

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450129

研究課題名(和文)銅含有アミノキシダーゼから各種アミノキシダーゼの創成

研究課題名(英文) Substrate recognition of bacterial copper-containing amine oxidase possessing broad substrate specificity

研究代表者

澤 嘉弘 (SAWA, Yoshihiro)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70127489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：広い基質特異性を有する2種の細菌由来銅含有アミノキシダーゼの基質認識機構を解明することにより、GABA, tyramine, histamine等の生理活性アミンの特異的定量に有用なバイオセンサー酵素の開発を試みた。

残念ながらバイオセンサーとして有望な酵素を開発することはできなかったが、in silico解析が生化学的解析と高い相関性を示しており、酵素の分子設計に十分利用できる段階になっていることを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)： We tried to develop biosensor enzymes useful for the specific quantification of physiologically active amines such as GABA, tyramine, histamine, by elucidating the substrate recognition mechanism of two bacterial copper-containing amine oxidases possessing broad substrate specificity.

Unfortunately we could not develop a promising enzyme as a biosensor, but in silico analysis shows a high correlation with biochemical results and it is at a stage where it can be fully utilized for the molecular design of amine oxidase.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：アミノキシダーゼ バイオセンサー 基質認識 分子設計

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体試料（尿、血液）や食品中のアミンの定量は、健康維持、アレルギー様食中毒の原因物質ヒスタミンおよび γ -アミノ酪酸 (GABA) 含有食品等の判定に重要となってきた。現在、一級アミンの定量は蛍光ラベル化後、HPLC で分析する方法が主流であるが、操作の煩雑さ、特異性、測定時間など、多くの問題を有している。簡便で各種アミンに特異的な酵素/電気化学的測定法が切望されているが、現在までアミン特異的酵素として知られているのはヒスタミン脱水素酵素のみであり、早急に各種アミンに特異的に作用するオキシダーゼを既存酵素から分子設計する必要がある。

(2) 1994 年に登場した DNA シャッフリング法は効率的な指向進化を可能にした画期的な進化分子工学技術であるが、酵素の触媒特性に関する改変は、これまでほとんど成功例がないのが現状である。これは、新規リガンドと相互作用するアミノ酸残基はそれぞれが協同的に働くため、特定部位の複数（多くの場合 3 カ所以上）のアミノ酸残基が特定のアミノ酸に同時に置換される必要があり、通常の大腸菌等の形質転換系でスクリーニングするのは困難であるからである。たとえば、400 個あまりのアミノ酸残基より構成される平均的な酵素タンパク質の場合、特定の場所に特定のアミノ酸残基が入る確率は $1/400 \times 1/20 = 1.25 \times 10^{-4}$ である。これが、同時に 3 カ所入る確率となると 4×10^{-12} となる。アミノ酸残基の機能類似性、発散進化の複数の道筋などを考慮すれば、もう少し確率は高くなると思われるが、通常の大腸菌形質転換ライブラリーサイズが $10^4 \sim 10^6$ 程度であることから

見れば、進化工学の各ラウンドでポジティブな基質特異性改変体をスクリーニングすることは、ほとんど不可能であるといわざるを得ない。

(3) 2010 年代に入り、*in silico* 分子設計法が目覚ましく発展し、おびただしい数の変異タンパク質 (10^7 - 10^{12}) のホモロジーモデリング・ライブラリーとリガンド・ドッキング・シミュレーションによる virtual screening を処理するために並列型スーパー・ワークステーションと独自のアルゴリズムを持つソフトウェアが開発されてきた。我々も、これまでに、リガンド・ドッキング・シミュレーションに基づく部位特異的変異法によりグルタミン脱水素酵素からアスパラギン酸脱水素酵素活性を持つ変異酵素を不完全ながらデザインすることに成功し、*in silico* 解析が基質特異性や触媒性改変の分子設計に有効であることを報告している。

