

## 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

#### **4-A 序**

AkAbf54 の立体構造を明らかにしたところ、触媒ドメインとは別に C 末側に未知ドメインが見られた。アラビノースとの複合体構造をとったところ予想外なことにこのドメインにもアラビノースが結合した。そこでこのドメインをアラビノース結合ドメインと名づけた。

この章では、このアラビノース結合ドメインの構造、糖質結合ドメインとしての機能について記述する。このドメインのアラビノース結合に関与している残基の変異体を作成して機能を調べた。

#### **4-B 目的・材料・方法**

##### **4-B-1 アラビノース結合ドメインの解析**

明らかになった構造について、解析サーバーを通して、解析した。

用いた解析サーバーなどについて述べる。

##### 解析サーバー

第3章と同様に DALI、SCOP、MATRAS、CE を用いた。

##### 図の作成ソフト

第3章と同様に PyMOL、Molscript、Xtalview、Raster3D、ligplot を用いた。

##### **4-B-2 アラビノース結合ドメインの変異体作成**

###### **4-B-2-1 目的**

結果のところに記述するが、アラビノース認識に関わる Asp435 と Asp488 の変異体を作成した。

###### **4-B-2-2 材料**

菌株などは、第2章に示したものをを用いた。

##### 培地

培地の調製を次のように行い、以下の実験に用いた。LB 培地は大腸菌の培養に、他の培地は酵母の培養に用いた。YPD 培地はプレート培地に、BMGH 培地は酵母の前培養液に、BMMH 培地は酵母の本培養液にそれぞれ用いた。BMGH 培地、BMMH 培地は制限培地であり、グリセロールまたはメタノールを唯一の炭素源とする。

・ LB 培地

2.5% LB (Difco)

・ YPD 培地

1% Yeast extract (Difco)、2% Glucose、2% Peptone (Difco)

・ BMGH 培地

1% 硫酸アンモニウム、0.34% Yeast Nitrogen Base (Difco)、1% グリセロール、 $4 \times 10^{-3}\%$  Histidine、 $4 \times 10^{-5}\%$  Biotin、100 mM Potassium phosphate (pH 6.0)

・ BMMH 培地

1% 硫酸アンモニウム、0.34% Yeast Nitrogen Base (Difco)、0.5% メタノール、 $4 \times 10^{-3}\%$  Histidine、 $4 \times 10^{-5}\%$  Biotin、100 mM Potassium phosphate (pH 6.0)

培地はオートクレーブ滅菌またはフィルター滅菌したものを用いた。抗生物質は、ゼオシン (Invitrogen) を用いた。発現に使用したプラスミドにはゼオシン耐性遺伝子が含まれている。大腸菌の培養の際にはゼオシンを 25  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で、酵母の培養の際にはゼオシンを 100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加した。振盪培養は、東京大学農学部 2 号館地下の振盪培養室、および水槽式インキュベーター (TAITEC) を利用した。

#### 4-B-1-3 方法

##### プライマーの設計

部位特異的変異に関して、QuikChange 法により変異を導入することにした。方法は 2-3-1 と同じ。プライマーの設計を図 4-1 に示す。完成する変異体の模式図を図 4-2A に示す。

また、触媒ドメイン単独、AkCBM42 単独で発現させるため、その部分を PCR で増幅することにした。同じくプライマーの設計を図 4-3 に示す。触媒ドメインは 19-335、アラビノース結合ドメインは 336-499 の部分を増幅させることにした。

##### QuikChange

QuikChange 反応を行った。第 3 章と同じ方法で行った。

##### PCR と Ligation

PCR を行った。reaction buffer 2.5  $\mu\text{l}$ , template (pPICZ $\alpha$ C-AkAbf54) 0.5  $\mu\text{l}$ , プライマー-F (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , プライマー-R (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , dNTP 2.5  $\mu\text{l}$ , pfuTarbo 0.75  $\mu\text{l}$ , を混合し、滅菌水を加えて 25  $\mu\text{l}$  にした。

1 cycle (95°C 30 sec)  
 30 cycle (95°C 30 sec, 50°C 1 min, 72°C 90 sec)  
 1 cycle (72°C 7 min)

の条件で PCR Thermal Cycler PERSONAL (Takara) により PCR を行った。

反応液をアガロース電気泳動し、目的のバンド (図 4-4) を切り出した。PCR 産物及びベクター pPICZαC をそれぞれ *Cl*aI と *X*baI で 20 時間制限酵素処理した。エタノール沈殿を行い、滅菌水に溶解させた。PCR 産物とベクター量の比を 3:1 にし、Ligation high (Toyobo) を用い 15°C で 1 時間ライゲーション反応を行った。反応液で大腸菌 XL10-Gold 株 (Stratagene) を形質転換した。LB プレートに出てきたコロニーのうちの 3 個を取って 5 ml の LB 培地で培養した。プラスミド抽出 (QIAGEN Plasmid Miniprep Kit) を行い、得られたプラスミドをアガロース電気泳動することにより、インサートが挿入されているか確認した。得られたプラスミドが正しいものであるかどうか DNA シークエンサー CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter) を用いて DNA シークエンスを行うことにより塩基配列を確認した。

## 発現

*Pichia pastoris* GS115 株への形質転換、及び発現は 2-B-3 と同様に行った。

## DEAE-Sepharose

簡単にするため、精製をバッチ法で行った。

使用したバッファー：

バッファー A：20 mM Sodium Acetate (pH 5.5)

バッファー B：1.0 M NaCl, 20 mM Sodium Acetate (pH 5.5)

- ① 上清を MILLEX-GP 0.22 μm Filter Unit (MILLIPORE) を用いて微粒子を除去した。塩濃度が高くそのままでは DEAE-Sepharose に吸着しないので、バッファー A で 3 倍希釈した。
- ② DEAE-Sepharose のレジン (Amersham Pharmacia Biotech.) 約 20 ml をバッファー A で平衡化し、①の希釈した培養液と混合した。
- ③ 低温室で一時間程度攪拌した後、遠心し、沈殿したレジンを回収した。
- ④ レジンにバッファー B を加え、結合した AkAbf54 を溶出させた。遠心し、上清を得た。
- ⑤ 濃縮と透析を行った。

## 4-B-3 アラビノース結合ドメインの機能解析

### 4-B-3-1 目的

アラビノース結合ドメインの機能は、詳しく解析されていない。同じ GH54 に属する *Hypocrea jecorina* 由来のアラビノフラノシダーゼに C 末にキシラン結合能があることが示されているのみである。そこで、ITC やアフィニティゲル電気泳動などの手法を用いて機能解析を行った。また、アラビノオリゴ糖との複合体構造も得た。

#### 4-B-3-2 材料

##### 試薬

本研究に用いた試薬は、特に記さない限り、和光純薬工業株式会社、SIGMA の特級試薬を用いた。

##### 不溶性の糖基質 (図 4-5)

- sugar beet arabinan (側鎖にもアラビノースを含むアラビナン)
- sugar beet debranched  $\alpha$ -1,5-arabinan (側鎖にアラビノースを含まないアラビナン)
- oat spelt xylan (アラビノース含量 10%のキシラン)
- birchwood xylan (アラビノース含量 10%以下のキシラン)
- wheat arabinoxylan (アラビノース：キシロース=41：59 の割合のアラビノキシラン、フェルラ酸を含む)
- rye arabinoxylan (アラビノース：キシロース=49：51 の割合のアラビノキシラン)

を用いた。これらは全て megazyme から購入した。

また、アラビノース側鎖を持たない wheat arabinoxylan (arabinose-free wheat arabinoxylan) を作成した。wheat arabinoxylan (0.01 g) に AkAbf54 (0.2 U) を加え、45℃で一晩インキュベートし、沈殿部分を遠心で回収し、arabinose-free wheat arabinoxylan とした。

##### オリゴ糖リガンド (図 4-6)

- L-アラビノース
- アラビノトリオース
- メチル- $\alpha$ -L-アラビノフラノシド
- メチル- $\beta$ -D-キシロピラノシド
- キシロトリオース
- D-グルコース
- アラビノフラノシル- $\alpha$ -1,2-キシロピオース (AXX)

を用いた。

AXX は、wheat arabinoxylan (0.02 g) をキシロシダーゼ (0.2 U) とキシラナーゼ (0.2 U) により分解して、HPLC で分取したものを酒類総合研究所の小関博士に頂いた。

