

第3章 放線菌 (*Streptomyces olivaceoviridis* E-86) 由来キシラナーゼの糖結合構造解析

酵素など、基質と作用して生産物を生成するものや、結合蛋白質やレセプターなど特定のターゲットを認識して結合するものなど、蛋白質や核酸などの生体高分子は他の分子と何らかのインターアクションを持つ場合が少なくない。X線結晶解析には、生体高分子間、あるいは生体高分子とリガンド間の複合体でも構造解析を行うことができるという利点がある。生体高分子間、例えば DNA 結合蛋白質/DNA 複合体、抗原/抗体複合体などのX線解析では、まず、複合体を作製して結晶化を行うか、または複合体を作る試料を混合したものを共結晶化させることで結晶化を行う。このとき複合体でない場合と比較すると、結晶化の条件が変わり複合体の結晶は結晶格子の大きさ、さらには結晶格子も違うものになることが普通であり、分子置換法の適用が必要となってくる。生体高分子に低分子のリガンドを作用させて結晶化する場合も共結晶を試みる場合もあるが、まず生体高分子の結晶を複合体にする前に作製しておき、結晶にリガンドをソーキングする方法もよく利用される。これは、生体高分子の結晶が通常水分含量が高く、低分子のリガンドであれば、結晶の中に簡単に入り込むことができるということに依存している。このソーキング法の利点は、複合体の結晶と複合体でないものの結晶が同形かほとんど同形であり、X線データを測定した後の位相計算にもとのモデルがそのまま適応でき、簡単にリガンドの同定が行えることにある。ただし、必ずしもソーキング法が利用できるというわけではなく、リガンドが結合する部位が結晶のパッキングでふさがっていたり、結晶化の条件下ではリガンドとの親和性が低くなったりして複合体が形成されなかったり、リガンドと結合することにより生体高分子の構造変化が起こったり、パッキングに影響を与えることで結晶が壊れたり、モザイシティや分解能などデータに悪い影響を与える場合がある。

酵素の触媒機構や基質結合機構を解明するために、基質や生産物、阻害剤などとの複合体の構造がしばしばX線解析により解析される。酵素の場合、基質との複合体を作製しようとしても、結晶中で反応が起こり、決定された構造には反応生成物が結合していたり、反応が進んで反応生成物が離脱し何も同定できないということもあるので、そのような場合には基質アナログを結合させたり、変異を入れることで酵素の活性を欠失させて複合体を作製する方法も良く利用される。

GH10 キシラナーゼもこれまでに、幾つかの種類でキシロオリゴ糖、あるいはキシロオリゴ糖アナログとの複合体の構造解析が行われている。その中でも、顕著なのは、序論でも述べた Withers らのグループによる 2-fluoro-xylobiose を作用させた触媒反応中間体と考えられる構造の決定である (Notenboom *et al.*, 1998a)。一方、CBM とキシロオリゴ糖の複合体構造もX線解析や NMR 法により解析されている。一般に糖を結合するレクチンなどの蛋白質を見ると、糖結合部位には芳香族アミノ酸があり、スタッキング結合をとっている場合が多く見受けられる (Nagy *et al.*, 1998)。他方、CBM13 については、植物毒素である、リシンやアブリン等に含まれるレクチンドメインとして構造解析が成されており、リシンについてはガラクトオリゴ糖との複合体構造がX線解析により明らかにされている (Rutenber *et al.*, 1987)。これまでの研究で、リシンやアブリンの CBM13 はガラクトース結合レクチンと考えられてきたが、同じ構造を持ちながら、キシランや、 β -1,3-グルカン、シアル酸など別の種類の糖をどのように認識しているのか、糖認識の特異性発現機構は興味深い。

そこで、GH10 の触媒ドメインと CBM13 を同時に持ち合わせている FXYN と各種キシロオリゴ糖、また、ガラクトース及びラクトースの各種糖結合複合体の構造解析を行い、本酵素の触媒機構、糖結合機構を明らかにすることにした。

