



植物細胞壁代謝に関わる β -D-ガラクトシダーゼの構造と機能の解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2016-03-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 枝, 真広 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00000770

大阪府立大学博士（理学）学位論文

植物細胞壁代謝に関わる

β -D-ガラクトシダーゼの構造と機能の解明

枝 真広

2014

目次

緒論	1
第一章 TBG1 の酵素特性および基質特異性	
1. 序論	9
2. 試薬および実験方法	11
3. 結果および考察	19
4. 要約	28
第二章 TBG4 の産生、精製および結晶化	
1. 序論	30
2. 試薬および実験方法	33
3. 結果および考察	39
4. 要約	45
第三章 TBG4 の X 線結晶構造解析	
1. 序論	46
2. 試薬および実験方法	49

3. 結果および考察	53
4. 要約	69
総括	71
謝辞	73
参考文献	74
論文目録	80

略語一覽

4NP- β -Gal: 4-nitrophenyl- β -galactopyranoside

ABEE: 4-aminobenzoic acid ethyl ester

AoBGAL: β -D-galactosidase from *Aspergillus oryzae*

ASP: alkali soluble pectin

AtBGAL: β -D-galactosidase from *Arabidopsis thaliana*

BcBGAL: β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*

BtBGAL: β -D-galactosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron*

CcBGAL: β -D-galactosidase from *Caulobacter crescentus*

CjBGAL: β -D-galactosidase from *Cellvibrio japonicus*

GH: glycoside hydrolase family

HEPES-NaOH: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid-sodium hydroxide
buffer

HF: hemicellulose fraction

HjBGAL: β -D-galactosidase from *Hypocrea jecorina*

HsBGAL: β -D-galactosidase from *Homo sapiens*

IMAC: immobilized metal ion affinity chromatography

MR: molecular replacement

native-SAD: native sulfur-based single-wavelength anomalous diffraction

PEG: polyethylene glycol

PspBGAL: β -D-galactosidase from *Penicillium* sp.

RMSD: root-mean-square deviation

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SEC: size exclusion chromatography

SpBGAL: β -D-galactosidase from *Streptococcus pneumoniae*

TBG: tomato β -D-galactosidase

Tris-HCl: tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloride buffer

緒論

植物細胞壁は、自然界に最も多く存在する有機化合物であり、その構成成分の90%以上が多糖である。植物細胞壁を構成する多糖はセルロース、ヘミセルロース、およびペクチンに分類されるが、その構造は非常に複雑である (Fig. 1-1; Cosgrove, 2005; Franková and Fry, 2013)。細胞壁に含まれる多糖の組成は植物の生育や発達と共に変化しており、その制御には多種多様なタンパク質や酵素が関与している (Yokoyama and Nishitani, 2004)。糖質加水分解酵素や糖転移酵素は細胞壁の分解や修飾に関わっており、近年、これら酵素の分子生物学的、遺伝子工学的、生化学的手法を用いた研究が進められている (Bapat *et al.*, 2010; Eklöf and Brumer, 2010; Gilbert, 2010)。

糖質加水分解酵素の触媒機構は、糖のアノマー炭素の立体配座が反応の前後で逆転する反転型 (*inverting*) と保持される保持型 (*retaining*) に大別される (Fig. 1-2)。反転型の触媒機構は、オキシカルベニウムイオン様遷移状態を経由する一段階反応であり、アノマー炭素の立体配座がワルデン反転するため、アノマーが反転する。反転型酵素の触媒反応には2つの活性残基が関与しており、それぞれ一般塩基触媒および一般酸触媒として機能する。これら2つの活性残基は、通常、側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸 (アスパラギン酸またはグルタミン酸) であり、一般に6~11 Åの距離に存在する。一方、保持型の触媒機構は、共有結合中間体を経由する二段階反応であり、それぞれの段階でアノマー炭素の立体配座がワルデン反転するため、結果的にアノマーが保持される。保持型酵素の触媒反応には2つの活性残基が関与しており、それぞれ求核剤および一般酸/塩基触媒として機能する。これら2つの活性残基は、通常、側鎖

にカルボキシ基を有するアミノ酸（アスパラギン酸またはグルタミン酸）であり、一般に 5.5 Å の距離に存在する。

また、糖質加水分解酵素は、基質への作用点によりエキソ型とエンド型に大別される (Fig. 1-3(a))。糖質加水分解酵素は、基質を認識するためのサブサイトを有しており (Fig. 1-3(b))、基質の加水分解部位を基点として、非還元末端側の糖残基を認識する領域がマイナスサブサイト (順に、-1, -2, -3...)、還元末端側の糖ユニットを認識する領域がプラスサブサイト (順に、+1, +2, +3...) と定義されている。

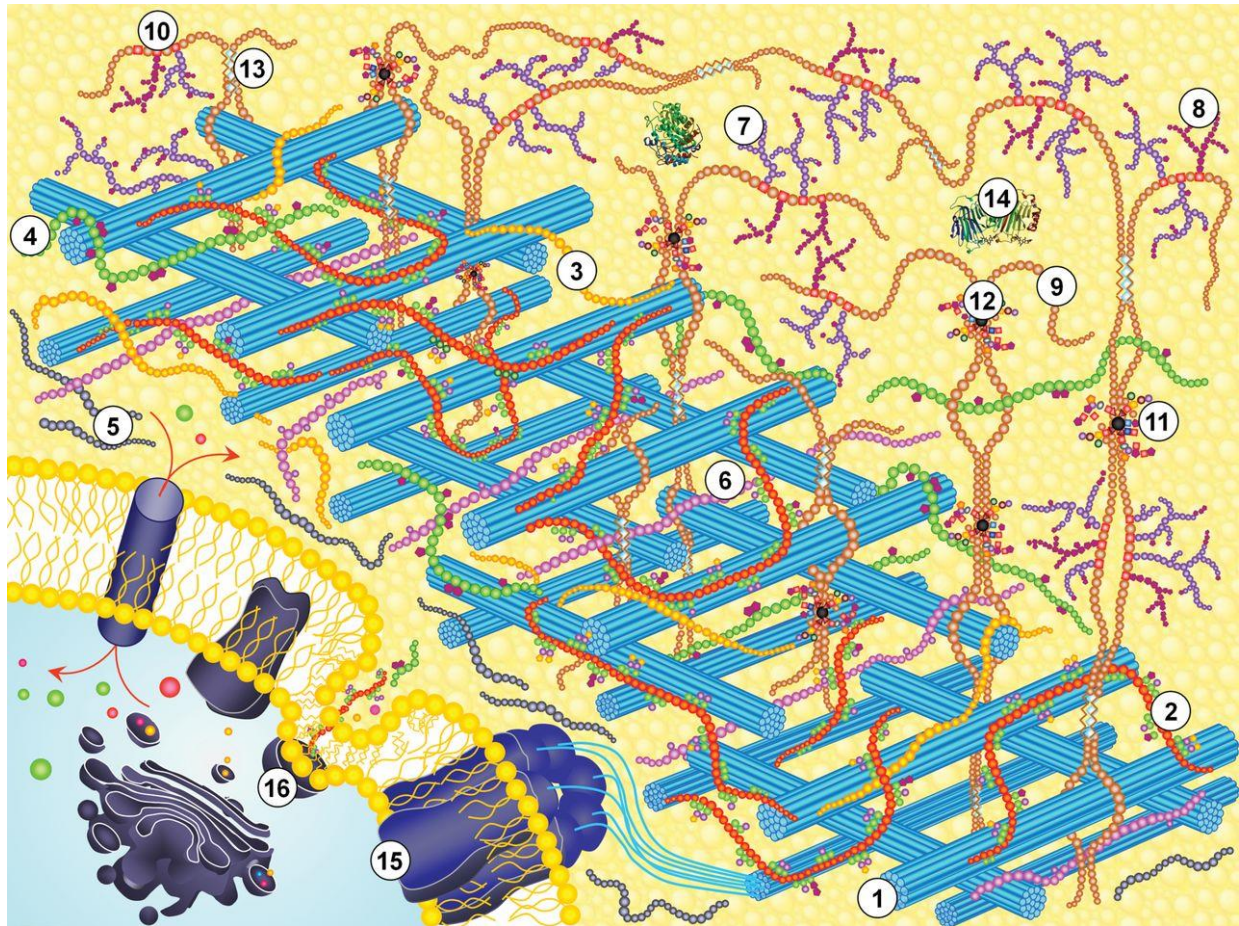
糖質加水分解酵素は、触媒ドメインにおける構造類似性、触媒残基、および触媒機構に基づき Clan に分類され、さらに、触媒ドメインのアミノ酸配列に基づき糖質加水分解酵素ファミリー (GH) に分類される。Clan GH-A は、触媒ドメインとして TIM バレル構造を有しており、触媒残基として 2 つのグルタミン酸残基を有しており、触媒機構としてアノマー保持型の反応を示す酵素のグループである (Carbohydrate Active Enzymes database; <http://www.cazy.org>)。β-D-ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23) は、Clan GH-A に属し、GH1、GH2、GH35、GH42 等に分類される。GH35 には、細菌類、菌類、動物、および植物由来の β-D-ガラクトシダーゼが属するが、植物由来のものについてはその立体構造は明らかにされていない (Fig. 1-3)。植物由来の β-D-ガラクトシダーゼは、細菌類や菌類、動物由来のものと比較してアミノ酸配列の相同性が非常に低い (<30%) ため、それらの酵素とは異なる構造や基質特異性を有すると考えられる。

植物では、β-D-ガラクトシダーゼは、果実成熟、ペクチン溶解性、細胞壁間隙率、細胞壁強度などの細胞壁の成長や発達に関与している (Minic and Jouanin, 2006; Goulao *et al.*, 2008)。トマトでは、果実の軟化に伴い果実細胞壁のペクチンのガラクトース含量が大きく減少することから (Gross, 1984)、β-D-ガラクトシダーゼが果実の軟化に関与する酵素として注目され、7 種のトマト β-D-ガラクトシ

ダーゼ (TBG) 遺伝子が単離された。TBG1~7は GH35に属しており、TBG間のアミノ酸配列相同性は33~79%である (Smith and Gross, 2000)。

各TBG遺伝子はトマト果実の生育および成熟過程において特有の発現パターンを示し、果実が急速に軟化する催色期には、*TBG1*、*TBG3*、および*TBG4*が特異的に発現している (Fig. 1-5: Smith and Gross, 2000)。しかしながら、*TBG1*の発現を抑制しても、トマト果実の硬度や細胞壁構成多糖に変化はみられず (Carey *et al.*, 2001)、また、*TBG3*の発現を抑制しても、トマト果実の硬度や細胞壁構成多糖に変化はみられなかった (de Silva and Verhoeyen, 1998)。ちなみに、*TBG6*の発現を抑制したトマトは、果実表面に‘cracking’がみられたことから、*TBG6*は果実の肥大に関与していることが示唆されている (Moctezuma *et al.*, 2003)。一方、*TBG4*の発現を抑制したトマトは、果実中のエキソ- β -1,4-D-ガラクタナーゼ活性と遊離ガラクトース量が低下し、対照と比較して約1.4倍の果実硬度を維持したことから、*TBG4*が果実の軟化に重要な役割を果たしていると考えられている (Smith *et al.*, 2002)。その後、*TBG4*は、TBGファミリーの中で唯一、 β -D-ガラクトシダーゼ/エキソ- β -1,4-D-ガラクタナーゼグループに属する酵素であり、 β -1,4結合に対して高い活性を示し、強いエキソ- β -1,4-D-ガラクタナーゼ活性を有していることが明らかとなった (Ishimaru *et al.*, 2009)。

トマト果実の生育および成熟過程における*TBG1*の機能を解明するためには、生体内における*TBG1*の標的を明らかにすることが重要である。また、トマト果実の軟化機構を解明するためには、*TBG4*の基質認識機構を明らかにすることが重要である。そのため、本研究は*TBG1*の基質特異性および*TBG4*の基質認識機構を解明することを目的とした。

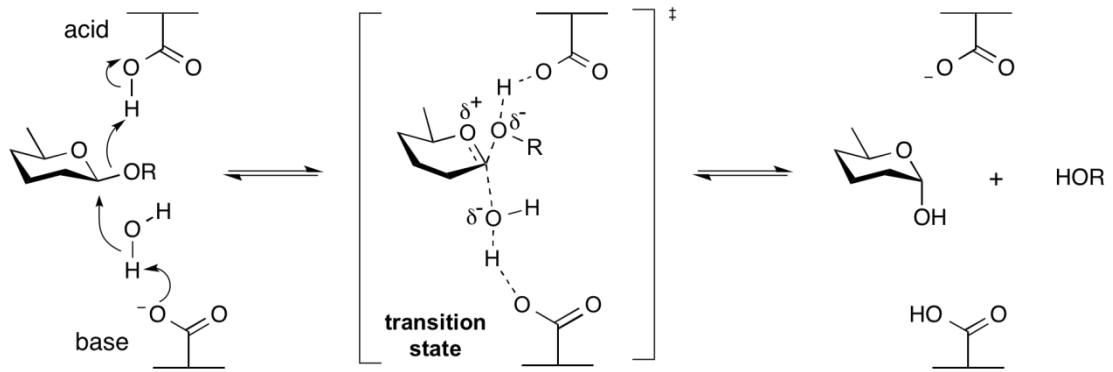


Franková and Fry, 2013

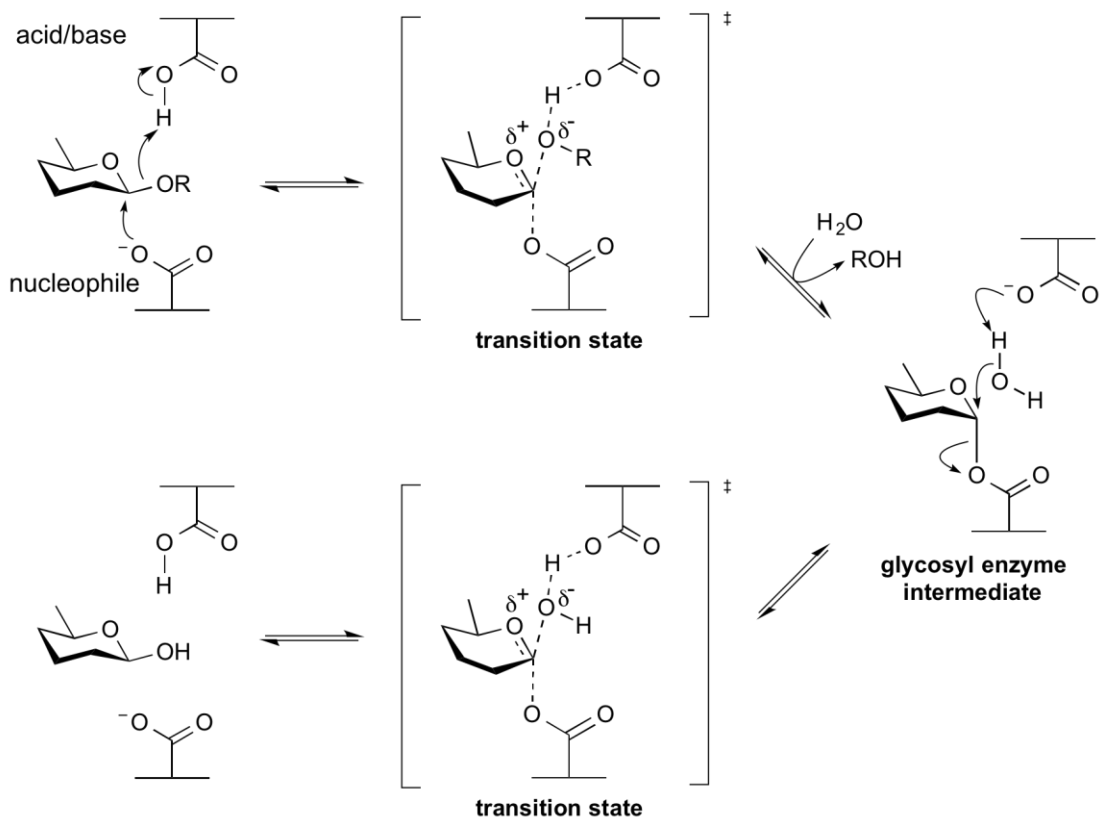
Fig. 1-1 Model of the polysaccharide framework in a plant cell wall, generalized for poalean and non-poalean walls.

1, Cellulose: cellulose microfibrils; 2–6, hemicelluloses: 2, xyloglucan; 3, mixed-linkage glucan; 4, xylan and related heteroxylans; 5, callose; 6, mannan and related heteromannans; 7–11, Pectins: 7, galactan; 8, arabinan; 9, homogalacturonan; 10, rhamnogalacturonan I; 11, rhamnogalacturonan II; 12, boron bridge; 13, ‘egg-box’ with calcium bridges; 14–16, Non-polysaccharide components: 14, enzymes and structural proteins; 15, cellulose synthase complex; 16, transport vesicles.

Inverting mechanism for a β -glycosidase:

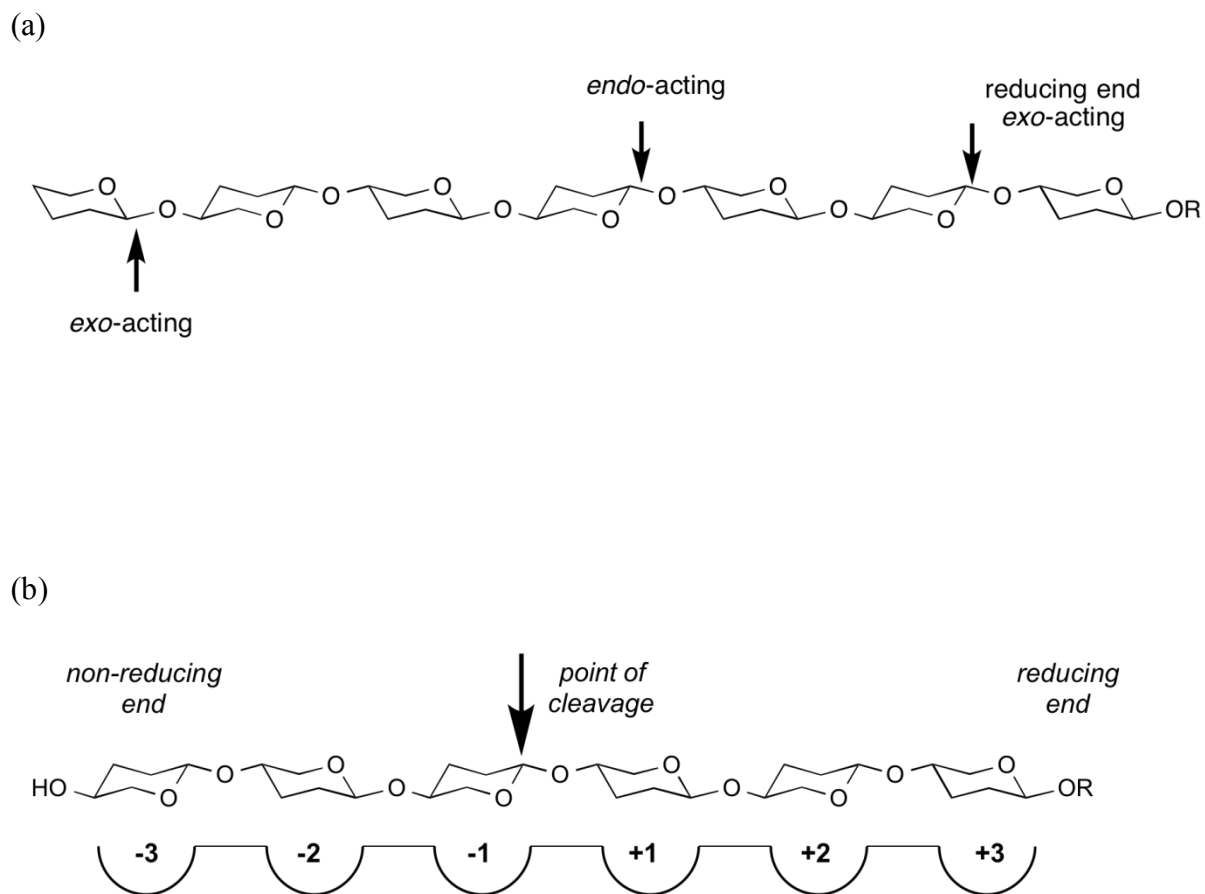


Retaining mechanism for a β -glycosidase:



<http://www.cazypedia.org>

Fig. 1-2 Reaction mechanisms of β -glycosidases



<http://www.cazypedia.org>

Fig. 1-3 (a) Modes of actions of glycoside hydrolases and

(b) subsite nomenclature in the active site

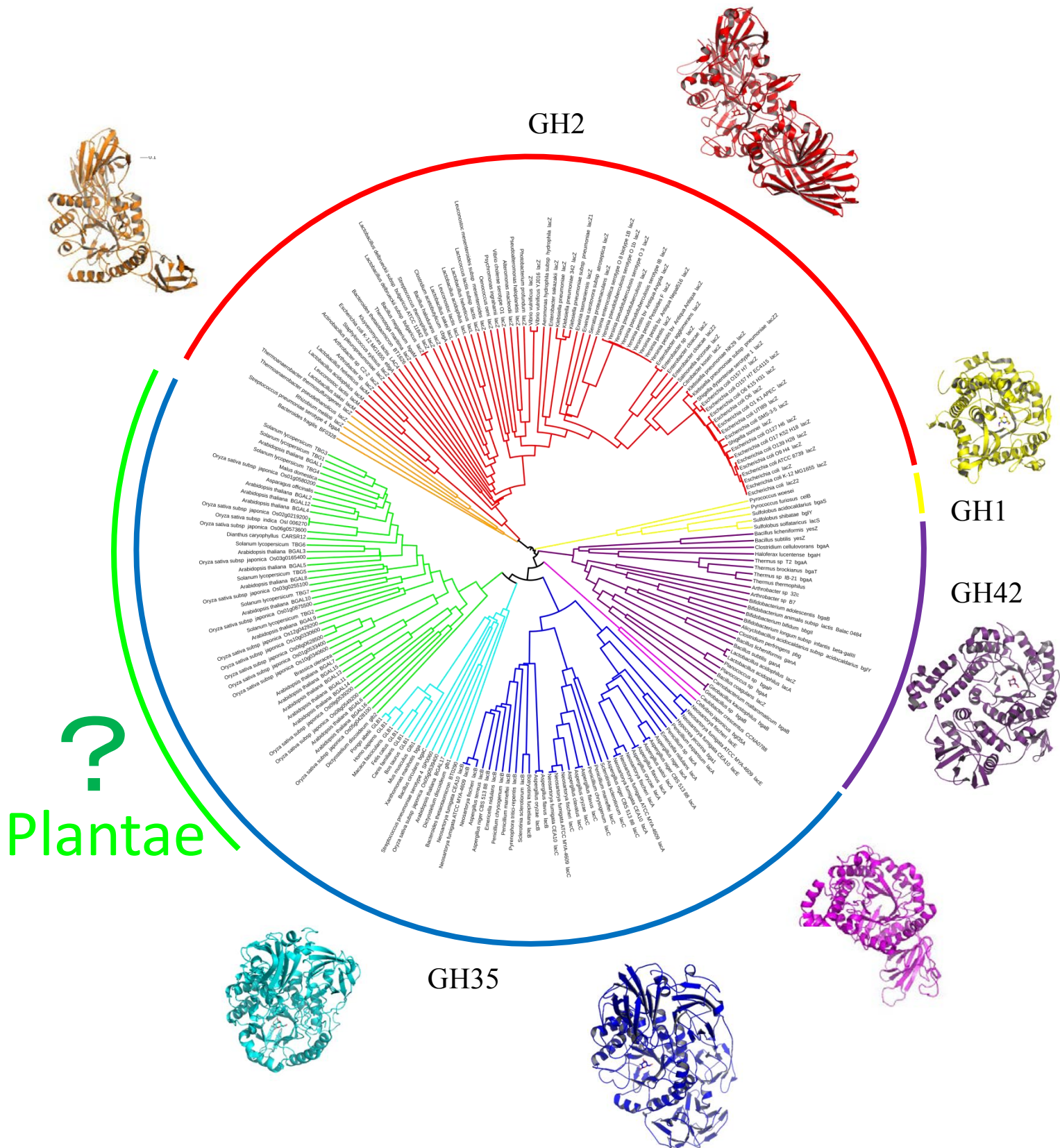
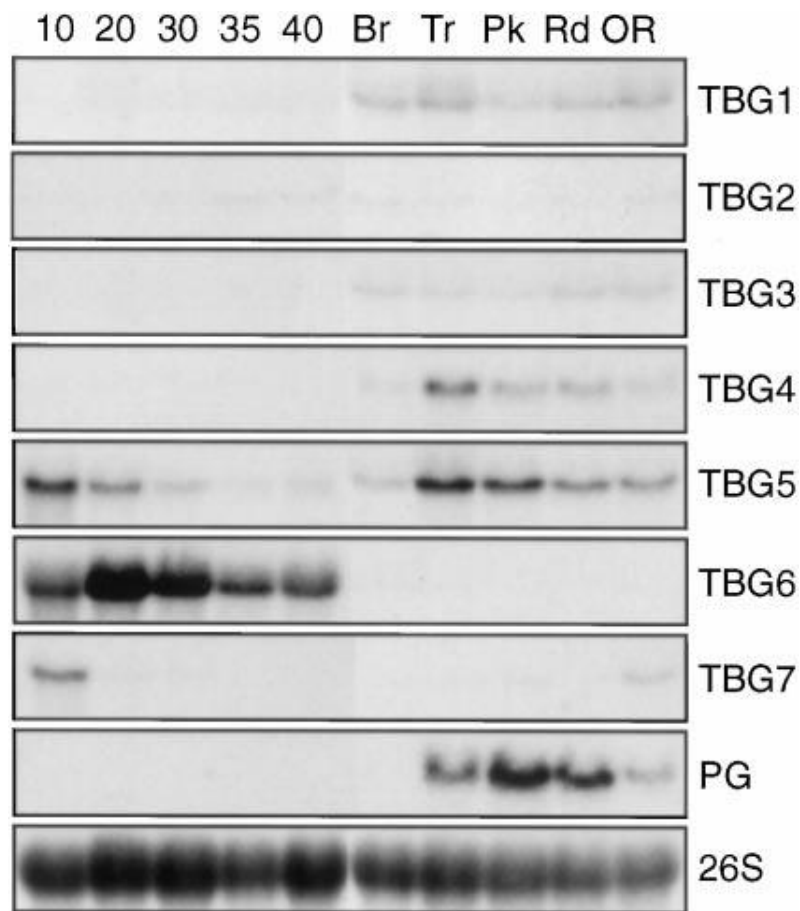


Fig. 1-4 A Phylogenetic tree of β -galactosidases.



Smith and Gross, 2000

Fig. 1-5 RNA gel-blot analysis of TBG temporal expression in fruit tissues.

Twenty micrograms of total RNA extracted from all fruit tissues except seeds was loaded in each lane. Fruit was harvested at 10, 20, 30, 35, and 40 days post-pollination and at the breaker (Br), turning (Tr), pink (Pk), red (Rd), and over-ripe (OR) stages. Blots were hybridized using the probes indicated to the right. PG was used as a fruit-ripening specific control. A 26S ribosomal gene clone was used as a loading control for each blot and one example is shown.

第一章 TBG1 の酵素特性および基質特異性

1. 序論

植物細胞壁を構成する多糖の内、 β -ガラクトンを含むものとしては、I型アラビノガラクトンおよびII型アラビノガラクトンが挙げられる (Fig. 2-1)。I型アラビノガラクトンは、ラムノガラクトン-Iの側鎖であり、 β -1,4-D-ガラクトンを主鎖とし、その一部のガラクトース残基のO3位にアラビノフラノース残基が結合している (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012)。一方、II型アラビノガラクトンは、アラビノガラクトンプロテインの糖鎖部分であり、 β -1,3-ガラクトンを主鎖とし、その一部のガラクトース残基のO6位に β -1,6-ガラクトンが結合した骨格を有し、さらに、その β -1,6-ガラクトンにアラビノフラノース、グルクロン酸、4-メチルグルクロン酸、フコースなどが結合している (Konishi *et al.*, 2008)。

トマト果実には、少なくとも7種の β -ガラクトシダーゼ遺伝子が存在している (Smith and Gross, 2000)。TBG4は、 β -1,4結合に対する活性が高く、強いエキソ- β -1,4-D-ガラクトナーゼ活性を有していることから (Ishimaru *et al.*, 2009)、I型アラビノガラクトンを標的にしていると考えられる。また、TBG5は、 β -1,6および β -1,3結合に対する活性が高いことから (Ishimaru *et al.*, 2009)、II型アラビノガラクトンを標的にしていると考えられる。一方、TBG1は、基質特異性が明らかにされておらず、その標的は不明である。

本章では、生体内におけるTBG1の標的を明らかにするため、TBG1組換えタンパク質の酵素特性および基質特異性を調べた。

2. 試薬および実験方法

2-1. TBG1 組換えタンパク質の産生および精製

TBG1 を導入した YEpFLAG-1 Expression Vector を用い、*Saccharomyces cerevisiae* を形質転換することにより、*TBG1* 組換えタンパク質を産生した。

YEpFLAG-1 Expression Vector は、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターによりクローニングサイトに導入した遺伝子の発現を制御するため、グルコースの欠乏により当該遺伝子の発現が誘導される。また、クローニングサイトの 5'末端側には α 因子シグナルペプチド配列および FLAG ペプチド配列が付加されていることから、産生されるタンパク質は N 末端に FLAG ペプチドが融合した形で細胞外に分泌される。

なお、*Saccharomyces cerevisiae* の形質転換体の選抜は、本ベクターのトリプトファン合成遺伝子を利用し、制限培地を用いて行うことができる。また、*Escherichia coli* の形質転換体の選抜は、本ベクターの ampicillin 耐性遺伝子を利用し、抗生物質である ampicillin を用いて行うことができる。

1) 発現ベクターの構築

クローニングした *TBG1* を鋳型に、*EcoRI* および *SalI* の制限酵素認識配列をそれぞれ 5'末端に付加したフォワードプライマーおよびリバースプライマーを用い、シグナルペプチド配列を除いた *TBG1* 断片をポリメラーゼ連鎖反応により増幅した。増幅した *TBG1* 断片を精製し、制限酵素 *EcoRI* および *SalI* を用いて YEpFLAG-1 Expression Vector に導入した。*TBG1* が導入された発現ベクターを用いて *Escherichia coli* DH5 α をヒートショック法により形質転換し、50 μ g/mL ampicillin を含む LB 寒天培地 (1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 1.0%

(w/v) NaCl, 1.5% (w/v) agar, pH 7.0) 上で 37°C 下において 16 時間培養した。得られたシングルコロニーを 50 µg/mL ampicillin を含む LB 液体培地 (1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 1.0% (w/v) NaCl, pH 7.0) で 37°C 下において 16 時間振盪培養し、アルカリ-SDS 法を用いて発現ベクターを抽出した。その後、DNA シークエンサーを用いて得られた発現ベクターの塩基配列を読み、*TBG1* が正しく導入されていることを確認した。

2) *Saccharomyces cerevisiae* の形質転換および *TBG1* 組換えタンパク質の産生

得られた発現ベクターを用いて、Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit (ZYMO RESEARCH) を使用して *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 株を形質転換し、SD^{-Trp} 寒天培地 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.192% yeast synthetic drop-out media supplement without tryptophan, 2% D-glucose, 2% agar) 上で 30°C 下において 5 日間培養した。得られた形質転換体を SD^{-Trp} 液体培地 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.192% yeast synthetic drop-out media supplement without tryptophan, 2% D-glucose) に植菌し、30°C 下において 1 日間振盪培養し、これを前培養液とした。YPHSM 液体培地 (1% yeast extract, 8% peptone, 3% glycerol, 1% D-glucose, 20mM CaCl₂) に対して前培養液を 5%量加え、30°C 下において 24 時間振盪培養後、20°C 下において 72 時間振盪培養した。

3) *TBG1* 組換えタンパク質の精製

培養液を 3000 x g で 10 分間遠心分離し、得られた上清をさらに 10000 x g で 30 分間遠心分離し、上清を回収して培養上清とした。Centriprep Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 membrane (Millipore) を用いて培養上清を濃縮し、次いで、

10 mM CaCl₂ および 150 mM NaCl を含む 50 mM

tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloride buffer (Tris-HCl) pH 7.4 へのバッファ交換を行い、粗酵素液を得た。

ANTI-FLAG M1 Agarose Affinity Gel (Sigma-Aldrich) をカラムに充填し、10 mM CaCl₂ および 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl pH 7.4 で平衡化した後、粗酵素液をカラムに供した。平衡化に用いたものと同じ溶液を 36 カラム量用いてカラムを洗浄した後、0.01% FLAG peptide および 150 mM NaCl を含む 10 mM Tris-HCl pH 7.4 を用いて TBG1 組換えタンパク質を溶出し、TBG1 組換えタンパク質を得た。

2-2. TBG1 組換えタンパク質の酵素特性の解析

酵素活性は、4-nitrophenyl- β -galactopyranoside (4NP- β -Gal) を基質として、pH 5.0、40°C 下において 1 分間に 1 μ mol の *p*-nitrophenol を遊離する酵素量を 1 U と定義した。

1) 至適 pH の測定

50 mM sodium acetate buffer (pH 2.0~8.0)、0.1% ウシ血清アルブミン、3.3 mM 4NP- β -Gal、および 0.01 U TBG1 組換えタンパク質を含む酵素反応溶液を 0.5 mL 調製し、40°C 下において 30 分間反応させた。0.2 M Na₂CO₃ を 1 mL 加えて反応を停止させた後、溶液の吸光度 (410 nm) を測定した。

2) pH 安定性の測定

0.01 U TBG1 組換えタンパク質を含む 10 mM sodium acetate buffer (pH 2.0~8.0) を 0.1 mL 調製し、4°C 下において 24 時間静置した。その後、終濃度 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0、0.1% ウシ血清アルブミン、3.3 mM 4NP- β -Gal となるようにそれぞれの試薬を添加して総量を 0.5 mL とし、40°C 下において 30 分間反応させた。0.2 M Na₂CO₃ を 1 mL 加えて反応を停止させた後、溶液の吸光度 (410 nm) を測定した。

3) 至適温度の測定

50 mM sodium acetate buffer pH 5.0、0.1% ウシ血清アルブミン、3.3 mM 4NP- β -Gal、および 0.01 U TBG1 組換えタンパク質を含む酵素反応溶液を 0.5 mL

調製し、0~80°C 下において 30 分間反応させた。0.2 M Na₂CO₃ を 1 mL 加えて反応を停止させた後、溶液の吸光度 (410 nm) を測定した。

4) K_m 値の測定

50 mM sodium acetate buffer pH 5.0、0.1% ウシ血清アルブミン、0.0625~8.0 mM 4NP- β -Gal、および 0.01 U TBG1 組換えタンパク質を含む酵素反応溶液を 0.5 mL 調製し、40°C 下において 30 分間反応させた。0.2 M Na₂CO₃ を 1 mL 加えて反応を停止させた後、溶液の吸光度 (410 nm) を測定した。その後、各基質濃度における反応速度に基づき、 K_m 値を算出した。

2-3. TBG1 組換えタンパク質の基質特異性の解析

1) TBG1 の基質特異性の解析

本解析は、Ishimaru *et al.*, 2009 記載の方法に準じて行った。概略を以下に示す。

基質として、 β -1,3-galactobiose, β -1,4-galactobiose, β -1,6-galactobiose, α -1,3-galactobiose, α -1,3-galactosyl β -1,4-galactobiose, lactose, lacto-N-tetraose, lacto-N-neotetraose を終濃度 0.5 mM で用い、lupin galactan, gum guar, gum arabic, locust bean gum, arabinogalactan を終濃度 0.2% で用いた。前記基質、50 mM sodium acetate buffer pH 5.0、0.1% ウシ血清アルブミン、および 0.01 U TBG1 組換えタンパク質を含む酵素反応溶液を 0.5 mL 調製し、40°C 下において 4 時間反応させた後、沸騰水浴中で 10 分間加熱して反応を停止させた。遊離したガラクトースは、アセチル化した後、ガスクロマトグラフィを用いて定量した。

2) APTS-labeled β -1,4-galactoheptaose に対する活性測定

本解析は、Ishimaru *et al.*, 2009 記載の方法に準じて行った。概略を以下に示す。

aminopyrene trisulfonate (APTS)-labeled β -1,4-galactoheptaose、ammonium acetate buffer pH 5.0、および TBG1 組換えタンパク質を含む酵素反応溶液を調製し、40°C 下において 27 時間反応させた後、沸騰水浴中で 10 分間加熱して反応を停止させた。反応生成物はキャピラリーゾーン電気泳動を用いて分析を行った。

3) methyl β -1,6-galactohexaoside に対する活性測定

本解析は、Kotake *et al.*, 2004 記載の方法に準じて行った。概略を以下に示す。

methyl β -1,6-galactohexaoside、sodium acetate buffer pH 5.0、および TBG1 組換えタンパク質を含む酵素反応溶液を調製し、40°C 下において 18 時間反応させた後、沸騰水浴中で 10 分間加熱して反応を停止させた。反応生成物は、4-aminobenzoic acid ethyl ester (ABEE) を用いて標識し、高速液体クロマトグラフィを用いて分析を行った。

2-4. トマト果実細胞壁分画物に対する TBG1 組換えタンパク質の活性測定

本解析は、Ishimaru *et al.*, 2009 記載の方法に準じて行った。概略を以下に示す。

開花後 10 日、20 日、40 日、催色期、過熟期のトマト果実から細胞壁を分離し、キレート可溶性ペクチン (CSP)、アルカリ可溶性ペクチン (ASP)、およびヘミセルロース (HF) に分画した。得られた 0.5% トマト果実細胞壁分画物、50 mM sodium acetate buffer pH 5.0、0.1% ウシ血清アルブミン、および 0.01 U TBG1 組換えタンパク質を含む酵素反応溶液を調製し、40°C 下において 4 時間反応させた後、沸騰水浴中で 10 分間加熱して反応を停止させた。遊離したガラクトースは、アセチル化した後、ガスクロマトグラフィを用いて定量した。

3. 結果および考察

TBG1 組換えタンパク質 (約 92 kDa) は、至適 pH が pH 5.0 であった (Fig. 2-2(a))。TBG1 の酵素活性は、pH が 5.5 より上がるにつれて緩やかに減少したのに対し、pH が 4.5 より下がるにつれて急激に低下した。TBG1 組換えタンパク質は pH 4.5~6.0 において安定であり、pH 6.5~8.0 では比較的安定であるのに対して、pH 4.0 以下では極めて不安定であった (Fig. 2-2(b))。このことから、pH 4.5 未満における酵素活性の急激な低下は、タンパク質の酸変性に起因するものと考えられる。また、TBG1 組換えタンパク質は、至適温度が 40~50°C であった (Fig. 2-3)。TBG1 の酵素活性は温度が 50°C より上昇するにつれて急激に低下したが、これはタンパク質の熱変性に起因するものと考えられる。

TBG1 組換えタンパク質の 4NP- β -Gal に対する K_m 値は 0.45 mM であった。TBG4 組換えタンパク質は 1.67 mM であり、TBG5 組換えタンパク質は 0.50 mM であることが報告されており (Ishimaru *et al.*, 2009)、TBG1 の 4NP- β -Gal に対する親和性は、TBG4 より高く、TBG5 と同程度であることが明らかとなった。

種々の基質を用いて TBG1 組換えタンパク質の基質特異性を調べた結果、TBG1 は β -1,3 および β -1,6 結合に対する活性を示し、 β -1,4 結合に対する活性は非常に低かった (Table 2-1)。TBG1 は lactose に対しては活性を示したが、lacto-N-tetraose および lacto-N-neotetraose に対しては活性を示さなかったことから、非還元末端のガラクトースが結合している糖残基についても認識していることが示唆された。また、TBG1 は、lupin galactan や tomato fruit ASP に対して活性を示したことから、エキソ- β -1,4-ガラクタナーゼ活性を有することが示唆され、arabinogalactan や gum arabic に対して活性を示したことから、エキソ- β -1,3/1,6-ガラクタナーゼ活性を有することが示唆された。TBG1 がエキソ- β -1,4-ガラクタナーゼ活性およびエキソ- β -1,3/1,6-ガラクタナーゼ活性を有するかどうか

かを検証するため、APTS-labeled β -(1,4)-galactoheptaose および methyl β -1,6-galactohexaoside に対する酵素活性をそれぞれ調べた。その結果、TBG1 は、APTS-labeled β -(1,4)-galactoheptaose からガラクトースを遊離しなかったことから (Fig. 2-4)、エキソ- β -1,4-ガラクタナーゼ活性は有していないことが確認された。一方、TBG1 は、methyl β -1,6-galactohexaoside からガラクトースを遊離したことから (Fig. 2-5)、少なくともエキソ- β -1,6-ガラクタナーゼ活性を有することが明らかとなった。なお、TBG1 を methyl β -1,6-galactohexaoside に作用させた際に、糖転移活性に由来すると考えられる ABEE 標識物が検出されたが (Fig. 2-5)、同定には至らなかった。これらのことから、TBG1 は II 型アラビノガラクトン等の β -1,3/1,6-D-ガラクトンを標的にしていると考えられる。

TBG1 のトマト果実細胞壁に対する活性を調べるため、様々な生育段階のトマト果実の細胞壁から分画したキレート可溶性ペクチン (CSP)、アルカリ可溶性ペクチン (ASP)、およびヘミセルロース画分 (HF) を基質に用いて酵素活性の測定を行った。その結果、TBG1 は、すべての生育段階の CSP、ASP、および HF からガラクトースを遊離したが、特に、開花後 10 日および 20 日の細胞壁分画物に対して高い活性を示した (Fig. 2-6)。TBG1 は、緑熟期 (開花後 10 日、20 日、および 40 日) においては HF からより多くのガラクトースを遊離し、催色期および過熟期においては ASP からより多くのガラクトースを遊離した。TBG1 は、その遺伝子の発現時期が催色期から過熟期であることから、主に ASP に含まれる多糖を標的としていると考えられる。なお、ペクチンに含まれるラムノガラクトツロナン- I は II 型アラビノガラクトンと共有結合していることが報告されており (Tan *et al.*, 2013)、ASP には II 型アラビノガラクトンが含まれていると考えられる。

以上のことから、TBG1 は、 β -1,3 および β -1,6 結合に対する活性が高い酵素であり、果実が急速に軟化する催色期における II 型アラビノガラクトサンの代謝に関与している可能性が示唆された。