ITC は、酒類総合研究所にある VP-ITC (Microcal) を用いて実験を行った。

#### 4-B-3-3 方法

##### アラビノトリオースまたは AXX との複合体構造

10 mM アラビノトリオース溶液または 10 mM AXX 溶液に AkAbf54 の結晶を 30 分間 soaking した。この際にリガンドの加水分解を防ぐため、触媒残基を置換して活性を失った E221A 変異体の結晶を用いた。この soaking した結晶を用いて、第 2 章と同様に X 線回折強度データの収集、回折強度データの処理、精密化を行った。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 の実験ステーション BL5B と PF-AR の実験ステーション NW12 で行った。

##### 活性測定

- ・可溶性糖基質に対する活性測定

合成基質である pNPAF を用いた。測定法は、第 2 章と同じである。

- ・不溶性糖基質に対する活性測定

広島大学の三輪氏にお願いした。不溶性基質として wheat arabinoxylan を用いた。

- ① 1% wheat arabinoxylan 900  $\mu$ l (100 mM Sodium Acetate pH 4.0) を 40℃ で 5 分間ブレインキュベートした。
- ② 酵素溶液を 100  $\mu$ l 加え、反応を開始させた。40℃ で 20 分間インキュベートした。
- ③ 1 M NaOH を 1 ml 加え、反応を停止させた。
- ④ 反応停止後、1 M HCl を 1 ml 加え、溶液を中和した。その後、遠心し、その上清をフィルターに通した。
- ⑤ HPAEC-PAD 法 (図 4-7) により生成物であるアラビノースの遊離量を測定した。測定機器は Dionex DXc-500 system (Dionex) を用いた。カラムは Carbo Pac PA1 anion-exchange column を用いた。1  $\mu$ mol のアラビノースの生成する活性を酵素の 1 unit とする。

##### 不溶性糖基質に対する結合測定 (図 4-8)

・ AkAbf54 Enzyme : AkAbf54 の各種変異体、1 mg/ml の濃度で 50 mM Sodium acetate (pH 5.5) に溶かしてある。

E221A、E221A/D435A、E221A/D488A、E221A/D435A/D488A

・ 不溶性糖基質 : 基質には以下の 4 種類の不溶性キシラン oat spelt xylan、birchwood xylan、wheat arabinoxylan、arabinose-free wheat arabinoxylan を用いた。

・ 阻害実験に用いたオリゴ糖 : L-アラビノース、アラビノトリオース、D-キシロース

- ① 2%不溶性糖基質 60  $\mu$ l と AkAbf54 溶液 30  $\mu$ l を混合した。阻害を調べる実験では、ここにオリゴ糖 5 mM または 100 mM の濃度になるように加えた。一時間、氷上で静置し、何回か攪拌した。
- ② 静置後、遠心 (15,000  $\times$ g, 5 min) を行った。沈殿を吸い取らないように注意しながら、上清を除いた。沈殿には不溶性糖基質とそれに結合した AkAbf54 が含まれており、上清には不溶性糖基質に結合していない AkAbf54 が含まれているはずである。
- ③ 次に沈殿に 20 mM Sodium Acetate (pH 5.5) 250  $\mu$ l を加え、遠心 (15,000  $\times$ g 1 min) して上清を取り除いた。この洗いの作業を 2 回繰り返した。このステップは結合していない AkAbf54 を完全に取り除くために行った。
- ④ 沈殿を 10% SDS 溶液 10  $\mu$ l に懸濁し、10 分間 boil した。遠心 (15,000  $\times$ g, 1 min) して上清を得た。結合していた AkAbf54 が上清に遊離してくるはずである。上清を等量の Sample buffer と混ぜ、SDS-PAGE に load した。

#### アフィニティゲル電気泳動

アフィニティゲル電気泳動は糖とタンパク質の相互作用を見る方法である。原理を図 4-9 に示す。酒類総合研究所の小関博士に実験を行っていただいた。方法、用いたサンプルを以下に示す。

- ・ AkAbf54 Enzyme : AkAbf54 の各種変異体 8  $\mu$ g  
野生型、D435A、D488A、D435A/D488A、BSA (相互作用しないネガティブコントロール)
- ・ 不溶性糖基質 : 基質には以下の 4 種類の糖を用いた  
sugar beet arabinan, sugar beet debranched  $\alpha$ -1,5-arabinan, wheat arabinoxylan, rye arabinoxylan

- ① SDS を含まないアクリルアミドゲルを作成した。アクリルアミド濃度は 7.5% (w/v) であり、25 mM Tris/250 mM glycine バッファーを用いて pH は 8.3 とした。コントロールとしてリガンドを含まないゲルを一枚作成、そのほかのゲルにはゲル重合させる前に一種類の不溶性糖を 0.1% (w/v) の濃度で加えた。
- ② 20 mA/gel で 1 時間、室温で泳動した。
- ③ タンパク質の移動度をみて、糖との相互作用の度合いを見積もった。

#### ITC (等温滴定カロリーメトリー)

測定は VP-ITC system (MicroCal) を用いて、標準プロトコルに従い行った。温度は 25°C で行った。原理などを図 4-10, 11 に示す。

用いたタンパク質及びリガンドは以下のとおりである。なお、活性中心に結合して熱が発生するのを防ぐため、主に Glu221 をアラニンに変異させたものを用いた。

- ・ AkAbf54 Enzyme : 野生型、E221A、E221A/D435A、E221A/D488A、E221A/D435A/D488A
- ・ 糖リガンド : L-アラビノース、アラビノトリオース、メチル- $\alpha$ -L-アラビノフラノシド、

メチル-β-D-キシロピラノシド、キシロトリオース、D-グルコース

- ① タンパク質を 30 mg/ml 程度に濃縮した。タンパク質は、20 mM Sodium Acetate pH 5.5 に透析した。リガンドも同じバッファーで溶解または希釈した。同じバッファーを用いるのは、希釈熱を最小にするためである。
- ② 適当な濃度 (0.1~0.6 mM) のタンパク質のサンプルを 1.4 ml reaction cell に入れた。タンパク質サンプルは、測定中は 300 rpm の回転数で攪拌し続けた。適当な濃度 (2.0~12.5 mM) の糖リガンドを 300 μl 程度シリンジに入れた。
- ③ リガンドを 150 秒間隔で 10 μl ずつ inject (時間は 10 秒) した。これを 25 回繰り返した。
- ④ 発生した熱を積分し nonlinear regression (MicroCal Origin, version 4) で分析した。フィットしたデータにより結合定数 ( $K_a$ )、タンパク質 1 個あたりの結合サイト数 ( $n$ )、結合エンタルピー ( $\Delta H$ ) が求まる。他のパラメーターは、 $-RT\ln K_a = \Delta G = \Delta H - T\Delta S$  により計算した。

## 4-C 結果と考察

### 4-C-1 アラビノース結合ドメインの構造と CBM42 への分類

#### アラビノース結合ドメイン

C 末アラビノース結合ドメインは、β-トレフォイルフォールドをとっていた。DALI によるアラビノース結合ドメインと類似のフォールドを持つタンパク質の検索の結果 (表 4-12)、CBM13 と構造的な相同性があった (図 4-13A)。CBM13 は、レクチングループと酵素グループに分けられる。レクチングループは、2つの糖結合能を持つドメインを含み、ガラクトースまたは N-アセチルグルコサミンを特異的に結合する。酵素グループは、一つの糖結合能を持つドメインを持っており、リガンド特異性は様々である。AkAbf54 はレクチングループの *Amaranthus caudatus* のアグルチニンと一番よく似ていた。164 残基中 157 残基が重なり、その Cα RMSD<sup>20)</sup>は 2.7 Å (DALI Z-score=15.1) であった。酵素グループでは、*Streptomyces lividans* 由来キシラナーゼの持つ CBM13 とよく似ており、RMSD は 1.9 Å であった (DALI Z-score=13.9)。

#### ・CBM13 との共通点

それぞれ約 50 アミノ酸から構成される 3 回の繰り返しアミノ酸配列 (α : 348-399、β : 400-446、γ : 447-499) から成り、そのα-サブドメイン、β-サブドメイン、γ-サブドメインが擬似 3 回対称軸を持っていた (図 4-13A)。それぞれのサブドメインが 4 つのβ-ストランドと 1 つのα-ヘリックスと 2 つのβ-ヘアピンを持っている。サブドメイン同士は構造的な類似性があり、Cα RMSD<sup>20)</sup>は、α-β間で 1.55 Å、β-γ間で 1.85 Å、γ-α間で 3.35 Å であった (図 4-14)。ただし、サブドメイン間のアミノ酸配列の相同性は比較的低く、3 つのサブドメイン間にわ



