

東海大学大学院平成 26 年度博士論文

生化学的手法を用いた糖質加水分解
酵素リゾチームの酵素反応機構に関
する研究

指導 荒木朋洋 教授

東海大学大学院生物科学研究科生物科学専攻

川口 裕也

生化学的手法を用いた糖質加水分解酵素リゾチ
ームの酵素反応機構に関する研究

2014

川口 裕也

目次

緒論	1
第 I 章 ニワトリ卵白リゾチームの触媒基周辺の変異体解析	10
緒言	10
第 1 節 実験材料および実験方法	10
第 1 項 材料	10
1) 試薬	
2) オリゴヌクレオチド	
3) 菌株	
4) 大腸菌用培地	
5) 酵母用培地	
第 2 項 遺伝子操作	12
1) DNA 断片の精製	
2) プラスミドの調製	
3) ライゲーション反応	
4) コンピテントセルの調製	
5) 形質転換	
6) プラスミド DNA の単離	
7) 塩基配列決定	
8) 部位特異的変異法	
9) プラスミドへのリゾチーム遺伝子の導入	
10) 酵母への形質転換	
11) 形質転換体の G418 抵抗性によるスクリーニング	
12) 小スケール発現による酵母形質転換体のスクリーニング	
第 3 項 部位特異的変異体の分泌発現と精製	18
第 4 項 タンパク質の分析法	19
第 5 項 円偏光二色性 (CD) スペクトルの測定	19
第 6 項 (GlcNAc) ₃ を用いた A-C 部位の基質結合力の測定	19

第 7 項	基質親和性の測定	20
1)	キチンコーティングセライトカラムの調整	
2)	キチンコーティングセライトカラムを用いた基質親和性の分析	
第 8 項	活性測定法	21
1)	溶菌法	
2)	グライコールキチンに対する活性測定	
1.	グライコールキチンの合成	
2.	活性測定	
3)	N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のオリゴマーに対する活性	
1.	GlcNAc のオリゴマーの調整	
2.	活性測定	
3.	リゾチーム反応のコンピューター・シミュレーション	
第 9 項	熱力学的安定性の測定法	26
1)	蛍光測定の方法	
2)	熱力学的パラメーターの解析	
第 10 項	X 線結晶構造解析	27
1)	結晶化の方法	
2)	結晶化条件のスクリーニング	
3)	X 線回析データの収集	
4)	格子定数および空間群の決定	
5)	分子置換法による初期位相の決定	
6)	構造精密化	
第 2 節	実験結果および考察	29
第 1 項	部位特異的変異体の作製	30
1)	プラスミドへのリゾチーム遺伝子の導入	
2)	変異体リゾチームの酵母での分泌発現と精製	
第 2 項	変異体の機能解析および構造解析	31

1) CD スペクトル	
2) 基質結合力	
1. A-C 部位の基質結合力	
2. 基質親和性	
第 3 項 酵素活性	35
1) 溶菌活性	
2) グライコールキチンに対する活性	
3) キチンオリゴマー(GlcNAc) ₅ に対する活性	
第 4 項 GdnHCl に対する安定性	41
第 5 項 X 線結晶構造解析	42
1) 結晶化	
2) 回析データの収集	
3) 精密化	
4) 構造解析	
第 3 節 小括	47
第 II 章 ダチョウ卵白リゾチームの触媒基周辺の変異体解析	48
緒言	48
第 1 節 実験材料および実験方法	48
第 1 項 材料	48
第 2 項 遺伝子操作	48
第 3 項 部位特異的変異体の分泌発現と精製	49
第 4 項 ダチョウ卵白リゾチームの変異体の機能解析	50
第 5 項 熱力学的安定性の測定法	50
1) 蛍光測定の方法	
1. 熱に対する安定性	
2. 変性剤 GdnHCl に対する安定性	
2) 熱力学的パラメーターの解析	
1. 熱に対する熱力学的安定性	
2. 変性剤 GdnHCl に対する熱力学的安定性	

第 6 項	X 線結晶構造解析	53
第 2 節	実験結果および考察	53
第 1 項	部位特異的変異体の作製	54
第 2 項	変異体リゾチームの酵母での分泌発現と精製	55
第 3 項	Asp 残基の変異体(D86A, D97A, D86A/D97A) の機能解析	55
第 4 項	Gly 残基の変異体(G90D, D86A/G90D/D97A) の機能解析	60
第 5 項	触媒基周辺を変異させた影響について	61
第 6 項	X 線結晶構造解析	63
第 3 節	小括	66
第 III 章	ハマグリリゾチームの機能および構造比較	68
緒言		68
第 1 節	実験方法	68
第 1 項	実験方法	68
第 2 節	実験結果および考察	68
第 1 項	ハマグリリゾチームの機能比較	68
第 2 項	ハマグリリゾチームの構造比較	70
第 3 節	小括	72
第 IV 章	総括	75
第 1 節	総合考察	75
第 2 節	要約	87
謝辞		92
参考文献		93
本論文に関わる報告		98

緒論

リゾチームは N-アセチルムラミン酸 (MurNAc) と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の共重合体やキチンを構成する GlcNAc の重合体の β -1, 4 結合を加水分解する糖加水分解酵素である (1). 本酵素は病原体の細胞壁に含まれるこれらの重合体を分解して溶菌することから, 生体防御タンパク質と考えられている. リゾチームはニワトリ型 (2-4), グース型 (5-7), T4 ファージ型 (8, 9) および無脊椎型 (10, 11) の 4 つに大きく分類され, これらのリゾチームは分子量, 構成アミノ酸数, 基質結合部位, 触媒基および触媒反応様式が異なる.

ニワトリ卵白リゾチーム (HEL) は, X 線結晶構造解析 (4, 12, 13), NMR スペクトル解析 (14, 15) および分子動力学解析 (16, 17) によって, 立体構造, 基質結合部位, 触媒基等, 構造的に詳しく研究されている. HEL には, 6 個の糖残基が結合する基質結合部位 (A-F 部位) が存在し, 結合した基質の D-E 部位間のグリコシド結合が 2 つの触媒基 (Glu35, Asp52) によって加水分解される (Fig. 1). また, HEL は単純な糖加水分解酵素ではなく, 高能率に糖を合成する糖転移反応を有しており, 複雑な反応機構を有する (18-20). さらに, アノマー保持型の酵素であると知られている. すなわち, 触媒基 Glu35 はグリコシド開裂のためのプロトンドナーとして働き, Asp52 は反応中間体であるオキシカルボニウムイオン中間体の安定化 (21), あるいは, Asp52 が共有結合中間体を形成し安定化に寄与すると考えられている (22). いずれかの方法で安定化された糖は, β 側から水分子が攻撃し, β -アノマーが生成される. しかし, Asp52 を他のアミノ酸に置換しても活性が完全に消失しないため (23), 触媒基である Asp52 の役割は未だに明らかにされておらず, 現在も研究が行われている.

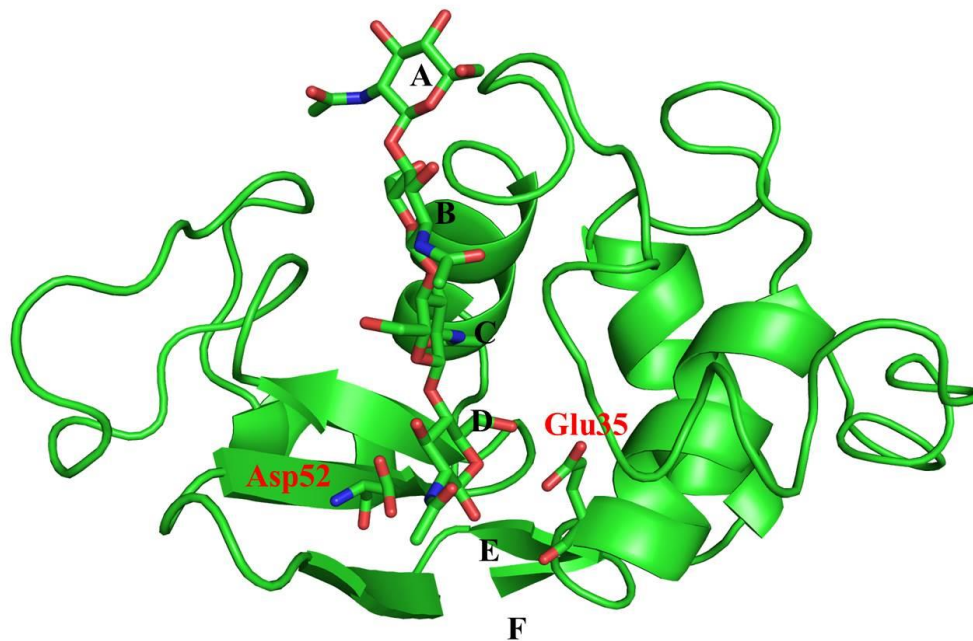


Fig. 1. The three-dimensional structure of HEL.

The side chain of amino acid (Glu35 and Asp52) and substrates binding subsites were shown in stick. The structure was created using PDB code 1lzc (22).

HEL の立体構造では， Asp52 は 3 つの逆平行 β シート構造の $\beta 2$ 上に位置し， 周辺のアミノ酸残基 (Asn46, Asp48, Ser50, Asn59) と強固な水素結合ネットワーク形成している (4, 15, 24) (Fig. 2). 水素結合ネットワークに関与するアミノ酸については， Asn46 の変異体の機能解析により， A-F 部位の基質結合力の変化はないが， 触媒基 Asp52 の環境変化が起こり， 触媒活性の低下が観察され (25), Asn59 の変異体の機能と立体構造解析により， 水素結合ネットワーク周辺の水分子の欠失により， 触媒基 Asp52 の側鎖の配向が変化によって， 触媒活性の低下が観察されている (26). このため， 水素結合ネットワークは， Asp52 の側鎖のカルボキシル基の位置と配向を規定し， Asp52 が触媒基として機能する最適の環境を保持していると考えられる. 水素結合ネットワークを形成する Asp48 および Ser50 に関する報告はなく， HEL の触媒基 Asp52 が形成する水素結合ネットワークの役割は完全に解明できていない.

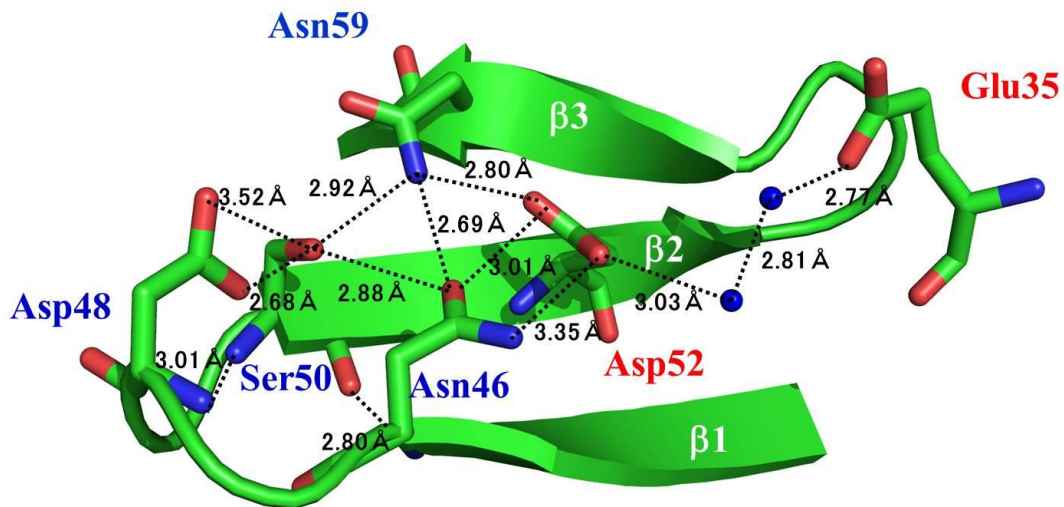


Fig. 2. Hydrogen-bonding network involving the catalytic residue Asp52 in HEL.

The structure was created using PDB code 1lzc (22).

一方，グース型リゾチームはガチョウ (GEL) (5)，コクチョウ (SEL) (27)，ダチョウ (OEL) (28)，ヒクイドリ (29)，レア卵白リゾチーム (30) のアミノ酸配列がタンパク質化学的手法で決定され，ニワトリ (31)，ヒラメ (32)，チャイロマルハタ (33)，サケ (34)，コイ (35) のアミノ酸配列が遺伝子構造から推定されている．また，グース型リゾチームの立体構造に関しては，鳥類由来である GEL と SEL の 2 種類 (6, 7, 36, 37) の他に，魚類由来であるサケ (38) やタラ (39) の構造が明らかにされているだけであり，ニワトリ型や T4 フェージ型と比較して，その構造と機能に関する情報は限られている (40)．

グース型リゾチームの基質結合部位に関しては，GEL と $(\text{GlcNAc})_3$ との複合体の X 線結晶構造解析から 3 つの糖残基が結合した B-D 部位が推定されている (36) (Fig. 3)．

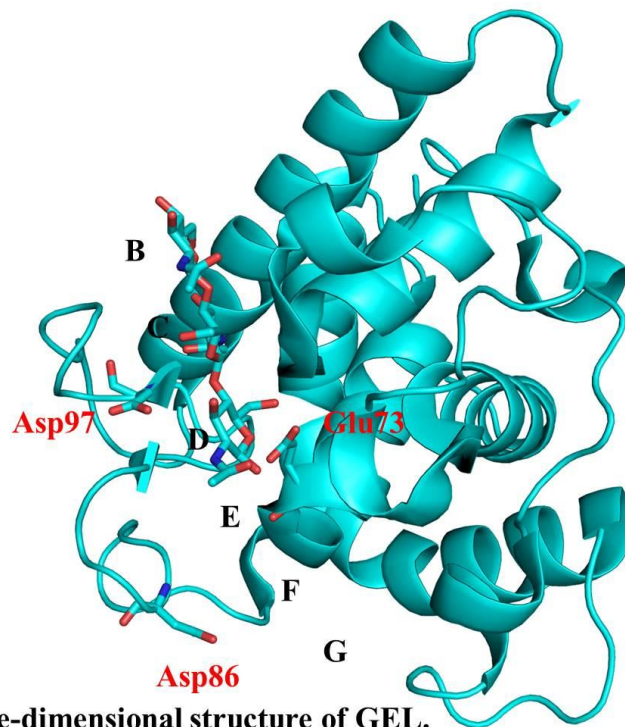


Fig. 3. The three-dimensional structure of GEL.

The side chain of amino acid (Glu73, Asp86 and Asp97) and substrates binding subsites were shown in stick. The structure was created using PDB ID 153L (36).

GEL の GlcNAc オリゴマーに対する活性の解析から，用いたオリゴマーのうち (GlcNAc)₆ が最も効率よく加水分解され，主として 3 量体が生成することから 6 つの基質結合部位 (B-G 部位) の存在と D-E 部位間でのグリコシド結合の切断が予測されている (41)．これらのことから，GEL には触媒基を挟んで糖の非還元末端に 3 個の基質結合部位 (B, C, D) と還元末端側に 3 個の基質結合部位 (E, F, G) が存在することが示され，触媒基を挟んで非還元末端側に 4 つの基質結合部位 (A, B, C, D) と還元末端側に 2 つの基質結合部位 (E, F) を持つニワトリ型リゾチームとは基質結合や糖の切断様式が異なることが示唆されている．さらに，アノマー反転型の酵素であると知られている．すなわち，グース型リゾチームは，ニワトリ型リゾチームと異なり， β -1, 4 結合している糖残基に， α 側から水分子が攻撃し， α -アノマーが生成する．

グース型リゾチームはニワトリ型リゾチームと同様に安定なタンパク質である (29, 30)．ニワトリ型リゾチームは分子量が小さいに

もかかわらず α ヘリックスや β シートが多く、さらに分子内に 4 つのジスルフィド結合を有することからコンパクトで安定な立体構造を形成している (4). グース型リゾチームでは、ニワトリ型リゾチームと同様に α ヘリックスや β シートで構成されているが、分子内部のコア構造を形成している 3 つのヘリックス ($\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 8$) が種間で高く保存されており、グース型リゾチームの立体構造形成や構造安定性における重要性が予測される (Fig. 3) (29, 30).

ダチョウ卵白由来リゾチーム (OEL) は遺伝子の人工合成と、OEL の酵母での大量発現系が構築され、OEL は糖転移反応を触媒しない加水分解酵素であることが明らかにされている (42). この発現系を用いて、 $\alpha 5$ の C 末端に位置する Glu73 に関する変異体の解析を行い、Glu73 がグース型リゾチームのプロトドナーとして働く触媒基であることを実験的に証明するとともに、構造安定性にも重要であるという他の糖加水分解酵素では見られない興味深い事実が明らかにされた (43). さらに、ジスルフィド結合を欠失した変異体の解析により、ジスルフィド結合はフォールディングに必須ではなく、変性状態の構造を不安定化することで構造安定性に寄与していることが明らかにされた (44). しかし、グース型リゾチームは HEL の Asp52 にあたる 2 つ目の触媒基が明らかになっていない. GEL と HEL 立体構造を重ね合わせた際に、GEL の Glu73 と Gly90 が、HEL の 2 つの触媒基 Glu35 と Asp52 と重なり、GEL の Gly90 の近傍には、2 つの Asp 残基 (Asp86 および Asp97) が存在している (Fig. 4).

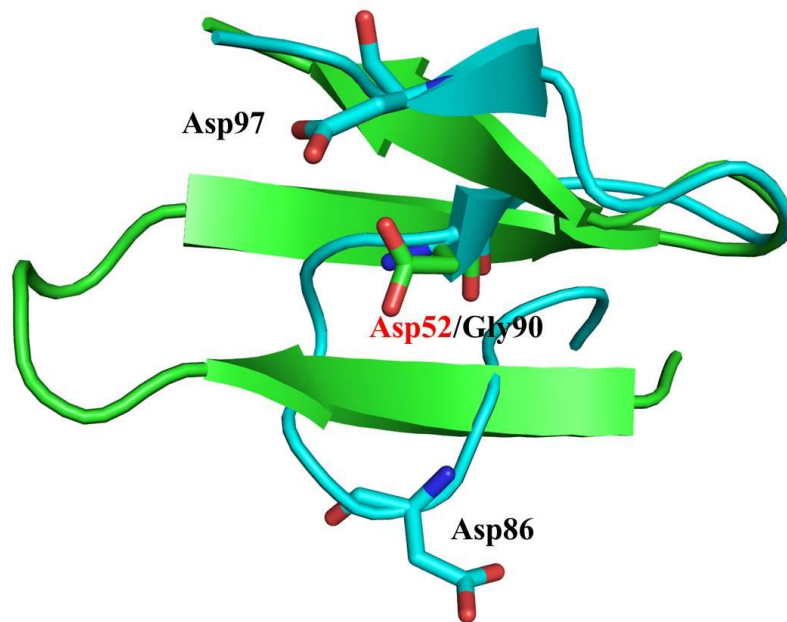


Fig. 4. The superposition of structure of HEL and GEL.

The side chains of amino acid (Asp52, Asp86, Gly90 and Asp97) were shown in stick. HEL and GEL were indicated in green and cyan, respectively.

一方，無脊椎型リゾチームの概念は，Jollés らがヒトデのリゾチームの N 末端配列が既存のニワトリ型，グース型リゾチームとは明らかに異なることを 1970 年代に報告したのが最初である (10)．その後，アサリのリゾチームが精製され，アミノ酸配列が明らかにされた (11)．このリゾチームは相同性検索の結果，既報のどのリゾチームとも相同性がなく，新しい型のリゾチームであり，タンパク質レベルでアミノ酸配列に基づいた初めての無脊椎型リゾチームとして同定された．無脊椎型リゾチームの初めての遺伝子配列はオオロラニシキガイのリゾチームで明らかとされている (45)．その後，ヨーロッパイガイ，ムラサキイガイなど 6 種の二枚貝について，リゾチーム遺伝子の塩基配列が明らかにされ，既報の脊椎動物，昆虫，甲殻類由来の推定的な無脊椎型リゾチームを含めた無脊椎動物のリゾチーム遺伝子の配列と併せて，系統発生的に解析された (46)．その結果，無脊椎動物が有するリゾチームの多くは，1 つの大きな遺伝子系統群を形成し，それはニワトリ型リゾチームと共通の祖先遺伝子から派生したが，早い段階で分化して別の系統群になっている

ことがわかった。

無脊椎型リゾチームの酵素学的性質は、ヨーロッパイガイリゾチームおよびアサリリゾチーム (*Tapes japonica* lysozyme ; TJL) で報告されてきた (11, 47). それらのリゾチームはニワトリ型リゾチームと類似した pH 依存性および温度依存性を示した。さらに、両者はキチナーゼ活性も持っていた。また、無脊椎型リゾチームは HEL と比較して数倍のリゾチーム活性を示していた。一方、オオロラニシキガイリゾチームは低い pH (pH 4.5-6.2) および低い温度 (4-35℃) でのみリゾチーム活性を示し、アミノ酸配列から予測された pI は 7 以下であった。

2007 年には TJL は X 線結晶構造解析によって GlcNAc₃ との複合体の立体構造が明らかとなっている。また、TJL はその触媒反応に関しても研究が行われており、実験的に二つの触媒残基 (Glu18 および Asp30) が証明されている (48) (Fig. 5). さらに、TJL の触媒メカニズムは、ニワトリ型リゾチームと同様に糖と酵素の反応中間体を通して進むアノマー保持型の酵素と報告されている。また、ゲルクロマトグラフィー分析および X 線結晶解析により、構造中の二量体によって低い NaCl 濃度では静電的相互作用を介して触媒残基をブロックする形で二量体を形成し、高い NaCl 濃度では一量体に解離することが報告され、カキおよびヨーロッパイガイリゾチームも NaCl 濃度の増加によって活性が増加すると報告されているため塩濃度に関連した四次構造によって活性を調節するという新しい提案がなされている (48)。

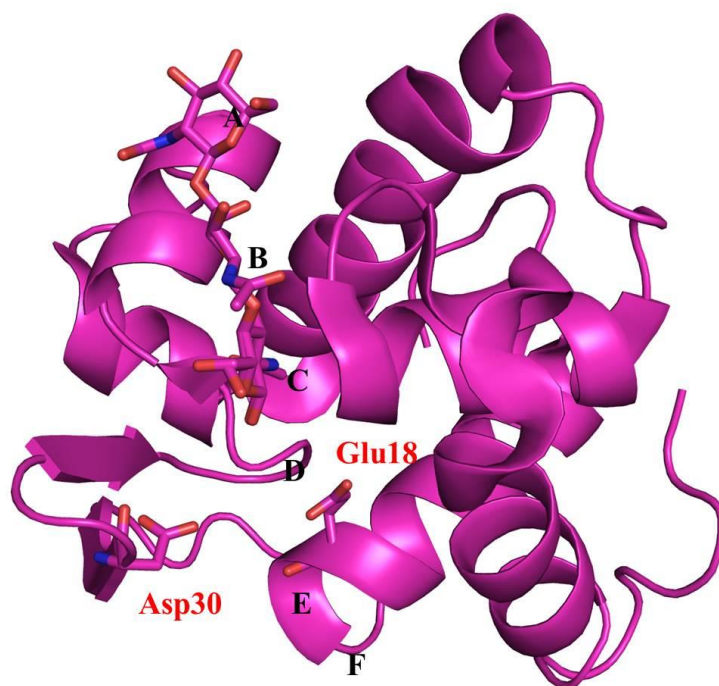


Fig. 5. The three-dimensional structure of TJJ.

The side chain of amino acid (Glu18 and Asp30) and substrates binding subsites were shown in stick. The structure was created using PDB code 2dqa (52).

上記で説明したこれら3種のリゾチームの性質をTable 1に示した。これらリゾチームについては、それぞれの型別に研究されており、酵素反応に関しては比較などがされている。さらに、立体構造や触媒基周辺についても比較されているが、違いがあるという言及のみであり、詳細な解析がされていない。そこで、本論文では、3種（ニワトリ型、グース型および無脊椎型）のリゾチームの触媒基周辺に着目し、3種のリゾチームの比較を行った。

Table 1. Comparison of properties of three-type lysozymes.

	C-type lysozyme	G-type lysozyme	i-type lysozyme
M.W. (kDa)	14.3	20.4	13.8
Amino acid residues	129	185	123
S-S bonds	4	2	7
Subsite structure	A,B,C,D,E,F	B,C,D,E,F,G	A,B,C,D,E,F
Catalytic residues	Glu35, Asp52	Glu73	Glu18, Asp30
Lytic activity	Yes	Yes	Yes
Chitin hydrolysis	High	Low	High
Catalytic reaction	Hydrolysis/Trans-glycosylation	Hydrolysis	Hydrolysis
Anomeric form	retaining	invertig	retaining

すなわち，本研究では，HELの触媒基 Asp52 が形成する水素結合ネットワークの役割を解明する一環として，水素結合ネットワークを構成する Asp48 を Ala に置換した変異体 (D48A) および Ser50 を Ala に置換した変異体 (S50A) を作製し，HEL (wild type) と比較することで，Asp48 および Ser50 の解析を行い，触媒基 Asp52 が形成する水素結合ネットワークの役割の解明を試みた．さらに，OELにおいても，この2つの Asp 残基が重要であるか検証するために Ala に置換した変異体を作製するとともに，HEL と似た触媒基環境にするため，Gly90 を Asp 残基に置換した変異体を作製し，機能解析を行った．これらの変異体を解析することにより，グース型リゾチームの触媒基周辺の新たな知見を得ることを目的とし，ニワトリ型リゾチームを比較することを目的とした．そして，無脊椎型リゾチームとして，報告されているハマグリリゾチーム (*Meretrix lusoria* lysozyme ; MLL) の構造と機能について (49, 50)，ニワトリ型リゾチームおよびグース型リゾチームとの比較を試みた．

第 I 章 ニワトリ卵白リゾチームの触媒基周辺の変異体解析

諸言

HEL の酵素反応機構の研究に関し，緒論で述べたとおり多くの研究がされているが，加水分解反応および糖転移反応機構は明確になっていない．さらに，HEL のみが糖転移反応を触媒する理由なども明らかになっていない．そこで本章では，HEL の触媒基周辺に着目し，変異体を作製し，機能解析および構造解析を行った．

HEL の触媒基である Asp 残基 (Asp52) は，緒論で述べたとおり周辺のアミノ酸 (Asp48, Ser50, Asn46 および Asn59) と水素結合ネットワークを形成している (Fig. 2)．この水素結合ネットワークに関与するアミノ酸残基 (Asn46 および Asn59) に関しては，過去に報告されているが，その役割は明らかになっていない．そこで，水素結合ネットワークに関与する Asp48 および Ser50 の役割を解明することを目的とした．

第 1 節 実験材料および実験方法

第 1 項 材料

1) 試薬

制限酵素 (*XhoI*, *EcoRI*, *SalI*, *SmaI*, *BamHI*) は東洋紡から，T₄DNA リガーゼ，*Taq* DNA ポリメラーゼはタカラバイオから購入した．pPIC9 と pPIC9K と宿主酵母 *Pichia pastoris* (GS115) は Invitrogen から購入した．バクトトリプトン，バクトペプトンおよび酵母ニトロベース (YNB) は Difco から購入した．乾燥酵母エキス，寒天末，ジェネティシン (G418 二硫酸塩)，グアニジン塩酸塩はナカライテスクから購入した．SP-トヨパールは東ソーから購入した．*Micrococcus luteus* は Sigma から購入した．その他の試薬は市販の特級または生化学用試薬を用いた．なお，遺伝子操作の試薬，緩

衝液等は全て高圧滅菌（オートクレーブ）またはフィルター滅菌したものを使用した。

2) オリゴヌクレオチド

PCR で用いたオリゴヌクレオチドプライマーは，北海道システムサイエンスに依頼して作製した。各プライマーは 100 pmol/ μ l となるように TE 緩衝液（10 mM Tris-HCl, pH 8.0 / 1 mM EDTA）で溶解後，-20°C で保存した。

3) 菌株

組み換えプラスミドの形質転換には大腸菌 JM109 (*recA1, supE44, endA1, hsdR17, gryA96, relA1, thi, Δ (lac-proAB) /F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZ Δ M15]*) を用いた。発現用の宿主酵母はメタノール資化能を有する *Pichia pastoris* (GS115) を用いた。

4) 大腸菌用培地

大腸菌の培養は，LB 培地（1% バクトトリプトン，0.5% 乾燥酵母エキス，0.5% NaCl）を使用した。なお，プラスミドを含む形質転換体 JM109 の培養は，アンピシリンを 50 μ g/ml になるように加えた LB 培地を使用した。形質転換用の LB 寒天培地は，LB 培地に寒天末およびアンピシリンを各々 1.5% (w/v)，50 μ g/ml になるように加えたものを使用した。

5) 酵母用培地

酵母の形質転換には，MD 寒天培地（1.34% YNB， 4×10^{-5} % ビオチン，2% D-グルコース，1.5% 寒天末）を使用した。形質転換体のスクリーニングに使う YPD 寒天培地は，YPD 培地（2% ペプトン，1% 乾燥酵母エキス，2% グルコース）に，寒天末 1.5% (w/v) と G418 を終濃度 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 mg/ml になるように加えたものを使用した。分泌発現には，BMGY 培地（Buffered

Glycerol-complex Medium ; 2% ペプトン, 1% 乾燥酵母エキス, 100 mM リン酸カリウム pH 6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % ビオチン, 1% グリセロール) と BMMY 培地 (Buffered Methanol-complex Medium; 2% ペプトン, 1% 乾燥酵母エキス, 100 mM リン酸カリウム pH 6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % ビオチン, 1% メタノール) を使用した.

