

Streptomyces violaceoruber

由来ホスホリパーゼA₂の
X線結晶構造に関する研究

2000年

広島大学大学院医学系研究科

的場 康幸

【目次】

序論	1
第一章 1.4 Å分解能のカルシウム非結合型(アポ型)酵素の構造	
緒言	5
実験結果	6
I. 結晶の調製	6
II. 結晶学的パラメーターの決定	7
III. Native結晶の回折強度測定	7
IV. 初期位相の決定	8
V. モデルの構築及び精密化	11
考察	13
I. モデルの信頼性及び電子密度図の質	13
II. 全体構造	15
III. 触媒部位及び周囲の水素結合ネットワーク	19
IV. カルシウム結合部位	21
V. 基質結合部位	24
第二章 原子分解能のカルシウム非結合型(アポ型)の構造	
緒言	26
実験結果	27
I. 回折強度の収集	27
II. 構造の精密化	29
考察	33
I. 電子密度図の質	33
II. モデルの信頼性	35
III. 1.4 Å分解能モデルとの比較	37
IV. 二次構造および主鎖の水素結合様式	38
V. 側鎖の関与した分子内相互作用	47
VI. 分子間相互作用	50
VII. 水分子の配置	52
VIII. ディスオーダー構造	53
IX. 熱振動の定量的・定性的解析	58
X. 分子全体の振動と局所的振動	65
XI. 触媒部位及び周囲の水素結合ネットワーク	68

第三章 カルシウム結合型(ホロ型)酵素の構造	
緒言	71
実験結果	72
I. 結晶化	72
II. 回折強度測定	73
III. 構造解析及び精密化	73
考察	74
I. モデルの信頼性及び電子密度図の質	74
II. 全体構造	76
III. カルシウム結合部位	78
IV. 触媒部位及び周囲の水素結合ネットワーク	83
総括	86
参考文献	90
報文目録	96
謝辞	97

【略号一覧】

ano	anomalous
B_{eqv}	equivalent temperature factor
B_{iso}	isotropic temperature factor
c or cal	calculated
CGLS	conjugate gradient least-square
esd	estimated standard deviation
F	structure factor (amplitude)
f_{anis}	anisotropy factor
FOM	figure of merit
f_{rad}	ratio of radial components
Goof	goodness of fit
I	diffraction intensity
inf.	infinity
IP	imaging plate
iso	isomorphous or isotropic
max.	maximum
MIR	multiple isomorphous replacement
NMR	nuclear magnetic resonance
no.	number
o or obs	observed
ORTEP	Oakridge thermal ellipsoid plot
PLA ₂	phospholipase A ₂
R-AXIS	Rigaku automated X-ray imaging system
R-factor	reliability factor
本文中で特に説明を加えていないものは、結晶学的R-factor ($=\sum F_o - F_c / \sum F_o$)のことを示す。	
rms	root mean square
rmsd	root mean square deviation (or distance)
S.	<i>Streptomyces</i>
SIR	single isomorphous replacement
S/N	signal to noise
sn	stereospecific numbering
TLS	translation, libration and screw
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
w	weight
Wat	water molecule

【序論】

Röntgenが1895年に真空放電現象の一つとしてX線を発見してからすでに約100年が経過した。この発見は原子物理学の分野に大きな影響を与え、1912年のLaueによる塩結晶のX線回折斑点の撮影、続いてその翌年のBragg父子による回折理論の提唱につながっていった。このようにして誕生したX線結晶構造解析は、他の方法に比べより正確で完全な立体構造を提供する分子構造研究の中心的な手法となった。

従来、X線結晶構造解析技術は、無機物や低分子の有機化合物の三次元構造を決める手法として用いられてきた。しかしながら、X線発生源を効率良く冷却できる回転対陰極の発明によるX線光学系の進歩、迅速に回折強度を測定できる四軸型回折計の発明等による検出系の進歩、直接法という構造解析アルゴリズムの開発により、X線を用いた構造解析の技術は、より高分子の有機化合物の立体構造解析にも応用することが可能となった。特に、PerutzやKendrewは、1950年代から60年代にかけて、20年の歳月を費やしてヘモグロビン及びミオグロビンの構造解析に成功した。それ以来、この技術は蛋白質や核酸などの生体高分子の構造解析にも応用されている。

最近では、コンピューターの処理速度及び記憶容量の飛躍的な向上、イメージングプレートやCCDカメラをX線検出器として利用することによる測定時間の大幅な短縮、構造解析アルゴリズムの確立、強力かつきれいなX線を提供する放射光施設の利用等によってより迅速に構造解析が行えるようになった。また、組換えDNA技術を用いることにより、微生物を利用して大量に蛋白質を得ることができるようになり、生体内の微量蛋白質もその研究対象にすることが可能となった。

一方、Wüthrichらの献身的な努力によって、NMR技術も生体高分子の構造解析に利用されるようになった。NMRの手法を用いて解析された構造は、計算に用いられるデータの数が少ないためX線で得られた構造に比べて不完全ではあるが、溶液中の状態を強く反映していると考えられる。このため、NMR解析はX線結晶構造解析に対し相補的な役割を担うと考えられる。

今や、X線及びNMRを用いた蛋白質の構造解析は、蛋白質の持つ多様な機能と構造との関係を説明するための必須の技術となっており、生体高分子の機能を理解するためには、高次構造の知見が不可欠であるという認識にたつ学問、すなわち、構造生物学の発展に非常に寄与している。さらに、得られた構造学的知見をもとに、ドラッグデザインや人工蛋白質の創生が盛んに行われており、これらの技術は今後も人類に多大なる恩恵を与えてゆくものと考えられる。

ところで、本研究対象となったホスホリパーゼA₂(PLA₂)は、ホスファチジルコリン

やホスファチジルエタノールアミンを始めとするグリセロリン脂質のグリセロール2位に結合する脂肪酸を加水分解する酵素である(Fig. 1)。現在までに哺乳類の腭分泌液、蛇毒や蜂毒など様々な生物種由来のPLA₂が見い出されている。特に、ある種のPLA₂は、アラキドン酸を遊離し、プロスタノイドやロイコトリエンなど脂質生理活性物質合成の律速酵素として働き、炎症カスケードに係わっているため、本酵素の調節は薬理的観点から非常に興味深いと考えられる¹⁻³⁾。

PLA₂は、①活性発現にmMオーダーのカルシウムイオンを必要とし、分子内に5-7個のジスルフィド結合を持つPLA₂で、哺乳類の腭液中のものに加えて、爬虫類や昆虫類の分泌液、リウマチ関節炎滑液中などに存在する分子質量が約14 kDaの分泌型PLA₂；②基質となる生体膜への集合にμMレベルのカルシウムイオンを必要とし、アラキドン酸の遊離に深く関与している分子質量が約85 kDaの細胞質型PLA₂；③最近になってその存在が明らかにされたカルシウム非依存型の分子質量約40 kDaの細胞質型PLA₂の3種類に分類される(Table 1)⁴⁾。中でも、分泌型PLA₂に関しては、分子量が約14,000と小さく、また、生体内に多量に存在しているため、古くから研究が進められており、生化学的ならびに物理化学的知見が多く蓄積している。このカテゴリーに属するPLA₂は、アミノ酸配列に基づき、さらに、I型、II型及びIII型に分類される⁵⁾。このうち、I型PLA₂とII型PLA₂とを比べると、全体に渡ってアミノ酸配列の相同性が高く、その違いはジスルフィド結合の位置の違いおよびC末端部分の違いによる(そこで以後、I型とII型をまとめてI/II型と表現する)。また、蜂毒中のみに認められるIII型PLA₂のアミノ酸配列においては、I/II型PLA₂との間で保存されている部分領域は存在する。しかしながら、全体を比べると、III型PLA₂とI/II型PLA₂との間でアミノ酸配列の相同性はない。このカテゴリーに属する様々なPLA₂の三次元構造が、X線結晶構造解析ならびにNMR解析の手法を用いて明らかにされている⁶⁻¹⁵⁾。これらの報告によると、分泌型PLA₂はおよそ50%のα-helix構造と、ひとつの逆平行β-sheet構造を二次構造として持ち、互いに、その立体構造は類似している。ここで特筆すべきは、III型PLA₂はアミノ酸配列上の相同性が低いにもかかわらず、部分アミノ酸配列を編成することにより、I/II型PLA₂と高い三次元構造上の類似性を有しており、かつ、I/II型PLA₂との間で保存された触媒部位およびカルシウム結合部位を持つことである¹⁰⁾。

一方、当研究室において、放線菌である*Streptomyces violaceoruber*からPLA₂遺伝子がクローニングされ、その塩基配列が決定された。本PLA₂のクローニングは、原核生物由来のPLA₂としては世界で初めての報告である。本酵素の分子量は既知の分泌型PLA₂と同程度の13,558であり、他の分泌型PLA₂と同じく、活性発現にカルシウムイオンを必要とする。しかしながら、本酵素は、一つのセグメント(残基番号61-68)を除

いてアミノ酸レベルで既知のPLA₂と相同性を持たず、また、アミノ酸配列中にわずか4個のシステイン残基しか持たない(Fig. 2)。さらに、酵素学的な性質に関して言えば、本酵素は、活性発現に必要なカルシウムイオンとの親和性が他のPLA₂に比べて約5倍低いこと、及び、ホスファチジルコリンに対する活性がホスファチジルエタノールアミンに対しする活性に比べて約3倍高いことなどの特異性を持つ¹⁶⁾。

ゆえに、本酵素の三次元構造を明らかにすることができれば、本酵素の持つ特異性、すなわち、カルシウムイオンを含む触媒メカニズムや基質認識機構などについて既知PLA₂との差異を明らかにすることができ、ひいては、真核生物由来PLA₂との進化的関連を明らかにし、PLA₂活性のために必要な立体構造学的規制など、本酵素の持つべき類似性についても議論することができよう。そこで、本研究では、*S. violaceoruber*由来PLA₂のX線結晶構造解析を行った。第一章には、1.4 Å分解能で求めたカルシウム非結合型(アポ型)酵素の構造について、第二章には、原子分解能で求めたアポ型酵素の構造について、第三章には、1.6 Å分解能で求めたカルシウム結合型(ホロ型)酵素の構造について述べる。

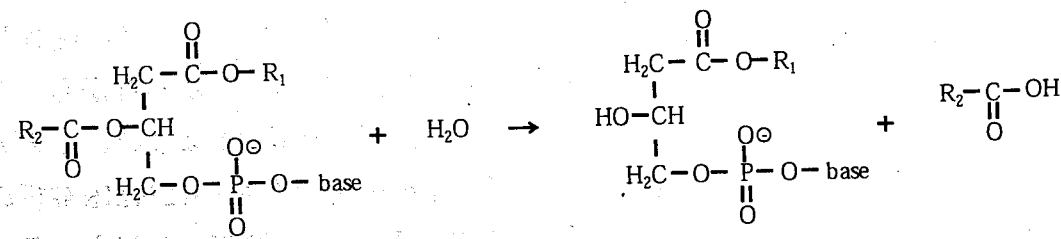


Fig. 1. Catalytic reaction of PLA₂. R₁ and R₂ represent the acyl chains. Base means choline or ethanolamine group.

Table 1. Classification of PLA₂⁴⁾

Type	Size (kDa)	Distribution	Calcium ion requirement	S-S bond
Calcium-dependent secreted				
Class I	14	mammalian pancreas cobra venom	mM	7
Class II	14	synovial fluid rattlesnake venom	mM	7
Class III	12	bee venom	mM	5
Calcium-dependent cytosolic	85	mammalian cell	μM	-
Calcium-independent cytosolic	40	cardiac muscle	-	-

ALA PRO ALA ASP LYS PRO GLN VAL LEU ALA 10
 SER PHE THR GLN THR SER ALA SER SER GLN 20
 ASN ALA TRP LEU ALA ALA ASN ARG ASN GLN 30
 SER ALA TRP ALA ALA TYR GLU PHE ASP TRP 40
 SER THR ASP LEU CYS THR GLN ALA PRO ASP 50
 ASN PRO PHE GLY PHE PRO PHE ASN THR ALA 60
 CYS ALA ARG HIS ASP PHE GLY TYR ARG ASN 70
 TYR LYS ALA ALA GLY SER PHE ASP ALA ASN 80
 LYS SER ARG ILE ASP SER ALA PHE TYR GLU 90
 ASP MET LYS ARG VAL CYS THR GLY TYR THR 100
 GLY GLU LYS ASN THR ALA CYS ASN SER THR 110
 ALA TRP THR TYR TYR GLN ALA VAL LYS ILE 120
 PHE GLY

Fig. 2. Amino acid sequence of *S. violaceoruber* PLA₂. This protein consists of 122 amino acids.

第一章 1.4 Å分解能のカルシウム非結合型(アポ型)酵素の構造

【緒言】

以前、当研究室において、放線菌である *S. violaceoruber* から PLA₂ 遺伝子がクローニングされ、その塩基配列が決定された¹⁶⁾。本酵素の推定分子量は既知の分泌型 PLA₂ と同程度の 13,558 であり、他の分泌型 PLA₂ と同じく、活性発現にカルシウムイオンを必要とする。しかしながら、本酵素は、一つのセグメント(残基番号 61-68)を除いてアミノ酸レベルで既知の PLA₂ と相同性を持たず、また、その配列中にわずか4個のシステイン残基しか持たない(Fig. 2)。このため、本 PLA₂ の三次元構造を明らかにすることができれば、比較構造生物学的観点からも非常に興味深いと考えられる。最近、*S. violaceoruber* の PLA₂ 遺伝子を放線菌のベクターに連結することにより、本 PLA₂ の大量生産系が確立されたことから、大量に蛋白質を必要とする X線や NMR による構造学的研究が本 PLA₂ に対しても可能となった。

本章においては、X線を用いて *S. violaceoruber* PLA₂ の三次元構造を決定するために、まず、本 PLA₂ の結晶化を行い、その回折強度を測定した。その後、重原子同型置換法を用いて初期構造を決定し、1.4 Å分解能で精密化した。得られた結晶構造は、活性発現に必要なカルシウムイオンが蛋白質と結合していないアポ型の構造であった。しかしながら、得られた構造をもとに、本 PLA₂ の触媒機構や他の PLA₂ との構造比較などについて、十分な議論をすることが可能であった。以下に、回折実験や構造解析の結果についての詳細、および、本 PLA₂ における機能部位の同定や他の PLA₂ との構造比較など、アポ型の結晶構造に基づく考察を述べた。

【実験結果】

I. 結晶の調製

S. violaceoruber PLA₂ の精製標品は、茨城高専の鈴木康司博士(元旭化成診断薬研究部所属)より大量に供与して頂いた。結晶化に先立ち、本酵素の凍結乾燥品を、完全な活性発現のために十分量の 20 mM Ca-chloride を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に対して透析し、その後、蛋白質濃度が 20 mg/ml となるように限外ろ過法で濃縮した。

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法¹⁷⁾により行った。蛋白質溶液 5 μl と各種沈殿剤溶液 5 μl を、シリコン処理したガラス板上で混合し、沈殿剤溶液 1 ml を入れたリザーバーの上にプレートを逆さにかぶせ密封した。これを 25 °C の恒温装置中に放置して結晶化を行った。最初の結晶は、沈殿剤として 14% (w/v) ポリエチレングリコール 6000、塩として 0.2 M Li-sulfate、緩衝剤として 0.1 M Na-cacodylate (pH 6.0) を含む溶液を沈殿剤溶液として用いたときに得られた。しかしながら、ここで得られた結晶は双晶を成しており、回折実験に用いることができなかった。温度条件の改良の結果、最初に得られた双晶型結晶を、温度を 20 °C に下げることによって溶解させた後、再び 25 °C に温度を上げることにより、回折実験に適した単結晶を生じさせることができた。さらに、得られた単結晶を種にして seeding 法を行うことによって、大きな結晶(最も長い方向が、1.0 mm 以上)を得ることができた(Fig. 3)。

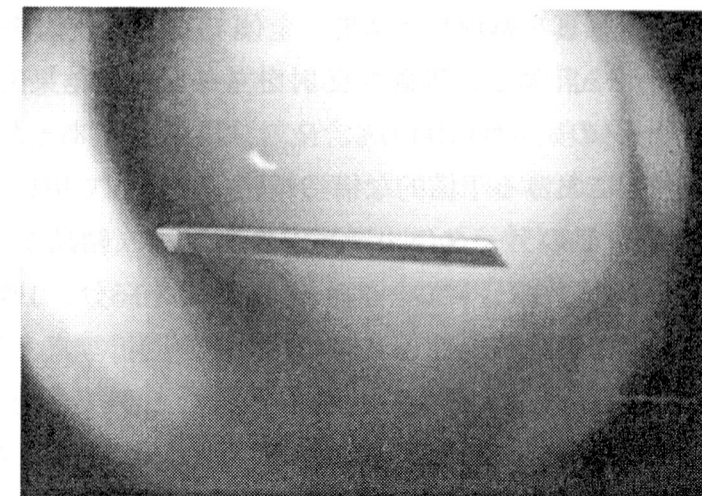


Fig. 3. Crystal of apo-type *S. violaceoruber* PLA₂. Typical crystal has a size of 1.0 mm in its longest dimension.

II. 結晶学的パラメーターの決定

X線実験は理学電機X線研究所にて行った。X線源としては、管電流100 mA、管電圧40 kVで稼働させたX線発生器RU-200から得られた、CuK α 線($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$)を用いた。グラフィートモノクロメーターで単色化し、0.3 mm ϕ のコリメーターで集光させたX線を、室温にて、ガラスキャピラリーに封入した結晶に照射した。回折強度の検出は、200 x 200 mmのイメージングプレート(IP)を検出器として持つR-AXIS IIcシステムにより行った。

プログラムProcess¹⁸⁾のStillを用いたauto-indexingの結果、本結晶は単斜晶系に属し、格子定数は $a = 29.4 \text{ \AA}$, $b = 57.8 \text{ \AA}$, $c = 31.7 \text{ \AA}$, $\beta = 111.5^\circ$ と求められた。また、消滅則から、空間群は $P2_1$ と同定された。本結晶の非対称単位に、酵素が1分子存在していると仮定すると、 V_M 値¹⁹⁾は $1.85 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ 、溶媒含量は33.5%となり蛋白質結晶として妥当な値を与える。よって単位胞内の分子数(Z)は2であると決定した。

III. Native結晶の回折強度測定

回折強度データの収集は前述のR-AXIS IIcシステムにより行い、その処理のためにはプログラムProcess¹⁸⁾のOscill及びScaleを用いた。以下に示すように、目的に応じて2種類のデータを収集した。

2.0 \AA 分解能までのデータ(Native-1)の測定は、結晶からIPまでの距離を80 mm、1枚のIPについての露光時間を30分、1枚のIPにつき ϕ 軸回りの結晶の回転角度を 6° に設定して行った。計60枚の回折写真を処理した結果、全体で46,973反射を観測できた。個々のIPにおけるスケール因子を計算し、等価な反射をマージした結果6,597個の独立反射を得ることができた。データの完全性は94.6%、 R_{merge} は7.21%であった。このデータは、初期位相の決定と低分解能における予備的な構造精密化に際して用いた。

より高分解能の1.4 \AA までのデータ(Native-2)の測定は、結晶からIPまでの距離を85.4 mm、IPの 2θ 角を 35° 、1枚のIPについての露光時間を15分、1枚のIPにつき ϕ 軸回りの結晶の回転角度を 1.5° に設定して行った。計120枚の回折写真を処理した結果、全体で22,015反射、そのうち15,558個の独立反射を得ることができた。データの完全性は77.5%、 R_{merge} は7.41%であり、高分解能側(1.45–1.40 \AA)においても十分なS/N比($I/\sigma = 4.52$)を持つ。このデータは、最終的な構造精密化に際して用いた。

IV. 初期位相の決定

初期位相の決定は、プログラムPhases²⁰⁾を用い、重原子多重同型置換法(MIR法)により2.7 \AA 分解能までの反射に対して行った。重原子誘導体の調製は、それぞれの重原子試薬を含む沈澱剤溶液に結晶をソーキングすることにより行った。最終的に、3種類の重原子誘導体(Pt, Au and Rh)を位相決定のために用いた。これらの誘導体の調製方法及びデータの統計学的数値をTable 2に示す。Pt誘導体における主要な金属結合部位の位置は、差パターンマップから容易に決定することができた。この位置を基にして、単一の誘導体を用いた同型置換法(SIR法)により位相を計算した。得られた位相を用いて、差フーリエマップを計算することにより、他の誘導体における重金属結合部位及びPt誘導体におけるマイナーな重金属結合部位の位置を決めることができた。結合した重金属のパラメーター(位置、相対的含有率と温度因子)は、プログラムPhasesのPhasitにより精密化し、これを基にして位相を計算し直した。得られたMIR法による位相はより正確であり、この位相を用いて差フーリエマップを再計算することにより、さらにマイナーな金属結合部位を決定することができる。このように、重金属結合部位の決定 \rightarrow Phasitによるパラメーターの精密化 \rightarrow MIR法による位相の計算という一連のルーティンを繰り返し行うことによって、より正確な位相を計算した。最終的に得られた位相のFigure of merit (FOM)は0.73となった。なお、この過程において、Pt誘導体の異常分散についての情報を使用した。また、重金属の温度因子は等方的に処理するのが一般的であるが、今回は異方的に処理を行った。精密化した重原子パラメーターと得られた位相に関する統計学的数値をTable 3に示す。

2.0 \AA 分解能までの位相拡張、及び、溶媒平滑化法とヒストグラムマッチング法とを組み合わせた電子密度修飾による位相の改良は、プログラムSquash²¹⁾を用いて行った。実際には、本結晶は約33%の溶媒領域を含んでいるが、溶媒平滑化法において分子の境界を決める際のover-estimationを防ぐため、溶媒領域20%という実際より小さい値を適用した。この処理によって、2.7 \AA 分解能までの反射に対するFOMは0.86となり初期位相の改善がみられた。因みに、2.0 \AA 分解能までの反射に対するFOMは0.67となった。この位相を用いて得られた電子密度図は非常に良質であり、容易に主鎖のトレースを行うことができると考えられた。また、Native結晶の異常分散を利用した差フーリエマップから、2つのジスルフィド結合及び1つのメチオニン残基の硫黄原子の位置を確定することができた。

Table 2. Summary of diffraction analysis

Data set	Native-1	Native-2	Pt	Au	Rh
Reagent	-	-	K ₂ PtCl ₄	NaAu(CN) ₄	(NH ₄) ₃ RhCl ₆
Soaking conditions	-	-	10 mM, 4 days	100 mM, 1 day	20 mM, 2 days
Max. resolution (Å)	2.0	1.4	2.7	2.7	3.0
Total reflections	46973	22015	9157	6025	2525
Unique reflections	6597	15558	2392	2608	1678
Completeness (%)	94.6	77.5	85.6	93.2	87.8
R_{merge}^a (%)	7.21	7.41	6.30	4.98	3.43
R_{iso}^b (%)	-	-	10.9	4.1	5.3

$$^a R_{\text{merge}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$$

$^b R_{\text{iso}} = \sum |F_{\text{PH}} - F_{\text{P}}| / \sum F_{\text{P}}$, where F_{PH} is the observed structure factor amplitude of derivative and F_{P} is that of 2.0 Å native data (Native-1).

Table 3. Summary of MIR analysis

(a). Refined heavy-atom parameters

Data	F_{H} scale	
Pt	1.1953	
Au	0.5276	
Rh	0.8146	

Atom	x	y	z	Occupancy	u_{11}	u_{22}	u_{33}	u_{12}	u_{13}	u_{23}	B_{iso}
Pt1	0.55124	0.25541	0.56600	1.00000	0.00906	0.00250	0.01160	0.00091	0.00632	0.00069	31.39
Pt2	0.70662	0.50418	0.45598	0.78853	0.02776	0.00309	0.00824	0.00480	0.00580	0.00419	51.49
Pt3	0.82554	0.01686	0.12147	0.52167	0.02299	0.00243	0.03360	0.00468	0.01608	0.00252	67.71
Pt4	0.46154	0.05851	0.08995	0.38062	0.00920	0.00261	0.01034	-0.00045	-0.00358	-0.00061	39.35
Au1	1.00129	0.49750	0.21576	1.00000	0.01962	0.00188	0.01126	0.00133	0.00117	-0.00309	45.02
Au2	0.14498	0.00513	0.47296	0.34200	0.00433	0.00096	0.00524	0.00081	0.00318	0.00064	13.37
Au3	0.97626	0.19607	0.08902	0.27350	0.00574	0.00688	-0.00148	0.00596	-0.00154	0.00016	36.68
Au4	0.65611	0.24578	0.39756	0.15681	0.00078	-0.00038	0.02816	0.00110	0.01102	0.00189	26.91
Rh1	0.48742	0.24371	0.03812	1.00000	0.01531	0.00362	0.01217	0.00135	0.00648	0.00156	44.18
Rh2	0.76828	0.50304	0.46189	0.68185	0.03087	0.00248	0.00592	-0.00263	0.00740	0.00475	47.81
Rh3	0.56634	0.24094	0.57868	0.32034	-0.00321	0.00814	0.01284	0.00274	0.00632	-0.00439	44.02
Rh4	0.47243	0.08864	0.06590	0.26175	0.01649	0.00384	-0.00369	0.00107	-0.00422	-0.00503	35.00

(b). Statistics of MIR phases

Data set	Pt (isomorphous)	Pt (anomalous)	Au (isomorphous)	Rh (isomorphous)
Used reflections	2388	2266	2565	1629
R_{cullis}^a (centric reflections)	0.464 (122)	-	0.419 (164)	0.500 (102)
R_{kraut}^b (acentric reflections)	0.105 (2266)	-	0.043 (2401)	0.068 (1527)
R_{ano}^c (acentric reflections)	-	0.133 (2266)	-	-
Figure of merit ^d	0.384	0.310	0.431	0.324
Phasing power ^e	2.45	1.96	2.27	1.47

$^a R_{\text{cullis}} = \sum | |F_{\text{PH}}(\text{obs}) \pm F_{\text{P}}(\text{obs})| - F_{\text{H}}(\text{calc}) | / \sum |F_{\text{PH}}(\text{obs}) \pm F_{\text{P}}(\text{obs})|$ for centric reflections, where F_{P} , F_{PH} and F_{H} are structure factor amplitudes of the reflections for native, derivative and heavy atoms.

$^b R_{\text{kraut}} = \sum |F_{\text{PH}}(\text{obs}) - F_{\text{PH}}(\text{calc})| / \sum F_{\text{PH}}(\text{obs})$ for acentric reflections.

$^c R_{\text{ano}} = \sum (|F_{\text{PH}^+}(\text{obs}) - F_{\text{PH}^+}(\text{calc})| + |F_{\text{PH}^-}(\text{obs}) - F_{\text{PH}^-}(\text{calc})|) / \sum (F_{\text{PH}^+}(\text{obs}) + F_{\text{PH}^-}(\text{obs}))$ for acentric reflections. "+" and "-" signs indicate a Bijvoet pair of reflections.

^dFigure of merit is a measure of phase precision in the analysis. Herein, these values are based on the single isomorphous replacement or single anomalous scattering phases.

^ePhasing power is the calculated heavy atom contribution divided by the lack of closure error in the analysis.

V. モデルの構築及び精密化

モデルビルディングは、プログラムXtalView²²⁾のXfitを用いて行った。初期モデルは、Squashによって修飾を施した電子密度図に対して構築した。この段階で、モデルは全ての残基を含み、10-3.0 Å分解能の反射に対するR値は39.8%となった。

精密化は、プログラムX-PLOR²³⁾によるシミュレーテッドアニーリング法²⁴⁾と制約付き共役勾配最小自乗(CGLS)法²⁵⁾の組み合わせによって行った。最初は、10-3.0 Å分解能の反射のみ用いて精密化を行い、徐々に分解能の上限値を2.0 Åへと上げていった。それぞれの精密化サイクルは、個々の原子の位置及び等方的温度因子の精密化、 $2F_o - F_c$ マップや $F_o - F_c$ マップを用いたモデルの見直し、残余のピークに対する溶媒分子の導入を含む。また、ランダムに選んだ全体の10%の反射については、シミュレーテッドアニーリング法における諸条件の検討や、精密化の進行状況のモニターするためのテストセットとして精密化に用いなかった。なお、テストセットに対するR値(R_{free})と精密化に用いた反射に対するR値との剥離が大きいと、精密化がうまく進行していないと考えられる²⁶⁾。10-2.0 Å分解能の反射に対するR値が20%以下になると、精密化に用いるNative結晶のデータセットを1.4 Å分解能のデータセット(Native-2)に変更した。さらに精密化サイクルを行った結果、最終的に、分解能が10-1.4 Åの範囲でかつ $F > 2\sigma$ の反射に対して $R_{free} = 23.1%$, $R = 18.8%$ となった。このモデルは、958個の蛋白質原子と127個の水分子を含んでいる。Fig. 4に、本モデルのC α トレースをstereo viewで示す。

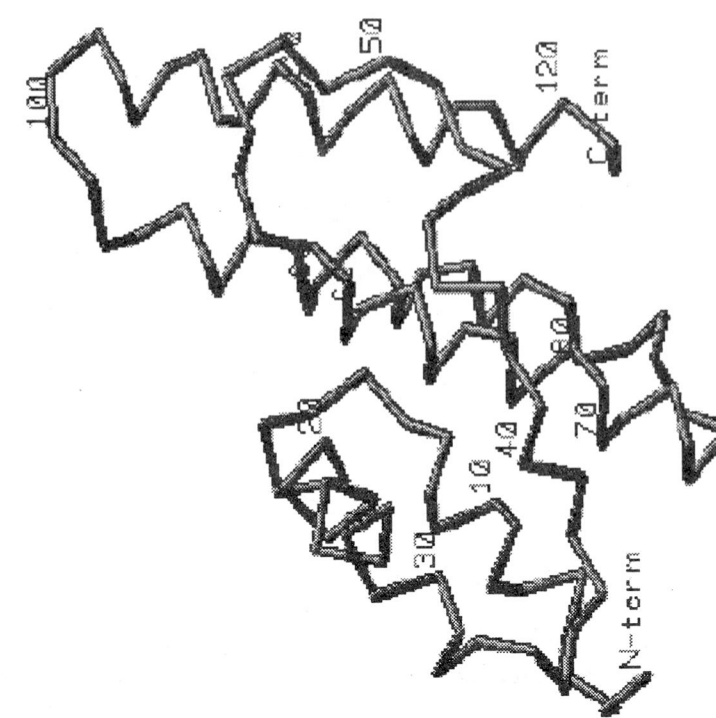
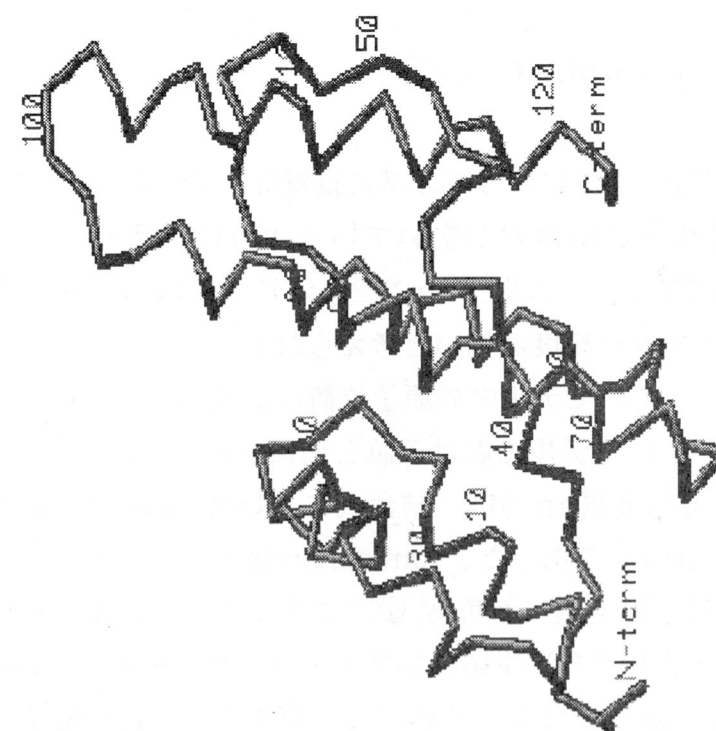


Fig. 4. Stereo view of the C α drawing of *S. violaceoruber* PLA₂.

