

第4章 放線菌 (*Streptomyces olivaceoviridis* E-86) 由来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

序章でも述べたように、 β -1,4 グルコシド結合がうまく反転していくことでセルロースは直線的にのびており、枝分れもない。それに比べると天然のキシランは、緩やかな螺旋状構造をとっていたり、水酸基がアセチル化されていたり、アラビノース (Araf) や、グルクロン酸、グルクロン酸メチル (MeGlcUA) 等が側鎖についているなど、その構造は未だ未解明な部分が多い (Fig. 4-1)。天然のキシランをキシラナーゼで分解してみても、その分解物にはキシロオリゴ糖以外に、アラビノキシロオリゴ糖、グルクロノキシロオリゴ糖など、側鎖がついたキシロオリゴ糖が得られ、その解析結果よりしばしば酵素の特異性が決定される (Yoshida *et al.*, 1990)。

FXYN の天然のキシランに対する特異性も、生成物の解析を行うことにより詳細に研究されてきた (Yoshida *et al.*, 1990)。FXYN を oat-spilt xylan に作用させたときの生成物を Fig. 4-2 に示す。FXYN がキシロオリゴ糖に作用するときは、最終産物としてキシロースと X2 を生産することから、FXYN は X3 以上の長さのものは分解するが、X2 は分解しないということが明らかとなっている (Kusakabe *et al.*, 1977b)。しかし、側鎖が入ったキシランに対しては、側鎖の影響で X3 でも場合によっては切断できないことを示している。アラビノキシラン、及びグルクロノキシランに対して FXYN の切断部位は、生成物解析により Fig. 4-3 のように結論づけることができる。

最近、側鎖の入ったガラクトマンノペンタオースと *Thermotoga maritima* の CBM27 との複合体が X 線結晶解析で構造解析され、CBM では側鎖付きオリゴ糖との複合体の最初の解析例となっている (Boraston *et al.*, 2003)。一方、側鎖のついたキシロオリゴ糖は、*Penicillium*

simplicissimum 由来のキシラナーゼ触媒ドメインにソーキングした例がある (Schmidt *et al.*, 1999)。そこで、今回は、側鎖付きキシロオリゴ糖が GH10 の触媒ドメイン及び CBM13 に結合する様式を解明することを目的として、Fig. 4-4 に示す 4 種類の側鎖付きキシロオリゴ糖を用い、マルチドメインの FXYN との複合体の構造解析を試みることにした。

4-1 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、4-O-メチルグルクロノキシロオリゴ糖 (Fig. 4-4, MeGlcUA-X2, MeGlcUA-X3) は Megazyme より購入した。また、アラビノキシロオリゴ糖は (Fig. 4-4, Araf-X2, Araf-X3) クマイザサ (*Sasa senanensis* Rehd) に FXYN を反応させることで調製し、精製されたものを用いた (Yoshida *et al.*, 1998)。複合体は、結晶に糖をソーキングすることで作製した。

側鎖付きキシロオリゴ糖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、リガンド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 に冷やされた窒素流下で瞬間凍結した。X線データ測定は実験室系、あるいは PF にて行った。実験室系では、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 の分解能巾でプログラム CrystalClear (Rigaku) で処理を行った。PF でのデータ測定はビームライン BL6A または BL6B において行

った。BL6A では ADSC Quantum R4 CCD 検出器 (ADSC, USA) を用いて回折データを測定した。0.1 mm のコリメーターを用い、0.978 Å の波長、95 K 下で測定を行った。BL6B ではイメージングプレート X線回折測定装置 R-AXIS IV++ (Rigaku) を使用して回折データを測定した。0.1 mm のコリメーターを用い、1.0 Å の波長、95 K 下で測定を行った。どちらのビームラインでも回折強度データには 1 つの結晶を用い、振動角 1 度ずつ、150 度の振動角のデータを収集した。データセットは 100 ~ 1.9 Å の分解能巾でプログラム DPS/Mosflm (Rossmann & van Beek, 1999) で指数付け及び強度解析を行った (Table 4-1)。

構造解析

構造解析は、既に決定された X2 または X3 と FXYN の複合体構造 (PDB code 1isw, 1isx) を初期モデルとし、プログラム CNS (Brünger *et al.*, 1998) で複合体データに対し、一度 rigid-body refinement を行った後、simulated annealing を 5000 K で行い、得られた構造より位相を計算した。得られた $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ 、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。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)。

4-2 結果

全体構造

側鎖付きキシロオリゴ糖複合体構造は 1.8 ~ 2.1 Å 分解能で決定された (Table 4-1, Fig. 4-5)。

全ての結晶には非対称単位中に 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 1.0Å 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。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。ソーキングした糖に対応する電子密度は、キシロオリゴ糖との複合体の場合と同じく、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。ソーキング実験の結果を Fig. 4-6 に示す。

触媒ドメインに結合した側鎖付きキシロオリゴ糖

FXYN/Araf-X3 複合体では、Araf-X3 に対応する電子密度が-側サブサイト -3 ~ -1 に観察されたが、+側には 2 つの Xyl に対応する電子密度がサブサイト +1 ~ +2 にしか観察されなかった (Fig. 4-6, 4-7)。側鎖である Araf 基はサブサイト-2 の Xyl の 3 位の水酸基に α -1,3-結合でつながっており、Araf 基の 3 位の水酸基と Asp272 の主鎖カルボニルと Glu44 の側鎖との間で水素結合を形成していた。FXYN/Araf-X2 複合体では、Araf 基の電子密度は観察されなかったが、2 つの Xyl に対応する電子密度が-側、サブサイト -2 ~ -1、+側サブサイト +1 ~ +2 に見られた。どちらの複合体でもキシロオリゴ糖自体は、前章におけるキシロオリゴ糖複合体のように多くの水素結合、疎水結合でサブサイトに結合していた。

また FXYN/MeGlcUA-X3 複合体では、MeGlcUA-X3 に対応する電子密度が-側サブサイト -3 ~ -1 に観されたが、+側には 2 つの Xyl に対応する電子密度がサブサイト +1 ~ +2 にしか観察

されず、FXYN/Araf-X3 複合体の場合と同じ結果になった (Fig. 4-6, 4-8)。側鎖である MeGlcUA 基はサブサイト-3 の Xyl の 2 位の水酸基に α -1,2-結合でつながっていたが、特に蛋白質との間のコンタクトはなく、溶液領域に存在した。MeGlcUA 基のピラノース環は、通常の椅子型コンフォーメーションをとっており、2 位、3 位の水酸基、4 位のメトキシ基 5 位のカルボキシル基は全て equatorial 位置に存在した。FXYN/MeGlcUA-X2 複合体では、非対称単位中の 2 つの分子間で結果が異なっていた。分子 A では、触媒溝には結合したりガンドは観察されなかったが、分子 B では、サブサイト -2 ~ -1 に 2 つの Xyl に対応する電子密度が観察された。

キシラン結合ドメインに結合した側鎖付きキシロオリゴ糖

FXYN/Araf-キシロオリゴ糖複合体では、2 種類の複合体でサブドメイン α および γ のどちらにも結合した糖鎖が見られたが、Araf-基がはっきりと見られたのはサブドメイン γ だけであった (Fig. 4-6, 4-9)。Araf-キシロオリゴ糖のキシロオリゴ糖部分の結合様式は 3 章で行ったキシロオリゴ糖の複合体の結合様式とほぼ同じであった。XBD の結合部位はキシロオリゴ糖の一つの Xyl を単糖認識していると考えられている。その際、その Xyl の O2 および O3 酸素原子は結合部位の内側を向いて保存されている Asp, Asn 残基と水素結合しており、サブドメイン α の Tyr340、サブドメイン γ では Tyr423 の芳香環とスタッキング結合しているのは 3 章で述べたとおりである。FXYN/Araf-X2 複合体のサブドメイン γ では、還元末端の Xyl が結合部位に結合しており、Araf-基はその隣の非還元末端方向の Xyl に α -1,3-結合でリンクしていた。O1 及び O4 水酸基を通じて β -1,4-結合でつながることにより、隣の Xyl は 2 つの方向に延長されていくので、理解しやすくするために、保存されている Gln 残基に近い方を γ_{QI} 部位、その反対を Asn 残基にちなんで γ_{NI} 部位と名前を付けることにする (Fig4-6, 4-9a)。この場合、Araf-基の結合してい

る Xyl は γ_{Q1} 部位に位置していたことになる。Araf-基自体には蛋白質との直接のコンタクトはなかった。一方、FXYN/Araf-X3 複合体のサブドメイン γ では、Araf-X3 全体の構造が観察されたが、非還元末端の Xyl が γ 結合部位に結合しており、Araf-基はその隣の γ_{N1} 部位にある X3 の中央の Xyl に α -1,3-結合でリンクしていた。Araf-基自体は外側を向いており、蛋白質との直接のコンタクトはなかった。

Araf-基自体の構造は、触媒ドメインと XBD では異なっていることが観察された。Fig. 4-10 に両者の構造と $F_{obs}-F_{calc}$ オミット電子密度図を示す。構造の違いは、フラノース環のパッカリングの違いによるものであり、それによって水酸基や $HOCH_2$ -基の方向がかなり異なっていた。フラノース環のパッカリングは Araf-基の水素結合様式により変わっているように思われた。触媒ドメインでは Fig. 4-7 にあるように、2 位の水酸基が Asp272 の主鎖、Glu44 の側鎖と水素結合を形成しているのに対し、XBD に結合した状態では、蛋白質との水素結合がない代わりに Fig. 4-10b に見られるような分子内水素結合を形成していた。

FXYN/MeGlcUA-キシロオリゴ糖複合体では、結合した糖鎖は FXYN/MeGlcUA-X2 複合体、FXYN/MeGlcUA-X3 複合体のサブドメイン α 、 γ 全てに観察されたが、MeGlcUA-基がはっきりと決定できたのは、FXYN/MeGlcUA-X2 複合体では両方、FXYN/MeGlcUA-X3 複合体ではサブドメイン α のみだった (Fig. 4-6, 4-9c, 4-9d)。FXYN/MeGlcUA-X2 複合体では、サブドメイン α 、 γ の両方に同じように MeGlcUA-X2 が結合していた。即ち、還元末端側の Xyl が結合部位に結合し、MeGlcUA-基はその隣の α_{N1} 部位あるいは γ_{N1} 部位にある非還元末端側 Xyl に α -1,2 結合でリンクしていた。MeGlcUA-基は Araf-基自体は外側を向いており、蛋白質との直接のコンタクトはなかった。FXYN/MeGlcUA-X3 複合体でも MeGlcUA-X3 分子は両方のサブドメインに結合していたが、その結合様式は異なっていた。サブドメイン α では、中央の Xyl が結合部

