

糖質加水分解酵素ファミリー 1 に属する
 β - グルコシダーゼの構造と機能に関する研究

塚田剛士

Abbreviations

BGL	β -glucosidase
BLAST	basic local alignment search tool
CAZy	carbohydrate-active enzymes
cDNA	complementary DNA
CHAPS	3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)propanesulfonic acid
CHES	2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid
DEAE	diethylaminoethyl
DIMBOA	2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one
DP	degree of polymerization
EPPS	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(3-propanesulfonic acid)
GH	glycoside hydrolase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria Bertani
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
NCBI	national center for biotechnology information
OD	optical density
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
PEG	polyethylene glycol
pK_{e1}	dissociation constant of acid/base catalyst in free enzyme
pK_{e2}	dissociation constant of catalytic nucleophile in free enzyme
pK_{es1}	dissociation constant of acid/base catalyst with substrate
pK_{es2}	dissociation constant of catalytic nucleophile with substrate
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrophenyl
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RT	reverse transcriptase
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

－目次－

第一章 序論	1
1.1 セルロース	2
1.2 セルロース分解酵素	3
1.2.1 糸状菌におけるセルロースの分解機構	3
1.2.2 糖質加水分解酵素の分類	5
1.2.3 糖質加水分解酵素の反応機構	5
1.3 β -グルコシダーゼ	7
1.3.1 β -グルコシダーゼとは	7
1.3.2 糸状菌が生産する β -グルコシダーゼ	7
1.4 GHファミリー1に属する β -グルコシダーゼ	8
1.4.1 特性	8
1.4.2 サブサイト-1に関する研究	11
1.4.3 プラス側サブサイトに関する研究	13
1.4.3.1 配糖体の認識	13
1.4.3.2 セロビオース、セロオリゴ糖の認識	14
1.5 本研究の目的	15
第二章 GHファミリー1に属するBGLをコードするcDNAの取得	17
2.1 目的	18
2.2 実験方法	18
2.2.1 GHファミリー1に属するBGLをコードするcDNAの取得	18
2.2.2 配列解析	18
2.3 結果	19
2.3.1 GHファミリー1に属するBGLをコードするcDNAの取得	19
2.3.2 配列解析	19
2.4 考察	25

第三章 組換え BGL の機能解析	26
3.1 目的	27
3.2 実験方法	27
3.2.1 組換え BGL の生産	27
3.2.2 組換え BGL の精製	27
3.2.3 組換え BGL の機能解析	29
3.2.3.1 <i>p</i> -ニトロフェニル誘導体に対する加水分解活性測定	29
3.2.3.2 オリゴ糖に対する加水分解活性測定	30
3.2.3.3 pH 依存性の測定	33
3.2.3.4 pH 安定性の測定	33
3.2.3.5 温度依存性の測定	33
3.2.3.6 温度安定性の測定	33
3.3 結果	34
3.3.1 組換え BGL の生産と精製	34
3.3.2 組換え BGL の機能解析	35
3.3.2.1 <i>p</i> -ニトロフェニル誘導体に対する加水分解活性測定	35
3.3.2.2 グルコシル二糖に対する加水分解活性測定	36
3.3.2.3 セロオリゴ糖に対する加水分解活性測定	38
3.3.2.4 pH 依存性の測定	40
3.3.2.5 pH 安定性の測定	40
3.3.2.6 温度依存性の測定	41
3.3.2.7 温度安定性の測定	41
3.4 考察	42
第四章 セロビオース認識に関与する因子の解析	45
4.1 目的	46
4.2 実験方法	46
4.2.1 X 線結晶構造解析	46
4.2.2 立体構造比較および配列比較	47
4.2.3 BGL 変異体発現ベクターの構築	47
4.2.4 野生型 BGL および BGL 変異体の生産と精製	49
4.2.5 セロビオースに対する加水分解活性測定	49

4.2.6	セロビオースホスホリラーゼの生産と精製	49
4.2.7	4-O- β -グルコシル二糖の酵素合成と精製	50
4.2.8	4-O- β -グルコシル二糖に対する加水分解活性測定	51
4.2.9	遷移状態における結合エネルギーの算出	51
4.3	結果	52
4.3.1	BGL1A および BGL1B の立体構造	52
4.3.2	BGL1A 変異体によるセロビオースの加水分解活性測定	57
4.3.3	BGL1B 変異体によるセロビオースの加水分解活性測定	57
4.3.4	4-O- β -グルコシル二糖に対する加水分解活性測定	59
4.3.5	遷移状態における結合エネルギー	62
4.4	考察	63
第五章 酸性域における活性に関与する因子の解析		65
5.1	目的	66
5.2	実験方法	66
5.2.1	pH 依存性の測定	66
5.3	結果	68
5.3.1	野生型 BGL の pH 依存性	68
5.3.2	BGL1A 変異体の pH 依存性	69
5.4	考察	72
第六章 総括		75
参考文献		78
研究業績		89
謝辞		91

第一章

序論

1.1 セルロース

セルロースは植物の光合成により二酸化炭素と水から生合成される有機化合物である。生合成されたセルロースは植物細胞壁を構成する主成分として存在しており、樹木（針葉樹、広葉樹）においては構成成分のおよそ 50% を占めている（磯貝ら、2008）。光合成により蓄積される量は年間約 1000 億トンであると推測されていることから、セルロースは地球上に最も豊富に存在する有機化合物であるといえる（横山、2001）。その化学構造は数千の β -D- グルコピラノースが β -1,4 グリコシド結合したホモ多糖からなる。セルロースの構成最小単位はグルコースであるが、各グルコース残基が 1 残基ごとに β -1,4 結合を軸として 180° 回転していることから、構造上の反復単位はセロビオースであると考えられている (Fig1.1)(Blackwell 1982; Atalla, 1983)。天然セルロースの結晶構造はセルロース I と呼ばれ、構造の似ている 2 つの結晶形（セルロース I_α 、 I_β ）が存在している。セルロース I では、反復単位であるセロビオース中の C3 位水酸基 (OH-3) と O-5、OH-2 と OH-6 の間で分子内水素結合が形成されている (Nishiyama et al. 2002)。さらにセルロース分子鎖同士は分子間水素結合および疎水結合を形成し多数収束することで結晶化し、植物細胞壁においては幅数 nm 程度からなるミクロフィブリルを形成している。結晶性を有するミクロフィブリルが寄り集まってさらなる高次構造を形成し、植物細胞壁の一次壁や二次壁を構成することにより、植物は高い物理強度ならびに難分解性を有している（福島ら、2003）。このような性質を有するセルロースを、人類は古くから主に燃料、木質材料、紙として利用してきた。しかしながら、近年においては地球温暖化や石油価格高騰の影響を受け、再生可能且つカーボンニュートラルな資源である植物バイオマスから、エタノールや化成品等の有用物質を生産することが望まれている。このような社会的要求を受け、現在、セルロースを効率よくグルコースへ変換するための技術開発が急務となっている。

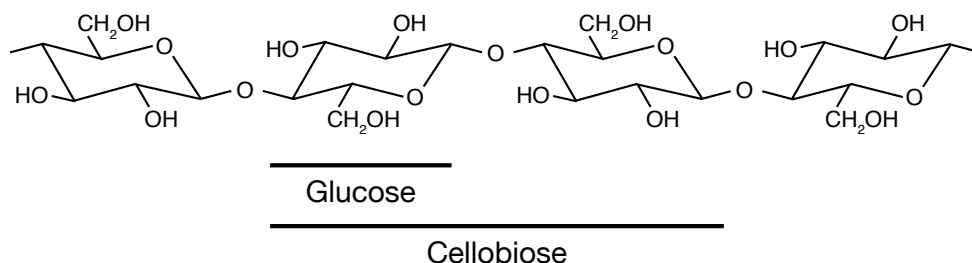


Fig1.1 Structural formula of cellulose.

1.2 セルロース分解酵素

1.2.1 糸状菌におけるセルロースの分解機構

セルロースは不溶性の固体基質であるが、セルロース加水分解酵素（セルラーゼ）はセルロースからセロビオースやセロオリゴ糖などの可溶性糖を生成させる。セルラーゼによるセルロースの分解機構は、微生物がどのようにセルロースを生分解するかという生理学的観点、またセルロースを効率よく分解したいという実学的観点から興味・関心が持たれ多くの研究が行われてきた。このような背景のなか、Reeseらはセルラーゼの作用機構として C_1 - C_x 説を提唱した(Reese et al. 1950)。 C_1 - C_x 説によると、 C_1 酵素によりセルロース分子間の水素結合が壊され結晶性が低下した後、 C_x 酵素により可溶性糖が切り出される。最後にそれら可溶性糖に対して β -グルコシダーゼ(BGL, EC 3.2.1.21)が作用することでセルロースは分解される(Fig1.2)。

その後セルラーゼの作用機構に関する様々な知見が集積され、新たにエンドーエキソ説が提唱された(Flickinger et al. 1980)。それによると第一に、エンド型に作用するEndo-glucanase(EC, 3.2.1.4)がセルロース分子内に存在する非晶領域をランダムに加水分解することで重合度を低下させる。第二に、新たに生じたセルロース分子末端に対して、エキソ型に作用し主にセロビオースを生成させるExo-glucanase(Cellobiohydrolase, 3.2.1.91)が加水分解を行う。セロビオースはセルラーゼの活性中心に取り込まれることで生成物阻害を引き起こすため(Halliwell and Griffin, 1973; Berghem et al. 1975; Holtzapple et al. 1990)、Endo-glucanase、Exo-glucanase、BGLが協調的に作用することでセルロースは分解されることが考えられた(Fig1.2)(Halliwell and Riaz, 1971; Wood and McCrae, 1972)。

近年、立体構造解析技術の進歩により、多くのセルラーゼの立体構造情報が明らかにされている。*Hypocrea jecorina* 由来 Cellobiohydrolase I (CBHI) は典型的なエキソ型セルラーゼとして位置づけられてきたが、その立体構造を見るとセルロース分子鎖が入る活性中心付近がトンネルのような形状をしていることが分かる(Fig1.3)(Divne et al. 1994)。そのためセルロース分子鎖は加水分解された後も酵素から離れにくくなり、連続的に加水分解が行われる(プロセッシブ)。一方 *H. jecorina* 由来 Endo-1,4-glucanase I (EGI) は典型的なエンド型セルラーゼとして位置づけられてきたが、その立体構造を見ると、活性中心付近の構造はCBHIとは異なり幅が広いことが分かる(Fig1.3)(Kleywegt et al. 1997)。そのためセルロース分子鎖は加水分解された後、酵素から容易に離れることができる(ノンプロセッシブ)。以上のような流れから現在では、セルロース分解を行うセルラーゼの作用機構は、

エンドーエキソ説ではなく、プロセッシビティー (processivity) という概念で考えられている。

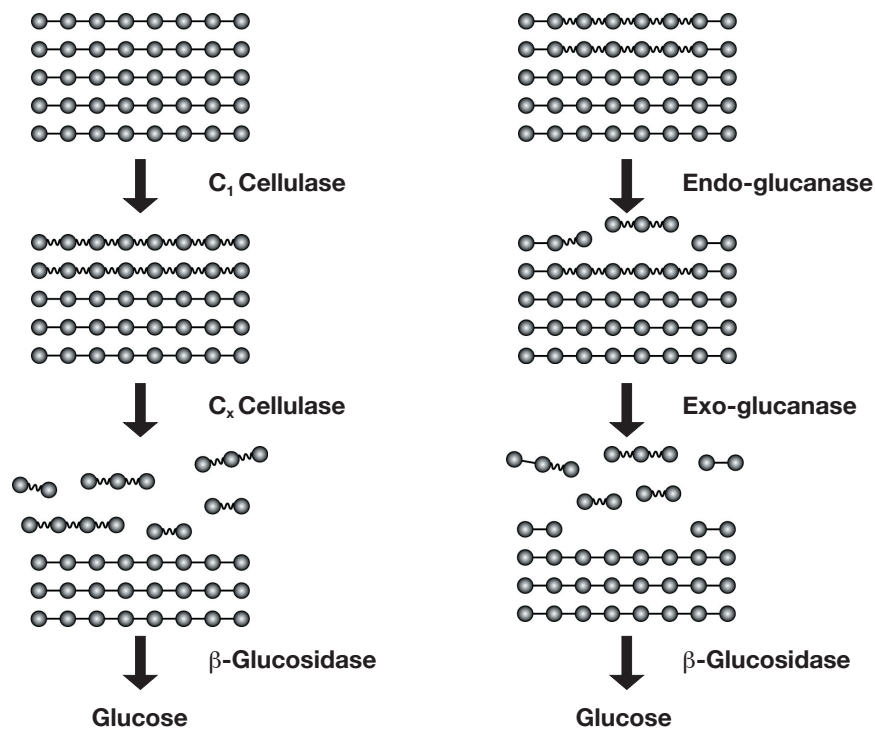


Fig1.2 C₁-C_x (left) and Endo-Exo (right) mechanism of cellulose hydrolysis.

●—●, cellulose chain with hydrogen bond; ●—w—●, cellulose chain without hydrogen bond

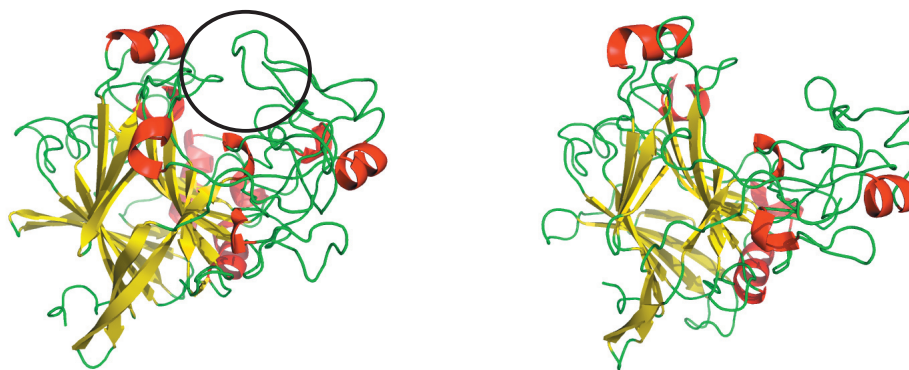


Fig1.3 Structural comparison of CBHI (left) and EGI (right) from *Hypocrea jecorina*.

CBHI, PDB ID 1CEL; EGI, PDB ID 1A39.

1.2.2 糖質加水分解酵素の分類

セルラーゼや BGL などの糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase; GH) は、1980 年代後半まで主に活性により分類されるのみであったが、その後分子生物学の進歩により多くの GH 遺伝子がクローニングされた。そこで Henrissat らは新たなタンパク質分類法として、疎水性クラスター解析 (Gaboriaud et al. 1987; Benchetrit et al. 1988; Henrissat et al. 1988) に注目し、それに基づきセルラーゼ、BGL、ヘミセルラーゼをファミリーとして分類することを試みた (Henrissat et al. 1989, Beguin 1990)。さらに Henrissat らは疎水性クラスター解析に基づき様々な GH をファミリーとして分類しており (Henrissat 1991; Henrissat et al. 1993, 1996)、その情報はデータベース CAZy(<http://www.cazy.org/>) で取りまとめられ、現在 (2008 年 12 月) までに GH は 114 のファミリーとして分類されている。その中で糸状菌が生産するセルラーゼは、GH ファミリー 5、6、7、9、12、45、61、74 と 8 つのファミリーに分類されている。また、BGL は GH ファミリー 1、3 に分類されている (Table 1.1)。

1.2.3 糖質加水分解酵素の反応機構

GH の反応機構は、反応生成物のアノマー構造の違いにより、「アノマー反転型 (Inverting)」または「アノマー保持型 (Retaining)」の二種類に分類される (McCarter and Withers. 1994; Rye and Withers. 2000; Davies et al. 2005)。

「アノマー反転型」においては、2 つの酸性残基が一般酸触媒および一般塩基触媒として働く。まずグリコシド結合に対して、一般酸触媒によるプロトンの供与、および一般塩基触媒の脱プロトン化で活性化した水分子による求核攻撃が起こる。その結果、糖はオキソカルボニウムイオンと呼ばれる中間体構造を経て、アノマーの反転が起こり反応が完了する (Fig 1.4a)。

「アノマー保持型」においては、2 つの酸性残基が一般酸・塩基触媒および求核触媒として働く。反応の第一段階として、まず求核触媒によるグリコシド結合の攻撃、および一般酸触媒によるプロトンの供与が起こる。その後、求核触媒と糖が共有結合を形成するアシル中間体を経由し、一般塩基触媒が脱プロトン化することで活性化した水分子がアシル中間体に対して求核攻撃することで糖が解離し反応は完了する (Fig 1.4b)。

CAzy データベースによると、GH ファミリー 6、9、45、74 に属するセルラーゼの反応機構はアノマー反転型であるのに対して、GH ファミリー 5、7、12 に属するセルラーゼ、ならびに GH ファミリー 1、3 に属する BGL の反応機構はアノマー

保持型である (Table1.1)。

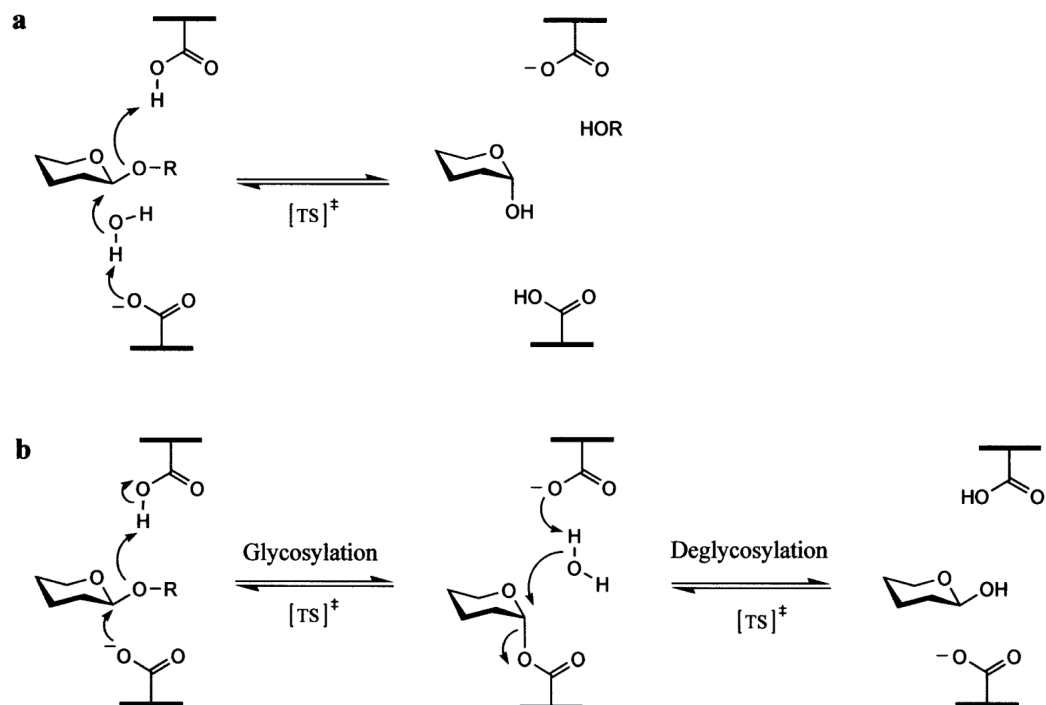


Fig1.4 Reaction mechanisms for inverting (a) and retaining (b) glycoside hydrolases.

Davies et al. 2003. [TS], transition state.

Table1.1 Classification of fungal cellulases and BGLs.

Enzyme	GH family	Reaction mechanism	Acid or Acid/Base	Base or Nucleophile
Cellulase	5	Retaining	Glu	Glu
	6	Inverting	Asp	Asp
	7	Retaining	Glu	Glu
	9	Inverting	Glu	Asp
	12	Retaining	Glu	Glu
	45	Inverting	Asp	Asp
	61	Inverting	not known	not known
β-Glucosidase	74	Inverting	Asp	Asp
	1	Retaining	Glu	Glu
	3	Retaining	Glu	Asp

Acid and Base represent catalytic residues in Inverting enzyme. Acid/Base and Nucleophile represent catalytic residues in Retaining enzyme.

1.3 β -グルコシダーゼ

1.3.1 β -グルコシダーゼとは

BGLは β -グルコシド結合を有するアリールグルコシド、アルキルグルコシド、糖質に作用し、その非還元末端側から β -グルコースを遊離するエキソ型の糖質加水分解酵素である(Esen, 1993)。BGLは微生物、植物、動物に広く存在しており、セルロース、配糖体、糖脂質などの代謝に関わることが報告されている。セルロース分解性微生物においてBGLは、セルラーゼにより切り出されたセロビオースやセロオリゴ糖を資化可能なグルコースまで分解する役割を担っている(Sternberg et al. 1977; Shewale, 1982)。植物においてBGLは、配糖体やセロオリゴ糖の代謝に関わることで、分化(Falk and Rask, 1995)、成長(Leah et al. 1995)、木化(Dharmawardhana et al. 1995)、生体防御(Niemeyer, 1988; Poulton, 1990; Rask et al. 2000)などに関わることが知られている。ヒトにおいては、糖脂質であるグルコセレブロシドの代謝に関わり、BGLをコードする遺伝子の欠損がゴーシェ病の要因となることが報告されている(Gatt, 1966; Yavin and Gatt, 1969)。

1.3.2 糸状菌が生産する β -グルコシダーゼ

上述したようにBGLは様々な生物種に存在するが、植物由来BGLや動物由来BGLは配糖体や糖脂質を天然の基質とするため、セルロースの酵素分解で求められる「セロビオースに対して高い反応特性を有するBGL」はセルロース分解性微生物が生産するBGLに限られる。なかでも優れたセルロース分解能を有する子囊菌(カビ)や担子菌(キノコ)など糸状菌が生産するBGLは、効率の良いセルロース分解を実現するために古くから注目を集めてきた(Sternberg et al. 1977)。

糸状菌は菌体外および菌体内にBGLを生産することでセルロースを分解することが知られており、菌体外に生産するBGLの多くはGHファミリー3、菌体内に生産するBGLの多くはGHファミリー1に分類されている。そのうち菌体外酵素であるGHファミリー3に属するBGLは、抽出する手間が掛からず精製も容易であるため、子囊菌 *Aspergillus* 属、*Humicola* 属、*Talaromyces* 属、*Hypocrea* 属を中心として多くの研究が行われており、それらの多くはセロビオースよりも長鎖のセロオリゴ糖に対する反応特性(反応速度、基質親和性)に優れる傾向を示すことが明らかとなっている(King and Smibert, 1963; Sternberg et al. 1977; Hirayama et al. 1978; Mchale and Coughlan, 1981; Sadana et al. 1983; Watanabe et al. 1992; Kubicek

et al. 1993)。

白色木材腐朽菌のモデル生物である担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は菌体外に GH ファミリー 3 に属する BGL を生産するが、この酵素もセロビオースを良好な基質とできず、基質特異性から β -1,3- グルコシダーゼとして位置づけられている (Lyman et al. 1995; Li and Renganathan. 1998; Igarashi et al. 2003; Kawai et al. 2003)。そのため *P. chrysosporium* においては、二量体であるセロビオースの形で菌体内に取り込み、GH ファミリー 1 に属する BGL により菌体内でグルコースへ変換する、というセロビオース代謝経路の存在が提案されている。このような報告例からも GH ファミリー 1 に属する BGL の酵素学的性質に興味を持たれるが、糸状菌が菌体内に生産する GH ファミリー 1 に属する BGL では、子囊菌 *H. grisea*、*H. jecorina*、*T. emersonii* 由来 BGL において機能解析が為されているのみであり (Mchale and Coughlan. 1981a, b; Peralta et al. 1990; Takashima et al. 1996, 1999; Saloheimo et al. 2002)、GH ファミリー 3 に属する BGL と比較すると情報は限られている。

1.4. GH ファミリー 1 に属する β - グルコシダーゼ

1.4.1 特性

現在 (2008 年 12 月) までに GH ファミリー 1 に属する 23 種 (古細菌 3 種、バクテリア 10 種、真核生物 10 種) 酵素の立体構造が明らかにされており (Tolley et al. 1993; Sanz-Aparicio et al. 1994; Barrett et al. 1995; Aguilar et al. 1997; Burmeister et al. 1997; Wiesmann et al. 1997; Sanz-Aparicio et al. 1998; Chi et al. 1999; Guasch et al. 1999; Czjzek et al. 2000; Hakulinen et al. 2000; Czjzek et al. 2001; Zouhar et al. 2001; Wang et al. 2003; Zechel et al. 2003; Akiba et al. 2004; Gloster et al. 2004; Verdoucq et al. 2004; Barleben et al. 2005; Husebye et al. 2005; Sue et al. 2005, 2006; Barleben et al. 2007; Isorna et al. 2007; Nijikken et al. 2007; Tribolo et al. 2007; Chuenchor et al. 2008; Nam et al. 2008)、その内 16 種が BGL として位置づけられている (Table 1.2)。GH ファミリー 1 では *Trifolium repens* (シロツメクサ) 由来 cyanogenic β -glucosidase において初めて立体構造が明らかにされており (Barrett et al. 1995)、全体構造は β -ストランドと α -ヘリックスを交互に 8 回繰り返す (β/α)₈ バレル構造であることが分かっている (Fig 1.5) (Banner et al. 1975)。GH ファミリー 1 に属する BGL の触媒機構はアノマー保持型であり (Kempton and Withers. 1992; Street et al. 1992)、加水分解の際一般酸・塩基触媒、求核触媒として働く 2 つの Glu が同定されており (Wang et al. 1995; Withers et al. 1990)、一般酸・塩基触媒を含む NEP モチーフ (Asn-Glu-Pro)、

および求核触媒を含む TENG モチーフ (Thr-Glu-Asn-Gly) として GH ファミリー 1 において広く保存されている。触媒残基である 2 つの Glu は、それぞれ 4 番目と 7 番目の β -ストランドの C 末端側に位置していることから、4/7 スーパーファミリーに分類されている (Jenkins et al. 1995)。また、活性中心において非還元末端のグルコピラノースと相互作用するアミノ酸残基群はサブサイト -1 と名前が付けられており、還元末端側の基質部位と相互作用するアミノ酸残基群はサブサイト +1、+2... と名前が付けられている (Fig1.6)(Davies et al. 1997)。

Table1.2 Structural information of GH family 1 enzymes.

	Protein	EC number	Organism
Archaea	alkyl β -glucosidase	3.2.1.21	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3
	β -glycosidase S	3.2.1.21, 3.2.1.23	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2
	β -glycosidase	3.2.1.-	<i>Thermosphaera aggregans</i> M11TL
Bacteria	β -glucosidase	3.2.1.21	<i>Bacillus circulans</i> subsp. <i>alkalophilus</i>
	6-P- β -galactosidase	3.2.1.85	<i>Lactococcus lactis</i> Z268
	β -glucosidase A	3.2.1.21	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	β -glucosidase B	3.2.1.21	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
	β -glucosidase	3.2.1.21	<i>Streptomyces</i> sp. QM-B814
	β -glucosidase A	3.2.1.21	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8
	β -glycosidase	3.2.1.21	<i>Thermus nonproteolyticus</i> HG102
	β -glycosidase	-	<i>Thermus thermophilus</i> HB8
	β -glycosidase	3.2.1.-	uncultured bacterium
	myrosinase	3.2.1.147	<i>Brevicoryne brassicae</i>
	β -glycosylceramidase	3.2.1.21, 3.2.1.62	<i>Homo sapiens</i>
Eukaryota	/ β -glucosidase	3.2.1.21	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
	β -glucosidase	3.2.1.21	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
	strictosidine β -glucosidase	3.2.1.105	<i>Rauvolfia serpentina</i>
	myrosinase	3.2.1.147	<i>Sinapis alba</i>
	cyanogenic β -glucosidase	3.2.1.21	<i>Sorghum bicolor</i> P721N
	β -glucosidase 2	3.2.1.21	<i>Trifolium repens</i>
	β -glucosidase	3.2.1.21	<i>Triticum aestivum</i>
	β -glucosidase 1	3.2.1.21	<i>Zea mays</i>
	zeatin β -glucosidase	3.2.1.21	<i>Zea mays</i>

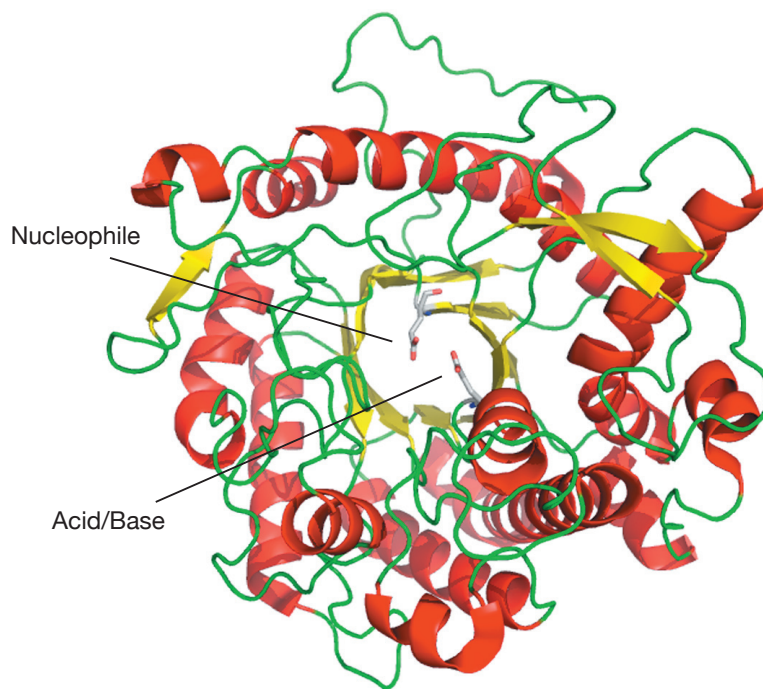


Fig1.5 Overall structure of GH family 1 BGLs.

