

グリコシル転移酵素の糖鎖合成における分子極性

(12660151)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成14年 3月

京 都 大 学 図 書



9810054571

附 属 図 書 館

研究代表者 杉 山 淳 司

(京都大学 木質科学研究所 助教授)

科研

2001

285

研究課題

研究代表者

研究代表者

杉山 淳司 (京都大学 木質科学研究所 助教授)

研究代表者 杉山 淳司 (京都大学 木質科学研究所 助教授)

グリコシル転移酵素の糖鎖合成における分子極性

(12660151)

平成 12 年度	3,500	0
平成 13 年度	600	0
総計	4,100	0

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成 14 年 3 月 支那語の内ハリー・ロビンソン

研究代表者 杉山 淳司

(京都大学 木質科学研究所 助教授)

はしがき

ビオチンヒドラジドを還元的アミノ化により還元末端に安定的に導入した後、ストレプトアビジン金標識物で電子顕微鏡的に可視化する方法を開発し、これに関連する多糖の構造解析や酵素による合成、分解過程の観察に適用した。そして

1. 天然マイクロフィブリル構造の解析と合成方位
 2. 結晶多系の解析
 3. 酵素分解における選択性
 4. 酵素の結合部位の選択性
- の4項目について検討した。

各項目ごとに要約すると以下の通りである。

①セルロース I, β -キチンともにパラレルアップ（還元末端が c 軸方位と一致する）であり、合成方位に関しては重合が非還元末端で起こることが示された。 α -キチンについては標識は片端のみに認められ、逆平行鎖構造と矛盾する結果を得た。

②セルロース II と III₁ を検討した。前者は両端に染色されることがあるが、後者は全く片端のみが染色された。結果は前者が逆平行、後者が平行鎖構造であることと矛盾しない。

③セラチア菌の生産する Chitinase A と Chitinase B の β -キチンに対する分解挙動の比較をしたところ、ChiA はマイクロフィブリルの還元末端側から分解するのに対して、ChiB は非還元末端側から分解することを明らかにした。

④トリコデルマ起源のセロビオヒドロラーゼの結合モジュールが、セルロースの矩形断面の対角上にある2角（(100) 面）に選択的に結合していることが示され、モジュール内の仮説が支持された。

上記の研究成果は、本学院生今井友也博士、江原大学校（韓国）金南勲教授、東京大学大学院和田昌久講師、新潟大学渡邊剛志教授、同内山拓博士、上遠野史基氏、本学 JSPS 特別研究員 Eva-Lena Hult 博士、スウェーデン王立工科大学 Janne Lehtio 博士、Tuula Teeri 教授との共同研究による。

研究組織

研究代表者 : 杉山淳司 (京都大学 木質科学研究所 助教授)

交付決定額 (配分額) (金額単位 : 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 12 年度	3,500	0	3,500
平成 13 年度	600	0	600
総計	4,100	0	4,100

研究発表

(1) 学会誌等

1. Imai, T., Watanabe, T., Yui, T., and Sugiyama J. (2002) Directional degradation of β -chitin by chitinase A1 revealed by a novel reducing end labelling technique, *FEBS Lett*, 510, 201-205
2. Müller, M., Hori, R., Itoh, T. and Sugiyama, J. (2002) X-ray Microbeam and Electron Diffraction Experiments on Developing Xylem Cell Walls, *Biomacromolecules*, 3, 182-186.
3. Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J. and Watanabe, T. (2001), Roles of the Exposed Aromatic Residues in Crystalline Chitin Hydrolysis by Chitinase A from *Serratia marcescens* 2170, *J. Biol. Chem* 276(44), 41343-41349.
4. Imai, T., Kim N.-H., Sugiyama, J. (2001) Molecular directionality in Chitin Crystallites in Chitin and Chitosan, Chitin and chitosan in life science. (Uragami, T, Kurita, K. and Fukamizo, T Eds), *Proc. 8th International Chitin and Chitosan Conference*. Kodansha, Japan pp. 157-158, ISBN 4-906464-13-0
5. Watanabe, T., Ishibashi, A., Ariga, Y., Hashimoto, M. Nikaido, N., Sugiyama, J, Matsumoto, and T., Nonaka, T. (2001) Trp122 and Trp134 on the surface of the catalytic domain are essential for crystalline chitin hydrolysis by *Bacillus circulans* chitinase A1. *FEBS Lett*. 494, 74-78
6. Wada, M., Heux, L., Isogai, A., Nishiyama, Y., Chanzy, H. and Sugiyama, J. (2001) Improved structural data of cellulose III_I prepared in supercritical ammonia. *Macromolecules*, 34, 1237-1243
7. 杉山淳司、今井友也 (2000) セルロースマイクロフィブリル — 構造と生物機構の接点, *Cellulose Commun.* 7, 2-8

