

博士論文

糸状菌由来キシラン主鎖分解酵素の機能解明

小島 圭輔

第1章 序論	1
1.1 木質バイオマスと草本バイオマス	1
1.1.1 植物細胞壁中の構造と主要構成成分	1
1.1.2 植物細胞壁の酵素糖化と利用	3
1.2 キシラン	4
1.2.1 キシランの局在と構造	4
1.2.2 キシランの生合成	6
1.3 木材腐朽菌	8
1.3.1 白色腐朽菌	8
1.3.2 褐色腐朽菌	8
1.3.3 軟腐朽菌	8
1.3.4 腐朽形式と保有する酵素の関係	9
1.4 キシランの酵素分解	10
1.4.1 キシラナーゼ (EC 3.2.1.8)	12
1.4.2 β -キシロシダーゼ (EC 3.2.1.37)	12
1.4.3 側鎖分解酵素	13
1.5 本研究の目的	14
第2章 β-キシロシダーゼの機能解析	16
2.1 目的	16
2.2 実験	17
2.3 結果	23
2.4 考察	41
2.5 結言	49
第3章 各種キシラン構造に対するキシラナーゼの反応特性	50

3.1 目的.....	50
3.2 実験.....	51
3.3 結果.....	57
3.4 考察.....	77
3.5 結言.....	80
第4章 総括.....	81
参考文献.....	88

第1章 序論

1.1 木質バイオマスと草本バイオマス

バイオマスは、一般に化石資源を除いた有機資源である。バイオマスは、再生可能かつカーボンニュートラルであることから、その利用が循環型社会の構築に有効であると考えられている（農林水産省, 2006）。木質バイオマスや草本バイオマスは、大気中の二酸化炭素によって生産されたものであることから、炭素固定能があると解釈される。また、これらは分解や利用によって再び二酸化炭素として大気中に排出されたとしても、化石資源の利用に比べると温室効果ガスの排出量が少ないと考えられる。したがって、木質バイオマスや草本バイオマスをバイオ燃料やバイオ化成品原料として利用することが期待されている。

バイオマスから燃料や化成品を製造するプロセス全体は、バイオマスリファイナリーと呼ばれている（Naik *et al.*, 2010）。米国エネルギー省では、バイオマスリファイナリーにおいて、まず初めにバイオマスを低分子量の有機化合物へと効率的に分解・変換し、これらを燃料や化成品の原料として用いることが提案されている。

1.1.1 植物細胞壁中の構造と主要構成成分

木質バイオマスと草本バイオマスの主体は、植物細胞壁である。一般的に、植物細胞壁は一次壁と二次壁に分けられる（図1-1）。一次壁・二次壁の主要構成成分は共通して、セルロース、ヘミセルロース、リグニンである。

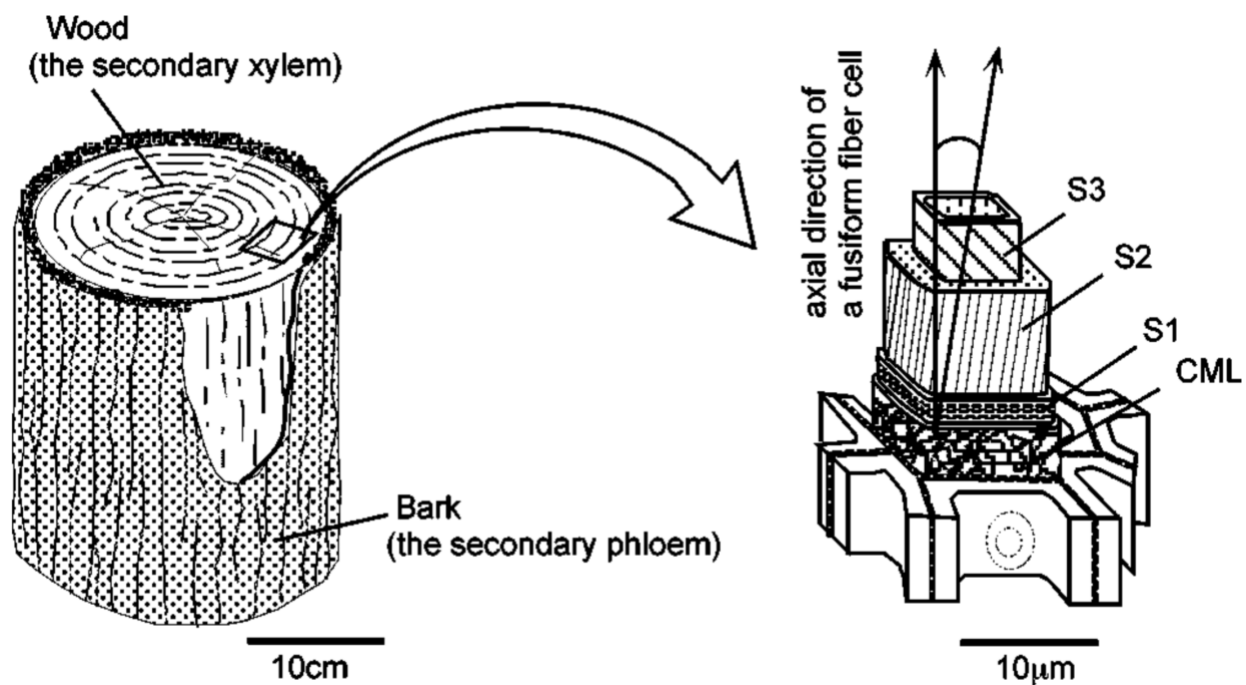


図1-1 木質バイオマスの構造及び植物細胞壁

左は丸太のモデル構造を示しており、右は二次木部中の細胞における、植物細胞壁の構造を示している (Yamamoto *et al.*, 2002)。右図では、最外層にあたる複合細胞間層 (CML) と、二次細胞壁 (S1、S2、S3) を表現している。

セルロースは、グルコースが β -1,4-結合した直鎖状のポリマーで、植物細胞壁中では結晶性の部分と非結晶性の部分があると考えられている (Hon, 1994; O'sullivan, 1997)。

ヘミセルロースは、冷水では抽出されず、アルカリ水溶液によって抽出される多糖 (Schulze, E. 1891) として最初に定義され、現在ではキシラン、マンナン、キシログルカンが含まれる。これらは植物種によって局在が異なる。例えば、高等植物の一次壁にはキシログルカンが共通して含まれる一方、二次壁にはキシランやマンナンが存在している。針葉樹では、二次壁中にマンナンとキシランが存在するが、広葉樹やイネ科草類の二次壁には主としてキシランが存在する (Timell, 1967)。また、近年、細胞壁中において一部のヘミセルロースは、セルロースの結晶と強い相互作用を持つことが報告されている (Tuo *et al.*, 2016)。

リグニンは、フェニルプロパン単位を有するモノリグノールが酸化重合した高分子化合物である。モノリグノールは、コニフェリルアルコール、シナピルアルコール、p-クマリルアルコールの三種類が存在する (Lin and Dence, 2012)。それぞれのモノリグノールに由来する芳香核単位を、グアイアシル核 (G 核)、シリングル核 (S 核)、p-ヒドロキシフェニル核 (H 核) と称する。針葉樹リグニンには G 核、広葉樹リグニンには G 核と S 核、イネ科植物には G 核、S 核と H 核を有するという特徴がある。また、リグニンは、セルロースなどと比べると、物理的・化学的に不均一なポリマーであり、一部はヘミセルロースと共有結合を有していると考えられている (Eriksson *et al.*, 1980)。このようなリグニンと多糖の複合体は、Lignin-carbohydrate complex (LCC) と呼ばれている。

1.1.2 植物細胞壁の酵素糖化と利用

各植物細胞壁成分は上述のように様々なモノマーから成るため、植物細胞壁を効率的に分解することがバイオマスリファイナリーにおいて重要である。しかしながら、セルロースの結晶性部分や、リグニンが難分解性であることに加え、各成分が植物細胞壁中で強く相互作用しているため、分解することが非常に難しいという特徴がある。天然では、様々な菌類が植物細胞壁を分解し、生育していることから、これらの菌類が持つ酵素を用いた酵素糖化法は、温和な条件で分解が可能であり、研究が進められている (Sakuragi, 2018; Tsutsui *et al.*, 2020)。

1.2 キシラン

近年、キシランが細胞壁中でセルロース結晶と相互作用していることや、リグニンとの LCC 構造が報告され、植物細胞壁の分解を妨げる要因として注目を浴びている。

1.2.1 キシランの局在と構造

キシランは、維管束植物に欠かせないヘミセルロースであり、一部のコケ類やシダ植物を始め、裸子植物・被子植物でも存在が確認されている (Carafa *et al.*, 2005; Timell, 1967)。

シダ植物では、維管束でキシランの存在が確認され、そのキシランはアセチル基修飾やグルクロン側鎖を有することが報告されている (Carafa *et al.*, 2005)。

針葉樹を含む裸子植物では、二次壁にキシランが堆積しており、そのキシランはグルクロン側鎖とアラビノース側鎖を有することが知られている。一般的に、裸子植物のキシランはアラビノグルクロノキシラン (AGX) と呼ばれている。

被子植物のうち、広葉樹などの双子葉類では、一次壁二次壁の両方でキシランが存在するが、キシラン構造に差異がある。どちらのキシランも側鎖にアセチル基修飾とグルクロン側鎖を有することは共通しているが、近年、一次壁キシランのグルクロン側鎖にアラビノースやガラクトースがさらに結合していることが報告されている (Mortimer *et al.*, 2015)。なお、双子葉類のキシランは、一次壁二次壁共にアセチルグルクロノキシラン (AcGX) と呼ばれている。ただし、一般的に市販されているキシラン基質は、広葉樹由来であっても、製造過程にアセチル基が脱離した、グルクロノキシラン (GX) である。

イネ科植物などの単子葉類では、二次壁にキシランが存在し、側鎖にはアセチル基、グルクロン酸、アラビノースがある。アラビノースはさらにフェルラ酸の修飾を受けており、最も複雑な構造をしている。こうしたキシランは、グルクロノアラビノキシラン (GAX) と呼ばれている。

これら高等植物キシランのモデル構造を図 1-2 に示した。

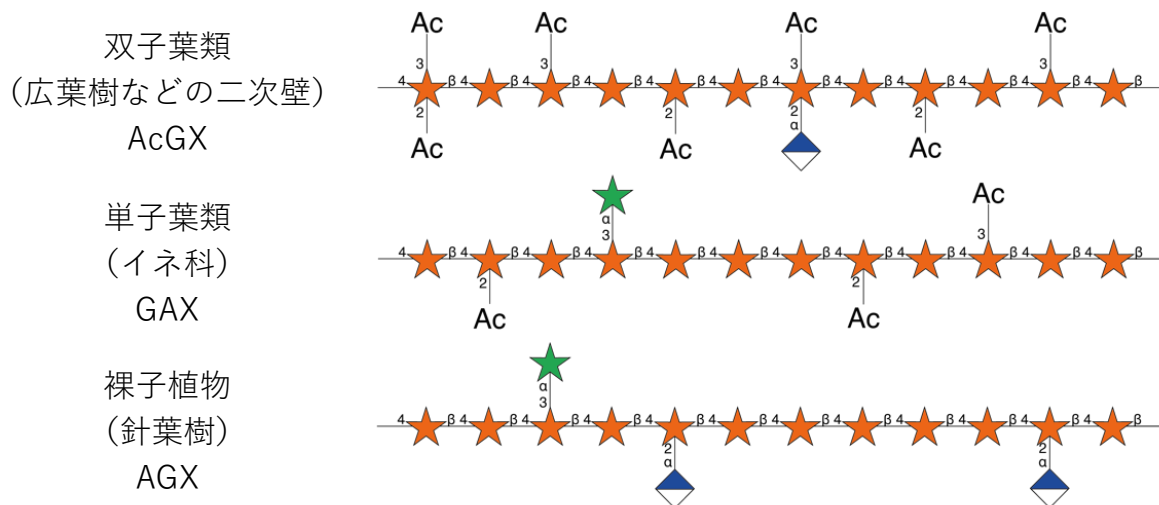


図 1－2 各種植物由来キシランのモデル構造図

双子葉類、単子葉類、被子植物由来のキシランのモデル構造を示している。橙の星はキシロース残基を、緑の星はアラビノース側鎖を、青と白の四角はグルクロン酸側鎖を示す。Ac はアセチル基修飾を示す。AcGX は、アセチルグルクロノキシランを意味し、側鎖にアセチル基及びグルクロン酸が含まれる。GAX は、グルクロノアラビノキシランを意味し、側鎖にアセチル基及びアラビノース、そしてごく僅かにグルクロン酸が含まれる。AGX は、アラビノグルクロノキシランを意味し、側鎖にアラビノースとグルクロン酸を有する。

1.2.2 キシランの生合成

近年の分子生物学の発展により、こうした様々なキシランを合成する酵素が特定され、その機能解析が進んでいる。

特に研究が盛んなシロイヌナズナの場合、キシランはゴルジ体で生合成され、以下に示すように、様々な生合成酵素が関与している。

キシラン主鎖の合成に関わる酵素は、これまでに IRX9、IRX10、IRX14 の三種類であることが明らかにされている (Doering *et al.*, 2012)。

グルクロン酸修飾を行う酵素は三種類報告され、GUX1 と GUX2 は二次壁キシランの生合成に (Bromley *et al.*, 2013)、GUX3 は一次壁キシランの生合成に関与するとされている (Mortimer *et al.*, 2015)。また、これらの使い分けは、セルロースとの相互作用を変化させていることが示唆されている (図 1-3)。

アセチル基修飾を行う生合成酵素は非常に多く、ESK1、数種類の TBL が報告されている (Wurman, 2017)。ただし、アセチル基はキシロースの二位と三位間及び三位と四位で転移しやすく (Biely *et al.*, 2014A)、詳細については依然不明な点が多い。

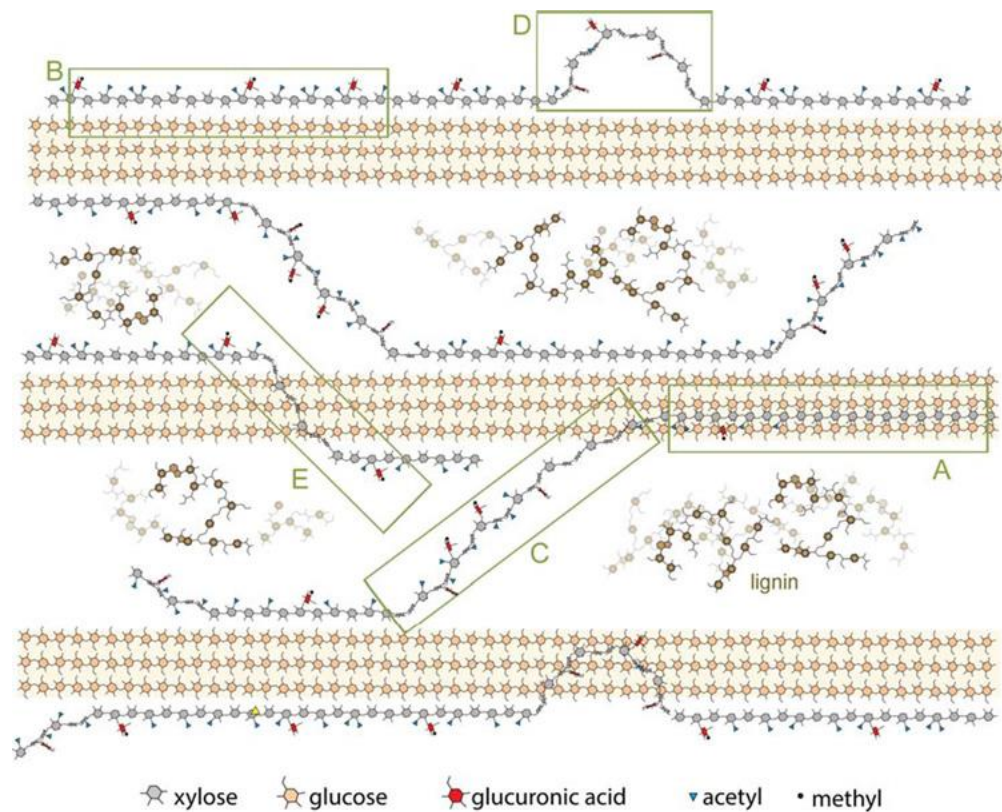


図1-3 植物細胞壁中のキシランのモデル図 (Busse-Wicher *et al.*, 2016)

被子植物中のキシラン構造を示している。セルロースの結晶に対して相互作用をしているキシラン (A と B) や、側鎖の影響で不規則な構造を取っているキシラン (C、D、E) を示している。

1.3 木材腐朽菌

天然で木質バイオマスを分解して生育している糸状菌は、木材腐朽菌と呼ばれている。木材腐朽菌は、その分解様式から白色腐朽菌・褐色腐朽菌・軟腐朽菌の三種類に分類される。

1.3.1 白色腐朽菌

白色腐朽菌は、腐朽によって木材が白色になることから、命名された。リグニン分解能が高く、セルロースやヘミセルロースと同程度分解しながら腐朽を行う。広葉樹を好むとされる。代表的な菌として、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が挙げられる。*P. chrysosporium* は、2004年にゲノムが公開され (Martinez et al., 2004)、多くの酵素の機能解析が進んでいる。

1.3.2 褐色腐朽菌

褐色腐朽菌は、白色腐朽菌とは対照的に、腐朽によって木材が褐色になることから命名された。リグニン分解酵素を持たないため、リグニンをほとんど分解することなく、セルロース・ヘミセルロースを分解するという特徴がある。また、これまでの研究から、結晶性セルロースを分解することが可能なセロビオヒドロラーゼを保有していないことが明らかとなるなど (Hori et al., 2013)、白色腐朽菌とは異なる分解系を有している。

1.3.3 軟腐朽菌

白色腐朽菌と褐色腐朽菌は、腐朽が進むにつれ木材の深部まで分解するが、軟腐朽菌は、表面だけを分解・軟化させる腐朽形式の菌類である。代表的な菌として子囊菌 *Trichoderma reesei* が挙げられる。古くからセルロース分解酵素を多く生産する近年として盛んに研究がされ、*P. chrysosporium* に次いで、2008年にゲノムが公開された (Martinez et al., 2008)。また、*T. reesei* は草本を分解することが知られているが、白色腐朽菌などとの違いについては不明な点が多い。

1.3.4 腐朽形式と保有する酵素の関係

各糸状菌は、植物バイオマス分解を行うために多種多様な酵素を保有・生産している。したがって、保有する酵素の違いによって腐朽形式が異なると解釈できる。例えば、白色腐朽菌・褐色腐朽菌では、白色腐朽菌ではセルロース結晶を分解する酵素やリグニン分解酵素が豊富に存在する一方、褐色腐朽菌はそうした酵素を保有していない (Hori *et al.*, 2013)。

また、逆に、異なる性質の菌が持つ、似た酵素同士を比較することで、それぞれの酵素の特徴を明らかにできる可能性もあり、特徴的な酵素に限らず、種々の酵素の機能解明は、糸状菌の分解戦略を明らかにする上で重要である。

1.4 キシランの酵素分解

キシラン分解に関わる酵素は、主鎖分解酵素と側鎖分解酵素に分類できる。キシラン主鎖は、キシラナーゼによりキシロオリゴ糖へと分解され、さらにキシロオリゴ糖は β -キシロシダーゼによってキシロースにまで分解される。これらの主鎖分解に並行して、側鎖構造に対応した様々な側鎖分解酵素が協調することで、キシラン分解系が成り立っている（図1-4）。

こうした酵素は、アミノ酸配列の相同性に基づき、Carbohydrate Active enZymes (CAZy, <http://www.cazy.org/>) (Lombard et al., 2014) 上にて、Glycoside Hydrolase (GH) family (Henrissat and Davies, 1997) や Carbohydrate Esterase (CE) family (Lombard et al., 2010) に分類・登録されている（表1-1）。また、相同性の高い酵素は、似た構造や基質特異性を示すことが多いので、以下ではキシラン分解に関わる酵素と、それらが属している GH family について説明する。

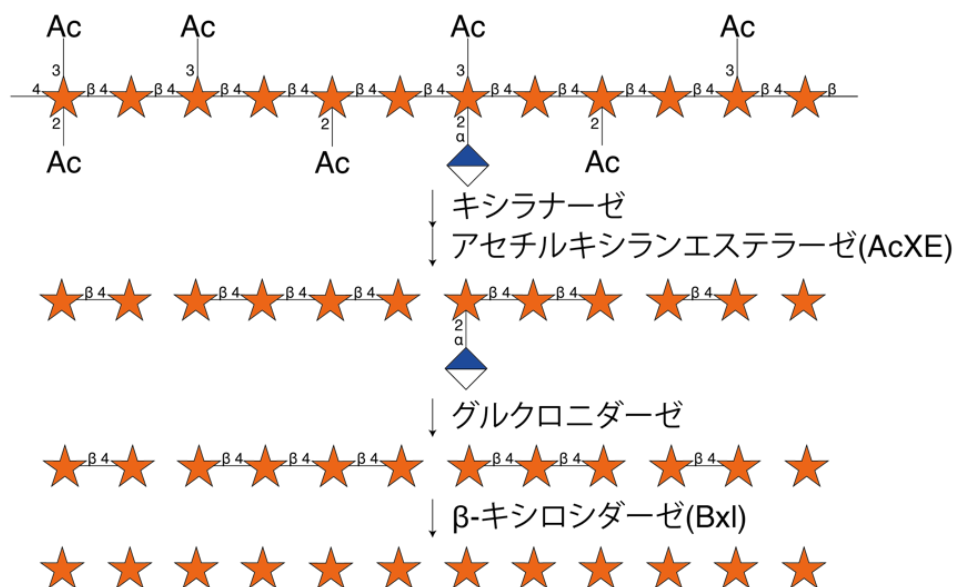


図 1-4 AcGX の酵素分解のモデル図

酵素（各酵素については以下本文で説明）はそれぞれ基質特異性を有するため、キシランの酵素分解は、各酵素が協調することで達成される。

表 1-1 糸状菌が有する、キシラン分解に関わる酵素の分類

酵素の種類	CAZy 上の family 分類
キシラナーゼ	主に GH10, 11, 30
Bxl	主に GH3
グルクロニダーゼ	GH67, 115
AcXE	主に CE1, 5, 6, 16
アラビノフラノシダーゼ	主に GH51, 54, 62

CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) データベース上の Glycoside Hydrolases (GH) と Carbohydrate esterases (CE) の分類を示す。

1.4.1 キシラナーゼ (EC 3.2.1.8)

キシラナーゼはキシラン主鎖を分解する酵素で、糸状菌由来のものは、主に GH family 10、11 に属しており、一部は GH family 30 に属している。GH family 10 と GH family 11 は主鎖を認識するキシラナーゼであるが、GH family 30 は主鎖のキシロース残基だけでなく、グルクロン酸側鎖も認識することで初めて活性を示すという特徴がある (Nakamichi *et al.*, 2020)。近年、広葉樹や針葉樹由来のキシランについて、グルクロン酸の修飾パターンが明らかにされた (Blomley *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2017) ため、キシランの構造と GH family 30 の機能・役割は明確になりつつある。

GH family 10 と 11 は、市販の基質を良好に分解するため、それぞれ基質特異性や、構造的な知見が多く得られている。広葉樹由来の市販キシランは、アセチル基が脱離しているものの、グルクロン酸が残っている。このキシランを用いた糸状菌由来キシラナーゼの比較解析では、グルクロン酸の存在により分解産物が異なり、GH family 10 の方がやや小さいオリゴ糖を生産することが明らかとなっている (Kolenová *et al.*, 2006)。こうした差異は、GH family 10 と 11 の構造が異なることに起因していることが、これまでの様々な糸状菌由来キシラナーゼの構造及び基質複合体構造が明らかにされている (Schmidt *et al.*, 1999; Jänis *et al.*, 2005; Vardakou *et al.*, 2007)。また、こうした特徴はバクテリアなど異なる菌由来の GH family 10 と 11 キシラナーゼでも明らかにされており (Biely *et al.*, 2016)、GH のファミリー毎に機能が強く保存されていると考えられる。

天然では、被子植物由来のキシランはアセチル基修飾がある。しかしながら、こうした基質を GH family 10 や 11 で分解すると、複雑で多様な分解産物が生じてしまうため (Biely *et al.*, 2014A)、詳細な分析が困難であり、市販の基質を用いた場合に比べ、十分な知見が得られていない。

1.4.2 β -キシロシダーゼ (EC 3.2.1.37)

β -キシロシダーゼ (Bxl) は、単糖であるキシロースを効率的に生産するため、キシランの利用において重要な役割を担っている。糸状菌由来の Bxl は、そのほとんどが GH family 3 に属している。

基質特異性については、*Trichoderma reesei* 由来の Bxl (*TrXyl3A*) が特に盛んに研究されている。例えば、*TrXyl3A* は、キシロオリゴ糖だけでなく、 2^3 - α -D-glucuronyl-xylotetraose (XUXX)

や 2³-α-L-arabinofuranosyl-xylotetraose (XA²XX)など、特定の修飾を受けたキシロオリゴ糖も分解することができることが報告されている (Herrmann *et al.*, 1997)。

三次元構造については、TrXyl3A の X 線結晶構造が公開されている (Protein Data Bank (PDB) ID: 5AE7) 他、*Aspergillus nidulans* 由来の GH family 3 Bxl の X 線結晶構造 (PDB ID: 6Q7I、6Q7J) が報告されている (Schröder *et al.*, 2019) もの、これまで活性と構造の関係についての知見は報告されていない。

1.4.3 側鎖分解酵素

側鎖分解酵素は、キシランの側鎖構造に対応して多岐に渡っている。

アセチルキシランエステラーゼ (AcXE、EC 3.1.1.72)、α-グルクロニダーゼ (EC 3.2.1.131)、α-L-アラビノフラノシダーゼ (EC 3.2.1.55) などが挙げられる (Biely *et al.*, 2016)。

AcXE は、アセチルキシランもしくはアセチル基修飾を持つキシロオリゴ糖から、アセチル基を遊離させる酵素である。これまで報告されている糸状菌由来の AcXE は、主に CE family 1 と 5 に属しており、一部には CE family 6 と 15 に属するものも確認されている。CE family 1 の AcXE は、ポリマーのアセチルキシランに対しても活性を示すものが報告されている。AcXE には、オリゴ糖に対して活性を示すもの (Poutanen *et al.*, 1990)、重合度が 10 以上のキシロオリゴ糖には活性が低いもの (Poutanen and Sunderberg, 1988) といったように、キシランもしくはキシロオリゴ糖の重合度に活性が依存しているため、主鎖分解酵素との関係が特に密であると考えられる。

α-グルクロニダーゼは、キシランもしくはキシロオリゴ糖を修飾しているグルクロン酸を遊離させる酵素である。現在、GH family 67 と 115 に分類されている。GH family 67 のα-グルクロニダーゼは、キシロオリゴ糖の非還元末端のキシロース残基を修飾しているグルクロン酸のみを遊離することができ、一方の GH family 115 のα-グルクロニダーゼはキシランポリマーやキシロオリゴ糖のグルクロン酸を遊離することが可能である (Khandke *et al.*, 1989; Tenkanen and Siika-aho, 2000)。こうした違いは、現在では GH family 10 と 11 によるキシラン分解産物に対応していると考えられている (Biely *et al.*, 2016)。

1.5 本研究の目的

キシランの効率的な分解は、植物細胞壁成分の酵素糖化の効率化に繋がることから、バイオリファイナリーにおいて重要なプロセスの一つである。

その達成には、キシランを分解する酵素の組み合わせを最適化することが必要であり、各酵素の機能の解明及びキシラン分解系における役割を明確化することが肝要である。また、キシラン分解系において、主鎖の分解は、高分子であるキシランを低分子へと分解し、最終的に単糖であるキシロースを効率的に生産することから、特に重視される。

