

博 士 論 文

超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来

O-phospho-L-serine sulfhydrylase の 1 次基質認識機構の解明

2017 年 3 月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科

バイオサイエンス専攻

バイオ科学技術研究領域

武田 瑛美

超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来
O-phospho-L-serine sulfhydrylase の 1 次基質認識機構の解明

目次

Abbreviations.....	2
1. General Introduction	5
1.1. L-システインとその生合成経路.....	6
1.2. 微生物と植物における L-システイン生合成経路とシステイン合成酵素	8
1.2.1. O-acetyl-L-serine sulfhydrylase (OASS)アイソザイム	8
1.2.2. O-phospho-L-serine sulfhydrylase (OPSS)	10
1.3 OASS/OPSS の反応機構	12
1.4. 研究対象 <i>Aeropyrum pernix</i> K1 由来 OPSS について	13
1.5 OAS/OPS の認識残基について	16
2. ApOPSS の酵素触媒反応における F225 の役割	17
2.1. Introduction	17
2.2. Materials and Methods	20
2.3. Results	31
2.4. Discussion	41
2.5. Conclusion.....	43
3. システイン合成酵素の活性部位における F と R は OAS/OPS 認識に必要か?	44
3.1. Introduction	44
3.2. Materials and Methods	44
3.3. Results	50
3.4. Discussion	57
3.5. Conclusion.....	59
4. General Discussion	60
Acknowledgements.....	64
References	65

Abbreviations

各生物種とこれらの本論文上の酵素略称名は表 1.1 (p. 4)に記した。

AA; α -アミノアクリレート中間体

ADP; adenosine diphosphate

APS; adenosine 5'-phosphosulphate

ATP; adenosine triphosphate

CCP4i; collaborative computational project no. 4

CBS; cystathionine β -synthase

CysO-SH; thiocarboxylated CysO

DTNB; 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid

DTT; dithiothreitol

EDTA; ethylenediamine tetraacetic acid

F225A 変異体; F225 を Ala に置換した ApOPSS 変異体

F225Y 変異体; F225 を Tyr に置換した ApOPSS 変異体

F225Y/R297A 変異体; F225 を Tyr、R297 を Ala に置換した ApOPSS 変異体

Na HEPES; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid sodium

IPTG; isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

K127A 変異体; K127 を Ala に置換した ApOPSS 変異体

K127A/F225Y 変異体; K127 を Ala、F225 を Tyr に置換した ApOPSS 変異体

K127A/F225Y/R297A 変異体; K127 を Ala、F225 を Tyr、R297 を Ala に置換した ApOPSS 変異体

LDH; 乳酸脱水素酵素

MPD; 2-methyl-2,4-pentanediol

MOE; molecular operating environment

MOPS; 3-morpholinopropanesulfonic acid

NaCl; sodium chloride

NADH; nicotinamide adenine dinucleotide

NADPH; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

OAS; *O*-acetyl-L-serine

OASS; *O*-acetyl-L-serine sulfhydrylase

OAS/OPS; OAS または OPS

OASS/OPSS; OASS または OPSS

OPS; *O*-phospho-L-serine

OPSS; *O*-phospho-L-serine sulfhydrylase

PEG4000; polyethylene glycol 4000

PAPS; 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate

PDB; protein data bank

PLP; pyridoxal-5'-phosphate

R297A 変異体; R297 を Ala に置換した ApOPSS 変異体

R297K 変異体; R297 を Lys に置換した ApOPSS 変異体

R297Q 変異体; R297 を Gln に置換した ApOPSS 変異体

RMSDs; root mean square deviations

SAT; serine acetyltransferase

TCEP-HCl; tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride

TNB; 5-thio-2-nitrobenzoate

野生型 free (ApOPSS free)

表 1.1. システイン合成酵素の本論文での統一名称。便宜上、*M. tuberculosis* のみ遺伝子名を統一名称とした。MtCysO はシステイン合成酵素ではないが、ここに含めて記載した。酵素番号(Enzyme Commission numbers, EC)については、OASS, EC2.5.1.47.; OPSS, EC2.5.1.65.; CBS, EC4.2.1.22.である。

生物種	本論文での統一名称	Uniprot		
		遺伝子名	タンパク質名	エントリー番号
<i>Aeropyrum pernix</i>	ApOPSS	cysO	Protein CysO	Q9YBL2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtOASS-A	OASA1	Cysteine synthase 1	P47998
<i>Entamoeba histolytica</i>	EhOASS-A	N/A	Cysteine synthase	O15570
<i>Escherichia coli</i>	EcOASS-A	cysK	Cysteine synthase A	POABK5
<i>Escherichia coli</i>	EcOASS-B	cysM	Cysteine synthase B	P16703
<i>Glycine max</i>	GmOASS-A	GLYMA_11G00580	Cysteine synthase	Q8W1A0
<i>Haemophilus influenzae</i>	HiOASS-A	cysK	Cysteine synthase	P45040
<i>Leishmania donovani</i>	LdOASS-A	OASS	O-acetyl serine sulfhydrylase	G1C2I2
<i>Leishmania major</i>	LmOASS-A	LMJF_36_3590	Cysteine synthase	Q4Q159
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MtCysM	cysM	O-phosphoserine sulfhydrylase	P9WP53
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MtCysK2	cysK2	Uncharacterized pyridoxal phosphate-dependent protein CysK2	Q79FV4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MtCysK1	cysK1	O-acetylserine sulfhydrylase	P9WP55
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MtCysO	cysO	Sulfur carrier protein CysO	P9WP33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ScOASS	YGRO12W	Putative cysteine synthase	P53206
<i>Salmonella typhimurium</i>	StOASS-A	cysK	Cysteine synthase A	POA1E3
<i>Salmonella typhimurium</i>	StOASS-B	cysM	Cysteine synthase B	P29848
<i>Spinacia oleracea</i>	SoOASS-A	N/A	Cysteine synthase	Q00834
<i>Trichomonas vaginalis</i>	TvOPSS	TVAG_387920	Cysteine synthase, putative	A2E119
<i>Aeropyrum pernix</i>	ApCBS	APE_1223.1	Cystathionine beta-synthase	Q9YCN5
<i>Homo sapiens</i>	HsCBS	CBS	Cystathionine beta-synthase	P35520
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ScCBS	CYS4	Cystathionine beta-synthase	P32582

超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来 O-phospho-L-serine sulfhydrylase の 1 次基質認識機構の解明

1. General Introduction

研究対象の超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来のシステイン合成酵素 O-phospho-L-serine sulfhydrylase (OPSS) は、2003 年に新規に発見された酵素である。

我々の研究室ではこれまでに、この新規 OPSS の反応機構に関わるアミノ酸残基の役割の推定を試みてきた。本論文では 1 次基質の反応に関わるアミノ酸残基の解明を進めた。この研究の目的の 1 つとして、私はヒト病原菌に対する阻害剤の開発につなげる試みを考えている。

ヒトに対する病原菌は結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* や赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* などおよそ 50 種類存在する。*M. tuberculosis* や *E. histolytica* に対する感染症治療薬は存在する。しかし、薬剤耐性菌の出現している現状があるため、新たな作用機構の感染症治療薬の開発が求められている。そこで、新たな作用機構薬のターゲットとして、システイン生合成経路に着目した。

生物は生きるために L-システインを必要とするが、ヒトと微生物はシステインの生合成経路が異なっていることが知られている。

微生物のシステイン合成酵素の反応において、L-システインの合成には、アミノ酸主鎖を構成する 1 次基質と硫黄源の 2 次基質が必要である。1 次基質は生物種によって異なり、O-acetyl-L-serine (OAS) または O-phospho-L-serine (OPS) を使用する。1 次基質の区別で酵素名が分類されており、1 次基質に OAS を用いる酵素が O-acetyl-L-serine sulfhydrylase (OASS)、1 次基質に OPS を用いる酵素が OPSS として名付けられている。例外として *A. pernix* とトリコモナス原虫 *Trichomonas vaginalis* のシステイン合成酵素は OAS と OPS 両方を 1 次基質として用いることが知られている。

微生物由来システイン合成酵素の 1 次基質の認識機構についてはこれまで、OPS の認識には活性部位の Arg や Lys が関わるということが知られているが、OAS についてはわかっていない。1 次基質アナログを抗病原菌剤として考えたとき、その病原菌の用いる 1 次基質に対応させるため、OAS と OPS それぞれの認識残基を知る必要がある。本研究では、OAS と OPS 両方を 1 次基質として用いることのできる *A. pernix* 由来システイン合成酵素を用いて、システイン合成酵

素の 1 次基質認識機構の解明を試みた。以下の項目にて詳細を述べる。

1.1. L-システインとその生合成経路

有機体の生物は、主に炭素、酸素、水素、窒素、リンで構成される。この生体構成元素の 1 つにわずかながら硫黄も含まれる。硫黄源は主に含硫アミノ酸である L-メチオニン、L-システインである。

哺乳類では、図 1.1 のように L-メチオニンからホモシステイン、L-システイン、タウリンに至る主経路がある[1], [2]。また、L-システインからグルタチオンを生成する経路や S-アデノシルメチオニンからポリアミンが生成する経路などが存在する[3], [4]。これらの細胞内における機能は、タウリンは浸透圧調節や抗酸化作用、グルタチオンは抗酸化作用、ポリアミンは分化や細胞増殖であることが知られている[3]–[5]。哺乳類における L-システインはこれら含硫生理活性物質の前駆体として機能している。微生物では、L-システインが細胞付着や運動性にも関わっている[6]–[9]。L-システインから生成されるピルビン酸は糖新生に関わっている。このように、L-システインは生理的に重要なアミノ酸の 1 種である。

L-システインの代謝経路は、図 1.1 の 2 通りの系が存在する。哺乳類では、硫黄代謝物を異化することで、L-メチオニンから L-システインを生成している。一方、微生物や植物は、硫酸イオン/チオ硫酸イオンがトランスポーターによって細胞内に取り込まれ[10]、アミノ基の転移を伴い硫黄を同化し、L-システインを合成している[11]。

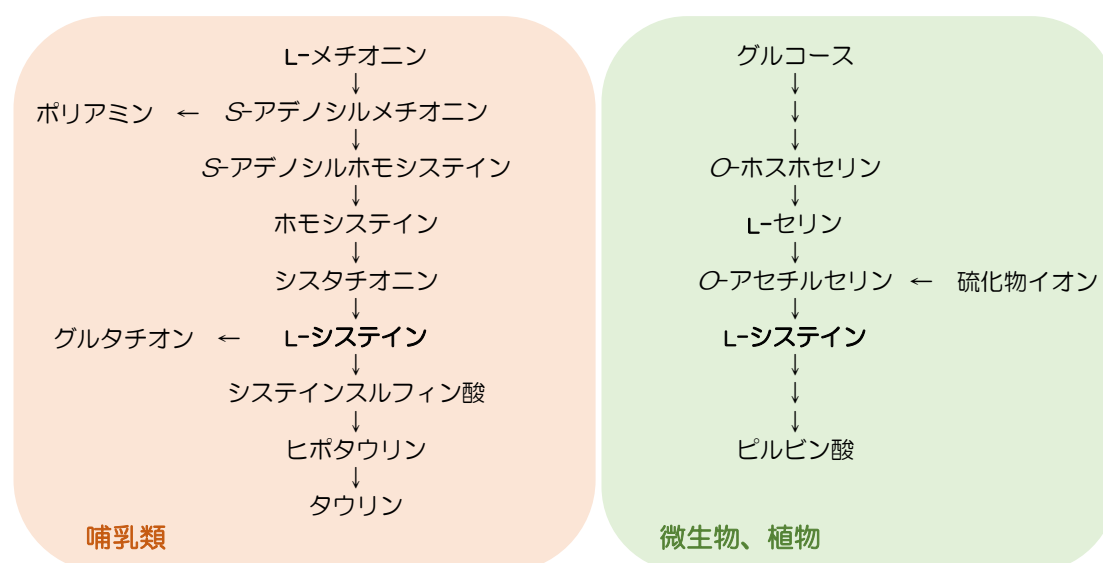


図 1.1. 含硫アミノ酸の代謝。ヒトなど哺乳類では、必須アミノ酸の L-メチオニンからホモシステイン、L-システイン、タウリンに至る主経路を異化していくことで硫黄源を獲得する。一方、微生物や植物では、硫化物イオンを取り込み、L-システインを合成する。

微生物や植物にみられるシステイン合成酵素と哺乳類にみられるシスタチオニン合成酵素(CBS)は、共に pyridoxal-5'-phosphate (PLP)を補酵素にもち、1次基質のβ位を置換するβ-シターゼである(図 1.2)。*A. pernix*、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、寄生原虫 *Trypanosoma cruzi* [12]、寄生原虫 *Leishmania major* は OASS と CBS の両方の遺伝子を持っていることが知られている[13], [14]。OASS/OPSS と CBS のアミノ酸配列は比較的類似しており、*A. pernix* では配列一致度が 27%である。

ヒト病原菌では *T. vaginalis* [15]–[19]、*M. tuberculosis* [20]–[32]、*Salmonella typhimurium* [33]–[46]、*E. histolytica* [7], [47]–[52]、*Haemophilus influenza* [53]–[55]、*Leishmania donovani* [56], [57]の OASS または OPSS (OASS/OPSS) は立体構造解析や活性測定が行われている。システイン合成酵素の活性部位を構成する残基は比較的保存されているため、*A. pernix* による 1次基質認識の解析が 1次基質アナログなど抗病原菌剤の開発につながることを期待する。

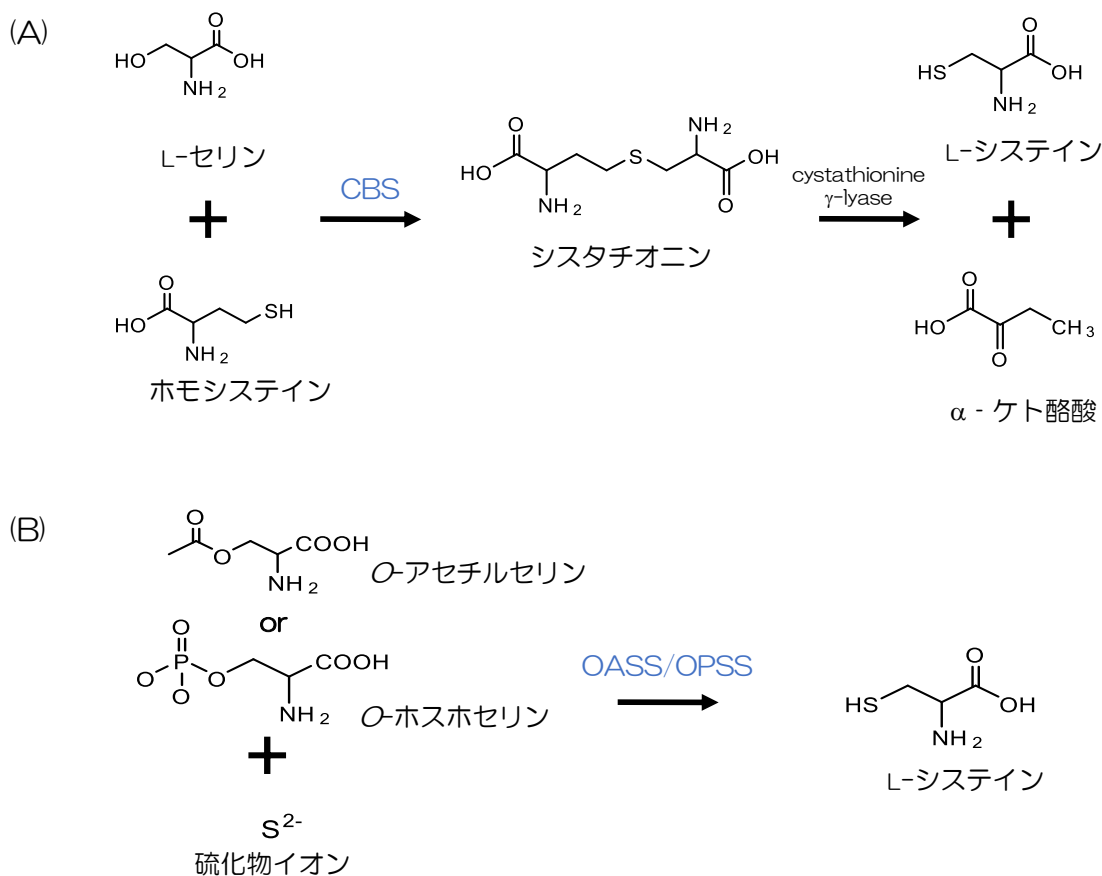


図 1.2. β-シターゼの反応式。(A)哺乳類にみられる L-システインの反応経路。(B)微生物や植物にみられる L-システインの反応経路。CBS と OASS/OPSS がβ-シターゼである。

1.2. 微生物と植物における L-システイン生合成経路とシステイン合成酵素

図 1.3 の赤字を除いた部分は大腸菌 *Escherichia coli* の L-システイン生合成経路である[58]。L-システインのアミノ酸構造の主鎖部はグルコースから作られる。グルコースは、最終段階では以下のように反応が進められる。OPS から O-phospho-L-serine phosphatase (遺伝子名 *serB*) によって L-セリンができる[32]。L-セリンは serine acetyltransferase (SAT、遺伝子名 *cysE*) によって OAS となる[59]。この OAS と硫酸イオン/チオ硫酸イオンから OASS の触媒によって、L-システインが合成される[39]。

1.2.1. O-acetyl-L-serine sulfhydrylase (OASS)アイソザイム

L-システイン生合成経路の硫酸イオンとチオ硫酸イオンの使用には、図 1.3 のように 2 つの OASS アイソザイムが用いられる。硫酸イオンの系では OASS-A(遺伝子名 *cysK*)、チオ硫酸イオンの系では OASS-B(遺伝子名 *cysM*) が用いられる。どちらも経路上の最終産物は L-システインである。OASS-A と OASS-B の特徴の違いが *E. coli* 由来とネズミチフス菌 *S. typhimurium* 由来において知られているため、それを以下に示す。

E. coli

E. coli は OASS-A (EcOASS-A) と OASS-B (EcOASS-B) をもつ。これらは他の種と異なり多くの 2 次基質を使用できる。それは PLP と水素結合する残基が一部異なっているためであると考えられている。2 次基質の認識範囲は似ているが、活性の違いがみられる。EcOASS-A では N-ヘテロ環に対して高い反応性を持つ。EcOASS-B ではチオール類に対して高い反応性を持ち、硫酸イオンとも反応可能である。特にチオ硫酸イオンは EcOASS-B と反応するが、EcOASS-A とは反応しない[60]–[62]。

S. typhimurium

S. typhimurium も OASS アイソザイム(StOASS-A, StOASS-B)をもつ[63]。2 次基質(硫黄源)の違いの他に OASS-A では好気条件下のみで働くが、OASS-B は嫌気条件下でも機能することが報告されている[64]。

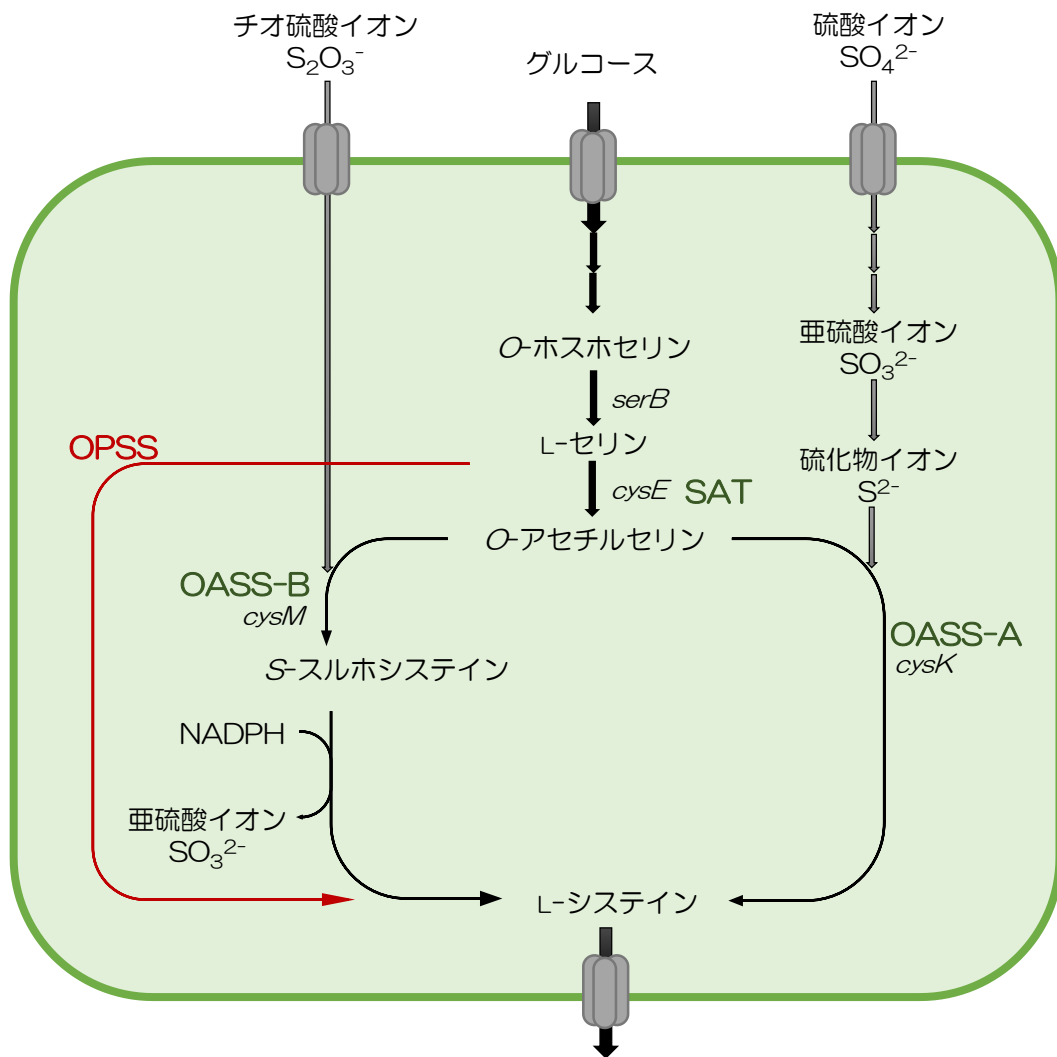


図 1.3. *Escherichia coli* の L-システイン生合成経路(赤字を除く)。微生物や植物の OASS は、O-アセチルセリン (OAS) と取り込まれた硫酸イオン/チオ硫酸イオンから L-システインを合成する。いくつかの種で見られる OPSS は O-ホスホセリン (OPS) と硫酸イオン/チオ硫酸イオンから L-システインを合成する。*E. coli* の系ではスルホシステインから L-システインへの変換の際に得られる亜硫酸イオンも OASS-A の基質として使われる。酵素名の略称は以下のとおりである。括弧内は遺伝子名である。OASS-A (*cysK*), O-acetyl-L-serine sulfhydrylase-type A; OASS-B (*cysM*), O-acetyl-L-serine sulfhydrylase-type B; OPSS, O-phospho-L-serine sulfhydrylase; SAT (*cysE*), serine acetyltransferase。

1.2.2. O-phospho-L-serine sulfhydrylase (OPSS)

OPS を基質とするシステイン合成酵素 OPSS が *A. pernix* K1 株 (ApOPSS) から初めて発見された [65], [66]。図 1.3 の赤色の矢印で示した反応である。ApOPSS はアミノ酸配列の比較から OASS-B とは一致度が高いが、当研究室の硫黄源の 2 次基質に対する活性の比較ではチオ硫酸イオンとの *S*-スルホシステイン合成反応は、硫化物イオンの L-システイン合成反応の 8% の活性であったため (未公表)、遺伝子が *cysM* に属すかは不明である。ApOPSS はまた OAS を基質としても活性がある [67]。本論文では ApOPSS が研究対象であり、ApOPSS の特徴の詳細を 1.4 に記述した。

後の研究で、OPSS はトリコモナス原虫 *Trichomonas vaginalis* と *M. tuberculosis* から発見された。*T. vaginalis* 由来 OPSS (TvOPSS) は OAS または OPS (OAS/OPS) を基質とするが、チオ硫酸イオンに対してはほとんど活性がない [17]。

M. tuberculosis に関しては、3 種類のシステイン合成酵素が存在する。遺伝子名で示すと、*cysK1* (MtCysK1), *cysK2* (MtCysK2), *cysM* (MtCysM) である [23], [29], [30]。これらの反応機構を図 1.4 に示した。MtCysK1 は OAS のみを基質とするため OASS である。MtCysK2 と MtCysM は OPS のみを基質とするため OPSS である。MtCysK1 と MtCysK2 は硫酸イオン由来の硫化物イオンを使うため遺伝子名 *cysK* が与えられている。なお、MtCysK2 はチオ硫酸イオンも基質とする。MtCysM はチオ硫酸イオンを使わないが遺伝子名は *cysM* である。MtCysM の硫黄源は thiocarboxylated CysO (CysO-SH) と呼ばれるタンパク質であり、これを基質として L-システインを合成する [21], [26]。CysO-SH を用いるシステイン合成酵素は現在 MtCysM のみで見つかっている。CysO-SH は 93 残基からなる硫黄輸送タンパク質である。CysO の SH 基を伴う C 末端が MtCysM の活性部位に入り、MtCysM は L-システインと CysO を放出する。なお、OASS/OPSS の表記が複数あるため、本論文では表 1.1 (p.4) に従った酵素名を記している。

