

図 3-2 GH-94酵素のアミノ酸配列に基づいた系統樹。酵素名は図 3-1と同じ。
本研究で対象とした酵素を赤色で示した。

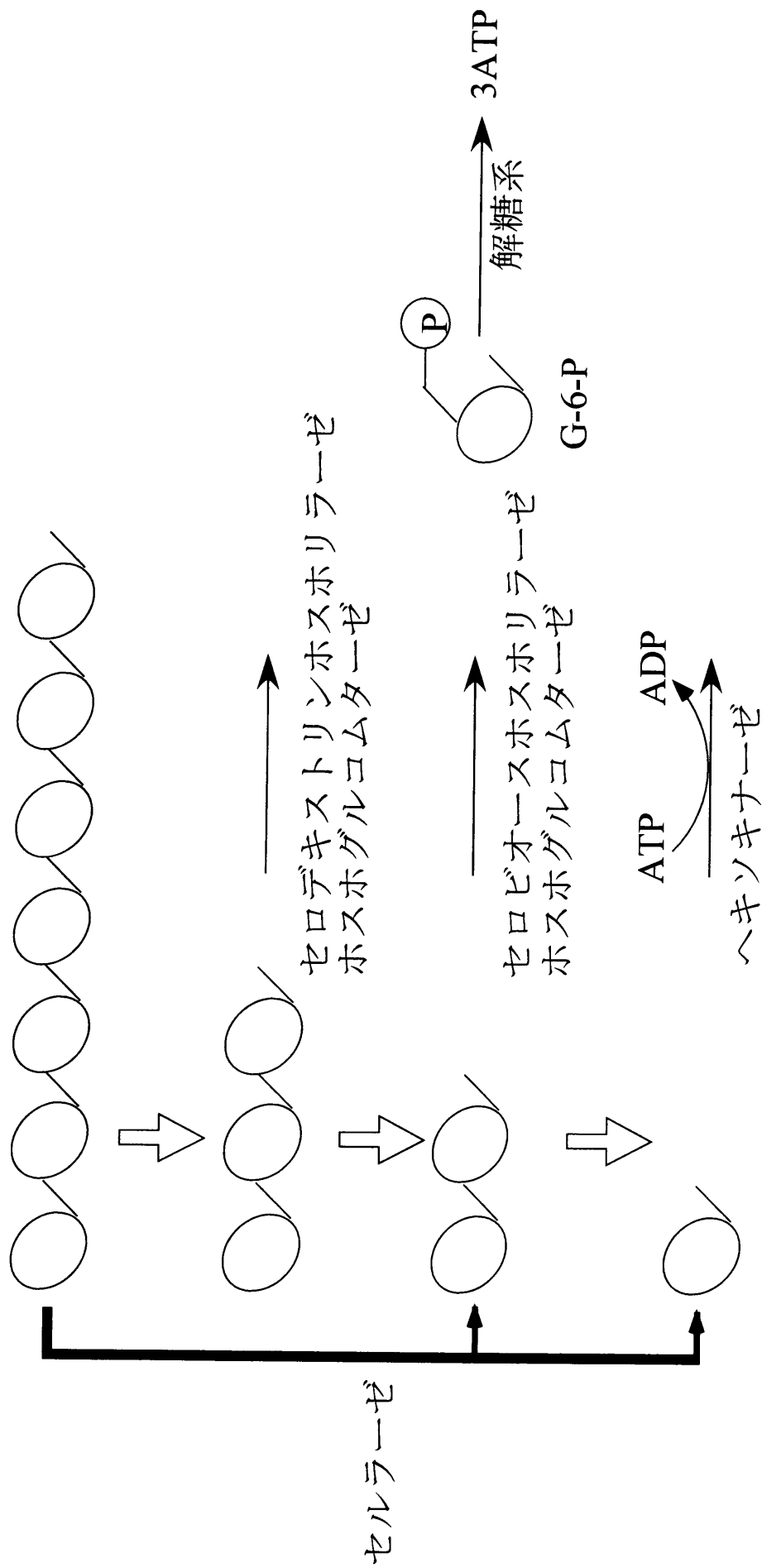


図 3-3 セルロース分解と加リン酸分解酵素

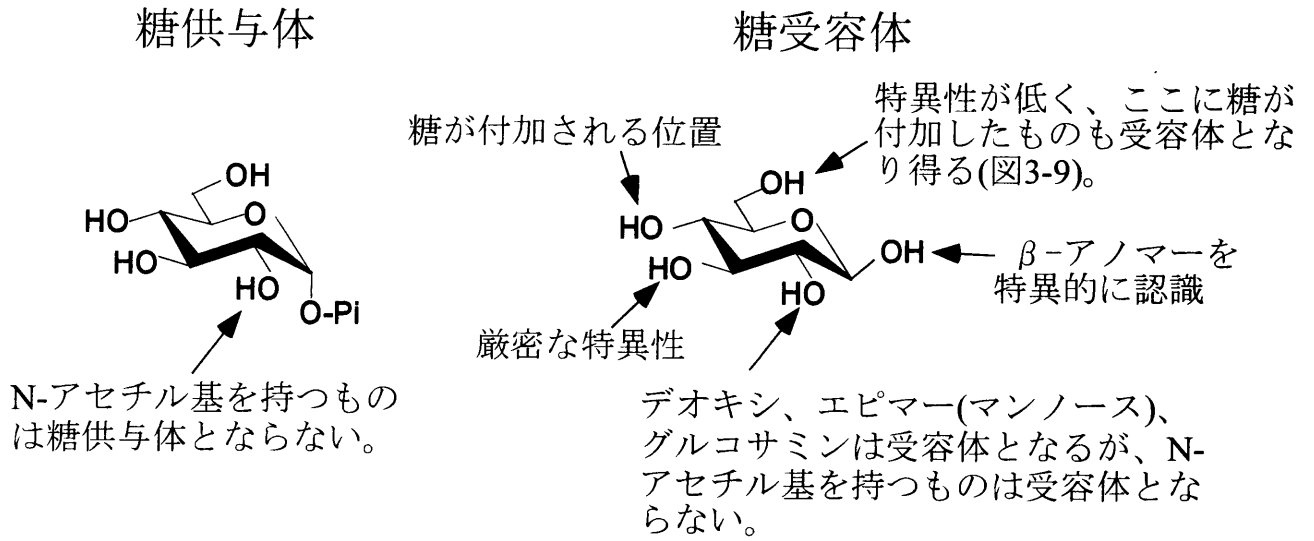


図 3-4a CgCBPの基質特異性[6]

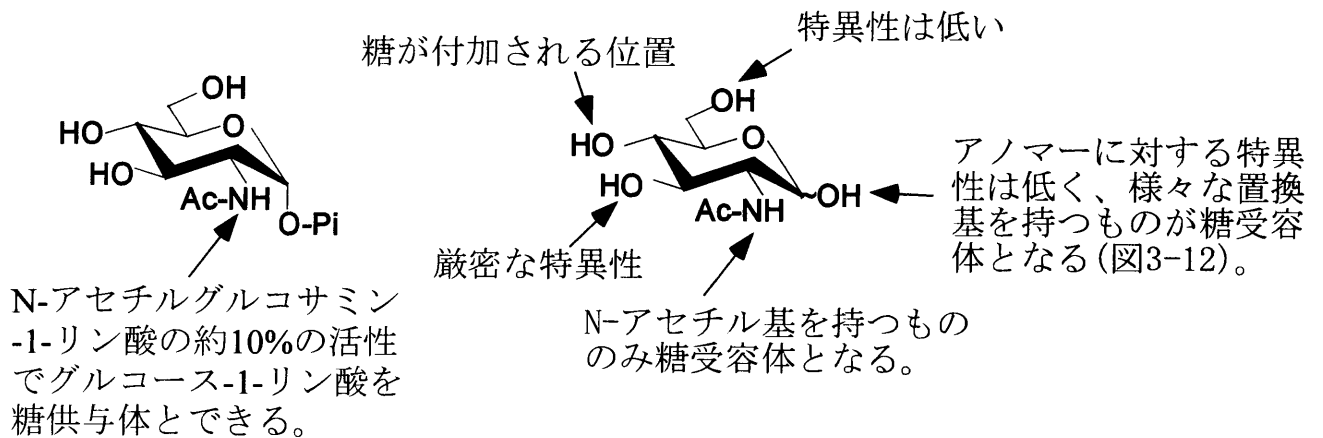


図 3-4b ChBPの基質特異性[15]