2. 研究の目的

(1) 銅含有アミノオキシダーゼ (CuAO) は、様々な生体アミンとの反応により、対応するアルデヒド、過酸化水素、アンモニアを生成し、アミンの酸化的脱アミノ化を触媒する。

CuAO は、原核生物から真核生物まで幅広く存在しており、エンドウマメや土壤細菌、大腸菌、酵母、ウシ、ヒトなどから見出されてきている。近年では更なる機能解析のため、様々な種における CuAO の X 線結晶構造解析が進められ、精密な分子構造が明らかにされている。

土壤微生物 *Arthrobacter globiformis* には、ヒスタミンオキシダーゼ (HAO) とフェニルエチルアミノオキシダーゼ (PAO) といった二つ

の銅含有アミノキシダーゼのアイソザイムが存在する。両酵素のアミノ酸配列におけるホモロジーは、58%と高いにも関わらず、基質特異性は大きく異なっている。すなわち、HAO はヒスタミン(HIS)に対して最も高い反応性を示し、PAO は芳香族アミンのフェニルエチルアミン(PEA)やチラミン(TYR)に対して高い反応性を示すのである。

基質特異性がかなり異なる HAO と PAO であるが、両者は極めて類似した基質結合ポケットを持ち、1 残基 (HAO : Glu378 – PAO : Leu358) のみが異なっていることが予測された。

HAO の X 線結晶構造の報告は現在まで行われておらず、PAO を鋳型としたホモロジーモデルを使用した解析ではあるが、HAO Glu378 の側鎖は疎水性ポケット内に極性環境を与えるとともに、ヒスタミン側鎖(2-アミノエチル基)との相互作用形成による基質認識に働くことが推察されていた。

本研究は、PAO および HAO の基質認識で重要な役割を担う残基と予想される Leu358 および Glu378 の詳細な役割を理解することで GABA, tyramine, histamine 等の生理活性アミンの特異定量に有用なバイオセンサー酵素を分子設計することを最終目標として、両アミノキシダーゼの変異体酵素解析を行ったものである。

今回は紙面の都合上、HAO Glu378 の解析のみを報告する。

3. 研究の方法

(1) HAO Glu378 位に対する網羅的アミノ酸残基変異体の導入については Inverse PCR 法を用いた。逆方向に設定した 2 種類のプライマーにより、目的プラスミド全長(約 6,600

bp)の位置に単一の DNA 断片の増幅を確認した。その後、Template DNA に由来するメチル化 DNA 切断のため、PCR 産物を制限酵素 *Dpn* にて処理した。

(2) HAO をコードするプラスミドで形質転換した発現用宿主大腸菌 BL21(DE3)の培養は、補因子である TPQ を持たないアポ酵素として酵素を発現させ、酵素精製後に翻訳後修飾をおこないホロ酵素として調製した方がより高い活性を示すとされるため、培養時は最少培地 (M9-Glucose medium) からさらに補因子形成に関わる銅イオン及び亜鉛イオンを極力除いた培地を使用した。リコンビナント大腸菌の集菌後、超音波ホモジナイザーを用いることで菌体を破碎、破碎液を超遠心分離することで粗酵素液を調製した。その後、DEAE-Toyopearl クロマトグラフィー、Butyl-Toyopearl クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、Superdex 200 Increase ゲル濾過クロマトグラフィーにて均一にまで精製した。本酵素は補因子 TPQ を持たないアポ酵素として発現していることから、50 μ M 硫酸銅を含む 50 mM HEPES-NaOH Buffer (pH 6.8)でホロ型酵素を調製した。

(3) 酵素活性測定方法

HAO の活性測定には、Phenethylamine を用い生成する過酸化水素を Horseradish Peroxidase で ABTS と反応させることで酸化型 ABTS を 414 nm で検出した。酵素活性単位 1 ユニットは、30 において 1 分間あたりに過酸化水素 1 μ mole を生成する酵素量と定義した。

