

解説

## トリプトファン合成酵素 $\alpha$ と $\beta$ サブユニットとの複合体形成の 等温滴定カロリーメトリー

油谷克英, 小笠原京子

(受取日: 2000年11月16日, 受理日: 2000年11月22日)

### **Isothermal titration calorimetry of the complex formation of tryptophan synthase $\alpha$ and $\beta$ subunits**

Katsuhide Yutani and Kyoko Ogasahara

(Received November 16, 2000; Accepted November 22, 2000)

A characteristic property of the tryptophan synthase  $\alpha_2\beta_2$  complex is the mutual activation of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunit upon complex formation. It has been speculated that this mutual activation results from the conformational change due to the  $\alpha/\beta$  subunit interaction. In order to elucidate this mechanism, the association for the various combinations of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits from mesophiles, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, and for the two subunits from a hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*, was examined using isothermal titration calorimetry. In mesophile proteins, the analyses of the thermodynamic parameters of association indicate that both the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits fold coupled with the association and the folding might occur not only at the subunit contact surface but also at the other parts in the molecules. This conformational rearrangement might be the origin of mutual activation. The thermodynamic measurements also revealed that the substitution of only one residue in the subunit interface of the *E. coli*  $\alpha$  subunit changed the thermodynamic properties of association with the  $\beta$  subunit similar to those of the *S. typhimurium*  $\alpha$  subunit. On the other hand, the association between  $\alpha$  and  $\beta_2$  subunit from *P. furiosus* was characterized by substantially low values of association enthalpy and association heat capacity changes. This suggests that the folding coupled with the association decreases at low temperatures around 40 °C examined. This relates with remarkably low activities around 40 °C, as compared with those of mesophile proteins. These differences in thermodynamic properties were discussed on the basis of X-ray structures of both proteins.

#### 1. はじめに

生体系における重要な反応は蛋白質分子間又は蛋白質とリガンド間の相互認識と密接に関連している。分子間相互作用の認識機構を正しく理解することは今日のライフサイ

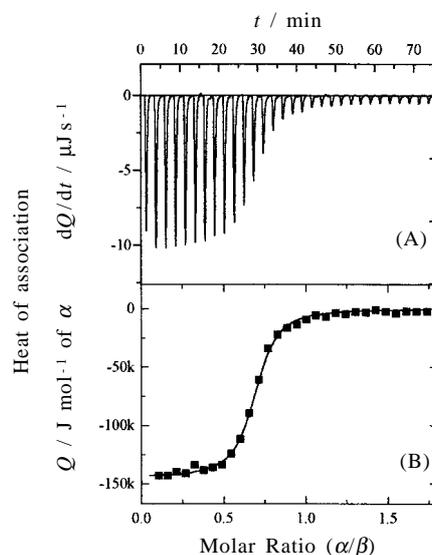
エンスの重要な課題の一つである。トリプトファン合成酵素における複合体形成は、蛋白質相互作用の分子認識機構を解明する上で、優れたモデル系である。<sup>1)</sup> 細菌のトリプトファン合成酵素は  $\alpha_2\beta_2$  複合体で、L-トリプトファン生成の最終反応 (インドール-3-グリセロリン酸 → トリプトファン)

を触媒する。トリプトファン合成酵素 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットはそれぞれ固有の $\alpha$ 反応と $\beta$ 反応を触媒する。 $\alpha$ 反応はインドール-3-グリセロリン酸をインドールとグリセルアルデヒド-3-リン酸に切断し、 $\beta$ 反応ではインドールとL-セリンからL-トリプトファンを生成する。しかし、各サブユニットが $\alpha_2\beta_2$ 複合体を形成するとそれぞれの固有の反応を1-2桁増幅する。この複合体形成に伴う相互活性増幅の仕組みは、 $\alpha/\beta$ サブユニット間相互作用による両サブユニットの構造変化を伴うと推定されているが、そのメカニズムはまだ解明されていない。

トリプトファン合成酵素の立体構造は、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) 由来の同酵素複合体について、X線結晶解析による結果が報告されている (Hyde *et al.*, 1988)<sup>2)</sup>。しかし、 $\alpha$ または $\beta$ サブユニット単独の構造解析はまだ成功していない。複合体形成に伴う活性増幅機構を理解するためには、複合体の構造はもとより、それぞれ単独構造の解明が必須である。最近になって、超好熱菌 (*Pyrococcus furiosus*) 由来の同酵素 $\alpha$ サブユニット構造解析が成功している。<sup>3)</sup> 超好熱菌由来の同酵素 $\beta$ サブユニット並びに複合体のX線結晶構造解析も同時に進められているので、近いうちに発表されることが期待されている。一方、等温滴定カロリメトリー (Isothermal Titration Calorimetry: ITC) による研究では、同酵素の複合体形成に伴う直接の熱力学的パラメータが求められるので、その複合体形成のメカニズムを理解する上では大変有用な手法である。本報告では、トリプトファン合成酵素 $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットの等温滴定カロリメトリーによって得られた結果を基に複合体形成のメカニズムを検討したい。