たって保存されているアミノ酸残基はほとんどなかった。さらに、フォールドの中心に各サブドメインのトリプトファンやフェニルアラニンやロイシンやイソロイシンといった疎水性残基の側鎖が集まって疎水コアを形成していた (図 4-15)。他の GH54 酵素中でもこの疎水コアを形成すると思われる残基はそれら 4 つのアミノ酸で保存されていた。これらは、CBM13 でも特徴的なものである。

#### ・CBM13 との相違点

しかし、AkAbf54 のアラビノース結合ドメインには CBM13 と比較していくつかの違いが見られた。CBM13 は各サブドメインに 2 つずつ G-X-X-Q-X-W モチーフを持つという特徴がある[4-1] (図 4-13B)。グルタミンはリガンド結合に重要な働きをし、トリプトファンは疎水コアの形成に関わっているとされている。しかし、アラビノース結合ドメインはこのモチーフを持っていない。また、CBM13 とはアミノ酸配列上の相同性がほとんどない (*S. lividans* CBM13 とのアミノ酸配列の相同性は 4.5%しかない)。また、CBM13 で比較的良好に見られる 3 つのジスルフィド結合の場所にはチロシンなどの疎水的な残基が来ており一致しなかった (図 4-15)。AkAbf54 のアラビノース結合ドメインに見られるジスルフィド結合 (Cys401-Cys439) はβサブドメインの表面部分に位置しており、場所が異なっていた。また、後述するように、これまでに報告されている CBM13 の糖結合部位とアラビノース結合ドメインの糖結合部位は異なっていた。

#### ・アラビノース結合ドメインの CBM42 への分類

以上のことからこのアラビノース結合ドメインがCBM13とは異なる性質を持っていることが分かった。このことからこのアラビノース結合ドメインは、Henrissat らにより新たなCBM42に分類された。以下、このアラビノース結合ドメインのことを AkCBM42 と表記する。

#### AkCBM42 のアラビノース結合サイト

AkCBM42 の 2 つのアラビノースは、β-サブドメインのポケット、γ-サブドメインのポケットに結合していた (図 4-16)。もうひとつの側面であるα-サブドメインのポケットには結合していなかった。結合しているアラビノースは両方とも O1 原子が表面溶媒領域に向いており、キシラン主鎖についた状態のまま認識できるのではないかとと思われる。

#### ・アラビノースの認識

β-サブドメイン、γ-サブドメインのサイト共にアラビノースの認識様式はほぼ同じであった (図 4-14, 17)。β-サブドメイン、γ-サブドメインのそれぞれのサイトに 1 つずつアスパラギン酸 (Asp435, Asp488) がある。これらの酸性残基はアラビノースの O2 原子と O3 原子を水素結合により認識していた。またヒスチジン残基 (His416, His463) がそれぞれ O5 原

子と水素結合をしていた。また、二つのチロシン残基 (Tyr417 と Tyr456、Tyr464 と Tyr359) によりスタックされるように疎水相互作用していた。チロシン残基の片方は、隣のサブドメインから来ているものであった。また、 $\beta$ -サブドメインと $\gamma$ -サブドメインを重ね合わせてみたところ、アラビノース及びそれを認識しているアスパラギン酸、ヒスチジン及び二つのチロシンはほぼ完全に重なった (図 4-14)。 $\alpha$ -サブドメインポケットに関しては、アスパラギン酸がグルタミン酸へ、二つのチロシンが両方ともスレオニンに変化しておりアラビノースが結合できる環境になっていないため、結合できなかったのだろう (図 4-13)。

#### ・CBM13 との糖リガンド部位の比較

CBM13 の複合体構造がいくつか報告されている。レクチングループでは *Ricinus communis* 由来の ricin toxin B-chain (RTB) のラクトース複合体構造が報告されている[4-2]。RTB は 3 つのガラクトース結合サイトを持っていた。酵素グループでは *S. olivaceoviridis* E86 由来のキシラナーゼの CBM13 の複合体構造[4-3]及び *S. lividans* 由来 xylanase 10A の CBM13 の複合体[4-4]が報告されており、キシロースやラクトースなどの糖リガンドは RTB と同様な位置に結合した。これらと比較すると、AkAbf54 は糖結合サイトの位置が 8 Å 程、隣のサブドメイン方向に移動しており、その周辺の構造は異なっていた (図 4-18)。

#### AXX との複合体構造

AkCBM42 の糖結合様式を明らかにするため、AkAbf54 (E221 変異体) と AXX との複合体構造を分解能 2.3 Å で得た (表 4-19)。精密化したモデル分子を PDB に登録した (PDB code: 2D44)。複合体構造は、native 構造とよく似ていた。

アラビノース複合体構造と同様に、AkCBM42 には AXX は、 $\beta$ -サブドメインと $\gamma$ -サブドメインのポケットに観察された (図 4-20, 21)。一方、活性中心には、AXX に相当する電子密度は観察されなかった、これはおそらく E221A 変異によるものだろう。AXX の各糖を Ara1、Xyl1 (非還元末端側、2 位にアラビノースが結合)、Xyl2 (還元末端側) とする。各サブドメインにおいて、それぞれの結合サイト共にアラビノース部位が中のポケットに入っており、キシロピオース部位は、溶媒中に出ていた。AkCBM42 は、結合サイト付近にキシラン主鎖を結合できるようなクレフトを持っていないようである。

Ara1 の認識は、アラビノース複合体のものと同じであった。つまり、アスパラギン酸とヒスチジンとチロシンにより認識されていた。Asp435 と Asp488 は、アラビノースの O2 原子及び O3 原子と 2 つの水素結合を形成していた。この相互作用が特に糖基質の認識に重要であると思われる。他にも His416 と His463 は O5 原子と水素結合していた。あと、2 つの Tyr がはさむように stacking 相互作用していた。

一方、主鎖の糖にあたるキシロピオース部分に関しては、少し電子密度が乱れていた、おそらく AkCBM42 と相互作用が弱いためだろう。Xyl1 は、全く相互作用していなかった。また Xyl2 は AkCBM42 と水素結合 1 つ及び弱い疎水相互作用しかしていなかった。 $\beta$ -サブ

ドメイン及び $\gamma$ -サブドメインに結合した XylI の O1 原子はそれぞれ Pro142、Asn466 と水素結合していた。この相互作用の仕方では、XylI の O1 原子からキシラン主鎖は先に伸びない (図 4-21) ため、このキシロピオース部位の認識は非特異的な認識かもしれない。主鎖単独でどのように結合するかを、キシロース複合体構造、キシロオリゴ糖複合体構造を決定して調べたが、リガンドが結合していなかった。このことから、本来のキシラン主鎖は違う形で結合しているのかもしれない。更にキシロース単位の長いアラビノキシロオリゴ糖を用いれば、正しい結合が分かるのかもしれないが、得ることができなかったため、試すことができなかった。キシラン主鎖が結合に関わるかについては、後の ITC など述べる。

#### アラビノトリオースとの複合体構造

アラビノトリオースとの複合体構造も分解能 2.8 Å で得た (表 4-19)。精密化したモデル分子を PDB に登録した (PDB code: 2D43)。複合体構造は、native 構造とよく似ていた。

##### ・アラビノトリオースの認識

AXX との複合体構造のように、AkCBM42 にはアラビノトリオースは、 $\beta$ -サブドメインと $\gamma$ -サブドメインのポケットに観察された (図 4-22)。アラビノトリオースの各糖を非還元末端から還元末端側へ Ara1、Ara2、Ara3 とする。両者とも、Ara1 がサブドメインポケットと相互作用しており、Ara2 は溶媒中に露出していた。Ara2 は、AkCBM42 とは全く相互作用してなかった。Ara3 の部分の電子密度は観測されなかった。このように、AkCBM42 はアラビノトリオースの非還元末端の糖である Ara1 のみを認識していた。

### **4-C-2 AkCBM42 (アラビノース結合ドメイン) の機能解析**

#### 変異体、触媒ドメイン単独、アラビノース結合ドメイン単独での発現

変異体については、全て発現に成功した (図 4-2B)。しかし、触媒ドメイン単独、アラビノース結合ドメイン単独での発現には成功しなかった。第 3 章で述べたように触媒ドメインとアラビノース結合ドメインは密接に相互作用しあっている。どちらか片方がないと、うまくフォールディングしないまたは不安定なことが考えられる。そのため、発現しなかったのだろう。

#### 活性

AkAbf54 は、可溶性アラビノース糖及び不溶性アラビノース糖両方に活性を示す。可溶性合成基質 pNPAF に対する活性は、31 U/mg であった。不溶性の wheat arabinoxylan に対する活性は、低いものの 0.041 U/mg を示した (表 4-23)。

