = 103, b = 118, c = 130 \text{ \AA}$ であった。分解能は 1.80 \AA で Completeness = 97.4 (81.2) %, $R_{meas} = 9.6 (70.0) \%$ であった (表 5-5) (カッコ内の数字は、Inner Shell での値を示す)。

また、回折強度データ測定を行ったすべてのデータを付録に載せた。

5-2.2 LigM- 3MGA 複合体結晶の回折強度データ収集

5-1.2 の方法で作製した LigM- 3MGA 複合体結晶を用いて、8つの回折強度データを収集した。回折強度データの処理及び、PHENIX の *phaserMR* による分子置換を行った。1回目の精密化後、2Fo-Fc map において 1.2σ 以上で 3 MGA と思われる電子密度を確認することができた。その後、3 MGA を入れずに数回精密化を行ったのち、3 MGA の座標を入れ更に精密化を行った。このように 3 MGA の結合確認を行った上で、2Fo-Fc map において 1.2σ 以上の電子密度が確認され、かつ最も分解能が高いデータは ligm383 のデータセットであった (図 5-1)。

ligm383 の回折強度データは、Photon Factory AR NE-3A (PF, つくば市 日本)にて収集した。波長 1.0000 \AA にて、振動角 0.5° 、露光時間 1.0 sec の条件で $0-360^\circ$ 分、720 枚の反射データを収集した。結晶の晶系は orthorhombic に属し、空間群 $P2_12_12$ 、格子定数は $a = 104, b = 118, c = 132 \text{ \AA}$ であった。分解能は 2.15 \AA で Completeness = 99.7 (97.3) %, $R_{meas} = 20.1 (133.1) \%$ であった (表 5-5) (カッコ内の数字は、Inner Shell での値を示す)。

また、回折強度データ測定を行ったすべてのデータを付録に載せた。

5-2.3 LigM- THF 複合体結晶の回折強度データ収集

5-1.3 の方法で作製した LigM- THF 複合体結晶を用いて、4つの回折強度データを収集した。回折強度データの処理及び、PHENIX の *phaserMR* による分子置換を行った。1回目の精密化後、2Fo-Fc map において 1.2σ 以上で THF と思われる電子密度を確認することができた。しかし、その電子密度がはっきりと確認できたのは chain B だけであった。THF を入れずに数回精密化を行ったのち、THF の座標を入れ更に精密化を行った。このように THF の結合確認を行った上で、2Fo-Fc map において 1.2σ 以上の電子密度が確認され、かつ最も分解能が高いデータは ligm312 のデータセットであった (図 5-1)。

ligm312 の回折強度データは、National Synchrotron Radiation Research Center 15 A (NSRRC, 新竹市 台湾)にて、千田研究室の牧尾 尚能 博士に収集を行っていただいた。波長 1.0000 \AA にて、振動角 0.5° 、露光時間 1.0 sec の条件で $0-180^\circ$ 分、360 枚の反射データを収集した。結晶の晶系は orthorhombic に属し、空間群 $P2_12_12$ 、格子定数は $a = 102, b = 118, c = 129 \text{ \AA}$ であった。分解能は 1.90 \AA で Completeness = 100.0 (100.0) %, $R_{meas} = 14.6 (142.9) \%$ であった (表 5-5) (カッコ内の数字は、Inner Shell での値を示す)。

また、回折強度データ測定を行ったすべてのデータを付録に載せた。

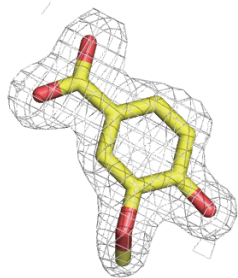
5-2.4 LigM- PCA-THF 複合体結晶の回折強度データ収集

5-1.4 の方法で作製した LigM- PCA-THF 複合体結晶を用いて、5 つの回折強度データを収集した。回折強度データの処理及び、PHENIX の *phaserMR* による分子置換を行った。1 回目の精密化後、2Fo-Fc map において 1.2σ 以上で PCA と思われる電子密度を確認することができた。THF について、 1.2σ の基準では、構造全体の電子密度がはっきり見えてはいなかったが、THF が結合していると判断できる電子密度が見えていたため、そのまま精密化を進めた。PCA 及び THF を入れずに数回精密化を行ったのち、PCA と THF の座標を入れ更に精密化を行った。このように PCA と THF の結合確認を行った上で、2Fo-Fc map において $1.0 - 1.2\sigma$ 以上の電子密度が確認され、かつ最も分解能が高いデータは ligm387 のデータセットであった (図 5-1)。

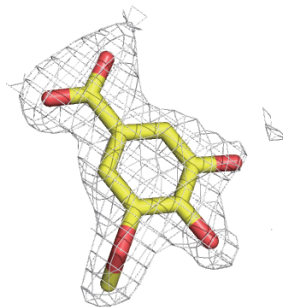
ligm387 の回折強度データは、Photon Factory AR NE-3A (PF, つくば市 日本)にて、収集した。波長 1.0000 \AA にて、振動角 0.2° 、露光時間 0.5 sec の条件で $0-360^\circ$ 分、1,800 枚の反射データを収集した。結晶の晶系は orthorhombic に属し、空間群 $P2_12_12$ 、格子定数は $a = 103, b = 118, c = 132\text{ \AA}$ であった。分解能は 1.90 \AA で Completeness = 100.0 (100.0) %, $R_{meas} = 14.5$ (182.3) %であった (表 5-5) (カッコ内の数字は、Inner Shell での値を示す)。

また、回折強度データ測定を行ったすべてのデータを付録に載せた。

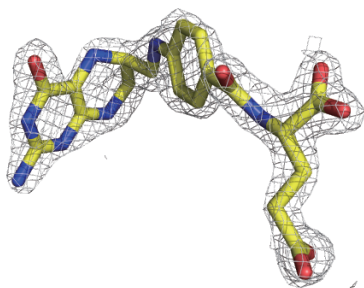
A)



B)



C)



D)

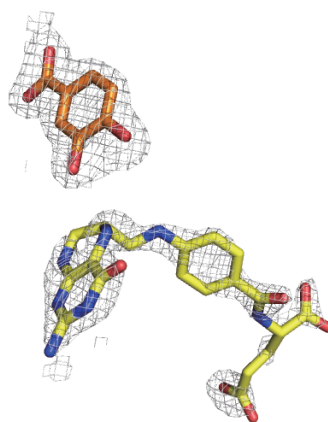


図 5-1. 2Fo-Fc map におけるリガンド結合の様子 (1.2 σ)

A) LigM-VNL 複合体結晶, B) LigM-3MGA 複合体結晶, C) LigM-THF 複合体結晶, D) LigM-PCA-THF 複合体結晶を示す。

5-3. LigM 結晶の高分解能回折強度データ収集

<目的>

Pt-LigM 誘導体結晶を用いた初期位相決定では、重原子試薬による結晶へのダメージが大きいため、分解能 3.0 Å の結晶構造しか得られなかった。複合体結晶構造と基質非結合型結晶構造との比較を行うためには、複合体結晶構造の分解能と同程度の分解能の結晶構造を決定する必要がある。よって、基質非結合型結晶の高分解能回折強度データの収集を行った。

<実験方法>

基質非結合型結晶の高分解能回折強度データを収集することを試みた。回折強度データは XDS を用いて処理を行い、AIMLESS を用いてスケーリングを行った。スケーリングの分解能はできるだけ高分解能の条件 (OuterShell での $I/\sigma(I) > 1.5$) で分解能カットを行った。

<実験結果>

LigM 結晶を用いて、14 つの回折強度データを収集した。回折強度データの処理の結果、ligm399 が最も高い分解能を示した。

ligm399 の回折強度データは、Photon Factory BL-17A (PF, つくば市 日本)において収集した。波長 0.9800 Å にて、振動角 0.2°、露光時間 0.2 sec の条件で 0-360°分、1800 枚の反射データを収集した。分解能は 1.85Å で Completeness= 100.0 (99.9) %, R_{meas} =16.3 (193.3) %であった (表 5-5) (カッコ内の数字は、Inner Shell での値を示す)。

また、回折強度データ測定を行ったすべてのデータを付録に載せた。

表 5-5. 結晶学的パラメーター

	Substrate free	LigM-VNL	LigM-3MGA
Data name	ligm399	ligm302	ligm383
<i>Data collection</i>			
Light source	PF BL-17A	APS 23ID-B	PF AR NE3A
Wavelength (Å)	0.9800	1.0322	1.0000
Temperature (K)	95	95	95
Detector	PILATUS 3S6M	MARmosaic CCD 300	PILATUS 2MF
Crystal-detector distance (mm)	344.4	250	284.6
Rotation range per image (°)	0.2	0.5	0.5
Exposure time per image (s)	0.2	1.0	1.0
Total rotation range (°)	0-360	0-135	0-360
Space group	$P2_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12$
Cell dimensions (Å)			
a, b, c (Å)	102.00, 118.60, 128.84	103.03, 118.05, 130.22	104.06, 118.07, 132.82
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	49.50-1.85	47.82-1.80	48.44-2.15
Highest resolution shell	1.88-1.85	1.83-1.80	2.19-2.15
R_{meas}	0.163 (0.1933)	0.096 (0.700)	0.201 (1.331)
I / σ	13.7 (1.6)	12.1 (2.0)	13.2 (1.8)
Completeness (%)	100.0 (99.9)	97.4 (81.2)	99.7 (97.3)
Redundancy	13.4 (13.7)	5.3 (3.6)	10.5 (9.1)

	LigM-THF	LigM-PCA-THF
Data name	ligm312	ligm387
Data collection		
Light source	NSRRC BL15A	PF AR NE3A
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000
Temperature (K)	95	95
Detector	MX300HS	PILATUS 2M-F
Crystal-detector distance (mm)	200	215.5
Rotation range per image (°)	0.5	0.2
Exposure time per image (s)	1.0	0.5
Total rotation range (°)	0-180	0-360
Space group	$P2_12_12$	$P2_12_12$
Cell dimensions (Å)		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	102.77, 117.89, 129.73	103.80, 118.37, 132.33
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	47.7-1.90	48.32-1.90
Highest resolution shell	1.93-1.90	1.93-1.90
R_{meas}	0.146 (1.429)	0.145 (1.823)
I / σ	12.2 (1.6)	14.4 (1.8)
Completeness (%)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundancy	7.5 (7.5)	13.3 (13.5)

5-4. 空間群の異なる結晶 ($P2_1$, $P2_12_12$, $P3_12_1$ ($P3_22_1$)) の位相決定

<目的>

S-SAD 法による位相決定のための結晶化条件のスクリーニングの過程で、位相決定に成功した空間群 $P2_12_12_1$ 以外の空間群 $P2_1$, $P2_12_12$, $P3_12_1$ ($P3_22_1$) の結晶の回折強度データの収集も行っていった。現在のところ、これらの空間群の回折強度データについては S-SAD 法による構造決定には至っていないが、分子置換法による位相決定を行った。

<実験方法>

LigM の立体構造を用いて、分子置換法により 3 つの空間群 $P2_1$, $P2_12_12$, $P3_12_1$ ($P3_22_1$) の結晶構造についてそれぞれ決定を行った。分子置換のプログラムは、PHENIX の *phaserMR* を用いた。

<実験結果>

各空間群の回折強度データより、Matthews の式から見積もられる非対称単位中の分子数と溶媒含量、および格子定数について表 5-6 に記載した。PHENIX の *phaser MR* を利用し、他 3 つの空間群についての位相を決定した (図 5-2, 5-3, 5-4)。

表 5-6. 各空間群の格子定数と溶媒含量

空間群	$P2_1$	$P2_12_12$	$P3_12_1$ ($P3_22_1$)
格子定数 (Å)	$a = 77, b = 122, c = 112, \beta = 91^\circ$	$a = 103, b = 117, c = 132, \alpha = \beta = \gamma = 91^\circ$	$a = 112, b = 112, c = 220, \gamma = 120^\circ$
非対称単位中の分子数	4	3	2
V_M	2.56	2.66	3.89
溶媒含量 (%)	52	53	68

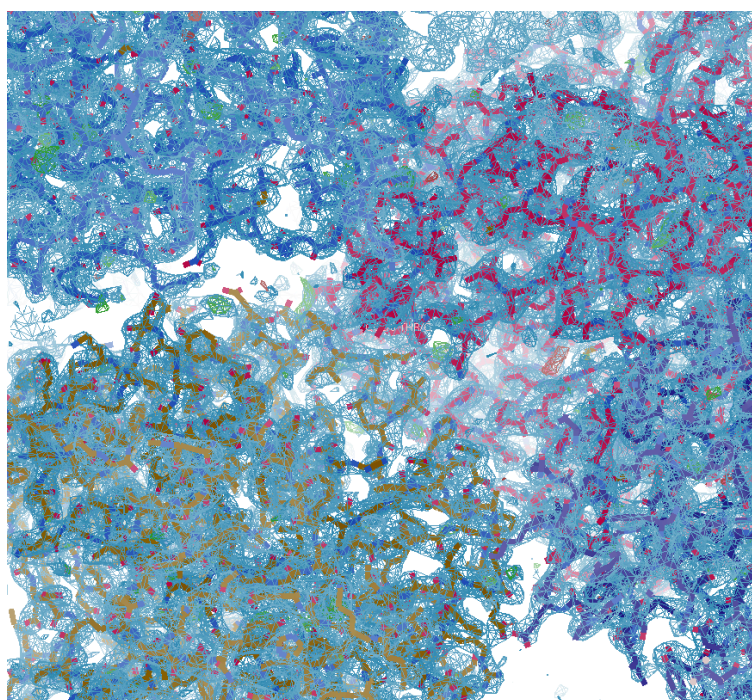


図 5-2. 空間群 $P2_1$ の LigM の結晶構造

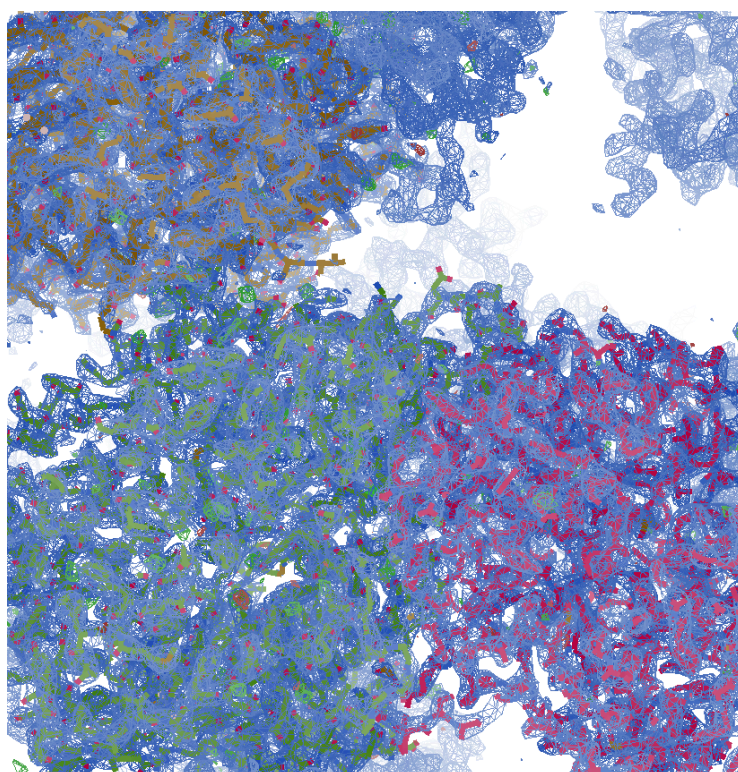


図 5-3. 空間群 $P2_1,2,2$ の LigM の結晶構造

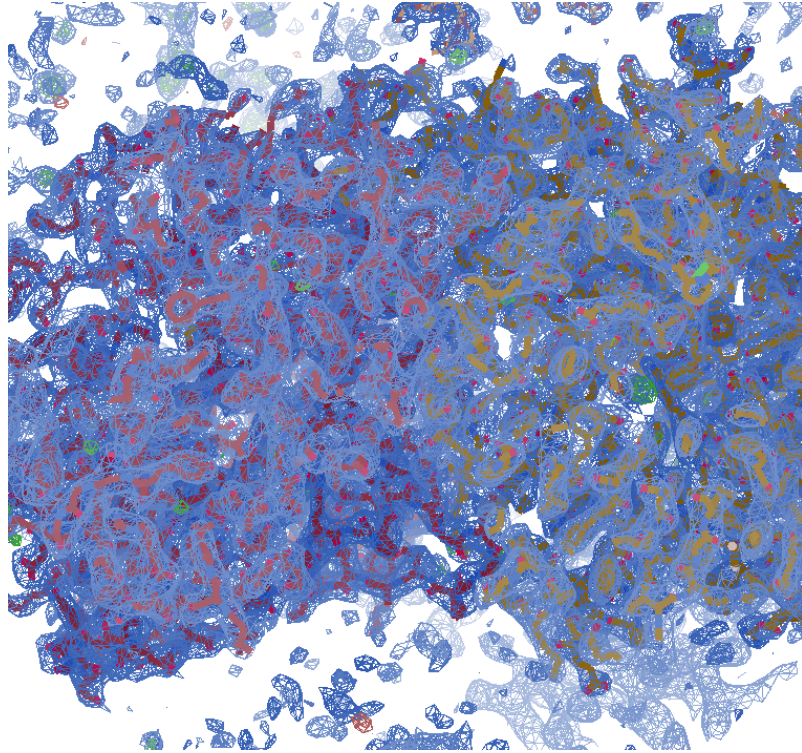


図 5-4 . 空間群 $P3_121$ の LigM の結晶構造

第 6 章 構造精密化

第 6 章 構造精密化

構造精密化の正しさは信頼度因子 R 値 (R_{work} , R_{free}) を指標とし確認を行う。電子密度は、位相角と構造因子 F_{obs} を計算することで求めることができる。よって、構造が決定されればその原子座標から、 F_{calc} を逆算することができる。理想的には実験で得られた構造因子 F_{obs} と得られた構造から逆算した F_{calc} は等しくなるはずである。構造精密化は、 F_{obs} と F_{calc} の差を近づけるように最尤法を用いて原子座標の精密化を行う。しかし、精密化では、精密化すべきパラメーターの数に比べ、測定値 (F_{obs}) の数が十分ではないため、いわゆる *over fitting* の問題が起こり、モデルの改良が行われず R_{work} だけを下げたおそれが常にある。そこで少数の反射(5% 程度)のデータをランダムに抽出し、精密化から除く。これらの反射だけを使って計算した R 因子を R_{free} という (Brünger, 1993; 1992)。 R_{free} は精密化に”使っていない”反射から計算されるため、 R_{free} の減少はモデルの改良に関する偏りのない見積もりとなる。データの分解能によるが、最終的に $R_{work}=20\%$, $R_{free}=25\%$ 程度であればよく精密化された正しい構造であると言われている。

6-1. 構造精密化

<目的>

分子置換法により決定した基質非結合型と全ての複合体結晶構造の精密化を行う

<実験方法>

構造精密化は PHENIX の *phenix.refine* (Afonine et al., 2012)により行った。精密化の結果より得られた電子密度マップは、2Fo-Fc map を 1.2σ 、Fo-Fc map を 3.5σ で表示し、以下の基準によりモデルの修正を行った。1. 電子密度がはっきりしないまたは見えない部分にアミノ酸残基を入れない。2. 電子密度の形により alternative 構造がある場合には、占有率 50% ずつにして構造を入れる。3. Fo-Fc map の表示基準である 3.5σ において、電子密度の形が丸いと判断できる大きさのものを水分子の電子密度であると判断する。

分子置換法による位相決定後の最初の精密化は Rigid body refinement を行うことで、大まかに全体の構造を精密化した後、上記基準に基づいて COOT により修正を行った。2-3 回精密化を行った後は、モデルバイアスを減少させるため Simulated annealing などの精密化を行った。

また、複合体結晶構造において、VNL、3MGA、THF や PCA のジオメトリファイル(CIF ファイル)は、PHENIX の *Ready Set* によりそれぞれ作成した (付録参照)。リガンド分子は、まず精密化を 2-3 回行いリガンドの電子密度を確認後、基質を導入して再度精密化を進めた。初期の水分子の同定には COOT の Find water を用い、その後の水分子の同定には精密化時の基準を用いて手動で同定した。

精密化した全ての LigM の結晶構造における幾何学的状態 (ジオメトリー)は、PHENIX の *MolProbity* (Lovell et al., 2003)にて確認を行った。

<実験結果と考察>

6-1.1 基質非結合型晶構造の精密化

PHENIX の *phenix.refine* による構造精密化の結果、分解能 1.85 Å で $R_{work} = 0.215$, $R_{free} = 0.247$ となったところで精密化を終了した。結晶学的精密化のまとめを表 6-1 に示す。また、PHENIX の *MolProbity* による Ramachandran analysis の結果、主鎖の結合距離及び結合角度が典型的な値から大きく外れていないことを確認した (図 6-1)。

6-1.2 LigM-VNL 複合体結晶構造の精密化

PHENIX の *phenix.refine* による構造精密化の結果、分解能 1.80 Å で $R_{work} = 0.173$, $R_{free} = 0.198$ となったところで精密化を終了した。結晶学的精密化のまとめを表 6-1 に示す。また、PHENIX の *MolProbity* による Ramachandran analysis の結果、主鎖の結合距離及び結合角度が典型的な値から大きく外れていないことを確認した (図 6-1)。

6-1.3 LigM-3MGA 複合体結晶構造の精密化

PHENIX の *phenix.refine* による構造精密化の結果、分解能 2.15 Å で $R_{work} = 0.234$, $R_{free} = 0.272$ となったところで精密化を終了した。結晶学的精密化のまとめを表 6-1 に示す。また、PHENIX の *MolProbity* による Ramachandran analysis の結果、主鎖の結合距離及び結合角度が典型的な値から大きく外れていないことを確認した (図 6-1)。

6-1.4 LigM-THF 複合体結晶構造の精密化

PHENIX の *phenix.refine* による構造精密化の結果、分解能 1.90 Å で $R_{work} = 0.186$, $R_{free} = 0.227$ となったところで精密化を終了した。結晶学的精密化のまとめを表 6-1 に示す。また、PHENIX の *MolProbity* による Ramachandran analysis の結果、主鎖の結合距離及び結合角度が典型的な値から大きく外れていないことを確認した (図 6-1)。

6-1.5 LigM-PCA-THF 複合体結晶構造の精密化

PHENIX の *phenix.refine* による構造精密化の結果、分解能 1.90 Å で $R_{work} = 0.217$, $R_{free} = 0.245$ となったところで精密化を終了した。結晶学的精密化のまとめを表 6-1 に示す。PHENIX の *MolProbity* による Ramachandran analysis の結果、主鎖の結合距離及び結合角度が典型的な値から大きく外れていないことを確認した (図 6-1)。

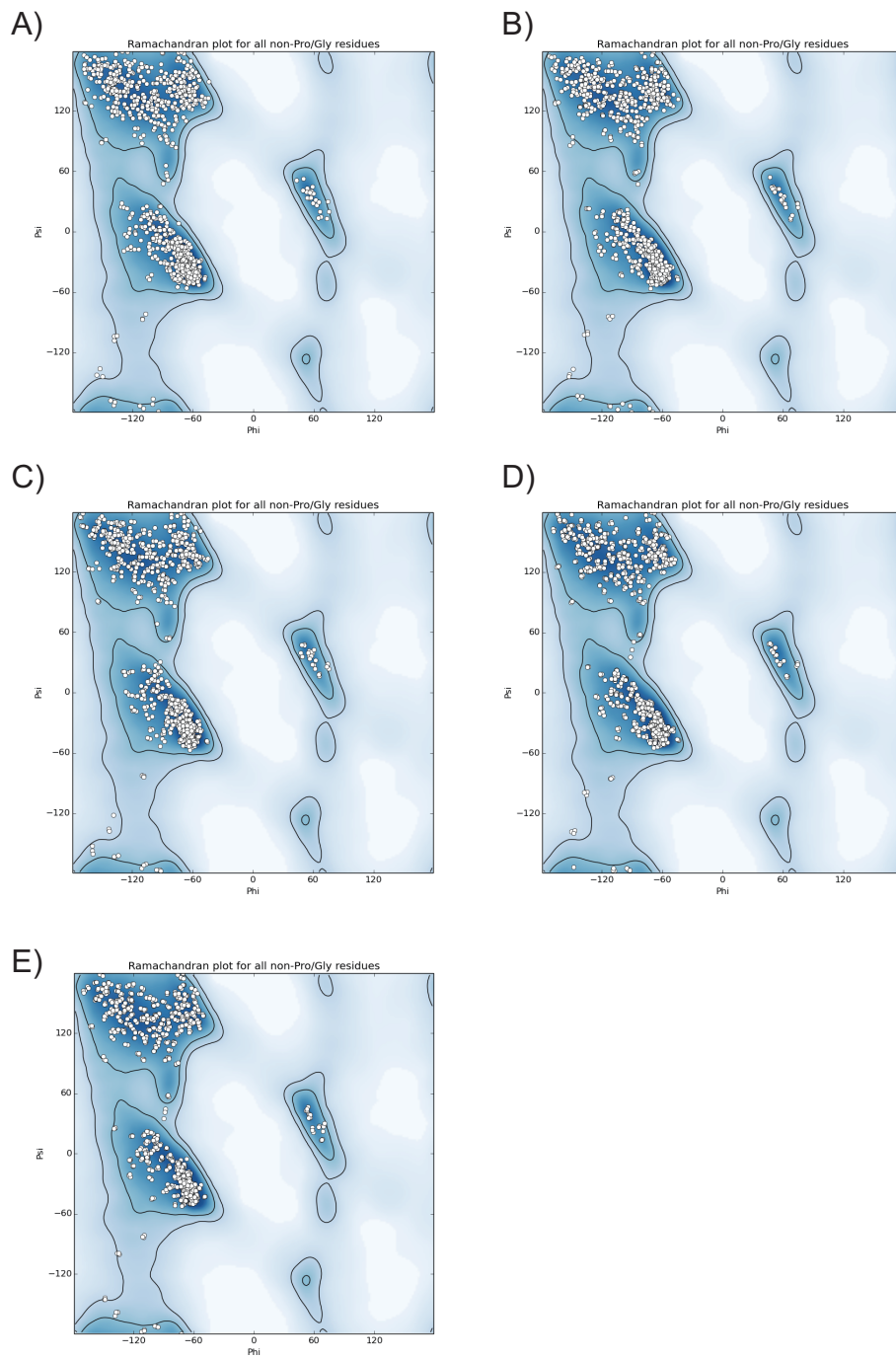


図 6-1. MolProbity (Lovell *et al.*, 2003)による Ramachandran Plot

A) 基質非結合型, B) LigM-VNL 複合体, C) LigM-3MGA 複合体, D) LigM-THF 複合体, E) LigM-PCA-THF 複合体をそれぞれ示す。Outlier に入るアミノ酸残基がないことを確認した。

表 6-1. 結晶学的精密化のまとめ

Data name	Substrate free	LigM-VNL	LigM-3MGA
	ligm399	ligm302	ligm383
<i>Refinement</i>			
Resolution (Å)	49.50-1.85	47.82-1.80	48.44-2.15
No. reflections	257,859	282,006	171,439
R_{work}	0.215	0.173	0.234
R_{free}	0.247	0.198	0.272
No. atoms			
Protein	10,576	10,720	10,516
Ligand/ion	36/-	116/4	78/0
Water	374	1074	234
B -factors (Å ²)			
Protein	30.5	23.7	35.1
Ligand/ion	29.0/-	27.2/35.9	29.9/-
Water	26.24	29.75	21.76
Rms deviations			
Bond lengths (Å)	0.007	0.007	0.008
Bond angles (deg)	0.889	0.869	1.013
PDB ID			

	LigM-THF	LigM-PCA-THF
Data name	ligm312	ligm387
	<i>Refinement</i>	
Resolution (Å)	47.7-1.90	48.32-1.90
No. reflections	239,653	248,153
R_{work}	0.186	0.217
R_{free}	0.227	0.245
No. atoms		
Protein	10,712	10,619
Ligand/ion	103/-	148/-
Water	1081	244
B -factors (Å ²)		
Protein	30.5	36.7
Ligand/ion	41.1/-	43.5/-
Water	32.9	28.9
Rms deviations		
Bond lengths (Å)	0.007	0.006
Bond angles (deg)	1.013	0.844
PDB ID		

6-2. 活性中心に結合している低分子化合物の確認

<目的>

精密化終了後の構造を用いて、すべての複合体結晶構造 (LigM-VNL 複合体結晶構造、LigM-3MGA 複合体結晶構造、LigM-THF 複合体結晶構造および LigM-PCA-THF 複合体結晶構造) において、それぞれのリガンド分子が活性中心に結合しているかどうか omit map を作製することで確認した。構造精密化は、構造モデルから計算された位相を用いるために、間違った構造を置いたとしてもそれを支持する電子密度が得られてしまう場合がある。omit map はその影響を抑えることができるため、リガンド結合の有無を確認するために計算される。

<実験方法>

すべての複合体結晶構造 (LigM-VNL 複合体結晶構造、LigM-3MGA 複合体結晶構造、LigM-THF 複合体結晶構造および LigM-PCA-THF 複合体結晶構造) において、それぞれの低分子化合物が結合しているかを確かめるために *phenix.refine* を用いて omit map を作成した。omit map とは、構造の一部を削除した位相を与えて求めた電子密度のことを示す。よって、それぞれの複合体結晶構造の PDB から、低分子化合物の座標のみを抜き出し、その PDB をインプットとし、simulated annealing を使用し精密化を行った。

<実験結果と考察>

それぞれの複合体結晶構造の PDB から低分子化合物の座標を除き *phenix.refine* による精密化を行った。Fo-Fc map において 3.5σ 以上でリガンドの結合が確認できたのは、LigM-VNL 複合体、LigM-3MGA 複合体及び LigM-THF 複合体であった (図 6-2)。LigM-PCA-THF 複合体は、PCA の電子密度は 3.5σ 以上ではっきり確認できるが、THF の電子密度は乏しかった (図 6-2)。しかし、 σ レベルを 3.0σ 、 2.5σ とした場合、THF の結合を確認できたため、THF は結合しているものとみなした (図 6-3)。

