

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	アルカリキシラナーゼおよび耐熱性キシラナーゼに存在するCBMファミリー36キシラン結合ドメインの性質検討
Title(English)	
著者(和文)	谷澤里沙
Author(English)	Risa Yazawa
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第8359号, 授与年月日:2011年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中村 聡
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第8359号, Conferred date:2011/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

アルカリキシラナーゼおよび耐熱性キシラナーゼに存在する

CBM ファミリー **36** キシラン結合ドメインの性質検討

生物プロセス専攻

谷澤 里沙

目次

第 1 章	序論	1
1-1	キシラナーゼ	2
1-1-1	キシランとキシラナーゼ	2
1-1-2	多糖加水分解酵素の多糖結合ドメイン	4
1-2	好アルカリ性細菌 <i>Bacillus</i> sp. 41M-1 株由来好熱性キシラナーゼ J	7
1-2-1	キシラナーゼ J の性質とドメイン構成	7
1-2-2	XBDj のファージディスプレイと進化分子工学による機能部位解析	10
1-2-3	XynJ の立体構造	16
1-3	高度好熱性細菌 <i>Dictyoglomus thermophilum</i> 由来キシラナーゼ B	20
1-4	本研究の目的と意義	23
1-5	引用文献	25
第 2 章	XynJ 由来 XBD の部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析	29
2-1	緒言	30
2-2	実験材料と方法	32
2-2-1	菌株、プラスミドおよび培地	32
2-2-2	立体構造モデリング	33
2-2-3	組換え DNA 技術	33
2-2-4	部位特異的変異導入法	33
2-2-5	塩基配列決定および遺伝情報解析	34
2-2-6	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	35
2-2-7	タンパク質の定量法	35
2-2-8	GST-XBDj の調製	36
2-2-9	GST 活性の測定	37
2-2-10	不溶性 Oat spelt キシランの調製	37

2-2-11 不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率の測定	38
2-2-12 不溶性 Oat spelt キシランとの結合における吸着等温線の作製	38
2-3 結果および考察	40
2-3-1 XynJ 由来 XBD とキシロトリオースとの 複合体立体構造モデルの構築	40
2-3-2 各種変異型 GST-XBDj をコードする発現型プラスミドの構築	40
2-3-3 野生型および各種変異型 GST-XBDj の大腸菌による生産と精製	42
2-3-4 Ca^{2+} への配位結合に関与する残基にアミノ酸置換を導入した 各種変異型 GST-XBDj の性質検討	46
2-3-5 キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基に アミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj の性質検討	50
2-4 結論	59
2-5 引用文献	60
第 3 章 変異型 XBD を含む XynJ の性質検討	61
3-1 緒言	62
3-2 実験材料と方法	63
3-2-1 菌株、プラスミドおよび培地	63
3-2-2 組換え DNA 技術	63
3-2-3 部位特異的変異導入法	64
3-2-4 塩基配列の決定および遺伝情報解析	64
3-2-5 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	64
3-2-6 タンパク質の定量法	64
3-2-7 XynJ の調製	64
3-2-8 不溶性 Oat spelt キシランの調製	65
3-2-9 キシラナーゼ活性の測定法 (DNS 法)	65
3-2-10 不溶性 Oat spelt キシラン加水分解活性の測定	66

3-3	結果および考察	67
3-3-1	各種変異型 XynJ をコードする発現型プラスミドの構築	67
3-3-2	野生型および各種変異型 XynJ の大腸菌による生産と精製	67
3-3-3	Ca ²⁺ への配位結合に関与する残基にアミノ酸置換を導入した 各種変異型 XynJ の性質検討	70
3-3-4	キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基に アミノ酸置換を導入した各種変異型 XynJ の性質検討	70
3-4	結論	75
3-5	引用文献	76
第 4 章	XynB 由来 XBD の部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析	77
4-1	緒言	78
4-2	実験材料と方法	81
4-2-1	菌株、プラスミドおよび培地	81
4-2-2	立体構造モデリング	81
4-2-3	組換え DNA 技術	81
4-2-4	部位特異的変異導入法	81
4-2-5	インバース PCR を用いた部位特異的変異導入法	82
4-2-6	塩基配列決定および遺伝情報解析	82
4-2-7	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	83
4-2-8	タンパク質の定量法	83
4-2-9	GST-XBDb の調製	83
4-2-10	GST 活性の測定	83
4-2-11	不溶性多糖の調製	83
4-2-12	各種不溶性多糖に対する結合率の測定	84
4-2-13	不溶性 Oat spelt キシランとの結合における キシロースおよびキシロオリゴ糖添加効果	85

4-2-14 不溶性 Oat spelt キシランとの結合における NaCl 添加効果	85
4-2-15 不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性	86
4-3 結果および考察	87
4-3-1 XBDj および XBDb のアミノ酸配列比較	87
4-3-2 XynB 由来 XBD の立体構造モデルの構築	87
4-3-3 野生型および各種変異型 GST-XBDb をコードする 発現型プラスミドの構築	90
4-3-4 野生型および各種変異型 GST-XBDb の大腸菌による生産と精製	94
4-3-5 野生型 GST-XBDb の各種不溶性多糖に対する結合率	94
4-3-6 各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率 ...	97
4-3-7 Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用以外の 不溶性 Oat spelt キシラン結合様式の解析	103
4-3-8 各種変異型 GST-XBDb の 不溶性 Larchwood キシランに対する結合率	108
4-4 結論	113
4-5 引用文献	115

第 5 章 種々の 2 価金属イオン存在下における

XynJ および XynB 由来 XBD の不溶性多糖結合能の評価	116
5-1 緒言	117
5-2 実験材料と方法	119
5-2-1 菌株、プラスミドおよび培地	119
5-2-2 タンパク質の定量法	119
5-2-3 GST-XBDj および GST-XBDb の調製	119
5-2-4 GST 活性の測定	119
5-2-5 不溶性キシランの調製	119
5-2-6 各種不溶性多糖に対する結合率の測定	120

5-3	結果および考察	121
5-3-1	種々の 2 価金属イオン存在下における 野生型および各種変異型 GST-XBDj の不溶性多糖に対する結合率	121
5-3-2	種々の 2 価金属イオン存在下における 野生型および各種変異型 GST-XBDb の不溶性多糖に対する結合率	127
5-3-3	種々の 2 価金属イオン存在下における XBDj および XBDb の不溶性多糖結合能の比較と考察	132
5-4	結論	137
5-5	引用文献	138
第 6 章	XynJ および XynB 由来 XBD の極限環境適応能の比較	139
6-1	緒言	140
6-2	実験材料と方法	142
6-2-1	菌株、プラスミドおよび培地	142
6-2-2	組換え DNA 技術	142
6-2-3	部位特異的変異導入法	142
6-2-4	塩基配列決定および遺伝情報解析	143
6-2-5	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	143
6-2-6	タンパク質の定量法	143
6-2-7	Xynj および XBDb の調製	143
6-2-8	不溶性 Oat spelt キシランの調製	144
6-2-9	XBDj および XBDb の pH 安定性	144
6-2-10	不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性	145
6-2-11	XBDj および XBDb の熱安定性	146
6-3	結果および考察	148
6-3-1	XBDj および XBDb をコードする発現型プラスミドの構築	148
6-3-2	XBDj および XBDb の大腸菌による生産と精製	152

6-3-3	XBDj および XBDb の pH 安定性	152
6-3-4	不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性	152
6-3-5	XBDj および XBDb の熱安定性	156
6-4	結論	161
6-5	引用文献	162
第 7 章	総括	163
7-1	要約	164
7-2	今後の展望	170

謝辞

第 1 章

序論

1-1 キシラナーゼ

1-1-1 キシランとキシラナーゼ

陸上植物の細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、ペクチンなどの多糖類、およびリグニンから構成される。ヘミセルロースは植物からアルカリ性水溶液で抽出される多糖混合物の総称であり、セルロースやペクチン以外の細胞壁構成多糖を指す。

β -1,4-キシラン (キシラン) はヘミセルロースの中で最も豊富な多糖であり、植物における含有率は 10~35% (乾燥重量比) である。キシランは D-キシロースが β -1,4 結合で連なった主構造を有する (Fig. 1-1)。天然に存在するキシランは一般にヘテロな多糖であり、主鎖の一部はアラビノース残基、メチルグルクロン酸残基、アセチル基等により修飾を受けている [1]。また、その修飾の程度も由来植物により大きく異なっている。

キシランの β -1,4 結合を加水分解する酵素には、キシラナーゼ (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) および β -キシロシダーゼ (1,4- β -D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.37) がある。キシラナーゼはキシランを加水分解し、キシロースおよび種々のキシロオリゴ糖を生成する。一方、 β -キシロシダーゼはキシランおよびキシロオリゴ糖を非還元末端側から加水分解して、キシロースを生成する。これらの酵素は主として微生物により生産され、由来は細菌、酵母、糸状菌など多岐にわたる。

様々な産業分野において、キシラナーゼの応用が注目を集めている [2]。例えば、キシランにキシラナーゼを作用させることにより、整腸作用や保湿作用を有するキシロオリゴ糖が製造される。また、家畜の飼料となる穀物をキシラナーゼで処理することにより、体内での分解性および栄養価を高めることができる。農産廃棄物をキシラナーゼによって糖化し、有用物質へと変換すること

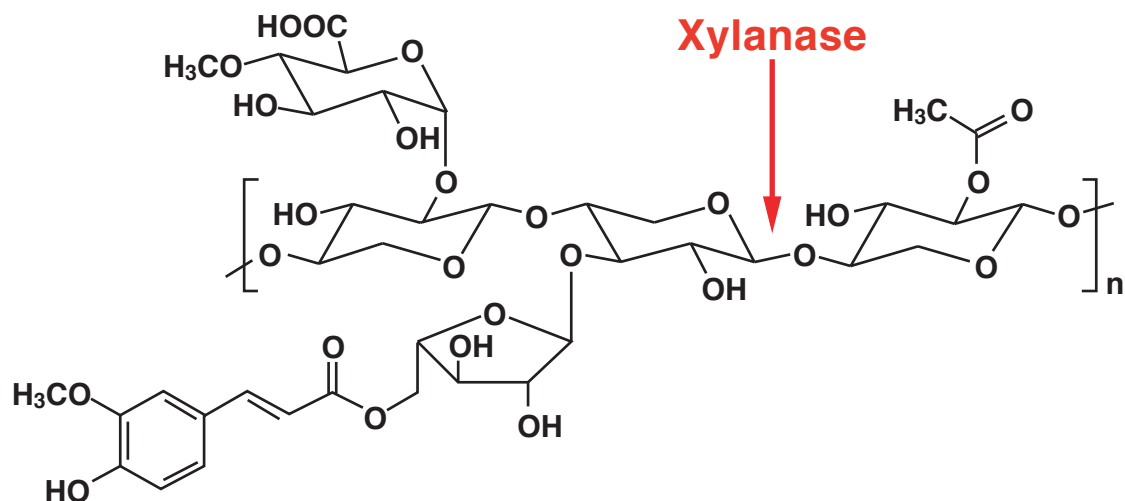


Fig. 1-1 β -1,4- キシランの主構造およびキシラナーゼによる加水分解部位

β -1,4- キシランは D- キシロースが β -1,4 結合で連なった主構造を有する。主鎖の一部はアラビノース残基、メチルグルクロン酸残基、アセチル基等により修飾を受けている。アラビノース残基にはフェルラ酸やクマル酸がエステル結合していることがある。修飾の程度は由来植物により大きく異なっている。

も可能である。このような植物バイオマスの有効利用は、持続可能な資源供給のため今後ますます重要になると考えられる。最近では、製紙工業におけるパルプ漂白にもキシラナーゼが利用されている。キシラナーゼで前処理を行うことにより、漂白工程における塩素化合物の使用量を低減させ、ダイオキシン等有害な芳香族塩素化合物の生成を抑えることができるという [3]。

一般にキシランは高温・アルカリ性条件下で水溶性が増す。したがって、キシラナーゼの実用化を考えた場合、高温・アルカリ性においても高い活性を有するキシラナーゼが望ましい。このようなキシラナーゼを獲得するために、その分離源を好熱性微生物や好アルカリ性微生物といった極限環境微生物に求めることは理にかなっており、有力な方法といえる。これまでに、好熱性微生物由来のキシラナーゼ [4-8] や好アルカリ性微生物由来のキシラナーゼ [9] も報告されている。

近年、触媒ドメインのアミノ酸配列および 2 次元的な構造を考慮したハイドロフォービッククラスター解析とよばれる手法によって、多糖加水分解酵素 (糖質加水分解酵素ともよばれる) のファミリー分けがなされている [10]。それによれば、キシラナーゼは主として糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 10 と 11 の 2 つに分類される。最近になり、相次いでキシラナーゼの立体構造が報告され、GH ファミリーと構造モチーフとの関連も明らかとなってきた。GH ファミリー 10 に属するキシラナーゼの触媒ドメイン領域の分子量は 37,000 程度で、 $(\alpha/\beta)_8$ バレル構造を有する。一方、GH ファミリー 11 に分類されるキシラナーゼの触媒ドメイン領域は分子量が 21,000 程度で、2 つの β -シートが β -ジェリーロール構造を作り、その内側に活性部位であるクレフトを形成している。

1-1-2 多糖加水分解酵素の多糖結合ドメイン

微生物由来のキシラナーゼやセルラーゼ (グルコースが β -1,4 結合で連なっ

た多糖であるセルロースの加水分解酵素) などの多糖加水分解酵素は、触媒活性を司る触媒ドメイン以外に、付加ドメインをもつものも多く知られている。触媒ドメイン以外の付加ドメインとしては、多糖結合ドメイン (糖質結合モジュールとも呼ばれる)、SLH ドメイン、フィブロネクチンタイプ III 様ドメインなどが知られている [11]。多くのキシラナーゼはこれら種々のドメインから構成されるマルチドメイン酵素である。マルチドメイン酵素内での各機能ドメインの位置関係は一定ではなく、触媒ドメインの N 末端側に多糖結合ドメインが存在するものもあれば、その逆の場合もある。

多糖結合ドメインは基質の加水分解に直接は関与しない。しかし、多糖結合ドメインは基質と結合し、触媒ドメインを基質表面に固定・濃縮する作用を通して、あるいは結晶性基質の結晶性を緩める機能を通して、触媒ドメインの加水分解作用を促進すると考えられている [12, 13]。ただし、それらの機能にあてはまらない例も報告されている。例えば、*Thermotoga maritima* キシラナーゼ A のキシラン結合ドメインは熱安定化にも関わっていると考えられている [14]。セルロースやキシランのみならず、デンプンやキチンといった多糖に親和性をもつ様々な多糖結合ドメインが見つかっている。触媒ドメインの場合と同様、多糖結合ドメインもアミノ酸配列の相同性に基づいてファミリー分け [糖質結合モジュール (CBM) ファミリー 1~61] がなされている [15, 16]。

同じ CBM ファミリーに属する多糖結合ドメインでも、多糖に対する結合特性が異なる例が報告されている。例えば、*Cellulomonas fimi* 由来エキソグルカナーゼに存在する CBM ファミリー 2 多糖結合ドメインはセルロースに強い親和性があるのに対し、同菌由来キシラナーゼ D に存在する CBM ファミリー 2 多糖結合ドメインはキシランに対して高親和性を示す [17]。また、タンパク質分子中に存在する多糖結合部位の数が異なる例も報告されている。*Cellulivibrio mixtus* 由来エンドグルカナーゼ 5A に存在する CBM ファミリー 6 多糖結合ドメインでは 2 つの結合部位 (クレフト A および クレフト B) が機能しているのに対し、*Clostridium thermocellum* 由来キシラナーゼ 11A に

存在する CBM ファミリー 6 多糖結合ドメインではクレフト A に対応する結合部位のみが機能している [18, 19]。そのため、ある多糖結合ドメインの多糖に対する結合特性や分子中の結合部位の数を CBM ファミリーのみから予測するのは不可能であり、多糖結合ドメインごとに個々に調べる必要がある。

多糖結合ドメインは、上述の CBM ファミリー分けとは別に、基質との結合様式に基づき 3 つのタイプ (タイプ A ~ C) に区分される [20]。タイプ A の多糖結合ドメインの分子表面には芳香族アミノ酸が並び、平らな結合面を形成している。結晶性セルロースやキチンがこの面と疎水性相互作用することにより結合する。タイプ B の多糖結合ドメインにはやや窪んだクレフトが存在し、非晶性セルロースやキシランなどの糖鎖が挟み込まれるようにして結合する。タイプ C の多糖結合ドメインはレクチンに似た性質をもっており、分子表面に存在するポケットでオリゴ糖 (単糖 ~ 三糖) を認識し、結合する。多糖結合ドメインの大部分が β -サンドイッチ構造をとり、それらは β -ジェリーロール構造とイムノグロブリン構造の 2 つのサブファミリーに分けられる [21]。

1-2 好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. 41M-1 株由来キシラナーゼ J

1-2-1 キシラナーゼ J の性質とドメイン構成

本研究室において、キシラナーゼ生産菌である好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. 41M-1 株が分離された [22]。本菌の培養上清からキシラナーゼが精製され、キシラナーゼ J (XynJ) と命名された。性質検討の結果、本酵素は分子量 36,000、反応の至適を pH 9.0 のアルカリ性域に有する新規なアルカリキシラナーゼであることが明らかとなった (Table 1-1) [23]。その後、XynJ をコードする遺伝子のクローニングと塩基配列の決定 [24]、さらには大腸菌における発現が行われた [25]。塩基配列より、XynJ 遺伝子は 354 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることがわかった。また、41M-1 株が生産する XynJ の N 末端アミノ酸配列解析により、N 末端の 27 アミノ酸はタンパク質の分泌に関与するシグナル配列であり、成熟型 XynJ は 327 アミノ酸からなると推定された。

XynJ の類推アミノ酸配列について SWISS-PROT のデータベースを用いた相同性検索を行った結果、N 末端側約 200 アミノ酸の領域については既知のキシラナーゼと相同性が認められ、この領域は GH ファミリー 11 に分類される触媒ドメインとして機能しているものと考えられた (Fig. 1-2) [26]。一方、C 末端側の約 130 アミノ酸からなる領域は、既知タンパク質との顕著な相同性が認められず (1995 年当時)、その機能は不明であった。

XynJ の C 末端領域の機能を調べる目的で、触媒ドメイン領域のみからなる C 末端領域欠失型酵素 [CatDj (原報では ΔJC という名称を用いているが、本論文では便宜上 CatDj とよぶ) : XynJ の Ala1 ~ Pro222 に相当 (残基番号は成熟タンパク質の N 末端を 1 とする)] が調製され、野生型酵素との性質比較が行われた。その結果、CatDj もキシラナーゼ活性を有しており、C 末端領域は触媒活性発現には必要ではないことがわかった [26, 27]。多糖加水分解酵素の

Table 1-1 XynJ の諸性質

Molecular weight	36,000
pI	pH 5.3
Optimum pH	pH 9.0 (at 37°C)
pH stability	pH 3.0-12.0
Optimum temperature	50 °C (at pH 9.0)
Temperature stability	≤ 55 °C (at pH 9.0)
Inhibitor	HgCl₂, NBS*

*NBS: N-bromosuccinimide

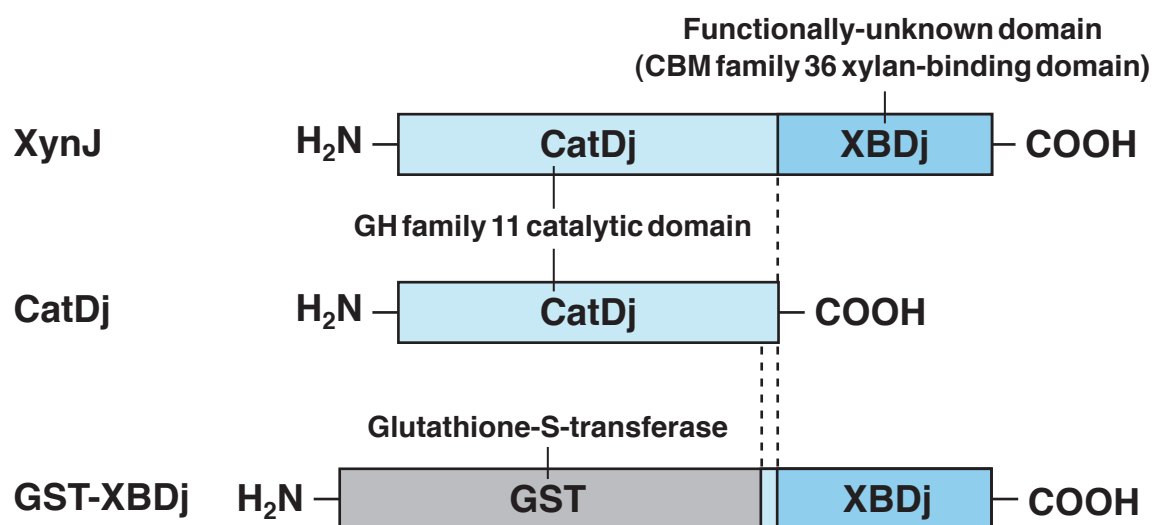


Fig. 1-2 XynJ およびその誘導体の構造模式図

XynJ、C 末端領域欠失型酵素 (CatDj) および C 末端領域と GST (グルタチオン -S- トランスフェラーゼ) との融合タンパク質 (GST-XBDj) の構造を模式的に示した。

中には多糖結合ドメインを含むものが数多く知られていることは先にも述べたが (本章 1-1-2 項参照)、その当時においてもセルラーゼやキシラナーゼにおけるセルロース結合ドメインの存在が知られていた [28]。そこで、XynJ および CatDj の不溶性キシランへの結合能が調べられた。XynJ は不溶性キシランへの結合能を有していたが、C 末端領域の欠失により、結合能は消失した。また、この C 末端領域とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質 [GST-XBDj (原報では GST-JC1 という名称を用いているが、本論文では便宜上 GST-XBDj とよぶ)] が調製され、不溶性キシランおよびセルロースに対する結合能が調べられた (Fig. 1-3) [29]。GST-XBDj は不溶性 Oat spelt キシランに対してとりわけ高い結合能を示し、不溶性 Larchwood キシランに対してもある程度結合能を示した。一方、結晶性セルロース (アビセルとして市販)、繊維性セルロースおよび微粒子性セルロース (いずれもセルロースパウダーとして市販) には結合能を示さなかった。以上の結果より、XynJ の C 末端領域は触媒ドメインとは独立してキシランに対して特異的に結合する、キシラン結合ドメイン (XBD) であると結論された。さらに、可溶性 Birchwood キシランの加水分解活性については XynJ と CatDj との間に差は認められなかったが、不溶性 Oat spelt キシランを基質として用いた場合には XynJ が著しく高い活性を示した [29]。これらの結果より、XynJ の XBD (以後 XBDj とよぶ) は不溶性キシランと結合し、触媒ドメインによる不溶性基質の加水分解を促進する機能を有していると考えられた。

1-2-2 XBDj のファージディスプレイと進化分子工学による機能部位解析

本研究室では、繊維状ファージである fd ファージ表面への XBDj の提示 (ファージディスプレイ) に成功している (Fig. 1-4) [30]。すなわち、ファージベクター fNEL を用いて繊維状ファージの大腸菌への感染に必要な外殻タンパク質 gIIIp の N 末端に相当する位置に XBDj 遺伝子 (XynJ の Ser195 ~

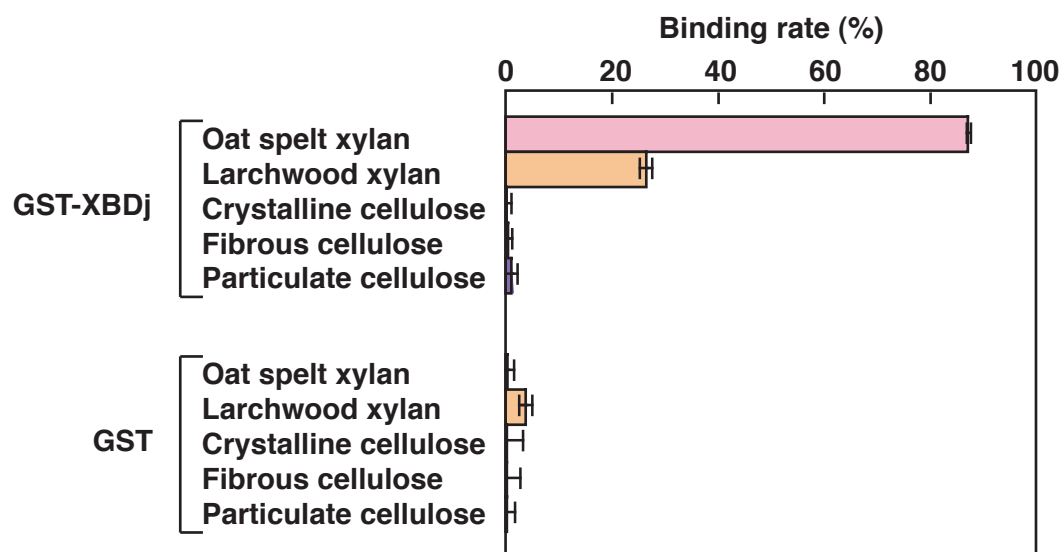


Fig. 1-3 GST-XBDj の不溶性キシランおよびセルロースに対する結合能

終濃度 0.6 μM の GST-XBDj および GST を用いて、不溶性キシランおよびセルロース (12 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は pH 9.0、37°C で 2.5 時間行った。

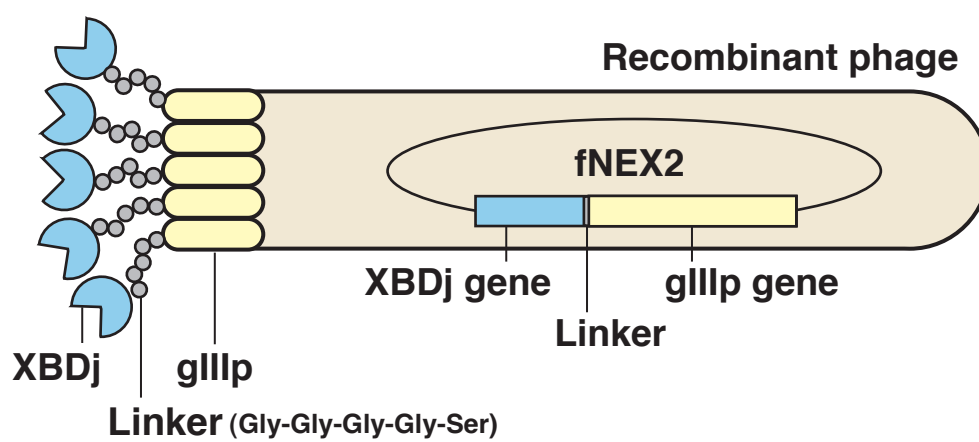


Fig. 1-4 XBDj のファージディスプレイ

Arg327 に相当する塩基配列)を連結し、組換えファージベクター fNEX2 を構築した。その際、XBDj 遺伝子と gIIIp 遺伝子の連結部位には、両タンパク質の機能を保持するためにリンカー配列 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) をコードする塩基配列を挿入している。fNEX2 に由来する野生型 XBDj 提示ファージは、fNEL に由来するコントロールファージに比べ、約 200 倍の不溶性キシラン結合能を有していた (Table 1-2) [30, 31]。

ファージディスプレイと進化分子工学 [32] を利用したキシラン結合ドメインの機能部位解析が行われた。すなわち、野生型 XBD 提示ファージベクター fNEX2 の XBDj 遺伝子領域にエラープローン PCR によりランダム突然変異を導入したファージライブラリーを構築した [30]。このランダム変異導入ファージライブラリーを不溶性 Oat spelt キシラン充填カラムにアプライし、カラムに結合しないファージを回収することにより、キシラン結合能が低下した変異体ファージ 22 株が取得された (Table 1-3) [30, 31]。

得られた変異体の中には、単一のアミノ酸置換を有するシングル変異体、2 つの置換を有するダブル変異体、そして 3 つの置換を有するトリプル変異体が含まれていた。置換が生じたアミノ酸の種類に着目した場合、Phe や Trp といった芳香族アミノ酸に置換が生じたものが延べ 8 種類、Asp に置換が生じたものが延べ 9 種類と、他のアミノ酸置換に比べて多く存在していた。シングル変異体 M31 および M46 のキシラン結合能が大きく低下したことから、Asp313 および Phe284 の重要性が示唆された (残基番号は成熟型 XynJ の N 末端を 1 とする)。また、ダブル変異体 M4、M11 および M21 に関しては、どちらのアミノ酸残基がキシラン結合に重要であることを特定するため、アミノ酸置換の一方を野生型に修復したシングル変異体が調製された。解析の結果、Trp317 が重要であることが明らかにされた [31]。さらに、ダブル変異体 M56 および M60 やトリプル変異体 M40 に関しても同様にシングル変異体の調製と解析が行われ、Asp286 および Asp318 が重要であることが明らかにされた [33]。セルラーゼやキシラナーゼに存在する多糖結合ドメインにおいては、タンパク

Table 1-2 野生型 XBDj 提示ファージの不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

	fNEL (Control)	fNEX2 (XBDj)
Recombinant phage titer (cfu/ml)	2.9 x 10⁹	2.5 x 10⁹
Bound phage titer (cfu/ml)	6.2 x 10⁶	1.1 x 10⁹
Xylan-binding rate	0.21%	44%
Relative binding rate	1	210

fNEL に由来するコントロールファージと fNEX2 に由来する野生型 XBDj 提示ファージについて、ファージ液と不溶性 Oat spelt キシランを混合後、キシランに結合したファージをキシランごと大腸菌に感染させた。ファージ感染後の大腸菌のコロニー数を計測することで、キシランに結合したファージ数を求めた。結合前との比較から結合率を見積もった。

Table 1-3 各種変異体ファージの不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

Mutant	Mutation(s)*	Binding rate (%)
(fNEL)	–	0.21
(fNEX2)	Wild	44
M17	F284S	N.D.**
M22	F284S	N.D.
M31	D313G	1.3
M35	N242D	9.7
M41	D313G	N.D.
M46	F284S	0.91
M3	S255G/D313V	0.81
M4	P289L/W317C	3.9
M9	G285R/A290V	2.4
M11	F256Y/G302E	2.7
M12	G260R/N263I	0.95
M15	S244N/D286E	N.D.
M21	N296S/W317R	2.6
M24	W317R/D318G	2.1
M43	N296S/W317R	N.D.
M56	S244N/D286E	2.6
M60	E213D/D271V	0.51
M32	G201R/A238S/T316I	1.0
M36	Q203R/T250A/R269G	5.4
M40	N226I/A261V/D318E	2.0
M47	N226I/A261V/D318E	N.D.
M52	S254G/I297T/N298S	0.71

* F284S は Phe284 の Ser への置換を表す。

** 測定未実施。

Phe に生じたアミノ酸置換は青色で、Trp に生じたアミノ酸置換は緑色で、そして Asp に生じたアミノ酸置換は赤色で示した。

質表面の Trp、Phe、Tyr といった芳香族アミノ酸残基が重要な役割を果たすことが指摘されている [34, 35]。また、*Streptomyces lividans* 由来キシラナーゼ 10A に存在するセルロース結合ドメインにおいては、キシラン結合への Asp 残基の関与が報告されている [36]。これらの報告は、これまでに本研究室で得られた結果を支持するものと考えられた。

その後、XBDj は CBM ファミリー 36 へと分類された。同 CBM ファミリーには現在までに細菌由来の 21 種類の多糖結合ドメイン (一部は機能未知ドメイン) が分類されており、*Bacillus* sp. YA-335 株由来キシラナーゼ Y [37]、*Paenibacillus campinasensis* BL11 株由来キシラナーゼ X [38]、*Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 株由来キシラナーゼ 11A [39]、*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5 株由来キシラナーゼ 11A [40]、*Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 株由来キシラナーゼ B [41]、*Caldicellulosiruptor* sp. Rt69B.1 株由来キシラナーゼ D [42] および *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842 株由来キシラナーゼ 43A [43] に存在する多糖結合ドメインが含まれる。これらの多糖結合ドメインについてアミノ酸配列を比較した結果を Fig. 1-5 に示す。XynJ の XBDj において Asp313、Trp317 および Asp318 に相当する残基は 8 種類の多糖結合ドメインすべてにおいて保存されており、キシラン結合に特に重要であることが示唆された。

1-2-3 XynJ の立体構造

最近になり、XynJ 全領域の立体構造が X 線結晶構造解析により明らかにされた [44, PDB ID: 2DCJ および 2DCK] (Fig. 1-6)。Xyn J の触媒ドメイン領域 (CatDj) は GH ファミリー 11 キシラナーゼに保存されている β -ジェリーロール構造をとっていることがわかった。一方、XBD 領域 (XBDj) も β -ジェリーロール構造をとっており、2 つの Ca^{2+} が含まれることがわかった。

マルチドメイン構造をとるキシラナーゼについては、それぞれ触媒ドメイン

Bacillus sp. 41M-1 XynJ	210	TRVEAESMTKGGPYTSNITSPFNGVALYANGDNVSNFHSFTTKANS-SFSLRGASNNNSNMA	268
Bacillus sp. YA-335 XynY	210	TRVEAESMTKGGPYTSNITSPFNGVALYANGDNVSNFHSFTTKANS-SFSLRGASNNNSNMA	268
P. campinasensis BL11 XylX	212	TRVEAENMTKSGQYTGNISSPFNGVALYANNDSVKYTYQYFSTSTH-SFSLRGASNNANMA	270
P. curdlanolyticus B-6 Xyn11A	226	TRIEAENMTKAGQYTGNIYSPFNGVALYANNDSVKFTHNFSTKSTN-NFSLRGASNNNSQMA	284
P. xylanivorans Mz5 Xyn11A	223	DKIQCEETMTKSGQYTGNISSPFNGVALYANNDAVKYTYQYFASGTH-DFTLRGCSNNNKMA	281
D. thermophilum R146B.1 XynB	207	TRIECENMSLSGPPVYSRITNPFNGIALYANGDTARATVNFPSRNYNFRLRGCGNNNNLA	266
Caldicellulosiruptor sp. R169B.1 XynD	221	SRIECESMSLSGPPVYSRITYPFNGIALYANGDRATANVNFASRNYTFKLRCGNNNNLA	280
P. polymyxa ATCC 842 Xyn43A	471	TKVEAENMKIGTVAGKISAPFDGVALYANADYVSYSQYFANSTH-NISVRGASSNAGTA	529
Bacillus sp. 41M-1 XynJ	269	RVDLRIGGQNRGTFYFGDQYPAVYTINNINHGIGNQLVELIVTADDDGTWDAYLDYLEIR	327
Bacillus sp. YA-335 XynY	269	RVDLRIGGQNRGTFYFGDHPYPAVYTINNINHGIGNQLVELIVTADDDGTWDAYLDYLEIR	327
P. campinasensis BL11 XylX	271	RVDLKIGGQTKGTFYFGGSSPAVYTLNNVSHGTGNQEIELIVTADDDGTWDAYLDYLEIR	329
P. curdlanolyticus B-6 Xyn11A	285	RVDLKVGGVTKGTFYFGGSPAVYTINNNTGTGNQQVELILTADNGQWDAFLDYLEIN	320
P. xylanivorans Mz5 Xyn11A	282	RVDLKIGGQNKGTFFYGDSPAEYTIKNVSHGTGNQTIELVVTDGQWDAFLDYFNNS	340
D. thermophilum R146B.1 XynB	267	RVDLRIDGRTVGTFFYQGYTPEAPIDNVVVSAGSHTVEITVTADNGTWDVADYLVIIQ	325
Caldicellulosiruptor sp. R169B.1 XynD	281	SVDLLIDGKKVGSFYKGYTPEASINNVVVSAGTHRVELVLSADNGTWDVADYLLIIQ	339
P. polymyxa ATCC 842 Xyn43A	530	KVDLVIGGVTVGSFNFKTPTVQTLISNITHATGDQEIKLALTSDDGTWDAYVDFIEFS	588

Identity(%)
100
97.5
73.7
72.6
64.3
52.1
50.4
50.4

Fig. 1-5 CBM ファミリー 36 に属する多糖結合ドメインのアミノ酸配列比較

Bacillus sp. 41M-1 株由来キシラナーゼ J (XynJ)、*Bacillus* sp. YA-335 株由来キシラナーゼ Y (XynY)、*Paenibacillus campinasensis* BL11 株由来キシラナーゼ X (XylX)、*Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 株由来キシラナーゼ 11A (Xyn11A)、*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5 株由来キシラナーゼ 11A (Xyn11A)、*Dictyoglomus thermophilum* R146B.1 株由来キシラナーゼ B (XynB)、*Caldicellulosiruptor* sp. R169B.1 株由来キシラナーゼ D (XynD)、および *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842 株由来キシラナーゼ 43A (Xyn43A) に存在するキシラン結合ドメインのアミノ酸配列を示した。網掛けのアミノ酸残基はこれらすべてのキシラン結合ドメインに保存されているアミノ酸残基を示す。XynJ 由来 XBDj のファージディスプレイと進化分子工学による機能部位解析でキシラン結合に重要と考えられたアミノ酸残基をアスタリスクで示した。



Fig. 1-6 XynJ の立体構造 (PDB ID: 2DCJ)
XBDj に含まれる Ca^{2+} を黄色の球で示した。

および多糖結合ドメイン単独での X 線結晶構造解析が行われてきたが、両ドメインが連結した形での結晶構造が解かれたのは XynJ 以外にほとんど見あたらない。

1-3 高度好熱性細菌 *Dictyoglomus thermophilum* 由来キシラナーゼ B

微生物はその生育上限温度の違いにより、好冷菌 (20 ~ 55°C)、中等度好熱菌 (55 ~ 75°C)、高度好熱菌 (75 ~ 90°C) および超好熱菌 (90°C 以上) に分類される [45]。種々の温度環境に適応して生存するため、微生物はそれぞれの環境下で有効に機能するタンパク質を有している。

耐熱性の高いキシラナーゼを生産する好熱菌の 1 つに、高度好熱性細菌 *Dictyoglomus thermophilum* [46] がある。*D. thermophilum* Rt46B.1 株は GH ファミリー 10 および 11 に属する 2 種類のキシラナーゼ [それぞれキシラナーゼ A および キシラナーゼ B (XynB)] を生産することが報告されている [47]。XynB は触媒ドメインの C 末端側にリンカー配列を介して機能未知なドメインを有している。このドメインは配列の相同性から CBM ファミリー 36 に分類されており、基質結合に関与すると推測されているが、実際に多糖への結合能を有していることは確認されていない [47]。