第 2 項 遺伝子操作

1) DNA 断片の精製

アガロースゲル電気泳動後の DNA 断片の精製は GeneClean kit II (フナコシ製) を用いて行った. すなわち, 紫外線照射下で目的の遺伝子を含むゲルを切り出し, ゲル重量の 2.5 倍量の NaI 溶液を加え, 55°C で 5 分間放置してゲルを溶解した. 次に, 5 μ l の Glassmilk を加え, 1 分毎に攪拌しながら室温で 5 分間静置し DNA を吸着させた. 遠心分離 (12000 rpm, 5 sec) して上清を除去した後, 沈殿した Glassmilk に NEW wash 溶液 (NEW concentrate : エタノール : 滅菌水 = 7 : 155 : 140) を 200 μ l 加えて懸濁した. 遠心分離 (12000 rpm, 5 min) して上清を取り除き, さらに NEW wash 溶液で Glassmilk を 2 回洗浄した. 洗浄した Glassmilk は 5 μ l の TE 緩衝液に穏やかに懸濁し, 55°C で 10 分間保温後, 遠心分離 (12000 rpm, 5 min) して, 上清を DNA 画分として回収した. この溶出操作を再度行い両画分と合わせて DNA の精製物とした.

2) プラスミドの調製

リゾチーム遺伝子のクローニングに用いたプラスミド (pBluescript, pPIC9, pPIC9K) は Midi-V100 Ultrapure Plasmid Extraction System (VIOGENE 社製) を用いて精製し, TE 緩衝液に溶解した. 次に, 1~10 μ g のプラスミドに, 10 \times 制限酵素緩衝液 10 μ l と制限酵素を 1~3 μ l (10~30 units) 加え, 滅菌水で全量を 100 μ l にした. 制限酵素消化は 37°C で 1 時間から 1 晩行い, 0.8% アガロースゲル電気泳動でプラスミドが完全に切断されていることを確認

した。反応液はフェノール抽出とエタノール沈殿後、ベクター濃度が $0.01\sim 0.1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように TE 緩衝液に溶解し、ライゲーション反応に使用した。

3) ライゲーション反応

ライゲーション反応は、プラスミド ($0.01\sim 0.1\ \mu\text{g}$) と目的遺伝子を含む溶液に、 $10\times T_4$ DNA リガーゼ緩衝液 $2\ \mu\text{l}$ と T_4 DNA リガーゼ $1\ \mu\text{l}$ ($350\ \text{units}$) を加え、滅菌水で全量を $20\ \mu\text{l}$ にし、 16°C で 4 時間～1 晩反応した。なお、プラスミドと目的遺伝子のモル比は $1:2\sim 1:4$ の割合で反応した。

4) コンピテントセルの調製

大腸菌 JM109 のコンピテントセルは Inoue らの方法で作製した (51)。すなわち、SOB 培地 (2% トリプトン, 0.5% 乾燥酵母エキス, $10\ \text{mM NaCl}$, $2.5\ \text{mM KCl}$, $10\ \text{mM MgSO}_4$, $10\ \text{mM MgCl}_2$) を $40\ \text{ml}$ 入れた $500\ \text{ml}$ の三角フラスコに大腸菌 JM109 を接種し、 18°C で $600\ \text{nm}$ における吸光度が $0.4\sim 0.8$ になるまで培養した。次に、菌体をあらかじめ氷冷した遠心管に移し、氷中に 10 分間放置後、遠心分離 ($3000\ \text{rpm}$, $15\ \text{min}$, 4°C) して集菌した。菌体を氷冷した $13.3\ \text{ml}$ の Transformation buffer (TB; $10\ \text{mM PIPES}$, $15\ \text{mM CaCl}_2$, $250\ \text{mM KCl}$, $55\ \text{mM MnCl}_2$) に穏やかに懸濁し、氷中で 10 分間放置後、再度遠心 ($3000\ \text{rpm}$, $15\ \text{min}$, 4°C) した。上清を取り除いた後、菌体を氷冷した $3.2\ \text{ml}$ の TB に穏やかに懸濁し、 $0.22\ \text{ml}$ のジメチルスルオキシド (DMSO) を加えた。氷中で 10 分間放置した後、あらかじめ冷やしておいた $1.5\ \text{ml}$ のエッペンドルフチューブに $100\ \mu\text{l}$ ずつ分注し、液体窒素中で凍結後、 -80°C で保存した。

5) 形質転換

JM109 のコンピテントセル ($20\sim 100\ \mu\text{l}$) に、第 4 項で示したライゲーション反応液を $1/10$ 倍量加えて軽く混合し、氷中に 30 分間放

置した。42℃で30秒間ヒートショックを行った後、すばやく氷中で2分間冷却し、室温のSOC培地（20 mM グルコースを含む SOB 培地）をコンピテントセルの約10倍量加え、37℃で1時間培養した。遠心分離（8000 rpm, 2 min）した後、上清を100 μl程度残して懸濁し、アンピシリンを含む LB 寒天培地にプレーティングし、37℃で1晩培養した。

6) プラスミド DNA の単離

プラスミド DNA はアルカリ-SDS法（52）で単離した。すなわち、形質転換後 LB 寒天培地にプレーティングした大腸菌単コロニーから、アンピシリンを含む LB 液体培地に接種後、37℃で1晩培養した。培養液を1.5 ml エッペンドルフチューブに移した後、遠心分離（8000 rpm, 3 min）して集菌した。菌体を100 μlの Solution I（25 mM Tris-HCl, pH 8.0 / 10 mM EDTA / 50 mM グルコース）に完全に懸濁後、Solution II（0.2 M NaOH / 1% SDS）を200 μl加え穏やかに混合し、氷中で5分間放置した。次に、Solution III（5 M 酢酸カリウム溶液）を150 μl加えてよく混合し、氷中で5分間放置した後、遠心分離（15000 rpm, 5 min）し、上清を別のエッペンドルフチューブに移した。この上清に等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混液（25:24:1）を加えて攪拌後、遠心分離（12000 rpm, 5 min）した。水層を回収後、2倍量のエタノールを加えて混合し、室温で5分間放置した。遠心分離（12000 rpm, 5 min, 4℃）した後、生じた沈殿を70% エタノールで洗浄・乾燥し、50 μlの TE 緩衝液に溶解した。なお、塩基配列の決定に用いるプラスミド DNA は、RNA を除去する目的で、RNaseA を終濃度 10 μg/ml になるように加えて 37℃で 30 分間反応した。反応液は 0.6 倍量（v/v）のポリエチレングリコール溶液（20% ポリエチレングリコール 6000 / 2.5 M NaCl）を加えて混合し、氷中で 1 時間以上放置した。遠心分離（12000 rpm, 10 min, 4℃）後、得られた沈殿は 70% エタノールで洗浄・乾燥後、適当量（約 16 μl）の滅菌水に溶解し、塩基配列の決

定に使用した。

7) 塩基配列決定

変異体リゾチームの塩基配列の解析は，バイオマトリックス研究所シーケンス事業部へ依頼した。試料は，アルカリ-SDS法で単離・調製したプラスミドDNAを300～600 ngになるように滅菌水で調製し，プラスミドDNA 12 μ lに1.6 pmol/ μ lの濃度のプライマーを2 μ l加えて調製した。なお，フォワード側からシーケンスを行うときはM13 (-21m13) プライマーを，リバーズ側から行うときには，M13RV (M13RP1) プライマーを使用した。

8) 部位特異的変異法

部位特異的変異法によるD48AおよびS50A変異体リゾチーム遺伝子の作製は，M13ファージベクターに連結されたHEL cDNA (HA94-1)を鋳型にしてPCRを用いたmegaprimer法(53)でそれぞれ行った。まず，HA94-1 5 μ l (50 ng)，変異体プライマー 5 μ l (50 pmol)，3' *Eco*RIプライマー 5 μ l (50 pmol)，10 \times PCR緩衝液 10 μ l，2.5mM dNTP mix 8 μ l，*Taq*ポリメラーゼ 0.5 μ l (2.5 units)に滅菌水を加えて全量を100 μ lとし，1st PCRを行い変異体リゾチーム遺伝子の3'側を増幅した。PCRはprogram temp control system PC-707 (アステック製)を用いて，変性(94 $^{\circ}$ C，1 min)，アニーリング(55 $^{\circ}$ C，1 min)，伸長(72 $^{\circ}$ C，1 min)を25サイクル繰り返し，最後に伸長反応を72 $^{\circ}$ Cで5分間行った。次に，5' *Xho*Iプライマーと1st PCR産物を用いて2nd PCRを行い，変異体リゾチーム遺伝子全体を増幅した。PCR産物は制限酵素 *Xho*I (10 units)と *Eco*RI (10 unit)で消化後(37 $^{\circ}$ C，1時間以上)，1.5%アガロース電気泳動を行い，Geneclean kit IIを用いて精製した。精製したDNA断片は，pBluescriptベクターの *Xho*Iと *Eco*RIサイトに挿入し，塩基配列を確認した。

9) プラスミドへのリゾチーム遺伝子の導入

プラスミドへのリゾチーム遺伝子の導入の概略を Fig. 6A に示した。すなわち，変異体リゾチーム遺伝子が連結された pBluescript プラスミド (Fig. 6B) を制限酵素 *Xho*I (10 units) と *Eco*RI (10 units) で消化後 (37°C, 1 時間以上), 1.5% アガロースゲル電気泳動を行った。変異体リゾチーム遺伝子は GeneClean kit II を用いて精製後, pPIC9 プラスミドの *Xho*I と *Eco*RI サイトに挿入し, α -因子シグナル配列下流に変異体リゾチーム遺伝子を連結した。次に変異体リゾチーム遺伝子が連結された pPIC9 プラスミドを *Bam*HI (10 units) と *Eco*RI (10 units) で消化後 (37°C, 1 時間以上), DNA 断片を同様に GeneClean kit II を用いて精製した。精製した α -因子シグナル配列と変異体リゾチーム遺伝子が連結された DNA は pPIC9K プラスミド (Fig. 6C) の *Bam*HI と *Eco*RI サイトに挿入し AOX1 プロモーター下流に連結した。

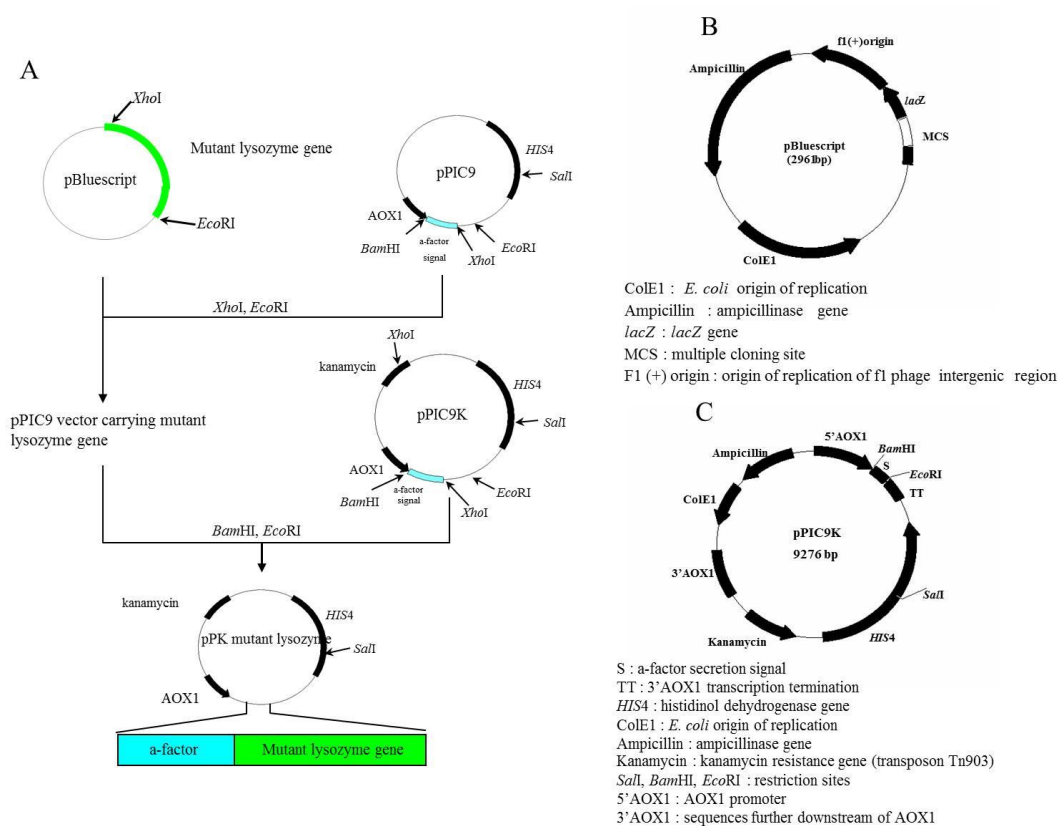


Fig. 6. Construction of an expression vector for mutant lysozymes.

10) 酵母への形質転換

変異体リゾチーム遺伝子が連結された pPIC9K ベクターを含む大腸菌形質転換体を，アンピシリンを含む LB 培地 40 ml に接種し，37℃で 1 晩振とう培養した後，アルカリ-SDS 法でプラスミド DNA を単離した．プラスミド DNA 10 µg を制限酵素 *SalI* (30 units) で消化後 (37℃, 1 晩), 0.8% アガロースゲル電気泳動でプラスミド DNA の切断を確認した．プラスミド DNA はフェノール抽出とエタノール沈殿後，50 µl の滅菌水に溶解して酵母の形質転換に使用した．

酵母の形質転換は LiCl 法で行った (54). すなわち，YPD 培地 5 ml に *P. pastoris* (GS115) を接種し，30℃で 1 晩振とう培養した．培養液 20 µl を YPD 培地 50 ml に植え継ぎ，30℃で 600 nm における吸光度が 0.8~1.0 になるまで振とう培養した．次に，培養液を遠心チューブに移し，遠心分離 (3000 rpm, 10 min) して集菌した．菌体を滅菌水 25 ml で穏やかに懸濁した後，遠心分離 (3000 rpm, 10 min) して上清を取り除き，得られた菌体を 1 ml の 100 mM LiCl で懸濁した．懸濁液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し，遠心分離 (12000 rpm, 15 sec) した後，上清を取り除き再度 400 µl の 100 mM LiCl で懸濁した．懸濁液を 50 µl ずつ 1.5 ml エッペンドルフチューブに分注し，遠心分離 (8000 rpm, 30 sec) して上清を取り除いた後，菌体に 50% PEG 6000 溶液 240 µl, 1 M LiCl 36 µl, プラスミド DNA 50 µl の順に入れ，ボルテックス (1 分以内) して完全に懸濁した．次に，30℃で 30 分間保温した後，42℃で 25 分間ヒートショックを行った．その後，遠心分離 (12000 rpm, 30 sec) して菌体を 500 µl の滅菌水に穏やかに懸濁した．これを MD プレートに 100 µl ずつプレーティングし，30℃で 2~3 日間培養した．

11) 形質転換体の G418 抵抗性によるスクリーニング

MD プレート上に得られた酵母形質転換体を 2~3 ml の滅菌水で懸濁し，滅菌チューブに移した．ボルテックスしてよく懸濁した後，

600 nm の濁度を測定して、懸濁液に含まれる菌体数を計算した (1OD₆₀₀ は 5×10^7 cells/ml に相当). 次に、懸濁液に含まれる菌体数が 2×10^6 cells/ml になるように滅菌水で希釈した後、各濃度の G418 (0~1.5 mg/ml) を含む YPD プレートに 100 μ l ずつプレーティングし 30°C で 2~5 日間培養した.

12) 小スケール発現による酵母形質転換体のスクリーニング

G418 が最も高い濃度で含まれる YPD プレート上に得られたすべての形質転換体を MD プレートに植え継ぎ、30°C で 1 晩培養してマスタープレートを作製した. 次に、各形質転換体を 1 ml の BMGY 培地に植え継ぎ、30°C で 1 晩培養した. 培養液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移して集菌後、菌体を 1 ml の BMMY 培地によく懸濁し、その全量を 1 ml の BMMY 培地を入れた滅菌試験管に植え継いで、30°C で 3 日間振とう培養した. なお、2 日目以降は、24 時間ごとにメタノールを終濃度 1% になるように添加した. 培養終了後、培養液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移して集菌後、培養上清の活性を溶菌法で測定した.

第 3 項 部位特異的変異体の分泌発現と精製

スクリーニングで得られた培養上清の活性が最も高かった形質転換体を 5 ml の BMGY 培地に植え継ぎ、30°C で 1 晩振とう培養した. 培養液の全量を BMGY 培地 100 ml に植え継ぎ、さらに 30°C で 1 晩振とう培養した. 培養液全量を遠心チューブに移し、遠心分離 (3000 rpm, 5 min) で集菌した後、菌体を 10 ml の BMMY 培地に懸濁した. 懸濁液は 150 ml の BMMY 培地を含むバフフルラスコに 600 nm における吸光度が 1.0 となるように菌体を植え継ぎ、30°C で 5 日間振とう培養した. なお 2 日目以降は、24 時間ごとにメタノールを終濃度 1% になるように添加した. 酵母の増殖は 600 nm における濁度を指標とし、菌体外に分泌発現した各変異体リゾチームの活性は溶菌法で測定した. 培地中に分泌発現した各変異体は、陽イオン交換

カラムクロマトグラフィーで精製した。すなわち、培養液は遠心分離 (4000 rpm, 20 min, 4°C) し、培養上清とした。培養上清は蒸留水で4倍希釈し、0.03 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した SP-トヨパールカラム (1.5×12.5 cm) に供与した。カラムは同緩衝液および 0.1 M NaCl を含む同緩衝液で十分に洗浄した後、NaCl 濃度を 0.1 M から 0.5 M まで直線的に上昇させてタンパク質を溶出した。クロマトグラフィーで得られた画分は紫外吸収法でタンパク質を測定し、溶菌法で酵素活性を測定した。活性画分は蒸留水に透析後、凍結乾燥後、精製標品として使用した。なお、変異体の濃度は 280 nm の吸光係数 ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 26.6$) を用いて計算した (55)。

第 4 項 タンパク質の分析法

1) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、Laemmli の方法にしたがって行った (56)。

第 5 項 円偏光二色性 (CD) スペクトルの測定

CD スペクトルは、JASCO J-600 Spectropolarimeter (日本分光製) を用いて測定した。0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に 0.15 mg/ml になるように溶解した試料溶液を光路長 0.5 mm の円筒型石英セルに入れ、室温にて遠紫外部の 200 nm から 250 nm におけるスペクトルを測定した。

第 6 項 (GlcNAc)₃ を用いた A-C 部位の基質結合力の測定

(GlcNAc)₃ を用いた A-C 部位の基質結合力は、F-4500 型分光蛍光光度計 (日立製作所製) を用いて測定した。0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中、酵素溶液は約 $2.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、(GlcNAc)₃ 溶液は $2.0 \times 10^{-5} \text{M}$ から $2.0 \times 10^{-4} \text{M}$ になるように調製した。2 ml の酵素溶液と 2 ml の基質溶液の混合液を 30°C で 5 分間プレインキュベート後、30°C における混合液の蛍光強度を測定した。励起波長は 291 nm で、蛍光波

長は 360 nm で測定した。本実験は、試料をすべて調製後測定するため、時間による蛍光強度の減少が観察される。そのため、試料と同等の蛍光強度を示すように調製した N-アセチルトリプトファン溶液を用いて補正した。すなわち、試料の蛍光強度の補正は試料測定の前で得られた N-アセチルトリプトファン溶液の蛍光強度をもとに行った。酵素-基質複合体の形成量はリゾチームの蛍光強度と複合体の蛍光強度の差 (ΔF) により求めた。その後、横軸に ΔF の値を基質濃度 ($[S]$) で割った値 ($\Delta F/[S]$)、縦軸に ΔF をプロットし、このプロットに対し、直線となるような近似直線を作成し、スキッチャードプロット (57) とした。このスキッチャードプロットから解離定数 (K_d) を求めた。すなわち、以下の式にしたがって ΔF と $\Delta F/[S]$ のプロットにより得られる直線の傾きから $-K_d$ を求めた。基質親和性を示す結合定数 (K_a) は酵素-基質複合体の解離定数 (K_d) の逆数によって求めた。

$$\Delta F = -K_d \frac{\Delta F}{[S]} + \Delta F_{Max}$$

ΔF : 酵素-基質複合体の形成量, K_d : 複合体の解離定数,

$[S]$: 基質濃度

基質結合自由エネルギーは以下の式で求められるユニタリー自由エネルギー変化 (ΔF_u) で示した。

$$\Delta F_u = -RT \ln K_a - RT \ln [H_2O]$$

R : 気体定数, T : 絶対温度, K_a : 結合定数

第 7 項 基質親和性の測定

1) キチンコーティングセライトカラムの調製

キチンコーティングセライトカラムに使用したキチンは Yamada らの方法 (58) にしたがって調製し、アルカリキチンをゲル化したものを使用した。すなわち、5 g のキチンを 100 ml の 42% (w/v) 水酸化ナトリウム溶液 100 ml に懸濁し、室温中減圧下で 4 時間放置した。その後、この懸濁液はろ過し、得られた残渣を 15 g 以下になる

までガラスフィルター上でプレスした。この残渣に粉碎した氷約 80 g を加え攪拌し、キチンをゲル化した。ゲル化したキチンに 42% (w/v) 水酸化ナトリウム溶液を終濃度が 14% (w/v) になるように加えて攪拌後、遠心分離 (6000 rpm, 20 min, 4°C) し、得られた上清をアルカリキチン溶液とした。次に、アルカリキチン溶液に約 20 g のセライトを加えて 2 時間攪拌後、1 晩放置することでキチンをコーティングした。その後、蒸留水でデカンテーションを繰り返し上清が中性になるまで洗浄し、キチンコーティングセライトとした。キチンコーティングセライトは、高純度蒸留水を用いて HPLC 用カラム (7.5 mm×7.5 cm) に充填した (100 kg/cm², 90 分間)。

2) キチンコーティングセライトカラムを用いた基質親和性の測定

試料は約 16 mg/ml の濃度になるように 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で調製し、キチンコーティングセライトカラムに 10 µl インジェクションした。タンパク質の溶出は、0.5 ml/min の流速で、80 分間で 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、NaCl 濃度を 0 M から 1 M まで直線的に上昇させて行い、295 nm の紫外吸収で検出した。なお、分析中はカラムを氷中につけ、カラムの温度が 0°C になるようにした。

第 8 項 活性測定法

1) 溶菌法

溶菌活性は MurNAc と GlcNAc の共重合体を細胞壁の構成成分とする *M. luteus* の菌体粉末を基質として測定した (59)。すなわち、基質溶液は菌体を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、540 nm における濁度が 0.9 になるように調製した。反応は室温で基質溶液 3 ml に対し、酵素溶液 100~500 µl を加えて行い、540 nm における濁度の減少勾配から初速度を測定した。その後、酵素単位は、室温で酵素溶液 1 ml が 1 分間に 540 nm における反応溶液の濁度を 0.1

減少させる活性の強さを 1 単位 (1 unit) とした。実際の反応溶液の酵素単位の計算は次式で行った。

$$\frac{540 \text{ nm の濁度の減少}}{0.1} \times \frac{\text{酵素溶液} + \text{基質溶液}}{\text{酵素溶液}} = \text{酵素単位 (unit)}$$

比活性はタンパク質 (1 mg) あたりの酵素単位 (unit) で示した。

さらに、溶菌活性測定の評価として吸光度の差を使用した。すなわち、基質に酵素を入れた時間を 0 分とし、1 から 10 分間の吸光度の減少を測定した。その後、1 分の吸光度を基準として、時間における吸光度の差を縦軸 ($\Delta 540\text{nm}$) として示した。

2) グライコールキチンに対する活性測定

1. グライコールキチンの合成

グライコールキチンの合成は Yamada らの方法にしたがい、アルカリ処理によるゲル化、エチレンクロロヒドリンによるグライコール化 (C6 位の水酸基をエチレングリコールに置換) および脱アセチル化に対する無水酢酸による再アセチル化の過程で行った (58)。すなわち、5 g のキチンを 100 ml の 42% (w/w) 水酸化ナトリウム溶液に懸濁し、室温中減圧下で 4 時間放置した。その後、この懸濁液はろ過し、得られた残渣を 15 g 以下になるまでガラスフィルター上でプレスした。この残渣に粉碎した氷 80 g を加えて激しく攪拌してキチンをゲル化し、アルカリキチンとした。このアルカリキチンに水酸化ナトリウムの濃度が 14% (w/w) になるように 42% (w/w) 水酸化ナトリウム溶液を加えた。さらに 30 ml のエチレンクロロヒドリンを冷却しながら 30 分間かけ滴下し、室温で一晩放置してグライコール化した。このグライコールキチンは前操作のアルカリ処理によって脱アセチルしている可能性があるため、氷水中で 10 ml の無水酢酸を加えて攪拌し、再アセチル化した。酢酸で中和した後、水道水に対して透析し、さらに蒸留水に対して透析を行った。透析後、遠心分離によって得られた上清を凍結乾燥し、グライコールキチンとして以後の実験に使用した。

2. 活性測定

キチナーゼ活性は基質の加水分解によって生じる還元末端を比色定量するシャーレス法でグライコールキチンを基質として測定した(58). すなわち, グライコールキチンを 0.05% になるように 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解して基質溶液とした. 酵素溶液は反応溶液中 1×10^{-6} M になるように, 酵素を 0.05 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に溶解した. 発色試薬は, 0.05% フェリシアン化カリウムを含む 0.5 M 炭酸ナトリウム溶液を用いた. なお, 最適 pH の測定には, 溶液 A (50 mM CH_3COOH , 12.5 mM H_3PO_4 , 0.1 M NaCl) と溶液 B (50 mM CH_3COONa , 12.5 mM K_2HPO_4 , 12.5 mM NaCl) を適量ずつ混合し, 3 から 8 の pH 範囲で調整した緩衝液を使用した (25).

酵素反応は, 基質溶液 1.0 ml を 50°C , 5 分間プレインキュベート後, 酵素溶液 0.1 ml を加え, 50°C で 10, 20, 30 分間で反応を行った. 反応後, 2.0 ml の発色試薬を加え 10 分間煮沸した. 反応溶液は, 420 nm における吸光度を測定した. ブランクは, 0.1 ml の酵素溶液を 2.0 ml の発色試薬および 1.0 ml の基質溶液に加え, 10 分間煮沸した. 酵素反応はブランクと試料の吸光度の差 ($\Delta 420 \text{ nm}$) として表した.

3) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のオリゴマーに対する活性測定

1. GlcNAc のオリゴマーの調製

GlcNAc のオリゴマー [$(\text{GlcNAc})_n$, $n=1\sim 6$] は Rupley の方法 (60) にしたがって調製した. キチン (生化学工業製) を無水酢酸によってアセチル化し, 塩酸でオリゴマーに加水分解した. オリゴマーはチャコール-セライトカラムクロマトグラフィーとセルロファイン GCL-25-m によるゲル濾過で分離精製した. すなわち, 20 g のキチンを氷水中で 700 ml の 10% メタノールを含む飽和酢酸ナトリウム溶液中に懸濁させた. この懸濁液に 1.84 ml の無水酢酸を滴下し, 1

昼夜放置してアセチル化した。アセチル化キチンは濾過した後、得られた残渣を蒸留水で洗浄し、エタノールで脱水後、風乾した。アセチル化キチンは 350 ml の 35% 塩酸溶液に懸濁し、氷水中で 2 時間放置後、40℃ で 2 時間加水分解した。加水分解した溶液は 50% 水酸化ナトリウム溶液で中和し、遠心分離 (6000 rpm, 60 min, 4℃) した。得られた上清はチャコール-セライトカラムクロマトグラフィーに供した。チャコール-セライトカラム (6.0×100 cm) は活性炭素 (ナカライテスク製) とセライト 503RV (ナカライテスク製) を 1:1 に混合し、充填したものを使用した。各オリゴマーの溶出はカラムを 60℃ に保ちながら蒸留水と 50% エタノールとの直線的濃度勾配法によって行った。得られた各オリゴマーは凍結乾燥後、セルロファイン GCL-25-m カラム (4.0×200 cm, 生化学工業) を用いたゲル濾過でさらに精製した。ゲル濾過の溶出は蒸留水で行った。得られたオリゴマーは 2 本連結した TSKgel G-Oligo-PW カラム (7.5×300 mm, 東ソー製) を装着した JASCO 800 シリーズ高速液体クロマトグラフィー (日本分光製) で均一性を確かめ、以後の実験の基質として使用した。

2. 活性測定

酵素と基質は、それぞれ 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解し、基質は (GlcNAc)₅ を用いた。酵素反応は酵素溶液と基質溶液をそれぞれ 50℃ で 5 分間プレインキュベーションした後、酵素溶液に基質溶液を加えることによって開始した。反応溶液中の酵素と (GlcNAc)₅ 溶液の濃度はそれぞれ 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M に調整した。反応溶液は経時的に取り出し、急冷することで反応を停止し、さらに陽イオン交換樹脂 Bio-Rex70 (Bio-Rad 製) を重層した遠心式の限外濾過により酵素を除去した。得られた濾液は凍結乾燥を行った。凍結乾燥物は冷却した高純度蒸留水 50 μ l に溶解し、そのうち 10 μ l を TSK-gel G-Oligo-PW カラム (東ソー製) を 2 本直列に装着した HPLC に供した。溶出は高純度蒸留水を用い、室温、流速 0.3 ml/min

で行った. GlcNAc のオリゴマーはアセチル基に由来する 220 nm の紫外吸収で検出した. 測定における相対誤差は反応生成物の GlcNAc オリゴマーを GlcNAc の 1 量体に換算し, 基質濃度に対する回収率で表した. 曲線は 10 μ l の濃度既知 (0.5×10^{-3} M \sim 4.0×10^{-3} M) の (GlcNAc)₁ から (GlcNAc)₅ の生成物を測定した同一のカラム, 同一の条件化で分離し, オリゴマーの濃度と面積から作製した. 標準曲線は (GlcNAc)₁ から (GlcNAc)₅ までの標準試料を用い, 濃度とピーク面積のプロットから作成した.

3. リゾチーム反応のコンピューター・シミュレーション

リゾチームの実験タイムコースは, Masaki らの方法 (61) にしたがってコンピューター・シミュレーションによって再現した. すなわち, モデル化 (Fig. 7) し, それにしたがって速度式をたて, コンピューター・シミュレーションを行った.

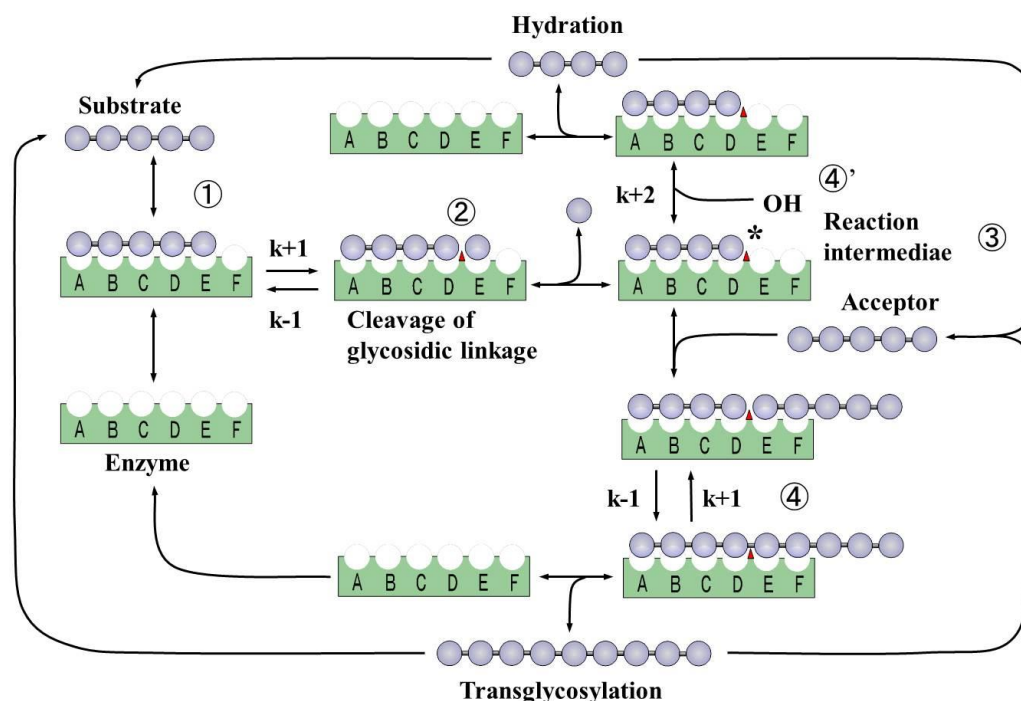


Fig. 7. Schematic representation of lysozyme-catalyzed reaction.

k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} are the rate constants for the glycosidic linkage, transglycosylation, and hydration, respectively.

モデルに示したようにリゾチームの反応は、数字で示したようにステップ化されている。すなわち、①基質は酵素の基質結合部位にそれぞれの結合自由エネルギーで結合し、酵素-基質複合体を形成する、②結合した基質は D, E 間でグリコシド開裂を受ける、③ E, F 部位上の基質断片が取り除かれ、A-D 部位上にある基質断片の D 部位が安定化する、④空になった E, F 部位にはアクセプター分子（糖）が結合し、D 部位上の糖残基と新しいグリコシド結合を形成すると糖転移反応となる、④'アクセプター分子の代わりに水分子が入ると加水分解反応になる (62)。図中、グリコシド開裂の速度定数を k_{+1} 、糖転移反応の速度定数を k_{-1} 、加水分解反応の速度定数を k_{+2} で示した。このモデルにしたがって速度式が誘導された。計算タイムコースのコンピューター・シミュレーションは 6 個の基質結合自由エネルギーと 3 個の速度定数のパラメーターを変化させ、実験タイムコースを再現するまで計算を繰り返した。

第 9 項 熱力学的安定性の測定法

1) 蛍光測定の方法

グアニジン塩酸塩 (GdnHCl) に対するリゾチームの安定性は、GdnHCl の濃度変化に伴うリゾチームの蛍光強度の変化で測定した。試料溶液中、リゾチーム濃度は 0.015 mg/ml、GdnHCl は 0.5~7.5 M になるように 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で調整した。リゾチーム溶液 0.2 ml と GdnHCl 溶液 3.8 ml を混合し、30℃で 1 時間以上インキュベートした後、蛍光分光光度計を用いて測定した。蛍光の測定は励起波長 280 nm、蛍光波長 360 nm で時間変化測定を行った。また、エキサイテーションスリット及びエミッションスリットは 5 nm に設定した。また蛍光は非常に不安定であるため、蛍光分光光度計の蛍光強度が十分に落ち着いてから蛍光測定を行い、測定値は N-アセチルトリプトファン溶液で補正した。

2) 熱力学的パラメーターの解析

熱力学的パラメーターは *N*-アセチルトリプトファンで補正して得られた 360 nm の蛍光強度を，GdnHCl 濃度に対してプロットすることで得られた変性曲線から Pace の方法にしたがって算出した (63). リゾチームの変性過程が 2 状態変性 [N (未変性) $\xrightleftharpoons{K_d}$ D (変性)] であると仮定し，各 GdnHCl 濃度に対する平衡定数 K_d および変性の自由エネルギー変化 ΔG_D を下記の式より求めた.

$$K_d = [D]/[N]$$

$$\Delta G_D = -RT \ln K_d$$

R: 気体定数，*T*: 絶対温度

安定性の指標となる変性剤非存在下における変性の自由エネルギー変化 ($\Delta G_D^{H_2O}$) は， ΔG_D を GdnHCl 濃度に対してプロットし， ΔG_D が GdnHCl 濃度と比例関係にあると仮定して下記の式より算出した.

$$\Delta G_D = \Delta G_D^{H_2O} - m[\text{GdnHCl}] \quad (63)$$

m: 比例定数

タンパク質が半分変性する変性曲線の中点の変性剤濃度 (C_m) においては， $K_d=1$ であることから， $\Delta G_D=0$ となる. したがって， C_m は下記の式より算出できる.

$$C_m = \Delta G_D^{H_2O} / m$$

Wild Type と変異体との変性剤非存在下での変性の自由エネルギー変化の差 ($\Delta \Delta G_D^{H_2O}$) は下記の式から求めた.

$$\Delta \Delta G_D^{H_2O} = G_D^{H_2O} (\text{mutant}) - \Delta G_D^{H_2O} (\text{Wild Type})$$

第 10 項 X 線結晶構造解析

1) 結晶化の方法

結晶化は，シッティングドロップ蒸気拡散法 (sitting drop vapour diffusion) (64) で行った. シッティングドロップ法では沈殿剤の入ったウェル上のドロップチャンバーで，タンパク質溶液と同量の沈殿剤溶液を混合した後，クリアテープで密閉した.

2) 結晶化条件のスクリーニング

ニワトリ型リゾチームの結晶化については，多くの研究がなされているため，それらの研究を基に変異体リゾチームの最適結晶化条件の検索を行った．各ウェルには，条件が異なるリザーバー溶液 100 μ l を入れ，ドロップチャンバー上に 1 μ l のタンパク質溶液 [0.2 M NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶解後，遠心分離 (14000 rpm, 5 min, 4°C) した上清を使用]，同量のリザーバー溶液をドロップ状になるように滴下混合した後，クリアテープで密閉した．結晶化が見られた条件では，リザーバー溶液の塩，沈殿剤の濃度および pH を系統的に変化させ，最適条件を決定した．

3) X 線回折データの収集

X 線照射直前に，ナイロン製クライオループを使用して結晶を抗凍結剤含有バッファー中に移し 1 分程度浸した．抗凍結剤が結晶に染みこむのを待った後，結晶をループで再び拾いあげゴニオメータにマウントし，液体窒素中で急速に冷却した．X 線回折データは，筑波の高エネルギー加速器研究機構 (Photon Factory BL5A) において収集した．

4) 格子定数および空間群の決定

CCD 検出器上に記録された回折像は，さまざまな結晶格子面 [指数 ($h k l$)] からの X 線の反射によって構成されている．これらの点を結ぶベクトルのうち，同一平面になく，また平行でもない 3 本の最も短いベクトルを選びだし，格子定数および結晶系を決定した (ベクトルミニマム法)．これをもとに各回折点と格子面との対応付け (指数付け) を行った．さらに，指数付けされた全反射から，特定の系列的な反射について反射強度が 0 となっている (消滅側) かチェックし空間群を決定した．これらの一連の回折データの処理は，プログラム HKL2000 を使用して行った．

5) 分子置換法による初期位相の決定

初期位相の決定は分子置換法により行い、プログラムには MOLREP (65) を使用した。

6) 構造精密化

分子モデルの精密化は、エネルギー関数を利用した最小二乗法により行った。分子構造に関して REFMAC5 (66), CNS (67) での精密化を行い、さらに CCP4 (68) で計算された電子密度マップを MIFit (69), COOT (70) 上で確認しながら手動で主鎖および側鎖の再構築を行った。また、分子グラフィックスの作図には、PyMOL (<http://www.pymol.org/>) を使用した。

第 2 節 実験結果および考察

HEL の変異体の解析内容は Fig. 8. に示した。すなわち、PCR を用いた部位特異的変異法により変異リゾチームの遺伝子を作製した。その後、酵母を用いて変異リゾチームの発現し、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。その後、基質結合力、酵素活性、構造安定性および立体構造の解析を行った。

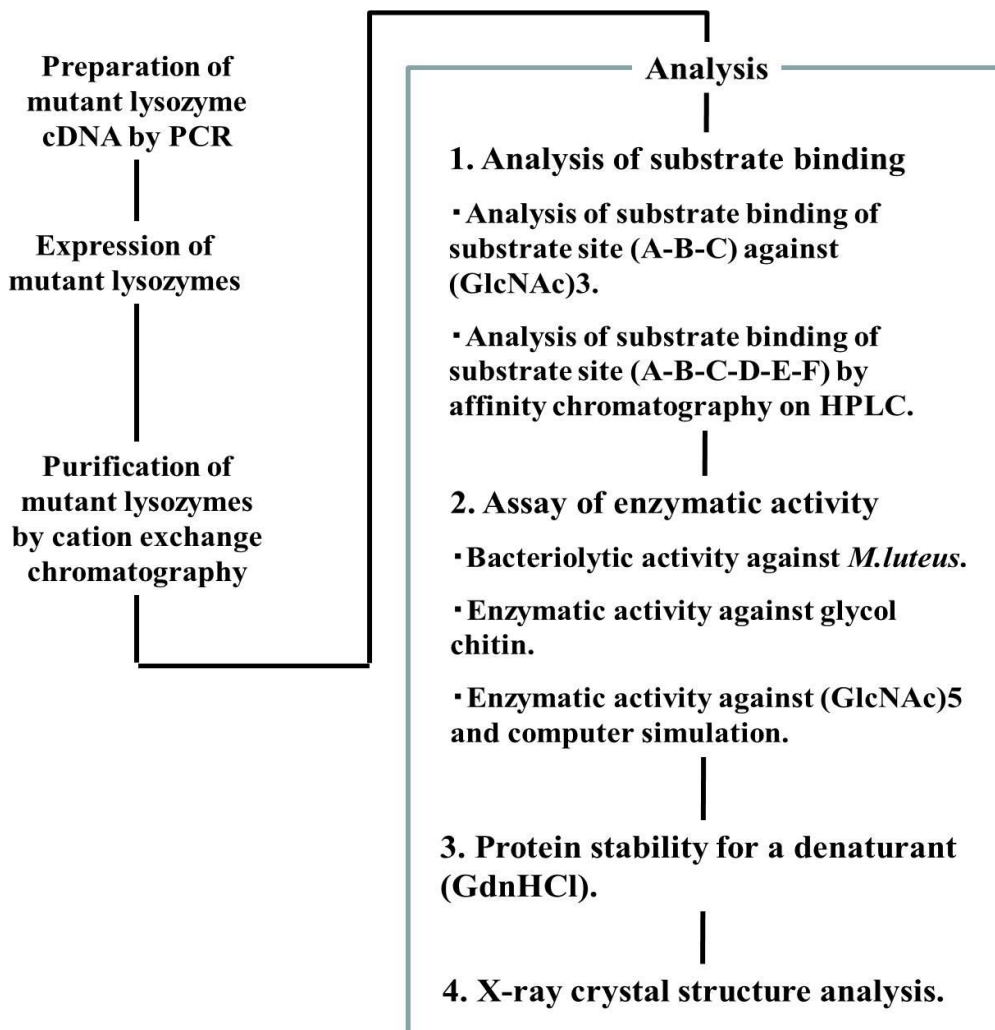


Fig. 8. The contents of experiments

第 1 項 部位特異的変異体の作製

1) プラスミドへのリゾチーム遺伝子の導入

PCR を用いた megaprimer 法 (53) で Asp48 および Ser50 を Ala に置換した 2 種の変異体 (D48A および S50A) を作製した。すなわち、第 1 節第 2 項 9) に述べたように行い、酵母発現ベクターとして pPIC9K ベクターを用いた。pPIC9K ベクターは、メタノールによって厳密に誘導・調節されるアルコールオキシダーゼ 1 (AOX1) プロモーターを有している。このプロモーターに連結された α -因子シグナル配列下流に存在する MSC に外来遺伝子を挿入した場合、その外来遺伝子の発現は、培地中に含まれるグルコースやグリセロールに

よって厳密に抑制されるが，炭素源としてメタノールを含む培地 (BMMY 培地) 中では迅速な転写が誘導され，組み換え型タンパク質の高レベルな分泌発現が可能であるため用いた．その結果，小スケールの発現で培養上清の溶菌活性が最も高かった形質転換体を選出し，以後の大量発現に使用した．

2) 変異体リゾチームの酵母での分泌発現と精製

第 1 節第 3 項に述べた方法で，発現を誘導後，培養時間の経過と共に菌体量と変異体の分泌発現量が増加していることが確認できた．

培養液中に分泌発現した変異体は，培養液を遠心分離して菌体を除去した後，陽イオン交換樹脂である SP-トヨパールを用いたカラムクロマトグラフィーで精製した．その結果，変異体 D48A および S50A は，溶菌活性を伴う 2 つのピークが得られた．各画分の SDS-PAGE の結果，前半のピークには，マーカーとして用いた HEL よりも高い分子量のバンドが，後半のピークでは HEL と同じ分子量に単一のバンドが検出された．高分子のタンパク質は，シグナル配列のミスプロセッシングにより，N 末端に α -factor シグナル配列の一部が付加したリゾチームだと分かっていることから (71)，後半のピークを回収した．以上の精製過程における 2 種の変異体の収量は，培地 900 ml あたり変異体が約 10.0 mg であった．

第 2 項 変異体の機能解析および構造解析

1) CD スペクトル

分泌発現した変異体がタンパク質合成後正しくフォールディングしたかを調べるために，タンパク質の主鎖構造の情報が得られる遠紫外部領域 (200-250 nm) の CD スペクトルを測定した．その結果，4 種の変異体の CD スペクトルは，wild type とほとんど同一の CD スペクトルを示した．このことから，2 種の変異体は wild type と同等の主鎖構造を持つことが示された．

2) 基質結合力

1. A-C 部位の基質結合力

(GlcNAc)₃ は, HEL の 6 個の基質結合部位 (A-F 部位) のうち, 優先的に A-C 部位に結合する基質アナログであると報告されている (72). A-C 部位には, 3 つの Trp 残基が位置し, Trp62 が A, C 部位, Trp63 が B 部位, Trp108 が C 部位の糖残基の基質結合に関与する (1, 13). Trp 残基は周辺の構造変化や基質結合などの環境変化に対し, 紫外吸収スペクトルや蛍光スペクトルに変化を生じるため, これを利用して基質結合力を測定することができる (43, 73, 74). そこで, まず (GlcNAc)₃ を用い, wild Type と 2 種の変異体の A-C 部位の基質結合力を Trp 残基の蛍光スペクトルを指標に測定した. 横軸に ΔF の値を基質濃度 ([S]) で割った値 ($\Delta F/[S]$), 縦軸に ΔF をプロットし, このプロットに対し, 直線となるような近似直線を作成した (Fig. 9). 各プロットの近似曲線の傾きから求められた解離定数 K_d , その逆数である結合定数 K_a , さらに K_a を基に計算された A-C 部位の基質結合自由エネルギーで表した (Table 2). D48A および S50A のそれぞれの値は wild type とほぼ同等であった (Table 2). したがって, Asp48 および Ser50 の Ala への置換は A-C 部位の基質結合力に影響しないことが明らかとなった.

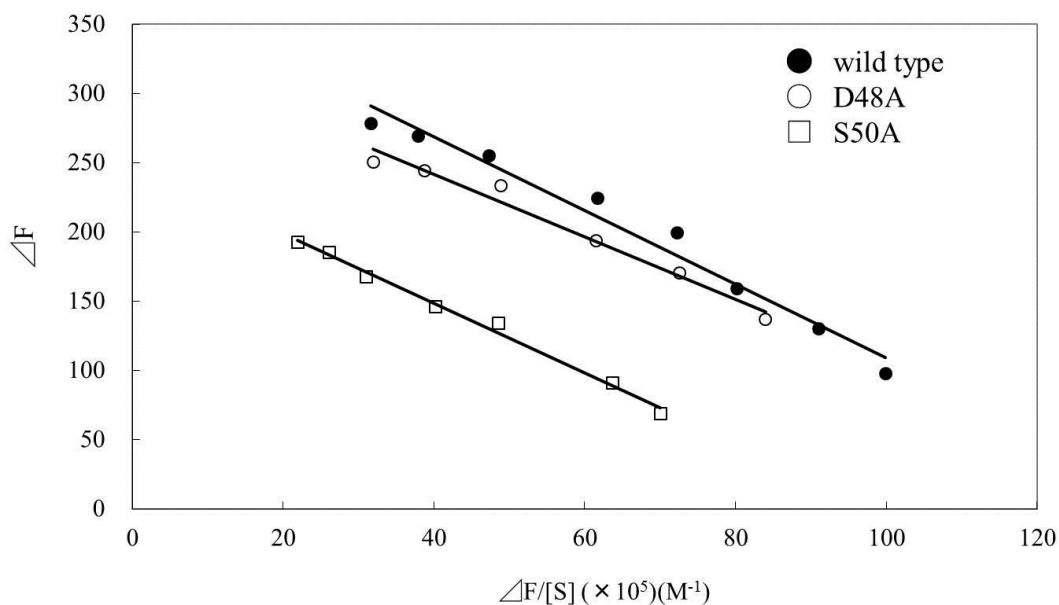


Fig. 9. Scatchard plotting for binding of wild type and mutant lysozymes (D48A and S50A) with (GlcNAc)₃.

Table 2. Binding of wild type and mutant lysozymes with (GlcNAc)₃.

	K_d ($\times 10^{-5}$ M)	K_a ($\times 10^4$ M ⁻¹)	Binding free energy (kcal/mol)
wild type	2.66	3.76	-8.76
D48A	2.51	3.98	-8.80
S50A	2.60	3.85	-8.78

K_d : dissociation constant K_a : association constant

2. 基質親和性

Wild type と 2 種の変異体の基質親和性は、キチンコーティングセライトカラムを用いて溶出位置の保持時間を比較することで A-F 部位の全体の基質結合力を定性的に評価した (43)。その結果、Wild type の保持時間は 47 分であるのに対して、D48A が 28.5 分、S50A が 40.7 分であった (Fig. 10 および Table 3)。すなわち、Asp48 と Ser50 を置換することによって基質親和性の低下が見られた。

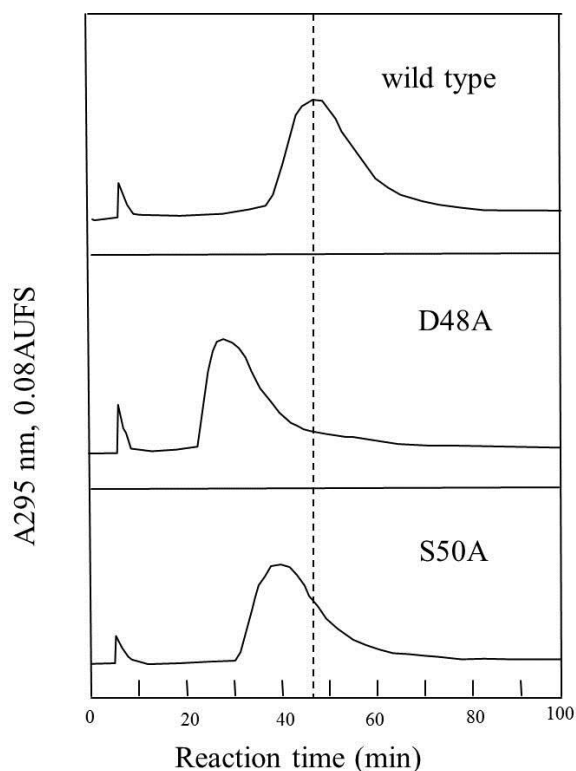


Fig. 10. Comparison of retention time in the affinity HPLC on a chitin-celite column at 0 °C.

Table 3. Retention time in the affinity HPLC on a chitin-coated celite column at 0°C.

lysozyme	Retention time (min)
wild type	47.0
D48A	28.5
S50A	40.7

したがって， D48A および S50A は 1)で述べたように， (GlcNAc)₃ に対する結合力の測定により A-C 部位の基質結合力が wild type と同じであったことから， 基質親和性の低下は D-F 部位の部分的な基質結合力の低下によるものと考えられた。

1) 溶菌活性

リゾチームは、菌体に対する溶菌活性を示す。そのため、2種の変異体の活性は、まず基質に MurNAc と GlcNAc の共重合体を細胞壁の構成成分とする *M. luteus* を用いて、その溶菌作用を測定する方法で評価した。溶菌活性測定は、4 回行い、同様の結果が得られた。そのうちの 1 回を Fig. 11 に示した。その結果、2種の変異体の溶菌活性は、wild type の活性を 100%とした場合、D48A および S50A はそれぞれ 67.5%、24.4%となった。

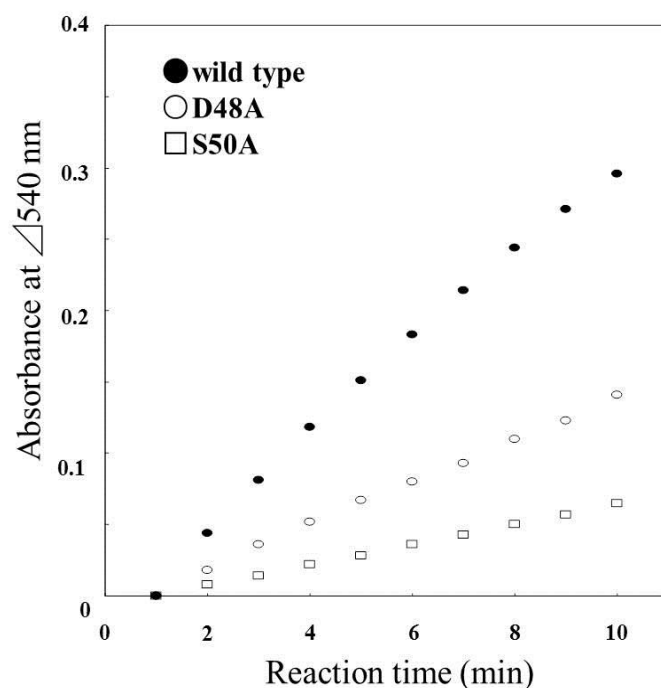


Fig. 11. Lytic activity of wild type and mutant lysozymes (D48A and S50A) against *M. luteus* cells.

2) グライコールキチンに対する活性

次に、GlcNAc のホモポリマーであるキチンをグライコール化することにより可溶化したグライコールキチンを基質に用いて、キチナーゼ活性を測定した。グライコールキチンに対する活性測定は、3 回行い、同様の結果が得られた。そのうちの 1 回を Fig. 12 に示し

すなわち，wild type と 2 種の変異体のグライコールキチンに対する活性を pH 3 から 8 の領域で測定し，wild type の活性と比較した．その結果，2 種の変異体は wild type とほぼ同様な pH 依存性を示し，活性の至適 pH は 5.0 付近であった．したがって，Asp48 および Ser50 を置換することは，2 つの触媒基の側鎖の pK_a に影響しないことが推定された．至適 pH である pH 5.0 における wild type と変異体の活性を比較した結果，反応時間 10 分での変異体の活性は wild type を 100% としたとき，D48A および S50A は，それぞれ 25.7%，43.0% であった．これらの結果より，Asp48 および Ser50 を置換した変異体は wild type と比較して，高分子の基質に対する糖加水分解反応が低下していると考えられた．

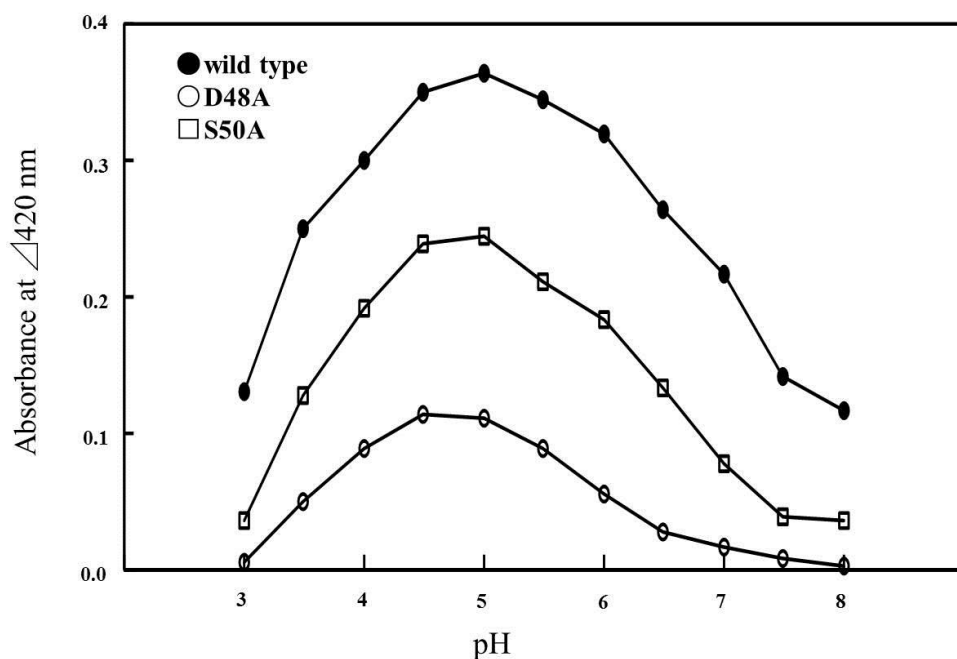


Fig. 12. pH dependence of activity of wild type and mutant lysozymes (D48A and S50A) against glycol chitin.

