

放線菌(*Streptomyces olivaceoviridis* E-86)由来ファミリー  
ー 10 キシラーゼの立体構造と機能に関する研究

藤 本 瑞

目次	.....	i
略語表	.....	iii
序論	.....	1
第1章 放線菌 ( <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> E-86) 由来ファミリー 10		
キシラナーゼの結晶化	.....	26
1-1 方法	.....	27
1-2 結果	.....	29
1-3 考察	.....	29
第2章 放線菌 ( <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> E-86) 由来ファミリー 10		
キシラナーゼの結晶構造解析	.....	33
2-1 方法	.....	34
2-2 結果	.....	36
2-3 考察	.....	38

第3章 放線菌 ( <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> E-86) 由来ファミリー 10	
キシラナーゼの糖結合構造解析	..... 59
3-1 方法	..... 61
3-2 結果	..... 62
3-3 考察	..... 66
第4章 放線菌 ( <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> E-86) 由来ファミリー 10	
キシラナーゼの側鎖付きキシロオリゴ糖複合体の構造解析	..... 86
4-1 方法	..... 87
4-2 結果	..... 89
4-3 考察	..... 92
総括	..... 109
引用文献	..... 112
謝辞	

## 略語表

Araf	$\alpha$ -L-arabinofuranosyl residue
Araf-X2	2 <sup>2</sup> - $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-xylobiose
Araf-X3	3 <sup>2</sup> - $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-xylotriose
Cat	XBD-truncated FXYN
CBD	cellulose-binding domain
CBM	carbohydrate-binding module
Cex	family 10 xylanase from <i>Cellulomonas fimi</i>
FXYN	family 10 xylanase from <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> E-86
Gal	D-galactose
GH	glycosyl hydrolase
Glc	D-glucose
Lac	lactose
MeGlcUA	4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucuronosyl residue,
MeGlcUA-X2	2 <sup>2</sup> -4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucuronosylxylobiose,
MeGlcUA-X3	3 <sup>3</sup> -4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucuronosylxylotriose,
PDB	Protein Data Bank
PF	Photon Factory
SIR	single isomorphous replacement
X1	D-xylose
X2	xylobiose
X3	xylotriose
X7	xyloheptaose
XlnA	family 10 xylanase from <i>Streptomyces lividans</i>
XYLA	family 10 xylanase from <i>Cellvibrio japonicus</i>
XBD	xylan-binding domain

## 序論

植物には、動物細胞にはない細胞壁を持つという大きな特徴がある。高等植物の細胞壁は、約 90%がリグニン及びセルロース、ヘミセルロース、ペクチン等からなる多糖、残り約 10%が蛋白質で構成されている (Carpita & Gibeaut, 1993)。セルロースは D-グルコースが $\beta$ -1,4-グリコシド結合した枝分れのない多糖であり、それぞれのグルコースが隣接したグルコースに対して  $180^\circ$  回転しているために非常にまっすぐな鎖となり、鎖の長さは長いものでグルコースが 2000 分子を越えるものもある。およそ 150 本のセルロース鎖が水素架橋により集合して、マイクロフィブリルと呼ばれる結晶格子構造を形成する。

ヘミセルロースも重要な細胞壁構成要素であり、多彩な分岐多糖類を包括している (Heredia *et al.*, 1995)。広義的には、細胞壁においてセルロースと結合し、アルカリや酸等により、ペントース、ヘキソース、ウロン酸等を溶出するような多糖のことをいう。狭義には陸上植物細胞壁多糖のうち、セルロースとペクチンを除いた水不溶性多糖を指す。ヘミセルロースにはキシラン、アラバンなどのペントースホモ多糖、マンナンなどのヘキソースホモ多糖もあるが、多くはヘテロ多糖であり、グルコースの他、マンノース、ガラクトース、フコース、キシロース、アラビノースなどの単糖を構成成分とする。

細胞壁多糖はその複雑な構造を維持するためお互いに相互作用して形成されており、不溶性、抗張性が高く、化学的及び生物学的攻撃に対する抵抗性も強い。自然界では、細菌やカビなどの微生物が細胞外酵素を生成し、それが植物細胞壁の各種オリゴ糖、多糖のグリコシド結合を切断し、単糖やオリゴ糖として栄養化している (Tomme *et al.*, 1995a)。例えば *Streptomyces* 属の放線菌は、特にセルラーゼやヘミセルラーゼのような糖分解酵素を持っており、グルコース

や他の糖質を生成する役割を持っている (Nguyen, 1999)。

糖質関連酵素は、アミノ酸配列の相同性に基づき、Glycosidases and Transglycosidases、Glycosyltransferases、Polysaccharide Lyases、Carbohydrate Esterases、Carbohydrate-Binding Modules (CBMs) の5つのクラスについて Henrissat らのグループにより精力的にファミリーに分類されており、CAZY Web サーバー(URL:<http://afmb.cnrs-mrs.fr/cazy/CAZY/index.html>)で見ることができる(Henrissat *et al.*, 2001; Coutinho *et al.*, 2003)。また、その中の一つである糖分解酵素 (glycosyl hydrolase, GH) は現在 90 を越えるファミリーが存在している (Table 0-1, Henrissat & Bairoch, 1993; Henrissat & Davies, 1997)。アミノ酸配列に基づいたファミリー分類は、酵素学的にも、構造上にも多岐にわたり非常に有用である。アミノ酸配列に基づいているので、ファミリーの中では酵素の立体構造はよく保存されている。その結果、ファミリー内での関連酵素に基づいた酵素のバイオインフォマティクスの応用も可能になる。酵素の機能解析をする上で、基質特異性と酵素の立体構造の関係を議論することは大変重要であるが、そのためにもファミリーの分類が重要な役割を果たしている。

糖分解酵素による合成的、あるいは分解的な糖転移は糖のアノマー中心で起こり、アノマー型の保持や反転をもたらす (Fig. 0-1, Sinnott, 1990; McCarter & Withers, 1994)。酵素の触媒機構は、酵素の立体構造に基づく触媒基の空間的位置及び方向で決定されるが、酵素の構造自体はそのアミノ酸配列によるため、酵素反応機構自体も特定のファミリーの中ではほぼ共通である (Gebler *et al.*, 1992)。即ち、いったんファミリーに属する酵素の反応機構が確立されれば、その反応機構はそのファミリーに属する酵素にすべて共通することになる。一方、糖分解酵素のファミリーは、アミノ酸配列上は共通配列を持っていながら、時として異なる基質を利用したり、異なる生成物を生産したりと進化的に新しい機能を獲得してきたと考えられる非常に特徴的な

性質を兼ね備えている。即ち、酵素学的な分類である E.C.ナンバールとは異なり、同じファミリーの中に異なる酵素が分類されていたり、同じ基質から同じ生成物を生産する酵素が別のファミリーに分類されたりすることが非常に多い。例えば、糖分解酵素ファミリー 13 (GH13)は、 $\alpha$ -アミラーゼに代表される酵素群であり、立体構造的には触媒ドメインに $(\beta/\alpha)_8$ -バレルを持ち、アノマー型保持の触媒機構を有することが共通しているが、実際には 20 を越える酵素活性が知られている (Table 0-2)。また、セルロースを分解するセルラーゼは、GH5, GH6, GH7, GH8, GH9, GH12, GH26, GH44, GH45, GH48, GH61 という 10 を越えるファミリーに分類されており、その立体構造も反応機構も多岐に渡っている (Davies, 1998)。

酵素による糖の分子認識は細胞認識、細胞接着など幾多もある生物学的局面において非常に重要な役割を果たしており、糖認識蛋白質の基質特異性などを構造的に明らかにしていくことも重要である。植物は、糖をあらゆる形で蓄えるのに貢献しているが、特に細胞壁に存在する多糖は非常に重要で、セルロースは地球上で最も多いバイオマスであり、全有機炭素の約半分はセルロースとして存在すると推定されている。植物細胞壁を分解する加水分解酵素は通常、触媒ドメインの他にも幾つかの糖結合モジュール (CBM) を有しており、全体としてモジュール構造をとっている場合が多い (Tomme *et al.*, 1995b, Table 0-3)。CBM の主な機能は、多糖など基質の表層に酵素を接着させ、基質周りの酵素濃度を高めることで、酵素の触媒反応をより効率的にすることであると考えられている (Black *et al.*, 1996; Bolam *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 1999)。また、幾つかの CBM は多糖にねじれを起こすことで基質分解が起こりやすくと考えられている (Din *et al.*, 1994; Southall *et al.*, 1999)。CBM は一般的に触媒能を持たないものの基質や糖に結合する 50-200 アミノ酸でできた小ドメインであり、アミノ酸配列に基づき現在 30 を越えるファミリーに分類されており、先程の CAZY Web サーバーで見ることができる。CBM の研

