

はしがき

本報告書は、平成 16 年度～平成 17 年度に行った「好熱性放線菌が持つシクロデキストリン代謝・膜間輸送マシーナリーの構造学的研究」についてまとめたものである。本研究は、好熱性放線菌 (*Thermoactinomyces vulgaris* R-47) が持つシクロデキストリン代謝・輸送タンパク質群の 3 次元構造を X 線結晶解析により決定し、この代謝・輸送マシーナリーについて、構造生物学的に理解することを目的として行われた。その結果、菌体外で多糖を分解しオリゴ糖を生成する酵素 TVA1、シクロデキストリンを補足し膜輸送担体に受け渡すシクロデキストリン結合タンパク質、菌体内でシクロデキストリンを加水分解する酵素 TVA2 等をはじめ多くのタンパク質について、精力的に研究をすすめ、2 年間で多くの研究成果をあげることができた。また、最も困難を極めると予想されたシクロデキストリン膜輸送担体タンパク質複合体についても、個別にはあるが、これらの発現系の構築に成功した。今後、3 次元構造決定を目指して、本研究をさらに継続・発展させていきたい。

本研究を遂行するにあたり、日本学術振興会科学研究補助金の果たした役割は、極めて大きく、ここに改めて感謝する。X 線回折データは、その大部分を、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (BL6A, BL18B, NW12) および (財) 高輝度光科学センター SPring-8 (BL38B1, BL41XU (共用ビームライン), BL44XU (大阪大学蛋白質研究所専用ビームライン)) において収集した。

本研究は、平成 6 年 9 月、筆者が東京農工大学着任直後より、筆者の研究グループと研究分担者である坂野教授のグループが行ってきた共同研究を発展させたものである。この間、平成 10 年度から科学研究費補助金を採択していただいていた。参考までに、本報告書において、付録として、これらの研究成果についてもまとめた。本研究およびこれらの研究成果は、多くの学生諸氏が研究に携わってくれたことによるものである。特に、近藤伸、横田雄弘、大滝 証、水野正浩、市川和洋、安部暁美、井口晃弘、山田 貢の諸氏らによる貢献が大きかったことを謝意とともに記しておく。

平成 18 年 5 月 神鳥成弘

研究組織

研究代表者： 神鳥成弘（香川大学・総合情報基盤センター・教授）
平成16年11月，東京農工大学・大学院共生科学技術研究部・助教授から
転出

研究分担者： 坂野好幸（東京農工大学・大学院共生科学技術研究部・教授）

吉田裕美（香川大学・総合情報基盤センター・助教授）
平成17年4月より研究分担者として参加

研究協力者： 殿塚隆史（東京農工大学・大学院共生科学技術研究部・助教授）

大滝 証（東京農工大学大学院工学研究科博士課程）
平成16年4月～16年12月参加，平成16年12月博士（工学）号取得後，
現在東京農工大学博士研究員

水野正浩（東京農工大学大学院連合農学研究科博士課程）
平成16年4月～17年3月参加，平成17年3月，博士（農学）号取得後，
海洋研究開発機構にて日本学術振興会特別研究員PDを経て，現在信州大
学工学部助手

安部暁美（香川大学大学院医学系研究科博士課程）
平成17年4月，東京農工大学大学院工学研究科より転籍，平成18年3月
博士（医学）号取得後，現在香川大学にて日本学術振興会特別研究員PD

山田 貢（香川大学大学院医学系研究科博士課程）
平成17年4月，東京農工大学大学院工学研究科より転籍

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	10,400	0	10,400
平成 17 年度	4,600	0	4,600
総計	15,000	0	15,000

研究発表

(1) 原著論文 (研究代表者および研究分担者にはアンダーライン)

1. Ohtaki, A., Mizuno, M., Tonozuka, T., Sakano, Y. & Kamitori, S. (2004). Complex structures of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase 2 with acarbose and cyclodextrins demonstrate the multiple substrate recognition mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 31033-31040.
2. Ichikawa, K., Tonozuka, T., Mizuno, M., Tanabe, Y., Kamitori, S., Nishikawa, A. & Sakano, Y. (2005). Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 maltooligosaccharide-metabolizing enzyme homologous to glucoamylase" *Acta Crystallogr.*, **F61**, 302-304.
3. Mizuno, M., Ichikawa, K., Tonozuka, T., Ohtaki, A., Shimura, Y., Kamitori, S., Nishikawa, A. & Sakano, Y. (2005). Mutagenesis and structural analysis of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase II (TVA I). *J. Appl. Glycosci.*, **52**, 225-231.
4. Abe, A., Yoshida, H., Tonozuka, T., Sakano, Y. & Kamitori, S. (2005). Complexes of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase 1 and pullulan model oligosaccharides provide new insight into the mechanism for recognizing substrates with α -(1,6) glycosidic linkages. *FEBS J.* **272**, 6145-6153.
5. Ohtaki, A., Mizuno, M., Yoshida, H., Tonozuka, T., Sakano, Y. & Kamitori, S. (2006). Structure of a Complex of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -Amylase 2 with Maltohexaose Demonstrates the Important Role of Aromatic Residues at the Reducing End of the Substrate Binding Cleft. *Carbohydr. Res.* (in press).

