

真菌類Mevalonate kinase及び

Phosphomevalonate kinaseの機能・構造解析

令和 4 年度

北海道医療大学大学院薬学研究科

鈴木 千 幸

SUMMARY

The mevalonate pathway is a crucial metabolic pathway that converts acetyl-CoA into isopentenyl diphosphate, a 5-carbon building block used in the biosynthesis of isoprenoids. The three enzymes involved in the yeast mevalonate pathway—mevalonate kinase (MK), phosphomevalonate kinase (PMK), and diphosphodecarboxylase (MDD)—belong to the GHMP kinase superfamily and convert mevalonate to isopentenyl diphosphate using ATP.

Interestingly, there are two distinct types of PMK that catalyze the ATP-dependent phosphorylation of (*R*)-mevalonate 5-phosphate (*R*-mev5p) to form (*R*)-mevalonate 5-diphosphate: fungal PMK (Erg8p) is a GHMP kinase type PMK and its orthologs are found in fungi, plants, and some eubacteria; human PMK (*h*PMK) is an NMP kinase type PMK and its orthologs are found only in animals and invertebrates. Although these two enzymes use the same substrate to produce the same product, they have no sequence similarity. As GHMP kinase-type PMKs are not present in animals, making it an attractive target for antifungal drug development. However, enzymatic studies on Erg8p are limited, and three-dimensional structural information is not available. Based on the above background, this study focused on fungal Erg8p and investigated Erg8p and related enzymes.

Four different fungal Erg8p and related enzymes, fungal MK (Erg12p), human MK (*h*MK) and *h*PMK, were selected as target proteins. Overexpression system using *Escherichia coli* as a host was constructed for these enzymes, and all seven enzymes were successfully expressed in soluble form. By examining various conditions such as culture temperature, we determined the optimal induction conditions for the target protein. Purification of all target proteins was carried out by combining liquid chromatography, and purified enzymes were successfully prepared in 10 mg scale.

The activity assay method for MK and PMK was optimized and a highly accurate assay method was established. Kinetic parameters were calculated for all target proteins, including fungal MK (*C. gla* Erg12p), which had never been analyzed using purified enzymes. It was found that the K_m and V_{max} of Erg8p and Erg12p are higher than those of *h*PMK and *h*MK.

A method for quantification of Erg8p and Erg12p by LC-MS/MS was investigated. Purified enzymes (*C. gla* Erg8p and *C. gla* Erg12p) were reduced, alkylated and digested with trypsin to prepare peptide samples. Analysis was performed by the multiple reaction monitoring (MRM) method using a semi-micro LC-triple quadrupole mass spectrometer. MRM transitions were set by selecting 3-4 peptides based on the analysis results by Skyline software. Among the peptides separated by LC,

peptides with excellent sensitivity, reproducibility, and high specificity were selected, and the MRM method was established. For both enzymes, the calibration curve showed good linearity in the range of several tens of fmol to several pmol, and the detection limit was several fmol. It was applicable to quantification of this enzyme in complex matrices such as bacterial cell extracts.

Crystallization of four different fungal Erg8p and *C. gla* Erg12p was attempted for X-ray crystal structure analysis, and *S. cer* Erg8p was successfully crystallized. After data collection by X-ray diffraction experiments, the structure of *S. cer* Erg8p was solved through molecular replacement using an *AlphaFold2*-predicted model as a search model. As expected from the amino acid sequences, the three-dimensional structures of *S. cer* Erg8p and hPMK are completely different, and no similarity was confirmed in the local structures. Result of analyzing the Erg8p - ATP complex structure and the Erg8p - *R-mev5p* - ATP complex structure, the details of substrate and ATP recognition by Erg8p were elucidated. Crystal structure analysis revealed that Bis Tris Propane (BTP) binds to the vicinity of the ATP-binding site of *S. cer* Erg8p.

In this study, a large-scale preparation method for Erg8p and related enzymes was established, and functional and structural analyzes were performed. Activity measurements were performed for these enzymes, and detailed kinetic parameters were determined. As part of the proteome analysis, a method for measuring *C. gla* Erg8p and Erg12p using LC-MS/MS was established. X-ray crystallographic analysis of *S. cer* Erg8p revealed details of the *R-mev5p*, ATP and BTP recognition by Erg8p. The findings in this study will not only deepen our understanding of Erg8p, but also provide useful information for designing Erg8p-specific inhibitors.

略語集

本文では、以下の略語を使用した。

AEX	Anion exchange chromatography (陰イオン交換クロマトグラフィー)
ADP	Adenosine diphosphate (アデノシン二リン酸)
ATP	Adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)
Bis-Tris propane	1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane (1,3-ビス[トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]プロパン)
BSA	Bovine serum albumin (牛血清アルブミン)
cDNA	Complementary DNA (相補的 DNA)
CID	Collision-induced dissociation (衝突誘起解離)
Cm	Chloramphenicol (クロラムフェニコール)
C.V.	Coefficient of variation (変動係数)
CYP	Cytochrome P450 (シトクロム P450)
DTT	Dithiothreitol (ジチオトレイトール)
DL	Desolvation line (脱溶媒ライン)
GHMP	Galactokinases, Homoserine kinases, Mevalonate kinase, Phosphomevalonate kinase
Erg8p	Fungi phosphomevalonate kinase (真菌メバロン酸キナーゼ)
Erg12p	Fungi mevalonate kinase (真菌ホスホメバロン酸キナーゼ)
HEPES	4-(2-HydroxyEthyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid (4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸)
His-tag	Six-histidine-residues tag (ポリヒスチジンタグ)
hMK	Human mevalonate kinase (ヒトメバロン酸キナーゼ)
HPLC	High performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
hPMK	Human phosphomevalonate kinase (ヒトホスホメバロン酸キナーゼ)
IAA	2-Iodoacetamide (ヨードアセトアミド)
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド)
Km	Kanamycin monosulfate (カナマイシン)
K_m	Michaelis constant (親和定数)
LC	Liquid chromatography (液体クロマトグラフィー)

LDH	Lactate dehydrogenase (乳酸デヒドロゲナーゼ)
MDD	Mevalonate diphosphodecarboxylase (ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ)
MES	2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid (2-モルホリノエタンスルホン酸)
Mev	Mevalonate (メバロン酸)
Mev5p	Mevalonate 5-phosphate (メバロン酸 5 リン酸)
Mev5pp	Mevalonate 5-pyrophosphate (メバロン酸 5 ピロリン酸)
MK	Mevalonate kinase (メバロン酸キナーゼ)
MRM	Multiple reaction monitoring (多重反応モニタリング)
MS	Mass spectrometry (質量分析法)
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)
NMP	Nucleoside monophosphate kinases (ヌクレオシド一リン酸キナーゼ)
PCR	Polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
PEG	Polyethylene glycol (ポリエチレングリコール)
PEP	Phosphoenolpyruvic acid (ホスホエノールピルビン酸)
PK	Pyruvate kinase (ピルビン酸キナーゼ)
PMK	Phosphomevalonate kinase (ホスホメバロン酸キナーゼ)
SEC	Size exclusion chromatography (サイズ排除クロマトグラフィー)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (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)
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SOE-PCR	Splicing by overlap extension polymerase chain reaction (一段階オーバーラップ伸長 PCR 法)
TIC	Total ion chromatogram (全イオンクロマトグラム)
TFA	Trifluoroacetic acid (トリフルオロ酢酸)
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane (トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)
tRNA	Transfer RNA (トランスファーRNA)
V_{\max}	Maximum velocity (最大反応速度)

目次

序論.....	1
第1章 Mevalonate kinase (MK) 及び Phosphomevalonate kinase (PMK) の大量調製法の確立	
第1節 緒言.....	5
第2節 実験方法.....	5
第1項 試薬, 使用機器及び DNA 試料.....	5
第2項 発現プラスミドの構築.....	8
第3項 発現誘導条件の至適化.....	10
第4項 組換えタンパク質の精製.....	11
第3節 結果及び考察.....	14
第1項 組換えタンパク質の大量発現.....	14
第2項 組換えタンパク質の大量調製.....	24
第4節 小括.....	33
第2章 活性測定法の確立と Kinetic parameters の測定	
第1節 緒言.....	34
第2節 実験方法.....	35
第1項 試薬及び使用機器.....	35
第2項 活性測定条件の検討.....	35
第3項 PMK の活性測定法.....	38
第4項 MK の活性測定法.....	38
第5項 酵素精製過程における比活性の測定.....	39
第3節 結果及び考察.....	39
第1項 活性測定条件の至適化.....	39
第2項 PMK の Kinetic parameters の測定.....	41
第3項 MK の Kinetic parameters の測定.....	44
第4項 酵素精製過程における比活性の測定.....	45
第4節 小括.....	46
第3章 LC-MS/MS 法による Mevalonate kinase (Erg12p) 及び Phosphomevalonate kinase (Erg8p) の定量	
第1節 緒言.....	47
第2節 実験方法.....	47

第1項 試薬及び使用機器.....	47
第2項 LC-MS/MS 測定.....	48
第3節 結果及び考察.....	49
第1項 LC-MS/MS による Erg8p の定量.....	49
第2項 LC-MS/MS による Erg12p の定量.....	53
第4節 小括.....	56
第4章 Erg8p の X 線結晶構造解析	
第1節 緒言.....	57
第2節 実験方法.....	57
第1項 試薬及び使用機器.....	57
第2項 結晶化スクリーニング.....	58
第3項 Erg8p 結晶化条件の至適化及びリガンド複合体結晶の作製.....	59
第4項 X 線回折データの収集とデータ処理.....	59
第5項 構造決定と精密化.....	62
第3節 結果及び考察.....	64
第1項 Erg8p の全体構造.....	65
第2項 Erg8p による ATP 認識.....	66
第3項 Erg8p による (R)-mevalonate 5-phosphate の認識.....	67
第4項 Erg8p と Bis-Tris propane の複合体構造.....	70
第5項 ヒト PMK 及び GHMP kinase との構造比較.....	75
第4節 小括.....	81
総括.....	83
謝辞.....	85
引用文献.....	86

序論

ステロールは真核生物の細胞膜を構成する脂質成分であり、真菌細胞ではエルゴステロールが主要構成成分である。現在、抗真菌薬としてエルゴステロールの生合成を阻害するアゾール系抗真菌薬、アリルアミン系抗真菌薬、モルホリン系抗真菌薬や、エルゴステロールに結合して作用するポリエン系抗真菌薬が開発されている。しかし、耐性菌の出現に加えて、今日、臨床でよく使用されるアゾール系抗真菌薬に関しては CYP3A4 阻害作用による薬物相互作用や腎機能への影響、ポリエン系抗真菌薬に関しては腎毒性や薬価などの様々な問題が挙げられる。これらの課題に対して、エルゴステロール生合成を標的とする新たな抗真菌薬の開発が求められている。

エルゴステロールは 25 種類のタンパク質が関与する長大な経路によって生合成されるが、その生合成経路はアセチル CoA からスクアレンまでのメバロン酸経路 (Mevalonate pathway) とスクアレンからエルゴステロールまでの後半部の大きく 2 つの経路に大別されている。メバロン酸経路はほとんどの真核生物、古細菌及び少数の細菌に存在し、酵母ではエルゴステロールのみならずユビキノン、ドリコール、プレニル化タンパク質などイソプレノイド代謝物の供給を行う重要な代謝経路となっている。¹⁻⁵⁾ しかしながら、エルゴステロールの生合成経路を標的とする既存の抗真菌薬 (アゾール系、ポリエン系など) は、スクアレン以降の後半部の酵素を標的としており、メバロン酸経路の酵素を標的とする抗真菌薬についてはほとんど検討されていない (Fig. 1)。⁶⁾

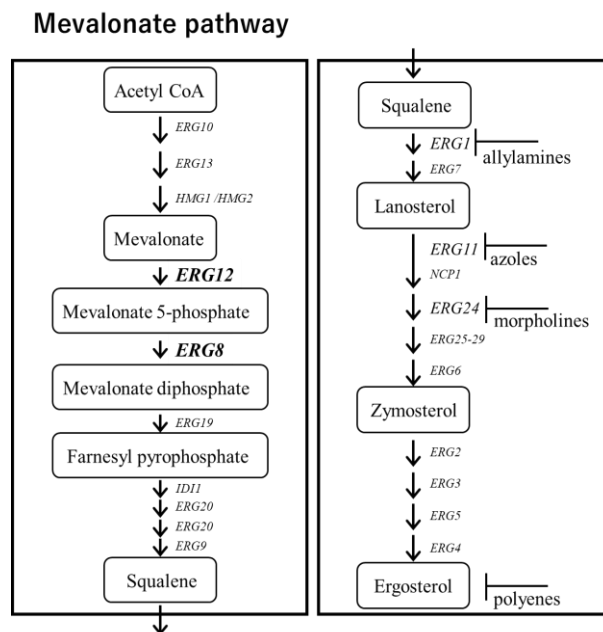


Fig. 1. Ergosterol Biosynthesis Pathway

真菌及びヒトのメバロン酸経路には、Mevalonate kinase (MK), Phosphomevalonate kinase (PMK), Mevalonate diphosphodecarboxylase (MDD) の3種の酵素が存在する。^{4,7-9)} これらの酵素はいずれもATP依存性キナーゼであり、MKが(R)-mevalonate (R-mev) から(R)-mevalonate 5-phosphate (R-mev5p) への変換を、PMKがR-mev5pから(R)-mevalonate 5-pyrophosphate (R-mev5pp) への変換を、MDDがR-mev5ppからイソペンテニルニリン酸への変換をそれぞれ触媒する (Fig. 2).

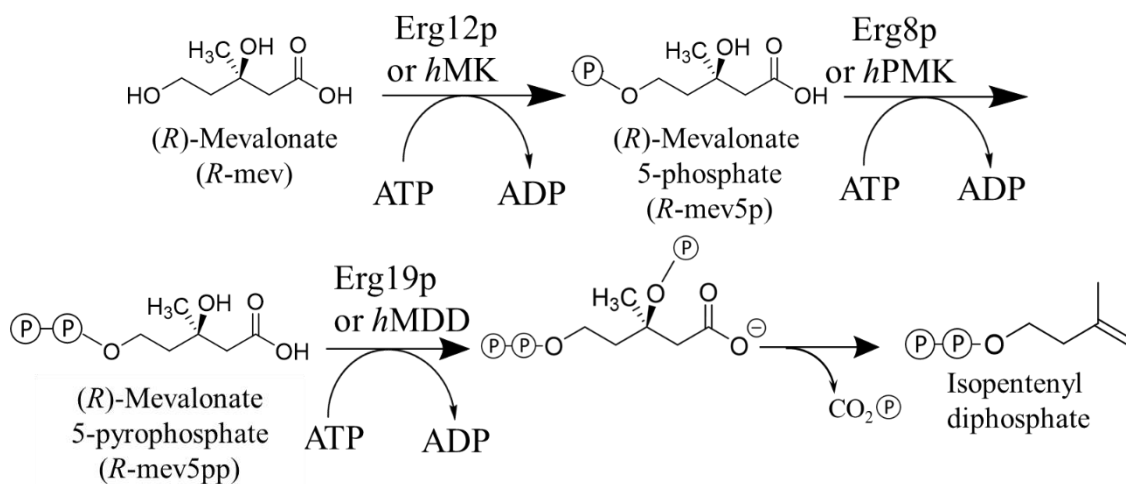


Fig. 2. GHMP Kinases in Mevalonate Pathway

真菌 PMK (以下 Erg8p) は真核生物に広く分布するオーソログで GHMP (Galactokinases, Homoserine kinases, Mevalonate kinase, Phosphomevalonate kinase) キナーゼタイプスーパーファミリーに属する必須酵素の PMK である。¹⁰⁾ 一方、ヒト PMK (以下 hPMK) は動物及び無脊椎動物にのみ確認されるオーソログで Nucleoside monophosphate (NMP) キナーゼタイプの PMK である。¹¹⁾ このように2種の異なるタイプの PMK が存在するのは動物の進化の初期に non-orthologous gene displacement が起きたためと推測されている。¹²⁾ これらの PMK は同じ基質を同じ産物へと変換し、同等の生物学的役割を担っているが、両者の間に配列及び構造の相同性が存在しないことから、hPMK に影響しない Erg8p 特異的阻害剤の開発が可能と考えられ、ひいてはエルゴステロール生合成を標的とする新規抗真菌薬の開発が可能であると期待される。しかし、Erg8p に関するこれまでの研究は *Saccharomyces cerevisiae* を用いた遺伝学的解析が中心であり、¹⁰⁾ 単離酵素を用いた機能解析の報告は1例に留まり、¹³⁾ 立体構造についてはこれまで全く報告されていない。⁴⁾ 従って、Erg8p の機能及び立体構造解析は、真菌類のメバロン酸経路の未解決部分の解明のみならず、Erg8p の阻害剤候補となる化合物の

探索において重要な情報を提供するものと考えられる。そこで、本研究では Erg8p に着目し、その詳細な機能解明並びに Erg8p に特異的な阻害剤を開発する上での基礎的知見を得ることを目的に Erg8p の立体構造解析を行うこととした。

Erg8p の機能及び立体構造を解析するにあたり、幅広い種類の真菌を調査するため 4 種の真菌 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cer*), *Candida glabrata* (*C. gla*), *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pom*), *Aspergillus oryzae* (*A. ory*) の Erg8p を研究対象として採用した。このうち *S. cer*, *S. pom*, *A. ory* についてはモデル生物として用いられる真菌種から進化的距離の大きいものを選択した。*Candida* 属はヒトに親和性が高く、常在菌として消化管粘膜に存在し内因性日和見感染症の原因の一つとして挙げられている。特に *C. gla* は一部にアゾール耐性を持つことが報告されており、¹⁴⁾ 新規治療薬の開発が切望されている真菌である。さらに、Erg8p に関して、将来的な阻害剤の開発を見据えて研究を行うにあたり、Erg8p のみならず Erg8p 関連酵素への影響等も考慮する必要があることから、Erg8p の関連酵素としてヒトオーソログである *hPMK*, 真菌 MK (以下 Erg12p) 及びヒト MK (以下 *hMK*) を選択し、併せて検討することとした。MK と PMK が触媒する反応は類似性が高く、また、Erg8p と Erg12p の間には 21% の配列相同性が、Erg8p と *hMK* との間には 19% の配列相同性が認められる (Fig. 3)。従って、これらの関連酵素についても包括的に調査・研究を行うことで、Erg8p と関連酵素の機能及び立体構造の差異が明確となり、Erg8p のより詳細な性質の解明並びに特異的な阻害剤を設計する上で有用な情報が得られるものと期待される。

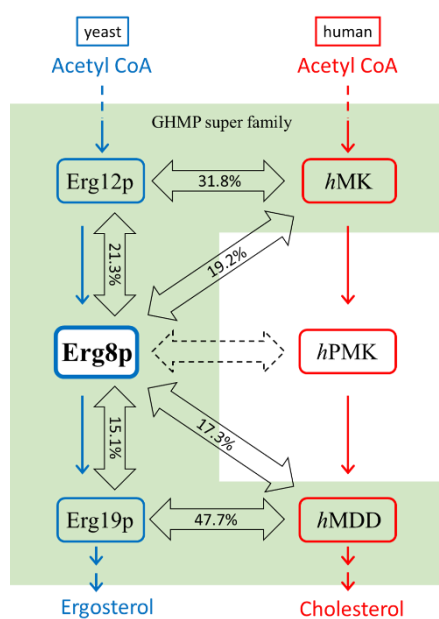


Fig. 3. GHMP Kinases and NMP Kinase in Yeast and Human Mevalonate Pathway
Sequence homology between enzymes indicated by numbers in arrows.

以下、本研究結果を4つの章で詳述する。

第1章では、MK及びPMKの詳細な機能解析並びに立体構造解析を行うためには、高純度かつ大量の酵素が必要となることから、それらの大量調製法について論述する。真菌の内在性MK及びPMKの存在比は極めて低いことから、大量にタンパク質を入手するには組換え発現系を利用する必要がある。しかしながらErg8p及びErg12pの大量発現系に関する報告は極めて少ないことから、変性が少なく、再現性及び効率の良い発現誘導条件並びに各種クロマトグラフ法による簡便な単離精製法について検討することとした。

第2章では、Erg8p及びErg12pの単離酵素を用いた速度論的解析について論述する。Kinetics parametersは酵素の機能の特徴づけるだけではなく、当該酵素の阻害剤を開発する上で極めて重要な情報となるが、Erg8p及びErg12pの単離酵素を用いた速度論的解析については、*S. cerevisiae*のErg8pに関する報告1例のみである。また、報告されている活性測定法については、そのほとんどがPyruvate kinaseとLactate dehydrogenaseの共役酵素反応系を用いる方法であることから、著者も採用することとしたが、報告者により用いる基質や反応条件が異なっており、また著者の予備的実験より既報の方法はいずれも精度が低いことが判明した。そこでErg8p及びErg12pの高精度活性測定法を開発した後、統一した条件下で各酵素のKinetic parametersを算出し、比較検討を行うこととした。

第3章では、LC-MS/MSを用いたErg8p及びErg12pの定量法について論述する。第1章においてErg8p及びErg12pの高純度精製タンパク質が得られ、本酵素を標準試料として用いる定量法への応用が可能となったことから、大量調製時の発現量の解析のみならず、真菌類の定量プロテオーム解析、さらにMKやPMKの関連する疾患の病態解析への応用も視野に入れ、LC-MS/MSを用いた定量ターゲットプロテオミクスについて検討した。

第4章では、Erg8pの機能や立体構造を解明するために行ったX線結晶構造解析について論述する。酵素阻害剤を開発する上で、酵素の立体構造に関する情報は極めて重要であるが、現在まで、Erg8pの結晶化や立体構造に関する報告はない。本研究では、Erg8pの結晶化法について検討した後、リガンド非結合体及び各種リガンド結合複合体結晶を作製し、X線結晶構造解析を行い、それらの立体構造について検討した。さらに関連するMKやPMKとの比較を行い、構造上の類似点や差異について比較検討した。

第1章 Mevalonate kinase (MK) 及び Phosphomevalonate kinase (PMK) の大量調製法の確立

第1節 緒言

本研究において真菌 MK (Erg12p) 及び真菌 PMK (Erg8p) の機能・構造解析を行うにあたり、ヒト関連酵素 (*h*MK, *h*PMK) も併せて、高純度の酵素が大量に必要となる。また、MK 及び PMK の酵素活性、阻害活性の安定した評価系を確立するためには、前提として酵素の安定した調製法の確立が必須である。天然に発現している内在性タンパク質の単離を試みる場合、全タンパク質に対する目的タンパク質の比率が低いことなどから、一般に大きな労力が必要であり、大量かつ安定した調製法の確立は不可能であることが多い。そこで本研究では大腸菌を発現ホストとした組換え発現系を利用する目的タンパク質の実用的な大量調製法について検討することとした。

組換え発現系には、外来タンパク質の誘導発現が可能な pET システムを選択し、本研究で用いる各種酵素に対して、C 末端にポリヒスチジンタグ (His-tag) を付加するよう設計した発現プラスミドを構築した。目的タンパク質の大腸菌における最適な発現誘導条件を設定するため、培養温度、誘導時間、添加剤の効果等を検討した。また、目的タンパク質の大量発現系を確立した後、目的タンパク質を高純度に精製するための液体クロマトグラム法についても検討した。

第2節 実験方法

第1項 試薬、使用機器及び DNA 試料

(1) 試薬及び使用機器

本章で用いた試薬及び使用機器は以下のとおりである。

サーマルサイクラー	PC320 (ASTEC 社)
エレクトロポレーター	MicroPulser (Bio-Rad 社)
フレンチプレス	FA-078 Pressure Cell Press (SLM Aminco 社)
クロマトグラムシステム	BioLogic DuoFlow (Bio-Rad 社)
96 ウェルマイクロプレート	マイクロウェルプレート 269620 (Thermo Fisher Scientific 社)
マイクロプレートリーダー	Infinite M200 (TECAN 社)

Polymerase chain reaction (PCR) に用いる DNA polymerase 及び KOD -plus- ver.2 を東洋紡社より、DNA 精製及びプラスミド抽出用の FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit 及び FastGene™ Plasmid mini Kit を日本ジェネティクス社より購入した。各種制限酵素 (*Nde* I, *Nco* I, *Xho* I, *Sal* I) 及び DNA Ligation Kit<Mighty Mix>をタカラバイオ社より購入した。LB Broth, タンパク質抽出試薬 10×BugBuster®, Benzonase 及び Amicon Ultra 遠心式限外ろ過フィルターを Merck 社より購入した。Lysozyme, Deoxyribonuclease I 及び Bovine serum albumin (BSA) を富士フィルム・和光純薬社より購入した。簡易精製用の Ni-resin としての Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 及びタンパク質精製用の各種カラム HisTrap™ HP, HiTrap™ Q HP, HiLoad® 16/600 Superdex 200 pg を Cytiva 社より購入した。タンパク質精製用透析膜に用いる Spectra/Por®3 (MW:3500) を Replizen 社より購入した。SDS-PAGE に用いる分子量マーカー SDS-PAGE スタンダード (Broad) 1610317 を Bio-Rad 社又は Protein Molecular Weight Marker (Broad) 3452 をタカラバイオ社より購入した。タンパク質定量用の XL-Bradford をファーマフーズ社より購入した。その他の試薬及び溶媒は全て市販の特級規格品を用いた。

(2) DNA 試料

真菌 (*S. cer*, *C. gla*, *S. pom*, *A. ory*) のゲノム DNA を独立行政法人製品評価技術基盤機構より購入した。*hMK* 及び *hPMK* の cDNA を trans OMIC technologies 社より、大腸菌で増幅可能なプラスミドベクターにクローニングされた製品を購入した。発現ベクターとして 2 種類のプラスミド pET-26b, pET-28b (Merck 社) を用いた。

プライマーは、目的遺伝子の 5'末端に相補的な配列に制限酵素 *Nde* I 又は *Nco* I 認識配列を付加した Fw primer 及び 3'末端に相補的な配列に制限酵素 *Xho* I 又は *Sal* I 認識配列を付加した Rv primer を設計し、合成を Merck 社に委託した (Table 1)。

(3) 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)

タンパク質の SDS-PAGE は Laemmli の方法に従って、¹⁵⁾ 厚さ 1 mm, 1.5% (w/v) アクリルアミドゲルを用いて行った。泳動後のゲルはクマシーブリリアントブルーで染色した。分子量マーカーには SDS-PAGE スタンダード (Broad) 1610317 又は Protein Molecular Weight Marker (Broad) 3452 を用いた。

Table 1. Primers Used in This Study

Primer	Nucleotide sequence
<i>S. cer</i> <i>ERG8</i> Fw	5'-CCCCAC <u>CAATGGC</u> CAGAGTTGAGAGCCTTCAGTGTGCC-3'
<i>S. cer</i> <i>ERG8</i> Rv	5'-GGGGT <u>CTCGAG</u> TTTATCAAGATAAGTTTCCGGATCTTTTTCTTTCTT AACAC-3'
<i>C. gla</i> <i>ERG8</i> Fw	5'-CCCCA <u>CATATG</u> AAAAACATGGAAAGAGCATAACAGTGCTCCA G-3'
<i>C. gla</i> <i>ERG8</i> Rv	5'-GGGGT <u>CTCGAG</u> ATTCAAATCTCTGTAATATTCAGGGTTTTCAAGCTT TAAACCAAC-3'
<i>S. pom</i> <i>ERG8</i> Fw	5'-CCCCA <u>CATATG</u> AAAGTGACCTGCTCTGCTCCTGGTAAAGTACTTATA G-3'
<i>S. pom</i> <i>ERG8</i> Rv	5'-GGGGT <u>CTCGAG</u> TTCTACGGCTAGCCCATCGAAAGCAGGAG A-3'
<i>A. ory</i> <i>ERG8</i> Fw1	5'-CCCCA <u>CATATG</u> TCTTATCCGCCATCCGGGAGCAC-3'
<i>A. ory</i> <i>ERG8</i> Rv1	5'-GGGGT <u>GTCGACA</u> AAGCCAACCGGCATATTGGTCGAGAACCT C-3'
<i>A. ory</i> <i>ERG8</i> Fw2	5'-CAAAGGAACGACGGGCGTTCCAATCCGTTTCGTCGAAACTT CCC-3'
<i>A. ory</i> <i>ERG8</i> Rv2	5'-CGGATTGGAACGCCCGTCGTTCCCTTTGAATCACTTTGATTCC ACC-3'
<i>S. cer</i> <i>ERG12</i> Fw	5'-CCCCA <u>CATATG</u> TCAATTACCGTTCTTAACTTCTGCACCGGG -3'
<i>S. cer</i> <i>ERG12</i> Rv	5'-GGGGT <u>CTCGAG</u> TGAAGTCCATGGTAAATTCGTGTTTCCCTGGCAATAA TAG -3'
<i>C. gla</i> <i>ERG12</i> Fw	5'-CCCCA <u>CATATG</u> ACTGTAGAGCGGGACTTGCCATTTTC-3
<i>C. gla</i> <i>ERG12</i> Rv	5'-GGGGT <u>CTCGAG</u> ATGGATCCAGAACAGTGAATTTGTTGCTG TAG -3'
<i>hMK</i> Fw	5'-CCCCA <u>CATATG</u> TGTGTCAGAAGTCCTACTGGTGTCTGCTC-3'
<i>hMK</i> Rv	5'-GGGGT <u>CTCGAG</u> GAGGCCATCCAGGGCTTGCTGGACTC-3'
<i>hPMK</i> Fw	5'-CCCCA <u>CATATG</u> GCACCGTTAGGTGGCGCCCCGCGTCTGGTACTGCT GTTC-3'
<i>hPMK</i> Rv	5'-GGGGT <u>CTCGAG</u> AAGTCTGGAGCGGATAAATTCTATCAGGTT C-3'

Underlines show restriction enzymes recognition sites.

