

博士論文

GH54 α -L-アラビノフラノシダーゼの構造決定と機能解析

平成 15 年度進学 宮永 顕正

指導教員 祥雲 弘文

目次

目次	1
略語	3
第1章 序論	5
1-A 糖質と糖質加水分解酵素	6
1-A-1 糖質	6
1-A-2 糖質構造の多様性	7
1-A-3 糖質関連酵素	7
1-A-4 糖質関連酵素のアミノ酸配列に基づく分類	8
1-A-5 GH の反応機構	9
1-A-6 GH の構造と分類	10
1-A-7 糖質関連酵素の構造解析の意義	10
1-B 細胞壁の構成成分とその分解酵素	10
1-B-1 植物細胞壁の構成成分	10
1-B-2 細胞壁分解酵素	12
1-B-3 糖質結合ドメイン	15
1-C 焼酎白麹菌とアラビノフラノシダーゼ	16
1-C-1 麹菌	16
1-C-2 焼酎用麹菌	16
1-C-3 <i>Aspergillus kawachii</i> の生産するセルラーゼ及びヘミセルラーゼ	17
1-C-4 AkAbf51 と AkAbf54	18
1-C-5 アラビノフラノシダーゼが分類されているファミリー	19
1-C-6 アラビノフラノシダーゼの有用性	20
1-C-7 本研究の目的	21
図表	22
第1章の引用論文	35
第2章 発現・精製・結晶構造解析	39
2-A 序	40
2-B 目的・材料・方法	40
2-B-1 AkAbf54 の大腸菌での発現系の構築、発現条件の検討	40
2-B-2 AkAbf54 の大腸菌での大量発現、精製	43
2-B-3 AkAbf54 の酵母での発現と精製	44
2-B-4 酵母で発現させた AkAbf54 と大腸菌で発現させた AkAbf54 の性質の比較	47
2-B-5 酵母で発現させた AkAbf54 の結晶化	48

2-B-6 AkAbf54 の構造解析	49
2-C. 結果と考察	53
2-C-1 酵母及び大腸菌での発現	53
2-C-2 結晶化	55
2-C-3 AkAbf54 の構造解析	56
図表	58
第 2 章の引用論文	80
第 3 章 触媒ドメインの構造とその機能解析	82
3-A 序	83
3-B 目的・材料・方法	83
3-B-1 全体構造、特に触媒ドメインの解析	83
3-B-2 触媒ドメインの変異体の作成	83
3-B-3 触媒ドメインの機能解析	86
3-C 結果と考察	86
3-C-1 触媒ドメインの構造と活性中心	86
図表	92
第 3 章の引用論文	107
第 4 章 アラビノース結合ドメインの構造と糖質結合ドメインとしての機能	109
4-A 序	110
4-B 目的・材料・方法	110
4-B-1 アラビノース結合ドメインの解析	110
4-B-2 アラビノース結合ドメインの変異体作成	110
4-B-3 アラビノース結合ドメインの機能解析	112
4-C 結果と考察	116
4-C-1 アラビノース結合ドメインの構造と CBM42 への分類	116
4-C-2 AkCBM42 (アラビノース結合ドメイン) の機能解析	119
4-C-3 AkCBM42 に関する考察	122
図表	128
第 4 章の引用論文	159
第 5 章 総括	161
発表論文	164
用語	165
謝辞	169

略語

abf1	: シグナル配列を含んだ AkAbf54 遺伝子
abf2	: シグナル配列を除いた AkAbf54 遺伝子
AkAbf51	: <i>Aspergillus kawachii</i> IFO4308 株由来の α -L-アラビノフラノシダーゼ A
AkAbf54	: <i>Aspergillus kawachii</i> IFO4308 株由来の α -L-アラビノフラノシダーゼ B
Ara	: アラビノース
Araf1	: 触媒ドメインの活性中心に結合したアラビノース
Araf2	: アラビノース結合ドメイン β サブドメインポケットに結合したアラビノース
Araf3	: アラビノース結合ドメイン γ サブドメインポケットに結合したアラビノース
AkCBM42	: AkAbf54 の持つ CBM42 に属するアラビノース結合ドメイン
AwAbfA	: <i>Aspergillus awamori</i> IFO4033 株由来の α -L-アラビノフラノシダーゼ A
AwAbfB	: <i>Aspergillus awamori</i> IFO4033 株由来の α -L-アラビノフラノシダーゼ B
AXX	: アラビノフラノシル- α -1,2-キシロピオース
BCA	: Bicinchoninic Acid
BL	: Beam Line
BMGH	: Buffered Minimal Glycerol Histidine、酵母用前培養培地
BMMH	: Buffered Minimal Methanol Histidine、酵母用本培養培地
BSA	: Bovine Serum Albumin
CAZy	: Carbohydrate Active enZymes、糖質関連データベース
CBM	: Carbohydrate-Binding Module、糖質結合ドメイン
CE	: Carbohydrate Esterase、糖質エステラーゼ
CNS	: Crystallography & NMR System
DM	: Density Modification
EMTS	: Ethyl Mercurithiosalicylate (Thimerosal), $C_9H_9HgO_2SNa$
EndoH	: Endoglycosidase H
FPLC	: Fast Protein Liquid Chromatograph
GH	: Glycosyl Hydrolase、糖質加水分解酵素
GsAbfA	: <i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6 株由来の α -L-アラビノフラノシダーゼ A
GT	: Glycosyl Transferase、糖転移酵素
HPAEC-PAD	: High Performance Anion Exchange Column Pulsed Amperometric Detection
HPLC	: High Performance Liquid Chromatograph
IPTG	: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
ITC	: Isothermal Titration Calorimetry、等温滴定カロリーメトリー
IUB-MB	: International Union of Biochemistry and Molecular Biology
LB	: Luria-Bertani

MAD	: Multiple wavelength Anomalous Dispersion、多波長異常分散法
MIR	: Multiple Isomorphous Replacement、重原子同型置換法
NAG	: N-アセチルグルコサミン
ORF	: Open Reading Frame
PAS	: Periodic Acid-Schiff base、過ヨウ素酸・シッフ塩基
PCMB	: <i>p</i> -Chloromercuribenzoic acid, $C_7H_5ClHgO_2$
PDB	: Protein Data Bank
PEG	: ポリエチレングリコール
PEG-MME	: ポリエチレングリコールモノメチルエーテル
PF	: Photon Factory、シンクロトロン放射光実験施設 (茨城県つくば市)
PF-AR	: Photon Factory - Advanced Ring、シンクロトロン放射光実験施設
PL	: Polysaccharide Lyase、多糖リアーゼ
pNPAF	: <i>p</i> -ニトロフェニル α -L-アラビノフラノシド
RMSD	: Root Mean Square Diviation
RTB	: Ricin Toxin B-chain
SDS-PAGE	: SDS ポリアクリルアミド電気泳動
SPring-8	: 高輝度光科学研究センター (兵庫県西播磨)
Xyl	: キシロース
YPD	: Yeast Peptone Dextrose

第 1 章 序論

1-A 糖質と糖質加水分解酵素

1-A-1 糖質

糖質は核酸、アミノ酸と並ぶ生体の重要な構成成分の一つである。糖質は $C_n(H_2O)_m$ の一般式で表される。糖質には単体である単糖、単糖が2分子から20分子程度結合したオリゴ糖、さらに多数の単糖からなる多糖がある。単糖は不斉炭素原子を持つため多くの異性体が存在する。また環状構造を形成するため、 α -アノマーと β -アノマーの異性体が存在する(図 1-1)。五員環の物をフラノース、六員環の物をピラノースと呼ぶ。基本的に糖の種類によってフラノースとピラノースの割合が異なる(表 1-2)。糖質の生体内における主な役割は生物の骨格形成、エネルギーの貯蔵・代謝、細胞認識などである。

骨格

糖質の役割の一つは、植物の細胞壁グリカンに代表される骨格の形成である。細胞壁を構成する糖質は、後で詳しく記述するが、グルコースが β -1,4 結合で重合したセルロース、キシロースが β -1,4 結合で重合したキシランをはじめ、マンノースを主成分とするマンナン、N-アセチルグルコサミン・グルコサミンが重合したキチン、キトサンなどがある。

エネルギーの貯蔵・代謝通貨

ほとんどの生物は解糖によるグルコースの酸化により、エネルギー(ATP)を合成する。解糖系はグルコースを出発物質として、ATPを生成しつつピルビン酸にいたる。真核生物は、ピルビン酸をアセチル CoA に変換し、ミトコンドリアでの TCA 回路により代謝し、エネルギーを生産する。

植物はエネルギーをデンプンの形で貯蔵する。アミロースは、グルコースが α -1,4 結合で直鎖状に重合したものである。アミロペクチンは、 α -1,4 結合のほかに α -1,6 結合で分岐して重合したものである。動物はエネルギーをグリコーゲンの形で貯蔵する。グリコーゲンは、アミロペクチンと似た構造をとるが、分岐の割合が異なる。

糖鎖

糖質はタンパク質や脂質と共有結合で結びついて複合糖質を形成する。タンパク質のアスパラギンの側鎖の窒素原子に結合するものを N 型糖鎖、タンパク質のセリンまたはスレオニン側鎖の水酸基に結合するものを O 型糖鎖、炭化水素鎖が結合したものを糖脂質と呼ぶ。糖鎖は、重要な蛋白質のほとんどに関連し、生体内の多様性を担い、生理活性を調節する存在である。例えば、細胞表面において各種抗原決定基群を形成する。また、細胞間相互作用や細胞の環境因子認識など重要な役割を果たす。この糖鎖に結合するタンパク質がレクチンである。

1-A-2 糖質構造の多様性

糖質は核酸やタンパク質と異なり、多様な構造が形成される。例えば、キシロースとアラビノースが重合した二糖の場合、アラビノースはキシロースの O2、O3、O4 位に結合できることから、3つの異性体構造の可能性がある。また、アラビノースは α -アノマーと β -アノマーの2種の立体配置をとるため、異性体の可能性は6つになる。さらに、アラビノースはフラノース型、ピラノース型となり得るので、異性体の可能性は全部で12になる。三糖以上になると、分岐構造を形成しうるため、鎖長が長くなると、異性体の数は幾何級数的に増加する。