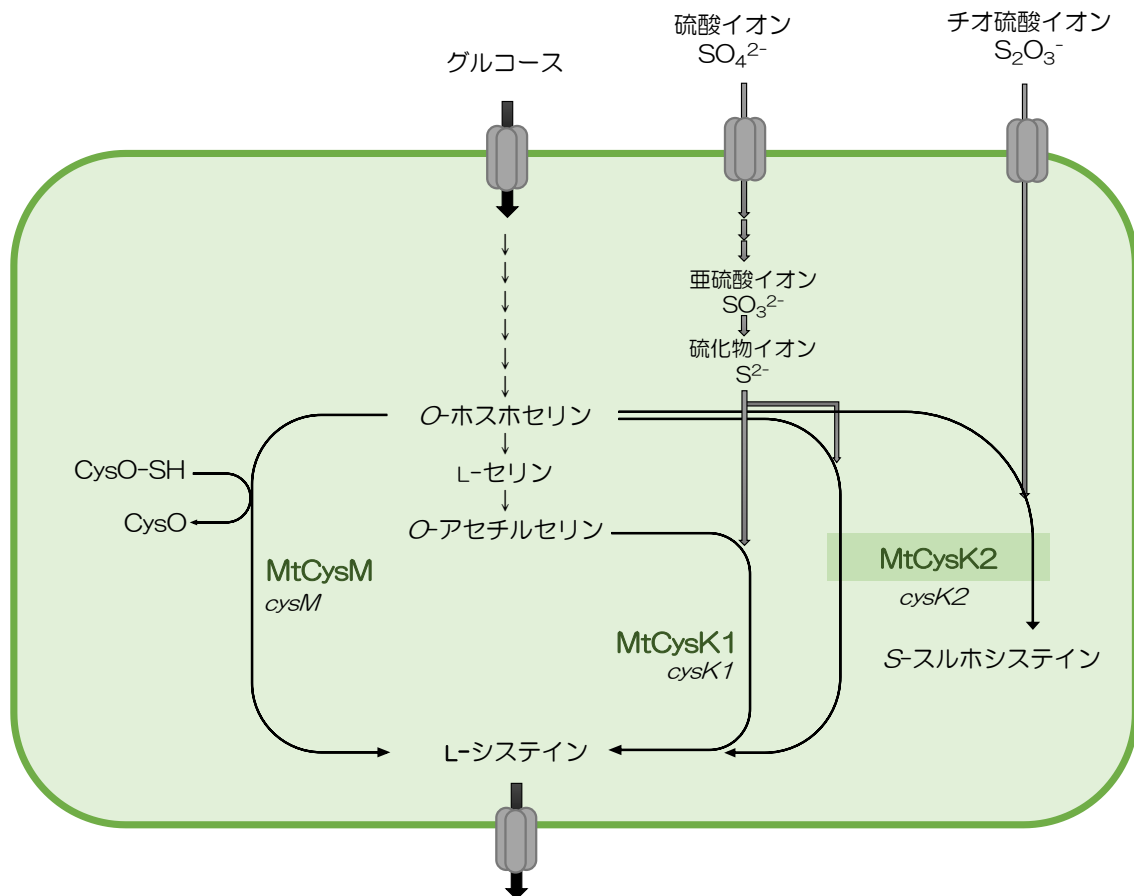


図 1.4. *Mycobacterium tuberculosis* の L-システイン生合成経路。 MtCysK1 (OASS)は OAS と硫化物イオンから、L-システインを合成する。MtCysK2 (OPSS)は OPS と硫化物イオンまたはチオ硫酸イオンから、L-システインまたは S-スルホシステインをそれぞれ合成する。MtCysM は OPS と CysO-SH から L-システインを合成する。酵素名の略称は表 1.1 のとおりである。

1.3 OASS/OPSS の反応機構

OASS/OPSS は PLP を補酵素とするフォールドタイプ II の PLP 依存性酵素である[68]–[70]。PLP 依存性酵素は触媒反応によって 7 種に分類されている。フォールドタイプ II の酵素には、1 次基質β位の置換基が外れた後、求核剤(2 次基質)が反応する触媒機構タイプのものが属し、β-シクターゼ群やβ-リアーゼ群がこれに当てはまる[71]。

図 1.5 に ApOPSS の OPS と硫化物イオンを伴う反応機構を示した。反応前、ApOPSS は PLP と K127 とで内部シッフ塩基を形成している[66]。これを内部アルジミンと呼ぶ(図 1.5 A)。OPS が活性部位に入ったとき、OPS のアミノ基と ApOPSS の K127 の側鎖のアミノ基との間でシッフ塩基の交換反応が起こる。すると、OPS と PLP の外部アルジミンが形成される(図 1.5 B)。OPS のリン酸基が脱離し、α-アミノアクリレート中間体(AA)ができる(図 1.5 C)。AA に硫化物イオンが共役付加する。最後に、L-システインが生成し、ApOPSS が再生する(図 1.5 D)。

OASS/OPSS の反応機構は ping-pong bi bi 機構である[72]。この機構は 1 次基質が反応して中間体が形成された後、続けて 2 次基質が反応する。OASS/OPSS の 1 次基質は OAS/OPS、中間体が AA、2 次基質が硫化物イオン/チオ硫酸イオンである。

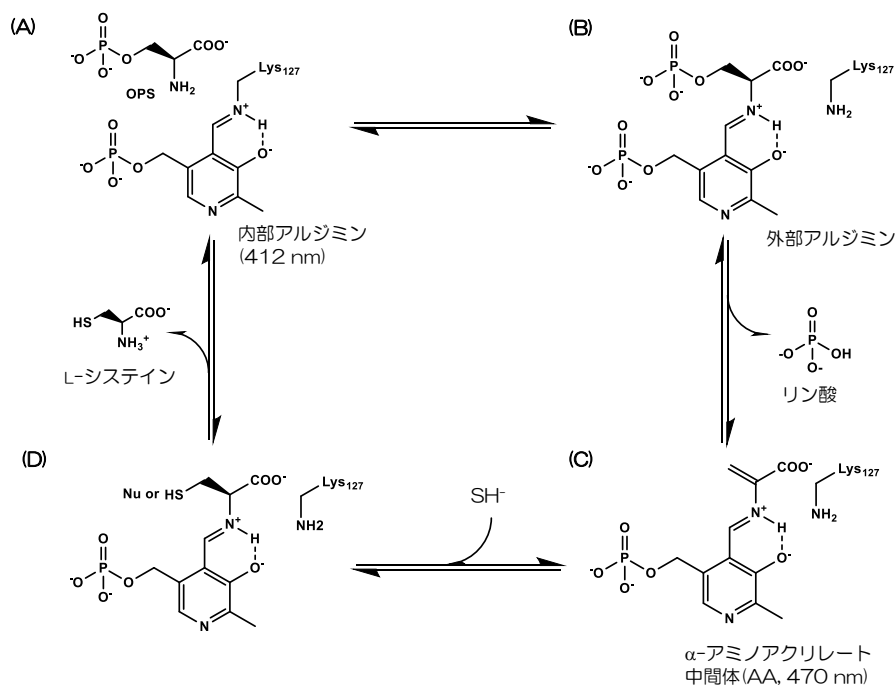


図 1.5. ApOPSS の反応機構。内部アルジミンを形成するリジンは PLP 依存性酵素では保存されている。1 次基質として OPS の代わりに OAS を使用した場合や 2 次基質としてチオ硫酸イオン(S₂O₃²⁻)を使用した場合でも、同様の反応が起こる。チオ硫酸イオンの場合 S-スルホシステインを生成する。

1.4. 研究対象 *Aeropyrum pernix* K1 由来 OPSS について

超好熱性好気性古細菌 *A. pernix* K1 株は、1993 年に鹿児島県小宝島沿岸の 90-95°C の熱流気孔から単離され、全ゲノムが解読された[13], [73]–[75]。2003 年に *A. pernix* において、至適温度 80°C 程度の耐熱性 OASS の存在が明らかになった[67]。*A. pernix* 由来 OASS は 1 次基質に OPS も用いた。このときシステイン合成酵素で初めて OPS を使う酵素として発見され、2005 年に OPSS と名付けられた[65], [66]。これら論文で 1 次基質 OPS と OAS の性質の違いの一つとして熱安定性が示された。ApOPSS を用いた実験において、OAS/OPS を 85°C で 10 分間反応させると、OPS は分解されず活性を維持しているが、OAS は 85°C では熱分解してしまうため、0 分時の 85°C で OAS を加熱しないときの酵素反応したときの活性の 10%に満たなかった。*A. pernix* は高温環境で生育するため、OAS よりも熱に強い OPS を使用することは理にかなっていると考察されている[65]。

その後の ApOPSS の研究は、ApOPSS の酵素反応における残基の役割推定が中心に行われてきた。2005 年、野生型 ApOPSS (野生型 free)の結晶構造が初めて決定された(PDB ID: 1WKV)[66]。3つのドメインから構成されるモノマーは 389 残基であり、全体で 42 kDa、ダイマーの PLP 依存性酵素であった(図 1.6)。図 1.5 のように、PLP は K127 とシッフ塩基を形成している(内部シッフ塩基)。ここで、ApOPSS の活性ポケット入り口付近にある R297 が OPS の取り込みをしていると推定された。2012 年には、K127A 変異体 ApOPSS (K127A 変異体)と OAS/OPS との複合体結晶構造取得と、野生型 free の構造の取り直しが行われた[76]。以前の報告の野生型構造(PDB ID: 1WKV)では、結晶化溶媒由来の酢酸イオンが活性部位に入っていたためであった。加えて変異体による活性の比較から 4つの残基の推定に至った。表 1.2 (p.15)、図 1.7 (p.15)に残基の役割のまとめと立体構造を示した。

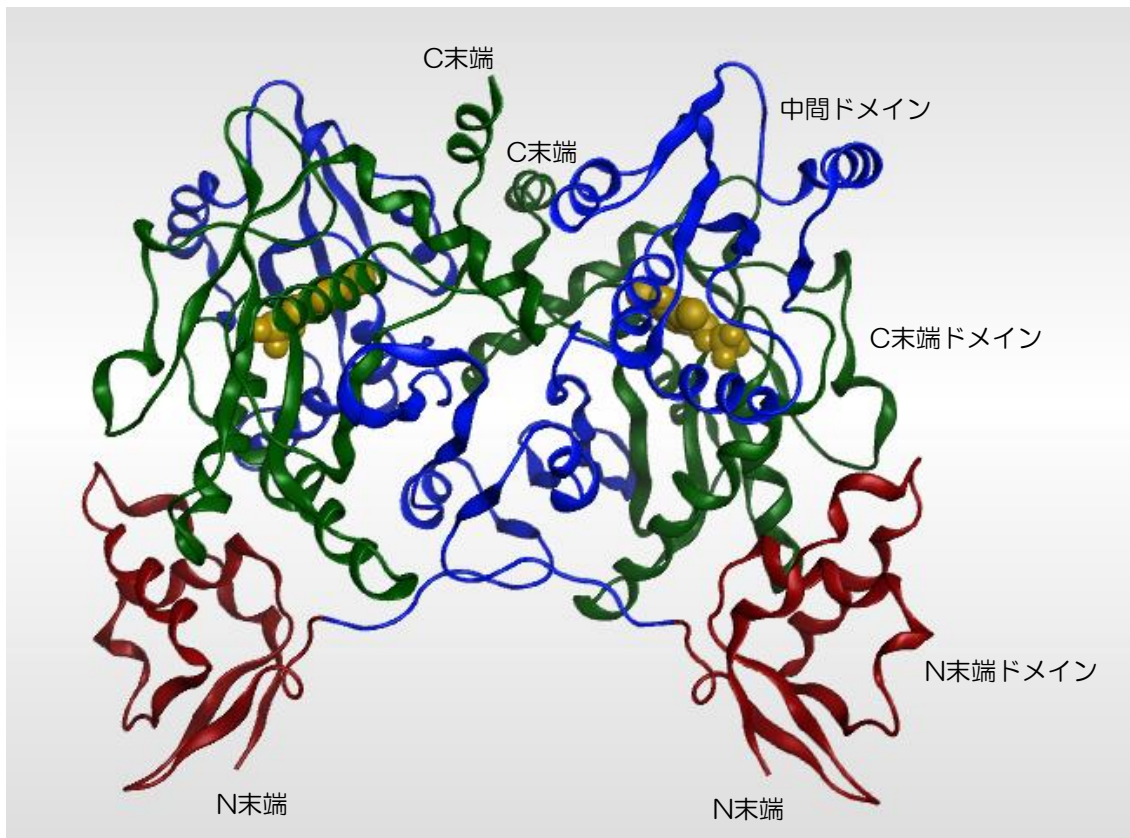


図 1.6. ApOPSS の立体構造。3つのドメインからなる。PLP を伴う活性部位は、中間ドメインとC末端ドメインの間に位置する。黄色の Sphere 表示が PLP、リボン表示の赤がN末端ドメイン(残基 2-73)、青が中間ドメイン(残基 77-224)、緑がC末端ドメイン(残基 226-383)である。ApOPSS の N 末端ドメインは他の微生物や植物由来の OASS/OPSS では存在せず、独特のドメインである。この N 末端ドメインの機能は知られていない。PDB IDが3VSAである構造を使用して molecular operating environment (MOE)により図を作成した。

表 1.2. ApOPSS の反応に関わると推定された残基。

残基	役割
K127	PLPと共有結合している。
T152	OPS またはOAS のカルボン酸部位の認識に必須。
S153 ^a	OPS のリン酸基の脱離を触媒する求核試薬の可能性はある。ただし、OPS を認識しない類似酵素でも完全に保存されている。
T203 ^a	OAS においてはポケット内部を親水性にする事で反応を促進、OPS においては弱い水素結合で認識し、OASを基質とする場合より反応促進に影響を与えると予測されている。
Q224	OPS またはOAS のカルボン酸部位の認識に必須。
R297	OPS をポケットに誘導するために必要。

^a S153 と T203 は機能が確定していない。

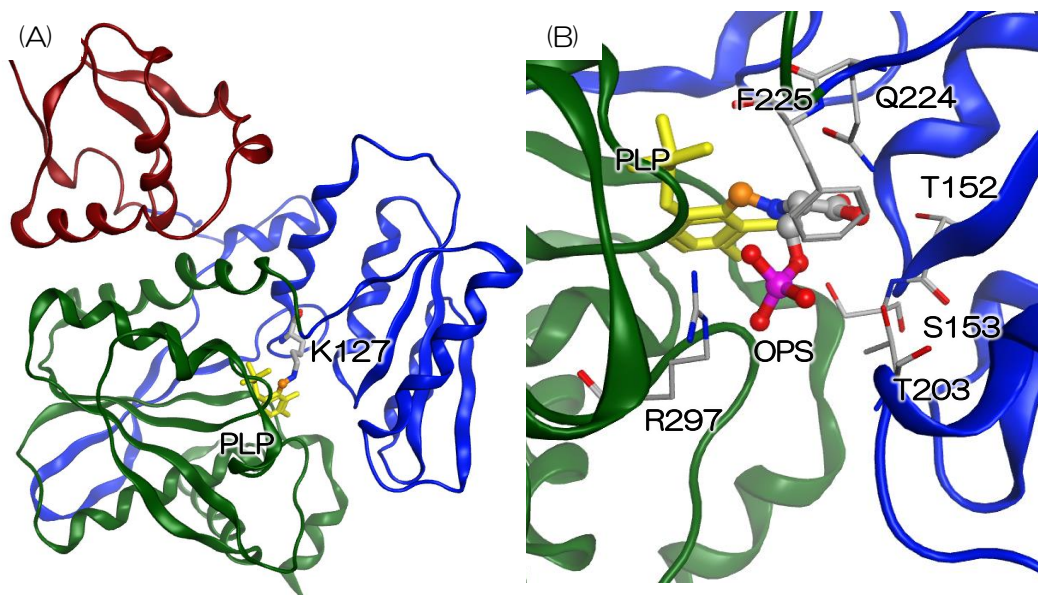


図 1.7. ApOPSS において推定された残基の位置。(A)モノマーでの立体構造。黄色が PLP である。橙色の原子は PLP の C4A 原子で、シッフ塩基の交換がこの C4A 原子で K127 や 1 次基質のアミノ基との間で行われる。(B)活性部拡大図。Ball&Stick 表示は OPS である。表 1.2 の反応上の役割が推定された残基を Stick 表示で示した。F225 は第 2 章で着目した残基である。リボン表示の赤が N 末端ドメイン(残基 2-73)、青が中間ドメイン(残基 77-224)、緑が C 末端ドメイン(残基 226-383)である。

1.5 OAS/OPS の認識残基について

前述のように、OPS の認識には活性部位の Arg (ApOPSS の R297) が関わる
ことが知られている。ApOPSS を含む微生物や植物のシステイン合成酵素
OASS/OPSS のアミノ酸配列アラインメントを巻末の図(p.75-80)に示した。な
お、アラインメントの作成方法は第 3 章の 3.2.1 (p.44)に記述した。図の緑色
(p.79)で示した列が、ApOPSS の R297 とそれに対応する各生物種のシステイン
合成酵素のアミノ酸である。この列に対する TvOPSS の Lys を Ala に置換した
変異体では、OPS に対する活性が損なわれたという報告がある[17]。また、OPSS
である MtCysM や MtCysK2 では Arg であり、MtCysM の Arg (R220)を Ala
に置換した変異体では、TvOPSS と同様に活性が損なわれた[29]。このことか
ら、活性部位の Arg や Lys は OPS の認識に関わると言える。しかし、MtCysK2
の Arg (R243)を Ala に置換した変異体では、OPS に対する k_{cat}/K_m に差がほと
んど見られなかったことや、EcOASS-B と StOASS-B は Arg を持つにもかかわ
らず、OPS を認識することができないことが知られている[30], [41]。

また、OAS に対して特異的に関わる残基の報告はない。

本論文では、ApOPSS の研究の続きを行っている。ほとんどの微生物や植物
に保有されるシステイン合成酵素は、1 次基質としてどちらかのみを認識する。
なぜ ApOPSS が広い基質特異性を持つのか。本研究では、「ApOPSS が
OAS/OPS の両方を認識できる残基を持っていることで両方の 1 次基質を認識で
きるのではないか」という仮説の検証を試みた。この検証により 1 次基質の認
識の区別にどの残基が関わっているのかを知ることができると考えられる。第 2
章では、図 1.5 における(A)と(C)と(D)の構造すなわち、反応機構の野生型-AA
複合体と野生型-L-システイン複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により取得
した[77]。そして、基質や生成物の出入りが、ApOPSS のどの残基に影響する
かを構造比較から確認した。第 3 章では、第 2 章で着目した残基の変異体から、
ApOPSS における OAS/OPS の基質認識に関与する残基の推測を試みた。

2. ApOPSS の酵素触媒反応における F225 の役割

2.1. Introduction

いくつかの OASS では、野生型 free と OASS-基質類似物複合体結晶構造が比較されている[23], [40], [44], [50], [78], [79]。OASS は N 末端ドメインと C 末端ドメインの 2 つのドメインで構成されている。補酵素 PLP を伴う OASS の活性部位は、小さい N 末端ドメインと大きい C 末端ドメインによって形成される溝に位置する。基質や基質アナログが活性部位にあると、N 末端ドメインごと閉じる方向に動き、活性部位を狭くすることが知られている。

本研究対象の ApOPSS は、図 1.7 (p.15)のように 3 つのドメインで構成される。活性部位は中間ドメインと C 末端ドメインとの溝に位置する[66]。本章では ApOPSS に対して AA および生成物との複合体構造を得ることで、OASS のような構造変化の観測を試みた。

過去に得られた ApOPSS の結晶構造は、以下の 3 つであり、スキーム上では図 2.1 の①②に当たる部分である。しかし、1 次基質 OAS/OPS の入った結晶構造では、OASS のようなドメインが動くような構造変化は見られなかった。

- 野生型 free (PDB ID: 3VSA、図 2.1 ①)
- K127A 変異体-OPS 複合体(PDB ID: 3VSC、図 2.1 ②)
- K127A 変異体-OAS 複合体(PDB ID: 3VSD、図 2.1 ②)

1 次基質との複合体形成に ApOPSS の K127A 変異体を使用しているのは、ApOPSS と 1 次基質との反応を止めるためである(図 2.2, p.19)。K127 は 1 次基質が入ると内部アルジミンからシップ塩基の交換反応を起こし、その後 1 次基質と PLP の外部アルジミン形成への反応に関わる。ここで K127A 変異体では、1 次基質が活性部位に入ってきててもこの反応が起こらない。

本章では、どの残基が 1 次基質と相互作用に関わるかを推測するために、野生型 free と野生型-AA 複合体と野生型-L-システイン複合体構造を比較した。まず、ApOPSS の以下の 2 つの構造を得て、重ね合わせによる比較を行った。

- 野生型-AA 複合体(PDB ID: 5B3A 図 2.1 ③)
- 野生型-L-システイン複合体(PDB ID: 5B36 図 2.1 ④)

その後、これらの構造の比較により動きの見られた残基の役割推定を行った。

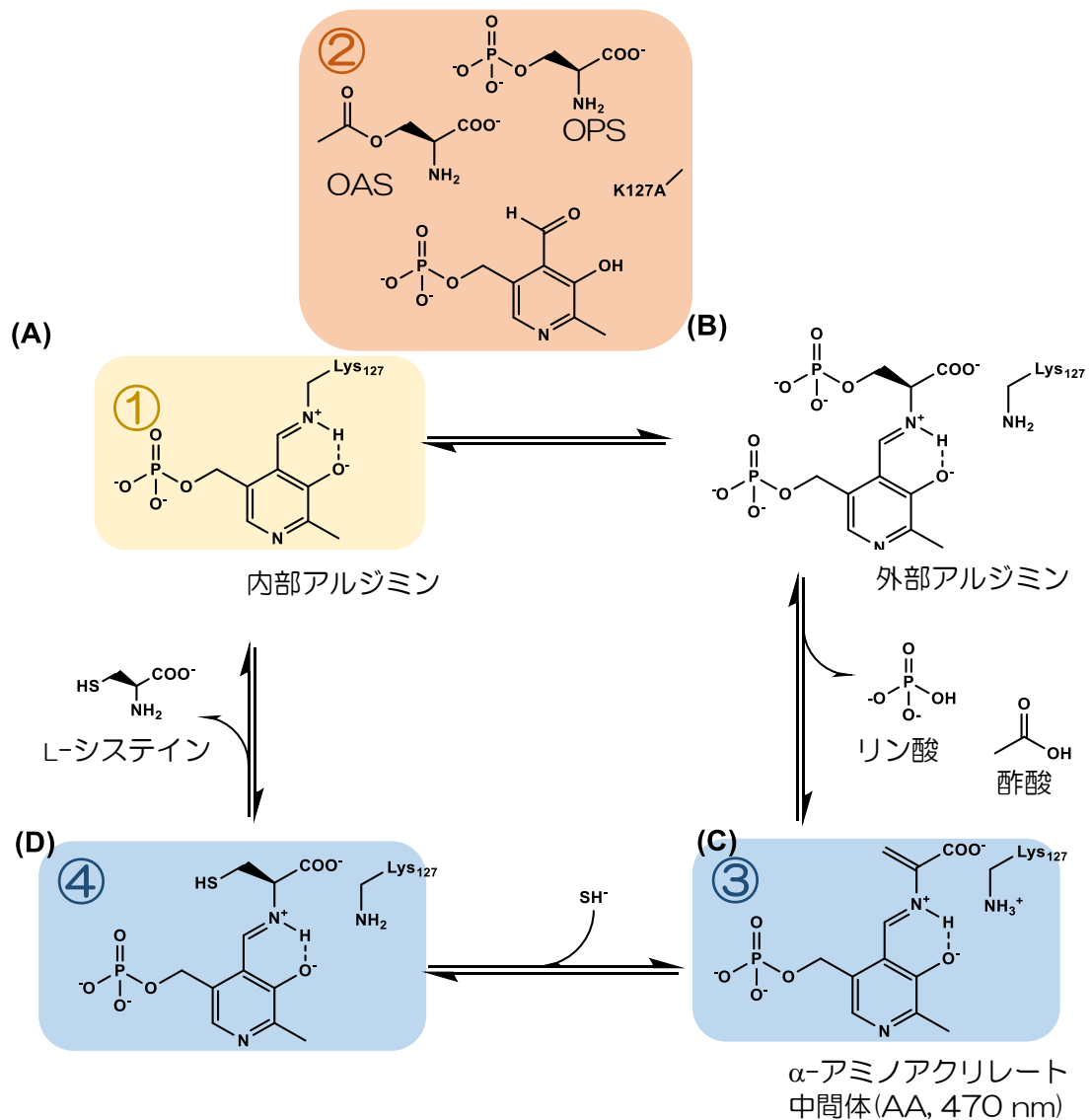


図 2.1. ApOPSS の反応機構と取得された結晶構造。黄色①と橙②が過去に得られた構造である。青③と④が本研究で得た構造である。①野生型 free (PDB ID: 3VSA)、② K127A 変異体-OPS 複合体 (PDB ID: 3VSC)、③ K127A 変異体-OAS 複合体 (PDB ID: 3VSD)、④ 野生型-AA 複合体 (PDB ID: 5B3A)、⑤ 野生型-L-システイン (PDB ID: 5B36)。

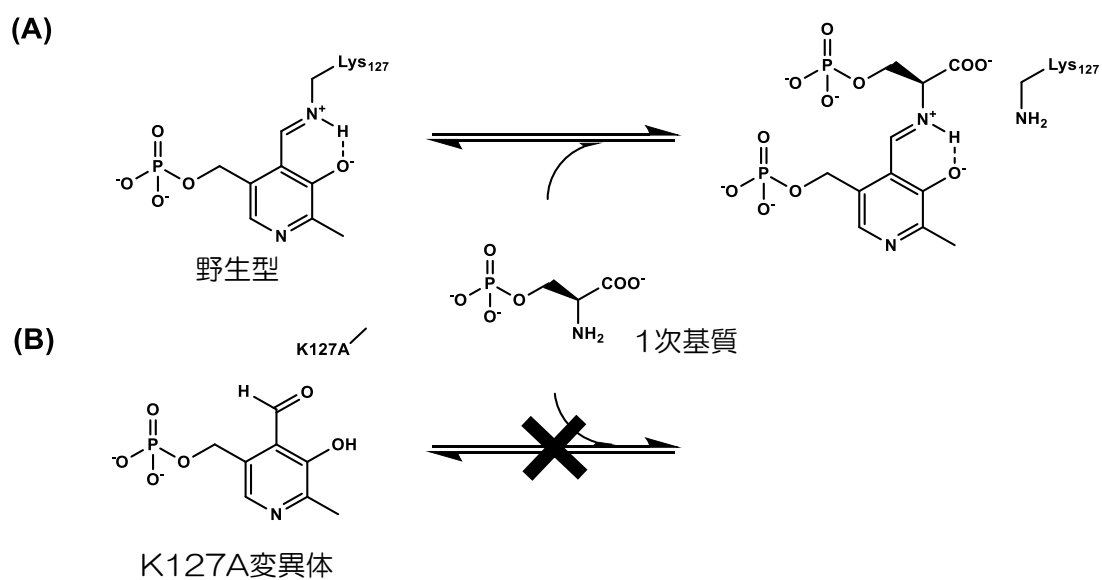


図 2.2. K127A 変異体による 1 次基質複合体結晶構造の取得。(A) 野生型に 1 次基質を添加した場合。1 次基質は、K127 によるシッフ塩基の交換反応が起き、反応が進行する。(B) K127A 変異体に 1 次基質を添加した場合。1 次基質はシッフ塩基の交換反応が起こらない。先行研究(p.18、図 2.1 ①②)や本研究第 3 章(p.44)の結晶構造では、一時的に活性部位に入った 1 次基質との複合体構造の構造解析を行ったものである。