カイネティクス解析には 4 種(Histamine,

Phenethylamine, Tyramine, Hexylamine) の基質を用いた。

(4) *in silico* 解析

HAO のホモロジーモデリングは SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) を使用した。鋳型で用いられた PDB は PAO (code:1w4n, 1.6Å) であった。

Docking Simulation, Residue Scan は Molecular Operating Environment 2016.08 (Chemical Computing Group 社、カナダ) を使用した。

4. 研究成果

(1) カイネティクス

表 1 4 種基質のカイネティクス

Histamine				Phenylethylamine					
RANK	MUTANT	Km (μM)	kcat (S ⁻¹)	kcat/Km (μM ⁻¹ ·s ⁻¹)	RANK	MUTANT	Km (μM)	kcat (S ⁻¹)	kcat/Km (μM ⁻¹ ·s ⁻¹)
1	WT	149	3.05	0.0205	2	WT	11.6	6.16	0.5306
2	E378D	160	3.16	0.0198	1	E378D	12.2	6.77	0.5543
3	E378H	117	1.81	0.0154	6	E378H	16.1	5.36	0.3328
4	E378Q	425	5.99	0.0141	3	E378Q	22.0	9.10	0.4128
5	E378F	182	2.49	0.0137	5	E378F	18.0	6.60	0.3668
6	E378M	139	1.88	0.0135	9	E378M	23.4	6.53	0.2786
7	E378S	204	2.70	0.0133	7	E378S	20.7	6.65	0.3221
8	E378N	171	2.19	0.0128	12	E378N	28.3	6.99	0.2470
9	E378V	297	3.67	0.0124	4	E378V	18.1	7.17	0.3961
10	E378G	297	3.16	0.0118	8	E378G	17.4	5.27	0.3029
11	E378A	179	2.01	0.0113	11	E378A	23.9	6.34	0.2650
12	E378I	285	2.66	0.0093	14	E378I	20.3	4.61	0.2274
13	E378W	166	1.53	0.0092	10	E378W	17.4	4.80	0.2757
14	E378T	176	1.36	0.0077	18	E378T	26.3	4.51	0.1713
15	E378Y	195	1.50	0.0077	13	E378Y	15.4	3.58	0.2335
16	E378K	227	1.74	0.0077	17	E378K	23.4	4.09	0.1744
17	E378C	333	2.15	0.0065	19	E378C	23.6	3.85	0.1632
18	E378L	493	2.17	0.0044	16	E378L	14.6	2.89	0.1979
19	E378P	330	1.28	0.0039	15	E378P	20.9	4.71	0.2247
20	E378R	384	1.27	0.0033	20	E378R	45.8	3.35	0.0731

Tyramine				Hexylamine					
RANK	MUTANT	Km (μM)	kcat (S ⁻¹)	kcat/Km (μM ⁻¹ ·s ⁻¹)	RANK	MUTANT	Km (μM)	kcat (S ⁻¹)	kcat/Km (μM ⁻¹ ·s ⁻¹)
2	WT	25.1	3.76	0.1500	10	WT	167	1.75	0.0104
1	E378D	27.4	4.43	0.1620	16	E378D	282	1.76	0.0062
13	E378H	65.6	4.18	0.0637	12	E378H	169	1.54	0.0091
3	E378Q	252	36.4	0.1443	5	E378Q	132	3.30	0.0250
8	E378F	42.6	3.89	0.0914	1	E378F	64.5	3.11	0.0482
12	E378M	70.0	5.36	0.0767	11	E378M	182	1.86	0.0102
9	E378S	53.5	4.61	0.0861	15	E378S	239	1.70	0.0071
5	E378N	54.2	4.99	0.0921	13	E378N	250	2.19	0.0087
4	E378V	45.0	5.03	0.1118	7	E378V	157	2.33	0.0149
11	E378G	45.8	3.67	0.0801	14	E378G	297	2.46	0.0083
6	E378A	57.5	5.29	0.0919	9	E378A	249	3.12	0.0125
10	E378I	45.5	3.68	0.0808	2	E378I	56.5	2.00	0.0353
16	E378W	66.9	3.68	0.0551	6	E378W	223	3.41	0.0153
17	E378T	88.6	4.32	0.0487	3	E378T	75.5	2.19	0.0290
15	E378Y	43.4	2.40	0.0552	8	E378Y	77.4	1.14	0.0148
18	E378K	72.0	2.86	0.0397	17	E378K	202	1.22	0.0060
19	E378C	75.7	2.70	0.0357	19	E378C	302	1.47	0.0049
14	E378L	44.1	2.50	0.0567	4	E378L	53.7	1.44	0.0268
7	E378P	48.0	4.40	0.0917	20	E378P	400	1.19	0.0030
20	E378R	142	2.70	0.0190	18	E378R	270	1.47	0.0055