(2) 口頭発表

1. Sugiyama, J. Electron microscopy of cellulose microfibril, International Conference on Polysaccharides, past, present and future, Grenoble, France, Sept. 21, 2001
2. Sugiyama, J. Molecular directionality of polysaccharide crystals and its physical and biochemical implications, Royal Society, Carbohydrate Group Autumn Meeting " Chemistry, Physics and Biology of Structural Polysaccharides", Manchester, UK, Sept. 12, 2001.
3. Sugiyama, J. The directionality of microfibril formation in algae - a crystallographic approach, International Phycology Conference, Greek, August 18-25, 2001
4. Sugiyama, J. Phylogenetic variation / distribution of cellulose and their structural diversity. ICBT symposium on "Hierarchical Organization of polysaccharides and lignocellulosics", Fiskebäckskil, Sweden, Sweden, August 15-18, 2000

(3) 出版物

なし

研究成果による工業所得懸の出願・取得状況

なし

還元末端の新しいラベル化による可視化法 目次

I. 還元末端の新しいラベル化による可視化法	— 1
II. 天然ミクロフィブリル構造の解析と合成方位	— 6
III. 結晶多系の解析	— 7
IV. 酵素分解における選択性	— 9
V. 酵素の結合部位の選択性	— 10
VI. おわりに	— 11
VII. 関連論文	— 13

（分）（分）（分）

（分）（分）（分）

1. 実験の目的と材料から始める。材料を取り除くため、マイクを減速機（Analog Unit）を用いて減速機に接続して、時間経過する。減速機に接続したマイクはマイクアンプに接続がある。実験機には制御、通好したい物質の電子量を読み取るため、制御機を使う。

2. 減速機を用いて時間経過を水からメタノールへ段階的減速する。時間経過減速機により減速機分散性を高める。減速機減速機は0.1mg/mlもあれば十分である。最終的にはマイクアンプに接続3Aを入れた減速機に入れて減速機メタノール中に懸濁させる。この時マイクアンプの減速機を減速機のために、マイクアンプに接続（マイクアンプ）

I. 還元末端の新しいラベル化 (BXH-SG) による可視化法

非水系において Sodium Cyanoborohydride の存在下で 1 級 amine と aldehyde を反応させ aldehyde に amine を結合させる。この反応により Biotin は amido 結合を介してセルロースやキチンなどの多糖分子鎖の還元末端に結合する事が出来る。この Biotin は金 colloid と結合している Streptavidin で標識され電子顕微鏡下で観察できる。関連論文 1。