1-A-3 糖質関連酵素

糖質に作用する酵素は古細菌から哺乳類に至るまで全ての生物が保持しており、その数は数万種類に上る。Henrissatらは、糖質関連酵素を以下のクラスに分類した[1-1] (表 1-3)。

糖質加水分解酵素 (EC3.2.1.*) (EC2.4.*.*)

糖質加水分解酵素 (GH) は、糖-糖間のグリコシド結合、または糖-非糖間のグリコシド結合を加水分解する (図 1-4A)。12,000 以上の遺伝子が分類されており、糖質関連酵素最大のクラスである。

GH の反応は、反応系に多量に存在する水のために、分解方向の不可逆反応であるものが多い。ただ、逆反応の糖質合成反応を触媒するものもあり、トランスグリコシダーゼと呼ぶ。

糖転移酵素 (EC2.4.*.*)

糖転移酵素 (GT) は、糖供与体の糖を特異的な糖受容体に転移し、新たなグリコシド結合を作り出す (図 1-4B)。糖供与体は、糖-リン酸、糖-ヌクレオチドの高エネルギーリン酸結合を持つ糖リン酸化合物で、全て α -アノマー構造 (axial 結合) を持つ。GT の反応は、この高エネルギー結合のため、合成方向の不可逆反応となる。

多糖リアーゼ (EC4.2.2.*)

多糖リアーゼ (PL) は、糖鎖を β -脱離機構で分解し、新たにできた非還元末端に二重結合を導入する (図 1-4C)。

炭水化物エステラーゼ (EC 3.1.1.*)炭水化物エステラーゼ (CE) は、O-アセチル基、または N-アセチル基を脱離する反応を触媒する (図 1-4D)。

糖質結合ドメイン (NOT enzyme)

これは、酵素ではないが、糖質結合ドメインについても分類がされている。これについては 1-B-3 で後述する。

1-A-4 糖質関連酵素のアミノ酸配列に基づく分類

ファミリー分類

糖質関連酵素は、IUB-MB による酵素命名法に従って命名されている (例: α -アミラーゼ、 β -ガラクトシダーゼなど)。しかし、この命名法は基質特異性に基づいたものであり、酵素の反応機構や特徴を反映していない。そのため、Henrissat らは、糖質関連酵素をアミノ酸配列に基づいて"ファミリー"に分類した[1-1]。この分類法により同一ファミリーに分類される酵素は、以下のような特徴があると考えられる。

- ・同一ファミリーに分類される酵素は、同様の立体構造を持つ。
- ・同一ファミリーに分類される酵素は、進化的に関連がある。
- ・同一ファミリーに分類される酵素は、同様の反応機構を示す。

ただし、酵素の基質特異性は反映していない。そのため、同じファミリー内にいろんな基質特異性を持つ酵素が含まれる。例えば、GH5 には、エンドグルカナーゼだけではなく、キシラナーゼ、マンナーゼ、セロビオヒドロラーゼなどが含まれている。

糖質関連酵素データベース CAZY (表 1-3)

糖質関連酵素のアミノ酸配列に基づいたファミリー分類は、Henrissat らが管理するデータベース CAZY で取りまとめられている[1-1] (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>)。

GH のファミリー分類 (表 1-5)

GH は、GH1 から GH104 までのファミリーに分類されている (2005 年 12 月現在)。このうち、GH21、GH40、GH41、GH60 は、一度酵素が分類されたものの、他のファミリーとの関連が明らかになり再分類されたことから、欠番となっている。また、GH69 は、PL16 に再分類されたため欠番となった。

GT のファミリー分類

GT は GT1 から GT79 までのファミリーに分類されている (2005 年 12 月現在)。このうち GT36 は、GH94 に再分類されたため欠番となった。

PL のファミリー分類

PL は PL1 から PL18 までのファミリーに分類されている (2005 年 12 月現在)。

CE のファミリー分類

CE は CE1 から CE14 までのファミリーに分類されている (2005 年 12 月現在)。

1-A-5 GH の反応機構

GH は、基質と生成物のアノマーの関係から、アノマー保持型、反転型に分類される。これらの反応は、以下のように一般化された反応機構で説明される[1-2, 3]。GH が、どちらの反応機構に属するかは、生成物のアノマーで判断する (図 1-6)。

アノマー保持型の反応機構 (図 1-6)

GH 酵素は、2 つの酸性残基がそれぞれ酸/塩基触媒、求核性触媒残基として働く。アノマー保持型機構の反応機構は、

- ① 求核性触媒によるグリコシド結合の攻撃、酸触媒によるプロトンの供与が起こる。
- ② 求核性触媒と糖が共有結合を形成するアシル酵素中間体構造ができる。
- ③ 塩基性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酵素中間体に対し求核攻撃する。
- ④ 糖が解離し反応が完了する。

アノマー保持型の反応機構は、二回の求核攻撃が起こるため、Double Displacement 機構とも呼ばれる。

GH では糖アナログである 2-F-グリコシド化合物を用いたアシル酵素中間体の X 線結晶構造解析や、質量分析の結果から、アシル酵素中間体の存在が証明された[1-4, 5]。

アノマー反転型の反応機構 (図 1-6)

GH 酵素は、2 つの酸性残基がそれぞれ一般酸触媒、一般塩基性触媒として働く。アノマー反転型の反応機構は、

- ① グリコシド結合に対し、一般酸触媒がプロトンを供与、一般塩基性触媒による脱プロトン化で活性化した水分子が求核攻撃する。
- ② 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、アノマーが反転する。

アノマー反転型の反応機構は、一回の置換で反応が進むため、Single Displacement 機構とも呼ばれる。

その他の反応機構

立体構造の解明や反応特異性の解析から、上記の 2 種の反応機構では説明できない反応機構が存在する。GH4 に分類される酵素は、アノマー保持型の反応機構を示すが、 NAD^+ と二価金属 (Mn^{2+}) が反応に関わる[1-6]。GH18, 20, 56, 84 に分類される酵素はアノマー保持型の反応機構を示すが、基質のアセトアミド基が触媒反応に関与する機構が提唱されている[1-7]。この他、上記の反応機構では説明することができないファミリーは、GH19, 23, 24,

33, 34, 38, 43, 47, 48, 67, 83, 88 などがある。

1-A-6 GH の構造と分類

近年多くの GH ファミリーの立体構造が明らかになってきた。

GH の構造分類 (クラン)

GH1~104 から欠番の 5 つのファミリーを除く 99 の GH ファミリーのうち、約 60 のファミリーで立体構造が明らかになっている (表 1-5A)。GH 酵素のフォールドは $(\beta/\alpha)_8$ バレル (TIM バレル) フォールド、 β -jelly roll (β -サンドイッチ) フォールド、 $(\alpha/\alpha)_6$ バレルフォールドなど多様なフォールドが見られる (図 1-7)。しかし、フォールドの種類はアミノ酸配列ほどの多様性を示さず、いくつかのファミリーで共通のフォールドを持っている。これら共通のフォールドに基づいた分類を"クラン"と呼ぶ。クランは GH-A から GH-N に分類される (表 1-5B)。同一クランに分類されるファミリーは進化的に関連のあるファミリーであると考えられる[1-8]。

同一クランに分類されるものは、以下のような条件がある。

- ・ 同一フォールドの触媒ドメインをもつ。
- ・ 反応機構が同じである。
- ・ 作用する基質のグリコシド結合が同じである。
- ・ 触媒残基が同じである。
- ・ 触媒残基の位置が立体構造上、またアミノ酸配列上同じである。

1-A-7 糖質関連酵素の構造解析の意義

近年、立体構造の決定や構造予測により、全く異なる機能を有するファミリー間で、立体構造の相同性が見出されてきた。そのため構造未知ファミリーの立体構造を解明することは、そのファミリー内の酵素のみならず、類似構造を有する多くのファミリーに対しても分子進化、触媒反応、基質認識機構などの新たな構造的知見を与えることが期待されている。特に機能的に有用な酵素は、タンパク質工学的手法による酵素の改良、応用のために立体構造の情報は必要不可欠であり、その解明が期待されている。

1-B 細胞壁の構成成分とその分解酵素

1-B-1 植物細胞壁の構成成分

植物の細胞壁は強固な繊維質であり、様々な構成糖質と複雑な側鎖構造を持っている。植物の細胞壁の構成成分として、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン、リグニンなど

がある[1-9]。

セルロース (図 1-8)

セルロースは、グルコースが β -1,4 結合で多数重合したものであり、単純な構造をとっている。セルロース分子の形状は水素結合によるシート状になっており、セルロース 36 本がまとまって、セルロース微少繊維を構成する[1-10]。結晶性の部分と非結晶性アモロファスな部分がある。細胞壁の基本骨格を構成する。植物の細胞壁で最も含まれている。

ヘミセルロース

ヘミセルロースは、セルロースとペクチン系多糖を除く陸上植物細胞壁を構成する多糖類と定義されている。セルロースと水素結合、リグニンと共有結合などを形成し、細胞壁を補強する役割をしている。植物の細胞壁で 2 番目に多く含まれている。骨格となる主鎖の糖に側鎖の糖などが結合した構造をしており、たとえば、キシロースを基本骨格とするキシラン、マンノースを基本骨格とするマンナンなどがある。構成する糖が多様であり、結合様式も複雑である[1-11]。

・キシラン (図 1-8, 9)

キシランは、イネ科植物や広葉樹などに多く含まれる。キシロースが β -1,4 結合したキシラン主鎖にアラビノース側鎖が結合した構造をとる。さらに、側鎖アラビノースの一部にフェルラ酸が結合している。フェルラ酸同士が結合して架橋しているものもある。そのほかにもグルクロン酸やアセチル基などが結合している。植物の種類によりアラビノース含量が異なり、アラビノース側鎖を多く含むものをアラビノキシランという。