(2) 学会発表 (研究代表者および研究分担者にはアンダーライン)

1. 大滝 証, 水野正浩, 殿塚隆史, 坂野好幸, 神鳥成弘 「Complex Structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -Amylase 2 with Acarbose and Cyclodextrins Demonstrate thr Multiple Substrate Recognition Mechanism」日本生化学会大会, 2004年10月13日(横浜)
2. 安部暁美, 殿塚隆史, 坂野好幸, 神鳥成弘 「Role of two sugar binding sites at domain N of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase」日本生化学会大会, 2004年10月13日(横浜)
3. 水野正浩, 市川和洋, 殿塚隆史, 神鳥成弘, 西河淳, 坂野好幸 「グラム陽性菌 *Arthrobacter globiformis* 由来グルコデキストラナーゼのX線結晶構造解析」日本応用糖質科学会糖質関連酵素化学シンポジウム, 2004年9月17日(鹿児島)
4. 殿塚隆史, 水野正浩, 市川和洋, 魚津理映, 神鳥成弘, 西河淳, 坂野好幸 「Glycoside Hydrolase Family 15 に属する糖質加水分解酵素の構造と機能」日本農芸化学会(シンポジウム), 2005年3月29日(札幌)
5. 山田貢, 吉田裕美, 神鳥成弘, 十川亜紀子, 水野正浩, 殿塚隆史, 西河淳, 坂野好幸 「好熱性放線菌 *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 由来シクロデキストリン結合タンパク質のX線結晶解析」日本生化学会-中国・四国支部例会-, 2005年5月28日(松山)
6. 殿塚隆史, 十川亜紀子, 山田貢, 吉田裕美, 神鳥成弘, 水野正浩, 西河淳, 坂野好幸 「好熱性放線菌由来シクロデキストリン結合タンパク質の立体構造と機能の解析」FCCA セミナーグライコサイエンス若手の会, 2005年8月26日, 館山(千葉)
7. 水野正浩, 山村昭裕, 神鳥成弘, 西河淳, 殿塚隆史, 坂野好幸 「*Aspergillus niger* ATCC9642 由来イソプルラナーゼのX線結晶構造解析」日本応用糖質科学会, 2005年9月28日, 津(三重)
8. 安部暁美, 吉田裕美, 殿塚隆史, 坂野好幸, 神鳥成弘 「Crystal structures of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase 1 (TVA1) complex with pullulan-analog substrates」日本生化学会年会, 2005年10月21日(神戸)

9. 山田貢, 吉田裕美, 神鳥成弘, 十川亜紀子, 水野正浩, 殿塚隆史, 西河淳, 坂野好幸
「好熱性放線菌シクロデキストリン膜輸送に関わる CBP の X 線結晶解析」日本結晶学会年会, 2005 年 12 月 7 日 (姫路)
10. 松本直樹, 殿塚隆史, 十川亜紀子, 神鳥成弘, 西河淳, 坂野好幸 「*Thermoactinomyces vulgaris* R-47 シクロデキストリン結合タンパク質と γ -シクロデキストリン複合体の結晶構造解析」日本農芸化学会, 2006 年 3 月 27 日 (京都)
11. 小出篤史, 殿塚隆史, 水野正浩, 神鳥成弘, 西河淳, 坂野好幸 「*Aspergillus niger* ATCC9642 由来イソプルラナーゼとイソパノースとの複合体の X 線結晶構造解析」日本農芸化学会, 2006 年 3 月 27 日 (京都)

(3) 総説等

1. Mizuno, M., Tonozuka, T., Ichikawa, K., Kamitori, S., Nishikawa, A. & Sakano, Y. (2005). X-ray crystallographic study of glucodextranase from a Gram-positive bacterium, *Arthrobacter globiformis* I42" *J. Appl. Glycosci.*, **52**, 145-151.
2. Mizuno, M., Tonozuka, T., Ichikawa, K., Kamitori, S., Nishikawa, A. & Sakano, Y. (2005). Three-dimensional structure of glucodextranase, a glycoside hydrolase family 15 enzyme, *Biologia, Bratislava*, **60, Suppl.11**, 171-176.

(4) 本研究に関わる学位取得

1. 大滝 証

Study on the Cyclodextrin-Hydrolyzing Mechanism of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -Amylase2 (TVA2)

「好熱性放線菌 *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 由来 α -アミラーゼ 2 (TVA2)のシクロデキストリン加水分解機構の解明」

東京農工大学工学大学院教育部生命工学専攻 博甲第 399 号 博士 (工学)

平成 16 年 12 月

2. 水野正浩

X-ray crystallographic and biochemical analyses of α -(1 \rightarrow 4)- and α -(1 \rightarrow 6)-glucan-hydrolyzing enzymes

「 α -(1 \rightarrow 4)-, および α -(1 \rightarrow 6)-グルカン加水分解酵素の X 線結晶構造解析ならびに生化学的解析に関する研究」

東京農工大学大学院連合農学研究科 博甲第 588 号 博士(農学) 平成 17 年 3 月

3. 安部暁美

Complexes of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase 1 and pullulan model oligosaccharides provide new insight into the mechanism for recognizing substrates with α -(1,6) glycosidic linkages

「好熱性放線菌 *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 由来 α -アミラーゼ 1・プルランモデルオリゴ糖複合体の X 線結晶解析： α -(1,6)結合を含む基質の認識機構」

香川大学大学院医学系研究科 博甲第 435 号 博士 (医学) 平成 18 年 3 月

(5) 受賞

坂野好幸

「澱粉および関連多糖に作用する酵素の基礎と応用に関する先駆的研究」

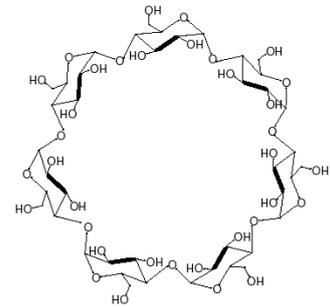
平成 18 年度日本農学賞および第 43 回読売農学賞受賞 平成 18 年 4 月 5 日

研究成果

1. 背景

好熱性放線菌 (*Thermoactinomyces vulgaris* R-47, 以下 *T.vulgaris*) は、2つの α -アミラーゼ (TVA1, TVA2) を持つ。これらは、デンプンに加えて、通常の α -アミラーゼがほとんど加水分解できない環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (図 1 参照, 以下 CD) や、 α -1,4, α -1,4, α -1,6 が規則正しく繰り返す多糖であるプルランも分解できるという興味深い基質特異性を持つ。

