最近の研究から

エンドガラクトツロナーゼ：ガラクトツロン酸複合体の
原子分解能結晶構造

京都大学大学院薬学研究科 清水哲哉, 中津 亨

Tetsuya SHIMIZU and Toru NAKATSU: Crystal Structures of Endopolygalacturonase - Galacturonate Complexes at Atomic Resolution

Endopolygalacturonases are involved in the degradation of pectin by hydrolyzing the α -1, 4 glycosidic bonds. Crystal structure of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum* was solved at atomic (0.96 Å) resolution. The enzyme folds into a right-handed parallel β -helix with 10 complete turns. The crystal structures of its binary complex with one D-galacturonate and its ternary complex with two D-galacturonates were also determined at 1.0 and 1.15 Å resolutions, respectively. The active site architecture of the complexes provides insight into the mode of substrate binding. These structures reveal that Asp173 is the general-acid catalyst and, Asp153 or Asp174 is the general-base catalyst.

1. はじめに

近年、放射光の利用をはじめとする測定技術の進歩は、タンパク質結晶の分解能を向上させ、一部のタンパク質結晶では1 Åを超える非常に高い分解能が得られている。このような高い分解能では、1原子当たり、多数の観測値が得られるため、通常の構造解析よりも少ない立体化学的制限を用いた解析や異方性温度因子を考慮した解析が可能であり、より精密な構造モデルが得られる。その結果得られた明瞭な電子密度図は、通常の分解能に比べ、より明確な解釈が可能である。例えば、電子密度から炭素原子と窒素原子、あるいは酸素原子と窒素原子の識別が可能となり、ヒスチジンやアスパラギン、グルタミン残基の側鎖の向きを決定することができる。また、水素原子の電子密度も可視化できると考えられている。しかしながら、このような解析を行うためには、分解能が1.2 Å以上かつ最外殻において $I/\sigma I \geq 2$ の反射のcompletenessが50%以上、すなわち原子分解能の回折強度データが必要とされている。¹⁾ 原子分解能における構造解析から得られる側鎖の正確な向きや水素原子の位置などの構造情報は、酵素をはじめとするタンパク質の生理的な機能を解明するうえで有用である。そこで、本稿では、筆者らが行った *Stereum purpureum* 由来エンドポリガラクトツロナーゼ (endoPG) I の原子分解能 X 線結晶構造解析の結果と、どのように水素原子が可視化されるのかも併せて紹介する。

EndoPG (EC 3.2.1.15) は、植物細胞壁を構成するペクチン質の主鎖であるポリガラクトツロン酸をランダムに加水分解する酵素である (図1A)。その反応は、ポリガラクトツ

図1 A: EndoPGの反応, およびB: inverting型グリコシダーゼの反応機構。(A: Reaction of endoPG, and B: Reaction mechanism of inverting glycosidase.)

ロン酸の α -1, 4グリコシド結合を加水分解し, β 型の生成物を生じる inverting 型のグリコシダーゼであることが知られている。この inverting 型のグリコシダーゼの反応機構 (図1B) は以下のように考えられている。²⁾ この反応は、一対の酸性残基により触媒される。一方の残基は一般酸触媒としてグリコシド結合へプロトンを供給し、もう一

方の残基は一般塩基触媒残基として加水分解を行う水分子よりプロトンの引き抜きを行う。そして、基質の1位の炭素を活性化された水分子が S_N2 で求核攻撃することにより、half-chair型の環構造をもつオキソカルベニウムイオン様の遷移状態(図1B, 中央)を経て、一段階でアノマーが逆転した生成物を与える。したがって、endoPGの反応機構の解明には2つの触媒残基を特定することがまず重要である。