【考察】

I. モデルの信頼性及び電子密度図の質

最終的な $2F_o - F_c$ マップは、全体に渡って非常に良質なものとなった(Fig. 5)。多くの芳香族環やプロリン残基の五員環は穴が空いているように見える。しかしながら、Gln7, Arg28, Gln47, Phe53, Lys103及びTrp112の側鎖部分は薄い電子密度しか持たず、これらの部分のパラメーター精度は低いと考えられる。

Luzzatiプロット²⁷⁾によって、モデル中の原子位置の誤差はおよそ0.15 Åであると見積もられた(not shown)。このモデルにおける値とEngh and Huber²⁸⁾によって与えられた理論値からの差の平均二乗根(rms)は、結合長において0.008 Å、結合角において1.2°、improper角において0.71°であった。Ramachandranプロット^{29, 30)}の結果から、Leu44以外の非グリシン残基の主鎖二面角(ϕ , ψ)はエネルギー的に安定な値をとっていることがわかる(Fig. 6)。望ましくない主鎖コンフォメーションをとっているLeu44は、Type II' β -turnの*i*+1位に位置しており、そのアミド窒素とThr42水酸基との間に水素結合を形成することにより安定化されていると考えられる。

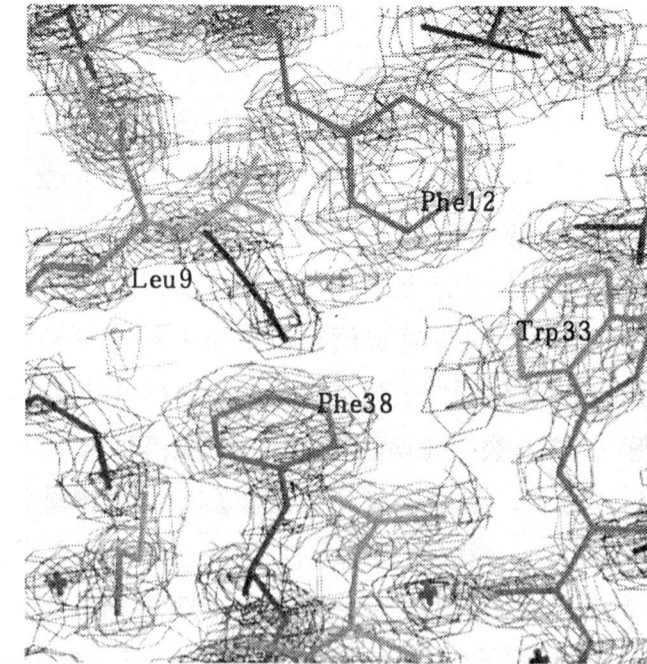


Fig. 5. Portion of the 1.4 Å resolution $2F_o - F_c$ map corresponding to hydrophobic core region. This map, prepared by the program Xfit²²⁾, was contoured in steps of 1σ starting at 1σ .

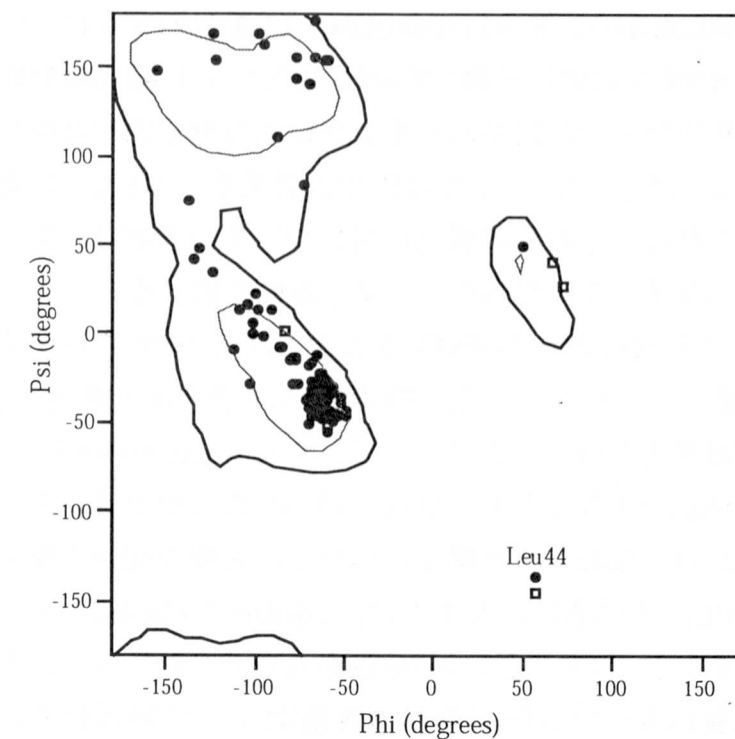


Fig. 6. Ramachandran plot of the main-chain conformational angles ϕ and ψ . Open squares indicate ϕ - ψ values of Gly residues. Apart from Gly residues, only one residue, Leu44 falls outside the low energy regions.

II. 全体構造

結晶化に用いたドロップ中にはカルシウムイオンが含まれているにもかかわらず、本結晶構造中において、カルシウムイオンは蛋白質と結合していなかった。この原因は、結晶が沈澱剤溶液中に含まれる硫酸イオンの存在下で、しかも、低いpH条件(およそ6)において成長したためと考えられる。カルシウムイオンというコファクターが無いにもかかわらず、このモデルは全体的に非常に堅い構造をとっている。全ての蛋白質原子における温度因子の平均値は 11.43 \AA^2 、主鎖に限れば 10.06 \AA^2 と非常に小さな値である。ある程度の構造学的な堅さは、他の分泌型PLA₂の結晶構造においても共通して観測される性質のひとつである。特に、触媒部位や基質認識部位の構造学的堅さは、十分なホスホリパーゼ活性(基質に対する親和性の増大、及び、最大反応効率の増加の両方を意味する)のために必須であると考えられている。過去のX線結晶構造解析の結果から、これらの構造学的堅さは、触媒残基周辺に水素結合ネットワークが形成されることによってもたらされると判明している^{31, 32)}。これに加えて、他の分泌型PLA₂においては、多くのジスルフィド結合(5-7個)の存在がより安定な構造の形成に関わっていると考えられる。このことは、特定の位置のジスルフィド結合を持たない変異体を用いた研究によって裏付けられる³³⁾。しかしながら、*S. violaceoruber* PLA₂はわずかに二つのジスルフィド結合しか持たない。本PLA₂における幾つかのジスルフィド結合の欠如は、分子内の水素結合、疎水性相互作用ならびに結晶パッキングによる分子間相互作用によって補われており、これらの非共有結合による相互作用の効果が、本PLA₂の安定な構造の形成に寄与していると思われる。これらの相互作用についての詳細は、原子分解能構造解析によって正確な原子パラメーターが得られた第二章にて述べる。

I/II型PLA₂は、およそ50%の α -helix構造と2つのストランドからなる逆平行 β -sheet構造を二次構造として持つ。III型の蜂毒PLA₂もまた α/β 構造をとっており、3本の α -helixと幾つかの β 構造を持つ。その一方で、*S. violaceoruber* PLA₂は β -sheet構造を持たず、5本の α -helixと少なくとも二つ以上のヘリカルセグメントからなる完全な α 構造をとっている(Fig. 7)。なお、二次構造についての正確な記述も原子分解能構造解析の章にて述べる。本PLA₂の構造は、大まかに、2本の α -helixと2つのヘリカルセグメントからなるN末ドメインと、3本の長い α -helixからなるC末ドメインとに分けられ、これらの両ドメインは長いループ(37-57番目の残基)によって結ばれている。トポロジーに関して言えば、3番目の α -helixと4番目の α -helixは逆平行に配向しており、同様に、4番目の α -helixと5番目の α -helixも逆平行に配向している。また、N末ドメイン中の2番目の α -helixは、C末ドメイン中の3本の α -helixに対してほぼ垂直である(Fig. 7)。な

お、前述の相同性の高いアミノ酸配列セグメントは3番目の α -helix中にある(Fig. 8b)。

S. violaceoruber PLA₂の触媒残基(後述)の原子位置が、I/II型に属する*Naja naja atra* PLA₂(コブラ毒PLA₂の一種)⁹⁾、もしくは、III型の蜂毒PLA₂¹⁰⁾の触媒残基の原子位置と最もうまく重なり合うように配置させた図をFig. 8aに示す。構造学的な相同性は、触媒残基を含む一組の逆平行 α -helix(*S. violaceoruber* PLA₂の3番目と4番目の α -helix)に限られる。*Naja naja atra* PLA₂と比べると、*S. violaceoruber* PLA₂において、I/II型PLA₂が共通して持つ逆平行 β -sheet構造の位置が空いており、その逆側にN末ドメインが存在している。また、*S. violaceoruber* PLA₂の5番目の α -helixの位置はI/II型PLA₂のN末 α -helixの位置に対応しているが、その配向は逆になっている。一方、III型の蜂毒PLA₂と比べた場合、3本の α -helixの配向は似ている。しかしながら、全体の構造は大きく異なっている。I/II型PLA₂と比べた場合と同様に、*S. violaceoruber* PLA₂のN末ドメインは蜂毒PLA₂において空隙になっていた位置に存在している。

S. violaceoruber PLA₂は、一次配列上、他の分泌型PLA₂が共通して保有しているカルシウム結合配列(X-Cys-Gly-X-Cys)を持っていない(Fig. 2, Fig. 8b)。他のPLA₂においてこの配列は、カルシウム結合ループという特異的な構造を形成している。また、立体構造上も、*S. violaceoruber* PLA₂にはカルシウム結合ループに対応する構造が存在していない。このことは、本PLA₂のカルシウムイオンに対する親和性が他のPLA₂に比べて低い事実を説明しうるものであると考えられる。さらに、本PLA₂には、他のPLA₂とは違ったカルシウム結合のメカニズムが存在しているものと思われる。

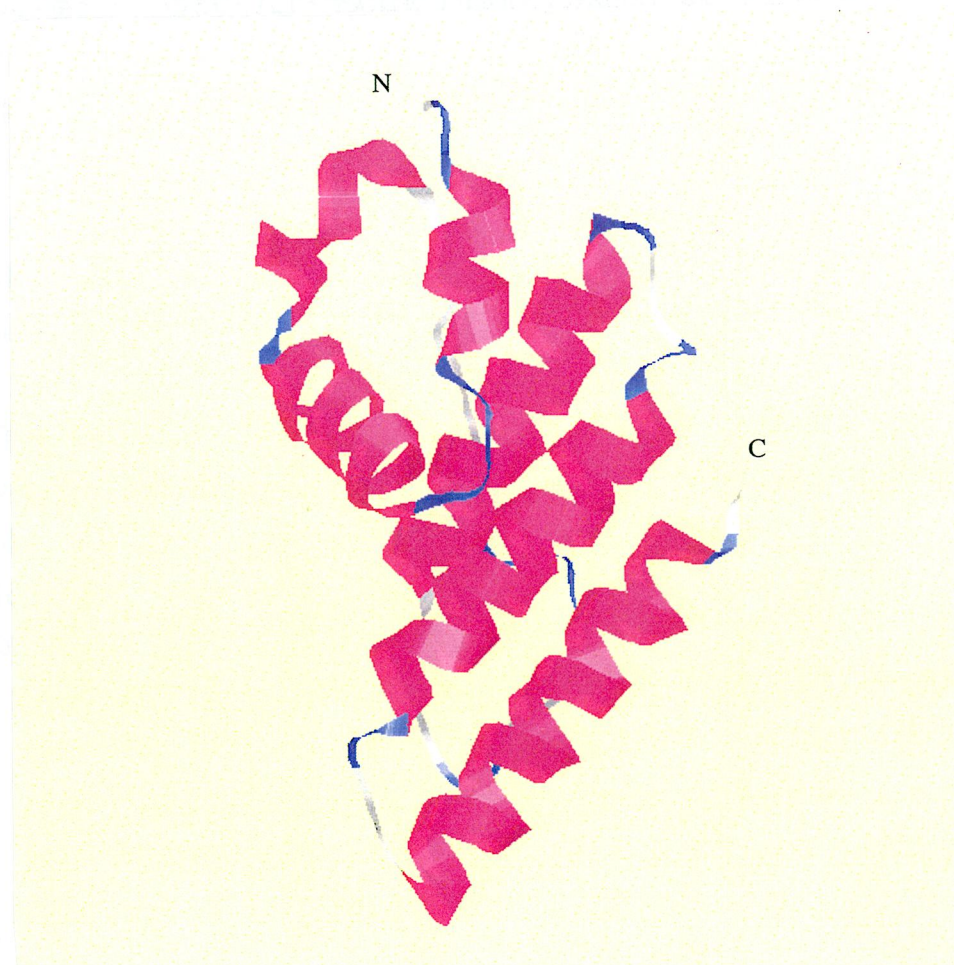


Fig. 7. Ribbon view of the three-dimensional structure of *S. violaceoruber* PLA₂. Helices or helical segments are in red and turn regions are in blue. Secondary structure was conveniently defined by the program Ras-Mol³⁴.

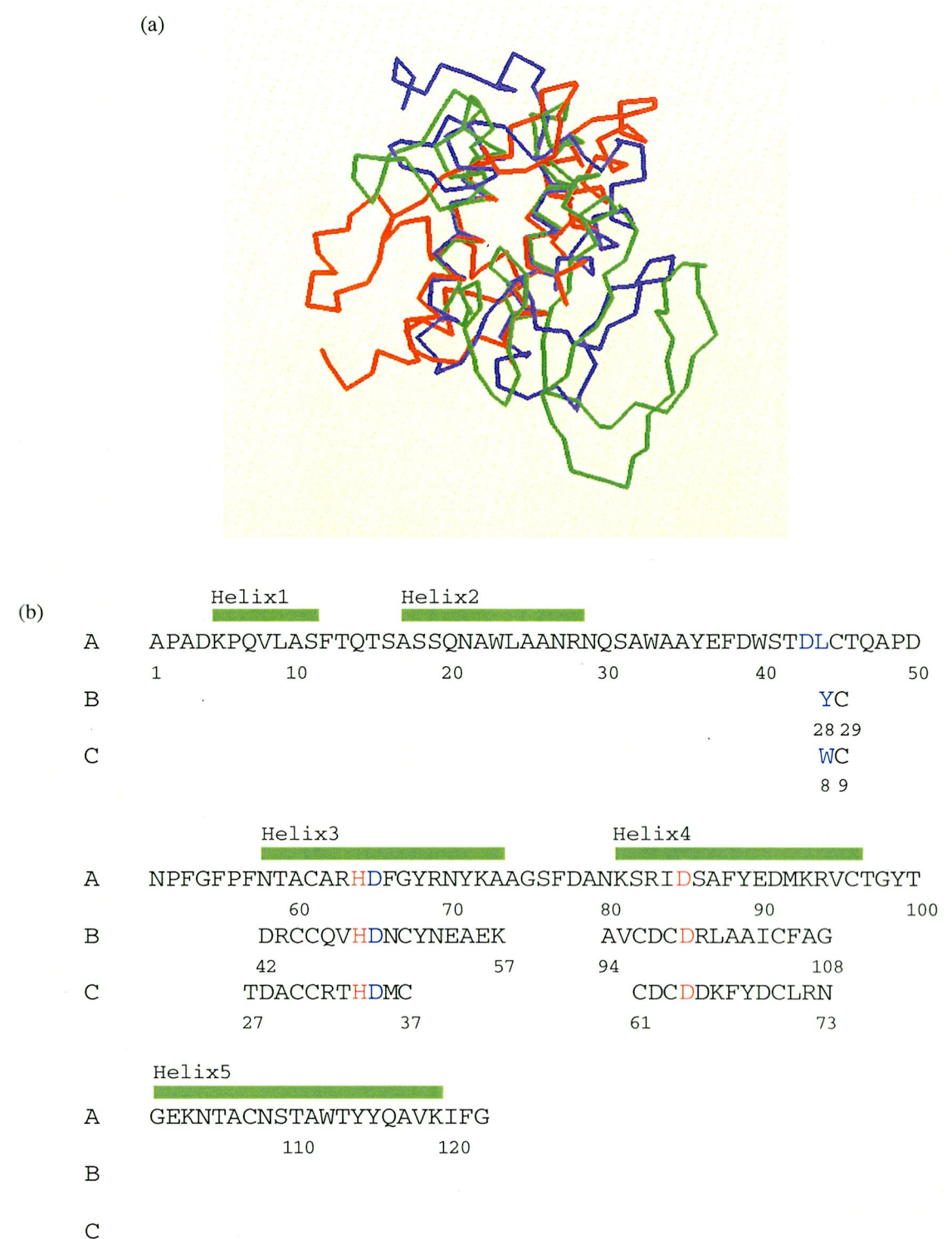


Fig. 8a. Superposition of three different PLA₂s. red, *S. violaceoruber* PLA₂; blue, *Naja naja atra* PLA₂⁹ (Class I/II); green, bee venom PLA₂¹⁰ (Class III). Fig. 8b. Amino acid sequence of the *S. violaceoruber* PLA₂ and structurally homologous segments of other PLA₂s. A: *S. violaceoruber* PLA₂; B: *Naja naja atra* PLA₂ (Class I/II); C: bee venom PLA₂ (Class III). Functional residues are indicated as follows: red, catalytic; blue, calcium-binding.

III. 触媒部位及び周囲の水素結合ネットワーク

上述のように、*S. violaceoruber* PLA₂のフォールディングは、他の分泌型PLA₂と大きく異なっているにもかかわらず、触媒部位の構造は非常に類似していた(Fig. 9)。さらに、他の分泌型PLA₂の結晶構造と同様に、触媒部位の周辺には水素結合ネットワークが形成され、これによって触媒部位が安定化されていた(Fig. 9)。

本PLA₂の活性中心はHis64であり、I/II型PLA₂のHis48に対応する。この残基のNδ1原子に水素結合した水分子(Wat260)が、ヒスチジン残基により分極化され、基質のカルボニル炭素を求核攻撃するものと考えられる。他のPLA₂においては、一次配列上、活性中心ヒスチジン残基の次にアスパラギン酸残基が存在しており、このアスパラギン酸の二つのカルボキシル酸素がカルシウムイオンに配位結合している。本PLA₂においても、一次配列上、His64の次にはアスパラギン酸残基が続いている。また、本PLA₂のAsp85は、I/II型PLA₂のAsp99に対応しており、I/II型PLA₂と同じく、活性中心ヒスチジンのNε2原子と水素結合を形成している。このアスパラギン酸残基は、触媒反応によって生じたヒスチジン残基上の正電荷を中和する役割を持つと考えられる。水素結合によって一直線上に並んだ、His64、Asp85及びWat260のジオメトリーは、セリンプロテアーゼの触媒トライアッドのジオメトリーに非常に類似している。また、この触媒部位のジオメトリーは、I/II型PLA₂のみならず、III型の蜂毒PLA₂にも共通して存在する。このように、進化度が異なる生物由来の全ての分泌型PLA₂に、保存された触媒部位ジオメトリーが存在するという事は、このジオメトリーがPLA₂活性のために必須であることを強く示唆している。

I/II型PLA₂において、触媒部位のまわりに二つのチロシン残基(Tyr52とTyr73)が存在し、それらのフェノール性水酸基が触媒残基Asp99のカルボキシル酸素と水素結合している。前者のチロシン残基はヒスチジン残基と水素結合している側のカルボキシル酸素と、後者のチロシン残基は別のカルボキシル酸素と水素結合している。*S. violaceoruber* PLA₂においては、ひとつのチロシン残基(Tyr68)のみが水素結合ネットワークに関与している。このチロシン残基は構造学的にI/II型PLA₂のTyr52と対応する。一方、立体構造上、I/II型PLA₂のTyr73水酸基と同等な位置に水分子Wat263が存在している。この水分子は、Asp85カルボキシル酸素のほかに、C末カルボン酸ならびにLys119アミノ基と水素結合している。また、I/II型PLA₂においては、N末アミノ基、2番目の残基の主鎖、ほぼ保存されている残基であるGln4の側鎖、68-73番目の残基の主鎖、および、触媒残基Asp99に直接水素結合している水分子によって水素結合ネットワークが形成され、触媒部位構造が安定化されている。*S. violaceoruber* PLA₂において

は、Lys81アミノ基が触媒残基Asp85カルボキシル酸素とイオン結合し、さらに、このアミノ基がC末カルボン酸とイオン結合を、Val118カルボニル酸素と水素結合を形成する。なお、Val118は5番目のα-helixのC末側に位置し、ヘリックス双極子効果により負の静電ポテンシャルを持つ。このように、水素結合ネットワークの形成による触媒部位構造の安定化が、全ての分泌型PLA₂において共通して観測されるので、触媒部位の構造学的な堅さはPLA₂活性のために重要であると考えられる。

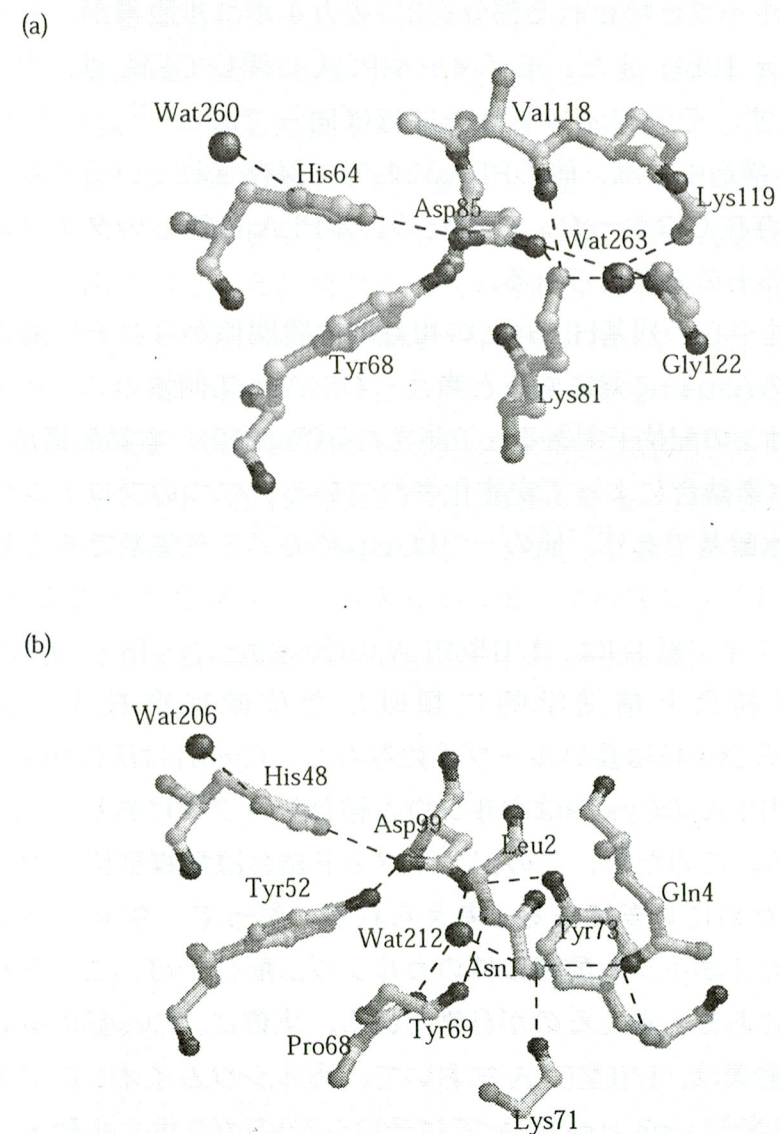


Fig 9. Comparison of the catalytic site and surrounding hydrogen bond network. (a), *S. violaceoruber* PLA₂; (b), *Naja naja atra* PLA₂⁹⁾. Hydrogen bonds are shown by broken lines.

IV. カルシウム結合部位

カルシウム結合部位に関しては、後述のカルシウム結合型(ホロ型)酵素の構造の章で明らかにしており、詳細についてはその章に記述する。以下には、あくまで、カルシウム非結合型(アポ型)酵素の結晶構造に基づく予測を述べる。

他のPLA₂の結晶構造解析によれば、カルシウム結合部位のジオメトリーは全ての分泌型PLA₂で保存されており、保存されたアスパラギン酸残基の二つのカルボキシル酸素とカルシウム結合ループと呼ばれる部分の3つのカルボニル酸素が、カルシウムイオンに配位している(Fig. 10b)。また、モノマー型PLA₂に関して言えば、カルシウムイオンの有無にかかわらず、そのジオメトリーはほぼ同一である^{7,12)}。しかしながら、本PLA₂のアポ型の結晶構造中には、他のPLA₂において保存されているカルシウム結合部位のジオメトリーが存在しなかった。このため、本PLA₂は新しいタイプのカルシウム結合様式を有しているものと考えられる。

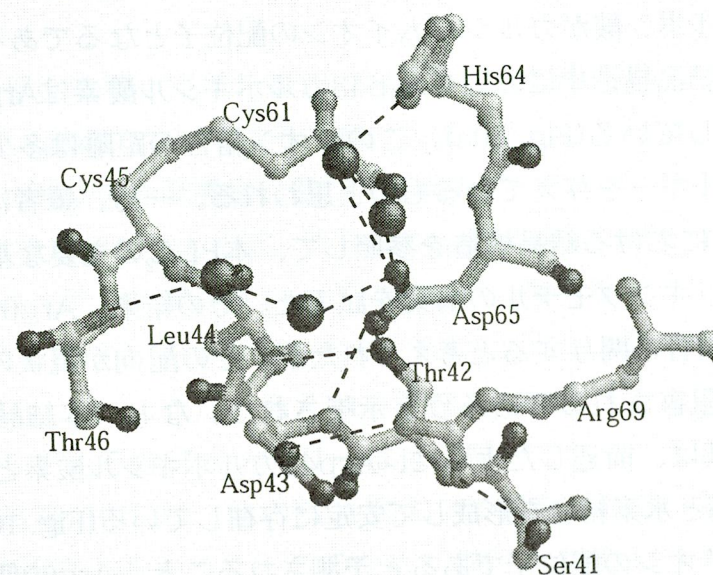
まず最初に、活性中心の残基His64との相対的位置関係から、その隣の残基であるAsp65がI/II型PLA₂のAsp49に対応すると考えられ、Asp65側鎖の二つのカルボキシル酸素がカルシウムイオンの配位子であると予測される(Fig. 10)。本結晶構造中において、Asp65側鎖は2つの水素結合によって安定化されている。二つのプロトン供与体のうちのひとつはThr42の水酸基であり、他の一つはAsp43のアミド窒素である(Fig. 10a)。

S. violaceoruber PLA₂において、2つのジスルフィド結合のうちひとつ(Cys45とCys61の間のジスルフィド結合)は、I/II型PLA₂のCys29とCys45との間に形成されているジスルフィド結合と構造学的に類似した位置に存在する(Fig. 10)。*S. violaceoruber* PLA₂のCys45は長いループ上に存在し、Cys61は活性中心His64の近傍にある。一方、I/II型PLA₂のCys29はカルシウム結合ループ中にあり、Cys45は活性中心His48の近傍にある。このため、このジスルフィド結合は触媒部位とカルシウム結合ループとを連結するために必要であると考えられる。従って、*S. violaceoruber* PLA₂においても、Asp65カルボキシル酸素以外のカルシウム配位子は、この保存されたジスルフィド結合の近傍にあるのが自然である。実際に、Cys45の隣の残基であるLeu44のカルボニル酸素は、I/II型PLA₂において、カルシウムイオンのアキシアル配位子である28位の残基(*Naja naja atra* PLA₂ではチロシン)のカルボニル酸素と対応した位置にある(Fig. 10)。この理由から、*S. violaceoruber* PLA₂において、Leu44カルボニル酸素はカルシウムイオンと配位結合するであろうと予測される。

また、Asp43側鎖の二面角が変わると、そのカルボン酸が予測されるカルシウム結合部位(Asp65とLeu44)の方を向き、カルシウムイオンに配位可能な位置に移動する

(Fig. 10a)。このため、本PLA₂において、Asp65カルボン酸及びLeu44カルボニル酸素に加え、Asp43カルボン酸がカルシウムイオンの配位子となるであろうと予測できた。しかしながら、本結晶構造中においてAsp43カルボキシル酸素はArg69グアニジノ基とイオン結合を形成している(Fig. 10a)。このイオン結合の距離は多少長いけれども、いくらかの結合エネルギーを与えているものと思われる。一方、筆者は、基質アナログと結合した他のPLA₂における結晶構造を参照して、本PLA₂の主要な基質であるホスファチジルコリンのドッキングモデルの構築を試みた。その結果、Arg69側鎖の炭化水素部分はコリン基との結合に関与すると考えられたが、その配向が現状のままであると、コリン基との結合が阻害されるであろうと示唆された。なお、本結晶構造中において、Arg69グアニジノ基は、前述したように、Asp43カルボキシル酸素とイオン結合を、さらに、Ser41水酸基と水素結合を形成して安定に存在している(Fig. 10a)。Asp43カルボン酸がカルシウムイオンの配位子であると予測されること、Arg69側鎖が基質の認識に係わっていると予測されること、及び、今回のモデルにおいてAsp43カルボキシル酸素とArg69グアニジノ基との間にイオン結合が存在していることから、本PLA₂において基質の認識とカルシウムイオンの結合との間に相関があるのではないかと推測される。すなわち、本酵素が基質と結合するためにArg69側鎖の配向を変化させると、Arg69グアニジノ基とAsp43カルボン酸との間のイオン結合、もしくは結合エネルギーが消失し、Asp43カルボン酸が容易にカルシウムイオンとの結合に関与できるようになる。また逆に、Asp43カルボン酸がカルシウムイオンに配位すると、Arg69側鎖が基質の結合のために適した配向をとるようになるのではないかと考えられる。

(a)



(b)

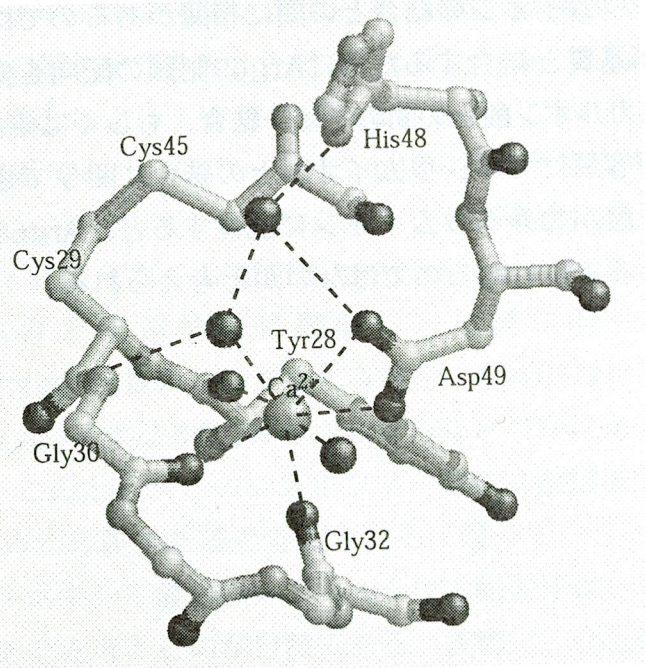


Fig. 10. Calcium binding site of *Naja naja atra* PLA₂⁹⁾ (b) and the corresponding region of *S. violaceoluber* PLA₂ (a). The position of calcium ion in *Naja naja atra* PLA₂ is represented by the large sphere. Hydrogen bonds and coordination bonds to calcium ion are shown by broken lines.