究は H. J. Gilbert らにより精力的に行われており、その基質認識特異性により、更に3つのグループ、即ち、結晶性多糖基質のセルロースやキチン等に結合する群 (CBM ファミリー 1, 2, 3, 5, 10 等)、結晶性ではないが同種多糖などに結合する群 (CBM ファミリー 4, 6, 22, 29, 15 等)、及び単糖や二糖に結合するレクチン様機能を持ち合わせている群に分けられると考えられている。CBM は比較的小さいので、単独で NMR 法や結晶解析で幾つかの立体構造が決定されている。また、キチナーゼやセルラーゼなど、触媒ドメインと基質結合ドメインが比較的強い結合で相対的に固定された状態で存在するものについては、触媒ドメインと基質結合ドメインを含むマルチドメインのままの構造解析例もある。糖に結合する蛋白質が、糖を認識するとき、ほとんど全ての場合に芳香族アミノ酸側鎖と糖のインターラクションが見られる (Nagy *et al.*, 1998)。

キシラナーゼは、植物細胞壁に含まれるヘミセルロースの主成分であるキシランの主鎖 (Fig. 0-2)、主に  $\beta$ -1,4-グリコシド結合を加水分解するエンド型酵素である (Fig. 0-3)。最初カタツムリの消化液に見出されたが、麦芽やカビ、細菌などによっても生産されることが明らかになった。日本や、北欧などで、パルプ工業における漂白行程で応用されるようになり、最近ではキシロオリゴ糖の生産に利用されるようになってきているほか、植物細胞壁の分解、代謝回転における役割に関心が持たれ、研究が行われるようになってきている。

キシラナーゼは、触媒ドメインの一次配列や立体構造の相同性からセルラーゼなどとともに、 $\beta$ -1,4-グリコシド結合を加水分解する酵素群で分類されていたが、現在では少なくとも4つ以上のファミリーに分類され、その中でも GH10 と GH11 が大きなファミリーである (Henrissat & Bairoch, 1993)。GH10 に属するキシラナーゼは、触媒ドメインとして約 300 アミノ酸からなる TIM バレル構造を持つのに対し、GH11 のキシラナーゼは、主に  $\beta$  ジェリーロール構造からなり、構成するアミノ酸も 220 アミノ酸を越える程度である (Fig. 0-4, Biely *et al.*, 1997)。



GH10 に属するキシラナーゼでは、まず、*Streptomyces lividans* (XlnA; Derewenda *et al.*, 1994), *Pseudomonas fluorescens* (現在 *Cellvibrio japonicus*) (XYLA; Harris *et al.*, 1994, 1996), *Cellulomonas fimi* (Cex; White *et al.*, 1994) 由来キシラナーゼの触媒ドメインの結晶構造が決定され、触媒ドメインの TIM バレル構造、及び活性部位、触媒クレフトが明らかにされた。引き続き、本研究が始まるまでに *Clostridium thermocellum* (Dominguez *et al.*, 1995), *Penicillium simplicissimum* (Schmidt *et al.*, 1998, 1999), *Thermoascus aurantiacus* (Lo Leggio *et al.*, 1999; Natesh *et al.*, 1999) 由来のキシラナーゼの触媒ドメインの構造が分子置換法により構造解析されている (Fig. 0-5)。本研究である *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 由来のものを併せて、10 種類近くの GH10 キシラナーゼの結晶構造がこれまでに解析されている (Fujimoto *et al.*, 2000, 2002)。

基質や基質アナログとの複合体の結晶構造も解析され、触媒機構や、基質結合様式についても明らかとなっている (White *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1999; Lo Leggio *et al.*, 2000)。Withers らのグループは、求核攻撃を受けやすい工夫を行った 2-fluoro-xylobiose を基質に用い、Cex の触媒反応中間体と考えられる構造の決定に成功した (Notenboom *et al.*, 1998a, 1998b)。この結果、GH10 のキシラナーゼの触媒反応は double-replacement mechanism により進むことが示され、Glu127 が一般酸塩基触媒基 (general acid/base catalyst) として働き、もう一つの Glu233 が求核基 (nucleophile) として働くという、2つの触媒活性残基の役割を明らかにした (Fig. 0-6)。また、キシロオリゴ糖との複合体の結晶解析や、基質結合クレフトの比較などより、クレフトのサブサイトマップが各酵素で同定され、その結果、GH10 キシラナーゼの中では、基質の非還元末端側、一側のクレフトはアミノ酸、構造ともにほぼ完全に保存されているが、+側のクレフトでは酵素の種類によって違うことが明らかとなった (Charnock *et al.*, 1998)。

キシランはヘミセルロースのひとつで、細胞壁の成分になるなど、長鎖になるほど複雑で不

溶性となる。キシラナーゼは、セルラーゼと同様に、不溶性基質に対して効率的に分解活性を有するために、触媒ドメインの他に、基質結合ドメインを同じアミノ酸鎖に持つことが多い (Tomme *et al.*, 1995b)。キシラン結合ドメインはセルロース結合ドメイン等とともに、CBM に分類されている。例えば、キシラナーゼ Cex はその C 末端にファミリー 2 に属する CBM をもち、N 末端の触媒ドメインとの間は 20 残基ほどの Pro, Thr リッチリンカーでつながれている (Creagh *et al.*, 1996)。キシラナーゼはセルラーゼに比べると、基質結合ドメインとの間のリンカーがフレキシブルであり、両ドメイン間がお互いに固定されることなく自由に動けるようになっているので、これまで 2 つのドメインを同時に構造解析した例はない。

放線菌 (*Streptomyces olivaceoviridis* E-86) が生産する GH10 (FXYN)、及び GH11 のキシラナーゼについては、以前から筑波大学を中心に研究されてきた (Kusakabe *et al.*, 1969, 1975a, 1975b, 1976a, 1976b, 1977a, 1977b, 1983; Yoshida *et al.*, 1994)。アラビノースやアセチル基が側鎖に入っている天然のキシランを基質とした場合の生産物の構造が同定され、その結果から 2 種類のキシラナーゼには側鎖が入っている基質に対する側鎖の認識や、切断部位の相違が存在することが明らかとなっている (Fig. 0-7, Yoshida *et al.*, 1990)。

FXYN の構造については DNA 配列より 1 次構造が決定され、分子量約 45,000 であり、本酵素の大腸菌での発現系構築、精製方法が確立されている (Kuno *et al.*, 1998)。FXYN は CBM13 を持った GH10 キシラナーゼであり、その基質認識機構、酵素活性発現機構に興味を持たれていた。そこで、共同研究者らにより本酵素の性質解析が、最近になって精力的に行われてきている (Kuno *et al.*, 1998, 1999, 2000; Kaneko *et al.*, 1998, 1999)。最初に述べたように、DNA シークエンスから本酵素は GH10 の糖分解酵素であることが明らかとなったが、C 末端には、11 残基の Gly/Pro-rich リンカー部位を介し 123 残基のキシラン結合ドメイン (xylan-binding domain,

XBD) が存在する。XBD は、CLD など数残基の共通配列を含む 40 残基ほどのアミノ酸配列が 3 回繰り返されたものである。XBD が実際に不溶性キシランに対し、酵素活性を高める働きがあるかを調べるために、触媒ドメインから XBD を除いた変異体 (Cat) を作製し、可溶性、及び不溶性キシランに対して酵素活性を測定した (Fig 0-8, Kuno *et al.*, 1998)。その結果、可溶性キシランに対しては、wild-type、Cat とともに同程度の活性を示したが、不溶性キシランに対しての酵素活性は Cat だけのものが XBD を持っている wild-type のものに比べて半分程度であったことから、XBD は不溶性キシランに対して酵素活性を高める働きがあることが明らかとなった。そこで、XBD をサブドメイン  $\alpha$ 、 $\beta$  及び  $\gamma$  に分けてサブドメイン  $\gamma$  (XBD $\gamma$ )、サブドメイン  $\beta$  -  $\gamma$  (XBD( $\beta$ - $\gamma$ ))、あるいはサブドメイン  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  を削除した変異体を作製し、不溶性キシランに対する結合能を測定した (Fig 0-9)。その結果、wild-type 酵素と比較して XBD $\gamma$  を削除したものは、結合活性が若干減り、また XBD( $\beta$ - $\gamma$ ) を削除したもの、XBD を全て削除し触媒ドメインだけにしたものは、wild-type の約半分の結合活性であった (Kuno *et al.*, 2000)。FXYN が XBD を使い、どのように基質を認識し酵素活性を高めているのか、また、天然キシランに対しどのように作用するのか、非常に興味深い。