基質特異性同様に全ての変異体において HIS に対する親和性や触媒効率の低下が認められた。触媒効率は負の電荷を持つ WT 及び E378D が 1 位、2 位という結果となったが、3 番目に高い触媒効率を示した変異体は His

置換体であった。おそらくイミダゾール基は無電荷状態であると推測され、基質認識へ与える影響としては空間的関与のみだと思われる。

一方 Arg, Lys の二つの塩基性アミノ酸はそれぞれ HIS 触媒効率が他の変異体と比較しても大きく低下していた。この結果は MOE 解析でも同様の結果が得られていることから、HIS 認識における Glu, Asp 残基の静電的相互作用の寄与を裏付けていると推測された。

PAO 置換体である E378L では、HIS に対する触媒効率の低下に付随して PEA, TYR の触媒効率も低下したこと、さらに基質特異性同様に PAO 型の触媒効率も示さなかったことから基質結合ポケット HAO-Glu378 : PAO-Leu358, 1 残基置換以外にポケットサイズなど静電的相互作用、水素結合相互作用とは異なる構造的要因等が関与していることも考えられる。

HIS, PEA, TYR の 3 基質における全変異体間の触媒効率変化には明らかに相関性が認められた。すなわち Glu378 位の改変と芳香族系アミンに対する触媒効率は連動して低下している。この傾向は PEA, TYR を基質とした PAO 定常カイネティクス解析における変異体の結果と一致していた。

(2) *in silico* 解析

表 2 は 4 種基質 (HIS, PEA, TYR, HEX) : HAO 378 変異体 (全 20 種) 複合体に対する親和性、安定性を MOE Residue Scan で評価した結果を示したものである。Normal は 378 位のみ注目し、親和性、安定性を評価したものであり、Ensemble は 378 位近傍に位置する残基との相互作用を加味して評価したものである。

表3は、表1の4種基質のカイネティクスデータセットと表2のResidue Scan 解析結果との2つのデータ間の相関係数を示したものである。今回の相関係数算出に使用したパラメータは、カイネティクスではKm, kcat, kcat/Kmの3つを、Residue ScanではdAffinity, dStabilityの2つを2つの計算条件(Normal, Ensemble)で求めている。従って1基質につき、カイネティクス解析・Residue Scan間で12通りの要素で検証をおこなったことになる。

