総合農学研究所所報　**25　2009**

蛋白質工学による酵素の構造と機能の研究：リゾチームの触媒反応機構解明と機能変換

河村　俊介[1)]・衛藤　仁[2)]・米田　一成[1)]・荒木　朋洋[1)]
[1)] バイオサイエンス学科、[2)] 阿蘇教養教育センター

1. 研究目的

本プロジェクトは、高い溶菌活性と組織修復促進作用を持ち、生体防御因子として重要な役割をはたすリゾチームに蛋白質工学的手法を適用し、その触媒反応機構や立体構造構築機構の詳細な解析、さらには機能変換酵素の作製や機能変換機構の解明についても試み、新規有用タンパク質の創製や酵素の応用面での新しい展開を図るための基盤確立を目指すものである。

リゾチームは糖質加水分解酵素であり、細菌細胞壁ペプチドグリカンの *N*-アセチルムラミン酸（MurNAc）と *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）の共重合体およびキチンを構成する GlcNAc の重合体のβ-1, 4 グリコシド結合を加水分解する糖加水分解酵素である。リゾチームはそのアミノ酸配列からニワトリ型リゾチーム、T4 ファージ型リゾチームおよびグース型リゾチームの大きく３つに分類されている。グース型リゾチームは、ニワトリ型リゾチームと比べて 3 倍強力な溶菌活性を有するなど優れた特性を持つが、その 1 次構造はタンパク質から 5 種類、遺伝子から 5 種類明らかにされているのみであり、ニワトリ型や T4 ファージ型と比較して、その構造と機能に関する研究は遅れている。既に立体構造が明らかになっているガチョウ卵白由来グース型リゾチーム（GEL）は、8 本のαヘリックスと 3 つのβシートからなっているが（Fig. 1）、2 本のジスルフィド結合（Cys4-Cys60, Cys18-Cys29）と分子内コア構造を形成する 3 つのヘリックス（α 5, α 7, α 8）は種間で高く保存されており、グ

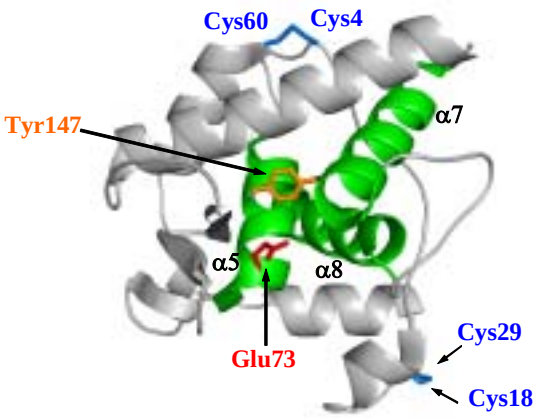

Fig. 1. The three-dimensional structure of GEL .
The two disulfide bonds (Cys4-Cys60 and Cys18-Cys29) and three α-helices (α5, α7, and α8) are shown in blue and green, respectively. The side chain of Glu73 and Tyr147 are also shown in red and orange, respectively.

ース型リゾチームが活性を発現するための立体構造形成における重要性が予測される。

近年我々は、ダチョウ卵白由来グース型リゾチーム（OEL）の遺伝子の人工合成と OEL の酵母での大量発現系を構築し、OEL はニワトリ型リゾチームとは異なり糖転移反応を触媒しない糖加水分解酵素であることを明らかにした。また、この確立した酵母での大量発現系を利用して、α5 の C 末端に位置する Glu73 に関する変異体の解析を行い、Glu73 がグース型リゾチームのプロトンドナーとして働く触媒基であることを初めて実験的に証明するとともに、構造安定性にも重要であるという他の糖加水分解酵素では見られない興味深い事実を明らかにした。さらに、分子動力学的計算を用いて OEL と $(GlcNAc)_6$ との複合体の立体構造をモデリングし、B-G 部位全体の基質結合様式や E-G 部位の基質結合に関与するアミノ酸残基を推定した。OEL は安定でその変性過程が可逆かつ 2 状態変性をたどることから、グース型リゾチームの触媒反応機構だけではなく、立体構造の構造安定性機構を解明するための良い分子ツールであると考えられる。

グース型リゾチームの Tyr147 は分子内コア構造を形成するα7 の C 末端に位置し、触媒基 Glu73 の近傍に存在している (Fig. 1)。ニワトリ卵白リゾチーム (HEL) と GEL の立体構造の重ね合わせからは (Fig. 2)、GEL の Glu73 と Gly90 が HEL の 2 つの触媒基である Glu35 と Asp52 と重なり、GEL の Tyr147 は HEL の Trp108 に相当する位置に存在している。井上らは、HEL の Trp108 を疎水性の低い Tyr と Gln に置換した変異体の解析を行い、Tyr108 の疎水的な性質が HEL の触媒活性、基質結合力、構造安定性および触媒基 Glu35 の以上に高い pK_a の維持重要であることを証明した。したがって、グース型リゾチームの Tyr147 も Trp108 と同様に活性や安定性等に対する重要性が示唆される。

本年度の研究では、主にグース型リゾチームの構造と機能を解明する一環として、OEL の Tyr147 を Phe と Ala に置換した 2 種の変異体を作製し、グース型リゾチームの主鎖構造、基質結合力および構造安定性への影響を解析した。

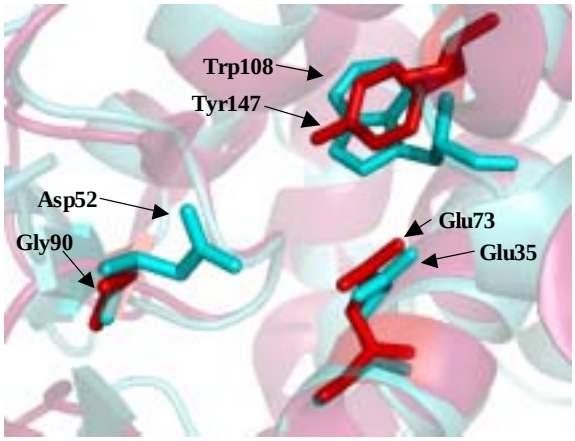

Fig. 2. Superposition of the active site structures of HEL and GEL.