アミノ酸配列より、FXYN の有する XBD は CBM13 に属することが明らかとなっているが、CBM13 についてはこれまでは植物由来の毒素であるリシンやアブリンといったガラクトース結合レクチンとして、構造解析例があるのみである (Fig. 0-10, Rutenber *et al.*, 1987; Tahirov *et al.*, 1995; Pascal *et al.*, 2001)。リシンの B 鎖はガラクトースを認識するレクチンとして以前からよく研究されており、CBM13 に属する蛋白質のほとんどは、CBM というよりもリシンスーパーファミリーのレクチンとして認識されている。その中には、ガラクトース以外の糖に結合するものとして、シアル酸、 $\beta$  グルカン、キシラン等を認識するものの存在が知られていた。CBM13

のファミリーの中で、ガラクトース以外の糖を認識する蛋白質の立体構造情報はこの研究以前に報告された例はなく、ガラクトース、キシロースという異なる糖に対する特異性の発現機構がどのようになっているか興味深い。

本研究では、FXYN が触媒ドメイン及び XBD のマルチドメイン構造を持っていることに着目し、本酵素の触媒ドメインの詳細な構造、XBD の基質に対する特異性、および、酵素全体での不溶性キシランに対する反応機構を酵素の立体構造の見地から明らかにすること、また、本酵素の分子モデリングの基盤を確立することを目的として、結晶構造解析に着手することにした。

**Table 0-1** List of the glycoside hydrolase families (1~91 families available).

- 
- 1: Mainly  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21); 6-phospho- $\beta$ -galactosidases (EC 3.2.1.85); 6-phospho- $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.86); lactase-phlorizin hydrolases (EC 3.2.1.108); and myrosinases (EC 3.2.3.1).
  - 2: Mainly  $\beta$ -galactosidases (EC 3.2.1.23),  $\beta$ -glucuronidases (EC 3.2.1.31) and  $\beta$ -mannosidases (EC 3.2.1.25).
  - 3: Mainly  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21).
  - 4: Bacterial  $\alpha$ -galactosidases (EC 3.2.1.22), 6-phospho- $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.86) and 6-phospho- $\alpha$ -D-glucosidases (EC 3.2.1.122).
  - 5: Mainly endoglucanases (EC 3.2.1.4). Contains also  $\beta$ -mannanases (EC 3.2.1.78) and exo-1,3-glycanases (EC 3.2.1.58).
  - 6: Endoglucanases (EC 3.2.1.4) and cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91).
  - 7: Endoglucanases (EC 3.2.1.4) and cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91).
  - 8: Mostly endoglucanases (EC 3.2.1.4).
  - 9: Mostly endoglucanases (EC 3.2.1.4).
  - 10: Mostly xylanases (EC 3.2.1.8).
  - 11: Mostly xylanases (EC 3.2.1.8).
  - 12: Endoglucanases (EC 3.2.1.4).
  - 13: Mostly  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1); pullulanases (EC 3.2.1.41), cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19), cyclomaltodextrinase (EC 3.2.1.54) and trehalose-6-phosphate hydrolase (EC 3.2.1.93).
  - 14:  $\beta$ -Amylases (EC 3.2.1.2)
  - 15: Glucoamylases (EC 3.2.1.3).
  - 16: Mainly bacterial  $\beta$ -glucanases (EC 3.2.1.73) (lichenases).
  - 17: Glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.39) and lichenases (EC 3.2.1.73).
  - 18: Chitinases (EC 3.2.1.14), endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidases (EC 3.2.1.96) and di-N-acetylchitobiases.
  - 19: Chitinases (EC 3.2.1.14).
  - 20:  $\beta$ -Hexosaminidases (EC 3.2.1.52) and chitobiases (EC 3.2.1.52).
  - 21: DELETED.

- 22: Lysozymes type C (EC 3.2.1.17) and  $\alpha$ -lactalbumins.
- 23: Lysozymes type G (EC 3.2.1.17).
- 24: Phage lysozymes (EC 3.2.1.17).
- 25: Lysozymes (EC 3.2.1.17).
- 26: Mainly mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidases (EC 3.2.1.78).
- 27:  $\alpha$ -Galactosidases (EC 3.2.1.22),  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidases (EC 3.2.1.49) and isomalto-dextranases (EC 3.2.1.94).
- 28: Polygalacturonases (EC 3.2.1.15).
- 29:  $\alpha$ -L-Fucosidases (EC 3.2.1.51).
- 30: Mammalian glucosylceramidases (EC 3.2.1.45).
- 31: Very diverse, contains  $\alpha$ -glucosidases (EC 3.2.1.20), glucoamylase (EC 3.2.1.3) and sucrase-isomaltases (EC 3.2.1.48 / EC 3.2.1.10).
- 32: Invertases (EC 3.2.1.26), inulinases (EC 3.2.1.7), and levanases (EC 3.2.1.65).
- 33: Sialidases (EC 3.2.1.18).
- 34: Influenza neuraminidases (sialidases) (EC 3.2.1.18).
- 35:  $\beta$ -Galactosidases (EC 3.2.1.23).
- 36:  $\alpha$ -Galactosidases (EC 3.2.1.22).
- 37: Trehalases (EC 3.2.1.28).
- 38:  $\alpha$ -Mannosidases (EC 3.2.1.24 / EC 3.2.1.114).
- 39: Mammalian  $\alpha$ -L-iduronidases (EC 3.2.1.76) and some bacterial  $\beta$ -xylosidases (EC 3.2.1.37).
- 40, 41: DELETED.
- 42:  $\beta$ -Galactosidases (EC 3.2.1.23).
- 43: Mainly bifunctional  $\beta$ -xylosidases (EC 3.2.1.37) and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55).
- 44: Endoglucanases (EC 3.2.1.4).
- 45: Endoglucanases (EC 3.2.1.4).
- 46: Chitosanases (EC 3.2.1.132).
- 47:  $\alpha$ -Mannosidases (EC 3.2.1.113).
- 48: Endoglucanases (EC 3.2.1.4) and cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91).
- 49: Dextranases (EC 3.2.1.11).

- 50: Agarases (EC 3.2.1.81).
- 51:  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55).
- 52:  $\beta$ -Xylosidases (EC 3.2.1.37).
- 53: Endo-1,4- $\beta$ -galactanases (EC 3.2.1.89).
- 54:  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55).
- 55: Exo- and endo-1,3-glucanases (EC 3.2.1.58 and EC 3.2.1.39).
- 56: Hyaluronidases (EC 3.2.1.35).
- 57:  $\alpha$ -Amylases (EC 3.2.1.1).
- 58: Endo-*N*-acetylneuraminidase (EC 3.2.1.129).
- 59: Galactocerebrosidases (EC 3.2.1.46).
- 60: DELETED.
- 61: Endoglucanases (EC 3.2.1.4).
- 62:  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55).
- 63: Mannosyl-oligosaccharide glucosidases (EC 3.2.1.106).
- 64: Endo-1,3-glucanases (EC 3.2.1.39).
- 65: Trehalases (EC 3.2.1.28).
- 66: Dextranases (EC 3.2.1.11) and cycloisomaltoligosaccharide glucanotransferase (EC 2.4.1.-).
- 67:  $\alpha$ -Glucuronidases (EC 3.2.1.139).
- 68: Levansucrases (EC 2.4.1.10) and invertases (EC 3.2.1.26).
- 69: Hyaluronidases (EC 3.2.1.35).
- 70: Dextransucrases (EC 2.4.1.5).
- 71:  $\alpha$ -1,3-Glucanase (EC 3.2.1.-).
- 72:  $\beta$ -1,3-Glucanosyltransglycosylase (EC 2.4.1.-).
- 73: Endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.96) and  $\beta$ -1,4-*N*-acetylmuramoylhydrolase (EC 3.2.1.17).
- 74: Endoglucanase (EC 3.2.1.4).
- 75: Chitosanase (EC 3.2.1.132).
- 76:  $\alpha$ -1,6-Mannanase (EC 3.2.1.-).
- 77: Amylomaltase or 4- $\alpha$ -glucanotransferase (EC 2.4.1.25).
- 78:  $\alpha$ -L-Rhamnosidase (EC 3.2.1.40).
- 79: Endo- $\beta$ -glucuronidase (heparanase, EC 3.2.1.-).