## 2. 用いた試料

本報告で用いたトリプトファン合成酵素 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットは大腸菌 (*Escherichia coli*)、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*)、と超好熱菌 (*Pyrococcus furiosus*) 由来のものである。それぞれ、*Ec*、*St*、*Pf*と略号で呼ぶ。更に、*Ec* $\alpha$ サブユニットの変異型、*Ec* $\alpha$ K109N、も用いた。大腸菌とサルモネラ菌の各サブユニットは残基数も同じで高い一次構造上の相同性を示す。特に、 $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニット接触界面 (各40残基ほど) では、 $\alpha$ サブユニットの109位と $\beta$ サブユニットの290位で2カ所が異なっているだけである。*Ec* $\alpha$ サブユニットの190位はLysであり、*St*のそれはAsnである。一方、*Ec* $\beta$ サブユニットの290位はGlu、*St*のそれはAlaである。しかし、*Pf* $\alpha$ サブユニットの残基数は248で*Ec*に比べ20残基少ない、また*Pf* $\beta$ サブユニットの残基数は388で*Ec*に比べ9残基少ない。*Ec*各サブユニットに対する一次構造の相同性は $\alpha$ サブユニット32%、 $\beta$ サブユニット58%である。<sup>37)</sup>における $\alpha_2\beta_2$ 複合体の $\beta$ 反応の



**Fig.1** Isothermal titration calorimetry of the association of the *E. coli* wild type  $\alpha$  subunit with the *E. coli*  $\alpha$  subunit. (A) Raw data of calorimetric titration obtained for automatic injections, each 10  $\mu$ l of  $\alpha$  subunit into the sample cell containing  $\beta_2$  subunit solution (1.31 ml), at 40 °C and pH 7.0. The 50 mM potassium phosphate buffer of pH 7.0 containing 0.1 mM DTT, 5 mM EDTA, and 0.2 mM PLP was used for experiments. (B) Calorimetric titration curve calculated from the raw data. The plots are experimental and the solid lines correspond to the best-fit curve obtained by least squares deconvolution.

活性は、大腸菌の $\alpha_2\beta_2$ 複合体の値を100とした場合、サルモネラ菌のそれは66%、超好熱菌のそれは3.7%である。しかし、*St* $\alpha$ サブユニットと*Ec* $\beta$ サブユニットとのハイブリッド複合体の活性は98%で、サルモネラ菌固有の複合体より高くなっている。*Ec* $\alpha$ K109N変異型は変異による活性値への影響はほとんどない(野生型の活性の99%)

## 3. 常温菌由来のトリプトファン合成酵素 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットとの複合体形成に伴う熱力学的パラメータ

等温滴定型熱量計OMEGA (Microcal) を用いて、種々の温度で、トリプトファン合成酵素 $\beta$ サブユニット溶液に $\alpha$ サブユニットを添加することによって、両サブユニット複合体形成の熱力学量を求めることができる。<sup>4-6)</sup> Fig.1に40 °Cでの*Ec* $\alpha$ サブユニットと*Ec* $\beta$ サブユニットとの滴定例を示す。<sup>5)</sup> Fig.1(A)は生データで、 $\alpha$ サブユニットの添加によって生じる熱量を表している。各ピークの面積を

トリプトファン合成酵素 $\alpha$ と $\beta_2$ サブユニットとの複合体形成の等温滴定カロリーメトリー

**Table 1** Thermodynamic parameters of the association of the  $\alpha$  subunit with the  $\beta_2$  subunit at various temperatures. All the molar concentrations for each parameter represent the molar concentration of the  $\alpha$  subunits. *Ec*, *St*, and *Pf* represent *E. coli*, *S. typhimurium*, and *P. furiosus*, respectively. \*Calorimetry was performed by injection of  $\beta_2$  subunit solution into  $\alpha$  subunit solution in ITC cell.

