The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Family I.3 リパーゼの結晶構造 : Ca2+イオンとC末端保存配列モチーフの役割
Author(s)	桑原, 克昌
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/739
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

工甲 14879

Family I.3 リパーゼの結晶構造：

Ca^{2+}イオンと C 末端保存配列モチーフの役割

Crystal structure of family I.3 lipase: role of calcium ion and C-terminal conserved sequence motif

大阪大学　大学院　工学研究科

生命先端工学専攻

物質生命工学コース

極限生命工学領域　金谷研究室

桑原　克昌

Family I.3 リパーゼの結晶構造：

Ca^{2+}イオンとC末端保存配列モチーフの役割

Crystal structure of family I.3 lipase: role of calcium ion and C-terminal conserved sequence motif

大阪大学　大学院　工学研究科

生命先端工学専攻

物質生命工学コース

極限生命工学領域　金谷研究室

桑原　克昌

【目次】

【序論】
【第 1 章】*Pseudomonas* sp. MIS38 由来 family I.3 リパーゼの結晶構造解析
1-1.　はじめに
1-2.　実験材料および方法
　1-2-1.　菌体、プラスミド
　1-2-2.　分泌による大量生産と精製
　1-2-3.　結晶化条件の探索
　1-2-4.　X 線回折データの収集
　1-2-5.　PML 変異体構築と重原子誘導体化
　1-2-6.　構造解析
　1-2-7.　Protein Data Bank accession number
1-3.　実験結果および考察
　1-3-1.　精製および PML の結晶化
　1-3-2.　PML の Pt 誘導体化
　1-3-3.　X 線回折
　1-3-4.　全体構造
　1-3-5.　N 末端触媒ドメインの Ca^{2+}イオン結合サイト
　1-3-6.　lid 構造
　1-3-7.　β ロールモチーフ構造
1-4.　要約

【第 2 章】N 末端触媒ドメインの Ca^{2+}イオンの役割
2-1.　はじめに
2-2.　実験材料および方法
　2-2-1.　菌体、プラスミド
　2-2-2.　プラスミド構築
　2-2-3.　分泌確認および大量精製
　2-2-4.　CD スペクトル
　2-2-5.　酵素活性
　2-2-6.　熱安定性
　2-2-7.　結晶化、X 線回折データ収集、および構造解析
　2-2-8.　Protein Data Bank accession numbers
2-3.　実験結果
　2-3-1.　変異体タンパク質の作製
　2-3-2.　CD スペクトル
　2-3-3.　D157A-PML および D337A-PML の結晶構造
　2-3-4.　酵素活性
　2-3-5.　熱安定性
2-4.　考察

2-4-1.　Ca1 サイト
2-4-2.　Ca2 サイト
2-4-3.　Ca3 サイト
2-5.　要約

【第 3 章】C 末端保存配列モチーフの役割
3-1.　はじめに
3-2.　実験材料および方法
3-2-1.　菌体、プラスミド
3-2-2.　変異導入
3-2-3.　大量生産および精製
3-2-4.　菌体外分泌
3-2-5.　CD スペクトル
3-2-6.　PMLΔ10 の結晶化、X 線回折データ収集、および構造解析
3-2-7.　酵素活性
3-2-8.　熱安定性
3-2-9.　尿素変性
3-3.　実験結果および考察
3-3-1.　変異体設計
3-3-2.　PML および PML 変異体の菌体外分泌
3-3-3.　PML および PML 変異体の大量生産と精製
3-3-4.　PMLΔ10 の結晶構造
3-3-5.　PML および PML 変異体の酵素活性
3-3-6.　PML および PML 変異体の熱安定性
3-3-7.　PML および PML 変異体の尿素変性に対する安定性
3-3-8.　C 末端モチーフの役割
3-4.　要約

【総括】

【参考文献】

【本研究に関する論文】

【その他の論文】

【謝辞】

【序論】

リパーゼ（E.C. 3.1.1.3）とは、水溶液中でモノ、ジ、トリグリセリドを脂肪酸とアルコールに加水分解する酵素のことで、細菌から真核生物まで様々な生物に普遍的に存在する。また有機溶媒中では、エステル化やアルコール分解など様々な反応を触媒する。更に、リパーゼの中には、高い位置選択性や光学選択性を有するものがあり、純度の高い化合物の有機合成などに利用されている。近年、リパーゼを用いるバイオディーゼル燃料の生産が注目を集めている。地球温暖化防止対策の強化が求められている中で、バイオマス由来の燃料は、化石燃料を使用しない特性を持った燃料として、その実用化、普及が期待されている。バイオディーゼル燃料は軽油を燃料とするディーゼルエンジンでそのまま使えるなどのメリットがある。現在、バイオディーゼル燃料は化学触媒を用いてが生産されているが、この製法には副生成物のグリセリンおよび生成物の洗浄に多額のコストを要するなどの欠点がある。そこで代替案として、リパーゼを用いてバイオディーゼル燃料を生産する研究が行われている。リパーゼを用いる場合、バージンオイルだけでなく、油脂関連廃棄物からバイオディーゼル燃料を生産できるという利点がある。

一般に良く用いられているリパーゼのほとんど全ては、菌体外に分泌される真菌または細菌由来のリパーゼである（Jeager and Reetz, 1998）。これらのリパーゼは、大量生産や遺伝子の取り扱いの簡便さから、バイオテクノロジーの分野で幅広く用いられている。細菌由来リパーゼは、アミノ酸配列や生物学的な特性の違いから 8 つのファミリー（Family I～VIII）に分類されている（Arpigny and Jeager, 1999）。これらのファミリーの中で、Family I は最も大きなグループで、更に 7 つのサブファミリーに分類される（Table 1）。その中

で Family I.1、Family I.2 そして Family I.3 はグラム陰性菌由来真正リパーゼ（true lipase）として知られている。

Table 1 Classification of bacterial lipases constituting Family I

Family	Enzyme-producing strain	Accession no.	Similarity (%)	
			Family	Subfamily
I.1	*Pseudomonas aeruginosa* (LipA)*	D50587	100	
	Pseudomonas fluorescens C9	AF031226	95	
	Vibrio cholerae	X16945	57	
	Pseudomonas aeruginosa (LipC)	U75975	51	
	Acinetobacter calcoaceticus	X80800	43	
	Pseudomonas fragi	X14033	40	
	Pseudomonas wisconsinensis	U88907	39	
	Proteus vulgaris	U33845	38	
I.2	*Burkholderia glumae**	X70354	35	100
	*Chromobacterium viscosum**	Q05489	35	100
	*Burkholderia cepacia**	M58494	33	78
	Pseudomonas luteola	AF050153	33	77
I.3	*Pseudomonas* sp. MIS38	AB025596	9	100
	Pseudomonas fluorescens HU380	AB109033	9	95
	Pseudomonas fluorescens B52 (LipB52)	AY623009	9	92
	Pseudomonas fluorescens B52	M86350	12	76
	Pseudomonas sp. KB700A	AB063391	13	75
	Pseudomonas fluorescens SIK W1	AF083061	14	74
	Pseudomonas fluorescens LS107d2	M74125	14	72
	Serratia marcescens Sr41	D13253	15	61
	Serratia marcescens SM6	U11258	15	61
I.4	*Bacillus subtilis* (LipA)*	M704010	16	100
	Bacillus pumilus	A34992	13	80
	Bacillus licheniformis	U35855	13	80
	Bacillus subtilis (LipB)	C69652	17	74
I.5	*Geobacillus stearothermophillus* L1	U78785	15	100
	Geobacillus stearothermophillus P1	AF237623	15	94
	Geobacillus thermocatenulatus	X95309	14	94
	Geobacillus thermovolerans	AF134840	14	92
I.6	*Staphylococcus aeureus*	M12715	14	100
	Staphylococcus haemolyticus	AF096928	15	45
	Staphylococcus epidermidis	AF090142	13	44
	Staphylococcus hyicus	X02844	15	36
	Staphylococcus xylosus	AF208229	14	36
	Staphylococcus warneri	AF208033	12	36
I.7	*Propionibacterium acnes*	X99255	14	100
	Streptomyces cinnamoneus	U80063	14	50

*: enzymes with known 3D structure

Family I.1 リパーゼと Family I.2 リパーゼは、互いに比較的高いアミノ酸配列の相同性（>30%）を有しており、Type II 分泌システム（T2SS）により分泌される。この分泌システムはタンパク質を2段階で菌体外に分泌する。まずはじめに、タンパク質は不規則な構造のまま N 末端にあるシグナル配列により、Sec システムを介してペリプラズム層へ分泌される。その際、分泌シグナルは Type I シグナルペプチダーゼにより切断され、タンパク質は不規則な構造を保持した状態でペリプラズム層に蓄積する。その後、2 種類の分子シャペロン[Dsb (disulfide bond formation)タンパク質と Lif (lipase foldase)]の働きによりタンパク質は折りたたまれる（Liebeton *et al.*, 2001; Urban *et al.*, 2001; Frenken *et al.*, 1993; El Khattabi *et al.*, 1999）。そして最後に、外膜の secreton を介してタンパク質は構造を形成したままで、菌体外へ分泌される。

・Family I.3 リパーゼ

Family I.3 リパーゼは、Family I.1 リパーゼや Family I.2 リパーゼとのアミノ酸配列相同性は低く（<20%）、Type I 分泌システム（T1SS）により 1 段階で菌体内から菌体外へ分泌される。Family I.3 リパーゼは、Family I.1 リパーゼや Family I.2 リパーゼと異なり C 末端付近に分泌シグナルを有している。Family I.1 リパーゼと Family I.2 リパーゼは幅広い細菌種から見つかっているが、Family I.3 リパーゼは、*Pseudomonas* 属と *Serratia* 属からしか見つかっていない。最初に単離精製され諸特性解析された Family I.3 リパーゼは、*P. fluorescens* LS107d2（Johnson *et al.*, 1993）、*P. fluorescens* B52（Tan and Miller, 1992）、*S. marcescens* Sr41 (Akatsuka *et al.*, 1994)、*P. fluorescens* SIK W1（Lee *et al.*, 1993）、および *S. marcescens* SM6（Li *et al.*, 1995）由来リパーゼである。その後、*Pseudomonas* sp. MIS38（Amada *et al.*, 2000）、

Pseudomonas sp. KB700A（Rashid *et al.*, 2001）、*P. fluorescens* HU380（Kojima *et al.*, 2003）由来リパーゼも続いて報告された。

当研究室では、*Pseudomonas* sp. MIS38 由来リパーゼ（PML）を Family I.3 リパーゼの生化学的知見を得るためのモデルタンパク質として用いている。Fig 1 には PML と相同性の高い Family I.3 リパーゼのアミノ酸配列のアライメントを示している。

・Type I 分泌システム

Type I 分泌システム（T1SS）は、タンパク質をグラム陰性細菌の菌体内から菌体外へ 1 段階で分泌させるシステムで、3 種類のサブユニットから構成されている。それは、ATP 結合モチーフを有する ATP-binding cassette（ABC）ータンパク質、membrane fusion (MF) - タンパク質、そして outer membrane（OM）タンパク質で、これらが細胞膜上でチャネルを構成することにより分泌システムとして機能する。本研究で用いている T1SS はリパーゼに特異的な *S. marcescens* SM8000 由来 Lip システムである。この Lip システムにおいては、LipB が ABC タンパク質に、LipC が MF タンパク質に、LipD が OM タンパク質に対応する。

T1SS により分泌されるタンパク質は、Family I.3 リパーゼ以外に、*Escherichia coli* 由来 hemolysin（Felmlee *et al.*, 1987）、*Pasteurella haemolytica* 由来 leukotoxin（Lo *et al.*, 1987）、*Bordetella pertussis* 由来 cyclolysin（Galser *et al.*, 1988）、*Rhizobium leguninosarum* 由来 Ca^{2+}結合タンパク質（Economou *et al.*, 1990）、*S. marcescens* 由来ヘム獲得タンパク質（HasA）（Létoffé *et al.*, 1994）、*Erwinia chrysanthemi* 由来 protease B（Delepelaire *et al.*, 1989）、*P. aeruginosa* 由来アルカリプロテアーゼ（$AprA_{PA}$）

(Duong *et al.*, 1992)、*S. marcescens* 由来メタロプロテアーゼ（$PrtA_{SM}$）(Braunagel *et al.*, 1990) などがある。

```
MIS38       MGVYDYKNFGTADSKALFSDAMAITLYSYHNLDNGFAAGYQHNGFGLGLPATLVTALLGG 60
SM6         MGIFSYKDLDENASKALFSDALAISTYAYHNIDNGFDEGYHQTGFGLGLPLTLITALIGS 60
Sr41        MGIFSYKDLDENASKALFSDALAISTYAYHNIDNGFDEGYHQTGFGLGLPLTLITALIGS 60
SIK W1      MGVFDYKNLGTEASKTLFADATAITLYTYHNLDNGFAVGYQQHGLGLGLPATLVGALLGS 60
B52         MGIFDYKNLGTEGSKTLFADAMAITLYSYHNLDNGFAVGYQHNGLGLGLPATLVGALLGS 60
LS107d2     MGVFDYKNLGAEGSKALFADAMAITLYTYHNLDNGFAVGYQHNGLGLGLPATLVGALLGS 60
            **::.**::.   **:**:** **: *:***:**** **:: *:***** **: **:*.

MIS38       TDSQGVIPGIPWNPDSEKLALDAVKKAGWTPITASQLGYDGKTDARGTFFGEKAGYTTAQ 120
SM6         TQSQGGLPGLPWNPDSEQAAQEAVNNAGWSVISATQLGYAGKTDARGTYYGETAGYTTAQ 120
Sr41        TQSQGGLPGLPWNPDSEQAAQDAVNNAGWSVIDAAQLGYAGKTDARGTYYGETAGYTTAQ 120
SIK W1      TDSQGVIPGIPWNPDSEKAALDAVHAAGWTPISASALGYGGKVDARGTFFGEKAGYTTAQ 120
B52         TDSQGVIPGIPWNPDSEKAALEAVQKAGWTPISASALGYAGKVDARGTFFGEKAGYTTAQ 120
LS107d2     SDSQGVIPGIPWNPDSEKAALEAVQHAGWTPITASALGYTGKVDARGTFFGEKPGYTTAQ 120
            ::*** :**:*******: * :**: ***: * *: *** **.*****::**..******

MIS38       VEILGKYDAQGHLTEIGIAFRGTSGPRENLILDSIGDVINDLLAAFGPKDYAKNYVGEAF 180
SM6         AEVLGKYDSEGNLTAIGISFRGTSGPRESLIGDTIGDVINDLLAGFGPKGYADGYTLKAF 180
Sr41        AEVLGKYDSEGNLTAIGISFRGTSGPRESLIGDTIGDVINDLLAGFGPKAMRR-YTLKAF 179
SIK W1      AEVLGKYDDAGKLLEIGIGFRGTSGPRESLITDSIGDLVSDLLAALGPKDYAKNYAGEAF 180
B52         VEVLGKYDDAGKLLEIGIGFRGTSGPRETLISDSIGDLISDLLAALGPKDYAKNYAGEAF 180
LS107d2     VEVLGKYDDAGKLLEIGIGFRGTSGPRESLISDSIGDLVQRSARGPGAQGLREKLRRRTF 180
            .*:*****  *:*  ***.*********.** *:***::.    . *.:        .:*

MIS38       GNLLNDVVAFAKANGLSGKDVLVSGHSLGGLAVNSMADLSGGKWGGFFADSNYIAYASPT 240
SM6         GNLLGDVAKFAQAHGLSGEDVVVSGHSLGGLAVNSMAAQSDANWGGFYAQSNYVAFASPT 240
Sr41        GNLLGDVAKFAQAHGLSGEDVVISGHSLGGLAVNSMAAQSDATWGGFYAQSNYVAFASPT 239
SIK W1      GGLLKTVADYAGAHGLSGKDVLVSGHSLGGLAVNSMADLSTSKWAGFYKDANYLAYASPT 240
B52         GGLLKNVADYAGAHGLTGKDVVVSGHSLGGLAVNSMADLSNYKWAGFYKDANYVAYASPT 240
LS107d2     GGLLKNIADYASAHGLSGHEVVVSGHSLGGLAVNSMADLSNGKWAGFFKDAKYVAYASPT 240
            *.**  :. :* *:**:*.:*::*************  *  .*.**: :::*:*:****

MIS38       Q-SSTDKVLNVGYENDPVFRALDGSTFTGASVGVHDAPKESATDNIVSFNDHYASTAWNL 299
SM6         QYEAGGKVINIGYENDPVFRALDGTSLTLPSLGVHDAPHTSATNNIVNFNDHYASDAWNL 300
Sr41        QYEAGGKVINIGYENDPVFRALDGTSLTLPSLGVHDAPHTSATNNIVNFNDHYASDAWNL 299
SIK W1      Q-SAGDKVLNIGYENDPVFRALDGSTFNLSSLGVHDKAHESTTDNIVSFNDHYASTLWNV 299
B52         Q-SAGDKVLNIGYENDPVFRALDGSSFNLSSLGVHDKPHESTTDNIVSFNDHYASTLWNV 299
LS107d2     Q-SSGDKVLNVGYENDPVFRALDGSSVNWSSLGVHDKPHESTTDNIVSFNDHYASTLWNV 299
            * .: .**:*:**************:::.. .*:**** .: *:*:***.*******  **:

MIS38       LPFSILNIPTWISHLPTAYGDGMNRIIESKFYDLTSKDSTIIVANLSDPARANTWVQDLN 359
SM6         LPFSILNIPTWLSHLPFFYQDGLMRVLNSEFYSLTDKDSTIIVSNLSNVTRGNTWVEDLN 360
Sr41        LPFSILNIPTWLSHLPFFYQDGLMRVLNSEFYSLTDKDSTIIVSNLSNVTRGSTWVEDLN 359
SIK W1      LPFSIANLSTWVSHLPSAYGDGMTRVLESGFYEQMTRDSTIIVANLSDPARANTWVQDLN 359
B52         LPFSIVNLPTWVSHLPTAYGDGMTRILESGFYDQMTRDSTVIVANLSDPARANTWVQDLN 359
LS107d2     LPFSITNLPTWISHLPTGYGDGMTRVLESGFYEVMTRDSTIIVSNLSDPARANTWVQDLN 359
            ***** *:.**:****  * **: *:::* **.   :***:**:***: :*..***:***

MIS38       RNAETHKGSTFIIGSDSNDLIQGGSGNDYLEGRAGNDTFRDGGGYNVILGGAGNNTLDLQ 419
SM6         RNAETHSGPTFIIGSDGNDLIKGGKGNDYLEGRDGDDIFRDAGGYNLIAGGKGHNIFDTQ 420
Sr41        RNAETHSGPTFIIGSDGNDLIKGGKGNDYLEGRDGDDIFRDAGGYNLIAGGKGHNIFDTQ 419
SIK W1      RNAEPHTGNTFIIGSDGNDLIQGGKGADFIEGGKGNDTIRDNSGHN---------- 405
B52         RNAEPHKGNTFIIGSDGNDLIQGGNGADFIEGGKGNDTIRDNSGHN---------- 405
LS107d2     RNAEPHKGDTFIIGSAGNDLIQGGKGADFIEAGKGNDTIRDSSGHN---------- 405
            ****.*.* ****** .****:**.* *::*.  *:* .:** .*:*   .. . .  . .

MIS38       KSVNTFDFANDGAGNLYVRDANGGISITRDIGSIVTKEPGFLWGLFKDDVTHSVTASGLK 479
SM6         QALKNTEVAYDG-NTLYLRDAKGGITLADDISTLRSKE--TSWLIFNKEVDHQVTAAGLK 477
Sr41        QALKNTEVAYDG-NTLYLRDAKGGITLADDISTLRSKE--TSWLIFSKEVDHQVTAAGLK 476
SIK W1      ------------------------------------------------------------
B52         ------------------------------------------------------------
LS107d2     ------------------------------------------------------------
            .: .. . : ..:..    .:... : : . .:  :....      ...   . :::. .

MIS38       VGSNVTQYDASVKGTNGADTLKAHAGGDWLFGLDGNDHLIGGVG-NDVFVGGAGNDLMES 538
SM6         SDSGLKAYAAAT-GGDGDDVLQARSHDAWLFGNAGNDTLIGHAGGNLTFVGGSGDDILKG 536
Sr41        SDSGLKAYAAATTGGDGDDVLQARSHDAWLFGNAGNDTLIGHAGGNLTFVGGSGDDILKG 536
SIK W1      ------------------------------------------------------------
B52         ------------------------------------------------------------
LS107d2     ------------------------------------------------------------
             .:. .   :: .. .. .  .: : .    .  ...   .  . .    ..:...  ..

MIS38       GGGADTFLFNGAFGQDRVVGFTSNDKLVFLGVQGVLPNDDFRAHASMVGQDTVLKFGGDS 598
SM6         VGNGNTFLFSGDFGRDQLYGFNASDKLVFIGTEG--ASGNIRDYATQQNDDLVLAFGHSQ 594
Sr41        VGNGNTFLFSGDFGRDQLYGFNATDKLVFIGTEG--ASGNIRDYATQQNDDLVLAFGHSQ 594
SIK W1      -----TFLFSGHFGQDRIIGYQPTDRLVFQGAD---GSTDLRDHAKAVGADTVLSFGADS 457
B52         -----TFLFSGHFGNDRVIGYQPTDKLVFKDVQ---GSTDLRDHAKVVGADTVLTFGADS 457
LS107d2     -----TFLFSGQFGQDRIIGYQPTDKLVFTDVQ---SSGDYRDHAKVVGGDTVISFGGDS 457
             ....****.* **.*:: *: ..*:*** ..:.   . : * :*.  . * *: ** ..

            R1 R2 R3 R4 R5 R6
MIS38          LVGVALNSLSADGIVIA 617
SM6         VTLIGVSLDHISTDQVVLA 613
Sr41        VTLIGVSLDHFNPDQVVLA 613
SIK W1         VG GLGGLWSEGVLIS 476
B52         VTLVGVGHGGLWTEGVVIG 476
LS107d2     VTLVGV -VGLSGEGIVIS 474
            ***:**.    :  : :::.
```

Fig 1. Amino acid sequences of representative members of Family I.3 lipase. The amino acid sequences of lipases from *Pseudomonas* sp. MIS38 (MIS38), *S. marcescens* Sr41 (Sr41), *P. fluorescens* SIK W1 (SIK W1), *P. fluorescens* B52(Lip52) (B52), *P. fluorescens* LS107d2 (LS107d2) are aligned using the program CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). The consensus GxSxG sequence, containing the active-site serine residue, is boxed by broken line. The amino acid residues forming a catalytic triad, Ser, Asp, and His, are highlighted in black. The repetitive nine-residue sequence motif, GgxGxDxux, is boxed by solid line. A putative C-terminal secretion signal (R1-R6) is shaded (Omori *et al.*, 2001). The cleavage site with limited chymotryptic digestion (Amada *et al.*, 2000) is shown in solid arrowhead. Numbers represent the positions of the amino acid residues that start from the initiator methionine residue for each protein. The GenBank accession numbers for these sequences are summarized in Table 1

これらのタンパク質はN末端に分泌シグナルを持たず、C末端から50～60残基内に分泌シグナルを有している(Ghigo *et al.*, 1994; Hess *et al.*,1990; Stanley *et al.*, 1991; Baumann *et al.*, 1993; Miyajima *et al.*, 1998)。このC末端分泌シグナルは、N末端分泌シグナルとは異なり分泌後切断されない。更にこれらのタンパク質には、C末端分泌シグナルの上流にRTX (Repeat In Toxin)モチーフと呼ばれる9残基GGxGxDxuxからなる繰り返し配列モチーフがある。$AprA_{PA}$ (Baumann *et al.*, 1993; Miyatake *et al.*,1995) と $PrtA_{SM}$ (Baumann, 1994; Hamada *et al.*,1996) の結晶構造が決定されたことで、このRTX繰り返し配列はβロール構造を形成し、そこに5～6個の Ca^{2+}イオンが結合することが明らかになった。このモチーフは最初の6残基はループを、最後の3残基はβ鎖を形成する。そしてβ鎖どうしは平行βシートを形成し、Ca^{2+}イオンはらせん構造のループとループの間に規則正しく結合する (Fig 2.)。