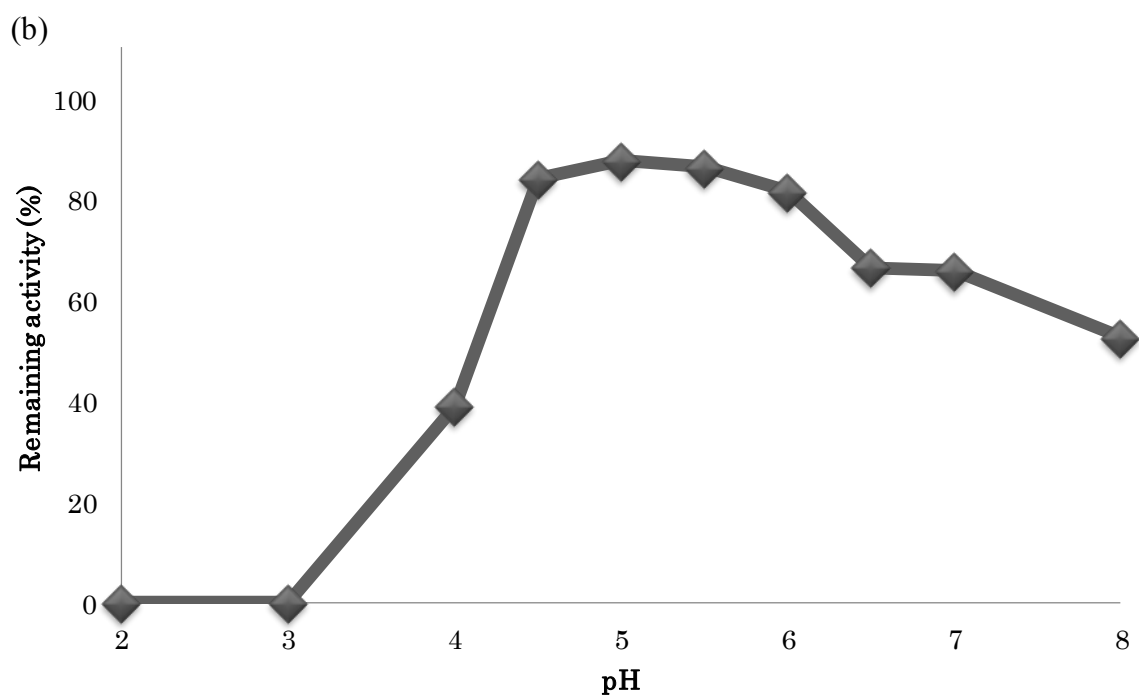
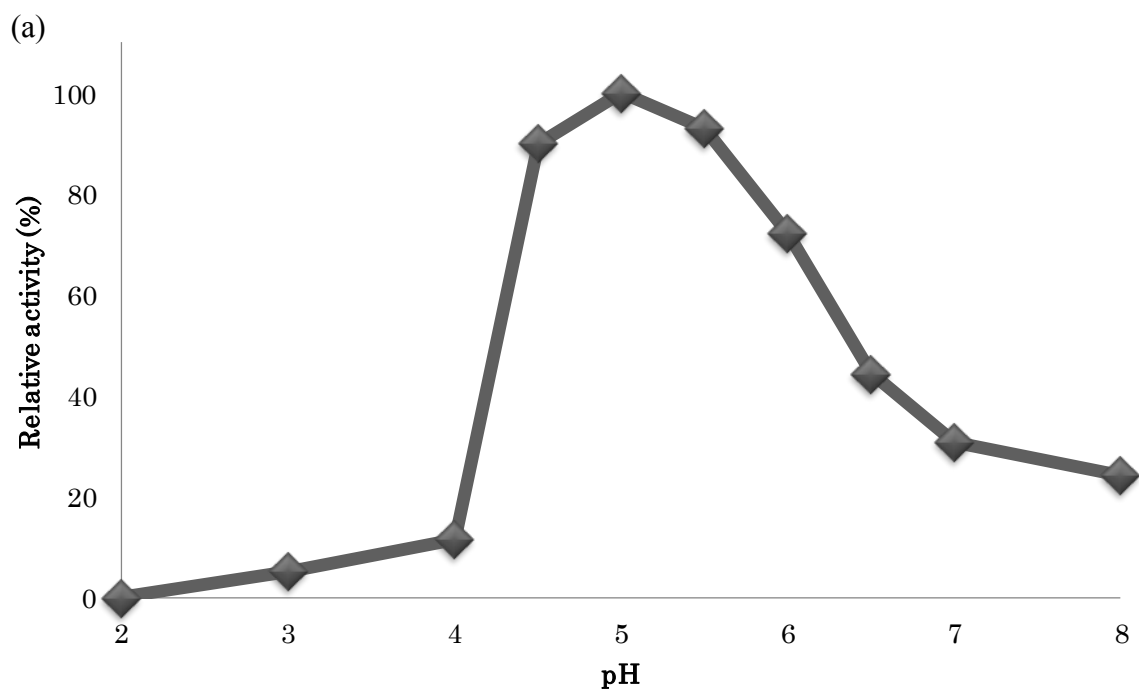


Fig. 2-2 (a) Optimum pH and (b) pH stability of TBG1 enzyme activity

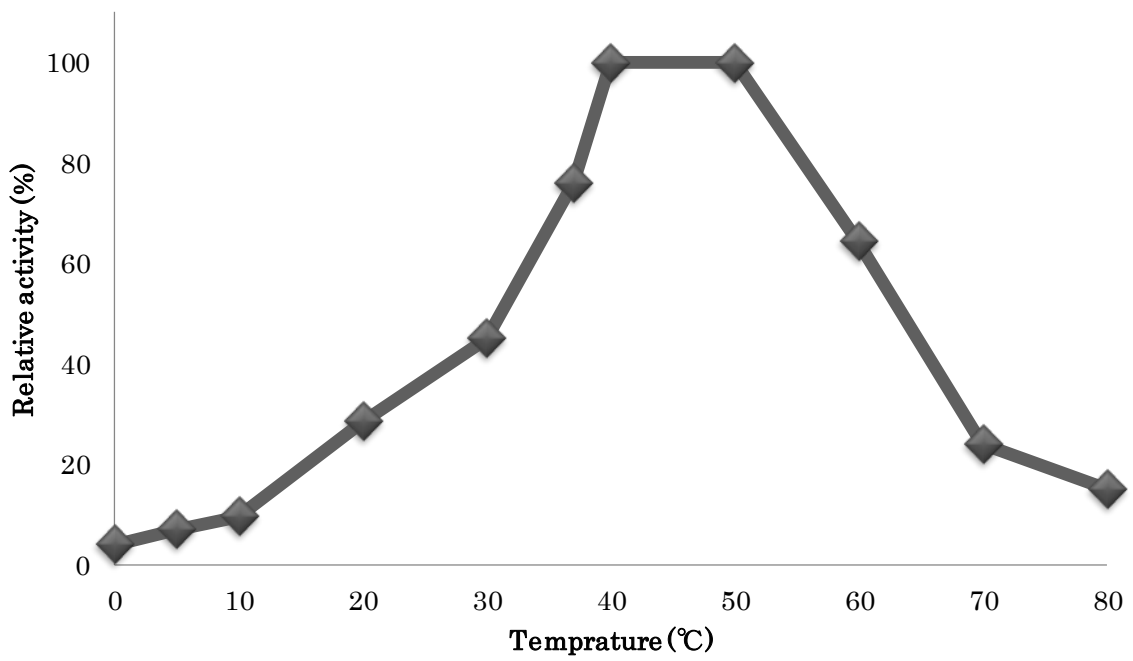


Fig. 2-3 Optimum temperature of TBG1 enzyme activity

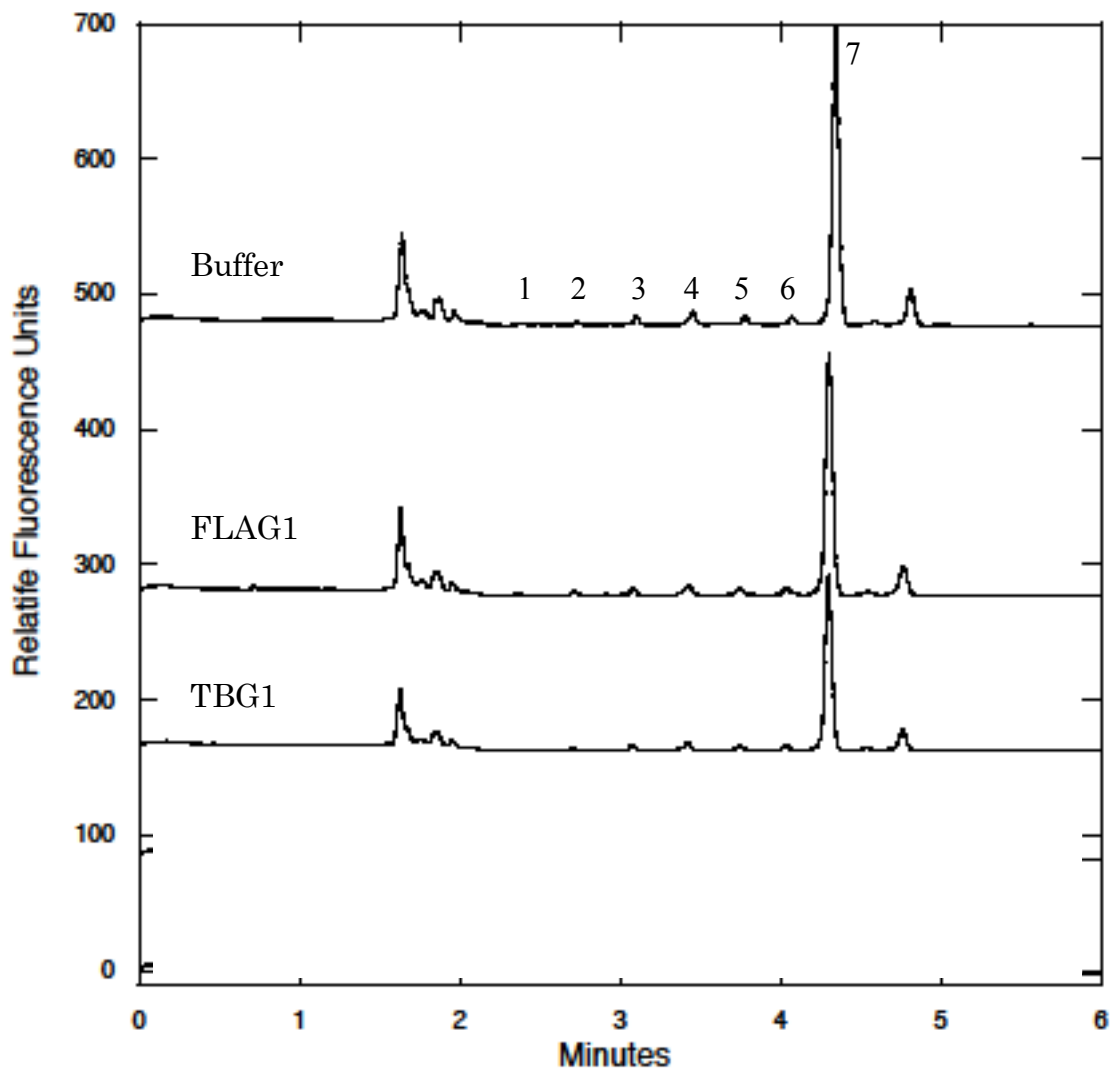


Fig 2-4 Electropherograms of the enzyme digestion products of a fluorescent labeled β -1,4-galactoheptaose incubated 27 h with TBG1, FLAG1 negative control and buffer alone. The numbers above the peaks indicate the number of galactose residues in an oligomer which would give rise to the peak after labeling

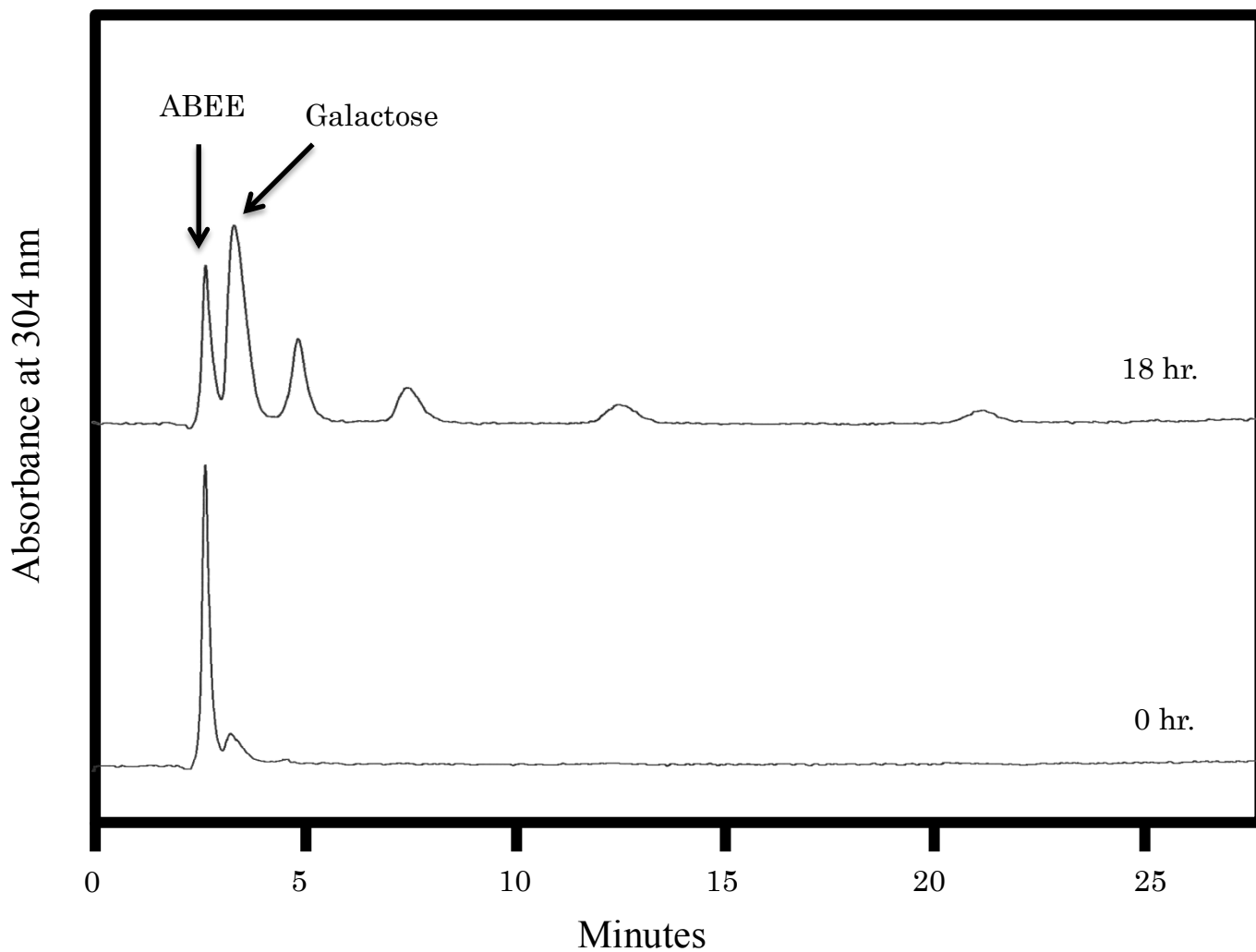


Fig. 2-5 The mode of action of the recombinant enzyme was examined using the methyl β -1,6-galactohexaoside as the substrates. Reducing sugars released from each substrate were derivatized with ABEE and analyzed by HPLC equipped with an Amide-80 column. Arrows indicate the elution positions of ABEE and ABEE-derivatized galactose.

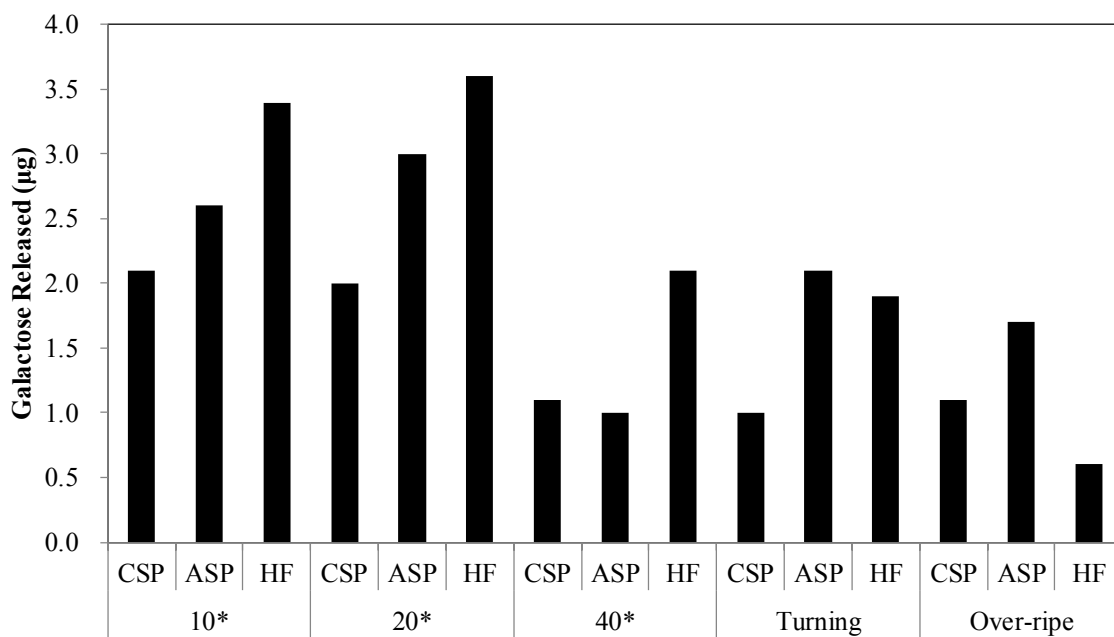


Fig. 2-6 Galactosyl residue hydrolysis by TBG1 recombinant protein from chelator soluble pectin (CSP), alkali soluble pectin (ASP) and hemicellulose (HF) fractions purified from tomato fruit cell walls. *10, 20 and 40 means days after pollination.

Table 2-1 Release of galactose by TBG1 recombinant protein and negative control (FLAG1) acting on a range of oligosaccharides and plant-derived polysaccharides

Compound	linkage position*	activity**	
		TBG1	FLAG
Gal- β -1,3-Gal	Gal- β -1,3	3.3	n.d.
Gal- β -1,4-Gal	Gal- β -1,4	tr.	n.d.
Gal- β -1,6-Gal	Gal- β -1,6	2.5	n.d.
Gal- α -1,3-Gal	Gal- α -1,3	n.d.	n.d.
Gal- α -1,3-Gal- β -1,4-Gal	Gal- α -1,3	n.d.	n.d.
Gal- β -1,4-Glc (lactose)	Gal- β -1,4	2.0	n.d.
Gal- β -1,3-GlcNAc- β -1,3-Gal- β -1,4-Glc (lacto-N-tetraose)	Gal- β -1,3	n.d.	n.d.
Gal- β -1,4-GlcNAc- β -1,3-Gal- β -1,4-Glc (lacto-N-neotetraose)	Gal- β -1,4	n.d.	n.d.
lupin galactan	Gal- β -1,4	1.4	n.d.
tomato fruit ASP	Gal- β -1,4	2.6	n.d.
arabinogalactan	Gal- β -1,3; Gal- β -1,6	tr.	n.d.
gum arabic	Gal- β -1,3; Gal- β -1,6	tr.	n.d.
gum guar	Gal- α -1,6; Man- β -1,4	n.d.	n.d.
locus bean gum	Gal- α -1,6; Man- β -1,4	n.d.	n.d.