3) キチンオリゴマー (GlcNAc)₅ に対する活性

リゾチームの反応は，GlcNAc のオリゴマー [(GlcNAc)_n; n=1~10] のような低分子の基質を用いると，糖加水分解反応の速度より糖転

移反応速度が大きくなると報告されている (20). したがって, GlcNAc のオリゴマーに対する活性を測定することによって, リゾチームの糖加水分解反応および糖転移反応を詳細に検討することが可能となる. しかし, GlcNAc のオリゴマーを基質にした場合, 糖加水分解反応生成物や糖転移反応生成物は次の反応の基質やアクセプターとなるため, 反応中の GlcNAc の分子種組成は複雑である. このため, リゾチームの反応の解析は種々の反応生成物を分離・定量し, 経時的変化を検討する必要がある. さらに, コンピューター・シミュレーションによってタイムコースを計算し, 反応パラメーターとして基質結合部位の結合自由エネルギーとグリコシド開裂反応, 加水分解反応, 糖転移反応の速度定数を求めた (Fig. 7). コンピューター・シミュレーションでは, 基質結合力の測定では分からない各サブサイトの基質結合エネルギーを求めることができる. そこで, 2 種の変異体の活性を低分子基質である (GlcNAc)₅ を用いて, wild type の至適 pH での反応生成物の経時的な変化で検討した. 反応産物のゲルろ過カラムを用いた HPLC パターン例を示した (Fig. 13). 図に示したように, 各 GlcNAc の面積から各濃度を計算した. 以降, タイムコースのすべての時間や変異体についても同様に行った.

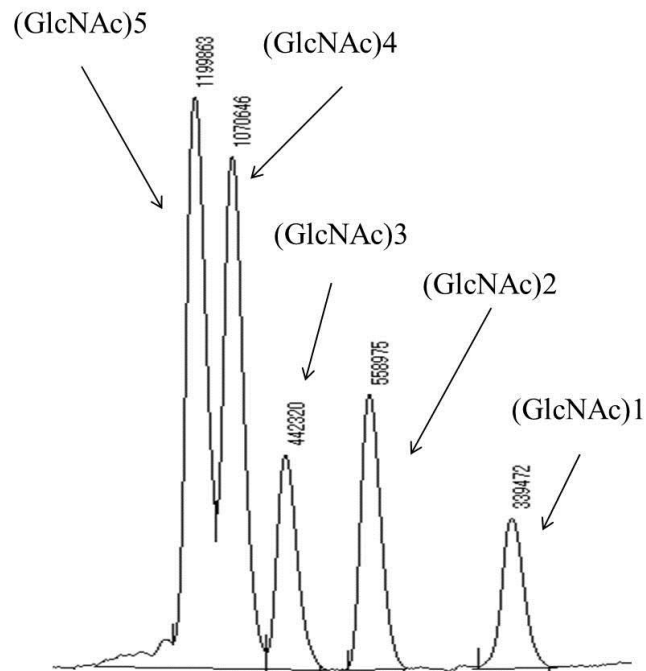


Fig. 13. Elution pattern of oligosaccharides on HPLC (TSK-gel G-Oligo-PW column).

The (GlcNAc) n ($n=1\sim 5$) on each peak indicates the degree of polymerization of the oligosaccharide. The peak area of the oligosaccharide indicates in numerals.

Wild type は, (GlcNAc) $_5$ を 20 分で分解し, 反応終了時の反応生成物の濃度は (GlcNAc) $_1 >$ (GlcNAc) $_2 >$ (GlcNAc) $_4 >$ (GlcNAc) $_3$ であった (Fig. 14A). 一方, D48A では, 反応速度が遅くなり, 反応開始後 240 分で (GlcNAc) $_5$ が消失し, 反応生成物に関しては, wild type と異なり (GlcNAc) $_1 >$ (GlcNAc) $_4 >$ (GlcNAc) $_2 >$ (GlcNAc) $_3$ であった (Fig. 14B). さらに, Ser50 の変異体では反応速度が遅くなり, S50A では反応開始後 90 分で (GlcNAc) $_5$ が消失し, 変異体の反応生成物に関しては, wild type と比べて (GlcNAc) $_2$ が若干減少するとともに (GlcNAc) $_4$ の増加が見られたが, 反応終了時の反応生成物の濃度は, wild type と同様に (GlcNAc) $_1 >$ (GlcNAc) $_2 >$ (GlcNAc) $_4 >$ (GlcNAc) $_3$ であった (Fig. 14C). 2 種の変異体のキチンオリゴマー (GlcNAc) $_5$ に対する活性は, 高分子基質であるグライコールキチンに対する活性の低下と一致した.

次に, Asp48 および Ser50 の置換が, 基質結合エネルギーや速度

定数に与える影響を詳細に検討するため、実験タイムコースのコンピュータ・シミュレーションを行った。その結果、実験タイムコースをほぼ再現した計算タイムコースが得られた (Fig. 14D, 14E, 14F)。Wild type と比較して D48A は、D 部位と E 部位の基質結合自由エネルギーが 0.2 kcal/mol 減少し、F 部位の基質結合自由エネルギーが 0.1 kcal/mol 増加した。また、糖転移反応の速度定数 (k_{-1}) が 40 s^{-1} から 19 s^{-1} に減少し、グリコシド開裂の速度定数 (k_{+1}) が 0.065 s^{-1} に減少した (Table 4)。一方、wild type と比較して S50A は、D 部位と E 部位の基質結合自由エネルギーがそれぞれ 0.1 kcal/mol と 0.2 kcal/mol 減少し、F 部位の基質結合自由エネルギーが 0.1 kcal/mol 増加した。また、糖転移反応の速度定数 (k_{-1}) は S50A が 40 s^{-1} から 26 s^{-1} に減少し、グリコシド開裂の速度定数 (k_{+1}) は S50A が 0.25 s^{-1} に減少した (Table 4)。したがって、D48A および S50A では、D から F 部位での基質結合様式が wild type とは異なることが示唆され、この結合様式の変化は、D から F 部位での基質やアクセプターの結合に影響し、その結果として糖転移反応の速度定数が減少したのではないかと考えられた。さらに、変異体の触媒活性の低下は、基質結合力の低下とともに、グリコシド開裂の速度定数が小さいことにも起因することが明らかとなった。これらの結果は、基質結合力の測定結果と一致した。

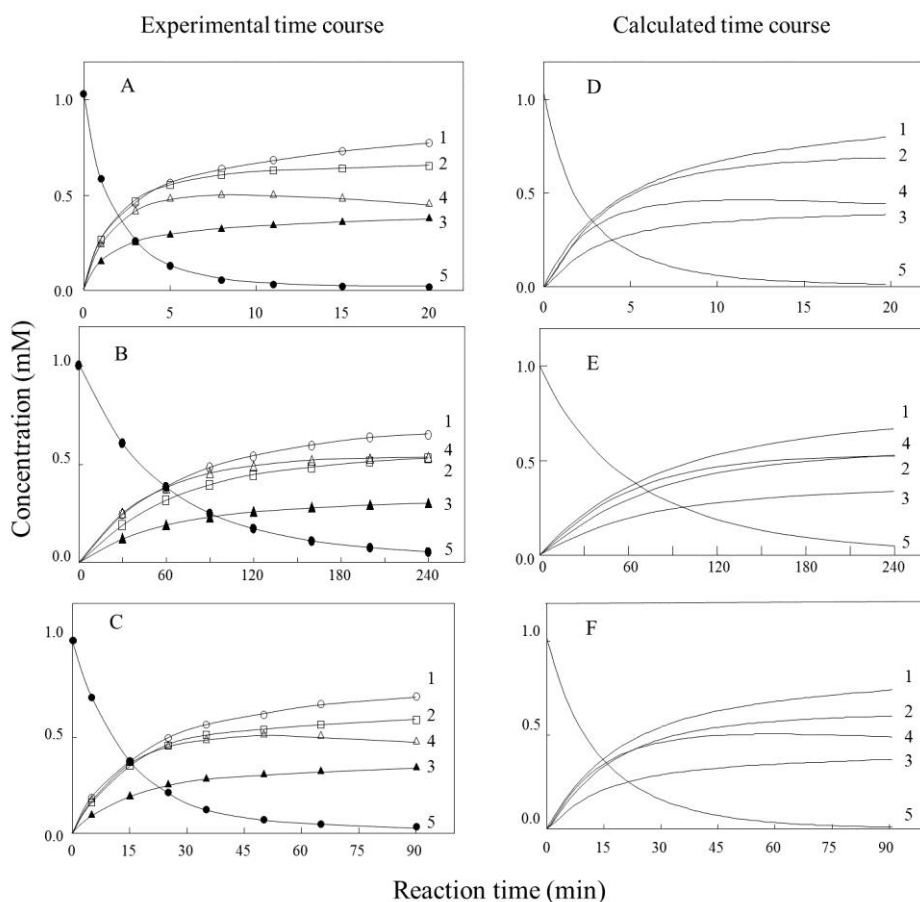


Fig. 14. Experimental and calculated time course plots of for (GlcNAc)₅ degradation by wild type and mutant lysozymes [(A, D) wild type, (B, E) D48A and (C, F)S50A].

Numerals in the figures are the polymerization degree of the reaction product species. (GlcNAc)₁, (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₄, and (GlcNAc)₅, are indicated as ○, □, ▲, △, and ●, respectively.

Table 4. Estimated values of reaction parameters for wild type and mutant lysozymes with (GlcNAc)₅.

HEL	Binding free energy (kcal/mol)						Rate constants (s ⁻¹)		
	A	B	C	D	E	F	k_{+1}	k_{-1}	k_{+2}
wild type	-2.0	-3.0	-5.0	4.5	-2.5	-1.5	0.93	40.0	0.30
D48A	-2.0	-3.0	-5.0	4.7	-2.3	-1.6	0.065	19.0	0.30
S50A	-2.0	-3.0	-5.0	4.6	-2.3	-1.6	0.25	26.0	0.30

k_{+1} : cleavage of glycosidic linkage k_{-1} : transglycosylation k_{+2} : hydration

第 4 項 GdnHCl に対する安定性

タンパク質は立体構造を保つことにより、触媒活性を保つ。そこで、触媒基が形成する水素結合ネットワークの Asp48 および Ser50 が立体構造へ寄与するかを検討するため、2 種の変異体の GdnHCl に対する構造安定性を熱力学的に評価し、wild type と比較した。GdnHCl に対する安定性測定は、3 回行い、同様の結果が得られた。そのうちの 1 回を Fig. 15 に示した。得られた変性曲線および変性曲線から計算した熱力学諸量を求めた (Table 5)。その結果、2 種の変異体の変性曲線は wild type と比較して低濃度側にシフトし、構造安定性が低下した。Wild type の変性の中点濃度 (C_m) が 3.99 M であるのに対し、2 種の変異体の C_m は D48A が 3.15 M ($\Delta C_m = -0.84$ M), S50A が 3.14 M ($\Delta C_m = -0.85$ M) であった。また、2 種の変異体の変性剤非存在下での変性の自由エネルギー変化 ($\Delta G_D^{H_2O}$) は、wild type と比較して D48A が -2.65 kcal/mol, S50A が -2.28 kcal/mol 減少した。したがって、Asp48 および Ser50 は、水素結合ネットワークの維持に関与すると考えられ、この水素結合ネットワークが HEL の立体構造に重要であると推測された。

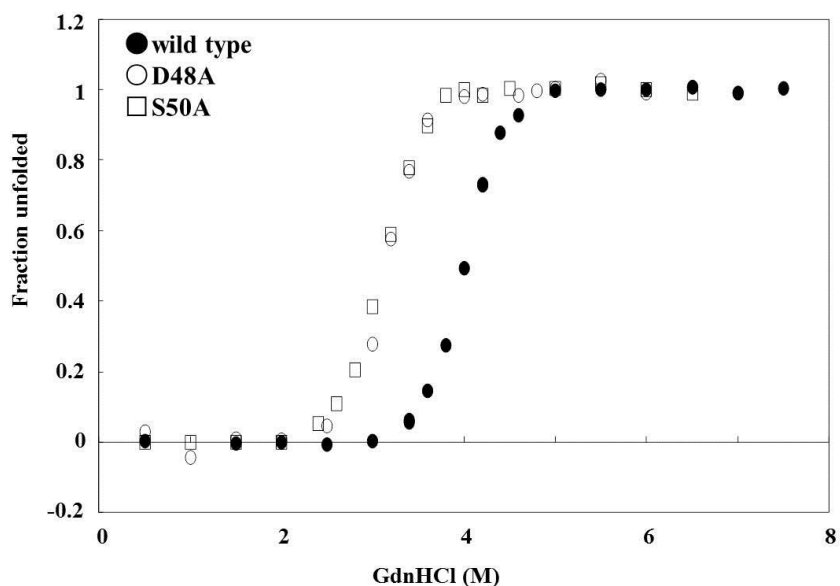


Fig. 15. GdnHCl-induced unfolding curves of wild type and mutant lysozymes (D48A and S50A) obtained by fluorescence measurements at 30°C.

Table 5. Parameters characterizing the GdnHCl denaturations of wild type and mutant lysozymes obtained by fluorescence measurements. The m value is a measure of the dependence of ΔG_D on GdnHCl concentration.

HEL	m (kcal/mol·M)	C_m (M)	ΔC_m (M)	$\Delta G_D^{H_2O}$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G_D^{H_2O}$ (kcal/mol)
wild type	2.90	3.99	-	11.56	-
D48A	2.83	3.15	-0.84	8.91	-2.65
S50A	2.95	3.14	-0.85	9.28	-2.28

第 5 項 X 線結晶構造解析

1) 結晶化

Asp48 を Ala に置換した変異体 (D48A) と (GlcNAc)₄ との複合体 (D48A-(GlcNAc)₄) および Ser50 を Ala に置換した変異体 (S50A) と (GlcNAc)₄ との複合体 (S50A-(GlcNAc)₄) に関しては, シッティングドロップ蒸気拡散法で結晶化を試みた. その結果, 4 種の結晶を得ることができた. 得られた結晶を回析実験に使用した.

2) 回析データの収集

4種の結晶について低温 X 線回折実験を行い、分解能 1.6 Å の回折データを収集した。これら回折データの処理（格子定数・空間群の決定、指数付けおよびデータの積分・スケールリング）は HKL2000 を用いて行った。その結果、格子定数から結晶系を推定し、空間群を決定した。

3) 精密化

得られたデータを基に構造精密化を行い、4種の変異体のアミノ酸残基、水分子および基質である (GlcNAc)₄ の位置を分子置換法で同定した。その結果、4種の変異体の構造決定に成功した。

4) 構造解析

精密化された4種の結晶構造は、構造既知で HEL の立体構造と比較した。まず、HEL の主鎖構造と D48A および S50A の主鎖構造を重ね合わせた (Fig. 16)。

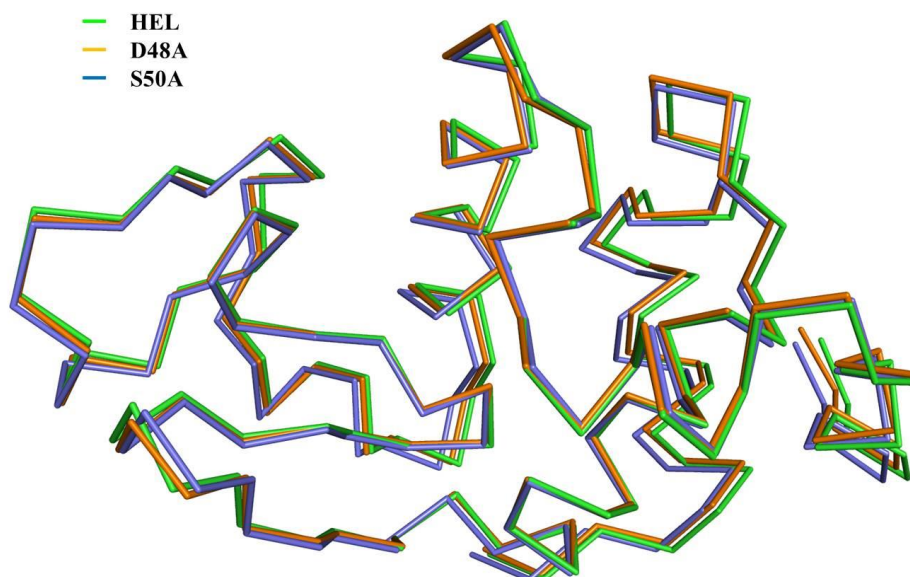


Fig. 16. Comparison of the back bone structure of HEL and mutant lysozymes (D48A and S50A).

The back bone structures of HEL, D48A and S50A were shown in green, orange and skyblue, respectively.

その結果，2 種の変異体の主鎖構造に大きな変化がないことが確認され，CD スペクトルの結果と一致した．このことから，Asp48 および Ser50 を置換しても主鎖構造に影響を与えないと明らかとなった．さらに，構造既知である HEL と HEL-(GlcNAc)₄ の主鎖構造を重ね合わせした結果，主鎖構造の変化が見られなかったため，基質が結合することで主鎖構造に影響がないことを確認した．さらに，各変異体と基質との複合体の主鎖構造に大きな変化がないことも確認した．

次に，基質結合に関する比較を行った．その結果，D48A-(GlcNAc)₄ および S50A-(GlcNAc)₄ の基質結合様式は，HEL-(GlcNAc)₄ と同様に，基質結合部位 A，B，C，D に糖残基が結合していた (Fig. 17)．

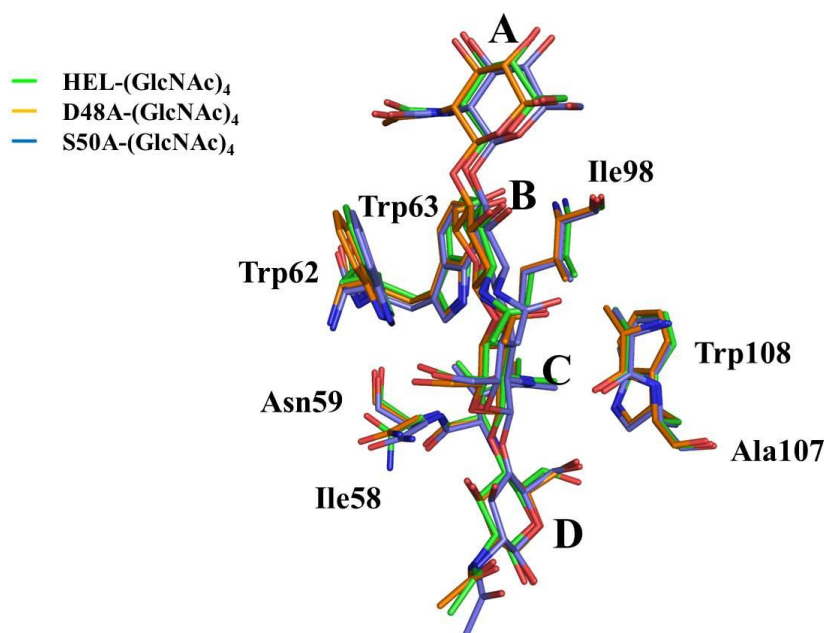


Fig. 17. Comparison of the A-D subsites of HEL-(GlcNAc)₄ and mutant lysozymes (D48A-(GlcNAc)₄ and S50A-(GlcNAc)₄).

The side chains of HEL, D48A, S50A and (GlcNAc)₄ were shown in stick.

HEL, D48A and S50A were indicated in green, orange and skyblue, respectively.

また，D48A-(GlcNAc)₄ および S50A-(GlcNAc)₄ の A-D 部位の基質結合へ関与するアミノ酸残基 (Ile58, Asn59, Trp62, Trp63, Ile98, Asn103, Ala107 および Trp108) (26) は，HEL-(GlcNAc)₄ と構造上での位置はほぼ同じであった (Fig. 17)．このことから，Asp48 と Ser50 は，

A-C 部位の基質結合に関与しないことが明らかとなった。また，E-F 部位の基質結合部位に関しては，E-F 部位に基質が結合した立体構造が得られておらず，基質結合に関与するアミノ酸は推定段階である (16, 17)。そこで，基質結合に関与すると推定されたアミノ酸残基 (Phe34, Asn37, Arg45, Asn46, Thr47, Arg114) の構造の比較を行った。その結果，Arg45, Asn46, Thr47 において，側鎖の配向の変化が見られた (Fig. 18)。このことから，E-F 部位の基質結合力が変化したのではないかと考えられ，コンピューター・シミュレーションの結果と一致した。

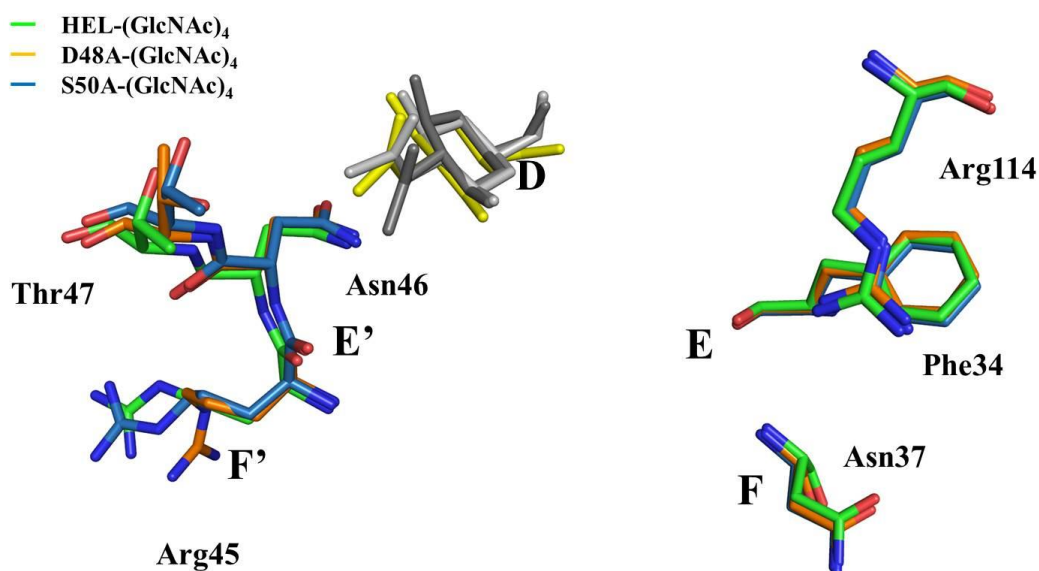


Fig. 18. Comparison of the D-F subsites of HEL-(GlcNAc)₄ and mutant lysozymes (D48A-(GlcNAc)₄ and S50A-(GlcNAc)₄).

The side chains of HEL, D48A and S50A were shown in stick.

HEL, D48A and S50A were indicated in green, orange and skyblue, respectively.

さらに，触媒基 Asp52 が形成する水素結合ネットワークがどのように変化したかを見るために，触媒基 Asp52 周辺の構造を検討した (Fig. 19A)。D48A-(GlcNAc)₄ では，Asp48 のカルボキシル基が欠失したことにより，Ser50 との水素結合が欠失した (Fig. 19B)。その結果，Ser50 の側鎖が動き，Asn59 の側鎖と水素結合が形成できず，Asn59 の配向が変化したと考えられた。このため，触媒基 Asp52 の

側鎖の配向は，Asn46 と Ser50 だけで規定されていた．また，触媒基 Asp52 と直接水素結合を形成する Asn46 と Asn59 の側鎖の配向を規定する上で，Ser50 の重要性が見出された．S50A-(GlcNAc)₄ では，Ser の水酸基が欠失することにより，Asn46，Asp48 および Asn59 との水素結合が欠失していた (Fig. 19C)．しかし，Asp48 と Asn46 の側鎖の配向は，HEL-(GlcNAc)₄ とほぼ同じ位置に存在していたが，Asn59 の側鎖の配向変化のみ見られた．

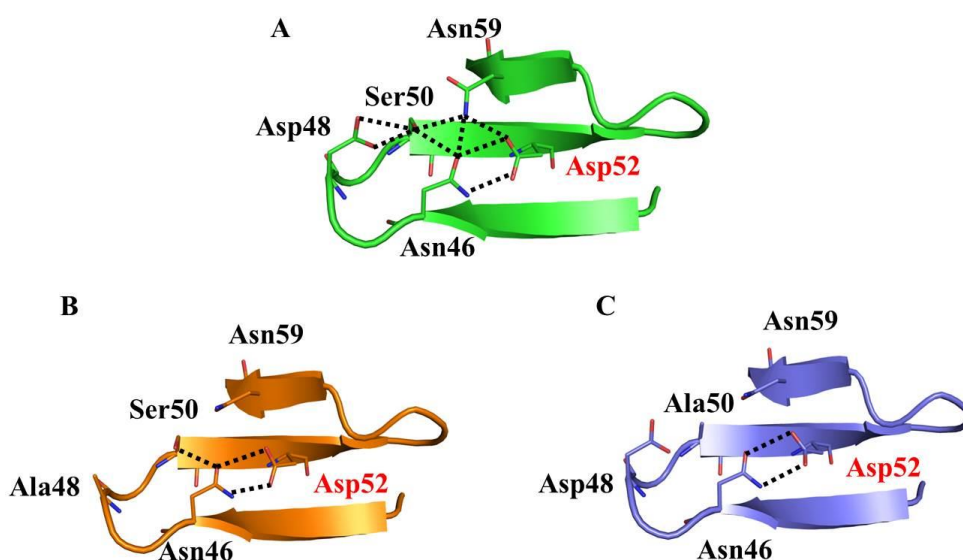


Fig. 19. The hydrogen-bonding network involving the catalytic residue Asp52 of HEL-(GlcNAc)₄ and mutant lysozymes (D48A-(GlcNAc)₄ and S50A-(GlcNAc)₄). The side chains of HEL, D48A and S50A were shown in stick. HEL, D48A and S50A were indicated in green, orange and skyblue, respectively. (A) HEL-(GlcNAc)₄, (B) D48A-(GlcNAc)₄, (C) S50A-(GlcNAc)₄

すなわち，Asp48 が D-F 部位の基質結合に大きく関与することが考えられ，Ser50 の側鎖の配向を規定することで水素結合ネットワークに重要であると考えられた．しかし，S50A の解析結果により，Asp48 と Ser50 の間の水素結合が欠失しても，Asp48 の側鎖の配向があまり変化しなかったことから，Asp48 は水素結合ネットワークに大きくは関与しないと考えられたが，D-F 部位の基質結合に関与することで HEL の触媒活性に関与することが明らかとなった．そして，S50A の解析結果より，Asn59 の側鎖の配向が変化したことから，

Asn59 の側鎖の配向を規定することで，触媒基 Asp52 の機能発現に関与していることが考えられた．このことから，Ser50 は，水素結合ネットワークに関与する Asn59 の側鎖の配向を規定することで，触媒基 Asp52 の機能発現に関与することが明らかとなった．

第 3 節 小括

HEL の触媒基である Asp 残基 (Asp52) は，緒論で述べたとおり周辺のアミノ酸 (Asp48, Ser50, Asn46 および Asn59) と水素結合ネットワークを形成している．この水素結合ネットワークに関与するアミノ酸残基 (Asn46 および Asn59) に関しては，過去に報告されている (25, 26) が，水素結合ネットワークの役割は明らかになっていない．そこで，水素結合ネットワークに関与する Asp48 および Ser50 の役割を解明することを目的とした．

HEL の触媒基 Asp52 を含む水素結合ネットワークに関与する Asp48 および Ser50 の役割は，Asp48 が水素結合ネットワークにあまり重要ではなく，D-F 部位の基質結合に関与することで HEL の触媒活性に関与することが明らかとなった．そして，Ser50 が Asn59 の側鎖の配向が変化したことから，Asn59 の側鎖の配向を規定することで，触媒基 Asp52 の機能発現に関与していることが考えられた．さらに，水素結合ネットワークが D-F 部位の基質結合力に重要であることから，糖転移反応に重要であると考えられた．しかし，Asp52 残基周辺の環境が酵素反応機構において重要であることは明らかとなったが，糖転移反応機構の解明に至らなかった．酵素反応機構の解明のためにも，その他のリゾチームとの触媒基周辺の構造や機能の比較の必要性が考えられた．

第 II 章 ダチ ヨ ウ 卵 白 リ ゾ チ ー ム の 触 媒 基 周 辺 の 変 異 体 解 析

緒 言

第 I 章で述べたようにニワトリ型リゾチームである HEL の触媒基 Asp52 が酵素反応機構に重要であると考えられ、Asp 残基周辺の環境も重要であることが明らかとなった。一方、グース型リゾチームである OEL の触媒基周辺は、Glu 残基は HEL と同様に保存されていたが、Asp 残基の位置には、Gly90 が存在し、その近傍に 2 つの Asp 残基 (Asp86 および Asp97) が存在していた (Fig. 4)。そこで本章では、OEL においても、この 2 つの Asp 残基が重要であるあるか検証するために Ala に置換した変異体を作製するとともに、HEL と似た触媒基環境にするため、Gly90 を Asp 残基に置換した変異体を作製し、機能解析を行った。これらの変異体を解析することにより、グース型リゾチームの触媒基周辺の新たな知見を得ることを目的とし、ニワトリ型リゾチームを比較することを目的とした。

第 1 節 実験材料および実験方法

第 1 項 材料

第 I 章第 1 節第 1 項で述べた方法を用いた。CM-トヨパールは東ソーから購入した。Crystal Screen 1, 2, Cyro は Hampton Research から、Wizard 1, 2 と Cryo 1, 2 は Emerald Biosystems から、Crystallization kit for Protein-Protein Complexes は SIGMA から購入した。

第 2 項 遺伝子操作

第 I 章第 1 節第 2 項で述べた方法で行った。部位特異的変異法は以下のように行った。すなわち、部位特異的変異は PCR を用いた megaprimer 法 (53) で行った。OEL の Lys58 から Gly152 をコードす

る遺伝子 (OEL-B) が pBluescript ベクターの *Hind*III と *Sma* I サイトに連結されたプラスミド (pB OEL-B) を鋳型とし, Asp86 変異プライマーと 3' *Sma* I プライマーを用いて 1st PCR を行った. 続いて, pB OEL-B を鋳型とし, 1st PCR 産物と 5' *Hind*III プライマーを用いて 2nd PCR を行い, Asp86 を Ala に置換した変異 OEL-B 遺伝子を作製した. 増幅された DNA 断片は, pBluescript ベクターの *Hind*III と *Sma* I サイトに連結後, 塩基配列を確認し, pB OEL-B (D86A) とした. 精製した変異 OEL-B (D86A) 遺伝子断片は, pB Ser-OEL WT の *Hind*III と *Sma* I サイトに挿入し, OEL-B 遺伝子と入れ替えることで Asp86 を Ala に置換した変異 Ser-OEL D86A 遺伝子を作製した. 同様に, Asp97 の変異を含む Met94~Gly152 をコードする遺伝子をコードする遺伝子 (D97A), 2 つの Asp 残基を変異させた遺伝子, さらに, Gly90 を Asp 残基に変異させた遺伝子 (G90D) および Asp86, Gly90, Asp97 をそれぞれ Ala, Asp, Ala に変異させた遺伝子 (D86A/G90D/D97A) を準備し, 変異 Ser-OEL 遺伝子を作製した.