V. 基質結合部位

I/II型PLA₂においては、不変の、もしくは高度に保存された疎水性残基が疎水性チャネルを形成している^{8,11)}。このチャネルは、反応時に基質であるグリセロリン脂質の *sn*-1位と *sn*-2位の脂肪酸側鎖を収容し、また、触媒部位やその周辺に形成されている水素結合ネットワークを溶媒領域から遠ざける役割をもつ。基質もしくはそのアナログと結合した状態の立体構造を解析しなければ、基質と本PLA₂の相互作用を完全に理解することはできない。しかしながら、本結晶構造から容易に疎水性チャネルの存在が示唆された。本PLA₂においては、Cys45, Pro49, Cys61, Phe88, Met92, Tyr114, Ala117, Val118, Ile120及びPhe121の疎水性側鎖がチャネルの形成に関わっていると思われる(Fig. 11)。

基質と結合するためには、疎水性相互作用に加えて、親水性相互作用も必要である。I/II型PLA₂の遷移状態において、*sn*-3位リン酸基の2つの酸素のうちの一つはカルシウムイオンと結合し、他の一つは69位にあるリシン残基のアミノ基もしくはチロシン残基のフェノール性水酸基と水素結合すると結晶構造から予測されている^{8,11)}。しかしながら、本モデルからは、*sn*-3位のリン酸基酸素との間に水素結合を形成する相手を特定することはできなかった。

他の分泌型PLA₂全てに共通した機構ではないが、I型のウシ膝液由来PLA₂において、*sn*-3位のリン酸にエステル結合しているコリン基は、Lys53とLys56の側鎖の炭化水素部分で形成される溝、いわゆる、コリン受容体ポケットに入り込む^{35, 36)}。*S. violaceoluber* PLA₂において、構造学的にこれらの残基に対応する残基はArg69とLys72である(Fig. 11)。これらの残基も長い炭化水素部分を有しており、コリン受容体ポケットを形成するものと思われる。本PLA₂において、コリン受容体ポケットを形成すると予測される残基が存在している事実は、本PLA₂がホスファチジルコリンを基質として好むという実験結果を説明し得る理由の一つであると考えられる。しかしながら、前述したように、Arg69の側鎖は、Ser41水酸基との水素結合、および、カルシウムイオンの配位子と考えられるAsp43カルボン酸とのイオン結合のためコリン受容体ポケットを形成し得ないように配向している。

第二章 原子分解能のカルシウム非結合型(アポ型)の構造

【緒言】

Sheldrick³⁷⁾によれば、原子分解能構造解析とは、1.2 Å分解能を超えて回折強度が観測され、かつ、高分解能側で 2σ 以上の回折強度を持つ反射が理論反射数の50%以上含まれている反射データを用いて構造を精密化することである。原子分解能で解析されたモデルから、蛋白質の構造やその安定性などについて詳しく理解することが可能となる。例えば、このモデルは、蛋白質間や、蛋白質と溶媒の水素結合パターン(距離や角度)について、もしくは原子の熱振動について、より信頼できる知見を与える。現在、Protein Data Bank (PDB)³⁸⁾に登録されている立体構造のうち、50%以上が高分解能モデルとして分類されているが、そのうちのごくわずかのモデルのみが、真に原子分解能で解析されたモデルである。また残念ながら、原子分解能と呼ばれるモデルの大半は分子質量が10 kDa以下の小分子量蛋白質である³⁹⁻⁴⁶⁾。将来的には、原子分解能モデルの数は指数関数的に増加するであろうと予測されるが、今の時点では、特に大きな蛋白質に関しては、原子分解能モデルはほとんどない⁴⁷⁻⁵²⁾。このため、*S. violaceoruber* PLA₂の原子分解能構造解析は、本PLA₂のより詳細な性状を与えるのみならず、蛋白質結晶学にとっての標準モデルを提供し得ると考えられる。そこで、本章の主題は、低分解能の解析では得られない分子内または分子間の相互作用や異方的な熱振動など、本PLA₂の性状についてより正確でかつ完全に記述することである。

前章で述べたように、PLA₂はグリセロリン脂質のグリセロール2位に結合する脂肪酸を加水分解する酵素である。PLA₂のミセル状基質に対する活性は、単分子分散状の基質に対する活性よりも100-1000倍高い。この現象を界面活性化と呼ぶ⁵³⁾。ブタ腭液由来PLA₂を用いたNMR解析から、界面活性化はPLA₂の構造変化によって生じることが明らかとなった¹³⁻¹⁵⁾。しかしながら、現在までに、X線構造解析の結果からはそのような構造変化を観測できていない。今回、*S. violaceoruber* PLA₂の原子分解能構造解析とOhtani and Sugiyama⁵⁴⁾によって得られたNMR解析の結果とを比較・検討することによって、本PLA₂の界面活性化について示唆する知見が得られたので併せてこの章に報告する。

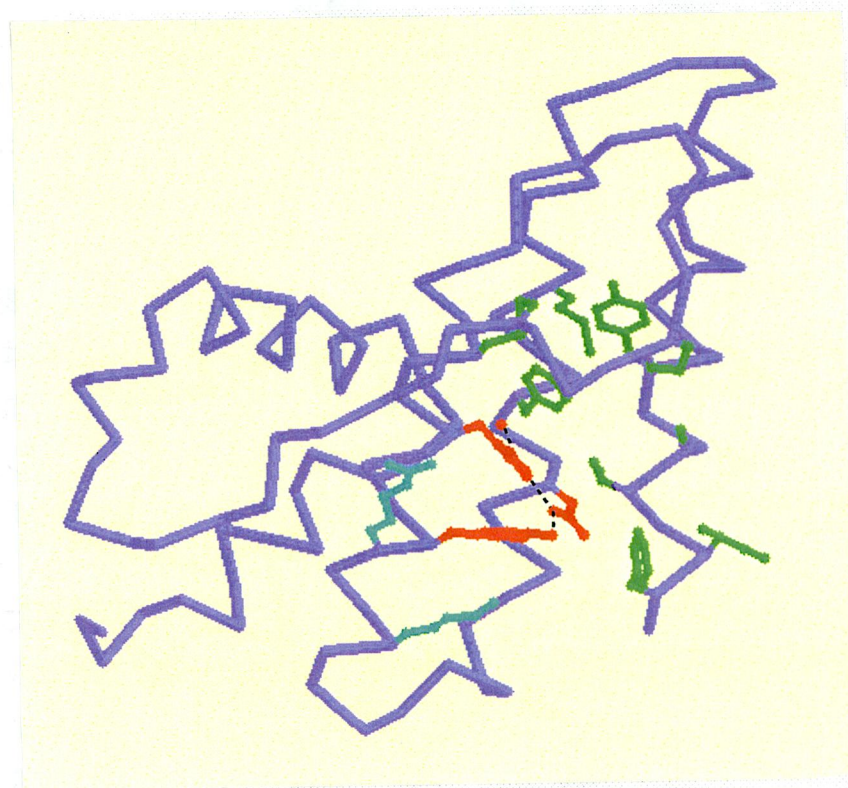


Fig. 11. The putative substrate binding site of *S. violaceoluber* PLA₂. The conserved catalytic residues, His64 and Asp85 and the invariant Tyr residue, Tyr68 are shown in red. they are connected through a hydrogen bond network to active site water molecule (also in red). Green color shows the side-chains of the residues, which may form the putative hydrophobic channel. Side-chains of Arg69 and Lys72, which may form choline receiving pocket, are shown in cyan.

【実験結果】

I. 回折強度の収集

結晶化についての詳細は前述した。本回折実験に用いた結晶は、空間群が $P2_1$ 、格子定数は $a=29.34 \text{ \AA}$, $b=57.50 \text{ \AA}$, $c=31.81 \text{ \AA}$, $\beta=111.07^\circ$ であり、非対称単位に一分子を含む。前章と同様に、X線実験は理学電機X線研究所にて行った。X線源としては、管電流100 mA、管電圧50 kVで稼働させたX線発生器RU-200から得られた $\text{MoK}\alpha$ 線($\lambda=0.71073 \text{ \AA}$)を用いた。グラフィトモノクロメーターで単色化し、0.3 mmφのコリメーターで集光したX線を、室温にて、ガラスキャピラリーに封入した結晶に照射した。回折強度の検出は300 x 300 mmのIPを検出器として持つR-AXIS IVシステムにより行った。

高分解能側においても十分な回折強度が得られると予測されるにもかかわらず、機械的理由で高分解能側の反射が測定できなかった場合、①結晶と検出器との距離を短くする ②検出器のサイズを大きくする ③X線の波長を短くするなどの方法により高分解能側の反射が測定可能となる。このうち、①と②はX線検出システムによりそれぞれ限界がある。①と③では回折強度スポットの重なりが多くなり、実質的に有効でない場合がある。また、③は結晶によるX線の吸収効果が抑えられるという利点を併せ持つが、回折強度は波長の三乗に比例して減少するので、実験室レベルの回折実験ではあまり用いられない。しかしながら、本結晶は非常に良質で、X線源として $\text{MoK}\alpha$ 線を用いても十分な回折強度が得られることが判明したので、これを用いて実験を行った。また、同時に、X線検出システムを200 x 200 mmのIPを持つR-AXIS IIcから、300 x 300 mmのIPを持つR-AXIS IVにかえてスポットの重なりを防いだ。

回折強度の収集ならびにスケーリング処理は、プログラムProcess¹⁸⁾のOscill及びScaleを用いた。0.92 Å分解能までの回折強度データの測定は、結晶からIPまでの距離を150 mm、一枚のIPについての露光時間を12分、一枚のIPにつきφ軸回りの結晶の回転角度を1°に設定して行った。計180枚の回折写真を処理した結果、全体で120,824反射を観測し、スケーリングの結果45,532個の独立反射を得ることができた。また、データの完全性は67.5%、 R_{merge} は7.16%であった。それぞれの分解能ごとにおける、統計学的数値をTable 4に示す。高分解能側における完全性の低さは、回折強度の値がバックグラウンド強度に比べて小さいためである。しかしながら、1.168-1.114 Å分解能において、 2σ 以上の回折強度を持つ反射数と理論反射数の比は51.3%であり、このデータセットはSheldrick³⁷⁾の定義した原子分解能に関する条件を満たすといえる。

Table 4. Statistics of atomic resolution data

Resolution (Å)	Unique reflections	I/σ	Completeness (%)		R_{merge} (%)
			$I>2\sigma$	$I>0$	
inf. > 3.694	1065	49.04	97.43	97.62	6.2
3.694 > 2.612	1904	33.28	96.64	97.04	6.3
2.612 > 2.133	2421	22.62	96.08	96.88	6.6
2.133 > 1.847	2853	15.63	93.66	95.77	6.7
1.847 > 1.652	3147	10.27	89.92	93.83	8.2
1.652 > 1.508	3395	7.90	85.68	91.58	8.9
1.508 > 1.396	3596	5.73	77.71	88.86	11.2
1.396 > 1.306	3682	4.48	70.78	84.64	12.6
1.306 > 1.231	3691	3.84	64.56	80.75	14.2
1.231 > 1.168	3726	3.31	56.96	76.29	16.0
1.168 > 1.114	3700	2.90	51.27	72.68	16.4
1.114 > 1.066	3361	2.50	37.86	62.53	17.8
1.066 > 1.024	3005	2.15	27.54	53.98	20.1
1.024 > 0.987	2472	1.90	16.87	42.86	19.8
0.987 > 0.954	2096	1.68	9.89	34.97	18.7
0.954 > 0.923	1418	1.64	5.82	22.75	22.8
All data	45532	8.21	50.99	67.48	7.2

II. 構造の精密化

先に決定した本PLA₂の1.4 Å分解能モデルを、原子分解能構造解析のスタートモデルとして用いた。まず、プログラムX-PLOR²³⁾を用いて、10-1.1 Å分解能でかつ $F > 2\sigma$ の反射のうち90%の反射に対して精密化を行った。200サイクルの原子位置の精密化、ならびに40サイクルの等方的温度因子の精密化の結果、R値は26.3%から18.4%へと下がった。残り10%の反射は精密化の進行具合をモニターするためのテストセットとして使用した。X-PLORによる精密化の結果、テストセットに対するR値(R_{free})²⁶⁾は20.9%となった。得られた $2F_o - F_c$ マップにおいて、個々の原子はよく分離しており、この段階ですでに原子分解能構造解析が達成されたと考えられた。

次に、プログラムSHELXL-97⁵⁵⁾のCGLS法²⁵⁾により、10-1.1 Å分解能でかつ $F > 0$ の反射を用いて精密化を行った。溶媒領域にSWATパラメータで定義される一定の電子密度があると仮定することで、構造因子の値を補正できる⁵⁶⁾。本結晶は一般的な蛋白質結晶に比べて溶媒含量がかなり低いけれども、この補正によりR値ならびに R_{free} の両方をわずかにではあるが下げることができた。また、初期的精密化ステップにおいて、 $F_o - F_c$ マップは個々の原子の振動が異方的であることを強く示唆していた。実際、温度因子を等方的から異方的へと変更することにより、劇的にR値や R_{free} ならびに電子密度図を改善することができた。このことは、この分子の精密化にとって異方的な処理が非常に有効であることを示す。よって、以下の精密化ステップにおいては、新しく加えられた原子以外の温度因子は異方的に精密化した。新しく加えられた原子に関しては、最初の2-3サイクル等方的に温度因子を精密化した後、異方的精密化に変更した。

個々の原子を異方的温度因子を用いて処理することにより、電子密度図の質は大幅に改善され、また、ディスオーダー構造の導入を容易に行うことができるようになった。すなわち、ディスオーダー構造の導入は、異方的温度因子を導入してもなお、高い残余のピークが認められる側鎖もしくは水分子に対してのみ行った。それぞれのコンフォメーションの含有率は個別に精密化するが、その和が1になるよう制限した。ディスオーダー構造の導入は、残余のピークを消失させたという点において、電子密度図を改善したと言えるが、R値ならびに R_{free} はわずかしかが下がらなかった。

SHELXLの精密化においては、Engh and Huber²⁸⁾によって与えられた理論的ジオメトリの制約を課すことにより、モデルのジオメトリは理想的に保持される。同時に、2つの共有結合した原子の熱振動は同程度であると仮定して温度因子が精密化され、水分子に関しては、その熱振動が等方的に近いと仮定してその温度因子が精密化される。プログラムSHELXL⁵⁵⁾では、理論的ジオメトリにおける値からのズレ、2つの共有結

合した原子間における温度因子の差、もしくは、水分子における各方向への温度因子成分の差の標準偏差値が、DEFSパラメータで与えられるターゲット値に近づくように調整される。このため、制約の強さはターゲット値を変更することにより調節できる。今回の反射強度データの数、求めるべきパラメータの数に比し充分大きいので、これらの制約の緩和を行った。なお、ターゲット値の変更に際し、 R_{free} 値をモニターとして用いた。最終的な標準偏差のターゲット値は、ジオメトリーに関しては、結合距離(DFIX)を0.03 Å、二つの共有結合を介した原子間の距離(DANG)を0.06 Å、キラル原子及び3個の非水素原子と結合した sp^2 原子の不斉体積(CHIV)を0.15 Å³にそれぞれ設定した。SHELXLにおける芳香族環やペプチド結合などの平面性(FLAT)の制約は、他のプログラムとは異なっており、平面中の1原子と同じ平面内の他の3原子がつくる不斉体積が0になるように制約が課せられる。今回の精密化において、平面性の制約は設定値(0)からのズレの標準偏差値が0.15 Å³に近づくように設定した。ただし、Table 6におけるFLATのrmsd値は、他のプログラムで得られた結果と比較し易くするため、他のプログラムと同じく理論平面からの距離として与えられている。また、温度因子に関しては、2つの共有結合した原子間における結合方向の温度因子成分の差(SIMU)を1.6 Å²、各方向の温度因子成分の平均値における差(DELU)を6.4 Å²にそれぞれ設定し、一つの水分子における各方向への温度因子成分の差(ISOR)を16 Å²に設定した。このように制約を緩和して精密化を行った結果、最終的モデルにおけるジオメトリーの理論値からの差rms値は、他に報告されている構造モデルにおける値と比べてかなり大きくなっている。

水素原子は、 $F_o - F_c$ マップに対して当てはめていくというよりむしろ、理論的ジオメトリーに従い自動的に蛋白質原子上に発生させた。また、回転角に自由度のある、アミノ基、メチル基及び水酸基の水素原子は、水素結合や二面角などを考慮し化学的にリーズナブルであると思われる位置に置いた。水素原子パラメータの精密化は直接的には行わず、"riding"モデルとして行った。すなわち、それぞれの精密化サイクルの後に、水素原子の位置に対して、水素原子が結合している重原子が移動した量と同じシフトを加えた。同時に、水素原子の温度因子は等方的に処理するが、その値は、水素原子が結合している重原子の等価的溫度因子に対して、アミノ基、メチル基及び水酸基の場合1.5倍に、他の場合は1.2倍に設定した。水素原子のX線散乱因子は小さく、回折強度への寄与は僅かであるが、R値ならびに R_{free} はかなり減少した。このため、"riding"モデルによる水素原子の構造は、精密化すべきパラメータの数を増やさずに、R値ならびに R_{free} の両方を減少させることのできる有意義な情報を持っていると考えられる。また、水素原子をモデルから削除して計算したオミットマップによって、大半の水素原子の位置を確認することができた。

水分子の付加ならびに削除、ディスオーダー構造の導入、CGLS法による精密化という一連のサイクルをさらに行うことにより、精密化は収束し、 $R = 9.7\%$, $R_{\text{free}} = 13.7\%$ となった。次に、これまでテストセットとして精密化に用いなかった反射も含めて数回の精密化サイクルを行った。その結果、最終的に、10-1.1 Å分解能の全ての反射に対する R 値は10.0%となった。しかしながら、用いた反射のデータセットには0.92 Å分解能までの反射が記録されている。そこで、モデル全体の精度を表わす当てはめの標準偏差値(*Goodness of Fit*, *GooF*)を参照して、精密化に含める反射の適切な分解能の上限値を決定した。様々な値を分解能の上限値として用い、それぞれ10回のCGLS計算を行ったところ、1.05 Åという値が分解能の上限値として最適であると判明した。10-1.05 Å分解能の全ての反射(37,649反射)に対して、更なる精密化サイクルを行った結果、 R 値は10.3%に収束した。最終モデルにおいて、水素以外の蛋白質原子は958個(ディスオーダー構造を含めると988サイト)、水分子の数は177個(ディスオーダー構造を含めると202サイト)となっている。差フーリエ合成による、最も大きな正の密度は $0.25 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$ 、負の密度は $-0.25 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$ であった。精密化の進行状況についての詳細はTable 5に、精密化したモデルの統計学的数値はTable 6に示す。

Table 5. Progress of refinement

	Resolution (Å)	σ cut	R (%)	R_{free} (%)
Start (1.4 Å model)	10 - 1.10	2	26.3	-
X-PLOR refinement	10 - 1.10	2	18.4	20.9
SHELXL refinement	10 - 1.10	0	17.1	19.6
	10 - 1.10	0	16.8	19.3
change to anisotropic	10 - 1.10	0	12.2	15.9
	10 - 1.10	0	11.9	15.6
relax restraints	10 - 1.10	0	10.8	15.6
	10 - 1.10	0	11.0	15.5
add hydrogens	10 - 1.10	0	9.9	14.0
	10 - 1.10	0	9.7	13.7
include all data	10 - 1.10	0	10.0	-
change upper limit	10 - 1.05	0	10.6	-
	10 - 1.05	0	10.3	-

Table 6. Summary of the refined model

Refinement statistics		
Resolution (Å)	10.0-1.05	
No. of used reflections	37649	
Range completeness (%)	82.2	
No. of parameters	10,812	
No. of restraints	13,414	
<i>GooF</i> ^a	1.127	
Restrained <i>GooF</i>	0.966	
<i>wR</i> ^b	0.232	
Rms deviations from ideal values		
Bond lengths	0.022 Å	
Bond angles	2.5 deg	
Dihedral angles	20.9 deg	
Improper angles	2.03 deg	
Rms differences between B_{eqvs} of 1-2 or 1-3 bonded atoms		
Main-chain bond	1.52 Å ²	
Main-chain angle	2.02 Å ²	
Side-chain bond	4.46 Å ²	
Side-chain angle	6.55 Å ²	
Restraints		
	target sigma	rmsd from target values
DFIX (Å)	0.03	0.022
DANG (Å)	0.06	0.035
FLAT (Å)	-	0.0225
CHIV for sp^2 atoms (Å ³)	0.15	0.104
for sp^3 atoms (Å ³)	0.15	0.128
DELU (Å ²)	1.60	0.80
SIMU (Å ²)	6.40	3.52
ISOR (Å ²)	16.0	10.6

^a $GooF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n - p)]^{1/2}$, where w is the weight for a reflection, F_o and F_c are observed and calculated structure factor amplitudes, n is the number of reflections and p is the total number of parameters refined.

^b $wR^2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$.

【考察】

I. 電子密度図の質

前述のように、温度因子の異方的処理は劇的に位相を改善した。電子密度図に関して言えば、異方的処理によって F_o-F_c マップ中の残余のピークを取り去ることができた。また、最終的な $2F_o-F_c$ マップは、大半の原子を球として認識できるほど極めて良質である(Fig. 12)。しかしながら、両末端の残基は主鎖も含めて電子密度が薄い。また、Gln7, Arg28, Gln47, Phe53, Ser76, Asp78, Lys103及びLys119の側鎖は薄い電子密度を持つ。このうち、Gln7, Ser76, Asp78及びLys119の側鎖にはディスオーダー構造を導入した。ディスオーダー構造の導入により、確かに、 F_o-F_c マップ中の残余のピークを除去することができたが、得られた電子密度は薄いままであった。Gln37, Asp43, Asp50及びLys72のように、側鎖原子が大きな温度因子を持つ残基においては、電子密度がかなり広がっており、これらの側鎖原子が高い異方性を持つことが示唆された。このため、厳密には、これらの側鎖に対してもディスオーダー構造を導入すべきかもしれない。

また、低分解能の構造解析では、得られた電子密度図から、ヒスチジン残基のイミダゾール環における窒素原子と炭素原子の位置を区別することは非常に困難である。しかし、今回の電子密度図では、窒素原子における電子密度の方が炭素原子のそれよりも高いので、容易にかつ明瞭に区別できる。同様に、アスパラギン及びグルタミン残基のアミド基に含まれる窒素原子と酸素原子の区別も容易に行うことができた。

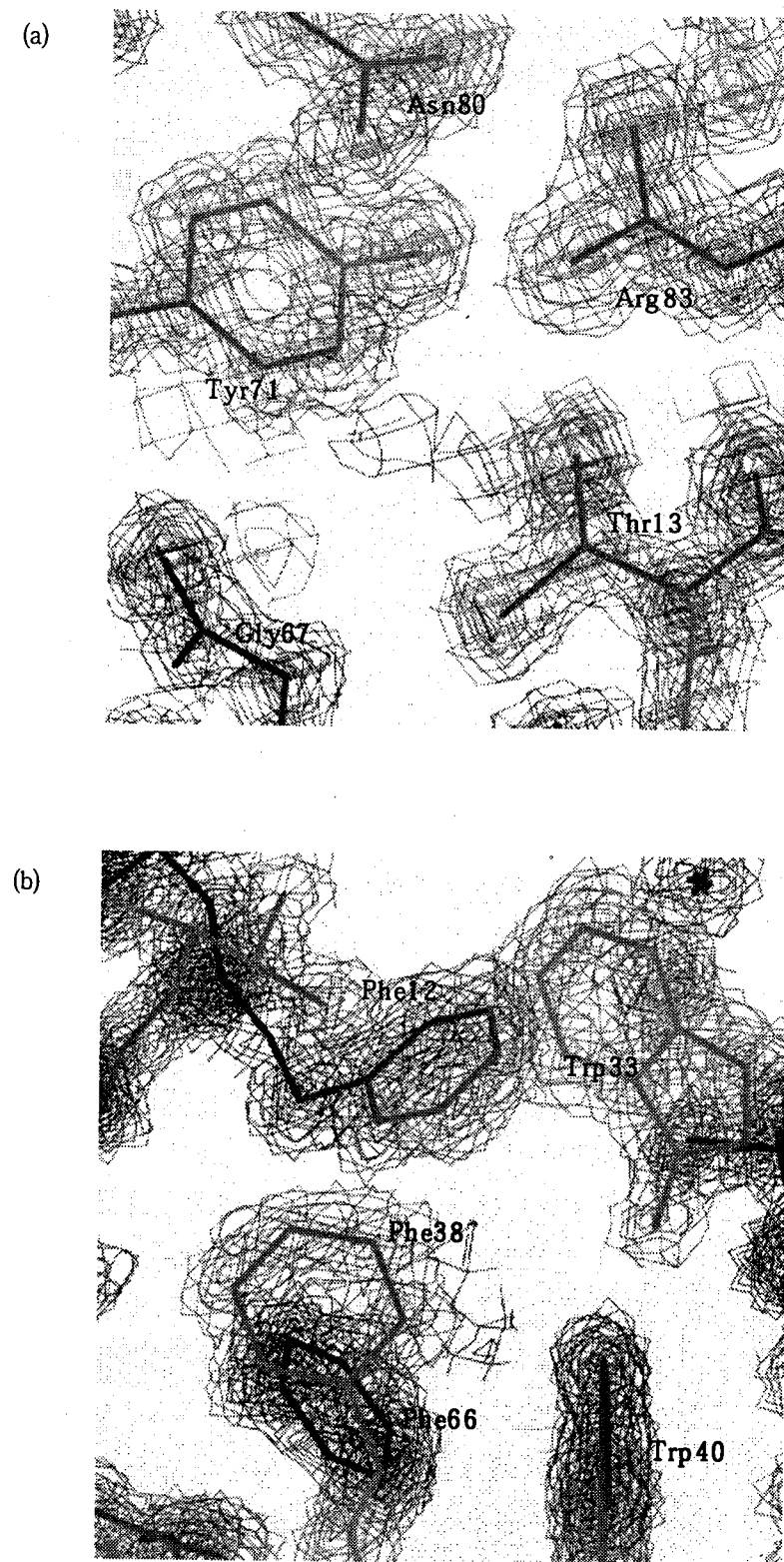


Fig. 12. Two portions of the atomic resolution $2F_o-F_c$ map. The map was contoured in steps of 1σ starting at 1σ . (a), region between third and fifth α -helices; (b), hydrophobic core region in the N-terminal domain.

II. モデルの信頼性

Ramachandranプロット^{29, 30)}の結果は前章のものとはほぼ同じである。このプロットから、Leu44以外の残基の主鎖コンフォメーションはエネルギー的に安定であることがわかる。Leu44についての考察は、前章にてすでに述べた。

モデルの信頼性は、本モデルにおける値と理論的ジオメトリーにおける値との差rms値を求めることによって定量的に評価される。このrms値をプログラムX-PLOR²³⁾を用いて計算した(Table 6)。前述したように、このモデルにおけるrms値は、他に報告されている構造モデルにおける値と比べてかなり大きくなっている。これは、精密化の際にジオメトリーに関する制約を緩和したためであると考えられる。

精密化した個々のパラメーターの誤差の見積り値(esd値)を求めるため、CGLS計算によって得られた最終モデルを、SHELXLのブロック行列最小自乗法⁵⁵⁾によりさらに精密化した。まず最初に、蛋白質部分に関しては、それぞれ、約50残基を含む4つのブロック(およそ15残基はoverlapさせた)に分け、各ブロックに含まれる原子の位置及び異方的温度因子のパラメーターのみを同時に最小自乗法で精密化した。溶媒部分は、全ての分子を一つのブロックにまとめ、このブロックに含まれる原子の位置及び異方的温度因子のパラメーターのみを同時に最小自乗法で精密化した。最後に、モデル中の全原子の位置パラメーターのみを一つのブロックにまとめ、これを同時に最小自乗法で精密化した。esd値は計算に用いた最小自乗法行列の逆行列を計算することによって求められる。なお、今回の最小自乗法行列には、全ての非対角項が含まれている訳ではない。また、このブロック行列最小自乗法による精密化において、パラメーターに制約を課しているため、得られたesd値が過小評価されていることは否めない。しかしながら、この評価方法はLuzzatiプロット²⁷⁾に比べて、より正確で、かつ、より多くの情報を含んでいる。この手法によって、モデル中の原子位置の誤差の平均値は、主鎖原子について0.0246 Å、含有率が1の側鎖原子について0.0358 Åであるとそれぞれ求められた。それぞれの残基における原子位置誤差の平均値を、残基番号に対してプロットした図をFig. 13に示す。大半の原子位置誤差は、0.02から0.03 Åの範囲にある。主鎖に関して言えば、誤差が大きい部分は両末端部分と二次構造を連結しているループやターン領域である。一方、側鎖に関しては、両末端部分の残基やArg28, Asp43, Gln47, Asp50, Phe53, Lys72, Lys93, Lys103及びGln116において誤差が大きい。また、電子密度が不明瞭な部分は、誤差が大きくより不正確であると予測される。事実、原子位置誤差と等価的温度因子(B_{eq})との間の相関係数は、主鎖原子について0.86、含有率が1の側鎖原子について0.93であった。多重コンフォメーションをとっている含有率が1以下の原子において、原子

位置誤差はかなり大きく見積もられた。特に、Thr59, Ser82, Ser86及びSer109に関しては電子密度が比較的明瞭であるので、見積もられた精度の低さは驚きである。おそらく、これらの残基においては、正確に求めることが困難な含有率をひとつのパラメーターとして決定したため、含有率における大きな誤差が位置パラメーターの誤差に伝播し、原子位置誤差が大きく見積もられたものと考えられる。

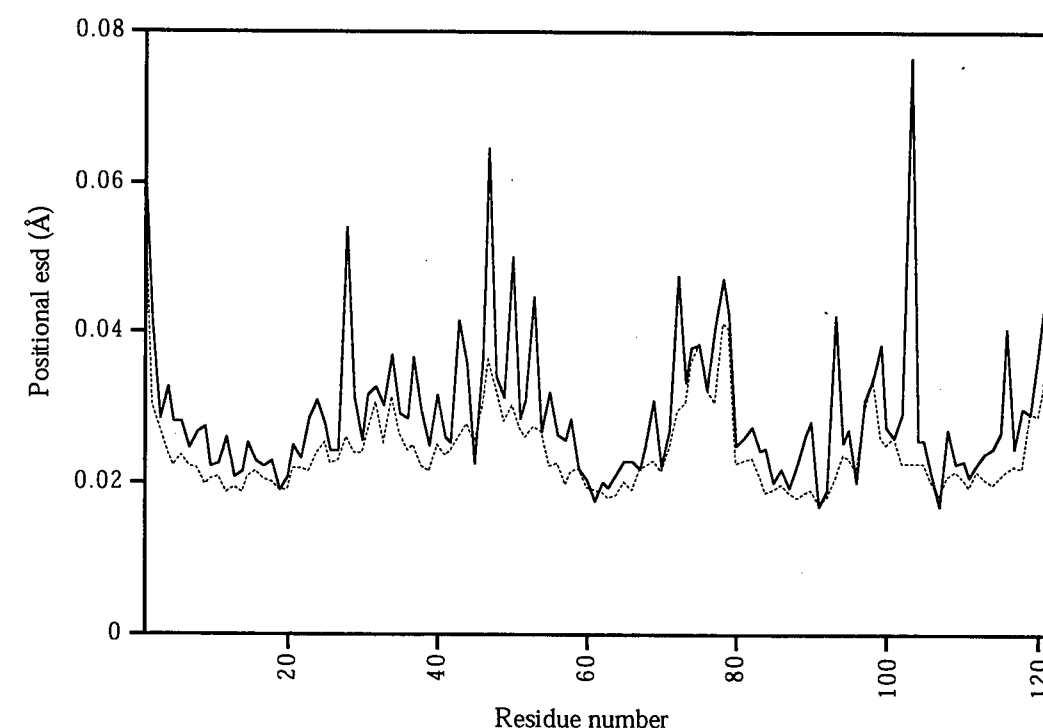


Fig. 13. Plot of positional estimated standard deviation (esd) values against the residue number: solid line, all atoms; broken line, main-chain atoms. Partially occupied atoms were not included.

III. 1.4 Å分解能モデルとの比較

先に求められた1.4 Å分解能モデルと1.05 Å分解能モデルとを比べると、両者の間にはほとんど違いがない。重ね合せた場合、対応する原子位置間の距離のrms値は全蛋白質原子について0.234 Å、主鎖に限ると0.096 Åであった(ただし、ディスオーダー構造を導入した残基はメジャーコンフォメーションで比べた)。しかしながら、Arg28の χ_3 、Asp50の χ_2 、Lys103の χ_2 及びLys119の χ_2 以上の二面角は両者間でかなり異なっている。また、Ile84のC δ 1及びLys93C δ 原子は2 σ 以上移動している。Thr59, Ser76, Asp78, Ser86, Ser109, Trp112及びLys119について、1.4 Å分解能モデル中のコンフォメーションは、1.05 Å分解能モデルにおけるメジャーコンフォメーションとなっている。一方、1.4 Å分解能モデル中のSer82のコンフォメーションは、現モデルにおける二番目にメジャーなコンフォメーションと対応している。ジオメトリーに関する制約を緩和して精密化した現モデルにおいて、多くのプロリン残基の五員環のコンフォメーションは1.4 Å分解能モデルと比べより平面からズレている。

IV. 二次構造および主鎖の水素結合様式

より正確に得られた主鎖の二面角(ϕ and ψ in Table 7)とその水素結合様式(Table 8)から、二次構造の帰属を行った。前述したように、本蛋白質の構造は、N末ドメインとC末ドメイン及び両者を連結する長いループ領域に分けられる。N末ドメインは2つの α -helixと2つの 3_{10} -helixを持ち、一方、C末ドメインは3つの長い α -helixと3つの 3_{10} -helixを持つ。以下にその詳細を記述する。また、現モデルにおいて、水素結合可能な極性原子のほとんどが、分子内及び分子間で、もしくは溶媒分子との間で水素結合を形成している。このため、全ての水素結合様式について記述するのは困難である。従って、この項には、二次構造の帰属に用いた主鎖の水素結合様式のうち、特に重要なものについてのみ指摘する。

現モデルのN末において、2-5番目の残基がType I β -turnを形成している。i位のPro2カルボニル酸素とi+3位のLys5アミド窒素との間の距離は3.07 Åであり、両者の間に水素結合が存在する。ここで認められるi位のカルボニル酸素とi+3位のアミド窒素との間の水素結合は、 β -turn構造に典型的である。この β -turnの後に、5-11番目の残基からなる最初の α -helixが続く。この α -helixにおいて、i位のカルボニル酸素とi+4位のアミド窒素との間の形成される α -helixに典型的な水素結合様式が認められる。一般的に、 α -helixの両端においては水素結合様式に乱れが生じることが多い。また、 α -helixのN端のアミド窒素やC端のカルボニル酸素は、二次構造形成によっても水素結合を作ることができない。このため、これらの原子が他の要素中の原子との間で水素結合(キャッピング水素結合)を形成することによって、二次構造がより安定化される。最初の α -helixのN端においては、主鎖原子によるキャッピング水素結合が3つ観測されている。ひとつは、上述したように、Pro2カルボニル酸素とLys5アミド窒素の間の水素結合である。他のものには、Asp4カルボニル酸素が係わっており、これがGln7およびVal8アミド窒素との間に水素結合を形成している(それぞれ2.97 Åと2.91 Å)。この α -helixのC端においても、枝分かれした水素結合が α -helixのキャッピングに係わっている。Ser11アミド基はGln7およびVal8カルボニル酸素に水素を供与し、その結合距離は2.95 Åと3.05 Åである。同様に、Phe12アミド基はVal8およびLeu9カルボニル酸素に水素を供与し、その結合距離は3.04 Åと3.26 Åである。 α -helixのC端は、続く10-13番目の残基によって形成されるType I β -turnの一部となっている。Ala10カルボニル酸素とThr13アミド窒素との間に、 β -turnに典型的な水素結合が形成されている(結合距離3.07 Å)。

2番目の α -helixは、17-28番目の残基によって構成され、C末ドメインにある3本の α -helixとほぼ垂直に配向している。また、C末ドメインの3本の α -helixのうち、3番目

と4番目の α -helixと接している。2番目の α -helixのN端において、Ser16カルボニル酸素とGln20アミド窒素の間、及び、Ser16カルボニル酸素とSer19アミド窒素の間に主鎖によるキャッピング水素結合が形成されている(結合距離はそれぞれ3.14 Åと3.18 Å)。一方、この α -helixのC端において、最後の残基であるArg28の ϕ 及び ψ 角は典型的な α -helixにおける値からかなりずれており($\phi = -74^\circ$, $\psi = -17^\circ$)、このズレが、Ala26カルボニル酸素とAsn29アミド窒素との間の水素結合(結合距離2.95 Å)を可能にしていると考えられる。