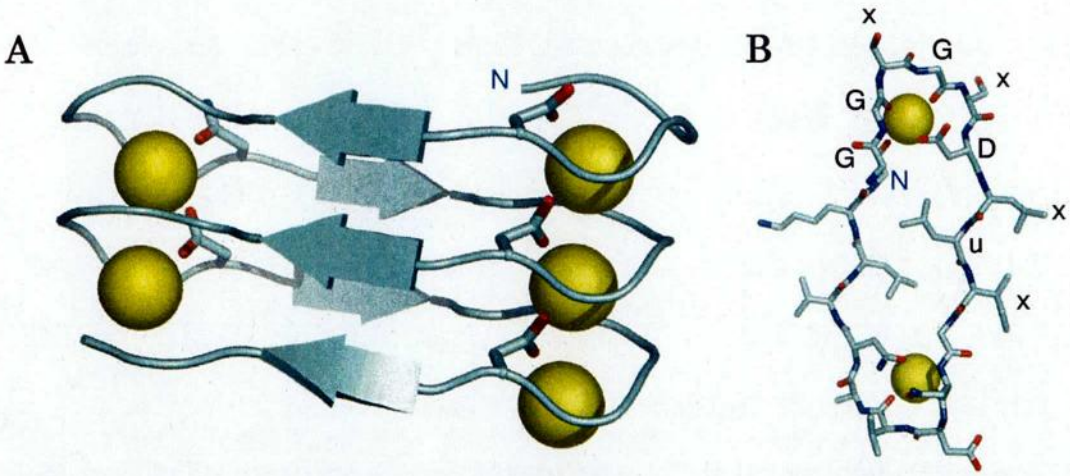


Fig 2. (A) Side view of a β-roll structure. The β-roll structure formed by residues 333-379 (five repeats of GGxGxDxux) of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease (PDB ID 1AKL) is drawn by the program PyMol. The first six residues (GGxGxD) form a loop that binds Ca^{2+} ions and the last three residues (xux) form a short β-strand. The β-strands and internally bound Ca^{2+} ions are represented by arrows and spheres, respectively. The side chains of aspartate and asparagines residues, each of which provides two and one side-chain oxygen atoms for Ca^{2+}-coordination, respectively, are shown by stick model. (B) Top view of a β-roll structure. The first turn of the β-roll structure shown in (A) is shown in a stick model

・*Pseudomonas* sp. MIS38 由来リパーゼ（PML）

PML は 617 個のアミノ酸残基からなり、N 末端触媒ドメイン（1～370 残基目）と C 末端ドメイン（371～617 残基目）で構成されている（Amada *te al.*, 2000）。PML の C 末端ドメインには 13 個の RTX 繰り返し配列があり、Ca^{2+} イオン存在下でβロール構造を形成する（Amada *et al.*, 2001）。PML と Lip システムを大腸菌で共発現させると、PML は大腸菌菌体外に分泌される（Kwon *et al.*, 2002）。PML の RTX 繰り返し配列は、PML の分泌や酵素活性に必要であるが、RTX 繰り返し配列の数は PML の分泌能や酵素活性を失うことなしに、6 個まで減らすことができる。しかし、繰り返し配列が 6 個未満になると、PML の分泌量と酵素活性は激減する（Kwon *et al.*, 2002）。実際、*P. fluorescens* SIK

W1 由来リパーゼなどは 6 個の繰り返し配列を有している（Fig 1.）。従って、βロール構造を安定に形成させるためには、最低 6 個の繰り返し配列が必要であると考えられる。また PML の C 末端から 19 残基削除された変異体は菌体外に分泌されず、活性も示さない。さらにこの変異体の菌体内蓄積は見られない（Kwon *et al.*, 2002）。このことから、削除された 19 残基の中に PML の安定性や活性や構造形成に関与する部分があると考えられている。

これまで Family I.3 リパーゼの研究は、主として PML、*P. fluorescens* 由来リパーゼ、および *S. mercescens* 由来リパーゼの菌体外分泌や生化学特性の解析を中心に行われてきた。しかし、これらの Family I.3 リパーゼの三次構造が決定されていないため、これらの生化学諸特性の構造的基盤は明らかにされていない。そのために、例えば以下のような疑問が生じる。(1) 活性に必須の Ca^{2+}イオンは N 末端触媒ドメインのどこに結合するのか？ (2) C 末端ドメインの RTX 繰り返し配列は、どのような構造を形成するのか？ (3) 1 つの PML 分子に何個の Ca^{2+}が結合するのか？ (4) C 末端ドメインの構造形成は、N 末端触媒ドメインの構造形成に影響するのか？

これらの疑問を解決するために、本研究では PML の結晶構造を決定することを目的とした。また、得られた結晶構造に基づき、N 末端触媒ドメインの Ca^{2+}イオン結合サイトの役割や C 末端配列モチーフの役割を解析することを目的とした。

第 1 章では、以前得られた PML の生化学的な解析結果が、どのような構造基盤に基づいているのかを明らかにするために、PML の結晶構造を 1.5Å の分解能で close 構造として決定した。その結果、PML は N 末端触媒ドメインと C 末端ドメインから成ることを明らかにした。また、C 末端ドメインの 13 個

のRTX繰り返し配列がβロールサンドイッチ構造を形成することを明らかにした。βロールサンドイッチ構造は2つのβロールモチーフ構造から成り、5個のRTX繰り返し配列が1つ目の、8個のRTX繰り返し配列が2つ目のβロールモチーフ構造を形成する。1つ目と2つ目のβロールモチーフ構造にはそれぞれ3個と6個のCa^{2+}イオンが結合している。一方、同時期に*S. mercescens* SM6由来リパーゼ（SML）の結晶構造がopen構造として決定された。そこでPMLとSMLの構造を比較したところ、他のリパーゼに見られる典型的なlid1の他にlid2が存在することを発見した。いずれのlidも、close構造では活性部位を覆うように、open構造では活性部位を溶媒に露出させるように、その構造や位置が大きく変化していた。また、N末端触媒ドメインには、open構造でのみ形成されるCa^{2+}イオン結合サイト（Ca1）の他に、2つのCa^{2+}イオン結合サイト（Ca2とCa3）が存在することを明らかにした。Ca2サイトはPMLとSMLに保存されているのに対して、Ca3サイトはPMLのみに存在する。Ca1サイトのCa^{2+}イオンはlid1に結合することによりopen構造を安定化すると考えられた。

第2章では、第1章で発見したCa1～Ca3サイトの役割を解析するために、変異体D157A-、D275A-、D337A-PMLを構築した。D157A-、D275A-、D337A-PMLは、それぞれCa1、Ca2、Ca3サイトが除去されるように設計したが、Ca3サイトの除去に関しては、D337A-PMLの結晶構造を解析することにより確認した。D157A-PMLの結晶構造も決定したが、close構造であったためCa1サイトの除去は確認できなかった。しかし、変異によりPMLの構造がほとんど変化しないことは確認した。Ca2サイトの除去も確認していないが、D275A-PMLのCDスペクトルから変異によりPMLの構造はほとんど変化しな

いと考えられる。それぞれの変異体の活性を調べたところ D157A-PML は微弱なエステラーゼ活性を示すものの、リパーゼ活性は示さなかった。D275A-PML は PML より低いエステラーゼ活性とリパーゼ活性を示した。また D337A-PML はエステラーゼ活性もリパーゼ活性も PML と同等の活性を示した。熱安定性は、CD を用いてタンパク質の 50 %が変性する温度を測定することにより解析したが、D157A-PML の安定性は PML と同じであったのに対して、D275A-PML と D337A-PML の安定性は、いずれも PML より 5℃低下していた。また D157A-PML の安定性は triton X-100 存在下では PML より 1℃低かった。これらの結果から、Ca1 サイトは lid1 を固定して活性部位を完全に開けるのに必要であり、Ca2 と Ca3 サイトは PML の安定化に寄与することを明らかにした。さらに Ca2 サイトは PML の活性中心の構造を最適化するために必要であることを提案した。

第 3 章では、T1SS により分泌される酵素に比較的よく保存されている C 末端モチーフと、その上流にある 5 残基配列モチーフの機能について解析した。なお、PML においては、C 末端モチーフは DGIVIA、5 残基配列モチーフは VTLVG として保存されている。これらのモチーフの機能を調べるために 4 種類の変異体（PMLΔ5、PMLΔ10、2A-PML、そして 3A-PML）を構築した。ここで、PMLΔ5 と PMLΔ10 は、それぞれ C 末端から 5 残基、10 残基削除された変異体であり、3A-PML は C 末端モチーフに三重変異を、2A-PML は 5 残基配列モチーフに二重変異を導入した変異体である。これらの変異体のうち PMLΔ10 の結晶構造を決定したところ、その構造は PML とほぼ同じであった。従って、C 末端の削除により PML の構造は、ほとんど変化しないことを明らかにした。2A-PML と 3A-PML の短波長 CD スペクトルも長波長 CD スペクトル

も PML とほぼ同じであったことから、PML の構造は変異によって大きく変化しないと考えられる。これらの変異体の Lip システムによる分泌レベルを解析したところ、2A-PML の分泌レベルは PML より劇的に減少したが、3A-PML の分泌レベルは PML と同等であった。このことから、PML の分泌に必要なのは C 末端モチーフではなく、5 残基配列モチーフであることを明らかにした。しかしどの変異体も野生化型 PML と同じ活性を示した。また安定性においては、3A-PML、PMLΔ5、そして PMLΔ10 は野生型 PML より不安定化していた。この結果から、PML の C 末端モチーフは安定性に重要であることを明らかにした。

【第１章】

Pseudomonas sp. MIS38 由来 Family I.3 リパーゼの結晶構造解析

1-1. はじめに

序論でも述べたように、Family I.3 リパーゼは Family I.1 または Family I.2 リパーゼとのアミノ酸配列の相同性が極めて低い（<20%）(Arpigny & Jaeger, 1999; Angkawidjaja & Kanaya, 2006)。また、Family I.3 リパーゼは、他のファミリーのリパーゼとは異なり、Type I 分泌システム（T1SS）により 1 段階で直接、細胞質から菌体外へと分泌される(Holland *et al.*, 2005)。この分泌タンパク質が酵素である場合は、分泌タンパク質は通常 N 末端触媒ドメインと C 末端ドメインの 2 つのドメインから成る。C 末端ドメインはその C 末端付近に分泌に必要なシグナルモチーフを有している(Delepelaire, 2004)。また、その上流（N 末端側）に GGxGxDxux（u は、かさ高い疎水性アミノ酸残基を指す）の繰り返し配列を有している。この繰り返し配列は RTX（Repeat In Toxin）と称され、Ca^{2+}イオン存在下で、β ロールモチーフ構造を形成することが知られている(Baumann *et al.*, 1993; Baumann, 1994; Hege & Baumann, 2001; Aghajari *et al.*, 2003)。

PMLも、N末端触媒ドメインとC末端ドメインから成る（Amada *et al.*, 2000)。しかし、PMLは、その構造形成だけでなく酵素活性にもCa^{2+}を必要とする(Amada *et al.*, 2001)。また、C末端ドメインの構造が形成されないと、N末端触媒ドメインの構造も不活性型から活性型に変化せず、プロテアーゼ耐性にもならない(Kwon *et al.*, 2002; Angkawidjaja *et al.*, 2005)。しかし、PMLおよびそのホモログの結晶構造が決定されていないため、活性に必要なCa^{2+}イオンはN末端触媒ドメインのどこに結合するのか、C末端ドメインのRTX繰り返し配列はどのような構造を形成するのか、C末端ドメインの構造形成がどうしてN末端触

媒ドメインの構造形成に影響を与えるのか等まだ明らかにされていない。そこで本章では、PMLの結晶構造を決定することを目的とした。

1-2. 実験材料および方法

1-2-1. 菌体、プラスミド

分泌の宿主として用いる大腸菌DH5 [F^-, *hsdR17*(rk^-, mk^+), *recA1*, *endA1*, *deoR*, *thi-1*, *supE44*, *gyrA96*, *relA1*]はToyobo社から購入した。*S. marcescens* SM8000由来Lipシステム（*lipBCD* 遺伝子）がベクターpACYC184に導入されたプラスミドpYBCD20は田辺三菱製薬の大森謙二様から頂いた（Kawai *et al.*, 1998）。PMLをLipシステムと共発現させ、大量分泌させるためのプラスミドpUC-PMLは当研究室で以前に構築された（Kwon *et al.*,2002）。

1-2-2. 分泌による大量生産と精製

大腸菌DH5をプラスミドpYBCD20で予め形質転換し、更にpUC-PMLを用いて形質転換することにより、LipシステムとPMLを共発現させる形質転換体を作成した。この形質転換体を50 mg/Lのアンピシリンと30 mg/Lのクロラムフェニコールを含むLB培地（1%バクトトリプトン、0,5%バクト酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム）中で30℃、24時間振とう培養した。培養終了後、培養液を4℃で、10,000 gで30分間遠心し、菌体と培養上精に分離した。この培養上精を回収し、これに1/20（v/v）の2 M Tris-HCl（pH 8.0）を添加して均一になるように攪拌し、更に終濃度80%相当量の硫酸アンモニウムを添加した。この溶液を更に10,000 gで30分間遠心分離し、沈殿物を5%グリセロール、10 mM塩化カルシウムを含む50 mM Tris-HCl（pH8.0）緩衝液で溶かし、この溶液を上記緩衝液に対して一晩透析した。この透析物を25,000 gで30分遠心して、沈殿と上精に分離し、この上精をHiTrap Q HPカラム（GE Healthcare）に供し、フロースルーを回収した。この溶液をCentriplus YM-50（Millipore）を用いて限

外ろ過して濃縮した。この濃縮液を5mM 塩化カルシウムを含む5 mM Tris-HCl (pH 8.0) の緩衝液で平衡化させたHiLoad 16/60 Superdex 200ゲルろ過カラム (GE Healthcare) に供した。PMLを含む画分を回収し、Centriplus YM-50を用いて、タンパク質濃度が約10 mg/mLになるまで濃縮し、Ultrafree-MC (Millipore) によりろ過した。タンパク質濃度は、280nmにおけるTyrとTrpのε値 1490 $M^{-1}cm^{-1}$、5500 $M^{-1}cm^{-1}$を用いて算出した吸光係数 $A_{280}^{0.1\%}$ =1.14を用いて決定した (Pace *et al.*, 1995)。精製タンパク質の純度の検定は15% SDS-PAGEを用いて、クマシーブルー染色にて行なった。

1-2-3. 結晶化条件の探索

まず、Hampton Research社のcrystallization kit (Crystal Screens I, II) とEmerald Biostructures社のcrystallization kit (Wizard I, II) を用いて結晶化条件の探索を行なった。結晶化条件の探索は4℃、10℃、20℃の温度条件下、96-well Corning CrystalEX Microplates (Hampton Research) を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により行なった。結晶化ドロップは1 μLのタンパク質溶液と、結晶化リザーバー溶液1 μLを混合して調製し、100 μLのリザーバー溶液に対して蒸気拡散平衡化させた。1週間後、4 ℃の条件の下、Wizard IのNo. 7 (0.1 M MES pH 6.0, 10 % PEG 8000, 0.2 M 酢酸亜鉛) に小さな針状の結晶が得られた。そこで、4℃で緩衝液のpHや金属イオンの濃度や種類を変えて最適化を行なったところ、2 μLのタンパク質溶液と1 μLの最適化されたクリスタラント溶液 (0.1M MES pH6.0, 10% PEG 20000, 0.2 M 酢酸カルシウム, 5 mM 酢酸亜鉛) を混合して調製し、300 μLのリザーバー溶液 (0.1 M MES pH 6.0, 5 % PEG 20000, 0.2 M 酢酸カルシウム, 5 mM 酢酸亜鉛) に対してハンギングドロップ蒸気拡散法によりX線回折データ収集に適した結晶が得られ

た。

1-2-4. X線回折データの収集

X線回折データの収集は、SPring-8のビームラインBL38B1のシンクロトロン放射光で行なった。データ収集の前に、結晶をCryoLoop（Hampton Research）にマウントし、20%エチレングリコールを含むクリスタラント溶液に浸した後、-173℃の窒素ガスを吹き付けた状態で、0.9Åの波長でデータ収集を行なった。得られたDiffractionデータはHKL-2000を用いてまとめ、スケーリングを行なった。

1-2-5. PML変異体構築と重原子誘導体化

もし目的タンパク質のX線結晶構造解析を行なう前に、目的タンパク質と相同性の高い別のタンパク質の構造が決定されていれば、目的タンパク質の位相決定は、決定されたタンパク質の構造を鋳型に分子置換法により決定することができる。しかし本研究で用いたPMLのホモログの結晶構造はまだ決定されていないので、PMLの結晶構造を決定するためには重原子同型置換法を用いる必要がある。この方法では、ネイティブの結晶の他に重原子を組み込んだ同型置換体結晶を調製する。ついで、両方の結晶に同じ波長のX線を当て、重原子を組み込むことによる回折強度変化を利用して重原子の位置を決め、それをもとにタンパク質の構造を決める。しかし重原子を含む溶液にネイティブの結晶を浸す方法では、重原子を組み込んだ同型置換体結晶は得られなかった。なぜならPMLの結晶は重原子と特異的に結合せず、時には重原子溶液に結晶を浸して放置すると、結晶が壊れてしまったからである。そこでPMLに重原子結合サイトを導入するために、システイン変異法を採用した。以前、セリンをシステインに置換することにより高い効率で重原子をタンパク質に結合させるこ

とができることが報告されている（Dao-Pin *et al.*, 1987）。しかし、PML には 45 個のセリン残基があるため、どの位置の置換が誘導体化に適しているかを、1 つづつシステインに置換した変異体を構築することにより解析することは大変困難と思われた。そこで 12 個のセリン残基（Ser95, Ser144, Ser220, Ser242, Ser270, Ser312, Ser335, Ser384, Ser445, Ser472, Ser538, Ser608）をランダムに選択し、これら 12 個のセリン残基をそれぞれ QuickChange Ⅱ Site-Directed Mutagenesis Kit（Agilent Technologies）を用いて部位特異的にシステイン残基に置換した。それぞれの変異体の塩基配列は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）により確認した。また変異体の精製、結晶化法は野生型 PML と同様に行なった。

システイン変異体の結晶を、40mM K_2PtCl_4 を含むクリスタラント溶液に 1 週間ソーキングし、Pt による誘導体化を行なった。ソーキング終了後は結晶を、20%エチレングリコールを含むクリスタラント溶液に浸した。12 個のシステイン変異体の中で、S445C だけが特異的に Pt で誘導体化されていることがパターソンマップから分かった。重原子誘導体のデータ収集はネイティブの結晶と同様に行なった。

1-2-6. 構造解析

まず S445C-PML の結晶の Pt 誘導体の構造を、単一重原子同型置換法（SIRAS）により HKL2MAP（Pape *et al.*, 2004; Sheldrick *et al.*, 1997）を用いて決定した。そして ArpWarp（Perrakis *et al.*, 1999）を用いてモデルを自動的に作成した。モデルの精密化は CCP4（Collaborative *et al.*, 1994）の REFMAC を用いて行い、更に COOT（Emsley *et al.*, 2004）を用いて修正し、完了した。データ収集および精密化の統計値は Table1-1 に示す。タンパク質構造の図は

PyMol を用いて作成した。

Table 1-1. Statistics on data processing and structure determination[c]

	Native wild-type	Pt-derivative S445C
Space group	$P2_1$	$P2_1$
Unit cell	a = 49.972, b = 84.300, c = 86.849	a = 49.879, b = 84.404, c = 87.012
Wavelength (Å)	0.9	1.071784
Resolution range (Å)	50.00–1.48 (1.53–1.48)	50.0–1.80 (1.86–1.80)
Unique reflections	118,695	65,946
Redundancy	7.2 (5.8)	7.2 (6.3)
Completeness	96.9 (79,.3)	95.9 (82.5)
I/σ	38.3 (3.8)	26.9 (3.4)
R_{merge}[a] (%)	5.5 (33.3)	7.4 (29.8)
Refinement statistics		
Resolution range (Å)	37.08–1.48	
No. of reflections	107,798	
Cutoff	None	
R-value (%)	17.7	
Free R-value[b] (%)	19.4	
No. of protein atoms	4553	
No. of solvent atoms	769	
Rms deviations from ideal values		
Bond lengths (Å)	0.008	
Bond angles (°)	1.175	
Ramachandran plot statistics. Percentage of residues in regions:		
Most favored	91.8	
Additionally allowed	7.4	
Generously allowed	0.8	
Disallowed	0.0	

[a]$R_{merge}=\Sigma \mid I_{hkl}-(I_{hkl}) \mid / \Sigma I_{hkl}$..

[b]Free R-value was calculated using 5% of reflections omitted from the refinement.

[c]Numbers in parentheses are for the highest resolution shell.

1-2-7. Protein Data Bank accession number

解析したPMLの構造座標および構造因子はProtein Data Bankに登録した。(PDB code: 2Z8X)

1-3. 実験結果および考察

1-3-1. 精製およびPMLの結晶化

以前の研究で、Lipシステムを導入した大腸菌を用いて培養液1Lあたり25 mgのPMLを、菌体外に大量に分泌させることに成功している。そこで、培養上精を硫安沈殿した後、沈殿物を再溶解させて一晩透析した。この透析された溶液を陰イオン交換カラムに供したところ、ほとんどの培地成分はこのカラムに吸着したが、PMLは吸着されなかった。ゲルろ過カラムに、このフロースルー画分を供して、PMLのフラクションを回収し、SDS-PAGEによりタンパク質溶液の純度を見積もったところ95%以上の純度でPMLを得ることができた（Fig 1-1）。

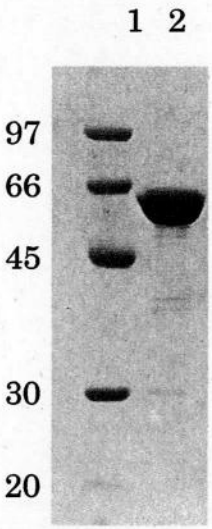


Fig1-1. SDS-PAGE of PML. Sample were subjected to electrophoresis on 12% polyacrylamide gel in the presence of SDS. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1, low-molecular-weight marker kit (GE Healthcare); lane 2, purified PML. Numbers along the gel represent the molecular weights in kDa of the standard proteins.