第 3 項 部位特異的変異体の分泌発現と精製

第 I 章第 1 節第 3 項で述べた方法を用いて行った. 陽イオン交換クロマトグラフィーには, 樹脂体として CM-トヨパールを用い, 緩衝液として 0.03 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用した. 粗抽出は蒸留水で 4 倍希釈し, 0.03 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した CM-トヨパールカラム (4×15cm) に供した. 同緩衝液および 0.1 M NaCl を含む同緩衝液で十分に洗浄した後, 0.5 M NaCl を含む同緩衝液でタンパク質を溶出した. 活性画分はさらに蒸留水で 4 倍希釈した後, 遠心分離で沈殿を除去し, 上清を 0.03 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した CM-トヨパールカラム (1×95 cm) に供した. 同緩衝液で十分に洗浄後, NaCl 濃度を 0 M から 0.35 M まで直線的に上昇させてタンパク質を溶出した. クロマトグラフィーで得られた画分は紫外吸収法でタンパク質を測定し, 溶菌法でタンパク質の活性を測定した. 活性画分は蒸留水に十分透析後, 遠心分離で沈殿を除去し

た後、凍結乾燥した。

第 4 項 ダチョウ卵白リゾチームの変異体の機能解析

円偏光二色性 (CD) スペクトルの測定は、第 I 章第 1 節第 5 項で述べた方法を用いて行った。活性測定は、*M.luteus* および N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のオリゴマーを用いて行った。すなわち、溶菌法は、第 I 章 1 節第 8 項 1) で述べた方法を用いて行った。N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のオリゴマーを用いた活性測定は、第 I 章第 8 項 3)2 で述べた方法を用いて行った。しかし、基質には、(GlcNAc)₅ および (GlcNAc)₆ を使用した。さらに、分析には、TSK-gel Amide-80 カラム (4.6×250 mm, 東ソー製) を装着した HITACHI L-7000 シリーズ高速液体クロマトグラフィーに供した。溶出は溶媒に 72%アセトニトリル (MeCN) を用い、カラム温度 30 °C, 流速 1.0 ml/min で行った。解析に用いた TSK-gel Amide-80 は、温度 30°C で測定することで、反応産物のアノマー糖を分析することができる。すなわち、反応生成物のアノマー体 (α -糖および β -糖) が分離して検出される。反応生成物の濃度は、二つのピーク両方を含めた面積により、反応生成物の濃度を算出した。反応生成物の各オリゴマーのピーク面積は HITACHI L-7000 システムマネージャーを用いて測定した。さらに、反応産物は、質量分析機を用いて解析を行った。すなわち、酵素と基質を混合後、MALDI プレートの上にスポットし乾燥させた。さらにその上に 0.1% TFA / 50% MeCN に溶解した CHCA 飽和溶液 (10 mg / ml) を 1 μ l 重層し、室温で乾燥させた。その後、アプライドバイオシステムズ社製の MALDI-TOF-MS : ABI 4800 Proteomics Analyzer を使用し、リニアモードで分析した。

第 5 項 熱力学的安定性の測定法

1) 蛍光測定の方法

1. 熱に対する安定性

熱に対するタンパク質の安定性は、温度変化に伴うタンパク質の

蛍光強度の変化で測定した。試料溶液は、タンパク質濃度が 0.015 mg/ml (7.1×10^{-7} M) になるように 0.5 M グアニジン塩酸 (GdnHCl) を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した。試料溶液を脱気した後、試料を蛍光セルに入れ、各温度で 5 分間放置後、励起波長 280 nm における 300~400 nm の蛍光スペクトルを、F-4500 型蛍光分光光度計 (日立製作所製) を用いて測定した。実際のセル内の温度は TX1001 デジタル温度計 (横河 M&C 製) で測定し、エキサイテーションスリットおよびエミッションスリットは 5 nm に、積算回数は 4 回に設定した。また蛍光は非常に不安定であるため、蛍光分光光度計の蛍光強度が十分に落ち着いてから測定を行った。

2. 変性剤 GdnHCl に対する安定性

GdnHCl に対するタンパク質の安定性は、GdnHCl の濃度変化に伴うタンパク質の蛍光強度の変化で測定した。試料溶液中、タンパク質濃度は 0.015 mg/ml (7.1×10^{-7} M), GdnHCl 濃度は 0~7.5 M になるように 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH5.0) で調整した。酵素溶液 0.2 ml と GdnHCl 溶液 3.8 ml を混合し、30°C で 1 時間以上インキュベートした後、蛍光分光光度計を用いて測定した。蛍光の測定は励起波長 280 nm での蛍光波長 360 nm の時間変化を測定した。また、エキサイテーションスリットおよびエミッションスリットは 5 nm に設定した。また蛍光は非常に不安定であるため、蛍光分光光度計の蛍光強度が十分に落ち着いてから測定を行い、測定値はトリプトファン溶液で補正した。

2) 熱力学的パラメーターの解析

1. 熱に対する熱力学的安定性

熱力学的パラメーターは、360 nm の蛍光強度を温度に対してプロットして得られた変性曲線から算出した。すなわち、変性過程が N (未変性) と D (変性) のみから成る 2 状態変性であると仮定し、各温度に対する平衡定数 K_d および変性の自由エネルギー変化 ΔG_D を下

記の式より求めた.

$$K_d = [D]/[N]$$

$$\Delta G_D = -RT \ln K_d$$

R: 気体定数, T: 絶対温度

タンパク質が半分変性する変性の midpoint 温度 (T_m) は, $\Delta G_D = 0$ となるときの絶対温度 T をセ氏温度 ($^{\circ}\text{C}$) に変換して求めた. T_m における変性のエンタルピー変化 ΔH_m とエントロピー変化 ΔS_m は下記の式より求めた.

$$\Delta H_m = -Rd(\ln K_d)/d(1/T)$$

$$\Delta S_m = \Delta H_m/T_m$$

野生型 (WT) と変異体の T_m における変性の自由エネルギー変化の差 ($\Delta \Delta G$) は下記の式から求めた (63).

$$\Delta \Delta G = \Delta T_m \times \Delta S_m \text{ (} T_m \text{ における WT の } \Delta S_m \text{)}$$

2. 変性剤 GdnHCl に対する熱力学的安定性

熱力学的パラメーターは, トリプトファンで補正して得られた 360nm の蛍光強度を GdnHCl 濃度に対してプロットして得られた変性曲線から算出した. 変性過程が N (未変性) と D (変性) の 2 状態変性であると仮定し, 各 GdnHCl 濃度に対する平衡定数 K_d および変性の自由エネルギー変化 ΔG_D を下記の式より求めた.

$$K_d = [D]/[N]$$

$$\Delta G_D = -RT \ln K_d$$

R: 気体定数, T: 絶対温度

安定性の指標となる変性剤非存在下における変性の自由エネルギー変化 ($\Delta G_D^{\text{H}_2\text{O}}$) は, ΔG_D を GdnHCl 濃度に対してプロットし, ΔG_D が GdnHCl 濃度と比例関係にあると仮定して下記の式より算出した.

$$\Delta G_D = \Delta G_D^{\text{H}_2\text{O}} - m[\text{GdnHCl}] \text{ (63)}$$

m: 比例定数

タンパク質が半分変性する変性曲線の midpoint の変性剤濃度 (C_m) で

は $K_d=1$ であることから, $\Delta G_D=0$ となる. したがって, C_m は下記の式より算出できる.

$$C_m = \Delta G_D^{H_2O}/m$$

野生型 (WT) と変異体との変性剤非存在下での変性の自由エネルギー変化の差 ($\Delta \Delta G_D^{H_2O}$) は下記の式から求めた.

$$\Delta \Delta G_D^{H_2O} = \Delta G_D^{H_2O}(\text{mutant}) - \Delta G_D^{H_2O}(\text{WT})$$

第 6 項 X 線結晶構造解析

結晶化方法は, 第 I 章第 1 節第 10 項に述べた方法を用いて行った. 結晶化条件のスクリーニングは, 塩, pH, 沈殿剤の異なる結晶化条件スクリーニングキット Crystal Screen 1&2, Crystal Screen Cryo, Wizard 1&2, Cryo 1&2, Crystallization kit for Protein-Protein Complexes を用いて最適結晶化条件の検討を行った. 得られた結晶の X 線回折データは, 筑波の高エネルギー加速器研究機構 (Photon Factory BL5A) において収集した. その後, 回折データの処理は, プログラム HKL2000 を使用して行った. 初期位相の決定は分子置換法により行い, プログラムには MOLREP (65) を使用した. 分子モデルの精密化は, エネルギー関数を利用した最小二乗法により行った. 分子構造に関して REFMAC5 (66), CNS (67) での精密化を行い, さらに CCP4 (68) で計算された電子密度マップを MIFit (69), COOT (70) 上で確認しながら手動で主鎖および側鎖の再構築を行った. また, 分子グラフィックスの作図には, PyMOL (<http://www.pymol.org/>) を使用した.

第 2 節 実験結果および考察

OEL の変異体の解析内容は, Fig. 20 に示した. すなわち, PCR を用いた部位特異的変異法により変異リゾチームの遺伝子を作製した. その後, 酵母を用いて変異リゾチームの発現し, 陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した. その後, Fig. 20 に示したように解析した.

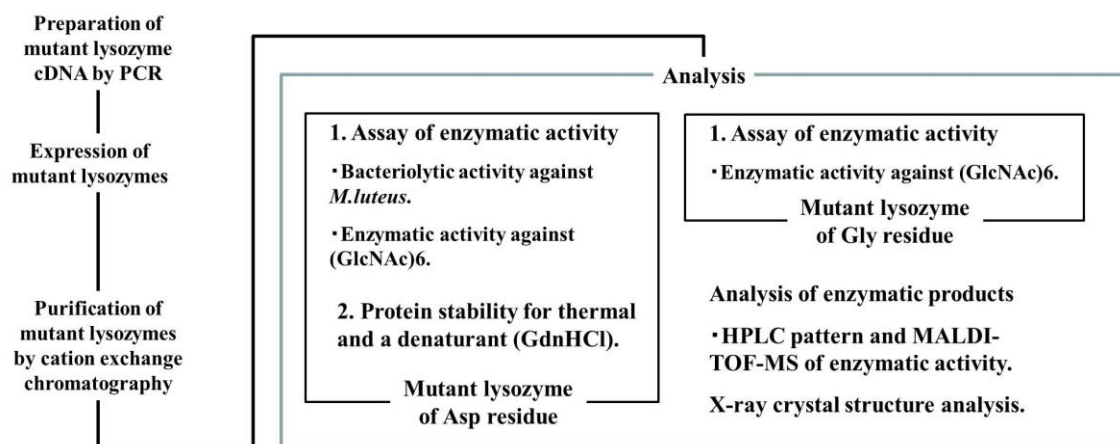


Fig. 20. The contents of experiments

第 1 項 部位特異的変異体の作製

PCR を用いた megaprimer 法 (53) で Asp86 および Asp97 を Ala に置換した変異体 (D86A, D97A), 2 つの Asp 残基を Ala に置換した変異体 (D86A/D97A), Gly90 を Asp 残基に置換した変異体 (G90D) および HEL と似た触媒基環境にするために置換した変異体 (D86A/G90D/D97A) を作製した. 作製した変異遺伝子は塩基配列を決定して目的の変異を確認し, 最終的にプラスミドである pPIC9K の *Bam*HI と *Eco*RI 部位に挿入し, 各変異体リゾチーム遺伝子の酵母発現ベクターを構築した. 目的遺伝子の pPIC9K ベクターへの挿入は, プラスミド DNA を単離・精製した後, 制限酵素 *Bam*HI と *Eco*RI で消化し, 1.5% アガロースゲル電気泳動で確認した. 各変異体リゾチーム遺伝子が連結された発現プラスミドは, LiCl 法でメタノール資化能を有する宿主酵母 *Pichia pastoris* (GS115) に形質転換した. 得られた酵母形質転換体については G418 を用いたスクリーニングを行い, G418 濃度が 1.5 mg/ml のプレートから得られた形質転換体を小スケールでの発現に使用した. 小スケールの発現で培養上清の溶菌活性が最も高かった形質転換体を選出し, 以後の大量発現に使用した.

第 2 項 変異体リゾチームの酵母での分泌発現と精製

各変異体リゾチーム遺伝子を含む酵母形質転換体を BMGY 培地で前培養した後、菌体を 1% メタノールを含む BMMY 培地に植え継ぎ、30°C で 120 時間培養して各変異体の大量発現を行った。培養中、メタノールを最終濃度が 1% となるように 24 時間ごとに添加した。酵母の増殖は 600 nm における濁度を指標とし、菌体外に分泌発現した変異体の活性は *M. luteus* に対する溶菌法で測定した。その結果、発現を誘導後、培養時間の経過と共に菌体量と変異体の分泌発現量が増加していることが確認できた。

培養液中に分泌発現した変異体は、培養液を遠心分離して菌体を除去した後、陽イオン交換樹脂である CM-トヨパールを用いたカラムクロマトグラフィーで精製した。その後、再度 CM-トヨパールを用いた陽イオン交換カラムで再クロマトグラフィーを行った。その結果、溶菌活性を伴うピークが得られた。以上の精製過程における変異体の収量は、培地 900 ml あたり変異体が約 30 mg であった。

第 3 項 Asp 残基の変異体 (D86A, D97A, D86A/D97A) の機能解析

Asp 残基を変異させたタンパク質がタンパク質合成後正しくフォールディングしたかを調べるために、タンパク質の主鎖構造の情報が得られる遠紫外領域 (200-250 nm) の CD スペクトルを測定した。その結果、4 種の変異体の CD スペクトルは、wild type とほとんど同一の CD スペクトルを示した。このことから、3 種の変異体は wild type と同等の主鎖構造を持つことが示された。

リゾチームは、菌体に対する溶菌活性を示す。そのため、3 種の変異体の活性は、まず基質に MurNAc と GlcNAc の共重合体を細胞壁の構成成分とする *M. luteus* を用いて、その溶菌作用を測定する方法で評価した。溶菌活性測定は、4 回行い、同様の結果が得られた。そのうちの 1 回を Fig. 21 に示した。その結果、3 種の変異体の溶菌活性は、wild type の活性と比較して、ほとんど活性がみられなかった。

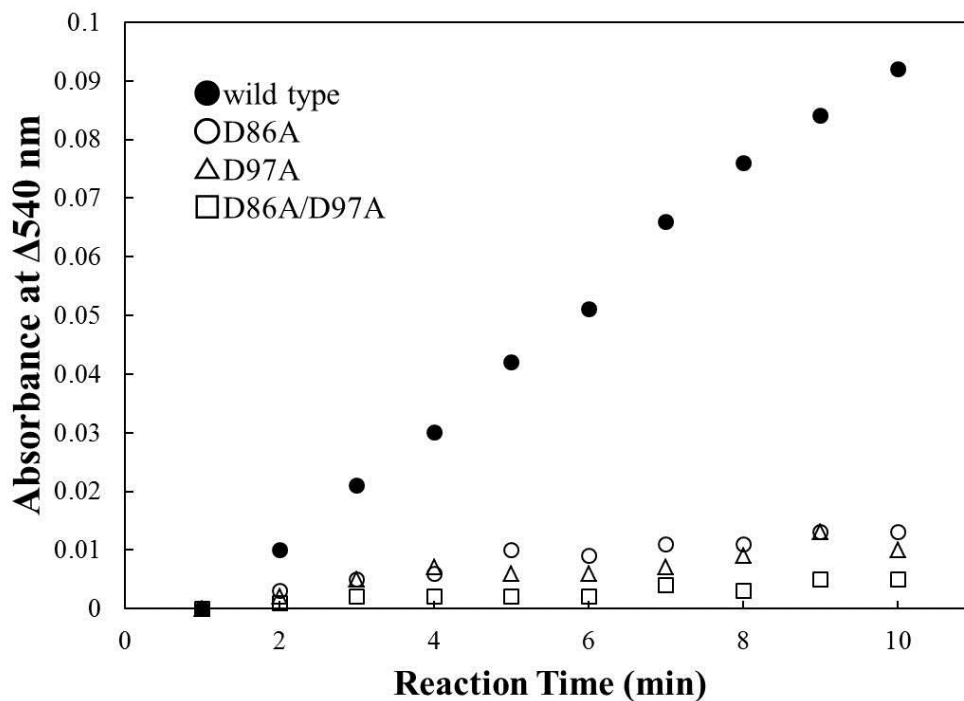


Fig. 21. Lytic activity of wild type and mutant lysozymes (D86A, D97A and D86A/D97A) against *M. luteus* cells.

さらに、3種の変異体の活性を低分子基質である (GlcNAc)₆ を用いて、wild type の至適 pH での反応生成物の経時的な変化で検討した。反応産物は TSKgel Amide-80 カラムを用いた HPLC で分離した (Fig. 22)。図に示したように、各 GlcNAc の前半 (α-糖) および後半のピーク (β-糖) の全面積から各濃度を計算した。以降、タイムコースのすべての時間や変異体についても同様に行った。

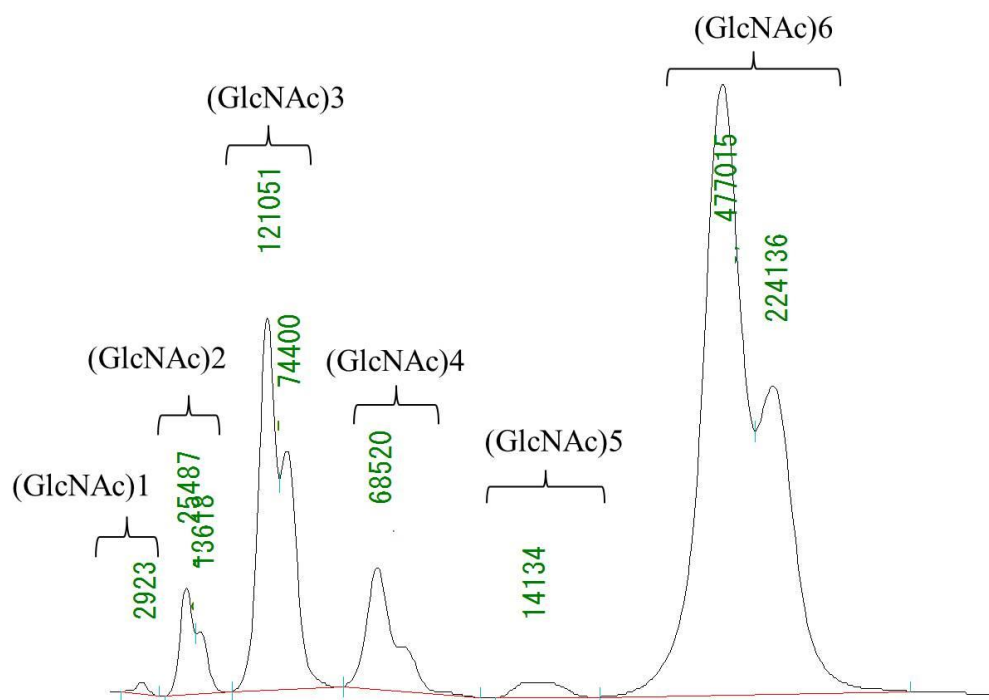


Fig. 22. Elution pattern of oligosaccharides on HPLC (TSK-gel Amide-80 column).

The (GlcNAc)*n* (*n*=1~6) on each peak indicates the degree of polymerization of the oligosaccharide. The peak area of the oligosaccharide indicates in numerals of green.

Wild type は, (GlcNAc)₆ を 180 分で分解し, 反応終了時の反応生成物の濃度は (GlcNAc)₃>(GlcNAc)₂>(GlcNAc)₄>(GlcNAc)₁ であった (Fig. 23A). 一方, Asp 残基の変異体である D97A では, 反応速度が遅くなり, 初期基質を 48 時間で半分分解する程度になった (Fig. 23B). さらに, D86A および D86A/D97A では, ほとんど活性がみられなかった (Fig. 23B, 23D). このことから, この 2 つの Asp 残基が酵素反応に関与することが明らかとなった.

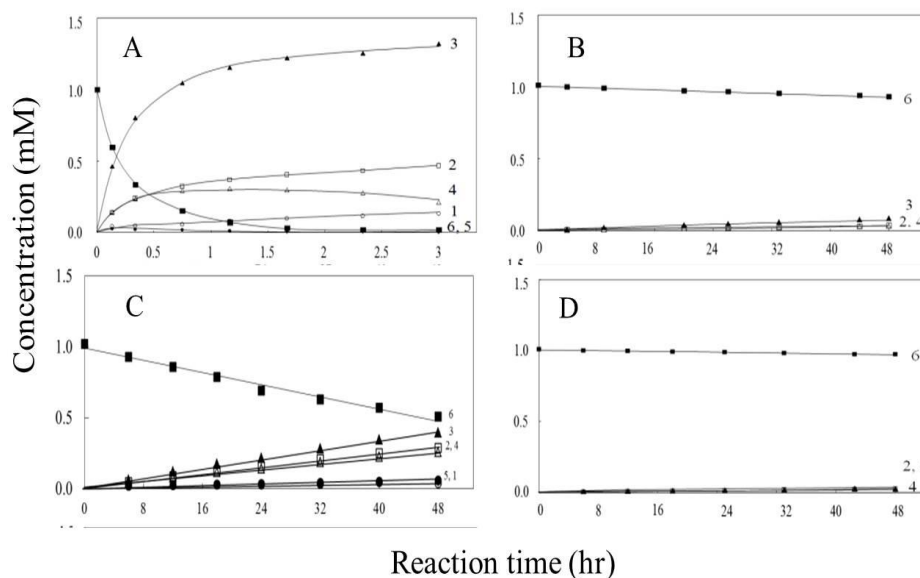


Fig. 23. Experimental time course plots of for (GlcNAc)₆ degradation by wild type (A) and mutant lysozymes [(B) D86A, (C) D97A and (D) D86A/D97A].

Numerals in the figures are the polymerization degree of the reaction product species. (GlcNAc)₁, (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅ and (GlcNAc)₆ are indicated as ○, □, ▲, △, ●, and ■, respectively.

さらに，タンパク質は立体構造を保つことにより，触媒活性を保つ．そこで，酵素活性に関与する2つの Asp 残基が立体構造へ寄与するかを検討するため，3種の変異体の熱および GdnHCl に対する構造安定性を熱力学的に評価し，wild type と比較した．得られた変性曲線および変性曲線から計算した熱力学諸量を求めた (Fig. 24 および Table 6)．その結果，熱に対する安定性では，3種の変異体の変性曲線は wild type と比較して低温側にシフトし，構造安定性が低下した．Wild type の変性の midpoint 温度 (T_m 値) が 60.6 °C であるのに対し，3種の変異体の T_m 値は D86A が若干減少し 59.7 °C ($\Delta T_m = -0.9$ °C)，D97A, D86A/D97A が大きく減少し 55.2 °C ($\Delta T_m = -5.4$ °C) であった．また，3種の変異体の変性の自由エネルギー変化 ($\Delta \Delta G$) は，wild type と比較して D86A が -0.46 kcal/mol, D97A が -2.75 kcal/mol, D86A/D97A が -2.75 kcal/mol と減少した．さらに，GdnHCl に対する安定性でも，3種の変異体の変性曲線は wild type と比較して低濃度側にシフトし，構造安定性が低下した．Wild type の変性の

中点濃度 (C_m 値) が 2.21 M であるのに対し, 3 種の変異体の C_m 値は D86A が wild type と同様に 2.21 M を示し, D97A, D86A/D97A が大きく減少し 1.78 M ($\Delta C_m = -0.43$ M) および 1.80 M ($\Delta C_m = -0.41$ M) であった. また, 3 種の変異体の変性の自由エネルギー変化 ($\Delta \Delta G$) は, wild type と比較して D86A が -0.1 kcal/mol, D97A が -2.66 kcal/mol, D86A/D97A が -2.61 kcal/mol と減少した. したがって, Asp86 はほとんど構造安定性に関与せず, Asp97 が構造安定性に大きく関与することが明らかとなった.

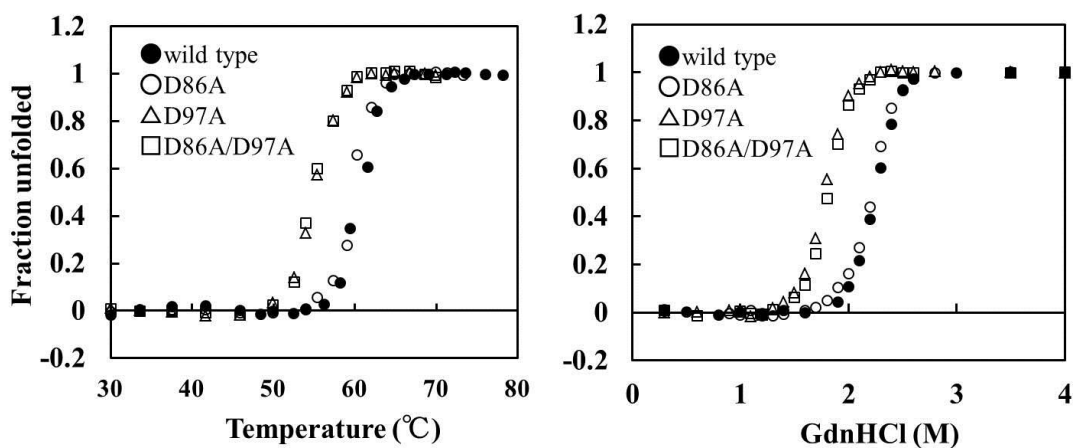


Fig. 24. Thermal and guanidine hydrochloride (GdnHCl)-induced unfolding curves of wild type and mutant lysozymes (D86A, D97A and D86A/D97A) obtained by fluorescence measurements.

Table 6. Parameters characterizing the thermal and GdnHCl denaturations of wild type and mutant lysozymes obtained by fluorescence measurements.