第2項 発現プラスミドの構築

(1) 各種真菌及びヒト遺伝子の増幅

目的遺伝子の増幅は、適切な鋳型 DNA と Fw 及び Rv プライマーを組み合わせ、KOD-plus-ver.2 を使用した PCR により行った。鋳型には、真菌由来遺伝子の場合はゲノム DNA を用い、*hMK* 及び *hPMK* の遺伝子に関しては当該 cDNA を含むプラスミドベクターを使用した。

真菌の遺伝子は基本的にイントロンを有していなかったためゲノムを鋳型とした PCR 産物を直接クローニングに用いることが出来たが、*A. ory ERG8* に関しては一か所のイントロンを有していたため、これをオーバーラップ伸長法 (Splicing by overlap extension PCR : SOE-PCR) で取り除いた。SOE-PCR の 1 段階目として、ゲノムを鋳型として *A. ory ERG8* Fw1 及び Rv2 プライマーを用いて前半のエキソン配列を増幅し、Fw2 及び Rv1 を用いて後半のエキソン配列を増幅した。1 段階目で増幅した各エキソン配列の 3'末端はアニーリング可能なオーバーラップを含むようプライマーが設計されていることから、これらを鋳型として *A. ory ERG8* Fw1 及び Rv1 プライマーを用いて SOE-PCR の 2 段階目の反応、すなわちイントロンを有しない目的遺伝子の増幅を行った。

(2) PCR 産物の精製と制限酵素処理

PCR 産物のアガロースゲル電気泳動を行い、主要な増幅産物が適切な分子量を示していることを確認した。泳動後のアガロースゲルから目的遺伝子の DNA 断片を含む部分を切り出し、FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit を用いてゲル内の DNA を回収することで精製した。アガロースの溶解及び電気泳動の際には TAE 緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA] を用い、DNA の染色には臭化エチジウムを使用した。

精製後の PCR 産物を、各プライマーによって導入された認識配列に対応する 2 種類の制限酵素で処理し、両末端に異なる突出末端を持つ目的遺伝子 DNA を得た。また、発現ベクターとして用いるプラスミド pET-26b を *Nde* I 及び *Xho* I で、pET-28b を *Nco* I 及び *Xho* I でそれぞれ処理した上で電気泳動を行い、アガロースゲルから回収、精製した。

(3) 発現プラスミドの構築

目的遺伝子のうち *S. cer ERG8* は pET-28b に、その他の目的遺伝子は pET-26b に導入し、C 末端に His-tag を有する目的タンパク質の発現プラスミドを構築した (Fig. 4)。制限酵素

処理後のプラスミド DNA 50 ng に対して、モル比で 3 倍から 10 倍程度の目的遺伝子 DNA を加えて滅菌水で全量を 10 μ L に調製し、これに DNA Ligation Kit <Mighty Mix> を等量混合して 16 $^{\circ}$ C で 30 分から 4 時間、ライゲーション反応による環状化を行った。

ライゲーション反応液 1 μ L を大腸菌株 HST08 のエレクトロコンピテントセル 40 μ L に加えて、エレクトロポレーション法 (1.80 kV) でプラスミドを大腸菌に導入した。SOC 培地 [2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgSO₄, 20 mM glucose] 960 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪した後、30 μ g/mL カナマイシンを含む LB 寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}$ C で一晩静置培養して形質転換体を選択した。形質転換体のコロニーを 30 μ g/mL カナマイシンを添加した LB 培地 (LB-Km 培地) 5 mL に植菌し、37 $^{\circ}$ C で一晩振盪培養し集菌した。得られた菌体から FastGene™ Plasmid mini Kit を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを各目的タンパク質の発現プラスミドとして保存し、以下の実験に用いた。

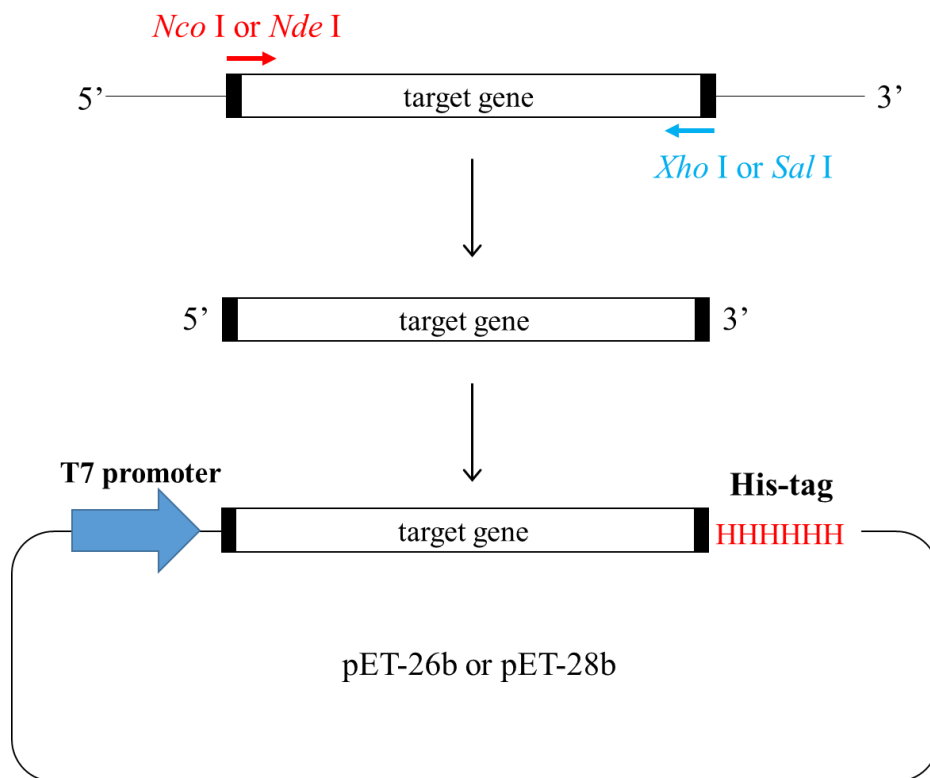


Fig. 4. Construction Scheme of Plasmids for Expression of Target Protein Using pET System

第3項 発現誘導条件の至適化

(1) 発現ホストの形質転換及び前培養

目的タンパク質の発現ホストとして大腸菌株 BL21 (DE3) 及び Rosetta (DE3) を用いた。各大腸菌株のコンピテントセルに対して、エレクトロポレーション法 (1.80 kV) で発現プラスミドを導入した。形質転換体の選択は、BL21 (DE3) の場合には 30 µg/mL カナマイシン及び 0.45% グルコースを添加した LB 寒天培地を、Rosetta (DE3) の場合には 30 µg/mL カナマイシン、34 µg/mL クロラムフェニコール及び 0.45% グルコースを添加した LB 寒天培地を用いて行った。得られたコロニーを適切な抗生物質及び 0.45% グルコースを添加した LB 培地に植菌し、30 °C、180 rpm で一晩振盪培養することで前培養液とした。

(2) 発現誘導条件の検討

BL21 (DE3) を用いた発現誘導条件の検討は、1 条件につき本培養液として 25 mL の LB-Km 培地を入れた 50 mL バッフルフラスコを 1 本用いて行った。Rosetta (DE3) の場合は 34 µg/mL クロラムフェニコール含有 LB-Km 培地 (LB-KmCm 培地) を用いた。

37 °C 発現誘導においては、本培養液 25 mL に対して前培養液 1/100 量 (250 µL) を植菌し、37 °C、180 rpm で振盪培養した。濁度の指標である OD₆₀₀ が 0.6 に達した時点で Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 400 µM になるように加え、発現誘導を行った。さらに 37 °C、180 rpm で振盪培養を続け、IPTG 添加後 2 時間及び 5 時間の時点で培養液を 10 mL 分取した。培養液を 4 °C、3,000 × g で 20 分間遠心し、上清を取り除いた。得られた菌体ペレットを 1 mL の Cell wash buffer [20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM imidazole pH 8.0] で懸濁し、再度遠心して上清を取り除いた。洗浄後の菌体ペレットは簡易精製に用いるまで -30 °C で保存した。

25 °C 発現誘導においては、本培養液に対して前培養液 1/100 量を植菌し、25 °C、180 rpm で振盪培養、OD₆₀₀ が 0.6 に達した時点で IPTG を終濃度 400 µM になるように加え、発現誘導を行った。さらに 25 °C、180 rpm で振盪培養を続け、IPTG 添加後 5 時間及び 20-23 時間の時点で培養液を 10 mL 分取し、37 °C と同様の方法で菌体を回収、-30 °C で保存した。

15 °C 発現誘導においては、本培養液に対して前培養液 1/100 量を植菌し、37 °C、180 rpm で振盪培養した。OD₆₀₀ が 0.6 に達した時点で氷上に移し、15-20 分間氷水内で振盪することで培養液を急速に冷却した。冷却後 15 °C、180 rpm で振盪培養を 2 時間行った後に

IPTG を終濃度 400 μ M になるように加え、発現誘導を行った。さらに 15 $^{\circ}$ C, 180 rpm で振盪培養を続け、IPTG 添加後 20 時間及び 40 時間の時点で培養液を 10 mL 分取し、37 $^{\circ}$ C と同様の方法で菌体を回収、-30 $^{\circ}$ C で保存した。

S. cer Erg12p 及び *C. gla* Erg12p に関しては、エタノール添加条件での発現誘導を行った。IPTG を添加する際に、本培養液に終濃度 0%, 1%, 3% (v/v) エタノールを同時に加えることで、3 条件のエタノール濃度下での発現誘導を行った。

(3) 目的タンパク質の発現の確認

目的タンパク質の発現量及び可溶性の確認は、BugBuster[®]による菌体破碎、Ni-resin を用いた簡易精製した後に、SDS-PAGE により行った。

本項 (2) で得た菌体を氷上で溶解し、Lysis buffer A [1 \times BugBuster[®], 50 mM Tris pH 8.0, 125 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM imidazole pH 8.0, 5 mM 2-mercaptoethanol, 5 U benzonase, 40 μ g lysozyme] を 240 μ L 用いて菌体を完全に懸濁し、4 $^{\circ}$ C で 20 分間緩やかに攪拌することで、菌体をタンパク質非変性条件下で破碎した。Wash buffer [50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM imidazole pH 8.0, 5 mM 2-mercaptoethanol] を 480 μ L 添加し、再び 4 $^{\circ}$ C で 20 分間緩やかに攪拌し、4 $^{\circ}$ C, 16,100 \times g で 20 分間遠心した。

得られた可溶性画分 (S) と不溶性画分 (P) の一部を泳動試料として回収し、残りの可溶性画分に 20 μ L の Ni-resin を加え、4 $^{\circ}$ C で 30 分間穏やかに攪拌することでニッケルイオンに親和性のあるタンパク質を吸着させた。静置により得られた上清を非吸着画分 (F) の泳動試料として回収した。Ni-resin に対しては、Wash buffer を加え攪拌し、静置、上清除去を 2 回行うことで、非特異的に吸着した分子を除いた。洗浄後の Ni-resin に対して 400 mM imidazole を含む Wash buffer を 50 μ L 加えて攪拌、静置したのちに、上清を溶出画分 (E) として回収した。回収した P, S, F, E の各泳動試料の SDS-PAGE を行い、泳動パターンを確認した。

第 4 項 組換えタンパク質の精製

(1) スケールアップ培養

前項で得られた至適化された発現誘導条件に基づいて、本培養液 500 mL の入った 1 L バッフルフラスコを用いて大腸菌のスケールアップ培養を行った。発現誘導を終えた本培養液を 4 $^{\circ}$ C, 3,000 \times g で 20 分間遠心し、上清を取り除いた。得られた菌体ペレットを 30 mL

の Cell wash buffer [20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM imidazole pH 8.0] で懸濁し、再度遠心して上清を取り除いた。洗浄後の菌体ペレットはタンパク質精製に用いるまで -80 °C で保存した。

(2) 菌体破碎

操作は全て氷上又は 4 °C で行った。菌体ペレットを溶解し、菌体湿重量 1 g あたり 1 mg の Lysozyme 及び 0.5 mg の Deoxyribonuclease I を含む Lysis buffer B [50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM imidazole pH 8.0, 5 mM 2-mercaptoethanol] を加えて約 40 mL とした。十分に攪拌し、完全に均一な懸濁液とした後、フレンチプレスを用いて 10,000 psi で大腸菌を高圧せん断破碎した。破碎液を 4 °C, 30,000 × g で 30 分間遠心し、上清を 0.45 µm フィルターに通して粗抽出液として回収した。

(3) タンパク質精製

操作は全て氷上又は 4 °C で行った。クロマトグラフィーは全て BioLogic DuoFlow を使用して行い、検出は紫外吸光計 (260 nm 及び 280 nm) で行った。

粗抽出液に対して HisTrap™ HP 1 mL カラム (以下 Ni カラム) を使用し、Ni アフィニティークロマトグラフィーを行った。Ni カラムを Ni-A buffer [50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM imidazole pH 8.0, 5 mM 2-mercaptoethanol] を用いて平衡化した後、粗抽出液を添加して目的タンパク質を結合させた。Ni-A buffer で洗浄後、20 - 400 mM imidazole グラジエントでタンパク質を溶出した。流速は全て 1 mL/min で行った。クロマトグラムと得られたフラクションの SDS-PAGE による解析結果により、目的タンパク質を含むフラクションを回収した。

Ni カラム溶出液を Dialysis buffer [20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoethanol] に対して終夜透析することにより buffer 交換を行った。

透析後試料に対して HiTrap™ Q HP 1 mL カラムを使用し、陰イオン交換クロマトグラフィー (anion exchange chromatography : AEX) を行った。HiTrap™ Q HP 1 mL カラム (AEX カラム) を AEX buffer [20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoethanol] で平衡化した後、試料を添加してタンパク質を結合させた。AEX buffer で洗浄後、50 - 635 mM NaCl グラジエントでタンパク質を溶出した。流速は全て 1 mL/min で行った。クロマトグラムと SDS-PAGE による解析結果より、目的タンパク質を含むフラク

ションを回収した。

AEX カラム溶出液に対して HiLoad® 16/600 Superdex 200 pg カラムを使用し、サイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography : SEC) を行った。HiLoad® 16/600 Superdex 200 pg カラム (SEC カラム) を SEC buffer [20 mM HEPES-K pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT] で平衡化した後、試料を添加し、SEC buffer でタンパク質を溶出した。流速は全て 0.3 mL/min で行った。クロマトグラムと SDS-PAGE による解析結果より、目的タンパク質を含むフラクションを回収した。

SEC カラム溶出液を、Amicon Ultra 遠心式限外ろ過フィルター (MWCO = 10,000) を用いて 20 mg/mL 程度まで濃縮し、これを精製タンパク質試料として -80 °C で保存した。

(4) タンパク質定量

精製過程で得られた粗抽出液、Ni カラム溶出液、AEX カラム溶出液及び SEC カラム溶出液に含まれる全タンパク質量を Bradford 法により測定した。XL-Bradford の通常法プロトコルに従って、タンパク質濃度を 0.1 - 10 mg/mL になるよう適宜希釈した測定試料 10 µL に対して 1×XL-Bradford 試薬を 0.5 mL 加え、室温で 5 分間インキュベートした。96 ウェルマイクロプレートに 200 µL/well 分注しマイクロプレートリーダーを用いて 595 nm の吸光度を測定した。検量線は BSA を標準試料として作成した。

精製タンパク質試料に関しては紫外吸光法による定量を行い、これを基にタンパク質濃度と最終収量を算出した。

以上確立した大量調製法の概略を Fig. 5 に示す。

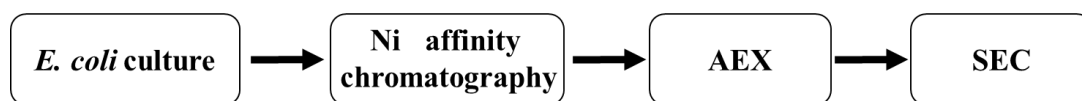


Fig. 5. Overview of Protein Preparation Methods

第3節 結果及び考察

第1項 組換えタンパク質の大量発現方法の検討

大腸菌を用いた外来タンパク質の発現系では、低発現量、不溶性発現、分解などの様々な問題が生じることから、発現誘導条件の検討が必要になる。一般に発現誘導の時間を長くすると発現量は増加する傾向にあるが、目的タンパク質の分解などの問題が起きやすい。発現誘導時の培養温度に関しては、高温では発現量は高いが不溶性になりやすく、低温では発現量は低いが可溶性になりやすい傾向がみられる。また、発現誘導時にエタノールを添加すると、濃度依存的に大腸菌の生育が妨げられるが、無添加時に不溶性発現だった目的タンパク質が可溶性になることがある。これはエタノール添加ストレスによって大腸菌シャペロンの発現が誘導されるためではないかと考えられている。

また、外来遺伝子が大腸菌にとって使用頻度の低いレアコドンを多く有している場合、発現ホストに大腸菌株 BL21 (DE3) を用いると、対応する tRNA の不足で発現が妨げられることが知られている。一方、コドン補正プラスミド pRARE2 を BL21 (DE3) に導入した大腸菌株 Rosetta (DE3) では、pRARE2 がレアコドンに対応する tRNA 遺伝子を持つことからレアコドンの多い外来遺伝子の発現に有利に働くことが多い。以上のことから、本研究ではまず、培養温度と培養時間を全ての目的タンパク質で検討し、十分な発現量及び可溶化率が得られなかったものについては、さらにエタノール添加あるいは pRARE2 導入により検討した。

(1) *Saccharomyces cerevisiae* Erg8p (*S. cer* Erg8p) の発現

BL21 (DE3) を発現ホストとして *S. cer* Erg8p (452 残基, 51.37 kDa) を第1章第3節第3項 (2), (3) の方法に従い発現させ、Ni-resin で簡易精製した時の SDS-PAGE の結果を Fig. 6 (A)-(C) に示す。37 °C での発現誘導においては培養時間に関わらず *S. cer* Erg8p が不溶性画分 (P) と溶出画分 (E) に認められたが、発現量はいずれも微量であった。25 °C での発現誘導においても誘導時間に関わらず改善は認められなかった。一方、15 °C で発現誘導したところ、培養時間が 20 時間、40 時間共に可溶性画分 (S) と Ni-resin からの溶出画分 (E) に認められた。発現量は大腸菌の内在性タンパク質量と比較して、大量発現には至っていないが、不溶性画分 (P) と非吸着画分 (F) に *S. cer* Erg8p がほぼ認められないことから、本条件下ではほぼ全てが可溶性発現したものと考えられる。

Rosetta (DE3) を発現ホストとして用いた結果を Fig. 6 (D), (E) に示す。pRARE2 による

コドン補正下での発現誘導では, *S. cer* Erg8p の発現量の著しい増加が認められ, 大腸菌の内在性タンパク質量に比べて高濃度の *S. cer* Erg8p が合成されたことが確認された. 37 °C での発現誘導ではいずれの時間においても大部分が不溶性画分 (P) に存在する結果となったが, 15 °C での発現誘導では *S. cer* Erg8p の大量発現に加え可溶化に成功した. 20 時間, 40 時間共に非常に高濃度かつ高純度の *S. cer* Erg8p を溶出画分 (E) に回収することができ, 培養時間 20 時間でも, その後の機能解析及び立体構造解析に利用するのに十分な酵素が合成されていることが確認できた.

以上の結果から, *S. cer* Erg8p の至適誘導条件を, Rosetta (DE3) を発現ホストとした 15 °C, 培養時間 20 時間に設定した.

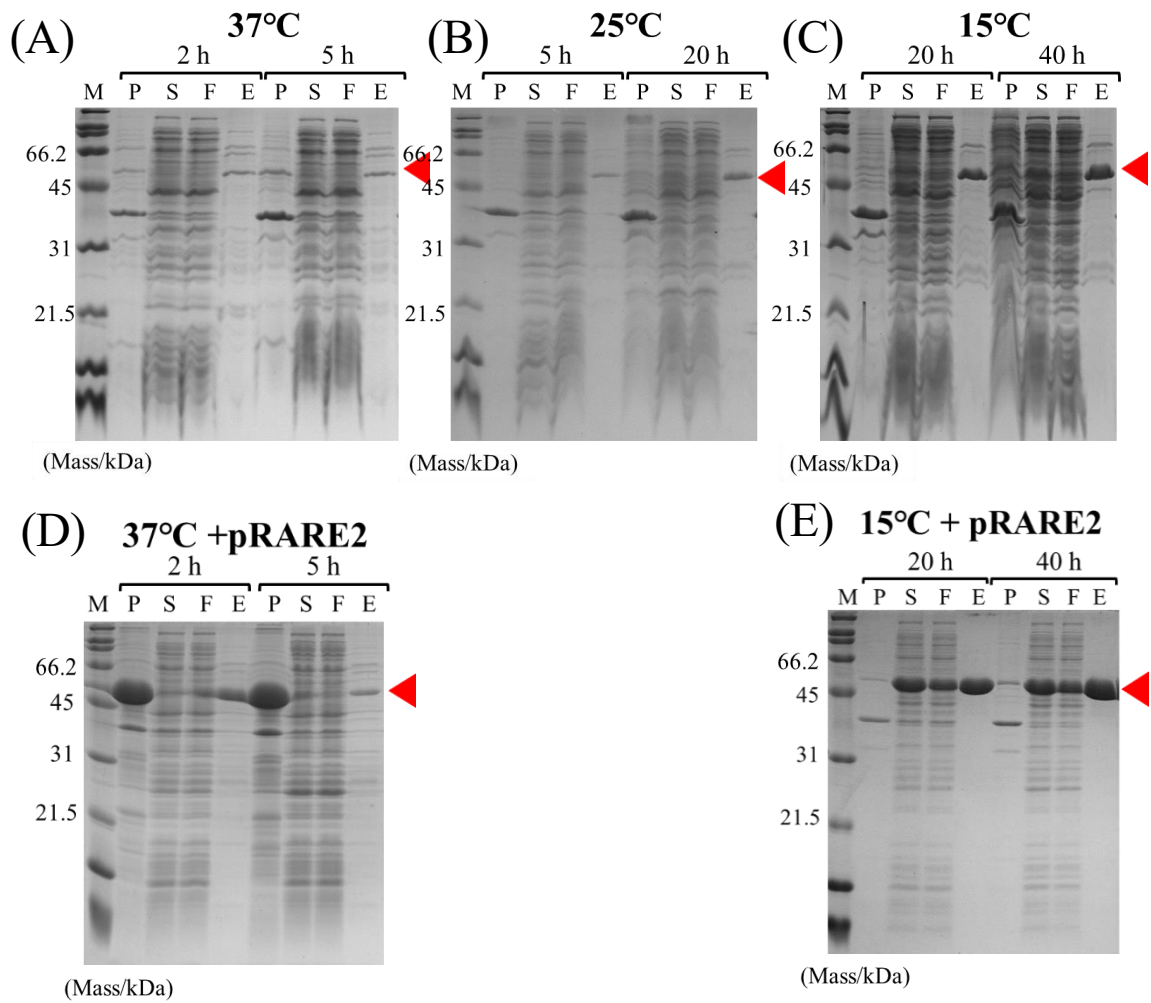


Fig. 6. SDS-PAGE Analysis of Recombinant Expression of *S. cer* Erg8p in *E. coli* BL21(DE3) or Rosetta (DE3)

(A) Incubation at 37°C. (B) Incubation at 25°C. (C) Incubation at 15°C. (D) Incubation at 37°C with pRARE2. (E) Incubation at 15°C with pRARE2.

M : Marker of protein, P : Precipitation, S : Supernatant, F : Flow through of Ni-resin, E : Eluate of Ni-resin. The red triangle shows *S. cer* Erg8p.

(2) *Candida glabrata* Erg8p (*C. gla* Erg8p) の発現

C. gla Erg8p (449 残基, 50.68 kDa) を BL21 (DE3) を用いて発現させた時の解析結果を Fig. 7 に示す. いずれの誘導条件においても *C. gla* Erg8p の発現が確認された. 37 °C での発現誘導ではいずれの培養時間においても大量発現が確認されるものの, 可溶化効率が悪く, そのほとんどが不溶性画分 (P) に認められた. 一部の可溶化しているタンパク質については Ni-resin による精製が可能であった. 一方, 発現誘導を 25 °C 又は 15 °C で行うと *C. gla* Erg8p の発現量は 37 °C に比べ著しく減少するものの可溶化効率は上昇することから, 溶出画分 (E) への回収量は 37 °C の場合と同程度であった.

いずれの条件においても溶出画分 (E) の約 30 kDa の位置に, *C. gla* Erg8p の分解産物と推定されるバンド (青色マーカー部分) が観察された. *C. gla* Erg8p 全長は約 50 kDa であることから, N 末端側の約 20 kDa が大腸菌内のプロテアーゼによって分解されたものと考えられる.

全長タンパク質の収量と分解産物の比率を勘案して, *C. gla* Erg8p の至適誘導条件を, BL21 (DE3) を発現ホストとした 25 °C, 培養時間 20 時間に設定した.

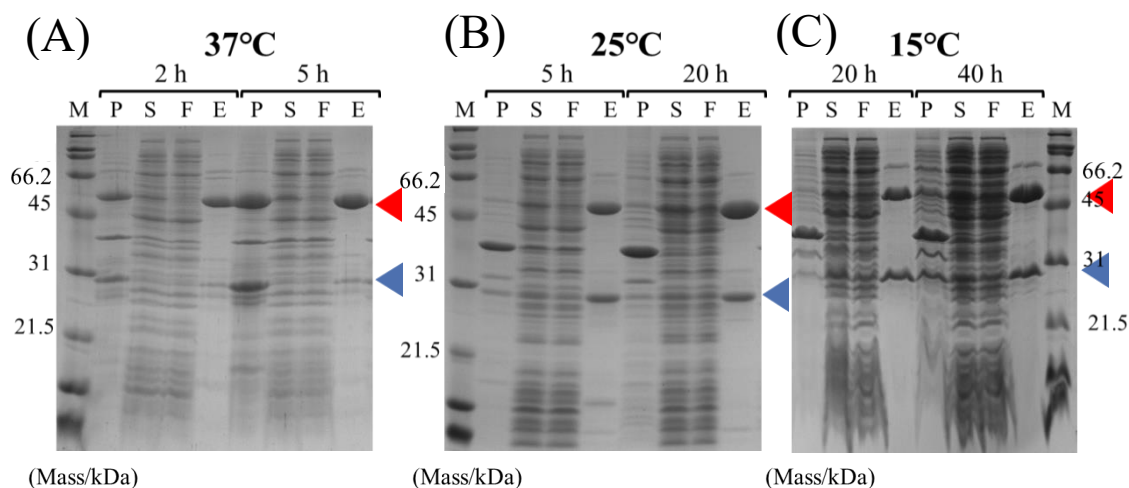


Fig. 7. SDS-PAGE Analysis of Recombinant Expression of *C. gla* Erg8p in *E. coli* BL21(DE3)

(A) Incubation at 37°C. (B) Incubation at 25°C. (C) Incubation at 15°C.

M : Marker of protein, P : Precipitation, S : Supernatant, F : Flow through of Ni-resin, E : Eluate of Ni-resin. The red triangle shows *C. gla* Erg8p. The blue triangle shows decomposition products of *C. gla* Erg8p.

(3) *Schizosaccharomyces pombe* Erg8p (*S. pom* Erg8p) の発現

S. pom Erg8p (427 残基, 48.26 kDa) を BL21 (DE3) を用いて発現させた時の解析結果を Fig. 8 に示す. 全ての誘導条件において *S. pom* Erg8p の発現が認められた. しかしながら 37 °C での発現誘導ではいずれの培養時間においてもほぼ完全に不溶化しており, 溶出画分 (E) に *S. pom* Erg8p のバンドはほとんど観察されなかった. 25 °C での発現誘導では, 37 °C の結果と比較して可溶化効率が改善したものの, 不溶性画分 (P) にも多くの *S. pom* Erg8p が認められた.

一方, 発現誘導を 15 °C で行くと, 発現量は維持されたまま可溶化率の著しい向上が認められた. しかし, 誘導時間を 40 時間に延長すると, 20 時間の場合に比べ不溶性画分 (P) の割合が増大した. 以上の結果より, *S. pom* Erg8p の至適誘導条件を, BL21 (DE3) を発現ホストとした 15 °C, 培養時間 20 時間に設定した.

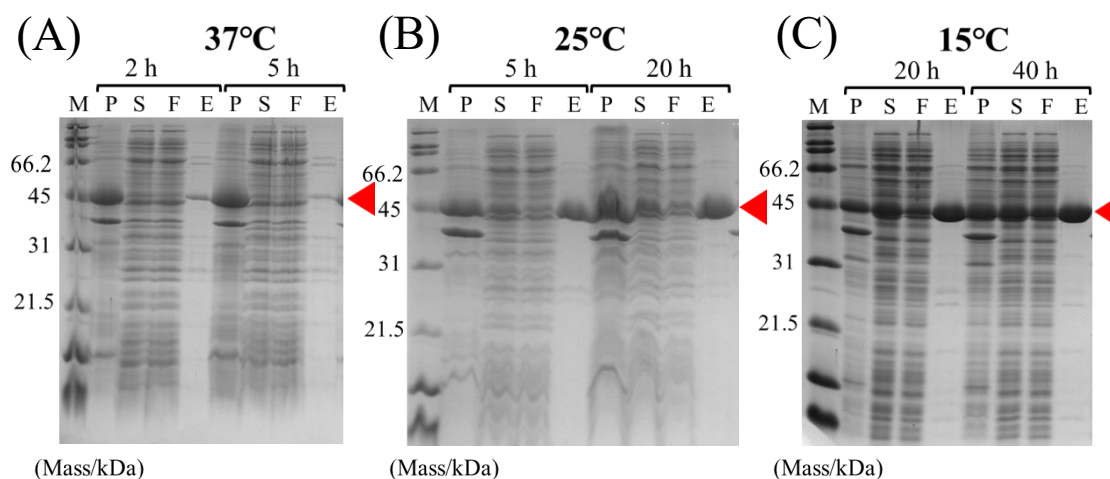


Fig. 8. SDS-PAGE Analysis of Recombinant Expression of *S. pom* Erg8p in *E. coli* BL21(DE3)

(A) Incubation at 37°C. (B) Incubation at 25°C. (C) Incubation at 15°C.

M : Marker of protein . P : Precipitation, S : Supernatant, F :Flow through of Ni-resin, E : Eluate of Ni-resin. The red triangle shows *S. pom* Erg8p.

(4) *Aspergillus oryzae* Erg8p (*A. ory* Erg8p) の発現

A. ory Erg8p (484 残基, 53.49 kDa) を BL21 (DE3) を用いて発現させた時の解析結果を Fig. 9 に示す. 全ての誘導条件において *A. ory* Erg8p の発現が認められた. 37 °C での発現誘導ではいずれの培養時間においても *A. ory* Erg8p の発現量は非常に多かったが, そのほとんどが不溶化しており, 溶出画分 (E) に存在する *A. ory* Erg8p は少量であった. 一方,

発現誘導を 25 °C 又は 15 °C で行うと発現量は低下するが、可溶化率が著しく向上し、溶出画分 (E) の収量が増加した。また、25 °C の発現誘導ではいずれの培養時間においても 15 °C と比較して溶出画分 (E) の収量が多く、また純度も高かった。

以上の結果から、*A. ory* Erg8p の至適誘導条件を、BL21 (DE3) を発現宿主とした 25 °C、培養時間 20 時間に設定した。

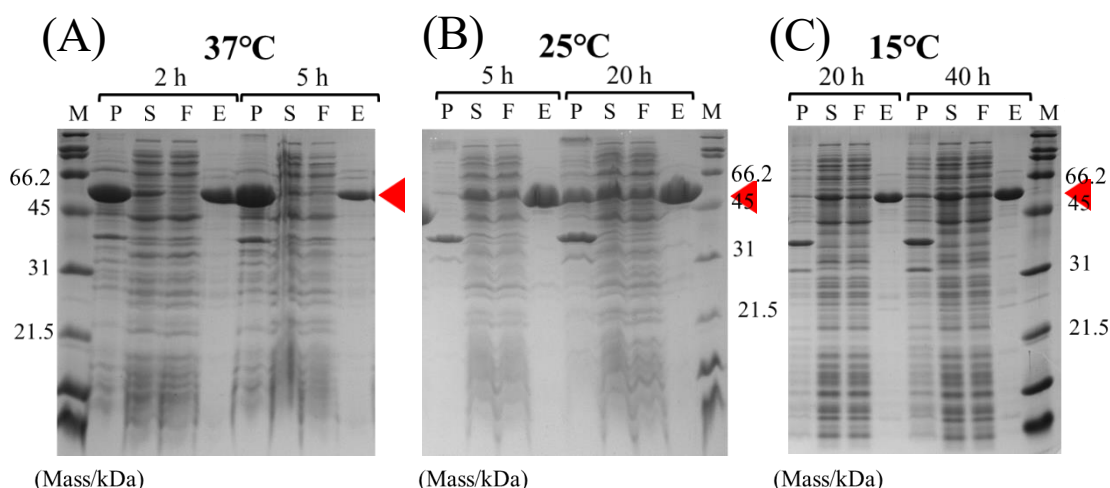


Fig. 9. SDS-PAGE Analysis of Recombinant Expression of *A. ory* Erg8p in *E. coli* BL21(DE3)

(A) Incubation at 37°C. (B) Incubation at 25°C. (C) Incubation at 15°C.