上に述べたように、Asp435 と Asp488 は、アラビノキシランのアラビノース側鎖と 2 つの水素結合を介して相互作用しているため、これらの残基を変異させて、可溶性オリゴ糖と

不溶性糖に対する活性がどう変化するかを見た。

- ・可溶性の糖に対する活性

可溶性の糖 pNPAF に対する活性は、野生型と比較してどの変異体も同様な活性を示した (表 4-23、図 4-24)。このことはアラビノース結合ドメインが、可溶性糖基質に対しての触媒活性に特に関係していないことを示している。

- ・不溶性の糖に対する活性

一方で、不溶性の糖 wheat arabinoxylan に対する活性は、野生型と比較して大幅に低下した。2 つの結合ポケットのうちひとつのアスパラギン酸残基の変異体でさえも、それぞれ D435A 変異体は 21.4%、D488A 変異体は 12.2%と大幅に減少した (表 4-23、図 4-24)。2 つの結合ポケットの両方のアスパラギン酸残基を変異させた D435A/D488A 変異体では、2.0%と相乗的に活性が低下した。これらの結果は、AkCBM42 が不溶性基質に対する活性を助けていることを示している。そして、Asp488 を変異させた方が活性の低下が大きいことから、 $\gamma$ サブドメインポケットの方が活性に対する補助が大きいといえる。

*Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) PC-3-7 由来の GH54 アラビノフラノシダーゼは、C 末に 18 kDa のペプシンによって切り離せる非触媒のキシラン結合ドメインを持っていることが報告されている[4-5]。ペプシン処理分解を行うと、oat spelt xylan に対する活性が 2.3%と大幅に減少した。この活性の下がり方は D435A/D488A 変異体と同程度であった。

### 不溶性キシランとの結合能

*H. jecorina* PC-3-7 由来のアラビノフラノシダーゼの CBM42 はすでに、oat spelt xylan に結合することが示されている[4-5]。AkCBM42 の不溶性糖に対する結合能の定性的な分析を行った。

- ・各種不溶性糖に対する結合能

AkAbf54 は wheat arabinoxylan に結合した (図 4-25)、しかし、oat spelt xylan や birchwood xylan にはほとんど結合しなかった。oat spelt xylan や birchwood xylan のアラビノース含量が 10%以下であり、wheat arabinoxylan のアラビノース含量が 41%であることを考慮に入れると、AkCBM42 は、側鎖アラビノースを豊富に含む wheat arabinoxylan を好んで結合すると考えられた。そこで、AkCBM42 の結合における側鎖アラビノース量の重要性を調べるため、側鎖アラビノースを取り除いた arabinose-free wheat arabinoxylan を用いて Binding assay を行った。AkAbf54 は、この arabinose-free wheat arabinoxylan には全く結合しなかった (図 4-25B)。このことは AkCBM42 が arabinoxylan の側鎖アラビノース部位のみを認識していることを示している。

- ・各種オリゴ糖存在下での結合能の阻害

100 mM L-アラビノース、5 mM アラビノトリオース存在下では、アラビノキシラン結合が阻害された (図 4-26)。アラビノースがポケットに入り込んで競合阻害を起こしているのだろう。100 mM D-キシロース存在下では特に結合は阻害されなかった。

- ・変異体の wheat arabinoxylan に対する結合能

各サブドメインポケットが、AkCBM42 のアラビノキシラン結合にどう影響するかについて評価するため、Asp435 と Asp488 を変異させて、Binding assay を行った。E221A/D435A、E221A/D488A 変異体は、E221A と比較して明らかに wheat arabinoxylan に対する結合が減少した (図 4-27)。さらに、E221A/D435A/D488A 変異体は、全く wheat arabinoxylan に結合しなかった。これらの結果は、Asp435 と Asp488 が AkCBM42 のアラビノキシランとの相互作用に重要な役割を果たしていることを示している。また、結合測定におけるこれらの結果は、活性における結果と相関を示した。

#### アフィニティゲル電気泳動

アラビナンやアラビノキシランを加えたゲルで泳動を行い、移動度が変化するかを調べた。また、変異体でも行った。

- ・arabinan と debranched arabinan

側鎖アラビノース糖を含む arabinan に対しては野生型で移動度の変化が認められたが、側鎖アラビノースを持たない debranched arabinan に対しては野生型でも移動度の変化が認められなかった (図 4-28)。

- ・wheat arabinoxylan と rye arabinoxylan

wheat arabinoxylan は側鎖アラビノース含量 41%、rye arabinoxylan は側鎖アラビノース含量 49% と高いアラビノース含量を示す。野生型で特に側鎖に含まれるアラビノース量が 49% と多い rye arabinoxylan ではとくに大きな移動度の変化を示した (図 4-29)。

- ・rye arabinoxylan での野生型と変異体での泳動度の比較

D435A 変異体は野生型と比較して移動度の変化が小さくなった (図 4-29)。ただ、コントロールと比較すると確かに移動度が変化している。一方、D488A 変異体はコントロールと比較して、全く移動度が変化しなかった。D435A/D488A 変異体でも同様に変化しなかった。D488A 変異体では全く移動度が変化しなかったことから、Asp488 がアラビノキシランなどとのアフィニティに大きく寄与していることが示された。D435A 変異体でも移動度の変化が小さくなったことから、Asp435 が Asp488 ほどではないが、少しはアフィニティに寄与していることが示された。

## ITC

AkCBM42 のリガンドの特異性を詳細に調べるため、ITC を用いて、アラビノース糖やキシロース糖に対する結合力を測定した。測定結果をまとめて、表 4-30 に示す。野生型で測定したところ、解釈不能な熱が発生した (図 4-31)。そこで E221A 変異体を主に用いた。

### ・各種糖に対するアフィニティ

E221A 変異体のアラビノースの結合力は弱すぎて正確に程度を測ることができなかった (図 4-31)。この原因として、アラビノースは溶液中ではほとんどピラノース型で存在していることが考えられる[4-6] (表 1-2)。そこで、完全にフラノース型で存在しているメチル- $\alpha$ -L-アラビノフラノシドを用いて、結合力を測定した。タンパク質濃度を 0.6 mM (30 mg/ml) という高い濃度にして測定したものの、結合力が弱く ( $c$  値が 1 程度)、他の報告で見られるようなシグモイダル状のカーブ (図 4-11) を描かなかった。そのため、やや信頼できない値であるが、結合定数は  $1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  程度と求められた (図 4-32)。この結合力は他のオリゴ糖と CBM 間で報告されている結合力より低い値であった。メチル- $\alpha$ -L-アラビノフラノシドの E221A への結合化学量 ( $n$ ) は約 2 であり、これは 2 つのリガンドが 1 つの AkCBM42 に結合したことを示した。

アラビノトリオースもメチル- $\alpha$ -L-アラビノフラノシドと同様の結合力 ( $K_a = 1.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) を示した (図 4-32)。この結果は、末端のアラビノース部分のみを認識していることを示す。アラビノトリオースとの複合体構造を見ても、末端のアラビノース糖一糖のみを結合ポケットで認識しており (図 4-22)、この結果と一致した。

E221A 変異体は、メチル- $\beta$ -D-キシロピラノシド及びキシロトリオースとは結合しなかった (図 4-33)。このことは、AkCBM42 がキシラン主鎖結合サイトを持ってないことを示している。

### ・変異体のアラビノース糖に対するアフィニティ

両方のアスパラギン酸をアラニンへ変異させた E221A/D435A/D488A 変異体は、メチル- $\alpha$ -L-アラビノフラノシド及びアラビノトリオースは結合しなかった (図 4-34)。これは、2 つの変異が結合サイトをなくしたことを示している。片方のみのアスパラギン酸を変異させた (結合サイトが片方残っている) 場合は、同様の結合力を示した (図 4-34)。メチル- $\alpha$ -L-アラビノフラノシドの E221A への結合化学量 ( $n$ ) は約 1 であり、これは 1 つのリガンドが 1 つの AkCBM42 に結合したことを示した。

## 4-C-3 AkCBM42 に関する考察

### 明らかにした CBM42 の性質

CBM42 についての考察をする前に、機能解析の結果明らかになったことをまとめておく。

- ・二つの結合サイトを持つ。
- ・ヘミセルロースの側鎖の糖アラビノースに結合する。
- ・二つの結合サイトによる結合が触媒ドメインの活性に必須である。
- ・一糖のみを認識するため、結合力が比較的弱い。