$\alpha$ subunit	$\beta$ subunit	$T$	$K_a$ $10^6 \text{ M}^{-1}$	$\Delta H_a$ $\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_a$ $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	$\Delta G_a$ $\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta C_{p,a}$ $\text{kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
<i>Ec</i> wild	<i>Ec</i>	25	31.3	- 36.9	20	- 42.8	- 7.29
		30	14.6	- 63.7	- 73	- 41.6	
		35	8.0	- 96.8	- 182	- 40.8	
		40	5.3	- 147.5	- 342	- 40.4	
	<i>St</i>	25	14.2	- 51.1	- 34	- 40.9	- 6.37
		30	4.8	- 75.0	- 119	- 38.8	
		35	6.9	- 116.1	- 246	- 40.4	
		40	2.4	- 143.3	- 335	- 38.3	
<i>Ec</i> K109N	<i>Ec</i>	25	17.9	- 45.7	- 14	- 41.2	- 8.21
		30	8.9	- 81.3	- 135	- 40.4	
		35	6.0	- 115.2	- 244	- 40.1	
		40	3.5	- 171.0	- 421	- 39.3	
	<i>St</i>	25	14.5	- 67.0	- 88	- 40.9	- 6.79
		30	7.1	- 91.8	- 171	- 39.8	
		35	4.4	- 123.6	- 274	- 39.3	
		40	2.9	- 169.3	- 416	- 38.8	
<i>St</i>	<i>Ec</i>	25	33.9	- 49.9	- 23	- 43.0	- 7.84
		30	15.2	- 77.5	- 118	- 41.7	
		35	9.8	- 113.5	- 234	- 41.3	
		40	9.6	- 168.0	- 403	- 41.9	
	<i>St</i>	25	8.9	- 60.3	- 69	- 39.7	- 6.83
		30	7.5	- 88.8	- 161	- 39.9	
		35	7.2	- 120.3	- 259	- 40.5	
		40	5.7	- 163.8	- 394	- 40.5	
<i>Pf</i> *	<i>Pf</i> *	40	164	- 24.0	80.7	- 49.2	- 1.91
		50	152	- 43.8	20.9	- 50.6	
		60	1150	- 57.9	0.4	- 57.8	
<i>Ec</i> *	<i>Ec</i> *	35	4.0	- 87.6	- 157.9	- 28.9	- 5.67

Fig.1(B)に示す。Table 1に示すような組み合わせで、常温菌各サブユニットの複合体形成の熱力学的パラメータが算出された。全ての滴定曲線から得られた $\alpha$ と $\beta$ との結合比( $\alpha/\beta$ )はほぼ0.7を示した。期待値1.0からのずれは $\beta_2$ サブユニットに含まれている不活性なフラクションであると思われる。複合体形成の熱力学的パラメータは、 $\alpha$ サブユニットのモル濃度によって計算されているので、結合数とは直接関係しない。実験データは、 $\beta_2$ サブユニットの2個の $\alpha$ サブユニット結合サイトが同一で互いに独立であると仮定して、解析された。複合体形成のエントロピー値( $\Delta H_a$ )と結合定数( $K_a = [\alpha\beta]/[\alpha][\beta]$ )は実験データから直接求めることができる。解析に他のモデル、独立的又は従属的な二つのサイトがあると仮定したモデル、での解析を試みたがいずれも実験結果にフィットしなかった。

それぞれの組み合わせの40での熱力学的パラメータを

Fig.2にまとめた。*Ec* $\alpha$ サブユニットの $\Delta H_a$ の負の値は*St* $\alpha$ サブユニットの値よりも約20  $\text{kJ mol}^{-1}$ 小さい。サブユニット界面で*St*タイプに変位した変異型(*Ec* $\alpha$  K109N)の $\Delta H_a$ は*St* $\alpha$ サブユニットのそれに近くなっている。*St* $\alpha$ サブユニットと*Ec* $\alpha$  K109Nの $\Delta H_a$ は複合体形成に有利に寄与しているが、エントロピー項( $\Delta S_a$ )で相殺されて、結果的に複合体形成のギブスエネルギー変化は( $\Delta G_a$ )が互いに似かよった値となっている。Fig.3は $\Delta H_a$ と $\Delta S_a$ の温度依存性を示す。変異型(*Ec* $\alpha$  K109N)サブユニットは全ての図で*St* $\alpha$ サブユニットのそれらに似ている。Table 1の複合体形成の熱容量変化( $\Delta C_{p,a}$ )はFig.3の $\Delta H_a$ の温度依存性の勾配から求められた。得られた変異型の結果は、 $\alpha$ サブユニットの $\alpha/\beta$ 界面に位置する109位の残基は複合体形成の性質、*Ec*型か*St*型かを定める重要な役割を担っていることを示唆している。

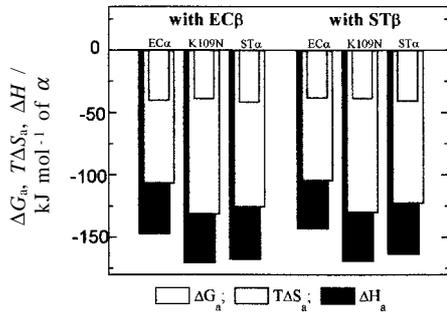


Fig.2 The thermodynamic parameters of association for each combination among  $\alpha$  and  $\beta_2$  subunits from *E. coli* and *S. typhimurium* at 40 °C. The thermodynamic parameters in Table 1 are used.