また、天然のキシランには、アセチル基を持つものも多く、その酵素分解についても明らかにする必要がある。

以上を踏まえ、次章からはキシラン主鎖分解酵素である、Bxl とキシラナーゼの両酵素に着目し、その機能と糸状菌のキシラン分解系における役割を明らかにする目的で、酵素の機能解析を行った。

まず初めに、第2章では、キシラン分解系の最終ステップを担う Bxl に着目した。これは、キシランの構造が多様であることと、より上流に位置する酵素群によって最終的に生産されるオリゴ糖が絞り込めないことなどから、あえて真逆のアプローチを取ることで、可能性を絞り込むことを目指した。そのため、異なる性質を持つ糸状菌、*P. chrysosporium* と *T. reesei* 由来の GH family 3 Bxl (PcBxl3 と TrXyl3A) を用い、比較解析を行った。

第3章では、上流の酵素である GH family 10 と 11 のキシラナーゼが、どのように天然のキシラン構造を分解するかを明らかにする目的で、アセチル基を保持したキシランを抽出し、分解特性を比較した。アセチルキシランとの絡みもいれる。図1-4で示したように、キシラン分解に関わる酵素は多様で、これらが順番に、あるいは協働して機能することで、キシランは単糖まで分解される。これまでも、各酵素の機能解明は行われてきたが、主鎖分解酵素が二つに分かれていることや、主鎖分解酵素と側鎖分解酵素の関係性については、未知の点も多い。

第4章では、以上を踏まえ、糸状菌のキシラン主鎖分解系について考察を行った。

第2章 β -キシロシダーゼの機能解析

2.1 目的

序章で述べたように、 β -キシロシダーゼ (Bxl) はキシラン主鎖分解の最後に直鎖キシロオリゴ糖からキシロースを生産する酵素である。また、キシラン構造が多様であることや、上流の酵素が多数存在することから、Bxl の分解対象となるキシロオリゴ糖は多数の可能性がある。したがってこれまでの研究では、主に上流の酵素に由来する、側鎖付きのキシロオリゴ糖に対する基質特異性について報告がある (Biely *et al.*, 1997; Pell *et al.*, 2004; Fujimoto *et al.*, 2004; Vardakou *et al.*, 2008; Fujimoto *et al.*, 2021)。その一方で、基質の重合度と基質特異性の関係については知見が不十分であった。キシラナーゼのキシロオリゴ糖に対する基質特異性は基質の重合度に依存していることから、Bxl についても詳細を明らかにする必要がある。また、上流の酵素と Bxl の性質の関係を明らかにすることで、糸状菌のキシラン分解系の理解を深めることが可能であると考えられた。そこで、本章では、広葉樹を分解する担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* と、草本を分解する子囊菌 *Trichoderma reesei* 由来の GH family 3 に属する Bxl (PcBxl3 と TrXyl3A) の比較を行い、機能の解明及び両菌のキシラン分解系の差異について明らかにした。

2.2 実験

アミノ酸配列の比較

TrXyl3A のアミノ酸配列は、GenBank (CAA93248.1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Bensen *et al.*, 2013) から入手した。*PcBxl3* のアミノ酸配列は Joint Genome Institute (JGI) MycoCosm (Protein ID: 2919526) (Grigoriev *et al.*, 2013) から入手した。相同性の計算には Blastp サーバー (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) を使用した。アミノ酸配列は、Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) を用いてアライメントした。二次構造は、上記アライメントと *TrXyl3A* のネイティブ立体構造 (PDB ID: 5A7M chain B) を用いて ESPript (Robert *et al.*, 2014) で予測した。

タンパク質の調製

Phanerochaete chrysosporium strain K-3 株は、2%のセルロース (CF11; Whatman, Kent, UK) を唯一の炭素源として含む Kremer and Wood 培地 (Kremer and Wood, 1992) で培養した。凍結させた約 100 mg の菌糸体粉末から、Isogen (ニッポンジーン、東京) を用いてトータル RNA を抽出し、1 µg のトータル RNA から Oligotex-dT30 Super (タカラバイオ、滋賀) を用いて mRNA を精製した (いずれも説明書に従った)。mRNA からの first strand cDNA の合成は、SuperScript III 逆転写酵素及び GeneRacer キット (Invitrogen、CA、USA) を用いて行った。*PcBxl3* をコードする cDNA 断片を増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマー、Pcxyn3_07481_3RACE (5'-GGTCGTCAGCCCAGATTAAAGCTAG-3') および Pcxyn3_9257_5RACE (5'-GCGGGAACGAAGTAGCAGAGCTG-3') は、Genome JGI で入手可能な *P. chrysosporium* のゲノム配列に基づいて設計した。PCR は KOD-Plus (東洋紡、大阪、日本) を用いて行った。クローン断片は、遺伝子特異的プライマーである Pcxyn3_9257_Met (5'-ATGGTCGCCAGCCCAGATTAAAGC-3') および Pcxyn3_9257_Met (5'-GCTGCCTATGTACACTACCGTGGTTG-3') を用いて増幅し、*EcoRI* および *NotI* 制限認識部位を用いて pPICZα A プラスミドベクター (Invitrogen 社) にライゲーションした。マニュアルに従い、エレクトロポレーション法によりメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* KM71H 株を形質転換した後、形質転換体を Zeocin で選択した。

pPICZα *Xho*I と *Not*I の制限認識部位の間に *Trxyl3A* をコードするプラスミドベクターは、*P. pastoris* 用に最適化し、Genscript 社 (NJ, USA) にて合成したものを用いた。*P. pastoris* の形質転換とその後の手順は上記の通りである。

組換えタンパク質の生産は、5-L ジャーファーマンター (TSC-M5L, 高杉製作所, 東京) を用いて、既報に従い (Igarashi *et al.*, 2008; Igarashi *et al.*, 2012; Matsuyama *et al.*, 2020)、溶存酸素濃度に応じて自動的にメタノールを投入することで行った。粗タンパク質の濃度は、ウシ血清アルブミンを標準物質とする Bradford Protein Assay (Bio-Rad, CA USA) を用いて定量した (Bradford, 1976)。*PcBxl3* および *TrXyl3A* の収量は、それぞれ約 900 mg および 5000 mg であった。120 時間後、遠心分離 (5,000 × *G* で 30 分) により培地を回収し、100 kDa のフィルターにより限外濾過を行い、5 kDa のフィルター (いずれも Merck Millipore, MA, USA) を用いて濃縮した。

得られた溶液を 2 段階のカラムクロマトグラフィーで精製した。*PcBxl3* と *TrXyl3A* の活性試験用には、1 回目のクロマトグラフィーに疎水性クロマトグラフィー用単体 (Phenyl Toyopearl 650M、カラム容量 = 20.5 ml、東ソー、東京、日本) を使用した。1 M 硫酸アンモニウム (和光、東京、日本) を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した後、酵素を溶出させた。二段階目の精製には陰イオン交換クロマトグラフィー用単体 (TSKgel DEAE-5PW、カラム容量 = 3.3 ml、東ソー) を用いた。50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した後、1 M NaCl (和光) を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で酵素を溶出した。精製したタンパク質の濃度は NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で定量した。

PcBxl3 の結晶化サンプルは、DEAE カラムクロマトグラフィーの前に *Streptomyces plicatus* 由来のエンドグリコシダーゼ H を用いて脱糖を行った。エンドグリコシダーゼ H をコードする遺伝子を持つ pET 28 ベクターは、琉球大学金子哲教授から頂いた。*Escherichia coli* BL21(DE3) (New England Biolabs, MA, USA) の形質転換は、マニュアルに従って行った。LB 培地で培養後、100 μM の IPTG を添加し 37°C でタンパク質の発現を誘導した。細胞を含む培地を 10,000 × *G* で 10 分間の遠心分離を行った後、マニュアルに従って BugBuster (Merck) を用いて細胞を溶解させた。組換えエンドグリコシダーゼ H は、HisTrap HP カラム (GE, IL, USA) を用いて精製した。500 mM イミダゾール (和光) を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した後、酵素を溶

出させた。脱糖鎖処理の工程では、*PcBxl3* を酸化還元剤や熱などによる変性を行わずに、*PcBxl3* 1 mg あたり 0.2 mg の精製エンドグリコシダーゼ H 及び酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を混合した。この混合溶液を 37℃ で 24 時間インキュベートし、脱糖鎖処理を完了とした。

TrXyl3A の結晶化に使用したタンパク質は、DuPont™ Industrial Bioscience 社から寄贈されたものを用いた。0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 5) 中に 149 mg/ml の *TrXyl3A*、13% のソルビトール、0.125% の安息香酸ナトリウムを含むストック溶液として、結晶化実験の前に 4℃ で保存した。

Bxl の結晶化

PcBxl3 の結晶化は、96 ウェルのシッティングドロッププレート (Greiner、Frichenhausen、Germany) を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法で行った。10 mg/ml の *PcBxl3* を含む酵素溶液 0.5 µl と、0.2 M の硫酸リチウム、0.1 M の Tris buffer (pH 8.5)、40 v/v % の PEG400 (No.43 of JCSG + Suite、Qiagen、Limburg、Netherlands) を含むリザーバー溶液 0.5 µl を混合した。プレートは 293 K で 3 週間インキュベートした。得られた結晶はデータ収集前に、液体窒素で瞬間凍結した。ソーキング用結晶の作製には、リザーバー液は、終濃度 525 mM リンゴ酸 (pH 7.0、QIAGEN) と 20 v/v % PEG3350 (Sigma-Aldrich、MO、USA) を含む水溶液を用いた。上記と同様に、タンパク質溶液と混合後、293 K で 1 週間インキュベートした。得られた結晶は終濃度 100 mM キシロビオース (X_2 、Megazyme、Wicklow、Ireland) を含む、40 v/v % PEG400 (Sigma-Aldrich、MO、USA) に短時間浸漬し、液体窒素で瞬間凍結し、データを取得した。

TrXyl3A タンパク質ストック溶液は、結晶化の直前に 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) を加えて 10 mg/ml に希釈した。データ収集のために最適化された *TrXyl3A* の結晶は、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって得られた。リガンドが結合した *TrXyl3A* のデータ収集用の結晶は、PACT スクリーン (Qiagen 社) の条件 C4 (0.1 M PCB pH 7.0、25% PEG1500) を用いて得た。リガンドとして用いた、4-thioxylobiose は先行研究に従って化学合成した (Rho et al., 1982)。結晶の 4-thioxylobiose 溶液への浸漬は、*TrXyl3A* 結晶を 0.095 M PCB (pH 7.0) および 33% PEG1500 中で、14 mM の 4-thioxylobiose とともに 1 時間インキュベートすることで行った。デ

ータ収集の前に、*TrXyl3A* 結晶を 30% PEG3350 と 10%グリセロールを含む凍結保護剤溶液で短時間インキュベートした後、液体窒素で瞬間凍結した。

X 線結晶構造解析

4-thioxylobiose 溶液中にソーキングした *TrXyl3A* 結晶のデータセット（分解能 2.1Å）は、スウェーデンの MAXII-lab にあるビームライン I911-5 で収集した。すべての *TrXyl3A* の回折データは、データ統合プログラム Mosflm（Leslie, 2006）を用いて処理され、CCP4i suite ソフトウェア中の Scala を用いてスケールリングされた（Collaborative Computational Project, Number 4, 1994）。*TrXyl3A* と 4-thioxylobiose のリガンド構造は、Phaser プログラム（McCoy, 2007; McCoy *et al.*, 2007）を用いて、フリーの *TrXyl3A* 構造(PDB ID: 5A7M、chain B)を検索モデルとして分子置換法(MR)により解いた。

TrXyl3A リガンド結合構造の構造精密化は REFMAC5 プログラム（Murshudov *et al.*, 2007）を用いて行った。クロスバリデーションと R_{free} 計算のために、5%のデータを精密化から除外した（Brünger, 1992）。Coot（Emsley and Cowtan, 2004）を用いて、手動でモデルを構築・調整できるように、精密化の過程で $2mF_o - DF_c$ および $mF_o - DF_c$ シグマ A 重み付けマップ（Pannu and Read, 1996）を作成・精査した。

PcBxl3 結晶の回折実験は、高エネルギー加速器研究機構（つくば）のフォトンファクトリー（PF）のビームラインで行われた。回折データは、DECTRIS PILATUS3 S 6M（Dectris、Baden、Switzerland）で収集した。結晶は窒素気流中で 95 K まで冷却した。フリーの *PcBxl3* の結晶データは、PREMO にインストールされた XDS を用いて統合およびスケールリングされた。 X_2 溶液に浸漬させた結晶のデータは、CCP4i2 suite プログラム（Winn *et al.*, 2011）の XDS および Aimless を用いてデータ統合およびスケールリングを行った。*PcBxl3* の構造決定は、CCP4i2 中の MOLREP を用いた分子置換によって行われた。N-アセチル-D-グルコサミン、キシロース、水分子、結晶化剤を、電子密度マップと配位距離に基づいてモデル化した。キシロース分子の配向は、*TrXyl3A* と 4-thioxylobiose のリガンド構造（5A7M）中のサブサイト-1 に配位しているキシロース残基の配向を基に決定した。精密化は、CCP4i2 の Refmac5 と Phenix プログラムの Phenix.refine(バージョン

1.18.2-3874、Lawrence Berkeley National Laboratory、USA; 51) (Afonine *et al.*, 2012) で行った。

最終的な *TrXyl3A* と *PcBxl3* の構造モデルの座標、および構造因子の振幅は、Protein Data Bank (PDB) (Sussman *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 1998) に登録され、アクセスコードはそれぞれ 5AE6 (*TrXyl3A*)、7VC6 および 7VC7 (*PcBxl3*) である。

構造図の作成には、PyMOL (The PyMOL molecular Graphics System、version 2.2.3、Schrödinger、LLC) を使用した。Ligand-protein interaction は Ligplot+ (v.2.2) (Laskowski and Swindells, 2011) を用いて描写した。

Bxl の反応速度論的解析

基質として、 X_2 、キシロトリオース (X_3)、キシロテトラオース (X_4)、キシロペンタオース (X_5) (Megazyme) を用いた。反応溶液は、酵素の他に、5 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)、および 50 μ M から 5 mM の範囲の様々な濃度のキシロオリゴ糖からなるものを用いた。なお、*PcBxl3* と *TrXyl3A* の終濃度は、それぞれ 30.2 nM と 26.6 nM であった。反応は 30℃で 30 分間行い、以降の定量実験中に反応が続かないように 95℃で 5 分間加熱して停止させた。分解により生じたキシロースの量の測定は、SUGAR-KS802 および 801 (昭和電工、東京) のタンデムカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (LC-2000 シリーズ; Jasco、東京) で行った。サンプルは全て手動で注入した。カラムオーブンは 70℃に設定した。検出器は Corona CAD (ESA Biosciences、Massachusetts、USA) を使用した。

サブサイト理論

上記反応速度論的解析によって得られた反応速度論的パラメーターから、各サブサイトとキシロース残基の親和性を算出するため、サブサイト理論による解析を行った。計算は、既報論文に基づいて行った (Hiromi, 1970; Hiromi *et al.*, 1973)。

ドッキングシミュレーション

各 Bxl とキシロオリゴ糖のドッキングシミュレーションは、Chimera (version1.14.0) (Petterson *et al.*, 2004) の Autodock Vina プログラム (1.1.2) (Oleg and Arthur, 2010) を用いて行った。X₂およびX₃のモデル構造は、Sweet2 サーバー (Bohne *et al.*, 1998; Bohne *et al.*, 1999) を用いて構築し、ドッキングシミュレーションに供与した。

2.3 結果

アミノ酸配列及び二次構造の比較

PcBxl3 と *TrXyl3A* は、それぞれ 743 アミノ酸残基と 777 アミノ酸残基からなり。この 2 つの酵素の配列の同一性は 54% である。そのため、図 2 – 1 に示すように、両 Bxl の二次構造の分布は非常に類似していることが明らかとなった。ただし、2 つの GH family 3 の β -キシロシダーゼの構造の大きな違いとして、*TrXyl3A* の N 末端領域において、*PcBxl3* にはない追加の α -helix が存在することが示唆された。この追加の α -helix を含む *TrXyl3A* の N-末端領域は、27 個のアミノ酸からなることが明らかとなった。また、*TrXyl3A* の C 末端領域にも 10 個の余分なアミノ酸があるが、これらでは二次構造は予測されなかった。

TrXy13A α1 η1 α2
 1 10 20 30 40 50* 60
 TrXy13A QNNQTYANYSAQGQPDLYPETLATLTLSFPDCEHGPLKNNLVCDSSAGYVERAQAIIISLF
 PcBx13AFPDCANGLKSNLVCNASADPVSRAKALVDAL

TrXy13A α3 β1 η2 β2 TT
 70 80 90 100 110
 TrXy13A TLEELILNTQNSGPGVPRRGLPNYQVWNEALHGLDRAN...FATRGQFEWATSFFMPI
 PcBx13 TLEELVNNTVNASPGVPRRGLPNYNWSEALHGLARSPGTFNFSTVPGSPFSSATSFFQPI

TrXy13A α4 α5 β3 TT η3
 120 130 140 150 160 170
 TrXy13A LITAAALNRTLIHQIADISTQARAFNSNGRYGLDVYAPNNGFRSEFLWGRGOETPGEDAIF
 PcBx13 ILGATFDDDLIHSTIATVISTEARAFNNAGRAGLDFETPNENPFKDERWGRGOETPGEDPY

TrXy13A α6 β4 η4 η5 β5 α7
 180 190 200 210 220 230
 TrXy13A FISSAYTYEYITCIQGGVDPEHLKVAAATVKHFAGYDLENWNNQSRILGFDAIITQODLSIE
 PcBx13 HIAQYVYQLITCIQGGVSPDPYVKVADCXHFAGYDLEWHGNRMFAFNAVISTODLAE

TrXy13A α8 β6 β7 β8 η6 α9 π1 β9
 240 250 260 270 280 290
 TrXy13A YITPQFLAAARYANRSRLMCAYNSVNGVPSCANSFFLQTLIRRESMGFPFWGIVVSDCDCAV
 PcBx13 FYTPSFQSCVRDAHVGSVMCSYNVNGVPSCASPYLLQDLIRDRHGLGDSWITSDCDAV

TrXy13A α10 α11 α12 α13
 300 310 320 330* 340 350
 TrXy13A YNVFNPHDYASNQSSAAASSLRAGTDDICGQTYPHWLNESFVAGEVSRGETERSVTRLYA
 PcBx13 DNVFDPHNYTSTLVNASAVSLKAGTDVDCGTTYQTLDVAVNQKLVETEDDVYKTSMVRLYLS

TrXy13A α14 α15 β10 TT β11
 360 370* 380 390 400 410
 TrXy13A NLVRLGYFD..KKNQYRSLGWKDVVKTDWNNISYEAADVVECHVLLKNDGTLPLSKKVRSTIA
 PcBx13 SLVRLGYFDSPENQPRRLGWADVNTPSAQALALTAEECHVLLKNDGTLPLSRRRKHI

TrXy13A η7 α16 β12 TT α17
 420 430 440 450 460 470
 TrXy13A LIGPWANATTQMCGNYYGAPYLISPLEANKKAGVHVNFELGTEIAGNSTTGFAKATIAAA
 PcBx13 VYGPWANATTQMCGNYQCTAPELISPLQAIQDAGHVSVFANGTAINSTDTSGFASALMAA

TrXy13A β13 TT α18 β14 α19
 480 490 500 510 520 530
 TrXy13A KKSDAIYILCGIDNTIESEGADRTDIAWPGNQDLILKQLSEVCGKPLIVLQMGGGQVDSSS
 PcBx13 KAADAIVFAGGIDETIESEGHDRDSEWPGNQDLILQLAAALRKPLIVLQMGGGQVDSSS

TrXy13A β15 α20 α21 TT
 540 550 560 570 580 590
 TrXy13A LKSNKKVNSLVWGGYPGQSGGVAFDFILSGKRAPAGRLVTTOYPAEYVHQFEPQNDMLLRP
 PcBx13 LKASKAVNALLVWGGYPGQSGGTALVNIILGKTAPSGRLVTTOYPAEYVDAIETMDMLLRP

TrXy13A α22 β16 β17 α23 η8
 600 610 620 630 640 650
 TrXy13A DGRSNPGQTYIWTGKPVYFEGSGLFYTFKELTASHPKSLKFNISILSAPHPGYTYSE
 PcBx13 SS.SSPGRTYKWTGTVPVDFEGSLHYTFKELSWASPPSRFDISSLVAGAKHAGVAFD

TrXy13A β18 β19 β20 TT β21
 660 670 680 690 700 710
 TrXy13A QIPVFTFEANIKNSGKTESPYTAMLFVRTENAGFAPYPNKWLVGFDRLADTKPGHYSKLS
 PcBx13 LALPFTFERVAVKNSGKVTSYVVALFARATTVGESPAPQQLVATRVKGLTPGRATATA

TrXy13A α24 β22 β23 β24 β25 β26
 720 730 740 750 760 770
 TrXy13A IIPTPVSAITARVDGSHGNRIYYPGKYELALNTDESVKLEFELVGEETIENWPLEEQIKDA
 PcBx13 LSVTLGSLARVDESGRVSYYPGKYSVWVDVTREIMHTFELTGKTTQILGWQPR.....

TrXy13A
 TrXy13A TPDA
 PcBx13

図 2 – 1 *PcBxl3* と *TrXyl3A* の二次構造比較

PcBxl3 と *TrXyl3A* のアミノ酸配列は Clustal W によりアライメントを行なった。*PcBxl3* の二次構造予測は公開されている *TrXyl3A* の構造を基に、ESPrpt を用いて行った。

***PcBxl3* と *TrXyl3A* の結晶構造の比較**

PcBxl3 と *TrXyl3A* の構造上の違いを明らかにするため、両酵素の X 線結晶構造解析を行った。チオキシロビオースが結合した *TrXyl3A* の結晶構造は、フリーの *TrXyl3A* (Protein Data Bank (PDB) ID 5A7M chain B) をモデルとする分子置換 (MR) により決定した。なお、本研究で用いる *TrXyl3A* の結晶構造は、スウェーデン農業科学大学の Mats 研究室にて解かれたものである。フリーの *PcBxl3* の結晶構造は、同様に *TrXyl3A* (5AE6 chain B) をモデルとして MR で決定した。また、活性中心にキシロースが結合した *PcBxl3* の構造は、フリーの *PcBxl3* の結晶構造をモデルとして MR で決定した。データ収集の統計と構造精密化の統計は表 2-1 にまとめた。

PcBxl3 は $(\beta/\alpha)_8$ ドメイン、 $(\alpha/\beta)_6$ サンドウィッチドメイン、フィブロネクチン III (FnIII) 様ドメインの 3 つのドメインから構成されており、これらのドメインの全体構造と順序は、*TrXyl3A* と同様であった (図 2-2)。FnIII 様ドメインは、他の GH family 3 酵素と同様に、リンカーによって活性ドメインに接続されている。非対称ユニットには *PcBxl3* が 1 分子存在するのに対し、*TrXyl3A* の場合はタンパク質二量体として存在した。*PcBxl3* の Asn17、Asn40、Asn74、Asn279、Asn286、Asn398、Asn432、Asn437 には、糖鎖修飾に起因する N-アセチルグルコサミン部位が確認された。

N 末端領域に注目すると、*TrXyl3A* の活性中心付近に α -helix を含むループが確認され、これは二次構造予測の結果と一致している。一方、二次構造の比較で、*TrXyl3A* の C 末端領域はより長いと予測されたが、両酵素とも C 末端は同じ位置にあることが明らかとなった。

表 2 – 1 X 線結晶構造に用いたデータ

Data	<i>PcBxl3</i>	<i>PcBxl3</i> bound with X	<i>TrXyl3A</i> bound with thioxylobiose
Wavelength	1.000	1.000	1.038
Resolution range	44.44–2.54 (2.631–2.54)	44.08–3.08 (3.19–3.08)	28.89–2.1 (2.175–2.1)
Space group	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 2
Unit cell (a, b, c)	79.667 91.292 107.082	79.367 91.071 106.012	100.244 202.443 82.441
Unit cell (α , β , γ)	90 90 90	90 90 90	90 90 90
Total reflections	52707 (5163)	29463 (2896)	192986 (19158)
Unique reflections	26406 (2587)	14756 (1450)	98434 (9738)
Multiplicity	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)
Completeness (%)	99.94 (99.92)	99.91 (99.93)	99.79 (99.85)
R-merge	0.06141 (0.3395)	0.09164 (0.3472)	0.04487 (0.1965)
Reflections used in refinement	26401 (2586)	14750 (1449)	98400 (9738)
Reflections used for R-free	1262 (127)	720 (71)	4910 (478)
R-work	0.1835 (0.2554)	0.2005 (0.2501)	0.1761 (0.2088)
R-free	0.2369 (0.3252)	0.2562 (0.3378)	0.2123 (0.2480)
Number of non-hydrogen atoms	6140	6161	13404
macromolecules	5623	5609	11971
ligands	118	339	482
solvent	399	213	951
RMS (bonds)	0.004	0.003	0.007
RMS (angles)	1.06	0.73	1.15
Ramachandran favored (%)	95.55	93.79	96.65
Ramachandran allowed (%)	3.51	5.4	3.16
Ramachandran outliers (%)	0.94	0.81	0.2
Rotamer outliers (%)	0	0	0
Average B-factor	34.54	42.34	22.87
macromolecules	34.16	41.24	22
ligands	52.37	64.63	38
solvent	34.7	35.94	26.23
PDB code	7VC6	7VC7	5AE6

Phenix プログラムにより作成した。カッコ内は各データのなかで最も解像度の高いものの数値を表す。

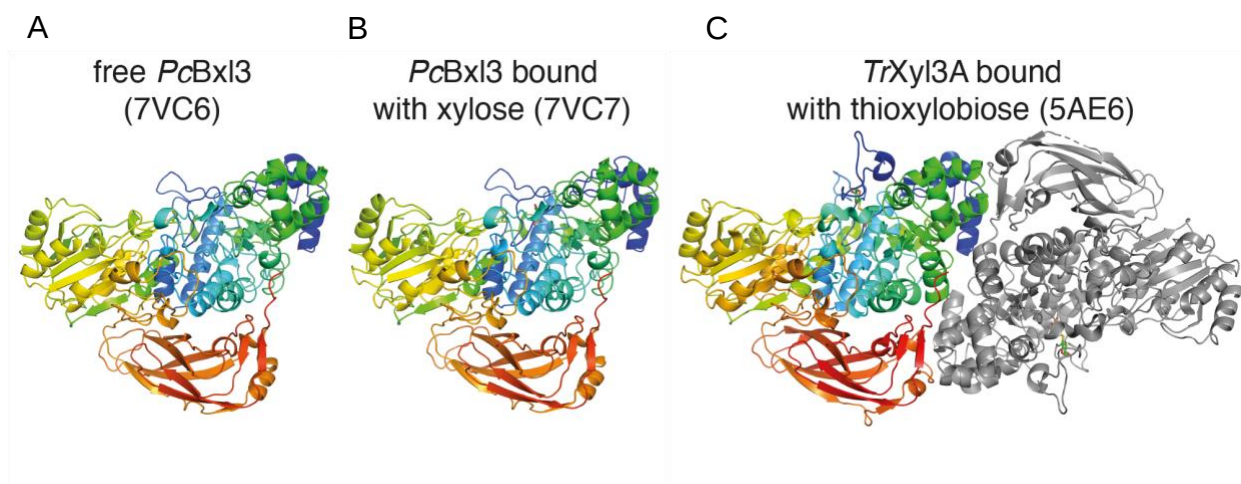


図 2-2 本実験で得られた X 線結晶構造の全体像

Pymol にて、各構造を cartoon 表示し、一分子を N 末端から C 末端までを青色から赤色のグラデーションにて表現した。

活性中心の構造比較

これまでの研究より、GH family 3 の酵素の触媒残基はグルタミン酸とアスパラギン酸であることが報告されている (Hrmova *et al.*, 2001; Dan *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002)。 *Hordeum vulgare* 由来の β -D-exohydrolase (HvExoI, PDB ID:1IEX; Hrmova *et al.*, 2001) は GH family 3 の中でも特に研究が進んでいる酵素で、既に構造が公開されている。そこで、本実験で得られた Bxl の結晶構造に重ね合わせてみると、PcBxl3 は酸・塩基触媒残基として Glu470、求核触媒残基として Asp267 が該当した。また、TrXyl3A で対応する残基は、それぞれ Glu492 と Asp291 であった。Glu470 (PcBxl3) のコンフォメーションは、PcBxl3 のフリーな構造とキシロースを保持する構造で同じであるが、Glu492 (TrXyl3A) のコンフォメーションは、TrXyl3A のネイティブ構造とリガンド構造で異なっていた。