ϕ 及び ψ 角から判断すると、続く部位(30-36番目の残基)には2つの 3_{10} -helixが含まれる。一般に、 3_{10} -helixにおいて、 i 位のカルボニル酸素はその軸から外の方に突き出しており、 $i+3$ 位のアミド窒素との間に非直線的水素結合を形成する。事実、この部分には i 位と $i+3$ 位の水素結合が多く観測される[Asn29カルボニル酸素-Ala32アミド窒素(2.94 Å), Gln30カルボニル酸素-Trp33アミド窒素(2.90 Å), Ser31カルボニル酸素-Ala34アミド窒素(3.20 Å), Trp33カルボニル酸素-Tyr36アミド窒素(2.98 Å)及びAla34カルボニル酸素-Gln37アミド窒素(3.18 Å)]。また、Trp33の ϕ 及び ψ 角は、典型的な 3_{10} -helixにおける値からかなりずれており($\phi = -107^\circ$, $\psi = 13^\circ$)、2つの 3_{10} -helixの分岐点になっていると考えられる。

続く長いループ領域には、45-48番目の残基と51-54番目の残基でそれぞれ形成される2つのType I β -turn、43-46番目の残基で形成されるType II' β -turn、55-57番目の残基で形成される γ -turnが含まれる。それぞれのturnに対応した水素結合の距離は、Asp43カルボニル酸素とThr46アミド窒素の間が3.07 Å、Cys45カルボニル酸素とAla48アミド窒素の間が3.06 Å、Asn51カルボニル酸素とGly54アミド窒素の間が3.10 Å、Phe55カルボニル酸素とPro57アミド窒素の間が2.99 Åである。Pro52はType I β -turnの $i+1$ 位に、Pro57もまた γ -turnの $i+1$ 位に存在しており、プロリン残基における主鎖コンフォメーションの制限がこれらのターン構造の構築に寄与していると考えられる。また、Leu44はType II' β -turnの $i+1$ 位に存在し、その ϕ 及び ψ 角はRamachandranプロット^{29,30}において許容されない領域にある($\phi = 57^\circ$, $\psi = -138^\circ$)。このため、この残基は、主鎖コンフォメーションの自由度が大きいグリシン残基によって置換されるのがエネルギー的に望ましいと考えられる。

3番目の α -helixは、58-73番目の残基によって構成され、4番目の α -helixと逆平行に、5番目の α -helixと平行に配向している。また、この α -helixは2番目及び4番目の α -helixと接触している。3番目の α -helixのN端において、Pro57カルボニル酸素がAla60及びCys61アミド窒素との間にキャッピング水素結合を形成し(結合距離はそれぞれ3.06 Åと3.02 Å)、 α -helix構造の安定化に寄与している。3番目の α -helixの後に、

72-75番目の残基によって形成されるType I β -turnが続いている。この β -turnに対応した水素結合も含めて、3番目の α -helixのC端においては、主鎖によるキャッピング水素結合が4つ存在する[Asn70カルボニル酸素-Ala74アミド窒素(3.19 Å), Tyr71カルボニル酸素-Ala74アミド窒素(3.23 Å), Lys72カルボニル酸素-Gly75アミド窒素(3.09 Å), Tyr71カルボニル酸素-Ser76アミド窒素(3.19 Å)]。最後に述べた、 i 位のカルボニル酸素と $i+5$ 位のアミド窒素との間を結ぶ水素結合は、蛋白質構造中であり頻繁には観測されない π -turnにおいて見られるものである。しかし、本構造中において、71-76番目の残基の主鎖二面角は典型的な π -turnにおける値と異なっている。また、この部分に存在するGly75の主鎖二面角は、Ramachandranプロット^{29,30}中で、非グリシン残基では望ましくない範囲の値をとっている($\phi = 79^\circ$, $\psi = 22^\circ$)。このため、主鎖コンフォメーションの自由度が大きいグリシン残基の存在が、この部分の特異的な構造の構築に寄与していると考えられる。

4番目の α -helixは、81-95番目の残基によって構成され、3番目及び5番目の α -helixと逆平行に配向している。また、この α -helixは、2番目、3番目及び5番目の α -helixと接触している。主鎖二面角 ϕ 及び ψ の値から判断すると、4番目の α -helixの前に一巻の 3_{10} -helix(残基番号77-79)が存在している。また、 3_{10} -helixに典型的な $i-i+3$ 型の水素結合が、Phe77カルボニル酸素とAsn80アミド窒素の間に存在している(結合距離3.03 Å)。Asn80の ϕ 及び ψ の値は、それぞれ -108° と -12° であり、典型的な α -helixもしくは 3_{10} -helixにおける値からずれている。このため、Asn80は両helixの分岐点になっていると考えられ、事実、この位置で両helixの配向がかなり曲げられている。4番目の α -helixのN端においては、二つの主鎖によるキャッピング水素結合が存在する。一つはPhe77カルボニル酸素とLys81アミド窒素の間(結合距離2.94 Å)に、もう一つはAsn80カルボニル酸素とIle84アミド窒素の間(結合距離3.22 Å)に形成されている。一方、4番目の α -helixのC端側においては、主鎖の水素結合様式に乱れが生じている。Ser95アミド基は、Asp91カルボニル酸素($i-i+4$ 型、結合距離3.45 Å)よりむしろMet92カルボニル酸素($i-i+3$ 型、結合距離2.98 Å)との間に水素結合を形成しており、この位置で α -helixの配向がかなり湾曲している。また、4番目の α -helixの後に一巻の 3_{10} -helix(残基番号96-98)が続いている。このため、4番目の α -helixのC端には、 3_{10} -helixに典型的な $i-i+3$ 型のキャッピング水素結合が主鎖原子間で4つ形成されている。これらは、一つの $i-i+4$ 型のキャッピング水素結合と協調して、 α -helix構造の安定化に寄与している[Lys93カルボニル酸素-Cys96アミド窒素(3.04 Å), Lys93カルボニル酸素-Thr97アミド窒素(3.20 Å), Arg94カルボニル酸素-Thr97アミド窒素(3.32 Å), Val95カルボニル酸素-Gly98アミド窒素(3.09 Å), Cys96カルボニル酸素-Tyr99アミド窒素(3.11 Å)]。

5番目の α -helixは102-117番目の残基によって構成され、3番目の α -helixと平行に、4番目の α -helixと逆平行に配向している。また、この α -helixは4番目の α -helixとのみ接触している。この α -helixのN端において、Asn104アミド基はThr100及びGly101カルボニル酸素と水素結合を形成しており(結合距離は、それぞれ3.42 Å及び2.95 Å)、さらに、Gly101カルボニル酸素はThr105アミド窒素とも水素結合を形成している(結合距離3.22 Å)。また、Gly101の主鎖二面角($\phi = 56^\circ$, $\psi = -145^\circ$)は、Ramachandranプロット^{29,30}中で非グリシン残基にとっては許容されない範囲の値をとっている。このため、主鎖コンフォメーションの自由度が大きいグリシン残基の存在が、5番目の α -helixのN端における3つのキャッピング水素結合の形成を可能にしていると考えられる。一方、主鎖二面角 ϕ 及び ψ の値から判断すると、5番目の α -helixの後に一巻の 3_{10} -helix(残基番号119-121)が続いている。事実、この部分には*i*-*i*+3型の水素結合が二つ観測される[Val118カルボニル酸素-Phe121アミド窒素(3.22 Å), Lys119カルボニル酸素-Gly122アミド窒素(3.10 Å)]。Val118の主鎖二面角($\phi = -100^\circ$, $\psi = -32^\circ$)は、典型的な α -helixもしくは 3_{10} -helixにおける値からずれている。このため、この残基は両helixの分岐点となっており、実際に、この位置で二つのhelixの配向がかなり曲げられている。また、5番目の α -helixのC端において、主鎖によるキャッピング水素結合が3つ形成されている[Tyr115カルボニル酸素-Val118アミド窒素(3.12 Å), Tyr115カルボニル酸素-Lys119アミド窒素(2.98 Å), Gln116カルボニル酸素-Ile120アミド窒素(3.10 Å)]。

一般的に、プロリン残基における主鎖コンフォメーションの低い自由度、並びに水素結合に関する制限、グリシン残基における主鎖コンフォメーションの高い自由度は、二次構造の開始及び終結に関与し、溶液中における分子の折り畳みに寄与すると考えられている。現モデルにおいて、Pro2は β -turnの*i*位に、Pro49は*i*+4位に、Gly54は*i*+3位にそれぞれ存在している。また、Gly75及びGly98は α -helixのC末付近に存在し、Gly101は α -helixのN末付近に存在している。また、プロリン残基のアミド基は水素結合を形成することができず、二次構造形成を阻害すると考えられるが、Pro6は、 α -helixのN端側にあり、そのアミド基が必ずしも水素結合を形成しなくてよい位置にある。これらのことから、プロリン及びグリシン残基の一般的な性質が本結晶構造中においても当てはまっており、これらの残基が溶液中における分子の折り畳みに寄与するものと考えられる。

Table 7. Torsion angles in the atomic resolution model

	ϕ	ψ	ω	χ^1	χ^2	χ^3	χ^4
Ala1		159.16	173.43				
Pro2	-61.02	153.36	-176.97	-31.10	47.26	-45.70	
Ala3	-62.13	-24.14	-178.15				
Asp4	-95.51	12.50	177.79	60.43	-5.58		
Lys5	-51.83	-47.72	-178.49	-178.26	171.55	-179.46	176.08
Pro6	-60.59	-36.33	179.24	-18.58	31.03	-30.23	
Gln7	-71.67	-37.93	176.07	-67.66	79.35	52.93	
				-71.31	89.76	-1.25	
Val8	-63.64	-45.61	-179.23	169.50			
Leu9	-60.79	-42.52	175.58	176.84	55.85		
Ala10	-59.52	-42.92	-177.32				
Ser11	-64.95	-28.15	177.80	-64.80			
Phe12	-81.30	-6.55	-169.03	-73.50	154.66		
Thr13	-129.15	31.98	171.32	61.68			
Gln14	-94.37	165.88	-177.25	-53.84	-63.34	-54.49	
Thr15	-79.39	-13.08	-173.69	63.78			
Ser16	-72.53	155.54	173.32	62.69			
Ala17	-59.44	-37.52	178.75				
Ser18	-63.49	-36.39	174.16	61.06			
Ser19	-64.83	-45.89	177.23	-179.01			
Gln20	-59.32	-44.62	-178.73	-176.10	-173.72	24.15	
Asn21	-61.88	-41.73	175.39	-70.74	-15.80		
Ala22	-59.40	-45.91	179.84				
Trp23	-65.14	-43.18	-177.84	-177.02	84.58		
Leu24	-60.94	-37.69	177.00	-76.62	168.70		
Ala25	-66.39	-38.76	177.35				
Ala26	-68.50	-36.72	177.36				
Asn27	-63.11	-34.97	175.16	-171.18	52.89		
Arg28	-74.25	-17.45	-174.58	-73.78	-167.50	-69.51	-85.64
Asn29	-130.39	45.67	-171.25	-63.83	-77.56		
Gln30	-57.23	-40.77	-178.42	-66.69	171.28	7.87	
Ser31	-58.37	-29.13	178.15	64.11			
Ala32	-66.05	-17.27	-178.21				
Trp33	-107.26	13.29	-174.79	-61.35	85.07		
Ala34	-54.48	-37.10	-177.45				
Ala35	-54.39	-30.73	-174.21				
Tyr36	-81.33	-16.57	176.23	-70.20	83.69		
Glu37	55.20	45.18	172.06	-62.33	-173.55	27.51	
Phe38	-69.98	155.00	167.56	-67.76	-56.99		
Asp39	-86.87	113.66	-179.97	-177.06	-15.74		
Trp40	-99.75	8.53	-179.20	-70.72	102.44		
Ser41	-72.78	147.82	-178.35	72.84			
Thr42	-150.09	145.19	171.47	176.18			
Asp43	-98.42	10.50	-175.68	-60.42	128.86		
Leu44	56.54	-138.42	-178.91	-54.67	174.70		
Cys45	-99.38	19.62	-176.62	-56.64			

Table 7. (continued)

Thr46	-69.93	-15.91	177.19	60.80				
Gln47	-108.80	16.27	174.12	-71.05	-170.85	-120.06		
Ala48	-96.56	172.58	177.01					
Pro49	-65.04	173.15	177.62	-27.53	42.33	-41.70		
Asp50	-59.23	150.34	177.67	-64.96	126.17			
Asn51	-129.36	70.99	-169.11	-178.54	7.73			
Pro52	-62.06	-22.80	-179.96	23.09	-32.75	30.40		
Phe53	-96.64	-5.16	175.35	-55.45	122.17			
Gly54	72.47	32.37	178.73					
Phe55	-67.24	145.55	-173.89	-63.29	-63.67			
Pro56	-83.89	84.36	-177.27	29.80	-35.09	27.21		
Phe57	-102.08	5.65	-172.37	-67.82	-22.25			
Asn58	-58.29	-43.69	-178.38	-77.65	-1.52			
Thr59	-67.53	-29.30	174.62	69.92				
				-77.12				
Ala60	-65.71	-49.36	177.57					
Cys61	-59.28	-40.68	-178.75	-66.60				
Ala62	-62.53	-38.98	-179.06					
Arg63	-73.75	-32.42	177.67	-170.87	165.20	82.96	109.55	
His64	-68.20	-41.92	172.93	-175.45	-103.60			
Asp65	-58.26	-43.25	-178.82	-78.12	167.31			
Phe66	-61.24	-45.79	178.09	-177.53	-89.62			
Gly67	-63.01	-49.52	179.24					
Tyr68	-56.82	-50.74	-171.23	-88.63	-152.56			
Arg69	-67.88	-39.98	-177.75	-67.92	170.53	-167.63	-152.73	
Asn70	-76.10	-34.47	174.75	-71.67	-74.07			
Tyr71	-73.63	-32.68	173.49	-83.01	-77.07			
Lys72	-62.56	-42.61	-176.77	-74.02	-175.22	171.21	169.22	
Ala73	-65.96	-25.03	178.59					
Ala74	-86.29	-9.39	-177.85					
Gly75	78.66	21.71	177.56					
Ser76	-139.25	44.77	178.95	64.10				
				-139.84				
Phe77	-64.24	-48.92	-168.23	177.07	69.88			
Asp78	-59.80	-38.73	-176.66	-60.25	-29.49			
				-61.01	-76.09			
Ala79	-70.82	-22.15	-174.01					
Asn80	-108.11	-12.30	-173.91	-69.06	-78.37			
Lys81	-54.74	-47.02	-173.94	-179.43	-175.78	-168.53	-66.58	
Ser82	-59.73	-43.84	177.84	77.81				
				176.18				
				-69.34				
Arg83	-62.37	-43.59	179.44	-171.47	-176.50	71.91	-105.18	
Ile84	-61.13	-43.42	175.82	-61.04	162.84			
Asp85	-62.26	-46.00	177.30	-65.36	163.41			
Ser86	-60.93	-40.87	179.40	-68.38				
				-170.82				

Table 7. (continued)

Ala87	-61.57	-38.35	175.79					
Phe88	-60.59	-46.25	177.90	174.90	45.66			
Tyr89	-59.64	-44.81	179.92	-173.03	39.72			
Glu90	-65.46	-37.36	177.39	-67.83	-62.36	133.60		
Asp91	-64.31	-40.98	178.42	-73.60	-7.50			
Met92	-68.52	-41.74	179.96	-70.67	-178.86	-72.84		
Lys93	-59.52	-36.47	177.07	-72.50	171.44	26.73	-170.28	
Arg94	-59.16	-40.19	175.53	-84.49	-175.84	-90.04	-79.19	
Val95	-59.73	-41.93	-174.45	171.43				
Cys96	-67.14	-21.58	177.49	-59.76				
Thr97	-67.95	-11.87	175.69	66.44				
Gly98	-78.35	-3.80	179.70					
Tyr99	-117.90	157.02	177.33	-51.80	-79.82			
Thr100	-124.75	166.74	173.77	58.22				
Gly101	56.30	-144.65	-175.66					
Glu102	-52.13	-40.04	-178.66	-175.87	-165.53	34.32		
Lys103	-67.31	-33.82	172.42	-71.41	-171.75	30.89	91.59	
Asn104	-58.81	-48.89	-179.91	178.92	-95.49			
Thr105	-62.27	-45.08	178.83	-54.47				
Ala106	-62.34	-40.75	177.19					
Cys107	-63.36	-46.78	179.78	-173.28				
Asn108	-63.25	-35.05	177.42	-78.26	-41.75			
Ser109	-66.99	-42.67	178.03	178.51				
				-71.66				
Thr110	-63.54	-42.92	177.94	-55.00				
Ala111	-58.41	-48.12	-179.20					
Trp112	-60.29	-44.66	179.74	174.78	-104.18			
				-170.33	77.04			
Thr113	-62.80	-39.42	176.66	-69.99				
Tyr114	-63.18	-45.18	178.33	-88.56	36.48			
Tyr115	-62.47	-45.72	-178.97	174.67	-122.26			
Gln116	-66.25	-31.46	-179.15	-72.98	-55.97	115.33		
Ala117	-71.52	-15.37	170.17					
Val118	-100.47	-31.63	176.85	-59.50				
Lys119	-63.34	-25.57	178.56	-156.34	75.67	175.17	144.05	
				-64.61	-154.36	87.08	-162.91	
Ile120	-61.59	-20.99	-179.56	-161.62	56.01			
Phe121	-85.40	-11.00	169.13	-68.16	100.97			
Gly122	149.03							

Table 8. Hydrogen bonds between main-chain atoms

Donor		Acceptor		D-A (Å)	D-H (Å)	H-A (Å)	∠DHA (deg)
Lys5	N	Pro2	O	3.07	0.86	2.24	162.8
Gln7	N	Asp4	O	2.97	0.86	2.44	120.3
Val8	N	Asp4	O	2.91	0.86	2.07	163.7
Leu9	N	Lys5	O	2.92	0.86	2.07	169.4
Ala10	N	Pro6	O	3.09	0.86	2.26	162.8
Ser11	N	Gln7	O	2.95	0.86	2.15	154.5
Ser11	N	Val8	O	3.05	0.86	2.60	113.6
Phe12	N	Val8	O	3.04	0.86	2.29	146.2
Phe12	N	Leu9	O	3.26	0.86	2.64	129.2
Thr13	N	Ala10	O	3.07	0.86	2.24	162.8
Ser19	N	Ser16	O	3.18	0.86	2.65	121.0
Gln20	N	Ser16	O	3.14	0.86	2.29	170.3
Asn21	N	Ala17	O	2.76	0.86	1.93	161.4
Ala22	N	Ser18	O	2.98	0.86	2.14	163.9
Trp23	N	Ser19	O	2.95	0.86	2.12	162.4
Leu24	N	Gln20	O	2.78	0.86	1.95	160.7
Ala25	N	Asn21	O	3.09	0.86	2.26	161.3
Ala26	N	Ala22	O	3.06	0.86	2.25	156.8
Ala26	N	Trp23	O	3.09	0.86	2.65	112.9
Asn27	N	Trp23	O	2.79	0.86	1.97	157.9
Arg28	N	Leu24	O	3.11	0.86	2.32	151.6
Asn29	N	Ala26	O	2.95	0.86	2.23	141.1
Ala32	N	Asn29	O	2.94	0.86	2.21	143.2
Trp33	N	Gln30	O	2.90	0.86	2.11	152.8
Ala34	N	Ser31	O	3.20	0.86	2.39	158.5
Tyr36	N	Trp33	O	2.98	0.86	2.18	155.9
Glu37	N	Ala34	O	3.18	0.86	2.40	151.4
Thr46	N	Asp43	O	3.07	0.86	2.23	164.1
Ala48	N	Cys45	O	3.06	0.86	2.23	161.2
Gly54	N	Asn51	O	3.10	0.86	2.30	154.8
Phe57	N	Phe55	O	2.99	0.86	2.41	125.2
Ala60	N	Phe57	O	3.06	0.86	2.52	121.5
Cys61	N	Phe57	O	3.02	0.86	2.16	170.5
Ala62	N	Asn58	O	2.91	0.86	2.12	153.6
Arg63	N	Thr59	O	3.13	0.86	2.34	153.2
His64	N	Ala60	O	3.17	0.86	2.36	156.5
Asp65	N	Cys61	O	2.96	0.86	2.11	168.9
Phe66	N	Ala62	O	3.01	0.86	2.22	154.4
Gly67	N	Arg63	O	2.99	0.86	2.16	162.7
Tyr68	N	His64	O	3.00	0.86	2.14	178.3
Arg69	N	Asp65	O	2.88	0.86	2.04	167.3
Asn70	N	Phe66	O	3.09	0.86	2.27	159.0
Tyr71	N	Gly67	O	3.04	0.86	2.20	163.5
Lys72	N	Tyr68	O	2.95	0.86	2.12	159.5

Table 8. (continued)

Ala73	N	Arg69	O	3.05	0.86	2.27	150.3
Ala74	N	Asn70	O	3.19	0.86	2.52	135.1
Ala74	N	Tyr71	O	3.23	0.86	2.60	130.6
Gly75	N	Lys72	O	3.09	0.86	2.28	156.3
Ser76	N	Tyr71	O	3.19	0.86	2.37	161.0
Asn80	N	Phe77	O	3.03	0.86	2.27	147.8
Lys81	N	Phe77	O	2.94	0.86	2.34	127.9
Ile84	N	Asn80	O	3.22	0.86	2.38	166.6
Asp85	N	Lys81	O	2.93	0.86	2.09	167.3
Ser86	N	Ser82	O	2.94	0.86	2.11	164.2
Ala87	N	Arg83	O	2.85	0.86	2.04	156.8
Phe88	N	Ile84	O	3.04	0.86	2.22	157.4
Tyr89	N	Asp85	O	3.13	0.86	2.30	162.1
Glu90	N	Ser86	O	2.92	0.86	2.08	162.5
Asp91	N	Ala87	O	2.90	0.86	2.09	155.2
Met92	N	Phe88	O	3.02	0.86	2.19	161.5
Lys93	N	Tyr89	O	2.90	0.86	2.07	162.6
Arg94	N	Glu90	O	3.05	0.86	2.25	155.2
Val95	N	Met92	O	2.99	0.86	2.47	119.3
Val95	N	Asp91	O	3.45	0.86	2.65	155.4
Cys96	N	Met92	O	3.21	0.86	2.43	152.8
Cys96	N	Lys93	O	3.04	0.86	2.54	118.2
Thr97	N	Lys93	O	3.20	0.86	2.53	135.4
Thr97	N	Arg94	O	3.32	0.86	2.61	141.7
Gly98	N	Val95	O	3.09	0.86	2.27	161.1
Tyr99	N	Cys96	O	3.11	0.86	2.28	162.8
Asn104	N	Gly101	O	2.95	0.86	2.42	120.4
Asn104	N	Thr100	O	3.42	0.86	2.59	161.5
Thr105	N	Gly101	O	3.22	0.86	2.38	165.5
Ala106	N	Glu102	O	2.85	0.86	2.01	168.7
Cys107	N	Lys103	O	2.91	0.86	2.10	158.2
Asn108	N	Asn104	O	2.94	0.86	2.10	167.2
Ser109	N	Thr105	O	2.95	0.86	2.16	153.3
Thr110	N	Ala106	O	3.00	0.86	2.17	161.3
Ala111	N	Cys107	O	2.93	0.86	2.10	164.5
Trp112	N	Asn108	O	2.91	0.86	2.08	159.9
Thr113	N	Ser109	O	2.97	0.86	2.14	163.4
Tyr114	N	Thr110	O	2.93	0.86	2.10	162.0
Tyr115	N	Ala111	O	2.97	0.86	2.14	164.8
Gln116	N	Trp112	O	2.85	0.86	2.02	163.9
Ala117	N	Thr113	O	3.12	0.86	2.34	149.7
Val118	N	Tyr115	O	3.12	0.86	2.37	145.5
Lys119	N	Tyr115	O	2.98	0.86	2.15	162.3
Ile120	N	Gln116	O	3.10	0.86	2.38	141.2
Phe121	N	Val118	O	3.22	0.86	2.40	160.3
Gly122	N	Lys119	O	3.10	0.86	2.32	150.2

V. 側鎖の関与した分子内相互作用

本構造解析においてX線実験は室温で行った。このため、得られた構造は冷却によって不自然に安定化されている訳ではない。加えて、前述したように、他のPLA₂が分子内に5-7個のジスルフィド結合を持つのにに対し、本PLA₂はわずか2つのジスルフィド結合しか持たない。しかしながら、本PLA₂は非常に堅く安定な分子構造をとっている。本PLA₂における幾つかのジスルフィド結合の欠如は、分子内の水素結合 (Table 8, Table 9)、疎水性相互作用、結晶パッキングによる分子間相互作用や溶媒分子との間の相互作用によって補なわれており、これらの非共有結合による相互作用の効果が、本PLA₂の安定な構造の形成に寄与していると思われる。主鎖原子による分子内水素結合は前項で述べたので、ここでは側鎖の関与した分子内相互作用について記述する。なお、安定な分子構造の構築に寄与すると考えられる相互作用は、一次配列上離れた残基間の相互作用(非局所的相互作用)とヘリックスの安定化に関与する相互作用であり、これらに力点をおいて述べる。また、分子間相互作用と溶媒分子との相互作用については次の項で述べる。

N末ドメインに関しては、主に、疎水性相互作用が安定な分子構造形成に関与している。N末ドメインの内部は、このドメイン中の芳香族や脂肪族側鎖によって構成されており、これらの側鎖は、C末ドメイン中のいくつかの側鎖(Phe66やTyr71など)と共に、疎水性コアを形成し堅くパッキングしている。この疎水性コアは触媒水素結合ネットワークの近くに存在し、溶媒分子がこの水素結合ネットワークに侵入するのを防いでいる。両ドメイン間の相互作用は疎水的なものだけでなく、水素結合による相互作用も存在する。例えば、ヘリックス双極子効果によって負の静電ポテンシャルを有している最初の α -helixのC端側付近において、主鎖のカルボニル酸素がC末ドメイン中の正電荷を持つ残基(Arg63, Arg83)との間に水素結合を形成しており、 α -helix構造を安定化している。これらの相互作用は非局所的相互作用の一例である。

側鎖の関与したヘリックスの安定化機構は、上記の例以外にも存在する。しかしながら、そのおおくは配列上近い残基間で形成されている。正の静電ポテンシャルを持つ最初の α -helixのN端側付近において、主鎖アミド基が負電荷を持つAsp4側鎖と相互作用しており、また、C端側において、Thr13水酸基がLeu9及びAla10のカルボニル酸素と、Ser19水酸基がSer11カルボニル酸素と、Gln14 N δ 2原子がAla10カルボニル酸素との間にキャッピング水素結合を形成している。また、2番目の α -helixのN端側においては、Ser19の主鎖アミド基がSer16水酸基とキャッピング水素結合し、C端側において、Ala25の主鎖カルボニル酸素がAsn29 N δ 2原子とキャッピング水素結合している。4番

目の α -helixのC端側では、Arg94カルボニル酸素とThr97水酸基の間と、Cys96カルボニル酸素とAsn104 N δ 2原子の間にキャッピング水素結合が形成されている。一方、5番目の α -helixのC端側付近では、配列上離れた正電荷を持つLys85アミノ基が、ヘリックス双極子効果によって負の静電ポテンシャルを持ったVal118カルボニル酸素との間に水素結合を形成している。

長いループ領域中のCys45と3番目の α -helix中のCys61との間に、他のPLA₂と立体構造学的に保存されたジスルフィド結合が存在する(前述)。このジスルフィド結合はカルシウム結合部位と触媒部位とを連結し、また、ターン構造しか持たないループ領域の安定化に寄与しているものと考えられる。このジスルフィド結合に加えて、ループ領域と3番目の α -helixの間には、側鎖が関与した水素結合が6個存在し、これらも、カルシウム結合部位と触媒部位との連結、及びループ領域の安定化に係わっているものと考えられる。さらに、ループ領域の構造は、最初の α -helix並びに5番目の α -helix中の側鎖との親水的相互作用によっても安定化されている。

他のPLA₂において、触媒残基を持つ一組の逆平行 α -helixは、立体構造学的に保存された2つのジスルフィド結合によって固定されている。しかしながら、本PLA₂の対応する逆平行 α -helix(3番目と4番目の α -helix)の間には、ジスルフィド結合がひとつも存在していない。さらに言えば、逆平行 α -helix構造はエネルギー的に不安定である⁵⁷。これらの不利益さは何らかの方法で克服されなければならない。本PLA₂中の3番目と4番目の逆平行 α -helixの間には、触媒残基(His64, Asp85)を結ぶ水素結合のほかに、Arg63グアニジノ基とAsp91カルボキシル基との間のイオン結合が存在する。また、両 α -helixはともに2番目の α -helixと接触している。ゆえに、Arg63とAsp91の間のイオン結合と2番目の α -helixの存在が、この逆平行 α -helix構造の安定化に寄与しているものと思われる。

もう一組の逆平行 α -helix(4番目と5番目の α -helix)に関しては、一方の端において、Cys96とCys107との間に形成されるジスルフィド結合が両者の間に存在する。このジスルフィド結合の周りには、これらの α -helixや長いループ領域中にある疎水性残基によって疎水性コアが形成されており、この部分の構造の安定化に寄与している。他方の端においては、Lys81アミノ基がC末カルボン酸、及びVal118カルボニル酸素との間に水素結合を形成している。これらの親水的相互作用は、触媒部位の近傍にあり、触媒部位の安定化に寄与していると思われた(前述)。しかしながら、今回の原子分解能構造解析から、また、NMR解析の結果⁵⁴から、この水素結合ネットワークはそれほど安定でないと思われる(後述)。

Table 9. Intramolecular hydrogen bonds involving side-chain atoms

Donor	Acceptor	Distance (Å)	Donor	Acceptor	Distance (Å)
(i). Backbone amide to side-chain atom					
Asp4	N Asp4	Oδ1 2.88	Ser86a	Oγ Ser82	O 3.18
Gln7	N Gln7b	Oε1 2.96	Arg94	Nη2 Thr15	O 3.03
Gln14	N Ser19	Oγ 2.95	Thr97	Oγ1 Arg94	O 2.81
Ser19	N Ser16	Oγ 3.23	Asn104	Nδ2 Cys96	O 3.00
Asp39	N Asn70	Oδ1 2.89	Asn104	Nδ2 Tyr99	O 3.31
Ser41	N Asp39	Oδ1 2.86	Ser109b	Oγ Thr105	O 3.08
Asp43	N Asp65	Oδ1 2.97	Thr110	Oγ1 Ala106	O 3.06
Leu44	N Thr42	Oγ1 2.95	Thr113	Oγ1 Ser109	O 3.16
Phe55	N Asn51	Oδ1 3.05	Tyr114	Oη Pro49	O 2.76
Asp78	N Asp78b	Oδ2 3.09	(iii). Side-chain atom to side-chain atom		
(ii). Side-chain atom to backbone carbonyl					
Lys5	Nζ Tyr36	O 2.76	Ser16	Oγ Ser18	Oγ 3.14
Ser11	Oγ Gln7	O 2.99	Gln30	Nε2 Asn27	Oδ1 2.96
Thr13	Oγ1 Leu9	O 2.89	Tyr36	Oη Asp4	Oδ1 2.60
Thr13	Oγ1 Ala10	O 3.28	Ser41	Oγ Asp39	Oδ1 2.64
Gln14	Nε2 Ala10	O 2.88	Thr42	Oγ1 Asp65	Oδ1 2.63
Ser19	Oγ Ser11	O 2.68	Arg63	Nε Asp91	Oδ2 2.87
Asn29	Nδ2 Ala25	O 2.92	Arg63	Nη1 Ser19	Oγ 3.14
Thr46	Oγ1 Asp43	O 2.78	Arg63	Nη2 Asp91	Oδ1 2.92
Asn51	Nδ2 Phe55	O 2.88	His64	Nε2 Asp85	Oδ2 2.76
Arg63	Nη1 Gln14	O 2.96	Tyr68	Oη Asp85	Oδ2 2.57
Arg63	Nη1 Phe12	O 2.89	Arg69	Nη1 Ser41	Oγ 2.86
Arg63	Nη2 Gln14	O 2.98	Arg69	Nη2 Asp43	Oδ1 2.79
Asn70	Nδ2 Asp39	O 2.94	Lys81	Nζ Asp85	Oδ1 2.77
Asn70	Nδ2 Phe66	O 2.88	Arg83	Nη1 Asn80	Oδ1 2.84
Asn80	Nδ2 Ser76	O 2.82	Arg83	Nη2 Thr13	Oγ1 2.97
Lys81	Nζ Val118	O 2.93	Arg83	Nη2 Tyr71	Oη 3.13
Lys81	Nζ Gly122	OT1 2.74	Arg83	Nη2 Asn80	Oδ1 3.35
Arg83	Nε Thr13	O 2.87	Lys93	Nζ Gln20	Oε1 2.78
			Arg94	Nε Glu90	Oε1 2.76
			Arg94	Nη2 Asp91	Oδ1 2.89

VI. 分子間相互作用

本解析に用いた結晶の密度は非常に高く ($V_M = 1.85 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$)、かつ、その溶媒含量はかなり低い(33.4%)。ただし、Matthews¹⁹⁾によれば、これらの値は蛋白質結晶において決して例外的な値ではない。本結晶の低い溶媒含量のため、結晶パッキングによる分子間相互作用が、分子構造の安定化にかなりの部分寄与していると考えられる。本結晶中において、ひとつの分子の周りには、6つの並進操作によって関連づけられた対称分子と、6つの二回螺旋軸で関連づけられた対称分子が存在する(Table 10)。大部分の分子表面は親水性であり、溶媒領域に接している。しかしながら、20個の直接的な分子間水素結合(Table 11)を含む対称分子との間の分子間相互作用が少なからず存在している。

Table 11に示すように、長いループ領域は8つの付加的な分子間水素結合により安定化されていると考えられる。また、ヘリックス双極子効果によって正の静電ポテンシャルを持つGlu102のアミド基(5番目のα-helixのN端に存在)は、ヘリックス双極子効果によって逆に負の静電ポテンシャルを持つ対称分子中のAsn27のカルボニル酸素(2番目のα-helixのC端に存在)と分子間水素結合を形成しており、分子間相互作用はヘリックスの安定化にも寄与していると考えられる。一方、Glu102カルボン酸(5番目のα-helixのN端に存在)は、結晶パッキングによって、対称分子中のSer31アミド基及び水酸基と相互作用している。しかしながら、おそらく溶液中においては、このGlu102カルボン酸は、自己分子中の配列的に近接する残基のアミド基と相互作用し、分子間でなく分子内で、ヘリックス双極子効果による正の静電ポテンシャルを中和するものと思われる。

また、本結晶構造中には、上記の親水性分子間相互作用に加えて、疎水的な分子間相互作用も観測される。その一例がC末部分のIle120及びPhe121の側鎖である。これらの側鎖は、対称分子中のVal8, Phe12, Ala22及びTrp33の疎水性側鎖と疎水性相互作用している。よって、C末部分の構造学的安定性は人工的なものである可能性がある。

Table 10. Neighbor molecules

Name	Symmetry operation	Residues near the symmetry related molecule (distance < 5 Å)	Area buried (Å ²)
\$1	[-x+1, y+1/2, -z+1]	105, 109, 112	130
\$2	[-x+1, y-1/2, -z+1]	37, 38, 39, 41, 72, 73, 74, 75	130
\$3	[-x+1, y+1/2, -z+2]	100, 101, 102, 103	190
\$4	[-x+1, y-1/2, -z+2]	27, 28, 29, 30, 31, 32, 40, 42, 44	190
\$5	[-x, y+1/2, -z+1]	15, 16, 17, 90, 93, 94, 97	190
\$6	[-x, y-1/2, -z+1]	1, 2, 31, 34, 35, 37	190
\$7	[x-1, y, z]	8, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 25, 28, 29, 32, 33	460
\$8	[x+1, y, z]	46, 47, 48, 49, 50, 113, 116, 117, 120, 121	460
\$9	[x-1, y, z-1]	3, 4, 7, 10, 14, 71, 76, 79, 80, 83	290
\$10	[x+1, y, z+1]	44, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58	290
\$11	[x, y, z+1]	28, 54, 56, 59, 99	130
\$12	[x, y, z-1]	74, 75, 76, 78, 121, 122	130

Surface areas were calculated with X-PLOR²³, using a probe radius 1.6 Å. The surface area buried by each lattice contact are calculated as one half of the difference between the total surface areas of two non-contacting molecules, and of two molecules related by the specified symmetry.