3-1 方法

結晶化及びデータ測定

FXYN の調製、結晶化は、1-1 に従って行った (Fujimoto *et al.*, 1997)。ハンギングドロップ蒸気拡散法により、0.3 ~ 1 mm 程度の結晶が安定して得られる条件を使用した。複合体解析に用いた糖のうち、キシロース (X1)、ラクトース(Lac)、ガラクトース (Gal)、グルコース (Glc) は和光純薬より、キシロピオース(X2)、キシロトリオース(X3)は Megazyme より購入した。複合体は、結晶に糖をソーキングすることで作製した。

Lac と Gal 複合体は、沈殿剤溶液中 20 mg/ml の糖濃度になるように糖溶液を調製し、それに結晶を約 3 時間ソーキングすることで作製した。データ測定は 20℃で、実験室系 X 線発生装置 Ultrax-18 (Rigaku, X 線は $\text{CuK}\alpha$, $\lambda=1.5418$) 及びイメージングプレート X 線回折測定装置 R-AXIS IV++ (Rigaku) を使用した。回折強度データは 1 つの結晶を用い、振動角 1 度ずつ、120 度の振動角のデータを収集した。カメラ長は 150 mm に設定し、データセットは 100 ~ 約 2 Å の分解能でプログラム CrystalClear (Rigaku) で処理を行った。

X1、Glc、X2 及び X3 複合体はクライオ条件でのデータ測定を行った。そのためにクライオプロテクタントとして、基質自身を沈殿剤溶液に 25-30%になるように溶かし、約 30 秒ソーキングした後、100 K の窒素流下で瞬間凍結した。その後は、先の条件で実験室系で、反射データの測定、処理を行った。

構造解析

構造解析は、既に決定された単独の FXYN の構造 (PDB code 1xyf, Fujimoto *et al.*, 2000) を

初期モデルとし、プログラム CNS を利用し、複合体データに対し rigid-body refinement を行った後、simulated annealing を 5000 K から行い、得られた構造より位相を計算した。その位相を用いて計算された $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ 、および $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ 電子密度図は全て正しく位相が決定されていることを示すものだった。また、ソーキングした糖の電子密度図も全ての複合体について観察されたので、糖のモデルを入れて、モデルの修正をしながら精密化を進めた (Table 3-1)。モデルの表示、修正はプログラム QUANTA (Accelrys) を用いた。その後も、電子密度図を更新しながら、モデルの精密化、水分子の追加を行った。モデルは、プログラム Procheck によりモデルの信頼性を確かめた (Laskowski *et al.*, 1992)。

構造モデルの座標は Protein Data Bank に登録した。FXYN/X1, FXYN/X2, FXYN/X3, FXYN/Glc, FXYN/Gal, FXYN/Lac 複合体についてそれぞれ 1isv, 1isw, 1isx, 1isy, 1isz, 1it0 と登録された。

3-2 結果

全体構造

FXYN の結晶は、触媒部位及び、サブドメイン α 、 γ の周辺が結晶化のパッキングの隙間となり、基質をソーキングすることにより複合体になる空間があったので、本研究の遂行が可能となった。

糖複合体構造はおよそ 2.0 Å 分解能で決定された (Table 3-1, Fig. 3-1)。X線データ測定は FXYN/X1, FXYN/X2, FXYN/X3、及び FXYN/Glc 複合体に関してはクライオ条件下で、FXYN/Gal と FXYN/Lac 複合体に関しては室温で行った。全ての結晶は非対称単位中に 2つの分子 A、B が存在し、これら 2分子の間の二乗根平均誤差は 1.0 Å 以下であった。結晶のパラメーターと精密化の統計値を表に示す。格子定数は、クライオ条件下では、室温の時と比較して全体的に