2.2. Materials and Methods

2.2.1. プラスミドの作製

ApOPSS(ORF APE1586)の遺伝子が pET-3d (Novagen)に組み込まれたプラスミド(pApOPSS)は K. Mino と K. Ishikawa から譲り受けたものである[67]。

F225 を Ala に置換した ApOPSS 変異体(F225A 変異体)プラスミドは、KOD-plus[®] mutagenesis kit (Toyobo)を用いて、部位特異的変異導入により作製された。テンプレートの pApOPSS と 2 つのプライマーを用いた(5'-GCCTACAACGACGCTAACTTCGAGG- 3', 5'-CTGGTTCACGTGAACGAACC- 3')。下線部は変異導入箇所を示している。変異を加えた全配列をジデオキシ法により DNA シーケンサー(Applied Biosystems 3130xl genetic analyzer; Life Technologies Japan, Tokyo)を用いて確認した。

2.2.2. 酵素発現と精製

ApOPSS を発現させるためにレアコドンに適応した *E. coli* Rosetta (DE3, Merck)に 2.2.1 で作製したプラスミドを組み込み、100 µg/ml カルベニシリン(Nacalai)を含む Lysogeny Broth 寒天培地にプレーティングした後、37°C で 20 時間置いた。得られたコロニーを 100 µg/ml カルベニシリン、34 µg/ml クロラムフェニコール(Nacalai)、0.001% ピリドキシン(Nacalai)、0.001%チアミン(Nacalai)を含む 0.5 L の NZCYM 培地に加えた。37°C、140 strokes/min で振盪した。培養液の 600 nm における吸光度が 0.6 に到達したときに、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Nacalai)を終濃度 0.01%で加えた。その後 2 日間、37°C、100 strokes/min で培養した。4 本の遠沈管に菌体をペレットとして回収した。1 本につき 25 ml の 2 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, 同仁化学研究所), 1 mM dithiothreitol (DTT, Nacalai), 0.2 mM PLP (Nacalai), and 0.15 M sodium chloride (NaCl, Nacalai)を含む 50 mM potassium phosphate buffer (bufferA, pH 7.5)を加えた。その後氷上で冷却状態を保ちながら超音波破碎機で 1 本のチューブにつき合計 5 分間破碎し、細胞片を遠心分離により取り除いた(18000 × g, 30 分間、4°C)。上澄みに PLP を終濃度 1 mM となるように加え、30 分間 4°C で攪拌した。この溶液を 85°C で 50 分間熱処理した。遠心分離して(18000 × g, 35 分間、4°C)得られた上清に終濃度 50%となるように硫酸アンモニウムを加え、30 分間攪拌した。溶液を遠心分離し(18000 × g, 35 分間、4°C)、タンパク質を沈殿させた。沈殿を 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mM PLP を含む 5 ml の 50 mM potassium phosphate buffer (buffer B, pH 7.5)で溶解した。buffer B で平衡化された HiTrap Q HP col-

umn(陰イオン交換カラム、GE Healthcare Life Sciences)にタンパク質溶液を加え、タンパク質用クロマトグラフィシステム ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Sciences)を用いて NaCl 濃度を 0.1 M へと高めていき、フラクションを回収した。ApOPSS の分子質量は 42 kDa である。各フラクションの SDS-PAGE の結果から 42 kDa 付近で発現量の多いフラクションを回収し濃縮した。続けて、PD-10 (脱塩・バッファー交換用自然落下カラム、GE Healthcare Life Sciences)を用いて、タンパク質溶液を buffer A に置換した。buffer A で平衡化した Superdex 200 pg column (ゲル濾過カラム、GE Healthcare Life Sciences)にタンパク質溶液を通し、フラクションを回収した後、SDS-PAGE の結果から ApOPSS のみが含まれているフラクションを集めて濃縮した。精製した ApOPSS は用途により保存方法を変えた。結晶化以外の測定に使用した ApOPSS は、PD-10 を用いて、buffer A 中で終濃度約 10 mg/ml, -80°C にて保存した。結晶化に使用した ApOPSS は、0.1 mM PLP, 2 mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP-HCl)を含む 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 に置換し、終濃度約 20 mg/ml, -80°C にて保存した。酵素濃度は、Bovine Serum Albumin Standard Set (Thermo SCIENTIFIC)を標準溶液に用い Bradford 法により決定した。

2.2.3. 結晶化

野生型-AA 複合体と野生型-L-システインの立体構造を得るために、先行論文を参考に、野生型の結晶化実験を行った[80]。結晶化条件を検討するために、StockOptions™ Na HEPES (HAMPTON RESEARCH)を用い、溶媒の pH を最適化した。結晶化溶液には 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid sodium (Na HEPES, pH 6.8-8.2)、polyethylene glycol 4000 (PEG4000, HAMPTON RESEARCH)、2-propanol (HAMPTON RESEARCH)、TCEP-HCl を用いた(リザーバー溶液)。精製ごとに得られた野生型の結晶化条件の溶液組成が異なるため、結晶化溶液の組成は結果の項目にて示した。野生型の結晶はハンギングドロップ法を用いて作製した。20 mg/ml 野生型の溶液とリザーバー溶液を各 1 µl 混合しドロップを作製した。ドロップは表面をシリコナイズ L-25(富士システムズ)でシリコン加工したガラス板(松浪)に乗せた。リザーバーとガラス板の接触面にグリース HIVAC-G (信越シリコン)をつけた。リザーバー(サンプルラック)に 250 µl のリザーバー溶液を入れ、ドロップに乗せたガラス板を接着させた。結晶のドロップがついたリザーバーを 23°C で静置した。

2.2.4. 構造精密化

野生型-AA 複合体と野生型-L-システイン複合体の結晶構造を得るためには、

野生型の結晶に 1 次基質/生成物と抗凍結剤の浸潤(ソーキング)が必要である。野生型-AA の回折データ取得には OPS、野生型-L-システイン複合体の回折データ取得には L-システインを浸潤した。抗凍結剤は、急速凍結による水分子結晶(氷)の析出とそれによるタンパク質結晶の損傷を防ぐものである。これらを浸潤させるために、終濃度 20 mM の OPS/L-システインと抗凍結剤である終濃度 6% の(+/-)-2-methyl-2,4-pentanediol (MPD, HAMPTON RESEARCH)が含まれた人工結晶母液を作製した。0.3 × 0.1 × 0.1 mm 程度の野生型の結晶をこの溶液に 30 分間浸した。

X 線回折実験には、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL44XU、検出器 Mar300HE (Rayonix)を使用し、1つのスナップショット当たり振動角 0.5°、露光時間 2 秒、検出距離 250 mm、波長 0.9 Å の条件により、X 線回折データを得た。回折実験は結晶をループマウントし、吹き付け乾燥窒素(100K)でフラッシュ凍結して行った。取得した回折像を回折データ処理ソフト HKL2000 を用いて指数付け(indexing)および回折強度積分を行った[81]。HKL2000 での indexing により、格子定数から tetragonal 結晶系、逆空間対称性と消滅則から P4₃2₁2/P4₁2₁2 が示唆され、結晶系および格子定数が先行論文で得られている野生型 free の結晶とほぼ同じであることから、P4₃2₁2 を仮定し、分解能 2.15 Å までの反射について scaling および data merge を行ったところ、R_{merge} 値は 0.1 であった[80]。

次に、構造解析ソフトウェアパッケージ Collaborative Computational Project No. 4 (CCP4i)を用いて、既知の立体構造の野生型 free (PDB ID: 3VSA)をサーチモデルとして、分子置換法により位相を決定した[82]。得られた初期電子密度マップ(野生型-AA 複合体の R 値 0.263, 野生型-L-システイン複合体の R 値 0.260)で分子構造が明確に観察されたことから、空間群を P4₃2₁2 (# 96)で確定した。

立体構造構築ソフト Coot と CCP4i を用いて以下のように精密化した[83]。まず CCP4i の REFMAC5 を用いて構造の精密化計算を行い、Coot で分子モデルと電子密度マップの一致を確認し、必要であれば手動でモデルの修正を行い、リガンド分子と溶媒分子を付加した。この精密化サイクルを構造精密化の指標である R 値と freeR 値(反射データの 5%を使用)が下がるのを確認しながら繰り返し、野生型-AA 複合体では R 値 0.148、freeR 値 0.216 で、野生型-L-システイン複合体では R 値 0.180、freeR 値 0.246 で、精密化を終了した。

最終モデルの評価のために RAMPAGE を用いて Ramachandran plot を作成したところ、野生型-AA 複合体では 96.5%、野生型-L-システイン複合体では 97.4%の残基が少なくとも generously allowed region に存在した[84]。また、化学結合長、結合角の標準値からの rmsd 値は、それぞれ野生型-AA 複合体では

0.024 Å、2.0°、野生型-L-システイン複合体では 0.024 Å、2.1°であったことから、妥当な分子モデルが得られたと判断した。最終モデルは Protein Data Bank (PDB)に供託した(野生型-AA 複合体の PDB ID: 5B3A, 野生型-L-システイン複合体の PDB ID: 5B36)。

2.2.5. 構造重ね合わせ

OASS に見られるような構造変化を見るために、各反応ステップの 3 つの構造(野生型 free、野生型-AA 複合体、野生型-L-システイン)を重ね合わせた。molecular operating environment (MOE, Chemical Computing Group)を用いて、構造の C α を基準に比較し、Root mean square deviations (RMSDs)を算出した。

残基単位での比較には、モデル座標算出システム COMP3D を用いた。COMP3D では、立体構造重ね合わせをの C α を基準に行い、各アミノ酸の側鎖ごとに RMSD を算出した[85]。この比較は野生型 free と野生型-AA 複合体間、野生型-AA 複合体と野生型-L-システイン複合体間で行った。

2.2.6. L-システイン合成活性

ApOPSS の F225 の役割を推定するために、野生型と F225A 変異体の活性を測定した。OAS/OPS と硫化物(Na₂S)による L-システインの合成活性を、酸ニンヒドリン試薬を利用した比色定量法により測定した[86]。酸ニンヒドリンは L-システインと特異的に反応し、ピンク(560 nm)に呈色させる。1次基質の OPS と OAS は至適 pH と温度が異なるのでそれぞれに合わせた測定を行った[65], [67]。

OPS: OPS と 0.2 mM PLP と 1 mM DTT を含む 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 を 80°C で 3 分間インキュベーションした。そこに Na₂S と ApOPSS を加え L-システインの合成反応を開始させた。ApOPSS を加えた時点が反応開始時間である。反応溶液は 600 μ l とした。一定時間ごとに反応溶液 12 μ l を取り、6 μ l の 20 % (v/v) trichloroacetic acid に加え酵素反応を停止させた。酸ニンヒドリン溶液は、ニンヒドリン 250 mg、塩酸 4 ml、酢酸 6 ml の組成で調製した。酵素反応液に酸ニンヒドリン溶液を 54 μ l 加え 99°C で 10 分間インキュベーションした。その後 1 分間氷上で冷却して軽く遠心後、100% cold ethanol を 108 μ l 加えた。この溶液を 150 μ l 移し、96 穴プレートリーダー(Varia Max, Molecular Devices) で 560 nm における吸光度を測定し決定した。

野生型の測定において、OPS に対する活性測定では 4 mM Na₂S 存在下で、30-120 mM OPS (30, 40, 60, 80, 100, 120 mM)の濃度範囲で測定した。Na₂S に対する活性測定では 80 mM OPS 存在下で、1-6 mM Na₂S (1, 1.5, 2, 3, 4, 6

mM)の濃度範囲で測定した。野生型の酵素量は 120 ng とした。

F225A の測定において、OPS に対する活性測定では 4 mM Na₂S 存在下で、20-120 mM OPS (20, 30, 40, 60, 80, 100, 120 mM)の濃度範囲で測定した。Na₂S に対する活性測定では 80 mM OPS 存在下で、0.5-6 mM Na₂S (0.5, 1, 2, 3, 4, 6 mM)の濃度範囲で測定した。F225A の酵素量は 630 ng とした。

OAS: pH 6.7、60°C にて測定を行った。他の条件は OPS と同様である。

野生型の測定において、OAS に対する活性測定では 6 mM Na₂S 存在下で、6-36 mM OAS (6, 12, 18, 24, 36 mM)の濃度範囲で測定した。野生型 ApOPSS の酵素量は 840 ng とした。Na₂S に対する活性測定では 80 mM OAS 存在下で、1-6 mM Na₂S (1, 2, 4, 6 mM)の濃度範囲で測定した。

F225A 変異体の測定において、OAS に対する活性測定では 6 mM Na₂S 存在下で、20-80 mM OAS (20, 40, 80 mM)の濃度範囲で測定した。Na₂S に対する活性測定では 80 mM OPS 存在下で、1-6 mM Na₂S (1, 2, 4, 6 mM)の濃度範囲で測定した。F225A 変異体の酵素量は 5700 ng とした。

2.2.7. 分光計による AA 減少度の経時変化測定

F225A 変異体と野生型で AA の分解時間が異なるかを検証した。ApOPSS は内部シッフ塩基を形成しているとき、416 nm に吸収を持つ。ApOPSS に 1 次基質を加えると、470 nm に吸収を持つ AA が形成される(図 2.1, p.18) [66]。酵素内の AA は硫黄源が入らなければ、活性部位に AA が残る。しかし、PLP との共有結合に関わる Lys は形成した AA と再度シッフ塩基を交換し、イミノピルビン酸を放出する(図 2.3)[87]。

F225 が AA の分解度に関わるかを検証するために、野生型と F225A 変異体にそれぞれ同じモル濃度の OPS を添加し、AA の分解時間を 470 nm の吸光度変化(吸光度の減少)で確認した。終濃度 0.8 mg/ml 酵素、0.2 mM PLP 含有 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5、1 mM OPS で測定溶液を調製し、600-200 nm の波長を 80°C で測定した。2 分おきに、470 nm の吸光度の減少がなくなるまで測定した。V-630_{BIO} (日本分光)を用い、セル幅 0.5 mm、走査速度 200 nm/min、データ間隔 1 nm で測定した。

野生型と F225A 変異体の OPS に対する基質濃度範囲は、それぞれ 7.8-210 μM (7.8, 16, 31, 46, 61, 77, 92, 120, 150, 210 μM)と 7.8-1500 μM (7.8, 16, 31, 46, 61, 77, 110, 170, 230, 350, 590, 820, 1100, 1300, 1500 μM)である。野生型と F225A 変異体の OAS に対する基質濃度範囲は、それぞれ 7.8-92 μM (7.8, 16, 31, 46, 61, 77, 92 μM)と 7.8-13000 μM (7.8, 39, 160, 410, 890, 1700, 2500, 3600, 7200, 13000 μM)である。

2.2.8. ピルビン酸測定

2.2.7 と同様、引き続き F225 が AA の分解度に関わるか検証した。

酵素内の AA の分解反応を図 2.3 (p.28)に示した[87]。ApOPSS の活性部位に OPS が入ってくると(A)、PLP への OPS のアミノ基転移が起こる(B)。その後 OPS のリン酸が脱離し、AA が形成される(C)。K127 の側鎖は脱プロトン化・プロトン化が平衡状態にある(C, D)。プロトンが脱離した K127 は外部アルジミンとシッフ塩基を交換し、イミノピルビン酸が放出される(E, F)。イミノピルビン酸は水分子によってピルビン酸とアンモニアになる(G)。この反応は平衡反応である。律速段階は不明である。この反応上で F225 が関わると仮定した場合、フェニル基のない F225A 変異体では活性部位が溶媒にさらされやすくなっており、イミノピルビン酸ができやすくなることが考えられる。その結果、イミノピルビン酸が加水分解して生成するピルビン酸の生成量が野生型 ApOPSS よりも多くなると考えられる。このことを検証するために、先行論文の方法と同様に、最終段階で生成されるピルビン酸を乳酸脱水素酵素(LDH)を用いて測定した[87]。

LDH と nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)によってピルビン酸は乳酸へと分解する。この時、反応とともに 340 nm に吸収を持つ NADH ($\epsilon=6220$)の吸光度が減少する。NADH 由来の 340 nm の吸光度変化を分光計 V-630Bio(日本分光)にて測定し、各酵素に対する AA から生じたイミノピルビン酸の水による分解速度を調べた。

終濃度が 100 mM 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)バッファー pH 7.5, 0.4 mg/ml 酵素, 10 mM OPS, 14 mM NADH の反応溶液を 80°C で 10 分間インキュベーションした。反応液冷却のため、反応液を光路長 0.1 cm のセルに移した後、25°C で 10 分間静置した。続けて、反応液に 0.025 U LDH を添加し、20 秒後に 5 秒間隔で 340 nm の吸光度変化を追跡した。吸光度変化の傾きから NADH のモル吸光係数を用いてピルビン酸の生成速度を算出した。1 mol のピルビン酸から 1 mol の NADH が消費されるため、減少した NADH 濃度を生成したピルビン酸濃度として算出した。なお、1 U は 1 分間に 1 mol のピルビン酸を生成する LDH の量である。

また、酵素と OPS を 80°C、5 分でインキュベーションしたときの NADH 消費量と酵素と OPS を 80°C、20 分でインキュベーションしたときの NADH 消費量を比較した。

コントロール: 100 mM MOPS バッファー pH 7.5, 0.4 mg/ml 野生型, 14 mM NADH の反応溶液を 80°C で 5 分間インキュベーションした。反応液冷却のため、反応液を光路長 0.1 cm のセルに移した後、25°C で 10 分間静置した。続け

て、反応液に 10 U LDH を添加し、8 分後の 340 nm の吸光度を測定した。

80°C、5 分：100 mM MOPS バッファー pH 7.5, 0.4 mg/ml 野生型または F225A 変異体, 1 mM OPS, 14 mM NADH の反応溶液を 80°C で 5 分間インキュベーションした。反応液冷却のため、反応液を光路長 0.1 cm のセルに移した後、25°C で 10 分間静置した。続けて、反応液に 10 U LDH を添加し、8 分後の 340 nm の吸光度を測定した。

80°C、20 分：上記の条件の 5 分間のインキュベーションを 20 分間に変更し、野生型に対して測定を行った。

2.2.9. AA 形成度(K_{AA})の測定

ApOPSS 内で PLP と 1 次基質が形成する AA は、酵素溶液に 1 次基質を滴下していくことで測定することができる[88]。このときの AA 形成度を K_{AA} と表した(図 2.4, p.29)。

1 次基質の OPS と OAS は至適 pH が異なるため、それぞれ pH 7.5、pH 6.7 に合わせて測定を行った。酵素 480 μ g (0.2 mg/ml)を含む 100 mM potassium phosphate buffer 600 μ l を光路長 0.5 mm のセルに入れた。OAS/OPS を混合し、20 秒後に 600-250 nm における吸光度を 25°C で V-630_{BIO} (日本分光)を用いて測定した。滴下を繰り返し K_{AA} が算出可能になるまで測定した。走査速度 200 nm/min、データ間隔 1 nm でデータ回収した。測定データから 470 nm の吸光度を抽出し、グラフ算出ソフト Sigma Plot 10.0 (Systat Software)の Hyperbola equation から K_{AA} (μ M)を求めた。

Hyperbola equation: $A = a \times x / (b + x)$

A は吸光度、a は 470 nm の最大吸光度、b は K_{AA} 、x は 1 次基質の濃度である。

2.2.10. ドッキングシミュレーション

野生型と F225A 変異体に対する 1 次基質との相互作用を見るために、MOE (ver. 2013.01.17)を用いてドッキングシミュレーションを行った。まず、F225A 変異体のモデルを作製した。野生型(PDB ID: 3VSA)に対し、Protonate 3D により水素原子を付加した。MOE の Rotamer Explorer function を用い F225 を Ala に変換した。次に MOE の Site finder を用いて、活性部位の親水性・疎水性領域を計算し(Alpha site)、活性部位の領域の Alpha site を選出した。Alpha site に対して、MOE の ASEDock により OAS/OPS のドッキングを行った。計算後に得られた 8-10 個の構造に対して、1 次基質の N と PLP の C4A 間の距離が 4 Å 以内であり、1 次基質のアミノ基の N と PLP の C4A、NZ の角度が 90°に近い構造を、反応が進行する構造として選択した(図 2.5, p.30)。この構造に対し、力

場 Amber12: EHT によるエネルギー極小化計算を RMS が $0.001 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$ 以下になるまで行い、得られた構造を比較した。

2.2.11. 立体構造の表面表示

野生型と F225A 変異体の活性ポケットの変化を見るために、**surface** 表示でのモデル比較を行った。野生型の **surface** 表示には、野生型-AA 複合体構造(PDB ID: 5B3A)を用いた。F225A 変異体の **surface** 表示には、2.2.10 と同じ方法で MOE により野生型-AA 複合体構造の F225 を Ala に置換したものをを用いた。

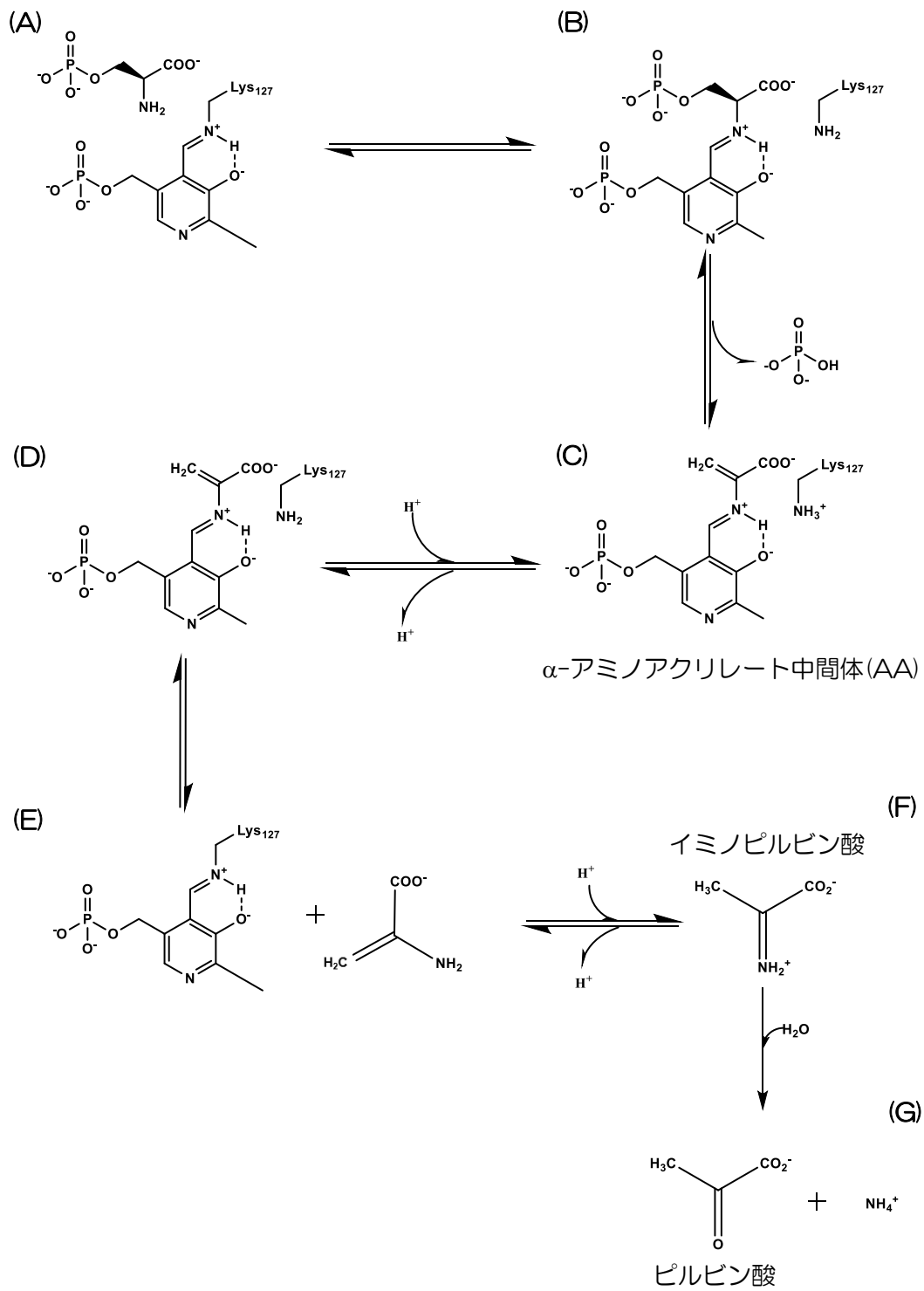


図 2.3. OASS/OPSS の中間体分解時の反応機構。

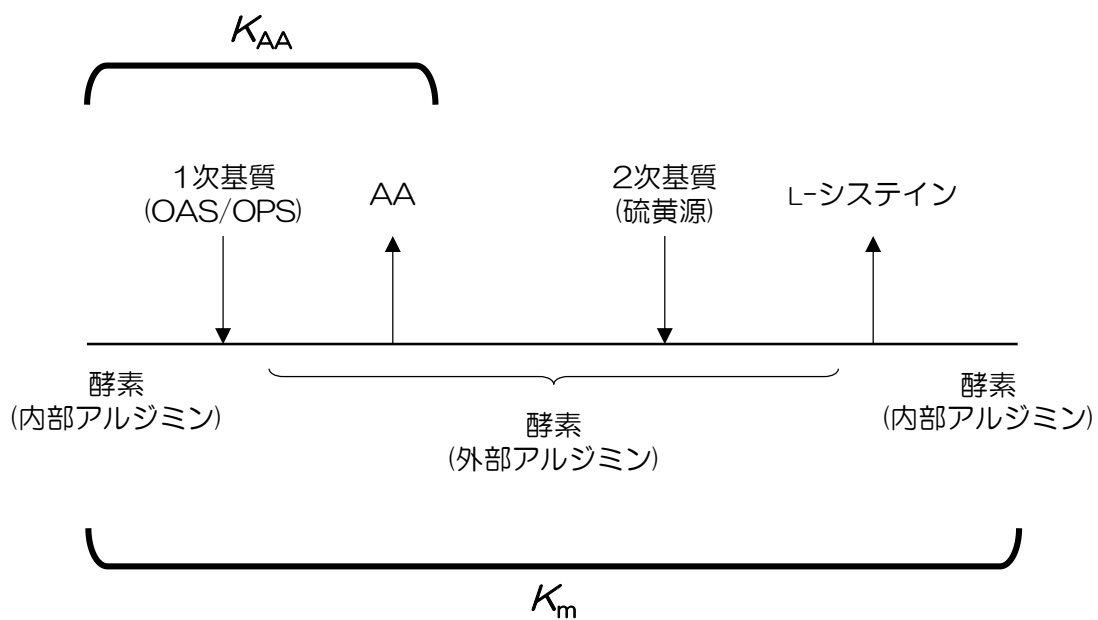


図 2.4. 本論文における K_m および K_{AA} の定義。システイン合成酵素の Ping-Pong Bi Bi 機構を図式化した。反応の全体から得られた基質の親和性を K_m とした(実験項 2.2.6; p. 23)。また、1 次基質を添加し、AA を生成物とした場合の AA 形成度を K_{AA} とした(実験項 2.2.9; p. 24)。 K_m および K_{AA} は、どちらもミカエリス定数を用いて値を導いた(表 2.2、表 3.1-3.3)。