Table 11. List of intermolecular hydrogen bonds

Donor	Acceptor	Distance (Å)
Gln7b Ne2	Asn58_\$9 Oδ1	3.34
Ser11 Oy	Ile120_\$7 O	3.02
Gln14 Ne2	Pro52_\$9 O	2.95
Arg28 Nη2	Ala48_\$7 O	3.36
Asn29 Nδ2	Thr46_\$7 O	3.23
Ser31 N	Glu102_\$4 Oε1	2.82
Ser31 Oy1	Glu102_\$4 Oε2	2.77
Asn58 Nδ2	Ala3_\$10 O	3.16
Ser76b Oy	Asp50_\$9 Oδ2	2.85
Glu102 N	Asn27_\$3 O	3.25

VII. 水分子の配置

水分子の構築はプログラムSHELXL-97⁵⁵の半自動的な方法を用いて行った。各精密化サイクルの後、SHELXL-97によって差フーリエ合成が自動的に行われ、高い電子密度をもち(0.25 eÅ⁻³以上)、かつ、モデル中の極性原子と水素結合可能な位置(極性原子との距離が、2.4-3.3 Å以内)にあるピークが出力される。出力されたピークのうち、F_o-F_cマップにおいて3σ以上の強度を持ち、かつ、球状のものを新たな水分子位置として選択し、含有率1の水分子として精密化した。精密化後、ステレオグラフィックスを用いて水分子のチェックを行った。水分子をモデルに残すための条件としては、2F_o-F_cマップにおいて0.5σ以上の強度を持つこと、並びに水素結合可能な極性原子との距離が2.4-3.4 Å以内に保持されていることを用いた。電子密度中で明らかなピークを持つにもかかわらず、等価的温度因子が60 Å²以上になった水分子については、その含有率を0.5にして次の精密化サイクルに含めた。2.45 Å以内に近接する二つの水分子については、それぞれを一分子の水に由来する多重コンフォメーションのひとつであると仮定し、ディスオーダー構造として精密化した。同様に、近接する位置に明らかな残余のピークを持つ水分子、もしくは、大きな異方性を持つ水分子に対してもディスオーダー構造を加えた。また、SHELXL-97において、含有率の和が1.1を超える一組の原子対については、不良接触しないように制約が課される。このため、多重コンフォメーションをとっている側鎖や水分子の近くに新たに水分子をモデリングする際には、不良接触の制約が課されないようにその含有率を低く設定した。精密化の当初、25個以上もの水分子を加える必要があったが、精密化が進むにつれ加えるべき水分子の数は減少した。最終的には、付加すべき水分子位置が全く存在しなくなるまで精密化を行った。

1.4 Å分解能モデルは127個の水分子を含んでいる。これに比べ、現在の1.05 Å分解能モデルでは202個の水分子位置が存在する。このうち、63個の水分子位置は前モデル中の位置とほぼ同一であり、また、残りの139個のうち60個の水分子位置は前モデル中における位置から1.0 Å以内にある。

本PLA₂は非常に堅く折り畳まれた構造をとっているにもかかわらず、幾つかの水分子は蛋白質内部に存在している。これらの水分子の大半は等価的温度因子が15 Å²以下であり、その形状はほぼ等方的である。しかしながら、触媒残基His64の周囲にある水分子は蛋白質内部に存在するにもかかわらず、温度因子が比較的大きく、かなり揺らいでいると考えられる。His64 Nδ1原子と水素結合し、触媒反応の際に基質を求核攻撃すると考えられるWat260もこの部位に存在する不安定な水分子の一つである。また、不安定な水分子が多いHis64周辺に、カルシウムイオンや基質が結合すると考えられ、実

際にこれらが蛋白質と結合すれば、この部位にある水分子の多くは排除されると思われる。同様に、触媒残基のAsp85カルボン酸とLys119アミノ基との間のイオン結合を仲介しているWat263も温度因子が比較的大きく、かなり揺らいでいる。

分子表面にある極性残基のほとんどは水分子との間に水素結合を形成している。モデル中の水分子は、分子表面上や分子間にある溝において、蛋白質原子や他の水分子との間に水素結合ネットワークを形成している。以下にその詳細を述べる。

本モデル中の202個の水分子位置のうち、166個の位置は蛋白質内部もしくは蛋白質周囲の最初の水和層中に存在している。このうち84個の水分子位置は、2個以上の蛋白質原子との間で水素結合を形成することが可能である。特に、2個もしくは3個以上の主鎖原子と水素結合している水分子は非常に安定で蛋白質と強固に結合している。水分子が関与した水素結合のうち、96個は主鎖カルボニル酸素との間に、34個は主鎖アミド窒素との間に形成されている。蛋白質の近くに存在する水分子は蛋白質構造の一部であると考えられ、側鎖コンフォメーションの決定や二次構造の終結に関与していると思われる。これらに加えて、36個の水分子位置が第二の水和層中に存在している。ここにある水分子は直接蛋白質原子と水素結合せず、最初の水和層にある水分子を仲介して蛋白質と相互作用している。また、これらの水分子はより不安定で、大きな温度因子もしくは部分的な含有率を有している。他の蛋白質モデルと同様に、蛋白質からの距離が遠くなるほど、水分子の構造がより不安定になっていると言える。

水分子の関与した水素結合ネットワークは、一つの蛋白質分子と対称操作によって関連づけられた隣の分子との間にも形成されている。蛋白質中の原子と水素結合している水分子のうち、31個もの水分子が隣接した蛋白質中の原子とも水素結合を形成している。このため、水分子は結晶パッキングの安定化にも寄与していると考えられる。

VIII. ディスオーダー構造

多重コンフォメーションは、温度因子の異方的処理の後においても、明らかな差ピークを持つ側鎖及び水分子に対して導入した。最終モデルにおいて、9残基の側鎖に対して多重コンフォメーションが導入されている。このうち、Ser82以外の残基の側鎖は2つのコンフォメーションを持ち、Ser82の側鎖は3つのコンフォメーションを持つ。これら9残基のうち4残基に対しては、C β 原子にも多重コンフォメーションを導入している。厳密に言えば、これらの残基の主鎖に対しても多重コンフォメーションを導入すべきかもしれないと思われる(Table 12)。また、これらのディスオーダー構造をとっている側鎖はすべて溶媒領域に接している(Fig. 14)。

最も興味深い結果は、Lys119の側鎖がディスオーダー構造をとっていることである。現モデル中のLys119aアミノ基は、触媒残基であるAsp85カルボン酸と一分子の水を介したイオン結合を形成している。一方、Lys119bアミノ基はそのようなイオン結合を形成できない。第一章の結果から、Lys119の側鎖は安定な構造を持ち、一分子の水を介したイオン結合を形成することで触媒部位を安定化するものと考えられた。しかしながら、今回の原子分解能構造解析から、Lys119のコンフォメーションは不安定であり、Lys119が関与した触媒部位周囲の水素結合ネットワークはそれほど安定でないことが判明した。

生化学的な側面から離れて、ディスオーダー構造の研究は蛋白質結晶学的に興味深い。本解析は一つの温度で測定したデータを用いて行っている。このため、9残基におけるディスオーダーが動的なものか静的なものかを単純には区別できない。ちなみに、ここでいう動的ディスオーダーとは、それぞれのコンフォメーション間で交換可能なものを指し、静的ディスオーダーとは、結晶成長の過程で固定されたコンフォメーションが複数存在している場合を指す。しかしながら、本構造を注意深く観察することによって、ある残基に関しては、動的ディスオーダーと静的ディスオーダーとを区別することができた。また、本構造中には、関連したディスオーダー⁵⁸⁾についての例が含まれている。以下には、上記の2点に留意してディスオーダー構造についての考察を述べる。

Gln7aのO ϵ 1原子とWat286bは不良接触しており、両者は同時には存在できない(Fig. 15a)。このため、Gln7のディスオーダーはWat286のディスオーダーと関連していると考えられる。言い換えると、Gln7がaサイトを占めるとき、Wat286もaサイトに存在し、Gln7がbサイトに移動すると、空いた空間にWat286が入り込みbサイトを占めると考えられる。

同様に、Thr59のディスオーダーも周囲の水分子のディスオーダーと関連していると考えられる。Thr59の周りには、不安定な水分子や部分的な含有率を持つ水分子が数多く存在している。このうち、Thr59aとWat358、及びWat358とWat213bは共存できない(Fig. 15b)。このため、Thr59がaサイトを占めるとき、Wat213はbサイトに存在し、逆に、Thr59がbサイトに移動すると、Wat213はaサイトを占める。このとき、空いた空間にWat358が入り込むのではないかと予測される。また、Thr59の側鎖に近接して、Arg28や対称分子中のAsp50、Ser76及びAsp78の側鎖が存在する。このうち、Arg28とAsp50は大きな温度因子を持ち、Ser76とAsp78は多重コンフォメーションをとっている。これらの側鎖は隣接する3分子によってできる溝へ突き出しており(Fig. 15c)、また、この溝は多くの不安定な水分子によって占められている。よって、原子モデルを提案することはできないが、これらの側鎖のディスオーダーもしくは不安定さは、水分子の仲

介によって関連付けられているのかもしれない。

Trp112の各コンフォメーションにおけるインドール環は近接する対称分子と接触している。また、周囲に十分な空間がないので、Trp112がそれぞれのコンフォメーションを交換することは不可能であると思われる。ゆえに、Trp112のディスオーダーは静的ディスオーダーの一例であると考えられる。一方、配列上近接したSer109側鎖は溶媒領域に接しており、不安定な水分子や部分的な含有率を持つ水分子と相互作用している。このため、Ser109のディスオーダーは動的なものであると考えられる。これらのことから、配列上近くにあるTrp112とSer109のディスオーダーは互いに相関はしていないといえる。

蛋白質内部の水分子であるWat263とWat217の周りには、多重コンフォメーションを持つSer82, Ser86及びLys119の側鎖が存在している(Fig. 15d)。このうち、Lys119aのアミノ基はWat263及びWat217と、Ser82cの水酸基はWat263と、Ser82bの水酸基はWat217と、Ser86aの水酸基はWat217と水素結合可能な位置に存在している。このため、これらの残基のディスオーダーは互いに相関し、構造水を維持するように働くのではないかと予測される。完全な原子モデルを提案することはできないが、以下に一つの予測例を示す。Lys119がbサイトを占め、Wat263及びWat217と水素結合できないとき、Ser82がcサイトを占めその水酸基がWat263へのプロトン供与体として働く。このとき、可能性として、Ser82がbサイトを占めその水酸基がWat217へのプロトン供与体として働くとも予測される。しかし、Wat217の周りには、Ser82bの水酸基以外にプロトン供与体となりえるSer86aの水酸基やTyr115の水酸基が存在しているのに対し、Wat263の周りには、Ser82cの水酸基以外にプロトン供与体となりえる原子が存在していない。このため、上記の予測の方が正しいと思われる。また同様に、Ser86がbサイトを占め、Wat217と水素結合できない場合には、Ser82がbサイトを占めその水酸基がWat217へのプロトン供与体として働く。このとき、可能性として、Lys119aのアミノ基がWat217へのプロトン供与体として働くとも予測されるが、精密化した含有率の値(Table 12)から判断して上記の予測が支持される。

Yamano and Teeter⁵⁸⁾は、結晶構造中に相関したディスオーダー構造が存在していることを最初に示した。また、彼らは、相関したディスオーダー構造は蛋白質特異的でなく普遍的に存在するが、多くの場合、低分解能のためそのメカニズムを明らかにできず、その存在に気付くことができなかつたのであろうと述べている。今回、原子分解能構造解析によって、本蛋白質の結晶構造中にも相関したディスオーダー構造が存在することを見出すことができた。よって、彼らの意見は正しいと考えられる。

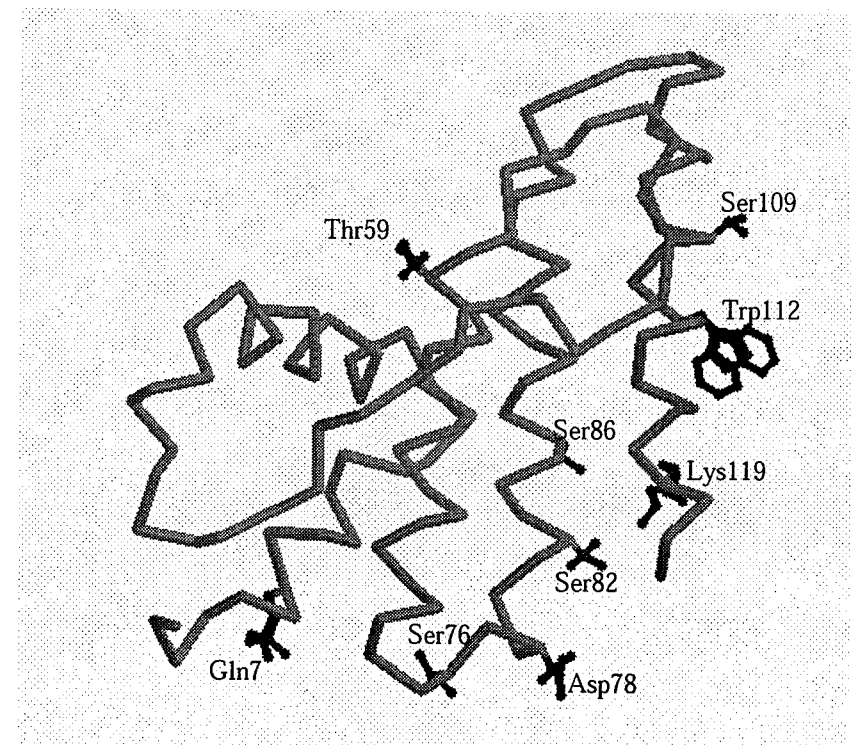


Fig. 14. Distribution of the disordered residues. All side-chains of disordered residues are facing the solvent region.

Table 12. List of the disordered residues

	Atoms	Occupancies
Gln7	C γ C δ O ϵ 1 N ϵ 2	0.57 0.43
Thr59	C β O γ 1 C γ 2	0.55 0.45
Ser76	C β O γ	0.68 0.32
Asp78	C γ O δ 1 O δ 2	0.60 0.40
Ser82	O γ	0.45 0.29 0.26
Ser86	O γ	0.75 0.25
Ser109	O γ	0.57 0.43
Trp112	C γ C δ 2 C ϵ 2 C ϵ 3 C δ 1 N ϵ 1 C ζ 2 C ζ 3 C η 2	0.53 0.47
Lys119	C β C γ C δ C ϵ N ζ	0.68 0.32

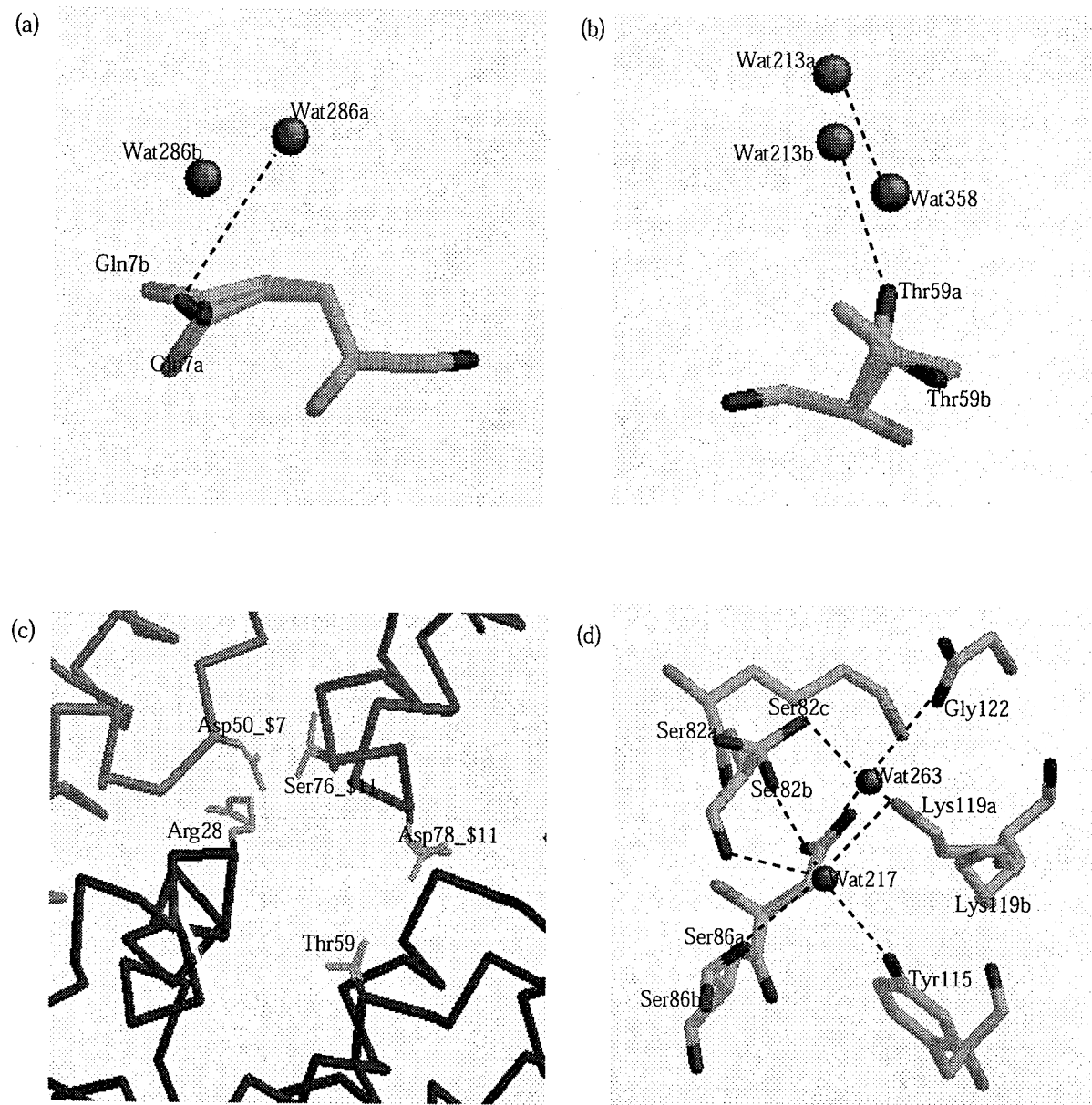


Fig. 15. Details of disorder. (a), disordered structure of Gln7; (b), disordered structure of Thr59; (c), distribution of the flexible residues, including disordered Thr59, Ser76 and Asp78, facing the crevice among three molecules; (d), disordered structures of Ser82, Ser86 and Lys119.

IX. 熱振動の定量的・定性的解析

今回の原子分解能構造解析においては、電子密度をうまく説明できるようにモデリングを行った。すなわち、電子密度図から原子の振動範囲が極めて大きいと示唆されたものに関しては、ディスオーダー構造を導入している。この項には、分離した電子密度を持つディスオーダー構造ではなく、電子密度内の振動について定量的及び定性的に解析した結果を述べる。

異方的温度因子を用いた本モデル中の主鎖の構造は、等方的温度因子を用いた中間体モデル中のものとはほぼ同一である。異方的温度因子の導入は、主鎖の原子位置にほとんど影響を与えなかった。事実、両者の主鎖を最小自乗法で重ね合せた場合、原子位置の差は0.1 Å以内である。その一方、側鎖の原子位置はよりシフトしている。この傾向は、特に、分子表面にある残基に関して顕著である。

原子振動の大きさを比較するため、異方的温度因子行列の3つの固有値の平均値(等価的温度因子, B_{eqv})を計算した。概して、最終モデルにおける B_{eqv} 値は、中間体モデルの等方的温度因子(B_{iso})に比べて大きくなっている。最終モデルにおいて、含有率が1の全蛋白質原子の B_{eqv} 値の平均値は11.09 Å²であり、主鎖に限れば9.08 Å²となっている。これに対し、中間体モデルにおける B_{iso} 値の平均値は、それぞれ、9.21 Å²と8.26 Å²である。両者の差は、大きな異方性をもっている原子において特に顕著である。また、これらの原子は、最終モデル中と中間体モデル中との原子位置の変位が大きい原子とよく対応している。このことは、異方的温度因子の導入によって、これまで等方的であると仮定したバイアスが除去され、より正確な原子位置並びに熱振動の情報が得られたことを示す。個々の残基ごとにプロットした B_{eqv} 値の平均値をFig. 16aに、分子の重心からの距離の二乗(r^2)に対して主鎖(N, Cα and C)の B_{eqv} 値をプロットした図をFig. 16bに示す。 B_{eqv} 値と r^2 との間の正の相関(相関係数0.56)は、熱振動が分子表面において大きく、コア部分では小さいことを示している。また、Fig. 17にCα原子の熱楕円体(70% possibility)をORTEP表現⁵⁹⁾で示す。この図から、分子の中心にある原子は等方的に振動しているのに対し、分子表面ではより異方的になっているのが分かる。またさらに、本蛋白質分子中の個々の原子の熱振動において、分子全体の剛体として振動がかなりの部分寄与しているのではないかと示唆される。

個々の原子の異方性の大きさを定量的に表現するため、異方性を以下の式で見積もった。

$$f_{anis} = \sigma(\lambda_i) / \langle \lambda_i \rangle$$

ここで、 λ_1, λ_2 及び λ_3 は異方的温度因子行列の固有値であり、 $\langle \lambda_i \rangle$ 及び $\sigma(\lambda_i)$ は λ_i の平均値

と標準偏差値を表す。この方法では熱振動の大きさを無視して異方性のみを表現することができる。個々の残基ごとにプロットした f_{anis} 値の平均値をFig. 18aに示す。この図から、異方性が小さい部位は、2番目、3番目及び4番目の α -helixに対応する残基であることがわかる。また、 r^2 に対して、主鎖(N, C α and C)の f_{anis} 値をプロットした図をFig. 18bに示す。 f_{anis} 値と r^2 との間の正の相関(相関係数0.53)は、分子の中心にある原子は等方的に振動しているのに対し、分子表面ではより異方的になっていることを示す。

個々の原子の熱振動の、分子の重心方向への成分は以下の式で見積もった。

$$f_{\text{rad}} = [(\mathbf{e}_0 \cdot \mathbf{V}_1)^2 + (\mathbf{e}_0 \cdot \mathbf{V}_2)^2 + (\mathbf{e}_0 \cdot \mathbf{V}_3)^2]^{1/2} / [(V_1^2 + V_2^2 + V_3^2)/3]^{1/2}$$

ここで、 \mathbf{V}_1 , \mathbf{V}_2 及び \mathbf{V}_3 は熱楕円体の主軸を表すベクトルであり、 \mathbf{e}_0 は重心から個々の原子を結ぶ単位ベクトルである。もし、熱振動が等方的であれば、 f_{rad} 値は1となる。分子の重心からの距離(r)に対して、主鎖(N, C α and C)の f_{rad} 値をプロットした図をFig. 19に示す。 f_{rad} 値と r との間の負の相関(相関係数-0.44)は、分子の中心にある原子は等方的に振動しているのに対し、分子表面ではより異方的に振動し、かつ、接線方向の熱振動成分が大きいことを示している。

Fig. 20aに 3_{10} -helixを含むC末部分のORTEP図⁵⁹⁾を示す。この図から、主鎖原子の熱振動は比較的小さくかつ等方的であるのに対し、側鎖原子の熱振動は大きくかつ異方的であることがわかる。また同様に、熱振動は共有結合に対して垂直な方向に大きいこともわかる。これらの一般的な性質は、他の部位についても同様に当てはまる。

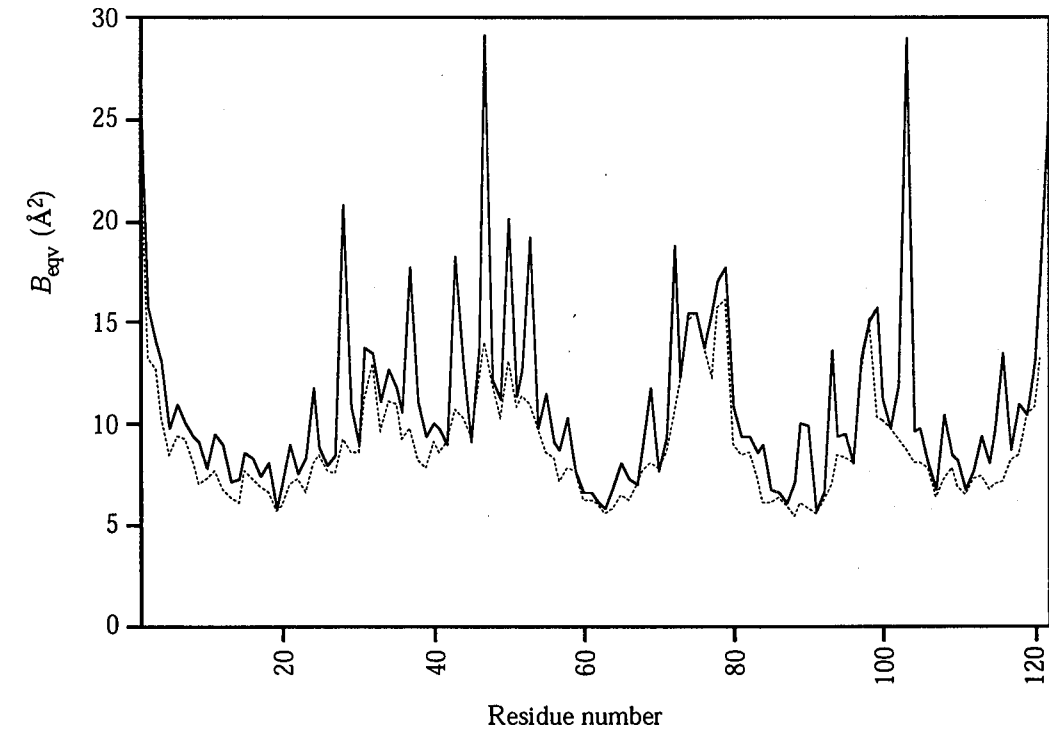


Fig. 16a. Plot of mean B_{eqv} values against the residue number: solid line, all atoms; broken line, main-chain atoms. Partially occupied atoms were omitted.

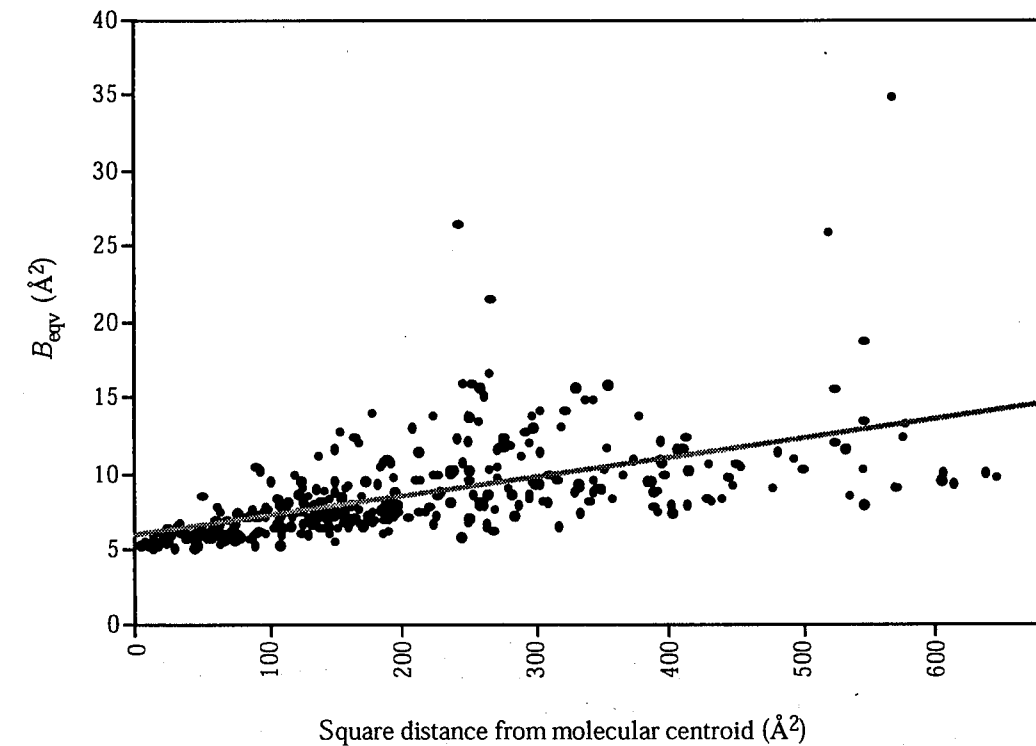


Fig. 16b. Plot of B_{eqv} values of main-chain atoms (N, C α and C) against the square distance from molecular centroid.

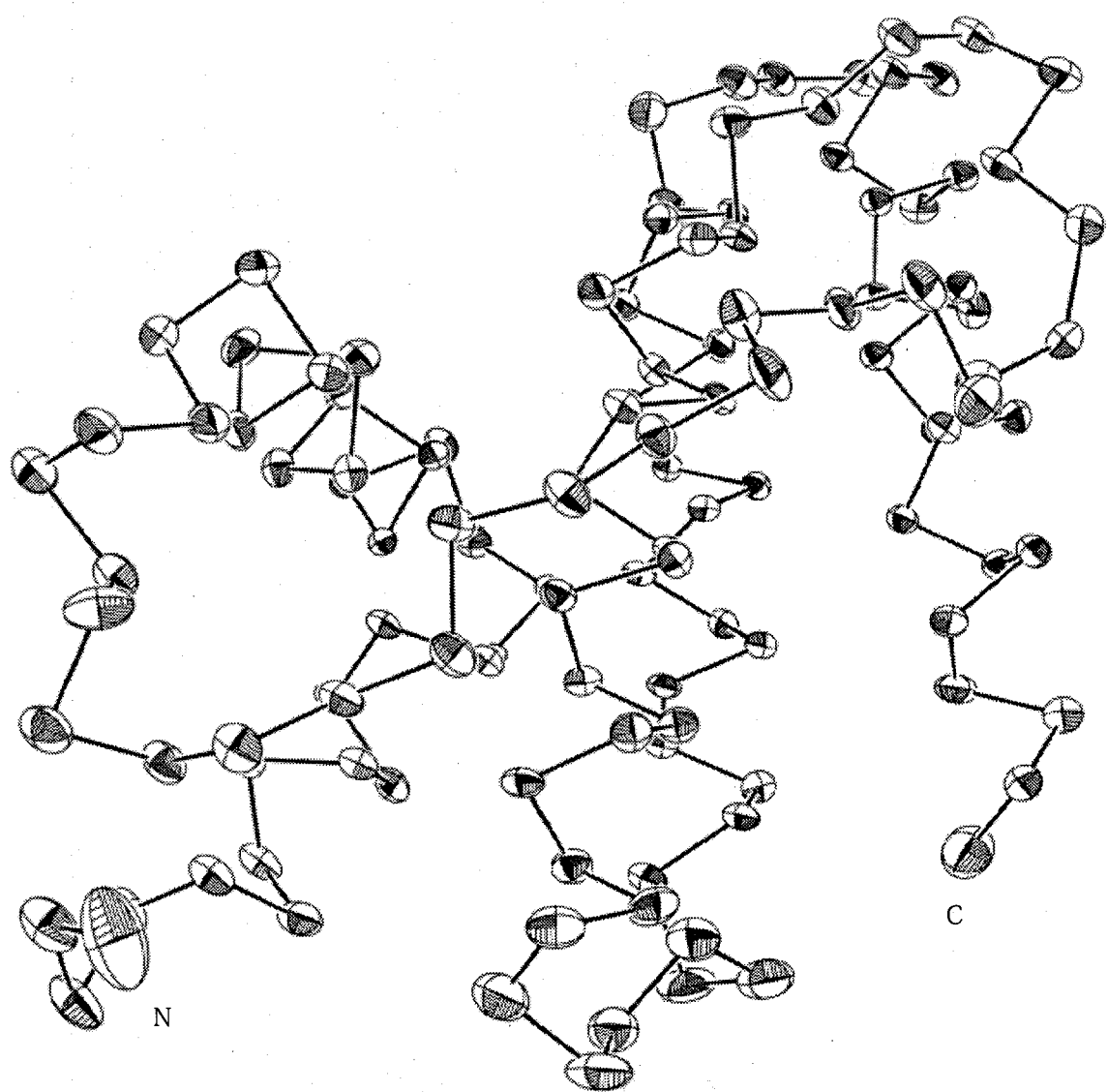


Fig. 17. Anisotropic thermal motion of the $C\alpha$ atoms produced by the program ORTEP-III⁵⁹. This model was refined at atomic resolution and contains anisotropic temperature factors. Thermal ellipsoids are drawn with 70% possibility.