小さくなっていた。全ての複合体の全体構造はほぼ、複合体でないものと同じであった。複合体構造と複合体でない構造の二乗根平均誤差も 1.0 Å 以下であった。FXYN のモデルは 2 章で述べたとおり、N 末端 301 残基が触媒ドメインである (β/α)₈-バレルであり、C 末端には 123 アミノ酸のリシタイプレクチンドメインを持つキシラン結合ドメイン (XBD) があり、その間には 11 アミノ酸の Gly/Pro リッチリンカー部位でつながれている。このリンカー部分は、304-312 の 9 残基が室温条件下では、電子密度として観測できなかったが、クライオ条件下の測定で、若干の電子密度図が観測された (Fig. 3-2)。中央の Pro-Pro-Pro 残基が、ターンを作っていた。

ソーキングした糖に対応する電子密度は、触媒ドメインの活性クレフトや XBD の結合部位 α 、 γ で観察された。サブドメイン β の糖結合部位は、非対称単位中の 2 分子間の結晶化パッキングのインターフェースとなっており糖の入り込む空間がなく、サブドメイン β には結合する糖は観察されなかった。ソーキング実験の結果を (Fig. 3-3) に示す。

触媒ドメインに結合したキシロオリゴ糖

触媒部位は、2 章の通り、(β/α)₈-バレルの中央にある β -ストランドの C 末端側にある触媒クレフトの底面にある。触媒残基は 2 つのグルタミン酸、Glu128、Glu236 であり、それぞれ酸塩基触媒基、求核基として働く。非対称単位中の 2 分子に対する糖の入り方は、結晶のパッキングの違いもあることより若干の違いは見られるものの、大部分は同じであったので基本的に分子 A についての表記を今後行い、A-B 間で構造の異なるものについては必要があれば表記する。例えば、分子 A では FXYN/X3 の複合体構造ではキシロトリオース分子は一側のサブサイトには -3~-1 に見られたが、+側には +1、+2 の 2 カ所のみを観察された。しかし、分子 B では、一側のサブサイトには -3~-1 に、+側にも +1~+3 に電子密度が観察された (Fig. 3-4)。

FXYN/X2 複合体では、2つのキシロース分子に対応する電子密度が、-側、-2 ~ -1 にも、+側+1 ~ +2 にも観察された (Fig. 3-3, 3-4)。FXYN/X1 複合体では、触媒溝には若干の電子密度はあったものの明瞭なキシロースに対応する電子密度は見られなかった。FXYN/X2 および FXYN/X3 複合体でキシロオリゴ糖の結合様式が共通して見られた部分は、-側のサブサイト-2、-1、+側サブサイト+1、+2 である。サブサイト-1 のキシロースは Glu128、Glu236 の2つの触媒残基の他、Asn127、His81 と水素結合を形成しており、特に Glu128 とはキシロース-1 の O1 酸素原子との間に 2.5 Å と比較的短い水素結合を形成していた。また、Trp85、Trp274、Trp266 に囲まれており、これらのアミノ酸との間に疎水的結合があると考えられた。サブサイト-2 のキシロースは、Glu44、Asn45、Trp266、Lys48 と水素結合を形成していた。サブサイト-3 のキシロースは、FXYN との直接の結合はなく、水を介して Asp50、Gln88 の側鎖と水素結合を形成しているだけであった。+側の電子密度は、-側と比較すると鮮明ではなかったものの、サブサイト+1、+2 と思われるところに電子密度図が観察された。サブサイト+1 のキシロースは、アミノ酸側鎖との水素結合はなかったものの、Tyr172 とのスタッキング相互作用が見られた。サブサイト+2 のキシロースは Asn209、Ser212、Arg275 の3つのアミノ酸側鎖と水素結合を形成していた。また、サブサイト+2 の外側に、1キシロース分子の大きさの電子密度が FXYN/X と FXYN/X2 の複合体構造の分子Aに観察された。キシロース分子を当てはめてみると、Trp179 とスタッキング結合していると思われたが、アミノ酸側鎖との水素結合はなかった。

キシラン結合ドメインに結合したキシロオリゴ糖

FXYN/X1 複合体では、サブドメイン α と γ にそれぞれ1つずつキシロースに対応する電子密度が存在した (Fig. 3-3)。また、FXYN/X2 及び FXYN/X3 複合体では、サブドメイン α にキ