本研究室においても、*D. thermophilum* ATCC35947 株の染色体 DNA から XynB ホモログをコードする遺伝子がクローニングされ、塩基配列の決定が行われた [48]。XynB 遺伝子は 360 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、成熟型 XynB は 336 アミノ酸からなると推定された (Fig. 1-7)。さらに、触媒ドメイン領域のみからなる組換え酵素 [CatDb : XynB の Glu1 ~ Ser212 に相当 (残基番号は成熟タンパク質の N 末端を 1 とする)] の大腸菌における発現と粗精製標品を用いた性質検討が行われ、反応至適温度を 90 ~ 100°C という高温域に有することが確認された [48]。また、組換え CatDb の反応至適 pH は pH 6.0 であり、アルカリ性では大幅に活性が低下することが明らかとなった [48]。なお、ATCC35947 株由来 XynB 遺伝子の配列は Rt46B.1 株由来 XynB 遺伝子と 27 塩基異なっており、触媒ドメイン領域に 3 残基、そして機

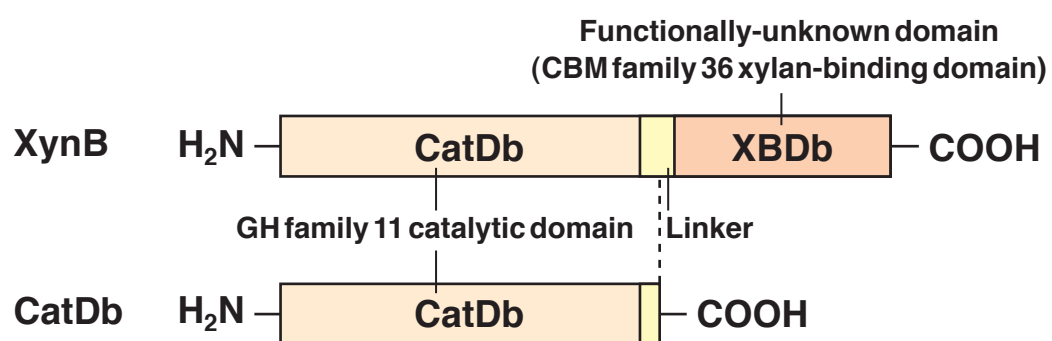


Fig. 1-7 XynB および C 末端領域欠失型酵素の構造模式図

XynB および C 末端領域欠失型酵素 (CatDb) の構造を模式的に示した。

能未知ドメイン (後に XBDb と命名) 領域に 4 残基のアミノ酸置換が生じていたが、ATCC35947 株由来 CatDb の酵素学的性質は、既報の Rt46B.1 株由来のものとほぼ同様であった [47, 48]。

1-4 本研究の目的と意義

アルカリキシラナーゼ XynJ の立体構造が明らかとなったことで、XBD 領域の機能部位の詳細な解析が可能となった。そこで本研究では、XynJ に存在する CBM ファミリー 36 XBD (XBDj) のキシラン結合機構の解明をめざすこととした。さらに、同じ CBM ファミリー 36 に属する、耐熱性キシラナーゼ XynB 由来 XBD (XBDb) についても、キシラン結合機構の解明をめざすこととした。両 XBD のキシラン結合機構はこれまで明らかにされておらず、本研究の学術的意義は大きい。また、XBD は触媒ドメインによる不溶性基質の加水分解を促進する機能を有していることから、XBD の機能部位の解析はキシラナーゼの加水分解能向上を達成する上で有意義である。先にも述べたように、キシラナーゼの産業応用を考えた場合、高温・アルカリ性条件下で高活性を有するキシラナーゼが望まれる。アルカリキシラナーゼおよび耐熱性キシラナーゼ両方の XBD を研究対象とすることで、高温・アルカリ性条件下でも機能し得る XBD の創製が期待できることから、本研究の産業界へのインパクトも大きい。

本論文の構成は以下の通りである。

第 2 章では、XynJ 由来 XBD の部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析について述べる。

第 3 章では、変異型 XBD を含む XynJ の性質検討について述べる。

第 4 章では、XynB 由来 XBD の部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析について述べる。

第 5 章では、種々の 2 価金属イオン存在下における XynJ および XynB 由来 XBD の不溶性多糖結合能評価について述べる。

第 6 章では、XynJ および XynB 由来 XBD の極限環境適応能の比較につ

いて述べる。

第 7 章では、本研究を総括し、今後の展望について述べる。

1-5 引用文献

- [1] P. Biely, *Trends Biotechnol.*, **3**, 286-290 (1985).
- [2] M. P. Coughlan and G. P. Hazlewood, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **17**, 259-289 (1993).
- [3] L. Viikali, M. Panua, A. Kantelinen, J. Sundquist and M. Linko, Proc. "The Third International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry", pp. 67-69, Stockholm (1986).
- [4] J. Berenger, C. Frixon, J. Bigliardi and N. Creuzet, *Can. J. Microbiol.*, **31**, 635-643 (1985).
- [5] S. L. Bachmann and A. J. McCarthy, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2121-2130 (1991).
- [6] T. Saiki, K. Yasuhiko, K. Kawagoe and T. Beppu, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 253-259 (1985).
- [7] R. Huber, T. A. Langworthy, H. König, M. Thomm, C. R. Woese, U. B. Sleytr and K. O. Stetter, *Arch. Microbiol.*, **144**, 324-333 (1986).
- [8] S. Nakamura, R. Nakai, K. Wakabayashi, Y. Ishiguro, R. Aono and K. Horikoshi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 78-81 (1994).
- [9] A. Ohkoshi, T. Kudo, T. Mase and K. Horikoshi, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3037-3038 (1985).
- [10] B. Henrissat, *Biochem. J.*, **280**, 309-316 (1991).
- [11] B. Henrissat and G. J. Davies, *Plant Physiol.*, **124**, 1515-1519 (2000).
- [12] D. N. Bolam, A. Ciruela, S. Mcqueen-Mason, P. Simpson, M. P. Williamson, J. E. Rixon, A. Boraston, G. P. Hazlewood and H. J. Gilbert, *Biochem. J.*, **331**, 775-781 (1998).
- [13] N. Din, H. G. Damude, N. R. Gilkes, Jr, R. C. Miller, R. A. J. Warren and D. G.

- Kilburn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 11383-11387 (1994).
- [14] K. Meissner, D. Wassenger and W. Liebl, *Mol. Microbiol.*, **36**, 898-912 (2000).
- [15] P. M. Coutinho and B. Henrissat, “Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering” (ed. by H. J. Gilbert, G. J. Davies, B. Henrissat and B. Svensson), pp. 3-12, The Royal Society of Chemistry (1999).
- [16] <http://www.cazy.org/>
- [17] P. J. Simpson, D. N. Bolam, A. Cooper, A. Ciruela, G. P. Hazlewood, H. J. Gilbert and M. P. Williamson, *Structure Fold. Des.*, **7**, 853-864 (1999).
- [18] V. M. R. Pires, J. L. Henshaw, J. A. M. Prates, D. N. Bolam, L. M. A. Ferreira, C. M. G. A. Fontes, B. Henrissat, A. Planas, H. J. Gilcert and M. Czjzek, *J. Biol. Chem.*, **279**, 21560-21568 (2004).
- [19] M. Czjzek, D. N. Bolam, A. Mosbah, J. Allouch, C. M. G. A. Fontes, L. M. A. Ferreira, O. Bornet, V. Zamboni, H. Darbon, N. L. Smith, G. W. Black, B. Henrissat and H. J. Gilcert, *J. Biol. Chem.*, **276**, 48580-48587 (2001).
- [20] A. B. Boraston, D. N. Bolam, H. J. Gilbert and G. J. Davies, *Biochem. J.*, **382**, 769-781 (2004).
- [21] H. Hashimoto, *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 2954-2967 (2006).
- [22] S. Nakamura, K. Wakabayashi, R. Nakai, R. Aono and K. Horikoshi, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 221-224 (1993).
- [23] S. Nakamura, K. Wakabayashi, R. Nakai, R. Aono and K. Horikoshi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2311-2316 (1993).
- [24] R. Nakai, K. Wakabayashi, T. Asano, R. Aono, K. Horikoshi and S. Nakamura, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **31**, 235-236 (1994).
- [25] 浅野 健, 学士論文, 東京工業大学 (1994).
- [26] 中井龍一郎, 修士論文, 東京工業大学 (1995).
- [27] S. Nakamura, R. Nakai, K. Namba, T. Kubo, K. Wakabayashi, R. Aono and K. Horikoshi, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **32**, 99-100 (1995).

- [28] D. D. Morris, *ACS Symp. Ser.*, **655**, 101-115 (1996).
- [29] T. Kubo, R. Nakai, H. Tamanoi, K. Wakabayashi and S. Nakamura, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **35**, 221-222 (1996).
- [30] 宮久保博幸, 修士論文, 東京工業大学 (2000).
- [31] 長田悠子, 学士論文, 東京工業大学 (2001).
- [32] S. Harayama, *Trends Biotechnol.*, **16**, 76-82 (1998).
- [33] 和田理恵子, 学士論文, 東京工業大学 (2002).
- [34] M. Linder, T. Nevanen and T. T. Teeri, *FEBS Lett.*, **447**, 13-16 (1999).
- [35] T. Nagy, P. Simpson, M. P. Williamson, G. P. Hazlewood, H. J. Gilbert and L. Orosz, *FEBS Lett.*, **429**, 312-316 (1998).
- [36] A. B. Boraston, P. Tomme, E. A. Amandoron and D. G. Kilburn, *Biochem. J.*, **350**, 933-941 (2000).
- [37] J. H. Yu, Y. S. Park, D. Y. Yum, J. M. Kim, I. S. Kong and D. H. Bai, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 139-145 (1993).
- [38] J. H. Yoon, D. K. Yim, J. S. Lee, K. S. Shin, H. H. Sato, S. T. Lee, Y. K. Park and Y. H. Park, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 833-837 (1998).
- [39] P. Pason, A. Kosugi, R. Waeonukul, C. Tachaapaikoon, K. Ratanakhanokchai, T. Arai, Y. Murata, J. Nakajima and Y. Mori, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 573-580 (2010).
- [40] J. Kopecky, R. Marinsek Logar, M. Zorec, J. Mrazek and Y. Kobayashi, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 201-209 (2003).
- [41] D. D. Morris, M. D. Gibbs, C. W. J. Chin, M. H. Koh, K. K. Y. Wong, R. W. Allison, P. J. Nelson and P. L. Bergquist, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1759-1765 (1998).
- [42] D. D. Morris, M. D. Gibbs, M. Ford, J. Thomas and P. L. Bergquist, *Extremophiles*, **3**, 103-111 (1999).
- [43] M. J. Gosalbes, J. A. Perez-Gonzalez, R. Gonzalez and A. Navarro, *J. Bacteriol.*,

173, 7705-7710 (1991).

[44] Ihsanawati ほか, 未発表データ.

[45] 今堀和友, 山川民夫, 生化学辞典, 第二版, 東京化学同人 (1990).

[46] T. Saiki, K. Yasuhiko, K. Kawagoe and T. Beppu, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 253-259 (1985).

[47] D. D. Moris, M. D. Gibbs, C. W. J. Chin, M. H. Koh, K. K. Y. Wong, R. W. Allson, P. J. Nelson and P. L. Bergquist, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1759-1765 (1998).

[48] 諸熊千尋, 修士論文, 東京工業大学 (2002).

第 2 章

XynJ 由来 XBD の 部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析

2-1 緒言

好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. 41M-1 株が生産するキシラナーゼ J (XynJ) には、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 11 に属する触媒ドメイン以外に、糖質結合モジュール (CBM) ファミリー 36 に属するキシラン結合ドメイン (XBD) が存在する [1]。本研究室では、XynJ の XBD (XBDj) の fd ファージ表面への提示 (ファージディスプレイ) と進化分子工学的検討により、XBDj とキシラン (不溶性 Oat spelt キシランを使用) との結合に関与するアミノ酸残基 (Phe284、Asp286、Asp313、Trp317 および Asp 318) を明らかにしている [2, 3]。しかしながら、XBDj のキシラン認識・結合機構には不明な点が多く残されていた。

ファージディスプレイでは、目的タンパク質がファージ 1 粒子につき 3~5 分子提示されるといわれている [4]。そのため、数分子が隣接して存在することによる相乗効果によってキシラン結合能が高く見積もられる可能性がある [5]。その一方で、立体障害によってキシラン結合能が低く見積もられる可能性も考えられる。したがって、XBDj の正確なキシラン結合能を知るためには、遊離の状態で評価する必要がある。本研究室では、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と XBDj との融合タンパク質 (GST-XBDj) を調製し、GST-XBDj がキシラン (不溶性 Oat spelt および Larchwood キシランを使用) 結合能を有していることを明らかにしている [1, 6]。これにより、遊離の XBDj のキシラン結合能を GST 活性を指標に評価することが可能となった。

最近になり、XynJ 全領域の立体構造を明らかにした [7、PDB ID: 2DCJ および 2DCK]。また、*Paenibacillus polymyxa* 由来キシラナーゼ 43A に存在する CBM ファミリー 36 多糖結合ドメイン (*Pp*CBM36) の立体構造、さらには *Pp*CBM36 とキシロトリオースとの複合体の構造が他の研究グループにより報告された [8、PDB ID: 1W0N および 1UX7]。これらの構造が明らかとなった

ことにより、タンパク質工学的検討による XBDj の機能部位の詳細な解析が可能となった。

本章では、XBDj のキシラン結合機構の解明を目的として、XBDj 領域に部位特異的アミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj を調製し、それらのキシラン結合能を調べることにした。

2-2 実験材料と方法

2-2-1 菌株、プラスミドおよび培地

菌株

遺伝子組換え用宿主としては大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 株を、そして遺伝子発現用宿主としては大腸菌 BL21 株を使用した。各宿主の遺伝子型は以下の通りである。

株	遺伝子型
DH5 α	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ($r_k^-m_k^+$), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, $\phi 80lacZ\Delta M15$, F^- , λ^-
BL21	F^- , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> ($r_B^-m_B^-$), <i>gal</i> , <i>dcm</i>

プラスミド

pGEX-XBDj は、GST と XBDj (XynJ の Leu198 ~ Arg327 の領域) との融合タンパク質 (GST-XBDj) をコードする発現型プラスミドである [1, 6]。発現ベクターとして pGEX-3X (Pharmacia) が用いられている。

培地

大腸菌の培養には LB 培地 [1.0% (w/v、以下省略) トリプトン (ナカライテスク)、0.5% 酵母エキス (Becton Dickinson)、1.0% NaCl、pH 7.2] を用いた。各成分は脱イオン水に溶解し、121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌を行った。さらに、終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリン (ナカライテスク) を添加した。固形培地には終濃度 1.5% の寒天末 (ナカライテスク) を加えた。

2-2-2 立体構造モデリング

分子モデリングソフトウェア Discovery Studio (Accelrys Software Inc.) を使用した。*P. polymyxa* キシラナーゼ 43A 由来 XBD とキシロトリオースとの複合体立体構造 [8] を、XynJ の XBDj の立体構造 [7] に重ね合わせることで、XBDj とキシロトリオースとの複合体立体構造モデルを構築した。

2-2-3 組換え DNA 技術

大腸菌の形質転換にはエレクトロポレーション法および塩化カルシウム法 [9] を用いた。塩化カルシウム法では 37°C、2 分間の熱ショックを施した。形質転換体の培養は、LB 固形培地を用いて 37°C で行った。大腸菌からのプラスミド DNA の調製はアルカリ-SDS 法 [10] にて行った。

制限酵素は東洋紡あるいは宝酒造より購入し、各メーカーの指示に従って使用した。DNA のアガロースゲル電気泳動 (AGE) には TAE 緩衝液 [40 mM Tris-HCl、2.8% (v/v) 酢酸、2 mM EDTA・3Na、pH 7.8] を用い、アガロース濃度は 0.7% とした。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) には TBE 緩衝液 [50 mM Tris-HCl、0.3% (w/v) ホウ酸、1 mM EDTA・3Na、pH 8.2] を用い、5% ポリアクリルアミドゲルを使用した。泳動後のゲルはエチジウムブロミド染色を行い、DNA を検出した。DNA 分子量マーカー (λ /Hind III digest- ϕ X174/Hae III digest) は東洋紡より購入した。

2-2-4 部位特異的変異導入法

部位特異的変異導入は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) の方法に準じて行った。すなわち、プライマーを鋳型 DNA にアニーリングし、プラスミド全体に相当する DNA 鎖を耐熱性 DNA ポリメラーゼで合成した。オリゴヌクレオチドはオペロンおよびグライナージャパンより購入し、滅菌水

に溶解したものを変異導入用プライマーとして用いた。反応液 50 μ l 中には 5 ~ 50 ng の鋳型 DNA、各 125 ng の変異導入用センスおよびアンチセンスプライマー、0.2 mM dNTPs および 2.5 U の *PfuTurbo* DNA Polymerase (Stratagene) を含む。サーマルサイクラーは iCycler (Bio-Rad) を使用した。以下にサイクル条件を示す。

プレヒート		95°C	30 秒
サイクル (18 回)	ステップ 1	95°C	30 秒
	ステップ 2	55°C	1 分
	ステップ 3	68°C	7 分
ポストヒート		68°C	5 分

得られた反応産物に対して制限酵素 *Dpn* I 処理を行い、メチル化を含む鋳型 DNA を消化・除去した後、大腸菌 DH5 α 株へ導入することで、変異遺伝子を含む形質転換体を得た。目的とする変異が正しく導入されたか否かは、同時に導入した制限酵素サイトでの切断ならびに塩基配列決定 (後述、本章 2-2-4 項参照) により確認した。

2-2-5 塩基配列決定および遺伝情報解析

塩基配列の決定はジデオキシ法 [11] により行った。すなわち、ダイターミネーター法に基づく BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて調製した試料を、自動蛍光式 DNA シークエンサー ABI PRISM 3100-*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により解析した。

DNA 塩基配列およびアミノ酸配列の解析には、遺伝子情報処理ソフトウェア GENETYX-MAC Ver. 13.0.2 (ゼネティックス) を使用した。

2-2-6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli の方法 [12] に従って行った。電気泳動用試料を SDS-PAGE 試料用緩衝液 [終濃度 2% SDS、5% (v/v) 2-メルカプトエタノール、10% (v/v) グリセロール、0.01% ブロモフェノールブルー (BPB)、15 mM Tris-HCl (pH 6.8)] に溶解し、100°C で 3 分間熱処理した後、電気泳動を行った。泳動には 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた。クーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色には CBB R-250 (ナカライテスク) を使用した。

なお、分子量マーカーには SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (Bio-Rad) を使用した。組成は以下の通りである。() 内の数字は未染色の各マーカータンパク質の分子量を示す。

ウサギ筋ホスホリラーゼ B	(97,400)
ウシ血清アルブミン	(66,200)
ニワトリ卵白オブアルブミン	(45,000)
ウシカルボニックアンヒドラーゼ	(31,000)
大豆トリプシンインヒビター	(21,500)
ニワトリ卵白リゾチーム	(14,400)

2-2-7 タンパク質の定量法

タンパク質の定量には Lowry 法 [13] (DC Protein Assay、Bio-Rad) を用いた。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミン (BSA、Sigma) を標準物質として作成した検量線から算出した。

2-2-8 GST-XBDj の調製

大腸菌無細胞抽出液の調製

各種発現型プラスミドを含む大腸菌 BL21 株形質転換体を LB 培地に植菌し、37°C、160 rpm (パーソナル-11、タイテック) で一晩前培養した。前培養液を新たな LB 培地に終濃度 1% (v/v) で植菌し、37°C、160 rpm で振とう培養した。培養液の濁度 (OD₆₆₀) が 0.6~0.7 に達したところで、終濃度 1.0 mM のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG、ナカライテスク) を添加し発現誘導を行い、さらに 37°C で 3 時間培養した。培養液を遠心分離 (4 °C、7,000 x g、10 分間) し、菌体を回収した。回収した菌体は 1/5 倍容の PBS (140 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.8 mM KH₂PO₄) で洗浄後、1/10 倍容の 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma) 含有 PBS に再懸濁し、Bioruptor UCD-200TM (コスモバイオ) を用いて超音波破碎を行った (氷冷下、10 秒間、60 回)。遠心分離 (4°C、12,000 x g、10 分間) により未破碎菌体を除き、得られた上清を無細胞抽出液とした。

GST-XBDj の精製

野生型および各種変異型 GST-XBDj は、グルタチオン固定化担体である Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。無細胞抽出液に 1/5 倍容の 50% Glutathione Sepharose 4B スラリーを加え、室温で 30 分間穏やかに振とうすることで、タンパク質との結合を行った。遠心分離 (4°C、500 x g、5 分間) により上清を取り除き、PBS で担体を数回洗浄した。次に、担体の 2 倍容の 10 mM 還元型グルタチオン (ナカライテスク) 含有 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加え、室温で 10 分間穏やかに振とうすることで、結合したタンパク質の溶出を行った。遠心分離 (4°C、500 x g、5 分) 後の上清を回収し、さらに同様の溶出操作を数回行った。得られた溶出画分をまとめ、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に

対して透析することで試料中に含まれるグルタチオンを除去し、GST-XBDj 精製標品とした。その際、発現ベクター pGEX-3X を有する大腸菌無細胞抽出液より GST の精製も行った。

2-2-9 GST 活性の測定

GST 活性の測定は、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB、Sigma) を基質として、既法 [14] に従って行った。活性測定に供する試料 20 μ l に対し、1 mM の還元型グルタチオン、1 mM の CDNB および 100 mM KH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.5) からなる基質溶液 200 μ l を加え、攪拌後、波長 355 nm (GST 活性によって生成する CDNB-グルタチオン結合体の吸収波長) における吸光度 (A_{355}) を約 5 分間経時的に測定した。反応は 96 穴マイクロプレートのウェル内で行い、吸光度測定には Wallac 1420 ARVO_{SX} マルチラベルカウンタ (Amersham Pharmacia Biotech) を使用した。酵素無添加の場合に認められる基質溶液の A_{355} 値の自発的上昇 ($\Delta A_{355}/\text{min}$ で $6.0 \times 10^{-4} \sim 3.0 \times 10^{-4}$ 程度) を差し引くことで、試料の活性値 ($\Delta A_{355}/\text{min} \cdot \text{ml}$) を算出した。

2-2-10 不溶性 Oat spelt キシランの調製

不溶性 Oat spelt キシランは既法 [6] に準じて調製した。すなわち、12 g の Oat spelt キシラン (Sigma) を脱イオン水 180 ml に懸濁し、1 M NaOH で pH 10.5 に調整した後、室温で 2 時間穏やかに攪拌した。さらに 1 M NaOH を加えて pH 10.5 に再調整し、室温で 1 時間穏やかに攪拌した。遠心分離 (6,000 x g、5 分間、室温) により沈殿を得た。脱イオン水での洗浄、遠心分離を 3 回繰り返した後、不溶性の沈殿を 95% (v/v) エタノールに懸濁した。吸引によりエタノールを除いた後、濾紙上の沈殿を乾燥した。さらに乳鉢で摩砕し、これを不溶性 Oat spelt キシランとした。なお、回収率は 87.7% であった。

2-2-11 不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率の測定

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に 2.0 mg/ml の BSA を溶解し、BSA 溶液とした。この BSA 溶液に 2.0 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシランを加え、超音波処理を施すことによりキシラン粒子を均一化したものを不溶性 Oat spelt キシラン懸濁液とした。これらの溶液・懸濁液を用い、1.5 ml 容マイクロチューブ内で終濃度 0.2 μ M の各種 GST-XBDj、1.0 mg/ml の BSA、1.0 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシラン、および各種緩衝液 (後述) からなる試料液 400 μ l を調製した。同時に、同じ組成で不溶性 Oat spelt キシランを含まないコントロール液 400 μ l も調製した。試料液等は、室温で 3 時間、小型巡回ミキサー (愛くる、イワキ) を用いて穏やかに攪拌した。遠心 (室温、7,000 x g、5 分間) により試料液中の不溶性 Oat spelt キシランを沈殿・除去した後、上清の GST 活性を測定した。コントロール液の GST 活性は全タンパク質濃度 (= 0.2 μ M) に、そして試料液の GST 活性は不溶性 Oat spelt キシランに未結合のタンパク質濃度に相当する。コントロール液の GST 活性から試料液の GST 活性を差し引き、それをコントロール液の GST 活性で除することにより、不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を算出した。

なお、緩衝液は以下のものを使用した。

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM CaCl_2

2-2-12 不溶性 Oat spelt キシランとの結合における吸着等温線の作製

2.0 mg/ml の BSA 溶液に 0.5 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシランを加え、超音波処理を施すことによりキシラン粒子を均一化したものを不溶性 Oat spelt キシラン懸濁液とした。1.5 ml 容マイクロチューブ内で終濃度 0.2 ~ 1.2 μ M の

各種 GST-XBDj、1.0 mg/ml の BSA、0.25 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシラン、および 10 mM CaCl_2 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) からなる試料液 400 μl を調製した。同時に同じ組成で不溶性 Oat spelt キシランを含まないコントロール液 400 μl も調製した。試料液等は室温で 3 時間、小型旋回ミキサーを用いて穏やかに攪拌した。遠心 (室温、7,000 x g、5 分間) により試料液中の不溶性 Oat spelt キシランを沈殿・除去した後、上清の GST 活性を測定した。コントロール液の GST 活性は溶液中に含まれる全タンパク質濃度 (= 0.2 ~ 1.2 μM) に、そして試料液の GST 活性は不溶性 Oat spelt キシランに未結合のタンパク質濃度に相当する。コントロール液の GST 活性から試料液の GST 活性を差し引くことにより、不溶性 Oat spelt キシランに結合したタンパク質量を算出した。横軸に不溶性 Oat spelt キシランに未結合のタンパク質濃度、縦軸に結合したタンパク質量をとりデータをプロットすることで、吸着等温線を作製した。

2-3 結果および考察

2-3-1 XynJ 由来 XBD とキシロトリオースとの複合体立体構造モデルの構築

P. polymyxa キシラナーゼ 43A 由来 XBD とキシロトリオースとの複合体立体構造 [8] を、XynJ の XBDj の立体構造 [7] に重ね合わせることで、XBDj とキシロトリオースとの複合体立体構造モデルを構築した (Fig. 2-1)。

本モデルにおいては、キシロースの 2 つの O 原子が XBDj に含まれる Ca^{2+} に配位結合しており、その Ca^{2+} には Tyr237 および Trp317 の主鎖カルボニル基の O 原子ならびに Asp313 および Asp318 の側鎖 O 原子が配位結合していると考えられた。ちなみに、 Ca^{2+} は 6~8 配位をとることが知られており、XBDj に含まれる Ca^{2+} への配位子としては上述の 4 つのアミノ酸残基の O 原子以外に 1 つの水分子が存在する (ここでは Ca^{2+} は 7 配位)。 Ca^{2+} に配位結合しているこれらのアミノ酸残基のうち Asp313、Trp317 および Asp318 は、XynJ の立体構造が明らかになる以前から、ファージディスプレイを用いた進化分子工学的検討によりキシラン結合に重要であることが推定されていたアミノ酸残基であった。これより、本研究で構築した複合体立体構造モデルの妥当性が支持される。また、Tyr223 および Tyr237 の側鎖芳香環は、キシロース環を挟むように疎水性相互作用していることが予想された。そこで、 Ca^{2+} への配位結合ならびにキシロース環との疎水性相互作用に関与するアミノ酸残基に注目し、これらの残基に部位特異的アミノ酸置換を導入した各種変異型 XBDj を調製し、それらの不溶性キシラン結合能を評価することとした。

2-3-2 各種変異型 GST-XBDj をコードする発現型プラスミドの構築

XBDj のキシラン結合能評価には GST と XBDj (XynJ の Leu198 ~ Arg327

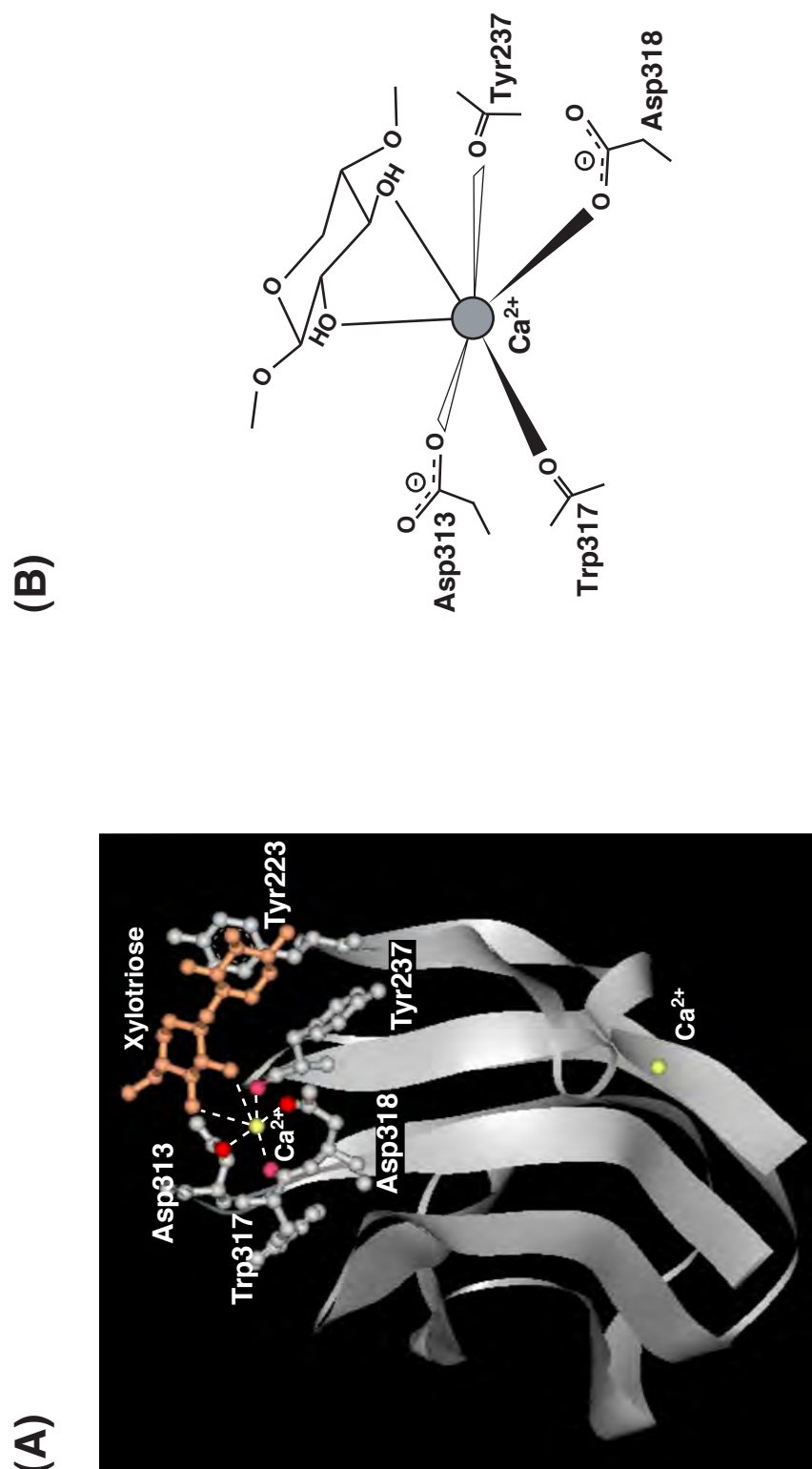


Fig. 2-1 XBDj とキシロトリオースとの複合体立体構造モデル (A) および Ca^{2+} への配位結合の様子 (B)

Ca^{2+} への配位結合に関する残基 (Tyr237、Asp313、Trp317 および Asp318) ならびにキシロース環との疎水性相互作用に関与する残基 (Tyr223 および Tyr237) を示した。この図では Ca^{2+} に配位結合していると思われる 1 つの水分子は省略しており、 Ca^{2+} は全体として 7 配位をとるものと考えられる。

の領域) との融合タンパク質 (GST-XBDj) を用いることとした。

各種変異型 GST-XBDj をコードする発現型プラスミドは、野生型 GST-XBDj をコードする発現型プラスミド pGEX-XBDj に部位特異的変異を導入することにより構築した。また、GST-XBDj_{Y223A/Y237A} をコードする発現型プラスミドは、GST-XBDj_{Y237A} をコードする発現型プラスミド pGEX-XBDj_{Y237A} に部位特異的変異を導入することにより構築した。変異導入に際しては、Table 2-1 に示した互いに相補的な変異導入用プライマーセットを使用した。プライマーに導入した制限酵素サイトにおける切断の成否と塩基配列決定により、目的の位置に正しく変異が導入されていることを確認した。なお、各種変異型 GST-XBDj は導入したアミノ酸置換を表記し、たとえば Tyr223 の Ala への置換を含む場合は GST-XBD_{Y223A} とよぶこととした。

2-3-3 野生型および各種変異型 GST-XBDj の大腸菌による生産と精製

各種発現型プラスミドを大腸菌 BL21 株に形質転換した。得られた形質転換体を培養し、IPTG 誘導を施すことにより野生型および各種変異型 GST-XBDj ならびに GST の生産を試みた。無細胞抽出液を SDS-PAGE に供し、発現確認を行った。その結果、野生型および各種変異型 GST-XBDj をコードする発現型プラスミドを有する大腸菌の無細胞抽出液を泳動したレーンにおいて、約 40 kDa の位置に GST-XBDj と思われる濃いタンパク質バンドが確認された (Fig. 2-2)。また、発現ベクター pGEX-3X を有する大腸菌のレーンにおいては、約 30 kDa の位置に GST と思われる濃いタンパク質バンドが確認された。

次に、大腸菌が生産した GST-XBDj および GST の精製を試みた。精製はグルタチオン固定化担体を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより行った。精製後のタンパク質を SDS-PAGE に供した結果、いずれも高純度の精製標品が得られたことがわかった (Fig. 2-3)。以後の性質検討では、ここで得られた精製標品を用いることとした。

Table 2-1 各種変異型 GST-XBDj をコードする発現型プラスミド構築のための変異導入用プライマーの塩基配列

Plasmid	Primer	Sequence
pGEX-XBDj _{Y223F}	X-Y223F	5'-GTATGACAAAGGTGGGCC <u>TtCACCTCTAATAATTAC</u> -3'
	RX-Y223F	5'-GTAATATTAGAGGT <u>GaAGGGcCCACCCCTTTGTCA</u> TAC-3'
pGEX-XBDj _{Y223A}	X-Y223A	5'-GTATGACAAAGGTGGGCC <u>gcCACCTCTAATAATTAC</u> -3'
	RX-Y223A	5'-GTAATATTAGAGGT <u>GgcGGGcCCACCCCTTTGTCA</u> TAC-3'
pGEX-XBDj _{Y237F}	X-Y237F	5'-GGAGTTGCTTTTA <u>TtTGCAAAATGGTGATAATGTaAGCTTTAATC</u> -3'
	RX-Y237F	5'-GATTAAAGCTTACATTATCACCATTTGC <u>AaTAAAGCAA</u> CTCC-3'
pGEX-XBDj _{Y237A}	X-Y237A	5'-GGAGTTGCTTTTA <u>gcTGC AAAATGGTGATAATGTaAGCTTTAATC</u> -3'
	RX-Y237A	5'-GATTAAAGCTTACATTATCACCATTTGC <u>AgcTAAAGCAA</u> CTCC-3'
pGEX-XBDj _{Y223A/Y237A}	X-Y223A ^{*1}	5'-GTATGACAAAGGTGGGCC <u>gcCACCTCTAATAATTAC</u> -3'
	RX-Y223A ^{*1}	5'-GTAATATTAGAGGT <u>GgcGGGcCCACCCCTTTGTCA</u> TAC-3'
	X-Y237A ^{*2}	5'-GGAGTTGCTTTTA <u>gcTGC AAAATGGTGATAATGTaAGCTTTAATC</u> -3'
	RX-Y237A ^{*2}	5'-GATTAAAGCTTACATTATCACCATTTGC <u>AgcTAAAGCAA</u> CTCC-3'
	X-D313A	5'-GCTCATTTGTAAACAGCT <u>GcTGACGGTACctgggatGCTTATTTAG</u> -3'
	RX-D313A	5'-CTAAATAAGCAtccagGTaCCGT <u>CAgCAGCTGTTCAATGAGC</u> -3'
pGEX-XBDj _{W317A}	X-W317A	5'-GCTCATTTGTAAACAGCTgatGACGGT <u>ACcgcGgatGCTTATTTAG</u> -3'
	RX-W317A	5'-CTAAATAAGCAtc <u>CgcggGTaCCGT</u> CatcAGCTGTTCAATGAGC-3'
pGEX-XBDj _{D318A}	X-D318A	5'-GCTCATTTGTAAACAGCTgatGACGGT <u>ACctggGcTGCTTATTTAG</u> -3'
	RX-D318A	5'-CTAAATAAGC <u>AgCccagGTaCCGT</u> CatcAGCTGTTCAATGAGC-3'

アミノ酸置換を施したコドンは赤字で、野生型配列と異なる塩基は小文字で示した。変異導入の成否を判断するために導入した制限酵素サイトを下線で示した。^{*1}および^{*2}は、プラスミド pGEX-XBDj_{Y223A} および pGEX-XBDj_{Y237A} の構築で用いたプライマーと同一のものである。