精製されたPMLの収量は、培養液1Lから約5 mgであった。またPMLの分子量はSDS-PAGEおよびゲルろ過による算出により、65 kDaと見積もられた。

最初のPMLの結晶化スクリーニングでは、セットしてから7から10日

後に針状の結晶が得られたが、X線回折には適していなかった。そこで結晶化条件を再検討し、最適条件を探索したところ、良い結晶がセットしてから数週間後に出現し、1ヵ月後には0.3×0.2×0.05 mmの大きさまで成長した(Fig. 1-2)。

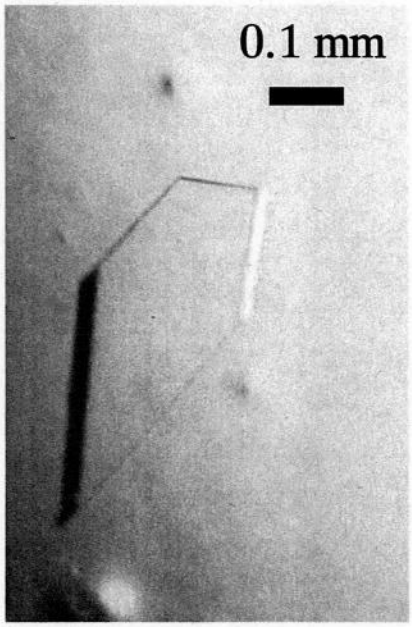


Fig 1-2 Crystal of PML grown by the hanging-drop vapor-diffusion method. The approximate dimensions of the crystal are 0.3×0.2×0.05 mm

1-3-2. PMLのPt誘導体化

PMLのSer445をCysに置換した変異体S445C-PMLの結晶を、40 mM K_2PtCl_4を含むクリスタラント溶液に1週間ソーキングし、Ptによる誘導体化を行なった。すると結晶は薄い黄色に変色した。これはPtが結晶中に存在していることを示している。そこで、X線回折を行なう前に、誘導体の結晶を20%エチレングリコールを含むクリスタラント溶液に30分間浸した。そして、その結晶に-173℃の窒素ガスを吹き付けた状態で、多波長X線を照射すると同時に、蛍光でX線の重原子の自由電子による散乱波長を観察、測定することにより、結晶中でS445C-PMLがPtにより誘導体化されていることを確認した。

1-3-3. X線回折

ネイティブの結晶を用いて、1.5Å分解能のX線回折データを取得した。Measured reflectionsは553,967点あり、そのうちUnique reflectionsは118,695点、R_{merge}は5.5%であった。空間群は$P2_1$に属し、格子定数は、a=49.972、b=84.300、c=86.849であった。分子量と空間群に基づき、結晶は非対称単位中に一分子のタンパク質を含んでいると仮定でき、V_M値は2.73 $Å^3Da^{-1}$、溶媒含量は55%と計算された。

S445C-PMLのPt誘導体に関しては、1.7Åの分解能で回折し、1.8Åの分解能でスケーリングを行なった。この結晶の空間群や各パラメータはネイティブの結晶の結果と似ていたが、これはS445C-PMLの分子のパッキングや配向性がネイティブの結晶と同じであることを示している。

1-3-4. 全体構造

システイン変異体のPt誘導体を用いたSIRAS法により、PMLの結晶構造を1.5Åの分解能で決定した。N末端のメチオニン残基を除き、PMLの全てのアミノ酸残基の電子密度を観察できた。PMLはαヘリックスが多いN末端ドメインと、β構造が多いC末端ドメインから構成されていた（Fig1-3A）。一方、同時期に、PMLと同じサブファミリー属する*S. marcescens*由来リパーゼ（SML）の結晶構造が決定された（Meier *et al.,* 2007）。PMLとSMLのアミノ酸配列の相同性は61%で、SMLもPMLと同様にN末端触媒ドメインとC末端RTXドメインから構成されている。SMLの触媒ドメインのlidはopen構造を形成しており、1個のCa^{2+}イオン（Ca1）により固定されている。一方、PMLの結晶構造はclose構造として決定された。PMLとSMLのlidがそれぞれclose構造とopen構造を形成した理由は、PMLとSMLの結晶構造がtriton-X100非存在、存在下で決定され

たためである。これら2つの結晶構造を比較することにより、PMLもSMLもリパーゼに通常存在するlid（lid1）以外に、もう1つのlid（lid2）を有していた。また、close構造では、これらのlidの位置や構造が活性中心を覆うことができるように大きく変化していた。PMLの構造はclose構造で決定されたためCa1サイトは見られなかった。しかし、SMLの構造はlid構造を除くとPMLの構造とよく似ており（Fig 1-3B)、両者のα炭素のRMSD値は、分子全体では0.7Å、活性中心では0.15Åであった。またPML分子の他に、10個のCa^{2+}、2個のZn^{2+}、そして769個の水分子の電子密度が観察された。Zn^{2+}イオンはタンパク質分子の接合部分に位置し、それぞれが2個のタンパク質分子に配位している。つまりこれらのZn^{2+}イオンは結晶形成に必要であることを示している。

1-3-5. N末端触媒ドメインのCa^{2+}イオン結合サイト

PMLのN末端触媒ドメインには、SML同様に2個のCa^{2+}イオン結合サイトがある。その1つはCa2としてSMLに保存されているが、もう1つのサイトは保存されていない。SMLのopen構造の保持に必要なCa^{2+}イオン結合サイト（Ca1）はPMLにも存在するはずであるが、今回決定したPMLの結晶構造はclose構造であるため、このCa1サイトは形成されていないと考えられる。よってPMLのclose構造にある2つのCa^{2+}イオン結合サイトを、それぞれCa2、Ca3サイトと命名した。Ca3サイトではCa^{2+}イオンが、Asp283、Asp337の側鎖のO原子、Lys278、Ala281の主鎖のO原子そして2個の水分子と7座配位している。しかし、SMLにCa3サイトが存在しないのは、このサイトを構成するアミノ酸残基があまり良く保存されていないためと思われる。

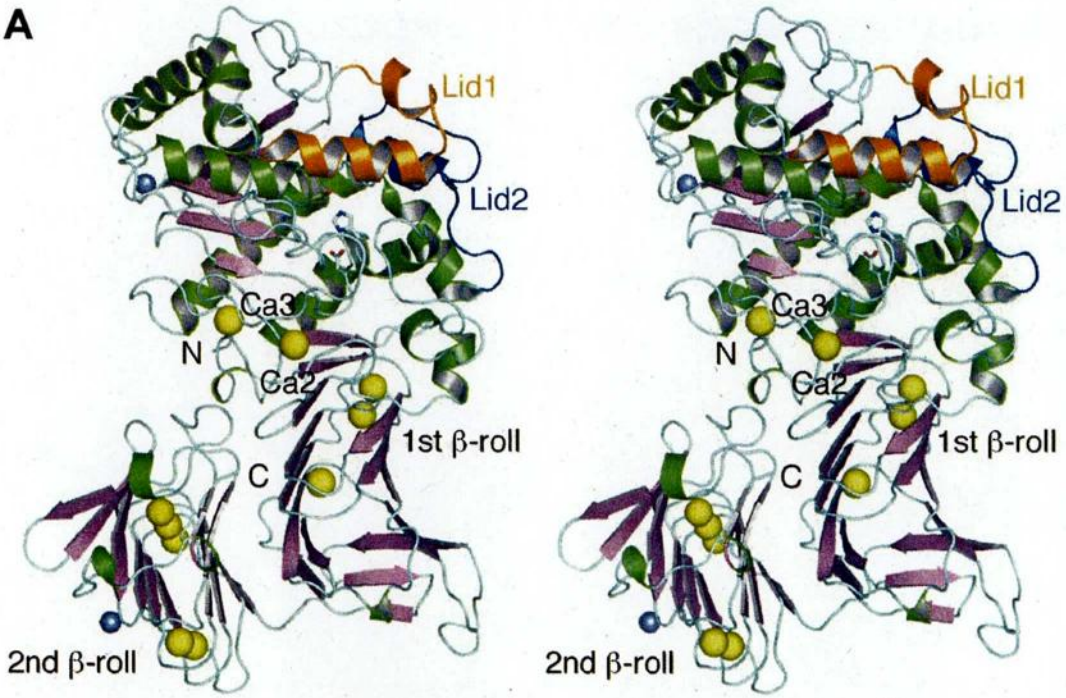
1-3-6. lid構造

PMLとSMLの構造を比較すると、ヘリックスα6構造（lid1）とヘリックスα3を含む領域は大きく異なっている。lid1（PMLでは、146～167残基目）は、リパーゼに通常存在するlidに対応する。lid1はPMLの構造ではヘリックスの途中で鋭く折れ曲がっている。一方、lid1はSMLの構造ではCa1サイトに結合したCa^{2+}イオンにより固定されている。このCa^{2+}イオンはタンパク質分子中に埋もれており、Asp153、Asp157、Gln120の側鎖の酸素原子、そしてThr118、Ser144の主鎖の酸素原子と配位結合している。Ca1サイトがclose構造では形成されないのは、ヘリックスα6にあるAsp153とAsp157の位置がopen構造での位置と比較すると大きく変化しているからである。以前の研究でPMLの活性には1個のCa^{2+}イオンが必要とされている（Amada *et al.*, 2001）。Ca1サイトがopen構造にだけ形成され、活性中心の構造がlidの構造に関係なく変化しないということは、この触媒に必要なCa^{2+}イオンはCa1サイトに結合し、lid1のopen構造を安定化させていることを示唆している。しかしCa^{2+}イオン非存在下ではlid1の埋もれた荷電性残基が反発して、lidのopen構造は不安定になると考えられる。

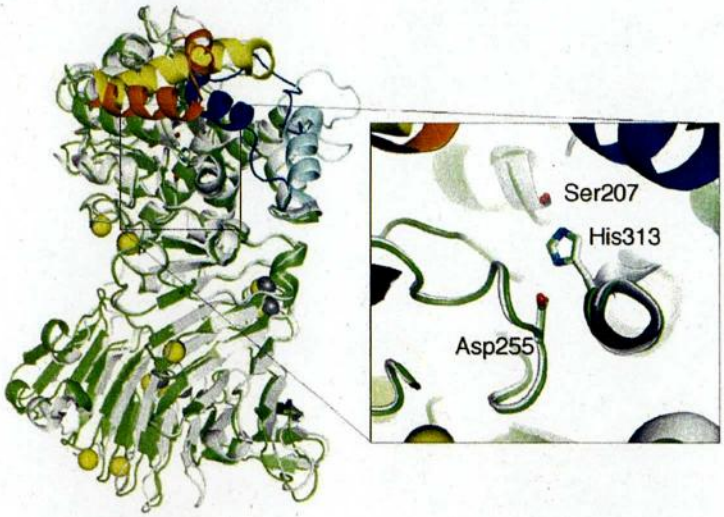
lid2（PMLでは、46～74残基目）は、SMLのopen構造では、ヘリックスα3がヘリックスα2とα-ヘリックスヘアピン構造を作り、活性中心を露出させている。一方、PMLのclose構造では、lid2のヘリックスα3はヘリックスα2とヘアピン構造を形成せず活性中心を覆う。他のリパーゼにおいては、2番目のlid（lid2）があることはこれまで報告されていない。したがってFamily I.3リパーゼは、このlid2があることによって他のリパーゼと区別される。また、lid1、lid2両方の疎水性側鎖はclose構造では活性中心の方へ向いているが、open構造になると溶媒側へと露出する。PMLとSMLの結晶構造は、それぞれ界面活性剤（triton X-100）非存在下、存在下で決定されたため、溶媒側に露出したSML

の疎水性側鎖は界面活性剤により安定化されると思われる。

A


Lid1
Lid2
Ca3
N
Ca2
1st β-roll
C
2nd β-roll
Lid1
Lid2
Ca3
N
Ca2
1st β-roll
C
2nd β-roll

B


Ser207
His313
Asp255

C

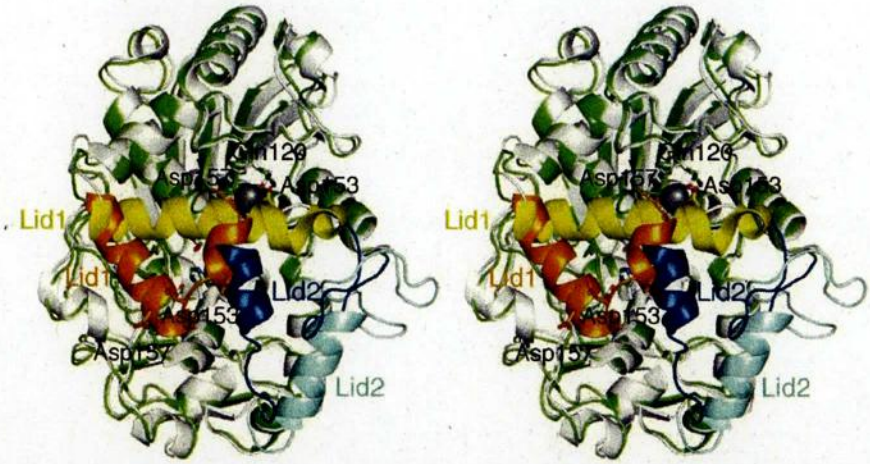

Lid1
Lid1
Lid2
Lid2
Lid1
Lid1
Lid2
Lid2

Fig. 1-3. (A) Stereo view of the cartoon model of PML structure, colored based on secondary structures. Ca^{2+} and Zn^{2+} ions are shown in yellow and blue spheres, respectively. Two Ca^{2+}-binding sites (Ca2 and Ca3) in the N-terminal lipase domain and the first and second β-roll motifs are indicated. Lid1 and lid2 are colored orange and blue, respectively. Three active site residues (Ser207, Asp255, and His313) are indicated by stick models. N and C represent the N- and C-termini. (B) Superposition of the structures of PML and SML (PDB ID: 2QUB), which are colored green and gray, respectively. Lid1 and lid2 of PML are colored orange and blue, while those of SML are colored yellow and light blue, respectively. Ca^{2+} ions in the PML and SML structures are shown in yellow and dark-gray spheres, respectively. Zn^{2+} ions are shown in blue spheres. Three active site residues (Ser207, Asp255, and His313) are indicated by stick models. (C) Stereo view of the lipase domain. The structures of the lipase domains of PML and SML are superimposed. The structures shown in Fig. 1B are viewed from the top. The Ca^{2+} ion bound to the Ca1 site is shown in dark gray sphere. The side chains of Asp153, Asp157, and Gln120, which coordinate with this Ca^{2+} ion in an open conformation, are indicated by stick models, in addition to those of three active site residues. The side chains of Asp153 and Asp157 in a closed conformation are also indicated.

1-3-7. βロールモチーフ構造

PMLのC末端ドメインの13個のRTX繰り返し配列は、2つのβロールモチーフ構造が互いに横に並ぶ形の、いわゆるβロールサンドイッチ構造を形成している（Fig 1-4）。SMLも同様である。1つ目のβロールモチーフ構造（1st βロール）は373～417残基目から成り、5個のRTX繰り返し配列に3個のCa^{2+}イオンが結合して形成されている。2つ目のβロールモチーフ構造（2nd βロール）は493～568残基目から成り、8個のRTX繰り返し配列に5個のCa^{2+}イオンが結合して形成されている。それぞれCa^{2+}イオンはRTXモチーフにより形成されるループとループの間に挟まれるように結合する。従って1つ目と2つ目のβロールモチーフ構造にはCa^{2+}イオンが最大で、それぞれ3個と6個結合できるはずである。実際、PMLとSMLの1つ目のβロールモチーフ構造には3個のCa^{2+}イオンが

結合している。しかしPMLとSMLの2つ目のβロールモチーフ構造には、それぞれ5個と3個のCa^{2+}イオンしか結合していない。PMLの2つ目のβロールモチーフ構造では9残基からなるRTXモチーフの6番目にあるアスパラギン酸が全てのモチーフに保存されている。それにも関わらず、PMLの場合、2番目と5番目のRTXモチーフのループの隙間に、Ca^{2+}イオンの代わりに水分子が入っていた。SMLの場合、2つ目のβロールモチーフ構造の2番目、4番目、そして6番目のRTXモチーフでは、アスパラギン酸がそれぞれAla、AsnそしてAsnに置き換わっている。そのため、βロールモチーフ構造の片側だけに3個のCa^{2+}イオンが結合する。

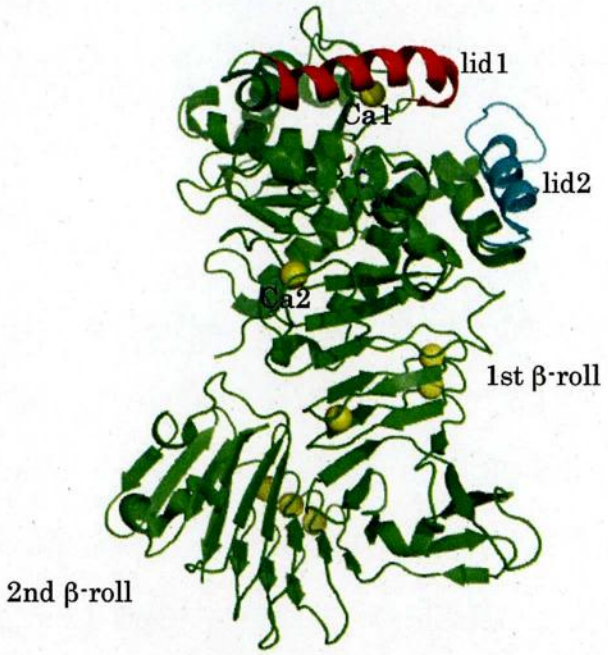


Fig 1-4. The cartoon model of SML structure. Ca^{2+} ion is shown in yellow. . Lid1 and lid2 are colored red and cyan, respectively.

以前、C末端ドメインの一部を除去しても最低6個の機能的なRTX繰り返し配列があれば、PMLの酵素活性やプロテアーゼ耐性はそれほど低下しないことが報告されている（Kwon *et al.,* 2002）。実際、Family I.3リパーゼ中には、

6個のRTX繰り返し配列しか有していないものが、幾つか存在する（Angkawidjaja *et al.,* 2006）しかし、繰り返し配列の数が5個以下になるまでC末端ドメインの一部を除去したり、Ca^{2+}イオンが結合できないように繰り返し配列に変異を入れたりすると、C末端ドメインはβロールモチーフ構造を形成できなくなり、分泌効率、プロテアーゼ耐性、酵素活性が激減する（Angkawidjaja *et al.,* 2005; Kwon *et al.,* 2002）。これらの結果より、βロールモチーフ構造は、N末端触媒ドメインの構造形成に必要であることが示唆されている（Angkawidjaja *et al.,* 2006; Meier *et al.,* 2007）。1つ目のβロールモチーフ構造が作る平行βシートは、触媒ドメインの3個のβシート（β6～β8）と連なって、長い平行βシート形成している（Fig 1-3A）。そのため1つ目のβロールモチーフ構造の形成は、おそらく、N末端触媒ドメインの構造形成に必要と考えられる。しかし、1つ目のβロールモチーフ構造は、5個のRTX繰り返し配列しか有していないため、単独ではβロールモチーフ構造を形成できないと考えられる。従って、βロールサンドイッチ構造の形成は、1つ目のβロールモチーフ構造を安定化させるために必要なのかもしれない。

1-4. 要約

本章では、PMLへのCa^{2+}イオンの結合状態と、C末端ドメインがN末端触媒ドメインの構造形成に直接的または間接的に影響しているかどうかを調べるために、PMLの結晶化およびX線結晶構造解析を行なった。しかしこれまで、本リパーゼのホモログの結晶構造は決定されていないため、PMLの結晶構造を重原子同型置換法により決定することにした。そのために、まずセリン残基を1つずつシステインに置換した変異体を12個作成し、PMLと同様の方法で精製、結晶化を行い、Ptによる誘導体化を行った。その結果S445C-PMLの結晶だけPtにより誘導体化されることがパターソンマップにより確認できた。このS445C-PMLの構造をモデルとして用いることにより、ネイティブのPMLの構造をclose構造として決定した。一方、ほぼ同時期に、PMLと同じサブファミリーに属する*S. marcescens*由来リパーゼ（SML）の結晶構造がopen構造として決定された。PMLとSMLの構造はlid構造を除くと非常によく似ており、RMSD 値は分子全体では0.7Å、活性中心では0.15Åであった。PMLとSMLの結晶構造から、Ca1サイトはopen構造にだけ形成され、活性中心残基の構造はlidの構造に関係なく変化しないことが示唆された。

また、PMLとSMLの構造を比較することにより、Family I.3リパーゼには2個のlid（lid1、lid2）が存在することが分かった。lid1は他のリパーゼにも存在するが、lid2はFamily I.3リパーゼにしか存在しない。lid1は、close構造では途中で鋭く折れ曲がり活性部位を塞いでいるが、open構造では真直ぐになりCa1サイトに結合したCa^{2+}イオンにより活性部位から離れた位置で安定に固定される。一方lid2は、SMLのopen構造では、ヘリックスα3がヘリックスα2とα-ヘリックスヘアピンを作ることにより活性中心を露出させる。しかしPML

のclose構造では、ヘリックスα3はヘリックスα2とヘアピン構造を形成せず、活性中心を覆う。

PMLのC末端ドメインはSMLと同様に、2つのβロールモチーフ構造が互いに横に並ぶ形の、いわゆるβロールサンドイッチ構造を形成している。1つ目のβロールモチーフ構造は、5個のRTX繰り返し配列に3個のCa^{2+}イオンが結合して形成されている。2つ目のβロールモチーフ構造は、8個のRTX繰り返し配列に5個のCa^{2+}イオンが結合して形成されている。以前、6個の機能的なRTX繰り返し配列があれば、PMLの分泌効率、活性、安定性は、ほぼ完全に保たれていることが報告された。しかし繰り返し配列の数が5個以下になるまでC末端ドメインを欠損させたり、繰り返し配列に変異を入れたりすると、C末端ドメインがβロールを形成できなくなり、分泌効率、プロテアーゼ耐性、そして酵素活性が激減することが分かっている。このことからβロールモチーフ構造はPMLの品質保持に重要であることが示唆される。1つ目のβロールモチーフ構造が作る平行βシートは、触媒ドメインの3個のβシート（β6～β8）と連なって、長い平行βシート形成している（Fig 1-3A）。そのため1つ目のβロールモチーフ構造の形成は、おそらく、触媒ドメインの構造形成に必要と考えられる。しかし、1つ目のβロールモチーフ構造は、5個のRTX繰り返し配列しか有していないため、単独ではβロールモチーフ構造を形成できないと考えられる。従って、βロールサンドイッチの形成は、1つ目のβロールモチーフ構造を安定化させるために必要なのかもしれない。

【第2章】

N末端触媒ドメインのCa^{2+}イオンの役割

2-1. はじめに

第1章で述べたように、PML（Angkawidjaja *et al.*, 2007b）とSML（Meier *et al.*, 2007）の結晶構造は、それぞれclose構造とopen構造として決定された。これらの構造は、N末端触媒ドメインとC末端βロールサンドイッチドメインから構成されており、2つのlidを除けば互いによく似ている。これらの構造によると、PMLのN末端触媒ドメインはCa2、Ca3サイトを有しており、SMLのN末端触媒ドメインはCa1、Ca2サイトを有している。なおSMLにはCa3サイトは存在しない。PMLの構造ではCa1サイトは見られないが、それはlid1がclose構造を形成したためと考えられる。SMLの構造では、lid1の2つのアスパラギン酸残基（Asp153、Asp157）がCa1サイトでCa^{2+}イオンと配位結合している。これらの結果をもとに、Ca^{2+}イオンはlid1を固定することによって、lid1のopen構造を安定にするのに必要であり、さらに活性にも必要であることが示唆されている（Meier *et al.*, 2007; Angkawidjaja *et al.*, 2007b）。しかし、Ca1サイトが除かれると、これらのリパーゼは活性を示さなくなるのかどうかまだ調べられていない。さらに、他のCa^{2+}イオン結合サイト（Ca2とCa3サイト）の役割も明らかにされていない。

本章ではPMLのCa1～Ca3サイトの役割を明らかにする目的で、これらのサイトのうち、1つだけが除去されるように設計した3種類のPML変異体を構築し、活性や安定性を解析した。またこれら3種類のうち2つの変異体の結晶構造を決定した。これらの結果をもとに、Ca1～Ca3サイトの役割を考察する。

2-2. 実験材料および方法

2-2-1. 菌体、プラスミド

分泌の宿主として用いる大腸菌 DH5 [F^-, *hsdR17* (rk^-, mk^+), *recA1*, *endA1*, *deoR*, *thi-1*, *supE44*, *gyrA96*, *relA1*]は Toyobo 社から購入した。*S. marcescens* SM8000 由来 Lip システム(*lipBCD* 遺伝子)がベクターpACYC184 に導入されたプラスミド pYBCD20 は田辺三菱製薬の大森謙二様から頂いた(Kawai *et al.*, 1998)。pUC18 は Toyobo 社から購入した。PCR のプライマーとして用いた DNA オリゴマーの合成は北海道システムサイエンス社に依頼した。

