

図 4-15 CBM13 (紫) とアラビノース結合ドメイン (黄) の疎水コア部の重ね合わせ

電子密度は AkAbf54 の $2F_o - F_c$ マップ¹⁵⁾である。

青で囲んだように、両者共に疎水性残基により疎水コアを形成しているという特徴を持っていた。赤で囲んだように、CBM13 で見られるジスルフィド結合がチロシン残基に置き換わっていた。

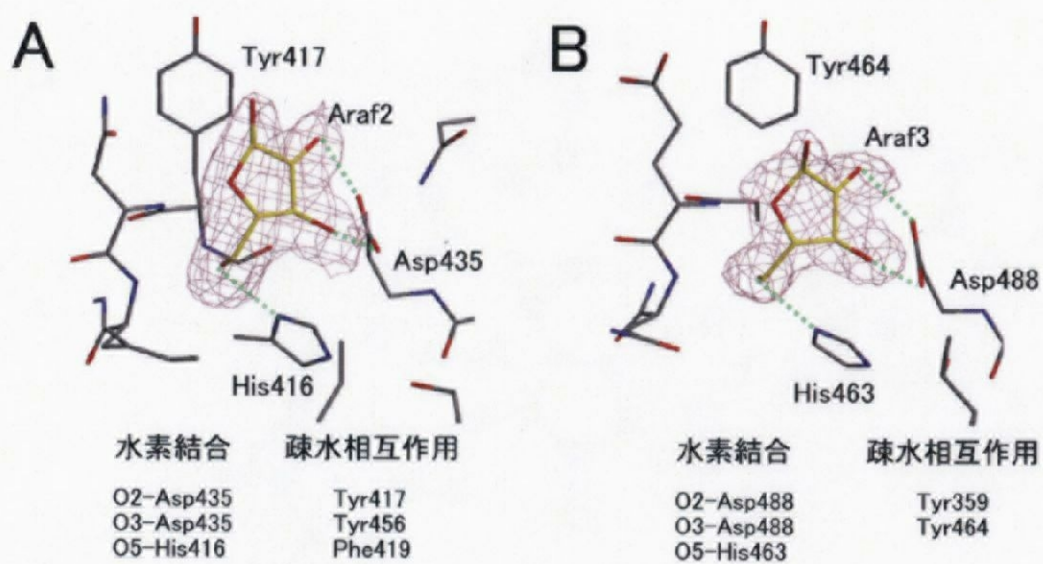
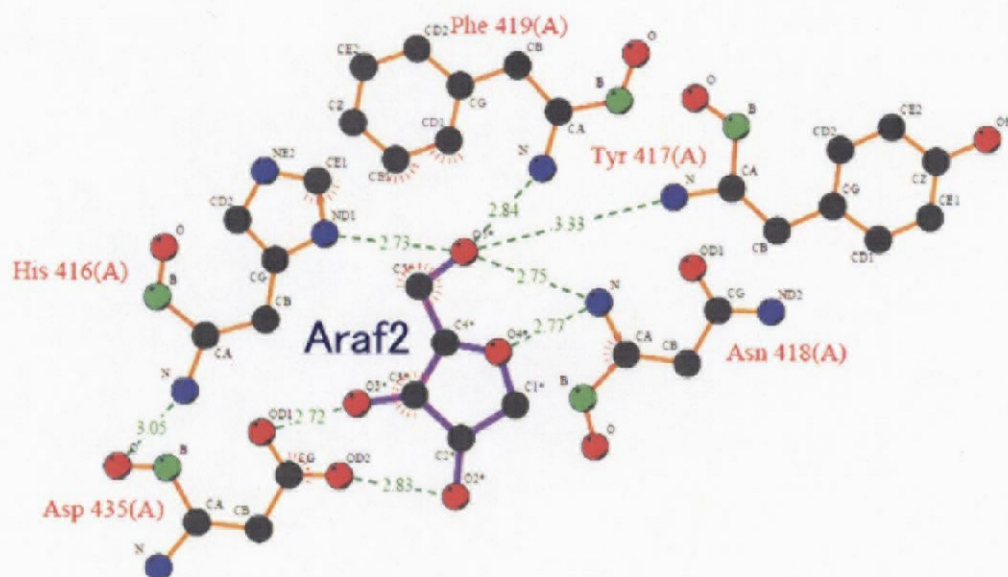