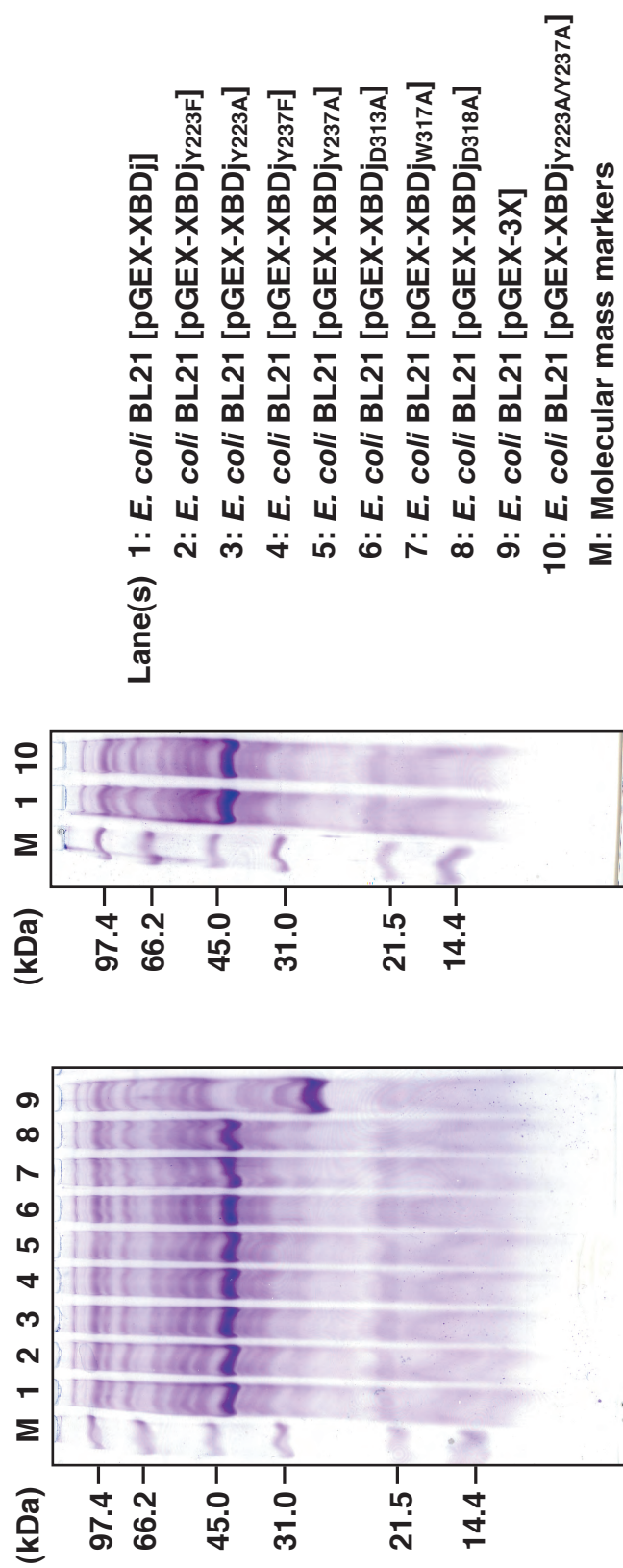


Fig. 2-2 野生型および各種変異型 GST-XBDj をコードする発現型プラスミドを有する大腸菌細胞抽出液の SDS-PAGE

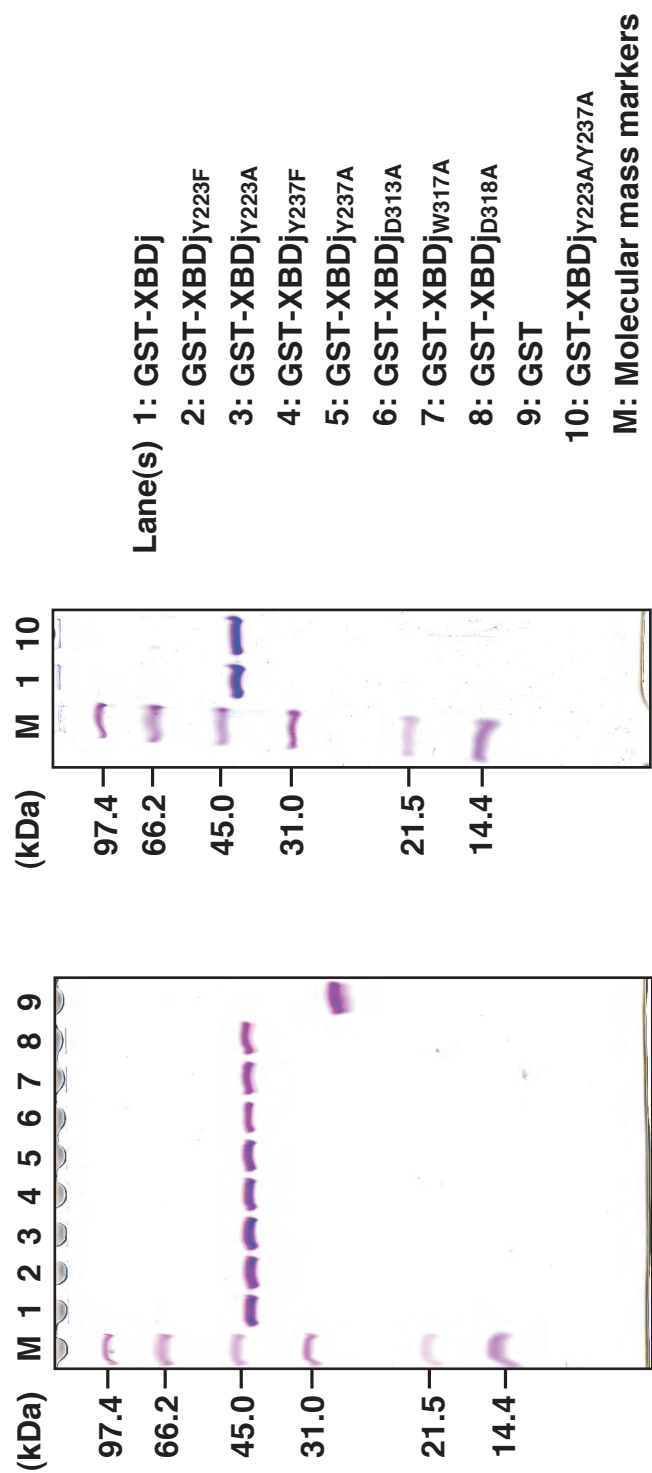


Fig. 2-3 野生型および各種変異型 GST-XBDj 精製標品の SDS-PAGE

2-3-4 Ca^{2+} への配位結合に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj の性質検討

不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

野生型および各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を測定した。その結果、すべての変異型 GST-XBDj の結合率は野生型に比べて大きく低下し、これらの残基が実際にキシラン結合に関与していることが確かめられた (Fig. 2-4)。さらに、試料液に Ca^{2+} を十分量添加した状態で結合率を測定したところ、GST-XBDj_{Y237A} および GST-XBDj_{W317A} の結合率は Ca^{2+} 非添加時に比べて大きく回復するのに対し、GST-XBDj_{D313A} および GST-XBDj_{D318A} の結合率はほとんど変化しないことがわかった。これより、 Ca^{2+} への配位結合に関与する 4 つの残基のうち、とりわけ Asp313 および Asp318 が重要であることが明らかとなった。

XBDj とキシロトリオースとの複合体立体構造モデルにおいて、基質結合に関与する Ca^{2+} には Tyr237 および Trp317 の主鎖カルボニル基の酸素原子、ならびに Asp313 および Asp318 の側鎖酸素原子が配位結合している。Asp313 および Asp318 を Ala に置換した場合、 Ca^{2+} との配位結合は完全に消失するため、後から Ca^{2+} を添加しても Ca^{2+} の取り込みはおこらなかったと考えられる。一方、Tyr237 および Trp317 を Ala に置換した場合、 Ca^{2+} との配位結合に関与する主鎖酸素原子はなお存在している。そのため、 Ca^{2+} の添加により脱落していた Ca^{2+} が補われ、結合能が回復したものと考えられた。

不溶性 Oat spelt キシランに対する吸着等温線

GST-XBDj、GST-XBDj_{Y237A} および GST-XBDj_{W317A} の Ca^{2+} 存在下における不溶性 Oat spelt キシランに対する吸着等温線を作製した (Fig. 2-5-A)。得られた吸着等温線は Langmuir モデルに従うと考えられた。以下に Langmuir モデル式を示す。

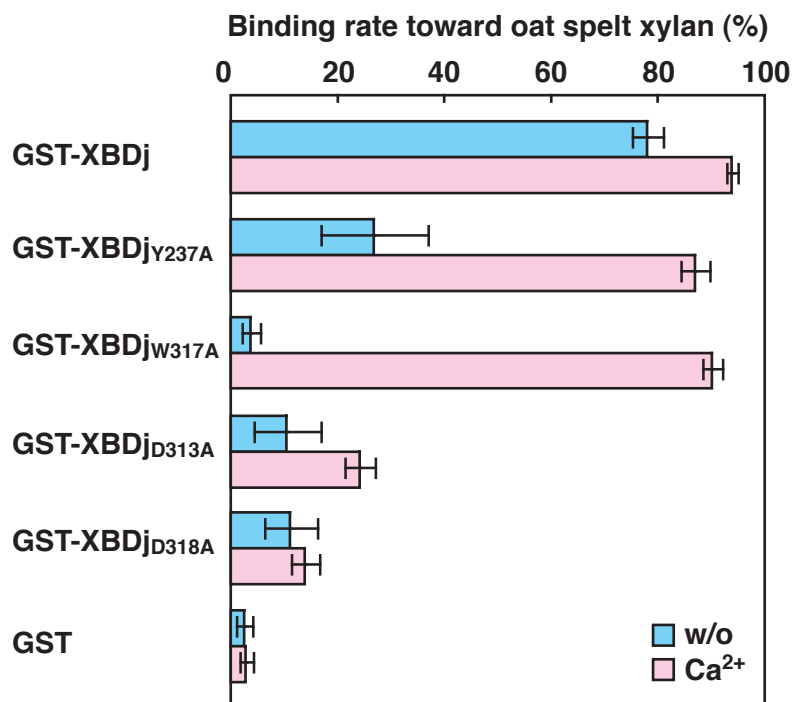


Fig. 2-4 Ca^{2+} への配位結合に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

終濃度 $0.2 \mu\text{M}$ の野生型および各種変異型 GST-XBDj を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で 3 時間行った。

w/o : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 ($\text{pH } 7.5$)

Ca^{2+} : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 ($\text{pH } 7.5$)、 10 mM CaCl_2

(A)

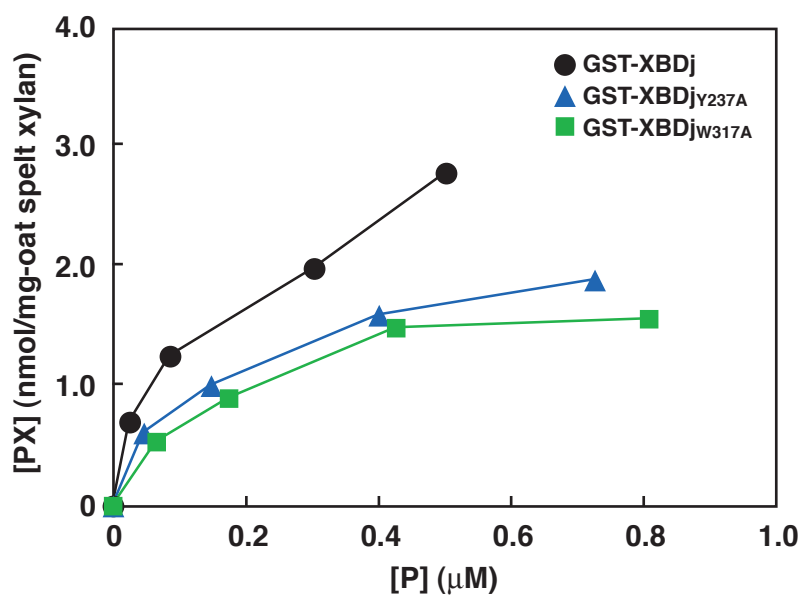
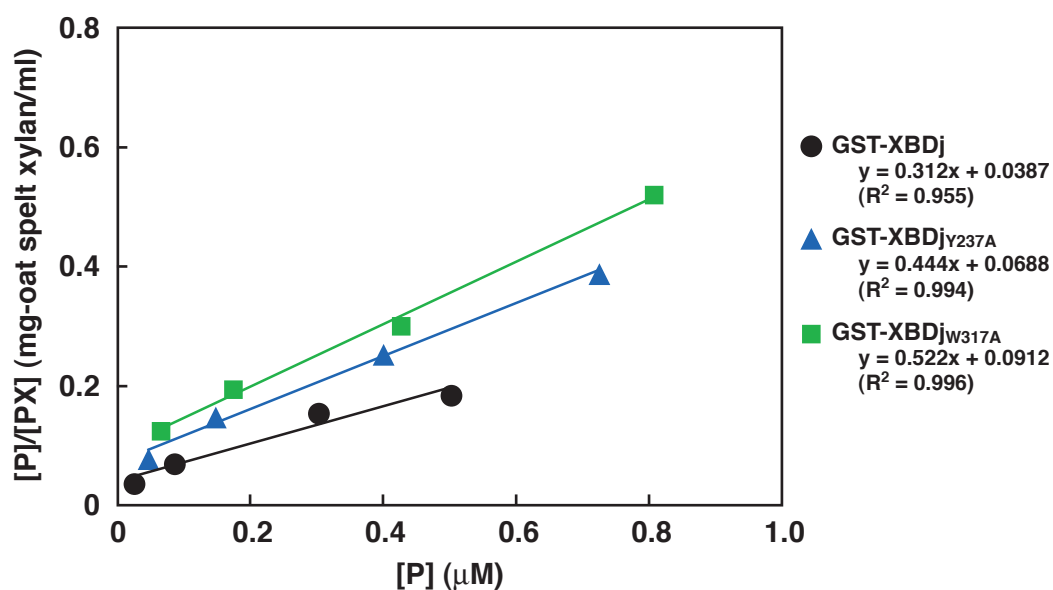


Fig. 2-5 Ca^{2+} への配位結合に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する吸着等温線 (A) ならびに Hanes-Woolf プロット (B)

終濃度 0.2~1.2 μM の野生型および各種変異型 GST-XBDj を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (0.25 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は 10 mM CaCl_2 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、室温で 3 時間行った。得られた結合率をもとに、吸着等温線ならびに Hanes-Woolf プロットを作製した。

(B)



(つづき)

Fig. 2-5 Ca^{2+} への配位結合に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する吸着等温線 (A) ならびに Hanes-Woolf プロット (B)

終濃度 0.2 ~ 1.2 μM の野生型および各種変異型 GST-XBDj を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (0.25 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は 10 mM CaCl_2 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、室温で 3 時間行った。得られた結合率をもとに、吸着等温線ならびに Hanes-Woolf プロットを作製した。

$$[PX] = \frac{[PX]_{\max}[P]}{K_d + [P]}$$

ここで、[P] は不溶性 Oat spelt キシランに未結合のタンパク質濃度 (μM)、[PX] は不溶性 Oat spelt キシラン 1 mg に結合したタンパク質量 (nmol/mg-Oat spelt xylan)、 $[PX]_{\max}$ は最大結合量 (nmol/mg-Oat spelt xylan)、そして K_d (μM) は解離定数を表す。また、Langmuir モデル式を変形したものが、以下の Hanes-Woolf 式である。

$$\frac{[P]}{[PX]} = \frac{K_d}{[PX]_{\max}} + \frac{1}{[PX]_{\max}} [P]$$

横軸に [P]、縦軸に $[P]/[PX]$ をとりデータをプロットすることで、直線関係が得られる (Hanes-Woolf プロット)。Fig. 2-5-B の直線の傾きおよび切片から、解離定数 K_d および最大結合量 $[PX]_{\max}$ を求めた (Table 2-2)。

GST-XBDj_{Y237A} および GST-XBDj_{W317A} においては、野生型に比べて解離定数の増大と最大結合量の低下が認められた。 Ca^{2+} との配位結合に関与する主鎖酸素原子はなお存在しているものの、Ala への置換により主鎖の構造がわずかに変化し、結合能の低下につながったものと考えられた。また、Tyr237 はキシロース環と疎水性相互作用すると考えられる残基でもあるため、GST-XBDj_{Y237A} の解離定数の増大と最大結合量の低下は、キシロース環との疎水性相互作用の低下による影響も含んでいる可能性が考えられた。

GST-XBDj_{D313A} および GST-XBDj_{D318A} についても各種定数の算出を試みたが、結合率が低いため算出には至らなかった (データ示さず)。

2-3-5 キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj の性質検討

不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

野生型および各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を測定した。Phe への置換を含む変異型 GST-XBDj の結合率は野生型

Table 2-2 Ca^{2+} への配位結合に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する解離定数および最大結合量

	K_d (μM)	$[\text{PX}]_{\text{max}}$ (nmol/mg-xylan)
GST-XBDj	0.12	3.2
GST-XBDj_{Y237A}	0.15	2.3
GST-XBDj_{W317A}	0.17	1.9

と同程度であったのに対し、Ala への置換を含むものの結合率は野生型に比べて大きく低下していた (Fig.2-6)。さらに、試料液に Ca^{2+} を十分量添加した状態でも結合率を測定した。Phe への置換を含む変異型 GST-XBDj の結合率は、 Ca^{2+} 非添加時と同様、野生型と同程度であった。また、GST-XBDj_{Y223A} および GST-XBDj_{Y237A} の結合率は、野生型には及ばないものの、 Ca^{2+} 非添加時に比べて大きく回復した。ここで、XBDj は Ca^{2+} を介してキシランと結合することがわかっている (本章 2-3-4 項参照)。 Ca^{2+} 非添加時の結合率は、XBDj 分子中に取り込まれ、保持されている Ca^{2+} の量に依存すると考えられる。そのため、XBDj のキシラン結合におけるキシロース環との疎水性相互作用の寄与を正しく評価するためには、 Ca^{2+} の取込み・保持の違いによる Ca^{2+} を介したキシラン結合の違いの影響が最小限となる条件、すなわち Ca^{2+} 添加条件での結合率を比較する必要がある。 Ca^{2+} 添加時の GST-XBDj_{Y223A} および GST-XBDj_{Y237A} の結合率が野生型に比べてやや低下しており、この低下分がキシロース環との疎水性相互作用の寄与分と考えられる。これより、 Ca^{2+} との配位結合を介したキシラン結合が存在する条件においては、 Ca^{2+} を介した結合に比べて寄与は小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も XBDj の不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していると推察された。(後述する本論文第 4 章では試料液に EDTA を添加した場合の測定も行っており、キシロース環との疎水性相互作用を、① Ca^{2+} を介したキシラン結合が存在する条件と②存在しない条件とに分けて、それぞれ議論している。本項の議論は、① Ca^{2+} を介したキシラン結合が存在する条件に相当する。)

ここで再び Ca^{2+} 非添加時の結合率に注目する。Ala への置換を含む変異型 GST-XBDj の結合率は、野生型に比べて大きく低下していた。このことは、Tyr237 が Ca^{2+} への配位結合にも直接関与すること、そして Tyr223 は Ca^{2+} への配位結合に直接は関与しないが Ala への置換により Ca^{2+} が脱落しやすくなることで説明できる (本論文 2-3-4 項参照)。一方、Tyr223 や Tyr237 の Phe への置換では Ca^{2+} の脱落はおこらなかったと解釈され、これらの残基が

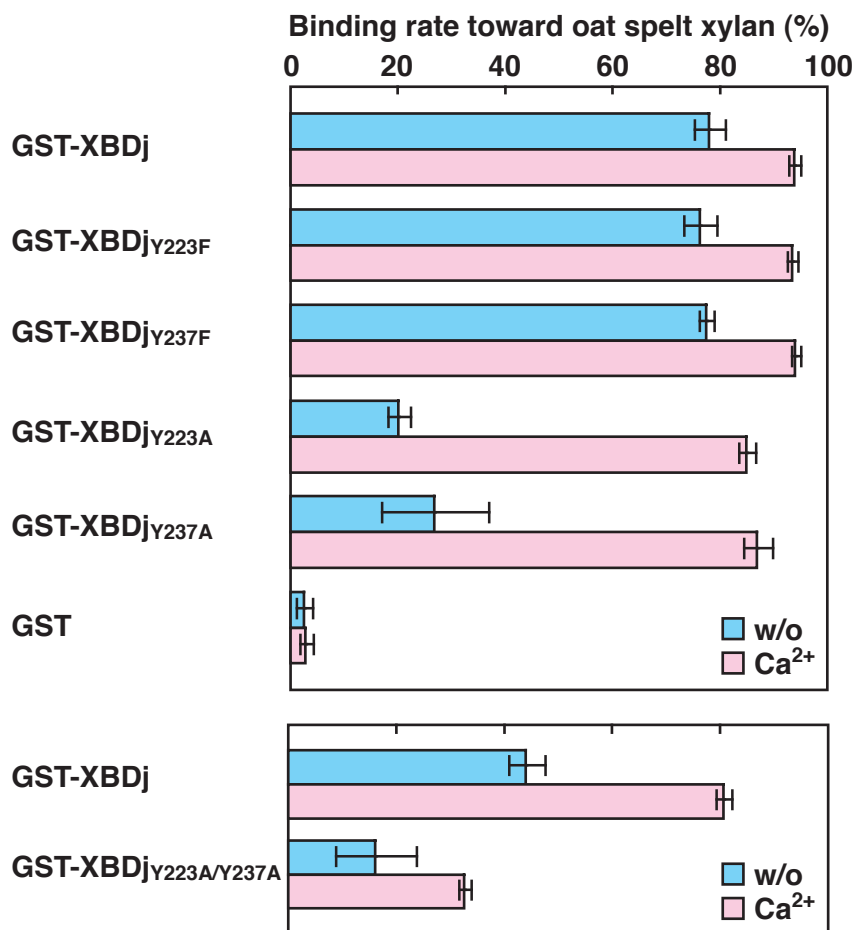


Fig. 2-6 キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

終濃度 0.2 μ M の野生型および各種変異型 GST-XBDj を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で 3 時間行った。

w/o : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)

Ca²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM CaCl₂

芳香族アミノ酸であることが、キシロース環との疎水性相互作用だけでなく Ca^{2+} の取り込み・保持にも重要であると考えられた。2 つのアミノ酸置換を含む GST-XBDj_{Y223A/Y237A} の結合率は、 Ca^{2+} を添加しても GST-XBDj_{Y223A} や GST-XBDj_{Y237A} ほど回復しなかった。2 つの残基を両方とも Ala に置換することにより、キシロース環との疎水性相互作用が完全に消失したためと考えられるが、 Ca^{2+} の取り込み・保持が著しく損なわれた可能性も否定できない。現段階で、各種変異型 GST-XBDj の Ca^{2+} 添加時における結合率の低下が、「キシロース環との疎水性相互作用の消失」と「 Ca^{2+} の取り込み・保持の低下」のどちらに起因するものであるかは明確ではない。今後、各種変異型 GST-XBDj 分子中に含まれる Ca^{2+} の量を定量することで、その理由が明らかになることが期待される。

結果は試料調製のロットが同一のもの同士をまとめ、2 組に分けて示した。野生型 GST-XBDj の Ca^{2+} 非添加時の結合率にロット間で差がみられるが、これはロットの違いによりタンパク質に取り込まれ、保持される Ca^{2+} の量が変化するためと考えられる。また、野生型の Ca^{2+} 添加時の結合率にも差がみられるが、これは使用した不溶性 Oat spelt キシラン懸濁液のロットも異なるため、試料液中のキシラン粒子の細かさなどに違いがあるためと考えられる。ちなみに、同一ロットであれば、野生型および変異型 GST-XBDj で結合率の逆転が生じることはない。

不溶性 Oat spelt キシランとの結合における吸着等温線

野生型および各種変異型 GST-XBDj の Ca^{2+} 存在下における不溶性 Oat spelt キシランに対する吸着等温線を作製した (Fig. 2-7-A)。さらに Hanes-Woolf プロットを作製し (Fig. 2-7-B)、直線の傾きおよび切片から解離定数 K_d および最大結合量 $[\text{PX}]_{\text{max}}$ を求めた (Table 2-3)。

Phe への置換を含む変異型 GST-XBDj の解離定数および最大結合量は野生型と同程度であったのに対し、Ala への置換を含む変異型 GST-XBDj におい

(A)

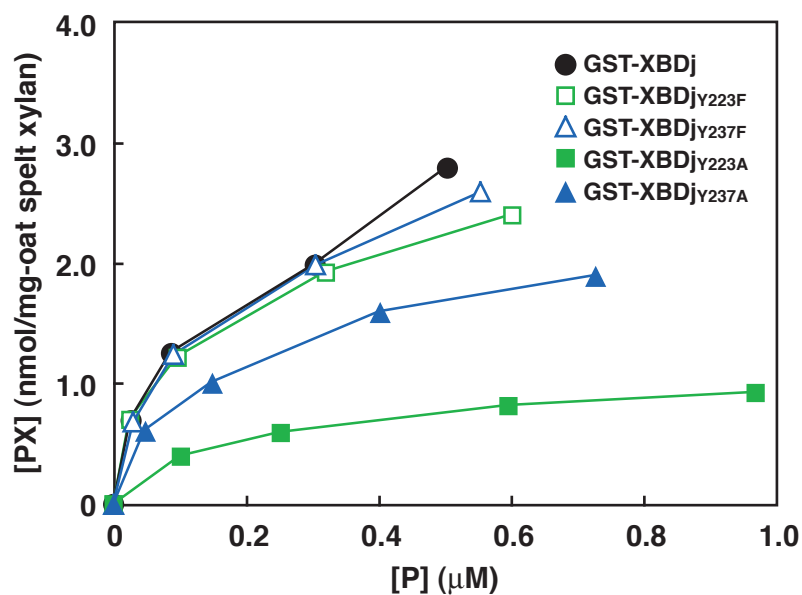
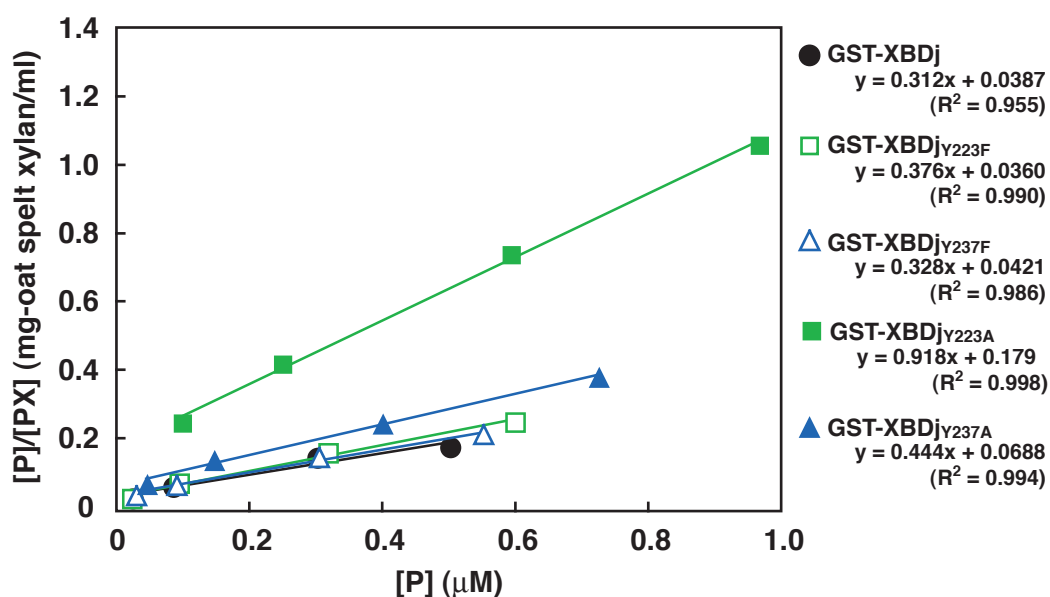


Fig. 2-7 キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する吸着等温線 (A) ならびに Hanes-Woolf プロット (B)

終濃度 0.2 ~ 1.2 μM の野生型および各種変異型 GST-XBDj を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (0.25 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は 10 mM CaCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、室温で 3 時間行った。得られた結合率をもとに、吸着等温線ならびに Hanes-Woolf プロットを作製した。

(B)



(つづき)

Fig. 2-7 キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する吸着等温線 (A) ならびに Hanes-Woolf プロット (B)

終濃度 0.2 ~ 1.2 μM の野生型および各種変異型 GST-XBDj を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (0.25 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は 10 mM CaCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、室温で 3 時間行った。得られた結合率をもとに、吸着等温線ならびに Hanes-Woolf プロットを作製した。

Table 2-3 キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する解離定数および最大結合量

	K_d (μ M)	$[PX]_{max}$ (nmol/mg-xylan)
GST-XBDj	0.12	3.2
GST-XBDj_{Y223F}	0.10	2.7
GST-XBDj_{Y237F}	0.13	3.0
GST-XBDj_{Y223A}	0.19	1.1
GST-XBDj_{Y237A}	0.15	2.3

ては、野生型に比べて解離定数の増大と最大結合量の低下が認められた。特に GST-XBDj_{Y223A} は野生型との差が大きく、Tyr223 の重要性が示唆された。

GST-XBDj_{Y223A/Y237A} についても各種定数の算出を試みたが、結合率が低いいため算出には至らなかった (データ示さず)。

2-4 結論

XBDj とキシロトリオースとの複合体立体構造モデルを構築した。本モデルにおいては、キシロースの 2 つの O 原子が XBDj に含まれる Ca^{2+} に配位結合しており、その Ca^{2+} には Tyr237 および Trp317 の主鎖カルボニル基の O 原子ならびに Asp313 および Asp318 の側鎖 O 原子が配位結合していると考えられた。また、Tyr223 および Tyr237 の側鎖芳香環は、キシロース環を挟むように疎水性相互作用していることが予想された。そこで、これらの残基に部位特異的アミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj を調製し、それらの不溶性 Oat spelt キシラン結合能を評価した。

Ca^{2+} への配位結合に関与する残基を Ala に置換した変異型 GST-XBDj の結合能が野生型に比べて大きく低下したことより、これらの残基が不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していること、そしてとりわけ Asp313 および Asp318 が重要であることが明らかとなった。

キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基を Phe に置換した変異型 GST-XBDj が野生型と同程度の結合能を示したのに対し、Ala に置換したものの結合能は野生型に比べて低下していた。これより、 Ca^{2+} との配位結合を介したキシラン結合が存在する条件においては、 Ca^{2+} を介した結合に比べて寄与は小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も XBDj の不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していると推察された。また、Tyr223 はキシロース環との疎水性相互作用だけでなく、 Ca^{2+} の取り込みにも影響することが示唆された。

2-5 引用文献

- [1] T. Kubo, R. Nakai, H. Tamanoi, K. Wakabayashi and S. Nakamura, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **35**, 221-222 (1996).
- [2] 宮久保博幸, 修士論文, 東京工業大学 (2000).
- [3] H. Miyakubo, A. Sugio, T. Kubo, R. Nakai, K. Wakabayashi and S. Nakamura, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **44**, 165-166 (2000).
- [4] 熊谷 泉, 津本浩平, 蛋白質核酸酵素, **43**, 159-167 (1998).
- [5] H. B. Lowman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**, 401-424 (1997).
- [6] 久保貴文, 修士論文, 東京工業大学 (1997).
- [7] Ihsanawati ほか, 未発表データ.
- [8] S. Jamal-Talabani, A. B. Boraston, J. P. Turkenburg, N. Tarbouriech, V. M. Ducros and G. J. Davies, *Structure*, **12**, 1177-1187 (2004).
- [9] J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, “*Molecular Cloning, a Laboratory Manual*”, pp. 1.82-1.85, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- [10] J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, “*Molecular Cloning, a Laboratory Manual*”, pp. 1.21-1.29, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- [11] F. Sanger and A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5463-5467 (1977)
- [12] U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- [13] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- [14] W. H. Habig, M. J. Pabst and W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139 (1974).

第 3 章

変異型 XBD を含む XynJ の性質検討

3-1 緒言

好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. 41M-1 株が生産するキシラナーゼ J (XynJ) には、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 11 に属する触媒ドメイン以外に、糖質結合モジュール (CBM) ファミリー 36 に属するキシラン結合ドメイン (XBD) が存在する [1]。最近になり、XynJ 全領域の立体構造が明らかにされ [2、PDB ID: 2DCJ および 2DCK]、その XBD 領域 (XBDj) の構造に基づき、XBDj とキシロトリオースとの複合体立体構造モデルを構築した。その結果、Tyr237、Asp313、Trp317 および Asp318 が Ca^{2+} への配位結合を介してキシランに結合し、また Tyr223 および Tyr237 の側鎖芳香環がキシロース環と疎水性相互作用していることが予想された。

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と XBDj との融合タンパク質 (GST-XBDj) [3] に部位特異的アミノ酸置換を導入することで調製した各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシラン結合能を評価した結果、 Ca^{2+} へ配位結合する 4 つの残基がキシラン結合に関与していること、そして Asp313 および Asp318 がとりわけ重要であることが明らかとなった。また、それに比べて寄与は小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用もキシラン結合に関与している可能性が示唆された (本論文第 2 章参照)。

本章では、GST-XBDj に導入したものと同様なアミノ酸置換を XBDj 領域に導入した各種変異型 XynJ を調製し、XBDj のキシラン結合能の変化が XynJ の不溶性キシラン加水分解能に与える影響を調べることにした。

3-2 実験材料と方法

3-2-1 菌株、プラスミドおよび培地

菌株

遺伝子組換え用宿主としては大腸菌 JM109 株を、そして遺伝子発現用宿主としては大腸菌 BL21(DE3) 株を使用した。遺伝子型は以下の通りである。

株	遺伝子型
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, F'</i> [<i>traD36, proAB</i> ⁺ , <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>], Δ(<i>lac-proAB</i>)
BL21(DE3)	<i>F</i> ⁻ , <i>ompT, hsdS_B(r_B⁻m_B⁻), gal, dcm, λ</i> (DE3)

プラスミド

pET-XynJ は成熟型 XynJ をコードする発現型プラスミドである [4]。また、pET-CatDj (原報では pET-ΔJC という名称を用いているが、本論文では便宜上 pET-CatDj とよぶ) は XynJ の触媒ドメイン領域のみからなる組換え酵素 (CatDj: 原報では ΔJC という名称を用いているが、本論文では便宜上 CatDj とよぶ) をコードする発現型プラスミドである [5]。両者とも発現ベクターとして pET-21b(+) (Novagen) が用いられている。

培地

本論文第 2 章 2-2-1 項に準じた。

3-2-2 組換え DNA 技術

本論文第 2 章 2-2-3 項に準じた。

3-2-3 部位特異的変異導入法

本論文第 2 章 2-2-4 項に準じた。

3-2-4 塩基配列決定および遺伝情報解析

本論文第 2 章 2-2-5 項に準じた。

3-2-5 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

本論文第 2 章 2-2-6 項に準じた。

3-2-6 タンパク質の定量法

本論文第 2 章 2-2-7 項に準じた。

3-2-7 XynJ の調製

大腸菌無細胞抽出液の調製

各種発現型プラスミドを含む大腸菌 BL21(DE3) 株形質転換体を LB 培地に植菌し、37°C、160 rpm (パーソナル-11、タイテック) で一晩前培養した。前培養液を新たな LB 培地に終濃度 1% で植菌し、37°C、160 rpm で振とう培養した。培養液の濁度 (OD₆₆₀) が 0.6~0.7 に達したところで、終濃度 0.1 mM の イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG、ナカライテスク) を添加し発現誘導を行い、さらに 37°C で 2 時間培養した。培養液を遠心分離 (4 °C、

7,000 x g、10 分間) し、菌体を回収した。回収した菌体は 1/5 倍容の 10 mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 緩衝液 (pH 10.0) に懸濁し、Bioruptor UCD-200TM (コスモバイオ) を用いて超音波破碎を行った (氷冷下、15 秒間、60 回)。遠心分離 (4°C、20,400 x g、10 分間) により未破碎菌体を除き、得られた上清を無細胞抽出液とした。

XynJ の精製

野生型および各種変異型 XynJ は、DEAE-Toyopearl 650M (東ソー) 充填カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。カラムを 3 倍容の 10 mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 緩衝液 (pH 10.0) で平衡化後、無細胞抽出液をアプライした。3 倍容の同緩衝液で洗浄後、0 ~ 500 mM の NaCl 濃度勾配を段階的にかけ、タンパク質を溶出した。溶出画分を SDS-PAGE (本章 3-2-5 項参照) に供することにより、XynJ に相当する画分を特定した。その際、発現型プラスミド pET-CatDj を有する大腸菌無細胞抽出液より CatDj の精製も行った。

3-2-8 不溶性 Oat spelt キシランの調製

本論文第 2 章 2-2-9 項に準じた。

3-2-9 キシラナーゼ活性の測定法 (DNS 法)

DNS 試薬の調製

糖の還元末端の定量に用いる 3,5-ジニトロサリチル酸 (DNS) 試薬の調製法 [6] を以下に示す。

- ① 4.5% NaOH 水溶液 300 ml に、1% DNS 水溶液 880 ml およびロッセル塩 255 g を加えた。
- ② ① とは別に、10% NaOH 水溶液 22 ml にフェノール 10 g を加え、

脱イオン水を追加して溶解し 100 ml とした。

- ③ 69 ml の ② に NaHCO_3 6.9 g を加えて溶解した。
- ④ ① に ③ を加え、ロッセル塩が十分に溶解するまで攪拌した。
- ⑤ 2 日間放置後、着色瓶中に保存した。

基質懸濁液の調製

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に 2.0 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシランを加え、超音波処理を施すことによりキシラン粒子を均一化したものを基質懸濁液とした。

酵素活性測定法

2.0 mg/ml の基質懸濁液 100 μl に酵素試料および各種緩衝液をそれぞれ 50 μl ずつ加え、37°C の水浴中で所定の時間反応を行った。遠心 (4°C、7,000 x g、5 分間) により試料液中の不溶性 Oat spelt キシランを沈殿・除去した後、上清 50 μl を新たなマイクロチューブにとり、DNS 試薬 100 μl を加え、100°C で 5 分間煮沸した。氷冷した後、常温に戻した。波長 545 nm における吸光度を分光光度計 UV-1200 (島津) を用いて測定し、不溶性 Oat spelt キシランの加水分解により生じた還元末端量を算出した。対照にはキシロースを用いた。

3-2-10 不溶性 Oat spelt キシラン加水分解活性の測定

1.5 ml 容マイクロチューブ内で終濃度 0.2 μM の各種 XynJ、1.0 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシランおよび各種緩衝液 (後述) からなる試料液 200 μl を調製し、37°C で 15 ~ 60 分間反応を行った。加水分解により生じた還元末端量を DNS 法により定量した。