キシロース1つ分の電子密度が、サブドメイン γ にはキシロース2つ分の電子密度が存在した(Fig. 3-3, 3-5a, 3-5b)。但し、サブドメイン γ のキシロースの一つは α に結合したキシロースと同じ結合部位に結合していた。キシロースの O2、O3 原子は結合部位の内側に入り込み、保存されている Asp、Asn 残基(サブドメイン α では Asp325、Asn347、サブドメイン γ では Asp408、Asn430)と水素結合を形成していた。O4 原子は結合部位の表面に位置しており、サブドメイン α では Gln338 と、サブドメイン γ では Gln421 と水素結合を形成していた。サブドメイン α の Tyr340、サブドメイン γ の Tyr423 の芳香環はそれぞれキシロースの糖環とスタッキングによる結合を形成していた。その他、キシロースの O3 原子はサブドメイン α の Pro327、サブドメイン γ の Val410 の主鎖カルボニルと、O2 原子はサブドメイン α の His343 の側鎖と水素結合を形成していた。サブドメイン γ では、水分子が、O2 原子と Ser426 の側鎖との間を介して水素結合を形成していた。以上の結合様式は、結合部位は同じ場所であるにもかかわらず、リシンのB鎖のガラクトースとの結合様式とは異なっていた。

キシラン結合ドメインに結合したガラクトース、ラクトース

XBD と Gal の結合様式は、FXYN/Gal と FXYN/Lac 複合体の構造より明らかとなった(Fig. 3-3, 3-5d, 3-5f)。FXYN/Gal 複合体の構造では、XBD のサブドメイン α と γ に Gal が一つずつ結合していた。Gal 結合様式は、FXYN/X1 複合体等で見られたキシロース結合様式とは異なり、どちらかというとしシンの Gal 結合様式に類似していた。サブドメイン α では Gal 分子の O3、O4 原子が結合部位の内側に入り、Asp325 と水素結合を形成していた。O3 原子は更に His343 と Asn347 の二つの側鎖との水素結合も形成していた。O4 原子も Gln338 の側鎖、及び Asn328 の主鎖カルボニル基との水素結合を形成していた。Gal のピラノース環はいす形であったが、そ

のうち C3-C4-C5 の部分が一部 Tyr340 とスタッキングしていた。サブドメイン γ においても同様の結合様式であった。また、FYXN/Lac 複合体でも、サブドメイン α と γ に電子密度が観察されたが、どちらも明瞭に観察されたのは Lac のガラクトース部分のみで、グルコース部分の電子密度ははっきりとは同定されなかった。しかしながら、2つの結合部位で結合様式が異なっていた。それは、サブドメイン α では、FXYN/Gal 複合体で見られたガラクトース結合様式と同じであったが、サブドメイン γ ではむしろ FXYN/X1 複合体と同じように結合していた (Fig. 3-5e, 3-5f)。即ち、FXYN/Gal と FYXN/Lac 複合体でサブドメイン γ のガラクトース結合様式は2つの異なった様式があることが明らかとなった。

キシラン結合ドメインに結合したグルコース

FXYN/Glc 複合体では、Glc はサブドメイン α 、 γ に結合しており、その方向は FXYN/X1 複合体と同じであった (Fig. 3-5c)。HOCH₂-基の電子密度は明瞭に観察されたが、XBD との直接の結合や衝突は特に見られなかった。また、触媒ドメインや、他の部位には Glc の結合は観察されなかった。

3-3 考察

触媒ドメインのキシロオリゴ糖結合

GH10 キシラーゼ/基質複合体の構造解析は、これまでも様々な種類のものが、様々な方法で行われている。その結果を総合すると、一側の触媒溝のアミノ酸は非常によく保存されているが、+側はそれほど保存されているわけではないことを示している (Charnock *et al.*,

