

## Ca<sup>2+</sup>依存性糖質結合モジュールの分子認識における カルシウムイオンの役割

(<sup>1</sup>九大院理、<sup>2</sup>琉大理) ○谷本 勝一<sup>1</sup>、東 雅大<sup>2</sup>、吉田 紀生<sup>1</sup>、中野 晴之<sup>1</sup>

### Role of calcium ion in molecular recognition process of calcium-dependent carbohydrate-binding module

(<sup>1</sup>Kyushu Univ.; <sup>2</sup>Univ. Ryukyus)

○Shoichi Tanimoto<sup>1</sup>, Masahiro Higashi<sup>2</sup>, Norio Yoshida<sup>1</sup>, and Haruyuki Nakano<sup>1</sup>

**【序論】** 多糖類分解酵素による植物の細胞壁を構成する多糖類(糖鎖)の加水分解は、バイオ燃料生成において重要なプロセスである。この酵素は加水分解を行う触媒モジュールに加えて、触媒モジュールの働きを助ける複数の補助モジュールを有している。それらの補助モジュールの中で、加水分解の際に主要な役割を果たしているものの一つに、糖質結合モジュール(CBM)がある。CBMはセルロースやキシラン等の糖鎖を選択的に結合し、酵素の触媒モジュールの基質認識を助ける働きをもっており、その働きは酵素の加水分解能を向上させることが知られている<sup>[1], [2]</sup>。そのため、CBMによる糖鎖結合の詳細なメカニズムを解明することで、天然のものよりも分解能を向上させた多糖類分解酵素を設計するための知見が得られると期待されている。

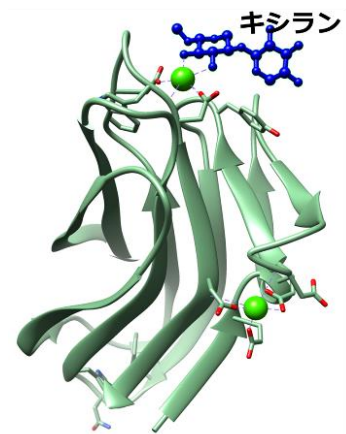


図 1: CBM36 の PDB  
結晶構造  
(緑色の球体:Ca<sup>2+</sup>)

CBMは現在 70 種類以上のファミリーに分類されており、それぞれのファミリーはモジュールの形状に応じて異なる糖鎖選択性をもつ。本研究では、CBM36 というファミリーに着目し、研究を行った。このファミリーは結合サイトに Ca<sup>2+</sup>が存在すると、キシランを選択的に認識するという特異な性質をもつ(図 1)。CBM36 は Jamal-Talabani らによって発見された最初の Ca<sup>2+</sup>依存性 CBM であり、その構造及び分子認識の特性については明らかにされているが<sup>[3]</sup>、キシラン結合の分子論的メカニズム及びキシラン親和性に対するイオン種依存性については依然として未解明なままだった。そこで、本研究では、MD シミュレーションと 3D-RISM 法を用いた自由エネルギー解析を行い、キシラン結合のメカニズム及びキシラン親和性に対するイオン種依存性の解明を目的として研究を行った。<sup>[4]</sup>

**【計算方法】** CBM36 の初期構造として、PDB 結晶構造(1ux7)を用いた。この結晶構造は結合サイトに Ca<sup>2+</sup>とキシロトリオース(xylotriose; キシロースの三量体。キシランはキシロースの多量体であり、キシロトリオースはキシランの鎖長が短いものに相当する)を結合している。この初期構造を基に、(1)結合サイトの Ca<sup>2+</sup>を Mg<sup>2+</sup>に置換した系(CBM36-Mg<sup>2+</sup>-xylotriose)、(2)初期構造からキシロトリオースを取り除いた系(CBM36-Ca<sup>2+</sup>)、(3)1 からキシロトリオースを取り除いた系(CBM36-Mg<sup>2+</sup>)、(4)キシロトリオースのみ(only xylotriose)の四種類の系を構築し、初期構造も含めた五種類の系の水中における構造サンプリングおよびエネルギー計算を、定温定圧 MD シミュ

レーションにより行った。次にサンプリングした構造に対して 3D-RISM 法を適用し、溶媒和自由エネルギーと溶媒分布を計算した。得られた自由エネルギー変化に対し、成分分解解析を行った。