2-2-2. プラスミド構築

変異体タンパク質 D157A-、D275A-、そして D337A-PML をコードする遺伝子は、PCR を用いて overlap extension 法(Horton *et al.*, 1990)により構築した。なお、変異導入用プライマーは、Asp157 (GAC)、Asp275 (GAC)、Asp337(GAC)をコードするコドンが、それぞれ Ala をコードする GCA、GCC、GCC に変換されるように設計した。ここで PCR の鋳型として、以前に PML の分泌用に構築された pUC-PML (Kwon *et al.*, 2002) を用いた。PCR により増幅された DNA 断片は、pUC18 の *Xba*I-*Hin*dIII サイトに挿入した。DNA の塩基配列は ABI Prism 310 DNA sequencer (Applied Biosystems) を用いて決定した。

2-2-3. 分泌確認および大量精製

大腸菌 DH5 をプラスミド pYBCD20 で予め形質転換し、更に pUC18 誘導体を用いて形質転換することにより、Lip システムと PML の変異体を共発

現させる形質転換体を作成した。この形質転換体を 50 mg/L のアンピシリンと 30 mg/L のクロラムフェニコールを含む LB 培地中で 30℃、24 時間振とう培養した。培養終了後、培養液を 4℃、17,000 g で 10 分間遠心して菌体と培養上清を分離した。この培養上清を 12%-SDS-PAGE（Laemmli, 1970）に供して、変異体の分泌の有無および分泌レベルを確認した。

分泌された PML の変異体は、野生型 PML と同じ方法で精製した（Angkawidjaja *et al.*, 2007a）後、塩化カルシウムを含まない緩衝液（25mM Tris-HCl（pH 7.5））に透析した。第 1 章で述べたように、PML の C 末端のβサンドイッチ構造には 8 個の Ca^{2+}イオンが結合している（Fig 1-1A）。これらの Ca^{2+}イオンはβロールサンドイッチモチーフの内部に埋もれているため透析では除去できない（Amada *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2002）。しかし、Ca2 と Ca3 サイトに結合している Ca^{2+}イオンは比較的溶媒に露出しているため透析により容易に除去されると考えられる。従って透析により C 末端のβロールサンドイッチ構造には Ca^{2+}イオンが結合しているが、N 末端触媒ドメインには Ca^{2+}イオンが結合していないタンパク質が得られると考えられる。各 PML 変異体のタンパク質濃度は、280nm における Tyr と Trp の ε 値 1490 $M^{-1}cm^{-1}$、5500 $M^{-1}cm^{-1}$ を用いて算出した吸光係数 $A_{280}^{0.1\%}$ =1.14 を用いて決定した（Pace *et al.*, 1995）。

2-2-4. CD スペクトル

短波長 CD スペクトル（200～260 nm）と長波長 CD スペクトル（250～320 nm）は 25℃の下で、日本分光の J-725 spectropolarimeter により測定した。測定用バッファーは、10 mM 塩化カルシウムを含む Tris-HCl（pH 7.5）を用いた。短波長 CD スペクトルの測定には、タンパク質濃度 0.1 mg/mL のサ

ンプル、2 mm 光路長のセルを用い、長波長 CD スペクトルには、タンパク質濃度 0.5 mg/mL のサンプル、1 cm 光路長のセルを用いた。平均残基分子楕円率[θ]（deg cm^2 $dmol^{-1}$）はアミノ酸の平均分子量 110 を用いて計算した。

2-2-5. 酵素活性

リパーゼ活性はオリーブオイルを基質にして測定した（Derewenda, 1993）。10 mM 塩化カルシウムと 55 μL のオリーブオイルを含む 25 mM Tris-HCl（pH 7.5）1.5mL 中、30 ℃で 30 分間反応した後、5 mL のアセトン－エタノール（1:1, v/v）を加え、氷につけて冷やすことにより反応を停止した。これに 1 %フェノールフタレイン液を数滴加え、0.01 N の水酸化ナトリウム水溶液で滴定することにより、酵素反応により生成した脂肪酸を定量した。エステラーゼ活性は、*p*-nitrophenyl laurate（C_{12}）を基質にして測定した（Amada *et al.*, 2000）。10 mM 塩化カルシウム、10 % アセトニトリル、および 0.5 mM *p*-nitrophenyl laurate を含む 25 mM Tris-HCl（pH 7.5）100 μL 中 30 ℃で 10 分間反応した後、最終濃度 0.2 %になるように SDS を加え、反応を停止した。反応に伴い遊離する *p*-nitrophenol を波長 412nm における吸光度を測定することにより定量した（モル吸光係数は 14,200M^{-1} cm^{-1}）。1 unit は 30 ℃で 1 分間に 1 μmol の *p*-nitrophenol または脂肪酸を生成する酵素量とした。比活性はタンパク質 1 mg あたりの酵素活性とする。

2-2-6. 熱安定性

熱変性曲線は温度変化に伴う波長 220 nm の CD 値を追跡することで測定した。タンパク質溶液は 25m M Tris-HCl（pH 7.5）または 10 mM 塩化カルシウムを含む 25 mM Tris-HCl（pH 7.5）に溶かした。測定はタンパク質濃度

0.1 mg/mL、光路長 2 mm、昇温速度 1.0℃/min の条件で行なった。なお、この条件下では、野生型や変異体 PML の熱変性は不可逆であった。従ってタンパク質の 50 %が変性した温度を $T_{1/2}$ とした。

2-2-7. 結晶化、X 線回折データ収集、および構造解析

D157A-PML、D337A-PML を ultrafiltration system Microcon YM-10（Millipore）を用いて、タンパク質濃度が 10 mg/mL になるまで濃縮し、野生型 PML と同じ方法（Angkawidjaja et al., 2007a）で、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化させた。D157A-PML と D337A-PML の結晶の X 線回折データの収集は、SPring-8 のビームライン BL38B1 のシンクロトロン放射光、ADSC Quantum4R CCD detector を用いて行なった。データ収集の前に、結晶を CryoLoop（Hampton Research）にマウントし、Cryo-buffer（20% エチレングリコールおよび 10% PEG 20,000、0.2 M 酢酸カルシウム、5 mM 酢酸亜鉛を含む 0.1 M MES（pH 6.0））に浸した。その後結晶に-173℃の窒素ガスを吹き付けた状態で、1.0Åの波長でデータ収集を行った。データ処理は、HKL2000（Otwinowski and Minor, 1997）を用いて行なった。計算された電子密度図から、第 1 章で決定した PML の構造を鋳型に、MOLREP（Vagin and Teplyakov, 1997）による分子置換法により初期分子モデルを構築した。COOT（Emsley and Cowtan, 2004）および REFMAC（Murshudov et al., 1997）を用いて構造精密化を行い、R_{factor} または PROCHECK（Laskowski et al., 1993）を用いて計算される立体化学的パラメーターを用いて、そのつど評価した。PROCHECK を用いて作製したラマチャンドランプロットにより、構築した分子モデルの全ての残基は most favored region または allowed region に入っていることを確かめた。データ収集および精密化の統計値は Table 2-1 に示す。タンパク質の立体構

造は PyMol を用いて作製した

2-2-8. Protein data bank accession numbers

解析した D157A-PML と D337A-PML の構造座標および構造因子は、Protein Data Bank に登録した。(PDB code: D157A-PML、2ZJ7; D337A-PML、2ZJ6)

2-3. 実験結果

2-3-1. 変異体タンパク質の作製

PML の N 末端触媒ドメインの Ca^{2+}イオン結合サイト（Ca1～Ca3）の役割を解析するために、3 つの 1 アミノ酸置換変異タンパク質 D157A-PML、D275A-PML、および D337A-PML を構築した。Ca1、Ca2、および Ca3 サイトでは、Asp157、Asp275、および Asp337 がそれぞれ Ca^{2+}イオンと 2 座で配位結合している。これらのアスパラギン酸残基は様々な Family I.3 リパーゼに良く保存されている。従って、これらの変異により Ca1～Ca3 サイトは Ca^{2+}イオン結合能を失うことが期待される。

これら 3 つの変異体タンパク質を Lip システムとの共発現により大腸菌 DH5 から菌体外へ分泌させた。その後、培養上精からこれらのタンパク質を精製した。それぞれの変異体タンパク質の分泌レベルは培養液 1 L あたり 15 mg から 30 mg であった。1 L の培養液から精製されたタンパク質の量は 2 mg から 8 mg であった。これらの値は、野生型タンパク質の値と匹敵する（Angkawidjaja *et al.*, 2007a）。

2-3-2. CD スペクトル

PML とその変異体タンパク質の短波長および長波長 CD スペクトルは、25℃で、10 mM $CaCl_2$ を含む Tris-HCl（pH 7.5）を用いて測定した。変異体タンパク質の短波長 CD スペクトルは、いずれも野生型タンパク質のスペクトルとほぼ一致した（Fig 2-1A）。一方、D275A-PML の長波長 CD スペクトルは、PML のスペクトルと明らかに異なっていたが、D157A-PML と D337A-PML のスペクトルは、PML のスペクトルと類似していた（Fig 2-1B）。これらの結果

は、Asp275 を Ala に置換することにより、部分的な構造変化が起きることを示唆している。

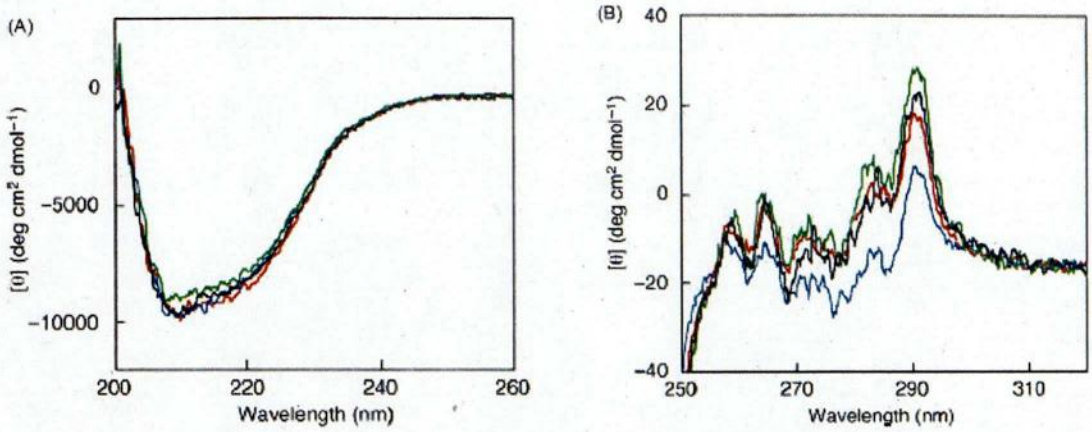


Fig 2-1 CD spectra. The far-UV (A) near-UV (B) CD spectra of PML (black line), D157A-PML (green line), D275A-PML (blue line) and D337A-PML (red line) were measured at 25℃ in 25 mM Tris–HCl (pH7.5) containing 10 mM $CaCl_2$

2-3-3. D157A-PML および D337A-PML の結晶構造

PML と同じ結晶化条件において、D157A-PML および D337A-PML の結晶が得られた。一方、同様の条件で D275A-PML の結晶は得られなかった。そこで、D157A-PML と D337A-PML の結晶構造を close 構造としてそれぞれ 2.2Å と 2.3Å の分解能で決定した。D157A-PML および D337A-PML の全体構造は PML と同じであった（Fig 2-2A）。なお、PML と D157A-PML または D337A-PML の全てのα炭素原子の RMSD 値の平均値は、それぞれ 0.39Å と 0.21Å であった。また D157A-PML と D337A-PML の変異導入部位周辺の構造も Asp157 と Asp337 のカルボキシル基が除去された以外は、基本的に PML と同じであった。しかし、D157A-PML には PML と同様に 2 個の Ca^{2+}イオンが Ca2 と Ca3 サイトに結合しているのに対して、D337A-PML には Ca^{2+}イオンが 1 個だけ Ca2 サイトに結合していた。PML と D337A-PML の Ca3 サイトある

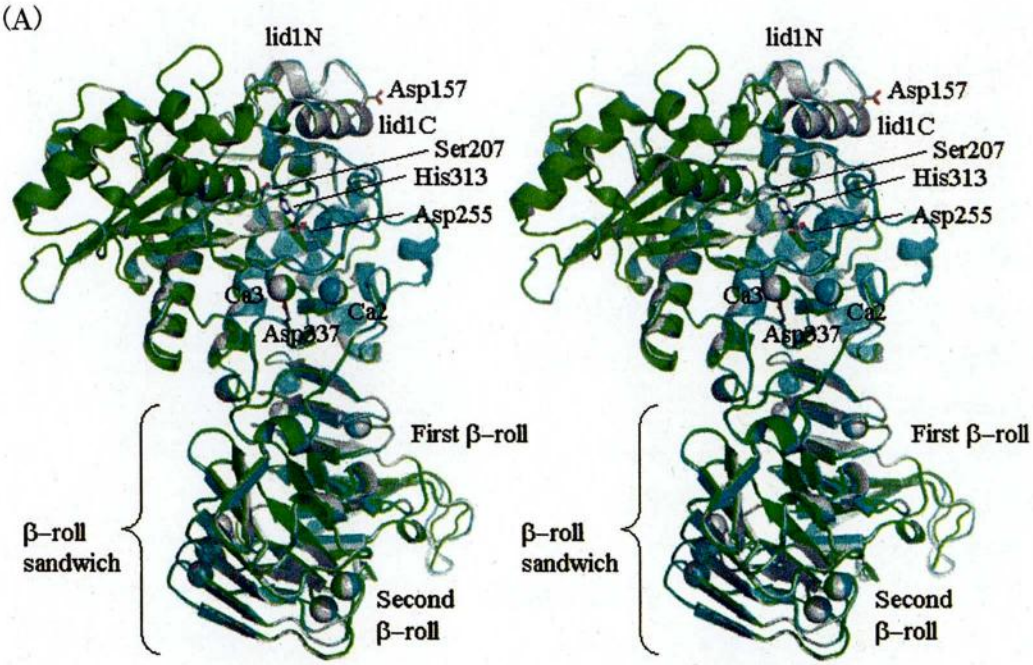
いは、それに対応する部位周辺の電子密度図（$2F_O F_C$マップ）を Fig 2-2D と E にそれぞれ示した。これらの結果は、Asp337 を Ala に置換することにより Ca3 サイトを除去しても、PML の close 構造はほとんど変化しないことを示している。また Ca1 サイトは open 構造だけに形成されるので、Asp157 を Ala に置換することにより、Ca1 サイトが除去されたかどうかは明らかにすることはできなかったが、少なくともこの変異により PML の構造はほとんど変化しないことを明らかにした。

Table2-1 Data collection and refinement statistics

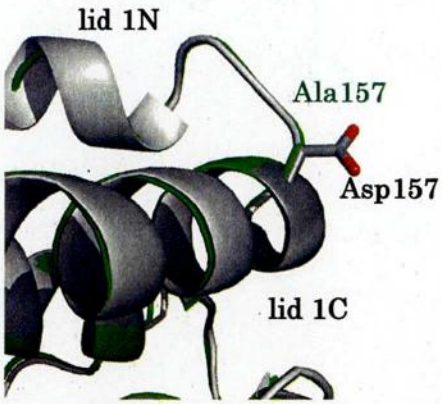
	D157A-PML	D337A-PML
Beamline	BL38B1	BL38B1
Wavelength (Å)	1.0	1.0
Resolution	87.0–2.20 (2.28–2.20)	86.4–2.25 (2.33–2.25)
Unique reflections	35 333	33 670
Redundancy	5.2 (4.1)	5.2 (3.4)
Completeness (%)	94.7 (82.6)	95.1 (72.4)
R_{merge} (%)[a]	8.6 (13.4)	6.2 (11.8)
Average $I/\sigma(I)$	17.4 (3.2)	26.7 (7.1)
Refinement		
Resolution range (Å)	40.2–2.20	39.7–2.25
Space group	$P2_1$	$P2_1$
Cell unit (Å)	a = 48.63, b = 84.63, c = 87.52, β = 96.88°	a = 49.60, b = 84.32, c = 86.90, b = 96.28°
No. of reflections	33 409	32 009
Cutoff	None	None
No. of protein atoms	4550	4550
No. of water	366	501
No. of metal ions (Ca^{2+}/Zn^{2+})	10/2	9/2
R-factor (%)	23.1	20.8
R-free (%)[b]	27.8	24.3
RMSD		
Bond length(Å)	0.026	0.018
Bond angles (°)	2.254	1.573
Ramachandran plot statistics. Percentage of residues in regions		
Most favored	95.6	97.6
Generously allowed	4.4	2.4
Disallowed	0.0	0.0

[a] $R_{merge} = \Sigma \mid I_{hkl} \mid - \langle I_{hkl.} \rangle / \Sigma I_{hkl}$, where I_{hkl} is the intensity measurement for reflection with indices hkl and <Ihkl> is the mean intensity for multiply recorded reflections.
[b] R_{free} was calculated using 5% of the total reflections chosen randomly and omitted from refinement.

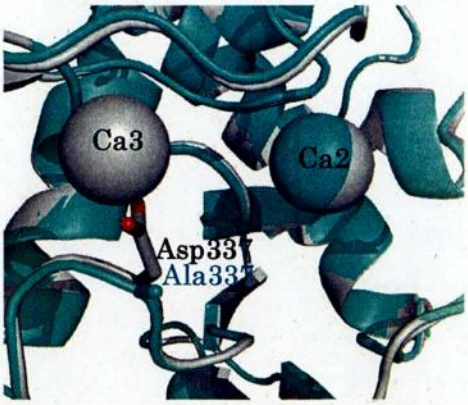
(A)


lid1N
Asp157
lid1C
Ser207
His313
Asp255
Ca3
Ca2
Asp337
First β–roll
β–roll
sandwich
Second
β–roll
lid1N
Asp157
lid1C
Ser207
His313
Asp255
Ca3
Ca2
Asp337
First β–roll
β–roll
sandwich
Second
β–roll

(B)


lid 1N
Ala157
Asp157
lid 1C

(C)


Ca3
Ca2
Asp337
Ala337

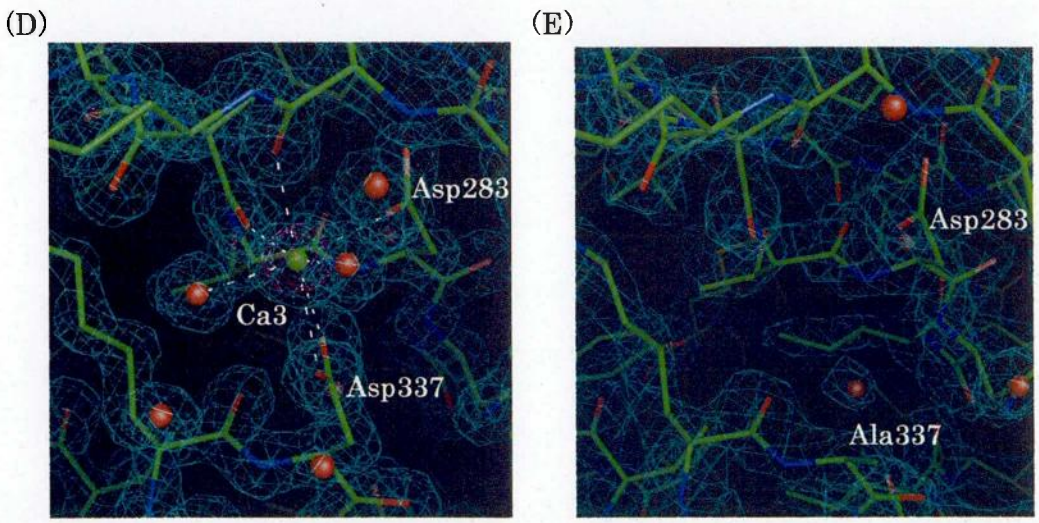


Fig 2-2 Comparison of the crystal structures of PML and its mutants. (A) Stereo view of the ribbon diagrams of superimposed structures of PML (gray), D157A-PML (green) and D337A-PML (cyan). The Ca^{2+} ions bound to PML, D157A-PML and D337A-PML are shown as gray, green and cyan spheres,
respectively. The side chains of the amino acid residues forming catalytic triad (Ser207, Asp255 and His313), Asp157 and Asp337 of PML are shown in stick model. The positions of lid 1N, lid 1C, Ca2 site, Ca3 site, β-roll sandwich consisting of the first and second β-roll motifs are also indicated. (B) The main chain fold around residue 157 of PML (gray) and D157A-PML (green) superimposed. The side chains of Asp157 and Ala157 are shown in stick model. The positions of lid 1N and lid 1C are indicated. (C) The main chain fold around residue 337 of PML (gray) and D337A-PML (cyan) superimposed. The side chains of Asp337 and Ala337 are shown in stick model. The Ca^{2+} ions bound to PML and D337A-PML are shown as gray and cyan spheres, respectively. (D) Electron density around the Ca3 site of PML. The $2F_o$-F_c maps contoured at the 2.0σ and 8.0σ levels are shown in cyan and magenta, respectively. The coordinate bonds for the Ca^{2+} ion are represented by broken lines. (E) Electron density around residue 337 of D337A-PML. The $2F_o$-F_c map contoured at the 2.0σ level is shown.

2-3-4. 酵素活性

野生型タンパク質と変異体タンパク質のエステラーゼおよびリパーゼ活性を、それぞれ *p*-nitrophenyl laurate およびオリーブオイルを基質として用いて、30℃で、10 mM 塩化カルシウム存在下、非存在下で測定した。得られた結果を Table 2-2 にまとめた。Ca^{2+}イオン存在下では、D337A-PML は、PML と同程度のエステラーゼ活性とリパーゼ活性を示した。一方、D157A-PML は、PML より非常に低いエステラーゼ活性を示した。またリパーゼ活性をほとんど

示さなかった。D157A-PML のエステラーゼ活性（比活性）は、PML の 0.7%であった。また、D275A-PML のエステラーゼ活性とリパーゼ活性も、それぞれ PML の 3.4%、25%に低下していた。しかし、Ca^{2+}イオン非存在下では、野生型タンパク質も変異体タンパク質も微弱なエステラーゼ活性しか示さず、リパーゼ活性をほとんど示さなかった。Ca^{2+}イオン非存在下における野生型タンパク質と変異体タンパク質のエステラーゼ活性はいずれも Ca^{2+}イオン存在下における PML の活性の 0.4%～0.9%であった。これらの結果は、Ca^{2+}イオン非存在下ではいずれの変異も PML のエステラーゼ活性に、それほど大きな影響を及ぼさないことを示している。従って、D157A-PML と D275A-PML のエステラーゼ活性やリパーゼ活性が PML と比べて大きく低下したのは、Ca1 と Ca2 サイトにそれぞれ Ca^{2+}イオンが結合できなくなったためであると考えられる。

Table 2-2 Enzymatic activities of PML and its mutants

Protein	[$CaCl_2$] (mM)	Esterase[a]		Lipase[a]	
		Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
PML	10	44	100	2800	100
(wild-type)	0	0.4	0.9	<10	<0.4
D157A-PML	10	0.3	0.7	<10	<0.4
	0	0.2	0.4	<10	<0.4
D275A-PML	10	1.5	3.4	710	25
	0	0.3	0.7	<10	<0.4
D337A-PML	10	49	110	2500	89
	0	0.4	0.9	<10	<0.4

[a]The esterase and lipase activities were determined at 30℃ in 25 mM Tris–HCl (pH 7.5) in the presence or absence of 10 mM $CaCl_2$ using *p*-nitrophenyl laurate and olive oil as a substrate, respectively. The experiment was carried out at least twice and errors from the average values were within 9 and 7% of the values reported for esterase and lipase activities, respectively.