M : Marker of protein, P : Precipitation, S : Supernatant, F :Flow through of Ni-resin, E : Eluate of Ni-resin. The red triangle shows *A. ory* Erg8p

(5) *Saccharomyces cerevisiae* Erg12p (*S. cer* Erg12p) の発現

S. cer Erg12p (443 残基, 49.39 kDa) を BL21 (DE3) を発現宿主として用いて発現させた時の解析結果を Fig. 10 に示す。37 °C での発現誘導ではいずれの培養時間においても大量の、25 °C 及び 15 °C での発現誘導では若干量の発現が認められたが、全て不溶性であった (Fig.10 (A), (B), (D))。エタノール添加による可溶化効率の向上を試みたところ、発現量に改善が認められたものの、無添加の場合と同様に全て不溶性であった (Fig.10.(C), (E))。

残念ながら今回、*S. cer* Erg12p に関しては有効な発現誘導条件を確立することができなかった。

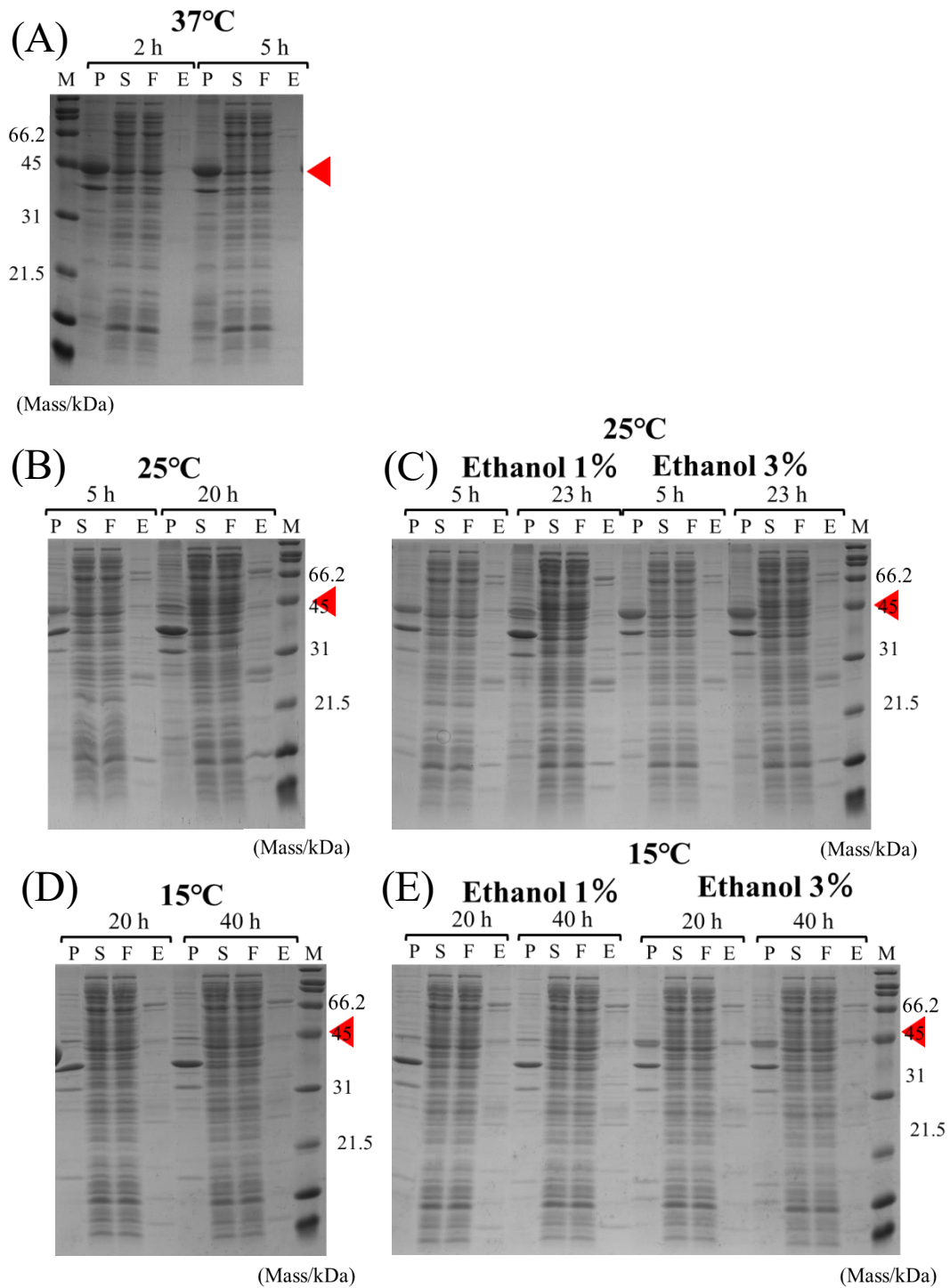


Fig. 10. SDS-PAGE Analysis of Recombinant Expression of *S. cer* Erg12p in *E. coli* BL21(DE3)

(A) Incubation at 37°C. (B) Incubation at 25°C. (C) Incubation at 25°C with ethanol (1 or 3%).

(D) Incubation at 15°C. (E) Incubation at 15°C with ethanol (1 or 3%).

M : Marker of protein, P : Precipitation, S : Supernatant, F :Flow through of Ni-resin, E : Eluate of Ni-resin. The red triangle shows *S. cer* Erg12p.

(6) *Candida glabrata* Erg12p (*C. gla* Erg12p) の発現

C. gla Erg12p (430 残基, 46.47 kDa) を BL21 (DE3) を発現ホストとして用いて発現させた時の解析結果を Fig. 11 に示す. 37 °C 及び 25 °C での発現誘導において *C. gla* Erg12p の大量発現が認められた. また, 溶出画分 (E) にもバンドが認められ, 可溶化が確認された (Fig. 11 (A), (B)). 25 °C での発現誘導時にエタノールを添加し可溶化効率の向上を試みたが, エタノール無添加時と差異は認められなかった (Fig. 11 (B), (C)). また, 発現誘導を 15 °C で行うといずれの培養時間においても発現量, 可溶化率は共に著しく低下した (Fig. 11 (D)).

以上の結果から, *C. gla* Erg12p の至適誘導条件を, BL21 (DE3) を発現ホストとした 25 °C, 培養時間 20 時間に設定した.

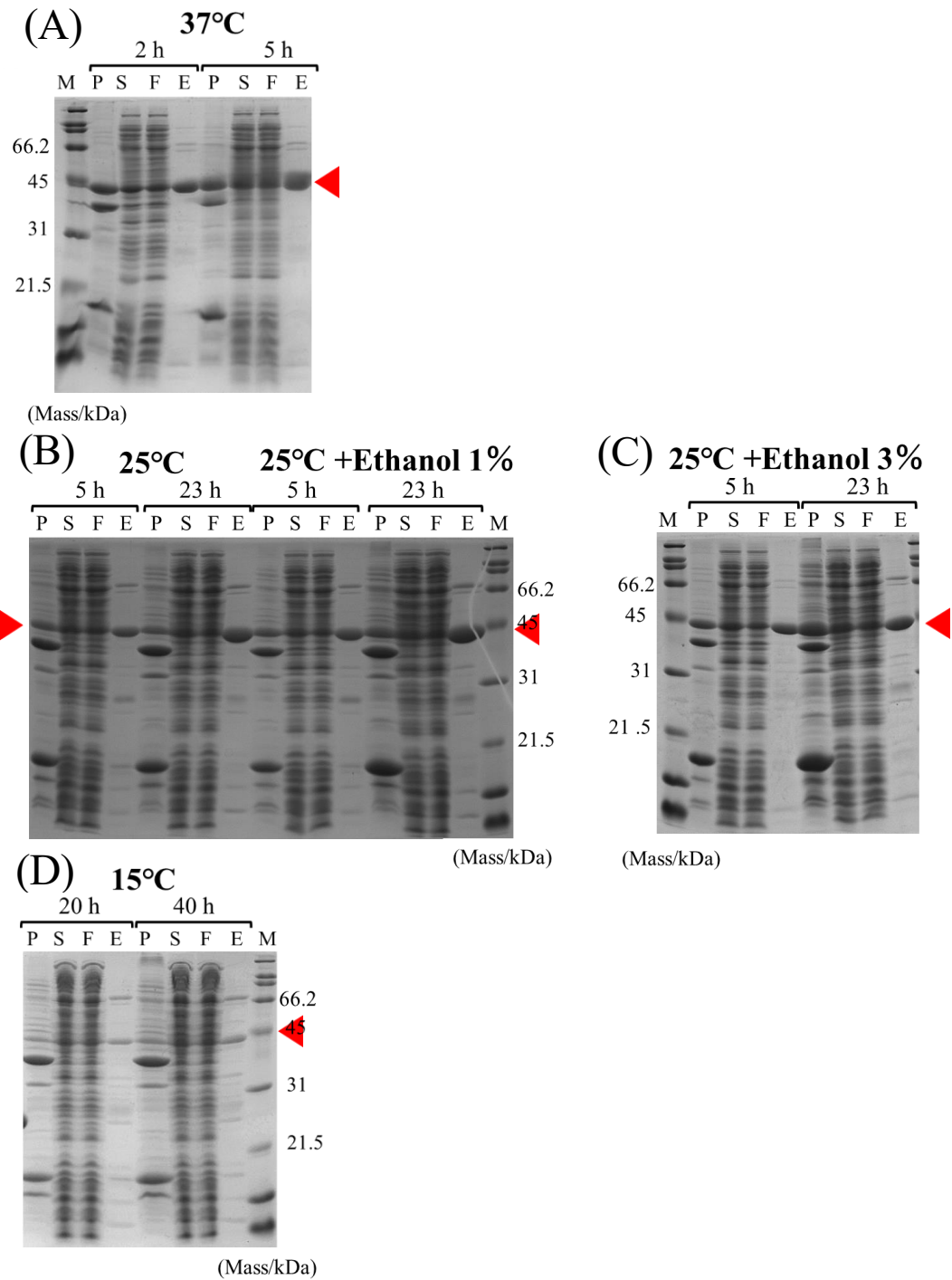


Fig. 11. SDS-PAGE Analysis of Recombinant Expression of *C. gla* Erg12p in *E. coli* BL21(DE3)

(A) Incubation at 37°C. (B) Incubation at 25°C without ethanol or with ethanol (1%). (C) Incubation at 25°C with ethanol (3%). (D) Incubation at 15°C.

M : Marker of protein, P : Precipitation, S : Supernatant, F :Flow through of Ni-resin, E : Eluate of Ni-resin. The red triangle shows *C. gla* Erg12p.

(7) ヒト MK (*hMK*) 及びヒト PMK (*hPMK*) の発現

hMK (396 残基, 43.38 kDa) 及び *hPMK* (192 残基, 22.92 kDa) を BL21 (DE3) を用いて発現させた時の解析結果を Fig. 12 及び Fig. 13 に示す。

全ての条件で目的タンパク質の大量発現及び可溶化が確認された。培養時間、収量などを勘案し、*hMK* の至適誘導条件を、BL21 (DE3) を発現ホストとした 25 °C、培養時間 20 時間、*hPMK* の至適誘導条件を、BL21 (DE3) を発現ホストとした 37 °C、培養時間 5 時間に設定した。

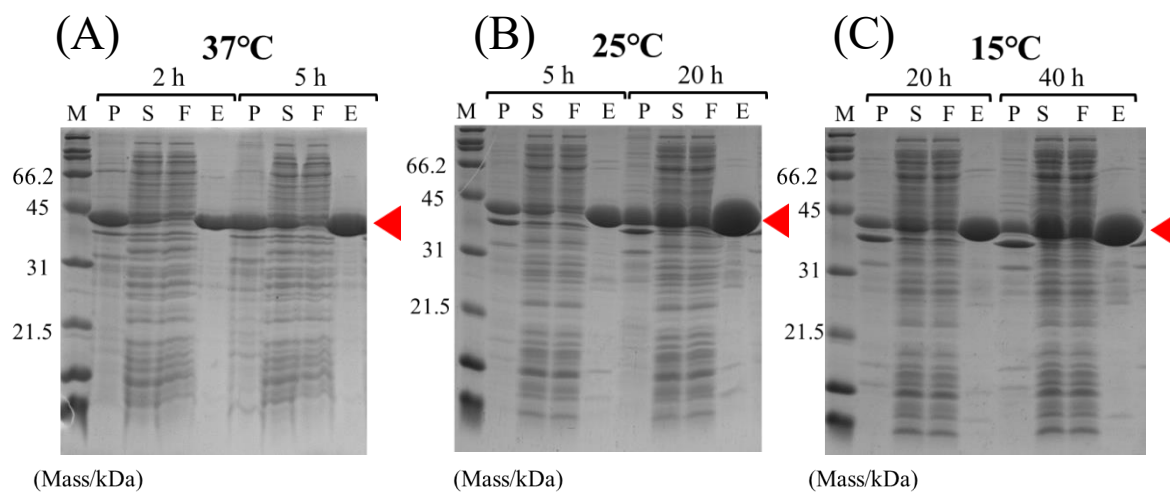


Fig. 12. SDS-PAGE Analysis of Recombinant Expression of *hMK* in *E. coli* BL21(DE3)

(A) Incubation at 37°C. (B) Incubation at 25°C. (C) Incubation at 15°C.

M : Marker of protein, P : Precipitation, S : Supernatant, F : Flow through of Ni-resin, E : Eluate of Ni-resin. The red triangle shows *hMK*.

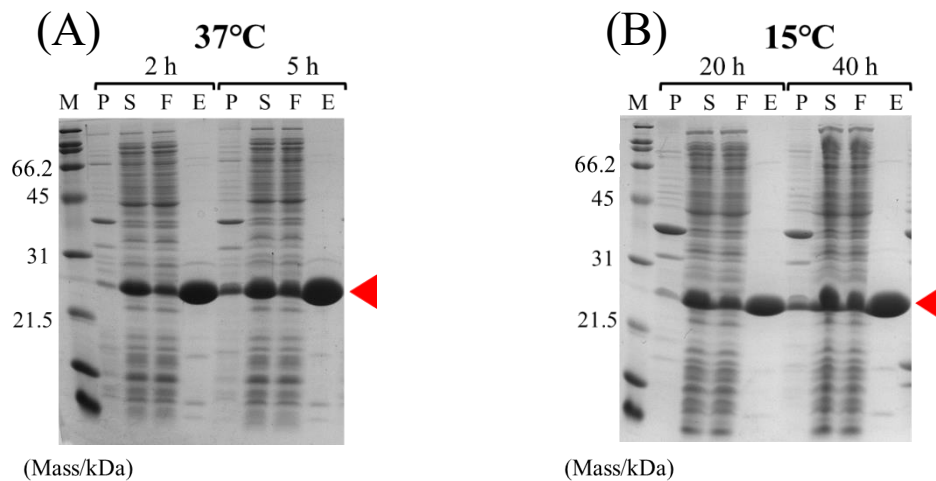


Fig. 13. SDS-PAGE Analysis of Recombinant Expression of *hPMK* in *E. coli* BL21(DE3)

(A) Incubation at 37°C. (B) Incubation at 15°C.

M : Marker of protein, P : Precipitation, S : Supernatant, F :Flow through of Ni-resin, E : Eluate of Ni-resin. The red triangle shows *hPMK*.

第2項 組換えタンパク質の大量調製

前項で最適化した条件に従ってスケールアップ培養を行い、目的タンパク質を各種クロマトグラム法により精製した。全ての目的タンパク質に対して発現誘導条件を入念に検討し、特に Ni-resin を用いた精製の結果を考慮して至適発現条件を決定したため、Ni アフィニティークロマトグラフィーを行った段階で高純度の目的タンパク質を得ることができた。

目的タンパク質は全て第1章第2節第4項に記述した同一の方法で高純度かつ大量に調製することができた。これは由来する生物種に関わらず、いずれの MK 及び PMK も等電点などの諸性質が類似していることから、精製に用いた buffer やカラムに対して類似の挙動をとるためと考えられる。

(1) *S. cer* Erg8p の大量調製

本培養液1.0Lから得られた菌体 (湿重量4.42 g) をフレンチプレスによって破碎した後、遠心上清をフィルターを通して粗抽出液を得た。Ni アフィニティークロマトグラフィーの結果を Fig. 14 (A), (B) に、AEX の結果を Fig. 14 (C), (D) に、SEC の結果を Fig. 14 (E), (F) にそれぞれ示した。各種クロマトグラム法を組み合わせることにより、*S. cer* Erg8p を電気泳動的に均一なバンドを与えるまで高度に精製することができた (Fig. 14 (B), (D), (F))。

SEC では少量の *S. cer* Erg8p が多量体を形成していることが示されたが (溶出時間の早

いピーク), 大部分は単量体であったため (溶出時間の遅いピーク), 単量体のみを回収した.

限外濾過法を用いて濃縮し, 濃度 19.0 mg/mL の精製タンパク質を得た. 本培養液 1.0 L から得られる *S. cer* Erg8p の収量は 31.4 mg であった.

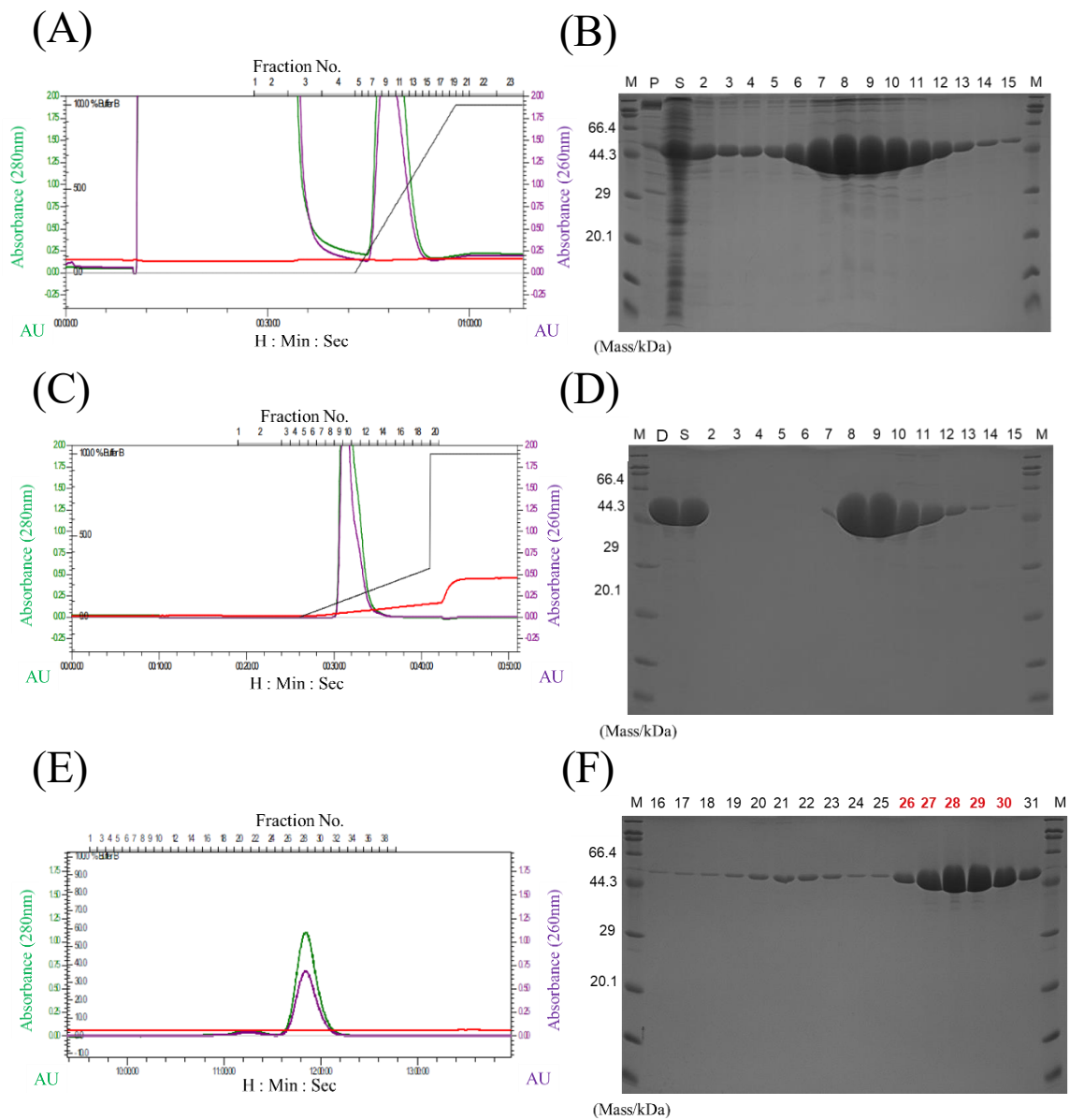


Fig. 14. Purification of Recombinant *S. cer* Erg8p in *E. coli*

(A) Chromatogram of *S. cer* Erg8p purified using Ni affinity chromatography. (B) SDS-PAGE analysis of *S. cer* Erg8p eluted from a HisTrapTM HP column. (C) Chromatogram of *S. cer* Erg8p purified using AEX. (D) SDS-PAGE analysis of *S. cer* Erg8p eluted from a HiTrapTM Q HP column. (E) Chromatogram of *S. cer* Erg8p purified using SEC. (F) SDS-PAGE analysis of *S. cer* Erg8p eluted from a HiLoad[®] 16/600 Superdex 200 pg column. The red numbered fractions were collected. M : Marker of protein, P : Precipitation, S : Supernatant, D : After dialysis

(2) *C. gla* Erg8p の大量調製

本培養液 1.5 L から得られた菌体 (湿重量 7.74 g) を用いて *C. gla* Erg8p を精製した。SEC の結果を Fig. 15 に示した。SEC カラム溶出液を濃縮し、濃度 20.0 mg/mL の精製タンパク質を得た。本培養液 1.0 L から得られる *C. gla* Erg8p の収量は 12.4 mg であった。

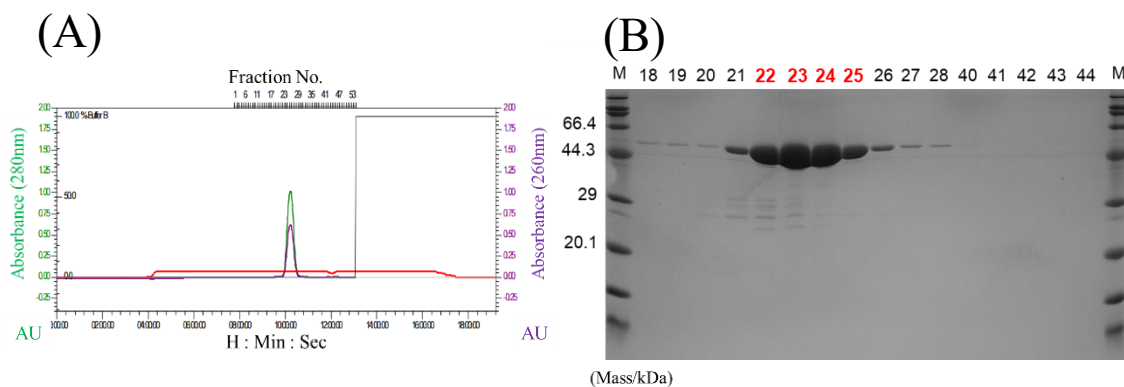


Fig. 15. Purification of Recombinant *C. gla* Erg8p in *E. coli*

(A) Chromatogram of *C. gla* Erg8p purified using SEC. (B) SDS-PAGE analysis of *C. gla* Erg8p eluted from a HiLoad[®] 16/600 Superdex 200 pg column. The red numbered fractions were collected.

M : Marker of protein

(3) *S. pom* Erg8p の大量調製

本培養液 0.5 L から得られた菌体 (湿重量 3.10 g) を用いて *S. pom* Erg8p を精製した。SEC の結果、若干量の多量体が確認されたが、単量体 *S. pom* Erg8p のみを回収した (Fig. 16)。SEC カラム溶出液を濃縮し、濃度 20.0 mg/mL の精製タンパク質を得た。本培養液 1.0 L から得られる *S. pom* Erg8p の収量は 32.2 mg であった。

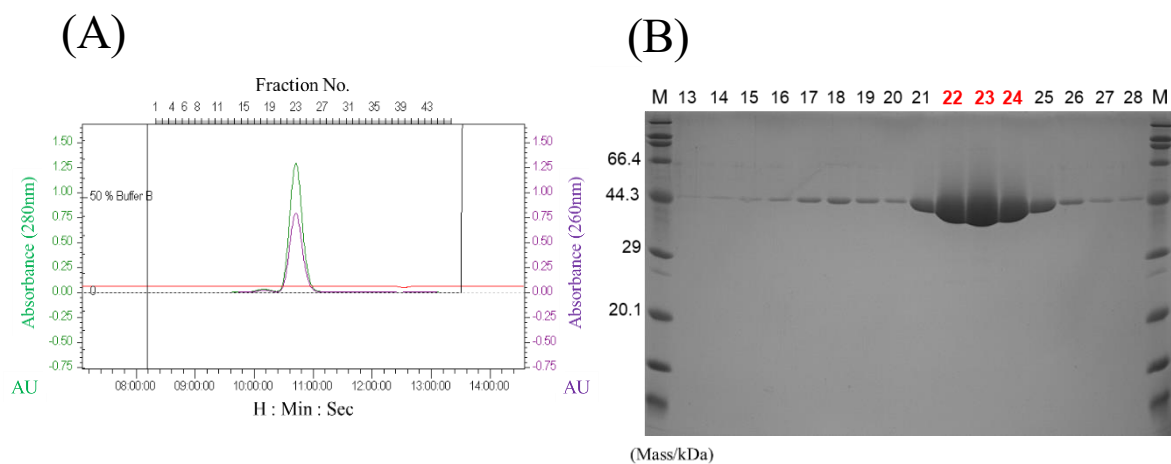


Fig. 16. Purification of Recombinant *S. pom* Erg8p in *E. coli*

(A) Chromatogram of *S. pom* Erg8p purified using SEC. (B) SDS-PAGE analysis of *S. pom* Erg8p eluted from a HiLoad® 16/600 Superdex 200 pg column. The red numbered fractions were collected. M : Marker of protein

(4) *A. ory* Erg8p の大量調製

本培養液 0.5L から得られた菌体 (湿重量 3.15 g) を用いて *A. ory* Erg8p を精製した。SEC の結果、若干量の多量体が確認されたが、単量体 *A. ory* Erg8p のみを回収した (Fig. 17)。SEC カラム溶出液を濃縮し、濃度 20.0 mg/mL の精製タンパク質を得た。本培養液 1.0 L から得られる *A. ory* Erg8p の収量は 27.6 mg であった。

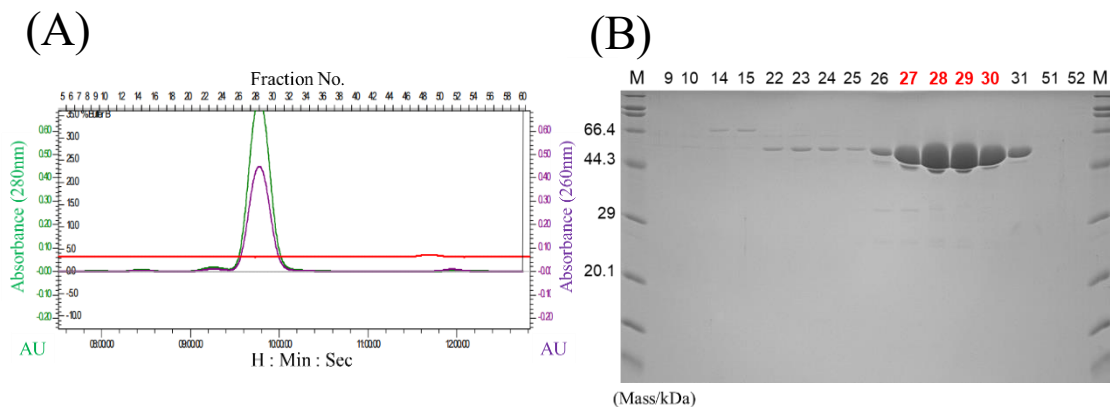


Fig. 17. Purification of Recombinant *A. ory* Erg8p in *E. coli*

(A) Chromatogram of *A. ory* Erg8p purified using SEC. (B) SDS-PAGE analysis of *A. ory* Erg8p eluted from a HiLoad® 16/600 Superdex 200 pg column. The red numbered fractions were collected. M : Marker of protein

(5) *C. gla* Erg12p の大量調製

本培養液 2.5 L から得られた菌体 (湿重量 16.3 g) を用いて *C. gla* Erg12p を精製した。Ni アフィニティークロマトグラフィーの結果を Fig. 18 (A), (B) に、AEX の結果を Fig. 18 (C), (D) に、SEC の結果を Fig. 18 (E), (F) にそれぞれ示した。 *C. gla* Erg12p は今回ターゲットとした酵素の中で最も発現及び可溶化率が低く、AEX を終えた段階では電気泳動上不溶性のバンドが複数認められたが、SEC によって高純度の精製タンパク質を得ることが出来た (Fig. 18 (F))。 SEC カラム溶出液を濃縮し、濃度 20.0 mg/mL の精製タンパク質を得た。本培養液 1.0 L から得られる *C. gla* Erg12p の収量は 3.44 mg であった。

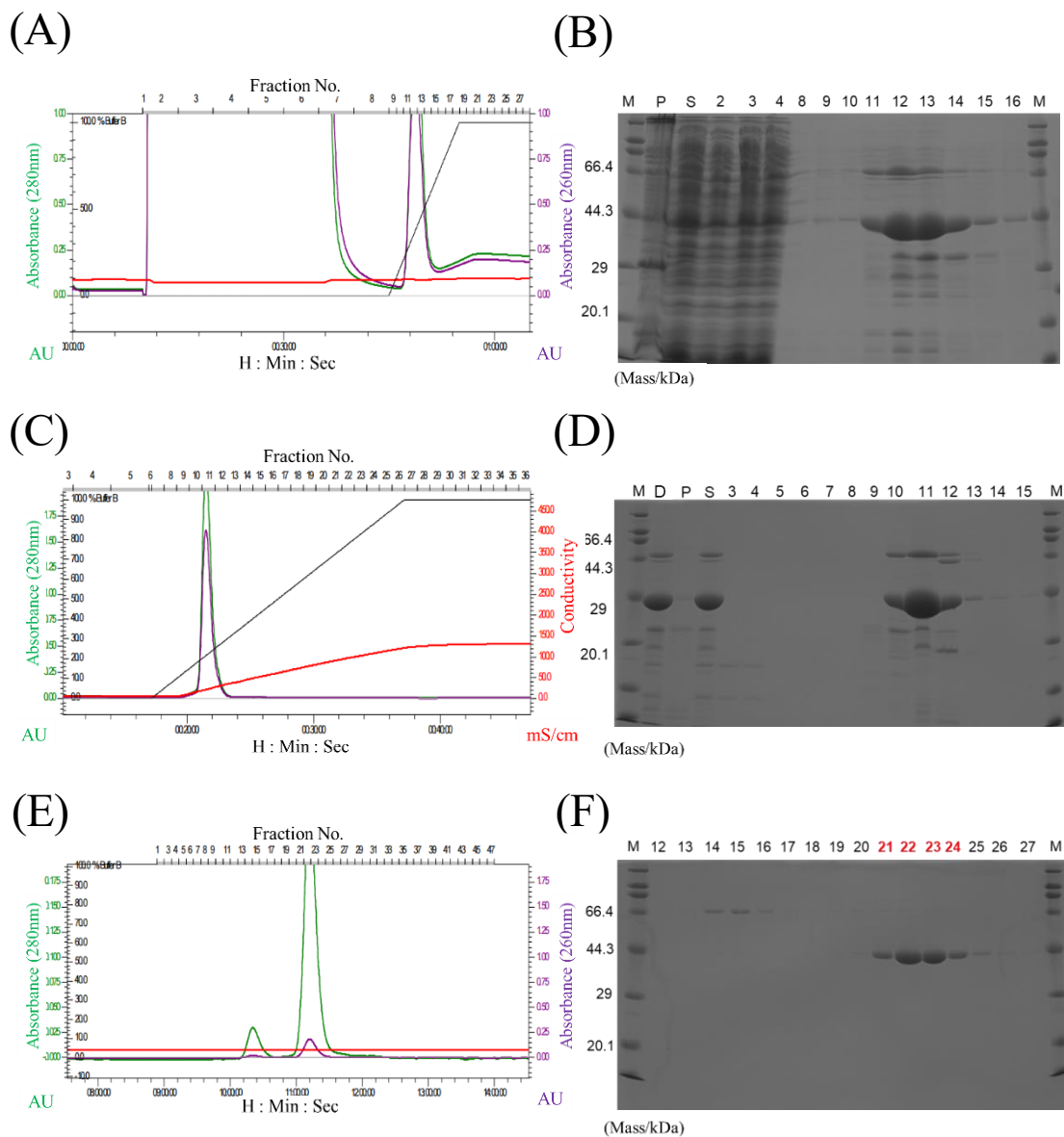


Fig. 18. Purification of Recombinant *C. gla* Erg12p in *E. coli*

(A) Chromatogram of *C. gla* Erg12p purified using Ni affinity chromatography. (B) SDS-PAGE analysis of *C. gla* Erg12p eluted from a HisTrap™ HP column. (C) Chromatogram of *C. gla* Erg12p purified using AEX. (D) SDS-PAGE analysis of *C. gla* Erg12p eluted from a HiTrap™ Q HP column. (E) Chromatogram of *C. gla* Erg12p purified using SEC. (F) SDS-PAGE analysis of *C. gla* Erg12p eluted from a HiLoad® 16/600 Superdex 200 pg column. The red numbered fractions were collected. M : Marker of protein . P : Precipitation, S : Supernatant, D : After dialysis

(6) *hMK* の大量調製

本培養液 0.5 L から得られた菌体 (湿重量 3.1 g) を用いて *hMK* を精製した。 *hMK* については Ni アフィニティークロマトグラフィー及び AEX を行った段階で十分な純度に達したことから SEC による精製操作を省略した (Fig. 19)。 陰イオン交換カラム溶出液を濃縮し、濃度 7.32 mg/mL の精製タンパク質を得た。 本培養液 1.0 L から得られる *hMK* の収量は 38.8 mg であった。

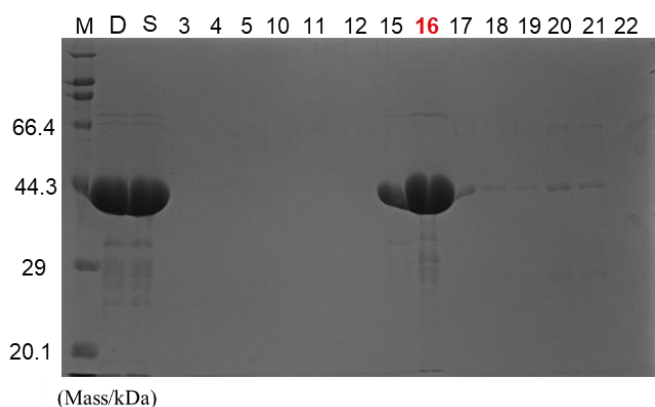


Fig. 19. Purification of Recombinant *hMK* in *E. coli*

SDS-PAGE analysis of *hMK* eluted from a HiTrap™ Q HP column. The red numbered fraction was collected.