### 二つの結合サイトの差異

ITC 測定の結果から、二つのサブドメインポケットはアラビノースオリゴ糖に対してほぼ同じアフィニティを示すことがわかった。ただ、アフィニティゲル電気泳動や活性測定の結果から、不溶性の糖に対する相互作用や加水分解活性に対しては、その影響が等価ではないことが示された。この理由としては二つのサブドメインポケット周辺の環境が異なっていることが挙げられる。 $\beta$ -サブドメインポケットはくぼんだ位置にあるのに対して、 $\gamma$ -サブドメインポケットは溶媒に少しでているような位置に存在している (図 4-35)。つまり、 $\gamma$ -サブドメインポケットの方が、キシラン主鎖に修飾されているアラビノース側鎖を結合しやすい環境にあるといえる。

### 可溶性基質と不溶性基質

可溶性の糖基質は、溶液中を動き回っているため、活性中心に基質が入りやすく、反応が進みやすい。しかし、アラビノキシランのような不溶性の糖基質は、図 1-11 に示すように一箇所に固まって存在していると考えられ、CBM の助けを借りないと活性中心に基質が入りにくく反応が進みにくい。AkCBM42 は、その表面、または表面から出ているアラビノキシラン鎖に結合すると考えられる。詳しくは側鎖認識機構の項で述べる。

### 主鎖認識機構と側鎖認識機構

これまで、ヘミセルロースの主鎖を認識する CBM は報告されてきたが、側鎖を認識するような CBM は報告されてこなかった。

#### ・主鎖を認識する CBM (図 4-36A)

アモロファスセルロースやキシランなどと結合する CBM は、主鎖の糖と結合できるようなクレフトを持っている。例えば、*Pseudomonas cellulosa* 由来のキシラナーゼ Xyn10C の持つ CBM15 は、キシロペンタオース ( $X_5$ ) 複合体構造が明らかになっており、主鎖部分のみを認識していることが分かっている[4-7]。側鎖が付く可能性のある O2 と O3 が溶媒に露出しており、側鎖があっても結合できるようになっている。最近側鎖の糖が修飾したオリゴ糖との複合体構造が報告されてきた。*Thermotoga maritima* のマンナーゼの持つ CBM27 は、マンノヘキサオース ( $M_6$ ) には非常に高い親和性を示した[4-8]。しかし、ガラクトースが 2 つ側鎖として結合したガラクトマンナン ( $G_2M_5$ ) は非常に親和性が低下した。複合体構造で

は、ガラクトースのうちひとつは溶媒中に出ていたが、もうひとつがトリプトファン残基により不自然な構造を取らされていた。また、*Streptomyces olivaceoviridis* E86 由来 CBM13 とアラビノース-キシロオリゴ糖及びメチルグルクロン酸-キシロオリゴ糖の複合体構造が報告された[4-9]。アラビノースは結合サイトと反対側にあり CBM13 と弱い相互作用していなかった。また、メチルグルクロン酸は溶媒に出ており、CBM13 との相互作用がなかった。このように、これらの CBM は、ある程度側鎖に修飾された主鎖でも、糖の主鎖のみを認識し、側鎖の糖を溶媒側に出すことにより結合することができる。ただ、側鎖があまりにも多種多様に修飾していると結合には不利になる。

#### ・側鎖を認識する CBM (図 4-36B)

一方、側鎖の糖を認識する CBM というのは、これまで報告されてこなかった。CBM42 は、本研究で行った構造解析及び機能解析からヘミセルロースの分岐した側鎖を認識する機構を持っていることが明らかになった。AkCBM42 は他の主鎖を認識する CBM より比較的低い親和性を持っていた、これはたった一糖のみを認識する機構のためである。この低い親和性は、AkCBM42 が結合したアラビノキシランから反応が終わった後に簡単に離れることができることを意味している。もし、AkCBM42 が高い親和性を持っていたなら、AkAbf54 は加水分解反応の後でさえも不溶性糖に結合した状態が続き、次の反応のために移動することができないだろう。

AkAbf54 は、結合と解離を繰り返しながら側鎖アラビノースが豊富な不溶性ヘミセルロースの近傍に存在するのではないだろうか (図 4-37)。近傍に存在し続けることにより、触媒ドメインの活性中心がアラビノース側鎖を捕らえる確率が上昇し、反応を進みやすくなっているのではないかと考えられる (近接効果)。十分に近傍に存在し続けるためには、二つのポケットが必要だと考えられる。

これまで、このような側鎖を認識するタイプのものが報告されてこなかった原因として、CBM42 の他にほとんど存在していないことも十分に考えられる。しかし、本当はそのようなタイプは多く存在するが、結合力が弱いため、いままで発見されていないだけかもしれない。

この側鎖のみを認識するという機構は、主鎖のみを認識する機構と比較して、側鎖の付いた基質のみを選択的に結合し反応を進めることができるという点で、有利であると考えられる。もし、糖側鎖を分解する酵素が主鎖を認識すれば、側鎖がすべてなくなった糖にも結合してしまい、分解効率が落ちる場合がある。

#### アラビノフラノシダーゼの持つ CBM

GH43 の一部と GH54 はアラビノース側鎖を認識する CBM42 を持っており、GH62 の一部は、キシラン主鎖を認識する CBM2 または CBM13 または CBM35 を持つことが報告されている。



- GH3

特に CBM を持つものは報告されていない。

- GH43

*Streptomyces avermitilis* 由来の GH43 遺伝子 (SAV1043) が、そのアミノ酸配列から C 末側に CBM42 を持っていることが予想される (図 4-38)。アラビノース結合に関わる残基が $\alpha$ -サブドメイン、 $\beta$ -サブドメイン、 $\gamma$ -サブドメインの3つ全てで保存されている。この点が後に述べる GH54 の持つ CBM42 ( $\alpha$ サブドメインに結合能がない) と異なっている。この SAV1043 は、エキソ-1,5- $\alpha$ -アラビノフラノシダーゼ[4-10]と 58%の相同性を持つため、アラビノフラノシダーゼではないかと思われる。また、同じ *S. avermitilis* 由来の ORF SAV1115 も C 末側に CBM42 と相同性を持つ配列が見られる。しかし、それ以外には CBM を持つものは見当たらない。

- GH51

CBM を持つものは報告されていない。GsAbfA の立体構造から C 末側にセルロース結合ドメインなどと構造的相同性のある $\beta$ -サンドイッチドメインを持っていることが分かった[4-11]。しかし、キシラン結合能はなかった。進化の過程で結合能を失ったのかもしれない。

- GH54

GH54 は高度に保存されているファミリーであり、全ての GH54 酵素が CBM42 を C 末端に含むと思われる。アライメントを行ったところ、 $\beta$ -サブドメインと $\gamma$ -サブドメイン共にアラビノースの結合に関わるアミノ酸残基はほぼ保存されていた (図 4-39)。 $\alpha$ -サブドメインに関しては、全てアラビノースが結合できないようなアミノ酸配列になっている。

- GH62

GH62 に属するアラビノフラノシダーゼは主鎖を認識する CBM を持っているものが多い。*Streptomyces* 属 (*Streptomyces chattanoogensis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*) のアラビノフラノシダーゼは、CBM13 を持っている[4-12]。また、*Cellvibrio japonicus* のアラビノフラノシダーゼは、CBM2 と CBM35 という二つの CBM を持っている[4-13]。これらの CBM は全てキシラン結合能を持つことが示されている。

#### CBM の中での CBM42 の占めるポジション

第1章に述べたように、構造や機能に基づいた CBM の分類で、3つの種類にグループ分けされることが提唱されている[4-14] (図 4-40)。Type A の CBM は、結晶性の表面の鎖と相互作用する平らな疎水表面を持っている。Type B の CBM は、ポリまたはオリゴ糖のリガン

ドの一つのグリカン鎖に結合できるようなクレフトを持っている。これらは、結合定数が  $10^5$  以上の比較的高い結合を示す。一方、Type C の CBM はオリゴ糖のリガンドを結合できる表面のポケットを持っている。この CBM は、一糖、二糖、三糖など小さな糖を好んで結合する性質を持っている。結合定数が  $10^4$  程度と比較的弱いアフィニティを示すのが特徴である。

CBM42 は、糖結合ポケットを持ち、オリゴ糖を結合し、弱いアフィニティを示した。従って、AkCBM42 は、Type C の CBM に分類されるだろう。ただし、Type C の中では特異的な位置を占めるだろう。一糖のみしか認識せず、ヘミセルロースの側鎖のみしか認識しないという性質を示すからである。