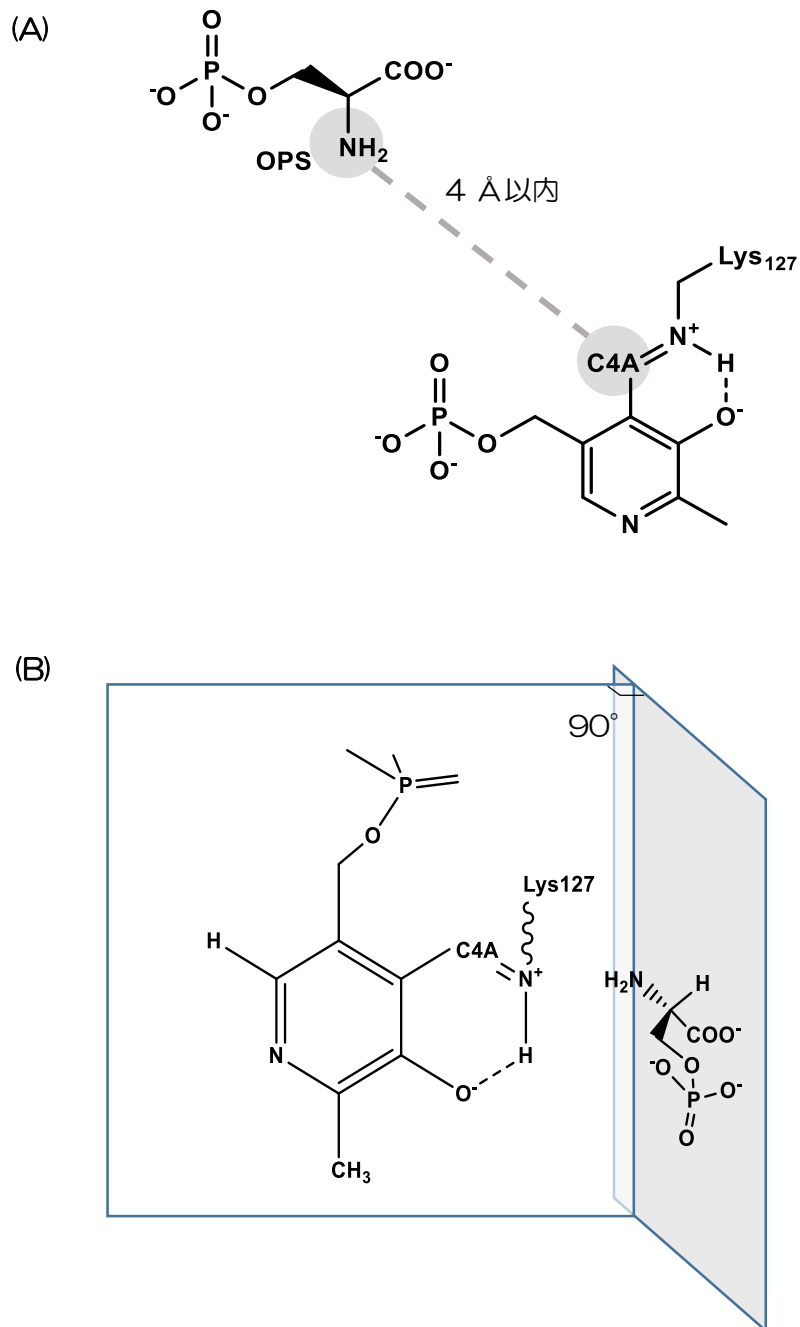


図 2.5. ドッキングポジションの選択。(A)灰色で示した原子は、PLP の C4A と OPS または OAS のアミノ基 N であり、外部シッフ塩基を形成する。この間を 4 Å 構造を選択した。さらに、(B) PLP のピリジン環平面に対し、1 次基質のアミノ基が垂直に近い構造を選択した。

2.3. Results

2.3.1. X線結晶構造解析

図 2.6 に野生型の結晶を示した。野生型の結晶は 0.1 M Na HEPES buffer, pH 7.5, 27% (v/v) 2-propanol, 10-12% (v/v) PEG 4000, 12 mM TCEP-HCl, 23°C、約 2 週間の条件で得られた。結晶の形はテトラゴナルバイピラミッドであった。結晶の最長部を計測すると、小さいもので 0.05 mm、大きいもので 0.4 mm のものが得られた。大きさの平均は約 0.2 mm であった。

このような結晶から得られた野生型-AA 複合体と野生型-L-システイン複合体の最終精密化後のデータを表 2.1 に示した。図 2.7 (p.33) に示した電子密度マップは AA と L-システインを覆っていた。ApOPSS の残基も同様であった。そのため、目的の構造が得られたと判断した。

2.3.2. 反応間の構造比較

野生型 free、野生型-AA 複合体、野生型-L-システイン複合体の全体構造の重ね合わせを行ったところ、残基の C α を基準にした RMSDs は 0.26~0.36 Å であった。他の OASS/OPSS に見られるような顕著な構造変化は見られなかった。

次に残基レベルでの活性部位の構造比較を図 2.8 A (p.34) に示した。一番側鎖に動きがみられたのは R297 であった。R297 は活性中心よりもポケットの出入り口に近い。この残基は OPS を活性部位に誘導する残基として知られている [66], [76]。R297 に次いで動きの大きい残基は F225 であった。図 2.8 B (p.34) に F225 の動きを示した。1 次基質が入り中間体ができただ時の RMSD (野生型 free と野生型-AA 複合体間) は、F225 の方が R297 よりも大きかった。そこで、F225 残基の役割の推定を試みた。

表 2.1. 回折データと最終構造の精密化データ。

Data collection	Wt ApOPSS-AA comolex	Wt ApOPSS-cysteine complex
Wavelength (Å)	0.9	0.9
Space group	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Unit-cell parameters (Å)		
a = b	74.151	74.135
c	275.961	275.812
Resolution range (Å)	50.0-2.15 (2.20-2.14) ^a	50.0-2.15 (2.21-2.15) ^a
Total No. of observed reflections	428145	546227
No. of unique reflections	43787	43621
Average I/σ(I)	59.8 (19.4) ^a	17.0 (4.7) ^a
R _{merge}	0.071	0.101
Completeness (%)	97.8 (95.8) ^a	93.5 (93.8) ^a
Refinement		
No. of atoms		
Protein	5920	5929
PLP	----	15
MPD	16	8
AA	42	----
Cysteine	----	14
Water	349	268
Resolution used in refinement (Å)	32.9-2.14	49.1-2.15
R _{work} /R _{free}	0.148/0.216	0.180/0.246
Wilson B factor (Å ²)	18	28
RMSD, bond distances (Å)	0.024	0.024
RMSD, bond angles (°)	2.0	2.1
Mean overall B factor (Å ²)	20	37
Average B factors (Å ²)		
AA	11.8	----
Cysteine	----	46.5
Number of residues in Ramachandran plot		
Most favoured regions (%)	96.5	97.4
Allowed regions (%)	2.8	2.4
Outlier region (%)	0.7	0.2
PDB code	5B3A	5B36

^a 括弧は最外殻分解能での値である。



図 2.6. 得られた野生型の結晶。1つのドロップに得られた結晶であり、この大きさであると2 μlドロップ中に5個程度形成された。

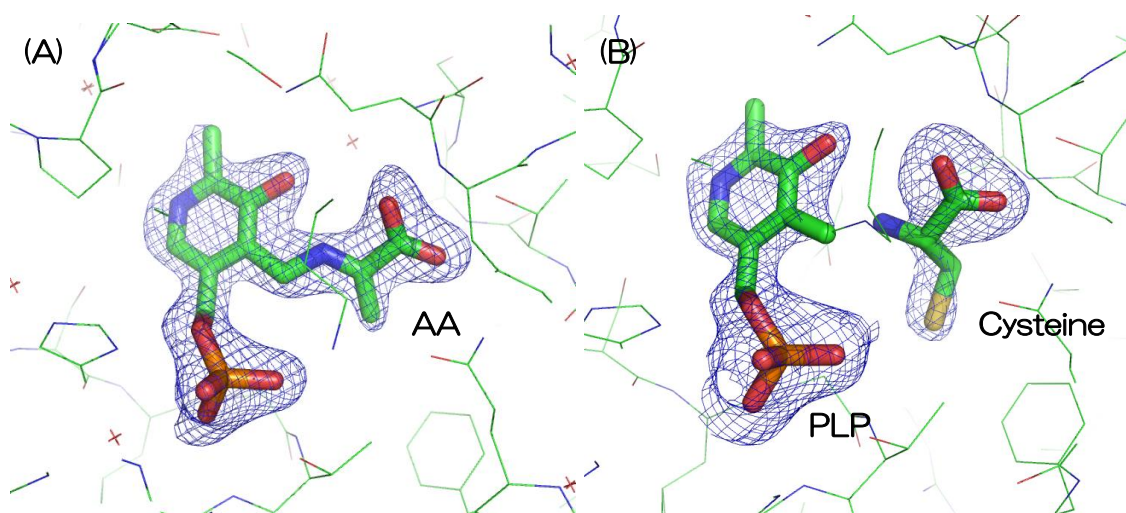


図 2.7. 精密化後の複合体と $F_o - F_c$ オミットマップ。(A)AA と(B)PLP と L-システインのオミットマップ(構造が入っていないときの電子密度マップ)を 3σ レベルで表示した。このオミットマップに精密化後の立体構造を重ね合わせた図である。AA と PLP と L-システインを Ball & Stick 表示した。原子の色は、赤 : O、緑 : C、青 : N、黄色 : S、橙 : P である。図は Pymol で作成した。

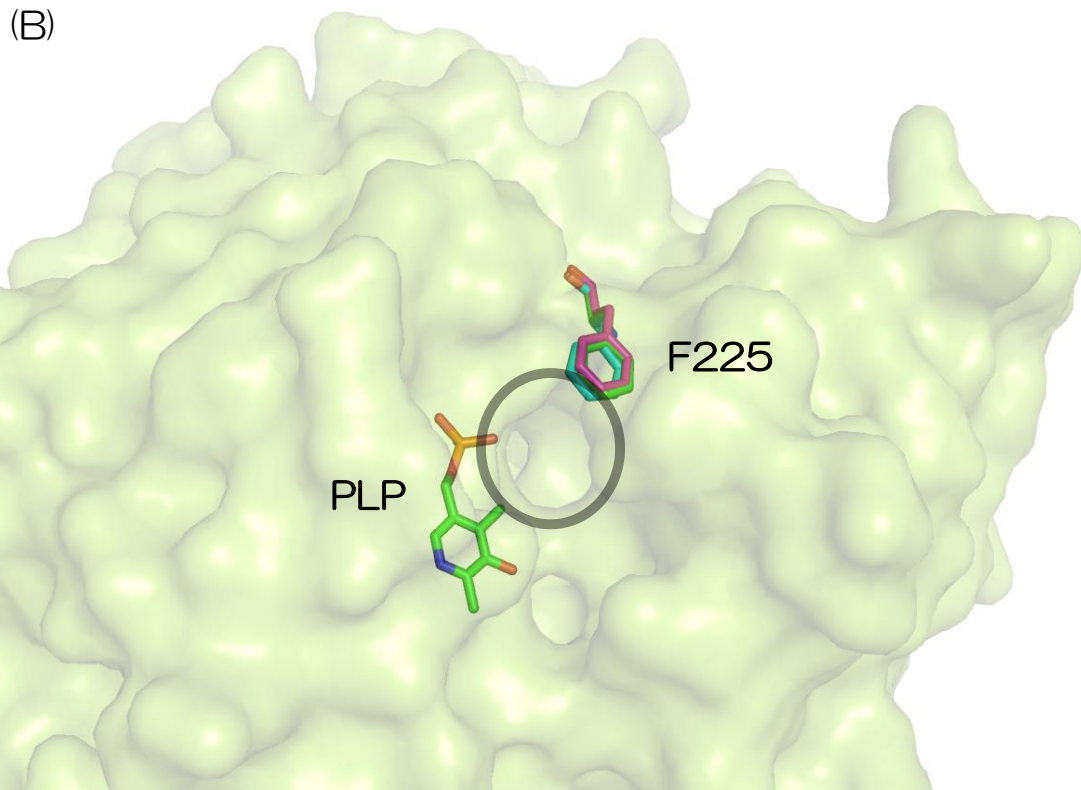
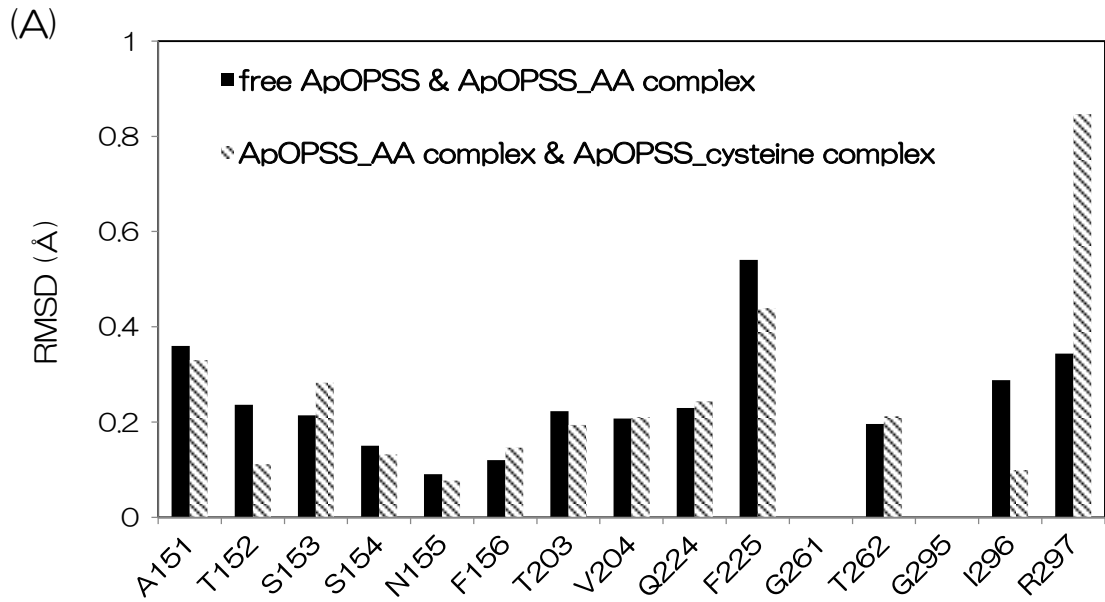


図 2.8. 側鎖の RMSD と各構造における F225 の位置の違い。(A) 野生型 free、野生型-AA 複合体、野生型-L-システイン複合体の側鎖位置の RMSD の比較である。(B) 各構造を重ね合わせ、F225 を表示した。野生型 free : 緑、野生型-AA 複合体 : 青、野生型-L-システイン複合体 : ピンクで色分けした。スティックでは PLP と F225 を示した。Surface 表示のモデルは ApOPSS、黒丸は活性ポケットの入り口を示す。図は MOE で作成した。

2.3.3. L-システイン合成の活性測定

ApOPSS の F225 の役割を確認するために F225A 変異体を作製した。野生型と F225A 変異体の活性を図 2.9 と表 2.2 に示した。結果として、OPS との親和性の差はほとんどなく、 k_{cat}/K_m は 4.8 倍の差であった。一方、OAS との親和性の差もほとんどないが、 k_{cat}/K_m は 50 倍の差であった。

2.3.4. K_{AA} 測定

AA 形成度を表す K_{AA} の結果を図 2.10 (p.37) と表 2.2 (p.38) に示した。 K_{AA} の値が小さいほど AA の形成度が高い。F225A の AA 形成度は、OPS を基質としたとき野生型の 12 倍低下し、OAS を基質としたときには 27 倍低下していた。L-システインの合成活性と同様に F225 の Ala への変異は OAS からの AA 形成に大きく影響した。

2.3.5. AA の安定性

図 2.11 (p.38) に AA のピーク減少時間の測定結果を示した。同じ基質濃度で OPS を加えたとき、F225A 変異体は野生型よりも AA 消失に要する時間が 5 倍程度速かった。

2.3.6. ピルビン酸測定

時間経過に伴う吸光度変化から得られる 1 次反応速度は、野生型が $4.8 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ 、F225A 変異体が $8.5 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ であった。AA の分解速度は 1.8 倍 F225A 変異体のほうが速かった。

また、酵素と OPS 濃度を 2.3.5 と同じにし、NADH の消費量を算出した。酵素と OPS を 5 分インキュベーションしたときの NADH 消費量は、野生型では 0.101 mM、F225A 変異体では 0.939 mM であった。野生型と OPS を 20 分間インキュベーションしたときの NADH 消費量は、0.958 mM であった。

2.3.7. 1 次基質とのドッキングシミュレーション

OPS/OAS のドッキングシミュレーションの結果を図 2.12 (p.39) に示した。野生型ではどちらも脱離基が溶媒側(活性部位の入り口方向)に向いていた。一方、F225A 変異体では脱離基が F225 のフェニル基が存在した部分に位置していた。

2.3.8. 立体構造の活性部位の表面表示

野生型と F225A 変異体の活性部位における分子表面を図 2.13 (p.40) に示した。野生型よりも F225A 変異体のほうが活性部位のポケットの広がりが大きかった。

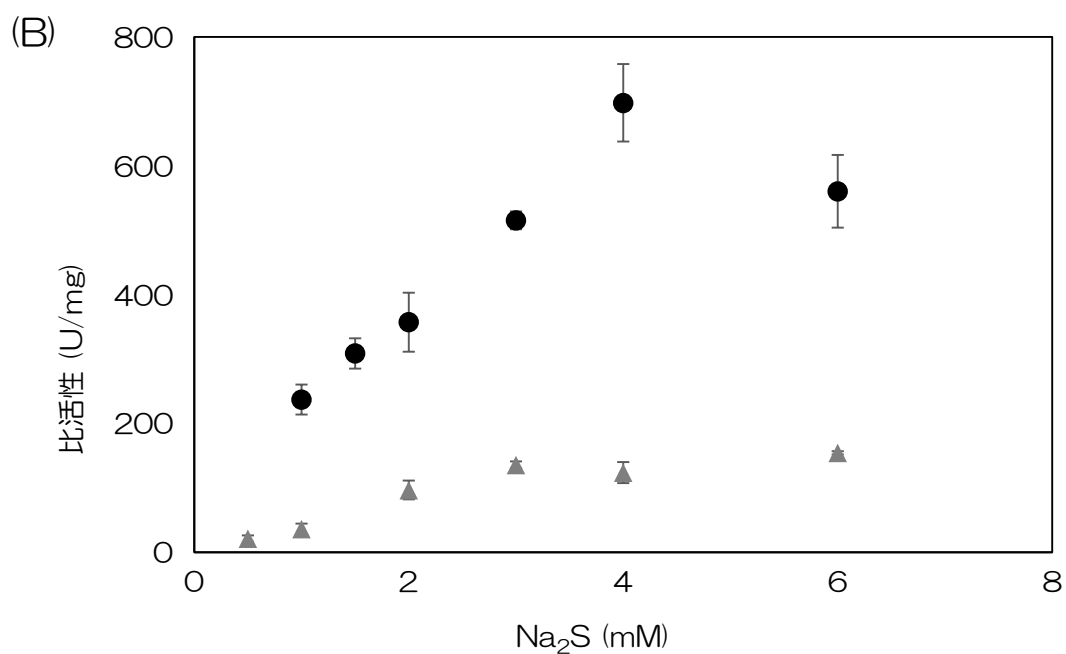
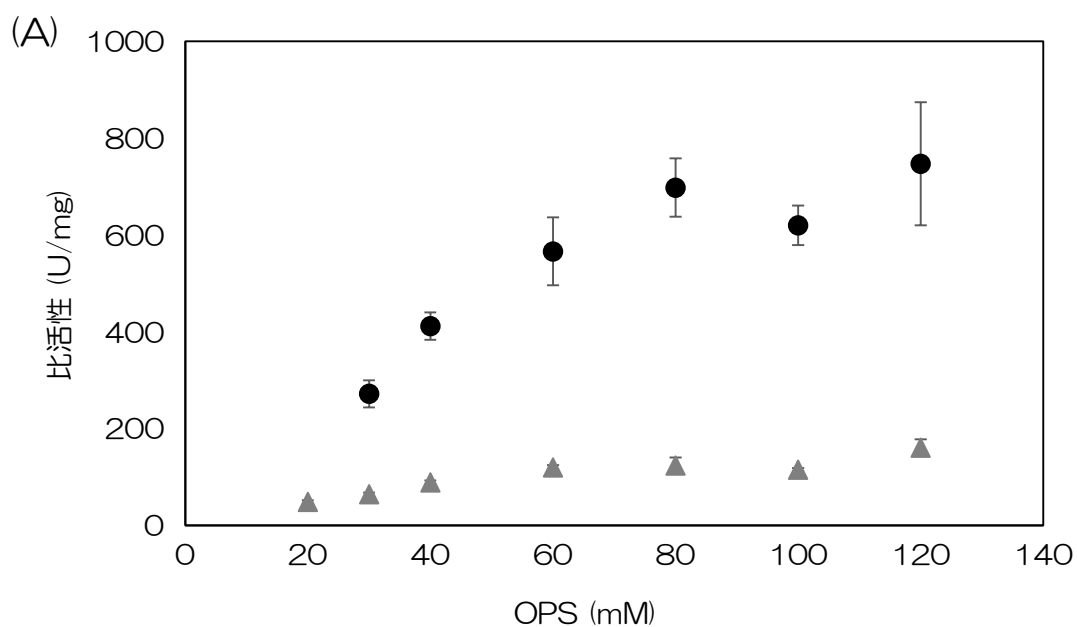


図 2.9. 野生型とF225A 変異体の基質濃度と比活性の関係。丸が野生型、三角がF225A 変異体である。プロットは 3 回測定中の平均値であり、エラーバーはその標準偏差である。1 U は 1 分間に 1 μ mol の L-システインを生成する ApOPSS の量である。野生型において、(A)は Na₂S を 4 mM に固定し OPS 濃度を 30-120 mM の範囲で比活性を算出し、(B)は OPS を 80 mM に固定し Na₂S 濃度を 1-6 mM の範囲で比活性を算出した。F225A 変異体において、(A)は Na₂S を 4 mM に固定し OPS 濃度を 20-120 mM の範囲で比活性を算出し、(B)は OPS を 80 mM に固定し Na₂S 濃度を 0.5-6 mM の範囲で比活性を算出した。

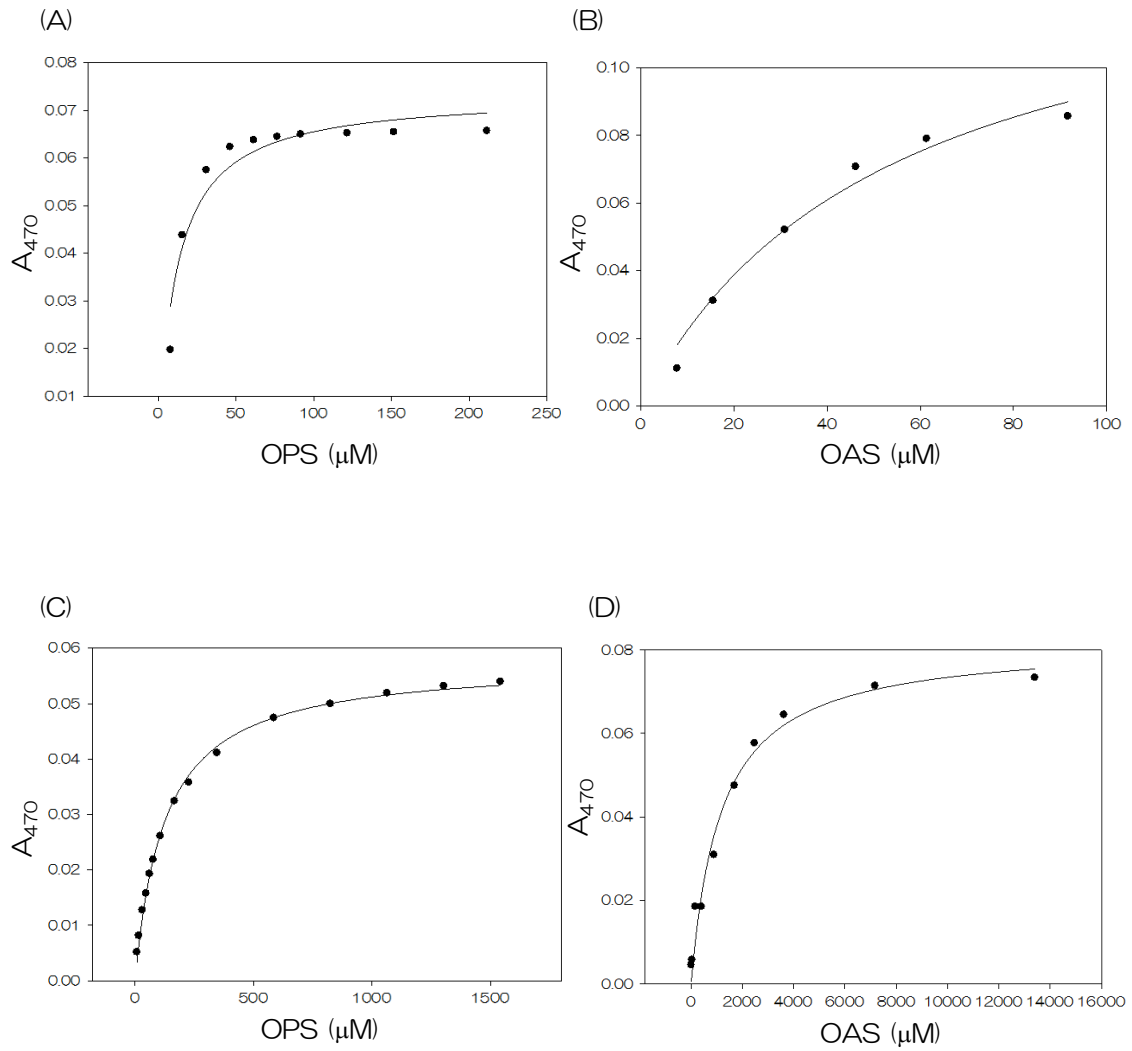


図 2.10. AA の形成度測定の結果

使用酵素と 1 次基質は、(A) 野生型、OPS、(B) 野生型、OAS、(C) F225A 変異体、OPS、(D) F225A 変異体、OAS である。横軸が基質濃度 (μM)、縦軸が 470 nm の吸光度である。