* Terminal residue on aglycon

** μ g Gal released in 4 h; not detected (n.d.); trace (tr)

4. 要約

本章では、生体内における TBG1 の標的を明らかにするため、TBG1 組換えタンパク質の酵素特性および基質特異性を調べた。

まず、*TBG1* を導入した YEpFLAG1 Expression Vector を用いて *S. cerevisiae* BJ3505 株を形質転換し、TBG1 組換えタンパク質を産生した。TBG1 組換えタンパク質の至適 pH は pH 5.0 であり、至適温度は 40~50°C であった。また、TBG1 組換えタンパク質の 4NP- β -Gal に対する K_m 値は 0.45 mM であった。

TBG1 組換えタンパク質の基質特異性を調べた結果、TBG1 は、 β -1,4 結合に対する活性が極めて低かったのに対し、 β -1,3 および β -1,6 結合に対して高い活性を示した。また、TBG1 は、APTS-labeled β -(1,4)-galactoheptaose からはガラクトースを遊離しなかったが、methyl β -1,6-galactohexaoside からガラクトースを遊離した。これらのことから、TBG1 は II 型アラビノガラクトン等の β -1,3/1,6-D-ガラクトンを標的にしていると考えられた。

次に、生育段階の異なるトマト果実から分画した CSP、ASP、および HF に対する TBG1 組換えタンパク質の活性を測定した結果、TBG1 は、すべての生育段階の CSP、ASP、および HF からガラクトースを遊離したが、特に、開花後 10 日および 20 日の細胞壁分画物に対して高い活性を示した。TBG1 は、緑熟期（開花後 10 日、20 日、および 40 日）においては HF からより多くのガラクトースを遊離したが、催色期および過熟期においては ASP からより多くのガラクトースを遊離した。TBG1 は、その遺伝子の発現時期が催色期から過熟期であることから、主に ASP に含まれる多糖を標的としていると考えられた。

以上のことから、TBG1 は、 β -1,3 および β -1,6 結合に対する活性が高い酵素であり、果実が急速に軟化する催色期における II 型アラビノガラクトサンの代謝に関与していると考えられる。

第二章 TBG4 の産生、精製、および結晶化

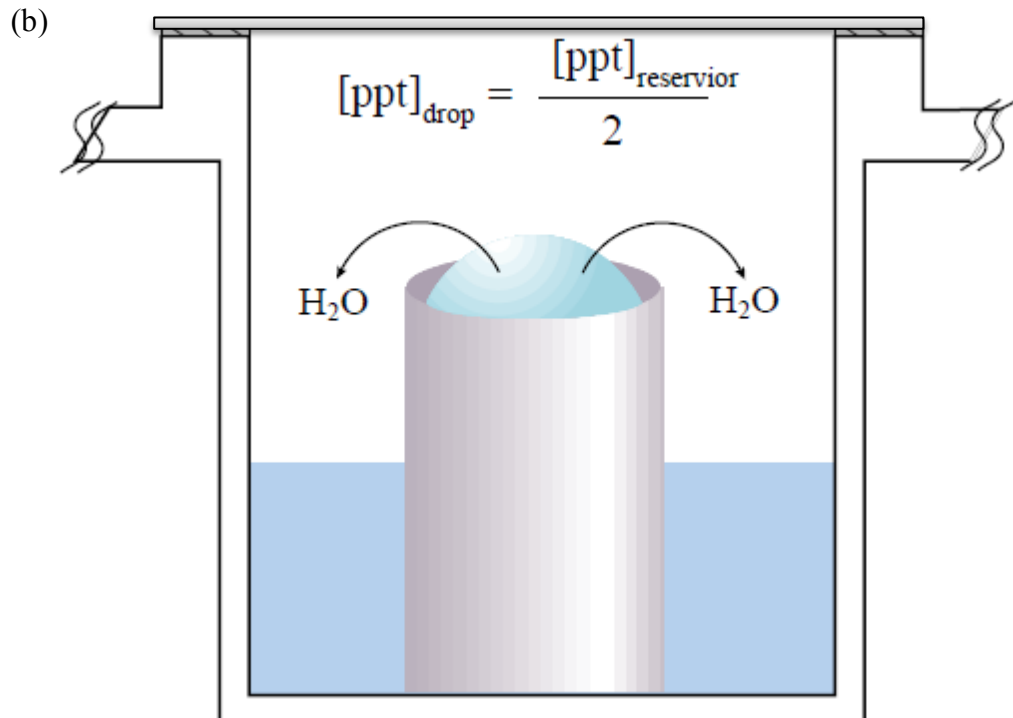
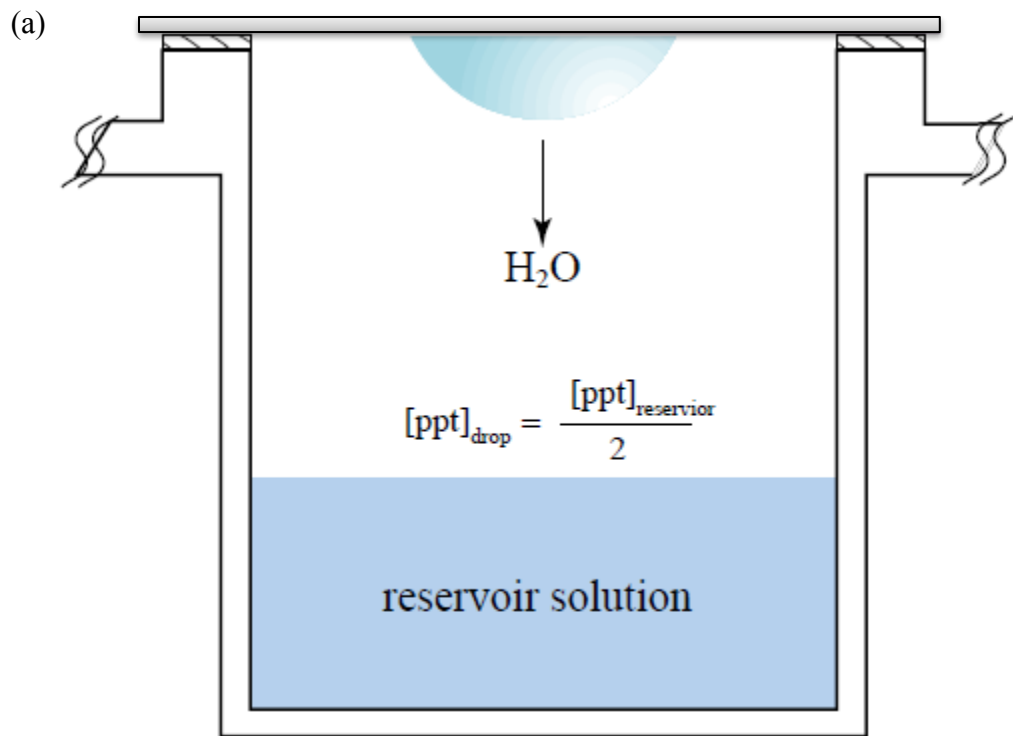
1. 序論

トマト果実の軟化に重要な役割を果たす TBG4 は、 β -1,4 結合に対する活性が高く、強いエキソ- β -1,4-D-ガラクタナーゼ活性を有している。トマト果実の軟化機構を解明するためには、TBG4 の基質認識機構を明らかにすることが重要であるが、酵素の機能を深く理解するためには、機能と密接に関係している立体構造を正確に知る必要がある。

タンパク質である酵素の立体構造を明らかにする手段の 1 つとして、X 線結晶構造解析が挙げられる。タンパク質はある特定の条件下において結晶化する。タンパク質の結晶化には、シッティングドロップ蒸気拡散法またはハンギングドロップ蒸気拡散法がよく用いられるが (Fig. 3-1)、沈殿剤の種類および濃度、緩衝剤の種類および濃度、タンパク質濃度、pH、温度、イオン強度、共存イオンの種類など、様々な条件が結晶化に影響を与える。タンパク質の等電点 pI 付近の pH の場合は沈殿剤として polyethylene glycol (PEG) が用いられることが多く、 pI から離れた pH の場合は沈殿剤として塩が用いられることが多いという傾向があるものの、あらゆる条件を検討することは実質的に不可能であるため、過去の結晶化成功例を基に調製されたスパースマトリックススクリーニングキットが結晶化条件探索に利用されている。

なお、タンパク質の結晶は各分子が分子間力、疎水性相互作用、およびクーロン力（双極子モーメントにより生じる弱いクーロン力を含む）によって規則正しく集合したものであり、結晶中のタンパク質分子の状態は溶液中と本質的に同等であると考えられている。

本章では、TBG4 の X 線結晶構造解析を行うため、TBG4 組換えタンパク質の産生、精製、および結晶化を行った。



<http://hamptonresearch.com>

Fig. 3-1 (a) The hanging-drop and (b) the sitting-drop vapor diffusion technique.

2. 試薬および実験方法

2-1. TBG4 組換えタンパク質の産生

TBG4 を導入した *Pichia* Expression Vector pPICZ α A を用い、*Pichia pastoris* を形質転換することにより、TBG4 組換えタンパク質を産生した。

Pichia Expression Vector pPICZ α A は、アルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーターによりクローニングサイトに導入した遺伝子の発現を制御することから、メタノールにより目的遺伝子の発現が誘導される。また、クローニングサイトの 5'末端側には α 因子シグナルペプチド配列が付加されており、その 3'末端側には 6xHis-tag 配列が付加されていることから、産生されるタンパク質は C 末端に 6xHis-tag が融合した形で細胞外に分泌される。

なお、*Pichia pastoris* および *Escherichia coli* の形質転換体の選抜は、本ベクターの Zeocin 耐性遺伝子を利用し、抗生物質である Zeocin を用いて行うことができる。

1) 発現ベクターの構築

クローニングした *TBG4* を鋳型に、*EcoRI* および *SacII* の制限酵素認識配列をそれぞれ 5'末端に付加したフォワードプライマーおよびリバースプライマーを用い、シグナルペプチド配列および停止コドンを除いた *TBG4* 断片をポリメラーゼ連鎖反応により増幅した。増幅した *TBG4* 断片を精製し、制限酵素 *EcoRI* および *SacII* を用いて *Pichia* Expression Vector pPICZ α A に導入した。*TBG4* が導入された発現ベクターを用いて *Escherichia coli* DH5 α をヒートショック法により形質転換し、25 μ g/mL Zeocin を含む low salt LB 寒天培地 (1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) NaCl, 1.5% (w/v) agar, pH 7.5) 上で 37°C 下において

16 時間培養した。得られたシングルコロニーを 25 µg/mL Zeocin を含む low salt LB 液体培地 (1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) NaCl, pH 7.5) で 37°C 下において 16 時間振盪培養し、アルカリ-SDS 法を用いて発現ベクターを抽出した。その後、DNA シークエンサーを用いて得られた発現ベクターの塩基配列を読み、*TBG4* が正しく導入されていることを確認した。

2) *Pichia pastoris* の形質転換および *TBG4* 発現株の選抜

制限酵素 *SacI* により直鎖化した発現ベクターを用いて、*Pichia pastoris* SMD1168H 株をエレクトロポレーション法により形質転換し、100 µg/mL Zeocin を含む YPDS 寒天培地 (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) D-glucose, 1 M D-sorbitol, 2% (w/v) agar) 上で 30°C 下において 5 日間培養した。得られた形質転換体を MMYC+X-gal 寒天培地 (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) casamino acids, 1.34% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 1% (v/v) methanol, 4×10^{-5} % (w/v) D-biotin, 0.2 M D-sorbitol, 2% (w/v) agar, 50 µg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) 上で 20°C 下において 5 日間培養した。培養中は 24 時間毎に 100 mL のメタノールを寒天培地上に均一に添加した。その後、青く呈色した形質転換体を *TBG4* 発現株として選抜した。

3) *TBG4* 組換えタンパク質の産生

TBG4 発現株を YPG 液体培地 (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 1% (w/v) glycerol) で 30°C 下において 1 日間振盪培養し、これを前培養液とした。前培養液を 1500 x g で 5 分間遠心分離し、菌体を回収した。回収した菌体を 600 nm の吸光度が 1.0 となるように BMMYC 液体培地 (1% (w/v) yeast extract, 2%

(w/v) peptone, 2% (w/v) casamino acids, 1.34% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 1% (v/v) methanol, 4×10^{-5} % (w/v) D-biotin, 0.2 M D-sorbitol, 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.0) に懸濁し、30°C 下において 24 時間振盪培養後、20°C 下において 72 時間振盪培養した。培養中は 24 時間毎に培養液に 1% (v/v) 量のメタノールを添加した。

2-2. TBG4 組換えタンパク質の精製

1) 硫酸分画

培養液を 3000 x g で 10 分間遠心分離し、得られた上清をさらに 10000 x g で 30 分間遠心分離し、上清を回収して培養上清とした。培養上清に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 70%飽和になるように添加して完溶させた後、3 時間静置した。これを 10000 x g で 1 時間遠心分離し、沈殿を回収した。その後、培養上清の 2.5% (v/v) 量の 20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 40 mM imidazole, pH 8.0 を加えて沈殿を溶解した。これを 10000 x g で 10 分間遠心分離し、上清を回収して硫酸沈殿画分とした。

2) 固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィ (IMAC)

Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) をカラムに充填し、20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 40 mM imidazole, pH 8.0 で平衡化した後、硫酸沈殿画分をカラムに供した。平衡化に用いたものと同じ溶液を 10 カラム量用いてカラムを洗浄後、50 mM sodium acetate buffer pH 4.5, 500 mM NaCl を用いて TBG4 組換えタンパク質を溶出し、IMAC 画分とした。

3) 修飾糖鎖および 6xHis-tag の除去

Endoglycosidase H from *Streptomyces plicatus* (New England Biolabs, P0702L)、Endoglycosidase F1 from *Elizabethkingia miricola* (Sigma-Aldrich, E9762) および α -mannosidase from *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich, M7257) から選ばれる酵素をそれぞれ IMAC 画分に添加し、20°C 下において 3 日間静置した。その際、Endoglycosidase H または Endoglycosidase F1 を添加したものについては、予め溶

液の pH を 1 M sodium acetate を用いて pH 5.0 に調整した。反応後、溶液の pH を 1 M tris(hydroxymethyl)aminomethane を用いて pH 7.0 に調整して Carboxypeptidase A from bovine pancreas (Sigma-Aldrich, C9268) を添加し、20°C 下において 1 日間静置した。その後、溶液の pH を 1 M acetic acid を用いて pH 4.5 に調整し、これを脱糖鎖処理液とした。

4) サイズ排除クロマトグラフィ (SEC)

10 mM sodium acetate buffer pH 4.5, 0.2 M L-arginine hydrochloride で平衡化した Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) に Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 membrane (Millipore) を用いて濃縮した脱糖鎖処理液を供した。平衡化に用いたものと同じ溶液を用いて TBG4 組換えタンパク質を溶出し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) において単一バンドを示す画分を回収し、これを SEC 画分とした。

2-3. TBG4 組換えタンパク質の結晶化

1) TBG4 の濃縮

Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane (Millipore) を用いて、SEC 画分をタンパク質濃度 8%まで濃縮し、これを結晶化に使用する TBG4 溶液とした。タンパク質濃度は紫外吸収法 (TBG4 濃度 0.1%、光路長 10 mm : $A_{280\text{nm}}=2.24$) を用いて定量を行った。

2) TBG4 の結晶化

タンパク質の結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法を用いて行った。結晶化条件探索には、沈殿剤として Crystal Screen HT (Hampton Research) を用い、96 ウェル結晶化用プレート (Hampton Research) の各ウェルにおいて、TBG4 溶液 0.5 μL と沈殿剤 0.5 μL を混合し、4°C 下において 1 ヶ月間静置した。また、X 線回折測定に用いた結晶の調製には、沈殿剤として 0.1 M

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid-sodium hydroxide buffer

(HEPES-NaOH) pH 7.0, 20% (w/v) PEG 10000 を用い、24 ウェル結晶化用プレート (Hampton Research) の各ウェルにおいて、TBG4 溶液 2 μL と沈殿剤 2 μL を混合し、4°C 下において約 3 ヶ月間静置した。

3. 結果および考察

TBG4 を導入した Pichia Expression Vector pPICZαA を用いて *P. pastoris* SMD1168H 株を形質転換した後、TBG4 発現株の選抜を行った。得られた TBG4 発現株をメタノール存在下で培養し、TBG4 組換えタンパク質を得た。硫酸分画および Ni Sepharose 6 Fast Flow を用いて TBG4 組換えタンパク質を精製し、SDS-PAGE を行った結果、TBG4 組換えタンパク質のバンドに加え、高分子がスミア状に確認された (Fig. 3-1)。なお、TBG4 組換えタンパク質は、C 末端にリンカーペプチドおよび 6xHis-tag が付加されているため、その分子量は約 82 kDa である。

TBG4 には、*N*-結合型糖鎖修飾部位が 2 箇所存在することがアミノ酸配列から予測されている。*N*-結合型糖鎖は、タンパク質のシークオン配列「アスパラギン-プロリン以外のアミノ酸-セリン/トレオニン」におけるアスパラギン残基の側鎖のアミド基に、マンノース 3 残基とキトビオースを含む母核構造の還元末端に位置する *N*-アセチルグルコサミンが β -(1-*N*) 結合している。*N*-結合型糖鎖は、母核ユニットの非還元末端に結合している糖の種類により、複合型、混成型、高マンノース型の 3 種類に分類される。*P. pastoris* は高マンノース型の *N*-結合型糖鎖修飾を行うことが知られているため、TBG4 組換えタンパク質は幅広い分子量の高マンノース型 *N*-結合型糖鎖が修飾されていることが示唆された。

TBG4 組換えタンパク質に結合した糖鎖を切断して均一にするため、Endoglycosidase H、Endoglycosidase F1、および α -mannosidase の 3 種のハイマンノース型 *N*-結合型糖鎖切断酵素を検討した。その結果、 α -mannosidase を用いることにより、分子量の大きな糖鎖は除去されないものの、一部の糖鎖が均一に除去されたため (Fig. 3-2)、以後の実験には α -mannosidase を単独で処理したもの

を用いた。その後、TBG4 組換えタンパク質の C 末端に付加されている 6xHis-tag を Carboxypeptidase A を用いて除去した。

次いで、修飾された糖鎖が小さく均一な TBG4 組換えタンパク質を単離するため、Superdex 200 10/300 GL を用いて精製を行い、SDS-PAGE において単一バンドを示す画分を回収した (Fig. 3-3)。なお、TBG4 組換えタンパク質は、SEC における保持時間から溶液中で単量体として存在することが示唆された。また、TBG4 組換えタンパク質は、等電点電気泳動において、pH 勾配が 3~9 のゲルの負電極まで泳動したため、その pI は 9 以上であることが明らかとなった (Fig. 3-4)。

TBG4 組換えタンパク質の結晶化を試みた結果、0.1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 20% (w/v) PEG 10000 の条件下において板状結晶が得られた。この条件に基づき、pH 7.0~8.0 の 0.1 M HEPES-NaOH および濃度 12~22% (w/v) の PEG 10000 を組み合わせた種々の沈殿剤を用いて結晶化条件の最適化を試みた結果、初期スクリーニングで得られた条件と同一の条件下において、約 0.6 mm×約 0.3 mm×約 0.1 mm の大きさの結晶が得ることに成功した (Fig. 3-5)。

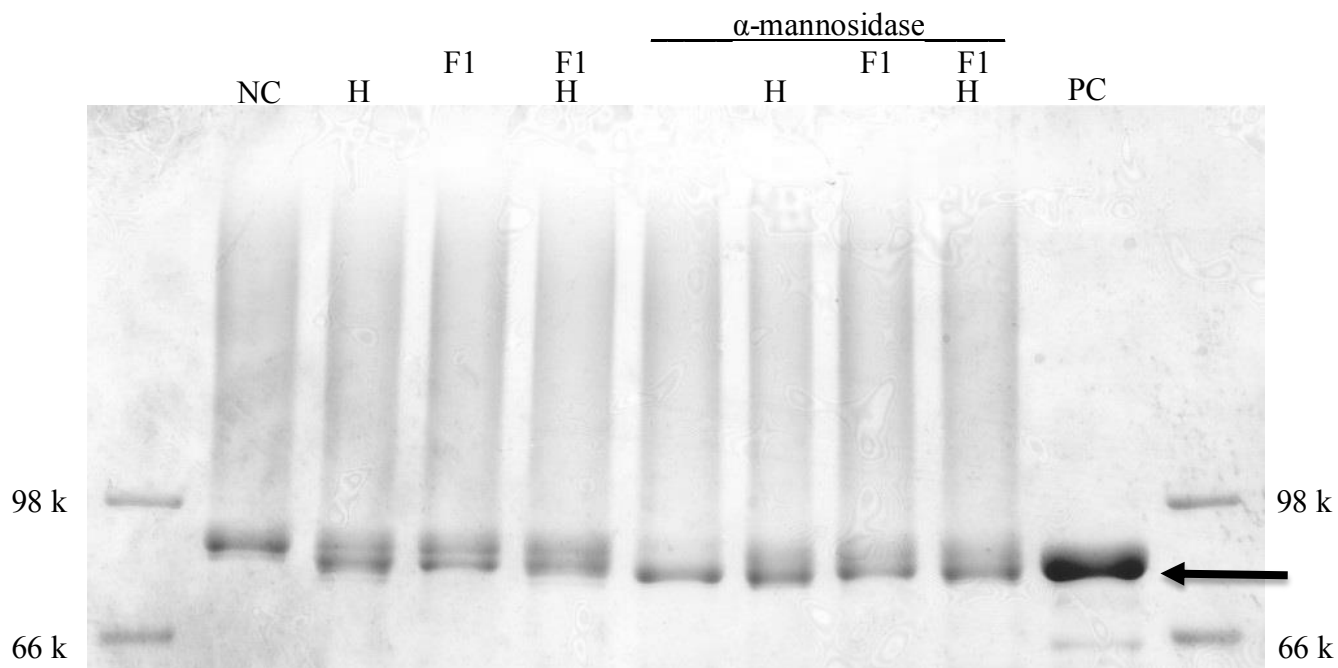


Fig. 3-2 Deglycosylation analysis by SDS-PAGE.

Deglycosylated TBG4 is indicated by the arrow.

NC: TBG4 eluted from Ni Sepharose 6 Fast Flow

H: TBG4 treated with Endoglycosidase H

F1: TBG4 treated with Endoglycosidase F1

α : TBG4 treated with α -mannosidase

PC: Pre-denatured TBG4 treated with Endoglycosidase H

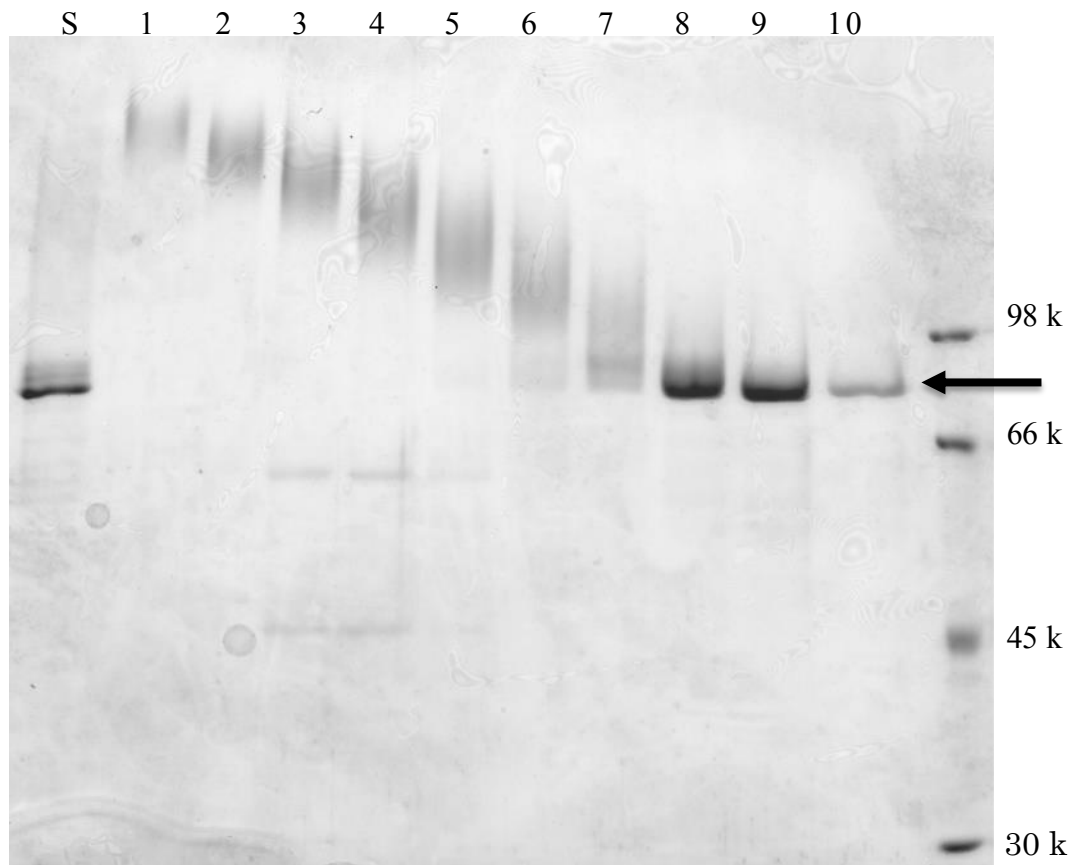


Fig. 3-3 SDS-PAGE analysis of TBG4 purified by size exclusion chromatography.