反応スキームを図 1 に示す。また詳しい実験の手順は次の通りである。

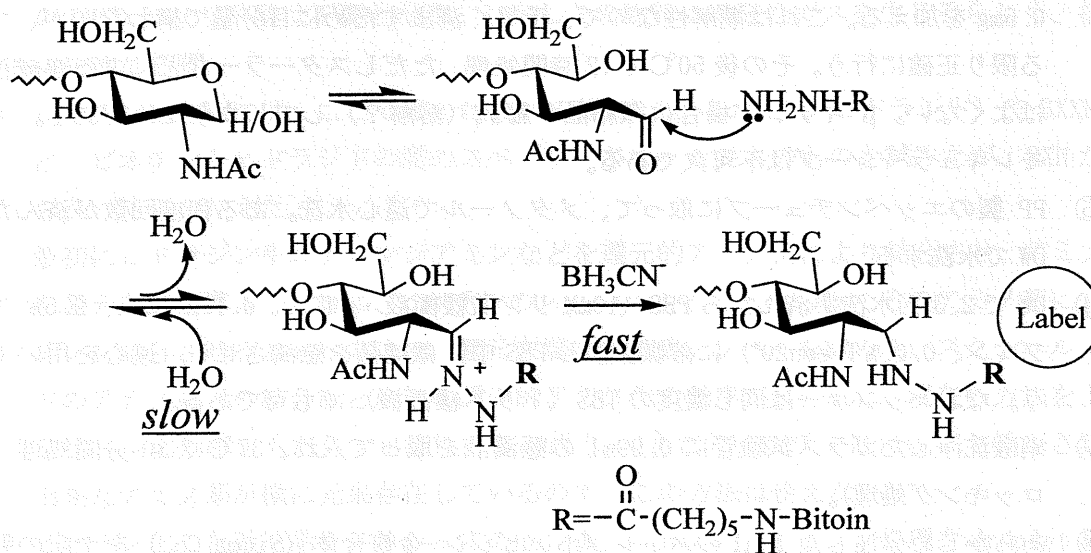


図 1 還元末端染色法について

[手順 (今井 2001)]

微結晶に対する BXH-SG ラベルの手順

- ① 微結晶の懸濁液試料から不純物 (含アルデヒド物質) を取り除くため、マイクロ透析器 (Amika Corp.,) を用いて蒸留水に対して 12 時間透析する。透析膜には再生セルロースとアセチルセルロースがある。有機溶媒には前者、透析したい物質の分子量分布を狭めたいならば後者を使う。
- ② 遠心機を用いて懸濁液を水からメタノールへ段階置換する。時折超音波処理により微結晶の分散性を高める。懸濁液濃度は 0.1mg/ml もあれば十分であろう。最終的にはモレキュラーシーブ 3A を入れた瓶に入れて用意した絶乾メタノール中に懸濁させる。この時モレキュラーシーブのカスを除くために、メンブレンフィルター (ADVANTEC 社製

の DISMIC-13CP, セルロースアセテート・孔径 0.20 μ m) を用いる。

- ③ あらかじめ内壁を濃硝酸で洗浄したガラス試験管中に、1ml の微結晶懸濁液と 50 μ l の酢酸を入れる。以降の操作は水分の混入を避けるため、できる限り素早く行う。まず 3mg の Biotinamidocaproyl hydrazide (Sigma Co., 以下 BXH) を溶解させる。すぐには解けないので、温めたり超音波洗浄機を使ったりしながら完全に溶解させる。その後、あらかじめアルコールでカスを洗い流して乾燥させたモレキュラーシーブ 3A を 2 片入れる (入れ過ぎは明らかによくない)。
- ④ 試験管を 50 $^{\circ}$ C に温める。1~2 時間後に、シアノ化ヒドロホウ素ナトリウム (NaBH_3CN) 0.5mg を加える。これは潮解性なので、手早く済ますために目分量で構わないが、できる限り正確に行う。その後 50 $^{\circ}$ C で 12 時間処理。ただしスターラーなどによる連続攪拌はよくない。 β -キチンの場合は微結晶が膨潤 (溶解?) してしまうためである。逆にモレキュラーシーブは不可欠である。
- ⑤ PP 製のエッペンチューブに取って、メタノールで遠心水洗。ある程度回数が済んだら DW で水洗する。
- ⑥ DW で 2, 3 回水洗が済んだら PBS (10mM リン酸緩衝液・pH7.0、0.15M NaCl、0.5% アルブミン、0.05% Tween20*) に溶媒置換し PBS 中に微結晶を懸濁させる。遠心を用いて行う。なおバッファーは同じ濃度の TBS (トリス緩衝液) でも可である。
- ⑦ 硝酸洗浄したガラス試験管に 0.99ml の懸濁液を取って入れ、37 $^{\circ}$ C で 30 分間処理 (ブロッキング処理)。
- ⑧ あらかじめ分注した 10 μ l のストレプトアビジン-金複合体 (Sigma Co.) を上記の懸濁液に加える。分注して冷凍保存してある原液を溶かした後に、ブロッキングした 0.99ml の微結晶 PBS 懸濁液を加え、再びガラス試験管に戻す (100 倍希釈相当)。37 $^{\circ}$ C で 1 時間処理。
- ⑨ PP 製のエッペンチューブに取って、一度遠心して上清を除き、そこに洗浄用 buffer (50mM リン酸緩衝液・pH7.0、0.05% Tween20*、0.01% NaN_3) を加えて遠心水洗。次に DW を注いで遠心水洗し、再び DW を注いで完了。この時の遠心水洗は 100rpm でも可能。