位に結合し、MeGlcUA-基は α_{N1} 部位にある非還元末端側の Xyl に結合しており、その結合様式は FXYN/MeGlcUA-X2 複合体で見られたものと同様であった。しかし、サブドメイン γ では、還元末端側の Xyl 基が結合部位に結合しており、反対側にリンクしているはずの MeGlcUA-基の電子密度は観察されなかった。

4-3 考察

触媒ドメインに結合した側鎖付きキシロオリゴ糖

触媒溝の γ 側では、サブサイト-2 ~ -1 はキシロオリゴ糖に対し強い親和性があると考えられており、結合するオリゴ糖もこの2つのサイトに優先的に結合する。FXYN/Araf-X2、FXYN/Araf-X3 両複合体においてこれらのサブサイトはその中のキシロオリゴ糖部分に結合し、Araf 基は Araf-X3 のサブサイト-2 の Xyl に見られた。FXYN/Araf-X3 複合体では、Araf 基はサブサイト-3 の Xyl と触媒溝との間にきつく挟み込まれているが、FXYN/Araf-X2 複合体では、Araf 基が観察されなかったことから、隙間が大きく α -1,3-結合の自由度が高かったと思われる。 β 側では Araf 基は観察できなかったが、FXYN/Araf-X2 複合体ではその糖の構造から Araf 基はサブサイト+1 の Xyl に、FXYN/Araf-X3 複合体では Araf 基はサブサイト+2 についているものと考えられる。サブサイト+2 の Xyl の3位の水酸基は Arg275 と水素結合をしてはいるものの、Arg275 が長い側鎖であること、キシラン主鎖の β -1,4-結合がフレキシブルであることを考えるとサブサイト+2 の Xyl の3位に側鎖が入ることも可能であると考えられる。これらの結果は、FXYN がアラビノキシランの Araf 基のついた Xyl から非還元末端方向への最初と2番目、還元末端方向への2番目の β -1,4-結合を分解できるという反応特異性の結果と一致している (Fig. 4-3)。FXYN は還元末端への最初の β -1,4-結合は分解できない。これは、Araf 基がサブサイト-1

に入った Xyl の 3 位の水酸基に結合できないことを示しているが、このサブサイト-1 の 2 位と 3 位の水酸基はサブサイトの奥に入り込んでいるからであると考えられる。

また、MeGlcUA 基のついた複合体の結果からは、MeGlcUA 基は一侧の触媒溝のサブサイト-3 の位置の Xyl には結合できるが、サブサイト-2 の位置（そして-1）には結合できないことが明らかとなった。サブサイト-2 の Xyl の 2 位の水酸基は Trp266 の Ne 原子と水素結合を形成し、さらに Trp274 に覆われクレフトの内部を向いているため、MeGlcUA 基はサブサイト-2 の Xyl には入れないと考えられる。表面モデルで見ると理解しやすいので、Fig. 4-11 に Araf-MeGlcUA-X3 をドッキングしたモデルを示す。Trp274 と Gln88 は一侧のクレフトの入り口に当たり、サブサイト-1 の 2 位、3 位、サブサイト-2 の 2 位の水酸基は内部を向いているが、サブサイト-2 の 3 位及びサブサイト-3 の 2 位、3 位の水酸基は外を向いている。クレフトの外側は充分開けており、Araf-はサブサイト-2 に充分結合するだけの場所がある。しかし、MeGlcUA 基はサブサイト-2 には結合できない。+側サブサイトは弱い親和性のため、側鎖は揺らいでおり観察できなかった。しかし、サブサイト+1 の 2 位、3 位の水酸基は外を向いており、おそらくはどんな側鎖でも結合できると考えられた。

キシラン結合ドメインに結合した側鎖付きキシロオリゴ糖

FXYN/Araf-キシロオリゴ糖複合体では、2 種類の複合体のどちらもサブドメイン γ で結合された糖鎖が見られたが、FXYN/Araf-X2 複合体と FXYN/Araf-X3 複合体の場合を比較すると、Araf-基は γ 結合部位の反対側に存在していることになり、Araf-基の結合した Xyl は結合部位の両側に入る事ができた。結合部位の Xyl 基の O3 原子は結合にかかわり結合部位の奥に埋まっているため、Araf-基の結合した Xyl が結合部位に結合することはないと考えられた。

また、FXYN/Araf-X2 複合体と FXYN/MeGlcUA-X2 複合体との間で、サブドメイン γ の糖結合様式を比較してみると、両方とも結合部位は還元末端の Xyl を認識しているが、その隣になる側鎖がリンクしている Xyl は結合部位の反対の位置に存在するということが分かる。すなわち、これら二つの糖鎖では、結合したキシロオリゴ糖の向きが反対になっているということが分かる。3章でのキシロオリゴ糖の同定では、キシロースやキシロオリゴ糖の電子密度の高い対称性のため、分解能 2 Å 程度では O1-O4 の方向は同定できず、一つの可能性として、Glc の結合構造からその方向を定めた。Glc は C5 炭素位置に HOCH₂-基があり、この位置が定まることで自動的に糖の向きも決定できる。側鎖付き糖鎖の場合も、側鎖があることで糖の対称性をなくし、キシロオリゴ糖の方向を決定することができた。また、糖鎖が電子密度で見えない場合でも、電子密度がとぎれていたり、糖の結合状態の可能性を考えることで、糖鎖の方向を決定することができた。キシロオリゴ糖の方向は Fig. 4-6 に示したとおりとなった。

FXYN/MeGlcUA-キシロオリゴ糖複合体では、MeGlcUA-基はすべて XBD の結合部位の同じ側に位置しており、糖鎖の向きも全て、3章で決めたものと逆向きであった。これはおそらく、キシロオリゴ糖が順方向を向いたときは、 r_{Q1} 部位にある Xyl の O2 酸素原子が XBD の方向を向き MeGlcUA-基が位置的に置き換われなくなるからだと思われる。FXYN/Araf-X2 複合体のサブドメイン α では、キシロオリゴ糖はやはり逆向きに結合していた。即ち、XBD は Araf-基で置き換わった Xyl の還元末端側の隣の Xyl に結合するときは両方向に、また、非還元末端側の Xyl にも少なくとも 1 方向には結合できることが示された、と考えられる。

以上の結果は、XBD はキシランの主鎖に対してどちらの方向でも認識できるということを示した。また、XBD が側鎖付きのキシロオリゴ糖、即ち天然キシランの Araf-基、MeGlcUA-基のすぐ隣の Xyl に結合できるということ、およびその結合様式も明らかになった。XBD の役割は

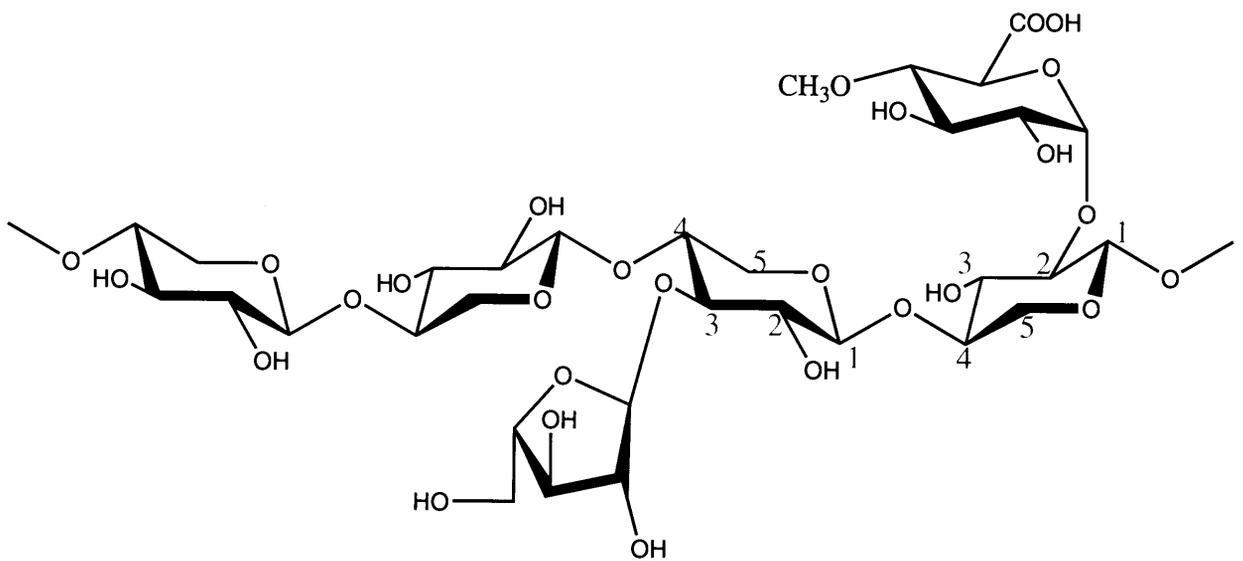
基質と結合することであり、基質を触媒ドメインに送ることではないので、基質に多様な様式で結合できるということが、結合部位を3つ持っているということと相まって、触媒ドメインの天然キシランの分解の可能性を高めるという効果を持っていることが明らかとなった。

Table 4-1 Crystal parameters and refinement statistics of the SoXyn10A/sugar complexes.

