総 説

リパーゼのタンパク質工学

山口 庄太郎

天野製薬株式会社 筑波研究所 (〒305 つくば市御幸が丘 22)

Protein Engineering on Lipases

Shotaro YAMAGUCHI

Tsukuba Research Laboratories, Amano Pharmaceutical Co. Ltd.

(Miyukigaoka 22, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 〒305)

Since the first reports on X-ray crystallographic determination of the 3 D structure of two lipases in 1990, 3 D structures of many other lipases and their complexes with inhibitors have been clarified to elucidate the lipase reaction mechanism. An approach through protein engineering has also been playing an important role in such studies. Recent development of lipase applications in industry have created demand for new lipases having superior and specific functions, leading to the improvement or alteration of lipase functions by a tool of protein engineering. In this article, recent progress in protein engineering on lipases is reviewed, focusing on four well-studied families of lipase, i.e., pancreatic lipase, *Rhizomucor miehei* lipase from filamentous fungi, *Geotrichum candidum* lipase and lipases from *Pseudomonas* sp. An understanding of the molecular basis for the broad substrate specificity of lipases as well as the reaction mechanisms may lead to the design and manufacture of protein-engineered lipases having improved properties for industrial use.

1 はじめに

リパーゼの反応機構に関する知識は、1990年代に入り飛躍的に増大した。きっかけとなったのは、1990年のNature誌の2月22日号での二つのグループによるリパーゼのX線結晶構造の報告であった。一方はカビ由来、他方はヒトすい(膵)臓由来と材料は異なっていたが、双方に共通の特徴として二つの重要な発見があった。一つは触媒部位としてのセリンプロテアーゼ様の catalytic triad, もう一つはそれを覆う α ヘリックスの存在である。これらの知見をベースにして、その後、現在までに数多くのリパーゼやリパーゼとインヒビターとの複合体のX線結晶構造が解明されると同時に、遺伝子工学の技術を駆使して変異タンパク質を作製し分析するという、いわゆるタンパク質工学の研究も積み重ねられ、リパーゼの分子レベルでの理解に貢献している。一方、リパーゼの産業界での利用に目を向けてみると、1980年代後半より、油脂の改質、洗剤への応用、不斉合成等が注目を浴び、大きな市場でのリパーゼの実用化が行われてきた。そして、必然的に優れた性質を有するリパーゼのニーズが高まり、新規リパーゼのスク

リーニングと共に、タンパク質工学的手法による機能改変リパーゼの創製が試みられている。

リパーゼは、高等動物から植物、微生物に至るまで自然界に広く存在しているが、そのなかで研究の進んでいるものは以下に示す四つのグループ(本稿ではこのグループをファミリーと呼んでいるが、これは必ずしも定義された遺伝子ファミリーばかりではない)に分けられる。本稿では、これら四つのリパーゼ・グループについて各々、構造-機能相関の解明、機能向上を目的にしたタンパク質工学の研究について概観する。急速に進展しつつあるこの分野の全体の状況を把握する一助になれば、幸いである。

2 膵臓リパーゼ・ファミリー

膵臓リパーゼ(PL), リボプロテインリパーゼ(LPL), 肝臓リパーゼ(HL)は、生体中で各々異なった重要な役割を担っているが、一次構造上のホモロジー、ゲノム遺伝子のイントロン/エキソン構成より、同一の祖先遺伝子より分化してきた一つの遺伝子ファミリーに属すると考えられている。高次構造も近似していると考えられるが¹⁾, 各々の生体中での役割に応じて、タンパク性の

コファクターの有無、基質特異性、ヘパリン結合性などの性質は、三つの酵素において異なっている。1990年に、ヒトPLのX線結晶構造が解明される²⁾とすぐに活性部位として推定されたセリンプロテアーゼ様の触媒部位 (catalytic triad) の部位特異的変異による検証がなされ^{3)~5)}、次に三者間の機能の違いと構造との相関を明らかにするため、タンパク質工学の手法が用いられている。

2.1 ループの改変

まずリパーゼの構造上の第一の特徴である活性部位を覆っているループ領域に注目が集まった (Fig.-1)。この領域は lid [ふた(蓋)] とも呼ばれ、天然酵素の結晶では活性部位のポケットを覆い基質を入り込めなくしているが、基質が結合した状態では、このループは大きく移動し蓋が開いた状態になると考えられた。その後、リパーゼ-プロコリパーゼ-リン脂質複合体⁶⁾やごく最近の C₁₁ Alkyl phosphonate 複合体⁷⁾のX線解析で確認された。三つの酵素では、ループのヒンジ部の SS 橋かけや近傍のアミノ酸配列はよく保存されているが、22~23

The loop (lid) covering the catalytic site and the domain construction are indicated. The catalytic triad residues and the cysteine residues in the loop-hinge regions are marked.

Fig.-1 Schematic diagram of the structure of human pancreatic lipase reported by Winkler²⁾.

アミノ酸残基よりなるループ領域での保存性はそれほど高くない。Dugi ら⁸⁾は、このループを構成すると推定された LPL の二つの α ヘリックスの両親媒性をアミノ酸置換により破壊したもの、ループ全体を HL もしくは PL の配列に置換したもの、4 アミノ酸残基のループに置き換えたものなどの幾つかの変異タンパク質を作製し、トリブチロイルグリセリン (TB) 及びトリオレイルグリセリン (TO) の分解活性の変化を調べた。その結果、HL のループに置換した変異体以外は、TB 分解活性は残存していたが TO 分解活性は消失し、ループ領域の基質特異性における重要性が示唆された。また三つの酵素のうち比較的ループ領域の配列が保存されている LPL と HL との間では、ループの互換性のあることや⁹⁾、22 残基中 8 残基を欠失させても LPL 活性が保存されることが、他のグループにより報告されている¹⁰⁾。

最近、Lowe らのグループは、PL のループ欠失変異体を作製し、TB、TO 分解活性のほか界面活性化現象、界面結合性の変化についても詳細に調べた¹¹⁾。その結果、欠失変異体は TB と水の界面での結合性が大きく低下しており界面活性化現象も消失していた。これにより X線構造解析より推定されていた、ループ領域の界面への結合とそれに伴う活性化への関与が実験的に示された。前述の基質特異性の変化は界面活性化の変化の結果として説明できると考えられる。