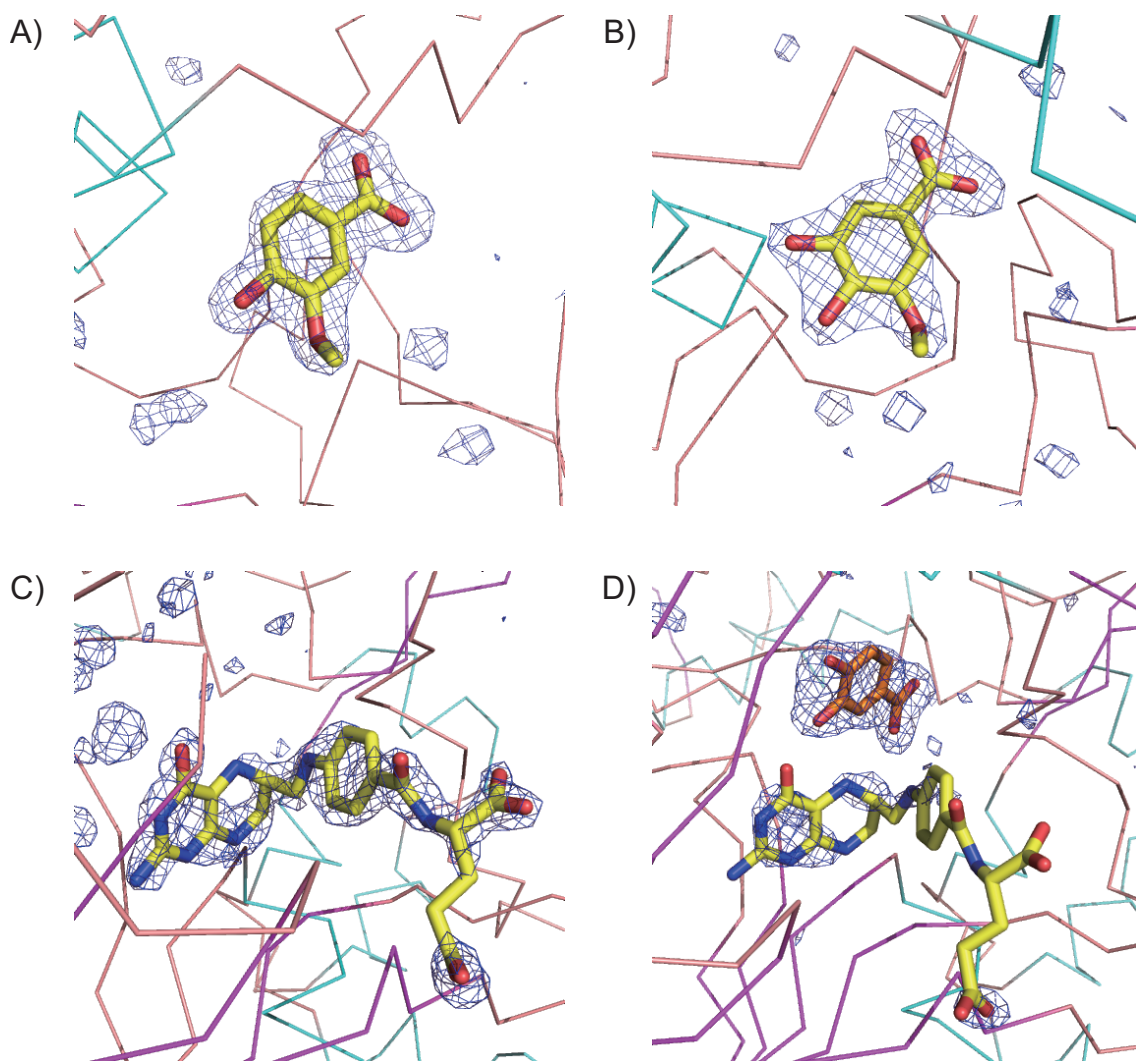


図 6-2. Omit map による低分子化合物の結合の確認 (Fo-Fc: 3.5σ)

原子の周り 10\AA の範囲で Fo-Fc map を 3.5σ 以上で作成した。A) LigM-VNL 複合体結晶, B) LigM-3MGA 複合体結晶, C) LigM-THF 複合体結晶, D) LigM-PCA-THF 複合体結晶を示す。

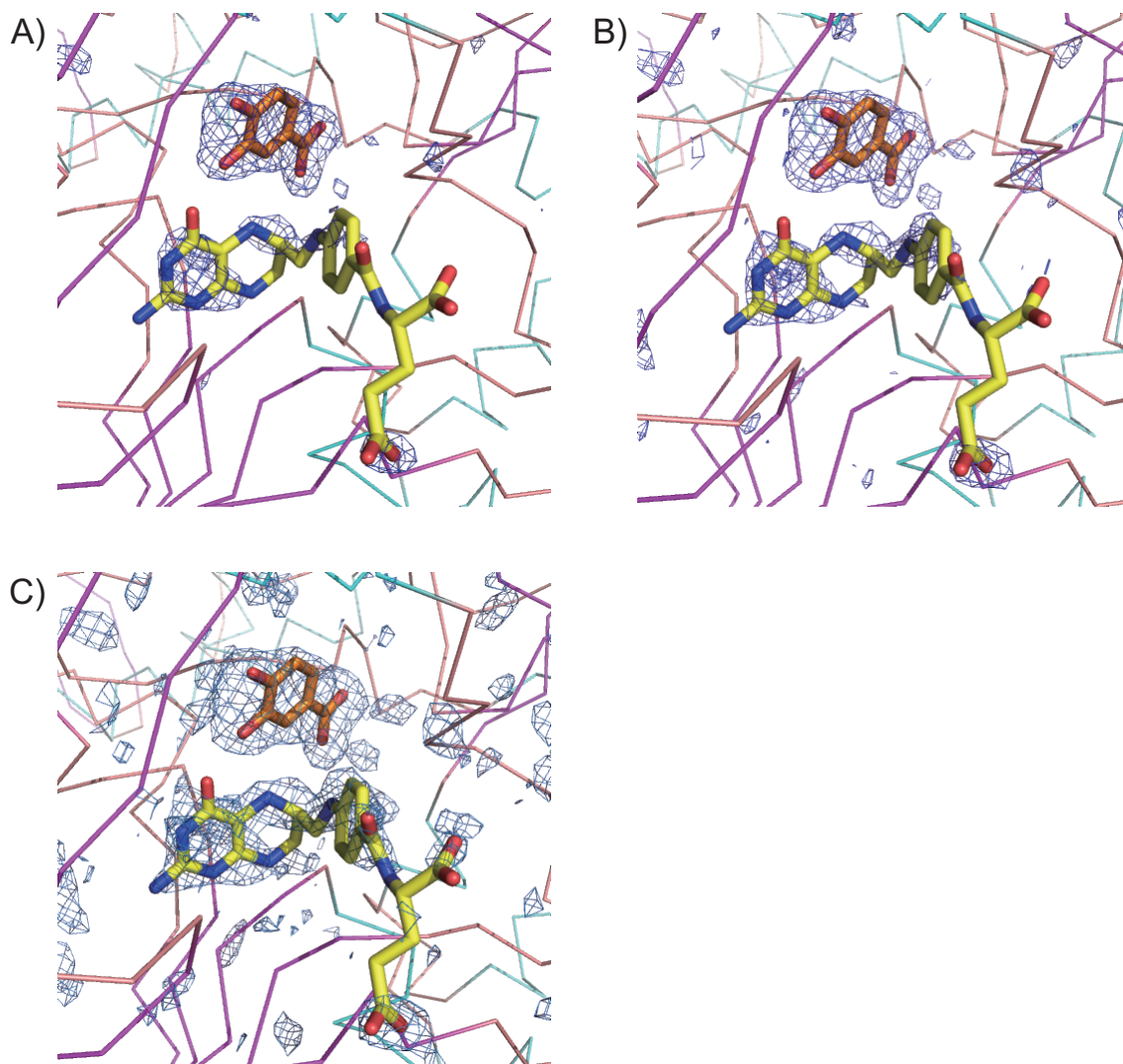


図 6-3. LigM-PCA-THF 複合体構造における THF 結合の確認 (Fo-Fc: 2.5-3.5 σ)

原子の周り 10Å の範囲で Fo-Fc map を 2.5-3.5 σ で作成した。A) Fo-Fc map : 3.5 σ , B) Fo-Fc map : 3.0 σ , C) Fo-Fc map : 2.5 σ での電子密度を示す。3.5 σ でははっきりと THF の結合を確認できないが、 σ レベルを落とすと THF の結合を確認することができる。

第 7 章 LigM の立体構造

第7章 LigMの立体構造

7-1. LigMの全体構造

<実験結果>

X線結晶構造解析の結果、LigMの結晶構造は16本の α ヘリックスと16本の β シートで構成されており、その大きさは、約 $65 \times 55 \times 45 \text{ \AA}^3$ であることがわかった(図7-1,7-2)。

LigMの結晶構造には、これまでに結晶構造の決定された相同タンパク質であるT-proteinを構成している2つのドメイン Aminomethyltransferase folate-binding domain (Pfam code : PF01571)(GCV_T domain) と、Glycine cleavage T-protein C-terminal barrel domain (Pfam code : PF08669)(GCV_T_C domain)が含まれていることがわかった (McNeil *et al.*, 1997)。この2つのドメインはそれぞれ図7-1において青色(残基番号20-259)とピンク色(アミノ酸残基番号317-449)の部分に相当する。GCV_T domainは、7本の α ヘリックスと10本の β シートで構成されており、GCV_T_C domainは3本の α ヘリックスと6本の β シートで構成されていた。また、LigMの結晶構造にはGCV_T domainとGCV_T_C domainの他に、2つのドメインで挟まれたアミノ酸配列の領域(残基番号260-316)が存在し、この部分をMiddle domainとした(図7-1,7-2)。Middle domainは、5本の α ヘリックスで構成されていた。

複合体結晶構造(LigM-VNL複合体、LigM-3MGA複合体、LigM-THF複合体およびLigM-PCA-THF複合体)において、補酵素THFは、3つのドメインで囲われた大きなポケットに結合していた。また、基質/基質アナログであるVNL,3MGA,PCAも同じポケットに結合していた。THFは、ポケットの入り口側に結合し、VNL,3MGA,PCAは、入り口から見てTHFの奥側に位置するように結合していた。このポケットは、補酵素と基質/基質アナログの2つが結合することから、このポケットを基質・補酵素結合ポケットと名付けた(図7-3)。

基質・補酵素結合ポケットの内部の表面は、Tyr29, Tyr31, Gln57, His60, Met61, Asn81, Lys90, Ala91, Lys92, Gln93, Tyr94, Asp106, Gly107, Ile108, Val120, Gly121, Arg122, Arg147, Arg163, Phe188, Phe189, Leu204, His206, Glu215, Tyr247, Pro248, Ser249, Asn250, Thr251, Trp256, Pro258のアミノ酸残基で構成されており、その大きさは約 $25 \times 10 \times 15 \text{ \AA}^3$ で、基質及び補酵素が結合するのに十分な大きさがあった。

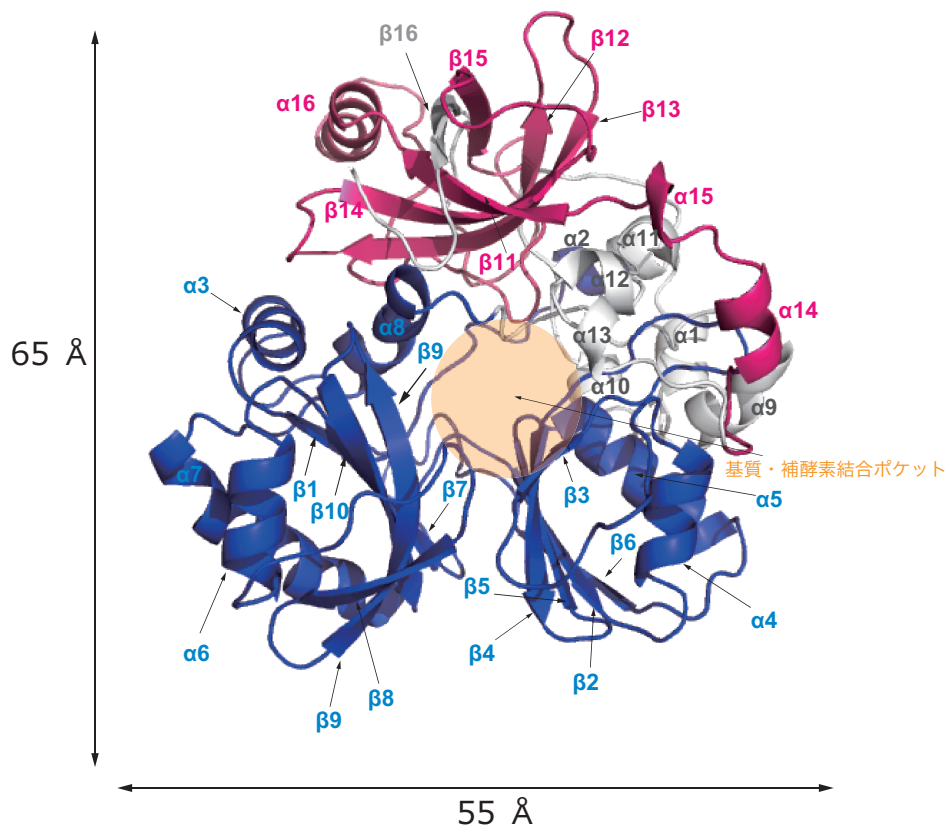


図 7-1. LigM の全体構造

LigM の結晶構造は、16 本の α ヘリックスと 16 本の β シートで構成されていた。青色: Aminomethyltransferase folate-binding domain (GCV_T domain) (残基番号 20-259)、ピンク色: Glycine cleavage T-protein C-terminal barrel domain (GCV_T_C domain) (残基番号 317-449)、灰色: Middle domain (残基番号 260-316)をそれぞれ示す。

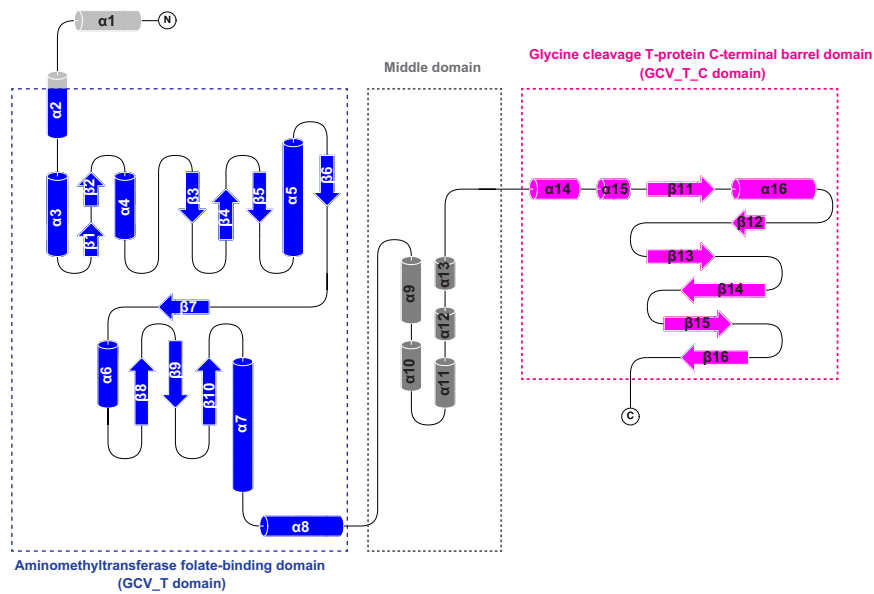


図 7-2. LigM の結晶構造に基づく二次構造のトポロジー

LigM の結晶構造に基づく二次構造のトポロジーを示す。青色：Glycine Cleavage T-protein like N-terminal domain (GCV_T domain) (残基番号 20-259), ピンク色：Glycine cleavage T-protein C-terminal barrel domain (GCV_T_C domain) (残基番号 317-449), 灰色：Middle domain (残基番号 260-316) をそれぞれ示す。GCV_T domain は、7 本の α ヘリックスと 10 本の β シート、Middle domain は 5 本の α ヘリックス、そして GCV_T_C domain は 3 本の α ヘリックスと 6 本の β シートで構成されていた。

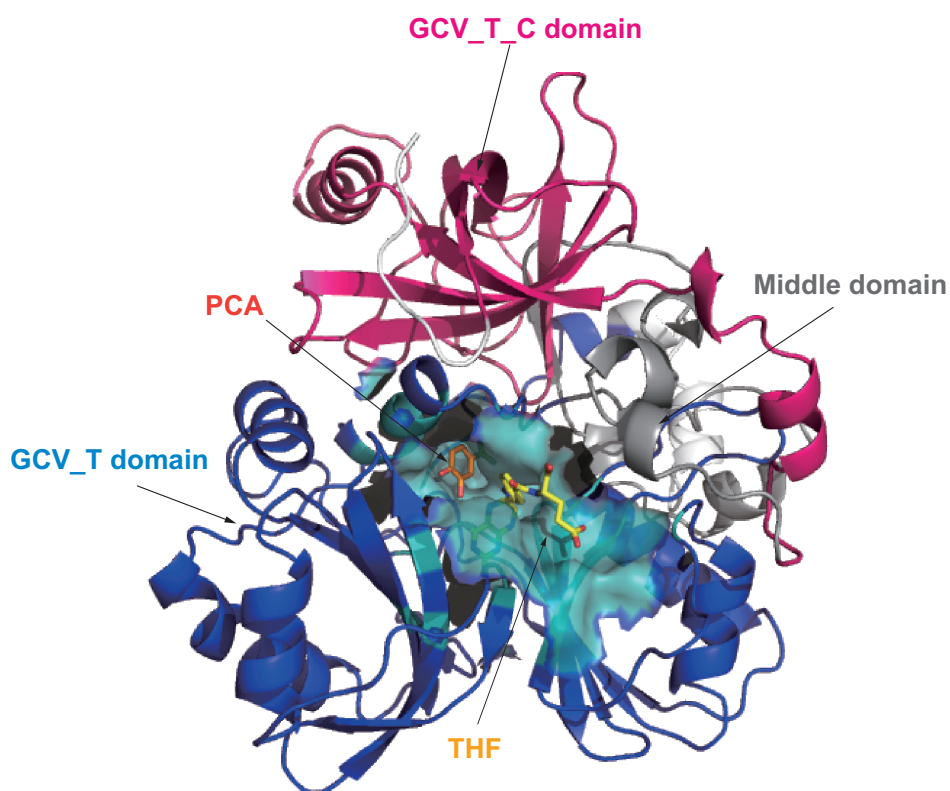


図 7-3. LigM の立体構造における基質・補酵素結合ポケット

LigM の立体構造における基質・補酵素結合ポケットの内部の表面を示した。青色: GCV_T domain, ピンク色: GCV_T_C domain, 灰色: Middle domain として cartoon で表示した。また, 基質・補酵素結合ポケットの内部表面を構成するアミノ酸残基を青緑色で surface 表示した。基質・補酵素結合ポケットに結合している THF と PCA をそれぞれ黄色と橙色の stick で表示した。

7-2. LigM の 2 量体の形成

<目的>

2-5. SEC-MALSによる溶液中でのLigMの会合状態解析の結果、LigMは溶液中で2量体であることが示唆されている。よって、LigMの結晶構造に見られる2量体のどれが、溶液中の2量体に対応しているのか明らかにする。

<実験結果と考察>

空間群 $P2_12_12$ のLigMの結晶構造では非対称単位中には3分子含まれているため、2量体の取り方は、B-C またはA-Bの2種類がある (図7-4)。また、対称操作で関連付けられる隣のLigM分子をA', B', C' で表示した(図 7-5)。

結晶中には2つの2量体候補 (B-C 分子またはA-B 分子) があり、分子間の接触面積が大きい方で2量体を形成し、安定化していると考えられる。よってB-C 分子、A-B 分子それぞれの Accessible surface area(接触面積) を Pita (The European Bioinformatics Institute ; <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pita/>)により計算した (Ponstingl *et al.*, 2003)。結果、B-C 分子、A-B 分子の接触面積はそれぞれ1795 Å², 337 Å²であったことから、B-C 分子が溶液中での2量体に対応している可能性が高いことがわかった。また、B-C 分子は互いの16番目の α ヘリックスが逆平行に配置していた。 α 16を構成するアミノ酸残基は、Asn342, Gly343, Asp344, Asp345, Met346, Ala347, Lys348, Ile349, Tyr350, Ala351, Ser352, Leu353, Phe354であり、疎水性リッチであることから疎水性相互作用により結合していることがわかった (図7-6)。

5-4. において述べたように、空間群 $P2_1$ 及び空間群 $P3_12_1$ の結晶についても結晶構造の決定を行っている。非対称単位中に含まれる分子数及びクリスタルパッキングも空間群 $P2_12_12$ とは異なるため、これら2つの結晶構造も用いてLigM分子の2量体構造の解析を行った(表5-6)。

空間群 $P3_12_1$ には、非対称単位中に2分子 (A及びB 分子)含まれており、対称操作で関連付けられる隣のLigM分子をA', B'で表示した (図7-7)。2量体の候補はA-B 分子 (A'-B' 分子) が考えられ、その接触面積が1825 Å²であった。また、A-B 分子 (A'-B' 分子) は、空間群 $P2_12_12$ における2量体と同様、互いの16番目の α ヘリックスが疎水性相互作用により結合していた。

さらに、空間群 $P2_1$ には非対称単位中に4分子 (A, B, C及びD 分子) 含まれており、対称操作で関連付けられる隣のLigM分子をA', B', C', D'および A'', B'', C'', D''で表示した (図7-8)。2量体の候補はA-C 分子 (B-D 分子)、またはB-C 分子が考えられるが、A-C 分子

(B-D 分子)の接触面積が 1843 \AA^2 、B-C 分子の接触面積が 487 \AA^2 であったことから、A-C 分子 (B-D 分子)が 2 量体を形成している可能性高いと考えられた。また、A-C 分子 (B-D 分子)は、空間群 $P2_12_12$ における 2 量体と同様互いの16番目の α ヘリックスが疎水性相互作用により結合していた。

よって、空間群 $P2_12_12$ における 2 量体は、他の 2 つの空間群でも同様の構造を取っており、この 2 量体が溶液中の 2 量体であると示唆された。

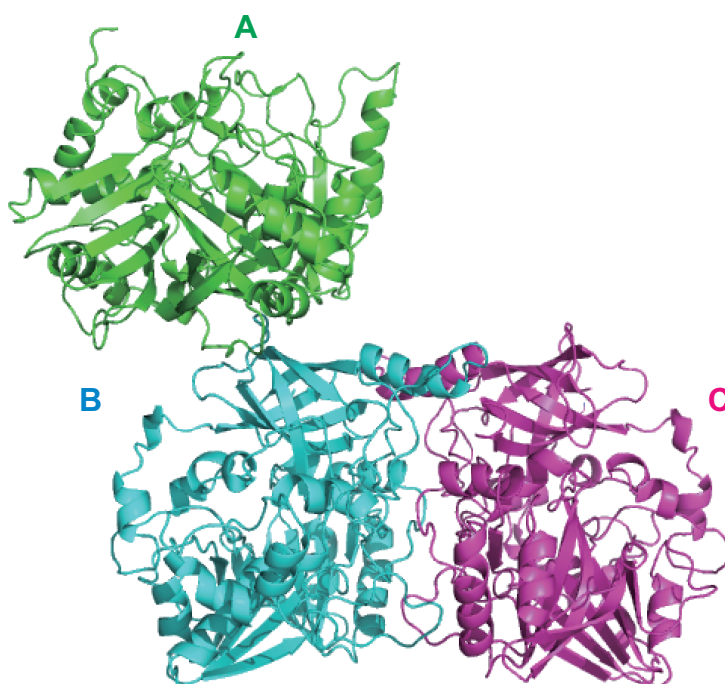


図 7-4. 空間群 $P2_12_12$ における非対称単位中に含まれる LigM 分子

溶媒含量の計算より、空間群 $P2_12_12$ の非対称単位に LigM は 3 分子含まれている。3 分子をそれぞれ A (緑色), B (青色), C (ピンク色) で示した。

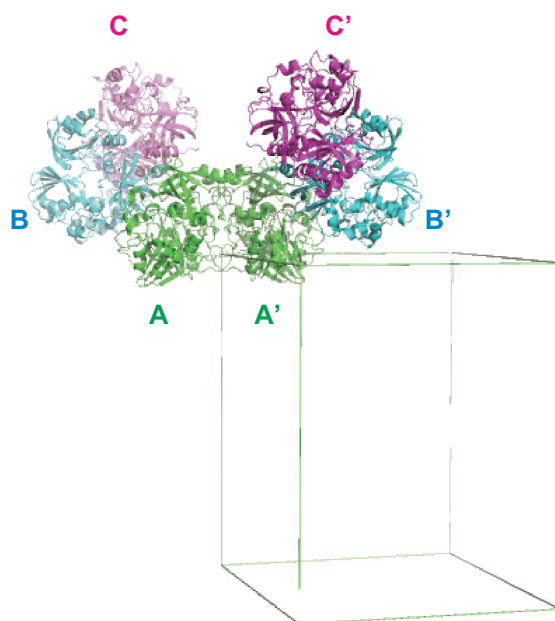


図 7-5. 空間群 $P2_12_12$ における対称操作で関連付けられる隣の LigM 分子

空間群 $P2_12_12$ の非対称単位含まれる LigM 分子 (A-C 分子) と、対称操作で関連付けられる隣の LigM 分子(A'-C'分子)を示した。A 及び A 分子'を 緑色, B 及び B'分子を青色, C 及び C'分子をピンク色でそれぞれ示した。

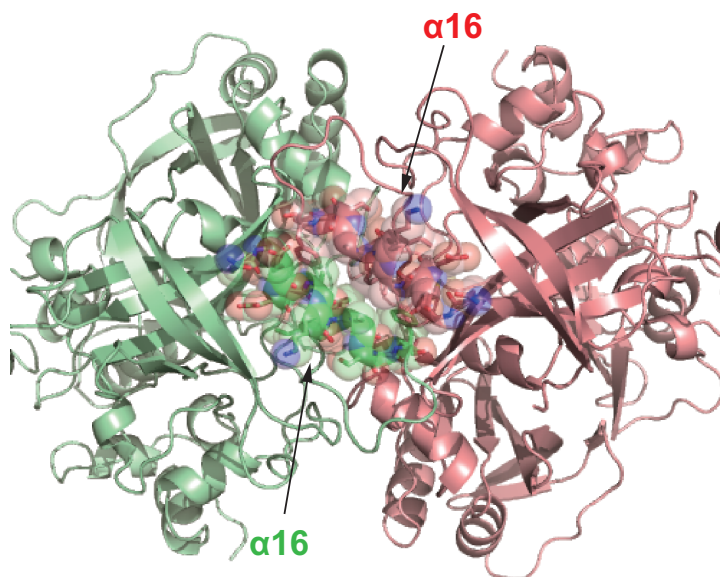


図7-6. 2量体を形成するLigM分子の特徴

2量体を形成するLigM分子は、互いの16番目の α ヘリックスが逆平行に配置し、Van der Waals相互作用により結合している。2量体を形成しているLigM分子をそれぞれ緑色、ピンク色で示し、16番目の α ヘリックスを構成するアミノ酸残基をsphereで表示した

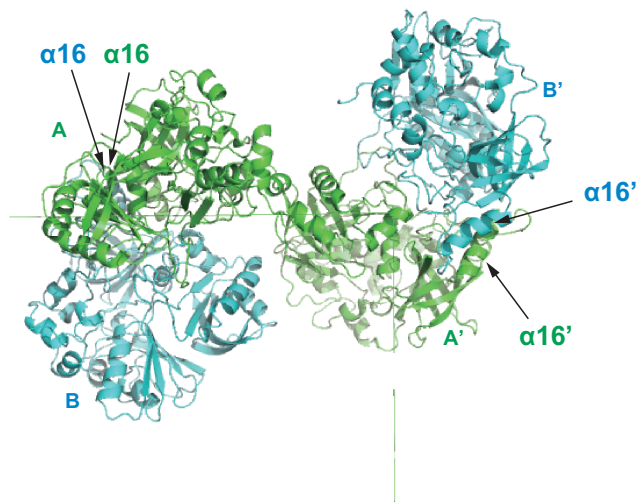


図 7-7. 空間群 $P3_121$ における対称操作で関連付けられる隣の LigM 分子

空間群 $P3_121$ の非対称単位含まれる LigM 分子 (A-B 分子) と、対称操作で関連付けられる隣の LigM 分子(A'-B'分子)を示した。A 及び A 分子'を 緑色, B 及び B'分子を青色, C 及び C'分子をピンク色でそれぞれ示した。A-B 分子、A'-B'分子がそれぞれ 2 量体を形成している。

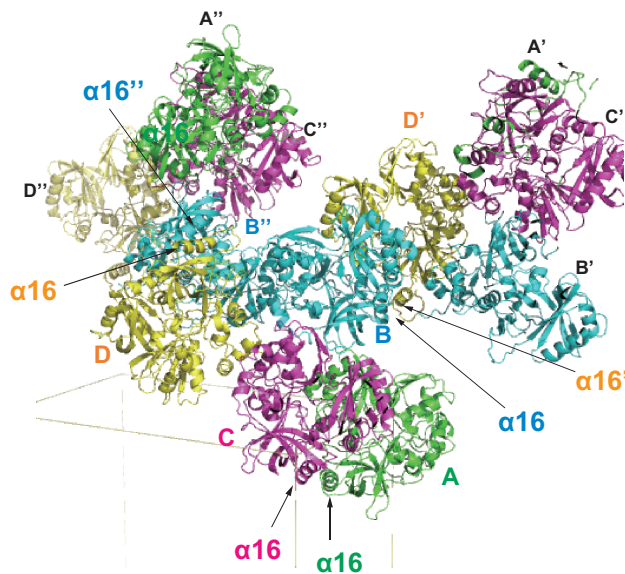


図 7-8. 空間群 $P2_1$ における対称操作で関連付けられる隣の LigM 分子

空間群 $P2_1$ の非対称単位含まれる LigM 分子 (A-D 分子) と、対称操作で関連付けられる隣の LigM 分子(A'-D'分子及び A''-B''分子)を示した。A 及び A 分子'を 緑色, B 及び B'分子を青色, C 及び C'分子をピンク色, D 及び D'分子を黄色でそれぞれ示した。A-C 分子、B-D' 分子、D-B'分子がそれぞれ 2 量体を形成している。