Ligand	Araf-X2	Araf-X3	MeGlcA-X2	MeGlcA-X3
Cell parameter ($P2_12_12_1$)				
a (Å)	75.3	78.6	79.0	74.5
b (Å)	94.2	94.0	93.8	94.2
c (Å)	137.7	139.1	138.3	137.4
Experiment				
	Rigaku	PF6A	PF6B	Rigaku
Resolution (Å)	30-2.1 (2.18-2.10)	30-1.9 (1.97-1.90)	30-2.0 (2.07-2.0)	30-2.1 (2.18-2.1)
No. of reflections	56,504 (5,425)	80,951 (8,083)	68,082 (6,456)	56,625 (5,568)
Completeness (%)	97.7 (95.8)	99.0 (99.8)	97.1 (93.2)	99.0 (98.6)
R -factor (%)	22.0 (28.7)	18.6 (23.2)	17.4 (19.2)	19.4 (23.0)
R_{free} -factor (%)	25.8 (34.4)	21.4 (26.8)	20.9 (25.1)	23.4 (28.3)
Average B-factor (Å ²)	32.1	21.9	27.9	21.4
Rmsd Bond (Å)	0.006	0.005	0.005	0.005
Rmsd Angle (°)	1.38	1.37	1.28	1.25

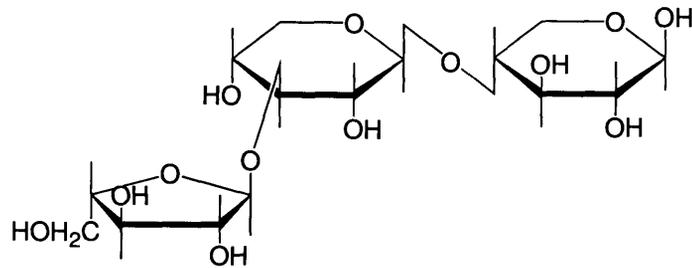
R_{free} -factor was calculated using 10 % of the unique reflections.

4-O-Methyl- α -D-Glucuronosyl residue (MeGlcA)

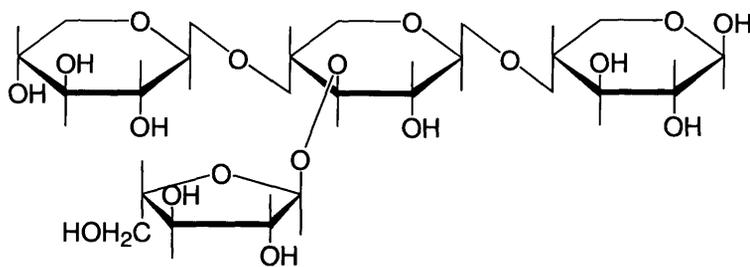


α -L-Arabinofuranosyl residue (Araf)

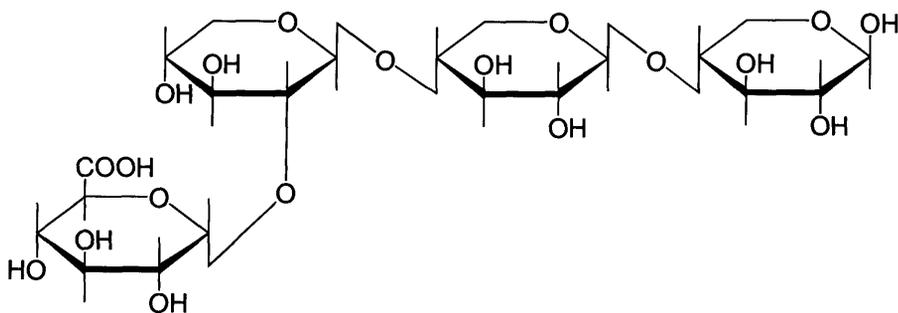
Fig. 4-1 Partial chemical structure of arabinoglucuronosyl xylan from annual plants.



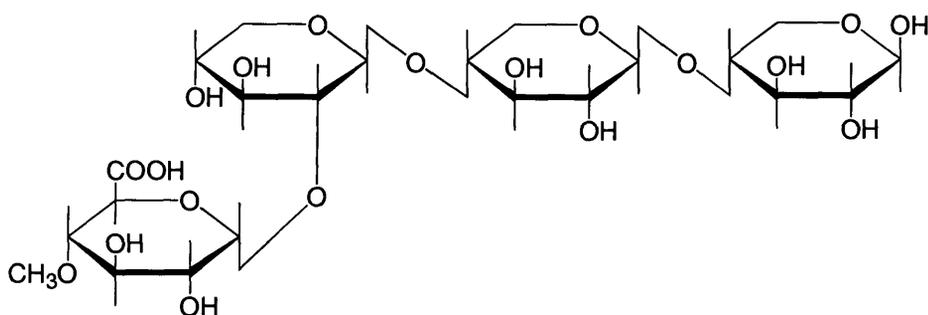
2²-α-L-arabinofuranosyl-xylobiose (Araf-X2)



3²-α-L-arabinofuranosyl-xylotriase (Araf-X3)



3³-α-D-glucuronosylxylobiose (GlcUA-X2)



3³-4-O-methyl-α-D-glucuronosylxylotriase (MeGlcUA-X3)

Fig. 4-2 Side-chain substituted xylooligosaccharides produced by the FXYN from the oat-spilt xylan.

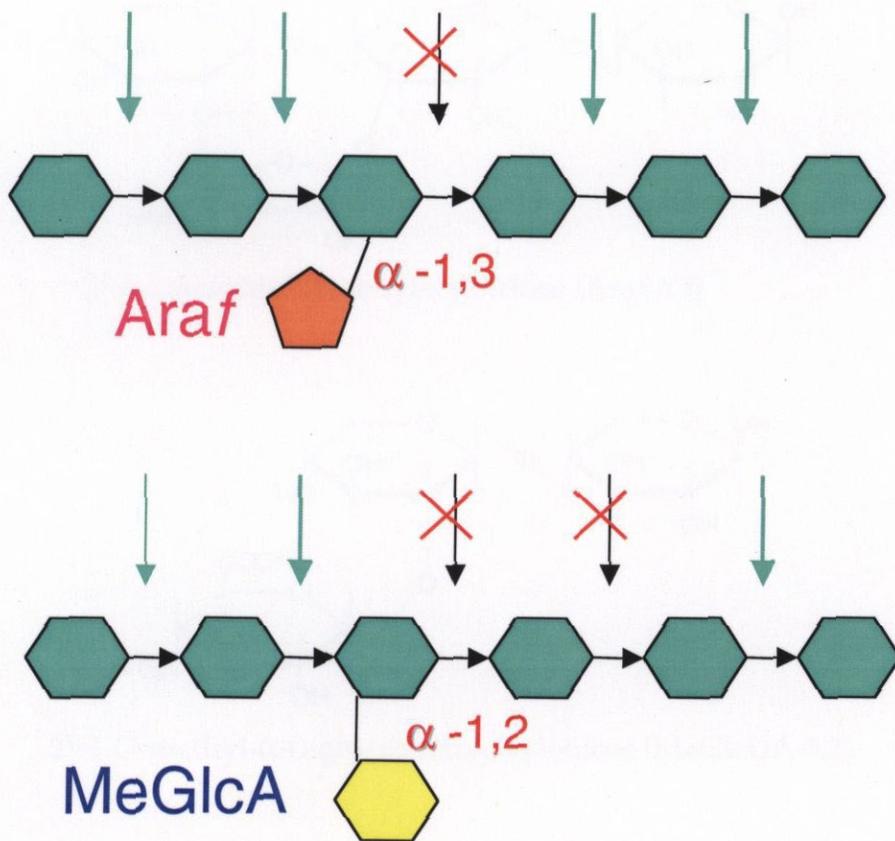


Fig. 4-3 Specificity of FXYN toward arabinoglucuronoxylan.

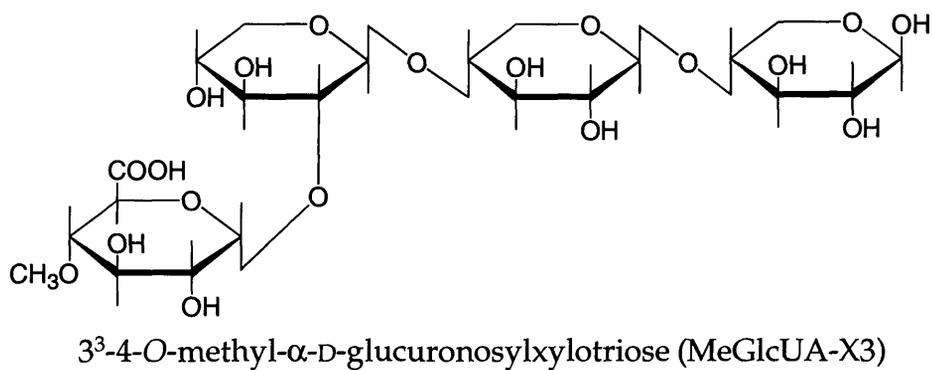
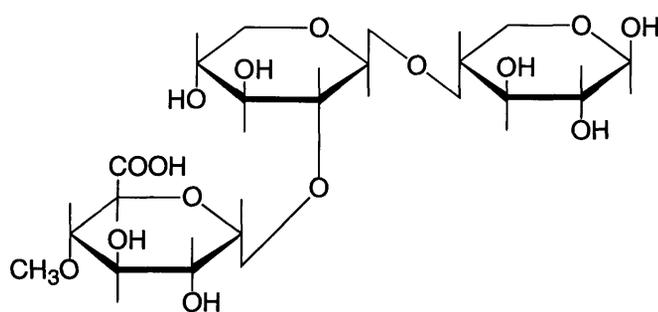
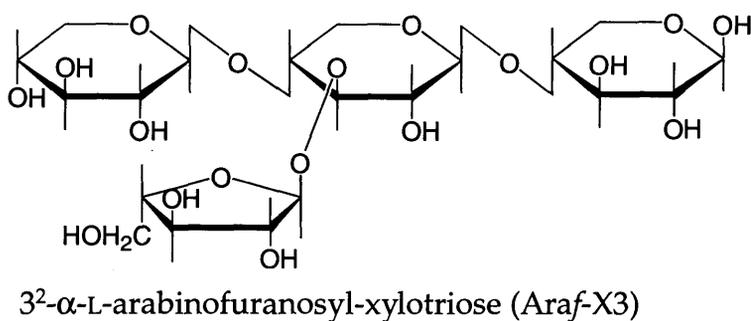
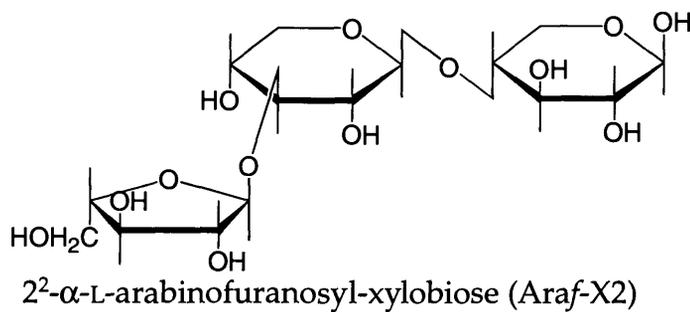
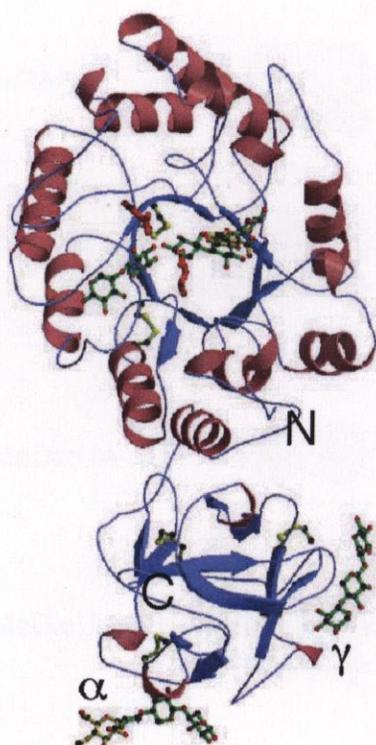


Fig. 4-4 Side-chain substituted xylooligosaccharides used in the X-ray analyses.