表2 各種 Residue Scan

HAO-HIS (TPQ修正)				HAO-HIS (TPQ修正) Ensemble					
mutation	Affinity	dAffinity	Stability	dStability	mutation	Affinity	dAffinity	Stability	dStability
2E378H	-5.0711	-0.0459	82086879	0.9204	2E378H	-5.2398	-0.1294	-4836.1	0.7525
2E378E	-5.0251	0	82086878	0	2E378E	-5.1906	-0.0873	-4835.68	1.1749
2E378N	-4.9256	0.0995	82086880	1.6579	2E378N	-5.1104	0	-4836.86	0
2E378Q	-4.7964	0.2287	82086879	1.1581	2E378M	-5.0578	0.0526	-4836.61	0.2458
2E378Y	-4.7929	0.2323	82086878	0.1442	2E378Q	-5.0433	0.0670	-4836.21	0.6478
2E378C	-4.7519	0.2733	82086879	1.2747	2E378W	-4.9733	0.1371	-4835.61	0.2475
2E378T	-4.7354	0.2897	82086879	1.2723	2E378F	-4.9518	0.1585	-4836.66	0.1950
2E378M	-4.7311	0.2941	82086879	0.4614	2E378Y	-4.9452	0.1651	-4836.76	0.0954
2E378L	-4.7225	0.3026	82086879	0.3524	2E378N	-4.9391	0.1713	-4835.19	1.6665
2E378F	-4.7080	0.3171	82086878	-0.1101	2E378D	-4.9300	0.1661	-4836.36	1.1629
2E378V	-4.6635	0.3617	82086879	0.6995	2E378K	-4.8959	0.2144	-4835.09	1.7647
2E378I	-4.6629	0.3622	82086879	0.6677	2E378P	-4.8891	0.2213	-4835.03	1.8305
2E378S	-4.6547	0.3704	82086880	1.7005	2E378Y	-4.8879	0.2225	-4836.32	0.5389
2E378G	-4.6519	0.3732	82086880	0.0907	2E378C	-4.8851	0.2253	-4835.65	1.2033
2E378R	-4.6417	0.3834	82086879	0.8955	2E378I	-4.8790	0.2314	-4836.43	0.4310
2E378D	-4.6397	0.3855	82086880	1.4704	2E378S	-4.8542	0.2562	-4835.16	1.7008
2E378A	-4.6267	0.3984	82086880	1.6967	2E378T	-4.8541	0.2562	-4835.67	1.1907
2E378K	-4.5822	0.4429	82086879	1.0150	2E378S	-4.8417	0.2687	-4834.66	2.1946
2E378P	-4.5726	0.4629	82086880	1.6550	2E378A	-4.8276	0.2827	-4835.36	1.5019
2E378W	-4.5236	0.5015	82086879	0.4744	2E378R	-4.7762	0.3342	-4835.87	0.9827

HAO-PEA (TPQ修正)				HAO-PEA (TPQ修正) Ensemble					
mutation	Affinity	dAffinity	Stability	dStability	mutation	Affinity	dAffinity	Stability	dStability
2E378Y	-5.4486	-0.1100	82087846	-0.5798	2E378E	-5.5137	0	-4837.2	0
2E378Q	-5.4174	-0.0788	82087847	0.3468	2E378L	-5.4458	0.0679	-4838.0	-0.7994
2E378N	-5.2473	-0.0067	82087848	1.0132	2E378D	-5.4077	0.0161	-4835.6	1.3180
2E378E	-5.3386	0	82087847	0	2E378N	-5.3803	0.1335	-4836.0	1.1106
2E378P	-5.3349	0.0036	82087847	0.3720	2E378Q	-5.3774	0.1364	-4836.4	0.7973
2E378K	-5.3039	0.0347	82087847	0.5129	2E378M	-5.3749	0.1388	-4837.1	0.0430
2E378F	-5.2961	0.0424	82087846	-0.6211	2E378D	-5.3470	0.1568	-4837.6	-0.4307
2E378L	-5.2948	0.0438	82087846	-0.2947	2E378F	-5.3457	0.1681	-4837.8	-0.6494
2E378I	-5.2861	0.0525	82087846	-0.1810	2E378H	-5.3413	0.1725	-4836.7	0.4168
2E378Y	-5.2847	0.0539	82087846	-0.3512	2E378S	-5.3405	0.1732	-4836.1	1.0380
2E378C	-5.2701	0.0651	82087847	0.1626	2E378V	-5.3359	0.1778	-4835.9	0.9182
2E378T	-5.2649	0.0737	82087847	0.5176	2E378C	-5.3317	0.1821	-4836.5	0.6891
2E378D	-5.2588	0.0798	82087848	1.5260	2E378Y	-5.3300	0.1838	-4837.7	-0.5639
2E378V	-5.2546	0.0840	82087846	-0.0813	2E378I	-5.3184	0.1954	-4837.0	0.1541
2E378R	-5.2535	0.0851	82087847	0.1626	2E378N	-5.3139	0.1999	-4837.1	0.6035
2E378P	-5.2497	0.0889	82087847	0.3946	2E378M	-5.3009	0.2129	-4835.7	1.4699
2E378H	-5.2444	0.0942	82087848	1.3033	2E378V	-5.2980	0.2158	-4837.3	-0.1021
2E378S	-5.2439	0.0947	82087848	0.9844	2E378A	-5.2928	0.2210	-4836.2	0.9530
2E378G	-5.2399	0.0987	82087848	1.4036	2E378T	-5.2867	0.2270	-4836.5	0.6622
2E378A	-5.2346	0.1040	82087847	0.9878	2E378C	-5.2854	0.2283	-4835.6	1.5057