図 4-16 アラビノース複合体の F_o-F_c 電子密度マップ ¹⁶⁾

A. β -サブドメインポケット、B. γ -サブドメインポケット

緑の点線は水素結合を示す。

A



B

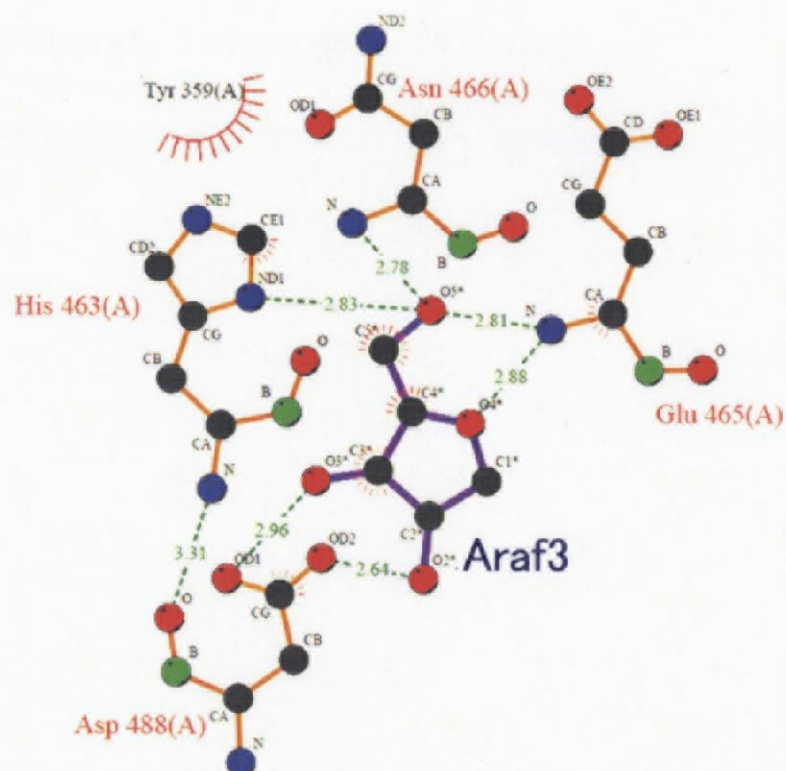


図 4-17 各サブドメインポケットのアラビノースの認識 (ligplot により作成)
A. β -サブドメインポケット、B. γ -サブドメインポケット

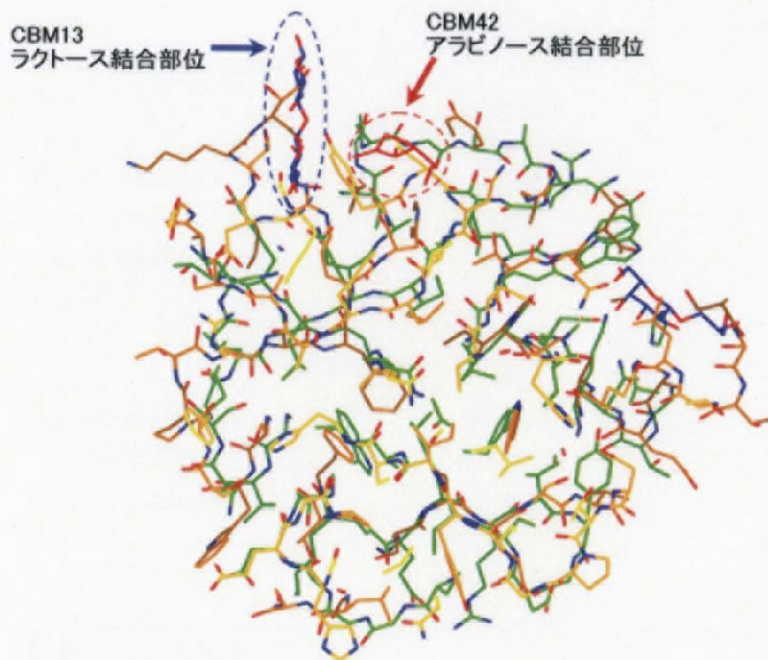


図 4-18 CBM13 (緑) と CBM42 (黄色) の重ね合わせ

CBM13 のリガンドであるラクトースを青で、CBM42 のリガンドであるアラビノースを赤で示す。

Ligand	AXX	アラビノトリオース
Data collection statistics		
Date	2004/6/24	2004/2/26
Place	PF-AR NW12	PF BL5B
Wavelength (Å)	1.000	0.978
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit-cell parameters		
<i>a</i> (Å)	39.5	39.5
<i>b</i> (Å)	98.7	98.8
<i>c</i> (Å)	144.0	144.5
Resolution (Å)	50.0-2.3	50.0-2.8
(outer shell)	(2.38-2.3)	(2.9-2.8)
Unique reflections	25,910	14,668
Completeness (%)	83.2 (67.0)	88.6 (87.5)
<i>R</i> _{merge} (%)	0.104 (0.322)	0.160 (0.463)
Mean <I/σ(I)>	12.2 (2.4)	7.5 (2.0)
Refinement statistics		
<i>R</i> / <i>R</i> _{free} (%)	20.3 / 24.9	19.9 / 24.9
No. of waters	118	59
Average <i>B</i> -factors (Å ²)		
Protein	27.1	30.3
Waters	27.6	23.8
<i>N</i> -Acetylglucosamines	48.9	46.9
β-サブドメイン		
Ara1	32.8	35.1
Xyl1	47.7	
Xyl2	42.3	
Ara2		56.1
γ-サブドメイン		
Ara1	43.2	38.9
Xyl1	62.4	
Xyl2	54.3	
Ara2		56.2

表 4-19 Data collection and refinement statistics for AkAbf54 complex structures

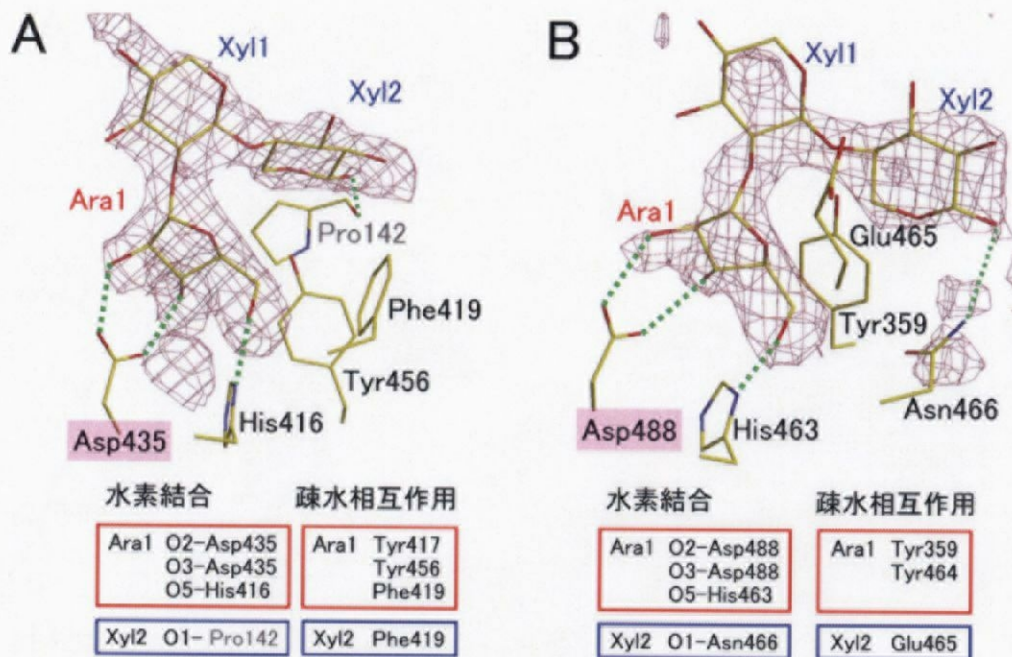


図 4-20 AXX 複合体の $F_o - F_c$ 電子密度マップ¹⁶⁾

A. β -サブドメインポケット、B. γ -サブドメインポケット

緑の点線は水素結合を示す。

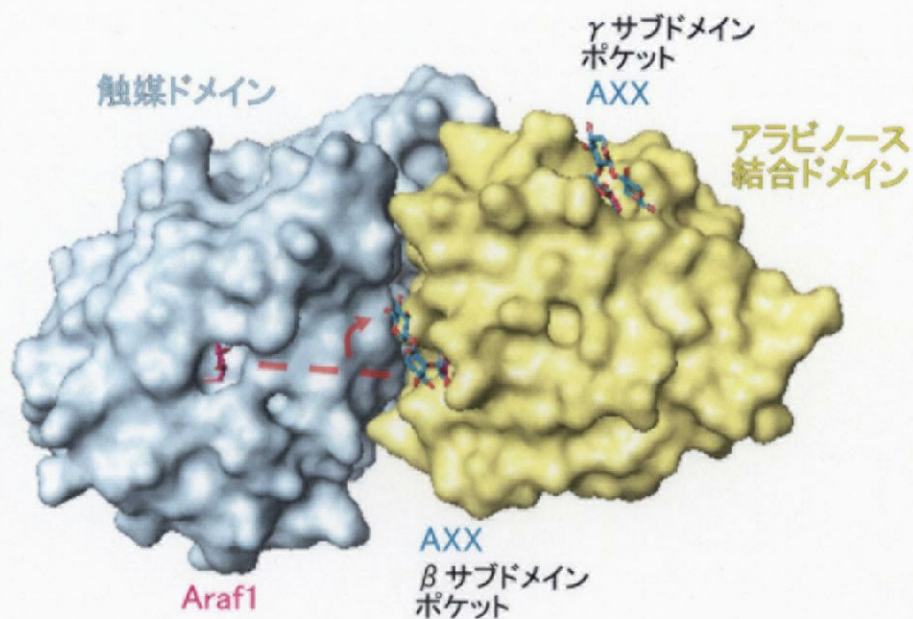


図 4-21 AXX 複合体の表面図

結合した AXX 分子をシアンで示す。活性中心には、何も結合していなかったため、参考にあらびノース複合体のあらびノース分子を入れ、ピンクで示した。 β -サブドメインの AXX のキシロピオース部位が活性中心に向いていないことを赤で示した。

