

Sphingobium sp. SYK-6 株由来 Extradiol 型 2
原子酸素添加酵素 DesZ の X 線結晶構造解析

松原 永季

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 29 (2017) 年度

Sphingobium sp. SYK-6 株由来 Exradiol 型 2 原子酸素添加酵素
DesZ の X 線結晶構造解析

高エネルギー加速器科学研究科
物質構造科学専攻

学籍番号：20131302

松原 永季

目次

要旨

第1章 序論 1

- 1.1.2 原子酸素添加酵素 (ジオキシゲナーゼ)
- 1.2 Extradiol 型ジオキシゲナーゼ
- 1.3 *Sphingobium* sp. SYK-6 株に内在する Extradiol 型 2 原子酸素添加酵素
- 1.4 DesZ、LigAB、DesB および LigZ の比較
- 1.5 研究目的

第2章 実験方法 19

- 2.1 実験材料および使用機器
- 2.2 DesZ の発現および精製
- 2.3 精製標品の N 末端配列解析
- 2.4 ゲル濾過および SEC-MALS による分子量解析
- 2.5 結晶化
 - 2.5.1 結晶化用 DesZ 溶液の調製
 - 2.5.2 DesZ 結晶化条件の探索と最適化
- 2.6 初期位相の決定
- 2.7 構造精密化
- 2.8 DesZ 結晶中の金属イオンの分析
 - 2.8.1 X 線吸収によるネイティブ結晶に含まれる金属イオンの分析
 - 2.8.2 異常分散差フーリエ図の作成による DesZ 結晶中の金属イオンの分析
- 2.9 溶存酸素濃度の測定による野生型 DesZ の活性評価
 - 2.9.1 活性測定用 DesZ 溶液の調製
 - 2.9.2 酵素反応溶液中の溶存酸素濃度の測定
- 2.10 溶存酸素濃度の測定による DesZ 変異体の活性評価
 - 2.10.1 DesZ 変異体発現用プラスミドの作製
 - 2.10.2 大腸菌による DesZ 変異体の発現と精製
 - 2.10.3 CD (circular dichroism) による DesZ およびその変異体の二次構造組成の確認

- 2.10.4 活性測定用 DesZ 変異体溶液の調製
- 2.10.5 酵素反応溶液中の溶存酸素濃度の測定と酵素活性の評価
- 2.11 DesZ-基質複合体構造の構造解析
 - 2.11.1 基質複合体の結晶化
 - 2.11.2 回折強度データの収集と構造解析

第3章 結果

3-1 DesZ の X 線結晶構造解析 38

- 3-1.1 DesZ の発現および精製
- 3-1.2 精製標品の N 末端配列解析
- 3-1.3 ゲル濾過および SEC-MALS による分子量解析
- 3-1.4 結晶化と回折像の測定
- 3-1.5 初期位相の決定
 - 3-1.5.1 回折データの収集
 - 3-1.5.2 初期位相の決定とモデル構築
- 3-1.6 構造精密化
- 3-1.7 DesZ 結晶中の金属イオンの分析
 - 3-1.7.1 X 線吸収によるネイティブ結晶に含まれる金属イオンの分析
 - 3-1.7.2 異常分散差フーリエ図の作成による DesZ 結晶中の金属イオンの分析

3-2 DesZ の立体構造 63

- 3-2.1 DesZ の全体構造
- 3-2.2 DesZ の 2 量体形成における接触面積
- 3-2.3 DesZ と LigAB, DesB の構造比較
 - 3-2.3.1 DesZ と LigAB, DesB の全体構造
 - 3-2.3.2 DesZ, DesB および LigAB の活性中心の比較

3-3 DesZ の酵素活性測定 73

- 3-3.1 DesZ 精製標品および再活性化された DesZ 溶液の活性比較
- 3-3.2 DesZ の酵素活性における鉄およびカルシウム依存性の確認
- 3-3.3 PCA、Gallate および HPCA を基質とした DesZ の酵素活性測定

3-4 DesZ 野生型とその変異体との酵素活性比較	77
3-4.1 大腸菌による DesZ 変異体の発現と精製	
3-4.2 CD (circular dichroism) による DesZ およびその変異体の二次構造組成の確認	
3-4.3 DesZ 変異体の酵素活性評価	
3-4.3.1 触媒残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体の酵素活性評価	
3-4.3.2 金属イオンと配位する残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体の酵素活性評価	
3-4.3.3 基質特異性に関与する残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体の酵素活性評価	

第 4 章 考察	90
-----------------------	----

参考文献	101
------	-----

Appendix. A 使用した試薬および機器	111
-------------------------	-----

Appendix. B 略号及び備考	120
--------------------	-----

Appendix. C 比活性の算出	122
--------------------	-----

謝辞	124
----	-----

要 旨

DesZ は活性中心にノンヘム型の二価鉄を 1 つもつアミノ酸残基数 330、分子量 36,530 の TypeII–ClassIII Extradiol 型 2 原子酸素添加酵素(ジオキシゲナーゼ)で、*Sphingobium* sp. SYK-6 株のリグニン由来低分子芳香族化合物代謝経路において 3-O-methylgallate (3MGA) の芳香環開裂反応を触媒する。この菌株からは現在までに DesZ の他 LigZ、LigAB、DesB という基質特異性は異なるが同じ分類に属する芳香環開裂酵素が単離されており、それぞれ主に 2,2',3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxybiphenyl (OH-DDVA)、protocatechuate (PCA) および gallate を基質とした反応を触媒すること、これらの酵素反応で DesZ は比較的低い活性を示すことが知られている。また、LigAB および DesB については既に結晶構造が決定されている。これらの酵素のアミノ酸配列解析から、DesZ は LigAB および DesB が持つ活性中心の蓋にあたる領域を持たず、LigAB および DesB が持たない 2 箇所(33-66、126-136 残基)を持つことが分かった。また、これら酵素が属する Extradiol 型ジオキシゲナーゼの大多数では活性中心で鉄イオンと配位結合する残基について His-His-Glu モチーフが保存されるが、DesZ ではこのモチーフに相当する 98 番目の残基の His は保存されておらず、Gln として存在していた。この解析結果と Swiss-model による DesZ の予測構造から、DesZ の活性中心で鉄イオンと配位する残基は His-Gln-Glu という新規モチーフを持つことが予想された。本研究では、DesZ と類縁酵素間の基質および金属イオンの結合様式の違いについて立体構造に基づいた知見を得ることを目的とし、DesZ の X 線結晶構造解析と、得られた結晶構造による基質複合体構造の予測に基づいた変異体群の活性比較による分析を行った。

DesZ は大腸菌を用いて大量発現、精製を行い、結晶化は活性中心の鉄イオンが酸化により遊離するのを防ぐために精製直後に嫌気条件下で行った。回折データ測定はフオンファクトリー PF-BL1A (茨城県つくば市) で行い、Native-SAD 法により位相を決定した。構造精密化は 1.85 Å 分解能で行った。得られた DesZ の構造は LigAB・DesB の活性中心を含むドメインと似た全体構造を示し、活性部位の蓋に相当する欠損領域については C 末端側の約 15 残基 (126-136 残基)の挿入配列領域が部分的にそれを補填していた。また、活性中心で金属イオンに配位していた残基はアミノ酸配列分析による予想とは異なり、His12-His184-Glu287 で構成されていた。しかし、His184 は一次構造配列上 LigAB・DesB の His127 および His124 に相当し、これらは触媒残基として機能して鉄イオンとは配位しない残基であった。また、LigAB・DesB の活性中心の構造と比較して金属イオンとそれに配位する残基の距離が長くなっており、配位状態も両三角錐を保ってはいなかった。DesZ の結晶について異常分散を利用した解析からは、得られた結晶構造の活性中心には DesZ が本来持つ鉄イオンではなくカルシウムイオンが結合していることが強く示唆された。また、DesZ の活性測定結果において、鉄イオン配位型では活性を示すが、カルシウムイオン配位型では活性が阻害されることから、本研究で得られた結晶構造はカルシウムイオンが配位した不活性型の構造であることが示唆された。そこで、ネイティブの状態の活性型 DesZ について分析するために、LigAB および DesB のアミノ酸配列、基質複合体構造と本研究で得られた DesZ 構造の重ね合わせ比較から基質認識および金属配位に関与すると予測されるアミノ酸残基に変異を入れた DesZ 変異体を調製し、これらの活性測定を行った。この結果、LigAB の触媒残基である His127 と His195、DesB の触媒残基である His124 と His192 はアミノ酸配列解析で DesZ の His184 および His250 に相当するが、これを Ala に置換した変異体では 3MGA の開裂触媒活性が消失したことから、DesZ においても His184 および His250 が触媒残基として機能する可能性が示唆された。同様に、LigAB で鉄イオンと配位する残基

His12/His61/Glu242/Asn59、DesB で鉄イオンと配位する残基 His12/His59/Glu239/Asn57 は DesZ の His12/Gln98/Glu287/Asn96 に相当するが、これらの残基を Ala に置換した変異体では 3MGA の開裂触媒活性が消失もしくは活性が大きく低下したことから、DesZ においてもこれらの残基が金属イオンの配位に関与する可能性が示唆された。また、LigAB および DesB において基質のカルボキシ基を認識する残基に相当する位置にある Arg26、Arg315 を Ala もしくは Glu に置換した変異体でも酵素活性が消失することが明らかになり、これらの残基は 3MGA のカルボキシ基の認識に必須であると予測された。

本研究で得られた DesZ の結晶構造において、類縁酵素で触媒残基として機能し、鉄イオンとは配位しない残基に相当する His184 が金属イオンと配位していたこと、それに代わって LigAB/DesB で鉄イオンに配位する残基である His61/His59 に対応する位置にある Gln98 は金属イオンと配位していないが、活性に強く関与すること、これに加え、触媒残基と予測される His250 の位置および 3MGA のカルボキシ基を認識すると思われる Arg26/Arg315 の位置と、実際の LigAB および DesB の基質複合体構造との位置関係を対応させると、ネイティブ状態の活性型 DesZ で実際に鉄イオンと配位する残基は His12-Gln98-Glu287 である必要がある。このことから、今回得られた DesZ 結晶構造の金属配位状態はカルシウムイオン配位型の不活性な状態であることによるものと考えられた。

これらの結果を考慮に入れてゲノム配列分析を行った結果、TypeII-ClassIII ジオキシゲナーゼには DesZ 同様の挿入配列を持ち、Arg26、Arg315 に対応する残基が保存されたサブグループが存在することが示唆された。このサブグループでは、これらの残基は基質と相互作用し、活性中心における基質の位置を安定させる役割を持つことが予測される。また、このサブグループはさらに a) DesZ および LigZ の Gln98 および Asn96 に相当するアミノ酸残基が保存され、His-Gln-Glu 金属配位モチーフを持つグループ、b) DesZ の Gln98 に相当するアミノ酸残基は His として保存されるが、DesZ で Asn96 に相当する残基が Ser として存在する His-His-Glu 金属配位モチーフを持つことが予測されるグループが存在することが判明した。

本研究で決定した DesZ の X 線結晶構造および変異体の活性測定結果およびアミノ酸配列を用いたゲノム配列分析から、DesZ および LigZ は金属配位モチーフがこれまで一般的に考えられてきた His-His-Glu ではなく、His-Gln-Glu という新規モチーフを持つ TypeII-ClassIII ジオキシゲナーゼの新規サブグループに属することが示唆された。

第 1 章 序論

第1章 序論

1.1 2原子酸素添加酵素 (ジオキシゲナーゼ)

2原子酸素添加酵素 (ジオキシゲナーゼ) はオキシドレダクターゼ = 酸化還元酵素 (oxidoreductase enzymes) に属する2原子(1分子)の酸素を取り込み基質に供与する酸化還元酵素で、EC 番号 1.13.11. 以下に分類される。ジオキシゲナーゼはバクテリアから複雑な真核生物まで、トリプトファン代謝や外因性化学物質の分解などの様々な代謝経路において酸素を用いた酸化触媒反応に利用されており、代謝および基質については広範な様式が存在することが知られている。また、その補因子として最も多く用いられるのは鉄である。鉄を含むジオキシゲナーゼは、i) 単核 (mononuclear) の鉄、ii) [2Fe-2S] クラスタを持つ Rieske 型、iii) ヘム鉄を補因子とするものに大きく分類される。i) の単核の鉄を補因子として触媒反応を行う酵素はさらに二価の鉄イオンを補因子としてジオールの隣接するヒドロキシ基のメタ型開裂を触媒する Extradiol 型と、三価の鉄イオンを補因子としてオルト型開裂を行う Intradiol 型のジオキシゲナーゼに分類される (図 1-1) (Costas et al., 2004 ; Frey et al., 2007)。

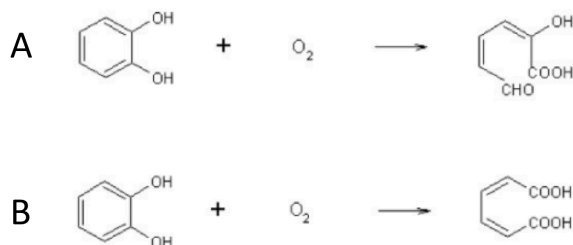


図 1-1 ジオキシゲナーゼの分類

Extradiol 型ジオキシゲナーゼと Intradiol 型ジオキシゲナーゼ

(https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/369/2683861/PMC2683861_1756-0500-2-67-2.png より)

A: Extradiol ring cleavage dioxygenase ; B: Intradiol ring cleavage dioxygenase. 芳香環の開裂反応を触媒するジオキシゲナーゼのうち、A の Extradiol 型ジオキシゲナーゼは二価の鉄イオンを補因子として用い、メタ型開裂反応を触媒する。B の Intradiol 型ジオキシゲナーゼでは補因子に三価の鉄イオンを用い、オルト型開裂反応を触媒する。

また、Extradiol 型ジオキシゲナーゼについては、そのアミノ酸配列の相同性によりさらなる分類がされており、現在 Type I および II (Eltis et al., 1996)、もしくは Class I から Class III (Spence et al., 1996) に分類されている(図 1-2)。それぞれ代表的な酵素として、Type I - Class I は homoprotocatechuate (HPCA) 2,3-dioxygenase (HPCD) が、Type I - Class II には 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase (BphC) が、Type II - Class III には protocatechuate (PCA) 4,5-dioxygenase (LigAB) などがあげられる。

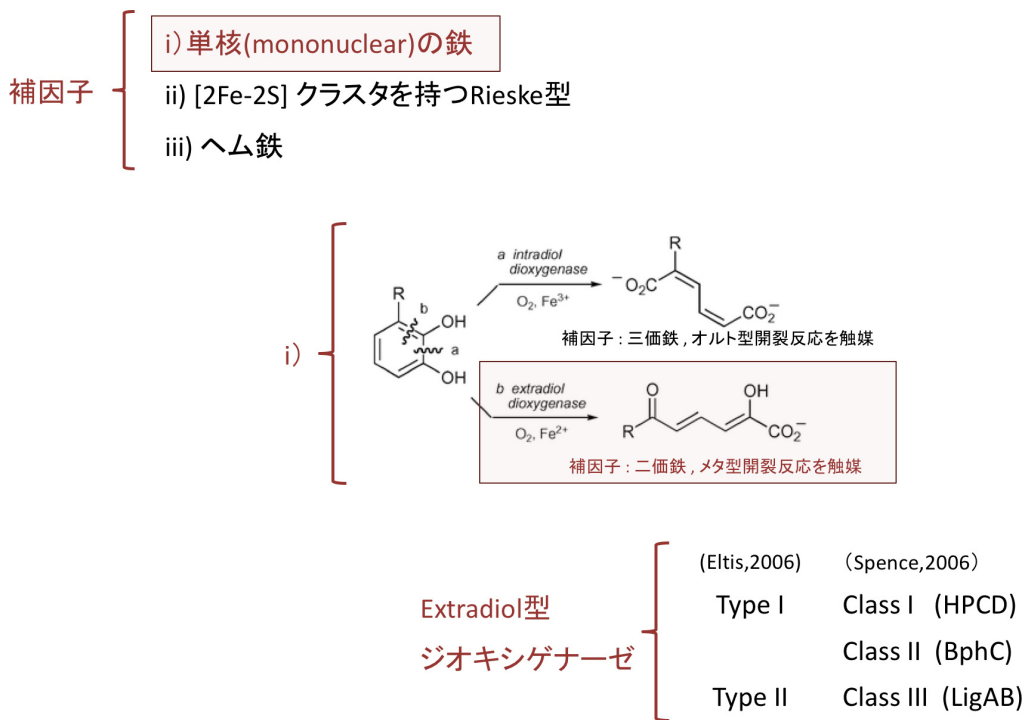


図 1-2 Extradiol 型ジオキシゲナーゼの分類

単核の鉄イオンを補因子とする Extradiol 型ジオキシゲナーゼはさらにアミノ酸配列相同性により Type I-II および Class I-III に分類される。Type I の Extradiol 型ジオキシゲナーゼはさらに Class I・II に分類され、進化上アミノ酸配列の相同性から Class I が遺伝子重複により 2つのドメインを持つことで Class II 化したと考えられているが、Type II - Class III に属する Extradiol 型ジオキシゲナーゼは配列および構造が Class I・II とは異なっている。

1.2 Exradiol 型ジオキシゲナーゼ

Exradiol 型ジオキシゲナーゼの分類については、古くは Harayama らにより基質の選択性(基質が二環式であるか単環式であるか)によって2種類に分けられることが提示された(Harayama et al., 1989)。その後、Exradiol 型ジオキシゲナーゼについて初の立体構造となる BphC の X 線結晶構造が決定されたことで分類のみならず、その機能を知る上での大きな進歩を迎えた。まず Sugiyama らによって *Acidovorax* sp. KKS102 株由来の (Sugiyama et al., 1995)の、次いで Han らによって *Burkholderia xenovorans* LB400 株の BphC の X 線結晶構造が決定され(Han et al., 1995)、また、Senda らによって *Acidovorax* sp. KKS102 株由来の BphC およびその基質複合体の構造について詳細な解析がなされた (Senda et al., 1996)。ここで、BphC の全体構造は N 末端ドメインと C 末端ドメインの2つのドメインで構成されており、この両ドメインでは $\beta \alpha \beta \beta \beta$ 構造モチーフが2回くり返された同様の構造をとっていたことから、BphC の遺伝子が2回以上の遺伝子重複を経て進化してきたことが示唆された。補因子である鉄イオンは C 末端のドメインに1つ含まれ、C 末端側ドメインが活性を担保していることが示されている。また、BphC とその基質である 2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-DHPB)の複合体の活性中心においては鉄イオンが His145、His209、Glu260 で構成される His-His-Glu モチーフと配位結合し、2,3-DHPB とは2個の水酸基を介して鉄イオンと配位結合していることが示された。この結果は Arciero らによって EPR を用いた実験結果から予測された構造 (Arciero et al., 1986)が本質的に正しいことを明らかにした。BphC を代表とする Type I - Class II の酵素ではこの His145、His209、Glu260 で構成される His-His-Glu モチーフは配列上保存されており、アミノ酸配列全体でも相同性が認められることから、全体構造が類似していることが示唆されている。Type I - Class II と Type I - Class I の酵素を比較すると、Class I に属する酵素ではサブユニットの大きさが Class II の半分程度であり、Class II の C 末端ドメインとアミノ酸配列の相同性がある。また、配列上 Class II において活性中心を構成する残基も保存されていることから、Class I の酵素は Class II の酵素の C 末端ドメインのみで構成されている酵素であり、遺伝的に関連があると考えられている。

それに対し、Type II - Class III の酵素では Class I および Class II の酵素との一次構造の相同性が低く、全体構造や活性中心で保存されたアミノ酸残基については Class III の一次構造からは予測できない。しかし、protocatechuate (PCA) 4,5-dioxygenase (LigAB)の立体構造が決定されたことで(Sugimoto et al., 1999)、その立体構造が Class I および Class II の酵素とは全く異なることが明確にされた。LigAB の構造を図 1-3 に示す。この結果から、Class III の酵素は Class I および Class II の酵素と進化的に関連がないことが示唆された。LigAB の活性中心は β サブユニット(LigB)にあり、His12, His61, Glu242 で構

成される His-His-Glu モチーフが鉄イオンと配位結合していた。活性中心は α サブユニット(LigA)により覆われ、これが蓋の役目を果たしていることが分かった。また、LigAB-PCA 基質複合体において、PCA は 2 個の水酸基を介して鉄イオンと配位結合しており、LigAB の活性中心の配置は BphC のものときわめて似ていることが示された。このことから、BphC と LigAB の関係は進化上の祖先が異なるものの、きわめて類似した活性中心を進化させてきた収斂進化の例と考えられ、両者が同一の反応メカニズムをもっていることが示唆された。これに加え、LigAB と同じく Type II - Class III に属する酵素である gallate dioxygenase (DesB)について、Sugimoto らが構造を決定している(Sugimoto et al., 2014)。DesB は全体構造として LigAB とよく類似した構造をとっていたが(図 1-3)、LigAB ではその構造が α (LigA)と β (LigB)ユニットに分かれるのに対し、DesB ではこれらのユニットが連続した 1 分子として存在しており、LigA に相当する蓋の部分は DesB 分子の C 末端側がそれに相当した 2 量体を形成していた。DesB の活性中心においても LigAB 同様、一次配列上保存された His12, His59, Glu239 で構成される His-His-Glu モチーフが鉄イオンと配位結合していた。DesB の基質複合体構造から、活性中心に存在する鉄イオンは基質と相互作用をしないフリーの状態の位置(R-site)と、基質との複合体を形成する活性化状態の位置(A-site)とは異なり、活性型の基質複合体を形成する際に金属イオンがシフトすることが示唆された(図 1-4)。

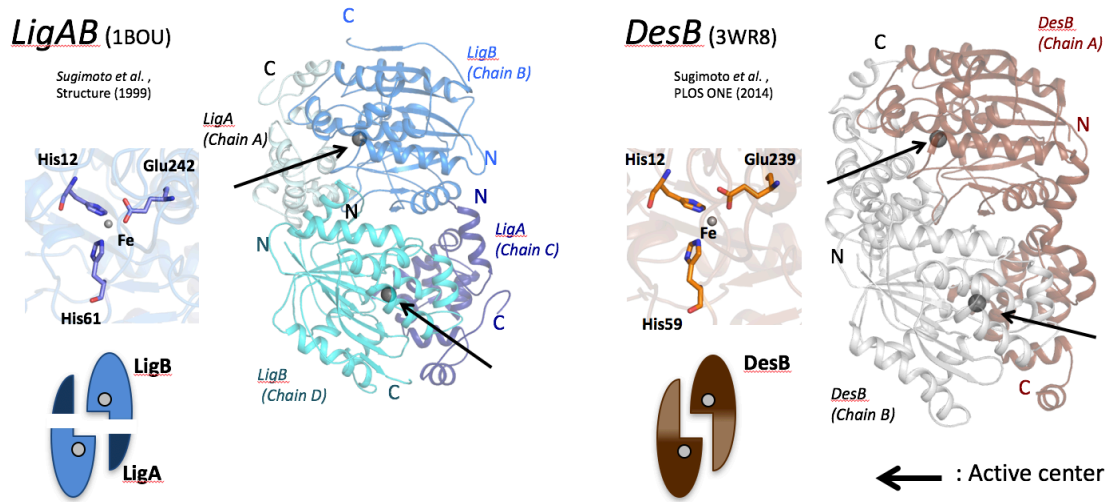


図 1-3 LigAB および DesB の X 線結晶構造

LigAB, DesB の全体構造を cartoon で示した。モデルの左上にはそれぞれの PDB 番号を、左下には模式図を示した。活性中心についてはそれぞれ鉄イオンと配位する残基をスティックモデルで表示した。

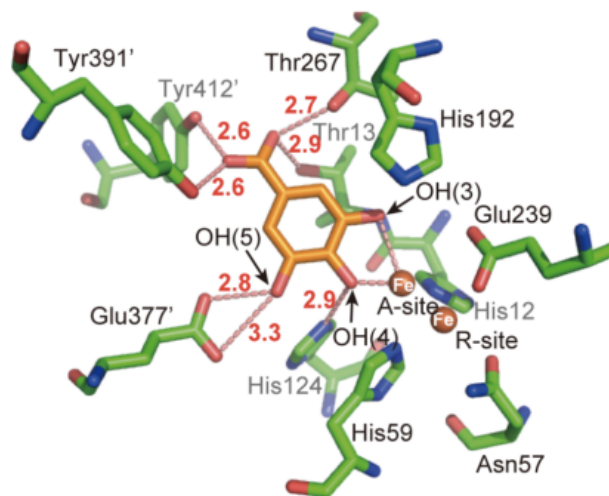


図 1-4 DesB-gallate 複合体の活性中心と鉄イオンの位置
(Sugimoto et al., PLoS One, 9(3), e92249, 2014 より)

嫌気状態の DesB-gallate 複合体の活性中心. DesB の残基は緑で, gallate の炭素原子はオレンジ色で示した. DesB 分子との水素結合はピンク色の点線で示し, その距離(Å)の数値を追記した. 活性中心にある鉄イオンが gallate と水素結合し, 活性化状態を形成する位置が A-site, DesB の Asn57 側にある位置を R-site として, 鉄イオンがシフトすることが示されている.

Extradiol 型ジオキシゲナーゼの触媒反応の機序については、Type I - Class II Extradiol 型ジオキシゲナーゼである BphC について、Uragami らにより *Acidovorax* sp. KKS102 株由来の BphC の活性化型とその基質複合体の結晶構造解析がなされ (Uragami et al., 2001)、Sato らにより反応中間体の詳細な構造を解明するために基質フリー体、BphC-基質複合体および BphC-基質(一酸化窒素)複合体の結晶構造が決定された (Sato et al., 2002)。また、Type I - Class I に属する酵素である homoprotocatechuate (HPCA) においては 2,3-dioxygenase (HPCD)の変異体解析と反応中間体の構造から解析が進められてきた (Kovaleva et al., 2007, 2008 ; Lipscomb, 2008)。ここで示された反応中間体構造においては、酸素分子との複合体構造は Sato らによる BphC-基質(一酸化窒素)複合体の結晶構造とは異なり、鉄と酸素が side-on 型の配位結合を行い、アルキルペルオキシ型の間接を経て反応が進むことが示された(図 1-5)。

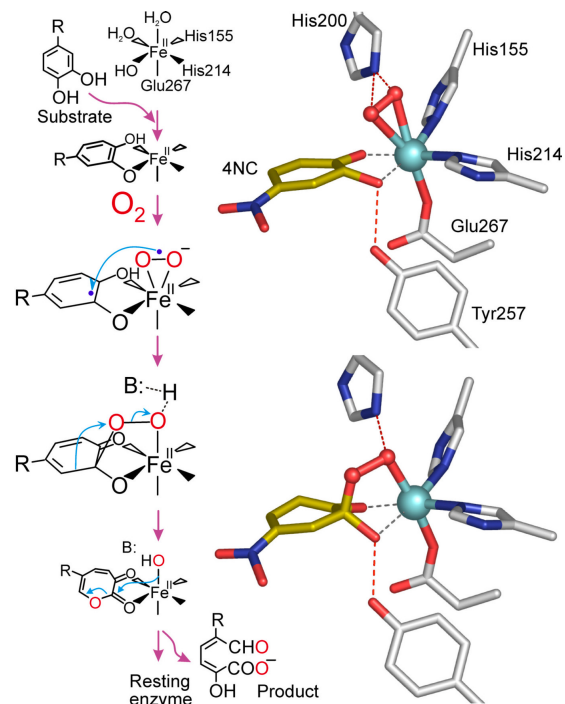


図 1-5 HPCD の酸素による活性化と酵素反応

(Kovaleva et al., Nat Chem Biol., 4, 186-193, 2008 より)

Type II - Class III Extradiol 型ジオキシゲナーゼについては、LigAB および DesB について結晶構造および変異体の解析(Mizumoto 修士論文, 2001; Sugimoto et al., 1999 ; Sugimoto et al., 2014)および 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase (MhpB)の変異体解析 (Mendel et al., 2004)等により、触媒反応経路の機序および基質特異性についての解析が進められてきた。

これらの結果から、Extradiol 型ジオキシゲナーゼの酵素反応においてはまず活性中心の鉄イオン (II) に配位結合した Equatorial 位にある基質の水酸基の脱プロトン化を Type I (HPCD/BphC)では Tyr (Tyr257/ Tyr249)が、 TypeII (LigB/DesB)では His (His127/HIs124)が担い、引き続き Type I (HPCD/BphC)では His (His200/ His194)が、 TypeII (LigB/DesB)では His (His195/His192)が基質の axial 位の水酸基からプロトンの引き抜きを行い、次いでプロトンに戻すことで酵素反応が進んでいくと考えられている。このような経緯で、Extradiol 型ジオキシゲナーゼにおいてはほぼ一般的に図 1-6 に示す様式での触媒反応が起こっているであろうことが示されてきた。

また、活性中心に存在する金属イオンについて、鉄およびマンガンを活性中心でスワップさせた酵素について活性の比較を行った結果、それらの活性が変わらないことから、Extradiol 型ジオキシゲナーゼが一般的な金属酵素とは異なり、活性中心の金属イオンが酸化還元電位に依らず酸素の活性化を担っていることが示された(Emerson et al., 2007)。

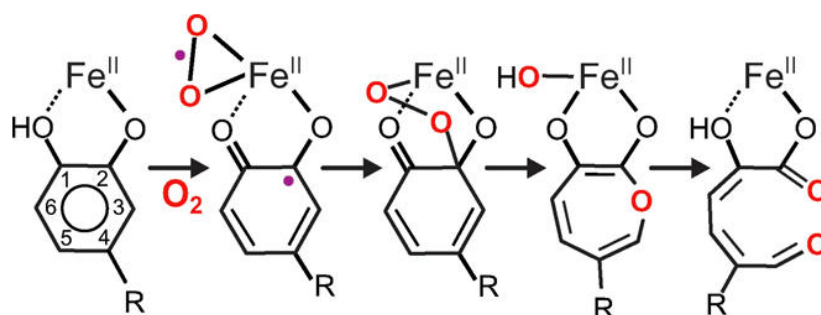


図 1-6 エクストラジオール型ジオキシゲナーゼの反応シーケンス案
(Mbughuni et al., Biochemistry, 51, 8743-8754, 2012 より)

1.3 *Sphingobium* sp. SYK-6 株に内在する Extradial 型 2 原子酸素添加酵素

自然界において最大の芳香族化合物バイオマスを占めるリグニン¹は陸生の植物の構造支持体として存在し、非常に複雑かつ安定な構造を持つ。リグニンは自然界では主に白色腐朽菌によって分解され (Higuchi et al., 1971)、低分子化された後に土壌細菌によって利用される事が可能になる。低分子化されたリグニンは土壌中に生育する低分子リグニン²資化性細菌などにより最終的に二酸化炭素として大気に放出されることになる。

Sphingobium sp. SYK-6 株はパルプ工場の廃液から単離され (Katayama et al., 1987)、これまでに最もよく研究されてきた低分子リグニン²資化性細菌で、その代謝経路については網羅的な研究がなされてきた (Katayama et al., 1988 ; Masai et al., 1989 ; Noda et al., 1990 ; Masai et al., 1991 ; Nishikawa et al., 1998 ; Masai et al., 1999 ; Peng et al., 1999 ; Hara et al., 2000)。SYK-6 株は通常の生物が栄養源とする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できず、リグニン²誘導体低分子化合物のみを栄養源としている。このため、SYK-6 株は他の生物と比べて特殊な代謝系を持っている (図 1-7)。この代謝経路において、鍵となるのは芳香環の開裂反応である。この開裂反応を触媒する酵素としてジオキシゲナーゼ³があげられ、SYK-6 株の代謝経路では Biphenyl catabolic pathway, 3MGA catabolic pathway および PCA 4,5-cleavage pathway においてジオキシゲナーゼにより芳香環開裂反応が触媒されている。

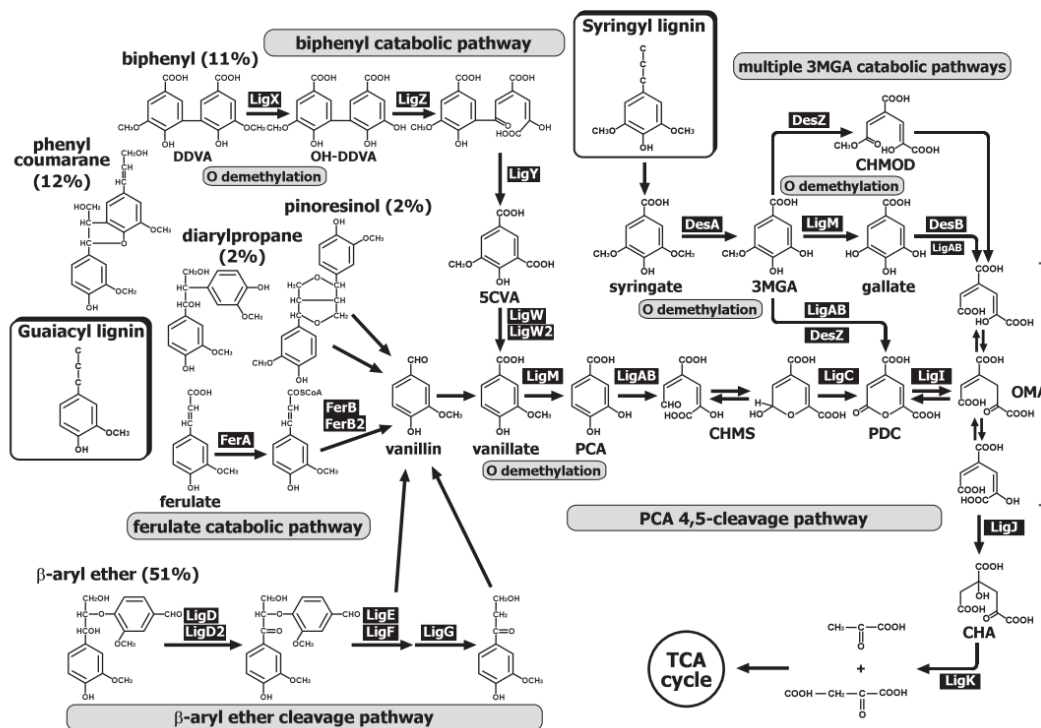


図 1-7 *Spingobium* sp. SYK-6 株のリグニン誘導体低分子化合物の代謝マップ
 (Masai et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 71 (1), 1–15, 2007 より)
Spingobium sp. SYK-6 株による低分子リグニンの資化代謝系

SYK-6 株の代謝系において芳香環の開裂反応を触媒する酵素については現在までに 2,2',3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxybiphenyl (OH-DDVA) dioxygenase (LigZ)、protocatechuate (PCA) 4,5-dioxygenase (LigAB)、gallate dioxygenase (DesB)、および 3-O-methylgallate (3MGA) dioxygenase (DesZ) の 4 種類が単離されており (Peng et al., 1998 ; Noda et al., 1990 ; Kasai et al., 2005 ; Kasai et al., 2004)、これらの酵素はすべて Type II-Class III の Extradial 型ジオキシゲナーゼに属している。LigAB, DesB, DesZ については SYK-6 株の代謝経路のうち 3MGA catabolic pathway および PCA 4,5-cleavage pathway で協調的に機能していることが LigAB, DesB, DesZ の遺伝子を欠損させた変異株を用いた研究結果から明らかにされている (Kasai et al., 2005)。ここで、Syringate の代謝系において、LigAB と DesB の機能を欠損させると Gallate の開裂反応が著しく阻害されるが、DesZ は Gallate の開裂には大きく関与せずに補助的に働くこと、DesZ は 3MGA の

開裂に関与していることが示されている(図 1-8)。また、LigAB、DesB については先述のとおり立体構造が既に決定されている (Sugimoto et al., 1999 ; Sugimoto et al., 2014)。

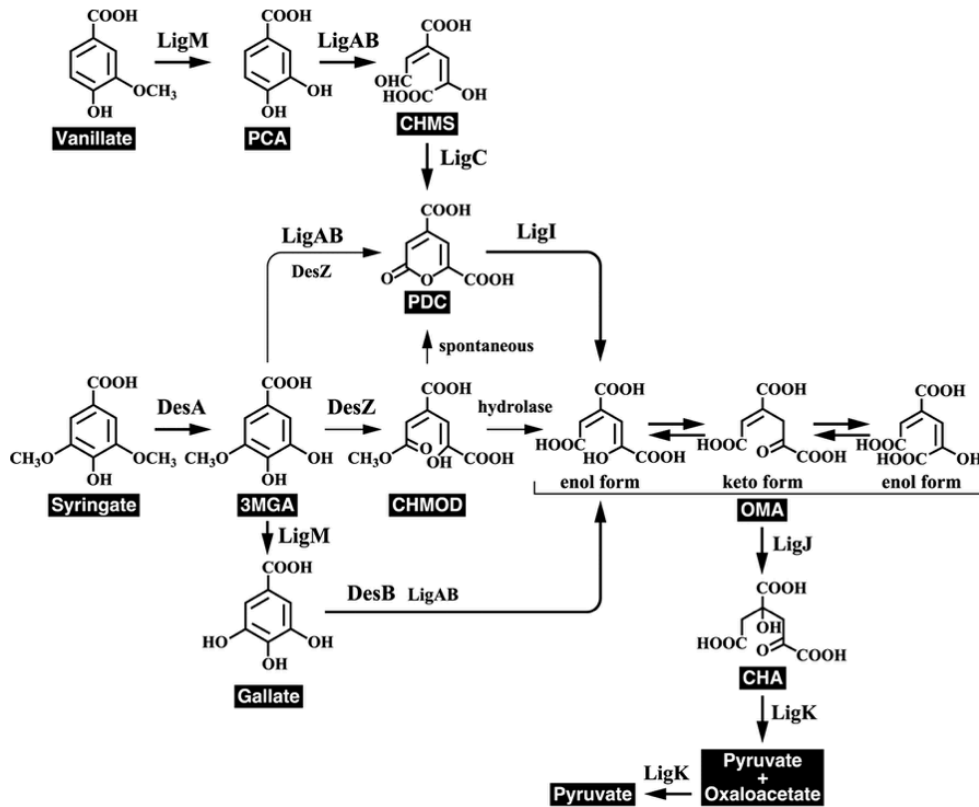


図 1-8 *Spingobium* sp. SYK-6 株の 3MGA catabolic pathway および PCA 4,5-cleavage pathway.