2-3-5. 熱安定性

変異導入の効果が PML の安定性にどのように影響するのかを検討するために、野生型タンパク質および変異体タンパク質の熱安定性を、温度上昇に伴う 220 nm の CD 値の変化を追跡することにより解析した。これらのタンパク質の熱安定性はいくつかの条件で解析したが、どの条件でも不加逆であった。野生型タンパク質と変異体タンパク質の熱変性曲線は、10 mM 塩化カルシウム存在下で解析した（Fig 2-3A)。また PML と D275A-PML に関しては、Ca^{2+}イオン非存在下でも熱変性曲線を解析した（Fig 2-3A)。これらの熱変性曲線の変性中点温度（$T_{1/2}$）を、Table 2-3 にまとめた。

Ca^{2+}イオン存在下では、D157A-PML は PML と同様の安定性を示したが、D275A-PML と D337A-PML は PML より不安定で、その $T_{1/2}$ はいずれも PML の $T_{1/2}$ より約 5℃低下していた。しかし、Ca^{2+}イオン非存在下では、D275A-PML は PML と同様の安定性を示した。D337A-PML も同様の安定性を示すと考えられたので測定しなかった。このことは、Ca^{2+}イオン非存在下では、Asp275 を Ala に置換しても PML の安定性はそれほど大きく変化しないことを示唆している。Ca^{2+}イオン存在下、非存在下での $T_{1/2}$ を比較すると、Ca^{2+}イオン非存在下における PML と D275A-PML の安定性は Ca^{2+}イオン存在下における場合と比べて、それぞれ 10℃、5℃低下している。従って、Ca^{2+}イオン存在下では PML の Ca2 と Ca3 サイトに 2 個の Ca^{2+}イオンが、D275A-PML の Ca3 サイトには 1 個の Ca^{2+}イオンが結合しており、透析によりこれらの Ca^{2+}イオンが除去されたと考えられる。

Ca^{2+}イオン非存在下での野生型 PML の長波長 CD スペクトルは、Ca^{2+}イオン存在下のときのスペクトルと全く同じであった（data not shown)。このことは、PML の Ca2 と Ca3 サイトから Ca^{2+}イオンを除いても構造はほとんど

変化しないことを示唆している。

Ca1サイトにCa^{2+}イオンが結合するのはPMLがopen構造を形成する時だけなので、PMLとD157A-PMLのopen構造の安定性を比較する目的で、PMLとD157A-PMLの熱安定性を0.015%（w/v）（約0.23 mM）triton X-100存在下、10 mM塩化カルシウム存在下または非存在下で解析した。これらのタンパク質の熱変性曲線をFig 2-3に示した。また、得られた変性中点温度$T_{1/2}$をTable 2-3にまとめた。第1章で述べたように、SMLは0.2%(w/v)triton X-100存在下で、open構造を形成する（Meier *et al.*, 2007）。このことから、PMLもこれと同じ条件でopen構造を形成すると予測される。しかし、triton X-100を加えると、CDシグナルのノイズが増加するため、0.2% triton X-100存在下では熱変性曲線を測定することができなかった。そこでtriton X-100の濃度を0.015%まで減らして解析を行なった。以然としてCDシグナルのノイズは高いが、この条件で熱変性曲線を測定することができた（Fig 2-3B）。

Ca^{2+}イオン存在下でtriron X-100存在下と非存在下の$T_{1/2}$を比べると、PMLの安定性もD157A-PMLの安定性もtriton X-100存在下では、いずれも約2℃低下する（Table 2-3）。PMLの安定性をCa^{2+}イオン非存在下で解析した場合も同様である（Table 2-3）。その理由としておそらく、triton X-100を加えることにより、lid1とlid2のclose構造を安定化する疎水性相互作用が低下し、これらのlidの柔軟性が増加するためと考えられる。Ca^{2+}イオン存在下でPMLとD157A-PMLの$T_{1/2}$を比べると、triton X-100非存在下では、両者の安定性はほとんど同じであるのに対して、triton X-100存在下ではD157A-PMLはPMLより1.0℃不安定化する（Table 2-3）。Ca^{2+}イオン非存在下では、triton X-100存在下でもD157A-PMLの安定性はPMLと変わらない。これらの結果は、Ca^{2+}イオンはopen構造が形成される時だけCa1サイトに結合すること、

Ca1 サイトに Ca^{2+}イオンが結合すると安定性が 1.0℃高くなることを示唆している。

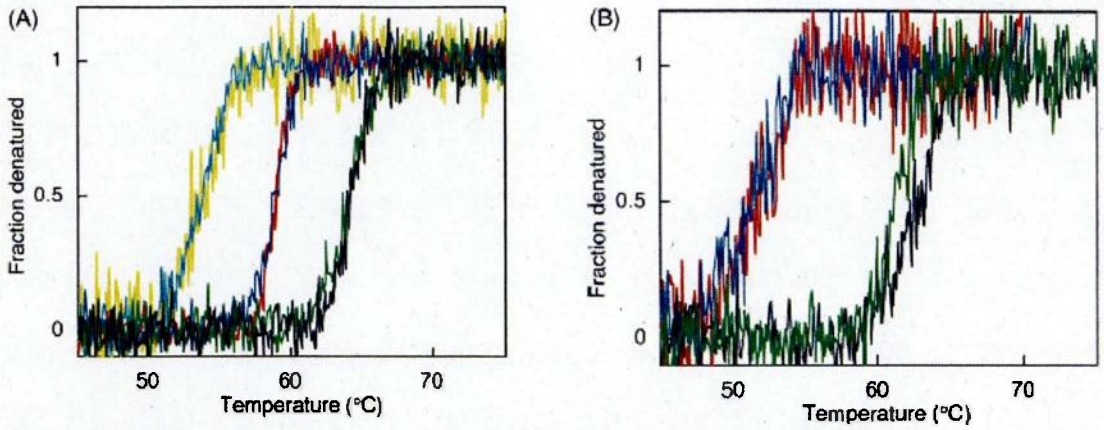


Fig 2-3 Thermal denaturation curves. (A) The thermal denaturation curves of D157A-PML (green), D275A-PML (blue) and D337A-PML (red) measured in the absence of Triton X-100 and presence of 10 mM $CaCl_2$, and PML (cyan) and D275A-PML (yellow) measured in the absence of Triton X-100 and Ca^{2+} ions are compared with that of PML measured in the absence of Triton X-100 and presence of 10 mM $CaCl_2$ (black). (B) The thermal denaturation curves of PML (black) and D157A-PML (green) measured in the presence of 0.015% (w/v) Triton X-100 and 10 mM $CaCl_2$, and PML (red) and D157A-PML (blue) measured in the presence of 0.015% (w/v) Triton X-100 and absence of Ca^{2+} ions are shown. The measurements were done at pH 7.5 by monitoring the change in CD values at 220 nm as described in Material and Methods.

2-4. 考察

Family I.1 リパーゼ（Nardini *et al.*, 2000）と Family I.2 リパーゼ（Noble *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1997; Schrag *et al.*, 1997）の結晶構造によると、これらのリパーゼは活性中心の近くに 1 個の Ca^{2+}イオン結合サイトを持つ。生化学的研究から、このサイトは、安定性（Tanaka *et al.*, 2003）と活性（Svendsen *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2000）に必要であることが示唆されている。Family I.5 の Staphylococcal リパーゼも活性中心の近くに 1 個の Ca^{2+}イオンを有しており、このサイトに結合する Ca^{2+}イオンも構造の安定性と活性に必要であることが示されている（Talon *et al.*, 1995; Simons *et al.*, 1996; Oh *et al.*, 1999）。これらの Ca^{2+}イオン結合サイトはいずれも Family I.3 リパーゼには、保存されていない。すなわち、Family I.3 リパーゼの N 末端触媒ドメインにある 3 つの Ca^{2+}イオン結合サイト（Ca1～Ca3）は、Family I.3 リパーゼにしか存在しないことが分かる。そこで PML のこれらの Ca^{2+}イオン結合サイトの役割を以下で考察する。

2-4-1. Ca1 サイト

SML の open 構造によると（Meier *et al.*, 2007）、Ca1 サイトは open 構造の時に形成される。この時長い lid1 と称されるヘリックス構造が Ca^{2+}イオンにより固定される。この Ca^{2+}イオンは Gln210、Asp153（1 座配位）、および Asp157（2 座配位）の側鎖と、Thr118 と Ser144 の主鎖の酸素原子とで 6 座配位している。これら全てのアミノ酸残基は、PML にも保存されている。このことから、Ca1 サイトは PML でも SML と同様に open 構造の時に形成されると考えられる。なお安定性に関しては、Asp157 を Ala に置換しても、close 構造では PML の安定性に影響しなかった。しかし、PML はこの変異により酵素活

性をほとんど失った。このことから、この変異は Ca1 サイトの形成を妨げていることが示唆される。これは、open 構造が誘導される条件（triton X-100 と Ca^{2+} イオン存在下）で PML は安定化されるが、D157A-PML は PML ほどには安定化されないという結果から分かる（Fig 2-3B と Table 2-3）。close 構造では、lid1 はヘリックスの途中で鋭く折れ曲がり、ヘリックスーターンーヘリックス構造を形成している（Fig 2-2A）。ここで lid1 の N 末端側、C 末端側をそれぞれ lid1N と lid1C と称す。Asp157 は lid1C の N 末端側に位置し溶媒に露出している。ミセル基質との相互作用により、lid1N と lid1C は大きく移動して 1 本の長いヘリックスとなる。このヘリックスの軸は Fig 2-2A の平面に対して大体垂直になる。この構造変化によって、Asp157 は左側へ約 15Å移動し、Ca1 サイトを形成する。もし Ca^{2+}イオンが Ca1 サイトに結合しなければ、open 構造はおそらく不安定になると思われる。なぜなら Ca^{2+}イオンと配位する Asp153 と Asp157 の間に強い静電的反発が生じるためである。従って Ca1 サイトは open 構造を安定にし、酵素活性を生み出すために必要であることが示唆される。

Table 2-3 Stabilities of PML and its mutants

Protein	[$CaCl_2$] (mM)	- Triton X-100		+Triton X-100	
		$T_{1/2}$[a] (℃)	$\Delta T_{1/2}$[b](℃)	$T_{1/2}$[a] (℃))	$\Delta T_{1/2}$[c](℃)
PML	10	64.3	–	62.7	–
(wild-type)	0	53.7	-10.6	51.9	–
D157A-PML	10	64.1	-0.2	61.7	-1.0
	0	ND		51.8	-0.1
D275A-PML	10	58.9	-5.4	ND	
	0	53.9	-10.4	ND	
D337A-PML	10	58.9	-5.4	ND	
	0	ND		ND	

ND, not determined.

[a]Thermal denaturation of the protein was analyzed at the same condition for assay in the presence or absence of 0.015% Triton X-100 by monitoring the change in CD values at 220 nm. $T_{1/2}$ represents the midpoint of the transition of the thermal denaturation curve. The experiment was carried out at least twice and the errors from the average values were ±0.1℃.

[b]$\Delta T_{1/2}=T_{1/2}$ (examined) - 64.3 (The $T_{1/2}$ value of the wild-type protein determined in the presence of 10 mM $CaCl_2$).

[c]$\Delta T_{1/2}=T_{1/2}$ value of D157A-PML - $T_{1/2}$ value of the wild-type protein.

D157A-PML はリパーゼ活性を示さなかったが、弱いエステラーゼ活性を示した (Table 2-2)。このエステラーゼ活性は PML の活性の 0.7%である。この値はとても低いが、以前に報告された活性部位変異体の値（<0.06%）(Amada *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2000) よりは明らかに高い。PML も Ca^{2+} イオン非存在下ではリパーゼ活性を示さず、微弱なエステラーゼ活性を示す (Table 2-2)。また D157A-PML のエステラーゼ活性は、triton X-100 のような非イオン系界面活性剤存在下では、約 10 倍になる。これらの結果は、Ca1 サイトはエステラーゼ活性には必須ではないことを示唆している。基質または非イオン系界面活性剤存在下では、おそらく lid1 と lid2 が活性部位から解離する。しかし活性部位が完全に開くのは lid1 が Ca^{2+}イオンに固定されたときだけであ

る。リパーゼの基質は大きなミセル構造を形成するので、lid1 と lid2 が完全に開いたときだけ活性部位に接触できると考えられる。一方、エステラーゼの小さな基質はこれらの lid が部分的に開いた時でも活性部位と接触することができると考えられる。このことから、Ca^{2+}イオン非存在下で、PML や D157A-PML がリパーゼ活性を示さず、弱いエステラーゼ活性を示したのは、lid1 や lid2 が完全に開いたためではなく、小さなエステラーゼ基質との相互作用により lid が部分的に開いたことによると考えられる。

2-4-2. Ca2 サイト

Ca2 サイトの Ca^{2+}イオンは、Gln253 (1 座配位)、Asp275 (2 座配位)、および Asn284 の側鎖と Asp283 の主鎖の酸素原子および 2 つの水分子と 7 座配位結合している。Ca2 サイトは Asp257 を Ala に置換することによって Ca^{2+}イオン結合能を失うと思われる。なぜなら、Ca^{2+}イオン存在下での PML の安定性と比較すると D275A-PML の安定性は大幅に低下しているが、Ca^{2+}イオン非存在下での PML と D275A-PML の安定性は同じだからである。PML と D275A-PML の短波長および長波長 CD スペクトルの結果より、Ca2 サイトから Ca^{2+}イオンを透析で除去しても PML の構造は変化しなかったが、この変異により D275A-PML の構造わずかに変化したことが示唆される。Asp275 の側鎖は、Ca^{2+}イオンのリガンドだけでなく、Arg259 の側鎖および Glu363 の主鎖の窒素原子と水素結合を形成している。D275A-PML は、これらの水素結合を形成できないので部分的な構造変化を引き起こしていると推測される。しかし短波長 CD スペクトルの結果から分かる様に、この構造変化はごくわずかである。なぜなら Ca^{2+}イオン非存在下での PML の安定性は Asp275 を Ala に置換しても、大きく変化しないからである (Table 2-2)。

Ca2 サイトの Ca^{2+}イオンと配位結合している全てのアミノ酸残基は、β7 鎖（Leu249～Val251）とβ8 鎖（Ile285～Phe288）の間の長いループの中に位置している。活性中心残基の 1 つである Asp255 もこのループの中にある。Ca2 サイトでの変異によって PML の酵素活性が大きく減少したのは、おそらくこのループの構造が変化し、それによって Asp255 が最適な位置から動いてしまったためと考えられる。この構造変化はおそらく、CD スペクトルでは観測できないほど小さいと思われる。従って、Ca2 サイトの Ca^{2+}イオンはおそらく活性中心の構造を最適化するために必要と考えられる。

2-4-3. Ca3 サイト

Ca3 サイトでは、Ca^{2+}イオンが Asp283（1 座配位）および Asp337（2 座配位）の側鎖、Lys278 および Ala281 の主鎖の酸素原子そして 2 個の水分子とで 7 座配位結合している。これらのアミノ酸残基は Family I.3 リパーゼには完全には保存されていない。このことから、Ca3 サイトは Family I.3 リパーゼに保存されていないことが示唆される。実際、このサイトは SML の構造には見られない。SML では Lys283 と Asp283 がそれぞれ His（His279）と Asn（Asn284）に置き換えられている。D337A-PML は PML と同じ活性を示したが、PML より約 5℃不安定である。このことから、Ca3 サイトは PML の安定化に寄与することが示唆される。（2-4-2.）で述べたように Ca2 サイトも PML の安定化に寄与する。Ca3 サイトの Ca^{2+}イオンは Ca2 サイトの Ca^{2+}イオンから約 8.4Å しか離れていない。それにも関わらず、両サイトは相加的に PML の安定化に寄与する。PML をはじめ、いくつかの Family I.3 リパーゼは安定性を向上させるために Ca3 サイトを獲得したのかもしれない。

2-5. 要約

PML は N 末端触媒ドメインに 3 つの Ca^{2+}イオン結合サイトを有している（Ca1～Ca3）。このうち、Ca1 サイトは PML が open 構造を形成した時にだけ形成される。これら 3 つの Ca^{2+}イオン結合サイトの役割を解析するために、3 つの 1 アミノ酸置換変異タンパク質 D157A-PML、D275A-PML、および D337A-PML を構築した。これらのうち、D157A-PML と D337A-PML の結晶構造を close 構造として決定した。D337A-PML の構造で Ca3 サイトの Ca^{2+}イオンが見られなかったことを除いて、両タンパク質の構造は PML の close 構造とよく似ていた。そして D157A-PML は PML とほぼ同程度の安定性を示した。一方、Ca^{2+}イオン存在下で PML と D157A-PML の $T_{1/2}$ を比べると、triton X-100 非存在下では、両者の安定性はほとんど同じであるのに対して、triton X-100 存在下では D157A-PML は PML より 1.0℃不安定化した。Ca^{2+}イオン非存在下では、triton X-100 存在下でも D157A-PML の安定性は PML と変わらなかった。D157A-PML は、ほとんど酵素活性を示さなかった。D275A-PML の安定性は PML より約 5℃低かった。そして D275A-PML は PML より低いリパーゼ活性とエステラーゼ活性を示した。一方、D337A-PML の安定性も PML より約 5℃低かった。しかし D337A-PML はリパーゼ活性もエステラーゼ活性も PML と同等の活性を示した。これらの結果から、Ca1 サイトの Ca^{2+}イオンは lid1 を固定して活性部位を完全に開けるのに必要であり、Ca2 と Ca3 サイトの Ca^{2+}イオンは PML の安定化に寄与し、さらに Ca2 サイトの Ca^{2+}イオンは PML の活性中心の構造を最適化するために必要と考えられる。

【第 3 章】

C 末端保存配列モチーフの役割

3-1. はじめに

PML と SML の結晶構造から示されるように、13 個の RTX 繰り返し配列はβロールサンドイッチ構造を形成する。この構造においては 2 つのβロールモチーフはβロールの中心軸がほぼ平行になるように並んでいる。Ca^{2+}イオンはβロールモチーフ構造の構造形成に必要であり、Ca^{2+}イオン非存在下では、PML の C 末端ドメインは不規則な構造をとると推測されている（Amada *et al.*, 2001; Angkawidjaja *et al.*, 2006）。*Bordetella pertussis* 由来 adenylate cyclase（Chenal *et al.*, 2009; Sotomayor Pérez *et al.*, 2010）に対して示唆されているように、T1SS により分泌されるタンパク質は、その RTX 繰り返し配列の構造を Ca^{2+}イオンの結合により不規則構造から規則的な構造へと変化させることにより、効率よく分泌されるものと思われる。細菌の細胞質内のカルシウム濃度は非常に低いため、βロールモチーフ構造が菌体内で形成されるとは考えにくい。実際、大腸菌菌体内の Ca^{2+}イオン濃度は 0.6 μM と報告されており（Jones *et al.*, 2002）、これはβロールモチーフ構造を形成させるのに必要な Ca^{2+}イオン濃度（Ostolaza *et al.*, 1995; Rose *et al.*, 1995; Amada *et al.*, 2001）より 2～3 桁低い。一方、菌体外のカルシウム濃度はβロールモチーフ構造の形成を促すには十分なくらい高い。従って、RTX 繰り返し配列は、菌体内では不規則な構造を形成しており、そのためタンパク質は T1SS により効率よく分泌されるが、分泌後は Ca^{2+}イオンの結合により RTX 繰り返し配列はβロールモチーフ構造を形成すると考えられる。

酸性アミノ酸残基の後に幾つか（たいてい 3 または 4 個）のかさ高い疎水性残基が並ぶ C 末端モチーフは、T1SS によって分泌されるタンパク質に

よく保存されている。*Erwinia chrysanthemi* 由来 metalloprotease PrtG では、C 末端モチーフ（DVIV）は T1SS によるタンパク質分泌に必要であることが示唆されている（Ghigo and Wandersman, 1994）。しかし、*S. marcescens* 由来ヘム獲得タンパク質 HasA では、C 末端モチーフ（ELLAA）は分泌には必須でないことが示唆されている（Omori *et al.*, 2001）。また SML に関して C 末端モチーフの上流にある疎水性の 5 残基配列モチーフ（VTLIG）が T1SS のタンパク質分泌に必要だということが示唆されている（Omori *et al.*, 2001）。これまでの研究で、5 残基配列モチーフと C 末端モチーフを含む C 末端の 19 残基を削除すると、PML が分泌されなくなるだけでなく、PML の酵素活性や安定性が著しく低下することが明らかにされている（Kwon *et al.*, 2002）。また大腸菌由来 hemolysin（Felmlee and Welch, 1988）のように、PML はβロールモチーフ構造が形成された時だけ酵素活性を示すことが明らかにされている（Kwon *et al.*, 2002; Angkawidjaja *et al.*, 2005）。従って、5 残基配列モチーフと C 末端モチーフのどちらが PML の分泌に必要なのか、また、これらのモチーフのどちらが PML の酵素活性や安定性に重要なのか調べる必要がある。

本章では、C 末端モチーフを切除したり、5 残基配列モチーフや C 末端モチーフに変異を入れたりすることにより 4 種類の PML 変異体を構築し、これらの変異体の分泌、酵素活性、および安定性を調べた。これらの結果をもとに、5 残基配列モチーフと C-末端モチーフの役割について考察する。

3-2. 実験材料および方法

3-2-1. 菌体、プラスミド

PML 変異体の大量生産のために、宿主として用いた大腸菌 HMS174（DE3）pLysS [F^-, *recA*1, *hsdR*($r_{k12}^-m_{k12}^+$), *RifR*(DE3), pLysS(Cm^r)] は Novagen 社より購入した。プラスミド pET25b(+)も Novagen 社より購入した。また、PML 変異体の菌体外分泌に用いた菌体およびプラスミドは、(2-2-1) と同じである。PCR のプライマーとして用いた DNA オリゴマーの合成は北海道システムサイエンス社に依頼した。

3-2-2. 変異導入

PMLΔ5 と PMLΔ10 を大量生産するために、これらをコードする遺伝子を PCR によって増幅した。得られた PCR 断片を pET25b(+)の *Xba* I-*Hin*d III サイトに挿入した。なお PCR の鋳型としては、pET-PML（Amada *et al.*, 2000）を用いた。PCR に用いたプライマーは、PMLΔ5 の場合では、プライマー1（5'-GGGGCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAAC-3'）とプライマー2（5'-CCTTTAAGCTTTCAATCGGCACTGAGGC-3'）、PMLΔ10 の場合ではプライマー1 とプライマー3（5'-CCTTTAAGCTTTCAATTCAGCGCCACCCC-3'）である。これらの配列のアンダーライン部分はプライマー1 では *Xba* I サイト、プライマー2 と 3 では *Hin*d III サイトを示している。2A-PML や 3A-PML をコードする遺伝子が導入された pET25b（+）誘導体は、それぞれ QuickChange II site-directed mutagenesis kit（Agilent Technologies）および KOD-plus-mutagenesis kit（Toyobo）を用いて構築した。この変異導入でも pET-PML を鋳型として用いた。変異導入用プライマーの配列は、2A-PML の場合は、Val599（GTG）と Leu615（GTG）のコドンが、それぞれ Ala をコード

するコドン（GCG）に変化するように、3A-PML の場合では Ile614（ATT）、Val615（GTG）、および Ile616（ATC）のコドンが、それぞれ Ala をコードするコドン GCT、GCG、および GCC に変化するように設計した。

PML 変異体を分泌させる際に用いる pUC18 誘導体は、上述の pET25b（+）誘導体を制限酵素の *Xba* I と *Hin*d III で処理して PML 変異体の遺伝子を含む DNA 断片を取得し、それを pUC18 の *Xba* I-*Hin*d III サイトに挿入することにより構築した。DNA の塩基配列は ABI Prism 3100 DNA sequencer（Applied Biosystems）で確認した。

3-2-3. 大量生産および精製

PML および PML 変異体の大量生産は、pET25b（+）誘導体で形質転換した大腸菌 HMS174(DE3)pLysS を用いて行なった。精製は従来の方法（Amada *et al.*, 2000）に従って行なった。最終精製物の純度は 12% SDS-PAGE（Laemmli, 1970）を用いて確認した。各変異体 PML の $A_{280}^{0.1\%}$は（1-1-2.）と同様に算出し、PML、2A-PML、そして 3A-PML の値を 1.14、PMLΔ5 の値を 1.15、そして PMLΔ10 の値を 1.16 とした。