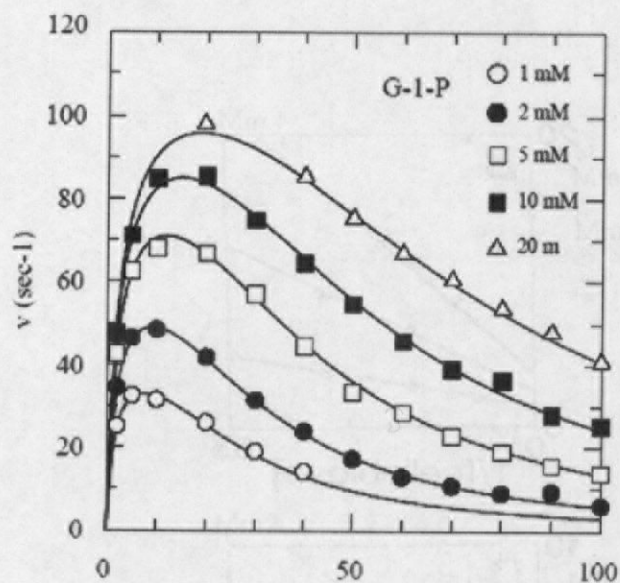
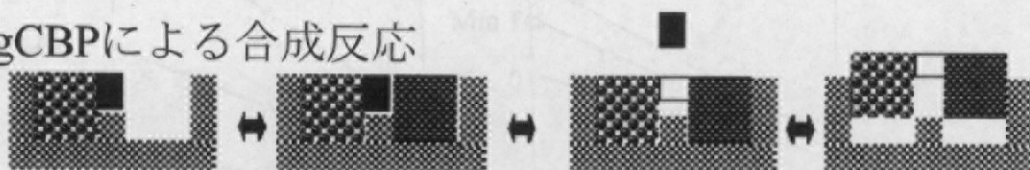
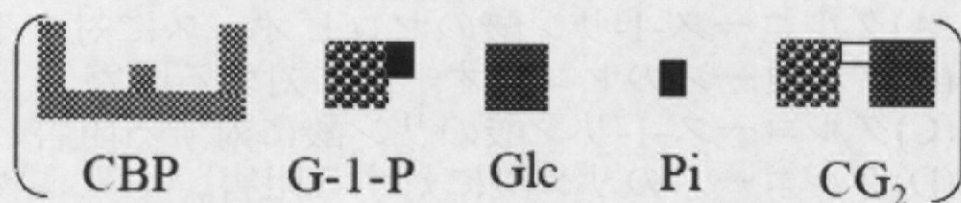


図 3-5 合成方向の反応における CgCBP の拮抗基質阻害 [6]。この阻害は以下のモデルで説明される。

CgCBP による合成反応

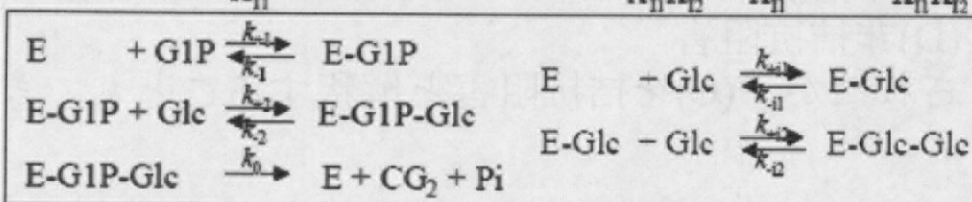


グルコースがグルコース-1-リン酸(G-1-P)結合部位に競合することによる生成物阻害



反応速度の理論式

$$v = \frac{k_0[E]_0[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + (K_{mA} \frac{K_{iA}K_{mB}}{K_{11}})[B] - K_{mB}[A] - [A][B] + (\frac{K_{iA}K_{mB}}{K_{11}K_{12}} \frac{K_{mA}}{K_{11}})[B]^2 - \frac{K_{mA}}{K_{11}K_{12}} [B]^3}$$



この速度式による理論値(図中の線)は、実測値と一致した [6]。

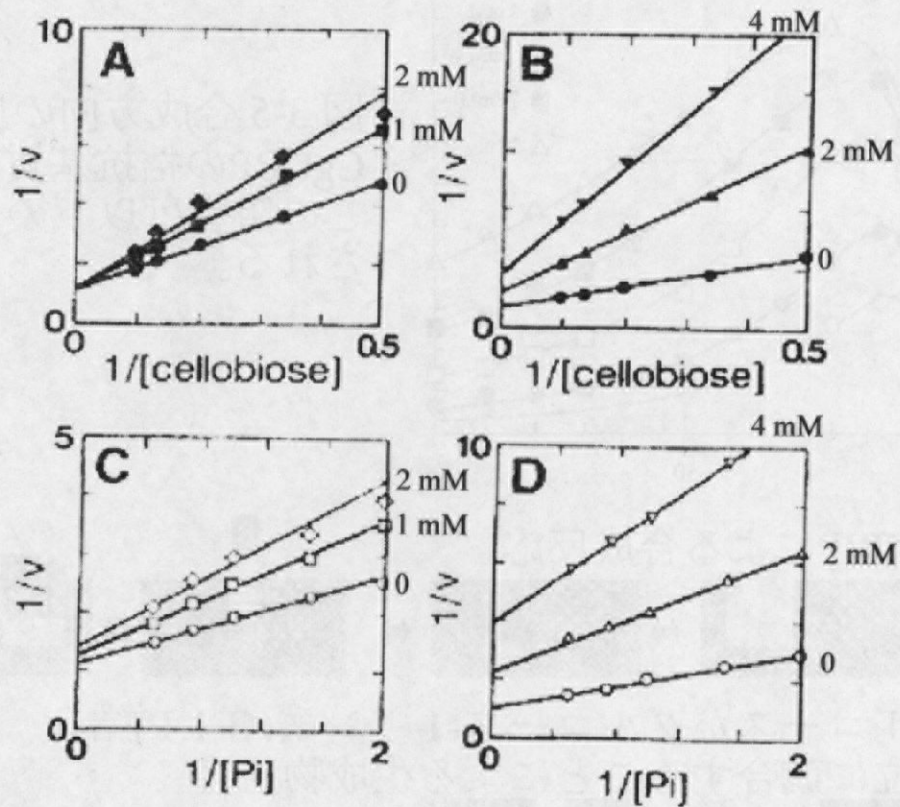


図 3-6a CgCBPの生成物阻害[8]。

- (A) グルコース-1-リン酸のセロビオースに対する阻害。
- (B) グルコースのセロビオースに対する阻害。
- (C) グルコース-1-リン酸のリン酸に対する阻害。
- (D) グルコースのリン酸に対する阻害。