図 2-3 に示すように、どちらの Bxls もポケット構造を有しサブサイト-1 を形成していた。サブサイト-1 を形成するアミノ酸残基は、基質認識と、触媒反応中に基質を適切な構造に維持するために特に重要である。図 2-3 C および D に示すように、3 つの重要な相互作用が確認された。C2、C3、C4 の水酸基（以下それぞれ O2、O3、O4）との相互作用、C5 との相互作用、そしてキシロース環の α 面および β 面との相互作用である。キシロース環の α 面および β 面は、既報のルール (Rise *et al.*, 1980) に従い、図 2-3 E に示すように命名した。

初めに、キシロースの水酸基は、親水性のアミノ酸と相互作用していることが示唆された。例えば、PcBxl3 の Asp267 は、サブサイト-1 に結合しているキシロース残基の O2 から 2.7Å の距離に位置し、TrXyl3A の Arg166 と Asp291 はそれぞれ 2.7Å と 2.8Å の距離に位置している。さらに、Arg143 と His184 (PcBxl3) は、サブサイト-1 のキシロース残基の O3 からそれぞれ 3.0Å と 2.4Å の距離にある。TrXyl3A で対応するアミノ酸残基 Arg166、Lys206、His207 は、それぞれキシロース残基の O3 から 2.8Å、3.0Å、2.7Å の距離にある。さらに、サブサイト-1 に結合しているキシロース残基の C4 水酸基 (O4) 付近のアミノ酸も、両酵素で類似している。PcBxl3 の Glu62 と Lys183 は、それぞれキシロース残基の O4 から 2.7Å と 3.0Å の距離にあり、TrXyl3 の Glu89 と Lys206 は、ともに O4 から 2.7Å の距離にある。さらに、PcBxl3 の Trp60 と TrXyl3A の Trp87 は C5 の近くに位置している。このように、トリプトファン残基は C5 と疎水的に相互作用している。さらに、キシロース環の α 面と β 面側の環境は大きく異なっている。PcBxl3 の Tyr407 の水酸

基と *TrXyl3A* の Tyr429 の水酸基は α 面に向いており、 β 面にはジスルフィド結合とメチオニンが露出している。非還元末端の糖を囲むアミノ酸はよく保存されているが、*PcBxl3* は *TrXyl3A* の Tyr152 に対応する残基が Phe129 であることから、*PcBxl3* のサブサイト-1 は *TrXyl3A* のサブサイト-1 よりも疎水性が高いと考えられる。

PcBxl3 では、サブサイト+1 が明確に確認されなかった（図2-3）。一方、*TrXyl3A* は、サブサイト+1 に結合しているキシロース残基の半分がアミノ酸残基に覆われていた。この違いは、前述の *TrXyl3A* の余分なループが *TrXyl3A* の活性サイトに隣接していることに起因していることが明らかとなった。*HvExoI* (1IEX) (Hrmova *et al.*, 2001) や *T. reesei* の Bgl (*TrCel3A*, 4I8D) (Karkehabadi *et al.*, 2014) のような GH family 3 の Bgl と比べると、Bxl のサブサイトは二糖を完全にはカバーしていないことが確認された。また、サブサイト+1 に結合しているキシロース残基の O3 の側には、小さな空間がある。これは、*TrXyl3A* が 1³-acetyl xylobiose (XAc³) を分解できるが、1³- α -L-arabinofuranosyl-xylobiose (XA³) は分解できないという実験結果 (Wurman, 2017) に一致している。

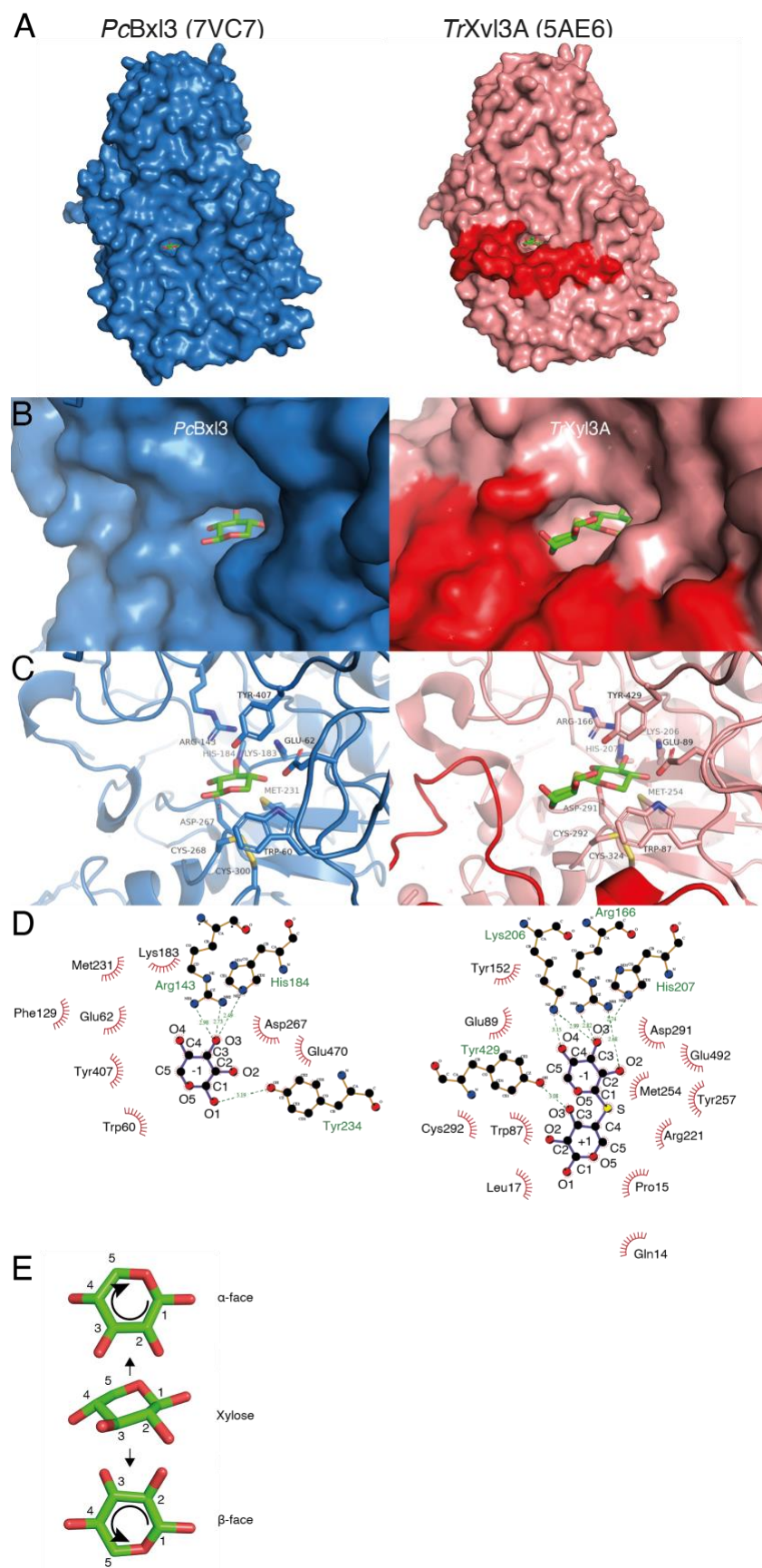


図 2-3 *PcBxl3* 及び *TrXyl3A* の活性中心付近の構造比較

A: 両酵素の表面構造を示す。*PcBxl3* はスカイブルー、*TrXyl3A* はサーモン色で表現されている。キシロースとチオキシロビオースは、緑（炭素）、赤（酸素）、黄（硫黄）でスティック表示している。B: 活性中心付近を拡大した図を示す。色の表示は A と同様である。C: 活性中心付近で、基質から 3.0Å 以内の親水性残基及び疎水性残基をスティック表示した。D: 結晶構造中のオリゴ糖とのインタラクションを LigPlot+を用いて図示した。E: キシロース環の α 面及び β 面を示す。

反応速度論的パラメーターの比較解析

キシロビオース (X_2)、キシロトリオース (X_3)、キシロテトラオース (X_4)、キシロペンタオース (X_5) に対する基質特異性を調べるために、反応速度論的解析を行った。図 2-4 のように、基質濃度を 50 μM から 5 mM の範囲で酵素反応を行い、反応速度論的パラメーターを算出した。*PcBxl3* と *TrXyl3A* の構造上の違いから予想されるように、反応速度論的パラメーターも大きく異なっていた (表 2-2)。すなわち、 X_2 , X_3 , X_4 および X_5 に対する k_{cat} の値は、*PcBxl3* では 1.66 から 2.05 s^{-1} の範囲であるのに対し、*TrXyl3A* では 0.34 から 0.82 s^{-1} と *PcBxl3* の約 4 分の 1 である。また *TrXyl3A* の k_{cat} 値は基質の重合度 (DP) に依存しており、DP4 までは増加し、DP5 では減少する。一方、*PcBxl3* の K_M 値は *TrXyl3A* の K_M 値よりも高い。*PcBxl3* の K_M 値は 0.74 から 1.21 mM であるのに対し、*TrXyl3A* の K_M 値は 0.024 から 0.09 mM と *PcBxl3* の 10 分の 1 である。このように、この 2 つの酵素の触媒特性は大きく異なることが明らかとなった。

基質特異性を表す k_{cat}/K_M 値を計算すると、*TrXyl3A* は *PcBxl3* に比べて 2~10 倍効率が良いことが明らかとなった。そこで、さらに詳細を明らかにする目的で、 k_{cat}/K_M の DP 依存性を調べた (図 2-5)。*PcBxl3* の k_{cat}/K_M 値は、キシロオリゴ糖の重合度変化に対してほとんど影響がない一方、*TrXyl3A* の k_{cat}/K_M 値は、 X_3 を基質とした時に最大であり、 X_4 や X_5 を基質とした場合も、 X_2 の場合の二倍以上の値を示した。したがって X_2 よりも長いキシロオリゴ糖が *TrXyl3A* の基質として優れており、 X_3 が最も優れた基質であることが示された。反応速度論的パラメータから、*PcBxl3* が重合度の異なるキシロオリゴ糖を同等に分解するのに対し、*TrXyl3A* はより長いオリゴ糖を優先的に分解することを示唆している。

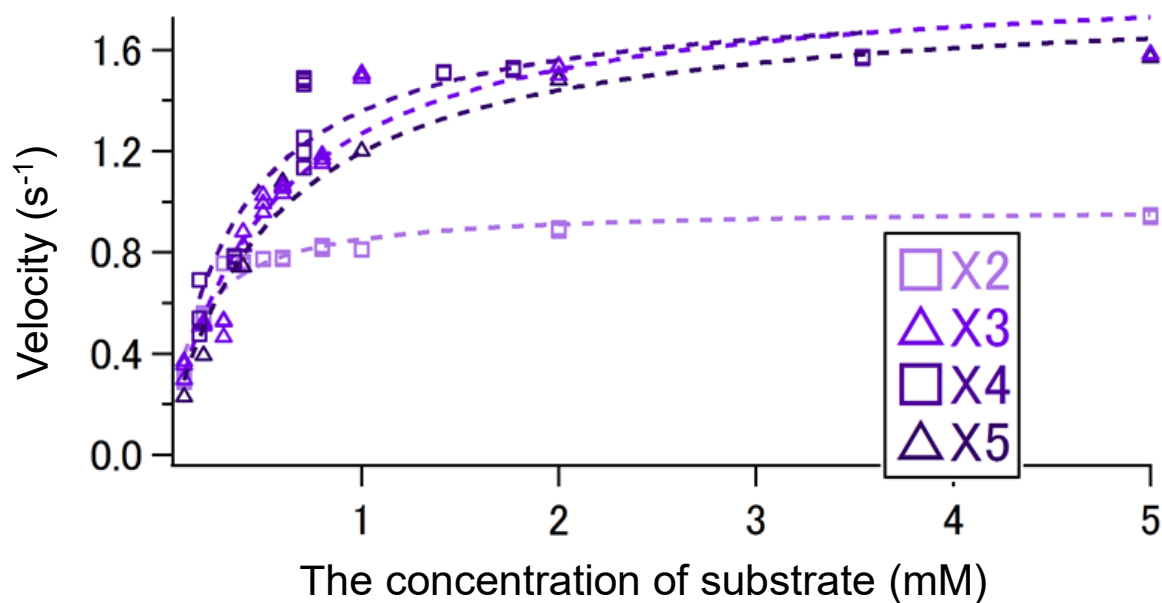


図 2-4 各基質濃度と *PcBxl3* の反応初速度の関係

反応速度論的パラメーターを算出するために、各キシロオリゴ糖の濃度を変え、各 *Bxl* の反応速度を求めた。ここには *PcBxl3* の結果を示す。

表 2-2 *PcBxl3* と *TrXyl3A* の、重合度の異なるキシロオリゴ糖に対する反応速度論的パラメーター

Parameters	<i>PcBxl3</i>			<i>TrXyl3A</i>		
	k_{cat} (s^{-1})	K_{M} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_{M} (μM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
X_2	1.81 ± 0.05	0.90 ± 0.06	2.0 ± 0.2	0.34 ± 0.01	90 ± 10	3.7 ± 0.6
X_3	1.80 ± 0.06	1.14 ± 0.08	1.6 ± 0.2	0.39 ± 0.01	24 ± 5	16 ± 4
X_4	2.05 ± 0.05	0.74 ± 0.04	2.8 ± 0.2	0.82 ± 0.03	70 ± 10	12 ± 2
X_5	1.66 ± 0.15	1.21 ± 0.25	1.4 ± 0.3	0.56 ± 0.01	66 ± 3	8.5 ± 0.5

図 2-4 より、酵素反応により生産されたキシロース量を HPLC により分析し、定量した結果を基に各反応速度論的パラメーターを算出した。

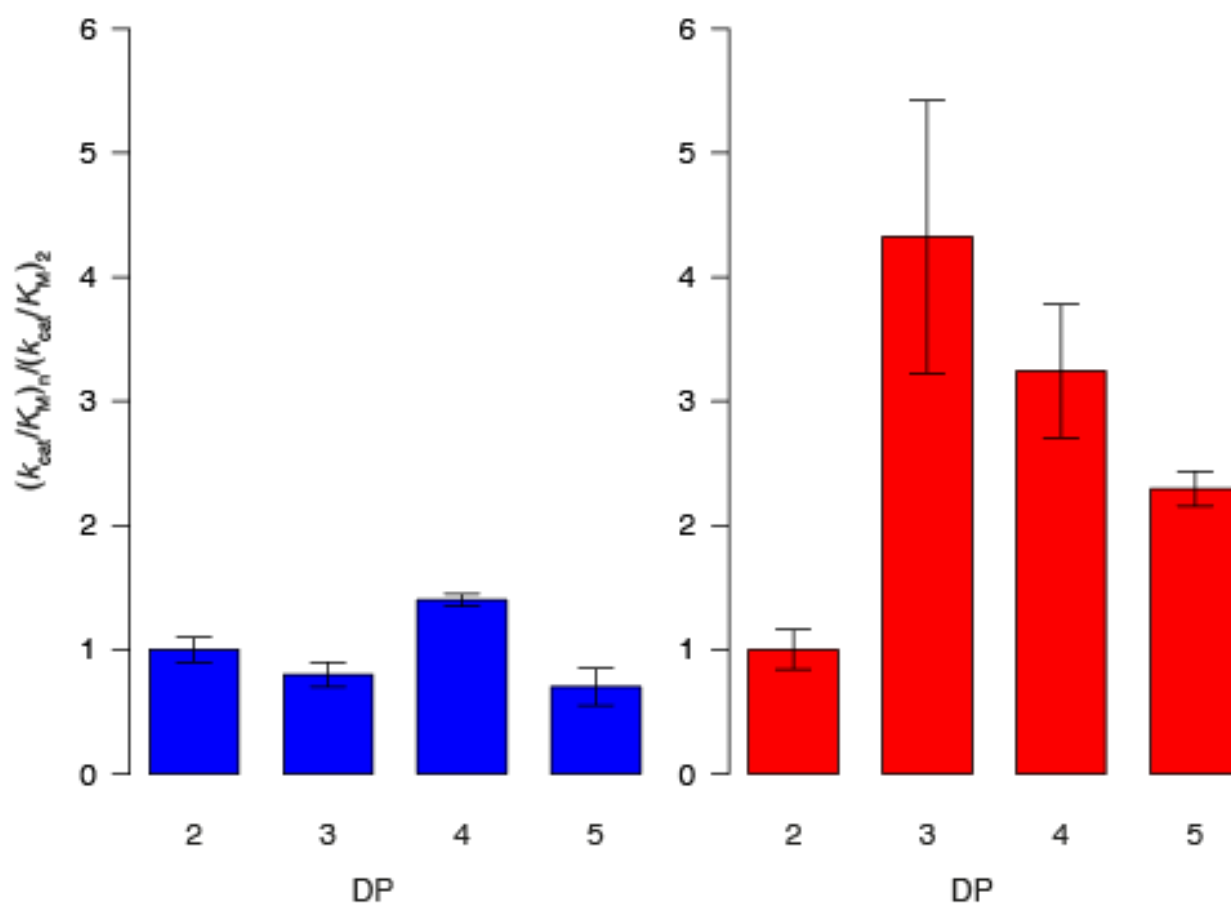


図 2-5 *PcBxl3* 及び *TrXyl3A* の反応速度論的パラメーターと基質の重合度の関係

表 2-2 を基に、 X_2 に対する基質特異性を 1 とし、各キシロオリゴ糖に対する基質特異性と重合度 (DP) の関係を表す。

サブサイトアフィニティーの比較（理論の説明を何処かに足す）

両 Bxl のサブサイト親和性を速度論的パラメーターから算出した (Hiromi, 1970; Hiromi *et al.*, 1973)。Bxl のような *exo* 型酵素の場合、 $(k_{\text{cat}}/K_M)_{n+1}/(k_{\text{cat}}/K_M)_n$ の比はサブサイト *n* での結合親和性を反映している。 k_{cat} の最大値から、PcBxl3 と TrXyl3A の k_{int} はそれぞれ 2.05 と 0.82 s⁻¹ と仮定した。算出結果を図 2 - 6 に示す。なお、サブサイト-1 と +1 の親和性についても、Hiromi らの方法 (Hiromi *et al.*, 1973; Hiromi *et al.*, 1983) に従って計算しようと試みたが、以下の理由から断念した。サブサイト-1 の親和性を求めるためには、生産的な結合モードと非生産的な結合モードの 2 つの結合モードがあると仮定する必要がある。しかし、PcBxl3 の場合は、結晶構造のサブサイト構造よりこの仮定が成立しないと考えられた。また、上記の 2 つの結合様式を仮定できる場合、サブサイト-1 での親和性は、 k_{cat} とサブサイト+2~+4 の親和性から導き出すことが可能である (Hiromi *et al.*, 1983)。しかし、両酵素のサブサイト+3 と +4 が持つ親和性は非常に弱いことから、今回のケースでは不適であった。本研究では DP=2 以上の場合の DP と Bxl 機能の関係に焦点を当てていることから、サブサイト-1 と +1 の親和性の合計を以降の比較で用いた。既報論文で明らかにされた様々なグルコシダーゼの結果 (Hiromi *et al.*, 1983) と同様に、Bxl においても活性中心 (サブサイト-1 と +1 の和) は、他のサブサイトの親和性よりも高い親和性を持つことが確認された。この特徴は Bxl でも同様であった。さらに、TrXyl3A の活性中心は PcBxl3 の場合よりも高い親和性を示し、その差は約 1 kcal/mol であった。これは構造的な知見と一致している。

TrXyl3A のサブサイト+2 の結合エネルギーは 1 kcal/mol であり、上記親和性の差に近い数字であった。さらに、これは他の糖質加水分解酵素のサブサイトとして典型的な値である (Hiromi *et al.*, 1983; Kita *et al.*, 1991; Bonnin *et al.*, 1997; Kulminkskaya *et al.*, 2001; Kawai *et al.*, 2004; Opassiri *et al.*, 2004)。一方で PcBxl3 のこのサブサイトの結合エネルギーは非常に低く、さらにその外側のサブサイトもほとんど親和性を示さなかった。これらの結果から、PcBxl3 の基質結合サブサイトは多くても 2 つ、すなわちサブサイト-1 とサブサイト+1 (活性中心) であるのに対し、TrXyl3A の基質結合サブサイトは 3 つ、すなわちサブサイト-1、+1、+2 からなることが示された。

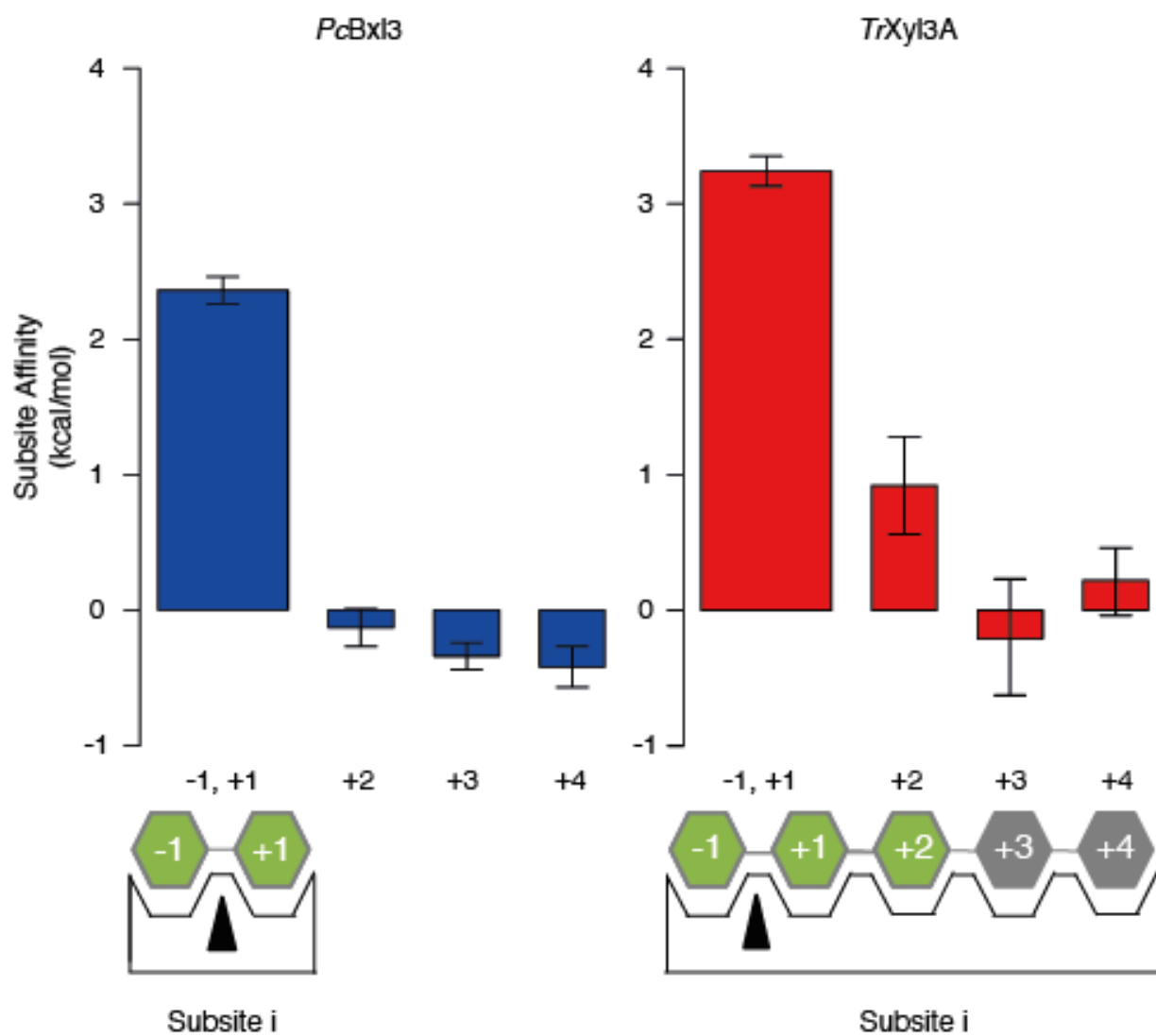


図2-6 *PcBxl3* 及び *TrXyl3A* のサブサイトアフィニティーとサブサイト構造の推定

サブサイト理論に基づき、図2-5から各サブサイトとキシロース残基の親和性（サブサイトアフィニティー）を算出した。また、そこから Bxl のサブサイト構造を推定した。

ドッキングシミュレーション

次に、ドッキングシミュレーションにより、キシロースと X_2 (*PcBxl3* と *TrXyl3A*)、及び X_3 (*TrXyl3A*) の親和性を推定した。その結果を表 2 – 3 にまとめ、図 2 – 7 に図示した。シミュレーションでは一度にいくつかの異なる結合様式が示されたが、ほとんどの場合で、*PcBxl3* の結晶構造におけるキシロース残基の結合様式や、*TrXyl3A* の結晶構造におけるチオキシロピオースの結合様式が同じ場合に最も高いスコアが記録されたため、シミュレーション結果の信頼性は高いと考えられる。*PcBxl3* と X_2 のドッキング結果ではスコアは -6.3 kcal/mol である。*TrXyl3A* の場合、 X_2 とのドッキングで -7.9 kcal/mol、 X_3 とのドッキングで -8.9 kcal/mol である。 X_2 と X_3 の結合スコアの差は -1.0 kcal/mol で、サブサイト理論で予測された値と一致した。

PcBxl3 と *TrXyl3A* のキシロースと X_2 の結合スコアを比較すると、*PcBxl3* のスコアは *TrXyl3A* のスコアの半分以下であり、構造的な差異が基質認識に大きな影響を与えることが確認された。図 2 – 7 B に示すように、サブサイト+1 のキシロース残基の O3 のみが、Tyr407 (*PcBxl3*) および Tyr429 (*TrXyl3A*) と親水的な相互作用をしている可能性がある。さらに、図 2 – 7 C では、*PcBxl3* とサブサイト+1 にあるキシロース残基の 4 原子が相互作用し、*TrXyl3A* ではサブサイト+1 のキシロース残基のうち 6 原子が相互作用することが示された。以上より、スコアの違いは主にサブサイト+1 の疎水性相互作用の数の違いに起因すると考えられる。

さらに、図 2 – 7 B の *TrXyl3A* とドッキングした X_3 に注目すると、Leu17 はサブサイト+2 のキシロース部位の C5 から 3.0 Å の距離に位置している。加えて、追加のループの表面にある 2 つの水分子は、キシロース部位の近く、2.9 Å の距離に配置されている。水分を含まないドッキングシミュレーションの結果は、有意に低いスコアだった (data not shown) ことから、水分が基質との結合に関与している可能性がある。これらの結果は、*TrXyl3A* にサブサイト+2 が存在することを裏付けるものであり、この追加のループが長いオリゴ糖を結合するのに重要であると結論づけた。