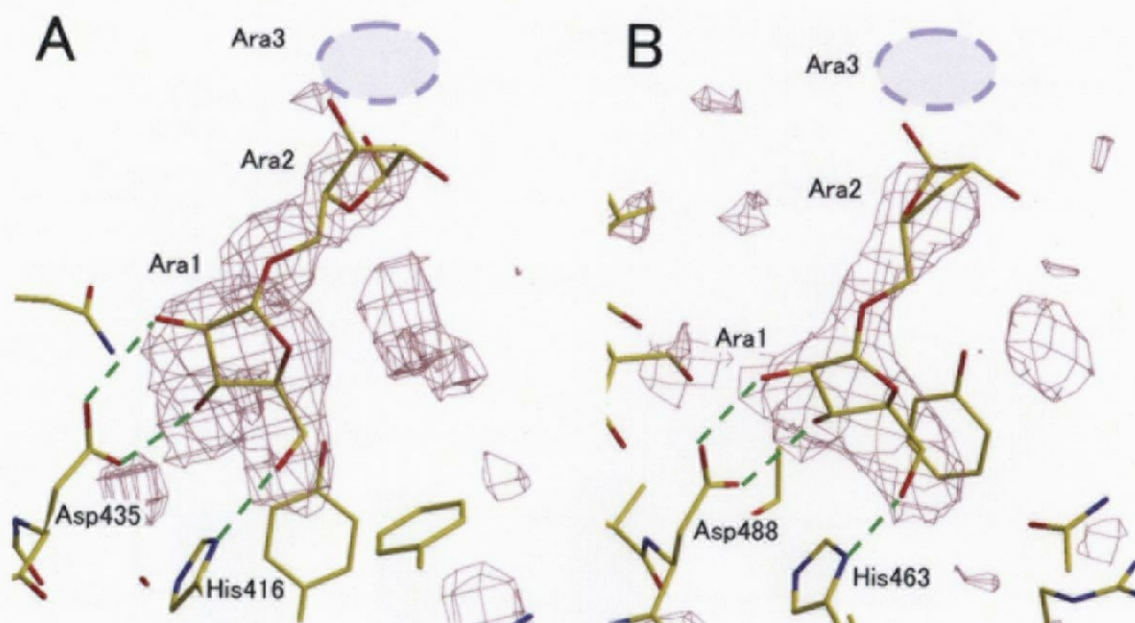


図 4-22 アラビノトリオース複合体の F_o-F_c 電子密度マップ¹⁶⁾

A. β -サブドメインポケット、B. γ -サブドメインポケット

緑の点線は水素結合を示す。青丸は Ara3 の部分がディスオーダーしていることを示す。

	Specific activity (U mg ⁻¹ min ⁻¹)			
	Wild-type	D435A	D488A	D435A/D488A
pNPAF	31.5	33.4	35.0	29.7
Wheat arabinoxylan	4.1×10^{-2}	8.8×10^{-3}	5.0×10^{-3}	8.1×10^{-4}