Red, α -Helix; Yellow, β -sheet; Green, loop.

This figure was constructed using the structure of cyanogenic β -glucosidase from *T. repens* (PDB ID, 1CBG).

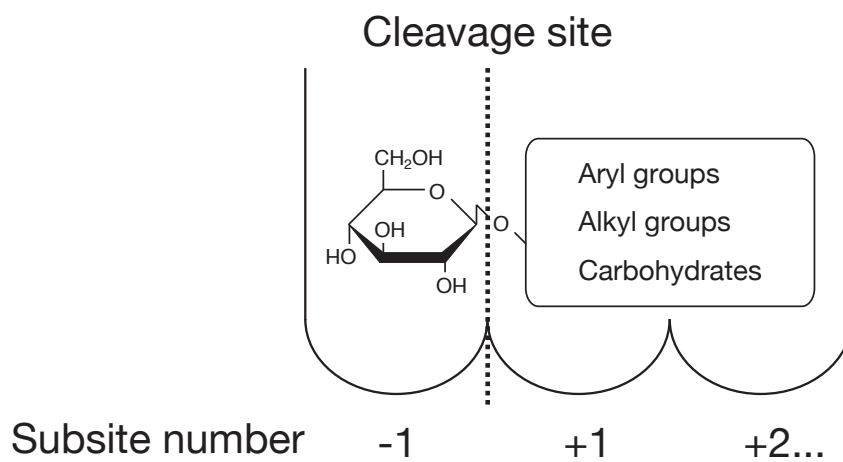


Fig1.6 Schematic image of active site of β -glucosidases.

Hydrolysis occurs between subsite -1 and +1.

1.4.2 サブサイト -1 に関する研究

立体構造が明らかにされている GH ファミリー 1 に属する多くの BGL において、酵素と基質または阻害剤の複合体構造解析が行われている (Barrett et al. 1995; Aguilar et al. 1997; Sanz-Aparicio et al. 1998; Czizek et al. 2001; Zechel et al. 2003; Isorna et al. 2007; Nijikken et al. 2007; Tribolo et al. 2007; Chuenchor et al. 2008)。その結果、サブサイト -1 を構成するアミノ酸残基群とグルコピラノースの相互作用が明らかにされており、グルコピラノースはサブサイト -1 において、少なくとも 4 つのアミノ酸残基と水素結合を形成すると考えられている (Table 1.3)。各水酸基ごとにみると、グルコピラノースの OH-2 は Asn、His、求核触媒の Glu、OH-3 は His、Gln、Trp、OH-4 は Gln、Glu、およびグルコピラノースの α 面と疎水性相互作用を形成する Trp、OH-6 は Glu、と水素結合を形成しうる距離に位置しており、それらの残基の保存性は非常に高いことから、上述したようなサブサイト -1 環境は GH ファミリー 1 に属する BGL において保存されていると考えられる (Fig 1.7)。

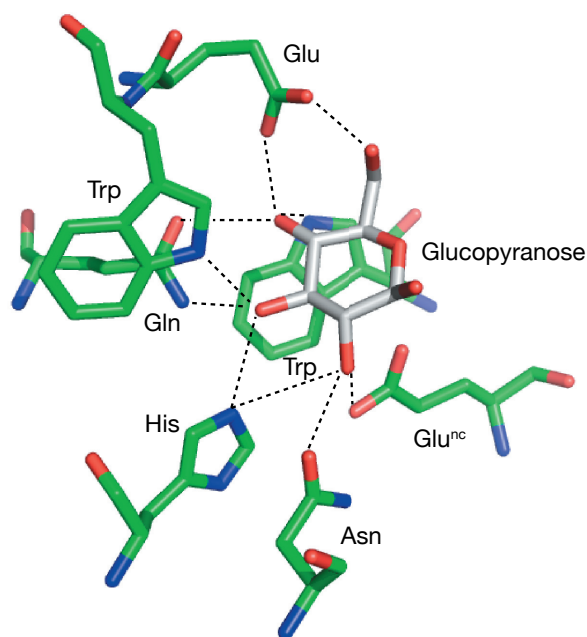
サブサイト -1 で形成される水素結合に関する研究は、立体構造解析だけでなくデオキシ糖や変異酵素を利用した反応速度論解析によっても詳細に為されている。Namchuk らはサブサイト -1 とグルコピラノースの水酸基間に形成される水素結合を解析するため、*Agrobacterium* sp 由来 BGL と各種デオキシ糖を利用することで、サブサイト -1 においては OH-2 との水素結合が加水分解反応過程における遷移状態形成に最も重要であることを報告している (Namchuk and Withers, 1995)。Marana らは *Spodoptera frugiperda* 由来 β -glycosidase 変異体を機能解析することにより、OH-4 と水素結合を形成する Gln と Glu においては、Glu の方が熱力学的な寄与が大きいことを報告している (Marana et al. 2002, 2004)。Hancock らは *Sulfolobus solfataricus* 由来 β -glycosidase 変異体を機能解析することにより、equatorial な OH-4 との相互作用形成には OH-4 と Glu、および Trp との水素結合形成が関与していることを実証している (Hancock et al. 2005)。このような立体構造的および反応速度論的な知見から、GH ファミリー 1 に属する BGL のサブサイト -1 においては、複雑な水素結合ネットワーク形成によりグルコピラノースが結合していると考えられる。

Table1.3 Residues forming the subsite -1 residues.

	Residues interacting with glycone hydroxyls			
	OH-2	OH-3	OH-4	OH-6
<i>S. solfataricus</i>	Asn205, Glu387 ^{nc}	Gln18, His150, Trp433	Gln18, Glu432	Glu432
<i>P. polymyxa</i> (BglA)	His121, Glu352 ^{nc}	Gln20, Trp406	Gln20, Glu405	Glu405
<i>P. polymyxa</i> (BglB)	Asn166, Glu356 ^{nc}	Gln22, His122, Trp410	Gln22, Glu409	-
<i>T. maritima</i>	Asn165, Glu351 ^{nc}	Gln20, His121, Trp406	Gln20, Trp398, Glu405	Glu405
<i>H. sapiens</i>	Asn164	His120, Trp425	Gln17, Glu424	Trp345, Glu424
<i>O. sativa</i>	-	Gln29, Trp441	Gln29, Glu440	Glu440
<i>P. chrysosporium</i>	His123, Asn169	Gln20, His123, Trp423	Gln20, Trp415, Glu422	Glu422
<i>R. serpentina</i>	Asn206, Glu207 ^{A/B} , Glu416 ^{nc}	Gln57, His161, Trp473	Gln57, Trp465, Glu472	Glu472, Tyr481
<i>S. bicolor</i>	His143, Asn188, Glu404 ^{nc}	Gln39, His143, Trp461	Gln39, Trp453, Glu460	Glu460
<i>Z. mays</i>	-	Gln38, His142, Trp465	Gln38, Trp457, Glu464	Glu464

^{nc}, catalytic nucleophile; ^{A/B}, Acid/Base.

P. polymyxa (BglA), Sanz-Aparicio et al. 1998; *P. polymyxa* (BglB), Isorna et al. 2007; *T. maritima*, Zechel et al. 2003; *H. sapiens*, Tribolo et al. 2007; *O. sativa*, Chuenchor et al. 2008; *P. chrysosporium*, Nijikken et al. 2006; *R. serpentina*, Barleben et al. 2007; *S. bicolor*, Barrett et al. 1995; *S. solfataricus*, Gloster et al. 2004; *Z. mays*, Czjzek et al. 2001.

**Fig1.7 Hydrogen bond network within the subsite -1.**

This figure was constructed using the structure of β -glycosylceramidase complexed with glucose (PDB ID, 2E9L) by PyMOL. Glu^{nc}, catalytic nucleophile.

1.4.3 プラス側サブサイトに関する研究

1.4.3.1 配糖体の認識

これまで GH ファミリー 1 に属する 3 種の植物由来 BGL において酵素と天然基質との複合体構造解析が行われている。その結果、*Rauvolfia serpentina*(インドジャボク)由来 strictosidine β -glucosidase(SG) は天然基質である strictosidine との複合体構造、*Sorghum bicolor*(モロコシ)由来 dhurrinase(SbDhr1) は天然基質である dhurrin との複合体構造、*Zea mays*(トウモロコシ)由来は 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one-(DIMBOA)-glucosidase(ZmGlu1) と天然基質である DIMBOA-glucoside との複合体構造が明らかにされており、基質との相互作用に与するアミノ酸残基ならびに活性中心ポケットの形状に関する情報が得られている (Fig1.8)(Czjzek et al. 2001; Barret et al. 1995; Barleben et al. 2005, 2007)。

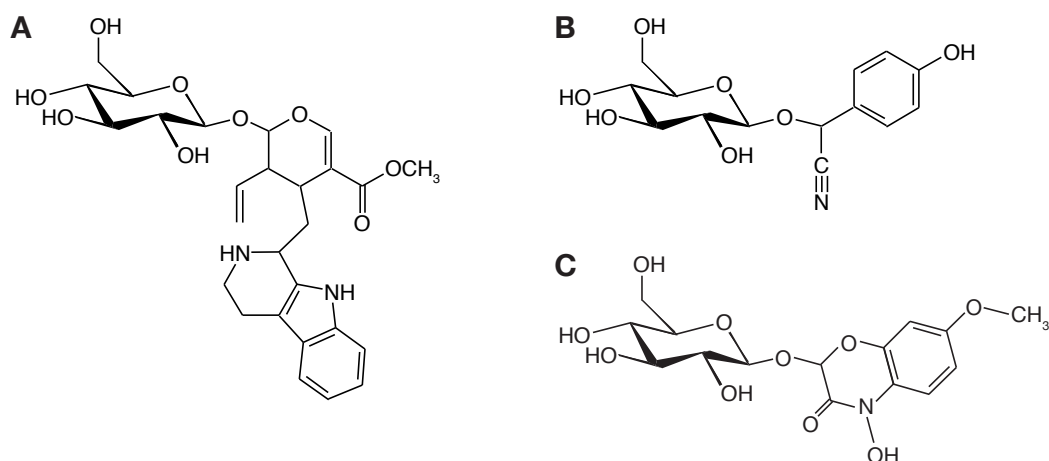


Fig1.8 Structural formula of aglycons complexed with plant GH family 1 BGLs.

A, strictosidine; B, dhurrin; C, DIMBOA-glucoside.

基質との相互作用をまとめると、SG と配糖体の還元末端側部分には水素結合形成が観測されていないことから、配糖体の還元末端側部位との主たる相互作用は疎水性相互作用であると考えられている (Barleben et al. 2007)。ZmGlu1 のサブサイト +1 においても、疎水性相互作用が配糖体の還元末端側部位との主たる相互作用であると考えられている (Czjzek et al. 2000; Verdoucq et al. 2003)。一方、SbDhr1 では疎水性相互作用に加え Asn259、Ser462 が水分子を介して配糖体の還元末端側部位と水素結合を形成することが明らかとなっている (Verdoucq et al. 2003, 2004)。

次に活性中心ポケットの形状に関してまとめると、SG のサブサイト +1 である

Asn214、Phe221、Asn474、SbDhr1 のサブサイト +1 である Val196、Leu203、Ser462 は、ZmGlu1 では Phe198、Phe205、Phe466 と嵩高い残基に置換されていることにより、SG および SbDhr1 の活性中心ポケットは幅の広い形状をしているのに対して、ZmGlu1 の活性中心ポケットは幅が狭く細長い形状をしている。SG、SbDhr1、ZmGlu1 およびこれまでに立体構造が明らかにされている植物由来 BGL をアラインメント解析に供すると、サブサイト +1 を構成する残基の保存性は低い。そのため配糖体を天然の基質とする GH ファミリー 1 に属する BGL は、様々な配糖体と結合するためにサブサイト +1 を多様化させ、それぞれに適した相互作用や活性中心の形状を調節していると考えられている。

1.4.3.2 セロビオース、セロオリゴ糖の認識

先に GH ファミリー 1 に属する BGL による配糖体の認識について述べたが、ここではセロビオースやセロオリゴ糖の認識に関する研究を紹介する。これまでに細菌 *P. polymyxa*、*Hordeum vulgare* (オオムギ)、*O. sativa* (アジアイネ) 由来 GH ファミリー 1 に属する BGL を対象として、立体構造解析や反応速度論解析によりセロビオース、セロオリゴ糖の認識に関する知見が得られている。

P. polymyxa は GH ファミリー 1 に属する 2 つの BGL (BglA、BglB) を生産する (Candelas et al. 1989, 1990)。両酵素の基質特異性が調べられた結果、BglA はセロビオース特異的であるのに対して、BglB はセロビオースよりも長鎖のセロオリゴ糖に対して高い反応特性を有することが明らかとなっている (Painbeni et al. 1992)。後に両酵素の立体構造解析が行われ、BglB においてはセロビオースのアナログ基質であるチオセロビオース、およびセロテトラオースとの複合体構造解析に成功しており、それらの基質と結合する上で重要な残基について議論が為されている (Sanz-Aparicio et al. 1998; Isorna et al. 2007)。

H. vulgare 由来 BGL (BGQ60) と *O. sativa* 由来 BGL (BGlu1) はともに植物由来 BGL であり、アミノ酸配列相同性は 66% と非常に高い (Simos et al. 1994; Leah et al. 1995)。しかしながら、両酵素はセロオリゴ糖 (重合度 2-5) に対する反応特性が異なっているため、植物由来 BGL のセロオリゴ糖に対する基質特異性を明らかにする上で良いモデルになると考えられている。BGQ60 はセロペンタオース > セロテトラオース > セロビオース > セロトリオースの順で高い反応特性 (反応速度、基質親和性) を示すが (Hrmova et al. 1996)、BGlu1 はセロペンタオース > セロテトラオース > セロトリオース > セロビオースの順で高い反応特性を示す (Opassiri et al. 2003, 2004, 2006)。両酵素のセロオリゴ糖に対する基質特異性は Hiromi らにより提唱さ

れた「サブサイト理論」に基づく解析が行われ (Hiromi, 1970)、BGQ60 ではサブサイト +2 とグルコースとの親和性が小さいこと、BGlu1 ではサブサイト +2、+3 とグルコースとの親和性が大きいこと、によりそれぞれの酵素特有な基質特異性を示すと考えられている (Hrmova et al. 1996; Opassiri et al. 2004)。後に BGlu1 の立体構造解析およびセロトリオースとのドッキングシミュレーションが行われ、BGlu1 および BGQ60 にはプラス側のサブサイトを形成すると予想される位置に芳香族アミノ酸が多く存在するが、配糖体を基質とする植物由来 BGL にはそれらの残基が存在しないことが明らかとなっている (Chuenchor et al. 2008)。そのため BGlu1、BGQ60 などの植物由来 BGL が長鎖のセロオリゴ糖と結合するためには、プラス側サブサイトに位置する芳香族アミノ酸が重要であると考えられている。

上述した 4 種酵素の立体構造解析ならびに反応速度論解析より、セロビオースやセロオリゴ糖に対する基質特異性が調べられているが、いずれの酵素もセロビオースに対する反応特性に乏しい (BglA, $K_m=13\text{mM}$, k_{cat} 未発表; BglB, $K_m=100\text{mM}$, k_{cat} 未発表; BGlu1, $K_m=31.5\text{mM}$, $k_{cat}=1.52\text{s}^{-1}$; BGQ60, $K_m=2.67\text{mM}$, $k_{cat}=11.58\text{s}^{-1}$)。さらに変異酵素の機能解析が殆ど行われていないことから、セロビオースの認識に関する十分な情報が得られているとはいえない。

1.5 本研究の目的

糸状菌は菌体外に GH ファミリー 3 に属する BGL を生産するが、それらの多くはセロビオースに対する反応特性 (反応速度、基質親和性) に乏しいことが明らかとなっている。多くの BGL のセロビオースに対する K_m 値は数 mM 程度であるが、セルラーゼに対するセロビオースの阻害定数 (K_i 値) が $100\mu\text{M}$ 以下であることを考慮すると (Igarashi et al. 1998)、セルロースの酵素糖化工程における生成物阻害を効率よく解除するためにも、セロビオースに対してより高い親和性を有する BGL が必要といえる。また多くのセルラーゼの至適 pH は酸性域であることから、酸性域で高い反応特性を示すことも BGL に求められる性質の一つである。そこで本研究では、先ずセロビオースに対する反応特性 (反応速度、基質親和性) の高い BGL を取得するため、GH ファミリー 1 に属する BGL に注目した。そして GH ファミリー 1 に属する BGL の構造と機能の関係を明らかにすることにより、酸性域においてセロビオースに対して高い反応特性を示す新規な BGL を取得するための指針を得ることを目的とした。

上述した目的を達成するため本研究では、BGL を取得する起源として、ゲノム情報が公開されており GH ファミリー 1 に属する BGL を 2 つ有することが明らか

となっている担子菌 *P. chrysosporium* に注目した。そしてゲノム情報を利用して設計したプライマー対を利用することにより、*P. chrysosporium* 由来 GH ファミリー 1 に属する BGL をコードする cDNA の取得を試みた（第二章）。次に取得した 2 つの cDNA がコードするタンパク質を組換え体 (BGL1A、BGL1B) として生産し、精製した組換え体の機能解析を行うことで、両酵素の酵素学的性質を明らかにすることを試みた（第三章）。また、BGL1A と BGL1B の立体構造情報に基づき、両酵素の変異体を作製し機能解析を行うことにより、セロビオース認識に関与する因子の解析を試みた（第四章）。さらに両酵素の立体構造情報に基づき変異体を作製し pH 依存性を測定することにより、酸性域における活性に関与する因子の解析を試みた（第五章）。以上の取り組みにより、酸性域においてセロビオースに対して高い反応特性を示す新規な BGL を取得するための指針を得ることを目指した。

第二章

GH ファミリー 1 に属する
BGL をコードする cDNA の取得

2.1 目的

担子菌 *P. chrysosporium* 由来 GH ファミリー 1 に属する新規な BGL の酵素学的性質を明らかにするため、本章では先ずそれらをコードする cDNA を取得することを目的とした。本菌は全ゲノム配列情報が明らかになっていることから、cDNA を取得するにあたっては、*P. chrysosporium* 由来 GH ファミリー 1 に属する BGL に特異的なプライマー対を設計し PCR に利用した。こうして得られた塩基配列、推定アミノ酸配列情報を、配列解析やデータベース検索に供することで詳細に解析を行った。

2.2 実験方法

2.2.1 GH ファミリー 1 に属する BGL をコードする cDNA の取得

2% セルロース (Whatman CF11) を単一の炭素源とする Kremer and Wood 培地 (Kremer and Wood, 1992) において 3 日間培養した *P. chrysosporium* K-3 株 (Johnsrud and Eriksson, 1985) の菌体を用い、Kawai らの方法に準じて合成した一本鎖 cDNA を鋳型として (Kawai et al. 2006)、Fig2.1 で示したプライマーを利用することにより 5'RACE-PCR、3'RACE-PCR を行った。得られた増幅断片の塩基配列を日立 SQ5500E 型核酸シーケンサ (日立製作所) により解析した後、決定した 5' 末端、3' 末端の塩基配列情報をもとにプライマー対を設計し、BGL をコードする cDNA の全長クローニングを行った。クローニングされた cDNA の塩基配列を核酸シーケンサによって解析した後、推定アミノ酸配列を決定した。

2.2.2. 配列解析

2.2.1 で明らかにした 2 種類の cDNA がコードするタンパク質 (BGL1A、BGL1B) の推定アミノ酸配列をクエリーとして、NCBI protein database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al. 1990, 1997) に対する protein blast 検索を行った。マルチプルアラインメント解析は GenomeNet が提供する ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson et al. 1994) を用いて行った。両酵素の局在性に関する知見を得るため、シグナルペプチドの有無を Center for Biological Sequence Analysis の提供する SignalP version 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Nielsen et al. 1997; Bendtsen et al. 2004) によって検索した。

2.3. 結果

2.3.1 GH ファミリー 1 に属する BGL をコードする cDNA の取得

P. chrysosporium ゲノムデータベース ver1.0 上で gx.44.14.1、gx.79.11.1 と名付けられた配列情報をもとに、Fig2.1 に示したプライマー対を設計し、GH ファミリー 1 に属する BGL をコードする 2 つの cDNA を RT-PCR および RACE により増幅させた後、それぞれの塩基配列および推定アミノ酸配列を決定した。gx.44.14.1 に含まれ *bgl1A* と名付けられた cDNA のオープンリーディングフレーム (ORF) は、462 残基のアミノ酸をコードする 1389 塩基対からなることが明らかとなった (Accession No. AB253326)(Fig2.2)。また gx.79.11.1 に含まれ *bgl1B* と名付けられた cDNA の ORF は、540 残基のアミノ酸をコードする 1623 塩基対からなることが明らかとなった (Accession No. AB253327)(Fig2.3)。

2.3.2 配列解析

Protein blast を利用して両 BGL と相同性の高いタンパク質を検索したところ、これまでに配列情報が明らかとなっている子囊菌由来 GH ファミリー 1 に属する BGL といずれも 45% 以上の高い相同性を示すことが明らかとなった (Table2.1)。なかでも両 BGL は *H. grisea* 由来 Bgl4 と最も高いアミノ酸配列相同性を示し、その値はそれぞれ 56%、58% であった。Clustal W により子囊菌由来 GH ファミリー 1 に属する BGL とアラインメント解析を行った結果、加水分解の際に一般酸・塩基触媒として働く Glu(BGL1A, Glu170; BGL1B, Glu175) を含む NEP 配列、および求核触媒として働く Glu(BGL1A, Glu365; BGL1B, Glu380) を含む TENG 配列がそれぞれ保存されていた (Fig2.4)。BGL1A と BGL1B のアミノ酸配列を比較すると、BGL1B は C 末端側のアミノ酸残基数が 63 残基長いことが明らかとなった。そこでその配列を BLAST 検索に供したが、いずれのタンパク質とも相同性を示さなかった。伸長配列を除き、BGL1A と BGL1B は 65% のアミノ酸配列相同性を示していた。両酵素の局在性に関する知見を得るため、SignalP によりシグナルペプチドの有無を検索したところ、どちらの N 末端配列にもシグナルペプチドは検出されなかった。

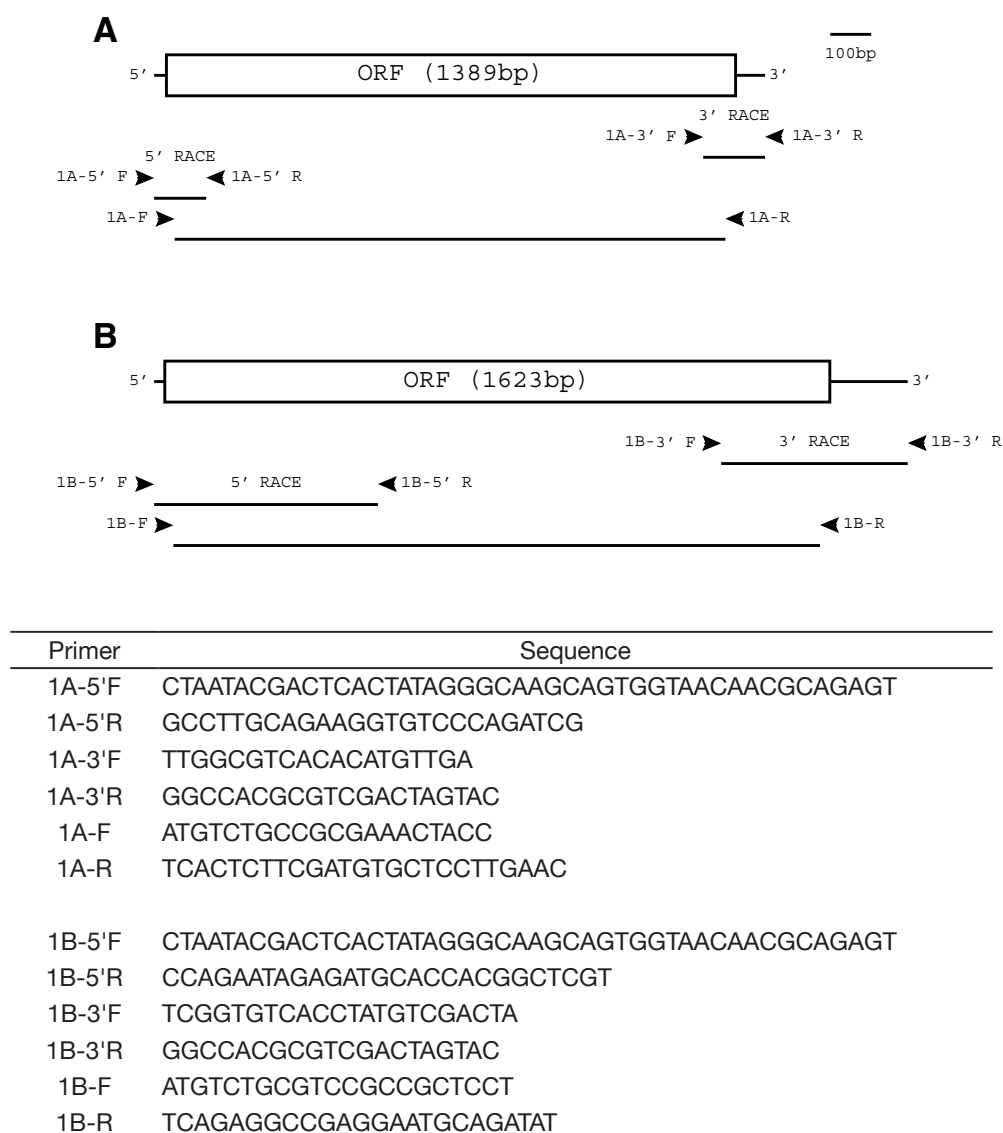


Fig2.1 Schematic diagram of cDNA encoding *P. chrysosporium* BGL1A (A) and BGL1B (B), showing the locations and nucleotide sequences of primers used for PCR.

F and R indicate forward and reverse directions, respectively.

Table2.1 Structural comparison of fungal BGLs belonging to GH family 1

Organism	Protein	Nucleotide (bp)	Amino acid (aa)	Mw (kDa)	Identity (%)	
					BGL1A	BGL1B
<i>Aspergillus niger</i>	Bgl1	1302	434	48	51	53
<i>Aspergillus oryzae</i>	β -glucosidase B3	1314	438	49	51	55
<i>Aspergillus oryzae</i>	β -glucosidase B6	1518	506	57	48	47
<i>Humicola grisea</i>	Bgl4	1398	466	54	56	58
<i>Hypocrea jecorina</i>	CellA	1428	476	52	55	55
<i>Talaromyces emersonii</i>	Bgl	1467	489	56	52	54

Bgl1, AF268911; β -glucosidase B3, AP007155; β -glucosidase B6, AP007166; Bgl4, AB003109; CellA, AB003110; Bgl, AF439322.