なお、緩衝液は以下のものを使用した。

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM CaCl_2

3-3 結果および考察

3-3-1 各種変異型 XynJ をコードする発現型プラスミドの構築

各種変異型 XynJ をコードする発現型プラスミドは、野生型 XynJ をコードする発現型プラスミド pET-XynJ に部位特異的変異を導入することにより構築した。変異導入に際しては、Table 3-1 に示した互いに相補的な変異導入用プライマーセットを使用した。プライマーに導入した制限酵素サイトにおける切断の成否と塩基配列決定により、目的の位置に正しく変異が導入されていることを確認した。なお、各種変異型 XynJ は導入したアミノ酸置換を表記し、たとえば Tyr223 の Ala への置換を含む場合は XynJ_{Y223A} とよぶこととした。

3-3-2 野生型および各種変異型 XynJ の大腸菌による生産と精製

各種発現型プラスミドを大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換した。得られた形質転換体を培養し、IPTG 誘導を施すことにより各種 XynJ および CatDj の生産を試みた。無細胞抽出液を SDS-PAGE に供し、発現確認を行った。その結果、野生型および各種変異型 XynJ をコードする発現型プラスミドを有する大腸菌の無細胞抽出液を泳動したレーンにおいて、約 36 kDa の位置に XynJ と思われる濃いタンパク質バンドが確認された (Fig. 3-1)。また、pET-CatDj を有する大腸菌のレーンにおいては、約 30 kDa の位置に CatDj と思われる濃いタンパク質バンドが確認された。次に、大腸菌が生産した XynJ および CatDj の精製を試みた。精製は DEAE-Toyopearl 650M 充填カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより行った。SDS-PAGE における約 36 kDa ないし約 30 kDa のタンパク質バンドを指標とすることで、XynJ および CatDj はいずれも NaCl 濃度 150 mM 付近で溶出することが明らかとなった。精製後のタン

Table 3-1 各種変異型 XynJ をコードする発現型プラスミド構築のための変異導入用プライマーの塩基配列

Plasmid	Primer	Sequence
pET-XynJ _{Y223F}	X-Y223F	5'-GTATGACAAAGGGTGGGCCc <u>TtCACCTCTAATAATTAC</u> -3'
	RX-Y223F	5'-GTAATATTAGAGGT <u>GaAgGGcCCACCCCTTTGTCATAC</u> -3'
pET-XynJ _{Y223A}	X-Y223A	5'-GTATGACAAAGGGTGGGCCc <u>gcCACCTCTAATAATTAC</u> -3'
	RX-Y223A	5'-GTAATATTAGAGGT <u>GgcggGcCCACCCCTTTGTCATAC</u> -3'
pET-XynJ _{Y237F}	X-Y237F	5'-GGAGTTGCTTTTA <u>TtTGCAAAATGGTGATAATGtaAGCTTTAATC</u> -3'
	RX-Y237F	5'-GATTAAAGCTtACATTATCACCATTtTGC <u>AaATAAAGCAACTCC</u> -3'
pET-XynJ _{Y237A}	X-Y237A	5'-GGAGTTGCTTTTA <u>gcTGCAAAATGGTGATAATGtaAGCTTTAATC</u> -3'
	RX-Y237A	5'-GATTAAAGCTtACATTATCACCATTtTGC <u>AgcTAAAGCAACTCC</u> -3'
pET-XynJ _{D313A}	X-D313A	5'-GCTCATTTGTAAACAGCT <u>GcTGACCGGtACc</u> tgggatGCTTATTtTAG-3'
	RX-D313A	5'-CTAAATAAGCatcccagG <u>TaCCGTCAgCAGCTGTTACAATGAGC</u> -3'
pET-XynJ _{W317A}	X-W317A	5'-GCTCATTTGTAAACAGCTgatGACCGGtACc <u>gcGgatGCTTATTtTAG</u> -3'
	RX-W317A	5'-CTAAATAAGCatc <u>CgcggTaCCGT</u> CatcAGCTGTTACAATGAGC-3'
pET-XynJ _{D318A}	X-D318A	5'-GCTCATTTGTAAACAGCTgatGACCGGtACc <u>tgGcTGCTTATTtTAG</u> -3'
	RX-D318A	5'-CTAAATAAGC <u>AgCccagGtaCCGT</u> CatcAGCTGTTACAATGAGC-3'

アミノ酸置換を施したコドンは赤字で、野生型配列と異なる塩基は小文字で示した。変異導入の成否を判断するために導入した制限酵素サイトを下線で示した。

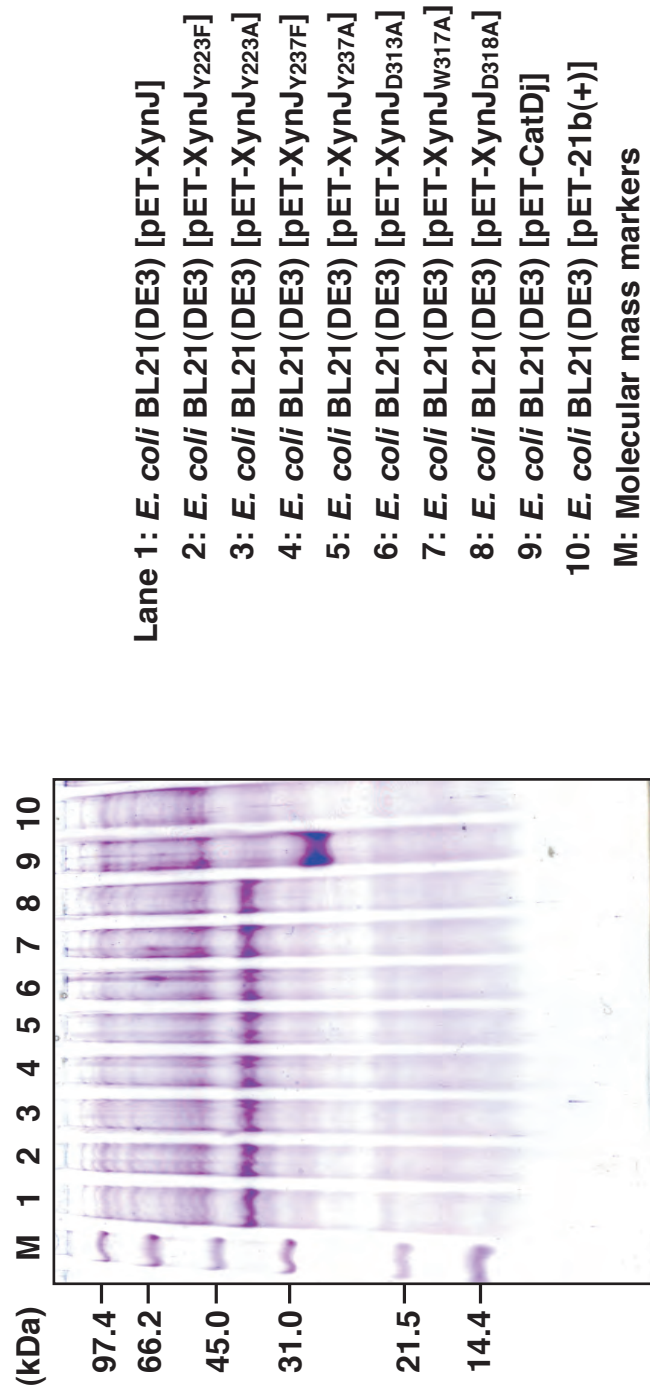


Fig. 3-1 野生型および各種変異型 XynJ をコードする発現型プラスミドを有する大腸菌無細胞抽出液の SDS-PAGE

パク質を SDS-PAGE に供した結果、いずれも高純度の精製標品が得られたことがわかった (Fig. 3-2)。以後の性質検討では、ここで得られた精製標品を用いることとした。

3-3-3 Ca^{2+} への配位結合に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 XynJ の性質検討

野生型および各種変異型 XynJ の不溶性 Oat spelt キシラン加水分解活性を測定した。同様のアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj について、不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を測定した際 (本論文第 2 章 2-2-11 項参照) と同濃度の酵素および基質を用いて反応を行った。その結果、すべての変異型 XynJ の加水分解活性は野生型に比べて大きく低下した (Fig. 3-3)。特に XynJ_{D313A} および XynJ_{D318A} の活性は低く、触媒ドメイン領域のみからなる CatDj と同程度であった。さらに、試料液に Ca^{2+} を十分量添加した状態で活性を測定したところ、XynJ_{Y237A} および XynJ_{W317A} の活性は Ca^{2+} 非添加時に比べて大きく回復するのに対し、XynJ_{D313A} および XynJ_{D318A} の活性はほとんど変化せず、各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシラン結合能変化に対応した結果が得られた。これより、XynJ の不溶性キシラン加水分解活性と XBDj の不溶性キシラン結合能が密接に関係していることが明らかとなった。

3-3-4 キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 XynJ の性質検討

野生型および各種変異型 XynJ の不溶性 Oat spelt キシラン加水分解活性を測定した。同様のアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj について、不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を測定した際 (本論文第 2 章 2-2-11

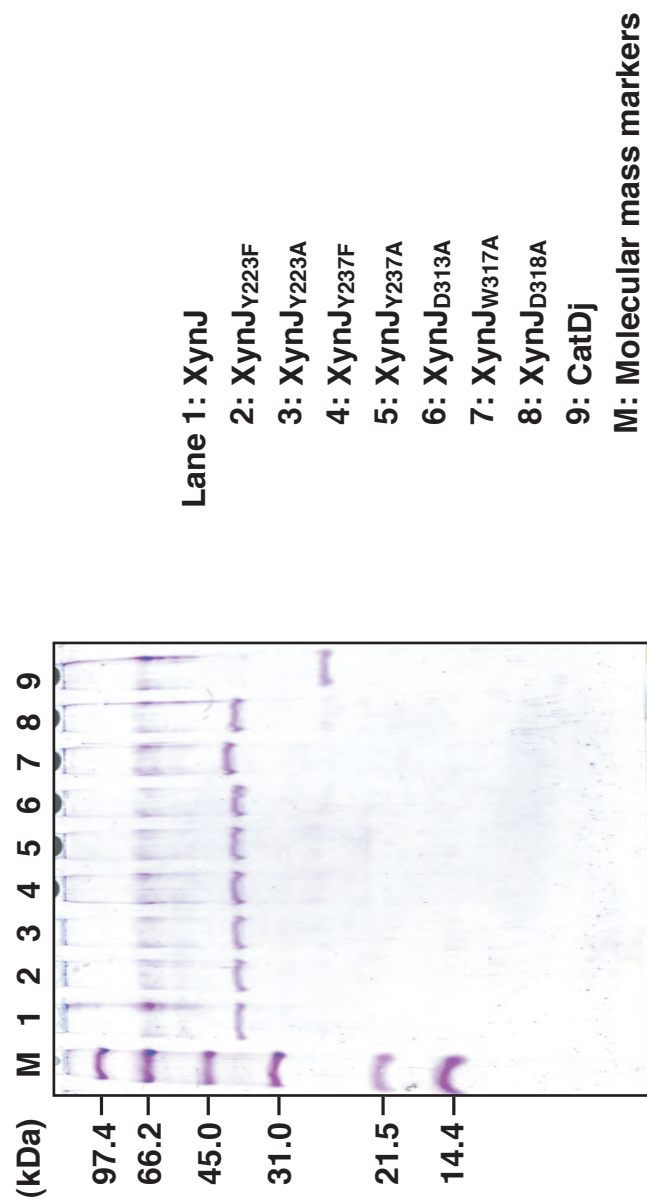


Fig. 3-2 野生型および各種変異型 XynJ 精製標品の SDS-PAGE

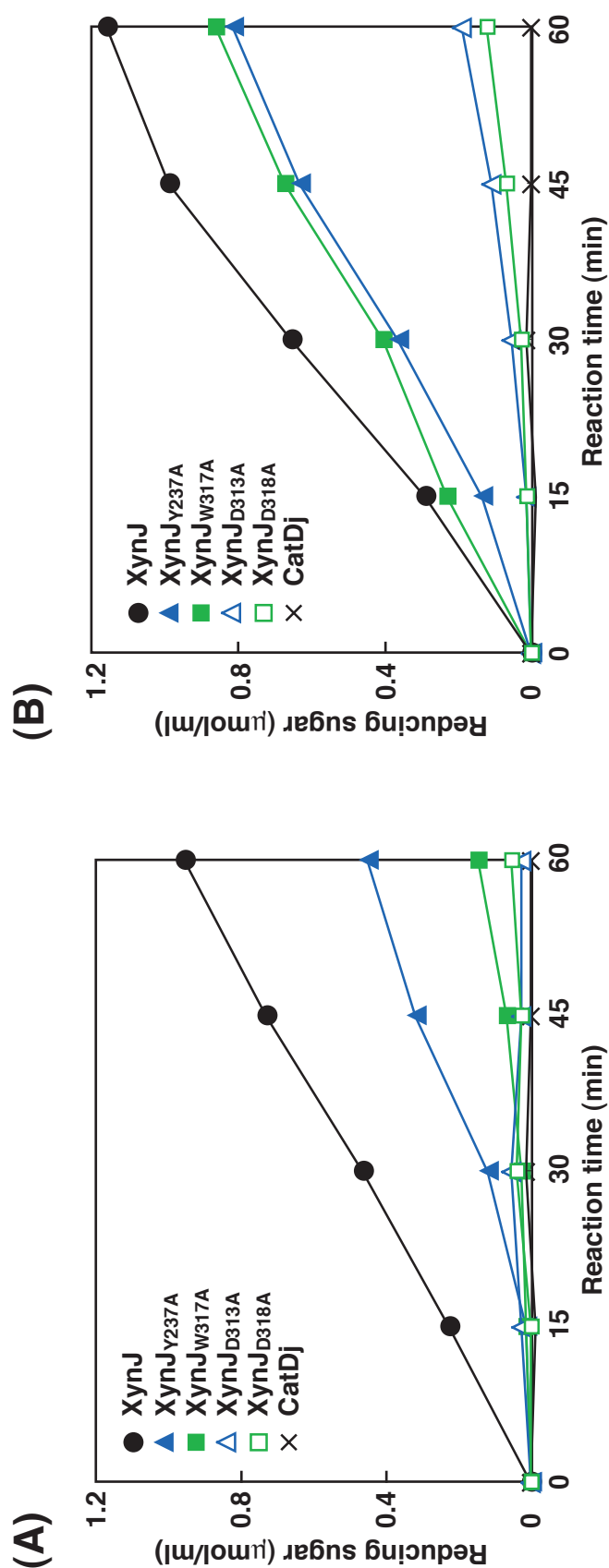


Fig. 3-3 Ca^{2+} への配位結合に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 XynJ の不溶性 Oat spelt キシラン加水分解活性

終濃度 $0.2 \mu\text{M}$ の野生型および各種変異型 XynJ ならびに CatDj を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (1.0 mg/ml) 加水分解におけるタイムコースを測定した。反応は以下の緩衝液中、 37°C で $15 \sim 60$ 分間行った。

(A) : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 ($\text{pH } 7.5$)

(B) : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 ($\text{pH } 7.5$)、 10 mM CaCl_2

項参照)と同濃度の酵素および基質を用いて反応を行った。ここで、Tyr237 は Ca^{2+} への配位結合にも直接関与する。また、Tyr223 は Ca^{2+} への配位結合に直接は関与しないが、 Ca^{2+} の取り込みに影響を及ぼすことが示唆されていた(本論文第 2 章参照)。そこで、試料液に Ca^{2+} を十分量添加した状態でのみ反応を行った。その結果、Phe への置換を含む変異型 XynJ の加水分解活性は野生型に比べてやや低下したものの、ほぼ同程度の活性を維持していることがわかった (Fig. 3-4)。一方、Ala へ置換を含む変異型 XynJ の活性は野生型に比べて顕著に低下しており、XynJ の不溶性キシラン加水分解活性と XBDj の不溶性キシラン結合能が密接に関係していることがさらに支持された。

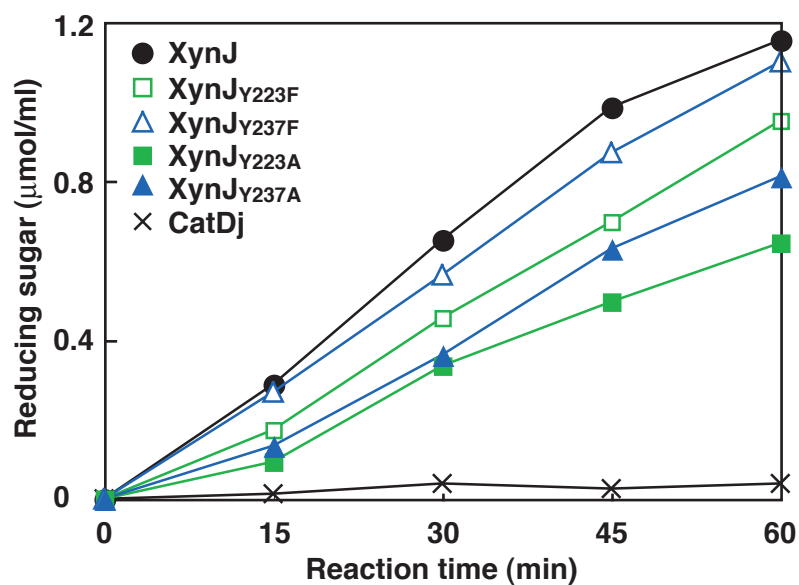


Fig. 3-4 キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 XynJ の不溶性 Oat spelt キシラン加水分解活性

終濃度 0.2 μM の野生型および各種変異型 XynJ ならびに CatDj を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (1.0 mg/ml) 加水分解におけるタイムコースを測定した。反応は 10 mM CaCl_2 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、37°C で 15~60 分間行った。

3-4 結論

Ca^{2+} への配位結合ならびにキシロース環との疎水性相互作用に関与する残基に部位特異的アミノ酸置換を導入した変異型 XBDj を含む各種変異型 XynJ を調製し、それらの不溶性 Oat spelt キシラン加水分解活性を測定した。

Ca^{2+} への配位結合に関与する 4 残基を Ala に置換した変異型 XynJ の不溶性 Oat spelt キシラン加水分解活性は野生型に比べて大きく低下し、その度合いは各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシラン結合能変化に対応したものであった。これら 4 残基がキシラン結合に関与していること、そして Asp313 および Asp318 がとりわけ重要であることが明らかとなった。キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基を Phe に置換した変異型 XynJ が野生型とほぼ同程度の加水分解活性を示したのに対し、Ala に置換したものの加水分解活性は野生型に比べて低下していた。これより、XynJ の不溶性キシラン加水分解活性と XBDj の不溶性キシラン結合能が密接に関係していることが明らかとなった。

3-5 引用文献

- [1] T. Kubo, R. Nakai, H. Tamanoi, K. Wakabayashi and S. Nakamura, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **35**, 221-222 (1996).
- [2] Ihsanawati ほか, 未発表データ.
- [3] 久保貴文, 修士論文, 東京工業大学 (1997).
- [4] 阪田朋子, 修士論文, 東京工業大学 (2004).
- [5] 稲見麻由子, 修士論文, 東京工業大学 (2003).
- [6] J. B. Sumner, *J. Biol. Chem.*, **47**, 393-395 (1925).

第 4 章

XynB 由来 XBD の 部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析

4-1 緒言

高度好熱性細菌 *Dictyoglomus thermophilum* が生産するキシラナーゼ B (XynB) はマルチドメイン酵素であり、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 11 に属する触媒ドメインの下流には、リンカー配列を介して機能未知なドメインが存在している (Fig. 4-1)。このドメインは配列の相同性から糖質結合モジュール (CBM) ファミリー 36 に分類されており、基質結合に関与すると推測されるが、実際に多糖への結合能を有しているかは確認されていない [1,2]。

一方、好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. 41M-1 株が生産するキシラナーゼ J (XynJ) には CBM ファミリー 36 に属するキシラン結合ドメイン (XBD) が存在する [3]。XynJ の立体構造が明らかにされ [4、PDB ID: 2DCJ および 2DCK]、その XBD 領域 (XBDj) の構造に基づき、XBDj とキシロトリオースとの複合体立体構造モデルを構築した。その結果、Tyr237、Asp313、Trp317 および Asp318 が Ca^{2+} への配位結合を介してキシランに結合し、また Tyr223 および Tyr237 の側鎖芳香環がキシロース環と疎水性相互作用することが予想された。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と XBDj との融合タンパク質 (GST-XBDj) [5] を用いて部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析を行った結果、 Ca^{2+} へ配位結合する 4 つの残基が不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していること、そして Asp313 および Asp318 がとりわけ重要であることが明らかとなった。また、 Ca^{2+} との配位結合を介したキシラン結合が存在する条件においては、 Ca^{2+} を介した結合に比べて寄与は小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も XBDj の不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していると推察された (本論文第 2 章参照)。

XynJ の XBDj および XynB の機能未知ドメイン (以後、XBDb とよぶ) のアミノ酸配列を比較した結果、両者は互いに約 53% の相同性を有しており、XBDj においてキシラン結合に関与するアミノ酸残基はすべて XBDb におい

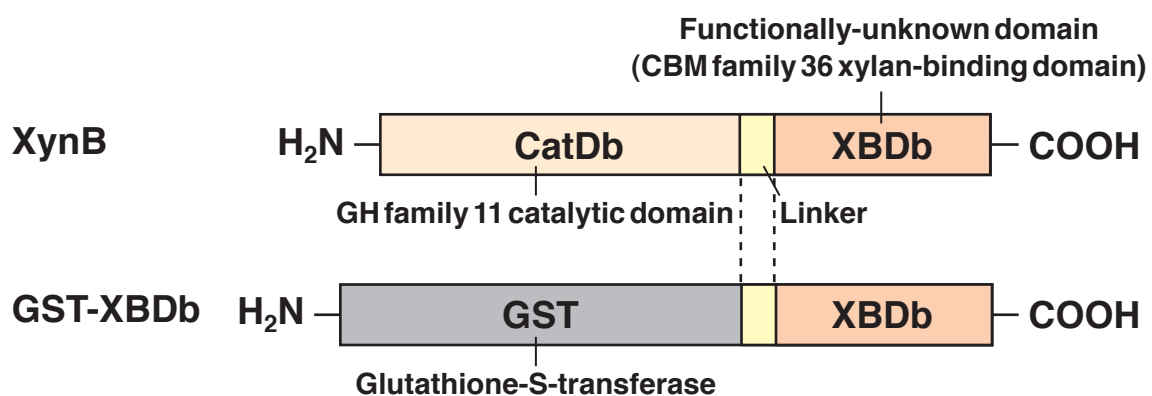


Fig. 4-1 XynB ならびに GST と XBDb との融合タンパク質の構造模式図

XynB ならびに GST と XBDb との融合タンパク質 (GST-XBDb) の構造を模式的に示した。

でも保存されていることがわかった (後述 4-3-1 項参照)。このことから、XBDb もキシランへの結合能を有していること、さらには XBDj と同様のキシラン結合様式をとることが予想された。

本章では、GST と XBDb との融合タンパク質 (GST-XBDb) を調製し、不溶性多糖への結合能を評価することとした。さらに、XBDj においてキシラン結合に関与するアミノ酸残基に対応する残基をそれぞれ Ala に置換した各種変異型 GST-XBDb を調製し、それらの性質検討を行うこととした。

4-2 実験材料と方法

4-2-1 菌株、プラスミドおよび培地

pGEM-DB は *D. thermophilum* ATCC35947 株由来 XynB の全領域をコードするプラスミドであり、ベクターとして pGEM-T Easy Vector (Promega) が用いられている [1]。GST と XBDb (XynB の Phe199 ~ Gln336 の領域) との融合タンパク質をコードする遺伝子の発現には、発現ベクター pGEX-3X (Pharmacia) を用いた。その他は、本論文第 2 章 2-2-1 項に準じた。

4-2-2 立体構造モデリング

分子モデリングソフトウェア Discovery Studio (Accelrys Software Inc.) を使用した。XynJ の XBDj の立体構造 [4] をもとに XBDb の立体構造モデルを構築した。さらに、*P. polymyxa* キシラナーゼ 43A 由来 XBD とキシロトリオースとの複合体立体構造 [6] を XBDb の立体構造モデルに重ね合わせることで、XBDb とキシロトリオースとの複合体立体構造モデルを構築した。

4-2-3 組換え DNA 技術

DNA の連結には Ligation High (東洋紡) を用い、添付のプロトコールに従い反応を行った。その他は、本論文第 2 章 2-2-3 項に準じた。

4-2-4 部位特異的変異導入法

本論文第 2 章 2-2-4 項に準じた。

4-2-5 インバース PCR を用いた部位特異的変異導入法

オリゴヌクレオチドはオペロンおよびグライナー・ジャパンより購入し、滅菌水に溶解したものを変異導入用プライマーとして用いた。インバース PCR 後の産物をそのままライゲーションに用いるため、プライマーにはあらかじめリン酸化を施した。リン酸化の反応液 20 μ l 中には、各 15 pmol のオリゴヌクレオチド、2 μ l の Protruding End Kinase Buffer、2 μ l の 20 mM ATP および 10 U の T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (東洋紡) が含まれる。反応液を 37°C で 30 分間、続いて 95°C で 3 分間インキュベートし、リン酸化プライマーを得た。

PCR 反応液 50 μ l 中には、50 ng の鋳型 DNA、各 15 pmol のリン酸化プライマー、0.2 mM の dNTPs、1 mM の $MgSO_4$ および 1 U の耐熱性 DNA ポリメラーゼ KOD-Plus- (東洋紡) を含む。サーマルサイクラーは iCycler (Bio-Rad) を使用した。以下に反応サイクル条件を示す。

プレヒート		94°C	2 分
サイクル (25 回)	ステップ 1	94°C	15 秒
	ステップ 2	50°C	30 秒
	ステップ 3	68°C	5 分 30 秒

得られた反応産物に対して制限酵素 *Dpn* I 処理を行い、メチル化を含む鋳型 DNA を消化・除去した後、セルフライゲーションを行い、大腸菌 DH5 α 株へ導入することで変異遺伝子を含む形質転換体を得た。目的とする変異が正しく導入されたか否かは、同時に導入した制限酵素サイトでの切断ならびに塩基配列の決定 (後述 4-2-6 項参照) により確認した。

4-2-6 塩基配列決定および遺伝情報解析

本論文第 2 章 2-2-5 項に準じた。

4-2-7 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

本論文第 2 章 2-2-6 項に準じた。

4-2-8 タンパク質の定量法

本論文第 2 章 2-2-7 項に準じた。

4-2-9 GST-XBDb の調製

本論文第 2 章 2-2-8 項に準じた。

4-2-10 GST 活性の測定

本論文第 2 章 2-2-9 項に準じた。

4-2-11 不溶性多糖の調製

不溶性 Oat spelt キシランの調製

本論文第 2 章 2-2-10 項に準じた。

不溶性 Larchwood キシランの調製

不溶性 Larchwood キシランは既法 [5] に準じて調製した。すなわち、12 g の Larchwood キシラン (東京化成) を脱イオン水に懸濁し、1 M NaOH で pH 10.5 に調整した後、室温で 3 時間穏やかに攪拌した。遠心分離 (6,000 x g、5 分間、室温) により沈殿を得た。脱イオン水での洗浄、遠心分離を 3 回繰り返した後、

不溶性の沈殿をエタノールに懸濁した。吸引によりエタノールを除いた後、濾紙上の沈殿を乾燥した。さらに乳鉢で摩砕し、これを不溶性 Larchwood キシランとした。なお、回収率は 46% であった。

パキマンの調製

パキマンは既法 [7] に準じて調製した。すなわち、担子菌 *Poria cocos* の子実体の乾燥粉末 (ブクリョウ、鈴粉末薬品) 約 200 g を 2 L ひだ付き三角フラスコに取り、クロロホルム-メタノール混合液 (1 : 1) 1 L を加えて、60°C、170 rpm で 6 時間振とうした。その後、40°C になるまで振とうしながら除冷し、さらに一晩静置した。吸引濾過を行い、固形物をクロロホルム-メタノール混合液約 100 ml で洗浄した。クロロホルム-メタノール混合液 1 L を再び加え、洗浄までの操作を再度繰り返した。その後、ジエチルエーテル 500 ml を加え、一晩静置した。吸引濾過を行い、固形物をバットに広げて 2 日間静置して乾燥した。さらに乳鉢で摩砕し、これをパキマンとした。

4-2-12 各種不溶性多糖に対する結合率の測定

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に 2.0 mg/ml のウシ血清アルブミン (BSA) を溶解し、BSA 溶液とした。この BSA 溶液に 2.0 mg/ml の各種不溶性多糖を加え、超音波処理を施すことにより粒子を均一化したものを不溶性多糖懸濁液とした。不溶性多糖は不溶性 Oat spelt キシラン、不溶性 Larchwood キシラン、非晶性セルロース (SIGMACELL Type 101、Sigma)、結晶性セルロース (アビセル、Merck)、カルボキシメチルセルロース (CMC、和光純薬)、キチン (フナコシ)、パキマン、およびカードラン (和光純薬) を使用した。これらの溶液・懸濁液を用い、1.5 ml 容マイクロチューブ内で終濃度 0.2 μ M の各種 GST-XBDb、1.0 mg/ml の BSA、1.0 mg/ml の不溶性多糖、および各種緩衝液 (後述) からなる試料液 400 μ l を調製した。同時に同じ組成で不溶性多糖を含まないコント

ロール液も調製した。試料液等は、室温で 3 時間、小型旋回ミキサー (愛くる、イワキ) を用いて穏やかに攪拌した。遠心 (室温、7,000 x g、5 分間) により試料液中の不溶性多糖を沈殿・除去した後、上清の GST 活性を測定した。GST 活性を指標にして、本論文第 2 章 2-2-10 項と同様の方法により、各種 GST-XBDb の不溶性多糖に対する結合率を算出した。

なお、緩衝液は以下のものを使用した。

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM CaCl₂

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM EDTA

4-2-13 不溶性 Oat spelt キシランとの結合におけるキシロースおよびキシロオリゴ糖添加効果

終濃度 0.2 μ M の GST-XBDb_{D327A}、1.0 mg/ml の BSA、1.0 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシラン、および 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) からなる試料液 400 μ l を調製した。その際、キシロース (和光純薬) またはキシロオリゴ糖 (和光純薬) が終濃度 1 ~ 20 % (w/v) で段階的に含まれるよう添加した。同時に同じ組成で不溶性 Oat spelt キシランを含まないコントロール液 400 μ l も調製した。試料液等は、室温で 3 時間、小型旋回ミキサーを用いて穏やかに攪拌した。遠心 (室温、7,000 x g、5 分間) により試料液中の不溶性 Oat spelt キシランを沈殿・除去した後、上清の GST 活性を測定した。GST 活性を指標にして、GST-XBDb_{D327A} の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を算出した。

4-2-14 不溶性 Oat spelt キシランとの結合における NaCl 添加効果

終濃度 0.2 μ M の GST-XBDb_{D327A}、1.0 mg/ml の BSA、1.0 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシラン、および 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) からなる試料液

400 μ l を調製した。その際、NaCl が終濃度 100 ~ 1000 mM で段階的に含まれるよう添加した。同時に同じ組成で不溶性 Oat spelt キシランを含まないコントロール液 400 μ l も調製した。試料液等は、室温で 3 時間、小型旋回ミキサーを用いて穏やかに攪拌した。遠心 (室温、7,000 x g、5 分間) により試料液中の不溶性 Oat spelt キシランを沈殿・除去した後、上清の GST 活性を測定した。GST 活性を指標にして、GST-XBDb_{D327A} の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を算出した。

4-2-15 不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性

終濃度 0.2 μ M の GST-XBDb_{D327A}、1.0 mg/ml の BSA、1.0 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシラン、および 80 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 5.0 ~ 11.0) [8] からなる試料液 400 μ l を調製した。同時に同じ組成で不溶性 Oat spelt キシランを含まないコントロール液 400 μ l も調製した。試料液等は、室温で 3 時間、小型旋回ミキサーを用いて穏やかに攪拌した。遠心 (室温、7,000 x g、5 分間) により試料液中の不溶性 Oat spelt キシランを沈殿・除去した後、上清の GST 活性を測定した。GST 活性を指標にして、GST-XBDb_{D327A} の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を算出した。

4-3 結果および考察

4-3-1 XBDj および XBDb のアミノ酸配列比較

XBDj (XynJ の Thr210 ~ Arg327 の領域) および XynB の機能未知ドメイン XBDb (XynB の Thr218 ~ Gln336 の領域) のアミノ酸配列を比較した結果を Fig. 4-2 に示す。両者は互いに約 53% の相同性を有していた。XBDj において Ca^{2+} 結合に関与する残基 (Tyr237、Asp313、Trp317 および Asp318) は、XBDb ではそれぞれ Tyr245、Asp322、Trp326 および Asp327 に対応していた。また、XBDj においてキシロース環との疎水性相互作用に関与する残基 (Tyr223 および Tyr237) は、XBDb ではそれぞれ Tyr231 および Tyr245 に対応していた。XBDj においてキシラン結合に関与する残基はすべて XBDb においても保存されていることがわかった。

4-3-2 XynB 由来 XBD の立体構造モデルの構築

XynJ の立体構造をもとに XBDb の立体構造モデルを構築した。さらに、*P. polymyxa* キシラナーゼ 43A 由来 XBD とキシロトリオースとの複合体立体構造 [6] を XBDb の立体構造モデルに重ね合わせることで、XBDb とキシロトリオースとの複合体立体構造モデルを構築した (Fig. 4-3)。XBDb の Tyr223、Tyr245、Asp322、Trp326 および Asp327 は、XBDj と同様、キシラン結合に関与する残基として機能し得ると考えられた。

そこで、XynB の機能未知ドメイン XBDb がキシランへの結合能を有していることを確かめることとした。さらに、キシラン結合に関与すると考えられる残基に部位特異的アミノ酸置換を導入した各種変異型 XBDb を調製し、それらの不溶性キシラン結合能を評価することとした。

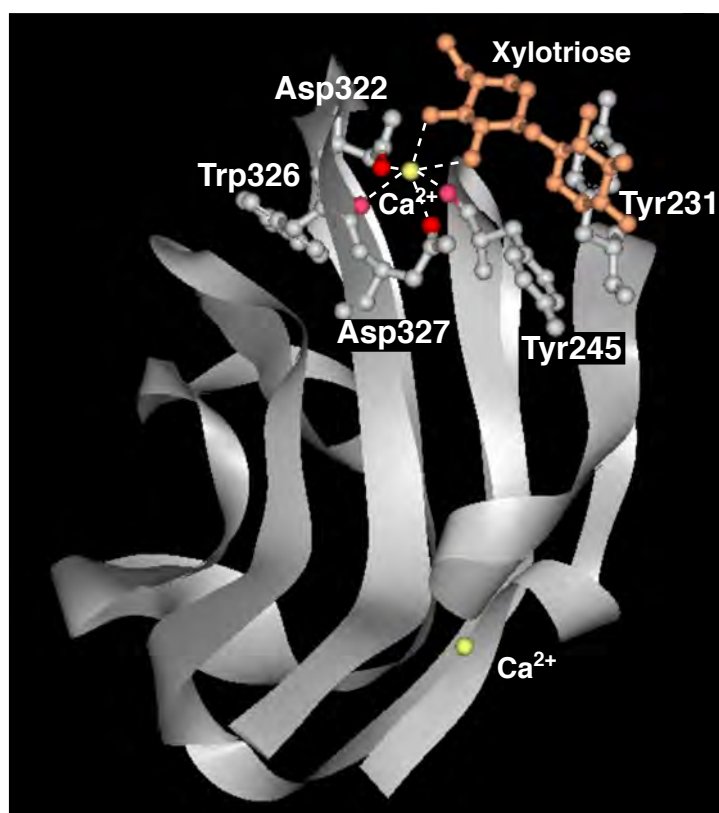


Fig. 4-3 XBDb とキシロトリオースとの複合体立体構造モデル

Ca^{2+} への配位結合に関与する残基 (Tyr245、Asp322、Trp326 および Asp327) ならびにキシロース環との疎水性相互作用に関与する残基 (Tyr231 および Tyr245) を示した。 Ca^{2+} に配位結合していると思われる 1 つの水分子は省略した。

4-3-3 野生型および各種変異型 GST-XBDb をコードする発現型プラスミドの構築

XBDb の不溶性多糖結合能を評価するため、GST と XBDb との融合タンパク質 (GST-XBDb; Fig. 4-1 参照) を調製することとした。

XynB 全領域の遺伝子を含むプラスミド pGEM-DB から、リンカー配列および XBDb (XynB の Phe199 ~ Gln326) をコードする領域を PCR 増幅した後、制限酵素 *EcoR* I で消化した (Fig. 4-4)。得られた DNA 断片を発現ベクター pGEX-3X の *EcoR* I サイトに連結することで、野生型 GST-XBDb 発現型プラスミド pGEX-XBDb を構築した。その際、Table 4-1 に示したプライマーセットを使用した。

GST-XBDb_{Y231A} および GST-XBDb_{Y245A} をコードする発現型プラスミドは、上述の pGEX-XBDb に部位特異的変異を導入することにより構築した。また、GST-XBDb_{Y231A/Y245} をコードする発現型プラスミドは、GST-XBDb_{Y245} をコードする発現型プラスミド pGEX-XBDb_{Y245A} に部位特異的変異を導入することにより構築した。変異導入に際しては、Table 4-2 に示した互いに相補的な変異導入用プライマーセットを使用した。プライマーに導入した制限酵素サイトにおける切断の成否と塩基配列決定により、目的の位置に正しく変異が導入されていることを確認した。

GST-XBDb_{D322A}、GST-XBDb_{D327A} および GST-XBDb_{D322A/D327A} をコードする発現型プラスミドは、pGEX-XBDb を鋳型とするインバース PCR により構築した。その際、Table 4-2 に示した変異導入用プライマーセットを使用した。プライマーに導入した制限酵素サイトにおける切断の成否と塩基配列決定により、目的の位置に正しく変異が導入されていることを確認した。