フォールドについては、CBM13 が属するフォールドファミリー2 ( $\beta$ -トレフォイル) に分類されるだろう。

#### レクチンとの関連 (図 4-41)

CBM と似た性質を持つものとしてレクチンを上げることができる。両者とも糖を特異的に認識し、結合するという性質を示すからである。

##### ・レクチン

レクチンとは、糖鎖に対する特異的結合活性をもったタンパク質のことであり、主に単糖などオリゴ糖レベルに作用する。動植物・微生物を問わず自然界に数多く存在しており、糖鎖とレクチン間のコミュニケーションが細胞同士の情報伝達だけでなく、酵素やホルモンなどの認識に役立っていることが分かっている。

##### ・CBM とレクチンとの相違点

CBM とレクチンは、非常に類似したものである。あえて相違点をあげるならば、以下の二つを上げることができる。

- ① CBM は、同じポリペプチド内に触媒ドメインを持っているのに対し、レクチンは持っていない。
- ② CBM は植物の細胞壁の多糖 (セルロースやヘミセルロースなど) に特異性を持つものが多いのに対して、レクチンは真核生物の糖質 (糖鎖など) に対して特異性を持っている。

##### ・レクチンと Type C CBM の関係

レクチンと Type C に分類される CBM は、小さな糖を認識するという点で共通点を持っている。例えば Type C CBM である CBM13 は、RTB レクチンに分類されていた。さらに、CBM6、CBM32、CBM36 は、*Anguilla anguilla* フコース特異的レクチンとフォールド、金属結合位置、糖結合サイトにおいて、共通点が見られた[4-15]。これらは、レクチンと Type

C CBM の密接なつながりを示すものである。

CBM42 は、CBM13 と同じ $\beta$ -トレフォイルフォールドを持つ。CBM13 はレクチンと強いつながりがあり、レクチンから進化した可能性が考えられている。機能の面でも CBM42 は、弱い結合力で小さな糖を認識する点に類似点が見られる。このことから CBM42 は、レクチンと強い進化的関連があると思われる。

# 図表

## E221A

5'-C TGG ATC ATG GTC GAT ATG **GCG** AAC AAC CTC TTC TCT G-3'

## D435A

5'-G AAG CAG TTC CAT GAG **GCT** GCT ACT TTC TGT CC-3'

## D488A

5'-CG AAG ACG TCG TTT AAT AAT **GCT** GTT AGC TTT GAG ATT GAG AC-3'

図 4-1 QuickChange のプライマー設計

赤で示したのが、変異を導入した残基である。complementary なプライマーは記述を省略する。

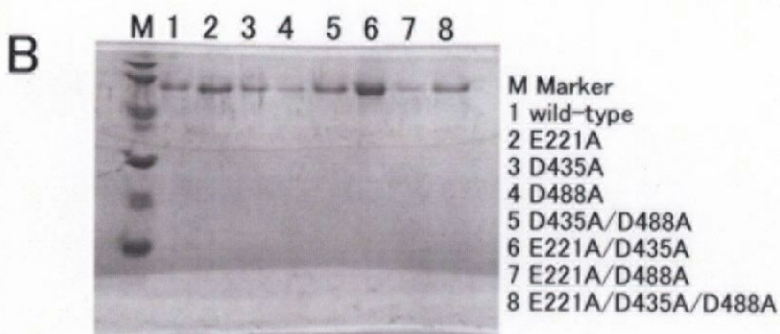


図 4-2 各種変異体

A. 変異体の模式図、B. 変異体の SDS-PAGE

① (19-335)

nter\_clai: GAGGCTGAAGCATCGATGGG

nter\_xbai: CGGACCGCTCTAGAGCGAGCCGACGACG

② (336-499)

cter\_clai: GTCGTCGGATCGATGGTTAGCGGTCC

cter\_xbai: CAGATCCTCTTCTGAGATGAG

図 4-3 PCR のプライマー設計

下線は制限酵素サイトである。

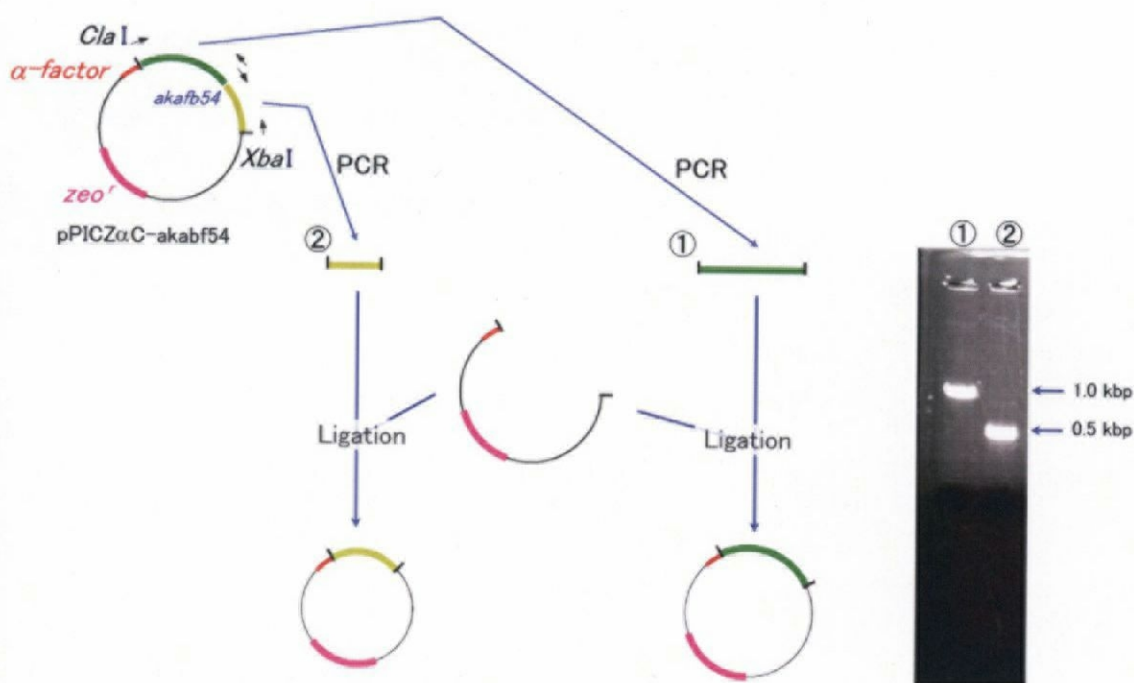


図 4-4 プラスミドの作成

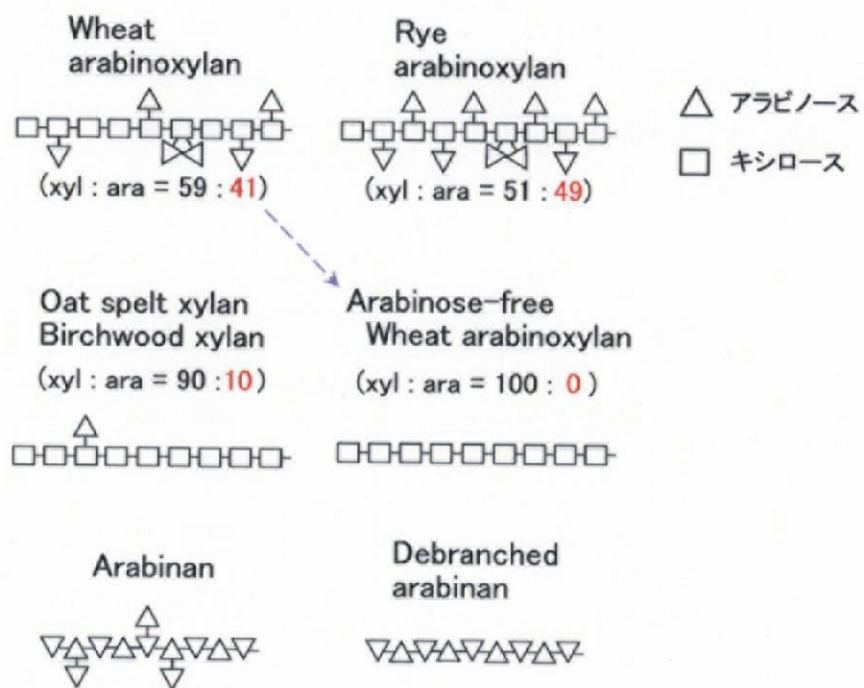
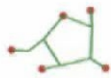