(a)



(b)

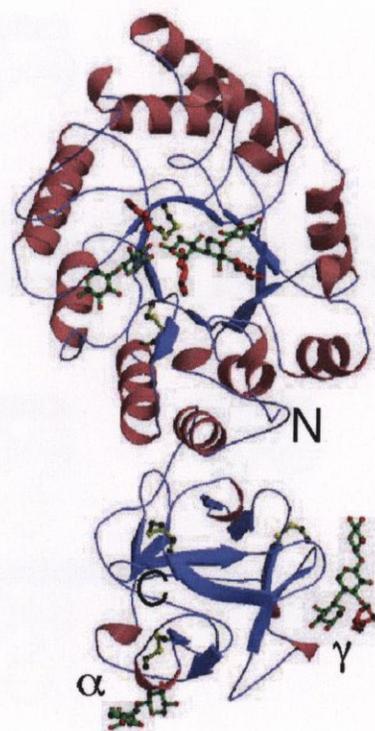


Fig. 4-5 Ribbon models of (a) FXYN/AraF-X3 and (b) FXYN /MeGlcUA-X3 complexes. The catalytic domain, linker, and subdomains α -helices and β -strands are drawn in magenta and blue, respectively. Two catalytic residues are displayed in red. Soaked sugars and disulfide bonds are indicated by ball-and-stick drawings, where the xylose moieties, AraF moieties, MeGlcUA moieties and cysteine residues are shown in green, orange, yellow and light green, respectively. The figure was drawn with the programs Molscrip (Kraulis, 1991) and Raster3d (Merritt, 1994).

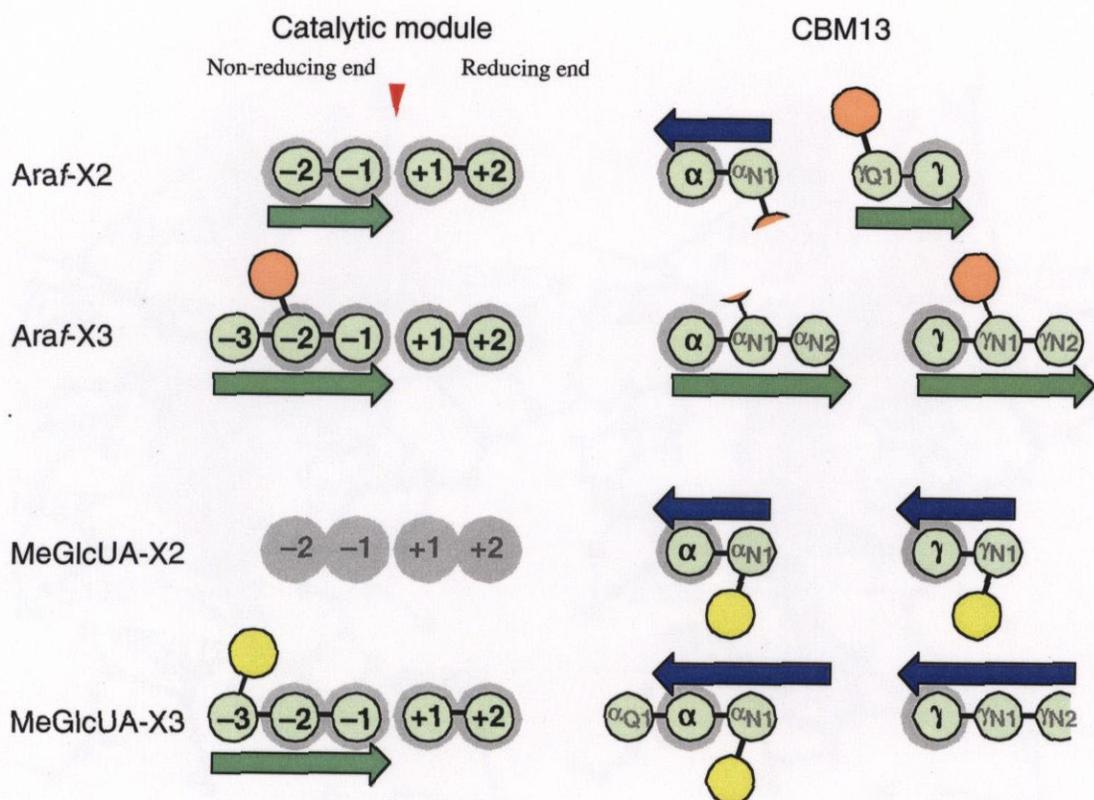


Fig. 4-6 Sugar binding diagram at the sugar binding sites of molecule A of FXYN in the substituted sugar complex structures. Red triangle indicates the cleavage site and gray solid circle indicates the possible sugar binding sites with the subsite or subdomain names. Bound sugars are shown in green, orange and yellow circles corresponding to xylose, Araf and MeGlcUA units, respectively. Incomplete circle indicates the sugar whose electron density was partly observed. Arrows indicate the direction of the xylooligosaccharides from the non-reducing end to the reducing end. α and γ show the xylose binding sites of the subdomains α and γ , and α _{N1}, α _{Q1}, γ _{N1}, γ _{Q1}..... indicate the adjacent position of the xylose binding sites.

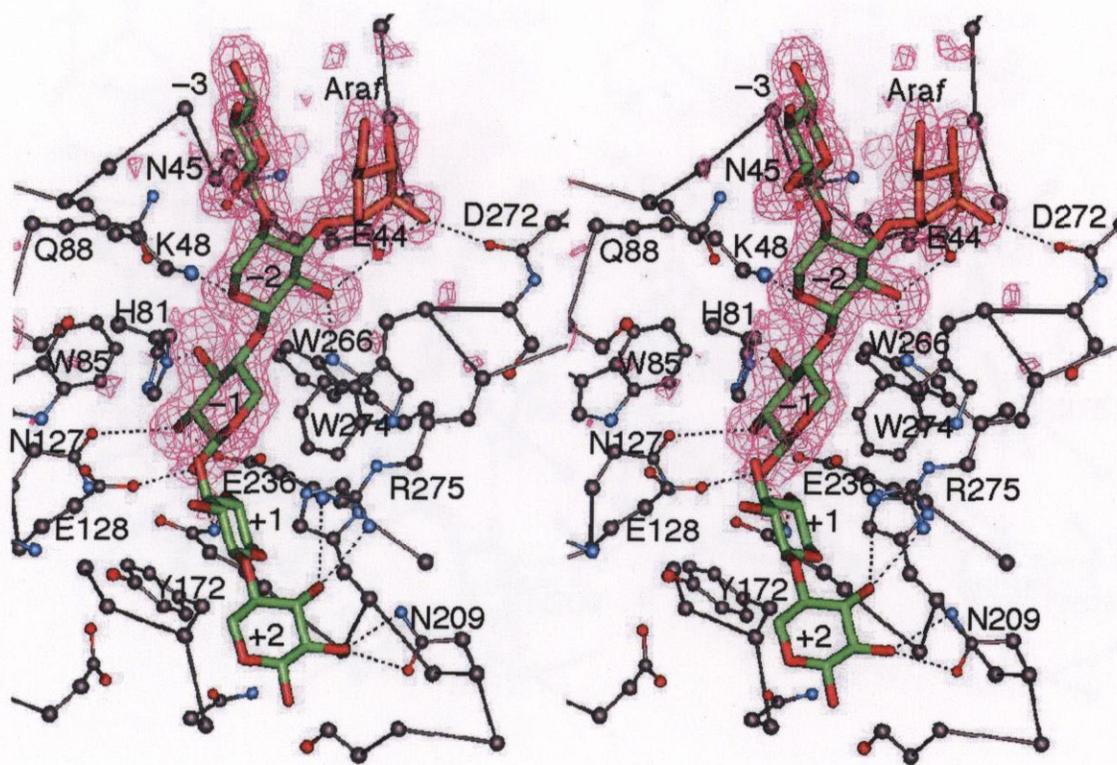


Fig. 4-7 Stereo view of the bound Araf-X3 in the catalytic cleft, with the $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ omit electron density maps for the substituted xylooligosaccharides in the (-) side of the cleft contoured at 2.5σ .