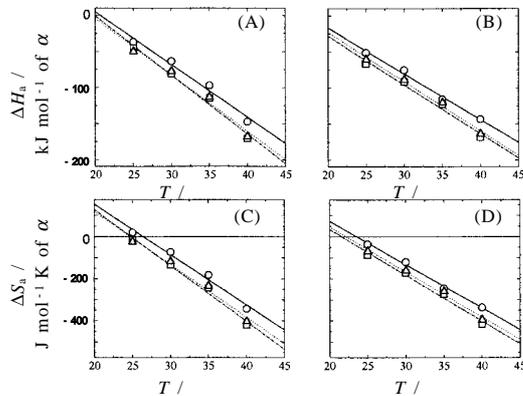


Fig.3 The temperature dependence of  $\Delta H_a$  (A and B) and  $\Delta S_a$  (C and D) of the association of the  $\alpha$  subunits with the *E. coli*  $\beta$  subunit (A and C) or with the *S. typhimurium*  $\beta$  subunit (B and D). In each figure, - - - ; *E. coli* wild type  $\alpha$  subunit, --- --- ; *E. coli* K109N mutant, and ... ... ; *S. typhimurium*  $\alpha$  subunit. The lines shows the linear regression of the experimental values.

#### 4. $\alpha$ と $\beta$ サブユニットの複合体形成に伴う構造変化

両サブユニットの活性相増幅効果は複合体形成に伴うサブユニットの構造変化に起因していると考えられている。これらは、酵素活性実験<sup>7)</sup>、小角X線散乱実験<sup>8)</sup>、蛍光測定<sup>9,10)</sup>などから推定されている。ここでは、複合体形成に伴う構造変化を明らかにするために、ここで得られた熱力学的パラメータが解析された。 $\alpha$ と $\beta$ サブユニットの複合体形成に伴う $\Delta C_{p,a}$ はTable 1に示すように比較的大きな値である。蛋白質のフォールディングによる熱容量変化は個々の原子の溶媒露出表面積の変化に依存する。Spolarら<sup>11)</sup>は次の関係式を導いている。

$$\Delta C_p = 1.34 \Delta A^{\text{non-pol}} - 0.59 \Delta A^{\text{pol}} \quad (\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}) \quad (1)$$

ここで、 $\Delta A^{\text{non-pol}}$ と $\Delta A^{\text{pol}}$ とはそれぞれ非極性原子と極性原子のフォールディングに伴う溶媒露出表面積の変化を示す。この式を用いて、サルモネラ菌の複合体のX線結晶構造から $\alpha_2\beta_2$ 複合体形成に伴う $\Delta C_p$ を計算できる。Connolly<sup>12)</sup>の手法を用いると、複合体形成による $\Delta A^{\text{non-pol}}$ は13.3 nm<sup>2</sup>で、 $\Delta A^{\text{pol}}$ は12.4 nm<sup>2</sup>となる。式(1)から $\Delta C_p$ は1.05 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>となる。この値はTable 1の常温菌由来蛋白質の $\Delta C_{p,a}$ 値(6.37 - 8.21 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)よりはるかに小さい。このことは、複合体形成による非極性残基の埋没(溶媒と接触しなくなる)はサブユニット接触面だけに起因しているのではなく、サブユニット分子の他の部分の構造形成(フォールディング)を伴っていることを示唆している。

SpolarとRecord<sup>13)</sup>は蛋白質間相互作用に伴って構造形成(フォールディング)を誘起された残基の数を定量する方法を提案している。彼らは複合体形成に伴うエントロピー変化( $\Delta S_a$ )を、疎水性効果( $\Delta S_{\text{HE}}$ )、回転と並進の自由度の変化( $\Delta S_{\text{tr}}$ )、その他の項( $\Delta S_{\text{others}}$ )に分けた。

$$\Delta S_a(T_s) = \Delta S_{\text{HE}}(T_s) + \Delta S_{\text{tr}} + \Delta S_{\text{others}} = 0 \quad (2)$$

ここで、 $T_s$ は $\Delta S_a$ がゼロになる温度である。 $\Delta S_{\text{tr}}$ は蛋白質間相互作用では一般に一定である(-210 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)。更に、SpolarとRecord<sup>13)</sup>は $\Delta S_{\text{HE}}(T_s)$ は $\Delta C_{p,a}$ 次の式で関連づけられと提案している。

$$\Delta S_{\text{HE}}(T_s) = 1.35 \Delta C_{p,a} \ln(T_s / 386) \quad (3)$$

複合体形成に伴う構造変化が主に $\Delta S_{\text{others}}$ に寄与し、残基あたりのエントロピーの寄与が相対的に一定であれば(-23.5 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)、複合体形成に伴い構造変化した残基の数は次の式で表されることになる。

$$R^{\text{th}} = \Delta S_{\text{others}} / -23.5 \quad (4)$$

式(2)-(4)を用いると、 $\alpha/\beta$ 複合体形成に伴う構造形成に寄与した残基数を、滴定量熱法の結果(Table 1)から算出できる。Table 2に示すように、 $\alpha/\beta$ 複合体形成に伴って構造形成する残基はほぼ90~110に相当する。この結果は、接触界面に位置する残基数(80残基)より多くの残基が複合体形成に関わっており、その複合体形成は鍵が鍵穴に挿入されるような固定的なものではなく、接触部分以外の領域も含み構造変化(フォールディング)を伴うことを示唆している。

