第５章 総括

植物の細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、リグニンなどからなる。近年、天然の有機物としてセルロースに次いで多量に存在するヘミセルロースの有効利用が注目されている。ヘミセルロースの主鎖を分解するキシラナーゼのような酵素については研究が進んでいたが、側鎖を分解する酵素についてはあまり研究が進んでいなかった。特に、糖質加水分解酵素ファミリー54 (GH54) に属するアラビノフラノシダーゼは基質特異性などの研究は進んでいたものの、その構造は明らかになっておらず、構造学的な研究は全く進んでいなかった。そのため、触媒残基も同定されておらず、基質認識機構についても不明であった。このようなことから、GH54 アラビノフラノシダーゼの構造解析が強く望まれていた。

そこで、私は、白麹菌 *Aspergilus kawachii* 由来 GH54 アラビノフラノシダーゼ (AkAbf54) を研究対象にして立体構造解析を行った。第 2 章でその発現、精製、結晶化、構造解析について述べた。酵母による大量発現に成功し、精製及び結晶化を行い、良質な結晶を得た。重原子同型置換法により位相を決定し、分解能 1.75 Å で立体構造を明らかにした。また、アラビノース複合体構造も明らかにした。

その結果、AkAbf54 は、N 末触媒ドメインと C 末ドメインの 2 つのドメインから構成されることが分かった。第 3 章では主に触媒ドメインについての構造の特徴を述べた。β-サンドイッチフォールドを持っており、負に荷電した触媒ポケットを持っていた。アラビノース複合体の活性中心の構造と変異体を用いた実験から、触媒残基を決定した。求核性残基が Glu221 であり、酸・塩基触媒が Asp297 であった。反応機構はアノマー保持型であることが以前に報告されていたが、二つの触媒残基間の距離はこの報告を裏付けるものであった。アラビノースを認識する残基も決定した。その中で、シスペプチド結合で隣り合ったシステイン (Cys176 と Cys177) 間で形成されるジスルフィド結合が見られ、基質を疎水的に認識する役割を果たすことが分かった。このような認識は他に例のないものであり、基質認識を考える上で非常に興味深い。

第 4 章では C 末にあるドメインについて構造の特徴を述べた。この C 末ドメインにアラビノース結合能があることは、活性中心にアラビノースがどのように結合するかを見るためにアラビノース複合体構造を明らかにしたところ、偶然発見されたものである。このことからこのドメインが糖質結合ドメイン (CBM) であることが分かり、アラビノース結合ドメインと名付けた。独立した結合ポケットを 2 つ (β-サブドメインとγ-サブドメインに一つずつ) 持っていることが分かった。アラビノース結合ドメインは、その構造の特徴とアラビノースを結合するという機能から新しく CBM42 に分類された。

アラビノオリゴ糖との複合体構造を明らかにしたところ、CBM42 は側鎖の糖アラビノースと主に相互作用しており、主鎖の糖キシロースとはほとんど相互作用していないことが明らかになった。このことから、CBM42 はヘミセルロースの側鎖を認識して結合するという性質を示すことが予想された。これは驚くべきことであった。なぜならば、これまで報告されてきたヘミセルロースに結合する CBM は、主鎖の糖を認識する性質を示すものばかりであったからである。そこで、私は CBM42 の機能解析を行い、本当にそのような性質を

示すのかを調べた。機能解析に先立ち、アラビノース結合に関わる残基であるアスパラギン酸 Asp435 と Asp488 の変異体を作成した。

まず、不溶性基質に対して活性測定を行った。片方のアスパラギン酸を変異させると野生型と比較して 5~10 倍程度活性が低下し、両方のアスパラギン酸を変異させると 50 倍程度と活性が相乗的に低下した。このことから、CBM42 は糖質結合ドメインとして確かに機能していることが分かった。次に、不溶性糖に対する CBM42 の結合力を Binding assay やアフィニティゲル電気泳動により調べた。その結果、CBM42 はアラビノース側鎖を多く含むヘミセルロースほど結合力が高いことが分かった。また、アスパラギン酸を変異させると結合力を失った。そして、ITC により、オリゴ糖に対する結合力を測定した。アラビノース糖に対する結合定数は、2.0×10^3 程度と他の CBM と比較して弱い値を示した。一方、キシロース糖に対しては結合が検出できなかった。このことはキシラン主鎖の結合サイトがないことを示している。