The structures of HEL and GEL are shown in cyan and red, respectively.

2. 材料および方法

(1) ジスルフィド結合を欠失した変異体の作製

変異リゾチーム遺伝子は、PCR による部位特異的変異法で作製した。OEL の cDNA を鋳型にして、目的とする変異を含むプライマーと cDNA の 3’末端に相補的なプライマーを用いて PCR を行った。次にこの PCR 産物と cDNA の 5’末端に相補的なプライマーを用いて再度 PCR を行い、変異リゾチ

ーム遺伝子を作製した。作製した変異遺伝子は pBluescript ベクターの *Xho*I と *Eco*RI 部位に連結後、DNA シークエンスを行い目的の変異を確認した。各変異遺伝子は、酵母用発現ベクターである pPIC9K のα-factor シグナル配列下に挿入後、メタノール資化能を有する宿主酵母 *Pichia pastoris* GS115 に形質転換し、得られた遺伝子組み換え酵母を用いて変異の発現を行った。発現した変異体は陽イオン交換クロマトグラフィーで精製した。

(2) 円偏光二色性（CD）スペクトル

CD スペクトルは，日本分光社製 J-600 を用いて測定した。試料は 10 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）に溶解し、0.15 mg/ml の濃度に調整した。光路長 0.5 mm のセルを用いて、室温にて 260 nm から 190 nm におけるスペクトルを測定した。

(3) キチンコーティングセライトカラムを用いた基質親和性

キチンコーティングセライトカラムは Yamada らの方法にしたがって調製した。試料は約 16 mg/ml の濃度になるように 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で調製し、キチンコーティングセライトカラムに 10 μl インジェクションした。タンパク質の溶出は、流速を 0.5 ml/min とし、80 分間で 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、NaCl 濃度を 0 M から 1 M まで直線的に上昇させて行い 280 nm の紫外吸収で検出した。なお、分析中はカラムを氷中につけ、カラムの温度が 0 ℃になるようにした。

(4) 溶菌活性

溶菌法による活性測定は、MurNAc と GlcNAc の共重合体を細胞壁の構成成分とする *Micrococcus luteus* 菌体に対するリゾチームの溶菌作用を測定する方法で行った。 基質溶液は *Micrococcus luteus* の菌体 (Sigma 製) を 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.0）に懸濁し、540 nm における濁度が 0.9 になるように調製した。酵素反応は、基質溶液 3 ml に、酵素溶液を 100 μl（終濃度 0.015 μM）加えて行い、室温で 540 nm における基質溶液の濁度の減少勾配から初速度を測定した。

(5) GlcNAc のオリゴマーに対する活性測定

GlcNAc のオリゴマーに対する活性測定は、$(GlcNAc)_5$ と $(GlcNAc)_6$ を基質に用いて行った。すなわち、0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解した酵素溶液と基質溶液は、それぞれ 40℃で 5 分間プレインキュベーションした後、基質溶液に酵素溶液を加えて反応を開始した。反応は酵素濃度約 1.0×10^{-4} M、基質濃度約 1.0×10^{-3} M で行った。反応生成物の分析は、TSKgel Amide-80 カラム (4.6×250 mm, 東ソー製) を装着した HPLC で行った。溶出は 69%アセトニトリルを用い、30℃、流速 1.0 ml/min で行った。GlcNAc のオリゴマーはアセチル基に由来する 220 nm の

紫外吸収で検出した。GlcNAc のオリゴマーの濃度は測定された面積と標準曲線から換算した。標準曲線は 10 μl の濃度既知の$(GlcNAc)_1$ から $(GlcNAc)_6$ を活性測定法と同一カラム、同一条件で分離し、オリゴマーの濃度と面積から作製した。

(6) 熱に対する熱力学的安定性

熱に対するタンパク質の安定性は、温度変化に伴うタンパク質の蛍光強度（励起波長；280 nm，蛍光波長；360 nm）または CD での 220 nm の楕円率の変化で測定した。タンパク濃度は、蛍光測定では 0.015 mg/ml に CD 測定では 0.15 mg/ml に、0.5 M グアニジン塩酸（GdnHCl）を含む 0.1 M 酢酸緩衝液（pH 5.0）で調整した。タンパク質の変性が 2 状態変性であると仮定し、各温度に対する平衡定数 K_d および変性の自由エネルギー変化ΔG_Dを下記の式より求めた。

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

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

R：気体定数，T：絶対温度

タンパク質が半分変性する変性の中点温度(T_m)は、$\Delta G_D=0$ となるときの絶対温度 Tをセ氏温度(℃)に変換して求めた。T_m における変性のエンタルピー変化ΔH_m とエントロピー変化ΔS_m は下記の式から求めた。

$$\Delta H_m = -R\mathrm{d}(\ln K_d)/\mathrm{d}(1/T)$$

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

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

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

(7) 変性剤に対する熱力学的安定性

変性剤である GdnHCl に対するタンパク質の安定性は、GdnHCl の濃度変化に伴うタンパク質の蛍光強度（励起波長；280 nm，蛍光波長；360 nm）または CD での 220 nm の楕円率の変化で測定した。タンパク濃度は、蛍光測定では 0.015 mg/ml に CD 測定では 0.15 mg/ml に調整し、GdnHCl 濃度は 0 ～ 7.5 M になるように 0.1 M 酢酸緩衝液（pH 5.0）で調製した。試料溶液は、30℃ で１時間以上インキュベートした後、各変性剤濃度における安定性を測定した。タンパク質の変性