表 2 – 3 *PcBxl3* または *TrXyl3A* と角キシロオリゴ糖のドッキングシミュレーションの結果

<i>PcBxl3</i>			<i>TrXyl3A</i>			
		Affinity (kcal/mol)			Affinity (kcal/mol)	
Binding mode	Xylose	X ₂	Binding mode	Xylose	X ₂	X ₃
1	-5.8	-6.3	1	-6.2	-7.9	-8.9
2	-5.6	-6.3	2	-6.1	-7.5	-8.6
3	-5.3	-6.1	3	-5.4	-7.3	-8.2
4	-4.9	-5.9	4	-5.2	-7.1	-8.1
5	-4.6	-5.7	5	-5.1	-6.9	-7.9
6	-4.1	-5.1	6	-5.1	-6.9	-7.8
7	-4.0	-5.1	7	-4.9	-6.8	-7.0
8	-3.9	-5.0	8	-4.9	-6.7	-7.0

ドッキングシミュレーションは、AutoDock Vina により行った。

2.4 考察

GH family3 の酵素との比較

GH family 3 の酵素の大まかな基質特異性は、主にサブサイト-1 によって決定される。これは、exo 型の酵素では、基質認識から反応の終了まで、非還元末端の残基を継続的に認識して結合し続ける必要があるからである。したがって、基質特異性が類似している酵素のサブサイト-1 は、一般的に同一または類似のアミノ酸残基から構成されている。図 2 – 8 は、4 種類の GH family 3 に属する酵素の活性中心の構造を示したものである。*PcBxl3* (7VC7), *TrXyl3A* (5AE6), *TrCel3A* (4I8D) (Karkehabadi *et al.*, 2014)、*HvExoI* (1IEX) (Hrmova *et al.*, 2001) である。O2、O3、O4 と相互作用する親水性アミノ酸のほとんどは彼らの間で共通している。このことは、キシロースを結合する場合もグルコースを結合する場合も、糖の間で共通する結合様式は保存されていることを示している。ここで、キシロースとグルコースの重要な違いは、キシロースでは、グルコースの六位の炭素 (C6) を欠いていることである。図 2 – 8 で示すように、*Bxl* は C5 の近くにトリプトファン残基を配置しているが、*Bgl* にはこのトリプトファン残基が存在しないため、C6 に相当するスペースが十分に存在する。以上から、このトリプトファン残基は、C5 との疎水性相互作用だけでなく、基質選択性にも関与していると考えられる。さらに、*Bxl* と *Bgl* の構造的な差異に着目すると、 α 面と β 面の環境が異なっていることが確認された。図 2 – 8 に示すように、どちらの *Bxl* も α 面の側にチロシン残基があり、反対側にはジスルフィドとメチオニン残基がある。このように、共通して疎水性の勾配があることが確認できる。それに対し、*TrCel3A* は α 面の側に Ser384、反対側に Try237 とメチオニン残基があり、*HvExoI* は α 面の側に Trp158、 β 面の側に 2 つのメチオニン残基がある (図 2 – 8)。 *Bgl* も糖環と疎水的に相互作用することが確認できるが、 β 面の一つのメチオニン残基のみが共通しており、*Bxl* と同様な疎水性の勾配はないようである。これらの違いは、*Bxl* のサブサイト-1 におけるキシロースの結合様式を示唆している。キシロースはグルコースよりも対称性が高いため、環の 2 つの面を区別することは通常困難である。しかし、C5 のアキシャル水素とエクアトリアル水素の違いから、 β 面は α 面よりも疎水性が若干高い。この違いを認識するために、GH family 3 の *Bxl* では両サイドの疎水性に勾配をつけていると考えられる。また、以上より、*TrXyl3A* のサブサイト-1 に存在する 3 つのチロシン残基は、それぞれ異なる役割を持っていると考えられる。Tyr257 は、GH family 3 の *Bgl* と *Bxl* で保存されている。*TrCel3A* では、こ

の残基に空間的に対応しているチロシン残基が O2 と親水的な相互作用をしていると考えられる。図 2-7 に示すように、Tyr257 は、O2 と水素結合するために十分近い位置にある。したがって、このチロシンは O2 と結合する可能性がある。*TrXyl3A* の Tyr429 は、図 2-8 に示すようにキシロース環の α 面だけでなく、図 2-7 に示すようにサブサイト+1 のキシロース残基の O3 と、キシロース残基の向きによっては相互作用することが可能であると考えられる。*TrXyl3A* の Tyr152 は、*PcBxl3* の Phe129 に対応する位置にあるため、このチロシンも *PcBxl3* の Phe129 同様、サブサイト-1 の疎水性を高める機能があると推定される。

サブサイト-1 とは対照的に、*PcBxl3* と *TrXyl3A* のサブサイト+1 の構造は大きく異なっている。*PcBxl3* の結晶構造では、サブサイト+1 は明確に確認できなかったが、*TrXyl3A* では明確に確認された。*Aspergillus oryzae* 由来の GH family 3 に属するイソプリメベロース（キシログルカン由来の α -D-xylopyranose-(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucopyranose) 産生酵素では、サブサイト-1 に隣接する浅いポケットがサブサイト-1'まで広がっている (Matsuzawa *et al.*, 2019)。また、 β -1,2-グルコオリゴ糖を分解する *Listeria innocua* の Lin1860 や *Bacteroides thetaiotaomicron* の BT_3567 タンパク質のポケットも浅い (Nakajima *et al.*, 2016; Ishiguro *et al.*, 2017)。これらのサブサイト構造は、広範な基質認識と一致している。セロオリゴ糖を分解する Bgl の場合、サブサイト+1 のグルコース部分は 2 つのトリプトファン残基の間に挟まれている。これは基質が置換のない直鎖であるために可能なことである。GH family 3 の Bgl は 2 糖を結合するのに十分な大きさのポケットを持っているが、GH family 3 の Bxl はより小さなポケットである。この欠点を補う為に *TrXyl3A* は置換されたキシロオリゴ糖を結合することが可能なループを保有するようになったと結論づけた。

サブサイト理論を基に算出された *TrXyl3A* のサブサイト+2 の親和性が 1 kcal/mol で、これは他の酵素のサブサイトの親和性でもしばしば確認されている (Hiromi *et al.*, 1983; Kita *et al.*, 1991; Bonnin *et al.*, 1997; Kulminskaya *et al.*, 2001; Kawai *et al.*, 2004; Opassiri *et al.*, 2004) ことから、*TrXyl3A* にはサブサイト +2 があると考えられた。一般的に、基質と酵素は単体でもそれぞれ水分子と相互作用しているため、基質と酵素の親和性は見かけ上低いことに注意が必要である。また、サブサイトの形状も重要である。例えば、*Kluyveromyces marxianus* 由来 GH3 Bgl (*KmBgl3*) では、サブサイトの特異性は PA14 ループによって制限されている (Yoshida *et al.*, 2010)。一方、*TrXyl3A* のこのループは比較的オープンな形状である。したがって *TrXyl3A* のサブサイト+1 の O2 の周りの空間は、GlcA やアラビノースなどの置換基を受け入れることがで

きる。しかしながら、O3 の周辺は立体的に制限されており、TrXyl3A は XA^3XX を分解できないものの、 XAc^3 は分解可能であること (Herrmann *et al.*, 1997; Wurman, 2017) とよく一致する。

こうした GH family 3 Bxl の特徴は、本研究以外でその三次元構造が明らかとなっている *Asperigillus nidulans* 由来 Bxl (XlnD) でも確認された (Schröder *et al.*, 2019)。XlnD は、TrXyl3A 型の Bxl で、N 末端領域に追加のループ構造を有している。TrXyl3A と同様のアミノ酸残基によってサブサイトが構成されていることが確認されただけでなく、XlnD では、上述の TrXyl3A の Tyr152 に対応する残基が Tyr169 であることが明らかとなった。したがって、該当箇所が Tyr 残基であるか、Phe 残基であるかは、それぞれ子囊菌由来 Bxl、担子菌由来 Bxl に特徴的な可能性があり、この差が活性へ与える影響を解明するためにも、今後さらに多くの構造が明らかにされる必要がある。

以上から、木材腐朽菌や軟腐朽菌は、菌によって、PcBxl3 型や TrXyl3A 型の Bxl を使い分けていることが示唆され、これらの差は、天然で基質となるキシロオリゴ糖の違いを反映している可能性がある。さらに、キシラン分解系の上流過程に目を向けると、こうしたキシロオリゴ糖の違いは、上流過程を担う酵素だけでなく、分解されるキシランの構造に起因すると考えられる。したがって、糸状菌は、それぞれ異なるキシラン分解系を有する可能性が示唆された。

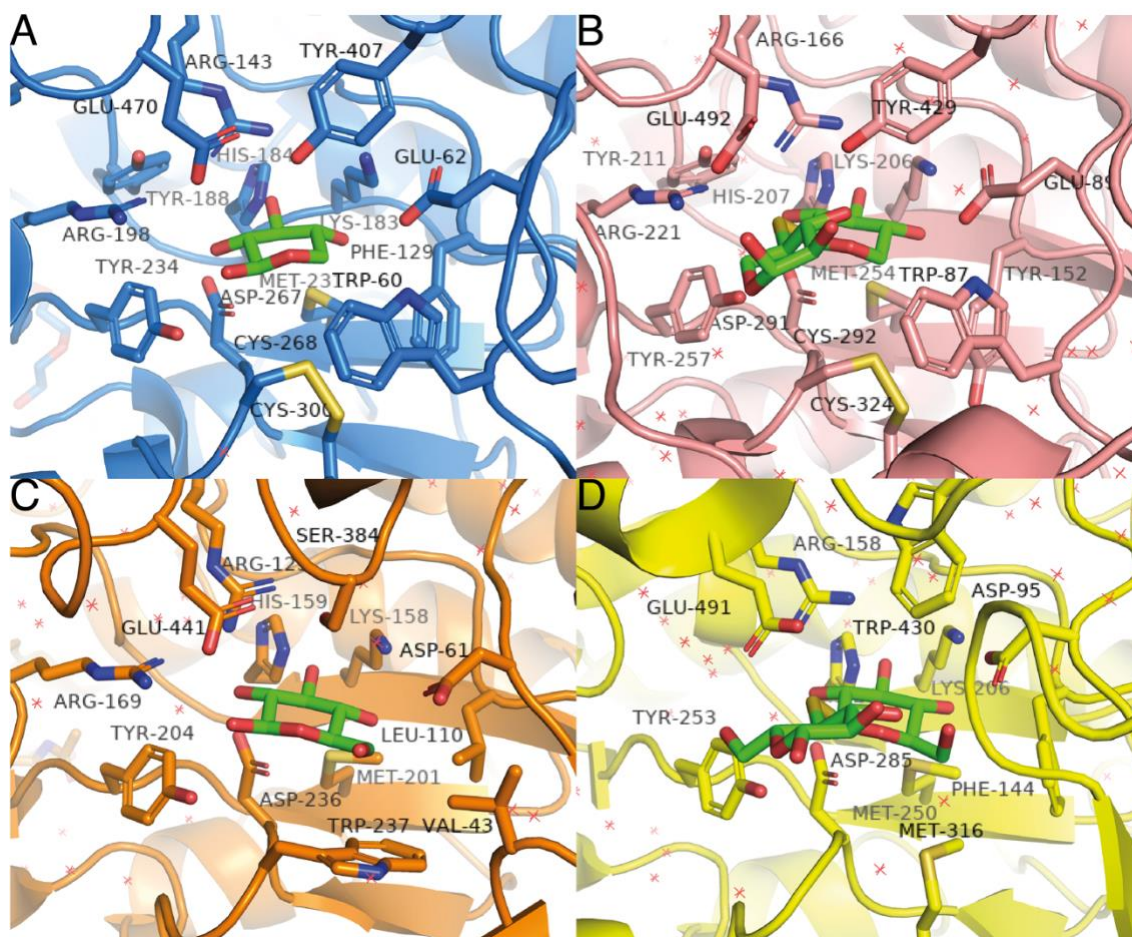


図2-8 GH family 3 に属する Bxl と Bgl の活性中心構造の比較

A: *PcBxl3* (PDB ID: 7VC7、スカイブルー)、B: *TrXyl3A* (5AE6、サーモン)、C: グルコースと結合した *TrCel3A* (4I8D、オレンジ)、D: チオセロビオースと結合した *HvExo1* (1IEX、イエロー) の活性中心を cartoon で示した。活性中心の周りのアミノ酸はスティック表示し、色は図2-3 B や図2-7 B と同じである。

活性中心におけるチロシン残基の異なる機能

以上の結果と考察から、*TrXyl3A* のサブサイト-1 に存在する 3 つのチロシン残基は、それぞれ異なる役割を持っていることがわかった。*Tyr257* は、GH family 3 の Bgls と Bxls に保存されている。*TrCel3A* では、対応するチロシン残基はキシロースの C2 の水酸基 (O2) と親水性の相互作用を持つと考えられている。図 6 に示すように、*Tyr257* は、水素結合を形成するのに十分なほど O2 に近い位置にある。したがって、このチロシン残基も O2 と相互作用する。*TrXyl3A* の *Tyr429* は、図 2-7 に示すようにキシロース環の α 面だけでなく、サブサイト+1 のキシロース残基の向きによっては O3 と相互作用すると考えられる。*PcBxl3* の *Phe129* は、*TrXyl3A* の *Tyr152* と対応する位置にあるため、このチロシン残基が疎水性環境に寄与している。

反応速度論的解析と構造の関係

サブサイト理論は、今回調べた酵素の反応速度論的パラメーターの違いを説明することができる。反応速度論的解析の結果、*PcBxl3* の k_{cat} 値は *TrXyl3A* の k_{cat} 値よりも一般的に高いことがわかった。これは、*TrXyl3A* の方がサブサイトの数が多く、非生産的な結合の比率が高くなるためと考えられる。一方、*TrXyl3A* の K_M 値は *PcBxl3* の K_M 値の 10 分の 1 であり、一般的に基質への親和性が高いことがわかる。これはループの構造の有無に起因すると結論づけた。

糸状菌のキシラン分解戦略

キシラナーゼは様々な置換されたキシロオリゴ糖を生成する (Biely *et al.*, 2016)。キシラン分解システム全体を理解するためには、菌種の違い、酵素の特性、分解対象となるキシラン構造の違いを考慮する必要がある。図 2-9 は、Floudas らの研究に基づいた 31 種の真菌の系統樹に、糸状菌の生態や GH family 10 および 11 のキシラナーゼの保有数 (Floudas *et al.*, 2012)、GH family 3 の Bxl の有無やループの有無などの情報を組み合わせたものである。全体の傾向として、ほとんどの担子菌が GH family 3 の Bxl を保有し、それらは追加のループを持たないものがほとんどであることが明らかとなった。白色腐朽菌 (WR) と褐色腐病菌 (BR) の間には大きな違いはなかった。一方、子囊菌の *Trichoderma reesei* や *Aspergillus niger* の Bxls (Schröder *et al.*, 2019) は、追加のループ領域を持っている。

次に地質学的年代に着目すると、糸状菌が GH family 3 の BxIs や GH family 11 のキシラナーゼを獲得したのは、石炭紀である可能性が高いと思われる（赤線）。これらの BxIs は、PcBxl3 のようにループ領域を欠いていた可能性がある。石炭紀に繁栄したシダ植物は、細胞壁にキシランを含んでいる（Carafa *et al.*, 2005）ことから、これらの結果は、糸状菌がシダ植物を炭素源として利用するために、キシラン分解系を獲得したことを示唆していると考えられる。*Auricularia delicata* (Ad) や *Aspergillus niger*(An)などの一部の糸状菌は、炭素紀からペルム紀にかけて、TrXyl3A のようにループが追加された GH family 3 の Bxl を獲得したと考えられる。その後、ほとんどの糸状菌は再びループのない Bxl を採用したが、*Trichoderma reesei* はループのある Bxl を保持していた。*Cryphonectria parasitica*(Cp)は子囊菌であるが、樹木を分解するため、ループのない Bxl を持っていると考えられる。菌類は、対象となる植物のその後の進化に合わせて、キシラン分解システムを適応させていったと考えられる。

白色腐朽菌は GH10 のキシラナーゼを持ち、広葉樹の基質を好む。グルクロン酸の置換パターンは分散しており（Bromley *et al.*, 2013）、キシロース残基の約 2 個に 1 個はアセチル化されている（Busse-Wicher *et al.*, 2014）ので、アセチルグルクロノキシランはキシラナーゼによる分解に抵抗性があり（Biely *et al.*, 2013）、アセチルキシランエステラーゼが重要な役割を果たしていると考えられてきた（Biely *et al.*, 1985）。GH10 のキシラナーゼとアセチルキシランエステラーゼがキシランを攻撃した場合、最終生成物はキシロース、 X_2 、 2^3 - α -D-グルクロニルキシロトリオース（UXX）となる。したがって、この環境にいる Bxl は、小さなキシロオリゴ糖を優先的に分解すると考えられる。褐色腐朽菌も同様に GH10 のキシラナーゼを保有しており、一般に、アラビノグルクロノキシランを含む針葉樹の基質を好むと考えられている。アラビノグルクロノキシランの構造は比較的単純で、グルクロン酸の置換のうち、ほとんどはキシロース 6 残基に 1 個の割合で存在し、アラビノースは GlcA 置換残基から 2 残基離れたところに位置している（Busse-Wicher *et al.*, 2016; Martinez *et al.*, 2017）。したがって、GH10 によって、非還元末端に GlcA または Ara で置換されたキシロビオースとキシロオリゴ糖が生成される。この環境での Bxl は、主にこれらの比較的小さなオリゴ糖を分解するために必要である。木材腐朽菌とは対照的に、子囊菌のモデル生物である *T. reesei* の既報論文より、軟腐朽菌やカビは主に GH11 や GH30 のキシラナーゼを使用している（Tenkanen *et al.*, 1992; Biely *et al.*, 2014B）。GH family 11 と 30 のキシ

ラーナーゼは、GH10 のキシラーナーゼよりも重合度の長いキシロオリゴ糖を生成する傾向にある。例えば、GH family 11 のキシラーナーゼの場合、Bxl は、キシラーナーゼの分解産物である XUXX や 2³- α -L-arabinofuranosyl-xylobiose (XAXX) に由来する X₄ を分解する必要がある。GH30 のうち、グルクロノキシラン特異的なキシラーナーゼでは、置換パターンに応じてより長いキシロオリゴ糖を生成する (Biely *et al.*, 2014B)。こうしたキシラーナーゼの特性は、長いキシロオリゴ糖を好む TrXyl3A の機能と補完的であると考えられる。さらに、GH family 11 によるアセチルグルクロノキシラン分解産物は、脱アセチル化の前に Bxl で分解する必要があることが指摘されている (Biely, 2016)。したがって、子囊菌の一部は、上流の主鎖分解酵素だけでなく、側鎖分解酵素の機能的制約から、TrXyl3 型の Bxl を選択した可能性がある。こうしたキシラン主鎖分解系は、GH family 10 と PcBxl3 型の Bxl を用いる担子菌のキシラン分解系とは異なると考えられ、糸状菌のキシランには多様性があることを示唆している。

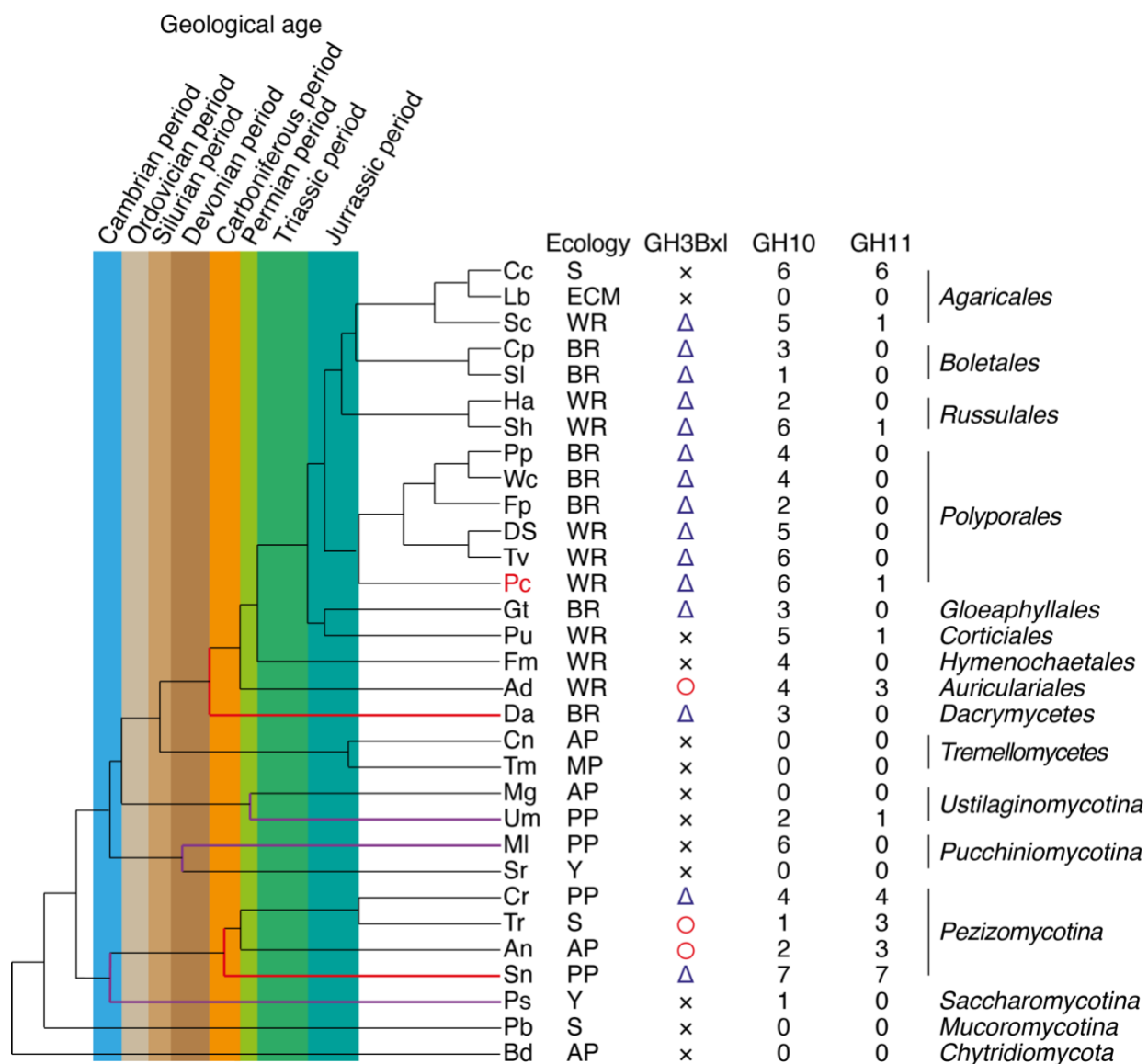


図 2-9 糸状菌の系統樹と、キシラン主鎖分解酵素の保有数の関係

Floudas らの先行研究（2012）に基づき、編集したものに、GH family 3 Bxl の情報を足した。

GH family 3 の Bxl を持たないものは x、PcBxl3 のようにループが欠損している Bxl を持つものは △（青）、TrXyl3A のように追加のループを持つものを ○（赤）で示した。Pc（赤字）は *Phanerochaete chrysosporium* である。略語は Floudas（2012）に従った。GH family 10 を獲得したと考えられる時期、菌を紫線で、GH family 3 Bxl を獲得したと考えられる時期、菌を赤線で示した。

2.5 結言

本章では、2 種類の糸状菌由来 Bxl のキャラクタライズを行い、比較解析を行った。サブサイト構造と基質の DP を考慮した反応速度論的解析により、*PcBxl3* と *TrXyl3A* の基質特異性の違いを説明することができた。木材腐朽菌である担子菌は、木質植物由来のキシラン構造に効率的に作用する *PcBxl3* などの Bxl を使用し、カビは草本由来のキシランを効率的に分解する Bxl を使用するなど、糸状菌による異なるキシラン分解戦術の存在が示唆された。

第3章 各種キシラン構造に対するキシラナーゼの反応特性

3.1 目的

第2章では、菌によって二種類の Bxl を使い分けている可能性があることが示唆された。さらに、GH family 10 と 11 のキシラナーゼの保有数に依存していることが明らかとなった。したがって、GH family 10 と 11 のキシラナーゼの機能的な差異をより精査する必要がある。

序章で紹介したように、これまでの研究では、主に市販の基質を用い、GH family 10 と 11 のキシラナーゼの機能解析が行われてきた。しかしながら、こうした基質はアセチル基が脱離しているため、実際の天然に存在するキシランに対する各キシラナーゼの反応特性はほとんど知られていない。また、序論でも述べたように、アセチルキシランエステラーゼには、その活性が基質の重合度に依存しているものもあることから、キシラナーゼのアセチルキシランに対する反応特性と関連があると考えられるが、これまでほとんど研究が行われていない。

P. chrysosporum は、白色腐朽菌のモデル生物で、GH family 10 のキシラナーゼを 6 つ、GH family 11 のキシラナーゼを 1 つ保有している。このうち、Sakuragi ら (2018) によって GH family 10 の 2 つのキシラナーゼ (*PcXyn10A* と *PcXyn10C*) と GH family 11 のキシラナーゼ (*PcXyn11B*) が、培養実験にて実際に発現が確認されている。同論文で、*PcXyn10A* は *PcXyn10C* よりも恒常的に発現し、発現量も多いことから、選抜した。さらに、*PcXyn11B* やアセチルキシランエステラーゼは、培養時の炭素源によって、その発現量が大きく変化することでも論文で報告されており、これまで似た酵素と考えられてきた GH family 10 と 11 のキシラナーゼには、糸状菌のキシラン分解系において明確に異なる機能があることが示唆された。

そこで、本研究では、糸状菌のキシラン主鎖分解を明らかにするため、第3章では実際に天然に近い構造を保持するキシランを様々な植物から抽出し、担子菌 *Phanerochaete chrysosporum* 由来の GH family 10 と 11 のキシラナーゼ (*PcXyn10A* と *PcXyn11B*) の反応特性を比較した。

3.2 実験

二種キシラナーゼのクローニング

P. chrysosporium K-3 株は、2% Avicel を唯一の炭素源として含む Kremer and Wood (Kremer and Wood, 1992) 培地で培養した。凍結した菌糸体粉末約 100 mg から RNeasy (QIAGEN, Limburg, Netherlands) を用いて Total RNA を抽出し、Oligo dT Latex (タカラバイオ、滋賀、日本) を用いてマニュアルに従って mRNA を精製した。mRNA から cDNA への合成は GeneRacer kit (Invitrogen, MA, USA) を用いて行った。cDNA 増幅用プライマーは、*P. chrysosporium* のゲノム配列に基づいて設計した。表 3 – 1 に示すように Generacer3'Primer (5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3') とともに、Pcxyn10A については Pcxyn10A-GSP (5'-GTGGTACAACCAGCTCCCAAG-3')、Pcxyn11B については Pcxyn11B-GSP (5'-TCGAGGACTTCGGGACGTACAAC-3') を使用した。Nested PCR には、Pcxyn10A 用プライマーとして、Pcxyn10A-F2_Nested (5'-ACGTCGTCAACGAGCCCTTCA-3') および GeneRacer3'Nested primer (5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3') を用いた。Pcxyn11B については、GeneRacer3'Nested primer に併用して Pcxyn11B-F2_Nested (5'-GTGAACGAGCCGTCGATCCA-3') を用いた。最後に、Pcxyn10A については、FW_PcXyn10A_5'UTR2 (5'-CACGTGTTCCGCATCTACCTG-3') および RV_PcXyn10A_3'UTR2 (5'-GAACGCGCCGTCTAATTGC-3') のプライマーを用いた。Pcxyn11B については、FW_PcXyn11B_5'UTR (5'-CTCAAGCACGTCGATC-3') および RV_PcXyn11B_3'UTR (5'-GCACCCGCCACTTTTAGTG-3') を用いた。すべての PCR 産物は、Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit for Sequencing (Thermo Fisher Science, MA, USA) を用いてクローニングした。PcXyn10A と PcXyn11B のアミノ酸配列を SignalP 5.0 (Almagro *et al.*, 2019) と Pfam 31.0 (Dustin *et al.*, 2017) で解析し、シグナルペプチドとドメイン構造を推定した。*Pcxyn10A* または *Pcxyn11B* を pPICZα プラスミド中の Kex2 と XbaI サイトの間に位置するよう、In-Fusion HD cloning Kit (タカラバイオ) を用いて融合させた。*Pichia pastoris* KM71 株をエレクトロポレーション法で形質転換した後、マニュアル通りに Zeocin を抗生物質として用いて形質転換体を選択した。