Deglycosylated TBG4 is indicated by the arrow.

S: TBG4 treated with α -mannosidase and Carboxypeptidase A

1-10: Elution fractions of Superdex 200 10/300 GL

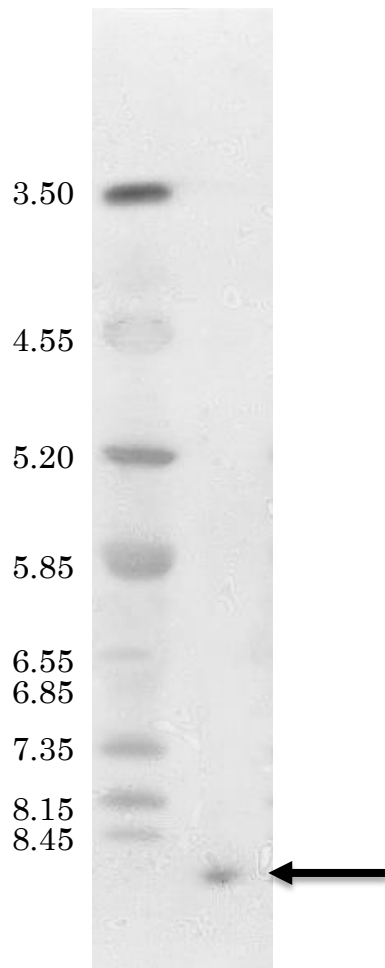


Fig. 3-4 Isoelectric focusing analysis of TBG4.

TBG4 is indicated by the arrow.

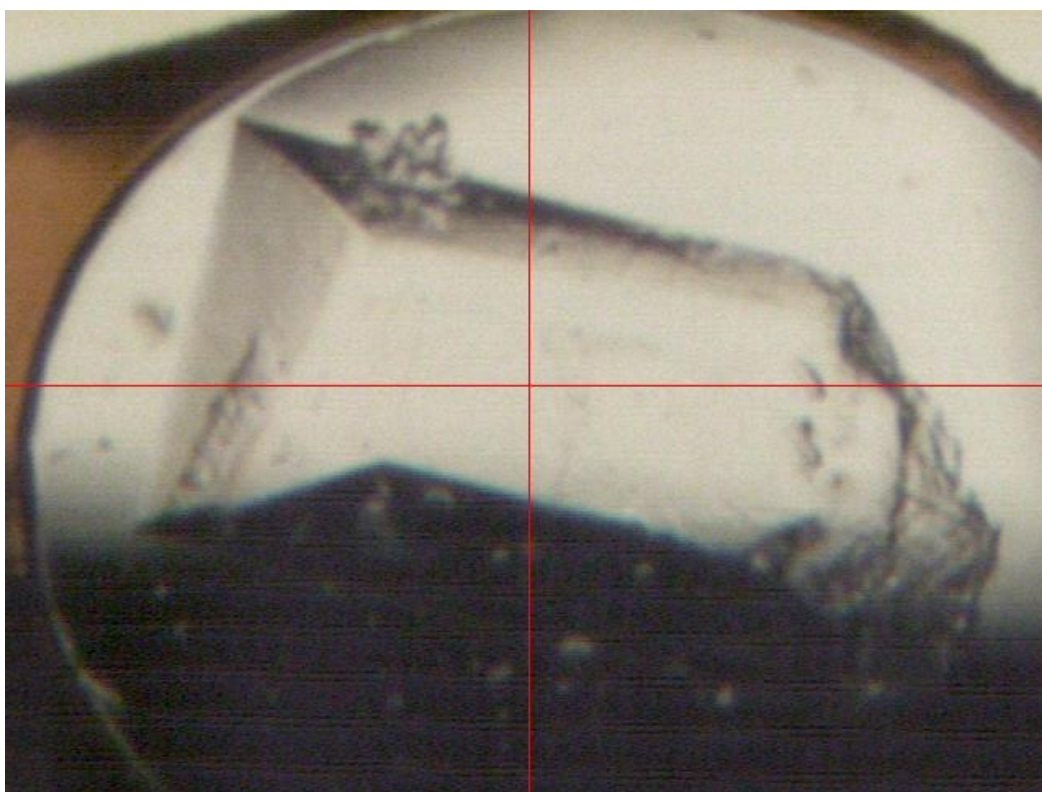


Fig. 3-5 A single crystal of TBG4 (approx. 0.6 x 0.3 x 0.1 mm).

4. 要約

本章では、X線結晶構造解析を行うため、TBG4組換えタンパク質の産生、精製、および結晶化を行った。

TBG4を導入した Pichia Expression Vector pPICZαA を用いて *P. pastoris* SMD1168H 株を形質転換し、TBG4組換えタンパク質を産生した。得られた TBG4組換えタンパク質には幅広い分子量の高マンノース型 N-結合型糖鎖が修飾していたため、修飾した糖鎖の除去を検討した結果、α-mannosidase を用いることにより、TBG4組換えタンパク質に結合した糖鎖の一部を均一に除去することに成功した。その後、修飾糖鎖が均一な TBG4組換えタンパク質の精製を行った。

TBG4組換えタンパク質の結晶化を試みた結果、0.1 M HEPES-NaOH pH 7.5, 20% (w/v) PEG 10000 の条件下において板状結晶が得られた。この条件を基に、種々の pH の 0.1 M HEPES-NaOH および種々の濃度の PEG 10000 を組み合わせた種々の沈殿剤を用いて結晶化条件の最適化を試みた結果、初期スクリーニングで得られた条件と同一の条件下において、約 0.6 mm × 約 0.3 mm × 約 0.1 mm の大きさの結晶を得ることに成功した。

第三章 TBG4 の X 線結晶構造解析

1. 序論

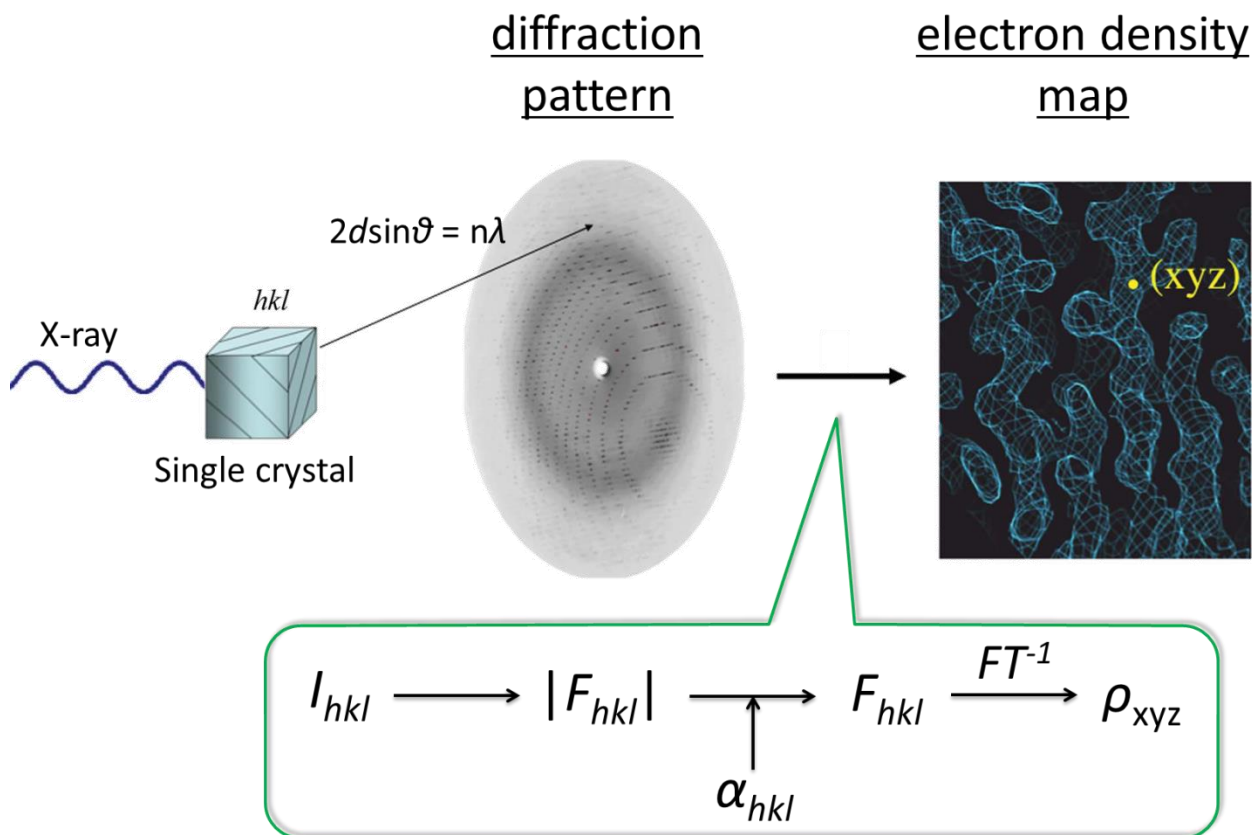
X 線結晶構造解析は、結晶に X 線を照射し、回折した X 線の強度を測定し、その強度から結晶構造因子の絶対値を算出し、そこに位相情報を加えることにより得られる結晶構造因子を逆フーリエ変換することにより、結晶中の電子密度分布を求める方法である (Fig. 3-1)。結晶構造因子の絶対値は回折 X 線の強度から求めることができるが、その位相情報は回折 X 線の強度を測定する過程で失われているため、何らかの方法で位相を決定する必要がある。X 線結晶構造解析の原理については、例えば、McCoy and Read, 2010 や Taylor, 2010 などに解説されている。初期位相を求める方法としては、分子置換法 (MR) や同型置換法、異常分散法などがあり、類似構造が既知の場合は MR を用いて位相を求めることができる。一方、類似構造が存在しない場合は、共結晶法や浸漬法により重原子を導入したタンパク質結晶を利用する重原子同型置換法、または、セレノメチオニン導入したタンパク質結晶を利用する異常分散法などを用いて、位相を決定する必要がある。

近年、X 線発生装置や検出器、試料マウント器具などの進歩、さらにはヘリウムガス吹付装置やヘリウムチャンバーなどの導入により、タンパク質に本来含まれるメチオニンおよびシステインの硫黄原子を利用した単波長異常分散法 (native-SAD) を用いた位相の決定が実用的に利用されるようになった (Liu *et al.*, 2012; Ru *et al.*, 2012)。native-SAD は、X 線回折データの位相を重原子誘導体の結晶を用いることなく決定できるという点で、従来の方法と比較して非常に優れた方法である。本手法は、その理論上、硫黄原子の含有率が極度に低いタンパク質への適応が非常に困難であるが、bijvoet diffraction ratio “ $\langle |\Delta F_{\pm h}| \rangle / \langle |F| \rangle$ ” が

0.53%と極めて小さい X 線回折データが本手法により解析された例がある (Ramagopal, 2003)。

GH35 には、細菌類や菌類、動物、植物由来の β -D-ガラクトシダーゼが分類されている。細菌類由来の酵素としては、*Bacillus circulans* (BcBGAL, Henze *et al.*, 2014), *Bacteroides thetaiotaomicron* (BtBGAL; unpublished, PDB ID: 3D3A), *Caulobacter crescentus* (CcBGAL; unpublished, PDB ID: 3U7V), *Cellvibrio japonicus* (CjBGAL, Larsbrink *et al.*, 2014), *Streptococcus pneumonia* (SpBGAL; Cheng *et al.*, 2012) の構造が報告されており、菌類由来の酵素としては、*Aspergillus oryzae* (AoBGAL; Maksimainen *et al.*, 2013), *Hypocrea jecorina* (HjBGAL, Maksimainen *et al.*, 2010), *Penicillium sp.* (PspBGAL; Rojas *et al.*, 2004) の構造が報告されている。また、動物由来の酵素としては、*Homo sapiens* (HsBGAL; Ohto *et al.*, 2012) の構造が報告されている。しかしながら、GH35 に属する植物由来の酵素については、その立体構造は明らかにされていない。

本章では、TBG4 の基質認識機構を解明するため、TBG4 組換えタンパク質の結晶の X 線結晶構造解析を行った。



Taylor, 2010

Fig. 4-1 Outline of X-ray crystallography. The specific directions determined by Bragg's law ($2d\sin\theta=n\lambda$; d is the spacing between diffracting planes, θ is the incident angle, n is any integer, and λ is the wavelength of the beam.) appear as spots on the diffraction pattern called reflections. The intensity (I) of each diffraction 'spot' is recorded, and this intensity is proportional to the square of the structure factor amplitude ($|F|$). The structure factor (F), a complex number containing information relating to both the amplitude and phase (α) of a wave, is converted into a three-dimensional model of the electron density (ρ) using the mathematical technique of the inverse Fourier transform (FT^{-1}).

2. 試薬および実験方法

2-1. X線回折測定

X線回折測定は、高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光科学研究施設のビームライン PF-BL17A において行った。TBG4 組換えタンパク質の結晶は、測定の直前に 25% PEG 400 を含む沈殿剤溶液に数秒間浸漬し、90 K の窒素気流下において X線回折測定を行った。

まず、波長 0.98 Å の X線を用いて測定を行った。カメラ長 219.25 mm、振動角 0.5°に設定し、180°の範囲にわたり計 360 枚のデータを収集した。得られた X線回折データは *HKL2000* (Otwinowski and Minor, 1997) を用いて Index、Integration および Scale を行った。

次に、タンパク質に本来含まれるメチオニンおよびシステインの硫黄原子を利用した単波長異常分散法 (native-SAD) を用いた位相の決定を行うため、同結晶を用いて波長 2.0 Å においてデータ測定を行った。カメラ長 156.20 mm、振動角 1.0°に設定し、9000°の範囲にわたり計 9000 枚のデータを収集した。得られた X線回折データは *XDS* (Kabsch, 2010) を用いて Index および Integration を行った後、*CCP4* (Winn *et al.*, 2011) の *SCALA* を用いて Scale を行った。

2-2. 結晶構造解析

構造解析は *CCP4* (Winn *et al.*, 2011)、*CNS* (Brunger, 2007)、*ARP/wARP* (Langer *et al.*, 2013)、および *Coot* (Emsley *et al.*, 2010) を用いて行った。

X 線回折データの初期位相は、分子置換法および native-SAD を併用して決定した。*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 β -D-ガラクトシダーゼの構造 (PDB ID: 3D3A, 26% sequence identity) を鋳型に、FFAS sever (<http://ffas.burnham.org>) を用いて TBG4 のホモロジーモデルを構築した。本ホモロジーモデルをサーチモデルとして、native-SAD データの初期位相を *Phaser* を用いて計算した。得られた構造の精密化を *CNS* を用いて行った後、得られた位相に基づき *Phaser-EP* を用いて native-SAD データの異常分散データを解析し、硫黄原子の位置を決定した。その後、*Parrot* を用いて位相の改良を行い、*Buccaneer* を用いてポリアラニンモデルの構築を行った。得られた位相を波長 0.98 Å で測定した X 線回折データに適応し、*ARP/wARP* を用いてモデルの構築を行った。その後、*Coot* および *Refmac* を用いて構造精密化を行った。

2-3. D-ガラクトース複合体の X 線結晶構造解析

D-ガラクトース複合体結晶の調製には、共結晶法を用いた。沈殿剤に 0.1 M HEPES-NaOH pH 7.0, 20% (w/v) PEG 10000, 0.1 M D-ガラクトースを用いたこと以外は、第二章に記載の方法に準じて行った。

X 線回折測定は、高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光科学研究施設のビームライン PF AR-NW12A において行った。TBG4 組換えタンパク質の結晶は、測定の直前に 1 M D-ガラクトースを含む沈殿剤溶液に数秒間浸漬し、90 K の窒素気流下において波長 1.00 Å の X 線を用いて X 線回折測定を行った。カメラ長 235.00 mm、振動角 1.0°に設定し、180°の範囲にわたり計 180 枚のデータを収集した。得られた X 線回折データは *HKL2000* を用いて *Index*、*Integration* および *Scale* を行った。

先に決定した TBG4 の構造をサーチモデルとして使用し、得られたデータの初期位相を *Phaser* を用いて計算した。その後、*Coot* および *Refmac* を用いて構造精密化を行った。

2-4. 部位特異的変異体の産生、精製および活性測定

TBG4 が導入された Pichia Expression Vector pPICZαA に QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて点変異を導入し、TBG4 の変異体を発現するためのプラスミドを作製した。その後、第二章に記載の方法と同様の方法で TBG4 の E181A 変異体、E250A 変異体、および V548W 変異体をそれぞれ産生および精製し、活性測定に用いた。

1) K_m 値および k_{cat} の測定

50 mM sodium acetate buffer pH 5.0、0.1% ウシ血清アルブミン、0.05~10 mM 4NP-β-Gal、2 pmol TBG4 もしくはその変異体を含む酵素反応溶液を 0.5 mL 調製し、37°C 下において反応させた。0.2 M Na_2CO_3 を 1 mL 加えて反応を停止させた後、溶液の吸光度 (410 nm) を測定した。その後、各基質濃度における反応速度に基づき、TBG4 およびその変異体の K_m 値および k_{cat} をそれぞれ算出した。

2) 基質特異性の解析

基質として、β-1,4-galactobiose, β-1,3-galactobiose, β-1,6-galactobiose, CSP, ASP を終濃度 0.1% で用いた。前記基質、50 mM sodium acetate buffer pH 4.0、および 2 pmol TBG4 もしくは V548W 変異体を含む酵素反応溶液を 0.5 mL 調製し、37°C 下において反応させた後、沸騰水浴中で 10 分間加熱し、酵素反応を停止させた。遊離したガラクトースは、パルスドアンペロメトリ検出器を用いた陰イオンクロマトグラフィを用いて定量した。

3. 結果および考察

TBG4 組換えタンパク質の結晶の X 線回折測定を波長 0.98 Å において行った結果、分解能 1.2 Å の良質なデータを得ることに成功した (Table 4-1)。結晶の空間群は $P2_12_12_1$ であり、その格子定数は $a=92.82$ Å, $b=96.30$ Å, $c=159.26$ Å であった。TBG4 と 30% 以上のアミノ酸配列の相同性を有するタンパク質の構造は報告されておらず、精度の高い TBG4 のホモロジーモデルを構築することが困難であったため、分子置換法では十分な初期位相が得られなかった。

TBG4 の結晶の波長 2 Å における bijvoet diffraction ratio “ $\langle |\Delta F_{\text{hh}}| \rangle / \langle |F| \rangle$ ” は 3.5% と見積もられ、理論上は native-SAD による位相決定が可能であると判断したため、波長 2.0 Å の X 線を用いて冗長性の高いデータ測定を行った。その結果、分解能 2.8 Å、異常分散の冗長度 186.5、異常分散差の相関 0.74 の極めて良質な異常分散データを得ることに成功した (Table 4-1)。しかしながら、種々検討を行ったが、得られた異常分散データの初期位相の決定には至らなかった。そこで、分子置換法で得た不十分な初期位相に異常分散データを加えることにより、位相の拡張を行った。その結果、異常分散差フーリエ図上において、すべての硫黄原子の位置を特定することに成功し、TBG4 の構造決定に至った (Table 4-1, Fig. 4-2)。

また、D-ガラクトース複合体の結晶の X 線回折測定を行った結果、分解能 3.0 Å の X 線回折データを得ることに成功した。先に決定した TBG4 の構造を用いて分子置換法により初期位相を決定し、構造精密化を行った (Table 4-1)。

TBG4 組換えタンパク質の結晶の非対称単位には、2 つの分子が含まれていた (Fig. 4-2)。TBG4 の apo 体と D-ガラクトース複合体は結晶のパッキングが異なっていたが (Fig. 4-4)、それぞれの分子間の平均二乗偏差 (RMSD) は 0.350~0.423

Å であり、顕著な構造変化は認められなかったことから、パッキングの変化は TBG4 の構造変化に起因するものではなかった。また、結晶の非対称単位に含まれる 2 分子の TBG4 は、2 回軸で関連付けられないことから、2 量体を形成するものではなかった。2 量体は、通常、2 回軸を有している (Klotz *et al*, 1975)。

TBG4 は 4 つのドメインから構成される新奇構造を有していた (Fig. 4-3)。触媒ドメインである第一ドメインは、TIM バレル構造を形成していたが、5 番目と 6 番目の α -ヘリックスが欠損していた。第二ドメインは 7 本の β -ストランドから成る β -サンドイッチ構造を形成していた。第三ドメインは 9 本の β -ストランドから成る β -サンドイッチ構造を形成しており、既知の GH35 の構造には見られない長いループを有していた。第四ドメインは、第三ドメインの途中に挿入された形で存在し、8 本の β -ストランドから成る β -サンドイッチ構造を形成しており、既知の GH35 の構造と同様の長いループを有していた。

TBG4 の D-ガラクトース複合体の活性部位には、 β -D-ガラクトース分子の電子密度が認められた (Fig. 4-5)。求核剤である Glu250 はガラクトースのアノマー炭素と 3.0 Å の距離にあり、一般酸/塩基触媒である Glu181 はアノマー炭素のヒドロキシ基と水素結合 (2.6 Å) を形成していた。これら 2 つのグルタミン酸残基をそれぞれアラニンに変異した E250A 変異体および E181A 変異体は、4NP- β -Gal に対する K_m が野生型の TBG4 とほぼ同等であったのに対し、 k_{cat} がそれぞれ 380 倍および 4400 倍減少していた (Table 4-2)。これらの結果は、酵素における求核剤 (Glu250) および一般酸/塩基触媒 (Glu181) の重要性を確認するものであった。