図 1. シクロデキストリン (CD) の化学構造式。グルコースが 6 個からなるものを α -CD, 7 個, 8 個からなるものを β -, γ -CD と呼ぶ。CD は環状構造ゆえ還元末端がなく剛直な構造を持つ。CD は、その内孔にサイズが合った分子をゲスト分子として取り込み安定な包接化合物を形成するので、香味成分の安定化剤等として広く実用化されている機能性分子である。



TVA1 は、菌体外酵素であり、比較的高分子量の基質に対してよく働き、それに対して TVA2 は、CD の加水分解能力に優れており、 α -アミラーゼというよりはシクロデキストリン加水分解酵素として位置づけられる。われわれは、これまでに TVA1, TVA2 およびその基質複合体の 3 次元構造を X 線結晶解析により決定し、これらの基質認識・加水分解機構について報告してきた。*T.vulgaris* のゲノム上 TVA2 の上流には CD の運搬に関与すると考えられる ABC トランスポーター (CDK), CD 結合タンパク質 (CDE), および 2 つの CD 膜間輸送担体タンパク質 (CDF, CDG) の遺伝子が存在し、下流にはオリゴ糖をグルコースにまで分解するグルコアミラーゼ (TGA) およびこれらの遺伝子群の発現を調節するレプレッサータンパク質 (CDI) の遺伝子が存在している (図 2 参照)。

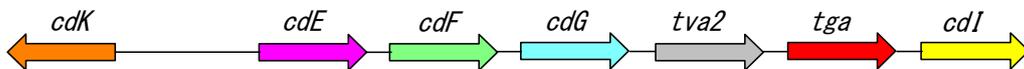


図 2. CD 代謝・輸送系遺伝子群。色分けは図 3 と対応している。

本研究におけるタンパク質と、大腸菌マルトース輸送系の対応するタンパク質との間の 1 次構造の相同性は、10–18 % と低く、それぞれのタンパク質の構造は大きく異なっていると考えられるが、大腸菌マルトース輸送系との類似点に基づいて、予想される *T.vulgaris* が持つシクロデキストリン (CD) 代謝・輸送系を図 3 に示す。

図中、左上から、菌体外において TVA1 が、生デンプン等の高分子多糖を加水分解することにより、中程度のオリゴ糖を生成する。このオリゴ糖を基質として CD 合成酵素 (CGT, 遺伝子未知) が CD を合成する。合成された CD は、CD 結合タンパク質 (CDE) により捕捉され、細胞膜内に存在する CD 膜間輸送担体タンパク質 (CDF・CDG 複合体) に結合する。菌体内から、ABC トランスポーター (CDK) が、CDF・CDG 複合体に結合し、ATP→ADP のエネルギーを使って、CD が通過するためのチャネルを開く。CDE から CD がチャネルを通過して菌体内に入る際、CDK, CDE は CDF・CDG 複合体から離れる。菌体内においては、TVA2 が、菌体内に入ってきた CD を加水分解してマルトースやマルトトリオースなど小さなオリゴ糖を生成する。最後にグルコアミラーゼ (TGA) がグルコースまで加水分解して、解糖系へとすすむ。CDI は、CDK と CDE の間に存在するパリンドローム配列に結合することを確かめており、輸送系タンパク質の発現を調節・制御していると考えられる。他生物がグルコース源として利用できない CD を外界からの運搬物として巧みに利用するために、*T.vulgaris* は、こうした代謝運搬系を獲得したものと考えられる。本研究の目的は、*T.vulgaris* が持つこの新奇な CD 代謝・輸送タンパク質群の 3 次元構造を X 線結晶解析により決定し、この代謝・輸送マシーナリーについて、構造生物学的に理解することである。CD は、いくつかの種類の細菌によって合成されるが、CD の生物学的意味に関する研究はこれまでに少ない。本研究は、*T.vulgaris* の CD 代謝・輸送マシーナリーを構造学的に明らかにするだけでなく、細菌にとって CD が代謝中間生成物として極めて重要であることを証明するものである。