EndoPGは、植物、真菌および細菌に広く分布し、これまで報告されたすべてのendoPGは、そのアミノ酸配列の相同性からファミリー28のグリコシダーゼに部類されている。³⁾1996年にKester⁴⁾らは、それまで知られていたendo型およびexo型ポリガラクトツロナーゼの一次配列の解析から、すべての酵素に共通する4カ所の短い保存配列(¹⁵¹NXD, ¹⁷³DD, ¹⁹⁵HG, ²²⁶RXK, 残基番号は*S. purpureum* endoPG Iによる)の存在を明らかにした。さらに、Markovic⁵⁾らは115個のendo-およびexoPGの一次配列の解析から、新たにGly200とTyr262の2個の保存された残基の存在を示唆した。Visserらの研究グループが行った一連の変異実験の結果,^{6),7)}これらの保存されている残基のうち、3個のAsp残基(Asp153, Asp173, Asp174に相当)が触媒作用に直接関与すること、さらに塩基性残基およびTyr残基が基質認識にかかわっていることが示唆された。一方、endoPGの結晶構造については、細菌、*Erwinia carotovora*由来⁸⁾および真菌*Aspergillus niger*由来⁹⁾をはじめとして4種のendoPGで明らかにされている。これらの構造から、endoPGの立体構造が β -ヘリックス構造であること、先に挙げた保存残基が集まった領域が存在することが明らかにされた。しかし、いずれも酵素分子のみの結晶構造であったため、個々の保存残基の具体的な役割についてはまったく不明であった。

そこで、endoPGの反応機構の詳細を検討するために*S. purpureum*由来endoPG Iの結晶構造を決定し、さらにガラクトツロン酸複合体の構造解析を行った。

2. 糖鎖不均一性の除去と結晶化

*S. purpureum*のendoPG Iは、結晶化のサンプルとして以下の2つの利点がある。¹⁰⁾第1に、endoPG Iは、非常に安定で、室温で数ヵ月間活性を保つことができる。第2に、*S. purpureum*の培養液1 L当たり20 mg以上の大量のendoPG Iを得ることが可能であり、大腸菌などを用いた大量発現系を構築しなくとも、結晶化に十分な量の酵素を得ることが可能であった。一方、結晶化を行う上で不利な点としては、得られたendoPG Iが糖タンパク質であることが挙げられた。しかも、糖鎖の修飾の仕方に違いがあるため、精製されたendoPG IはSDS-PAGE(図2, Lane 2)においてIa, IbおよびIcの3つのバンドを示した。これまでの研究¹¹⁾から、endoPG Iの糖鎖修飾の詳細は以下のよう

図2 EndoPG Iおよび脱糖鎖 endoPG IのSDS-PAGE. (SDS-PAGE of endoPG I and deglycosylated endoPG I.) Lane 1:分子量マーカー, Lane 2: *S. purpureum* の培養液より精製された endoPG I, Lane 3: エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼHにより脱糖鎖した endoPG I.

に明らかにされている。IaはAsn92とAsn161に2本の糖鎖が結合していた。またIbは、Iaの2本に加え、Asn279もしくはAsn302に合計3本の糖鎖修飾を受けた2種の分子の混合物であった。そして、IcではAsn92, Asn161, Asn279およびAsn302に4本の糖鎖が結合していた。

このような糖鎖の修飾部位が異なる分子の混合物状態では結晶化が困難と考えられたため、それらを分離する条件を検討した。その結果、以下の手順でそれらの分離が可能となった。まず、*S. purpureum*の培養液より、CM-52陽イオン交換カラム, Sephadex G-100ゲルろ過カラムを用いてendoPG Iを精製した。次に、精製したendoPG Iを、先ほどよりも非常に長い($\phi 30 \times 1000$ mm)CM-52陽イオン交換カラムに添加し、0 mM NaCl ~ 50 mM NaClのリニアグラジエントで溶出した。その結果、endoPG Iは、Ic, Ib, Iaの順で分離して溶出された。そこで、その後の実験は糖鎖が最も少ないendoPG Iaを用いて行った。結晶化に先立ち、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼHを用いてendoPG Iaの脱糖鎖処理を行い、N結合糖鎖をアスパラギンに結合したGlcNAc残基のみとした(図2, Lane 3)。得られた脱糖鎖endoPG Iaを用いて結晶化条件を検討した結果、酢酸緩衝液(pH 5.0)と沈殿剤にPEG4000を用いた条件で、容易に結晶化に成功した。その後の研究において、ほかの糖鎖付きのendoPG Ia, Ib, Icの結晶化を試みた結果、endoPG Iaは脱糖鎖endoPG Iaと同一条件で結晶化したものの、Asn279およびAsn302に糖鎖修飾を受けたendoPG IbとIcは結晶を得ることはできなかった。以上のことから、糖タンパク質の結晶化において、糖鎖の不均一性の除去が有効であることが示された。

3. 構造決定と全体構造

EndoPG I 結晶の回折強度データ収集は, SPring-8 の理研構造生物学ビームライン II (BL44B2)¹²⁾ で行った. その結果, 0.96 Å に達する驚異的な高分解能の回折強度データを得ることに成功した. 結晶は空間群 *P*1 に属し, 格子定数は $a = 37.26$ Å, $b = 46.34$ Å, $c = 52.05$ Å, $\alpha = 67.17^\circ$, $\beta = 72.44^\circ$, $\gamma = 68.90^\circ$ であった.