表 4-23 野生型と変異体の可溶性基質と不溶性基質に対する比活性

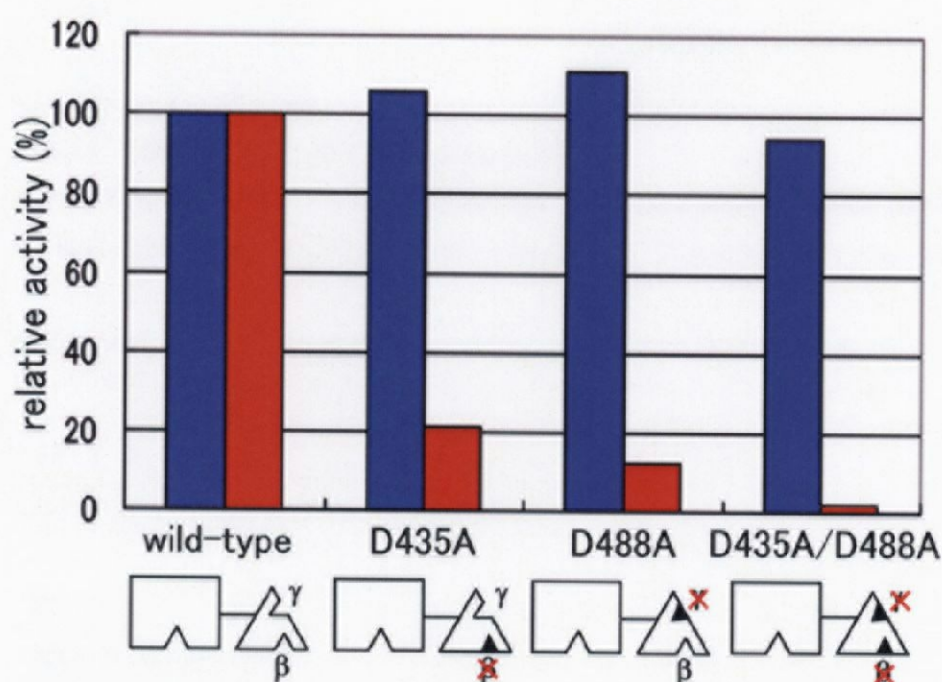


図 4-24 野生型と変異体の可溶性基質と不溶性基質に対する比活性の比較

青で示したのが可溶性糖基質、オレンジで示したのが不溶性糖基質に対する活性である。
wild-type の活性を 100%とした。

変異体は、不溶性の糖に対する活性が減少した。

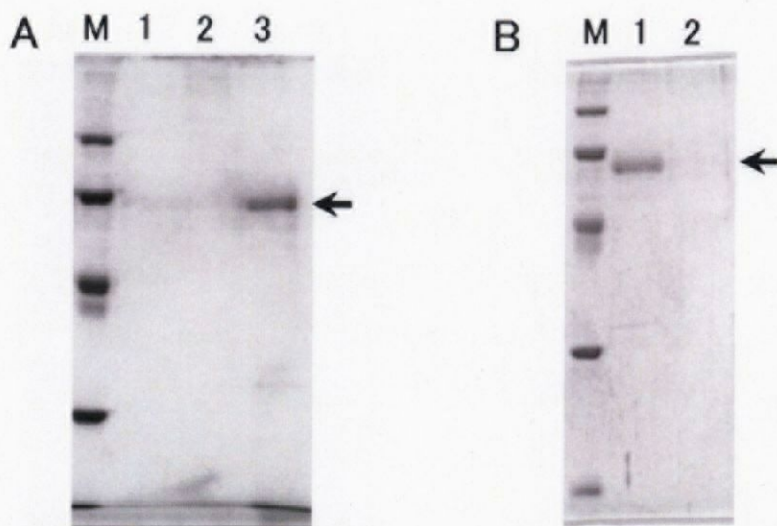


図 4-25 各種キシランに対する Binding assay

A 各種不溶性キシラン：1. birchwood xylan、2. oat spelt xylan、3. wheat arabinoxylan

B wheat arabinoxylan：1. 未処理 wheat arabinoxylan、2. arabinose-free wheat arabinoxylan

側鎖アラビノースを多く含む wheat arabinoxylan にのみ結合している。

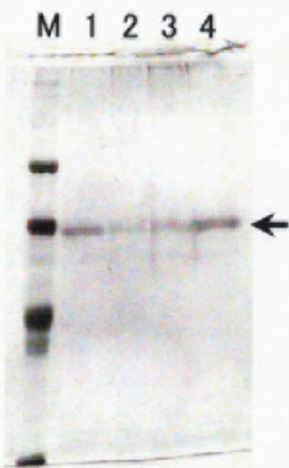


図 4-26 糖による阻害

1 何も加えず、2 +100 mM L-アラビノース、3 +5 mM アラビノトリオース、4 +100 mM D-キシロース

アラビノース糖存在下では、結合が阻害される。

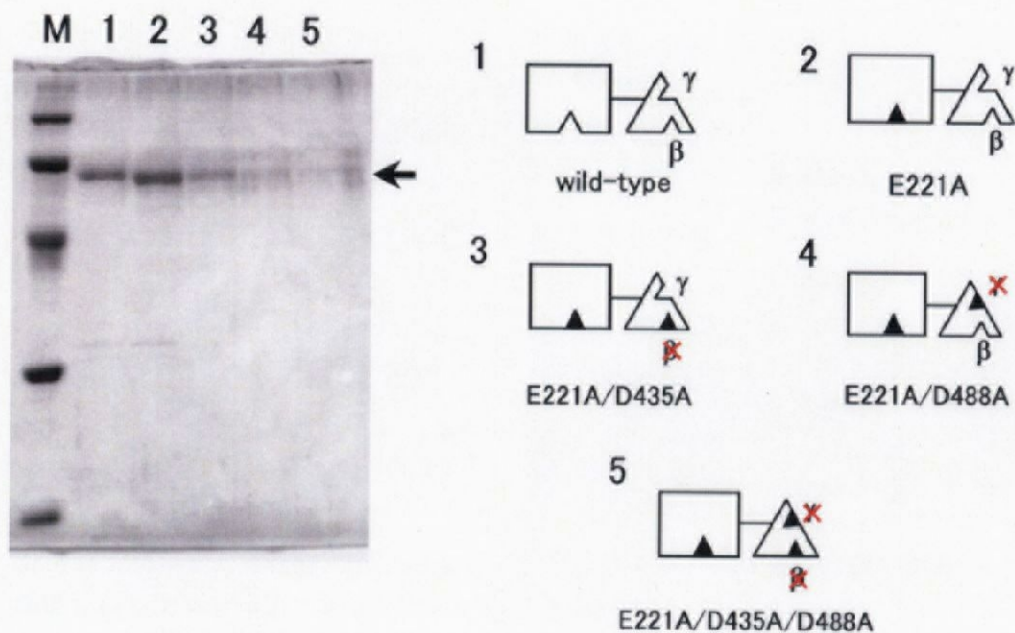


図 4-27 変異体の Binding assay

片方の結合サイトを変異させると、結合した AkAbf54 の量が減少したことから、結合力が低下したと考えることができる。



図 4-28 arabinan と debranched arabinan でのアフィニティゲル電気泳動の結果
側鎖を持つアラビナンにのみアフィニティを示した。

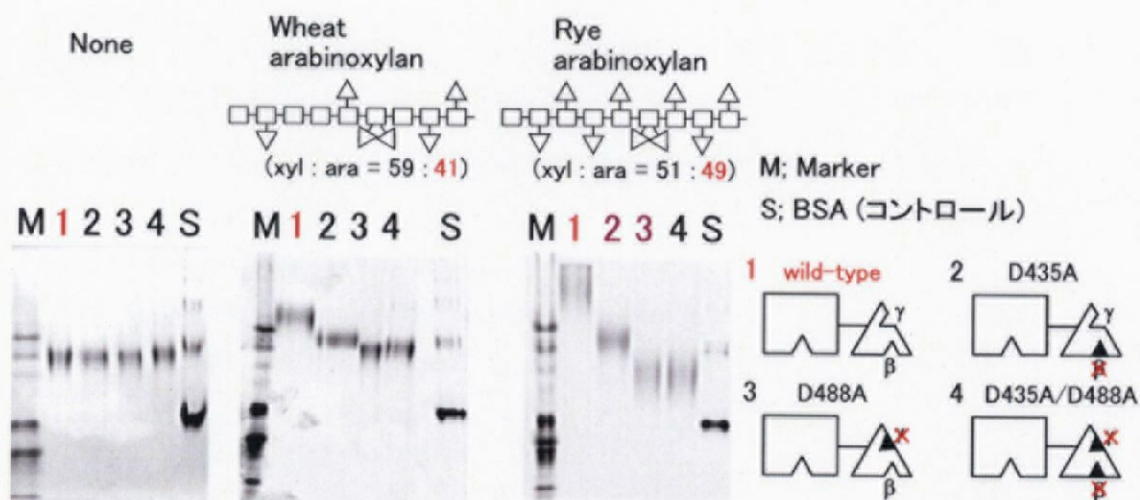


図 4-29 wheat arabinoxylan と rye arabinoxylan でのアフィニティゲル電気泳動の結果

rye arabinoxylan では、紫で示したように、D435A 変異体と D488A 変異体で泳動度に差が見られる。

AkAbf54	リガンド	$K_a \times 10^3$	ΔG	ΔH	$T\Delta S$	n^a
		M^l	$kcal\ mol^{-1}$	$kcal\ mol^{-1}$	$kcal\ mol^{-1}$	
E221A	メチル- α -L- アラビノフラノシド	1.5 (± 0.1) ^b	-4.3	-5.3 (± 0.2)	-1.0	1.9 (± 0.04)
E221A	アラビノトリオース	1.8 (± 0.1)	-4.5	-5.1 (± 0.2)	-0.6	1.7 (± 0.05)
E221A	メチル- β -D- キシロピラノシド	ND ^c	ND	ND	ND	ND
E221A	キシロトリオース	ND	ND	ND	ND	ND
E221A	グルコース	ND	ND	ND	ND	ND
E221A/D435A	メチル- α -L- アラビノフラノシド	2.2 (± 0.1)	-4.6	-3.2 (± 0.5)	1.4	1.0 (± 0.1)
E221A/D488A	メチル- α -L- アラビノフラノシド	1.8 (± 0.2)	-4.5	-1.9 (± 0.3)	2.6	1.0 (± 0.2)
E221A/D435A /D488A	メチル- α -L- アラビノフラノシド	ND	ND	ND	ND	ND
E221A/D435A /D488A	アラビノトリオース	ND	ND	ND	ND	ND

表 4-30 ITC により決定された AkCBM42 のオリゴ糖に対するアフィニティ

^a n is the number of binding sites on the protein.