が 2 状態変性であると仮定し、各 GdnHCl 濃度に対する平衡定数 K_d および変性の自由エネルギー変化ΔG_D を下記の式より求めた。

$K_d = [D]/[N]$

$\Delta G_D = -RT\ln K_d$

R: 気体定数, T: 絶対温度

安定性の指標となる変性剤非存在下における変性の自由エネルギー変化 (ΔG_D^{H2O}) は、 ΔG_D を GdnHCl 濃度に対してプロットし、ΔG_D が GdnHCl 濃度と比例関係にあると仮定して下記の式より算出した。

$\Delta G_D = \Delta G_D^{H2O} - m[\mathrm{GdnHCl}]$

m: 比例定数

タンパク質が半分変性する変性曲線の中点の変性剤濃度 (C_m) では $K_d = 1$ であることから、C_m は下記の式より算出した。

$C_m = \Delta G_D^{H2O} / m$

野生型 (WT) と変異体との変性剤非存在下での変性の自由エネルギー変化の差 ($\Delta\Delta G_D^{H2O}$) は下記の式から求めた.

$\Delta\Delta G_D^{H2O} = \Delta G_D^{H2O}(\mathrm{mutant}) - \Delta G_D^{H2O}(\mathrm{WT})$

3. 結果および考察

(1) Tyr147 を置換した 2 種の変異体の発現と精製および CD スペクトル

グース型リゾチームの立体構造から、Tyr147 はα7 の C 末端に位置し、触媒基 Glu73 周辺の疎水的環境に存在している。さらに Tyr147 は、HEL のプロトンドナーである Glu35 の近傍に位置し、触媒活性、基質結合力および構造安定性に重要な役割をもつ Trp108 に相当する位置にあることから、グース型リゾチームの構造と機能に重要であると予想される。本研究では、Tyr147 の側鎖の水酸基をなくした Phe と水酸基とベンゼン環の両方をなくした Ala に置換した 2 種の変異体 (Y147F, Y147A) を作製した。酵母で分泌発現した変異体は、2 段階の陽イオン交換クロマトグラフィーで単一に精製し、各変異体の培地 1 L あたりの収量は約 60-80 mg であった。精製した変異体の N 末端アミノ酸配列は Ser-Arg-Thr-Gly であり、α-因子シグナル配列は正しくプロ

セシングされていることが確認できた。次に、酵母で発現して精製した 2 種の変異体が、タンパク質合成後正しくフォールディングしたかを調べるために、タンパク質の主鎖構造の情報が得られる遠紫外部領域 (190 ～ 250 nm) の CD スペクトルを測定した（Fig. 3）。各変異体と WT の CD スペクトルは殆ど同一であったことから、Tyr147 を他のアミノ酸に置換してもグース型リゾチームの主鎖構造には変化がないことが示された。

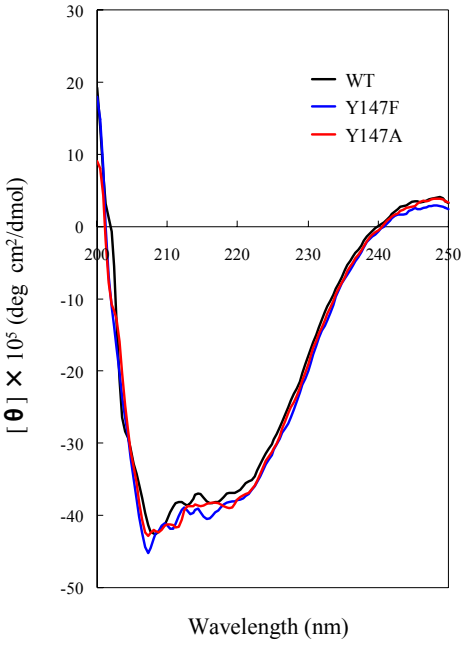

Fig. 3. CD spectra of WT, Y147F, and Y147A in the far-UV region.

(2) 基質親和性

OEL は、活性の解析からニワトリ型リゾチームと同様に 6 個の基質結合部位（B-G 部位）が存在すると推定されている。我々は先に、OEL の触媒基である Glu73 に関する変異体を作製し、それらの基質結合部位の全体的な基質親和性を高分子基質であるキチンに対する結合力で評価する系を確立した。そこで Tyr147 の変異体の基質親和性は、Glu73 変異体と同様にキチンコーティングセライトカラムに対する結合力で評価した (Fig. 4)。その結果、Y147F と Y147A のリテンションタイムは、それぞれ 49.0 分と 48.9 分であった。WT の溶出時間（48.6 分）を 1 としたときの両変異体の相対的結合力は 1.01 であり、Tyr147 の変異体は WT と同様の基質結合力を示した。GEL と $(GlcNAc)_3$ との複合体の X 線構造では、Tyr147 の側鎖は基質結合に関与せず、主鎖の O 原子が C 部位の糖残基の N2 原子と水素結合（3.0 Å）していることから、Tyr147 の置換による側鎖構造の変化自体は直接基質結合部位全体の基質親和性に大きな影響を与えないものと考えられた。

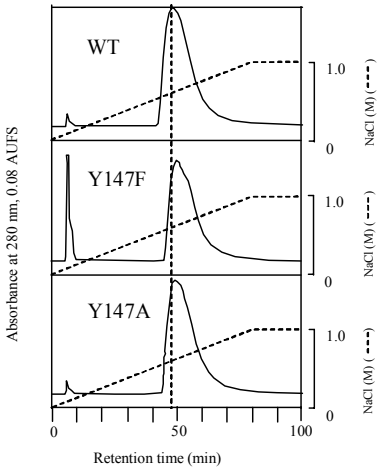

Fig. 4. Elution pattern of WT, Y147F, and Y147A on chitin coating celite column.