(Kasai et al., Journal of Bacteriology, 187(15), 5067-5074, 2005 より)

SYK-6 の低分子リグニン代謝で Vanillate および Syringate より下流の代謝経路を示す。PCA の芳香環開裂を LigAB が触媒し、3MGA catabolic pathway と合流する。また 3MGA は LigAB, DesZ により芳香環開裂反応を触媒される。Gallate は DesB および LigAB に芳香環開裂反応を触媒される。これらの経路をたどることで低分子リグニンの代謝産物が最終的に TCA 回路に合流することが可能になっている。

1.4 DesZ、LigAB、DesB および LigZ の比較

DesZ はリグニン誘導体低分子化合物である 3MGA を基質に、2 分子酸素添加しメタ開裂反応を触媒する 330 残基長、分子量 36,530 の酵素で(Kasai et al., 2004)、DesZ と LigAB、DesB、および LigZ のアミノ酸配列の相同性(identity)はそれぞれ 22.2、22.5 および 46%である。DesZ、LigAB と DesB の基質および活性について表 1-1 に、LigZ の活性について表 1-2 に示す。

Enzyme	Substrate								
	Gallate			3MGA			PCA		
	V_{max} (U/mg)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m	V_{max} (U/mg)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m	V_{max} (U/mg)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m
DesB	42.7 \pm 2.4 ^a	66.9 \pm 9.3	0.64	<0.1	ND ^b	ND	<0.1	ND	ND
DesZ	2.75 \pm 0.08	371 \pm 21	0.0074	3.63 \pm 0.20	214 \pm 24	0.017	<0.1	ND	ND
LigAB	15.0 \pm 1.5	381 \pm 38	0.039	0.925 \pm 0.032	937 \pm 18	0.00099	30.6 \pm 4.2	75.0 \pm 19.2	0.41

^a Mean \pm standard deviation.

^b ND, not determined.

表 1-1 DesB, DesZ および LigAB の酵素速度論的解析
(Kasai et al., Journal of Bacteriology, 187(15), 5067-5074, 2005 より)

Table 1. Apparent steady-state kinetic and inactivation parameters of LigZ.

Substrate	K_{mA}^{app} (μ M)	k_{cat}^{app} (s^{-1})	$k_{cat}^{app}/K_{mA}^{app}$ ($\times 10^4 M^{-1} s^{-1}$)	Partition ratio	j_3^{app} ($\times 10^{-2} s^{-1}$)	j_3^{app}/K_{mA}^{app} ($M^{-1} s^{-1}$)
OH-DDVA	6.0 (0.6)	129 (2)	2200 (200)	18 000 (600)	0.72 (0.03)	1000 (100)
PCA	8000 (1000)	5.2 (0.3)	0.07 (0.01)	50 (5)	10 (1)	13 (2)

Experiments were performed using 40 mM HEPES ($I = 0.1$ M), pH 7.5 at 25 °C. The values in parentheses represent standard errors.

表 1-2 LigZ の酵素速度論的解析
(Kuatsjah et al., FEBS Letters, 591(7), 1001-1009, 2017 より)

表に示されたように、DesZ の 3MGA に対する活性は LigAB の PCA に対する、また DesB の Gallate に対する活性と比較すると 1/10 程度に低く、DesZ には天然において他に活性の高い基質が存在する可能性も指摘されている(Kasai et al., 2004)。また、LigZ は

SYK-6 株の biphenyl catabolic pathway においてビフェニル構造を持つ OH-DDVA の開裂を触媒するジオキシゲナーゼで、DesZ とは一次構造の相同性が 46% と似た構造を持つが、3MGA の開裂反応を触媒することはできない(Peng et al., 1998 ; Kasai et al., 2004 ; Kuatsjah et al., 2017)。一方、LigAB および DesB と DesZ のアミノ酸配列解析(図 1-9)と Swiss-model による DesZ の予測構造(図 1-10)からはこれらの触媒活性に必須である LigAB および DesB の His127/His195 および His124/His192 が DesZ では His184/His250 として保存されており、DesZ の活性中心で金属の配位に関与する残基は His-Gln-Glu という新規モチーフであることが予想された。一般的に Exradiol 型ジオキシゲナーゼで金属配位に関わる残基のモチーフは His-His-Asp/Glu で構成され、この立体構造予測からは DesZ の活性中心のアミノ酸残基の配向がこれまでと異なる可能性も考えられる。加えて、アミノ酸配列解析からは DesZ が LigAB と DesB が持たない insertion 領域を持つことがわかった。さらに、DesZ では LigAB・DesB で活性中心の蓋部にあたる LigA および DesB の C 末端部分に対応する領域を欠損している(deletion 領域)。この insertion 領域は予測構造から活性中心の蓋になる部分に相当する可能性がある。この領域には LigAB および DesB においてそれらの基質特異性に関与する残基が含まれることも示されており(Sugimoto et al., 1999 ; Sugimoto et al., 2014)、これらのジオキシゲナーゼと DesZ における基質特異性との差違にこの insertion-deletion 領域が関わっていることが予想できる。

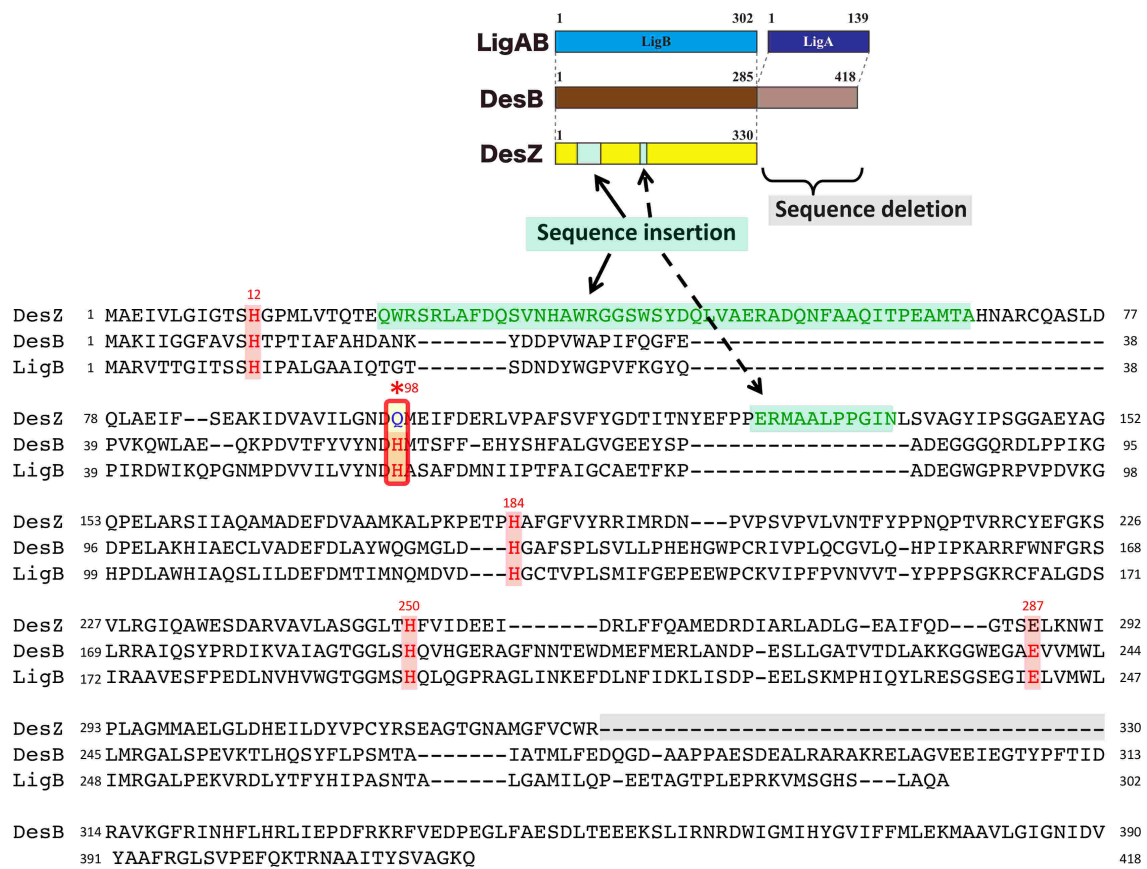


図 1-9 DesZ、LigAB および DesB のアミノ酸配列解析

上図に LigAB, DesB および DesZ の各ドメインおよびそれらの相関について模式図を示した。シーケンスアラインメント上に赤で囲んだ部分が保存された金属配位モチーフ残基および活性残基を (DesZ については予想される残基、上に DesZ の残基番号を赤字で示した)、緑で囲んだ部分は DesZ のみが持つ insertion 領域を示す。*は DesZ において金属配位モチーフが保存されていない残基を示す。なお DesZ が持たない deletion 領域部分に相当する LigA の相関性についてはこの解析結果に含んでいない。

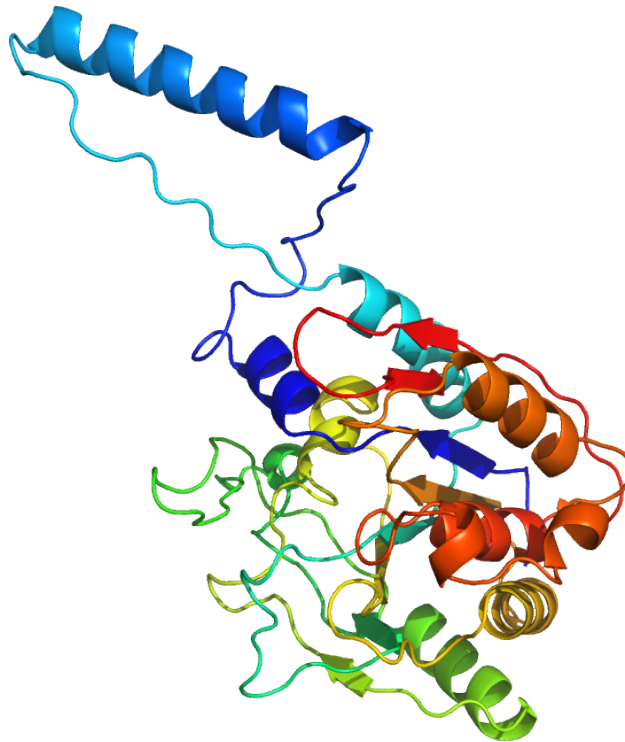


図 1-10 Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>) による DesZ の予測構造
DesB の構造を鋳型に構築された DesZ の予測構造. 図の上部方向に突き出た helix 部分が N 末端側の insertion 領域に相当している.