M : Marker of protein . D : After dialysis S : Supernatant

(7) *hPMK* の大量調製

本培養液 0.5 L から得られた菌体 (湿重量 1.43 g) を用いて *hPMK* を精製した。 *hPMK* についても Ni アフィニティークロマトグラフィー及び AEX のみで十分な純度の精製タンパク質を得ることができた (Fig. 20)。 陰イオン交換カラム溶出液を濃縮し、濃度 5.26 mg/mL の精製タンパク質を得た。 本培養液 1.0 L から得られる *hPMK* の収量は 21.8 mg であった。

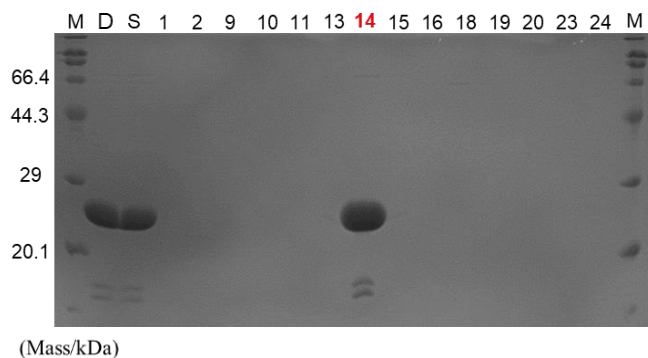


Fig. 20. Purification of Recombinant *hPMK* in *E. coli*

SDS-PAGE analysis of *hPMK* eluted from a HiTrap™ Q HP column. The red numbered fraction was collected.

M : Marker of protein . D : After dialysis S : Supernatant

(9) 総タンパク質量の定量

Bradford 法によって測定した各精製段階におけるタンパク質量及び回収率を Table 2 に示した. いずれのタンパク質においても, Ni アフィニティークロマトグラフィーによって 7 割以上の夾雑タンパク質の除去が可能であった. *Erg8p* は全ての真菌種において粗抽出液全タンパク質の 3 - 10% 程度が精製タンパク質として単離された. 一方, *C. gla Erg12p* に関しては粗抽出液全タンパク質の 1.5% 程度であった.

Table 2. Summary of Purification of *Erg8p* and *Erg12p*

	Estimated protein amount in the each purification step (mg)			
	Crude extract	Eluate of Ni column	Eluate of AEX	Eluate of SEC
<i>S. cer Erg8p</i>	532	148 (27.8%)	142 (26.7%)	20.4 (3.8%)
<i>C. gla Erg8p</i>	137	32.0 (23.4%)	15.9 (11.6%)	12.4 (9.1%)
<i>S. pom Erg8p</i>	304	37.2 (12.2%)	26.5 (8.7%)	16.1 (5.3%)
<i>A. ory Erg8p</i>	550	137 (24.1%)	31.0 (5.6%)	27.6 (5.0%)
<i>C. gla Erg12p</i>	445	21.8 (4.9%)	11.6 (2.6%)	6.8 (1.5%)

Numbers in parentheses show recovery (%).

第4節 小括

MK 及び PMK の詳細な機能解析並びに構造解析を行うには高純度の酵素が大量に必要となる。そこで本研究では、まず大腸菌組換え発現系を用いた精製酵素の大量調製法を確立した。

発現プラスミドを構築し、全ての目的タンパク質に対して様々な条件下で発現誘導を行い、Ni-resin を用いた簡易精製の結果に基づき至適発現誘導条件を決定した。決定した発現誘導条件に従いスケールアップ培養を行い、得られた菌体から目的タンパク質の大量調製を行った。合計7種の MK 及び PMK の大量調製を行ったが、各種クロマトグラフィーによる分離条件については、タンパク質の種類に関わらず同一条件で一精製が可能であった。これは各酵素の性質が似ていることに加え、発現誘導条件の検討を入念に行った成果と考えられる。

真菌 PMK の大量調製法の報告はこれまで Garcia らによる *S. cer* Erg8p の1例にとどまり、¹³⁾ 今回新たに *C. gla* Erg8p, *S. pom* Erg8p, *A. ory* Erg8p の大量調製法を確立することができた。真菌 MK の大量調製法はこれまで報告例がなく、本研究においても *S. cer* Erg12p については発現系の構築には至らなかったが、*C. gla* Erg12p については、収量は若干低いものの初の真菌 MK の大量調製に成功した。

本章において高純度の目的タンパク質が大量に得られたことから、本論文第2章から第4章ではこれらを用いた機能及び立体構造解析について論述する。

第2章 活性測定法の確立と Kinetic parameters の測定

第1節 緒言

これまでにヒト MK 及び PMK (*h*MK 及び *h*PMK) に関しては, Kinetic parameters 等の機能解析の結果が多数報告されている.¹⁶⁻¹⁸⁾ 一方, 真菌類 MK 及び PMK (Erg12p 及び Erg8p) の機能に関する報告は主に遺伝学的解析によるものであり,¹⁰⁾ 単離酵素を用いた機能解析の報告は, Erg12p については報告がなく, Erg8p についても *S. cer* Erg8p を用いた1例のみと極めて少ない.¹³⁾ Kinetics parameters は酵素の機能の特徴づけるだけではなく, 当該酵素の阻害剤を開発する上で極めて重要な情報となることから, 本章では Erg8p 及び Erg12p の機能解析の一環として第1章で精製した各種単離酵素を用いて Kinetic parameters を算出し, 比較検討を行うこととした.

これまでに報告されている MK 及び PMK の活性測定法は, そのほとんどがリン酸化反応によって生成する ADP を Pyruvate kinase と Lactate dehydrogenase の共役酵素反応系を用いて測定する方法であることから,^{13,16-19)} 著者も本測定法を採用することとした. 報告者により共役酵素反応系の諸条件が異なることから, 既報の方法を精査したところ, 方法により測定結果が著しく異なり, またいずれも精度が低いことが判明した. 著者の検討結果より, 共役酵素反応系の酵素量や基質量が最適化されていないことが原因と考えられた. また, MK と PMK はそれぞれ (*R*)-Mevalonate (*R*-mev) と (*R*)-Mevalonate 5-phosphate (*R*-mev5p) を ATP 依存的リン酸化する酵素であるが, これまでの報告ではそのほとんどが基質としてラセミ体 (*RS*-mev 及び *RS*-mev5p) を用いて Kinetic parameters を算出している. 現時点で, *S*-mev 及び *S*-mev5p の酵素への結合及び反応性については不明であることから, ラセミ体を基質として算出した Kinetic parameters が本来の基質である *R*-mev 及び *R*-mev5p に対する結果を反映しているかは不明である.

以上のことより, 既報の方法をそのまま採用することはできず, また既報の結果との比較が困難であることが明らかとなった. そこで本研究では, 本来の基質である *R*-mev あるいは *R*-mev5p を用いて反応条件の至適化を行い, Erg8p 及び Erg12p の高精度活性測定法を開発した後, 統一した条件下で各酵素の Kinetic parameters を算出し, 比較検討を行うこととした.

第2節 実験方法

第1項 試薬及び使用機器

本章で用いた試薬及び使用機器は以下のとおりである。

分光光度計	UV1240 (島津製作所)
96 ウェルマイクロプレート	3635 UV Plate (Corning 社)
マイクロプレートリーダー	Infinite M200 (TECAN 社)

活性測定に用いる(*R*)-Mevalonate (*R*-mev), (*R*)-Mevalonate 5-phosphate (*R*-mev5p), Adenosine 5'-diphosphate (ADP), Phosphoenolpyruvic acid, Pyruvate kinase 及び L-Lactic dehydrogenase を Sigma-Aldrich 社より購入した。Adenosine 5'-triphosphate (ATP) 及び Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) をオリエンタル酵母工業社より購入した。Dithiothreitol (DTT) を富士フイルム・和光純薬社より購入した。その他の試薬は全て市販の特級規格品を用いた。

R-mev 及び *R*-mev5p の構造式を Fig. 21 に示す。

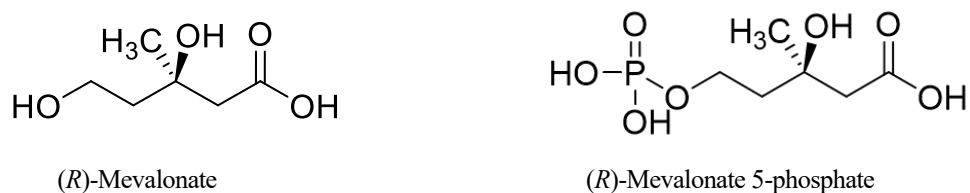


Fig. 21. Chemical Structures of Substrates Used in This Study

(3) 試薬の調製

ATP, ADP, NADH を 10 mM HEPES-K で用時溶解して使用した。PEP を超純水に用時溶解して使用した。PK を PK dissolution buffer [100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50% glycerol], LDH を LDH dissolution buffer [100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glycerol] に溶解して使用した。

第2項 活性測定条件の検討

本研究では多くの文献で採用されている MK 又は PMK によるリン酸化反応で生成する ADP の量を PK 及び LDH の 2 種の酵素反応系と共役させて測定する手法を採用した (Fig. 22).¹⁹⁾ 本論文では便宜的にこの測定法を NADH 消費量測定法と呼称し, PK と LDH による酵素反応経路を下流経路と呼称する。

NADH 消費量測定法では、反応液中に研究対象である MK 又は PMK と ATP 及び基質、さらに下流経路を構成する PK, LDH, PEP 及び NADH を共存させて反応を行う。下流経路では、MK 又は PMK のリン酸化反応によって生成する ADP に対して PK が作用することで、ADP 量と等モルのピルビン酸が生成し、さらにピルビン酸に対して LDH が作用することで等モルの NADH が消費される。従って MK 又は PMK によるリン酸化反応を律速段階とすることで、本活性測定系で消費される NADH 量より、MK 又は PMK の酵素活性を算出することが可能となる。

本項では、目的タンパク質の活性測定に先立って、酵素として *h*MK を用いて下流経路を中心に NADH 消費量測定法の条件検討を行った。反応液中の NADH の吸光度 (340 nm) の測定は分光光度計と光路長 1 cm の石英セルを使用し、30 °C で行った。

次いで下流経路及び MK 又は PMK によるリン酸化反応を至適化した後、測定の迅速化及び試料類の節約を目的に 96 ウェルマイクロプレートによる測定法について検討した。

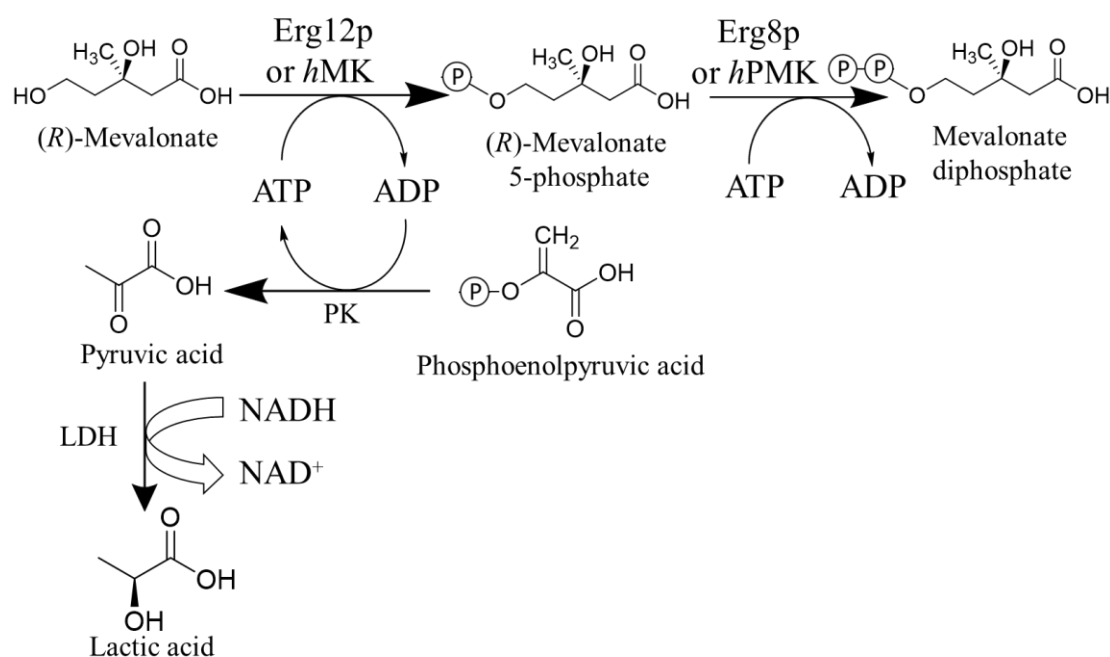


Fig. 22. Enzymatic Coupling of ADP Formation and NADH Consumption

(1) PK 添加量の決定

100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PEP, 5 U/mL LDH, 2 mM ADP 及び 0.2 mM NADH から成る反応液に PK を 0.25 - 5 U/mL の濃度になるよ

うに添加し，吸光度を測定した。

(2) LDH 添加量の決定

100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PEP, 5 U/mL PK, 2 mM ADP 及び 0.2 mM NADH から成る反応液に LDH を 0.5 - 15 U/mL の濃度になるように添加し，吸光度を測定した。

(3) PEP 添加量の決定

100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 U/mL PK, 15 U/mL LDH, 2 mM ADP 及び 0.2 mM NADH から成る反応液に PEP を 0.025 - 2 mM の濃度になるように添加し，吸光度を測定した。

(4) 反応液中の不純物の確認

100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PEP, 5 U/mL PK, 15 U/mL LDH, 3 mM ATP 及び 0.2 mM NADH から成る反応液に *R*-mev を 1 mM 及び *h*MK を 1 µg/mL になるように添加し，吸光度を測定した。反応開始は ATP 添加，*R*-mev 添加あるいは *h*MK 添加による 3 条件で行った。反応開始前の吸光度変化と反応開始後の吸光度変化より，反応物の有無を確認した。

(5) 酵素 (MK, PMK) 添加量の決定

100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PEP, 5 U/mL PK, 15 U/mL LDH, 3 mM ATP, 0.2 mM NADH 及び 1 mM *R*-mev から成る反応液に *h*MK を 0.2 - 1 µg/mL となるように添加し，吸光度を測定した。反応は *R*-mev を添加することで開始させた。なお，Erg12p 量については，Erg8p の結果を参考に設定した。

(6) ATP 添加量の決定

100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PEP, 5 U/mL PK, 15 U/mL LDH, 0.2 mM NADH, 1 mM *R*-mev 及び 0.2 µg/mL *h*MK から成る反応液に ATP を 3 - 6 mM となるように添加し，吸光度を測定した。反応は *R*-mev を添加することで開始させた。

第3項 PMK の活性測定法

測定の迅速化を図るため、確立した至適条件に基づき、96 ウェルマイクロプレートを用いる方法について検討した。200 $\mu\text{L}/\text{well}$ となるように調製した反応液を96 ウェルマイクロプレートに分注し、マイクロプレートリーダーを用いて反応液の吸光度 (340nm) を 30 $^{\circ}\text{C}$ で測定した ($n=3$)。

R-mev5p に対する Kinetic parameters の測定では、種々の濃度の *R-mev5p* 溶液 50 μL を96 ウェルマイクロプレートに分注し、次いで各試薬の混合溶液 150 μL を加えることで反応を開始させた。ATP 濃度は 5 mM とした。温度変化による誤差を抑えるため、プレート (及び内部の *R-mev5p* 溶液) と混合溶液は、反応開始前に 30 $^{\circ}\text{C}$ で5分間プレインキュベートした。反応液の終濃度は 0.02 - 0.01 $\mu\text{g}/\text{well}$ PMK (Erg8p 又は *hPMK*), 0.0125 - 0.4 mM *R-mev5p*, 100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PEP, 5 U/mL PK, 15 U/mL LDH, 5 mM ATP 及び 0.2 mM NADH である。

ATP に対する Kinetic parameters の測定では、*R-mev5p* 濃度を 20mM として ATP 濃度を 0.025 - 2 mM の範囲で変化させ測定を行った。反応液の終濃度は 0.02 - 0.01 $\mu\text{g}/\text{well}$ PMK (Erg8p 又は *hPMK*), 0.025 - 2 mM ATP, 100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PEP, 5 U/mL PK, 15 U/mL LDH, 20 mM *R-mev5p* 及び 0.2 mM NADH である。

回帰曲線の作成と、非線形回帰による親和定数 (K_m) 及び最大速度 (V_{max}) の算出は Biosoft 社製の EnzFitter ソフトウェア (<https://enzfitter.software.informer.com>) の Michaelis-Menten 式を用いて行った。

第4項 MK の活性測定法

前項の PMK の活性測定法に準じて行った。

R-mev に対する Kinetic parameters の測定では、ATP 濃度を 5 mM として *R-mev* 濃度を 0.0125 - 0.4 mM の範囲で変化させ測定を行った。反応液の終濃度は 0.01 $\mu\text{g}/\text{well}$ *C. gla* Erg12p 又は 0.04 $\mu\text{g}/\text{well}$ *hMK*, 0.0125 - 0.4 mM *R-mev*, 100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PEP, 5 U/mL PK, 15 U/mL LDH, 5 mM ATP 及び 0.2 mM NADH である。

ATP に対する Kinetic parameters の測定では、*R-mev* 濃度を 20 mM として ATP 濃度を 0.033 - 2 mM の範囲で変化させ測定を行った。反応液の終濃度は 0.01 $\mu\text{g}/\text{well}$ *C. gla* Erg12p 又は

0.04 $\mu\text{g}/\text{well}$ hMK, 0.033 - 2 mM ATP, 100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 2 mM PEP, 5 U/mL PK, 15 U/mL LDH, 20 mM *R*-mev 及び 0.2 mM NADH である。

第 5 項 酵素精製過程における比活性の測定

第 1 章において述べた Erg8p 及び Erg12p の精製過程で得られた粗抽出液, Ni カラム溶出液, AEX カラム溶出液, 及び SEC カラム溶出液の比活性を測定した。各試料は Bradford 法で求めたタンパク質濃度に応じて希釈して使用した (Table 2 参照)。

比活性の測定は, 第 3 項の PMK の活性測定法に準じて行った。適当な濃度に希釈した Erg8p 又は Erg12p 溶液 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ を 96 ウェルマイクロプレートに分注し, 次いで各試薬の混合溶液 150 μL を加えることで反応を開始させた。反応液中の終濃度は, 100 mM HEPES-K pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 2 mM PEP, 5 U/mL PK, 15 U/mL LDH, 5 mM ATP, 20 mM *R*-mev 又は *R*-mev5p 及び 0.2 mM NADH である。

第 3 節 結果及び考察

第 1 項 活性測定条件の至適化

緒言で述べたように, MK 及び PMK の活性測定法については多くの文献で NADH 消費量測定法が採用されていることから, ¹⁶⁻¹⁸⁾ 著者も本測定法を採用することとした。しかしながら, 報告者により下流経路の諸条件が大きく異なることから, 既報の方法を精査したところ, 方法により測定結果が著しく異なり, また再現性のある測定結果が得られなかった。これは下流経路の酵素量や基質量が最適化されていないことが原因と考えられた。また, これまでの報告ではそのほとんどが基質としてラセミ体を用いて Kinetic parameters を算出しており, 現時点で(S)-体の基質に対する反応性が不明であることから, ラセミ体の Kinetic parameters が本来の基質である(R)-体に対する結果を反映しているかは不明である。従って, 既報の方法をそのまま採用することはできず, また既報の Kinetic parameters との比較が困難であることが明らかとなった。

以上のことより, Erg8p 及び Erg12p の Kinetic parameters を明確にするためには, 本来の基質である *R*-mev, *R*-mev5p を用いるだけでなく, 下流経路の酵素やその基質濃度を最適化し, 再現性の高い活性測定条件の確立が必要と考えられた。本研究では, *R*-mev あるいは *R*-mev5p を基質として用いて反応条件の至適化を行い, Erg8p 及び Erg12p の高精度活性測

定法を開発した後, Erg8p, Erg12p, *hMK*, *hPMK* に対して統一した条件下で各酵素の Kinetic parameters を算出し, 比較検討を行うこととした.

(1) PK 添加量の決定

NADH 消費量測定法では, 目的の酵素反応が律速となるように, 下流経路の反応速度が十分速くなる条件を設定する必要がある. PK の添加量を変化させて (0.25 - 5 U/mL) 測定を行ったところ, PK 濃度の増加に伴い反応速度は増大し, 1 - 5 U/mL の PK 添加時では反応速度は最大となり, ほぼ一定となった. 以上の結果より PK 濃度を 5 U/mL に設定した.

(2) LDH 添加量の決定

LDH の添加量を変化させて (0.5 - 15 U/mL) 測定を行ったところ, LDH 濃度の増加に伴い反応速度は増大し, 10 - 15 U/mL の LDH 添加時では反応速度は最大となり, ほぼ一定となった. 以上の結果より LDH 濃度は 15 U/mL に設定した.

(3) PEP 添加量の決定

PEP の添加量を変化させて (0.025 - 2 mM) 測定を行ったところ, PEP 濃度が 0.075 mM 以下の場合, 反応液中の PEP の枯渇が確認されたが, 0.5 - 2 mM の PEP の添加で最大速度が得られた. 以上の結果より PEP 濃度は 2 mM に設定した.

本項 (1) ~ (3) において至適化した条件を用いて, ADP の濃度と NADH の消費量に伴う吸光度減少量から検量線を作成したところ, 良好な直線性が成立した.

(4) 反応液中の不純物の確認

活性測定を妨害する原因の一つとして, 測定に用いる各種試薬中に含まれる不純物によるバックグラウンドの上昇がある. そこで, バックグラウンドを上昇させる不純物が存在するか否かを確認するため, ATP, *R-mev* あるいは *hMK* のいずれかが含まれていない反応液を調製し, その吸光度変化を確認した. いずれの条件でも吸光度変化は認められず, 不純物の存在は確認されなかった. また, ATP, *R-mev* あるいは *hMK* のいずれを反応開始物としても反応速度は同程度であった.

(5) 酵素 (MK, PMK) 添加量の決定

MK あるいは PMK の添加量については、5 - 10 分の反応時間で 340 nm の吸光度変化が 0.1 - 0.3 程度になるように設定した。hMK を用いて種々検討した結果、0.2 $\mu\text{g/mL}$ が最適濃度であった。その他の酵素については hMK の酵素量を参考に、測定時の反応速度によって適宜増減させた。

(6) ATP 添加量の決定

ATP 濃度については 3 - 5 mM で反応速度が最大かつ一定となった。しかし、6 mM ATP 添加では反応速度の低下が認められた。以上の結果から ATP 濃度を 5 mM に設定した。

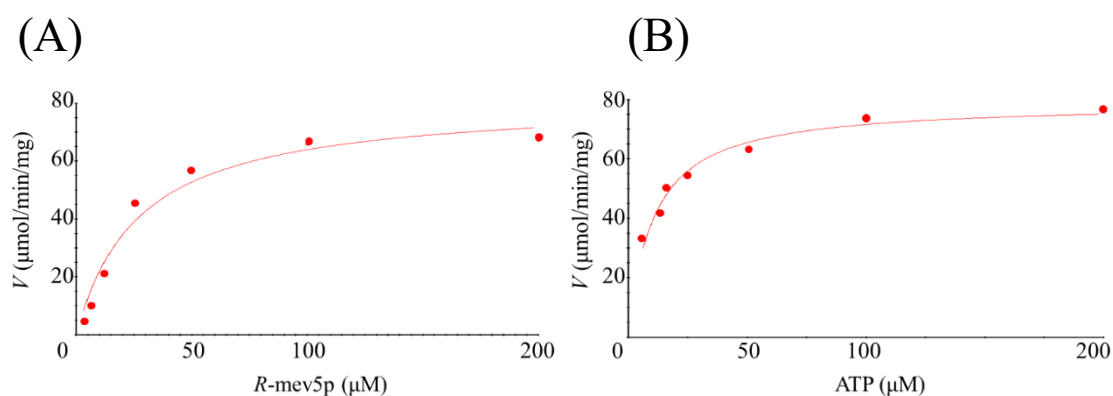
第 2 項 PMK の Kinetic parameters の測定

前項で確立した測定法を用いて、Erg8p 及び hPMK の Kinetic parameters を算出した。4 種類の真菌由来 Erg8p 及び hPMK の非線形回帰により求めた K_m 及び V_{\max} を Table 3 に、非線形プロットを Fig. 23 - 27 に示す。4 種の Erg8p の R-mev5p に対する K_m ($K_{mR\text{-mev5p}}$) の値は約 14 - 27 μM となり、hPMK の約 1.3 - 2.4 倍であった。一方、 V_{\max} についてはいずれの Erg8p も hPMK の 5 倍以上の値を示し、 V_{\max}/K_m は hPMK が約 1.4 であるのに対して Erg8p では約 3 - 6 と高値を示し、真菌の単位時間当たりの反応サイクル数はヒトに比べて多いものと推察された。また、*S. cer* Erg8p, *A. ory* Erg8p, hPMK においては $K_{mR\text{-mev5p}}$ と ATP に対する K_m (K_{mATP}) の値に大きな差は認められず、これらの酵素は R-mev5p と ATP に対して同程度の親和性を示すものと考えられる。一方、*C. gla* Erg8p 及び *S. pom* Erg8p では、 K_{mATP} が $K_{mR\text{-mev5p}}$ に対してそれぞれ約 3 倍及び 2 倍の値を示し、特に *C. gla* Erg8p は他の Erg8p に比べ ATP に対する親和性が低いことが明らかとなった。

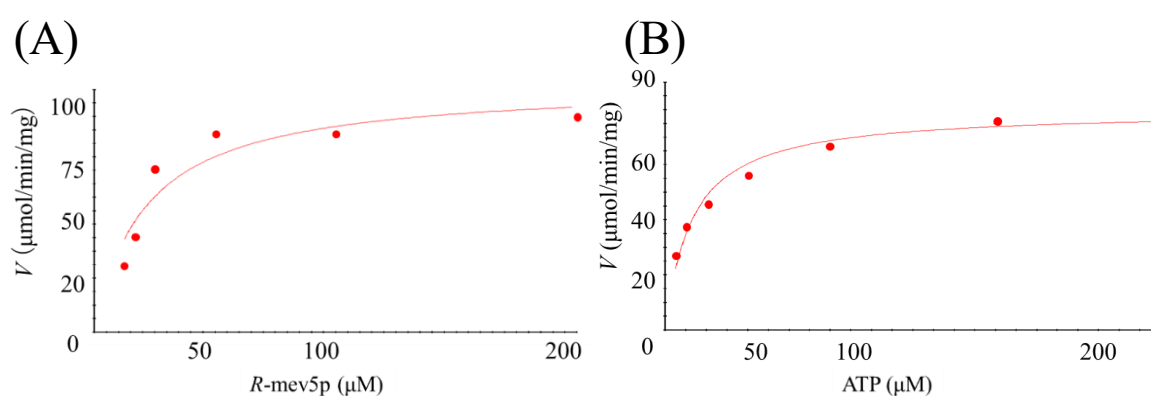
本研究で算出した *S. cer* Erg8p の Kinetic parameters を、Garcia らによって報告された発現酵素の値と比較すると、¹³⁾ 基質に対する K_m は約 1/2 であり V_{\max} は約 20 倍であった。この原因として、文献に記載されていないが Garcia らの用いた基質の meV5p がラセミ体の可能性があること、発現酵素の精製が Ni アフィニティーカラムのみであること、測定法の下流経路の濃度条件等が本研究と異なることなどが考えられる。その他の 3 種の真菌の Erg8p については、過去に活性測定の報告がなく、今回初めてこれらの Kinetic parameters を明らかにすることができた。

Table 3. Kinetic Parameters of Erg8p and hPMK

	$K_m R\text{-mev5p}$ (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	$K_m \text{ATP}$ (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
<i>S. cer</i> Erg8p	26.9	81.2	20.4	78.9
<i>C. gla</i> Erg8p	20.8	92.2	64.0	79.8
<i>S. pom</i> Erg8p	14.0	89.3	30.5	89.4
<i>A. ory</i> Erg8p	22.2	88.8	24.7	66.9
hPMK	11.0	15.0	16.0	16.8

**Fig. 23. Initial Reaction Velocity of *S. cer* Erg8p**

(A) As a function of $R\text{-mev5p}$ concentration. (B) As a function of ATP concentration.