^b Values in parentheses are standard deviations from the fit.

^c ND, not detected.

ΔG 及び ΔS は以下の式から求めた。

$$-RT \ln K_a = \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

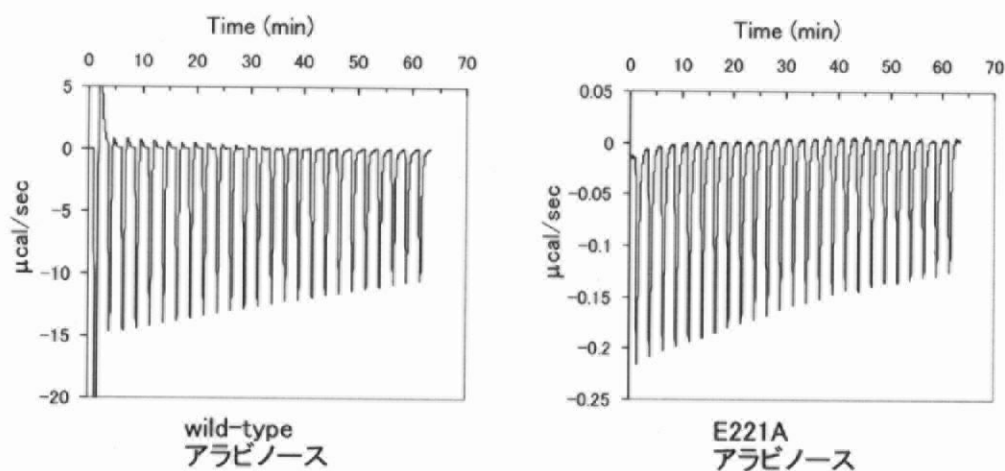
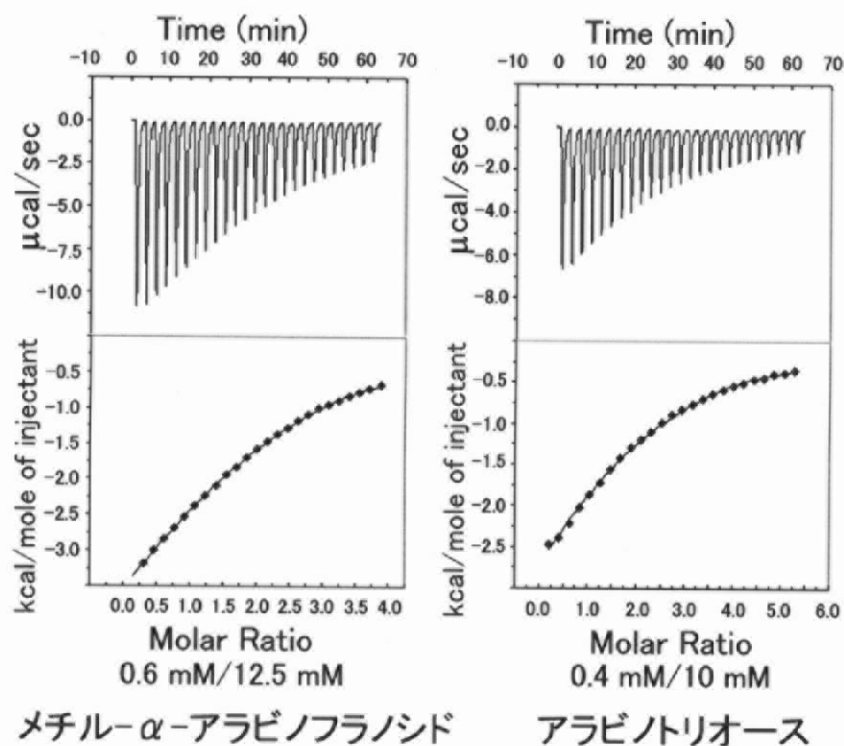


図 4-31 アラビノースに対するアフィニティ

アラビノースは溶液中でほぼピラノース型で存在するため、うまく測定ができていない。
wild-type は、活性中心にアラビノースが結合して熱が発生するのか、大きな発熱反応が起きているが、詳細は不明である。