The protein samples subjected to chitin coating celite column (7.5×75 mm) were eluted with a linear gradient between 0 and 1 M of NaCl in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0).

(3) 溶菌活性

Tyr147 変異体の活性は、まず基質に MurNAc と GlcNAc の共重合体を細胞壁の構成成分とする *Micrococcus luteus* を基質に用いて、その溶菌作用を測定する方法で簡易的に評価した（Fig. 5）。 WT の 1 分から 5 分の濁度の減少の傾きを 100%とした場合、Y147F では 72.3%であり、WT と比べて若干溶菌活性が低下した。一方、Y147A の溶菌活性は WT と比較して 2.6%と大きく低下した。

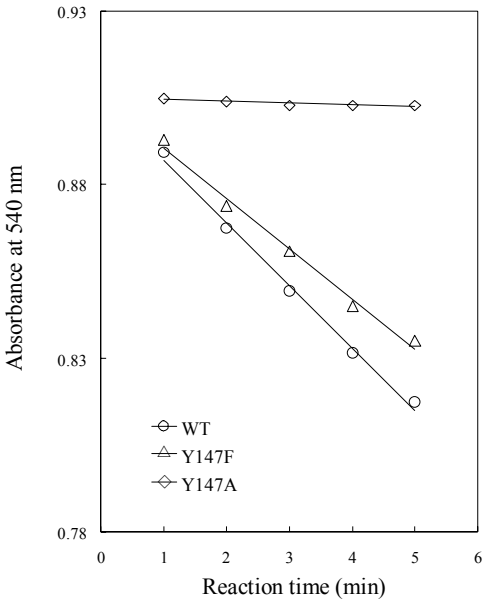

Fig. 5. Lytic activity of WT, Y147F, and Y147A.

(4) GlcNAc のオリゴマーに対する触媒活性

より詳細な活性の変化を解析するために、Tyr147 変異体の活性を、低分子基質である $(GlcNAc)_5$ を用いて反応生成物の経時的な変化で検討した。Fig. 6 に示すように、WT は基質 5 量体を約 4 時間で完全に分解し、反応時間とともに 2 量体と 3 量体の増加と 1 量体と 2 量体のわずかな増加が検出された。Y147F では WT と同様の反応生成物のパターンを示したが、反応速度が遅くなり基質 5 量体の分解に約 12 時間を要した。一方、Y147A では溶菌活性と同様に反

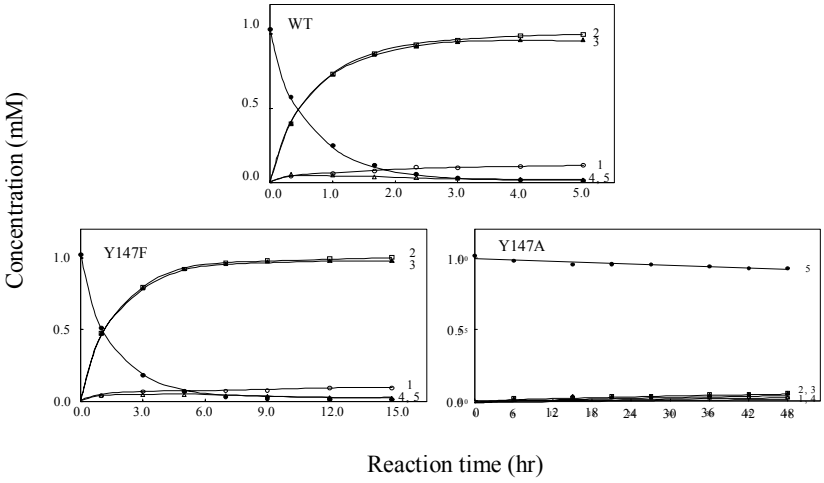

Fig. 6. Time course plots of $(GlcNAc)_5$ degradation by WT, Y147F, and Y147A.
The enzymatic reaction was performed in 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) at 40℃. Numerals in the figures are the polymerization degrees of the reaction product species.