・キシログルカン (図 1-8)

キシログルカンは、双子葉植物に多く含まれる。グルコースが β -1,4 結合したグルカン主鎖に対して、 α -1,6 結合のキシロース側鎖が高頻度に結合している。キシロース側鎖にガラクトースが β -1,2 結合している場合もある。

・マンナン (図 1-8)

マンナンは、こんにゃくや針葉樹に多く含まれる。マンノースが β -1,4 結合した主鎖を持つものを基本構造とする。主鎖にグルコースが入っているものをグルコマンナンという。 α -1,6 結合でガラクトースが側鎖として結合しているものをガラクト(グルコ)マンナンという。アセチル基が側鎖についているものは、水に溶けやすくなる。

ペクチン

ペクチンは、主に植物の葉、茎、果実に含まれる。ホモガラクトuron、ラムノガラクト

ロン I、ラムノガラクトロン II がある。

- ・ホモガラクトロナン

ホモガラクトロナンは、最も主となる構造であり、ガラクトロン酸のみの連続した α -1,4-結合。ガラクトロン酸のカルボキシル基へのメチルエステル化や水酸基へのアセチル化が存在し、構造に変化をもたらしている。

- ・ラムノガラクトロナン I (図 1-8)

ラムノガラクトロナン I は、ガラクトロン酸とラムノースの α -1,4/1,2-結合の繰り返し構造をとる。ラムノースからはガラクトン (ガラクトースが β -1,4 結合した主鎖)、アラビナン (アラビノースが α -1,5 結合した主鎖に α -1,2 結合や α -1,3 結合で側鎖が分岐した構造をとる) が分岐している。

- ・ラムノガラクトロナン II

ラムノガラクトロナン II は、約 30 の糖からなる複雑な構造をとる。ガラクトロン酸、ラムノースに加え、アピオースやメチルエーテル化したグルクロン酸やフコースなどを含む。

リグニン

リグニンは、不規則な芳香族ポリマーである。セルロース、ヘミセルロースの間に存在し、それらを接着剤のような感じで結びつける役割をしている。

1-B-2 細胞壁分解酵素

細胞壁を分解する酵素群は、非常に多様性に富んでいる。セルロース分解酵素とヘミセルロース分解酵素は、1-A-4 で述べた糖質関連酵素に属する。

エンド型とエキソ型

酵素の作用様式として、エンド型とエキソ型の 2 つの酵素が知られている。エンド型は、基質の鎖をランダムに切断するタイプであり、エキソ型とは端のほうから順に切断するタイプである。

非還元末端型と還元末端型 (図 1-9)

糖鎖には、還元末端と非還元末端がある。還元末端は、糖の O1 が露出しているものである。非還元末端は、糖の O1 が隣の糖に結合しており、露出していないものを言う。分岐がないセルロース鎖は、還元末端と非還元末端の数は 1 で同じとなる。しかし、分岐するヘミセルロース鎖は、還元末端の数が 1 に対し、非還元末端の数は飛躍的に多くなる。側鎖

に結合している糖の末端は全て非還元末端である。このため、エキソ型のヘミセルロース分解酵素は非還元末端に作用するものがほとんどである。

セルロース分解酵素

セルロース分解には、主に三種類の酵素が関わる[1-12]。

・エンドグルカナーゼ (EC 3.2.1.4)

セルロース鎖をランダムに切断するエンド型加水分解酵素である。図 1-10 のように、非結晶のセルロース部分に働く。活性中心がクレフト型になっているものが多い。キシログルカンもセルロースと同じ β -1,4 グルカン主鎖を持つため、キシログルカンも分解できるエンドグルカナーゼが多く存在する。GH5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51, 61, 74 に分類されている。

・セロビオヒドロラーゼ (EC 3.2.1.91)

端から 2 糖ずつ切断するエキソ型の加水分解酵素である。図 1-10 のように、エンドグルカナーゼによって生じた切断点に作用し、セロビオースを生成する。GH6 は非還元末端側より、GH7, 48 は還元末端側よりセロビオースを遊離することが知られている。活性中心がトンネル型になっているものも多く、酵素がセルロース鎖に結合したまま、順に 2 糖ずつ切断していく (プロセス)。遊離したセロビオースは、トンネルの反対側から出て行く。GH5, 6, 7, 9, 10, 48 に分類されている。

・ β -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21)

主にセロオリゴ糖を基質とする。セルロース分解で最終段階において働く酵素である。 β -グリコシド結合を有する基質に作用し、その非還元末端から β -グルコースを遊離させるエキソ型の加水分解酵素である。GH1, 3, 9 に分類されている。

ヘミセルロース分解酵素

ヘミセルロースは、複雑で多様な構造をしているため、それを分解するヘミセルラーゼは非常に種類が多い[1-13]。ここでは、キシラン分解に関わる酵素について主に述べる。

・キシラナーゼ (EC 3.2.1.8)

キシランの β -1,4 結合をエンド型で加水分解する酵素であり、キシラン分解の主役である[1-14]。GH5, 8, 10, 11, 43 に分類されている。GH10 と GH11 に分類されているキシラナーゼが多い。最近、還元末端からエキソ型で切断していくものが報告された[1-15]。

・キシロシダーゼ (EC 3.2.1.37)

キシランやキシロオリゴ糖の β -1,4 結合をエキソ型で加水分解する。非還元末端から切断していき、キシロースが遊離する。GH3, 39, 43, 52, 54 に分類されている。キシロピラノースとアラビノフラノースはコンフォメーションが似ており、キシロシダーゼ/アラビノフラノシダーゼという二種類の活性を持つものが GH3, 43, 54 で見つかった[1-16]。

- ・アラビノフラノシダーゼ (EC 3.2.1.55)

アラビノキシランやアラビナンに含まれる α -1,2、 α -1,3、 α -1,5 結合で結合した非還元末端のアラビノフラノース (フラノース型のアラビノース) をエキソ型で切断する[1-17]。GH3, 43, 51, 54, 62 に分類される。後で詳しく記述する。

- ・グルクロニダーゼ (EC 3.2.1.139)

キシラン主鎖に結合したグルクロン酸側鎖を切断する。GH4, 67 に分類される。

- ・フェルラ酸エステラーゼ (EC 3.1.1.73)

キシラン側鎖アラビノースに結合したフェルラ酸を切断する。CE1 に分類される。CE1 の酵素は、アスパラギン酸、ヒスチジン、セリンの catalytic triad を持ち、触媒反応を行う。

- ・アセチルキシランエステラーゼ (EC 3.1.1.72)

キシラン主鎖に結合したアセチル基を切断する。CE1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 に分類される。

- ・アラビナナーゼ (EC 3.2.1.99) (EC 3.2.1.55)

アラビナンの主鎖を分解する。GH43, 93 に分類される。GH43 のアラビナナーゼはエンドとエキソ型両方があり、エキソ型のものは非還元末端から 3 糖ずつ切断していく[1-18]。GH93 のアラビナナーゼは、非還元末端から 2 糖ずつ切断していくエキソ型のものが報告されている[1-19]。

リグニン分解酵素

リグニンは不規則な高分子で三次元の網目状構造をもっているため、非常に分解を受けにくい。リグニン分解酵素を持つのは白色腐朽菌というキノコだけである。白色腐朽菌はリグニンを炭素源およびエネルギー源として利用するのではない。リグニンを分解することで菌糸をより広範囲に伸ばして、セルロースやヘミセルロースなどを炭素源として利用している。白色腐朽菌の種類は多く 600 種類にも達するともいわれている。

分解酵素として、リグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼなどがある。これらは、基質から 1 電子を引き抜く 1 電子酸化反応を行う。フリーラジカルを生じさせることにより、非特異的に分解が進む。このような酵素の強力な酸化反応により通常のペルオキシダーゼでは酸化の不可能な基質の酸化も可能となると考えられている。

1-B-3 糖質結合ドメイン

糖質結合ドメイン

上に述べた糖質関連酵素は、触媒ドメインの隣に比較的小さな非触媒の糖質結合ドメインを持っていることがある。これらは、CBM (Carbohydrate-Binding Module) と呼ばれる。結晶性セルロース、非結晶性セルロース、ラミナリン (β -1,3-グルカン)、キシラン、マンナン、ガラクトンなど植物細胞壁の構成成分に結合するものが多い。他にはキチン (甲殻類や昆虫の外骨格、カビやキノコなどの細胞壁の構成成分)、デンプンに結合するものが知られている。

CBM の持つ 3 つの機能

CBM は、3 つの機能を持つといわれている[1-20]。

- proximity effect

CBM は不溶性の糖に対して結合することにより、触媒ドメインは基質である不溶性の糖の周辺に存在し続けることになり、基質の分解効率が高くなる (図 1-11)。この CBM を触媒ドメインから除去すると、可溶性糖基質に対する活性は変化しないが、不溶性糖基質に対する活性は大幅に減少することが知られている。

- targeting function

ターゲッティング機能がある。例えば、細胞壁はいろんなポリ多糖が混在しているが、CBM により適切どころに結合することができる。

- disruptive function

一部の CBM にしか報告されていないが、結晶性セルロースなどのポリマーの構造を破壊する機能もある。構造が乱れることで、触媒ドメインによる分解を受けやすくなる。

CBM のファミリー分類 (表 1-12)

CBM も同様に、Henrissat らによりアミノ配列を元に"ファミリー"に分類されている。CBM は、CBM1 から CBM43 までのファミリーに分類されている (2005 年 12 月現在)。このうち、CBM42 は、本研究により新しく分類されたファミリーである (第 4 章)。CBM7 は欠番となった。

ただし、結合特異性は反映していない。そのため、同じファミリー内に様々な特異性を持つ CBM が含まれる。例えば、CBM35 には、キシラン結合能のあるもの、マンナン結合能があるもの、ガラクトン結合能を持つものがある。