阻害の様式は

- (A) 拮抗阻害
- (B) 非拮抗阻害
- (C) 非拮抗阻害
- (D) 非拮抗阻害

とされたが、(C)を拮抗阻害と解釈することもできる。

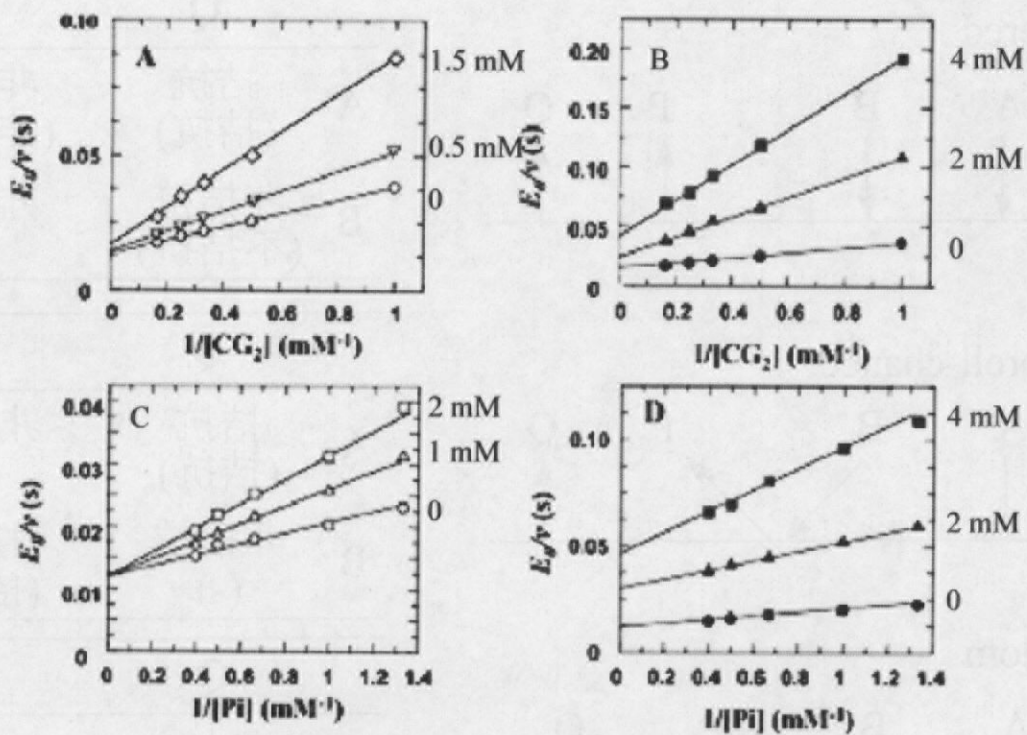


図 3-6b CtCBPの生成物阻害[16]。

(A) グルコース-1-リン酸のセロビオースに対する阻害。

(B) グルコースのセロビオースに対する阻害。

(C) グルコース-1-リン酸のリン酸に対する阻害。

(D) グルコースのリン酸に対する阻害。

阻害の様式は

(A) 非拮抗阻害

(B) 非拮抗阻害

(C) 拮抗阻害

(D) 非拮抗阻害

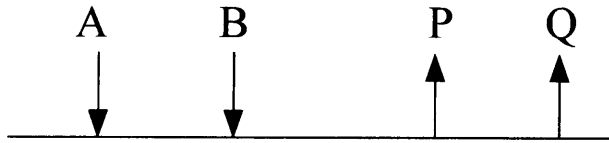
とされたが、(A)を拮抗阻害と解釈することもできる。

反応スキーム

生成物阻害

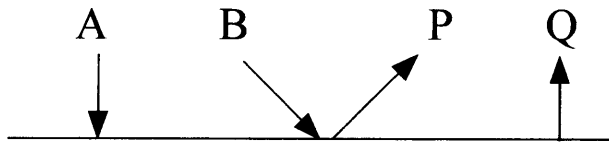
(1) Sequential機構

Ordered



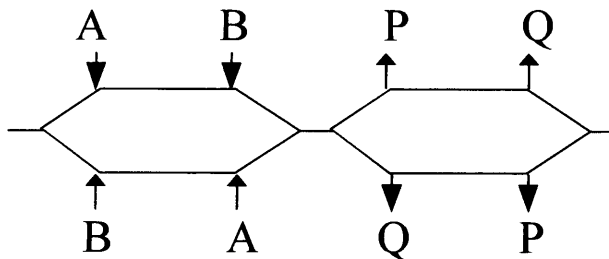
	Q	P
A	拮抗 (拮抗)	非拮抗 (非拮抗)
B	非拮抗 (不拮抗)	非拮抗 (-)

Theorell-chance



	Q	P
A	拮抗 (拮抗)	非拮抗 (-)
B	非拮抗 (-)	拮抗 (拮抗)

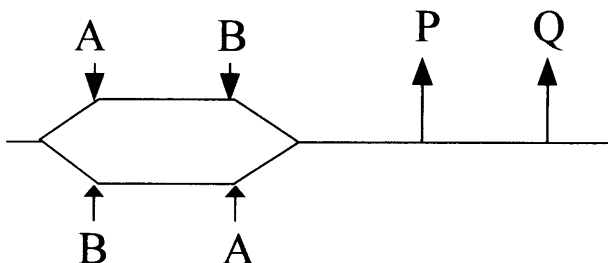
Random



	Q	P
A	拮抗 (-)	拮抗 (-)
B	拮抗 (-)	拮抗 (-)

(2) TmCBPの反応機構

Random-Ordered

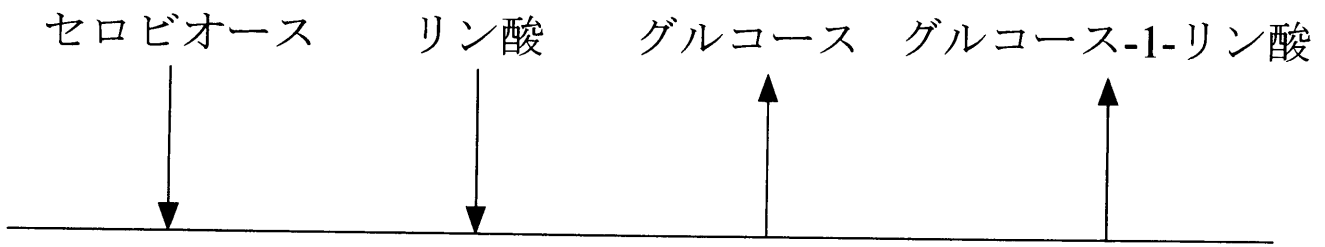


	Q	P
A	拮抗 (拮抗)	非拮抗 (非拮抗)
B	拮抗 (拮抗)	非拮抗 (非拮抗)

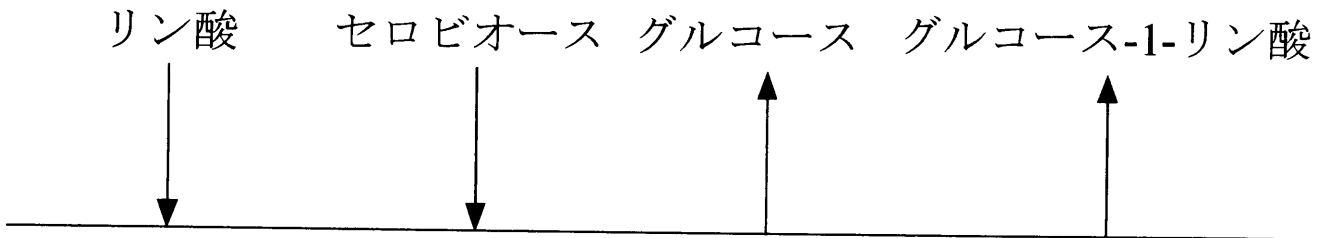
図 3-6c 生成物阻害の様式と反応スキームの関係。

A、Bは基質、P、Qは生成物を表す。括弧内は他方の基質が飽和状態のときの阻害様式を表す。TmCBPは、阻害様式から一般的なSequential機構と異なり、(2)の反応スキームを取ることが明らかになっている[17]。

CgCBP



CtCBP



TmCBP

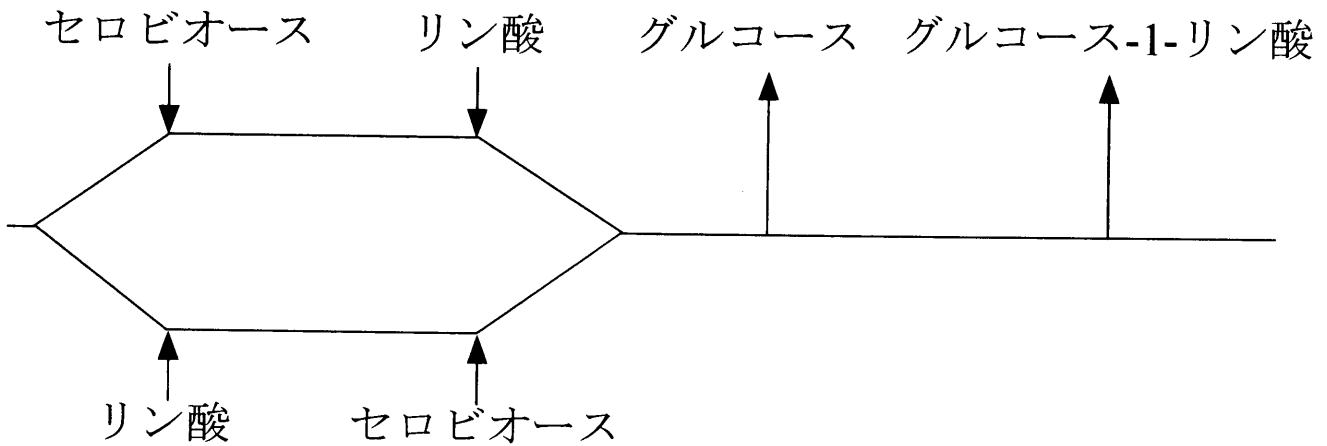


図 3-7 提唱されているCgCBP、CtCBP、TmCBPの反応スキーム[8,16,17]