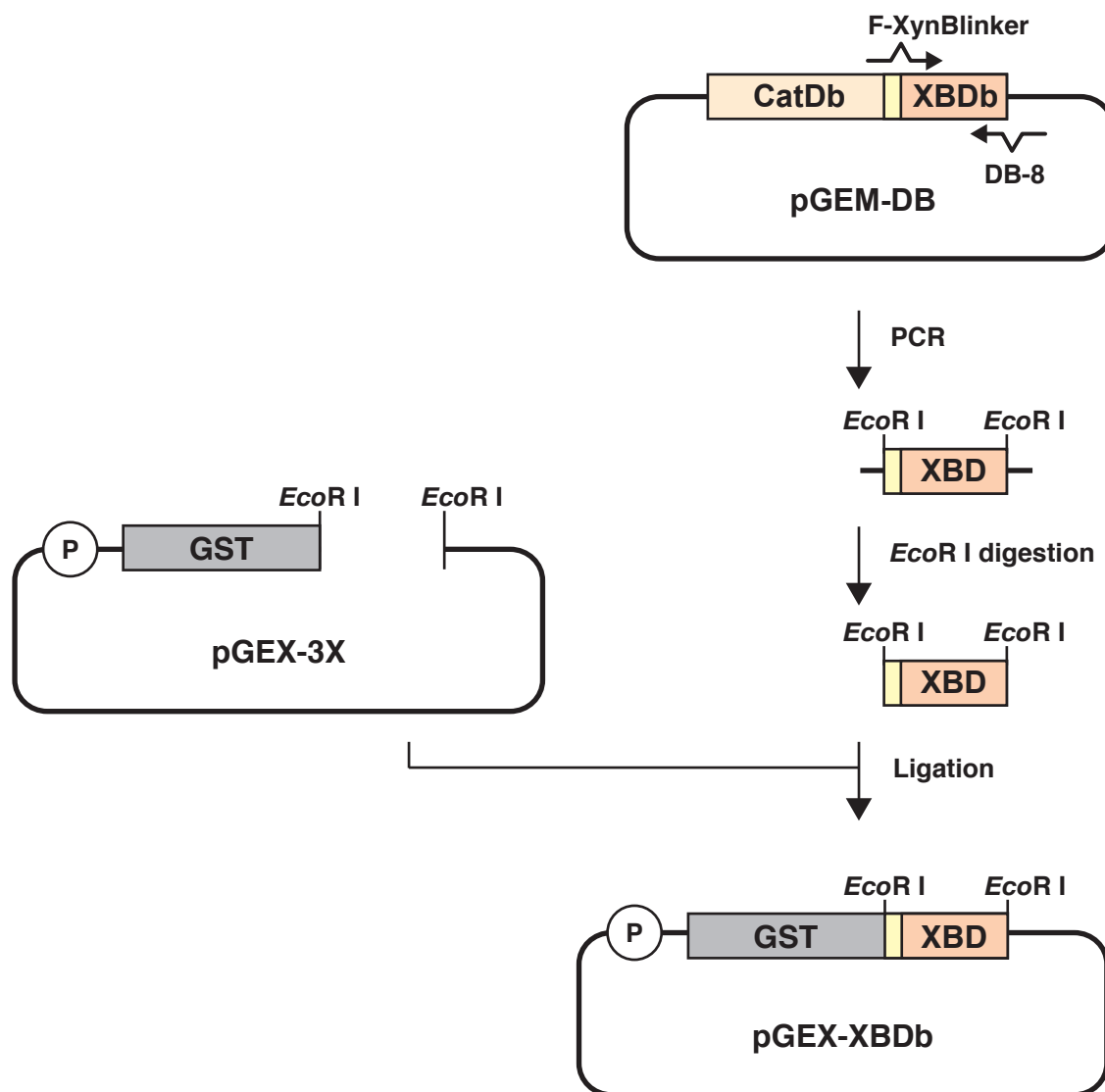


Fig. 4-4 野生型 GST-XBDb をコードする発現型プラスミドの構築

Table 4-1 野生型 GST-XBDdb をコードする発現型プラスミド構築のためのプライマーの塩基配列

Plasmid	Primer	Sequence
pGEX-XBDdb	F-XynBlinker	5´-GGCTAATATAACACAGAA <u>Tt</u> CTTTTCTCAAAGTAG-3´
	DB-8	5´-GCTCCTAGAAATTCCTCCCTCATTACTGTATC-3´

野生型配列と異なる塩基は小文字で示した。導入した制限酵素サイトを下線で示した。

Table 4-2 各種変異型 GST-XBDb をコードする発現型プラスミド構築のための変異導入用プライマーの塩基配列

Plasmid	Primer	Sequence
pGEX-XBDb _{Y231A}	F-Y231A	5'-CATTAAAGTGGGCCT <u>gca</u> GTATCGAGAATTACAAG-3'
	R-Y231A	5'-CTTGTAATTCTCGATAC <u>tgc</u> aGGCCCACTTAATG-3'
pGEX-XBDb _{Y245A}	F-Y245A	5'-CCATTTAATGGTATAGCGCTa <u>gc</u> TGCAAAATGGAG-3'
	R-Y245A	5'-CTCCATTTGCA <u>gct</u> AGcTAGcGCTATACCATTAATGG-3'
pGEX-XBDb _{Y231A/Y245A}	F-Y231A ^{*1}	5'-CATTAAAGTGGGCCT <u>gca</u> GTATCGAGAATTACAAG-3'
	R-Y231A ^{*1}	5'-CTTGTAATTCTCGATAC <u>tgc</u> aGGCCCACTTAATG-3'
	F-Y245A ^{*2}	5'-CCATTTAATGGTATAGCGCTa <u>gc</u> TGCAAAATGGAG-3'
	R-Y245A ^{*2}	5'-CTCCATTTGCA <u>gct</u> AGcTAGcGCTATACCATTAATGG-3'
pGEX-XBDb _{D322A}	F-B1	5'-GTACATGGGATGTTTATGCAGATTATCTGTTG-3'
	R-D322A	5'-CATT <u>AgC</u> tGCAGTAACCTACAATTTCCACTG-3'
pGEX-XBDb _{D327A}	F-D327A	5'-GTACATGGG <u>Ct</u> GTaTAcGCAGATTATCTGTTG-3'
	R-B2	5'-CATTATCAGCAGTAACCTACAATTTCCACTG-3'
pGEX-XBDb _{D322A/D327A}	F-D327A ^{*3}	5'-GTACATGGG <u>Ct</u> GTaTAcGCAGATTATCTGTTG-3'
	R-D322A ^{*4}	5'-CATT <u>AgC</u> tGCAGTAACCTACAATTTCCACTG-3'

アミノ酸置換を施したコドンは赤字で、野生型配列と異なる塩基は小文字で示した。変異導入の成否を判断するために導入した制限酵素サイトを下線で示した。^{*1}、^{*2}、^{*3}および^{*4}は、プラスミド pGEX-XBDb_{Y231A}、pGEX-XBDb_{Y245A}、pGEX-XBDb_{D327A} および pGEX-XBDb_{D322A} 構築で用いたプライマーと同一のものである。

4-3-4 野生型および各種変異型 GST-XBD_b の大腸菌による生産と精製

各種発現型プラスミドを大腸菌 BL21 株に形質転換した。得られた形質転換体を培養し、IPTG 誘導を施すことにより野生型および各種変異型 GST-XBD_b ならびに GST の生産を試みた。無細胞抽出液を SDS-PAGE に供し、発現確認を行った。その結果、野生型および各種変異型 GST-XBD_b をコードする発現型プラスミドを有する大腸菌の無細胞抽出液を泳動したレーンにおいて、約 40 kDa の位置に GST-XBD_b と思われる濃いタンパク質バンドが確認された (Fig. 4-5)。また、発現ベクター pGEX-3X を有する大腸菌のレーンにおいては、約 30 kDa の位置に GST と思われる濃いタンパク質バンドが確認された。

次に、大腸菌が生産した GST-XBD_b および GST の精製を試みた。精製はグルタチオン固定化担体を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより行った。精製後のタンパク質を SDS-PAGE に供した結果、いずれも高純度の精製標品が得られたことがわかった (Fig. 4-6)。以後の性質検討においては、ここで得られた精製標品を用いることとした。

4-3-5 野生型 GST-XBD_b の各種不溶性多糖に対する結合率

XBD_b の各種不溶性多糖に対する結合能を評価することとした。不溶性多糖としては、不溶性 Oat spelt キシラン、不溶性 Larchwood キシラン、非晶性セルロース、結晶性セルロース、CMC、キチン、パキマン、およびカードランを使用した。Oat spelt キシランは β -1,4-キシランの主鎖の一部がアラビノース残基およびメチルグルクロン酸残基により修飾を受けたものである (本論文第 1 章 Fig. 1-1 参照)。アラビノース残基には、フェルラ酸やクマル酸といったフェノール酸がエステル結合しているという特徴をもつ。Larchwood キシランは Oat spelt キシランと同様、 β -1,4-キシランの主鎖の一部がアラビノース残基およびメチルグルクロン酸残基により修飾を受けたものである。メチルグルクロ

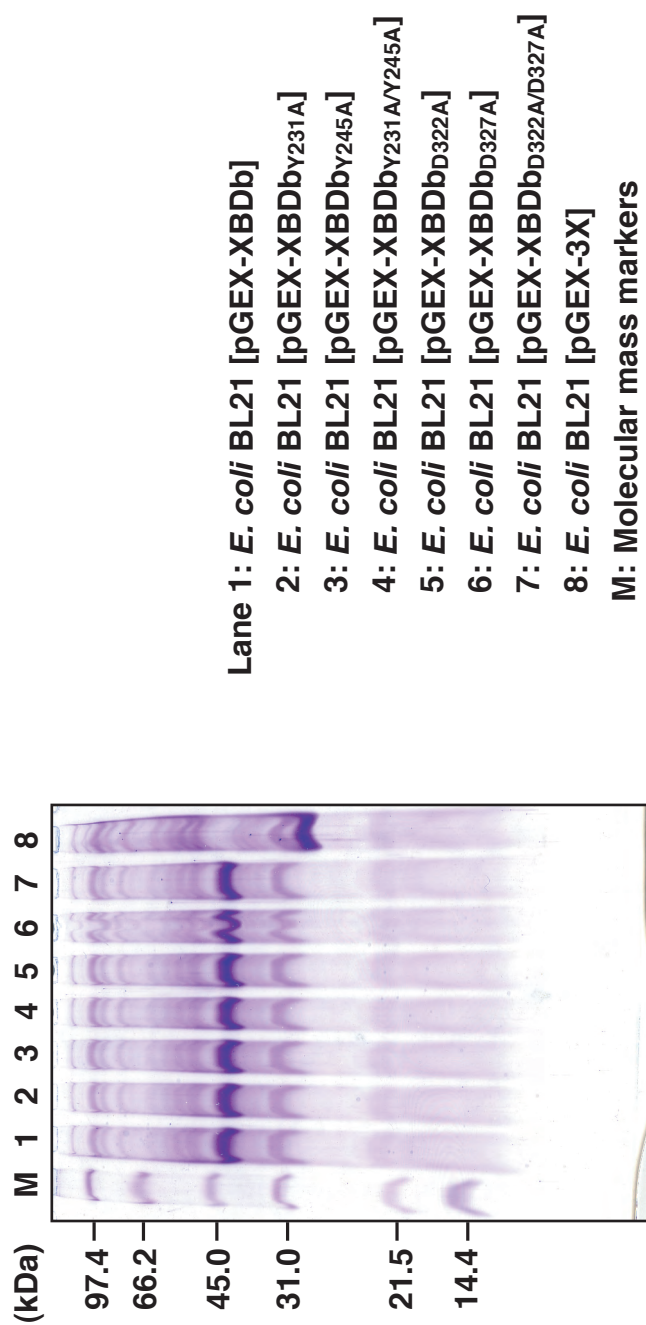


Fig. 4-5 野生型および各種変異型 GST-XBDdb をコードする発現型プラスミドを有する大腸菌無細胞抽出液の SDS-PAGE

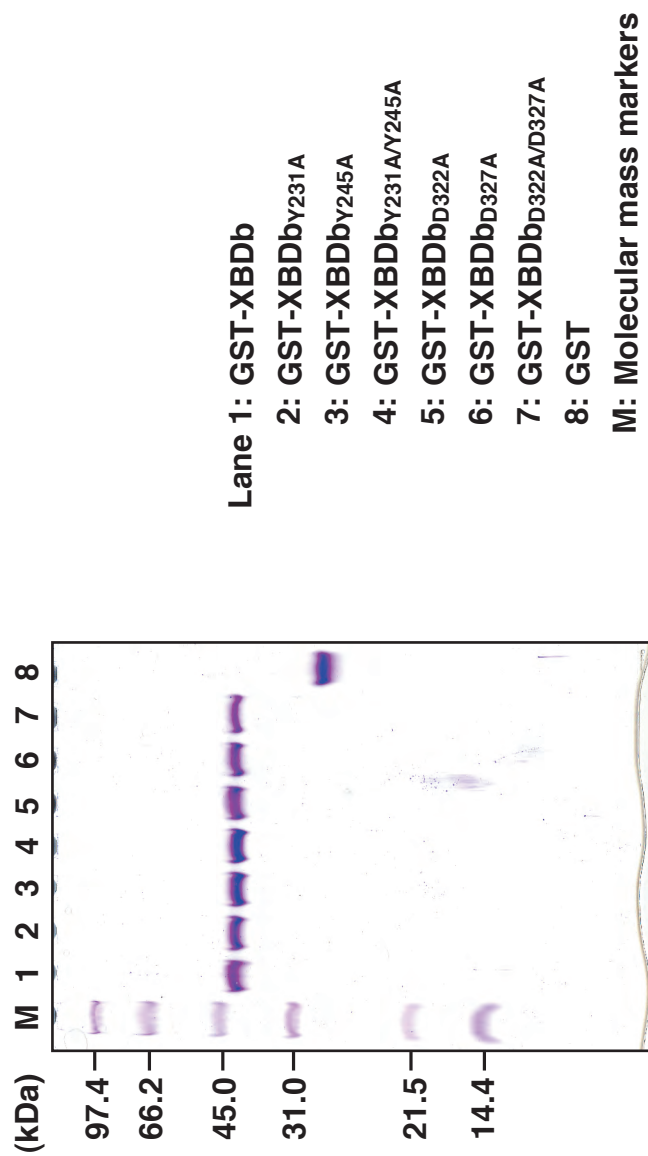


Fig. 4-6 野生型および各種変異型 GST-XBDdb 精製標品の SDS-PAGE

ン酸残基の比率が高く、その多くが隣接した 2 つのキシロース残基のそれぞれに結合している。セルロースは D-グルコースが β -1,4 結合で連なった β -1,4-グルカンである。セルロース分子内ではグルコース残基の O6 位と O2 位、および O3 位と O1 位の間に水素結合が存在し、分子がねじれにくく強固になっている。さらに分子間では O6 位と O3 位の間で水素結合が形成されている。結晶性の違いにより、非晶性セルロースおよび結晶性セルロースに分けられる。CMC はセルロースのヒドロキシル基の一部がカルボキシメチル基により修飾を受けた誘導体である。キチンは β -1,4-ポリ-N-アセチル-D-グルコサミンである。パキマンおよびカードランは、いずれも D-グルコースが β -1,3 結合で連なった β -1,3-グルカンである。

野生型 GST-XBD_b の上記各種不溶性多糖に対する結合率を試料液に Ca^{2+} を十分量添加した状態で測定した結果、GST-XBD_b は不溶性 Oat spelt キシランおよび不溶性 Larchwood キシランに対してとりわけ高い結合率を示し、非晶性セルロースに対しても比較的高い結合率を示すことがわかった (Fig. 4-7)。このことから、XynB の機能未知ドメイン XBD_b がキシラン結合ドメインとしての機能を有することが明らかとなった。

4-3-6 各種変異型 GST-XBD_b の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

GST-XBD_j の例に倣い、各種変異型 GST-XBD_b の不溶性 Oat spelt キシラン結合能を評価した。

Ca^{2+} への配位結合に関与する残基を Ala に置換した各種変異型 GST-XBD_b の結合率

Ca^{2+} への配位結合に関与する 4 つの残基のうち、キシラン結合にとりわけ重要であると考えられる Asp322 および Asp327 のいずれか、または両方を Ala に置換した。野生型および各種変異型 GST-XBD_b の不溶性 Oat spelt キシ

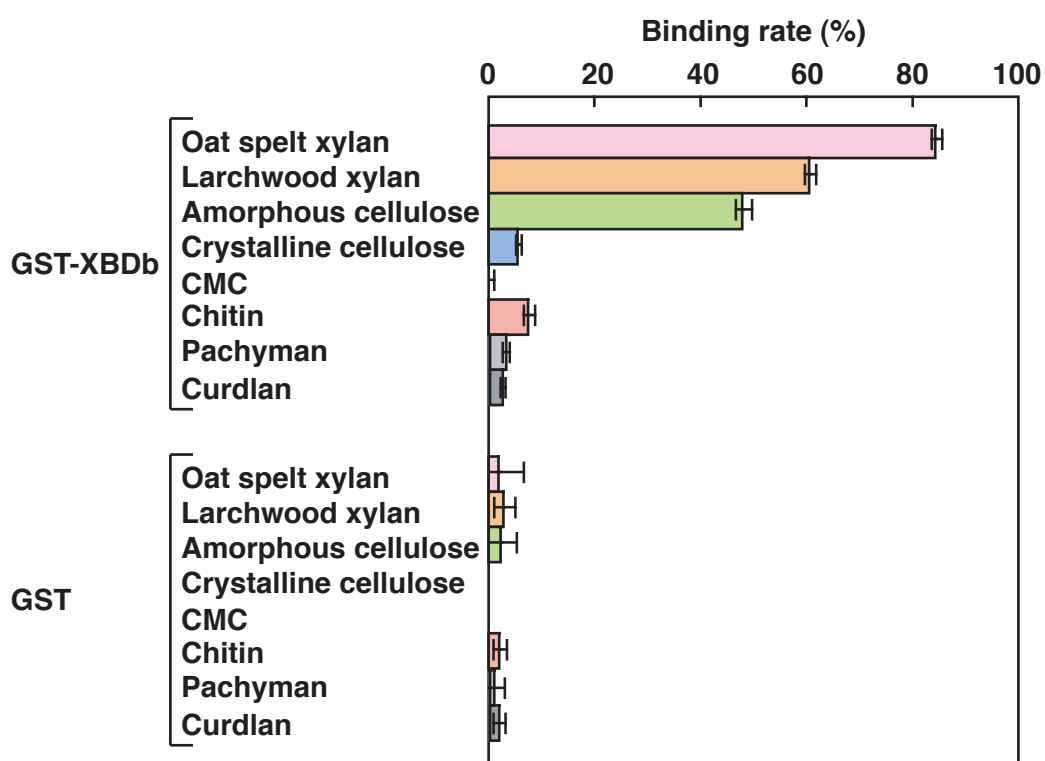


Fig. 4-7 野生型 GST-XBDb の各種不溶性多糖に対する結合率

終濃度 $0.2 \mu\text{M}$ の野生型 GST-XBDb を用いて、各種不溶性多糖 (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は 10 mM CaCl_2 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、室温で 3 時間行った。

ランに対する結合率を測定した結果、いずれの変異型 GST-XBD_b の結合率も野生型に比べて低下していた (Fig. 4-8)。これより、Asp322 および Asp327 は Ca^{2+} への配位結合に実際に関与しており、Ala への置換により Ca^{2+} を介した結合は消失したものと考えられた。一方で、これらの変異型 GST-XBD_b は一定レベルの結合率をなお保持しており、GST-XBD_j の不溶性 Oat spelt キシランとの結合とは異なる挙動を示した。また、試料液に EDTA を十分量添加した状態で結合率を測定したところ、変異型 GST-XBD_b の結合率は EDTA 添加の有無で変化がなく、結合率は一定レベルを保持し続けた。その際、野生型 GST-XBD_b の結合率は低下し、変異型と同程度となった。これらの結果より、EDTA 添加の有無に関らず変異型 GST-XBD_b がなお結合率を保持しているのは、 Ca^{2+} への配位結合を介したキシラン結合以外の結合 (この段階では、キシロース環との疎水性相互作用を想定) が強いためと考えられた。

さらに、試料液に Ca^{2+} を十分量添加した状態で結合率を測定したところ、 Ca^{2+} 無添加の場合に比べて変異型 GST-XBD_b の結合率はやや向上したが、この理由は不明である。大過剰の Ca^{2+} 存在下では Asp322 や Asp327 の代わりに水分子が配位するなどして Ca^{2+} が若干取り込まれることなどの理由が推測された。

キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基を Ala に置換した各種変異型 GST-XBD_b の結合率

キシロース環との疎水性相互作用に関与する Tyr231 および Tyr245 のいずれか、または両方を Ala に置換した。野生型および各種変異型 GST-XBD_b の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を測定した結果、いずれの変異型 GST-XBD_b の結合率も野生型に比べて低下していた (Fig. 4-9)。一方、試料液に Ca^{2+} を十分量添加した状態で結合率を測定したところ、変異型 GST-XBD_b の結合率は Ca^{2+} 非添加時に比べて大きく回復し、野生型とほぼ等しい結合率を示した。ここで、XBD_b は Ca^{2+} を介してキシランと結合することがわかっ

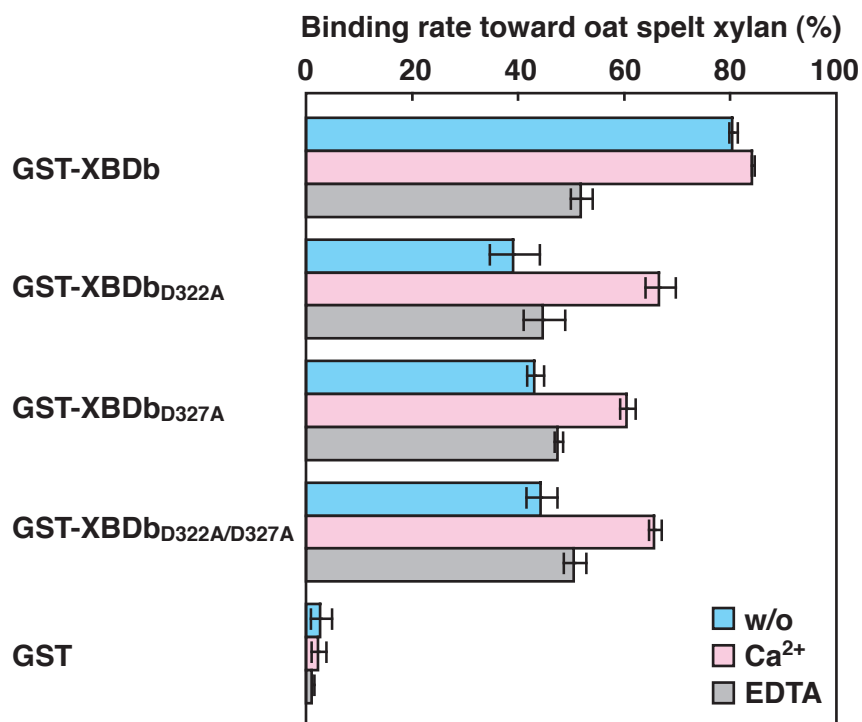


Fig. 4-8 Ca^{2+} への配位結合に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

終濃度 $0.2 \mu\text{M}$ の野生型および各種変異型 GST-XBDb を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で 3 時間行った。

w/o : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)

Ca^{2+} : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM CaCl_2

EDTA : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM EDTA

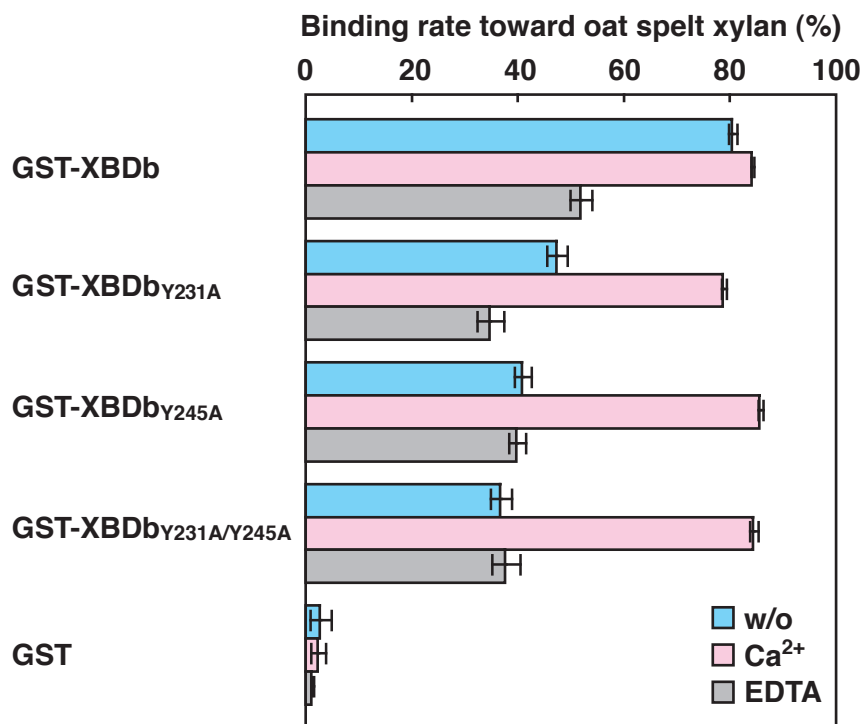


Fig. 4-9 キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

終濃度 0.2 μ M の野生型および各種変異型 GST-XBDb を用いて、不溶性 Larchwood キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で 3 時間行った。

w/o : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)

Ca²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM CaCl₂

EDTA : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM EDTA

ている。 Ca^{2+} 非添加時の結合率は、XBDb 分子中に取り込まれ、保持されている Ca^{2+} の量に依存すると考えられる。そのため、XBDb のキシラン結合におけるキシロース環との疎水性相互作用の寄与を正しく評価するためには、 Ca^{2+} の取込み・保持の違いによる Ca^{2+} を介したキシラン結合の違いの影響が最小限となる条件、すなわち Ca^{2+} 添加条件での結合率を比較する必要がある。 Ca^{2+} 添加時の各種変異型 GST-XBDb の結合率は野生型と同レベルであったことより、 Ca^{2+} を介した不溶性 Oat spelt キシランとの結合が存在する条件においては、キシロース環との疎水性相互作用はキシラン結合にほとんど寄与しないことがわかった。

ここで再び Ca^{2+} 非添加時の結合率に注目する。Ala への置換を含む変異型 GST-XBDb の結合率は、野生型に比べて低下していた。このことは、Tyr245 が Ca^{2+} への配位結合にも直接関与すること、そして Tyr231 は Ca^{2+} への配位結合に直接は関与しないが Ala への置換により Ca^{2+} が脱落しやすくなることで説明できる。さらに、試料液に EDTA を十分量添加した状態で結合率を測定したところ、変異型 GST-XBDb の結合率は EDTA 添加の有無でほとんど変化しなかった。これより、変異型 GST-XBDb 分子中の Ca^{2+} は EDTA 非添加時においてもほぼ完全に脱落していたことがわかった。ちなみに GST-XBDj においても、Tyr231 および Tyr245 に対応する残基が Ca^{2+} の取り込み・保持に関与することが示唆されていた (本論文 2-3-5 項参照)。以上より、XBDj と同様、XBDb においても、Tyr231 および Tyr245 が Ca^{2+} の取り込み・保持に関与することが明らかとなった。

さて、EDTA 添加時の変異型 GST-XBDb の結合率は野生型に比べてやや低下していた。この低下分は、 Ca^{2+} を介した不溶性 Oat spelt キシランとの結合が存在しない条件における、キシロース環との疎水性相互作用の寄与分と考えられる。これより、 Ca^{2+} との配位結合を介したキシラン結合が存在しない条件においては、寄与は非常に小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も XBDb の不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していると推察された。

さらに、EDTA 添加時においても各種変異型 GST-XBDb は不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率をなお保持していたことから、XBDb には Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用に加えて、それ以外の第 3 のキシラン結合様式も存在することが強く示唆された。

4-3-7 Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用以外の不溶性 Oat spelt キシラン結合様式の解析

XBDb がもつ Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用以外の第 3 のキシラン結合様式に関して解析を行った。変異型 GST-XBDb としては、 Ca^{2+} を介した結合が消失した GST-XBDb_{D327A} (本章 4-3-6 項参照) を用いることとした。GST-XBDb_{D327A} はキシロース環との疎水性相互作用はなお保持している。しかし、XBDb のキシラン結合におけるキシロース環との疎水性相互作用の寄与は非常に小さいため (本章 4-3-6 項参照)、GST-XBDb_{D327A} が示す結合率はほぼ第 3 のキシラン結合様式によるものとみなすことができる。

不溶性 Oat spelt キシランとの結合におけるキシロースおよびキシロオリゴ糖添加効果

GST-XBDb_{D327A} を用いて、不溶性 Oat spelt キシランとの結合におけるキシロースおよびキシロオリゴ糖 (キシロビオースおよびキシロトリオースの混合物) 添加効果を調べた。なお、結合率はキシロースおよびキシロオリゴ糖非添加の場合を 100% とした相対値で表した。その結果、キシラン 0.1% (w/v) に対してキシロースおよびキシロオリゴ糖を 20 % (w/v) まで加えても、不溶性 Oat spelt キシランへの結合は顕著な阻害を受けなかった (Fig. 4-10)。このことから、GST-XBDb_{D327A} は、不溶性 Oat spelt キシランの主鎖ではなく側鎖を認識している可能性が考えられた。

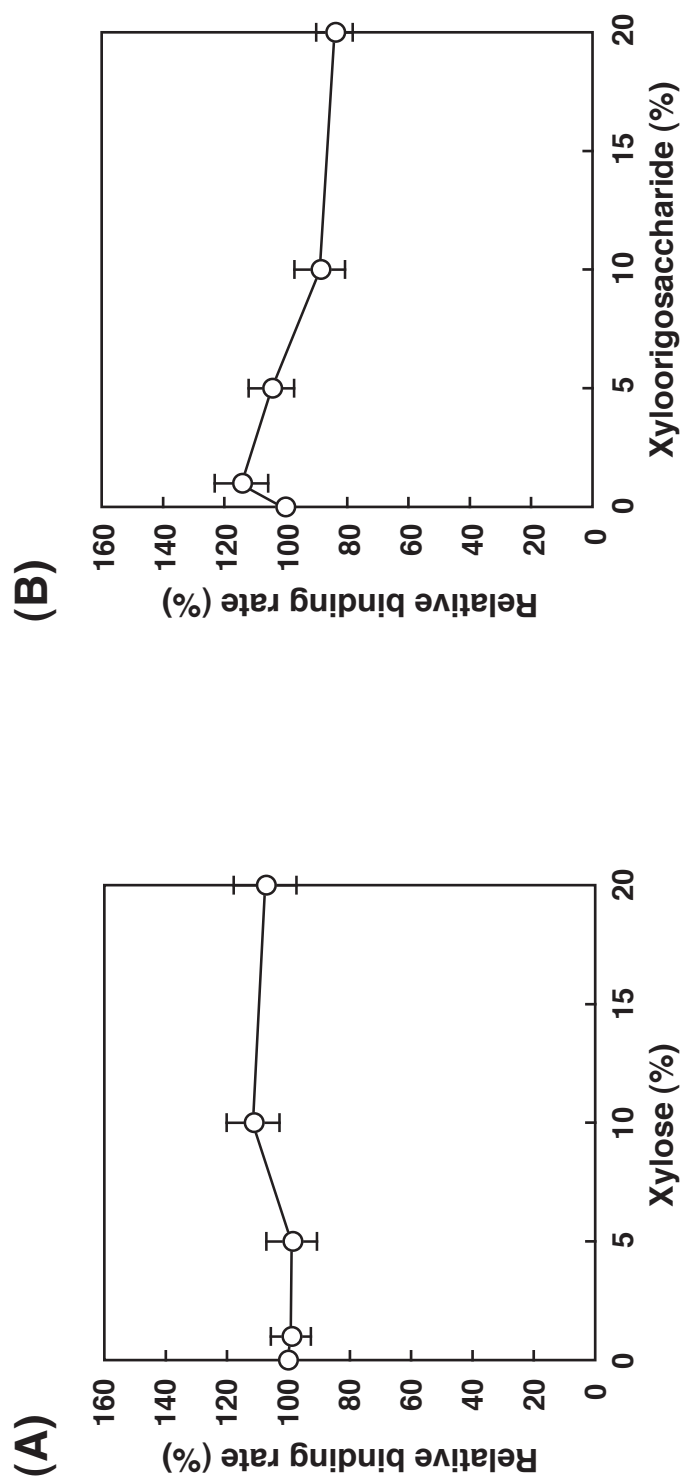


Fig. 4-10 GST-XBD_{bD327A} の不溶性 Oat spelt キシランとの結合におけるキシロース (A) およびキシロオリゴ糖 (B) 添加効果

終濃度 0.2 μ M の GST-XBD_{bD327A} を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は 0-20 % キシロースおよびキシロオリゴ糖を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、室温で 3 時間行った。縦軸はキシロースおよびキシロオリゴ糖非添加の場合の結合率を 100% とする相対値で表した。

不溶性 Oat spelt キシランとの結合における NaCl 添加効果

GST-XBDb_{D327A} を用いて、不溶性 Oat spelt キシランとの結合における NaCl 添加効果を調べた。なお、結合率は NaCl 非添加の場合を 100% とした相対値で表した。その結果、NaCl 濃度が高まるにつれて不溶性 Oat spelt キシランへの結合率が向上することがわかった (Fig. 4-11)。NaCl の添加により、キシランと XBDb 間の何らかの疎水性相互作用が強まったためと考えられた。

不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性

GST-XBDb_{D327A} を用いて、不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性を調べた。その結果、pH が高まるにつれて結合率が徐々に低下することがわかった (Fig. 4-12)。理論計算上の GST-XBDb_{D327A} の pI は 5.84 であり、pH が高まるにつれてタンパク質全体として負電荷を帯びることになる。また、キシランは本来中性糖であるが、Oat spelt キシランの主鎖の一部はメチルグルクロン酸残基により修飾を受け、負電荷を帯びていることが考えられる。そのため、XBDb とキシラン側鎖の負電荷同士の反発が高まり、結合率の低下につながった可能性が推察されよう。

また、上述の推察とは相反するが、XBDb 表面の局所の正電荷とキシラン側鎖の負電荷間のイオン結合により結合がおこっている可能性もある。pH が高まるにつれて静電的相互作用が弱まり、結合率の低下につながった可能性も考えられよう。XBDb には XBDj よりも Arg が 3 残基多く存在しており、XBDj においては XBDb にみられる第 3 の結合様式はみられないことからこの推察が支持されるが、正否は不明である。

結局、XBDb がもつ Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用による結合以外の「第 3 のキシラン結合様式」に関する詳細は依然として不明なまま残されている。今後、キシラン結合におけるグルクロン酸の添加効果を調べたり、より広い pH 域でキシラン結合の pH 依存性を調べたりすることに

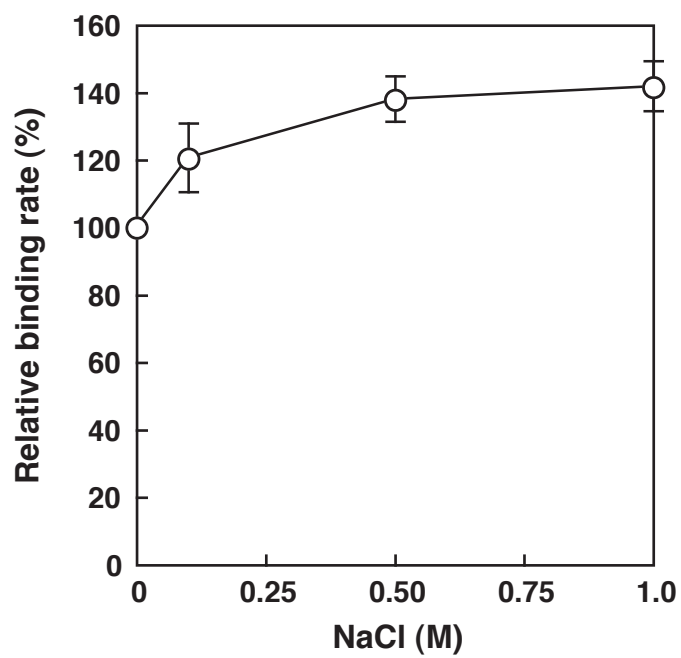


Fig. 4-11 GST-XBDb_{D327A} の不溶性 Oat spelt キシランとの結合における NaCl 添加効果

終濃度 0.2 μ M の GST-XBDb_{D327A} を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は 0-1.0 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、室温で 3 時間行った。縦軸は NaCl 非添加の場合の結合率を 100% とする相対値で表した。

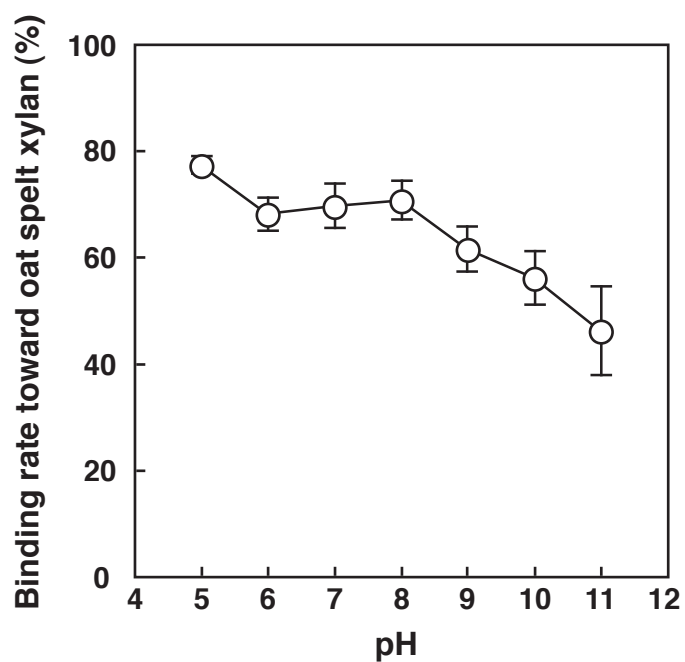


Fig. 4-12 GST-XBDb_{D327A} の不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性

終濃度 0.2 μ M の GST-XBDb_{D327A} を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は 80 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 5.0 - 11.0) 中、室温で 3 時間行った。

より、新たな情報が得られることに期待したい。

4-3-8 各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Larchwood キシランに対する結合率

Oat spelt キシランとは側鎖修飾が異なる多糖である Larchwood キシランを用いて、各種変異型 GST-XBDb の不溶性キシラン結合能を評価することとした。