CBM の 3 つのタイプ

Boraston らにより三つのタイプに分類されている[1-20] (表 1-12)。

・タイプ A

結晶性セルロース、キチンに結合するもの。芳香族アミノ酸により形成される平らな結合サイトが、平らな結晶性セルロースやキチンの表面に結合する。疎水的な認識が主である。オリゴ糖結合能はない。

・タイプ B

独立した糖の鎖に結合するもの。アモロファスセルロースやヘミセルロースなどに結合する。糖鎖を結合できるような長いクレフトを持つ。水素結合により、主に糖鎖を認識する。

・タイプ C

主にオリゴ糖を結合し、一糖から三糖を好む性質がある。タイプ B との違いは少ないが、タイプ B のような長いクレフトを持たない。レクチンに似た性質を示し、フォールドもレクチンに似たものがあることからレクチンとの進化的関連が示唆されている。

CBM の構造分類

CBM1~43 から欠番の 1 つのファミリーを除く 42 の CBM ファミリーのうち、7 割以上のファミリーで立体構造が明らかになっている。CBM 酵素は、 β -サンドイッチフォールドをとっているものが多い (表 1-12)。Boraston により、フォールドファミリーは 1~7 に分類されている[1-20]。

1-C 焼酎白麹菌とアラビノフラノシダーゼ

1-C-1 麹菌

麹菌とは麹に用いられるカビのことである。麹菌は、アミラーゼやプロテアーゼなど醸造に必要な酵素を大量に合成し、細胞の外へ分泌する性質を持っている。そのため、醸造産業で有用な微生物である。麹菌で最も有名なのは、味噌・醤油・清酒の醸造に用いられている *Aspergillus oryzae* である。

1-C-2 焼酎用麹菌

焼酎用の麹菌には、*Aspergillus kawachii* という白麹菌や *Aspergillus awamori* という黒麹菌

がある[1-21]。黒麹はもともと沖縄の泡盛用の麹であり、コクのある辛口の焼酎に仕上がるといわれている。一方、白麹菌は黒麹菌の変異株であり、白麹を用いると口当たりがソフトで甘い焼酎になるといわれている。

麹菌の役割

麹菌は焼酎を造るには欠かせない存在である。直接的にアルコール発酵を行うのは酵母である。しかし、酵母は焼酎の原料である米や麦や芋に含まれるデンプンを分解する酵素を持っていない。そこで、米のデンプンをグルコースに変えるため麹（米に麹菌を繁殖させたもの）を用いる。麹菌が生産する α -アミラーゼやグルコアミラーゼによりデンプンが分解されグルコースが生産される。そのグルコースを元に酵母はアルコール発酵を行う。

穀類のデンプンは、細胞壁に取り囲まれて存在している（図 1-13）。芋や麦には、特にセルロースやヘミセルロースが多い。麹菌の出すセルラーゼやヘミセルラーゼにより細胞壁が分解されることで、デンプンが露出し、糖化酵素がデンプンに働くことができる。

また、芳香成分生成にも関与している。麹菌が持つフェルラ酸エステラーゼによりフェルラ酸が遊離し、貯蔵しておく、フェルラ酸はバニリンやバニリン酸などの香り成分に変換される。また、麹菌は大量のクエン酸を生産し、焼酎もろみを強い酸性にして雑菌汚染を防止するといった役割も果たす。

1-C-3 *Aspergillus kawachii* の生産するセルラーゼ及びヘミセルラーゼ

Aspergillus kawachii は、様々なセルラーゼやヘミセルラーゼを生産する[1-22]。

セルラーゼに関しては、GH5 に属する二種類のエンドグルカナーゼ (Cel5A, Cel5B)、GH12 に属する二種類のエンドグルカナーゼ (Cel12A, Cel12B)、GH61 に属するエンドグルカナーゼ (Cel61A)、GH3 に属する β -グルコシダーゼ (BglA) の遺伝子を持っていることが分かっている。また、ヘミセルラーゼに関しては、GH10 に属する β -1,4-キシラナーゼ (XynA)、GH11 に属する二種類の β -1,4-キシラナーゼ (XynB, XynC)、GH51 に属する α -L-アラビノフラノシダーゼ (AkAbf51)、GH54 に属する α -L-アラビノフラノシダーゼ (AkAbf54) の遺伝子を持っていることが分かっている。さらに、近縁種である *Aspergillus awamori* に CE1 に属するアセチルキシランエステラーゼ、CE1 に属するフェルラ酸エステラーゼ、GH3 に属するキシロシダーゼの遺伝子があることから、*A. kawachii* もこれら 3 つの遺伝子を有しているものと考えられる。*A. kawachii* は全ゲノム情報が明らかになっていないため、上で述べた以外のセルラーゼやヘミセルラーゼを持っている可能性もある。

上に示したセルラーゼ及びヘミセルラーゼは、全てN末にシグナル配列を有しており、菌体外に分泌される酵素であると思われる。これらの酵素を細胞外に分泌し、セルロースやアラビノキシランを分解し、その産物であるグルコースやキシロースやアラビノースといった糖を菌体内に取り込んで炭素源やエネルギー源にする。グルコースは、解糖経路によ

り代謝される。また、キシロースやアラビノースは、キシリトールを経て、キシルロース 5-リン酸に変換された後、ペントースリン酸経路により代謝されると思われる[1-23]。

キシラナーゼに関しては、上に記したように、XynA、XynB、XynC の三種類がある。至適 pH はそれぞれ 5.5、4.5、2 であり、XynA と XynB が弱酸性で働き、XynC が強酸性で働く酵素であるといえる[1-24~27]。発酵の初期段階で pH があまり下がっていない時は XynA と XynB が主に生産され、発酵が進んで pH が下がると XynC が多く生産されることが報告されている[1-28]。

1-C-4 AkAbf51 と AkAbf54

Aspergillus kawachii は、ある種の炭素源を加えることで、細胞外に二種類のアラビノフラノシダーゼ (AkAbf51 と AkAbf54) を分泌する。L-アラビトール、wheat bran、L-アラビノースで強く誘導された[1-29]。キシランと D-キシロースで弱く誘導され、グルコースでは全く誘導されなかった。アラビトールやアラビノースで誘導して、ノーザンブロットで解析を行ったところ、AkAbf51 より AkAbf54 の方が、発現レベルが高いことがわかった。上流にある CreA により発現が調節されているのではないかと考えられている[1-30, 31]。

精製を行い、その酵素化学的性質を検討した[1-29]。分子量は、AkAbf51 が 80 kDa、AkAbf54 が 62 kDa であった。最適 pH は共に 4.0、安定 pH は共に 3.0~7.0 と酸性側で働く酵素であった。焼酎もろみは酸性であるので、醸造中でも安定して働く酵素であるといえる。最適温度は共に 55℃、安定温度は 55~60℃と比較的熱安定である。

N 末端配列を読み、degenerate PCR を行い、遺伝子配列を決定した結果[1-29]、AkAbf51 には N 末に 26 アミノ酸残基、AkAbf54 は N 末に 18 アミノ酸残基 (図 1-14) のシグナル配列と予想される部分が切られて発現していることが分かっている。

この AkAbf51 や AkAbf54 と相同性の非常に高い配列 (99%程度) を持つ *Aspergillus awamori* 由来の α -L-アラビノフラノシダーゼ A (AwAbfA) と GH54 に属する α -L-アラビノフラノシダーゼ B (AwAbfB) では基質特異性が調べられている[1-32]。両方とも α -1,2、 α -1,3、 α -1,5 アラビノフラノシド結合の全てに活性を示すが、やや基質特異性に差があることが分かっている。GH51 AwAbfA は α -1,5 結合を好んで加水分解し、GH54 AwAbfB は α -1,3 結合を好んで加水分解する。

精製酵素を用いて、フェルラ酸エステラーゼ、キシラナーゼとの相乗効果を調べた[1-29]。キシラナーゼとともにそれぞれのアラビノフラノシダーゼを作用させるとアラビノキシランの分解率が高まった。これは、アラビノース側鎖があると、邪魔になり、うまくキシラナーゼが働けないが、アラビノフラノシダーゼを加えておくことで、アラビノース側鎖が取り除かれ、うまくキシラナーゼが作用できるようになったためと考えられる。また、アラビノキシランに、フェルラ酸エステラーゼとともにそれぞれのアラビノフラノシダーゼを作用させた。加えていない場合と比較して、フェルラ酸の遊離量が 20%程度上昇した。

このことから、アラビノフラノシダーゼは、焼酎の醸造において、重要な働きをしていることが予想された。

1-C-5 アラビノフラノシダーゼが分類されているファミリー

アラビノフラノシダーゼは、GH3、GH43、GH51、GH54、GH62 の 5 つのファミリーに分類されている。

GH3

β -グルコシダーゼ、 β -N-アセチルヘキサミニダーゼ、 β -1,3-グルカナーゼ、 β -1,4-グルカナーゼ、エキソ-1,3-1,4-グルカナーゼ、 α -L-アラビノフラノシダーゼが分類されており、幅広い基質特異性を示す。2005 年 12 月現在、617 の ORF が分類されている。ただし、アラビノフラノシダーゼと思われる遺伝子は 4 つしか見られない。

GH3 は、アノマー保持機構を取ることが分かっている[1-33]。エキソ-1,3-1,4-グルカナーゼの構造が明らかになっている[1-34]。

GH43

β -キシロシダーゼ、 α -L-アラビノフラノシダーゼ、アラビナナーゼ、キシラナーゼ、1,3- β -ガラクトシダーゼが分類されており、幅広い基質特異性を示す。2005 年 12 月現在、244 の ORF が分類されている。

GH43 はアノマー反転機構を取ることが分かっている[1-35]。

キシラナーゼのようなエンド型のものとキシロシダーゼやアラビノフラノシダーゼのようなエキソ型のものが報告されている。アラビナナーゼはエンド型とエキソ型両方のタイプがある。クレフトを持っており、クレフトの片側がループでふさがれているとエキソ型、ループでふさがれていないとエンド型になる。エキソ型のアラビナナーゼのループを取り除くと、エンド型活性を示すことが報告されている[1-36]。