2.2 ドメイン交換

このファミリーのリパーゼは、触媒部位を有する約 340 残基よりなる N ドメインと約 110 残基よりなる C ドメインに分けられる (Fig.-1)。PL の場合、限定プロテオリシスにより単離した各ドメイン断片が調べられ¹²⁾、リパーゼ-コリパーゼ複合体の X線解析が行われた結果^{6), 7), 13), 14)}、C ドメインはコリパーゼ結合ドメインであることが判明している。一方、LPL にはそのようなコファクターとしてアポリポプロテイン C-II (ApoC-II) があるが、HL にはない。又、HL はリン脂質にも作用するなど基質特異性が低い。生体内では、LPL と HL は PL と異なりヘパリン硫酸プロテオグリカンとの結合を介し血管内皮に存在する。これらの各々の特徴と構造との関連は興味あるところである。

Scholtz らのグループは、LPL と HL の各ドメインの役割を明らかにするため、両酵素の N、C ドメインを交換した 2 種のキメラ酵素を作製して両野性型と比較した^{15), 16)}。その結果を Table-1 に示す。V_{max}/K_m、NaCl による阻害様式、ApoC-II による活性化は N ドメインに起因し、ヘパリン親和性は C ドメインの由来と関連すると考えられる。基質特異性 (リン脂質分解活性/TO 分解活性) は、両ドメインの組み合わせにより変化した。これらの現象を説明するため彼らは、LPL モノマーが head to tail に結合した二量体モデルを提案

Table-1 Comparison of the properties among lipoprotein lipase, hepatic lipase, and the chimeric lipase^{a)}.

	Catalytic efficiency ^{b)} ($V_{\max}/K_m$)	NaCl inhibition	Activation by ApoC-II	Substrate specificity ^{c)} (PC/TO)	Heparin affinity ^{d)} (M)
LPL	100	+	+	1	1.1
LPL/HL ^{e)}	110	+	+	4	0.75
HL	46	-	-	10	0.75
HL/LPL	48	-	-	20	1.1

a) Data from references 15) and 16). b) Trioleoylglycerol (TO)-hydrolyzing activity. c) The ratio of phosphatidylcholine (PC)-hydrolyzing activity to TO-hydrolyzing activity. The ratio was normalized to lipoprotein lipase (LPL). d) The molarity of NaCl at which the protein was eluted from a heparin-Sepharose column. e) The chimeric lipase, LPL/HL, having the N-terminal domain from LPL and the C-terminal domain from hepatic lipase (HL).

している¹⁷⁾。

ヘパリン結合に関しては、他のヘパリン結合タンパク質との配列比較より見いだされた LPL の N ドメイン中の塩基性アミノ酸クラスターを含むコンセンサス配列 (ニワトリ LPL の場合 Arg 281-Arg 284) がヘパリン結合に部分的に寄与が示された、ニワトリ LPL を用いた部位特異的変異実験の報告もある¹⁸⁾。

2・3 N-グリコシレーションの役割

LPL と HL においては、従来よりアスパラギン酸結合型糖鎖が活性発現に重要であることが、培養細胞へのツナマイシン添加実験等より指摘されていた。これに対する検証実験が、部位特異的変異の手法を用いて複数のグループにより行われた^{19)~21)}。LPL と HL の N ドメインに共通に存在する N-グリコシレーション部位 (ヒトの場合 LPL の Asn 43, HL の Asn 56) への糖鎖の付加が酵素の活性発現と分泌に重要であることが示された。ただし、HL の場合は厳密な要求性を示さない。両酵素にはさらに C ドメイン中に共通の N-グリコシレーション部位が一箇所存在するが、こちらの方は活性タンパク質の発現には必須ではない。

3 糸状菌 *Rhizomucor miehei* リパーゼ・ファミリー

糸状菌由来のリパーゼは、エステル交換・合成反応によるカカオ代替脂肪の製造や油脂の改質あるいは洗剤用として実用化されており、産業上重要な酵素が多い。糸状菌由来のこれらのリパーゼは一次構造上 30~50 % 程度の相同性を有している。1990 年、*Rhizomucor miehei* 由来のリパーゼ (RmL) の X 線結晶構造解析が Derewenda らのグループにより報告され²²⁾、引き続いてインヒビターとの複合体の構造解析も行われた^{23), 24)}。その後 *Humicola lanuginosa*, *Penicillium camembertii*, *Rhizopus delemar* のリパーゼ (順に HmL, PcL, RdL) の高次構造が同グループにより相

いで明らかにされた^{25)~29)}。いずれも一次構造上の相同性はそれほど高くないにもかかわらず (Fig.-2), 三次構造はかなりよく似ている (Fig.-3)。他に *Rhizopus niveus* の酵素の X 線結晶構造解析が試みられている³⁰⁾。最近クローニングされた *Fusarium heterosporum* のリパーゼもこのファミリーに属すると考えられる³¹⁾。

これらの酵素におけるタンパク質工学の研究では、構造解析より推定された catalytic triad, オキシアニオンホールや lid ヘリックスの検証、脂肪酸結合領域の改変、安定化など実用化をにらみ機能向上を目的とした研究もなされている。

3・1 オキシアニオンホール

ズブチリシン等のセリンプロテアーゼの触媒部位は、catalytic triad と活性中心のセリンがアシル化及び脱アシル化される際に形成される遷移状態の四面体中間体を安定化するオキシアニオンホールと呼ばれる空間から構成される。ズブチリシンの場合、Asn 155 の側鎖のアミド基が、オキシアニオンとして存在するペプチド結合のカルボニル炭素と水素結合を形成する。

リパーゼの場合、天然酵素の X 線結晶構造解析ではこれに相当するアミノ酸残基は明確には見あたらなかったが、RmL と遷移状態アナログであるインヒビターとの複合体の X 線結晶構造解析より、lid ヘリックス (残基 85~91) が移動しコンホメーションの変化が起こった後、Ser 82 の主鎖アミド基と側鎖ヒドロキシル基が四面体中間体と水素結合を形成すると推定された^{23), 24)}。Ser82 は lid ヘリックスのヒンジ部位に位置する。膵臓リパーゼの場合でも同様に、コンホメーション変化が起こった後に、Leu154 と Phe78 の主鎖アミド基が同じ役割をしていることが、PL-プロコリパーゼ-リン脂質複合体の構造解析から推定されている⁶⁾。

筆者らは、RmL における Ser 82 の役割が報告されるとすぐに、この *Penicillium camembertii* 由来のリ

The secondary structural elements are shown at the bottom²⁹⁾. The catalytic triad residues and the residue presumed to be involved in the oxyanion interaction are marked with closed circles and an open circle, respectively. The Trp 88 in RmL is indicated by the open triangle (see text 3.2). The arrows indicate the two residues replaced with cysteine in SS mutant of PcL (see text 3.4).