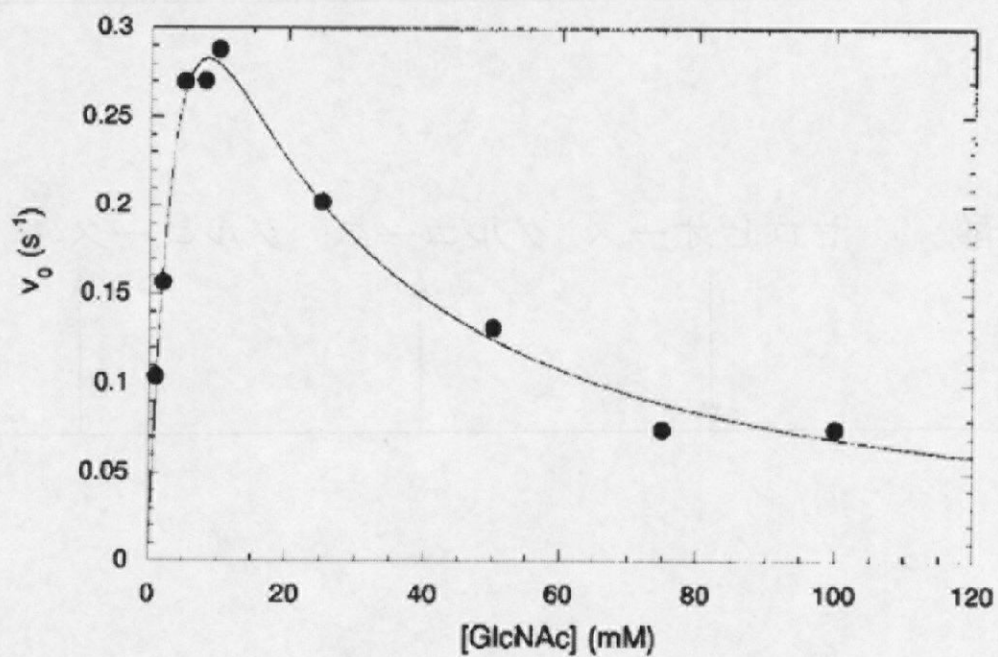


図 3-8 ChBPの合成反応における拮抗基質阻害。
CgCBPと同様、基質GlcNAc(糖受容体)による阻害
が見られる[15]。

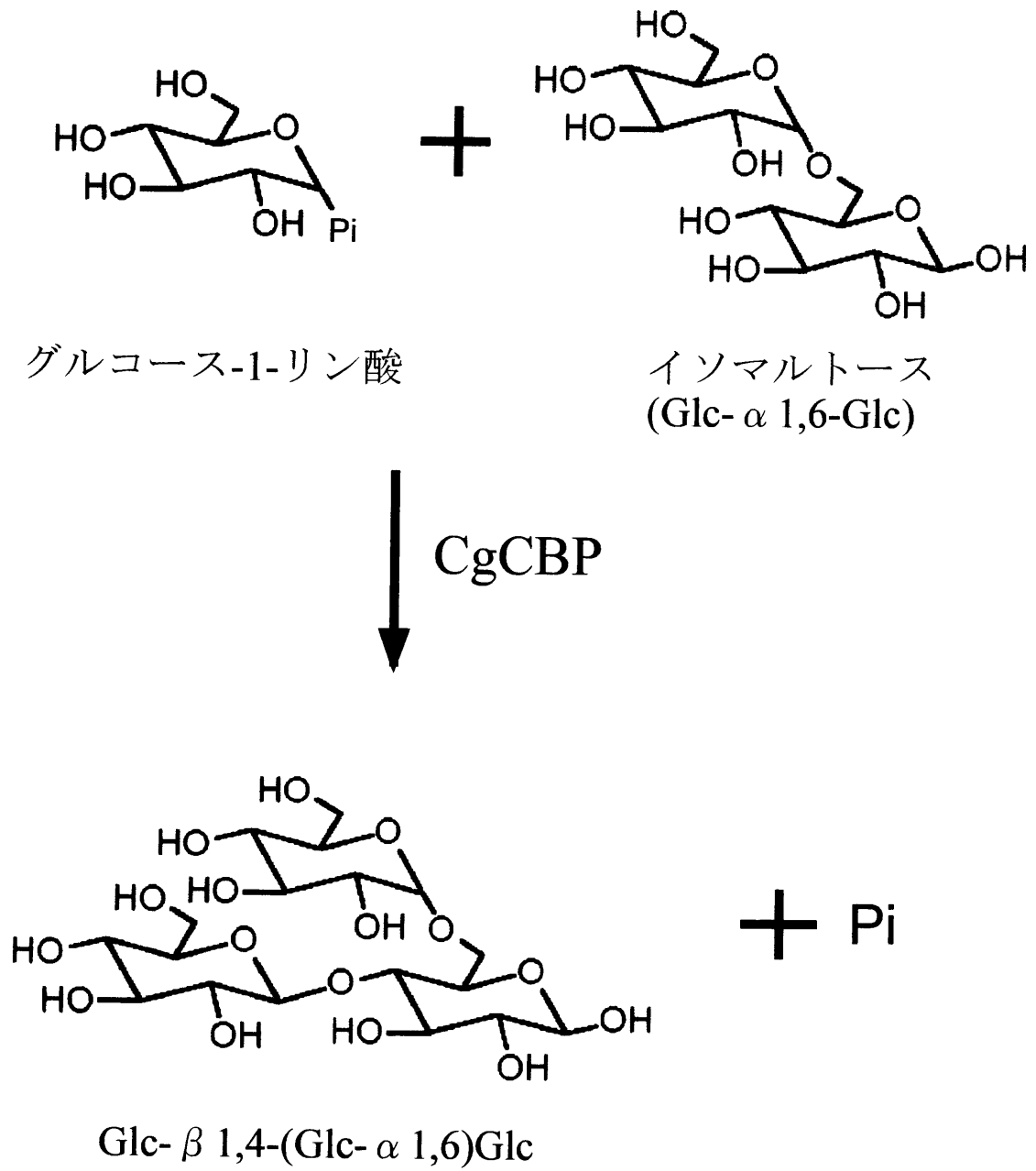
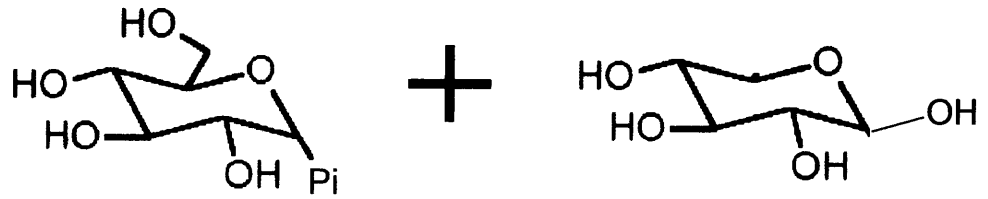


図 3-9a CgCBPを用いた分岐三糖合成[6]。



グルコース-1-リン酸

キシロース

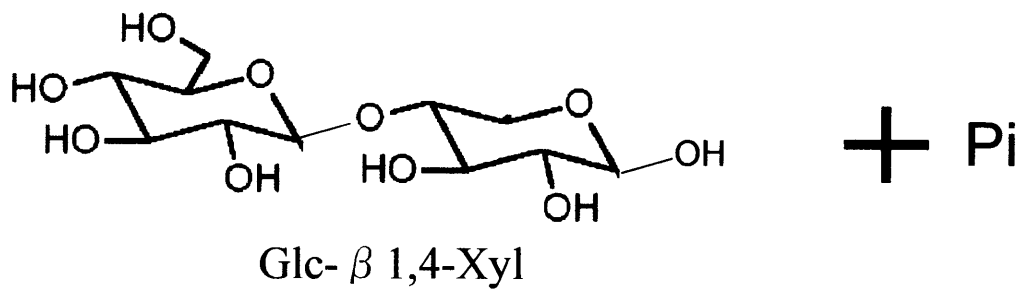
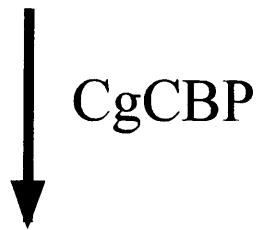


図 3-9b CgCBPを用いたGlc-β -Xylの合成[11]