アミノ酸配列からアラビノフラノシダーゼの属するグループ、キシロシダーゼやキシラナーゼが属するグループ、アラビナナーゼが属するグループの三つにサブファミリーに分けられる。GH43 の構造はいくつか報告されているが[1-36, 37]、まだアラビノフラノシダーゼが属するグループの構造は報告されていない。

クラン GH-F に分類され、5-fold β -プロペラフォールドをとっている。

GH51

GH51 には、 α -L-アラビノフラノシダーゼとエンドグルカナーゼが分類されている。2005 年 12 月現在、79 の ORF が分類されている。GH51 の酵素は、*Thermotoga maritima* などの好熱菌、*Geobacillus stearothermophilus* などの *Bacillus* 属細菌、*Streptomyces coelicolor* などの放

線菌、*Aspergillus kawachii* や *Aspergillus niger* などのカビ、*Arabidopsis thaliana* などの植物といったように幅広く存在している。

GH51 は、*Geobacillus stearothermophilus* T-6 の α -L-アラビノフラノシダーゼ A (GsAbfA) で詳細な解析がなされている。反応機構は、アノマー保持型であり[1-35]、求核残基が Glu294、酸・塩基触媒残基が Asp175 であることが決定されている[1-38, 39]。また、立体構造が明らかになっている。基質複合体構造としてアシル中間体などがとられている[1-40]。

クラン GH-A に属し、 $(\beta/\alpha)_8$ バレルフォールドをとっている。

GH54

GH54 には、 α -L-アラビノフラノシダーゼ (キシロシダーゼ活性を持つものを一つ含む) が分類されている。2005 年 12 月現在、17 の ORF が分類されている。GH51 に比べて、報告されている ORF の数が少ない。由来を見ても *Aspergillus* 属や *Fusarium* 属などカビ由来のものしか報告されていない。主なもののアライメントを図 1-14 に示す。

GH54 は、アノマー保持機構を取ることが分かっている[1-35]。 *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) 由来のアラビノフラノシダーゼで、C 末にキシランに結合できるドメインを持っていることが報告されている[1-41]。プロテアーゼ処理すると、C 末ドメインが切断され、不溶性アラビノキシランに対する活性が低下する。本研究を始めるにあたって立体構造は未知であった。本研究により立体構造が明らかにされた。

GH62

GH62 には、 α -L-アラビノフラノシダーゼが分類されている。2005 年 12 月現在、18 の ORF が分類されている。由来は *Aspergillus* 属などのカビや *Streptomyces* 属などの放線菌由来のものが報告されている。

GH62 は、可溶性の基質は加水分解できず、不溶性の基質しか加水分解することができないことが報告されている[1-42]。CBM2、CBM13、CBM35 といったキシラン結合能を持つ CBM を持っているのが特徴である[1-43]。反応機構は明らかになっておらず、構造未知のファミリーである。配列からクラン GH-F に分類され、5-fold β -プロペラフォールドをとることが予想されている。

1-C-6 アラビノフラノシダーゼの有用性

ヘミセルロースは、木質バイオマスであるにもかかわらず、あまり有効利用されてこなかった。1-C-4 でも述べたように、アラビノキシランは、キシラナーゼが特に分解に関与するが、側鎖にアラビノースが結合しているため、分解が進みにくい。そこで、アラビノフラノシダーゼで側鎖アラビノースを取り除いてやることにより、分解が飛躍的に進む。分解された糖は、アルコール発酵や乳酸発酵の基質として利用することができる。

また、最近、単糖 L-アラビノースが注目されている。L-アラビノースには小腸粘膜に存在するスクラーゼの働きを特異的に阻害する。砂糖 (スクロース) と一緒に摂取することで砂糖の消化や吸収を抑制することができ、その結果、血糖値の急激な上昇を抑制することができる。このように、L-アラビノースは、機能性食品素材として注目されており、アラビノフラノシダーゼを用いた L-アラビノースの生産が期待される。

1-C-7 本研究の目的

AkAbf54 の属する GH54 の酵素は、立体構造が明らかになっておらず、反応機構は保持機構をとること以外にはよく分かっていない。また、基質認識機構などもよく分かっていない。それらの解明には立体構造解析が必須である。そこで、本研究ではまず AkAbf54 の立体構造解析を行い、その構造情報を元に機能解析を行った。

図表

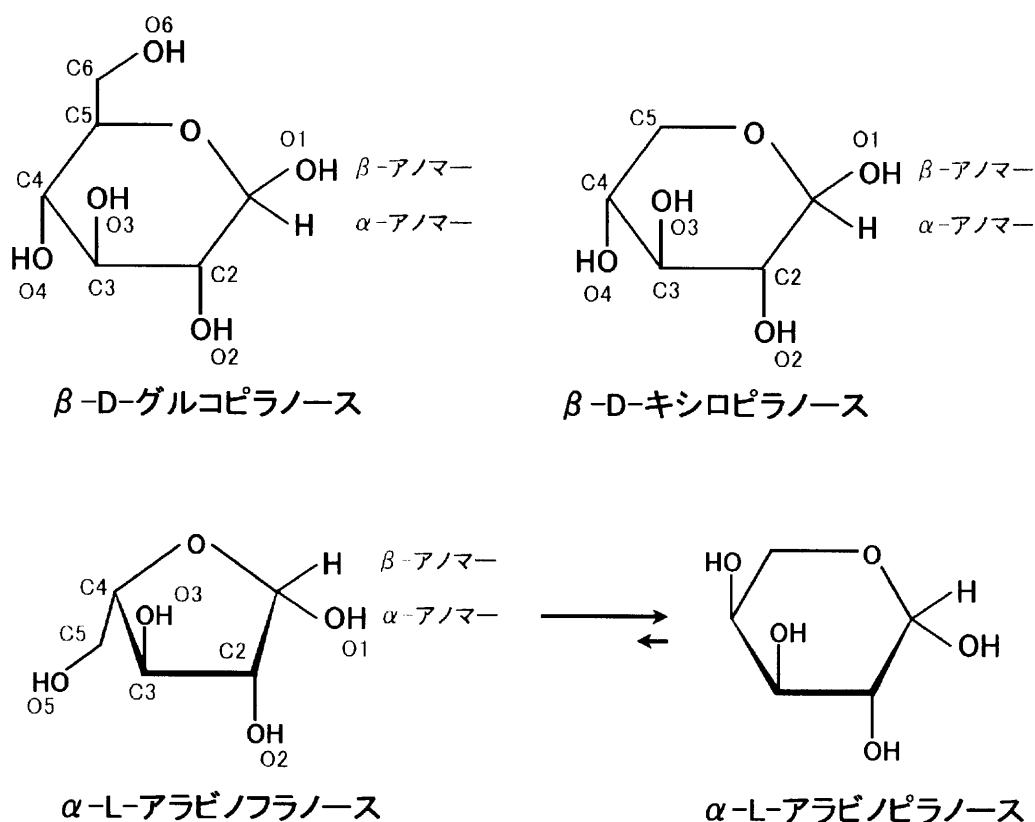


図 1-1 糖の構造とアノマー

グルコース、キシロース、アラビノース (フラノース型とピラノース型) の構造を示した。

アラビノースとキシロースは五炭糖であり、グルコースは六炭糖である。

C1 (アノマー炭素) は不斉 (キラル) なので、水酸基の配位にはα配位 (ヘミアセタール環またはヘミケタール環を平面とした場合、その平面の下側に配向) とβ配位 (同上側に配向) の二つの立体異性体が存在することになる。

フラノース体とピラノース体、α-アノマーとβ-アノマーは、溶液中で平衡状態にある。一般にフラノース体は不安定であるため、溶液中での存在比は低い。ただし、自然界には、フラノース型で結合した多糖も存在する。多糖ではアラビノースは全てフラノース型で結合し、キシロースはピラノース型で結合する。特に述べない場合、アラビノースはアラビノフラノースのことを、キシロースはキシロピラノースのことを指すこととする。

単糖 (断りなければ D 糖)	ピラノース(%)		フラノース(%)		非環状体 (%)
	α	β	α	β	
アロース	14	77.5	3.5	5	0.01 ⁽¹⁾
アルトロース	30	41	18	11	0.04 ⁽¹⁾
ガラクトース	29	64	3	--	0.082 ⁽¹⁾
グルコース	38	62		0.25	0.002 ⁽¹⁾
グロース	16	78	6		
イドース	38.5	36	11.5	14	0.2 ⁽¹⁾
マンノース	65.5	34.5	--	--	0.005 ⁽¹⁾
タロース	37	32	17	14	0.03 ⁽¹⁾
アラピノース	60	35.5	2.5	2	0.03 ⁽¹⁾
L-リキソース	70	28	1.5	0.5	0.03 ⁽¹⁾
リボース	21.5	58.5	6.5	13.5	0.05 ⁽¹⁾
キシロース	36.5	63	<1		0.02 ⁽¹⁾
フルクトース	2 ⁽²⁾	53 ⁽²⁾	10 ⁽²⁾	32 ⁽²⁾	3 ⁽²⁾
プシコース	22 ⁽³⁾	24 ⁽³⁾	39 ⁽³⁾	15 ⁽³⁾	0.3 ⁽¹⁾
L-ソルボース	87 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	8 ⁽²⁾	1 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
タガロース	79 ⁽³⁾	16 ⁽³⁾	4 ⁽³⁾	1 ⁽³⁾	0.6 ⁽¹⁾