3-2-4. 菌体外分泌

PML 変異体の分泌確認は、（2-2-2.）と同様の方法で行なった。なおタンパク質の菌体外分泌量および菌体内蓄積量は、SDS-PAGE ゲルを CBB 染色して可視化したものを、Scion Image プログラムを用いて推定した。

3-2-5. CD スペクトル

PML および PML 変異体の短波長および長波長 CD スペクトルは

（2-2-3.）と同様の方法で測定した。

3-2-6.　PMLΔ10 の結晶化および X 線回折データ収集、構造解析

PMLΔ10 の結晶化および X 線回折データ収集、構造解析は、（2-2-6.）と同様の方法で行い、PMLΔ10 の結晶構造を決定した。

3-2-7.　酵素活性

PML および PML 変異体の酵素活性は（2-2-4.）と同様の方法で測定した。

3-2-8.　熱安定性

PML 変異体の熱変性曲線から得られる $T_{1/2}$ は、（2-2-5.）と同様の方法で測定した。

3-2-9.　尿素変性

尿素による変性曲線は、25℃で様々な尿素存在下における波長 220 nm の CD 値を追跡することで測定した。タンパク質は 10 mM 塩化カルシウムおよび様々な濃度の尿素を含む 25 mM Tris-HCl（pH7.5）に溶かし、測定前に 1 週間、25℃でインキュベートした。タンパク質濃度は～0.15 mg/mL で、光路長 2 mm で測定を行なった。PML および変異体 PML は尿素変性に対して可逆性を示す。これらのタンパク質の平衡論的な変性は二状態変性であると仮定し、転移領域前後のベースラインを直線に近似し、天然状態と変性状態の自由エネルギー差（ΔG）および、水中での変性に伴う自由エネルギー変化（$\Delta G(H_2O)$）を Pace により提案された以下の式により算出した（Pace, 1990）。

$$f_u=(b_n+a_n[D]-y)/(b_n+a_n[D]-b_u-a_u[D]) \quad (eq\ 1)$$

$$K=f_u/(1-f_u) \quad (eq\ 2)$$

$$\Delta G=-RT\ln K \quad (eq\ 3)$$

$$\Delta G=\Delta G(H_2O)-m[D] \quad (eq\ 4)$$

$$\Delta G(H_2O)=m\cdot C_m \quad (eq\ 5)$$

$$f_u=1/(1+\exp\{\Delta G(H_2O)/RT-m[D]/RT\}) \quad (eq\ 6)$$

ここで f_u は変性状態の割合を、y はある濃度[D]の尿素存在下における CD 値を意味している。b_n 、b_u は天然状態、あるいは変性状態の CD 値を、a_n 、a_u は転移状態前後のベースラインの傾きをそれぞれ表している。K は変性過程における平衡定数を、ΔG は変性過程におけるギブスの自由エネルギー変化を表している。また、m 値はΔG と尿素濃度[D]との相関に見られる直線の傾きである。C_m はΔGが 0 (Zero) のときの尿素濃度である。示した値は Sigma Plot (Jandel Scientific) を用いて、上記の式から直接外挿することで算出した。

3-3. 実験結果および考察

3-3-1. 変異体設計

PML と PML 変異体の C 末端のアミノ酸配列を Fig 3-1 に示す。5 残基配列モチーフと C 末端モチーフは、それぞれ VTLVG（599 残基目～603 残基目）、DGIVIA（612 残基目～617 残基目）として PML に保存されている。

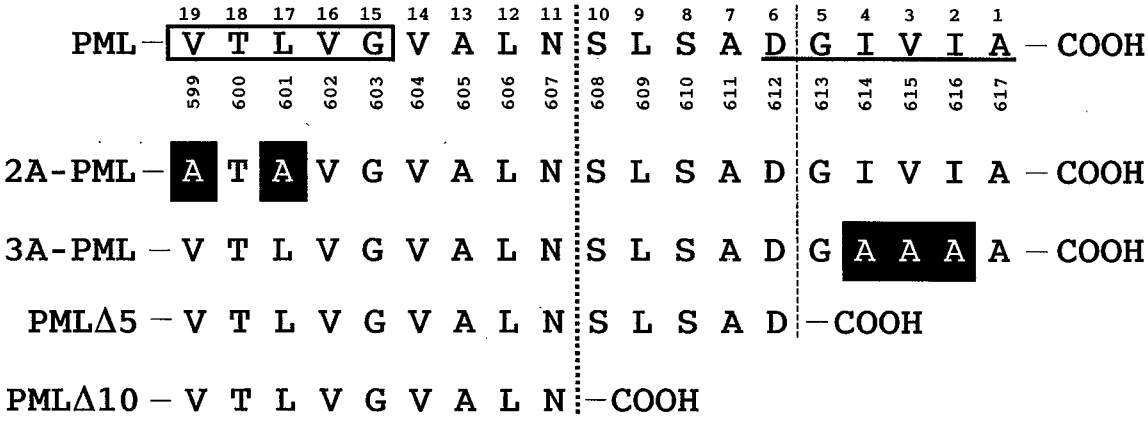
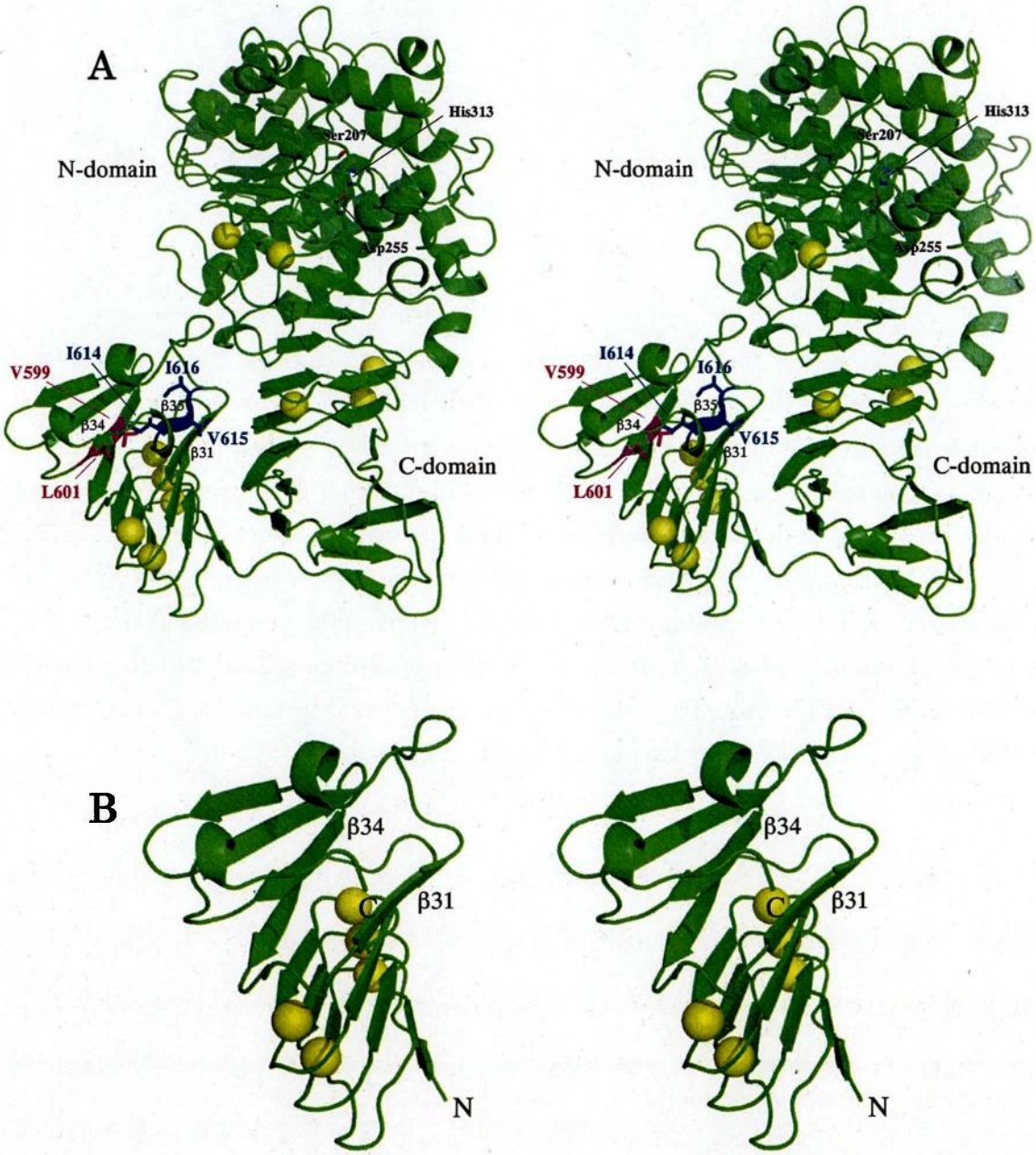


Fig 3-1. The amino acid sequences of the C-terminal regions of PML and its mutant proteins. Numbers below and above the sequence of PML represent the positions of the amino acid residues starting from the N- and C-termini of PML, respectively. The mutated residues are denoted with white letters and black background. A five-residue sequence motif is boxed and an extreme C-terminal motif is underlined for the PML sequence.

PML の結晶構造より、5 残基配列モチーフ内の Val599～Leu601 はβ34 鎖の C 末端部分を、C 末端モチーフ内の Ile614～Ile616 はβ35 鎖を形成している（Fig 3-2A）。両β鎖は、それぞれが 2 つ目のβロールモチーフ構造中のβシートと平行βシートを形成しており、結果的にこのβロールモチーフ構造を 1 回転分伸ばしている。

C 末端から 5 残基または 10 残基が削除された PML Δ 5 および PML Δ 10 は、C 末端モチーフが PML の分泌、酵素活性、および安定性に必要かどうか確かめるために構築した。ここで、PML Δ 5 は C 末端モチーフのほとんどを、PML Δ 10 は C 末端モチーフ全体を欠損している（Fig 3-1）。



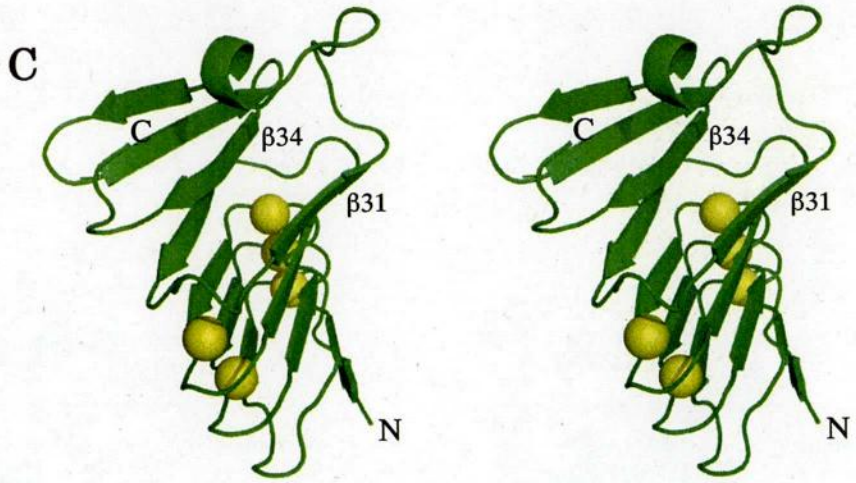


Fig 3-2. (A) A stereo view of the three-dimensional structure of PML. The crystal structure of PML in the closed conformation (PDB ID 2Z8X) is shown. The amino acid residues that are mutated to Ala in this study are indicated by stick models, which are colored magenta and dark blue for those located in β34- and β35-strands, respectively. Ten Ca^{2+} ions are shown in yellow spheres. Three active site residues (Ser207, Asp255, and His313) are indicated by stick models, in which the oxygen and nitrogen atoms are colored red and blue, respectively. β31-strand, which forms parallel β-sheet with β35-strand, is also shown. (B, C) Stereo views of the three-dimensional structure models of PMLΔ5 (B) and PMLΔ10 (C). Only the structures of the C-terminal regions (residues 489-617) are shown. The Ca^{2+} ions are shown in yellow spheres.

PMLΔ5 および PMLΔ10 の構造モデルから、PMLΔ5 はβ35 鎖を欠損しているが、β35 鎖とβ34 鎖の間のループを有している（Fig 3-2B）。一方、PMLΔ10 はβ35 鎖とβ34 鎖の間のループのほとんどを欠損している（Fig 3-2C）。更に、PML の二重変異タンパク質（2A-PML）は、5 残基配列モチーフの強い疎水性が PML の分泌だけでなく活性や安定性に必要かどうか確かめるために構築した。このモチーフは 3 つのかさ高い疎水性残基を有している。上記 3 つの

アミノ酸残基のうち、Val599 と Leu601 をそれぞれ Ala に置換した。なぜならこれらのアミノ酸残基は SML に保存されており、以前、これらを Ala に置換すると SML の分泌効率が非常に減少することが報告されているからである（Omori *et al.*, 2001）。更にまた、PML の三重変異体タンパク質（3A-PML）は、C 末端モチーフの強い疎水性が PML の分泌、酵素活性および安定性に必要かどうか確かめるために構築された。これら 3 つのアミノ酸残基（Ile614,、Val615 そして Ile616）は、C 末端モチーフで唯一のかさ高いアミノ酸残基なので、変異サイトとして選んだ。なおいずれの残基も Ala に置換した。なぜなら、これらのアミノ酸残基は疎水性ポケットの中に位置しているので、疎水性で側鎖の小さな Ala に置換した場合、変異導入に伴う大きな構造変化は生じないと考えられたからである。

3-3-2. PML と PML 変異体の菌体外分泌

T1SS による PML とその変異体タンパク質の菌体外分泌は、*S. marcescens* 由来 Lip システムを導入した大腸菌 HD5 を用いて解析した。培地中に分泌されたタンパク質と、菌体内に蓄積したタンパク質は SDS-PAGE により検出した。その結果は Fig 3-3 に示した。培養液 1L あたりの菌体外分泌量は CBB 染色によるバンドの濃さから、PML では 68 mg、3A-PML では 60 mg、PMLΔ5 では 16 mg、PMLΔ10 では 8 mg、そして 2A-PML では 1.6 mg と見積もられた（Fig 3-3B）。これらの値を Table 3-1 にまとめている。同様に、培養液 1 L あたりのタンパク質の菌体内蓄積量は、PML では 57 mg、3A-PML では 42 mg そして PMLΔ5、PMLΔ10、2A-PML では 110 mg と見積もられた（Fig 3-3A）。

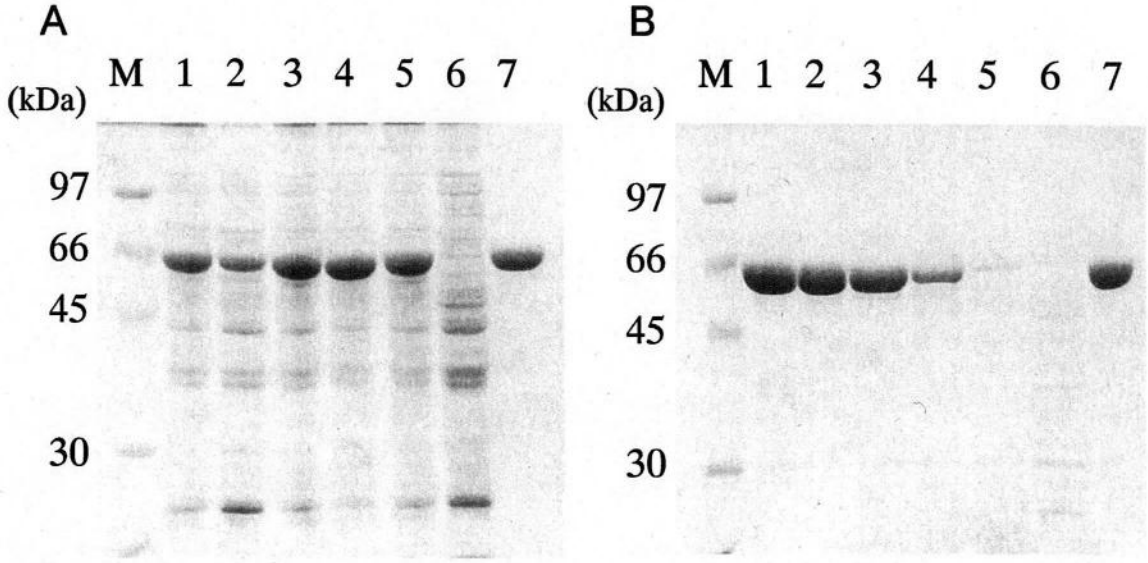


Fig 3-3. SDS-PAGE analysis of proteins secreted into the external medium and accumulated intracellularly. Recombinant *E. coli* DH5 cells were cultivated and the culture supernatant and whole cell extract were prepared as described in Materials and methods. The whole cell extract (A) and culture supernatant (B) were applied to SDS-PAGE using a 12% polyacrylamide gel. The gels were stained with CBB. M, low molecular weight marker kit (GE Healthcare); lanes 1-5, *E. coli* DH5 cells carrying plasmids pYBCD20 and pUC18 derivative for secretion of PML (lane 1), 3A-PML (lane 2), PMLΔ5 (lane 3), PMLΔ10 (lane 4), or 2A-PML (lane 5); lane 6, *E. coli* DH5 cells carrying plasmids pYBCD20 and pUC18; lane 7, purified PML (5 μg). The amount of the sample loaded was 30 μl culture equivalent for whole cell extract and 100 (lanes 1-2) or 400 μl (lanes 3-6) culture equivalent for culture supernatant.

これら全てのタンパク質は菌体内にinclusion bodyとして蓄積されていた(data not shown)。菌体外分泌量と菌体内蓄積量はそれぞれの変異体タンパク質において大きく異なっていた。しかし培養液1Lあたりの菌体外分泌量と菌体内蓄積量の合計は全ての変異体タンパク質において、100～130 mgとほとんど差はなかった。このことは、変異体タンパク質の合成量と菌体内における安定性は野生型タンパク質とそれほど違わないことを示唆している。2A-PMLの菌体外分

泌量はPMLの約1/40であったのに対し、2A-PMLの菌体内蓄積量はPMLの約2倍であった。このことは、5残基配列モチーフの強い疎水性はPMLの分泌に必要であることを示唆している。一方、3A-PML の分泌量および菌体内蓄積量はともにPMLと同様であった。このことは、C末端モチーフの強い疎水性はPMLの分泌に必要ではないことを示している。しかし、C末端モチーフとその上流域は補助的に分泌に関わっている可能性は排除できない。なぜなら、PMLの分泌レベルはC末端モチーフとその上流のループ部分を切除すると大きく減少するからである（Table 3-1）。2A-PMLの分泌量はPMLと比べて大きく減少した一方で、3A-PMLの分泌量はPMLと同様であったことは、C末端に位置するDGIVIAの配列ではなく、C末端から15～19残基目に位置するVTLVGの配列が、PML の分泌シグナルとして機能していることを示唆している。以前、T1SSの分泌タンパク質の分泌シグナルはT1SSの一部のATP-binding cassette (ABC)タンパク質（Lip システムでは LipB）により認識されることが示唆されている（Omori *et al.*, 2001）。しかし、分泌シグナルを含むPMLのC末端領域は、菌体内では不規則な構造を形成すると考えられる。従って、LipBがどのような機構で分泌シグナルを認識するのか大変興味深い。

Table 3-1. Secretion competencies, and enzymatic activities of PML and its mutant proteins

Protein	Secretion competency[a]		Enzymatic activity[b]			
	Amount of external protein (mg)	Relative amount of external protein (%)	Specific esterase activity (U/mg)	Relative esterase activity (%)	Specific lipase activity (U/mg)	Relative lipase activity (%)
PML	68	100	70	100	2800	100
2A-PML	1.6	2.3	75	107	2900	104
3A-PML	60	88	64	91	2800	100
PMLΔ5	16	24	71	101	2800	100
PMLΔ10	8	12	68	97	2900	104

[a] The amount of the protein secreted to the external medium (external protein) was estimated from the intensity of the band visualized with CBB staining following SDS-PAGE. Relative amount of external protein is calculated by dividing the amount of the mutant protein secreted to the external medium by that of PML.

[b] The specific esterase and lipase activities were determined at 30°C in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 10 mM $CaCl_2$ using *p*-nitrophenyl laurate and olive oil as a substrate, respectively. Relative activity is calculated by dividing the specific activity of the mutant protein by that of PML. The experiment was carried out at least twice and errors from the average values were within 3 and 4 % of the values reported for relative esterase and lipase activities, respectively.

3-3-3. PMLおよびPML変異体の大量生産と精製

PML と変異体タンパク質は、pET システムを用いて大腸菌 HMS174(DE3) pLysS で inclusion body として大量生産した。この inclusion body を 8 M 尿素存在下で可溶化し、精製した。この精製物を尿素を含まない緩衝液に対して透析して尿素を取り除くことにより、タンパク質を再構成させ、生化学的解析に用いた。菌体外に分泌された変異体タンパク質を精製することも可能であったが、本研究では再構成させたタンパク質を用いた。以前の研究で、再構成されたタンパク質は菌体外に分泌されたタンパク質と同等の活性を示すことが明らかにされている（Kwon *et al.*, 2002）。全ての変異体タンパク質の生産レベルは PML と同等であった（～100 mg/L-culture）。1L の培地から精製されたタンパク質の収量は約 50 mg であった。

変異体タンパク質の短波長および長波長 CD スペクトルはいずれも PML と類似していた（Fig 3-4）。このことから、PML の構造は C 末端を削除しても、C 末端領域に変異を入れても、大きく変化しないことが示唆された。しかし、PMLΔ5 と PMLΔ10 においては、その短波長 CD スペクトルは 220 nm 周辺で PML や他の変異体タンパク質と少し異なっていた。その理由としては、β35 鎖を除去したことにより、相対的にヘリックス含量が増えたためと考えられる。同様に、PMLΔ5 と PMLΔ10 の短波長 CD スペクトルは 265～285 nm で PML や他の変異体タンパク質と少し異なっていた。その理由としては、Tyr404、Phe559、Phe567、Phe579、Phe594 など幾つかの芳香族アミノ酸残基が C 末端領域に位置しており、これらの構造や周囲の環境が C 末端領域の除去により少し変化したためと考えられる。

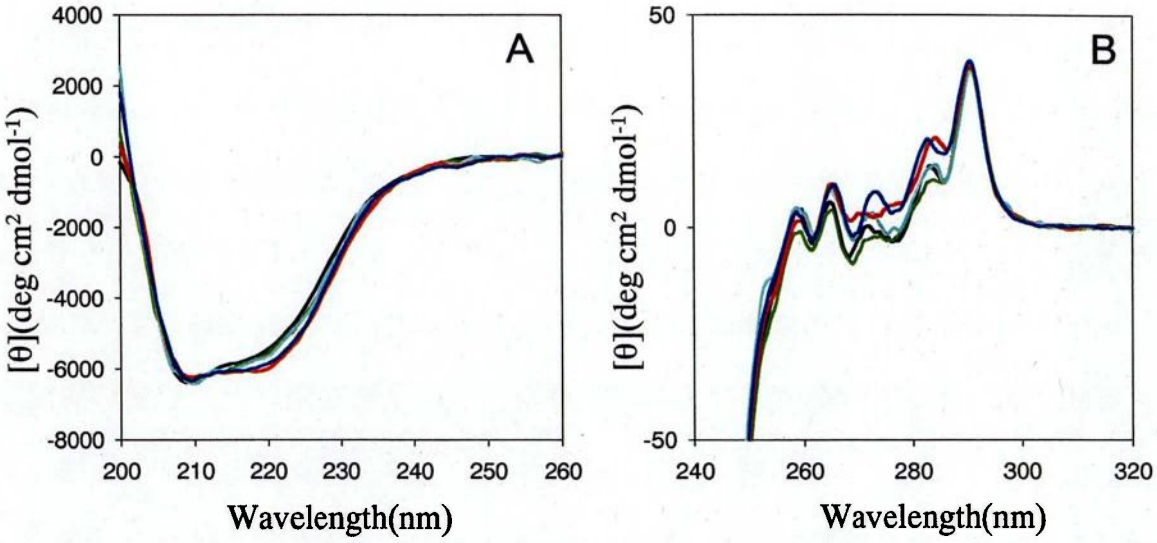
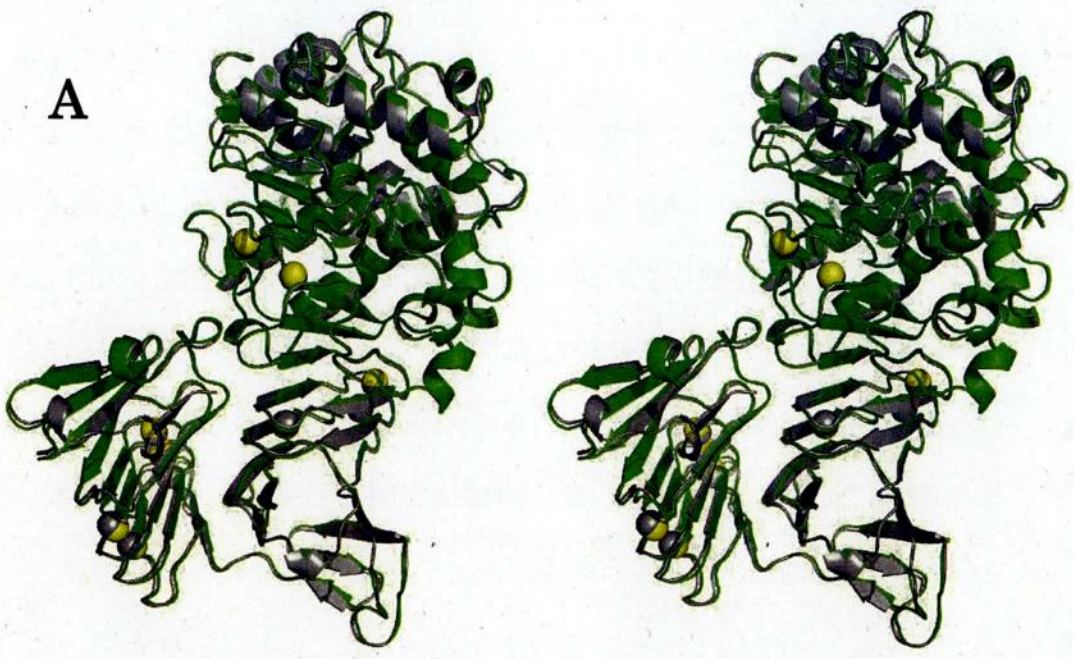


Fig 3-4. CD spectra. The far-UV (A) and near-UV (B) CD spectra of PML (black line), 2A-PML (green line), 3A-PML (cyan line), PMLΔ5 (red line), and PMLΔ10 (blue line) were measured at 25°C in 25 mM Tris–HCl (pH 7.5) containing 10 mM $CaCl_2$.