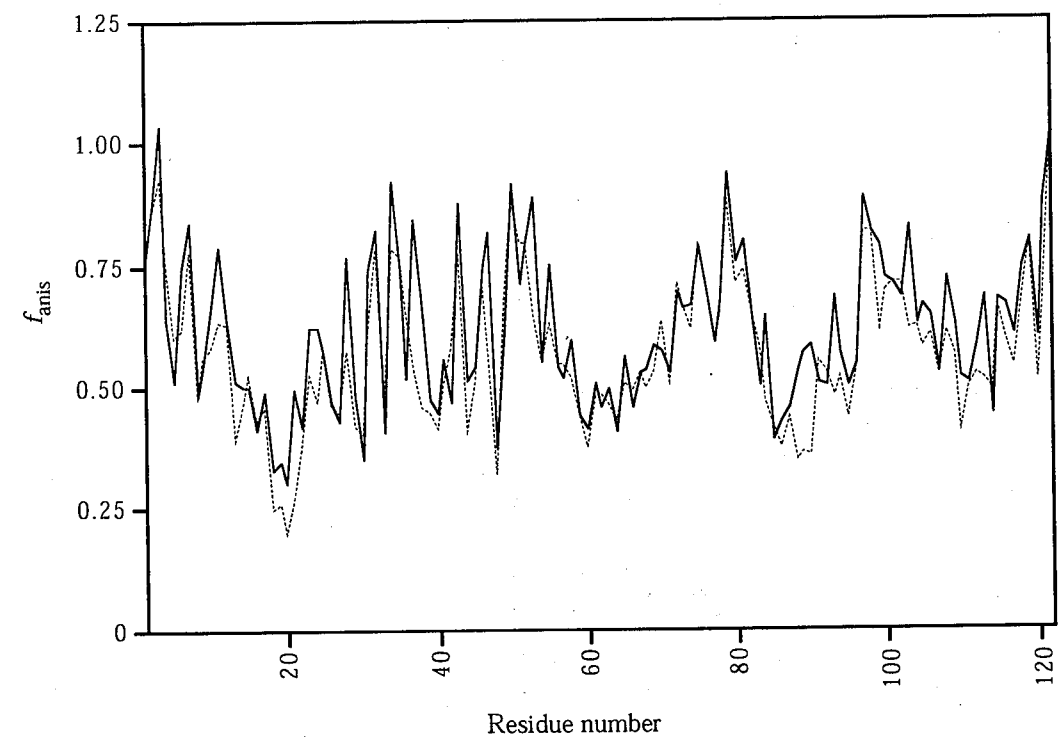


Fig. 18a. Plot of mean anisotropy factor (f_{anis}) against the residue number: solid line, all atoms; broken line, main-chain atoms. Partially occupied atoms were omitted.

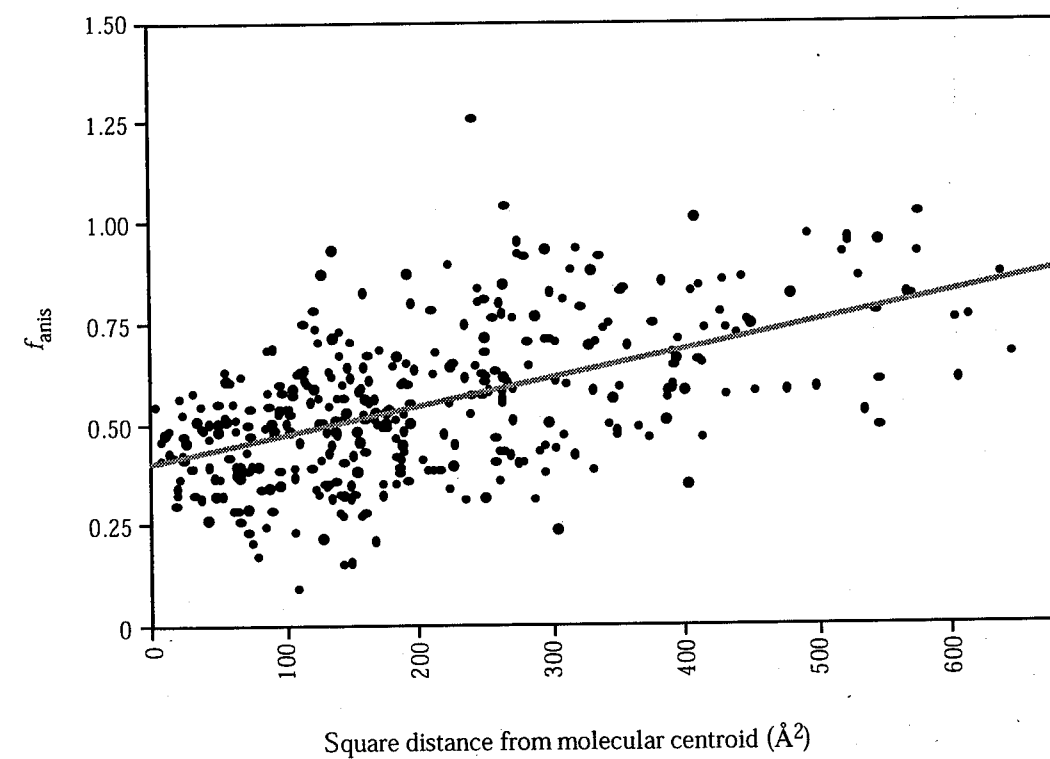


Fig. 18b. Plot of anisotropy factor (f_{anis}) of main-chain atoms (N, $C\alpha$ and C) against the square distance from molecular centroid.

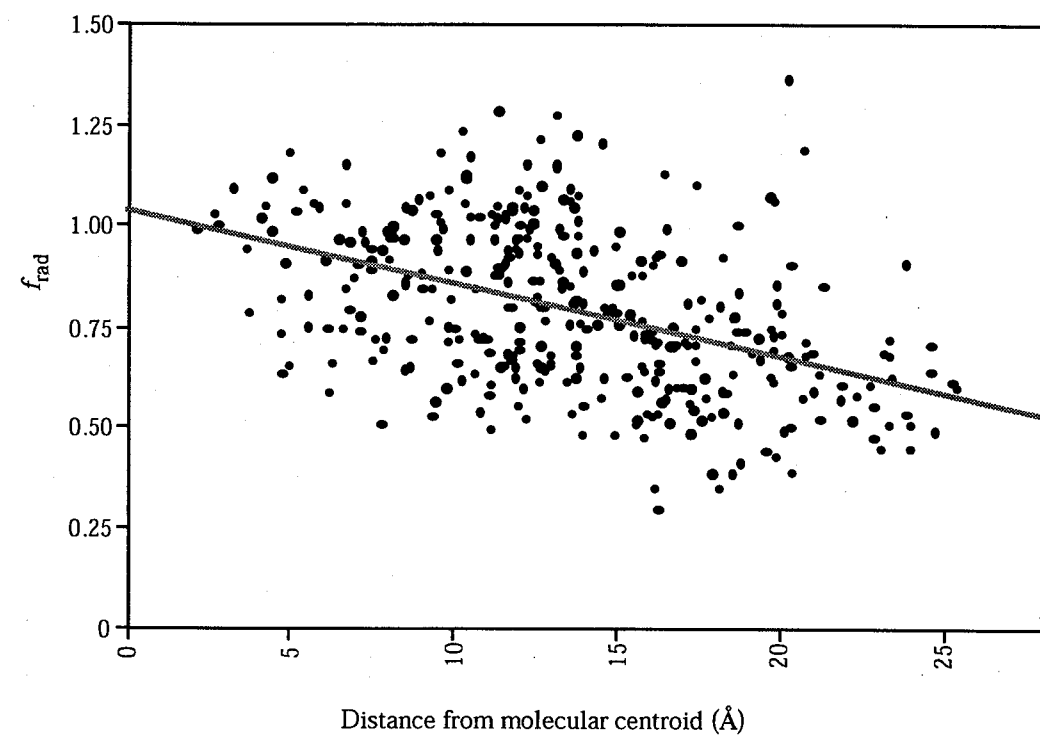


Fig. 19. Plot of the ratio of radial components (f_{rad}) of main-chain atoms (N, C α and C) against the distance from molecular centroid.

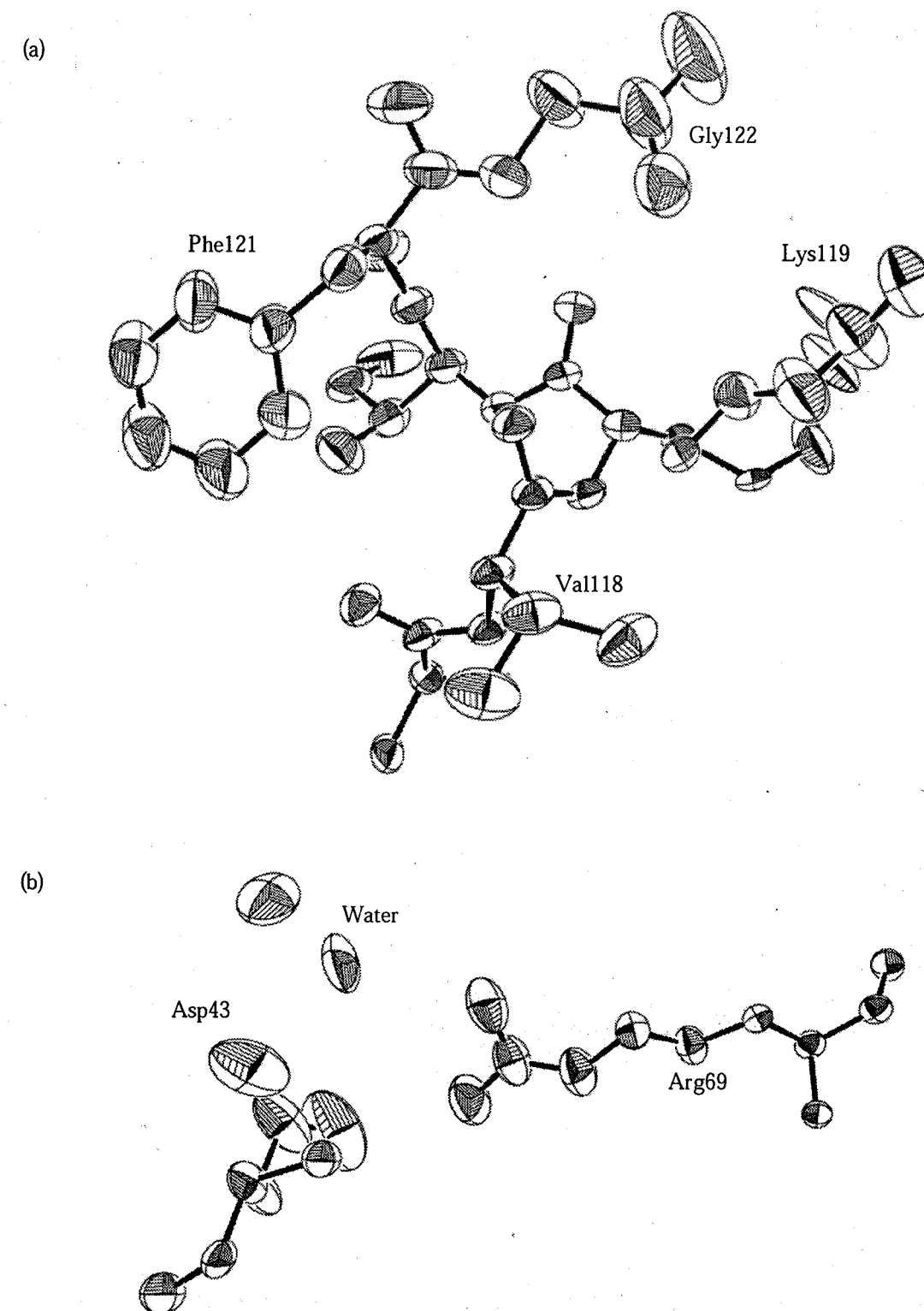


Fig. 20. Anisotropic thermal motion of two portions in the model. (a), portion of C-terminal region. The side-chain of Lys 119 is disordered and has two alternate conformations; (b), portion of Asp43 and Arg69. In both figures, thermal ellipsoids are drawn by the program ORTEP-III⁵⁹ with 20% possibility.

X. 分子全体の振動と局所的振動

熱振動は大きく二つに分けられる。ひとつは分子の構造を変型させえる局所的振動(内部振動)であり、もうひとつは分子全体の剛体的な振動(外部振動)である。このうち、後者の振動は結晶中の特殊事情であり興味はない。ところが、電子密度図を説明するように求められる温度因子は両者の振動を含んでいる。このため、分子全体の振動と局所的振動を分離し、局所的振動のみを取り出すことは通常困難である。しかしながら、現モデルは熱振動に関しても多くの情報を含んでおり、これらの情報を処理することによって、局所的振動に関する知見を得ようと試みた。

分子全体の剛体的な振動を解析するために、Schomaker and Trueblood⁶⁰⁾のTLSモデル法を適用した。TLSモデルでは、分子が剛体として振動しているとき、直交した異方的温度因子行列の各成分(u_i)が、並進(T)、回転(L)及び螺旋回転(S)を表す行列成分の線形関数として表現される。

$$u_i = G_{ijk}L_{kj} + H_{ijk}S_{kj} + T_j$$

この式の、 G_{ijk} 及び H_{ijk} は文献に与えられている。本解析において、T、L及びSの各行列成分は、主鎖原子(N, C α and C)のみを対象とし、TLSモデルから計算した u_i 値とその実測値との重みつき差二乗和が最小化するように求めた。この際、ブロック行列最小自乗法で得られたesd値の逆数を重み(w)として用いた。また、行列Sの対角項は0に固定し、回転の中心は行列Sが対称化するように決定した。なお、全ての解析は自作のC言語で記述したプログラムを用いて行っている。

TLSモデルによる解析結果をTable 13に示す。観測された u_i 値とTLSモデルから計算した u_i 値(u_i^{cal})の一致度を表すR値は以下の式で評価した。

$$R = \frac{\sum_{atom} \sum_j w_j (u_j - u_j^{cal})^2}{\sum_{atom} \sum_j w_j u_j^2}$$

得られた比較的低いR値(28.4%)は、本蛋白質中の個々の原子の熱振動において、分子全体の剛体的振動がかなりの部分寄与していることと示す。これはFig. 17のORTEP図⁵⁹⁾から得られた視覚的なイメージとも一致している。回転の中心(-1.13, 2.98, 1.10)は、分子の重心からの距離として与えられている。並進及び回転の大きさを評価するため、行列T及びLの固有値を求めた。並進の大きさは、それぞれの固有ベクトルの方向に0.27 Å, 0.30 Å, 0.24 Åとほぼ等方的であるのに対し、回転の大きさは、固有ベクトルを中心として、0.55°, 1.18°, 0.82°と求められ、より異方的であることが判明した。この結果は、本蛋白質の構造が球状からかなりずれていることに起因すると思われる。観測された異方的温度因子から求めた等価的温度因子(B_{eqv}^{obs})と、TLSモデルによって計算した異方的温度因子から求めた等価的温度因子(B_{eqv}^{cal})を、残基ごとにプロットした図を

Fig. 21に示す。 B_{eqv}^{obs} 値と B_{eqv}^{cal} 値との間の相同性は、個々の原子の熱振動において、分子全体の剛体的振動がかなり寄与していることを改めて示している。しかしながら、本蛋白質の両末端、ループ領域にある43-52番目の残基、3番目と4番目の α -helixの連結部位である74-79番目の残基において、 B_{eqv}^{obs} 値と B_{eqv}^{cal} 値との間にかなりの差が生じている。このことは、これらの部位が大きな局所的振動を持つことを意味していると考えられる。

C末残基(Fig. 20a)は、4番目の α -helixと近い位置にあり、かつ、触媒残基から伸長した水素結合ネットワークの一員であるにもかかわらず、大きな局所的振動をもつ。このことは、NMRで得られた解析結果⁵⁴⁾と一致し、触媒水素結合ネットワークがそれほど安定でないことを示唆していると考えられる。また、前章で述べたように、Leu44とAsp43はカルシウムイオンとの結合に係わっていると予測される。このため、これらの残基を含む43-52番目の残基において局所的振動が大きい理由は、本構造中にカルシウムイオンが欠如しているためであると考えられる。Fig. 20bには、Asp43とArg69のORTEP図⁵⁹⁾を示す。Asp43カルボン酸は、現モデル中において、Arg69グアニジノ基との間で、1つの直接的なイオン結合と1つの水分子を介したイオン結合を形成している。しかしながら、この図から、Asp43側鎖は異方的振動が大きくそれほど安定でないことが示され、Asp43がカルシウムイオンとの結合に係わっているという予測の妥当性が示唆される。一方、74-79番目の残基は、他のPLA₂において、ミセル状基質の存在下で安定化する部位(界面認識部位のひとつではないかといわれている)¹⁴⁾と立体的に対応した位置にある。ゆえに、本PLA₂における74-79番目の残基の大きな局所的振動は、本構造中にミセル状の基質が存在していないことに由来すると思われる。

Table 13. Summary of TLS analysis

Rotation center (Å)				
-1.13	2.98	1.10		
Matrix T x10 ³ (Å ²)			eigen value	eigen vector
80.22 (1.54)	8.51 (1.16)	-1.18 (1.15)	72.07	(0.7256, -0.6839, 0.0757)
8.51 (1.16)	80.79 (1.47)	-2.86 (1.18)	89.29	(0.6881, 0.7200, -0.0904)
-1.18 (1.15)	-2.86 (1.18)	57.56 (1.37)	57.21	(0.0073, 0.1177, 0.9930)
Matrix L x10 ⁵ (rad ²)			eigen value	eigen vector
24.34 (1.01)	11.64 (0.79)	11.29 (0.75)	9.16	(0.7206, -0.3715, -0.5854)
11.64 (0.79)	26.63 (1.15)	3.25 (0.88)	42.21	(0.6692, 0.5934, 0.4472)
11.29 (0.75)	3.25 (0.88)	21.00 (1.24)	20.60	(0.1813, -0.7140, 0.6763)
Matrix S x10 ⁴ (Å · rad)				
0.00 (-)	-2.07 (0.64)	1.85 (0.70)		
-2.06 (0.74)	0.00 (-)	4.15 (0.72)		
1.84 (0.87)	4.16 (0.68)	0.00 (-)		

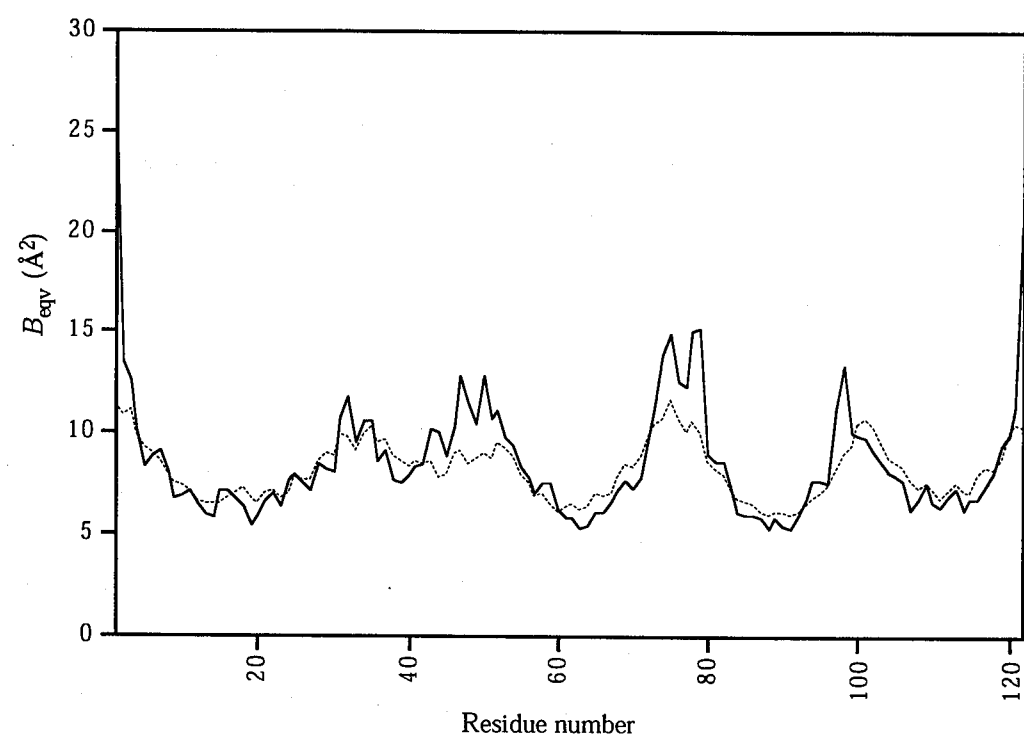


Fig. 21. Plot of mean B_{eqv} values of main-chain atoms (N, C α and C) against the residue number: solid line, observed; broken line, calculated from TLS analysis.

XI. 触媒部位及び周囲の水素結合ネットワーク

前章で述べたように、*S. violaceoruber* PLA₂の触媒残基はHis64とAsp85である。His64のN δ 1原子に水素結合しているWat260が、基質のカルボニル炭素を求核的に攻撃し、His64のN ϵ 2原子に水素結合しているAsp85が、触媒反応の際にHis64上に生じた正の電荷を中和する役割を持つと考えられる(Fig. 22)。

本結晶中におけるHis64の荷電状態(プロトン化状態)を調査するため、このモデルからHis64中のH δ 1及びH ϵ 2原子を削除したオミットマップを作成した。なお、オミットマップ作成の前に、over-refinementによるバイアスを避けるため、H δ 1及びH ϵ 2原子を削除した状態で5回のCGLS計算を行った。この結果、Fig. 23に示すように、His64のN δ 1及びN ϵ 2原子の近くに明らかな差ピークが観測された。よって、結晶化条件(およそpH 6)において、本蛋白質の触媒残基のHis64はプロトン化され、正の電荷を持つことが示された。このため、本モデルは、水分子(Wat260)から水素を引き抜くことができないという点において不活性型であると言える。しかしながら、本PLA₂はpH 6においてもある程度の活性を有している。この矛盾した結果は以下の様に解釈できる。前述のように、His64の周囲には、不安定で動きやすい水分子が数多く存在する。これらの水分子のため、本モデル中のHis64のpKa値は溶液中のヒスチジンにおけるpKa値(およそ7)に近いと予測される。また、これらの水分子の位置には、カルシウムイオンや基質が結合すると考えられる。実際にこれらが蛋白質に結合すれば、この位置の水分子の多くが排除されることになり、His64周辺の環境がより疎水的に変わり、続いて、His64のpKa値が下がることでHis64のプロトン化状態が変化すると思われる。これらのことから判断すると、本PLA₂がpH 6で活性を持つことは決して不思議なことではない。

前章において、触媒残基の周囲に水素結合ネットワークが形成されており、また、この水素結合ネットワークが触媒部位を安定化するのに役立っていると示唆された。この原子分解能モデルにおいては、Asp85カルボン酸がTyr68水酸基とLys85アミノ基に直接連結し、Lys119aアミノ基と一分子の水(Wat263)を介したイオン結合を形成している。Lys85アミノ基は、さらに、C末カルボン酸及びVal118のカルボニル酸素と連結している。また、Wat263を介したイオン結合は、Lys119aアミノ基とC末カルボン酸との間にも形成されている(Fig. 22)。しかしながら、ネットワークの一員であるLys119の側鎖はディスオーダー構造をとっておりそれほど安定でない。また、熱振動の解析結果から、C末残基やLys119を含むC末部位は大きな局所的振動を持っていることが判明した。これらの結果から、触媒残基の周囲にある水素結合ネットワークは、前章で考えられていたよりも安定ではないと言える。

ところで、Bergら¹³⁻¹⁵⁾は、ブタ腭液由来PLA₂の溶液構造をNMRの手法を用いて解析し、以下の知見を得た。ブタ腭液由来PLA₂の結晶構造においては、N末アミノ基が触媒残基Asp99と一分子の水を介したイオン結合を形成して、触媒部位を安定化するのに役立っていると考えられていた。しかしながら、同様な状態のブタ腭液由来PLA₂のNMR構造は、結晶構造とは異なり、N末アミノ基を含むN末部位が非常にフレキシブルになっている¹³⁾。一方、界面活性剤及び競合的阻害剤を共存させたブタ腭液由来PLA₂の溶液構造では、結晶構造と同じく、N末部位が非常に安定化しており、N末アミノ基とAsp99との間に一分子の水を介したイオン結合が形成していると考えられた¹⁴⁾。同様に、結晶構造において、触媒水素結合ネットワークの一員であると考えられていた分子表面にあるTyr69を含むループ領域(界面認識部位のひとつと考えられる)が、溶液中では不安定である¹³⁾にもかかわらず、界面活性剤及び競合的阻害剤を共存させると安定化していた¹⁴⁾。これらの知見をもとに、彼らは、ミセル状基質の存在がブタ腭液由来PLA₂の構造変化を引き起こし、触媒残基及び界面認識部位を安定化させる水素結合ネットワークが完全に形成されると結論づけた¹⁵⁾。また、このことは、PLA₂のミセル状基質に対する活性が単分子分散状の基質に対する活性よりもかなり高くなるという極めて重要な現象、すなわち、界面活性化現象⁵³⁾を説明し得るものであると考えられる。

前述したように、*S. violaceoruber* PLA₂の原子分解能構造解析から、水素結合ネットワークに参与しているLys119及びC末残基を含むC末部位がそれほど安定でないことが判明した。一方、Ohtani and Sugiyama⁵⁴⁾によって求められたNMR構造において、C末部位は非常にフレキシブルで、触媒水素結合ネットワークを形成し得ないことが判明している。ゆえに、原子分解能構造解析から得られた結果は、NMR解析のそれとよく対応していると言える。また、*S. violaceoruber* PLA₂において、溶液構造と結晶構造が異なり、かつ、溶液中で不安定な部分が触媒水素結合ネットワークに参与しているという知見は、ブタ腭液由来PLA₂において観測された知見¹³⁻¹⁵⁾と極めて一致している。このため、本PLA₂においても、触媒水素結合ネットワークは必ずしも安定には存在しないが、界面活性化された状態に類似した一つのconformerの選択的結晶化によって、一見安定に見える水素結合ネットワークが結晶構造中にのみ観測されたと予想される。また同時に、*S. violaceoruber* PLA₂においても、界面活性化はミセル状基質の存在によって引き起こされ、その結果、構造が変化することで、触媒水素結合ネットワークの形成が完全になされるものと思われる。ゆえに、界面活性剤と競合的阻害剤を共存させて、その溶液構造を解析すれば、現在の結晶構造に似た構造が得られるであろうと予測される。

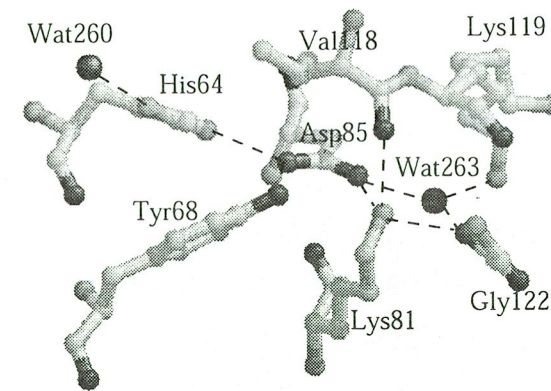


Fig. 22. Structure of the catalytic site and surrounding hydrogen bond network in the atomic resolution model.

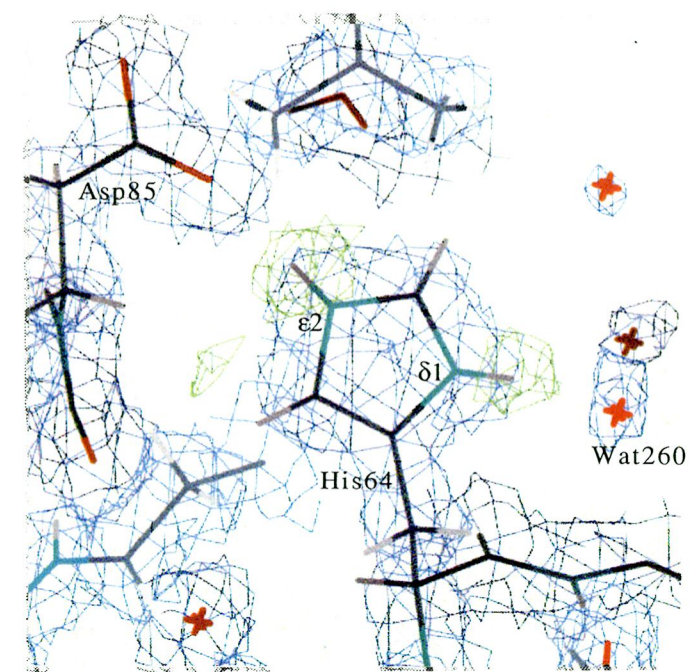


Fig. 23. Electron density maps around the catalytic residue His64: blue, $2F_o - F_c$ map; green $F_o - F_c$ map obtained after removal of His64 H δ 1 and H ϵ 2 atoms.

第三章 カルシウム結合型(ホロ型)酵素の構造

【緒言】

分泌型PLA₂は、その活性発現にカルシウムイオンを必要とする。カルシウムイオンは基質のリン酸基を認識し、基質のカルボニル炭素を分極化させ、さらに、反応中間体における負の電荷を中和し安定化することによって活性発現に関与する⁹⁻¹¹⁾。これまでに、様々な生物種由来の分泌型PLA₂の結晶構造が報告され、かつ、カルシウムイオンの結合様式が明らかとなっている。これらの報告によると、カルシウムイオンの結合様式は種を超えて保存されており、また、その配位子は、完全に保存されたアスパラギン酸残基のカルボン酸と、カルシウム結合ループに存在する3つのカルボニル酸素及び2つの水分子であることが判明している⁹⁻¹¹⁾。また、競合的阻害剤と複合体を形成したPLA₂の構造解析から、遷移状態において、カルシウムイオンに配位した水分子は、基質のリン酸基の酸素とエステル結合が解裂する直前に生じるのオキシアニオンとに置換されると予測されている⁹⁻¹¹⁾。

前章までに、カルシウム非結合型(アポ型)の*S. violaceoruber* PLA₂の結晶構造解析の結果を述べた。アポ型酵素の構造には、他の分泌型PLA₂において保存されているカルシウムイオンの結合ジオメトリーが存在しなかった。このため、本PLA₂は新しいタイプのカルシウム結合ジオメトリーを有しているものと考えられた。

本章では、カルシウム結合型(ホロ型)酵素の結晶構造について述べる。この解析は新規のカルシウム結合ジオメトリーを明らかにするのみならず、カルシウムイオンを含む本PLA₂の触媒メカニズムをより深く理解するのに役立つと思われる。

【実験結果】

I. 結晶化

結晶化に先立ち、本酵素の凍結乾燥品を、完全な活性発現のために十分量の20 mM Ca-chlorideを含む10 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0)に対して透析し、その後、蛋白質濃度が20 mg/mlとなるように限外ろ過にて濃縮した。

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法¹⁷⁾によって行った。蛋白質溶液5 µlと各種沈殿剤溶液5 µlをシリコン処理したガラス板上で混合し、沈殿剤溶液1 mlを入れたリザーバーの上にプレート逆さにかぶせ密封した。これを25 °Cの恒温装置中に放置して結晶化を行った。最初の結晶は、沈殿剤として50-60% (v/v) 2-メチル-2,4-ペンタンジオール、緩衝剤として0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)含む溶液を沈殿剤溶液として用いたときに得られた。しかしながら、ここで得られた結晶は双晶を成していた。回折実験に適した単結晶を得るために、破碎した微小結晶を種にしてseeding法を行った。その結果、回折実験に適した結晶(0.1 x 0.5 x 2.0 mm)を得ることができた(Fig. 24)。

本結晶は単斜晶系に属し、格子定数は $a = 38.3 \text{ \AA}$, $b = 54.3 \text{ \AA}$, $c = 30.6 \text{ \AA}$, $\beta = 90.2^\circ$ と求められた。また、消滅則から、空間群は $P2_1$ と同定された。本結晶の非対称単位に酵素が1分子存在していると仮定すると、 V_M 値¹⁹⁾は $2.35 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ 、溶媒含量は47.7%となり蛋白質結晶として妥当な値を与える。よって、単位胞内の分子数(Z)は2であると決定した。

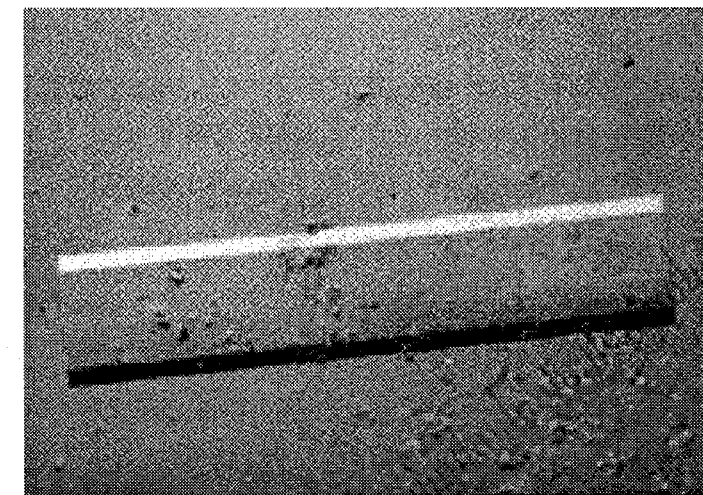


Fig. 24. Crystal of holo-type *S. violaceoruber* PLA₂. Typical crystal grew up to the size of 0.1 x 0.5 x 2.0 mm.