Fig.-2 Structure-based sequence alignment of four lipases of the *Rhizomucor miehei* family of filamentous fungi.

パーゼ (mono- and diacylglycerol lipase, PcL) を用いて, RmL の Ser 82 に相当する PcL の Ser 83 を Gly に置換した変異体を実質的に不活性タンパク質であることを確認した³²⁾. Fig.-2 に示した四種のリパーゼのうち, RmL の Ser 82 に相当する残基は, RdL の場合のみ Thr であった. Joerger らは³³⁾, この RmL の Thr 83 を Ala 及び Ser に置換したところ, Ala 置換体は比活性が $1/10^3$ 程度に著しく減少するのに対し, Ser 置換体は $1/2 \sim 1/7$ 程度の比活性を保持していることを確認し, この位置のアミノ酸残基の側鎖のヒドロキシル基が重要であることが示された. Thr83Ser における比活性の低下は, Thr と Ser でヒドロキシル基の位置がずれるためと考えられる.

コンピューターによる分子動力学シミュレーションの結果, Tyr 28 (RmL の場合) のヒドロキシル基がオキシアニオンと相互作用しているのではないかという推定や³⁴⁾, lid の移動は触媒反応に関与していないという報告もあり³⁵⁾, オキシアニオンホールの詳細な構造を知るには, 高分解能のリパーゼ-インヒビター複合体の X 線構造解析を待たなければならない。

3.2 lid ヘリックス領域のアミノ酸置換

Derewenda らのグループによる上述の RmL-インヒビター複合体の構造解析では, lid が閉じた状態 (closed form) では lid ヘリックスの中央に位置する Trp88 が分子の内側を向き側鎖が触媒部位空間を占め, lid が大きく移動した open form では Trp 88 は分子表

面に現れ, 新たに形成された広い疎水性の表面の一部となることが見いだされた. Holmquist らは³⁶⁾, RmL の Trp 88 に相当する HIL の Trp 89 を電荷をもつ Glu 及び側鎖サイズの異なる疎水性アミノ酸 Phe, Leu, Gly に置換し, TB を基質としたときの活性とみかけの K_m を測定した. その結果, Glu 置換体は活性が大きく減少し (野性型の 1 %) 基質界面への親和性も減少したが, 他の疎水性アミノ酸への置換体では基質界面親和性は野性型と変わらない一方, 活性 (V_{max}) は 14 % 以下に減少した. 従って, この Trp 残基はリパーゼが基質界面に吸着した後の触媒反応のステップでも何らかの役割をしていると推定された. Fig.-2 に示す様に, この位置のアミノ酸残基は RdL では Ala である. RdL の Ala89Trp 変異株については, TB, トリオクタンノイルグリセリン (トリカプリリン, TC), TO に対し活性が 80~60 % に減少するが基質特異性は変化しないことが Joerger らにより報告されているが³³⁾, 界面活性化現象の変化については調べられていない。

Holmquist らは, RmL の Arg の化学修飾及び低濃度のグアニジン (Arg 側鎖のアナログ) による阻害実験³⁷⁾, あるいは分子動力学シミュレーション³⁸⁾により, lid が開いた状態 (open form) では, lid ヘリックス中の Arg 86 残基とタンパク質本体との間の静電相互作用により安定化されているのではないかと推定した. RmL の Ser 86 に相当する残基は, HIL の場合 Glu87 である (Fig.-2). 彼らは, HIL の Glu87 の Ala 置換

(A) C backbones of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* (broken line) are superimposed. The catalytic triad residues are shown. (B) Same as above, for *Penicillium camembertii* and *R. miehei* lipases and (C) for *Rhizopus delemar* and *R. miehei* lipases.

Fig.-3 A comparison of the tertiary structures of four lipases of the *Rhizomucor miehei* lipase family of filamentous fungi.

体において, RmL の Arg 化学修飾体と同様に活性の減少を観察し, この位置の極性側鎖の重要性を示した³⁹⁾。2-メチルデカン酸エステルの加水分解において, HIL の Glu 87 Ala 変異体, RmL の Arg 化学修飾体いずれもエナンチオ選択性が変化することが報告されている。

3・3 脂質結合領域の改変

RmL-インヒビター (*n*-hexyl phosphonate ethylester) 複合体では, *n*-hexyl基はいくつかの疎水性アミノ酸側鎖よりなるポケット (脂肪酸結合グローブ) に位置していた。Joergerらは³⁶⁾, RdLの脂肪酸結合グローブに位置する疎水性アミノ酸 Phe95, Phe112, Val206, Val209 をターゲットとして, 各々のアミノ酸に対し他の19のアミノ酸すべてが置換されるように変異をかけた。発現宿主として大腸菌を用いたプレート・アッセイにより, 基質特異性の変化した変異リパー

(A) *Rhizomucor miehei*, (B) *Rhizopus delemar*, (C) *Humicola lanuginosa*, (D) *Penicillium camembertii*.

Fig.-4 The distribution of disulfide linkages and free sulphydryl in lipases from the four filamentous fungi.