初期位相の決定は, 白金誘導体結晶を用いた多波長異常分散法により行った. 得られた初期位相と 0.96 Å 分解能の回折強度データを用いてプログラム ARP/wARP¹³⁾ による分子モデルの自動構築を行った. その結果, 335 アミノ酸残基のうち 321 残基の分子モデルを構築することに成功した. 得られた分子モデルは, さらにプログラム SHELXL¹⁴⁾ を用いて異方性温度因子を考慮した構造の精密化を行った. その結果, N 末端の 2 残基を除く 333 アミノ酸残基の分子モデル ($R = 11.4\%$, $R_{\text{free}} = 14.0\%$) が得られた.

EndoPG I の構造は, β -ストランドが 10 回の完全な螺旋を巻いた β -ヘリックス構造であった (図 3A). EndoPG I の β -ヘリックスは, 38 本の β -ストランドより構成され, 5 つの平行 β -シートを含んでいた. この β -ヘリックス構造は, これまでに構造が解かれたほかの endoPG と共通し

図3 EndoPG I の全体構造. (Overall structure of endoPG I.) A: N 末端を左に, C 末端を右にした図. B: C 末端側から見た図. 活性残基の候補である 3 つの Asp 残基 (Asp153, Asp173 および Asp174) は ball & stick モデルで示している.

ていた.^{8),9)} C 末端側から見た場合 (図 3B), 分子の表面には, 大きなクレフトが存在し, その底の部分には, 触媒残基の候補である Asp153, Asp173 および Asp174 が位置していた. また, すべての endoPG で保存されている Asp 以外の 7 つの残基 (Asn151, His195, Gly196, Gly200, Arg226, Lys228 および Tyr262) もすべてクレフトの内部に存在し, これまでに構造が解かれたすべての endoPG で保存されていた. 以上のことから, このクレフト部分が endoPG I の基質結合部位と予想された.

4. ガラクツロン酸複合体の構造解析

EndoPG I の基質認識機構を解明するために, リガンドとの複合体結晶の解析を試みた. まず, 基質であるトリガラクトロン酸 37 mM を加えた条件で共結晶化を行った. 得られた複合体結晶は SPring-8 の BL44B2 において測定を行った結果, 1.0 Å の回折強度データが得られた. 構造決定は, 先に解析した native 結晶を初期構造として用いて行い, SHELXL により異方性温度因子を含めた構造精密化を行った. 最終的に, 1.0 Å 分解能において $R = 10.9\%$, $R_{\text{free}} = 13.4\%$ の構造モデルを得た. この構造解析の結果, クレフト内に基質の構成単位であるガラクトロン酸 1 分子を示す明瞭な電子密度が観察された (図 4A, 図 4B). また, native 結晶を 97 mM のガラクトロン酸溶液に浸漬した結晶の構造解析においても, 同じガラクトロン酸 1 分子の電子密度が観測された. したがって, トリガラクトロン酸との共結晶において観測されたガラクトロン酸分子は, 共結晶化中にトリガラクトロン酸が endoPG I により加水分解されて生じた反応生成物と考えられた. このガラクトロン酸分子の構造は, β -ピラノース型 (β -D-galactopyranuronate: GalpA) であった. この複合体結晶は酵素とガラクトロン酸をそれぞれ 1 分子含むことから, 以降, binary 複合体と呼ぶこととする.