	Thermal unfolding					GdnHCl unfolding				
	ΔH_m (kcal/mol)	ΔS_m (kcal/mol·K)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	$\Delta \Delta G$ (kcal/mol)	m (kcal/mol·M)	C_m (M)	ΔC_m (M)	$\Delta G_D^{H_2O}$ (kcal/mol)	$\Delta \Delta G_D^{H_2O}$ (kcal/mol)
Wild type	170.1	0.510	60.6	—	—	5.48	2.21	—	12.11	—
D86A	163.0	0.490	59.7	-0.9	-0.46	5.44	2.21	0.00	12.01	-0.1
D97A	142.6	0.434	55.2	-5.4	-2.75	5.31	1.78	-0.43	9.45	-2.66
D86A/D97A	145.7	0.444	55.2	-5.4	-2.75	5.27	1.80	-0.41	9.50	-2.61

第 4 項 Gly 残基の変異体 (G90D, D86A/G90D/D97A) の機能解析
変異体の活性を低分子基質である (GlcNAc)₆ を用いて, wild type

の至適 pH での反応生成物の経時的な変化で検討した。

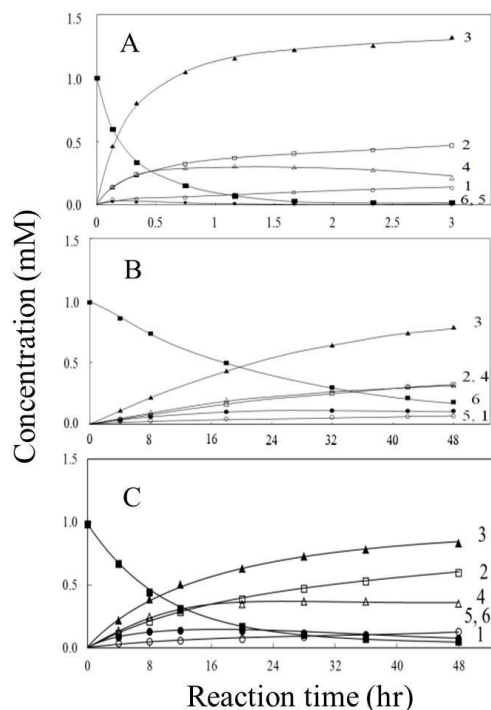


Fig. 25. Experimental time course plots of for (GlcNAc)₆ degradation by wild type (A) and mutant lysozymes [(B) G90D and (C) D86A/G90D/D97A].

Numerals in the figures are the polymerization degree of the reaction product species. (GlcNAc)₁, (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅ and (GlcNAc)₆ are indicated as ○, □, ▲, △, ●, and ■, respectively.

Wild type は、(GlcNAc)₆ を 180 分で分解し、反応終了時の反応生成物の濃度は (GlcNAc)₃>(GlcNAc)₂>(GlcNAc)₄>(GlcNAc)₁ であった (Fig. 25A). 一方、Gly 残基の変異体である G90D では、反応速度が遅くなり、48 時間で初期基質をやっと分解した。しかし、反応生成物の濃度に変化はみられなかった (Fig. 25B). 次に、HEL と似た触媒基環境にした変異体である D86A/G90D/D97A では、第 3 章第 3 項で述べたように、D86A/D97A はほとんど活性がみられなかったが、G90D を導入することにより、活性が回復した (Fig. 25C). このことから、ニワトリ型リゾチームの Asp52 に相当する位置に導入した Asp 残基が酵素反応に新たに参与したと考えられた。

第 5 項 触媒基周辺を変異させた影響について

変異体の活性を低分子基質である (GlcNAc)₆ を用いた反応生成物の解析については、第 2 章第 3・4 項に記載したが、その解析の中で、HPLC を用いた解析において、反応に用いた初期基質 (GlcNAc)₆ より高分子の基質が確認された。そこで、D86A, D97A, D86A/D97A, G90D および D86A/G90D/D97A について、再度 HPLC を用いて解析を行った。その結果、D97A, G90D および D86A/G90D/D97A において、初期基質より高分子の糖が観察された (Fig. 26)。さらに、D97A, G90D および D86A/G90D/D97A について、質量分析機を用いて、高分子の糖を解析した。その結果、G90D および D86A/G90D/D97A において、N-アセチルグルコサミンの 11 量体までの糖が確認された (Fig. 27)。

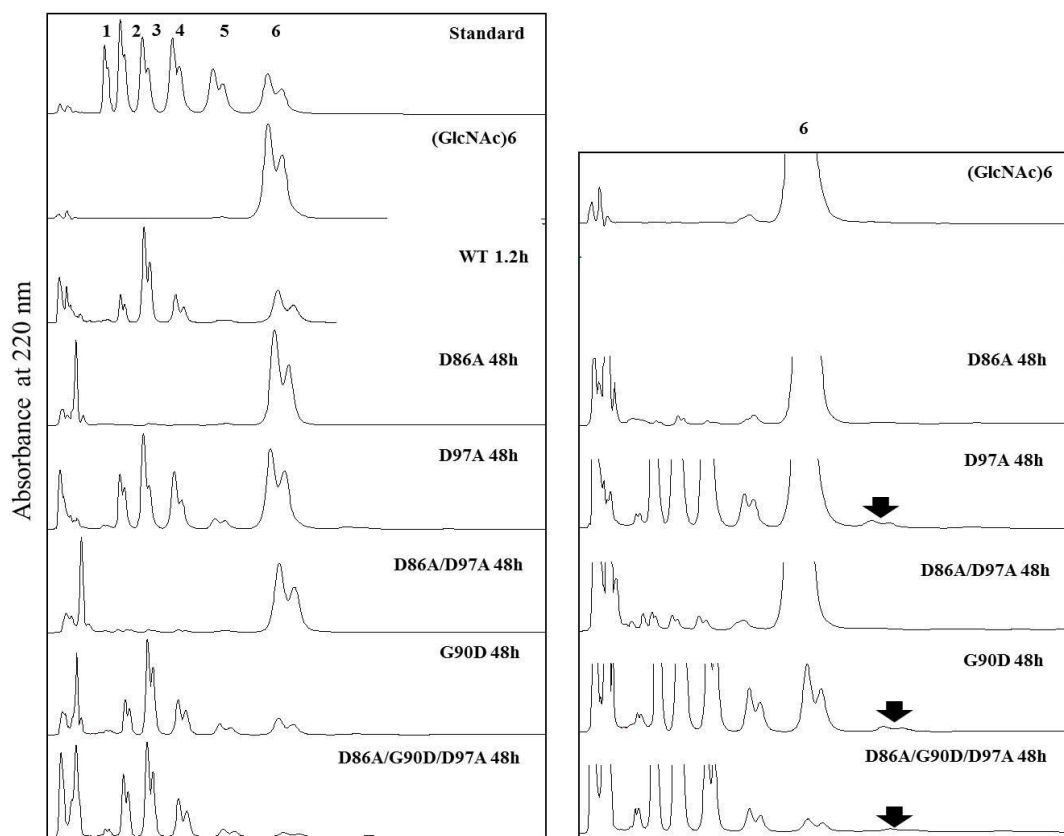


Fig. 26. HPLC analysis of the hydrolysis reaction products.
 The numerals on each peak indicates the degree of polymerization of the oligosaccharide.
 The arrows indicates the peak of GlcNAc polymer.

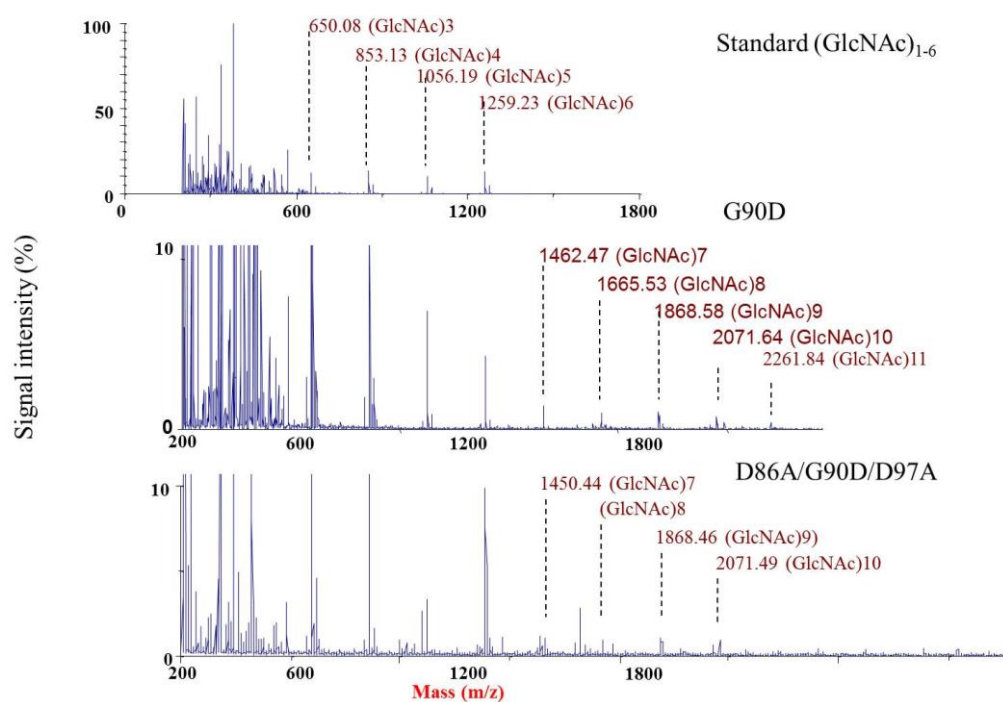


Fig. 27. MADLI-TOF-MS of the hydrolysis products.

第 6 項 X 線結晶構造解析

OEL の 2 本のジスルフィド結合に関わる Cys 残基を Ser に置換することで、OEL の 2 本のジスルフィド結合を欠失した変異体 (C4S/C18S/C29S/C60S) および (GlcNAc)₃ との複合体の結晶化について、第 2 章第 7 項に示したようにシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶を作製し、スクリーニングキットを用いて結晶化条件の検討を行った。その結果、2 本のジスルフィド結合欠失変異体 (C4S/C18S/C29S/C60S) の基質フリーおよび (GlcNAc)₃ との複合体においてのみ、X 線回折実験が可能と思われる結晶が得られた。さらに得られた結晶化条件について、最適の条件を決定する目的で、塩、沈殿剤の濃度、pH の検討を行った。すなわち PEG 200 は 35～59 %、Li₂SO₄ は 0～0.5 M、pH は 5.6～8.0 の条件で検討した。その結果、50% PEG200、0.05 M Li₂SO₄、0.1 M Tris-HCl pH 7.0 で結晶が得られ、得られた結晶を回折実験に用いた。C4S/C18S/C29S/C60S および (GlcNAc)₃ との複合体について低温 X 線回折実験を行い、それぞれ分解能 1.98 Å、1.77 Å の回折データを収集した。これら回折データの処理 (格子定数・空間群の決定、指数付けおよびデータの積分・スケールリング) は HKL2000 を用いて行いた。C4S/C18S/C29S/C60S に関して、格子定数は a=38.264 (Å)、b=66.948 (Å)、c=131.075 (Å)、α=β=γ=90.00 (°) であり、結晶系は斜方晶系であると推測された。そこで空間群を結晶系の類似性と消滅則より P2₁2₁2₁ と決定した。(GlcNAc)₃ との複合体に関しては、格子定数は a=38.188 (Å)、b=64.934 (Å)、c=131.118 (Å)、α=β=γ=90.00 (°) であり、結晶系は斜方晶系であると推測された。空間群は結晶系の類似性と消滅則より P2₁2₁2₁ と決定した。

次に本空間群を適用し、データの積分およびスケールリングを行った。その結果得られた指標は、いずれも適切にデータの収集が行われていることを示していた。

積分およびスケールリング処理されたデータを用い、前述の方法にしたがって構造精密化を行い、185 のアミノ酸残基および水分子の

位置を同定した．基質フリーの C4S/C18S/C29S/C60S に関しては，第 1 節での OEL の WT の精密化と同様に，*R* だけが低下する現象が見られた．そのため基質フリーの C4S/C18S/C29S/C60S の構造決定には到らなかった．一方，(GlcNAc)₃ との複合体では，精密化に成功した．しかしながら，構造中には (GlcNAc)₃ は見られず，基質結合部位には結晶化に用いた沈殿剤の PEG と緩衝液のトリスヒドロキシメタン (Tris) が存在していた．すなわち，分子 A では PEG と Tris がそれぞれ基質結合部である B サイトと D サイトに結合していた (Fig. 28A)．分子 B では Tris が C サイトに結合していた (Fig. 28B)．したがって，(GlcNAc)₃ との複合体構造は得られなかったが，基質を含まない C4S/C18S/C29S/C60S として，構造決定に成功した．

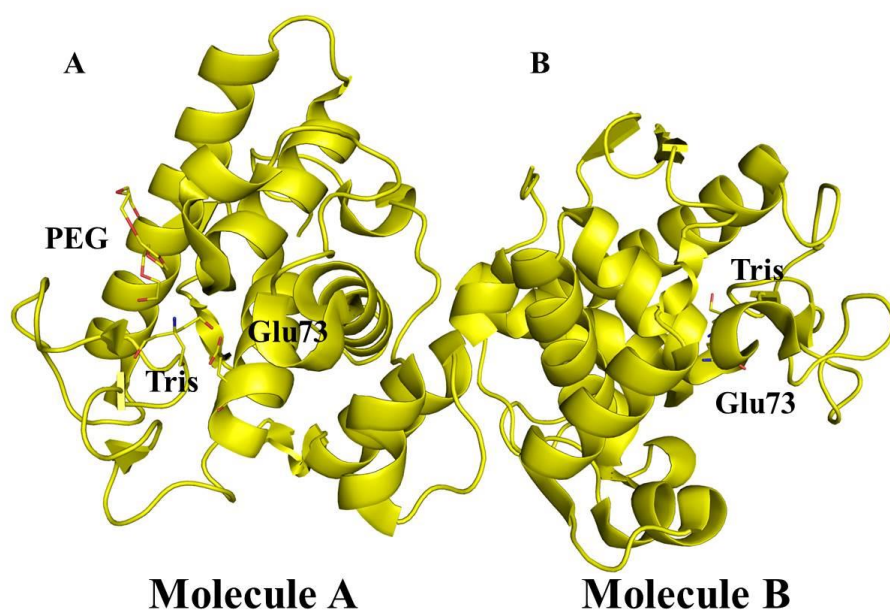


Fig. 28. The overall structure of S-S bonds deleted OEL.

Right and left views was molecule A and molecule B in crystal structure. The catalytic residue (Glu73) and the substance (PEG and Tris) were indicated as stick.

精密化された C4S/C18S/C29S/C60S は，GEL-(GlcNAc)₃ の構造と比較した．まず C4S/C18S/C29S/C60S の主鎖構造を GEL に対して最適位置で重ね合わせた (Fig. 29A)．分子 A の Asp86 は，GEL の Asp86 と比較して大きく変化していた (Fig. 29B)．

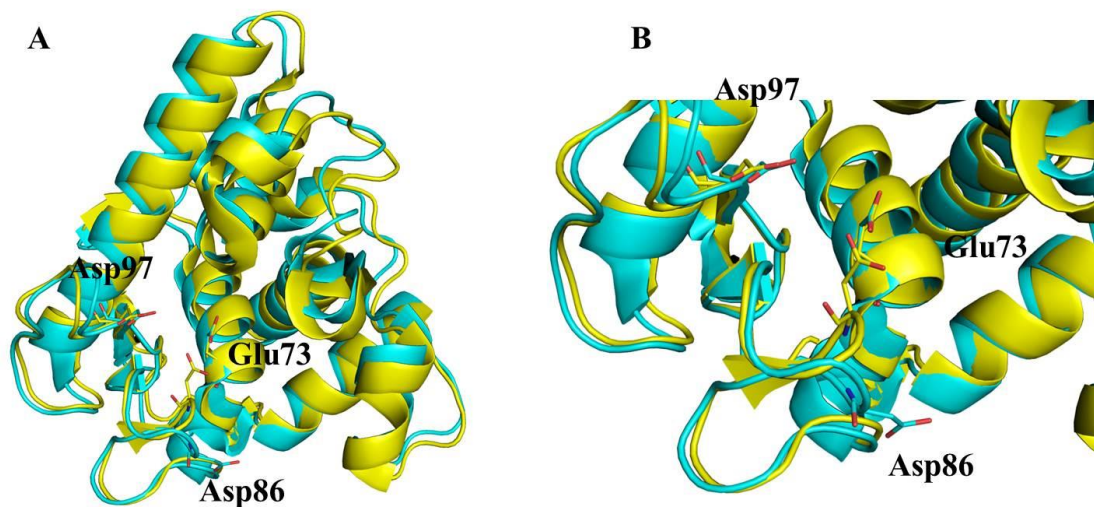


Fig. 29. Comparison of the structure of molecule B of S-S bonds deletion OEL and GEL.

(A) The overall of the structure of molecule B of S-S bonds deletion OEL and GEL. The catalytic residue (Glu73) and Asp residue (Asp86 and Asp97) are indicated as stick. OEL and GEL were indicated in yellow and cyan, respectively.

(B) The catalytic site of molecule B of S-S bonds deletion OEL and GEL.

しかしながら，2本のジスルフィド結合を欠失しても，グース型リゾチームの全体的な主鎖構造に大きな変化は無いと考えられた。OELに関する2本のジスルフィド結合を欠失した変異体の解析から，グース型リゾチームのジスルフィド結合は，そのフォールディングや触媒活性には関与せず，構造安定性に重要な役割を持つことが明らかとなっている(44)。また，熱力学的安定性の解析から，2本のジスルフィド結合を欠失したことによる安定性の大きな低下は，天然状態の立体構造の変化ではなく，変性状態の自由度が増加することによって引き起こされると考えられている(44)。今回解析した変異体 C4S/C18S/C29S/C60S の全体構造は GEL の構造と比較して大きな変化は無かったことから，立体構造の観点からも，グース型リゾチームの2本のジスルフィド結合は，変性状態のエントロピーを下げることによって構造安定性に関与していると考えられた。

また，BサイトとDサイトにPEGとTrisが結合していた分子Aでは，グース型リゾチームの活性部位で非常に高く保存されている

Asp86が GEL の Asp86 と比べて、大きく構造変化していた (Fig. 29B). グース型リゾチームの活性部位で完全に保存されている Asp97 に関しては分子 A, B ともに大きな構造変化は見られなかった. このことから, Asp97 が存在するループ構造がフレキシブルに可動することが考えられ, この 2 つの Asp 残基は, 構造からも酵素反応に関与することが示唆された.

第 3 節 小括

グース型リゾチームである OEL の触媒基周辺は, Glu 残基は HEL と同様に保存されていたが, Asp 残基の位置には, Gly90 が存在し, その近傍に 2 つの Asp 残基 (Asp86 および Asp97) が存在していた. この 2 つの Asp 残基に相当するタイセイヨウタラリゾチームにおいて, 変異体を作製・解析され, その重要性が示されている (39). そこで本章では, OEL においても, この 2 つの Asp 残基が重要である検証するために Ala に置換した変異体を作製するとともに, HEL と似た触媒基環境にするため, Gly90 を Asp 残基に置換した変異体を作製し, 機能解析を行った. これらの変異体を解析することにより, グース型リゾチームの触媒基周辺の新たな知見を得ることを目的とし, ニワトリ型リゾチームを比較することを目的とした.

まず, 2 つの Asp 残基 (Asp86 および Asp97) を Ala に置換した変異体の作製し, 機能解析を行った. その結果, D86A/D97A において, ほとんど活性を示さなかったことから, この 2 つの Asp 残基が酵素反応に重要であることが明らかとなった. さらに, Asp97 が構造安定性に大きく関与することが明らかとなった. 次に, Gly90 を Asp に置換した変異体の解析を行った. その結果, Asp 残基が 3 つ存在する場合, 活性が低下することが明らかとなった. さらに, ほとんど活性が見られなかった D86A/D97A に G90D を導入し, HEL と似た触媒基環境にした変異体を作製し機能解析した. その結果, 活性が回復し, 新たに導入した Asp 残基が酵素反応に関与したことが考えられた. さらに, これらの変異体 (D97A, G90D, D86A/G90D/D97A)

において、加水分解反応だけではなく、新たに糖転移反応が観察された。そこで、質量分析機を用いて反応産物を解析した結果、確かに高分子の糖が観察された。このことから、Asp 残基の場所を変化させることによって、糖転移反応が触媒されるのではないかと考えられた。以上のことから、HEL において、糖転移反応が観察され、OEL において糖転移反応が観察されない理由として、触媒基である Glu 残基と Asp 残基の位置関係の違いが酵素反応の違いに繋がっていると考えられ、さらに、Glu 残基と Asp 残基の位置関係が糖転移反応に重要であると考えられた。このように、OEL が本来触媒しない糖転移反応を触媒する変異体を作製することに成功し、HEL と触媒基周辺の比較を行うことが可能になった。しかし、どのようなメカニズムで糖転移反応が触媒されるようになったかなど、多くの疑問が残った。そこで、リゾチームの主なタイプの 1 種である無脊椎型リゾチームである MLL について着目した。

第 III 章 ハマグリリゾチームの機能解析

緒言

第 I 章で述べたようにニワトリ型リゾチームである HEL の触媒基 Asp52 が酵素反応機構に重要であると考えられ、Asp 残基周辺の環境も重要であること明らかとなった。第 II 章で述べたようにグース型リゾチームである OEL の触媒基周辺に存在する 2 つの Asp 残基が酵素反応に重要であることが明らかとなり、さらに、HEL の Asp52 と同等の位置に存在する Gly90 残基を Asp 残基に置換した結果、加水分解活性が低下したが、D86A/G90D/D97A では、糖転移反応が観察された。このことから、触媒基 Glu 残基と Asp 残基の位置関係が加水分解および糖転移反応に重要であると考えられた。そこで本章では、すでに機能や構造が報告されている MLL について、ニワトリ型リゾチームおよびグース型リゾチームと比較することで、酵素反応機構の解明へのアプローチを試みた。

第 1 節 実験方法

第 1 項 実験方法

MLL の機能および構造情報に関しては、桑野らの報告を使用した (49, 50)。すなわち、桑野らは、ハマグリから MLL を精製し、活性測定して、第 I 章第 8 項および第 II 章第 6 項で述べた方法と同様の方法で機能および構造解析を行っている。そこで、この報告されている機能および構造情報を基に、ニワトリ型リゾチームおよびグース型リゾチームの機能・構造を比較した。

第 2 節 実験結果および考察

第 1 項 ハマグリリゾチームの機能比較

桑野らは、MLLの機能解析として、*M. luteus*に対する溶菌活性、グライコールキチンに対する活性およびGlcNAcの5・6量体に対する活性測定を行い、HELと比較している(49)。すなわち、溶菌活性では、pH 6.0において、HELより約4倍高い活性を示していた。グライコールキチンに対する活性では、HELがpH 4-6の範囲で活性を示していたが、MLLでは、pH 3で高い活性を示していた。GlcNAcの5量体および6量体に対する活性測定では、HELがGlcNAcの5量体を20分で4量体と1量体に分解する。MLLでは、GlcNAcの5量体を20分では4分の1程度しか分解できなかったが、HELと同様に4量体と1量体を生成した。さらに、GlcNAcの6量体を用いた場合、20分で4量体と2量体に分解した。これにより、MLLには、6個の糖結合部位が存在し、6量体を4量体と2量体に分解し、HELと同様であることを報告している(Fig. 30)。このように、MLLとHELの比較は報告されているが、OELとの比較はされていない。そこで、MLLとOELの機能を比較した。まず、*M. luteus*に対する溶菌活性を比較した結果、HELよりOELの溶菌活性は約2倍強いことから、MLLの溶菌活性はOELより高い活性を示すと考えられた。このことから、3種のリゾチームにおいて、MLLが菌体との相互作用が一番強いのではないかと考えられた。次に、グライコールキチンに対する活性測定では、OELがキチンに対する活性がほとんど検出できないため、比較することができなかった。次に、GlcNAcの6量体に対する活性測定を比較した(Fig. 30)。OELは、6量体を3量体と3量体に約2時間分解する。OELのサブサイトはB-G部位が存在し、D-F部位間でグリコシド結合を分解する。この結果により、MLLとOELの活性の違いは、サブサイト構造の違いに加え、基質結合力の違いだと考えられた。ニワトリ型リゾチームであるHELと似た酵素性質を示すMLLであるが、最も大きな違いは、糖転移反応を示すか示さないかである。この違いがどのような違いなのか確認するために、X線結晶構造解析で得られている構造について比較を行った。

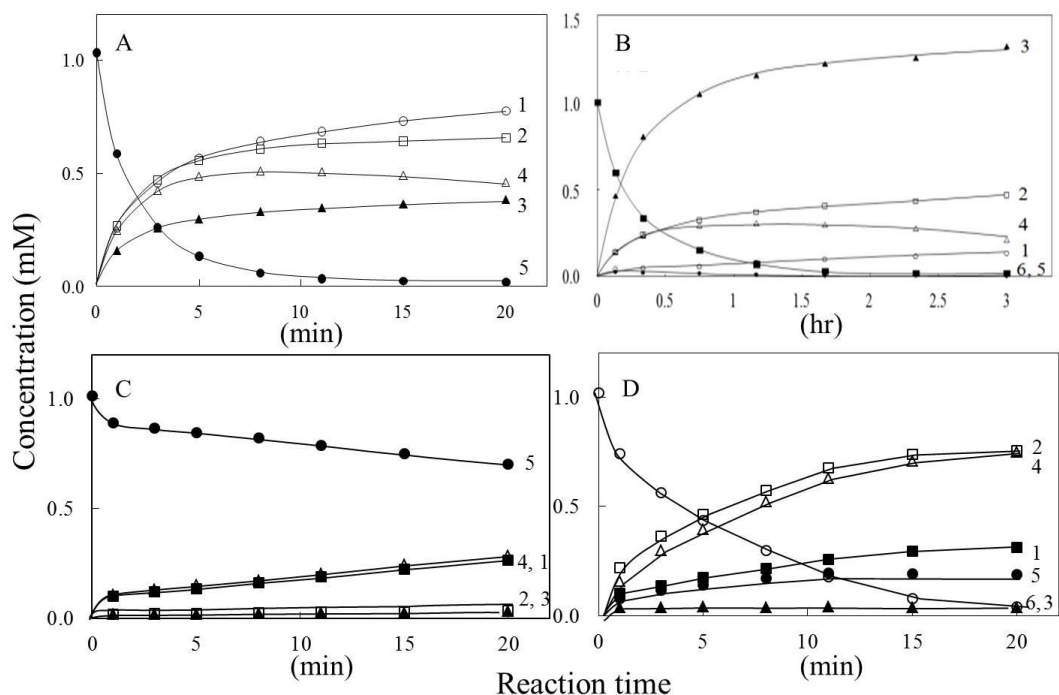


Fig. 30. Experimental time course plots of for (GlcNAc)₅ and (GlcNAc)₆ degradation by lysozyme [(A) (GlcNAc)₅ of HEL, (B) (GlcNAc)₆ of OEL, (C) (GlcNAc)₅ of MLL and (D) (GlcNAc)₆ of MLL].

(C) and (D) data was reported Kuwano *et al.* (49).

Numerals in the figures are the polymerization degree of the reaction product species.

(GlcNAc)₁, (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅ and (GlcNAc)₆ are indicated as ○, □, ▲, △, ●, and ■, respectively.

第 2 項 ハマグリリゾチームの構造比較

MLL の立体構造は, 桑野らによって報告されている (50). そこで, HEL, OEL および MLL の立体構造を比較した結果, 分子量の違いにより, 酵素の大きさに違いが見られた (Fig. 31). しかしこれらは類似したフォールディングトポロジーを示していた. 次に, 基質結合部位について比較した. HEL の立体構造では (GlcNAc)₄ が A-D 部位に結合した構造および GEL の立体構造では (GlcNAc)₃ が B-D 部位に結合した構造が報告されている (25, 36). 報告されている MLL は, HEL と同様に, A-C 部位に (GlcNAc)₃ が結合していた (Fig. 31).