7-3. LigM構造の重ねあわせ

<目的>

LigMの基質非結合型の構造に、基質または補酵素が結合することによる構造変化の有無を明らかにするために、LigMの結晶構造全ての重ねあわせを行う。

<実験方法>

COOT (Emsley *et al.*, 2010)中のLeast square fit structureを用いて、LigM分子のC α を基準に構造の重ねあわせを行った。重ねあわせに利用したC α の数は表7-1に示す。

表7-1. 重ねあわせに用いたアミノ酸残基の範囲

構造の種類	アミノ酸残基の範囲		
	Chain A	Chain B	Chain C
LigM 基質非結合型	2-457	3-455	3-455
LigM-VNL 複合体	2-457	3-458	3-453
LigM-3MGA 複合体	2-459	2-454	3-457
LigM-THF 複合体	2-457	4-453	3-458
LigM-PCA-THF 複合体	2-458	3-453	3-457

<実験結果と考察>

すべてのLigMの結晶構造の重ねあわせを図7-9に示す。また、構造変化が有意なものであるか調べるため、LigMの結晶構造における座標誤差、及び各結晶構造に含まれるすべてのLigM分子に対する重ねあわせのroot mean square deviation (rmsd)を表7-2, 表7-3に示した。

各結晶構造における*phenix.refine*を用いて求めた座標誤差は、すべてにおいて0.30 Å以下であり、LigM分子に対する重ねあわせのrmsd (Å)が0.5 Å以下であった。よって、座標誤差と構造を重ねあわせたことによる誤差が同程度であることから、複合体形成によるコンフォメーション変化は見られないと考えられた。

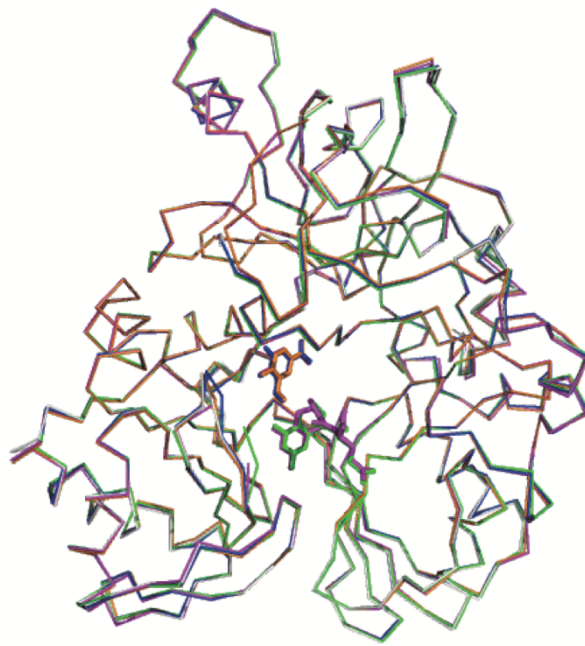


図 7-9. LigM の構造重ねあわせ

COOT (Emsley et al., 2010)中の Least square fit structure を用いて、LigM 分子の C α で構造の重ねあわせを行った。基質非結合型: 白色, LigM-PCA-THF 複合体: ピンク色, LigM-THF 複合体: 緑色, LigM-VNL 複合体: 橙色, LigM-3MGA 複合体: 青色で示す。基質/基質アナログ分子、及び補酵素の結合位置は同じであった。

表7-2. LigM結晶構造における座標誤差

構造の種類	座標誤差 (Å)
基質非結合型	0.24
LigM-VNL 複合体	0.19
LigM-3MGA 複合体	0.30
LigM-THF 複合体	0.23
LigM-PCA-THF 複合体	0.24

各結晶構造の PDB より、座標誤差 (COORDINATE ERROR (MAXIMUM-LIKELIHOOD BASED))の値を抜き出して記述した。

表 7-3. すべての LigM 結晶構造において、C α で重ねあわせた際の rmsd (Å)

	座標誤差0.24 Å			座標誤差0.30 Å			座標誤差0.19 Å			座標誤差0.23 Å			座標誤差0.24 Å		
	Native-A	Native-B	Native-C	3MGA-A	3MGA-B	3MGA-C	VNL-A	VNL-B	VNL-C	THF-A	THF-B	THF-C	PCA-THF-A	PCA-THF-B	PCA-THF-C
Native-A		0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3
Native-B			0.4	0.5	0.2	0.5	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	0.5	0.4	0.3	0.4
Native-C				0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3
3MGA-A					0.4	0.3	0.3	0.2	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.2
3MGA-B						0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3
3MGA-C							0.3	0.3	0.4	0.4	0.5	0.4	0.3	0.4	0.3
VNL-A								0.2	0.3	0.1	0.4	0.3	0.2	0.3	0.2
VNL-B									0.3	0.2	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2
VNL-C										0.4	0.3	0.4	0.4	0.2	0.3
THF-A											0.4	0.3	0.2	0.3	0.2
THF-B												0.4	0.4	0.3	0.4
THF-C													0.4	0.5	0.3
PCA-THF-A														0.4	0.3
PCA-THF-B															0.4
PCA-THF-C															

非対称単位に3分子含まれるため A: A Chain; B: B-Chain; C: C-Chain とし、Least square fit structure を用いて C α で重ねあわせた際の rmsd (Å)を示す。

7-4. 活性中心の構造

<実験結果と考察>

7-4.1 LigM-VNL 複合体結晶構造

LigM-VNL 複合体結晶構造における、VNL の水素結合形成の様子を図 7-10 に示す。VNL のメトキシル基の OM 原子は、His60 と Tyr247 と水素結合を形成していた。O3 原子は、Tyr247, Asn250 及び W41(水分子)と水素結合を形成していた。O2 原子は Arg122 及び W287、O1 原子は Arg122 及び Tyr31 とそれぞれ水素結合を形成していた。

また、VNL のファンデルワールス半径 (Van der Waals 半径)から、相互作用をしていると考えられるアミノ酸残基を図 7-11 に示した。水素結合を形成しているアミノ酸残基の他に、Tyr29, Gln57, Met61, Pro248, Thr251, Trp256, Pro258, Phe393 が VNL と相互作用をしていると考えられた (図 7-11)。

7-4.2 LigM-3MGA 複合体結晶構造

LigM-3MGA 複合体結晶構造における、3MGA の水素結合形成の様子を図 7-12 に示す。3MGA のメトキシル基の O2 原子は、His60 と Tyr247 と水素結合を形成していた。O10 原子は、Tyr247, Asn250 と水素結合を形成していた。O13 原子は Arg122 及び W198、O12 原子は Tyr31 とそれぞれ水素結合を形成していた。

また、3MGA のファンデルワールス半径 (Van der Waals 半径)から、相互作用をしていると考えられるアミノ酸残基を図 7-13 に示した。水素結合を形成しているアミノ酸残基の他に、Tyr29, Gln57, Met61, Thr251, Trp256, Pro258, Phe393 が 3MGA と相互作用をしていると考えられた (図 7-13)。

7-4.3 LigM-THF 複合体結晶構造

LigM-THF 複合体結晶構造において、THF のプテリジン環は C6 を軸に p-安息香酸とグルタミン酸部分に対してほぼ垂直となるように折れ曲がった状態で結合していた。また、THF の水素結合形成の様子を図 7-14 に示す。Gln93, Val120, Gln165, Glu215 が THF と水素結合を形成していた。水素結合に関わる水分子は 3 つあった(W162, W961, W420)。

さらに、THF のファンデルワールス半径 (Van der Waals 半径)から、相互作用をしていると考えられるアミノ酸残基を図 7-15 に示した。水素結合を形成しているアミノ酸残基の他に、Gln57, Met61, Asn81, Ala91, Lys92, Asp106, Gly107, Ile108, Phe110, Gly121, Arg163, Phe188, Phe189, His206, Tyr247, Trp256, Phe312 が THF と相互作用をしていると考えられた (図 7-15)。

7-4.4 LigM-PCA-THF 複合体結晶構造

LigM-PCA-THF 複合体結晶構造における、PCA 及び THF の水素結合形成の様子を図 7-16 に示す。PCA は、LigM-VNL 複合体、LigM-3MGA 複合体と同様に、Tyr31, His60, Arg122, Tyr247 と水素結合を形成していた。水素結合に関わる水分子は 2 つ (W17, W91)あった。

また、PCA 及び THF のファンデルワールス半径 (Van der Waals 半径)から、相互作用をしていると考えられるアミノ酸残基を図 7-17 に示した。水素結合を形成しているアミノ酸残基の他に、Lys92, Ile108, Phe110, Gly121, Phe188, Phe189, Pro248, Trp256, Phe312, Pro258, Phe393 が PCA あるいは THF と相互作用をしていると考えられた (図 7-17)。

LigM-PCA-THF 複合体結晶構造とその他の構造とを比較した結果、全体構造に顕著な変化はなかった (図 7-9)。しかし、基質/基質アナログ分子が結合している結晶構造 (LigM-VNL 複合体、LigM-3MGA 複合体) でのみ、Asn250 が基質/基質アナログ分子と水素結合を形成するように配向していた (図 7-18)。よって Asn250 は基質分子の認識に関わっていることが示唆された。また、THF が結合している結晶構造 (LigM-PCA-THF 複合体、LigM-THF 複合体) でのみ、 β 9 及び β 10 を構成するアミノ酸残基の Met208, Ala209, Gly210 の電子密度をはっきりと確認できなかった (図 7-19)。 β 9 及び β 10 は、基質・補酵素結合ポケットの周辺に位置していることから、THF が結合することで、 β 9 及び β 10 を構成するアミノ酸残基が影響を受けゆらいでいるためであると考えられた。

LigM-PCA-THF 複合体の結晶構造は、反応中間体 (類似体) 構造でもあるため、LigM の触媒反応機構について検討することが可能である。触媒反応機構については 8 章で述べることとする。

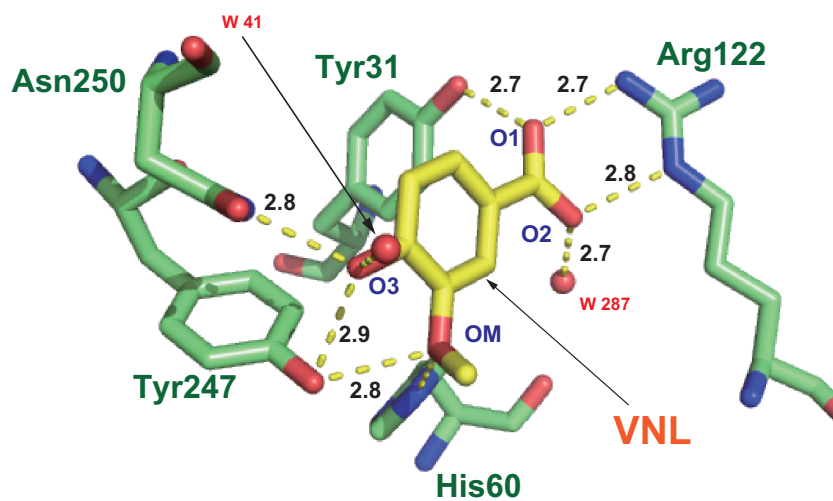


図 7-10. LigM-VNL 複合体結晶構造における VNL の水素結合形成の様子

VNL と水素結合を形成するアミノ酸残基：緑色、VNL：黄色、水分子：赤色で示した。また、アミノ酸残基と VNL の水素結合を黄色の破線で示し、その距離を記入した。

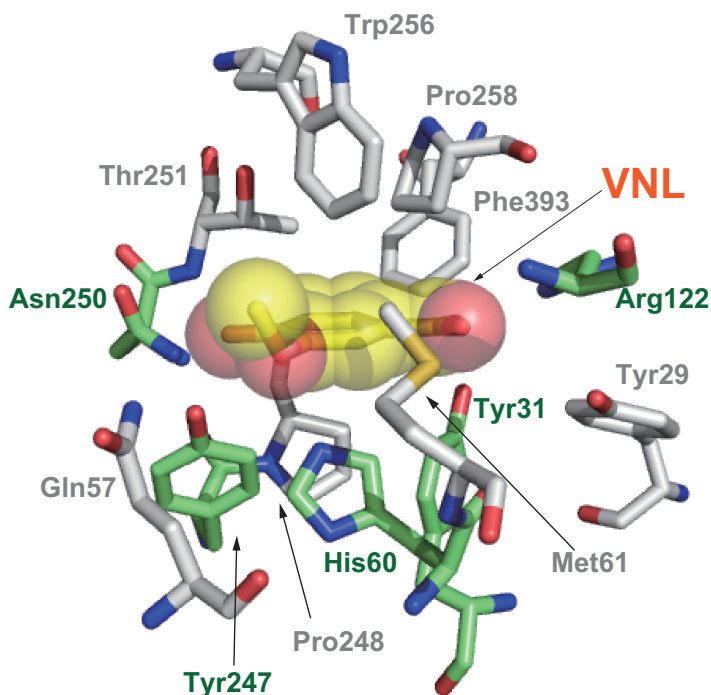


図 7-11. LigM-VNL 複合体結晶構造における VNL の Van der Waals 相互作用の様子

VNL の Van der Waals 半径を sphere で表示し、相互作用をしていると考えられるアミノ酸残基を表示した。水素結合を形成するアミノ酸残基：緑色、VNL：黄色、水分子：赤色、VNL と Van der Waals 相互作用を形成しているアミノ酸残基：白色で示した。

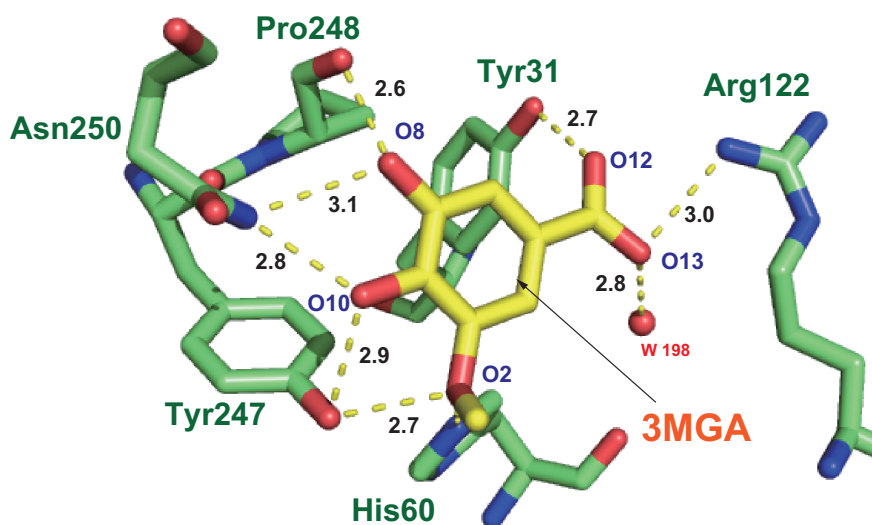


図 7-12. LigM-3MGA 複合体結晶構造における 3MGA の水素結合形成の様子
 3MGA と水素結合を形成するアミノ酸残基：緑色、3MGA: 黄色、水分子：赤色で示した。
 また、アミノ酸残基と 3MGA の水素結合を黄色の破線で示し、その距離を記入した。

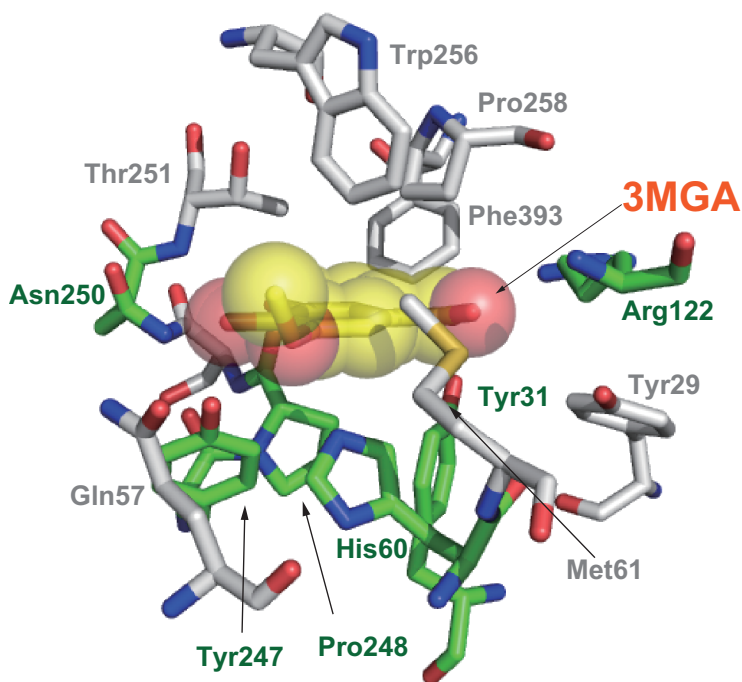


図 7-13. LigM-3MGA 複合体結晶構造における 3MGA の Van der Waals 相互作用の様子
 3MGA の Van der Waals 半径を sphere で表示し、相互作用をしていると考えられるアミノ酸残基を表示した。水素結合を形成するアミノ酸残基：緑色、3MGA: 黄色、水分子：赤色、VNL と Van der Waals 相互作用を形成しているアミノ酸残基：白色で示した。

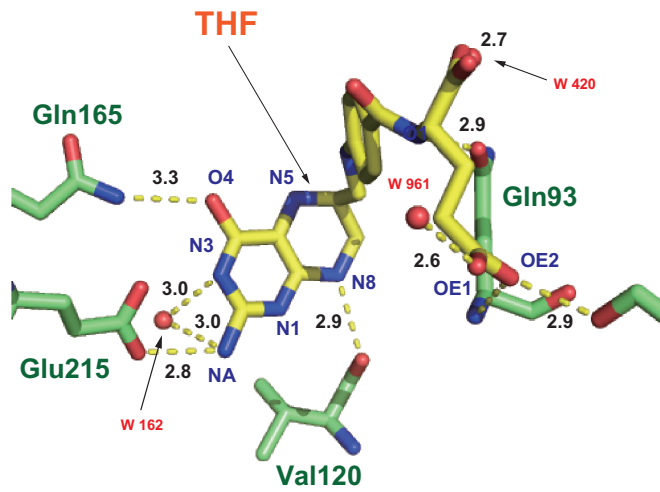


図 7-14. LigM-THF 複合体結晶構造における THF の水素結合形成の様子

THFと水素結合を形成するアミノ酸残基：緑色、THF: 黄色 水分子：赤色で示した。また、アミノ酸残基とTHFの水素結合を黄色の破線で示し、その距離を記入した。

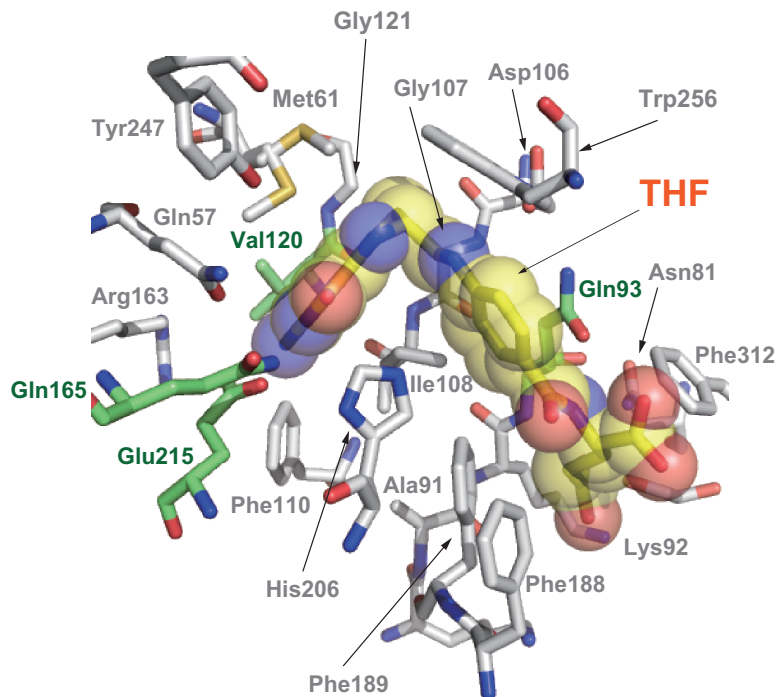


図 7-15. LigM-THF 複合体結晶構造における THF の Van der Waals 相互作用の様子

THF の Van der Waals 半径を sphere で表示し、相互作用をしていると考えられるアミノ酸残基を表示した。水素結合を形成するアミノ酸残基：緑色、THF: 黄色、水分子：赤色、THF と Van der Waals 相互作用を形成しているアミノ酸残基：白色で示した。

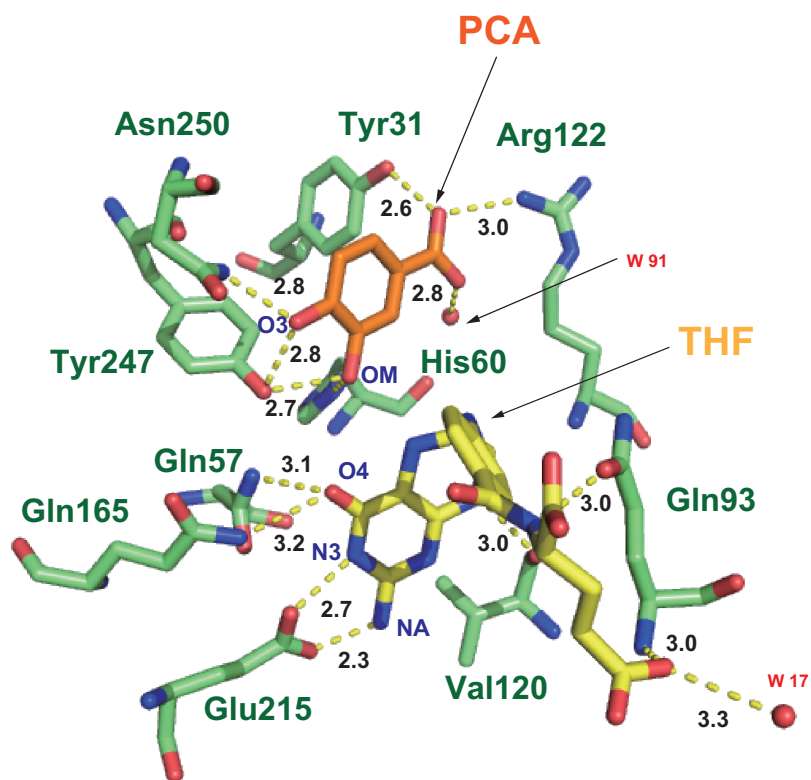


図 7-16. LigM-PCA-THF 複合体結晶構造における PCA 及び THF の水素結合形成の様子
 PCA 及び THF と水素結合を形成するアミノ酸残基：緑色、THF：黄色、PCA：オレンジ、水
 分子：赤色で示した。また、アミノ酸残基と VNL の水素結合を黄色の破線で示し、その距
 離を記入した。

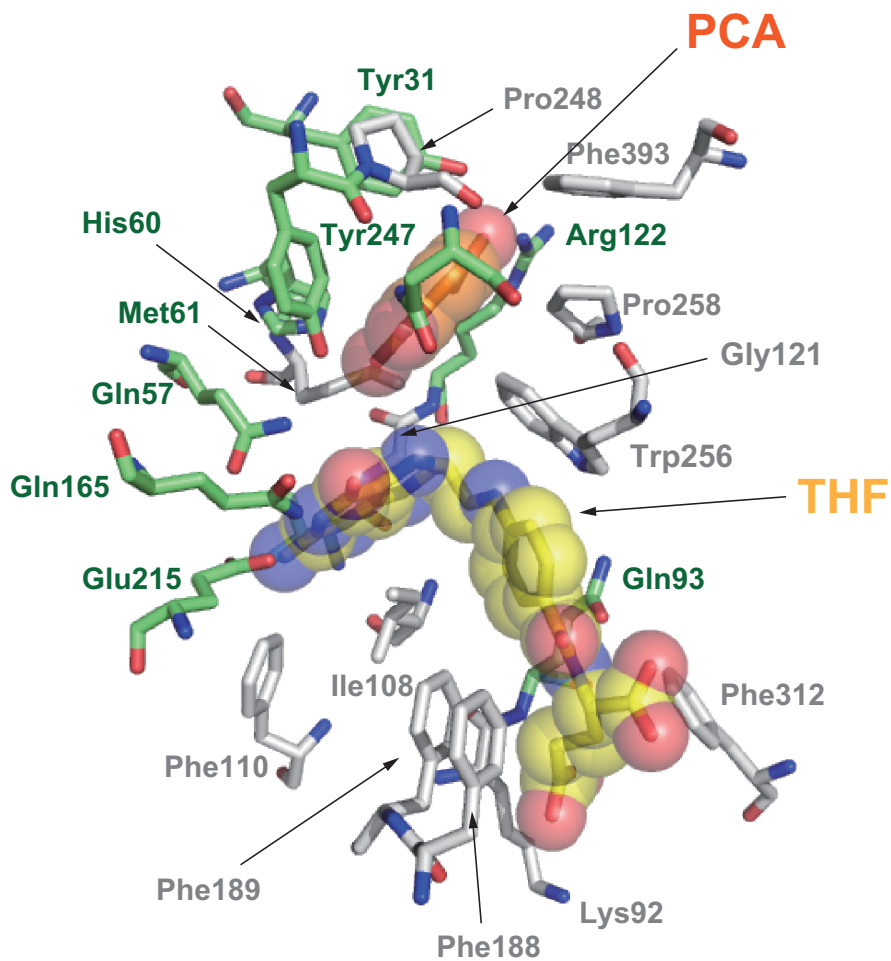


図 7-17. LigM-PCA-THF 複合体結晶構造における PCA 及び THF の Van der Waals 相互作用の様子

PCA 及び THF の Van der Waals 半径を sphere で表示し、相互作用をしていると考えられるアミノ酸残基を表示した。水素結合を形成するアミノ酸残基：緑色、THF: 黄色、PCA：オレンジ、水分子：赤色、THF と Van der Waals 相互作用を形成しているアミノ酸残基：白色で示した。

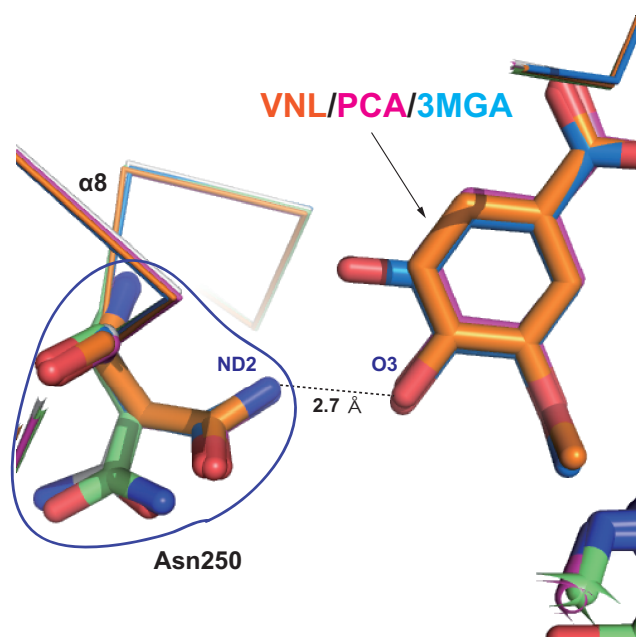


図 7-18. Asn250 の配向の違い

基質/基質アナログ分子が結合している場合のみ、Asn250 は基質/基質アナログ分子と水素結合を形成できるような配向になっていた。基質非結合型: 白色, LigM-PCA-THF 複合体: ピンク色, LigM-THF 複合体: 緑色, LigM-VNL 複合体: 橙色, LigM-3MGA 複合体: 青色で示す。

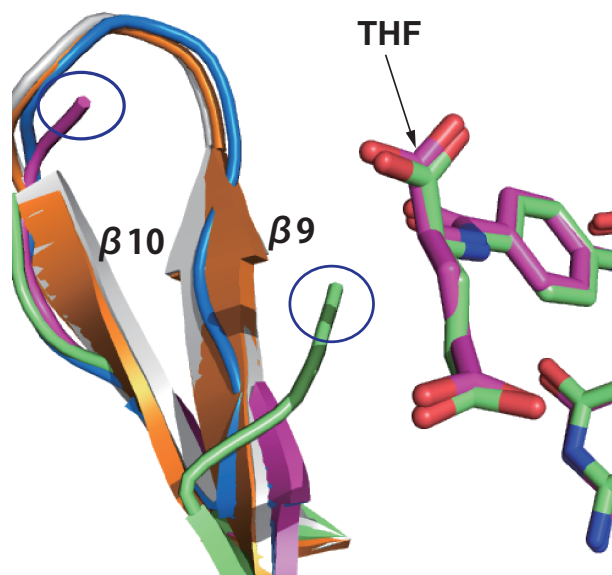


図 7-19. $\beta 9$ 及び $\beta 10$ の違い

THF が結合している場合のみ、 $\beta 9$ 及び $\beta 10$ を構成するアミノ酸残基中の Met208, Ala209, Gly210 の電子密度が見えなかった。基質非結合型: 白色, LigM-PCA-THF 複合体: ピンク色, LigM-THF 複合体: 緑色, LigM-VNL 複合体: 橙色, LigM-3MGA 複合体: 青色で示す。