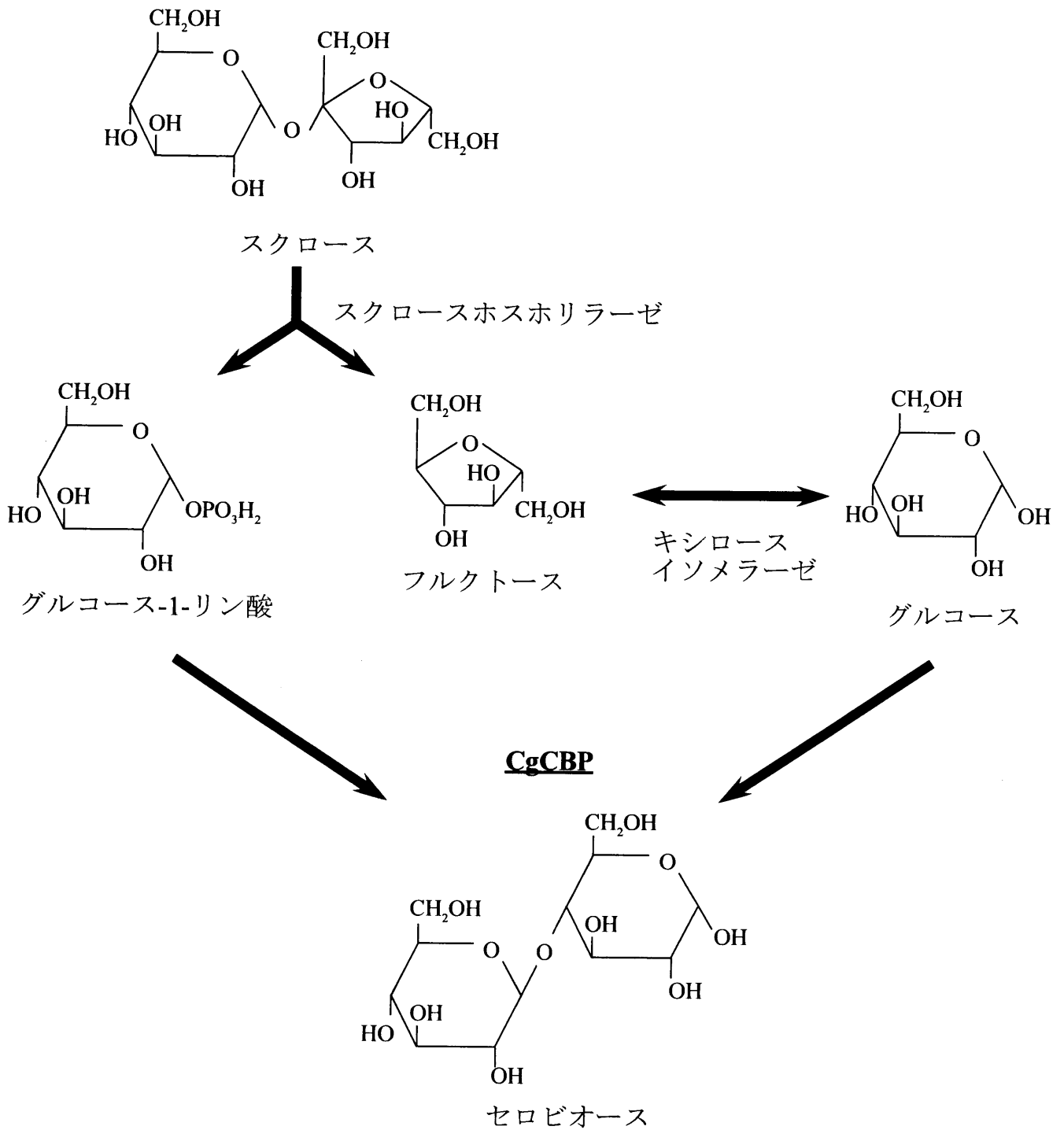


図 3-10 CgCBPを用いたスクロースのセロビオース変換[6]。

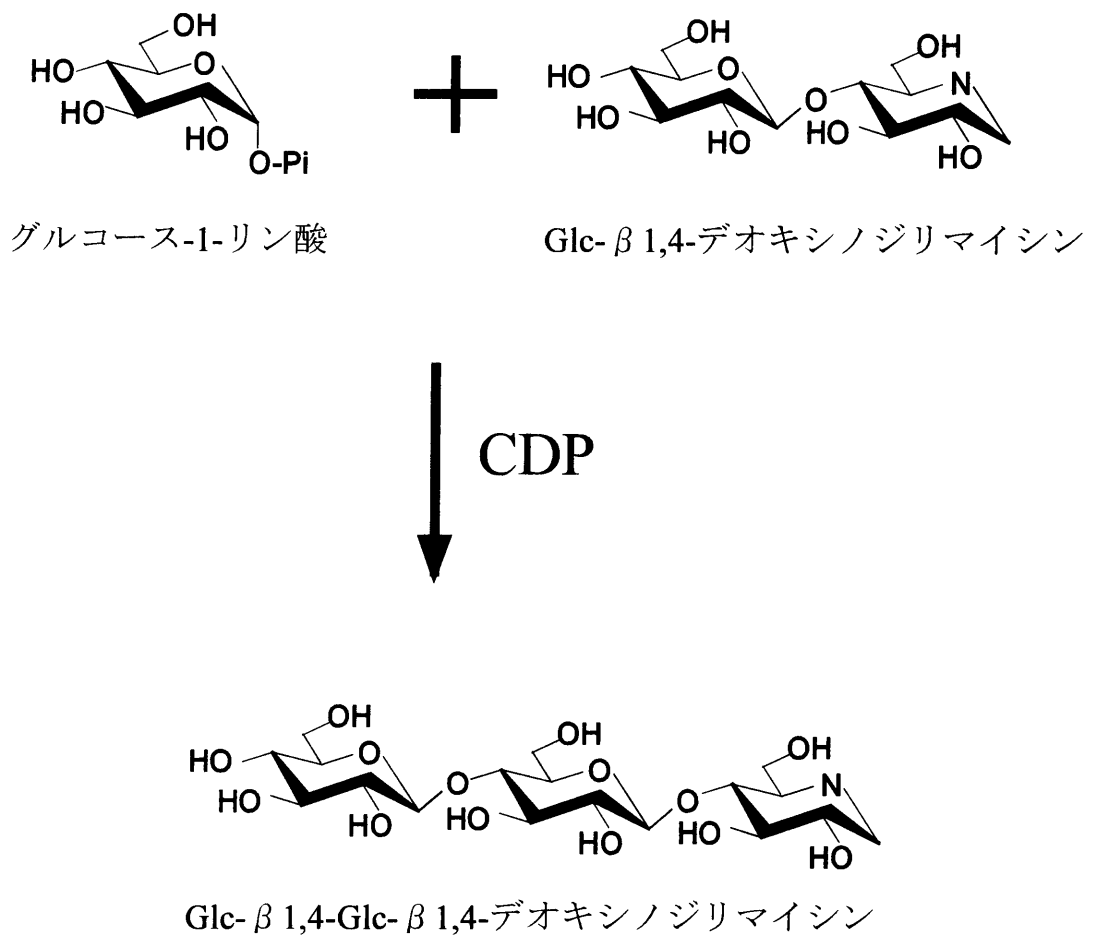


図 3-11 CDPを用いたセルラーゼ阻害剤合成[20]。経時的に伸長反応が起こり、鎖長7の(Glc)₆-β 1,4-デオキシノジリマイシンまで合成される。

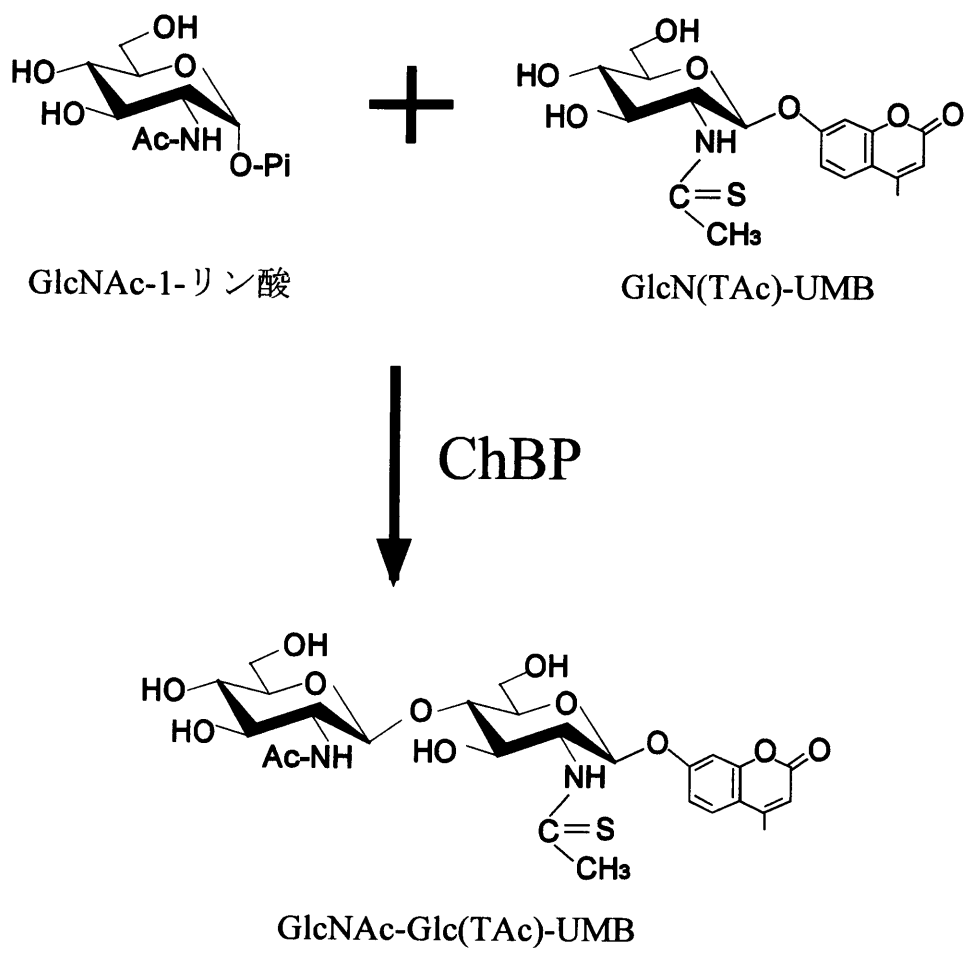


図 3-12 ChBPを用いたキトビオース誘導体作成[15,22]