- 80: Chitosanases (EC 3.2.1.132).
- 81:  $\beta$ -1,3-Glucanase (EC 3.2.1.39)
- 82:  $\iota$ -Carrageenase (EC 3.2.1.-)
- 83: Hemagglutinin-neuraminidase (EC 3.2.1.18)
- 84: *N*-Acetyl  $\beta$ -glucosaminidase (EC 3.2.1.52) and hyaluronidase (EC 3.2.1.35).
- 85: Endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.96).
- 86: Agarases (EC 3.2.1.81)
- 87: Mycodextranase (EC 3.2.1.61)
- 88:  $\delta$ -4,5 Unsaturated glucuronyl hydrolases (EC 3.2.1.-)
- 89:  $\alpha$ -*N*-Acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.50)
- 90: Endorhamnosidases (EC 3.2.1.-)
- 91: Inulin fructotransferase (depolymerizing,  
difructofuranose-1,2':2',1-dianhydride-forming) (EC 2.4.1.200) and  
Inulin fructotransferase (depolymerizing,  
difructofuranose-1,2':2,3'-dianhydride-forming) (EC 2.4.1.93)
-



**Table 0-2** List of the enzyme activities among glycoside hydrolase family 13.

---

Enzyme activities
-------------------

---

$\alpha$ -Amylase
Pullulanase
Cyclomaltodextrin glucanotransferase
Cyclomaltodextrinase
Trehalose-6-phosphate hydrolase
Oligo- $\alpha$ -glucosidase
Maltogenic amylase
Neopullulanase
$\alpha$ -Glucosidase
Maltotetraose-forming $\alpha$ -amylase
Isoamylase
Glucodextranase
Maltohexaose-forming $\alpha$ -amylase
Branching enzyme
4- $\alpha$ -Glucanotransferase
Maltopentaose-forming $\alpha$ -amylase
Amylosucrase
Sucrose phosphorylase

---

**Table 0-3** Carbohydrate-binding module (CBM) classification.

CBM	number of proteins	function
1	121	Cellulose-binding
2	124	Cellulose-binding and xylan-binding
3	65	Cellulose-binding
4	18	Xylan, $\beta$ -1,3-glucan, $\beta$ -1,3-1,4-glucan, $\beta$ -1,6-glucan and amorphous cellulose-binding
5	114	Cellulose-binding
6	41	Cellulose-binding
8	2	Cellulose-binding
9	19	Cellulose-binding
10	15	Cellulose-binding
11	3	Cellulose-binding
12	40	Cellulose-binding and chitin-binding
13	188	Cellulose-binding and galactose-binding lectin
14	153	Chitin-binding
15	2	Xylan and xylooligosaccharide-binding
16	17	
17	10	Amorphous cellulose, celooligosaccharide and derivatized cellulose-binding
18	201	Chitin-binding
19	6	Chitin-binding
20	80	Starch-binding and cyclodextrin-binding
21	27	Starch-binding
22	58	Xylan binding and $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,4-glucan-binding
23	1	Mannan-binding
24	3	$\alpha$ -1,3-Glucan (mutan)-binding
25	10	Starch-binding
26	13	Starch-binding

27	5	Mannan-binding
28	10	Non-crystalline cellulose, cellooligosaccharides and $\beta$ -(1,3)(1,4)-glucan-binding
29	1	Mannan/glucomannan-binding
30	5	Cellulose-binding
31	3	$\beta$ -1,3-Xylan-binding
32	60	Galactose-binding and lactose-binding
33	78	Chitin-binding

---

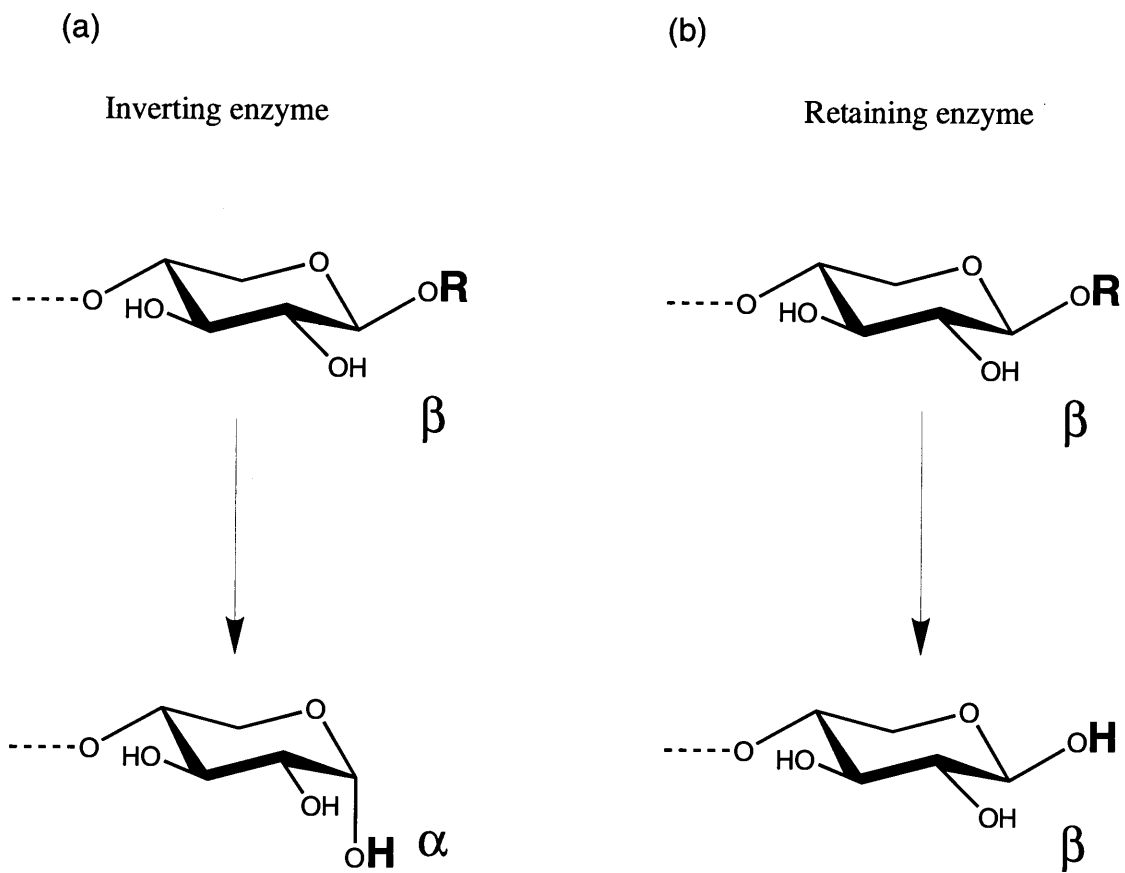


Fig. 0-1 Synthetic or hydrolytic, enzymatic glycosyl transfer with inversion or retention of anomeric configuration. Glycosidases are classified into two types according to reaction mechanism. (a) inverting enzyme and (b) retaining enzyme.

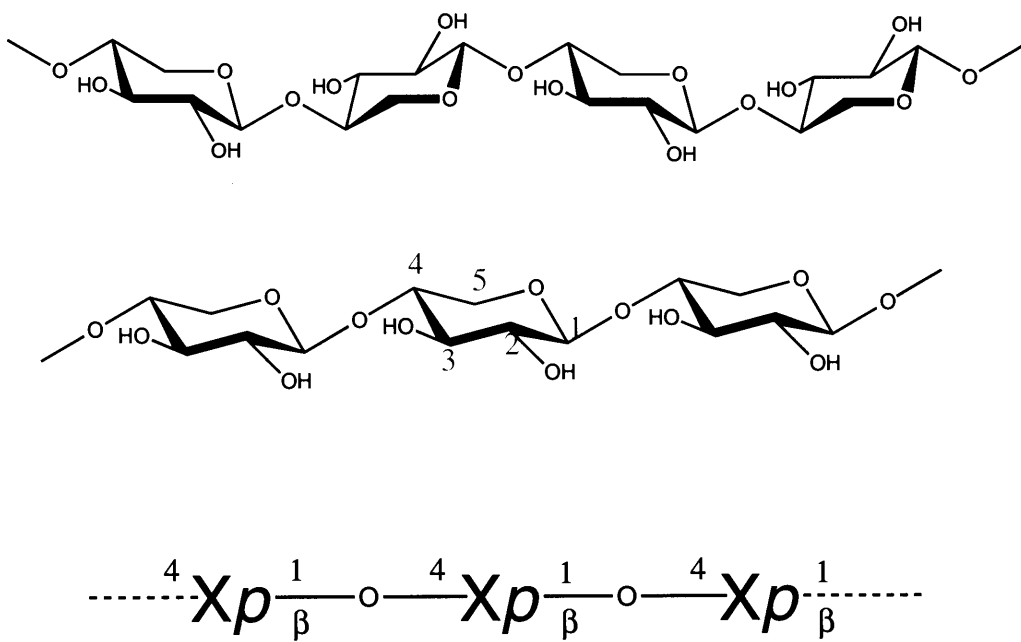


Fig. 0-2 The structure of xylan backbone.