第 8 章 T-protein と LigM との比較

第 8 章 T-protein と LigM との比較

8-1. LigM と T-protein の構造比較

<目的>

Protein Data Bank (PDB)には、T-protein として合計 12 個の結晶構造が登録されている(2016 年 4 月 21 日現在) (表 8-1)。これら T-protein の立体構造は、一次構造の類似性から LigM の立体構造と類似していると予測できる。よって、T-protein と LigM の立体構造情報を用いて作成したシークエンスアライメントに基づき、両者の類似点及び相違点を明らかにする。

表 8-1. PDB に登録されている LigM のホモログタンパク質の情報

TAXONOMY	Organism	PDB ID	Unique Ligands
Bacteria	<i>Thermotoga maritima</i>	1WOO	Tetrahydrofolate (THG)
		1WOP	5-CHO-THF
		1WOR	Dihydrokipoic acid (RED)
		1WOS	-
	<i>Escherichia coli</i>	3A8I	H-protein + 5-CH ₃ -THF + lipolysine
		3A8J	H-protein + lipolysine
		3A8K (D97N)	H-protein + lipolysine
		1VLO	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	1YX2	-
	Eukaryota	<i>Homo sapiens</i>	1WSR
1WSV			5-CH ₃ -THF
Archea	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	1V5V	-

PDB に登録されている LigM のホモログタンパク質の情報を一覧にした。生物分類学 (taxonomy)ごとに分けて記載した。Unique ligands には、結合しているタンパク質または低分子の名前を載せた。記載がなく”-“ となっている場合は基質非結合型を意味し、PDB ID (1WOS, 1VLO, 1YX2, 1WSR, 1V5V) が該当する。

<実験方法>

DALI サーバー (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server) を用いて LigM と 3 次元構造が似たタンパク質の検索を行った。また、Cobalt: Constraint-based Multiple Protein Alignment Tool

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgiLINK_LOC=BlastHomeLink) を用いて *T. maritima*, *E. coli*, *B. subtilis*、*H. sapiens* 及び *P. horikoshii* OT3 のそれぞれの T-protein の一次構造情報と、LigM の一次構造情報を用いてシーケンスアライメントを行った。

<実験結果>

DALI サーバーを用いて LigM と相同立体構造を持つ他のタンパク質の検索をかけたところ、PDB に登録されている *T. maritima*, *E. coli*, *B. subtilis*、*H. sapiens* 及び *P. horikoshii* OT3 の T-protein がヒットした (表 8-2) (Lee *et al.*, 2004) (Okamura-Ikeda *et al.*, 2010) (Okamura-Ikeda *et al.*, 2005) (Lokanath *et al.*, 2004)。また、表 8-1 に挙げた PDB ID 以外に PDB ID : 3TFI がヒットした。PDB ID : 3TFI は、Dimethylsulfoniopropionate demethylase (EC 2.1.1.269)であり、反応には THF が必須である。また、GCV_T domain 及び GCV_T_C domain を持ち、LigM と 3 次元構造が類似していた (表 8-2) (Schuller *et al.*, 2012)。DALI サーバーの結果から、ヒットした立体構造と LigM のアミノ酸配列の相同性 (id %)は低いものの、立体構造は類似していることがわかった。

Cobalt を用いて PDB ID : 1WOO, 3A8I, 1YX2, 1WSV, 1V5V と LigM のアミノ酸配列のシーケンスアライメントを行ったところ、26 個のアミノ酸 (Arg 49, Phe55, Asp56, His59, Met61, Gly68, Gly101, Gln167, Gly168, Pro169, Ala171, Gly207, Gly210, Gly213, Glu215, Gly243, Ala246, Glu253, Pro304, Asp318, Phe319, Gly321, Val337, Gly389, Ser397, Val421) が保存されていることがわかった(図 8-1, 8-2)。

また、26 個の保存残基の中の Glu215 は、基質・補酵素結合部位を形成するアミノ酸残基の 1 つであり、Glu215 の OE1 と OE2 は、THF の N3 及び N2 とそれぞれ 2.7 Å、2.3 Å の距離で水素結合を形成していた (図 8-3)。

さらに、シーケンスアライメントの結果から、T-protein と比較して LigM(1-457)に 5 つの挿入配列が存在していた (図 8-1)。5 つの挿入配列の範囲は、insert 1 (アミノ酸残基 24-32)、insert 2 (アミノ酸残基 147-161)、insert 3 (アミノ酸残基 266-300)、insert 4 (アミノ酸残基 355-382)、insert 5 (アミノ酸残基 426-439)とした。insert 領域を LigM-PCA-THF 複合体構造を用いてマッピングした結果、insert 領域は基質・補酵素結合ポケットの入り口 (表面) と反対側の裏面に集中して存在していることがわかった (図 8-4)。

表 8-2. Dali サーバーを用いた LigM 類似構造の解析結果

N	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% id	Discription
1	1wos-A	32.7	2.6	327	361	23	Aminomethyltransferase
2	1wor-A	32.6	2.6	328	362	23	Aminomethyltransferase
3	1woo-A	32.5	2.6	326	362	23	Aminomethyltransferase
4	1wop-A	32.2	2.7	328	362	23	Aminomethyltransferase
5	1yx2-A	32	2.6	326	358	27	Aminomethyltransferase
6	1yx2-B	31.8	2.6	326	362	27	Aminomethyltransferase
7	1wsr-B	29.9	2.7	323	371	22	Aminomethyltransferase
8	1wsv-B	29.9	2.7	324	371	22	Aminomethyltransferase
9	1v5v-B	29.7	2.5	329	399	23	Aminomethyltransferase
10	1v5v-A	29.4	2.6	331	399	24	Aminomethyltransferase
11	1wsv-A	29.4	2.8	323	371	23	Aminomethyltransferase
12	1wsr-A	29.2	2.8	323	371	23	Aminomethyltransferase
13	3tfi-A	29.2	2.8	325	369	19	Dimethylsulfiopropionate demethylase
14	3tfj-A	29.2	2.8	325	369	20	Dimethylsulfiopropionate demethylase
15	3a8k-A	29.1	3	317	363	23	Aminomethyltransferase
16	3a8k-D	29.1	2.9	313	362	23	Aminomethyltransferase
17	3a8k-C	29.1	2.9	314	362	23	Aminomethyltransferase
18	3tfi-B	29	2.8	324	369	20	Dimethylsulfiopropionate demethylase
19	3tfj-B	29	2.8	325	369	20	Dimethylsulfiopropionate demethylase
20	3a8i-A	29	2.9	313	364	24	Aminomethyltransferase
21	3a8j-C	29	2.9	312	363	24	Aminomethyltransferase
22	3a8i-C	29	2.9	313	364	24	Aminomethyltransferase
23	3a8j-D	29	2.8	312	363	24	Aminomethyltransferase

Dali サーバーを用いて LigM の結晶構造に類似する構造を検索し、全部で 159 個ヒットした。Z : Z 値, rmsd : 平均二乗偏差, lali : 位置合わせをした残基数, nres : 適合した構造を構成する総残基数, %id : 位置合わせをした残基の配列相同性(%)をそれぞれ示す。

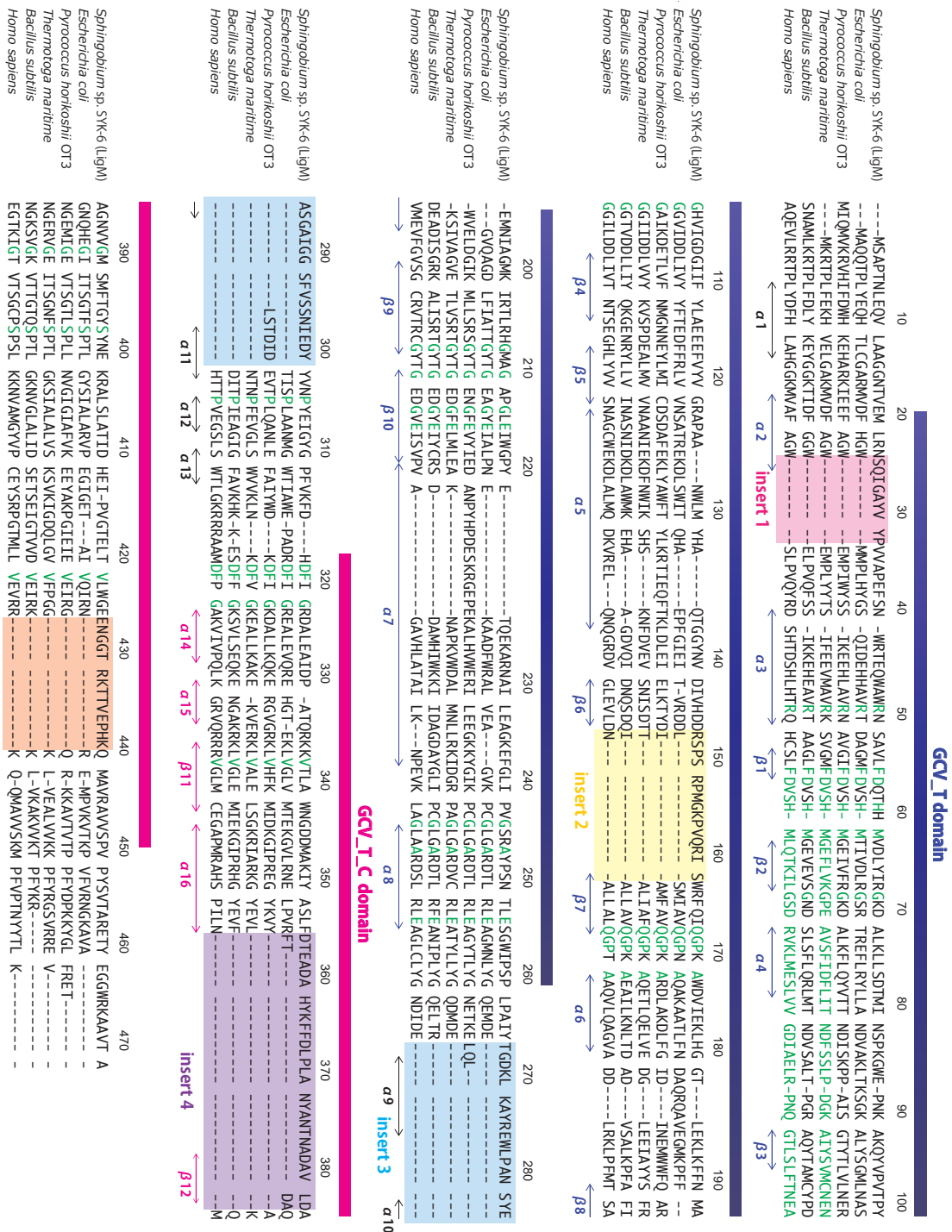


図 8-1. 立体構造情報を元にしたアミノ酸シークエンスアライメントの結果

立体構造情報を元にしたシークエンスアライメント表。T. maritima, E. coli, B. subtilis, H. sapiens, P. horikoshii OT3 を比較対象とした。生物種に関わらず保存されているアミノ酸残基：緑色および LigM に見られる insert 領域 1-4 をそれぞれ示す。

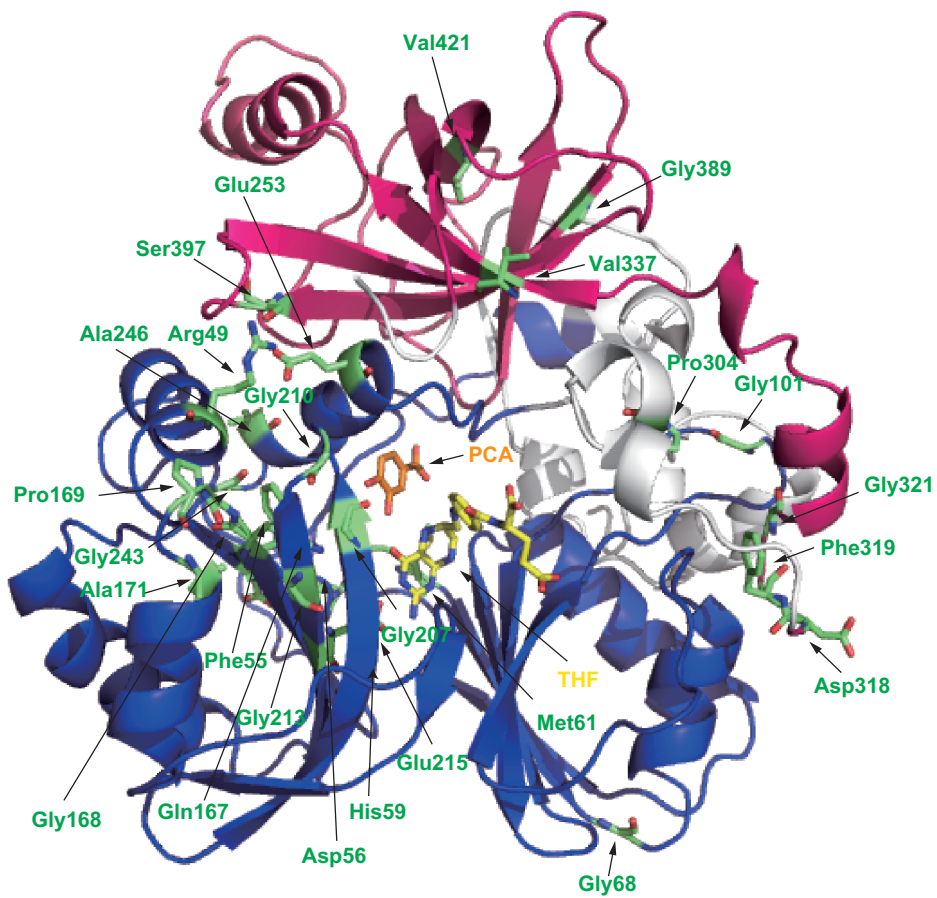


図 8-2. LigM の立体構造上での保存残基の配置

T-protein とのシーケンスアライメントの結果、保存されている残基は全部で 26 個あった。26 個の保存残基を LigM-PCA-THF 複合体構造上にマッピングした。GCV_T ドメイン：ピンク色, GCV_T_C ドメイン：青色, 保存残基：緑色, PCA：橙色, THF：黄色をそれぞれ示す。

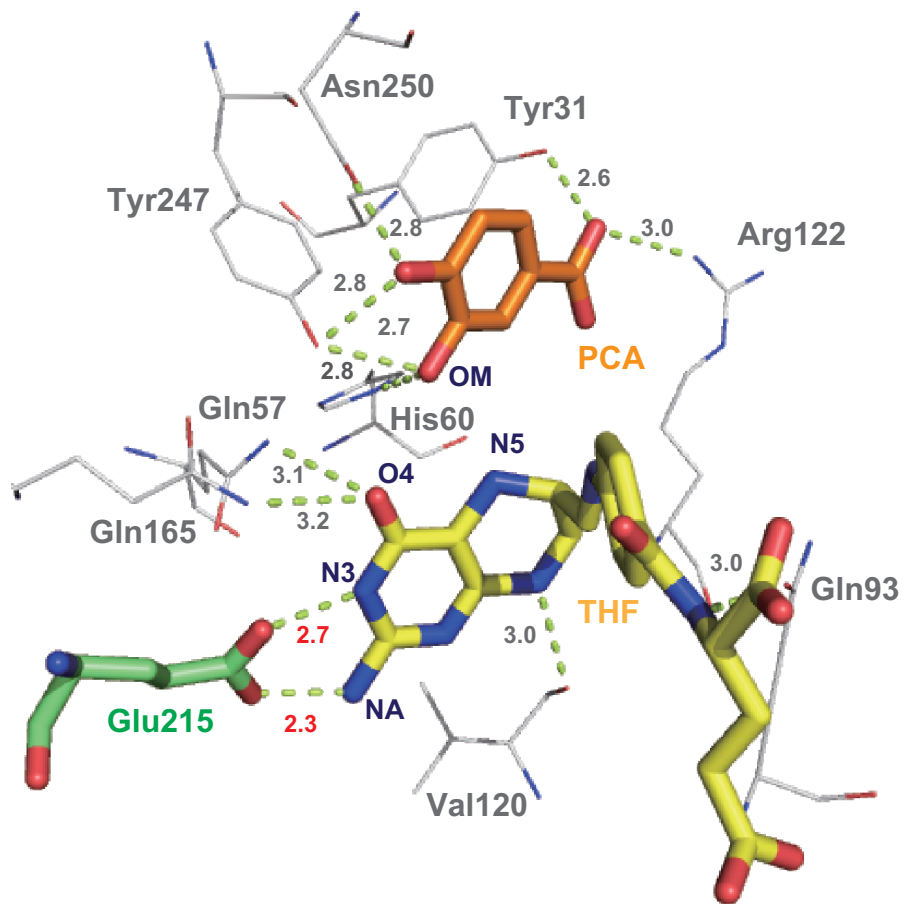


図 8-3. Glu215 の LigM の立体構造上での配置

T-protein とのシーケンスアライメントの結果、保存残基の Glu215 は活性部位において THF と水素結合を形成していた。THF：黄色,PCA：橙色,Glu215：緑色, 水素結合を形成するアミノ酸残基：白色でそれぞれを示した。

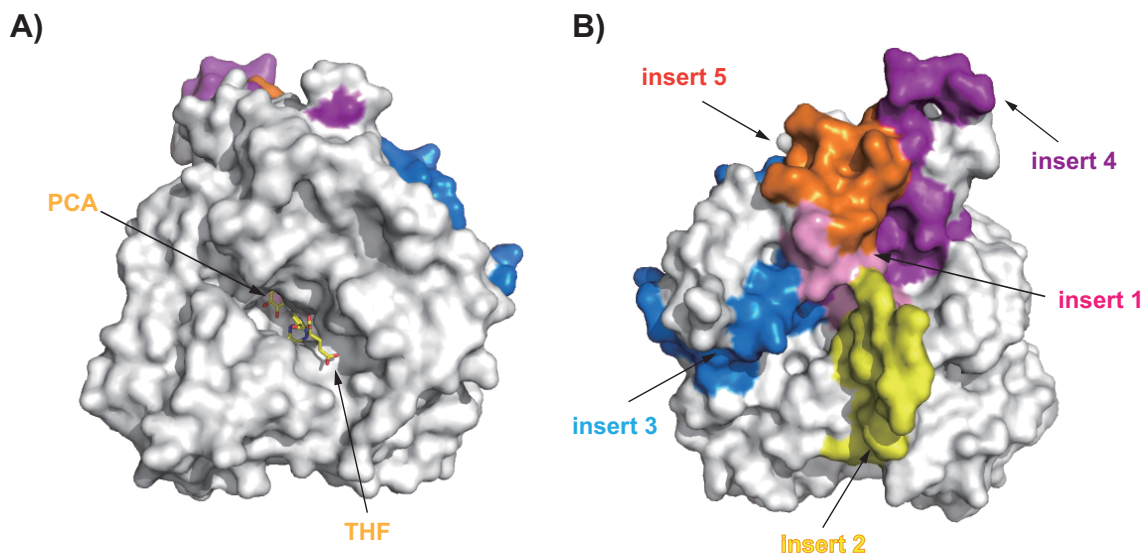


図 8-4. LigM の結晶構造上での insert 領域の配置

LigM の結晶構造上での insert 領域の配置を示した。insert1: ピンク, insert2: 黄色, insert3: 青色, insert4: 紫色, insert5: 橙色でそれぞれ表示した。A) 基質・補酵素結合ポケットがある表面、B) Insert 領域が集中している裏面をそれぞれ示した。

8-2. 立体構造の比較

<目的>

図 8-1 の一次配列を用いたシークエンスアライメントの結果、LigM には T-protein にはない 5 つの insert 領域が存在することが分かった。次に、3 次元構造上での T-protein と LigM の違いを明らかにするため、構造比較を行った。

<実験方法>

LigM-PCA-THF 複合体構造 (アミノ酸残基数 3-453) と、*T. maritima* (PDB ID: 1WOO)、*E. coli* (PDB ID: 3A8I)、*B. subtilis* (PDB ID: 1YX2)、*H. sapiens* (PDB ID: 1WSV)、*P. horikoshii* OT3 (PDB ID: 1V5V) との全体構造との比較を行った。アミノ酸配列の相同性が低いことから、2 次構造情報を基にした構造の重ね合わせを行った。使用したプログラムは、COOT の Superpose protein molecule Secondary structure Matching (SSM) を用いて、Chain A で重ねあわせを行った。

<実験結果>

SSM を用いて構造既知の T-protein と LigM の全体構造を重ねあわせた結果、GCV_T domain 及び GCV_T_C domain の構造は両者でよく似ていることが分かった (図 8-5)。各 T-protein の GCV_T domain 及び GCV_T_C domain のアミノ酸配列の領域を表 8-3 に示す。

T-protein の立体構造は、現在まで 12 個の結晶構造が登録されている (Okamura-Ikeda *et al.*, 2010)。しかし、*E. coli* 由来の PDB ID: 3A8I が唯一 T-protein と H-protein 複合体構造として登録されているため、LigM における基質複合体の類似体である LigM-PCA-THF 複合体構造と PDB ID: 3A8I (以後、T-H 複合体と呼ぶ) との比較を行った。

(Okamura-Ikeda *et al.*, 2010) より、T-H 複合体において、H-protein と補酵素は、LigM における基質・補酵素結合ポケットに相当する部分に結合していた。しかし、T-H 複合体は、H-protein のリポイルリシンが結合できるための穴 (リポイルリシン結合ポケット) があり、その穴は、補酵素が結合している部分まで、トンネルのように内部まで繋がっていた (図 8-6)。

また、他の T-protein (*B. subtilis* (PDB ID: 1YX2)、*H. sapiens* (PDB ID: 1WSV)、*T. maritima* (PDB ID: 1WOO)、*P. horikoshii* OT3 (PDB ID: 1V5V)) についても、リポイルリシン結合ポケットがあることがわかった。

しかし、LigM の立体構造では、insert 1 のアミノ酸残基 (Tyr29, Val 30, Tyr31) が、T-protein のリポイルリシン結合ポケットに相当する部分を覆っており、T-protein に存在するリポイルリシン分子の外側から分子内部の補酵素に至るトンネル (H-protein のリポイルリシンはこのトンネルを通じて活性部位に導かれている) も塞がれていた。その結果、H-protein の結合部位 (H-protein 用の基質結合ポケット) が消失している状態であることがわかった (図 8-7)。

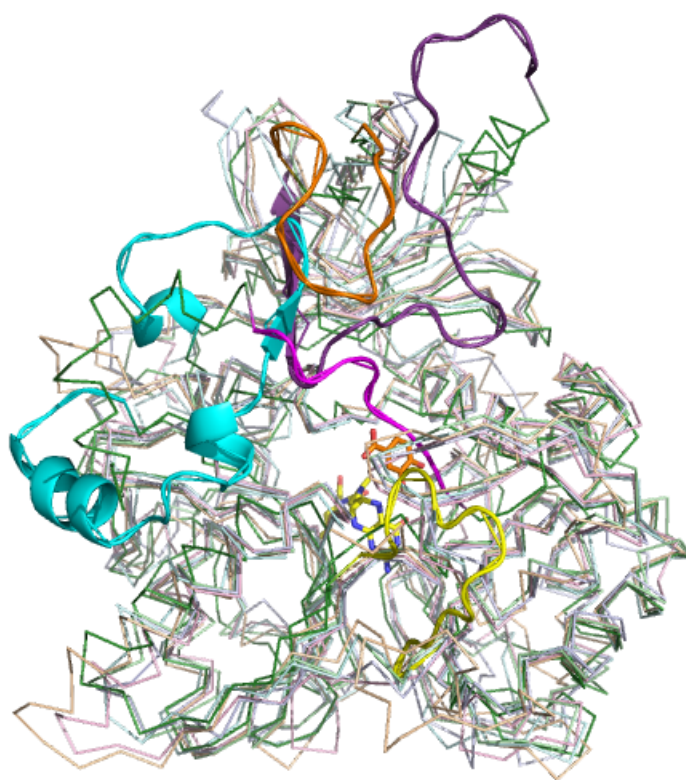


図 8-5. 全体構造の比較

LigM とホモログタンパク質の立体構造を Chain B で重ねあわせて line 表示した。3A8I: 薄紫 1YX2: 薄青, 1WSV: ピンク, 1WOO: 薄緑, 1V5V:薄橙, LigM: 濃緑でそれぞれ表示してある。また、LigM に存在する insert 領域を cartoon 表示した。

表 8-3. LigM のホモログ酵素の domain 領域

Organism	PDB ID	Domain	
		GCV_T	GCV_T_C
<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6	-	29-259	317-449
<i>T.maritima</i>	1WOO	6-257	262-353
<i>P.horikoshi</i> OT3	1V5V	10-290	295-387
<i>E.coli</i>	3A8I	6-253	261-353
<i>B.subtilis</i>	1YX2	7-258	265-357
<i>H.sapiens</i>	1WSV	10-263	272-364

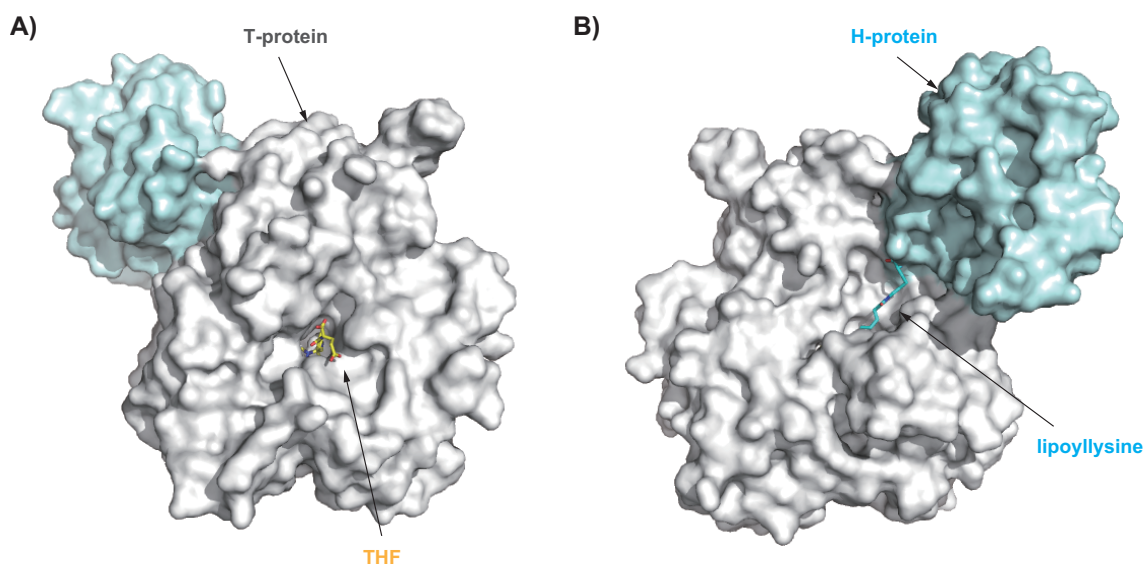


図 8-6. *E. coli* 由来 T-H 複合体 (PDB ID: 3A8I) のリポイルリシン結合ポケット

T-protein : 白色、H-protein : 水色、補酵素 : 黄色でそれぞれ表示した。A) 補酵素結合ポケットがある表面、B) リポイルリシン結合ポケットをそれぞれ示す。リポイルリシンは、THF が結合している表面までトンネルのように内部で繋がっていた。

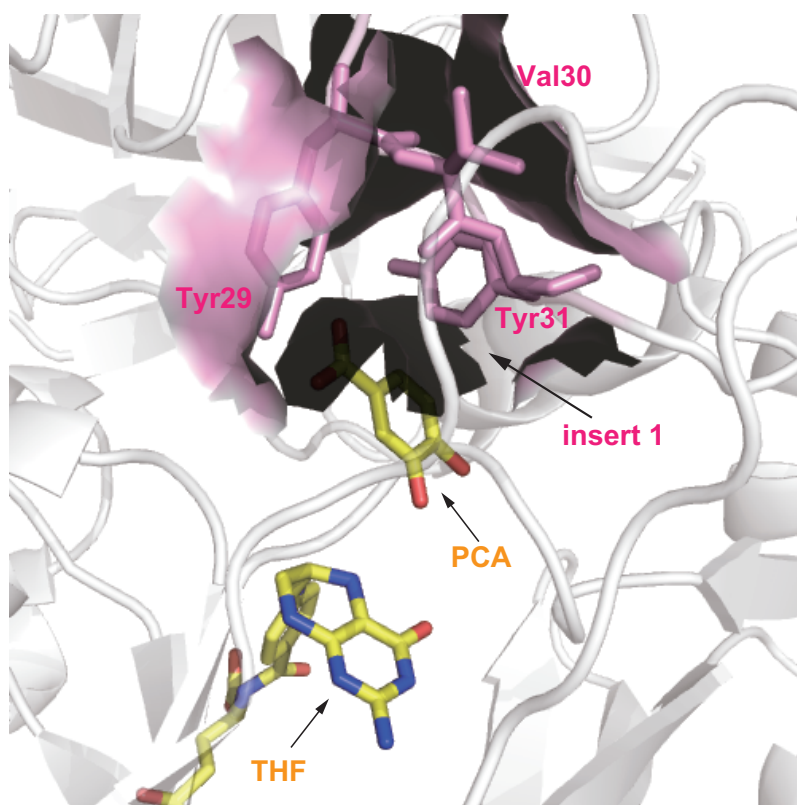


図 8-7. LigM の立体構造上における H-protein 結合部位に相当するアミノ酸残基
LigM: 白色,insert1: ピンク色,THF 及び PCA: 黄色でそれぞれ表示した。LigM は insert1 の
Tyr29, Val30, Tyr31 が H-protein 結合部位を塞いでいる。

8章 考察

LigM-PCA-THF 複合体構造において、基質・補酵素結合ポケットは小さく基質結合に伴う構造変化がほとんどないため (7-3.)、基質分子の結合方向は一義的に決定できると考えられる (図 8-8)。よって、PCA の構造に VNL を当てはめ反応中間体の立体構造を予測した (図 8-9)。