また、DesZ と LigZ のアミノ酸配列解析を行った結果を図 1-11 に示す。この結果から LigZ も DesZ と同様、活性中心の金属配位モチーフと予測される残基が His-Gln-Glu で構成されていること、LigAB と DesB が持たない insertion 領域を持つこと、LigAB・DesB で活性中心の蓋部にあたる LigA および DesB の C 末端部分を欠損している (deletion 領域を持つ) ことが示唆される。


```

DesZ MAEIVLGIGTSHGPMPLVTQTEQWRSLAFDQSVNHAWRGGWSYDQLVAERADQNFAAQI 60
LigZ MAEIVLGMWTSHGPTLSTTPEQWTLRVSADLKRKHPFRGEEYSFEELVSLRSGEKLAEC 60
*****: ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DesZ TPEAMTAHNARCQASLDQLAEIFSEAKIDVAVILGNDQMEIFDERLVPAFSVFYGDTITN 120
LigZ SLPERERRAAGCQSAIADMADRFAAAKIDVAVIMGNDQRELFLEDVTPAITVYLGETIWD 120
: : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DesZ YEFPPERMAALPPGINLSVAGYIPSGGAEYAGQPELARSIIAQAMADEFDVAAMKALPKP 180
LigZ QPATPEQAARMPPGIHEAEWGHSPERRDYPCQPELGMHVCKTLVPPQGFDLAVSKTLPEP 180
** : * : * * * * * : : * : * : * * * * . : : : * * * . * * * * *
DesZ E-----TPHAFGFVYRRIMRDNPVSPVPLVNTFYPPNQPTVRRRCYEFGKSVLRGIQAW 234
LigZ AGHWSSGAPHSLGFIYRQIMRDQVVPNLPPIINTFFPPNQPTARRCFELGRAVKGAIKRSW 240
: * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DesZ ESDARVAVLASGGLTHFVIDEEIDRLFFQAMEDRDIARLADLGEAIFQDGTSELKNWIPL 294
LigZ KEDLRVAVFGSGGMSHFVIDEDFDRMFFEALRNRDAETLCAIEDKHLQSGTSELKTIWIAA 300
: . * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DesZ AGMMAELGLDHEILDYVPCYRSEAGTGNAMGFVCWR 330
LigZ AGALFDTDLKGDVVGYEPCYRSEAGTGTANGFVAWQ 336
** : : . * . : : . * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

図 1-11 DesZ と LigZ のアミノ酸配列解析

シーケンスアラインメント上に赤で囲んだ部分が予測される金属配位モチーフ残基および活性残基を、赤字の*は DesZ および LigZ において金属配位モチーフが保存されていない残基を示す。緑で囲んだ部分は DesZ が持つ insertion 領域を示しており、LigZ についても DesZ 同様にこの insertion 領域をもつことが示唆される。

1.5 研究目的

これまでに広範な生物種、基質のジオキシゲナーゼについてその生化学的および系統的な解析はなされてきたが、構造決定に至ったものは非常に限定されている。しかし、SYK-6 株においては同一生物種において構造を含めた網羅的な解析がなされており、殊に DesZ と LigZ では配列相同性が高く、類似した構造を持つことが予想されるにも関わらず、低分子リグニン分解経路の上流側 (LigZ : biphenyl catabolic pathway) と下流側 (DesZ : 3MGA catabolic pathway) で芳香環の数が異なる化合物を基質とすることが可能であることも明らかにされている。加えて DesZ は LigAB・DesB と比較して分子量が小さく、基質の認識に関与する残基が含まれると考えられる一部ドメインが欠落していること、補因子となる金属イオンと配位するアミノ酸残基が新規モチーフを持つことが予測されることなどから、その立体構造情報はこれまでに知られていない Exradiol 型

ジオキシゲナーゼの触媒反応機構を理解可能にすることが強く示唆される。つまり、i) LigAB、DesB の蓋にあたる部分は DesZ および LigZ ではどうなっているのか、ii) DesZ および LigZ の活性中心で金属に配位する残基は LigAB、DesB とは異なることが一次構造から予測されるが、補因子である鉄イオンと基質はどのアミノ酸残基とどのように相互作用しているのか、これらの疑問について DesZ の立体構造を用いることで、原子レベルで明らかにすることができれば、Type II - Class III Extradial 型ジオキシゲナーゼの基質特異性に関してさらに精度の高い情報が得られる。このような考えから、本研究は X 線結晶構造解析法を利用して DesZ の結晶構造を決定し、生化学的な比較を行うことによって、DesZ の活性中心がどのような状態で触媒反応を担保しているのか、構造情報と野生型および変異型の活性比較からその分子的基盤を明らかにす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 章では実験方法について、第 3 章では結果について DesZ の X 線結晶構造解析、DesZ の立体構造、DesZ の酵素活性測定および DesZ 野生型と変異体との酵素活性の比較を行った結果の順に述べる。また最後の第 4 章では本論文の考察を記した。

第 2 章 実験方法

2.1 実験材料および使用機器

実験に用いた試薬および機器については Appendix. A に記載した。

2.2 DesZ の発現および精製

DesZ の結晶化および酵素活性評価のための精製タンパク質を得るため、DesZ の全コード領域を含む発現用プラスミドである pEDZA を用いて発現および精製を行った。

pEDZA は長岡技術科学大学の政井研究室から譲渡して頂いたものを使用した。

プラスミド構成の模式図を図 2-1 に示す。

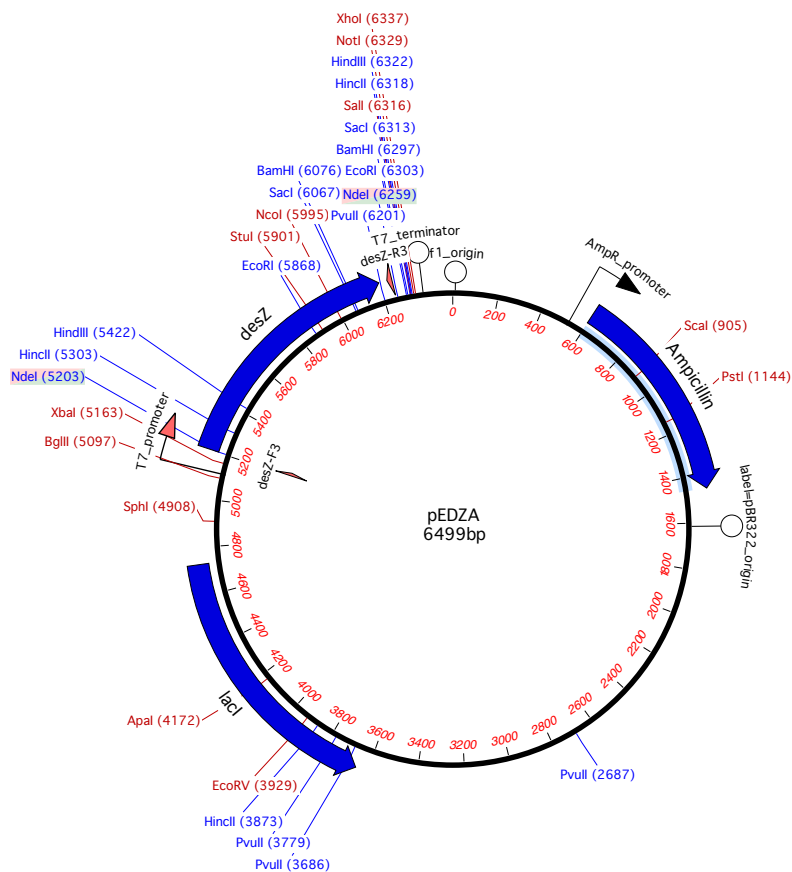


図 2-1 pEDZA plasmid map

この発現プラスミドを大腸菌株 BL21(DE3)pLysS に導入し、終濃度 100 µg/ml のアンピシリンを含む 2×YT 培地で 37°C にて培養し、波長 600 nm における濁度が 0.5 になった時点で終濃度 1 mM の IPTG を加えて発現誘導した。誘導後も引き続き同条件で振とう培養し、誘導後 4 時間目に培養を終了した。培養後、培養液を 5,000 × g, 4°C で 10 分間遠心分離して集菌し、菌体を 2 L 培地分あたり 45 mL の破碎用 Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl) に懸濁した後、氷冷下で超音波破碎機を用いて菌体を破碎した。破碎液は遠心分離(15,000×g, 20 min, 4°C)により不溶性画分を除いた後、上清を回収した。

次に、得られた DesZ を含む粗抽出液を陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化した HiPrep 16/10 Q FF カラム (GE Healthcare) に得られた粗抽出液をチャージし、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.5 M NaCl を用いてグラジエント溶出を行った。グラジエント溶出により得られた DesZ を含む画分は、さらに疎水性相互作用クロマトグラフィーにより精製を行った。陰イオン交換クロマトグラフィー精製画分を 50 mM Tris-HCl (pH 8), 3 M (NH₄)₂SO₄ と 1:1 容量で混合した後、50 mM Tris-HCl (pH 8), 2 M (NH₄)₂SO₄ で平衡化した RESOURCE ETH 6mL カラム (GE Healthcare) にチャージし、50 mM Tris-HCl (pH 8) を用いてグラジエント溶出を行った。引き続きここで得られた溶出画分について、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC, ゲル濾過) による最終精製を行った。カラムは Superdex200 increase 10/300 (GE Healthcare)、バッファーは 50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM NaCl を用いて溶出を行った。溶出された DesZ 画分については Nanodrop を用いて測定した波長 280nm の吸収から計算した。DesZ のモル吸光係数は ExPASy (<http://web.expasy.org>) の protparam により算出し、その値は全てのシステイン残基が還元状態にあると仮定した場合、

$$\epsilon_{280} = 47,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}, \text{ Abs } 0.1\% (=1 \text{ g/L}) 1.311$$

であることを利用して濃度を算出した。

純度については SDS-PAGE のバンド面積から ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S.

National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.) を用いて算出した。

2.3 精製標品の N 末端配列解析

精製したタンパク質が DesZ であることを確認するため、精製標品についてアミノ酸 N 末端の配列解析を行った。まず精製標品を SDS-PAGE に供した後、ニトロセルロー

ス膜に転写した。転写後のニトロセルロース膜は目的のバンド部分を切り取り、プロテインシーケンサーを用いて配列の解析を行った。以下に手順を示す。

N 末端配列解析用 Blotting (semi-dry)

使用した Buffer の組成を表 2-1 に示す。

表 2-1 N 末端配列解析のための Blotting (semi-dry)用 Buffer 組成

Blotting buffer A	Tris : 3.63 g (f. 300 mM) Methanol : 5 mL (f. 5%) 超純水 : 95 mL
Blotting buffer B	Tris : 0.3 g (f. 25 mM) Methanol : 5 mL (f. 5%) 超純水 : 95 mL
Blotting buffer C	Tris : 0.3 g (f. 25 mM) 6-アミノカプロン (ヘキサン) 酸 : 0.52 g (f. 40 mM) Methanol : 5 mL (f. 5%) 超純水 : 95 mL

ニトロセルロース膜

- ↓ 100% Methanol に 20-30 sec. 浸漬する
- ↓ B 液に沈め、30 以上振盪する (水を弾かなくなるまで)

SDS-PAGE 終了後

- ↓ 濾紙を A に 2 枚、B に 1 枚、C に 3 枚浸す
- ↓ A 濾紙を 2 枚電極版にセットする
- ↓ B 濾紙を 1 枚上に重ねる
- ↓ ニトロセルロース膜を重ね、少量の B をたらす
- ↓ SDS-PAGE のゲルを一瞬 B に浸した後、ニトロセルロース膜の上に重ねる
- ↓ C 濾紙を 3 枚上に重ねる
- ↓ 全体を圧着させる
- ↓ C 液を少量たらす

- ↓ 上部電極版をセットし、圧をかけないように密着させる
- ↓ 153 mA , 30 min (25V 位になる) * 2 mA/1 cm²

- ↓ CBB 染色 : ~5 min
- ↓ 脱色 : 70% Ethanol (すぐ抜けるので様子を見ながら行う)
- ↓ 乾燥
- ↓
- ↓ 目的バンド部分の膜を切り取り、プロテインシーケンサーに供する

2.4 ゲル濾過および SEC-MALS による分子量解析

精製した DesZ のストイキオメトリーを調べるため、ゲル濾過および SEC-MALS を用いて溶液状態での分子量測定を行った。手順を以下に示す。

ゲル濾過による分子量の推定

ゲル濾過の溶出位置 (Retention volume) から溶液状態の DesZ の分子量を推定するため、分子量マーカータンパク質を用いたゲル濾過の溶出位置から分子量推定を行った。分子量マーカーとして Bovine Serum Albumin(BSA, 分子量 66,000)、Carbonic anhydrase(分子量 29,000)および Cytochrom C(分子量 12,400)の混合液を Superdex200 increase 10/300 カラムにアプライし、Buffer : 50 mM Tris-HCl (pH8.0)、流量 : 0.75 ml/min での溶出ピークを測定した。この結果をもとに検量線を算出し、同一条件下でゲル濾過した DesZ の溶出位置からその分子量を推定した。

SEC-MALS による分子量の測定

ゲル濾過での分子量推定と平行し、SEC-MALS を用いた分子量の測定を行った。手順を以下に示す。

カラムの洗浄

- ↓ MilliQ による洗浄: 0.5 m/min で 2 カラムボリューム(CV)(一晩行う場合は 0.1 ml/min)
- ↓ Buffer による洗浄および平衡化: 0.5 m/min で 2 CV(40 分)
- ↓ ループ洗浄

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

ASTRA 6 の立ち上げ

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 μL アプライし、黒いレバーを Load から Inject に回してデータ測定を開始する

データ解析

- ↓ SEC による A_{280} のピークを確認する
- ↓ Procedures の”Baseline”を選択し、Base line を確認し、apply & OK を押す
- ↓ Procedures の”Peaks”を選択し、Peak を囲む、もしくは”Autofind Peaks”を指定する
- ↓ Procedures の”Molar Mass & Radius from LS”を選択し、Enabled Detector から計算に用いる LS の No.を選択して OK を押す

Result の”Report summary”を選択し、Mw を確認する

2.5 結晶化

2.5.1 結晶化用 DesZ 溶液の調製

ゲル濾過による最終精製後のDesZ溶液は氷冷下でAmicon[®] Ultra 4(10,000 MWCO)を用いて遠心分離による限外濾過濃縮を行った。遠心分離は1回を5,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10分で行い、10-15 mg/mlに達するまで遠心分離を繰り返した。最終的に目的濃度に合わせるための希釈液には限外濾過膜の通過画分を用いた。DesZの濃度は Nanodrop ND-1000 Spectrophotometerを用いて測定した波長 280nmの吸収から計算した。DesZのモル吸光係数は ExPASy (<http://web.expasy.org>) のprotparamにより算出し、その値は全てのシステイン残基が還元状態にあると仮定した場合、

$$\epsilon_{280} = 47,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}, \text{ Abs } 0.1\% (=1 \text{ g/L}) 1.311$$

であることを利用して濃度を算出した。濃縮および濃度調整が完了した DesZ 溶液は氷冷状態を保ったまま嫌気チャンバー内に移動させ、30 分おきに泡を立てないように穏やかに混和して脱酸素を行った。脱酸素の状態については嫌気インディケーターに溶液

を滴下して色の変化がないことを確認できた時点で完全に脱酸素が出来たものとして扱った。脱酸素済みの DesZ 溶液はそのまま結晶化に供す、もしくは液体窒素で急速凍結して-80°Cで保存した。保存した DesZ 溶液を融解させて結晶化に用いる際には再度脱酸素操作を行った。

2.5.2 DesZ 結晶化条件の探索と最適化

10-15 mg/mL に濃度調整した DesZ 溶液を用い、結晶化条件の探索と最適化を行った。全ての結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法を用い、20°Cで行った。嫌気条件下での結晶化にあたっては嫌気チャンバー内で脱酸素した器具を用いた。また、結晶化スクリーニングキットおよび調製済み沈殿剤、その他液体の試薬についても嫌気条件下で十分にピペティングと静置を繰り返し、残存する酸素がないことを嫌気インディケーターで確認してから実験に用いた。初期スクリーニングには Crystal Screen, Crystal Screen 2, Index (HAMPTON RESEARCH)、The PEGs II Suite, The Protein Complex Suite (QIAGEN)、Wizard Classic 1&2 (Emerald BioSystems) 結晶化スクリーニングキットを用いた。その後の結晶化条件の最適化にあたっては Detergent screen、Additive screen (HAMPTON RESEARCH)も適宜使用し、シーディング法も併用した。シーディングには結晶化スクリーニングで得られた結晶を回折測定用ループで拾い、結晶化に用いた沈殿剤に移し替えた後、ホモジナイザーペッスルでホモジナイズした液をウイスキーに浸漬し、タンパク溶液と沈殿剤を混合した後に液滴内に線状に塗布するストリークシーディング法を用いた。

2.6 初期位相の決定

DesZ 結晶の回折強度データは *XDS* (Kabsch, 2010)、*CCP4 program suite* (Winn *et al.*, 2011)の *AIMLESS* (Evans *et al.*, 2013)を用いて処理を行った。スケーリングの分解能は *AIMLESS* 処理時の Aimless Resolution estimate の値を基準に設定した。分子置換に用いるモデルは *Phyre2* (Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0 ; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>)を利用して探索を行い、DesB の Chain B (PDB: 3WRB)、次いで LigB の Chain B (PDB: 1B4U)が分子置換のモデルとして適切であるという結果を得た。また、これに加え、DesZ は天然の状態では活性中心に鉄イオンを持つことが予想されたため、この鉄イオンの異常分散を利用する SAD 法 (単波長異常分散法)、および天然状態のタンパク質中に存在する硫黄原子の異常分散を利用する Native-SAD 法による初期位相の決定を試みた。分子置換法には *PHENIX* (Adams *et al.*, 2010)の *phaserMR*

(McCoy et al., 2007)を、SAD法およびNative-SAD法には *PHENIX AutoSol* (Terwilliger et al., 2009)を用い、モデル構築には *AutoBuild* (Terwilliger et al., 2008)を使用した。

2.7 構造精密化

DesZ 結晶から得られた回折強度データの中で最も高い分解能を示したデータセットについて精密化を行った。位相決定には 2.6 で得られた DesZ 初期構造をモデルとして用い、*PHENIX* の *phaserMR* により分子置換を行った。また、構造精密化には *PHENIX* の *phenix.refine* (Afonine et al., 2012)を用いた。精密化により得られた電子密度マップは、2mFo-DFc map を 1.2 σ 、mFo-DFc map を 3.5 σ で表示し、以下の基準によりモデルの修正を行った。i) 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 ii) 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 iii) mFo-DFc map の表示基準である 3.5 σ 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した。精密化した全ての DesZ 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。

2.8 DesZ 結晶中の金属イオンの分析

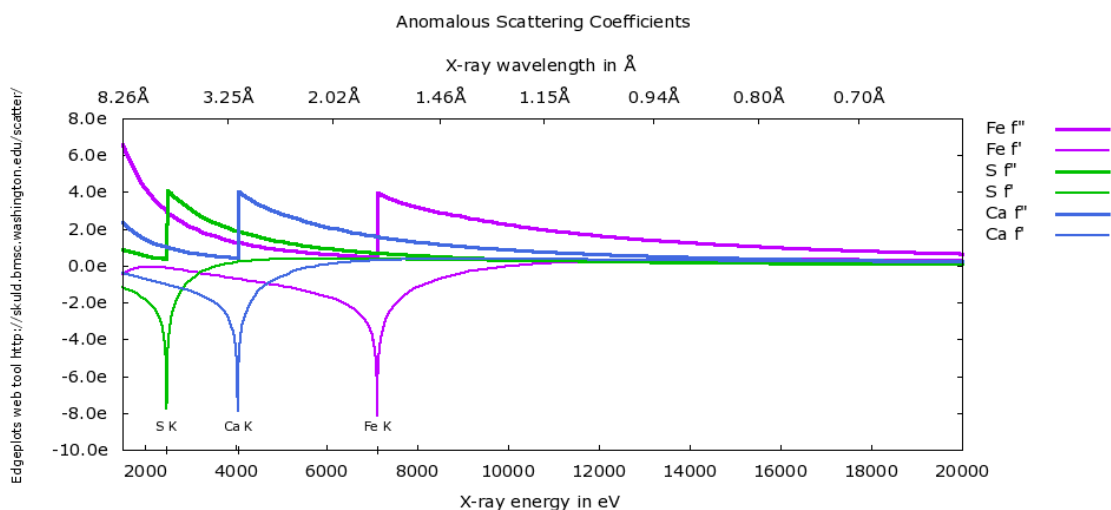
2.8.1 X線吸収によるネイティブ結晶に含まれる金属イオンの分析

DesZ 結晶に含まれる金属イオンについて XAFS (X-ray Absorption Fine Structure)による分析を行った。DesZ をはじめとする Extradiol 型ジオキシゲナーゼは主に鉄、あるいは二価の遷移金属を保持する可能性が高いため、測定波長についてはこれらの金属イオンの X線吸収を測定することを考慮に入れて行った。まず MCA (Multi Channel Analyzer)を用いて DesZ ネイティブ結晶を試料としてマンガン、鉄、コバルト、銅、ニッケルに対して特異的な吸収をもつ波長をそれぞれスキャンし、X線吸収を確認できた波長についてのみ、XAFS による分析を行った。

2.8.2 異常分散差フーリエ図の作成による DesZ 結晶中の金属イオンの分析

図 2-2 で示すように、カルシウムに特異的な吸収を持つ X線の波長は 3.08 Å であるため、この吸収端付近の短波長側で回折点測定を行い、それについての異常分散差フーリエ図を書くことでカルシウムが存在する位置に電子密度を確認できる。しかし、同時に硫黄原子などの波長 3.08 Å よりも長波長側に吸収端をもつ重原子で異常散乱に寄与するものについても電子密度が確認できてしまうため、測定波長 3.0、3.3 Å での異常分散

差を用いてカルシウムの異常分散差フーリエ図を作成した。異常分散差フーリエ図は測定波長 3.0 Å および 3.3 Å における DANO (anomalous difference = $|F(+)-F(-)|$) を用い、 $|F_{3.0\text{\AA}}(+)-F_{3.0\text{\AA}}(-)| - |F_{3.3\text{\AA}}(+)-F_{3.3\text{\AA}}(-)|$ と 3.0 Å 波長で測定した回折強度データから分子置換により得られた位相を用いて計算した。回折点測定は Photon Factory (茨城県つくば市) PF BL-1A においてヘリウムチャンバーを使用し、DesZ 結晶格子間のぼらつきによる影響を避けるため、同一の結晶の違う部分を使って波長 3.0、3.3 Å について行った。測定したそれぞれの回折強度データは XDS、AIMLESS を用いて処理を行った後、phaserMR により分子置換を行った。モデル構造には 2.6 で得られた DesZ 初期構造を用いた。スケージングの分解能は AIMLESS 処理時の Aimless Resolution estimate の値を基準に設定した。また、構造精密化には phenix.refine を用いた。異常分散差フーリエ図の作成には CCP4 program suite の CAD、Scaleit (Howell *et al.*, 1992) および FFT (Read *et al.*, 1988) を用いた。詳細な手順については図 2-3 に記した。



(http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/AS_form.html で作成)

図 2-2 鉄および硫黄、カルシウムの K 殻吸収端およびそれらの異常散乱係数

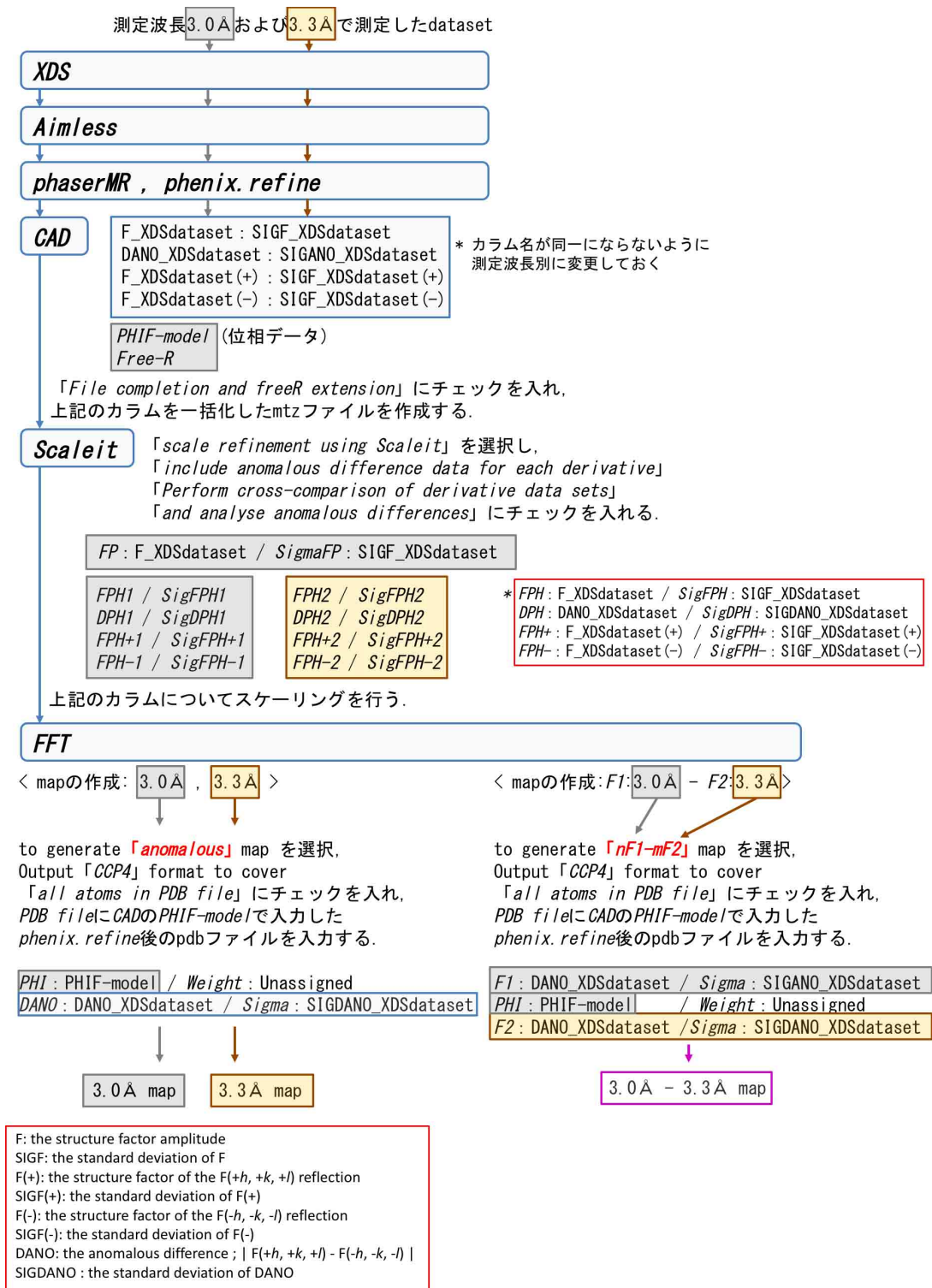


図 2-3 異常分散差フーリエ図の作成手順

2.9 溶存酸素濃度の測定による野生型 DesZ の活性評価

DesZ の酵素活性を評価するため、DesZ-基質反応液中の酸素濃度の減衰量を活性の判断指標とし、反応液の溶存酸素濃度の測定を行った。DesZ は空気中の酸素にさらされることにより補因子である二価鉄イオンが酸化されて活性が低下することが想定される(Kuatsjah et al., 2017)一方、反応には基質としての酸素が必要となる。このため、脱酸素した DesZ 溶液と、基質および酸素を含んだ反応液が混合された瞬間からの酸素濃度の減衰量を測定する必要がある。一般的に液体中の溶存酸素濃度を測定するには試験溶液に電極を直接浸漬して攪拌しながら電位を測定する手法が用いられる。しかし、この手法を用いる場合、i) 比較的多量の反応液を必要とする ii) 測定自体が酸素を消費する iii) 嫌気-好気条件のコントロールが困難である 等の理由により測定条件の最適化が難しい。そこで、本研究では密閉型の光学式酸素濃度測定系を用いて反応液の溶存酸素濃度を測定した。この測定系では液体中の酸素分子が波長 600 nm の蛍光を消光することを利用し、密閉された反応容器内に添付したプラチナ錯体パッチを容器外のプローブからの励起光で励起して蛍光を発生させ、その後方散乱から消光度を測定することで溶存酸素濃度を測定するため直接反応液に電極を挿入する必要が無く、酸素の消費なく測定ができる利点がある(図 2-4)。

Ocean Optics
NeoFox oxygen sensing system

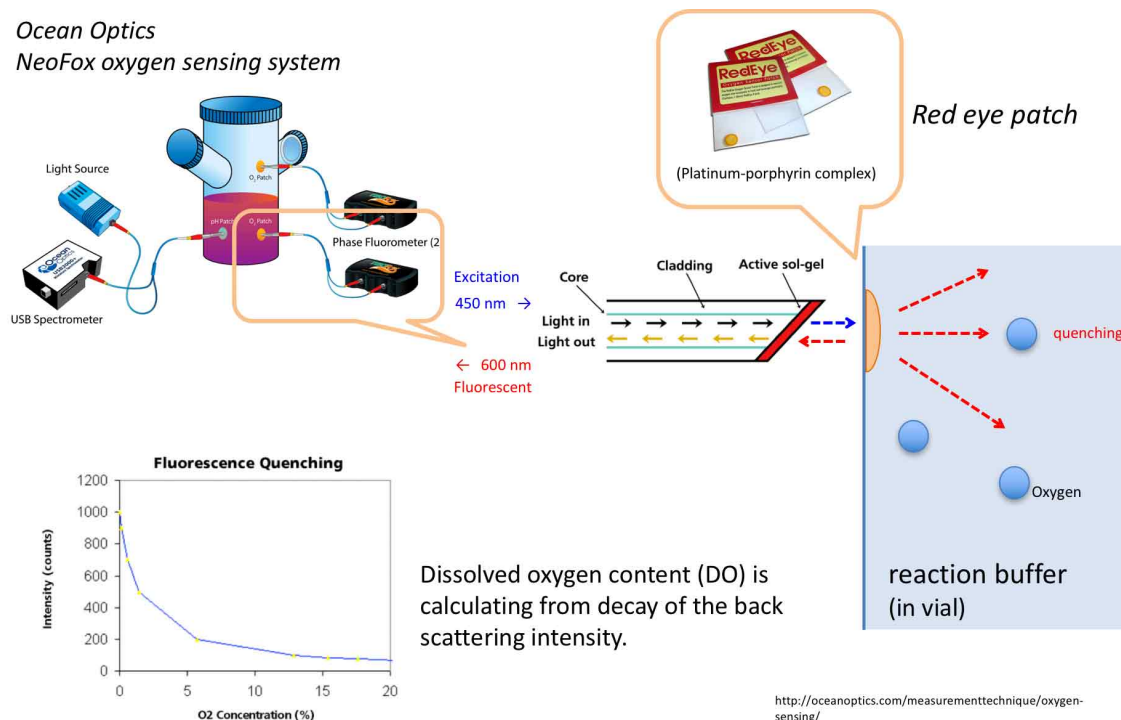


図 2-4 密閉型光学式酸素濃度測定装置 (NeoFox) による溶存酸素濃度測定

上記装置は溶液中の酸素分子が濃度依存的に 600 nm の蛍光を消光することを利用して溶存酸素濃度を測定する。左上に装置の全体像、右にプラチナ錯体パッチを用いた場合の拡大模式図を示した。プローブから 450 nm 励起光を密閉容器内に添付したパッチに当てることにより 600 nm 蛍光を発生させ、その後方散乱強度を測定する。左下には溶存酸素濃度と蛍光強度の相関図を示す。溶存酸素濃度が高いほど蛍光の減衰量が多くなることを利用して溶存酸素濃度を求める。

<http://oceanoptics.com/measurementtechnique/oxygen-sensing/> から図を引用し、追記した。

2.9.1 活性測定用 DesZ 溶液の調製

DesZ の発現および精製は 2.2 に記した方法に準じて行った。測定に際する前処理 (再活性化処理)として、精製した DesZ は Amicon[®] Ultra 4 (10,000 MWCO)を用いて 6 mg/mL に濃縮し、嫌気チャンバー内で脱酸素処理の後、再活性化バッファー (4 mM アスコルビン酸ナトリウム, 2 mM 硫酸鉄(II), 100 mM Tris-HCl (pH 7.5))と等量ずつ混合し氷冷下で 2 時間インキュベートした。インキュベート後の DesZ 溶液は余剰の鉄イオンを除くため、脱酸素したバッファーでレジンを脱酸素および平衡化した脱塩カラム(PD-10)を

用いて 100 mM Tris-HCl (pH 7) にバッファー置換した。前処理の完了した DesZ 溶液は分注し、液体窒素で凍結させてから -80°C に保存した。以上の前処理はすべて嫌気チャンバー内で行い、-80°C 保存したサンプルを融解して測定する前には再度脱酸素処理を行った。また、測定日毎に標準として凍結した同一ロットの再活性化処理済 DesZ サンプルについて活性測定を行い、凍結保存による影響および測定精度の変動について確認した。

2.9.2 酵素反応溶液中の溶存酸素濃度の測定

全ての測定については 20°C 恒温室内で、同一の試験区について各 4 回の測定を行った。測定に際しての pH は Kasai ら(2004)により最適 pH とされた pH 7.0 のバッファーを用い、試験液の溶存酸素濃度は 1 秒ごとに記録した。また、手順は以下の通りで行った。概略を図 2-5 に示す。

1. 基質反応液 (基質を任意濃度になるように 100 mM Tris-HCl (pH 7) に溶解する) を空気飽和状態になるまで攪拌する (用時調製)。
2. DesZ 溶液を嫌気チャンバーに入れ、脱酸素処理を行う。
3. 測定用バイアルに基質反応液を 1.7 mL 入れてセプタム付きの蓋をし、嫌気チャンバーに入れる (図 2-4 ①)。
4. マイクロシリンジを脱酸素した 100 mM Tris-HCl (pH 7) で 3 回以上洗浄する。サンプルを 20 μ L 吸い込んだ後、サンプル液と基質反応液が直接触れないように嫌気チャンバー内の気相を 2 μ L 吸ってシリンジのニードル部分を満たした後、バイアルのセプタム部分にマイクロシリンジを差し込んだ状態でそのまま嫌気チャンバーから出す (図 2-4 ②,③)。
5. 酸素濃度測定計のセッティングを行う。プローブの先端部をバイアル内部のシール添付位置に合わせ、攪拌しながら測定記録を開始する。
6. 基質溶液の溶存酸素濃度値が安定していることを確認した後、マイクロシリンジのプランジャーを押し込み、サンプル溶液を基質に添加する。添加による酸素濃度の変化が落ち着いたことを確認してから測定記録を終了する (図 2-4 ④)。
7. Bradford 法により測定したサンプル溶液のタンパク質濃度を用い、酵素反応パラメータを算出する。DesZ 溶液と基質との酵素反応による酸素消費量を算出する際には、ブランクとして脱酸素した 20 μ L の 100 mM Tris-HCl (pH 7) のみを反応溶液に加えた区について測定し、その平均値を差し引いた値を用いて計算した。比活性は測定開始時(サ

サンプル溶液と基質溶液混合時)から約 4 秒後までの酸素消費量 (μmol)の値を用い、タンパク質量 (mg)当たりのユニット数 ($1\text{U} = 1 \mu\text{mol O}_2/\text{min}$)/ $\text{mg} \cdot \text{protein}$ で算出した (Appendix. C)。

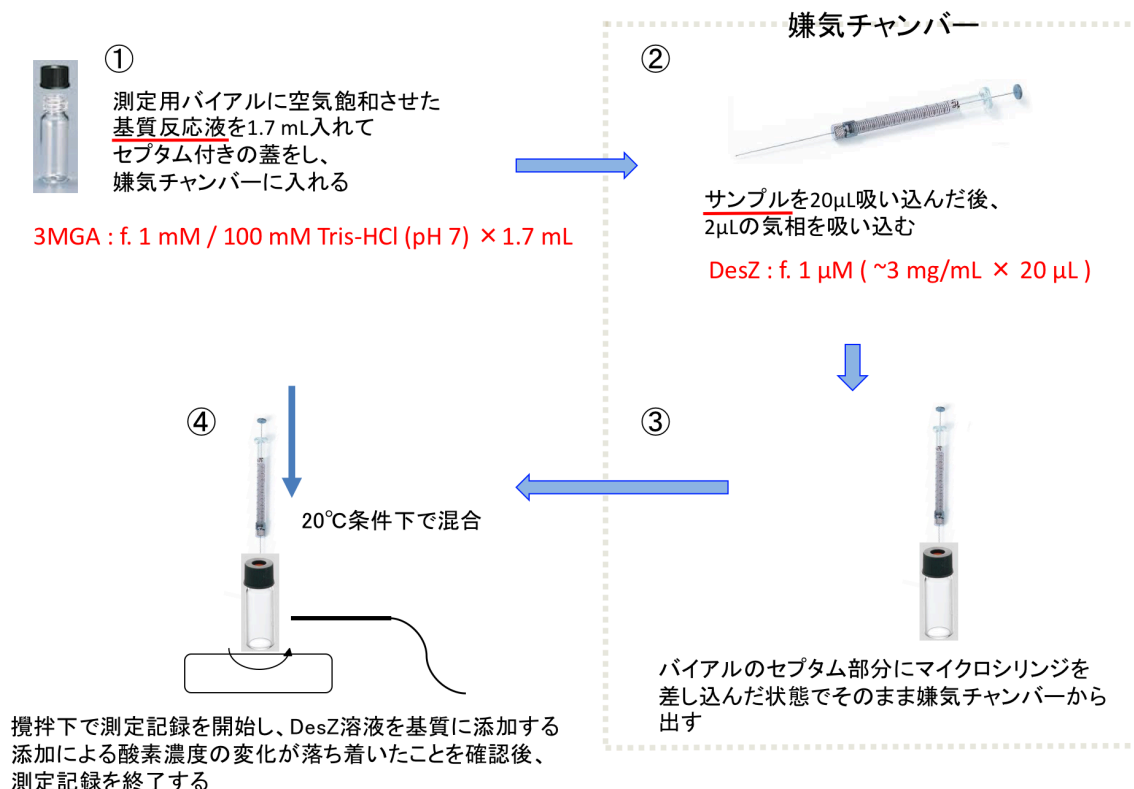


図 2-5 DesZ 活性測定のための溶存酸素濃度測定手順

2. 10 溶存酸素濃度の測定による DesZ 変異体の活性評価

2. 10. 1 DesZ 変異体発現用プラスミドの作製

各変異体用に設計したプライマーセットを使用し、pEDZA ベクターを鋳型とした PCR 反応により変異 *desZ* コード領域部分を含むベクター全体を増幅させた。反応後、鋳型とした pEDZA ベクターを *DpnI* 制限酵素処理により消化させ、DH5 α コンピテントセルに形質転換を行うことにより目的プラスミドを調製した。手順を以下に示す。

1. PCR 反応

PCR 反応液組成 (使用した酵素 : *PfuUltra* High-Fidelity DNA polymerase AD)

Components	Volume	Final conc.
10×PCR Buffer for <i>PfuUltra</i>	5 μ L	1×
2 mM dNTPs	5 μ L	0.2 mM each
primer (5 μ M each)	1 μ L	0.1 μ M
	1 μ L	0.1 μ M
template (pEDZA: 70 ng / μ L)	1 μ L	70 ng/50 μ L
<i>PfuUltra</i> (2.5U/ μ L)	1 μ L	2.5U/ 50 μ L
DW	to 50 μ L	

↓

上記の通り調製し、サーマルサイクラーを用いて以下のプログラムを実行した。

↓

95°C, 2 min

95°C, 30 sec

50°C, 1 min

68°C, 5 min

68°C, 10 min

10°C, ∞

} ×20 cycles

2. pEDZA ベクターの酵素処理による消化

Components	Volume
PCR 反応後溶液	50 μ L
制限酵素 <i>DpnI</i>	1 μ L
	51 μ L

上表の組成で調製後、37°Cで1時間反応させる

3. 形質転換

↓ 反応後溶液 10 μ L をコンピテントセル(DH5 α) 100 μ L と混合

↓ 氷中で 20 分静置

- ↓ 42°C , 40 秒間ヒートショック後、氷中で静置
- ↓ 2×YT 培地を 300 μL 加え、37 °C で 1 時間振とう培養
- ↓ Ampicillin (終濃度 100μg / mL)を含む LB 寒天培地に播種し、37 °C で一晩静置培養

4. プラスミドの複製と精製