* Tween20 とは ICI 社の商標で、Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate がそれに相当する。界面活性剤の一種。

還元的アミノ化によるビオチン化の時には、いかに水の混入を避けるかを常に頭に置く。潮解性のシアノ化ヒドロホウ素ナトリウムを入れる際、目分量で手早く計り取るのはそのためである。また、アルコール等で拭いたスパチュラを用いるなどの策も有効なようである。シアノ化ヒドロホウ素ナトリウムやモレキュラーシーブを時々乾燥 (真空乾燥) させるのもよからう。真空オーブンがあれば一番いい (80 $^{\circ}$ C で 12 時間)。

ラベル化効率の up へ向けて、改善の余地およびいくつかの試行結果

- ・ 最初に行う透析を、メタノールに対して行う。→セルロース・キチンについては膨潤するようだ。
- ・ NaBH_3CN を加えるのを、BXH を投入してから 3 時間後くらいにしてみる。下記のジメチルアミンボランを還元剤として使う方法では、計 24 時間の処理のうち、アミンを投入してから 3 時間後に還元剤を投入していた。
- ・ 還元剤として NaBH_3CN の代わりにジメチルアミンボランを使う。そうすると溶媒は DMF か DMSO となり酢酸は不要となる。しかしこの物質は爆発性ガスを生じるらしく、扱いに注意が必要。
- ・ ビオチン化合物には、ここで用いた BXH の他に、BH (ビオチンヒドラジド) や BXXH など、ビオチンとヒドラジドの間のスペーサーが様々な長さのものを試みたが、BXH が最も良い結果を与えた。
- ・ 最初にヒドラジンやエチレンジアミンなどを還元的アミノ化により結合させ、アミノ基を還元末端に導入した後に、ビオチンのスクシニルイミド化合物でそのアミノ基にビオチンを結合させるという方法で、還元末端のビオチンラベルを試みる。スクシニルイミドのアミノ基との結合能と最初の還元的アミノ化の効率が良ければ、現在の方法を上回るラベル化効率をもたらす可能性ありと思う。(ただし、キチンには脱アセチルされて出来たアミノ基が横に元来存在しているので、この方法は使えない)
- ・ ビオチン化した微結晶をメッシュにのせた後、ストレプトアビジン処理を droplet 法で行う。このほうが消費する試薬の量は格段に節約できる。また、強い遠心力によりビオチンとストレプトアビジンの結合が解けてしまう可能性を考えると、遠心水洗で洗浄するよりも良い結果を与えるかもしれない。また、希釈濃度も 100 倍希釈よりももっと濃いほうがいいのかもかもしれない。
- ・ ストレプトアビジン-金複合体処理の前半と後半で異なる径の金コロイドが付いたもので処理を行い、ストレプトアビジンが処理の前半でビオチンに付くのか、それとも後半に尻上がりに付いてくるのかを判断できる？
- ・ ストレプトアビジンの代わりに、ストレプトアビジン-アルブミン金複合体 (Sigma Co.) を使う。親和性はアップするらしい。

切片試料（メッシュ上）のラベル化

- ① 切片は脱包埋を行う。市販の脱包埋キットで普通ならば5分のところ、20分行う。
- ② 2.5% KOH で3~12時間、室温で、脱タンパク・脱ヘミセルを行う。
- ③ DW で洗浄後、マイクロ透析器を用いて、DW に対して透析処理。
- ④ 濃硝酸で洗浄したガラス試験管をメタノールで段階的に洗浄し、無水メタノール 1ml を入れる。そこに 50 μ l の酢酸、3mg の BXH を溶解させる。完全に溶解した後、モレキュラーシープ 3A を入れる。
- ⑤ メッシュを段階的にメタノールで洗浄し、最終的には無水メタノールで洗浄する。それを素早く④の試験管中に入れる。このとき、ピンセットの隙間に入ったメタノールが入らないように注意。
- ⑥ 1~3 時間後、 NaBH_3CN を 0.5mg 溶解させ、50℃に温める。その後 12 時間処理。試験管を強く振ってモレキュラーシープで支持膜を傷つけないよう注意。
- ⑦ メタノールを使ってメッシュをシャーレ上に流し出し、メタノール、DW で洗浄。さらに PBS（処方は上と同じ）で洗浄。
- ⑧ PBS で 37℃にて 30 分ブロッキング処理。
- ⑨ 40-100 μ l（適当で OK）の 40 倍希釈ストレプトアビジン-金複合体溶液で、1 時間、37℃で処理。もっと濃くてもいいかも。
- ⑩ リン酸緩衝液（同じく上と同じ処方）で洗浄の後、DW で余分な液を洗い流し、水分をろ紙で吸い取る。これにシャドウイングをかけて観察試料完成。