LigM による *O*-脱メチル化反応は、VNL のメトキシ基のメチル基が THF の N5 位へ転移される反応である。VNL の OM 位から THF の N5 までの距離は 2.1 Å であることから、メチル基が十分に転移可能な距離であると考えられた (図 8-9)。His60 の NE2 位 N 原子と VNL の OM 位 O 原子のとの距離は 2.8 Å であることから、His は触媒塩基として作用していることが予測された。よって、LigM による *O*-脱メチル化の触媒反応機構を予測した (図 8-10) また、Tyr31, Arg122, Asn250 は基質の特異的な結合に重要なアミノ酸残基であると推察された。

Okamura-Ikeda *et al.*, 2010 より、T-protein の触媒反応機構に関わるアミノ酸残基は Tyr84, Asp96, Asp97, Asn113, Arg223 であると考えられている (図 8-11)。これらのアミノ酸と LigM の触媒残基や基質認識に重要と考えられるアミノ酸を立体構造上にマッピングすると、3次元構造上で異なる場所に配置していることがわかった (図 8-12)。

よって、LigM と T-protein は、立体構造は似ているものの触媒残基が異なることが示唆された。

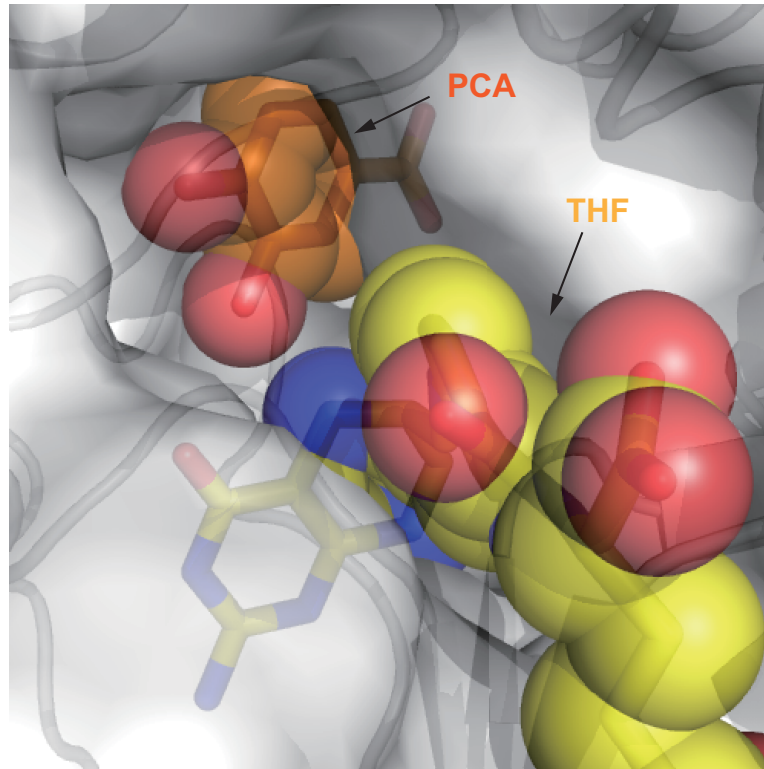


図 8-8. 基質・補酵素結合ポケットにおける PCA と THF の van der waals 半径

基質・補酵素結合ポケットにおける PCA（橙色）と THF（黄色）の van der waals 半径を示した。基質・補酵素結合ポケットは小さく、基質結合に伴う構造変化がほとんどないため基質分子の結合方向へ一義的に決定できると考えられる。

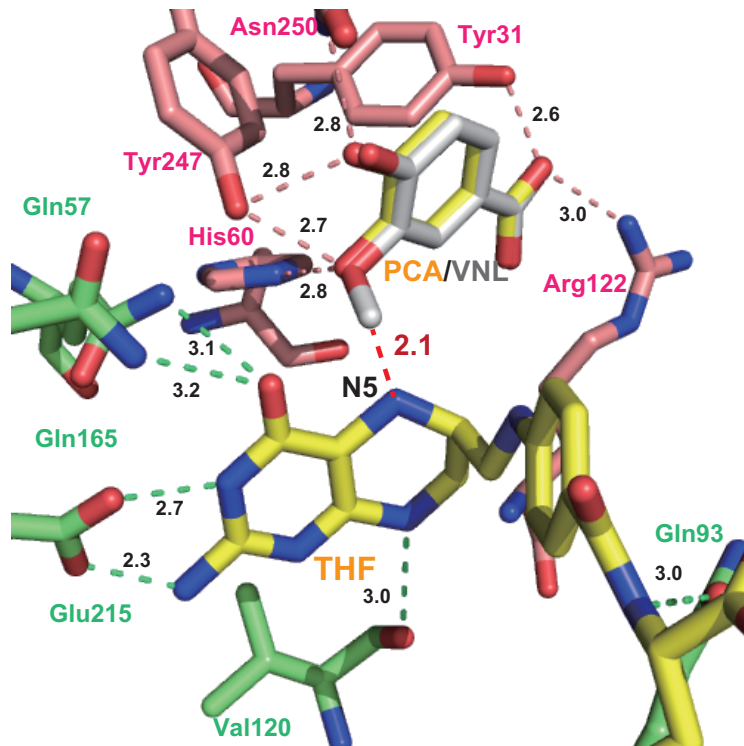


図 8-9. LigM の立体構造における活性中心の様子

LigM の活性中心における基質と補酵素が形成する水素結合を表示した。THF, PCA: 黄色, PCA と水素結合を形成するアミノ酸残基: ピンク色, THF と水素結合を形成するアミノ酸残基: 緑色

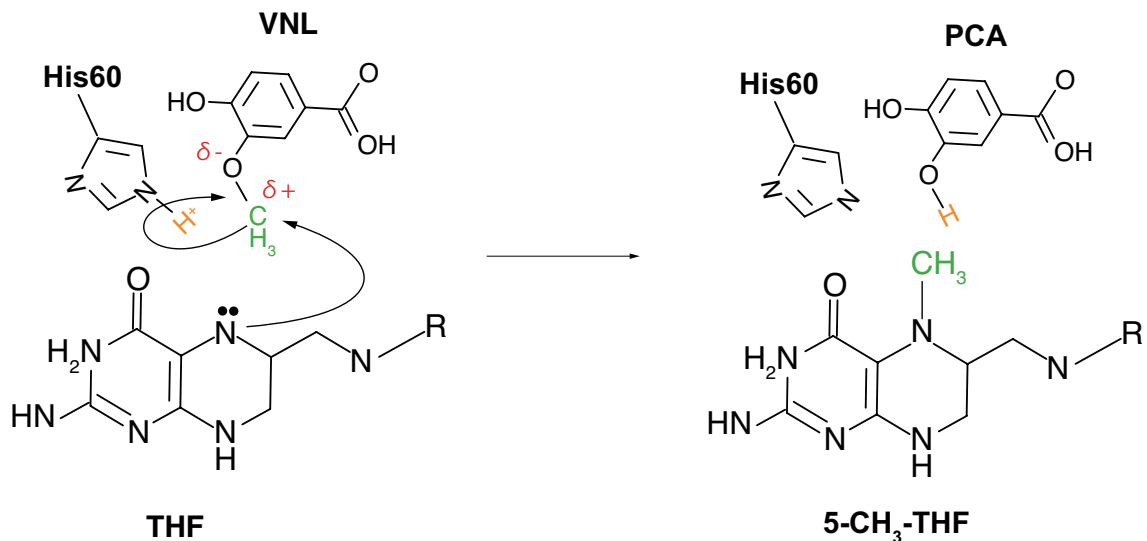


図 8-10. LigM による *O*-脱メチル化触媒反応機構

活性中心の構造から LigM による *O*-脱メチル化触媒反応機構のモデルを示す。

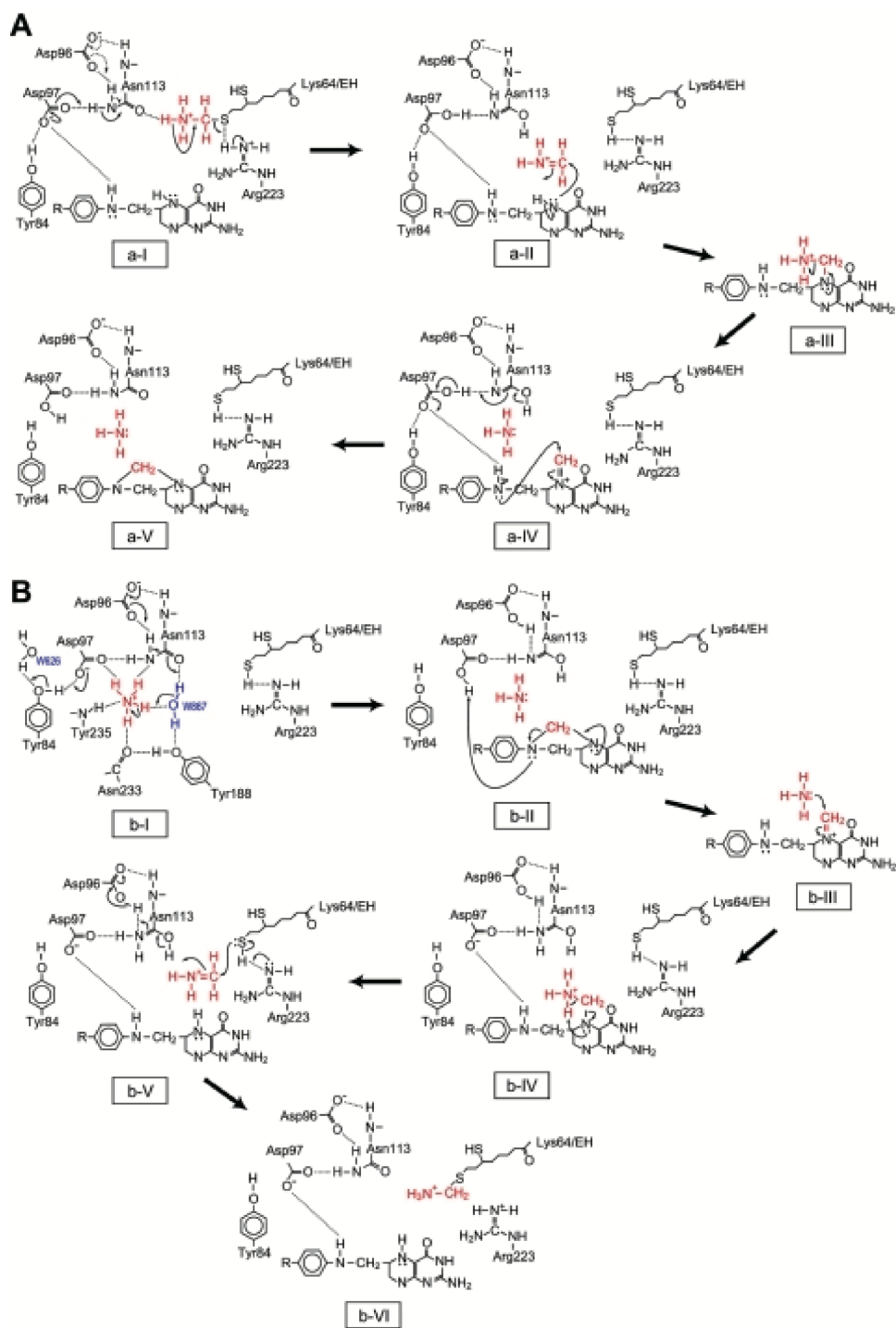


図 8-11. T-proteinn の触媒反応機構 (PDB ID: 3A8I)

Okamura-Ikeda *et al.*, 2010 から Figure 5 を引用。T-protein の触媒反応機構モデルを示す。触媒反応機構に関わるアミノ酸は Tyr84, Asp96, Asp97, Asn113, Arg223 であると考えられている。A：正反応, B：逆反応をそれぞれ示す。

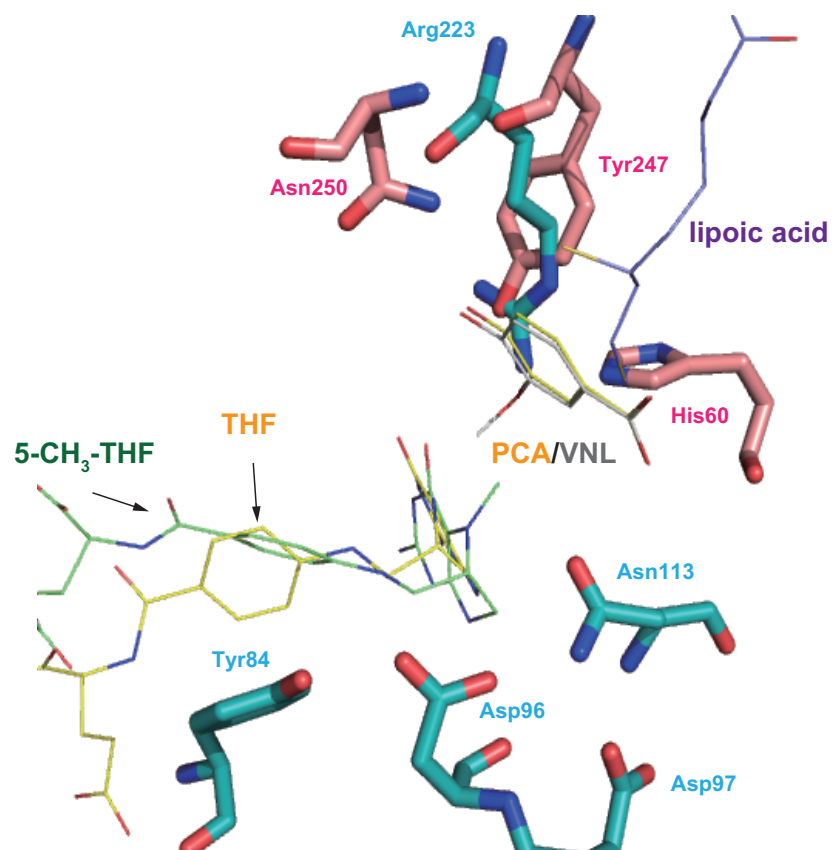


図 8-12. LigM と T-H 複合体 (PDB ID: 3A8I)の触媒残基の立体構造上での配置

LigM と T-H 複合体 (PDB ID: 3A8I)のそれぞれの触媒残基の配置を示した。THF/5-CH₃-THF: 黄色または緑色、PCA/lipoic acid: 黄色または紫色、VNL: 白色、LigM の触媒残基: ピンク色、T-protein の触媒残基: 水色でそれぞれ示す。LigM の触媒残基と T-protein の触媒残基は立体構造上で異なる場所に配置されている。

第9章 近縁種におけるシーケンスアライメント

第9章 近縁種におけるシークエンスアライメント

9-1. *Sphingobium* 属に含まれる LigM のホモログ酵素

<目的>

Sphingobium sp. SYK- 6 株は、生物分類学上では真正細菌の *Proteobacteria* 門 *Alphaproteobacteria* 綱 *Sphingomonadales* 目 *Sphingomionadaceae* 科 *Sphingobium* 属に分類される。構造既知の T-protein には、真核生物や古細菌由来のものも含まれているため、SYK-6 との比較対象としては、遠縁の種にあたる。遠縁種であるほど、進化の過程で変異が入る確率も上がるため、アミノ酸配列の異なる割合も高くなると考えられる。そこで、生物分類学上で最も近縁である *Sphingobium* 属に含まれる LigM のホモログ酵素とのシークエンスアライメントを行い、LigM の O-脱メチル化に必要な触媒残基が保存されているかどうかを調べ、LigM 型の酵素がどの様に分布しているかを調べる。

<実験結果と考察>

第8章より、LigM の触媒反応や基質認識に関与すると考えられる残基 (His60, Tyr247, Asn250) と T-protein の触媒反応を行う触媒残基の候補 (Tyr84, Asp96, Asp97, Asn113, Arg22) (Okamura-Ikeda *et al.*, 2010) は、立体構造上で異なる場所に配置されていることがわかった。よって、近縁のバクテリアに含まれる LigM のホモログ酵素は、O-脱メチル化に必要な触媒残基が保存されているかどうかを調べた。

Protein BLAST を用いて、organism に *Sphingobium* を入力し検索の対象範囲を *Sphingobium* に絞り、LigM のアミノ酸シークエンスを用いて、LigM のホモログ酵素の検索を行った (表 9-1)。さらに、COBALT を用いてシークエンスアライメントを行った。シークエンスアライメントには、*Sphingobium japonicum*、*Sphingobium czechense* LL01、*Sphingobium* sp. DC-2、*Sphingobium quisquiliarum*、*Sphingobium xenophagum*、*Sphingobium* sp. TCM1、*Sphingobium* sp. Leaf26、*Sphingobium* sp. ba1 のバクテリアの LigM のホモログ酵素を利用した。

シークエンスアライメントの結果、*Sphingobium* 属のバクテリアには、LigM のホモログ酵素が存在した。また、そのホモログ酵素には LigM の触媒残基候補が保存されており、かつ LigM と T-protein とのシークエンスアライメントで LigM に特徴的であった insert 領域部分も保存されていた。

ここで、LigM の触媒残基が保存されている、かつ insert 領域部分が存在する、2つの条件を満たすホモログ酵素を「LigM 型酵素」と定義することにする。*Sphingobium* sp. *japonicum*、

Sphingobium czechense LL01、 *Sphingobium* sp. DC-2、 *Sphingobium quisquiliarum*、 *Sphingobium xenophagum*、 *Sphingobium* sp. TCM1、 *Sphingobium* sp. Leaf 26、 *Sphingobium* sp. ba1 に含まれる LigM のホモログ酵素は、LigM 型の酵素であることがわかった（図 9-1）。

表 9-1. *Sphingobium* に含まれるバクテリアにおける LigM のホモログ酵素の検索結果

Description	Max score	Total score	E value	Ident	Accession
<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 (LigM)	972	972	0	100%	WP_014075600.1
<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 (DesA)	433	433	2.00E-148	50%	WP_014076820.1
<i>Sphingobium japonicum</i>	493	493	5.00E-172	54%	WP_006960180.1
<i>Sphingobium czechense</i> LL01	490	490	5.00E-171	53%	KMS52152.1
<i>Sphingobium</i> sp. DC-2	489	489	1.00E-170	52%	WP_030541068.1
<i>Sphingobium quisquiliarum</i>	489	489	1.00E-170	52%	WP_021236519.1
<i>Sphingobium xenophagum</i>	488	488	3.00E-170	53%	WP_017181837.1
<i>Sphingobium</i> sp. TCM1	488	488	5.00E-170	53%	OAN59422.1
<i>Sphingobium</i> sp. Leaf26	485	485	5.00E-169	52%	WP_056685049.1
<i>Sphingobium</i> sp. ba1	482	482	8.00E-168	53%	WP_037474347.1

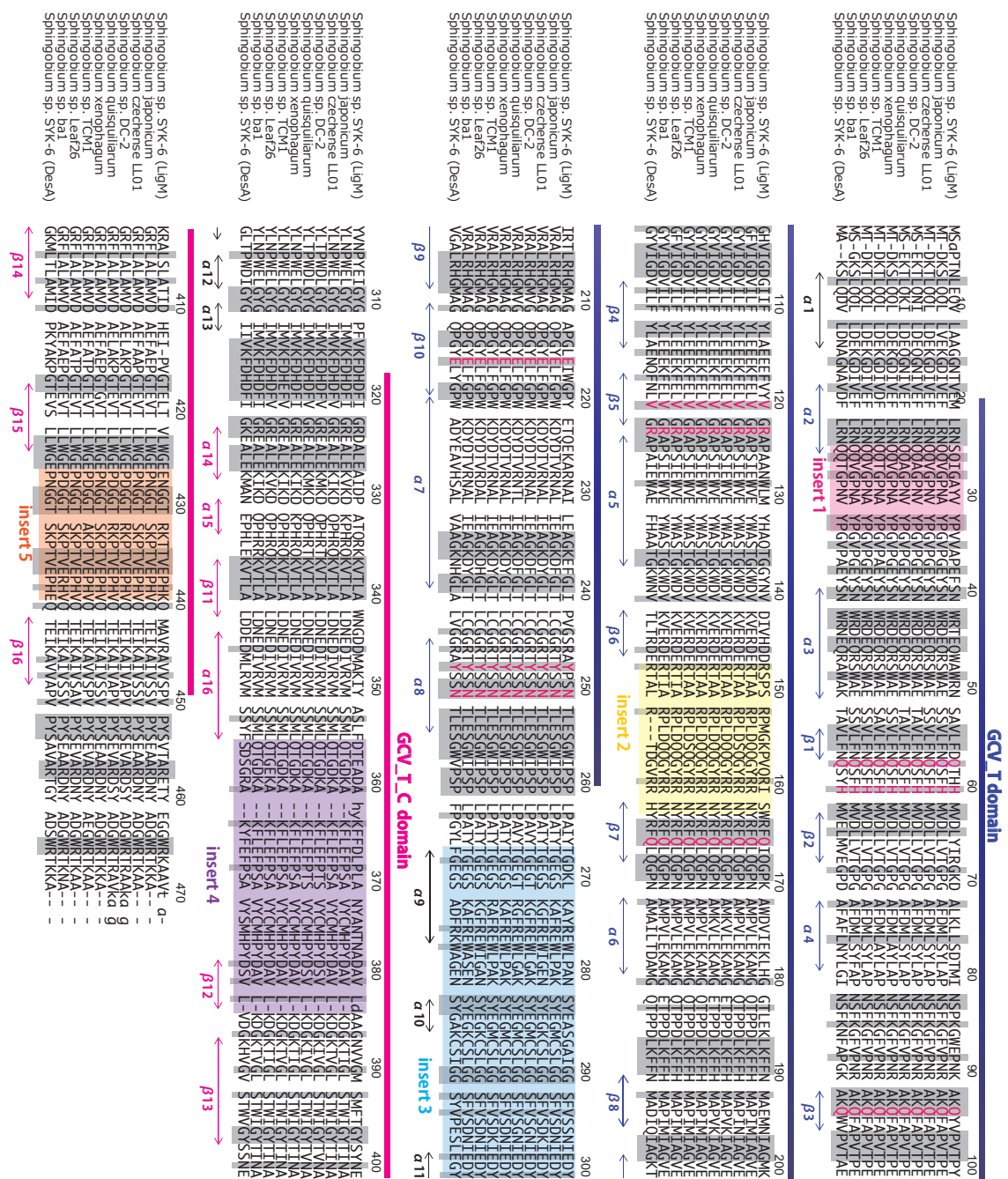


図 9-1. LigM のホモログ酵素を持つ *Shingobium* 属のバクテリアと LigM とのシーケンズアライメント

T-protein と比較して LigM に特徴的であった insert 領域をそれぞれ以下のように示す。insert 1 (アミノ酸残基 24- 32): ピンク色, insert 2 (アミノ酸残基 147- 161): 黄色, insert 3 (アミノ酸残基 266- 300): 青色, insert 4 (アミノ酸残基 355- 382): 紫色, insert 5 (アミノ酸残基 426- 439): 橙色でそれぞれ表示した。また、LigM の触媒残基候補をピンク色で示した。

9-2. Sphingomonadales に含まれる LigM 及び T-protein のホモログ酵素

<目的>

9-1. での解析よりも、生物分類学上の広い範囲のバクテリア (*Sphingomonadales*) に対し BLAST 検索を行い、LigM 型酵素の探索を行う。探索により見出された LigM のホモログ酵素と LigM とのシークエンスアライメントを行い、そのホモログ酵素が LigM 型であるかについての検証を行う。また、LigM のホモログ酵素を持つバクテリアについて、そのバクテリアに T-protein のホモログ酵素があるか BLAST を用いて検索を行う。さらに、T-protein のホモログ酵素と T-protein とのシークエンスアライメントを行い、そのホモログ酵素が T-protein であるかについて検証を行う。

<実験方法と結果>

9-2.1 Sphingomonadales に含まれるバクテリアに対する LigM のホモログ酵素の検索とシークエンスアライメント

Protein BLAST において、organism に *Sphingomonadales* を入力し検索の対象範囲を *Sphingomonadales* に絞り、LigM のアミノ酸シークエンスをもちいて、LigM のホモログ酵素の検索を行った (表 9-2)。次に検索結果上位 100 から、26 個のバクテリアに含まれる LigM のホモログ酵素と LigM とのシークエンスアライメントを行った (図 9-2)。その結果、LigM の触媒残基候補 (His60, Tyr247, Asn250) が全て保存されていることがわかった。また、活性部位において基質及び THF と水素結合を形成する全てのアミノ酸が保存されていた。さらに、LigM にのみ特徴的であった insert 領域も存在していた。

よって、表 9-2 に挙げたバクテリアには、LigM 型酵素の条件を満たしている酵素が存在することがわかった。

表 9-2. *Sphingobium* に含まれるバクテリアにおける LigM のホモログ酵素の検索結果

No.	Description	Max score	Total score	E value	Ident	Accession
1	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6	972	972	0	100%	WP_014075600.1
2	<i>Sphingomonas</i> sp. UNC305MFCo15.2	783	783	0	80%	WP_029936031.1
3	<i>Sphingomonas hengshuiensis</i>	773	773	0	79%	WP_044333022.1
4	<i>Sphingomonadales bacterium</i> BRH_c42	771	771	0	79%	KUO50791.1
5	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	763	763	0	78%	WP_011446501.1
6	<i>Novosphingobium</i> sp. CCH12-A3	761	761	0	79%	WP_062346633.1
7	<i>Novosphingobium subterraneum</i>	761	761	0	79%	WP_039331636.1
8	<i>Sphingomonas wittichii</i>	760	760	0	78%	WP_037526909.1
9	<i>Novosphingobium</i> sp. ST904	760	760	0	77%	WP_054436020.1
10	<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y	760	760	0	78%	WP_041558815.1
11	<i>Novosphingobium</i> sp. KN65.2	758	758	0	78%	WP_054947719.1
12	<i>Novosphingobium</i> sp. AAP83	755	755	0	78%	WP_054106610.1
13	<i>Altererythrobacter atlanticus</i>	753	753	0	76%	WP_046903636.1
14	<i>Erythrobacter</i> sp. SG61-1L	752	752	0	76%	WP_054531112.1
15	<i>Novosphingobium capsulatum</i>	750	750	0	77%	WP_062787541.1
16	<i>Novosphingobium</i> sp. AAP1	750	750	0	77%	WP_054132649.1
17	<i>Novosphingobium</i> sp. Fuku2-ISO-50	749	749	0	77%	KUR79158.1
18	<i>Novosphingobium</i> sp. FSW06-99	749	749	0	77%	KUR77235.1
19	<i>Novosphingobium</i> sp. B-7	749	749	0	77%	WP_022677629.1
20	<i>Altererythrobacter</i> sp. Root672	748	748	0	77%	WP_055925659.1
21	<i>Novosphingobium fuchskuhlense</i>	748	748	0	77%	KUR73015.1
22	<i>Novosphingobium acidiphilum</i>	746	746	0	76%	WP_028641467.1
23	<i>Erythrobacter luteus</i>	738	738	0	77%	WP_047003752.1
24	<i>Novosphingobium</i> sp. AAP93	735	735	0	78%	WP_054122432.1
25	<i>Sphingorhabdus</i> sp. M41	625	625	0	66%	AMO73226.1
26	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04	614	614	0	81%	GAM05512.1

橙色でそれぞれ示す。また、基質と水素結合を形成するアミノ酸を濃いピンク色、補酵素と水素結合を形成するアミノ酸:を緑色でそれぞれ表示した。

9-2.2 *Sphingomonadales* に含まれるバクテリアに対する T-protein のホモログ酵素の検索とシークエンスアライメント

9-2.1 の結果に基づいて、26 個の LigM 型酵素を持つバクテリアについて、そのバクテリアに T-protein (もしくは、ホモログ酵素) があるか BLAST を用いて検索を行った(表 9-4)。解析結果をよりわかりやすくするため、26 個のバクテリアについて表 9-3 のように順に番号をつけた(表 9-3)。T-protein を検索した結果、興味深い結果が得られた。

T-protein のホモログ酵素の検索で出てきたホモログ酵素と、LigM のホモログ酵素の検索で出てきたホモログ酵素が同一であり、それ以外にホモログとみなせる酵素がないバクテリアが 4 種いた(表 9-4)。4 種のバクテリアは、*Sphingomonadales bacterium BRH_c42*, *Erythrobacter* sp. SG61-1L, *Altererythrobacter* sp. Root672, *Sphingorhabdus* sp. M41 であり、BLAST の検索結果の表 9-4 において赤くハイライトで示した。また、それらのホモログ酵素はいずれも LigM との相同性の方が高く、LigM の触媒残基を保存していることから、LigM 型であると判断した。よって、*Sphingomonadales bacterium BRH_c42*, *Erythrobacter* sp. SG61-1L, *Altererythrobacter* sp. Root672, *Sphingorhabdus* sp. M41 は、SYK-6 と同様に T-protein を持たないバクテリアであるらしいことがわかった。

また、LigM のホモログ酵素を持つバクテリア内に、T-protein のホモログ酵素があるバクテリアは 19 種あった。19 種類のうち、表 9-3 において *Novosphingobium* sp. AAP1 と *Novosphingobium* sp. B-7 は同じホモログ酵素を持っていた。よって、全 18 種の T-protein のホモログ酵素と T-protein とをシークエンスアライメントを行った。結果、T-protein の活性残基 (Tyr84, Asp96, Asp97, Asn113, Arg223) が保存されていたため(Okamura-Ikeda *et al.*, 2010)、シークエンスに使用した T-protein のホモログ酵素は T-protein であると判断した(図 9-3)。よって、SYK-6 と近縁の種において LigM 型酵素を持つもの、LigM 型および T-protein を持つバクテリアがいることがわかった。