次に, 新たなガラクトロン酸の結合を期待して, native 結晶を 515 mM という非常に高濃度のガラクトロン酸溶液に結晶を浸漬し, 2 つ目の複合体結晶の作成を試みた. 作成した複合体結晶は, BL44B2 で測定を行い, 1.15 Å 分解能の回折強度データを得た. 構造解析は binary 複合体と同様に行い, $R = 12.6\%$, $R_{\text{free}} = 16.4\%$ の構造モデルを構築した. この複合体の構造を観察したところ, ガラクトロン酸に由来する 2 つの電子密度が観察された (図 4C). そこで, この複合体を ternary 複合体と呼ぶこととする. Ternary 複合体で観察された 2 つのガラクトロン酸の由来の電子密度のうち, 一方は binary 複合体と同じ位置に結合した GalpA 分子であった. しかし, 新たに結合したもう 1 分子のガラクトロン酸に相当する電子密度は, 特異な 5 員環構造であった (図 4D). ガラクトロン酸は, 溶液状態において, 約 10% は 5 員環構造をもつフラノース型をとることが NMR の解析から知られている.¹⁵⁾ このことか

図4 2つのガラクトツロン酸複合体の活性中心付近とガラクトツロン酸の拡大図。(Active site of two galacturonate complexes and close up views of the galacturonate molecules.) A: binary 複合体の活性中心付近. B: GalpA の拡大図. C: ternary 複合体の活性中心付近. D: GalfA の拡大図. A および B の電子密度は GalpA の $F_o - F_c$ omit map ($+9\sigma$) を, C および D の電子密度は GalpA と GalfA の $F_o - F_c$ omit map ($+3\sigma$) を示している.

ら, この電子密度は, β -フラノース型のガラクトツロン酸 (β -D-galactofuranuronate: GalfA) と同定した.

5. ガラクトツロン酸の結合様式

2つのガラクトツロン酸分子と endoPG I との相互作用の模式図を図5に示す. まず, 両複合体で見られた GalpA の4位の水酸基は, 活性残基の候補の1つである Asp173 のカルボキシル基と水素結合が可能な距離 (2.68 Å) に位置していた. EndoPG の基質であるポリガラクトツロン酸では, ガラクトツロン酸残基は α -1, 4 結合していることから, この水酸基の位置は切断されるグリコシド結合の酸素原子に相当すると考えられた. したがって, GalpA の結合位置は, 活性残基の候補である Asp153, Asp173 および Asp174 の還元末端側にあたるサブサイト+1と考えられた.¹⁶⁾ 4位の水酸基以外に2つの水酸基が酵素分子と直接相互作用していた. 2位の水酸基は His150 の側鎖, 3位の水酸基は Asn91 と Asn151 の側鎖とそれぞれ水素結合していた. また6位のカルボキシル基は, His195, Arg226, Lys228 および Tyr262 の側鎖と静電相互作用あるいは水素結合を形成していた.

一方, GalfA は, GalpA に対して3つの Asp 残基をはさんで反対側に位置していたことから, その結合位置は活性中心の非還元末端にあたるサブサイト-1の一部を占

図5 GalpA と GalfA の結合様式の模式図。(Schematic drawing of the binding sites of GalpA and GalfA.) 点線は水素結合を示す. 下の数字はサブサイトの位置を示す.

めていると考えられた. GalfA の結合には合計6つの残基が関与していた. 2位の水酸基は Asn151 と Asp153 の側鎖, 3位の水酸基は Gln120 の側鎖とそれぞれ水素結合していた. 一方, 6位のカルボキシル基は, Gly200 と Ser201

の間にある *cis* 型のペプチド結合の主鎖のアミド基と水素結合していた。さらに、このカルボキシル基は、Ser201 と Lys228 の側鎖とも水素結合していた。Gly200 と Ser201 による特徴的な *cis*-ペプチド結合と Lys228 の位置は、これまでに構造が知られているすべての *endoPG* で保存されていた。また、*endoPG* と同じグリコシダーゼ、ファミリー 28 に属するラムノガラクトツロナーゼ (RG) においても、この構造は保存されていた。¹⁷⁾ RG は、D-ガラクトツロン酸と L-ラムノース間の α -1, 2 結合を加水分解する酵素である。したがって、*endoPG* と RG では、サブサイト-1 にガラクトツロン酸残基が結合する点が共通している。以上のことから、GalF のカルボキシル基の結合様式は、酵素-基質複合体でのサブサイト-1 のカルボキシル基の結合様式を反映していると予想された。

サブサイト-1 の近傍には、活性残基の候補である Asp153 と Asp174 の双方と水素結合した水分子が見つかった。この水分子は、GalP の 4 位の水酸基からは、4.15 Å の距離に位置しており、*A. niger* の *endoPG* II においても見出され、基質の加水分解を行う水分子と推定されている。⁹⁾