II. 回折強度測定

X線実験は京都大学化学研究所にて行った。X線源としては、管電流100 mA、管電圧40 kVで稼働させたX線発生器RU-300から得られたCuK α 線($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$)を、ミラー及び0.3 mm ϕ のコリメーターで集光させたものを用いた。また、回折強度の検出は、R-Axis IIcシステムにより行った。

本実験では、一つの結晶のみを用いて回折強度を測定した。結晶はそのa*軸が回転軸とほぼ平行になるように立てた。1.6 \AA 分解能までの回折強度データの測定は、結晶からIPまでの距離を60 mm、一枚のIPについての露光時間を12分、一枚のIPにつき ϕ 軸回りの結晶の回転角度を2.5 $^\circ$ に設定して行った。プログラムProcess¹⁸⁾を用いて、計57枚の回折写真を処理した結果、全体で30,440反射を観測でき、スケーリングの結果12,820個の独立反射を得ることができた。このデータの完全性は73.2%、 R_{merge} は6.50%であった。また、高分解能側の、1.7-1.6 \AA 分解能において、データの完全性は48.0%、 R_{merge} は28.3%、 I/σ の平均値は2.41であった。

III. 構造解析及び精密化

構造解析はプログラムX-PLOR²³⁾の分子置換法によって行った。また、第一章で述べた1.4 \AA 分解能のアポ型酵素の結晶構造をスタートモデルとして用いた。10-4.0 \AA 分解能の反射を用い交差回転関数を計算したところ、平均値より8.4 σ 高いピーク($\theta_1 = 183.3^\circ$, $\theta_2 = 72.5^\circ$, $\theta_3 = 30.8^\circ$)を得ることができた。並進関数はxz平面上でサーチした。その結果、平均値より7.7 σ 高いピーク($x=0.214$, $z=0.425$)を得ることができた。

初期段階の精密化はプログラムX-PLOR²³⁾を用いた。分子置換法によって得られたモデルは、10-4.0 \AA 分解能の反射を用いて、20サイクルの剛体近似精密化をすると $R=35.0\%$ となった。個々の原子の精密化は、X-PLORによるシミュレーテッドアニーリング法²⁴⁾とCGLS法²⁵⁾の組み合わせによって行った。最初は、10-3.0 \AA 分解能の反射のみを用いて精密化を行い、徐々に上限の値を1.6 \AA へと上げていった。それぞれの精密化サイクルは、個々の原子の位置及び等方的温度因子の精密化、 $2F_o-F_c$ マップや F_o-F_c マップを用いたモデルの見直し、残余のピークに対する溶媒分子の導入を含む。なお、モデルビルディングはプログラムXtalView²²⁾のXfitを用いて行った。また、ランダムに選んだ全体の10%の反射は、精密化の進行状況をモニターするため、テストセットとして精密化に用いなかった。数回のX-PLORによる精密化の結果、分解能が10-1.6 \AA の範囲でかつ $F > 2\sigma$ の反射に対して R 値は20.1%、テストセットに対する R 値(R_{free})²⁶⁾は26.5%となっ

た。X-PLORで収束した後、さらに、5-1.6 \AA 分解能の全ての反射を用いプログラムSHELXL-97⁵⁵⁾で精密化した。最終的に、12,244反射に対する R 値は15.0%となった。このモデルは、958個の蛋白質原子と1個のカルシウムイオン及び88個の水分子を含む。

【考察】

I. モデルの信頼性及び電子密度図の質

最終的な $2F_o-F_c$ マップは、全体に渡って、非常に良質なものとなった(Fig. 25)。多くの芳香族環やプロリン残基の五員環には穴が空いているように見える。また、Luzzatiプロット²⁷⁾によって、モデル中の原子位置の誤差はおよそ0.16 \AA であると算出された(not shown)。理論値²⁸⁾からの差rms値は、結合長において0.008 \AA 、結合角において1.9 $^\circ$ 、improper角において1.13 $^\circ$ であった。また、平均の温度因子は、958個の蛋白質原子において30.1 \AA^2 、主鎖のみに限れば28.0 \AA^2 であり、88個の水分子においては45.7 \AA^2 となっている。本モデルには全ての蛋白質原子が含まれている。しかしながら、C末部分(120-12番目の残基)の主鎖及び側鎖、Gln7, Arg28, Asn29, Gln47, Phe53, Glu102, Lys103, Trp112及びLys119の側鎖部分は薄い電子密度しか持たず、かなり不安定であると考えられる。また、Ramachandranプロット^{29,30)}の結果から、アポ型酵素と同じく、Leu44以外の非グリシン残基の主鎖の二面角(ϕ , ψ)はエネルギー的に安定な値をとっていることがわかった(Fig. 26)。

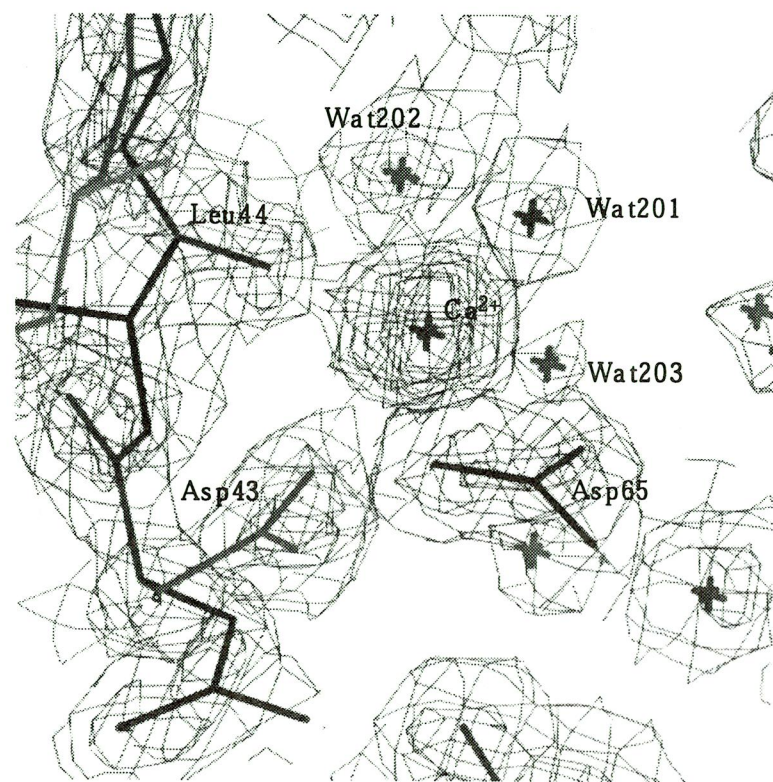


Fig. 25. $2F_o - F_c$ map around the calcium ion. This map was contoured in steps of 1.5σ starting at 1σ .

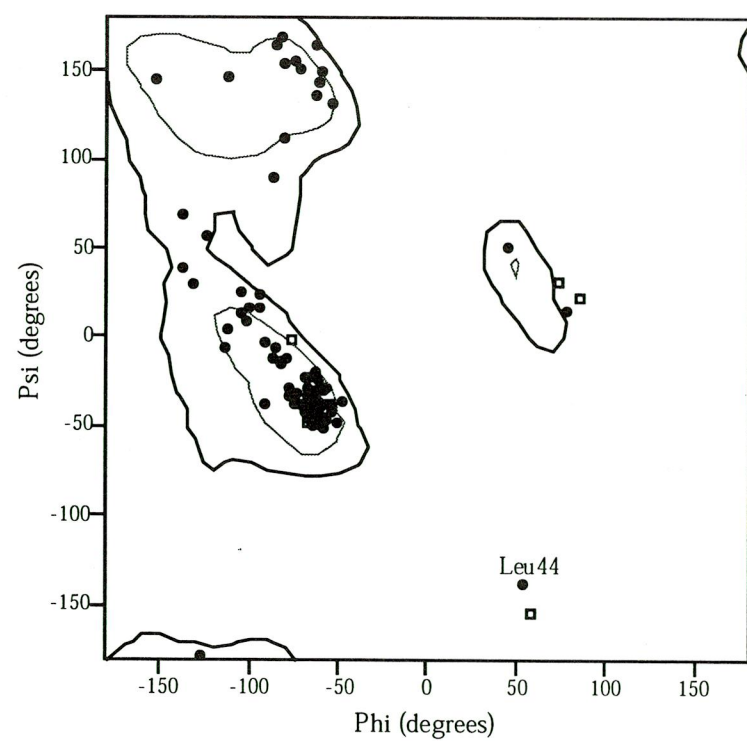


Fig. 26. Ramachandran plot of the main-chain conformational angles ϕ and ψ . Open squares indicate ϕ - ψ values of Gly residues. Apart from Gly residues, only one residue, Leu44 falls outside the low energy regions.

II. 全体構造

本実験で得られたホロ型酵素の構造は、アポ型酵素の構造と非常に類似していた。両者の重ね書きをFig. 27に示す。両者の原子位置の差rms値は、全蛋白質原子に関して 1.10 \AA 、主鎖のみに限れば 0.93 \AA であった。最も異なる部位は45-48番目の残基(Fig. 27b)とC末部分(Fig. 27c)である。前者の変化はカルシウムイオンの結合によるものと考えられ、後者はこの部位の柔軟性を反映していると思われる(後述)。

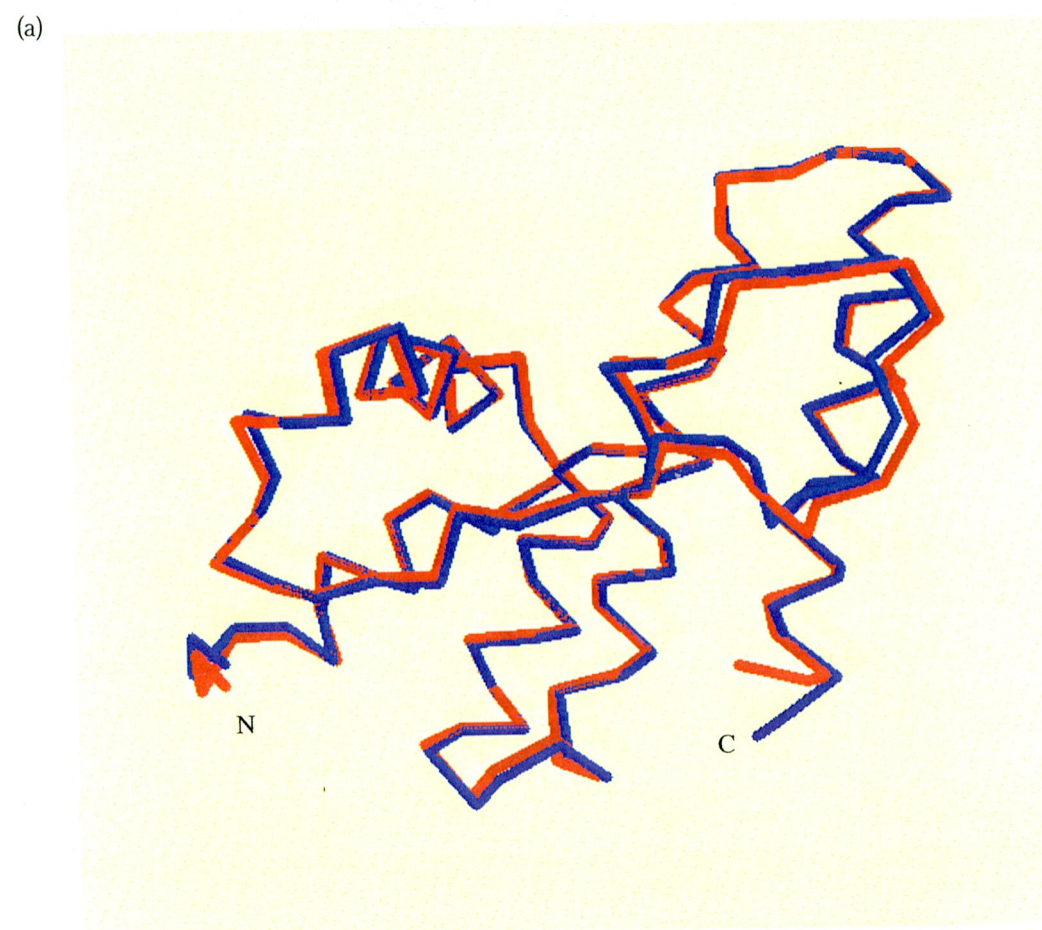


Fig. 27a. (See legend on next page)

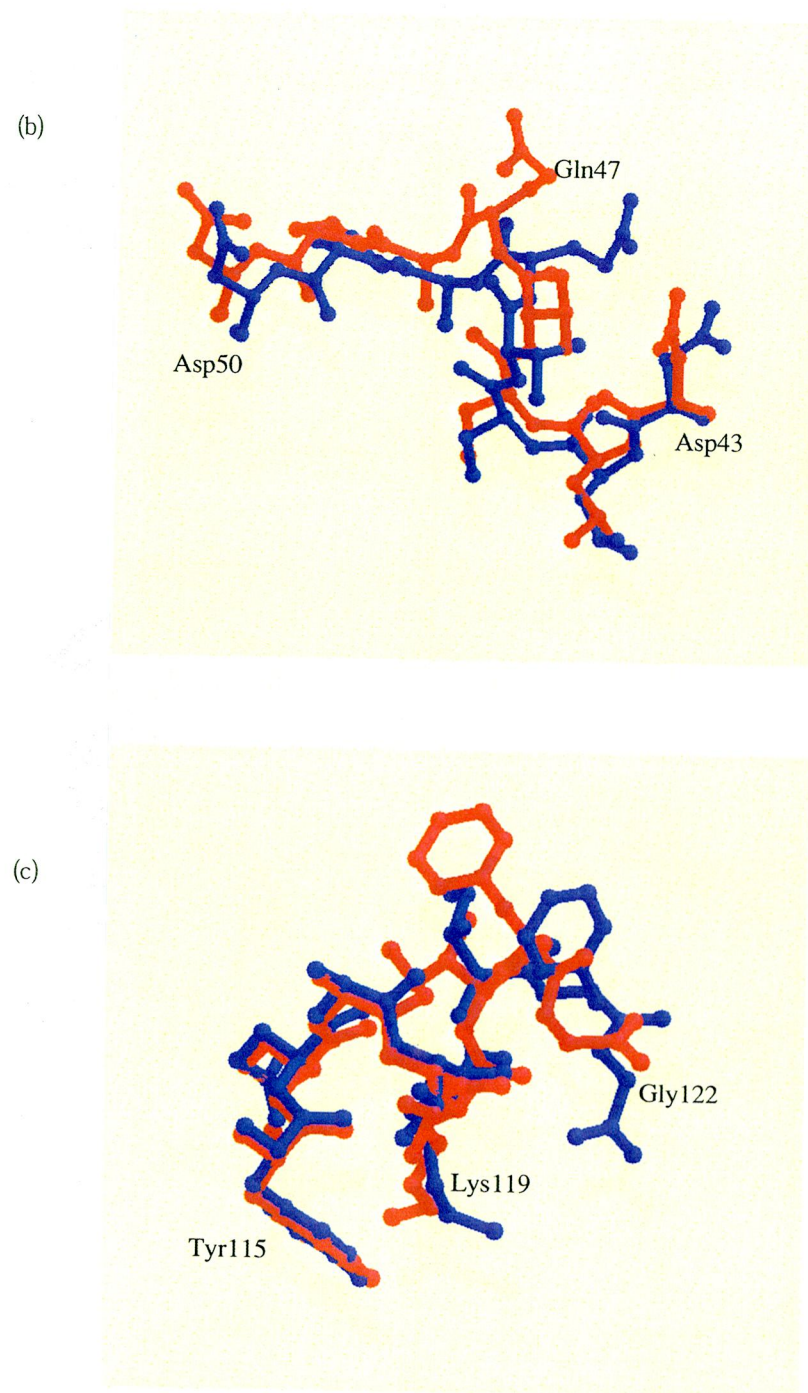


Fig. 27. Comparison of apo- (red) and holo-type (blue) structures. (a), superposition of the C α atoms; (b) superposition of the atoms in residues 42-50; (c), superposition of the atoms in the C-terminal region.

III. カルシウム結合部位

Fig. 25に示すように、カルシウムイオンは、電子密度図中に明らかに確認された。カルシウムイオンの比較的低い温度因子(24.0 Å²)から判断すると、このイオンはかなり強固に蛋白質と結合しているものと思われる。*S. violaceoruber* PLA₂において、カルシウムイオンは、他の分泌型PLA₂と同じく7つの配位子によって配位されており、その配位ジオメトリーは五方両錐体型である(Table 14, Fig. 28a)。しかし、その結合様式は他のPLA₂と大きく異なっている。すなわち、他のPLA₂においては、完全に保存されたアスパラギン酸残基の2つのカルボキシル酸素、カルシウム結合ループにある3つのカルボニル酸素、及び、2つの水分子がカルシウムイオンの配位子である。また、カルシウム結合ループにある3つのカルボニル酸素のうちの一つの酸素と一つの水分子がアキシアルに配位している⁹⁻¹¹⁾。一例として、*Naja naja atra* PLA₂のカルシウム結合部位をFig. 28bに示す。この例では、Tyr28カルボニル酸素とWat202がアキシアルに配位している。しかしながら、*S. violaceoruber* PLA₂において、カルシウム結合ループに対応する構造は存在していない。Fig. 28aに示すように、本PLA₂においてカルシウムイオンの配位子は、Asp65の2つのカルボキシル酸素、Leu44の主鎖カルボニル酸素、Asp43の1つのカルボキシル酸素及び3つの水分子である。また、Asp43のカルボキシル酸素と一つの水分子(Wat201)がアキシアルに配位している。

Asp65は触媒残基His64の隣の残基である。His-Aspという一次配列は全ての分泌型PLA₂において保存されており、後者のアスパラギン酸残基の2つのカルボキシル酸素は、カルシウムイオンの結合に関与している。このため、*S. violaceoruber* PLA₂においても、Asp65の2つのカルボキシル酸素がカルシウムイオンの配位子であると容易に予測された。事実、今回のホロ型酵素の構造解析から、Asp65の2つのカルボキシル酸素がカルシウムイオンの配位子であることが明らかとなった。しかしながら、他のPLA₂と比べると、この残基の側鎖二面角は多少違っており、これが原因でカルシウムイオンに対するエクアトリアル平面の位置が他のPLA₂と比べて異なっていると考えられる。同様に、Asp65との相対的な位置関係から、Leu44のカルボニル酸素がカルシウムイオンの配位子であると予測された。今回のホロ型酵素の構造解析から、この予測も正しかったと判明した。ただし、Leu44カルボニル酸素は、他のPLA₂において、アキシアル位でカルシウムイオンに配位しているカルボニル酸素と構造学的に等価な位置にあるが、本PLA₂においてはエクアトリアル配位子となっている。

アポ型酵素の結晶構造において、Asp43のカルボン酸はArg69のグアニジノ基とイオン結合を形成していた。しかしながら、ホロ型酵素の結晶構造ではそのようなイオン

結合は存在していない。また、ホロ型酵素の結晶構造において、Asp43側鎖の配向が変化し、Asp43カルボン酸のうち1つのカルボキシル酸素がカルシウムイオンと結合している(Fig. 29)。Arg69側鎖の炭化水素部分は、Lys72側鎖の炭化水素部分と協調して、基質であるホスファチジルコリンのコリンと相互作用すると考えられるので、Asp43側鎖の配向変化は非常に興味深い。また、本PLA₂において、基質の認識とカルシウムイオンの結合との間に相関があるのではないかと強く予測される。すなわち、本酵素が基質と結合するためにArg69の側鎖の配向が変化すると、Arg69のグアニジノ基とAsp43のカルボキシル酸素との間のイオン結合が消失し、Asp43のカルボキシル酸素が容易にカルシウムイオンとの結合に関与できるようになる。もしくは逆に、Asp43のカルボキシル酸素がカルシウムイオンに配位すると、Arg69の側鎖が基質の結合のために適した配向をとりやすくなるのではないかと考えられる。

本結晶構造においては、3つの水分子がカルシウムイオンに配位結合している。これらの水分子は蛋白質内部に存在し、Wat201とWat202に関しては、蛋白質中の極性原子と水素結合している。詳しく言えば、Wat201はCys61カルボニル酸素と、Wat202はThr46カルボニル酸素との間にそれぞれ水素結合を形成している(Fig. 29b)。アポ型酵素の結晶構造において、45-48番目の残基はType I β -turnを形成し、Thr46カルボニル酸素は溶媒領域の方を向いていた。しかしながら、ホロ型酵素の結晶構造において、45-48番目の残基はType II β -turnを形成し、Thr46カルボニル酸素は蛋白質内部を向いている。この構造変化がWat202とThr46カルボニル酸素との間の水素結合形成を可能にしている(Table 15, Fig. 29)。また、この水素結合によってWat202は非常に安定化されており、低い温度因子(27.1 Å²)を持つ。NMR解析の結果⁵⁴⁾、カルシウムイオン非存在化において、45-48番目の残基を含む長いループ領域はかなりフレキシブルであることが判明している。また、アポ型酵素の原子分解能構造解析の結果、この部位は大きな局所的振動を持つことが予測された。このため、アポ型酵素の結晶構造は、様々な conformerのうち、45-48番目の残基がType I β -turnを形成しているひとつの conformerの選択的結晶化によって生じたものかもしれない。しかしながら、ホロ型酵素の結晶構造における妥当なカルシウムイオンの結合ジオメトリーから、カルシウムが結合した状態では、45-48番目の残基はType II β -turnを形成し安定に存在するものと考えられる。

ところで、競合的阻害剤と複合体を形成した他のPLA₂の結晶構造解析の結果(*Naja naja atra* PLA₂の例をFig. 28cに示す)から、遷移状態において、カルシウムイオンに配位した水分子の位置は、それぞれ、基質のsn-3位リン酸基の酸素とsn-2位のエステル結合が解裂する直前に生じるのオキシアニオンとに置換されると予測されている^{10, 11)}。

S. violaceoruber PLA₂において、多少のずれはあるものの、他のPLA₂中にある配位水との相対的位置関係から、Wat201はオキシアニオンに置換される水であり、Wat203は基質のリン酸基の酸素に置換される水であると予測できる。

Table 14. Calcium ion and its ligands

Atom	Distance (Å)	B-factor (Å ²)
Ca190	-	24.0
Asp65 Oδ1	2.50	21.2
Asp65 Oδ2	2.51	23.1
Asp43 Oδ2	2.41	25.0
Leu44 O	2.31	22.7
Wat201	2.32	31.3
Wat202	2.40	27.1
Wat203	2.41	31.5

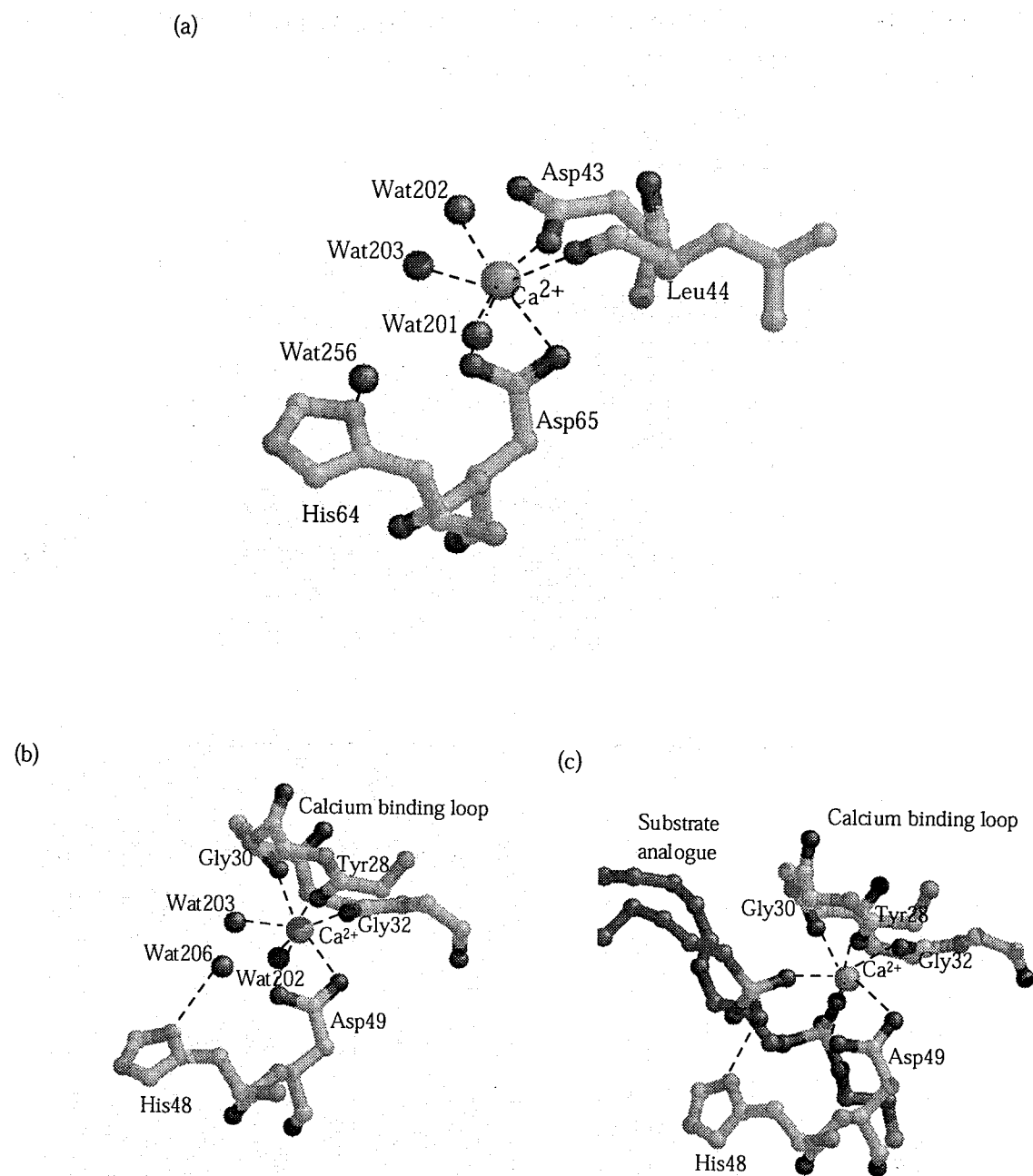


Fig. 28. Comparison of calcium-binding site. (a), *S. violaceoruber* PLA₂; (b), *Naja naja atra* PLA₂⁹⁾; (c) *Naja naja atra* PLA₂ complexed with substrate analogue¹¹⁾.

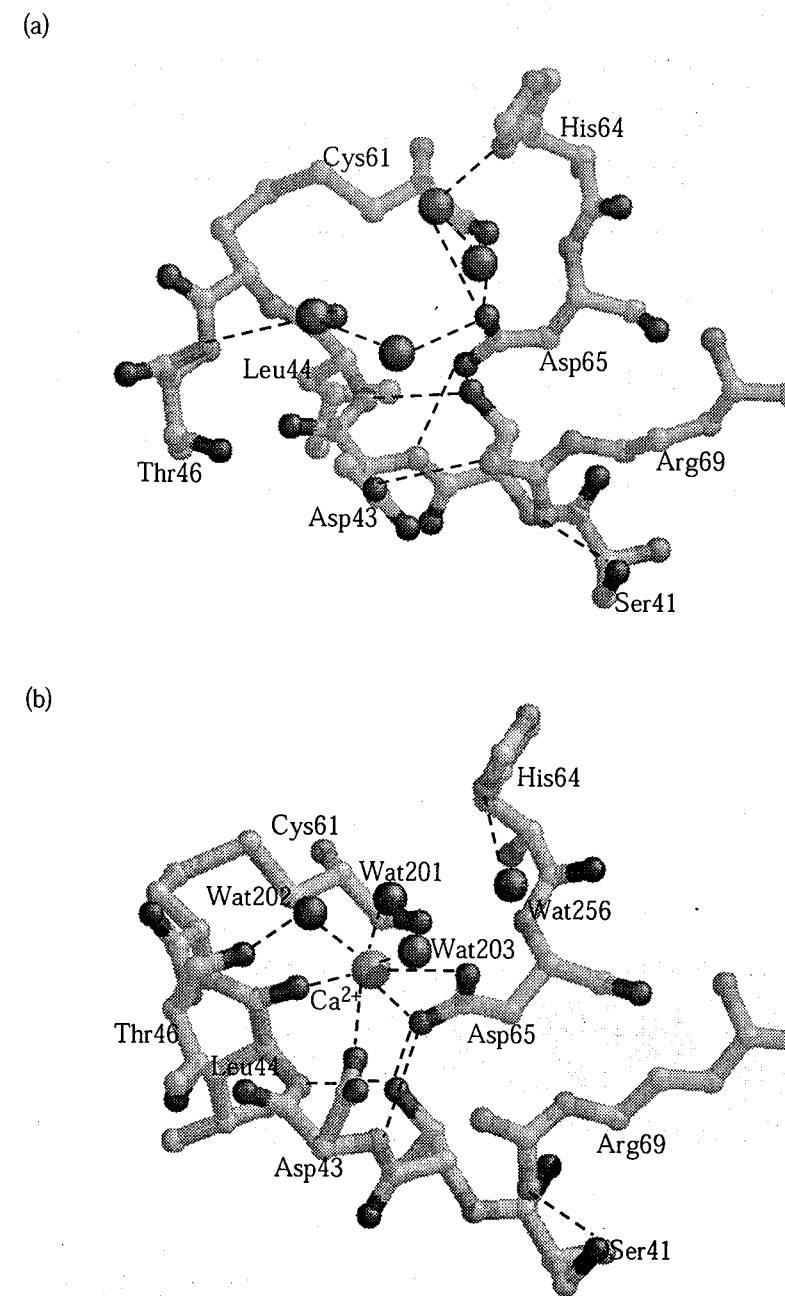


Fig. 29. Structural difference around the calcium-binding site between apo- (a) and holo-type (b) *S. violaceoruber* PLA₂.