表 9-3. T-protein のホモログ酵素の検索を行ったバクテリアの種類

No.	Description	Organism
1	GcvT	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6
2	GcvT	<i>Sphingomonas</i> sp. UNC305MFCo15.2
3	GcvT	<i>Sphingomonas hengshuiensis</i>
4	GcvT	<i>Sphingomonadales bacterium</i> BRH_c42
5	GcvT	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>
6	GcvT	<i>Novosphingobium</i> sp. CCH12-A3
7	GcvT	<i>Novosphingobium subterraneum</i>
8	GcvT	<i>Sphingomonas wittichii</i>
9	GcvT	<i>Novosphingobium</i> sp. ST904
10	GcvT	<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y
11	GcvT	<i>Novosphingobium</i> sp. KN65.2
12	GcvT	<i>Novosphingobium</i> sp. AAP83
13	GcvT	<i>Altererythrobacter atlanticus</i>
14	GcvT	<i>Erythrobacter</i> sp. SG61-1L
15	GcvT	<i>Novosphingobium capsulatum</i>
16	GcvT	<i>Novosphingobium</i> sp. AAP1
17	GcvT	<i>Novosphingobium</i> sp. Fuku2-ISO-50
18	GcvT	<i>Novosphingobium</i> sp. FSW06-99
19	GcvT	<i>Novosphingobium</i> sp. B-7
20	GcvT	<i>Altererythrobacter</i> sp. Root672
21	GcvT	<i>Novosphingobium fuchskuhlense</i>
22	GcvT	<i>Novosphingobium acidiphilum</i>
23	GcvT	<i>Erythrobacter luteus</i>
24	GcvT	<i>Novosphingobium</i> sp. AAP93
25	GcvT	<i>Sphingorhabdus</i> sp. M41
26	GcvT	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04

表 9-4. LigM 及び T-protein のホモログ酵素の検索を行った結果 1

No.	LigM							T-protein					
	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession		Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
1	972	972	100%	0	100%	WP_014075600.1	1	57	57	73%	9.00E-10	27%	WP_014076820.1
	433	433	97%	5.00E-150	50%	WP_014076820.1		40.4	40.4	54%	2.00E-04	26%	WP_014075600.1
2	783	783	99%	0	80%	WP_029936031.1	2	170	170	90%	2.00E-50	35%	WP_025560480.1
								37	37	58%	0.002	24%	WP_029936031.1
								35	35	20%	0.005	29%	WP_025587369.1
3	773	773	97%	0	79%	WP_044333022.1	3	159	159	90%	3.00E-46	34%	WP_044335718.1
	498	498	97%	9.00E-176	54%	WP_044329823.1		60.8	60.8	73%	5.00E-11	27%	WP_044329823.1
								45.1	45.1	54%	6.00E-06	27%	WP_044333022.1
4	771	771	98%	0	79%	KUO50791.1	4	45.4	45.4	52%	2.00E-06	27%	KUO50806.1
	459	459	99%	9.00E-161	50%	KUO50806.1		41.2	41.2	54%	4.00E-05	26%	KUO50791.1
5	763	763	98%	0	78%	WP_011446501.1	5	174	174	96%	5.00E-52	35%	WP_041550960.1
	472	472	97%	2.00E-165	53%	WP_011446046.1		48.9	48.9	73%	3.00E-07	24%	WP_011446046.1
6	761	761	98%	0	79%	WP_062346633.1	6	39.7	39.7	54%	2.00E-04	26%	WP_011446501.1
	473	473	97%	8.00E-166	52%	WP_062343076.1		170	170	93%	8.00E-51	36%	WP_062346753.1
	41.2	41.2	20%	1.00E-04	31%	WP_062346753.1		49.7	49.7	73%	2.00E-07	24%	WP_062343076.1
7	761	761	98%	0	79%	WP_039331636.1	7	38.5	38.5	54%	7.00E-04	27%	WP_062346633.1
	474	474	97%	2.00E-166	53%	WP_039335069.1		176	176	96%	1.00E-52	36%	KHS48365.1
	40.8	40.8	20%	2.00E-04	31%	KHS48365.1		168	168	93%	6.00E-50	35%	WP_052242025.1
	40.8	40.8	20%	2.00E-04	31%	WP_052242025.1		49.7	49.7	73%	2.00E-07	24%	WP_039335069.1
8	760	760	98%	0	78%	WP_037526909.1	8						
	480	480	98%	4.00E-168	52%	WP_037526887.1		166	166	97%	2.00E-48	35%	WP_037522959.1
	52.8	52.8	46%	1.00E-07	25%	WP_029549029.1		152	152	97%	4.00E-43	33%	ABO69050.1
								142	142	93%	1.00E-39	33%	WP_049771313.1
								142	142	93%	1.00E-39	33%	WP_050986519.1
9	760	760	98%	0	77%	WP_054436020.1	9	120	120	95%	5.00E-30	28%	WP_029549029.1
	500	500	98%	3.00E-176	54%	WP_054438039.1		45.1	45.1	61%	2.00E-05	26%	WP_037526909.1
	36.2	36.2	49%	0.005	24%	WP_054441739.1		40.8	40.8	67%	4.00E-04	24%	WP_037526887.1
10	760	760	98%	0	78%	WP_041558815.1	10	169	169	95%	3.00E-50	35%	WP_054441739.1
	759	759	98%	0	78%	CCA92070.1		54.3	54.3	73%	7.00E-09	25%	WP_054438039.1
	498	498	97%	1.00E-175	54%	WP_013836803.1							
11	758	758	98%	0	78%	WP_054947719.1	11	159	159	97%	4.00E-46	35%	CCA93573.1
	498	498	97%	1.00E-175	54%	WP_054948289.1		152	152	93%	7.00E-44	35%	WP_051010127.1
12	755	755	98%	0	78%	WP_054106610.1	12	52.4	52.4	73%	3.00E-08	24%	WP_013836803.1
	471	471	97%	6.00E-165	53%	WP_054106367.1		163	163	97%	1.00E-47	35%	WP_054944794.1
	330	330	98%	5.00E-110	40%	WP_054109405.1		163	163	97%	2.00E-47	35%	CDO34794.1
	36.6	36.6	20%	0.003	30%	WP_054108540.1		52.8	52.8	73%	2.00E-08	24%	WP_054948289.1
13	753	753	98%	0	76%	WP_046903636.1	13	159	159	93%	1.00E-46	34%	WP_054108540.1
	462	462	100%	2.00E-161	51%	WP_046904336.1		44.3	44.3	73%	9.00E-06	24%	WP_054106367.1
	38.9	38.9	49%	6.00E-04	24%	WP_046904306.1		38.9	38.9	54%	4.00E-04	26%	WP_054106610.1

表 9-4. LigM 及び T-protein のホモログ酵素の検索を行った結果 2

No.	LigM						T-protein						
	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	
14	752	752	97%	0	76%	WP_054531112.1	14	52.4	52.4	73%	2.00E-08	25%	WP_054531709.1
	464	464	100%	3.00E-162	52%	WP_054531709.1							
15	750	750	98%	0	77%	WP_062787541.1	15	162	162	98%	1.00E-47	34%	WP_062783053.1
	487	487	97%	2.00E-171	55%	WP_062781918.1		49.7	49.7	73%	1.00E-07	25%	WP_062781918.1
	47	47	54%	2.00E-06	26%	WP_062785695.1							
16	750	750	98%	0	77%	WP_054132649.1	16	164	164	98%	4.00E-48	36%	WP_028657880.1
	488	488	97%	1.00E-171	55%	WP_054131979.1		49.7	49.7	73%	2.00E-07	25%	WP_054131979.1
	47.4	47.4	54%	2.00E-06	26%	WP_022675218.1		40.8	40.8	54%	1.00E-04	27%	WP_054132649.1
17	749	749	98%	0	77%	KUR79158.1	17	166	166	96%	6.00E-49	37%	KUR77917.1
	426	426	97%	2.00E-147	48%	KUR79148.1		149	149	90%	1.00E-40	33%	KUR76577.1
								45.1	45.1	73%	4.00E-06	25%	KUR79148.1
	47.4	47.4	45%	2.00E-06	24%	KUR76577.1		36.2	36.2	54%	0.003	25%	KUR79158.1
18	749	749	98%	0	77%	KUR77235.1	18	164	164	96%	4.00E-48	37%	KUR80669.1
	486	486	97%	6.00E-171	51%	KUR79594.1		133	133	90%	4.00E-35	32%	KUR80858.1
	437	437	98%	9.00E-152	49%	KUR77196.1		84	84	89%	8.00E-19	28%	KUR80853.1
	45.1	45.1	45%	9.00E-06	23%	KUR80858.1		52.4	52.4	73%	3.00E-08	25%	KUR79594.1
	37.7	37.7	35%	0.001	22%	KUR80853.1		47.4	47.4	73%	1.00E-06	27%	KUR77196.1
19	749	749	98%	0	77%	WP_022677629.1	19	164	164	98%	4.00E-48	36%	WP_028657880.1
								49.3	49.3	73%	2.00E-07	25%	WP_022676813.1
	489	489	97%	3.00E-172	55%	WP_022676813.1		39.7	39.7	54%	2.00E-04	27%	WP_022677629.1
20	748	748	98%	0	77%	WP_055925659.1	20	51.2	51.2	52%	5.00E-08	26%	WP_055925659.1
	460	460	98%	8.00E-161	52%	WP_055925659.1							
21	748	748	97%	0	77%	KUR73015.1	21	65.1	65.1	90%	1.00E-12	23%	KUR70053.1
	471	471	97%	6.00E-165	52%	KUR70427.1		40.8	40.8	73%	9.00E-05	24%	KUR70427.1
	43.5	43.5	37%	2.00E-05	26%	KUR70053.1		35.8	35.8	65%	0.003	24%	KUR73015.1
22	746	746	99%	0	76%	WP_028641467.1	22	177	177	96%	6.00E-53	34%	WP_028641726.1
								141	141	90%	5.00E-38	33%	WP_028640525.1
								96.7	96.7	89%	2.00E-23	28%	WP_028640519.1
								56.6	56.6	90%	1.00E-09	24%	WP_028642123.1
								43.5	43.5	73%	1.00E-05	25%	WP_028639525.1
								40	40	54%	2.00E-04	27%	WP_028641467.1
23	738	738	97%	0	77%	WP_047003752.1	23	169	169	93%	1.00E-50	36%	WP_047004608.1
	463	463	98%	5.00E-162	52%	WP_047004291.1		46.2	46.2	73%	1.00E-06	25%	WP_047004291.1
24	735	735	94%	0	78%	WP_054122432.1	24	93.2	93.2	96%	1.00E-21	27%	WP_054123169.1
	466	466	97%	6.00E-163	52%	WP_054121823.1		93.6	93.6	96%	1.00E-21	27%	KPF80213.1
	55.8	55.8	44%	3.00E-09	22%	WP_054123169.1		76.6	76.6	90%	2.00E-16	25%	WP_054123611.1
	55.5	55.5	44%	5.00E-09	22%	KPF80213.1		41.2	41.2	73%	9.00E-05	24%	WP_054121823.1
	50.4	50.4	44%	2.00E-07	25%	WP_054120481.1							
	47	47	60%	2.00E-06	25%	WP_054121948.1							
	38.5	38.5	54%	7.00E-04	24%	WP_054123611.1							
25	625	625	95%	0	66%	AMO73226.1	25	179	179	97%	6.00E-54	36%	AMO72247.1
	465	465	98%	1.00E-162	50%	AMO71229.1		52.4	52.4	73%	2.00E-08	25%	AMO71229.1
26	614	614	75%	0	81%	GAM05512.1	26	167	167	97%	2.00E-49	35%	GAM06461.1
	420	420	95%	8.00E-145	47%	WP_039396326.1		167	167	97%	2.00E-49	35%	WP_052322645.1
	322	322	62%	9.00E-109	54%	GAM05472.1		42.4	42.4	31%	1.00E-05	29%	GAM05471.1
	166	166	30%	2.00E-50	55%	GAM05471.1		43.9	43.9	71%	2.00E-05	24%	WP_039396326.1
	126	126	16%	3.00E-36	73%	GAM05513.1		41.6	41.6	54%	9.00E-05	26%	GAM05512.1
	36.6	36.6	19%	0.005	35%	WP_052322645.1							

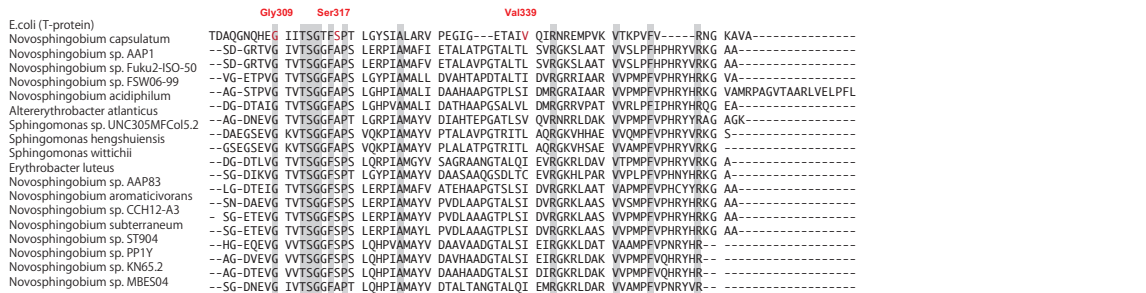
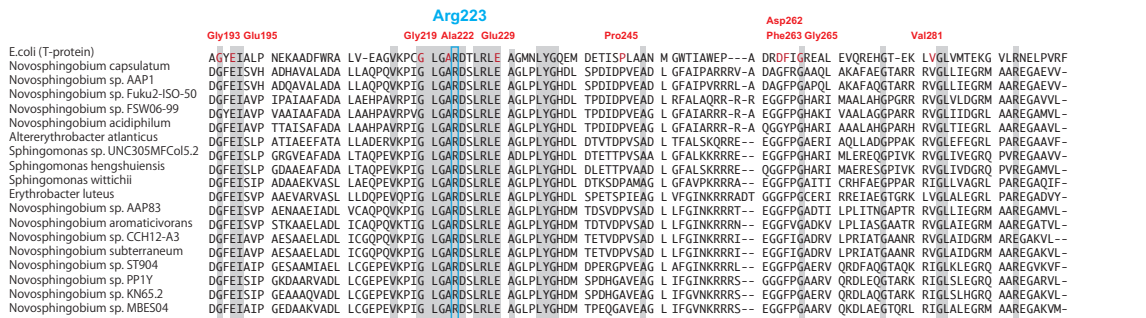
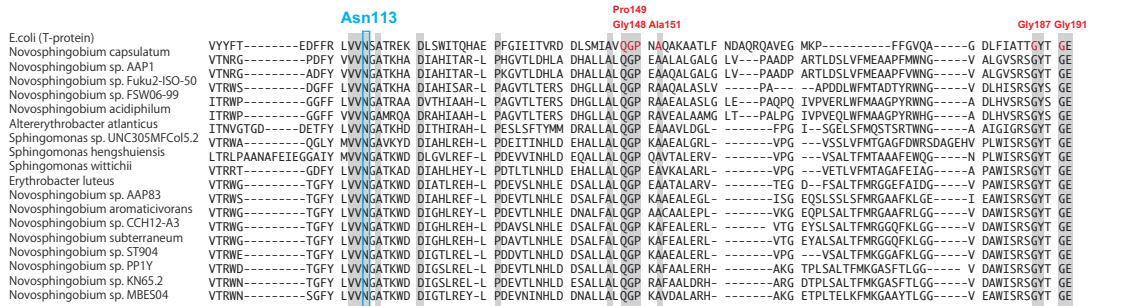
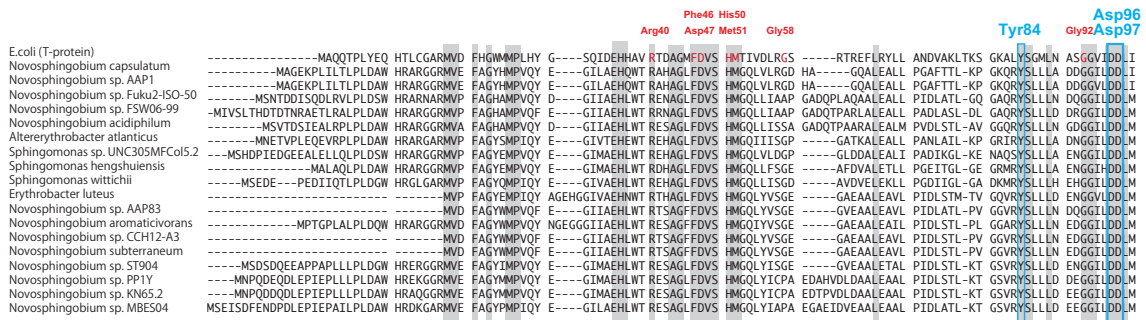


図 9-2. T-protein のホモログ酵素を持つ *Spingomonadales* 属のバクテリアと T-protein とのシークエンスアライメント

T-protein の触媒残基を水色, T-protein 及び LigM の両方で保存されていた残基を赤色でそれぞれ表示する。T-protein ホモログ酵素には、T-protein の触媒残基が完全に保存されていた。

9章 考察

SYK-6 株の近縁種において、BLAST を用いて、LigM のホモログ酵素と T-protein のホモログ酵素の解析を行った。それぞれのホモログ酵素を LigM 型ホモログタンパク質、T-protein、それ以外に分けることができた。LigM 型とは、LigM の触媒残基と推定されるアミノ酸残基と T-protein と比較して LigM にのみ特徴的であった 5 つの insert 領域が存在すると定義している。また、T-protein は、T-protein の触媒残基が保存されているものと定義した。

Sphingomonadales における 26 種のバクテリアを用いた解析の結果、興味深いことに、LigM 型ホモログ酵素しか持たないもの、T-protein しか持たないものと分類することができた。また、LigM 型ホモログ酵素だけを持つものより LigM 型酵素と T-protein の 2 つの C1 代謝関連酵素を持つバクテリアの方が多い。

LigM 型酵素は、多くのものが、T-protein と共存している事から、H-protein の結合部位やリポイルリシン結合ポケットが保持されたままであると H-protein と VNL や 3-MGA などの低分子性リグニン誘導体化合物との競合が生じ、低分子性の基質分子反応しにくくなると考えられる。そこで、H-protein との反応を妨げ、リグニン誘導体化合物とのみ反応を行うため LigM 型酵素に特徴的なインサート領域を付加することで、H-protein との結合ポケットを塞いだのではないかと推測された。また、低分子性リグニン誘導体化合物を基質とし、異なる反応を触媒するためには触媒残基も T-protein とは変わる必要があったと考えられた。

第 10 章 まとめと今後の展望

まとめと今後の展望

LigM はリグニン誘導性低分子化合物を基質とし、*O*-脱メチル化を行うことで C1 代謝へ C1 単位を供給する。LigM のホモログである T-protein は我々ヒトやその他の生物が持つ、C1 代謝関連酵素である。結晶構造既知の T-protein (*Thermotoga maritime* (PDB ID; 1WOO), *Escherichia coli* (PDB ID; 3A8I), *Bacillus subtilis* (PDB ID; 1YX2), *Homo sapiens* (PDB ID; 1WSV), *Pyrococcus horikoshii* OT3 (PDB ID; 1V5V)) と LigM との立体構造の比較を行った結果、これらの全体構造は類似していることがわかった。

LigM には構造中央部分にある基質・補酵素結合ポケットに基質および補酵素が結合しており、ポケットは1つであった。しかし、T-protein には、補酵素結合ポケットと、本来の基質である H-protein のリポイルリシンが結合するためのポケット (リポイルリシン結合ポケット) の2つがあり、そのポケットは分子内部で繋がっていることが分かった。

LigM と T-protein のシークエンスアライメントの結果から、LigM には5つのインサート領域があることが分かった。そのうち insert 1 の領域は、T-protein のリポイルリシン結合ポケットに相当する部分を塞いでいることから、LigM は外部から基質・補酵素結合ポケットへのアクセスを阻害しているのではないかと考えられた。

また、両者の活性中心の構造にも違いがあった。LigM は Tyr31, His60, Arg122, Thy247, Asn250 及び1つの水分子と基質分子が水素結合のネットワークを形成しており、これらのアミノ酸が触媒反応に関与すると考えられた。特に、*O*-脱メチル化されるメトキシ基の酸素原子と 2.8Å の距離で水素結合を形成している His60 は、*O*-脱メチル化反応に直接関与する可能性が高い。また、Glu215 は、T-protein と LigM すべてにおいて保存されており、THF の結合に必要なアミノ酸残基であることが示唆された。

一方、大腸菌の T-protein の触媒残基は、Tyr84, Asp96, Asp97, Asn113, Arg223 であるとされているが (Okamura-Ikeda *et al.*, 2010)、これらは LigM の予測される触媒残基とは3次元構造上で異なる位置に配置されていた。LigM と T-protein は、類似したフォールドを持つものの、異なる反応を触媒する酵素である事は知られていたが、活性部位の立体構造からも別種の酵素であると考えられた。

LigM ホモログ酵素の中で、LigM の *O*-脱メチル化に必要なと考えられる触媒残基候補が保存されていること、また insert 領域を持つものを、LigM 型酵素と呼ぶ事にした。LigM のホモログ酵素が類縁のバクテリア内にどのように分布しているのか 26 種のバクテリアを用いて解析した。その結果、SYK-6 以外にも LigM 型酵素を持つものが 4 種類存在したが、LigM 型酵素と T-protein の両方の酵素を持つものは 19 種類存在した。

本研究結果から LigM と T-protein は、それぞれの触媒反応、活性部位や基質結合部位にも明確な違いがあり、2 つは異なるグループに分類すべき酵素であることが明確になった。よって、LigM の分子進化の解明に向けて大きく前進した。

LigM の触媒反応機構に関しては LigM-PCA-THF 複合体結晶構造を利用して触媒残基や基質認識に関わるアミノ酸残基の予測を行うにとどまった。よって、今後は H60A, Y31A, Y247F, N250A などの変異体を作製し活性測定を行うことで触媒反応機構を明らかにする予定である。また、DesA の基質特異性の違いを解明するため変異体の活性測定と併せて VNL や SYR のアナログ分子を用いた活性測定も同時に行う予定である。

さらに、*Sphingobium* 属内の LigM 型酵素および T-protein の分布だけではなく、*Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis*, *Sphingosinicella*, *Blastomonas*, *Sandarakinorhabdus*, *Zymomonas* など、他の属内に LigM 型酵素や T-protein がどのように分布しているかシーケンスアライメントを用いて詳細に検討する必要がある。

近縁種での LigM 型酵素および T-protein の分布状況を詳細に検討し、立体構造情報と併せて議論することにより分子進化の解明を行うことができると期待される。

付録 1. LigM-VNL 複合体結晶回折強度データセット

Date	2015/7/22	2015/7/22	2015/7/22	2015/7/22	2015/7/22
Data name	ligm302	ligm291	ligm292	ligm300	ligm304
Ligand	10mM VNL	10mM VNL	10mM VNL	10mM VNL	10mM VNL
Diffraction source	APS 23IDB	APS 23IDB	APS 23IDB	APS 23IDB	APS 23IDB
Wavelength (Å)	1.0332	1.0332	1.0332	1.0332	1.0332
Temperature (K)	95	95	95	95	95
Detector	MARmosaic CCD 300	MARmosaic CCD 300	MARmosaic CCD 300	MARmosaic CCD 300	MARmosaic CCD 300
Crystal-detector distance (mm)	250	400	350	320	250
Total rotation range (°)	0-135	0-360	0-360	0-180	10-190
Rotation range per image (°)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Exposure time per image (s)	1.0	0.5	0.5	0.5	1.0
Data Statistics					
Resolution (Å)	47.82-1.80 (1.83-1.80)	49.56-2.40 (3.67-3.40)	49.20-3.10 (3.27-3.10)	47.98- 2.40 (2.56-2.40)	47.64- 1.90 (1.93-1.90)
Completeness (%)	97.4 (81.2)	99.4 (99.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (99.9)
Redundancy	5.3 (3.6)	22.3 (22.8)	21.7 (22.0)	7.4 (7.4)	7.3 (5.9)
I/σ_I	12.1 (2.0)	9.7 (2.7)	12.4 (2.6)	11.9 (2.1)	14.2 (2.4)
R_{meas} (%)	9.6 (70.0)	47.4 (247.6)	143.8 (803.4)	17.2 (111.1)	14.7 (96.4)
Space group	$P2_12_12$	$P3_121$	$P3_121$	$P2_12_12$	$P2_12_12$
a, b, c (Å)	a = 103.03	a = 114.46	a = 113.61	a = 103.12	a = 102.46
	b = 118.05	b = 114.46	b = 113.61	b = 118.73	b = 117.74
	c = 130.2	c = 221.08	c = 220.19	c = 131.03	c = 129.68
α, β, γ (°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\beta = 120$	$\beta = 120$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$

付録2. LigM-3 MGA 複合体結晶回折強度データセット

Date	2015/12/19	2015/8/7	2015/11/1	2015/11/1	2015/11/1
Data name	ligm383	ligm324	ligm343	ligm345	ligm347_osc1
Ligand	50 mM 3MGA	20 mM 3MGA	10mM 3MGA	10mM 3MGA	10mM 3MGA
Diffraction source	PF AR NE3A	NSRRC 15A	PF BL17A	PF BL17A	PF BL17A
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	0.9800	0.9800	0.9800
Temperature (K)	95	95	95	95	95
Detector	Pilatus 2M-F	MX300HS	Pilatus 3M	Pilatus 3M	Pilatus 3M
Crystal-detector distance (mm)	284.6	300	323.8	446.5	229.6
Total rotation range (°)	0-360	130-310	0.5	0.5	0.5
Rotation range per image (°)	0.5	0.3	0-360	0-180	0-360
Exposure time per image (s)	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5
Data Statistics					
Resolution (Å)	48.44-2.15 (2.19-2.15)	48.58 -2.60 (2.68-2.60)	48.47-2.35 (2.41-2.35)	48.23-2.50 (2.57-2.50)	47.93-2.27 (2.32-2.27)
Completeness (%)	99.7 (97.3)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundancy	10.5 (9.1)	10.8 (2.3)	13.1 (12.9)	6.6 (6.4)	13.3 (12.7)
I/σ_I	13.2 (1.8)	10.8 (2.3)	12.0 (2.0)	11.3 (2.1)	10.8 (2.2)
R_{meas} (%)	20.1 (133.1)	21.5 (96.4)	23.3 (172.8)	20.6 (107.3)	35.7 (199.9)
Space group	$P2_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12$
a, b, c (Å)	a = 104.06	a = 104.27	a = 104.19	a = 103.61	a = 103.07
	b = 118.07	b = 118.30	b = 117.24	b = 117.59	b = 117.14
	c = 132.82	c = 133.80	c = 132.31	c = 132.24	c = 130.48
α, β, γ (°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$

2015/11/3	2015/12/19	2015/12/19
ligm349	ligm375	ligm376
10 mM 3MGA	50 mM 3MGA	50 mM 3MGA
PF-AR NE3A	PF AR NE3A	PF AR NE3A
1.0000	1.0000	1.0000
95	95K	95K
PILATUS 2M-F	Pilatus 2M-F	Pilatus 2M-F
260.98	257.3	284.6
0.2	0-360	0-360
0-360	0.5	0.5
0.5	1.5	1.5
48.53-2.05 (2.09-2.05)	48.52-2.10 (2.14-2.10)	48.92-2.45 (2.51-2.45)
100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
13.3 (12.5)	13.5 (13.3)	13.00 (13.3)
16.6 (2.1)	14.7 (2.4)	11.9 (2.5)
16.1 (168.9)	22.3 (145.7)	38.0 (242.3)
<i>P</i> _{2,2,2}	<i>P</i> _{2,2,2}	<i>P</i> _{2,2,2}
<i>a</i> = 104.27	<i>a</i> = 104.19	<i>a</i> = 104.81
<i>b</i> = 118.13	<i>b</i> = 118.32	<i>b</i> = 120.59
<i>c</i> = 132.83	<i>c</i> = 133.33	<i>c</i> = 136.33
$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$

付録3. LigM-THF 複合体結晶回折強度データセット

Date	2015/8/7	2015/7/22	2015/7/22	2015/7/22
Data name	ligm312	ligm306	ligm306_2	ligm307
Ligand	20 mM THF	5mM THF	5mM THF	5 mM THF
Diffraction source	NSRRC 15A	APS 23IDB	APS 23IDB	APS 23IDB
Wavelength (Å)	1.0000	1.0332	1.0332	1.0332
Temperature (K)	95	95	95	95
Detector	MX300HS	MARmosaic CCD 300	MARmosaic CCD 300	MARmosaic CCD 300
Crystal-detector distance (mm)	200	300	270	340
Total rotation range (°)	0-180	128-308	31-211	52-232
Rotation range per image (°)	0.5	0.5	0.5	0.5
Exposure time per image (s)	1.0	0.5	1.0	0.5
Data Statistics				
Resolution (Å)	47.7-1.90 (1.93-1.90)	49.59-2.15 (2.19-2.15)	49.40-2.05 (2.09-2.05)	47.78-2.51 (2.58-2.51)
Completeness (%)	100.0 (100.0)	100.0 (99.7)	99.8 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundancy	7.5 (7.5)	7.1 (4.7)	7.3 (7.0)	7.4 (7.3)
I/σ_I	12.2 (1.6)	12.1 (2.6)	11.5 (2.2)	15.1 (2.3)
R_{meas} (%)	14.6 (142.9)	12.5 (66.4)	13.0 (95.1)	13.8 (105.8)
Space group	$P2_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12$
a, b, c (Å)	a = 102.77	a = 103.24	a = 102.75	a = 102.87
	b = 117.89	b = 118.16	b = 117.70	b = 118.53
	c = 129.73	c = 128.79	c = 128.33	c = 129.12
α, β, γ (°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$