表 2.2. 野生型と F225A 変異体の活性比較。

	野生型	F225A 変異体	野生型	F225A 変異体
	OPS sulfhydrylation reaction		OAS sulfhydrylation reaction	
Toward OPS and OAS				
K_m (mM)	57 (9.2)	65 (5.3)	11 (2.1)	37 (9.3)
k_{cat} (sec ⁻¹)	630 (44)	150 (6.0)	38 (2.6)	2.6 (0.29)
k_{cat}/K_m (10 ³ · M ⁻¹ · sec ⁻¹)	11	2.3	3.5	0.07
Toward Na₂S				
K_m (mM)	3.8 (0.59)	1.6 (0.14)	0.39 (0.096)	-a
k_{cat} (sec ⁻¹)	730 (63)	130 (4.2)	33 (1.3)	-a
k_{cat}/K_m (10 ³ · M ⁻¹ · sec ⁻¹)	190	81	85	-a
Apparent K_{AA} (μM)	12 (0.24)	140 (11)	55 (1.8)	1500 (520)

括弧内の値は、それぞれ 3 回の測定から算出された平均値の標準偏差である。

^a 決定されなかった項目である。

K_{AA} の値が小さいほど中間体の形成度が高い。

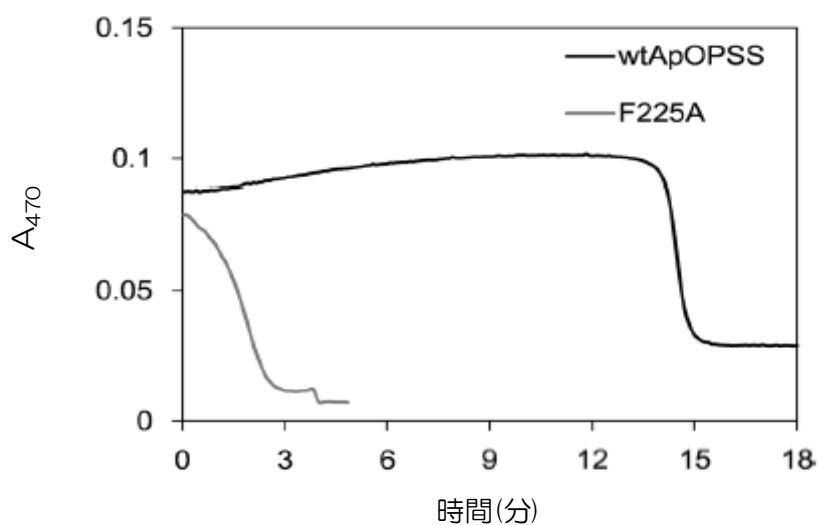


図 2.11. AA のピーク減少時間測定の結果。黒の線と灰色の線は、それぞれ野生型と OPS、F225A 変異体と OPS の測定結果である。

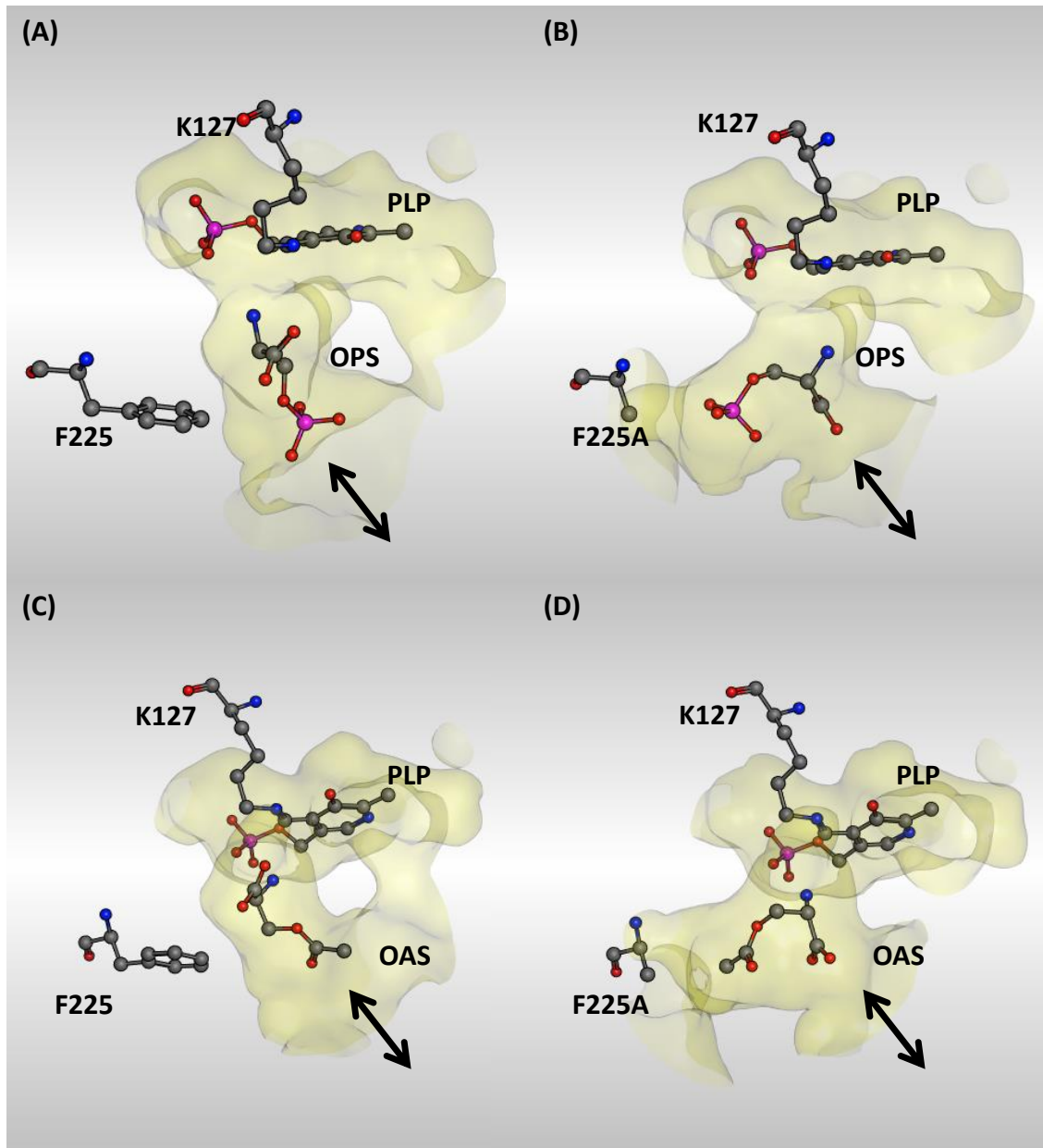


図 2.12. ApOPSS と 1 次基質とのドッキングシミュレーション

(A)野生型-OPS、(B)F225A 変異体-OPS、(C) 野生型-OAS、(D) F225A 変異体-OAS のドッキング結果である。赤は O 原子、青は N 原子、灰色は C 原子、ピンクは P 原子、黄色は ApOPSS の分子表面を示す。両方向の矢印は活性ポケットの出入り口を示している。図は MOE で作成した。

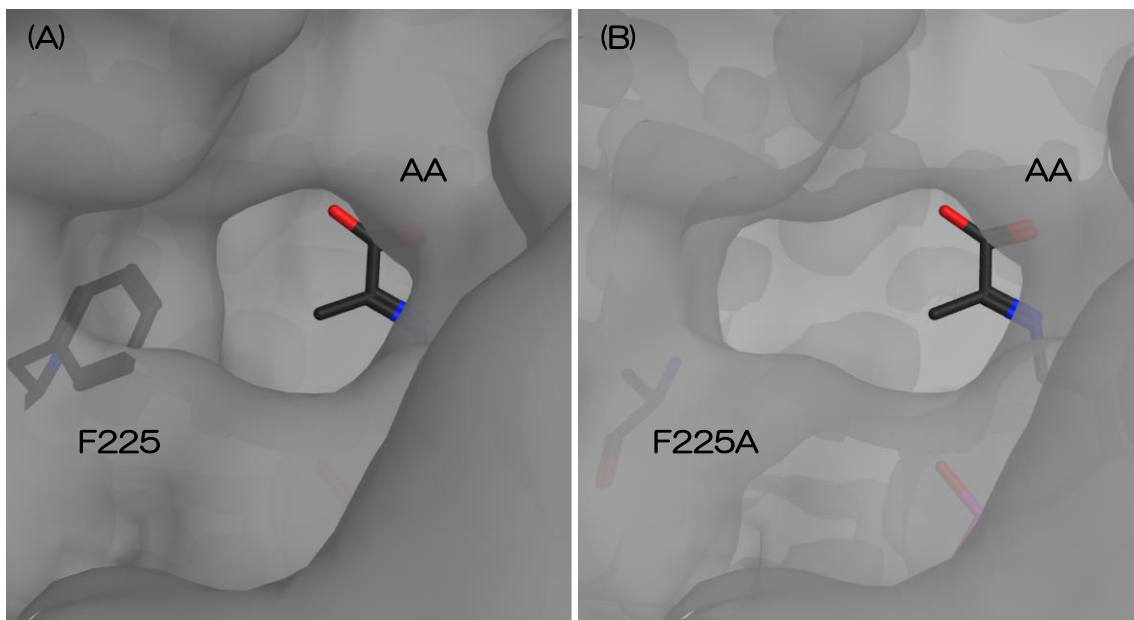


図 2.13. 活性部位の分子表面。(A)野生型、(B)F225A 変異体の分子表面を灰色で示した。AA と F225 をスティックで示した。この図は野生型-AA 複合体 (PDB ID: 5B3A) を用いており、MOE により作成した。

2.4. Discussion

結晶構造の比較

1 次基質の認識に関わる残基を推測するために、ApOPSS の各反応段階である野生型 free, 野生型-AA 複合体, 野生型-L-システイン複合体の構造を比較した(図 2.1, p.18)。

このような構造比較はいくつかの OASS で報告があり、活性部位に基質や生成物が入ったとき、ドメインが動くほどの大きな構造変化がみられる[23], [40], [44], [50], [78], [79]。

しかし、ApOPSS は AA の形成時や L-システインが入っていても、大きな構造変化がみられなかった。

A. pernix は 95°C 付近の極限環境で生育しているため、構造の変化が抑えられていることが考えられる。実際に、野生型の 30°C での比活性は、80°C での比活性の 1.8%になっていた[76]。75°C 付近で生育する高度好熱菌の *Thermus thermophilus* のタンパク質では、低温で測定する X 線結晶構造解析では構造の動きがみられなかったが、高温条件下による NMR を用いた構造解析では構造の動きが確認されている[89]。X 線照射時の温度は 100 K (-173°C)であるため、高温下でないと他のシステイン合成酵素のようにドメインが動かないのかもしれない。ApOPSS では高温条件での構造解析は行っていない。

また、結晶構造は、酵素の結晶に基質や生成物をソーキングして構造解析を行ったため、OASS のような構造変化が見られなかった可能性がある。酵素と生成物の共結晶化を行ったが、結晶は得られたものの、X 線照射後の分解能が低く、構造解析に至らなかった。構造変化による揺らぎの影響で立体構造が得られなかったことが考えられる。

活性中心の残基の側鎖を比較では、OPS を誘導する R297 に次いで動きが大きかったのは F225 であった(図 2.8 A, p.34)。この F225 の動きは 0.5 Å 程度であったが、AA が形成されると F225 が閉じるように動き、L-システインがあると F225 が開くように動いていた(図 2.8 B, p.34)。

この F225 が 1 次基質の認識に関わるかを検証するために、野生型と F225A 変異体の活性や立体構造を比較した。

F225 の役割

酵素と 1 次基質から AA が形成される。この AA は酵素内反応によってイミノピルビン酸への分解が起こる(図 2.3, p.28)。この AA の分解は、2.3.5 の 1 次基質消費による AA 分解時間の測定と 2.3.6 の AA の分解から得られるピルビン酸の測定で確認した。

AA 分解時間の測定において、野生型では 3 分、F225A 変異体では 15 分の時点で AA の吸光度の減少がみられ、AA の分解時間は、野生型よりも F225A 変異体のほうが約 5 倍速かった(図 2.11, p.38)。このことから、F225 は AA の安定性に寄与することが考えられた。

また、ピルビン酸の測定では、野生型よりも F225A 変異体のほうがピルビン酸の形成速度が約 2 倍速かった(2.3.6)。ここで測定されたピルビン酸は、溶媒の水分子によってイミノピルビン酸が分解されたものであり(図 2.3, p.28)、野生型よりも F225A 変異体では、AA 分解から生じるイミノピルビン酸を 2 倍速く溶媒に放出していることを示す。イミノピルビン酸が放出されやすくなることは、AA の形成状態が維持されにくくなることと対応していると考えられる。これは、F225A 変異体では、図 2.3 の D と E 間の平衡反応が E→F への方向に行きやすくなった可能性が示唆される。

AA 分解時間の測定では AA の安定性の関与が示唆されたが、ピルビン酸の測定によって、225 番目のフェニル基がイミノピルビン酸の放出を抑えていたことがわかった。このことから、F225 は AA の形成状態の維持に関わっていると推定した。

さらに、図 2.13 (p.40)の野生型と F225A 変異体の分子表面を見てみると、F225A 変異体では活性部位のポケットが広がっていた。225 番目のフェニル基が活性部位のポケットを小さくしていることで、AA の形成状態を保持していると考えられる。

野生型と F225A 変異体に対して 1 次基質のドッキングシミュレーションを行うと、野生型の場合 OAS/OPS の脱離基(アセチル基/リン酸基)は活性部位の入り口に向き、F225A 変異体の場合 OAS/OPS の脱離基は F225 のフェニル基があった場所に位置していた(図 2.11, p.39)。このことから、F225 は AA の形成維持に加えて、1 次基質の配向にも関与していることが示唆された。

表 2.2 (p.38)の AA の形成度を測定した K_{AA} (定義: 図 2.4, p.29)では、F225A 変異体において、AA の形成度が低下していた。この結果は、F225 の役割である AA の形成維持が反映していると考えられる。

L-システイン合成の活性測定では、野生型と F225A 変異体の OAS または OPS に対する K_m はどちらもあまり差がみられないが、 k_{cat} ではそれぞれ 4 倍、15 倍の差がみられ F225A 変異体において活性が低下していた。この結果は、F225A 変異体では AA が不安定となっていることで、2 次基質の硫黄源との反応が行われにくくなっているのではないかと思われる。

2.5. Conclusion

ApOPSS の F225 は、AA の形成維持と基質の配向を定めることに関与することが示された。しかしながら、本章の結果では、目的である 1 次基質の区別に関わる残基の特定には至らなかった。

OAS または OPS に対する AA の形成度(K_{AA})や L-システイン活性測定の結果を見ると、F225A 変異体では OAS に対する K_{AA} や K_m の値が大きく、AA 形成度や親和性が低下している。このことから、F225 は OPS よりも OAS に対しての親和性に関連しているのではないかと推測される。

そこで第 3 章では、OAS の認識に関連のあると思われる ApOPSS の F225 と、OPS の認識に関連のある R297 の残基に焦点を当て、1 次基質の区別に関わる残基の推定を進めた。

3. システイン合成酵素の活性部位における F と R は OAS/OPS 認識に必要か？

3.1. Introduction

第 2 章では、ApOPSS の F225 が、基質の配向を定めることと、AA の形成維持に関わっていると推定した。本章では、役割を推定した F225 および OPS の認識に関与する R297 と 1 次基質の相互作用について検証した。

OPS を基質とする酵素 OPSS (ApOPSS、MtCysK2、MtCysM、TvOPSS) の活性部位には、OPS の認識に関与する Arg や Lys が存在する [17], [29], [66], [76]。巻末の図(p.79)の緑に囲まれた配列で、ApOPSS の R297、TvOPSS の K214、MtCysM の R220 は、アラインメント上、対応した配列関係にある。

ApOPSS の F225 に相当する残基をみると、MtCysK2 と MtCysM では Tyr であった(p.70 の黄色)。MtCysM のドッキングシミュレーションによると、この Tyr の水酸基が OPS のリン酸基と 3.15 Å の距離にあったため相互作用するのではないかと考えられている [29]。しかしながら、MtCysM の Tyr の相互作用を評価するような測定は行われておらず、実際に OPS との相互作用があるのかは明らかにされていない。

そこで本章では、システイン合成酵素における OPS の認識と Tyr の関わりを検証した。そのために、ApOPSS の F225 を Tyr に置換した F225Y 変異体を作製した。Tyr と OPS の相互作用が ApOPSS で見られるならば、MtCysM から推測される、OPS と Tyr 残基間の相互作用の根拠の 1 つとなる。F225Y 変異体の OPS 認識を詳細に知るために ApOPSS の F225Y/R297A 変異体を作製し R297 による OPS の誘導がない場合の検証も行った。

また、OAS の認識の検証も行った。ApOPSS の R297 は、OASS の場合、Gln で保存されていることが多い。そこで ApOPSS の R297Q 変異体では、OAS 認識が向上するのかを検証した。ApOPSS は OAS/OPS 両方を基質にできる [65], [67]。ただし、*A. pernix* は生体内に OAS を生成する SAT 遺伝子を持っていないため、生体内では OAS を用いた L-システイン合成が行われていないと考えられている [13]。このことから、野生型は OAS を認識するための構造として完全に最適化おらず、R297Q 変異体は野生型よりも OAS との親和性が向上することが考えられる。そこで、R297Q 変異体と OAS の活性測定を行った。

3.2. Materials and Methods

3.2.1. マルチプルアラインメント

統合データベース Uniprot から、ApOPSS を含め 11 種類の OASS/OPSS の

配列を取得した。活性や構造データが研究されている酵素(ApOPSS, MtCysK1, MtCysK2, MtCysM, TvOPSS, AtOASS-A, GmOASS-A, LmOASS-A, HiOASS-A, EcOASS-B, StOASS-B, ScOASS)を選択した。正式名称は表 1.1 (p.4) に示している。これらの配列を T-coffee を用いて、マルチプルアラインメントを行った[90]。

3.2.2. プラスミド作製と酵素精製

OPS を認識するという役割が ApOPSS の F225 に対応する Tyr にもあるのではないかと仮定した。そこで F225Y 変異体と F225Y/R297A 変異体を作製した。テンプレートの pApOPSS をもとに 2.2.1 (p.20)と同様の方法により変異体のプラスミドを作製した。F225Y 変異体のプライマーは 5'-TACTACAACGACGCTAACTTCGAGG- 3' と 5'- CTGGTTCACGTGAACGAACC- 3' を用いた。R297A 変異体のプライマーは 5'-CCTCGCTATACCAGGTATGGAATCTC- 3' と 5'- GTTGAGACGGGCATGCTCTG- 3'を用いた。下線部は変異導入箇所を示している。OPS との複合体結晶構造を得るため、上記のプラスミドにさらに K127A の変異を導入した。当研究室で作製されていた K127A 変異体の遺伝子を含む pET-3d のプラスミドと上記のプライマーを用いて、K127A/F225Y 変異体と K127A/F225Y/R297A 変異体の遺伝子を含む pET-3d プラスミドを作製した。また、R297Q への変異に用いたプライマーは、5'- CCTTTGTATACCAGGTATGGAATCTCCC - 3' と 5'- GTTGAGACGGGCATGCTCTG- 3'である。下線部が変異導入箇所である。

作製したプラスミドを用いて、2.2.2 (p.20)と同様の操作で各酵素の発現と精製を行った。

3.2.3. K_{AA} 測定

1 次基質との親和性を見るために 2.2.9 (p.26)と同じ方法で検証した。野生型やその変異体酵素内で PLP と 1 次基質から形成される AA は、470 nm に特異的に吸収を持つ。酵素溶液に 1 次基質を滴下しながら 470 nm における吸光度を測定することで、1 次基質の AA 形成度(K_{AA} , p.29)を算出した。

F225Y 変異体, F225Y/R297A 変異体, R297Q 変異体の OPS に対する基質濃度範囲は、それぞれ 8.3-250 μ M (8.3, 17, 25, 33, 41, 49, 74, 110, 170, 250 μ M), 21-5900 μ M (21, 61, 120, 240, 320, 440, 550, 690, 840, 1000, 1600, 2700, 4200, 5900 μ M), 21-11000 μ M (21, 41, 81, 140, 220, 380, 530, 760, 1100, 1800, 2900, 4700, 6700, 8700, 11000 μ M)である。F225Y 変異体, F225Y/R297A 変異体, R297Q 変異体の OAS に対する基質濃度範囲は、それぞれ 17-2700 μ M (17, 160, 240, 560, 1500, 2700 μ M), 41-1800 μ M (41, 81, 120, 180, 330, 560, 1100, 1800

μM), 12-230 μM (12, 21, 29, 37, 49, 62, 74, 110, 170, 230 μM)である。

3.2.4. 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB)活性測定

2.2.6 のシステイン合成活性に代わり、2 次基質に 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB)を用いた K_m , k_{cat} の算出を行った[39]。

OAS/OPS と TNB を基質にすると、*S*-(3-carboxy-4-nitrophenyl)-L-cysteine (*S*-CNP-cysteine)が生成される(図 3.1)。システインを発色させる酸ニンヒドリン法での測定は、反応時間ごとに反応を停止させて発色させるため、反応を連続的に測ることができない。今回の TNB を用いた反応では、TNB が黄色で 412 nm に吸収を持ち($\epsilon=13600$)、生成物の *S*-CNP-cysteine では無色となる。そのため、412 nm の吸光度変化を追跡すれば、反応を連続的に測ることができる。

1次基質の OPS と OAS は至適 pH と温度が異なるのでそれぞれに合わせた測定を行った[65], [67]。また、TNB は 5,5- dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) を 1 mM TCEP を含む 100 mM MOPS buffer で還元することで調製しており、1 モルの DTNB から還元によって 2 モルの TNB が生成する。なお、DTNB は溶解度が低く 3 mM DTNB (6 mM TNB)程度までしか調製することができなかった。

OPS: 分光光度計内と石英セルをあらかじめ 80°C で温めた。1 mM TCEP を含む 100 mM MOPS buffer pH 7.5、ApOPSS、OPS、TNB の混合溶液を 1.5 ml チューブ内で 400 μl 調製した。その溶液を 300 μl セルに移し、20 秒後に測定を開始した。開始から 10 分間 412 nm における吸光度の測定を行った。測定時

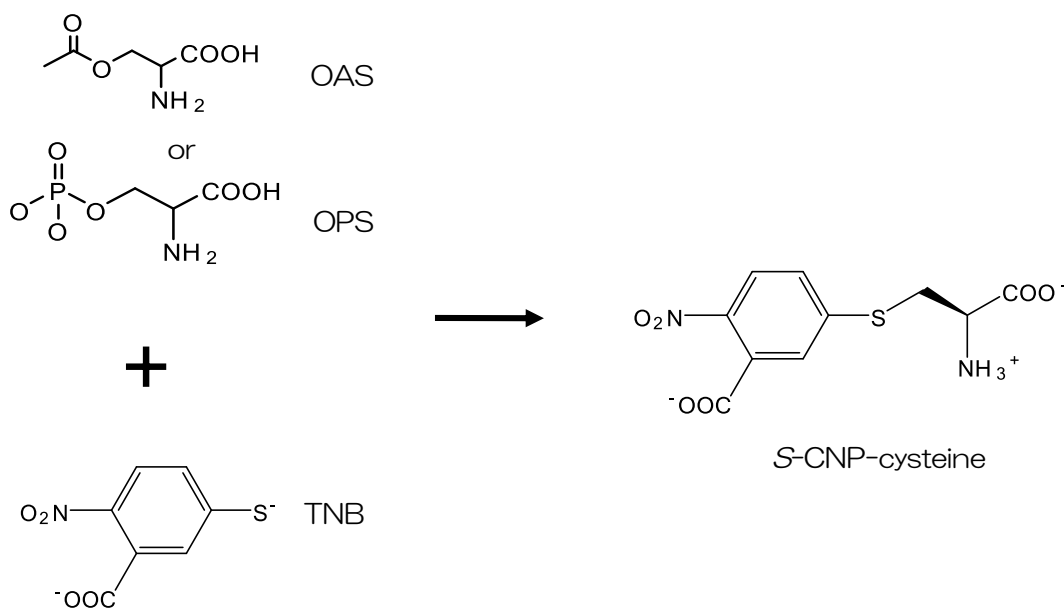


図 3.1. 硫黄源を TNB としたときの反応式。

は溶液の揮発を防ぐため、セルにふたをした。OPS に対する K_m , k_{cat} の算出のための TNB 濃度は、TNB の V_{max} にあたる濃度を用いている。TNB の V_{max} とは、OPS 濃度を一定にし、TNB を振った時の反応最大速度である。時間経過による吸光度変化の傾きと TNB のモル吸光係数($\epsilon=13600$)から、OAS/OPS 濃度と TNB 生成速度のミカエリス・メンテンのグラフを作成した。Hanes-Woolf plot から K_m と k_{cat} を求めた。

野生型の測定において、OPS に対する活性測定では 1.75 mM TNB 存在下で、0.05-2.5 mM OPS (0.05, 0.25, 0.5, 1, 1.75, 2.5 mM) の濃度範囲で測定した。TNB に対する活性測定では 30 mM OPS 存在下で、0.1-2.4 mM TNB (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.4 mM) の濃度範囲で測定した。野生型の酵素量は 6 μg とした。

F225A 変異体の測定において、OPS に対する活性測定では 1.25 mM TNB 存在下で、0.05-2.5 mM OPS (0.05, 0.25, 0.5, 1, 1.75, 2.5 mM) の濃度範囲で測定した。TNB に対する活性測定では 30 mM OPS 存在下で、0.1-3 mM TNB (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.4, 2.75, 3 mM) の濃度範囲で測定した。F225A 変異体の酵素量は 6 μg とした。

F225Y 変異体の測定において、OPS に対する活性測定では 4 mM TNB 存在下で、0.05-40 mM OPS (0.05, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40 mM) の濃度範囲で測定した。TNB に対する活性測定では 20 mM OPS 存在下で、0.1-5 mM TNB (0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.4, 4, 5 mM) の濃度範囲で測定した。F225Y 変異体の酵素量は 11.25 μg とした。