K_a (M^{-1})	1.5×10^3	1.8×10^3
n	1.9	1.7

図 4-32 E221A のアラビノース糖に対するアフィニティ

Molar Ratio: AkAbf54 濃度/リガンド濃度

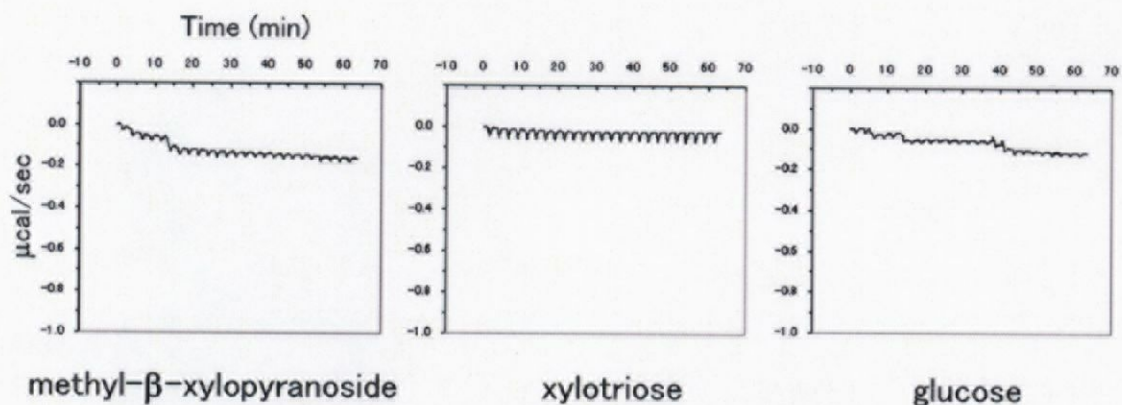


図 4-33 キシロース糖、グルコースに対するアフィニティ

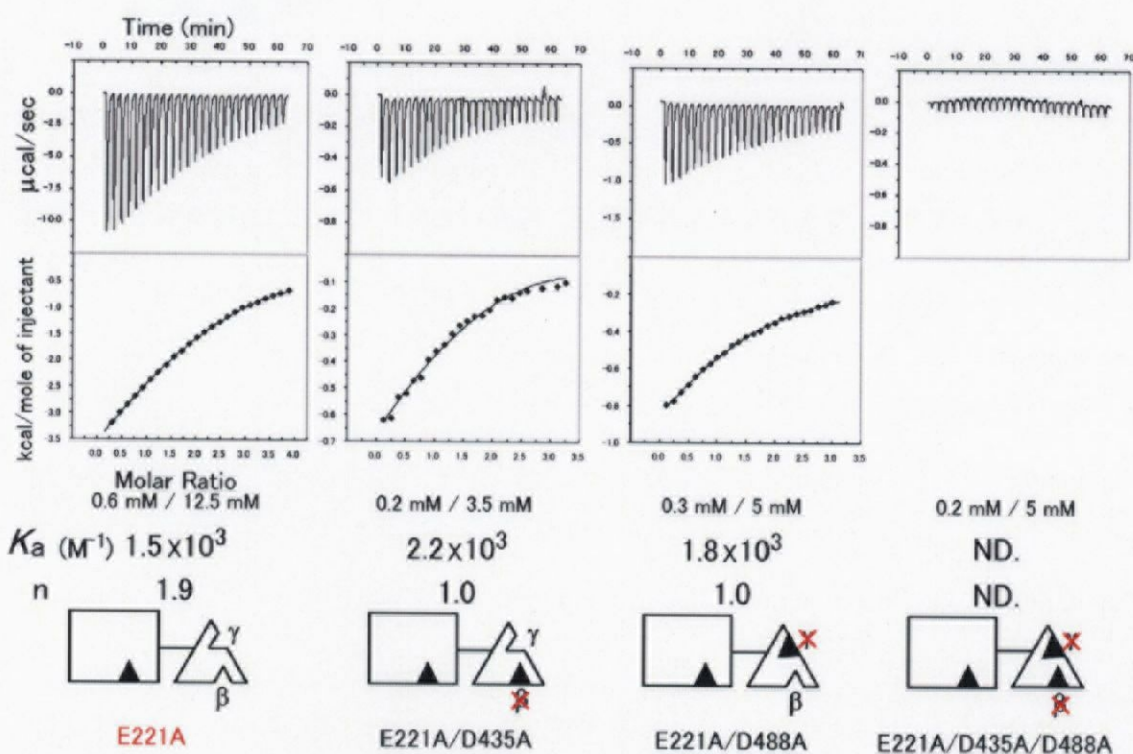


図 4-34 各種変異体のメチル-α-L-アラビノフラノシドに対するアフィニティ

2つある結合サイトのうち、ひとつに変異を入れると n が約 1 となり、両方に変異を入れると全く結合しなくなった。

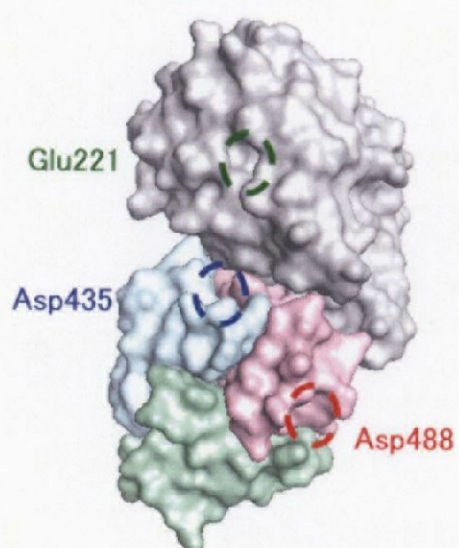
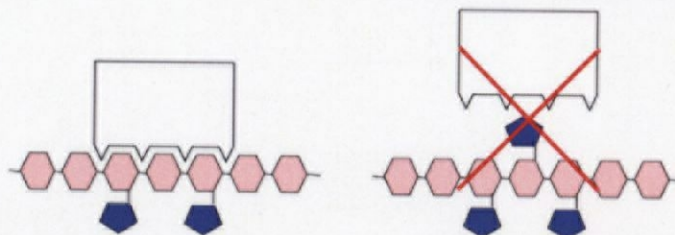


図 4-35 各サブドメインポケットの位置と環境

触媒ドメインを灰色、 α -サブドメインを緑、 β -サブドメインを青で、 γ -サブドメインを赤で示した。

A 主鎖認識型

キシラナーゼ: CBM6、CBM13、CBM15
アラビノフラノシダーゼ: CBM2、CBM13、CBM35
マンナーゼ: CBM27



B 側鎖認識型

アラビノフラノシダーゼ: CBM42

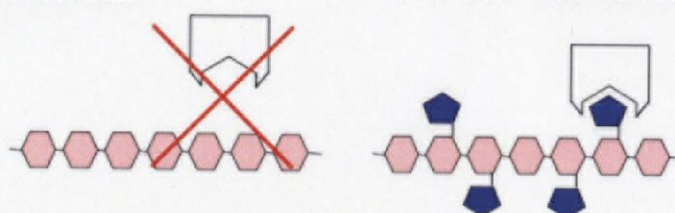


図 4-36 主鎖認識型 (A) と側鎖認識型 (B)