付録 4. LigM-PCA-THF 複合体結晶回折強度データセット

Date	2015/12/19	2015/12/19	2015/12/19	2015/12/19	2015/12/19
Data name	ligm387	ligm384	ligm385	ligm386	ligm391
Ligand	10 mM PCA + 50 mM THF	10 mM PCA + 50 mM THF	10 mM PCA + 50 mM THF	10 mM PCA + 50 mM THF	10 mM PCA + 50 mM THF
Diffraction source	PF AR NE3A	PF AR NE3A	PF AR NE3A	PF AR NE3A	PF AR NE3A
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Temperature (K)	95	95K	95K	95K	95K
Detector	Pilatus 2M-F	Pilatus 2M-F	Pilatus 2M-F	Pilatus 2M-F	Pilatus 2M-F
Crystal-detector distance (mm)	215.5	257.3	257.3	229.5	229.5
Total rotation range (°)	0-360	0-360	0-360	0-360	0-360
Rotation range per image (°)	0.2	0.5	0.5	0.2	0.2
Exposure time per image (s)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Data Statistics					
Resolution (Å)	48.32-1.90 (1.93-1.90)	48.32-2.05 (2.09-2.05)	48.38-2.30 (2.35-2.30)	48.37-2.00 (2.03-2.00)	49.06-1.95 (1.98-1.95)
Completeness (%)	100.0 (100.0)	99.4 (95.3)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	99.9 (99.3)
Redundancy	13.3 (13.5)	13.2 (12.7)	13.2 (13.0)	13.3 (13.5)	19.7 (20.1)
I/σ_I	14.4 (1.8)	14.9 (2.2)	15.0 (2.4)	14.9 (2.2)	21.2 (1.9)
R_{meas} (%)	14.5 (182.3)	19.4 (191.5)	21.1 (196.0)	19.0 (170.8)	11.5 (205.1)
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P3_121$
a, b, c (Å)	$a = 103.80$	$a = 103.57$	$a = 103.80$	$a = 103.79$	$a = 115.46$
	$b = 118.37$	$b = 118.86$	$b = 118.69$	$b = 118.16$	$b = 115.46$
	$c = 132.33$	$c = 134.40$	$c = 133.72$	$c = 133.52$	$c = 225.20$
α, β, γ (°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = 90.0, \gamma = 120.0$

付録 5. 基質非結合型結晶回折強度データセット

Date	2015/12/18	2015/12/18	2015/12/18	2015/12/18	2015/12/18
Data name	ligm399	ligm392	ligm393	ligm396	ligm398
Ligand	Native	Native	Native	Native	Native
Diffraction source	PF BL17A	PF BL17A	PF BL17A	PF BL17A	PF BL17A
Wavelength (Å)	0.98000	0.98000	0.98000	0.98000	0.98000
Temperature (K)	95	95	95	95	95
Detector	Pilatus 3S6M	Pilatus 3S6M	Pilatus 3S6M	Pilatus 3S6M	Pilatus 3S6M
Crystal-detector distance (mm)	344.37	295.11	295.11	368.47	295.11
Total rotation range (°)	0-360	0-360	0-360	0-360	0-360
Rotation range per image (°)	0.2	0.2	0.2	0.5	0.2
Exposure time per image (s)	0.2	0.2	0.2	0.5	0.2
Data Statistics					
Resolution (Å)	49.50-1.85 (1.88-1.85)	49.45-1.90 (1.93-1.90)	49.52-1.90 (1.93-1.90)	49.26-1.95 (1.98-1.95)	49.10-1.95 (1.98-1.95)
Completeness (%)	100.0 (99.9)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundancy	13.4 (13.7)	13.1 (13.7)	13.3 (13.5)	13.4 (13.8)	13.4 (13.7)
I/σ_I	13.7 (1.6)	10.9 (2.2)	12.6 (2.1)	14.5 (2.3)	14.6 (2.1)
R_{meas} (%)	16.3 (193.3)	20.9 (133.9)	21.6 (159.1)	20.0 (151.6)	15.3 (148.8)
Space group	$P2_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12$
a, b, c (Å)	$a = 102.0$	$a = 103.4$	$a = 102.6$	$a = 101.7$	$a = 102.04$
	$b = 118.60$	$b = 118.7$	$b = 118.8$	$b = 118.0$	$b = 118.15$
	$c = 128.84$	$c = 127.9$	$c = 128.5$	$c = 128.1$	$c = 127.2$
α, β, γ (°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$

2013/10/29	2013/12/19	2014/1/25	2014/1/25	2014/1/27	2014/5/22
ligm003	8	ligm004	ligm005	ligm006	ligm007
Native	Native	Native	Native	Native	Native
PF BL 5A	PF BL 5A	PF BL17A	PF BL17A	BL 1A	BL 1A
1.00000	1.00000	0.97921	0.97921	1.10000	1.10000
95	95	95	95	95	95
ADSC Quantum 315r	ADSC Quantum 315r	ADSC Quantum 270	ADSC Quantum 270	PILATUS 2M-F	PILATUS 2M-F
419.6	419.6	396.9	396.9	177.5	229.5
0-180	0-180	0-360	0-360	0-360	0-180
0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5
1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5
47.88-2.35 (2.40-2.35)	49.18-2.80 (2.91-2.80)	49.30-2.90 (3.0-2.90)	48.84-2.91 (3.00-2.91)	49.03-1.95 (1.98-1.95)	48.14-2.60 (2.68-2.60)
95.2 (59.0)	100.0 (100.0)	97.7 (80.3)	99.5 (94.6)	100.0 (100.0)	99.9 (99.0)
5.9 (1.6)	11.0 (11.0)	14.4 (13.3)	13.6 (10.5)	13.6 (13.5)	10.0 (9.5)
19.3 (3.9)	17.9 (2.7)	6.3 (2.7)	7.8 (3.2)	9.1 (2.2)	14.6 (3.3)
6.8 (16.2)	17.0 (109.2)	77.8 (150.5)	86.1 (191.0)	32.7 (139.2)	18.5 (89.6)
$P_{2,2,2}$	$P_{3,21}$	$P_{2,2,2_1}$	$P_{2,2,2_1}$	$P_{2,2,2_1}$	$P_{3,21}$
$a = 103.11$	$a = 113.58$	$a = 113.95$	$a = 112.86$	$a = 112.60$	$a = 113.88$
$b = 117.89$	$b = 113.58$	$b = 126.57$	$b = 125.32$	$b = 126.63$	$b = 113.88$
$c = 129.18$	$c = 219.40$	$c = 156.16$	$c = 155.19$	$c = 155.0$	$c = 220.66$
$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\beta = 120.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$	$\beta = 120.0$

2015/11/1	2014/12/5	2014/12/5
ligm011	ligm-ssad134	ligm-ssad155
Native	Native	Native
BL17A	PF AR NE3A	PF AR NE3A
0.98000	1.00000	1.00000
95	95	95
PILATUS 3S	ADSC Quantum315	ADSC Quantum315
577	387.9	359.7
0-360	0-180	0-180
0.1	1.0	1.0
0.1	5.0	5.0
48.58-2.70 (2.80-2.70)	48.82-3.00 (3.15-3.00)	49.03-3.00 (3.15-3.00)
99.4 (98.4)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
19.9 (17.6)	10.9 (10.8)	11.1 (11.3)
11.0 (2.4)	13.5 (2.8)	12.0 (2.7)
32.3 (142.9)	19.8 (119.0)	27.8 (119.7)
$P3_121$	$P3_121$	$P3_121$
$a = 112.19$	$a = 112.74$	$a = 113.22$
$b = 112.19$	$b = 112.74$	$b = 113.22$
$c = 218.95$	$c = 219.41$	$c = 219.35$
$\beta = 120.0$	$\beta = 120.0$	$\beta = 120.0$

付録 6. CIF ファイル (VNL)

```
#
data_comp_list
loop_
  _chem_comp.id
  _chem_comp.three_letter_code
  _chem_comp.name
  _chem_comp.group
  _chem_comp.number_atoms_all
  _chem_comp.number_atoms_nh
  _chem_comp.desc_level
VNL VNL "Unknown" "ligand 19 12 ."
#
data_comp_VNL
#
loop_
  _chem_comp_atom.comp_id
  _chem_comp_atom.atom_id
  _chem_comp_atom.type_symbol
  _chem_comp_atom.type_energy
  _chem_comp_atom.partial_charge
  _chem_comp_atom.x
  _chem_comp_atom.y
  _chem_comp_atom.z
VNL C1 C CR6 . -0.1610 -0.2895 -1.6571
VNL C01 C CR16 . 1.2306 -0.2193 -1.6570
VNL C02 C CR16 . -0.8578 -0.3022 -0.4459
VNL CM1 C CR16 . 1.9252 -0.1620 -0.4513
VNL CM2 C CR6 . -0.1614 -0.2449 0.7565
VNL OM O O2 . -0.8726 -0.3355 2.0031
VNL CZ C CR6 . 1.2301 -0.1749 0.7544
VNL CC C C . -0.9165 -0.3176 -2.9637
```

VNL	CV	C	CH3	.	-1.4359	0.9109	2.4459
VNL	O1	O	OC	.	-1.2379	0.7590	-3.5274
VNL	O2	O	O	.	-1.1886	-1.4181	-3.5087
VNL	O3	O	OH1	.	1.9373	-0.1837	1.9771
VNL	H01	H	HCR6	.	1.7310	-0.2104	-2.5209
VNL	H02	H	HCR6	.	-1.8519	-0.3526	-0.4428
VNL	HM1	H	HCR6	.	2.9186	-0.1117	-0.4517
VNL	HV1	H	HCH3	.	-1.4907	0.9163	3.4368
VNL	HV2	H	HCH3	.	-2.3452	1.0164	2.0645
VNL	HV3	H	HCH3	.	-0.8590	1.6616	2.1416
VNL	H03	H	HOH1	.	2.4056	-0.9418	2.0468

#

loop_

_chem_comp_bond.comp_id

_chem_comp_bond.atom_id_1

_chem_comp_bond.atom_id_2

_chem_comp_bond.type

_chem_comp_bond.value_dist

_chem_comp_bond.value_dist_esd

VNL	C1	C01	aromatic	1.393	0.020
VNL	C1	C02	aromatic	1.397	0.020
VNL	C1	CC	single	1.510	0.020
VNL	C01	CM1	aromatic	1.393	0.020
VNL	C01	H01	single	0.998	0.020
VNL	C02	CM2	aromatic	1.391	0.020
VNL	C02	H02	single	0.995	0.020
VNL	CM1	CZ	aromatic	1.392	0.020
VNL	CM1	HM1	single	0.995	0.020
VNL	CM2	OM	single	1.438	0.020
VNL	CM2	CZ	aromatic	1.393	0.020
VNL	OM	CV	single	1.438	0.020
VNL	CZ	O3	single	1.412	0.020
VNL	CC	O1	deloc	1.257	0.020

VNL	CC	O2	deloc	1.258	0.020
VNL	CV	HV1	single	0.992	0.020
VNL	CV	HV2	single	0.992	0.020
VNL	CV	HV3	single	0.995	0.020
VNL	O3	H03	single	0.894	0.020
#					
loop_					
_chem_comp_angle.comp_id					
_chem_comp_angle.atom_id_1					
_chem_comp_angle.atom_id_2					
_chem_comp_angle.atom_id_3					
_chem_comp_angle.value_angle					
_chem_comp_angle.value_angle_esd					
VNL	CC	C1	C02	120.03	3.000
VNL	CC	C1	C01	120.06	3.000
VNL	C02	C1	C01	119.89	3.000
VNL	H01	C01	CM1	119.92	3.000
VNL	H01	C01	C1	120.06	3.000
VNL	CM1	C01	C1	120.01	3.000
VNL	H02	C02	CM2	119.97	3.000
VNL	H02	C02	C1	120.08	3.000
VNL	CM2	C02	C1	119.96	3.000
VNL	HM1	CM1	CZ	119.97	3.000
VNL	HM1	CM1	C01	119.99	3.000
VNL	CZ	CM1	C01	120.04	3.000
VNL	CZ	CM2	OM	119.89	3.000
VNL	CZ	CM2	C02	120.06	3.000
VNL	OM	CM2	C02	119.95	3.000
VNL	CV	OM	CM2	113.96	3.000
VNL	O3	CZ	CM2	119.90	3.000
VNL	O3	CZ	CM1	119.99	3.000
VNL	CM2	CZ	CM1	120.04	3.000
VNL	O2	CC	O1	119.98	3.000

VNL	02	CC	C1	119.98	3.000
VNL	01	CC	C1	120.01	3.000
VNL	HV3	CV	HV2	109.51	3.000
VNL	HV3	CV	HV1	109.47	3.000
VNL	HV2	CV	HV1	109.44	3.000
VNL	HV3	CV	OM	109.44	3.000
VNL	HV2	CV	OM	109.46	3.000
VNL	HV1	CV	OM	109.50	3.000
VNL	H03	03	CZ	109.58	3.000

#

loop_

_chem_comp_tor.comp_id

_chem_comp_tor.id

_chem_comp_tor.atom_id_1

_chem_comp_tor.atom_id_2

_chem_comp_tor.atom_id_3

_chem_comp_tor.atom_id_4

_chem_comp_tor.value_angle

_chem_comp_tor.value_angle_esd

_chem_comp_tor.period

VNL	CONST_01	CZ	CM1	C01	C1	0.00	0.0	0
VNL	CONST_02	CZ	CM2	C02	C1	0.00	0.0	0
VNL	CONST_03	CM2	C02	C1	C01	-0.01	0.0	0
VNL	CONST_04	CM2	CZ	CM1	C01	-0.01	0.0	0
VNL	CONST_05	CM1	C01	C1	C02	0.00	0.0	0
VNL	CONST_06	CM1	CZ	CM2	C02	0.00	0.0	0
VNL	CONST_07	OM	CM2	C02	C1	-176.42	0.0	0
VNL	CONST_08	03	CZ	CM1	C01	176.86	0.0	0
VNL	CONST_09	03	CZ	CM2	C02	-176.87	0.0	0
VNL	CONST_10	CC	C1	C01	CM1	178.51	0.0	0
VNL	CONST_11	OM	CM2	CZ	CM1	176.43	0.0	0
VNL	CONST_12	CC	C1	C02	CM2	-178.51	0.0	0
VNL	CONST_13	HM1	CM1	C01	C1	-179.98	0.0	0

VNL CONST_14	H02	C02	C1	C01	-179.97	0.0	0
VNL CONST_15	H01	C01	C1	C02	179.99	0.0	0
VNL Var_01	01	CC	C1	C01	-87.08	30.0	2
VNL Var_02	HV1	CV	OM	CM2	-151.48	30.0	3

#

loop_

_chem_comp_plane_atom.comp_id

_chem_comp_plane_atom.plane_id

_chem_comp_plane_atom.atom_id

_chem_comp_plane_atom.dist_esd

VNL plan-1 C1 0.020

VNL plan-1 C01 0.020

VNL plan-1 C02 0.020

VNL plan-1 CM1 0.020

VNL plan-1 CM2 0.020

VNL plan-1 OM 0.020

VNL plan-1 CZ 0.020

VNL plan-1 CC 0.020

VNL plan-1 O3 0.020

VNL plan-1 H01 0.020

VNL plan-1 H02 0.020

VNL plan-1 HM1 0.020

VNL plan-2 C1 0.020

VNL plan-2 CC 0.020

VNL plan-2 O1 0.020

VNL plan-2 O2 0.020

付録 7. CIF ファイル (3MGA)

```
#
data_comp_list
loop_
  _chem_comp.id
  _chem_comp.three_letter_code
  _chem_comp.name
  _chem_comp.group
  _chem_comp.number_atoms_all
  _chem_comp.number_atoms_nh
  _chem_comp.desc_level
LIG      LIG 'Unknown          ' ligand 29 18 .
#
data_comp_LIG
#
loop_
  _chem_comp_atom.comp_id
  _chem_comp_atom.atom_id
  _chem_comp_atom.type_symbol
  _chem_comp_atom.type_energy
  _chem_comp_atom.charge
  _chem_comp_atom.partial_charge
  _chem_comp_atom.x
  _chem_comp_atom.y
  _chem_comp_atom.z
LIG      N1      N  NR15  0  .    -0.6129  0.0119  -2.2437
LIG      N3      N   N      0  .     0.7891  0.0184  -2.2383
LIG      C4      C  CR55  0  .     1.1986  0.0072  -0.9657
LIG      C5      C  CR55  0  .     0.0735 -0.0065  -0.1546
LIG      C6      C  CR5    0  .    -1.0344 -0.0033  -0.9682
LIG      C7      C  CR6    0  .    -2.4022 -0.0247  -0.7493
LIG      C8      C  CR16  0  .    -3.0840  1.1378  -0.6086
LIG     C10      C  CR16  0  .    -4.4615  1.1188  -0.4622
```


LIG	N12	N	N	0	.	-5.1254	-0.0587	-0.4597
LIG	C13	C	CR16	0	.	-4.4470	-1.2194	-0.5999
LIG	C15	C	CR16	0	.	-3.0695	-1.2041	-0.7465
LIG	C17	C	CH2	0	.	0.5252	-0.0091	1.2451
LIG	C20	C	CR56	0	.	1.9876	0.0077	1.2491
LIG	C21	C	CR56	0	.	2.4185	0.0163	-0.0763
LIG	C22	C	CR16	0	.	3.7838	0.0418	-0.3654
LIG	C24	C	CR16	0	.	4.7141	0.0588	0.6693
LIG	C26	C	CR16	0	.	4.2823	0.0502	1.9975
LIG	C28	C	CR16	0	.	2.9225	0.0247	2.2869
LIG	HN1	H	HNR5	0	.	-1.1977	0.0229	-3.0559
LIG	HC8	H	HCR6	0	.	-2.5522	2.0816	-0.6106
LIG	HC10	H	HCR6	0	.	-5.0068	2.0480	-0.3497
LIG	HC13	H	HCR6	0	.	-4.9807	-2.1621	-0.5976
LIG	HC15	H	HCR6	0	.	-2.5261	-2.1344	-0.8589
LIG	H171	H	HCH2	0	.	0.1484	0.8727	1.7520
LIG	H172	H	HCH2	0	.	0.1688	-0.9049	1.7423
LIG	HC22	H	HCR6	0	.	4.1193	0.0485	-1.3955
LIG	HC24	H	HCR6	0	.	5.7736	0.0786	0.4445
LIG	HC26	H	HCR6	0	.	5.0071	0.0634	2.8025
LIG	HC28	H	HCR6	0	.	2.5881	0.0181	3.3173

#

loop_

_chem_comp_bond.comp_id

_chem_comp_bond.atom_id_1

_chem_comp_bond.atom_id_2

_chem_comp_bond.type

_chem_comp_bond.value_dist

_chem_comp_bond.value_dist_esd

_chem_comp_bond.value_dist_neutron

LIG	N1	N3	aromatic	1.402	0.020	1.402
LIG	N1	C6	aromatic	1.343	0.020	1.343
LIG	N1	HN1	single	0.860	0.020	1.020

LIG	N3	C4	aromatic	1.337	0.020	1.337
LIG	C4	C5	aromatic	1.387	0.020	1.387
LIG	C4	C21	aromatic	1.510	0.020	1.510
LIG	C5	C6	aromatic	1.375	0.020	1.375
LIG	C5	C17	single	1.471	0.020	1.471
LIG	C6	C7	single	1.385	0.020	1.385
LIG	C7	C8	aromatic	1.355	0.020	1.355
LIG	C7	C15	aromatic	1.355	0.020	1.355
LIG	C8	C10	aromatic	1.385	0.020	1.385
LIG	C8	HC8	single	0.930	0.020	1.080
LIG	C10	N12	aromatic	1.352	0.020	1.352
LIG	C10	HC10	single	0.930	0.020	1.080
LIG	N12	C13	aromatic	1.352	0.020	1.352
LIG	C13	C15	aromatic	1.385	0.020	1.385
LIG	C13	HC13	single	0.930	0.020	1.080
LIG	C15	HC15	single	0.930	0.020	1.080
LIG	C17	C20	single	1.462	0.020	1.462
LIG	C17	H171	single	0.970	0.020	1.090
LIG	C17	H172	single	0.970	0.020	1.090
LIG	C20	C21	aromatic	1.394	0.020	1.394
LIG	C20	C28	aromatic	1.397	0.020	1.397
LIG	C21	C22	aromatic	1.396	0.020	1.396
LIG	C22	C24	aromatic	1.391	0.020	1.391
LIG	C22	HC22	single	0.930	0.020	1.080
LIG	C24	C26	aromatic	1.397	0.020	1.397
LIG	C24	HC24	single	0.930	0.020	1.080
LIG	C26	C28	aromatic	1.391	0.020	1.391
LIG	C26	HC26	single	0.930	0.020	1.080
LIG	C28	HC28	single	0.930	0.020	1.080

#

loop_

_chem_comp_angle.comp_id

_chem_comp_angle.atom_id_1

_chem_comp_angle.atom_id_2

_chem_comp_angle.atom_id_3

_chem_comp_angle.value_angle

_chem_comp_angle.value_angle_esd

LIG	HN1	N1	C6	125.97	3.000
LIG	HN1	N1	N3	125.97	3.000
LIG	C6	N1	N3	108.07	3.000
LIG	C4	N3	N1	108.06	3.000
LIG	C21	C4	C5	108.12	3.000
LIG	C21	C4	N3	143.93	3.000
LIG	C5	C4	N3	107.95	3.000
LIG	C17	C5	C6	144.17	3.000
LIG	C17	C5	C4	107.91	3.000
LIG	C6	C5	C4	107.92	3.000
LIG	C7	C6	C5	134.61	3.000
LIG	C7	C6	N1	117.38	3.000
LIG	C5	C6	N1	108.01	3.000
LIG	C15	C7	C8	119.91	3.000
LIG	C15	C7	C6	120.00	3.000
LIG	C8	C7	C6	120.00	3.000
LIG	HC8	C8	C10	120.02	3.000
LIG	HC8	C8	C7	120.02	3.000
LIG	C10	C8	C7	119.97	3.000
LIG	HC10	C10	N12	119.98	3.000
LIG	HC10	C10	C8	119.98	3.000
LIG	N12	C10	C8	120.03	3.000
LIG	C13	N12	C10	120.08	3.000
LIG	HC13	C13	C15	119.98	3.000
LIG	HC13	C13	N12	119.98	3.000
LIG	C15	C13	N12	120.03	3.000
LIG	HC15	C15	C13	120.02	3.000
LIG	HC15	C15	C7	120.02	3.000
LIG	C13	C15	C7	119.97	3.000

LIG	H172	C17	H171	110.06	3.000
LIG	H172	C17	C20	109.68	3.000
LIG	H171	C17	C20	109.68	3.000
LIG	H172	C17	C5	109.68	3.000
LIG	H171	C17	C5	109.68	3.000
LIG	C20	C17	C5	108.04	3.000
LIG	C28	C20	C21	119.97	3.000
LIG	C28	C20	C17	132.18	3.000
LIG	C21	C20	C17	107.86	3.000
LIG	C22	C21	C20	119.97	3.000
LIG	C22	C21	C4	131.95	3.000
LIG	C20	C21	C4	108.08	3.000
LIG	HC22	C22	C24	120.00	3.000
LIG	HC22	C22	C21	120.00	3.000
LIG	C24	C22	C21	120.01	3.000
LIG	HC24	C24	C26	119.99	3.000
LIG	HC24	C24	C22	119.99	3.000
LIG	C26	C24	C22	120.03	3.000
LIG	HC26	C26	C28	119.99	3.000
LIG	HC26	C26	C24	119.99	3.000
LIG	C28	C26	C24	120.03	3.000
LIG	HC28	C28	C26	120.00	3.000
LIG	HC28	C28	C20	120.00	3.000
LIG	C26	C28	C20	120.01	3.000

#

loop_

_chem_comp_tor.comp_id

_chem_comp_tor.id

_chem_comp_tor.atom_id_1

_chem_comp_tor.atom_id_2

_chem_comp_tor.atom_id_3

_chem_comp_tor.atom_id_4

_chem_comp_tor.value_angle

_chem_comp_tor.value_angle_esd

_chem_comp_tor.period

LIG CONST_01	C5	C4	N3	N1	0.00	0.0	0
LIG CONST_02	C21	C4	N3	N1	-179.19	0.0	0
LIG CONST_03	C4	C5	C6	N1	0.00	0.0	0
LIG CONST_04	C8	C7	C6	N1	-91.25	0.0	0
LIG CONST_05	C15	C7	C6	N1	85.25	0.0	0
LIG CONST_06	C5	C6	N1	N3	0.00	0.0	0
LIG CONST_07	C7	C6	N1	N3	-179.41	0.0	0
LIG CONST_08	C6	C5	C4	N3	-0.00	0.0	0
LIG CONST_09	C20	C21	C4	N3	179.19	0.0	0
LIG CONST_10	C22	C21	C4	N3	-0.20	0.0	0
LIG CONST_11	C6	N1	N3	C4	-0.00	0.0	0
LIG CONST_12	C7	C6	C5	C4	179.27	0.0	0
LIG CONST_13	C28	C20	C21	C4	-179.47	0.0	0
LIG CONST_14	C24	C22	C21	C4	179.32	0.0	0
LIG CONST_15	C20	C21	C4	C5	0.00	0.0	0
LIG CONST_16	C22	C21	C4	C5	-179.38	0.0	0
LIG CONST_17	C8	C7	C6	C5	89.54	0.0	0
LIG CONST_18	C15	C7	C6	C5	-93.96	0.0	0
LIG CONST_19	C21	C4	C5	C6	179.50	0.0	0
LIG CONST_20	C10	C8	C7	C6	176.51	0.0	0
LIG CONST_21	C13	C15	C7	C6	-176.51	0.0	0
LIG CONST_22	N12	C10	C8	C7	0.00	0.0	0
LIG CONST_23	N12	C13	C15	C7	-0.00	0.0	0
LIG CONST_24	C13	C15	C7	C8	0.00	0.0	0
LIG CONST_25	C13	N12	C10	C8	0.00	0.0	0
LIG CONST_26	C15	C7	C8	C10	-0.00	0.0	0
LIG CONST_27	C15	C13	N12	C10	0.00	0.0	0
LIG CONST_28	C24	C22	C21	C20	0.00	0.0	0
LIG CONST_29	C24	C26	C28	C20	-0.00	0.0	0
LIG CONST_30	C26	C28	C20	C21	0.00	0.0	0
LIG CONST_31	C26	C24	C22	C21	0.00	0.0	0

LIG CONST_32	C28	C20	C21	C22	-0.00	0.0	0
LIG CONST_33	C28	C26	C24	C22	-0.00	0.0	0
LIG CONST_34	C8	C7	C6	N1	-91.25	0.0	0
LIG CONST_35	C15	C7	C6	N1	85.25	0.0	0
LIG CONST_36	C7	C6	N1	N3	-179.41	0.0	0
LIG CONST_37	C7	C6	C5	C4	179.27	0.0	0
LIG CONST_38	C8	C7	C6	C5	89.54	0.0	0
LIG CONST_39	C15	C7	C6	C5	-93.96	0.0	0
LIG CONST_40	C10	C8	C7	C6	176.51	0.0	0
LIG CONST_41	C13	C15	C7	C6	-176.51	0.0	0
LIG CONST_42	C17	C5	C6	C7	-1.39	0.0	0
LIG CONST_43	HN1	N1	N3	C4	179.62	0.0	0
LIG CONST_44	HC22	C22	C21	C4	-0.68	0.0	0
LIG CONST_45	HC8	C8	C7	C6	-3.49	0.0	0
LIG CONST_46	HC15	C15	C7	C6	3.49	0.0	0
LIG CONST_47	HC10	C10	C8	C7	180.00	0.0	0
LIG CONST_48	HC13	C13	C15	C7	180.00	0.0	0
LIG CONST_49	HC28	C28	C20	C17	0.55	0.0	0
LIG CONST_50	HC26	C26	C28	C20	-180.00	0.0	0
LIG CONST_51	HC24	C24	C22	C21	180.00	0.0	0
LIG Var_01	C8	C7	C6	N1	-91.25	30.0	1
LIG Var_02	H171	C17	C5	C4	119.67	30.0	1

#

loop_

_chem_comp_plane_atom.comp_id

_chem_comp_plane_atom.plane_id

_chem_comp_plane_atom.atom_id

_chem_comp_plane_atom.dist_esd

LIG plan-1 C6 0.020

LIG plan-1 C7 0.020

LIG plan-1 C8 0.020

LIG plan-1 C10 0.020

LIG plan-1 N12 0.020

LIG plan-1	C13	0.020
LIG plan-1	C15	0.020
LIG plan-1	HC8	0.020
LIG plan-1	HC10	0.020
LIG plan-1	HC13	0.020
LIG plan-1	HC15	0.020
LIG plan-2	N1	0.020
LIG plan-2	N3	0.020
LIG plan-2	C4	0.020
LIG plan-2	C5	0.020
LIG plan-2	C6	0.020
LIG plan-2	C7	0.020
LIG plan-2	C17	0.020
LIG plan-2	C20	0.020
LIG plan-2	C21	0.020
LIG plan-2	C22	0.020
LIG plan-2	C24	0.020
LIG plan-2	C26	0.020
LIG plan-2	C28	0.020
LIG plan-2	HN1	0.020
LIG plan-2	HC22	0.020
LIG plan-2	HC24	0.020
LIG plan-2	HC26	0.020
LIG plan-2	HC28	0.020

付録 8. CIF ファイル (THF)

```
#
data_comp_list
loop_
  _chem_comp.id
  _chem_comp.three_letter_code
  _chem_comp.name
  _chem_comp.group
  _chem_comp.number_atoms_all
  _chem_comp.number_atoms_nh
  _chem_comp.desc_level
THG THG "Unknown" "ligand 32 32 ."
#
data_comp_THG
#
loop_
  _chem_comp_atom.comp_id
  _chem_comp_atom.atom_id
  _chem_comp_atom.type_symbol
  _chem_comp_atom.type_energy
  _chem_comp_atom.partial_charge
  _chem_comp_atom.x
  _chem_comp_atom.y
  _chem_comp_atom.z
THG O2 0 0 . 1.5761 -18.3817 -36.1098
THG CT C C . 2.5285 -18.6583 -35.3244
THG O1 0 OC . 3.7269 -18.6550 -35.7527
THG CA C C . 2.2492 -18.9465 -33.8789
THG CB C CSP . 3.1746 -18.1144 -33.0121
THG CG C CSP . 2.5387 -16.7657 -32.5917
THG CD C C . 3.3582 -15.5608 -33.0782
THG OE2 0 0 . 4.5468 -15.3730 -32.6331
THG OE1 0 OC . 2.9221 -14.8490 -33.9950
```