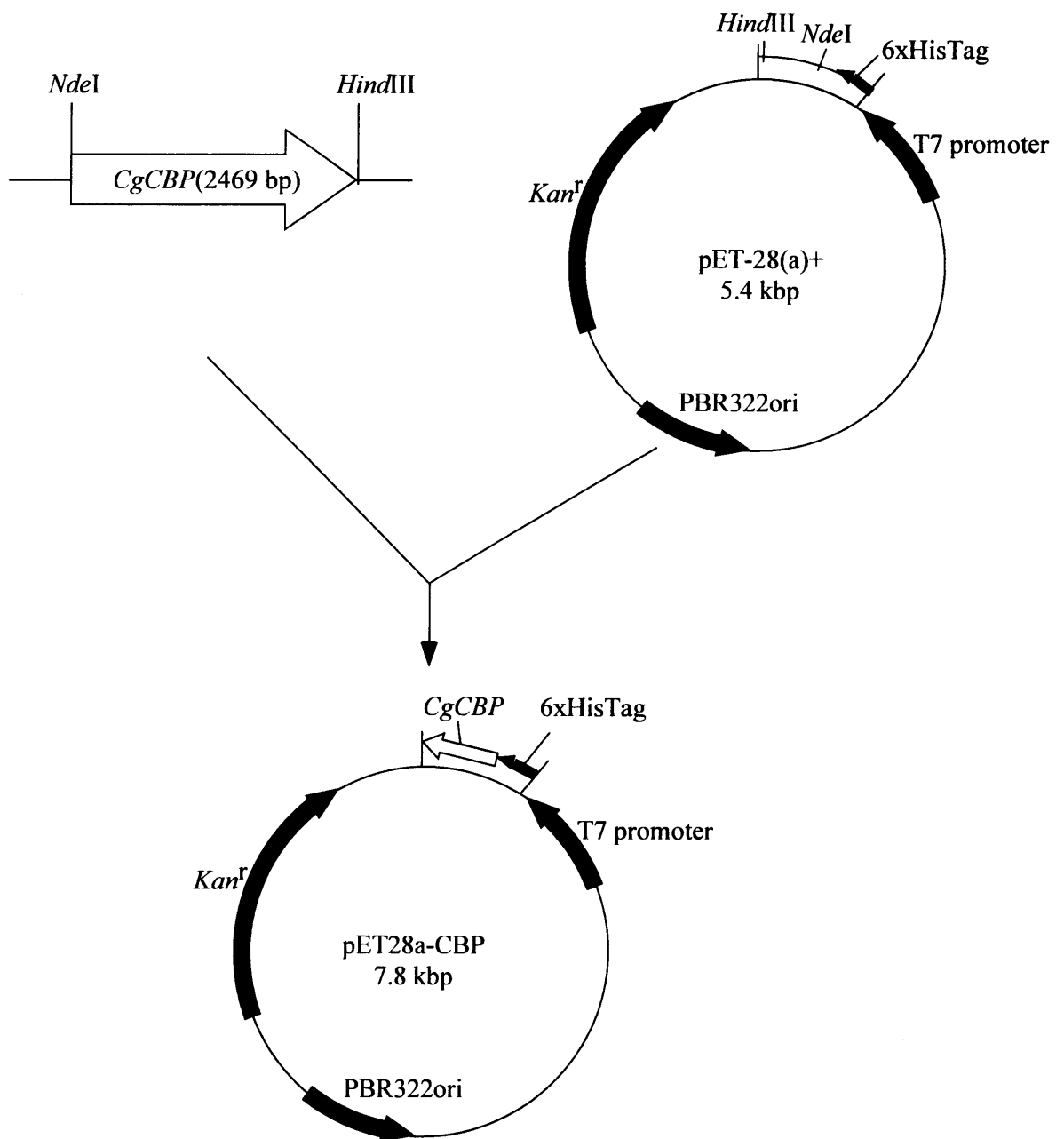


図 3-13 CgCBP発現用ベクターpET28a-CBP。

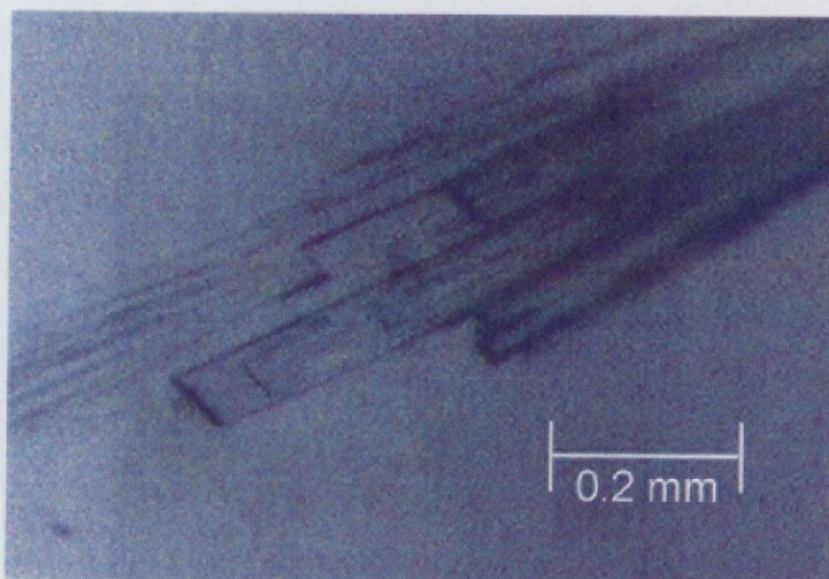


図 3-14a CgCBP-SO₄結晶

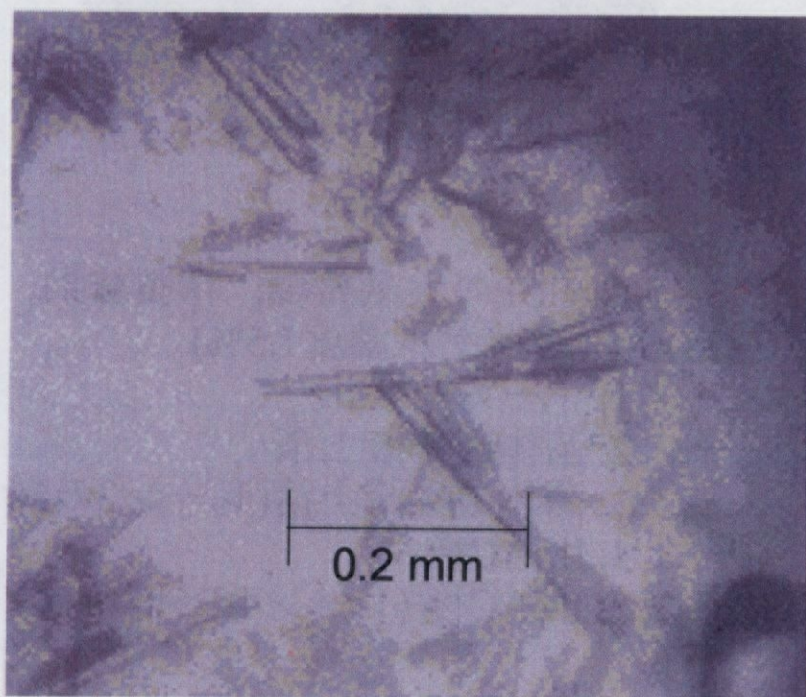


図 3-14b CgCBP-PO₄結晶

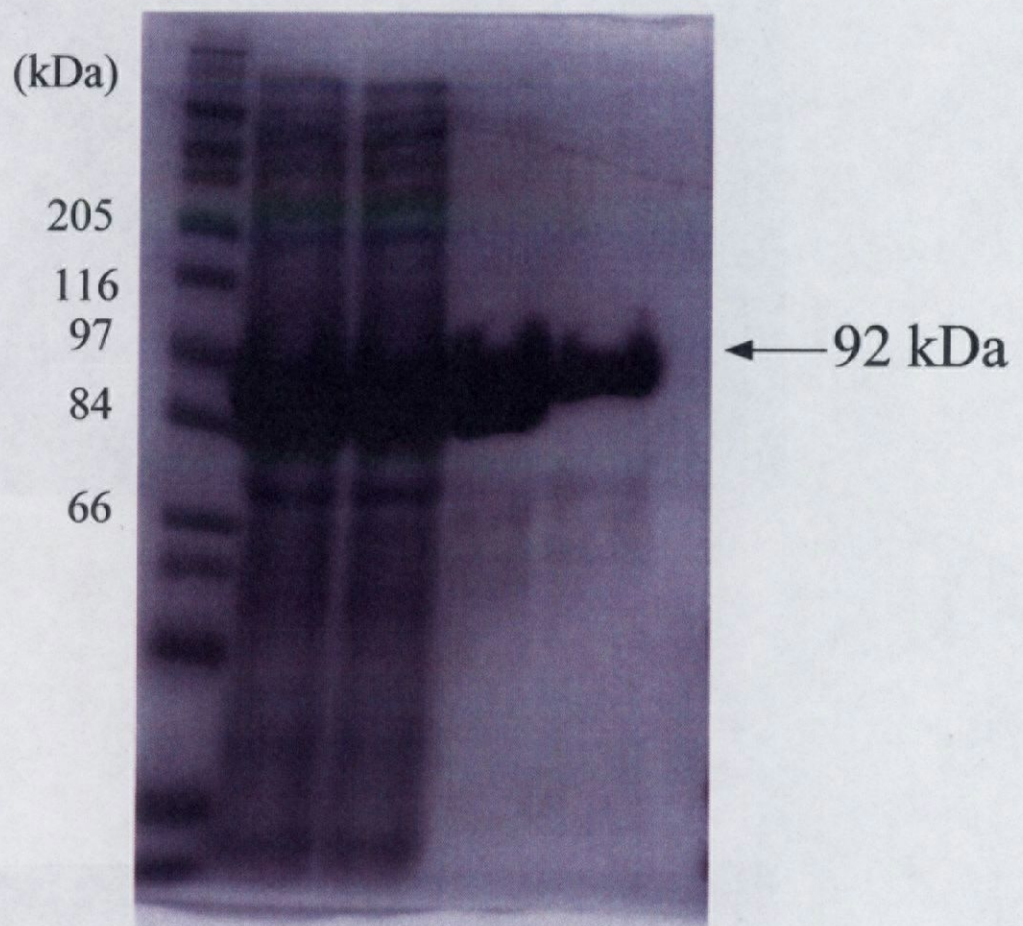