GGTTCTCCCTAGGTTCTGTGCGTCTACACA -1

1	ATGTCCTGCCGCGAAACTACCCAAGTCGTTCTGTCGGGGCTATGCCACCGCGGCGTACCAGATCGAGGGATCGCCAGACAAGGACGGGCGT	90
1	M S A A K L P K S F V W G Y A T A A Y Q I E G S P D K D G R	30
91	GAGCCGTCGATCTGGGACACCTTCTGCAAGGCCCGCAAGATCGCGGACGGCTCGAGCGGCGACGTCGCGACCGACTCGTACAACCGG	180
31	E P S I W D T F C K A P G K I A D G S S G D V A T D S Y N R	60
181	TGGCGCGAGGAGCTGCAGCTCCTCAAGTCCTACGGCGTCAAAGCGTATCGCTTCTCGCTCTCGTGGTCGCGGATCATACCCAAGGCGGG	270
61	W R E D V Q L L K S Y G V K A Y R F S L S W S R I I P K G G	90
271	CGCAGCGATCCTGTGAACGGGCGGGGATCAAGCACTACCGCACGCTCATCGAGGAGCTTGTGAAGGAGGGCATCACTCCGTTCTGTGACA	360
91	R S D P V N G A G I K H Y R T L I E E L V K E G I T P F V T	120
361	CTGTATCATTGGGACCTTCCCCAAGCACTAGATGATCGGTATGGCGGCTGGCTGAACAAAGAGGAAGCAATTCAGGACTTTACGAACTAC	450
121	L Y H W D L P Q A L D D R Y G G W L N K E E A I Q D F T N Y	150
451	GCGAAACTTTGCTTCGAATCCTTCGGGGATCTTGTGCAGAACTGGATCACCTTCAACGAACCTGGGTCATTTCCGTGATGGGCTACGGA	540
151	A K L C F E S F G D L V Q N W I T F N E P W V I S V M G Y G	180
541	AACGGCATCTTTGCTCCTGGCCATGTCAAGTAATACTAGCCTTGGATAGTGTGCGCACCATATTACTTGGCCATGCACATGCGGTGAAG	630
181	N G I F A P G H V S N T E P W I V S H H I I L A H A H A V K	210
631	CTCTATAGAGACGAATTCAAAGAGAAACAAGGCGGACAAATTTGGTATCACGCTCGATAGCCACTGGCTCATCCCTATGATGACACCGAT	720
211	L Y R D E F K E K Q G G Q I G I T L D S H W L I P Y D D T D	240
721	GCAAGCAAGGAGGCGACGCTCCGCGCAATGGAGTTTAAGCTCGGTGCTTTGCAAATCCGATATACAAGGAGAGTATCCTCCACGTATC	810
241	A S K E A T L R A M E F K L G R F A N P I Y K G E Y P P R I	270
811	AAGAAGATCCTCGGTGACCGCCTCCCGAGTTACCCCCGAGGAAATTGAGCTTGTGAAGGGCTCCTCCGACTTCTTCGGCCTGAACACG	900
271	K K I L G D R L P E F T P E E I E L V K G S S D F F G L N T	30
901	TACACGACGCTATCTGTCAGGATGGGGGACGCGACGAGCTGGCGGGCTTCGTCAAGACAGGGCACACGCGGGCCGACGGACACAGCTG	990
301	Y T T H L V Q D G G S D E L A G F V K T G H T R A D G T Q L	330
991	GGAAACGAGTCTGACATGGGTTGGTTGCAGACTTACGGCCCGGGGTTCCGATGGCTGCTGAACTACCTGTGGAAGGCATATGATAAACCT	1080
331	G T Q S D M G W L Q T Y G P G F R W L L N Y L W K A Y D K P	360
1081	GTCTACGTACAGAGAACGATTCCCAAGTCAAGGGCGAGAAGACCTTCCCGTGGAACAAGCGGTCGACGACACGGACAGGACAGGCGTAT	1170
361	V Y V T E N G F P V K G E N D L P V E Q A V D D T D R Q A Y	390
1171	TACCGTGACTACACGAGGCGCTGCTGCAAGCCGTAACGGAAGACGGCGCGACGTGCGGGGGTATTTTCGGATGGAGTCTTCTCGATAAC	1260
391	Y R D Y T E A L L Q A V T E D G A D V R G Y F G W S L L D N	420
1261	TTGAGTGGGCGGAGGCTACAAGGTTTCGCTTTGGCGTCACACATGTTGACTATGAGACGCAAGCGGACACCGAAGAAGTCTGCCGAG	1350
421	F E W A E G Y K V R F G V T H V D Y E T Q K R T P K K S A E	450
1351	TTCTGTCCCGTGGTTCAAGGAGCACATCGAAGAGTGA	1389
451	F L S R W F K E H I E E *	
1390	GATTTCCTGCCTTTGCTGTCCCTATGCGAAACTACAAATACACCTAGATGTTACGAATACACTTTTGGCGTC (An)	

Fig2.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of cDNA encoding *P. chrysosporium* BGL1A.

		ACGCGGGGACCTCTCAGAGAGCAAC	-1
1	ATGTCTGCGTCCGCGCTCCTCCAAACAGCTCCCTGCAGACTTTCTATGGGGCTTCGCAACTGCGAGCTTCCAGATTGAAGGCGCAACT	90	
1	M S A S A A P P N K L P A D F L W G F A T A S F Q I E G A T	30	
91	GACGTGGACGGACGTGGCAAGTCCATTTGGGACGACTTCTCGAAAATACCTGGCAAGACGCTCGACGGAAGAACGGAGATGTGCGGACC	180	
31	D V D G R G K S I W D D F S K I P G K T L D G K N G D V A T	60	
181	GACTCTTACAACCGCTGGCGAGAAGACGTGCACTGCTCGTCCAGTACGGCGTGAAGAGCTACCGCTTCTCCATCTCCTGGTCTCGTATC	270	
61	D S Y N R W R E D V D L L V Q Y G V K S Y R F S I S W S R I	90	
271	ATTCCCCTCGGAGGCCGGAACGACCCAGTAAACGAGGCCGGAATTAAATTCTACTCGGATCTCATGTATGCGCTGCTCGAGCGGGGCATC	360	
91	I P L G G R N D P V N E A G I K F Y S D L I D A L L E R G I	120	
361	GTGCCCTTTGTGACTCTCTACCACTGGGACCTCCCGCAGGCCCTGCACGACCCGTACCTTGGCTGGCTGAACAAGGACGAGATCGTCCAG	450	
121	V P F V T L Y H W D L P Q A L H D R Y L G W L N K D E I V Q	150	
451	GACTATGTTGCTACGCGGGGTCTGCTTCGAGCGCTTTTGGCGATCGAGTAAAACTGGTTGACGATGAACGAGCCGTGGTGCATCTCT	540	
151	D Y V G R Y A G V C F E R F G D R V K H W L T M N E P W C I S	180	
541	ATTCTGGGTACGCGCGGGGTGTTTCGCGCTGCGCCGCTCAAGTGACCGCATGCGCTCGCCAGAGGGTGATTCTCTGCAAGCAACCTTGG	630	
181	I L G Y G R G V F A P G R S S D R M R S P E G D S S T E P W	210	
631	ATCGTCGGCCACAGTGTGATCTCTGCGCCATGCGTACGCGGTCAAGCTCTACCGCGAGCAGTTCAAGGCGAACAGGGGCGGCCAGATCGGC	720	
211	I V G H S V I L A H A Y A V K L Y R E Q F K A N R G G Q I G	240	
721	ATCACCTCAACGCGACTGGGCCATGCCGTACGACGACAGTCCGCAAAACATTGAGGCTGCTCAGCACGCATGGATGTTGCCATCGGT	810	
241	I T L N G D W A M P Y D D S P Q N I E A A Q H A L D V A I G	270	
811	TGGTTCGCGGACCCCATTTACCTCGGCCAATACCCGCGTATATGAAAGAGATGCTGGGCGACAGGCTTCCGGAGTTTACCCCGGAGGAA	900	
271	W F A D P I Y L G Q Y P A Y M K E M L G D R L P E F T P E E	300	
901	CTCGCTGTCGTCAAGGGTCTGTCGGACTTCTATGGCATGAACACGTACACCACGAACCTCTGCAAGGCTGGTGGTGAAGACGAGTTCCAA	990	
301	L A V V K G S S D F Y G M N T Y T T N L C K A G G E D E F Q	330	
991	GGGAACGTCGAATACACCTTCACTCGCCCGACGGCACGCACTCGGCACTGCTGCCCACTGCTCCTGGCTGCAGGATTACGCGCCGGGC	1080	
331	G N V E Y T F T R P D G T Q L G T A A H C S W L Q D Y A P G	360	
1081	TTCCGCGACTTGCTCAACTACCTGTACAAACGTTACCGCAAACCCATCTACGTGACCGAGAACGGGTTGCGGTGAAGGATGAGAACTCC	1170	
361	F R D L L N Y L Y K R Y R K P I Y V T E N G F A V K D E N S	390	
1171	AAGCCGCTCGAGGAAGCCCTCAAGGATGACGACCGCGTGCATCTACTACCAGGGTGTGACCGACTCCCTGCTTGGGCGGTGAAGGAGGAC	1260	
391	K P L E E A L K D D D R V H Y Y Q G V T D S L L A A V K E D	420	
1261	GGCGTTGATGTCCGGGGCTACTTTGGCTGGAGTCTTCTCGACAACCTTCGAATGGGCGGACGGGTACATCACCCTGCTCGGTGTACCTAT	1350	
421	G V D V R G Y F G W S L L D N F E W A D G Y I T R F G V T Y	450	
1351	GTCGACTACGACACCCAAAAGCGGTACCCGAAGGACTCGGGCAAGTTCCTCTCACAGTGGTTCCAGCGCACATCGCGGAGAGCCCCAAG	1440	
451	V D Y D T Q K R Y P K D S G K F L S Q W F P A H I A E S P K	480	
1441	CCGCGCGGAGACAAAGAAGGCGGCAACGCGCTCGCCGCTGAAGCCCCACGGGCGATCTCCAACGGTGTGACGAAGAAGTCTCTCGGCG	1530	
481	P A A E T K K A A T P S P L K P H G A I S N G V S K K S S A	510	
1531	ACGAAGGAACCAAGAGTGCTTCGCGCAAAAAGGGAGGAAAAGCCCCATTCCGCCCGCTTCACAGCGTACATATCTGCATTCTCTCGGCCTC	1620	
511	T K E P K S A S R K K G R K A P F A R F T A Y I S A F L G L	540	
1621	TGA	1623	
	*		
1624	GGCGGATCCTGTTGGCGTTCCCTGCTTACCGGACTAGAATAATGTGTTTCTCACTCACTCGCCTTTCCCATCGTCACTGTAAATAT	1714	
1715	TCCCCACTGGAGGTTCTACCTTCAGTTGTAGTTGTATGCTTTTCGCTATCGTTGATACCTCTGCTATCCGGATTTTATCATTA	1805	
1806	CCTACAGACT (An)		

Fig2.3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of cDNA encoding *P. chrysosporium* BGL1B.

```

bgl4      1  -----MSLPPDFKQWGFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSG 48
Bgl2      1  -----MLPKDFQWGFATAAYQIEGAVDQDGRGPSIWDTFCAQPGKIADGSSG 47
Bg1       1  MTTTETPTTTTSTLPPDFLWGFATASYQIEGAFDEGRLPSIWDTFSKTPGKVEDGTNG 60
BGL1A     1  ----MSA----AKLPKSFVWGYATAAYQIEGSPDKDGREPSIWDTFCKAPGKIADGSSG 51
BGL1B     1  ----MSASAAPPNKLPAFLWGFATASFQIEGATDVDGRGKSIWDDFSKIPGKTLDGKNG 56
          ** . * **:***:****: : *** ***** * . *** **..*

bgl4      109 EAGITPFITLFHWDLDPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAIP-KCKHWITFNEP 167
Bgl2      108 DAGITPFITLFHWDLPEGLHQRYGGLNRTFPLDFENYARVMFRLP-KVRNWITFNEP 166
Bg1       121 AAGIEPFVTLFHWDLPEELMKRYGGMLNKEEFVADYANYARVVFNALGSKVKHWITFNEP 180
BGL1A     112 KEGITPFVTLYHWDLPQALDDRYGGWLNKEEAIQDFTNYAKLCFESFGDLVQNWITFNEP 171
BGL1B     117 ERGIVPFVTLYHWDLPQALHDRYLGWLNKDEIVQDYVRYAGVCFERFGRVKKHWTMNEP 176
          ** *:***:****: * .** * *: * *: .** : * . : :*:***

bgl4      347 SFWLRPHAQGFRLDNLNWSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFN DY 406
Bgl2      337 SPWLRPCAAGFRDFLVWISKRYGYPIYVTENGTSIKGESDLPKEKILEDDFRVKYNEY 396
Bg1       360 CEWLRPFPLGFRKLLKWLADRYNNPKIYVTENGTSVKGESDKPLEEVLNDEFVQYYRDY 419
BGL1A     336 MGWLQTYGPGFRWLLNYLWKAYDKP-VYVTENGFPVKGENDLPEQAVDDTDRQAYYRDY 394
BGL1B     351 CSWLQDYAPGFRDNLNLYKRYRKP-IYVTENGFAVKDENSKPLEEALKDDDRVHHYQGV 409
          **:      *** : * : . * * :***** :*. * . * *: :. * * *:.

bgl4      407 VRAMAAVAEDGCNVRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVGYTYVDYANDQKRYPKKSAKSLK 466
Bgl2      397 IRAMVTAVELDGVNVKGYFAWSLMDNFEWADGYVTRFGVYTYVDYENGQKRFPPKSAKSLK 456
Bg1       420 IGAMVDAVAQDGVNVKAYMAWSLLDNFEWSEGYRSRFGVYTYVDYKNGQKRIPKKSALVIG 479
BGL1A     395 TEALLQAVTEDGADVRYFGWSLLDNFEWAEGYKVRFGVTHVDYET-QKRTPKKSAEFLS 453
BGL1B     410 TDSLAAVKEDGVDVRGYFGWSLLDNFEWADGYITRFVGYTYVDYDT-QKRYPKDSGKFLS 468
          :: ** ** :*:*.***:*****:*** *****:*** ..*** **..* :

bgl4      467 PLFDSLIRKE----- 476
Bgl2      457 PLFDELIAAA----- 466
Bg1       480 ELFNKYIRKE----- 489
BGL1A     454 RWFKEHIEE----- 462
BGL1B     469 QWFFAHIAESPKPAAETKKAATPSPLKPHGAISNGVSKKSSATKEPKSASRKKGRKAPFA 528
          * *

bgl4      -----
Bgl2      -----
Bg1       -----
BGL1A     -----
BGL1B     529 RFTAYISAFLGL 540

```

Fig2.4 Multiple alignment of amino acid sequences of *P. chrysosporium* BGL1A, BGL1B, and other BGLs from ascomycetes belonging to GH family 1.

The conserved GH family 1 N-terminal signature is highlighted. The putative catalytic proton donor is boxed, and the putative catalytic nucleophile is marked with half-toned boxes. bgl4, *H. grisea* var. thermoidea bgl4; Bgl2, *H. jecorina* QM9414 Bgl2; Bg1, *T. emersonii* Bg1.

2.4 考察

これまでに多くの糸状菌由来 BGL の配列情報が公開されているが、それらはいずれも GH ファミリー 1 または 3 に分類されている (CAZy, <http://www.cazy.org/CAZY/>) (Henrissat 1991; Henrissat and Bairoch 1993, 1996; Cantarel et al. 2008)。担子菌 *P. chrysosporium* においては GH ファミリー 3 に属する BGL の機能解析が行われているが、この酵素はセロビオースに対する親和性が低く、基質特異性から β -1,3- グルコシダーゼとして位置づけられている (Igarashi et al. 2003)。そこで本研究では *P. chrysosporium* ゲノム中に 2 つ存在する GH ファミリー 1 に属する BGL 様遺伝子に注目し、それらをコードする cDNA の取得を試みた。

ゲノム配列情報を利用して配列特異的なプライマー対を設計し、RACE-PCR、RT-PCR により BGL をコードすると予想される 2 つの cDNA を得ることに成功した。*P. chrysosporium* 由来 *bgl1A* の ORF は 462 残基のアミノ酸をコードする 1389 塩基対、*bgl1B* の ORF は 540 残基のアミノ酸をコードする 1623 塩基対から成り立っていた。両 cDNA がコードするタンパク質の推定アミノ酸配列は 65% と高い相同性を示すことが明らかになったことから、それらがコードするタンパク質は互いに類似した立体構造を有していることが推測された。また、どちらの ORF にもシグナルペプチドが見いだされなかったため、これまでに報告されている子囊菌由来 GH ファミリー 1 に属する BGL 同様、両酵素も菌体内に局在していると考えられた。さらに *P. chrysosporium* 由来 BGL1A、BGL1B は子囊菌由来 GH ファミリー 1 に属する BGL と高い相同性を示し、加水分解の際に一般酸・塩基触媒として働く Glu を含む NEP 配列、および求核触媒として働く Glu を含む TENG 配列、そして N 末端側には GH ファミリー 1 において高い保存性を示す配列が保存されていた。GH ファミリー 1 に属する糸状菌由来 BGL では、これまでに 5 種の子囊菌 (*A. niger*, *A. oryzae*, *H. grisea*, *H. jecorina*, *T. emersonii*) において塩基配列情報が明らかにされているが (Mchale and Coughlan 1981a, b; Peralta et al. 1990; Takashima et al. 1996, 1999; Saloheimo et al. 2002)、担子菌由来 BGL をクローニングした報告例はない。これらのことから、本章では *P. chrysosporium* ゲノム情報を利用して、担子菌初となる GH ファミリー 1 に属する BGL をコードする 2 つの cDNA を取得することに成功した。

第三章

組換え BGL の機能解析

3.1 目的

本章では、第二章で取得した GH ファミリー 1 に属する 2 つの cDNA がコードするタンパク質の酵素学的性質を明らかにすることを目的とした。そこで先ず、組換え体を生産するための大腸菌発現系構築を試みた。得られた組換え体をカラム分画により精製し、2 つの BGL の基質親和性、反応速度、pH 依存性、pH 安定性、温度依存性、温度安定性を測定した。

3.2 実験方法

3.2.1 組換え BGL の生産

大腸菌発現系により組換え BGL1A および BGL1B を生産するため、Table3.1 に示したプライマーを用い PCR を行うことで、5' 末端に NcoI 切断サイト、3' 末端にヒスチジンタグおよび HindIII 切断サイトが付加した BGL1A、BGL1B 全長配列を得た。それら大腸菌発現ベクター pET28a(+)(Novagen) に導入することで、組換え体を生産するための発現ベクター pET-BGL1A、pET-BGL1B を構築し (Fig3.1)、エレクトロポレーションによりタンパク質発現用大腸菌宿主 Rosetta(DE3) 株 (Novagen) を形質転換した。形質転換した大腸菌を 20mg/ml のカナマイシンを含む 200ml の LB 培地に植菌し、37℃で 16 時間振とう培養した。培養液 10ml を 1l の LB 培地に植菌し、OD₆₀₀ が 0.5-0.6 になるまで 37℃で振とう培養した。その後 IPTG を終濃度 50μM で添加し、26.5℃で 4 時間振とう培養することで組換え体の生産誘導を行った。菌体は 3,000g で 10 分間遠心することで集菌した後、-80℃で保存した。

3.2.2 組換え BGL の精製

-80℃保存した菌体を 50ml の 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に懸濁させ、超音波破砕機 Bioruptor(COSMO BIO) で 30 分間破砕し、10,000g で 30 分間遠心することにより破砕後の菌体を取り除いた。上清に 70% 飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、10,000g で 30 分間遠心することによりタンパク質を沈殿させた。得られた沈殿を 1M 硫酸アンモニウムを含む 20mM MES 緩衝液 (pH6.0) に懸濁し、この溶液を同緩衝液で平衡化した Phenyl-Toyopearl 650S(22x150mm) カラムに供し、20mM MES 緩衝液 (pH6.0) への直線勾配により溶出した。組換え体を含

Table3.1 Primers for construction of pET-BGL1A and pET-BGL1B

Primer	Sequence
pET-BGL1A-F	TTTCCATGGCGATGTCTGCCGCGAAACTACCCAA
pET-BGL1A-R	TTT <i>AAGCTT</i> TCAATGATGATGATGATGATGGCGTCCCTCAATCTCTTCGATGTGCTCCTT
pET-BGL1B-F	TTTCCATGGCGATGTCTGCGTCCGCCGCTCCT
pET-BGL1B-R	TTT <i>AAGCTT</i> TCAATGATGATGATGATGATGGCGTCCCTCAATGAGGCCGAGGAATGCA GA

Bold, NcoI cleavage site; Bold Italic, HindIII cleavage site; Underlined, His₆-tag.

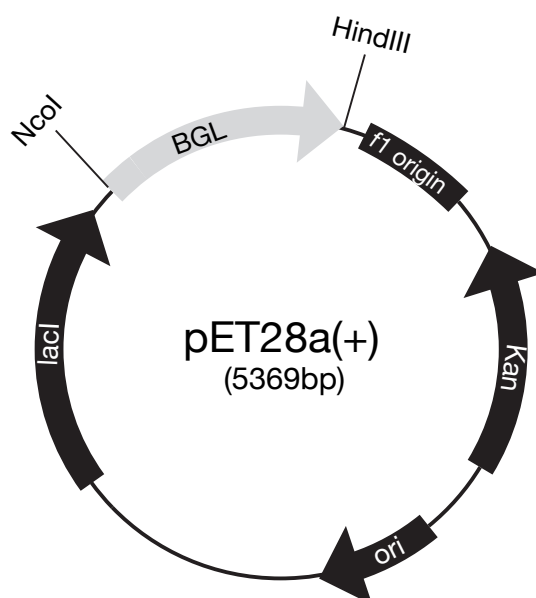


Fig3.1 Construction of pET-BGL1A and pET-BGL1B.

Kan, a gene coding for Kanamycin resistance; ori, replication origin; lacI, a gene coding for lactose repressor.

NcoI, NcoI cleavage site; HindIII, HindIII cleavage site.

む画分を集め、20mM トリス緩衝液 (pH8.0) に置換した後、同緩衝液で平衡化した DEAE-Toyopearl 650S(16x150mm) カラムに供した。溶出には 0-0.3M NaCl の直線勾配を用いた。組換え体を含む画分を集め、0.5M NaCl を含む 20mM HEPES 緩衝液 (pH7.4) に置換した後、同緩衝液で平衡化した Ni Sepharose High Performance カラム (16x80mm) に供した。溶出には 0-0.3M イミダゾールの直線勾配を用いた。精製したタンパク質は SDS-PAGE 分析に供することで、単一のバンドとなったことを確認した。タンパク質濃度は 280nm における吸光度を測定することにより決定した (BGL1A; $\epsilon_{280}=123\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$, BGL1B; $\epsilon_{280}=126\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$)。

3.2.3 組換え BGL の機能解析

3.2.3.1 *p*-ニトロフェニル誘導体に対する加水分解活性測定

p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (*p*NP-Gal)、*p*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (*p*NP-Glc)、*p*-ニトロフェニル- β -D-マンノピラノシド (*p*NP-Man)、*p*-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシド (*p*NP-Xyl) を基質として (Fig3.2)、50mM 緩衝液中で 30℃、10 分反応させ、 Na_2CO_3 を終濃度 0.2M で添加することにより反応の停止ならびに呈色を行った。400nm におけるモル吸光係数 ($\epsilon_{400}=17100\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) から加水分解により遊離した還元末端側 *p*-ニトロフェノール量を計算し、ミカエリスメンテン式 (1) に近似することで各基質に対する反応速度パラメータを算出した (Igarashi et al. 1997)。

$$v = k_{\text{cat}}S / (K_{\text{m}} + S) \quad (1)$$

K_{m} , ミカエリス定数 ; k_{cat} , 触媒活性 ; S , 基質濃度

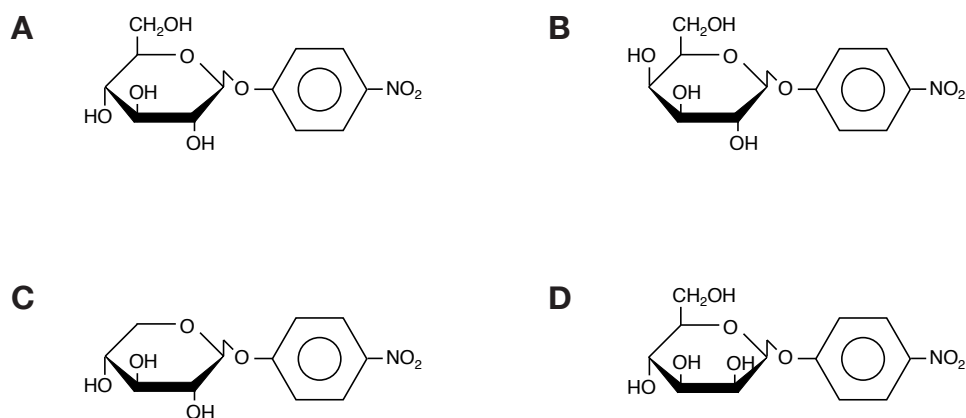


Fig3.2 Structural formula of *p*NP glycosides.

A, *p*NP-Glc; B, *p*NP-Gal; C, *p*NP-Xyl; D, *p*NP-Man

3.2.3.2 オリゴ糖に対する加水分解活性測定

結合様式が異なる4種のO-β-グルコシル二糖（ソホロース、ラミナリビオース、セロビオース、ゲンチオビオース）、グルコース二分子がα-1,4結合しているマルトース、重合度3-5のセロオリゴ糖 (Fig3.3) を基質として、50mM 緩衝液中で30℃、10分反応させ、3分間ボイルすることで酵素を失活させ反応を停止させた。加水分解により遊離したグルコースをグルコース CII テストワコー (Wako) により検出し、505nm の吸光度を測定することで反応液に含まれるグルコース濃度を算出した ($\epsilon_{505}=317\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)。グルコシル二糖は一分子が加水分解されることにより二分子のグルコースが生成されるため、得られたグルコース濃度の半量を反応液に含まれるグルコース濃度とした。得られたグルコース濃度をミカエリスメンテン式 (1) に近似することで、各オリゴ糖に対する反応速度パラメータを算出した。O-β-グルコシル二糖に対して糖転移反応阻害が観測された場合は、糖転移反応を考慮した阻害式 (2) に近似することで反応速度パラメータを算出した (Kawai et al. 2004; Seidle et al. 2005)。重合度3以上のセロオリゴ糖に対して糖転移反応阻害が観測された場合は、阻害式 (3) に近似することで反応速度パラメータを算出した (堀尾ら 1981)。

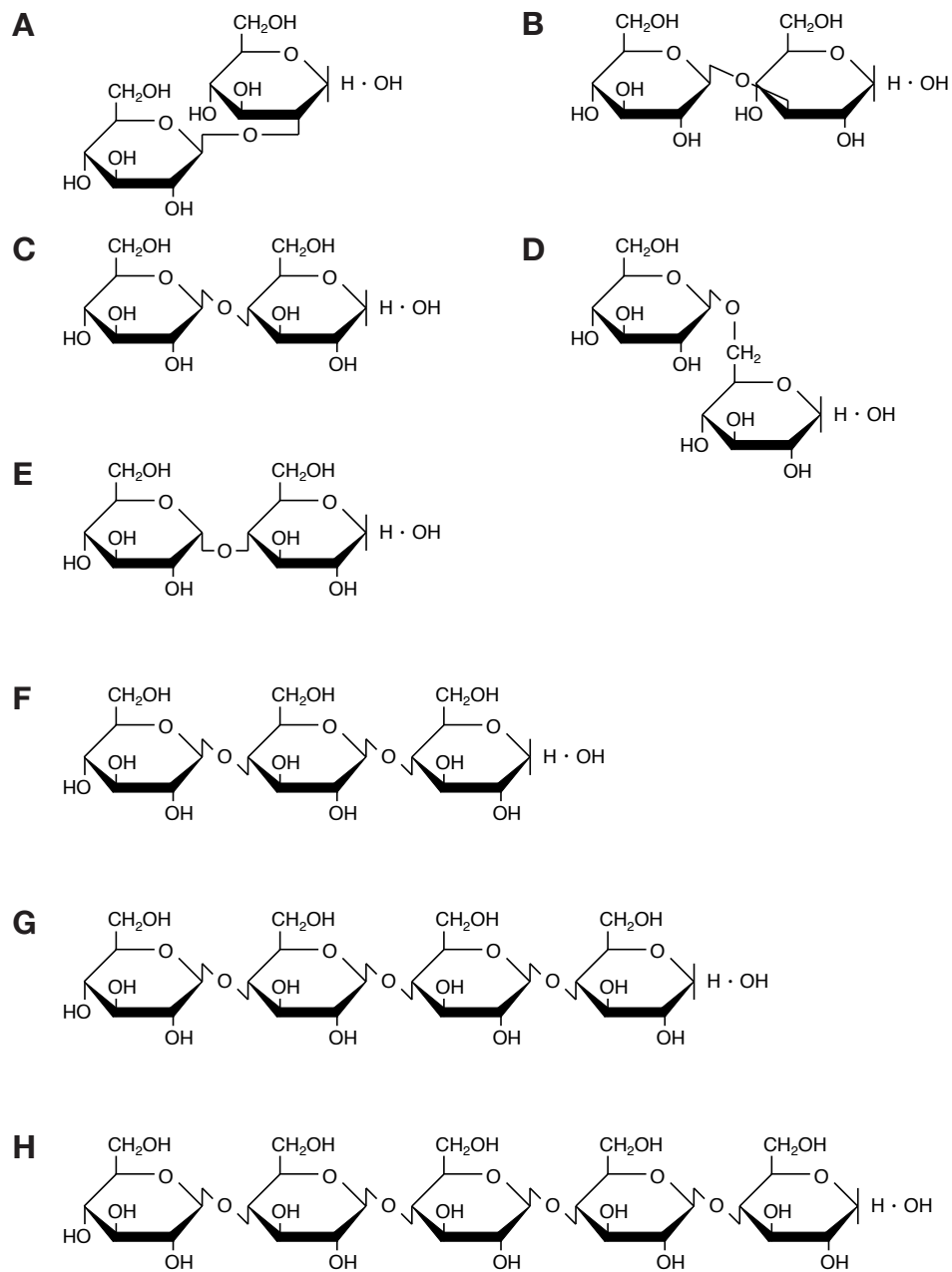


Fig3.3 Structural formula of various substrates.