CBM42 は、これまで報告されていないヘミセルロースの側鎖を認識する CBM であった。

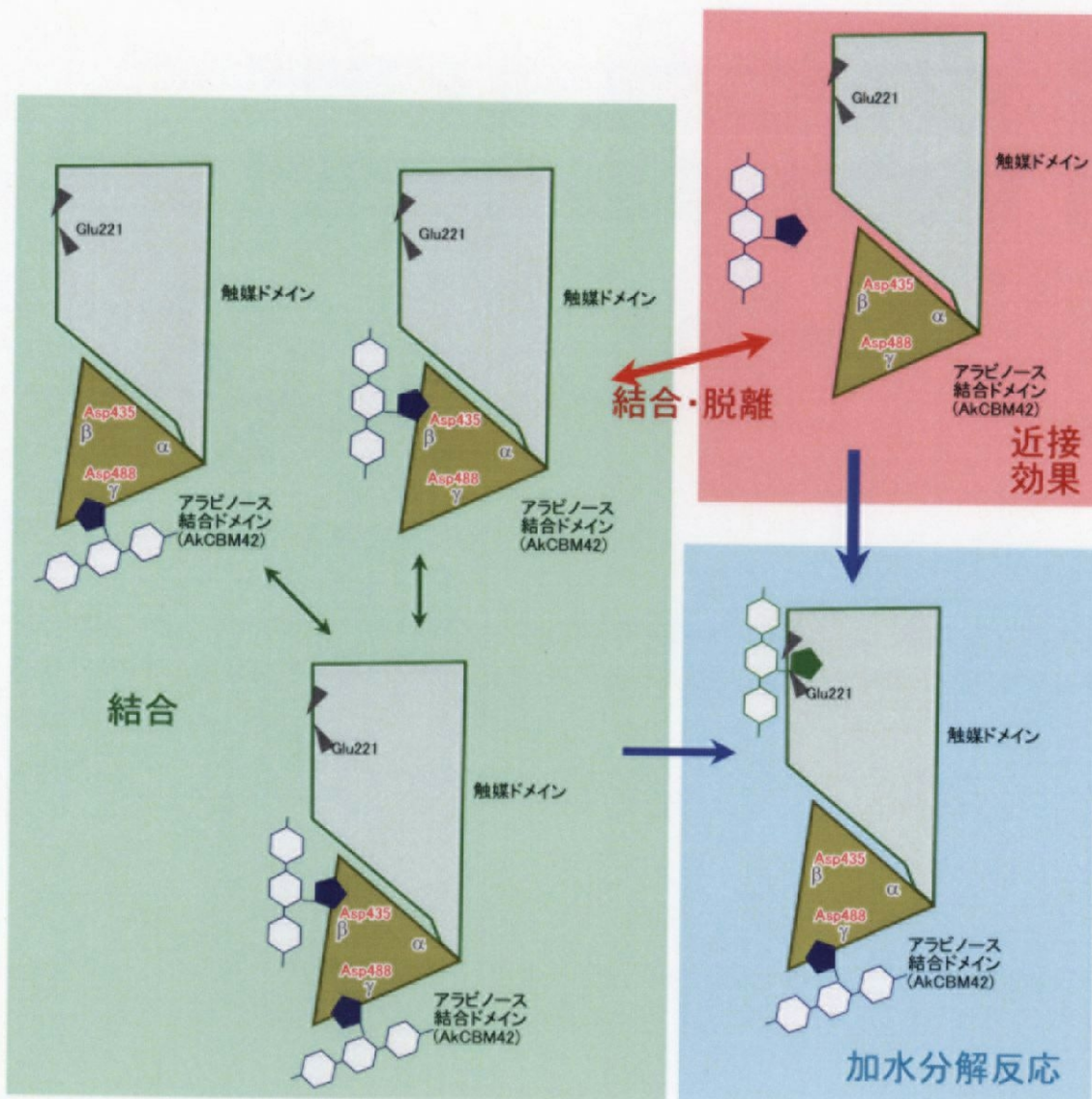


図 4-37 アラビノキシランへの結合の模式図

アラビノース結合ドメインは、赤矢印で示したように結合・解離を繰り返すことにより、アラビノース側鎖を豊富に含むヘミセルロースに近接した状態で存在し続けると考えられる。結合定数 10^3 という結合の弱さは、解離を起こしやすくしていると考えられる。近接することにより、青矢印で示したように活性中心にアラビノース側鎖が結合しやすくなり、結果として反応を起こしやすくする役割を果たしているのだろう。

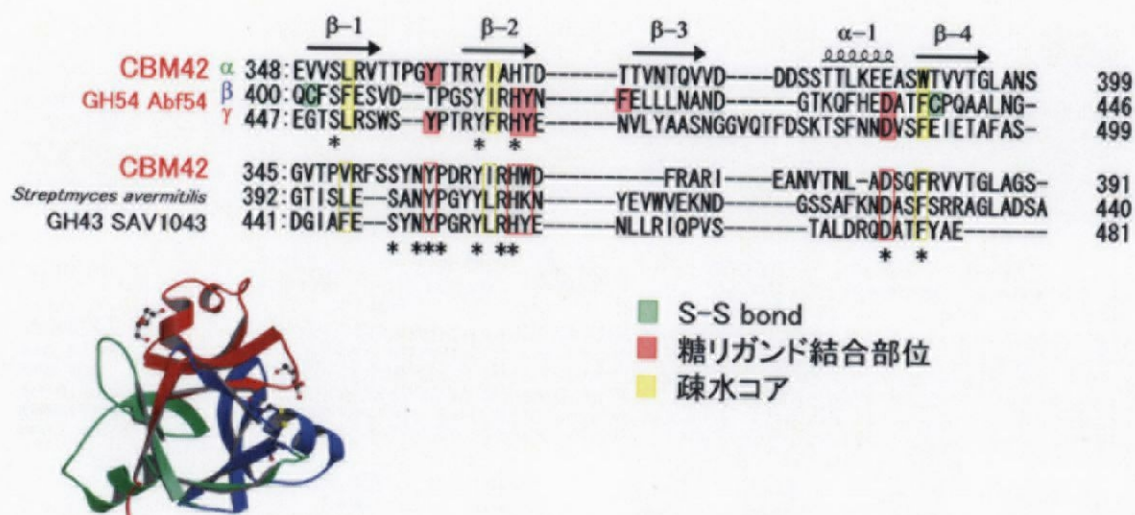


図 4-38 AkCBM42 と SAV1043 の C 末ドメインとの比較

黄色で示したように疎水コアを形成する疎水残基が保存されており、赤で示したように糖リガンドを結合する残基もα-サブドメイン、β-サブドメイン、γ-サブドメインの全てで保存されている。