F225Y/R297A 変異体の測定において、OPS に対する活性測定では 2.4 mM TNB 存在下で、0.05-50 mM OPS (0.05, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM) の濃度範囲で測定した。TNB に対する活性測定では 30 mM OPS 存在下で、0.1-5 mM TNB (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.25, 2, 2.4, 3, 4, 5 mM) の濃度範囲で測定した。F225Y/R297A 変異体の酵素量は 11.25 μg とした。

R297A 変異体の測定において、OPS に対する活性測定では 1.5 mM TNB 存在下で、0.05-40 mM OPS (0.05, 1, 5, 10, 20, 30, 40 mM) の濃度範囲で測定した。TNB に対する活性測定では 20 mM OPS 存在下で、0.1-2.4 mM TNB (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.4 mM) の濃度範囲で測定した。R297A 変異体の酵素量は 40 μg とした。

R297Q 変異体の測定において、OPS に対する活性測定では 4.6 mM TNB 存在下で、0.05-40 mM OPS (0.05, 0.5, 1, 10, 25, 40 mM) の濃度範囲で測定した。TNB に対する活性測定では 30 mM OPS 存在下で、0.1-5.4 mM TNB (0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5.4 mM) の濃度範囲で測定した。R297A 変異体の酵素量は 11.25 μg とした。

OAS: pH 6.7、60°Cにて測定を行った。他の条件はOPSと同様である。

野生型の測定において、OASに対する活性測定では1.75 mM TNB存在下で、0.05-5 mM OPS (0.05, 0.3, 0.6, 1, 3, 5 mM)の濃度範囲で測定した。TNBに対する活性測定では10 mM OAS存在下で、0.1-3 mM TNB (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3 mM)の濃度範囲で測定した。野生型の酵素量は6 µgとした。

F225A変異体の測定において、OASに対する活性測定では1.75 mM TNB存在下で、0.05-30 mM OAS (0.05, 1, 1.5, 5, 7, 10, 20, 30 mM)の濃度範囲で測定した。TNBに対する活性測定では30 mM OAS存在下で、0.1-1.5 mM TNB (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 mM)の濃度範囲で測定した。F225A変異体の酵素量は6 µgとした。

F225Y変異体の測定において、OASに対する活性測定では3 mM TNB存在下で、0.05-50 mM OAS (0.05, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM)の濃度範囲で測定した。TNBに対する活性測定では30 mM OAS存在下で、0.1-5 mM TNB (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.4, 3, 4, 5 mM)の濃度範囲で測定した。F225Y変異体の酵素量は11.25 µgとした。

F225Y/R297A変異体の測定において、OASに対する活性測定では4 mM TNB存在下で、0.05-40 mM OAS (0.05, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40 mM)の濃度範囲で測定した。TNBに対する活性測定では30 mM OAS存在下で、0.1-5 mM TNB (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.4, 3, 4, 5 mM)の濃度範囲で測定した。F225Y/R297A変異体の酵素量は15 µgとした。

R297A変異体の測定において、OASに対する活性測定では1.75 mM TNB存在下で、0.05-40 mM OAS (0.05, 1, 5, 10, 20, 30, 40 mM)の濃度範囲で測定した。TNBに対する活性測定では40 mM OAS存在下で、0.1-1.75 mM TNB (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75 mM)の濃度範囲で測定した。R297A変異体の酵素量は30 µgとした。

R297Q変異体の測定において、OASに対する活性測定では3 mM TNB存在下で、0.01-0.15 mM OAS (0.01, 0.02, 0.05, 0.15, 0.3 mM)の濃度範囲で測定した。TNBに対する活性測定では5 mM OAS存在下で、0.1-5.4 mM TNB (0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.25, 2, 2.4, 3, 4, 5, 5.4 mM)の濃度範囲で測定した。R297Q変異体の酵素量は6 µgとした。

3.2.5. 結晶化と精密化

F225Y変異体と1次基質との相互作用を見るためにK127A/F225Y変異体と

K127A/F225Y/R297A 変異体の結晶化を行った。用いた試薬と方法は 2.2.3 (p.21)と同じである。結晶化条件は結果にて示した。

K127A/F225Y 変異体 OPS 複合体と K127A/F225Y/R297A 変異体 OPS 複合体の結晶構造を得るためには、各変異体の結晶に 1 次基質 OPS と抗凍結剤の浸潤(ソーキング)を行った。これらを浸潤させるために、終濃度 5 mM の OPS と抗凍結剤である終濃度 6%の(+/-)-2-methyl-2,4-pentanediol (MPD, HAMPTON RESEARCH)が含まれた人工結晶母液を作製した。0.3 × 0.1 × 0.1 mm 程度の各変異体の結晶をこの溶液に 3 時間浸した。

X 線回折実験には、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL44XU、検出器 Mar300HE (Rayonix)を使用し、1つのスナップショット当たり振動角 0.5°、露光時間 2 秒、検出距離 300 mm (K127A/F225Y 変異体 OPS 複合体)、270 mm (K127A/F225Y/R297A 変異体 OPS 複合体)、波長 0.9 Å、アルミニウム減衰板 0.4 mm を用いた条件により、X 線回折データを得た。回折実験は結晶をルーブマウントし、吹き付け乾燥窒素(100K)でフラッシュ凍結して行った。取得した回折像を回折データ処理ソフト HKL2000 を用いて指数付け(indexing)および回折強度積分を行った[81]。HKL2000 での indexing により、格子定数から tetragonal 結晶系、逆空間対称性と消滅則から P4₃2₁2/P4₁2₁2 が示唆され、結晶系および格子定数が先行論文で得られている野生型 free の結晶とほぼ同じであることから、P4₃2₁2 を仮定し、K127A/F225Y 変異体 OPS 複合体では分解能 1.58 Å まで、K127A/F225Y/R297A 変異体 OPS 複合体では分解能 1.79 Å までの反射について scaling および data merge を行ったところ、R_{merge} 値は 0.1 であった[80]。

次に、構造解析ソフトウェアパッケージ Collaborative Computational Project No. 4 (CCP4i)を用いて、既知の立体構造の野生型 free (PDB ID: 3VSA)をサーチモデルとして、分子置換法により位相を決定した[82]。得られた初期電子密度マップ (K127A/F225Y 変異体 OPS 複合体の R 値 0.327, K127A/F225Y/R297A 変異体 OPS 複合体の R 値 0.314)で分子構造が明確に観察されたことから、空間群を P4₃2₁2 (# 96)で確定した。

立体構造構築ソフト Coot と CCP4i を用いて以下のように精密化した[83]。まず CCP4i の REFMAC5 を用いて構造の精密化計算を行い、Coot で分子モデルと電子密度マップの一致を確認し、必要であれば手動でモデルの修正を行い、リガンド分子と溶媒分子を付加した。この精密化サイクルを構造精密化の指標である R 値と freeR 値(反射データの 5%を使用)が下がるのを確認しながら繰り返し、K127A/F225Y 変異体 OPS 複合体では R 値 0.189、freeR 値 0.231 で、K127A/F225Y/R297A 変異体 OPS 複合体では R 値 0.273、freeR 値 0.322 で、精密化を終了した。

最終モデルの評価のために RAMPAGE を用いて Ramachandran plot を作成したところ、K127A/F225Y 変異体 OPS 複合体では 97.9 %、K127A/F225Y/R297A 変異体 OPS 複合体では 96.5%の残基が少なくとも generously allowed region に存在した[84]。また、化学結合長、結合角の標準値からの rmsd 値は、それぞれ K127A/F225Y 変異体 OPS 複合体では 0.020 Å、2.2°、K127A/F225Y/R297A 変異体 OPS 複合体では 0.016 Å、2.0° であったことから、妥当な分子モデルが得られたと判断した。

3.2.6. 構造観察

MOE を用いて得られた結晶構造を C α を基準に重ね合わせ、OPS のリン酸基に対する相互作用を、原子間距離を測ることで確認した。

3.3. Results

3.3.1. 配列アラインメント

システイン合成酵素の配列アラインメントを巻末(p.75-80)に示した。ApOPSS の F225 に位置する残基が Tyr であったのは MtCysK2 と MtCysM だった。OASS は Phe だった。ApOPSS の R297 に位置する残基について、OPSS は Arg または Lys、OASS-A は Gln、OASS-B は Arg だった。

3.3.2. K_{AA} 測定

ApOPSS と 1 次基質による AA 形成度(K_{AA})の結果を表 3.1 (p.53)に示した。野生型と F225Y 変異体を比較すると、1 次基質 OAS に対する K_{AA} 値は F225Y 変異体のほうが 9 倍増加したが(野生型 55 μ M, F225Y 変異体 500 μ M)、1 次基質 OPS に対する K_{AA} 値は野生型と F225Y 変異体で 2 倍以内であり、ほとんど変わらなかった(野生型 12 μ M, F225Y 変異体 22 μ M)。

F225Y/R297A 変異体では、OPS に対する K_{AA} 値は F225Y 変異体よりも 60 倍増加し、野生型と比較すると 110 倍増加した(F225Y/R297A 変異体 1300 μ M, F225Y 変異体 22 μ M, 野生型 12 μ M)。一方、F225Y/R297A 変異体における OAS との K_{AA} 値は、F225Y 変異体と比べ 3.6 倍低下した(F225Y/R297A 変異体 140 μ M, F225Y 変異体 500 μ M)。

R297Q 変異体において、OPS との K_{AA} 値は野生型よりも 140 倍増加し(R297Q 変異体 1700 μ M, 野生型 12 μ M)、OAS との K_{AA} 値は野生型よりもわずかに高くなった(R297Q 変異体 41 μ M, 野生型 55 μ M)。

3.3.3. K_m , k_{cat} 算出のための TNB による活性測定

2次基質に TNB を用いた OPS に対する活性測定の結果を表 3.2 (p.53) に示した。野生型と F225A 変異体では、 K_m (野生型 0.35 mM、F225A 変異体 0.42 mM) はほぼ同じであるが k_{cat} に 2 倍の差があり (野生型 113 min^{-1} 、F225A 変異体 54 min^{-1})、F225A 変異体のほうが活性が低かった。この結果は、2.3.3 の表 2.2 (p.38) シス테인合成活性の結果と同じ傾向が得られた。野生型、F225A 変異体、F225Y 変異体、F225Y/R297A 変異体の K_m 値にはあまり差が見られないが、F225Y 変異体と F225Y/R297A 変異体は k_{cat} が小さいため (F225Y 変異体 9.3 min^{-1} 、F225Y/R297A 変異体 7.6 min^{-1})、 k_{cat}/K_m を野生型と比較すると、20-40 倍小さいと言える (野生型、F225Y 変異体、F225Y/R297A 変異体: 各 320, 15, 5.8 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)。R297A 変異体は K_m 値が他の変異体と比べて 20-70 倍大きく、OPS に対する親和性が低かった。

次に、OAS に対する活性測定の結果を表 3.3 に示した。野生型と F225A 変異体では、 K_m は 6 倍 (野生型 0.25 mM、F225A 変異体 1.5 mM)、 k_{cat} は 3 倍 (野生型 42 min^{-1} 、F225A 変異体 16 min^{-1}) の差があった。この結果は、2.3.3 の表 2.2 シス테인合成活性の結果と比較し、 K_m 値の差は近いが、シス테인合成活性の k_{cat} は 15 倍の差があり、TNB を用いた活性測定の結果と異なっていた。表 3.3 (p.53) の k_{cat} は、F225A 変異体 (16 min^{-1}) と R297A 変異体 (24 min^{-1}) 間、F225Y 変異体 (5.6 min^{-1}) と F225Y/R297A 変異体 (1.2 min^{-1}) 間で近かった。R297A 変異体は、変異体の中でも k_{cat} が高い (24 min^{-1}) が、最も親和性が低いものでもあったため、 k_{cat}/K_m で見たとき F225A 変異体 (11 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)、F225Y 変異体 (8.9 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)、R297A 変異体 (11 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) に値の差が見られなかった。

3.3.4. X 線結晶構造解析

K127A/F225Y 変異体と K127A/F225Y/R297A 変異体の結晶化実験を行ったところ、それぞれ 0.1 M Na HEPES buffer, pH 7.8-8.2, 29% (v/v) 2-propanol, 11-17% (v/v) PEG 4000, 9-12 mM TCEP-HCl, 0.1 M Na HEPES buffer, pH 7.5, 27% (v/v) 2-propanol, 10-12% (v/v) PEG 4000, 12 mM TCEP-HCl の組成の時、結晶が形成した。これらは、野生型と同じテトラゴナルバイピラミッド型の結晶であった。どちらも 23°C の条件で約 3 週間で図 2.6 (p.33) と同様の結晶が得られた。このときの最長部の大きさはそれぞれ小さいもので 0.03 mm、大きいもので 0.2 mm のものが得られた。平均約 0.1 mm であった。

結晶から得られた K127A/F225Y 変異体-OPS 複合体と K127A/F225Y/R297A 変異体-OPS 複合体の最終精密化後のデータを表 3.4 (p.54) に示した。また、図 3.2 (p.52) に示した電子密度マップはどちらの変異体も OPS を覆っていた。

ApOPSS の残基も同様であった。そのため、目的の構造が得られたと判断した。

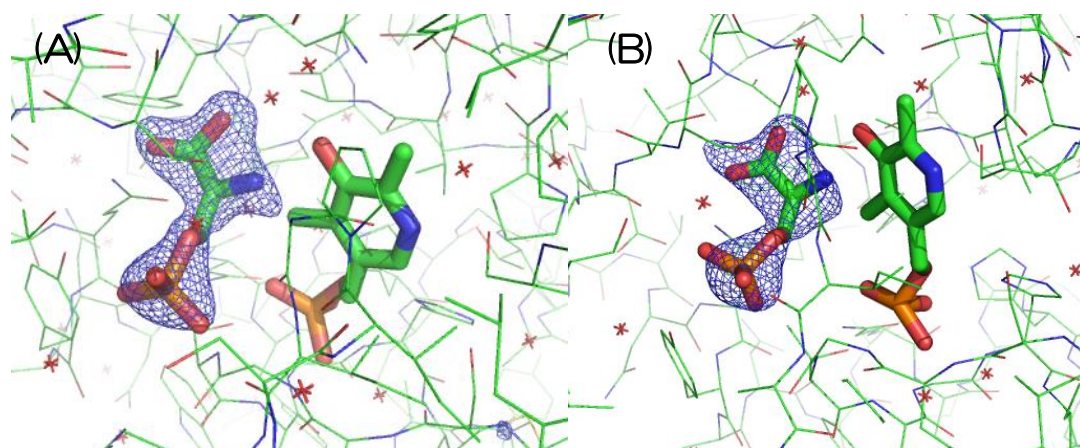


図 3.2. 精密化後の複合体の F_0-F_0 オミットマップ。(A) K127A/F225Y-OPS 複合体と(B) K127A/F225Y/R297A-OPS 複合体の OPS のオミットマップを COOT を用いて 3σ レベルでを表示した。このオミットマップに精密化後の立体構造を重ね合わせた図である。PLP と OPS を Ball & Stick 表示した。原子の色は、赤 : O、緑 : C、青 : N、橙 : P である。図は Pymol で作成した。

表 3.1. ApOPSS と 1 次基質の AA 形成度 (K_{AA})^a。

ApOPSS	OPS (μ M)	OAS (μ M)
野生型	12 (0.24)	55 (1.8)
F225A	140 (0.24)	1500 (520)
F225Y	22 (5.7)	500 (100)
F225Y R297A	1300 (200)	140 (39)
R297A	8500 (220) ^b	20 (3.2) ^b
R297Q	1700 (0.85)	41 (1.0)
R297K	100 (13) ^b	70 (4.4) ^b

^a 表の値と括弧内の値は、それぞれ 3 回の測定から算出された平均値とその標準偏差である。

^b 先行論文のデータ[76]。測定条件は本論文と同一である。

表 3.2. OPS に対する TNB を用いた活性測定 ^a。

ApOPSS	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
野生型	0.35 (0.060)	113 (3.8)	320
F225A	0.42 (0.12)	54 (4.4)	130
F225Y	0.62 (0.55)	9.3 (0.84)	15
F225Y/R297A	1.3 (0.23)	7.6 (0.99)	5.8
R297A	24 (13)	16 (4.4)	0.67
R297Q	1.3 (0.78)	28 (5.3)	22

^a 表の値と括弧内の値は、それぞれ 3 回の測定から算出された平均値とその標準偏差である。

表 3.3. OAS に対する TNB を用いた活性測定 ^a。

ApOPSS	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
野生型	0.25 (0.022)	42 (1.0)	170
F225A	1.5 (0.53)	16 (1.1)	11
F225Y	0.63 (0.47)	5.6 (0.23)	8.9
F225Y/R297A	0.62 (0.29)	1.2 (0.071)	1.9
R297A	2.2 (0.076)	24 (0.15)	11
R297Q	0.013 (0.019)	24 (6.7)	1800

^a 表の値と括弧内の値は、それぞれ 3 回の測定から算出された平均値とその標準偏差である。

表 3.4. 回折データと最終構造の精密化データ

Data collection	F225Y ApOPSS-OPS	F225Y R297A ApOPSS-OPS
Wavelength (Å)	0.9	0.9
Space group	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Unit-cell parameters (Å)		
a = b	75.3	75.2
c	275.5	275.9
Resolution range (Å)	50.0-1.58 (1.62-1.58)	50.0-1.79 (1.82-1.79)
Total No. of observed reflections	1070130	569687
No. of unique reflections	109641	75778
Average I/σ(I)	21.6 (1.0)	13.7 (1.1)
R _{merge}	0.099	0.118
Completeness (%)	94.6 (60.3)	98.7 (91.6)
Refinement		
No. of atoms		
Protein	5872	5832
PLP	30	30
MPD	8	8
OPS	22	22
Water	218	185
Resolution used in refinement (Å)	46.07-1.58	72.56-1.79
Rwork/Rfree	0.189/0.231	0.273/0.322
Wilson B factor (Å ²)	22.1	19.4
RMSD, bond distances (Å)	0.0198	0.0163
RMSD, bond angles (°)	2.1600	2.0186
Mean overall B factor (Å ²)	38	39
Average B factors (Å ²)		
OPS	36	58
Number of residues in Ramachandran plot		
Most favoured regions (%)	97.9	96.5
Allowed regions (%)	1.7	3.3
Outlier region (%)	0.4	0.3
PDB code	Unregistered	Unregistered

括弧は最外殻分解能での値である。

3.3.5. 構造観察

野生型 free、K127A 変異体-OPS 複合体、K127A/F225Y 変異体-OPS 複合体、K127A/F225Y/R297A 変異体-OPS 複合体の重ね合わせを図 3.3 (p.56)に示した。図 3.3 A は ApOPSS の F225 と R297 と OPS との位置関係を示しており、F225 と R297 の間に活性ポケットが位置する。図 3.3 B に各構造と各構造の OPS のリン酸基間の原子間距離を示した。K127A 変異体-OPS 複合体は OPS のリン酸基の O 原子と R297 の ϵ 位の N 原子間距離が 4.12 Å であった。K127A/F225Y 変異体-OPS 複合体では、OPS リン酸基の O 原子と R297 の ϵ 位の N 原子間距離が 3.90 Å であった。さらに、K127A/F225Y 変異体-OPS 複合体では、OPS リン酸基の O 原子と Tyr の OH 基の O 原子との原子間距離が 2.46 Å であり、2 か所での水素結合がみられた。K127A/F225Y/R297A 変異体-OPS 複合体では、Tyr の OH 基の O 原子を挟んで、OPS のリン酸基の 2 つの O 原子がほぼ同じ距離(3.13 Å と 3.19 Å)に位置していた。

ApOPSS の 225 番目の残基について、各結晶構造の温度因子の値を元に結晶像の位置を色で比較すると、K127A/F225Y/R297A 変異体が最も温度因子が大きかった(図 3.3 C, D)。

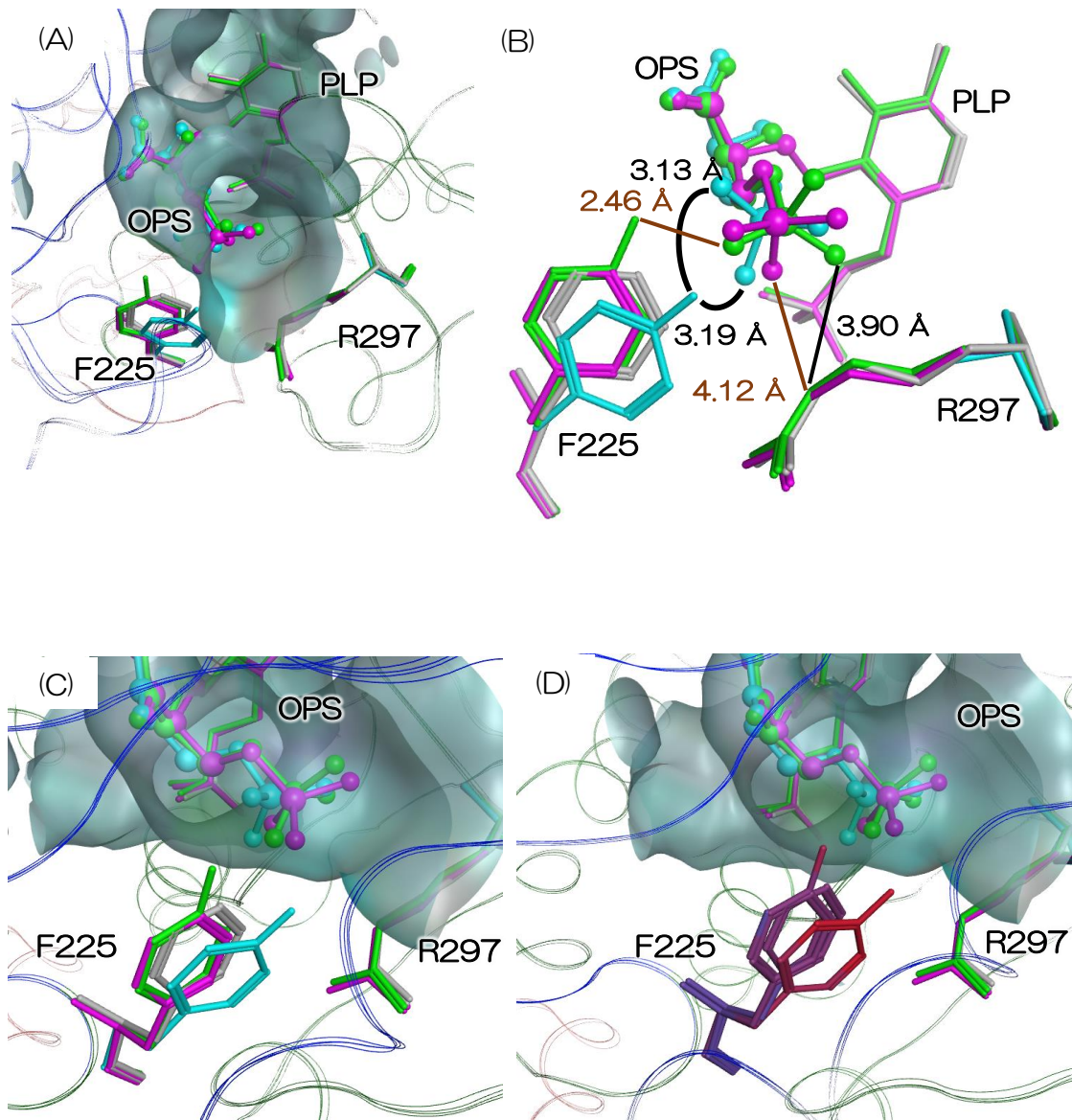


図 3.3. 野生型やその変異体と OPS との結晶構造の重ね合わせ。(A) ApOPSS 内の OPS と F225 と R297 の位置関係を示した。(B) OPS との各複合体構造に対して、ApOPSS の 225 番の残基あるいは 297 番目の残基と OPS 間で、最も近い原子間距離を表示した。(C) 225 番目の残基に焦点を当てた。(D) ApOPSS の 225 番の残基の温度因子を表示したものであり、(C) の構造の F225 の部分のみ色を変えた。Stick 表示の白は野生型 free、ピンクは K127A 変異体-OPS 複合体、黄緑は K127A/F225Y 変異体-OPS 複合体、水色は K127A/F225Y/R297A 変異体-OPS 複合体の構造である。(D) の色は青が濃い紫色ほど原子の温度因子が低く、赤が濃い紫色ほど原子の温度因子が高いことを示す。リボン表示は ApOPSS の主鎖である。図は MOE で作成した。

3.4. Discussion

第2章では、着目した ApOPSS における F225 の役割を推定した。システイン合成酵素間でアラインメントを行うと、ApOPSS の F225 に相当する残基は(巻末の図 p. 78 の黄色)、MtCysM と MtCysK2 において Tyr であった。MtCysM のドッキングシミュレーションによると、この Tyr の水酸基が OPS のリン酸基と 3.15 Å の距離にあったため相互作用することが推測されていた[29]。

そこで、① OPS の認識と ApOPSS の Tyr (225)の関連を検証した。

また、OPS の認識に重要であるとされる残基は Arg であるが、OAS を1次基質とする OASS では、Gln として高く保存されていた。そこで、② OAS の認識と ApOPSS の Gln (297)の関連を検証した。

① 1次基質 OPS の認識

野生型と F225A 変異体を比較したとき、OPS に対する K_m 値にほとんど差が見られなかった(表 3.2, p.53: 野生型 0.35 mM、F225A 0.42 mM)。一方、野生型と R297A 変異体の比較では、R297A 変異体のほうが OPS に対する K_m 値と K_{AA} 値がそれぞれ 69 倍、708 倍増加し(表 3.2 K_m 値: 野生型 0.35 mM、R297A 24 mM、表 3.1 K_{AA} 値: 野生型 12 μ M、R297A 8500 μ M)、親和性と AA 形成度が低下した。R297 は OPS の反応に関与することが、先行論文と同様に示され[66]、[76]、F225 は OPS との反応に対しては影響が小さいことが示された。

R297A と F225Y/R297A 変異体を比較すると、F225Y/R297A 変異体のほうが K_m 値と K_{AA} 値がそれぞれ 1/18、1/7 となり(表 3.2 K_m 値: F225Y/R297A 1.3 mM、R297A 24 mM、表 3.1 K_{AA} 値: F225Y/R297A 1300 μ M、R297A 8500 μ M)、R297A に F225Y の変異を加えることによって、OPS に対する親和性と AA 形成度が R297A 変異体よりも向上した。

F225Y/R297A 変異体では、Arg 残基がなくても Y225 によって AA の形成度や親和性が上がったことについて、図 3.3 (p.56)の温度因子を見ると、F225Y/R297A 変異体の Tyr の温度因子が高かったため、この Tyr の柔軟性が R297 の役割を担っていると推測される。

以上により、ApOPSS における結果から、225 番目の残基が Tyr であることと、297 番目の残基が Arg であることは、OPS との反応を可能にするであろうことが示唆された。

しかしながら、表 3.2 (p.53)の OPS に対する k_{cat} は、R297A と F225Y/R297A と F225Y 変異体間で比較すると、R297A 変異体の活性が最も高かった。これら

の結晶構造を比較すると(図 3.3, p.56)、OPS のリン酸基(脱離基)は、R297A 変異体よりも F225Y や F225Y/R297A 変異体との水素結合距離が短く、強く相互作用していた。R297A 変異体と比べ、F225Y/R297A と F225Y 変異体では OPS に対する親和性が高く、この水素結合の強さが、活性が低下した原因であると考えた。

② 1 次基質 OAS の認識

297 番目に変異を加えた変異体と野生型間の比較を以下に記述した。

OAS に対する K_{AA} 値では、R297A 変異体の値が最も小さく、AA 形成度が高かった(表 3.1 K_{AA} : 野生型 55 μM 、R297A 20 μM 、R297Q 41 μM 、R297K 70 μM)。これらの中で K_{AA} 値を高かった順に並べると、R297K (70 μM)、野生型 (55 μM)、R297Q (41 μM)、R297A (20 μM)となった。297 番目の側鎖の分子が小さく、活性部位の出入り口が広いほうが、AA の形成度が高い傾向にあることが示された。

一方、OAS に対する K_m 値の比較では、R297Q 変異体の値が最も小さく、親和性が高かった(表 3.3 K_m : 野生型 0.25 mM、R297A 2.2 mM、R297Q 0.013 mM)。OAS に対する AA の形成度では R297A での反応性が高いが、活性測定での OAS に対する親和性 R297Q での反応性が高く、異なる結果となった。活性測定では R297Q 変異体が、OAS との親和性が高かったことについて、Glu のアミド基が 2 次基質のチオール基を引き付けたことが、OAS との親和性の向上につながり、反応性(k_{cat}/K_m)を高めたと考えた。

225 番目に変異を加えた変異体間の比較を以下に記述した。

F225A と F225Y 変異体の OAS に対する K_{AA} 値および K_m 値を比較すると、どちらも F225Y 変異体のほうが値が小さく、AA の形成度や親和性が高かった(表 3.1 K_{AA} : F225A 1500 μM 、F225Y 500 μM 、表 3.3 K_m : F225A 1.5 mM、F225Y 0.63 mM)。しかし、OAS に対する k_{cat} 値を比べると、F225Y 変異体のほうが 3 倍値が大きかった(表 3.3 k_{cat} : F225A 16 min^{-1} 、F225Y 5.6 min^{-1})。この結果は、前述した OPS の場合とおそらく同様であり、OAS を基質とした場合も Tyr 残基と OAS のアセチル基(脱離基)との原子間距離が短くなり、野生型よりも強い水素結合を形成しているのではないかと思われる。そのため、アセチル基が脱離しにくいことが F225Y 変異体において k_{cat} 値が低下する原因になったのではないかと考えた。

F225Y/R297A 変異体の K_m 値は、R297A と比較すると値が低いにもかかわらず、 k_{cat} 値が小さくなっているのも、F225Y 変異体の場合と同様に、Tyr 残基によるアセチル基の脱離のしにくさが原因となったと思われる(表 3.3 K_m : F225Y/R297A 0.62 mM、R297A 2.2 mM、表 3.3 k_{cat} : F225Y/R297A 1.2 min^{-1} 、

R297A 24 min⁻¹).