応速度が極端に遅くなり、48 時間の反応で基質 5 量体は 7.2%しか分解されず、それとともに反応生成物である 2 量体と 3 量体および 1 量体と 2 量体がわずかに検出された。次に、WT と各変異体の $(GlcNAc)_6$ に対する活性を測定した (Fig. 7)。WT は基質 6 量体を約 2 時間で完全に分解し、反応生成物として主に 3 量体、ついで 2 量体と 4 量体および 1 量体と 5 量体がわずかに検出された。Y147F では WT と同様の反応生成物のパターンを示したが、反応速度が遅くなり基質 6 量体の分解に約 5 時間を要した。一方、Y147A では、基質 5 量体に対する活性と同様に反応速度が極端に遅くなり、48 時間の反応で基質 6 量体は 29%しか分解されなかった。これらの結果より、Tyr147 の置換、特に Ala への置換はグース型リゾチームの触媒活性（糖加水分解活性）を大きく低下させることが明らかとなった。Tyr147 の変異体は、WT と比較して基質結合部位全体の基質親和性に大きな変化がなかったことから、Tyr147 の置換は近傍に位置する触媒基である Glu73 の側鎖の配向や Glu73 の側鎖のカルボキシル基の脱プロトン化の効率に影響し、結果として触媒活性が低下したのではないかと考えられた。さらに、基質 5 量体に対する反応生成物をアミド 80 カラムで分析した結果、WT と Y147F では基質 5 量体よりも高分子の反応産物は検出されなかったが、Y147A の反応において、5 量体よりも高分子の 6 量体および 6 量体よりも高分子の糖転移反応産物が検出された (Fig. 8)。この糖転移反応産物は、6 量体を基質に用いた Y147A の反応においても検出された (Fig. 9)。この結果より、変異体 Y147A は WT と Y147F が触媒しない糖転移活性を有すると考えられた。現時点では、OEL の WT や変異体 Y147A の反応機構の詳細は不明であるが、Tyr147 を側鎖の小さい Ala に置換することによって、Y147A ではβサイドからの糖のアクセプター分子の反応が可能になったのではないかと考えられた。

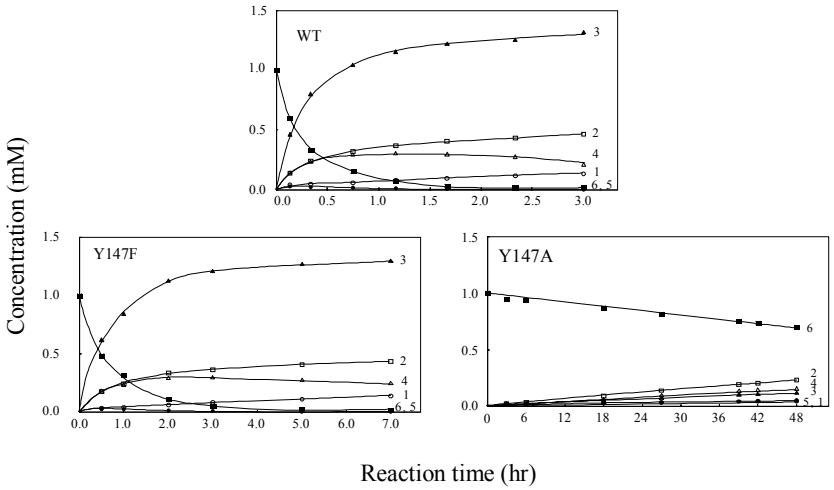

Fig. 7. Time course plots of $(GlcNAc)_6$ degradation by WT, Y147F, and Y147A.
The enzymatic reaction was performed in 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) at 40℃. Numerals in the figures are the polymerization degrees of the reaction product species.

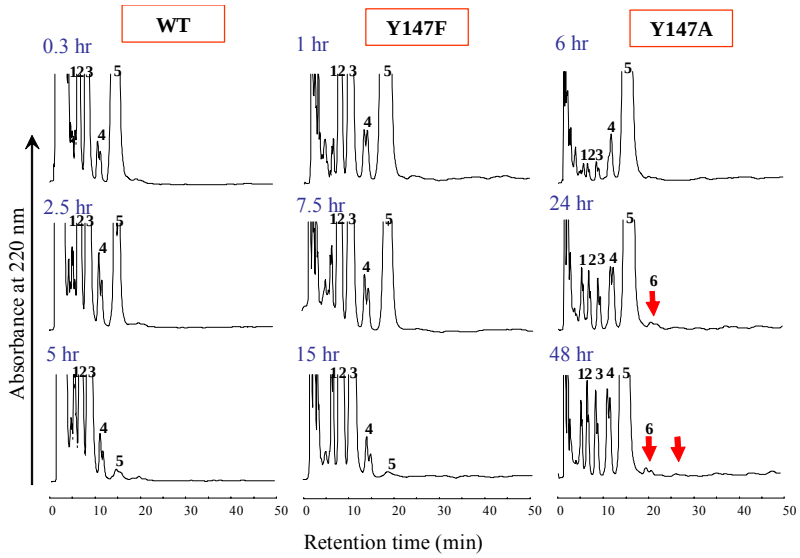

Fig. 8. Time-dependent HPLC profile of $(GlcNAc)_5$ degradation catalyzed by WT, Y147F, and Y147A.

Numerals in the figures are the polymerization degrees of the reaction product species. Arrows indicate oligosaccharide products with a degree of polymerization higher than that of the initial substrate.

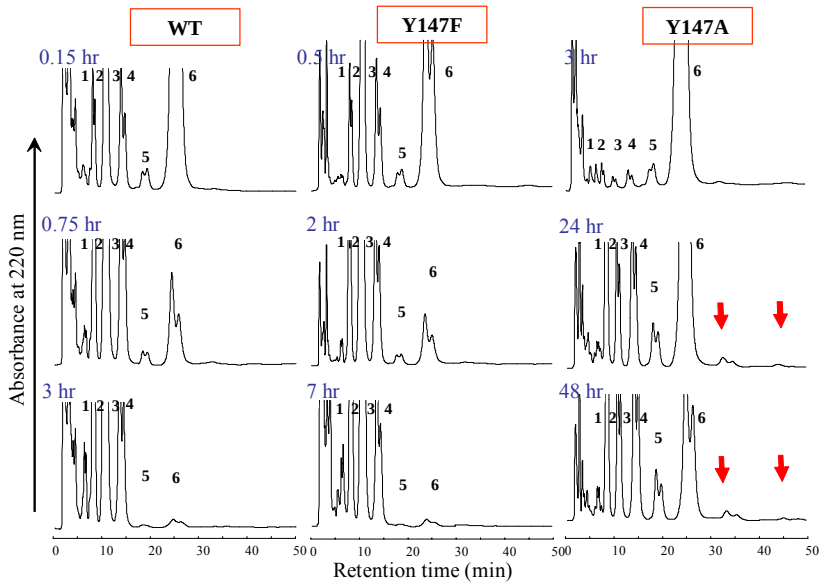

Fig. 9. Time-dependent HPLC profile of $(GlcNAc)_6$ degradation catalyzed by WT, Y147F, and Y147A.