Murphy<sup>14)</sup>は実験的に得られた $\Delta H$ と $\Delta C_p$ を用いて、結合反応中に生じる構造変化を推定する別の方法を提案している。この方法を用いると、 $St\alpha$ サブユニットと $St\beta$ サブユニットの複合体形成に伴って埋もれる $\Delta A^{\text{non-pol}}$ と $\Delta A^{\text{pol}}$ の値

トリプトファン合成酵素 $\alpha$ と $\beta$ サブユニットとの複合体形成の等温滴定カロリーメトリー

**Table 2** The number of residues participating in the folding transition during the  $\alpha/\beta$  association reaction.  $T_s$  represents the temperature of  $\Delta S_a = 0$  obtained from Figs.3-c and d, and Fig.6. *Ec*, *St*, and *Pf* represent *E. coli*, *S. typhimurium*, and *P. furiosus*, respectively.

$\alpha$ subunit	$\beta$ subunit	$\Delta C_{p,a}$ J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	$T_s$ K	$\Delta S_{HE}(T_s)$ J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	$\Delta S_{Others}$ J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	$R^{th}$
wild <i>Ec</i>		- 7290	299.8	2487	- 2277	97
K109N	<i>Ec</i>	- 8210	298.1	2864	- 2654	113
wild <i>St</i>		- 7840	298.1	2735	- 2525	107
wild <i>Ec</i>		- 6370	296.8	2260	- 2050	87
K109N	<i>St</i>	- 6790	295.0	2465	- 2255	96
wild <i>St</i>		- 6830	295.5	2463	- 2253	96
<i>Pf</i>	<i>Pf</i>	- 1910	333.0	381	- 171	7

はそれぞれ54 ~ 70 nm<sup>2</sup>と36 ~ 45 nm<sup>2</sup>となる。これらの値はX線構造から得られた値(それぞれ13.3 nm<sup>2</sup>と12.4 nm<sup>2</sup>)よりも大きな値である。このことは複合体形成に伴って大きな構造変化を伴うという主張と一致する。

オリゴマー蛋白質の多くの場合、サブユニットの会合はそのポリペプチド鎖の構造形成を伴う。例えば、メリチン、<sup>15)</sup>  $\lambda$ Cro リプレッサー、<sup>16)</sup> Arc リプレッサー<sup>17)</sup>の場合、オリゴマーの解離は変性反応(Unfolding)を伴う。それらのモノマー構造は変性状態にある。一般に、オリゴマー蛋白質のサブユニット間相互作用は蛋白質の構造形成反応とよく似ている<sup>18)</sup> また、サブユニット間の接触面積も比較的広い。広い接触領域で埋め込まれた疎水性残基の寄与が大きな負の $\Delta C_p$ となって現れる。<sup>19)</sup> トリプトファン合成酵素のここで示した結果はオリゴマー蛋白質のサブユニット間相互作用の典型的な性質を示している。ここで示した熱力学的性質は、 $\alpha$ と $\beta$ サブユニット単独の構造は部分的にルーズな構造を含み、複合体形成してはじめて完全に折れたたまたま天然構造を形成することを示唆している。複合体形成に伴うトリプトファン合成酵素の構造変化は $\alpha$ と $\beta$ サブユニット間の相互活性増幅と関連している。<sup>20)</sup> また、 $\alpha$ と $\beta$ サブユニット単独で、部分的に存在するルーズな構造が結晶化の困難性をもたらしていると思われる。そこで、私たちは、高い安定性を示す超好熱菌由来のトリプトファン合成酵素 $\alpha$ 、 $\beta_2$ サブユニットそしてその複合体の結晶化に取り組み成功しつつある。このことに関しては後で記述する。超好熱菌の $\alpha$ サブユニットの構造に関しては、最近、論文を投稿し<sup>2)</sup> 構造データをPDBに登録した。

5. 一残基アミノ酸置換の複合体形成の熱力学的パラメータへの影響

一般に、変性反応並びに会合(複合体形成)反応におい

て、アミノ酸置換による熱力学的パラメータ、特に $\Delta G$ への影響はあまり大きなものではない。しかし、これは通常、大きな $\Delta H$ の変化が大きな $\Delta S$ の変化に相殺されて、結果的にわずかの $\Delta G$ の変化となる。本研究においても、一アミノ酸置換が $\Delta H_a$ に大きな影響を与えた( Table 1 )。変異型の $\Delta H_a$ は野生型に比べ40 で23.5 kJ mol<sup>-1</sup>変化したが、 $\Delta S_a$ に大きく相殺され、 $\Delta G_a$ の変化は僅か1.1 kJ mol<sup>-1</sup>となった。 Table 1に示すように、*Ec* $\alpha$ サブユニットと*St* $\alpha$ サブユニットの複合体形成の熱力学的性質は有意に異なっていた。*Ec* $\alpha$ サブユニットの一残基のみを*St* $\alpha$ サブユニットに似せた変異型、*Ec* $\alpha$  K109N、の複合体形成の熱力学的パラメータは*St* $\alpha$ サブユニットのそれに類似した。