形質転換後の大腸菌のシングルコロニーを Ampicillin (終濃度 100 μg/ mL)を含む 2×YT 液体培地に植菌し、37°C で一晩振盪培養した後、培養液を 5,000×g, 10 分, 4°C で遠心分離して回収した菌体ペレットから、QIAprep® Spin Miniprep Kit を用いてプラスミドを精製した。精製した溶出液については Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer を使用して 260 nm の吸光度を測定し、DNA 濃度を光路長 1 cm、260 nm での吸光度 1.0 が 50 μg/mL とし、溶液中のプラスミドの濃度を算出した。

5. Insertion sequence の確認

精製したプラスミドについて、その Insertion が目的の配列をもつかどうか、DNA シーケンス解析を行った。解析はユーロフィンジェノミクスに依頼し、目的の配列を保持していることを確認したプラスミドを以降の実験に使用した。

2. 10. 2 大腸菌による DesZ 変異体の発現と精製

作製したそれぞれのプラスミドを発現用宿主大腸菌に形質転換し、DesZ 変異体の発現および精製を行った。また、特に記述がない限りは 2.2 に記した野生型 DesZ の精製方法に準じて行った。

2. 10. 3 CD (circular dichroism)による DesZ およびその変異体の二次構造組成の確認

精製した DesZ 変異体が野生型と同様の二次構造組成を保持しているかどうかを確認するため、CD 測定を行った。測定はサンプルバッファーとして 0.065 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.065 mM NaCl を用いてタンパク質濃度を 0.2 mg/mL (吸光度による算出)に調製し、20°C で波長 195 nm – 260 nm について行った。測定結果は測定後のサンプルを回収して Bradford 法によりタンパク質濃度を算出し、平均残基モル楕円率に換算して示した。測定および平均残基モル楕円率換算には J-820 スペクトル解析プログラムを使用した。また、二次構造比率の算出には JWSSE-480 型タンパク質二次構造解析プログラムを用いた。対照として 0.2 mg/mL に調製した BSA を用いた。

2. 10. 4 活性測定用 DesZ 変異体溶液の調製

2.9.1 に記した手順と同様に調製した後、活性測定に供した。

2. 10. 5 酵素反応溶液中の溶存酸素濃度の測定と酵素活性の評価

活性測定方法については特に記述がない限り 2.9 と同様の方法を用いた。

2. 11 DesZ-基質複合体構造の構造解析

2. 11. 1 基質複合体の結晶化

DesZ 溶液は 2.2 に示した方法で精製し、2.5 と同様の手順を用いて結晶化を行った。シーディング法の種結晶には野生型の DesZ 結晶を使用した。結晶化条件は野生型 DesZ 結晶と同じく、0.1M Tris-HCl (pH8.5), 0.15M CaCl₂, 15% PEG8000, 7 mM HEGA[®]-10 を沈殿剤として用い、沈殿剤と DesZ 溶液を 1 : 1 で混合した。混合後、基質および基質アナログを結晶化ドロップに添加してカバーガラスで封入し、経時的に実体顕微鏡で観察を行った。用いた基質および基質アナログの構造式は図 2-6 に示す。

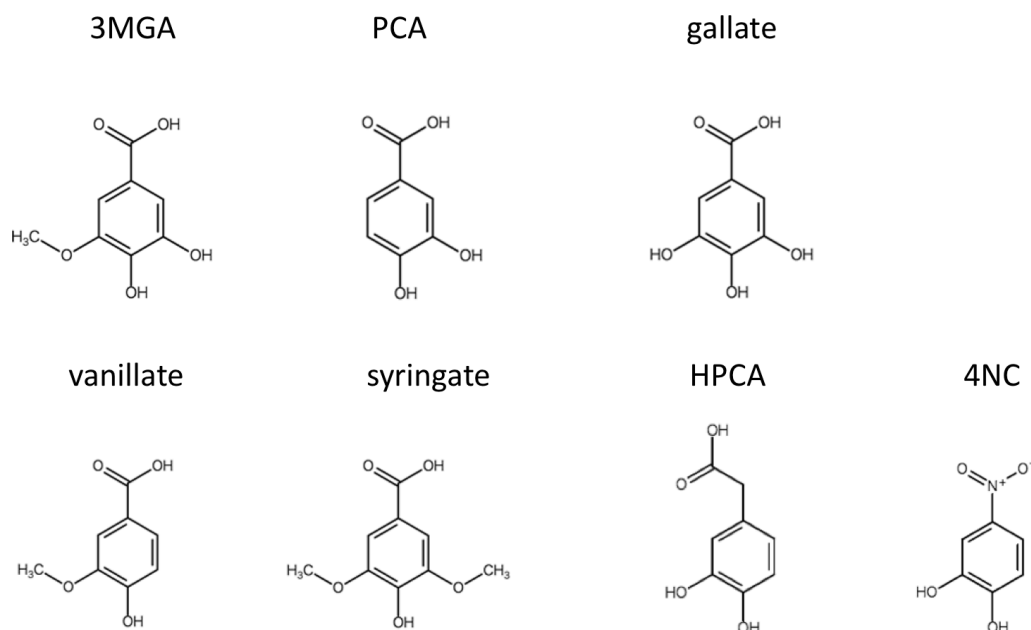


図 2-6 共結晶化に用いた基質および基質アナログの構造式

2.11.2 回折強度データの収集と構造解析

2.11.1 において作製した結晶の回折強度データは *XDS*、*AIMLESS* を用いて処理を行った後、*phaserMR* による分子置換により位相を決定した。スケーリングの分解能は *AIMLESS* 処理時の Aimless Resolution estimate の値を基準に設定した。分子置換法に用いる初期モデルは、2.7 で決定した DesZ の構造を用いた。得られた DesZ の構造については、mFo-DFc 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どうかを判断した。

第 3 章 結果

3-1 DesZ の X 線結晶構造解析

3-1.1 DesZ の発現および精製

DesZ の結晶構造解析に際し、精製標品が結晶化に必要な高純度・高収量であることはもちろん DesZ の活性に鉄イオンが必須であること、また、好気条件に長時間暴露することで鉄イオンの酸化や遊離により活性が下がっていく可能性 (Kuatsjah et al., 2017) を考慮に入れ、精製手順を確立した。当初は精製の効率を上げるため、精製用のアフィニティタグ (His-tag および GST-tag) を付加したコンストラクトについて発現量の検討を行ったが、可溶性画分への発現効率が低かったため、精製用のアフィニティタグ領域を含まない発現用プラスミド pEDZA を用いた大腸菌による DesZ の大量発現系を用い、3 段階のクロマトグラフィーによる精製を行った。1 段階目の精製には DesZ の等電点が ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) により 4.65 と予測されたため、pH が中性付近の Buffer を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー製が適切であると考え、Sephacryl S4B (GE Healthcare)担体による精製を行った。次に、陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製のみでは結晶化には不十分な純度であったため、2 段階目の精製として RESOURCE ETH カラム(GE Healthcare)を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーを行った。これは陰イオン交換クロマトグラフィーで溶出された画分の塩濃度が既に高く、透析などのバッファー交換に要する時間を短縮する必要性を考慮に入れて選定した。さらに純度を上げるための最終精製としてゲル濾過を行い、最終的に純度 94% の精製標品を得た。最終的に至適化された DesZ の精製方法およびそれらの収率・純度については図 3-1-1 に、表 3-1-1 には Purification Table を示した。

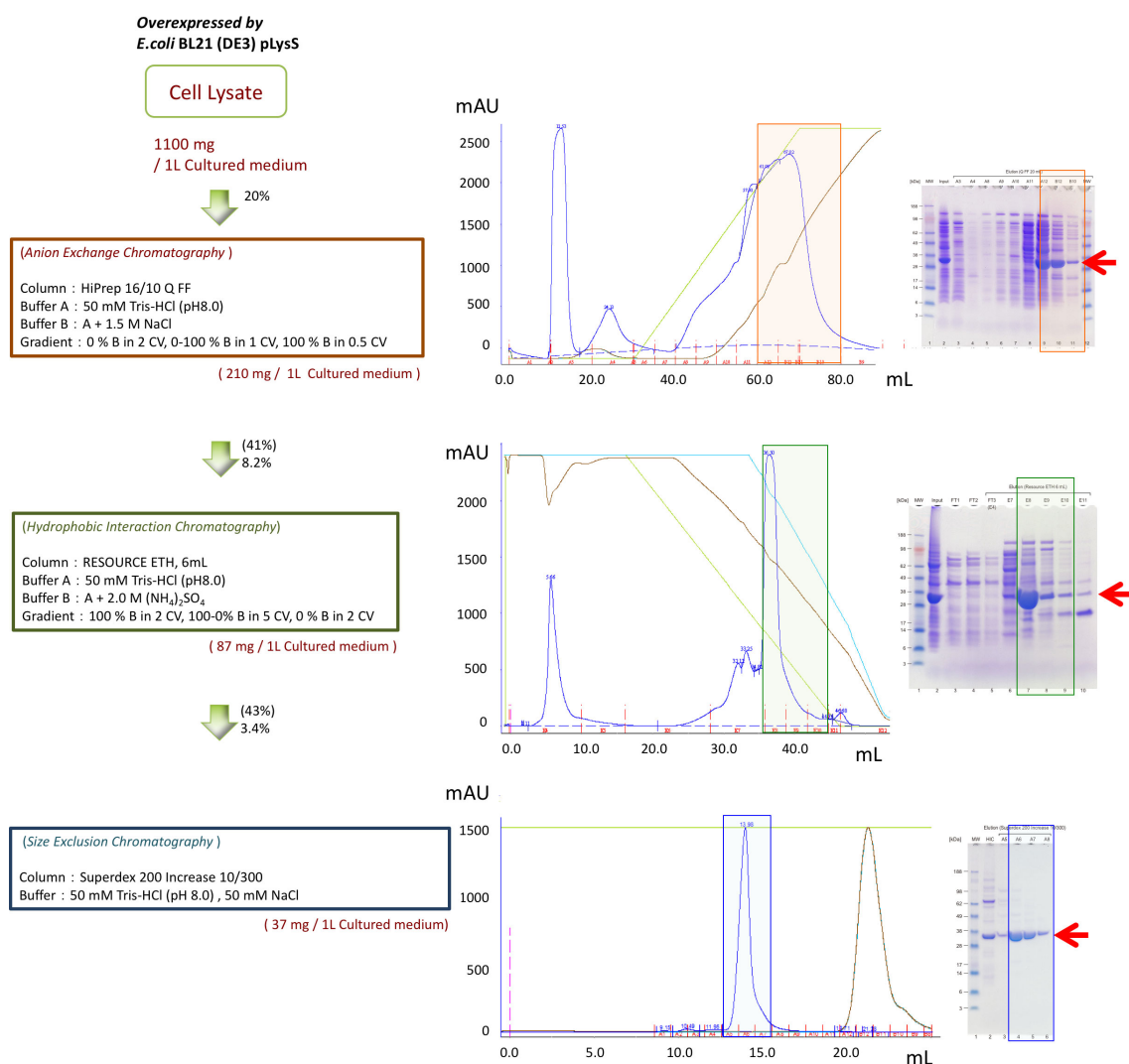


図 3-1-1 DesZ の精製

左側フローの%値はタンパク質全体の回収率を示し、()内はそのクロマトグラフィー精製時の回収率を示した。SDS-PAGE 結果の赤矢印は DesZ の分子量に相当するバンド位置を示す。これら 3 段階のクロマトグラフィーにより最終的に純度 94% の DesZ 精製標品を得た。また、得られた精製標品は SDS-PAGE の結果バンドがほぼ単一のパターンを示しており、結晶化に十分な純度であると判断した。

表 3-1-1 Purification Table

Fraction	Total protein (mg) / L medium	Yield (%)	Purity (%)	DesZ (mg)
Crude extract	1,100	100	-	-
HiPrep Q FF	210	20	21	197.4
RESOURCE ETH	87	8.2	33	81.8
Superdex 200 Increase	37	3.4	94	34.8

総タンパク質量は吸光度測定により算出し、大腸菌培養液 1L 当たりの量に換算した。DesZ の純度は SDS-PAGE のゲルのバンド面積から Image J を用いて算出した。

3-1.2 精製標品の N 末端配列解析

結晶化に先立ち、得られた精製タンパク質標品が DesZ であることを確認するために N 末端配列解析を行った。図 3-1-2 にその結果を示す。

N 末端側から 7 残基についてアミノ酸配列を調べた結果、精製標品の N 末端配列は “AEIV?GI”(? は不明瞭なピークで判別不能)であった。DesZ の配列は “AEIVLGI” であり、1 番目のメチオニンが切断されていたが、精製されたタンパク質標品は DesZ であることが確認できた。

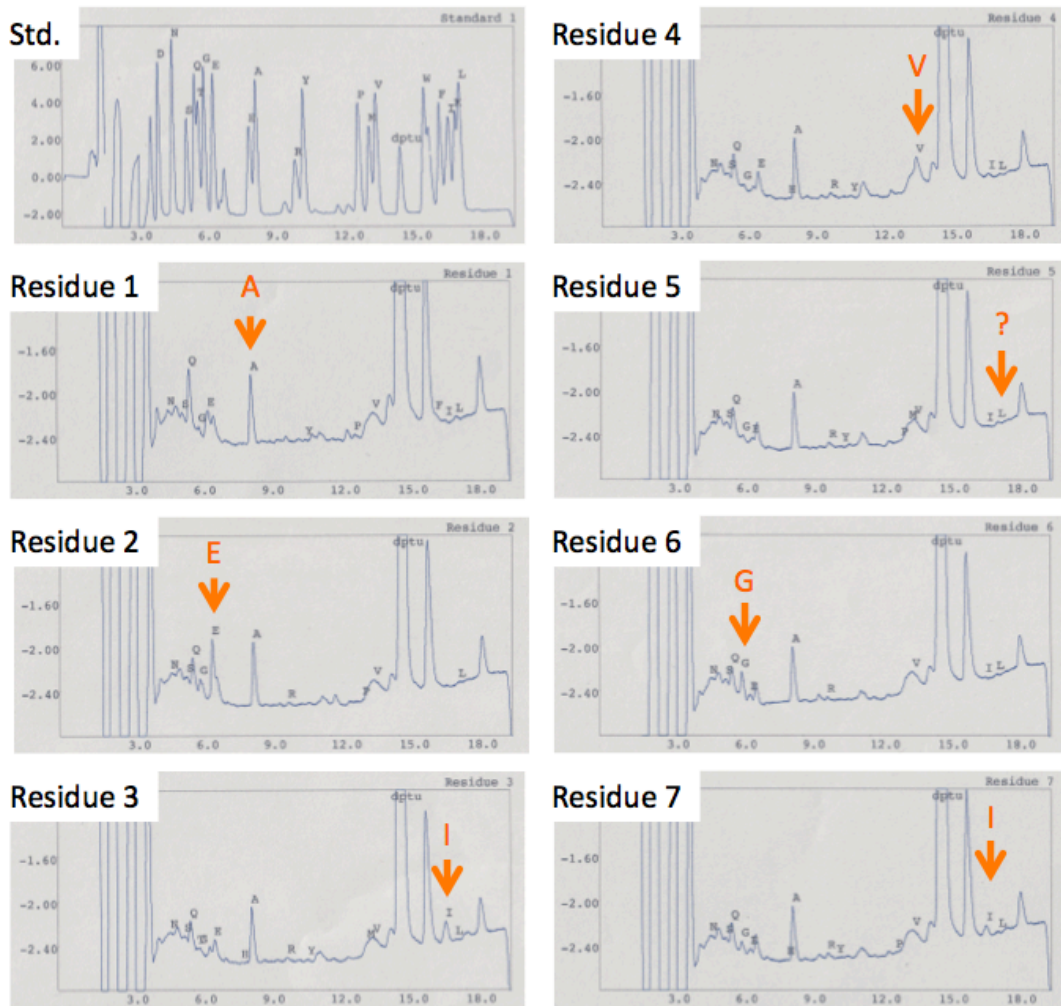


図 3-1-2 精製標品の N 末端配列分析

3-1.3 ゲル濾過および SEC-MALS による分子量解析

精製した DesZ のストイキオメトリーを調べるため、ゲル濾過および SEC-MALS を用いて溶液状態での分子量測定を行った。図 3-1-3 および 図 3-1-4 に結果を示す。

標準タンパク質の分子量のゲル濾過溶出位置から、精製された溶液状態の DesZ の分子量は 52,400 と算出された。また、SEC-MALS の結果では 78,730 であった。ストイキオメトリーとしては DesZ の分子量が 36,500 であることから、精製された DesZ は溶液中で 2 量体の形を取っていることが示唆された。

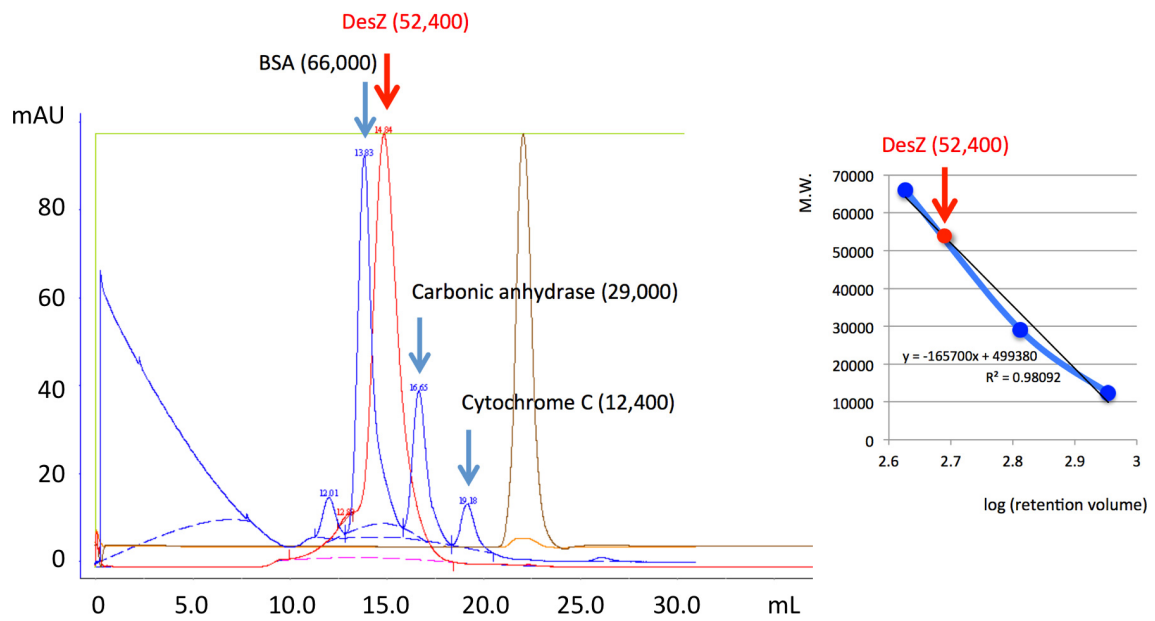
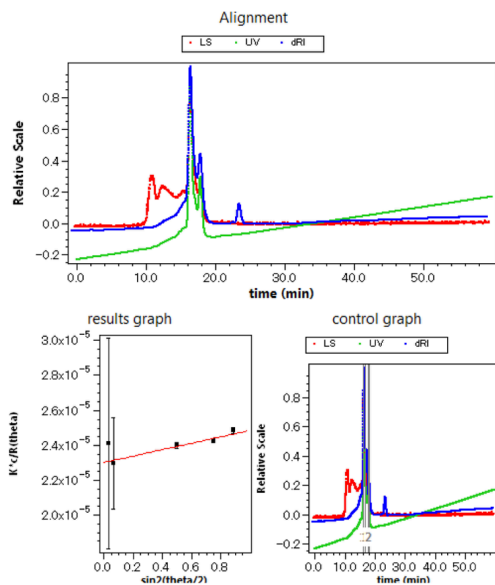


図 3-1-3 ゲル濾過による精製 DesZ 標品の分子量評価

左図は標準タンパク質のゲル濾過結果と精製された DesZ 標品のゲル濾過結果を重ね合わせた図。右に標準タンパク質のピーク位置と分子量から作成した検量線を示した。この検量線と DesZ のピーク位置から溶液状態の DesZ の分子量が 52,400 であることを見積もった。



Configuration

Concentration Source: RI
Flow Rate: 0.500 mL/min
Light Scattering Instrument: HELEOS
Cell Type: Fused Silica
Wavelength: 664.5 nm
Calibration Constant: 3.4067×10^{-5} 1/(V cm)
RI Instrument: generic RI
UV Instrument: generic UV
Solvent: 50mM Tris-HCl (8) 50mMNaCl
Refractive Index: 1.330

	Peak 1	Peak 2
Masses		
Calculated Mass (μ g)	37.40	14.41
Molar mass moments (g/mol)		
Mn	7.857×10^4 ($\pm 1.845\%$)	4.427×10^4 ($\pm 3.334\%$)
Mp	8.007×10^4 ($\pm 0.489\%$)	4.384×10^4 ($\pm 2.101\%$)
Mv	n/a	n/a
Mw	7.873×10^4 ($\pm 2.046\%$)	4.433×10^4 ($\pm 3.460\%$)
Mz	7.892×10^4 ($\pm 4.840\%$)	4.439×10^4 ($\pm 7.872\%$)
Polydispersity		
Mw/Mn	1.002 ($\pm 2.755\%$)	1.001 ($\pm 4.805\%$)
Mz/Mn	1.004 ($\pm 5.179\%$)	1.003 ($\pm 8.549\%$)
rms radius moments (nm)		
Rn	20.8 ($\pm 14.1\%$)	20.7 ($\pm 25.7\%$)
Rw	21.1 ($\pm 14.4\%$)	20.8 ($\pm 25.8\%$)
Rz	21.4 ($\pm 14.8\%$)	21.0 ($\pm 25.9\%$)

図 3-1-4 SEC-MALS による精製 DesZ 標品の分子量評価

左上は溶出ピーク図(溶出ピークに対する UV の強度を緑色、静的光散乱強度を赤色、示差屈折率強度を青色で示す)。ここから算出された DesZ の数平均分子量 Mn、重量平均分子量 Mw はそれぞれ $78,570 \text{ Da} \pm 1.845\%$ 、 $78,730 \text{ Da} \pm 2.046\%$ であった。

3-1.4 結晶化と回折像の測定

予備実験として、構造生物学研究センター内にある大規模結晶化装置 (PXS) (Hiraki et al., 2006)を用いて好気条件下での結晶化スクリーニングを行った。DesZ の濃度は 10.58 mg/mL で行ったが、結晶化後 30 日までに結晶は確認できなかった。

次いで、DesZ の活性には鉄イオンが必須であることから、好気条件への長時間暴露による鉄イオンの酸化や遊離が構造の安定性に影響を及ぼす可能性があり (Kuatsjah et al., 2017)、大気中の酸素による酸化の影響を出来るだけ抑えるために嫌気チャンバー内で結晶化を行った (Senda et al., 2007)。DesZ の濃度は 13.55 mg/mL に調製し、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて行った。スクリーニングキットは好気条件と同様に Index および Wizard classics 1, 2 を使用して行った。DesZ 溶液と沈殿剤は $2 \mu\text{L} : 2 \mu\text{L}$ で混合した。その結果、結晶化操作から 1 日後に、Wizard II-28 の条件 ($20\% \text{ PEG8000}$, 0.1M

MES/NaOH pH6.0, 0.2M Ca acetate)で直径が 0.1mm 以下の小さな針状のクラスター形結晶が観察された (図 3-1-5)。

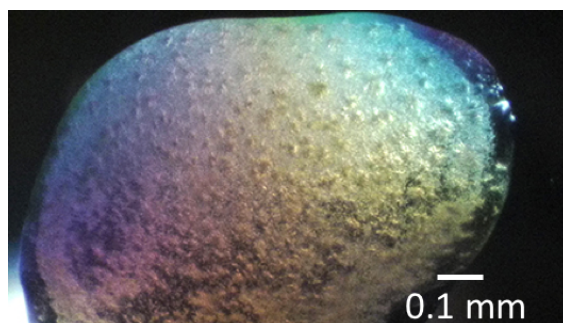


図 3-1-5 Wizard II-28 (20% PEG8000, 0.1M MES/NaOH pH6.0, 0.2M Ca acetate) 条件で観察された結晶. 直径 0.1 mm 以下の針状のクラスター結晶が数多く確認できる.

この結果を基に、これ以降の結晶化は全て嫌気条件下で行うこととし、測定に適した大きさの単結晶を得ることを目的として結晶化スクリーニングを行った。その結果、PEGsII #36 (20% PEG8000, 0.1M Tris-HCl pH8.5, 0.2M CaCl₂) で針状結晶が観察された (図 3-1-6)。

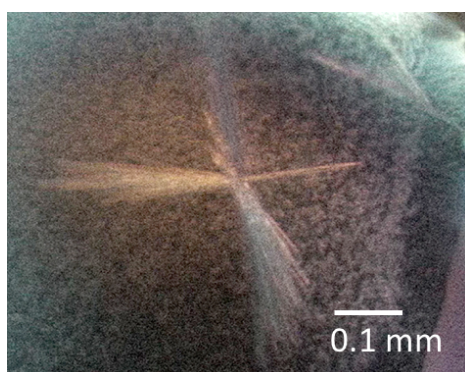


図 3-1-6 PEGsII #36 (20% PEG8000, 0.1M Tris-HCl pH8.5, 0.2M CaCl₂)で観察された結晶

引き続き、この結晶化条件 PEGsII #36 (20% PEG8000, 0.1M Tris-HCl pH8.5, 0.2M CaCl₂) を元に、結晶化条件について最適化検討を行った。その結果、16% PEG8000, 0.1M Tris-HCl pH8.5, 0.2 M CaCl₂, シーディング(+)の結晶化条件下で結晶が観察された。これ

らの結晶および Photon Factory PF-AR NE3A での測定により得られた X 線回折像を図 3-1-7 に示す。

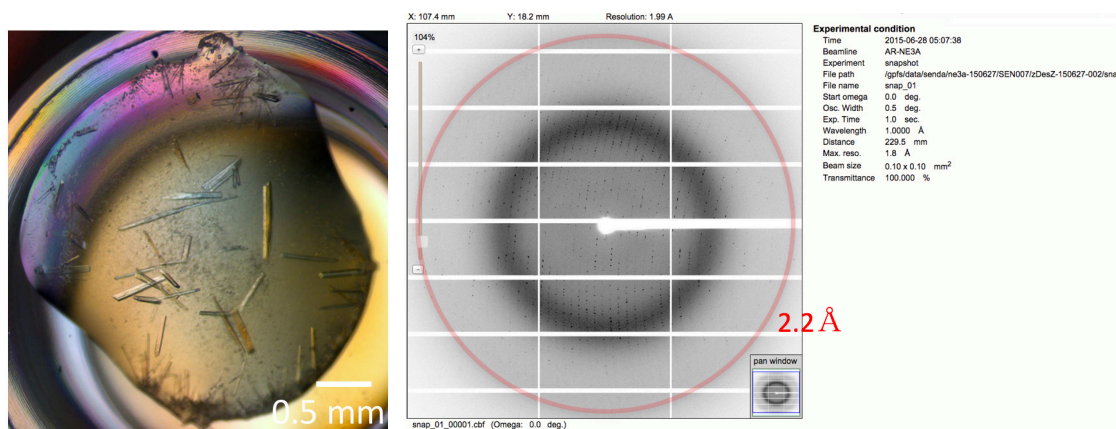


図 3-1-7 16% PEG8000, 0.1M Tris-HCl pH8.5, 0.2 M CaCl₂, シーディング(+)の結晶化条件下で観察された結晶(左)とその回折像および測定条件(右).

ここで得られた結晶については最大で 2.2 Å 分解能の回折像が得られた。測定した回折強度データについては *phaserMR* による分子置換を試みたが、この条件下で得られた全ての結晶の回折強度データからは DesB の Chain B (PDB: 3WRB)、LigB の Chain B (PDB: 1B4U) 等をモデルとした分子置換では適切な初期位相が得られなかったため、引き続き結晶化条件の最適化を進めた。最終的に、これまでの条件の中で最も良い回折像が得られた結晶化条件、

0.1M Tris-HCl (pH8.5), 0.15M CaCl₂, 15% PEG8000

について、結晶化条件に化合物を添加することにより結晶構造のパッキングを変化させてモザイク性の低下や結晶格子の対称性を向上させるなどの効果を狙い、Additive screen および Detergent screen を用いた結晶化スクリーニングを行った。各 screen はリザーバーの沈殿剤に終濃度で 1/10 容量含まれるように調製し、DesZ 溶液と 1:1 容量で混合するシッティングドロップ蒸気拡散法で行った。その結果、いくつかの単結晶様の結晶が得られたため、以下に示す条件で晶出した結晶について Photon Factory BL-1A で回折点の測定を行った。下記条件で得た結晶の回折強度データについて表 3-1-2、3-1-3 に示す。

0.1M Tris-HCl (pH8.5), 0.15M CaCl₂, 15% PEG8000 + 0.2 M Sodium chloride

0.1M Tris-HCl (pH8.5), 0.15M CaCl₂, 15% PEG8000 + 0.1% ANAPOE[®]-X-405

0.1M Tris-HCl (pH8.5), 0.15M CaCl₂, 15% PEG8000 + 7 mM HEGA[®]-10

0.1M Tris-HCl (pH8.5), 0.15M CaCl₂, 15% PEG8000 + 10 mM Betaine hydrochloride

表 3-1-2 DesZ 結晶における初期位相決定のための回折強度データ収集条件

Additive	Sodium chloride	ANAPOE [®] -X-405	HEGA [®] -10	Betaine hydrochloride
Light source	Photon Factory BL-1A			
Wavelength (Å)	1.9			
Temperature (K)	95			
Detector	EIGER 4M			
Crystal-detector distance (mm)	103.800			
Rotation range/ image (°)	0.5			
Total rotation range (°)	0-350	0-200	0-300	0-275
Exposure time/ image (s)	1			
Transmittance (%)	100			

表 3-1-3 DesZ 結晶の結晶学的パラメータおよび回折強度データの統計値

Additive	Sodium chloride	ANAPOE [®] -X -405	HEGA [®] -10	Betaine hydrochloride
Space group	$P2_1$	$P2_1$	$P6_5$	$P2_1$
Unit-cell parameters				
a, b, c (Å)	128.63 , 53.42 , 129.23	128.26 , 53.38 , 129.35	184.10 , 184.10 , 53.56	128.53 , 53.55 , 129.00
α, β, γ (°)	90 , 115.17 , 90	90 , 115.15 , 90	90 , 90 , 120	90 , 115.19 , 90
No. of subunits / asym. unit	4	4	2	4
Resolution (Å)	69.11 - 2.53	69.06 - 2.53	92.05 - 2.52	69.01 - 2.52
Outer Shell (Å)	(2.62 - 2.53)	(2.61 - 2.53)	(2.62 - 2.52)	(2.62 - 2.52)
R-merge	0.119 (0.315)	0.050 (0.095)	0.096 (0.552)	0.099 (0.434)
R-pim	0.081 (0.315)	0.025 (0.080)	0.024 (0.271)	0.053 (0.350)
$I/\sigma(I)$	7.6 (1.6)	23.0 (5.9)	27.6 (2.8)	13.0 (1.6)
Completeness (%)	83.2 (28.2)	83.2 (29.7)	87.1 (42.5)	82.0 (29.1)
No. of observed reflections	131,003 (1,695)	212,809 (2,428)	502,769 (7,234)	194,062 (2,711)
No. of unique reflections	44,785 (1,442)	44,774 (1,514)	30,843 (1,648)	44,461 (1,599)
Multiplicity	2.9 (1.2)	4.8 (1.6)	16.3 (4.4)	4.4 (1.7)
Mosaicity	0.25	0.19	0.15	0.18

スケーリングの分解能は AIMLESS 処理時の Aimless Resolution estimate の値を基準に設定した。

()内の数値は最外殻の値を示す。

これらの回折強度データについて解析を行った結果、0.1M Tris-HCl (pH8.5), 0.15M CaCl₂, 15% PEG8000 + 7 mM HEGA[®]-10 条件で晶出した結晶 (図 3-1-8)では得られた回折強度データの結晶学的パラメータにおいて結晶の格子定数が変化し、これまでの結晶化条件で得られた結晶より対称性の高い空間群に属することが分かった ($P2_1 \rightarrow P6_5$; 表 3-1-3 参照)。また、この回折強度データから初期位相を決定することができたため (詳細は 3-1.5.2 に記す)、この条件をもって結晶化条件の最適化を終了することとした。

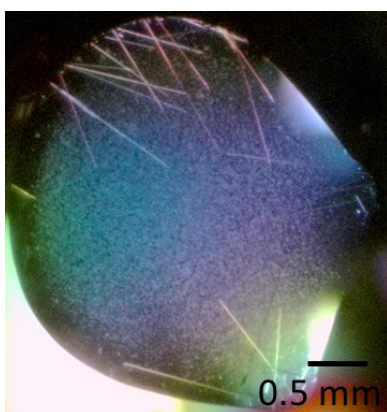


図 3-1-8 0.1M Tris-HCl (pH8.5), 0.15M CaCl₂, 15% PEG8000 + 7 mM HEGA[®]-10 で観察された結晶

3-1.5 初期位相の決定

3-1.5.1 回折データの収集

Native-SAD 法を用いた構造決定を目的とし、1.9 Å 波長での回折強度データの収集を行った。位相決定のための回折強度データは、Photon Factory BL-1A でヘリウムチャンバーを使用して行った。この回折強度データ収集条件について表 3-1-4 に示す。

表 3-1-4 DesZ 結晶における初期位相決定のための回折強度データ収集条件

Light source	PF BL-1A
Wavelength (Å)	1.9
Temperature (K)	95
Detector	EIGER 4M
Crystal-detector distance (mm)	103.8
Rotation range per image (°)	0.5
Total rotation range (°)	0-325
Exposure time per image (s)	1.0
Transmittance (%)	100

表 3-1-5 DesZ 結晶の結晶学的パラメータおよび回折強度データの統計値

Space group	$P6_5$
Wavelength (Å)	1.9
Unit-cell parameters (Å)	$a=184.1, b=184.1, c=53.56$ $\alpha = \beta = 90.0^\circ, \gamma = 120^\circ$
No. of subunits / asymmetric unit	2
Matthews coefficient (Å ³ /Da)	3.53
Solvent content [%]	65.16
Resolution (Å)	92.05 - 2.52
Outer Shell (Å)	(2.62 - 2.52)
R-merge	0.096 (0.552)
R-pim	0.024 (0.271)
$I/\sigma(I)$	27.6 (2.8)
Completeness (%)	87.1 (42.5)
Number of observed reflections	502,769 (7,234)
Number of unique reflections	30,843 (1,648)
Multiplicity	16.3 (4.4)
Mosaicity	0.15

スケーリングの分解能は *AIMLESS* 処理時の Aimless Resolution estimate の値を基準に設定した。

()内の数値は最外殻の値を示す。

3-1.5.2 初期位相の決定とモデル構築

DesZ 結晶から得られた X 線回折像を図 3-1-9 に示す。測定した回折強度データは *XDS*、*AIMLESS* を用いて処理を行った後 (表 3-1-5)、*phaserMR* による分子置換を試みたが、*Phyre2* によりモデル構造として適切であるとされた DesB の Chain B (PDB: 3WRB)、LigB の Chain B (PDB: 1B4U) 等をもとに構造が異なると思われる領域を除いたモデルを使用した分子置換では適切な初期位相が得られなかったため、鉄イオンからの異常分散効果を利用した SAD 法を用いた位相決定を計画した。しかし、測定波長を決定するために MCA を用いた検討を行った際に鉄イオン由来の蛍光 X 線ピークが確認できなかったため、この結晶に鉄イオンは含まれないと判断し、Native-SAD 法を用いた初期位相の決定を試みた。波長 1.9 Å で得られた回折データを用い、*PHENIX AutoSol*、*AutoBuild* により初期位相の決定からモデル構築までを行うことで最終的に図 3-1-10 に示すように 96% 以上 (640/660 残基) について、分子置換モデルを使用せずに DesZ のモデルを構築することができた。また、非対称単位中の分子数は Matthews の式 (Matthews, 1968) から見積もった。最終的に得られた結晶学的パラメータおよび回折強度データの統計値は表 3-1-5 に示した。

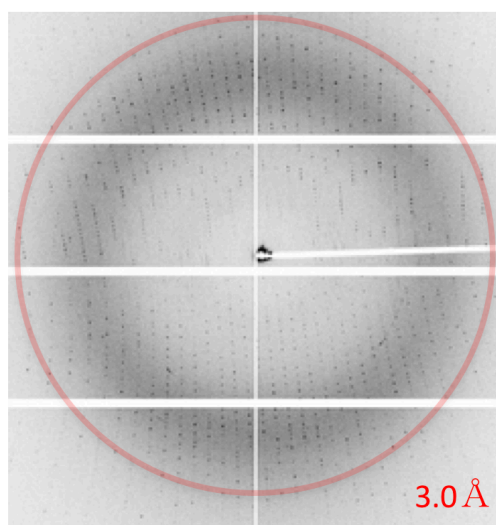


図 3-1-9 DesZ 結晶から得られた回折像

Photon Factory BL-1A にて DesZ 結晶の回折強度データの収集を行った回折像。赤い線で示した部分は分解能 3.0 Å に相当する位置を示す。

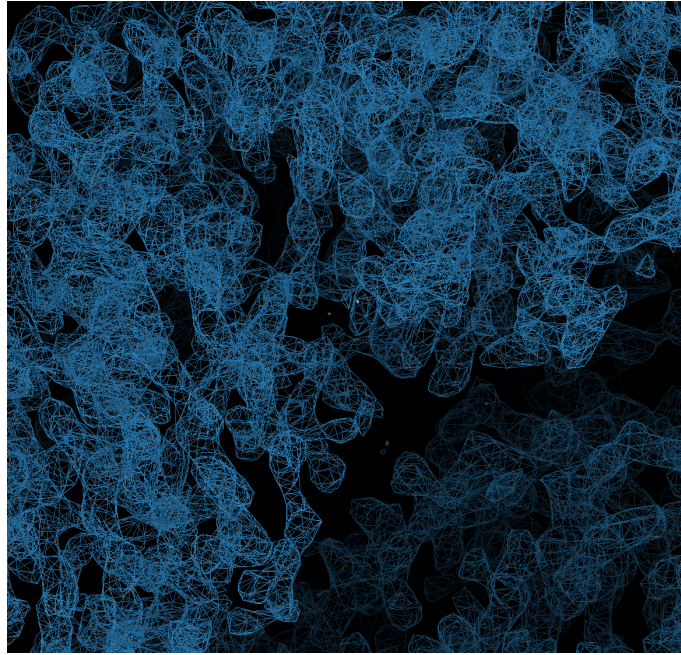


図 3-1-10 *PHENIX AutoSol* により得られた電子密度図 (2.0σ)

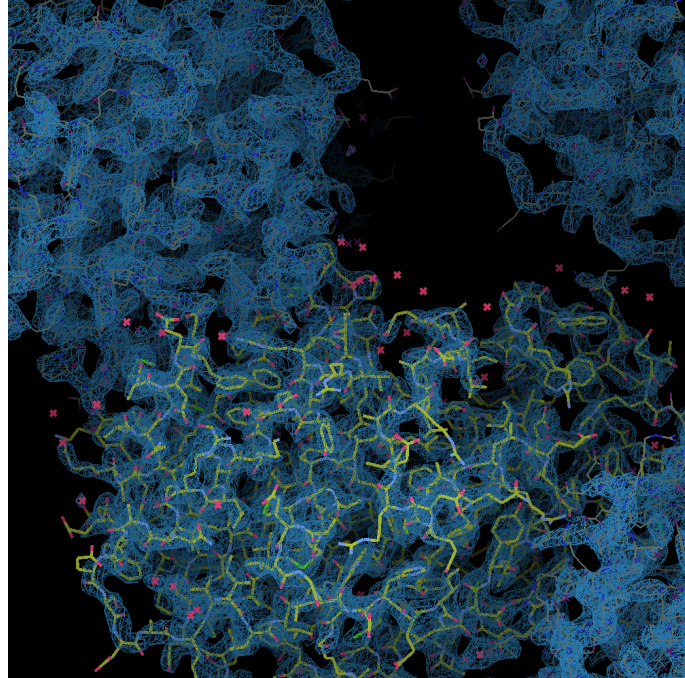


図 3-1-11 *PHENIX AutoBuild* によるモデル構築結果 (2.0σ)

AutoBuild の結果, R-work/free = 0.1937/0.2372, Residues :640/660 で DesZ モデルが構築された.

3-1.6 構造精密化

DesZ 結晶から得られた回折強度データの中で最も高い分解能を示したデータセット (表 3-1-6) を用いて *phenix.refine* による構造精密化を行い、分解能 1.85 Å で $R_{work} = 0.1412$, $R_{free} = 0.1640$, *Rms deviations : Bond lengths* = 0.006 Å, *Bond angles* = 0.761 deg. となったところで精密化を終了した。回折強度データ収集条件およびその結晶学的パラメータ、結晶学的精密化のまとめを表 3-1-6、表 3-1-7 に示す。また、*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 3-1-12)。ここで得られた DesZ の全体構造を図 3-1-13 に示した。

DesZ の立体構造については 3-2 に詳細を記す。

表 3-1-6 DesZ 結晶の回折強度データ収集および結晶学的パラメータ (精密化用データ)

<i>Data collection</i>	
Light source	PF BL-17A
Wavelength (Å)	0.98
Temperature (K)	95
Detector	PILATUS3 S 6M
Crystal-detector distance (mm)	368.475
Rotation range per image (°)	0.5
Total rotation range (°)	0-300
Exposure time per image (s)	1.0
Transmittance (%)	100
Resolution (Å)	45.99 - 1.85 (1.88 - 1.85)
Space group	$P6_5$
Unit-cell parameters (Å)	$a = 182.98, b = 182.98, c = 53.21$
(°)	$\alpha = \beta = 90.0, \gamma = 120$
Number of subunits / asymmetric unit	2
R-merge	0.093 (0.711)
R-pim	0.023 (0.184)
$I/\sigma(I)$	26.8 (4.8)
Completeness (%)	98.7 (96.5)
Number of observed reflections	1,453,033 (69,004)
Number of unique reflections	86,140 (4,429)
Multiplicity	16.9 (15.6)

()内の数値は最外殻の値を示す.

表 3-1-7 DesZ 結晶の精密化パラメータ

<i>Refinement</i>	
Resolution (Å)	45.99-1.85
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.1412 / 0.1640
Number of atoms	10,775
Protein	656
Ligand/ion	- / 4 (カルシウム)
Water	740
Rms deviations	
Bond lengths (Å)	0.006
Bond angles (deg.)	0.761
Ramachandran (%)	
favored	97.5
outliers	0
B -factors (Å ²)	
Protein	23.91
Ligand/ion	- / 18.96
Water	37.02

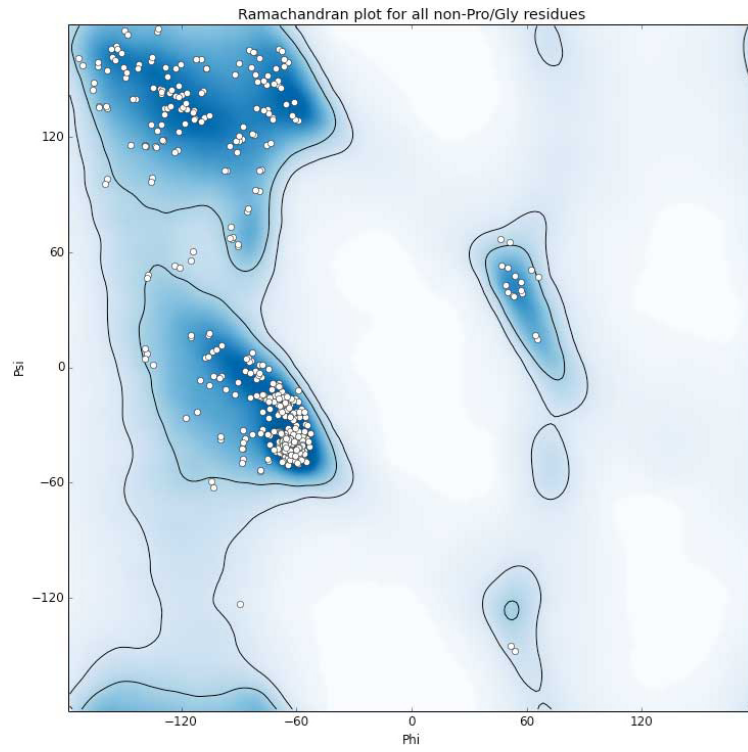


図 3-1-12 *MolProbity* による DesZ 結晶構造の Ramachandran Plot

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。

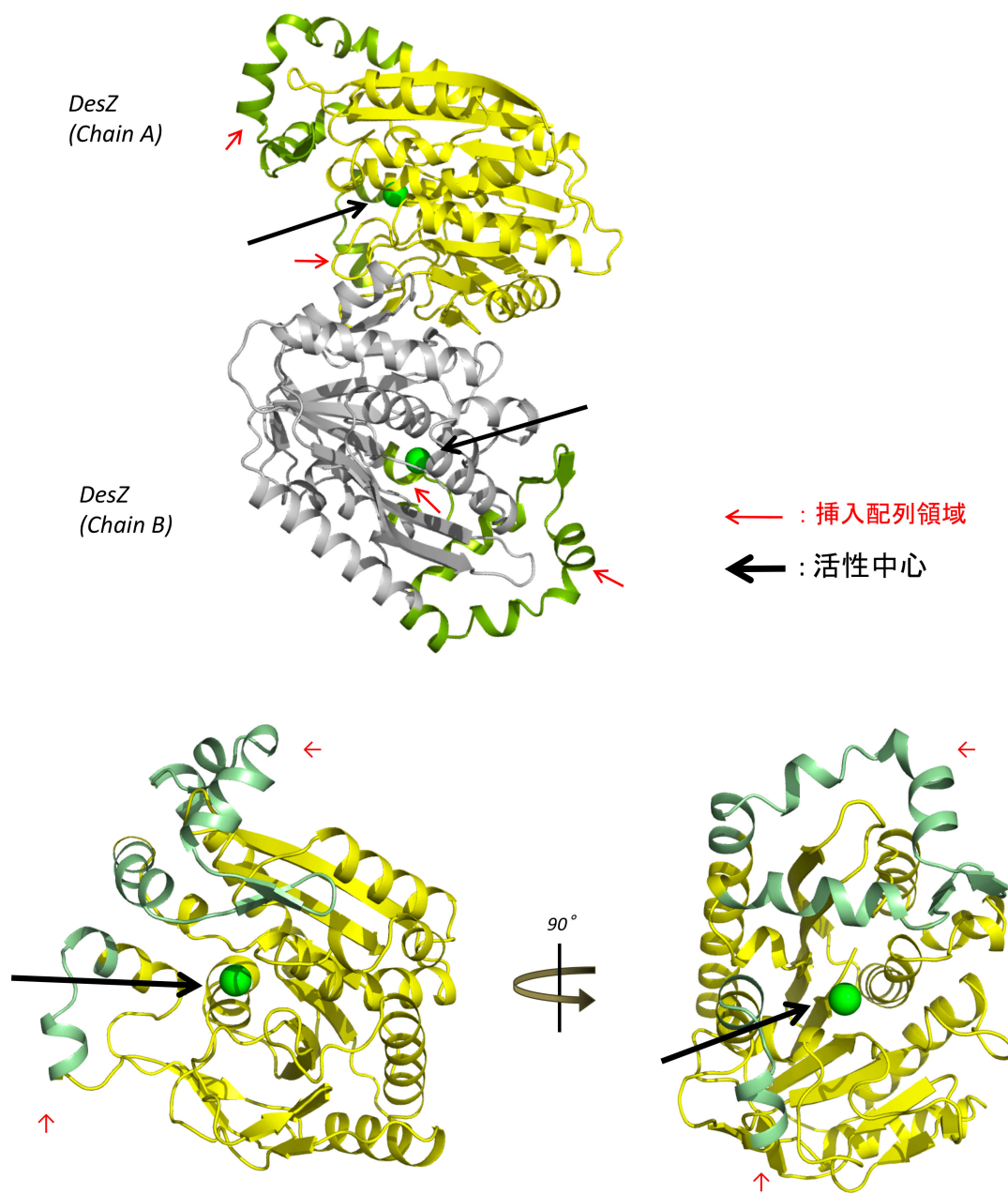


図 3-1-13 DesZ の X 線結晶構造

上図は非対称単位中に含まれる DesZ 2 分子について A chain を黄色, B chain を灰色で示した. 下図は Chain A について拡大して表示した. 黄緑色で示した部分 (赤矢印) は挿入配列領域を示す. 活性中心の金属イオンは黒矢印で示した.

3-1.7 DesZ 結晶中の金属イオンの分析

DesZ が活性を持つためには活性中心に鉄イオンを持つことが必要であるが、得られた DesZ 結晶には鉄イオンが含まれないことが MCA を用いた測定で示唆された。しかし、3-1.6 で得られた DesZ 構造とその電子密度図において活性中心と予測される部位に金属であると予想される強い電子密度図が観察された (図 3-1-14)。

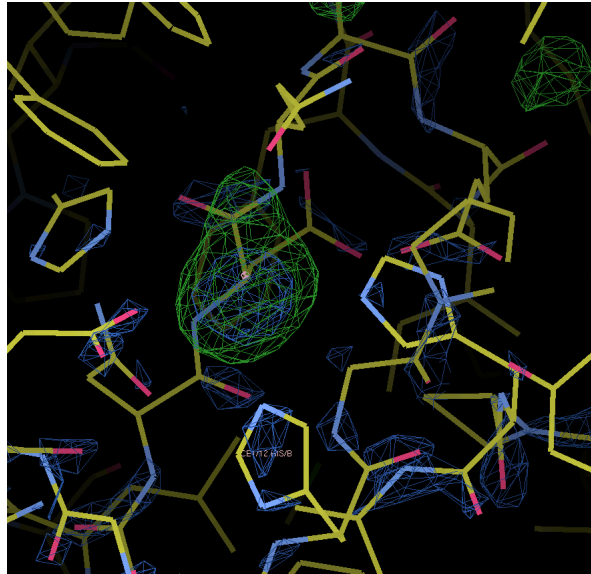


図 3-1-14 DesZ 結晶構造中に確認された電子密度図 (5 σ)

DesZ の結晶構造中において活性中心に配位する金属であると予測される電子密度の 2mFo-DFc map (青色の mesh) および mFo-DFc map (緑色の mesh). 両 map はともに 5.0 σ で表示した。

そこで、この電子密度が何に由来するのかを検討するために、得られた DesZ 結晶構造の座標から CheckMyMetal (http://www.csgid.org/csgid/metal_sites#home-anchor; Zheng et al., 2017) を用いて配位距離分析を行った (図 3-1-15)。また、対照として鉄イオンが配位した結晶構造である LigAB (1BOU) および DesB (3WR8) の結果を併記した。LigAB および DesB の活性中心では鉄イオンと配位する残基間の距離はおよそ 2.1 Å、Fe-O および Fe-N の配位距離についてもおよそ平均的な範囲内 (2.0-2.4 Å) におさまっていたが、DesZ については金属イオンとそれに配位する残基間の距離はおよそ 2.6 Å と長く、Fe-O および Fe-N の配位距離についても平均分布から外れており、この電子密度が鉄イオン由来ではないことが示唆される結果であった。また、この電子密度中にカルシウムイオンを置いた構造の分析では、完全には許容範囲内ではないが、CA-O 配位距離で平均的な距離範囲 (2.2-2.8 Å) に近いプロファイルを示した。活性中心に存在する金属イオンをカルシウムイオンもしくは鉄イオンとし、占有率を 100% として精密化を行った場合の

温度因子の差を比較すると、カルシウムイオンを置いた構造において、より全体的な温度因子の差が小さく、活性中心の構造の温度因子として齟齬がない結果となった (表 3-1-8)。

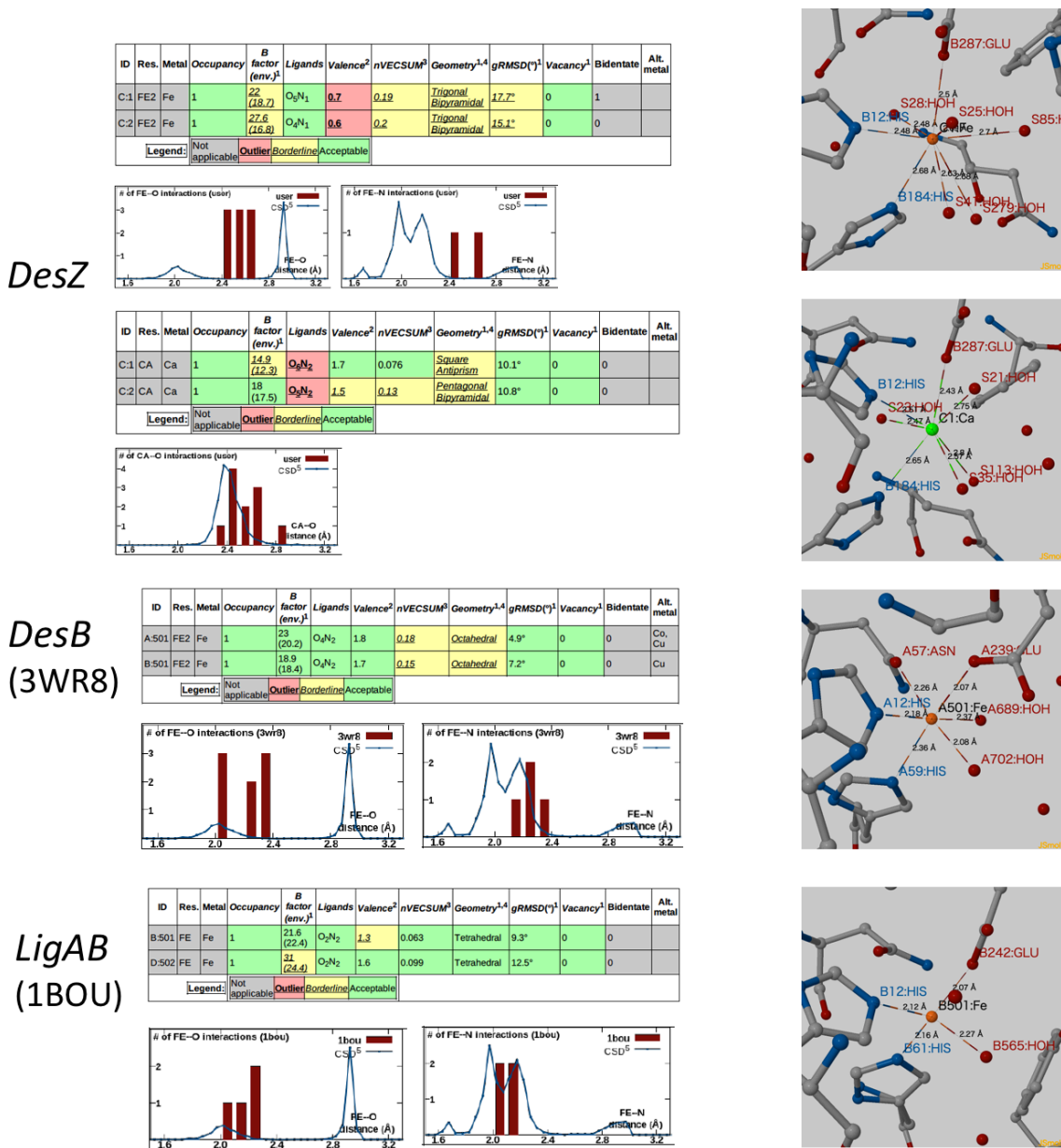


図 3-1-15 CheckMyMetal による金属イオンの配位距離分析