GH35 に属する β -D-ガラクトシダーゼは、そのドメインの構成に基づき、少なくとも 4 つのグループ、すなわち、*Hypocrea jecorina* 由来の酵素 (HjBGAL) 等の 6 つのドメインから構成される酵素、TBG4 等の 4 つのドメインから構成される酵素、*Streptococcus pneumoniae* 由来の酵素 (SpBGAL) 等の 3 つのドメインか

ら構成される酵素、および *Caulobacter crescentus* 由来の酵素 (CcBGAL) 等の 2 つのドメインから構成される酵素に分類できる (Fig. 4-6(a)-(d))。SpBGAL では、活性部位の 3 つの芳香族アミノ酸残基が基質の認識に関与していることが報告されているが、TBG4 はその内の 1 つの芳香族アミノ酸残基がバリン残基 (V548) に変異していた (Fig. 4-6(e))。このバリン残基は、TBG4 が属する β -D-ガラクトシダーゼ/エキソ- β -1,4-D-ガラクタナーゼグループに属する酵素に保存されており (Fig. 4-7)、基質の認識に重要な役割を果たしていると考えられた。

そこで、このバリン残基をトリプトファンに変異した V548W 変異体の酵素活性および基質特異性を調べた。その結果、V548W 変異体は、4NP- β -Gal に対する K_m が野生型の TBG4 とほぼ同等であったのに対し、 k_{cat} が約 5 倍増加していた (Table 4-2)。また、V548W 変異体は、野生型の TBG4 と比較して、 β -1,3-galactobiose に対する活性が同等であった一方で、 β -1,6-galactobiose に対する活性は約 6 倍であり、 β -1,4-galactobiose に対する活性は 0.6 倍であった。さらに、V548W 変異体が CSP および ASP から遊離したガラクトース量は、野生型の TBG4 の約 0.6~0.8 倍であった (Table 4-3)。この結果は、TBG4 の V548 に対応するアミノ酸残基としてチロシン残基 (Y564) を有する TBG5 (Fig. 4-8) が、 β -1,6 および β -1,3 結合に対して高い活性を示し、CSP および ASP からほとんどガラクトースを遊離しないということ (Ishimaru *et al.*, 2009) と一致するものであった。

以上のことから、TBG4 の V548 は、 β -1,4 および β -1,6 結合に対する基質特異性の決定に重要な役割を果たしており、 β -1,4-ガラクトサンの効率的な分解に寄与していると考えられる。また、 β -D-ガラクトシダーゼ/エキソ- β -1,4-D-ガラクタナーゼグループに属する他の酵素においても、TBG4 の V548 に対応するバリン残基が基質特異性の決定に深く関与していると考えられる。

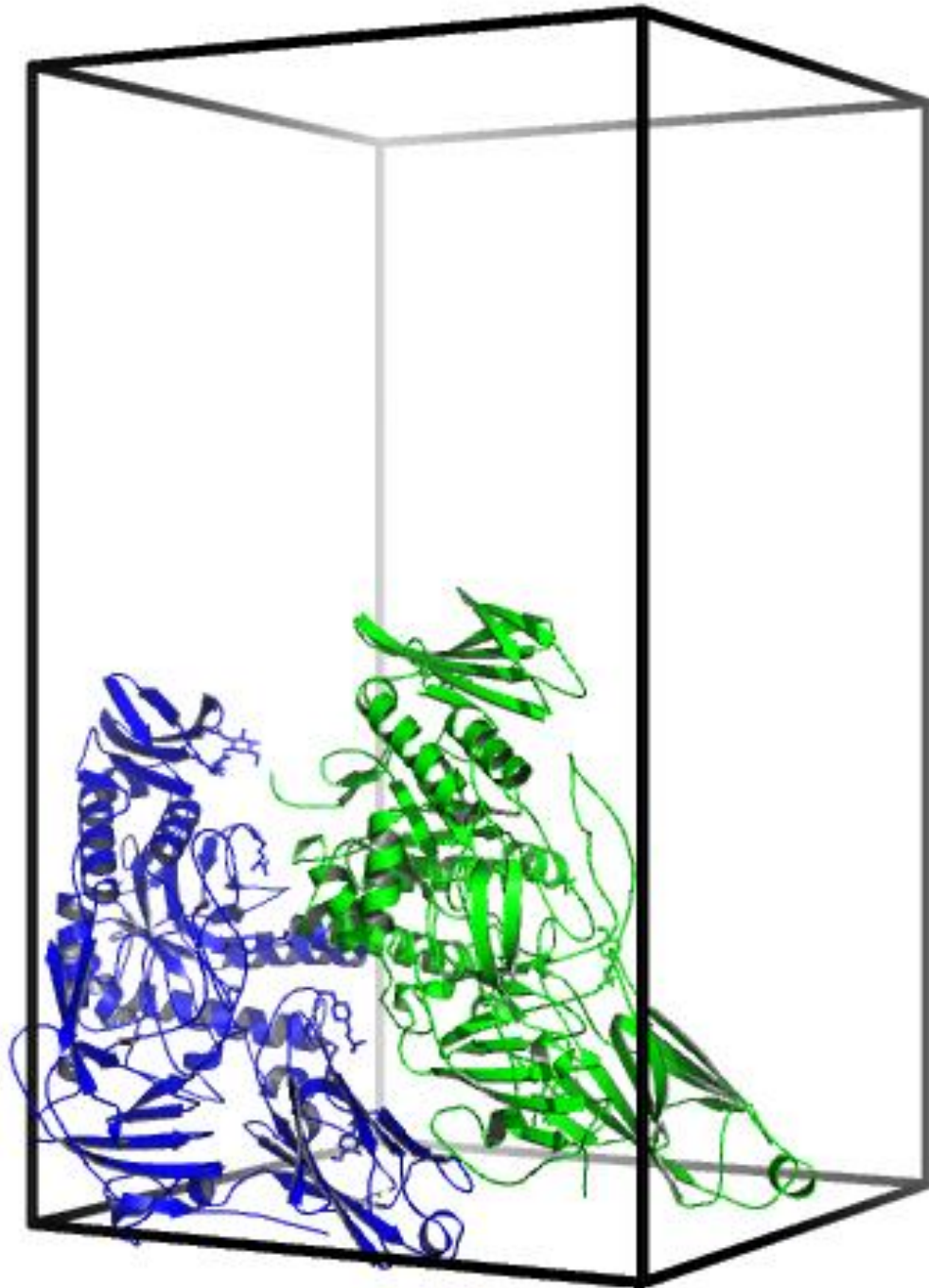


Fig. 4-2 The the crystallographic unit cell of TBG4. The molecules in the asymmetric unit are shown as ribbon model.

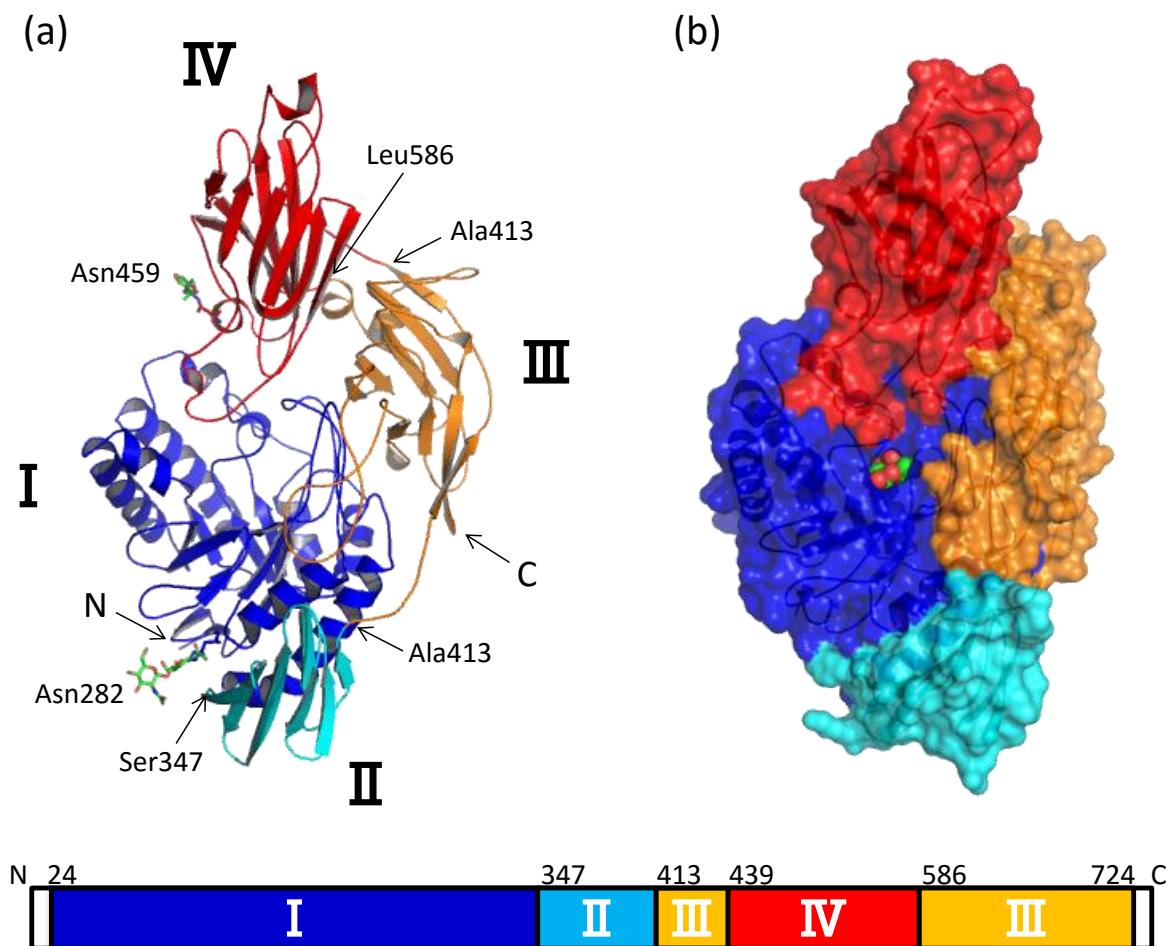


Fig. 4-3 Three-dimensional structure of (a) TBG4 and (b) its complex with galactose. Domains I through IV are colored by blue, cyan, orange and red, respectively. The glycosylation sites, Asn459 and Asn282, are represented as sticks in (a). The β -D-galactose molecule in the catalytic site is represented as spheres in (b).

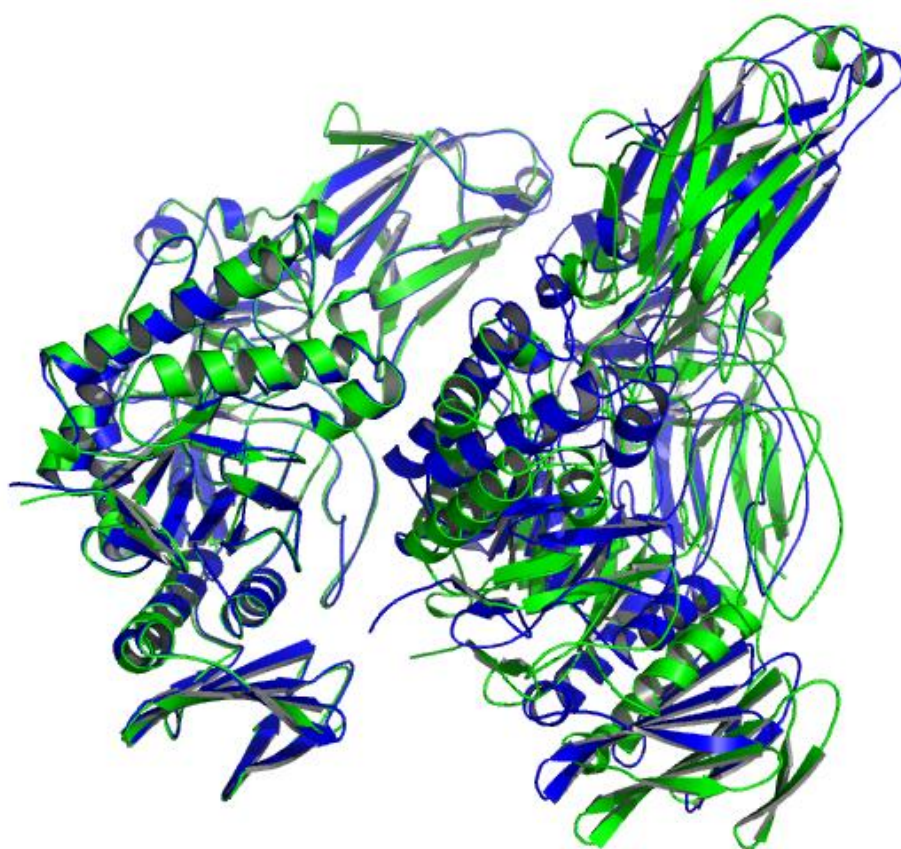


Fig. 4-4 Comparison of the crystal packings of the apo form and the galactose complex of TBG4. TBG4 molecules in the asymmetric unit of the apo form (bleu) and those of the galactose complex (green) are superimposed.

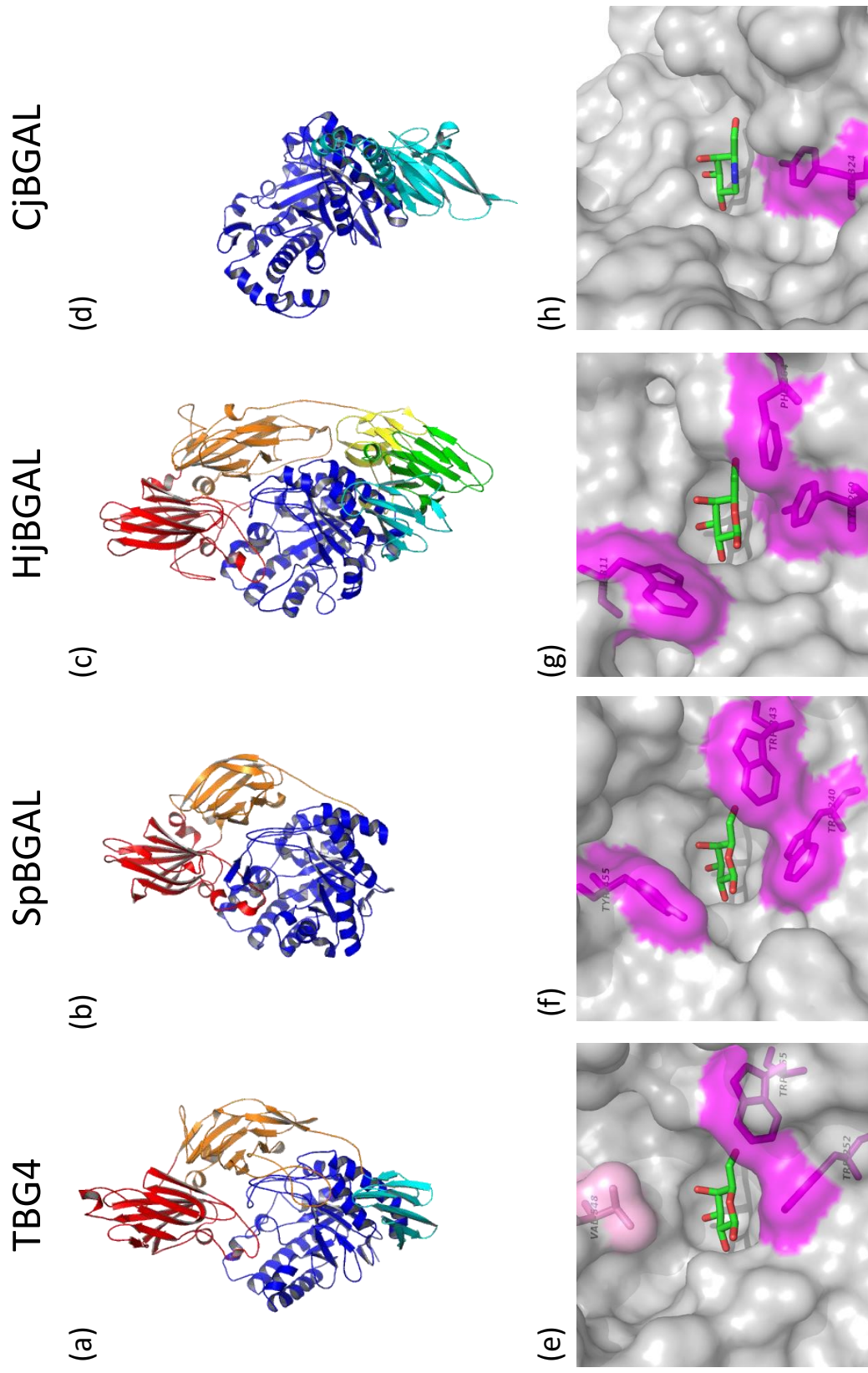


Fig. 4-6 Structures of GH35 β -galactosidases. The overall structures ((a)-(d)) and the catalytic sites ((e)-(h)) of TBG4, SpBGAL, HjBGAL and CjBGAL are shown respectively. Aromatic residues (magenta) and V548 (pink) of TBG4 are shown as sticks in (e)-(h).

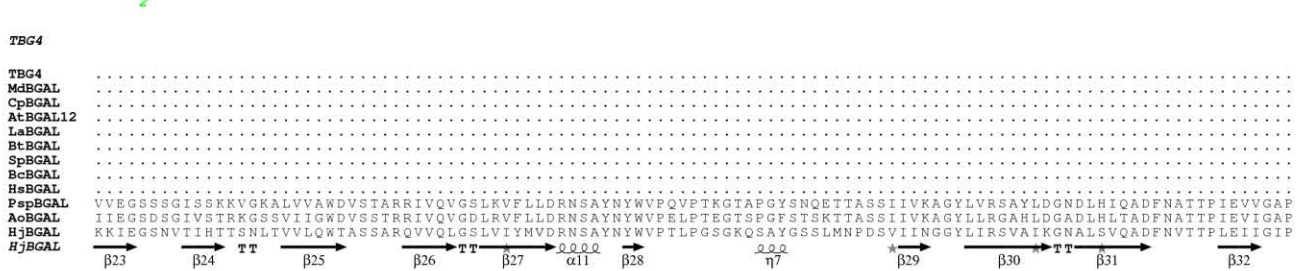
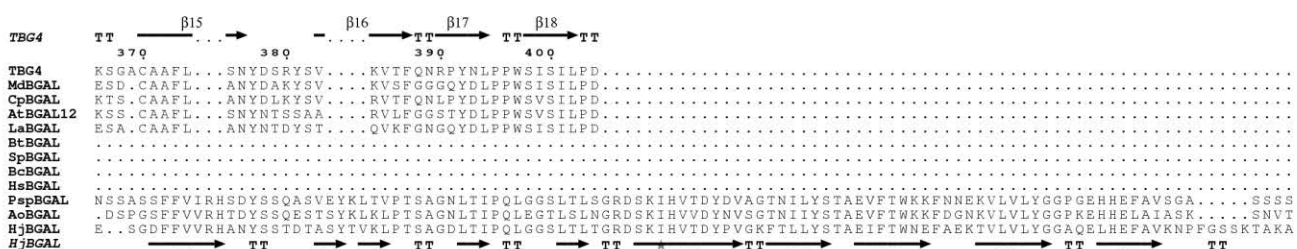
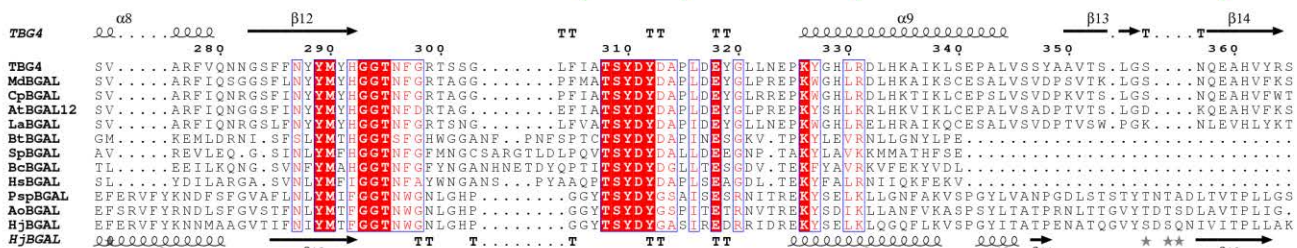
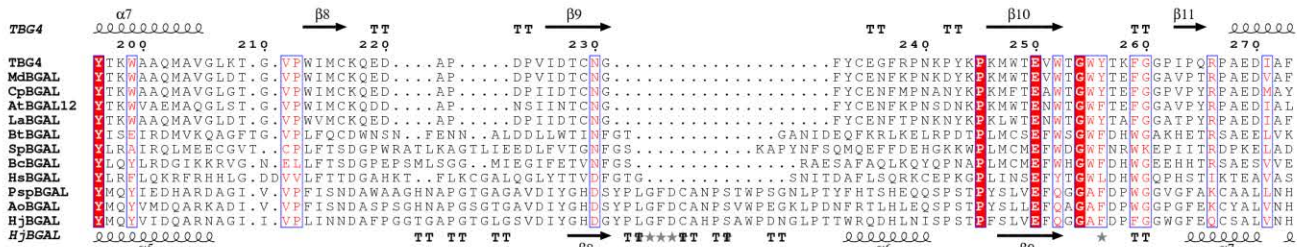
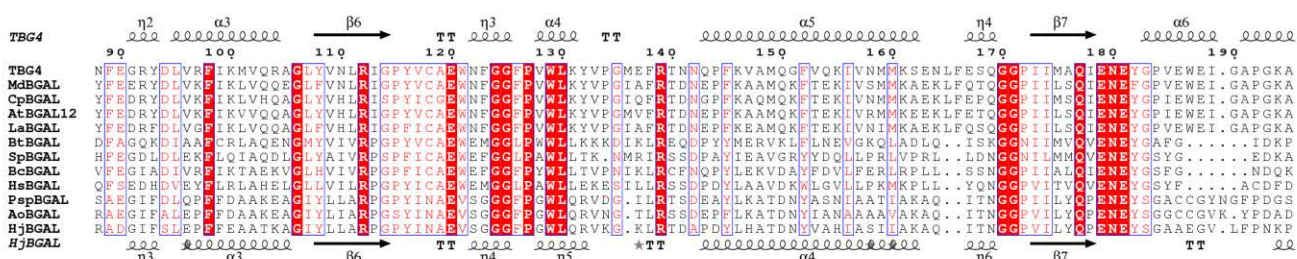
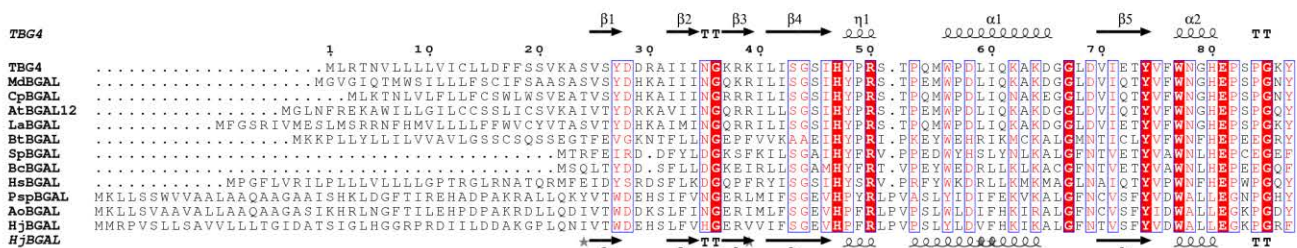


Fig. 4-7 Structure-based alignment of GH35 β -galactosidases. Accession numbers for the clones are as follows: AoBGAL (*Aspergillus oryzae*), BAE60622; AtBGAL12 (*Arabidopsis thaliana*), At4g26140; BcBGAL (*Bacillus circulans*), BAA21669; BtBGAL (*Bacteroides thetaiotaomicron*), AAO75397; CpBGAL (*Carica papaya*), AAC77377; HjBGAL (*Hypocrea jecorina*), CAD70669; HsBGAL (*Homo sapiens*), AAA51819; LaBGAL (*Lupinus angustifolius*), CAA09467; MdBGAL (*Malus domestica*), AAA62324; PspBGAL (*Penicillium sp.*), CAF32457; SpBGAL (*Streptococcus pneumoniae*), AAK74249; TBG4 (*Solanum lycopersicum*), AAC25984. AtBGAL12, MdBGAL, CpBGAL and TBG4 belong to β -galactosidase/exo- β -(1,4)-galactanase subfamily.