3-3-4. PMLΔ10の結晶構造



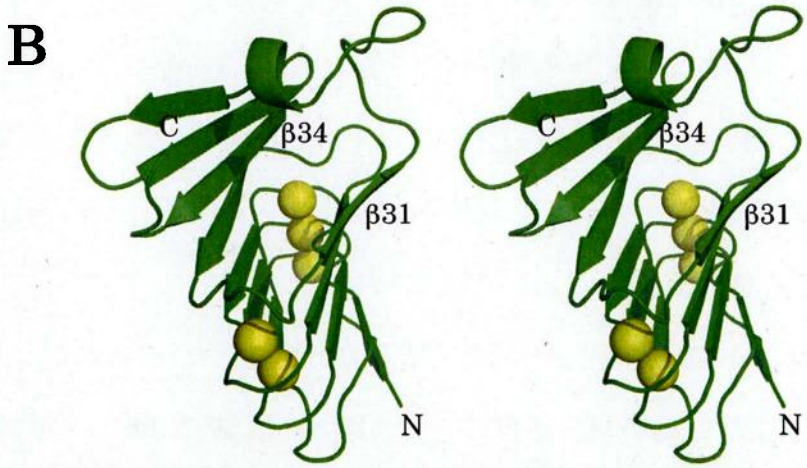


Fig 3-5. (A) A stereo view of superposition of the structures of PML and PMLΔ10, which are colored gray and green, respectively. The Ca^{2+} ions in the PML and PMLΔ10 structures are shown in gray and yellow spheres, respevtively. (B) A stereo view of the structure of PMLΔ10. Only the structures of the C-terminal regions (residues 489-616) are shown. The Ca^{2+} ions are shown in yellow spheres.

C 末端の欠損により PML の構造がそれほど変化しないことを確認するために PMLΔ10 の結晶化を行い、X 線結晶構造解析により PMLΔ10 の結晶構造を 2.1 Åの分解能で決定した（Fig 3-5A）。PMLΔ10 の結晶構造は、C 末端の 10 残基が削除されている以外、PML の close 構造と同じであった。なお PML と PMLΔ10 の全てのα炭素原子の RMSD 値の平均値は、0.47Åであった。以上の結果、C 末端から 10 残基削除しても、PML の構造はほとんど変化しないことを明らかにした（Fig 3-5B）。このことから、他の変異体の構造も PML とほとんど同じと考えられる。

3-3-5. PML および PML 変異体の酵素活性

C末端領域の削除あるいは変異がPMLの酵素活性に及ぼす影響を調べるために、PMLと変異体タンパク質のエステラーゼ活性およびリパーゼ活性を、

それぞれ *p*-nitrophenyl laurate およびオリーブオイルを基質として用いて、30℃で 10 mM 塩化カルシウム存在下で測定した。その結果を Table 3-1 に示す。両基質に対する全ての変異体タンパク質の比活性は PML と同等であった。これらの結果から、C 末端を削除しても、C 末端領域に変異を入れても、PML の酵素活性はそれほど大きく変化しないことが示唆される。

以前、C 末端から 19 残基削除すると PML のエステラーゼおよびリパーゼ活性は約 90%低下することが報告されている（Kwon *et al.*, 2002）。この変異体においては、C 末端からβ34 鎖の中央付近まで削除されている。β34 鎖は長いβシートの真中に位置している（Fig 3-2A）ため、β34 鎖の除去により、βロールモチーフ構造が大きく変化し、そのためにと N 末端触媒ドメインの構造も変化したのかもしれない。以前、βロールモチーフ構造の構造形成が不完全だと PML の酵素活性は大きく低下することが報告されている（Kwon *et al.*, 2002; Angkawidjaja *et al.*, 2005）。

3-3-6. PML および PML 変異体の熱安定性

C 末端領域の削除および変異が PML の熱安定性に及ぼす影響を調べるために、PML とその変異体タンパク質の安定性を、温度上昇に伴う 220 nm での CD 値の変化を追跡することにより解析した。これらのタンパク質の熱変性はいくつかの条件で解析したが、どの条件でも不加逆的であった。10 mM 塩化カルシウム存在下、pH7.5 で測定した PML と変異体タンパク質の熱変性曲線を Fig 3-5 に示す。また熱変性曲線の変性中点温度（$T_{1/2}$）を Table 3-2 に示す。2A-PML の $T_{1/2}$ は PML と同等であったが、3A-PML、PMLΔ5、そして PMLΔ10 の $T_{1/2}$ は PML よりそれぞれ、2.1、7.6、そして 7.6℃低かった。

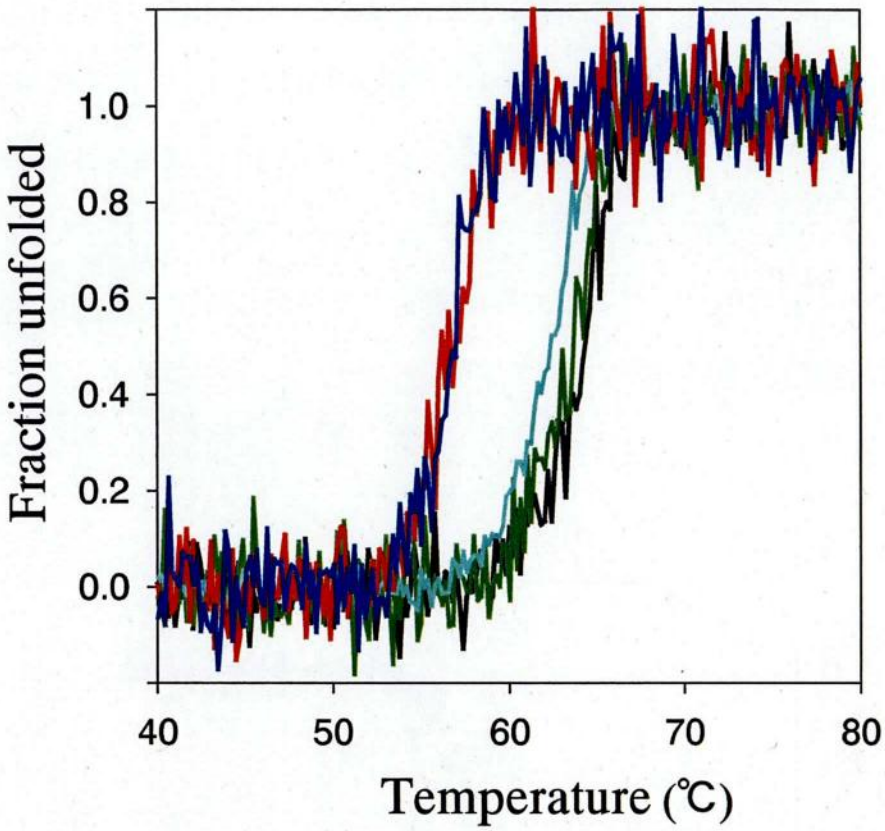


Fig 3-6. Thermal denaturation curves. The thermal denaturation curves of PML (black line), 2A-PML (green line), 3A-PML (cyan line), PMLΔ5 (red line), and PMLΔ10 (blue line) were measured in 25 mM Tris–HCl (pH 7.5) containing 10 mM $CaCl_2$ by monitoring the change in CD values at 220 nm as described in Materials and methods.

3-3-7. PML および PML 変異体の尿素変性に対する安定性

C 末端領域の削除および変異が、PML の構造的安定性に及ぼす影響を調べるために、PML およびその変異体タンパク質の安定性を、尿素濃度の上昇に伴う 220 nm での CD 値の変化を追跡することにより解析した。pH7.5、25℃では、これらのタンパク質の尿素変性はいずれも可逆的であった。PML と変異体タンパク質の尿素変性曲線を Fig 3-6 に示す。また、尿素変性の熱力学的パラメータを Table 3-2 に示す。2A-PML の $\Delta G(H_2O)$ と C_m は、PML とほぼ同じで

あった。このことは、2A-PML の構造安定性は、熱安定性の解析結果同様に、PML とほぼ同じであることを示唆している。一方、3A-PML、PMLΔ5、および PMLΔ10 のΔG(H_2O)は、PML よりそれぞれ 5.0、21.3、および 17.9 kJ/mol 低かった。更に、3A-PML、PMLΔ5、および PMLΔ10 の尿素変性曲線の変性中点濃度（C_m）は、PML よりそれぞれ 0.36、0.56、および 0.47 M 低かった。従って、これら変異体タンパク質の構造安定性を解析して得られた結果は、熱安定性の解析結果とほぼ一致する。

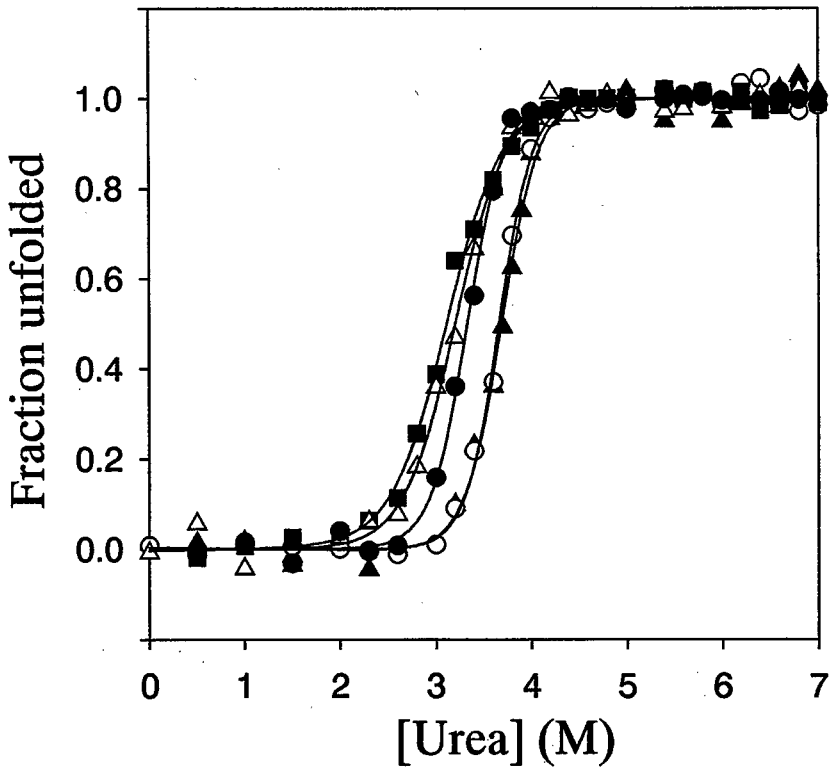


Fig 3-7. Urea-induced denaturation curves. The urea-induced denaturation curves of PML (filled triangle), 2A-PML (open circle), 3A-PML (filled circle), PMLΔ5 (filled square), and PMLΔ10 (open triangle) were obtained at pH 7.5 and 25°C in the presence of 10 mM $CaCl_2$ by monitoring the change in CD values at 220 nm as described in Materials and methods.

PML と 3A-PML の間の $\Delta G(H_2O)$の差（$\Delta\Delta G(H_2O)$）は、PML と PML Δ5 の間の $\Delta\Delta G(H_2O)$の 1/4 であり、この結果は $T_{1/2}$ 値の差と類似している。一方、PML と 3A-PML の間の C_m 値の差は、PML と PMLΔ5 の C_m の差の 2/3 である。つまり、3A-PML の $\Delta G(H_2O)$や $T_{1/2}$ 値はどちらかというと、PMLΔ5 より PML に類似しているのに対して、3A-PML の C_m 値は PML より PMLΔ5 に類似している。この不一致は PML と PMLΔ5 の m値の違いに起因する。PML Δ5 の m値は PML と比較するとかなり低いが、3A-PML の m値は PML と同等だからである。このことは、尿素によって誘導される PMLΔ5 の変性の共同性が PML や 3A-PML より低いことを示唆している。

Table 3-2. Stabilities of PML and its mutant proteins

	Thermal stability[c]		Parameters characterizing urea-induced denaturation[d]				
Protein	$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	m (kJ/mol/M)	C_m (M)	ΔC_m (M)	$\Delta G(H_2O)$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta G(H_2O)$ (kJ/mol)
PML	64.3	-	12.9±1.14	3.68±0.1	-	47.5±4.23	-
2A-PML	63.3	-1.0	13.9±1.01	3.68±0.1	0.0	51.1±3.72	+3.6
3A-PML	62.2	-2.1	12.8±0.75	3.32±0.1	-0.36	42.5±2.56	-5.0
PMLΔ5	56.7	-7.6	8.41±0.69	3.12±0.1	-0.56	26.2±2.28	-21.3
PMLΔ10	56.7	-7.6	9.23±0.81	3.21±0.1	-0.47	29.6±2.6	-17.6

[c] Thermal denaturation of the protein was analyzed at the same condition for assay by monitoring the change in CD values at 220 nm. $T_{1/2}$ represents the midpoint of the transition of the thermal denaturation curve. $\Delta T_{1/2} = T_{1/2}$(mutant) – $T_{1/2}$(PML). The experiment was carried out at least twice and the errors from the average values were ±0.1°C.

[d] Urea-induced denaturation curves of the proteins were measured at pH 7.5 containing 10 mM $CaCl_2$ and 25°C. Urea-induced denaturation of these proteins was reversible under this condition. The midpoint of the urea-induced denaturation curve (C_m), the measurement of the dependence of ΔG on the urea concentration (m), and the free energy change of unfolding in H_2O [$\Delta G(H_2O)$] were calculated from the urea-induced denaturation curves shown in Fig 3-6. The differences in $\Delta G(H_2O)$ [$\Delta\Delta G(H_2O)$] and C_m (ΔC_m) between the wild-type and mutant proteins were calculated by the equations $\Delta\Delta G(H_2O) = \Delta G(H_2O)$(mutant) – $\Delta G(H_2O)$(PML) and $\Delta C_m = C_m$(mutant) – C_m(PML), respectively. The experiment was carried out at least twice and the errors from the average values are indicate.

3-3-8. C 末端モチーフの役割

2A-PML の酵素活性や安定性は PML とほぼ同じである。このことは、β34 鎖の強い疎水性は PML の活性や安定性に必要でないことを示唆している。また、3A-PML、PMLΔ5、そして PMLΔ10 の酵素活性は PML と同等である。このことは、β35 鎖は PML の構造形成や活性に必要ではないことを示している。もしβ35 鎖が PML の構造形成に必要ならば、PMLΔ5 と PMLΔ10 は正しく折りたたまれず、酵素活性を示さないと考えられる。しかし、PMLΔ5 は PML よりも $T_{1/2}$ で 7.6℃、ΔG(H_2O)で 21.3 kJ/mol 不安定である。このことは、β35 鎖は PML の安定性に重要であることを示している。β35 鎖は水素結合と疎水性相互作用を介してコア領域に固定されている。ここで、β35 鎖とβ31 鎖との間で 3 つの水素結合が形成され（Fig 3-8A)、Ile614、Val615、そして Ile616 の側鎖が C 末端ドメインのコア領域と疎水性相互作用を形成している（Fig 3-8B)。C 末端の 5 残基を削除すると、これらの水素結合や疎水結合は取り除かれる。一方、Ile614～Ile616 の三重変異では、水素結合は取り除かれないが、疎水性相互作用が大幅に減少する。PML が三重変異よりも C 末端を削除されることで、大幅に不安定になったことは、主として水素結合が PML の安定化に寄与することを示唆している。

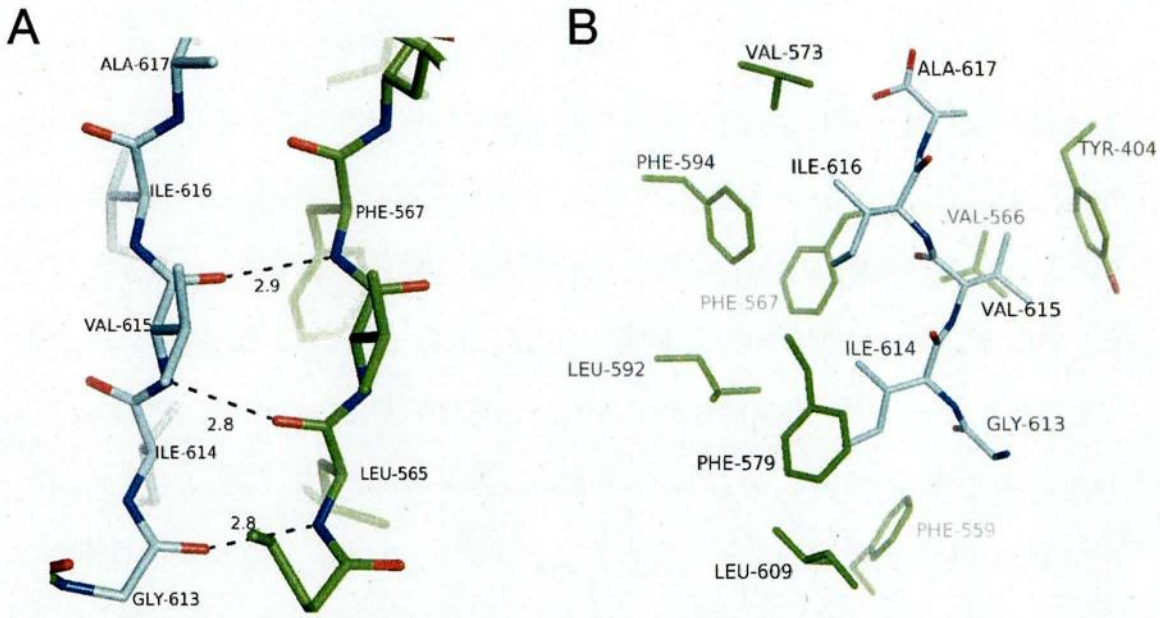


Fig 3-8. A close-up structure around the extreme C-terminal region. The structure is shown as a stick model, in which nitrogen and oxygen atoms are colored blue and red, respectively. The extreme C-terminal region is colored cyan and the other regions are colored green. (A) Three hydrogen bonds formed between β35- and β31-strands are shown with broken lines together with the distances. (B) The side chains of hydrophobic amino acid residues that make hydrophobic interactions with the extreme C-terminal region are shown.