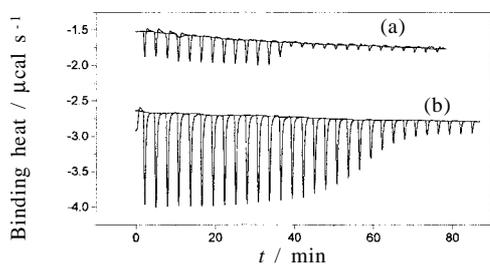
複合体形成に伴って構造形成に関わる残基の数は Table 2に示すように、変異型と*St* $\alpha$ サブユニットが*Ec* $\alpha$ サブユニットよりも大きい。これらの3種の $\alpha$ サブユニットは酵素活性が等しいので、複合体の構造はほぼ同一と仮定できるので、*St* $\alpha$ サブユニット単独の構造は*Ec* $\alpha$ サブユニット単独の構造よりもよりルーズな箇所が多いことを示唆している。変異型も同じ傾向にあることが分かる。事実、変異型の示差走査熱量計(DSC)によると、変異型の変性のエンタルピー変化( $\Delta H_d$ )が野生型に比べ54 で約80 kJ mol<sup>-1</sup>低い。この大きな変化はエントロピー項( $\Delta S_d$ )で大きく相殺されている。このことは、変異型が野生型に比べルーズな部分が多いという推定を支持している。

6. 超好熱菌由来のトリプトファン合成酵素 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットとの複合体形成に伴う熱力学的パラメータ

超好熱菌、*P. furiosus*は水の沸騰温度付近を生育の至適温度とするアーキア(Archaeaは真核生物と真正細菌とは異なったドメインに分類されている。古細菌とも訳されているが真性細菌と紛らわしいのでアーキアと呼ばれている)である。超好熱菌由来の酵素は、通常の蛋白質が変性する高い温度で安定で、最も高い酵素活性を発揮する。また、一般に、常温生物由来の蛋白質に比べX線結晶構造解析に適した結晶が得やすいと言われている。事実、最近、私たちは超好熱菌、*P. furiosus*由来のトリプトファン合成酵素 $\alpha$ サブユニットの結晶構造解析に成功した。 $\alpha$ サブユニット単独での構造解析は世界ではじめての成功である。<sup>3)</sup>

ここでは、*P. furiosus*由来のトリプトファン合成酵素 $\alpha$ サブユニットと $\beta_2$ サブユニットとの複合体形成の特徴を等温滴定カロリーメトリーによって得た熱力学的パラメータと構造知見とに基づいて議論する。

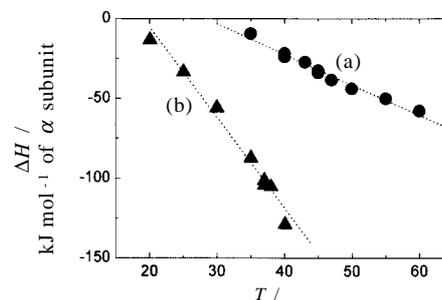
Fig.4に、*Pf* $\alpha$ サブユニットに*Pf* $\beta_2$ サブユニットを添加した滴定曲線を示す。この測定では、*Pf* $\alpha$ サブユニットを高い濃度に濃縮できないために、先述の常温菌の滴定実験と



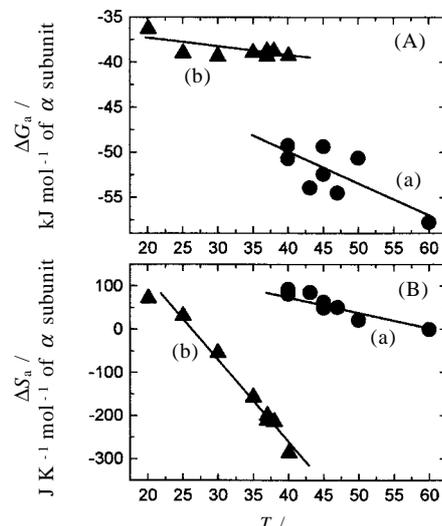
**Fig.4** Raw data of isothermal titration calorimetry obtained for automatic injections, each 10  $\mu\text{l}$  of the  $\beta_2$  subunit into the sample cell containing  $\alpha$  subunit solution (1.31 ml). (a): The  $\alpha$  and  $\beta_2$  subunits of tryptophan synthase from *P. furiosus* at 40 and pH 7.0. The concentration of them was 0.015 mM and 0.16 mM, respectively. (b): The  $\alpha$  and  $\beta_2$  subunits of tryptophan synthase from *E. coli* at 37 and pH 7.0. The concentration of them was 0.019 mM and 0.174 mM, respectively.