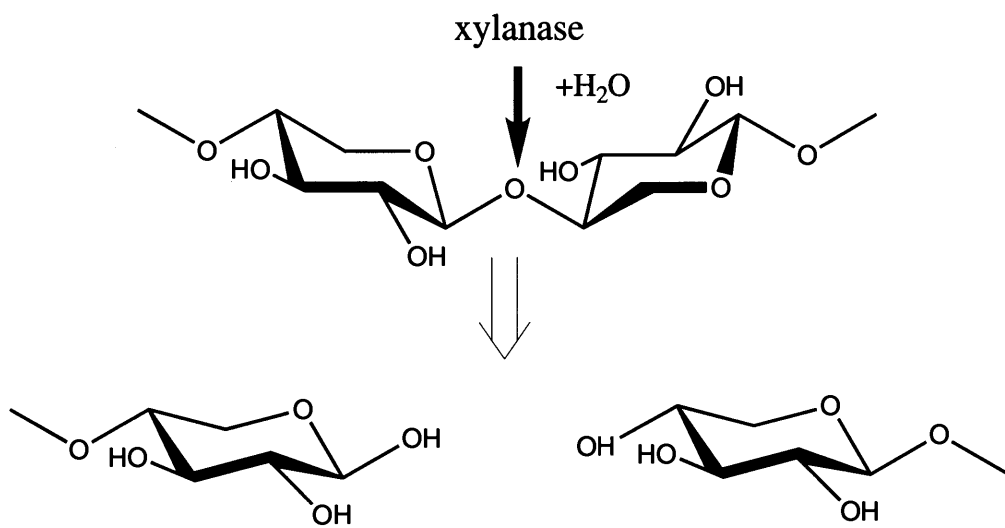


Fig. 0-3 The enzymatic scheme of xylanase.

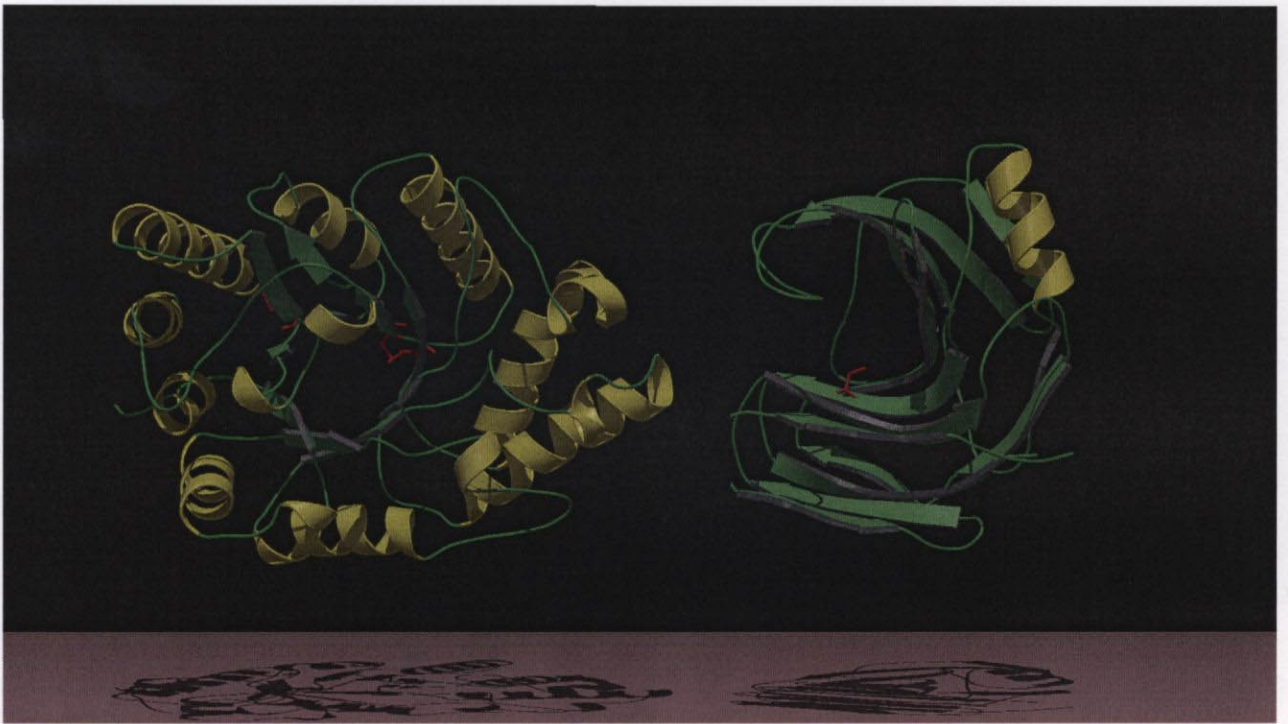


Fig. 0-4 Crystal structure of the catalytic domains of the two types of xylanase; Family 10 from *Cellulomonas fimi* (left) and Family 11 from *Bacillus circulans* (right).

$\beta$ -1,4-glucanase from *Cellulomonas fimi*

Xylanase A from *Pseudomonas fluorescens*

Xylanase from *Thermoascus aurantiacus*



Xylanase A from *Streptomyces lividans*

Xylanase Z from *Clostridium thermocellum*

Xylanase from *Penicillium simplicissimum*

Fig. 0-5 Ribbon models of the catalytic domains of several family 10 xylanases determined by X-ray crystallography.