A, Sophorose ; B, Laminaribiose; C, Cellobiose; D, Gentiobiose; E, Maltose;
F, Cellotriose; G, Cellotetraose; H, Cellopentaose

$$V_{\text{glucose}} = (2k_{\text{cat}}K_{\text{m2}}S + k_{\text{cat2}}S^2)/(K_{\text{m}}K_{\text{m2}} + K_{\text{m2}}S + S^2) \quad (2)$$

K_{m} , ミカエリス定数 ; K_{m2} , 糖転移反応定数 ; k_{cat} , 触媒活性 ; k_{cat2} , 最大糖転移活性 ;
 S , 基質濃度

$$V_{\text{glucose}} = k_{\text{cat}}S/(K_{\text{m}} + S + S^2/K_{\text{m2}}) \quad (3)$$

K_{m} , ミカエリス定数 ; K_{m2} , 糖転移反応定数 ; k_{cat} , 触媒活性 ; S , 基質濃度

3.2.3.3 pH 依存性の測定

pH 依存性の測定には、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0、4.5、5.0、5.5)、MES 緩衝液 (pH6.0、6.5)、HEPES 緩衝液 (pH7.0、7.5)、EPPS 緩衝液 (pH8.0、8.5)、CHES 緩衝液 (pH9.0)、CHAPS 緩衝液 (pH10、11) を終濃度 50mM で使用した。3.2.3.1 に記載した活性測定法に準じ、各 pH において 1mM *p*NP-Glc を基質とした際の吸光度を測定した。各 pH における吸光度の値をプロットすることにより pH 依存性とした。

3.2.3.4 pH 安定性の測定

1 μ M の BGL1A、BGL1B を上述した 50mM 緩衝液 (酢酸ナトリウム、MES、HEPES、EPPS) 中、30℃ で 10 分間インキュベートした後、3.2.3.1 で記載した活性測定法に準じ 1mM *p*NP-Glc を基質とした際の吸光度を測定した。各 pH における吸光度の値をプロットすることにより pH 安定性とした。

3.2.3.5 温度依存性の測定

温度依存性の測定は、50mM MES 緩衝液 (pH6.5) 中、反応温度 20-70℃ において 3.2.3.1 で記載した活性測定法に準じ 1mM *p*NP-Glc を基質とした際の吸光度を測定することにより行った。各温度における吸光度の値をプロットすることにより温度依存性とした。

3.2.3.6 温度安定性の測定

1 μ M の BGL1A、BGL1B を 50mM MES 緩衝液 (pH6.5) 中、20-70℃ で 10 分間インキュベートした後、3.2.3.1 で記載した活性測定法に準じ 1mM *p*NP-Glc を基質とした際の吸光度を測定した。各温度における吸光度の値をプロットすることにより温度安定性とした。

3.3 結果

3.3.1 組換え BGL の生産と精製

組換え BGL を大腸菌 Rosetta(DE3) を宿主とした発現系で生産させ、菌体破砕液を三段のカラム分画により SDS-PAGE で単一のバンドとなるまで精製を行った (Fig3.4)。精製過程における総タンパク質量、総 Unit 数、比活性、収率、精製倍率をまとめた (Table3.2)。最終的に BGL1A、BGL1B をそれぞれ 24 倍、13 倍で精製することができた。なお、1U は「標準条件において 1 分あたりに 1 μ mol の pNP-Glc を加水分解できる酵素量」として定義した。精製された BGL1A と BGL1B の分子量は SDS-PAGE 上でそれぞれ 53kDa、60kDa であり、両酵素の推定アミノ酸配列から予測される分子量とよく一致していた。

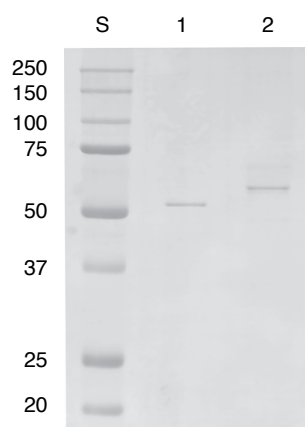


Fig3.4 SDS-PAGE of purified recombinant BGL1A and BGL1B.

S, molecular weight standards (kDa); Lane1, BGL1A; Lane2, BGL1B

Table3.2 Purification table of BGL1A and BGL1B.

Purification step	Total protein (mg)	Total Unit (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold (fold)
BGL1A					
Ammonium sulfate precipitation	60	81	1.3	100	1.0
Phenyl-Toyopearl 650S	8.3	38	4.5	46	3.4
DEAE-Toyopearl 650S	2.2	29	13	35	9.8
Ni Sepharose High Performance	0.88	28	32	35	24
BGL1B					
Ammonium sulfate precipitation	62	30	0.49	100	1.0
Phenyl-Toyopearl 650S	12	11	0.95	37	1.9
DEAE-Toyopearl 650S	0.63	1.6	2.6	5.3	5.2
Ni Sepharose High Performance	0.22	1.3	6.1	4.4	13

3.3.2 組換え BGL の機能解析

3.3.2.1 *p*-ニトロフェニル誘導体に対する加水分解活性測定

本研究では活性型の組換え BGL を得ることに成功した。両 BGL の *p*NP 誘導体に対する反応速度パラメータを測定した結果、どちらの酵素も *p*NP-Glc に対して最も高い触媒効率 (k_{cat}/K_m) を示した (Table3.3)。二番目に高い触媒効率を示した基質は *p*NP-Glc の C4 エピマーである *p*NP-Gal であったが、 K_m 値は *p*NP-Glc と比較して顕著に増加していた。CH₂OH-5 が存在しない *p*NP-Xyl を基質とした場合、BGL1A は僅かながら活性を示したが、BGL1B は活性を示さなかった。また *p*NP-Glc の C2 エピマーである *p*NP-Man に対してはどちらの酵素も活性を示さなかった。

Table3.3 Substrate specificities of BGL1A and BGL1B for *p*NP-glycosides.

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
BGL1A	<i>p</i> NP-Glc	20.8 ± 0.0	0.229 ± 0.001	91
	<i>p</i> NP-Gal	67.6 ± 0.8	10.2 ± 0.2	6.6
	<i>p</i> NP-Xyl	0.384 ± 0.019	0.752 ± 0.142	0.51
	<i>p</i> NP-Man	ND	ND	ND
BGL1B	<i>p</i> NP-Glc	9.35 ± 0.20	0.619 ± 0.001	15
	<i>p</i> NP-Gal	9.16 ± 0.39	4.02 ± 0.32	2.3
	<i>p</i> NP-Xyl	ND	ND	ND
	<i>p</i> NP-Man	ND	ND	ND

Hydrolytic activities for the substrates were estimated from the amounts of released *p*-nitrophenol from the substrates at 50mM MES buffer (pH6.5). ND, not detected.

3.3.2.2 グルコシル二糖に対する加水分解活性測定

様々なグルコシル二糖に対する加水分解活性を測定した結果、両酵素はグルコース二分子が α -1, 4 結合しているマルトースには活性を示さなかったが、 β 結合している基質に対しては活性を示した (Fig3.5、Table3.4)。

BGL1A の各基質に対する反応特性 (反応速度、親和性) を比較すると、最も高い k_{cat} 値を示した基質はラミナリビオースであり、次いでソホロース、セロビオース、ゲンチオビオースの順であった。各基質に対する K_m 値はラミナリビオース、ソホロースでは同程度であったがセロビオース、ゲンチオビオースは上述した二基質と比較して一桁以上高い値であった。その結果、セロビオースおよびゲンチオビオースに対する触媒効率 (触媒効率) はラミナリビオース、ソホロースと比較して非常に低かったことから、BGL1A はセロビオース、ゲンチオビオースを良い基質とできないことが示された。

BGL1B の各基質に対する反応特性を比較するとラミナリビオース、ソホロース、セロビオースに対しては同程度の k_{cat} 値を示したが、ゲンチオビオースに対してはそれらより一桁低い値を示した。各基質に対する K_m 値もラミナリビオース、ソホロース、セロビオースに対しては同程度であったが、ゲンチオビオースに対しては 50 倍以上高い値であったため、ゲンチオビオースに対する触媒効率は、他の三基質と比較して 1/200 以下となった。セロビオースを基質とした際、基質濃度が 1mM 以上になると反応速度の減少が観測されたが、薄層クロマトグラフィー分析に供したところ糖転移反応によると推測される生成物が確認されたため、セロビオース濃度増加により糖転移反応阻害が起こっていることが明らかとなった。

BGL1A と BGL1B の各基質に対する反応特性を比較すると、BGL1B の方がいずれの O- β -グルコシル二糖に対しても優れた反応特性を有していたが、ゲンチオビオースはいずれの酵素も良い基質とできないことが明らかとなった。両酵素で反応特性が顕著に異なっていた基質はセロビオースであり、BGL1A はセロビオースに対する親和性に乏しいが、BGL1B はセロビオースに対する親和性に優れ、セロビオースを効率よく加水分解する酵素であることが判明した。

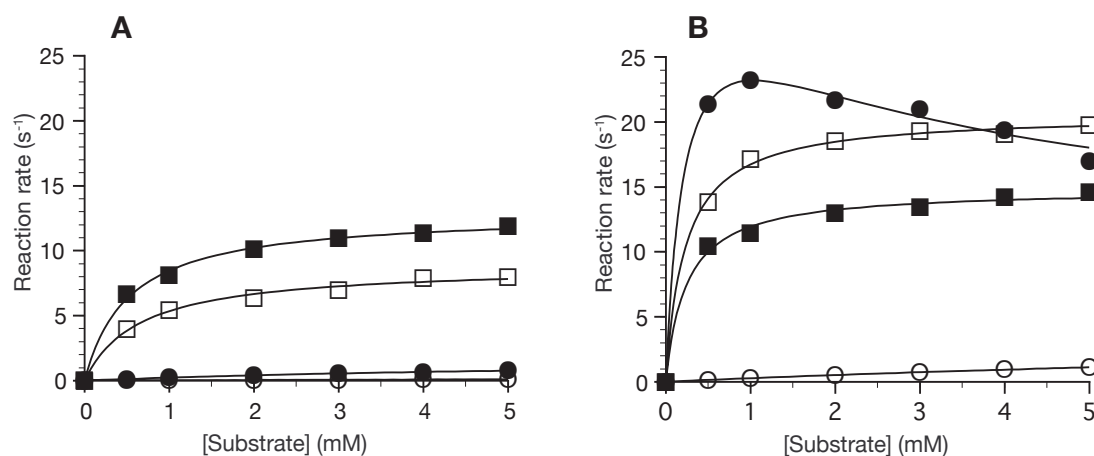


Fig3.5 Hydrolysis of various β -linked disaccharides by BGL1A (A) and BGL1B (B).

Open square, Sophorose; Filled square, Laminaribiose; Filled circle, Cellobiose; Open circle, Gentiobiose. Hydrolytic activities were estimated from the release of glucose.

Table3.4 Kinetic parameters of BGL1A and BGL1B for various disaccharides.

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)	k_{cat2} (s^{-1})	K_{m2} (mM)
BGL1A	Sophorose	8.85 ± 0.26	0.655 ± 0.078	14		
	Laminaribiose	12.9 ± 0.3	0.525 ± 0.047	25		
	Cellobiose	1.81 ± 0.05	6.80 ± 0.29	0.27		
	Gentiobiose	0.357 ± 0.036	12.7 ± 1.6	0.028		
	Maltose	ND	ND	ND		
BGL1B	Sophorose	20.6 ± 0.2	0.231 ± 0.018	89		
	Laminaribiose	14.8 ± 0.3	0.243 ± 0.036	61		
	Cellobiose	16.4 ± 0.4	0.218 ± 0.017	75	8.77 ± 1.65	3.20 ± 0.69
	Gentiobiose	4.45 ± 0.49	15.1 ± 2.1	0.29		
	Maltose	ND	ND	ND		

Hydrolytic activities for the substrates were estimated from the amounts of released glucose from the substrates at 50mM MES buffer (pH6.5). The kinetic parameters were calculated as described in Materials and Methods Section.

ND, not detected.

3.3.2.3 セロオリゴ糖に対する加水分解活性測定

重合度 2-5 のセロオリゴ糖を基質として BGL1A、BGL1B の加水分解活性を測定することで各セロオリゴ糖に対する反応速度パラメータを決定した (Fig3.6, Table3.5)。BGL1A の各基質に対する反応特性を比較すると、セロトリオース、セロテトラオース、セロペンタオースに対しては同程度の k_{cat} 値を示したが、セロビオースに対しては一桁低い値を示した。各基質に対する K_m 値はセロトリオース、セロテトラオース、セロペンタオースでは同程度であったが、セロビオースは上述した三基質と比較して一桁以上高い値であった。その結果、触媒効率はセロビオースのみ他の三基質と比較して 1/200 以下となったことから、BGL1A は重合度 2-5 のセロオリゴ糖のなかではセロビオースのみを良い基質とできないことが判明した。

BGL1B の各基質に対する反応特性を比較すると、BGL1B はいずれの基質に対しても同程度の k_{cat} 値を有していた。各基質に対する K_m 値はセロトリオース、セロテトラオースが 0.05-0.06mM、セロビオース、セロペンタオースは 0.15-0.25mM で同程度の親和性を有していた。その結果、触媒効率はセロトリオース、セロテトラオース、セロビオース、セロペンタオースの順に高い値を示した。BGL1B において重合度 2-5 のセロオリゴ糖を基質とした際、いずれの基質に対しても基質濃度 0.5-1.0mM 以上において糖転移反応阻害が観測された。

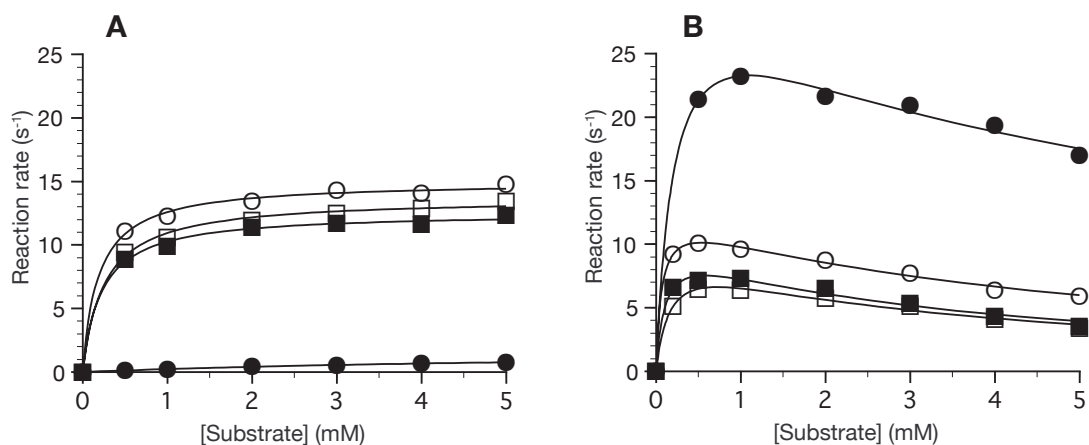


Fig3.6 Hydrolysis of cellobiosaccharides (DP2-5) by BGL1A (A) and BGL1B (B).

Filled circle, Cellobiose; Open circle, Cellotriose; Filled square, Cellotetraose; Open square, Cellopentaose. Hydrolytic activities were estimated from the release of glucose.

Table3.5 Kinetic parameters of BGL1A and BGL1B for cellobiosaccharides.

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat2} (s ⁻¹)	K_{m2} (mM)
BGL1A	Cellobiose	1.81±0.05	6.80±0.29	0.27		
	Cellotriose	15.0±0.2	0.189±0.022	79		
	Cellotetraose	12.5±0.2	0.223±0.027	56		
	Cellopentaose	13.7±0.2	0.253±0.028	54		
BGL1B	Cellobiose	16.4±0.4	0.218±0.017	75	8.77±1.65	3.20±0.69
	Cellotriose	12.2±0.1	0.0571±0.0016	21×10		5.04±0.18
	Cellotetraose	8.65±0.08	0.0549±0.0021	16×10		5.60±0.29
	Cellopentaose	9.14±0.11	0.144±0.004	63		3.65±0.18

Hydrolytic activities for the substrates were estimated from the amounts of released glucose from the substrates at 50mM MES buffer (pH6.5). The kinetic parameters were calculated as described in Materials and Methods Section.

3.3.2.4 pH 依存性の測定

両酵素の pH 依存性を測定した結果、どちらの酵素も中性域に至適 pH を有し (BGL1A, pH5.5–6.5; BGL1B, pH6.5)、pH8.0 以上のアルカリ性域で急激に活性が減少した。一方酸性域では、BGL1A が pH4.0 であっても最大活性の 50% 程度を保持していたのに対して、BGL1B は pH4.0 で殆ど活性を示さないことが判明した。

3.3.2.5 pH 安定性の測定

BGL1A および BGL1B の pH 安定性を測定した結果、BGL1A は pH4.0–8.0 で 30℃、10 分間インキュベートしても残存活性の顕著な変化は観測されなかった。同様に BGL1B においても、中性からアルカリ性にかけては残存活性は変化しなかったが、pH5.5 以下では残存活性の顕著な減少が観測され、pH4.0 では中性域における残存活性と比較して 40% 程度まで減少した。

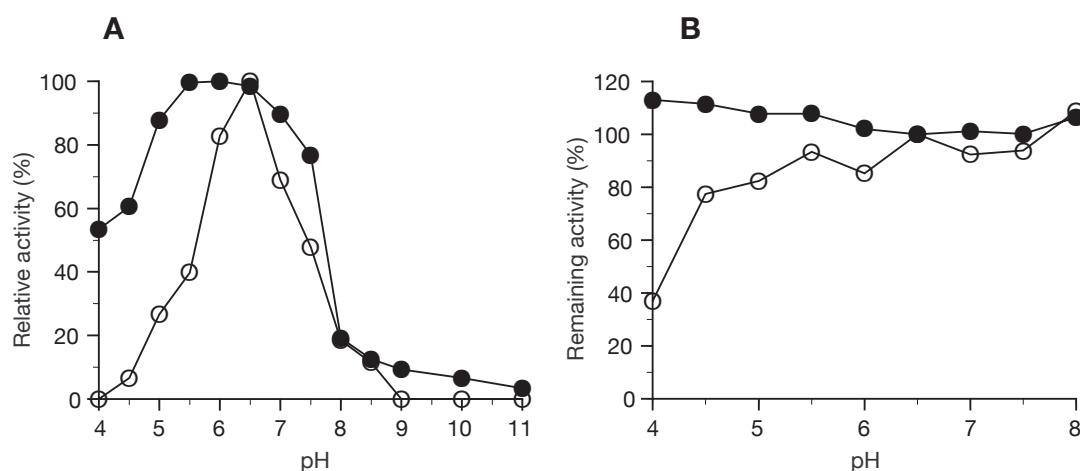


Fig3.7 pH effects on enzyme activity (A) and stability (B).

Filled circle, BGL1A; Open circle, BGL1B. Hydrolytic activities for *p*NP-Glc were estimated from the release of *p*-nitrophenol. The buffers (50 mM solutions) used were sodium acetate (pH4.0–5.5), MES (pH6.0, 6.5), HEPES (pH7.0, 7.5), EPPS (pH8.0, 8.5), CHES (pH9.0), and CHAPS (pH10, 11).

3.3.2.6 温度依存性の測定

両酵素の温度依存性を測定した結果、BGL1A の最適温度は 45℃であり、20℃、70℃における相対活性はそれぞれ 40%、20%であった。BGL1B の最適温度は 35℃であり、20℃、70℃における相対活性はそれぞれ 55%、20%であった。

3.3.2.7 温度安定性の測定

両酵素を 20-70℃で 10 分間インキュベートし、残存活性を測定することにより温度安定性を決定した。その結果、BGL1A は 50℃においても活性の減少は観測されなかったが、55℃で約 80% へ減少し 60℃以上では殆ど活性を示さなかった。BGL1B は 45℃においても活性の減少は観測されなかったが、50℃で約 20% まで減少し 55℃以上では殆ど活性を示さなかった。以上より両酵素を比較すると、どちらも 60℃以上では殆ど活性を示さず不可逆的に変性してしまうものの、BGL1A の方が約 5℃温度安定性に優れることが明らかとなった。

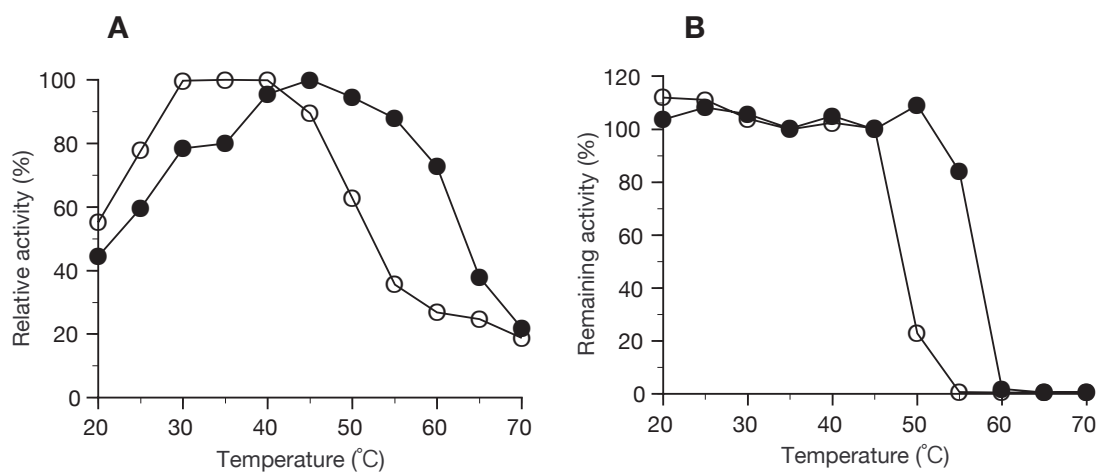


Fig3.8 Temperature effects on enzyme activity (A) and stability (B).

Filled circle, BGL1A; Open circle, BGL1B. Hydrolytic activities for *p*NP-Glc were estimated from the release of *p*-nitrophenol.

3.4 考察

前章でクローニングされた2つのcDNA(*bgl1A*, *bgl1B*)がコードするタンパク質の酵素学的性質(基質親和性、反応速度、pH依存性、pH安定性、温度依存性、温度安定性)を解析するため、本章では先ず異種宿主発現系による組換えタンパク質の大量発現系構築を試みた。これまでに子囊菌 *H. jecorina* 由来 GH ファミリー1に属するBGLが大腸菌を宿主として生産されているが(Saloheimo et al. 2002)、本研究においても大腸菌発現系を選択し活性型の組換え体を生産することに成功した。精製した2つのタンパク質のpNP誘導体に対する加水分解活性を測定した結果、どちらも非還元末端がグルコースであるpNP-Glcに対して最も高い触媒効率を示したことから、両酵素はBGLとして位置付けられた。両酵素はpNP-Glcだけでなく、OH-4がaxialであるpNP-Galに対しても比較的高い反応特性を示したことからOH-4に対する認識が比較的緩いことが示されたが、この傾向はGHファミリー1に属する多くのBGLにおいても報告されている(Kempton et al. 1992; Bauer et al. 1998; Dion et al. 1999; Kaper et al. 2000; Marana et al. 2001; Vallmitjana et al. 2001; Hancock et al. 2005; Escamilla-Trevino et al. 2006; Tribolo et al. 2007)。サブサイト-1においてグルコースのOH-4、OH-6と水素結合を形成するGluはフレキシブルに動くことが立体構造解析により明らかにされているため(Verdoucq et al. 2004; Isorna et al. 2007)、GHファミリー1に属するBGLはpNP-GlcだけでなくpNP-Galも基質にすることができると考えられている。そのGluはBGL1AおよびBGL1Bにおいても保存されているため(BGL1A, Glu422; BGL1B, Glu437)、両酵素もOH-4がaxialであるpNP-Galに対して比較的高い反応特性を示したと考えられた。

両酵素のグルコシル二糖に対する加水分解活性を測定したところ、どちらの酵素もマルトースを基質とすることができなかった。その理由として、還元末端側グルコースが α 結合していることにより、求核触媒であるGluの求核攻撃が妨げられたことが考えられた。ゲンチオビオースは還元末端のOH-6が結合に関与しているため、他のグルコシル二糖と比較してピラノース環同士が1.0 Å以上離れた構造をしている。そのためゲンチオビオースの還元末端側部位においてはサブサイト+1との相互作用形成が妨げられ、他のO- β -グルコシル二糖と比較して著しく低い反応特性を示したと考えられた。ソホロース、ラミナリビオース、セロビオースに対する反応特性を比較すると、BGL1Aではセロビオースに対してのみ反応特性に乏しいことが明らかとなった。GHファミリー1に属する酵素はサブサイト+1を構成するアミノ酸の保存性が低いため、サブサイト+1が基質特異性に関与していると考えられている(Marana et al. 2006)。BGL1Aにおいて推測されるサブサイト+1(Trp172, Val173, Met177, Asp229, His231, Lys253, Trp338)(Fig4.4参照)には極性

アミノ酸や側鎖の長いアミノ酸が多く見られるため、O- β -グルコシル二糖の中でセロビオースのみを良い基質とできない要因はそれらの残基にあることが推測された。一方、BGL1B はソホロース、ラミナリビオース、セロビオースに対しては殆ど等しい反応特性を有していることが明らかとなった。BGL1B において推定されるサブサイト +1(Trp177, Cys178, Leu182, Asn244, Asp246, Ala268, Trp353)(Fig4.4 参照)は、BGL1A と比較して極性アミノ酸は一残基のみであり、側鎖の短いアミノ酸が多い。そのため BGL1B のサブサイト +1 における基質認識は Trp177、Trp353 による疎水性相互作用が中心となった結果、結合様式が異なるソホロース、ラミナリビオース、セロビオースに対しても同程度の反応特性を示したと考えられた。

両酵素のセロオリゴ糖(重合度 2-5)に対する反応特性を比較すると、BGL1A はセロビオースに対してのみ反応特性に乏しく、GH ファミリー 3 に属する多くの BGL と類似したセロオリゴ糖認識を有していた(King and Smibert. 1963; Sternberg et al. 1977; Hirayama et al. 1978; Mchale and Coughlan. 1981; Sadana et al. 1983; Watanabe et al. 1992; Kubicek et al. 1993)。一方 BGL1B は長鎖のセロオリゴ糖に対してだけでなく、セロビオースに対しても高い反応特性を示していたことから、これまでに報告されている多くの BGL とは異なるセロオリゴ糖認識を有していることが示された。

セルロースの酵素分解は酸性且つ高温条件下で行われるため、酸性域で効率よく働き耐熱性に優れた BGL が求められる。そこで両酵素の pH 依存性、pH 安定性、温度依存性、温度安定性を測定した結果、どちらの酵素も他の GH ファミリー 1 に属する多くの BGL 同様、中性域に至適 pH を有することが明らかとなった(Gabelsberger et al. 1993; Lopez-Camacho et al. 1996; Bauer et al. 1998; Hashimoto et al. 1998; Dion et al. 1999; Takashima et al. 1999; Marana et al. 2001; Vallmitjana et al. 2001)。しかしながら両酵素は酸性域において全く異なる活性挙動を示し、BGL1A が pH4.0 においても最大活性の 50% 程度を保持できるのに対して、BGL1B は pH4.0 において殆ど活性を保持できなかった。両酵素の pH 安定性を測定した結果、BGL1A の残存活性は pH4.0 においても変化が見られなかったのに対し、BGL1B の残存活性は 40% 程度であったことから、不可逆的な変性が酸性域において低い活性を示す 1 つの要因であると考えられた。さらに温度依存性、温度安定性ともに BGL1A の方が高い傾向が見られたことから、BGL1A は物理的に安定な酵素であることが示された。