1998)。我々の解析では、FXYN/X2 や FXYN/X3 複合体で、クライオデータの解析により、-側、及び+側のサブサイトにキシロオリゴ糖が同定されている。ところが、前段階実験で、基質の濃度をクライオ条件の時より低い濃度でソーキングし、室温下でデータを取ったところ、-側のサブサイトには基質が同定できたが、+側のサブサイトには基質の電子密度が見られなかった。この結果より、-側のサブサイトは構造が保存されているだけでなく、基質に対する親和性も+側よりも高い、また、+側はより分解産物をリリースしやすいということが分かる。+側に入った基質が観察されたことは、高濃度でかつクライオ条件でデータを取ることにより可能となったと考えられる。

サブサイト-3 は直接の触媒溝との結合はなく、水が介した水素結合のみで結合エネルギーも低いと考えられるが、それに比べるとサブサイト-1、-2 には非常に多くのコンタクトが存在する (Fig. 3-4)。また、3つの Trp 残基を初めとする多くの疎水結合もあり、これが更に強い結合をもたらしていると考えられる。しかし、FXYN/X1 複合体では、高濃度の X1 をソーキングしたにもかかわらず-側のサブサイトにキシロースの明瞭な電子密度は見られず、-側のクレフトはサブサイト-1 と-2 が同時に埋まることで基質を認識できるということが示唆された。本酵素は X3 は分解するが X2 は分解しないことが明らかとなっており (Kusakabe *et al.*, 1977b)、このことから基質の認識に最低-側サブサイトが2つ埋まる必要があるということが理解できる。

+側のサブサイトは、-側のサブサイトに比べると結合力が弱いので、-側のサブサイト-1 が埋まった状態で基質が入っており、そのため若干基質がクレフトからはずれ、かつ曖昧な電子密度が見られたものと思われる。FXYN の+側クレフトは、他の GH10 キシラナーゼと比較すると、クレフトの末端に Asn209-Pro213 のループ領域が突出しているなど大きく構造が異なる。

っている。このループの中の Asn209、Ser212 はサブサイト+2 のキシロースと水素結合を形成しており、この結果サブサイト+2 のキシロースの位置は他の構造解析例と比較して触媒溝の外よりに位置している。さらに、サブサイト+2 より離れたところにもキシロースらしい電子密度が存在したが(サブサイト R と仮に命名)、このキシロース分子は Asn173 との水素結合と Trp179 とのスタッキングで保持されている。しかし、その間をつなぐであろうサブサイト+3 は存在しそうでないことと、+3 に当たる位置のキシロースからサブサイト R にはつながらないことなどからも、本酵素の+側のサブサイトは+2 までであると考えるのが妥当である。

キシラン結合ドメインに結合したキシロオリゴ糖

XBD は2章で述べたように、40 残基ほどの繰り返し配列より形成されており、そのサブドメイン α 、 β 、 γ はアミノ酸配列も構造も類似している (Fig. 2-6)。糖結合サイトにある3つの Tyr 残基のうち、二つずつに変異をかけ結合能を調べた研究では、3つのサブドメインがキシラン及びキシロオリゴ糖に結合すること、その中でも結合部位 β が一番親和性が高いということも明らかとなっている (Kuno *et. al.*, 2000)。ガラクトースがリシンに結合するとき、O3、及び O4 原子が結合部位の内側に入り込み、中央の Asp 残基との結合をとるため、結果的に O2、O3 原子が入り込むキシラン結合様式とは、糖のヘキソース環の向きが異なる (Fig. 3-5)。キシロースの結合は、サブドメイン α と γ ではほぼ同じであるが、その際、O1、O4 原子は結合部位の内側には入り込まず、表面に出てくることになる。その結果、この結合したキシロースは β -1,4-結合で隣に他のキシロース分子がつながっていくことが両方向で可能となり、FXYN/X2 及び FXYN/X3 の複合体のサブドメイン γ で見られたような、キシロオリゴ糖の結合が可能になる。即ち、キシランという長い基質であっても、その中央部に XBD が結合することが可能

であると考えられる。前述のようにサブドメインβは結晶化の相互作用のため、基質が結合している様子を観察することはできなかったが、サブドメインβも他のサブドメインと同様の構造を持っており、サブドメインβをキシロースに結合した他のサブドメインに重ねてみれば明らかのように、サブドメインβもキシラン、あるいはキシロオリゴ糖に同じ結合様式で結合できると予想できる (Fig. 3-6)。その結果、キシランに結合できる同様の結合部位が、3つのサブドメインに存在しているということができる。

