

論文の内容の要旨

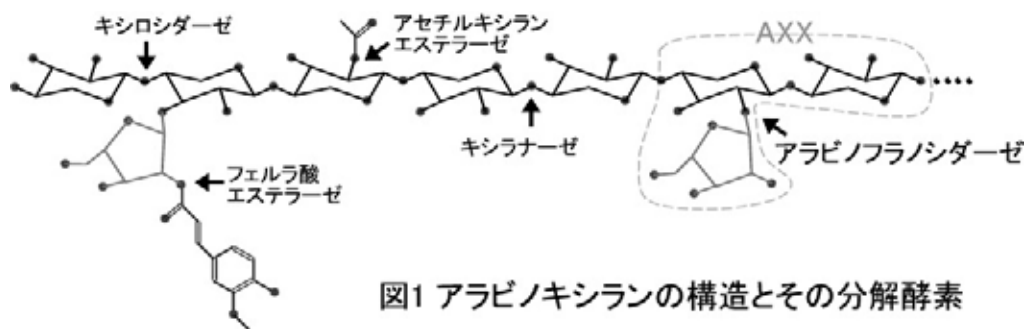
応用生命工学 専攻
平成 15 年度博士課程 進学
氏名 宮永 顕正
指導教員名 祥雲 弘文

論文題目 GH54 α -L-アラビノフラノシダーゼの構造決定と機能解析

1. 序論

植物細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、リグニンという主に 3 つの成分からなっている。そのうち、ヘミセルロースには様々な種類が存在し、構成する糖の種類が多く、結合様式も複雑なため、それを分解するヘミセルラーゼも多様に存在する。糖質加水分解酵素 (GH) はグリコシド結合を切断する反応を行う。GH はアミノ酸配列に基づいて分類されたファミリーで構成されており、現在約 100 のファミリーが登録されている。ヘミセルラーゼは、この GH に属しているものが多く、しばしば触媒ドメインとは別に糖質結合ドメイン (CBM) を有している。CBM は不溶性糖基質に結合して触媒ドメインの反応効率を上昇させる役割を持っており、アミノ酸配列から現在 40 以上のファミリーに分類されている。

ヘミセルロースの一種であるアラビノキシランは、図 1 に示すようにキシロースで構成される主鎖にアラビノースなどの側鎖が結合しているという構造をとる。アラビノフラノシダーゼは、このアラビノース側鎖を分解する酵素であり、焼酎の発酵において穀物の分解や香り成分の生成を助ける役割をすることから、醸造産業において重要な酵素の一つである。焼酎白麹菌 *Aspergillus kawachii* は、GH51 に属している AkAbf51 と GH54 に属している AkAbf54 の 2 種類のアラビノフラノシダーゼを生産する。GH51 の酵素は、*Geobacillus stearothermophilus* のアラビノフラノシダーゼ (GsAbfA) で構造が明らかになっており、詳細な研究が進んでいる。一方、AkAbf54 が属している GH54 の酵素については構造が決定されておらず、構造機能相関に関する研究は全く進んでいなかった。本研究では、この GH54 に属する AkAbf54 の構造解析及び機能解析を行った。



2. AkAbf54 の結晶構造解析とその全体構造 [1, 2]

AkAbf54 を大量発現させるため、発現系を構築した。大腸菌では発現量が少量であったが、*Pichia* 酵母で発現させると大量の AkAbf54 が得られた。酵母で発現させた AkAbf54 には糖鎖が付加していたが、これを切断することなく結晶化に成功した。立体構造を重原子同型置換法 (MIR 法) により分解能 1.75 Å で決定した。また、アラビノース、アラビノフラノシル- α -(1,2)-キシロピオース (図 1、AXX) との複合体構造をそれぞれ分解能 2.07 Å、2.3 Å で決定した。AkAbf54 は、図 2 に示すように N 末触媒ドメイン (Gly19-Val335) と C 末ドメイン (Gly336-Ser499) の 2 つのドメインからなっていた。触媒ドメインの Asn202 に糖鎖が結合していた。

3. 触媒ドメイン [2]

触媒ドメインは β -サンドイッチフォールドをとっており、GH7 や GH16 といったクラン B に属する酵素と弱い構造上の相同性が見られた。負に強く荷電したポケットを持っており、アラビノースとの複合体ではこのポケットにアラビノース (Araf1) が結合していたことから、このポケットが触媒ポケットであると考えられた。Araf1 は、水素結合及び疎水的相互作用により認識されていた。変異体を用いた実験及び GH51 GsAbfA との構造比較などから触媒残基 (Nucleophile: Glu221、Acid/base: Asp297) を決定した。また、連続した 2 つのシステイン残基 (Cys176 と Cys177) からなるジスルフィド結合がアラビノースを疎水的に認識していた。さらに、このシステイン間のペプチド結合はシス結合になっていた。このようにシスペプチド結合で連なった連続するシステインのジスルフィド結合が糖を認識している例は他に報告されていない。

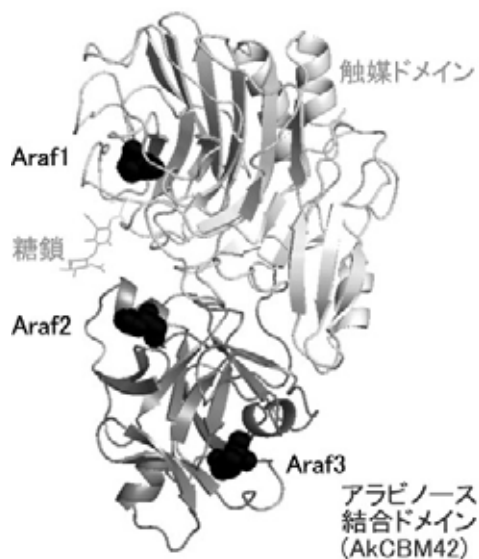


図2 AkAbf54の全体構造

4. アラビノース結合ドメインのCBM42 への分類 [2, 3]