図 3-15 CgCBPの大量発現、精製結果。

(SDS-PAGE; ゲル濃度7.5%)

レーン 1: マーカー

レーン 2: 菌体破砕液上清

レーン 3: 菌体破砕液上清(レーン2の5倍希釈)

レーン 4: IMAC後

レーン 5: IMAC後 (レーン4の5倍希釈)

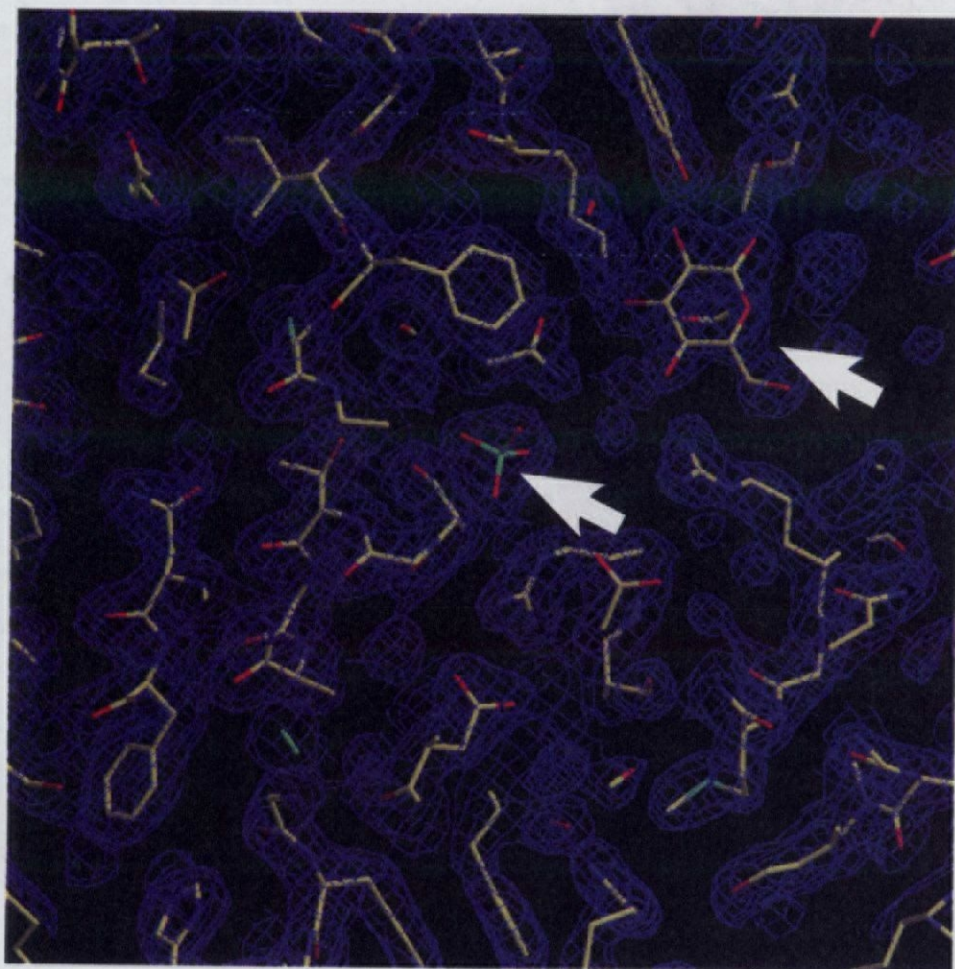
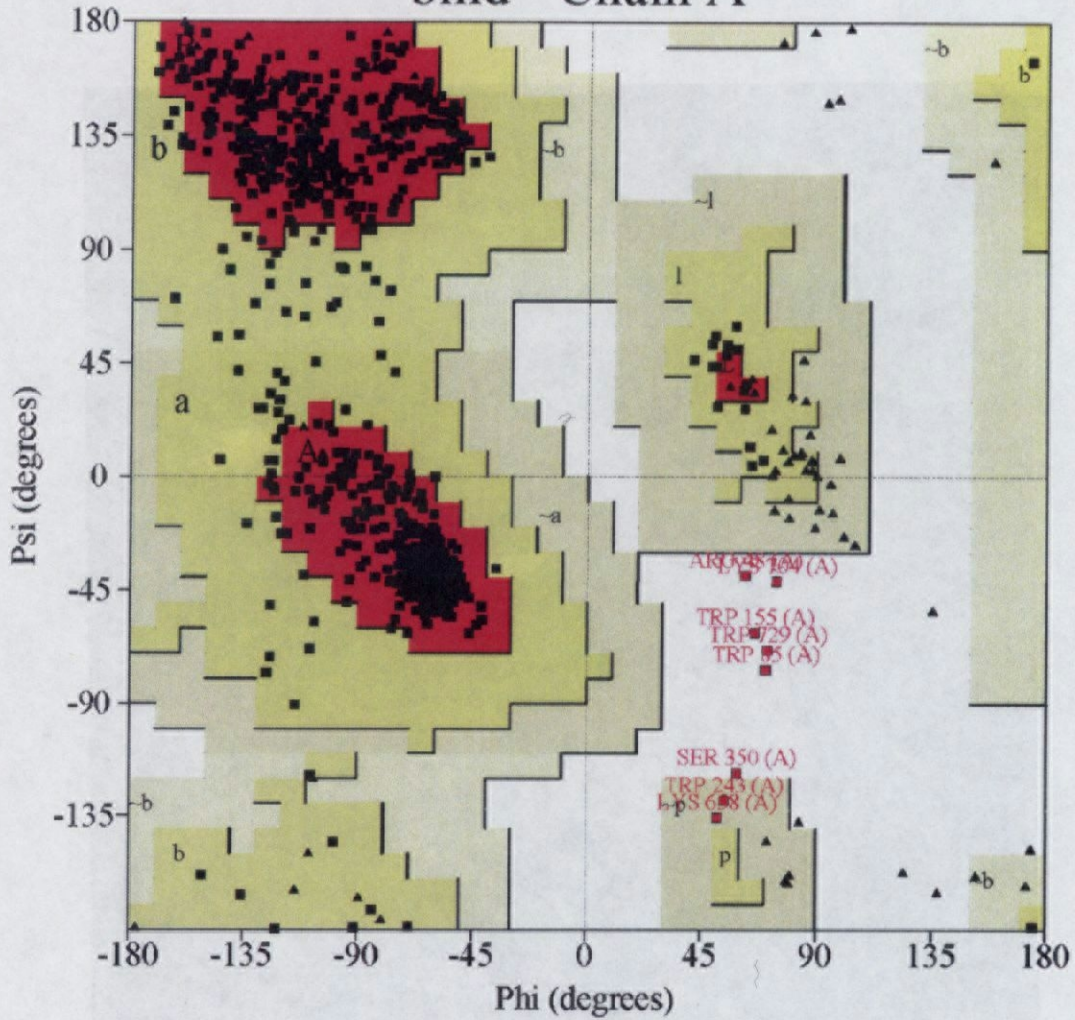