分解能 2 Å の電子密度図からキシロースを同定する場合、キシロースの向き、即ち O1、O4 がどちらの方向を向いているかを同定することはできなかった (Fig. 3-5a)。Tyr 残基の芳香環と糖のヘキソース環のスタッキング以外は C5、O5 原子ともに直接、蛋白質との相互作用はなく、電子密度の大きさの違いも明瞭ではない。キシロースのこれら以外の部分は4つの水酸基がすべて equatorial に向いており完全に対称になっていて、方向を区別できない。従って、最初はグルコースの複合体の構造の結果に従って、キシロースのモデルの方向を決定した (Fig. 3-5c)。即ち、グルコースはキシロースと違い5位の炭素原子に HOCH₂-基があり、その電子密度がはっきりと見えたため、糖の方向も同定できた。この場合、O5 原子がスタッキングしている芳香環のピラノース環の遠い側に来ており、酸素原子と芳香環の接近を避けるように結合するのではないかと考えられた。精密化を繰り返していく段階で、サブドメインγに結合したキシロースの O5 原子より水素結合距離にある位置に水分子が同定され、このキシロースの入り方が正しいと考えられた。しかしながら、結合部位αについては確証がなく、また XBD の目的が方向に関係なく基質に結合することであると考えれば、基質に逆に結合したとしても充分目的にかなっていると考えられる。キシロースの向きについては、X線データの分解能を上げる、非対称の基質を入れるなど、今後明らかにしていく必要がある。

キシラン結合ドメインに結合したガラクトース、ラクトース

FYXN/Lac 複合体では、サブドメイン α と γ にガラクトース部分の電子密度が見られたが、2つの結合部位で結合様式が異なっていた (Fig. 3-5d, 3-5e)。それは、サブドメイン α では、FXYN/Gal 複合体で見られたガラクトース結合様式と同じであったが、サブドメイン γ ではむしろ FXYN/X1 複合体と同じように結合しており、FXYN/Gal と FYXN/Lac 複合体でサブドメイン γ は Gal に対し、2つの異なった結合様式で結合できることが明らかとなった。この違いはおそらく結晶のパッキングによるもので、サブドメイン γ の結合部位は隣の分子と比較的近く、Lac のグルコース部分が障害となり、通常の結合ができなくなったものと考えられる。結晶中では、Lac は XBD 表面に接するような結合様式でも結合するが、溶液中では十分に空間があるので、Lac の場合はサブドメイン γ でもサブドメイン α で見られるような Gal 結合様式で結合すると予想される。これらの結果から、XBD は酵素としてはキシランやキシロオリゴ糖を認識するために利用されているにもかかわらず、いまだにガラクトース結合レクチンに見られるような Gal 結合能を持っているということが明らかとなった。キシラン結合部位は各種糖に結合し、さらに Gal に対して2種類の異なる様式で結合するなど、糖に対しての特異性が比較的緩いことが明らかとなった。

FYXN/Lac 複合体では、Gal 分子の O1 の先に連続して電子密度が見られ、これは Lac 分子内のグルコース部分の α -1,4-グルコシド結合で結合した O4 原子に当たると考えられた。即ち、実際に結合しているのは Lac であるが、グルコース部分は揺らいでいる等の理由で電子密度がはっきりしていないものと考えられた (Fig. 3-5f)。リシンの Lac 結合構造では Lac 分子が全て同定されているが、FYXN/Lac 複合体ではガラクトース部分しか見えていない。リシンで Lac 分子のグルコース O3 原子に水素結合していた Asp25 が、XBD では Asn328 に変わっている点

が構造的に異なるが、この点だけで認識力の差が出るということでもなく、結合部位周辺の環境など、微妙な要因でグルコースの認識が変わってしまったのではないかと思われ、いずれにしても XBD の糖結合部位は Gal に対しては単糖認識であると考えられた。