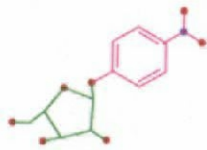
図 4-5 本章で実験に用いた不溶性の糖



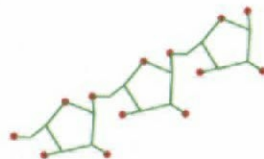
アラビノース



メチル- $\alpha$ -アラビノフラノシド



pNPAF



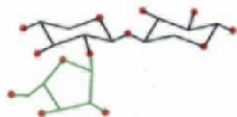
アラビノトリオース



メチル- $\beta$ -キシロピラノシド



グルコース



AXX



キシロトリオース

図 4-6 本章で実験に用いた可溶性の糖

緑はアラビノース部分、黒はキシロース部分、灰色はグルコース部分、青はメチル基、ピンクはニトロフェノール部分を示す。

アラビノース、グルコースは、フラノース型とピラノース型両方のコンフォメーションをとり得る。その他の糖は、アラビノースであればフラノース型、キシロースはピラノース型である。

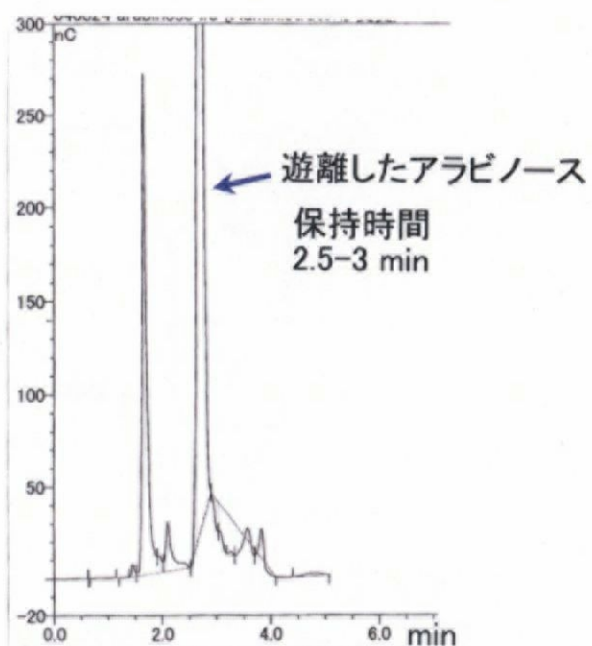


図 4-7 HPAEC-PAD 法によるアラビノースの検出

HPAEC-PAD 法は、イオン交換法とアンペロメトリー検出器を組み合わせ、糖を分離、検出する方法である。強アルカリ下の陰イオン交換カラムで糖を分離し、パルスアンペロメトリー検出器により金電極表面で糖を酸化させて生じる電流を測定する。

遊離アラビノース量を保持時間 2.5~3 分のところに見られるピークの面積を計算することで見積もった。



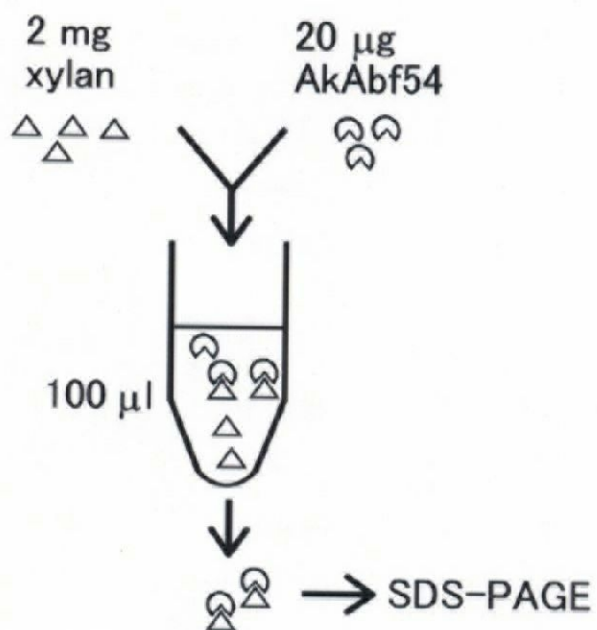


図 4-8 Binding assay の方法

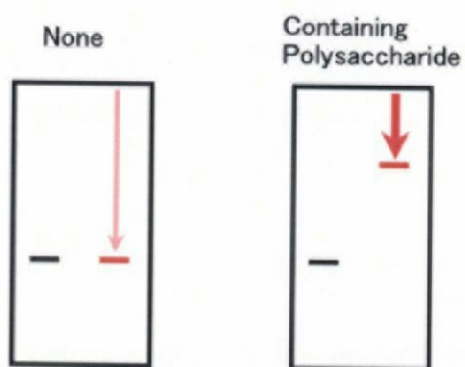


図 4-9 アフィニティゲル電気泳動の原理

ポリ多糖をゲル中に混ぜておくと、それと相互作用するタンパク質は、移動度が変化する。移動度が小さいほど、相互作用が強いことを示す。

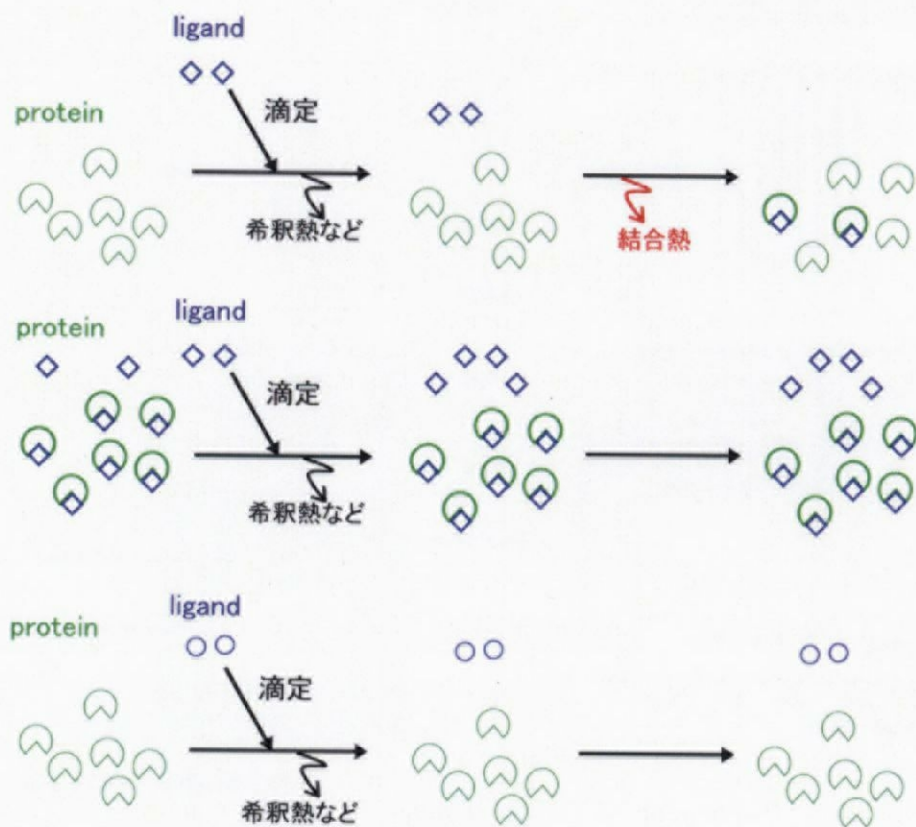


図 4-10 ITC の原理その 1

タンパク質と相互作用するリガンドを加えると結合熱が発生する。ITC は、その結合熱を測定することにより、アフィニティを求める測定法である。

リガンドが試料セル内へ滴定されて両物質が相互作用すると、結合量に正比例した熱の発生または吸収が起こる。リガンド滴定の進行に沿って試料セル中の生態高分子の結合サイトがリガンドで徐々に飽和され、しだいに熱シグナルは減少して最終的にはリガンドの希釈熱のみが観測されるようになる。相互作用しないものを滴定すると希釈熱しか観測されない。