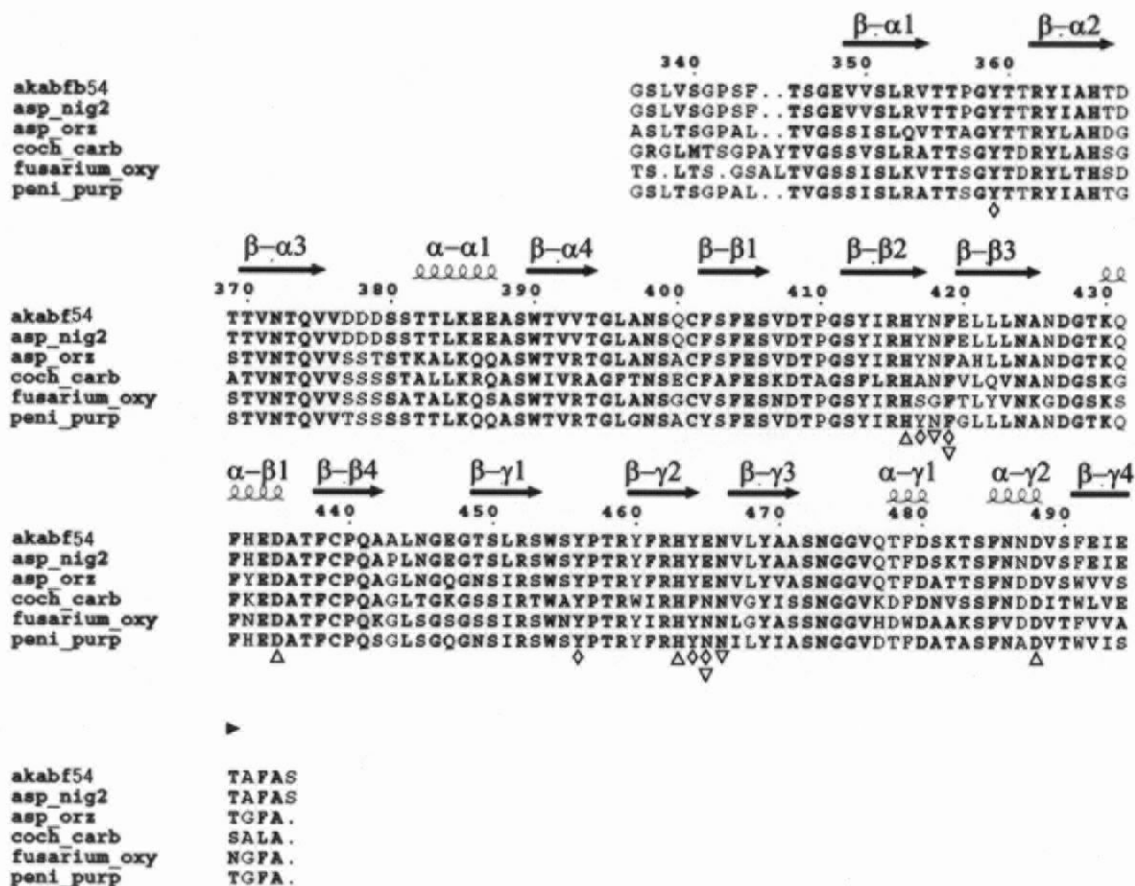


図 4-39 GH54 C 末領域のアライメント

上三角が AkAbf54 で側鎖がアラビノースと水素結合していた残基、下三角が AkAbf54 で主鎖がアラビノースと水素結合していた残基、ひし形が AkAbf54 でアラビノースと疎水相互作用していた残基。

akabf54: *Aspergillus kawachii* IFO4308, asp_nig2: *Aspergillus niger*, asp_orz: *Aspergillus oryzae* HL15, coch_carb: *Cochliobolus carbonum*, fusarium_ox: *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi, peni_purp: *Penicillium purpurogenum*

Type A

表面に結合 不溶性の結晶性セルロース

CBM1, 2a, 3, 5, 10



Type B

糖鎖に結合 独立した糖鎖

CBM2b, 4, 6, 15, 17, 20, 22, 27, 28, 29, 34, 36



Type C

小さな糖に結合 1~3糖

CBM9, 13, 14, 18, 32



Type C'

1糖のみに結合 ヘミセルロース側鎖

CBM42

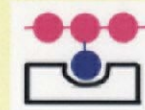


図 4-40 CBM のグループわけと CBM42 の位置づけ

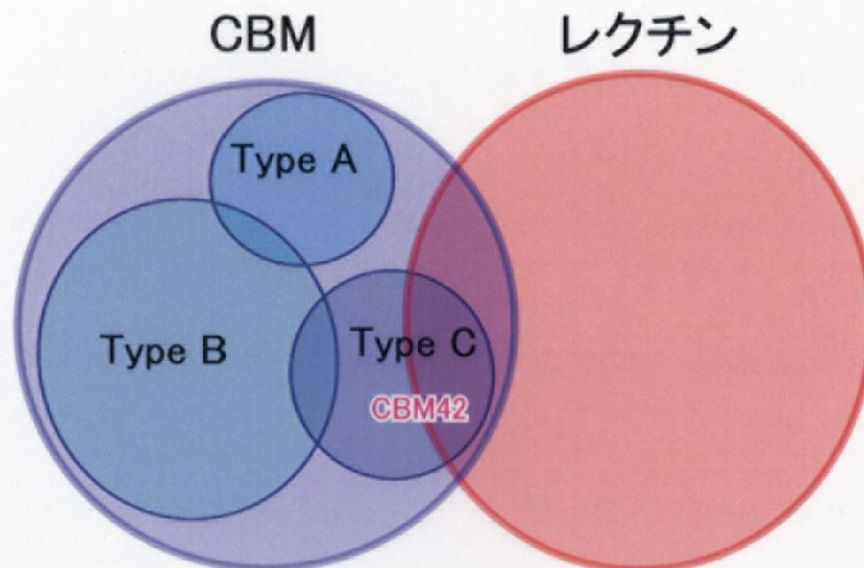


図 4-41 CBM とレクチンの関係

第4章の引用論文

- 4-1. Hirabayashi, J., Dutta, S. K., and Kasai, K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14450-14460
- 4-2. Rutenber, E., Ready, M., and Robertus, J. D. (1987) *Nature* **326**, 624-626
- 4-3. Fujimoto, Z., Kuno, A., Kaneko, S., Kobayashi, H., Kusakabe, I., and Mizuno, H. (2002) *J. Mol. Biol.* **316**, 65-78
- 4-4. Notenboom, V., Boraston, A. B., Spencer J., Williams, S. J., Kilburn D. G., and Rose, D. R. (2002) *Biochemistry* **41**, 4246-4254
- 4-5. Nogawa, M., Yatsui, K., Tomioka, A., Okada, H., and Morikawa, Y. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3964-3968
- 4-6. Angyal, S. J., and Pickles, V. A. (1972) *Aust. J. Chem.* **25**, 1695-1710
- 4-7. Szabo, L., Jamal, S., Xie, H., Chamock, S. J., Bolam, D. N., Gillbert, H. J., and Davies, G. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 49061-49065
- 4-8. Boraston, A. B., Revett, T. J., Boraston, C. M., Nurizzo, D., and Davies, G. J. (2003) *Structure* **11**, 665-675
- 4-9. Fujimoto, Z., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H., Kusakabe, I., and Mizuno, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 9606-9614
- 4-10. Matsuo, N., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H., and Kusakabe, I. (2000) *Biochem. J.* **346**, 9-15
- 4-11. Hovel, K., Shallom, D., Niefind, K., Belakhov, V., Shoham, G., Baasov, T., Shoham, Y., and Schomburg, D. (2003) *EMBO J.* **22**, 4922-4932
- 4-12. Vincent, P., Shareck, F., Dupont, C., Morosoli, R. and Kluepfel, D. (1997) *Biochem. J.* **322**, 845-852
- 4-13. Bolam, D. N., Xie, H., Pell, G., Hogg, D., Galbraith, G., Henrissat, B., and Gilbert, H. J. (2004)

J. Biol.Chem. **279**, 22953-22963

4-14. Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J. and Davies, G. J. (2004) *Biochem. J.* **382**, 769-781

4-15. Boraston, A. B., Notenboom, V., Warren, R. A. J., Kilburn, D. G., Rose, D. R., and Davies, G. (2003) *J. Mol. Biol.* **327**, 659-669