表 3-1 使用したプライマー一覧表

Primer	Sequence
Pcxyn10A-GSP	5'-GTGTGGTACAACCAGCTCCCAAG-3'
Pcxyn11B-GSP	5'-TCGAGGACTTCGGGACGTACAAC-3'
Generacer 3' Primer	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'
Pcxyn10A-F2_Nested	5'-ACGTCGTCAACGAGCCCTTCA-3'
Pcxyn11B-F2_Nested	5'-GTGAACGAGCCGTCGATCCA-3'
GeneRacer 3' Nested	5'- CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'
FW_PcXyn10A_5'UTR2	5'-CACGTGTTCCGCATCTACCTG-3'
RV_PcXyn10A_3'UTR2	5'-GAACGCGCCGTCTAATTGC-3'
FW_PcXyn11B_5'UTR	5'-CTCAAGCACGTCTCGATC-3'
RV_PcXyn11B_3'UTR	5'-GCACCCGCCACTTTTAGTG-3'

各キシラナーゼの配列決定のために用いたプライマーをまとめた。

酵素の生産及び精製

5-L ジャーファーマンター (TSC-M5L: 高杉製作所、東京、日本) を用いて、既報の通りメタノールを投入して (Igarashi *et al.*, 2008; Igarashi *et al.*, 2012)、組換えタンパク質を得た。組換え酵素の生産終了後、各培地を遠心分離 ($5,000 \times G$ で 30 分) して回収した。

粗酵素を含む上清は、100 kDa フィルターを通して不純物を除去後、10 kDa フィルター (Millipore、MA、USA) を用いて濃縮した。続いて、疎水性カラム (TOYOPEARL Phenyl 650M、東ソー、東京、日本) で精製を行った。1 M 硫酸アンモニウム (和光、大阪、日本) を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で平衡化後、酵素を溶出した。二段目精製には DEAE カラム (TOYOPEARL 650S 東ソー) を使用した。50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した後、1 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 5.0) で酵素を溶出した。純度を確認するために、12% SDS-PAGE を行った。*Cellvibrio japonicus* 由来の GH family 10 キシラナーゼ (CjGH10、Deboy *et al.*, 2008) は Harry Gilbert 教授 (Newcastle University) から頂いたものを、*Neocallimastix patriciarum* 由来の GH family 11 キシラナーゼ (NpGH11、Vardakou *et al.*, 2008) は Megazyme 社 (Wicklow, Ireland) から購入したものを用了。

セルロースカラムへの吸着実験

既報論文に従い、セルロースカラム精製を行った (Sugimoto *et al.*, 2012)。各画分を遠心濃縮チューブ (VIVASPIN 500 MWCO 3,000、PES、Sartorius、Goettingen、Germany) により濃縮し、12% SDS-PAGE ゲルを用いてタンパク質を確認した。

天然構造に近いキシランの調製

Wicher ら (2014) が報告した方法に基づいてシロイヌナズナ (*A. thaliana* Col-0) からアセチルキシランを抽出した。シロイヌナズナの幹部分から調製された AIR (アルコール不溶物) は Dupree 研究室からいただいたものを用了 (Goubet *et al.*, 2009)。初めに、100 mg AIR に 0.5 g/v % シュウ酸アンモニウム水溶液を加え、85℃で 2 時間インキュベーションした。続いて、11% 過酢酸を用いて 85℃で 30 分間脱リグニンを行った。最後に得られたホロセルロースから DMSO 溶媒を用いてアセチルキシランを抽出した。最後に PD-10 カラム (GE healthcare、IL、

USA)を用いてマニュアルに従い、溶媒を蒸留水に置換した。構成糖の分析のため、アセチルキシランを TFA 分解後に Dionex (Dionex, CA, USA) により定量を行った。キシランのモル濃度は、平均重合度算出に不要であるが、キシラン一分子あたりの反応回数算出のため、キシランの DP は 150 とした (Johansson and Samuelson, 1977)。

植物種の異なるキシラン調製のため、シラカバ、稲わら、スギを用いた。各サンプルは、既報論文の通り、乾燥後、粉碎・脱脂したものをを用いた (Sakuragi *et al.*, 2018; Sakuragi, 2018)。次に、上記と同様に脱ペクチンを行なった。脱ペクチンサンプルの、脱リグニンは最も穏やかな方法である Klaudiz 法 (Klaudiz, 1957; Awano *et al.*, 2002) によって実施した。粉末試料 1 g、NaClO₂ 0.8 g、酢酸 150 mg (和光、大阪、日本) を蒸留水 11 mL と混合し、37℃で 40 時間インキュベーションした。シラカバや稲わらのアセチルキシランは得られたホロセルロースから DMSO 溶媒で抽出を行った。スギのキシランは、アセチル基を保有しないため、4 M KOH で抽出した。最後に、抽出後、上記と同様に溶媒を蒸留水に変えた。得られたキシランはそれぞれ TFA 加水分解後、キシロースキット (Megazyme, Wicklow, Ireland) を用いてキシロース濃度を測定した。キシラン成分の比率を推定するために、500 MHz の分光器 (JNM-ECA500II, JEOL, Tokyo, JAPAN) を用いて、20℃で ¹H-NMR スペクトルを取得した。スギ由来のキシランについては、抽出サンプルに対して飽和 Ba(OH)₂(和光)溶液を加えてマンナンを沈殿させることで精製を行った。各基質 20 mg を 1 mL の D₂O (Sigma-Aldrich, MA, USA) に溶解し、遠心分離して沈殿物を除去した。得られたデータは delta プログラム (version 6.0.0, JEOL, Tokyo, Japan) で解析した。既報の NMR スペクトルデータ (Telemen *et al.*, 2000; Evtuguin *et al.*, 2003; Uhliariková *et al.*, 2013; Naran *et al.*, 2009, Morais *et al.*, 2017; Naidjonoka *et al.*, 2020) と比較して、¹H-NMR の帰属を行った。各領域の比率から、キシラン成分の比率を推定した。

タイムコース実験

反応中の DP の減少を分析するために、Bicinchoninic acid (BCA, TCI, 東京、日本)を用いて還元末端の量の増加をモニターした。反応液は 1 pmol の精製酵素、200 μL の抽出キシラン溶液、50 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) からなるものをを用いた。反応は 0、5、10、30、60 分後に停止させ、BCA を用いて比色定量した (Waffenschmidt and Jaenicke, 1987)。反応液は、

4 nM の精製酵素、1.67 μ M のシロイヌナズナ由来 AcGX と 50 mM 酢酸アンモニウムバッファー (pH5.0) からなるものを用いた。反応 0、5、10、30、60 分毎に、サンプルを採取し、BCA 法のアルカリ溶液と混和することで反応を停止し、時間定量サンプルとした。BCA 法の溶液は、溶液 A (5.65 mM BCA、512 mM Na_2CO_3 と 288 mM NaHCO_3) と溶液 B (7.82 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ と 12.0 mM L-serine) からなり、サンプル：溶液 A：溶液 B の混合割合は、1:2:2 とした。これらのサンプルは、80℃で 30 分間加熱し、その後氷上で冷却した。最後に 560 nm の吸光度を測定し、生成した還元末端の濃度をキシロース標準曲線に基づいて算出した。得られた結果は、R ソフトウェア(version 3.6.3)用い、次の式で 近似した。

$$Y = S(1 - e^{-t/\tau})$$

ここで、Y と t は、それぞれ、生成した還元末端量 (μ M) と反応時間 (h) を意味する。また、S は各基質がその酵素によって分解されうる量 (μ M) を、 τ は時定数 (h) を意味している。

アセチルキシラン溶液に 4 M NaOH を加え、室温で 20 分間脱アセチル化反応を行うことで、アセチルキシランと同濃度の脱アセチル化したキシラン溶液を調整した。その後、1 M 塩酸を加えて中和した。アセチルキシラン溶液、NaOH、HCl の比率は、200 : 5 : 20 とした。

Polysaccharides Analysis using Carbohydrate Electrophoresis (PACE)

各種キシランの各キシラナーゼによる分解産物は 10% PACE ゲルを用いて分析を行った。

シロイヌナズナ由来キシランの分解反応では、タイムコース実験と同様の反応液を 30℃で 24 時間インキュベーションした。反応後は、Speed-Vac (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) によりサンプルを乾燥させ、既報論文に従って ANTS (8-amino-naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid) 標識を行った (Bromley *et al.*, 2013)。標識したサンプルは Speed-Vac で乾燥後、3 M 尿素水溶液に懸濁させ、PACE サンプルとした。スタンダードとして、重合度が 1~6 のキシロオリゴ糖 (Megazyme, Wicklow, Ireland) を用いた。10%PACE ゲルは既報論文に従って作成し、サンプルローディング後、Hofer SE660 (Hofer, MA, USA) を用いて電気泳動を 1000 V で 45 分間行った。ゲルの可視化は既報論文に従って実施した (Bromley *et al.*, 2013)。

シラカバ、稲わら、スギ由来キシランの分解産物は、シロイヌナズナ由来キシランの分解反応と同様に実施し、PACE サンプルを調製した。電気泳動は、特注した泳動装置 (日本エイドー、東

京、日本)を用いて、1000 Vで一時間実施した。泳動後、ゲルはアルミホイルで覆われた箱の中で、365 nmの照明装置(オプトコード、東京、日本)を照射することで可視化したゲル中のバンドの解析にはImage J (version1.53)を用いた。

***PcXyn10A* と *PcXyn11B* の三次元構造のモデリング**

PcXyn10A と *PcXyn11B* の活性ドメインについて、それぞれ SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018) により、三次元構造の推定を行った。なお、テンプレートとして、それぞれ *Aspergillus aculeatus* 由来 GH family 10 キシラナーゼ (AaXyn2、PDB 6Q8M、相同性 58%; Schröder *et al.*, 2018) 及び *Talaromyces cellulolyticus* 由来 GH family 11 キシラナーゼ (TcXynC、3WP3、相同性 65%; Kataoka *et al.*, 2014) を用いた。

3.3 結果

PcXyn10A 及び PcXyn11B のクローニング

本研究では、初めに *Pcxyn10A* と *Pcxyn11B* のクローニングを行った。その結果はそれぞれ図 3 – 1 と図 3 – 2 に示した。図 3 – 3 に示すように、*PcXyn10A* は 389 アミノ酸残基からなり、*PcXyn11B* は 271 アミノ酸残基からなることが明らかとなった。また、両キシラナーゼは既報論文で指摘されているように (Nishijima *et al.*, 2014)、CBM1 で重要な 3 つの芳香族アミノ酸残基が異なることが推定された。

PcXyn10A 及び *PcXyn11B* の組換え酵素はメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* により生産後、精製を行った。最終的な精製酵素サンプルは、図 3 – 4 に示したように SDS-PAGE ゲル上で単一のバンドを示した。

PcXyn10A 及び *PcXyn11B* は、CBM 1 を保有することから、セルロースカラムへの吸着実験を行った。図 3 – 5 に示すように、両 CBM1 はセルロースに吸着することが確認された。

```

>pcxyn10a
-78 GCGACGATGAGGGCTCGGGGTGCGTGTCCCCAGCAATTGTCGTCTGCTATATCGCCCGGCGTGTGACCCAGCAATG -1

1 ATGAAGCTCTCTGCCTCCTTCGCGGCCCTCGCGGTCCTCCTGCCGTTTGTGCAGGCCAGTCGCCTGTTTGGGGCCAA 78
-19 M K L S A S F A A L A V L L P F V Q A Q S P V W G Q 7

73 TCGGGTGGTATTGGCTGGACCGGCCACGACCTGCACGGCTGGCAACGTCTGCCAGGAGTACAGCGCGTACTACTCG 156
8 C G G I G W T G P T T C T A G N V C Q E Y S A Y Y S 33

145 CAGTGCATCCCTGCTAGCCAGGCAACGTCCGTACGTCCGTCTCCACCGCGCCGAACCCGCTCCGACGTGCGACACG 234
34 Q C I P A S Q A T S V T S V S T A P N P P P T S H T 59

217 AGCACGTGCTCTGCCCCGTCCGGTGCCTCGACCTCGACCGCGAAGCTGAACACGCTCGCGAAGGCCAAGGGCAAGCTC 312
60 S T S S A P S G A S T S T A K L N T L A K A K G K L 85

289 TACTTCGGCACGGCGACGGACAACGGCGAGCTCTCGGACACCGCGTACACCGCGATCCTCGATGACAACACGATGTTTC 390
86 Y F G T A T D N G E L S D T A Y G Q I T P A N S M K 111

361 GGCCAGATCAGCCTGCGAACAGCATGAAATGGGATGCCACCGAGCCGACGAGGGCCAGTTACCTTCAGCGGAGGT 468
112 T A I L D D N T M F W D A T E P Q Q G Q F T F S G G 137

433 GACCAGATTGCCAACCTTGCCAAATCAAATGGCATGCTCCTGCGTGGTCACAATTGCGTGTGGTACAACCAGCTCCCA 546
138 D Q I A N L A K S N G M L L R G H N C V W Y N Q S W 163

505 AGCTGGGTGTCCAACGGCAAGTTCACCGCAGCCAGCTTACCTCCATTATCCAAAACCACTGCTCGACCCTCGTCACC 624
164 L P V S N G K F T A A Q L T S I I Q N H C S T L V T 189

577 CACTACAAGGGCCAGGTCTACGCTGGGACGTCGTCAACGAGCCCTTCAACGACGACGGCTCGTGGCGCACGGACGTC 702
190 H Y K G Q V Y A W D V V N E P F N D D G S W R T D V 215

649 TTCTACAACACGCTCGGCACGTGTCAGTTCGCGTCGAGGCCGCCGCGCGGCGGACCCGGACGCGAAGCTG 780
216 F Y N T L G T S Y V Q I A L E A A R A A D P D A K L 241

721 TACATCAACGAGTACAACATCGAGTACGCGGGCGGAAGGCGACGTCGCTGCTCAACCTCGTAAAGACGCTCAAGGCT 858
242 Y I N E Y N I E Y A G A K A T S L L N L V K T L K A 267

793 GCATCCGTACCGCTCGACGGCATTGGCTTCCAGAGCCACTTCATCGTCGGCCAGGTCCCGACTGGCCTGCAGTCGAG 936
268 A S V P L D G I G F Q S H F I V G Q V P T G L Q S Q 293

865 CTCACGACGTTCCCGCGCAGGCGCTCGAGGTCGCGATCACCGAGCTCGACATCCGATGACGCTCCCGTCGACGCC 1014
294 L T T F A A Q G V E V A I T E L D I R M T L P S T P 319

937 GCGCTCCTCGCGCAGCAGAAGACGGACTACTCGAACGTCATCAAGGCGTGCGGTCCGTCGAGGCGTGTGTCGGCGTC 1092
320 A L L A Q Q K T D Y S N V I K A C A S V E A C V G V 345

1009 ACCGTGTGGGACTGGACGGACAAGTACTCGTGGGTGCCGAACACGTTCTCTGGCCAGGGTGCGGCCTGCCCGTGGGAC 1170
346 T V W D W T D K Y S W V P N T F S G Q G A A C P W D 371

1081 CAGAACTTCGTCAGGAAACCCGCTACGATGGTATCGCTATTGGCTTCGGCAATTAG 1227
372 Q N F V R K P A Y D G I A I G F G N * 389

1228 ACGGCGGTTCAAGGGCGAATTTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGT 1271

```

図 3-1 *PcXyn10A* のクローニング結果

開始コドン及び終始コドンを赤色で表示した。橙色で CBM1 と予測された領域を、青色で GH family 10 と予測された領域を示す。

```

>pcxyn11b
-63          AGTCCTGCAGGTTTAAACGAATTGCGCCTTCTCAAGCACGTCTCGCATCGCCACCGGTCACG      -1

  1  ATG GTCAGCTTTAACTCCCTCCTCGTCGCAGTCTCGGCTGCCACCTGCGCCCTCGCCTTCCCTTCGAGTTCCACAAC      78
-19  M  V  S  F  N  S  L  L  V  A  V  S  A  A  T  C  A  L  A  F  P  F  E  F  H  N      7

  79  GGCACGCACGTCTTCCCGCGTCAGAGCACGCCCGCAGGCACCGGCACGAACAACGGCTTCTTCTACTCCTTCTGGACC      156
   8  G  T  H  V  F  P  R  Q  S  T  P  A  G  T  G  T  N  N  G  F  F  Y  S  F  W  T      33

 157  GACGGTGGCGGATCCGTCACCTACAACAACGGTCCCGCGGGCGAGTACAGCGTGACGTGGTCCAACGCGGACAACCTTC      234
  34  D  G  G  G  S  V  T  Y  N  N  G  P  A  G  E  Y  S  V  T  W  S  N  A  D  N  F      59

 235  GTCGCCGGCAAGGGCTGGAACCCGGGCTCTGCCCAGGCGATCTCGTTCACGGCGAACTACCAGCCGAACGGAACTCG      312
  60  V  A  G  K  G  W  N  P  G  S  A  Q  A  I  S  F  T  A  N  Y  Q  P  N  G  N  S      85

 313  TACCTGTCCGTGTACGGCTGGTTCGACGAACCCGCTCGTGGAGTACTACATCCTCGAGGACTTCGGGACGTACAACCCC      390
  86  Y  L  S  V  Y  G  W  S  T  N  P  L  V  E  Y  Y  I  L  E  D  F  G  T  Y  N  P      111

 391  GCGGTGTGCTGCACGCACAAGGGCACGCTCACGTGCGACGGCGCGACGTACGACGTGTACGAGGGCACGCGCGTGAAC      468
  112  A  V  S  L  T  H  K  G  T  L  T  S  D  G  A  T  Y  D  V  Y  E  G  T  R  V  N      137

 469  GAGCCGTGCATCCAGGGCACCGCGACGTTCAACCAGTACTGGTCGATCCGCTCCTCGAAGCGCTCCTCGGGCACCGTC      546
  138  E  P  S  I  Q  G  T  A  T  F  N  Q  Y  W  S  I  R  S  S  K  R  S  S  G  T  V      163

 547  ACGACCGCGAACCCTTCGCGGCCTGGAAGCAGCTCGGCCTCCCGCTCGGCACGTTCAACTACCAGATCGTCGCCACC      624
  164  T  T  A  N  H  F  A  A  W  K  Q  L  G  L  P  L  G  T  F  N  Y  Q  I  V  A  T      189

 625  GAGGGCTACCAGTCTCCGGCTCGTCCACCGTACCCTGTAACCCCGCGGCGGCGTCACCTCGCCACCGCCCCACC      702
  190  E  G  Y  Q  S  S  G  S  S  T  V  T  V  N  P  A  G  G  V  T  S  P  T  A  P  T      215

 703  GGGCCCTCGTCCGTCTCCACCACCCCGAGCGGCCCTCGAGCAGCCCGAGCCCGTCGGCAGTTGCGCGGCTCTCTAC      780
  216  G  P  S  S  V  S  T  T  P  S  G  P  S  S  S  P  S  P  V  G  S  C  A  A  L  Y      241

 781  GGCCAGTGCGGCGGCCAGGGCTGGACGGGCCCCGACCTGCTGCTCGTCGGGCACCTGCAAGTTCTCGAACAACTGGTAC      858
  242  G  Q  C  G  G  Q  G  W  T  G  P  T  C  C  S  S  G  T  C  K  F  S  N  N  W  Y      267

 859  TCCAGTGCCTCTAA      873
 268  S  Q  C  L  *      271

 874  CGGGCACCTGCAAGTTCTCGAACAACTGGTACTCCAGTGCCTCTAAGTGAGTGCAGGATGGAGGGTAGAGGGCGGT      951

```

図 3-2 *PcXyn11B* のクローニング結果

開始コドン及び終始コドンを赤色で表示した。橙色で CBM1 と予測された領域を、青色で GH family 11 と予測された領域を示す。また、緑色のアミノ酸残基は糖鎖修飾を受ける可能性のあるアミノ酸を意味する。

>PcXyn10A

QSPVWGQCGGIGWTGPTTCTAGNVCEYSAYYSQIPASQATSVTSVSTAPNPPPTSHTSTSSAPSGASTST AKLNTLAKAKGKLYFGT
 ATDNGLSDTAYTAILDDNTMFGQITPANSMKWDATEPQQGQFTFSGGDQIANLAKSNGMLLRGHNCVWYNQLPSWVSNGKFTAAQLTS
 IIQNHCSLTVTHYKGQVYAWDVVNEPFNDGDSWRDVFYNTLGTSYVQIALEAARAADPDALYINEYNIYAGAKATSLNLVKTLLA
 ASVPLDGIQGFQSHFIVGQVPTGLQSLTTFAAQGVETAITELDIRMTLPSTPALLAQKTDYSNVIKACASVEACVGVTVWDWTDKYSW
 VPNTFSGQGAACPWDQNFVRKPAYDGIAGFGN

>PcXyn11B

FPFEFHNGTHVFPQSTPAGTGTNNGFFYSFWTDGGGSVTYNNPGAGEYSVTWSNADNFVAGKGWNPGSAQAISFTANYQPNGNSYLSV
 YGWSTNPLVEYYIILEDFTYNPAVSLTHKGTLTSDGATYDVYEGTRVNEPSIQGTATFNQYWSIRSSKRSSGTVTTANHFPAWKQLGLP
 LGTFNYQIVATEGYQSSGSSTVTNVPAGGVTSPTAPTGPSSVSTTPSGPSSSPSPVSGSC AALYGQCGGQGWGTGPTCCSSGTCKFSNNWY
 SQCL

図 3-3 PcXyn10A と PcXyn11B のアミノ酸配列

CBM1 領域は橙色、活性ドメインは青色で表示した。赤色で表示されたアミノ酸は、CBM1 で重要な 3 つの芳香族アミノ酸と考えられているアミノ酸を示している。

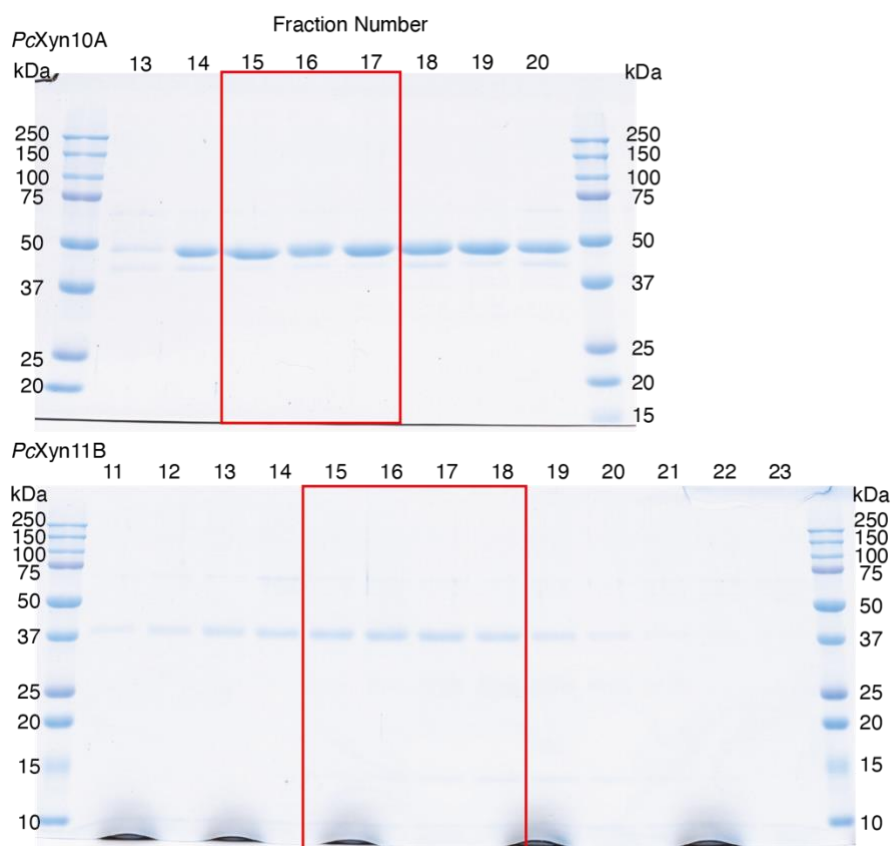


図 3-4 PcXyn10A 及び PcXyn11B の精製結果

両酵素は精製度合いを 12%SDS-PAGE ゲルにより確認した。アミノ酸配列から予想された分子量と概ね一致する結果であった。また、赤枠で囲ったサンプルを以降の活性試験に用いた。

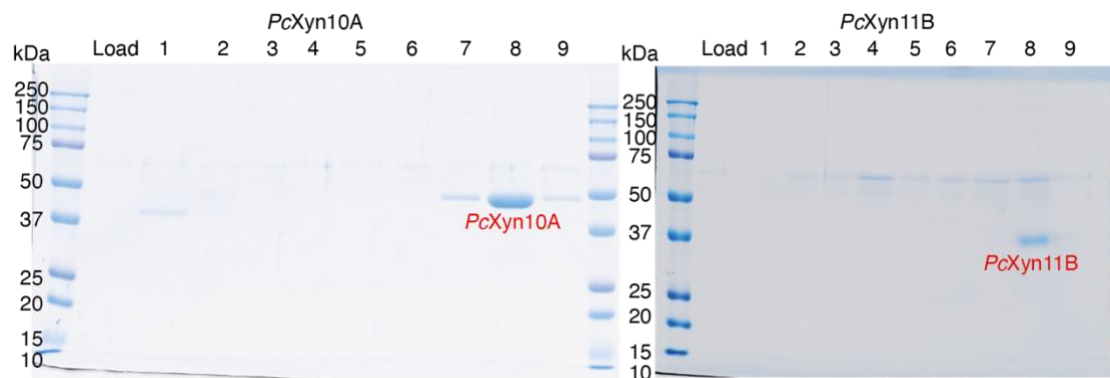


図 3-5 *PcXyn10A* 及び *PcXyn11B* のセルロースカラムへの吸着実験

1 M 硫酸アンモニウム水溶液により平衡化したセルロースカラムに、各酵素をアプライし、3CV の 1 M 硫酸アンモニウム水溶液、3CV の 0.1 M 硫酸アンモニウム水溶液、3CV の蒸留水を流した。1CV 毎に分取した。蒸留水を流した 7~9 の分画で *PcXyn10A* 及び *PcXyn11B* が溶出したことから、セルロース吸着能を確認した。