Numerals in the figures are the polymerization degrees of the reaction product species. Arrows indicate oligosaccharide products with a degree of polymerization higher than that of the initial substrate.

(5) 蛍光を用いた Tyr147 変異体の熱力学的安定性の解析

WT と 2 種の変異体の熱力学的安定性は、まず熱に対する安定性をタンパク質の変性に伴う Trp や Tyr 残基の空間的配置の変化を蛍光スペクトルで追跡することで評価した。得られた熱変性曲線を Fig. 10 に、熱変性曲線から算出した熱力学的パラメーターを Table 1 に示した。その結果、各変異体の熱変性曲線は低温側にシフトし、特に Y147A の熱安定性は大きく低下した。この変性曲線から熱力学的パラメーターを算出した結果、WT の T_m 値（60.6℃）と比べ、Y147F の T_m 値（ΔT_m = −2.9℃）であり若干熱安定性が低下した。一方、Y147A の T_m 値は 49.8℃（ΔT_m = −10.8℃）と大きく低下した。WT の T_m 値での WT と各変異体の変性の自由エネルギー変化の差 ($\Delta\Delta G$) は Y147F では−1.48 kcal/mol、Y147A では−5.51 kcal/mol と低下していた。

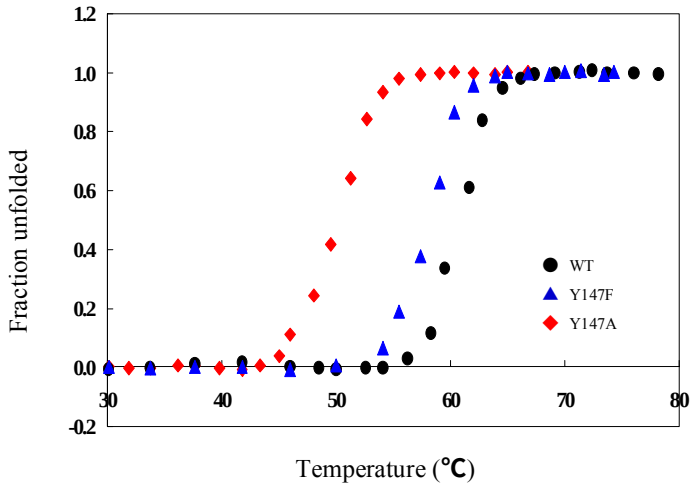

Fig. 10. Thermal unfolding curves of WT, Y147F, and Y147A obtained by fluorescence measurements.

Table 1. Parameters characterizing the thermal denaturation of WT and its mutants. Thermodynamic parameters were calculated from the thermal unfolding curves presented in Figs. 10 and 12.

	Method	ΔH_m (kcal/mol)	ΔS_m (kcal/mol･K)	T_m (℃)	ΔT_m (℃)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
WT	Flu [a]	170.1	0.510	60.6	—	—
Y147F	Flu [a]	154.6	0.468	57.7	-2.9	-1.48
Y147A	Flu [a]	129.3	0.401	49.8	-10.8	-5.51
WT	CD	166.9	0.501	60.5	—	—
Y147A	CD	125.6	0.389	50.0	-10.5	-5.26

[a] Fluorescence

次に、WT と変異体の変性剤である GdnHCl に対する安定性を測定した。得られた変性曲線を Fig. 11 に、変性曲線から計算した熱力学的パラメーターを Table 2 に示した。 熱安定性の低下と同様に、WT の変性の中点濃度 (C_m) が 2.21 M であるのに対し、変異体 Y147F と Y147A の C_m 値はそれぞれ 2.01 M (ΔC_m = −0.20 M), 1.39 M (ΔC_m = −0.82 M) に低下した。WT と各変異体の水中での変性の自由エネルギー変化の差 ($\Delta\Delta G^{H2O}$) は、Y147F で−1.27 kcal/mol、Y147A で−4.44 kcal/mol であり、Y147A の安定性は大きく低下した。

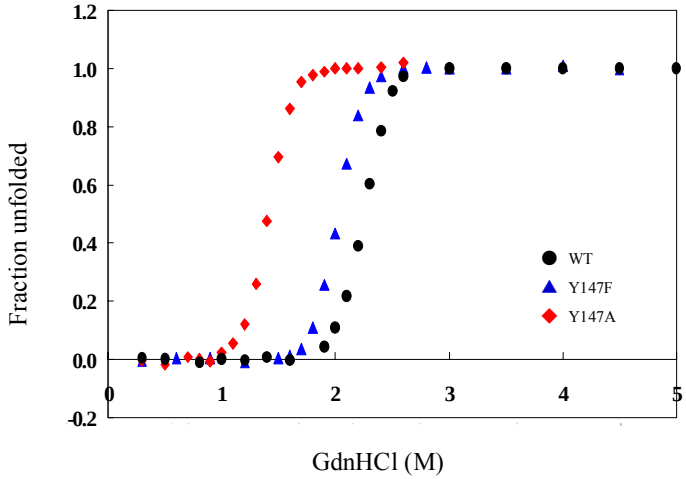

Fig. 11. Guanidine hydrochloride (GdnHCl)-induced unfolding curves of WT, Y147F, and Y147A obtained by fluorescence measurements.