表 1-2 平衡溶液中の互変異性体の組成

特に断りの無いものは、D₂O 中、31℃, 44℃, ¹H NMR により決定されたもの。

⁽¹⁾ 円二色性によるもの

⁽²⁾ D₂O 中、80℃, 3.7 mol/l, ¹³C NMR によるもの

⁽³⁾ D₂O 中、27℃, ¹³C NMR によるもの。

後藤良造他著「単糖類の化学」丸善 (1988) 中の表から抜粋、なお、同様の表は阿武喜美子著「糖化学の基礎」講談社 (1984) にも所収。

五炭糖、六炭糖は、 α -ピラノース、 β -ピラノース、開環アルデヒド構造、 α -フラノース、 β -フラノースのそれぞれの構造をとり得ることができ、実際にそれら化学種の平衡状態にある。これらの平衡比に関しては NMR その他の方法によって決定されている。

触媒能による分類 (Class)	立体構造に基づく分類 (Clan)	一次構造に基づく分類 (Family)
糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase: GH)	GH-A ~ GH-N	GH1 ~ GH104
糖転移酵素 (GlycosylTransferase: GT)	GT-I ~ GT-IV	GT1 ~ GT79
多糖リアーゼ (Polysaccharide Lyase: PL)		PL1 ~ PL15
炭水化物エステラーゼ (Carbohydrate Esterase: CE)		CE1 ~ CE14
糖質結合ドメイン (Carbohydrate-Binding Module: CBM)	fold1 ~ fold7	CBM1 ~ CBM43

表 1-3 糖質関連酵素の分類

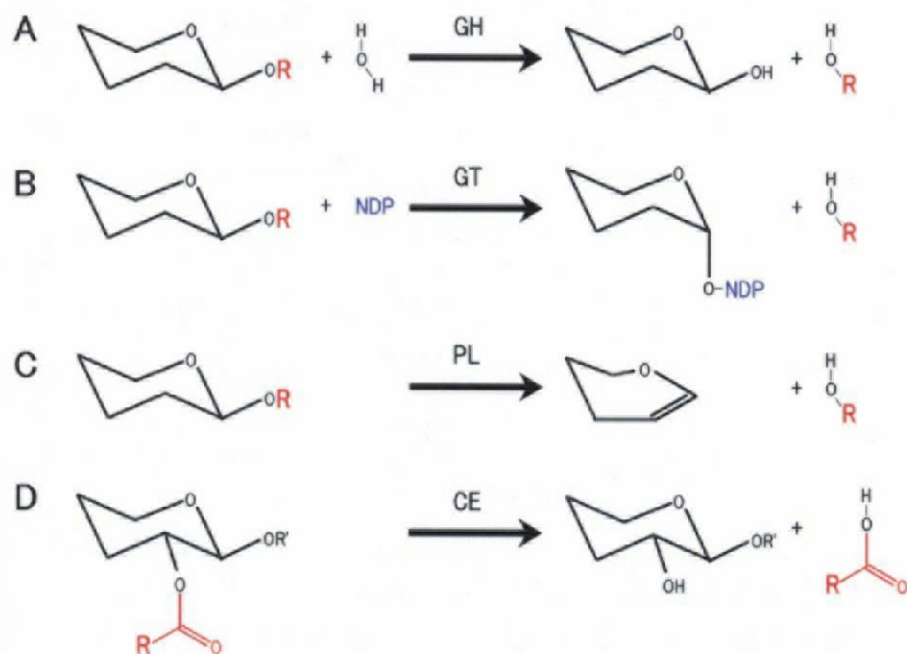


図 1-4

A. 糖質加水分解酵素 GH の行う反応、B. 糖転移酵素 GT の行う反応、C. 多糖リアーゼ PL の行う反応、D. 糖質エステラーゼ CE の行う反応

A. GH ファミリー

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	
	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	
61	62	63	64	65	66	67	68		70
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
101	102	103	104						

B. GH ファミリーのクランへの分類

クラン	フォールド	ファミリー
GH-A	(β/α) ₈	1, 2, 5, 10, 17, 26, 30, 35, 39, 42, 50, 51, 53, 59, 72, 79, 86
GH-B	β -jelly roll	7, 16
GH-C	β -jelly roll	11, 12
GH-D	(β/α) ₈	27, 36
GH-E	6-fold β -propeller	33, 34, 83
GH-F	5-fold β -propeller	43, 62
GH-G		37, 63
GH-H	(β/α) ₈	13, 70, 77
GH-I	$\alpha+\beta$	24, 46, 80
GH-J	5-fold β -propeller	32, 68
GH-K	(β/α) ₈	18, 20
GH-L	(α/α) ₆	15, 65
GH-M	(α/α) ₆	8, 48
GH-N	β -helix	28, 49

表 1-5 GH ファミリー

A. 立体構造が明らかになっているものを水色で、立体構造未知のものを灰色で示した。ピンクで示したものは、研究対象とした GH54 の酵素である。構造未知であった GH54 は、本研究により構造が明らかになった。

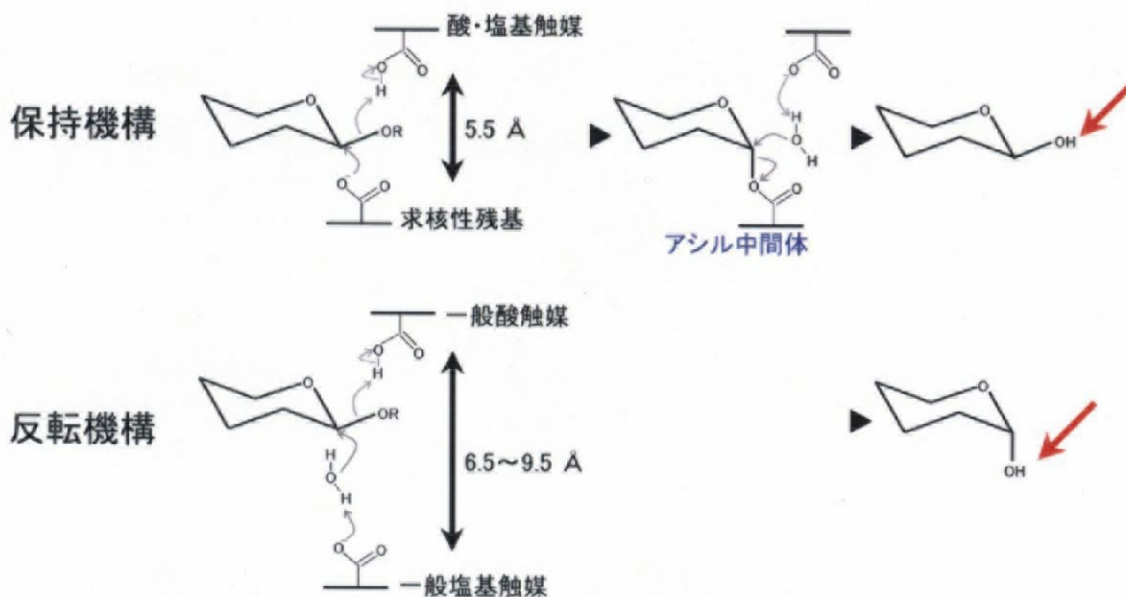
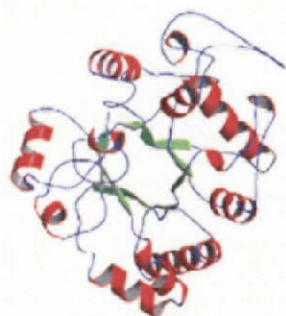


図 1-6 糖質加水分解酵素の 2 つの反応機構

アノマー保持機構とアノマー反転機構では、赤矢印で示したように生成物のアノマーの位置が異なる。

アノマー反転機構の場合は、間に水分子を挟むため、アノマー保持型機構に比べて、触媒残基間の距離が離れている。

アノマー保持型機構では、これら二つの触媒残基は必須である。ただ、酸・塩基触媒は解離した水分子が置き換わり得るため、酸・塩基触媒を変異させた場合、活性は大幅に減少するもののある程度は残る。