DesZ, DesB (3WR8) および LigAB (1BOU) について CheckMyMetal で分析した結果. DesZ については活性中心に確認できた電子密度に鉄イオンおよびカルシウムイオンを置いた座標ファイルを作成し、それぞれについて分析を行った。

表 3-1-8 金属イオンの温度因子と配位原子の温度因子の比較

		カルシウムイオン	鉄イオン (Fe ²⁺)
金属イオン	chain A	14.90	22.00
	chain B	18.00	27.58
His12	chain A	13.70 (1.2)	14.80 (7.2)
	chain B	16.13 (1.87)	17.51 (10.07)
Gln98	chain A	34.60 (19.7)	38.79 (16.79)
	chain B	30.30 (12.3)	31.24 (3.66)
Glu287	chain A	13.83 (1.07)	14.01 (7.99)
	chain B	17.73 (0.27)	18.08 (9.5)
His184	chain A	14.30 (0.6)	12.84 (9.16)
	chain B	19.94 (1.94)	18.49 (9.09)

DesZ 結晶構造中の金属イオンおよび金属イオンに配位する原子の温度因子 (単位は Å). 活性中心に存在する金属イオンをカルシウムイオンもしくは鉄イオンとし, 占有率を 100% として精密化を行った値を示す. ()内の数値はそれぞれの chain に存在する金属イオンの温度因子と金属イオンに配位する原子の温度因子の差の絶対値を示す.

3-1.7.1 X線吸収によるネイティブ結晶に含まれる金属イオンの分析

Photon Factory BL-17A において MCA を用いて分析を行った結果、マンガン、コバルト、銅については散乱 X 線のみピークが得られ、蛍光 X 線のピークは確認できなかった。また、鉄およびニッケルについては、それぞれの原子からの蛍光 X 線と思われる 2 つのピークが得られたが、どちらも非常に微弱なピークであった。MCA による測定の結果を図 3-1-16 に示す。また、引き続き Photon Factory BL-17A において MCA による分析の結果をもとに、鉄およびニッケルについてそれぞれの吸収端付近で X 線吸収スペクトルを測定したが明確な吸収スペクトルは確認出来ず、全ての結果においてこれら金属の占有率は非常に低いものであると考えられた。

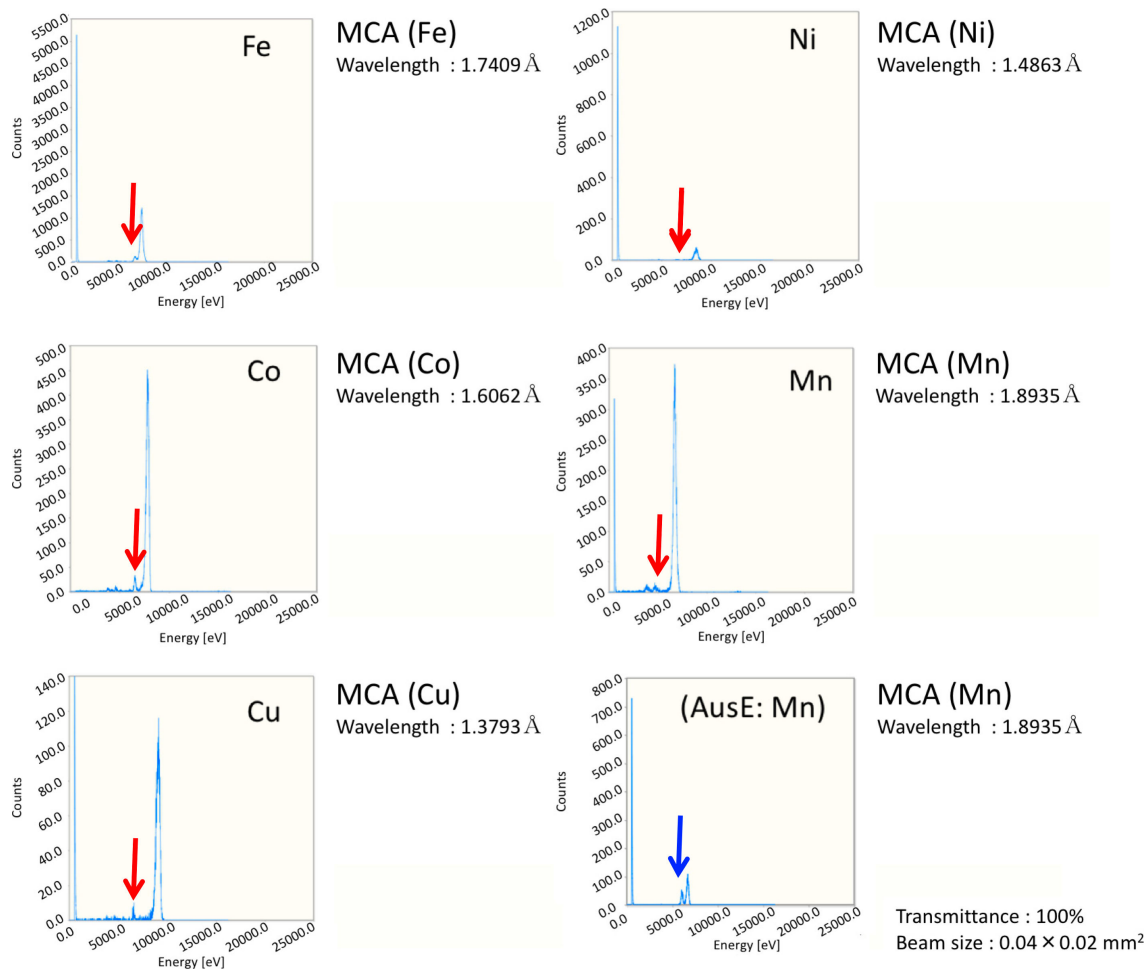


図 3-1-16 DesZ 結晶の二価遷移金属に対する MCA 分析

Photon Factory BL-17A において DesZ 結晶の MCA による蛍光 X 線測定を行った結果を赤矢印で示した。それぞれの測定波長については図中に示した。右下に positive control として同日に同ビームラインで MCA による分析を行った AusE タンパク質の結晶 (Mn positive) の蛍光 X 線測定結果を青矢印で示した。これらの比較により DesZ 結晶の蛍光 X 線ピークが非常に微弱であることがわかる。

3-1. 7. 2 異常分散差フーリエ図の作成による DesZ 結晶中の金属イオンの分析

DesZ 結晶構造において測定波長 3.0、3.3 Å で確認できた異常分散差フーリエ図、測定波長 3.0 Å での異常分散 - 3.3 Å での異常分散で得た異常分散差フーリエ図を図 3-1-17 に示した。また、DesZ 結晶構造のパッキングの状態と共に示した図を図 3-1-18 に示した。

なお、DesZ 結晶構造パッキングについては 3-2 に詳細を記す。

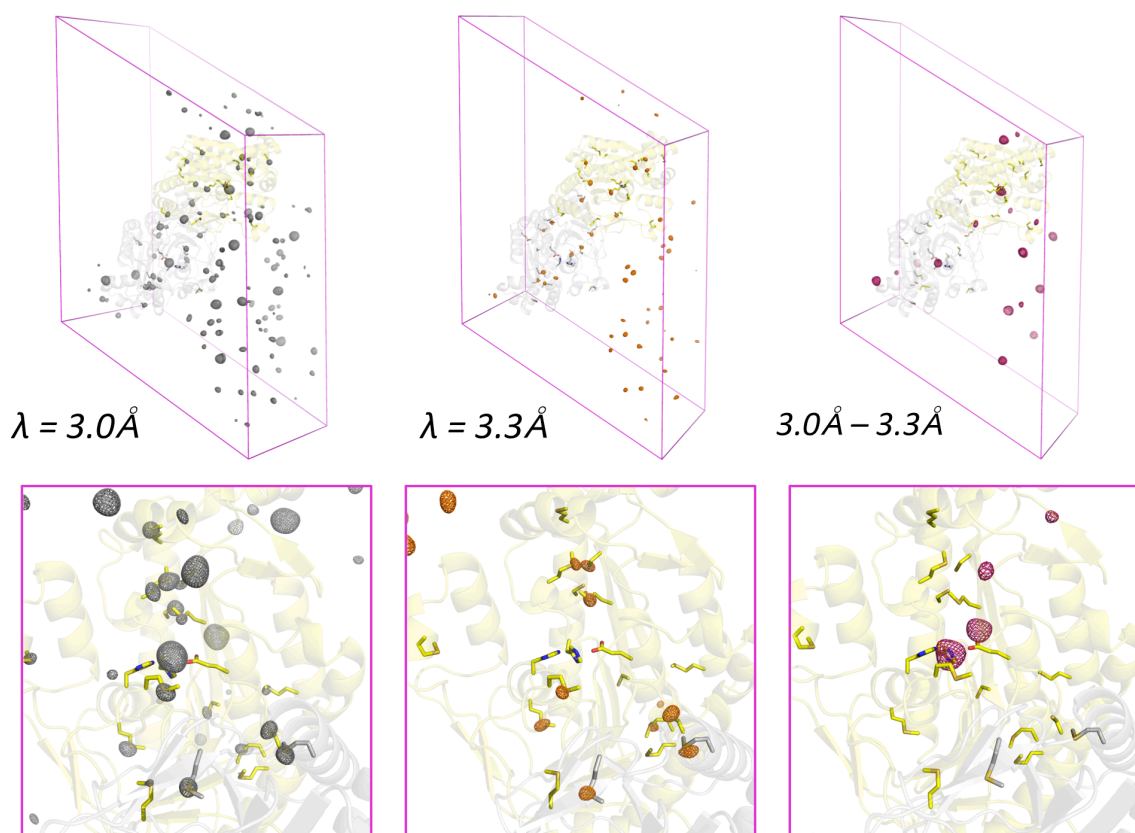


図 3-1-17 DesZ 結晶構造における異常分散差フーリエ図 (5σ)

測定波長 3.0\AA (ピーク波長: 灰色メッシュ), 3.3\AA (低エネルギー側リモート波長: 橙色メッシュ)の異常分散差フーリエ図とその差分となる測定波長 $3.0 - 3.3\text{\AA}$ (ピンク色メッシュ)についてそれらの全体配置 (上) と活性中心部分を拡大した図 (下) を示す. 測定波長 3.0\AA および 3.3\AA では各波長における DANO (anomalous difference = $|F(+)-F(-)|$)と, 3.0\AA 波長で測定した回折強度データから分子置換により得られた位相を用いて計算した異常分散差フーリエ図を, また $3.0 - 3.3\text{\AA}$ 異常分散差フーリエ図については測定波長 3.0\AA および 3.3\AA における DANO を用い, $|F_{3.0\text{\AA}}(+)-F_{3.0\text{\AA}}(-)| - |F_{3.3\text{\AA}}(+)-F_{3.3\text{\AA}}(-)|$ と 3.0\AA 波長で測定した回折強度データから分子置換により得られた位相を用いて計算した異常分散差フーリエ図を示した.

DesZ 分子については全体を cartoon で示し、硫黄原子をふくむアミノ酸であるメチオニンおよびシステイン残基と活性中心で金属に配位する残基をスティックモデルで描画した. 電子密度マップは全て 5σ で表示した. $3.0 - 3.3\text{\AA}$ 異常分散差フーリエ図においてカルシウムであることが強く示唆される電子密度が活性中心に確認できる.

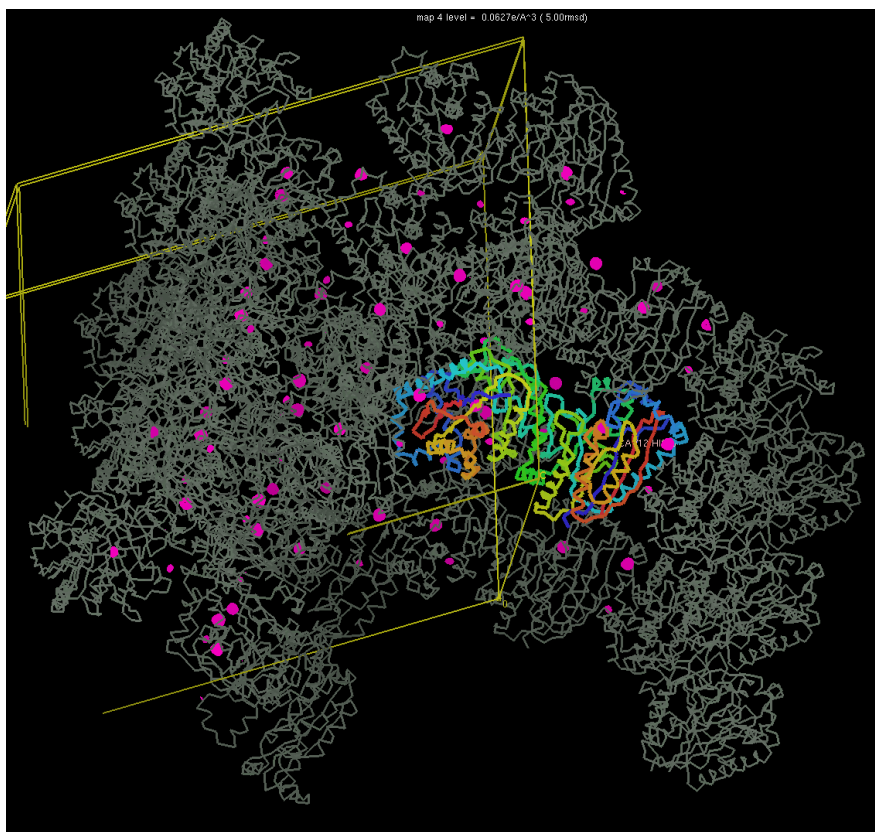


図 3-1-18 DesZ 結晶構造中のカルシウムの電子密度

電子密度図 (5σ) をピンク色のメッシュで DesZ パッキングの状態と共に示した. DesZ (2 分子) はレインボーカラーのリボン図で表示した. DesZ 結晶構造パッキングにおいて, 分子間にもカルシウムであることが強く示唆される電子密度が確認できる.

K 殻吸収端を $3.0\text{-}3.3\text{ \AA}$ の範囲に持つ元素はカルシウム(原子番号 20)のみであり、カリウム(原子番号 19、K 殻吸収端: 3.44 \AA)では 3.3 \AA の異常分散差フーリエ図で電子密度が確認できるため、測定波長 3.0 \AA での異常分散 - 3.3 \AA での異常分散で得た異常分散差フーリエ図では電子密度が差し引かれることになる。またスカンジウム(原子番号 21、K 殻吸収端: 2.76 \AA)では測定波長 3.0 \AA での異常分散差フーリエ図で電子密度は確認できない。

これらの結果から、得られた DesZ 構造の活性中心には鉄イオンではなくカルシウムイオンが配位し、また、カルシウムイオンがこの結晶構造の安定に寄与していることが強く示唆された。

3-2 DesZ の立体構造

3-2.1 DesZ の全体構造

X線結晶構造解析の結果、DesZの構造は、14本の α ヘリックスと10本の β シートで構成されていた。二次構造およびトポロジー図と立体構造を図3-2-1に示す。また、DesZのinsertion領域の立体構造中の配置について図3-2-2に示す。

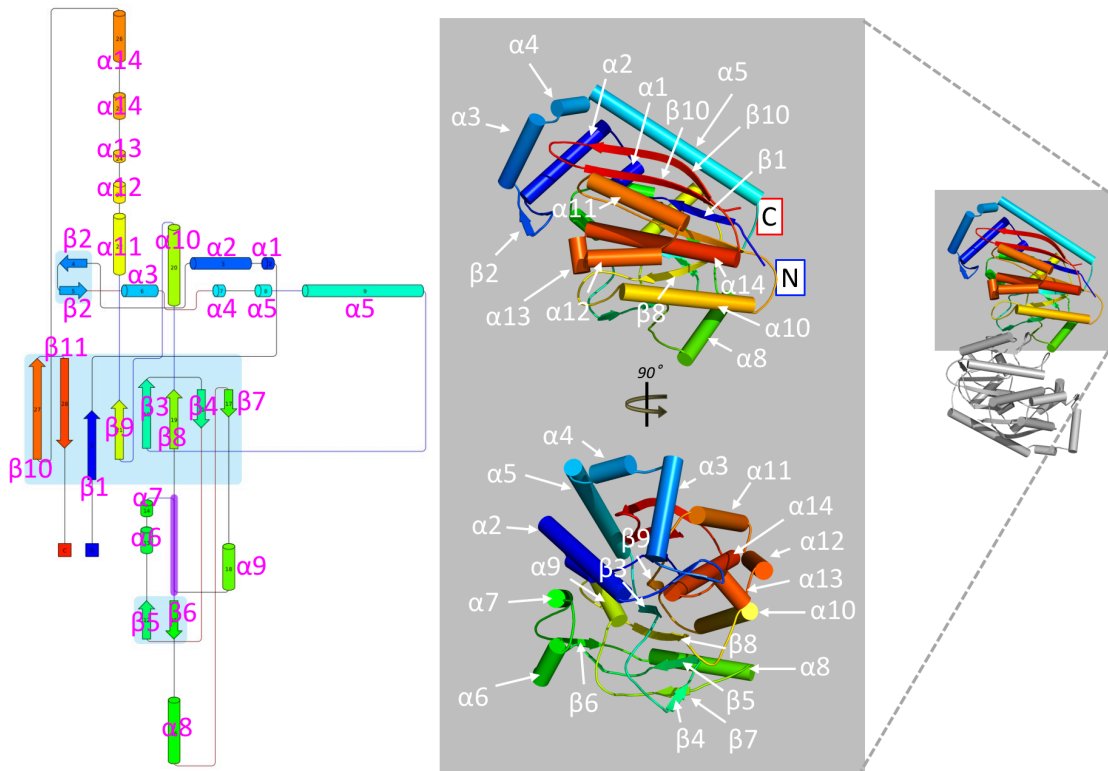
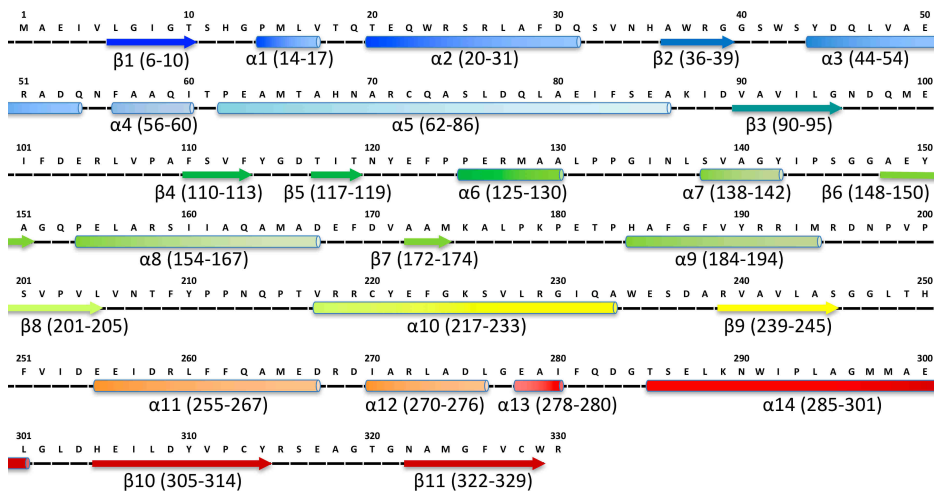
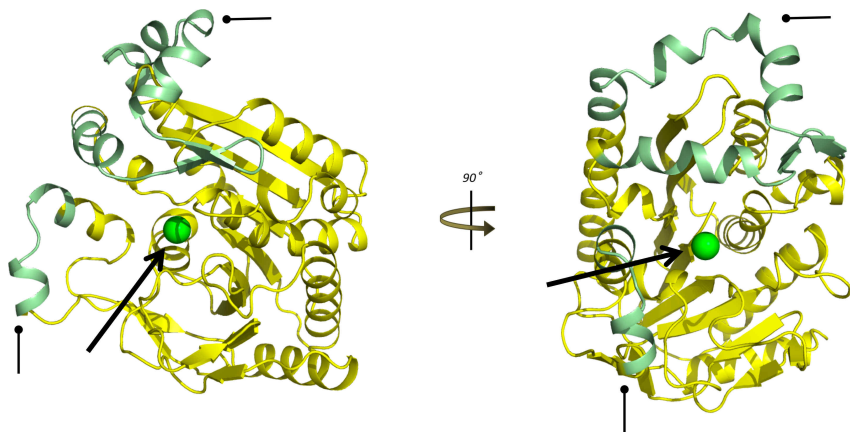
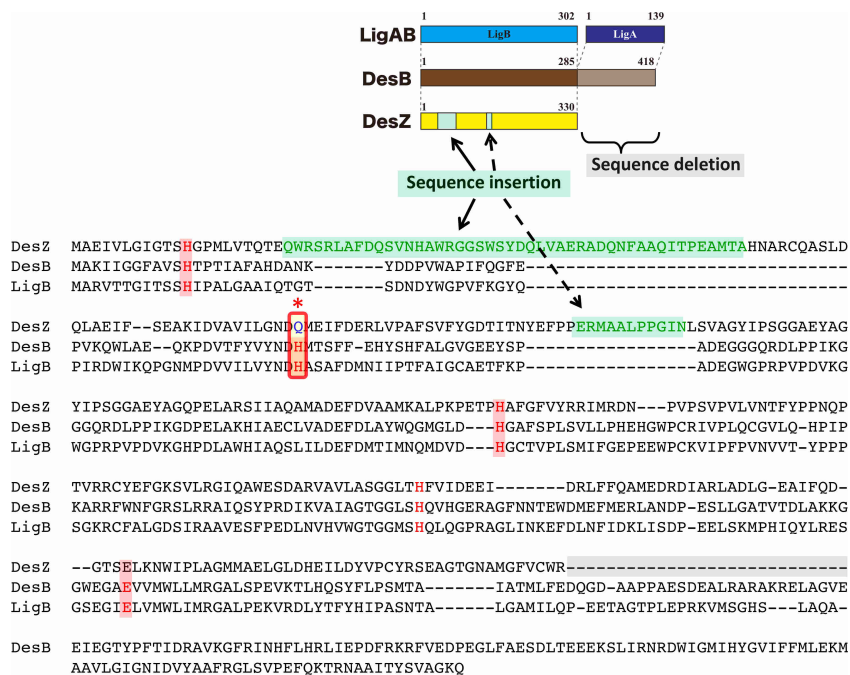


図 3-2-1 DesZ の結晶構造およびその二次構造のトポロジー

DesZ の結晶構造は 14 本の α ヘリックスと 11 本の β シートで構成されていた. 上に一次構造と二次構造の対応図を示した. () 内の数字は残基番号を示す. 左下のトポロジー図は Pro-origami (<http://munk.csse.unimelb.edu.au/pro-origami/>; Stivala et al., 2011) で作図し, DesZ 構造の α ヘリックス, β シート番号を追記した. 右下図では DesZ 結晶構造を cylinder モデルで表示し, α ヘリックス, β シート番号を記した.



← : 金属イオン
 — : insertion

図 3-2-2 DesZ の結晶構造における insertion 領域

上図は DesZ, DesB および LigB のアミノ酸配列解析結果と DesZ の insertion, deletion 領域の対応図. 下に本研究で得られた DesZ 結晶構造 (A chain) を cartoon で表示した. DesZ 構造の全体は黄色で示し, 構造中の insertion 領域に対応する部分については黄緑色で示した. 矢印で示された活性中心に存在する緑色の球はカルシウムイオンを示す. 左下図の DesZ の上部に突き出た helix 周辺が N 末端側 (31-66 : 31 残基), 左下に突き出た helix 周辺が C 末端側 (126-136 : 10 残基) の insertion 領域を示す.

3-2.2 DesZ の 2 量体形成における接触面積

得られた DesZ の結晶構造について、PISA server (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver; Krissinel et al., 2007) を用い、隣り合う各 Chain 間における相互作用面積を計算した。Structure Analysis で Interfaces 分析を行った結果を表 3-2-1 に示す。

表3-2-1 DesZの各Chain間の相互作用面積

	Surface area (\AA^2)	interface area (\AA^2)
Chain B × Chain A	13,348 × 13,810	1,302.2
Chain A × Chain A'	13,810 × 13,810	643.4
Chain B × Chain A'	13,348 × 13,810	616.3
Chain B × Chain B'	13,348 × 13,348	129.6
Chain A × Chain A'	13,810 × 13,810	119.2

PISA server を用いて Structure Analysis による Interfaces 分析を行った結果. (単位は \AA^2). Chain A', ChainB'は対象操作により関連づけられた隣接する Chain であることを示す.

結晶構造において DesZ 分子は非対称単位中に 2 分子存在しており、Chain B×A で示された 2 量体の組み合わせにおいて相互作用面積が最大となること、また LigAB および DesB の構造において Chain B×A で示された 2 量体と同様の 2 量体構造をとることから、DesZ 結晶中で非対称単位に存在する 2 つの分子 Chain A および Chain B は 2 量体を形成し、3.1-3 で示した溶液中の DesZ 構造を反映しているものと考えられた。DesZ の 2 量体化においては Chain A と Chain B が $\beta 4$ と $\beta 7$ 領域周辺で逆平行に配置し、(R105, L106, V107, P108, A109; V171, A172, A173, M174, K175, A176) 疎水性リッチであることから疎水性相互作用によって、また Chain A の D170 残基と Chain B の R219 残基間および Chain A の R219 残基と Chain B の D170 残基間で塩橋により相互作用していることが分かった (図 3-2-3)。この領域の相互作用面積は $1,302.2 \text{\AA}^2$ であった。

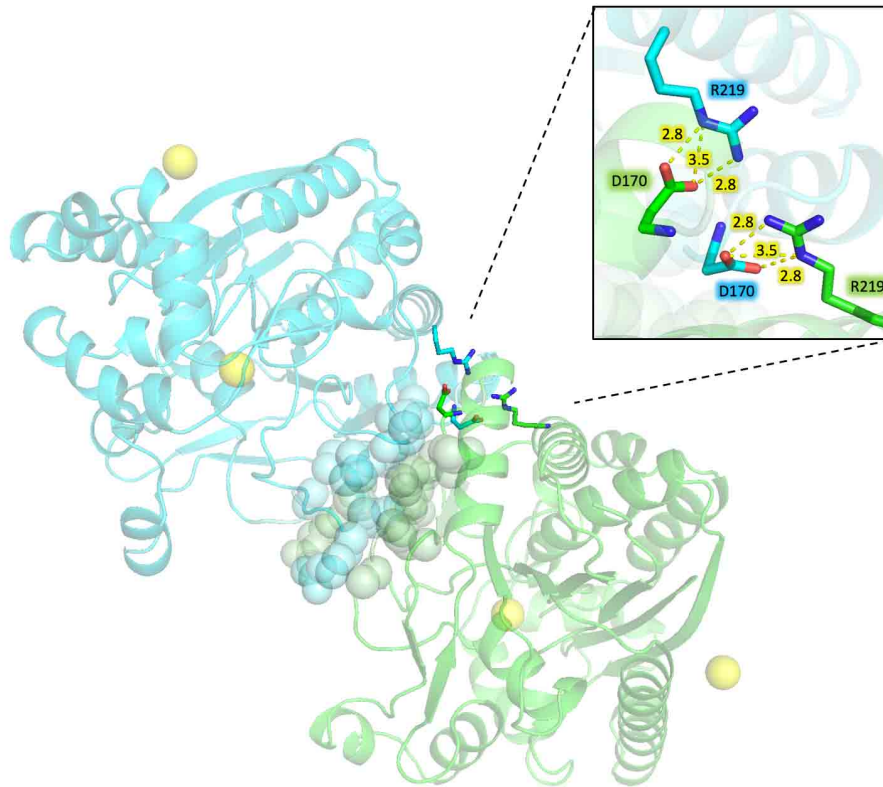


図 3-2-3 DesZ 結晶構造の非対称単位における 2 量体形成

DesZ 結晶構造の非対称単位を形成する 2 分子は互いの $\beta 4$ と $\beta 7$ が逆平行に配置し、Van der Waals 作用により 2 量体を形成している。2 量体を形成している DesZ 分子をそれぞれ緑色と青色で示し、結晶構造中のカルシウムイオンは黄色で表示した。疎水性相互作用に関与するアミノ酸残基は sphere で表示した。また互いの D170 残基と R219 残基間で塩橋により相互作用している領域を拡大図として右上に示した。右上図には残基間の距離(Å)を黄色で示した。

結晶構造中の DesZ 非対称単位において、対称操作で関連づけられる隣の分子とは $\alpha 5$, $\alpha 4$, $\alpha 3$ (D53-A70 : DQNFAAQITPEAMTAHNA) が逆平行に配置して疎水性相互作用し、またその界面にはカルシウムイオンが DesZ 1 分子につき 1 つ存在している。このカルシウムイオンはそれぞれの分子の Q54 および D309 と最も近い位置にあった (図 3-2-4)。

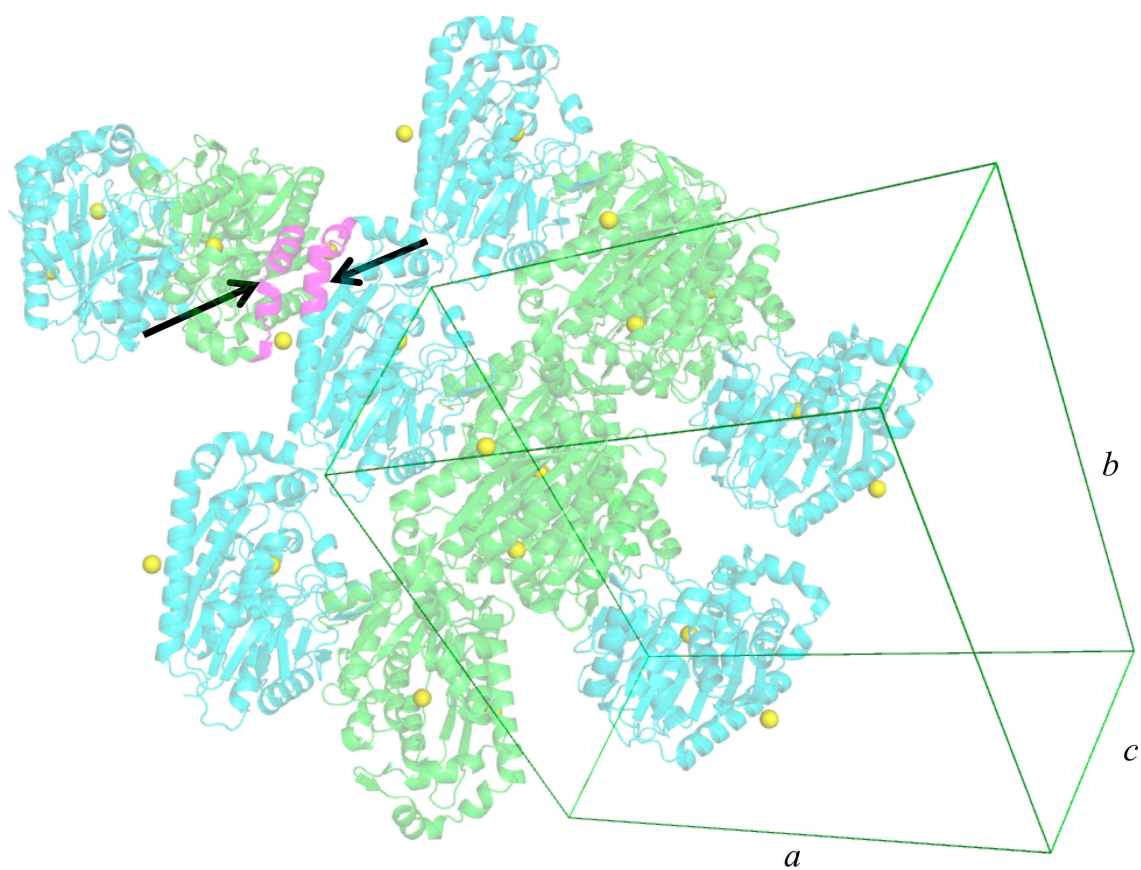


図 3-2-4 DesZ 結晶構造のクリスタルパッキング

DesZ 結晶構造の非対称単位で 2 量体を形成する 2 分子 (Chain A : 緑色 , Chain B : 青色) およびカルシウムイオン(黄色) について, 対称操作で関連付けられる近隣の DesZ 分子を単位格子(空間群 $P6_5$)とともに表示した. 矢印で示したマゼンタの部分は相互作用領域 (D53-A70 : DQNFAAQITPEAMTAHNA)を示す.

3-2.3 DesZ と LigAB, DesB の構造比較

3-2.3.1 DesZ と LigAB, DesB の全体構造

DesZ と LigAB, DesB の結晶構造およびそれぞれの模式図と活性中心の拡大図を図 3-2-5 に示す。

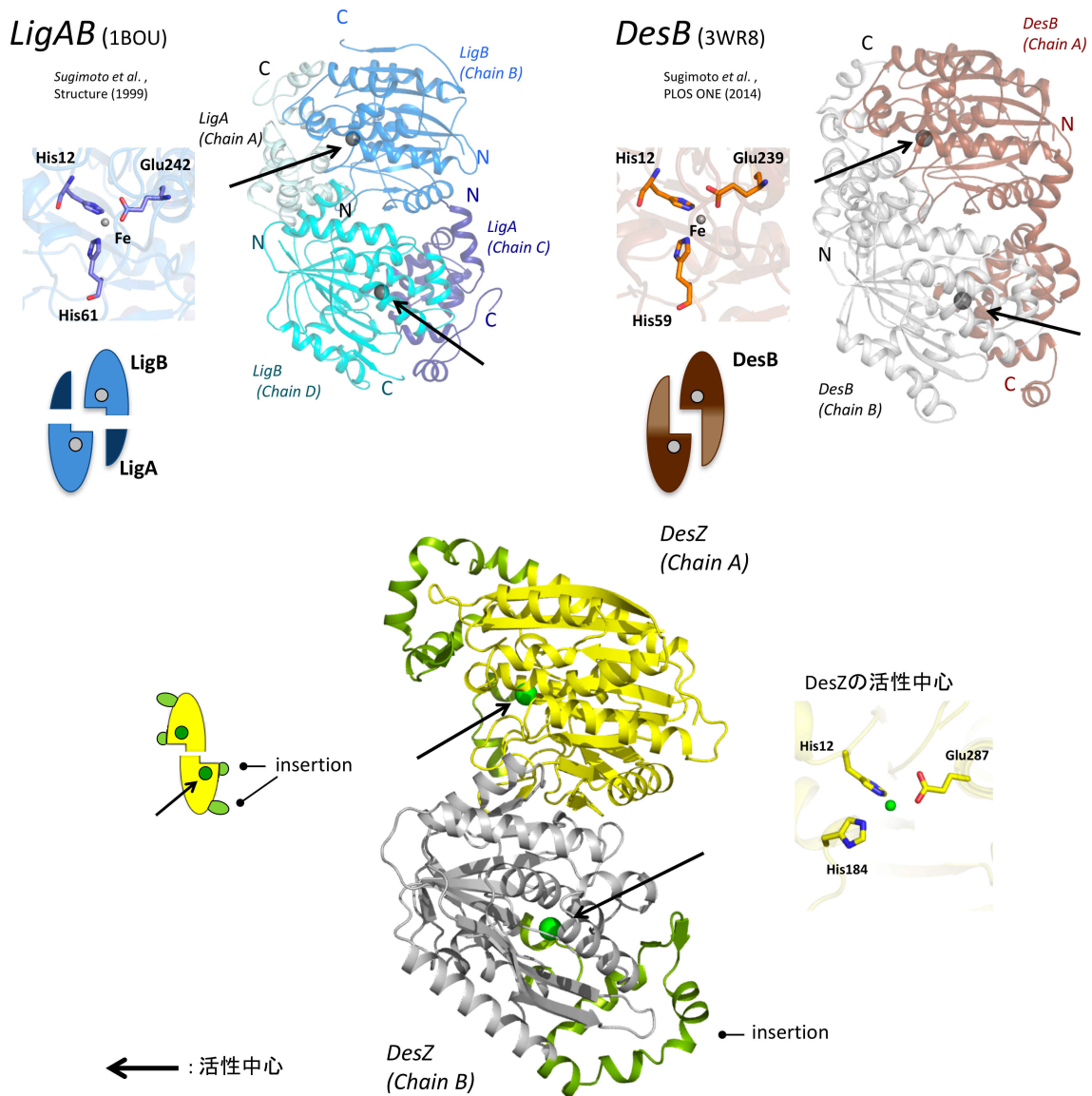


図 3-2-5 DesZ, LigAB および DesB の全体構造と活性中心

DesZ と LigAB, DesB の結晶構造およびそれぞれの活性中心とそれらの模式図. 全体構造は cartoon, 金属の配位に関与する残基はスティックモデルで表示し, 活性中心に存在する金属イオンは sphere モデルで表示した.

また、これらの構造の重ね合わせ図を図 3-2-6 に示す。

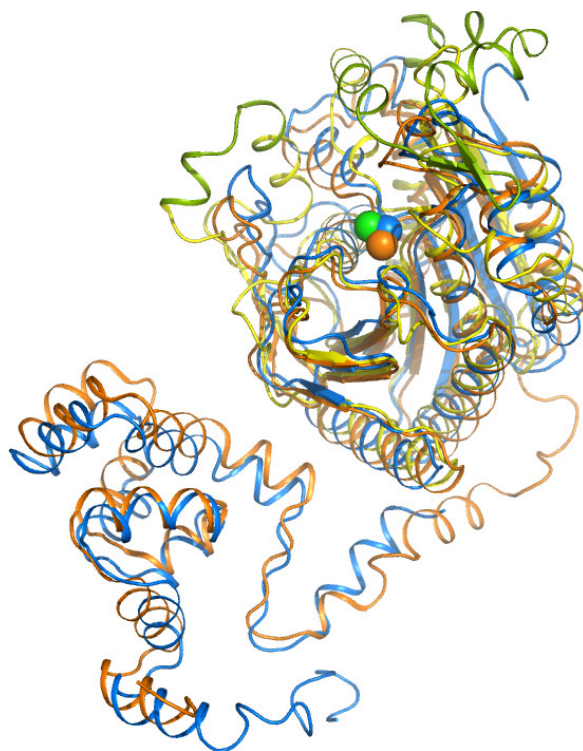


図 3-2-6 DesZ , LigAB および DesB の重ね合わせ

LigAB (1BOU)の LigA (Chain C)および LigB (Chain B)を青色, DesB (3WR8)の Chain A を橙色, DesZ の Chain A を黄色で, またその insertion 領域を黄緑色で示した. 金属イオンは sphere で示した. 重ね合わせ図には PyMOL の Align を使用し, 平均二乗偏差は CCP4 の *SuperPose* (Krissinel et al., 2004)を用いて二次構造を利用した重ね合わせアルゴリズム (Secondly Structure Matching/SSM)により求めた. DesZ と LigB および DesB の平均二乗偏差はそれぞれ 2.3 Å ($C\alpha$: 502) および 2.0 Å ($C\alpha$: 505)であった.

これらの構造から、DesZ、LigB および DesB で活性中心部分を擁するサブユニットについては類似した構造を持つことが分かるが、DesZ は活性中心部分の蓋になる領域に 2 量体の状態に対になる分子がない (deletion 領域に相当する) ため、活性中心部分をカバーするために insertion 領域が部分的にこれを補っていることが示された(図 3-2-7)。

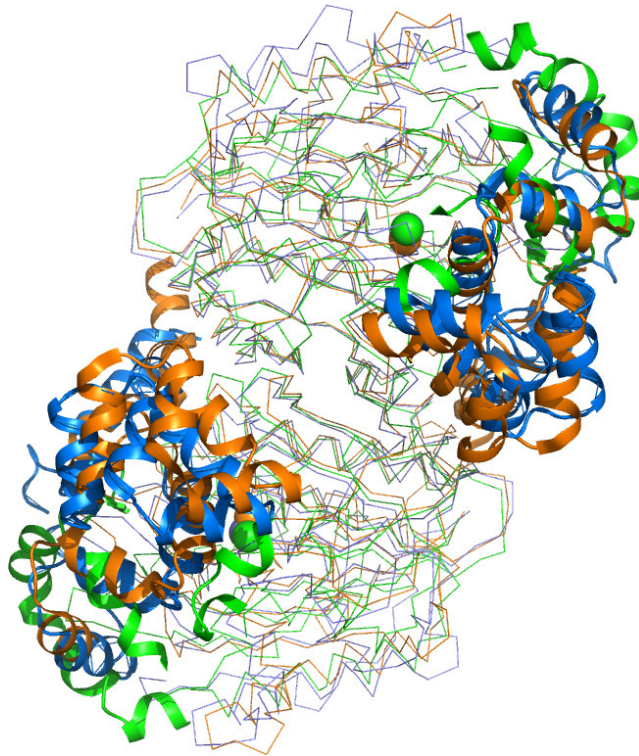


図 3-2-7 DesZ , LigAB および DesB の重ね合わせ (2)

DesZ を緑色, LigAB (1BOU)を青色, DesB (3WR8)をオレンジ色で示した. 全体をリボン図で示し, 金属イオンは sphere で示した. 活性中心の蓋に相当する領域については cartoon で表示した(DesZ は insertion 領域 (アミノ酸残基: 31-66 および 126-136), DesB は 286-418 の C 末端領域, LigAB は LigA サブユニット).

3-2. 3. 2 DesZ, DesB および LigAB の活性中心の比較

図 3-2-8 に DesZ, DesB および LigAB の活性中心の拡大図を示す。この図から、DesZ では DesB および LigAB に比べて活性中心にある金属イオンと相互作用する残基間の配位距離が長いことが分かる。3-1.7 にも CheckMyMetal による金属イオン配位分析を行った結果を示したが、この配位距離の違いは本研究で得られた DesZ の結晶構造中では活性中心に配位する金属がカルシウムイオンである可能性が高いこと、また、DesZ の Q98 残基が金属配位に関与していないことで、金属配位モチーフの配向が変化することに起因すると考えられる。いずれにしてもこの結晶構造中に含まれる金属イオンが鉄イオン

ではないことから、この活性中心の構造が生体内の DesZ の状態を直接反映しない可能性が強く示唆された。

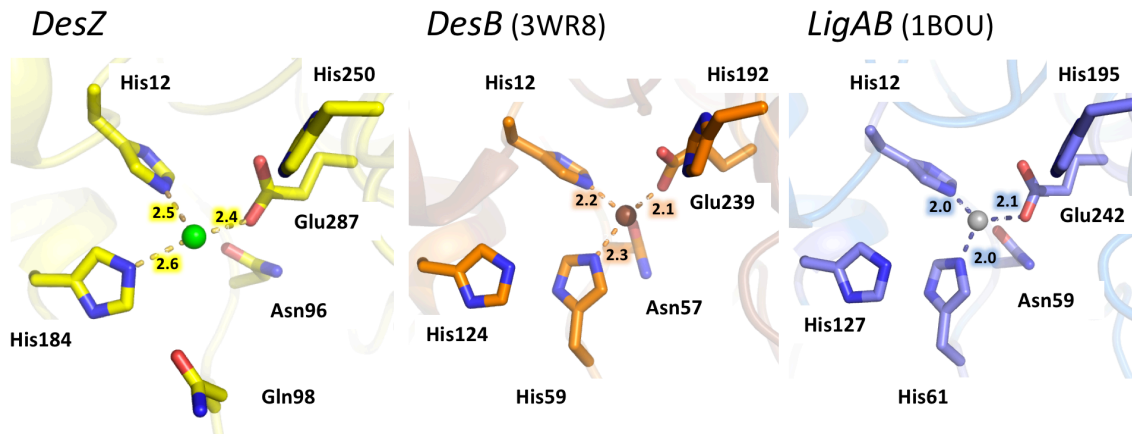


図 3-2-8 DesZ , DesB および LigAB の活性中心

それぞれの活性中心において金属イオンと配位する残基をスティックモデルで表示し、金属イオンと配位する残基間の距離 (Å)を示した。DesZ ではこの距離が平均 2.5 Å であるが、DesB および LigAB では平均 2.1 Å であり、DesZ の配位距離が長いことがわかる。DesZ の座標誤差は 0.14 Åであった。

3-3 DesZ の酵素活性測定

DesZ の酵素活性を評価するため、DesZ-基質反応液中の酸素濃度の減衰量を活性の判断指標とし、反応液の溶存酸素濃度の測定を行った。

3-3.1 DesZ 精製標品および再活性化された DesZ 溶液の活性比較

再活性化処理を行わない DesZ 溶液、再活性化後にバッファー置換を行っていない DesZ 溶液、再活性化後にバッファー置換を行った DesZ 溶液のそれぞれについて 3MGA を基質とした酵素反応活性の測定を行った。また、バッファー対照区(ブランク)として 100 mM Tris-HCl (pH 7)のみを測定した区、再活性化後にバッファー置換を行っていない DesZ 溶液については再活性化バッファー対照区として脱酸素した 100 mM Tris-HCl (pH 7)で 2 倍希釈した再活性化バッファー 20 μ L を反応溶液に加えて酸素濃度減衰量を測定し、その平均値を差し引いた値を算出した。測定結果はタンパク質量 (mg)当たりのユニット数 (1U = 1 μ mol O₂/min)/mg \cdot protein に換算して表した。結果を表 3-3-1 に示す。

表 3-3-1 DesZ 精製標品および再活性化された DesZ 溶液の活性比較

測定した溶液	酸素消費量 (μ mol)	U /mg \cdot protein (DesZ 濃度 mg/mL)
[1]:バッファー対照区	5.31 \pm 2.66	-
[2]:再活性化バッファー対照区	11.1 \pm 0.82	-
[A]: 再活性化処理を行わない	-0.03 \pm 0.3	n.d. (4.13)
[B]: 再活性化後 (バッファー置換なし)	108.6 \pm 8.95	7.29 \pm 0.59 (4.13)
[C]: [B] - ([2]再活性化バッファー対照区)	97.5 \pm 8.95	6.59 \pm 0.60 (4.13)
[D]: 再活性化 + バッファー置換	34.5 \pm 3.66	6.13 \pm 2.60 (2.29)

全ての結果は酵素添加後の酸素消費量から[1]のサンプルバッファー対照区の値を差し引き、Bradford 法により測定したタンパク質濃度を用いて算出した。それぞれの試験区については独立した 4 回の測定を行い、結果を平均 \pm 標準偏差で示した。n.d.は検出限界以下であったことを示す。

表 3-3-1 に示すように、[A]の再活性化処理を行っていない DesZ 溶液では酵素活性は確認できなかったが、再活性化後の DesZ 溶液については酸素消費がみられ、活性が復活していることが分かった。また、[2]の再活性化用バッファー対照区のみでも酸素消費が確認されたことで、バッファー中の余剰鉄イオンが酵素反応とは無関係に基質反応液中の酸素を消費していることが示され、反応速度を必要とするパラメータへの影響を考慮に入れる必要があった。しかし、[2]の再活性化用バッファー対照区の値を[B]のバッファー置換を行っていない DesZ 溶液の値から差し引いた値[C]が、再活性化後にバッファー置換を行った区 [D]と大きく変わらない値 ($C/D = \text{約 } 93\%$)を示したことから、再活性化後のバッファー置換による DesZ の酵素活性への影響は大きくないと判断し、今後の全ての測定において再活性化の後にバッファー置換を行うことで、再活性化バッファー中の余剰鉄イオンの影響を除去することとした。

3-3.2 DesZ の酵素活性における鉄およびカルシウム依存性の確認

本研究で得られた DesZ の結晶構造において、活性中心に存在する金属がカルシウムイオンであることが強く示唆された(3-1.7)。これまでの研究では、活性を保持しているジオキシゲナーゼでは活性中心に主に鉄もしくはマンガンイオンを擁することが示されているが、カルシウムイオンが配位した状態での活性についての報告はなされていないため、カルシウムイオン配位型 DesZ に酵素活性が存在するかどうかを確認した。

まず、嫌気チャンバー内で脱酸素した再活性化処理後の DesZ 溶液 [E] に終濃度 $500\mu\text{M}$ になるように EDTA (pH 8.0)溶液を加え、氷冷下で 20 時間インキュベートし、不活性化処理を行った。不活性化処理後の DesZ 溶液は脱塩カラム(ZebaTM Spin Desalting Column)を用い、100 mM Tris-HCl (pH7)にバッファー置換した。バッファー置換した DesZ 溶液は 3 本に分注し、[F]: 100 mM Tris-HCl (pH7) で二倍希釈、[G]: 鉄を含む再活性化用バッファー(4 mM アスコルビン酸ナトリウム, 2 mM 硫酸鉄(II), 100 mM Tris-HCl (pH 7.5))を等量加えて氷冷下で 2 時間インキュベート後、再度脱塩カラム(ZebaTM Spin Desalting Column)を用いて 100 mM Tris-HCl (pH7)にバッファー置換、[H]: カルシウムを含む再活性化用バッファー(4 mM アスコルビン酸ナトリウム, 2 mM 塩化カルシウム, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5))を等量加えて氷冷下で 2 時間インキュベート後、再度脱塩カラム(ZebaTM Spin Desalting Column)を用いて 100 mM Tris-HCl (pH7)にバッファー置換したもの、それぞれについて活性を測定した。これらの操作はすべて嫌気チャンバー内で脱酸素状態を保ったまま行った。結果は測定結果はタンパク質量(mg)当たりのユニット数($1\text{U} = 1\ \mu\text{mol O}_2/\text{min}/\text{mg} \cdot \text{protein}$)に換算し、[E]の再活性化後にバッファー置換した区に対する比率 (Recover %)とともに表した。結果を表 3-3-2 に示す。

表 3-3-2 DesZ の酵素活性における鉄およびカルシウム依存性の確認

	U /mg · protein (Recover %)
[E]: 再活性化 → バッファー置換	6.13 ± 2.60 (100)
[F]: 不活性化 → バッファー置換	1.52 ± 0.40 (24.7)
[G]: 不活性化 → バッファー置換 → + Fe 配位型の調製 → バッファー置換	4.83 ± 1.15 (78.8)
[H]: 不活性化 → バッファー置換 → + Ca 配位型の調製 → バッファー置換	1.02 ± 0.26 (16.6)

全ての結果は酵素添加後の酸素消費量からサンプルバッファー対照区の値を差し引き、Bradford 法により測定したタンパク質濃度を用いて算出した。それぞれの試験区については独立した 4 回の測定を行い、結果を平均±標準偏差で示した。(Recover %)は再活性化後にバッファー置換した DesZ の 3MGA に対する活性を 100%として示した。

表 3-3-2 に示したように、再活性化後の DesZ 溶液において EDTA による不活性化処理 [F] で活性は約 25%まで低下し、また、その状態から鉄を含む再活性化バッファー処理 [G]により元の活性の約 80%まで復活した。しかし、鉄を含む再活性化は有効であったが、カルシウムを含むバッファーでは再活性化されず、さらに活性は低下した [H]。

これらの結果から、カルシウムイオン配位型の DesZ には活性はないことが示唆された。これに伴い、本研究で得られた DesZ 結晶構造は結晶化条件由来のカルシウムイオンが配位した構造であると考えられるため、この構造は不活性状態の構造で、活性型の構造ではないことが示唆された。

3-3.3 PCA、Gallate および HPCA を基質とした DesZ の酵素活性測定

本研究における酵素活性測定条件で、LigAB、DesB および HPCD のそれぞれ主な基質である PCA、Gallate および HPCA についても酵素活性を測定し、DesZ の 3MGA に対する酵素活性と比較を行った。測定方法については 2.9.2 に示したとおりに行い、それぞれ基質は 3MGA と同じ濃度(1 mM)で測定した。結果はタンパク質量(mg)当たりのユニット数(1U = 1 μmol O₂/min)/mg · protein に換算し、3MGA の酵素活性に対する比率 (%)とともに表した。その結果を表 3-3-3 に示す。

表 3-3-3 DesZ の PCA、Gallate および HPCA に対する酵素活性

Substrate	U/mg · protein (%)
3MGA	5.50 ± 1.43 (100)
Gallate	5.80 ± 1.18 (105.6)
PCA	1.01 ± 0.55 (18.4)
HPCA	n.d.

全ての結果は酵素添加後の酸素消費量からサンプルバッファー対照区の値を差し引き、Bradford 法により測定したタンパク質濃度を用いて算出した。それぞれの試験区については独立した 4 回の測定を行い、結果を平均±標準偏差で示した。n.d.は検出限界以下であったことを示した。() 内の数値は 3MGA に対する DesZ 活性を 100%とした値を示す。

表 3-3-3 に示すように、Gallate および PCA についても酵素活性が確認された。Kasai ら(2005)による報告(表 3-3-4)では DesZ の Gallate、3MGA および PCA に対する V_{max} はそれぞれ 2.75 ± 0.08 、 3.63 ± 0.20 、 < 0.1 (U/mg)であり、本研究で測定された活性はこれらに比べて高い値を示した。また、HPCA については酵素活性は確認できなかった。

表 3-3-4 DesB, DesZ and LigAB の酵素速度論的解析

Enzyme	Substrate								
	Gallate			3MGA			PCA		
	V_{max} (U/mg)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m	V_{max} (U/mg)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m	V_{max} (U/mg)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m
DesB	42.7 ± 2.4^a	66.9 ± 9.3	0.64	<0.1	ND ^b	ND	<0.1	ND	ND
DesZ	2.75 ± 0.08	371 ± 21	0.0074	3.63 ± 0.20	214 ± 24	0.017	<0.1	ND	ND
LigAB	15.0 ± 1.5	381 ± 38	0.039	0.925 ± 0.032	937 ± 18	0.00099	30.6 ± 4.2	75.0 ± 19.2	0.41

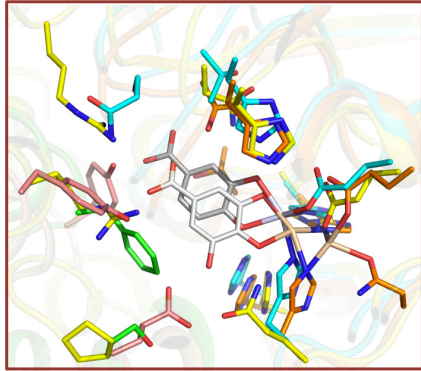
^a Mean ± standard deviation.

^b ND, not determined.

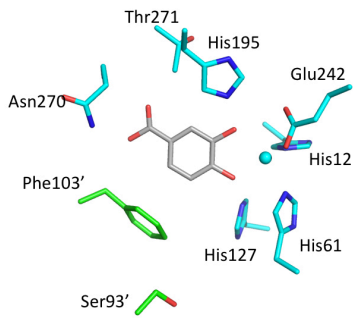
(Kasai et al., Journal of Bacteriology, 187(15), 5067-5074, 2005より)

3-4 DesZ 野生型とその変異体との酵素活性比較

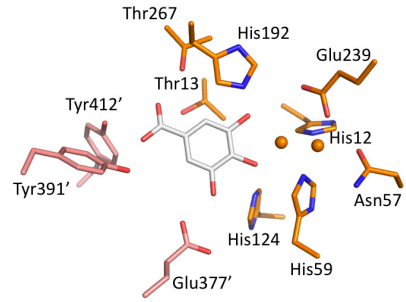
前節に次いで、本節では DesZ の基質特異性、鉄との配位状態および他のジオキシゲナーゼとの関係などについてより詳細な生化学的解析を行うため、DesZ 変異体を用いた酵素活性の評価を試みた。まず、本研究で得られた結晶構造において、DesZ の活性中心で実際に金属イオンと配位している残基は LigAB・DesB とのシークエンスアライメントによる予測とは異なっていた。つまり、LigAB・DesB ではそれぞれ H61, H59 と鉄イオンが配位しているが、DesZ ではそれらに対応する位置にある Q98 に代わって H184 が金属イオンと配位していた。この Q98 が DesZ が活性に関与する残基であるかどうかを確認するため、Q98 をヒスチジンに置換する変異を導入した Q98H 変異体、アラニンに置換する変異を導入した Q98A 変異体を作製した。また、シークエンスアライメントによる予測と本研究で決定した DesZ 立体構造と LigAB・DesB との重ね合わせを行った結果(図 3-4-1) から、触媒残基としての機能を持つと考えられる残基 (H184, H250) をアラニンに置換させた変異体を作製した。それに加え、金属イオンと配位している残基 (H12, E287, H184) と、DesB が嫌気条件下において基質である Gallate と複合体を形成する際に鉄イオンが移動する(Sugimoto et al., 2014)ことから、移動前の鉄イオンの配位に関わる残基(DesB : N57)に対応する位置にある残基(DesZ : N96)についてもそれぞれ変異体を作製した。また、基質特異性に影響を及ぼす可能性があるアミノ酸残基を予測するため、既知の LigAB・DesB-基質複合体構造において、基質と相互作用していると思われる残基と重なる位置にある DesZ のアミノ酸残基 (P132, N322)、重ならないが基質に近い位置に側鎖が存在する可能性のあるアミノ酸残基 (R26, R315)についてもそれぞれ変異体を作製した。作製した全ての変異体について図 3-4-2 に示した。本節では、DesZ 変異体の作製と精製およびそれぞれの変異体の活性評価について記す。



A: LigAB+PCA (1B4U)



B: DesB+Gallate (3WR9)



C: DesZ

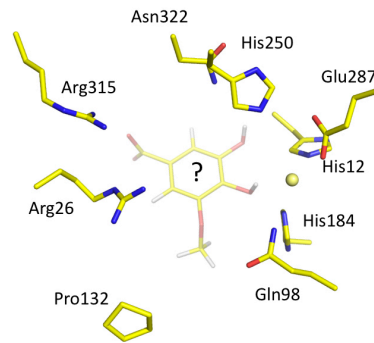


図 3-4-1 LigAB, DesB 基質複合体構造の活性中心と DesZ 立体構造の重ね合わせ
 左上の重ね合わせ図では基質および基質と相互作用していると思われる残基、金属イオンをスティックモデルで示した。A: LigAB (PDB: 1B4U) の活性中心、基質は PCA。B: DesB (PDB: 3WR8) の活性中心、基質は Gallate。C: DesZ の活性中心。中心部に基質である 3MGA の予想を基に仮に置いた。

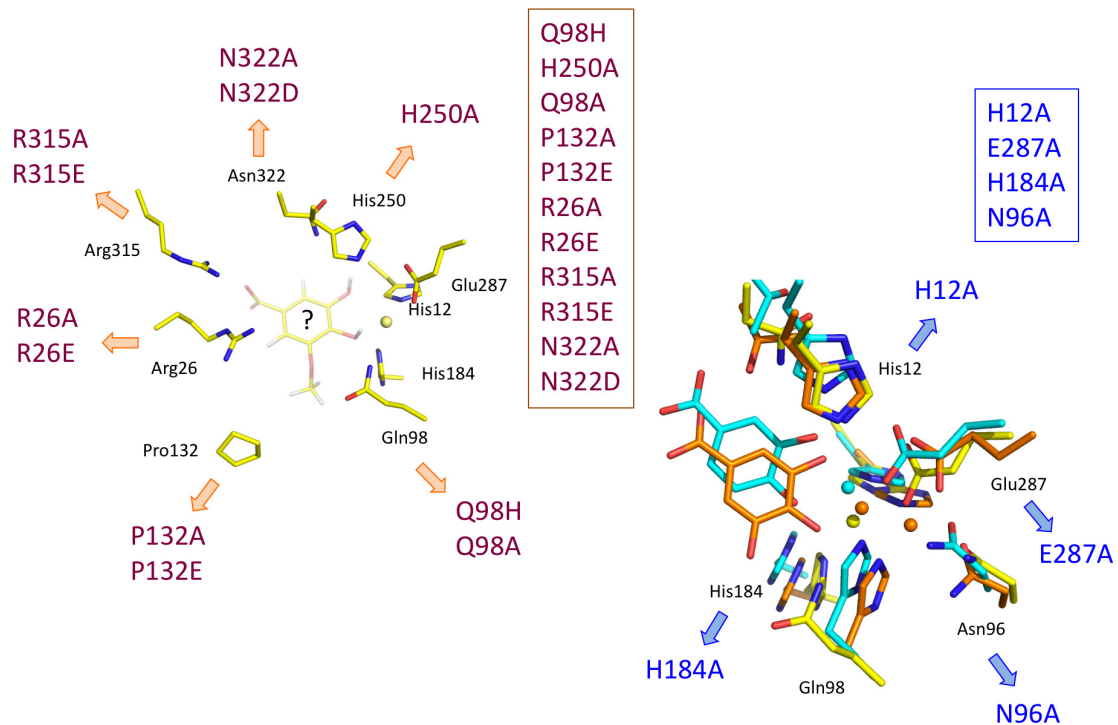


図 3-4-2 DesZ 変異体の作製

図中に示した通りにアミノ酸残基に変異を導入した。左図には酵素活性および基質特異性に影響を及ぼす可能性が考えられる残基に入れた変異を示し、中心部に基質である 3MGA を予想を基に仮に置いた。右図では金属イオンと配位する(N96 については金属イオンと配位する可能性がある)残基に導入した変異を示した。

3-4.1 大腸菌による DesZ 変異体の発現と精製

作製したそれぞれの変異体プラスミドについて、発現用宿主大腸菌に形質転換し、DesZ 変異体の発現および精製を行った結果、E287A、R315E および N322D 変異体を除く全ての変異体については野生型 DesZ と同じ精製プロファイルを示した (図 3-4-1, 3-4-2, 3-4-3)。しかし E287A、R315A および N322D 変異体では陰イオン交換クロマトグラフィーのプール画分を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供するための前処理において塩濃度を 2M (NH₄)₂SO₄ まで上昇させた際に沈殿画分に多くが移行してしまい、疎水性相互作用クロマトグラフィーでは活性測定に用いるに十分な収率での精製ができなかった。そこで、沈殿画分をゲル濾過バッファーに再溶解させてから濃縮し、疎水性相互作用クロマトグラフィーを行わずにゲル濾過を 2 回繰り返すことで純度を上げ、