Ca²⁺ への配位結合に関与する残基を Ala に置換した各種変異型 GST-XBDb の結合率

Ca²⁺ への配位結合に関与する 4 つの残基のうち、キシラン結合にとりわけ重要であると考えられる Asp322 および Asp327 のいずれか、または両方を Ala に置換した。野生型および各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Larchwood キシランに対する結合率を測定した結果、すべての変異型 GST-XBDb の結合率は野生型に比べて大きく低下することがわかった (Fig. 4-13)。これより、これらの残基が実際にキシラン結合に関与していることが確かめられた。また、試料液に Ca²⁺ を十分量添加した場合においても GST-XBDb_{D327A} や GST-XBDb_{D322A/D327A} の結合率はほとんど向上せず、これらの残基、とりわけ Asp327 が不溶性 Larchwood キシランへの結合に重要であることが明らかとなった。一方で、Ca²⁺ の添加により GST-XBDb_{D322A} の結合率がやや向上する理由は不明である。

キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基を Ala に置換した各種変異型 GST-XBDb の結合率

キシロース環との疎水性相互作用に関与する Tyr231 および Tyr245 のいずれか、または両方を Ala に置換した。野生型および各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Larchwood キシランに対する結合率を測定した結果、いずれの変異型

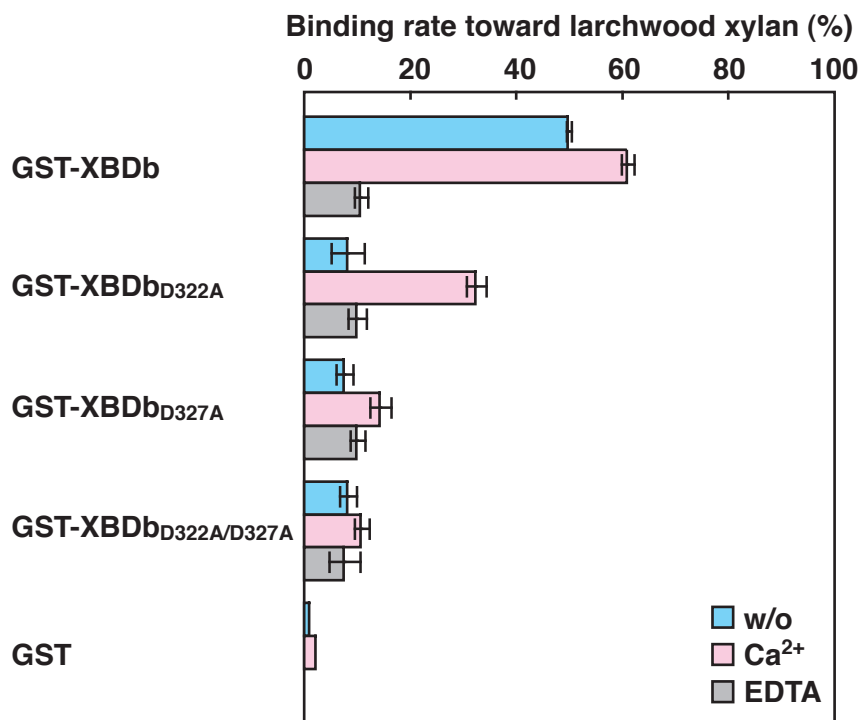


Fig. 4-13 Ca^{2+} への配位結合に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Larchwood キシランに対する結合率

終濃度 $0.2 \mu\text{M}$ の野生型および各種変異型 GST-XBDb を用いて、不溶性 Larchwood キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で 3 時間行った。

w/o : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)

Ca^{2+} : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM CaCl_2

EDTA : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM EDTA

GST-XBDb の結合率も野生型に比べて大きく低下していた (Fig. 4-14)。試料液に Ca^{2+} を十分量添加した状態で結合率を測定したところ、GST-XBDb_{Y245A} の結合率は Ca^{2+} 非添加時に比べて大きく回復し、野生型と同レベルの値を示した。一方、GST-XBDb_{Y231A} および GST-XBDb_{Y231A/Y245A} の結合率は Ca^{2+} 非添加時に比べて回復するものの、野生型のレベルには及ばなかった。この低下分は、 Ca^{2+} を介した不溶性 Larchwood キシランとの結合が存在する条件における、キシロース環との疎水性相互作用の寄与分と考えられる。これより、 Ca^{2+} との配位結合を介したキシラン結合が存在する条件においては、 Ca^{2+} を介した結合に比べて寄与は小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も XBDb の不溶性 Larchwood キシラン結合に関与していること、そして特に Tyr231 が重要であることが示唆された。

ここで再び Ca^{2+} 非添加時の結合率に注目する。 Ca^{2+} 非添加時の変異型 GST-XBDb の結合率は、野生型に比べて低下していた。さらに、試料液に EDTA を十分量添加した状態で結合率を測定したところ、変異型 GST-XBDb の結合率は EDTA 添加の有無でほとんど変化しなかった。これより、変異型 GST-XBDb 分子中の Ca^{2+} は EDTA 非添加時においてもほぼ完全に脱落していたことがわかった。この結果は、不溶性 Oat spelt キシランを用いた実験結果と同一であり (本章 4-3-6 項参照)、Tyr231 および Tyr245 がキシロース環との疎水性相互作用だけでなく Ca^{2+} の取り込み・保持に関与することがあらためて確認された。

さて、EDTA 添加時の変異型 GST-XBDb の結合率は野生型に比べてわずかに低下していた。この低下分は、 Ca^{2+} を介した不溶性 Larchwood キシランとの結合が存在しない条件における、キシロース環との疎水性相互作用の寄与分と考えられる。

さらに、各種変異型 GST-XBDb は EDTA 添加時においても不溶性 Larchwood キシランにわずかに結合率を示した。これは XBDb の Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用以外の第 3 のキシラン結合様式に

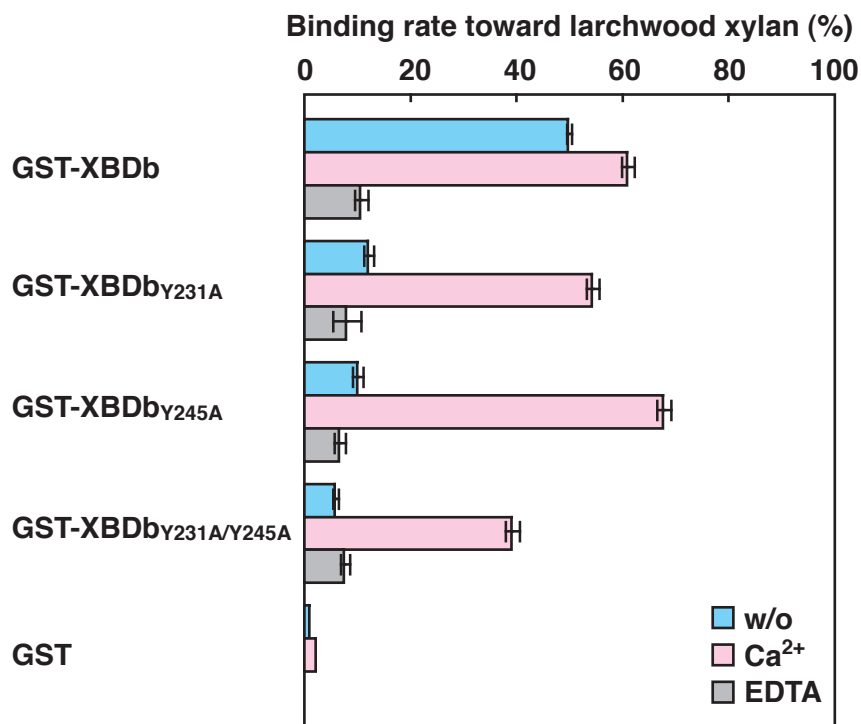


Fig. 4-14 キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基にアミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Larchwood キシランに対する結合率

終濃度 0.2 μ M の野生型および各種変異型 GST-XBDb を用いて、不溶性 Larchwood キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で 3 時間行った。

w/o : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)

Ca²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM CaCl₂

EDTA : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、10 mM EDTA

よる結合であると考えられる。不溶性 Oat spelt キシランとの結合においては、EDTA 添加時の変異型 GST-XBD_b の結合率はある程度高く保持されていたのに対し (本章 4-3-6 項参照)、不溶性 Larchwood キシランとの結合においては、変異型 GST-XBD_b の結合率は大きく低下した。これより、XBD_b の第 3 のキシラン結合様式は、Oat spelt キシランに特異性が高いことが示唆された。

4-4 結論

XBDj は Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用によりキシランと結合する。XBDj および XynB の機能未知ドメイン XBDb のアミノ酸配列は互いに約 53% の相同性を有しており、XBDj のキシラン結合に関与するアミノ酸残基はすべて XBDb においても保存されていることから、XBDb もキシランへの結合能を有していること、さらには XBDj と同様のキシラン結合様式をとることが予想された。そこで、GST と XBDb との融合タンパク質 (GST-XBDb) を調製し、各種不溶性多糖に対する結合率を測定した。GST-XBDb は各種不溶性キシランに対して高い結合率を示し、XynB の機能未知ドメイン XBDb はキシラン結合ドメインとしての機能を有することが実験的に明らかとなった。

XBDj との比較からキシラン結合に関与すると考えられる残基に部位特異的アミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDb を調製し、それらの不溶性 Oat spelt キシラン結合能を評価した。 Ca^{2+} への配位結合に関与する 4 つの残基のうち、キシラン結合にとりわけ重要であると考えられる Asp322 および Asp327 のいずれか、または両方を Ala に置換した各種変異型 GST-XBDb を調製し、不溶性 Oat spelt キシラン結合能を評価した。各種変異型 GST-XBDb の結合能が野生型に比べて低下したことより、これらの残基が不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していることが明らかとなった。一方で、これらの変異型 GST-XBDb は一定レベルの結合率をなお保持しており、GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシラン結合とは異なる挙動を示した。次に、キシロース環との疎水性相互作用に関与する Tyr231 および Tyr245 のいずれか、または両方を Ala に置換した各種変異型 GST-XBDb を調製し、不溶性 Oat spelt キシラン結合能を評価した。 Ca^{2+} との配位結合を介したキシラン結合が存在する条件においては、キシロース環との疎水性相互作用は XBDb の不溶性 Oat spelt キシラン結

合にほとんど寄与しないことがわかった。一方、 Ca^{2+} を介したキシラン結合が存在しない条件においては、寄与は非常に小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も XBDb の不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していると推察された。また、XBDb と同様、XBDb においても Tyr231 および Tyr245 が Ca^{2+} の取り込み・保持に関与することが示唆された。さらに、XBDb には Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用に加えて、それ以外の第 3 のキシラン結合様式も存在することが示唆された。

Oat spelt キシランとは側鎖修飾が異なる多糖である Larchwood キシランを用いて、各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Larchwood キシラン結合能を評価した。 Ca^{2+} への配位結合に関与する Asp322 および Asp327 のいずれか、または両方を Ala に置換した各種変異型 GST-XBDb の結合能が野生型に比べて大きく低下したことより、これらの残基が不溶性 Larchwood キシラン結合に関与していること、そしてとりわけ Asp327 が重要であることが明らかとなった。次に、キシロース環との疎水性相互作用に関与する Tyr231 および Tyr245 のいずれか、または両方を Ala に置換した各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Larchwood キシラン結合能を評価した。 Ca^{2+} との配位結合を介したキシラン結合が存在する条件においては、寄与は小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も XBDb の不溶性 Larchwood キシラン結合に関与していること、そして特に Tyr231 が重要であることが示唆された。また、 Ca^{2+} を介したキシラン結合が存在しない条件においても、キシロース環との疎水性相互作用が XBDb の不溶性 Larchwood キシラン結合に関与していると推察された。さらに、XBDb の Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用以外の第 3 のキシラン結合様式は不溶性 Larchwood キシランに対してはほとんど確認されず、第 3 のキシラン結合様式は Oat spelt キシランに特異性が高いことが示唆された。

4-5 引用文献

- [1] 諸熊千尋, 修士論文, 東京工業大学 (2002).
- [2] D. D. Moriiis, M. D. Gibbs, C. W. J. Chin, M. H. Koh, K. K. Y. Wong, R. W. Allson, P. J. Nelson and P. L. Bergquist, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1759-1765 (1998).
- [3] T. Kubo, R. Nakai, H. Tamanoi, K. Wakabayashi and S. Nakamura, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **35**, 221-222 (1996).
- [4] Ihsanawati ほか, 未発表データ.
- [5] 久保貴文, 修士論文, 東京工業大学 (1997).
- [6] S. Jamal-Talabani, A. B. Boraston, J. P. Turkenburg, N. Tarbouriech, V. M. Ducros and G. J. Davies, *Structure*, **12**, 1177-1187 (2004).
- [7] 山本まみ, 博士論文, 東京工業大学 (2001).
- [8] H. T. S. Britton and R. A. Robinson. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J. Chem. Soc.*, **1931**, 1456-1462 (1931).

第 5 章

種々の 2 価金属イオン存在下における
XynJ および XynB 由来 XBD の
不溶性多糖結合能の評価

5-1 緒言

好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. 41M-1 株が生産するキシラナーゼ J (XynJ) には、糖質結合モジュール (CBM) ファミリー 36 に属するキシラン結合ドメイン (XBD) が存在する [1]。XynJ の立体構造が明らかにされ [2、PDB ID: 2DCJ および 2DCK]、その XBD 領域 (XBDj) の構造に基づき、XBDj とキシロトリオースとの複合体立体構造モデルを構築した。本モデルにおいては、キシロースの 2 つの O 原子が XBDj に含まれる Ca^{2+} に配位結合しており、その Ca^{2+} には 4 つのアミノ酸残基の O 原子が配位結合していると考えられた。また、上述の Ca^{2+} を介した結合以外に、2 つのアミノ酸残基がキシロース環を挟むように疎水性相互作用していることも予想された。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と XBDj との融合タンパク質 (GST-XBDj) [3] を用いて部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析を行った結果、 Ca^{2+} へ配位結合する 4 つの残基が不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していること、そして Asp313 および Asp318 がとりわけ重要であることが明らかとなった。また、それに比べて寄与は小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も XBDj の不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与している可能性が示唆された (本論文第 2 章参照)。

一方、高度好熱性細菌 *Dictyoglomus thermophilum* が生産するキシラナーゼ B (XynB) [4] にも、CBM ファミリー 36 に属するキシラン結合ドメイン (XBDb) が存在する。XBDj および XBDb のアミノ酸配列は互いに約 53% の相同性を有しており、XBDj のキシラン結合に関与するアミノ酸残基はすべて XBDb においても保存されていることから、XBDb も XBDj と同様のキシラン結合様式をとることが予想された。GST と XBDb との融合タンパク質 (GST-XBDb) を用いて部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析を行った結果、XBDj においてキシラン結合に関与する残基は XBDb においても機能

していることが明らかとなった。しかしながら、不溶性 Oat spelt キシランとの結合においては、XBDb には Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用以外の第 3 のキシラン結合様式も存在することが示唆された (本論文第 4 章参照)。

さて、レクチンは糖を特異的に認識し結合するタンパク質である。動物から植物、微生物に至るまで広く存在し、さまざまな種類のものが単離されている。マメ科レクチンは分子量約 3 万のサブユニットが 2 量体または 4 量体を形成しており、サブユニットあたり 1 つの糖結合部位が存在する。その近傍には Ca^{2+} および Mn^{2+} が配位しており、これらの金属イオンは糖と直接には結合しないが、糖との結合に関与するアミノ酸残基を正しい立体配置に保つ役割を果たす。このうち、 Mn^{2+} は他の遷移金属である Zn^{2+} 、 Ni^{2+} および Co^{2+} と置換可能であることが報告されている [5]。

そこで本章では、XBDj や XBDb に含まれる Ca^{2+} の他の金属イオンへの置換の可否を調べるために、種々の 2 価金属イオン存在下における GST-XBDj および GST-XBDb の各種不溶性多糖に対する結合能を評価することとした。

5-2 実験材料と方法

5-2-1 菌株、プラスミドおよび培地

野生型および各種変異型 GST-XBDj の発現には、発現型プラスミド pGEX-XBDj [3]、および pGEX-XBDj_{D313A} ならびに pGEX-XBDj_{D318A} を用いた。また、野生型および各種変異型 GST-XBDb の発現には、発現型プラスミド pGEX-XBDb、および pGEX-XBDb_{D322A}、pGEX-XBDb_{D327A} ならびに pGEX-XBDb_{D322A/D327A} を用いた。さらに発現ベクター pGEX-3X も用いた。その他は、本論文第 2 章 2-2-1 項に準じた。

5-2-2 タンパク質の定量法

本論文第 2 章 2-2-7 項に準じた。

5-2-3 GST-XBDj および GST-XBDb の調製

本論文第 2 章 2-2-8 項に準じた。

5-2-4 GST 活性の測定

本論文第 2 章 2-2-9 項に準じた。

5-2-5 不溶性キシランの調製

本論文第 4 章 4-2-11 項に準じた。

5-2-6 各種不溶性多糖に対する結合率の測定

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に 2.0 mg/ml のウシ血清アルブミン (BSA) を溶解し、BSA 溶液とした。この BSA 溶液に 2.0 mg/ml の各種不溶性多糖を加え、超音波処理を施すことにより粒子を均一化したものを不溶性多糖懸濁液とした。不溶性多糖としては、不溶性 Oat spelt キシラン、不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロース (SIGMACELL Type 101、Sigma) を使用した。また、タンパク質分子中に含まれる Ca^{2+} を除去するため、4.0 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、0.8 μM の GST-XBDj および GST-XBDb を室温で約 30 分間インキュベートした。これらの溶液・懸濁液を用い、1.5 ml 容マイクロチューブ内で終濃度 0.2 μM の GST-XBDj および GST-XBDb、1.0 mg/ml の BSA、1.0 mg/ml の不溶性多糖、および各種緩衝液 (後述) からなる試料液 400 μl を調製した。同時に同じ組成で不溶性多糖を含まないコントロール液も調製した。試料液等は、室温で 3 時間、小型巡回ミキサー (愛くる、イワキ) を用いて穏やかに攪拌した。遠心 (室温、7,000 x g、5 分間) により試料液中の不溶性 Oat spelt キシランを沈殿・除去した後、上清の GST 活性を測定した。GST 活性を指標にして、本論文第 2 章 2-2-10 項と同様の方法により、各種 GST-XBDb の不溶性多糖に対する結合率を算出した。

なお、結合は以下の緩衝液中で行った。ここで 1.0 mM EDTA は Ca^{2+} を除去するために用いた緩衝液に由来するものである。

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CaCl_2

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MgCl_2

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MnCl_2

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CoCl_2

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM NiCl_2

5-3 結果および考察

XBDj および XBDb は Ca^{2+} への配位結合を介して多糖に結合する。 Ca^{2+} 以外の 2 価金属イオンで Ca^{2+} を置換可能であるかを調べるため、種々の 2 価金属イオン (Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} および Ni^{2+}) 存在下における野生型 GST-XBDj および GST-XBDb の各種不溶性多糖に対する結合率を測定した。その際、 Ca^{2+} への配位結合に関与するアミノ酸残基を Ala に置換した変異型 GST-XBDj および GST-XBDb についても、併せて結合率を測定することとした。

5-3-1 種々の 2 価金属イオン存在下における野生型および各種変異型 GST-XBDj の不溶性多糖に対する結合率

不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

野生型 GST-XBDj の結合率は EDTA 存在下においては低く、 Ca^{2+} の添加 (EDTA に対して十分過剰量、以下同様) により結合率は向上した (Fig. 5-1)。これより、XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合は、主に Ca^{2+} への配位を介したものであることがあらためて確認された (本論文第 2 章参照)。また、その他のすべての金属イオンの添加 (いずれも EDTA に対して十分過剰量、以下同様) により結合率の向上が認められ、これらの金属イオンが Ca^{2+} と置換可能であることがわかった。その際、 Mn^{2+} 添加による結合率向上効果は他の金属イオンに比べて低かった。

一方、各種変異型 GST-XBDj の結合率は低く、 Ca^{2+} を含めて大部分の金属イオンの添加により結合率の向上は観察されず、わずかに Ni^{2+} 添加の効果が認められたのみであった。

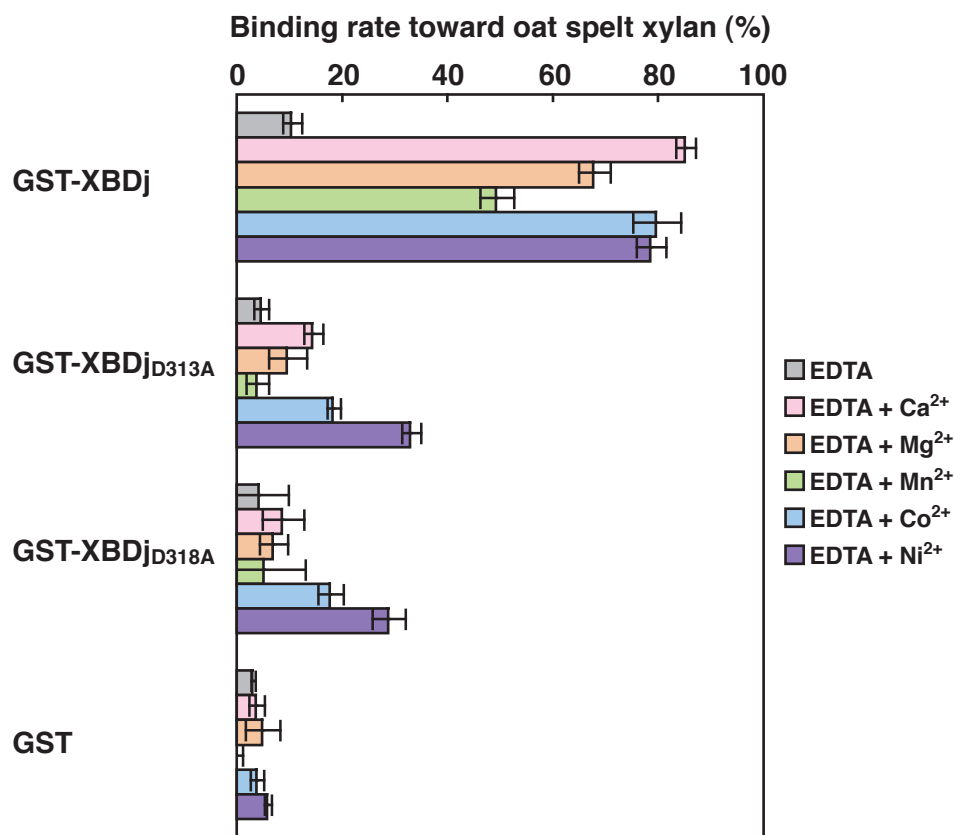


Fig. 5-1 種々の2価金属イオン存在下における野生型および各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

終濃度 0.2 μM の野生型および各種変異型 GST-XBDj を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で3時間行った。

- EDTA : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA
- EDTA + Ca²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CaCl₂
- EDTA + Mg²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MgCl₂
- EDTA + Mn²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MnCl₂
- EDTA + Co²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CoCl₂
- EDTA + Ni²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM NiCl₂

不溶性 Larchwood キシランに対する結合率

野生型 GST-XBDj は Ca^{2+} の添加により不溶性 Larchwood キシランに結合能を示した (Fig. 5-2)。これより、XBDj は不溶性 Oat spelt キシランの場合と同様、 Ca^{2+} への配位を介して不溶性 Larchwood キシランに結合することが明らかとなった。しかしながら、その結合率は不溶性 Oat spelt キシランに対する値よりも低いものであった。この傾向は、GST-XBDb の場合と同様であった (本論文第 4 章 4-3-5 項参照)。また、 Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加により結合率は向上しなかったのに対し、 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加では Ca^{2+} 以上の結合率向上効果が認められ、 Co^{2+} および Ni^{2+} が Ca^{2+} と置換可能であることがわかった。

一方、各種変異型 GST-XBDj の結合率は低く、 Ca^{2+} を含めすべての金属イオンの添加により結合率の向上は観察されなかった。

非晶性セルロースに対する結合率

野生型 GST-XBDj は Ca^{2+} の添加により非晶性セルロースに結合能を示した (Fig. 5-3)。これより、XBDj は不溶性 Oat spelt キシランおよび不溶性 Larchwood キシランの場合と同様、 Ca^{2+} への配位を介して非晶性セルロースに結合することが明らかとなった。しかしながら、結合率は不溶性 Larchwood キシランに対する値よりもさらに低いものであった。この傾向は、GST-XBDb の場合と同様であった (本論文第 4 章 4-3-5 項参照)。また、不溶性 Larchwood キシランの場合と同様、 Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加により結合率は向上しないのに対し、 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加では Ca^{2+} 以上の結合率向上効果が認められ、 Co^{2+} および Ni^{2+} が Ca^{2+} と置換可能であることがわかった。

一方、各種変異型 GST-XBDj の結合率は低く、 Ca^{2+} を含めすべての金属イオンの添加により結合率の向上は観察されなかった。

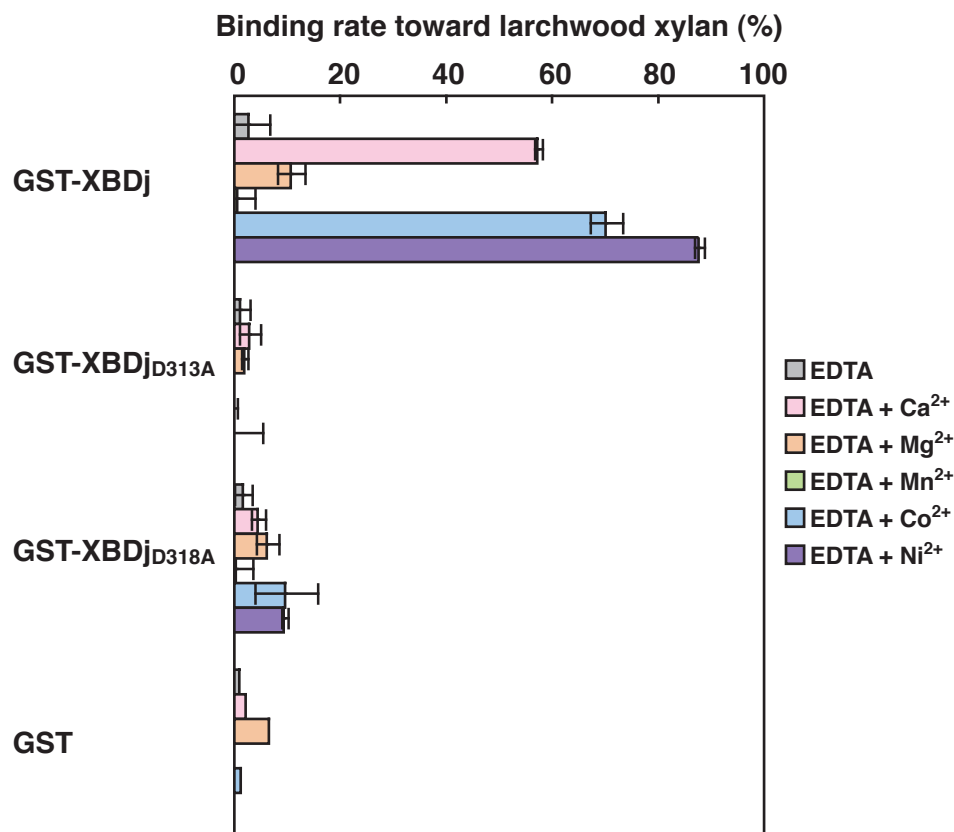


Fig. 5-2 種々の 2 価金属イオン存在下における野生型および各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Larchwood キシランに対する結合率

終濃度 0.2 μM の野生型および各種変異型 GST-XBDj を用いて、不溶性 Larchwood キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で 3 時間行った。

- EDTA : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA
- EDTA + Ca²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CaCl₂
- EDTA + Mg²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MgCl₂
- EDTA + Mn²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MnCl₂
- EDTA + Co²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CoCl₂
- EDTA + Ni²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM NiCl₂

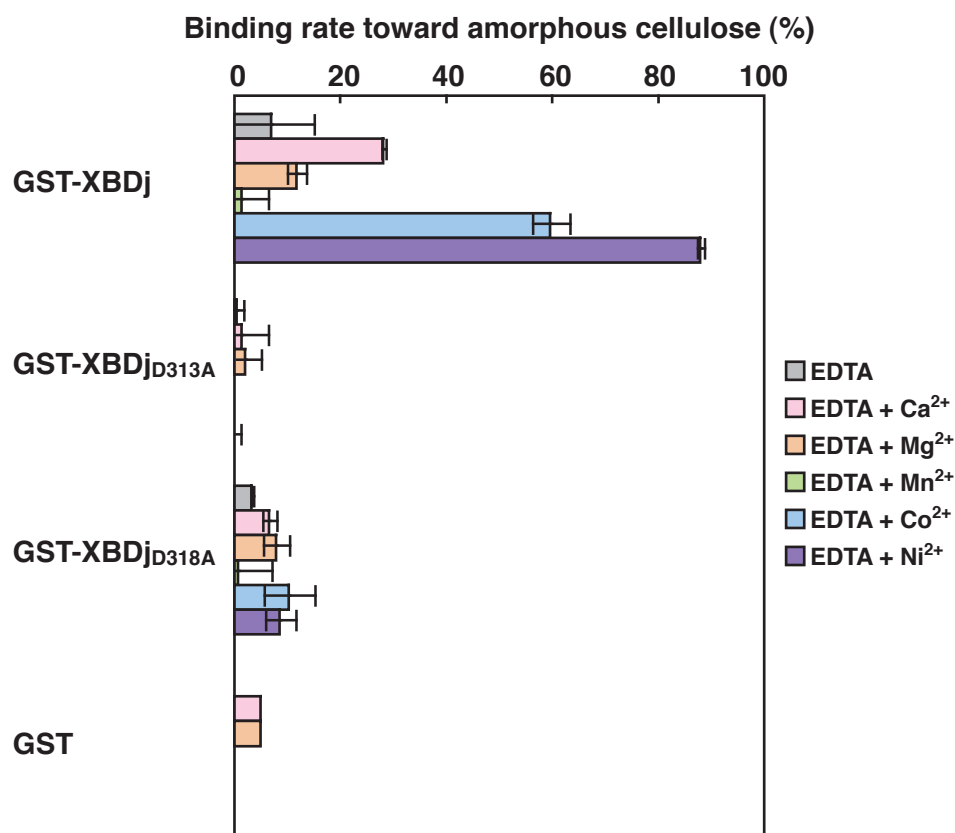


Fig. 5-3 種々の 2 価金属イオン存在下における野生型および各種変異型 GST-XBDj の非晶性セルロースに対する結合率

終濃度 0.2 μM の野生型および各種変異型 GST-XBDj を用いて、非晶性セルロース (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で 3 時間行った。

- EDTA : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA
- EDTA + Ca²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CaCl₂
- EDTA + Mg²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MgCl₂
- EDTA + Mn²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MnCl₂
- EDTA + Co²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CoCl₂
- EDTA + Ni²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM NiCl₂

各種金属イオンの添加効果に関する考察

はじめに、不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースへの結合における各種金属イオンの添加効果について考察する。種々の金属イオン添加時における野生型 GST-XBDj の結合に及ぼす効果が類似していたことから、不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースへの結合は、それぞれキシロースおよびグルコースの O2 位ならびに O3 位の O 原子への結合であると考えられる。野生型 GST-XBDj においては、 Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加による結合率の向上は観察されないのに対し、 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加では結合率の向上効果が認められた。一般に、 Mg^{2+} および Mn^{2+} は 6 配位をとる傾向が強いことが知られている [6]。そのため、 Mg^{2+} および Mn^{2+} は Ca^{2+} のような 7 配位 (本論文第 2 章 Fig. 2-1 参照) をとることができず、 Ca^{2+} と置換できなかったものと考えられた。一方、 Co^{2+} および Ni^{2+} は 4 配位または 6 配位をとり得る。 Co^{2+} および Ni^{2+} 添加時の結合率が Ca^{2+} 添加時よりも高い理由は不明であるが、これらの金属イオンが Ca^{2+} の場合とは異なる配位様式をとることで、多糖との結合が強まったのかもしれない。また、各種変異型 GST-XBDj においては Co^{2+} および Ni^{2+} の添加による結合率の向上は観察されなかったことから、これらの金属イオンへの配位結合には Asp313 および Asp318 の両方が重要であることが示唆された。

次に、不溶性 Oat spelt キシランへの結合における各種金属イオンの添加効果について考察する。種々の金属イオン添加時における野生型 GST-XBDj の結合に及ぼす効果は、不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースを用いた場合とは異なっていた。これらの多糖はすべて O2 位および O3 位の O 原子を有していることから、金属イオン添加効果の違いは多糖側鎖の修飾の違いに起因するものと考えられた。Oat spelt キシランにはクマル酸およびフェルラ酸といったフェノール酸が結合していることが知られている (本論文第 4 章 4-3-5 項および 第 1 章 Fig. 1-1 参照)。不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースへの結合においては Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加による結合

率の向上は観察されなかったのに対し、不溶性 Oat spelt キシランへの結合においては結合率の向上効果が認められた。以上のことより、 Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加が不溶性 Oat spelt キシランに対して示す結合率向上効果は、フェノール酸との結合に起因する効果であると推測された。また、各種変異型 GST-XBDj においては Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加による結合率の向上は観察されなかったことから、フェノール酸との結合にも Asp313 および Asp318 の両方が関与していることが示唆された。

5-3-2 種々の 2 価金属イオン存在下における野生型および各種変異型 GST-XBDb の不溶性多糖に対する結合率

不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

野生型 GST-XBDb は EDTA 存在下においても結合能を保持しており (Fig. 5-4)、これはキシロース環との疎水性相互作用および第 3 の結合様式による結合と考えられた (本論文第 4 章参照)。また、 Ca^{2+} を含めすべての金属イオンの添加により結合率の向上が認められ、これらの金属イオンが Ca^{2+} と置換可能であることがわかった。

各種変異型 GST-XBDb も EDTA 存在下において一定レベルの結合率を保持しており、これはキシロース環との疎水性相互作用および第 3 の結合様式による結合と考えられた (本論文第 4 章参照)。また、 Ca^{2+} を含めすべての金属イオンの添加により結合率の向上が認められた。

不溶性 Larchwood キシランに対する結合率

野生型 GST-XBDb は Ca^{2+} の添加により不溶性 Larchwood キシランに結合能を示した (Fig. 5-5)。しかしながら、その結合率は不溶性 Oat spelt キシランに対する値よりも低いものであり、本論文第 4 章 4-3-5 項の結果と矛盾しない。また、その他のすべての金属イオンの添加により結合率の向上が認めら

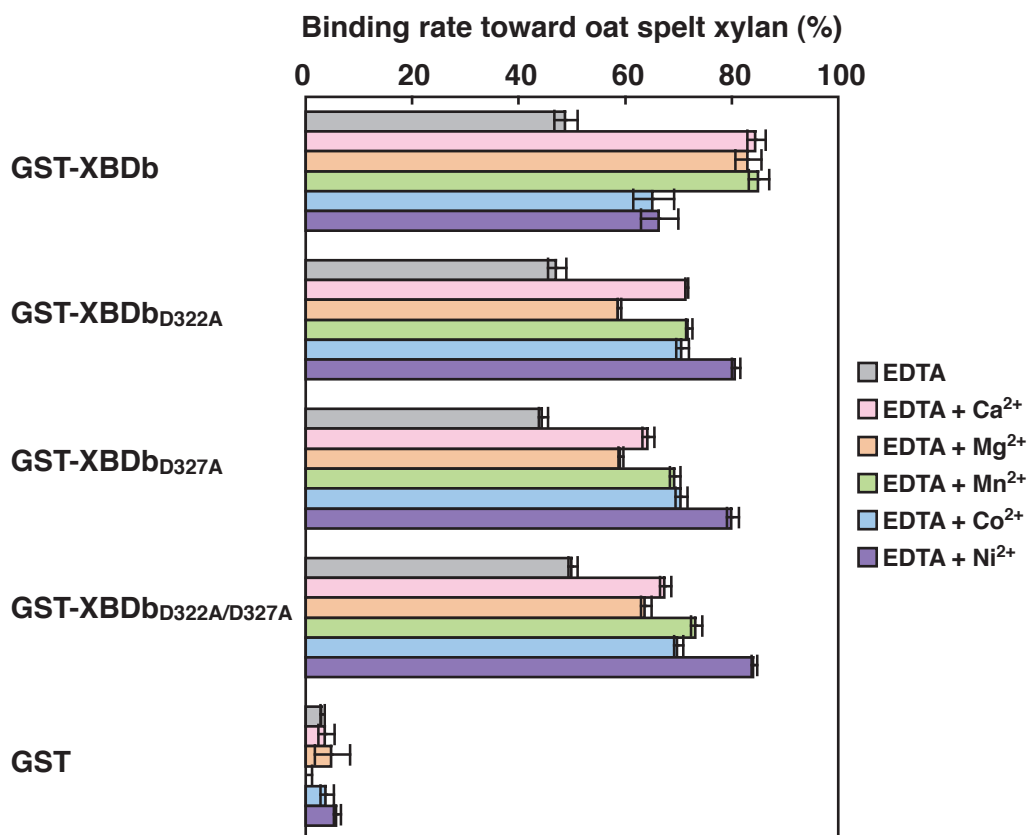


Fig. 5-4 種々の 2 価金属イオン存在下における野生型および各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

終濃度 0.2 μM の野生型および各種変異型 GST-XBDb を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で 3 時間行った。

- EDTA : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA
- EDTA + Ca²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CaCl₂
- EDTA + Mg²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MgCl₂
- EDTA + Mn²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MnCl₂
- EDTA + Co²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CoCl₂
- EDTA + Ni²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM NiCl₂