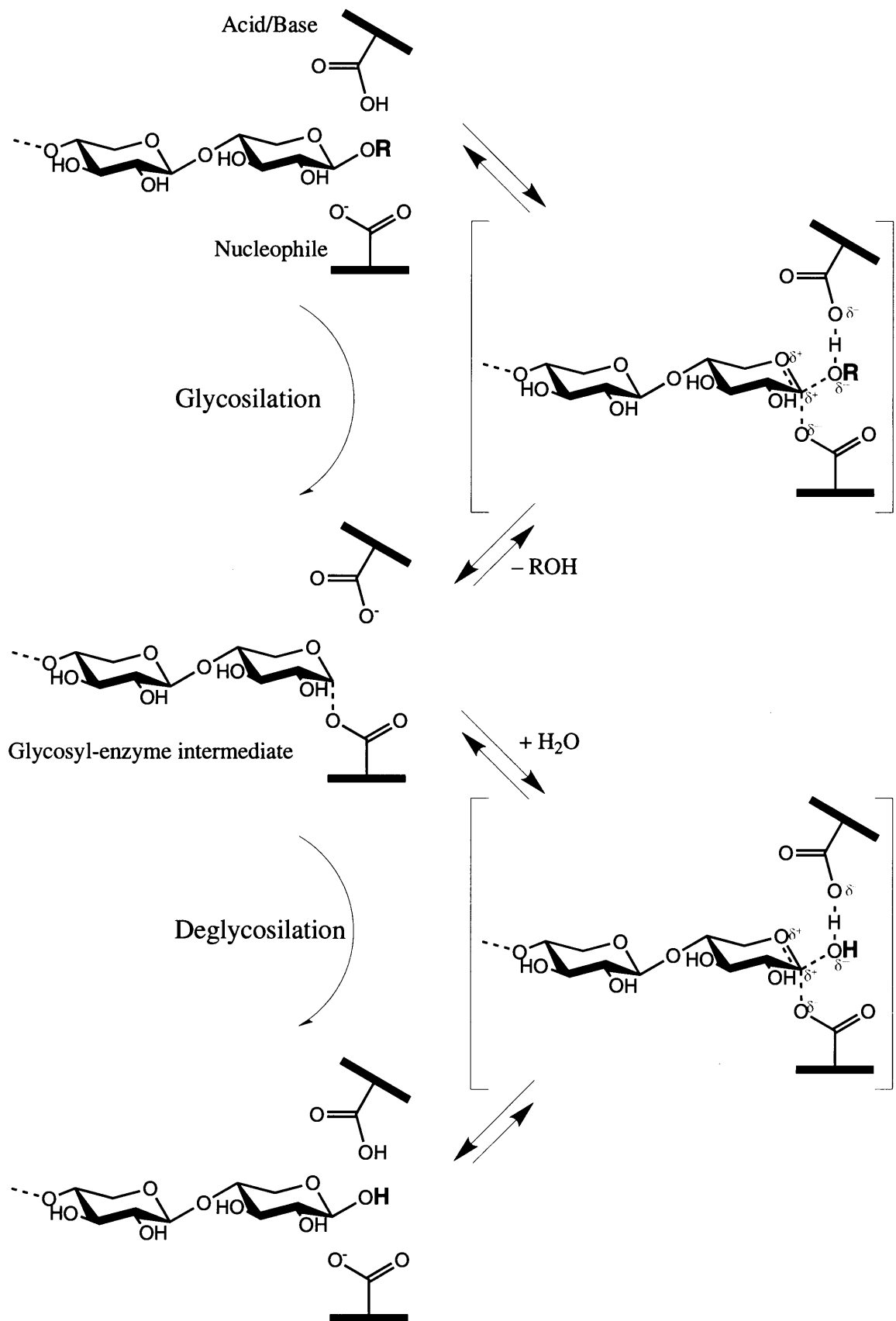
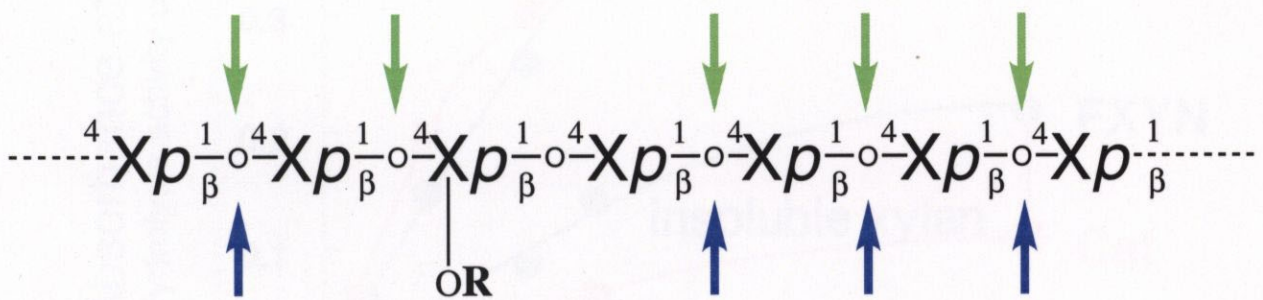


Fig. 0-6 Reaction mechanism of retaining  $\beta$ -1,4-xylanases.

## Family 10 xylanase



## Family 11 xylanase

Fig. 0-7 Substrate specificities of family 10 and family 11 xylanases toward side-chain substituted xylan. The scissile site of xylanases are shown as arrows. Xp; D-xylopyranose, R; various kinds of side chains including acetate and arabinofuranoside.

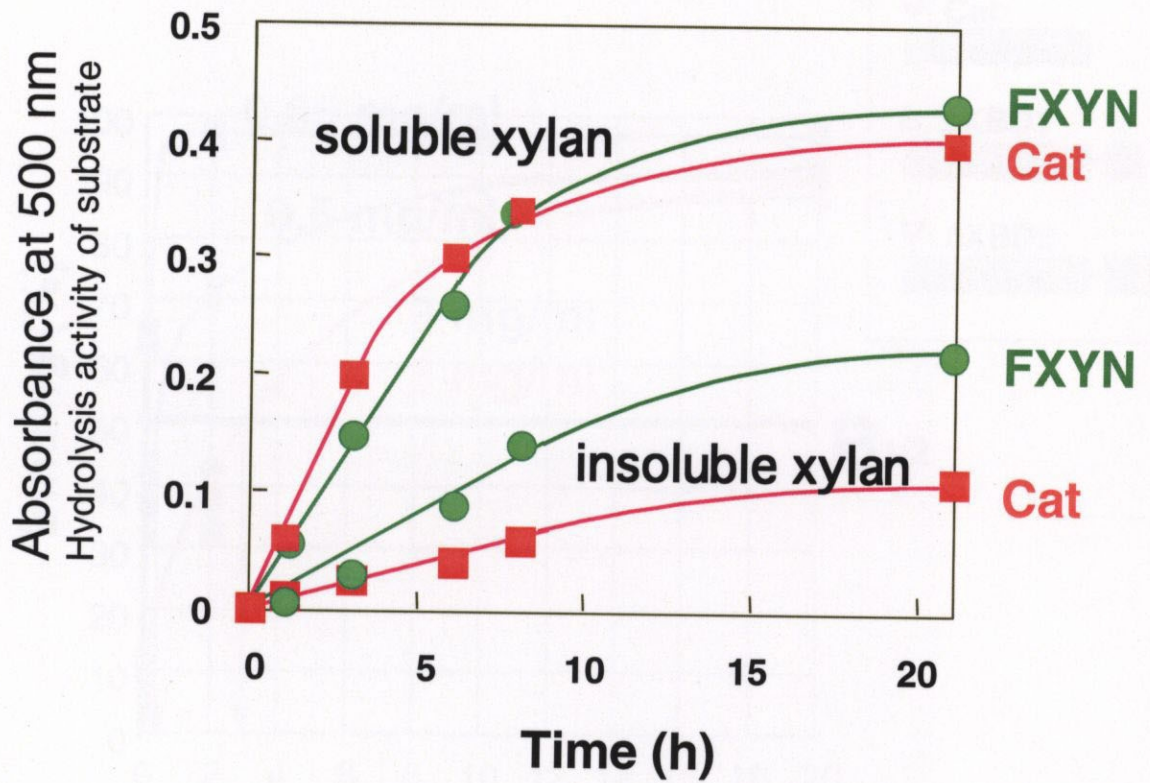


Fig. 0-8 Hydrolysis rate of FXYN and XBD-truncated FXYN (Cat) toward soluble / insoluble xylan.