ゼを生産する大腸菌をスクリーニングし, Phe95Asp, Phe112Trp, Val206Thr, Val209Trp, Val209Gly など TB, TC, TO に対する特異性の変化した変異体を得ている。

HIL は洗剤用リパーゼとして実用化されている酵素 (Novo-Nordisk, Lipolase™) である。Gormsen は⁴⁰⁾, HIL の洗剤用酵素としての能力を向上させるため, 脂質結合領域の負電荷の消去や疎水度の変化を試みた。幾つかの変異体について評価したところ, ある負電荷アミノ酸を置換した変異体は, 界面吸着能, 実際の洗浄試験において良い結果が得られたという。負電荷の消去は, 洗剤中でのリパーゼ反応の場においてはアニオン界面活性剤や遊離脂肪酸の蓄積により負に帯電しており, その負電荷と酵素の負電荷との静電的反発をなくするという考えに基づくものである⁴¹⁾。

3・4 SS 橋かけの導入

このファミリーに属する高次構造の明らかになった四種のリパーゼの SS 橋かけに着目してみると, Fig.-4 のように合計四種の SS 結合があり, 4 リパーゼすべてに保存されているもの (RmL の場合 40-43) から, 三つのリパーゼに保存されているもの (RmL の 29-268), 二つのリパーゼに保存されているもの (RmL の 235-244, HIL の 104-107) がある。これらの中で最も特徴的な構造は, RmL の 29-268 に相当する SS 結合が PcL に見られないことである。

PcL は, モノアシルグリセリン, ジアシルグリセリンには作用するがトリアシルグリセリンには実質的に作用しないという性質を有するリパーゼであり⁴²⁾, トリ

アシルグリセリンを主体に分解する通常のリパーゼ（トリアシルグリセロールリパーゼ）とは異なるユニークな酵素（天野製薬, Lipase GTM）である。この性質により油脂中の部分アシルグリセリンの分解除去等に利用できる。RmL, HIL, RdL はトリアシルグリセロールリパーゼである。PcL の高次構造をみると, RmL の Cys 29, Cys268 に相当する残基は Tyr22, Gly269 であり, 両者は近傍に位置し, 側鎖は向かい合う位置にあった。そこで Tyr22Cys/Gly269Cys 変異体を作製したところ, 予想通り新たな SS 結合が形成された。諸性質を野性型と比較したところ, この変異体は比活性, 基質特異性には変化が見られなかったが, 55°C での活性半減期が 2.6 倍に延び DSC 測定による T_m 値が約 9°C 上昇していた (Fig.-5)⁴³⁾。現在 PcL の基質特異性と構造との相関を明らかにするため種々のアミノ酸置換を行っている。

4 *Geotrichum candidum* リパーゼ・ファミリー

このファミリーに属するリパーゼの代表的なものには, *Geotrichum candidum* 由来のリパーゼ (GcL) のほかに *Candida rugosa* (*cylindracea*) 由来のリパーゼ (CrL) がある。前者はオレイン酸などの 9 位に *cis* の二重結合を有する脂肪酸に特異性を示す酵素, 後者は基質特異性の広い酵素として, いずれも古くからよく知られたリパーゼである。これらは, 一次構造上のホモロジーからほ(哺)乳動物のアセチルコリンエステラーゼ, プチルコリンエステラーゼ, カルボキシエステラーゼ,

コレステロールエステラーゼ(ミルク中の bile salt-activated lipase と同一とも言われている)などの加水分解酵素や *Drosophila* の細胞接着性タンパク質などが属するセリンエステラーゼ遺伝子ファミリーに属すると考えられる⁴⁴⁾。高次構造は, 1991 年に Cygler らのグループ⁴⁵⁾と杉原らのグループ⁴⁶⁾により GcL について, *Torpedo californica* (シビレエイ) のアセチルコリンエステラーゼについて Sussman ら⁴⁷⁾により報告された。次いで 1993 年に CrL の高次構造が Cygler らのグループによって明らかにされた⁴⁸⁾。

このファミリーの酵素の高次構造解析において第一に特徴的であったのは, catalytic triad のメンバーであるカルボキシル基を持つアミノ酸として, セリンプロテアーゼや他のリパーゼの場合にみられた Asp ではなく, Glu が見いだされたことである。Cygler のグループは⁴⁹⁾, GcL において推定した catalytic triad の Ser 217, His463, Glu354 を部位特異的変異により検証した。Glu354 については Asp 置換体も作製したところ, 野性型の半分程度の TO 分解活性を保持していた。エステラーゼ活性 (*p*-nitrophenyl acetate, *p*-nitrophenyl butyrate に対する活性) も同様に野性型の 50 % 程度であったが, TB 分解活性は 1/10 程度であった。この基質特異性の変化の原因は明らかでない。同様のアミノ酸置換がヒト・アセチルコリンエステラーゼについても行われたが, こちらの場合の Asp 置換体 (Glu 334Asp) は野性型の 0.4 % 以下と大きく活性が減少している⁵⁰⁾。一次構造アライメントから, このファミリーに属する加水分解酵素のなかでコレステロールエステラーゼだけは, 他と異なり Ser-His-Asp の catalytic triad を有すると考えられる⁴⁴⁾。DiPersio らは, ラット脾臓コレステロールエステラーゼの, GcL やアセチルコリンエステラーゼの Glu 残基に相当する Asp 320 について, 逆に Glu 置換体を作製し, 野性型の 50 % の活性が保持されることを報告している⁵¹⁾。

最近 CrL について, lid (この場合は flap と呼ばれている) が開いた結晶と閉じた結晶の二つの高次構造が比較され⁵²⁾, またエナンチオマーを含む種々のインヒビターとの複合体の高次構造解析^{53), 54)}がなされた。その結果, オキシアニオンホールが closed form ですでに形成されていること, 基質結合部位としての狭い疎水性トンネルの存在と基質トリアシルグリセリンの結合モデル, 立体選択性に寄与している構造など幾つかの興味ある推定がなされている。これらのなかで, リパーゼの立体特異性は実用的観点からも特に重要である。Cygler らは, *Candida rugosa* リパーゼと遷移状態アナログ menthyl hexylphosphonate の R 体, S 体各々との複合体の X 線結晶構造解析を行い, 両構造の比較を行った⁵⁴⁾。その結果, 触媒部位において, catalytic triad

Fig.-5 Differential scanning calorimetry curves for wild type and SS mutant of *Penicillium camembertii* lipase under non-reducing and reducing conditions.

The hydrogen bond between $N\epsilon 2$ of His 449 and O1 of (1*S*)-menthol is lacking due to the pushing out (indicated by the arrow) of the imidazole by the isopropyl substituent of (1*S*)-menthol. The distances between $N\epsilon 2$ of His 449 and $O\gamma$ of Ser 209 or O1 of the menthol are shown.

Fig.-6 Comparison of the hydrogen bonds between inhibitors and the imidazole of the catalytic triad in the crystal structure of *Candida rugosa* lipase inhibited by (1*R*)- (A) and (1*S*)-menthylhexylphosphonate (B)⁵³.