XBD がキシロースと Gal に異なる様式で結合するとしても、糖の結合様式に共通する部分が見出された。Fig. 3-7 に示すように、FYXN/Gal では Asp325 が Gal 分子の O3、O4 原子と水素結合する一方、キシロオリゴ糖に対しては Xyl 分子の O2、と O3 原子に水素結合しており、その場合の Gal 分子の O3-C3-C4-O4 とキシロースの O2-C2-C3-O3 はほぼ同じ位置にあることが分かる。糖のヘキソース環の方向の違いは、Gal 分子の O3、O4 原子と Xyl 分子の O2、O3 原子がそれぞれ重なり、しかも Gal 分子の 4 位水酸基は axial に結合していることによるものであり、結合の強さも環の方向と水酸基の向きの兼ね合いで決まってくると考えられる。通常糖の結合にかかわる芳香環アミノ酸側鎖は糖の向きを決定する強い要因となっているが、XBD の場合は、Tyr 側鎖は完全に糖の位置を決めているわけではなく、どちらかという内側に入り込む 2 つの水酸基を、Asp を始め保存されたアミノ酸からの多くの水素結合で捕まえて結合することが重要であると考えられる。

XBD が Xyl に結合する際、O1、O4 原子が結合ポケットの側面にくることで、 β -1,4 結合により隣の Xyl とリンクすることができ、結果的にキシランなどの長い基質でも結合すると考えられていた (Fig. 3-8)。それに対して、XBD が Gal に結合する場合は、O1 原子は確かに結合部位の外に出るようになり、ラクトースなど O1 を通して結合している糖鎖に対しては XBD は結合できるが、逆に O4 は結合部位内部に埋もれてしまうので Gal の O4 原子から先に延びた糖鎖には結合できないということになる。実際このような結合様式で、リシンは細胞表層の末端 Gal、あるいは Gal 誘導体に、Gal 結合レクチンとして結合している (Rutenber *et al.*, 1987)。

不溶性キシランに対する結合

XBD や CBD の様な CBM は通常不溶性基質の分解を助ける役割がある。前章でも述べたが、*Thermomonospora fusca* 由来のセルラーゼ E4 は、糖分解酵素 GH9 のセルロースの触媒ドメインに CBM3 の CBD、即ちセルロース結合部位が存在し、CBD が触媒ドメインと 1 直線上に並び直鎖セルロースを結合し触媒ドメインに送るというマルチドメイン機構がある (Sakon *et al.*, 1997)。CBD と触媒ドメインはそのために直接隣り合っており、おそらく相対的關係を保持するために両ドメインが離れることはないと考えられる。然るに、FXYN の XBD の場合は、結晶中ではある程度のコンタクトはあるにしろ、実際はリンカーでつながれながらも溶液中ではお互いに独立して動いていると考えられるため、XBD は基質に結合することはあっても、その基質を触媒ドメインに送るという機能はないと考えられる。Fig. 3-9 にはキシロヘプタオース (X7) を XBD の 3 つの糖結合部位にドッキングしたモデルを示している。X7 は標準的なキシラン主鎖の 3 回らせん構造をもとに、また、実際に得られたキシロオリゴ糖結合構造に基づいてモデルを作製した。結晶構造に基づいて考えると、XBD に結合した X7 で、そのまま直接触媒ドメインの触媒溝に向いているものはない。キシランの主鎖は、セルロースと比較すると若干自由度があるので、曲がることにより 2 つのドメインを渡る可能性も考えられるが、そうであっても触媒溝で分解反応が起こるためには、基質が正確に触媒溝に結合する必要がある。このためには、リンカー部分の可動性と、それによる触媒ドメインの基質へのアクセスが必要である。XBD の役割が単に基質に結合するだけで、触媒部位に基質を送る訳ではないと考えると、3 つの結合部位を持っているということは単純に、XBD が基質を結合する可能性を高めるといふことであり、その結果として触媒部位が分解をする可能性を高めているものと考えられる。