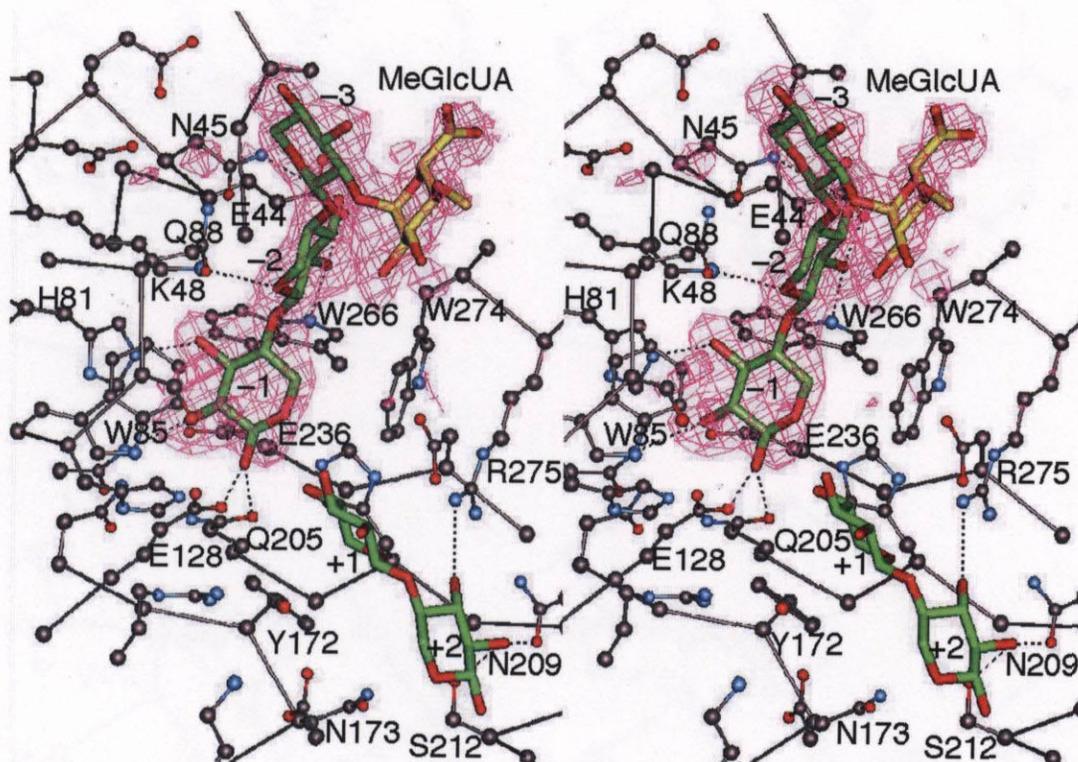


Fig. 4-8 Stereo view of the bound MeGlcUA-X3 in the catalytic cleft, with the $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ omit electron density maps for the substituted xylooligosaccharides in the (-) side of the cleft contoured at 2.5σ .

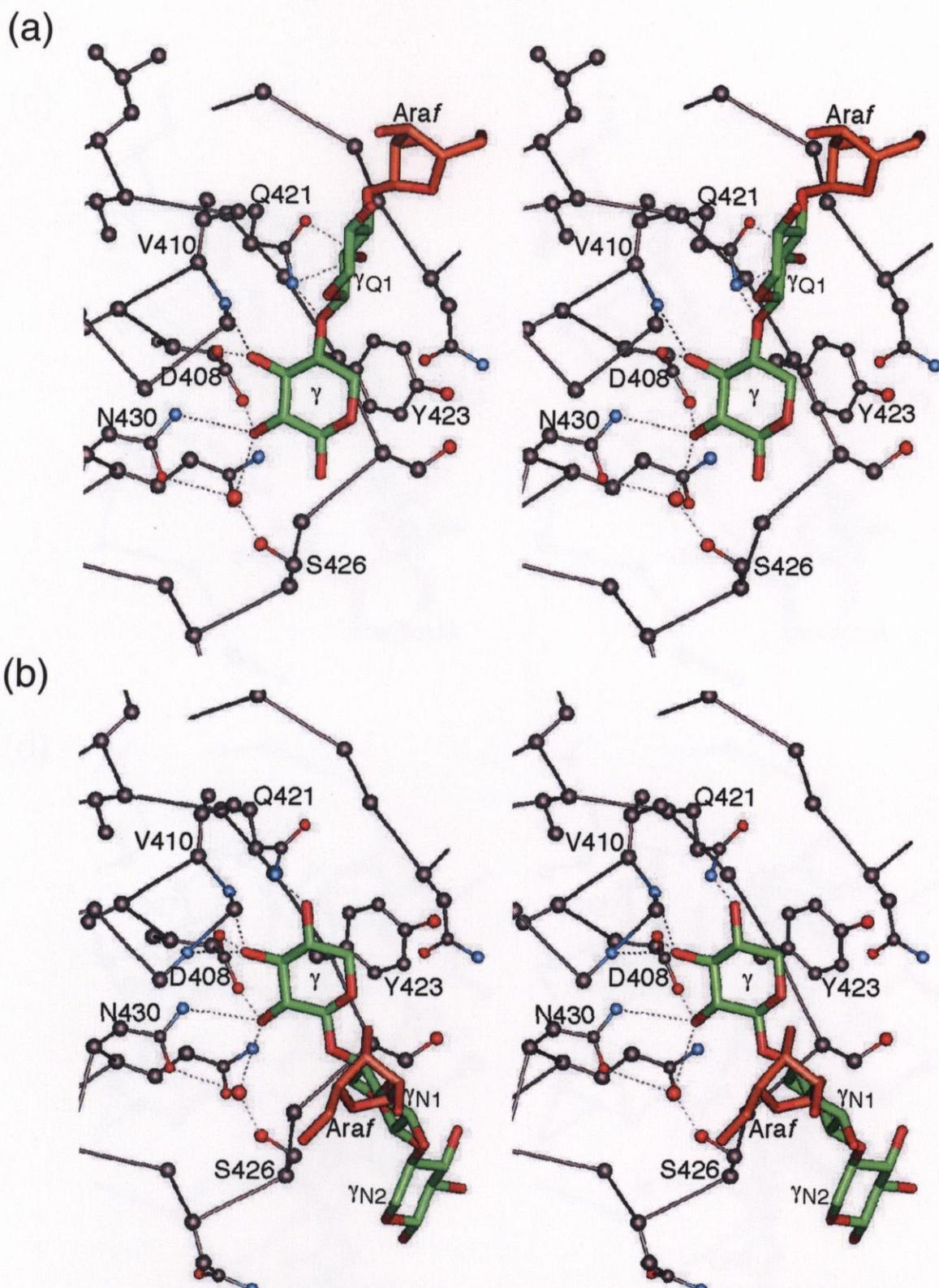
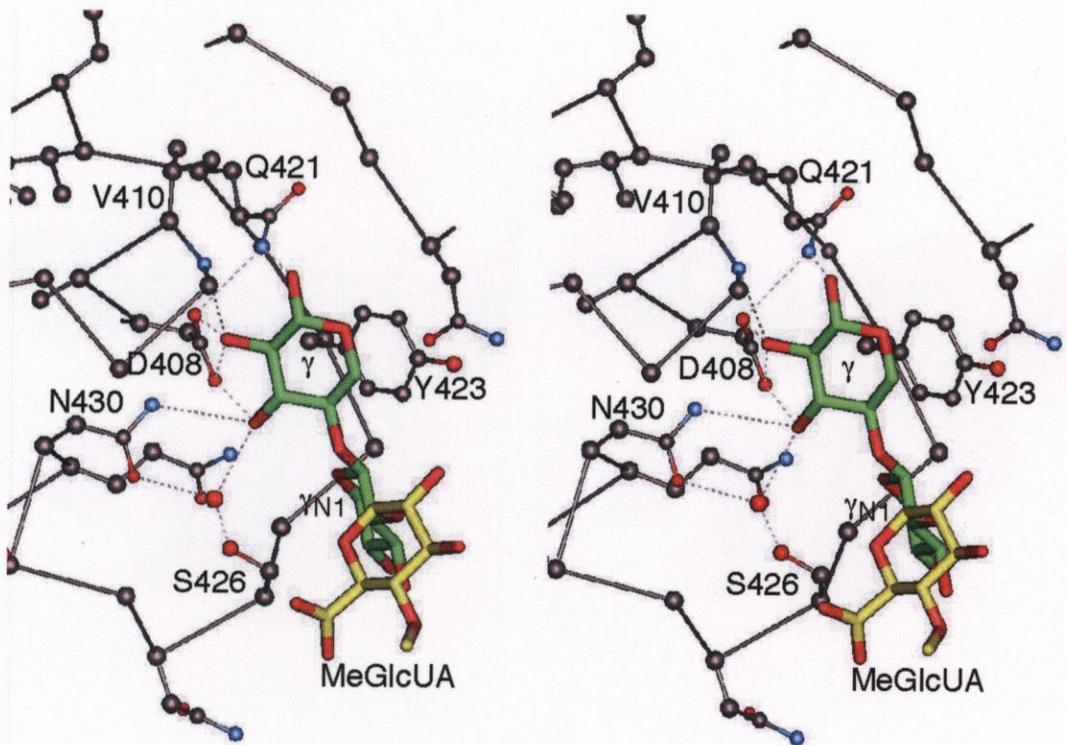


Fig. 4-9 Stereo views of the substituted sugar binding structures in the XBD. (a) In the subdomain γ in the Araf-X2 complex, (b) subdomain γ in the Araf-X3 complex, (c) subdomain α in the FXYN/MeGlcUA-X3 complex, and (d) subdomain γ in the FXYN/MeGlcUA-X2 complex. Hydrogen bonding interaction between the enzyme and sugars are indicated by broken lines. Carbon numbers of bound xylose are indicated.

(c)



(d)

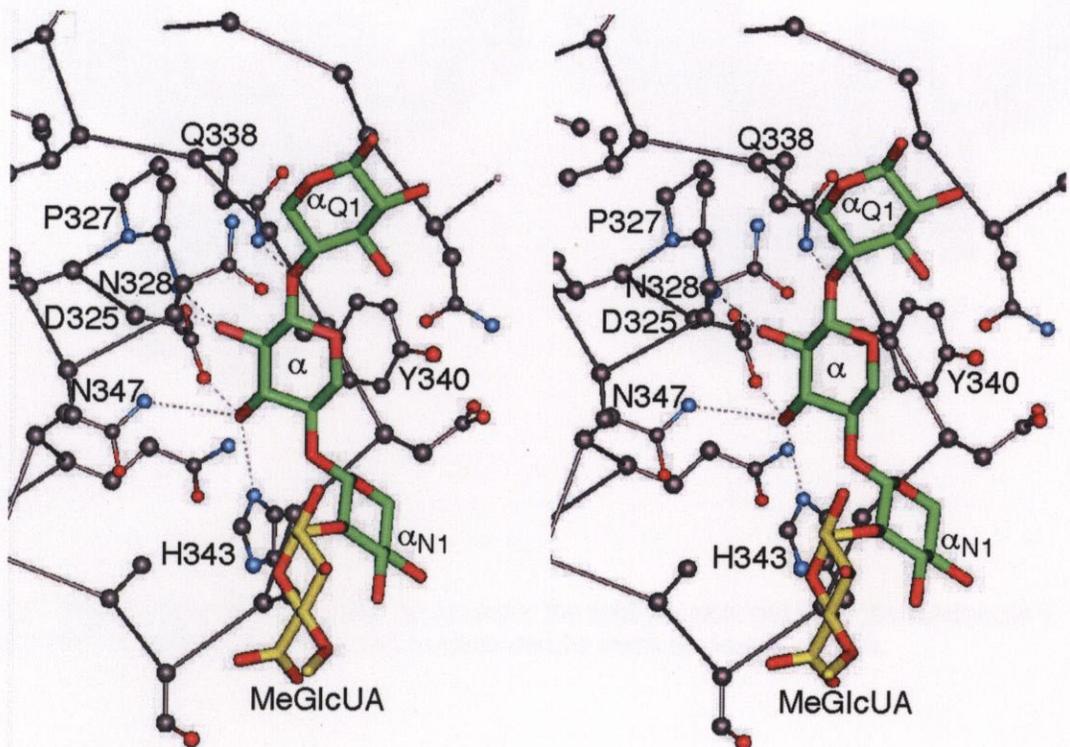


Fig. 4-9 Continued.