活性測定に用いることとした。これらの変異体については純度が野生型および他変異体と違い、SDS-PAGE で単一のバンドとなる純度ではなかったため、SDS-PAGE 結果から ImageJ による純度計算を行い、その結果から濃度補正を行った。また、これらの変異体の CD 測定には野生型 DesZ と同様の方法で精製した画分を用いて行った。ゲル濾過を用いた最終精製後の DesZ 変異体について SDS-PAGE で分析した結果を図 3-4-4 に示す。

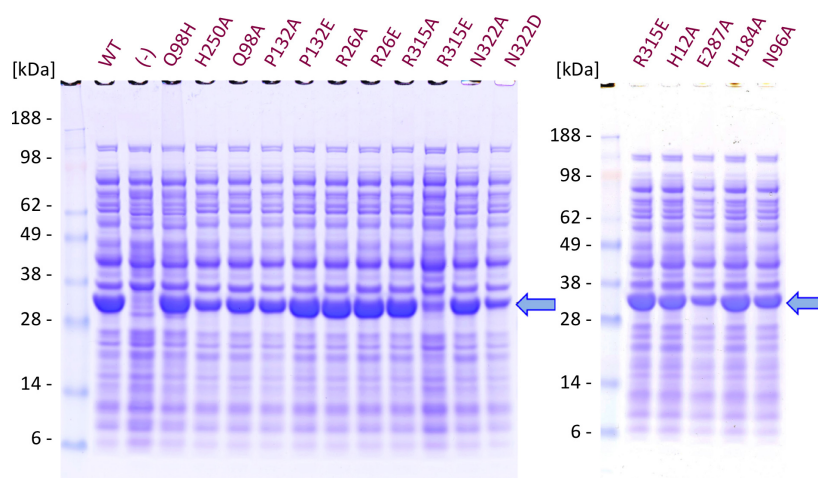


図 3-4-1. DesZ 変異体の発現と精製 (1)

それぞれの変異体プラスミドを大腸菌で発現させ、その Lysate を SDS-PAGE に供した結果を示す。矢印は DesZ のバンド位置を示す。WT は野生型を、(-) は *desZ* コード領域を含まないプラスミドベクターを形質転換した大腸菌の Lysate を、矢印は DesZ のバンド位置を示す。

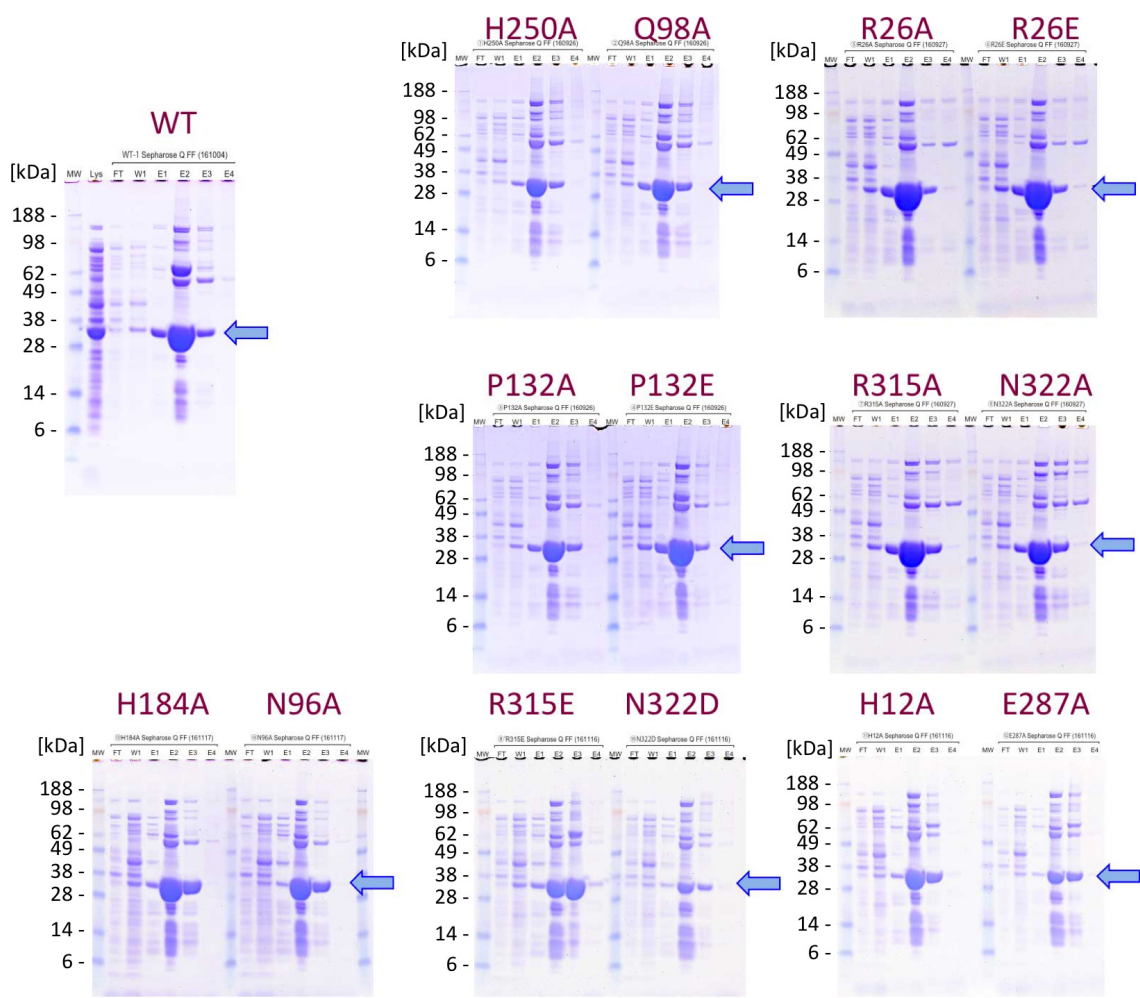


図 3-4-2. DesZ 変異体の発現と精製 (2)

それぞれの変異体 Lysate を陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した画分について、SDS-PAGE で分析した結果を示す。矢印は DesZ のバンド位置を示す。

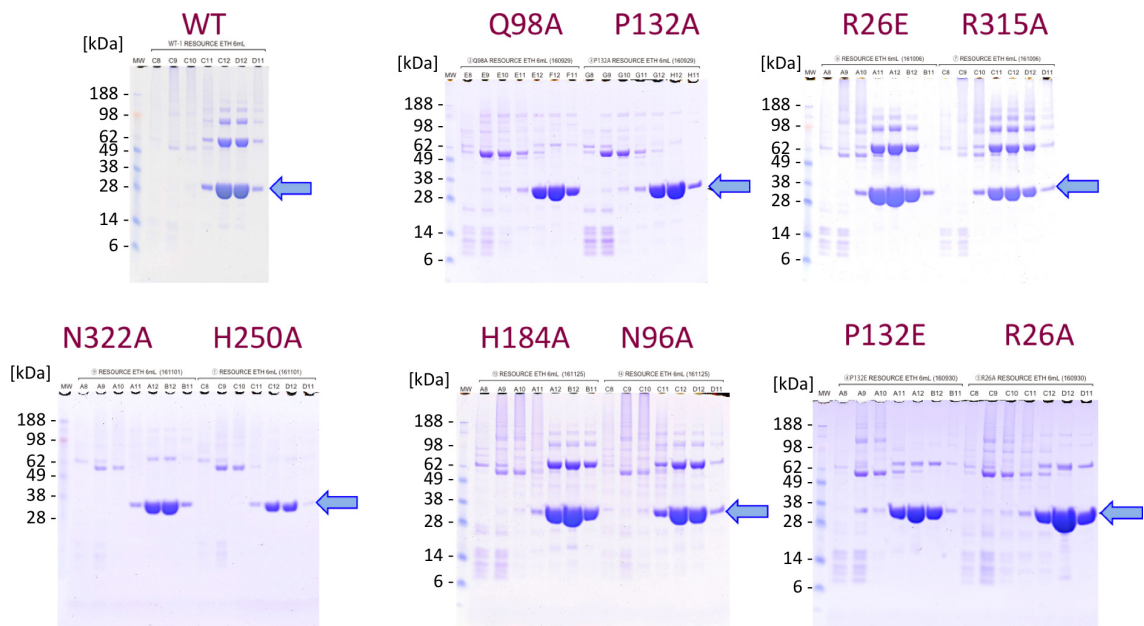


図 3-4-3. DesZ 変異体の発現と精製 (3)

E287A、R315A および N322D 変異体を除くそれぞれの変異体を疎水性相互作用クロマトグラフィーで精製した画分について SDS-PAGE で分析した結果を示す。矢印は DesZ のバンド位置を示す。

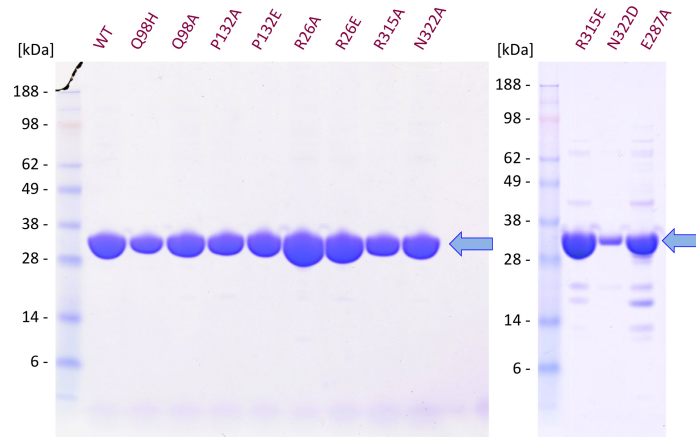


図 3-4-4. DesZ 変異体の発現と精製 (4)

それぞれの変異体をゲル濾過を用いて最終精製した画分について、SDS-PAGE で分析した結果を示す。矢印は DesZ のバンド位置を示す。

3-4.2 CD (circular dichroism) による DesZ およびその変異体の二次構造組成の確認

CD 測定の結果を図 3-4-5 に示す。野生型 DesZ および DesZ 変異体の CD スペクトルはほぼ一致しており、そのヘリックス含量は約 50%であった。この値は本研究ですでに得られた野生型 DesZ の二次構造組成と一致している。また、対照として測定した BSA のヘリックス含量が約 20%と正しい値を示したことから併せて、測定精度に問題はなく、変異導入に際しての大きな二次構造の変化はないことが確認できた。

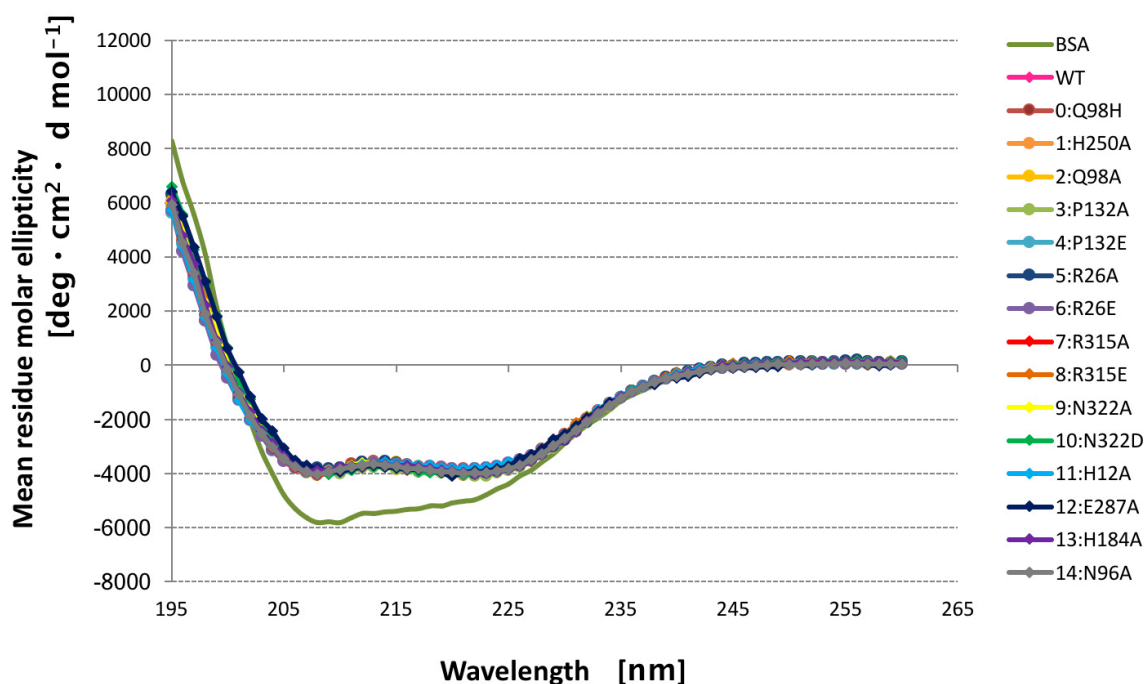


図 3-4-5 精製した DesZ およびその変異体の CD スペクトル

DesZ およびその変異体について 0.065mM NaCl 0.065mM Tris-HCl (pH 8.0), 20°C 条件下で測定し、測定結果は平均残基モル橢円率で示した。対照として BSA を用いた。

3-4.3 DesZ 変異体の酵素活性評価

3-4.3.1 触媒残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体の酵素活性評価

シークエンスアラインメント、LigAB および DesB の活性中心と本研究で決定した DesZ 立体構造の重ね合わせ結果から、野生型 DesZ で LigAB および DesB の触媒残基 (H127, H195 および H124, H192) に相当するアミノ酸の DesZ 変異体 (H184A, H250A) について、酵素活性を測定した。測定結果はタンパク質量 (mg) 当たりのユニット数 (1U = 1 $\mu\text{mol O}_2/\text{min}$)/mg \cdot protein に換算して表し、野生型 DesZ が 3MGA を基質とした場合の酵素活性に対する比率(%)とともに表した。表 3-4-1 に結果を示す。

表 3-4-1 触媒残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体の 3MGA に対する酵素活性

野生型	H250A	H184A
5.50 \pm 1.43 (100)	n.d.	0.30 \pm 0.08 (5.5)

単位は U/mg \cdot protein.

全ての結果は酵素添加後の酸素消費量からサンプルバッファー対照区の値を差し引き、Bradford 法により測定したタンパク質濃度を用いて算出した。それぞれの試験区については独立した 4 回の測定を行い、結果を平均 \pm 標準偏差で示した。() 内の数値は野生型 DesZ が 3MGA を基質とした場合の活性を 100%として換算した値(%)を、n.d.は検出限界以下であったことを示す。

触媒残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体では、H250A 変異体で完全に活性が消失し、また H184A 変異体では野生型と比較して 5.5%まで活性が低下していた。

3-4.3.2 金属イオンと配位する残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体の酵素活性評価

LigAB および DesB の活性中心と DesZ 立体構造の重ね合わせ結果から、金属イオンに配位するアミノ酸残基と重なる残基の DesZ 変異体について、酵素活性を測定した。

測定結果はタンパク質量 (mg) 当たりのユニット数 (1U = 1 $\mu\text{mol O}_2/\text{min}$)/mg \cdot protein に換算して表し、野生型 DesZ が 3MGA を基質とした場合の酵素活性に対する比率(%)とともに表した。表 3-4-2 に結果を示す。

表 3-4-2 金属イオンと配位する残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体の 3MGA に対する酵素活性

野生型	Q98H	Q98A	H12A	E287A	N96A
5.50 \pm 1.43 (100)	0.85 \pm 0.56 (15.4)	0.58 \pm 0.29 (10.6)	n.d.	n.d.	0.45 \pm 0.29 (8.3)

単位は U/mg \cdot protein.

全ての結果は酵素添加後の酸素消費量からサンプルバッファー対照区の値を差し引き, Bradford 法により測定したタンパク質濃度を用いて算出した。それぞれの試験区については独立した 4 回の測定を行い, 結果を平均 \pm 標準偏差で示した。() 内の数値は野生型 DesZ が 3MGA を基質とした場合の活性を 100%として換算した値(%)を, n.d.は検出限界以下であったことを示す。

LigAB および DesB で金属イオンと配位するアミノ酸残基と重なる位置にある残基の DesZ 変異体では、H12A、E287A 変異体で完全に活性が消失していた。このことから、これらの残基は金属イオンを擁するに必須な残基であると考えられた。この結果に加え、N96A 変異体の酵素活性が野生型 DesZ と比べて約 8%まで低下していたことから、この残基が DesB の N57 (基質複合体を形成していない状態において鉄イオンとの配位に関与する残基)の役割を果たしていることが示唆される。DesZ の結晶構造では N96 に配位する金属イオンは確認できなかったが、これはこの結晶構造中で活性中心に存在した金属イオンがカルシウムイオンであったことが金属イオンのシフトに影響を及ぼした可能性が考えられる。

3-4. 3.3 基質特異性に関与する残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体の酵素活性評価

LigAB および DesB の活性中心と DesZ 立体構造の重ね合わせ結果から、基質特異性に関与する残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体について、酵素活性を測定した。測定結果はタンパク質量 (mg) 当たりのユニット数 (1U = 1 μ mol O₂/min)/mg \cdot protein に換算して表し、野生型 DesZ が 3MGA を基質とした場合の酵素活性に対する比率 (%) とともに表した。表 3-4-3 に結果を示す。

表 3-4-3 基質特異性に関与する残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体の 3MGA に対する酵素活性

野生型	R26A	R26E	P132A	P132E
5.50 \pm 1.43 (100)	n.d.	n.d.	3.33 \pm 0.54 (60.6)	4.23 \pm 0.38 (77.0)

R315A	R315E	N322A	N322D
n.d.	n.d.	2.50 \pm 0.25 (45.4)	0.75 \pm 0.52 (13.6)

単位は U/mg \cdot protein.

全ての結果は酵素添加後の酸素消費量からサンプルバッファー対照区の値を差し引き、Bradford 法により測定したタンパク質濃度を用いて算出した。それぞれの試験区については独立した 4 回の測定を行い、結果を平均 \pm 標準偏差で示した。() 内の数値は野生型 DesZ が 3MGA を基質とした場合の活性を 100% として換算した値を、n.d. は検出限界以下であったことを示す。

基質特異性に関与する残基と重なる位置にあるアミノ酸残基の DesZ 変異体解析では、R26A および R26E 変異体、R315A および R315E 変異体で完全に活性が消失していた。

また、野生型 DesZ と DesZ P132E 変異体の PCA および Gallate に対する酵素活性について測定した結果を表 3-4-4 に、これらの酵素活性測定結果についてのまとめを図 3-4-6 に示す。

表 3-4-4 野生型 DesZ と DesZ P132E 変異体の PCA および Gallate に対する酵素活性

	野生型	P132E
3MGA	5.50 ± 1.43 (100) ^{a)}	4.23 ± 0.38 (77.0) ^{a)}
Gallate	5.80 ± 1.18 (105.6) ^{a)}	5.25 ± 1.14 (95.4) ^{a)} (90.4) ^{b)}
PCA	1.01 ± 0.55 (18.4) ^{a)}	

単位は U /mg・protein.

全ての結果は酵素添加後の酸素消費量からサンプルバッファー対照区の値を差し引き, Bradford 法により測定したタンパク質濃度を用いて算出した. それぞれの試験区については独立した 4 回の測定を行い, 結果を平均±標準偏差で示した. () 内の数値は野生型 DesZ の ^{a)}3MGA および ^{b)}Gallate に対する活性を 100% とした値を示す.

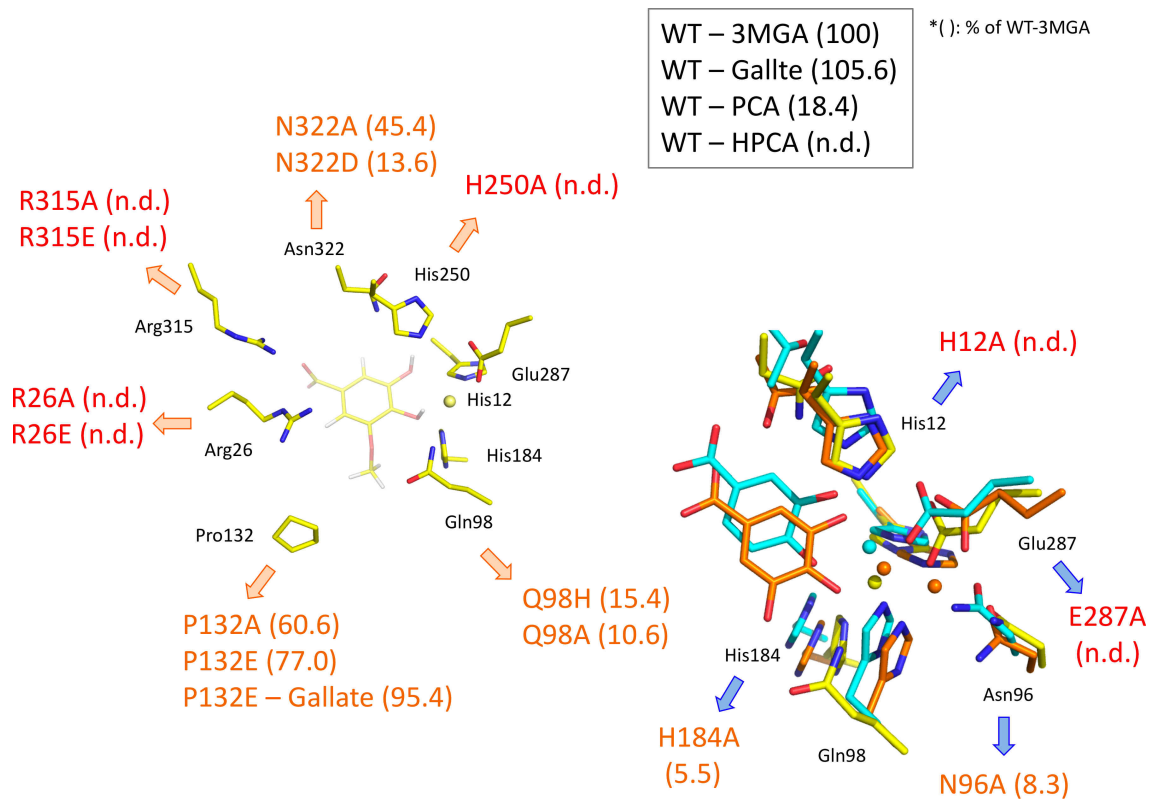


図 3-4-6 DesZ 変異体の活性測定結果

DesZ 野生型および変異体の活性測定結果。() 内の数値は野生型 DesZ の 3MGA に対する活性を 100% とし て換算した値を, n.d. は検出限界以下であったことを示す. 赤字は変異により完全に活性が失われた残基 を, 橙字は変異により活性が低下した残基を示す. 左図の DesZ 構造図の中心部に基質である 3MGA を予想 を基に仮に置いた.

DesZ の H250 は LigAB および DesB とのシークエンスアラインメントから触媒残基 としての機能を持つと予測されたが、実際に H250A 変異体では活性が完全に消失し、 この残基が DesZ の触媒残基であることが強く示唆される結果であった。

また、DesZ では R26 および R315 が 3MGA に対する活性に必須であることが確認さ れた。この結果と既知の LigAB および DesB の複合体構造から、これら残基が 3MGA のカルボキシ基を認識する部位と予想され、DesB の Tyr391'、Tyr412' および Thr267 の役割を受け持っていることが示唆される。Tyr391'、Tyr412' は DesB の活性中心の蓋 にあたる部分 (DesB の C 末端側 = LigA に対応するドメイン) に存在している。LigAB では DesZ および DesB のこれらの残基の役割を LigA の Phe103' が担うと考えられるが、

Phe103' は基質のカルボキシ基ではなく芳香環部分を π スタックする形で安定化させているという違いがある。また、既に複合体構造が報告されている Type I のジオキシゲナーゼである HPCD が DesZ の R26 および R315 と類似した働きをされると考えられる R243 と R293 を持っていたが (図 3-4-7)、DesZ は HPCA に対する酵素活性を持たなかった。

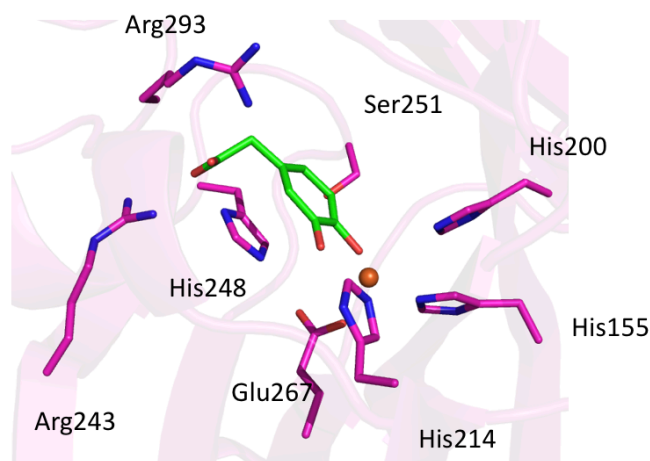


図 3-4-7 HPCD の基質複合体構造 (PDB : 4GHG)

HPCD の基質複合体構造 (基質は HPCA). R243 と R293 が HPCA のカルボキシ基側に存在している。

また、P132E 変異体は DesB-Gallate 複合体構造において Glu377' の位置に対応する DesZ の Pro132 を Glu に置換した変異体であるが、この変異体では Gallate に対する酵素活性が 3MGA に対する酵素活性よりも比較的高いことが示された。

第 4 章 考察

第4章 考察

DesZ は *Sphingobium* sp. SYK-6 株の代謝経路において 3MGA の芳香環開裂を触媒する Extradial 型ジオキシゲナーゼで、Type II-Class III に分類される。SYK-6 株においては芳香環開裂を触媒する Type II-Class III の Extradial 型ジオキシゲナーゼが DesZ の他に 3 種類 (LigZ・LigAB・DesB) 同定されており、このうち DesZ と最も高いアミノ酸配列相同性を持つ LigZ は SYK-6 株の代謝経路の上流においてビフェニル構造をもつ OH-DDVA の開裂を触媒する。また、LigAB・DesB とのアミノ酸配列相同性は LigZ より低い、それらの基質は PCA、Gallate など、DesZ と共通する、あるいは類似した構造の基質を触媒する事が可能である。DesZ と LigAB・DesB は SYK-6 株の Syringate 代謝系において協働するが、DesZ の 3MGA に対する活性は LigAB・DesB の PCA、Gallate に対する酵素活性と比較して低いことが示されている。本研究では、これら酵素の違いを構造的な視点から明らかにするため、DesZ の X 線結晶構造解析を行い、その結果を基に活性に関与すると予測される残基に変異を導入して活性の測定を行った。

本研究において得られた DesZ 結晶構造の活性中心には鉄イオンではなくカルシウムイオンが配位していること、クリスタルパッキングにおいてカルシウムイオンが結晶構造の安定に寄与していることが示唆された。DesZ と基質および基質アナログとの複合体結晶は得られなかったが、この理由として配位している金属イオンが原因となっている可能性が考えられる。つまり、ソーキングによりカルシウムイオンが結晶から抜けた場合には結晶のパッキングが壊れ、溶ける・もしくは反射が消失してしまうが、安定した結晶構造ではカルシウムイオンが活性中心に存在するために複合体構造をとれない可能性が考えられるため、本研究で構造解析に用いた結晶化条件においては DesZ-基質複合体結晶を得ることは非常に困難であることが推測された。DesZ の結晶化についてはスクリーニングの時点で既に多くの結晶化条件について検討済みであり、少なくとも現在の発現コンストラクトから得た遺伝子改変を加えない全長の DesZ についてはカルシウムを含む結晶化条件がほぼ必須であることが分かっている。他にマグネシウムを含む条件で結晶が観察されたものもあったが、再現性に乏しく不安定であったため、基質特異性についての考察に必要な分解能の回折データを得るためには適さないことが想定される。今後、基質複合体結晶を得るためには活性中心に配位する金属イオンに考慮し、結晶構造安定化のための DesZ 発現コンストラクトの改変や化学的架橋などが必要となると考えられた。

また、本研究で得られた DesZ の結晶構造と LigAB および DesB との構造比較から、LigA および DesB の C 末端側ドメインで活性中心の蓋となる部分の役割を DesZ の C 末端側の約 15 残基の insertion 領域が部分的に補完していることが示された。図 4-1 に示すように、LigA および DesB の C 末端部分には基質と相互作用する残基 (橙色の文字で示された残基) が存在している。

DesZ	1	MAEIVLGIGTSHG	12	PMLV	26	QTEQWR	SRLAFDQSVNHAWRGG	77					
DesB	1	MAKIIGGFVAVSH		PTIAFAHDANK		YDDPWAPIFQGF		38					
LigB	1	MARVTTGITSSH		IPALGAAIQTGT		SDNDYWGPVFKGYQ		38					
DesZ	78	QLAEIF--SEAKIDVAVILG	96	NDOMEIF	98	FDERLVP	AFSVFYGDTITNYEFPP	132	ERMAALP	GINLSVAGYIPSGGAEYAG	152		
DesB	39	PVKQWLAE--QKPDVTFYVY		NHMTSFF		EHYSHFALGVGEEYSP				ADEGGQRDLPPKIG	95		
LigB	39	PIRDWIKQPGNMPDVVILVY		NHASAFDMNI		IPTFAIGCAETFKP				ADEGWGPRPVPDVKG	98		
DesZ	153	QPELARSIIAQAMADEFDVA		AAMKALPKPETP		HAFGFVYRRIMRDN				PVPSVPVLVNTFYPPNQPTV	184	RRRCYEFGKS	226
DesB	96	DPELAKHIAECLVADEFDL		AYWQGMGLD		HGAFSPLSVLLPHEHG				WPCRIVPLQCGVLQ		HPKARRFWNFGRS	168
LigB	99	HPDLAWHIAQSLILDEFDM		TIMNQMDVD		HGCTVPLSMIFGEPEE				WPCVKVIFFPVNVVT		YPPPSGKRCFALGDS	171
DesZ	227	VLRGIQAWESDARVAVLAS		GGLTF	250	FVIDEEI				DRLFFQAMEDRDIARLADL		GEAIFQD	292
DesB	169	LRRAIQSYPRDIKVAIAGT		GGLSH	250	QVHGERAGFNTEWDM				EFMERLANDP		ESLLGATVTDLAKKGG	244
LigB	172	IRAAVESFPEDLNVHVWG		TGGMSS	250	HQLQGP				PRAGLINKEFDLNFIDKL		ISDP	247
DesZ	293	PLAGMMAELGLDHEILDY		VPCYR	315	SEAGT	322	Q		NAMGFVCWR*			330
DesB	245	LMRGALSPEVKTLHQSYFL		PSMTA		IATMLFEDQGD				AAPPAESDEALRARAKRE		LAGVEEIEGTYPTID	313
LigB	248	IMRGALPEKVRDLTYFYHI		PASNTA		LGAMILQP				EETAGTPEPRKVM		SGHS	302
LigA	1											MTEKKERIDVHAYLAE	29
DesB	314	RAVKGFRINHFLHRLIEP		DFRKR		FVEDPEGLFAESDLTE				EEKSLIRNRDWIGMIHY		GVIFFML	390
LigA	30	RARKGYNLNQFAMSLMKA		ENRERFKADESAYLDE		WNLT				TPAAKAAVLARDY		NAMIDEGGNVYFL	106
DesB	391	AAFRGLSVPEFQKTR				NAAIT				Y		SVAGKQ*	418
LigA	107	AGSMTGMTQEYEQMMID		GGRSPAGVRSIKGGY*									139

図 4-1 DesZ、DesB および LigAB において活性に関与する残基

DesZ、DesB および LigAB において活性に関与する残基をシーケンズアラインメント上に示した。アラインメント上に記入した数字は DesZ の残基番号を示す。赤字で示した残基は活性中心で金属を配位する残基を、青字で示した残基は DesB および LigB では基質のカルボキシ基と相互作用する残基を、橙色で示した残基はカルボキシ基以外の基質原子と相互作用する残基を示した (DesZ では予測される残基を示す)。DesZ の insertion 領域は緑文字で示した。

DesZ の結晶構造の活性中心と LigAB および DesB の活性中心を比較すると、DesZ では His12/His184/Glu287 が金属イオンと配位しており、これらの残基の位置は LigAB および DesB の His12/His127/Glu242 および His12/His124/Glu239 に対応していたが、LigAB および DesB では His184 に相当する位置にある His127 および His124 は触媒残基として

機能し、鉄イオンとは配位していない残基であった。また、DesZ 結晶構造では金属イオンと配位する残基の配位距離が LigAB および DesB と鉄イオンとの配位距離に比べて長く、その配向も DesZ では両三角錐を保ってはいなかった。また、DesZ の His250 は LigAB と DesB の触媒残基であるヒスチジン(His195 および His192)に重なる位置にあった。金属イオンとの配位については先述の残基の他に、DesB において嫌気条件下で基質複合体を形成する際に活性中心に配位する鉄イオンが R-site から A-site に移動するという報告があるが(Sugimoto et al., 2014)、DesB の R-site で鉄イオンの配位に関わる Asn57 に相当する位置には DesZ の Asn96 が存在した。

本研究においては DesZ-基質複合体構造を得ることはできなかったが、野生型と変異体の酵素活性を比較することにより、DesZ の基質および金属イオンとの相互作用様式について考察を行った。まず、触媒残基および金属イオンと配位する残基についての変異体を作製し、その 3MGA に対する活性を測定した。LigAB/DesB の触媒残基として機能するヒスチジン(His195/His192 に対応する His250)をアラニンに置換した変異体では活性がほとんどもしくは完全に消失したことから、DesZ においても His250 は触媒残基としての機能を持つことが考えられた。また、Gln98 および DesZ 結晶構造において活性中心で金属イオンと配位していた残基 (His12-His184-Glu287)についても同様、どれひとつをアラニンに置換しても活性がほぼ消失する結果であった。DesB の R-site で鉄イオンの配位に関わる Asn57 に相当する位置にある Asn96 についてもアラニンに置換した変異体で活性が大きく低下したことから、DesZ においても N96 残基が R-site を構成し、金属イオンとの配位に関わる役割を持っている可能性が示唆される。

また、DesZ 構造と LigAB・DesB の基質複合体構造との重ね合わせ比較により、基質のカルボキシ基を認識するアミノ酸残基 (図 4-1 の青字で示した残基) がこれらのジオキシゲナーゼ間では保存されておらず、アミノ酸配列解析からは予測ができないことがわかった。DesZ でこのカルボキシ基と相互作用すると予測される位置にあるのは Arg26 および Arg315 残基で、これは LigAB や DesB よりもむしろ Type I ジオキシゲナーゼに属する HPCD が基質である HPCA のカルボキシ基を認識する残基と類似していた。DesZ と HPCD は Type が異なるジオキシゲナーゼであることからアラインメント上では配列相同性が見いだせないが、HPCD が HPCA のカルボキシ基と相互作用する残基もアルギニン 2 残基である (他に Type I - Class II ジオキシゲナーゼに属する BphC の結晶構造ではこれらに近い位置にイソロイシン 2 残基が存在し、基質である 2,3-dihydroxybiphenyl はここで問題とされているカルボキシ基を持たない)。このことから、DesZ も HPCA を基質とする酵素活性を持つのではないかと考え、酵素活性の測定を行ったが、DesZ は

HPCA に対する酵素活性を示さなかった。しかし DesZ の Arg26 および Arg315 残基は活性にとって必須であり、どちらか片方に変異を導入しても酵素活性は消失した。

これまでの報告と本研究での結晶構造および活性測定の結果から活性型 DesZ の基質複合体構造モデルを予測すると、DesZ の Gln98 は一次構造配列解析、重ね合わせた立体構造の Ca 位置のいずれにおいても LigAB/DesB で鉄イオンに配位する残基である His61/His59 に対応していたが、DesZ 構造中では金属イオンに配位していなかったこと、DesZ の His184 は LigAB/DesB の触媒残基で鉄イオンとは直接配位しない His127/His124 に対応するが、DesZ 結晶構造中では金属イオンと配位しており、これに代わって触媒反応を担うことが可能な残基が必要な距離範囲内に存在しないこと、また、DesZ においても触媒残基と予測される His250 の位置や 3MGA のカルボキシ基を認識すると思われる Arg26/Arg315 を含めて LigAB および DesB の基質複合体構造との位置対応を考慮に入れると、ネイティブ状態の活性型 DesZ で実際に鉄イオンと配位する残基は His12-Gln98-Glu287 である必要がある。これらのことから、今回得られた DesZ 結晶構造の金属配位状態はカルシウムイオン配位型の不活性な状態であることによるものと考えられた。これらの結果と既に報告された LigAB, DesB の基質複合体から導き出した DesZ の基質複合体構造予測モデルを図 4-2 に示す。

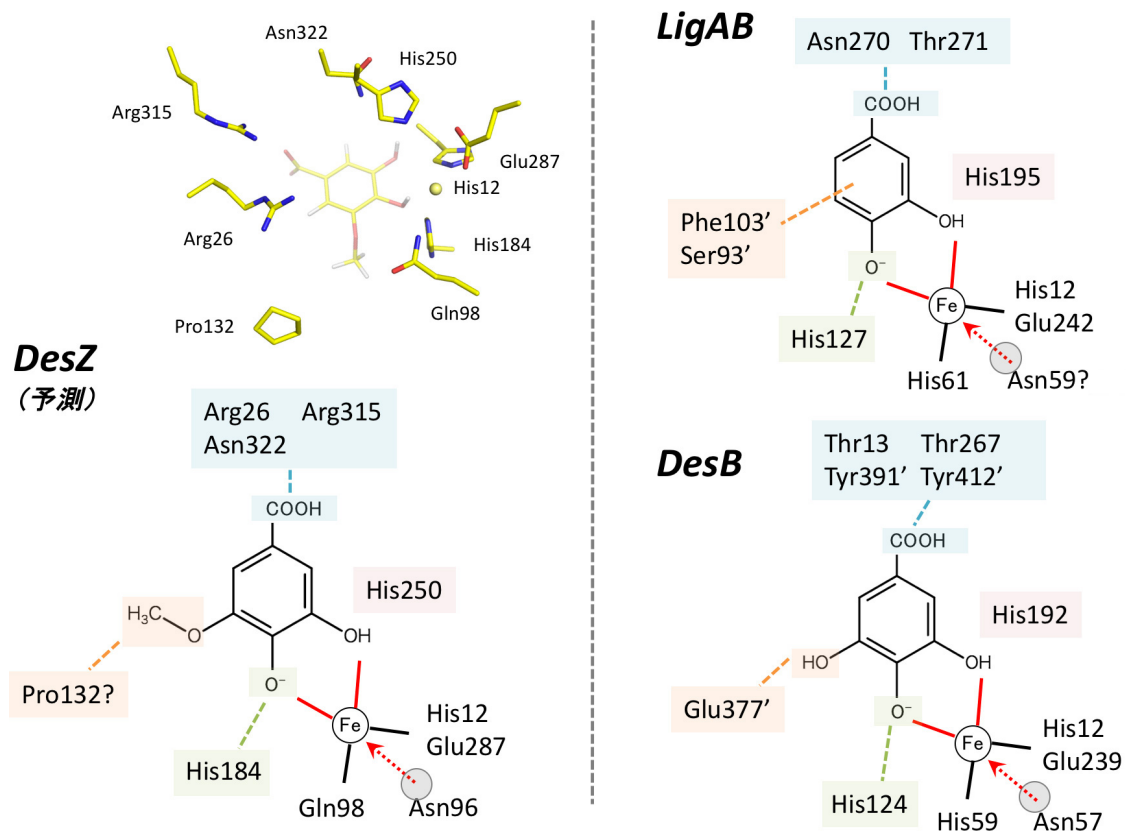


図 4-2 DesZ の基質複合体構造予測モデル

DesZ の基質複合体構造の活性中心の予測モデルおよび模式図と、既に報告された複合体構造による LigAB, DesB の基質複合体の活性中心の模式図を示す。青で囲まれた残基は DesB および LigB では基質のカルボキシ基と相互作用する残基を、橙色で示した残基はカルボキシ基以外の基質部位と相互作用する残基を示した。(DesZ では予測される残基を示す)。

また、DesZ の Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)による検索結果 (表 4-1) でリストアップしたアミノ酸配列を用いて配列解析 (図 4-3)を行った結果およびこれに基づいて作成した系統樹 (図 4-4)から、TypeII-ClassIII ジオキシゲナーゼには DesZ 同様の挿入配列を持ち、Arg26、Arg315 に対応する残基が保存された対象未知のジオキシゲナーゼ群と予想されるサブグループが存在することが示唆された。このサブグループでは、これらの残基は基質と相互作用し、活性中心における基質の位置を安定させる役割を持つことが予測される。また、このサブグループはさらに a) DesZ および

LigZ の Gln98 および Asn96 に相当するアミノ酸残基が保存され、His-Gln-Glu 金属配位モチーフを持つグループ、b) DesZ の Gln98 に相当するアミノ酸残基は His として保存されるが、DesZ で Asn96 に相当する残基が Ser として存在し、His-His-Glu 金属配位モチーフを持つことが予測されるグループが存在することが判明した。また、b)に含まれる生物種はここに示した限りでは全て high GC グラム陽性菌が占めていた。これらのサブグループについての模式図を図 4-5 に示す。

表 4-1 DesZ の Protein BLAST による検索結果

			Identities (%)	Positives (%)	Length	e-value
DZ-1	Novosphingobium sp. MD-1	GAO53369.1	64.242	80.91	330	8.57E-160
DZ-3	Sphingomonas hengshuiensis	WP_044332785.1	63.333	77.88	330	1.24E-156
DZ-4	Cupriavidus pinatubonensis	WP_011301880.1	58.788	76.36	330	5.80E-144
DZ-5	Pandoraea oxalativorans	WP_046290763.1	59.091	76.97	330	6.04E-143
DZ-7	Paraburkholderia bannensis	WP_027818904.1	58.182	74.85	330	3.36E-139
DZ-9	Burkholderia sp. JPY251	WP_026228572.1	56.667	75.15	330	1.04E-137
DZ-10	Paraburkholderia ferrariae	WP_028228540.1	57.273	74.55	330	2.80E-137
DZ-12	Burkholderia sp. WSM4176	WP_035471857.1	56.364	73.64	330	9.25E-137
DZ-14	Nocardia sienata	WP_063062875.1	58.209	74.03	335	8.41E-133
DZ-16	Sphingomonas wittichii	WP_012049260.1	52.071	65.09	338	1.88E-112
DZ-17	Gammaproteobacteria bacterium RIFCSPLOWO2_02_FULL_56_15	OGT75717.1	50	67.26	336	2.50E-112
DZ-19	Acidobacteria bacterium 13_1_40CM_2_56_5	OLD57575.1	48.214	66.37	336	1.16E-110
DZ-20 (LigZ)	LigZ	WP_014075098.1	45.833	65.48	336	8.50E-106
DZ-21	Bordetella sp. SCN 67-23	ODS75664.1	47.041	64.5	338	1.45E-105
DZ-22	Sphingomonas sp. Leaf357	WP_055779812.1	46.726	64.29	336	4.40E-105
DZ-23	Betaproteobacteria bacterium RIFCSPLOWO2_02_FULL_62_17	OGA01546.1	47.478	61.42	337	2.82E-103
DZ-25	Beijerinckia sp. 28-YEA-48	SED48155.1	43.713	61.68	334	6.15E-102
DZ-26	Pandoraea sputorum	AJC17894.1	46.588	60.83	337	5.08E-99
DZ-29	Aminobacter aminovorans	WP_067967568.1	44.91	61.68	334	6.23E-97
DZ-30	Lautropia sp. SCN 66-9	ODU67202.1	46.608	64.6	339	8.08E-97
DZ-32	Rhizobiales bacterium GAS113	SDR34382.1	44.478	62.39	335	2.04E-96
DZ-33	Microbispora sp. GMKU363	WP_055482056.1	45.238	64.58	336	4.36E-96
DZ-36	Microtetraspora niveoalba	WP_067180101.1	44.048	63.69	336	1.51E-94
DZ-39	Pandoraea norimbergensis	WP_058376297.1	45.104	59.94	337	8.34E-93
DZ-40	Pandoraea pnomenus	WP_039366532.1	43.195	60.06	338	2.29E-92
DZ-41	Bordetella sp. SCN 67-23	ODS75689.1	44.643	60.12	336	4.14E-92
DZ-44	Pandoraea sputorum	AJC19144.1	44.214	60.83	337	9.53E-90
DZ-43	Burkholderia sp. GAS332	WP_074286553.1	42.985	59.4	335	1.16E-89
DZ-45	Pandoraea pulmonicola	AJC20152.1	43.027	59.35	337	2.64E-87
DZ-47	Streptomyces sp. Ach 505	WP_041992788.1	42.478	62.83	339	1.07E-86
DZ-48	Kibdelosporangium phytohabitans	WP_054294118.1	42.433	60.53	337	6.04E-86