HAO-TYR (TPQ修正)				HAO-TYR (TPQ修正) Ensemble					
mutation	Affinity	dAffinity	Stability	dStability	mutation	Affinity	dAffinity	Stability	dStability
2E378E	-5.4152	0	82086829	0	2E378Y	-5.9639	-0.3461	-4838.1	-0.8449
2E378D	-5.4145	0.0007	82086830	1.0634	2E378D	-5.6102	-0.0524	-4836.5	0.7783
2E378Q	-5.3120	0.1032	82086829	0.6007	2E378H	-5.5595	-0.0017	-4836.7	0.6316
2E378N	-5.2549	0.1603	82086830	1.0725	2E378E	-5.5578	0	-4837.3	0
2E378K	-5.2174	0.1978	82086829	0.5585	2E378Q	-5.5162	0.0416	-4836.7	0.5855
2E378P	-5.2100	0.2052	82086830	1.0123	2E378Y	-5.4393	0.1184	-4837.6	-0.2867
2E378L	-5.2013	0.2139	82086829	0.1026	2E378K	-5.3487	0.2091	-4836.4	0.9297
2E378R	-5.1978	0.2174	82086829	0.3187	2E378F	-5.3351	0.2227	-4837.5	-0.2355
2E378I	-5.1700	0.2452	82086829	-0.0106	2E378P	-5.3262	0.2315	-4836.0	1.2425
2E378V	-5.1399	0.2754	82086829	-0.2491	2E378R	-5.3228	0.2350	-4837.2	0.1102
2E378C	-5.1366	0.2786	82086829	0.4741	2E378L	-5.3211	0.2366	-4837.2	0.1071
2E378V	-5.1364	0.2788	82086829	0.3091	2E378M	-5.2996	0.2582	-4836.4	0.9045
2E378C	-5.1343	0.2810	82086830	0.9814	2E378I	-5.2951	0.2627	-4837.2	0.0844
2E378W	-5.1128	0.3024	82086829	0.6908	2E378N	-5.2757	0.2720	-4837.1	0.1938
2E378H	-5.1117	0.3035	82086830	0.9221	2E378C	-5.2636	0.2942	-4836.5	0.7983
2E378M	-5.1116	0.3037	82086830	0.6560	2E378S	-5.2545	0.3033	-4835.9	1.3509
2E378G	-5.0656	0.3487	82086831	1.8160	2E378N	-5.2515	0.3063	-4836.3	1.0122
2E378A	-5.0614	0.3538	82086830	1.3244	2E378T	-5.2294	0.3284	-4836.3	0.9360
2E378T	-5.0085	0.4067	82086830	1.0409	2E378A	-5.2242	0.3335	-4836.0	1.2455
2E378S	-4.9937	0.4215	82086830	1.4846	2E378G	-5.2194	0.3384	-4835.5	1.8330