の His 残基の $\epsilon 2$ 窒素原子とエステル結合の酸素原子に相当するメンチル基の酸素原子との間で、*R* 体との複合体では水素結合を形成しているのに対し、*S* 体との複合体では、メンチル基による立体障害のため His のイミダゾール基が押しやられ両原子が水素結合を形成しえないことが観察された (Fig.-6)。これより *S* 体に対する加水分解速度が遅くなり、*R* 体に対する立体選択性として現れると推定している。これまで第二級アルコールエステルに対するリパーゼによる立体選択性は、膨大な数の基質を用いた研究より、経験則として *R* 体選択性が見られていたが⁵⁵⁾、Cyglar らの推定はこれに合致する。これによれば、立体特異性は基質認識部位ではなく、触媒部位そのものの構造に依存していることになる。リパーゼの catalytic triad の構成は、これまで解明されたものすべてに共通である。従って、彼らが指摘するように、少なくとも第二級アルコールエステルにおける立体特異性は、このメカニズムが多くのリパーゼに共通するかもしれない。今後のタンパク質工学による検証、さらには機能改変が期待される。

5 *Pseudomonas* リパーゼ・ファミリー

細菌由来のリパーゼについては、非常に数多く報告されている。そのなかで基礎、応用両面で最もよく研究されているのは *Pseudomonas* 由来のリパーゼである。実用的な用途として、特に洗剤分野あるいは光学活性体を中心とした有機合成分野への応用開発が盛んに研究されており、それに伴い高次構造解析、タンパク質工学による機能改変も多くのグループにより行われている。

Pseudomonas 由来の代表的リパーゼは、一次構造から分類すると三つのグループに分けられる。最初のグ

ループは、分子量約 30,000、約 285 アミノ酸残基よりなるリパーゼで、*Pseudomonas* (*Pse.*) *aeruginosa*, *Pse. alcaligenes* (Gist-brocades, LipomaxTM) 由来の酵素等がある。第二のグループは、分子量約 33,000、約 320 アミノ酸残基よりなり、*Pse. cepacia* (天野製薬, Lipase PSTM 等), *Pse. glumae* (Uniliver) が代表的である。*Chromobacterium viscosum* のリパーゼのアミノ酸配列は、*Pse. glumae* のそれと同一である。三つめのグループのリパーゼとしては、分子量約 50,000、約 475 アミノ酸残基よりなる *Pse. fluorescens* のリパーゼがある。*Serratia marcescens* 由来のリパーゼは、*Pse. fluorescens* リパーゼとホモロジーが高い。これら 3 グループ間での一次構造ホモロジーは、第一、第二グループ間では 40 % 程度あるが、第三グループと他の 2 グループとの間のホモロジーはかなり低い。*Pseudomonas* 由来としては、他に *Pse. mendocina* 由来の酵素 (Genencor, LumafastTM) がある。このものは、リパーゼというよりむしろクチナーゼの一種と考えられている。クチナーゼは、本来、植物の表面のクチン質を分解する酵素として見いだされたものであるが、トリアシルグリセリンもよく分解する。植物病原菌 *Fusarium solani* のクチナーゼについて高次構造が報告されており、分子全体の構造はリパーゼに類似しているが lid を有していないこと、及びオキシアニオンホールがあらかじめ形成されていることが明らかにされている^{56), 57)}。

Pseudomonas リパーゼの X 線構造解析は、種々の株由来の酵素について少なくとも 8 グループにより試みられているようであるが、現在のところ報告されているのは 1993 年の *Pse. glumae* リパーゼの高次構造につ

いてのみである⁵⁸⁾。一方、タンパク質工学の研究は、実用的ニーズがあるためか高次構造が解明される以前から企業を中心に盛んに行われている。

5.1 catalytic triad のアスパラギン酸

Frenken らは、*Pse. glumae* リパーゼについて、結晶構造が解明されるまえに部位特異的変異により catalytic triad のアミノ酸の特定を試み、その酸性アミノ酸メンバーとして Asp241 を推定していた⁵⁹⁾。これはこのファミリーのリパーゼで高度に保存されている三つの Asp 残基 (Asp121, Asp241, Asp263) の Ala 置換体のうち、活性をほぼ完全に消失したのは Asp241 の置換体のみであったという結果に基づいていた。その後、結晶構造解析からは Asp263 が catalytic triad の酸性アミノ酸メンバーであることが示された。Asp263 Ala 変異体は野性型の約 23 % の活性を保持していたのだが、これに関し彼らは Asp263Ala 変異体においては、結晶構造で Asp263 のカルボキシル基のわずか 2.7 Å の位置にある Glu288 のカルボキシル基が、Asp263 のその代役をしているか、もしくはこの役割をする水分子を供給しているのではないかと推定している。また Asp263Glu 変異体も野性型の約半分の活性を有しており、*Pse. glumae* リパーゼの catalytic triad の酸性基は、通常とは変わった環境にあると思われた。Asp 241 は、カルシウムのリガンドとして同定された四つのアミノ酸のうちの一つであることが結晶構造解析より判明した。

この catalytic triad のアスパラギン酸の構造が *Pseudomonas* リパーゼに共通のものなのかは興味あるところである。288 番目のグルタミン酸は、第一、第二グループのリパーゼすべてで保存されている。しかしながら、*Pse. glumae* リパーゼと 80 数 % ホモロジーのある *Pseudomonas* sp. M-12-33 由来のリパーゼでは、*Pse. glumae* の Asp 263 に相当する残基 (Asp 264) の Ala 置換体は不活性であることが報告されている⁶⁰⁾。*Pse. glumae* の Asp 263 Ala 変異体や他の *Pseudomonas* リパーゼの X 線結晶構造解析が待たれるところである。

5.2 プロテアーゼ抵抗性の向上

Pseudomonas リパーゼは、至適 pH が 9 付近のものが多く、またアルカリ側での安定性も比較的良好なものが多いため洗剤用酵素として開発されているものが多い。洗剤用酵素としてはアルカリプロテアーゼが古くより使用されており、リパーゼを新たに配合する際にはアルカリプロテアーゼ抵抗性の高いリパーゼが望まれる。Frenken らは⁶¹⁾、部位特異的変異により *Pse. glumae* リパーゼのプロテアーゼ抵抗性の向上に成功している。まずこのリパーゼにズブチリンの一種であるサビナーゼTM (*Bacillus lentus* 由来) を作用させ、最初の切断点が Ser153 と His154 の間であることを同定した。後