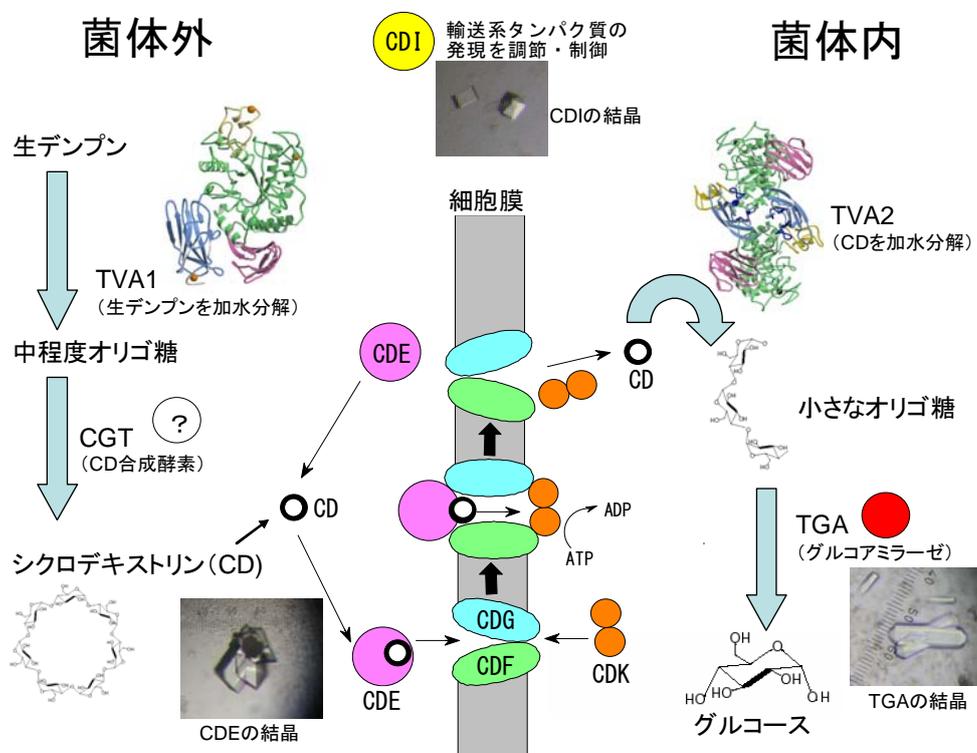


図 3. 予想されるシクロデキストリン代謝・輸送経路

2. TVA1 (好熱性放線菌 α -アミラーゼ 1) に関する研究

T.vulgaris が持つ CD 代謝系において, TVA1 は, 菌体外で, デンプンやプルラン (α -1,4, α -1,4, α -1,6 が規則正しく繰り返す多糖) といった高分子量の基質を中程度の長さのオリゴ糖に分解するという役割を持つと予想される。TVA1 は, 他の α -アミラーゼにない, 特徴的なドメインを N 末側に持つ (Domain N)。これまで, われわれは, Domain N には, 2つの Starch 結合サイトが存在し, Starch Binding Domain(SBD)として働いていることを明らかにしてきた。本研究課題では, TVA1・プルランモデルオリゴ糖複合体の X線結晶解析を行うことにより, TVA1 の Domain N が, プルランに対しても, Pullulan Binding Domain として働いていること, さらに, TVA1 が, プルラン中の α -1,6 結合を弱いながらも, 加水分解できるメカニズムを解明した。 α -1,6 結合を加水分解部位として認識している α -アミラーゼ・基質複合体の例は, 初めてである (図 4)。本研究成果は, 以下の論文誌に報告した (本報告書に別刷りを採録)。

Abe, A., Yoshida, H., Tonozuka, T., Sakano, Y. & Kamitori, S. (2005). Complexes of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase 1 and pullulan model oligossacharides provide new insight into the mechanism for recognizing substrates with α -(1,6) glycosidic linkages. *FEBS J.* **272**, 6145-6153.

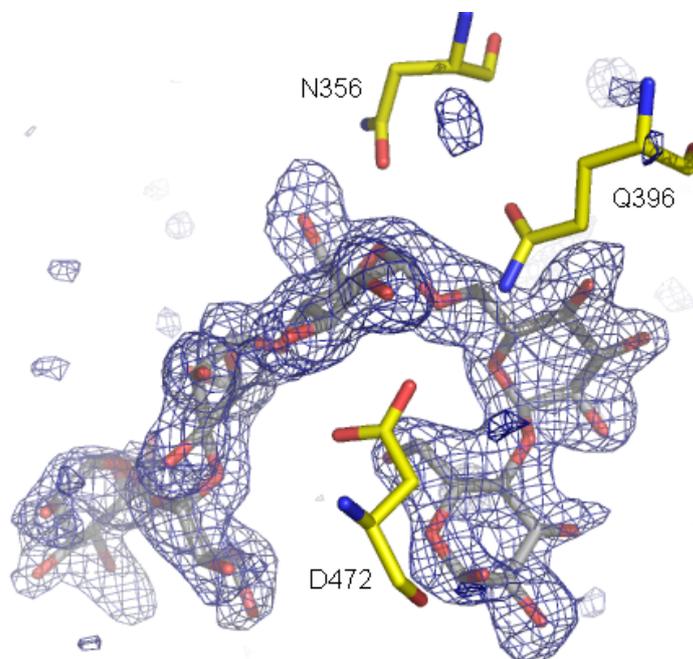


図 4. TVA1 に結合したプルランモデルオリゴ糖 (パノシルパノース) の電子密度。加水分解部位 (3 つの触媒残基の中心) には α -1,6 結合が位置している。

3. TVA2 (好熱性放線菌 α -アミラーゼ 2) に関する研究

T.vulgaris が持つ CD 代謝系において, TVA2 の役割は, 菌体内で, CD を加水分解して小さなオリゴ糖を生成することだと予想される。これまでに, 不活性型 TVA2 と CD およびオリゴ糖との複合体の X 線結晶解析を行ってきたが, 高分解能のデータが得られず, 詳細な議論をすることができなかった。本研究課題では, 様々な基質/阻害剤 (α -CD, β -CD, γ -CD, マルトヘキサオース, パノシルパノース, アカボース) が結合した TVA2 複合体の高分解能 X 線結晶解析に成功し (図 5), TVA2 の様々な基質に対する基質認識機構について多くの興味ある知見を得た。本研究成果は, 以下の論文誌に報告した (本報告書に別刷りを採録)。

Ohtaki, A., Mizuno, M., Tonozuka, T., Sakano, Y. & Kamitori, S. (2004). Complex structures of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase 2 with acarbose and cyclodextrins demonstrate the multiple substrate recognition mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 31033-31040.

Mizuno, M., Ichikawa, K., Tonozuka, T., Ohtaki, A., Shimura, Y., Kamitori, S., Nishikawa, A. & Sakano, Y. (2005). Mutagenesis and structural analysis of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase II (TVA I). *J. Appl. Glycosci.*, **52**, 225-231.

Ohtaki, A., Mizuno, M., Yoshida, H., Tonozuka, T., Sakano, Y. & Kamitori, S. (2006). Structure of a Complex of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -Amylase 2 with Maltohexaose Demonstrates the Important Role of Aromatic Residues at the Reducing End of the Substrate Binding Cleft. *Carbohydr. Res.* (in press).