Table 2. Parameters characterizing the guanidine hydrochloride (GdnHCl) denaturation of WT and its mutants. Thermodynamic parameters were calculated from the GdnHCl-indiced unfolding curves presented in Figa. 11 and 13.

	Method	m (kcal/mol･M)	C_m (M)	ΔC_m (M)	ΔG_D^{H2O} (kcal/mol)	$\Delta\Delta G_D^{H2O}$ (kcal/mol)
WT	Flu [a]	5.48	2.21	—	12.11	—
Y147F	Flu [a]	5.41	2.01	-0.20	10.84	-1.27
Y147A	Flu [a]	5.52	1.39	-0.82	7.67	-4.44
WT	CD	5.32	2.20	—	11.73	—
Y147A	CD	5.52	1.39	-0.81	7.67	-4.06

[a] Fluorescence

(6) CD を用いた熱力学的安定性の解析

蛍光分析で見られた Tyr147 変異体の安定性の低下をさらに検証するために、主鎖構造を反映する遠紫外部 CD スペクトルを用いて WT と最も安定性が低下していた変異体 Y147A の熱と GdnHCl に対する安定性を解析した。220 nm の楕円率を温度および GdnHCl 濃度に対してプロットして得られた Y147A の変性曲線を WT と比較した結果、CD を用いた解析からも Y147A の安定性の大きな低下が確認できた (Figs. 12 and 13)。CD 測定から算出した Y147A の熱力学的パラメーターは、熱に対する安定性では T_m 値が 50.0℃ (ΔT_m = －10.5℃)、WT の T_m 値での変性の自由エネルギー変化の差 ($\Delta\Delta G$) は－5.26kcal/mol、GdnHCl に対する安定性では C_m 値が 1.39 M (ΔC_m = －0.81 M)、水中での変性の自由エネルギー変化の差 ($\Delta\Delta G^{H2O}$) は－4.06 kcal/mol であり、蛍光分析で得られた値とほとんど同じ値を示した (Tables 1 and 2)。また、WT と同様に Y147A の熱と GdnHCl に対する変性曲線は、タンパク質の変性に伴う Trp や Tyr 残基の空間的配置の変化を追跡する蛍光分析と主鎖構造の変化を追跡する CD 分析の両方で一致した（Figs. 12 and 13）。したがって、Y147A の立体構造の変性と再生過程は、WT と同様に変性の中間状態を伴わない 2 状態変性であることが確認できた。Fersht らはチロシン tRNA 合成酵素を用いた安定性の解析を行い、1 本の水素結合の安定性の寄与が 0.5 ～ 1.5 kcal/mol であることを報告した。GEL の立体構造では、Tyr147 の側鎖の水酸基は Met94 の主鎖 O 原子と水素結合（2.89 Å）を形成している。今回測定した Y147F の熱安定性（－1.48 kcal/mol）と GdnHCl に対する安定性（－1.27 kcal/mol）の低下は、Fersht らの結果とよく一致することから、Y147F の安定性の低下は Tyr147-Met94 間の水素結合の欠失に起因すると考えられた。また、Tyr147 は Ile69, Ile70, Leu93, Met94, Gln95（C_β, C_γ）、Tyr169 とともに、グース型リゾチームの触媒基である Glu73 周辺の疎水的環境を構成していることから、Y147A で見られた安定性の大きな変化は、Tyr147-Met94 間の水素結合の欠失に加えて、Tyr147 周辺の疎水的環境の不安定化に起因するのではないかと考えられた。

以上の結果より、Tyr147 の置換、特に Ala への置換はグース型リゾチームの触媒活性と構造安定性を大きく低下させることが明らかとなった。したがって、Tyr147 の側鎖のベンゼン環が有する疎水的性質や平面構造が、活性を発現するうえで必要と思われる触媒基 Glu73 周辺の疎水的環境の安定化に重要な役割をはたすと考えられた。

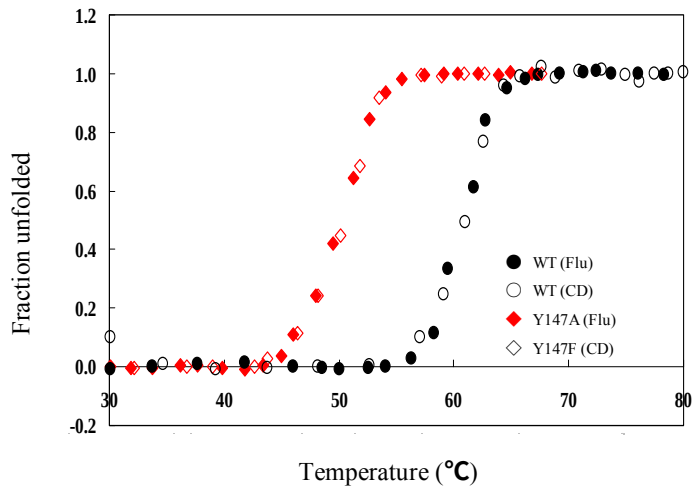

Fig. 12. Thermal unfolding curves of WT and mutant Y147A obtained by CD and fluorescence measurements.

The unfolding curves of WT and mutant Y147A obtained with CD are indicated as "WT (CD)" and "Y147A (CD)", respectively, and those of WT and mutant Y147A obtained with fluorescence are indicated as "WT (Flu)" and "Y147A (Flu)", respectively.