図 3-16 CgCBP-SO₄構造の $2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ 電子密度マップ
(分解能2.0 Å、1σ)
矢印で示した部分に硫酸、グルコースの結合が見られる。

Ramachandran Plot bind - Chain A



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	602	86.1%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	89	12.7%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	2	0.3%
Residues in disallowed regions	6	0.9%
Number of non-glycine and non-proline residues	699	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	3	
Number of glycine residues (shown as triangles)	77	
Number of proline residues	44	
Total number of residues	823	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

図 3-17 CgCBP-SO₄構造のラマチャンドランプロット

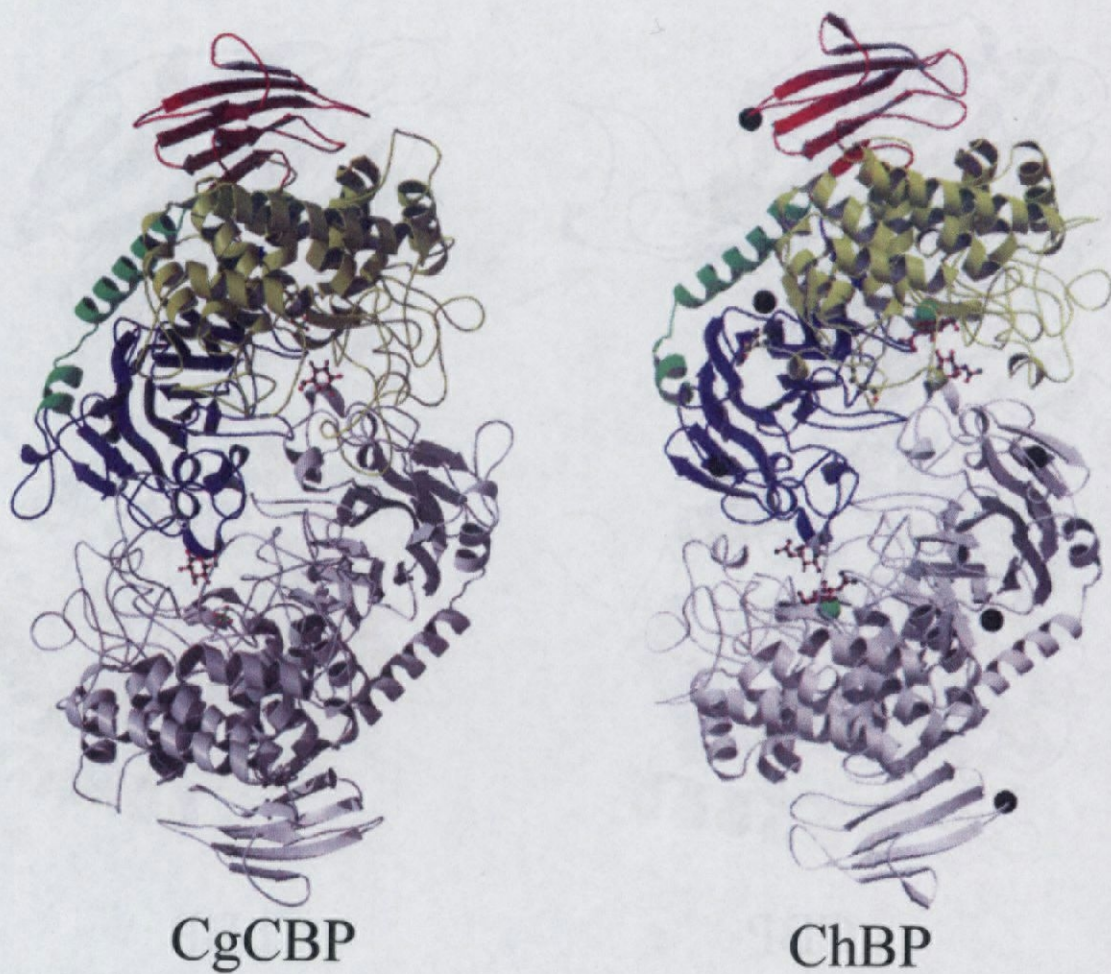


図 3-18 CgCBPとChBPの二量体構造。片方のサブユニットのN末端ドメインを青、リンカーヘリックスを緑、 α -バレルドメインを黄、C末端ドメインを赤、他方のサブユニットを白で表した。

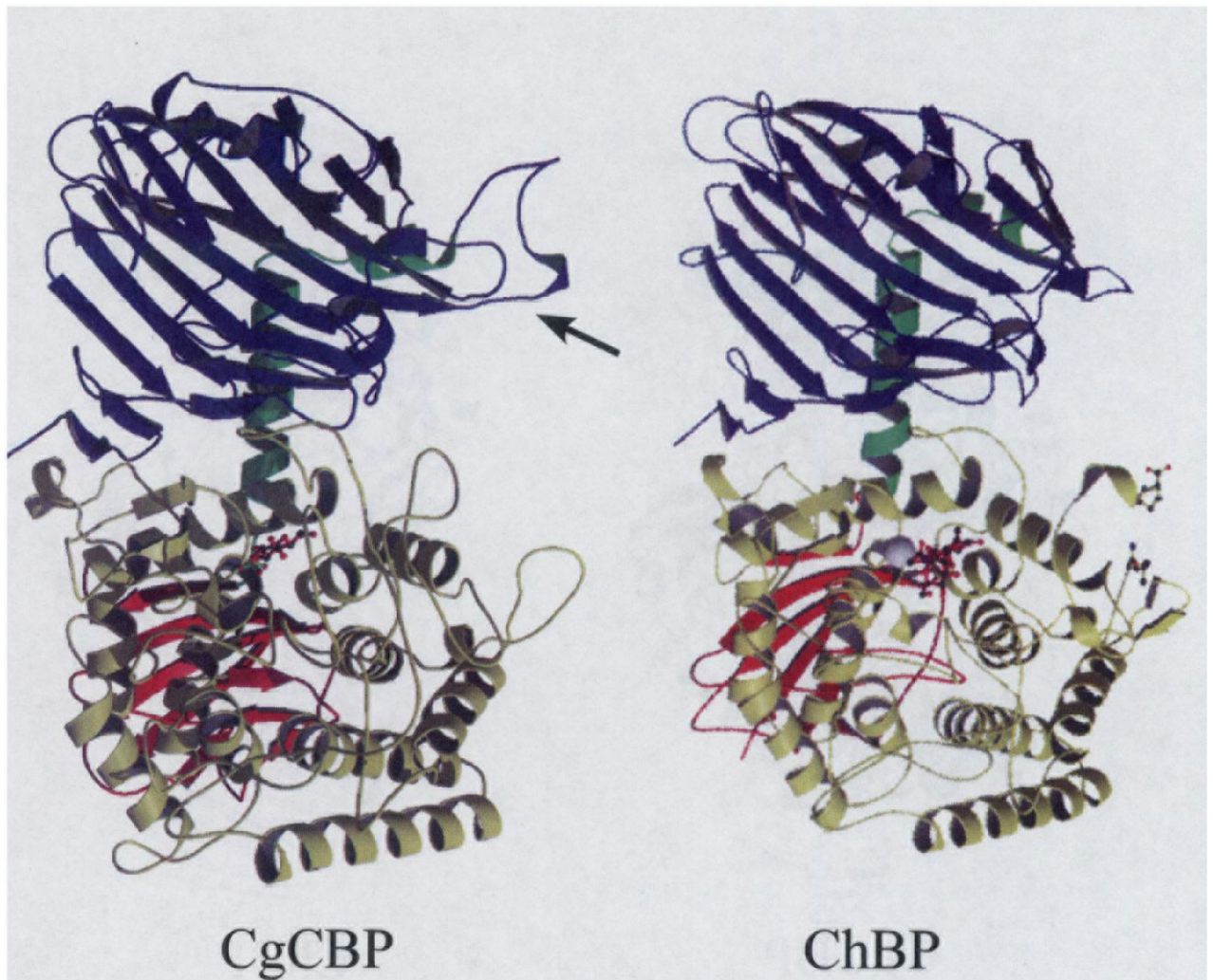


図 3-19 CgCBPとChBPの単量体構造。N末端ドメインを青、リンカーヘリックスを緑、 α -バレルドメインを黄、C末端ドメインを赤で表した。CgCBPのN末端ドメインに見られる挿入配列(残基番号273-279)を矢印で表した。