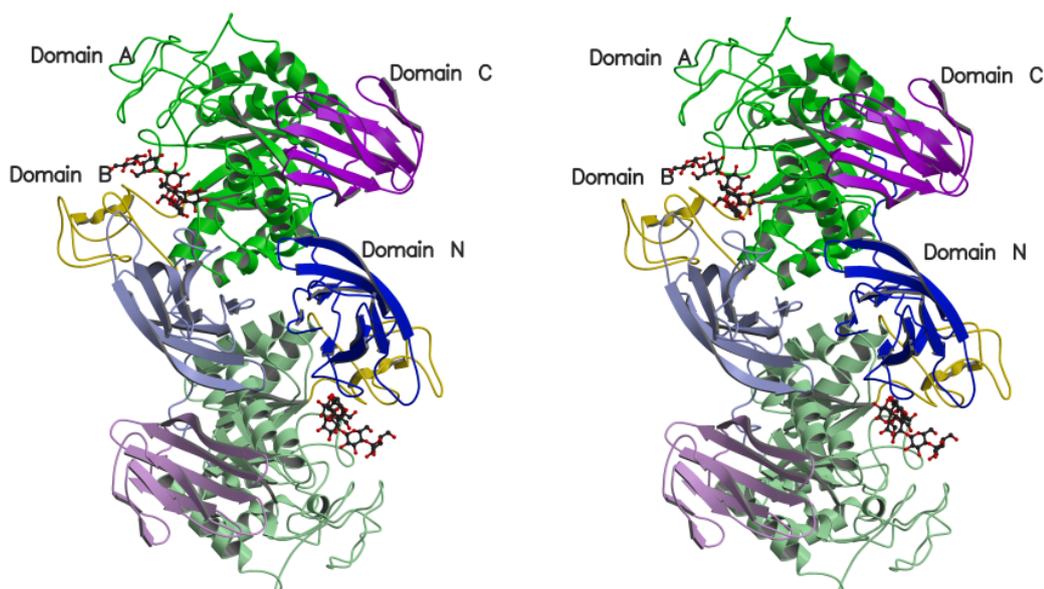


図 5. TVA2・マルトヘキサオース複合体 2.1 Å 分解能の構造のステレオ図。

4. TGA（好熱性放線菌グルコアミラーゼ）に関する研究

T.vulgaris が持つ CD 代謝系において、TGA の役割は、菌体内で、TVA2 により生成した小さなオリゴ糖を加水分解してグルコースを生成することだと予想される。本研究課題では、TGA の結晶化および予備的な X 線回折実験を行った。本研究成果は、以下の論文誌に報告した（本報告書に別刷りを採録）。

Ichikawa, K., Tonozuka, T., Mizuno, M., Tanabe, Y., Kamitori, S., Nishikawa, A. & Sakano, Y. (2005). Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 maltooligosaccharide-metabolizing enzyme homologous to glucoamylase" *Acta Crystallogr.*, **F61**, 302-304.

5. CDE（好熱性放線菌シクロデキストリン結合タンパク質, CBP）に関する研究

本研究では、シクロデキストリン結合タンパク質(Cyclodextrin Binding Protein, CBP = CDE)と最も親和性の高いリガンドである γ -CDを用いてX線結晶解析によりCBP(CDE) \cdot γ -CD複合体の3次元構造を決定した。

初期位相決定はセレノメチオニン置換体を用いたMAD法によった。構造精密化の結果、分解能2.1 Å, R-factor = 0.21, の構造を得た (PDB code 2DFZ)。

CBP(CDE)の全体構造を図6に示す。CBP(CDE)は、ヘリックスの多い2つのドメインが、1つのループと2本の β -ストランドによるHinge領域で繋がっていた。リガンドである γ -CDは、2つのドメインに挟まれるようにして結合していた。

CBP(CDE)とさまざまな糖との親和性を蛍光強度測定により解析したところ、CBP(CDE)は、CDのみならず、直鎖オリゴ糖に対しても同様の親和性を示し、一次構造上相同性を有する大腸菌のマルトース結合タンパク質MBP(MalE)とは異なる結合特異性を持つことがわかった(表1)。現在、既に報告されている*E. coli*のMBP(MalE) \cdot リガンド(マルトース, β -CD)複合体の構造との比較を行い、リガンド結合にともなうタンパク質全体の特徴的なコンフォメーション変化と機能との関係について検討している。

CBP(CDE)は、大腸菌MBP(MalE)よりも、すべてのオリゴ糖に対して親和性が高いことから、融合タンパク質を用いたタンパク質精製プロセス工学への応用が期待できる。