は逆の方法で滴定した。そのため、参照実験として大腸菌のサブユニットの滴定実験も $\beta_2$ サブユニットを添加する方法で行った (Fig.4)。図から分かるように両者の滴定曲線は著しい相違を示した。超好熱菌サブユニットの複合体形成の熱量は大腸菌サブユニットのそれに比べ著しく低く、また、滴定曲線の共同性が高い。これは、Table 1に示すように、超好熱菌由来サブユニットの複合体形成に伴うエントロピー変化 ( $\Delta H_a$ ) は大腸菌のそれよりも小さく、複合体形成の結合定数は大きいことを意味する。Fig.5に両蛋白質の $\Delta H_a$ の温度依存性を示す。各温度ともに超好熱菌蛋白質の $\Delta H_a$ は大腸菌のものに比べ負の値が小さい。このことは、複合体形成に伴う発熱量が超好熱菌では著しく少ないことを意味している。 $\Delta H_a$ の温度勾配は複合体形成に伴う熱容量変化 ( $\Delta C_{p,a}$ ) を示す。超好熱菌蛋白質の $\Delta C_{p,a}$ は  $-1.91 \text{ kJ K}^{-1} (\text{mol of } \alpha \text{ subunit})^{-1}$  で、大腸菌蛋白質のそれは  $-5.67 \text{ kJ K}^{-1} (\text{mol of } \alpha \text{ subunit})^{-1}$  であった。超好熱菌蛋白質の $\Delta C_{p,a}$ は大腸菌のそれに比べほぼ1/3に減少している。更に、Fig.6には $\Delta G_a$ と $\Delta S_a$ の温度関数が示されている。 $\Delta G_a$ は滴定カロリメトリーから得たサブユニット複合体形成の結合定数 ( $K_a$ ) から求めることができる。

Fig.5と6から明らかなように、超好熱菌、*P. furiosus* 由来トリプトファン合成酵素 $\alpha/\beta$ サブユニットの複合体形成のメカニズムが、大腸菌由来のそれと大変に異なっている。特に、大腸菌のそれは大きな $\Delta C_{p,a}$ の変化を伴うことが特徴としてあげられたが、超好熱菌のそれは $\Delta C_{p,a}$ 値が著しく低下している。しかし、超好熱菌蛋白質の $\Delta C_{p,a}$  ( $-1.91 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) の値は、式(1)を用いて得たサルモネラ菌由来の蛋白質が複合体形成にともない変化することが予測される熱容量変化量 ( $-1.05 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) のほぼ2倍の値を



**Fig.5** Temperature dependence of  $\Delta H_a$  for the association of  $\alpha$  and  $\beta_2$  subunits of tryptophan synthase at pH 7.0. (a): Subunits from *P. furiosus*. The slope ( $\Delta C_{p,a}$ ) was  $-1.91 \text{ kJ K}^{-1} (\text{mol of } \alpha \text{ subunit})^{-1}$ . (b): Subunits from *E. coli*. The slope ( $\Delta C_{p,a}$ ) was  $-5.67 \text{ kJ K}^{-1} (\text{mol of } \alpha \text{ subunit})^{-1}$ .



**Fig.6** Temperature dependence of  $\Delta G_a$  (A) and  $\Delta S_a$  (B) for the association of  $\alpha$  and  $\beta_2$  subunits of tryptophan synthase at pH 7.0. (a) Subunits from *P. furiosus*. (b) Subunits from *E. coli*. The  $\Delta G_a$  was estimated using the association constant ( $K_a$ ) obtained from titration calorimetry.

示している。このことは、超好熱菌蛋白質においても、複合体形成に伴い、構造形成 (フォールディング) 反応が起こっていることを示している。そこで、先に示した方法で、超好熱菌蛋白質の複合体形成に関わる残基数の算出を試みた。その結果、Table 2に示すように、10残基以下で常温菌由来蛋白質の100残基近くと大きな差異を示した。

#### 7. 熱力学的パラメータの変化と立体構造との関連 熱測定によって明らかとなった超好熱菌と常温菌由来のト

トリプトファン合成酵素 $\alpha/\beta$ サブユニット複合体形成反応の違いが、どのような構造的な特徴に基づいているかを明らかにするためには、それぞれの各サブユニット単独と複合体の両構造を必要とする。しかし、これまでに判明している立体構造は、サルモネラ菌由来の複合体の構造と超好熱菌由来の $\alpha$ サブユニット単独の構造だけである。複合体を形成している $St\alpha$ サブユニットと $Pf\alpha$ サブユニットの構造上の違いは次の通りである。 $Pf\alpha$ サブユニットの一次構造は $St\alpha$ サブユニットに比べ20残基短くなっている。その主な部分はN-端で12残基、C-端で6残基である。残基構造の運動性(flexibility)が高いため、座標を決定できていない部分が $Pf\alpha$ サブユニットで3残基(170-172)、 $St\alpha$ サブユニットでは12残基(178-189)ある。このことは、 $St\alpha$ サブユニットは複合体を形成している構造であるにもかかわらず、単独の $Pf\alpha$ サブユニットよりもより多くのルーズな(動きの激しい)構造部分を有していることを示す。 $St\alpha$ サブユニットの単独での構造解析に必要な良好な結晶が得られないことなどを考えあわせると、 $St\alpha$ サブユニット単独では、複合体よりも更にルーズな部分が非常に多い構造である可能性が高い。