DZ-49	Microbacterium azadiractae	WP_045249429.1	40.95	60.53	337	9.30E-86
DZ-52	Amycolatopsis rubida	SFO52550.1	41.246	59.64	337	1.18E-84
DZ-53	Amycolatopsis sp. M39	WP_067580795.1	41.246	59.64	337	1.82E-84
DZ-54	Streptomyces sp. AA4	WP_009081888.1	40.653	60.53	337	4.78E-84

Protein BLAST を用いて DesZ とアミノ酸配列相同性の高いタンパク質を検索し、アミノ酸相同性が約 40% までのタンパク質 (ゲノムデータから予測されたタンパク質を含む)をリストアップした結果を示す。

また、これらのタンパク質について系統樹を作製した結果を図 4-4 に示す。

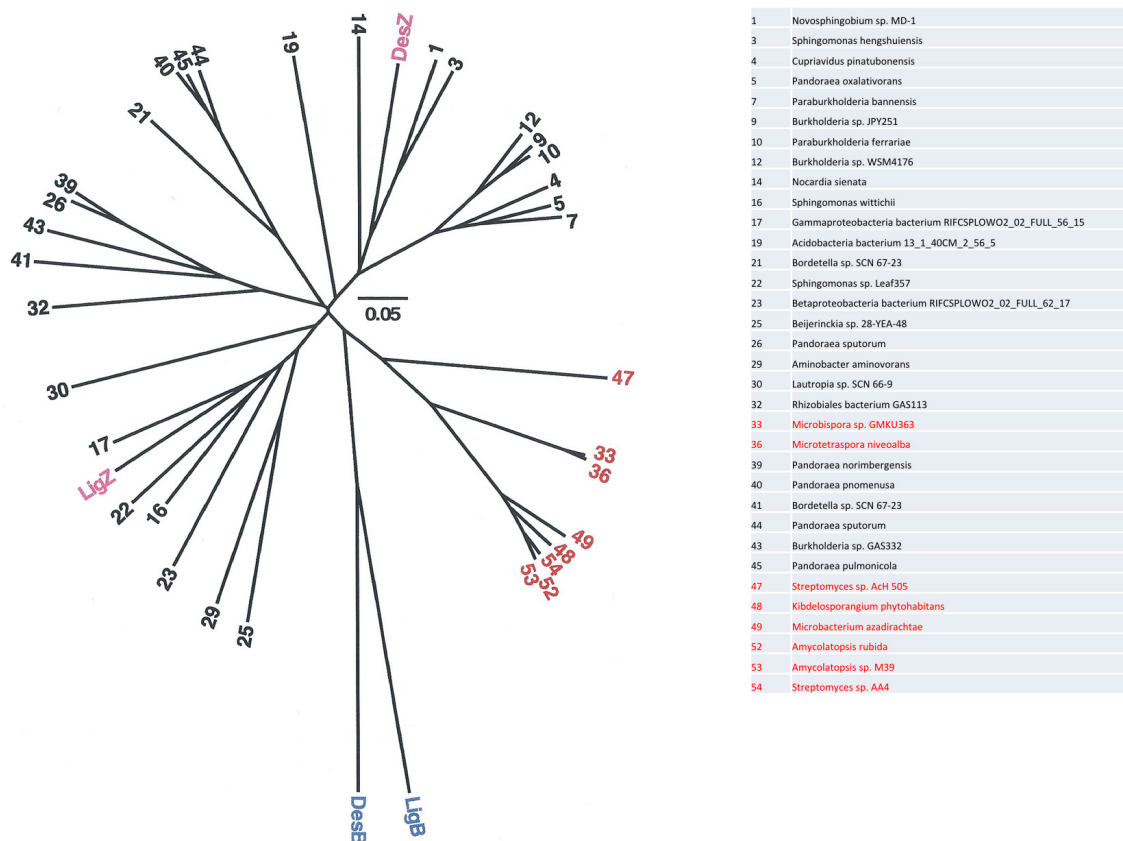


図 4-4 DesZ のアミノ酸配列解析結果による系統樹

Protein BLAST を用いた検索結果から得られた系統樹。右は生物種の凡例表。表に黒字で記載した種は a) DesZ および LigZ の Gln98 および Asn96 に相当するアミノ酸残基が保存され、His-Gln-Glu 金属配位モチーフを持つグループを、赤字は b) DesZ の Gln98 に相当するアミノ酸残基は His として保存されるが DesZ で Asn96 に相当する残基が Ser として存在し、His-His-Glu 金属配位モチーフを持つことが予測されるグループを示す。

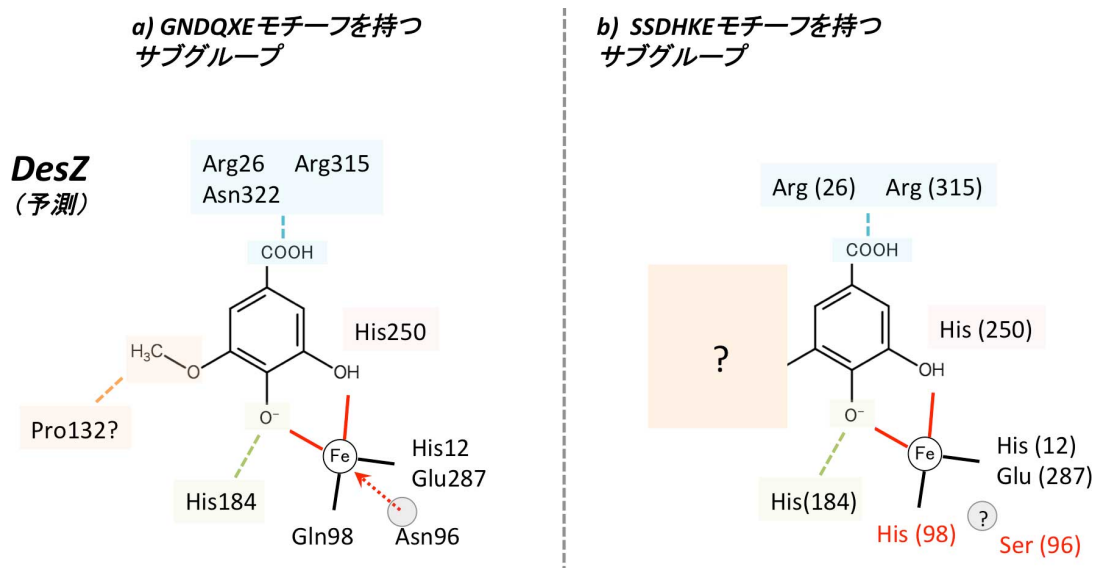


図 4-5 TypeII-ClassIII ジオキシゲナーゼの新規サブグループの活性中心予想模式図

a) DesZ および LigZ の Gln98 および Asn96 に相当するアミノ酸残基が保存され、His-Gln-Glu 金属配位モチーフを持つ (GNDQXE モチーフを持つ) グループ, b) DesZ の Gln98 に相当するアミノ酸残基は His として保存されるが、DesZ で Asn96 に相当する残基が Ser として存在し、His-His-Glu 金属配位モチーフを持つ (SSDHKE モチーフを持つ) ことが予測されるグループの活性中心について構築した予測モデルを示す。それぞれのアミノ酸残基に付記した数字は DesZ のアミノ酸残基番号に対応させた。

本研究においては、得られた DesZ の X 線結晶構造は活性中心にカルシウムイオンを配位しており、Native の状態の鉄イオン配位型ではなかったが、DesZ 野生型および活性に影響を及ぼすと考えられる残基に変異を導入した変異体の活性測定結果を利用し、DesZ-3MGA の複合体モデルを予測する事ができた。また、構築された DesZ-3MGA 複合体予想モデルと DesZ アミノ酸配列を用いた BLAST 結果のシークエンスアライメントから、TypeII-ClassIII ジオキシゲナーゼには新規サブグループが存在し、DesZ および LigZ は金属配位モチーフがこれまで一般的に考えられてきた His-His-Glu ではなく、His-Gln-Glu という新規モチーフを持つサブグループに属することが示唆された。このように、アミノ酸配列相同性だけでは予測できない基質特異性の差違に起因する保存されたアミノ酸残基が結晶構造から明らかにされていくことで、今後も基質特異性とその反応機構についてだけではなく、ジオキシゲナーゼの分類や進化に関してもさらなる深い理解が得られることと期待される。

参考文献

Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH.

PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010 Feb;66(Pt 2):213-21.

Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH, Adams PD.

Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2012 Apr;68(Pt 4):352-67.

Arciero DM, Lipscomb JD.

Binding of ¹⁷O-labeled substrate and inhibitors to protocatechuate 4,5-dioxygenase-nitrosyl complex. Evidence for direct substrate binding to the active site Fe²⁺ of extradiol dioxygenases.

J Biol Chem. 1986 Feb 15;261(5):2170-8.

Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabañas A, Manzanares P, Ballesteros M.

Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw.

Appl Biochem Biotechnol. 2006 Spring;129-132:496-508.

Barry KP, Taylor EA.

Characterizing the promiscuity of LigAB, a lignin catabolite degrading extradiol dioxygenase from *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6.

Biochemistry. 2013 Sep 24;52(38):6724-36.

Barry KP, Ngu A, Cohn EF, Cote JM, Burroughs AM, Gerbino JP, Taylor EA.

Exploring allosteric activation of LigAB from *Sphingobium* sp. strain SYK-6 through kinetics, mutagenesis and computational studies.

Arch Biochem Biophys. 2015 Feb 1;567:35-45.

Cho HJ, Kim K, Sohn SY, Cho HY, Kim KJ, Kim MH, Kim D, Kim E, Kang BS.

Substrate binding mechanism of a type I extradiol dioxygenase.

J Biol Chem. 2010 Nov 5;285(45):34643-52.

Costas M, Mehn MP, Jensen MP, Que L Jr.

Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates.

Chem Rev. 2004 Feb;104(2):939-86.

Eltis LD, Bolin JT.

Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases.

J Bacteriol. 1996 Oct;178(20):5930-7.

Emerson JP, Kovaleva EG, Farquhar ER, Lipscomb JD, Que L Jr.

Swapping metals in Fe- and Mn-dependent dioxygenases: evidence for oxygen activation without a change in metal redox state.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 May 27;105(21):7347-52.

Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K.

Features and development of Coot.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010 Apr;66(Pt 4):486-501.

Evans G, Pettifer R.F.

CHOOCH: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra.

J Appl Crystallogr. 2001 Feb; 34(Pt 1):82-86.

Evans PR, Murshudov GN.

How good are my data and what is the resolution?

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2013 Jul ;69U(Pt 7):1204-1214.

Fielding AJ, Lipscomb JD, Que L Jr.

A two-electron-shell game: intermediates of the extradiol-cleaving catechol dioxygenases.

J Biol Inorg Chem. 2014 Jun;19(4-5):491-504.

Frey PA, Hegeman AD.

Enzymatic Reaction Mechanisms.

OXFORD UNIVERSITY PRESS. 2007.

Gray KA, Zhao L, Emptage M.

Bioethanol.

Curr Opin Chem Biol. 2006 Apr;10(2):141-6.

Han S, Eltis LD, Timmis KN, Muchmore SW, Bolin JT.

Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading pseudomonad.

Science. 1995 Nov 10;270(5238):976-80.

Hara H, Masai E, Katayama Y, Fukuda M.

The 4-oxalomesaconate hydratase gene, involved in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway, is essential to vanillate and syringate degradation in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6.

J Bacteriol. 2000 Dec;182(24):6950-7.

Harayama S, Reik M.

Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families.

J Biol Chem. 1989 Sep 15;264(26):15328-33.

Higuchi T.

Formation and biological degradation of lignins.

Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1971;34:207-83.

Hiraki M, Kato R, Nagai M, Satoh T, Hirano S, Ihara K, Kudo N, Nagae M, Kobayashi M, Inoue M, Uejima T, Oda S, Chavas LM, Akutsu M, Yamada Y, Kawasaki M, Matsugaki N, Igarashi N, Suzuki M, Wakatsuki S.

Development of an automated large-scale protein-crystallization and monitoring system for high-throughput protein-structure analyses.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2006 Sep;62(Pt 9):1058-65.

Howell PL, Smith GD.

Identification of heavy-atom derivatives by normal probability methods
J Appl Crystallogr. 1992 Feb 1;25(Pt 1):81-86.

Jensen J, Sverdrup LE.

Polycyclic aromatic hydrocarbon ecotoxicity data for developing soil quality criteria.
Rev Environ Contam Toxicol. 2003;179:73-97.

Kabsch W.

Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement
Acta Crystallogr D Struct Biol. 2010 Feb ;66(Pt 2):133-144.

Kantardjieff KA, Rupp B.

Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA,
and protein-nucleic acid complex crystals.
Protein Sci. 2003 Sep;12(9):1865-71.

Kasai D, Masai E, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M.

Characterization of the 3-O-methylgallate dioxygenase gene and evidence of multiple
3-O-methylgallate catabolic pathways in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6.
J Bacteriol. 2004 Aug;186(15):4951-9.

Kasai D, Masai E, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M.

Characterization of the gallate dioxygenase gene: three distinct ring cleavage dioxygenases are
involved in syringate degradation by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6.
J Bacteriol. 2005 Aug;187(15):5067-74.

Katayama Y, Nishikawa S, Murayama A, Yamasaki M, Morohoshi N, Haraguchi T.

The metabolism of biphenyl structures in lignin by the soil bacterium (*Pseudomonas
paucimobilis* SYK-6)
FEBS Lett. 1988 Jun ;233(1):129-133.

Kovaleva EG, Lipscomb JD.

Crystal structures of Fe²⁺ dioxygenase superoxo, alkylperoxo, and bound product intermediates.

Science. 2007 Apr 20;316(5823):453-7.

Krissinel E, Henrick K.

Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2004 Dec; 60(Pt 12 Pt 1):2256-2268.

Krissinel E, Henrick K.

Inference of macromolecular assemblies from crystalline state.

J Mol Biol. 2007 Sep 21;372(3):774-97.

Lin Y, Tanaka S.

Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects.

Appl Microbiol Biotechnol. 2006 Feb;69(6):627-42.

Lipscomb JD.

Mechanism of extradiol aromatic ring-cleaving dioxygenases.

Curr Opin Struct Biol. 2008 Dec;18(6):644-9.

Masai E, Katayama Y, Nishikawa S, Yamasaki M, Morohoshi N, Haraguchi T.

Detection and localization of a new enzyme catalyzing the beta-aryl ether cleavage in the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6).

FEBS Lett. 1989 Jun 5;249(2):348-52.

Masai E, Katayama Y, Kawai S, Nishikawa S, Yamasaki M, Morohoshi N.

Cloning and sequencing of the gene for a *Pseudomonas paucimobilis* enzyme that cleaves beta-aryl ether.

J Bacteriol. 1991 Dec;173(24):7950-5.

Masai E, Shinohara S, Hara H, Nishikawa S, Katayama Y, Fukuda M.

Genetic and biochemical characterization of a 2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid hydrolase

involved in the protocatechuate 4, 5-cleavage pathway of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6.
J Bacteriol. 1999 Jan;181(1):55-62.

Masai E, Katayama Y, Fukuda M.

Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds.

Biosci Biotechnol Biochem. 2007 Jan;71(1):1-15.

Matthews BW.

Solvent content of protein crystals.

J Mol Biol. 1968 Apr 28;33(2):491-7.

Mbughuni MM, Meier KK, Münck E, Lipscomb JD.

Substrate-mediated oxygen activation by homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: intermediates formed by a tyrosine 257 variant.

Biochemistry. 2012 Nov 6;51(44):8743-54.

McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ.

Phaser crystallographic software.

J Appl Crystallogr. 2007 Aug 1;40(Pt 4):658-674.

Mendel S, Arndt A, Bugg TD.

Acid-base catalysis in the extradiol catechol dioxygenase reaction mechanism: site-directed mutagenesis of His-115 and His-179 in *Escherichia coli* 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase (MhpB).

Biochemistry. 2004 Oct 26;43(42):13390-6.

Nishikawa S, Sonoki T, Kasahara T, Obi T, Kubota S, Kawai S, Morohoshi N, Katayama Y.

Cloning and sequencing of the *Sphingomonas (Pseudomonas) paucimobilis* gene essential for the O demethylation of vanillate and syringate.

Appl Environ Microbiol. 1998 Mar;64(3):836-42.

Noda Y, Nishikawa S, Shiozuka K, Kadokura H, Nakajima H, Yoda K, Katayama Y, Morohoshi N, Haraguchi T, Yamasaki M.

Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*.
J Bacteriol. 1990 May;172(5):2704-9.

Peng X, Egashira T, Hanashiro K, Masai E, Nishikawa S, Katayama Y, Kimbara K, Fukuda M.
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. 1998 Jul;64(7):2520-7.

Peng X, Masai E, Katayama Y, Fukuda M.
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. 1999 Jun;65(6):2789-93.

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA,
<http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.

Read RJ, Schierbeek AJ.
A phased translation function
J Appl Crystallogr. 1988 Oct 1;21(Pt 5):490-495.

Sato N, Urugami Y, Nishizaki T, Takahashi Y, Sasaki G, Sugimoto K, Nonaka T, Masai E,
Fukuda M, Senda T.
Crystal structures of the reaction intermediate and its homologue of an extradiol-cleaving
catecholic dioxygenase.
J Mol Biol. 2002 Aug 23;321(4):621-36.

Senda M, Kishigami S, Kimura S, Senda T.
Crystallization and preliminary X-ray analysis of the reduced Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin
derived from *Pseudomonas* sp. strain KKS102.
Acta Cryst. (2007). F63, 311–314

Senda T, Sugiyama K, Narita H, Yamamoto T, Kimbara K, Fukuda M, Sato M, Yano K, Mitsui Y.

Three-dimensional structures of free form and two substrate complexes of an extradiol ring-cleavage type dioxygenase, the BphC enzyme from *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *Mol Biol.* 1996 Feb 9;255(5):735-52.

Spence EL, Kawamukai M, Sanvoisin J, Braven H, Bugg TD.

Catechol dioxygenases from *Escherichia coli* (MhpB) and *Alcaligenes eutrophus* (MpcI): sequence analysis and biochemical properties of a third family of extradiol dioxygenases.

J Bacteriol. 1996 Sep;178(17):5249-56.

Stivala A, Wybrow M, Wirth A, Whisstock JC, Stuckey PJ.

Automatic generation of protein structure cartoons with Pro-origami.

Bioinformatics. 2011 Dec 1;27(23):3315-6.

Sugimoto K, Senda T, Aoshima H, Masai E, Fukuda M, Mitsui Y.

Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4,5-dioxygenase, under aerobic conditions.

Structure. 1999 Aug 15;7(8):953-65.

Sugimoto K, Senda M, Kasai D, Fukuda M, Masai E, Senda T.

Molecular mechanism of strict substrate specificity of an extradiol dioxygenase, DesB, derived from *Sphingobium* sp. SYK-6.

PLoS One. 2014 Mar 21;9(3):e92249.

Sugiyama K, Narita H, Yamamoto T, Senda T, Kimbara K, Inokuchi N, Iwama M, Irie M, Fukuda M, Yano K, Mitsui Y.

Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain KKS102 having polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading activity.

Proteins. 1995 Jul;22(3):284-6.

Ten Eyck LF.

Crystallographic fast Fourier transforms

Acta Crystallogr A. 1973 Mar ;29(Pt 2):183-191.

Terwilliger TC, Grosse-Kunstleve RW, Afonine PV, Moriarty NW, Zwart PH, Hung LW, Read RJ, Adams PD.

Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008 Jan;64(Pt 1):61-9.

Terwilliger TC, Adams PD, Read RJ, McCoy AJ, Moriarty NW, Grosse-Kunstleve RW, Afonine PV, Zwart PH, Hung LW.

Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2009 Jun;65(Pt 6):582-601.

Uragami Y, Senda T, Sugimoto K, Sato N, Nagarajan V, Masai E, Fukuda M, Mitsu Y.

Crystal structures of substrate free and complex forms of reactivated BphC, an extradiol type ring-cleavage dioxygenase.

J Inorg Biochem. 2001 Feb;83(4):269-79.

Vaillancourt FH, Barbosa CJ, Spiro TG, Bolin JT, Blades MW, Turner RF, Eltis LD.

Definitive evidence for monoanionic binding of 2,3-dihydroxybiphenyl to 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from UV resonance Raman spectroscopy, UV/Vis absorption spectroscopy, and crystallography.

J Am Chem Soc. 2002 Mar 20;124(11):2485-96.

Vaillancourt FH, Bolin JT, Eltis LD.

The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases.

Crit Rev Biochem Mol Biol. 2006 Jul-Aug;41(4):241-67.

Vicuña R, Gonzalez B, Ruttimann C, Sapag A, Seelenfreund D.

Biochemical and genetic studies of bacteria metabolizing lignin-related compounds.

Arch Biol Med Exp (Santiago). 1988 Jun;21(1):247-55.

Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AG, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS.

Overview of the CCP4 suite and current developments.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2011 Apr;67(Pt 4):235-42.

Zheng H, Cooper DR, Porebski PJ, Shabalin IG, Handing KB, Minor W.

CheckMyMetal: a macromolecular metal-binding validation tool.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2017 Mar 1;73(Pt 3):223-233.

Narita H (成田 裕樹)

「PCB 分解酵素 BphC の立体構造と機能」

修士論文 (長岡技術科学大学), 1996

Taguchi K (田口 和之)

「ポリ塩化ビフェニル代謝系開裂酵素の改変と機能の解析」

修士論文 (長岡技術科学大学), 1996

Mizumoto A(水本 歩)

「リグニン分解経路に存在する酵素 Protocatehuate(PCA) 4,5-dioxygenase(LigAB)の触媒反応機構解析」

修士論文 (長岡技術科学大学), 2001

Appendix. A 使用した試薬および機器

大腸菌培養関連試薬

Agar powder ... Wako

Ampicillin Sodium ... Wako

Bacto Tryptone ... Difco Laboratories

Bacto Yeast Extract ... Difco Laboratories

Isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside [IPTG] ... Wako

Potassium Dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) ... Wako

Sodium Chloride (NaCl) ... Wako

Disodium Hydrogenphosphate 12-Water (Na_2HPO_4) ... Wako

Ammonium chloride (NH_4Cl) ... Wako

Thiamin Hydrochloride... Wako

Magnesium sulfate (MgSO_4) ... Wako

Iron(III) Chloride Hexahydrate, 99.9% ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ... Wako