本成果については論文執筆中である。

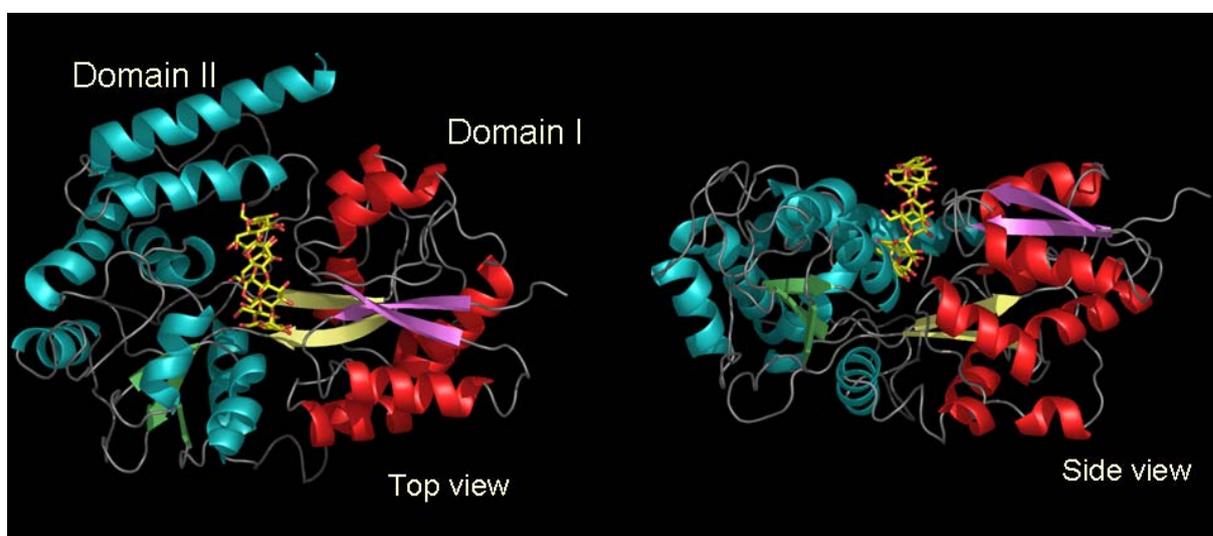


図6. CBP(CDE)の全体構造。N末側をDomain I (赤色), C末側をDomain II (青色)とした。結合している γ -CDは棒球モデル(黄色炭素)で示す。

表1. オリゴ糖に対する K_d 値 (μM) の比較

	CBP	MBP from <i>E. coli</i>
Maltose (G2)	0.41	3.50
Maltotriose (G3)	0.97	0.16
Maltotetraose (G4)	0.27	2.30
Maltopentaose (G5)	0.20	—
α -CD	0.73	4.00
β -CD	1.2	1.80
γ -CD	0.23	—

T. vulgaris の CBP は直鎖オリゴ糖、環状オリゴ糖ともにほぼ同様の K_d 値を示した。

6. CDF・CDG・CDKに関する研究

本研究では、*T. vulgaris* R-47におけるシクロデキストリン膜輸送担体タンパク質 CDF, CDG, CDK の X 線結晶解析を目指したタンパク質の発現と精製を行った。

(1) pET23a ベクターによる発現と確認

T. vulgaris R-47 のゲノムから CDF, CDG, CDK に相当する遺伝子領域とそれぞれの C 末端に 6-His を融合するようデザインした遺伝子領域を発現するプラスミドを受託により構築した。発現ベクター pET23a (Novagen) のマルチクローニングサイト内の NdeI-XhoI サイトに各遺伝子領域がクローニングされ、3 種類のプラスミド、pET23a_MalF_His, pET23a_MalG_His, pET23a_MalK_His を得た。水溶性タンパク質である CDK は可溶性タンパク質として大量発現が確認されたが、膜タンパク質である CDF, CDG においては不溶性画分にその存在が確認されたため、CDK について精製を検討した。

(2) pET23a_CDK の精製

大腸菌 BL21(DE3)を宿主とする発現ベクター pET23a を用いた発現系では CDK は C 末に 6-His が融合された His タグ付 CDK(His-tagged CDK)として発現される。pET23a_CDK を発現する大腸菌 BL21(DE3)をアンピシリン 100 µg/ml を加えた LB 培地にて一晚培養し、これを 1 L のアンピシリン 100 µg/ml を含む LB 培地に 1%植菌し、30°Cにて吸光度 600nm が 0.5 付近に達するまで培養した。その後、終濃度が 0.1 mM となるように IPTG を加えて CDK の発現を誘導し、25°Cにて一晚培養を続けた。培養菌体を集菌し (3000G, 4°C, 10min), 超音波破碎装置により破碎した菌体破碎液を遠心分離し(20400G, 4°C, 20min), 得られた上清を無細胞抽出液とした。これをアフィニティーカラム (HisTrap™ HP 5 ml, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ)にアプライし、シングルステップでの精製を試みた。カラムの平衡化に用いた緩衝液は 50mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.6,目的タンパク質の溶出には緩衝液 50mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole pH 7.6 を用いて 0, 4, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100% (相当する imidazole 濃度は 0, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500 mM) のステップグラジェントにより溶出させた。得られたタンパク質は SDS-PAGE により 30 kDa 付近にシングルバンドが見られたことから His-tagged CDK が精製されたことを確認した (図 7)。

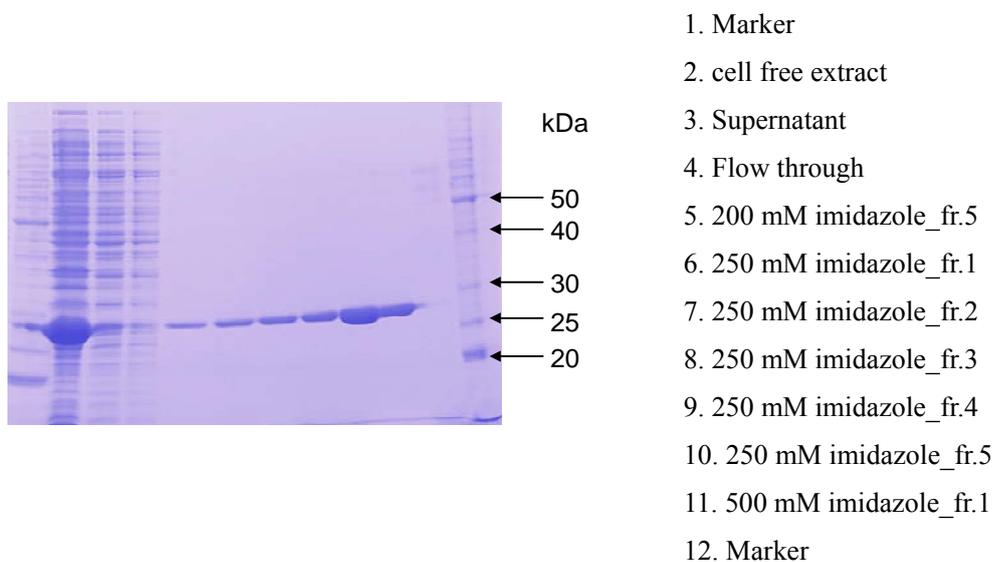


図 7. SDS-PAGE による pET23a ベクターを発現系とした CDK の発現と精製確認

しかし、溶出サンプル中の imidazole を取り除くため、50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6 緩衝液への交換およびタンパク質の濃縮を行うため、緩衝液の交換を試みたが、精製後、タンパク質の凝集が見られた。凝集を防ぐために、添加剤として Glycerol, EDTA, ATP, MgCl₂ の添加も試みたが、タンパク質の凝集を防ぐことはできなかった。