アラビノースとの複合体構造を決定した際、アラビノースは触媒ドメインの他に、C 末ド

メインに 2 分子 (Araf2 と Araf3) が結合していた。このことから、C 末ドメインは CBM であると考えられ、アラビノース結合ドメインと名付けた。他の CBM は、触媒ドメインとの間にリンカーを持ち、触媒ドメインと離れた状態で存在するものが多いが、アラビノース結合ドメインはそれらとは異なり、リンカーを持たず、触媒ドメインと密に結合していた。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。ドメイン内に 3 回繰り返し配列をもっており、 α サブドメイン、 β サブドメイン、 γ サブドメインに分けられる。各サブドメインは擬似 3 回軸で集まっており、サブドメイン間には構造上の相同性が見られた。このようなアラビノース結合ドメインのフォールドは CBM13 と似ているものであったが、CBM13 に見られるモチーフを持っていないなどの違いが見られた。このことから、アラビノース結合ドメインは新たに設置された CBM ファミリー (CBM42) に分類されることになった。以下、アラビノース結合ドメインを AkCBM42 と略す。アミノ酸配列のアライメントを行ったところ、GH54 に属する全ての酵素が CBM42 に対応する部分を持っていることが分かった。この他、GH43 にも CBM42 と相同性を持つ ORF が見られた。

アラビノースとの複合体構造では、Araf2 が β サブドメインに、Araf3 が γ サブドメインに結合していた。 β 、 γ 各サブドメインポケットのアラビノース認識はほぼ同じであり、水素結合及び疎水相互作用により認識されていた。特に、アスパラギン酸とアラビノース間 (Asp435-Araf2, Asp488-Araf3) に見られるそれぞれ二つずつの水素結合が重要であると思われる。CBM13 とは糖結合部位及び相互作用の様式が異なっていた。

また、AXX との複合体構造では、AXX はアラビノース複合体と同様に β サブドメインと γ サブドメインに結合していた。側鎖アラビノース部分はアラビノース複合体と同様な認識を受けていた。一方、主鎖の糖にあたるキシロピオース部分とは弱い相互作用しかしていなかった。これまでに報告されているヘミセルロースに結合する CBM は主に主鎖の糖を認識するものばかりであるが、CBM42 はこれらとは異なるタイプであった。

5. AkCBM42 の機能解析 [3]

Asp435、Asp488 の変異体を用いて、AkCBM42 の詳細な機能解析を行った。

不溶性の糖 wheat arabinoxylan に対する活性を測定した。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、AkCBM42 は触媒ドメインの不溶性糖に対する活性を助けていることが分かった。一方、可溶性基質 *p*-ニトロフェニルアラビノフラノシドに対する活性は、野生型と変異体で同様な活性を示した。

結合アッセイを行ったところ、wheat arabinoxylan に結合した。アラビノース側鎖を除去した wheat arabinoxylan を作成したところ、全く結合しなかった。変異体で結合アッセイを行ったところ、片方のアスパラギン酸を変異させると結合能力が低下し、両方のアスパラギン酸を変異させると全く結合しなかった。また、様々な不溶性糖を用いてアフィニティゲル電気泳動を行った。アラビノース側鎖を持つ arabinan にはアフィニティを示したのに対

し、アラビノース側鎖を持たない debranched arabinan ではアフィニティは見られなかった。アラビノース側鎖が多く含まれている rye arabinoxylan では特に高いアフィニティを示した。これらの結果は、AkCBM42 はアラビノース側鎖を多く含む糖ほど結合力が高いことを示している。

等温滴定熱量法を用いて、オリゴ糖に対する結合力測定を行った。AkCBM42 は、アラビノース糖（メチルアラビノフラノシドやアラビノトリオース）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。結合サイト数は2であり、片方のアスパラギン酸を変異させると結合サイト数が1に減少した。一方、キシロース糖（メチルキシロピラノシドやキシロトリオース）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、() 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、() 図3 に示すように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、() 糖に対する結合定数が 10^3 乗程度と他のCBMと比較して弱い、といったユニークな性質を示すことが明らかになった。

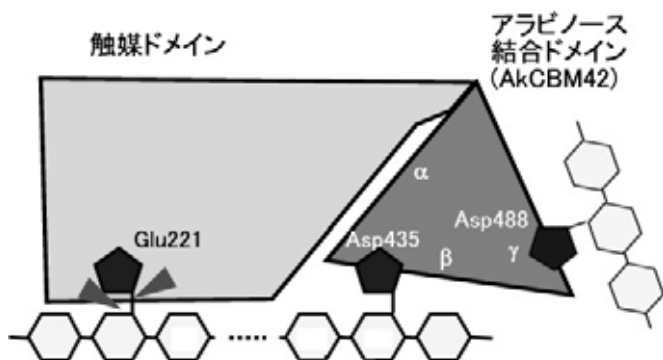


図3 AkAbf54とアラビノキシランの結合の模式図

発表論文

- [1] A. Miyana et al. (2004) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 1286-1288
- [2] A. Miyana et al. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 44907-44914
- [3] A. Miyana et al. 投稿中