これらのことから、CBM42 は、(ⅰ) 糖結合ポケットを二つ持ち、この二つが不溶性糖に対する結合に働く、(ⅱ) ヘミセルロースのアラビノース側鎖一糖のみを認識する、(ⅲ) 糖に対する結合定数が 10^3 程度と他の CBM と比較して弱い、といった機能を示すことが明らかになった。この CBM42 のヘミセルロースの側鎖の糖のみを認識するという新規性は応用性を秘めている。他の細胞壁分解酵素と組み合わせることにより、分解対象を特異的に制御出来る可能性を持つからである。

GH54 に分類されるアラビノフラノシダーゼはカビに特異的に分布する酵素である。この酵素がどのようにしてカビに生まれたのかは不明である。ただ、触媒ドメインに関しては、第 3 章に述べたように、クラン GH-B の酵素と比較すると、フォールドが弱いながらも相同性を示すことや求核性残基の位置がほぼ重なることから、クラン GH-B との進化的関連が示唆される。また、アラビノース結合ドメインに関しては、第 4 章に述べたようにレクチンとフォールドが似ており、弱い結合力で単糖を認識する性質に共通点が見出されることから、レクチンとの強い関連が示唆される。このことから、クラン GH-B 酵素とレクチンが組み合わさって GH54 酵素が誕生したと考えることもできる。

AkAbf54 の構造を明らかにし、機能解析は行ってきたが、まだ謎が残っている。それは、AkAbf54 がどのように不溶性基質アラビノキシランに結合して反応が進むのかということである。図 4-37 のような近接効果により反応を助けていると考えると矛盾が少ない。ただ、このモデルが正しいかどうかは不明であり、これから明らかにしていくべき課題であると考える。

発表論文

本博士論文の内容の一部は、

Miyanaga, A., Koseki, T., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H., and Fushinobu, S. (2004) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of alpha-L-arabinofuranosidase B from *Aspergillus kawachii*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60,** 1286-1288

Miyanaga, A., Koseki, T., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H., and Fushinobu, S. (2004) Crystal structure of a family 54 alpha-L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. *J. Biol. Chem.* **279,** 44907-44914

に発表されている。

さらに、

Miyanaga, A., Koseki, T., Miwa, Y., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H., and Fushinobu, S. The family 42 carbohydrate-binding module of family 54 alpha-L-arabinofuranosidase specifically binds the arabinofuranose side-chain of hemicellulose.

を投稿中である。

今回解析した構造は、PDB (http://www.rcsb.org/pdb/) ID 1WD3 (Native)、1WD4 (アラビノース複合体)、2D43 (アラビノトリオース複合体)、2D44 (AXX 複合体) に登録されている。

今回の研究成果により、新たに CBM42 (http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/CBM_42.html) が創設された。

用語

1) 構造因子・位相

タンパク質の結晶にX線を照射したときに得られる回折像は1-1式で表される。

$$F(hkl) = V\int_{x=0}^{1}\int_{y=0}^{1}\int_{z=0}^{1}\rho(xyz)\times\exp[2\pi i(hx+ky+lz)]dxdydz \quad (1\text{-}1)$$

ここでFは構造因子、Vは結晶の単位胞の体積、ρは結晶中の点(xyz)の電子密度、exp成分は位相角である。回折像として得られる回折強度$I(hkl)$は$F(hkl)$の2乗に比例する。

測定された$F(hkl)$に対し結晶中の各点(xyz)における電子密度$\rho(xyz)$は、$F(hkl)$のフーリエ変換として表される。

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V}\sum_{h}\sum_{k}\sum_{l}|F(hkl)|\exp[-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha(hkl)] \quad (1\text{-}2)$$

1-2式右辺の$F(hkl)$は回折像から求めることができるが、$i\alpha(hkl)$はX線の位相成分であり、回折像から直接求めることはできない。そのためX線結晶構造解析ではX線の位相を決定する必要がある。

2) 分子置換法 (Molecular Replacement method ; MR法)

1-2式右辺の位相性分$i\alpha(hkl)$を、既知の類似構造から借用する方法である。分子置換法は、アミノ酸配列の相同性が高い (30%以上)、すなわち類似の構造を持っている可能性が高い既知構造をサーチモデルとして、サーチモデル分子が結晶中でどのように並んでいるのか探す。この時、結晶中に配置されたサーチモデル分子から計算されるX線回折像と、実際に測定された回折像との差が小さくなるように配置する。この配置されたサーチモデルから算出される位相を初期位相とする。

3) 多波長異常分散法 (Multiple Wavelength Anomalous Dispersion method ; MAD法)

1-1式で表されるhklの反射に対し、反対の位相角$-2\pi(hx+ky+lz)$を持つものは

$$F(\overline{hkl}) = V\int_{x=0}^{1}\int_{y=0}^{1}\int_{z=0}^{1}\rho(xyz)\times\exp[2\pi i(-hx-ky-lz)]dxdydz \quad (1\text{-}3)$$