**【結果と考察】** 結合サイトに  $\text{Ca}^{2+}$  または  $\text{Mg}^{2+}$  を結合した場合の結合サイトへのキシロトリオース結合にともなう自由エネルギー変化図を図 2 に示す。 $\text{Ca}^{2+}$  結合時にはキシロトリオースの結合により系全体の自由エネルギーが減少した。また、自由エネルギー変化の成分分解解析の結果から、 $\text{Ca}^{2+}$  と結合に関与するキシロトリオースのヒドロキシ酸素間の静電相互作用が結合の駆動力となることが分かった。次に  $\text{Mg}^{2+}$  結合時にはサンプリング中にキシロトリオースが結合サイトから離れてしまい、またキシロトリオースの結合にともない系全体の自由エネルギーが増加した。この結果から、 $\text{Mg}^{2+}$  結合時には CBM36 はキシラン親和性をもたないことが示された。成分分解解析の結果から、 $\text{Mg}^{2+}$  結合時には  $\text{Ca}^{2+}$  結合時よりもキシロトリオースの結合による溶媒和自由エネルギーの変化量が  $20 \text{ kcal mol}^{-1}$  以上も高くなった。これは、溶媒和自由エネルギーの成分中の溶質( $\text{CBM36} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{キシロトリオース}$ )-溶媒(水)間の相互作用エネルギーの顕著な増加に起因する。すなわち、 $\text{Mg}^{2+}$  結合時にはキシロトリオースの結合にともなう脱水和によるエネルギー増加量が、 $\text{CBM} \cdot \text{Mg}^{2+}$  とキシロトリオース間の相互作用増加によるエネルギー減少量を大きく上回ったため、結果的に系全体の自由エネルギーが増加したことを示している。以上の結果から、キシラン結合の親和性に対するイオン種依存性は、結合サイトにあるイオンの脱溶媒和による自由エネルギーの損失とイオン-キシラン間の静電相互作用による利得との差に主に起因することが分かった。詳細な内容は当日発表する。

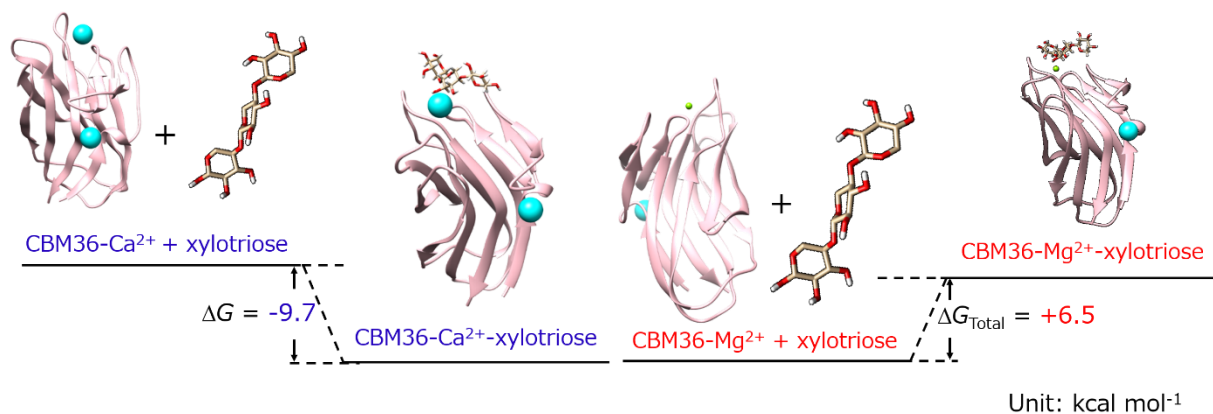


図 2:  $\text{Ca}^{2+}$  結合時(左)と  $\text{Mg}^{2+}$  結合時(右)のキシロトリオース結合による自由エネルギー変化図

- [1] Bolam D. N., Ciruela A., McQueen-Mason S., Simpson P., Williamson M. P., Rixon J. E., Boraston A., Hazlewood G. P., and Gilbert H. J. *Biochem. J.*, **331** (Pt 3), (1998) 775.
- [2] Din N., Damude H. G., Gilkes N. R., Miller R. C., Jr., Warren R. A., and Kilburn D. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, (1994) 11383.
- [3] Jamal-Talabani S., Boraston A. B., Turkenburg J. P., Tarbouriech N., Ducros V. M., and Davies G. J. *Structure*, **12**, (2004) 1177.
- [4] Tanimoto S., Higashi M., Yoshida N., and Nakano H. *J. Phys. Condens. Matter*, **28**, (2016) 344005.