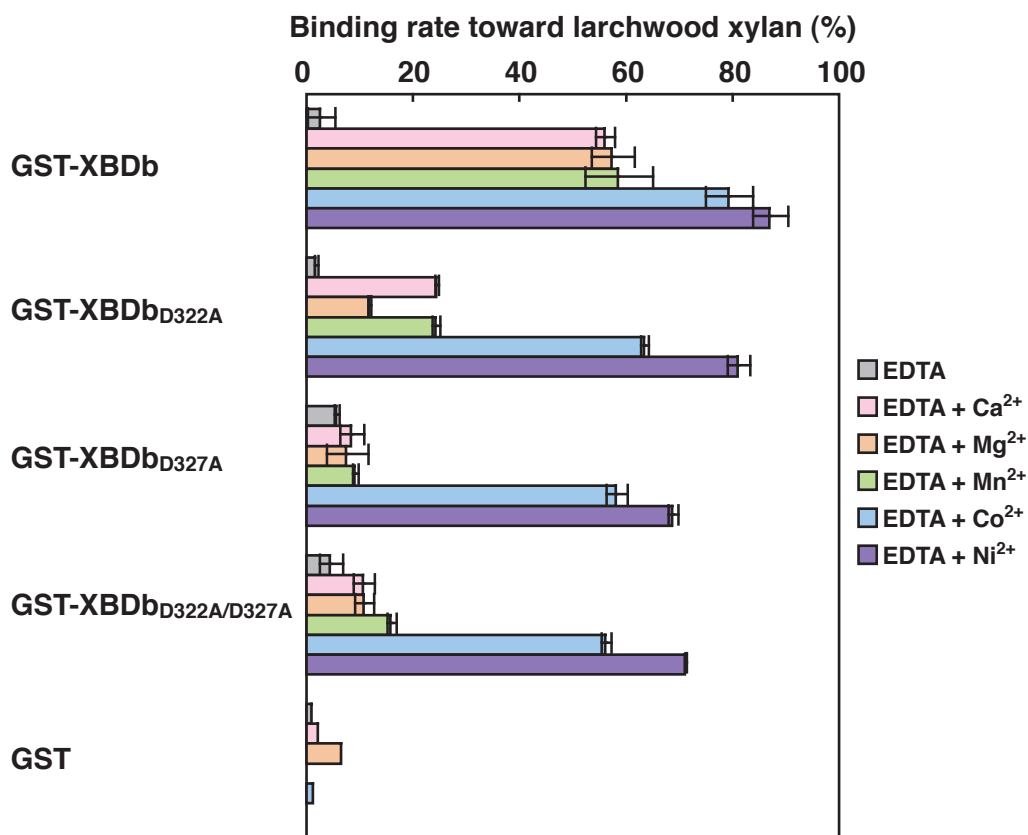


Fig. 5-5 種々の 2 価金属イオン存在下における野生型および各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Larchwood キシランに対する結合率

終濃度 0.2 μM の野生型および各種変異型 GST-XBDb を用いて、不溶性 Larchwood キシラン (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で 3 時間行った。

- EDTA : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA
- EDTA + Ca²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CaCl₂
- EDTA + Mg²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MgCl₂
- EDTA + Mn²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MnCl₂
- EDTA + Co²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CoCl₂
- EDTA + Ni²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM NiCl₂

れ、これらの金属イオンが Ca^{2+} と置換可能であることがわかった。

各種変異型 GST-XBDb は、 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加により結合率の向上が認められた。また、GST-XBDb_{D322A} に関しては、その他の金属イオンを添加した場合もわずかに結合率の向上が観察された。

非晶性セルロースに対する結合率

野生型 GST-XBDb は Ca^{2+} の添加により非晶性セルロースに結合能を示した (Fig. 5-6)。 Ca^{2+} 存在下において GST-XBDb が非晶性セルロースにもある程度の結合率を示すことはすでに明らかとなっていたが (本論文第 4 章 4-3-5 項)、新たに EDTA 存在下においては結合能を示さないことがわかった。これより、不溶性 Oat spelt キシランおよび不溶性 Larchwood キシランの場合と同様、XBDb は Ca^{2+} への配位を介して非晶性セルロースに結合することが明らかとなった。しかしながら、その結合率は不溶性 Larchwood キシランに対する値よりもさらに低いものであった。また、 Ca^{2+} 以外のすべての金属イオンの添加により結合率の向上が認められ、これらの金属イオンが Ca^{2+} と置換可能であることがわかった。

各種変異型 GST-XBDb は、 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加により結合率の向上が認められた。

各種金属イオンの添加効果に関する考察

GST-XBDj の場合に倣い、はじめに不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースへの結合における各種金属イオンの添加効果について考察する。種々の金属イオン添加時における野生型 GST-XBDb の結合に及ぼす効果が類似していたことから、野生型 GST-XBDj の場合と同様、不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースへの結合は、それぞれキシロースおよびグルコースの O2 位ならびに O3 位の O 原子への結合であると考えられる。野生型 GST-XBDb においてはすべての金属イオンの添加により結合率の向上が認め

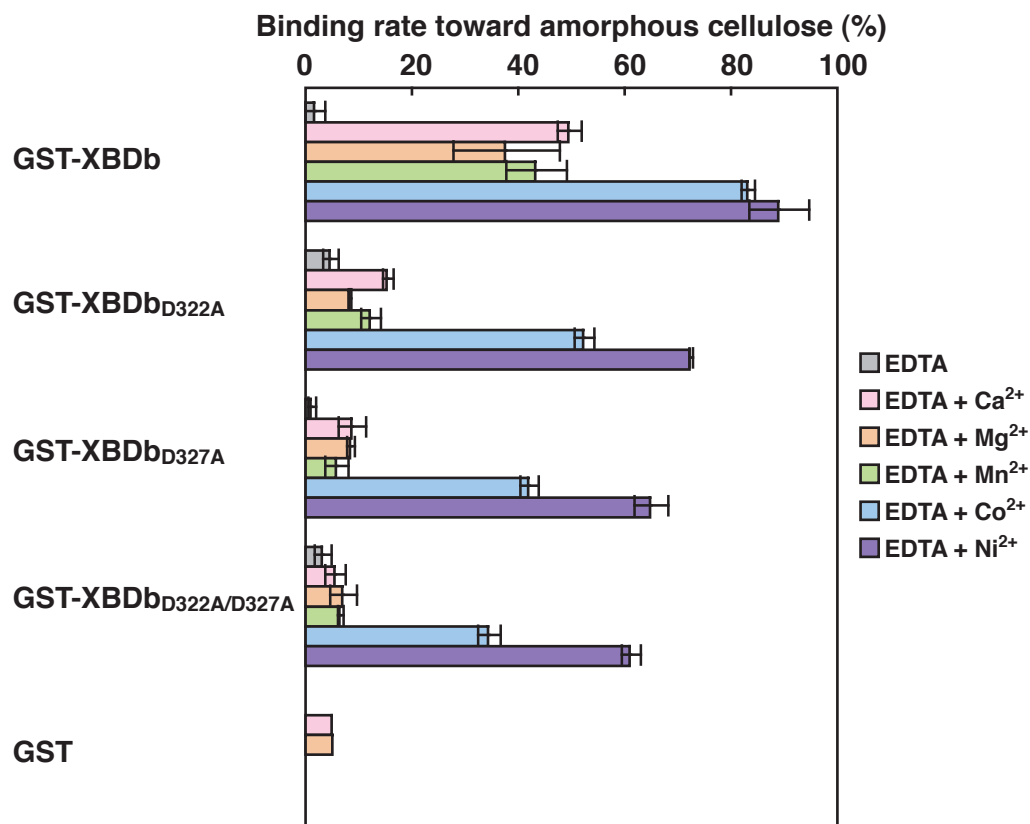


Fig. 5-6 種々の 2 価金属イオン存在下における野生型および各種変異型 GST-XBDb の非晶性セルロースに対する結合率

終濃度 0.2 μM の野生型および各種変異型 GST-XBDb を用いて、非晶性セルロース (1.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は以下の緩衝液中、室温で 3 時間行った。

- EDTA : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA
- EDTA + Ca²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CaCl₂
- EDTA + Mg²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MgCl₂
- EDTA + Mn²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM MnCl₂
- EDTA + Co²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM CoCl₂
- EDTA + Ni²⁺ : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1.0 mM EDTA、10 mM NiCl₂

(*PpCBM36*) は、単独 (キシロトリオース非存在下) の立体構造およびキシロトリオースとの複合体の立体構造が明らかにされている [7, PDB ID: 1W0N および 1UX7] (本論文第 2 章参照)。このうちキシロトリオース非存在下での構造については、キシランとの結合に関与する Ca^{2+} の位置に結晶化溶媒に由来する Mg^{2+} が取り込まれた結晶構造が解かれている (Fig. 5-7-A)。それによれば、*PpCBM36* の 2 つのアミノ酸残基の O 原子と 4 つの水分子が Mg^{2+} に配位することで 6 配位をとっているが、この状態ではキシロトリオースとは結合できない。*GST-XBDb* においては、 Mg^{2+} および Mn^{2+} がこのように 6 配位をとりながら、これらの多糖と結合しているのかもしれない。*XBDj* および *XBDb* の間で Mg^{2+} および Mn^{2+} の許容性に違いが生じていたが、 Ca^{2+} への配位結合に重要なアミノ酸残基が多数存在するループ中に両 *XBD* 間で 1 残基の違いが生じており (Fig. 5-7-B)、そのことが理由として考えられる。すなわち、*XBDj* の Asp314 の位置のアミノ酸残基が、*PpCBM36* においては同じく Asp であるのに対し、*XBDb* においては Asn に置きかわっている。

野生型 *GST-XBDj* および野生型 *GST-XBDb* の不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースへの結合の場合、 Ca^{2+} (*GST-XBDb* では Mg^{2+} および Mn^{2+} も) の添加による結合率の向上が認められた。これら金属イオンへの配位結合には、Asp313 および Asp318 (*GST-XBDj*) ならびに Asp322 および Asp327 (*GST-XBDb*) が重要であることがわかった。また、野生型 *GST-XBDj* および野生型 *GST-XBDb* の両方に Co^{2+} および Ni^{2+} 添加による結合率の向上が認められた。*GST-XBDj* においては Asp313 および Asp318 の両方が配位結合に重要であるのに対し、*GST-XBDb* においては Asp322 および Asp327 は配位結合に関与していないことが示唆され、*XBDj* と *XBDb* との間に違いがみられた。*XBDb* と Co^{2+} および Ni^{2+} との配位結合に関与する残基については不明である。

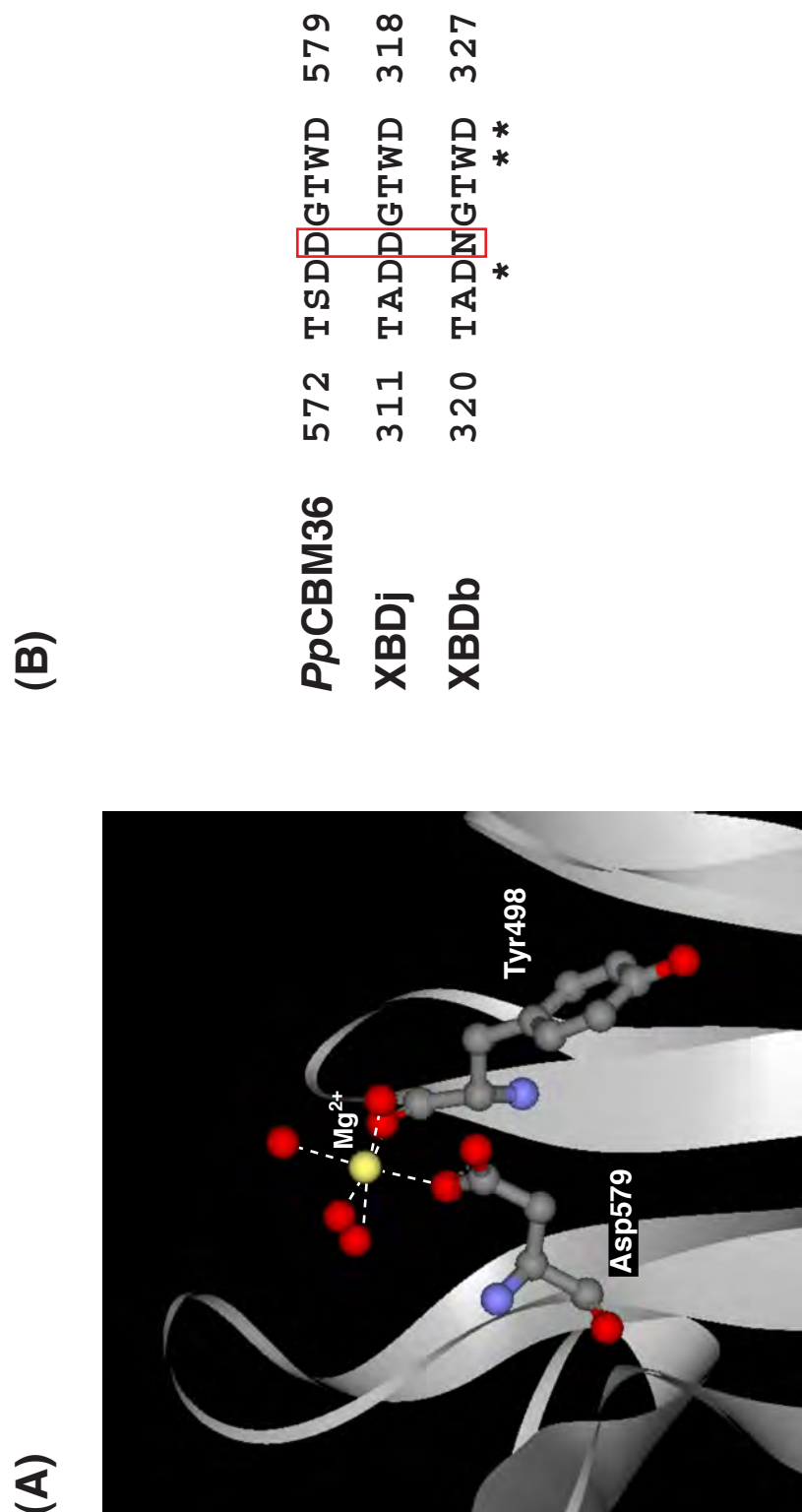


Fig. 5-7 *Paenibacillus polymyxa* 由来 *PpCBM36* の Ca^{2+} 結合部位近傍の立体構造 (A) および *PpCBM36*、*XBDj* ならびに *XBDb* の部分アミノ酸配列比較 (B)

(A) キシロトリオース非存在下においては、 Ca^{2+} のかわりに結晶化溶媒に由来する Mg^{2+} が取り込まれている。(B) Ca^{2+} 結合部位近傍に位置しているループ領域のアミノ酸配列を示す。数字は残基番号であり、アスタリスクは Ca^{2+} への配位結合に関与するアミノ酸残基を表わす。*XBDb* では 323 番目のアミノ酸が *PpCBM36* および *XBDj* とは異なり、対応する位置を赤字で示した。

られ、4 ～ 7 配位のさまざまな配位様式により多糖と結合し得ることが示唆された。その際、各種変異型 GST-XBDb においては Ca^{2+} 、 Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加による結合率の大きな向上は観察されなかったことから、これらの金属イオンへの配位結合には Asp322 および Asp327、とりわけ Asp327 が重要であることが示唆された。一方 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加では、いずれの変異型 GST-XBDb においても結合率の向上が認められた。これより、 Co^{2+} および Ni^{2+} への配位結合には Asp322 および Asp327 は直接は関与していないと考えられた。

次に、不溶性 Oat spelt キシランへの結合における各種金属イオンの添加効果について考察する。 Ca^{2+} の添加により野生型だけでなく各種変異型 GST-XBDb の結合率がやや向上することは既に述べた (本論文第 4 章 4-3-6 項参照)。その他の金属イオンの添加により、野生型および各種変異型 GST-XBDb の結合率向上が観察されたが、その理由は依然として不明である。このうち、 Co^{2+} および Ni^{2+} 添加時における、野生型および各種変異型 GST-XBDb の結合率向上は不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースへの結合の場合にもみられた現象であるが、その理由は不明である。

5-3-3 種々の 2 価金属イオン存在下における XBDj および XBDb の不溶性多糖結合能の比較と考察

不溶性 Larchwood キシランならびに非晶性セルロースへの結合の場合、野生型 GST-XBDj においては Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加による結合率の向上は観察されなかった。 Mg^{2+} および Mn^{2+} が Ca^{2+} のような 7 配位 (本論文第 2 章 Fig. 2-1 参照) をとることができず、 Ca^{2+} と置換できなかったものと考えられた。一方、野生型 GST-XBDb においては、 Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加により Ca^{2+} と同程度の結合率の向上が認められた。ここで、*Paenibacillus polymyxa* 由来キシラナーゼ 43A (Xyn43A) に存在する CBM ファミリー 36 XBD

不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースとの結合においては、GST-XBDj および GST-XBDb のどちらの場合においても、 Ca^{2+} を介した配位結合の寄与が大きかった。一方、不溶性 Oat spelt キシランとの結合においては、GST-XBDj の場合は Ca^{2+} を介した配位結合の寄与がメインであったのに対し、GST-XBDb ではそれ以外にキシロース環との疎水性相互作用および第 3 の結合様式の寄与も大きい (本論文第 4 章 4-3-6 項参照)。GST-XBDj および GST-XBDb の不溶性 Oat spelt キシランへの結合のうち、 Ca^{2+} を介した結合については、他の金属イオンが Ca^{2+} と置換可能であることが明らかとなった。

不溶性 Oat spelt キシランへの結合の場合、不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースの場合とは異なり、野生型 GST-XBDj においても Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加による結合率の向上が観察された。このような金属イオン添加効果の違いは用いた多糖における側鎖修飾の違いに起因するものと考えられる。すなわち、 Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加が不溶性 Oat spelt キシランに対して示す結合率向上効果は、フェノール酸との結合に起因する現象であると推測された。一方、野生型 GST-XBDb においても Mg^{2+} および Mn^{2+} の添加により Ca^{2+} と同程度の結合率の向上が認められたが、この結合率の向上にフェノール酸との結合が関与しているか否かは不明である。

野生型 GST-XBDj および野生型 GST-XBDb の不溶性 Oat spelt キシランへの結合率は、 Ca^{2+} 添加時の方が Ni^{2+} および Co^{2+} 添加時よりも高かった。一方、不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースへの結合率は、 Ca^{2+} 添加時よりも Ni^{2+} および Co^{2+} 添加時の方が高く、キシランの種類により異なる傾向を示した。金属錯体における中心金属と配位子との相性を計る尺度として、ハード-ソフト酸塩基の概念 (HSAB 則) が知られている [6]。中心金属は Lewis 酸であり、配位子は Lewis 塩基である。HSAB 則によれば、ハードな酸はハードな塩基と相互作用しやすく、ソフトな酸はソフトな塩基と相互作用しやすい。 Ca^{2+} はハードな酸であり、 Ni^{2+} および Co^{2+} はそれに比べてややソフトで中間的な酸である。一方、キシロース環 O2 位および O3 位の O 原

子に比べてフェノール酸はよりハードな塩基であることが予想される。不溶性 Oat spelt キシランにはハードな塩基であるフェノール酸が側鎖として含まれるため、ハードな酸である Ca^{2+} の添加時において結合率が高かったことが考えられよう。

野生型および各種変異型 GST-XBDj ならびに GST-XBDb に含まれる Ca^{2+} を他の 2 価金属イオンで置換することで、特定の不溶性多糖に対する結合率が向上することが明らかとなった。これより、金属イオンの交換による XBD の機能向上および機能改変への道が拓かれるものと期待されよう。

5-4 結論

XBDj および XBDb には、 Ca^{2+} への配位結合を介したキシラン結合様式が存在する (本論文第 2 章 および第 4 章参照)。そこで、両 XBD に含まれる Ca^{2+} の他の金属イオンへの置換の可否を調べるために、種々の 2 価金属イオン (Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} および Ni^{2+}) 存在下における GST-XBDj および GST-XBDb の各種不溶性多糖 (Oat spelt キシラン、Larchwood キシランおよび非晶性セルロース) に対する結合能を評価した。その際、 Ca^{2+} への配位結合に関与するアミノ酸残基を Ala に置換した変異型 GST-XBDj および GST-XBDb についても、併せて結合能を評価した。GST-XBDj と不溶性 Oat spelt キシランとの結合の場合、すべての金属イオンの添加により、非添加時に比べて結合率が向上し、これらの金属イオンが Ca^{2+} と置換可能であることがわかった。また、GST-XBDj と不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースとの結合の場合、 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加時のみに結合率の向上が認められ、 Co^{2+} および Ni^{2+} が Ca^{2+} と置換可能であることがわかった。また、 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加では、 Ca^{2+} 以上の結合率向上効果が認められた。一方、GST-XBDb の場合、いずれの不溶性多糖との結合においても各種金属イオン添加による結合率の向上効果が認められ、これらの金属イオンが Ca^{2+} と置換可能であること、そして GST-XBDj とは異なる挙動を示すことがわかった。GST-XBDb においても Co^{2+} および Ni^{2+} に Ca^{2+} 以上の結合率向上効果が認められたが、 Co^{2+} および Ni^{2+} への配位には Ca^{2+} への配位とは異なる残基が関与していることが示唆された。また、野生型および各種変異型 GST-XBDj ならびに GST-XBDb に含まれる Ca^{2+} を他の 2 価金属イオンで置換することで、特定の不溶性多糖に対する結合率が向上することが明らかとなった。

5-5 引用文献

- [1] T. Kubo, R. Nakai, H. Tamanoi, K. Wakabayashi and S. Nakamura, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **35**, 221-222 (1996).
- [2] Ihsanawati ほか, 未発表データ.
- [3] 久保貴文, 修士論文, 東京工業大学 (1997).
- [4] 諸熊千尋, 修士論文, 東京工業大学 (2002).
- [5] N. Sharon (山本一夫訳), レクチン: 歴史, 構造・機能から応用まで, 第二版, シュプリンガー・ジャパン (2006).
- [6] J. P. Glusker, A. K. Katz and C. W. Bock, *Rigaku J.*, **16**, No. 2 (1999).
- [7] S. Jamal-Talabani, A. B. Boraston, J. P. Turkenburg, N. Tarbouriech, V. M. Ducros and G. J. Davies, *Structure*, **12**, 1177-1187 (2004).

第 6 章

XynJ および XynB 由来 XBD の
極限環境適応能の比較

6-1 緒言

好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. 41M-1 株が生産するキシラナーゼ J (XynJ) には、糖質結合モジュール (CBM) ファミリー 36 に属するキシラン結合ドメイン (XBD) が存在する [1]。XynJ の立体構造 [2] に基づき、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と XBD 領域 (XBDj) との融合タンパク質 (GST-XBDj) [3] を用いて部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析を行った結果、不溶性 Oat spelt キシランとの相互作用に関与するアミノ酸残基が明らかとなった。また、XBDj は分子中の Ca^{2+} を介して不溶性 Oat spelt キシランと結合すること、そして、それに比べて寄与は小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も不溶性 Oat spelt キシランへの結合に関与している可能性が示唆された (本論文第 2 章参照)。

一方、高度好熱性細菌 *Dictyoglomus thermophilum* が生産するキシラナーゼ B (XynB) [4] にも、CBM ファミリー 36 に属するキシラン結合ドメイン (XBDb) が存在する。XBDj および XBDb のアミノ酸配列は互いに約 53% の相同性を有しており、XBDj のキシラン結合に関与するアミノ酸残基はすべて XBDb においても保存されていることから、XBDb も XBDj と同様のキシラン結合様式をとることが予想された。GST と XBDb との融合タンパク質 (GST-XBDb) を用いて部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析を行った結果、XBDj においてキシラン結合に関与する残基は XBDb においても機能していることが明らかとなった。しかしながら、不溶性 Oat spelt キシランとの結合においては、XBDb には Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用以外の第 3 のキシラン結合様式も存在することが示唆された (本論文第 4 章参照)。

互いに異なる反応至適 pH および反応至適温度を有するアルカリキシラナーゼの XynJ と耐熱性キシラナーゼの XynB が、同じ CBM ファミリー 36

に属する XBD をもつことは興味深い。XBDj および XBDb はそれぞれアルカリ性域および高温域での安定性を有することが期待されるが、極限環境耐性をもたない GST との融合タンパク質の形では両 XBD の極限環境適応能を調べることはできない。そこで本章では、XBDj および XBDb 単独での調製を行い、両 XBD の極限環境適応能を比較することとした。

6-2 実験材料と方法

6-2-1 菌株、プラスミドおよび培地

菌株

遺伝子組換え用宿主としては大腸菌 DH5 α 株を、そして遺伝子発現用宿主としては大腸菌 BL21(DE3) 株を使用した。各株の遺伝子型はそれぞれ本論文第 2 章 2-2-1 項および第 3 章 3-2-1 項に記載した。

プラスミド

pET-XynJ は成熟型 XynJ をコードする発現型プラスミドであり、発現ベクターとして pET-21b(+) (Novagen) が用いられている [5]。また、pGEM-DB は *D. thermophilum* ATCC35947 株由来 XynB の全領域をコードするプラスミドであり、ベクターとして pGEM-T Easy Vector (Promega) が用いられている [4]。XBDj (XynJ の Thr210 ~ Arg327 の領域) および XBDb (XynB の Thr218 ~ Gln336 の領域) をコードする遺伝子の発現には、発現ベクター pET-21b(+) を用いた。

培地

本論文第 2 章 2-2-1 項に準じた。

6-2-2 組換え DNA 技術

本論文第 2 章 2-2-3 項に準じた。

6-2-3 部位特異的変異導入法

本論文第 2 章 2-2-4 項に準じた。

6-2-4 塩基配列決定および遺伝情報解析

本論文第 2 章 2-2-5 項に準じた。

6-2-5 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

本論文第 2 章 2-2-6 項に準じた。

6-2-6 タンパク質の定量法

本論文第 2 章 2-2-7 項に準じた。

6-2-7 Xynj および XBDb の調製

大腸菌無細胞抽出液の調製

XBDj および XBDb をコードする発現型プラスミドを含む大腸菌 BL21(DE3) 株形質転換体を LB 培地に植菌し、37°C、160 rpm (パーソナル-11、タイテック) で一晩前培養した。前培養液を新たな LB 培地に終濃度 1% で植菌し、37°C、160 rpm で振とう培養した。XBDj をコードする発現型プラスミドを含む大腸菌は、そのまま 16 時間培養した。XBDb をコードする発現型プラスミドを含む大腸菌は、培養液の濁度 (OD_{660}) が 0.4 ~ 0.5 に達したところで、終濃度 0.1 mM の イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG、ナカライテスク) を添加し発現誘導を行い、さらに 37°C で 3 時間培養した。培養液を遠心分離 (4 °C、7,000 x g、10 分間) し、菌体を回収した。回収した菌体は 1/5 倍容の 40 mM イミダゾールおよび 500 mM NaCl を含む 20 mM

Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、Bioruptor UCD-200TM (コスモバイオ) を用いて超音波破碎を行った (氷冷下、15 秒間、60 回)。遠心分離 (4°C、12,000 x g、10 分間) により未破碎菌体を除き、得られた上清を無細胞抽出液とした。

XBDj および XBDb の精製

XBDj および XBDb は、Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) 充填カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。カラムを 3 倍容の 40 mM イミダゾールおよび 500 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した後、無細胞抽出液をアプライした。5 倍容の同緩衝液で洗浄後、10 倍容の 500 mM イミダゾールおよび 500 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を添加し、結合したタンパク質を溶出した。得られた溶出画分を 1.0 mM CaCl_2 を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に対して透析し、精製標品とした。

6-2-8 不溶性 Oat spelt キシランの調製

本論文第 2 章 2-2-9 項に準じた。

6-2-9 XBDj および XBDb の pH 安定性

種々の pH の 40 mM Britton-Robinson 緩衝液 [6] 中、0.6 mg/ml の XBDj および XBDb を 4°C で 16 時間インキュベートした。なお、タンパク質調製の際に用いた透析外液には CaCl_2 が添加してあるため、溶液中には透析外液由来の CaCl_2 が 0.6 mM の濃度で含まれている。一方、脱イオン水に 30 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシランを加え、超音波処理を施すことによりキシラン粒子を均一化したものを不溶性 Oat spelt キシラン懸濁液とした。インキュベート後のタンパク質溶液および不溶性 Oat spelt キシラン懸濁液を用い、1.5 ml

容マイクロチューブ内で終濃度 0.1 mg/ml の XBD、3.0 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシラン、および 80 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 7.0) からなる試料液 300 μ l を調製した。同時に同じ組成で不溶性 Oat spelt キシランを含まないコントロール液 300 μ l も調製した。なお、試料液等には透析外液由来の CaCl_2 が 0.1 mM の濃度で含まれている。試料液等は、室温で 1 時間、小型旋回ミキサーを用いて穏やかに攪拌した。遠心 (室温、7,000 x g、5 分間) により試料液中の不溶性 Oat spelt キシランを沈殿・除去した後、上清のタンパク質を定量した。コントロール液は全タンパク質濃度 (= 0.1 mg/ml) に、そして試料液は不溶性 Oat spelt キシランに未結合のタンパク質濃度に相当する。コントロール液のタンパク質濃度から試料液のタンパク質濃度を差し引き、それをコントロール液のタンパク質濃度で除することにより、XBDj および XBDb の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を算出した。

6-2-10 不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性

脱イオン水に 30 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシランを加え、超音波処理を施すことによりキシラン粒子を均一化したものを不溶性 Oat spelt キシラン懸濁液とした。この懸濁液を用い、1.5 ml 容マイクロチューブ内で終濃度 0.1 mg/ml の XBD、3.0 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシラン、および 80 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 5.0 ~ 11.0) からなる試料液 300 μ l を調製した。同時に同じ組成で不溶性 Oat spelt キシランを含まないコントロール液 300 μ l も調製した。なお、試料液等にはタンパク質調製の際に用いた透析外液由来の CaCl_2 が 0.1 mM の濃度で含まれている。試料液等は、室温で 1 時間、小型旋回ミキサーを用いて穏やかに攪拌した。遠心 (室温、7,000 x g、5 分間) により試料液中の不溶性 Oat spelt キシランを沈殿・除去した後、上清のタンパク質を定量した。タンパク質濃度を指標にして、XBDj および XBDb の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を算出した。

6-2-11 XBDj および XBDb の熱安定性

XBDj および XBDb の熱処理による変性

1.0 mM CaCl_2 を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、0.5 mg/ml の XBDj および XBDb を 50 ~ 98°C の水浴中で 30 分間加熱した。遠心 (4°C、20,400 x g、10 分間) により変性タンパク質を沈殿・除去した後、上清に含まれる可溶性状態のタンパク質を定量した。

また、この上清を以下のキシラン結合実験にも用いることとした。

熱処理後の XBDj および XBDb の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率

1.0 mM CaCl_2 を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に 3.75 mg/ml の不溶性 Oat spelt キシランを加え、超音波処理を施すことによりキシラン粒子を均一化したものを不溶性 Oat spelt キシラン懸濁液とした。XBDj および XBDb に熱処理を施した後の上清 60 μl を不溶性 Oat spelt キシラン懸濁液 240 μl に加えることで、試料液 300 μl を調製した。同時に熱処理後の上清 60 μl を 1.0 mM CaCl_2 を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 240 μl に加えることで、同じ組成で不溶性 Oat spelt キシランを含まないコントロール液 300 μl も調製した。試料液等は、室温で 1 時間、小型旋回ミキサーを用いて穏やかに攪拌した。遠心 (室温、7,000 x g、5 分間) により試料液中の不溶性 Oat spelt キシランを沈殿・除去した後、上清のタンパク質を定量した。コントロール液は熱処理後の上清に含まれるすべての可溶性状態のタンパク質濃度に、そして試料液は不溶性 Oat spelt キシランに未結合の可溶性状態のタンパク質濃度に相当する。コントロール液のタンパク質濃度から試料液のタンパク質濃度を差し引き、それをコントロール液のタンパク質濃度で除することにより、熱処理後の XBDj および XBDb の不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を算出した。

示差走査熱測定 (DSC)

DSC には超高感度断熱型示差走査型カロリメータ MCS DSC (MicroCal) を使用した。XBDj および XBDb の精製標品を 1.0 mM CaCl_2 を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に対して再透析 (4°C、16 時間、1 回) した後、0.5 mg/ml の濃度に調整し、DSC 用試料溶液とした。脱気後の透析外液をサンプルセルとリファレンスセルの両方に充填し、ブランク測定を行った。次に、脱気後の透析外液をリファレンスセルに、そして脱気後の試料溶液をサンプルセルに充填し、試料測定を行った。昇温速度は 1°C/min とし、測定範囲は 20°C から 90°C (XBDj) および 110°C (XBDb) とした。なお、本測定はいわき明星大学・関口武司研究室にて実施した。

6-3 結果および考察

6-3-1 XBDj および XBDb をコードする発現型プラスミドの構築

極限環境適応能を比較するにあたり、XBDj および XBDb 領域単独での調製を行うこととした。その際、精製を考慮し C 末端側に His-tag 配列 (His-His-His-His-His-His) を付加した。

XBDj をコードする発現型プラスミドの構築

成熟型 XynJ をコードする発現型プラスミド pET-XynJ から XBDj (XynJ の Thr210~Arg327) をコードする領域を PCR 増幅した。その際、XBDj の C 末端に His-tag 配列を付加するように設計したプライマーセットを使用した (Table 6-1)。PCR 産物を制限酵素 *Nde* I および *EcoR* I で消化し、得られた DNA 断片を発現ベクター pET-21b(+) の *Nde* I および *EcoR* I サイト間に連結することで、XBDj をコードする発現型プラスミド pET-XBDj を構築した (Fig. 6-1)。

XBDb をコードする発現型プラスミドの構築

XynB 全領域をコードするプラスミド pGEM-DB から XBDb (XynB の Thr218~Gln336) をコードする領域を PCR 増幅した。その際、XBDb の C 末端に His-tag 配列を付加するように設計したプライマーセットを使用した (Table 6-1)。PCR 産物を制限酵素 *Nde* I および *EcoR* I で消化し、得られた DNA 断片を発現ベクター pET-21b(+) の *Nde* I および *EcoR* I サイト間に連結することで、XBDb をコードする発現型プラスミド pET-XBDb を構築した (Fig. 6-2)。

Table 6-1 XBDj および XBDb をコードする発現型プラスミド構築用プライマーの塩基配列

Plasmid	Primer	Sequence
pET-XBDj	F-XynJXBD	5´-GTGGTGAGCA <u>tatg</u> ACTAGAGTAGAAGCAG-3´
	R-XynJXBD	5´-CTGTAGA <u>aat</u> TCTTTA <u>gtGgTggTggTggTg</u> CCTTATTTCTAGATAG-3´
pET-XBDb	F-XynBXBD	5´-GTGGTAGTACAc <u>at</u> AtgACTAGAAATAGAATGTG-3´
	R-XynBXBD	5´-CTAGG <u>aaATTCT</u> Ca <u>gtGgTggTggTggTg</u> CTGTATCAACAGATAATC-3´