ビオチン化の時、モレキュラーシープがメッシュ表面の支持膜を傷つける可能性大であるため、試験管を揺らすのは厳禁。改善の余地あり。また、洗浄操作の時ピンセットでメッシュを保持する時も、できる限りメッシュの端を持つべき。もしメッシュを落としてしまうのが心配ならば、下に網を引いて操作を行うべし。⑧の PBS による洗浄操作からは、パラフィルム上に droplet を作って行う。最後に DW 洗浄は洗瓶を使って行う。

過ヨウ素酸酸化

過ヨウ素酸酸化を試料の前処理に行うと、セルロースの場合は2位と3位の水酸基の間で結合が切れてジアルデヒド構造となり、これがラベル化されるため、微結晶の表面もランダムにラベル化される。ところが、キチンの場合はジオール構造が還元末端と非還元末端の2箇所のみ存在するため、 β -キチンにおいては微結晶の両端に形成されるジアルデヒドにラベルを導入することができる。キチンにおける還元末端および非還元末端の構造および過ヨウ素酸処理による変化について図2に図示した。またラベル化実験の実際を図3に示す。このような実験から、今回考案したラベル化は、前処理のない場合は還元末端に特異的であることが確認された。

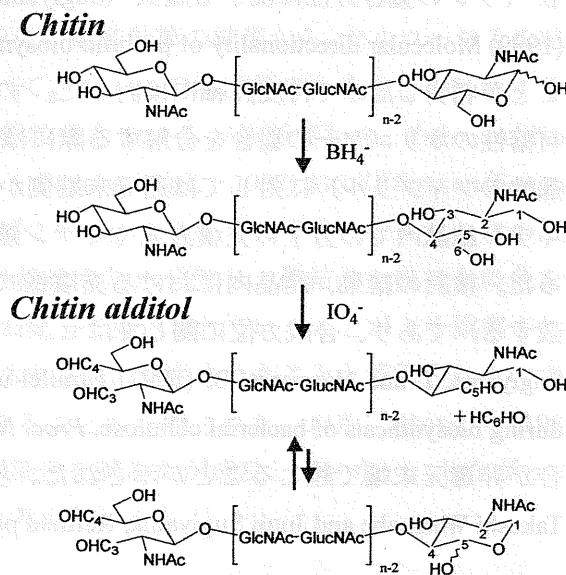


図2 キチン鎖の酸化、還元反応様式

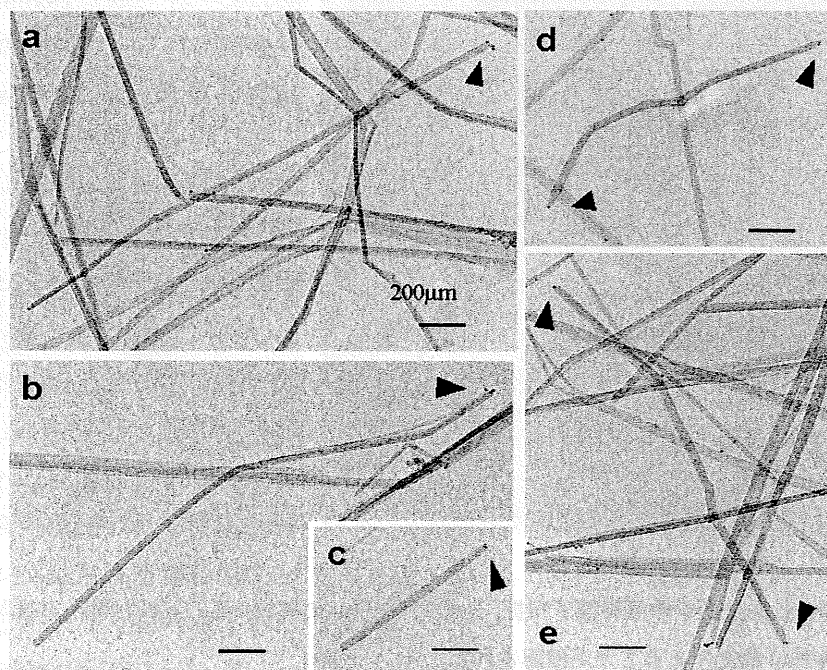


図3 β -キチンのラベル化実験 a-c: 前処理なし d-e: 過ヨウ素酸処理

II. 天然マイクロフィブリル構造の解析と合成方位

β -キチンの重合方位に関する論文 (Sugiyama, J., Boisset, C., Hashimoto, M., and Watanabe, T. (1999) Molecular directionality of β -chitin biosynthesis, *J. Mol. Biol.* **286**, 247-255) に誤りがあることが判明したので再度詳細に検討した。すなわちバチルス菌の生産する Chitinase A1 が可溶性のオリゴマーの場合を分解する際にはキチンの非還元末端から分解し、 β -キチン (結晶性のフィブリル) に対しては還元末端側から働くことが明らかになった。その結果、 β -キチン結晶内での分子の充填方向やキチン鎖の重合方位についても再考せざるおえなくなった。検討の結果、結晶内における充填様式はパラレルアップ (還元末端が c 軸方位と一致する) であり、合成方位に関してはセルロースの場合 (Koyama, M., Helbert, W., Imai, T., Sugiyama, J. and Henrissat, B. (1997) Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 9091-9095.) と同様に重合が非還元末端で起こることが示された。現在投稿準備中 (Tomoya Imai, Toshifumi Yui, Takeshi Watanabe and Junji Sugiyama, Refined parallel-up structure of β -Chitin Crystal) である。