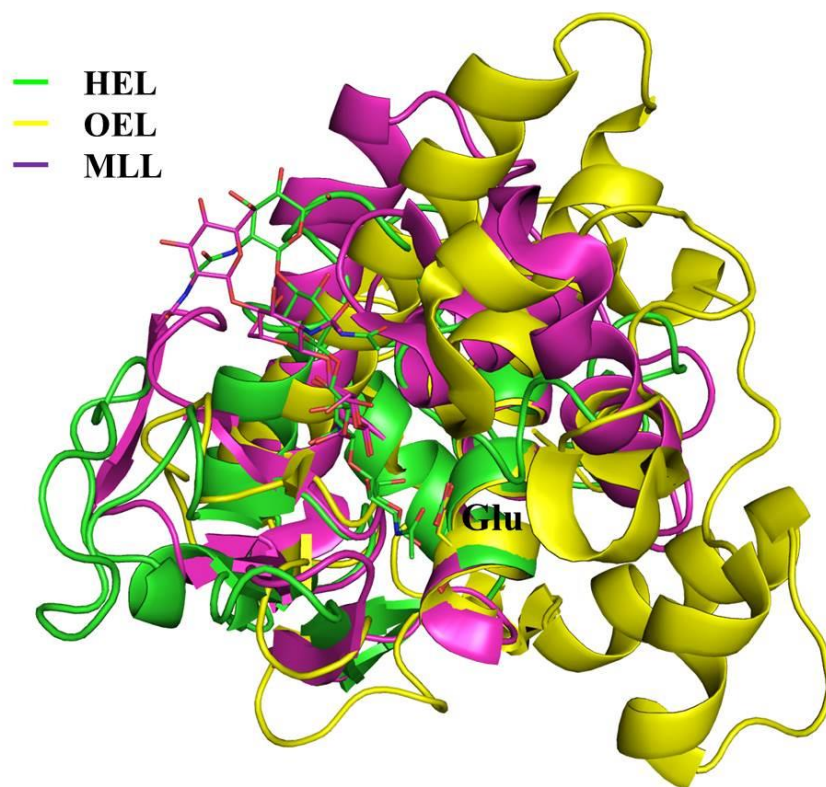


Fig. 31. Comparison of the structure of HEL, OEL and MLL.
 The catalytic residue (Glu) and the substrate were indicated as stick. HEL, OEL and MLL were indicated in green, yellow and purple, respectively.

この結合した基質の位置は、ほとんど一致していたが、細かい位置に違いが見られた。これは、基質結合に関与するアミノ酸の違いであると考えられた。さらに、報告されている MLL の立体構造の触媒基周辺について、HEL の構造と比較した (Fig. 32)。その結果、MLL で保存されている無脊椎型リゾチームの触媒残基のうち、MLL の Glu18 は HEL の一般酸触媒の Glu35 に相当し立体構造上保存されていたが、無脊椎型リゾチームのもう一つの触媒残基である MLL の Asp29 は HEL の求核性の Asp52 の位置とは異なった β シートに存在していた (Fig. 32A)。また、TJL との構造比較では、一般酸触媒の Glu 残基の位置は保存されていたが、Asp 残基は同位置に存在したが側鎖の配向が異なっていた (Fig. 32B)。さらに、OEL の触媒基周辺について比較した。その結果、触媒基 Glu 残基は保存されて

いたが， Asp 残基の位置は一致しなかった (Fig. 32C). 無脊椎型リゾチームの Asp29 は， グース型リゾチームの Asp86 と似た位置に存在していた (Fig. 32C). この OEL の Asp86 は， もう一つの Asp 残基 (Asp97) より， 酵素反応に重要であることが明らかになっている. このことから， リゾチームにおいて， Asp 残基が重要であるが， その位置が保存されていなかった.

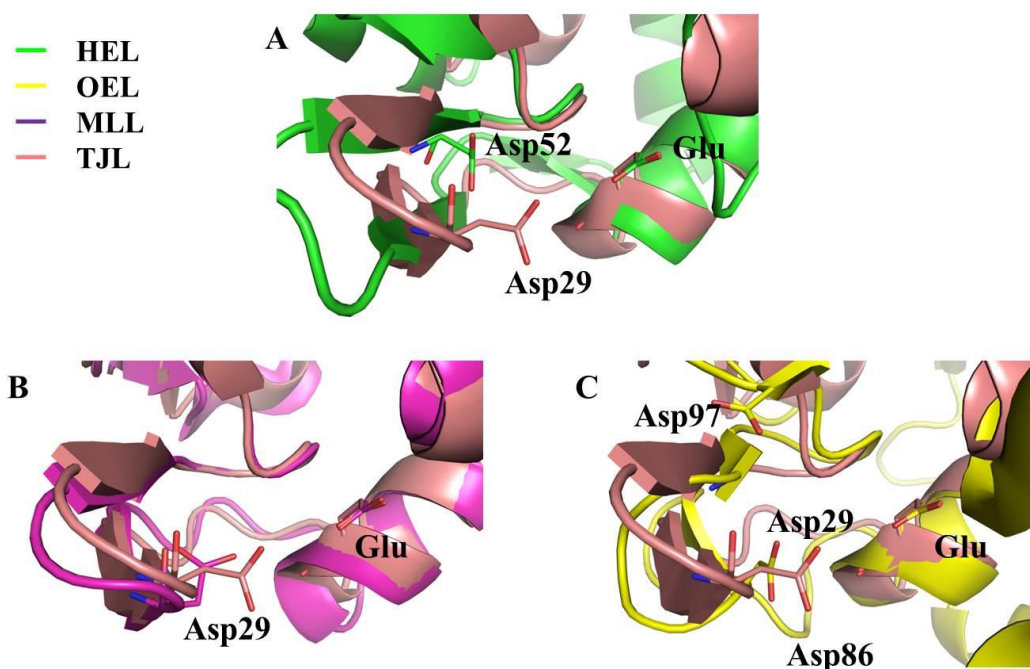


Fig. 32. Comparison of the catalytic site of HEL, OEL, MLL and TJL.
 (A) The superposition of HEL and MLL. (B) The superposition of MLL and TJL. (C) The superposition of OEL and MLL.
 The side chains are indicated as stick. HEL, OEL, MLL and TJL were indicated in green, yellow, pink and purple, respectively.

第 3 節 小括

分子量が近いが糖転移反応を示さない無脊椎型リゾチームである MLL の機能・構造を比較することで， 酵素反応機構の解明へのアプローチを試みた.

桑野らは， MLL の酵素学的機能が HEL と似ていることを報告している (49). しかし， 大きな違いとして， グライコールキチンに対

する活性では，HEL が pH 4-6 の範囲で活性を示していたが，MLL では，pH 3 で高い活性を示していた．GlcNAc 5 量体および 6 量体に対する活性測定では，HEL が GlcNAc の 5 量体を 20 分で 4 量体と 1 量体に分解する．MLL では，GlcNAc の 5 量体を 20 分では 4 分の 1 程度しか分解できななかったが，HEL と同様に 4 量体と 1 量体を生成した．さらに，GlcNAc の 6 量体を用いた場合，20 分で 4 量体と 2 量体に分解した．これにより，MLL には，6 個の糖結合部位が存在し，6 量体を 4 量体と 2 量体に分解し，HEL と同様であることを報告している．今回，MLL と OEL の酵素学的機能の比較を行った結果，サブサイト構造の違いに加え，基質結合力の違いに大きな違いがあることが見出された．ニワトリ型リゾチームである HEL と似た酵素性質を示す MLL であるが，最も大きな違いは，糖転移反応を示すか示さないかである．この違いがどのような違いなのか確認するために，X 線結晶構造解析で得られている構造について比較を行った．

MLL の立体構造は，桑野らによって報告されている (50)．そこで，HEL，OEL および MLL の立体構造を比較した結果，最も大きく異なったことは触媒基周辺である．MLL で保存されている無脊椎型リゾチームの触媒残基のうち，MLL の Glu18 は HEL の一般酸触媒の Glu35 に相当し立体構造上保存されていたが，無脊椎型リゾチームのもう一つの触媒残基である MLL の Asp29 は HEL の求核性の Asp52 の位置とは異なった β シートに存在していた．さらに，OEL の触媒基周辺について比較した．その結果，触媒基 Glu 残基は保存されていたが，Asp 残基の位置は一致しなかった．無脊椎型リゾチームの Asp29 は，グース型リゾチームの Asp86 と似た位置に存在していた．この OEL の Asp86 は，もう一つの Asp 残基 (Asp97) より，酵素反応に重要であることが明らかになっている．このことから，リゾチームにおいて，Asp 残基が重要であるが，その位置が保存されていなかった．無脊椎型リゾチームにおいて，Asp 残基の位置の重要性や転移反応機構の解明のためにも，触媒基周辺の変異体

の解析が必要であると考えられた。

第IV章 総括

第1節 総合考察

リゾチームは細菌細胞壁の多糖類を加水分解する糖加水分解酵素である。ニワトリ型リゾチームは構造と機能に関して詳細に研究され、6個の基質結合部位(A-F部位)が存在し、触媒基のGlu35とAsp52の作用によってD-E部位間のグリコシド結合が加水分解されると考えられている(1)。さらにニワトリ型リゾチームは糖加水分解反応とともに高能率な糖転移反応を触媒し複雑な反応機構であることが知られている(18-20)。さらに、ニワトリ型リゾチームは、加水分解物のアノマー構造の違いにより、 β -アノマーを生成することから保持型に分類される。しかしながら、その高能率な糖転移反応機構は全く不明であり、その反応触媒基Asp52がどのように関与するかも明らかでない。

HELの立体構造では、Asp52は3つの逆平行 β シート構造の β 2上に位置し、周辺に存在するアミノ酸残基(Asn46, Asp48, Ser50およびAsn59)と強固な水素結合ネットワークを形成するとともに、2個の水分子を介して、もう1つの触媒基であるGlu35とも水素結合を形成している(Fig. 2)。このため、水素結合ネットワークは、Asp52の側鎖のカルボキシル基の位置と配向を規定し、Asp52が触媒基として機能する最適の環境を保持していると考えられる。したがって、Asp52の機能発現にはAsp52が形成する水素結合ネットワークが重要であると考えられている。

本研究では、HELの触媒基Asp52が形成する水素結合ネットワークの役割を解明する一環として、水素結合ネットワークを構成するAsp48をAlaに置換した変異体(D48A)およびSer50をAlaに置換した変異体(S50A)を作製し、HEL(wild type)と比較することで、Asp48およびSer50の解析を行い、触媒基Asp52が形成する水素結合ネットワークの役割の解明を試みた。

HELのAsp48をAlaに置換した変異体(D48A)およびSer50をAla

に置換した変異体 (S50A) の変異リゾチーム遺伝子は PCR で作製し、発現ベクター pPIC9K と宿主酵母 *P. pastoris* (GS115) を用いて発現した。

精製した 2 種の変異体の遠紫外部 CD スペクトルは、wild type とほとんど同一の CD スペクトルを示したことから、2 種の変異体は wild type と同等の主鎖構造を持つと考えられた。次に、2 種の変異体の基質結合に対する影響を検討した。その結果、基質親和性の低下は D-F 部位の部分的な基質結合力の低下によるものと考えられた。

また、2 種の変異体の触媒活性に対する影響を検討した。まず、*M. luteus* およびグライコールキチンに対する活性測定を行った。その結果、Asp48 および Ser50 を置換した変異体は wild type と比較して、活性が低下した。また、(GlcNAc)₅ を用いて、種々の反応生成物を分離・定量し、経時的変化を検討した。Wild type は、(GlcNAc)₅ を 20 分で分解する。一方、D48A では、反応速度が遅くなり、反応開始後 240 分で (GlcNAc)₅ が消失した。さらに、Ser50 の変異体では、S50A が 90 分で (GlcNAc)₅ が消失した。2 種の変異体の (GlcNAc)₅ に対する活性は、高分子基質であるグライコールキチンに対する活性の低下と一致した (Fig. 12 および Fig. 14)。次に、実験タイムコースのコンピューター・シミュレーションを行った。すなわち、コンピューター・シミュレーションによってタイムコースから、反応パラメーターとして基質結合部位の結合自由エネルギーとグリコシド開裂反応、加水分解反応、糖転移反応の速度定数を求めた。すなわち、実験タイムコースをほぼ再現した計算タイムコースを構築し、その結果、D48A および S50A では、D から F 部位での基質結合様式が wild type とは異なることが示唆された。この結合様式の変化は、D から F 部位での基質やアクセプターの結合に影響し、その結果として糖転移反応の速度定数が減少したのではないかと考えられた。さらに、変異体の触媒活性の低下は、基質結合力の低下とともに、グリコシド開裂の速度定数が小さいことにも起因することが明らかとなった。これらの結果は、基質結合力の測定結果と一

致した (Fig. 9, 10, 14 および Table 4).

タンパク質は立体構造を保つことにより、触媒活性を保つ。そこで、触媒基が形成する水素結合ネットワークの Asp48 および Ser50 が立体構造へ寄与するかを検討するため、2 種の変異体の GdnHCl に対する構造安定性を熱力学的に評価し、wild type と比較した。その結果、2 種の変異体の変性曲線は wild type と比較して低濃度側にシフトし、構造安定性が低下した。したがって、Asp48 および Ser50 は、水素結合ネットワークの維持に関与すると考えられ、この水素結合ネットワークが HEL の立体構造に重要であると推測された。

次に、X 線結晶構造解析を行い、詳細な構造変化を検討した。その結果、D48A および D48A-(GlcNAc)₄、S50A および S50A-(GlcNAc)₄ の良質な結晶が得られた。決定した変異体および基質と複合体を形成した変異体の立体構造は、HEL および HEL-(GlcNAc)₄ と比較した。その結果、主鎖構造の大きな変化が見られず、遠紫外部 CD スペクトルの結果と一致した。次に、基質結合部位周辺の変化を詳細に確認した。また、E-F 部位の基質結合部位に関しては、基質結合に関与すると推定されたアミノ酸残基 (Phe34, Asn37, Arg45, Asn46, Thr47, Arg114) の構造の比較を行った。その結果、すべての変異体において Arg45, Asn46, Thr47 の側鎖の配向の変化が見られた。このことから、Asp48 および Ser50 を置換することによって、E-F 部位の基質結合力が変化したのではないかと考えられた。さらに、触媒基 Asp52 が形成する水素結合ネットワークがどのように変化したかを見るために、触媒基 Asp52 周辺の構造について確認した。その結果、D48A-(GlcNAc)₄ では、Asp48 のカルボキシル基が欠失したことにより、Ser50 との水素結合の欠失が確認され、Ser50 の側鎖が動き、Asn59 の配向が変化していた。このため、触媒基 Asp52 の側鎖の配向は、Asn46 と Ser50 だけで規定されており、触媒基 Asp52 と直接水素結合を形成する Asn46 と Asn59 の側鎖の配向を規定する上で、Ser50 の重要性が見出された。S50A-(GlcNAc)₄ では、Ser の水酸基が欠失することにより、Asn59 の側鎖の配向変化のみ見られた。X 線

結晶構造解析により， Asp48 では， Asp48 が D-F 部位の基質結合に大きく関与することが考えられ， Ser50 の側鎖の配向を規定することで水素結合ネットワークに重要であるが， Asp48 と Ser50 の間の水素結合が欠失しても， Asp48 の側鎖の配向があまり変化しないことから， Asp48 は水素結合ネットワークにあまり重要ではなく， D-F 部位の基質結合に関与することで HEL の触媒活性に関与することが明らかとなった．そして， Ser50 では， S50A の解析結果より， Asn59 の側鎖の配向が変化した．このことから， Ser50 は， C 部位の基質結合および水素結合ネットワークに関与する Asn59 の側鎖の配向を規定する上で重要であることが明らかとなった．さらに， X 線結晶構造解析により， Asp48 と Ser50 の変異体の触媒活性の低下は， 水素結合ネットワーク周辺の変化に起因すると考えられた． Pincus らは分子動力学から， E, F 部位は基質がレフトサイドとライトサイドの 2 通りに結合することを推定した (16, 17)．すなわち， レフトサイドへの基質結合への基質結合には Arg45, Asn46, Thr47 が関与し， ライトサイドへの基質結合には Phe34, Asn37, Arg114 が関与すると報告している．そして， この報告をもとに， リゾチームの触媒反応機構は次のようになる (Fig. 33)．すなわち， リゾチームの触媒反応では， まず， 基質がレフトサイドに結合し， ライトサイドに遷移後， 2 つの触媒基の作用で D から E 部位間でグリコシド結合が開裂し， つぎに A から D 部位の基質断片に水分子が結合すると加水分解反応， 糖のアクセプターが結合すると糖転移反応になると推定した．この触媒反応機構をもとに考えると， X 線結晶構造解析により， Arg45, Asn46, Thr47 の変化が見られたため， D-F 部位のレフトサイドの基質結合力の低下が考えられた．つまり， 酵素と基質が結合する反応初期段階の基質の結合速度が低下することで， Asp48 と Ser50 の変異体の触媒活性が低下したのではないかと考えられた．

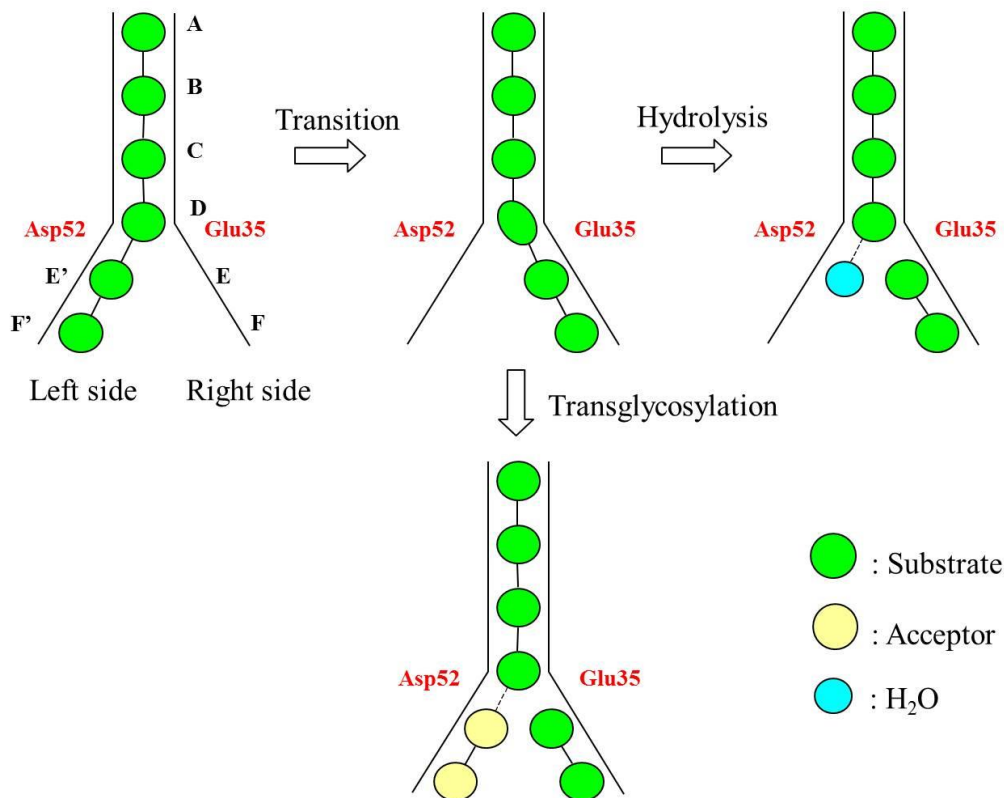


Fig. 33. The schematic diagram of catalytic mechanism of HEL

水素結合ネットワークに関与するアミノ酸のそれぞれの役割は、Asn46が、触媒基 Asp52 の環境維持に関与し、Asp48が、D-F部位のレフトサイドの基質結合部位に存在するアミノ酸残基の位置を規定し、Ser50が、Asn59の側鎖の配向を規定し、Asn59が、C部位の基質結合に関与し、触媒基 Asp52の側鎖の配向を規定することであった。以上をまとめると、触媒基 Asp52が形成する水素結合ネットワークの役割は、触媒基 Asp52が機能発現するために重要であり、糖転移反応に重要であるE-F部位のレフトサイドの基質結合に大きく関与していることが明らかとなった。このように、ニワトリ卵白リゾチームの触媒基 Asp52は、周辺のアミノ酸によって固定され、触媒基の位置関係が固定されていた。さらに、Asp残基が糖転移反応に重要であることは明らかとなったが、酵素反応機構の解明には至らなかった。そこで、加水分解反応を示すが糖転移反応を示さな

いグース型リゾチームである OEL の触媒基周辺に着目した。

グース型リゾチームは、大型の鳥類や魚類に含まれ、その一次構造や機能解析された。グース型リゾチームの基質結合部位に関しては、GEL と (GlcNAc)₃ との複合体の X 線結晶構造解析から 3 つの糖残基が結合した B-D 部位が推定されている (36)。GEL の GlcNAc オリゴマーに対する活性の解析から用いたオリゴマーのうち (GlcNAc)₆ が最も効率よく加水分解され、主として 3 量体が生成することから 6 つの基質結合部位 (B-G 部位) の存在と D-E 部位間でのグリコシド結合の切断が予測されている (41)。

グース型リゾチームはニワトリ型リゾチームと同様に安定なタンパク質である (29, 30)。ニワトリ型リゾチームは分子量が小さいにもかかわらず α ヘリックスや β シートが多く、さらに分子内に 4 つのジスルフィド結合を有することからコンパクトで安定な立体構造を形成している (4)。グース型リゾチームでは、ニワトリ型リゾチームと同様に α ヘリックスや β シートで構成されているが、分子内部のコア構造を形成している 3 つのヘリックス ($\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 8$) が種間で高く保存されており、グース型リゾチームの立体構造形成や構造安定性における重要性が予測される (Fig. 3) (29, 30)。

OEL は遺伝子の人工合成と酵母での大量発現系が構築され、糖転移反応を触媒しない加水分解酵素であることが明らかにされている (42)。この発現系を用いて、 $\alpha 5$ の C 末端に位置する Glu73 に関する変異体の解析を行い、Glu73 がグース型リゾチームのプロトドナーとして働く触媒基であることを実験的に証明するとともに、構造安定性にも重要であるという他の糖加水分解酵素では見られない興味深い事実が明らかにされた (43)。加えて、ジスルフィド結合を欠失した変異体の解析を行い、ジスルフィド結合がフォールディングに必須ではなく、変性状態の構造を不安定化することで構造安定性に寄与していることが明らかにされた (44)。しかし、グース型リゾチームは HEL の Asp52 にあたる 2 つ目の触媒基が明らかになっていない。GEL と HEL 立体構造を重ね合わせた際に、GEL の Glu73 と

Gly90がHELの2つの触媒基であるGlu35とAsp52と重なり、Gly90のその近傍に2つのAsp残基(Asp86およびAsp97)が存在している。そこで、これら触媒基Glu73周辺に存在する2つのAsp残基やHELの触媒基Asp52と同等の位置に存在するGly90に着目し、変異体を作製し機能解析した。変異体は、Asp86およびAsp97をAlaに置換したもの(D86AおよびD97A)、2つをAlaに置換したもの(D86A/D97A)、さらに、Gly90をAspに置換したもの(G90D)、3つのアミノ酸を置換したもの(D86A/G90D/D97A)を準備した。

まず、2つのAsp残基の変異体(D86A, D97A, D86A/D97A)について解析を行った。変異リゾチーム遺伝子はPCRで作製し、発現ベクターpPIC9Kと宿主酵母*P. pastoris* (GS115)を用いて発現した。CDスペクトルを測定した結果、ほとんど同一のCDスペクトルを示したから、wild typeと同等の主鎖構造を持つことが示された。次に、活性測定を行った。リゾチームは、菌体に対する溶菌活性を示すため、*M. luteus*を用いて、溶菌活性を測定した。その結果、3種の変異体の溶菌活性は、wild typeの活性と比較して、ほとんど活性がみられなかった。さらに、3種の変異体の活性を低分子基質である(GlcNAc)₆を用いて、wild typeの至適pHでの反応生成物の経時的な変化で検討した。Wild typeは、(GlcNAc)₆を180分で分解するのに対して、Asp残基の変異体であるD97Aでは、反応速度が遅くなった。さらに、D86AおよびD86A/D97Aでは、ほとんど活性がみられなかった。このことから、この2つのAsp残基が酵素反応に関与することが明らかとなった。次に、酵素活性に関与する2つのAsp残基が立体構造へ寄与するかを検討するため、3種の変異体の熱およびGdnHClに対する構造安定性を熱力学的に評価し、wild typeと比較した。得られた変性曲線および変性曲線から計算した熱力学諸量を求めた。その結果、熱に対する安定性では、3種の変異体の変性曲線はwild typeと比較して低温側にシフトし、構造安定性が低下した。この2つのAsp残基が酵素反応に大きく関与することが明らかとなり、構造安定性にも関与することが明らかとなった。

次に、Gly 残基の変異体 (G90D, D86A/G90D/D97A) の機能解析を行った。変異体の活性を低分子基質である (GlcNAc)₆ を用いて、wild type の至適 pH での反応生成物の経時的な変化で検討した。Gly 残基の変異体である G90D では、反応速度が遅くなった。しかし、反応生成物の濃度に変化はみられなかった。次に、HEL と似た触媒基環境にした変異体である D86A/G90D/D97A では、D86A/D97A はほとんど活性がみられなかったが、G90D を導入することにより、活性が回復した。このことから、導入した Asp 残基が酵素反応に新たに関与したと考えられた。さらに、HPLC を用いた解析において、反応に用いた初期基質 (GlcNAc)₆ より高分子の基質が確認された。そこで、D86A, D97A, D86A/D97A, G90D および D86A/G90D/D97A について、再度 HPLC を用いて解析を行った。その結果、D97A, G90D および D86A/G90D/D97A において、初期基質より高分子の糖が観察された。さらに、D97A, G90D および D86A/G90D/D97A について、質量分析機を用いて、高分子の糖を解析した。解析した結果、G90D および D86A/G90D/D97A において、N-アセチルグルコサミンの 11 量体までの高分子の糖が確認された。

T4 フェージ型リゾチームにおいて、触媒基 Glu11 および Asp20 が知られているが、Asp20 の近傍の存在する Thr26 を His に置換することによって、本来アノマー型が α -アノマーを生成する酵素であるにも関わらず、 β -アノマーを生成する酵素に変わり、さらに、糖転移反応を示さない酵素であるが、糖転移反応を示すように形質が変化することが報告されている (Fig. 34) (75)。今回の OEL の解析において、ニワトリ型リゾチームと似た触媒基環境にした結果、変異体の活性が弱く、アノマー解析を行うことができなかったが、糖転移反応が観察された。OEL の触媒基 Glu73 の対になる場所の Asp 残基の環境によって、加水分解反応もしくは糖転移反応も触媒するか決まるのではないかと考えられた。

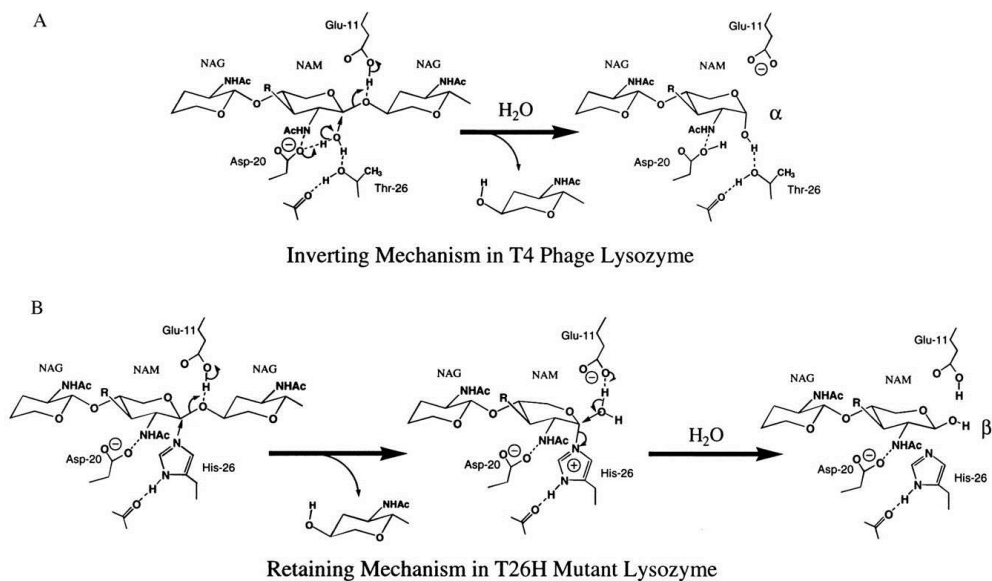


Fig. 34. Schematic diagram showing the overall relationship between the active-site structures and the proposed mechanisms of T4 phage lysozyme and T26H (75).
 (A) In WT the water molecule hydrogen-bonded to Asp-20 and Thr-26 is presumed to act as the nucleophile, attacking the C-1 carbon of NAM.
 (B) In mutant T26H the nitrogen of His-26 occupies a position close to the water molecule in WT and is presumed to act as the nucleophile, leading to a covalent adduct. This adduct can either break down by the addition of water, as shown, or can be subject to attack by another disaccharide, leading to transglycosylation.