**Fig. 24. Initial Reaction Velocity of *C. gla* Erg8p**

(A) As a function of $R\text{-mev5p}$ concentration. (B) As a function of ATP concentration.

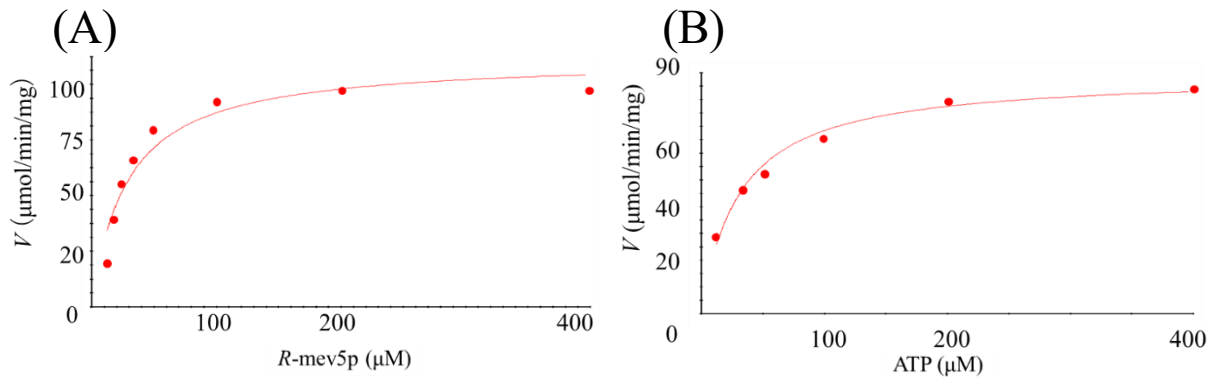


Fig. 25. Initial Reaction Velocity of *S. pom* Erg8p

(A) As a function of $R\text{-mev5p}$ concentration. (B) As a function of ATP concentration.

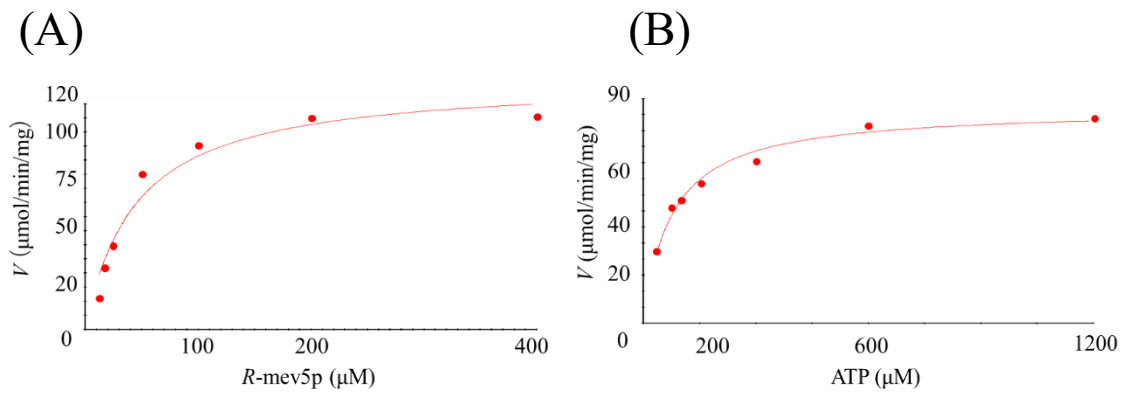


Fig. 26. Initial Reaction Velocity of *A. ory* Erg8p

(A) As a function of $R\text{-mev5p}$ concentration. (B) As a function of ATP concentration.

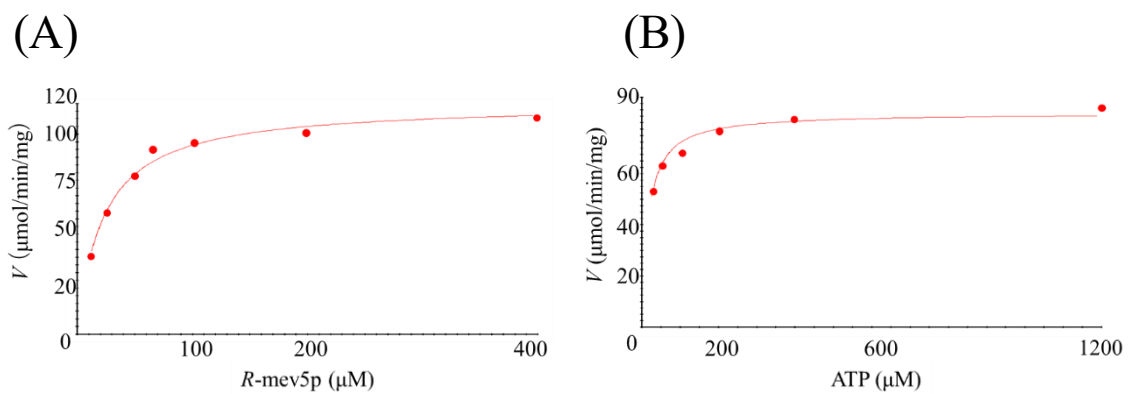


Fig. 27. Initial Reaction Velocity of hPMK

(A) As a function of $R\text{-mev5p}$ concentration. (B) As a function of ATP concentration.

第3項 MK の Kinetic parameters の測定

C. gla Erg12p と *hMK* の非線形回帰により求めた K_m 及び V_{max} を Table 4 に、非線形プロットを Fig. 28 及び Fig. 29 に示す。これまでに Erg12p の単離酵素を用いた活性測定の報告はなく、今回初めて Kinetic parameters が明らかとなった。*C. gla* Erg12p の K_m 及び V_{max} は、それぞれ *hMK* の約 1.3 倍及び約 7.5 倍であり、 V_{max}/K_m は *hMK* が約 1.4 であるのに対して *C. gla* Erg12p では約 7 と高値を示し、PMK 同様、真菌の単位時間当たりの反応サイクル数はヒトに比べて多いものと推察された。*C. gla* Erg12p の K_{mATP} は K_{mR-mev} に比べて約 20 倍の高値を示し、ATP に対する親和性が基質の親和性に比べて極めて低いことが明らかになった。同様の傾向は *hMK* でも認められるが、*C. gla* Erg12p の場合は特に顕著であった。Erg8p と Erg12p のパラメーターを比較すると、基質に対する K_m と V_{max} は両酵素で同程度であるが、ATP に対する K_m については差異が認められ、Erg12p は Erg8p に比べ ATP に対する親和性が著しく低いことが明らかになった。

本研究で算出した *hMK* の Kinetic parameters を、Potter らによって報告された His-tag を付加せずに発現させた発現酵素の値と比較すると、¹⁸⁾ 基質に対する K_m が約半分であった。活性測定条件が異なることから、厳密な比較はできないが、これは本研究では基質として *R-mev* を用いているのに対し、Potter らはラセミ体を活性測定に用いていることが要因の一つになっていると考えられる。

Table 4. Kinetic Parameters of Erg12p and *hMK*

	K_{mR-mev} (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	K_{mATP} (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
<i>C. gla</i> Erg12p	16.8	118	322	111
<i>hMK</i>	11.3	15.8	170	18.9

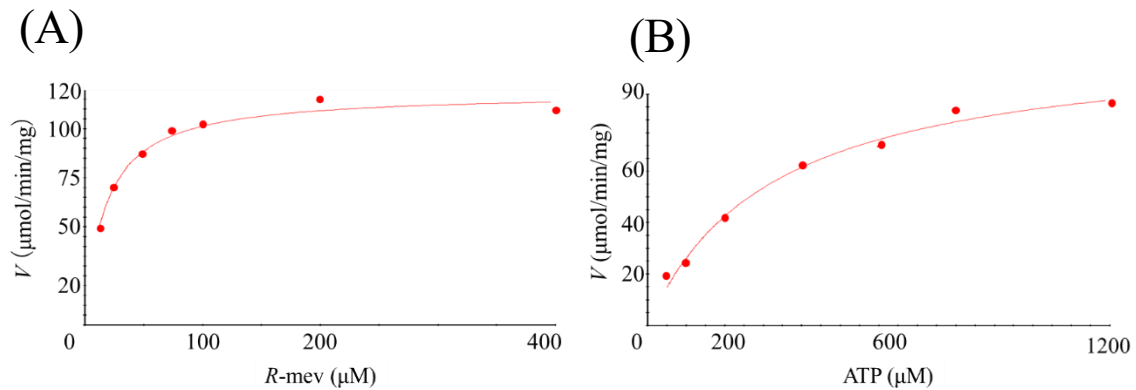


Fig. 28. Initial Reaction Velocity of *C. gla* Erg12p

(A) As a function of $R\text{-mev}$ concentration. (B) As a function of ATP concentration.

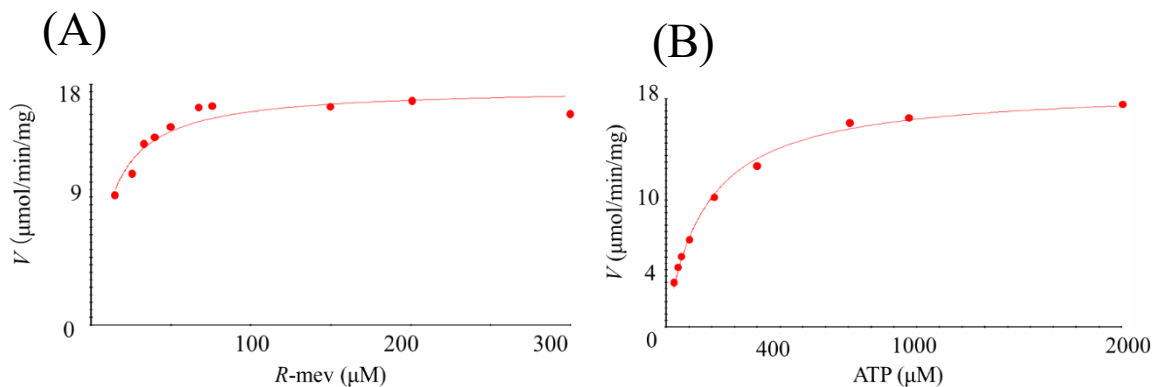


Fig. 29. Initial Reaction Velocity of *hMK*

(A) As a function of $R\text{-mev}$ concentration. (B) As a function of ATP concentration.

第4項 酵素精製過程における比活性の測定

精製過程で得られた試料の比活性を Table 5 に示す。最終工程である SEC カラムからの溶出液の比活性は、粗抽出液の比活性に対して Erg8p で 2.4 - 8 倍、Erg12p では 32 倍であった。Erg8p については Ni アフィニティークロマトグラムの段階ですでに 80% 以上の純度を達成していることが明らかとなった。一方、発現効率と可溶化率の低い *C. gla* Erg12p については Ni アフィニティークロマトグラムと SEC によって比活性が大きく上昇し、最終的に高純度の精製タンパク質を得ることができた。

Table 5. Specific Activity of Erg8p and Erg12p

	Specific activity at each purification step ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)			
	Crude extract	Eluate of Ni column	Eluate of AEX column	Eluate of SEC column
<i>S. cer</i> Erg8p	33.1	69.5	63.0	80.0
<i>C. gla</i> Erg8p	6.1	41.0	50.3	50.0
<i>S. pom</i> Erg8p	10.8	48.9	54.1	58.2
<i>A. ory</i> Erg8p	4.5	32.8	32.6	36.4
<i>C. gla</i> Erg12p	4.2	73.6	72.5	136

第4節 小括

本章では第1章で単離精製した Erg8p 及びその関連酵素である Erg12p, *h*PMK 及び *h*MK の高精度活性測定法を開発し, 各酵素の Kinetic parameters を明らかにした. 共役酵素反応系の諸条件を至適化し, 再現性の高い活性測定法を確立した後, 測定の迅速化を図るため, 確立した至適反応条件に基づき 96 ウェルマイクロプレートによる活性測定法に応用した. 測定には基質にラセミ体ではなく (*R*)- 体を用い, 各酵素の基質及び補酵素に対する Kinetic parameters を算出した.

Erg8p 及び Erg12p の単離精製酵素を用いた Kinetic parameters は, これまでほとんど検討されておらず, 現時点で *S. cer* Erg8p に関する報告 1 例のみである. 本研究では *S. cer* Erg8p に加え, 新たに 3 種の Erg8p 及び 1 種の Erg12p の Kinetic parameters を明らかにした. Erg12p の単離酵素の Kinetic parameters については, 本研究結果が初めての報告となる.

本研究により Erg8p 及び Erg12p の基質や補酵素に対する親和性及び V_{\max} に関する有用な情報を得ることができた. Erg8p と Erg12p のパラメーターの比較から, 基質に対する親和性及び V_{\max} は両酵素で同程度であるが, ATP に対する親和性は著しく異なることが明らかとなった. また, 真菌類の酵素と対応するヒトの酵素を比較すると MK と PMK で同様の傾向があり, K_m 及び V_{\max} はヒトの酵素の 5 倍以上の値を示し, さらに真菌類の酵素の V_{\max}/K_m がヒトの酵素の 3 - 5 倍の値となり, 真菌の単位時間当たりの反応サイクル数はヒトに比べて多いものと推察された. 今回得られた測定結果は, 今後 PMK あるいは MK 阻害剤を開発する上での基礎データになるものと考えられる.

第3章 LC-MS/MS法による真菌 Mevalonate kinase (Erg12p) 及び Phosphomevalonate kinase (Erg8p) の定量

第1節 緒言

近年、クロマトグラフィーや質量分析技術の進歩に伴い、生体試料中のタンパク質やペプチドを高感度かつ精度よく定量することが可能となり、タンパク質の網羅的な解析 (プロテオミクス) が飛躍的に発展した。

LC-MS/MSによるプロテオミクスはノンターゲットプロテオミクスとターゲットプロテオミクスの2つに大別されるが、ターゲットプロテオミクスでは、一般に対象タンパク質のトリプシン消化ペプチド混合物をLCで分離し、三連四重極型質量分析計を用いた多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring : MRM) 法で検出・定量する方法が広く利用されている。酵母などの真菌類については、これまでターゲットプロテオミクスによる出芽酵母等のプロテオーム解析が行われているが、そのほとんどが中心炭素代謝経路のタンパク質に関連するもので、²⁰⁾ Erg8p 及び Erg12p をターゲットとしたプロテオミクスに関する報告はない。第1章において Erg8p 及び Erg12p の高純度精製タンパク質が大量に得られたことから、それらを標準タンパク質として用いる LC-MS/MS 定量法への応用が可能になった。そこで本章では、Erg8p 及び Erg12p の大量調製時の発現量の解析のみならず、真菌類の定量プロテオーム解析、さらに MK や PMK の関連する疾患の病態解析への応用も視野に入れ、LC-MS/MS を用いた定量ターゲットプロテオミクスについて基礎的検討を行った。

第2節 実験方法

第1項 試薬及び使用機器

本章で用いた試薬及び使用機器は以下のとおりである。

液体クロマトグラフ	LC-20AD システム (島津製作所)
質量分析計	LCMS-8040 (島津製作所)
分離カラム	Mightysil RP-18 GP II (2.0 mm×100 mm, 3 µm, 関東化学)

ペプチド精製の MonoSpin C18 カラム及びマイレックス[®] フィルターをそれぞれジーエルサイエンス社及び Merck 社より、質量分析グレード Trypsin, Iodoacetamide (IAA), Trifluoroacetic acid (TFA) 及び Dithiothreitol (DTT) を富士フィルム・和光純薬社より購入し

た. 試料の前処理に用いたタンパク低吸着マイクロチューブ (プロテオセーフ®) を住友ベークライトより購入した. その他の試薬及び溶媒は全て市販の特級規格品又は質量分析グレードのものをを用いた.

第2項 LC-MS/MS 測定

(1) 試料の前処理

測定試料 30 μL (タンパク質濃度を 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以下に調整) を 1.5 mL マイクロチューブに分取し, 0.5 M Tris (pH 8) - 10 M Urea 200 μL 及び 250 mM DTT 10 μL を添加し 37 °C で 60 分間インキュベートした. さらに 500 mM IAA 10 μL を添加し, 遮光下, 室温で 60 分間インキュベートした後, 50 mM DTT 5 μL を添加し 37 °C で 60 分間インキュベートした (還元, アルキル化). 50 mM 炭酸水素アンモニウム 1 mL を添加後, 500 μL を 1.5 mL マイクロチューブに分取し, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ トリプシン溶液 20 μL を加え 37 °C で 18 時間インキュベートした (消化). TFA を 5 μL 加えて反応を停止した後, 得られたペプチドを MonoSpin C18 カラムにより精製し, マイレックス®フィルター (0.45 μm , PTFE) でろ過した後, その一定量を LC-MS/MS に注入した.

(2) 測定条件

LC-MS/MS による測定条件を Table 6 及び 7 に示した. 質量分析計には三連四重極型質量分析計を用い, MRM 法で検出・定量を行った. 対象ペプチドの選択及びそれらの MRM transition の最適化は, ワシントン大学の MacCos Lab で開発された無償の Skyline ソフトウェア (<https://skyline.ms/project/home/software/Skyline/begin.view>) による解析結果と Erg8p 及び Erg12p 標準タンパク質より得られた実測データに基づいて行った.

Table 6. HPLC Conditions for Quantitative Analysis of *C. gla* Erg8p and *C. gla* Erg12p

Column	: Mightysil RP-18 GP II (2.0 mm \times 100 mm, 3 μm)
Mobile phase	: A 0.1% HCOOH in H ₂ O B 0.1% HCOOH in CH ₃ CN
	Gradient elution
	Erg8p : A 95% \rightarrow 54% B 5% \rightarrow 46% 30 min
	Erg12p : A 90% \rightarrow 50% B 10% \rightarrow 50% 20 min
Column temp.	: 40°C
Flow rate	: 0.2 mL/min

Table 7. MS/MS Conditions for Quantitative Analysis of *C. gla* Erg8p and *C. gla* Erg12p

Capillary voltage	: 4.50 kV	Nebulizer gas	: N ₂ (2.5 L/min)
Ionization	: ESI (+)	Dry gas	: N ₂ (15.0 L/min)
Interface temp.	: 350 °C	CID gas	: Ar (270 kPa)
Heat block / DL temp.	: 400 °C / 250 °C		

第3節 結果及び考察

MRM 法によるタンパク質の測定では、目的タンパク質をトリプシンで消化して得られる多数のペプチドから対象ペプチドを選択して定量するため、感度及び特異性の高い定量法を確立するためには、適切なペプチドを選択する必要がある。対象ペプチドの選択は本研究では、タンパク質定量を支援する目的で開発された Skyline ソフトウェアによる解析結果のみならず、Erg8p 及び Erg12p 標準タンパク質を用いて、実測によりペプチドの選択及び MRM transition の最適化を行うことから、精度の高い定量法の構築が可能と考えられる。

プロテオミクスでは、一般に高分離能を有し高感度化が可能なナノ LC システムと、より安定した定量解析を実施するための測定法として安定同位体標識ペプチドを用いる内標準法が利用されている。本研究では測定感度は劣るものの汎用性が高く、1 測定あたりの測定時間を短縮可能なセミマイクロ LC による方法と、定量法として絶対検量線法について検討した。以下、*C. gla* Erg8p 及び *C. gla* Erg12p の定量法について検討した結果について述べる。

第1項 LC-MS/MS による Erg8p の定量

(1) *C. gla* Erg8p 標準タンパク質の測定

Skyline ソフトウェアを用いて、*C. gla* Erg8p のアミノ酸配列からプリカーサーイオン、プロダクトイオンを予測した上で、標準タンパク質を用いて対象ペプチドの選択及び MRM transition の最適化を行った。なお対象ペプチドの選択は Uchida らにより提唱された定量ターゲットに適したペプチド選択指針を参考にした。²¹⁾

第3章第2節第2項の操作法に従い調製したペプチド試料のトータルイオンクロマトグラム (TIC) を Fig. 30 に示す。各ペプチドの基準ピークの m/z と Skyline による解析結果に基づき、これらのピークの中から感度及び再現性に優れ、他の真菌の Erg8p と識別可能な

特異性の高い3種のペプチドを選択した。選択したペプチドのアミノ酸配列及びそのプリカーサーイオンとプロダクトイオンの m/z , 並びに Collision energy 等の最適化結果を Table 8 に示す。プリカーサーイオンはいずれも $[M+2H]^+$ の2価イオンであり、プロダクトイオンには強度の大きい y 又は b 系列の1価イオンを選択した。また、短時間で各ペプチドのピークが明瞭に分離する LC の移動相条件を種々検討した結果、1試料あたり約13分で測定が可能となった。最終的に確立した条件下で測定した対象ペプチドのMRMクロマトグラムを Fig. 31 に示す。

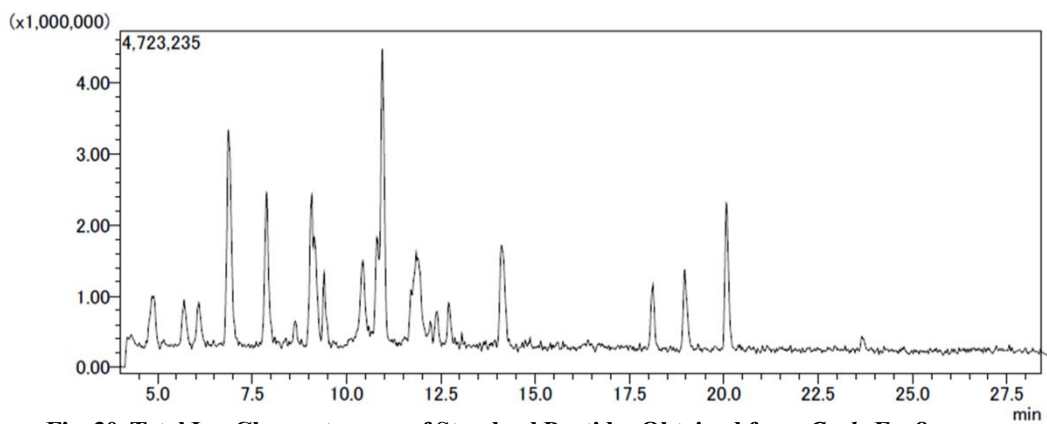


Fig. 30. Total Ion Chromatogram of Standard Peptides Obtained from *C. gla* Erg8p

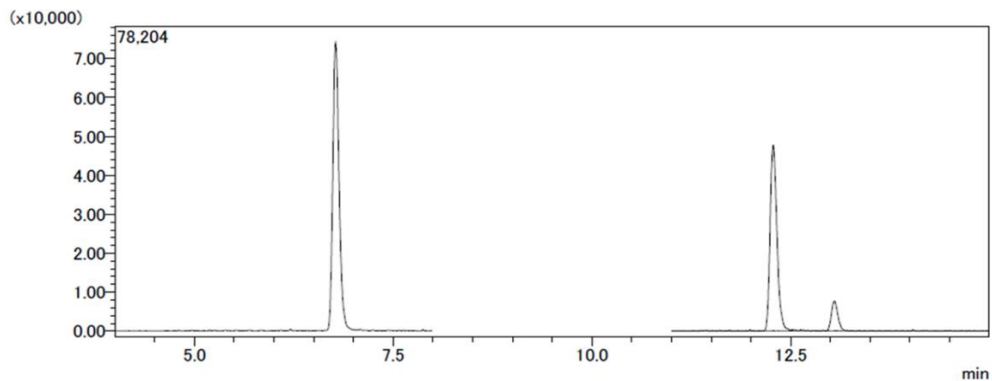


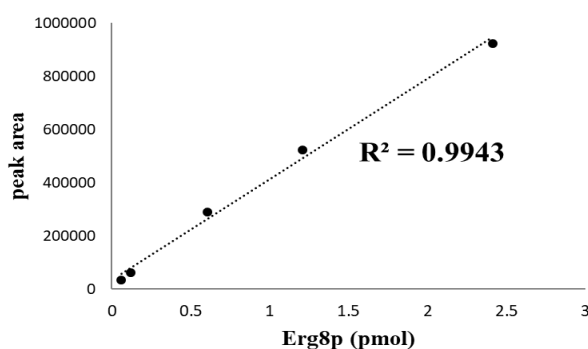
Fig. 31. MRM Chromatogram of Standard Peptides Obtained from *C. gla* Erg8p

Table 8. Optimized Analytical Conditions for MRM Analysis of *C. gla* Erg8p in LC-MS 8040

Peptide	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Q1 (V)	Collision energy (eV)	Q3 (V)
LVLGDVR	386.4	274.4	-12.0	-21.0	-20.0
		213.4	-12.0	-13.0	-24.0
		280.2	-15.0	-13.0	-15.0
VLLVGGYLVLDPK	693.4	213.3	-36.0	-41.0	-23.0
		961.2	-36.0	-25.0	-34.0
TVLNVLSFIGPASGK	752.3	201.4	-38.0	-37.0	-22.0

(2) 直線性, 検出限界及び分析法のバリデーション

以上の検討結果から確立した *C. gla* Erg8p 定量法では, 0.06 pmol から 2.4 pmol (注入量) の範囲で *C. gla* Erg8p 量とピーク面積の間に Fig. 32 に示すような良好な直線性が成立した。また, *C. gla* Erg8p 0.6 pmol を用いて, 確立した操作法に従い繰り返し測定 (intra-assay) したときの変動係数 (C.V.) は約 5~25% (n=6) と満足すべき値であった。本法の検出限界は S/N=3 とすると, 約 60 fmol であった。

**Fig. 32. Calibration Curve of *C. gla* Erg8p****(3) 大腸菌粗抽出液及び各種カラム溶出液中の *C. gla* Erg8p の測定**

確立した定量法を用いて, *C. gla* Erg8p の精製過程で得られた大腸菌粗抽出液, Ni カラム溶出液及び陰イオン交換カラム溶出液の 3 種の試料 (第 1 章参照) 中の *C. gla* Erg8p の測定を行った。各試料の MRM クロマトグラムを Fig. 33 に示す。3 種の対象ペプチドのピークはいずれの試料においても検出され, 保持時間 6.8 分と 12.3 分のピークは多成分が共存する粗抽出液試料においても十分な強度で検出された。また, いずれの試料においても保

保持時間 6.8 分と 12.3 分のピークの面積比は標準試料より得られたピーク面積比と一致しており、これらのピークは本酵素の定量に適用可能であることが判明した。一方、保持時間 13.1 分のピークについては強度が増大する傾向にあり、特に共存成分が多い粗抽出液試料において顕著であった。保持時間 13.1 分のピークについてはカラムより共溶出する成分によってマトリクス効果等、何らかの影響を受けているものと推察された。今後、さらに前処理やカラム分離条件等を検討することにより、より高い精度の定量解析を行うことが可能になると考えられる。

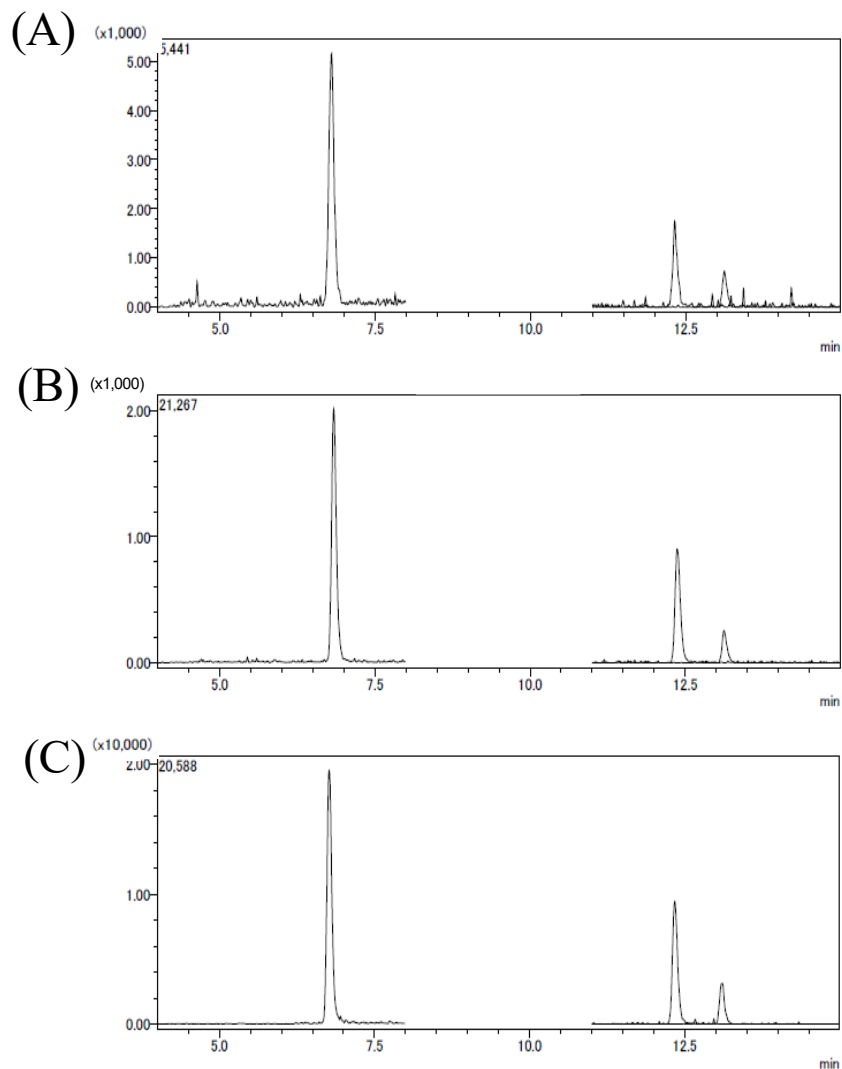


Fig. 33. MRM Chromatograms of Partially Purified *C. gla* Erg8p.

(A) Crude extract. (B) Eluate of Ni affinity chromatography. (C) Eluate of AEX.