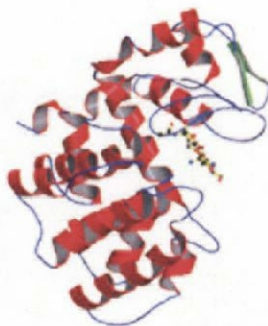
Clan GH-A
TIMバレル
GH17



Clan GH-C
Jelly roll
GH11



Clan GH-E
 β -プロペラ
GH33



Clan GH-I
 α / β
GH24

図 1-7 クランとそのフォールド

● ガラクトース ○ グルコース ■ マンノース □ キシロース ◆ ガラクツロン酸
 △ アラビノース ▲ ラムノース ● フェルラ酸 ◇ アセチル基

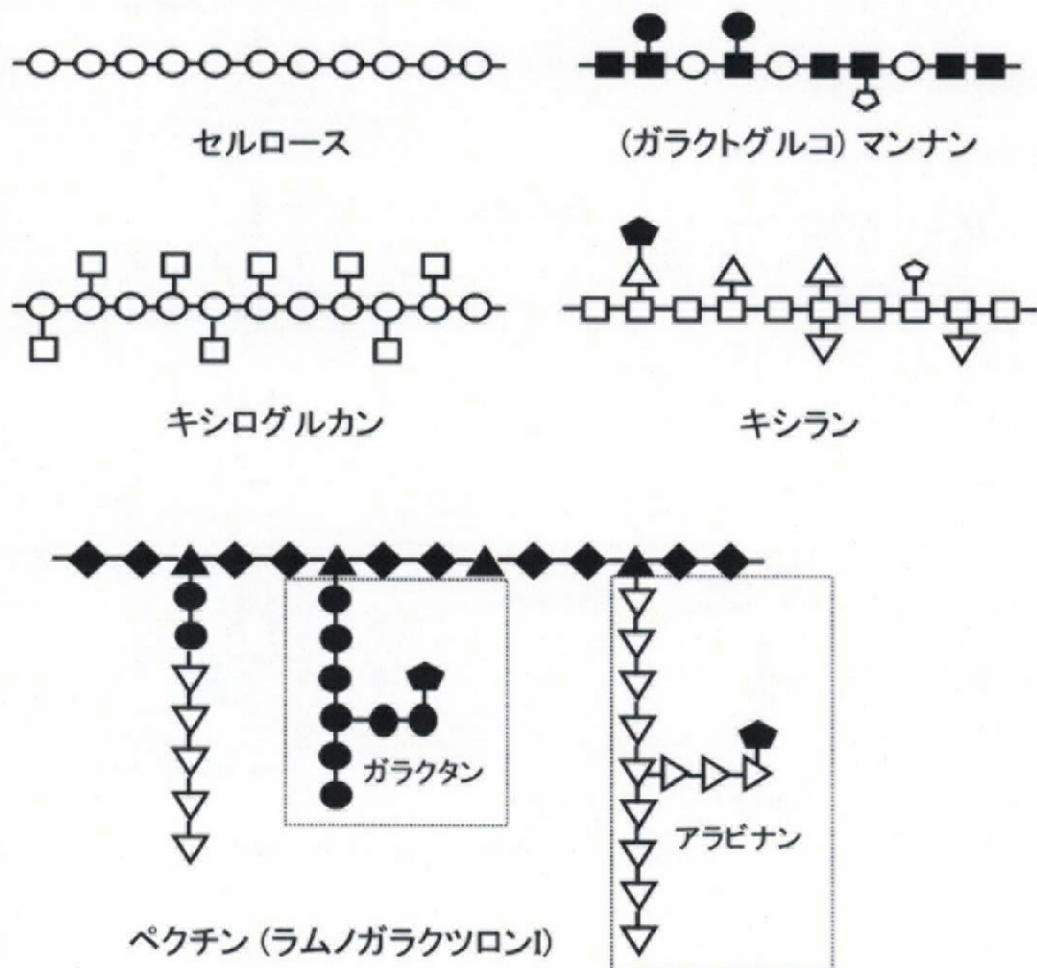


図 1-8 セルロースと様々なヘミセルロースとペクチンの構造

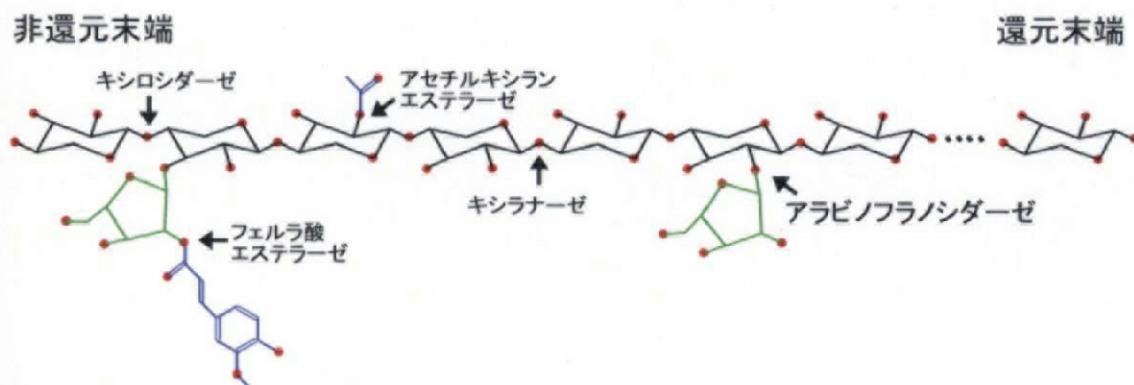


図 1-9 キシランの構造とそれを分解する酵素

主鎖の糖を黒で、側鎖の糖を緑で、糖以外の側鎖を青で示した。

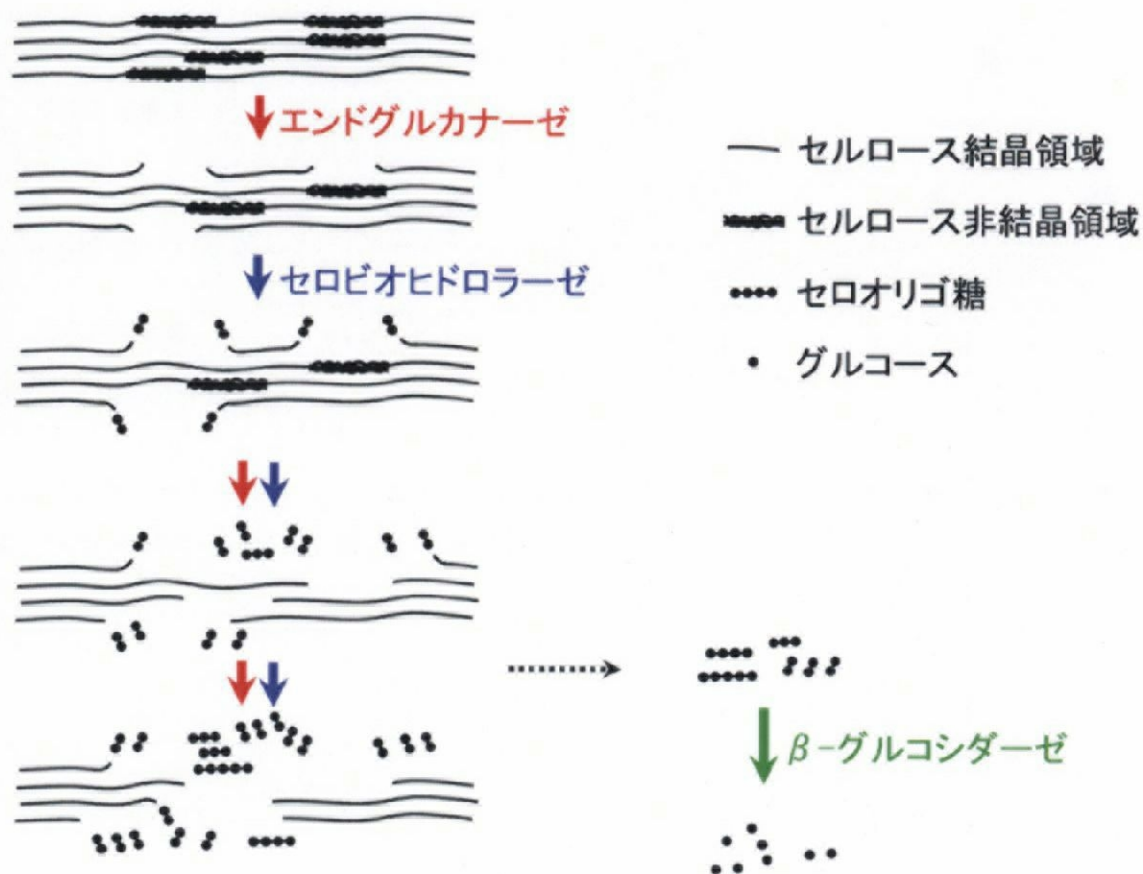


図 1-10 セルロース分解とそれに関わる酵素

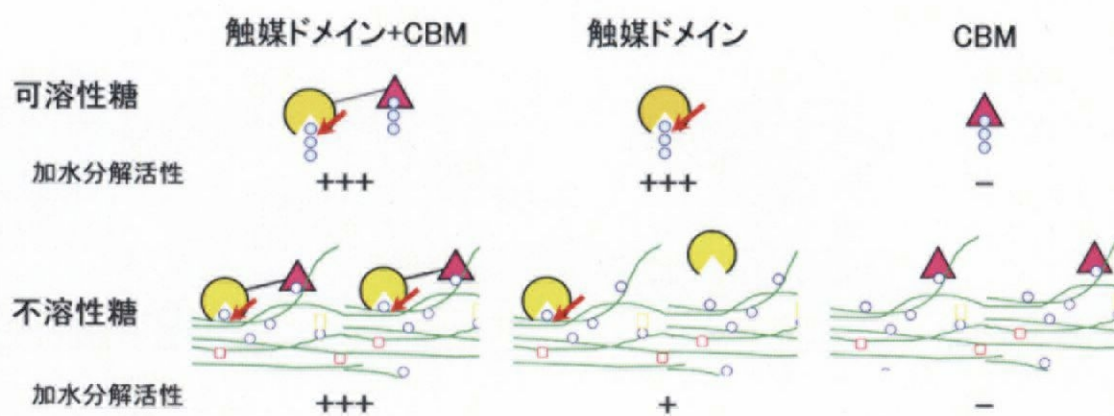


図 1-11 CBM の作用機構

可溶性の糖に対する活性は、CBM の有無は影響しない。しかし、不溶性の糖に対する活性は、CBM を持たない場合は活性が大幅に低下する。

A. CBM ファミリー

1	2	3	4	5	6		8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43							

B. CBM のフォールドによる分類

フォールド ファミリー	フォールド	ファミリー
1	β -sandwich	2, 3, 4, 6, 9, 15, 17, 22, 27, 28, 29, 32, 34, 36
2	β -trefoil	13
3	cysteine-knot	1
4	unique	5, 12
5	OB fold	10
6	hevein fold	18
7	unique contains hevein fold	14

C. CBM のタイプ分類

タイプ	フォールドファミリー	ファミリー
A	1, 3, 4, 5	1, 2a, 3, 5, 10
B	1	2b, 4, 6, 15, 17, 20, 22, 27, 28, 29, 34, 36
C	1, 2, 6, 7	9, 13, 14, 18, 32

表 1-12 CBM ファミリー

A. 立体構造が明らかになっているものを水色で、立体構造未知のものを灰色で示した。ピンクで示したものは、本研究により初めてその存在が明らかにされ、ファミリーが創設された CBM42 である。セルロース、ヘミセルロースに結合するものを太字で示す。