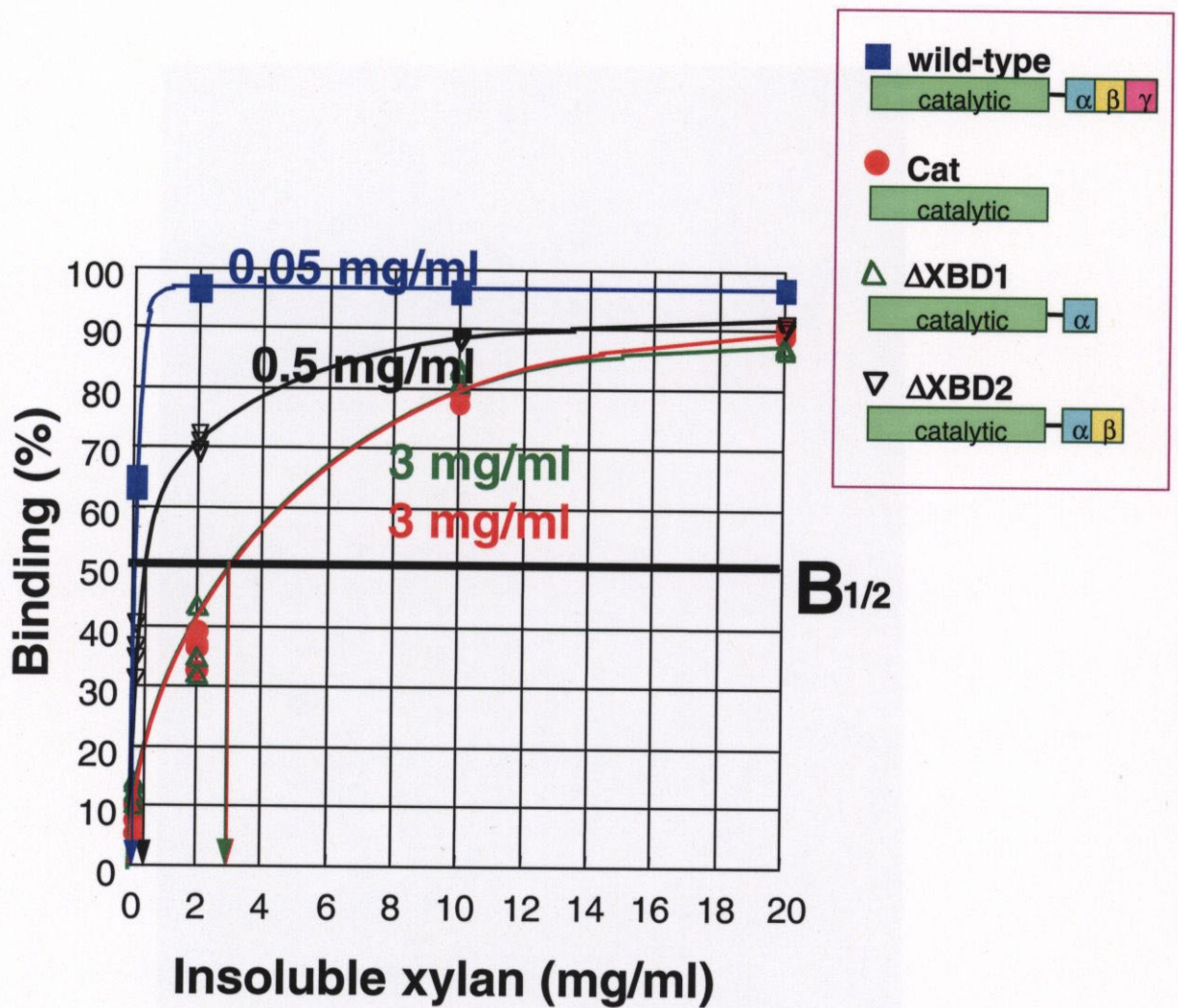


Fig. 0-9 Binding activity of wild-type and XBD-truncated FXYN toward insoluble xylan.



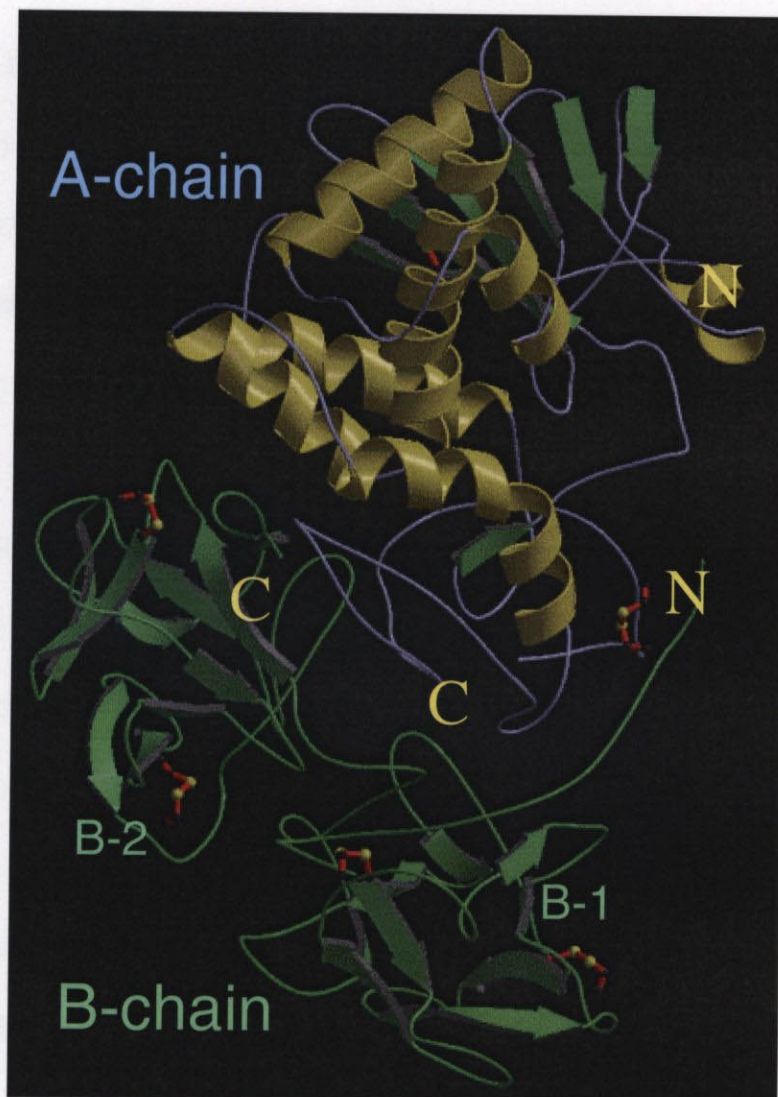


Fig. 0-10 Structure of the heterodimeric plant toxin ricin. Ricin A-chain is an *N*-glycosidase that attacks ribosomal RNA. Ricin B-chain is a lectin with a binding preference for galactosides.

## 第1章 放線菌 (*Streptomyces olivaceoviridis* E-86) 由来キシラナーゼの結晶化

X線結晶構造解析は、結晶にX線を照射し散乱されるX線の強度分布から結晶内の原子配列を決定する手法である。X線発生装置あるいは放射光研究施設の性能の向上、コンピューターの計算速度の増加、解析ソフトウェアの進歩等により、解析対象は蛋白質などの生体高分子から、膜蛋白複合体やウイルスなどの超分子まで広がってきた。蛋白質など、生体高分子のX線解析は、大まかに結晶化、回折強度測定、構造因子の位相角の計算、電子密度の計算、分子モデルの作製、分子モデルの精密化、という流れがある。このうち、結晶化と位相角の決定は現在でも取り扱いが困難な場合が多く、X線解析に要する時間を大きく左右する段階になる。蛋白質を結晶化する必要がある理由は、X線解析の原理にある。即ち、結晶化させて分子を規則正しく配列させると、個々の分子からの散乱X線が互いに干渉して散乱強度が相乗的に強くなるからであり、この回折点の強度データから蛋白質の電子密度を計算し、構造解析を行うことが可能となる。

蛋白質が結晶化するためには様々な要因が考えられるが、蛋白質自身の性質によるところも大きい。溶液中で蛋白質が会合してダイマー、あるいはオリゴマーが混在するような場合や、糖蛋白質であり糖の構造が不均一な場合は結晶化しにくい。また、目的蛋白質がマルチドメイン構造からなる場合や、マルチ構造をとりやすい場合も結晶化しにくい場合がある。序章で述べたように本研究の対象であるキシラナーゼの場合も、触媒ドメインの他に基質結合ドメインを持つものが多く、その複数のドメインがお互いに特定のコンタクトをとらないため結晶化が極めて困難であり、両ドメイン併せての結晶構造解析の事例はこれまでに存在しなかった。

FXYN も触媒ドメインと XBD を持ち合わせ、お互いがフレキシブルなリンカーでつながっ

ており結晶化も困難であるとも考えられたが、両ドメイン併せての結晶構造解析を期待して結晶化に着手した。

## 1-1 方法

### FXYN の精製

FXYN の結晶化は、結晶化スクリーニングを行った段階においては、放線菌の細胞培養上清より精製した蛋白質を試料として用いた。精製は、筑波大学日下部研究室により行われ、精製方法は以前に筑波大学にて確立された方法に準じて行なわれた (Kusakabe *et al.*, 1977a)。即ち、培養上清を硫酸分画後、沈澱を蒸留水に溶かし、蒸留水に対し 2℃で透析した。濃縮後、20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.6) で平衡化された DEAE-cellulose DE-52 (Whatman) 陰イオン交換カラムに供した。吸着されない素通り画分を濃縮後、10 mM ethanolamine-HCl 緩衝液 (pH 9.4) で平衡化された QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, 20 x 300 mm) カラムに供した。同緩衝液で洗浄後、0-0.5 M の NaCl グラジエントを用いて溶出を行った。キシラナーゼ活性を、*p*-nitrophenyl-xylobiose の分解反応を指標として確認し、活性画分を 0.1 M NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4) で平衡化された Ultrogel ACA44 (LBK, 25 x 900 mm) に供した。溶出は同溶液にて行い、活性画分を精製 FXYN とした。純度は SDS-PAGE で単一バンドであることを確認した。

その後、久野らにより、本酵素の DNA シークエンス、cDNA クローニングがなされ、大腸菌による発現系の構築にも成功した (Kuno *et al.*, 1998)。そこで研究後半では、本酵素の結晶化は新たに久野らにより確立された方法により精製された recombinant 蛋白質を用いて行った。