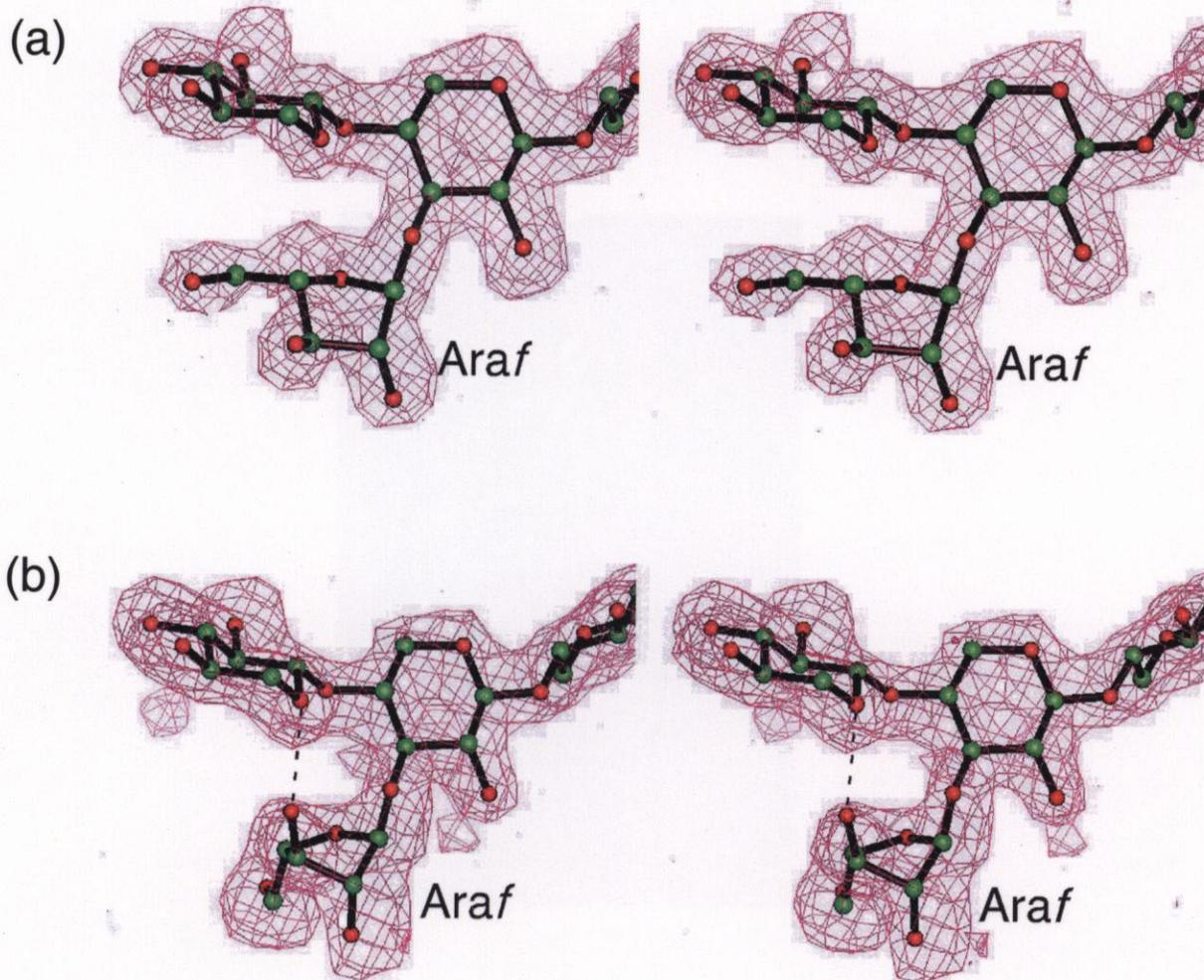


Fig. 4-10 Stereo views of the Araf-X3. (a) Bound in the catalytic cleft and (b) in the subdomain γ of the SoCBM13, with the $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ omit electron density maps contoured at 2.5σ .

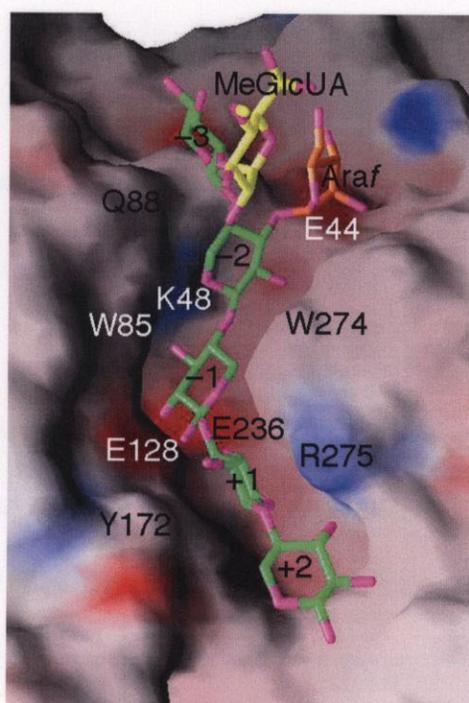


Fig. 4-11 Surface potential model of the catalytic cleft with the bound Araf-MeGlcUA-X3. The model was prepared based on the FXYN/Araf-X3 complex and the FXYN/MeGlcUA-X3 complex structures. Surface models are drawn with the program GRASP (Nicholls, 1992).

総 括

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の β -1,4-グリコシド結合を主に加水分解するエンド型酵素である。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糖分解酵素 (Glycosyl hydrolase, GH) の主に2つのファミリー GH10 と GH11 に分類される。また、セルラーゼやキシラナーゼなど植物細胞壁を分解する加水分解酵素は、触媒ドメインの他にも幾つかの糖結合モジュール(carbohydrate-binding module, CBM)を分子内に有しており、全体としてモジュール構造をとっている場合が多い。放線菌 (*Streptomyces olivaceoviridis* E-86) は、GH10 及び GH11 の2種類のキシラナーゼを生産する。GH10 に属するキシラナーゼ(FXYN)は、DNA 配列より1次構造が決定され、その分子量は約 45,000 であり、GH10 に共通な TIM バレル構造をもつ触媒ドメインを N 末端に有し、11 残基の Gly/Pro-rich リンカー部位を介し C 末端には 123 残基のキシラン結合ドメイン(xylan-binding domain, XBD)も有することが明らかとなった。また、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。本研究では、FXYN が触媒ドメイン及び XBD を有する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、および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した。

FXYN の結晶化は、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 の蛋白質溶液と 1:1 で混合したものをハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行い、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安定して得られる条件を

確立した。結晶は斜方晶系の空間群 $P2_12_12_1$ に属し、格子定数は $a = 79.6, b = 95.2, c = 140.3 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であった。Photon Factory を中心に X 線回折データの測定を行い、 1.9 \AA 分解能を超えるデータの取得に成功した。

構造解析は、他の GH10 に属するキシラナーゼの触媒ドメインをサーチモデルとした分子置換法を用いて進め、最終的にリンカー部分を除く酵素全体の結晶構造の構築に成功した。触媒ドメインは、TIM-バレルからなっており、触媒溝は TIM-バレルの中心にある β -バレルの C 末端側に存在する。XBD はサブドメイン α 、 β 、 γ の 3 つのサブドメインからなる 3 回繰り返し配列でできた球状ドメインであり、その構造は β -trefoil 構造をとっていた。また、これまでに植物由来ガラクトース結合レクチンとして認識されてきたリシンの B 鎖と類似していることが明らかとなった。両ドメインをつなぐリンカーのうちの 9 残基は電子密度が観察されず、リンカー一部分は高い可動性があることにより構造は同定されなかった。

次に、本酵素の基質認識機構を解明するために、キシロオリゴ糖として、キシロース、キシロピオース(X2)、キシロトリオース(X3)、それ以外にラクトース(Lac)、ガラクトース (Gal)、グルコース (Glc) を用いて複合体構造を決定した。各糖の複合体は全てソーキング法により作製し、Lac、Gal は常温で、それ以外は糖自体を不凍液とし、低温下で X 線回折データを収集した。クライオ法で決定した構造では、リンカー部分の電子密度も確認できた。キシロオリゴ糖との複合体の解析では、触媒溝における $-3 \sim -1$ 、 $+1 \sim +3$ のサブサイト構造、および、XBD のサブドメイン α と γ のキシラン結合機構を明らかにした。また、リシンの Gal 結合部位と同じ部分で、XBD ではキシランを認識していること、その糖の結合様式は異なることを明らかにした。さらに、Lac、Gal 複合体解析の結果、XBD は Gal、Lac とも複合体を形成し、その結合様式はリシンの様式と同じであることから、XBD はガラクトース結合レクチン能も持ち合わせて

いることが明らかとなった。XBD の3つのサブドメインは糖結合に関与するアミノ酸が配列、構造ともに厳密に保持されていることから、同じようにキシランを認識することが可能であると考えられた。

さらに、4-O-メチルグルクロノキシロオリゴ糖、アラビノキシロオリゴ糖との複合体構造の解析では、FXYN の側鎖を有するキシランに対する結合様式を明らかにした。また、側鎖を有するためリガンドが非対称になったことから、キシロオリゴ糖との複合体では決められなかった糖の方向も決定することができ、その結果、XBD のキシラン結合部位はキシランに対し、2つの方向に結合することができることも明らかにされた。