6. 酵素-基質複合体のモデリングと反応機構

EndoPG I の反応機構を検討するため、ternary 複合体の構造を基に、サブサイト-1、+1 に結合した 2 量体基質のモデルを、図 6A に示したように構築した。まず、サブサイト+1 のガラクトツロン酸残基は、GalP の構造をそのまま使用した。次に、サブサイト+1 のガラクトツロン酸残基の 4 位の酸素にサブサイト-1 のガラクトツロン酸残基をグリコシド結合を形成するようにつなげた。そして、サブサイト-1 のガラクトツロン酸残基のカルボキシル基を GalF のカルボキシル基と重なるようにグリコシド結合の 2 面角を動かした。はじめに、サブサイト-1 のガラクトツロン酸残基を通常の chair 型として構築したところ、グリコシド結合の酸素から GalF のカルボキシル基までの距離が遠いため、カルボキシル基部分を重ね合わせられなかった。そこで、サブサイト-1 のピラノース環を、chair 型から 2 位炭素-1 位炭素-5 位酸素-5 位炭素部分を平面的にした half-chair 型として構築することにした。このような half-chair 型の環構造は、グリコシダーゼと基質や阻害剤の複合体の X 線結晶構造解析においてよく見られるもので、加水分解反応のオキソカルベニウム様遷移状態の構造を模していると考えられている。^{18),19)} アミラーゼの遷移状態アナログである acarbose (図 4B)¹⁹⁾ はその構造中に valienamine 骨格を有している。Valienamine はグルコースのアナログで、ピラノース環の 5 位炭素-5 位酸素間の単結合が、5 位炭素-7 位炭素間の二重結合に変わっているため、half-chair 型の環構造を形成しており、今回のモデル作成には最適の構造であると考えられた。そこ

図6 -1,+1サブサイトに結合した2両体基質のモデル構造の模式図。(Schematic drawing of di-galacturonate substrate model bound in both the -1 and +1 subsites.) 点線は水素結合を示す。下の数字はサブサイトの位置を示す。矢印は予想される反応機構を示す。B は half-chair 型のガラクトツロン酸残基を構築するときに参考とした acarbose の構造。

で、この構造を基にサブサイト-1の部分に half-chair 型のガラクトツロン酸残基を構築した。さらに、この2両体基質モデルのグリコシド結合の2面角を動かしたところ、GalF のカルボキシル基部分と非常によく重ね合わせることができた。

そこで、構築した基質のモデル構造を基に *endoPG* I の触媒機構を考察した。まず、得られた基質モデルの切断されるグリコシド結合の酸素原子は、Asp173 と直接水素結合できる距離に存在していた。このことから、Asp173 は、グリコシド結合の酸素にプロトンを供給する一般酸触媒と考えられた。また、基質モデルのサブサイト-1の1位の炭素の付近には、Asp153 と Asp174 により保持された水分子が存在する。この水分子は、1位の炭素をはさんでグリコシド結合の酸素の反対側に位置していた。このことは、この水分子が1位の炭素を S_N2 様式で求核攻撃するのに適した位置にあることを示している。また、2つの Asp 残基がそれぞれ水分子からの水素結合のアクセプターとなることにより、水分子の酸素原子の非共有電子対の一方が、確実にサブサイト-1のガラクトツロン酸残基の1位の炭素を向くことになり、求核攻撃を容易にしていると考えられた。したがって、Asp153 か Asp174 のどちらかが、こ

の水分子からプロトンを引き抜く一般塩基触媒残基であると示唆された。

また、この基質のモデル構造から Asp 残基以外の endoPG 共通の保存残基の役割は以下のように考えられた。まず、Lys228 の側鎖のアミノ基は、基質分子のサブサイト-1 と +1 両方のガラクトツロン酸残基、および Asp174 の合計 3 つのカルボキシル基と均等に水素結合する位置に存在している。したがって、Lys228 は、これらのカルボキシル基間の静電的な反発を中和して、酵素と基質分子の位置を調整していると考えられる。同様に、Arg226 は、サブサイト +1 のガラクトツロン酸残基と Asp174 の双方のカルボキシル基と同時に水素結合し、それらの静電反発の中和と位置の調整を行っていると考えられる。さらに、His195 と Tyr262 も、静電相互作用あるいは水素結合によって、サブサイト +1 における基質のカルボキシル基の認識に関与している。Asn151 は、サブサイト-1 の 2 位の水酸基とサブサイト +1 の 3 位の水酸基の認識に関与していると予想される。Gly200 は、ほかのアミノ酸ではとれないコンホメーションをしている ($\phi = 103^\circ$, $\psi = -172^\circ$)。したがって、Gly200 のこの構造は、サブサイト-1 において基質のカルボキシル基の認識を行う Gly200 と Ser201 間の *cis*-ペプチド結合の維持に必須である。