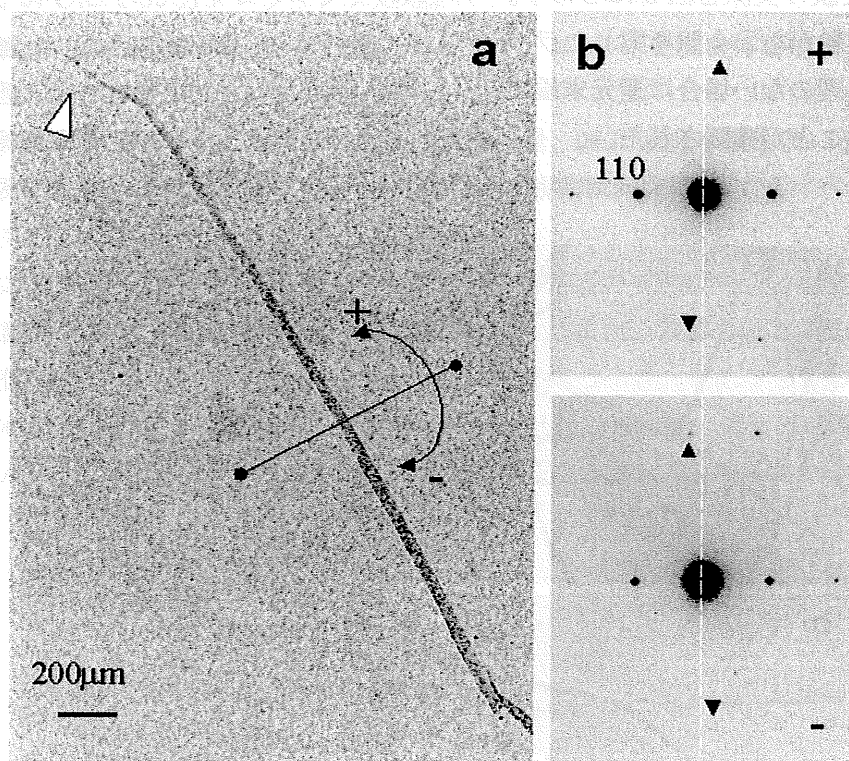


図4 ラベル化 β -キチンの傾斜電子回折。b,cのパターンの解析から、 c 軸と還元末端方位が一致する parallel-up 構造であることが確認された。

III. 結晶多系の解析

セルロース I

今までのX線および電子線回折のデータを用い構造計算の結果から、セルロース I の結晶中の分子鎖の極性は平行鎖であると結論されている。この平行鎖であることを証明する重要な手段の一つとして微結晶の還元末端に銀粒子を付ける方法が使われ、Valonia (Hieta et al., 1984)、Bacteria (Kuga & Brown, 1988; Koyama et al., 1997) および Cotton (Fengel, 1992) のセルロースではすでにその成果をあげている。Hieta らはラミーセルロースの銀染色も試みたが成功していない。今回、ラミー繊維を加水分解し、微結晶を得て金染色を行った結果、セルロース I の微結晶の片方に金の粒子で染色されていることがよく観察された。このことは他のセルロース I と同じく還元性末端側に染色されたことと推測されるのでラミー繊維のセルロース分子鎖方向は平行であることが示唆された。以前、Hieta ら (1984) は同じくラミーセルロースの分子鎖末端に銀染色を試みたが成功していない。したがって、この金染色の実験手法はかなり有効な方法と考えられる。