第2項 LC-MS/MSによるErg12pの定量

(1) *C. gla* Erg12p 標準タンパク質の測定

Skyline ソフトウェアを用いて、*C. gla* Erg12p のアミノ酸配列からプリカーサーイオン、プロダクトイオンを予測した上で、標準タンパク質を用いて対象ペプチドの選択及びMRM transition の最適化を行った。第3章第2節第2項の操作法に従い調製したペプチド試料のトータルイオンクロマトグラム (TIC) を Fig. 34 に示す。各ペプチドの基準ピークの m/z と Skyline による解析結果に基づき、これらのピークの中から感度及び再現性に優れ、他の真菌の Erg12p と識別可能な特異性の高い4種のペプチドを選択した。選択したペプチドのアミノ酸配列及びそのプリカーサーイオンとプロダクトイオンの m/z 並びに Collision energy 等の最適化結果を Table 9 に示す。プリカーサーイオンはいずれも $[M+2H]$ の2価イオンであり、プロダクトイオンには強度の大きい y 又は b 系列の1価イオンを選択した。また、短時間で各ペプチドのピークが明瞭に分離する LC の移動相条件を種々検討した結果、*C. gla* Erg8p の場合と同様に1試料あたり約13分で測定が可能となった。最終的に確立した条件下で測定した対象ペプチドのMRM クロマトグラムを Fig. 35 に示す。

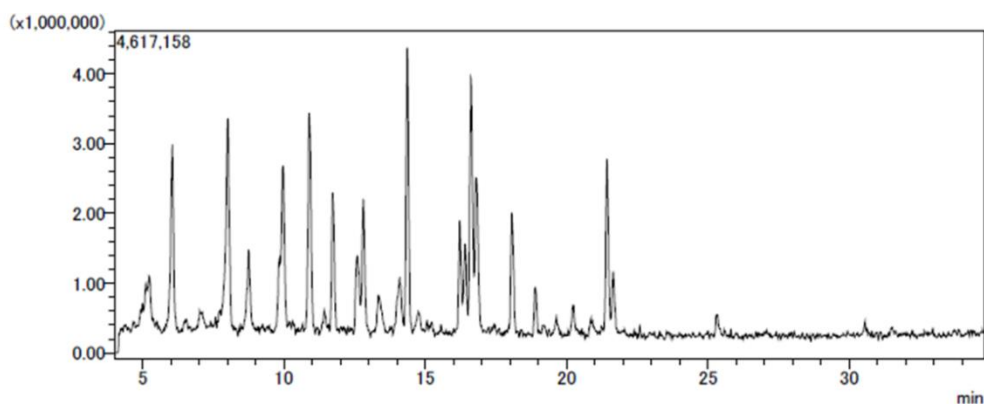


Fig. 34. Total Ion Chromatogram of Standard Peptides Obtained from *C. gla* Erg12p

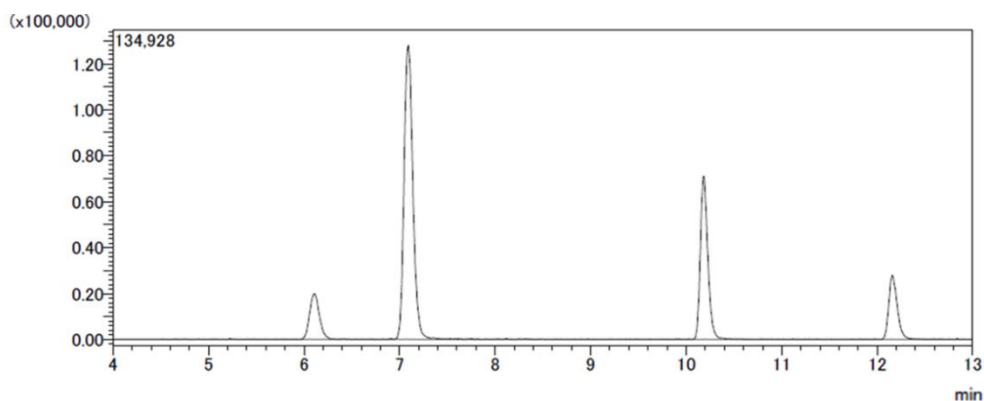


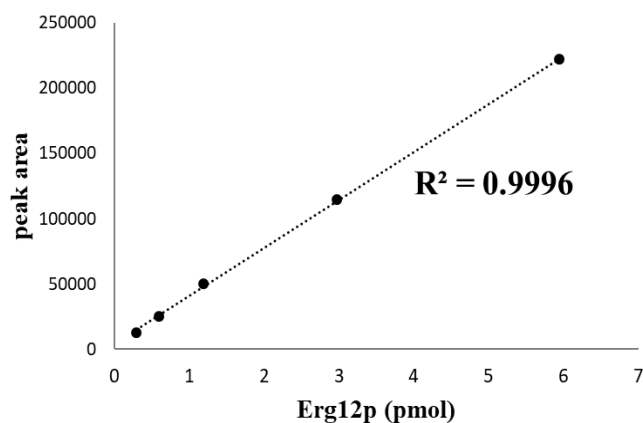
Fig. 35. MRM Chromatograms of Standard Peptides Obtained from *C. gla* Erg12p

Table 9. Optimized Analytical Conditions for MRM Analysis of *C. gla* Erg12p in LC-MS 8040

Peptide	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Q1 (V)	Collision energy (eV)	Q3 (V)
ETALLQAAR	486.6	317.3	-14.0	-22.0	-23.0
ELEPVLR	428.4	242.8	-13.0	-16.0	-17.0
		484.6	-13.0	-16.0	-18.0
IPMVLTYTR	547.3	490.9	-28.0	-20.0	-14.0
DLPFLVSAPGK	572.5	458.4	-30.0	-18.0	-17.0

(2) 直線性, 検出限界及び分析法のバリデーション

以上の検討結果確立した *C. gla* Erg12p 定量法では, 0.3 pmol から 6.4 pmol (注入量) の範囲で *C. gla* Erg12p 量とピーク面積の間に Fig. 36 に示すような良好な直線性が成立した。また, *C. gla* Erg12p 1.2 pmol を用いて, 確立した操作法に従い繰り返し測定 (intra-assay) したときの変動係数 (C.V.) は約 10~23% (n=6) と満足すべき値であった。本法の検出限界は S/N=3 とすると, 約 0.3 pmol であった。

**Fig. 36. Calibration Curve of *C. gla* Erg12p****(3) 大腸菌粗抽出液及び各種カラム溶出液中の *C. gla* Erg12p の測定**

確立した定量法を用いて, *C. gla* Erg12p の精製過程で得られた大腸菌粗抽出液, Ni カラム溶出液及び陰イオン交換カラム溶出液の 3 種の試料 (第 1 章参照) 中の *C. gla* Erg12p の測定を行った。各試料の MRM クロマトグラムを Fig. 37 に示す。4 種の対象ペプチドのピークはいずれの試料においても検出された。また, いずれの試料においても保持時間 6.1 分と 7.2 分のピークの面積比は標準試料より得られたピーク面積比と一致しており, これら

のピークは本酵素の定量に適用可能であることが判明した。一方、保持時間 10.2 分と 12.2 分のピークについては、それぞれ強度が減少及び増大する傾向にあり、共存成分が多い試料ほど顕著であった。これらのピークについてはカラムより共溶出する成分によってマトリックス効果等、何らかの影響を受けているものと推察された。今後、さらに前処理やカラム分離条件等を検討することにより、より高い精度の定量解析を行うことが可能になると考えられる。

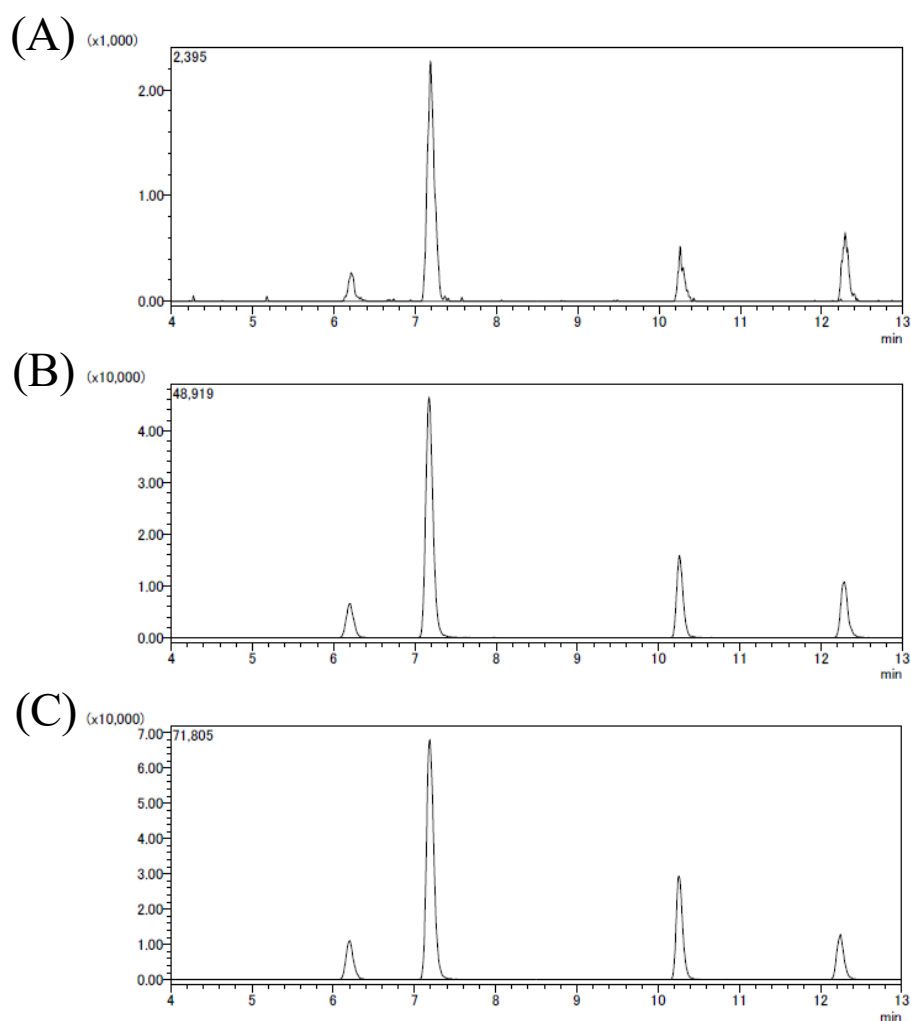


Fig. 37. MRM Chromatograms of Partially Purified *C. gla* Erg12p.

(A) Crude extract. (B) Eluate of Ni affinity chromatography. (C) Eluate of AEX.

第4節 小括

本章では Erg8p 及び Erg12p 発現量の解析並びに真菌類の定量プロテオーム解析の一助とするための定量ターゲットプロテオミクスについて基礎的検討を行った。

LC-MS/MS による定量法を開発する上で最も重要となる対象ペプチドの選択及び MRM transition の最適化については、Skyline ソフトウェアによる解析結果と第1章で単離精製した標準タンパク質を用いた実測データに基づき設定した。検出感度及び特異性から、*C. gla* Erg8p では3種、*C. gla* Erg12p では4種のペプチドを選択した。選択したペプチドのアミノ酸配列はいずれも *C. gla* Erg8p 及び *C. gla* Erg12p に特異的であることから、他の真菌類やヒトの酵素との識別が可能である。また、LC による分離条件を種々検討することで、これらのペプチドの測定時間をそれぞれ約 13 分にまで短縮することができた。絶対検量線法により *C. gla* Erg8p 及び *C. gla* Erg12p の検量線を作成したところ、いずれもフェptomol から picomol の範囲で良好な直線性を示し、それぞれサブpicomol 及び picomol レベルでの定量が可能であった。さらに今回検討した定量法は、測定値の変動が比較的大きい絶対検量線法による定量法であるが、同一条件下での Intra-assay の変動係数も約 10% 以下と良好であった。

本研究で確立した定量法を各酵素の精製過程で得られた大腸菌粗抽出液及びカラム溶出液中の *C. gla* Erg8p 及び *C. gla* Erg12p の定量に応用したところ、いずれの場合も選択したペプチドのうち、2種のペプチドを利用することで定量が可能であった。しかしながら、残りのペプチドについてはピーク強度が増大あるいは減少する傾向にあり、特に共存成分が多い粗抽出液試料において顕著であった。これらのピークについてはカラムより共溶出する成分によってマトリックス効果等、何らかの影響を受けているものと推察された。今後は、定量法として安定同位体標識ペプチドを用いる内標準法を用い、さらに前処理やカラム分離条件等を検討することにより、より高い精度の定量解析を行うことが可能となると考えられる。また、LC システムをセミマイクロ LC システムからナノ LC システムに変更することで、測定時間は延長するものの約 1,000 倍の感度向上が期待できることから、本酵素の LC-MS/MS による定量法は、大量調製時の発現量の解析、真菌類の代謝系酵素の網羅的解析や抗真菌薬の開発のみならず、ヒトのメバロン酸キナーゼ欠損症の診断や病態解析法としての利用も期待される。

第4章 Erg8p の X 線結晶構造解析

第1節 緒言

タンパク質の多くは、精緻に定まった固有の立体構造を自発的に形成することでその機能を発揮する。酵素は、相互作用をするべき相手とのみ結合することができる物理化学的性質を備えた分子表面を形成することで、高い基質特異性を備えた触媒として働く。従って立体構造に関する情報は、タンパク質の機能や性質を解明する上での大きな助けになる。特に基質や補因子が結合した複合体の構造を原子分解能で決定できれば、リガンド認識の詳細な情報を得ることが出来るため、酵素機能の分子基盤の理解、さらには酵素阻害剤を開発する上で非常に有用である。

本研究の対象である Erg8p と関連酵素では、これまでに *h*MK 及び *h*PMK の立体構造が明らかになっている。^{11,16)} *h*PMK の X 線結晶構造が Chang らによって報告され、三次構造から NMP キナーゼタイプであることが明確に示された。さらに *h*PMK の結晶構造情報を利用した virtual screening によって同定された阻害剤が報告されている。²²⁾ また、*h*MK とそのラットオーソログ (*r*MK) についても X 線結晶構造が報告されており、*r*MK では ATP 複合体及び阻害剤複合構造が決定され、ATP 認識の詳細と、MK の特徴であるフィードバック阻害の分子基盤が明らかにされている。^{16,23)}

現在、GHMP キナーゼタイプ PMK の立体構造は Erg8p を含めて報告されていない。そこで本研究では Erg8p の立体構造に関する情報を得ることを目的に *S. cer* Erg8p の X 線結晶構造解析を行った。アポ体に加えて *S. cer* Erg8p に ATP、*R*-mev5p 及び Bis-Tris Propane (BTP) が結合した複合体の構造解析を行い、リガンド結合状態の異なる計 6 状態の結晶構造を決定した。さらに構造既知の GHMP キナーゼとの比較を行い、構造上の類似点や差異について検討した。

第2節 実験方法

第1項 試薬及び使用機器

本章で用いた試薬及び使用機器は以下のとおりである。

96 ウェルマイクロプレート	MRC 2 Well UVXPO (Hampton Research 社)
24 ウェルプレート	Cryschem Plate (Hampton Research 社)

X線回折データ収集は、大型放射光施設 SPring-8 BL45XU (http://stbio.spring8.or.jp/ja/blinfo/blinfo_ja.php) 又は Photon Factory BL-1A (<https://www2.kek.jp/imss/sbr/beamline/px/beamline-info/bl-1a/bl1.html>) において行った。いずれも X線源はアンジュレーターを用いて発生させたシンクロトロン放射光であり、単色化された高輝度 X線を回折実験に用いた。

スクリーニングキット The LMB Screen, SG1 HT-96 Eco Screen, JCSG-plus HT-96 Eco Screen, The Ligand-Friendly Screen を Anatrace 社より購入した。結晶化に用いる buffer として 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 及び 1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane (Bis-tris Propane, BTP) をそれぞれ同仁化学研究所及び東京化成工業より購入した。Polyethylene glycol 3350 (PEG3350) を Hampton Research 社より購入した。その他の試薬及び溶媒は全て市販の特級規格品を用いた。MES 及び BTP の構造式を Fig. 38 に示す。

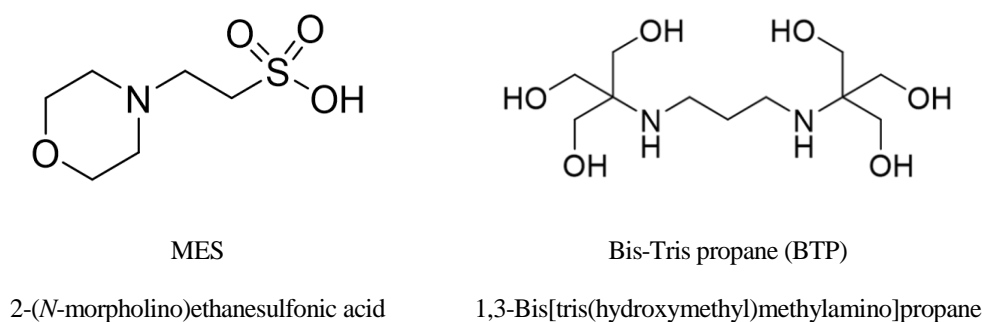


Fig. 38. Chemical Structures of MES and BTP

第2項 結晶化スクリーニング

結晶化スクリーニングは、市販のスクリーニングキット The LMB Screen, SG1 HT-96 Eco Screen, JCSG-plus HT-96 Eco Screen, The Ligand-Friendly Screen 及び 96 ウェルマイクロプレート (MRC 2 Well UVXPO) を使用し、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。

凍結保存されていたタンパク質試料を氷上で溶解後、16,100×g、4°Cで30分間遠心した。上清を SEC buffer [20 mM HEPES-K pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT] で希釈し、タンパク質濃度を 9-10 mg/mL とした。96 ウェルマイクロプレートにスクリーニングキットからリザーバー溶液を各 50 μL 分注し、1 μL のタンパク質溶液と 1 μL のリザーバー溶液を混合して結晶化ドロップを作製した。プレートを 20°C に静置し、蒸気拡散により結晶を形成させた。また、透析によってグリセロールを除去したタンパク質試料に対しても結晶化スクリーニングを行った。

第3項 Erg8p 結晶化条件の至適化及びリガンド複合体結晶の作製

(1) *S. cer* Erg8p 結晶化条件の至適化

The Ligand-Friendly Screen を用いた初期スクリーニングによって、*S. cer* Erg8p の比較的大きな板状の単結晶が得られたことから、結晶化条件の至適化を行った。結晶化の条件検討は 24 ウェルプレート (Cryschem Plate) を使用し、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。リザーバー溶液の buffer 成分の種類、pH 及び沈殿剤濃度などを変化させ、初期スクリーニング時と比較してより大きく、厚みのある良質な結晶が生じる条件を探索した。リザーバー溶液を 500 μ L 使用し、2 μ L のタンパク質溶液と 2 μ L のリザーバー溶液を混合して結晶化ドロップを作製し、20 $^{\circ}$ C に静置して蒸気を拡散させた。

(2) *S. cer* Erg8p のリガンド複合体結晶の作製

S. cer Erg8p のアポ体の結晶に加えて、*S. cer* Erg8p と ATP の複合体 (Erg8p - ATP 複合体) の結晶と *S. cer* Erg8p と基質及び ATP の複合体 (Erg8p - *R*-mev5p - ATP) の結晶を作製した。

Erg8p - ATP 複合体結晶はソーキング法により作製した。アポ体の結晶を、リザーバー溶液に 3 - 6 mM の ATP を加えたソーキング溶液に移し、10 - 15 分置くことで Erg8p - ATP 複合体結晶とした。

Erg8p - *R*-mev5p - ATP 複合体結晶は、共結晶化法とソーキング法を組み合わせで作製した。タンパク質試料に 0.2 mM の *R*-mev5p を加えて結晶化し、得られた共結晶をリザーバー溶液に 3 - 6 mM ATP 及び 1 mM *R*-mev5p を加えたソーキング溶液に移し、一晩おくことで Erg8p - *R*-mev5p - ATP 複合体結晶とした。

Erg8p 結晶はアポ体、ATP 複合体及び *R*-mev5p - ATP 複合体の 3 種を、MES 存在下と BTP 存在下でそれぞれ作製した (計 6 状態)。以下、リザーバー溶液及びソーキング溶液の buffer 成分に MES を用いた際の状態をそれぞれアポ体^(MES)、Erg8p - ATP 複合体^(MES)、Erg8p - *R*-mev5p - ATP 複合体^(MES) と記述し、BTP を用いた際の状態をそれぞれアポ体^(BTP)、Erg8p - ATP 複合体^(BTP)、Erg8p - *R*-mev5p - ATP 複合体^(BTP) と記述する。

第4項 X線回折データの収集とデータ処理

結晶が得られたリザーバー溶液もしくはソーキング溶液に、終濃度が 15% glycerol 又は 20% ethylene glycol と成るように添加し、クライオプロテクタント溶液とした。クライオプロテクタント溶液内に結晶を移した後、100 K の窒素気流下で結晶を瞬間凍結した。凍結

した結晶を液体窒素中に保存し、放射光施設に輸送した。

X線回折データは SPring-8 BL45XU 又は Photon Factory BL-1A においてそれぞれの施設の自動測定システムを利用して収集した。²⁴⁾ 回折データの処理 (指数付け, 積分, マージ, スケーリング) は XDS を用いて行った。²⁵⁾ MES 及び BTP 存在下で得られた結晶の回折データ収集の条件とデータ処理の統計値をそれぞれ Table 10 及び Table 11 にまとめた。

Table 10. Data Collection and Processing Statistics (Crystals Obtained in the Presence of MES)

	Apo-form ^(MES)	Erg8p - ATP complex ^(MES)	Erg8p - R-mev5p - ATP complex ^(MES)
Diffraction source	SPring-8 BL45XU	SPring-8 BL45XU	SPring-8 BL45XU
Wavelength (Å)	1.00000	1.00000	1.00000
Exposure time (sec.)	0.02	0.02	0.02
Rotation angle (deg./frame)	0.1	0.1	0.1
Total rotation angle (deg.)	720	720	720
Temperature (K)	100	100	100
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	87.23, 109.95, 55.72	87.58, 110.06, 56.11	87.45, 109.48, 55.65
Resolution range (Å)	46.96 - 1.42 (1.50 - 1.42)	47.24 - 1.907 (2.02 - 1.91)	49.61 - 2.20 (2.28 - 2.20)
Number of unique reflections	102224 (16252)	43071 (6769)	27858 (2726)
Multiplicity	20.47 (19.53)	17.88 (17.72)	10.26 (9.21)
Completeness (%)	99.8 (99.2)	99.7 (98.3)	100 (99.9)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	23.22 (2.14)	16.17 (2.12)	20.60 (7.10)
CC _{1/2}	100 (83.4)	99.9 (89.4)	99.8 (98.7)
<i>R</i> _{meas}	0.073 (1.483)	0.107 (1.401)	0.039 (0.618)

Values for the outer shell are given in parentheses.

$R_{\text{meas}} = \sum_h [m/(m-1)]^{1/2} \sum_j |<I>_h - I_{hj}| / \sum_h \sum_j I_{hj}$, where $<I>_h$ is the mean intensity of symmetry-equivalent reflections and *m* is redundancy.

Table 11. Data Collection and Processing Statistics (Crystals Obtained in the Presence of BTP)

	Apo-form ^(BTP)	Erg8p - ATP complex ^(BTP)	Erg8p - R-mev5p - ATP complex ^(BTP)
Diffraction source	Photon Factory BL-1A	SPring-8 BL45XU	SPring-8 BL45XU
Wavelength (Å)	1.05200	1.00000	1.00000
Exposure time (sec.)	0.1	0.02	0.02
Rotation angle (deg./frame)	0.1	0.1	0.1
Total rotation angle (deg.)	360	720	720
Temperature (K)	100	100	100
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	87.54, 110.10, 56.15	87.56, 110.14, 55.86	87.72, 109.32, 55.97
Resolution range (Å)	50.02 - 1.78 (1.89 - 1.78)	47.09 - 1.56 (1.65 - 1.56)	47.18 - 2.60 (2.69 - 2.60)
Number of unique reflections	52717 (8321)	77795 (12391)	17172 (1673)
Multiplicity	12.62 (12.80)	23.11 (23.18)	8.85 (7.48)
Completeness (%)	99.8 (98.9)	99.9 (99.8)	99.9 (100)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	18.00 (2.17)	23.20 (2.63)	19.70 (4.00)
CC _{1/2}	99.9 (78.3)	99.9 (81.9)	98.9 (96.5)
<i>R</i> _{meas}	0.097 (1.244)	0.089 (1.676)	0.043 (1.235)

Values for the outer shell are given in parentheses.

$R_{\text{meas}} = \sum_h [m/(m-1)]^{1/2} \sum_j \langle I \rangle_h - I_{h,j} / \sum_h \sum_j I_{h,j}$, where $\langle I \rangle_h$ is the mean intensity of symmetry-equivalent reflections and *m* is redundancy.

第5項 構造決定と精密化

回折データの初期位相は *MOLREP* を用いた分子置換法によって決定した。²⁶⁾ 探索モデルには *AlphaFold2* によって予測された *S. cer* Erg8p の構造を用いた。^{27,28)} 構造精密化は *Coot* を用いた手動のフィッティングと、*REFMAC* あるいは *PHENIX* を用いたコンピューターによる精密化のサイクルを繰り返すことで行った。²⁹⁻³¹⁾ MES 及び BTP 存在下で得られた結晶に対する精密化の統計値をそれぞれ Table 12 及び Table 13 に示す。

Table 12. Refinement Statistics (Crystals Obtained in the Presence of MES)

	Apo-form ^(MES)	Erg8p - ATP complex ^(MES)	Erg8p - R-mev5p - ATP complex ^(MES)
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.1612/0.1712	0.1744/0.2175	0.1749/0.2310
Number of non-H atoms	4067	3788	3753
macromolecules	3531	3531	3531
ligands	47	52	76
water	509	219	170
Protein residues	448	448	448
RMS(bonds)	0.009	0.011	0.011
RMS(angles)	0.999	1.03	1.12
Ramachandran favored (%)	98.43	98.43	98.43
Ramachandran allowed (%)	1.57	1.57	1.57
Ramachandran outliers (%)	0	0	0
Average B-factor	26.33	49.99	42.56
macromolecules	24.91	49.93	42.46
Ligands	31.61	65.16	58.02
solvent	35.96	48.42	39.88

$R_{\text{work}} = |F_{\text{obs}} - F_{\text{cal}}| / F_{\text{obs}}$, where F_{obs} and F_{cal} are observed and calculated structure factor amplitudes.

R_{free} value was calculated for R_{work} , using only an unrefined subset of reflections data (5%).

Table 13. Refinement Statistics (Crystals Obtained in the Presence of BTP)

	Apo-form ^(BTP)	Erg8p - ATP complex ^(BTP)	Erg8p - R-mev5p - ATP complex ^(BTP)
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.1690/0.1861	0.1635/0.1785	0.1814/0.2459
Number of non-H atoms	3987	4129	3705
macromolecules	3531	3531	3531
ligands	82	106	130
water	414	537	99
Protein residues	448	448	448
RMS(bonds)	0.011	0.009	0.013
RMS(angles)	1.04	1.00	1.16
Ramachandran favored (%)	98.65	98.21	96.86
Ramachandran allowed (%)	1.34	1.79	3.14
Ramachandran outliers (%)	0	0	0
Average B-factor	32.31	28.49	50.49
macromolecules	31.29	26.92	50.30
Ligands	41.94	37.42	70.37
solvent	40.06	37.80	42.12

$R_{\text{work}} = |F_{\text{obs}} - F_{\text{cal}}|/F_{\text{obs}}$, where F_{obs} and F_{cal} are observed and calculated structure factor amplitudes.

R_{free} value was calculated for R_{work} , using only an unrefined subset of reflections data (5%).

第3節 結果及び考察

以下本節では *S. cer* Erg8p を単に Erg8p と記述する。

Erg8p の結晶化条件について種々検討した結果、buffer 成分に MES を用いたリザーバー溶液 [100 mM MES pH 6.2, 20% (w/v) PEG 3350, 200 mM sodium malonate dibasic monohydrate, 10% (v/v) ethylene glycol], 及び buffer 成分に BTP を用いたリザーバー溶液 [100 mM BTP pH 6.2, 20% (w/v) PEG 3350, 200 mM sodium malonate dibasic monohydrate, 10% (v/v) ethylene glycol] を結晶化に使用した際に大きさ及び厚さが十分にあり、内部に偏光が見られる質の良い結晶が得られた。以下この2種の溶液を用いてそれぞれ結晶を作製した。

リザーバー溶液とソーキング溶液に MES を用いて作製した Erg8p 結晶のアポ体^(MES), ATP 複合体^(MES), *R-mev5p*-ATP 複合体^(MES), 及び BTP を用いて作製したアポ体^(BTP), ATP 複合体^(BTP), *R-mev5p*-ATP 複合体^(BTP) の全6種について、X線回折データの収集に成功し、結晶構造を決定することが出来た (Table 12, 13)。

アポ体^(MES)については原子分解能といえる 1.42 Å 分解能で構造を決定した。分子モデルは全 451 残基中、末端を除く 448 残基と約 500 個の水分子を含んでおり、ほぼ分子全体の三次構造と水和の詳細が明らかになった。最も分解能の低い Erg8p - *R-mev5p* - ATP 複合体^(BTP)においても、リガンド結合位置と 100 個程度の水和水の位置を決定することが出来た。

第1項 Erg8p の全体構造

Erg8p-*R*-mev5p-ATP 複合体^(MES)の全体構造を Fig. 39 に示す。リボンモデルでは、N 末端から C 末端までを青色から赤色へのグラデーションで表示している。Erg8p は図の上方に位置する N 末端ドメインと下方に位置する C 末端ドメインから構成されていた。分子表面モデルは正電荷を青、負電荷を赤で表している。

R-mev5p 及び ATP の位置から、基質結合部位はドメイン境界に存在し、ATP は N 末端ドメインに形成された深いポケットに結合していることが分かる。また、リガンド結合部位はいずれも強い正電荷を帯びており、これは *R*-mev5p 及び ATP の持つ負電荷に適応しているものと考えられる。

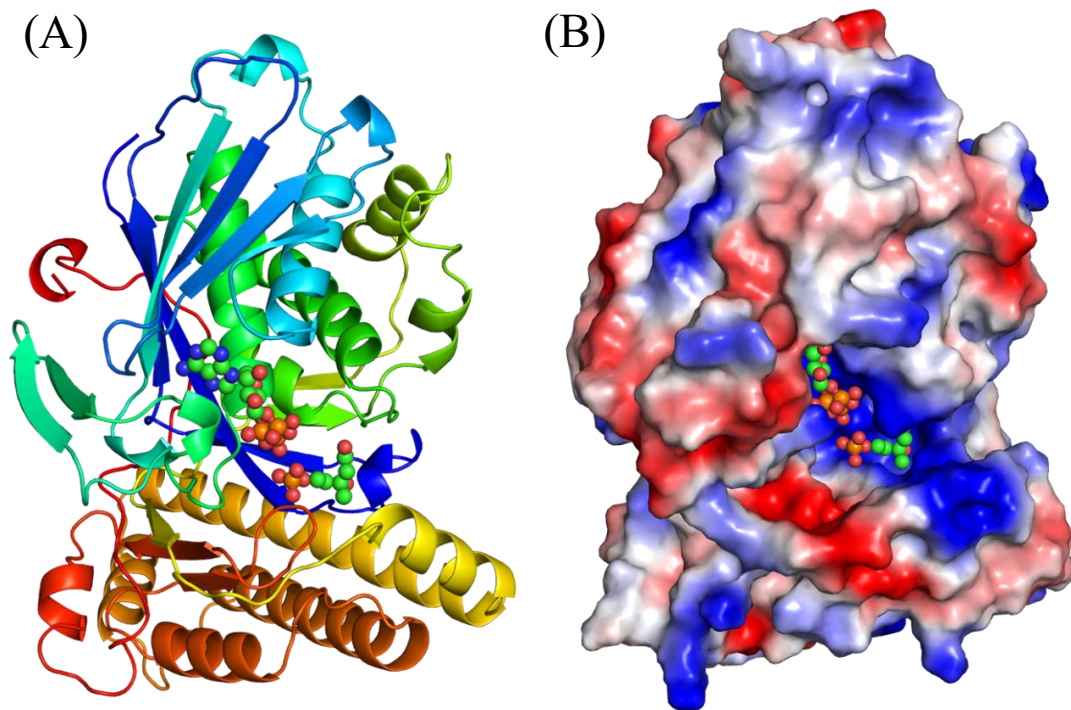


Fig. 39. Overall Structure of Erg8p-*R*-mev5p-ATP complex^(MES)

(A) Ribbon diagram. (B) Surface charge diagram.

第2項 Erg8p による ATP 認識

Erg8p-ATP 複合体^(MES) 構造における, ATP と相互作用している残基を Fig. 40 に示す. 水素結合を黄色の点線, 水和水を赤色の球体, ファンデルワールス相互作用距離にある残基を黄色で示す. 炭素を緑で示した ATP と直接又は水を介して水素結合している残基を水色で示した. ATP のアデニン部位は Ser59, Asn87, Ser120 と複数の水素結合とファンデルワールス力により酵素と強く相互作用していた. 一方, 三リン酸部位と酵素の相互作用は比較的弱く, リボース部位では酵素との相互作用はほとんど認められなかった.