以上より両酵素の酵素学的性質を比較すると、BGL1A は酸性域における安定性、温度安定性に優れているが、セロビオースに対する反応特性(親和性、反応速度)に乏しい酵素であることが判明した。一方、BGL1B は BGL1A と比較して酸性域における安定性、温度安定性に乏しいものの、セロビオースに対する K_m 値はこれま

で報告されている多くの GH ファミリー 3 に属する BGL と比べ低い値であったことから、BGL1B はセルロースの酵素糖化を効率化する上で有用な酵素であることが示された。しかしながら、BGL1B は酸性条件下で殆ど活性を示さないことから、この酵素を酵素糖化に利用するためには、酸性域における低い活性保持能を改善する必要がある。BGL1A と BGL1B はアミノ酸配列の相同性が 65% と高いことから、両酵素の構造と機能の関係を解析することで、pH 依存性やセロビオースに対する反応特性に差異を与えている構造的要因を明らかにすることができると期待される。そこで次章以降においては、両酵素の立体構造情報をもとに作製した変異体を機能解析することにより、それらの性質に差異を与えている要因を明らかにするとともに、酵素糖化に適した性質を有する BGL を取得するための指針を得ることを目指した。

第四章

セロビオース認識に関与する 因子の解析

4.1 目的

第三章より、BGL1A と BGL1B は高いアミノ酸配列相同性を有しているにもかかわらず、セロビオースに対する反応特性が互いに異なることが明らかとなった。そこで本章では、両酵素のセロビオース認識に関与する因子を明らかにすることを目的とした。そのため共同実験により両酵素の立体構造解析を行い、得られた立体構造情報を利用することにより、サブサイト +1 を構成するアミノ酸残基の比較をおこなった。得られた知見をもとに部位特異的変異体を作製し、それら変異体のセロビオースに対する加水分解活性を測定することにより、セロビオースに対して異なる反応特性を示した要因となるアミノ酸残基の特定をおこなった。さらに合成した様々な 4-O- β -グルコシル二糖に対する変異体の反応特性を比較することで、サブサイト +1 と相互作用しているセロビオースの還元末端側グルコース部位の特定をおこなった。

4.2 実験方法

4.2.1 X 線結晶構造解析

BGL1A の結晶化はシッティングドロップ法により行った。10mg/ml に調整した酵素液 1 μ l に対して、12% イソプロパノール、15% ポリエチレングリコール (PEG)6000、0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.8) を含む 1 μ l のリザーバー溶液を混合し 25℃で静置した。阻害剤である D-グルコノ-1,5-ラクトンとの複合体構造を得るため、得られた結晶を 10mM の D-グルコノ-1,5-ラクトンを含むリザーバー溶液に 1 時間浸透させた。回折強度データを回収するため、得られた結晶を 20% 2-メチル-2,4-ペンタンジオール、15% PEG6000、0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.8) を含む溶液に浸透させた後、100K で瞬間的に冷却して測定した。回折強度データの収集は、高エネルギー加速器研究機構 PF-AR の実験ステーション NW12 および PF リングの実験ステーション BL6A において波長 1.0 Åで行った。BGL1A と 41% のアミノ酸配列相同性を有する *T. repens* 由来 BGL の立体構造情報 (PDB ID; 1CBG) をもとに分子置換法を利用することで回折強度データから位相情報を得た。その後構造解析プログラムを利用し精密化を繰り返すことで基質フリーな BGL1A の立体構造、D-グルコノ-1,5-ラクトンと BGL1A の複合体構造を決定した。

4.2.2 立体構造比較および配列比較

BGL1A の立体構造情報 (PDB ID, 2E40)(Nijikken et al. 2007) を鋳型として、Swiss model homology server(<http://swissmodel.expasy.org//swiss-model.html>)(Peitsch and Jongeneel, 1993; Peitsch, 1995, 1996) を利用することにより BGL1B のモデル構造を構築した。BGL1A の立体構造および BGL1B のモデル構造を、チオセロビオースとの複合体構造が明らかにされている *P. polymyxa* 由来 BglB(PDB ID, 2O9R)(Isorna et al. 2007) と重ね合わせることで、両酵素の活性中心にチオセロビオース分子を挿入した。立体構造の重ね合わせや図の作成には PyMOL(DeLano Scientific LLC) を利用した。マルチプルアラインメント解析は GenomeNet が提供する ClustalW(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)(Thompson et al. 1994) を用いて行った。二次構造に基づく配列比較は ESPript(<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>, Gouet et al. 1999, 2003) を利用することにより行った。

4.2.3 BGL 変異体発現ベクターの構築

Table4.1 に記載したプライマーと PCR を利用したオーバーラップ伸長法により両酵素の変異体を作製した (Sambrook and Russell, 2001)。第三章で作製した大腸菌発現ベクター pET-BGL1A、pET-BGL1B を鋳型として使用した。Adaptor1A と V173C、M177L と名付けたプライマーにより V173C、M177L 変異体断片を作製した。Adaptor2A と D229N、H231D、K253A と名付けたプライマーにより D229N、H231D、K253A 変異体断片を作製した。V173C、M177L 断片と D229N、H231D、K253A 断片を組み合わせ、MatureAF、MatureAR と名付けたプライマー対を利用することにより、BGL1A 変異体 5 種の全長配列を増幅した。同様に、Adaptor1B と C178V、L182M と名付けたプライマーにより C178V、L182M 変異体断片を作製した。Adaptor2B と N244D、D246H、A268K と名付けたプライマーにより N244D、D246H、A268K 変異体断片を作製した。C178V、L182M 断片と N244D、D246H、A268K 断片を組み合わせ、MatureBF、MatureBR と名付けたプライマー対を利用することにより、BGL1B 変異体 5 種の全長配列を増幅した。得られた BGL1A、BGL1B 変異体を pET28a(+)(Novagen) に導入することにより、BGL1A、BGL1B 変異体発現ベクターを構築し、核酸シーケンサにより変異が導入されていることを確認した。

Table4.1 Mutagenic primer sequences

Enzyme	Primer Name	Primer Sequence
BGL1A	Adaptor1A	TTACAGTAATATAAAGAATTTGTTTAAACAAAA <i>AGCTTTTA</i> <i>ATGATGATGATGATGATG</i> CTCTTCGATGTGCTCCTT
	Adaptor2A	TTTTCAGCGTTCTCGGCCGGCAAA <i>ACCATGGCGATGTCT</i> GCCGCGAAACTA
	V173C	AACGAACCCTGGTGCATTTCCGTGATGGGC
	M177L	GTCATTTCCGTGCTGGGCTACGGAAACGGC
	D229N	GATGAGCCAGTGGCTGTTGAGCGTGATACC
	H231D	ATAGGGGATGAGCCAGTCGCTATCGAGCGT
	K253A	TGCAAAGCGACCGAGCGCAAACTCCATTGC
	Mature-AF	TTTTCAGCGTTCTCGGCCGGCAAAACCATGG
	Mature-AR	TTACAGTAATATAAAGAATTTGTTTAAACAAAAAGCTT
BGL1B	Adaptor1B	TTACAGTAATATAAAGAATTTGTTTAAACAAAA <i>AGCTTTTA</i> <i>ATGATGATGATGATGATG</i> AGGCGGAGGAATGCAGA
	Adaptor2B	TTTTCAGCGTTCTCGGCCGGCAAA <i>ACCATGGCGATGTCT</i> GCGTCCGCCGCT
	C178V	AACGAGCCGTGGGTCATCTCTATTCTGGGG
	L182M	TGCATCTCTATTATGGGGTACGGCCGCGGG
	N244D	CATGGCCCAGTCGCCATCGAGGGTGATGCC
	D246H	GTACGGCATGGCCCAGTGGCCGTTGAGGGT
	A268K	CGCGAACCAACCGATCTTAACATCCAGTGC
	Mature-BF	TTACAGTAATATAAAGAATTTGTTTAAACAAAA <i>AGCTT</i>
	Mature-BR	TTTTCAGCGTTCTCGGCCGGCAAA <i>ACCATGG</i>

Bold, NcoI cleavage site; Bold Italic, HindIII cleavage site; Underlined, His₆-tag; Light Italic, Mutation sites.

4.2.4 野生型 BGL および BGL 変異体の生産と精製

野生型 BGL および BGL 変異体の生産は第三章 3.2.1 に記載した方法に準じて行った。大腸菌発現宿主 Rosetta(DE3) から組換え体を抽出し、第三章 3.2.2 に記載した方法に準じ三段のカラムクロマトグラフィーに供することにより精製を行った。精製した組換え体は SDS-PAGE 分析に供することで、単一のバンドとなったことを確認した。タンパク質濃度は 280nm における吸光度を測定することにより決定した(野生型 BGL1A、BGL1A 変異体, $\epsilon_{280}=123\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$; 野生型 BGL1B、BGL1B 変異体, $\epsilon_{280}=126\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$)。

4.2.5 セロビオースに対する加水分解活性測定

第三章 3.2.3.2 に記載した方法に準じてセロビオースに対する加水分解活性を測定した。

4.2.6 セロビオースホスホリラーゼの生産と精製

Cellvibrio gilvus 由来組換えセロビオースホスホリラーゼ (EC, 2.4.1.20) を生産するための発現ベクターが導入された大腸菌グリセロールストックを用い (Liu et al. 1998)、第三章 3.2.1 に記載した方法に準じて組換えセロビオースホスホリラーゼの大量生産を行った。 -80°C 保存した菌体を 0.5M NaCl を含む 50ml の 20mM HEPES 緩衝液 (pH7.4) に懸濁後、超音波破碎機で 30 分間破碎し、10,000g で 30 分間遠心することにより破碎後の菌体を取り除いた。上清を同緩衝液で平衡化した Ni Sepharose 6 Fast Flow カラム (12x70mm)(GE Healthcare) に供し、0-0.25M イミダゾールの直線勾配により溶出した。組換え体を含む画分を集め、20mM HEPES 緩衝液 (pH7.4) に置換した後、同緩衝液で平衡化した DEAE-Toyopearl 650S (16x150mm) カラムに供した。溶出には 0-0.3M NaCl の直線勾配を用いた。精製したタンパク質は SDS-PAGE 分析に供することで、単一のバンドとなったことを確認した。タンパク質濃度は 280nm における吸光度を測定することにより決定した ($\epsilon_{280}=157$)。

4.2.7 4-*O*-β-グルコシル二糖の酵素合成と精製

精製した 5mg セロビオースホスホリラーゼと 0.2M α-グルコース-1-リン酸 (Wako)、および 0.3M 1,5-アンヒドロ-D-グルシトール (Wako) または 6-デオキシグルコース (Sigma) を、1ml の 0.5M HEPES 緩衝液 (pH7.4) 中で 37℃、48 時間反応させることにより、4-*O*-β-グルコシル-1,5-アンヒドロ-D-グルシトール (G1dG) または 4-*O*-β-グルコシル-6-デオキシグルコース (G6dG) を合成した。合成した 4-*O*-β-グルコシル二糖を含む反応液 0.5ml を超純水で平衡化した Toyopearl HW-40 により分画し、二糖が含まれる画分を薄層クロマトグラフィーにより確認した。二糖が含まれる画分を集め、アンバーライト MB3(ORGANO) を用いて脱塩した後、凍結乾燥することにより G1dG、G6dG を精製した。4-*O*-β-グルコシル-2-デオキシグルコース (G2dG) ならびに 4-*O*-β-グルコシル-キシロース (GX) は農研機構食品総合研究所の北岡本光博士に提供して頂いた (Fig4.1)。

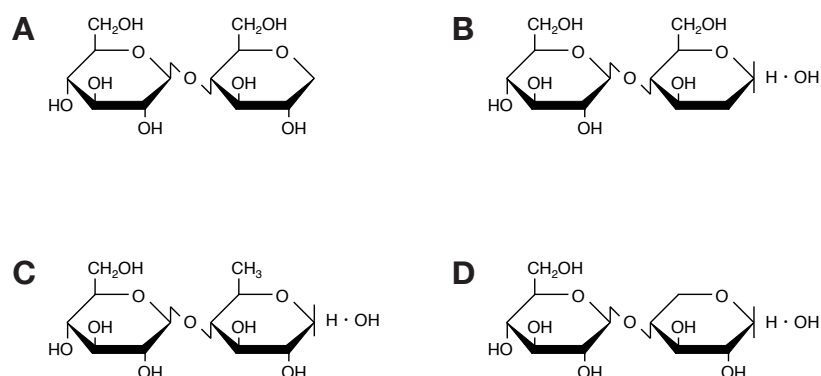


Fig4.1 Structural formula of 4-*O*-β-Glucosyl disaccharides.

A, 4-*O*-β-Glucosyl-1,5-Anhydro-D-glucitol (G1dG); B, 4-*O*-β-Glucosyl-2-Deoxyglucose (G2dG);
 C, 4-*O*-β-Glucosyl-6-Deoxyglucose (G6dG); D, 4-*O*-β-Glucosyl-Xylose (GX).

4.2.8 4-O-β- グルコシル二糖に対する加水分解活性測定

G1dG、G2dG、G6dG、GX を基質として、50mM 緩衝液中で 30℃、10 分反応させた後、3 分間ボイルすることで酵素を失活させ反応を停止させた。加水分解により各基質から遊離した非還元末端側グルコースを、グルコース CII テストワコー (Wako) により検出し、505nm の吸光度を測定することで反応液中に含まれるグルコース濃度を算出した ($\epsilon_{505}=317\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)。得られたグルコース濃度をミカエリスメンテン式 (1) に近似することで、4-O-β- グルコシル二糖に対する反応速度パラメータを算出し、糖転移反応阻害が観測された場合は、糖転移反応を考慮した阻害式 (3) に近似することで反応速度パラメータを算出した。作図には DeltaGraph5.5.1(Red Rock)、計算には Kaleida Graph ver3.6.4(Synergy Software) を利用した。

$$v = k_{\text{cat}}S/(K_{\text{m}} + S) \quad (1)$$

K_{m} , ミカエリス定数 ; k_{cat} , 触媒活性 ; S , 基質濃度

$$V_{\text{glucose}} = k_{\text{cat}}S/(K_{\text{m}} + S + S^2/K_{\text{m}2}) \quad (3)$$

K_{m} , ミカエリス定数 ; $K_{\text{m}2}$, 糖転移反応定数 ; k_{cat} , 触媒活性 ; S , 基質濃度

4.2.9 遷移状態における結合エネルギーの算出

基質の官能基を変化させた際の遷移状態における結合エネルギー変化 ($\Delta \Delta G^{\ddagger}$) は、触媒効率 ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) の値を利用することで式 (4) より算出した (Fersht. 1977, Wilkinson et al. 1983)。

$$\Delta \Delta G^{\ddagger} = RT \ln(k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})_{\text{sub}} / (k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})_{\text{cellobiose}} \quad (4)$$

R , 気体定数 ; T , 絶対温度 ; $(k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})_{\text{sub}}$, G1dG, G2dG, G6dG, GX に対する触媒効率 ; $(k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})_{\text{cellobiose}}$, セロビオースに対する触媒効率

4.3 結果

4.3.1 BGL1A および BGL1B の立体構造

BGL1A の結晶化および X 線構造解析は東京大学大学院農学生命科学研究科生命工学専攻酵素学研究室に行って頂いた。得られた回折強度データと *T. repens* 由来 BGL の立体構造情報 (PDB ID, 1CBG) を利用した分子置換法により、基質フリーな BGL1A の立体構造、および BGL1A と D-グルコノ-1,5-ラクトンとの複合体構造をそれぞれ 1.5、1.9 Å の分解能で決定した (Table4.2)。BGL1A の全体構造は典型的な (β/α)₈ バレル構造であり、GH ファミリー 1 において保存されているフォールディングを有していた (Fig4.2)。D-グルコノ-1,5-ラクトンと BGL1A の複合体構造を鋳型として BGL1B のモデル構造を構築し、両酵素の活性中心付近および全体構造の比較を行った。高いアミノ酸配列相同性から予想された通り、両酵素の活性中心付近の構造は良く類似しており、サブサイト -1 を構成すると推測されるアミノ酸残基群は互いに全て保存されていた (Fig4.3)。しかしながら、サブサイト +1 に位置する 8 つのアミノ酸残基の内、5 つが互いに異なっていた (BGL1A, Val173, Met177, Asp229, His231, Lys253; BGL1B, Cys178, Leu182, Asn244, Asp246, Ala268)(Fig4.4)。サブサイト +1 を構成する残基群を比較すると、BGL1A では側鎖の長いアミノ酸 (Val173, Met177, His231, Lys253) が多いのに対し、BGL1B ではそれらの残基が側鎖の短いアミノ酸 (Cys178, Leu182, Asp246, Ala268) に置換されているため、BGL1B の方が活性中心ポケットが広いことが推測された (Fig4.5)。さらに BGL1A は極性アミノ酸を 3 つ (Asp229, His231, Lys253) 有しているのに対して、BGL1B は極性アミノ酸残基を 1 つ (Asp246) しか有していないことにより、両酵素のサブサイト +1 近傍の表面電荷は大きく異なっていることが予想された (Fig4.5)。子囊菌由来 GH ファミリー 1 に属する BGL とのアミノ酸配列比較より、BGL1A のサブサイト +1 を構成する残基群は BGL1A に特異的であることが示された (Fig4.6)。

Table4.2 Data collection and refinement statistics.

	Substrate-free	Gluconolactone complex
<i>Data collection statistics</i>		
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters: a, b, c (Å)	65.76, 122.0, 134.6	65.79, 120.1, 133.0
Resolution ^a (Å)	50.00-1.50 (1.55-1.50)	50.00-1.90 (1.97-1.90)
Measured reflections	1,295,252	350,217
Unique reflections	173,769	83,722
Completeness ^a (%)	99.5 (98.8)	99.5 (99.4)
Redundancy ^a	3.9 (3.9)	2.2 (2.0)
Mean I/σ ^a	29.6 (3.6)	19.4 (3.6)
R_{merge} ^{a, b} (%)	8.8 (32.8)	7.8 (28.6)
<i>Refinement statistics</i>		
Resolution range (Å)	37.25-1.50	44.57-1.90
R/R_{free} factor (%)	16.6/18.1	16.4/19.1
No. of protein atoms	7431	7424
No. of solvent atoms	1357	933
No. of heteroatoms	-	24
Average B factor (Å ²)		
Protein (chain A/B)	12.6/15.6	18.5/21.8
Water	29.7	32.0
Gluconolactone		14.4/16.1
Ramachandran plot (%)		
Favored	89.0	88.5
Allowed	11.0	11.5
Disallowed	0.0	0.0
Rmsd bond lengths (Å)	0.004	0.005
Rmsd bond angles (°)	1.3	1.3

^aValues in parentheses are for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_i \sum_j |I(h,i) - \langle I(h) \rangle| / \sum_i \sum_j I(h,i)$, where $I(h,i)$ is the intensity of the i th measurement of reflection h and $\langle I(h) \rangle$ is the average value over multiple measurements.

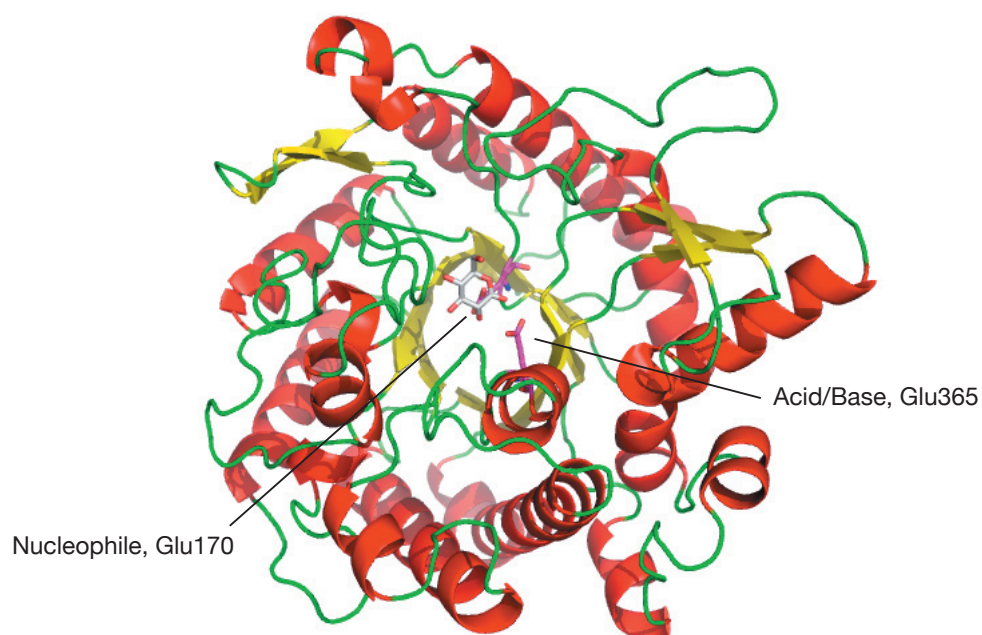


Fig4.2 Overall structure of BGL1A complexed with D-glucono-1,5-lactone.

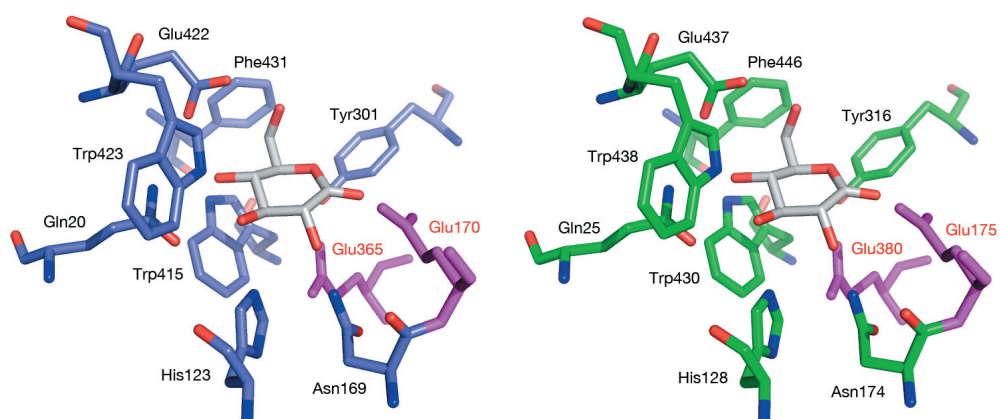


Fig4.3 Comparison of subsite -1 residues of BGL1A and model structure of BGL1B.

Left, BGL1A; Right, Model structure of BGL1B.

Acid/base catalyst, Glu170 (BGL1A), Glu175 (BGL1B).

Nucleophile, Glu365 (BGL1A), Glu380 (BGL1B).

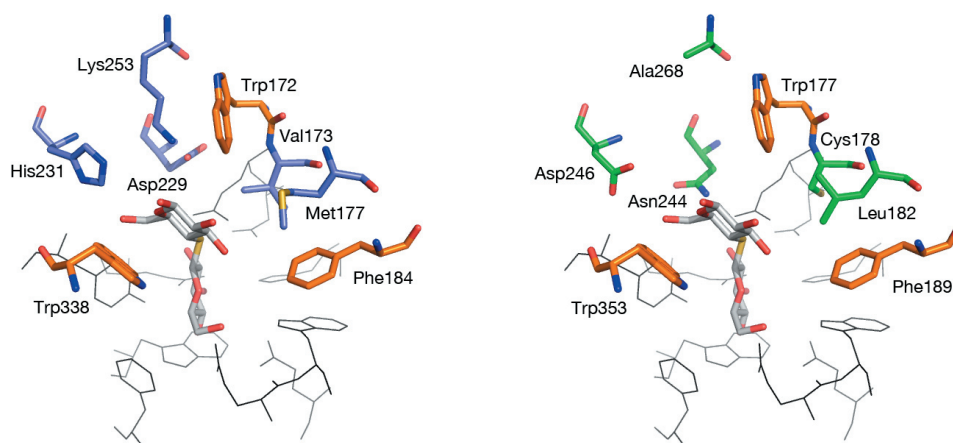


Fig4.4 Comparison of subsite +1 residues of BGL1A and model structure of BGL1B.

Left, BGL1A; Right, Model structure of BGL1B.

Orange, Conserved subsite +1; Black lines, Conserved subsite -1.

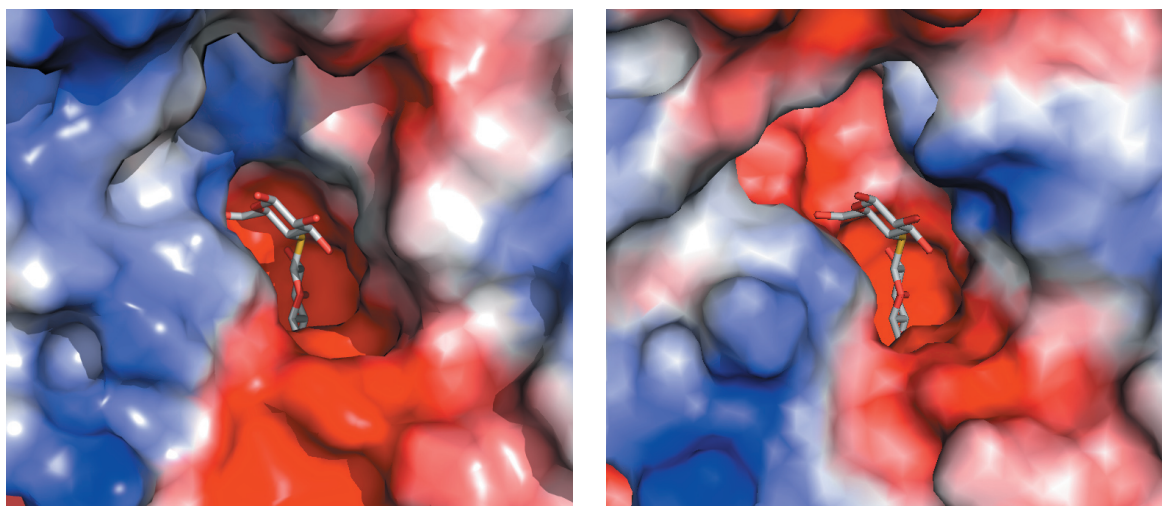


Fig4.5 Surface potential map of generated with PyMOL.

Left, BGL1A; Right, Model structure of BGL1B.

According to the electrostatic potential, the surfaces are colored blue for positive charges and red for negative charges.

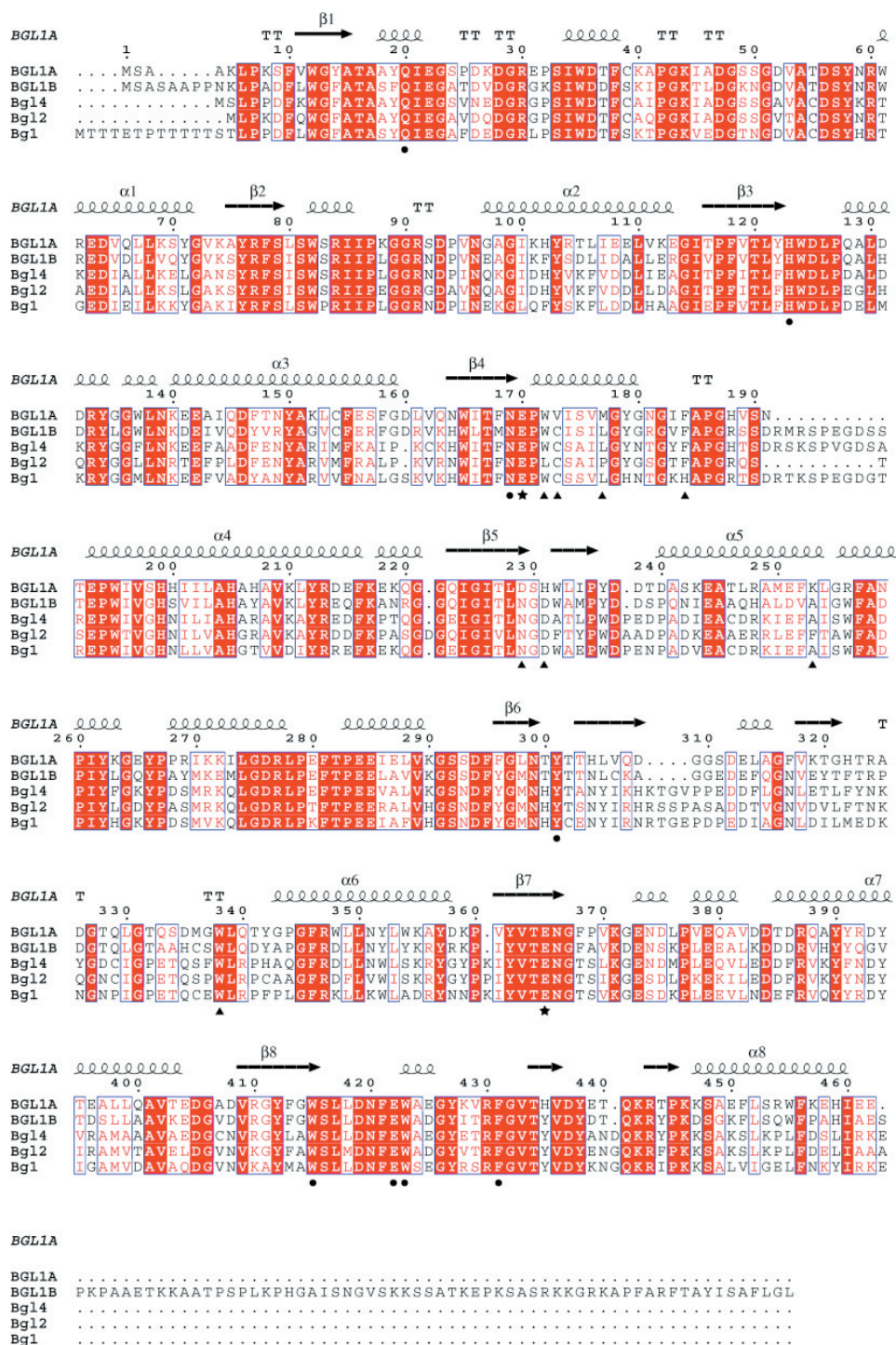


Fig.4.6 Alignment of *P. chrysosporium* BGL1s and fungal GH 1 BGLs.