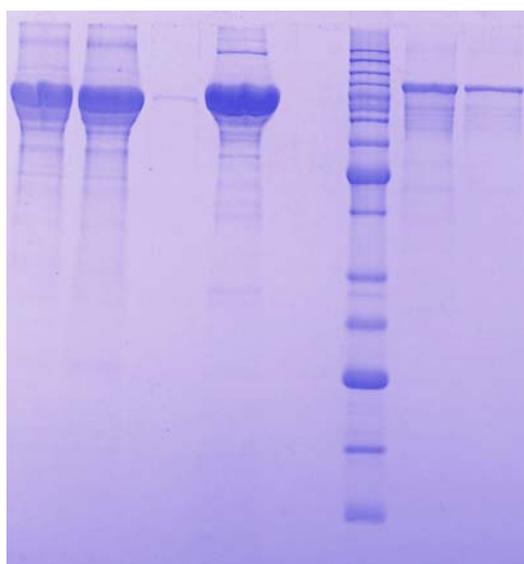
(3) pColdTF ベクターによる発現と確認

pET23a を発現ベクターに用いた CDF, CDG, CDK タンパク質の発現と精製は、結晶化を目的とする高濃度かつ高純度なタンパク質の調製には不向きであると判断し、可溶化タグとされる大腸菌シャペロン的一种であるトリガーファクター (Trigger Factor; TF) との融合タンパク質を発現させる pColdTF (TaKara) を用いた発現を試みた。既に構築された pET23a_CDF_His, pET23a_CDG_His, pET23a_CDK_His をテンプレートとし、PCR にて各タンパク質をコードする遺伝子領域ならびに両端に制限酵素サイト (NdeI, XhoI) をデザインした遺伝子を増幅した。pColdTF のマルチクローニングサイト内の NdeI-XhoI サイトにそれぞれの PCR 産物をサブクローニングし、pColdTF_CDF, pColdTF_CDG, pColdTF_CDK を構築した。構造遺伝子領域のシーケンスの確認を行った。pColdTF ベクターでの発現は、マ

ニュアルに従い 15°Cにて培養を行った。発現された TF 融合タンパク質は、水溶性タンパク質である CDK だけではなく、膜タンパク質である CDF, CDG においても可溶性のタンパク質として発現された。

(4) pColdTF_CDF, pColdTF_CDG, pColdTF_CDK の粗精製

pColdTF はマルチクローニングサイト外のベクター内に His タグ領域も有することから、それぞれの TF 融合タンパク質を Ni Sepharose HP 担体 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ)を用いてオープンカラムにて簡易精製を試みた (図 8)。平衡化に用いた緩衝液は 50mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole pH 7.6, 溶出には同上の緩衝液の imidazole 濃度が異なる 4 種類の緩衝液 (68, 116, 164, 500 mM imidazole) を用いてステップグラジェントにより溶出させた。



1. pColdTF_cdG_fr.3,4
2. pColdTF_cdG_fr.5
3. pColdTF_cdG_fr.6
4. pColdTF_cdK_fr.4,5
5. pColdTF_cdK_fr.6
6. Maker
7. pColdTF_cdF_fr.3,4
8. pColdTF_cdF_fr.5
9. pColdTF_cdF_fr.6

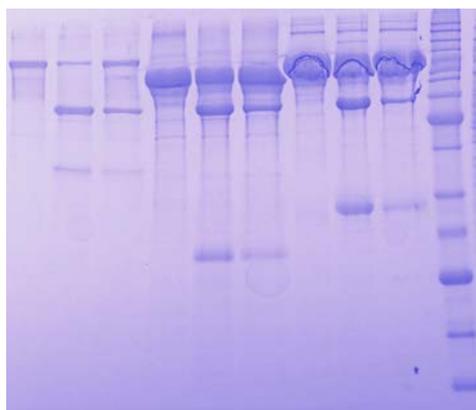
図 8. SDS-PAGE による pColdTF ベクターを発現系に用いた CDF, CDG, CDK の発現およびその粗精製の確認

(5) TF 融合タンパク質の Thrombin 消化

粗精製を行った TF 融合タンパク質 (各タンパク質分子量+52kDa, CDF: 46 kDa, CDG: 29 kDa, CDK: 30 kDa) に対して, Thrombin 消化による目的タンパク質の分子量の大きさ確認を行った。Thrombin 消化により His-Tag と TF を取り除く際に, CDK は凝集性が高かったことと, CDF と CDG は膜タンパク質であることを考慮し, 界面活性剤として

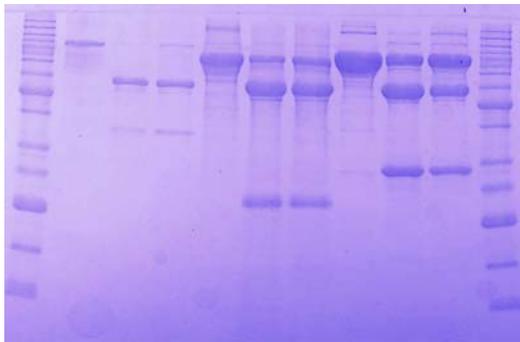
n-Dodecyl- β -D-maltoside (DM) の存在・非存在下での影響を SDS-PAGE により確認した (図 9, 図 10)。図 9 は 4°C で一晩 Thrombin 処理を行ったサンプル, 図 10 は同サンプルを 4°C にて 7 日間 Thrombin 処理を続けた後の SDS-PAGE の結果を示す。Thrombin 消化を行ったサンプルは CDK (30 kDa) では 30 kDa 付近にバンドが確認されたが, CDF (46 kDa) と CDG (29 kDa) は期待される分子量よりそれぞれ小さい 35 kDa と 22 kDa 付近にバンドが見られた。