次に、分子量がニワトリ型リゾチームに近いが糖転移反応を示さない無脊椎型リゾチームである MLL の機能・構造を比較することで、酵素反応機構の解明へのアプローチを試みた。まず、*M. luteus* に対する溶菌活性を比較した結果、HEL および OEL と比較して、MLL が強い溶菌活性を示すことが明らかとなった。グライコールキチンに対する活性測定についても比較した。幅広い pH で活性を示す HEL と比較して、MLL のグライコールキチンに対する活性は、酸性側で高い活性を示していた。これは、HEL と明らかに違いが見られた。次に、GlcNAc の 5 および 6 量体に対する活性測定について比較した。HEL は、GlcNAc の 5 量体を約 20 分で分解し、主に 4 量体と 1 量体が生成される。MLL は、HEL と比較して、分解速度が遅くなり、20 分では初期基質 5 量体を 4 分の 1 程度しか分解できず、このことから、オリゴマー分解能が、HEL より弱いことが報告され、さらに、6 量体を用いて、活性測定を行った結果、約 20 分で基質を分解し、

主に 4 量体と 2 量体が生成されたと報告されている。この結果より、HEL と同様に 6 量体を 4 量体と 2 量体に分解することが明らかとされている。さらに、OEL と比較した結果、OEL は、6 量体を 3 量体と 3 量体に約 2 時間分解する。OEL のサブサイトは B-G 部位が存在し、D-F 部位間でグリコシド結合を分解する。この結果により、MLL と OEL の活性の違いは、サブサイト構造の違いに加え、基質結合力の違いだと考えられた。ニワトリ型リゾチームである HEL と似た酵素性質を示す MLL であるが、最も大きな違いは、糖転移反応を示すか示さないかである。この違いがどのような違いなのか確認するために、X 線結晶構造解析で得られている構造について比較を行った。

そこで、詳細を解析するために、立体構造の比較を行うことにした。MLL の立体構造は HEL の構造と比較した結果、MLL の Glu18 は HEL の Glu35 に相当し立体構造上保存されていたが、MLL の触媒基 Asp29 は HEL の求核性の Asp52 の位置とは異なった β シートに存在していた。また、TJL との構造比較では、一般酸触媒の Glu 残基の位置は保存されていたが、Asp 残基は同位置に存在したが側鎖の配向が異なっていた。OEL の触媒基周辺について比較した。その結果、触媒基 Glu 残基は保存されていたが、Asp 残基の位置は一致しなかった。無脊椎型リゾチームの Asp29 は、グース型リゾチームの Asp86 と似た位置に存在していたが、位置は一致していなかった。この OEL の Asp86 は、もう一つの Asp 残基 (Asp97) より、酵素反応に重要であることが明らかになっている。このように、触媒基 Glu 残基は、HEL や OEL のように保存されていたが、Asp 残基の位置に違いが見られた。これが、酵素反応の違いに繋がっているのではないかと考えられた。

これら結果により、リゾチームの酵素反応機構において、Glu 残基がプロドンドナーとして働くことはどの種のリゾチームにおいても共通であった。しかし、Asp 残基の位置は、それぞれの種で違いが見られた。ニワトリ型リゾチームである HEL では、Asp 残基の側鎖が周囲のアミノ酸によって固定されていた。グース型リゾチーム

である OEL では，ニワトリ型リゾチームとは異なり，2つの Asp 残基 (Asp86 および Asp97) が存在していた．無脊椎型リゾチームである MLL では，ニワトリ型リゾチームと同様に 1 つの Asp 残基 (Asp29) が存在していたが，ニワトリ型リゾチームとは違う場所に存在していた．OEL の Asp 残基については，実験的にこの 2 つの Asp 残基が酵素反応に重要であるということは明らかになった．さらに，ニワトリ型リゾチームと似た触媒基環境にするため，Asp 残基の位置を変えた D86A/G90D/D97A では，活性が低下したが，新たに糖転移反応が観察された．糖転移反応が発現されるためには，アノマー構造が β -アノマー構造を示さないと反応できないと言われている．このことから，触媒基環境が反応機構を変化させたのではないかと考えられた．

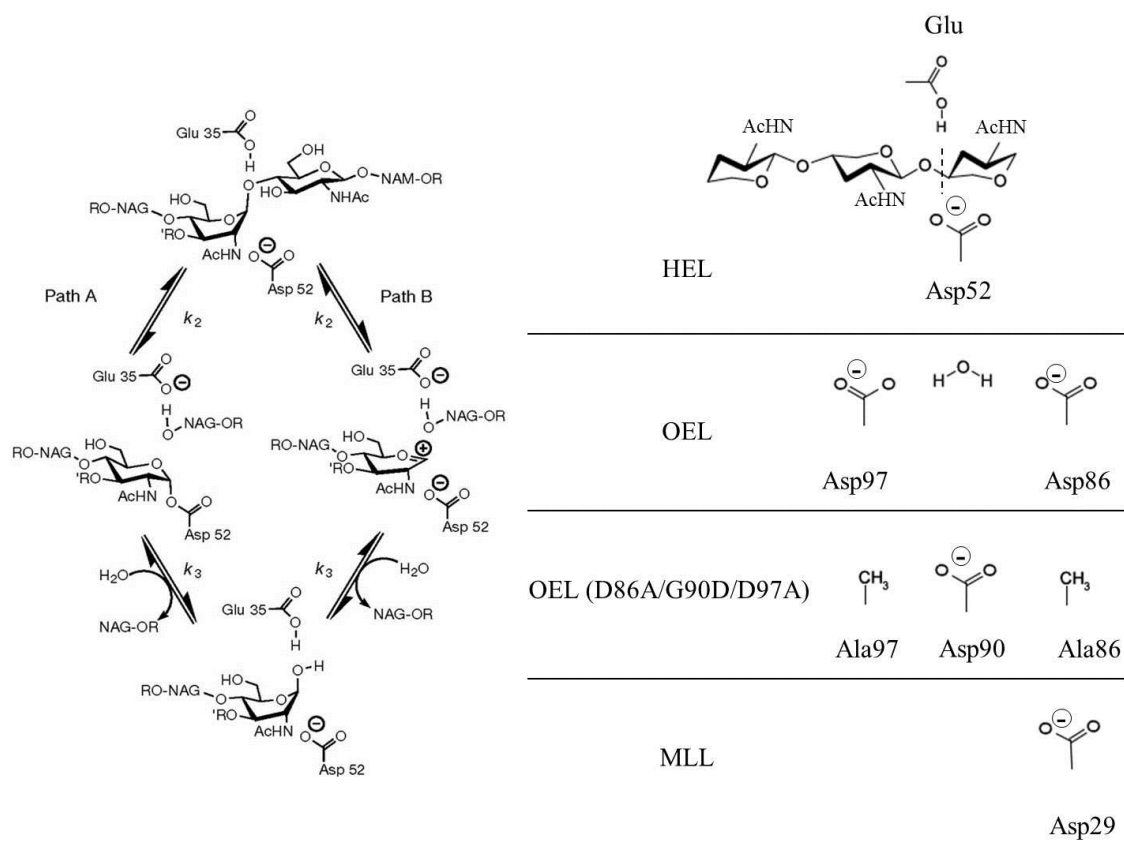


Fig. 35. Two possible catalytic mechanisms (76) and the position of Asp residues of lysozyme.

現在，リゾチームの酵素反応機構は次のように考えられている (76) (Fig. 35). すなわち，ニワトリ型リゾチームである HEL において，触媒基 Glu35 はグリコシド開裂のためのプロトンドナーとして働き，Asp52 は反応中間体であるオキソカルボニウムイオン中間体の安定化(22)，あるいは，Asp52 が共有結合中間体を形成し安定化に寄与すると考えられている(23). 今回の研究において，触媒基 Asp52 がどちらの働きをするかは明らかとならなかったが，触媒基 Asp 残基の側鎖が周辺のアミノ酸によって規定され，糖転移反応に重要であることが明らかとなった (Fig. 35). グース型リゾチームである OEL では，ニワトリ型リゾチームと異なり，触媒基 Asp52 の位置には，触媒作用を示さない Gly90 が存在しており，その近傍に 2 つの Asp 残基 (Asp86 および Asp97) が存在していた. グース型リ

ゾチームであるタイセイヨウタラリゾチームにおいて、この2つの Asp 残基に相当する Asp 残基 (Asp90 および Asp101) が酵素反応に重要であると報告されており、この2つの Asp 残基が水分子を安定化し、この水分子が求核攻撃として働くと考えられている。今回の研究において、この2つの Asp 残基が酵素反応に重要であることを明らかとした。このことから、OELにおいても、この2つの Asp 残基が酵素反応機構に関与していると考えられた (Fig. 35)。さらに、本来持つ Asp 残基を失くし、HEL の触媒基 Asp52 に位置に存在する Gly90 を Asp 残基に置換した変異体において、加水分解反応が弱くなったが、新たなる糖転移反応が観察された (Fig. 35)。このことから、触媒基 Glu 残基と Asp 残基の位置関係の変化により、酵素反応様式が変化したと考えられた。無脊椎型リゾチームである MLL では、ニワトリ型リゾチームと同様に、1つの Asp 残基が保存されていたが、別の場所に存在していた (Fig. 35)。この違いにより、加水分解の速度の違いおよび糖転移反応を触媒しないなどの違いが見られた。これらのことから、リゾチームの酵素反応機構の中で、加水分解反応においては、触媒基 Glu 残基は必須であるが、Asp 残基はあまり位置に関係がないと考えられた。しかし、糖転移反応においては、触媒基 Glu 残基および Asp 残基の位置関係が規定されている必要性が考えられた。

今後、MLL の触媒基周辺のアミノ酸を変異させた変異体を作製し解析することで、より詳細な酵素反応機構の解明が期待される。

第2節 要約

リゾチームは N-アセチルムラミン酸 (MurNAc) と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の共重合体やキチンを構成する GlcNAc の重合体の β -1, 4 結合を加水分解する糖加水分解酵素である。本酵素は病原体の細胞壁に含まれるこれらの重合体を分解して溶菌することから、生体防御タンパク質と考えられている。リゾチームはニワトリ型、グース型および無脊椎型の3つに大きく分類され、これら

のリゾチームは分子量，構成アミノ酸数，基質結合部位，触媒基および触媒反応様式が異なる．

ニワトリ型リゾチームは構造と機能に関して詳細に研究され，6個の基質結合部位（A - F 部位）が存在し，触媒基の Glu35 と Asp52 の作用によって D-E 部位間のグリコシド結合が加水分解される．さらに，ニワトリ型リゾチームは糖加水分解反応とともに高能率な糖転移反応を触媒し複雑な反応機構であることが知られている．しかしながら，その高能率な糖転移反応機構は不明であり，触媒基 Asp52 がどのように関与するかも明らかでない．この Asp52 は，周辺に存在するアミノ酸残基（Asn46, Asp48, Ser50 および Asn59）と強固な水素結合ネットワークを形成している．Asn46 および Asn59 の役割に関しては報告されているが，Asp48 および Ser50 の役割は報告されていない．そこで，ニワトリリゾチーム（HEL）の触媒基 Asp52 が形成する水素結合ネットワークの役割を解明する一環として，Asp48 を Ala に置換した変異体（D48A）および Ser50 を Ala に置換した変異体（S50A）を作製し，HEL と比較することで，触媒基 Asp52 が形成する水素結合ネットワークの役割の解明を試みた．変異体の基質結合に対する影響を検討した結果，D-F 部位の部分的な基質結合力の低下によるものと考えられた．また，変異体の触媒活性に対する影響について GlcNAc の 5 量体を用いた活性測定を検討した．さらに，コンピューター・シミュレーションによってタイムコースを計算し，反応パラメーターとして基質結合部位の結合自由エネルギーとグリコシド開裂反応，加水分解反応，糖転移反応の速度定数を求めた．HEL は基質を 20 分で分解したが，D48A では，反応速度が遅くなり，反応開始後 240 分で分解した．さらに，S50A は基質を 90 分で分解した．次に，コンピューター・シミュレーションを行い，パラメーターを求めた結果，D48A および S50A では，D から F 部位での基質結合様式が HEL とは異なることが示唆され，糖転移反応の速度定数が減少したのではないかと考えられた．次に，X 線結晶構造解析を行い，詳細な構造変化を検討した．その結果，

Asp48 は D-F 部位において, Ser50 の側鎖の配向を規定することで水素結合ネットワークに重要であり, Ser50 は, Asn59 の側鎖の配向を規定する上で重要であることが明らかとなった. 以上をまとめると, 水素結合ネットワークは, 触媒基 Asp52 が機能発現するために重要であり, 糖転移反応に重要である E-F 部位の基質結合に大きく関与していることが明らかとなった. このように, HEL の触媒基 Asp52 は, 周辺のアミノ酸によって固定され, 触媒基の位置関係が固定されていた. さらに, Asp 残基が糖転移反応に重要であることは明らかとなったが, 酵素反応機構の解明には至らなかった. そこで, 加水分解反応を示すが糖転移反応を示さないグース型リゾチームである OEL の触媒基周辺に着目した.

グース型リゾチームは, 大型の鳥類や魚類に含まれ, その基質結合部位に関しては, ガチョウリゾチーム (GEL) と (GlcNAc)₃ との複合体の X 線結晶構造解析から 3 つの糖残基が結合した B-D 部位が推定され, Glu73 が触媒基であると報告されている. しかし, GEL は HEL の Asp52 にあたる 2 つ目の触媒基が明らかになっていない. すなわち, HEL の Asp52 の位置に Gly90 が存在し, その近傍に 2 つの Asp 残基 (Asp86 および Asp97) が存在している. そこで, これらの 2 つの Asp 残基や HEL の触媒基 Asp52 と同等の位置に存在する Gly90 に着目し, ダチョウリゾチーム (OEL) の変異体を作製し機能解析した. 変異体は, Asp86 および Asp97 を Asp に置換したもの (D86A および D97A), 2 つを Ala に置換したもの (D86A/D97A), さらに, Gly90 を Asp に置換したもの (G90D), 3 つのアミノ酸を置換したもの (D86A/G90D/D97A) を作成した. まず, Asp 残基変異体の活性を GlcNAc の 6 量体を用いて, 反応生成物の経時的な変化で検討した. OEL は, 基質を 180 分で分解した. 一方, Asp 残基の変異体である D97A では, 反応速度が遅く, さらに, D86A および D86A/D97A では, ほとんど活性がみられなかった. このことから, この 2 つの Asp 残基が活性部位として関与することが明らかとなった. 次に, Gly 残基の変異体 (G90D, D86A/G90D/D97A) の反応生成

物の経時的な変化を検討した。G90Dでは、反応速度が遅くなった。次に、HELと似た触媒基環境にした変異体であるD86A/G90D/D97Aでは、D86A/D97Aはほとんど活性がみられなかったが、G90Dを導入することにより、活性が回復した。このことから、導入したAsp残基が酵素反応に新たに関与したと考えられた。さらに、HPLCを用いた解析において、反応に用いた初期基質GlcNAcの6量体より高分子の基質が確認された。そこで、これらの変異体について、HPLCを用いて解析を行った。その結果、D97A、G90DおよびD86A/G90D/D97Aにおいて、初期基質より高分子の糖が観察された。さらに、反応産物について、質量分析機を用いて、高分子の糖を解析した。その結果、G90DおよびD86A/G90D/D97Aにおいて、N-アセチルグルコサミンの11量体までの高分子の糖が確認された。

次に、分子量がニワトリ型リゾチームに近いが糖転移反応を示さない無脊椎型リゾチームであるハマグリリゾチーム (MLL) の機能・構造を比較することで、酵素反応機構の解明へのアプローチを試みた。まず、GlcNAcの5および6量体に対する活性測定を比較した。HELは、GlcNAcの5量体を約20分で分解し、主に4量体と1量体が生成される。MLLは、HELと比較して分解速度が遅かった。このことから、オリゴマー分解能が、HELより弱いことが明らかとなった。さらに、6量体を用いて、活性測定を比較した結果、約20分で基質を分解し、主に4量体と2量体が生成され、HELと同様であった。そこで、活性の違いの詳細を解析するために、立体構造の比較を行った。MLLの立体構造をアサリリゾチーム (TJL) と比較した結果、Asp残基の側鎖の配向が異なっていた。同じ無脊椎型リゾチームにおいても異なっていた。さらに、HELの構造と比較した結果、MLLのGlu18はHELのGlu35に相当し立体構造上保存されていたが、MLLの触媒基Asp29はHELのAsp52の位置とは異なった β シートに存在していた。また、OELの触媒基周辺についても比較した結果、触媒基Glu残基は保存されていたが、Asp残基の位置は一致しなかった。無脊椎型リゾチームのAsp29は、グース型

リゾチームの Asp86 と似た位置に存在していた。このように、触媒基 Glu 残基は、HEL や OEL のように保存されていたが、Asp 残基の位置に違いが見られた。これが、酵素反応の違いに繋がっているのではないかと考えられた。

今回の研究において、リゾチームの酵素反応機構の中で、加水分解反応においては、触媒基 Glu 残基は必須であるが、Asp 残基はあまり位置に関係がないと考えられた。しかし、糖転移反応においては、触媒基 Glu 残基および Asp 残基の位置関係が規定されている必要性が考えられた。今後、MLL の触媒基周辺のアミノ酸を変異させた変異体を作製し解析することで、より詳細な酵素反応機構の解明が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり，始終ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました東海大学農学部教授 荒木朋洋先生ならびに東海大学総合農学研究所教授 芝田猛先生に心より深甚なる謝意を表します．また，本論文を作成するにあたり，ご校閲ならびにご助言を賜りました，東海大学理学部教授 岩岡道夫先生ならびに東海大学農学部教授 星良和先生，東海大学農学部准教授 永井竜児先生に深く感謝いたします．

本論文の遂行にあたり，種々の実験のご指導とご鞭撻を賜りました東海大学農学部准教授 米田一成先生ならびに東海大学名誉教授 鳥潟隆雄先生に謹んで厚くお礼申し上げます．さらに，始終御協力を賜りました東海大学農学部機器分析室技術員 千々岩有紀氏に心より感謝いたします．また，本研究を行うにあたり，CD スペクトルおよび質量分析計による分析をご指導とご助言を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部准教授 荒木令江先生に厚くお礼申し上げます．そして，本研究に対し数々のご助言を賜りました東海大学阿蘇教養教育センター准教授 山口浩先生にお礼申し上げます．

本研究を行うにあたり，実験に関する方法や予備データの構築に関与していただいた東海大学農学部バイオサイエンス学科タンパク質化学研究室ならびに元細胞生物学研究室の歴代関係者皆様に厚く感謝の意を表します．

最後に，私に研究活動の基礎をご指導頂きました元東海大学農学部准教授 河村俊介氏に心より感謝申し上げます．

参考文献

- 1) Imoto, T., Johnson, L. N., North, A. T. C., Phillips, D. C., and Rupley, J. A. : *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed.) , **7**, 665-868(1972).
- 2) Canfield, R. E. : *J. Biol. Chem.*, **238**, 2698-2707(1963).
- 3) Jollès, J., Jauregui-Adell, J., Bernier, I., and Jollès, P. : *Biochim. Biophys. Acta*, **78**, 668-689(1963).
- 4) Blake, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., and Sarma, V. R. : *Nature*, **206**, 757-761(1965).
- 5) Simpson, R. J., and Morgan, F. J. : *Biochim. Biophys. Acta*, **744**, 349-351(1983).
- 6) Grütter, M. G., Weaver, L. H., and Matthews, B. W. : *Nature*, **303**, 828-831(1983).
- 7) Isaacs, N. W., Machin, K. J., and Masakuni, M. : *Aust. J. Biol. Sci.*, **38**, 13-22(1985).
- 8) Inoue, M., Imada, M., and Tsugita, A. : *J. Biol. Chem.*, **245**, 3479-3484(1970).
- 9) Matthews, B. W., and Remington, S. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 4178-4182(1974).
- 10) Jollès, J., and Jollès, P., *J. Biochem.*, **54**, 19-23. (1975).
- 11) Ito, Y., Yoshikawa, H., Fukuda, S., and Imoto, T., *Eur. J. Biochem.*, **259**, 456-461(1999).
- 12) Blake, C. C., Johnson, L. N., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., and Sarma, V. R. : *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, **167**, 378-388(1967).
- 13) Strynadka, N. C., and James, M. N. : *J. Mol. Biol.*, **220**, 401-424(1991).
- 14) Redfield, C., and Dobson, C. M. : *Biochemistry*, **27**, 122-136(1988).
- 15) Smith, L. J., Sutcliffe, M. J., Redfield, C., and Dobson, C. M. : *J. Mol. Biol.*, **229**, 930-944(1993).
- 16) Pincus, M. R., Zimmerman, S. S., and Scheraga, H. A. : *Proc. Natl.*

- Acad. Sci U. S. A.*, **74**, 2629-2633(1977).
- 17) Pincus, M. R., and Scheraga, H. A. : *Macromolecules*, **12**, 663-644(1979).
- 18) Monzingo, A. F., Marcotte, E. M., Hart, P. J., and Robertus, J. D. : *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 133-140(1996).
- 19) Rupley, J. A. : *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, **167**, 416-428(1967).
- 20) Sharon, N. : *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, **167**, 402-415(1967).
- 21) Phillips, D. C. : *Sci. Am.*, **215**, 78-90(1966).
- 22) Koshland, D. E. Jr., and Neet, K. E. : *Annu. Rev. Biochemistry*, **37**, 359-410(1968).
- 23) Matsumura, I., and Kirsch, J. F. : *Biochemistry*, **35**, 1881-1889(1996).
- 24) Maenaka, K., Matsushima, M., Song, H., Sunada, F., Watanabe, K., and Kumagai, I. : *J. Mol. Biol.*, **247**, 281-293(1995).
- 25) Inoue, M., Yamada, H., Yasukochi, T., Miki, T., Horiuchi, T., and Imoto, T. : *Biochemistry*, **31**, 10322-10330(1992).
- 26) Ose, T., Kuroki, K., Matsushima, M., Maenaka, K., and Kumagai, I. : *J. Biochem.*, **146**, 651-657(2009).
- 27) Simpson, R. J., Begg, G. S., Dorow, D. S., and Morgan, F. : *J. Biochem.*, **19**, 1814-1819(1980).
- 28) Schoentgen, F., Jollès, J., and Jollès, P. : *Eur. J. Biochem.*, **123**, 489-497(1982).
- 29) Thammasirirak, S., Torikata, T., Takami, K., Murata, K., and Araki, T. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 147-156(2002).
- 30) Pooart, J., Torikata, T., and Araki, T. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 159-169(2004).
- 31) Nakano, T., and Graf, T. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1090**, 273-276(1991).
- 32) Hikima, J., Minagawa, S., Hirono, I., and Aoki, T. : *Biochim.*

- Biophys. Acta*, **30**, 35-44(2001).
- 33) Yin, S., Weng, S., Deng, W., and He, J. : *Aquaculture Asia*, **3**, 21-22(2002).
- 34) Kyomuhendo, P., Myrnes, B., and Nilsen, I. W. : *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 2841-2847(2007).
- 35) Savan, R., Aman, A., and Sakai, M. : *Fish Shellfish Immunol.*, **15**, 263-268(2003).
- 36) Weaver, L. H., Grütter, M. G., and Matthews, B.W. : *J. Mol. Biol.*, **245**, 54-68(1995).
- 37) Karlsen, S., Hough, E., Rao, Z. H., and Isaacs, N. W. : *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **51**, 354-367(1995).
- 38) Kyomuhendo, P., Myrnes, B., Brandsdal, B., Smalas, A., Nilsen, I. W., Helland, R. : *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **156**, 254-263(2010).
- 39) Helland, R., Larsen, R.L., Finstad, S., Kyomuhendo, P., Larsen, A.N. : *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 2585-2598(2009).
- 40) Strynadka, N. C. J., and James, M. N. G. : *Lysozymes: Model enzymes in Biochemistry and Biology* (Jollès, P., ed.) 185-222(1996).
- 41) Honda, Y., and Fukamizo, T. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1388**, 53-65(1998).
- 42) Kawamura, S., Fukamizo, T., Araki, T., and Torikata, T. : *J. Biochem.*, **133**, 123-131(2003).
- 43) Kawamura, S., Ohno, K., Ohkuma, M., Chijiiwa, Y., and Torikata, T. : *J. Biochem.*, **140**, 75-85(2006).
- 44) Kawamura, S., Ohkuma, M., Chijiiwa, Y., Kohno, D., Nakagawa, H., Hirakawa, H., Kuhara, S., and Torikata, T. : *FEBS J.*, **275**, 2818-2830(2008).
- 45) Nilsen, I.W., Overbø, K., Sandsdalen, E., Sandaker, E., Sletten, K., and Myrnes, B., : *FEBS Lett.*, **464**(3), 153-8(1999).
- 46) Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jollès, P.,

- Fiala Medioni, A., and Deutsch, JS. : *J. Mol. Evol.*, **54**, 652-664(2002).
- 47) McHenry, JG., Birkbeck, TH. : *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **71**(4), 583-9(1982).
- 48) Goto, T., Abe, Y., Kakuta, Y., Takeshita, K., Imoto, T., and Ueda, T. : *J. Biol. Chem.*, **282**(37): 27459-67(2007).
- 49) Kuwano, Y., Yoneda, K., Kwaguchi, Y., Araki, N., and Araki, T. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 2269-2277(2013).
- 50) Kuwano, Y., Yoneda, K., Kawaguchi, Y., and Araki, T. : *Acta Crystallogr. Sec. F*, **69**, 1202-1206(2013).
- 51) Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H., : *Gene.*, **96**, 23-28(1990).
- 52) Birnboim, H. C., and Doly, J., : *Nucleic acids Res.*, **7**, 1513-1523(1979).
- 53) Sarkar, G., and Sommer, S. S., : *Biotechniques.*, **8**, 404-407(1990).
- 54) Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A.,: *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168(1983).
- 55) Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsly, G., and Gray, T. : *Protein Sci.*, **4**, 2411-2423(1995).
- 56) Leammli, U. K.: *Nature*, **227**, 680-685(1970).
- 57) Scatchard, G. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660-672(1949).
- 58) Yamada, H., and Imoto, T. : *Carbohydr. Res.*, **92**, 160-162(1981).
- 59) Salton, M. R. : *Nature.*, **170**, 746-747(1952).
- 60) Rupley, J. A. : *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 245-255(1964).
- 61) Masaki, A., Aso, Y., Koga, D., and Hayashi, K. : *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **21**, 47-66(1977).
- 62) Chipman, D. M.: *Biochemistry*, **10**, 1714-1744(1971).
- 63) Pace, C. N. : *Trends Biotechnol.*, **8**, 93-98(1990).
- 64) Ducruiv, A., and Giege, R.: *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins*, **2nd Ed**, 121-147(1999).
- 65) Vagin, A., and Teplyakov, A.: *J. Appl. Crystallogr.*, **30**,

- 1022-1025(1997).
- 66) Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J.: *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **53**, 240-255(1997).
- 67) Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L.: *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **54**, 905-921(1998).
- 68) Collaborative Computational Project, N.: *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **50**, 760-763(1994).
- 69) McRee, D. E.: *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **60**, 2276-2279(2004).
- 70) Emsley, P., and Cowtan, K.: *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **60**, 2126-2132(2004).
- 71) Kawamura, S., Toshima, G., Imoto, T., Araki, T., and Torikata, T.: *J. Biochem.*, **131**, 663-670(2002).
- 72) Kuhara, S., Ezaki, E., Fukamizo, T., and Hayashi, K. : *J. Biochem.*, **92**, 121-127(1982).
- 73) Teshima, K., Kuramitsu, S., Hamaguchi, K., Sakiyama, F., Mizuno, K., and Yamasaki, N. : *J. Biochem.*, **87**, 1015-1027(1980).
- 74) Fukamizo, T., Kuhara, S., and Hayashi, K. : *J. Biochem.*, **92**, 717-724(1982).
- 75) Kuroki, R., Weaver, L.H., and Matthews, B.W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 8949-8954(1999).
- 76) Vocadlo, D.J., Davies, G., Laine, R., and Withers, S.G. : *Nature*, **412**, 835-838(2009).

本論文に関わる報告

本論文は下記に発表した論文を基礎としてまとめたものである。

川口裕也，河村俊介，米田一成，鳥潟隆雄，荒木朋洋，C型リゾチームの触媒部位に存在する Ser50 の基質結合及びキチンオリゴマー分解に対する役割，キチン・キトサン研究，**18**(3)，242-251 (2012)。

Yuya Kawaguchi, Kazunari Yoneda, Takao Torikata, Tomohiro Araki, Asp48 function in the hydrogen-bonding network involving Asp52 of hen egg-white lysozyme, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press.