キシラナーゼのアセチルキシランに対する分解挙動の解析

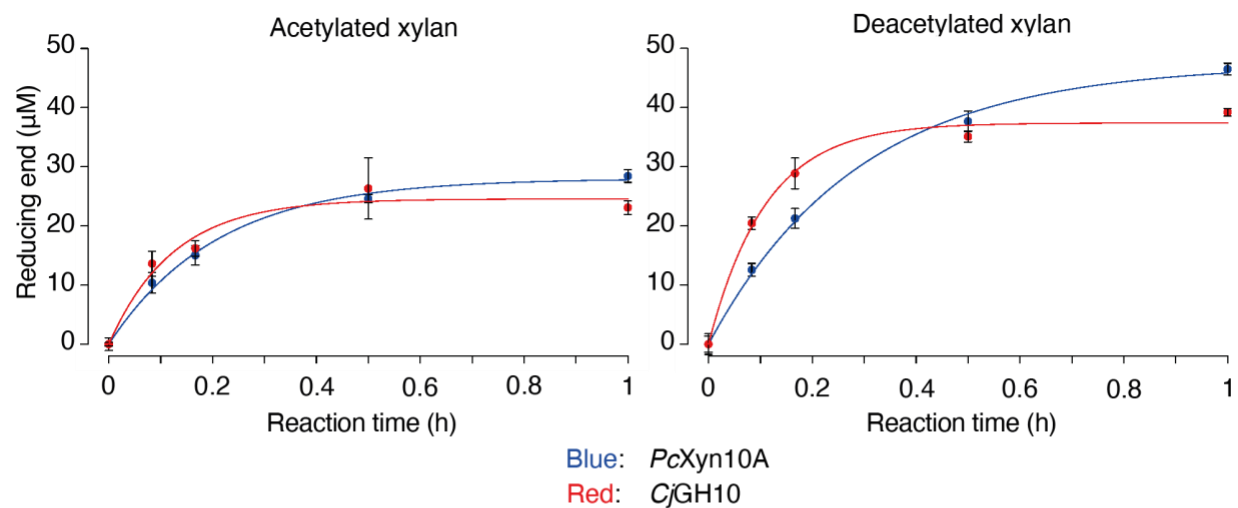
図 3-6 に、シロイヌナズナ由来アセチルキシラン（キシランの物性について説明いれる）分解のタイムコース実験の結果を示す。近似式は一次反応式として $y = S(1 - e^{-t/\tau})$ である。S は基質の認識可能箇所の量 (μM)、 τ は時定数 (h) を意味している。これら係数は表 3-2 にまとめた。

GH family 10 のキシラナーゼは、アセチルキシランをオリゴ糖に分解した。PcXyn10A と CjGH10 の近似式より $(S, \tau) = (28, 0.21)$ と $(25, 0.12)$ であった。S の値とは対照的に、CjGH10 の τ は PcXyn10A の半分程度である。これは、CjGH10 が PcXyn10A よりも早く反応を終えたことを意味している。S 値をもとに、反応後の平均 DP を算出したところ、PcXyn10A と CjGH10 により生成した分解産物の平均 DP は、それぞれ 9.6 と 11 であった。このアセチルキシランは、アセチル基と GluA の置換基を側鎖に持つ。これらの側鎖は、それぞれアセチルキシランエステラーゼ (AcXE) とグルクロニダーゼによって分解され、両者の基質特異性から、AcXE はグルクロニダーゼよりも先に作用すると考えられている (Razeq et al., 2018)。そこで、次にキシラナーゼ活性に対するアセチル化の影響に注目した。アルカリ処理後、アセチルキシランからすべてのアセチル化を除去した。図 3-6 に示すように、PcXyn10A は CjGH10 よりも多くの還元末端を生成した。CjGH10 の初速度は PcXyn10A よりも速いため、アセチルキシラン分解と同様に CjGH10 の τ は PcXyn10A よりも小さく、CjGH10 のキシランポリマーに対する基質特異性が PcXyn10A よりも高いことが示唆された。

GH family 11 のキシラナーゼは GH family 10 のキシラナーゼに比べてアセチルキシランへの活性が三分の一以下と低く、S 値は PcXyn11B で 5.2、NpGH11 で 7.8 であった。生成した還元末端の量は数分後にプラトーに達し、 τ 値はいずれも 0.09 と 0.06 h と小さかった。DP は PcXyn11B では 45、NpGH11 では 32 に減少した。GH family 11 のキシラナーゼは脱アセチル化したキシランを分解し、アセチルキシランの分解に比べて S 値の上昇が大きかった。S 値の変化にかかわらず、NpGH11 の τ 値は変化しないが、PcXyn11B の τ 値は有意に異なっている。

これらの実験から、キシランのアセチル基修飾が GH family 11 のキシラナーゼに対して、GH family 10 のキシラナーゼよりも強い負の影響を与えることが確認された。S 値と τ 値に着目すると、S 値は基質によって変化するが、 τ 値は PcXyn11B のみで顕著な変化が確認された。このことから、アセチル基修飾は主に酵素が認識できる場所の数に関わっていると考えられる。

GH10



GH11

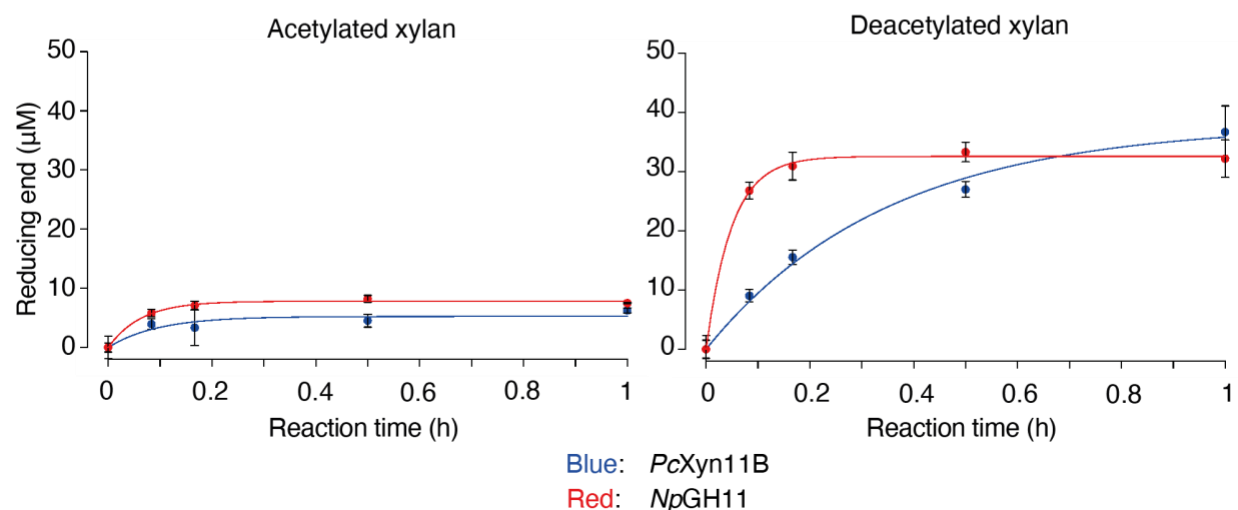


図 3-6 アセチルキシランとアルカリ処理したキシランの各キシラナーゼによるタイムコース実験

BCA により、反応により生成した還元末端量を時間毎に定量した。アセチルキシランは Paul 研究室からいただいたシロイヌナズナの AIR サンプルに対して、過酢酸による脱リグニン後、DMSO 溶媒により抽出した。溶媒はゲル濾過カラムで蒸留水に置換した。反応溶液 250 μL は、1 pmol の各キシラナーゼ、抽出したキシラン 200 μL 、終濃度 50 mM の酢酸バッファー (pH 5.0) からなる。酵素との混和により反応を開始し、BCA 溶液によって時間毎に反応を停止させ、遊離した還元末端量を定量した。

アセチルキシランと同濃度となるように、5 μL の 4 M 水酸化ナトリウム水溶液を 200 μL のアセチルキシランに加え、室温で 20 分間インキュベーションすることで脱アセチル化を行った。その後、20 μL の 1 M 塩酸により中和し、基質として利用した。

各点をプロット後、反応を一次反応とみなし近似曲線 $y = S(1 - e^{-t/\tau})$ を引いた。なお、 y は遊離した還元末端量、 τ は反応時間を表し、 S 及び τ は分解可能な基質の濃度及び時定数を意味する。

表 3-2 アセチルキシラン及びアルカリ処理したキシランに対する各キシラナーゼのタイムコース実験に基づく各パラメーターの算出結果

反応系	S (μM)	τ (min)	平均重合度
<i>PcXyn10A</i> + アセチルキシラン	28.0 ± 0.9	0.21 ± 0.02	9.6 ± 0.3
<i>PcXyn10A</i> + アルカリ処理したキシラン	47.3 ± 1.2	0.29 ± 0.02	5.8 ± 0.1
<i>CjGH10</i> + アセチルキシラン	24.6 ± 1.6	0.12 ± 0.03	11 ± 0.7
<i>CjGH10</i> + アルカリ処理したキシラン	37.4 ± 1.2	0.11 ± 0.01	7.3 ± 0.2
<i>PcXyn11B</i> + アセチルキシラン	5.2 ± 0.8	0.09 ± 0.05	45 ± 6.9
<i>PcXyn11B</i> + アルカリ処理したキシラン	38.0 ± 2.2	0.34 ± 0.05	7.2 ± 0.4
<i>NpGH11</i> + アセチルキシラン	7.8 ± 0.2	0.06 ± 0.01	32 ± 0.8
<i>NpGH11</i> + アルカリ処理したキシラン	32.6 ± 0.4	0.05 ± 0.01	8.3 ± 0.1

図 3-6 において、反応を一次反応として近似し、各係数を算出した。

一次近似の妥当性の確認

各基質に対して、酵素が分解可能な量が S として算出されたため、さらに、この S を用い、今回の近似の妥当性について確認を行った。一次反応式として取り扱える場合、基質濃度の対数 $\log(S')$ と反応時間 t (h) は、直線の関係にあり、 $\log(S') = kt + b$ と表せる。 S' は、表 3-3 で算出した S を用いて $S' = S - \text{reducing end}$ の関係にある。なお、reducing end は、図 3-6 でプロットしたものと同一である。したがって、反応時間 0 の時、 $S' = S$ である。傾き k の絶対値は速度定数であり、時定数と関係がある。切片 b は S に対応する。図 3-7 に、 $\log(S')$ と反応時間をプロットしたものを示す。

図 3-7 では、実験精度の問題で、 S' が負となり、 $\log$ が定義できなくなった点とそれ以降のプロットを除いている。*P. chrysosporium* 由来のキシラナーゼでは、ほとんどの場合で良い直線関係にあることが確認された。市販の酵素もプロット数は少ないものの、直線関係にあることが確認された。また、GH10 と GH11 のいずれの場合も、*P. chrysosporium* のキシラナーゼよりも市販のキシラナーゼの方が傾きの絶対値が大きいことが確認された。

さらに反応の詳細及び近似の妥当性を評価するため、 k と R^2 値をまとめた (表 3-3)。また、 k を基に再度時定数を算出し、 τ' として示した。

R^2 値については、PcXyn11B のアセチルキシラン分解では、0.68 で近似精度が低いことが確認された。それ以外の反応系では、0.980 以上と良好な近似であることが確認された。

最初に算出した時定数 τ と、再度算出した τ' を比較すると PcXyn10A によるアルカリ処理後のキシラン分解、PcXyn11B による反応 2 種については、 τ と τ' で誤差範囲を超える差が確認された。PcXyn10A については、反応一時間の基質量を除外した結果、より近似の精度が向上したためと考えられる。また、PcXyn11B では、実験精度及び近似方法による差と考えられる。

CjGH10、NpGH11 については、先ほどと同様の結果が得られた。また、再計算した結果、PcXyn10A によるキシラン分解系では、時定数がほとんど変わらないことが確認され、市販の酵素 2 種と同様、基質による時定数の変化は小さいことが明らかとなった。そして、PcXyn11B については、今後再検討する余地があることが明らかとなった。

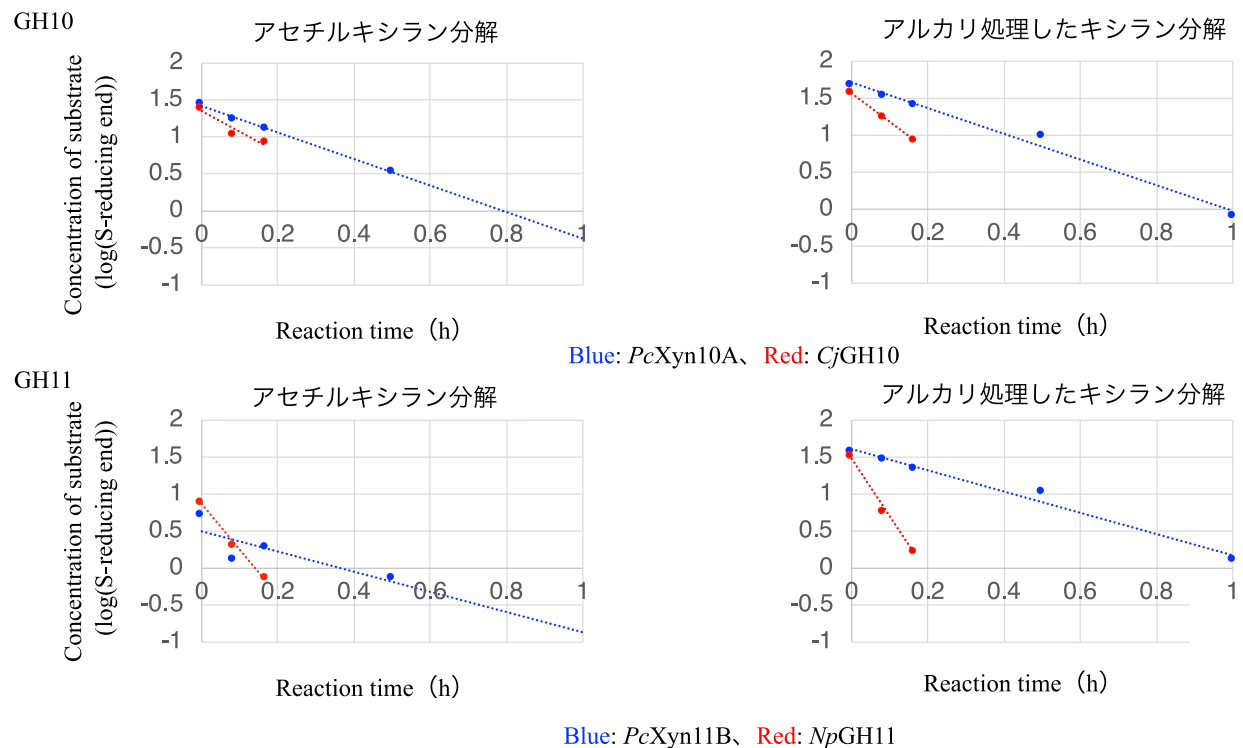


図 3-7 一次反応として近似した場合の、基質量の時間変化プロット

図 3-6 及び表 3-2 より求めた S を基に、基質量の減少 (S-reducing end) の対数を算出し、反応時間と共にプロットした。ただし、実験精度の問題で、基質量が負になる点は除外した。一次反応として取り扱える場合は、プロットが直線となるため、 $y = kt + b$ として評価を行った。ここで、 y は $\log(\text{S-reducing end})$ 、 t は反応時間 (h) を表す。 k は傾きで、その絶対値は時定数と逆数の関係にある。また、 b は切片で、 S に対応する定数である。

表 3－3 各反応における、傾き及び R^2 値

Enzyme	Substrate	k	τ'	R^2
PcXyn10A	アセチルキシラン	-1.80	0.20	0.997
	アルカリ処理したキシラン	-1.74	0.21	0.988
CjGH10	アセチルキシラン	-2.80	0.13	0.924
	アルカリ処理したキシラン	-3.84	0.10	0.998
PcXyn11B	アセチルキシラン	-1.36	0.27	0.680
	アルカリ処理したキシラン	-1.44	0.26	0.980
NpGH11	アセチルキシラン	-6.21	0.06	0.993
	アルカリ処理したキシラン	-7.78	0.05	0.992

図 3－7 より、傾き及び R^2 値を算出し、上表にまとめた。赤字は、近似が悪いことを示す。

PACE 法によるアセチルキシラン分解産物の分析

タイムコース研究では、キシラナーゼによるアセチル分解産物の平均重合度が約 10 から 40 程度であることが明らかとなった。しかしながら、こうした最終生成物の分布については不明であった。そこで、10% PACE ゲルを用い、PACE 法による最終生成物の評価を行った。10% PACE ゲルは大きなマトリックス構造を持つため、様々な DP を持つオリゴ糖を分離することができる。図 3-8 A の赤枠に示すように、キシランポリマーはゲルの上部にスミアバンド（赤枠）として検出された。図 3-8 B はゲルのピークの強度を示している。アセチルキシランはゲルトップ付近のバンドとして確認された。

図 3-8 より、PcXyn10A はアセチルキシランの大部分を DP<10 のキシロオリゴ糖へと分解したことが確認された。ただし、図 3-8 B の、PcXyn10A によるアセチルキシラン分解産物のグラフにおいて、中央の領域が平坦ではなく傾いているのは、DP=10 より長いオリゴ糖がまだ少量ながら存在していることを示唆している。

図 3-8 では、アルカリ処理による脱アセチル化後のキシラン分解の結果も示している。脱アセチル化によりキシランの分子量が低下したため、スミアバンド（赤枠）はやや下に移動した。

PcXyn11B は、10%PACE ゲルにおいて、アセチルキシランを分解したが、大部分が橙枠で示すように、高分子量のままであることが確認された。図 3-8 B でも、PcXyn11B によるアセチルキシラン分解産物は、左半分のバンド強度が確認され、水平になっていることから、様々な重合度のオリゴ糖が分布していることが明らかとなった。

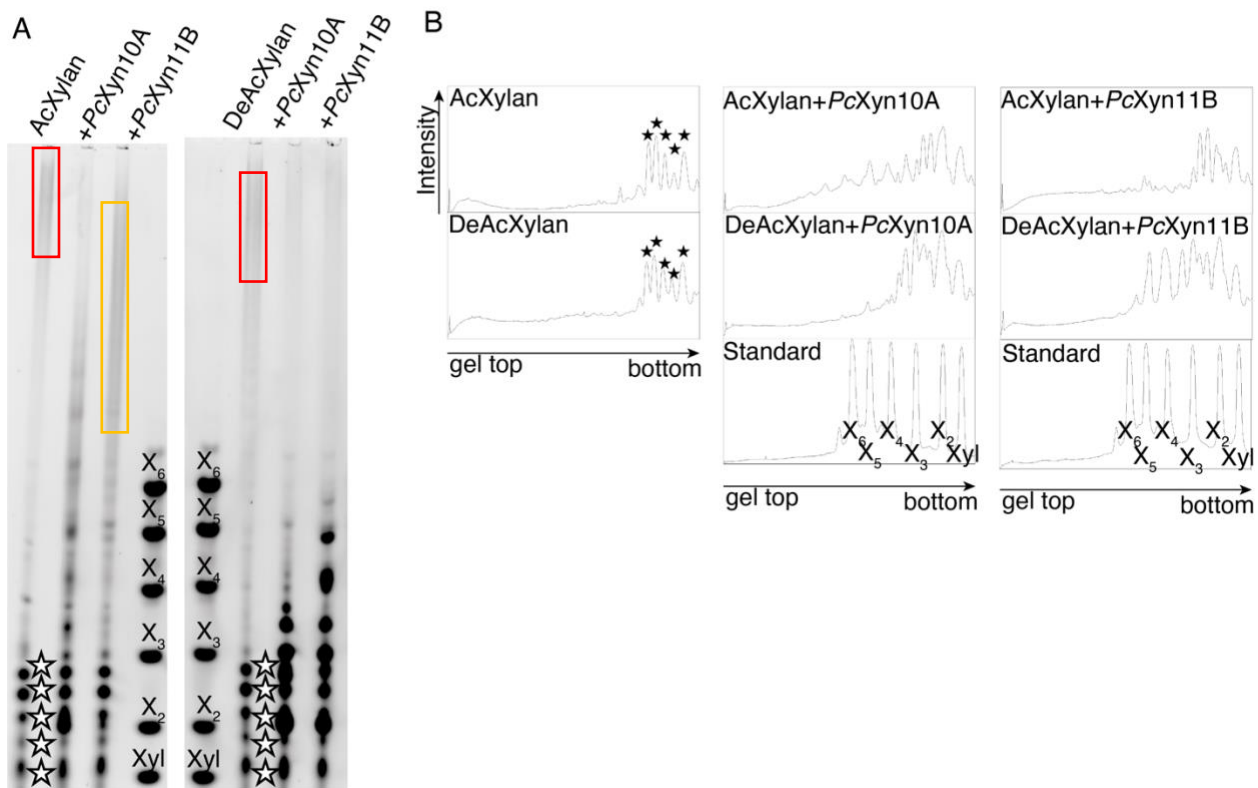


図 3-8 アセチルキシラン（AcXylan）とアルカリ処理したキシラン（DeAcXylan）の各キシランナーゼによる反応生成物の分析

A : 10% PA C E ゲルにより、反応生成物を分離した。反応時間が 24 時間であること以外は図 3-2 の条件を踏襲した。電気泳動は 1000V で 45 分間行った。星印はバックグラウンドのスポットを表す。

B : A のゲル泳動結果を Image J により分析した結果を表す。表の y 軸と x 軸はそれぞれピーク強度とゲルの位置を意味する。

天然に近い構造を有するキシラン分解産物の比較

アセチル基やグルクロン酸などのキシラン側鎖の、キシラナーゼ活性への影響を比較するため、異なる植物種の 3 つのキシランの分解産物を比較した。シラカバと稲わら由来のアセチルキシランとスギ由来のキシランを $^1\text{H-NMR}$ で分析し、その結果を表 3 – 4 にまとめた。シラカバ由来のアセチルキシランは、修飾のないキシロース残基 46%、アセチル基修飾のあるキシロース残基 52%、グルクロン酸で置換されたキシロース残基 7%から構成されている。アセチル化の比率は *A.thaliana* 由来のアセチルキシラン (Busse-Wicher *et al.*, 2014) に近いが、グルクロン酸/キシロースの比率はわずかに小さい (Bromley *et al.*, 2013)。稲わら由来アセチルキシランは、65%の修飾のないキシロース残基、26%のアセチル基が修飾したキシロース残基、1%のグルクロン酸置換キシロース残基、9%のアラビノース置換キシロース残基から構成されていることがわかった。これまでの研究で、イネ科由来のアセチルキシランの側鎖の割合は、アセチル基、アラビノース、グルクロン酸の順に高く、非修飾のキシロース残基の割合は 60~80%であることが明らかとなっている (Morais *et al.*, 2017)。スギ由来のキシランは、75%のフリーのキシロース、18%のグルクロン酸置換キシロース残基、8%のアラビノース置換キシロース残基から構成されている。グルクロン酸/キシロースとアラビノース/キシロースの比率は、それぞれ約 1/6 と 1/13 である。これまでの研究で、針葉樹由来のキシランの 2 つの主要モチーフは UX_6 (キシロペンタオースにグルクロン酸が一残基修飾した糖) と UAX_6 (キシロペンタオースにグルクロン酸とアラビノースが一残基ずつ修飾した糖) であり、その他に少数のマイナーモチーフが存在することが明らかになっている (Martínez-Abad *et al.*, 2017)。したがって、これらの割合は、針葉樹由来のキシラン構造の特徴と一致している。これら、広葉樹、イネ科、針葉樹を代表する 3 種のキシランを *PcXyn10A* または *PcXyn11B* で分解した結果を図 3 – 9 に示す。

PcXyn10A によるシラカバ材由来のアセチルキシランの分解は、シロイヌナズナのアセチルキシランの分解と同様であると考えられる。稲藁由来のアセチルキシランの分解は、図 3 – 8 のシラカバ由来アセチルキシランと同様の特徴を示しているが、*PcXyn10A* はより小さなオリゴ糖を生成した。詳細を調べるために、Image J で各レーンのピーク強度を測定したところ、図 3 – 9 B のような結果が得られた。*PcXyn10A* による最終生成物は、各種アセチルキシランを分解することを支持した。その一方で、*PcXyn11B* は、アセチルキシランは長いオリゴ糖として残存し、スギ由来のキシランはオリゴ糖へ分解することが確認された。

表 3-4 各キシランの構成成分

キシランの種類	修飾のない キシロース 残基(%)	グルクロン 酸修飾を持 つ残基(%)	アセチル基 修飾を持つ 残基(%)	アラビノー ス修飾を持 つ残基(%)
シラカバ由来の アセチルキシラン	46 ± 1	7 ± 1	51 ± 1	-
稲藁由来の アセチルキシラン	65 ± 1	1 ± 0	26 ± 1	9 ± 0
スギ由来のキシラン	75 ± 0	17 ± 0	-	8 ± 1

各キシラン構造を重水中に溶解後、 $^1\text{H-NMR}$ により分析した。既報の論文に基づき、ピークの同定及び各キシロース残基の割合を算出した。

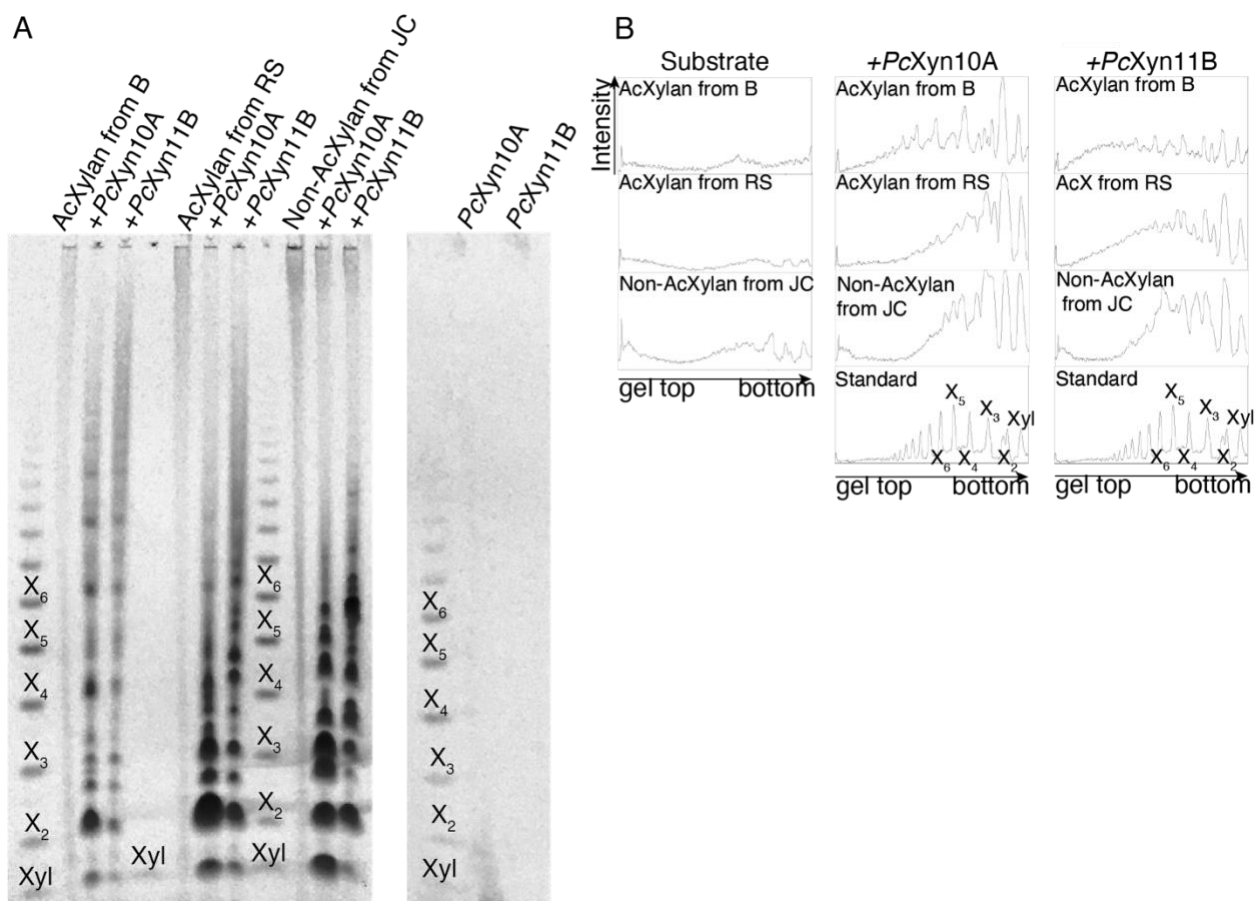


図 3-9 各種天然構造を有するキシランの分解産物の分析

A : 図 3-8 と同様に 10% PACE ゲルによって、反応生成物を分離した。シラカバと稲藁からは、DMSO 溶媒によりアセチルキシランを抽出した。スギのキシランは、アセチル基修飾がなく、収量向上のため 4 M 水酸化カリウム水溶液で抽出した。電気泳動は 1000 V で一時間行った。AcXylan from B、AcXylan from RS、Non-AcXylan from JC はそれぞれ、シラカバ由来のアセチルキシラン、稲わら由来のキシラン、スギ由来のキシランを表す。