今後は Thrombin による非特異的な消化の可能性が考えられるため, pColdTF ベクター内にデザインされている他のプロテアーゼ (FactorXa もしくは HRV 3C protease) 処理を検討する予定である。



1. pColdTF_cdF
2. pColdTF_cdF + thrombin
3. pColdTF_cdF + thrombin + DM
4. pColdTF_cdG
5. pColdTF_cdG + thrombin
6. pColdTF_cdG + thrombin + DM
7. pColdTF_cdK
8. pColdTF_cdK + thrombin
9. pColdTF_cdK + thrombin + DM
10. Maker

図 9. TF 融合タンパク質の Thrombin 消化 (4°C で一晩)



1. Maker
2. pColdTF_cdF
3. pColdTF_cdF + thrombin
4. pColdTF_cdF + thrombin + DM
5. pColdTF_cdG
6. pColdTF_cdG + thrombin
7. pColdTF_cdG + thrombin + DM
8. pColdTF_cdK
9. pColdTF_cdK + thrombin
10. pColdTF_cdK + thrombin + DM
11. Maker

図 10. TF 融合タンパク質の Thrombin 消化 (4°Cで7日間)

7. CDI (レプレッサータンパク質) に関する研究

CDIは、CDKとCDEの間に存在するパリンδροーム配列に結合することを確認しており、輸送系タンパク質の発現を調節・制御していると考えられる。本研究課題では、このCDIの発現系を構築・精製・結晶化を行った。結晶化条件は、ハンギングドロップ法、リザーバー溶液：1.5 M(NH₄)₂SO₄ / 12 %v/v Glycerol in 0.1M Tris-HCl (pH8.5), で良好な結晶が得られた。得られた結晶についてX線回折データの収集を試みたところ、3.04 Å分解能のデータ収集に成功した(図11)。現在、より高分解能データの収集、および結合配列を持つDNAとの複合体の結晶化に取り組んでいる。



$a = 94.30$ $b = 117.46$ $c = 122.42$

$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ Space group ; $C222_1$

Resolution; 3.04 Å Completeness ;
91.6% R-merge 13.3%

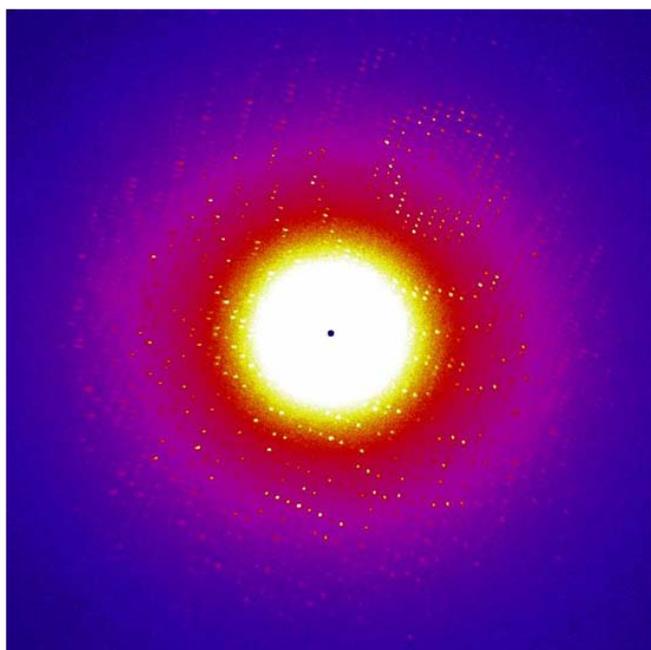


図11. CDIの結晶, X線回折像, および結晶学的データ

別刷 (Reprints)

本研究課題の成果のうち、すでに原著論文として発表したものについて、以下の順で、別刷を採録する。

1. Abe, A., Yoshida, H., Tonozuka, T., Sakano, Y. & Kamitori, S. (2005). Complexes of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase 1 and pullulan model oligosaccharides provide new insight into the mechanism for recognizing substrates with α -(1,6) glycosidic linkages. *FEBS J.* **272**, 6145-6153.
2. Ohtaki, A., Mizuno, M., Tonozuka, T., Sakano, Y. & Kamitori, S. (2004). Complex structures of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase 2 with acarbose and cyclodextrins demonstrate the multiple substrate recognition mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 31033-31040.
3. Mizuno, M., Ichikawa, K., Tonozuka, T., Ohtaki, A., Shimura, Y., Kamitori, S., Nishikawa, A. & Sakano, Y. (2005). Mutagenesis and structural analysis of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase II (TVA I). *J. Appl. Glycosci.*, **52**, 225-231.
4. Ohtaki, A., Mizuno, M., Yoshida, H., Tonozuka, T., Sakano, Y. & Kamitori, S. (2006). Structure of a Complex of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -Amylase 2 with Maltohexaose Demonstrates the Important Role of Aromatic Residues at the Reducing End of the Substrate Binding Cleft. *Carbohydr. Res.* (in press).
5. Ichikawa, K., Tonozuka, T., Mizuno, M., Tanabe, Y., Kamitori, S., Nishikawa, A. & Sakano, Y. (2005). Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 maltooligosaccharide-metabolizing enzyme homologous to glucoamylase" *Acta Crystallogr.*, **F61**, 302-304.