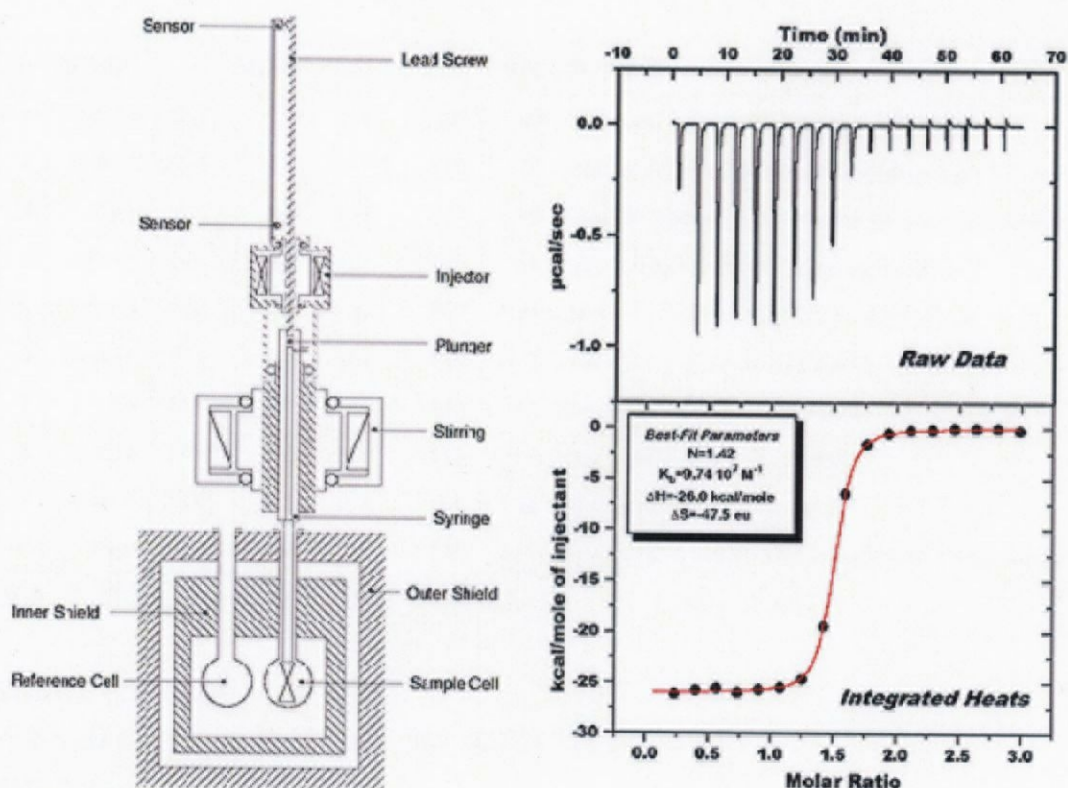


図 4-11 ITC の原理その 2

左に示すような VP-ITC (Microcal) という機械で測定を行う。Sample Cell の中にタンパク質を入れておき、上のシリンジからリガンドを数  $\mu\text{l}$  ずつ滴定していく。Reference cell 中の温度をヒータとクーラーを用いて一定にする。一方、Sample cell 中の温度もヒータとクーラーを用いて Reference cell と同じになるように保つ。滴定をしないと Sample cell にかかる熱は一定の平衡状態となるので、そこを  $0 \mu\text{cal/sec}$  とする。

滴定を行い、タンパク質とリガンドの間で発熱反応が起これば、Sample cell 中の温度が少し上昇し、かけるべき熱が少なくなるので、下向きのピークが出る (右図の上)。逆に吸熱反応が起これば、かける熱を多くするので上向きのピークが出る。

熱を積分し、プロットする。結合定数 ( $M^{-1}$ ) とタンパク質濃度 (M) の積である  $c$  値が 5 以上なら、シグモイダル状のカーブを描く (右図の下)。結合定数が高いほど、傾きが急となる。右図の場合、結合定数は約  $10^7$  である。また、変曲点の Molar ratio の値が  $n$  値となる。

MicroCal 社のホームページ (<http://www.microcalorimetry.com/>) 及び日本シイベルヘグナー社のホームページ (<http://www.microcal.jp/>) から図を抜粋した。



	STRID2	Z	RMSD	LALI	LSEQ2	%IDE	PROTEIN
1	1jly-A	15.1	2.4	125	299	14	agglutinin (amaranthin, aca)
2	1n4k-A	15.0	2.0	117	292	16	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 fragment
3	1bfg	15.0	2.4	123	126	13	Basic fibroblast growth factor mutant with cys 69 repla
4	1dfc-A	14.5	2.2	115	475	11	fascin fragment (actin bundling protein)
5	1abr-B	14.3	2.1	115	267	11	Abrin-a complexed with two sugar chains
6	1mc9-A	13.9	1.9	109	126	5	endo-1,4-beta-xylanase a fragment
7	2ila	13.6	2.7	123	145	11	Interleukin-1Alpha (IL-1Alpha)
8	2i1b	13.4	2.6	126	153	9	Interleukin-1Beta (IL-1Beta)
9	1dqg-A	13.0	2.2	113	134	13	mannose receptor fragment
10	1hce	11.2	2.6	115	118	11	Hisactophilin (NMR, minimized average structure)

表 4-12 アラビノース結合ドメインを DALI サーバーにかけた結果

STRID2: PDB code

Z: Z-score (似たフォールドを持つほど値が高くなる)

RMSD: root mean square deviation

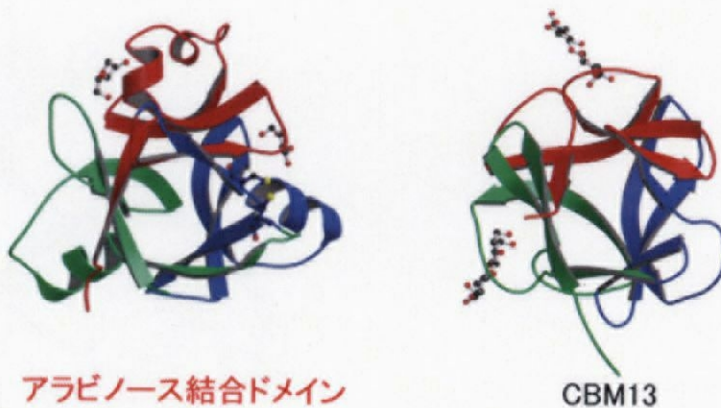
LALI: 比べた部分のアミノ酸配列の長さ

LSEQ2: アミノ酸配列の全長

%IDE: 相同性

PROTEIN: そのタンパク質の名前

A



B

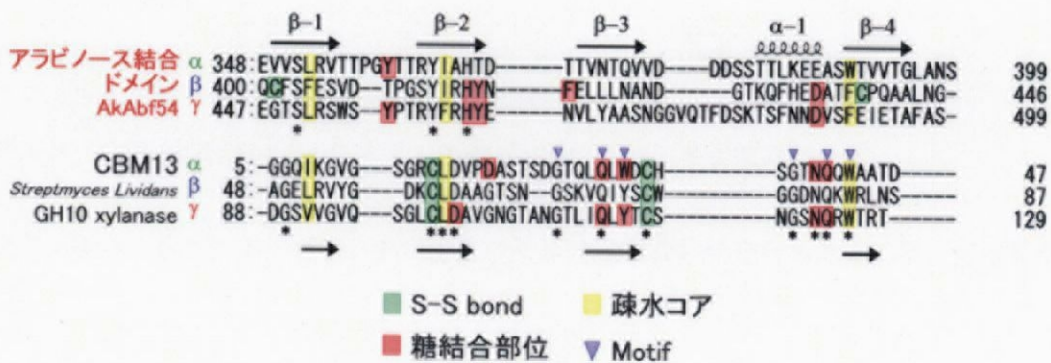


図 4-13 アラビノース結合ドメインと CBM13 との比較

#### A. フォールド

α-サブドメインを緑、β-サブドメインを青、γ-サブドメインを赤で示す。

#### B. アライメント

疎水コアを形成する疎水残基は保存されている。しかし、糖結合部位の残基が異なっている。また、ジスルフィド結合の位置も異なっている。

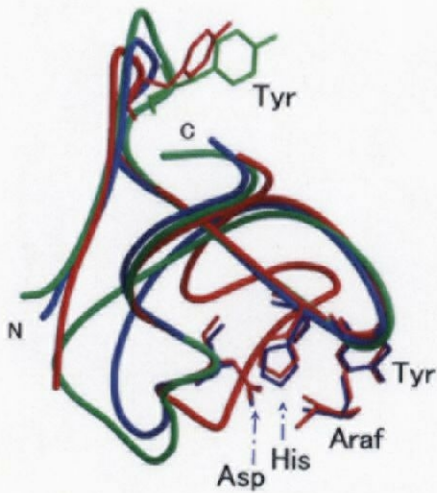


図 4-14  $\alpha$ -サブドメインと $\beta$ -サブドメインと $\gamma$ -サブドメインの重ね合わせ

$\alpha$ -サブドメインを緑で、 $\beta$ -サブドメインを青で、 $\gamma$ -サブドメインを赤で示す。

$\alpha$ -サブドメイン、 $\beta$ -サブドメイン、 $\gamma$ -サブドメインの重ね合わせを行ったところ、ほぼ重なった。

アラビノースは、アスパラギン酸残基とヒスチジン残基との水素結合及び二つのチロシン残基（一つは隣のサブドメインのもの）による stacking 相互作用で認識されている。 $\beta$ -サブドメインと $\gamma$ -サブドメインで重ね合わせを行ったところ、これらの認識残基はほぼ重なった。