で表される。一般に1-1式と1-3式の構造因子Fは同じである。しかし、タンパク質結晶中に特定の原子を含む場合、その原子にある波長のX線を照射すると構造因子Fに差が生まれる(異常分散)。一般に原子散乱因子は用いるX線の波長によって変化する。特に、内殻の電子の結合エネルギーに近いX線が入射すると異常分散という共鳴現象が起こる。この異常分散効果を利用し、X線の位相を決定することができる。

波長可変のシンクロトロン放射光施設では、1 Å付近の波長のX線が利用できる。そのため、1 Å付近の波長で異常分散効果の大きな原子をタンパク質中に取り込むことは、MAD法による位相決定に有効である。セレン (元素記号Se ; 原子番号34) は、周期表ではS原子の1

周期下に位置する原子で、0.979 Å付近の波長で大きな異常分散効果がある。Seは、S原子の代わりにSe原子を持つセレノメチオニンの形でタンパク質中に取り込むことが容易であり、近年セレノメチオニン置換体タンパク質のMAD法による構造解析が多く報告されている。

4) 重原子同型置換法 (Multiple Isomorphous Replacement method ; MIR法)

重原子誘導体の結晶の X 線回折データを収集すると、重原子の散乱効果が加わったデータが得られることになる。重原子 (水銀や白金など) は散乱能がタンパク質を構成する炭素、窒素、酸素と比較して大きいことから、パターソン関数などの方法によってその位置座標を求めることができる。その情報を手がかりにして位相を決定することができる。

一般に、位相を一義的に決定するには 2 種類以上の重原子誘導体 (それぞれ異なる位置に重原子が結合したもの) を必要とする。

5) 差パターソンマップ

重原子誘導体の結晶の構造因子 F_{PH} から母結晶の構造因子 F_P を引いた 2 乗$(F_{PH}-F_P)^2$ のフーリエ変換である差パターソン関数は、重原子誘導体の重原子の重原子間のベクトルの先にピークを示す。差パターソンマップのハーカー面に重原子のピークが現れ、それを元に重原子の位置を求めることができる。

6) 差フーリエマップ

差パターソンマップから重原子結合サイトの座標が予測できると、重原子が反射に与える影響を計算できる (位相情報が得られる) ので実空間での差フーリエマップを計算することができる。差フーリエマップを描くと、差パターソンマップでは見つけることが難しいマイナーサイトを見つけることができる。

7) SOLVE

MAD[3)]やMIR[4)]などのデータを元に自動的に重原子の位置を決定し、初期位相を計算するソフト。

8) RESOLVE

Density modification[9)]を行い、位相を改善し、モデルの自動構築を行う。

9) Density modification

溶媒平滑化やヒストグラムマッチングを行うことによる位相改善の方法。溶媒平滑化は、タンパク質結晶中の溶媒領域のピークをノイズと見なし位相を改善する方法である。ヒストグラムマッチングは、不明瞭な像の分布を標準的な像の分布に尺度を合わせる方法である。

10) ARP/wARP

2.3 Å 以上の高分解能の電子密度マップでは、ペプチド鎖を構成する原子が鮮明に区別できるため、プログラムによる主鎖構造構築の自動化が可能である。プログラム ARP/wARP は、電子密度のピークに対してタンパク質の主鎖構造 (N-Cα-C=O) および水分子を当てはめて精密化を行い、自動的に構造を構築するプログラムである。

11) CNS

X線結晶構造解析およびNMR構造解析のプログラムパッケージで、スクリプトを利用することで様々な精密化および電子密度マップ作製を行うことが可能である。

12) 剛体近似精密化 (スクリプト；rigid.inp)

構造の各部分を剛体として扱い、各原子を個別に精密化するのではなく、集団として精密化する精密化法である。

13) エネルギー精密化 (スクリプト；minimize.inp)

構造の結合距離や結合角などによるエネルギー関数を最小にする精密化法である。

14) 温度因子 (b-factor)

タンパク質の熱振動を表すパラメーターであり結晶中のタンパク質の状態を表す非常に重要なパラメーターである。温度因子の精密化 (スクリプト；bindividual.inp) は構造中の個々の原子について等方性温度因子を精密化する方法である。

温度因子には等方性と異方性がある。本来熱振動は、原子周りにラグビーボール状楕円軌道を持つ異方性の運動しており、その場合精密化するべきパラメーターはB_{11}、B_{12}、B_{13}、B_{21}、B_{22}、B_{23}の6個である。構造中の全原子に対し、異方性温度因子を精密化するためには測定される反射の数は少ないため、一般的にタンパク質の結晶構造の精密化には、原子は円形の熱振動をすると仮定する等方性温度因子を用いる。