B : A のゲル泳動結果を Image J により分析した結果を表す。表の y 軸と x 軸はピーク強度とゲルの位置を意味する。

PcXyn10A と PcXyn11B の構造とキシラン構造の関係

前節まで、キシラナーゼの活性に着目し、種々の実験を行ってきた。活性と構造の関係を明らかにするため、PcXyn10A と PcXyn11B の活性ドメインの三次元構造を SWISS-MODEL により推定した。Overall 構造は図 3-10 に示した。両者とも、GH family 10 と 11 に特徴的な活性ドメイン構造を有することが確認された。さらに、サブサイトを形成しているクレフト構造に着目し、サブサイト構造の推定を行った（図 3-11）。

青で示した PcXyn10A は、GH family 10 のキシラナーゼのサブサイトは-2 から+3 までの 5 つであり、これらを構成するアミノ酸残基もよく保存されていることが報告されている（Leggio *et al.*, 2000）。PcXyn10A でも概ね保存されており、既知のサブサイト構造と類似していた。しかしながら、PcXyn10A では、サブサイト-2 の周辺にさらに窪みが確認された。当該アミノ酸を確認したところ、Ala であった。通常は Glu であり、サブサイト-2 として、キシロース残基の二位の水酸基を認識する役割を担っている。先行研究では、この Glu を Ala に変異させたところ、活性が顕著に低下したことが報告されており、非常に重要なアミノ酸残基である（Charnock *et al.*, 1997）。PcXyn10A は、CjGH10 よりも反応速度は遅いが、分解可能な AcGX の量は多かった。したがって、このくぼみによって、アセチル基側鎖の立体障害を緩和し、分解可能な領域を増加させた可能性がある。前節までの活性と、本節で明らかになった構造をまとめると、PcXyn10A は図 3-12 のような基質特異性を有することが示唆された。

赤で示した PcXyn11B は、クレフト構造が確認されたが、PcXyn10A よりも基質認識について、立体的な制約が多い構造であることが確認された。前節までの結果を踏まえると、通常の GH family 11 キシラナーゼのように、3 連続の、修飾のないキシロース残基を認識し、キシランを分解する機構であると考えられる。AcGX のキシロース残基のうち、半分程度はアセチル基修飾を受けていることから、もしアセチル基修飾がランダムであれば、3 連続で修飾のないキシロース残基が並ぶ確率は 8 分の 1 である。しかしながら、実際の分解量は、PcXyn11B も NpGH11 も僅かであったことから、キシランのアセチル基修飾はある程度パターンが決まっており、GH family 11 による分解を防ぐ構造であると推察された。

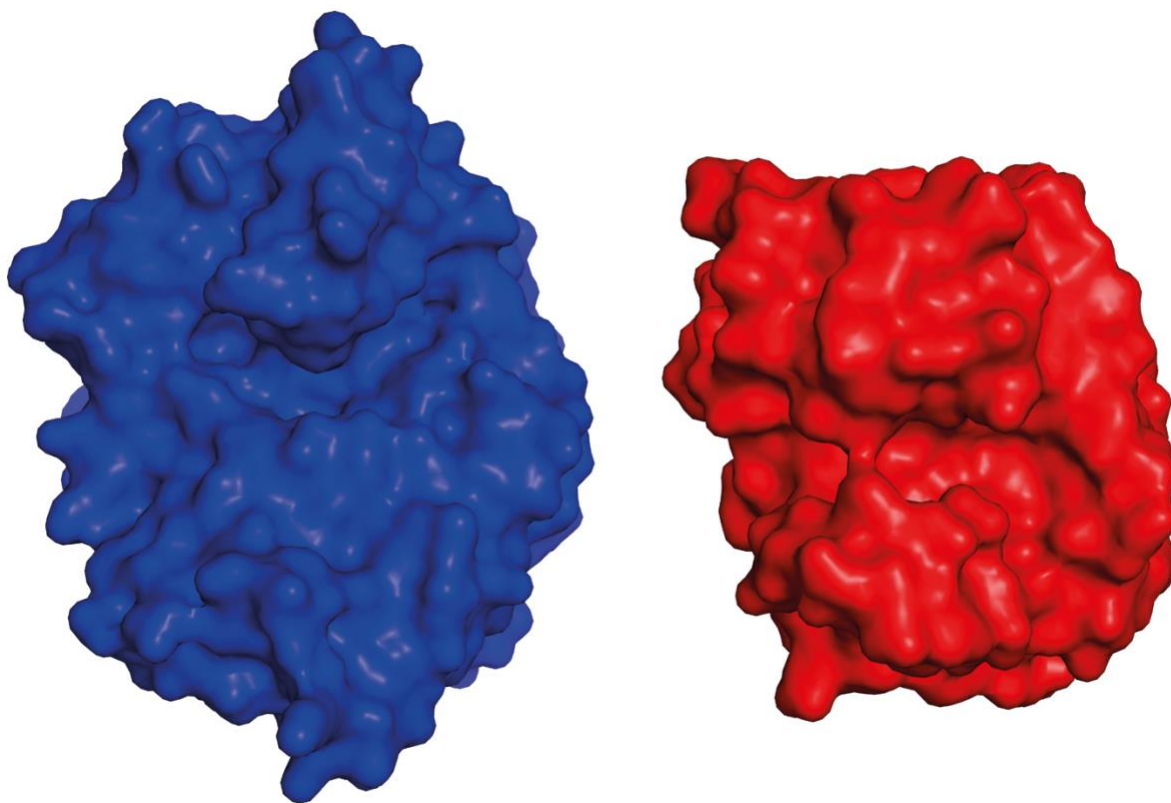


図3-10 *PcXyn10A* と *PcXyn11B* の活性ドメインのモデリング構造 (overall)

PcXyn10A は blue、*PcXyn11B* は red で surface 表示した。

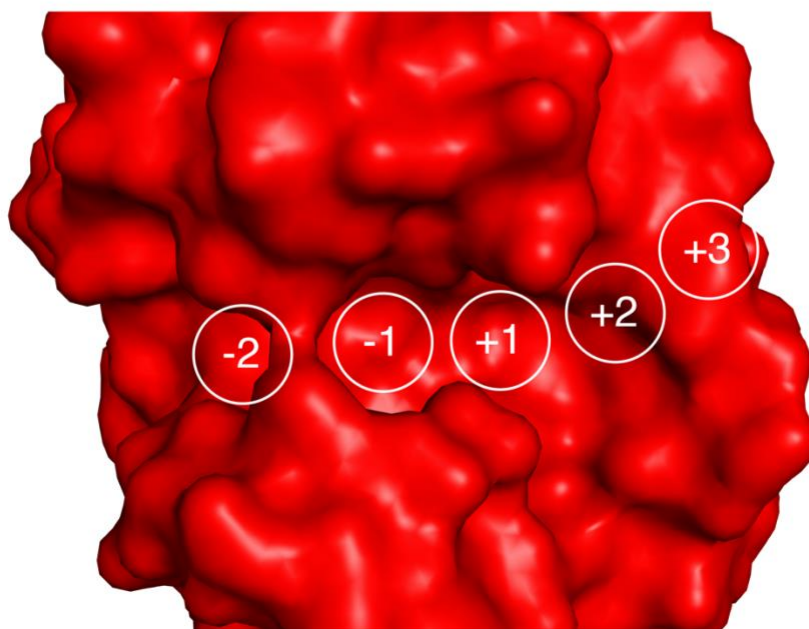
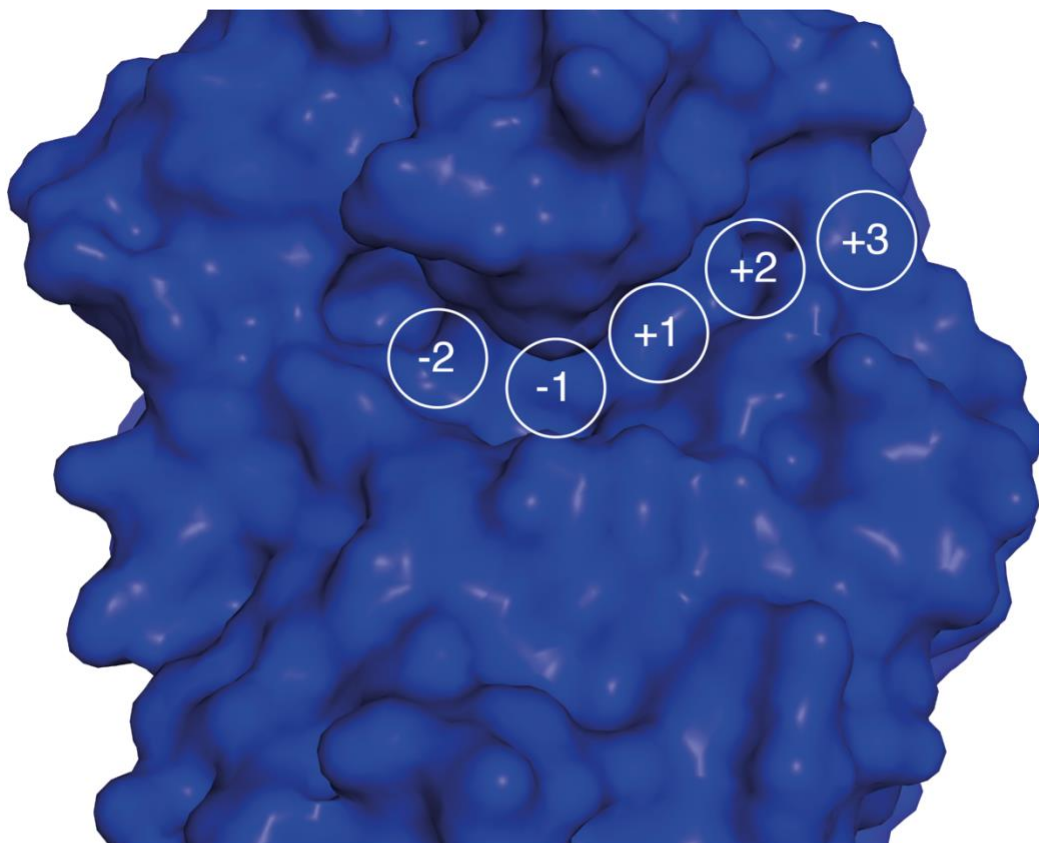


図3-11 PcXyn10A と PcXyn11B のサブサイト構造

3.4 考察

菌類のキシラーゼとアセチルキシランエステラーゼの進化の関係

図3-13は、Floudas らの先行研究（2012）に基づき、糸状菌の進化と GH family 10、11、アセチルキシランエステラーゼ（AcXE）が分類される CE family 1 の数との関係を示したものである。糸状菌のキシラン分解系における各酵素の役割を明らかにするため、各酵素の保有に関する相関係数を算出し、表3-5にまとめた。GH family 10 と 11 の酵素間の相関係数は 0.5 以下と比較的弱い、CE ファミリー1 と GH ファミリー両酵素間の相関係数は約 0.7 と高い。このことから、キシラーゼを多く持つ糸状菌は、AcXE も多く持つ傾向にあることが明らかとなった。

各酵素の存在に注目すると、GH ファミリー10 と CE ファミリー1 の酵素の存在の相関係数は 0.4 以下と低く、GH ファミリー11 と CE ファミリー1 の酵素の相関係数は約 0.6 であった。GH11 キシラーゼ遺伝子を持つ 10 菌種のうち 9 菌種が CE1 遺伝子を持っているが、今回リストアップした 31 菌種で CE1 遺伝子を持っているのは 14 菌種のみである。GH ファミリー10 と 11 のキシラーゼの違いを考慮すると、アセチル基の影響は GH family 11 に対して負に大きく、GH family 10 のキシラーゼには相対的に小さい。したがって、GH family 11 は CE family 1 の AcXE による脱アセチル化を必要としており、共進化は極めて合理的である。

さらに、グリコシダーゼによるアセチルキシラン分解を考えると、GH family 10 で分解されても、最終的にはアセチル基は除去されるはずである。このことは、GH family 10 に関連する AcXE が他にも存在することを示唆するが、既存の AcXE を含む CE family 内では見つからなかった。GH10 と GH11 の歴史的な出現時期を比較すると、GH family 10 のキシラーゼは GH11 よりもはるかに早く出現し、糸状菌類は裸子植物が出現した石炭紀からペルム紀にかけて GH family 11 と CE family 1 を同時に獲得したと考えられる。このことは、アセチル基の側鎖を持つ植物種の進化が、糸状菌のキシラン分解系の酵素と関係している可能性が高いことを示している。

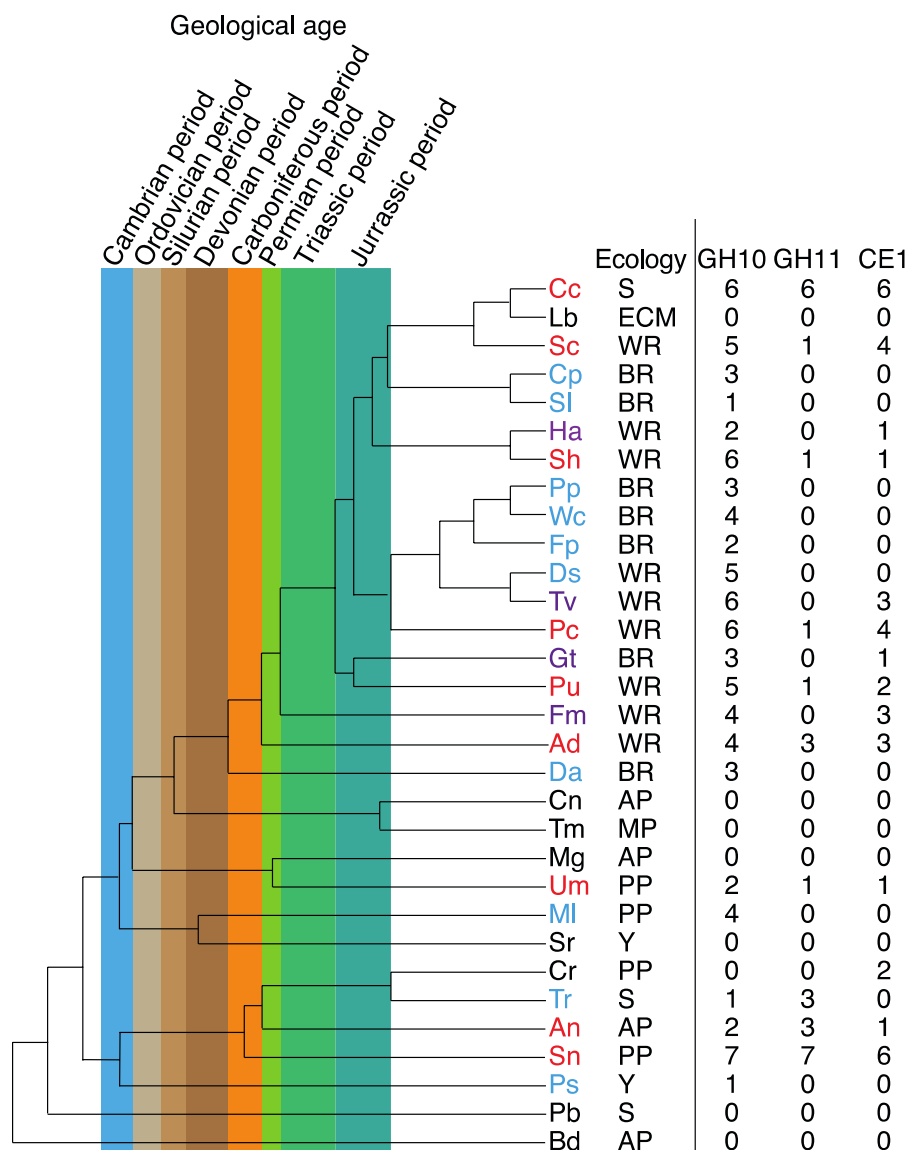


図 3-13 糸状菌の系統樹と、各菌のキシラン分解酵素の保有状況

上図は、Floudas ら（2012）による既報論文を基に、糸状菌の系統樹と GH family 10 及び 11 のキシラナーゼの保有数と CE family 1 の保有数をまとめたものである。Pc は *Phanerochaete chrysosporium* である。略語は Floudas（2012）に従った。GH10、11、CE1 全てを保有する菌は赤、キシラナーゼを保有し CE1 を保有しない菌は青、GH10 と CE1 を保有する菌を紫で色分けした。

表 3 – 5 糸状菌の各酵素の保有数間の相関係数（左下）と保有の有無に関する相関係数（右上）

	GH10	GH11	CE1
GH10		0.41	0.39
GH11	0.47		0.62
CE1	0.69	0.72	

図 3 – 1 3 に基づき、GH family 10 と 11、CE family 1 の酵素間で相関係数を算出した。なお、右上の相関係数は、酵素を保有する場合は 1、保有しない場合は 0 として計算した。

3.5 結言

本章では、これまで似た性質を持つキシラナーゼと考えられてきた、GH family 10 と 11 のキシラナーゼについて、GH family 10 はアセチルキシランを基質にするが、GH family 11 はアセチルキシランを良好な基質としないことが明らかとなった。

また、その差異が GH11 と CE ファミリー1 の AcXE の共進化に関係していることを示した。植物細胞壁を構成する成分は、糸状菌による分解システムと関連していることから、天然のヘミセルロースを基質とした酵素の特性評価を含め、進化的側面を組み合わせたこれらのアプローチは、植物バイオマスが自然界でどのように分解されているかを理解する上で重要であることも明らかにした。

第4章 総括

本研究では、糸状菌が植物細胞壁成分を分解するために保有している酵素郡のうち、キシラン主鎖分解に関わる酵素の機能解析を行い、糸状菌のキシラン分解系の解明を目指した。

第2章では、広葉樹を分解する担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* と草本を分解する子囊菌 *Trichoderma reesei* がどちらも GH family 3 に属する β -キシロシダーゼ (Bxl、以下それぞれ *PcBxl3* と *TrXyl3A*) を保有していることに着目し、構造及び活性の比較解析を行った。初めに、両酵素のアミノ酸残基について比較したところ、*TrXyl3A* の N 末端領域には、*PcBxl3* では確認されない 27 アミノ残基が存在し、さらにこれらの一部は α -helix 構造を取ることが予想された。これを踏まえ、両菌の X 線結晶構造解析を行ったところ、全体の構造は類似していたものの、活性中心周辺については *TrXyl3A* のみで確認された構造が存在した。活性中心について、両酵素は共通してサブサイト-1 に相当するポケットが存在し、*TrXyl3A* ではさらにサブサイト+1 を形成するループ構造が確認された。このループ構造は、アミノ酸配列において、*TrXyl3A* のみが有する N 末端の 27 アミノ酸残基からなることが明らかとなった。結晶構造より、このループ構造はさらに長い基質を認識することが示唆されたため、次に重合度の異なるキシロオリゴ糖に対する反応特性を明らかにしたところ、*PcBxl3* では基質の重合度による基質特異性の変化は確認されなかった一方、*TrXyl3A* ではキシロピオースよりも、さらに長いオリゴ糖を好むことが明らかとなった。この結果を踏まえ、サブサイト理論によるサブサイトアフィニティーの算出を行ったところ、*TrXyl3A* にはサブサイト+2 の存在が示唆された。ドッキングシミュレーションの結果からもこの仮説は支持されたため、*TrXyl3A* は N 末端に余分なアミノ酸残基があることで、*PcBxl3* とは対照的に長い基質を分解する酵素として機能すると結論づけた。*PcBxl3* のようにループ構造がない Bxl と、*TrXyl3A* のようにループを持つ Bxl について、その分布を糸状菌の系統樹と合わせて確認したところ、GH family 10 を多く保有する糸状菌が *PcBxl3* 型の Bxl を、反対に GH family 11 を多く保有する糸状菌は *TrXyl3A* 型の Bxl を保有していることが明らかとなった。さらに、各菌が分解対象とする植物種との関連については、木を分解する菌は *PcBxl3* 型の酵素を、草本を分解する菌は *TrXyl3A* 型の酵素を有する結果となった。以上より、各菌が分解する植物種が異なるために、それぞれが持つキシラ

ン分解系が異なっており、その結果、最下流に位置する Bxl についても機能の異なる二種類が存在していることが示唆された。

これを受けて、第3章では、糸状菌のキシラン分解系においてさらに上流に位置する GH family 10 と 11 のキシラナーゼに着目した。これまでの研究では、市販された基質を用いて両酵素の機能解析が行われており、基質特異性に関して多くの知見が集まっている。しかしながら、被子植物のキシランには多くのアセチル基修飾があるにも関わらず、市販の基質では化学処理により脱離していたため、これまで GH family 10 と 11 のキシラナーゼに対するアセチル基の影響が不明であった。そこで、第3章では天然に近い構造を保持するキシランを抽出し、担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の GH family 10 と 11 のキシラナーゼ(*PcXyn10* と *PcXyn11B*)の反応特性を比較した。シロイヌナズナ由来のアセチルキシラン分解挙動を、生成した還元末端量の時間推移により分析したところ、*PcXyn10A* はこのアセチルキシランを分解したものの、*PcXyn11B* はほとんど分解しないことが明らかとなった。このアセチルキシランをアルカリ処理により脱アセチル化したサンプルについては、*PcXyn11B* による分解は顕著に進んだ。この結果は、他の GH family 10 と 11 のキシラナーゼでも確認され、こうした違いは GH family で共通していることが示唆された。さらに、様々な天然のキシラン構造と両酵素の分解特性について明らかにするため、シラカバと稲藁由来のアセチルキシランと、スギ由来のアセチル基のないキシランを抽出し、両酵素による反応生成物を Polysaccharide Analysis using Carbohydrate gel Electrophoresis (PACE) によって分析した。その結果、アセチルキシランについては、*PcXyn10A* によってキシロオリゴ糖へと分解された一方で、*PcXyn11B* ではほとんどが長いオリゴ糖として残存することが明らかにされた。この対照的な差は、先ほどのタイムコース実験の結果と一致している。スギ由来のキシランについては、両酵素により短いオリゴ糖に分解されることが確認された。以上から *PcXyn10A* はアセチルキシランを基質とする一方で、*PcXyn11B* は良好な基質とせず、こうした差異は GH family に由来するものと結論づけた。また、GH family 11 キシラナーゼを有する菌は、基質からアセチル基を遊離させることが可能なアセチルキシランエステラーゼを併せて保有しており、GH family 11 キシラナーゼとアセチルキシランエステラーゼの組み合わせは、機能面だけでなく、進化的にも糸状菌のキシラン分解系において重要であることが確認された。

以上を踏まえ、図4-1、4-2、4-3には、糸状菌による各キシラン構造の分解戦略を示した。さらに、褐色腐朽菌・子囊菌・白色腐朽菌は一般的にそれぞれ針葉樹・草本・広葉樹を分解して生育すると考えられているため、糸状菌の種類と酵素の関係についてまとめた(表4-1)。針葉樹のキシラン(AGX)にはアセチル基修飾が存在しないため、褐色腐朽菌はCE family1のAcXEを保有せず、キシラナーゼもGH family 10のみである。したがって、BxlもPcBxl3型である。対照的に、草本(イネ科植物)のキシラン(GAX)にはアセチル基やアラビノースなどの側鎖を有するため、これを分解する必要がある一部の子囊菌は、CE family1のAcXEを保有する。そして、キシラナーゼはGH family 10と11のいずれも保有する。さらに、TrXyl3A型のBxlを保有している。したがって、この2種の菌では、キシラン構造に応じて、その分解戦略が異なることが裏付けられた。広葉樹由来のキシラン(AcGX)を分解する白色腐朽菌は、褐色腐朽菌と同様に、基本的な主鎖分解酵素としてGH family 10キシラナーゼとPcBxl3型のBxlを保有する。GH family 11キシラナーゼやCE family 1のAcXEは、菌によって保有パターンが異なる。GH family 10は一定程度AcGXを分解するため、分解後のアセチルキシロオリゴ糖に特異的なアセチルエステラーゼの保有を示唆するが、本研究では既存のCE family内では特定に至らなかった。これは、今後新たなCE familyが発見される可能性や、白色腐朽菌内でも様々な脱アセチル化戦略が存在する可能性があり、今後更なる検討の余地がある。

以上を踏まえ、各糸状菌によるキシラン主鎖分解は、様々なキシラン構造を基質とするGH family 10キシラナーゼが普遍的に存在することから①GH family 11を持たずPcBxl3型のBxlを保有する、②GH family 11を併用するがPcBxl3型のBxlを保有する、③GH family 11を多く保有しTrXyl3A型のBxlを保有する、という3系統に分けられることが明らかにされた。そして、側鎖分解についてはGH family 11とCE family 1の組み合わせが重要であることが明らかとなった。本研究では、天然に近い構造を有する基質を用いてBxlとキシラナーゼの機能解析を行ったため、本研究で得られた知見は、天然でキシランは水溶液中ではなく植物細胞壁中に存在しているという違いは残っているものの、今後の糸状菌由来のキシラン主鎖分解酵素の研究の足がかりになると考えられる。



図4-2 イネ科植物由来グルクロノアラビノキシラン分解の模式図

GAX 分解を大まかに順序付けると、①GH family 10 キシラーナーゼによる分解を受けつつ、AcXE によって脱アセチル化が進む、②アセチル化度の低下に伴い、GH family 11 キシラーナーゼが機能し、さらに低分子化する、③アラビノフラノシダーゼなどにより側鎖が全て取り除かれる、④Bxl によってキシロースにまで分解される。



図4-3 針葉樹由来アラビノグルクロノキシラン分解の模式図

AGX 分解を大まかに順序付けると、①各種キシラーナーゼにより低分子化し、②グルクロニダーゼとアラビノフラノシダーゼにより側鎖が全て取り除かれる、③Bxl によってキシロースにまで分解される。

表 4－1 糸状菌と保有する酵素の関係

菌	酵素		Bxl	AcXE
	キシラナーゼ			
	GH 10	GH 11	GH3	CE 1
褐色腐朽菌	○	×	<i>PcBxl3</i> 型	×
子囊菌	○	○	<i>TrXyl3A</i> 型	○
白色腐朽菌	○	菌に よる	<i>PcBxl3</i> 型	菌に よる