Glucose ... Wako

Buffer 調製用試薬

Acetic acid ... Wako

Ammonium Sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ... nacalai tesque

Bovine Serum Albumin [BSA] ... Wako

2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic Acid [HEPES] ... Dojindo

2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate [MES] ... Dojindo

L-cysteine hydrochloride ... SIGMA-ALDRICH

Potassium Chloride (KCl) ... nacalai tesque

Potassium Dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) ... Wako Pure Chemical Industries

Sodium Acetate (CH_3COONa) ... Wako

Sodium Hydroxide (NaOH) ... Wako

Sodium Chloride (NaCl) ... Wako

Tris (hydroxymethyl) aminomethane Nuclease and Protease tested [Tris] ... nacalai tesque

DNA 操作関連試薬

Agarose S ... Wako

Competent Cells BL21(DE3) ... Novagen
Competent Cells BL21(DE3)pLysS ... Novagen
Competent Cells *E. coli* DH5α ... TAKARA
DNA Ladder Marker (200 bp, 1Kbp) ... TAKARA
Ethanol ... Wako
In-Fusion HD Cloning Kit ... Clontech
Isopropanol ... Wako
KOD -Plus- ... TOYOBO
Ligation high Ver.2 ... TOYOBO
pET21, pET44 Vector ... Novagen
PfuUltra High-Fidelity DNA polymerase AD ... Agilent Technologies
pGEX6P Vector ... GE Healthcare
QIAprep[®] Spin Miniprep Kit ... QIAGEN
QIAquick[®] Gel Extraction Kit ... QIAGEN
Quick Taq[®] HS DyeMix ... TOYOBO
全ての制限酵素および反応用 Buffer ... TAKARA
トリス-酢酸-EDTA 緩衝液 (50 倍濃縮) [TAE Buffer] pH 8.3 ... nacalai tesque

プライマー ... ユーロフィンジェノミクスによる注文生産品を用いた

[シーケンス用プライマー]

T7 promoter (20 mer)

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

T7 terminator (21 mer)

5'-ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

pGEX 5' Sequencing Primer (23 mer)

5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'

pGEX 3' Sequencing Primer (23 mer)

5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'

[発現ベクター調製用プライマー]

pETHP/desZ infusion 用 (+) : (35 mer)

5'-CCAGGGGCCCGGATCCATGGCTGAGATCGTCCTTG-3'

pETHP/desZ infusion 用 (-) : (35 mer)

5'-CGATGGTACCGTCGACTCATCGCCAGCAGACGAAA-3'

pGEX6P-1/desZ infusion 用 (+) : (35 mer)

5'-GGGGCCCCTGGGATCCATGGCTGAGATCGTCCTTG-3'

pGEX6P-1/desZ infusion 用 (-) : (35 mer)

5'-GATGCGGCCGCTCGAGTCATCGCCAGCAGACGAAA-3'

pGEX 6P desZ 用 (+) : *Sma*I (23 mer)

5'-AAACCCGGGAATGGCTGAGATCG-3'

pGEX 6P desZ 用 (-) : 3C protease cleavage site +6His+*Xho*I (70 mer)

5'-TTTCTCGAGGTGGTGGTGGTGGTGGGGCCCCTGGAACAGAAGCTTCCAGTCG
CCAGCAGACGAAACCC-3'

[変異体調製用プライマー]

Q98H 変異体作成用 (+) : (35 mer)

5'-CTCGGCAATGATCACATGGAGATATTCGACGAACG-3'

Q98H 変異体作成用 (-) : (35 mer)

5'-CGTTCGTCGAATATCTCCATGTGATCATTGCCGAG-3'

H250A 変異体作成用 (+) : (35 mer)

5'-CTCGGGCGGTCTCACGGCTTTCGTCATCGACGAGG-3'

H250A 変異体作成用 (-) : (35 mer)

5'-CCTCGTCGATGACGAAAGCCGTGAGACCGCCCGAG-3'

Q98A 変異体作成用 (+) : (35 mer)

5'-CTCGGCAATGATGCGATGGAGATATTCGACGAACG-3'

Q98A 変異体作成用 (-) : (35 mer)

5'-CGTTCGTCGAATATCTCCATCGCATCATTGCCGAG-3'

P132E 変異体作成用 (+) : (35 mer)

5'-GTATGGCGGCGTTGGAGCCGGGCATCAACCTGTCC-3'

P132E 変異体作成用 (-) : (35 mer)

5'-GGACAGGTTGATGCCCCGGCTCCAACGCCGCCATAC-3'

P132A 変異体作成用 (+): (35 mer)

5'-GTATGGCGGCGTTGGCACCGGGCATCAACCTGTCC-3'

P132A 変異体作成用 (-): (35 mer)

5'-GGACAGGTTGATGCCCCGGTGCCAACGCCGCCATAC-3'

R26A 変異体作成用 (+): (35 mer)

5'-GAGCAATGGCGTTCGGCCCTCGCCTTCGATCAGAG-3'

R26A 変異体作成用 (-): (35 mer)

5'-CTCTGATCGAAGGCGAGGGCCGAACGCCATTGCTC-3'

R26E 変異体作成用 (+): (35 mer)

5'-GAGCAATGGCGTTCGGAGCTCGCCTTCGATCAGAG-3'

R26E 変異体作成用 (-): (35 mer)

5'-CTCTGATCGAAGGCGAGCTCCGAACGCCATTGCTC-3'

R315A 変異体作成用 (+): (35 mer)

5'-GATTATGTGCCCTGCTATGCAAGCGAAGCGGGAAC-3'

R315A 変異体作成用 (-): (35 mer)

5'-GTTCCCGCTTCGCTTGCATAGCAGGGCACATAATC-3'

R315E 変異体作成用 (+): (35 mer)

5'-GATTATGTGCCCTGCTATGAGAGCGAAGCGGGAAC-3'

R315E 変異体作成用 (-): (35 mer)

5'-GTTCCCGCTTCGCTCTCATAGCAGGGCACATAATC-3'

N322A 変異体作成用 (+): (35 mer)

5'-GAAGCGGGAACCGGCGCTGCGATGGGTTTCGTCTG-3'

N322A 変異体作成用 (-): (35 mer)

5'-CAGACGAAACCCATCGCAGCGCCGGTTCGCTTC-3'

N322D 変異体作成用 (+): (35 mer)

5'-GAAGCGGGAACCGGCGATGCGATGGGTTTCGTCTG-3'

N322D 変異体作成用 (-): (35 mer)

5'-CAGACGAAACCCATCGCATCGCCGGTCCCGCTTC-3'

H12A 変異体作成用 (+): (35 mer)

5'-CCTTGGCATCGGCACGAGCGCCGGCCCGATGCTTG-3'

H12A 変異体作成用 (-): (35 mer)

5'-CAAGCATCGGGCCGGCGCTCGTGCCGATGCCAAGG-3'

E287A 変異体作成用 (+): (35 mer)

5'-CCAGGACGGCACGTCCGCGCTCAAGAAGTGGATCC-3'

E287A 変異体作成用 (-): (35 mer)

5'-GGATCCAGTTCTTGAGCGCGGACGTGCCGTCCTGG-3'

H184A 変異体作成用 (+): (35 mer)

5'-CCAAGCCGAAACGCCCGCCGCTTTCGGCTTCGTC-3'

H184A 変異体作成用 (-): (35 mer)

5'-GACGAAGCCGAAAGCGGCGGGCGTTTCCGGCTTGG-3'

N96A 変異体作成用 (+): (35 mer)

5'-CAGTCATTCTCGGCGCTGATCAGATGGAGATATTC-3'

N96A 変異体作成用 (-): (35 mer)

5'-GAATATCTCCATCTGATCAGCGCCGAGAATGACTG-3'

基質および基質アナログ化合物

3,4-dihydroxy-5-methoxy-benzoic Acid [3MGA] (97%) ... ASTATECH

Syringic acid 98+% ... Alfa Aesar

Protocatechuic acid [PCA]... WAKO

Gallic acid monohydrate ... WAKO

Vanillic acid ... nakarai tesque

3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (homoprotocatechuate)[HPCA] 98% ... SIGMA-ALDRICH

4-nitrocatechol ... WAKO

タンパク質精製用プレパックカラム及びイオン交換クロマトグラフィー担体

< GE Healthcare >

Q Sepharose Fast Flow

DEAE Sepharose Fast Flow

SP Sepharose Fast Flow

RESOURCE ETH, ISO, PHE 各 1 mL, 6 mL

HiPrep Q FF 16/10

HiTrap Q Sepharose Fast Flow 1 mL

HiTrap Phenyl FF (high sub), HiTrap Octyl FF, HiTrap Butyl FF 各 1 mL

Superdex 200 increase 10/300

PD-10

Zeba™ Spin Desalting Column (0.5mL, for 30-130 µL 7K MWCO) ... Thermo SCIENTIFIC

SDS-PAGE および Blotting 関連

Methanol ... Wako

NuPAGE® Bis-Tris Mini Gels (4-12% グラジエントゲル) ... life technologies

NuPAGE® LDS Sample Buffer ... life technologies

NuPAGE® MES SDS Running Buffer ... life technologies

Rapid Stain CBB kit (CBB 染色液) ... nacalai tesque

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (分子量マーカー) ... invitrogen

XCell SureLock® Mini-Cell ... life technologies

6-Aminohexanoic Acid (6-Amino-n-caproic Acid) ... Wako

酸素濃度測定関連試薬

Sodium Sulfite, Anhydrous ... Wako

Bio-Rad Protein Assay (タンパク濃度測定用 Bradford 試薬) ... Bio-Rad

結晶関連試薬

Ammonium Iron(II) Sulfate Hexahydrate ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ... Wako

BIS-TRIS Propane ($\text{C}_{11}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$) ... SIGMA-ALDRICH

Calcium Acetate ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) ... Wako

Calcium chloride (CaCl_2) ... Wako

Cobalt(II) Chloride Hexahydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ... Wako
Copper (II) Chloride (CuCl_2) ... Wako
Glycine ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) ... Wako
Glycerol ... Wako
Imidazole ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$) ... Wako
Iron(II) Sulfate Heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ... Wako
Magnesium Chloride Hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ... Wako
Manganese(II) Chloride Tetrahydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ... Wako
Nickel(II) Chloride Hexahydrate ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ... Wako
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid [BES] ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{S}$) ... Dojindo
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine [Bicine] ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4$) ... Dojindo
N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid [CHES] ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$) ... Dojindo
N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid [TES] ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{S}$) ... Dojindo
N-[Tris(hydroxymethyl)methyl] glycine [Tricine] ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5$) ... Dojindo
Sodium Bromide (NaBr) ... Wako
Sodium Deoxycholate ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$) ... Dojindo
Sodium Iodide (NaI) ... Wako
Zinc Acetate Dihydrate ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ... Wako

70.0 mM HEGA® -10 (Detergent Screen Reagent 44) ... HAMPTON RESEARCH
Lithium chloride (LiCl) 10.0 M solution ... HAMPTON RESEARCH
Lithium acetate dihydrate ($\text{CH}_3\text{COOLi} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 5.0 M solution ... HAMPTON RESEARCH
Magnesium formate dihydrate ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4\text{Mg} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1.0 M solution ... HAMPTON RESEARCH
Potassium thiocyanate (KSCN) 8.0 M solution ... HAMPTON RESEARCH
Sodium formate (CHNaO_2) 7.0 M solution ... HAMPTON RESEARCH
Sodium malonate ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4$) 3.4 M solution (pH7.0) ... HAMPTON RESEARCH
Zinc chloride (ZnCl_2) 2.0 M solution ... HAMPTON RESEARCH
Polyethylene glycol 10,000 50% w/v solution ... HAMPTON RESEARCH
Polyethylene glycol 20,000 30% w/v solution ... HAMPTON RESEARCH
PEG8000 ... Applichem Panreac
PEG1500, 4000, 6000 ... nacalai tesque

<結晶化スクリーニングキット>

Crystal Screen, Crystal Screen 2, Index,
Detergent screen, Additive screen ... HAMPTON RESEARCH
Wizard Classic 1&2 ... Emerald BioSystems
The PEGs II Suite ... QIAGEN
The Protein Complex Suite ... QIAGEN

使用機器

AKTA FPLC System (FPLC) ... GE Healthcare
AKTA explorer System (FPLC) ... GE Healthcare
TOMY LSX-7000 (オートクレーブ) ... トミー精工
BIO-SHAKER BR-40LF (シェーカーインキュベーター) ... TAITEC
BLOCK INCUBATOR BI-516S (ブロックインキュベーター) ... ASTEC
CHIBITAN-II (遠心分離機) ... MILLIPORE
FAS-III (ゲル撮影装置)... TOYOBO
GeneAmp PCR System 9700 (サーマルサイクラー) ... Applied Biosystems
Innova 4330 (シェーカーインキュベーター) ... NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
IN602 (プログラム低温恒温機) ... ヤマト科学
VP30S ULTRAS HOMOGENIZER (超音波破碎機) ... TAITEC
Mupid-2 plus (DNA 用電気泳動装置) ... ADVANCE
HELEOS II /ASTLA 6 (SEC-MALS system) ... Wyatt Technology
WTC-030S5 (SEC column) ... Wyatt Technology
TOMY MX-305 (遠心分離機) ... トミー精工
Avanti HP-20XP (遠心分離機) ... BECKMANCOULER
嫌気チャンバー ... HIRASAWA WORKS
DU730 (分光光度計) ... BECKMANCOULER
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (分光光度計) ... Thermo SCIENTIFIC
NeoFox 酸素センサーセット(プローブ、レッドアイパッチ) ... Ocean Optics
Procise HT (プロテインシーケンサー) ... Applied Biosystems
Leica M250C (実体顕微鏡) ... Leica Microsystems
SteREO Discovery.V8 (実体顕微鏡) ... ZEISS
PERISTA PUMP (ペリスタポンプ) ... ATTO
J-820 (円二色性分散計) ... JASCO
PTC-423L (Peltier Effect Single Cell Holder) ... JASCO

CA-1112 (冷却水循環装置) ... EYELA

MNT-Series (窒素ガス発生装置) ... KOFLOC

Infinite F200 PRO (マイクロプレートリーダー) ... TECAN

その他

Amicon® Ultra 4, 15 (10,000 MWCO) ... MILLIPORE

セプトム付きスクリーバイアル 12×33 mm ... GL Sciences

マイクロシリンジ (100μL) ... HAMILTON Syringes

Anaerobic Indicator BR0055B (嫌気インディケーター) ... OXOID

Nunclon™ Delta Surface (96well マイクロプレート) ... Thermo SCIENTIFIC

2×YT 培地

Components	/ 1 L
Bacto Tryptone	16 g
Bacto Yeast Ex.	10 g
NaCl	5 g

LB (plate) 培地

Components	/ 1 L
Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Ex.	5 g
NaCl	10 g
(Agar)	(14 g)
Ampicillin Sodium (100 mg/mL stock)	1 mL

Appendix. B 略号及び備考

B.1 アミノ酸の略号

略号	英語表記	日本語表記
A, Ala	alanine	アラニン
C, Cys	cysteine	システイン
D, Asp	aspartic acid	アスパラギン酸
E, Glu	glutamic acid	グルタミン酸
F, Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
G, Gly	glycine	グリシン
H, His	histidine	ヒスチジン
I, Ile	isoleucine	イソロイシン
K, Lys	lysine	リジン
L, Leu	leucine	ロイシン
M, Met	methionine	メチオニン
N, Asn	asparagine	アスパラギン
P, Pro	proline	プロリン
Q, Gln	glutamine	グルタミン
R, Arg	arginine	アルギニン
S, Ser	serine	セリン
T, Thr	threonine	スレオニン
V, Val	valine	バリン
W, Trp	tryptophan	トリプトファン
Y, Tyr	tyrosine	チロシン

B.2 その他の略号

略号	英語表記
3MGA	3- <i>O</i> -methylgallate
HPCA	homoprotocatechuate
OH-DDVA	2,2',3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxy- biphenyl
PCA	protocatechuate
DesB	gallate dioxygenase
DesZ	3- <i>O</i> -methylgallate dioxygenase
LigAB	protocatechuate 4,5-dioxygenase
LigZ	2,2',3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxy- biphenyl dioxygenase
HPCD	homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase

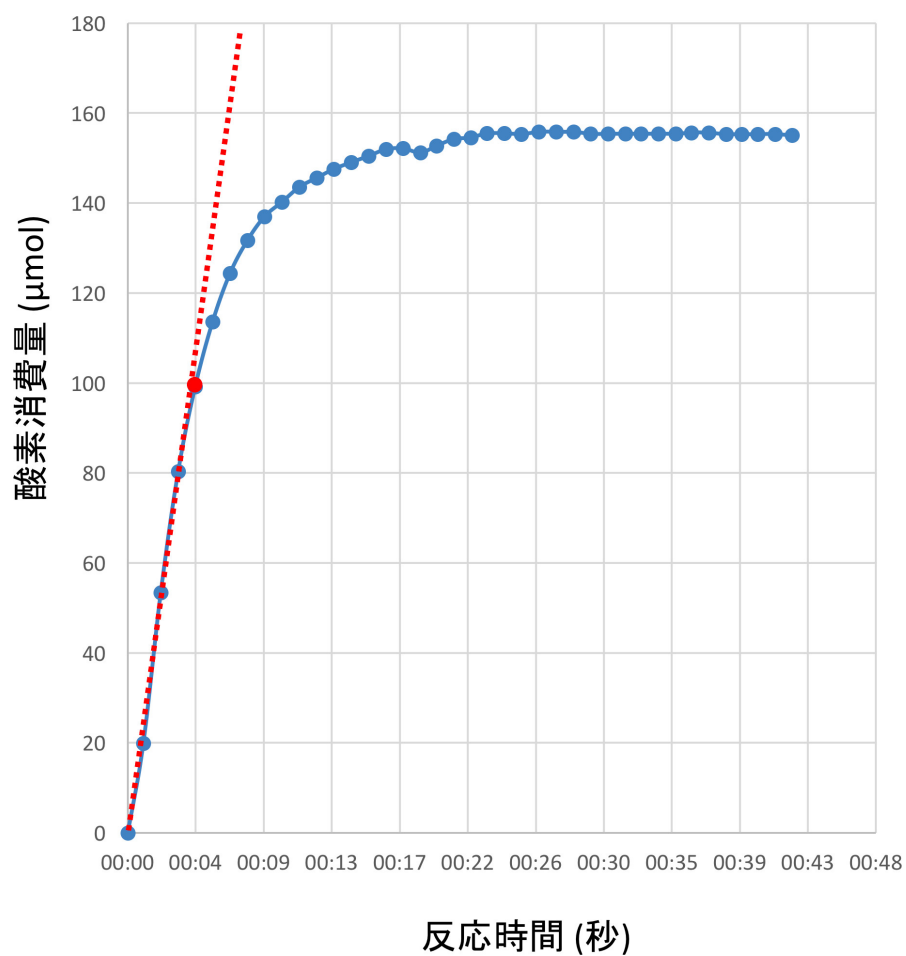
Appendix. C 比活性の算出

C.1 測定データからの算出例

時間 (秒)	酸素濃度 (ppm)	酸素消費量 (ppm)	ブランク補正 (-0.1)	酸素消費量 (μmol)	O_2 μmol /mg·protein	速度 $\mu\text{mol}(\text{O}_2)$ / sec.	U(1 μmolO_2 消費量/min) /mg·protein
00:00.0	11.38737	0					
00:01.0	10.65101	0.73636	0.63636	19.88625	0.201890863		
00:02.1	9.580047	1.807323	1.707323	53.35384375	0.541663388		
00:03.2	8.717212	2.670158	2.570158	80.3174375	0.815405457		
00:04.3	8.112979	3.274391	3.174391	99.19971875	1.007103744	23.06970203	14.05261038
00:05.4	7.651892	3.735478	3.635478	113.6086875	1.15338769		
00:06.5	7.307249	4.080121	3.980121	124.3787813	1.262728744		
00:07.6	7.070922	4.316448	4.216448	131.764	1.337705584		
00:08.7	6.902023	4.485347	4.385347	137.0420938	1.391290292		
00:09.8	6.798564	4.588806	4.488806	140.2751875	1.424113579		
00:10.9	6.694556	4.692814	4.592814	143.5254375	1.457111041		
00:12.0	6.62894	4.75843	4.65843	145.5759375	1.477928299		
00:13.1	6.564962	4.822408	4.722408	147.57525	1.498225888		
00:14.2	6.517149	4.870221	4.770221	149.0694063	1.513394987		
00:15.3	6.472701	4.914669	4.814669	150.4584063	1.52749651		
00:16.4	6.425067	4.962303	4.862303	151.9469688	1.54260882		
00:17.5	6.41867	4.9687	4.8687	152.146875	1.544638325		
00:18.6	6.449203	4.938167	4.838167	151.1927188	1.534951459		
00:19.6	6.401401	4.985969	4.885969	152.6865313	1.550117069		
00:20.7	6.352052	5.035318	4.935318	154.2286875	1.565773477		
00:21.8	6.342258	5.045112	4.945112	154.53475	1.568880711		
00:22.8	6.311836	5.075534	4.975534	155.4854375	1.57853236		
00:23.9	6.311394	5.075976	4.975976	155.49925	1.578672589		
00:25.0	6.317276	5.070094	4.970094	155.3154375	1.576806472		
00:26.1	6.300887	5.086483	4.986483	155.8275938	1.582006028		
00:27.2	6.301057	5.086313	4.986313	155.8222813	1.581952094		
00:28.3	6.30125	5.08612	4.98612	155.81625	1.581890863		
00:29.4	6.315348	5.072022	4.972022	155.3756875	1.577418147		
00:30.5	6.315019	5.072351	4.972351	155.3859688	1.577522525		
00:31.6	6.313286	5.074084	4.974084	155.440125	1.578072335		
00:32.6	6.31273	5.07464	4.97464	155.4575	1.578248731		
00:33.7	6.312634	5.074736	4.974736	155.4605	1.578279188		
00:34.8	6.313235	5.074135	4.974135	155.4417188	1.578088515		
00:35.8	6.306124	5.081246	4.981246	155.6639375	1.580344543		
00:36.9	6.307455	5.079915	4.979915	155.6223438	1.579922272		
00:38.0	6.316383	5.070987	4.970987	155.3433438	1.577089784		
00:39.0	6.318889	5.068481	4.968481	155.2650313	1.576294734		
00:40.0	6.317546	5.069824	4.969824	155.307	1.576720812		
00:41.1	6.316179	5.071191	4.971191	155.3497188	1.577154505		
00:42.2	6.32353	5.06384	4.96384	155.12	1.574822335		

5mM 3MGA 溶液を用いた DesZ の活性測定について、測定データ(反応開始時からの経過時間と反応液の溶解酸素濃度)よりサンプルバッファの酸素消費量を差し引き(ブランク補正)、酸素消費量(μmol)に換算する。Bradford 法で測定したタンパク質濃度 (1.97 mg/mL)をもとに反応液に加えたタンパク質量を計算し、直線性を保つ反応時間 (4.3 秒)までの値を用いて反応速度(酸素消費量 μmol /秒) および比活性 (タンパク質量 (mg) 当たりのユニット数 (1U = 1 $\mu\text{mol O}_2$ /min) /mg·protein) を算出した。赤字で示した部分が反応開始から 4.3 秒後の値を示す)。

C.2 活性測定における反応時間と酸素消費量



C.1 の測定データによる反応時間(秒)と酸素消費量(μmol)の関係. 直線性を保つ反応時間 (4.3 秒)を赤丸でプロットし, 速度算出に用いた直線を赤い点線として示した.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御教示を賜りました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 千田俊哉教授に心から御礼申し上げます。

研究遂行とともに本論文作成にあたり、終始御指導・御鞭撻を賜りました加藤龍一准教授、川崎政人准教授に心から感謝致します。また、折に触れ、適切な御助言を与えて頂きました松垣直宏准教授、山田悠介助教、千田美紀特任助教、佐藤友美研究員ならびに同研究センターの皆様に深く御礼申し上げます。

本研究の共同研究者であり多くの御助言等を頂きました長岡技術科学大学の政井英司教授、上村直史助教に心から御礼申し上げます。

最後に、多大な御支援、御協力を賜りました北海道大学薬学研究院 生体分子機能学研究室 前仲勝実教授と同研究室の皆様、友人、そして家族に心から感謝致します。