の結晶構造解析より、この部位は lid と推定された α ヘリックス (137–149) に隣接するループ内にあり主鎖の温度因子の高い、すなわちゆらぎの大きい領域であることがわかっている。サーモライシンの自己消化において指摘されていた⁶²⁾、タンパク質分子内の、プロテアーゼ被認識部位と主鎖温度因子の高い部位との相関がこの場合にもみられている。次に、一般的にスブチリンが切断しにくいと報告されているペプチド結合付近のアミノ酸配列の特異性から、Ser153–His154 近傍に電荷を持つアミノ酸の導入及びプロリンの導入が試みられた。1 もしくは 2 残基の置換、位置の違い、両方の組み合わせなど合計 12 の変異体が作製された。いずれもサビナーゼTM による失活速度は低下し、最高で 4.8 倍の低下であった。各々の切断部位を詳しく調べたところ、もとの切断部位からわずかにずれていたり、複数の位置で切断されるようになったものもみられた。オリブ油に対する見かけの K_m , V_{max} は、いずれも大きな変化がみられなかったとのことであるが、上述の α ヘリックスが lid 様のコンホメーション変化を起こすとしたら lid の C 末端側のヒンジ部位は 154 番目よりさらに C 末端寄りにあるのであろうか。このリパーゼの open form の構造解析に興味を持たれる。

5.3 立体選択性の反転

上述したようにリパーゼの立体選択性は、注目されるべき大きな特徴の一つである。有機溶媒中でのリパーゼ反応が見いだされると、医薬、農業分野で有用な光学活性体の製造のため、リパーゼによるラセミ体の光学分割、プロキラル化合物やメソ化合物の不斉合成など多くの試みが現在も盛んに行われている。リパーゼの立体選択性と構造との相関の解明、それに基づく新しい反応のデザインさらには広範な基質に対して高度の立体選択性を有するリパーゼの創製は、リパーゼ研究者の大きな夢である。これに関し、4 項で紹介したように最近興味ある報告がなされるなど構造-立体特異性相関にメスが入れられつつある。

Pseudomonas 由来のリパーゼ、特に Lipase PSTTM はこの分野で最もよく用いられている。広瀬らは⁶³⁾、プロキラルな 1,4-dihydropyridine 誘導体の水飽和イソプロピルエーテル中での加水分解において、Lipase AHTM (*Pseudomonas* sp. 由来) は S 体を、Lipase PSTTM (*Pseudomonas cepacia* 由来) は R 体を生成することを見いだした。これらの生成物の光学高純度は 99 % ee 以上であり、実用性の高いものであると考えられる。両酵素は、*Pseudomonas* リパーゼの第二のグループに属し、しかも全アミノ酸 320 残基中わずか 16 残基が異なるのみでありホモロジーはかなり高い。そこで彼らはまず、Lipase PSTTM におけるこれら 16 残基を Lipase AHTM のそれらに置換した 16 種の変異体を作製

All reaction are carried out in water-saturated isopropylether.

Fig.-7 Enantioselective hydrolysis of 1,4-dihydropyridines by the mutant and wild types of Lipase PSTM and Lipase AHTM⁶³).

し、立体特異性を調べた。大きな変化は見られなかったが、Phe221Leu, Val266Leu, Leu287Ile の 3 変異体は、R 体特異性がある程度低下した。次にこれら 3 残基の二重変異体及び三重変異体を作製したところ、二重変異体では相乗効果は見られなかったが、三重変異体では、Fig.-7 のように立体選択性が R 体から S 体へと大きく反転した。変異体作成によるこのような立体選択性の大きな変化は、リパーゼのみならずすべての酵素のなかでも非常に珍しいことである。Lipase PSTM やその変異体の結晶構造解析が待たれる。

5.4 *Pse. mendocina* 酵素の機能改変

Genencor のグループは、*Pse. mendocina* (当初は *Pse. putida* とされていた) のリパーゼ (クチナーゼ) について、実用的観点から種々の機能改変を試みている⁶⁴)。catalytic triad (Ser126, His206, Asp176) のアミノ酸残基を化学修飾や部位特異的変異により推定し、その近傍のアミノ酸をターゲットとし他の種々のアミノ酸への置換を導入した。得られた多くの変異体について、いくつかの活性、性質を指標にしてスクリーニングした。結果、 K_m , K_{cat} の変化したもの (Gln127 Ser, Ser205Glu 等)、脂肪酸特異性の変化したもの (Gln127 Thr, Ser205Arg 等)、加水分解活性に対してエステル交換 (メタノリシス) 活性の比が約 2 倍上昇したもの (Gln127Thr 等)、加水分解活性に対して過酸化水素による分解 (加過水分解, perhydrolysis) 活性の比が約 4 倍上昇したもの (Gln127Ser 等) が得られた。触媒部位アミノ酸の隣りに置換を導入することで、種々の性

質の変化が観察されている。加過水分解活性の向上は、洗剤用酵素として用いる場合に、洗浄中リパーゼによりトリアシルグリセリン等の脂肪酸エステルと過酸化水素との反応から生じた脂肪酸の過酸化物を、漂白剤として利用しようという考えに基づくものである⁶⁵)。

6 おわりに

ここで触れた四つのグループ以外にも、生体由来では胃リパーゼ [がく(顎)下せん(腺)リパーゼ, lysosomal acid lipase は胃リパーゼとホモロジーがある] などが、微生物起源では、*Candida antarctica* の Lipase B⁶⁶), *Bacillus* 由来のリパーゼ⁶⁷)などが研究対象になっている。*Molaxella* 由来の低温リパーゼ⁶⁸)も研究対象として興味深い。前述のクチナーゼは、リパーゼとエステラーゼの中間に位置する酵素として研究されている。

ここ数年の進歩により、触媒様式、界面活性化現象などリパーゼの基本的な性質についてのメカニズムは、おぼろげながら見えてきた。しかしながら、例えば lid ヘルックスのコンホメーション変化の引き金はどのようにしては引かれるのかというシンプルな疑問の解明、溶液中での動的変化の解明などはこれからの課題である。また、リパーゼは基質特異性が低く、いずれの基質でもエステル合成、交換反応も効率よく行う。このルーズさが、リパーゼの産業上の利用範囲を広くし、また研究者の興味をそそるのであるが、構造-機能相関の解明にとっては問題を複雑にし、多くの解明すべき課題を提供