Filled circle, Subsite -1 residues; Filled triangle, Subsite +1 residues;

Star, Catalytic residues.

4.3.2 BGL1A 変異体によるセロビオースの加水分解活性測定

BGL1A 変異体のセロビオースに対する加水分解活性を測定した結果、いずれの変異体もセロビオースに対して活性を有していたが、反応特性は大きく異なっていた (Table4.3)。作製した全ての BGL1A 変異体は、セロビオースに対して野生型よりも高い k_{cat} 値を示し、セロビオースに対する親和性は野生型より低下していた。各変異体における反応速度パラメータ変化を観測すると、V173C、M177L 変異体では k_{cat} 値だけでなく K_m 値も増加することにより触媒効率は野生型と比較してほぼ同じ値となったため、それらの残基は BGL1A のセロビオース認識にとって重要ではないことが示された。D229N 変異体は K_m 値が野生型と比較して 17 倍以上となりセロビオースに対する親和性が顕著に減少した結果、触媒効率は野生型と比較して 1/10 程度まで減少した。H231D、K253A 変異体では、 K_m 値は野生型と比較してそれぞれ 3 倍、7 倍増加した。

Table4.3 Kinetic parameters of wild-type BGL1A and BGL1A mutants.

Enzyme	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Optimum pH
BGL1A	1.81 \pm 0.05	6.80 \pm 0.29	0.27	6.5
V173C	4.35 \pm 0.14	13.3 \pm 1.3	0.32	6.0
M177L	2.53 \pm 0.08	9.22 \pm 1.05	0.27	6.0
D229N	3.23 \pm 0.17	114 \pm 9	0.028	5.0
H231D	3.94 \pm 0.08	21.0 \pm 1.0	0.19	6.5
K253A	4.47 \pm 0.21	46.5 \pm 3.8	0.096	6.5

The parameters of wild-type BGL1A were obtained from Table3.4. Hydrolytic activity for cellobiose was estimated from the amount of glucose released by each enzyme, and these parameters were calculated as described in Materials and Methods Section.

4.3.3 BGL1B 変異体によるセロビオースの加水分解活性測定

BGL1A のサブサイト +1 を構成するアミノ酸を導入した BGL1B 変異体を作製し、セロビオースに対する加水分解活性を測定した (Fig4.7, Table 4.4)。それぞれのセロビオースに対する k_{cat} 値を比較すると、L182M 変異体では野生型と同程度であったが、それ以外の変異体では減少していた。 K_m 値を野生型と比較すると、D246H 変異体は約 20 倍増加しており、その結果この変異体のみ触媒効率は 1/100 以下と顕著に減少した。他の変異体では K_m 値は野生型と同程度であった。なおいずれの変

異体においてもセロビオースに対する触媒効率は野生型と比較して減少していた。野生型 BGL1B ではセロビオース濃度 1mM 以上で糖転移反応阻害が観測されたが、本研究で作製した全ての変異体は 5mM においても糖転移反応阻害は観測されなかった。

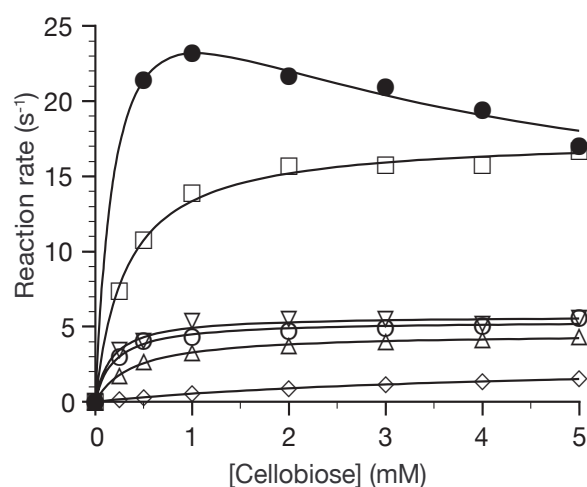


Fig4.7 Cellobiose hydrolysis by wild-type BGL1B and BGL1B mutants.

Filled circle, wild-type BGL1B; Open circle, C178V; Open square, L182M;

Open up-triangle, N244D; Open diamond, D246H; Open down-triangle, A268K.

Table4.4 Kinetic parameters of wild-type BGL1B and BGL1B mutants.

Enzyme	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat2} (s ⁻¹)	K_{m2} (mM)	Optimum pH
BGL1B	16.4±0.4	0.218±0.017	75	8.77±1.64	3.20±0.69	6.5
C178V	5.38±0.13	0.198±0.030	27			6.5
L182M	17.6±0.3	0.318±0.028	55			6.5
N244D	4.55±0.06	0.389±0.022	12			6.0
D246H	2.75±0.04	4.14±0.11	0.66			6.5
A268K	5.72±0.17	0.165±0.35	35			6.0

The parameters of wild-type BGL1B were obtained from Table3.4. Hydrolytic activity for cellobiose was estimated from the amount of glucose released by each enzyme, and these parameters were calculated as described in Materials and Methods Section.

4.3.4 4-O- β -グルコシル二糖に対する加水分解活性測定

セロビオースホスホリラーゼはセロビオースを α -グルコース-1-リン酸とグルコースに加リン酸分解する可逆反応を触媒する酵素であり (Sih et al. 1955)、逆反応を利用することで様々な 4-O- β -グルコシル二糖を合成することができる (Kitaoka et al. 1990; Tariq et al. 1995a, 1995b; Percy et al. 1998a, 1998b)。そこでセロビオースホスホリラーゼを利用することにより合成した 4-O- β -グルコシル二糖 (G1dG、G2dG、G6dG、GX) に対する加水分解活性を測定し、各基質に対する反応速度パラメータを算出した (Fig4.8, Table4.5)。G1dG に対する反応特性をセロビオースに対するそれと比較すると、野生型、C178V、L182M、N244D 変異体では k_{cat} 、 K_m 値は同程度変化することによりセロビオースを基質とした場合と同程度の触媒効率を示した。一方、D246H、A268K 変異体ではセロビオースを基質とした場合と比較して K_m 値が減少し、触媒効率は 2 倍以上高い値となった。G1dG に対する反応特性を各変異体ごとに比較すると、L182M、A268K 変異体と野生型 BGL1B は同程度の触媒効率を示した。

G2dG に対する反応特性をセロビオースに対するそれと比較すると、L182M 変異体以外は k_{cat} 、 K_m 値が同程度変化することにより、セロビオースを基質とした場合と同程度の触媒効率となった。L182M 変異体では k_{cat} 値が 2 倍以上増加することにより、G2dG に対する触媒効率はセロビオースと比較して約 1.3 倍増加した。その結果、G2dG に対する触媒効率は L182M 変異体のみ野生型と同程度の値となった。

G6dG、GX に対する反応特性をセロビオースに対するそれと比較すると、D246H 変異体以外は K_m 値が大幅に増加することにより触媒効率も顕著に減少した。セロビオースを基質とした場合、D246H 変異体の触媒効率は野生型と比較して 1/100 以下であったのに対して、G6dG および GX を基質とした場合の触媒効率は野生型と比較して 1/10 程度であった。

なお BGL1A の各基質に対する反応特性をセロビオースに対する反応特性と比較すると、G1dG を基質とした場合は k_{cat} 値の増加および K_m 値の減少により、触媒効率は約 10 倍増加していた。G2dG を基質とした場合は、 k_{cat} 値の増加により触媒効率は約 3 倍増加していた。一方、G6dG および GX を基質とした場合は k_{cat} 値の減少および K_m 値の増加により触媒効率はそれぞれ 1/3、1/5 程度まで減少した。野生型 BGL1B および D246H 以外の変異 BGL1B では、G6dG や GX を基質とすると K_m 値の顕著な増加が観測されたが、野生型 BGL1A では D246H と同じく K_m 値の顕著な増加は観測されなかった。

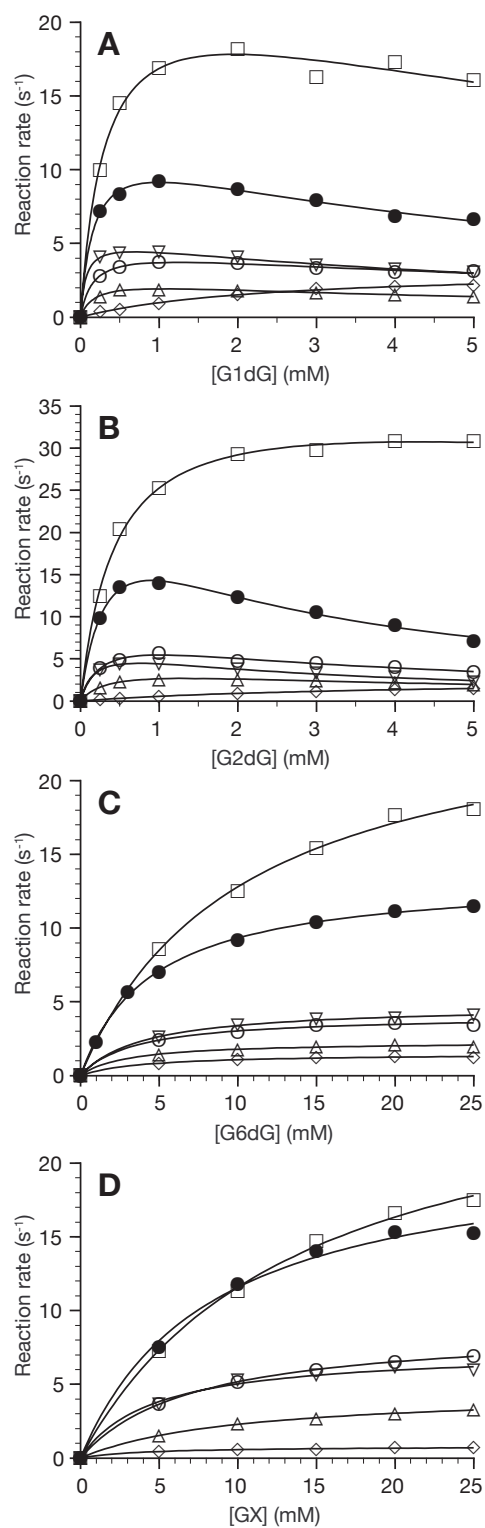


Fig4.8 Hydrolytic activities for 4-*O*- β -Glucosyl substrates by wild-type BGL1B and BGL1B mutants.

Filled circle, wild-type BGL1B; Open circle, C178V; Open square, L182M; Open up-triangle, N244D; Open diamond, D246H; Open down-triangle, A268K. A, G1dG; B, G2dG; C, G6dG; D, GX.

Table 4.5 Kinetic parameters of wild-type BGL1A, BGL1B, and BGL1B mutants.

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat2} (s ⁻¹)	K_{m2} (mM)
BGL1B	Cellobiose	16.4±0.4	0.218±0.017	75	8.77±1.64	3.20±0.69
	G1dG	11.3±0.1	0.135±0.003	84		
	G2dG	26.4±0.3	0.362±0.006	73		
	G6dG	13.6±0.20	4.55±0.23	3.0		
	GX	21.2±1.2	8.28±1.32	2.6		
C178V	Cellobiose	5.38±0.13	0.198±0.030	27		9.52±1.34
	G1dG	4.68±0.10	0.161±0.009	29		
	G2dG	8.34±0.16	0.275±0.010	30		
	G6dG	4.08±0.14	3.51±0.56	1.2		
	GX	8.86±0.09	7.15±0.23	1.2		
L182M	Cellobiose	17.6±0.3	0.318±0.028	55		6.47±0.18
	G1dG	27.6±0.2	0.430±0.004	64		
	G2dG	47.1±0.2	0.673±0.005	70		
	G6dG	26.0±1.0	10.3±0.1	2.5		
	GX	27.7±1.2	14.0±1.3	2.0		
N244D	Cellobiose	4.55±0.06	0.389±0.022	12		3.26±0.60
	G1dG	3.17±0.18	0.288±0.030	11		
	G2dG	4.79±0.24	0.475±0.036	10		
	G6dG	2.31±0.10	2.97±0.63	0.78		
	GX	4.52±0.12	9.81±0.68	0.46		
D246H	Cellobiose	2.75±0.04	4.14±0.11	0.66		
	G1dG	3.27±0.16	2.32±0.26	1.4		
	G2dG	2.61±0.13	3.80±0.34	0.69		
	G6dG	1.50±0.07	3.99±0.74	0.37		
	GX	0.809±0.053	4.23±1.12	0.19		
A268K	Cellobiose	5.72±0.17	0.165±0.35	35		7.38±0.75
	G1dG	5.19±0.08	0.0607±0.0047	86		
	G2dG	6.77±0.16	0.191±0.010	35		
	G6dG	4.76±0.09	4.02±0.31	1.2		
	GX	7.32±0.33	4.57±0.81	1.6		
BGL1A	Cellobiose	1.81±0.05	6.80±0.29	0.27		
	G1dG	8.23±0.26	3.32±0.21	2.5		
	G2dG	6.40±0.18	8.37±0.34	0.76		
	G6dG	1.00±0.10	10.3±1.4	0.097		
	GX	0.634±0.103	13.3±2.8	0.048		

The parameters of wild-type BGL1A and BGL1B were obtained from Table 3.4. Hydrolytic activity for cellobiose was estimated from the amount of glucose released by each enzyme, and these parameters were calculated as described in Materials and Methods Section.

4.3.5 遷移状態における結合エネルギー

セロビオースおよび 4-O- β - グルコシル二糖に対する触媒効率の値 (Table4.5) を利用することにより、セロビオースの還元末端側 OH-1、OH-2、OH-6、CH₂OH-5 の欠如が、遷移状態における結合エネルギーに与える影響を比較した (Table4.6)。セロビオースと G1dG に対する触媒効率比較より、OH-1 が欠如することによっても野生型、C178V、L182M、N244D 変異体は大きな影響を受けなかったが (± 0.5 kJ/mol)、D246H、A268K 変異体では 2kJ/mol 程度、BGL1A では 6kJ/mol 程度結合エネルギーが安定化された。セロビオースと G2dG に対する触媒効率比較より、OH-2 が欠如することで L182M 変異体では結合エネルギーが 0.6kJ/mol、BGL1A では 3kJ/mol 安定化することが明らかとなったが、それ以外の変異体には大きな影響を与えないことが示された。セロビオースと G6dG、GX に対する触媒効率比較より、OH-6 および CH₂OH-5 が欠如することで D246H 変異体以外は遷移状態における結合エネルギーが大きく不安定化 (8-9kJ/mol) されたものの、D246H 変異体では不安定化 (2-3kJ/mol) が緩和されていたことから、この変異体のみ OH-6 および CH₂OH-5 欠如の影響を受けにくくなっていることが示された。さらに OH-6 および CH₂OH-5 が欠如することによる D246H 変異体の結合エネルギー変化 (2-3kJ/mol) は、BGL1A における結合エネルギー変化 (3-4kJ/mol) と近い値であった。

Table4.6 Changes in the transition state energies.

Enzyme	Cellobiose->G1dG	Cellobiose->G2dG	Cellobiose->G6dG	Cellobiose->GX
	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kJ/mol)	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kJ/mol)
BGL1B	-0.3	0.1	8	9
C178V	-0.2	-0.3	8	8
L182M	-0.4	-0.6	8	8
N244D	0.2	0.5	7	8
D246H	-2	-0.1	2	3
A268K	-2	0	9	8
BGL1A	-6	-3	3	4

The $\Delta\Delta G^\ddagger$ values were calculated using k_{cat}/K_m values in Table4.5.

4.4 考察

本章では BGL1A の立体構造情報をもとに構築した BGL1B のモデル構造を用い、両酵素の活性中心付近の構造を比較した。その結果、これまでに立体構造が明らかにされている GH ファミリー 1 に属する BGL 同様、サブサイト -1 を構成する全てのアミノ酸残基が保存されていた (Fig4.3)。一方、サブサイト +1 を構成すると予想される 8 つのアミノ酸の内、5 つの残基が互いに異なっていたため (Fig4.4)、それら 5 残基がセロビオースに対して異なる反応特性を示した要因であることが予想された。

BGL1A のサブサイト +1 に対して変異を導入することにより、セロビオースに対する加水分解活性向上が期待されたが、野生型と比較していずれの BGL1A 変異体もセロビオースに対する K_m 値は増加し、反応特性が顕著に向上した変異体を得ることはできなかった (Table4.3)。なかでも D229N、K253A 変異体のセロビオースに対する K_m 値は顕著に増加していたが、立体構造情報より両アミノ酸側鎖は 2.7 Å の距離にあり水素結合を形成していることが明らかとなっている (Fig5.5)。そのため D229N、K253A 変異体においては、活性中心付近の構造が影響を受けセロビオースに対する親和性が著しく減少したと考えられた。

BGL1B のサブサイト +1 に対して変異を導入したところ、作製した 5 つの変異体の内、D246H はセロビオースに対する K_m 値が 20 倍程度増加した。その結果、野生型と比較して触媒効率が大幅に減少したことから、この残基が BGL1B のサブサイト +1 においてセロビオースの還元末端側グルコースと相互作用していることが推測された。そこでセロビオースの還元末端側グルコースとの相互作用を詳細に調べるため、様々な 4-O- β -グルコシル二糖に対する加水分解活性変化を評価するとともに、得られた触媒効率の値を利用することにより遷移状態における結合エネルギー変化を算出した (Fersht, 1977, Wilkinson et al. 1983)。その結果、いずれの酵素においても G1dG に対しては触媒効率の顕著な減少は観測されなかったことから、野生型 BGL1A および BGL1B は OH-1 と水素結合を形成していないことが示唆された。G1dG に対する加水分解活性をセロビオースを基質とした場合と比較すると、多くの BGL1B 変異体および野生型 BGL1A において K_m 値の減少が観測された。OH-1 が欠如することにより還元末端側グルコースが開環できなくなり、活性中心に取り込まれやすくなったことがその原因として考えられた。同基質に対して BGL1A では k_{cat} 値も顕著に増加しており、結合エネルギーは 6kJ/mol 安定化されていた。両酵素の立体構造から、BGL1A では His231、Lys253 の長い側鎖がセロビオースの還元末端側グルコースの OH-1 と近接しているが、BGL1B ではそれぞれ Asp、Ala に置換されているために空間は広がっていることが分かる (Fig4.4, 4.5)。

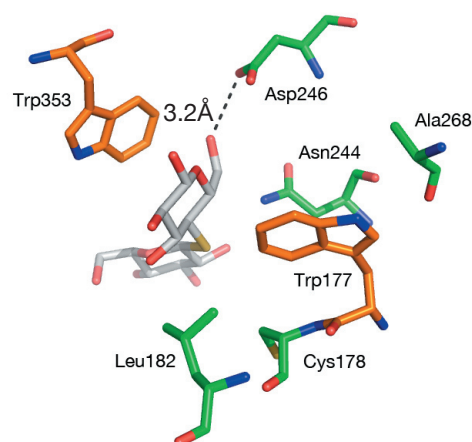
OH-1 が欠如することにより His231、Lys253 との立体障害が小さくなるため、野生型 BGL1A のみで顕著な k_{cat} 値の増加が観測されたと考えられた。

G2dG に対する加水分解活性をセロビオースを基質とした場合と比較すると、L182M 変異体および野生型 BGL1A では k_{cat} 値の増加により結合エネルギーはそれぞれ 0.6kJ/mol、3kJ/mol 安定化されていた。両酵素の立体構造比較より、還元末端側グルコースの OH-2 と相互作用しうる位置にはそれぞれ Met177(BGL1A)、Leu182(BGL1B) が存在しているのみであり、水素結合を形成しうる残基は存在しない。そのため L182M 変異体および野生型 BGL1A では、OH-2 が欠如することにより立体障害が小さくなり、 k_{cat} 値の増加が観測されたと考えられた。

セロビオースの還元末端側 OH-6、CH₂OH-5 が欠如することにより、D246H 以外の変異体ではそれらの基質 (G6dG, GX) に対する K_m 値は、セロビオースを基質とした場合と比較して顕著に増加していた。遷移状態における結合エネルギー変化を調べたところ、セロビオースの還元末端側 OH-6 または CH₂OH-5 が欠如することにより、D246H 変異体以外の結合エネルギーは 8-9kJ/mol 不安定化されることが明らかとなったが、この値は 1 つの水素結合が有する結合エネルギーとして適当である (Voet and Voet, 1995)。さらにチオセロビオースとの複合体構造が公開されている *P. polymyxa* 由来 BglB と BGL1B モデル構造の重ね合わせ図から、この Asp246 はセロビオースの還元末端側 OH-6 と水素結合を形成しうる距離 (3.2 Å) にあった (Fig4.9)。以上の定常状態における反応速度論的解析および構造比較から、BGL1B のサブサイト +1 に位置する Asp246 が水素結合によりセロビオースの還元末端側メチロール基と相互作用を形成することで、セロビオースに対する K_m 値に影響を与えていることが示唆された。

Fig4.9 Superimposition of thio-cellobiose in BglB from *P. polymyxa* and model structure of BGL1B.

White, thio-cellobiose molecule; Orange, conserved subsite +1 residues between BGL1A and BGL1B; Green, non-conserved subsite +1 residues between BGL1A and BGL1B. RMSD = 2.16Å.



第五章

酸性域における活性に関与する 因子の解析

5.1 目的

第三章より、BGL1A と BGL1B は高いアミノ酸配列相同性を有しているにもかかわらず、酸性域における pH 依存性が互いに異なることが明らかとなった。そこで本章では、両酵素の酸性域における活性に関与する因子を明らかにすることを目的とした。そのため BGL1A と BGL1B の活性中心付近の構造を比較し、差異が見られたアミノ酸残基を相互置換した変異体を作製した。それら変異体の pH 依存性を測定することで、酸性域における活性に関与する因子を考察した。

5.2 実験方法

5.2.1 pH 依存性の測定

pH 依存性の測定には、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0、4.5、5.0、5.5)、MES 緩衝液 (pH6.0、6.5)、HEPES 緩衝液 (pH7.0、7.5)、EPPS 緩衝液 (pH8.0) を終濃度 50mM で使用した。3.2.3.2 に記載した活性測定法に準じ、各 pH におけるセロビオースに対する反応速度パラメータを算出した。セロビオース存在下における一般酸・塩基触媒および求核触媒の pK_{es} 値は各 pH におけるセロビオースに対する k_{cat} 値をプロットし、式 (5) に近似することで決定した。またセロビオース非存在下における一般酸・塩基触媒および求核触媒の pK_e 値は各 pH におけるセロビオースに対する k_{cat}/K_m 値をプロットし、式 (6) に近似することで決定した (Fig5.1, 5.2)(廣海・1991)。作図には DeltaGraph5.5.1(Red Rock)、計算には Kaleida Graph ver3.6.4(Synergy Software) を利用した。

$$k_{cat}(pH) = k_{cat} / ((10^{(pK_{es1}-pH)} + 1)(10^{(pK_{es2}-pH)} + 1)) \quad (5)$$

k_{cat} , 触媒活性; pK_{es1} , セロビオース存在下における一般酸・塩基触媒の解離定数;
 pK_{es2} , セロビオース存在下における求核触媒の解離定数

$$k_{cat}/K_m(pH) = (k_{cat}/K_m) / ((10^{(pK_{e1}-pH)} + 1)(10^{(pK_{e2}-pH)} + 1)) \quad (6)$$

k_{cat} , 触媒活性; pK_{e1} ; セロビオース非存在下における一般酸・塩基触媒の解離定数;
 K_m , ミカエリス定数; pK_{e2} , セロビオース非存在下における求核触媒の解離定数

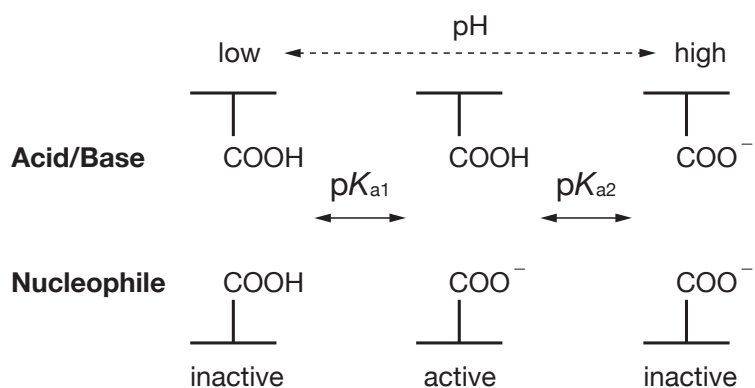


Fig5.1 Model for the dissociation pattern of an enzyme containing two catalytic residues.
 pK_{a1} and pK_{a2} show the dissociation constant for the nucleophile and acid/base, respectively.

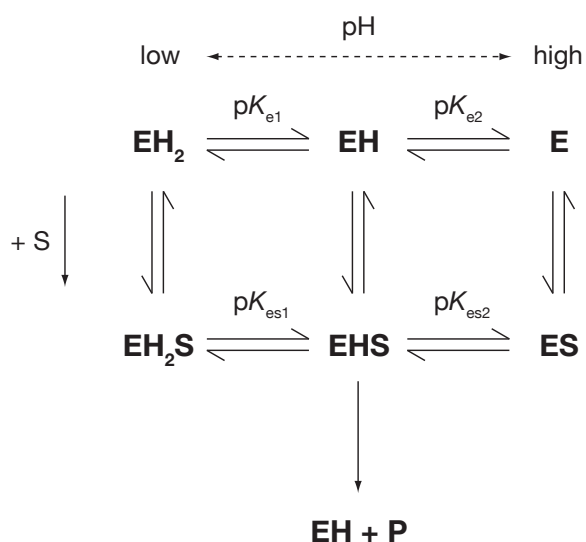


Fig5.2 Scheme of enzyme catalysis in various pH by retaining GHs.

P and S represent product and substrate, respectively. E, EH, EH₂ represent nonprotonated, singly, and doubly protonated forms of the enzyme with two ionizable groups, respectively. ES, EHS, EHS₂ represent protonated, singly, and doubly protonated forms of the enzyme-substrate complexes, respectively. pK_{e1} and pK_{e2} show the dissociation constant for the nucleophile and acid/base, respectively. pK_{es1} and pK_{es2} show the dissociation constant with substrate for the nucleophile and acid/base, respectively.