Table 15. Conformational change in residues 46 to 47

	holo	apo
Thr46	$\phi = -54.4, \psi = 131.6$	$\phi = -64.6, \psi = -22.7$
Gln47	$\phi = 73.3, \psi = 15.5$	$\phi = -104.8, \psi = 15.9$
	(Type II β -turn)	(Type I β -turn)

IV. 触媒部位及び周囲の水素結合ネットワーク

第一章及び第二章で述べたように、*S. violaceoruber* PLA₂の触媒残基はHis64とAsp85である(Fig. 30)。His64のN δ 1原子と水素結合する水分子が、基質のカルボニル炭素を求核的に攻撃し、His64のN ϵ 2原子と水素結合するAsp85が、触媒反応の際にHis64上に生じた正の電荷を中和する役割を持つと考えられる。アポ型酵素の結晶構造においては、His64のN δ 1原子に水素結合している水分子が確かに存在していた。今回のホロ型酵素の結晶構造において、この水分子とほぼ等価な位置にカルシウムイオンの配位水であるWat201が存在している。しかしながら、Wat201はHis64のN δ 1原子と水素結合可能な距離に存在していない。代わりに、大きな温度因子を持つWat256がHis64のN δ 1原子と水素結合可能な位置にある(Fig. 30)。おそらく、本PLA₂の触媒反応において、Wat256が基質のカルボニル炭素を求核攻撃し、生じたオキシアニオンがWat201に置き換わってカルシウムイオンに配位するものと思われる。

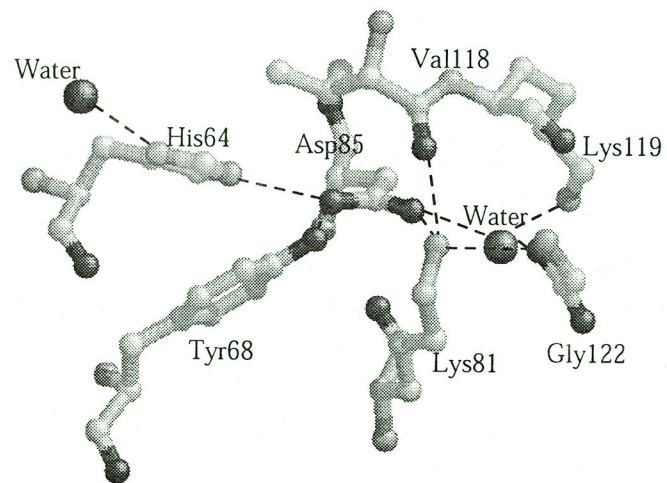
他のPLA₂の結晶構造において、触媒残基の周囲に水素結合ネットワークが形成されており、この水素結合ネットワークが触媒部位を安定化するのに役立っていると考えられた。今回のホロ型酵素の結晶構造において、触媒残基Asp85のカルボン酸は、Tyr68の水酸基、Lys85のアミノ基及びWat237に連結している。また、Lys85のアミノ基は、Tyr68の水酸基及びVal118のカルボニル炭素と連結している(Fig. 30b)。しかしながら、アポ型酵素の結晶構造においては、C末部分も水素結合ネットワークに参加していた。詳しく言えば、Asp85カルボン酸がLys119アミノ基と一分子の水を介してイオン結合を形成し、Lys85のアミノ基がC末カルボン酸と直接イオン結合を形成していた(Fig. 30a)。今回のホロ型酵素の結晶構造において、C末部分は非常にフレキシブルであり、触媒残基と相互作用していない。一方、Ohtani and Sugiyama⁵⁴⁾によって求められたNMR構造において、カルシウムイオンの有無にかかわらず、C末部分は非常にフレキシブルで触媒水素結合ネットワークを形成し得ないことが判明している。また、アポ型酵素の原子分解能構造解析から、水素結合ネットワークに関与しているLys119及びC末残基を含むC末部分がそれほど安定でないことが示唆された。ゆえに、今回のホロ型酵素の結晶構造はこれらの結果と一致しているといえる。

Bergら¹³⁻¹⁵⁾は、前章でも触れたように、ブタ腭液由来PLA₂の溶液構造をNMRの手法を用いて解析し以下の知見を得ている。以前報告されたブタ腭液由来PLA₂の結晶構造においては、N末アミノ基が触媒残基Asp99と一分子の水を介したイオン結合を形成し、触媒部位を安定化するのに役立っていると考えられていた。しかしながら、同様な状態のブタ腭液由来PLA₂の溶液構造は、結晶構造とは異なり、N末アミノ基を含むN末

部位が非常にフレキシブルになっている¹³⁾。一方、界面活性剤及び競合的阻害剤を共存させたブタ腭液由来PLA₂の溶液構造では、結晶構造と同じく、N末部位が非常に安定化しており、N末アミノ基とAsp99との間に一分子の水を介したイオン結合が形成していると考えられた¹⁴⁾。同様に、結晶構造において、触媒水素結合ネットワークの一員であると考えられていた分子表面にあるTyr69を含むループ領域(界面認識部位のひとつと考えられる)が、溶液中では不安定である¹³⁾にもかかわらず、界面活性剤及び競合的阻害剤を共存させると安定化していた¹⁴⁾。これらの知見をもとに、彼らは、ミセル状基質の存在がブタ腭液由来PLA₂の構造変化を引き起こし、触媒残基及び界面認識部位を安定化する水素結合ネットワークが完全に形成されると結論づけた¹⁵⁾。また、このことは、PLA₂のミセル状基質に対する活性が単分子分散状の基質に対する活性よりもかなり高くなるという極めて重要な現象、すなわち、界面活性化現象⁵³⁾を説明し得るものであると考えられる。

アポ型の*S. violaceoruber* PLA₂の結晶構造とその溶液構造に関して言えば、両者の構造が異なり、かつ、溶液中で不安定な部分が触媒水素結合ネットワークに関与しているという知見は、ブタ腭液由来PLA₂において観測された知見¹³⁻¹⁵⁾と極めて一致している。このため、得られたアポ型酵素の結晶構造は、様々なconformerのうち、界面活性化された状態に類似した一つのconformerの選択的結晶化によって生じたものであろうと予測した。では何故、本研究におけるホロ型酵素の結晶化において選択的結晶化が起こらなかったのだろうか？これに対する一つの説明として結晶化条件のpHの違いが考えられる。アポ型酵素の原子分解能構造解析から、pH 6で生じたこの結晶中において、触媒残基のHis64は正の電荷を持っていると示唆された。この状態は、His64に水素結合した水が基質のカルボニル炭素を求核攻撃した直後の中間体状態に似ている。一方、本研究においてホロ型酵素の結晶はpH 8.5で生成し、おそらく、この結晶中のHis64は電荷を持っていないと思われる。触媒残基の荷電状態が反応中間体状態に似ていると、より容易に触媒水素結合ネットワークが形成されると考えるのは妥当であり、この影響がアポ型とホロ型酵素の結晶構造におけるC末部分のコンフォメーションの違いに反映されたのかもしれないと思われる。

(a)



(b)

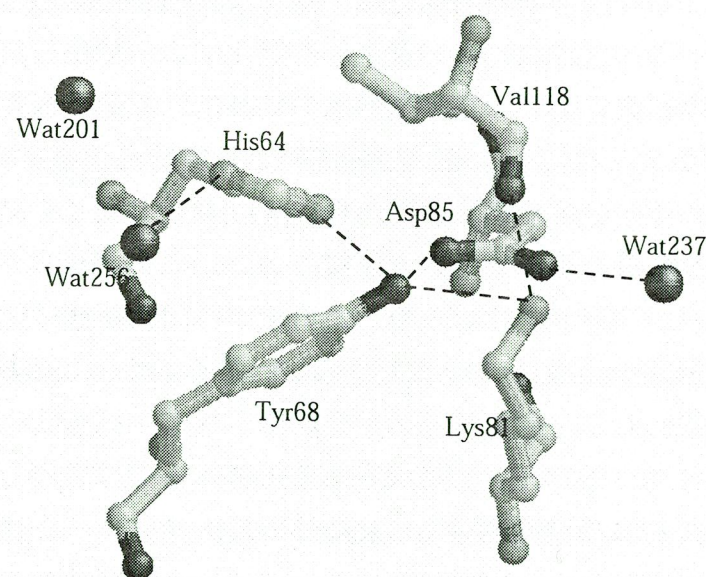


Fig. 30. Structural difference of catalytic site and surrounding hydrogen bond network between apo- (a) and holo-type (b) *S. violaceoruber* PLA₂.

【総括】

筆者は、X線結晶構造解析によって、アポ型及びホロ型の*S. violaceoruber* PLA₂の三次元構造を決定した。第一章には、1.4 Å分解能で求めたアポ型酵素の構造について、第二章には、原子分解能で求めたアポ型酵素の構造について、第三章には、1.6 Å分解能で求めたホロ型酵素の構造について、それぞれ、構造解析の方法、及び得られた構造に基づく考察を述べた。

本PLA₂はアミノ酸レベルで既知の分泌型PLA₂と相同性を持たない。このため、第一章において、重原子多重同型置換法を適用して構造解析を行った。得られた蛋白質のフォールディングは非常に新規なものであった。事実、三次元構造に基づいて蛋白質を分類するDALIサーバー⁶¹⁾にて、本蛋白質と三次元的に相同性のある蛋白質を検索したところ、本蛋白質の構造はProtein Data Bankに登録されているどの蛋白質の構造とも有意に相同性を持たないことが判明した。進化を蛋白質という分子レベルで考えると、時間を経るに従いアミノ酸配列がわずかつつ変化していき、形や機能までもが変わった多様な蛋白質が生じてきたといえる。過去の構造生物学的研究から、立体構造の方がアミノ酸配列そのものよりも強く保存されていると言われている。このため、本PLA₂は既知の分泌型PLA₂とは起源を異にするといえる。しかしながら、触媒部位の構造は他の分泌型PLA₂のそれと完全に保存されていた。また、他の分泌型PLA₂と同じく、水素結合ネットワークによる触媒部位構造の安定化が観測された。保存された触媒部位ジオメトリー、及び、共通して観測される触媒部位周辺の水素結合ネットワークの存在は、これらがPLA₂活性のために必須であることを強く示唆している。さらに、得られた構造から活性発現に必要なカルシウムイオンの結合部位、及び基質認識部位を予測することができた。

アポ型酵素の結晶は非常に良質で高分解の回折像を与える。このため、第二章において、原子分解能で構造の精密化を行った。これまでに、原子分解能で解析された蛋白質モデルは非常に少なく、*S. violaceoruber* PLA₂の原子分解能構造解析は、本PLA₂のより詳細な性状を与えるのみならず、蛋白質結晶学にとっての標準モデルを提供し得ると考えられる。このため、この章では、蛋白質の安定性をもたらす分子内または分子間の相互作用や、低分解能の解析では得られにくい水素原子の構造など、本結晶構造の性状について、より正確でかつ徹底的な記述を行った。また、X線結晶構造解析は、NMR解析とは異なり、存在し得る多数のconformerのうちひとつの平均構造しか与えないため、一般的に、ダイナミクスを観測しにくい。しかしながら、得られた原子分解能モデルはディスオーダーや異方的振動に関する情報を含んでいる。これらの情報から、本

PLA₂のダイナミクスについても議論することができた。このうち、最も興味深い知見は、低分解能の解析からは安定であると考えられていた触媒部位周辺の水素結合ネットワークが、それほど安定でないことが判明したことである。この結果は、本蛋白質のNMR解析で得られた知見⁵⁴と一致しており、さらには、他の分泌型PLA₂のNMR解析で得られた知見¹³⁻¹⁵とも一致している。このため、原子分解能モデルはより正確な静的情報を含んでいるだけでなく、NMR構造に匹敵するダイナミクスに関する情報をも含んでいるといえる。

第三章においては、活性発現に必要なカルシウムイオンと結合した*S. violaceoruber* PLA₂の結晶構造を分子置換法により求め、得られた構造に基づく考察を行った。本PLA₂のカルシウム結合ジオメトリーは他の分泌型PLA₂と大きく異なっていたが、カルシウムイオンは、他の分泌型PLA₂と同じく、触媒残基の近くに存在していた。このため、本PLA₂の触媒反応のメカニズムは他の分泌型PLA₂と同一であると考えられる。また、アポ型とホロ型間の構造比較によって、触媒部位及び周囲の水素結合ネットワーク、カルシウム結合部位、及び、基質認識に係わっていると推定される部位の構造変化を原子レベルで詳細に考察することができた。これらの知見は、本PLA₂がmMという比較的高いオーダーのカルシウムイオンを活性発現に必要とすることを考慮すれば、生理的条件下で起こり得る生化学的にも非常に興味深い知見であると考えられる。

これまでに得られた知見から予測される本PLA₂の触媒機構を、模式的にFig. 31に示す。まず最初に、基質のsn-2位のカルボニル酸素及びsn-3位リン酸基の酸素が、水分子に置き換わってカルシウムイオンと結合する。このとき、sn-1位及びsn-2位の脂肪酸側鎖は疎水性チャンネルに収容され、sn-3位のコリン基はArg69とLys72側鎖の炭化水素部分で形成されるコリン受容体ポケットに入り込む。また、カルシウムイオンの作用によって、基質のsn-2位のカルボニル炭素が分極化される。同時に、His64のNδ1原子と水素結合している水分子が、His64によってプロトンを引き抜かれて完全に分極化し、基質のsn-2位カルボニル炭素を求核的に攻撃する。生じた正四面体型の反応中間体はエネルギー的に不安定であり、電子移動を経て生成物であるリゾリン脂質と脂肪酸に分解される。この触媒反応の際に、His64のNe2原子と水素結合するAsp85がHis64上に生じた正の電荷を中和し、カルシウムイオンが正四面体型の反応中間体における負の電荷を中和し安定化する。これらは、触媒反応のエネルギー障壁を小さくすることに寄与していると考えられる。なお、ここに示す推定触媒機構は、他のPLA₂において推定されている機構⁹とほぼ同一である。

ところで、上述の触媒機構は、単分子分散状の基質及びミセル状基質の両方に当てはまるものである。このため、この記述は、PLA₂のミセル状基質に対する活性が単分

子分散状の基質に対する活性よりもかなり高くなるという極めて重要な現象、すなわち、界面活性化現象⁵³について説明しているものではない。他のPLA₂における過去の研究成果から、界面活性化は、基質に対する親和性の増加、及び、最大反応効率の増加の両方によってもたらされることがわかっている。基質に対する親和性の増加は、酵素がミセル状基質と結合してしまえば、一度に多くの基質に近づくこととなり、連続的に基質と作用できるようになるためであるとも考えられる。ただし、過去の研究成果から、基質に対する親和性の増加は、実効基質濃度増加による影響だけでは説明できないことが判明している。現在のところ、ブタ腭液由来PLA₂の溶液構造¹³⁻¹⁵において示唆されたように、基質に対する親和性の増加及び最大反応効率の増加の両方を含む界面活性化は、アロステリックな調節によってもたらされると考えるのが一般的である。すなわち、溶液中においてフレキシブルな部位がミセル状基質の存在によって安定化され、完全な触媒水素結合ネットワークの形成を可能にする。このことが、触媒部位並びに界面認識部位の安定化をもたらす、基質に対する親和性の増加、及び、最大反応効率の増加を引き起こすものと考えられる。筆者は、第二章と第三章において、本PLA₂の結晶構造中の触媒水素結合ネットワークがそれほど安定でないことや、ブタ腭液由来PLA₂において観測された知見と類似した点の本PLA₂において認められることについて指摘した。これらのことは、本PLA₂においても、ブタ腭液由来PLA₂と同じく、アロステリックな調節によって界面活性化がもたらされることを示唆するものである。しかしながら、本研究では界面活性化の分子機構について直接的な証拠を得たわけではない。このため、本PLA₂における界面活性化の詳細な分子機構について解明することは、今後の研究課題のひとつである。

また、筆者は、今後の研究課題のひとつとして、得られた本PLA₂の構造学的知見をもとに、様々な変異体蛋白質を創生したいと考えている。この研究は、基質認識部位や界面認識部位など、本論文中に記載した予測が正しいかどうかを明らかにするためにも重要である。さらに、全く異なった観点からのアプローチも可能である。例えば、本PLA₂の触媒残基His64のNδ1原子の近くに水酸基を持つ残基を導入してやれば、セリンプロテアーゼの触媒トライアドに似た構造を人工的に作り出すことができ、その結果、リン脂質のsn-2位がアミド結合に置換された基質アナログに対して加水分解活性を持つ蛋白質を創りだすことができるかもしれない。ただし、この変異体蛋白質の触媒トライアドでは、イミダゾール環の配向がセリンプロテアーゼの触媒トライアドとは異なり、Nδ1原子がプロトンを引き抜き、Ne2原子がカルボン酸と水素結合しなければならない。また、イミダゾール環とカルボン酸の間の水素結合が、セリンプロテアーゼの触媒トライアドで見られるsyn型でなくanti型となる。これらの変化が触媒活性にどの

ような影響をもたらすかを、変異体蛋白質を用いて明らかにできれば、有機化学や蛋白質工学的にも非常に興味深い。

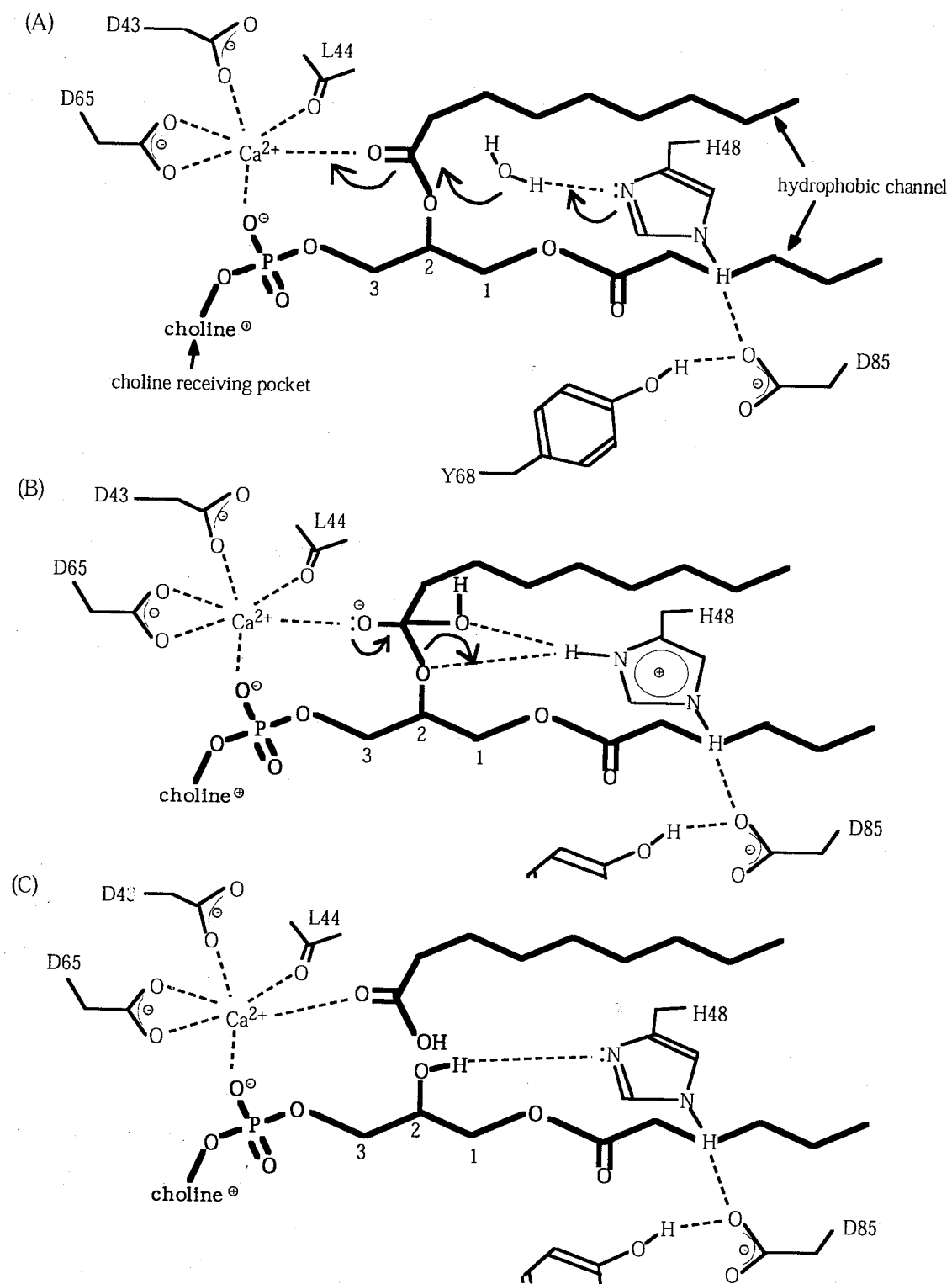


Fig. 31. Putative catalytic mechanism of *S. violaceoruber* PLA₂. (A), catalytic attack on substrate; (B), tetrahedral intermediate; (C), products formed by collapse.

【参考文献】

- 1) Dennis, E. A. (1987). Phospholipase A₂ mechanism: Inhibition and role in arachidonic acid release. *Drug. Dev. Res.* **10**, 205-220.
- 2) Irvine, R. F. (1982). How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.* **204**, 3-16.
- 3) Dennis, E. A. (1987). Regulation of eicosanoid production: role of phospholipases and inhibitors. *Biotech.* **5**, 1294-1300.
- 4) Dennis, E. A. (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **269**, 13057-13060.
- 5) Davidson, F. F. and Dennis, E. A. (1990). Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. *J. Mol. Evol.* **31**, 228-238.
- 6) Dijkstra, B. W., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. and Drenth, J. (1981). Structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **147**, 97-123.
- 7) Brunie, S., Bolin, J., Gewirth, D. and Sigler, P. B. (1985). The refined crystal structure of dimeric phospholipase A₂ at 2.5 Å. *J. Biol. Chem.* **260**, 9742-9749.
- 8) Thunnissen, M. M. G. M., AB, E., Kalk, K. H., Drenth, J., Dijkstra, B. W., Kuipers, O. P., Dijkman, R., de Haas, G. H. and Verheij, H. M. (1990). X-ray structure of phospholipase A₂ complexed with a substrate-derived inhibitor. *Nature* **374**, 689-691.
- 9) Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, K., Gelb, M. H. and Sigler, P. B. (1990). Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science* **250**, 1541-1546.
- 10) Scott, D. L., Otwinowski, Z., Gelb, M. H. and Sigler, P. B. (1990). Crystal structure of a bee-venom phospholipase A₂ in a complex with a transition-state analogue. *Science* **250**, 1563-1566.
- 11) White, S. P., Scott, D. L., Otwinowski, Z., Gelb, M. H. and Sigler, P. B. (1990). Crystal structure of cobra-venom phospholipase A₂ in a complex with a transition-state analogue. *Science* **250**, 1560-1563.

- 12) Wery, J. P., Schevitz, R. W., Clawson, D. K., Bobbitt, J. L., Dow, E. R., Gamboa, G., Goodson, T. Jr., Hermann, R. B., Kramer, R. M., McClure, D. B., Mihelich, E. D., Putnam, J. E., Sharp, J. D., Stark, D. H., Teater, C., Warrick, M. W., and Jones, N. D. (1991). Structure of recombinant human rheumatoid arthritic synovial fluid phospholipase A₂ at 2.2 Å resolution. *Nature* **352**, 79-82.
- 13) van den Berg, B., Tessari, M., de Haas, G. H., Verheij, H. M., Boelens, R. and Kaptein, R. (1995). Solution structure of porcine pancreatic phospholipase A₂. *EMBO J.* **14**, 4123-4131.
- 14) van den Berg, B., Tessari, M., Boelens, R., Dijkman, R., Kaptein, R., de Haas, G. H. and Verheij, H. M. (1995). Solution structure of porcine pancreatic phospholipase A₂ complexed with micelles and a competitive inhibitor. *J. Biomol. NMR* **5**, 110-121.
- 15) van den Berg, B., Tessari, M., Boelens, R., Dijkman, R., de Haas, G. H., Kaptein, R. and Verheij, H. M. (1995). NMR structures of phospholipase A₂ reveal conformational changes during interfacial activation. *Nature Struct. Biol.* **2**, 402-406.
- 16) Suzuki, K., Izuhara, M. and Sugiyama, M. *in preparation*.
- 17) McPherson, A. (1982). *The preparation and Analysis of Protein Crystals*. 1st ed., 96-97. (New York: John Wiley).
- 18) Higashi, T. (1990). Auto-indexing of oscillation images. *J. Appl. Cryst.* **23**, 253-257.
- 19) Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.
- 20) Furey, W. and Swaminathan, S. (1990). PHASES. A program package for processing and analysis of diffraction data from macromolecules. *Methods Enzymol.* **276**, 472-494.
- 21) Zhang, K. Y. J. and Main, P. (1990). The use of Sayre's equation with solvent flattening and histogram matching for phase extension and refinement of protein structures. *Acta Cryst.* **A46**, 377-381.
- 22) McRee, D. E. (1992). A visual protein crystallographic software system for X11/XView. *J. Mol. Graphics* **10**, 44-46.
- 23) Brünger, A. T. (1993). *X-PLOR version 3.1 Manual* Yale University Press, New Haven, CT, USA.
- 24) Brünger, A. T., Kuriyan, J., and Karplus, M. (1987). Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics. *Science* **235**, 458-460.
- 25) Konnert, J. H. and Hendrickson, W. A. (1980). A restrained-parameter thermal-factor refinement procedure. *Acta Cryst.* **A36**, 344-350.
- 26) Brünger, A. T. (1992). The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature (London)* **355**, 472-475.
- 27) Luzzati, V. (1952). Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines. *Acta Cryst.* **5**, 802-810.
- 28) Engh, R. A. and Huber, R. (1991). Accurate bond length and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.* **A47**, 392-400.
- 29) Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. and Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain conformations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95-99.
- 30) Kleywegt, G. J. and Jones, T. A. (1996). Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure* **4**, 1395-1400.
- 31) Dijkstra, B. W., van Nes, G. J. H., Kalk, K. H., Brandenburg, N. P., Hol, W. G. J. and Drenth, J. (1982). The structure of bovine phospholipase A₂ at 3.0 Å resolution. *Acta Cryst.* **B38**, 793-799.
- 32) Dijkstra, B. W., Kalk, K. H., Drenth, J., de Haas, G. H., Egmond, M. R., and Slotboom, A. J. (1984). Role of the N-terminus in the interaction of pancreatic phospholipase A₂ with aggregated substrates. Properties and crystal structure of transaminated phospholipase A₂. *Biochemistry* **23**, 2759-2766.
- 33) Zhu, H., Dupureur, C. M., Zhang, X. and Tsai, M.-D. (1995). Phospholipase A₂ engineering. The role of disulfide bonds in structure, conformational stability, and catalytic function. *Biochemistry* **34**, 15307-15314.
- 34) Sayle, R. and Milner, W. E. J. (1995). RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 374.
- 35) Noel, J. P., Bingman, C., Deng, T., Dupureur, C. M., Hamilton, K. J., Jiang, R. T., Kwak J.-G., Sekharudu, C., Sundaralingam, M., and Tsai, M. -D. (1991). Phospholipase A₂ engineering. X-ray structural and functional evidence for the interaction of lysine-56 with substrates. *Biochemistry* **30**, 11801-11811.

- 36) Tomoo, K., Ohishi, H., Ishida, T., Inoue, M., Ikeda, K., Sumiya, S., and Kitamura, K. (1994). X-ray crystal structure and molecular dynamics simulation of bovine pancreas phospholipase A₂-n-dodecylphosphorylcholine complex. *Proteins* **19**, 330-339.
- 37) Sheldrick, G. M. (1990). Phase annealing in SHELXL-90: direct methods for larger structures. *Acta Cryst.* **A46**, 467-473.
- 38) Bernstein, F. C., Koetzl, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F. Jr., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. and Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **112**, 535-542.
- 39) Dauter, Z., Sieker, L. C. and Wilson, K. S. (1992). Refinement of rubredoxin from *Desulfovibrio vulgarens* at 1.0 Å with and without restraints. *Acta Cryst.* **B48**, 42-59.
- 40) Teeter, M. M., Roe, S. M. and Heo, N. H. (1993). Atomic resolution (0.83 Å) crystal structure of hydrophobic protein crambin at 130 K. *J. Mol. Biol.* **230**, 292-311.
- 41) Derrick, J. P. and Wigley, D. B. (1994). The third IgG-binding domain from streptococcal protein G. An analysis by X-ray crystallography of the structure alone and in a complex with Fab. *J. Mol. Biol.* **243**, 906-918.
- 42) Frazao, C., Soares, C. M., Carrondo, M. A., Pohl, E., Dauter, Z., Wilson, K. S., Hervas, M., Navarro, J. A., de la Rose, M. A. and Sheldrick, G. M. (1995). Ab initio determination of the crystal structure of cytochrome c6 and comparison with plastocyanin. *Structure* **3**, 1159-1169.
- 43) Tong, L., Warren, T. C., King, J., Betageri, R., Rose, J. and Jakes, S. (1996). Crystal structures of the human p56^{lck} domain in complex with two short phosphotyrosyl peptides at 1.0 Å and 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **256**, 601-610.
- 44) Hu, S. H., Gehrmann, J., Guddat, L. W., Alewood, P. F., Craik, D. J. and Martin, J. L. (1996). The 1.1 Å crystal structure of neuronal acetylcholine receptor antagonist, α-conotoxin Pn1A from *Conus pennaceus*. *Structure* **4**, 417-423.
- 45) Parkin, S., Rupp, B. and Hope, H. (1996). Structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor at 125 K: definition of carboxyl-terminal residues Gly57 and Ala58. *Acta Cryst.* **D52**, 18-29.
- 46) Anderson, D. H., Weiss, M. S. and Eisenberg, D. (1997). Charges, hydrogen bonds, and correlated motions in the 1 Å resolution refined structure of the mating pheromone Er-1 from *Euplotes raikovi*. *J. Mol. Biol.* **273**, 479-500.
- 47) Sevcik, J., Dauter, Z., Lamzin, V. S. and Wilson, K. S. (1996). Ribonuclease from *Streptomyces aureofaciens* at atomic resolution. *Acta Cryst.* **D52**, 327-344.
- 48) Kumaraswamy, V. S., Lindley, P. F., Slingsby, C. and Glover, I. D. (1996). An eye-lens protein-water structure: 1.2 Å resolution structure of γB-crystallin at 150 K. *Acta Cryst.* **D52**, 611-622.
- 50) Longhi, S., Czjzek, M., Lamzin, V., Nicolas, A. and Cambillau, C. (1997). Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: Stereochemical analysis. *J. Mol. Biol.* **268**, 779-799.
- 51) Harata, K., Abe, Y. and Muraki, M. (1998). Full-matrix least-squares refinement of lysozyme and analysis of anisotropic thermal motion. *Proteins* **30**, 232-243.
- 52) Wang, Z., Luecke, H., Yao, N. and Quioco, F. A. (1997). A low energy short hydrogen bond in very high resolution structures of protein receptor-phosphate complexes. *Nature Struct. Biol.* **4**, 519-522.
- 53) Gelb, M. H., Jain, M. K., Hanel, A. M. and Berg, O. G. (1995). Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases: Lessons from secreted phospholipase A₂. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 653-688.
- 54) Ohtani, K. and Sugiyama, M. *in preparation*.
- 55) Sheldrick, G. M. and Schneider, T. R. (1997). SHELXL: high-resolution refinement. *Methods Enzymol.* **277**, 319-343.
- 56) Driessen, H., Haneef, M. I. J., Harris, G. W., Howlin, B., Kahn, G. and Moss, D. S. (1989). RESTRAIN: restrained structure-factor least-squares refinement program for macromolecular structures. *J. Appl. Cryst.* **22**, 510-516.
- 57) Chothia, C., Levitt, S., and Richardson, D. (1981). Helix to helix packing in proteins. *J. Mol. Biol.* **145**, 215-250.

- 58) Yamano, A. and Teeter, M. M. (1994). Correlated disorder of the pure Pro²²/Leu²⁵ form of crambin at 150 K refined to 1.05 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **269**, 13956-13965.
- 59) Burnett, M. N. and Johnson, C. K. (1996). ORTEP-III: Oakridge thermal ellipsoid plot program for crystal structure illustrations. (Report ORNL-6895). Oakridge National Laboratory, Oakridge, TN, USA.
- 60) Schomaker, V. and Trueblood, K. N. (1968). On the rigid-body motion of molecules in crystals. *Acta Cryst.* **B24**, 63-76.
- 61) Holm, L. and Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **233**, 123-138.

【報文目録】

I. 学位論文の基礎となる原著

- (1) Matoba, Y., Suzuki, K., Yamano, A. and Sugiyama, M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of bacterial phospholipase A₂. *Acta Cryst. Sec. D* 投稿予定
- (2) Matoba, Y., Yamano, A., Katsube, Y., Suzuki, K. and Sugiyama, M. Crystal structure of a novel phospholipase A₂ from *Streptomyces violaceoruber* at 1.4 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* 投稿予定
- (3) Matoba, Y., Yamano, A., Katsube, Y. and Sugiyama, M. Atomic resolution (1.05 Å) crystal structure of *Streptomyces violaceoruber* phospholipase A₂. *J. Mol. Biol.* 投稿予定
- (4) Matoba, Y. and Sugiyama, M. Crystal structure of *Streptomyces violaceoruber* phospholipase A₂ in a calcium-binding form. *J. Mol. Biol.* 投稿予定

II. 参考原著

- (1) Kumagai, T., Muta, K., Matoba, Y., Kawano, Y., Davies, J. and Sugiyama, M. (1998). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of bleomycin-binding protein from bleomycin-producing *Streptomyces verticillus*. *Acta Cryst.* **D54**, 127-128.
- (2) Kumagai, T., Maruyama, M., Matoba, Y., Kawano, Y. and Sugiyama, M. (1999). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of bleomycin-binding protein encoded on the transposon Tn5. *Acta Cryst.* **D55**, 1095-1097.
- (3) Kawano, Y., Kumagai, T., Muta, K., Matoba, Y., Davies, J. and Sugiyama, M. The 1.5 Å crystal structure of a bleomycin resistance determinant from bleomycin-producing *Streptomyces verticillus*. *Submitted to J. Mol. Biol.*

【謝辞】

本研究に対し、御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜り、さらに本論文の御校閲を賜りました広島大学医学部総合薬学科 杉山 政則 教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり、御指導と御助言を賜りました広島大学医学部総合薬学科 升島 努 教授、小池 透 教授、並びに、大谷 和弘 助教授に深く御礼申し上げます。特に、小池 透 教授と大谷 和弘 助教授には、本学科において、コンピュータ計算を行う環境作りに御協力頂いたのみならず、NMR解析の観点や有機化学の観点から、終始、有益な御助言を頂きました。

本論文の結果及び考察はX線結晶学に基づいておりますが、第一章及び第二章の実験において、快くX線検出器を使用させて頂いたのみならず、X線結晶学の基盤となる知識を御指導くださいました大阪大学名誉教授 勝部 幸輝 博士、理学電機X線研究所 東 常行 博士、山野 昭人 博士、並びに、長谷川 智一 博士に謹んで感謝の意を表します。また、第三章の実験において、快くX線検出器を使用させて頂き、さらに、構造生物学の観点から有益な御助言を賜りました京都大学化学研究所 畑 安雄 助教授、並びに、藤井 知実 助手に心より御礼申し上げます。さらに、X線結晶構造解析法に関して、御指導と御助言を賜りました、SPring-8の神谷 信夫 博士と河野 能顕 博士に深く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、大量の蛋白質を御供与下さいました茨木高専 鈴木 康司 博士(元旭化成診断薬研究部所属)に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、終始、暖かい御支援と御協力を頂きました広島大学医学部総合薬学科 金田 幸 助教授、熊谷 孝則 助手、並びに、杉山研究室の皆さまに厚く御礼申し上げます。