TBG4

1 10 20 30 40 50

β1 β2 TT β3 β4 η1

TBG4 M.....LRTNVLLLL...V I C L . L D F F S S V K A S V S Y D D R A I I I N G K R K I L I S G S I H Y P R S T P

TBG1 M.....GFWMAMLLML...L L C L . . W V S C G I A S V S Y D H K A I I V N G O R K I L I S G S I H Y P R S T P

TBG3 M.....GCTLILMLNV...L L V L L G S W V F S G T A S V S Y D H R A I I V N G O R R I L I S G S V H Y P R S T P

TBG6 M.....EVNSLQKVV...L W C I . V L F I S S G L V H C D V T Y D R K A I V I N G O R R L L F S G S I H Y P R S T P

TBG5 M...ERRSGYCLSVIMLVFGVVFH C L . . V M T S F A A N V T Y D H R A L V V D G R R V L L I S G S I H Y P R S T P

TBG7 M...NTMSCLSSNFKFVFLASTV I W T . . V M S S L A A V D A S N V T T I G T D S V T Y D R R S L I I N G O R K L L I S A S I H Y P R S T P

TBG2 MVEAMSRKTLNFPLLITVLTIH E V I A . G E Y F K P F N V T Y D N R A L I I G K R R M L I S G I H Y P R A T P

consensus>50 M...errsglnlnvilvvl.v.fvivil.gdvssfla.....nVsYDdkai!!nGqRkiLiSas!HYPRstP

TBG4

60 70 80 90 100 110 120 130

α1 β5 α2 TT η2 α3 β6 TT η3 α4 T

TBG4 Q M W P D L I Q K A K D G G L D V I E T Y V F W N G H E P S P K Y N F E G R D L V R F I K M V Q R A G L Y V N L R I G P V V C A E W N F G G F P V W L K Y V P

TBG1 E M W P D L I Q K A K E G G V D V I Q T Y V F W N G H E P E E G K Y Y F E E R D L V K F I K V V Q E A G L Y V H L R I G P Y A C A E W N F G G F P V W L K Y V P

TBG3 E M W P G I I Q K A K E G G V D V I Q T Y V F W N G H E P Q Q G K Y Y F E G R D L V K F I K L V H Q A G L Y V H L R V G P Y A C A E W N F G G F P V W L K Y V P

TBG6 E M W E D L I N K A K E G G L D V E T Y V F W N V H E P S P G N Y N F E G R D L V R F V K T I Q K A G L Y A H L R I G P V V C A E W N F G G F P V W L K Y V P

TBG5 D M W P D L I Q K S K D G G L D V I E T Y V F W N L H E P V R N Q Y D F E G R K D L I N F V K L V E R A G L F V H I R I G P V V C A E W N Y G G F P L W L H F I P

TBG7 A M W P G L V R L A K E G G V D V I E T Y V F W N G H E P S P G N Y Y F G G R D L V K F C K I I Q Q A G M Y M I L R I G P V V A E W N F G G F P V W L H Y V P

TBG2 E M W P T L I A R S K E G G A D V I E T Y V F W N G H E P T R G Q N F E G R D L V K F A K L V G S H G L F L F T R I G P Y A C A E W N F G G F P I W L R D I P

consensus>50 eMWPdli!qkaK#GGvDV!#TYvFWNgHEPeegnYyFegRyDl!kfiKv!qqaG\$%vhiR!GP%vcAEWN#GGFPvWLhy!P

TBG4

140 150 160 170 180 190 200 210

T α5 η4 β7 α6 α7

TBG4 G M E F R T N N Q P F K V A M Q G F V Q K I V N M M K S E N L F E S O G G P I I M A Q I E N E Y G P . . V E W E T G A P G K A Y T K W A A Q M A V G L K T G V P W

TBG1 G I S F R T N N P F F K A A M Q K F T T K I V D M M K A E K L Y E T O G G P I I L S Q I E N E Y G P . . M E W E L G E P G K V Y S E W A A K M A V D L G T G V P W

TBG3 G I S F R T D N G F F K A A M Q K F T A K I V N M M K A E R L Y E T O G G P I I L S Q I E N E Y G P . . M E W E L G A P G K S Y A Q W A A K M A V G L D T G V P W

TBG6 G I S F R A D N E P F K N A M K G Y A E K I V N L M K S H N L F E S O G G P I I L S Q I E N E Y G P . . Q A K V I G A P G H Q Y S T W A A N M A V G L D T G V P W

TBG5 G I E F R I D N E P F K A E M K R F T A K I V D M I K Q E N L Y A S O G G P V I L S Q I E N E Y G N G D I E S R Y G P R A K P Y V N W A A S M A T S L N T G V P W

TBG7 G T T F R T D S E P F K Y H M Q K F M T Y T V N L M K R E R L F A S O G G P I I L S Q I E N E Y G Y . . Y E N A Y G E G G K R Y A L W A A K M A L S Q N T G V P W

TBG2 G I E F R T D N A P F K E E M E R Y V V K I V D L M I S E L F S W O G G P I I L L Q I E N E Y G N . . V E S S F G P K G K I Y M K W A A M A V G L G A G V P W

consensus>50 GieFRt#neFFKneMqg%vqkiV#\$mkaenL\$esOGGP!I\$S\$Q!ENEYGN..veselGepgk.YaeWAAQMAvgldtGVPW

TBG4

220 230 240 250 260 270 280 290

β8 TT TT β9 TT TT β10 TT β11 α8 β12

TBG4 I M C K Q E D A P D P V I D T C N G F Y C E G F R P N K P Y K P K M W T E V W T G W Y T K F G G F I P Q R P A E D I A F S V A R F V Q N G S F N Y Y M Y H G G

TBG1 I M C K Q D D V P D P I I N T C N G F Y C D Y T P N K A N K P K M W T E A W T A W F T E F G G F V P Y R P A E D M A F A V A R F I Q T G G S F I N Y Y M Y H G G

TBG3 V M C K Q D D A P D P I I N A C N G F Y C D Y S P N K A Y K P K I W T E A W T A W F T G F G N E V P Y R P A E D I A F S V A R F I Q K G G S F I N Y Y M Y H G G

TBG6 V M C K E E D P P V I N T C N G F Y C D N F F P N K P Y K P A I W T E A W S G W F S E F G G F L H Q R P V Q D I A F A V A R F I Q R G G S F I N Y Y M Y H G G

TBG5 V M C Q Q P D A P P S V I N T C N G F Y C D Q F K Q N S D K T P K M W T E N W T G W F L S F G G F V P Y R P V E D I A F A V A R F F O R G G I F Q N Y Y M Y H G G

TBG7 I M C Q Q T A P P V I D T C N S F Y C Q K P I S P N K P I W T E N W G W F K T F G A R D P H R P A E D V A Y S V A R F F O K G G S V Q N Y Y M Y H G G

TBG2 V M C R Q T D A P P V I D T C N A Y C D G T E T S E K P K I W T E N W N G W F A D G E R L P Y R P S E D I A F A I A R F O R G G S I Q N Y Y M Y H G G

consensus>50 !MCQ#eDaPdp!I#tCNg%YC#yFkpnkdykPkIWtENWtaw%tefGnppvYRPv#DiA#a!ArFiQkgGsfInYYMYhGG

TBG4

300 310 320 330 340 350 360

TT TT TT α9 β13 TT β14 TT

TBG4 T N F G R T S S G L F I A T S Y D Y D A P I D E V G L L N E P K Y G H L R D L H K A I K L S E P A L V S S Y A A V T S L G S N Q E A H V Y R S K S

TBG1 T N F G R T S G G F F I A T S Y D Y D A P I D E V G S L R Q P K W G H L K D L H R A I K L C E P A L V S V D P T V T S L G N Y Q E A R V F K S E S

TBG3 T N F G R T A G G F F I A T S Y D Y D A P I D E V G L L R O P K W G H L K D L H R A I K L C E P A L V S G D P A V T A L G H Q E A H V F R S K A

TBG6 T N F G R T A G G F F I T S Y D Y D A P I D E V G L I R O P K W G H L K E L H R A V K M C E K S I V S A D P A I T S L G N I Q Q A Y V S S E T

TBG5 T N F G R T S G G F F I A T S Y D Y D A P I D E V G L I N O P K W G H L K D L H K A I K L C E A A M V A T E P N V T S L G S N I E V S V Y K T D S

TBG7 T N F G R T A G G F F I T S Y D Y D A P I D E V G L P R F P K W G H L K E L H K V I K S C E H A L L N N D P T L L S L G P L Q E A D V Y E D A S

TBG2 T N F G R T A G G F T Q I T S Y D Y D A P I D E V G L L R O P K W G H L K D L H A A I K L C E P A L V A A D S E Q Y I K L G P K Q E A H V Y R G T S N N I G Q Y M

consensus>50 TNFGRTAgGpfiatSYDYDAPiDe%GlinqPKYGHlK#LHka!KlCepalvaad.pnvtSLGnlq#ahV%kses.....

TBG4

370 380 390 400 410 420

β15 β16 TT β17 TT β18 TT β19 TT β20

TBG4 G A C A A F L S N Y D S R Y S V K V T F Q N R P Y N L P P W S I S I L P D C K T A V Y N T A Q V N S Q S S S I K M T P A G G . .

TBG1 G A C A A F L A N Y N Q H S F A K V A F G N M H Y N L P P W S I S I L P D C K N T V Y N T A R V G A Q S A Q M K M T P V S R . .

TBG3 G S C A A F L A N Y D Q H S F A T V S T A N R H Y N L P P W S I S I L P D C K N T V F N T A R I G A Q S A Q M K M T P V S R . .

TBG6 G G C A A F L S N N D W K S A A R V M F N N M H Y N L P P W S I S I L P D C R N V V F N T A K V G V Q T S K M E M L P T N S E . .

TBG5 Q C A A F L A N T A T Q S D A A V S F N G N S Y H L P P W S V S I L P D C K N V A F S T A K I N S A S T I S T F V T R S S E A

TBG7 G A C A A F L A N M D D K N D K V Q F R H V S Y H L P A W S V S I L P D C K N V A F N T A K V G C C Q T S I V N M A P I D L H P

TBG2 S L N E G I C A A F L A N I D E H E S A T V K F Y G Q E F T L P P W S V V F C Q A E I Q L S T Q L R W G H K L Q S K Q W A Q I L F Q L G I I L C E Y K L S L K A

consensus>50 ...gaCAAFlaNydqhnfakVsFnnmh%NLPPWS!silpdcnkvvfntakvnaqsaie.....mtpvnllea

TBG4

β21 → 430 440 450 460 470 480 490

β22 → α10 00000 β23 → α11 00000 β24 →

TBG4GLS.WQSYNEETPTAD.DSDT.LTAN.GLW.EQKNVTRDS.SDYLWYMTN.VN.IASN.E..G.FLKNKGDFY.LT.VM.SAG

TBG1GFS.WESFNEDAASHE.D.DTFTVV.GLLEQINITR.DVSDYLWYMTD.IEIDPTE..G.FLNSGNWFL.TV.FS.SAG

TBG3GLP.WQSFNEETSSYE.D.SSFTVV.GLLEQINITR.DVSDYLWYMTD.VKIDSR.E..K.FLRRGKWPW.LT.IM.SAG

TBG6MLS.WETYSEDISALD.DSSSIRSF.GLLEQINIVTR.DVSDYLWYIT.SVDIGSTE..S.FLHGGELET.LIVE.TTG

TBG5 DASGG.....SLSGWTSVNE.PVVGISNE.NA.FTRMGLLEQINITR.DVSDYLWYTS.LSVN.IK.NDE..P.FLQDGSATV.LHV.KTLG

TBG7 TASSPKRDIKSLQ.WEVFKETAGVWV.V.ADFTKNGFV.DH.IHTTKDA.DYLWYTT.SIFV.HAAE..D.FLRRNGTAM.LFV.E.SKG

TBG2 SSESF.....SQS.WMTLKEPLGVWV.D.KNFTSK.GILEHINVT.KKDQ.SDYLWYLR.YLTSDD.D.SFWEENDVSE.TLDIDSMR

consensus>50 .ass.....gls.WesfnEeigvwdssddfvtvG11#qIvNvTkDvsDYLWYmt d!f!dnd#. .gflnngnwp t!t!m!s!g

TBG4

β25 → TT β26 → 500 510 520 530 540 550 560 570

β27 → β28 → η5 000 β29 → TT β30 → TT

TBG4 HVLHVFVNGKLS.GT.VY.GTLDNP.KLTY.SGNV.KL.RA.GINK.I.SLLSV.SVGL.PNV.GV.HYD.TWN.AG.VL.GP.VT.LS.GL.NEG.S.R.N.LAK

TBG1 HALHVFVNGQLAGT.VY.GSLENPKLTF.SNGI.NE.RA.GVNK.I.SLLS.IAVGL.PNV.GPHFETWN.AG.VL.GP.VS.LNGL.NEG.T.RD.LTW

TBG3 HALHVFVNGQLAGT.VY.GSLEKPKLTF.SKAV.NE.RA.GVNK.I.SLLS.IAVGL.PNIG.PHFETWN.AG.VL.GP.VS.LTGL.DEG.K.RD.LTW

TBG6 HAMHVFVNGQLS.GS.AG.FTRKNRRFV.FKGV.NE.RA.GSNR.I.ALLS.VAVGL.PNIG.GHFE.TWS.TG.VL.GP.VA.IQGL.DH.K.WD.LSW

TBG5 HVLHAYVINGRLS.GS.GK.GNSRHSNFT.IE.VPV.LV.PGEN.K.I.LLSAT.VGL.QNY.GAF.FDLK.GAGIT.GP.VL.KG.FKN.GSTT.D.LSS

TBG7 HAMHVFVINKKLS.AS.ASG.NGTVP.QFKG.TPI.A.LKAG.KNE.I.SLLS.MT.VGL.QTAGAF.FYEW.IGAG.P.TSVKV.VAG.FKT.GT.MD.LTA

TBG2 DFVRI.FVNGQLAGS.VK.GKW...IKVVQP.VKLV.QG.YND.I.LLSE.TVGL.QNY.GAF.FL.KD.GAG.FK.GQ.I.KL.TG.CKS.GD.I.NL.TT

consensus>50 hvllhv%!NqqlagsvYgnlenpnklisnp!nlvaGvNeisLLSvaVGLqnvGaff#twnaGvlgp!kinGIneGk.r#Lsw

TBG4

β31 → α12 000 α13 0000 η6 000 β32 → β33 → TT β34 → TT β35 → TT

580 590 600 610 620 630 640 650

TBG4 QKWSYKVGKLGESLSLHSLSGSSVEWVRGSLMAQK.QPLTWYKATFNAPG.GNDPLALDMASMGKGQIWIINGG.VGRHWFG

TBG1 QKWFYKVGKLGEEALSLHSLSGSSVEWVEGSLVAQK.QPLTSWYKTTFNAPD.GNEPLALDMNTMGKQVWINGQSLGRHWFA

TBG3 QKWSYKVGKLGEEALSLHSLSGSSVEWVEGSLVAQR.QPLTWYKSTFNAPAGNDPLALDLNMGKQVWINGQSLGRYWPFG

TBG6 AKWYQVGLKGEAMNLVSTNGISA.VDWMQGSLIAQKQ.QPLTWYKAYFNTPE.GDEPLALDMSSMGKGQVWINGQSIGRYWTA

TBG5 KQWYQVGLKGEDLGL...SNGGSTLWKSQTALPTN.QPLTWYKASFDAPAGDTP.LSMDFTMGKGEAWWINGQSIGRWFPA

TBG7 SAWYKIGLQGEHLRIQKSYNLKSKI.WAPT.SQPPKQ.QPLTWYKAVVDAPP.GNEPVALDMIHMGKGMAWWINGQSIGRYWFR

TBG2 SLWYQVGLRGEFLVYDVNSTE.SAGWTEFFTGTP.SVSWYKTKFDAPGGTDP.VALDFSSMGKGQAWWINGH.VGRYWTLL

consensus>50 qkwsYq!GLkGEa\$nihslnnsssvewvegsLvaqn.qplswYKatf#aPdGndPva\$DmnsMGKQvWInGqsiGRyWpa

TBG4

β36 → TT β37 → η7 000 β38 → η8 000 β39 →

660 670 680 690 700 710 720

TBG4 YIA..QGDSCSKCSYAGTFNEK.KCQTN.CGQP.SQ.RWYHVPRSWLKPSGNL.VV.FEE.WGGN.PTGTG.I.SLVR.RSR.....

TBG1 YKS..SGSCSV.CNYTGW.FDEK.KCLT.NCGEG.SQ.RWYHVPRSWLYPTGNL.VV.FEE.WGGD.PYGTI.TLVK.RREIGSV.CADIYEQ.

TBG3 YKA..SNGCGA.CNYAGW.FNEK.KCLSN.CGEA.SQ.RWYHVPRSWLYPTGNL.VV.FEE.WGGEPHG.I.SLVK.RREIVASV.CADINEWQ.

TBG6 Y.A..TGD.CNGC.QYSV.FRPP.KCQL.GCGEP.TQ.KWYHVPRSWLKPTQNL.VV.FEE.LGGD.PTRI.SLVK.RRSVTNV.SNVAEYH.

TBG5 YIAPND.GCTDP.CNVRG.GYNAE.KCLKN.CGKPSQLLYHVPRSWLKPSGNL.VV.FEEM.GGD.PTKLSFATREIQSV.CSRTSDAH.

TBG7 RTSKYENCVTQCDYR.GKFNPD.KCVTG.CGQP.TQ.RWYHVPRSWLKPSGNL.VV.FEE.LGGD.PSQIRFSMRKVS.GAGHLSVDH.

TBG2 V.APNN.CGRT.CDYR.GAY.HSD.KCRT.NCGEITQ.AWYHVPRSWLKTLLN.LV.VIFEE.TDKT.PFDI.STSTRE.TETIC.AQVSEKH.Y

consensus>50 yiapnqgdcn.CnYaGw%nedKCLtnCGepsQrwyH!PRSWlypsqNvL!vFEElggdPyqislvkRevqsvcadisewq.

TBG4

TBG4 P..QLLN.WQLVSGKFDR..PLR.PRAHLK.CA.PGQKISSIKF.FAS.FGT.PG.V.CGN.F.Q.GS.CHAPRSYDAFKKN.CV.GKES.CSVQ

TBG1 P..QLVN.WQMASGKVDK..PLR.PRAHLS.CA.SGQKITSIKF.FAS.FGT.PG.V.CGN.F.Q.GS.CHAFHSYDAFERYCIGQNS.CSVP

TBG3 P..NIKN.WQIENYKTEE..FHL.PKVRH.CA.PGQSISSIKF.FAS.FGT.PG.V.CGN.F.Q.GS.CHAPDASHAVVEKKCLGRQTC.VA

TBG6 P.LPIDM.WASEDDARK...KSGP.TLSLE.CPHNQVISSIKF.FAS.FGT.PG.V.CGN.F.Q.GS.CHSSSNALSIVKKA.CIGSKS.CSLG

TBG5 P.SFDVENLQGSIEIEND..KNR.P.TLSLK.CP.TNTNISSVRF.FAS.FGN.PGT.CGSYMLGD.CHDQNSAALVEKV.CLNQNE.CALE

TBG7 P..PLHK.WSHSEFDRKLSLMDKT.PEMHLQ.CD.EGHTISSIEF.FAS.YGSP.NGS.CQK.F.SQ.GK.CHAAANSLSVV.SQACIGRTS.CSIG

TBG2 P..PLHK.WSHSEFDRKLSLMDKT.PEMHLQ.CD.EGHTISSIEF.FAS.YGSP.NGS.CQK.F.SQ.GK.CHAAANSLSVV.SQACIGRTS.CSIG

consensus>50 p.qidnwmqnyekkd..klrpkhlleca.pnqkissikfasfgtpqgvvcgsf.qgschapnsldvvekakicigqnscaqv

TBG4

TBG4 VTPEN.FGGDP.CRNVLK.KLSVEAICS.....