参考文献

- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H., and Adams, P. D. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. Sect.D.* **68**, 352–367
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2019) SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* **37**, 420–423
- Awano, T., Takabe, K., and Fujita, M. (2002) Xylan deposition on secondary wall of *Fagus crenata* fiber. *Protoplasma.* **219**, 106–115
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., and Sayers, E. W. (2013) GenBank. *Nucleic Acids Res.* **41**, 36–42
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer Jr, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., and Tasumi, M (1977) Coot: model-building tools for molecular graphics. *J. Mol. Biol.* **112**, 535–542
- Biely, P., Kratky, Z., and Vrsanska, M. (1981) Substrate-binding site of endo-1,4- β -xylanase of the yeast *Cryptococcus albidus*. *Eur.J.Biochem.* **119**, 559–564
- Biely, P., Puls, J., and Schneider, H. (1985) Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. *FEBS Lett.* **186**, 80–84
- Biely, P., Mackenzie, C. R., Puls, J., and H. Schneider. (1986) Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Nat Biotechnol.* **4**, 731– 733
- Biely, P., Csiszárová, M., Uhliariková, I., Agger, J. W., Li, X. L., Eijsink, V. G. H., and Westereng, B. (2013) Mode of action of acetylxylan esterases on acetyl glucuronoxylan and acetylated oligosaccharides generated by a GH10 endoxylanase. *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* **1830**, 5075–5086
- Biely, P., Westereng, B., Puchart, V., Maayer, P., and Cowan, D. A. (2014A) Recent progress in understanding the mode of action of acetylxylan esterases. *J. Appl. Glycosci.* **61**, 35–44
- Biely, P., Puchart, V., Stringer, M, A., and Krogh, K, B, R, M. (2014B) *Trichoderma reesei* XYN VI – a novel appendage dependent eukaryotic glucuronoxylan hydrolase. *FEBS Journal.* **281**, 3894–3903
- Biely, P., Singh, S., and Puchart, V. (2016) Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. *Biotechnol. Adv.* **34**, 1260–1274
- Bischof, R. H., Ramoni, J., and Seiboth, B. (2016) Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb. Cell Fact.* **15**, 1–13
- Bohne, A., Lang, E., and Lieth, V. D. (1998) W3-SWEET: carbohydrate modeling by internet. *J. Mol. Model.* **4**, 33–43
- Bohne, A., Lang, E., and Von Der Lieth, C. W. (1999) SWEET-www-based rapid 3D construction of oligo- and polysaccharides. *Bioinformatics.* **15**, 767–768

- Bonnin, E., Vigouroux, J., and Thibault, J. F. (1997) Kinetic parameters of hydrolysis and transglycosylation catalyzed by an exo- β -(1,4)-galactanase. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 516–522
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Bromley, J. R., Busse-Wicher, M., Tryfona, T., Mortimer, J. C., Zhang, Z., Brown, D. M., and Dupree, P. (2013) GUX1 and GUX2 glucuronyltransferases decorate distinct domains of glucuronoxylan with different substitution patterns. *Plant J.* **74**, 423–434
- Brünger, A. T. (1992) Free *R* value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature.* **355**, 472–475
- Busse-Wicher, M., Gomes, T. C. F., Tryfona, T., Nikolovski, N., Stott, K., Grantham, N. J., Bolam, D. N., Skaf, M. S., and Dupree, P. (2014) The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **79**, 492–506
- Busse-Wicher, M., Li, A., Silveira, R. L., Pereira, C. S., Tryfona, T., Gomes, T. C. F., Skaf, M. S., and Dupree, P. (2016) Evolution of xylan substitution patterns in gymnosperms and angiosperms: Implications for xylan interaction with cellulose. *Plant Physiol.* **171**, 2418–2431
- Carafa, A., Duckett, J.G., Nox, J.P., and Ligrone, R. (2005) Distribution of cell-wall xylans in bryophytes and tracheophytes: new insights into basal interrelationships of land plants. *New. Phytologist.* **168**, 231–240
- Collaborative Computational Project, Number 4. (1994) The CCP4 Suite: programs for protein crystallography. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr. Sect. D.* **50**, 760–763
- Correia, M. A. S., Mazumder, K., Brás, J. L. A., Firbank, S. J., Zhu, Y., Lewis, R. J., York, W. S., Fontes, C. M. G. A., and Gilbert, H. J. (2011) Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. *J. Biol. Chem.* **286**, 22510–22520
- Dan, S., Marton, I., Dekel, M., Bravdo, B. A., He, S., Withers, S. G., and Shoseyov, O. (2000) Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* β -glucosidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 4973–4980
- DeBoy, R. T., Mongodin, E. F., Fouts, D. E., Tailford, L. E., Khouri, H., Emerson, J. B., Mohamoud, Y., Watkins, K., Henrissat, B., Gilbert, H. J., and Nelson, K. E. (2008) Insights into plant cell wall degradation from the genome sequence of the soil bacterium *Cellvibrio japonicus*. *J. Bacteriol.* **190**, 5455–5463
- Dodd, D., Moon, Y. H., Swaminathan, K., Mackie, R. I., and Cann, I. K. O. (2010) Transcriptomic analyses of xylan degradation by *Prevotella bryantii* and insights into energy acquisition by xylanolytic bacteroidetes. *J. Biol. Chem.* **285**, 30261–30273
- Doering, A., Lathe, R., and Persson, S. (2012)

- Du, X., Pérez-Boada, M., Fernández, C., Rencoret, J., del Río, J. C., Jiménez-Barbero, J., Li, J., Gutiérrez, A., and Martínez, A. T. (2014) Analysis of lignin–carbohydrate and lignin–lignin linkages after hydrolase treatment of xylan–lignin, glucomannan–lignin and glucan–lignin complexes from spruce wood. *Planta*. **239**, 1079–1090
- Dustin Schaeffer, R., Liao Y., Cheng, H., and Grishin, N. V. (2017) ECOD: New developments in the evolutionary classification of domains. *Nucleic Acids Res.* **45**, D296–D302
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D*. **60**, 2126–2132
- Eriksson, Ö., Goring, D., and Lindgren, B. (1980) Structural studies on the chemical bonds between lignins and carbohydrates in spruce wood. *Wood Sci. Technol.* **14**, 267–279.
- Evtuguin, D. V., Tomás, J. L., Silva, A. M. S., Neto, C. P. (2003) Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus glubulus* Labill. *Carbohydr. Res.* **338**, 597–604
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. T., Henrissat, B., Martínez, A. T., Otilar, R., Spatafora, J. W., Yadav, J. S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P. M., Vries, R. P. De, Ferreira, P., Findley, K., Foster, B., Gaskell, J., Glotzer, D., Górecki, P., Heitman, J., Hesse, C., Hori, C., Igarashi, K., Jurgens, J. A., Kallen, N., Kersten, P., Kohler, A., Kues, U., Kumar, T. K. A., Kuo, A., LaButti, K., Larrondo, L. F., Lindquist, E., Ling, A., Lombard, V., Lucas, S., Lundell, T., Martin, R., McLaughlin, D. J., Morgenstern, I., Morin, E., Murat, C., Nagy, L. G., Nolan, M., Ohm, R. A., Patyshakuliyeva, A., Rokas, A., Ruiz-Dueñas, F. J., Sabat, G., Salamov, A., Samejima, M., Schmutz, J., Slot, J. C., John, F. S., Stenlid, J., Sun, H., Sun, S., Syed, K., Tsang, A., Wiebenga, A., Young, D., Pisabarro, A., Eastwood, E. C., Martin, F., Cullen, D., Grigoriev, I. V., and Hibbett, D. S. (2012) The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*. **336**, 1715–1719
- Fujimoto, Z., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H., Kusakabe, I., and Mizuno, H. (2004) Crystal structures of decorated xylooligosaccharides bound to a family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *J. Biol. Chem.* **279**, 9606–9614
- Gene, A., An, T., Lecula, M. O., Tech, B. I. O., and Ogasawara, N. W. (2006) Cloning , functional expression and promoter analysis of xylanase III gene from *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 995–1003
- Gonçalves, V. M. F., Evtuguin, D. V., and Domingues, M. R. M. (2008) Structural characterization of the acetylated heteroxylan from the natural hybrid *Paulownia elongata*/*Paulownia fortunei*. *Carbohydr. Res.* **343**, 256–266
- Goubet, F., Barton, C. J., Mortimer, J. C., Yu, X., Zhang, Z., Miles, G. P., Richens, J., Liepman, A. H., Seffen, K., and Dupree, P. (2009) Cell wall glucomannan in Arabidopsis is synthesised by CSLA glycosyltransferases, and influences the progression of embryogenesis. *Plant J.* **60**, 527–538

- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, Robin., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., and Shabalov, I. (2013) MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* **42**, D699–704
- Haghighat, M., Teng, Q., Zhong, R., and Ye, Z. H. (2016) Evolutionary conservation of xylan biosynthetic genes in *selaginella moellendorffii* and *physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* **57**, 1707–1719
- Henrissat, B., and Davies, G. J. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Op. Struct. Biol.* **7**, 637–644
- Herrmann, M. C., Vrsanska, M., Jurickova, M., Hirsch, J., Biely, P., and Kubicek, C. P. (1997) The β -D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional β -D-xylan xylohydrolase. *Biochem. J.* **321**, 375–381
- Hiromi, K. (1970) Interpretation of dependency of rate parameters on the degree of polymerization of substrate in enzyme-catalyzed reactions. Evaluation of subsite affinities of exo-enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 1–6
- Hiromi, K., Nitta, Y., Numata, C., and Ono, S. (1973) Subsite affinities of glucoamylase: examination of the validity of the subsite theory. *BBA – Enzymol.* **302**, 362–375
- Hiromi, K., Ohnishi, M., and Tanaka, A. (1983) Subsite structure and ligand binding mechanism of glucoamylase. *Mol. Cell. Biochem.* **51**, 79–95
- Hon, D. N-S. (1994) Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose.* **1**, 1–25
- Hori, C., Igarashi, K., Katayama, A., and Samejima, M. (2011) Effects of xylan and starch on secretome of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on cellulose. *FEMS Microbiol. Lett.* **321**, 14–23
- Hori, C., Gaskell, J., Igarashi, K., Samejima, M., Hibbett, D., Henrissat, B., and Cullen, D. (2013) Genomewide analysis of polysaccharides degrading enzymes in 11 white- and brown-rot Polyporales provides insight into mechanisms of wood decay. *Mycologia.* **105**, 1412–1427
- Hrmova, M., Varghese, J. N., De Gori, R., Smith, B. J., Driguez, H., and Fincher, G. B. (2001) Catalytic mechanisms and reaction intermediates along the hydrolytic pathway of a plant β -D-glucan glucosylase. *Structure.* **9**, 1005–1016
- Igarashi, K., Ishida, T., Hori, C., and Samejima, A. (2008) Characterization of an endoglucanase belonging to a new subfamily of glycoside hydrolase family 45 of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5628–5634
- Igarashi, K., Maruyama, M., Nakamura, A., Ishida, T., Wada, M., and Samejima, A. (2012) Degradation of crystalline celluloses by *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase II (Cel6A) heterologously expressed in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Appl. Glycosci.* **59**, 105–110
- Ishiguro, R., Tanaka, N., Abe, K., Nakajima, M., Maeda, T., Miyanaga, A., Takahashi, Y., Sugimoto, N., Nakai, H., and Taguchi, H. (2017) Function and structure relationships of a β -1,2-glucooligosaccharide-degrading β -glucosidase. *FEBS Lett.* **591**, 3926–3936

- Jänis, J., Hakanpää, J., Hakulinen, N., Ibatullin, F. M., Hoxha, A., Derrick, P. J., Rouvinen, J., Vainiotalo, P. (2005) Determination of thioxylo-oligosaccharide binding to family 11 xylanases using electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and X-ray crystallography. *FEBS J.* **272**, 2317-2333
- Johansson, M. H., and Samuelson, O. (1977) Alkaline destruction of birch xylan in the light of recent investigations of its structure. *Sven. Papperstidning.* **80**, 519-524
- Karkehabadi, S., Helmich, K. E., Kaper, T., Hansson, H., Mikkelsen, N. E., Gudmundsson, M., Piens, K., Fajdala, M., Banerjee, G., Scott-Craig, J. S., Walton, J. D., Phillips, G. N., Sandgren, M. (2014) Biochemical characterization and crystal structures of a fungal family 3 β -glucosidase, Cel3A from *Hypocrea jecorina*. *J. Biol.Chem.* **289**, 31624-31637
- Kawai, R., Igarashi, K., Kitaoka, M., Ishii, T., and Samejima, M. (2004) Kinetics of substrate transglycosylation by glycoside hydrolase family 3 glucan (1 $\rightarrow$ 3)- β -glucosidase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Carbohydr. Res.* **339**, 2851-2857
- Keller, P. A., Henrick, K., McNeil, P., Moodie, S., and Barton, G. J (1998) Deposition of macromolecular structures. *Acta Crystallogr. Sect. D.* **54**, 1105-1108
- Kataoka, M., Akita, F., Maeno, Y., Inoue, B., Inoue, H., Ishikawa, K. (2014) Crystal structure of *Talaromyces cellulolyticus* (formerly known as *Acremonium cellulolyticus*) GH family 11 xylanase. *Appl Biochem Biotechnol.* **174**: 1599-1612
- Khandke, K. M., Vithayathil, P. J., and Murthy, S. K. (1989) Purification and characterization of an α -D-glucuronidase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 511-517
- Kita, A., Matsui, H., Somoto, A., Kimura, A., Takata, M., and Chiba, S. (1991) Substrate specificity and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2327-2335
- Klaudiz, W. (1957). Zur biologisch-mechanischen Wirkung der Cellulose und Hemicellulose im Festigungsgewebe der Laubhölzer. *Holzforschung*, **11**, 110-116
- Kolenová, K., Vrsanská, M., and Biely, P. (2006) Mode of action of endo-beta-1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *J Biotechnol.* **121**, 338-345
- Koutaniemi, S., and Tenkanen, M. (2016) Action of three GH51 and one GH54 α -arabinofuranosidases on internally and terminally located arabinofuranosyl branches. *J. Biotechnol.* **229**, 22-30
- Kremer, S. M., and Wood, P. M. (1992) Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fn(III) reductase: kinetic comparison with neutrophil NADPH oxidase and yeast flavocytochrome b_2 . *Eur. J. Biochem.* **205**, 133-138
- Kulminskaya, A. A., Thomsen, K. K., Shabalin, K. A., Sidorenko, I. A., Eneyskaya, E. V., Savel'Ev, A. N., and Neustroev, K. N. (2001) Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3- β -glucanase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6123-6131

- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. **23**, 2947–2948
- Laskowski, R. A., and Swindells, M. B. (2011) LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **51**, 2778–2786
- Leslie, A. (2006) The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **62**, 48–57
- Li, Y. K., Chir, J., Tanaka, S., and Chen, F. Y. (2002) Identification of the general acid/base catalyst of a family 3 β -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Biochemistry*. **41**, 2751–2759
- Lin, S. Y., and Dence, C. W. (2012) Methods in lignin chemistry. *Springer Science & Business Media*.
- Lombard, V., Bernard, T., Rancurel, C., Brumer, H., Coutinho, P. M., Henrissat, B. (2010) A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. *Biochem. J.* **432**, 437–444
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **42**, 490–495
- Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Sollewijn Gelpke, M. D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., and Rokhsar, D. (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* **22**, 695–700
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P. M., Cullen, D., Danchin, E. G. J., Grigoriev, I. V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C. P., Han, C. S., Ho, I., Larrondo, L. F., De Leon, A. L., Magnuson, J. K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A. A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C. L., Yao, J., Barbote, R., Nelson, M. A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C. R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D. S., Lucas, S. M., Rubin, E. M., Dunn-Coleman, N., Ward, M., and Bretin, T. S. (2008) Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.* **26**, 553–560
- Martínez-Abad, A., Berglund, J., Toriz, G., Gatenholm, P., Henriksson, G., Lindström, M., Wohler, J., and Vilaplana, F. (2017) Regular motifs in xylan modulate molecular flexibility and interactions with cellulose surfaces. *Plant Physiol.* **175**, 1579–1592
- Matsuyama, K., Sunagawa, N., and Igarashi, K. (2020) Mutation of cysteine residues increases heterologous expression of peach expansin in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Plant. Biotechnol.* **37**, 397–403
- Matsuzawa, T., Watanabe, M., Nakamichi, Y., Fujimoto, Z., and Yaoi, K. (2019) Crystal structure and substrate recognition mechanism of *Aspergillus oryzae* isoprimeverose-producing enzyme. *J. Struct. Biol.* **205**, 84–90
- McCoy, A. J. (2007) Solving structures of protein complexes by molecular replacement with *Phaser*. *Acta*

- Crystallogr. Sect. D.* **63**, 32–41
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C and Read, R. J. (2007) *Phaser* crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674
- Morais de Carvalho, D., Abad, A. M., Evtuguin, D. V., Colodette, J. L., Lindström, M. E., Vilaplana, F., and Sevastyanova, O. (2017) Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. *Carbohydr. Polym.* **156**, 223–234
- Mortimer, J. C., Faria-Blanc, N., Yu, X., Tryfona, T., Sorieul, M., Ng, Y. Z., Zhang, Z., Stott, K., Anders, N., and Dupree, P. (2015) An unusual xylan in *Arabidopsis* primary cell walls is synthesised by GUX3, IRX9L, IRX10L and IRX14. *Plant J.* **83**, 413–426
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (2007) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sect. D.* **53**, 240–255
- Nakajima, M., Yoshida, R., Miyanaga, A., Abe, K., Takahashi, Y., Sugimoto, N., Toyoizumi, H., Nakai, H., Kitaoka, M., and Taguchi, H. (2016) Functional and structural analysis of a β -glucosidase involved in β -1,2-glucan metabolism in *Listeria innocua*. *PLoS One.* **11**, 1–19
- Naidjonoka, P., Hernandez, M. A., Pálsson, G. K., Heinrich, F., Ståhlbrand, H., and Nylander, T. (2020) On the interaction of softwood hemicellulose with cellulose surfaces in relation to molecular structure and physicochemical properties of hemicellulose. *Soft Matter.* **16**, 7063–7076
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., and Dalai, A. K. (2010) Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **14**, 578–597.
- Nakamichi, Y., Watanabe, M., Matsushika, A., and Inoue, H. (2020) Substrate recognition by a bifunctional GH30-7 xylanase B from *Talaromyces cellulolyticus*.
- Naran, R., Black, S., Decker, S. R., and Azadi, P. (2009) Extraction and characterization of native heteroxylans from delignified corn stover and aspen. *Cellulose*, **16**, 661–675
- Nishijima, H., Nozaki, K., Mizuno, M., Arai, T., and Amano, Y. (2014) Unique CBM1 of xylanase strongly adsorbed on cellulose from white rot fungus, *Irpex lacteus*. *応用糖質科学.* **4**, 154–159
- Nishitani, K., and Nevins, D. J. (1991) Glucuronoxylan xylanohydrolase: a unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6539–6543
- Oleg, T., and Arthur, J. O. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461
- Opassiri, R., Hua, Y., Wara-aswapati, O., Akiyama, T., and Svasti, J. (2004) β -glucosidase, exo- β -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice Bglu1. *Biochem J.* **131**, 125–131
- O'sullivan, A. C. (1997) Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*. **4**, 173–207
- Pannu, N. S., and Read, R. J (1996) Improved structure refinement through maximum likelihood. *Acta Crystallogr. Sect. A.* **52**, 659–688
- Park, T. H., Choi, C. Y., Kim, H. J., Song, J. R., Park, D., Kang, H. A., and Kim, T. J. (2021) Arabinoxylano- and arabino-oligosaccharides-specific α -L-arabinofuranosidase GH51 isozymes from the amylolytic

- yeast *saccharomycopsis fibuligera*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 272–279
- Pawar, P. M. A., Derba-Maceluch, M., Chong, S. L., Gandla, M. L., Bashar, S. S., Sparrman, T., Ahvenainen, P., Hedenström, M., Özparpucu, M., Rüggeberg, M., Serimaa, R., Lawoko, M., Tenkanen, M., Jönsson, L. J., and Mellerowicz, E. J. (2017) *In muro* deacetylation of xylan affects lignin properties and improves saccharification of aspen wood. *Biotechnol. Biofuels.* **10**, 1–11
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612
- S. C. Potter, A. Luciani, S. R. Eddy, Y. Park, R. Lopez, and R. D. Finn. (2018) HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* **46**, W200–W204
- Poutanen, K and Sundberg, M. (1988) An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of acetyl xylans. *Applied Microbiology Biotechnology.* **28**, 419–424
- Poutanen, K., Sundberg, M., Korte, H., and Puls, J. (1990) Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology Biotechnology.* **33**, 506–510
- Razeq, F. M., Jurak, E., Stogios, P. J., Yan, R., Tenkanen, M., Kabel, M. A., Wang, W., and Master, E. R. (2018) A novel acetyl xylan esterase enabling complete deacetylation of substituted xylans. *Biotechnol. Biofuels.* **11**, 1–12
- Rho, D., Desrochers, M., Jurasek, L., Drigeuz, H., and Defaye, J. (1982) Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: thiocellobiose as a new inducer. *J. Bacteriol.* **149**, 47–53
- Robert, X., and Gouet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **42**, 320–324
- Rogowski, A., Baslé, A., Farinas, C. S., Solovyova, A., Mortimer, J. C., Dupree, P., Gilbert, H. J., and Bolam, D. N. (2014) Evidence that GH115 α -glucuronidase activity, which is required to degrade plant biomass, is dependent on conformational flexibility. *J. Biol. Chem.* **289**, 53–64
- Rose, I. A., Hanson, K. R., Wilkinson, K. D., and Wimmer, M. J. (1980) A suggestion for naming faces of ring compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 2439–2441
- Saha, B. C. (2003) Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 279–291
- Sakuragi, K., Hori, C., Igarashi, K., and Samejima, M. (2018) Secretome analysis of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on ammonia-treated lignocellulosic biomass from birch wood. *J. Wood Sci.* **64**, 845–853
- Sakuragi, K. (2018) 広葉樹由来木質バイオマスの酵素糖化に関する研究.
- Schröder, S. P., De Boer, C., McGregor, N. G. S., Rowland, R. J., Moroz, O., Blagova, E., Reijngoud, J., Arentshorst, M., Osborn, D., Morant, M. D., Abbate, E., Stringer, M. A., Krogh, K. B. R. M., Raich, L., Rovira, C., Berrin, J. G., Van Wezel, G. P., Ram, A. F. J., Florea, B. I., Van Der Marel, G. A., Codée, J. D. C., Wilson, K. S., Wu, L., Davies, G. J., and Overkleeft, H. S. (2019) Dynamic and functional profiling of xylan-degrading enzymes in *Aspergillus* secretomes using activity-based probes. *ACS Cent. Sci.* **5**, 1067–1078

- Schmidt, A., Gübitz, G. M., Kratky, C. (1999) Xylan binding subsite mapping in the xylanase from *Penicillium simplicissimum* using xylooligosaccharides as cryo-protectant. *Biochemistry*. **38**, 2403-2412
- Schröder, S. P., de Boer, C., McGregor, N. G. S., Rowland, R. J., Moroz, O., Blagova, E., Reijngoud, J., Arentshorst, M., Osborn, D., Morant, M. D., Abbate, E., Stringer, M. A., Krogh, K. B. R. M., Raich, L., Rovira, C., Berrin J. G., van der Marel, G. A., Codee, J. D. C., Wilson, K. S., Wu, L., Davies, G. J., Overkleeft, H. S. (2019) Dynamic and functional profiling of xylan-degrading enzymes in *Aspergillus* secretomes using activity-based probes. *ACS Cent Sci*, **5**, 1067-1078
- Schulze, E. (1891) Zur Kenntniss der chemischen Zusammensetzung der pflanzlichen Zellmembranen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **24**, 2277-2287
- Simmons, T. J., Mortimer, J. C., Bernardinelli, O. D., Pöppler, A. C., Brown, S. P., DeAzevedo, E. R., Dupree, R., and Dupree, P. (2016) Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat. Commun.* **7**, 1-9
- Sugimoto, N., Igarashi, K., and Samejima, M. (2012) Cellulose affinity purification of fusion protein tagged with fungal family 1 cellulose-binding domain. *Protein. Expr. Purif.* **82**, 290-296
- Sussman, J. L., Lin, D., Jiang, J., Manning, N. O., Prilusky, J., Ritter, O., and Abola, E. E. (1998) Protein Data Bank (PDB): database of three-dimensional structural information of biological macromolecules. *Acta Crystallogr. Sect. D.* **54**, 1078-1084
- Takahashi, N., and Koshijima, T. (1988) Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Sci. Technol.* **22**, 231-241
- Teleman, A., Lundqvist, J., Tjerneld, F., Stålbrand, H., and Dahlman, O. (2000) Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **329**, 807-815
- Tenkanen, M. (1992) Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 566-574
- Tenkanen, M., Luonteri, E., and Teleman, A. (1996) Effect of side groups on the action of β -xylosidase from *Trichoderma reesei* against substituted xylo-oligosaccharides. *FEBS Lett.* **399**, 303-306
- Tenkanen, M and Siika-aho, M. (2000) An α -glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan. *J Biotechnol.* **78**, 149-161
- Timell, T. E. (1967) Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* **1**, 45-70.
- Tryfona, T., Sorieul, M., Feijao, C., Stott, K., Rubtsov, D. V., Anders, N., and Dupree, P. (2019) Development of an oligosaccharide library to characterise the structural variation in glucuronoarabinoxylan in the cell walls of vegetative tissues in grasses. *Biotechnol. Biofuels.* **12**, 1-19.

- Tsutsui, S., Sakuragi, K., Igarashi, K., Samejima, M., and Kaneko, S. (2020) Evaluation of ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse to recover xylooligosaccharides. *J. Appl. Glycosci.* **67**, 17-22
- Tuo, W., Phyto, P., and Hong, M. (2016) Multidimensional solid-state NMR spectroscopy of plant cell walls. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **78**, 56-63
- Uhliaríková, I., Vršanská, M., McCleary, B. V., and Biely, P. (2013) Positional specificity of acetylxylen esterases on natural polysaccharide: An NMR study. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3365–3372
- Vardakou, M., Dumon, C., Murray, J. W., Christakopoulos, P., Weiner, D. P., Juge, N., Lewis, R. J., Gilbert, H. J., and Flint, J. E. (2008) Understanding the structural basis for substrate and inhibitor recognition in Eukaryotic GH11 xylanases. *J. Mol. Biol.* **375**, 1293–1305
- Waffenschmidt, S and Jaenicke, L. (1987) Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2, 2'-bicinchoninate. *Anal. Biochem.*, **165**, 337-340
- Wang, T., H. Yang, Kubicki, J. D., and Hong, M. (2016) Cellulose structural polymorphism in plant primary cell walls investigated by high-field 2D solid-state NMR spectroscopy and density functional theory calculations. *Biomacromolecules.* **17**, 2210–2222
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46(W1)**, W296-W303
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., and Wilson, K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D.* **67**, 235–242
- Wurman-Rodrich, J. (2017) Glucuronoxylan acetylation patterns and site-specific acetyltransferases. Ph.D. thesis, University of Cambridge, 10.17863/CAM.40866
- Yagi, H., Takehara, R., Tamaki, A., Teramoto, K., Tsutsui, S., and Kaneko, S. (2019) Functional characterization of the GH10 and GH11 xylanases from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 provide insights into the advantage of GH11 xylanase in catalyzing biomass degradation. *J. Appl. Glycosci.* **66**, 29–35
- Yamamoto, H., Kojima, Y., Okuyama, T., Abasolo, W., and Gril, J. (2002) Origin of the biomechanical properties of wood related to the fine structure of the multi-layered cell wall. *J. Biomech. Eng.* **124**, 432-440
- Yoshida, E., Hidaka, M., Fushinobu, S., Koyanagi, T., Minami, H., Tamaki, H., Kitaoka, M., Katayama, T., and Kumagai, H. (2010) Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. J.* **431**, 39–49
- 農林水産省 (2006) バイオマスニッポン総合戦略