両構造のB-ファクターの相対的比較から、 $\alpha/\beta$ サブユニット接触界面でのB-ファクターは $Pf\alpha$ サブユニットの方が高い値を示したが、他の部分では $St\alpha$ サブユニットの方が高い値を示した。このことは、 $St\alpha$ サブユニット単独であれば、構造全体としても $St\alpha$ サブユニットの方が運動性の高いよりルーズな部分を多く含む構造であることを示唆している。

熱測定の結果から常温菌蛋白質 $\alpha/\beta$ サブユニットの複合体形成反応が構造形成(フォールディング)を伴うことを示唆したが、このことは $\alpha$ サブユニット単独ではかなりルーズな部分(部分的に変性した構造)があり、そのルーズな部分の構造形成が複合体形成と同時に起こることを示している。一方、超好熱菌蛋白質の場合は、 $\alpha$ サブユニット単独でルーズな構造部分が少ないため、複合体形成に伴って大きな構造形成反応が観察されないのであろう。<sup>37</sup>での超好熱菌酵素の酵素活性が大腸菌のその3.7%と著しく低い。大腸菌のその最大活性値と相当する値を示すには、超好熱菌の場合、80~90 付近まで温度を上げる必要がある。このことは、37 付近で $Pf\alpha$ サブユニットがかなり柔軟性の低い(rigid)構造をとっていることと関連していると思われる。

## 文 献

- 1) E. W. Miles, *Subcellular Biochemistry, Proteins: Structure, Function, and Engineering* (B. B. Biswas & S. Roy, eds.) **24**, pp.207-254, Plenum Press, New York (1995).
- 2) C. C. Hyde, S. A. Ahmed, E. A. Padlan, E. W. Miles, and D. R. Davies, *J. Biol. Chem.* **263**, 17857-17871 (1988).

- 3) Y. Yamagata, K. Ogasahara, Y. Hioki, S. J. Lee, A. Nakagawa, H. Nakamura, M. Ishida, S. Kuramitsu, and K. Yutani, *J. Biol. Chem.*, in press (2001).
- 4) K. Ogasahara, K. Hiraga, W. Ito, E. W. Miles, and K. Yutani, *J. Biol. Chem.* **267**, 5222-5228 (1992).
- 5) K. Hiraga and K. Yutani, *Eur. J. Biochem.* **240**, 63-70 (1996).
- 6) K. Hiraga and K. Yutani, *J. Biol. Chem.* **272**, 4935-4940 (1997).
- 7) A. N. Lane, C. H. Paul, and K. Kirschner, *EMBO J.* **3**, 279-287 (1984).
- 8) P. Wilhelm, I. Pilz, A. N. Lane, and K. Kirschner, *Eur. J. Biochem.* **129**, 51-56 (1982).
- 9) A. N. Lane, *Eur. J. Biochem.* **133**, 531-538 (1983).
- 10) A. N. Lane and K. Kirschner, *Eur. J. Biochem.* **129**, 675-684 (1983).
- 11) R. S. Spolar, J. R. Livingstone, and M. T. Record Jr., *Biochemistry* **31**, 3947-3955 (1992).
- 12) M. L. Connolly, *J. Mol. Graphics* **11**, 139-141 (1993).
- 13) R. S. Spolar and M. T. Record Jr., *Science* **263**, 777-784 (1994).
- 14) P. K. Murphy, E. Freire, and Y. Paterson, *Proteins: Str. Funct. Genet.* **21**, 83-90 (1995).
- 15) W. Wilcox and D. Eisenberg, *Protein Sci.* **1**, 641-653 (1992).
- 16) Y. V. Griko, V. V. Rogov, and P. L. Privalov, *Biochemistry* **31**, 12701-12705 (1992).
- 17) J. U. Bowie and R. T. Sauer, *Biochemistry* **28**, 7139-7143 (1989).
- 18) S. Miller, *Protein Engineering* **3**, 77-83 (1989).
- 19) J. Janin, *Proteins: Str. Funct. Genet.* **21**, 30-39 (1995).
- 20) E. W. Miles and T. Fairwell, *Arch. Biochem. Biophys.* **230**, 430-439 (1984).

油谷克英 Katsuhide Yutani

大阪大学蛋白質研究所, Inst. Protein Res., Osaka Univ.,  
TEL. 06-6879-8615, FAX. 06-6879-8616, e-mail: yutani@protein.osaka-u.ac.jp

研究テーマ: 蛋白質立体構造の安定化機構, 蛋白質分子間相互作用

小笠原京子 Kyoko Ogasahara

大阪大学蛋白質研究所, Inst. Protein Res., Osaka Univ.,  
TEL. 06-6879-8615, FAX. 06-6879-8616, e-mail: ogasa@protein.osaka-u.ac.jp

研究テーマ: 好熱菌蛋白質の安定化機構, 蛋白質分子間相互作用