7. 原子分解能で水素がどの程度見えるか

原子分解能でのタンパク質結晶の構造解析において、最大の関心は“水素原子がどの程度見えるのか?”ということである。特に、酵素の機能を議論するためには、反応にかかわる側鎖の解離性の水素や、水酸基、水分子の水素についてもその位置を知る必要がある。これらの水素は、主鎖やメチレンの水素と異なり、その位置を一義的に決定することができない。したがって、その位置を可視化することは大変重要であるが、非常に困難な作業であると予想される。そこで、binary 複合体を使って、どの程度水素を可視化できるかを検討した(未発表データ)。

異方性温度因子を使用した精密化を終えた段階(分解能 1.0 Å, $R = 10.9\%$, $R_{\text{free}} = 13.4\%$)における電子密度の観察の結果、 $F_o - F_c$ map で主鎖の窒素や C α 炭素の一部に、結合した水素と思われる電子密度を確認することができた。そこで、プログラム SHELXL を用いて、モデルに水素を発生させ、さらなる構造精密化を行った。最終的に、非水素原子 2500 個と水素原子 2376 個をもつモデルが得られ、水素原子を含めた結果、 $R = 9.8\%$, $R_{\text{free}} = 12.4\%$ となり、それぞれ約 1% 低下した。

得られたモデルの構造の一部を図 7 に示した。水素の電子密度は、 $F_o - F_c$ omit map で表現している。まず、主鎖やメチレン、芳香環の水素の電子密度は、非常にはっきりと確認できた。また、Tyr 残基の水酸基の水素についても、その電子密度から、中央の水分子との間の水素結合をつくっ

図 7 Tyr243 周辺の水素結合ネットワーク。(Hydrogen bond network in the vicinity of Tyr243.) $2F_o - F_c$ map (+2.5 σ) を黒で、水素原子の $F_o - F_c$ omit map (+2.0 σ) を灰色で示している。水素結合を点線で示す。矢印は水分子の水素の電子密度を示す。

ている様子が確認された。さらに、矢印で示したように、中央の水分子の水素はモデルに含まれないにもかかわらず、その近傍には主鎖のカルボニル酸素とそれぞれ水素結合をつくる 2 つの水素らしき電子密度が見られた。以上の観察から、1.0 Å 程度の分解能があれば酵素分子の水素を可視化することは十分可能であることが確認された。また、一部の水分子に関しても、その水素の位置を決定することが期待された。

8. おわりに

ガラクトツロン酸複合体の構造解析の結果、endoPG の保存残基の個々の機能を具体的にほぼ明らかにすることができた。これらは、これまでに明らかにされている 200 あまりの endoPG のアミノ酸配列に共通する残基であるが、それらの機能はおおむね以下の 2 つに大別される。1 つは、直接の加水分解反応に関与するもので、3 つの Asp 残基がそれにあたる。それ以外の残基は、活性中心付近の基質の結合に関与している。特にこれらの残基の多くは、基質ポリガラクトツロン酸の特徴であるカルボキシル基を認識するとともに、その負電化を中和しカルボキシル基間の反発を抑える役割をしている。

いまだ決定されていない一般塩基触媒残基については、endoPG I 結晶がもつ原子分解能を活かして、今後リガンドや pH の変化に伴う活性残基周辺の水素原子の状態変化を検討することにより、明らかにする予定である。今回試みた、binary 複合体の水素を含めた構造解析の結果から、1.0 Å 程度の分解能で、酵素の水酸基や一部の水分子の水

素の位置も決定可能と確認されたことから, 同様に活性 Asp 残基の解離性の水素の位置も決定できると期待される. このような, 解離性の水素原子の存在は多くの酵素反応の鍵となっている. したがって, 水素原子を直接可視化できる原子分解能 X 線結晶構造解析は, 酵素の作用機構研究の強力な武器になると期待できる.