5.3 結果

5.3.1 野生型 BGL の pH 依存性

各 pH における両酵素のセロビオースに対する触媒効率の値をプロットした。両酵素の至適 pH は pH6.0–6.5 であったが、酸性域における活性保持率が大きく異なっていた (Fig5.3)。pH4.0 において、BGL1A は最大活性の 50% 程度を保持していたのに対して、BGL1B は 1% 程度しか活性を保持することができなかった。各 pH における触媒効率の値から算出される pK_{e1} 、 pK_{e2} 値を比較すると、BGL1A の pK_{e1} 、 pK_{e2} 値はそれぞれ 4.4、7.7 であったのに対して、BGL1B の pK_{e1} 、 pK_{e2} 値はそれぞれ 5.8、7.2 であった。各 pH における k_{cat} 値から算出される pK_{es1} 、 pK_{es2} 値を比較すると、BGL1A の pK_{es1} 、 pK_{es2} 値はそれぞれ 4.1、7.6 であったのに対して、BGL1B の pK_{es1} 、 pK_{es2} 値はそれぞれ 4.8、7.9 であった。

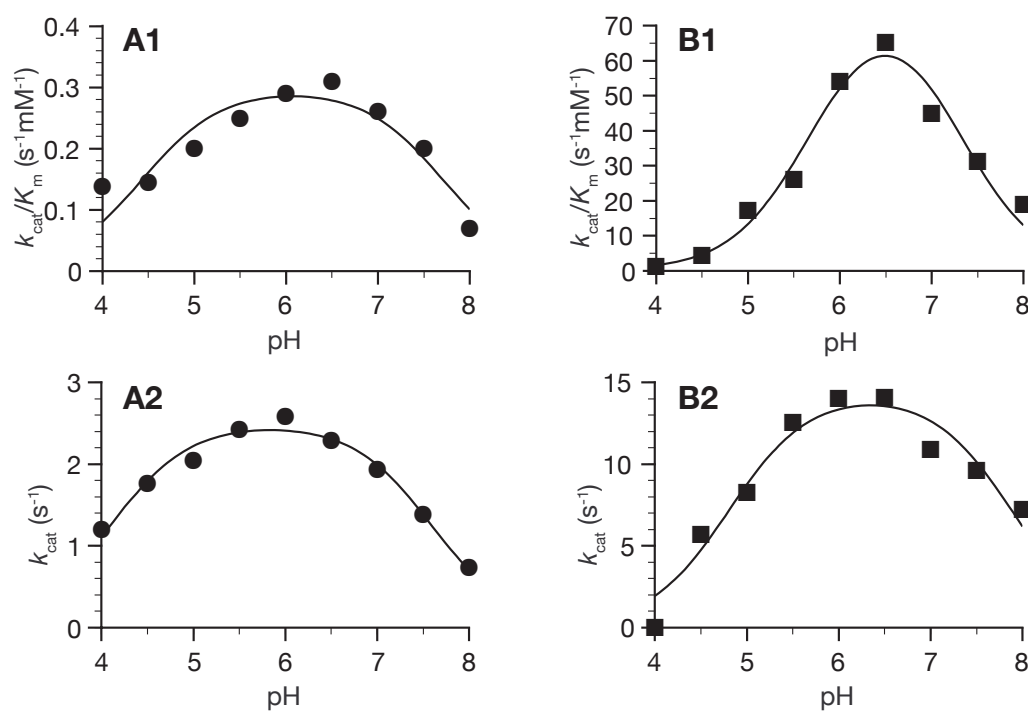


Fig5.3 Comparison of the pH dependences of BGL1A and BGL1B.

A1, pH- k_{cat}/K_m profiles of cellobiose hydrolysis for BGL1A. A2, pH- k_{cat} profiles of cellobiose for BGL1A.

B1, pH- k_{cat}/K_m profiles of cellobiose hydrolysis for BGL1B. B2, pH- k_{cat} profiles of cellobiose for BGL1B.

The buffers (50 mM solutions) used were sodium acetate (pH4.0–5.5), MES (pH6.0, 6.5), HEPES (pH7.0, 7.5), and EPPS (pH8.0).

5.3.2 BGL1A 変異体の pH 依存性

両酵素の活性中心付近の構造を比較したところ、第四章で示したように求核触媒付近の残基は全て保存されていたのに対して、一般酸・塩基触媒付近に位置する 5 残基が互いに異なっていた (Fig4.3, 4.4)。そこで BGL1B のそれら 5 残基を 1 残基ずつ導入した BGL1A 変異体のセロビオースに対する反応速度パラメータを決定し、各 pH における k_{cat} 値、触媒効率をプロットした後、5.2.1 に記載した式 (5)(6) に近似した (Fig5.4, Table5.1)。その結果、V173C 変異体および M177L 変異体は野生型と類似したプロットを示しており、 pK_e 、 pK_{es} 値も野生型と同程度であった。一方 D229N、H231D、K253A 変異体では野生型と比較して顕著な変化が見られた。H231D、K253A 変異体では、 pK_{e1} 、 pK_{e2} 、 $pK_{\text{es}1}$ 値は野生型と比較して同程度であったのに対して ($< \pm 0.5$)、 $pK_{\text{es}2}$ 値はそれぞれ +0.9、+1.2 であり野生型と比較して増加していた。D229N 変異体では、 pK_{e1} 、 $pK_{\text{es}1}$ 値の変化は野生型と比較して比較的小さかったのに対して ($< \pm 0.5$)、 pK_{e2} 、 $pK_{\text{es}2}$ 値はそれぞれ +1.4、+1.9 であった。

BGL1A の立体構造から、Asp229 と Lys253 の側鎖間には水素結合が形成されていることが推測されたため (Fig5.5)、Asp229 と Lys253 を同時に変異させた変異体 (D229N/K253A) を作製し pH 依存性を測定した。その結果、D229N 変異体と比較して中性域付近における活性が顕著に回復していた。D229N/K253A 変異体の k_{cat} 値の pH 依存性は釣鐘形にはならず、D229N 変異体の酸性から中性域におけるプロットと K253A 変異体の中性からアルカリ性域におけるプロットを混合したような形状をしていた (Fig5.6)。

Table5.1 pK values of the catalytic groups of wild-type BGL1A and BGL1A mutants.

Enzyme	pK_{e1}	pK_{e2}	ΔpK_{e1}	ΔpK_{e2}	$pK_{\text{es}1}$	$pK_{\text{es}2}$	$\Delta pK_{\text{es}1}$	$\Delta pK_{\text{es}2}$
BGL1A	4.4 \pm 0.2	7.7 \pm 0.2	-	-	4.1 \pm 0.1	7.6 \pm 0.1	-	-
C178V	4.3 \pm 0.2	7.1 \pm 0.1	-0.1	-0.6	3.9 \pm 0.2	7.4 \pm 0.1	-0.2	-0.2
M177L	4.2 \pm 0.2	7.5 \pm 0.2	-0.2	-0.2	4.0 \pm 0.1	7.7 \pm 0.1	-0.1	+0.1
D229N	3.9 \pm 0.2	6.3 \pm 0.2	-0.5	-1.4	3.6 \pm 0.2	5.7 \pm 0.1	-0.5	-1.9
H231D	4.8 \pm 0.2	8.0 \pm 0.2	+0.4	+0.3	3.8 \pm 0.1	8.5 \pm 0.2	-0.3	+0.9
K253A	4.4 \pm 0.2	8.0 \pm 0.2	\pm 0	+0.3	4.3 \pm 0.2	8.8 \pm 0.2	+0.2	+1.2
D229N/K253A	4.6 \pm 0.1	7.1 \pm 0.1	+0.2	-0.6	n.d.	n.d.	-	-

Hydrolytic activity for cellobiose was measured at pH4.0-8.0. The pK_e and pK_{es} values were calculated by curve-fitting the experimental data to the equation as described in Materials and Methods Section.

n.d., not determined.

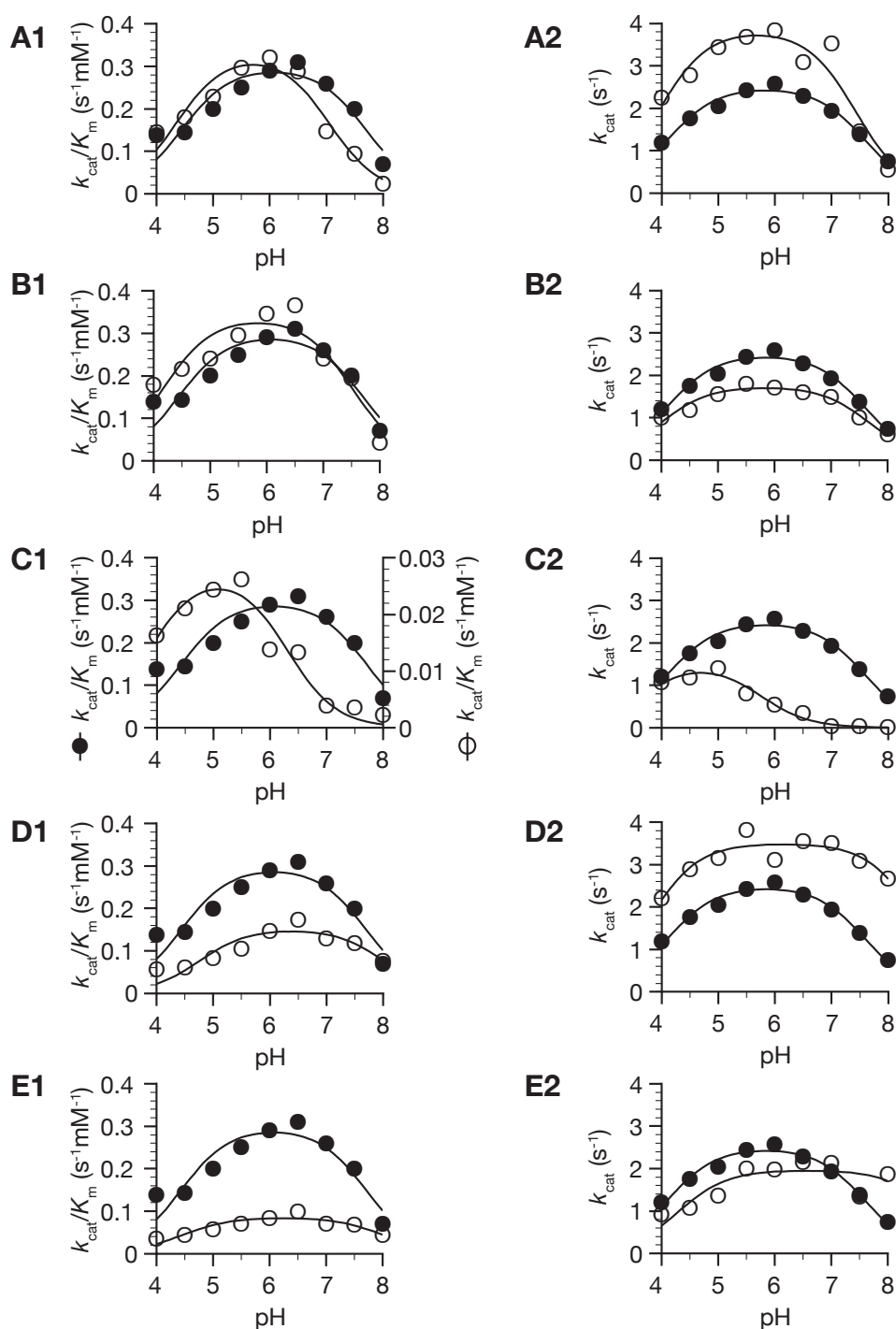


Fig5.4 pH- k_{cat}/K_m (A1-E1) and pH- k_{cat} (A2-E2) profiles of cellobiose hydrolysis for BGL1A mutants (open circle). Each graph also shows the pH- k_{cat}/K_m and pH- k_{cat} profiles of wild-type BGL1A (filled circle) for reference. The buffers (50 mM solutions) used were sodium acetate (pH4.0-5.5), MES (pH6.0, 6.5), HEPES (pH7.0, 7.5), EPPS (pH8.0). A, V173C; B, M177L; C, D229N; D, H231D; E, K253A.

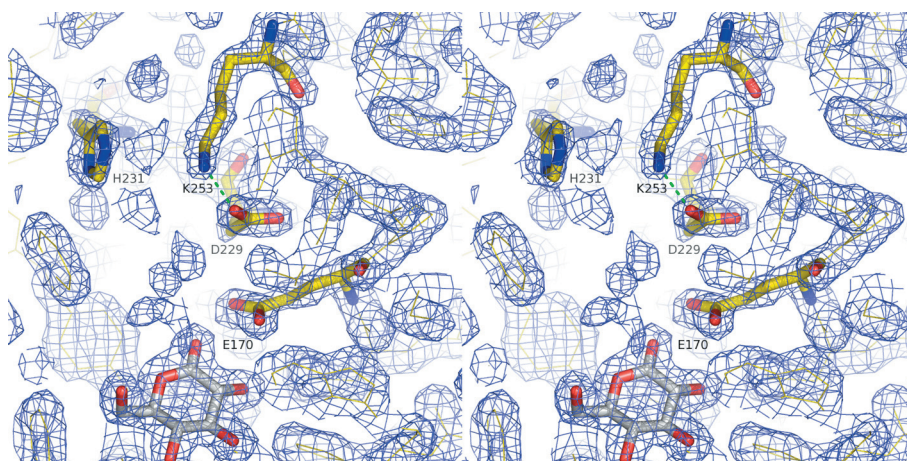


Fig5.5 Electron density of BGL1A complexed with D-glucono-1,5-lactone (PDB ID, 2E40).

Potential hydrogen bonds are indicated by dashed lines, oxygen atoms are shown in red and nitrogen atoms in blue, and the gluconolactone molecule is shown in white stick format. This figure was drawn with PyMOL (DeLano Scientific LLC).

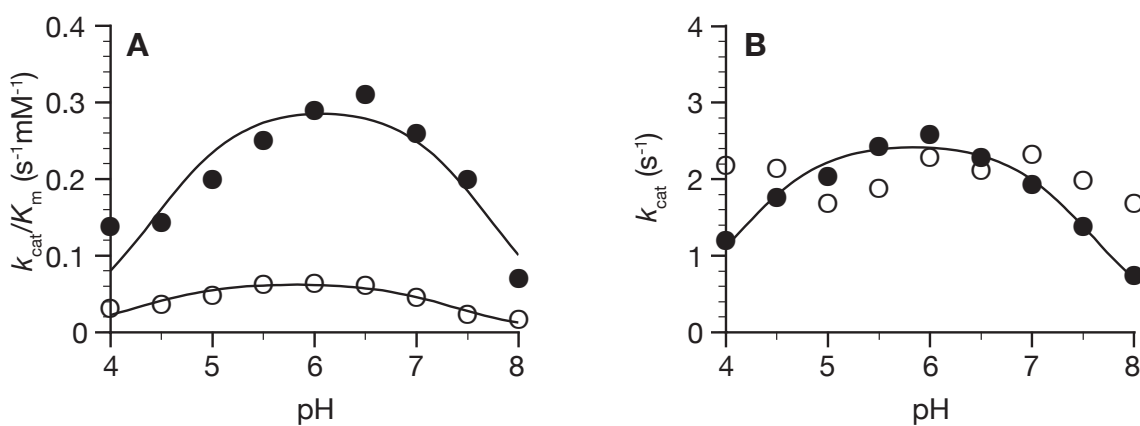


Fig5.6 pH dependence of D229N/K253A mutant (open circle).

A, pH- k_{cat}/K_m profiles of cellobiose hydrolysis. B, pH- k_{cat} profiles of cellobiose hydrolysis. Each graph also shows the pH dependence of wild-type BGL1A (filled circle) for reference. The buffers (50 mM solutions) used were sodium acetate (pH4.0-5.5), MES (pH6.0, 6.5), HEPES (pH7.0, 7.5), EPPS (pH8.0).

5.4 考察

アノマー保持型の糖質加水分解酵素は、一般酸・塩基触媒または求核触媒として位置づけられる2つのGluが作用することにより加水分解反応を行う (McCarter and Withers. 1994; Rye and Withers. 2000; Davies et al. 2005)。加水分解過程において、求核触媒として働くGluは加水分解反応の第一段階では求核触媒として作用するが、アシル中間体を形成した後は脱離基として作用する。一般酸・塩基触媒として働くGluは第一段階では一般酸触媒として作用するが、アシル中間体を攻撃する際には一般塩基触媒として作用する。そのため加水分解反応のpH依存性は、触媒残基であるGluの解離状態に依存していると考えられている (Fig5.1, 5.2)(Wang et al. 1995; Moracci et al. 1996)。

BGL1AとBGL1Bは互いに中性域に至適pHを有していたが、BGL1Aの方が低い pK_{e1} 値を示すことによりBGL1AはBGL1Bと比較して酸性寄りのpH依存性を示した (Fig5.3)。アノマー保持型の糖質加水分解酵素では、酸性域におけるpH依存性に関与しているのは求核触媒であると考えられているため (Fig5.1)、両酵素においては求核触媒近傍のアミノ酸が異なっていることが予想された。BGL1Aの立体構造とBGL1Bのモデル構造を比較したところ、一般酸・塩基触媒であるグルタミン酸残基近傍に位置する5つのアミノ酸に差異が見られたが、予想に反して求核触媒であるGlu近傍に位置する全てのアミノ酸残基は保存されていた (Fig4.3, 4.4)。そこで本章においては一般酸・塩基触媒近傍において差異が見られた5つのアミノ酸に注目し、作製したBGL1A変異体のpH依存性を比較した (Fig5.4)。その結果、いずれのBGL1A変異体においても求核触媒の解離定数を示す pK_{e1} 、 pK_{es1} 値に顕著な変化は観測されなかったため (Table5.1)、今回選択したアミノ酸は求核触媒であるGlu365の解離状態には関与していないことが示された。しかしながら、D229N、H231D、K253A変異体においては pK_{e2} 、 pK_{es2} 値の顕著な変化が観測されたため、これらのアミノ酸が一般酸・塩基触媒であるGlu170の解離状態に関与していることが示された (Table5.1)。

D229N変異体では、セロビオースに対する加水分解活性はいずれのpH領域においても減少していたことから、この残基はBGL1Aの触媒作用に重要であることが推測された (Fig5.4, Table 5.1)。S. bicolor由来SbDhr1の研究によると、BGL1AのAsp229に相当するAsp261をAsnに置換したところ、天然基質であるdhurrinに対する活性が著しく減少することが報告されている (Verdoucq et al. 2003)。さらにH. sapiens由来BGLにおいてAsp229に相当するアミノ酸はPheであるが、それをSerに置換すると活性が顕著に減少することが観測されている (Berrin et al. 2003)。BGL1AのpH依存性変化をみると中性からアルカリ性における活性の減少が著し

いため、*S. bicolor* および *H. sapiens* 由来変異 BGL においても、一般酸・塩基触媒の作用が妨げられることにより同様の pH 依存性変化が起こり、活性が顕著に減少したのではないかと考えられた。D229N 変異体は pK_{e2} および pK_{es2} 値が顕著に減少していたことから、Asp229 は Glu170 の解離状態に関与していることが推測されるが、BGL1A の電子密度図をみると Asp229 の側鎖と Lys253 の側鎖は 2.7 Å の距離にあることから強い水素結合を形成していることが示唆された (Fig5.5)。そのため D229N 変異体においては、Asn229 のカルボニル基と Lys253 のアミド基間の相互作用が Asn229 のアミド基と Glu170 のカルボキシル基間の相互作用に影響を与えたことにより、Glu170 は野生型より低い pH において脱プロトン化されたと考えられた (Fig5.7)。

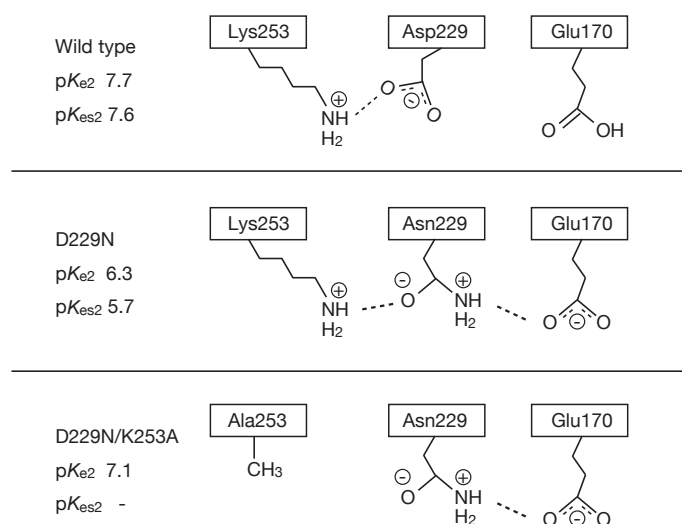


Fig5.7 Summary of ionization states of Glu170, Asp229, and Lys253 in wild-type BGL1A, the D229N mutant, and the D229N/K253A mutant.

Potential hydrogen bonds are indicated by broken lines.

H231D、K253A 変異体では、 pK_{es2} 値はそれぞれ 8.5、8.8 と顕著に増加していたが、 pK_{e2} 値の増加はわずかに +0.3 であった (Table5.1)。この結果はセロビオースが活性中心に取り込まれている状態において、Glu170 が強い影響を受けたことを示している。H231D、K253A 変異体は側鎖のコンホメーションおよび電荷を大きく変化させる置換であることから、セロビオース加水分解反応過程が影響を受け、基質フリーな状態と比較してより高い pH 条件下においても Glu170 のプロトンが保持されたと考えられた。

このように BGL1A 変異体は様々な pH 依存性変化を示したにもかかわらず、酸性域における活性保持率は顕著に変化しなかった。興味深いことに、両酵素の活性中心付近においては、今回変異を導入した 5 つのアミノ酸残基以外に異なる残基は見いだされていない。そのため BGL1A の求核触媒である Glu365 が酸性域においても脱プロトン化状態を保持できる要因を明らかにするためには、今後、BGL1A に対してランダムに変異を導入し、求核触媒の解離状態に関与しているアミノ酸残基を特定する試みが必要不可欠であろう。

第六章

総括

近年地球温暖化や石油価格高騰の影響を受け、再生可能でカーボンニュートラルな資源である植物バイオマスから、エタノールや化成品等の有用物質を生産することが望まれている。植物細胞壁の主成分であるセルロースから効率良くグルコースを得るため、セロビオースに対して高い反応特性を示す BGL が現在求められている。このような時代背景を受け本研究では、GH ファミリー 1 に属する BGL の構造と機能の関係を明らかにすることにより、セルラーゼの至適 pH である酸性域でセロビオースに対して高い反応特性を示す新規な BGL を取得するための指針を得ることを目的として研究をおこない、新たな知見を得ることができた。これらについて以下に総括する。

担子菌 *P. chrysosporium* はセルロースを単一の炭素源とした培養系において、菌体外に GH ファミリー 3 に属する 1 種類の BGL を生産するが、その酵素は基質特異性から β -1,3- グルコシダーゼとして位置づけられている。*P. chrysosporium* ゲノム情報から、本菌は GH ファミリー 1 に属する BGL 様遺伝子を 2 つ有することが明らかとなっていたため、それらの遺伝子産物がセロビオースに対して高い反応特性を有していることが期待された。そこで第二章では、*P. chrysosporium* から GH ファミリー 1 に属する新規な BGL 遺伝子の取得を目指した。その結果、ゲノム情報を利用して設計したプライマー対を利用することにより、担子菌初となる GH ファミリー 1 に属する BGL をコードする cDNA を取得することに成功した。

セルロースの酵素糖化においては、セルラーゼと BGL を同一の反応系内で作用させることにより糖化効率を向上させることができるため、酸性、高温条件下でセロビオースに対して高い反応特性を示す BGL が求められている。そこで第三章では、クローニングした cDNA を組換えタンパク質として生産し、それらの酵素学的性質を明らかにすることを目指した。その結果、両酵素を比較すると、BGL1A は BGL1B と比較して酸安定性、温度安定性に優れるが、セロビオースに対する反応特性に乏しい酵素であることを明らかにした。一方 BGL1B は、BGL1A と比較して酸安定性、温度安定性に乏しいが、セロビオースに対する反応特性、特に親和性に優れていたことから、セルロースの酵素糖化を効率化する上で有用な性質を有していることを明らかにした。

第三章より、BGL1A と BGL1B は高いアミノ酸配列相同性を有しているにもかかわらず、セロビオースに対する反応特性が互いに異なることが明らかとなった。そこで第四章では、両酵素の立体構造情報をもとに部位特異的変異体を作製し、それら変異体のセロビオースに対する加水分解活性を測定することにより、セロビオースに対して異なる反応特性を示した要因となるアミノ酸残基の特定をおこなった。さらに、様々な 4-O- β - グルコシル二糖を基質として利用することで、サブサイト +1 と相互作用しているセロビオースの還元末端側グルコース部位の特定をおこ

なった。以上により両酵素のセロビオース認識に関与する因子解明を目指した。その結果、BGL1B の Asp246 とセロビオースの還元末端側メチロール基間における水素結合が、セロビオースに対して高い親和性を示すために重要であることを明らかにした。

BGL1A と BGL1B は互いに高いアミノ酸配列相同性を有しているにもかかわらず、酸性域における pH 依存性および pH 安定性が異なることが第三章より明らかとなった。そこで第五章では、両酵素の立体構造比較から得られた知見をもとに変異体を作製し、pH 依存性を測定することで酸性域における活性に関与する因子解明を目指した。その結果、両酵素の活性中心において差異が見られた 5 つのアミノ酸残基は、BGL1A の求核触媒の解離状態には関与していないと考えられた。

以上のように本研究では、糸状菌由来 BGL としては世界初となる BGL1A の立体構造情報に基づき構築した変異体を機能解析することにより、BGL がセロビオースを特異的に認識する上で必須となるアミノ酸部位を特定することができたことから、セロビオースに対して高い反応特性を示す BGL を取得するための指針が得られたと考えられる。これまで GH ファミリー 1 および 3 に属する糸状菌由来 BGL の立体構造が解明されていなかった背景もあり、糸状菌由来 BGL の構造と機能に関する先行研究は殆ど存在しておらず情報に乏しかった。このような現状に対して本研究は一つの新たな知見を加えたといえるであろう。さらに今後、酸性域における構造安定化、および酸性域における求核触媒の脱プロトン化状態保持、につながる要因を明らかにすることで、酸性域で活性を保持しセロビオースに対して高い親和性を有する BGL を取得することが可能になると考えられる。人類が持続可能な社会を構築するため、本研究で得られた知見に基づきバイオリファイナリーを効率化するための BGL が開発されることを期待し総括とする。

参考文献

- Aguilar CF, Sanderson I, Moracci M, Ciaramella M, Nucci R, Rossi M, Pearl LH.** (1997) Crystal structure of the β -glycosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability. *J Mol Biol.* 271, 789-802.
- Akiba T, Nishio M, Matsui I, Harata K.** (2004) X-ray structure of a membrane-bound β -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Proteins.* 57, 422-431.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Atalla RH.** (1983) The structure of cellulose: recent developments. Academic Press, New York.
- Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman JD, Offord RE, Priddle JD, Waley SG.** (1975) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature.* 255, 609-614.
- Barleben L, Ma XY, Koepke J, Peng G, Michel H, Stockigt J.** (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of strictosidine glucosidase, an enzyme initiating biosynthetic pathways to a unique diversity of indole alkaloid skeletons. *Biochim Biophys Acta.* 1747, 89-92.
- Barleben L, Panjikar S, Ruppert M, Koepke J, Stockigt J.** (2007) Molecular architecture of strictosidine glucosidase: the gateway to the biosynthesis of the monoterpene indole alkaloid family. *Plant Cell.* 19, 2886-2897.
- Barrett T, Suresh CG, Tolley SP, Dodson EJ, Hughes MA.** (1995) The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure.* 3, 951-960.
- Bauer MW, Kelly RM.** (1998) The family 1 β -glucosidases from *Pyrococcus furiosus* and *Agrobacterium faecalis* share a common catalytic mechanism. *Biochemistry.* 37, 17170-17178.
- Beguin P.** (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Annu Rev Microbiol.* 44, 219-248.
- Benchetrit T, Bissery V, Mornon JP, Devault A, Crine P, Roques BP.** (1988) Primary structure homologies between two zinc metallopeptidases, the neutral endopeptidase 24.11 ('enkephalinase') and thermolysin, through clustering analysis. *Biochemistry.* 27, 592-596.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S.** (2004) Improved prediction of signal peptides: signalP 3.0. *J Mol Biol.* 340, 783-795.
- Berghem LER, Pettersson LG, Fredriksson UBA.** (1973) The mechanism of enzymatic cellulose

degradation. Eur J Biochem. 53, 55-62.

Blackwell J. (1982) The macromolecular organization of cellulose and chitin. Plenum, New York.

Burmeister WP, Cottaz S, Driguez H, Iori R, Palmieri S, Henrissat B. (1997) The crystal structure of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. Structure. 5, 663-675.

Candelas LG, Aristoy MC, Polaina J, Flors A. (1989) Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing β -glucosidase activity in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 55, 3173-3177.

Candelas LG, Ramon D, Polaina J. (1990) Sequences and homology analysis of two genes encoding β -glucosidases from *Bacillus polymyxa*. Gene. 95, 31-38.

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. (2008) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. Nucleic Acids Res. Nucleic Acids Res. doi: 10.1093/nar/gkn663.

Chi YI, Martinez-Cruz LA, Jancarik J, Swanson RV, Robertson DE, Kim SH. (1999) Crystal structure of the β -glycosidase from the hyperthermophile *Thermosphaera aggregans*: insights into its activity and thermostability. FEBS Lett. 445, 375-383.