THG	N	N	N	.	2.4675	-20.3456	-33.6156
THG	C	C	C	.	1.4157	-21.1335	-33.0391
THG	O	O	O	.	0.3361	-20.6272	-32.8094
THG	C11	C	CR6	.	1.6526	-22.6388	-32.7150
THG	C16	C	C	.	0.5573	-23.5163	-32.6091
THG	C15	C	C	.	0.7679	-24.8549	-32.3127
THG	C14	C	CR6	.	2.0497	-25.3267	-32.1217
THG	C13	C	C	.	3.1416	-24.4525	-32.2270
THG	C12	C	C	.	2.9321	-23.1094	-32.5244
THG	N10	N	N	.	2.2617	-26.6916	-31.7648
THG	C9	C	CSP	.	1.1776	-27.6341	-31.8542
THG	C6	C	C	.	1.4152	-28.8289	-30.8779
THG	N5	N	N	.	2.2441	-29.7527	-31.5029
THG	C7	C	CSP	.	0.0546	-29.4184	-30.4775
THG	N8	N	N	.	0.1743	-30.6091	-29.6391
THG	C8A	C	CR6	.	1.4863	-31.2408	-29.7293
THG	C4A	C	CR6	.	2.2780	-31.0249	-30.8309
THG	N1	N	N	.	1.7844	-32.2898	-28.8617
THG	C2	C	CR6	.	2.8127	-33.0797	-29.0780
THG	NA2	N	N	.	3.0270	-34.2116	-28.2016
THG	N3	N	N	.	3.6253	-32.9149	-30.1444
THG	C4	C	CR6	.	3.4072	-31.9416	-31.0128
THG	O4	O	OC	.	4.3091	-31.7487	-32.1031

#

loop_

_chem_comp_bond.comp_id

_chem_comp_bond.atom_id_1

_chem_comp_bond.atom_id_2

_chem_comp_bond.type

_chem_comp_bond.value_dist

_chem_comp_bond.value_dist_esd

THG O2 CT deloc 1.265 0.020

THG CT O1 deloc 1.273 0.020

THG	CT	CA	single	1.500 0.020
THG	CA	CB	single	1.517 0.020
THG	CA	N	single	1.440 0.020
THG	CB	CG	single	1.549 0.020
THG	CG	CD	single	1.536 0.020
THG	CD	OE2	deloc	1.283 0.020
THG	CD	OE1	deloc	1.240 0.020
THG	N	C	single	1.435 0.020
THG	C	O	double	1.214 0.020
THG	C	C11	single	1.558 0.020
THG	C11	C16	aromatic	1.407 0.020
THG	C11	C12	aromatic	1.377 0.020
THG	C16	C15	aromatic	1.387 0.020
THG	C15	C14	aromatic	1.379 0.020
THG	C14	C13	aromatic	1.403 0.020
THG	C14	N10	single	1.427 0.020
THG	C13	C12	aromatic	1.392 0.020
THG	N10	C9	single	1.439 0.020
THG	C9	C6	single	1.561 0.020
THG	C6	N5	aromatic	1.390 0.020
THG	C6	C7	aromatic	1.536 0.020
THG	N5	C4A	single	1.439 0.020
THG	C7	N8	aromatic	1.461 0.020
THG	N8	C8A	single	1.459 0.020
THG	C8A	C4A	aromatic	1.374 0.020
THG	C8A	N1	aromatic	1.394 0.020
THG	C4A	C4	aromatic	1.466 0.020
THG	N1	C2	aromatic	1.315 0.020
THG	C2	NA2	single	1.447 0.020
THG	C2	N3	aromatic	1.351 0.020
THG	N3	C4	aromatic	1.323 0.020
THG	C4	O4	single	1.428 0.020

#

```

loop_
  _chem_comp_angle.comp_id
  _chem_comp_angle.atom_id_1
  _chem_comp_angle.atom_id_2
  _chem_comp_angle.atom_id_3
  _chem_comp_angle.value_angle
  _chem_comp_angle.value_angle_esd
  THG CA CT 01 120.01 3.000
  THG CA CT 02 120.00 3.000
  THG 01 CT 02 119.96 3.000
  THG N CA CB 109.63 3.000
  THG N CA CT 109.55 3.000
  THG CB CA CT 109.37 3.000
  THG CG CB CA 112.48 3.000
  THG CD CG CB 112.20 3.000
  THG OE1 CD OE2 119.88 3.000
  THG OE1 CD CG 119.79 3.000
  THG OE2 CD CG 119.95 3.000
  THG C N CA 119.71 3.000
  THG C11 C O 119.92 3.000
  THG C11 C N 120.17 3.000
  THG O C N 119.91 3.000
  THG C12 C11 C16 119.99 3.000
  THG C12 C11 C 120.03 3.000
  THG C16 C11 C 119.98 3.000
  THG C15 C16 C11 119.97 3.000
  THG C14 C15 C16 120.06 3.000
  THG N10 C14 C13 119.96 3.000
  THG N10 C14 C15 120.00 3.000
  THG C13 C14 C15 119.99 3.000
  THG C12 C13 C14 120.02 3.000
  THG C13 C12 C11 119.97 3.000
  THG C9 N10 C14 119.94 3.000

```

THG	C6	C9	N10	110.35	3.000
THG	C7	C6	N5	112.98	3.000
THG	C7	C6	C9	108.78	3.000
THG	N5	C6	C9	108.56	3.000
THG	C4A	N5	C6	113.06	3.000
THG	N8	C7	C6	112.94	3.000
THG	C8A	N8	C7	113.02	3.000
THG	N1	C8A	C4A	119.62	3.000
THG	N1	C8A	N8	118.67	3.000
THG	C4A	C8A	N8	119.99	3.000
THG	C4	C4A	C8A	116.44	3.000
THG	C4	C4A	N5	120.86	3.000
THG	C8A	C4A	N5	119.98	3.000
THG	C2	N1	C8A	121.14	3.000
THG	N3	C2	NA2	118.97	3.000
THG	N3	C2	N1	121.81	3.000
THG	NA2	C2	N1	119.08	3.000
THG	C4	N3	C2	120.59	3.000
THG	O4	C4	N3	119.77	3.000
THG	O4	C4	C4A	119.79	3.000
THG	N3	C4	C4A	120.39	3.000

#

loop_

_chem_comp_tor.comp_id

_chem_comp_tor.id

_chem_comp_tor.atom_id_1

_chem_comp_tor.atom_id_2

_chem_comp_tor.atom_id_3

_chem_comp_tor.atom_id_4

_chem_comp_tor.value_angle

_chem_comp_tor.value_angle_esd

_chem_comp_tor.period

THG	CONST_01	C14	C15	C16	C11	-0.00	0.0	0
-----	----------	-----	-----	-----	-----	-------	-----	---

THG CONST_02	C14	C13	C12	C11	0.00	0.0	0
THG CONST_03	C13	C12	C11	C16	-0.00	0.0	0
THG CONST_04	C13	C14	C15	C16	0.00	0.0	0
THG CONST_05	C12	C11	C16	C15	-0.00	0.0	0
THG CONST_06	C12	C13	C14	C15	-0.01	0.0	0
THG CONST_07	N3	C4	C4A	C8A	-0.00	0.0	0
THG CONST_08	N3	C2	N1	C8A	-0.01	0.0	0
THG CONST_09	C2	N1	C8A	C4A	0.00	0.0	0
THG CONST_10	C2	N3	C4	C4A	-0.00	0.0	0
THG CONST_11	C4	C4A	C8A	N1	0.00	0.0	0
THG CONST_12	C4	N3	C2	N1	0.01	0.0	0
THG CONST_13	C15	C16	C11	C	-179.61	0.0	0
THG CONST_14	C13	C12	C11	C	179.61	0.0	0
THG CONST_15	N10	C14	C15	C16	177.52	0.0	0
THG CONST_16	N10	C14	C13	C12	-177.52	0.0	0
THG CONST_17	04	C4	C4A	N5	-16.05	0.0	0
THG CONST_18	04	C4	C4A	C8A	-177.40	0.0	0
THG CONST_19	NA2	C2	N1	C8A	-175.71	0.0	0
THG CONST_20	04	C4	N3	C2	177.40	0.0	0
THG CONST_21	C4	N3	C2	NA2	175.72	0.0	0
THG CONST_22	C9	N10	C14	C15	11.95	0.0	0
THG CONST_23	C9	N10	C14	C13	-170.53	0.0	0
THG CONST_24	C11	C	N	CA	-178.38	0.0	0
THG CONST_25	0	C	N	CA	1.99	0.0	0
THG Var_01	C8A	C4A	N5	C6	3.11	30.0	1
THG Var_02	C4	C4A	N5	C6	-157.59	30.0	1
THG Var_03	C8A	N8	C7	C6	-19.50	30.0	1
THG Var_04	N8	C7	C6	N5	55.13	30.0	1
THG Var_05	C4A	N5	C6	C7	-45.56	30.0	1
THG Var_06	C4A	C8A	N8	C7	-22.50	30.0	1
THG Var_07	N1	C8A	N8	C7	172.47	30.0	1
THG Var_08	C4A	N5	C6	C9	-166.31	30.0	1
THG Var_09	N8	C7	C6	C9	175.76	30.0	1

THG Var_10	C16	C11	C	N	-157.48	30.0	2
THG Var_11	C12	C11	C	N	22.91	30.0	2
THG Var_12	C16	C11	C	O	22.15	30.0	2
THG Var_13	C12	C11	C	O	-157.46	30.0	2
THG Var_14	C6	C9	N10	C14	-155.23	30.0	3
THG Var_15	N5	C6	C9	N10	-83.75	30.0	3
THG Var_16	C7	C6	C9	N10	152.93	30.0	3
THG Var_17	CB	CA	CT	O2	-130.30	30.0	2
THG Var_18	N	CA	CT	O2	109.52	30.0	2
THG Var_19	CG	CB	CA	CT	92.88	30.0	3
THG Var_20	C	N	CA	CT	-124.47	30.0	3
THG Var_21	CB	CA	CT	O1	47.73	30.0	2
THG Var_22	N	CA	CT	O1	-72.45	30.0	2
THG Var_23	CD	CG	CB	CA	-120.20	30.0	3
THG Var_24	C	N	CA	CB	115.51	30.0	3
THG Var_25	OE2	CD	CG	CB	-64.35	30.0	3
THG Var_26	OE1	CD	CG	CB	108.56	30.0	3
THG Var_27	N	CA	CB	CG	-146.99	30.0	2

#

loop_

_chem_comp_plane_atom.comp_id

_chem_comp_plane_atom.plane_id

_chem_comp_plane_atom.atom_id

_chem_comp_plane_atom.dist_esd

THG plan-1 C 0.020

THG plan-1 C11 0.020

THG plan-1 C16 0.020

THG plan-1 C15 0.020

THG plan-1 C14 0.020

THG plan-1 C13 0.020

THG plan-1 C12 0.020

THG plan-1 N10 0.020

THG plan-2 N5 0.020

THG plan-2	N8	0.020
THG plan-2	C8A	0.020
THG plan-2	C4A	0.020
THG plan-2	N1	0.020
THG plan-2	C2	0.020
THG plan-2	NA2	0.020
THG plan-2	N3	0.020
THG plan-2	C4	0.020
THG plan-2	04	0.020
THG plan-3	CA	0.020
THG plan-3	N	0.020
THG plan-3	C	0.020
THG plan-3	0	0.020
THG plan-3	C11	0.020
THG plan-4	C14	0.020
THG plan-4	N10	0.020
THG plan-4	C9	0.020
THG plan-5	02	0.020
THG plan-5	CT	0.020
THG plan-5	01	0.020
THG plan-5	CA	0.020
THG plan-6	CG	0.020
THG plan-6	CD	0.020
THG plan-6	OE2	0.020
THG plan-6	OE1	0.020

付録 9. CIF ファイル (PCA)

```
#
data_comp_list
loop_
  _chem_comp.id
  _chem_comp.three_letter_code
  _chem_comp.name
  _chem_comp.group
  _chem_comp.number_atoms_all
  _chem_comp.number_atoms_nh
  _chem_comp.desc_level
DHB      DHB 'Unknown          ' ligand 11 11 .
#
data_comp_DHB
#
loop_
  _chem_comp_atom.comp_id
  _chem_comp_atom.atom_id
  _chem_comp_atom.type_symbol
  _chem_comp_atom.type_energy
  _chem_comp_atom.charge
  _chem_comp_atom.partial_charge
  _chem_comp_atom.x
  _chem_comp_atom.y
  _chem_comp_atom.z
DHB      C1   C   CR6   0   .   -15.7095   0.3100  -10.5660
DHB      C01  C   C     0   .   -15.5434  -0.4484  -11.7134
DHB      C02  C   C     0   .   -16.1173  -0.2953  -9.3885
DHB      CM1  C   C     0   .   -15.7852  -1.8121  -11.6833
DHB      CM2  C   CR6   0   .   -16.3591  -1.6591  -9.3585
DHB      OM   O   OC    0   .   -16.7944  -2.2671  -8.1742
DHB      CZ   C   CR6   0   .   -16.1931  -2.4175  -10.5059
DHB      CC   C   C     0   .   -15.4452   1.8138  -10.5997
```


DHB	01	0	0	0	.	-14.2911	2.2557	-10.3589
DHB	02	0	OC	-1	.	-16.3794	2.6110	-10.8771
DHB	03	0	OC	0	.	-16.4144	-3.8000	-10.4695

#

loop_

_chem_comp_bond.comp_id

_chem_comp_bond.atom_id_1

_chem_comp_bond.atom_id_2

_chem_comp_bond.type

_chem_comp_bond.value_dist

_chem_comp_bond.value_dist_esd

_chem_comp_bond.value_dist_neutron

DHB	C1	C01	aromatic	1.385	0.020	1.385
DHB	C1	C02	aromatic	1.385	0.020	1.385
DHB	C1	CC	single	1.527	0.020	1.527
DHB	C01	CM1	aromatic	1.385	0.020	1.385
DHB	C02	CM2	aromatic	1.385	0.020	1.385
DHB	CM1	CZ	aromatic	1.385	0.020	1.385
DHB	CM2	OM	single	1.401	0.020	1.401
DHB	CM2	CZ	aromatic	1.385	0.020	1.385
DHB	CZ	O3	single	1.401	0.020	1.401
DHB	CC	O1	deloc	1.259	0.020	1.259
DHB	CC	O2	deloc	1.259	0.020	1.259

#

loop_

_chem_comp_angle.comp_id

_chem_comp_angle.atom_id_1

_chem_comp_angle.atom_id_2

_chem_comp_angle.atom_id_3

_chem_comp_angle.value_angle

_chem_comp_angle.value_angle_esd

DHB	CC	C1	C02	120.00	3.000
DHB	CC	C1	C01	120.00	3.000

DHB	C02	C1	C01	120.00	3.000
DHB	CM1	C01	C1	120.00	3.000
DHB	CM2	C02	C1	120.00	3.000
DHB	CZ	CM1	C01	120.00	3.000
DHB	CZ	CM2	OM	120.00	3.000
DHB	CZ	CM2	C02	120.00	3.000
DHB	OM	CM2	C02	120.00	3.000
DHB	03	CZ	CM2	120.00	3.000
DHB	03	CZ	CM1	120.00	3.000
DHB	CM2	CZ	CM1	120.00	3.000
DHB	02	CC	01	120.00	3.000
DHB	02	CC	C1	120.00	3.000
DHB	01	CC	C1	120.00	3.000

#

loop_

_chem_comp_tor.comp_id

_chem_comp_tor.id

_chem_comp_tor.atom_id_1

_chem_comp_tor.atom_id_2

_chem_comp_tor.atom_id_3

_chem_comp_tor.atom_id_4

_chem_comp_tor.value_angle

_chem_comp_tor.value_angle_esd

_chem_comp_tor.period

DHB	CONST_01	CZ	CM1	C01	C1	-0.00	0.0	0
DHB	CONST_02	CZ	CM2	C02	C1	0.00	0.0	0
DHB	CONST_03	CM2	C02	C1	C01	-0.00	0.0	0
DHB	CONST_04	CM2	CZ	CM1	C01	0.00	0.0	0
DHB	CONST_05	CM1	C01	C1	C02	0.00	0.0	0
DHB	CONST_06	CM1	CZ	CM2	C02	-0.00	0.0	0
DHB	CONST_07	OM	CM2	C02	C1	-178.86	0.0	0
DHB	CONST_08	03	CZ	CM1	C01	-178.86	0.0	0
DHB	CONST_09	03	CZ	CM2	C02	178.86	0.0	0

DHB CONST_10	CC	C1	C01	CM1	-179.90	0.0	0
DHB CONST_11	OM	CM2	CZ	CM1	178.86	0.0	0
DHB CONST_12	CC	C1	C02	CM2	179.90	0.0	0
DHB Var_01	01	CC	C1	C01	-89.29	30.0	2
DHB Var_02	02	CC	C1	C01	90.24	30.0	2
DHB Var_03	01	CC	C1	C02	90.81	30.0	2
DHB Var_04	02	CC	C1	C02	-89.66	30.0	2

#

loop_

_chem_comp_plane_atom.comp_id
 _chem_comp_plane_atom.plane_id
 _chem_comp_plane_atom.atom_id
 _chem_comp_plane_atom.dist_esd

DHB plan-1	C1	0.020
DHB plan-1	C01	0.020
DHB plan-1	C02	0.020
DHB plan-1	CM1	0.020
DHB plan-1	CM2	0.020
DHB plan-1	OM	0.020
DHB plan-1	CZ	0.020
DHB plan-1	CC	0.020
DHB plan-1	03	0.020
DHB plan-2	C1	0.020
DHB plan-2	CC	0.020
DHB plan-2	01	0.020
DHB plan-2	02	0.020

参考文献

1 章

Katayama, Y., Nishikawa, S., Murayama, A., Yamasaki, M., Morohoshi, N., and Haraguchi, T. (1988). The metabolism of biphenyl structures in lignin by the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). *FEBS Letters* 233, 129–133.

Kaufmann, F., Wohlfarth, G., and Diekert, G. (1998a). O-demethylase from *Acetobacterium dehalogenans*--substrate specificity and function of the participating proteins. *Eur. J. Biochem.* 253, 706–711.

Kaufmann, F., Wohlfarth, G., and Diekert, G. (1998b). O-Demethylase from *Acetobacterium dehalogenans*. Cloning, sequencing, and active expression of the gene encoding the corrinoid protein. *Eur. J. Biochem.* 257, 515–521.

Kikuchi, G., Motokawa, Y., Yoshida, T., and Hiraga, K. (2008). Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 84, 246–263.

Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217, 624–626.

Kimura, M. (1969). The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 63, 1181–1188.

Kimura, M., and Ohta, T. (1974). On some principles governing molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 71, 2848–2852.

KIMURA, M., and OHTA, T. (1971). Protein Polymorphism as a Phase of Molecular Evolution. *Nature* 229, 467–469.

Lin, Y., and Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 627–642.

- Masai, E., Ichimura, A., Sato, Y., Miyauchi, K., Katayama, Y., and Fukuda, M. (2003). Roles of the Enantioselective Glutathione S-Transferases in Cleavage of β -Aryl Ether. *Journal of Bacteriology* 185, 1768–1775.
- Masai, E., Katayama, Y., and Fukuda, M. (2007). Genetic and Biochemical Investigations on Bacterial Catabolic Pathways for Lignin-Derived Aromatic Compounds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71, 1–15.
- Nakata, T., Miyafuji, H., and Saka, S. (2006). Bioethanol from cellulose with supercritical water treatment followed by enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132, 476–485.
- Peng, X., Egashira, T., Hanashiro, K., Masai, E., Nishikawa, S., Katayama, Y., Kimbara, K., and Fukuda, M. (1998). Cloning of a *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 gene encoding a novel oxygenase that cleaves lignin-related biphenyl and characterization of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2520–2527.
- Peng, X., Masai, E., Katayama, Y., and Fukuda, M. (1999). Characterization of the meta-cleavage compound hydrolase gene involved in degradation of the lignin-related biphenyl structure by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2789–2793.
- Priefert, H., Rabenhorst, J., and Steinbüchel, A. (1997). Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *Journal of Bacteriology* 179, 2595–2607.
- Sato, Y., Moriuchi, H., Hishiyama, S., Otsuka, Y., Oshima, K., Kasai, D., Nakamura, M., Ohara, S., Katayama, Y., Fukuda, M., et al. (2009). Identification of Three Alcohol Dehydrogenase Genes Involved in the Stereospecific Catabolism of Arylglycerol- β -Aryl Ether by *Sphingobium* sp. Strain SYK-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5195–5201.
- Sonoki, T., Obi, T., Kubota, S., Higashi, M., Masai, E., and Katayama, Y. (2000). Coexistence of Two Different O Demethylation Systems in Lignin Metabolism by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6: Cloning and Sequencing of the Lignin Biphenyl-Specific O-Demethylase (LigX) Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2125–2132.

Venturi, V., Zennaro, F., Degrassi, G., Okeke, B.C., and Bruschi, C.V. (1998). Genetics of ferulic acid bioconversion to protocatechuic acid in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. *Microbiology (Reading, Engl.) 144 (Pt 4)*, 965–973.

Vicuña, R. (1988). Bacterial degradation of lignin. *Enzyme and Microbial Technology 10*, 646–655.

Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (2003). A structure for deoxyribose nucleic acid. 1953.

2 章

Wen, J., Arakawa, T., and Philo, J.S. (1996). Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Anal. Biochem.* *240*, 155–166.

3 章

Boutron, P. (1988). Non-Equilibrium Formation of Ice in Aqueous Solutions: Efficiency of Polyalcohol Solutions for Vitrification. In *The Biophysics of Organ Cryopreservation*, D.E. Pegg, and A.M. Karow, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 201–236.

Evans, P.R. (2011). An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 67*, 282–292.

Mcperson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* *189*, 1–23.

Mcperson, A. (2001). A comparison of salts for the crystallization of macromolecules. *Protein Science 10*, 418–422.

4 章

Abrahams, J.P., and Leslie, A.G. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 52*, 30–42.

Agniswamy, J., Joyce, M.G., Hammer, C.H., and Sun, P.D. (2008). Towards a rational approach for heavy-atom derivative screening in protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 64*, 354–367.

- Bricogne, G. (1988). A Bayesian statistical theory of the phase problem. I. A multichannel maximum-entropy formalism for constructing generalized joint probability distributions of structure factors. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography* 44, 517–545.
- Busby, J.N., Lott, J.S., and Panjikar, S. (2016). Combining cross-crystal averaging and MRSAD to phase a 4354-amino-acid structure. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 72, 182–191.
- Derewenda, Z.S., Li, J., Derewenda, U., Dauter, Z., and Smith, S. (2000). Crystal structure of the *Escherichia coli* thioesterase II, a homolog of the human Nef binding enzyme. *Nature Structural Biology* 7, 555–559.
- Evans, P.R., and Murshudov, G.N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69, 1204–1214.
- Garman, E., and Murray, J.W. (2003). Heavy-atom derivatization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 1903–1913.
- Hendrickson, W.A., and Teeter, M.M. (1981). Structure of the hydrophobic protein crambin determined directly from the anomalous scattering of sulphur. *Nature* 290, 107–113.
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 125–132.
- La Fortelle, de, E., and Bricogne, G. (1997). [27] Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. In *Macromolecular Crystallography Part A*, (Elsevier), pp. 472–494.
- Liu, Q., Liu, Q., and Hendrickson, W.A. (2013). Robust structural analysis of native biological macromolecules from multi-crystal anomalous diffraction data. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69, 1314–1332.
- Matthews, B.W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491–497.
- Olieric, V., Weinert, T., Finke, A.D., Anders, C., Li, D., Olieric, N., Borca, C.N., Steinmetz, M.O., Caffrey, M., Jinek, M., et al. (2016). Data-collection strategy for challenging native SAD phasing. *Acta Cryst* (2016). D72, 421–429 [Doi:10.1107/S2059798315024110] 72, 1–9.

Perrakis, A., Morris, R., and Lamzin, V.S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *6*, 458–463.

Schneider, T.R., and Sheldrick, G.M. (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *58*, 1772–1779.

Sheldrick, G.M. (2010). Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *66*, 479–485.

Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P., and Bricogne, G. (2007). Automated structure solution with autoSHARP. *364*, 215–230.

Wang, B.-C. (1985). Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. In *Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part B*, (Elsevier), pp. 90–112.

Yao, J.-X. (1981). On the application of phase relationships to complex structures. XVIII. RANTAN–random MULTAN. *Acta Crystallographica Section A* *37*, 642–644.

5 章

Evans, P.R., and Murshudov, G.N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *69*, 1204–1214.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* *40*, 658–674.

6 章

Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H., and Adams, P.D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *68*, 352–367.

Brünger, A.T. (1993). Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. *Methods and applications. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *49*, 24–36.

Brünger, A.T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* *355*, 472–475.

Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B., de Bakker, P.I.W., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2003). Structure validation by C α geometry: phi,psi and C β deviation. *50*, 437–450.

7 章

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *66*, 486–501.

McNeil, J.B., Zhang, F.-R., Taylor, B.V., Sinclair, D.A., Pearlman, R.E., and Bognar, A.L. (1997). Cloning, and molecular characterization of the GCV1 gene encoding the glycine cleavage T-protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *186*, 13–20.

Ponstingl, H., Kabir, T., and Thornton, J.M. (2003). Automatic inference of protein quaternary structure from crystals. *J Appl Crystallogr* *36*, 1116–1122.

8 章

Lee, H.H., Kim, D.J., Ahn, H.J., Ha, J.Y., and Suh, S.W. (2004). Crystal structure of T-protein of the glycine cleavage system. Cofactor binding, insights into H-protein recognition, and molecular basis for understanding nonketotic hyperglycinemia. *J. Biol. Chem.* *279*, 50514–50523.

Lokanath, N.K., Kuroishi, C., Okazaki, N., and Kunishima, N. (2004). Crystal structure of a component of glycine cleavage system: T-protein from *Pyrococcus horikoshii* OT3 at 1.5 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* *58*, 769–773.

Okamura-Ikeda, K., Hosaka, H., Maita, N., Fujiwara, K., Yoshizawa, A.C., Nakagawa, A., and Taniguchi, H. (2010). Crystal structure of aminomethyltransferase in complex with dihydrolipoyl-H-protein of the glycine cleavage system: implications for recognition of lipoyl protein substrate, disease-related mutations, and reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* *285*, 18684–18692.

Okamura-Ikeda, K., Hosaka, H., Yoshimura, M., Yamashita, E., Toma, S., Nakagawa, A., Fujiwara, K., Motokawa, Y., and Taniguchi, H. (2005). Crystal structure of human T-protein of glycine cleavage system at 2.0 Å resolution and its implication for understanding non-ketotic hyperglycinemia. *J. Mol. Biol.* *351*, 1146–1159.

Schuller, D.J., Reisch, C.R., Moran, M.A., Whitman, W.B., and Lanzilotta, W.N. (2012). Structures of dimethylsulfoniopropionate-dependent demethylase from the marine organism *Pelagabacter ubique*. *Protein Sci.* *21*, 289–298.

発表論分

Harada, A., Sato, Y., Kamimura, N., Venugopalan, N., Masai, E., and Senda, T. (2016). Overcoming a hemihedral twinning problem in tetrahydrofolate-dependent O-demethylase crystals by the microseeding method. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 72, 897–902.

謝辞

末筆ではありますが、千田研究室での学生生活でお世話になった方々に厚く御礼もうし上げます。

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター センター長 兼 総合研究大学院大学 高エネルギー加速器科学研究科 物質構造科学専攻 千田俊哉教授には指導教員として、学部・修士・博士課程の約7年間もの長い間お世話になりました。お忙しいにも関わらずいつも時間を工面して研究の折々で丁寧に指導していただきました。また、S-SAD 法による位相決定法の確立という最先端の研究を行う機会を作ってくださいました。ここに深く御礼もうし上げます。

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 足立 伸一教授には、お忙しい中本学位論文の査読を引き受けていただいたことをここに深く御礼もうし上げます。

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター 加藤龍一准教授、川崎政人准教授、松垣直宏准教授、清水伸隆准教授には、本学位論文の副査を引き受けていただいたことに深く感謝申し上げます。

長岡技術科学大学 生物機能工学専攻 政井英司教授、上村直史助教授、また、東北大学大学院生命科学研究科 永田 裕二教授には、貴重な時間をいただき助言を賜りましたことに深く感謝申し上げます。

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター 山田悠介助教には、S-SAD 法による位相決定のための回折強度データ収集及びその解析全般に関して基礎から詳細にご教授いただきました。長い間成果が出ませんでした、チャンスを与えていただいたことに深く感謝申し上げます。

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センターにおける S-SAD チームである松垣直宏准教授、千田美紀特別助教、Dorothee Liebschner 研究員(現

Lawrence Berkeley National Laboratory)、牧尾尚能研究員 (現 特許庁)には、研究方針や解析手法に関して助言を賜りましたことに深く感謝申し上げます。

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター 佐藤優花里研究員には、LigM の発現ベクターの作製から精製に関してその基礎から詳細にご教授いただきましたことに深く感謝申し上げます。

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 兼 総合研究大学院大学 高エネルギー加速器科学研究所 物質構造科学専攻長 河田 洋教授には、博士課程在学中に三ヶ月間海外で研究する機会を作っていただきました。貴重な体験をさせて頂けたことに深く感謝申し上げます。

Advanced Photon Source (APS) GM/CA のスタッフである Nagarajan Venugopalan 博士には APS での滞在中 3 か月間、公私ともに大変お世話になりました。ここに深く感謝申し上げます。

3年と半年、楽しい学生生活や研究生活を過ごすことができたのは、これらの皆様と千田研究室のメンバーの方々、家族をはじめ多くの方々のおかげです。また、祖母 (故) 澤井照子 様、叔母の戎 千代子 様にはこれまで多くの支援をしていただきました。感謝の念でいっぱいです。この紙面で挙げた方以外にも多くの方々に支えられて博士課程を過ごすことができました。お世話になったすべての方々に深く感謝申し上げます。

また、日本学術振興会による特別研究院 DC 2 への採用は、筆者の博士課程での研究継続のために精神的、経済的な大きな支えとなりました。ここに深く感謝申し上げます。

平成 28 年 9 月

原田 彩佳