以上のことから、XBD は基質結合部位を3つ持っており、それぞれが基質を2つの方向に認識できることにより基質結合の可能性を高めていること、可動性のリンカーを介して触媒ドメインと XBD がお互いに自由に動けるため、触媒ドメインが XBD の結合した基質に近づく可能性を高めていることなどを利用して、FXYN は不溶性の基質に対して非常に効率的な反応機構を採用して機能していることが明らかとなった。

引用文献

- Biely, P., Vrsanska(DASH), M., Tenkanen, M. & Kluepfel, D. (1997). Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* **57**, 151-166.
- Black, G. W., Rixon, J. E., Clarke, J. H., Hazlewood, G. P., Theodorou, M. K., Morris, P. & Gilbert, H. J. (1996). Evidence that linker sequences and cellulose-binding domains enhance the activity of hemicellulases against complex substrates. *Biochem. J.* **319**, 515-520.
- Bolam, D. N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M. P., Rixon, J. E., Boraston, A., Hazlewood, G. P. & Gilbert, H. J. (1998). *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem. J.* **331**, 775-781.
- Boraston, A. B., McLean, B. W., Kormos, J. M., Alam, M., Gilkes, N. R., Haynes, C. A., Tomme, P., Kilburn, D. G. & Warren, R. A. J. (1999). *Carbohydrate-binding modules: diversity of structure and function*. Recent advances in carbohydrate bioengineering (Gilbert, H. J., Davies, G. J., Henrissat, B. & Svensson, B., Eds.), The Royal Society of Chemistry, Cornwall.
- Boraston, A. B., Tomme, P., Amandoron, E. A. & Kilburn, D. G. (1999). A novel mechanism of xylan binding by a lectin-like module from *Streptomyces lividans* xylanase10A. *Biochem. J.* **350**, 933-941.
- Boraston, A. B., Revett, T. J., Boraston, C. M., Nurizzo, D. & Davies, G. J. (2003). Related structural and thermodynamic dissection of specific mannan recognition by a carbohydrate binding module, TmCBM27. *Structure* **11**, 665-675.
- Brünger, A., Adams, P., Clore, G., DeLano, W., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R., Jiang, J., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N., Read, R., Rice, L., Simonson, T. & Warren, G. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog.* **D54**, 905-921.
- Brünger, A. T. (1992). Free *R* value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.
- Brünger, A. T., Kuriyan, J. & Karplus, M. (1987). Crystallographic *R* factor refinement by molecular dynamics. *Science* **235**, 458-460.
- Carpita, N. C. & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**, 1-30.

- Charnock, S. J., Spurway, T. D., Xie, H., Beylot, M.-H., Virden, R., Warren, R. A. J., Hazlewood, G. P. & Gilbert, H. J. (1998). The topology of the substrate binding clefts of glycosyl hydrolase family 10 xylanases are not conserved. *J. Biol. Chem.* **273**, 32187-32199.
- Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallog.* **D50**, 760-763.
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J. & Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**, 307-317.
- Creagh, L., Ong, E., Jervis, E., Kilburn, D. G. & Haynes, C. A. (1996). Binding of the cellulose-binding domain of exoglucanase Cex from *Cellulomonas fimi* to insoluble microcrystalline cellulose is entropically driven. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **93**, 12229-12234.
- Davies, G. J. (1998). Structural studies on cellulases. *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 167-173.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **321**, 557-559.
- Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D. & Derewenda, Z. S. (1994). Crystal structure, at 2.6-Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of β -1,4-D-glycanases. *J. Biol. Chem.* **269**, 20811-20814.
- Din, N., Damude, H. G., Gilkes, N. R., Jr, R. C. M., Warren, R. A. & Kilburn, D. G. (1994). C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **91**, 11383-11387.
- Dominguez, R., Souchon, H., Spinelli, S., Dauter, Z., Wilson, K. S., Chauvaux, S., Beguin, P. & Alzari, P. M. (1995). A common protein fold and similar active site in two distinct families of β -glycanases. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 569-576.
- Fujimoto, Z., Kuno, A., Kaneko, S., Kobayashi, H., Kusakabe, I. & Mizuno, H. (2002). Crystal structures of the sugar complexes of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase: Sugar binding structure of the family 13 carbohydrate binding module. *J. Mol. Biol.* **316**, 65-78.
- Fujimoto, Z., Kuno, A., Kaneko, S., Yoshida, S., Kobayashi, H., Kusakabe, I. & Mizuno, H. (2000). Crystal structure of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 β -xylanase containing xylan-binding domain. *J. Mol. Biol.* **300**, 575-85.
- Fujimoto, Z., Mizuno, H., Kuno, A., Yoshida, S., Kobayashi, H. & Kusakabe, I. (1997). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 β -xylanase. *J. Biochem.* **121**, 826-8.
- Gebler, J., Gilkes, N. R., Claeyssens, M., Wilson, D. B., Beguin, P., Wakarchuk, W. W., Kilburn, D. G., Jr, R. C. M., Warren, R. A. & Withers, S. G. (1992). Stereoselective hydrolysis catalyzed by

- related β -1,4-glucanases and β -1,4-xylanases. *J. Biol. Chem.* **267**, 12559-12561.
- Gill, J., Rixon, J. E., Bolam, D. N., McQueen-Mason, S., Simpson, P. J., Williamson, M. P., Hazlewood, G. P. & Gilbert, H. J. (1999). The type II and X cellulose-binding domains of *Pseudomonas* xylanase A potentiate catalytic activity against complex substrates by a common mechanism. *Biochem. J.* **342**, 473-480.
- Harris, G. W., Jenkins, J. A., Connerton, I., Cummings, N., Lo Leggio, L., Scott, M., Hazlewood, G. P., Laurie, J. I., Gilbert, H. J. & Pickersgill, R. W. (1994). Structure of the catalytic core of the family F xylanase from *Pseudomonas fluorescens* and identification of the xylopentaose-binding sites. *Structure* **2**, 1107-1116.
- Harris, G. W., Jenkins, J. A., Connerton, I. & Pickersgill, R. W. (1996). Refined crystal structure of the catalytic domain of xylanase A from *Pseudomonas fluorescens* at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallog.* **D52**, 393-401.
- Hazes, B. (1996). The (QxW)₃ domain: a flexible lectin scaffold. *Protein Sci.* **5**, 1490-1501.
- Henrissat, B. & Bairoch, A. (1993). New family in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**, 781-788.
- Henrissat, B., Coutinho, P. M. & Davies, G. J. (2001). A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **47**, 55-72.
- Henrissat, B. & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Cur. Opin. Struct. Biol.* **7**, 637-644.
- Heredia, A., Jimenez, A. & Guillen, R. (1995). Composition of plant cell walls. *Z Lebensm Unters Forsch* **200**, 24-31.
- Higashi, T. (1989). The processing of diffraction data taken on a screenless Weissenberg camera for macromolecular crystallography. *J. Appl. Crystallog.* **22**, 9-18.
- Hirabayashi, J., Dutta, S. K. & Kasai, K.-i. (1998). Novel galactose-binding proteins in Annelida. Characterization of 29-kDa tandem repeat-type lectins from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *J. Biol. Chem.* **273**, 14450-14460.
- Kaku, H., Tanaka, Y., Tazaki, K., Minami, E., Mizuno, H. & Shibuya, N. (1996). Sialylated oligosaccharide-specific plant lectin from Japanese elderberry (*Sambucus sieboldiana*) bark tissue has a homologous structure to type II ribosome-inactivating proteins, ricin and abrin. *J. Biol. Chem.* **271**, 1480-1485.
- Kaneko, S., Iwamatsu, S., Kuno, A., Fujimoto, Z., Sato, Y., Yura, K., Go, M., Mizuno, H., Taira, K., Hasegawa, T., Kusakabe, I. & Hayashi, K. (2000). Module shuffling of a family F/10 xylanase:

- replacement of modules M4 and M5 of the FXYN of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 with those of the Cex of *Cellulomonas fimi*. *Protein Eng.* **13**, 873-879.
- Kaneko, S., Kuno, A., Fujimoto, Z., Shimizu, D., Machida, S., Sato, Y., Yura, K., Go, M., Mizuno, H., Taira, K., Kusakabe, I. & Hayashi, K. (1999). An investigation of the nature and function of module 10 in a family F/10 xylanase FXYN of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by module shuffling with the Cex of *Cellulomonas fimi* and by site-directed mutagenesis. *FEBS Letters* **460**, 61-66.
- Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **24**, 946-950.
- Kuno, A., Kaneko, S., Ohtsuki, H., Ito, S., Fujimoto, Z., Mizuno, H., Hasegawa, T., Taira, K., Kusakabe, I. & Hayashi, K. (2000). Novel sugar-binding specificity of the type XIII xylan-binding domain of a family F/10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis*. *FEBS Letters* **482**, 231-236.
- Kuno, A., Shimizu, D., Kaneko, S., Hasegawa, T., Gama, T., Hayashi, K., Kusakabe, I. & Taira, K. (1999). Significant enhancement in the binding of *p*-nitrophenyl- β -D-xylobioside by the E128H mutant F/10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *FEBS Letters* **450**, 299-305.
- Kuno, A., Shimizu, D., Kaneko, S., Koyama, Y., Yoshida, S., Kobayashi, H., Hayashi, K., Taira, K. & Kusakabe, I. (1998). PCR cloning and expression of the F/10 family xylanase gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 434-439.
- Kusakabe, I., Kawaguchi, M., Yasui, T. & Kobayashi, T. (1977a). Purification and some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces* sp. E-86. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **51**, 429-437.
- Kusakabe, I., Ohgushi, S., Yasui, T. & Kobayashi, T. (1983). Structures of arabinoxylooligosaccharides from the hydrolytic products of corncobs arabinoxylan by a xylanase from *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2713-2723.
- Kusakabe, I., Yasui, T. & Kobayashi, T. (1969). Studies on xylanase system of *Streptomyces* Part I. Some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **43**, 145-153.
- Kusakabe, I., Yasui, T. & Kobayashi, T. (1975a). A new method for preparation of xylobiose eliminating xylose from enzymatic xylan hydrolyzate by yeast. *Agric. Biol. Chem.* **39**, 1355-1362.
- Kusakabe, I., Yasui, T. & Kobayashi, T. (1975b). Preparation of crystalline xylooligosaccharides from xylan (Studies on xylanase system of *Streptomyces* part IV). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **49**, 383-385.
- Kusakabe, I., Yasui, T. & Kobayashi, T. (1976a). Enzymatic hydrolysis-extraction of xylan from xylan-