キシラン結合部位は水素結合及び Tyr 残基のスタッキングにより主として 1 つの Xyl を認識

することを明らかにした。FXYN/X3 複合体などでは、サブドメイン γ で、X2 に相当する電子密度が見られたが、結合部位からはずれた Xyl には XBD との直接の結合は見出されなかった。

しかし、久野らの研究の結果、XBD に結合した不溶性キシランにたいしては、X3 以上の長いキシロオリゴ糖がより高い確立で置き換わるということが明らかとなっており (Kuno *et al.*, 2000)、結合部位に結合している Xyl とは別の場所でも長いキシロオリゴ糖に結合する場所があるのではないかと考えられてきた。サブドメイン α における His343 やサブドメイン β の Trp383 はその候補であり、中央の Tyr 残基と併せて、隣り合う2つのキシロースを認識するダブルスタッキング結合をとっている可能性も示唆された。特に Tyr380、Trp383 はその位置関係から他の CBM でキシランを結合する際に見られるツイストスタッキングをとることが可能であると考えられ、今後サブドメイン β における結合の様子を構造解析等で明らかにすることが必要だと思われる。

FXYN と酷似している *S. lividans* 由来 CBM13 の糖結合特性では、それぞれのキシラン結合部位のキシロース、キシロオリゴ糖に対する親和性は 10^2 から 10^3 M と見積もられ比較的低いが、長い基質に対して2つの結合部位が結合することで相乗的に強い親和性が発揮されると報告されている (Boraston *et al.*, 2000)。残念ながら長いキシロオリゴ糖は不溶性が高く、酵素での分解も考えられるので、複合体として構造解析をすることは困難である。先程の X7 の結合モデルでみると、一つの結合部位から他の結合部位に向かっているキシラン鎖は存在せず、2つの結合部位をまたぐような結合をするためにはキシラン鎖が湾曲する必要がある。また、その際例えば、結合部位 γ に結合したキシラン鎖がその後結合部位 α に届くためには、キシラン鎖が湾曲する必要に加え、いったん結合部位 γ で結合したキシラン鎖は、結合部位 α では反対の方向を向いているので、 α で結合するキシランの向きは反対になるか、あるいはかなり遠回

りをして同じ向きに結合するかのどちらかということになる。実際、XBD のキシラン認識は、先に述べたように、裏表どちらで認識している状態かははっきりとしていないので、いったん結合したキシラン鎖が別の部位に反対に結合する可能性もある。しかし、不溶性キシランについての情報がまだあまりないのも事実ではあるが、一つのキシラン鎖が XBD の2カ所に結合するよりも、複雑に絡み合った不溶性キシランの別々の鎖が同時に2つ以上の XBD の結合部位に結合してより強い親和性を発揮する、という方が、現在のところ可能性があるのではないかと思われる。リシンの場合の様に、別々のドメインにある2つのガラクトース結合部位 1 α 及び 2 γ がより大きな Gal 糖鎖に結合することができ、それによって大きな親和性を表現しているという例もある。FXYN はただ一つの XBD しか持っていないが、それでも不溶性キシランという入り組んだ糖鎖をターゲットにすることによって、レクチンに見られるような、糖鎖のマルチ部位認識を実行して効率を高めているのではないかと推定される。

XBD の糖結合部位は比較的低い親和性を持つので、XBD 自体は、キシロオリゴ糖を簡単に離すことも予想される。XBD を持たない触媒ドメインだけでも、不溶性キシランに対して、半分ほどの触媒活性を持つことから、キシラナーゼにとって、XBD は不溶性キシランに対する高効率な触媒活性のためのモジュールである。この点からいえば、たとえ XBD のキシランに対する親和性が低かったとしても、基質のリリースのターンオーバーの速度が早く、触媒ドメインはそれだけ基質の様々な部位を切断する機会に恵まれることになる。特に XBD がより長い基質に対して親和性が高いとすれば、XBD が不溶性キシランに結合しやすく、触媒ドメインで切断され短くなったキシロオリゴ糖を素早く放出ということが期待され、酵素としては非常に効率的な反応機構をとっていると考えられる。