これらの結果から、225 番目の残基が Phe であると OAS との反応性が高まると考えた。

以上により、ApOPSS における結果から、225 番目の残基が Phe、297 番目の残基が Gln のとき、OAS との反応が高く、この Phe/Gln が OAS の認識に重要であろうことが示唆された。

3.5. Conclusion

本章では、第 2 章において役割を推定した F225 と、OPS の認識に重要な R297 が、1 次基質 OAS/OPS の基質認識の特異性に関連しているかについて検証した。

ApOPSS での結果より、225 番目残基が Phe または Tyr であることと、297 番目の残基が Arg または Gln であることが、1 次基質の認識に関わっている可能性が示唆された。OAS の認識には F225 と Q297、OPS の認識には Y225 と R297 が関連していると結論した。

4. General Discussion

我々の研究室ではこれまでに、この新規 OPSS の反応機構に関わるアミノ酸残基の役割の推定を試みてきた。続きとして、本論文では 1 次基質の反応に関わるアミノ酸残基の解明を進めた。

第 2 章では、機能未知であった F225 は、1 次基質である OAS や OPS の配向を定めており、反応時には AA のイミノピルビン酸へ放出を抑えることで AA の安定化に大きく貢献していることを明らかにした。

第 3 章では、1 次基質の認識の区別において、OAS の認識には F225 と Q297、OPS の認識には Y225 と R297 が関連していることを示した。この 1 次基質に対する Glu と Tyr 残基の役割は、システイン合成酵素の新たな知見となった。

このような研究の目的の 1 つとして、私はヒト病原菌に対する阻害剤の開発への応用を考えている。ヒトに対する病原菌は結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* や赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* などおよそ 50 種類存在する。*M. tuberculosis* や *E. histolytica* に対する感染症治療薬は存在するが、薬剤耐性菌の出現している現状があるため、新たな作用機構の感染症治療薬の開発が求められている。そこで、新たな作用機構薬のターゲットとして、システイン生合成経路に着目した。

ApOPSS とヒト病原菌のシステイン合成酵素のアラインメントを図 4.1 (p.61)に示した。ApOPSS の 225 番目の残基に Tyr 残基を持つのは、OPSS の MtCysM と MtCysK2 であった。MtCysM のモデリングでは、OPS のリン酸基がこの Tyr 残基と水素結合する距離にあることが示されている[29]。また、MtCysK2 の図 4.1 のアラインメントに示した Arg を Ala に置換した変異体では、OPS に対する k_{cat}/K_m 値が MtCysK2 野生型とほとんど活性が変わらない[30]。MtCysK2 の結晶構造は得られていないが、MtCysM と MtCysK2 の配列相同性は 31%であり、アラインメントでも Tyr が一致していることから、MtCysK2 の Tyr は活性部位に位置することが予想される。これら MtCysM と MtCysK2 の Thr 残基は OPS の認識に関わっていることが覗え、第 3 章の ApOPSS の Y225 の測定より、Tyr 残基が OPS の認識に関与するという結果は妥当であると考えられる。今回の知見は、機能未知のシステイン合成酵素に対しアラインメントを行い、Tyr が一致した場合、OPSS の可能性があるかと推測することができる。

また、OPSS では、ApOPSS の 297 番目の残基に対するアラインメントでは、

表 4.1. ヒト病原菌のマルチプルアライメント。ExpASy (Expert Protein Analysis System)にて、“cysteine synthase”のワードで検索し、その中からヒト病原菌を選出した。アライメントは T-coffee を用いて作製した。また、結核菌とトリコモナス原虫もアライメントに加えた。遺伝子名は Uniprot を参照した。

通称名	生物種	遺伝子名	OPSS/OASS	ApOPSSの225	ApOPSSの297
超好熱性古細菌	<i>Aeropyrum pernix</i>	<i>cysO</i>	OPSS	F	R
結核菌	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>cysM</i>	OPSS	Y	R
結核菌	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>cysK2</i>	OPSS	Y	R
トリコモナス原虫	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>TVAG_387920</i>	OPSS	F	K
カンピロバクター	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> serotype O:2	<i>cysM</i>	OASS	F	Q
日和見病原性菌	<i>Emericella nidulans</i>	<i>cysKL</i>	OASS	F	E
大腸菌	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>cysK</i>	OASS	F	Q
インフルエンザ菌	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>cysK</i>	OASS	F	Q
ピロリ菌	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>cysM</i>	OASS	F	E
らい菌	<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>cysK</i>	OASS	F	Q
結核菌	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>cysK1</i>	OASS	F	Q
髄膜炎菌	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B	<i>cysK</i>	OASS	F	Q
緑膿菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>cysM</i>	OASS	F	R
ネズミチフス菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>cysM</i>	OASS	F	R
ネズミチフス菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>cysK</i>	OASS	F	Q
黄色ブドウ球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>cysK</i>	OASS	F	Q
表皮ブドウ球菌	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>cysK</i>	OASS	F	Q
表皮ブドウ球菌	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>cysK</i>	OASS	F	Q
化膿レンサ球菌	<i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M6	<i>cysK</i>	OASS	F	Q

塩基性アミノ酸の R/K であった。この R/K 残基は ApOPSS、MtCysM、TvOPSS において OPS の認識に必要であることが示されていることから(第 3 章, [17], [29], [66], [76])、OPSS では塩基性アミノ酸で保存されている可能性が高い。

これらのことから、OPSS に対する阻害剤は、塩基性アミノ酸とイオン結合をする酸性の官能基を持つ分子構造をもつと親和性が高まると思われる。

OASS 間のアラインメントでは、ApOPSS の 225 番目の残基は Phe で完全に保存されていた(表 4.1, p.61)。MtCysK1 と *E. histolytica* 由来 OASS (EhOASS) では、阻害剤の報告がある [91], [92]。MtCysK1 と阻害剤 (3-((Z)-((Z)-5-(2(carboxymethoxy)benzylidene)-3-methyl-4-oxothiazolidin-2-ylidene)amino)benzoic acid)の結晶構造(PDB ID: 3ZEI)を図 4.1 A に示した。EhOASS と阻害剤の結晶構造はなかったため、論文中で[92]阻害効果の最も高い阻害剤(kerriamycins B)と EhOASS を MOE を用いてドッキングした結果を図 4.1 B に示した。

図 4.1 A の MtCysK1 の F145 と図 4.1 B の EhOASS の F160 は、アライン

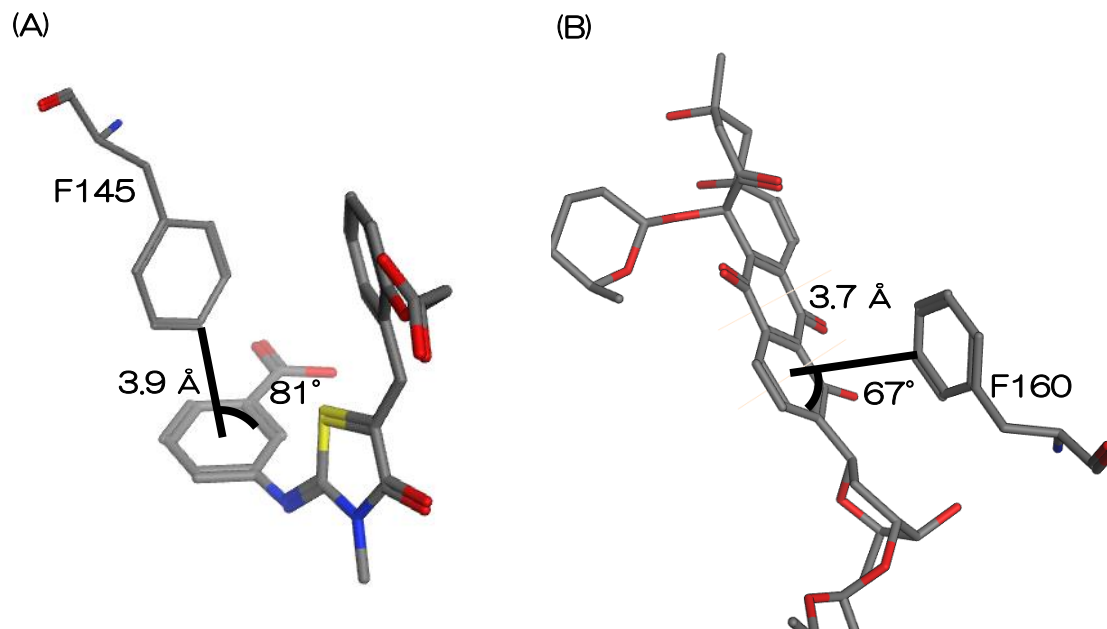


図 4.1. システイン合成酵素と阻害剤。(A) MtCysK1 と阻害剤。(B) EhOASS と阻害剤。それぞれの F145 と F160 は ApOPSS の F225 に対応している。MtCysK1 の F145 と EhOASS の F160 はどちらも阻害剤に対し、CH- π 結合していた。表記した角度は、阻害剤のベンゼン環平面に対する角度を測った。表記した距離(Å)は、阻害剤のベンゼン環中心と酵素の Phe に最も近い C 原子間の距離を測った。

メント上 ApOPSS の F225 に相当する。MtCysK1 の F145 と EhOASS の F160 はどちらも阻害剤に対し、CH- π 結合を形成していた。OASS のこの残基は Phe で完全に保存されているため、OASS に対する阻害剤にはベンゼン環を分子構造に備えると効果的だと考えられる。さらに、この Phe の近隣には、1 次基質 アミノ酸主鎖のカルボキシル基との結合部位がある(巻末の図 p.72-73 橙色、図 1.7 B p.15)。そのため、阻害剤の分子構造は、カルボキシル基が活性部位中心に、ベンゼン環を Phe の近くになるように配置できるとより阻害効果が得られることが考えられる。

図 4.1 (p.61)において、R/Q297 に対しては、阻害剤との特徴的な相互作用は見られなかった。OASS では、Gln で比較的保存されている。OAS は、297 番目の残基の分子が小さいほど活性部位に到達しやすい傾向にあった(表 3.1)。そのため、OASS に対して活性部位中心部に向かう阻害剤の構造は、OAS のアセチル基よりも小さな分子構造が好ましいかもしれない。

Acknowledgements

本論文は研究成果を「**超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来 O-phospho-L-serine sulfhydrylase の 1 次基質認識機構の解明**」としてまとめたものである。

本研究を進めるにあたり、中村 卓先生には指導教官として研究や勉強会等にて基礎から丁寧に御指導頂き、本研究の遂行に数多くの御助言を頂きました。この場を借りて深く感謝申し上げます。河合 靖先生には主査として、西 義介先生、白井 剛先生には副査として、塩生 真史先生には COMP3D や共同研究において多くの御助言を頂きました。ここに深く感謝申し上げます。産業総合技術研究所の石川 一彦先生、片岡 未有氏、安宅 光雄氏、渡邊 真宏氏には構造解析の技術・手法の御教授及び本研究の御助言を頂きました。この場を借りて厚くお礼を申し上げます。そして、研究を遂行するにあたり日頃より御協力頂いた、本分子生物化学研究室の在学生および卒業生の皆様に深く感謝致します。

X線結晶構造解析のための放射光照射実験は、公益財団高輝度光科学研究センターの大型放射光施設 SPring-8 の BL44XU で行われた。研究課題番号は、2013A6836, 2013B6836, 2014A6936, 2014B6936, 2015B6529, 2016A6630 である。

References

- [1] J. Yin *et al.*, “L-Cysteine metabolism and its nutritional implications,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 60, no. 1, pp. 134–146, 2016.
- [2] O. W. Griffith, “Mammalian sulfur amino acid metabolism: An overview,” *Methods Enzymol.*, vol. 143, pp. 366–376, 1987.
- [3] A. P. P. M. PEGG, ANTHONY E., “Polyamine Metabolism and Function,” *Am. J. Physiol.*, vol. 243, no. 5, pp. C212–C221, 1982.
- [4] J. M. Harlan, J. D. Levine, K. S. Callahan, B. R. Schwartz, and L. A. Harker, “Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide,” *J. Clin. Invest.*, vol. 73, no. 3, pp. 706–713, 1984.
- [5] P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus, and G. N. Somero, “Living with Water Stress : Evolution of Osmolyte Systems,” *Science (80-)*, vol. 217, no. 4566, pp. 1214–1222, 1982.
- [6] G. Jeelani *et al.*, “Two atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine and iron reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 35, pp. 26889–26899, 2010.
- [7] A. Husain, G. Jeelani, D. Sato, and T. Nozaki, “Global analysis of gene expression in response to L-Cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*,” *BMC Genomics*, vol. 12, pp. 275–292, 2011.
- [8] A. Levonen *et al.*, “Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products.,” *Biochem. J.*, vol. 378, no. Pt 2, pp. 373–82, 2004.
- [9] R. C. Fahey, G. L. Newton, B. Arrick, T. Overdank-Bogart, and S. B. Aley, “*Entamoeba histolytica* : A Eukaryote Without Glutathione Metabolism,” *Science (80-)*, vol. 224, no. 4644, pp. 70–72, 1984.
- [10] K. NM, “Biosynthesis of cysteine,” in *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 1996, pp. 514–527.
- [11] M. Wada and H. Takagi, “Metabolic pathways and biotechnological production of L -cysteine,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 73, pp. 48–54, 2006.

- [12] T. Nozaki, Y. Shigeta, Y. Saito-nakano, M. Imada, and W. D. Kruger, "Characterization of Transsulfuration and Cysteine Biosynthetic Pathways in the Protozoan Hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 9, pp. 6516–6523, 2001.
- [13] Y. Kawarabayasi *et al.*, "Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1.," *DNA Res.*, vol. 6, pp. 83–101, 1999.
- [14] R. A. M. Williams, G. D. Westrop, and G. H. Coombs, "Two pathways for cysteine biosynthesis in *Leishmania major*," *Biochem. J.*, vol. 420, pp. 451–462, 2009.
- [15] D. Petrin, K. Delgaty, R. Bhatt, and G. Garber, "Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 11, no. 2, pp. 300–17, 1998.
- [16] a E. McKie, T. Edlind, J. Walker, J. C. Mottram, and G. H. Coombs, "The primitive protozoon *Trichomonas vaginalis* contains two methionine gamma-lyase genes that encode members of the gamma-family of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 0021–9258 (Print), pp. 5549–5556, 1998.
- [17] G. D. Westrop *et al.*, "Cysteine Biosynthesis in *Trichomonas vaginalis* Involves Cysteine Synthase Utilizing O-Phosphoserine," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 35, pp. 25062–25075, 2006.
- [18] R. K. Singh, M. Mazumder, B. Sharma, and S. Gourinath, "Structural investigation and inhibitory response of halide on phosphoserine aminotransferase from *Trichomonas vaginalis*," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1860, no. 7, pp. 1508–1518, 2016.
- [19] V. Ali and T. Nozaki, "Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by 'amitochondriate' protozoan parasites," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 1, pp. 164–187, 2007.
- [20] R. Schnell and G. Schneider, "Biochemical and Biophysical Research Communications Structural enzymology of sulphur metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 396, no. 1, pp. 33–38, 2010.
- [21] C. T. Jurgenson, K. E. Burns, T. P. Begley, and S. E. Ealick, "Crystal structure of a sulfur carrier protein complex found in the cysteine biosynthetic pathway of *Mycobacterium tuberculosis*," *Biochemistry*,

- vol. 47, no. 39, pp. 10354–10364, 2008.
- [22] V. Ullas *et al.*, “Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Discovery of novel inhibitors targeting the Mycobacterium tuberculosis O-acetylserine sulfhydrylase (CysK1) using virtual high-throughput screening,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 5, pp. 1182–1186, 2013.
- [23] R. Schnell, W. Oehlmann, M. Singh, and G. Schneider, “Structural Insights into Catalysis and Inhibition of O-Acetylserine Sulfhydrylase from Mycobacterium tuberculosis CRYSTAL STRUCTURES OF THE ENZYME α -AMINOACRYLATE INTERMEDIATE AND AN ENZYME-INHIBITOR COMPLEX,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 32, pp. 23473–23481, 2007.
- [24] V. U. Jean Kumar *et al.*, “Discovery of novel inhibitors targeting the Mycobacterium tuberculosis O-acetylserine sulfhydrylase (CysK1) using virtual high-throughput screening,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 5, pp. 1182–1186, 2013.
- [25] D. Ågren, R. Schnell, and G. Schneider, “The C-terminal of CysM from Mycobacterium tuberculosis protects the aminoacrylate intermediate and is involved in sulfur donor selectivity,” *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 2, pp. 330–336, 2009.
- [26] C. Uni, “O -Phospho- L -serine and the Thiocarboxylated Sulfur Carrier Protein CysO-COSH Are Substrates for CysM , a Cysteine Synthase from Mycobacterium tuberculosis †,” pp. 11606–11615, 2008.
- [27] A. Reductase, J. A. Hong, D. P. Bhave, and K. S. Carroll, “Identification of Critical Ligand Binding Determinants in Mycobacterium tuberculosis,” pp. 5485–5495, 2009.
- [28] K. E. Burns, S. Baumgart, P. C. Dorrestein, H. Zhai, F. W. McLafferty, and T. P. Begley, “Reconstitution of a New Cysteine Biosynthetic Pathway in Mycobacterium tuberculosis,” vol. 7, pp. 11602–11603, 2005.
- [29] D. Ågren, R. Schnell, and M. Singh, “Cysteine Synthase (CysM) of Mycobacterium tuberculosis Is an O -Phosphoserine Sulfhydrylase: EVIDENCE FOR AN ALTERNATIVE CYSTEINE BIOSYNTHESIS PATHWAY IN MYCOBACTERIA,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, pp. 31567–31574, 2008.
- [30] E. M. Steiner, D. Böhth, P. Lössl, F. Vilaplana, R. Schnell, and G.

- Schneider, “CysK2 from *Mycobacterium tuberculosis* Is an O-Phospho-L-Serine- Dependent S-Sulfocysteine Synthase,” *J. Bacteriol.*, vol. 196, no. 19, pp. 3410–3420, 2014.
- [31] D. P. Bhave, W. B. Muse, and K. S. Carroll, “Drug targets in mycobacterial sulfur metabolism.,” *Infect. Disord. Drug Targets*, vol. 7, no. 2, pp. 140–58, 2007.
- [32] G. Arora *et al.*, “High throughput screen identifies small molecule inhibitors specific for *Mycobacterium tuberculosis* phosphoserine phosphatase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 36, pp. 25149–25165, 2014.
- [33] C. Tai, W. M. Rabeh, R. Guan, K. D. Schnackerz, and P. F. Cook, “Effect of mutation of lysine-120 , located at the entry to the active site of O -acetylserine sulfhydrylase-A from *Salmonella typhimurium*,” vol. 1784, pp. 629–637, 2008.
- [34] M. D. Hulanicka, S. G. Hallquist, N. M. Kredich, and T. Mojica, “Regulation of O-acetylserine sulfhydrylase B by L-cysteine in *Salmonella typhimurium*,” *J. Bacteriol.*, vol. 140, no. 1, pp. 141–146, 1979.
- [35] I. Effects, “Regulation of L-Cysteine Biosynthesis in *Salmonella typhimurium*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 246, no. 11, 1971.
- [36] E. Salsi *et al.*, “Exploring O -acetylserine sulfhydrylase-B isoenzyme from *Salmonella typhimurium* by fluorescence spectroscopy,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 505, no. 2, pp. 178–185, 2011.
- [37] P. F. Cook and R. T. Wedding, “A reaction mechanism from steady state kinetic studies for O-acetylserine sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium* LT-2.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 251, pp. 2023–2029, 1976.
- [38] F. Di, “*Salmonella Typhimurium* exhibits fluoroquinolone resistance mediated by the accumulation of the antioxidant molecule H₂S in a CysK-dependent manner,” no. i, pp. 1–7, 2016.
- [39] C. H. Tai, S. R. Nalabolu, T. M. Jacobson, D. E. Minter, and P. F. Cook, “Kinetic mechanisms of the A and B isozymes of O-acetylserine sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium* LT-2 using the natural and alternate reactants,” *Biochemistry*, vol. 32, no. 25, pp. 6433–6442, 1993.
- [40] A. Chattopadhyay *et al.*, “Structure, mechanism, and conformational dynamics of O-acetylserine sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium*: Comparison of A and B isozymes,” *Biochemistry*, vol. 46,

- no. 28, pp. 8315–8330, 2007.
- [41] T. Nakamura, H. Iwahashi, and Y. Eguchi, “Enzymatic proof for the identity of the S-sulfocysteine synthase and cysteine synthase B of *Salmonella typhimurium*,” *J. Bacteriol.*, vol. 158, no. 3, pp. 1122–7, 1984.
- [42] M. Diseases, “Purification and Characterization a Bifunctional Protein Complex , *Salmonella typhimurium* of Cysteine from,” vol. 244, 1969.
- [43] P. F. Cook, C. H. Tai, C. C. Hwang, E. U. Woehl, M. F. Dunn, and K. D. Schnackerz, “Substitution of pyridoxal 5'-phosphate in the O-acetylserine sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium* by cofactor analogs provides a test of the mechanism proposed for formation of the ??-aminoacrylate intermediate,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 42, pp. 25842–25849, 1996.
- [44] P. Burkhard, C. H. Tai, C. M. Ristroph, P. F. Cook, and J. N. Jansonius, “Ligand binding induces a large conformational change in O-acetylserine sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium*,” *J. Mol. Biol.*, vol. 291, no. 4, pp. 941–953, 1999.
- [45] R. Guan, S. a. Nimmo, K. D. Schnackerz, and P. F. Cook, “³¹P NMR studies of O-acetylserine sulfhydrylase-B from *Salmonella typhimurium*,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 487, no. 2, pp. 85–90, 2009.
- [46] P. Burkhard, G. S. Rao, E. Hohenester, K. D. Schnackerz, P. F. Cook, and J. N. Jansonius, “Three-dimensional structure of O-acetylserine sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium*,” *J. Mol. Biol.*, vol. 283, no. 1, pp. 121–33, 1998.
- [47] I. Nagpal, I. Raj, N. Subbarao, and S. Gourinath, “Virtual screening, identification and in vitro testing of novel inhibitors of O-acetyl-L-serine sulfhydrylase of *Entamoeba histolytica*,” *PLoS One*, vol. 7, no. 2, pp. 1–7, 2012.
- [48] C. Krishna, R. Jain, T. Kashav, D. Wadhwa, N. Alam, and S. Gourinath, “Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cysteine synthase from *Entamoeba histolytica*,” *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, vol. 63, no. 6, pp. 512–515, 2007.
- [49] K. Chinthalapudi, M. Kumar, S. Kumar, S. Jain, N. Alam, and S. Gourinath, “Crystal structure of native O-acetyl-serine sulfhydrylase from *Entamoeba histolytica* and its complex with cysteine: Structural