HAO-HEX (TPQ修正)				HAO-HEX (TPQ修正) Ensemble					
mutation	Affinity	dAffinity	Stability	dStability	mutation	Affinity	dAffinity	Stability	dStability
2E378E	-5.1347	0	85489092	0	2E378L	-5.2455	-0.0261	-4834.38	-0.4199
2E378Q	-5.0011	0.1336	85489092	0.2328	2E378E	-5.2195	0	-4833.96	0
2E378L	-4.9414	0.1933	85489092	-0.2108	2E378H	-5.1926	0.0269	-4833.85	0.1079
2E378W	-4.9316	0.2031	85489092	-0.4761	2E378R	-5.1908	0.0287	-4835.03	-1.0672
2E378N	-4.9039	0.2309	85489093	0.3585	2E378D	-5.1886	0.0287	-4833.01	0.9526
2E378R	-4.8867	0.2480	85489093	0.4810	2E378M	-5.1813	0.0382	-4834.57	-0.6071
2E378Y	-4.8850	0.2498	85489092	-0.0997	2E378I	-5.1498	0.0697	-4834.67	-0.7084
2E378M	-4.8651	0.2697	85489092	0.2295	2E378K	-5.1397	0.0798	-4833.11	0.8481
2E378F	-4.8403	0.2944	85489092	-0.3076	2E378N	-5.1136	0.1059	-4833.47	0.4308
2E378N	-4.8137	0.3211	85489093	1.3060	2E378Q	-5.1025	0.1170	-4833.55	0.4115
2E378T	-4.8126	0.3221	85489092	0.2478	2E378W	-5.1004	0.1191	-4834.33	-0.3648
2E378S	-4.8046	0.3302	85489093	0.5594	2E378S	-5.0707	0.1488	-4833.49	0.4714
2E378P	-4.7893	0.3454	85489093	0.5538	2E378Y	-5.0667	0.1528	-4834.53	0.2657
2E378A	-4.7570	0.3777	85489093	0.7164	2E378V	-5.0665	0.1530	-4834.18	-0.2174
2E378I	-4.7421	0.3926	85489092	-0.5566	2E378C	-5.0534	0.1661	-4833.64	0.3203
2E378H	-4.7195	0.4152	85489093	1.0210	2E378T	-5.0394	0.1801	-4833.71	0.2487
2E378G	-4.6869	0.4478	85489093	1.2142	2E378W	-5.0371	0.1824	-4833.02	0.3527
2E378V	-4.6865	0.4483	85489092	0.0410	2E378Y	-5.0225	0.1970	-4834.87	-0.9082
2E378C	-4.6796	0.4551	85489093	0.5602	2E378A	-5.0177	0.2018	-4833.34	0.6201
2E378D	-4.6560	0.4788	85489093	1.2221	2E378G	-4.9867	0.2328	-4832.79	1.1689

表3 カイネティクスとResidue Scan

HAO-HIS (TPQ修正)				HAO-PEA (TPQ修正)					
	Km	kcat	kcat/Km		Km	kcat	kcat/Km		
MOE	dAffinity	0.261	-0.155	-0.476	MOE	dAffinity	0.162	-0.097	-0.088
MOE	dStability	0.050	0.061	-0.063	MOE	dStability	0.042	0.266	0.177
MOE-ense	dAffinity	0.402	-0.253	-0.706	MOE-ense	dAffinity	0.287	-0.149	-0.479
MOE-ense	dStability	0.002	-0.162	-0.162	MOE-ense	dStability	-0.018	0.384	0.195

HAO-TYR (TPQ修正)				HAO-HEX (TPQ修正)					
	Km	kcat	kcat/Km		Km	kcat	kcat/Km		
MOE	dAffinity	-0.093	-0.273	-0.600	MOE	dAffinity	0.324	-0.064	-0.149
MOE	dStability	-0.015	0.026	0.086	MOE	dStability	0.636	-0.158	-0.626
MOE-ense	dAffinity	-0.064	-0.169	-0.241	MOE-ense	dAffinity	0.227	0.309	0.020
MOE-ense	dStability	0.005	0.056	0.083	MOE-ense	dStability	0.594	0.032	-0.431