謝 辞

本研究は, 筆者(清水)が弘前大学の奥野智旦, 宮入一夫両教授のもと在学中に行ったものである. また, X 線結晶構造解析については, 理化学研究所播磨研究所において, 現京都大学大学院薬学研究科の加藤博章教授の指導を受けて行った. また, 研究中, 理化学研究所播磨研究所メンブレンダイナミクス研究グループのメンバーの助力を受けた. 関係者の皆様に感謝いたします.

文 献

- 1) Z. Dauter, V. S. Lamzin and K. S. Wilson: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 784 (1995).
- 2) C. S. Rye and S. G. Withers: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 573 (2000).
- 3) B. Henrissat: *Biochem. J.* **280**, 309 (1991).
- 4) H. C. Kester, M. A. Kusters-van Someren, Y. Muller and J. Visser: *Eur. J. Biochem.* **240**, 738 (1996).
- 5) O. Markovic and S. Janecek: *Protein Eng.* **14**, 615 (2001).
- 6) S. Armand, M. J. Wagemaker, P. Sanchez-Torres, H. C. Kester, Y. van Santen, B. W. Dijkstra, J. Visser and J. A. Benen: *J. Biol. Chem.* **275**, 691 (2000).
- 7) S. Pages, W. H. Heijne, H. C. Kester, J. Visser and J. A. Benen: *J. Biol. Chem.* **275**, 29348 (2000).
- 8) R. Pickersgill, D. Smith, K. Worboys and J. Jenkins: *J. Biol. Chem.* **273**, 24660 (1998).
- 9) Y. van Santen, J. A. Benen, K. H. Schroter, K. H. Kalk, S. Armand, J. Visser and B. W. Dijkstra: *J. Biol. Chem.* **274**, 30474 (1999).
- 10) Y. Hasui, Y. Fukui, J. Kikuchi, N. Kato, K. Miyairi and T. Okuno: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 852 (1998).
- 11) T. Shimizu, K. Miyairi and T. Okuno: *Eur. J. Biochem.* **267**, 2380 (2000).
- 12) S. Adachi, T. Oguchi, H. Tanida, S. -Y. Park, H. Shimizu, H. Miyatake, N. Kamiya, Y. Shiro, Y. Inoue and T. Iizuka: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A* **467-468**, 711 (2001).
- 13) A. Perrakis, R. Morris and V. S. Lamzin: *Nat. Struct. Biol.* **6**,

458 (1999).

- 14) G. M. Sheldrick and T. R. Schneider: *Methods Enzymol.* **277**, 319 (1997).
- 15) M. L. D. Ramos, M. M. M. Caldeira and V. M. S. Gil: *Carbohydr. Res.* **286**, 1 (1996).
- 16) G. J. Davies, K. S. Wilson and B. Henrissat: *Biochem. J.* **321**, 557 (1997).
- 17) T. N. Petersen, S. Kauppinen and S. Larsen: *Structure* **5**, 533 (1997).
- 18) G. J. Davies, L. Mackenzie, A. Varrot, M. Dauter, A. M. Brzozowski, M. Schulein and S. G. Withers: *Biochemistry* **37**, 11707 (1998).
- 19) I. Przytylski, Y. Terada, K. Fujii, T. Takaha, W. Saenger and N. Sträter: *Eur. J. Biochem.* **267**, 6903 (2000).

プロフィール

清水哲哉 Tetsuya SHIMIZU
 京都大学大学院薬学研究科
 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University
 〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29
 46-29 Yoshida, shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan
 TEL. 075-753-4606, FAX. 075-753-4502
 e-mail: shimizu@pharm.kyoto-u.ac.jp
 最終学歴: 岩手大学大学院連合農学研究科博士
 後期過程修了 (2003 年)
 専門分野: 構造生物学
 現在の研究テーマ: エンドポリガラクトソナーゼの作用機構の研究
 趣味: 昆虫採集

中津 亨 Toru NAKATSU
 京都大学大学院薬学研究科
 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University
 〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29
 46-29 Yoshida, shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan
 TEL. 075-753-4606, FAX. 075-753-4502
 e-mail: nakatsu@pharm.kyoto-u.ac.jp
 最終学歴: 京都大学大学院農学研究科博士
 後期過程修了 (1997 年)
 専門分野: 構造生物学
 現在の研究テーマ: 光生物タンパク質の構造生物学的研究
 趣味: 演劇鑑賞, スポーツ観戦