三重変異がタンパク質の安定性にほとんど影響しなかったのは、おそらく Ala が立体的な衝突を起こさず、穏やかな疎水性を有しているためだと考えられる。以前、C 末端テールが固定されると、タンパク質は安定化されることが報告されている（You *et al.*, 2007）。β35 鎖は、SML（PDB ID 2QUA）（Meier *et al.*, 2007）、*S. marcescens* 由来メタロプロテアーゼ（PDB ID 1SAT）（Baumann, 1994）、そして *Pseudomonas aeruginosa* 由来アルカリプロテアーゼ（PDB ID 1AKL）（Baumann *et al.*, 1993）に良く保存されているため、おそらくこれらのβ鎖も、これらのタンパク質の安定化に寄与していると思われる。

3-4. 要約

PML の C 末端から 15～19 残基のところに位置している 5 残基配列モチーフ（VTLVG）と C 末端モチーフ（DGIVIA）は、T1SS により分泌されるタンパク質に比較的よく保存されている。これらのモチーフの役割を解析するために、4 種類の PML 変異体タンパク質（PMLΔ5、PMLΔ10、2A-PML、そして 3A-PML）を構築した。PMLΔ5 と PMLΔ10 は、それぞれ C 末端から 5 残基、10 残基削除された変異体である。また 3A-PML は C 末端モチーフに三重変異を、2A-PML は 5 残基配列モチーフに二重変異を有している。これらのタンパク質の分泌を、Lip システムを導入した大腸菌 DH5 を用いて解析した。その結果、2A-PML の分泌レベルを PML と比較すると劇的に減少したが、3A-PML の分泌レベルは PML と同等であった。このことは、C 末端モチーフではなく、5 残基配列モチーフが PML の分泌に必要であることを示唆している。また、C 末端領域に変異を入れても、C 末端領域を削除しても、PML の酵素活性はそれほど変化しなかった。しかし、3A-PML、PMLΔ5、そして PMLΔ10 の安定性は PML と比べて、$T_{1/2}$ でそれぞれ 2.1、7.6、そして 7.6℃、$\Delta G(H_2O)$ でそれぞれ 5.0、21.3、そして 17.9 kJ/mol 不安定化していた。これらの結果から、PML の C 末端モチーフは安定性に重要であることが示唆される。C 末端領域の削除による不安定化が大きな構造変化によるものでないことは、PMLΔ10 の結晶構造を決定することにより確認した。

【総括】

微生物が生産するリパーゼは入手が容易であること、安定であること等の理由から、バイオテクノロジー分野において様々な利用法が開発されており、油脂の分解、脂肪酸や石鹸の製造、食品加工、食品添加物や医薬品の製造、臨床検査薬、洗剤など多様な産業分野で使用されている。中でも真正リパーゼ(true lipase)のグラム陰性細菌由来 Family I.1 リパーゼおよび Family I.2 リパーゼはよく利用されている。これらのリパーゼに関しては、三次構造も決定され、構造機能相関が詳細に解析されている。しかしもう 1 つの真正リパーゼである Family I.3 リパーゼに関しては、大量調製が容易で、構造形成にシャペロン等の cofactor を必要としないことから産業酵素としての大きな可能性を秘めているものの、これまで実際に産業利用された例は少ない。その理由として、生化学的諸特性はかなり明らかにされているものの、三次構造がまだ決定されていないため、構造情報に基づく知見が十分に得られていないことがあげられる。そこで本研究では、Family I.3 リパーゼの産業利用を視野に入れて、PML の結晶構造を決定し PML の構造機能相関に関して新たな知見を得ることを目的として以下のような研究を行った。

第 1 章では、Family I.3 リパーゼの Ca^{2+}イオンの結合状態や、C 末端ドメインのβロールモチーフ構造と N 末端触媒ドメインの関係などを立体構造の観点から理解することを目的として、PML の結晶化および X 線結晶構造解析を行い、PML の結晶構造を close 構造として 1.5Å の分解能で決定した。その結果、PML は N 末端触媒ドメインと C 末端 RTX ドメインから成ることを明らかにした。一方、同時期に SML の結晶構造が open 構造として決定され

た。そこで2つの構造を比較したところ、PMLとSMLには通常のリパーゼに見られるlid（lid1）の他に、もう1つのlid（lid2）の存在することを見いだした。いずれのlidもclose構造では活性部位を覆っているのに対して、open構造では活性部位を溶媒に露出させるようにその構造や位置が大きく変化している。PMLのclose構造はtriton X-100非存在下で決定されたのに対して、SMLのopen構造はtriton X-100存在下で決定されている。従って基質非存在下ではlid1とlid2はclose構造を形成して活性部位を覆い、ミセル状の基質存在下では、これらのlidはopen構造を形成すると考えられる。

興味深いことに、lid1はopen構造を形成する時だけCa^{2+}イオンにより固定されていた。このCa^{2+}イオンが結合するサイト（Ca1サイト）はclose構造では形成されない。なぜなら、close構造ではlid1は途中で折れ曲がり、Ca1サイトを構成するアミノ酸残基は互いに離れ溶媒に露出するからである。open構造のSMLにはCa1サイトの他にもう1つのCa^{2+}イオン結合サイト（Ca2）が存在する。このサイトはclose構造のPMLにも存在する。PMLには更にもう1つのCa^{2+}イオン結合サイト（Ca3）が存在する。SMLにCa3サイトが存在しないのは、このサイトを構成するアミノ酸残基があまり良く保存されていないためと思われる。一方、Ca1サイトとCa2サイトを構成するアミノ酸残基は様々なFamily I.3リパーゼの間で良く保存されている。

lid1とlid2の構造が大きく変化することと、Ca1サイトがopen構造でのみ形成されることを除いて、close構造のPMLとopen構造のSMLの構造に大きな違いはない。いずれのC末端ドメインも2つのβロールモチーフ構造が互いに横に並ぶβロールサンドイッチモチーフ構造を形成する。C末端ドメインには13個のRTX繰り返し配列があるが、最初の5個が1つ目のβロールモチーフ構造を、最後の8個が2つ目のβロールモチーフ構造を形成する。

このβロールサンドイッチ構造には Ca^{2+}イオンがループとループの間に挟まれるように結合しているが、その数はPMLでは8個、SMLでは6個と違いが見られた。以上、PMLの結晶構造をclose構造として決定することにより、N末端触媒ドメインにはlid1とlid2の2つのlidが存在することを明らかにした。また、N末端触媒ドメインにはCa1サイト以外に2つのCa^{2+}イオン結合サイト（Ca2とCa3）が存在することを明らかにした。更に13個のRTX繰り返し配列はβロールサンドイッチ構造を形成すること、このβロールサンドイッチ構造には8個のCa^{2+}イオンが結合することを明らかにした。

第2章では、第1章で同定した3個のCa^{2+}イオン結合サイト（Ca1～Ca3）の役割を解析するために、3種類の1アミノ酸置換変異体D157A-PML、D275A-PML、およびD337A-PMLを構築した。これら3つの変異体のうちCa^{2+}イオン存在下でD157A-PMLとD337A-PMLの結晶構造をclose構造で決定した。これらの構造のうちD337A-PMLはCa3サイトにCa^{2+}イオンが結合していなかったことを除けば、両タンパク質ともにその構造はPMLとよく似ていた。酵素活性や熱安定性を解析したところD337A-PMLはPMLと同じ活性を示した。D157A-PMLはリパーゼ活性を示さず、そのエステラーゼ活性も著しく低下していた。D275A-PMLはD157A-PMLよりは高いがPMLよりも低い活性を示した。熱安定性に関しては、D157A-PMLはCa^{2+}イオン存在下ではPMLと同じ安定性を示したが、triton X-100存在下ではその安定性はPMLより1℃低かった。またD275A-PMLとD337A-PMLの安定性はPMLより5℃低かった。以上の結果、活性に必須のCa^{2+}イオンはCa1サイトに結合してlid1のopen構造を固定（安定化）するのに必要であることを明らかにした。また、Ca2サイトは安定性に寄与し、更に活性残基を最適な位置に維持するために必要であることを明らかにした。更にCa3サイトはFamily I.3リパーゼの一部

にしか保存されていないが、これらのリパーゼの安定化に寄与していることを提案した。

第3章では、Family I.3 リパーゼに保存されている C 末端モチーフと5残基配列モチーフの役割を解析することを目的として、C 末端モチーフを切除したり、5残基配列モチーフや C 末端モチーフに変異を入れたりすることにより、4種類の PML 変異体、PMLΔ5、PMLΔ10、2A-PML、3A-PML を構築した。これらの変異体の諸特性解析を行なう前に C 末端の削除が PML の構造に影響を及ぼすかどうか調べるために結晶化およびX線結晶構造解析を行い、PMLΔ10 の結晶構造を決定した。その結果、C 末端の 10 残基を削除しても PML の全体構造はそれほど変化しないことが分かった。そこで 4 種類の変異体の分泌、酵素活性、および安定性を調べた。Lip システムを用いて各種変異体の菌体外分泌を解析したところ、2A-PML の分泌レベルは PML より劇的に減少したが、3A-PML の分泌レベルは PML と同等であった。また、C 末端領域に変異を入れても、C 末端領域を削除しても、PML の酵素活性はそれほど変化しなかった。しかし、3A-PML、PMLΔ5、そして PMLΔ10 の安定性に関しては、熱変性でも尿素変性でも PML と比べて安定性が低下していた。特に PMLΔ5 と PMLΔ10 では大きく安定性が低下していた。以上の結果、5残基配列モチーフは PML の分泌シグナルとして働くこと、C 末端モチーフは PML の安定性に重要であることを明らかにした。ここで C 末端モチーフは Family I.3 リパーゼだけでなく、T1SS により分泌される他のタンパク質にも保存されている。従って、C 末端モチーフはこれらのタンパク質の安定化に寄与すると考えられる。

本研究の後で、PML の open 構造が、Ca^{2+}イオンと triton X-100 存在下で 2.1Å の分解能で決定された。PML の open 構造は SML の open 構造とほ

ぼ同じであった。PML の open 構造と close 構造を比較すると、open 構造では、lid1 と lid2 は close 構造の位置から大きく動き、lid1 は Ca1 サイトで Ca^{2+}イオンにより固定されていた。一方、結晶化の前に、Ca^{2+}イオンを含まず triton X-100 のみ含む緩衝液に対して PML を透析しても、このタンパク質の結晶構造は上述の open 構造とほとんど変わらなかった。このことから、ミセル基質を除かない限り、PML の open 構造はかなり安定であることが示唆された。またミセル基質非存在下で、PML の open 構造を MD シミュレーションしたところ、はじめに lid2 が閉じ、lid 1 は開いたままであった。更に Ca^{2+}イオン非存在下、オクタンまたはトリラウリンミセル存在下で PML の close 構造を MD シミュレーションしたところ lid1 は開いたが、lid2 は閉じたままであった。これらの結果から Ca1 サイトの Ca^{2+}イオンは、はじめに lid1 の open 構造を固定して安定化させ、その後 lid2 の開口を誘導する機能を有していることが示唆された。

今後の展望として、本研究で同定した Lip システムの分泌シグナル（5 残基配列モチーフ）と Lip システムの ABC タンパク質がどのように相互作用し、分泌タンパク質を菌体外へ輸送するのかを明らかにすることは非常に興味深い。また、PML を産業の場で利用させるためにタンパク質工学的に酵素活性、安定性、位置選択性、光学選択性などを改変した変異体を構築することは興味深い。PML は他の Family のリパーゼとは異なり 2 つの lid を有している。このため open 構造を形成すると活性部位周辺は大きく開き、ミセル基質と接触することができ、非常に高いリパーゼ活性を示す。この高い酵素活性を活かして、疎水性相互作用で形成している β ロールサンドイッチ構造を化学的または、タンパク質工学的に改良して、有機溶媒中でも安定に形成する変異体を構築できれば産業の分野でも活躍すると期待できる。

【参考文献】

Akatsuka H., Kawai E., Omori K., Komatsubara S., Shibatani T. and Tosa T. (1994) The *lipA* gene of Serratia marcescens which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. *J. Bacteriol.* **176**, 1949-1956.

Amada K., Haruki M., Imanaka T., Morikawa M. and Kanaya S. (2000) Overproduction in *Escherichia coli*, purification and characterization of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Biochim. Biophys. Acta* **1478**, 201-210.

Amada K., Kwon H-J., Haruki M., Morikawa M. and Kanaya S. (2001) Ca(2+)-induced folding of a family I.3 lipase with repetitive Ca(2+) binding motifs at the C-terminus. *FEBS Lett.* **509**, 17-21.

Angkawidjaja C., Paul A., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2005) Importance of a repetitive nine-residue sequence motif for intracellular stability and functional structure of a family I.3 lipase. *FEBS Lett.* **579**, 4707-4712.

Angkawidjaja C. and Kanaya S. (2006) Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 2804-2817.

Angkawidjaja C., Kuwahara K., Omori K., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2006) Extracellular secretion of *Escherichia coli* alkaline phosphatase with a C-terminal tag by type I secretion system: purification and biochemical characterization. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 337-343.

Angkawidjaja C., You D. J., Matsumura H., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2007a) Extracellular overproduction and preliminary crystallographic analysis of a family I.3 lipase. *Acta Crystallogr. Sect. F* **63**, 187-189.

Angkawidjaja C., You D. J., Matsumura H., Kuwahara K., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2007b) Crystal structure of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38 in a closed conformation. *FEBS Lett.* **581**, 5060-5064.

Angkawidjaja C., Matsumura H., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2010) X-ray crystallographic and MD simulation studies on the mechanism of interfacial activation of a family I.3 lipase with two lids. *J. Mol. Biol.* **400**, 82-95.

Arpigny J. L. and Jaeger K. E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J.* **343**, 177-183.

Baumann U. (1994) Crystal structure of the 50 kDa metallo protease from Serratia marcescens. *J. Mol. Biol.* **242**, 244-251.

Baumann U., Wu S., Flaherty K. M. and McKay D. B. (1993) Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J.* 12, 3357-3364.

Braunagel S. C. and Benedik M. J. (1990) The metalloprotease gene of *Serratia marcescens* strain SM6. **222**, 446-451.

Chenal A., Guijarro J. I., Raynal B., Delepierre M. and Ladant D. (2009) RTX calcium binding motifs are intrinsically disordered in the absence of calcium: implication for protein secretion. *J. Biol. Chem.* **284**, 1781-1789.

Collaborative Computational Project, Number 4. (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763.

Dao-Pin S., Alber T., Bell J. A., Weaver L. H. and Matthews B. W. (1987)

Use of site-directed mutagenesis to obtain isomorphous heavy-atom derivatives for protein crystallography: cysteine-containing mutants of phage T4 lysozyme. *Protein Eng.* **1**, 115–123.

Delepelaire P. (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 149-161.

Delepelaire P. and Wandersman C. (1989) Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*. Proteases B and C are synthesized and secreted as zymogens without a signal peptide. *J. Biol. Chem.* **264**, 9083-9089.

Derewenda Z. S. (1993) In: Advances in Protein Chemistry (Schumaker, V. N., Ed.) pp.1-52, Academic Press Inc., New York, NY.

Duong F., Lazdunski A., Cami B. and Murgier M. (1992) Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in Pseudomonas aeruginosa: relationships to other secretory pathways. *Gene* **121**, 47-54.

Economou A., Hamilton W. D., Johnston A. W. and Downie J. A. (1990) The Rhizobium nodulation gene *nodO* encodes a Ca2(+)-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. *EMBO J.* **9**, 349-354.

El Khattabi M.,Ockhuijsan C., Bitter W., Jeager K. E. and Tommassen J. (1999) Specificity of the lipase-specific foldase of Gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor. *Mol. Gen.* **261**, 770-776.

Emsley P. and Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.* **D60**, 2126-2132.

Felmlee T, Pellett S, Welch RA. (1987) Nucleotide sequence of an

Escherichia coli chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.* **163**, 94-105.

Felmlee T. and Welch R. A. (1988) Alterations of amino acid repeats in the *Escherichia coli* hemolysin affect cytolytic activity and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5269-5273.

Frenken L. G., de Groot A., Tommassen J. and Verrips C. T. (1993) Role of the lipB gene product in the folding of the secreted lipase of Pseudomonas glumae. *Mol. Microbiol.* 9, 591-599.

Glaser P., Sakamoto H., Bellalou J., Ullmann A. and Danchin A. (1988) Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis. EMBO J.* 7, 3997-4004.

Ghigo J. M. and Wandersman C. (1994) A carboxyl-terminal four-amino acid motif is required for secretion of the metalloprotease PrtG through the *Erwinia chrysanthemi* protease secretion pathway. *J. Biol. Chem.* **269**, 8979-8985.

Hamada K., Hata Y., Katsuya Y., Hiramatsu H., Fujiwara T. and Katsube Y. (1996) Crystal structure of *Serratia* protease, a zinc-dependent proteinase from *Serratia* sp. E-15, containing a β-sheet coil motif at 2.0 A resolution. *J. Biochem.* 119, 844-851.

Hess J., Gentschev I., Goebel W. and Jarchau T. (1990) Analysis of the haemolysin secretion system by PhoA-HlyA fusion proteins. *Mol. Gen. Genet.* 224, 201-208.

Hege T. and Baumann U. (2001) Protease C of *Erwinia chrysanthemi*: the crystal structure and role of amino acids Y228 and E189. *J. Mol. Biol.* **314**,

187-193.

Holland I. B., Schmitt L. and Young J. (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol. Membr. Biol.* 22, 29-39.

Horton R. M., Cai Z. L., Ho S. N. and Pease L. R. (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 8, 528-535.

Jeager K. E. and Reetz M. T. (1998) Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends. Biotechnol.* 16, 396-403.

Johnson T. L., Abendroth J., Hol W. G. and Sandkvist M. (1993) Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 175-186.

Jones H. E., Holland I. B. and Campbell A. K. (2002) Direct measurement of free Ca(2+) shows different regulation of Ca(2+) between the periplasm and the cytosol of *Escherichia coli. Cell Calcium* 32, 183-192.

Kawai E., Akatsuka H., Idei A., Shibatani T. and Omori K. (1998) *Serratia marcescens* S-layer protein is secreted extracellularly via an ATP-binding cassette exporter, the Lip system. *Mol. Microbiol.* 27, 941-952.

Kim K. K., Song H. K., Shin D. H., Hwang K. Y. and Suh S. W. (1997) The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* 5, 173-185.

Kojima Y., Kobayashi M. and Shimizu S. (2003) A novel lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380: gene cloning, overproduction, renaturation-activation, two-step purification, and characterization. *J.*

Biosci. Bioeng. 96, 242-249.

Kwon H. J., Amada K., Haruki M., Morikawa M. and Kanaya S. (2000) Identification of the histidine and aspartic acid residues essential for enzymatic activity of a family I.3 lipase by sitedirected mutagenesis. *FEBS Lett.* 483, 139-142.

Kwon H. J., Haruki M., Morikawa M., Omori K. and Kanaya S. (2002) Role of repetitive nine-residue sequence motifs in secretion, enzymatic activity, and protein conformation of a family I.3 lipase. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 157-164.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S. and Thornton J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.

Lee Y. P., Chung G. H. and Rhee J. S. (1993) Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta* 1169, 156-164.

Létoffé S., Ghigo J. M. and Wandersman C. (1994) Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 9876-9880.

Li X., Tetling S., Winkler U. K., Jaeger K. E. and Benedik M. J. (1995) Gene cloning, sequence analysis, purification, and secretion by *Escherichia coli* of an extracellular lipase from *Serratia marcescens. Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2674-2680.

Liebeton K., Zacharias A. and Jaeger K. E. (2001) Disulfide bond in Pseudomonas aeruginosa lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J. Bacteriol.* **183**, 1312-1319.

Lo R. Y., Strathdee C. A. and Shewen P. E. (1987) Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immun.* **55**, 1987-1996.

Meier R., Drepper T., Svensson V., Jaeger K. E. and Baumann U. (2007) A calcium-gated lid and a large β-roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *J. Biol. Chem.* **282**, 31477-31483.

Miyajima Y., Hata Y., Fukushima J., Kawamoto S., Okuda K., Shibano Y. and Morihara K. (1998) Long-range effect of mutation of calcium binding aspartates [correction of asparates] on the catalytic activity of alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.* **123**, 24-27.

Miyatake H., Hata Y., Fujii T., Hamada K., Morihara K. and Katsube Y. (1995) Crystal structure of the unliganded alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080 and its conformational changes on ligand binding. *J. Biochem.* **118**, 474-479.

Murshudov G. N., Vagin A. A. and Dodson E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sect. D* **53**, 240-255.

Nardini M., Lang D. A., Liebeton K., Jaeger K. E. and Dijkstra B. W. (2000) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.*

275, 31219-31225.

Noble M. E., Cleasby A., Johnson L. N., Egmond M. R. and Frenken L. G. (1993) The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* **331**, 123-128.

Oh B., Kim H., Lee J., Kang S. and Oh T. (1999) *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**, 385–392.

Omori K., Idei A. and Akatsuka H. (2001) *Serratia* ATP-binding cassette protein exporter, Lip, recognizes a protein region upstream of the C terminus for specific secretion. *J. Biol. Chem.* **276**, 27111-27119.

Ostolaza H., Soloaga A. and Goñi F. M. (1995) The binding of divalent cations to *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *Eur. J. Biochem.* **228**, 39-44.

Otwinowski Z. and Minor W. (1997) Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.

Rashid N., Shimada Y., Ezaki S., Atomi H. and Imanaka T. (2001) Low-temperature lipase from psychrotrophic Pseudomonas sp. strain KB700A. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4064-4069.

Pace C. N. (1990) Measuring and increasing protein stability. *Trends Biotechnol.* **8**, 93-98.

Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G. and Gray T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2433.

Pape T. and Schneider T. R. (2004) HKL2MAP: a graphical user interface for

phasing with SHELX programs. *J. Appl. Cryst.* 37, 843-844.

Perrakis A., Morris R. and Lamzin V. S. (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.* 6, 458-463.

Rose T., Sebo P., Bellalou J. and Ladant D. (1995) Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* 270, 26370-36376.

Schrag J. D., Li Y., Cygler M., Lang D., Burgdorf T., Hecht H. J., Schmid R., Schomburg D., Rydel T. J., Oliver J. D., Strickland L. C., Dunaway C. M., Larson S. B., Day J. and McPherson A. (1997) The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* 5, 187-202.

Sheldrick G. and Schneider T. (1997) SHELXL: High-resolution refinement. *Method. Enzymol.* 277, 319–343.

Simons J. W., Adams H., Cox R. C., Dekker N., Götz F., Slotboom A. J. and Verheij H. M. (1996) The lipase from *Staphylococcus aureus.* Expression in *Escherichia coli,* large-scale purification and comparison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase. *Eur. J. Biochem.* 242, 760-769.

Stanley P., Koronakis V. and Hughes C. (1991) Mutational analysis supports a role for multiple structural features in the C-terminal secretion signal of *Escherichia coli* haemolysin. *Mol. Microbiol.* 5, 2391-2403.

Sotomayor Pérez A. C., Karst J. C., Davi M., Guijarro J. I., Ladant D. and Chenal A. (2010) Characterization of the regions involved in the calcium-induced folding of the intrinsically disordered RTX motifs from the

Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *J. Mol. Biol.* 397, 534-549.

Svendsen A., Borch K., Barfoed M., Nielsen T. B., Gormsen E. and Patkar S. A. (1995) Biochemical properties of cloned lipases from the *Pseudomonas* family. *Biochim. Biophys. Acta* 1259, 9-17.

Tan Y and Miller K. J. (1992) Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from Pseudomonas fluorescens B52. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1402-1407.

Talon R., Dublet N., Montel M. C. and Cantonnet M. (1995) Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. *Curr. Microbiol.* 30, 11-16.

Tanaka A., Sugimoto H., Muta Y., Mizuno T., Senoo K., Obata H. and Inouye K. (2003) Differential scanning calorimetry of the effects of Ca^{2+} on the thermal unfolding of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 207-210.

Thompson J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids Res.* 22, 4673-4680.

Urban A., Leipelt M., Eggert T. and Jaeger K. E. (2001) DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.* 183, 587-596.

Vagin A. and Teplyakov A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* 30, 1022-1025.

Yang J., Kobayashi K., Iwasaki Y., Nakano H. and Yamane T. (2000) In vitro

analysis of roles of a disulfide bridge and a calcium binding site in activation of *Pseudomonas* sp. strain KWI-56 lipase. *J. Bacteriol.* **182**, 295-302.

You D. J., Chon H., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2007) Crystal structure of type 1 ribonuclease H from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*: role of arginine 118 and C-terminal anchoring. *Biochemistry* **46**, 11494-11503.

【本研究に関する論文】

1. Angkawidjaja C., You D. J., Matsumura H., Kuwahara K., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2007) Crystal structure of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38 in a closed conformation. *FEBS Lett.* **581**, 5060-5064.
2. Kuwahara K., Angkawidjaja C., Matsumura H., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2008) Importance of the Ca^{2+}-binding sites in the N-catalytic domain of a family I.3 lipase for activity and stability. *Protein Eng. Des. Sel.* **21**, 737-744.
3. Kuwahara K., Angkawidjaja C., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2011) Importance of an extreme C-terminal motif of a family I.3 lipase for stability. *Protein Eng. Des. Sel.* (In Press).

【その他の論文】

1. Angkawidjaja C., Kuwahara K., Omori K., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2006) Extracellular secretion of *Escherichia coli* alkaline phosphatase with a C-terminal tag by type I secretion system: purification and biochemical characterization. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 337-343.

【謝辞】

本研究は、大阪大学　大学院　工学研究科　生命先端工学専攻　金谷茂則教授のもとにおいて行われたものであり、先生より多大なる御指導、御鞭撻を賜りましたことを心より感謝致します。

本研究に際し、暖かい激励と御指導を賜りました大阪大学　大学院工学研究科　生命先端工学専攻　高野和文準教授、古賀雄一助教、Clement Angkawidjaja 特任助教に謹んで御礼申し上げます。更に本研究を行なうにあたり試料提供して戴きました田辺三菱製薬　大森謙司博士に感謝致します。また、高輝度光科学研究センターSPring-8 のシンクロトロン放射光の使用にあたり、便宜を図って戴きました大阪大学　蛋白質研究所　プロテオミクス総合研究センター　中川敦史教授に感謝致します。

本論文をまとめるにあたり、有益な御助言を賜りました大阪大学　大学院　工学研究科　生命先端工学専攻　宮田幹二教授、菊地和也教授に深く感謝致します。日々様々な便宜を図って戴きました松本玲子女史に深く深く感謝致します。本研究を遂行するにあたり、有益な御助言と共に実験の便宜を図って下さいました田中俊一博士に感謝致します。また様々な面で暖かい御配慮を戴いた金谷研究室の皆様に感謝致します。

最後に、在学中も様々な面で支援して下さった両親に深く感謝致します。

桑原　克昌