最も高い相関は、HIS Ensemble dAffinity : kcat/Km (-0.706)であった。他に0.6以上を示したのはHEX Normal dStability : Km (0.636), HEX Normal : kcat/Km (-0.626), TYR Normal dAffinity : kcat/Km (-0.600)であった。一方、PEAではいずれの組み合わせにおいても高い相関は見られなかった。

当初、SWISS-MODELで得られたHAOホモロジーモデルでResidue Scan計算を行ったところ、カイネティクスパラメータとの相関はほとんど見られなかった。PAO基質複合体のX線結晶構造を詳細に解析したところ水分子が基質認識に働いていることが明らかとなった。そこで、HAOホモロジーモデルに銕型として用いたPAO(1w4n)の水分子を付加してエネルギー最小化計算を行った後、Residue Scan計算をした結果が表2である。おそらく、PEAでは水分子の位置が不適切であったため高い相関が得られなかったと考察している。実際にPAO(1w4n)でもPHE, TYRで同様の解析を行っているが、共にEnsemble dAffinity : kcat/Kmで0.7以上の相関を示す結果となっている。これらの事実は、MOE 2016.08 Residue Scanがvirtual screening、すなわち分子設計に有用なツールであることを強く示唆している。

< 引用文献 >

Takeshi Murakawa, Hideyuki Hayashi, Tomoko Sunami, Kazuo Kurihara, Taro Tamada, Ryota Kuroki, Mamoru

Suzuki, Katsuyuki Tanizawae and Toshihide Okajimae. High-resolution crystal structure of copper amine oxidase from *Arthrobacter globiformis*: assignment of bound diatomic molecules as O₂. Acta Cryst. (2013). D69, 2483–2494

Takeshi Murakawa, Hideyuki Hayashi, Masayasu Taki, Yukio Yamamoto, Yoshiaki Kawano, Katsuyuki Tanizawa and Toshihide Okajima. (2011) Structural insights into the substrate specificity of bacterial copper amine oxidase obtained by using irreversible inhibitors. J. Biochem. 2012;151(2):167–178

Langley, D.B., Trambaiolo, D.M., Duff, A.P., Dooley, D.M., Freeman, H.C., Guss, J.M. Complexes of the Copper-Containing Amine Oxidase from *Arthrobacter Globiformis* with the Inhibitors Benzylhydrazine and Tranylecypromine. Acta Crystallogr., Sect. F, 64:577-, 2008

Sekiguchi Y, Makita H, Yamamura A, Matsumoto K. A thermostable histamine oxidase from *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007. J Biosci Bioeng. 2004;97(2):104-10.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Yoshida T, Ogola HJ, Amano Y, Hisabori T, Ashidas H, Sawa Y, Tsuge H, Sugano Y., *Anabaena* sp. DyP-type peroxidase is a tetramer consisting of two asymmetric dimers. Proteins, 84, 2016, 31-42
DOI: 10.1002/prot.24952

[学会発表] (計 1 件)

竹島大貴、芦田裕之、石川孝博、丸田隆典、澤 嘉弘、*Arthrobacter globiformis* 由来ものアミンオキシダーゼとヒスタミンオキシダーゼの基質認識、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月27日、岡山大学津島キャンパス (岡山)

[図書] (計 1 件)

Henry Josepha Oduor Ogola, Hiroyuki Ashida, Takahiro Ishikawa, Yoshihiro Sawa, Intech, Explorations and Applicastions of Enzyme-linked Bioremediation of Synthetic Dyes. 2015, 34

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

澤 嘉弘 (SAWA, Yoshihiro)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号 : 7 0 1 7 4 9 4 7