アポ体^(MES) と Erg8p-ATP 複合体^(MES) の構造を重ね合わせ, 酵素をチューブモデルで表示した図を Fig. 41 に示す. アポ体を赤色, ATP 複合体構造を水色で示し, 2つの構造のうち構造変化の大きかった部分を濃色で, 変化の少なかった部分を淡色で表示している. Erg8p の ATP 結合による構造変化は大きい部分でも 0.8 Å 程度で ATP 結合に伴う主鎖レベルでの誘導適合は観察されなかった.

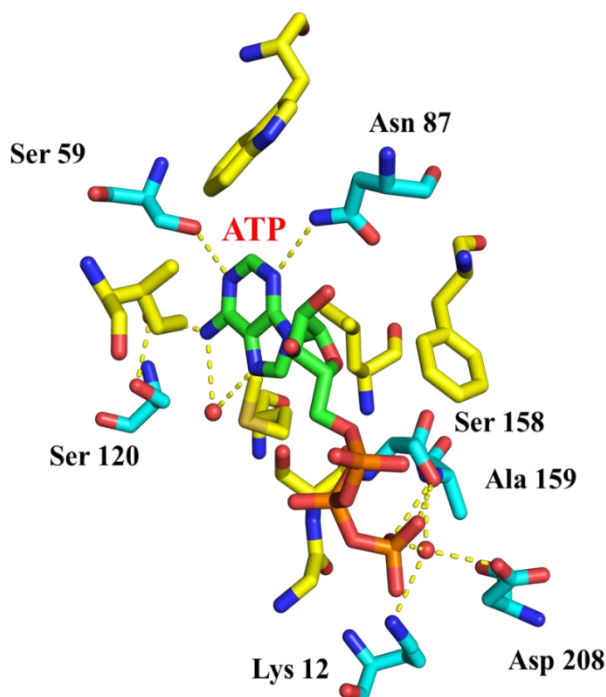


Fig. 40. Residues Interacting with ATP

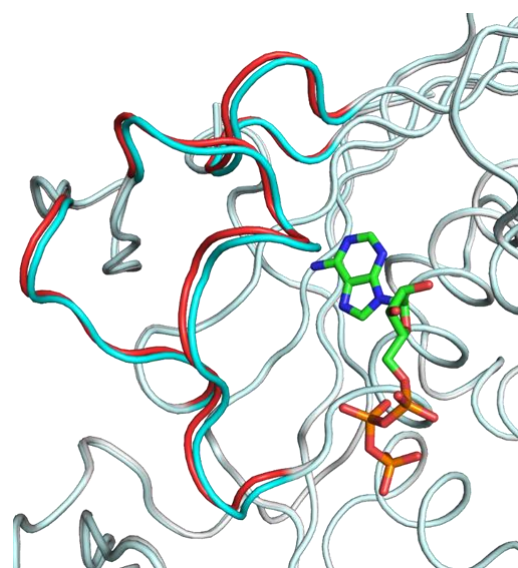


Fig. 41. Comparison of Structures of Apo-Form (Red) and Erg8p-ATP Complex (Cyan)

一方、側鎖レベルでは Ser59 の側鎖の配向変化が観察された。Ser59 と周辺の水和水についてアポ体 (Fig. 42) と ATP 複合体 (Fig. 43) を比較すると、アポ体で観察された水和水の 1 つが ATP に置き換わり、水素結合ネットワークが変化している。また Ser59 はアポ体では水和水の方向を向いているのに対し、ATP 複合体構造では配向変化によってアデニンリングと水素結合を形成していた。Ser59 と水和水の配向変化は、ATP の結合、解離の際のエネルギー障壁を下げるのに重要であると推測される。

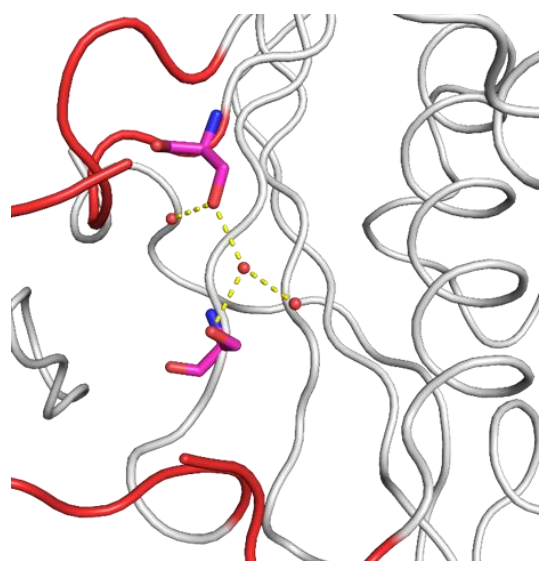


Fig. 42. Ser59 and Surrounding Water in the Apo-Form

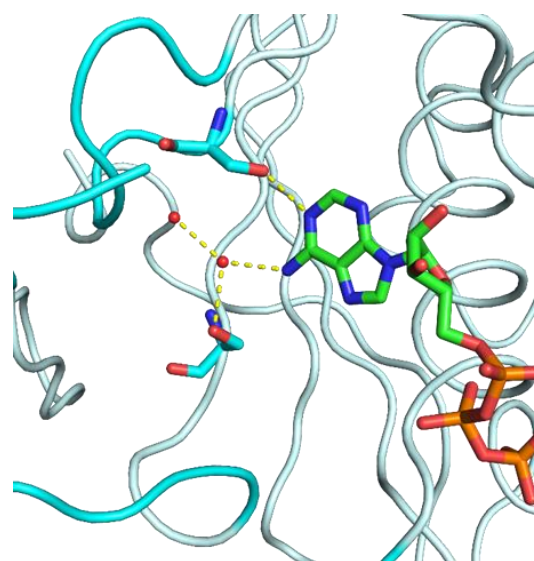


Fig. 43. Ser59 and Surrounding Water in the Erg8p-ATP Complex

第3項 Erg8p による (*R*)-mevalonate 5-phosphate の認識

Erg8p-*R*-mev5p-ATP 複合体^(MES) 構造における、*R*-mev5p と相互作用している残基を Fig. 44 に示す。水素結合を黄色の点線、水和水を赤色の球体、ファンデルワールス相互作用距離にある残基を黄色で示す。炭素を緑で示した *R*-mev5p と直接又は水を介して水素結合している残基 (Ser205, Tyr19, Ala398, Leu14) を水色で示した。Ser205 は主鎖のアミド基と側鎖の OH がそれぞれ *R*-mev5p と水素結合を形成することで複合体構造を安定化させていた。基質結合部位について視点を変更した図を Fig. 45 に示す。Erg8p は *R*-mev5p の不斉炭素上のヒドロキシ基、カルボキシ基及びリン酸基との間で水素結合 (黄色点線) を形成しており、さらにメチル基と Tyr19 側鎖はロンドン分散力の 1 種である CH- π 相互作用距離

にあった (赤色点線). よって Erg8p は *R*-mev5p の不斉炭素上のヒドロキシ基, メチル基, カルボキシ基, 並びに末端のリン酸基をそれぞれ認識することで, *R* 体と *S* 体を峻別していると考えられる.

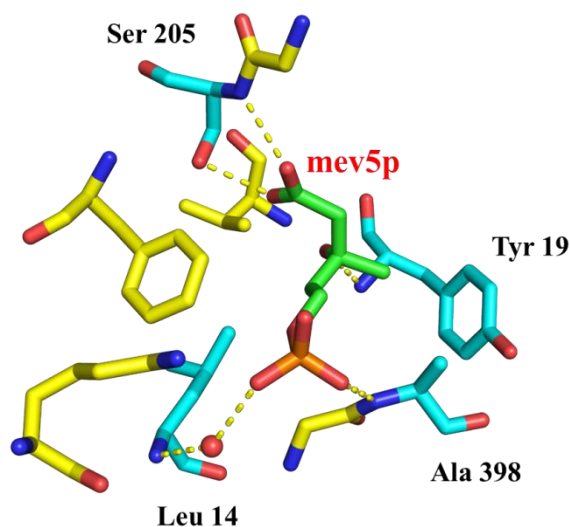


Fig. 44. Residues Interacting with *R*-mev5p

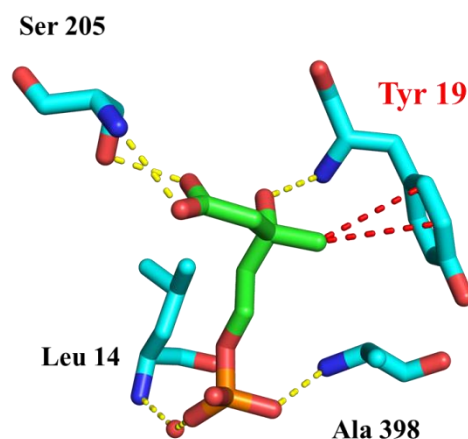


Fig. 45. Hydrogen Bond and CH- π Interaction between *R*-mev5p and Residues

アポ体^(MES), Erg8p - ATP 複合体^(MES), Erg8p - *R*-mev5p - ATP 複合体^(MES) の 3 つの結晶構造の重ね合わせ図を Fig. 46 に示す. アポ体を赤色, Erg8p - ATP 複合体を水色, Erg8p - *R*-mev5p - ATP 複合体構造を紫色で表示している. 全体的には 3 つの構造に大きな構造変化は認められなかったが, 唯一基質結合部位のループ付近に誘導適合が確認された.

Erg8p - ATP 複合体及び Erg8p - *R*-mev5p - ATP 複合体の誘導適合部位の重ね合わせ図を Fig. 47 に示す. Erg8p 及び ATP 複合体と比較して Erg8p - *R*-mev5p - ATP 複合体では Ser205 が *R*-mev5p と水素結合を形成するのに適した位置へ再配置されることが明らかとなった. 興味深いことに, *R*-mev5p の結合に直接関係していない Lys202 が Ser205 よりも大きく動き, 活性中心近傍へと位置を変化させることが明らかとなった. *S. cer* Erg8p は Mg^{2+} 依存性酵素であることから, ¹³⁾ Erg8p - *R*-mev5p - ATP 複合体構造に Mg^{2+} を加えたより遷移状態に近い構造を決めることが出来れば, Lys202 の役割がより明確になると思われる.

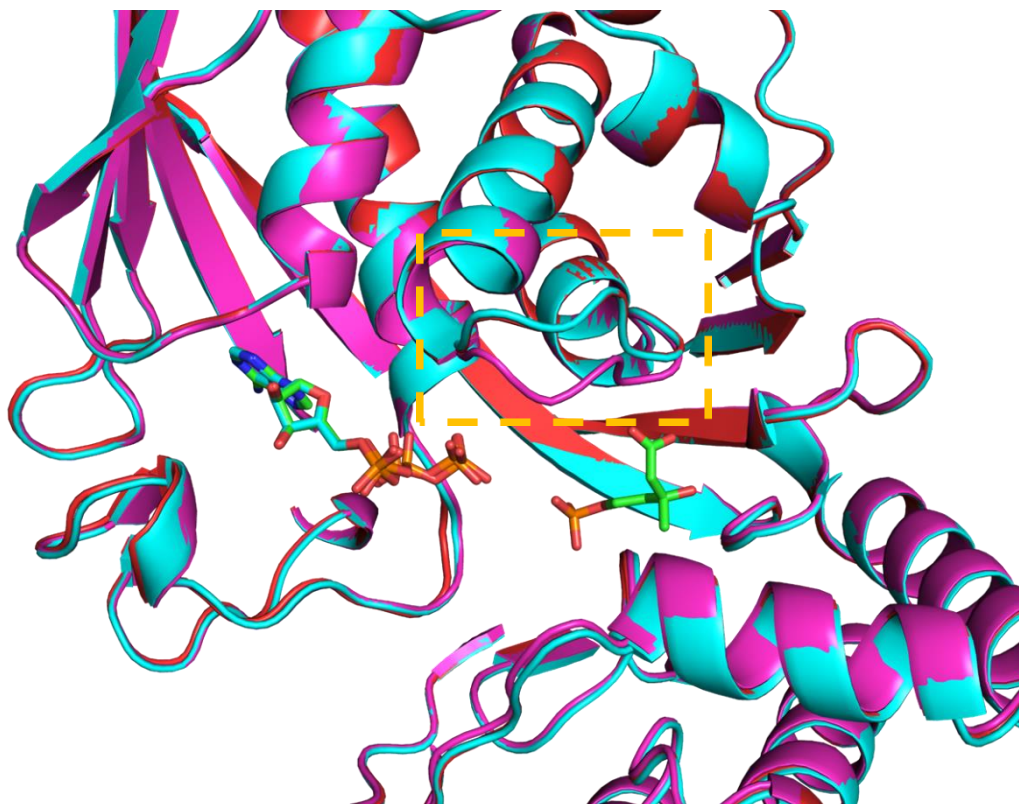


Fig. 46. Comparison of Structures of Apo-Form (Red), Erg8p-ATP Complex (Cyan), and Erg8p-R-mev5p-ATP (Purple)

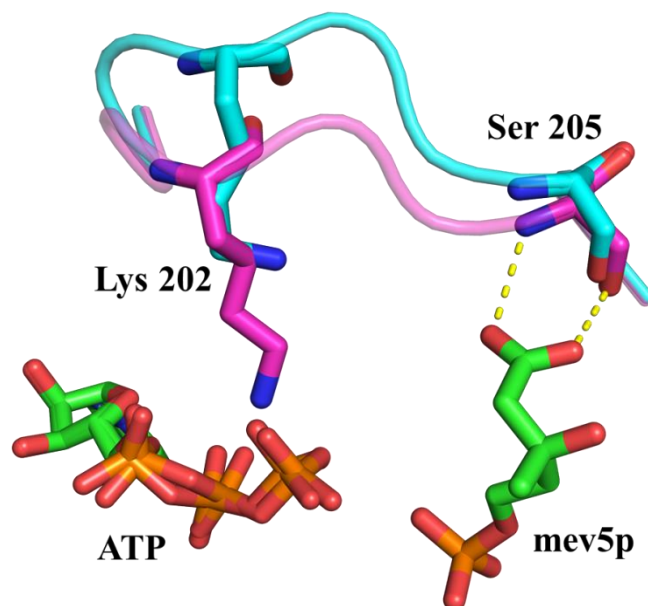


Fig. 47. Induced Fit Sites of Erg8p-ATP Complex (Cyan), and Erg8p-R-mev5p-ATP (Purple)

第4項 Erg8p と Bis-Tris propane の複合体構造

Erg8p の結晶構造解析を進めていく中で、リザーバー溶液の buffer 成分として Bis-Tris propane (BTP) を用いた場合、Erg8p と BTP が安定な複合体を形成するという非常に興味深い知見が得られた。Erg8p-*R*-mev5p-ATP 複合体^{〈MES〉}の結晶構造を Fig. 48 に、Erg8p-*R*-mev5p-ATP 複合体^{〈BTP〉}の結晶構造を Fig. 49 に示す。BTP は Erg8p の *R*-mev5p とは反対側のドメイン境界に結合していた。

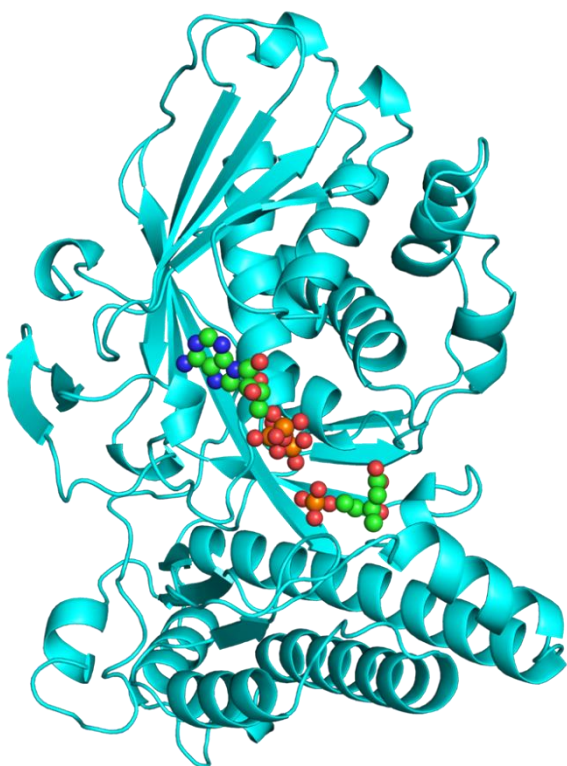


Fig. 48. Crystal Structure of Erg8p-*R*-mev5p-ATP Complex^{〈MES〉}



Fig. 49. Crystal Structure of Erg8p-*R*-mev5p-ATP Complex^{〈BTP〉}

(1) アポ体^(BTP)と Erg8p - ATP 複合体^(BTP)の比較

アポ体^(BTP)と Erg8p - ATP 複合体^(BTP)の BTP 結合部位を Fig. 50 に示す。リガンド周辺に実測された電子密度図 (mFo-DFc_polder omit map) を青のメッシュで表示し、タンパク質部分は淡色で示した。アポ体^(BTP) (Fig. 50(A)) では、図に対して BTP の左側のトリス (ヒドロキシメチル) 部分とプロパン部位の電子密度は明瞭だが、右側のトリス (ヒドロキシメチル) 部分の電子密度は不明瞭である。一方、ATP 複合体構造^(BTP) (Fig. 5(B)) では、BTP 全体の電子密度が明瞭に確認できることから、結合がより安定化されていることが明らかとなった。これは BTP と ATP の γ リン酸の間に水素結合が形成されていることが主な原因と考えられる。

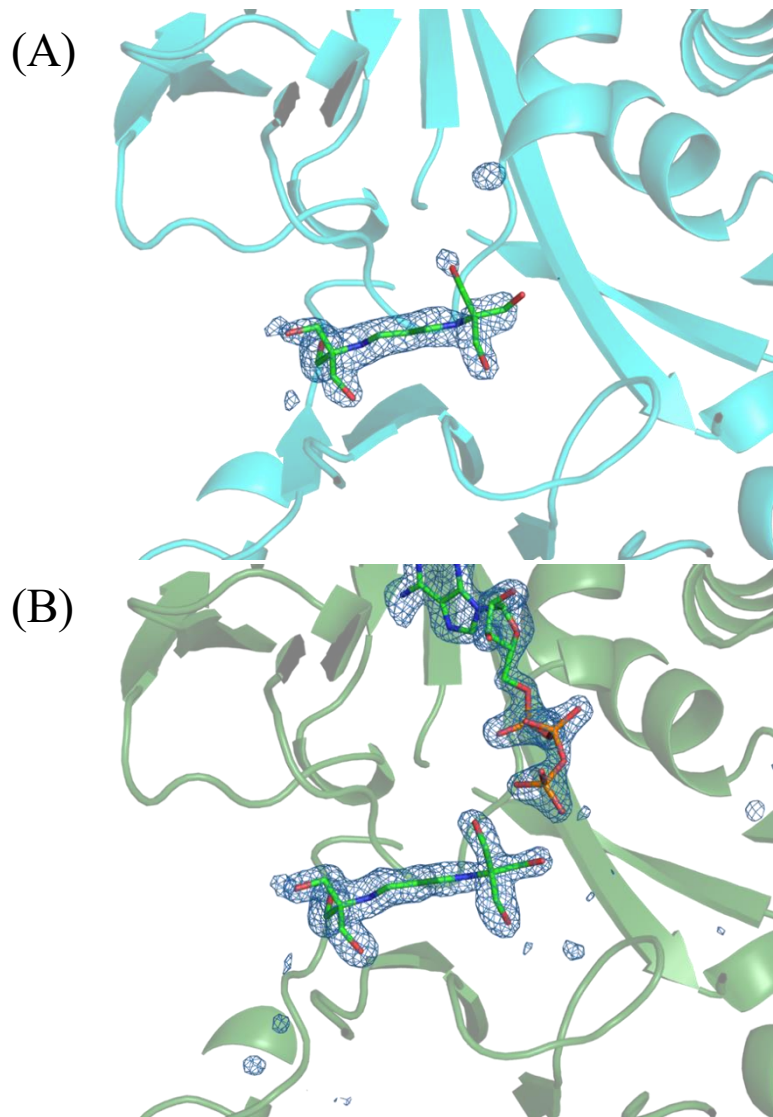


Fig. 50. BTP Binding Site of (A) Apo-Form^(BTP), and (B) Erg8p-ATP Complex^(BTP)
The blue mesh shows the electron density map (mFo-DFc_polder omit map).

(2) Erg8p-ATP 複合体 ^(MES) と Erg8p-ATP 複合体 ^(BTP) の比較

Erg8p-ATP 複合体 ^(MES) と Erg8p-ATP 複合体 ^(BTP) の BTP 結合部位を Fig. 51 に示す ((B) は Fig. 50 (B) を再掲). BTP 存在下と非存在下では ATP の三リン酸部位の配向が異なることが明らかとなった. MES 存在下では基質結合部位の方向, すなわち活性中心に向いていた三リン酸が, BTP 存在下では配向変化を起こし BTP と相互作用することが明らかとなった.

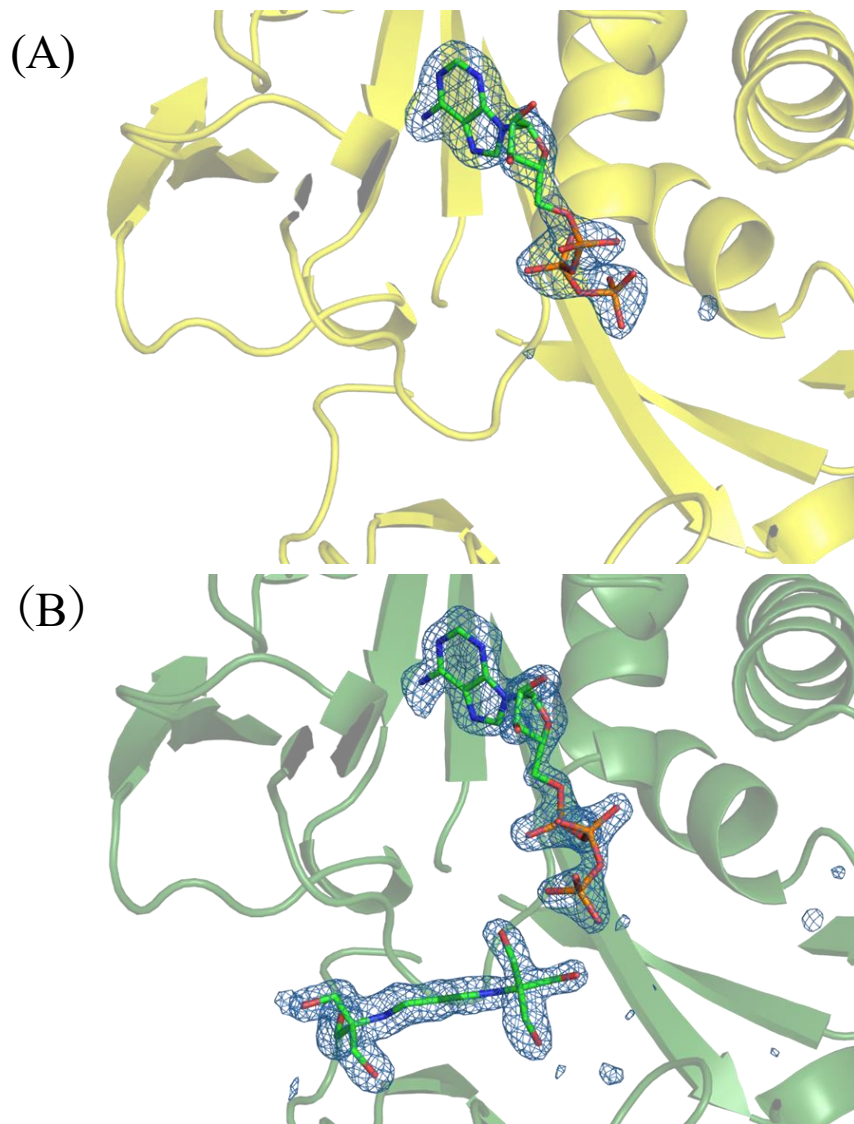


Fig. 51. BTP Binding Site of (A) Erg8p-ATP Complex ^(MES) , and (B) Erg8p-ATP Complex ^(BTP)
The blue mesh shows the electron density map (mFo-DFc_polder omit map).

Erg8p - ATP 複合体^(BTP) 構造 (Fig. 50 (B)) における2つのリガンドに加えて, BTP と相互作用している残基を Fig. 52 に示す. BTP と直接又は水を介して水素結合を形成している残基を水色, ファンデルワールス相互作用距離にある残基を黄色で示した. 黄色の点線は Erg8p と BTP 間の水素結合を, 水色の点線は ATP と BTP の間に直接又は水を介して形成された水素結合を表す. ATP の γ -リン酸基と BTP のヒドロキシ基の間に直接水素結合が形成されており, さらに BTP のアミノ基と ATP の三リン酸及び Erg8p の側鎖の間には水を介した水素結合ネットワークが形成されている. これらの相互作用により Erg8p, ATP, 及び BTP の三者は互いの構造を安定化していると考えられる. Erg8p と BTP の分子表面図を Fig. 53 に示す. BTP はドメインの境界に形成されているくぼみ部分に結合することで, Erg8p 及び ATP と複合体を形成していることが明らかとなった.

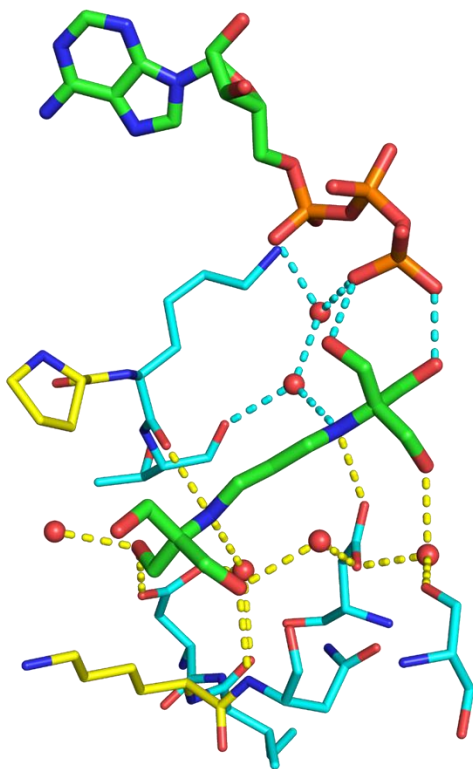


Fig. 52. Residues Interacting with BTP

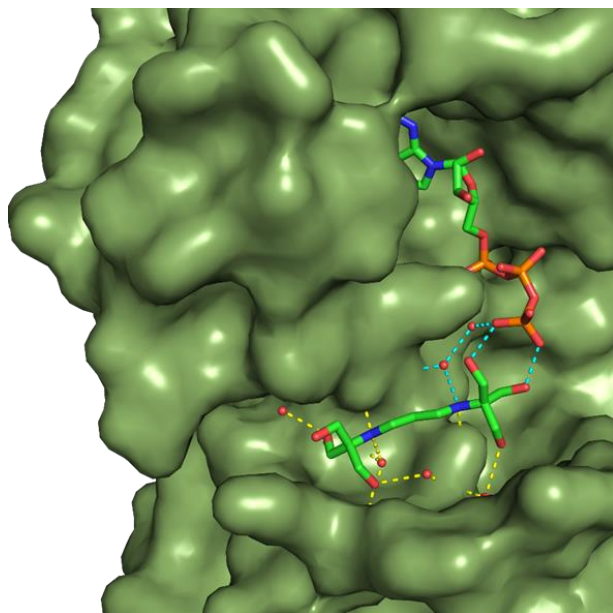


Fig. 53. Surface Representation of the BTP Binding Site

(3) Erg8p - *R*-mev5p - ATP 複合体 ^(BTP) の構造

Erg8p - *R*-mev5p - ATP 複合体 ^(BTP) の BTP 結合部位を Fig. 54 に示す. ATP の三リン酸の電子密度が二つに分裂しているような様子が観察された. このことから結晶中では BTP 側にリン酸基が向いている構造と *R*-mev5p 側にリン酸基が向いている構造が存在しているものと考えられた. *R*-mev5p 存在下の結晶構造では, 非存在下で BTP 結合部位に観察されていた電子密度は非常に弱く不明瞭になっており, 図の右側のトリス (ヒドロキシメチル) 部分の電子密度はほぼ消失している. これは *R*-mev5p 非存在下では結晶を構成する Erg8p に 100%に近い割合で BTP が結合していたのに対して, *R*-mev5p 存在下では Erg8p の一部にしか BTP が結合していないためと考えられる.

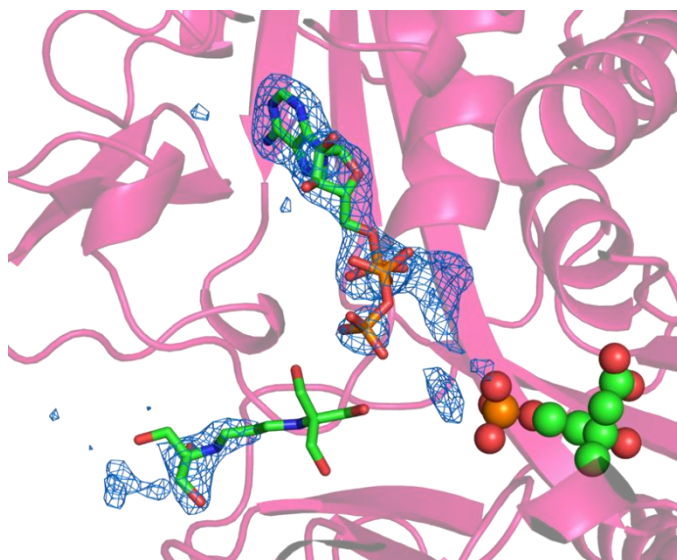


Fig. 54. BTP Binding Site of Erg8p-*R*-mev5p-ATP Complex ^(BTP)

The blue mesh shows the electron density map (mFo-DFc_polder omit map). The spheres represent *R*-mev5p.