温度因子が高い部分は、その部分の構造が非常に動きやすい (熱運動している) ということを表す。タンパク質の動きやすさや構造の評価に用いられるパラメーターである。

15) $2F_o$-F_c電子密度マップ

$2F_o$-F_c電子密度マップは、回折データより計算される構造因子F_oを2倍したものから、モデル構造より計算される構造因子F_cを差し引いたものを構造因子として作成した電子密度マップである。この時の位相はモデル構造から計算される位相を用いる。この電子密度マップは、モデル構造を構築されていない部分の電子密度が強く現れるので、モデル構築の際用いられる電子密度マップである。また、タンパク質の電子密度マップの表示にも一般

的に用いられる。

16) F_o-F_c電子密度マップ

F_o-F_c電子密度マップは、回折データより計算される構造因子F_oから、モデル構造より計算される構造因子F_cを差し引いたものを構造因子として作成した電子密度マップである。この時の位相はモデル構造から計算される位相を用いる。この電子密度マップは、モデル構造を構築されていない部分の電子密度がポジティブ、本来存在しない箇所にモデルが構築されている部分がネガティブピークとして現れる。リガンドを除いた構造をモデル構造としてF_o-F_c電子密度マップを作成し、リガンド部分の電子密度の形状を表示する時に用いられる。

17) 非対称単位 (Asymmetric unit)

結晶構造解析における最小の繰り返し単位で、非対称単位中の構造が結晶学的対称性によって繰り返されることで結晶を形成する。非対称単位中に一分子が含まれる場合は、結晶中に含まれるその分子のサブユニットは全て同じ構造を持つということになる。逆に非対称単位中に複数の同一サブユニットが含まれる場合は、これらのサブユニットは独立した構造を有しており、ループの揺らぎや側鎖の向きなど何らかの構造の違いが生じている。

18) Figure of Merit (FOM)

計算された位相と真の位相のずれを表すパラメーターで、0~1の値で表される。全て真の位相の時1となる。

19) *R* factor

モデル構造から計算される構造因子$F_c(h)$と回折データから計算される実測構造因子$F_o(h)$のずれを示す値。小さくなるほど、一致しているといえる。通常20%を切ることが要求される。

20) RMSD

2つの構造間の平均二乗距離の平方根であり、値が小さいほどそれらの構造が似ていることを示す。

謝辞

本博士論文研究を進めるに当たり、多くの方々の御指導、御協力に支えられながら、ここまで辿り着くことができました。

最初に、私の所属する酵素学研究室において、研究に対する姿勢などを教えていただいた祥雲弘文教授に深く感謝いたします。若木高善助教授には、私が卒論生として本研究室に入ったときから常に研究のサポートをしていただき感謝しております。そして、このような研究の場とテーマを与えていただき、常に助言を与えて下さった伏信進矢助手には心から感謝いたします。

本研究は、酒類総合研究所の小関卓也博士及び広島大学の三輪陽三氏との共同研究で行われました。サンプル提供を始め、不溶性糖に対する活性測定やアフィニティゲル電気泳動を行っていただきました。彼らなしには、この研究成果は成し得なかったと思っております。

他にも多くの方々に本研究を手伝っていただきました。食品総合研究所の北岡本光博士には、ITC 測定で用いたリガンドであるメチル-α-L-アラビノフラノシドを合成していただきました。食品総合研究所の西本完博士は PAS 染色の方法を教えて下さいました。ITC 測定においては、酒類総合研究所の家藤治幸博士と正木和夫博士、日本シイベルヘグナー株式会社の中村順司氏と国光計太氏と坂口安史氏に大変お世話になりました。産業技術総合研究所の久野敦博士、北海道大学の中原拓氏とは有益な討論をさせていただきました。彼らには本当に感謝しております。

本研究室の日高將文さん、西増弘志君には、本研究を進めるに当たって有益な助言をいただきました。金尚完さんは唯一の同期としてお互いに励ましあいながら研究を行いました。藤本海音さんには事務的なことで助けていただきました。その他にも、青木玲二君、横井大一郎君、森田綾子さん、小林磨貴子さん、尾崎未央さん、二十軒悠里さん、新井健司君をはじめとした本研究室の皆様には、私の話し相手になっていただき感謝しております。

最後に、これまでの長い学生生活を日々支えてくれ、研究に集中できるような環境を作ってもらった家族に感謝いたします。

2006 年　1 月