- evidence for cysteine binding and lack of interactions with serine acetyl transferase,” *Proteins Struct. Funct. Genet.*, vol. 72, no. 4, pp. 1222–1232, 2008.
- [50] I. Raj, M. Mazumder, and S. Gourinath, “Molecular basis of ligand recognition by OASS from *E. histolytica*: insights from structural and molecular dynamics simulation studies,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1830, no. 10, pp. 4573–83, 2013.
- [51] M. Mori *et al.*, “Identification of natural inhibitors of *Entamoeba histolytica* cysteine synthase from microbial secondary metabolites,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. SEP, pp. 1–10, 2015.
- [52] S. M. Agarwal and A. Azam, “Inhibitors of *Escherichia coli* serine acetyltransferase block proliferation of *Entamoeba histolytica* trophozoites,” vol. 38, pp. 137–141, 2008.
- [53] C. M. Johnson, B. Huang, S. L. Roderick, and P. F. Cook, “Kinetic mechanism of the serine acetyltransferase from *Haemophilus influenzae*,” vol. 429, pp. 115–122, 2004.
- [54] E. Salsi *et al.*, “Design of O-acetylserine sulfhydrylase inhibitors by mimicking nature,” *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 1, pp. 345–356, 2010.
- [55] S. Banerjee, M. K. Ekka, and S. Kumaran, “Comparative thermodynamic studies on substrate and product binding of O-acetylserine sulfhydrylase reveals two different ligand recognition modes,” *BMC Biochem.*, vol. 12, no. 1, p. 31, 2011.
- [56] I. Raj, S. Kumar, and S. Gourinath, “The narrow active-site cleft of O-acetylserine sulfhydrylase from *Leishmania donovani* allows complex formation with serine acetyltransferases with a range of C-terminal sequences,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 68, no. 8, pp. 909–919, 2012.
- [57] K. Singh *et al.*, *Interaction between cysteine synthase and serine O-acetyltransferase proteins and their stage specific expression in Leishmania donovani*, vol. 131. Elsevier Ltd, 2016.
- [58] T. Nakatani, I. Ohtsu, G. Nonaka, N. Wiriyanawudhiwong, and S. Morigasaki, “Enhancement of thioredoxin / glutaredoxin- mediated L -cysteine synthesis from S -sulfocysteine increases L -cysteine production in *Escherichia coli*,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 62, pp. 1–9, 2012.
- [59] F. Spyrakis *et al.*, “Fine tuning of the active site modulates specificity

- in the interaction of O-acetylserine sulfhydrylase isozymes with serine acetyltransferase,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1834, no. 1, pp. 169–181, 2013.
- [60] T. H. P. Maier, “Semisynthetic production of unnatural L- α -amino acids by metabolic engineering of the cysteine-biosynthetic pathway,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 4, pp. 422–427, 2003.
- [61] M. T. Claus, G. E. Zocher, T. H. P. Maier, and G. E. Schulz, “Structure of the O -Acetylserine Sulfhydrylase Isoenzyme CysM from *Escherichia coli* †,‡,” pp. 8620–8626, 2005.
- [62] C. Zhao, Y. Kumada, H. Imanaka, K. Imamura, and K. Nakanishi, “Cloning , overexpression , puri W cation , and characterization of O -acetylserine sulfhydrylase-B from *Escherichia coli*,” vol. 47, pp. 607–613, 2006.
- [63] T. M. Jacobson and P. F. Cook, “Acid-Base Chemical Mechanism of O-Acetylserine Sulfhydrylases-A and -B from pH Studies,” *Biochemistry*, vol. 34, pp. 12311–12322, 1995.
- [64] U. A. Conditions, “Delayed Inducibility of Sulphite Reductase in *cysM* Mutants of *Salmonella typhimurium* Under Anaerobic Conditions,” pp. 1791–1794, 1982.
- [65] K. Mino and K. Ishikawa, “A novel O-phospho-L-serine sulfhydrylation reaction catalyzed by O-acetylserine sulfhydrylase from *Aeropyrum pernix* K1,” *FEBS Lett.*, vol. 551, no. 1–3, pp. 133–138, 2003.
- [66] Y. Oda, K. Mino, K. Ishikawa, and M. Ataka, “Three-dimensional Structure of a New Enzyme, O-Phosphoserine Sulfhydrylase, Involved in L-Cysteine Biosynthesis by a Hyperthermophilic Archaeon, *Aeropyrum pernix* K1, at 2.0 Å ° Resolution,” *J. Mol. Biol.*, vol. 351, pp. 334–344, 2005.
- [67] K. Mino and K. Ishikawa, “Characterization of a Novel Thermostable O -Acetylserine Sulfhydrylase from *Aeropyrum pernix* K1,” *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 7, pp. 2277–2284, 2003.
- [68] F. Paul, “Pyridoxal r , -Elimination Reactions : Mechanism of O -Acetylserine Sulfhydrylase,” vol. 34, no. 1, pp. 49–59, 2001.
- [69] S. Bettati *et al.*, “Role of Pyridoxal 5’-Phosphate in the Structural Stabilization of O-Acetylserine Sulfhydrylase,” vol. 275, no. 51, pp. 40244–40251, 2000.
- [70] A. Amadasi *et al.*, “Pyridoxal 5’-Phosphate Enzymes as Targets for

- Therapeutic Agents,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 14, pp. 1291–1324, 2007.
- [71] G. Schneider, H. Käck, and Y. Lindqvist, “The manifold of vitamin B6 dependent enzymes,” *Structure*, vol. 8, no. 1, pp. R1–R6, 2000.
- [72] K. Mino, T. Yamanoue, T. Sakiyama, N. Eisaki, A. Matsuyama, and K. Nakanishi, “Effects of Bienenzyme Complex Formation of Cysteine Synthetase from *Escherichia coli* on Some Properties and Kinetics,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 64, no. 8, pp. 1628–1640, 2000.
- [73] Y. Sako *et al.*, “*Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 degrees C.,” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 46, no. 4, pp. 1070–1077, 1996.
- [74] A. Uchida, “Molecular Characterization and Postslicing Fate of Three Introns within the Single rRNA Operon of the Hyperthermophilic Archaeon *Aeropyrum pernix* K1,” vol. 180, no. 14, pp. 3635–3643, 1998.
- [75] T. Daifuku *et al.*, “Variation of the virus-related elements within syntenic genomes of the hyperthermophilic archaeon *aeropyrum*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 19, pp. 5891–5898, 2013.
- [76] T. Nakamura *et al.*, “Structural analysis of the substrate recognition mechanism in O-phosphoserine sulfhydrylase from the hyperthermophilic archaeon *aeropyrum pernix* K1,” *J. Mol. Biol.*, vol. 422, no. 1, pp. 33–44, 2012.
- [77] E. Takeda, K. Kunimoto, Y. Kawai, M. Kataoka, K. Ishikawa, and T. Nakamura, “Role of F225 in O-phosphoserine sulfhydrylase from *Aeropyrum pernix* K1,” *Extremophiles*, vol. 20, no. 5, pp. 733–745, 2016.
- [78] H. Tian *et al.*, “Identification of the structural determinants for the stability of substrate and aminoacrylate external schiff bases in o -acetylserine sulfhydrylase-A,” *Biochemistry*, vol. 49, no. 29, pp. 6093–6103, 2010.
- [79] G. Zocher, U. Wiesand, and G. E. Schulz, “High resolution structure and catalysis of O -acetylserine sulfhydrylase isozyme B from *Escherichia coli*,” vol. 274, pp. 5382–5389, 2007.
- [80] K. Mino, Y. Oda, M. Ataka, and K. Ishikawa, “Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of O-acetylserine sulfhydrylase from *Aeropyrum pernix* K1,” *Acta Cryst.*, vol. D59, pp. 338–340, 2003.
- [81] Z. Otwinowski and Wladek Minor, “Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode,” *Macromol. Crystallogr. Part A*, vol. 276,

- pp. 307–326, 1997.
- [82] CollaborativeComputationalProjectNumber4, “The CCP4 suite programs for protein crystallography,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 50, no. Pt 5, pp. 760–763, 1994.
- [83] P. Emsley and K. Cowtan, “Coot : model-building tools for molecular graphics,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. D60, pp. 2126–2132, 2004.
- [84] S. C. Lovell *et al.*, “Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation,” *Proteins-Structure Funct. Genet.*, vol. 50, pp. 437–450, 2003.
- [85] S. K. Kearsley, “On the orthogonal transformation used for structural comparisons,” *Acta Cryst.*, vol. A45. pp. 208–210, 1989.
- [86] M. K. Gaitonde, “A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids.,” *Biochem. J.*, vol. 104, no. 2, pp. 627–633, 1967.
- [87] P. F. Cook, S. Hara, S. Nalabolu, and K. D. Schnackerz, “pH dependence of the absorbance and ³¹P NMR spectra of O-acetylserine sulfhydrylase in the absence and presence of O-acetyl-L-serine,” *Biochemistry*, vol. 31, no. 8, pp. 2298–303, 1992.
- [88] A. Thaliana, E. R. Bonner, R. E. Cahoon, S. M. Knapke, and J. M. Jez, “Molecular basis of cysteine biosynthesis in plants: Structural and functional analysis of O-acetylserine sulfhydrylase from *Arabidopsis thaliana*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 46, pp. 38803–38813, 2005.
- [89] G. AK, M. K, S. M, K. S, K. T, and Y. S, “NMR and X-ray structures of the putative sterol carrier protein 2 from *Thermus thermophilus* HB8 show conformational changes,” *J Struct Funct Genomics*, vol. 11, no. 4, pp. 247–256, 2010.
- [90] P. Di Tommaso *et al.*, “T-Coffee: A web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, pp. 13–17, 2011.
- [91] Ömer Poyraz, Variam Ullas Jeankumar, Shalini Saxena, Robert Schnell, Martin Haraldsson, Perumal Yogeewari, Dharmarajan Sri-ram and Gunter Schneider, “Structure-Guided Design of Novel Thiazolidine Inhibitors of O - Acetyl Serine Sulfhydrylase from *Mycobacterium tuberculosis*,” *J. Med. Chem.*, vol. 56, pp. 6457–6466, 2013.
- [92] Mihoko Mori, Ghulam Jeelani, Yui Masuda, Kazunari Sakai, Kumiko

Tsukui, Danang Waluyo, Tarwadi, Yoshio Watanabe, Kenichi Nonaka, Atsuko Matsumoto, Satoshi Ōmura, Tomoyoshi Nozaki and Kazuro Shiomi, "Identification of natural inhibitors of *Entamoeba histolytica* cysteine synthase from microbial secondary metabolites," *Front. Microbiol.*, vol. 6, 2015.

ApOPSS	M A L A D I S G Y L D V L D S V R G F S Y L E N A R E V L R S G E A R C - - - -
MtCysK2	M R S R Q T R - - - - - D R Y - - - - R L L P E G
MtCysM	M T R Y D - - - - - - - - - - - - - - - -
TvOPSS	M I - - - - - - - - - - - - - - - -
EcoASS-B	M S - - - - - - - - - - - - - - - -
StOASS-B	M N - - - - - - - - - - - - - - - -
MtCysK1	M S I - - - - - - - - - - - - - - - -
AtOASS-A	M A S - - - - - - - - - - - - - - - -
GmOASS-A	M A V E R - - - - - - - - - - - - - - - -
LmOASS-A	M A A P F D - - - - - - - - - - - - - - - -
HiOASS-A	M A I - - - - - - - - - - - - - - - -
ApOPSS	- - - L G N P R S E P E Y V K A L Y V I G A S R I P V G D G C S H T L E E L G
MtCysK2	Y Q V - - - - - - - - - - - - - - - -
MtCysM	- - - - - - - - - - - - - - - -
TvOPSS	- - - - - - - - - - - - - - - -
EcoASS-B	- - - - - - - - - - - - - - - -
StOASS-B	- - - - - - - - - - - - - - - -
MtCysK1	- - - - - - - - - - - - - - - -
AtOASS-A	- - - - - - - - - - - - - - - -
GmOASS-A	- - - - - - - - - - - - - - - -
LmOASS-A	- - - K - - - - - - - - - - - - - - - -
HiOASS-A	- - - - - - - - - - - - - - - -

図. システイン合成酵素のマルチプルアライメント。黄色：ApOPSSのF225に相当する残基。緑：ApOPSSのR297に相当する残基。青：PLPと共有結合するLys。橙：1次基質と水素結合する残基。OASSはこの残基の動きによってドメインが閉鎖する。なお、酵素名の略称は表1.1の通りである。

ApOPSS	V F D I S V P G E M V F P S P L D F F E R G K P T P L V R S R L - Q L P - - - -
MtCysK2	- - - - - T P G R N R - - - H P G T M V G N T P V L W I P E L S G T - - - -
MtCysM	- - - - - - - - - - - S L L Q A L G N T P L V G L Q R L S P R W D D G
TvOPSS	- - - - - - - - - - - C N - - - N I L E T I G N T P L V R I N H L N P N - - - -
EcoASS-B	- - - - - - - - - - - - - - - T L E Q T I G N T P L V K L Q R M G P D - - - -
StOASS-B	- - - - - - - - - - - - - - - T L E Q T I G N T P L V K L Q R L G P D - - - -
MtCysK1	- - - - - - - - - - - A E - - - D I T Q L I G R T P L V R L R R V T D G - - - -
AtOASS-A	- - - - - - - - - - - R I A K - - - D V T E L I G N T P L V Y L N N V A E G - - - -
GmoASS-A	- - - - - - - - - - - S G I A K - - - D V T E L I G K T P L V Y L N K L A D G - - - -
LmoASS-A	- - - - - - - - - - - S R N V A Q - - - S I D Q L I G Q T P A L Y L N K L N N - - - -
HiOASS-A	- - - - - - - - - - - Y A - - - D N S Y S I G N T P L V R L K H F G H - - - -
ApOPSS	- - - N G V R V W L K L E W Y N P F S L S V K D R P A V E I I S R L S R R - - - V
MtCysK2	- S D P D R G F W A K L E G F N P G - - G M K D R P A L Y M V E C A R A R G D I
MtCysM	R D G P H V R L W A K L E D R N P T - G S I K D R P A V R M I E Q A E A D G L L
TvOPSS	- - - P K V E I W A K L E G F N P T - G S V K D R I A L K M I E Q A E T E G K L
EcoASS-B	- - - N G S E V W L K L E G N N P A - G S V K D R A A L S M I V E A E K R G E I
StOASS-B	- - - N G S E I W V K L E G N N P A - G S V K D R A A L S M I V E A E K R G E I
MtCysK1	- - - A V A D I V A K L E F F N P A - N S V K D R I G V A M L Q A A E Q A G L I
AtOASS-A	- - - C V G R V A A K L E M M E P C - S S V K D R I G F S M I S D A E K K G L I
GmoASS-A	- - - C V A R V A A K L E L M E P C - S S V K D R I G Y S M I A D A E E K G L I
LmoASS-A	- - - T K A K V V L K M E C E N P M - A S V K D R L G F A I Y D K A E K E G K L
HiOASS-A	- - - N G N V V V K I E G R N P S - Y S V K C R I G A N M V W Q A E K D G T L

ApOPSS	E K G S - L V A D A T S S N F G V A L S A V A R L Y G Y R A R V Y L P G A A E E
MtCysK2	A P G A - A I V E S T G G T L G L G L A L A G K V Y R H P V T L V T D P G L E P
MtCysM	R P G A - T I L E P T S G N T G I S L A M A A R L K G Y R L I C V M P E N T S V
TvOPSS	K P G S - T I I E A T S G N T G I G L A M I G R T K G Y H V I V V M S E A V S I
EcOASS-B	K P G D - V L I E A T S G N T G I A L A M I A A L K G Y R M K L L M P D N M S Q
StOASS-B	K P G D - V L I E A T S G N T G I A L A M I A A L K G Y R M K L L M P D N M S Q
MtCysK1	K P D T - I I L E P T S G N T G I A L A M V C A A R G Y R C V L T M P E T M S L
AtOASS-A	K P G E S V L I E P T S G N T G V G L A F T A A A K G Y K L I I T M P A S M S T
GmOASS-A	T P G K S V L I E P T S G N T G I G L A F M A A A R G Y K L I I T M P A S M S L
LmOASS-A	I P G K S V V E S S S G N T G V S L A H L G A I R G Y K V I I T M P E S M S L
HiOASS-A	T K G K - E I V D A T S G N T G I A L A Y V A A A R G Y K I T L T M P E T M S L
ApOPSS	F G K L L P R L L G A Q V I V D P E A P - - - S T V H L - L P R V M K D S K N -
MtCysK2	I I A R M L T A Y G A G V D M V T Q P H P V G G W Q Q A R K D R V A Q L M A E -
MtCysM	E R R Q L L E L Y G A Q I I F S A A E G - - - G S N T A - V A T A K E L A A T -
TvOPSS	E R Q K M I K A F G G E V I L T D R K L - - - G T D G A - I R K V A E L V K E N
EcOASS-B	E R R A A M R A Y G A E L I L V T K E Q - - - G M E G A - R D L A L E M A N R -
StOASS-B	E R R A A M R A Y G A E L I L V T K E Q - - - G M E G A - R D L A L A M S E R -
MtCysK1	E R R M L L R A Y G A E L I L T P G A D - - - G M S G A - I A K A E E L A K T D
AtOASS-A	E R R I I L L A F G V E L V L T D P A K - - - G M K G A - I A K A E E I L A K T
GmOASS-A	E R R I I L L A F G A E L V L T D P A K - - - G M K G A - V Q K A E E I L A K T
LmOASS-A	E R R C L L R I F G A E V I L T P A A L - - - G M K G A - V T M A K K I V T A N
HiOASS-A	E R K R L L C G L G V N L V L T E G A K - - - G M K G A - I A K A E E I V A S D

ApOPSS	- E G - F V H V N Q F	Y N D A N F E A H M R G T A R E I F V Q S R R G G L A L R
MtCysK2	Y P G - A W N P N Q Y	G N P D N V G A - Y R S L A L E L V A Q L G - - - R I D
MtCysM	N P S - W V M L Y Q Y	G N P A N T D S H Y C G T G P E L L A D L P - - - E I T
TvOPSS	- P G K Y F N P N Q F	S N E Y N K I A H Y K T T A E E I W T Q T K - - - G K V T
EcoASS-B	- G E - G K L L D Q F	N N P D N P Y A H Y T T T G P E I W Q Q T G - - - G R I T
StoASS-B	- G E - G K L L D Q F	N N P D N P Y A H Y T T T G P E I W R Q T S - - - G R I T
MtCysK1	- Q - R Y F V P Q Q F	E N P A N P A I H R V T T A E E V W R D T D - - - G K V D
AtOASS-A	- P N - G Y M L Q Q F	E N P A N P K I H Y E T T G P E I W K G T G - - - G K I D
GmoOASS-A	- P N - A Y I L Q Q F	E N P A N P K V H Y E T T G P E I W K G S D - - - G K I D
LmoOASS-A	- P N - A V L A D Q F	A T K Y N A L I H E E T T G P E I W E Q T N - - - H N V D
HiOASS-A	- P S R Y V M L K Q F	E N P A N P Q I H R E T T G P E I W K D T D - - - G K V D
ApOPSS	G V A G S L G T S G H M S A A A F Y L Q S V D P - S I R A V L V Q P A Q G D S I	
MtCysK2	V L V C S V G T G G H S A G V A R V L R E F N P - D M R L I G V D T I G S T I F	
MtCysM	H F V A G L G T T G T L M G T G R F L R E H V A - N V K I V A A E P R Y G E G -	
TvOPSS	H F V A A V G T S G T L M G V G K N L R E K N A - D I K I V E A Q P T K G H Y I	
EcoASS-B	H F V S S M G T T G T I T G V S R F M R E Q S K - P V T I V G L Q P E E G S S I	
StoASS-B	H F V S S M G T T G T I T G V S R F L R E Q E K - P V T I V G L Q P E E G S S I	
MtCysK1	I V V A G V G T G G T I T G V A Q V I K E R K P - S A R F V A V E P A A S P V L	
AtOASS-A	G F V S G I G T G G T I T G A G K Y L K E Q N A - N V K L Y G V E P V E S A I L	
GmoOASS-A	A F V S G I G T G G T I T G A G K Y L K E Q N P - N I K L I G V E P V E S P V L	
LmoOASS-A	C F I A G V G T G G T L T G V A R A L K K M G S - H A R I V A V E P M E S P V L	
HiOASS-A	V V V A G V G T G G S I T G I S R A I K L D F G K Q I T S V A V E P V E S P V I	

ApOPSS	P	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	V	E	T	G	M	L	W	I	N	M	L	D	-	-	I	S	Y	T	L	A	E	V
MtCysK2	G	Q	-	-	-	-	-	P	A	S	N	R	L	M	-	-	-	-	-	-	-	-	R	G	L	G	S	S	I	Y	P	-	R	N	V	D	Y	R	A	F	D	E	V	H	W	V
MtCysM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	Y	A	L	-	-	-	-	-	-	-	-	R	N	M	D	E	G	F	V	P	-	E	L	Y	D	P	E	I	L	T	A	R	Y	S	V
TvOPSS	Q	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	S	M	E	E	A	I	V	P	-	A	I	Y	Q	A	D	K	I	D	E	H	I	L	I	
EcoOASS-B	P	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	W	P	T	E	Y	L	P	-	G	I	F	N	A	S	L	V	D	E	V	L	D	I	
StoOASS-B	P	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	W	P	A	E	Y	M	P	-	G	I	F	N	A	S	L	V	D	E	V	L	D	I	
MtCysK1	S	G	-	-	-	-	-	G	Q	K	G	P	H	P	I	-	-	-	-	-	-	Q	G	I	G	A	G	F	V	P	-	P	V	L	D	Q	D	L	V	D	E	I	T	V		
AtOASS-A	S	G	-	-	-	-	-	G	K	P	G	P	H	K	I	-	-	-	-	-	-	Q	G	I	G	A	G	F	I	P	-	S	V	L	N	V	D	L	I	D	E	V	V	Q	V	
GmoOASS-A	S	G	-	-	-	-	-	G	K	P	G	P	H	K	I	-	-	-	-	-	-	Q	G	I	G	A	G	F	I	P	-	G	V	L	E	V	N	L	L	D	E	V	I	Q	I	
LmoOASS-A	S	G	-	-	-	-	-	G	K	P	G	A	H	K	I	-	-	-	-	-	-	Q	G	I	G	P	G	F	V	P	-	D	V	L	D	R	S	L	I	D	E	V	F	C	V	
HiOASS-A	S	Q	T	L	A	G	E	E	V	K	P	G	P	H	K	I	-	-	-	-	-	Q	G	I	G	A	G	F	I	P	-	K	N	L	D	L	S	I	D	R	V	E	T	V		
ApOPSS	T	L	E	E	A	M	E	A	V	V	E	V	A	R	S	D	G	L	V	I	G	P	S	G	G	A	A	V	K	A	L	A	K	K	A	A	E	G	D	L						
MtCysK2	A	P	P	E	A	V	W	A	C	R	S	L	A	A	T	H	Y	A	S	G	G	W	S	V	G	A	V	A	L	V	A	G	W	A	A	R	-	N	L	P						
MtCysM	G	A	V	D	A	V	R	R	T	R	E	L	V	H	T	E	G	I	F	A	G	I	S	T	G	A	V	L	H	A	A	L	G	V	G	A	L	A								
TvOPSS	E	S	E	A	F	A	K	A	R	E	V	I	A	K	E	G	I	F	I	G	M	S	S	G	A	A	M	L	A	A	Q	K	V	A	E	K	L	-	-							
EcoOASS-B	H	Q	R	D	A	E	N	T	M	R	E	L	A	V	R	E	G	I	F	C	G	V	S	S	G	A	V	A	G	A	L	R	V	A	K	A	N	-	-							
StoOASS-B	H	Q	N	D	A	E	N	T	M	R	E	L	A	V	R	E	G	I	F	C	G	V	S	S	G	A	V	A	G	A	L	R	V	A	R	A	T	-	-							
MtCysK1	G	N	E	D	A	L	N	V	A	R	R	L	A	R	E	E	G	L	L	V	G	I	S	S	G	A	T	V	A	A	L	Q	V	A	R	R	P	E	N							
AtOASS-A	S	S	D	E	S	I	D	M	A	R	Q	L	A	L	K	E	G	L	L	V	G	I	S	S	G	A	A	A	A	I	K	L	A	Q	R	P	E	N								
GmoOASS-A	S	S	D	E	A	I	E	T	A	K	L	L	A	L	K	E	G	L	F	V	G	I	S	S	G	A	A	A	A	A	F	Q	I	A	K	R	P	E	N							
LmoOASS-A	A	G	D	D	A	I	E	T	A	L	K	L	T	R	S	D	G	V	F	C	G	F	S	G	G	A	N	V	A	A	L	K	I	A	E	R	P	E	M							
HiOASS-A	D	S	D	T	A	L	A	T	A	R	R	L	M	A	E	E	G	I	L	A	G	I	S	S	G	A	V	A	A	A	D	R	L	A	K	L	P	E	F							

ApOPSS E - - P G D Y V V V P P D T G F K Y L S L V Q - - N A L E G A G D S V - - - - -
 MtCysK2 A - - D T T I A A V F P D G P Q R Y F D T I Y N - D A Y C N E H E L L G G Q P P
 MtCysM A G E R A D I A L V V A D A G W K Y L S T G A Y - A G S L D D A E T A L E G Q -
 TvOPSS E - - S G V I V V L F A D R G E K Y L S T K L - F D T - - - - -
 EcoASS-B P - - D A V V V A I I C D R G D R Y L S T G V - F G E E H F S Q G A G I - - - -
 StOASS-B P - - G A I V V A I I C D R G D R Y L S T G V - F G E E H F S Q G A G I - - - -
 MtCysK1 A - - G K L I V V V L P D F G E R Y L S T P L - F A D V A - - - - -
 AtOASS-A A - - G K L F V A I F P S F G E R Y L S T V L - F D A T R K E A E A M T F - - -
 GmOASS-A A - - G K L I V A V F P S F G E R Y L S S V L - F E S V R R E A E S M T F - - -
 LmOASS-A E - - G K T I V T I I P S F G E R Y L S T A L - Y R S V R D E V S S L P V - - -
 HlOASS-A A - - D K L I V V I L P S A S E R Y L S T A L - F E G I E - - - - -

ApOPSS - - - - -
 MtCysK2 T E P D E I A S P L D A - V V T R W T R S T T V I D P T Q V V S
 MtCysM - - - - - L W A
 TvOPSS - - - - - Q - - -
 EcoASS-B - - - - -
 StOASS-B - - - - -
 MtCysK1 - - - - - D - - -
 AtOASS-A - - - - - E - - - A - - -
 GmOASS-A - - - - - E - - - P - - -
 LmOASS-A - - - - - V D A S E L Q - - - - - D - - -
 HlOASS-A - - - - - - - - - - - - - - - G - - -