TBG1 VTPEN.FGGDP.CRNVLK.KLSVEAICS.....

TBG3 VTPEN.FGGDP.CRNVLK.KLSVEAICS.....

TBG6 VTPEN.FGGDP.CRNVLK.KLSVEAICS.....

TBG5 VTPEN.FGGDP.CRNVLK.KLSVEAICS.....

TBG7 VTPEN.FGGDP.CRNVLK.KLSVEAICS.....

TBG2 VTPEN.FGGDP.CRNVLK.KLSVEAICS.....

consensus>50 vsneifggdpcpnvkvkklavevicsp.....

Fig. 4-8 Sequence alignment of tomato β-D-galactosidases.

Table 4-1 Summary of data-collection and refinement statistics

Dataset	Apo	native-SAD	β -D-Galactose
Data collection			
X-ray source	PF-BL17A	PF-BL17A	PFAR-NW12A
Wavelength (Å)	0.9800	2.0000	1.0000
Temperature (K)	90	90	90
Resolution (Å)	50 – 1.65 (1.68 – 1.65)	48 – 2.80 (2.95 – 2.80)	50 – 3.00 (3.11 – 3.00)
space group	P212121	P212121	P212121
Cell dimensions (Å)	a = 92.82 b = 96.30 c = 159.26	a = 92.90 b = 96.42 c = 159.44	a = 93.93 b = 106.38 c = 162.38
$R_{\text{meas}}^{\dagger}$	0.079 (0.53)	0.102 (0.25)	0.136 (0.58)
$R_{\text{p.i.m.}}^{\ddagger}$	0.029 (0.19)	0.005 (0.01)	0.052 (0.23)
$\langle I/\sigma I \rangle$	33.0 (3.8)	145.6 (62.8)	20.0 (3.5)
Observed reflections	1271036	12743381	206610
Unique reflections	170809	35852	32837
Completeness (%)	99.9 (99.5)	99.6 (98.6)	99.2 (98.4)
Multiplicity	7.4 (7.4)	355.4 (360.5)	6.8 (5.8)
Anomalous completeness (%) -	-	99.7 (99.1)	-
Anomalous multiplicity	-	186.5 (185.9)	-
DelAnom correlation			
between half-sets	-	0.741 (0.502)	-
V_m (Å ³ /Da)	2.17	2.18	2.47
Solvent content (%)	43.3	43.5	50.3
Number of molecules per asymmetric unit	2	2	2
Refinement			
Resolution (Å)	46.1 – 1.65	-	31.1 – 3.00
No. of reflections	170193	-	32721
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	12.9/18.0	-	20.0/26.0
No. of atoms	13091	-	11428
No. of protein atoms	11006	-	11062
No. of heterogen atoms	179	-	166
No. of waters	1906	-	198
Wilson B (Å ²)	23.3	-	41.0
Mean B (Å ²)	17.8	-	47.3
R.m.s. deviations			
Bond length (Å)	0.007	-	0.006
Bond angles (°)	1.219	-	0.975
Ramachandran analysis (%)			
Favored region	97.4	-	95.9
Allowed region	2.6	-	3.9
Outliers	0.0	-	0.2

$$\dagger R_{\text{meas}} = \sum_{hkl} \{N(hkl)/[N(hkl)-1]\}^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$$

$$\ddagger R_{\text{p.i.m.}} = \sum_{hkl} \{1/[N(hkl)-1]\}^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$$

Table 4-2 Kinetic parameters of TBG4 and its mutants E250A, E181A, and V548W against 4-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside. All parameters were determined at 37°C and pH 4.0.

	K_m (M)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ ·s ⁻¹)
TBG4	1.5×10^{-3}	1.1×10^5	7.3×10^7
E250A	3.6×10^{-4}	2.5×10^1	6.9×10^4
E181A	1.1×10^{-3}	2.9×10^2	2.6×10^5
V548W	1.9×10^{-3}	5.5×10^5	2.9×10^8

Table 4-3 Release of galactose by TBG4 and its mutant V548W acting on galactobioses and pectins

Compound	Activity ($\mu\text{g galactose}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$)		Ratio
	TBG4	V548W	V548W/TBG4
Gal- β -(1,4)-Gal	14	7.8	0.56
Gal- β -(1,3)-Gal	9.4	11	1.2
Gal- β -(1,6)-Gal	1.4	8.3	5.9
Chelate-soluble pectin	0.12	0.092	0.77
Alkali-soluble pectin	0.28	0.16	0.57

4. 要約

本章では、TBG4の基質認識機構を解明するため、TBG4組換えタンパク質の結晶のX線結晶構造解析を行った。

TBG4組換えタンパク質の結晶について、波長 0.98 Å において X 線回折測定を行った結果、分解能 1.2 Å の良質なデータを得ることに成功した。TBG4組換えタンパク質の結晶の空間群は $P2_12_12_1$ であり、その格子定数は $a=92.82$ Å, $b=96.30$ Å, $c=159.26$ Å であった。次いで、native-SAD による位相決定を行うため、波長 2.0 Å において X 線回折測定を行った。その結果、異常分散の冗長度が 186.5、異常分散差の相関が 0.74 である分解能 2.8 Å の極めて良質な異常分散データを得ることに成功した。その後、得られた X 線回折データの位相を分子置換法および native-SAD を併用して求めることにより、TBG4の構造を決定することに成功した ($R_{\text{work}} 12.9\%$, $R_{\text{free}} 18.0\%$)。また、TBG4のD-ガラクトース複合体の構造決定にも成功した ($R_{\text{work}} 20.0\%$, $R_{\text{free}} 26.0\%$)。

TBG4は、4つのドメインから構成される新奇構造を有しており、GH35に属する細菌類および菌類由来のβ-D-ガラクトシダーゼにおいて広く保存されている基質認識に重要な3つの芳香族アミノ酸残基の1つがバリン残基 (V548) に変異していた。このバリン残基は、TBG4が属するβ-D-ガラクトシダーゼ/エキソ-β-1,4-D-ガラクトナーゼグループに属する酵素に保存されており (Fig. 4-7)、基質の認識に重要な役割を果たしていると考えられたため、このバリン残基をトリプトファンに変異した V548W 変異体の酵素活性および基質特異性を調べた。その結果、TBG4の V548W 変異体は、野生型の TBG4 と比較して、β-1,6-galactobiose に対する活性が約 6 倍であり、β-1,4-galactobiose に対する活性が 0.6 倍であり、CSP および ASP に対する活性が約 0.6~0.8 倍であった。

以上のことから、TBG4のV548は、 β -1,4および β -1,6結合に対する基質特異性の決定に重要な役割を果たしており、 β -1,4-ガラクトサンの効率的な分解に寄与していると考えられる。また、 β -D-ガラクトシダーゼ/エキソ- β -1,4-D-ガラクトナーゼグループに属する他の酵素においても、TBG4のV548に対応するバリン残基が基質特異性の決定に深く関与していると考えられる。

総括

本研究では、トマト果実の生育および成熟過程における TBG1 の機能の解明を目指し、生体内における TBG1 の標的を明らかにすることを目的とした。また、トマト果実の軟化機構の解明を目指し、TBG4 の基質認識機構を明らかにすることを目的とした。

第一章では、生体内における TBG1 の標的を明らかにするため、TBG1 組換えタンパク質の酵素特性および基質特異性を調べた。まず、*S. cerevisiae* を用いて TBG1 組換えタンパク質を産生し、精製を行った。得られた TBG1 組換えタンパク質の至適 pH は pH 5.0 であり、至適温度は 40~50°C であった。また、種々の基質に対する酵素活性を測定した結果、TBG1 組換えタンパク質は、 β -1,3 および β -1,6 結合に対して高い活性を示し、緑熟期の HF および催色期の ASP から比較的多くのガラクトースを遊離することが明らかとなった。TBG1 は、催色期において遺伝子の発現が最も高まることから、催色期における II 型アラビノガラクトサンの代謝に関与していると考えられた。

第二章では、X 線結晶構造解析を行うため、TBG4 組換えタンパク質の産生、精製、および結晶化を行った。まず、*P. pastoris* を用いて TBG4 組換えタンパク質を産生し、精製を行った。得られた TBG4 組換えタンパク質には、幅広い分子量の高マンノース型 N-結合型糖鎖が修飾されていたため、 α -mannosidase を用いて一部の糖鎖を除去した後、修飾した糖鎖が小さく均一な TBG4 組換えタンパク質を単離した。得られた TBG4 組換えタンパク質の結晶化条件の探索を行った結果、沈殿剤として PEG 10000 を用いた条件において、約 0.6 mm × 約 0.3 mm × 約 0.1 mm の大きさの結晶を得ることに成功した。

第三章では、TBG4の基質認識機構を解明するため、TBG4組換えタンパク質の結晶のX線結晶構造解析を行った。TBG4組換えタンパク質の結晶のX線回折測定を行い、得られたデータの位相を分子置換法およびnative-SADを併用して求めることにより、TBG4の立体構造を決定することに成功した (R_{work} 12.9%, R_{free} 18.0%)。また、TBG4のD-ガラクトース複合体の構造決定にも成功した (R_{work} 20.0%, R_{free} 26.0%)。TBG4は、4つのドメインから構成される新奇構造を有しており、GH35に属する細菌類および菌類由来の β -D-ガラクトシダーゼにおいて広く保存されている基質認識に重要な3つの芳香族アミノ酸残基の1つがバリン残基 (V548) に変異していることが明らかとなった。TBG4のV548に対応するバリン残基は、 β -D-ガラクトシダーゼ/エキソ- β -1,4-D-ガラクタナーゼグループに属する酵素に保存されており (Fig. 4-7)、基質の認識に重要な役割を果たしていると考えられたため、V548W変異体の酵素活性および基質特異性を調べた結果、V548W変異体は、野生型のTBG4と比較して、 β -1,6-galactobioseに対する活性が約6倍であり、 β -1,4-galactobioseに対する活性が0.6倍であり、CSPおよびASPに対する活性が約0.6~0.8倍であった。以上のことから、TBG4のV548は、 β -1,4および β -1,6結合に対する基質特異性の決定に重要な役割を果たしており、 β -1,4-ガラクトタンの効率的な分解に寄与していると考えられた。また、 β -D-ガラクトシダーゼ/エキソ- β -1,4-D-ガラクタナーゼグループに属する他の酵素においても、TBG4のV548に対応するバリン残基が基質特異性の決定に深く関与していると考えられた。

本研究により明らかにされた知見は、構造生物学、酵素学、園芸学といった学問分野において非常に重要であり、GH35に属する酵素の構造と機能の解明、さらには果実軟化機構の解明への途を拓くものと期待される。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました本学理学系研究科の多田俊治教授に感謝の意を表します。また、本研究全般にわたり、多大なるご支援、ご指導を賜りました近畿大学大学院生物理工学研究科の石丸恵准教授に厚く御礼申し上げます。さらに、本論文の作成にあたり、ご助言とご校閲を賜りました本学理学系研究科の藤井郁雄教授、恩田真紀准教授ならびに徳富哲教授に心より感謝申し上げます。

methyl β -1,6-galactohexaoside を用いた酵素活性測定におきましては、多大なるご支援を賜りました埼玉大学大学院理工学研究科の円谷陽一教授ならびに小竹敬久准教授に厚く御礼申し上げます。

Pichia pastoris を用いた異種遺伝子発現におきましては、多大なるご支援を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科の五十嵐圭日子准教授ならびに石田卓也特任助教に厚く御礼申し上げます。

単結晶 X 線回折測定におきましては、多大なるご支援を賜りました本学理学系研究科の木下誉富准教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、公私にわたりご支援いただきました構造生物学研究室の皆様に心より感謝申し上げます。

参考文献

- Bapat, VA, Trivedi, PK, Ghosh, A, Sane, VA, Ganapathi, TR, and Nath, P (2010). "Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene." *Biotechnol Adv* **28**(1): 94-107.
- Brunger, AT (2007). "Version 1.2 of the Crystallography and NMR system." *Nat Protoc* **2**(11): 2728-2733.
- Carey, AT, Smith, DL, Harrison, E, Bird, CR, Gross, KC, Seymour, GB, and Tucker, GA (2001). "Down-regulation of a ripening-related β -galactosidase gene (TBG1) in transgenic tomato fruits." *J Exp Bot* **52**(357): 663-668.
- Cheng, W, Wang, L, Jiang, YL, Bai, XH, Chu, J, Li, Q, Yu, G, Liang, QL, Zhou, CZ, and Chen, Y (2012). "Structural insights into the substrate specificity of *Streptococcus pneumoniae* β (1,3)-galactosidase BgaC." *J Biol Chem* **287**(27): 22910-22918.
- Cosgrove, DJ (2005). "Growth of the plant cell wall." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 850-861.
- de Silva, J, and Verhoeyen, M (1998) Production and characterization of antisense-exogalactanase tomatoes. In: Kuiper, H.A., ed., Report of the Demonstration Programme on Food Safety Evaluation of Genetically Modified Foods as a Basis for Market Introduction, *The Hague*, The Netherlands: Ministry of Economic Affairs, pp. 99-106.
- Eklöf, JM, and Brumer, H (2010). "The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling." *Plant Physiol* **153**(2): 456-466.

Emsley, P, Lohkamp, B, Scott, WG, and Cowtan, K (2010). "Features and development of Coot." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**(Pt 4): 486-501.

Franková, L, and Fry, SC (2013). "Biochemistry and physiological roles of enzymes that 'cut and paste' plant cell-wall polysaccharides." *J Exp Bot* **64**(12): 3519-3550.

Gilbert, HJ (2010). "The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction." *Plant Physiol* **153**(2): 444-455.

Goulao, LF, and Oliveira, CM (2008). "Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit." *Trends in Food Science & Technology* **19**(1): 4-25.

Gross, KC (1984). "Fractionation and partial characterization of cell walls from normal and non-ripening mutant tomato fruit." *Physiologia Plantarum* **62**(1): 25-32.

Henze, M, You, DJ, Kamerke, C, Hoffmann, N, Angkawidjaja, C, Ernst, S, Pietruszka, J, Kanaya, S, and Elling, L (2014). "Rational design of a glycosynthase by the crystal structure of β -galactosidase from *Bacillus circulans* (BgaC) and its use for the synthesis of N-acetyllactosamine type 1 glycan structures." *J Biotechnol* **191**: 78-85.

Ishimaru, M, Smith, DL, Mort, AJ, and Gross, KC (2009). "Enzymatic activity and substrate specificity of recombinant tomato β -galactosidases 4 and 5." *Planta* **229**(2): 447-456.

Kabsch, W (2010). "XDS." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**(Pt 2): 125-132.

Klotz, IM, Darnall, DW, and Langerman, NR (1975) Quaternary structure of proteins. In: Neurath, H, and Hill, RL, eds., *The Proteins Vol. 1*. New York: Academic Press, pp. 293–411.

Konishi, T, Kotake, T, Soraya, D, Matsuoka, K, Koyama, T, Kaneko, S, Igarashi, K, Samejima, M, and Tsumuraya, Y (2008). "Properties of family 79 beta-glucuronidases that hydrolyze

beta-glucuronosyl and 4-O-methyl-beta-glucuronosyl residues of arabinogalactan-protein."

Carbohydr Res **343**(7): 1191-1201.

Kotake, T, Dina, S, Konishi, T, Kaneko, S, Igarashi, K, Samejima, M, Watanabe, Y, Kimura, K, and Tsumuraya, Y (2005). "Molecular cloning of a β -galactosidase from radish that specifically hydrolyzes β -(1->3)- and β -(1->6)-galactosyl residues of Arabinogalactan protein." *Plant Physiol* **138**(3): 1563-1576.

Kotake, T, Kaneko, S, Kubomoto, A, Haque, MA, Kobayashi, H, and Tsumuraya, Y (2004). "Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Trichoderma viride* endo- β -(1->6)-galactanase gene." *Biochem J* **377**(Pt 3): 749-755.

Langer, GG, Hazledine, S, Wiegels, T, Carolan, C, and Lamzin, VS (2013). "Visual automated macromolecular model building." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**(Pt 4): 635-641.

Larsbrink, J, Thompson, AJ, Lundqvist, M, Gardner, JG, Davies, GJ, and Brumer, H (2014). "A complex gene locus enables xyloglucan utilization in the model saprophyte *Cellvibrio japonicus*." *Mol Microbiol* **94**(2): 418-433.

Liu, Q, Dahmane, T, Zhang, Z, Assur, Z, Brasch, J, Shapiro, L, Mancina, F, and Hendrickson, WA (2012). "Structures from anomalous diffraction of native biological macromolecules." *Science* **336**(6084): 1033-1037.

Maksimainen, M, Hakulinen, N, Kallio, JM, Timoharju, T, Turunen, O, and Rouvinen, J (2011). "Crystal structures of *Trichoderma reesei* β -galactosidase reveal conformational changes in the active site." *J Struct Biol* **174**(1): 156-163.

- Maksimainen, MM, Lampio, A, Mertanen, M, Turunen, O, and Rouvinen, J (2013). "The crystal structure of acidic β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*." *Int J Biol Macromol* **60**: 109-115.
- McCoy, AJ, and Read, RJ (2010). "Experimental phasing: best practice and pitfalls." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**(Pt 4): 458-469.
- Minic, Z, and Jouanin, L (2006). "Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation." *Plant Physiol Biochem* **44**(7-9): 435-449.
- Moctezuma, E, Smith, DL, and Gross, KC (2003). "Antisense suppression of a β -galactosidase gene (TBG6) in tomato increases fruit cracking." *J Exp Bot* **54**(390): 2025-2033.
- Ochoa-Villarreal, M, Aispuro-Hernández, E, Martínez-Téllez, MA, and Vargas-Arispuro, I (2012). *Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives*.
- Ohto, U, Usui, K, Ochi, T, Yuki, K, Satow, Y, and Shimizu, T (2012). "Crystal structure of human β -galactosidase: structural basis of Gm1 gangliosidosis and morquio B diseases." *J Biol Chem* **287**(3): 1801-1812.
- Otwinowski, Z, and Minor, W (1997). "Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode." In: Carter Jr., CW, and Sweet, RM, Eds., *Macromolecular Crystallography, part A, Methods in Enzymology* 276, New York: Academic Press, pp.307-326
- Ramagopal, UA, Dauter, M, and Dauter, Z (2003). "Phasing on anomalous signal of sulfurs: what is the limit?" *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**(Pt 6): 1020-1027.

Rojas, A. L., R. A. Nagem, K. N. Neustroev, M. Arand, M. Adamska, E. V. Eneyskaya, A. A. Kulminkaya, R. C. Garratt, A. M. Golubev and I. Polikarpov (2004). "Crystal structures of β -galactosidase from *Penicillium* sp. and its complex with galactose." *J Mol Biol* **343**(5): 1281-1292.

Ru, H, Zhao, L, Ding, W, Jiao, L, Shaw, N, Liang, W, Zhang, L, Hung, LW, Matsugaki, N, Wakatsuki, S, and Liu, ZJ (2012). "S-SAD phasing study of death receptor 6 and its solution conformation revealed by SAXS." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**(Pt 5): 521-530.

Smith, DL, Abbott, JA, and Gross, KC (2002). "Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening." *Plant Physiol* **129**(4): 1755-1762.

Smith, DL, and Gross, KC (2000). "A family of at least seven β -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development." *Plant Physiol* **123**(3): 1173-1183.

Tan, L, Eberhard, S, Pattathil, S, Warder, C, Glushka, J, Yuan, C, Hao, Z, Zhu, X, Avci, U, Miller, JS, Baldwin, D, Pham, C, Orlando, R, Darvill, A, Hahn, MG, Kieliszewski, MJ, and Mohnen, D (2013). "An Arabidopsis cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein." *Plant Cell* **25**(1): 270-287.

Taylor, GL (2010). "Introduction to phasing." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**(Pt 4): 325-338.

Winn, MD, Ballard, CC, Cowtan, KD, Dodson, EJ, Emsley, P, Evans, PR, Keegan, RM, Krissinel, EB, Leslie, AG, McCoy, A, McNicholas, SJ, Murshudov, GN, Pannu, NS, Potterton, EA, Powell, HR, Read, RJ, Vagin, A, and Wilson, KS (2011). "Overview of

the CCP4 suite and current developments." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**(Pt 4): 235-242.

Yokoyama, R, and Nishitani, K (2004). "Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and Arabidopsis." *Plant Cell Physiol* **45**(9): 1111-1121.

論文目録

Masahiro Eda, Megumi Ishimaru, Toshiji Tada, Tatsuji Sakamoto, Toshihisa Kotake, Yoichi Tsumuraya, Andrew J. Mort, and Kenneth C. Gross (2014). “Enzymatic activity and substrate specificity of the recombinant tomato β -galactosidase 1” *Journal of Plant Physiology* 171: 1454-1460

Masahiro Eda, Megumi Ishimaru, and Toshiji Tada (2015) “Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of tomato β -galactosidase 4” *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* F71: 153-156

Masahiro Eda, Megumi Ishimaru, and Toshiji Tada “Crystal structures of Tomato β -galactosidase 4 and its complex with β -D-galactose: Structural insights into the substrate specificity of the fruit softening related enzyme” *The Plant Journal* submitted