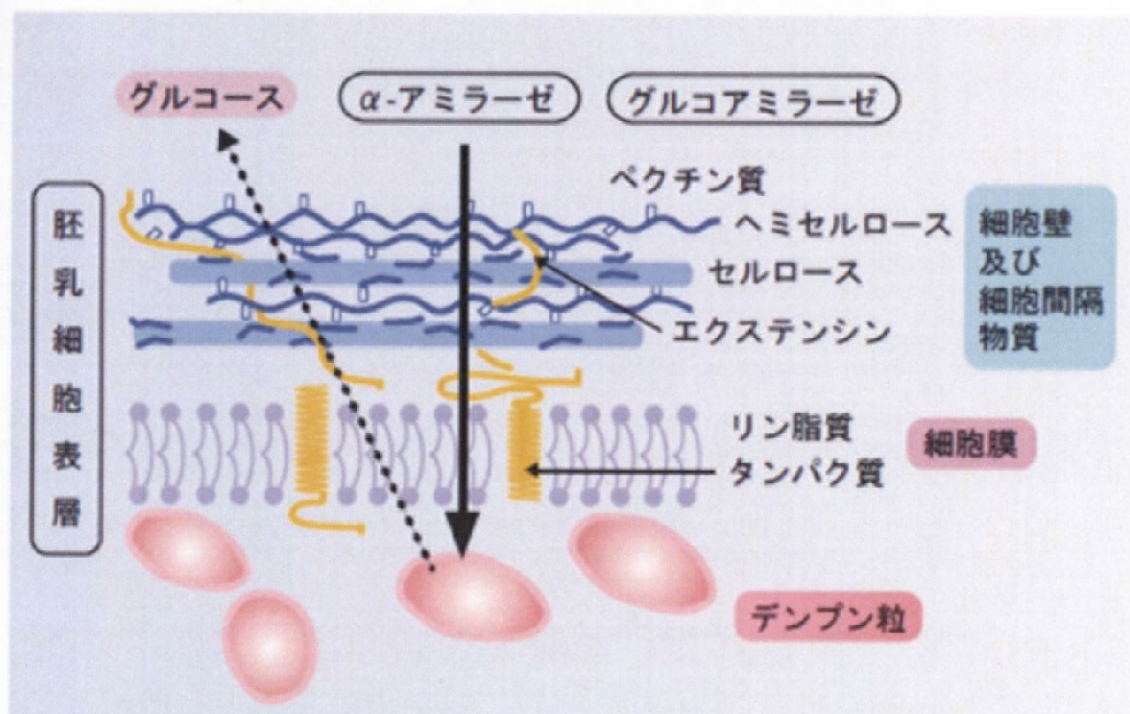


図 1-13 穀類の細胞表層構造の模式図

NRIB (酒類総合研究所広報誌) 第 6 号より抜粋した。

AkAbf54	471:ASNGGVQTFDSKTSFNNDVSFEIETAFAS	499
asp_nig2	471:ASNGGVQTFDSKTSFNNDVSFEIETAFAS	499
asp_orz	479:ASNGGVQTFDATTSFNDDVSWVSTGFA-	506
coch_carb	476:SSNGGVKDFDNVSSFNDITWLVESALA-	503
fusarium_oxy	472:SSNGGVHDWDAAKSFVDDVTFVVGFA-	499
peni_purp	479:ASNGGVDTFDATA SFNADVTVI STGFA-	506
	. ***** ..* **.* . .*	

図 1-14 GH54 酵素のアライメント

AkAbf54: *Aspergillus kawachii* IFO4308,

asp_nig2: *Aspergillus niger*,

asp_orz: *Aspergillus oryzae* HL15,

coch_carb: *Cochliobolus carbonum*,

fusarium_oxy: *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi,

peni_purp: *Penicillium purpurogenum*

AkAbf54 のシグナル配列の部分の配列を青で示した。

第 1 章の引用論文

- 1-1. Coutinho P. M., and Henrissat, B. (1999) *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat, and B. Svensson, eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12
- 1-2. Davies, G. and B. Henrissat, B. (1995) *Structure*, **3**, 853-859
- 1-3. McCarter, J. D., and Withers S. G. (1994) *Current Opinion Struct. Biol.* **4**, 885-892
- 1-4. Imamura, H., Fushinobu, S., Jeon, B. S., Wakagi, T., and Matsuzawa, H. (2001) *Biochemistry* **40**, 12400-12406
- 1-5. Vocadlo, D.J., Davies, G. J., Laineand, R., and Withers, S. G. (2001) *Nature* **412**, 835-838
- 1-6. Rajan, S. S., Yang, X., Collart, F., Yip, V. L., Withers, S. G., Varrot, A., Thompson, J., Davies, G. J., Anderson, W. F. (2004) *Structure* **12**, 1619-1629
- 1-7. Bortone, K., Monzingo, A. F., Ernst, S., and Robertus, J. D. (2002) *J. Mol. Biol.* **320**, 293-302
- 1-8. Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J., and Davies, G. (1995) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 7090-7094
- 1-9. McNeill, M., Darvill, A. G., Fry, S. C., and Albersheim, P. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 625-663
- 1-10. Kolpak, F. J., and Blackwell, J. (1976) *Macromolecules* **9**, 273-278
- 1-11. Puls, J., and Schuseil, J. (1993) *Hemicellulose and hemicellulases*, M.P. Coughlan and G.P. Hazlewood, eds., Portland Press, London, pp. 1-27
- 1-12. Rabinovich, M. L., Melnik, M. S., and Boloboba, A.V. (2002) *Appl. Biochem.Microbiol.* **38**, 305-321
- 1-13. Shallom, D., and Shoham, Y. (2003) *Current Opinion Microbiol.* **6**, 219-228

- 1-14. Gilbert, H. J., and Hazlewood, G. P. (1993) *J.Gen.Microbiol.* **139**, 187-194
- 1-15. Fushinobu, S., Hidaka, M., Honda, Y., Wakagi, T., Shoun, H., and Kitaoka, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 17180-17186
- 1-16. Lee, R. C., Hrmova, M., Burton, R. A., Lahnstein, J., and Fincher G. B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 5377-5388
- 1-17. Saha, B. C. (2000) *Biotechnol. Adv.* **18**, 403-423
- 1-18. Nagy, T., Emami, K., Fontes, C. M. G. A., Ferreira, L. M. A., and Gilbert, H. J. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 4925-4929
- 1-19. Sakamoto, T., and Kawasaki, H. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1621**, 204-210
- 1-20. Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., and Davies, G. J. (2004) *Biochem. J.* **382**, 769-781
- 1-21. Ogasawara, H., Takahashi, K., Iitsuka, K., Ito, K., and Ishikawa, T. (1991) *J. Brew. Soc. Jpn.* **86**, 304-307
- 1-22. de Vries, R. P., and Visser J. (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 497-522
- 1-23. de Groot, M. J. L., Prathumpai, W., Visser J., and Ruijter, G. J. G. (2005) *Biotechnol. Prog.* **21**, 1610-1616
- 1-24. Ito, K., Ogasawara, H., Sugimoto, T., and Ishikawa, T. (1992) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 547-550
- 1-25. Ito, K., Ikemasu, T., and Ishikawa, T. (1992) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 906-912
- 1-26. Ito, K., Iwashita, K., and Iwano, K (1992) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1338-1340
- 1-27. Fushinobu, S., Ito, K., Konno, M., Wakagi, T., and Matsuzawa, H. (1998) *Protein Eng.* **11**, 1121-1128

- 1-28. Ito, K.(1993) *J. Brew. Soc. Jpn.* **88**, 920-928
- 1-29. Koseki, T., Okuda, M., Sudoh, S., Kizaki, Y., Iwano, K., Aramaki, I., and Matsuzawa, H. (2003) *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 232-241
- 1-30. Ruijter, G. J. G., Vanhansen, S. A., Gielkens, M. M. C., van de Vondervoort, P. J. I., and Visser, J. (1997) *Microbiology* **143**, 2991-2998
- 1-31. Giellens, M. M. C., Gonzales-Candelas, L., Sanchez-Torres, P., van de Vondervoort, P., de Graaff, L., Visser, J., and Ramon, D. (1999) *Microbiology* **145**, 735-741
- 1-32. Kaneko, S., Arimoto, M., Ohba, M., Kobayashi, H., Ishii, T., and Kusakabe, I. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4021-4027
- 1-33. Hemova, M., Harvey, A. J., Wang, J., Shirley, N. J., Jones, G. P., Stone, B. A., Hoji, P. B., and Fincher, G. B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 5277-5286
- 1-34. Varghese, J. N., Hrmova, M., and Fincher, G. B. (1999) *Structure (Lond.)* **7**, 179-190
- 1-35. Pitson, S. M., Voragen, A. G., and Beldman, G. (1996) *FEBS Lett.* **398**, 7-11
- 1-36. Proctor, M. R, Taylor, E. J., Nurizzo, D., Turkenburg, J. P., Lloyd, R. M., Vardakou, M., Davies, G. J., and Gilbert, H. J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2697-2702
- 1-37. Nurizzo, D., Turkenburg, J. P., Charnock, S. J., Roberts, S. M., Dodson, E. J., McKie, V. A., Taylor, E. J., Gilbert, H. J. & Davies, G. J. (2002) *Nature Struct. Biol.* **9**, 665-668
- 1-38. Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Gilead-Gropper, G., Baasov, T., Shoham, G., and Shoham, Y. (2002) *FEBS Lett.* **514**, 163-167
- 1-39. Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Baasov, T., Shoham, G., and Shoham, Y. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43667-43673
- 1-40. Hovel, K., Shallom, D., Niefind, K., Belakhov, V., Shoham, G., Baasov, T., Shoham, Y., and Schomburg, D. (2003) *EMBO J.* **22**, 4922-4932

- 1-41. Nogawa, M., Yatsui, K., Tomioka, A., Okada, H., and Morikawa, Y. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3964-3968
- 1-42. Tsujibo, H., Takada, C., Wakamatsu, Y., Kosaka, M., Tsuji, A., Miyamoto, K., and Inamori, Y. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 434-438
- 1-43. Bolam, D. N., Xie, H., Pell, G., Hogg, D., Galbraith, G., Henrissat, B., and Gilbert, H. J. (2004) *J. Biol.Chem.* **279**, 22953-22963