している。本稿でも触れた立体特異性と構造との関係や、メインの基質であるトリアシルグリセリンとの結合様式の解明が始まりつつある。今後は、脂肪酸の鎖長の違い、飽和-不飽和の違い、グリセリンの1, 2, 3位の違いをどの様に認識するのか、トリアシルグリセリン、ジアシルグリセリン、モノアシルグリセリンあるいは他の低分子から高分子ポリマーまで種々のエステルをどのように認識するのか、などにも焦点があてられるであろう。

タンパク質工学の理想は、立体構造と機能の相関関係を知ることによって新しいタンパク質を自在に設計することであろう。リパーゼに限らず、この理想への路はまだまだ長く、それまでに多くの知識の蓄積が必要であろう。しかしながら、本稿で述べたようにリパーゼというやや扱いにくいタンパク質においても、着実にその知識は蓄積しているように思われる。また実用的ニーズからは、構造解析の知見から変異のターゲットをある程度絞り、望ましい性質を有するものをスクリーニングしていくという方法による成功例がいくつか見られ、現段階では実用性のある手法と思われる。これらの変異リパーゼの構造解析も、構造-機能相関の知識の蓄積、ひいては新しい機能改変リパーゼのデザインに貢献していくであろう。

〔平成7年(1995年)5月8日受理〕

文 献

- 1) Z.S. Derewenda, C. Cambillau, *J. Biol. Chem.*, **266**, 23112 (1991)
- 2) F.K. Winkler, A. D'Arcy, W. Hunziker, *Nature*, **343**, 771 (1990)
- 3) M.E. Lowe, *J. Biol. Chem.*, **267**, 17069 (1992)
- 4) F. Faustinella, L.C. Smith, C.F. Semenkovich, L. Chan, *J. Biol. Chem.*, **266**, 9481 (1991)
- 5) J. Emmerich, O.U. Beg, J. Peterson, L. Previato, J.D. Brunzell, *J. Biol. Chem.*, **267**, 4161 (1992)
- 6) H. van Tilbeurgh, M-P. Egloff, C. Martinez, N. Rugani, R. Verger, C. Cambillau, *Nature*, **362**, 814 (1993)
- 7) M-P. Egloff, F. Marguet, G. Buono, R. Verger, C. Cambillau, H. van Tilbeurgh, *Biochemistry*, **34**, 2751 (1995)
- 8) K.A. Dugi, H.L. Dichek, G.D. Talley, H.B. Brewer, Jr., S. Santamaria-Fojo, *J. Biol. Chem.*, **267**, 25086 (1992)
- 9) F. Faustinella, L.C. Smith, L. Chan, *Biochemistry*, **31**, 7219 (1992)
- 10) H.E. Henderson, Y. Ma, M.S. Liu, I. Clark-Lewis, D.L. Maeder, J.J.P. Kastelein, J.D. Brunzell, M.R. Hayden, *J. Lipid Res.*, **34**, 1593 (1993)
- 11) M.L. Jennens, M.E. Lowe, *J. Biol. Chem.*, **269**, 25470 (1994)
- 12) A. Abousalham, C. Chaillan, B. Kerfelec, E. Foglizzo, C. Chapus, *Protein Eng.*, **5**, 105 (1992)
- 13) H. van Tilbeurgh, L. Sarda, R. Verger, C. Cambillau, *Nature*, **359**, 159 (1992)
- 14) M-P. Egloff, L. Sarda, R. Verger, C. Cambillau, H. van Tilbeurgh, *Protein Sci.*, **4**, 44 (1995)
- 15) H. Wong, R.C. Davis, J. Nikazy, K.E. Seebart, M.C. Schotz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11290 (1991)
- 16) R.C. Davis, H. Wong, J. Nikazy, K. Wang, Q. Han, M.C. Schotz, *J. Biol. Chem.*, **267**, 21499 (1992)
- 17) H. Wong, R.C. Davis, T. Thuren, J.W. Goers, J. Nikazy, M. Waite, M.C. Schotz, *J. Biol. Chem.*, **269**, 10319 (1994)
- 18) D.E. Berryman, A. Bensadoun, *J. Biol. Chem.*, **268**, 3272 (1993)
- 19) C.F. Semenkovich, C-C Luo, M.K. Nakanishi, S-H. Chen, L.C. Smith, L. Chan, *J. Biol. Chem.*, **265**, 5429 (1990)
- 20) G. Stahnke, R.C. Davis, M.H. Doolittle, H. Wong, M.C. Schotz, H. Will, *J. Lipid Res.*, **32**, 477 (1992)
- 21) O. Ben-Zeev, G. Stahnke, G. Lui, R.C. Davis, M.H. Doolittle, *J. Lipid Res.*, **35**, 1511 (1994)
- 22) L. Brady, A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Nørskov, L. Thim, U. Menge, *Nature*, **343**, 767 (1990)
- 23) A.M. Brzozowski, U. Derewenda, Z.S. Derewenda, G.G. Dodson, D.M. Lawson, J.P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Høge-Jensen, S.A. Patkar, L. Thim, *Nature*, **351**, 491 (1991)
- 24) U. Derewenda, A.M. Brzozowski, D.M. Lawson, Z.S. Derewenda, *Biochemistry*, **31**, 1532 (1992)
- 25) U. Derewenda, L. Swenson, R. Green, Y. Wei, G.G. Dodson, S. Yamaguchi, M.J. Haas, Z.S. Derewenda, *Nature Struct. Biol.*, **1**, 36 (1994)
- 26) U. Derewenda, L. Swenson, Y. Wei, R. Green, P.M. Kobos, R. Joerger, M.J. Haas, Z.S. Derewenda, *J. Lipid Res.*, **35**, 524 (1994)
- 27) L. Swenson, R. Green, R. Joerger, M.J. Haas, K. Scott, Y. Wei, U. Derewenda, D.M. Lawson, Z.S. Derewenda, *Proteins*, **18**, 301 (1994)
- 28) U. Derewenda, L. Swenson, R. Green, Y. Wei, S. Yamaguchi, R. Joerger, M.J. Haas, Z.S. Derewenda, *Protein Eng.*, **7**, 551 (1994)
- 29) Z.S. Derewenda, U. Derewenda, G.G. Dodson, *J. Mol. Biol.*, **227**, 818 (1992)
- 30) M. Kohno, W. Kugimiya, Y. Hashimoto, Y. Morita, *J. Mol. Biol.*, **229**, 785 (1993)
- 31) T. Nagao, Y. Shimada, A. Sugihara, Y. Tomimaga, *J. Biochem.*, **116**, 536 (1994)
- 32) S. Yamaguchi, T. Mase, K. Takeuchi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 315 (1992)
- 33) R.D. Joerger, M.J. Haas, *Lipids*, **29**, 377, (1994)
- 34) M. Norin, F. Haeflner, A. Achour, T. Norin, K. Hult, *Protein Sci.*, **3**, 1493 (1994)
- 35) I.G. Clausen, A. Svendsen, E. Gormsen, S. Patkar, K. Mondorf, M. Egel-Mitani, M. Barfod, K. Borch, *INFORM*, **4**, 531 (1993)
- 36) M. Holmquist, M. Martinelle, I.G. Clausen, S. Patkar, A. Svendsen, K. Hult, *Lipids*, **29**, 599

