

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 のみに注目し、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 | -5.1936 | -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 | 0.0625 | 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 | 0.8878 | 2E378G | -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 |
| 2E378Y | -5.1399 | 0.2754 | 82086829 | -0.2491 | 2E378R | -5.3228 | 0.2350 | -4837.2 | 0.1102 |
| 2E378F | -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 | 2E378H | -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* 由来ものアミノ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