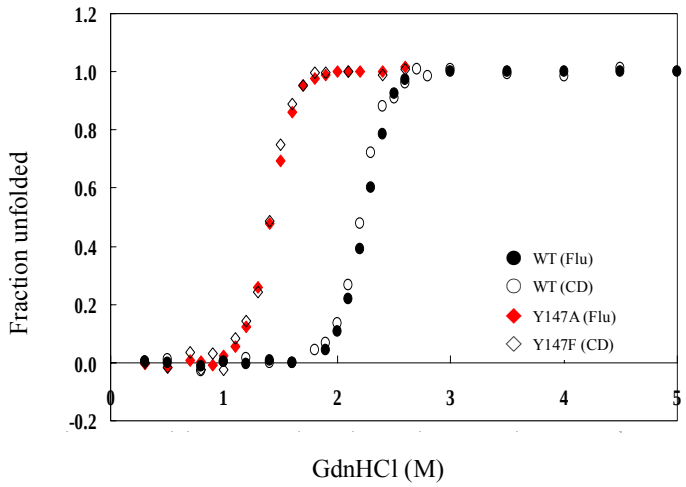

Fig. 13. Guanidine hydrochloride (GdnHCl)-induced unfolding curves of WT and mutant Y147A obtained by CD and fluorescence measurements.

The unfolding curves of WT and mutant Y147A obtained with CD are indicated as "WT (CD)" and "Y147A (CD)", respectively, and those of WT and mutant Y147A obtained with fluorescence are indicated as "WT (Flu)" and "Y147A (Flu)", respectively.

4. 引用文献

(1) Imoto, T., et al. (1972) The Enzymes (Boyer, P. D., ed.) 7, 665-868

(2) Weaver, L. H., et al. (1995) J. Mol. Biol., 245, 54-68

(3) Thammasirirak, S., et al. (2002) Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 147-156

(4) Pooart, J., et al. (2004) J. Biochem., Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 159-169

(5) Kawamura, S., et al. (2003) J. Biochem., 133, 123-131

(6) Kawamura, S., et al. (2006) J. Biochem., 140, 75-85

(7) Kawamura, S., et al., (2008) FEBS J., 275, 2818-2830

(8) Hirakawa, H., et al., (2008) J. Biochem., 144, 753-761

(9) Inoue, M., et al., (1992) Biochemistry, 31, 5545-5553

(10) Rupley, J. A. (1964) Biochim. Biophys. Acta., 83, 245-255

(11) Yamada, H., and Imoto, T. (1981) Carbohydr. Res. 92, 160-162

(12) Sarker, G., and Sommer, S. S. (1990) Biotechniques 8, 404-407

(13) Becktel, W. J., and Schellman, J. A. (1987) Biopolymers 26, 1859-1877

(14) Pace, C. N. (1990) Trends Biotechnol., 8, 93-98

(15) Pace, C. N., et al. (1988) J. Biol. Chem., 263, 11820-11825

(16) Fersht, A. R. et al., (1985) Nature, 314, 235-239

学会発表 ・ その他

① 河村俊介，千々岩有紀，米田一成，鳥潟隆雄　　リゾチームの触媒基Asp52が形成する水素結合ネットワークに関与する Ser50 の役割.
日本生化学会九州支部例会講演要旨集 p100，2009 年 5 月

② 多田紗織，平川英樹，久原哲，鳥潟隆雄，河村俊介　グース型リゾチームの疎水性コアに位置する Tyr169 の構造機能相関.
日本蛋白質科学会年会講演要旨集 p118，2009 年 5 月

③ 仲宗根公一，千々岩有紀，鳥潟隆雄，河村俊介　グース型リゾチームの２本のジスルフィド結合と分子内コア構造に位置する Tyr147 の役割.
日本生化学会大会講演要旨集 p279，2009 年 10 月

④ 中嶋章悟，千々岩有紀，鳥潟隆雄，河村俊介　ダチョウ卵白およびコイ由来グース型リゾチームの大腸菌での発現と性質の検討.
日本生化学会大会講演要旨集　p279，2009 年 10 月

⑤ 中嶋章悟，千々岩有紀，米田一成，鳥潟隆雄，河村俊介　グース型リゾチームの触媒基およびジスルフィド結合に関する変異体の構造機能相関.
日本農芸化学会関西･中四国･西日本支部大会講演要旨集 p157，2009 年 10 月

⑥　仲宗根公一，千々岩有紀，鳥潟隆雄，河村俊介　グース型リゾチームの分子内コアに位置する Tyr147 の解析.
日本農芸化学会関西･中四国･西日本支部大会講演要旨集 p157，2009 年 10 月

⑦　河村俊介，堀口貴広，仲宗根公一，鳥潟隆雄　グース型リゾチームの分子内コアに位置する Tyr169 の触媒活性と構造安定性への役割.
日本農芸化学会講演要旨集 p157，2010 年 3 月

①　P. Ponkham, S. Daduang, W. Kitimasak, C. Krittanai, D. Chokchaichamnankit, C. Srisomsap,J. Svasti, S. Kawamura, T. Araki, S. Thammasirirak.
Complete amino acid sequene of three reptile lysozymes.
Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 151, 75-83, 2010

②　中嶋章悟，千々岩有紀，鳥潟隆雄，河村俊介
ダチョウ卵白由来グース型リゾチームとジスルフィド結合欠失変異体の大腸菌での発現系の確立
東海大学農学部紀要　29，17-26，2010

③　仲宗根公一，千々岩有紀，鳥潟隆雄，河村俊介
グース型リゾチームの分子内コアに位置する Tyr147 を Ala に置換した変異体の解析
東海大学農学部紀要　29，27-34，2010