- containing natural materials (1) Increase in susceptibility for enzymatic action of native xylan in natural materials with pretreatment (Studies on xylanase system of *Streptomyces* part V). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **50**, 199-208.
- Kusakabe, I., Yasui, T. & Kobayashi, T. (1976b). Enzymatic hydrolysis-extraction of xylan from xylan-containing natural materials (2) Survey of optimum conditions for NaOH-pretreatment of corncobs (Studies on xylanase system of *Streptomyces* part VI). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **50**, 209-215.
- Kusakabe, I., Yasui, T. & Kobayashi, T. (1977b). The action of the *Streptomyces* xylanase on various xylans and xylooligosaccharides (Studies on xylanase system of *Streptomyces* Part VIII). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **51**, 439-448.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1992). *PROCHECK v.2.: Programs to check the Stereochemical Quality of Protein Structures*, Oxford Molecular Ltd, Oxford, England.
- Lo Leggio, L., Jenkins, J., Harris, G. W. & Pickersgill, R. W. (2000). X-ray crystallographic study of xylopentaose binding to *Pseudomonas fluorescens* xylanase A. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **41**, 362-373.
- Lo Leggio, L., Kalogiannis, S., Bhat, M. K. & Pickersgill, R. W. (1999). High resolution structure and sequence of *T. aurantiacus* xylanase I: implications for the evolution of thermostability in family 10 xylanases and enzymes with $\beta\alpha$ -barrel architecture. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **36**, 295-306.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.
- McCarter, J. D. & Withers, S. G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Cur. Opin. Struct. Biol.* **4**, 885-892.
- Merritt, E. A. & Murphy, M. E. P. (1994). Raster3D version 2.0: a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallog.* **D50**, 869-873.
- Murzin, A. G., Lesk, A. M. & Chothia, C. (1992). β -Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitor interleukins-1 β and 1 α and fibroblast growth factors. *J. Mol. Biol.* **223**, 531-543.
- Nagy, T., Simpson, P., Williamson, M. P., Hazlewood, G. P., Gilbert, H. J. & Orosz, L. (1998). All three surface tryptophans in Type IIa cellulose binding domains play a pivotal role in binding both soluble and insoluble ligands. *FEBS Letters* **429**, 312-316.
- Natesh, R., Bhanumorthy, P., Vithayathil, P. J., Sekar, K., Ramakumar, S. & Viswamitra, M. A. (1999).

- Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of a thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. *J. Mol. Biol.* **288**, 999-1012.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallog.* **A50**, 157-163.
- Nguyen, J. (1999). The regulatory protein Reg1 of *Streptomyces lividans* binds the promotor region of several genes repressed by glucose. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**, 51-58.
- Nicholls, A. (1992). GRASP: graphycal representation and analysis of surface properties. Columbia University, New York.
- Nieduszynski, I. A. & Marchessault, R. H. (1972). Structure of β, D(1->4')-xylan hydrate. *Biopolymers* **11**, 1335-1344.
- Notenboom, V., Birsan, C., Nitz, M., Rose, D. R., Warren, R. A. J. & Withers, S. G. (1998a). Insight into transition state stabilization of the β-1,4-glycanase Cex by covalent intermediate accumulation in active site mutants. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 812-818.
- Notenboom, V., Birsan, C., Warren, R. A. J., Withers, S. G. & Rose, D. R. (1998b). Exploring the cellulose/xylan specificity of the β-1,4-glycanase Cex from *Cellulomonas fimi* through crystallography and mutation. *Biochemistry* **37**, 4751-4758.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Pascal, J., PJD, Monzingo, A., Ernst, S., Robertus, J., Iglesias, R., Perez, Y., Ferreras, J., Citores, L. & Girbes, T. (2001). 2.8-Å crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin I. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **43**, 319-26.
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**, 283-437.
- Rossmann, M. G. & van Beek, C. G. (1999). Data processing. *Acta Crystallog.* **D55**, 1631-1640.
- Rutenber, E., Ready, M. & Robertus, J. D. (1987). Structure and evolution of ricin B chain. *Nature* **326**, 624-626.
- Sakabe, N. (1991). X-ray diffraction data collection system for modern protein crystallography with a Weissenberg camera and an imaging plate using synchrotron radiation. *Nuclear Instr. Methods Physics Res.* **A303**, 448-463.
- Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D. B. & Karplus, P. A. (1997). Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 810-817.
- Schmidt, A., Gubiz, G. M. & Kratky, C. (1999). Xylan binding subsite mapping in the the xylanase from

- Penicillium simplicissimum* using xylooligosaccharides as cryo-protectant. *Biochemistry* **38**, 2403-2412.
- Schmidt, A., Schlacher, A., Steiner, W., Schwab, H. & Kratky, C. (1998). Structure of the xylanase from *Penicillium simplicissimum*. *Protein Sci.* **7**, 2081-2088.
- Shimoi, H., Iimura, Y., Obata, T. & Tadenuma, M. (1992). Molecular structure of *Rarobacter faecitbidus* protease I. *J. Biol. Chem.* **267**, 25189-25195.
- Sinnott, M. L. (1990). Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1171-1202.
- Southall, S. M., Simpson, P. J., HJ, H. J. G., Williamson, G. & Williamson, M. P. (1999). The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Letters* **447**, 58-60.
- Tahirov, T. H., Lu, T.-H., Liaw, Y.-C., Chen, Y.-L. & Lin, J.-Y. (1995). Crystal structure of abrin-a at 2.14 Å. *J. Mol. Biol.* **250**, 354-367.
- Tomme, P., Warren, R. A. J. & Gilkes, N. R. (1995a). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **37**, 1-81.
- Tomme, P., Warren, R. A. J., Miller Jr, R. C., Kilburn, D. G. & Gilkes, N. R. (1995b). *Cellulose-binding domains: classification and properties*. Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides. (Saddler, J. M. & Penner, M. H., Eds.), American Chemical Society, Washington, DC.
- White, A., Tull, D., Johns, K., Withers, S. G. & Rose, D. R. (1996). Crystallographic observation of a covalent catalytic intermediate in a β -glycosidase. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 149-154.
- White, A., Withers, S. G., Gilkes, N. R. & Rose, D. R. (1994). Crystal structure of the catalytic domain of the β -1,4-glycanase Cex from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry* **33**, 12546-12552.
- Yoshida, S., Kuno, A., Saito, N., Aoyama, M. & Kusakabe, I. (1998). Structure of xylan from culms of Kumaizasa (*Sasa senanensis* Rehd.). *J. Wood Science* **44**, 457-462.
- Yoshida, S., Kusakabe, I., Matsuo, N., Shimizu, K., Yasui, T. & Murakami, K. (1990). Structure of rice-straw arabinoglucuronoxylan and specificity of *Streptomyces* xylanase toward the xylan. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 449-457.
- Yoshida, S., Ono, T., Matsuo, N. & Kusakabe, I. (1994). Structure of Hardwood xylan and specificity of *Streptomyces* β -xylanase toward the xylan. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 2068-2070.

謝 辞

本研究の遂行及び論文作製に当たり多くの方々の御指導、ご協力を賜りました。

博士論文作製においては、東京大学生物生産工学センター 山根久和教授に主査の労をとっていただくことをご快諾頂き、懇切丁寧な御指導を頂きました。野尻秀昭助教授には多大なご助言を頂きました。厚く御礼申し上げます。また、ご多忙の中お時間を割きご審査頂いた、東京大学大学院応用生命化学専攻 山口五十麿教授、応用生命工学専攻 祥雲弘文教授、田之倉優教授に心より御礼申し上げます。

本研究は、独立行政法人農業生物資源研究所生体高分子グループ蛋白機能研究チーム（前農林水産省農業生物資源研究所分子育種部遺伝子情報管理研究室・生物工学部蛋白質工学研究室）において行われました。研究室に着任以来、一貫して御指導いただきました蛋白機能研究チーム 水野洋研究チーム長、様々なご助言、御指導を頂きました、同 高瀬研二主任研究官、門間充主任研究官、松本隆主任研究官、若生俊行研究員に深く感謝いたします。

放線菌キシラナーゼの構造解析に当たり、本酵素を研究する機会を頂きました筑波大学応用生命化学系 日下部功教授、吉田滋樹講師、本酵素の機能解析を精力的に進めていただき、研究遂行上の有用な議論を頂きました、産業総合研究所久野敦主任研究員、食品総合研究所小林秀行生物機能開発部長、金子哲主任研究官に心より御礼申し上げます。

X 線回折データの測定では、高エネルギー加速器研究機構放射光施設の共同研究（98G157, 00G294）のもと、BL6A、BL18B の使用に際し、お世話になりました渡邊信久博士、鈴木守博士、五十嵐教之博士、松垣直宏博士をはじめとする放射光施設のスタッフ、アシスタントの方々に御礼申し上げます。また、構造生物学坂部プロジェクトのもと、BL6B の使用をご快諾頂きお世話になりました坂部知平教授、坂部貴和子博士に御礼申し上げます。

東京大学在学中、研究を志す礎を築いて頂き、御指導頂きました、東京大学農学部農薬学研究室 室伏旭教授（現秋田県立大学教授）、山口五十麿教授、山根久和教授、鈴木義人助教授、中嶋正敏助手をはじめ、研究室でお世話になった皆さまに感謝申し上げます。

農業生物資源研究所で、研究に対する的確な御指導を頂きました大澤勝次生物工学部長（現北海道大学教授）、渋谷直人生体高分子グループ長（現明治大学教授）、小林幹彦生体高分子グループ長をはじめ、様々な面から御指導、ご協力いただいた蛋白機能研究チームの皆さま、生体高分子グループの皆さま、そして農業生物資源研究所、農水省各研究所の皆さまに感謝申し上げます。

最後になりましたが、研究を行うことに理解いただき、暖かく見守り、支援して頂いた家族に感謝します。

平成15年11月19日

藤 本 瑞

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

発行日： 平成15年12月26日

発行人： 藤本 瑞

独立行政法人 農業生物資源研究所

生体高分子グループ 蛋白機能研究チーム

製本：アリック（有）