導入した制限酵素サイトを下線で示し、His-tag 配列を赤字で示した。

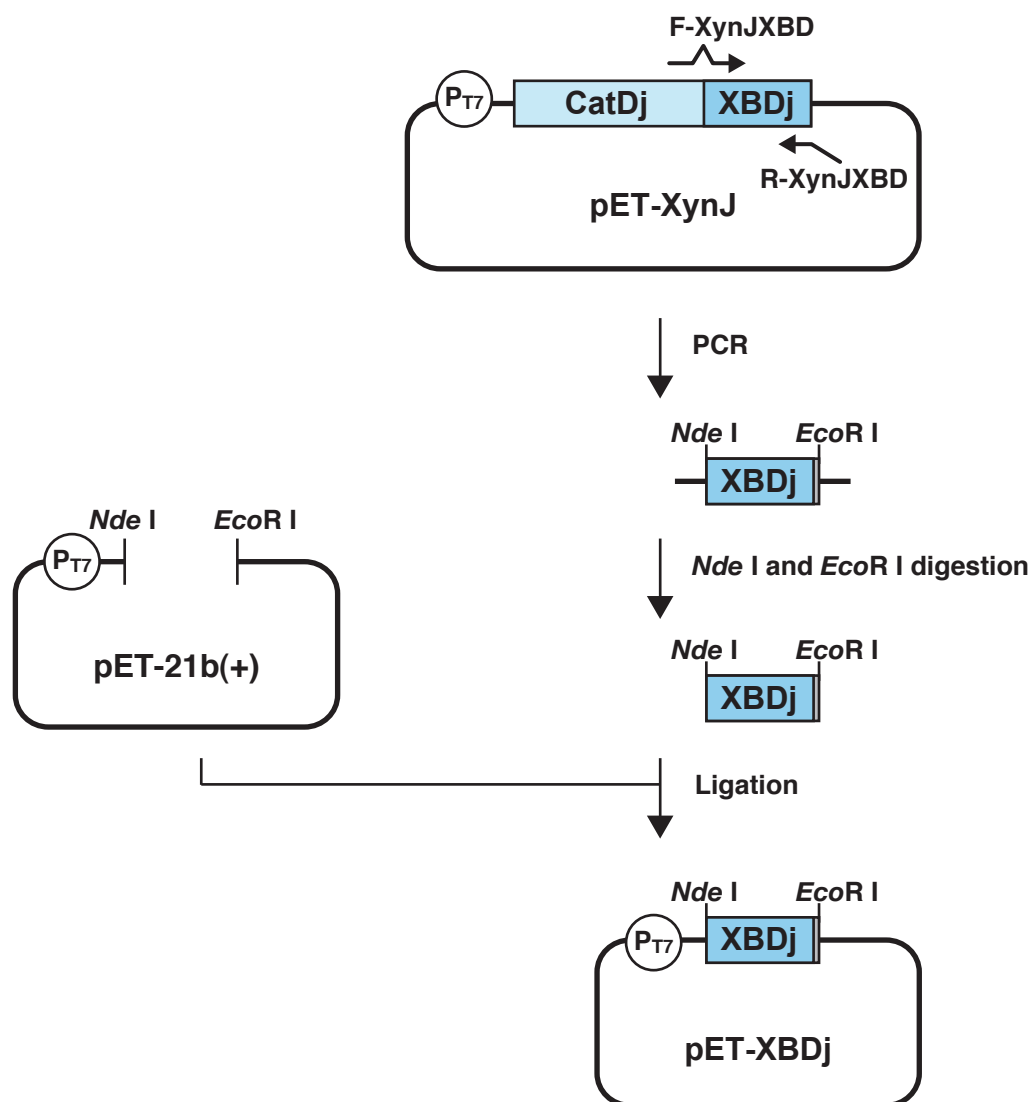


Fig. 6-1 XBDj をコードする発現型プラスミドの構築

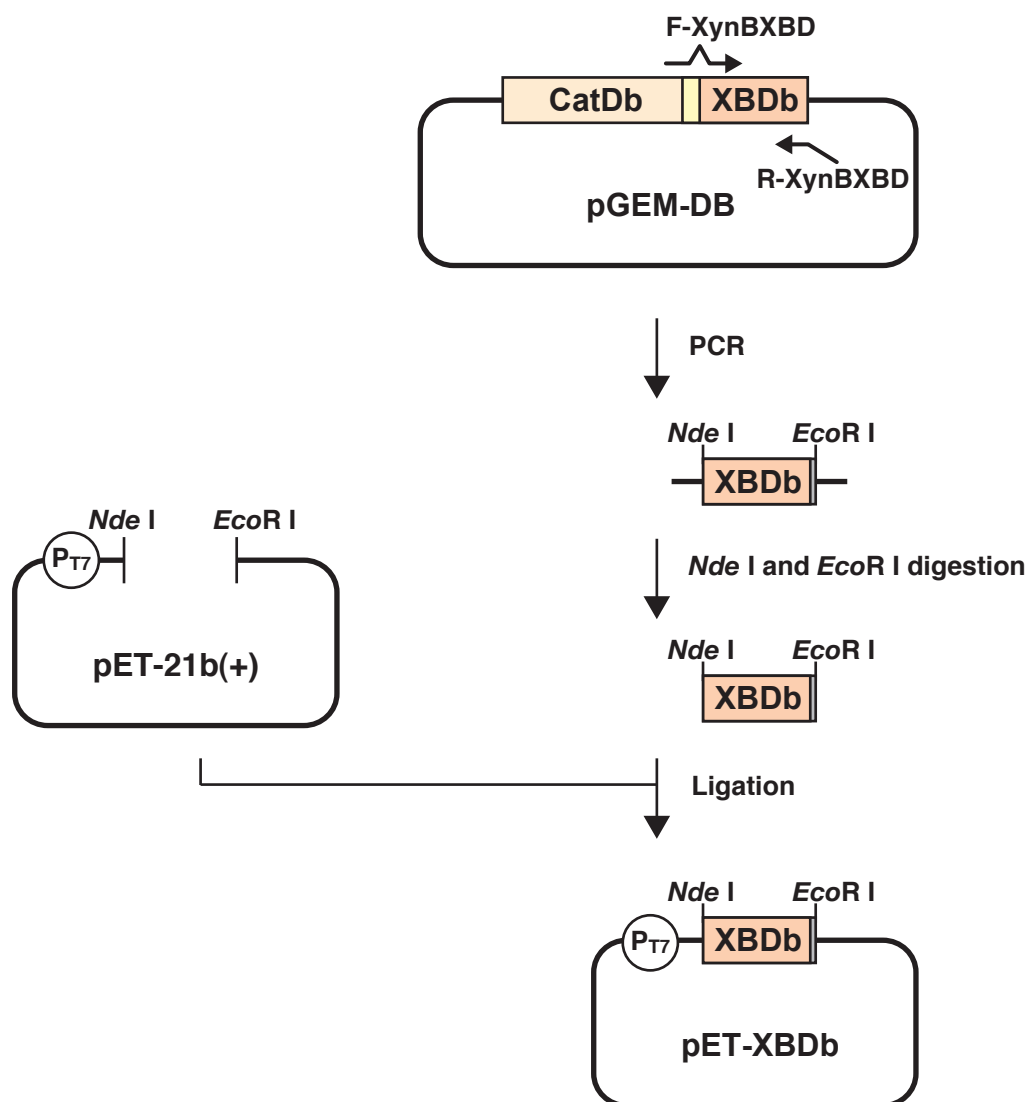


Fig. 6-2 XBDb をコードする発現型プラスミドの構築

6-3-2 XBDj および XBDb の大腸菌による生産と精製

XBDj および XBDb をコードする発現型プラスミドを大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換した。得られた形質転換体を培養し、必要に応じて IPTG 誘導を施すことにより XBDj および XBDb の生産を試みた。無細胞抽出液を SDS-PAGE に供し、発現確認を行った。その結果、XBDj および XBDb をコードする発現型プラスミドを有する大腸菌の無細胞抽出液を泳動したレーンにおいて、約 14 kDa の位置にそれぞれ XBDj および XBDb と思われる濃いタンパク質バンドが確認された (Fig. 6-3)。次に、大腸菌が生産した XBDj および XBDb の精製を試みた。精製は Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) 充填カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより行った。精製後のタンパク質を SDS-PAGE に供した結果、いずれも高純度の精製標品が得られたことがわかった (Fig. 6-4)。以後の性質検討では、ここで得られた精製標品を用いることとした。

6-3-3 XBDj および XBDb の pH 安定性

XBDj および XBDb を種々の pH の緩衝液中、4°C で 16 時間インキュベートした後、不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を測定することで、XBDj および XBDb の pH 安定性を調べた。なお、結合率は XBDj および XBDb を pH 7.0 の緩衝液中でインキュベートした場合を 100% とした相対値で表した。その結果、pH 安定性には両者の差はみられず、両 XBD とも広い pH 域で安定であることがわかった (Fig. 6-5)。

6-3-4 不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性

XBDj および XBDb の不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性を

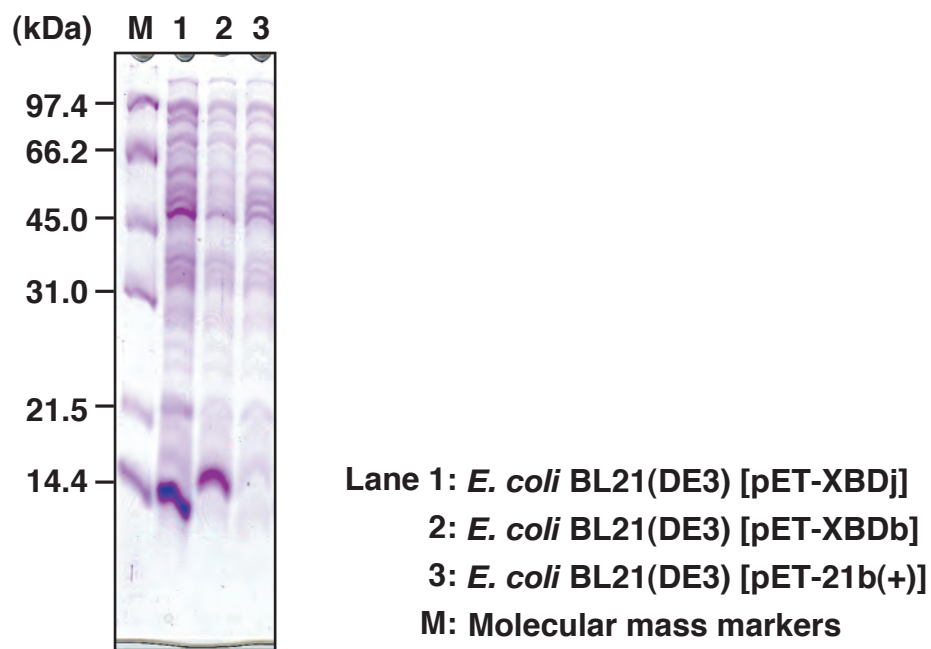


Fig. 6-3 XBDj および XBDb をコードする発現型プラスミドを有する大腸菌無細胞抽出液の SDS-PAGE

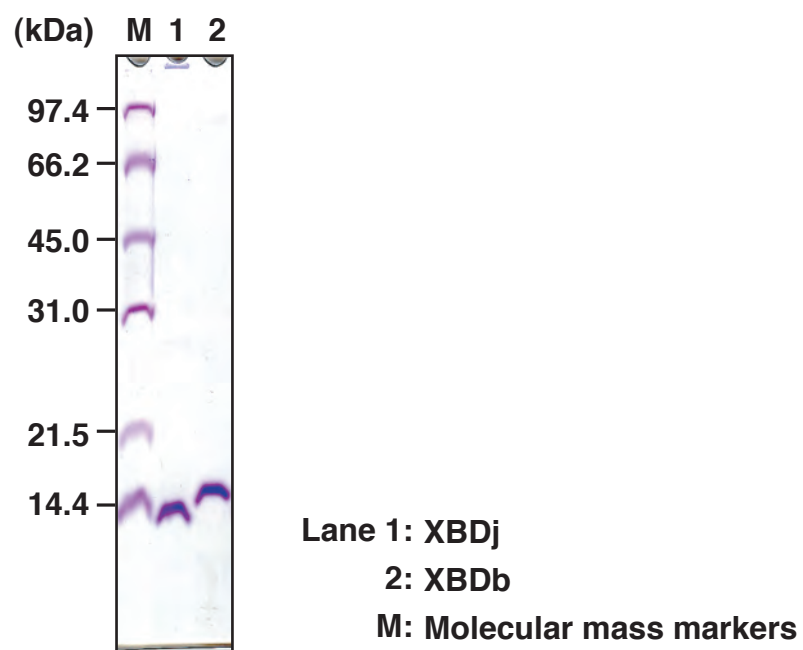


Fig. 6-4 XBDj および XBDb 精製標品の SDS-PAGE

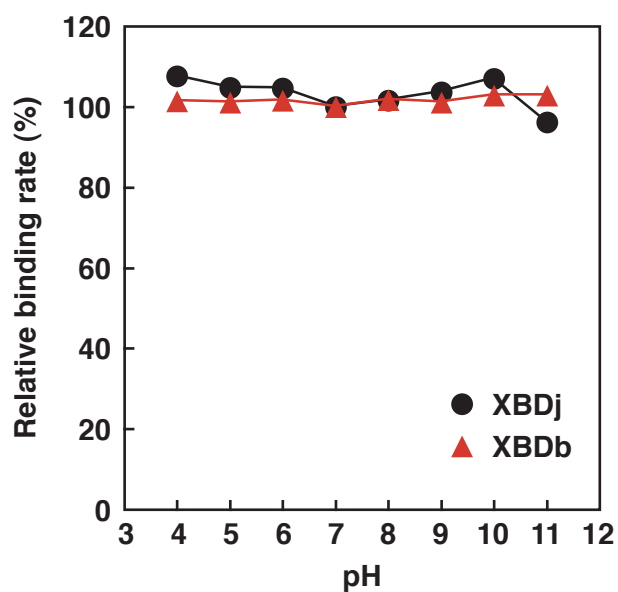


Fig. 6-5 XBDj および XBDb の pH 安定性

XBDj および XBDb を種々の pH の緩衝液中でインキュベートした後、終濃度 0.1 mg/ml の XBDj および XBDb を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (3.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は 0.1 mM CaCl_2 を含む 80 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 7.0) 中、室温で 1 時間行った。縦軸は pH 7.0 の緩衝液中でインキュベートした場合の結合率を 100% とした相対値で表した。

調べた。その結果、両 XBD とも pH が高まるにつれて結合率が徐々に低下することがわかった (Fig. 6-6)。pH 8.0 において、遠心後のコントロール液からわずかに白色沈殿が認められ、pH が高まるにつれてその量は増えていった。同様な現象は試料液についても観察された。この白色沈殿は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ であると考えられ、pH が高まるにつれて両 XBD 分子中の Ca^{2+} が奪われてゆき、結合率の低下につながったものと推察された。また、pH 11.0 においては XBDj の結合率が XBDb よりもやや低い値となった。XBDb には Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用以外に、第 3 のキシラン結合様式が存在していることは既に述べた (本論文第 4 章参照)。pH 11.0 において XBDj の結合率が XBDb よりもやや低い値となったのは、この第 3 のキシラン結合様式の寄与がないためであろう。ちなみに、pH 11.0 において XBDj の結合率が XBDb よりも低い値を示す現象は、GST との融合タンパク質 GST-XBD (pH 5.0-11.0 までの範囲では安定) を用いた場合にも観察されている (データ示さず)。

6-3-5 XBDj および XBDb の熱安定性

熱処理による変性を指標とする熱安定性

XBDj および XBDb を種々の温度で 30 分間加熱し、遠心後の上清に含まれる可溶性状態のタンパク質を定量した。なお、タンパク質量は熱処理を施さず室温 (25°C) で 30 分間静置した場合を 100% とした相対値で表した。その結果、XBDj は 70°C の熱処理で大部分が変性・沈殿してしまうのに対し、XBDb は 80°C まで沈殿が生じないことがわかった (Fig. 6-7-A)。また、XBDb は 90°C の熱処理後も 30% 以上のタンパク質が可溶性の状態を維持していた。これより、XBDj と XBDb の熱安定性には顕著な差があることが示唆された。

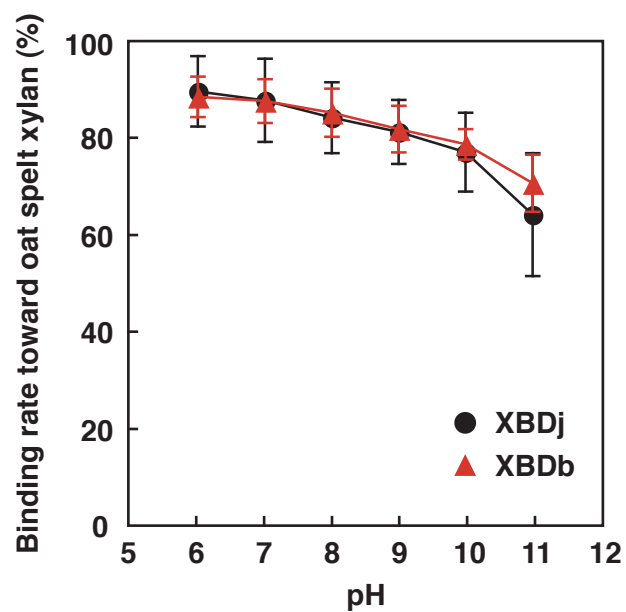


Fig. 6-6 XBDj および XBDb の不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性

終濃度 0.1 mg/ml の XBDj および XBDb を用いて、不溶性 Oat spelt キシラン (3.0 mg/ml) に対する結合率を測定した。結合は 0.1 mM CaCl_2 を含む 80 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 6.0-11.0) 中、室温で 1 時間行った。

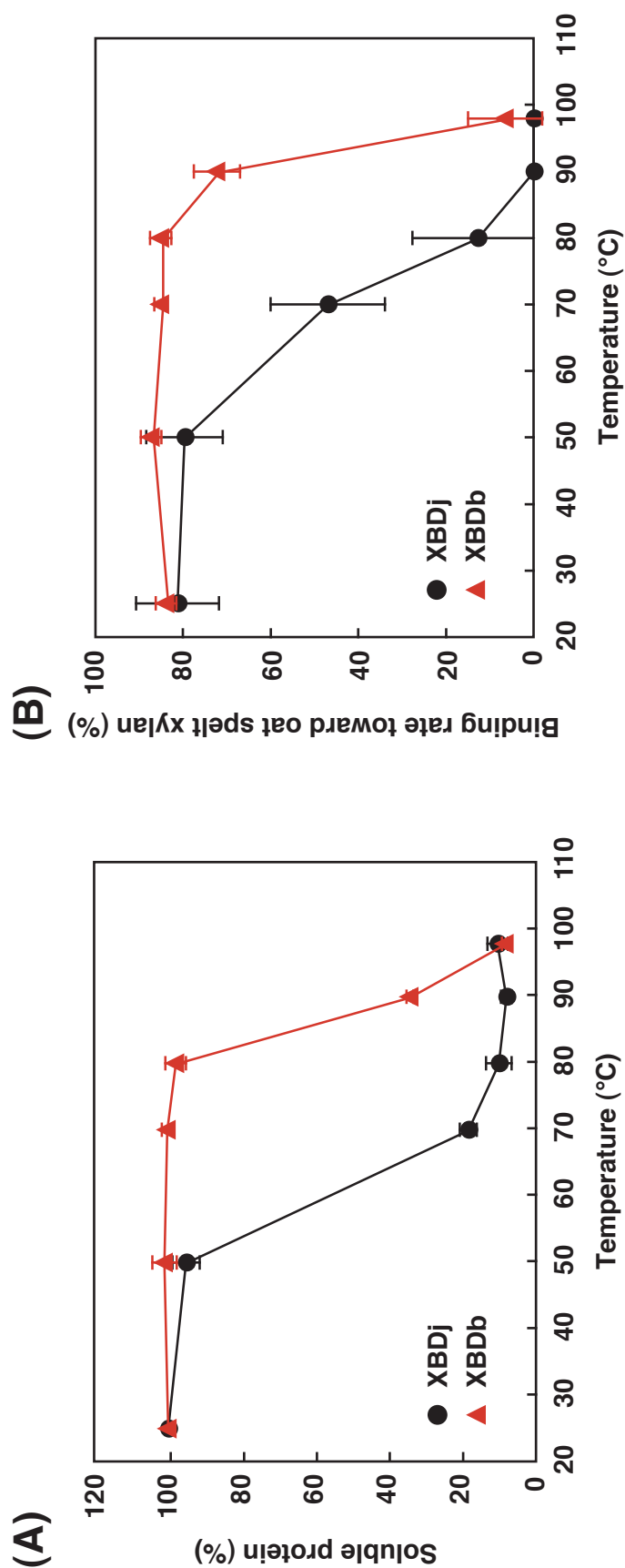


Fig. 6-7 XBDj および XBDb の熱安定性

(A) XBDj および XBDb を 1.0 mM CaCl₂ を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、種々の温度で 30 分間加熱し、遠心後の上清に含まれる可溶性状態のタンパク質量を測定した。縦軸は熱処理を施さない場合のタンパク質量を 100% とした相対値で表した。

(B) 熱処理後の上清を用いて、不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を測定した。結合は 1.0 mM CaCl₂ を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中、室温で 1 時間行った。

不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を指標とする熱安定性

熱処理後の上清に含まれる XBDj および XBDb は、タンパク質が可溶性の状態であっても、不溶性 Oat spelt キシランへの結合能を失っている可能性がある。そこで、熱処理後の上清を用い、不溶性 Oat spelt キシランに対する結合率を測定した。その結果、XBDj の結合率は 70°C の熱処理で低下するのに対し、XBDb の結合率は 80°C まで低下せず、90°C でも高い値を保持することがわかった (Fig. 6-7-B)。XBDb は 90°C の熱処理により約 70% が変性・沈殿するが、可溶性の状態を維持した約 30% のタンパク質については、熱処理を施さない場合とほぼ同程度の結合能を有していることになる。これより、XBDb は熱処理後もキシラン結合能を保持しており、高い耐熱性を有していることが明らかとなった。

DSC による吸熱ピークを指標とする熱安定性

DSC は、試料溶液と溶媒の両方を同時に昇温し、試料と溶媒との熱容量の差を観測するものである。タンパク質の熱変性においては、ネイティブ状態と変性状態との間で熱容量に差があるため、熱変性過程が吸熱ピークとして観察され、ピーク温度がほぼ変性中点温度に相当する。

XBDj および XBDb の DSC を行った結果、XBDj および XBDb の DSC 曲線のピーク温度はそれぞれ 71.5°C および 95.2°C であることがわかった (Fig. 6-8)。この結果は、熱処理による変性の実験結果と相関するものであった (本章 6-3-4 項参照)。これより、XBDb が高い耐熱性を有していることがあらためて確認された。

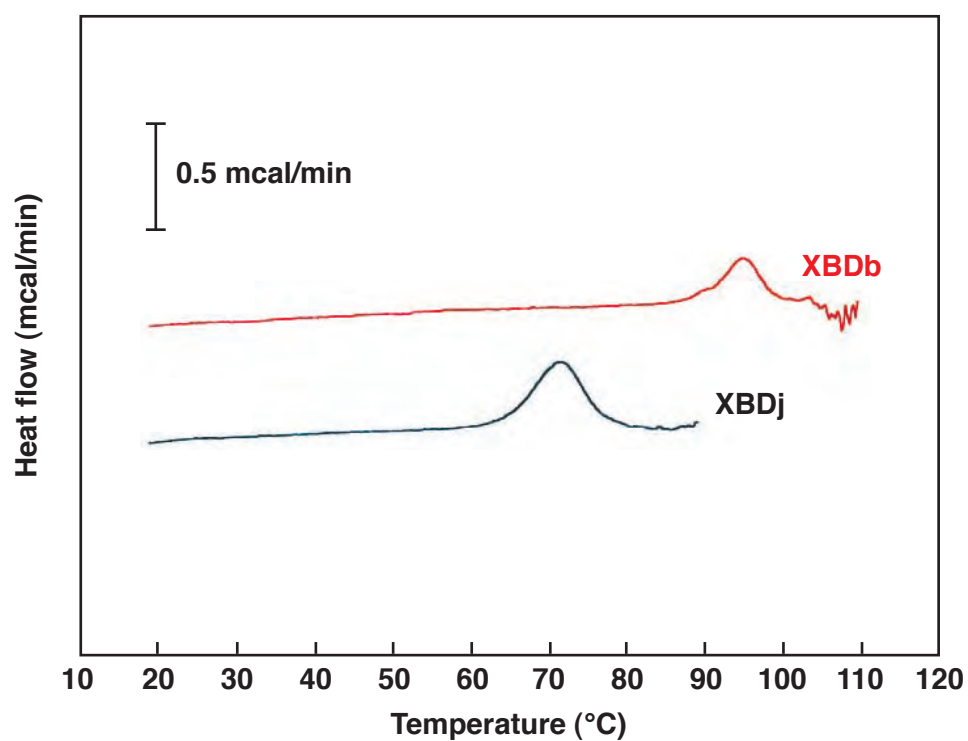


Fig. 6-8 XBDj および XBDb の DSC 曲線

XBDj および XBDb の精製標品を 1.0 mM CaCl_2 を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に対して再透析した後、0.5 mg/ml に調整し、DSC に供した。昇温速度は $1^\circ\text{C}/\text{min}$ とした。

6-4 結論

アルカリキシラナーゼの XynJ と耐熱性キシラナーゼの XynB には、CBM ファミリー 36 に属する XBD (それぞれ XBDj および XBDb) が存在する。XBDj および XBDb はそれぞれアルカリ性域および高温域での安定性を有していることが期待されるが、その真否は不明であった。そこで、XBDj および XBDb 単独での調製を行い、両 XBD の極限環境適応能を比較することとした。

XBDj および XBDb 領域単独での調製を行い、C 末端側に付加した His-Tag 配列を利用してアフィニティクロマトグラフィーによる精製を実施した。XBDj および XBDb の pH 安定性を調べた結果、両 XBD とも広い pH 域で安定であることがわかった。また、不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性にも両 XBD の間に大きな差はみられなかったが、pH 11.0 においては XBDj に比べて XBDb の方がやや高い結合率を示すことがわかった。一方、耐熱性には両 XBD 間で顕著な差がみられた。XBDj は 70°C、30 分の熱処理で大部分が変性・沈殿してしまうのに対し、XBDb は 80°C まで沈殿が認められず、熱処理後も不溶性 Oat spelt キシランへの結合能を保持していた。さらに DSC を行った結果、XBDj および XBDb の DSC 曲線のピーク温度はそれぞれ 71.5°C および 95.2°C であることがわかり、XBDb が高い耐熱性を有していることが明らかとなった。

6-5 引用文献

- [1] T. Kubo, R. Nakai, H. Tamanoi, K. Wakabayashi and S. Nakamura, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **35**, 221-222 (1996).
- [2] Ihsanawati ほか, 未発表データ.
- [3] 久保貴文, 修士論文, 東京工業大学 (1997).
- [4] 諸熊千尋, 修士論文, 東京工業大学 (2002).
- [5] 稲見麻由子, 修士論文, 東京工業大学 (2003).
- [6] H. T. S. Britton and R. A. Robinson. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J. Chem. Soc.*, **1931**, 1456-1462 (1931).

第 7 章

総括

7-1 要約

好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. 41M-1 株が生産するキシラナーゼ J (XynJ) はマルチドメイン酵素であり、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 11 に属する触媒ドメイン以外に、糖質結合モジュール (CBM) ファミリー 36 に属するキシラン結合ドメイン (XBD) が存在する。一方、高度好熱性細菌 *Dictyoglomus thermophilum* が生産するキシラナーゼ B (XynB) もマルチドメイン酵素であり、GH ファミリー 11 に属する触媒ドメインの下流には、リンカー配列を介して機能未知なドメインが存在する。この機能未知ドメインはアミノ酸配列の相同性から CBM ファミリー 36 に分類されており、基質結合に関与すると推測されるが、実際に多糖への結合能を有しているかは確認されていなかった。

最近になり、XynJ 全領域の立体構造が明らかになった。これにより、タンパク質工学的検討による XynJ 由来 XBD (XBDj) の機能部位の詳細な解析が可能となった。そこで本研究では、XBDj のキシラン結合機構の解明をめざすこととした。さらに、同じ CBM ファミリー 36 に属する XynB 由来機能未知ドメイン (XBDb) についても、XBD としての機能確認を行い、さらにキシラン結合機構の解明をめざすこととした。両 XBD のキシラン結合機構はこれまで明らかにされておらず、本研究の学術的意義は大きい。また、XBD は触媒ドメインによる不溶性基質の加水分解を促進する機能を有していることから、XBD の機能部位の解析はキシラナーゼの加水分解能向上を達成する上で有意義である。

以下に本研究で得られた成果を各章ごとに要約する。

第 2 章では、XynJ 由来 XBD の部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析を行った。

XynJ の立体構造に基づき、XBDj とキシロトリオースとの複合体立体構造モデルを構築した。本モデルにおいては、キシロースの 2 つの O 原子が XBDj に含まれる Ca^{2+} に配位結合しており、その Ca^{2+} には Tyr237 および Trp317 の主鎖カルボニル基の O 原子ならびに Asp313 および Asp318 の側鎖 O 原子が配位結合していると考えられた。また、Tyr223 および Tyr237 の側鎖芳香環は、キシロース環を挟むように疎水性相互作用していることが予想された。そこで、これらの残基に部位特異的アミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDj を調製し、それらの不溶性 Oat spelt キシラン結合能を評価した。

Ca^{2+} への配位結合に関与する残基を Ala に置換した変異型 GST-XBDj の結合能が野生型に比べて大きく低下したことより、これらの残基が不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していること、そしてとりわけ Asp313 および Asp318 が重要であることが明らかとなった。キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基を Phe に置換した変異型 GST-XBDj が野生型と同程度の結合能を示したのに対し、Ala に置換したものの結合能は野生型に比べて低下していた。これより、 Ca^{2+} との配位結合を介したキシラン結合が存在する条件においては、 Ca^{2+} を介した結合に比べて寄与は小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も XBDj の不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していると推察された。また、Tyr223 はキシロース環との疎水性相互作用だけでなく、 Ca^{2+} の取り込みにも影響することが示唆された。

第 3 章では、変異型 XBD を含む XynJ の性質検討を行った。

Ca^{2+} への配位結合に関与する 4 残基を Ala に置換した変異型 XynJ の不溶性 Oat spelt キシラン加水分解活性は野生型に比べて大きく低下し、その度合いは各種変異型 GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシラン結合能変化に対応したものであった。これら 4 残基がキシラン結合に関与していること、そして Asp313 および Asp318 がとりわけ重要であることが明らかとなった。キシロース環との疎水性相互作用に関与する残基を Phe に置換した変異型 XynJ が

野生型とほぼ同程度の加水分解活性を示したのに対し、Ala に置換したものの加水分解活性は野生型に比べて低下していた。これより、XynJ の不溶性キシラン加水分解活性と XBDj の不溶性キシラン結合能が密接に関係していることが明らかとなった。

第 4 章では、XynB 由来 XBD の部位特異的アミノ酸置換導入による機能部位解析を行った。

XBDj および XynB の機能未知ドメイン XBDb のアミノ酸配列は互いに約 53% の相同性を有しており、XBDj のキシラン結合に関与するアミノ酸残基はすべて XBDb においても保存されていることから、XBDb もキシランへの結合能を有していること、さらには XBDj と同様のキシラン結合様式をとることが予想された。そこで、GST と XBDb との融合タンパク質 (GST-XBDb) を調製し、各種不溶性多糖に対する結合率を測定した。GST-XBDb は各種不溶性キシランに対して高い結合率を示し、XynB の機能未知ドメイン XBDb はキシラン結合ドメインとしての機能を有することが実験的に明らかとなった。

XBDj との比較からキシラン結合に関与すると考えられる残基に部位特異的アミノ酸置換を導入した各種変異型 GST-XBDb を調製し、それらの不溶性 Oat spelt キシラン結合能を評価した。Ca²⁺ への配位結合に関与する 4 つの残基のうち、キシラン結合にとりわけ重要であると考えられる Asp322 および Asp327 のいずれか、または両方を Ala に置換した各種変異型 GST-XBDb を調製し、不溶性 Oat spelt キシラン結合能を評価した。各種変異型 GST-XBDb の結合能が野生型に比べて低下したことより、これらの残基が不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していることが明らかとなった。一方で、これらの変異型 GST-XBDb は一定レベルの結合率をなお保持しており、GST-XBDj の不溶性 Oat spelt キシラン結合とは異なる挙動を示した。次に、キシロース環との疎水性相互作用に関与する Tyr231 および Tyr245 のいずれか、または両方を Ala に置換した各種変異型 GST-XBDb を調製し、不溶性 Oat spelt キシラン結合能

を評価した。 Ca^{2+} との配位結合を介したキシラン結合が存在する条件においては、キシロース環との疎水性相互作用は XBDb の不溶性 Oat spelt キシラン結合にほとんど寄与しないことがわかった。一方、 Ca^{2+} を介したキシラン結合が存在しない条件においては、寄与は非常に小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も XBDb の不溶性 Oat spelt キシラン結合に関与していると推察された。また、XBDj と同様、XBDb においても Tyr231 および Tyr245 が Ca^{2+} の取り込み・保持に関与することが示唆された。さらに、XBDb には Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用に加えて、それ以外の第 3 のキシラン結合様式も存在することが示唆された。

Oat spelt キシランとは側鎖修飾が異なる多糖である Larchwood キシランを用いて、各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Larchwood キシラン結合能を評価した。 Ca^{2+} への配位結合に関与する Asp322 および Asp327 のいずれか、または両方を Ala に置換した各種変異型 GST-XBDb の結合能が野生型に比べて大きく低下したことより、これらの残基が不溶性 Larchwood キシラン結合に関与していること、そしてとりわけ Asp327 が重要であることが明らかとなった。次に、キシロース環との疎水性相互作用に関与する Tyr231 および Tyr245 のいずれか、または両方を Ala に置換した各種変異型 GST-XBDb の不溶性 Larchwood キシラン結合能を評価した。 Ca^{2+} との配位結合を介したキシラン結合が存在する条件においては、寄与は小さいものの、キシロース環との疎水性相互作用も XBDb の不溶性 Larchwood キシラン結合に関与していること、そして特に Tyr231 が重要であることが示唆された。また、 Ca^{2+} を介したキシラン結合が存在しない条件においても、キシロース環との疎水性相互作用が XBDb の不溶性 Larchwood キシラン結合に関与していると推察された。さらに、XBDb の Ca^{2+} を介した結合やキシロース環との疎水性相互作用以外の第 3 のキシラン結合様式は不溶性 Larchwood キシランに対してはほとんど確認されず、第 3 のキシラン結合様式は Oat spelt キシランに特異性が高いことが示唆された。

第 5 章では、種々の 2 価金属イオン存在下における XynJ および XynB 由来 XBD の不溶性多糖結合能を評価した。

XBDj および XBDb には、 Ca^{2+} への配位結合を介したキシラン結合様式が存在する。そこで、両 XBD に含まれる Ca^{2+} の他の金属イオンへの置換の可否を調べるために、種々の 2 価金属イオン (Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} および Ni^{2+}) 存在下における GST-XBDj および GST-XBDb の各種不溶性多糖 (Oat spelt キシラン、Larchwood キシランおよび非晶性セルロース) に対する結合能を評価した。その際、 Ca^{2+} への配位結合に関与するアミノ酸残基を Ala に置換した変異型 GST-XBDj および GST-XBDb についても、併せて結合能を評価した。GST-XBDj と不溶性 Oat spelt キシランとの結合の場合、すべての金属イオンの添加により、非添加時に比べて結合率が向上し、これらの金属イオンが Ca^{2+} と置換可能であることがわかった。また、GST-XBDj と不溶性 Larchwood キシランおよび非晶性セルロースとの結合の場合、 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加時のみに結合率の向上が認められ、 Co^{2+} および Ni^{2+} が Ca^{2+} と置換可能であることがわかった。また、 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加では、 Ca^{2+} 以上の結合率向上効果が認められた。一方、GST-XBDb の場合、いずれの不溶性多糖との結合においても各種金属イオン添加による結合率の向上効果が認められ、これらの金属イオンが Ca^{2+} と置換可能であること、そして GST-XBDj とは異なる挙動を示すことがわかった。GST-XBDb においても Co^{2+} および Ni^{2+} に Ca^{2+} 以上の結合率向上効果が認められたが、 Co^{2+} および Ni^{2+} への配位には Ca^{2+} への配位とは異なる残基が関与していることが示唆された。また、野生型および各種変異型 GST-XBDj ならびに GST-XBDb に含まれる Ca^{2+} を他の 2 価金属イオンで置換することで、特定の不溶性多糖に対する結合率が向上することが明らかとなった。

第 6 章では、XynJ および XynB 由来 XBD の極限環境適応能の比較を行

った。

XBDj および XBDb 単独での調製を行い、pH 安定性を調べた結果、両 XBD とも広い pH 域で安定であることがわかった。また、不溶性 Oat spelt キシランとの結合の pH 依存性にも両 XBD の間に大きな差はみられなかったが、pH 11.0 においては XBDj に比べて XBDb の方がやや高い結合率を示すことがわかった。一方、耐熱性には両 XBD 間で顕著な差がみられた。XBDj は 70°C、30 分の熱処理で大部分が変性・沈殿してしまうのに対し、XBDb は 80°C まで沈殿が認められず、熱処理後も不溶性 Oat spelt キシランへの結合能を保持していた。さらに DSC を行った結果、XBDj および XBDb の DSC 曲線のピーク温度はそれぞれ 71.5°C および 95.2°C であることがわかり、XBDb が高い耐熱性を有していることが明らかとなった。

7-2 今後の展望

XynJ および XynB に存在する CBM ファミリー 36 XBD (それぞれ XBDj および XBDb) がどちらも Ca^{2+} への配位結合を介したキシラン結合様式とキシロース環との疎水性相互作用によるキシラン結合様式をもつことが明らかとなった。さらに、XBDb にはそれ以外の第 3 のキシラン結合様式の存在が示された。現時点で第 3 のキシラン結合様式に関しては不明な点が多く残されており、今後のさらなる解析が待たれるところである。

XBDj および XBDb は Ca^{2+} との結合を介して不溶性キシランに結合する。この性質を利用して、XBD を精製のためのアフィニティタグとして利用できる可能性がある。すなわち、 Ca^{2+} 存在下で XBD を不溶性キシラン充填カラムに結合させた後、EDTA で Ca^{2+} を除けば、XBD とキシランとの結合が断たれ、XBD がカラムから溶出されると考えられる。同じく多糖結合ドメインを利用したアフィニティタグとしてはセルロース結合ドメインがすでに実用化されている。この場合、セルロース充填カラムからの溶出には高濃度のグルコース溶液や酸性緩衝液などが用いられるが、高濃度のグルコース溶液は後の環境汚染につながり、また酸性条件下での目的タンパク質の変性も問題となる。その点、EDTA を用いた溶出は環境にやさしい、目的タンパク質にダメージを与えない(金属タンパク質は除く)、操作が簡便であるなど多くの利点をもち、この精製システムは実用性が高いと考えられる。本研究により、XBDj および XBDb に含まれる Ca^{2+} を他の 2 価金属イオンで置換することで、キシラン以外の不溶性多糖に対する結合率が向上することが明らかとなった。これにより、キシラン以外の不溶性多糖充填カラムの利用が可能となり、XBD のアフィニティタグとしての応用範囲がさらに広がるものと期待される。

XBDj と XBDb の極限環境適応能を比較した結果、pH 安定性およびキシラン結合の pH 依存性には両 XBD の間に大きな差はみられなかった。一方、耐

熱性には顕著な差がみられ、XBDb は XBDj よりも高い耐熱性を有することが明らかとなった。XBD は不溶性キシランに結合することで隣接する触媒ドメインによる不溶性キシランの加水分解活性を増強することが知られている。本研究室では高温・強アルカリ性条件下においても高活性を示すキシラナーゼ触媒ドメインの取得に向け、タンパク質工学・進化分子工学の手法を用いた研究が鋭意行われている。高温・強アルカリ性条件下において高活性を示すキシラナーゼ触媒ドメインと本研究の XBDb を組み合わせることでより産業応用に適した酵素の創製が可能となろう。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切な御指導、御助言を賜りました、東京工業大学教授 中村 聡先生に深く心より御礼申し上げます。

多くの御指導、御助言を賜りました同准教授 福居俊昭先生に厚く御礼申し上げます。

多岐に渡る御指導、御助言を賜りました同助教 八波利恵先生に心より御礼申し上げます。

また、御指導、御助言を賜りました、同研究員 阿部 申先生、柿山幸恵氏ならびに加藤裕美氏に御礼申し上げます。

示差熱測定の実施にあたり、多大なるご指導とご協力を頂きました、いわき明星大学学長 関口武司先生、同大学薬学部教授 竹中章郎先生、ならびに同大学科学技術学部客員研究員 鈴木 薫博士に心から御礼申し上げます。

研究にあたり、親身なる御指導を頂きました、大竹 潤氏、羽鳥由信氏、李善美氏、高倉 淳氏、陳 碩氏、前田高宏氏、康 斐氏、太田俊也博士、梅本博仁博士、小泉直也博士、川島朗史氏、磯田裕也氏、中峯由香子氏、羽田大樹氏、前田聖恵氏、張 楊博士、清原三絵氏、久保田芳弘氏、星野佐織氏、澤谷秀之氏、月村 亘博士を始めとする本研究室卒業生の皆さんに心より御礼申し上げます。

また、研究だけでなく、本論文作成を始め多くの御協力を頂きました、安 然氏、宇仁文哉氏、小野寺雅彦氏、設楽まゆ子氏、石田俊晴氏、王 君婷氏、杉山典子氏、田力鉄平氏、牧野友理子氏、上舞洋敦氏、三谷俊介氏、山本公隆氏、安藤 藍氏、植田貴洋氏、齋藤圭祐氏、高見知広氏、趙 迪氏、ならびに Noh Soomin 氏に感謝いたします。

最後に、これまでの研究室生活を支えて下さった両親と友人達に深く感謝いたします。