第5項 ヒト PMK 及び GHMP kinase との構造比較

(1) *h*PMK の X 線結晶構造

Erg8p と生物学的に同等の役割を持つ *h*PMK の全体構造を Fig. 55 に示す。¹¹⁾ アミノ酸配列の相同性からも予測されたように Erg8p と *h*PMK の全体構造に類似性はほとんど認められなかった。*h*PMK はアポ体が唯一の報告例のため、*h*PMK が属する NMP キナーゼタイプの他の報告例などから予測されるリガンドの結合位置を図中に表示した。ATP 結合予測位置を赤丸、*mev5p* 結合予測位置を青四角で示している。全体構造に加えてリガンド結合位置における局所構造においても Erg8p と *h*PMK に類似性が存在しないことが明確となった。

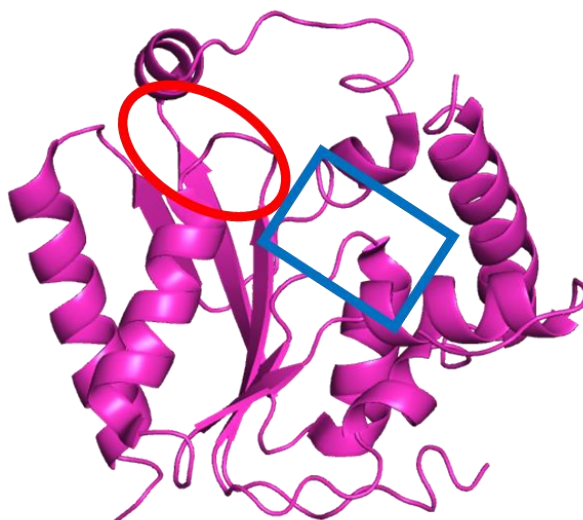


Fig. 55. Crystal Structure of *h*PMK

PDB accession code 3CH4

(2) MK との構造比較

Erg8p と同じ GHMP キナーゼタイプに属する *h*MK との比較を行った。 *h*MK の全体構造を Fig. 56 に示す。 同一のキナーゼタイプに属することから、Erg8p と *h*MK の構造は類似している。 *h*MK はアポ体が唯一の構造報告例であるため、ATP との複合体構造が報告されているラット MK (*r*MK) との構造比較を行った。^{16,23)} *r*MK の ATP 複合体構造を Fig. 57 に示す。

Erg8p-ATP 複合体^(MES) と *r*MK-ATP 複合体の ATP 結合部位を Fig. 58 に示す。 各複合体の ATP と直接又は水を介して水素結合している残基を水色、水素結合を黄色の点線、水和水を赤色の球体で表示した。 両者を比較すると、Erg8p は ATP のアデニンと多くの水素結合を形成するが、リボースや三リン酸部分との相互作用は少なかった。 一方、*r*MK は逆に ATP のリボースや三リン酸と多くの水素結合を形成するが、アデニンの相互作用は比較的少なかった。



Fig. 56. Crystal Structure of *h*MK
PDB accession code 2R3V

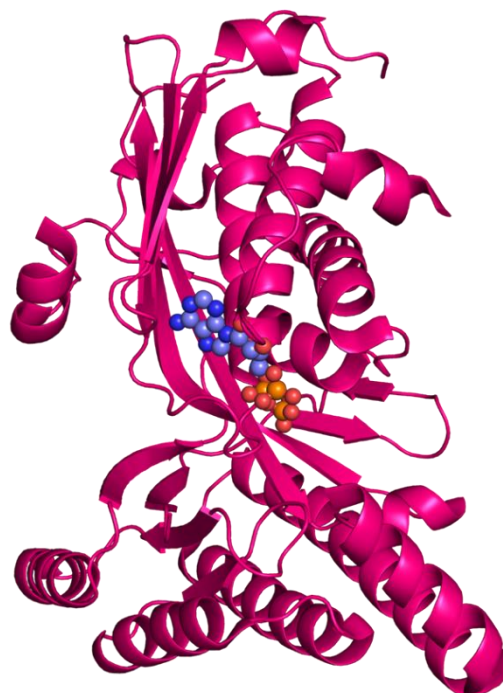


Fig. 57. Crystal Structure of *r*MK-ATP Complex
PDB accession code 1KVK

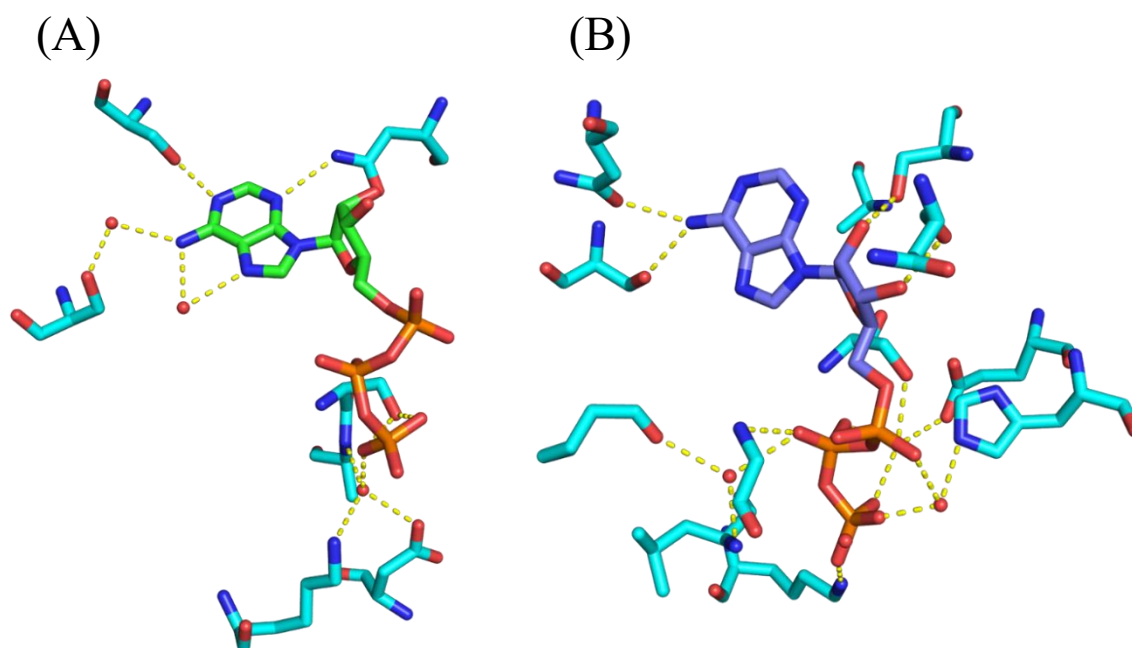


Fig. 58. Residues Directly or Indirectly Hydrogen-Bonded to ATP

(A) Erg8p-ATP complex ^(MES) (B) *r*MK-ATP complex

Erg8p と *r*MK の ATP 結合部位の分子表面図を Fig. 59 に示す。Erg8p ではアデニン周辺にポケットが形成され、リボースは溶媒側に露出している。それに対し *r*MK はアデニンがある程度溶媒側に露出しており、リボースや三リン酸と酵素の接触面積が大きいことが確認できる。これらの結果より、Erg8p と *r*MK の ATP 認識部位が異なることが明らかになった。

基質 (*R*-mev 又は *R*-mev5p) 結合部位を比較するため、Erg8p-*R*-mev5p-ATP 複合体 ^(MES) と MK の主鎖をチューブモデルで表示し、重ね合わせを行った (Fig. 60)。MK には *h*MK, *r*MK に加えて、*R*-mev 複合体の構造が報告されているリーシュマニア MK (PDB accession code 2HFU) 及び古細菌 MK (PDB accession code 6MDE) の 4 種について、二次構造を基に重ねて Erg8p と同じ方向から描写した。^{32,33} Erg8p 及び MK の基質認識に重要なループを赤丸 (Fig. 60 (A, B)), 4 種の MK と Erg8p を重ねた図を Fig. 60 (C) に示した。2 種の基質 (*R*-mev 及び *R*-mev5p) の炭素骨格部分は重ならず、リン酸基受容部位が重なっている。先に赤丸で強調したループに着目すると、MK に対して Erg8p はリン酸基受容部位から遠く

なる方向へずれていることが分かる。これはMKの基質である *R-mev* に比べて *R-mev5p* の方がリン酸基一つ分大きいことに適応するための差異と考えられる。すなわちATPの γ リン酸に対して基質のリン酸基受容部位が適切な位置に配置される必要があることから、Erg8pにおいてはメバロン酸骨格がリン酸基一つ分奥にずれた結合ポケットを形成するために、赤丸で示した部分の構造の違いが生じたと考えられる。

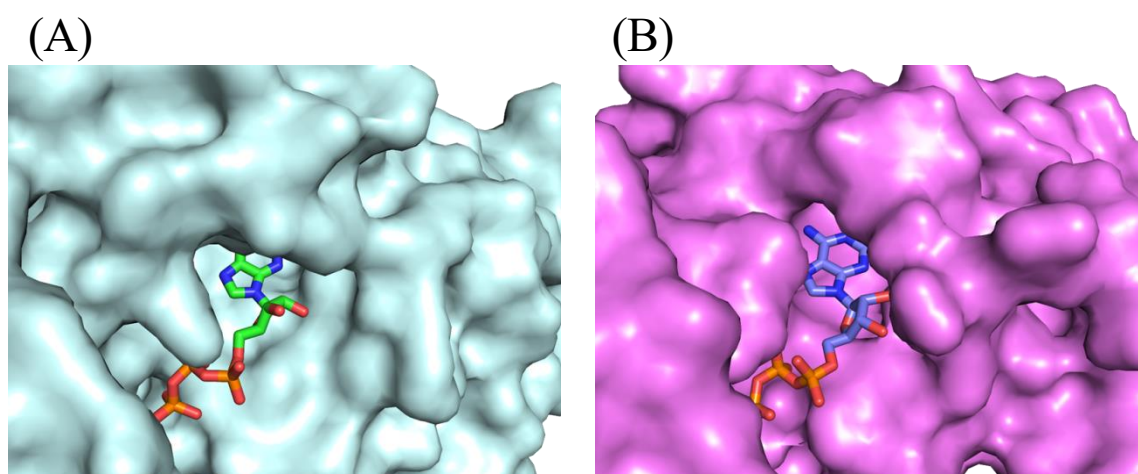


Fig. 59. Surface Representation of the ATP Binding Site

(A) Erg8p-ATP complex ^(MES) (B) *r*MK-ATP complex

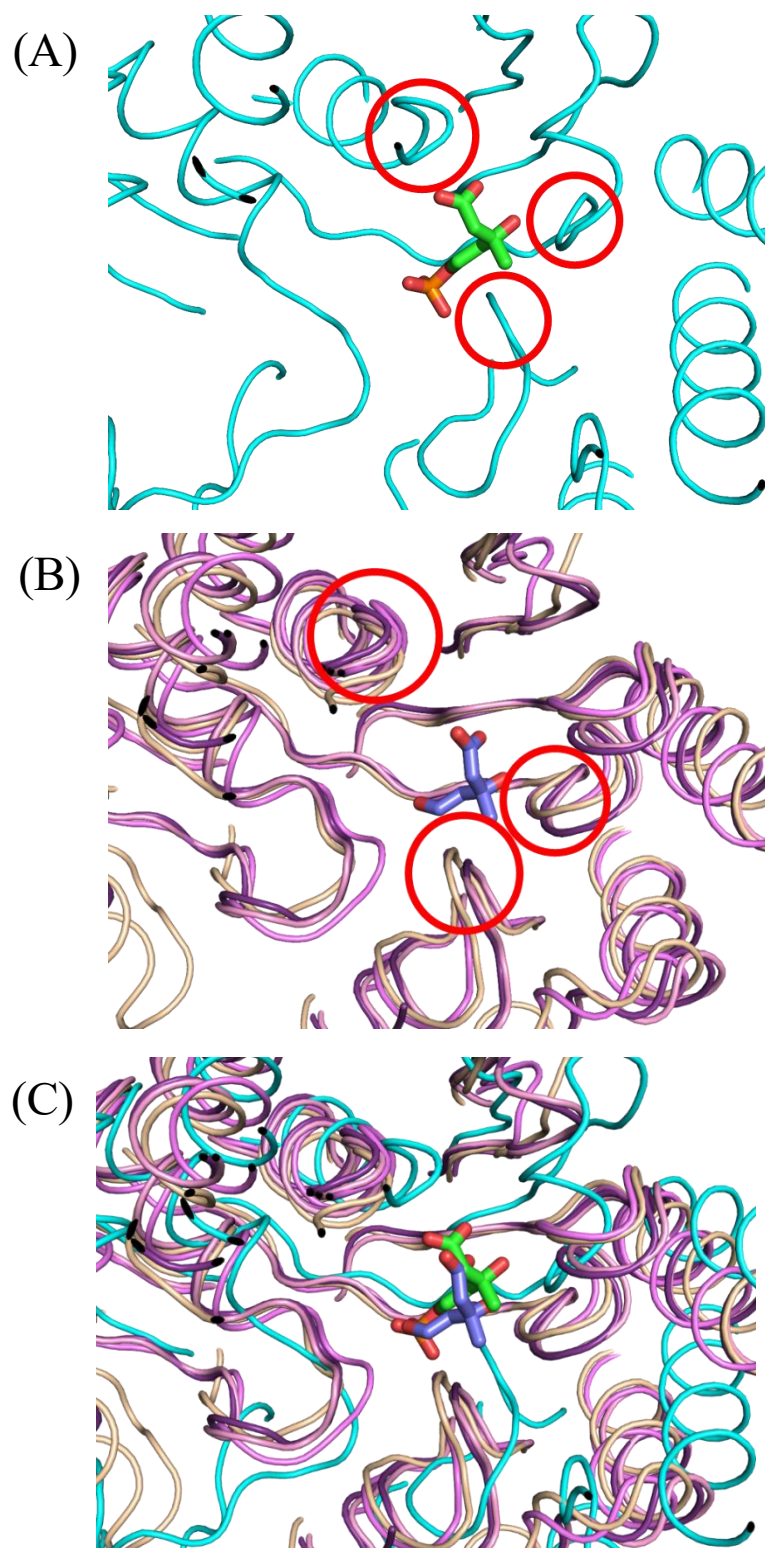


Fig. 60. Substrate Binding Site Represented by Tube Model

(A) Erg8p-R-mev5p-ATP complex ^(MES) (B) Superimposed diagram of MKs. (C) Superimposed diagram of MKs and Erg8p.

(3) MDD との構造比較

MDD については、MDD - ATP 基質複合体の構造が報告されている好熱性古細菌 *Sulfolobus solfataricus* (*S. sol*) 由来 MDD との比較を行った。³⁴⁾ *S. sol* MDD の複合体構造を Fig. 61 に示す。Erg8p と全体構造は類似しており、ATP や基質結合部位もおおむね一致している。リガンドの結合様式を比較するため、酵素部分を除いたリガンドのみを Fig. 62 に示す。反応機構から推測されるように、Erg8p と MDD の基質はリン酸基が一つ異なるだけだが (Fig. 2)、結合した基質の酵素に対する配向は全く異なっていた。この差は、Erg8p と MDD では基質のリン酸基受容部位が全く異なっているために、反応部位を ATP γ リン酸近傍に配置する必要性から生じていると考えられる。また、ATP に関してもアデニンリングの傾きが異なるなど大きな差異があることが今回明らかになった。

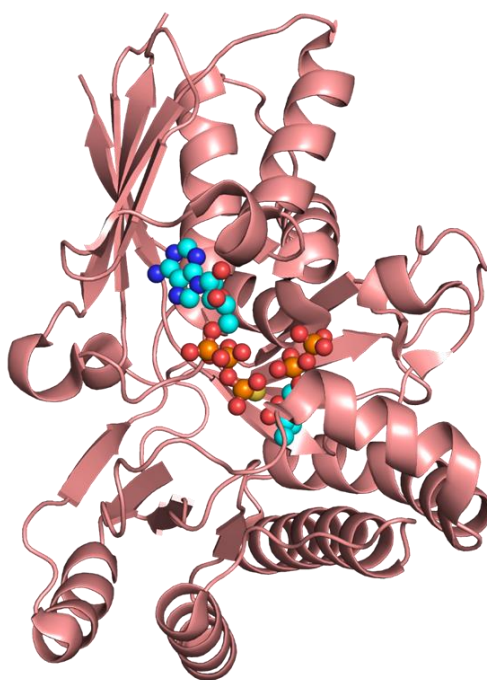


Fig. 61 Crystal Structure of *S. sol* MDD
PDB accession code 5GMD

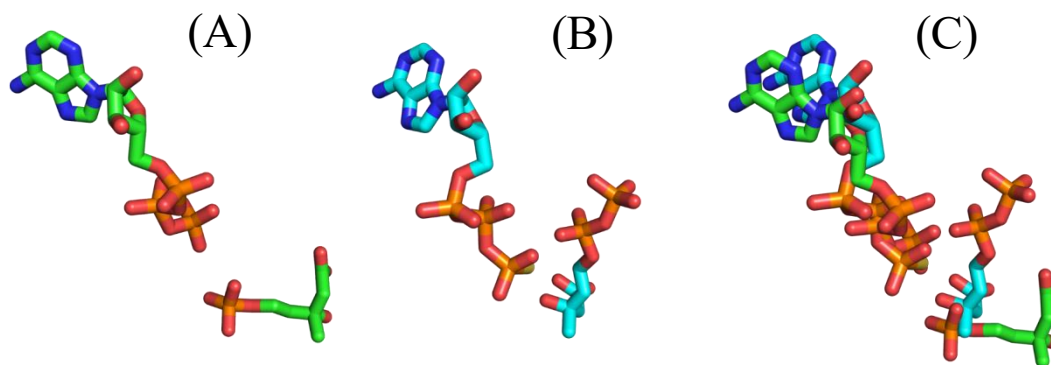


Fig. 62. Diagram Depicting the Ligands Bound to the Enzyme without Showing the Enzyme

- (A) Erg8p-R-mev5p-ATP complex ^(MES) (B) *S. sol* MDD-R-mev5pp-ATP complex
 (C) Superimposed

第4節 小括

本章では Erg8p の立体構造を解明するため、第1章で得られた精製酵素を用いて X 線結晶構造解析を行った。4 種の Erg8p のうち *S. cer* Erg8p について、結晶化条件の最適化、X 線回折データ収集を経てアポ体の立体構造を 1.42 Å 分解能で決定した。これは初の真核生物由来 GHMP キナーゼタイプ PMK の構造解析例である。Erg8p の全体構造は上下 2 つのドメインから構成され、リガンド結合部位は強い正電荷を帯びていた。今回構造解析に用いた精製酵素は C 末端側に His-tag が付加しているが、構造決定により His-tag は Erg8p の活性部位より離れた位置に存在していることが確認できた。このことから、His-tag が全体構造に与える影響は低いものと考えられる。

アポ体に加えてリガンド結合状態の異なる複合体の結晶を作製し、計 6 状態の *S. cer* Erg8p の X 線結晶構造を決定した。複合体の解析から、Erg8p による ATP 及び R-mev5p 認識の詳細が明らかとなった。ATP 結合部位ではアデニンは複数の水素結合とファンデルワールス力により酵素と強く相互作用していたが、三リン酸の相互作用は比較的弱く、リボースとの相互作用はほとんど認められなかった。アポ体との比較から ATP 結合による Ser59 の側鎖の配向変化が観察された。

Erg8p は R-mev5p のみを選択して反応を行うことが明らかとなっており、今回の結晶構造解析によって Erg8p は不斉炭素に結合しているヒドロキシ基、カルボキシ基及びリン酸基と水素結合を形成し、メチル基に関しては CH- π 相互作用することで安定化し、R 体の

みを認識することが明らかとなった。また、基質の結合により Lys202-Ser205 が誘導適合によって最大 3.4 Å 構造が変化し、Ser205 と *R-mev5p* の水素結合の形成、及び Lys202 の反応中心近傍への再配置が観察された。

リザーバー溶液の buffer 成分に MES と BTP を用いて結晶化を行ったが、BTP を用いた場合、BTP と Erg8p の複合体を形成することが明らかとなった。特に BTP と ATP 共存下では Erg8p, ATP 及び BTP の三者が安定な複合体を形成すること、一方、ATP, BTP 及び *R-mev5p* の三者の存在下では BTP と Erg8p の結合が著しく減弱することが明らかとなった。*R-mev5p* 存在下での BTP の結合能から、BTP は Erg8p 阻害活性を有していないと考えられるが、酵素に結合して ATP と安定な複合体を形成するなど興味深い性質を持つことから、Erg8p - ATP - BTP 複合体の高分解能の立体構造は今後 Erg8p の阻害剤を設計する上で非常に重要な情報になると考えられる。

S. cer Erg8p と *hPMK* や GHMP キナーゼタイプに属する酵素 (MK, MDD) との構造比較を行った。Erg8p と *hPMK* の間にはアミノ酸配列からの予測通り、構造の類似性は認められなかった。従って、Erg8p の構造情報に基づいて開発した阻害剤が *hPMK* へ影響する可能性は極めて低いものと考えられる。

Erg8p と MK の比較を行ったところ、基質結合についてはそれぞれの基質のリン酸基受容部位が適切に配置されるように結合ポケットが形成されていること、ATP については、酵素が主に認識する ATP の部位が異なっていることが明らかとなった。また、MDD と比較を行ったところ、基質認識の様式は大きく異なっており、ATP 認識の様式についても差異が認められた。

本研究で明らかになった Erg8p の立体構造に関する情報は Erg8p の機能解明並びに Erg8p の阻害剤を設計開発する上での基礎データになるものと考えられる。

総括

本研究では Erg8p に特異的な阻害剤を設計する上で有用な情報を提供することを目的に、Erg8p 及び関連酵素 (Erg12p, *h*MK, *h*PMK) の機能・構造解析を行った。以下に本研究で得られた成果、知見についてまとめる。

第 1 章において、Erg8p 及び関連酵素の精製酵素を得るために、大腸菌組換え発現系を用いた大量調製法の確立を行った。

4 種の Erg8p (*S. cer* Erg8p, *C. gla* Erg8p, *S. pom* Erg8p, *A. ory* Erg8p) 及び 3 種の関連酵素 (*C. gla* Erg12p, *h*MK, *h*PMK) の組換え発現系の構築、可溶性酵素の大量発現、組換えタンパク質精製について検討し、大量調製法の確立に成功した。Erg8p の大量調製法の報告はこれまでに *S. cer* Erg8p の 1 例のみであったが、今回新たに *C. gla* Erg8p, *S. pom* Erg8p, *A. ory* Erg8p の大量調製法を確立することができた。また、Erg12p の大量調製法についてはこれまでに報告例がなく、今回初めて *C. gla* Erg12p の大量調製法を確立することができた。以上 Erg8p 及び Erg12p の大量調製法を確立できたことから、これら酵素の詳細な機能及び立体構造解析が可能となった。

第 2 章において、Erg8p 及び関連酵素の機能解析の一環として、各酵素の Kinetic parameters を算出した。

本研究ではまずこれまでに報告されている活性測定条件の見直しを行い、より精度の高い活性測定を確立した後、Erg8p, Erg12p 及び *h*MK, *h*PMK の Kinetic parameters を明らかにした。測定の結果、Erg8p は *R*-mev5p と ATP に対して同程度の親和性を示したが、Erg12p では *R*-mev に対する親和性に比べ ATP への親和性が著しく低いことが明らかになった。真菌とヒトの MK 及び PMK の Kinetic parameters と比較すると、いずれの真菌類酵素も K_m , V_{max} はヒト酵素に比べて高値を示し、特に真菌類の酵素の V_{max} はヒトの酵素の 5 倍以上の値を示すことから真菌の単位時間当たりの反応サイクル数はヒトに比べて多いものと推察された。Erg12p の単離酵素による Kinetic parameters の算出は本研究が初めての報告となる。

第 3 章において、Erg8p 及び Erg12p 発現量の解析並びに真菌類の定量プロテオーム解析の一助とするための定量ターゲットプロテオミクスについて LC-MS/MS を用いた基礎的検討を行った。

Skyline ソフトウェアによる解析結果と、単離精製した標準タンパク質を用いた実測データに基づき、対象ペプチドの選択及び MRM transition の最適化を行った。選択した対象ペ

プチドによる絶対検量線法を用いて *C. gla* Erg8p 及び *C. gla* Erg12p の定量を行ったところ、fmol 及び pmol での定量が可能であった。また、選択したペプチドのアミノ酸配列はいずれも *C. gla* Erg8p 及び *C. gla* Erg12p に特異的であることから、他の真菌類やヒトの酵素との識別が可能である。本酵素の LC-MS/MS による定量法は、真菌類の代謝系酵素の網羅的解析や抗真菌薬の開発のみならず、ヒトのメバロン酸キナーゼ欠損症の診断や病態解析法としての利用も期待される。

第4章において、Erg8p の結晶化及びその X 線結晶構造解析を行った。

S. cer Erg8p の結晶化法を確立し、アポ体の立体構造を 1.42 Å 分解能で決定することに成功した。これは真核生物由来 GHMP キナーゼタイプ PMK に対する初の構造解析例である。さらにリガンド結合状態の異なる複合体の結晶を作製し、計 6 状態の *S. cer* Erg8p の X 線結晶構造を決定し、Erg8p の基質及び ATP に対する認識機構の詳細が明らかとなった。また、本研究過程で buffer 成分の複合体の解析から BTP が Erg8p に結合することを発見した。BTP は Erg8p 阻害活性を有していないと考えられるが、酵素上で ATP と安定な複合体を形成するなど興味深い性質を持つことから、Erg8p - ATP - BTP 複合体の高分解能の立体構造は今後 Erg8p の阻害剤を設計する上で非常に重要な情報になると考えられる。

さらに構造既知の他の GHMP キナーゼや *h*PMK との比較を行うことで構造上の類似点や差異を明確にすることができた。Erg8p と *h*PMK の間には相同性からの予測通り構造の類似性は認められず、MK では一部の基質認識部位に類似性が認められたが、基質の結合ポケットの深さや ATP の認識で差異が認められた。本研究で明らかになった Erg8p の立体構造は、阻害剤候補となる化合物を探索するための virtual screening やドッキングシミュレーションなどに利用され、阻害剤開発に役立てられることが期待される。また、Erg8p の結晶化法が確立されたことから、阻害剤候補が発見された際には、迅速に Erg8p と阻害剤の複合体構造を決定することが可能である。

以上本研究で明らかとなった Erg8p の機能及び立体構造に関する知見は、今後 Erg8p に特異的な阻害剤を設計する上で有用な情報になるものと考えられる。本研究で確立された各種酵素の大量調製法、活性測定法、LC-MS/MS による定量プロテオミクス、立体構造解析法が、Erg8p のさらに詳細な性質の解明及び阻害剤の設計、ひいては真菌類のメバロン酸経路の全容解明に大いに役立てられることを期待する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際し終始多大なご指導、ご鞭撻を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科生命物理科学分野 吉村昭毅教授に心より深く感謝致します。

本論文作成に際し、有益なご助言を賜りました、北海道医療大学大学院薬学研究科生命物理科学分野 村井毅教授、北海道医療大学大学院薬学研究科分子生命科学分野 青木隆教授、北海道医療大学大学院薬学研究科衛生薬学分野 小島弘幸教授に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、有益なご鞭撻を賜りました、北海道医療大学薬学部生命物理科学講座 (薬品物理化学) 岡田知晃助教に深く感謝致します。

本研究に際して有益なご支援を賜り、種々の検討にご協力いただきました薬品物理化学研究室の皆様へ深く感謝致します。

本研究の実施にあたり、X線回折データの収集にご協力いただいた、北海道大学大学院生命科学院、構造生物化学研究室 姚関教授、尾瀬農之教授、及び研究室の皆様、大型放射光施設SPring-8, BL45XUビームラインスタッフの皆様、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory, BL-1Aビームラインスタッフの皆様へ深く感謝致します。

本論文を提出するにあたり、ご支援とご協力を頂きました家族をはじめ全ての方々に心より感謝致します。

令和5年3月19日

北海道医療大学大学院薬学研究科

鈴木千幸

引用文献

- 1) Eisenreich W., Schwarz M., Cartayrade A., Arigoni D., Zenk M. H., Bacher A., *Chem. Biol.*, **5**, R221-33 (1998).
- 2) Lange B. M., Rujan T., Martin W., Croteau R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 13172–13177 (2000).
- 3) Andreassi J. L. 2nd, Vetting M. W., Bilder P. W., Roderick S. L., Leyh T. S., *Biochemistry*, **48**, 6461–6468 (2009).
- 4) Mizioro H. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **505**, 131–143 (2011).
- 5) Grabińska K., Palamarczyk G., *FEMS Yeast Res.*, **2**, 259–265 (2002).
- 6) Bhattacharya S., Esquivel B. D., White T. C., *MBio*, **9**, (2018).
- 7) Cordier H., Lacombe C., Karst F., Bergès T., *Curr. Microbiol.*, **38**, 290–294 (1999).
- 8) Zhou T., Daugherty M., Grishin N. V, Osterman A. L., Zhang H., *Structure*, **8**, 1247–1257 (2000).
- 9) Bork P., Sander C., Valencia A., *Protein Sci.*, **2**, 31–40 (1993).
- 10) Tsay Y. H., Robinson G. W., *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 620–631 (1991).
- 11) Chang Q., Yan X. X., Gu S.-Y., Liu J.-F., Liang D.-C., *Proteins*, **73**, 254–258 (2008).
- 12) Houten S. M., Waterham H. R., *Mol. Genet. Metab.*, **72**, 273–276 (2001).
- 13) Garcia D. E., Keasling J. D., *PLoS One*, **9**, e87112 (2014).
- 14) Berkow E. L., Lockhart S. R., *Infection and Drug Resistance*, **10**, 237–245 (2017)
- 15) Laemmli U. K., *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 16) Fu Z., Voynova N. E., Herdendorf T. J., Mizioro H. M., Kim J.-J. P., *Biochemistry*, **47**, 3715–3724 (2008).
- 17) Herdendorf T. J., Mizioro H. M., *Biochemistry*, **45**, 3235–3242 (2006).
- 18) Potter D., Mizioro H. M., *J. Biol. Chem.*, **272**, 25449–25454 (1997).
- 19) Pilloff D., Dabovic K., Romanowski M. J., Bonanno J. B., Doherty M., Burley S. K., Leyh T. S., *J. Biol. Chem.*, **278**, 4510–4515 (2003).
- 20) Picotti P., Bodenmiller B., Mueller L. N., Domon B., Aebersold R., *Cell*, **138**, 795–806 (2009).

- 21) Uchida Y., Tachikawa M., Obuchi W., Hoshi Y., Tomioka Y., Ohtsuki S., Terasaki T., *Fluids Barriers CNS*, **10**, 21 (2013).
- 22) Boonsri P., Neumann T. S., Olson A. L., Cai S., Herdendorf T. J., Mizioro H. M., Hannongbua S., Sem D. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 313–319 (2013).
- 23) Fu Z., Wang M., Potter D., Mizioro H. M., Kim J.-J. P., *J. Biol. Chem.*, **277**, 18134–18142 (2002).
- 24) Hirata K., Yamashita K., Ueno G., Kawano Y., Hasegawa K., Kumasaka T., Yamamoto M., *Acta Crystallogr. Sect. D, Struct. Biol.*, **75**, 138–150 (2019).
- 25) Kabsch W., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **66**, 125–132 (2010).
- 26) Vagin A., Teplyakov A., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **66**, 22–5 (2010).
- 27) Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S. A. A., Ballard A. J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A. W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D., *Nature*, **596**, 583–589 (2021).
- 28) Varadi M., Anyango S., Deshpande M., Nair S., Natassia C., Yordanova G., Yuan D., Stroe O., Wood G., Laydon A., Žídek A., Green T., Tunyasuvunakool K., Petersen S., Jumper J., Clancy E., Green R., Vora A., Lutfi M., Figurnov M., Cowie A., Hobbs N., Kohli P., Kleywegt G., Birney E., Hassabis D., Velankar S., *Nucleic Acids Res.*, **50**, D439–D444 (2022).
- 29) Emsley P., Cowtan K., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **60**, 2126–32 (2004).
- 30) Murshudov G. N., Skubák P., Lebedev A. A., Pannu N. S., Steiner R. A., Nicholls R. A., Winn M. D., Long F., Vagin A. A., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **67**, 355–67 (2011).
- 31) Afonine P. V., Grosse-Kunstleve R. W., Echols N., Headd J. J., Moriarty N. W., Mustyakimov M., Terwilliger T. C., Urzhumtsev A., Zwart P. H., Adams P. D., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **68**, 352–367 (2012).
- 32) Sgraja T., Smith T. K., Hunter W. N., *BMC Struct. Biol.*, **7**, 20 (2007).
- 33) Miller B. R., Kung Y., *PLoS One*, **13**, e0208419 (2018).

- 34) Motoyama K., Unno H., Hattori A., Takaoka T., Ishikita H., Kawaide H., Yoshimura T., Hemmi H., *J. Biol. Chem.*, **292**, 2457–2469 (2017).