- (1994)
- 37) M. Holmquist, M. Norin, K. Hult, *Lipids*, **28**, 721 (1994)
 - 38) M. Norin, O. Olsen, A. Svendsen, O. Edholm, K. Hult, *Protein Eng.*, **6**, 855 (1993)
 - 39) M. Holmquist, M. Martinelle, P. Berglund, I.G. Clausen, S. Patkar, A. Svendsen, K. Hult, *J. Protein Chem.*, **12**, 749 (1993)
 - 40) E. Gormsen, *INFORM*, **3**, 489 (1992)
 - 41) 上島孝之, 化学と生物, **31**, 761 (1993)
 - 42) S. Yamaguchi, T. Mase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 720 (1991)
 - 43) S. Yamaguchi, K. Takeuchi, T. Mase, K. Oikawa, T. McMullen, U. Derewenda, R.N. McElhaney, C.M. Kay, Z.S. Derewenda, *Protein Eng.*, under submission.
 - 44) M. Cygler, J.D. Schrag, J.L. Sussman, M. Harel, I. Silman, M.K. Gentry, B.P. Doctor, *Protein Sci.*, **2**, 366 (1993)
 - 45) J.D. Schrag, Y. Li, S. Wu, M. Cygler, *Nature*, **351**, 761 (1991)
 - 46) A. Sugihara, Y. Hata, Y. Shimada, Y. Tominaga, Y. Katsube, "Lipase: Structure, Mechanism and Genetic Engineering", L. Alberghina, R.D. Schmid & R. Verger, Weinheim (1991) p. 47
 - 47) J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science*, **253**, 872 (1991)
 - 48) P. Grochulski, Y. Li, J.D. Schrag, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, *J. Biol. Chem.*, **268**, 12843 (1993)
 - 49) T. Vernet, E. Ziomek, A. Rechtenwald, J.D. Schrag, C. de Montigny, D.C. Tessier, D.Y. Thomas, M. Cygler, *J. Biol. Chem.*, **268**, 26212 (1993)
 - 50) A. Shaffer, C. Kronman, Y. Flashner, M. Leitner, H. Grosfeld, A. Ordentlich, Y. Gozes, S. Cohen, N. Ariel, D. Barak, M. Harel, I. Silman, J.L. Sussman, B. Velan, *J. Biol. Chem.*, **267**, 17640 (1992)
 - 51) L.P. DiPersio, D.Y. Hui, *J. Biol. Chem.*, **268**, 300 (1993)
 - 52) P. Grochulski, Y. Li, J.D. Schrag, M. Cygler, *Protein Sci.*, **3**, 82 (1994)
 - 53) P. Grochulski, F. Bouthillier, R.J. Kazlauskas, A.N. Serreqi, J.D. Schrag, E. Ziomek, M. Cygler, *Biochemistry*, **33**, 3494 (1994)
 - 54) M. Cygler, P. Grochulski, R.J. Kazlauskas, J.D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A.N. Serreqi, A.K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 3180 (1994)
 - 55) R.J. Kazlauskas, A.N. Weissfloch, A.T. Rappaport, L.A. Cuccia, *J. Org. Chem.*, **56**, 2656 (1991)
 - 56) C. Martinez, P.D. Geus, M. Lauwereys, G. Matthyssens, C. Cambillau, *Nature*, **356**, 615 (1992)
 - 57) C. Martinez, A. Nicolas, H. van Tilbeurgh, M-P. Egloff, C. Cudrey, R. Verger, C. Cambillau, *Biochemistry*, **33**, 83 (1994)
 - 58) M.E. Noble, A. Cleasby, L.N. Johnson, M.R. Egmond, L.G.J. Frenken, *FEBS Lett.*, **331**, 123 (1993)
 - 59) L.G.J. Frenken, M.R. Egmond, A.M. Batenburg, J.W. Bos, C. Visser, C.T. Verrips, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3787 (1992)
 - 60) 食品産業酵素機能変換技術研究組合編, "食品産業のためのプロテインエンジニアリング" 食品化学新聞社 (1992) p. 144
 - 61) L.G.J. Frenken, M.R. Egmond, A.M. Batenburg, C.T. Verrips, *Protein Eng.*, **6**, 637 (1993)
 - 62) A. Fontana, G. Fassina, C. Vita, D. Dalzoppo, M. Zamai, M. Zamboni, *Biochemistry*, **25**, 1847 (1986)
 - 63) Y. Hirose, K. Kariya, Y. Nakanishi, Y. Kurono, K. Achiwa, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 7 (1995)
 - 64) R. Bott, J.W. Shield, A.J. Poulou, "Lipases-their structure, biochemistry and application", P. Woolley & S.B. Pertersen, Cambridge Univ. Press (1994) p. 337
 - 65) D.A. Estell, *J. Biotechnol.*, **28**, 25 (1993)
 - 66) J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T.A. Jones, *Structure*, **2**, 293 (1994)
 - 67) O. Misset, G. Gerritse, K-E. Jaeger, U. Winkler, C. Colson, K. Schanck, E. Lesuisse, V. Dartois, M. Blaauw, S. Ransac, B.W. Dijkstra, *Protein Eng.*, **7**, 523 (1994)
 - 68) G. Feller, M. Thiry, C. Gerday, *Biochim. Biophys. Acta*, **1088**, 323 (1991)