Chuenchor W, Pengthaisong S, Robinson RC, Yuvaniyama J, Oonasant W, Bevan DR, Esen A, Chen CJ, Opasiri R, Svasti J, Cairns JR. (2008) Structural insights into rice BGlu1 β -glucosidase oligosaccharide hydrolysis and transglycosylation. J Mol Biol. 377, 1200-1215.

Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Bevan DR, Henrissat B, Esen A. (2000) The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. Proc Natl Acad Sci USA. 97, 13555-13560.

Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Burmeister WP, Bevan DR, Henrissat B, Esen A. (2001) Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlul) β -glucosidase and a model of its complex with *p*-nitrophenyl β -D-thioglucoside. Biochem J. 354, 37-46.

Davies GJ, Wilson KS, Henrissat B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. 321, 557-559.

Davies GJ, Ducros VMA, Varrot A, Zechel DL. (2003) Mapping the conformational itinerary of β -glucosidases by X-ray crystallography. Biochem Soc Trans. 31, 523-527.

Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. (2005) Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. Curr Opin Struc Biol. 15, 1-9.

Dharmawardhana DP, Ellis BE, Carlson JE. (1995) A β -glucosidase from lodgepole pine specific for the lignin precursor coniferin. Plant Physiol. 107, 331-339.

Dion M, Fourage L, Hallet JN, Colas B. (1999) Cloning and expression of a β -glycosidase gene from *Thermus thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme.

Glycoconjugate J. 16, 27-37.

Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, Ruohonen L, Pettersson G, Knowles JK, Teeri TT, Jones TA. (1994) The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Science. 265, 524-528.

Escamilla-Trevino LL, Chen W, Card ML, Shih MC, Cheng CL, Poulton JE. (2006) *Arabidopsis thaliana* β -glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. Phytochemistry. 67, 1651-1660.

Esen A. (1993) β -Glucosidases: Biochemistry and molecular biology. American Chemical Society.

Falk A, Rask L. (1995) Expression of a zeatin-*O*-glucoside-degrading β -glucosidase in *Brassica napus*. Plant Physiol. 108, 1369-1377.

Fersht AR. (1977) Enzyme structure and mechanism. W. H. Freeman, San Francisco, CA.

Flickinger MH. (1980) Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come. Biotechnol Bioeng. 22, 27-48.

Gabelsberger J, Liebl W, Schleifer KH. (1993) Purification and properties of a recombinant β -glucosidase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. Appl Microbiol Biotechnol. 40, 44-52.

Gaboriaud C, Bissery V, Benchetrit T, Mornon JP. (1987) Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. FEBS Lett. 224, 149-155.

Gatt S. (1966) Enzymic hydrolysis of sphingolipids: Hydrolysis of ceramide glucoside by an enzyme from ox brain. Biochem J. 101, 687-691.

Gloster TM, Roberts S, Ducros VM, Perugino G, Rossi M, Hoos R, Moracci M, Vasella A, Davies GJ. (2004) Structural studies of the β -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus* in complex with covalently and noncovalently bound inhibitors. Biochemistry. 43, 6101-6109.

Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metoz F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. Bioinformatics. 15, 305-308.

Gouet P, Robert X, Courcelle E. (2003) ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. Nucl Acids Res. 31, 3320-3323.

Guasch A, Vallmitjana M, Perez R, Querol E, Perez-Pons JA, Coll M. (1999) Cloning, overexpression, crystallization and preliminary X-ray analysis of a family 1 β -glucosidase from *Streptomyces*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 55, 679-682.

Hakulinen N, Paavilainen S, Korpela T, Rouvinen J. (2000) The crystal structure of β -glucosidase from *Bacillus circulans* sp. alkalophilus: ability to form long polymeric assemblies. J Struct Biol. 129, 69-79.

Halliwell G, Riaz M. (1971) Interactions between components of the cellulase complex of *Trichoderma koningii* on native substrates. Arch Mikrobiol. 78, 295-309.

- Halliwel G, Griffin M.** (1973) The nature and mode of action of the cellulolytic component C1 of *Trichoderma koningii* on native cellulose. *Biochem J.* 135, 587-594.
- Hancock SM, Corbett K, Fordham-Skelton AP, Gatehouse JA, Davis BG.** (2005) Developing promiscuous glycosidases for glycoside synthesis: residues W433 and E432 in *Sulfolobus solfataricus* β -glycosidase are important glucoside- and galactoside-specificity determinants. *Chembiochem.* 6, 866-875.
- Hashimoto W, Miki H, Nankai H, Sato N, Kawai S, Murata K.** (1998) Molecular cloning of two genes for β -D-glucosidase in *Bacillus* sp. GL1 and identification of one as a gellan degrading enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 360, 1-9.
- Henrissat B, Popineau Y, Kader JC.** (1988) Hydrophobic cluster analysis of plant protein sequences. A domain homology between storage and lipid transfer proteins. *Biochem J.* 901-905.
- Henrissat B, Claeyssens M, Tomme P, Lemesle L, Mornon JP.** (1989) Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene.* 81, 83-95.
- Henrissat B.** (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 280, 309-316.
- Henrissat B, Bairoch A.** (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 293, 781-788.
- Henrissat B, Bairoch A.** (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 316, 695-696.
- Hirayama T, Horie S, Nagayama M, Matsuda K.** (1978) Studies on cellulases of a phytopathogenic fungus, *Pyricularia oryzae* cavara. II. Purification and properties of a β -glucosidase. *J Biochem.* 84, 27-37.
- Hiromi K.** (1970) Interpretation of dependency of rate parameters on 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, Ono S.** (1973) Subsite affinities of glucoamylase: examination of the validity of the subsite theory. *Biochim Biophys Acta.* 302, 362-375.
- Holtzapple M, Congnata M, Shu Y, Hendrickson C.** (1990) Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol Bioeng.* 36, 275-287.
- Hrmova M, Harvey AJ, Wang J, Shirley NJ, Jones GP, Stone BA, Hoj PB, Fincher GB.** (1996) Barley β -D-glucan exohydrolases with β -D-glucosidase activity. Purification, characterization, and determination of primary structure from a cDNA clone. *J Biol Chem.* 271, 5277-5286.
- Husebye H, Arzt S, Burmeister WP, Hartel FV, Brandt A, Rossiter JT, Bones AM.** (2005) Crystal structure at 1.1 Å resolution of an insect myrosinase from *Brevicoryne brassicae* shows its close relationship to β -glucosidases. *Insect Biochem Mol Biol.* 35, 1311-1320.

- Igarashi K, Samejima M, Saburi Y, Habu N, Eriksson KE.** (1997) Localization of cellobiose dehydrogenase in cellulose-grown cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Fungal Genet Biol. 21, 214-222.
- Igarashi K, Samejima M, Eriksson KE.** (1998) Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition. Eur J Biochem. 253, 101-106.
- Igarashi K, Tani T, Kawai R, Samejima M.** (2003) Family 3 β -glucosidase from cellulose-degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a glucan 1,3- β -glucosidase. J Biosci Bioeng. 95, 572-576.
- Inglin M, Feinberg BA, Loewenberg JR.** (1980) Partial purification and characterization of a new intracellular β -glucosidase of *Trichoderma reesei*. Biochem J. 185, 515-519.
- Isorna P, Polaina J, Latorre-Garcia L, Canada FJ, Gonzalez B, Sanz-Aparicio J.** (2007) Crystal structures of *Paenibacillus polymyxa* β -glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insights into the catalytic machinery of family 1 glycosidase. J Mol Biol. 371, 1204-1218.
- Jenkins J, Lo Leggio L, Harris G, Pickersgill R.** (1995) β -Glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases from a superfamily of enzymes with 8-fold β/α architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. FEBS Lett. 362, 281-285.
- Johnsrud SC, Eriksson KE.** (1985) Cross-breeding of selected and mutated homokaryotic strains of *Phanerochaete chrysosporium* K-3-new cellulase deficient strains with increased ability to degrade lignin. Appl Microbiol Biotechnol. 21, 320-327.
- Kaper T, Lebbink JH, Pouwels J, Kopp J, Schulz GE, van der Oost J, de Vos WM.** (2000) Comparative structural analysis and substrate specificity engineering of the hyperthermostable β -glucosidase CelB from *Pyrococcus furiosus*. Biochemistry. 39, 4963-4970.
- Kawai R, Yoshida M, Tani T, Igarashi K, Ohira T, Nagasawa H, Samejima M.** (2003) Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* β -glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Biosci Biotechnol Biochem. 67, 1-7.
- Kawai R, Igarashi K, Yoshida M, Kitaoka M, Samejima M.** (2006) Hydrolysis of β -1,3/1,6-glucan by glycoside hydrolase family 16 endo-1,3(4)- β -glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Microbiol Biotechnol. 71, 898-906.
- Kempton JB, Withers SG.** (1992) Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic studies. Biochemistry. 31, 9961-9969.
- King KW, Smibert RM.** (1963) Distinctive properties of β -glucosidase and related enzymes derived from a commercial *Aspergillus niger* cellulase. Appl Microbiol. 11, 315-319.

- Kitaoka M, Taniguchi H, Sasaki T.** (1990) Production of glucosyl-xylose using *Cellvibrio gilvus* cells and its properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 34, 178-182.
- Kleywegt GJ, Zou JY, Divne C, Davies GJ, Sinning I, Stahlberg J, Reinikainen T, Srisodsuk M, Teeri TT, Jones TA.** (1997) The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. *J Mol Biol.* 272, 383-397.
- Kremer SM, Wood PM.** (1992) Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe(III) reductase. Kinetic comparison with neutrophil NADPH oxidase and yeast flavocytochrome b2. *Eur J Biochem.* 205, 133-138.
- Kubicek CP, Messner R, Gruber F, Mach RL, Kubicek-Pranz EM.** (1993) The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microb Technol.* 15, 90-99.
- Leah R, Kigel J, Svendsen I, Mundy J.** (1995) Biochemical and molecular characterization of a barley seed β-glucosidase. *J Biol Chem.* 270, 15789-15797.
- Li B, Renganathan V.** (1998) Gene cloning and characterization of a novel cellulose-binding β-glucosidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 64, 2748-2754.
- Liu A, Tomita H, Li H, Miyaki H, Aoyagi C, Kaneko S, Hayashi K.** (1998) Cloning, sequencing and expression of the cellobiose phosphorylase gene of *Cellvibrio gilvus*. *J Ferment Bioeng.* 85, 511-513.
- Lopez-Camacho C, Salgado J, Lequerica JL, Madarro A, Ballestar E, Franco L, Polaina J.** (1996) Amino acid substitutions enhancing thermostability of *Bacillus polymyxa* β-glucosidase A. *Biochem J.* 314, 833-838.
- Lymar ES, Li B, Renganathan V.** (1995) Purification and characterization of a cellulose-binding β-glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 61, 2976-2980.
- Marana SR, Jacobs-Lorena M, Terra WR, Ferreira C.** (2001) Amino acid residues involved in substrate binding and catalysis in an insect digestive β-glycosidase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1545, 41-52.
- Marana SR, Terra WR, Ferreira C.** (2002) The role of amino-acid residues Q39 and E451 in the determination of substrate specificity of the *Spodoptera frugiperda* β-glycosidase. *Eur J Biochem.* 269, 3705-3714.
- Marana SR, Andrade EH, Ferreira C, Terra WR.** (2004) Investigation of the substrate specificity of a β-glycosidase from *Spodoptera frugiperda* using site-directed mutagenesis and bioenergetics analysis. *Eur J Biochem.* 271, 4169-4177.
- Marana SR.** (2006) Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases. *IUBMB Life.* 58, 63-73.

- Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Gelpke MD, Juang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Detter JC, Larimer F, Coutinho PM, Henrissat B, Berka R, Cullen D, Rokhsar D.** (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. Nat Biotechnol. 22, 695-700.
- McCarter JD, Withers SG.** (1994) Mechanism of enzymatic glycoside hydrolysis. Curr Opin Struc Biol. 4,885-892.
- Mchale A, Coughlan MP.** (1981a) The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*-identification of the various components produced during growth on cellulosic media. Biochim Biophys Acta. 662, 145-151.
- Mchale A, Coughlan MP.** (1981b) The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*-purification and characterization of the extracellular and intracellular β -glucosidases. Biochim Biophys Acta. 662, 152-159.
- Moracci M, Capalbo L, Ciaramella M, Rossi M.** (1996) Identification of two glutamic acid residues essential for catalysis in the β -glycosidase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Protein Eng. 9, 1191-1195.
- Nam KH, Kim SJ, Kim MY, Kim JH, Yeo YS, Lee CM, Jun HK, Hwang KY.** (2008) Crystal structure of engineered β -glucosidase from a soil metagenome. Proteins. 73, 788-793.
- Namchuk MN, Withers SG.** (1995) Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic analysis of the role of noncovalent enzyme/substrate interactions. Biochemistry. 34, 16194-16202.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G.** (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng. 10, 1-6.
- Niemeyer HM.** (1988) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defense chemicals in the Gramineae. Phytochemistry. 27, 3349-3358.
- Nijikken Y, Tsukada T, Igarashi K, Samejima M, Wakagi T, Shoun H, Fushinobu S.** (2007) Crystal structure of intracellular family 1 β -glucosidase BGL1A from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 581, 1514-1520.
- Nishiyama Y, Langan P, Chanzy H.** (2002) Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. J Am Chem Soc. 124, 9074-9082.
- Opassiri R, Ketudat J, Cairns R, Akiyama T, Wara-Aswapati O, Savasti J, Esen A.** (2003) Characterization of a rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. Plant Sci. 165, 627-638.
- Opassiri R, Hua Y, Wara-Aswapati O, Akiyama T, Svasti J, Esen A, Ketudat CJ.** (2004) β -Glucosidase, exo- β -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlu1. Biochem J. 379, 125-131.
- Opassiri R, Pomthong B, Onkoksoong T, Akiyama T, Esen A, Ketudat CJ.** (2006) Analysis of rice

glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 β -glucosidase. BMC Plant Biol. 6, 33.

Painbeni E, Valles S, Polaina J, Flors A. (1992) Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* β -glucosidase expressed in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 174, 3087-3091.

Peitsch MC, Jongeneel CV. (1993) A 3-D model for the Cd40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors. Int Immunol. 5, 233-238.

Peitsch MC. (1995) Protein modeling by E-Mail. Bio-Technol. 13, 658-660.

Peitsch MC. (1996) ProMod and Swiss-model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. Biochem Soc Trans. 24, 274-279.

Peralta RM, Terenzi HF, Jorge JA. (1990) β -D-Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. Biochim Biophys Acta. 1033, 243-249.

Percy A, Ono H, Hayashi K. (1998a) Acceptor specificity of cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus*: synthesis of three branched trisaccharides. Carbohydr Res. 308, 423-429.

Percy A, Ono H, Watt D, Hayashi K. (1998b) Synthesis of β -D-glucopyranosyl-(1-4)-D-arabinose, β -D-glucopyranosyl-(1-4)-D-arabinose, β -D-glucopyranosyl-(1-4)-L-fucose, and β -D-glucopyranosyl-(1-4)-D-altrose catalysed by cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus*. Carbohydr Res. 305, 543-548.

Poulton JE. (1990) Cyanogenesis in plants. Plant Physiol. 94, 401-405.

Rask L, Andreasson E, Ekbom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J. (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. Plant Mol Biol. 42, 93-113.

Reese ET, Siu RGH, Levinson HS. (1950) The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. J Bacteriol. 59, 485-497.

Rye CS, Withers SG. (2000) Glycosidase mechanisms. Curr Opin Chem Biol. 4, 573-580.

Saloheimo M, Kuja-Panula J, Ylosmaki E, Ward M, Penttila M. (2002) Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGLII (cel1A). Appl Environ Microbiol. 68, 4546-4553.

Sadana JC, Shewale JG, Patil RV. (1983) β -Glucosidases of *Sclerotium rolfsii*: substrate specificity and mode of action. Carbohydr Res. 118, 205-214.

Sambrook J, Russell D. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual (third edition). Cold Spring Harbor Laboratory Pr.

Sanz-Aparicio J, Romero A, Martinez-Ripoll M, Madarro A, Flors A, Polaina J. (1994) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a type 1 β -glucosidase encoded by the bglA gene of *Bacillus polymyxa*. J Mol Biol. 240, 267-270.

Sanz-Aparicio J, Hermoso JA, Martinez-Ripoll M, Gonzalez B, Lopez-Camacho C, Polaina J. (1998) Structural basis of increased resistance to thermal denaturation induced by single amino acid

substitution in the sequence of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*. *Proteins*. 33, 567-576.

Seidle HF, Huber RE. (2005) Transglucosidic reactions of the *Aspergillus niger* family 3 β -glucosidase: qualitative and quantitative analyses and evidence that the transglucosidic rate is independent of pH. *Arch Biochem Biophys*. 436, 254-264.

Shewale JG. (1982) β -Glucosidase: Its role in cellulase synthesis and hydrolysis and hydrolysis of cellulose. *Int J Biochem*. 14, 435-443.

Sih CJ, McBee RH. (1955) A cellobiose phosphorylase in *Clostridium thermocellum*. *Proc Montana Acad Sci*. 15, 21-26.

Simos G, Panagiotidis CA, Skoumbas A, Choli D, Ouzounis C, Georgatsos JG. (1994) Barley β -glucosidase: expression during seed germination and maturation and partial amino acid sequences. *Biochim Biophys Acta*. 1199, 52-58.

Sternberg D, Vijayakumar P, Reese ET. (1977) β -Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can J Microbiol*. 23, 139-147.

Street IP, Kempton JB, Withers SG. (1992) Inactivation of a β -glucosidase through the accumulation of a stable 2-deoxy-2-fluoro- α -D-glucopyranosyl-enzyme intermediate: a detailed investigation. *Biochemistry*. 31, 9970-9978.

Sue M, Yamazaki K, Kouyama J, Sasaki Y, Ohsawa K, Miyamoto T, Iwamura H, Yajima S. (2005) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a hexameric β -glucosidase from wheat. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 61, 864-866.

Sue M, Yamazaki K, Yajima S, Nomura T, Matsukawa T, Iwamura H, Miyamoto T. (2006) Molecular and structural characterization of hexameric β -D-glucosidases in wheat and rye. *Plant Physiol*. 141, 1237-1247.

Takashima S, Nakamura A, Masaki H, Uozumi T. (1996) Purification and characterization of cellulases from *Humicola grisea*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 60, 77-82.

Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, Masaki H, Uozumi T. (1999) Molecular cloning and expression of the novel fungal β -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J Biochem (Tokyo)*. 125, 728-736.

Tariq MA, Hayashi K. (1995a) Synthesis of three hetero disaccharides, 4-*O*- β -glucopyranosyl-6-deoxy-D-glucose, 4-*O*- β -D-glucopyranosyl-D-mannosamine, and 4-*O*- β -D-glucopyranosyl-D-mannose, and confirmation of their structures by C-13 NMR and MS. *Biochem Biophys Res Commun*. 214, 568-575.

Tariq MA, Hayashi K, Tokuyasu K, Nagata T. (1995b) Synthesis and structural analysis of disaccharides of 4-*O*- β -D-glucopyranosyl-D-glucosamine and 4-*O*-D- β -glucopyranosyl-2-deoxy-D-glucose. *Carbohydr Res*. 275, 67-92.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive

multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

Tolley SP, Barrett TE, Suresh CG, Hughes MA. (1993) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the cyanogenic β -glucosidase from the white clover *Trifolium repens* L. *J Mol Biol.* 229, 791-793.

Tribolo S, Berrin JG, Kroon PA, Czjzek M, Juge N. (2007) The crystal structure of human cytosolic β -glucosidase unravels the substrate aglycone specificity of a family 1 glycoside hydrolase. *J Mol Biol.* 370, 964-975.

Vallmitjana M, Ferrer-Navarro M, Planell R, Abel M, Ausin C, Querol E, Planas A, Perez-Pons JA. (2001) Mechanism of the family 1 β -glucosidase from *Streptomyces* sp: catalytic residues and kinetic studies. *Biochemistry.* 40, 5975-5982.

Verdoucq L, Moriniere J, Bevan DR, Esen A, Vasella A, Henrissat B, Czjze M. (2004) Structural determinants of substrate specificity in family 1 β -glucosidases: novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant β -glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate. *J Biol Chem.* 279, 31796-31803.

Voet D, Voet JG. (2004) *Biochemistry* 3rd edition. JOHN WILEY&SONS, INC.

Wang Q, Trimbur D, Graham R, Warren RA, Withers SG. (1995) Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium faecalis* β -glucosidase by kinetic analysis of mutants. *Biochemistry.* 34, 14554-14562.

Wang X, He X, Yang S, An X, Chang W, Liang D. (2003) Structural basis for thermostability of β -glycosidase from the thermophilic eubacterium *Thermus nonproteolyticus* HG102. *J Bacteriol.* 185, 4248-4255.

Watanabe T, Sato T, Yoshioka S, Koshijima T, Kuwahara M. (1992) Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. *Eur J Biochem.* 209, 651-659.

Wiesmann C, Hengstenberg W, Schulz GE. (1997) Crystal structures and mechanism of 6-phospho- β -galactosidase from *Lactococcus lactis*. *J Mol Biol.* 269, 851-860.

Withers SG, Warren RJ, Street IP, Rupitz K, Kempton JB, Aebersold R. (1990) Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue as a nucleophile in the mechanism of a "retaining" glycosidase. *J Am Chem Soc.* 112, 5887-5889.

Withers SG, Rupitz K, Trimbur D, Warren RA. (1992) Mechanistic consequences of mutation of the active site nucleophile Glu358 in *Agrobacterium* β -glucosidase. *Biochemistry.* 31, 9979-9985.

Wood TM, Mccrae SI. (1972) The purification and properties of the C₁ component of *Trichoderma koningii* cellulase. *Biochem J.* 128, 1183-1192.

Yavin Y, Gatt S. (1969) Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. 8. Further purification and properties of rat brain ceramidase. *Biochemistry.* 8, 1692-1698.

Zechel DL, Boraston AB, Gloster T, Boraston CM, Macdonald JM, Tilbrook DM, Stick RV, Davies GJ. (2003) Iminosugar glycosidase inhibitors: structural and thermodynamic dissection of the binding of isofagomine and 1-deoxynojirimycin to β -glucosidases. *J Am Chem Soc.* 125, 14313-14323.

Zouhar J, Vevodova J, Marek J, Damborsky J, Su XD, Brzobohaty B. (2001) Insights into the functional architecture of the catalytic center of a maize β -glucosidase Zm-p60.1. *Plant Physiol.* 127, 973-985.

磯貝 明 (2008) セルロース利用技術の最先端、シーエムシー出版

廣海啓太郎 (1991) 酵素反応、岩波書店

福島和彦、船田良、杉山淳司、高部圭司、梅澤俊明、山本浩之 (2003) 木質の形成
バイオマス科学への招待、海青社

堀尾武一、山下仁平 (1981) 蛋白質・酵素の基礎実験法、南江堂

横山伸也 (2001) バイオエネルギー最前線、森北出版

研究業績

(1) 公表論文一覧

1. **Tsukada T, Igarashi K, Yoshida M, Samejima M.** (2006) Molecular cloning and characterization of two intracellular β -glucosidase belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Microbiol Biotechnol. 73, 807-814.
2. **Nijikken Y, Tsukada T, Igarashi K, Samejima M, Wakagi T, Shoun H, Fushinobu S.** (2007) Crystal structure of intracellular family 1 β -glucosidase BGL1A from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 581, 1514-1520.
3. **Tsukada T, Igarashi K, Fushinobu S, Samejima M.** (2008) Role of subsite +1 residues in pH dependence and catalytic activity of the glycoside hydrolase family 1 β -glucosidase BGL1A from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol Bioeng. 99, 1295-1302.

(2) 受賞など

2007 年 セルラーゼ研究会ポスター賞 第三等

2008 年 MIE BIOFORUM 2008 Exellent poster award

日本学術振興会 特別研究員 DC2

(3) 学会における発表

国際学会における発表 (4 件)

1. **Tsukada T, Igarashi K, Fushinobu S, Samejima M.** (2007) Characterization of two family 1 β -glucosidases from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. 10th ICBPPI, Wisconsin.
2. **Tsukada T, Igarashi K, Fushinobu S, Samejima M.** (2007) Characterization of two family 1 β -glucosidases from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Gordon Conference, New Hampshire.
3. **Tsukada T, Igarashi K, Fushinobu S, Samejima M.** (2007) Characterization of two family 1 β -glucosidases from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. ICC2007, Tokyo.
4. **Tsukada T, Igarashi K, Fushinobu S, Kitaoka M, Samejima M.** (2008) Cellobiose recognition mechanism of β -glucosidase BGL1B belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. MIE BIOFORUM2008, Mie.

国内学会における発表 (11 件)

1. 塚田剛土、吉田 誠、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (2004) 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の菌体内 β -グルコシダーゼの機能解析、糸状菌分子生物学会、宮城
2. 塚田剛土、二十軒悠里、吉田 誠、伏信進矢、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (2005) 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する菌体内 β -グルコシダーゼの機能解析、日本応用糖質科学会、三重
3. 塚田剛土、二十軒悠里、吉田 誠、伏信進矢、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (2005) 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が菌体内に生産する β -グルコシダーゼの機能解析、日本木材学会、京都
4. 塚田剛土、二十軒悠里、吉田 誠、伏信進矢、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (2005) 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する糖質加水分解酵素ファミリー 1 に属する β -グルコシダーゼの機能解析、糸状菌分子生物学会、東京
5. 塚田剛土、二十軒悠里、伏信進矢、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (2006) 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する菌体内 β -グルコシダーゼの機能解析、セルロース学会、東京
6. 塚田剛土、二十軒悠里、伏信進矢、五十嵐圭日子、鮫島正浩 (2006) 糖質加水分解酵素ファミリー 1 に属する β -グルコシダーゼのセロビオース認識機構の解析、日本木材学会、秋田
7. 塚田剛土、五十嵐圭日子、伏信進矢、鮫島正浩 (2006) GH ファミリー 1 に属する β -グルコシダーゼのセロビオース認識機構の解析、セルラーゼ研究会、茨城
8. 塚田剛土、五十嵐圭日子、伏信進矢、鮫島正浩 (2007) GH ファミリー 1 に属する β -グルコシダーゼの pH 依存性調節メカニズムについて、セルラーゼ研究会、茨城
9. 塚田剛土、五十嵐圭日子、伏信進矢、鮫島正浩 (2007) 担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する菌体内 β -グルコシダーゼの機能解析、セルロース学会、静岡
10. 塚田剛土、五十嵐圭日子、伏信進矢、北岡本光、鮫島正浩 (2008) GH ファミリー 1 に属する β -グルコシダーゼのセロビオース認識機構について、セルラーゼ研究会、茨城
11. 塚田剛土、五十嵐圭日子、伏信進矢、北岡本光、鮫島正浩 (2008) GH ファミリー 1 に属する β -グルコシダーゼのセロビオース認識機構について、日本応用糖質科学会、沖縄

謝辞

本研究を進めるにあたり、実験や論文作成の御指導に加え、私に本研究室で勉強する機会を与えて下さいました指導教員の鮫島正浩教授に深く感謝致します。また、いろいろな面でお気遣い下さいました寺田珠美助教に感謝致します。そして、実験全般のことから、研究者としての心構えに至るまで日々指導して下さいました五十嵐圭日子助教に感謝致します。森林化学研究室の後輩の皆さん、川合理恵博士をはじめとする諸先輩方にも大変お世話になりました。深く感謝致します。

東京農工大学の吉田誠特任准教授には、私が学部生であった頃から勉強、進路、研究の相談に乗って頂き大変お世話になりました。また、様々な遺伝子実験を親切に教えて頂いただけでなく、普段から私の研究を気にかけて下さり、心から感謝しております。本当にありがとうございました。

東京大学の祥雲弘文教授、若木高善准教授をはじめ酵素学研究室の皆様に感謝致します。また共同研究を行うにあたりタンパク質の構造、機能に関する様々な知識を教えて下さいました酵素学研究室の伏信進也助教に深く感謝致します。また、酵素学研究室の二十軒悠里さんに行って頂いた立体構造解析により、本酵素に関する様々な知見を得る事ができました。感謝致します。

農研機構食品総合研究所の北岡本光博士には糖質の合成に関する事を教えて頂いただけでなく、研究に関する有意義な討論をさせて頂きました。御礼致します。

学部生時代の恩師である東京農工大学農学部の福田清春教授には、私が東京大学を受験する際に親身になって相談に乗って頂きました。本当にありがとうございました。

最後に、これまで私を支えて下さった全ての方々、ならびにいつも温かく見守って下さった家族に感謝を表して、謝辞とさせて頂きます。