## 結晶化

FXYN の結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行った。結晶化のスクリーニングは、硫化アンモニウムを沈殿剤に用い、McIlvaine 緩衝液 (0.1 M citric acid, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> の混合液) 存在下、沈殿剤濃度と pH の条件を変えることで検討を行った。20 mg/ml の濃度の蛋白質溶液と 25%飽和硫酸を含む沈殿剤緩衝液をそれぞれ 5  $\mu$ l ずつ混合し、1.5 ml のリザーバー溶液に対し 4 $^{\circ}$ C で平衡化し、結晶成長を観察した。0.3 ~ 1 mm の比較的大きな結晶が、McIlvaine 緩衝液で pH 5.2~6.0 の範囲で観察された。20  $^{\circ}$ C でも同様の結晶が得られることが確認された。最適結晶化条件として、1 mm 程の大きな結晶が安定して得られる条件を選択した。大腸菌により発現された recombinant 蛋白質を使用した場合でも、精製蛋白質と同様の良質な結晶が得られた。

## X線データ測定

X線回折データの測定は高エネルギー物理学研究所 (現高エネルギー加速器研究機構) 放射光施設 (Photon Factory, PF) ビームライン BL6A で行った。FXYN の結晶は直径 1 mm の quartz キャピラリーに封入し、ゴニオヘッド上に粘土で固定した。回折データは、0.1 mm のコリメーターを用い、1.0  $\text{\AA}$  の波長、20 $^{\circ}$ C で測定を行った。1つの結晶を用い、1枚当たり 120 秒の露光で、振動角 2度ずつ、178 度、89 枚の振動角のデータセットを収集した。検出器にはイメージングプレート (400 x 200 mm, Fuji film) をセットした、427.3 mm 半径の Weissenberg カメラ (Sakabe, 1991) を用い、Fuji BA100 イメージリーダー (Fuji film) によりデータのデジタル化を行った。データセットは 100-1.9  $\text{\AA}$  の分解能中でプログラム WEIS (Higashi, 1989), または DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) で指数付け及び強度解析を行い、プログラム SCALEPACK でスケ-



ル・マージを行った。

## 1-2 結果

ハンギングドロップ蒸気拡散法で FXYN の結晶化を行い、最長 1.0 mm を越える柱状、あるいはブロック状の良質な結晶が得られた (Fig. 1-1)。最終的に、2% McIlvaine 緩衝液 pH 5.7、1.05 M 硫酸アンモニウム溶液を沈殿剤とし、20 mg/ml の FXYN 溶液と 1:1 で混合したものを蒸気拡散法で 20°C 下で結晶化し、これを結晶化条件とした (Fujimoto *et al.*, 1997)。

PF BL6A での測定を行い、収集した native データの概要を Table 1-1 に示す。100-1.9 Å の分解能で、全回折反射数 441,579 個、独立反射数 80,196 個、完全性 94.2%、マージ R 因子 0.055 のデータが得られた (Table 1-1)。結晶は斜方晶系の空間群  $P2_12_12_1$  に属し、格子定数は  $a = 79.6$ ,  $b = 95.2$ ,  $c = 140.3$  Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  であった。Matthews の値  $V_m = 2.95$  Å<sup>3</sup>/Da と計算すると、非対称単位中に 2 分子の FXYN 分子を含んでおり、水分含量は 58% と見積もられた (Matthews, 1968)。

## 1-3 考察

FXYN の結晶化に成功した当時は、GH10 に属するキシラナーゼの立体構造は 3 種類決定されていた。それらは *Streptomyces lividans* (XlnA; Derewenda *et al.*, 1994), *Pseudomonas fluorescens* (現在 *Cellvibrio japonicus*) (XYLA; Harris *et al.*, 1994), *Cellulomonas fimi* (Cex; White *et al.*, 1994) 由来キシラナーゼの触媒ドメインの結晶構造である。これらの構造は、GH10 のキシラナーゼの触媒ドメインが TIM バレルにより成り立っていることを明らかにし、触媒クレフトにある保存された 2 つのグルタミン酸が触媒アミノ酸残基であることを示した。これらの酵素は、実際

は触媒ドメインの他に、N末あるいはC末端にキシラン結合ドメインと思われる小さな別のドメインが存在して一つの分子を成しているものであったが、触媒ドメインとの間を繋いでいるリンカー部分に可動性があり、ドメイン間で安定な構造をとらないと考えられており、全長分子を用いた場合、結晶化に成功しなかった。従って、これらの酵素では触媒ドメインのみの発現を行って結晶構造を得ており、キシラナーゼ分子全体として結晶化された今回の FXYN は両ドメインの構造を同時に決定できるという点で大きな意義があると考えられた。

また、本結晶は、結晶成長が比較的早く、長い間安定に保たれること、a 軸方向には特に安定に成長し、条件を詳細に検討することにより、シッティングドロップ蒸気拡散法で 4 mm 長にも達する大きな結晶が得られることが明らかとなった (Fig. 1-1)。他の GH10 キシラナーゼと同様、本酵素も可動性リンカー部位を持っているものの、触媒ドメインとキシラン結合ドメインがうまくコンタクトをとり結晶化に寄与しているものと考えられる。

立体構造解析は、当時分子置換法に十分な立体構造座標が入手不可能であり、重原子多重同形置換法を視野に入れた重原子誘導体のスクリーニングを行った。ここには示さないが  $K_2HgI_4$  の重原子誘導体を得られた。しかし、重原子同形置換法 (single isomorphous replacement, SIR) での解析には不十分であった。

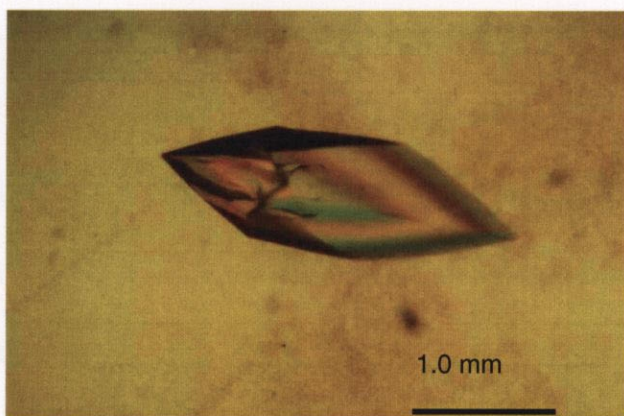
**Table 1-1** Crystal parameters and data collection statistics.

---

Cell parameter ( $P2_12_12_1$ )	$a = 79.8 \quad b = 95.0 \quad c = 141.1 \text{ (\AA)}$	
Resolution range ( $\text{\AA}$ )	8.0-1.9	(1.97-1.90)
Total reflections	441, 125	
Unique reflections	76, 761	3, 708
Completeness (%)	90.1	(70.0)
$R$ -merge (%)	5.4	(21.4)
Average $I/\sigma(I)$	22.2	5.3
$V_m$ ( $\text{\AA}^3/\text{Da}$ )	2.95	
Solvent content (%)	58	
$Z$	8	

---

(a)



(b)

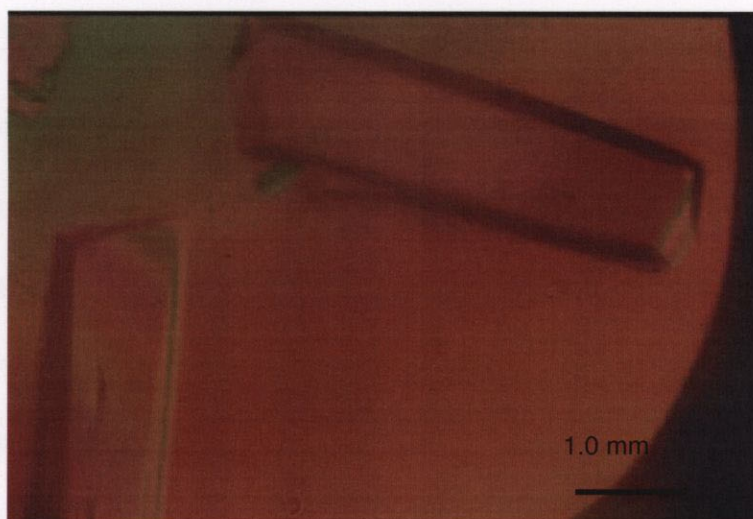


Fig. 1-1 (a) A typical crystal of FXYN grown by the hanging drop vapor diffusion method (1.0 x 0.3 x 0.3 mm in size). (b) The longest crystals of FXYN grown by the sitting drop vapor diffusion method (4.0 x 1.0 x 0.5 mm in size)