セルロース II

X線回折図の構造解析からセルロース II 結晶中の分子鎖方向は逆平行鎖であることが一般に受けられているが、この結果を証明する研究は稀である。Fengel (1992) は cotton linter 由来のセルロース II を用い銀染色を試み、セルロース II の微結晶にも片方しか染まってないことを見出し、セルロース II もセルロース I と同じ平行鎖であるとしている。今回のマーセル化ラミーに対する実験の結果、セルロース II の微結晶の片方だけがそまる比率が非常に高いこと (図 5) からセルロース II の分子鎖も平行鎖である可能性が示唆された。しかし本実験では図 6 に示すとおりの両端にラベルが見られる場合もあったため、反応効率などを考慮すれば逆平行鎖可能性は否定できない。

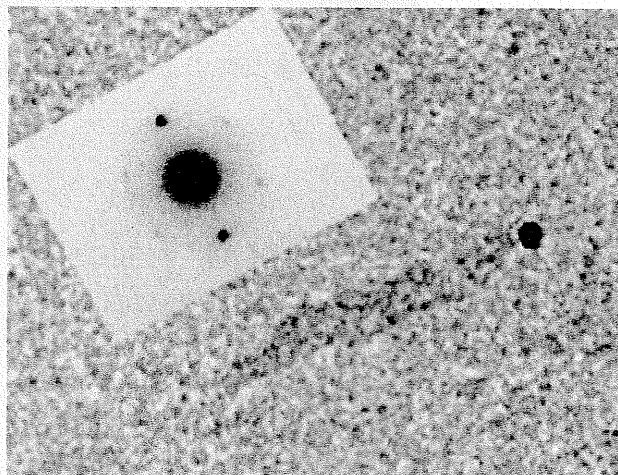


図5 片端のみラベル化されたセルロース II 微結晶。回折図は典型的な II 型。

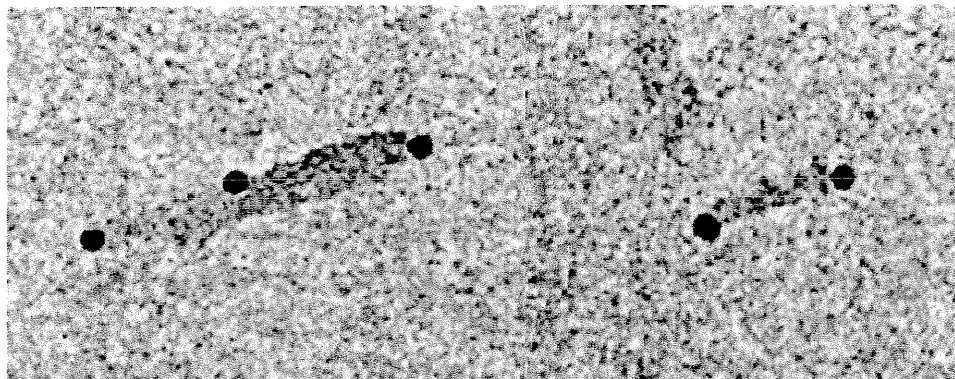


図6 両端が染められたセルロース II 微結晶

セルロース III_I

X線実験のデータから構造解析の結果、セルロース I から得られる III_I は分子鎖が平行鎖構造であると結論されている。今回の実験でセルロース III_I はセルロース I、II と同じく微結晶の片方だけが染まることがわかった(図7)。一本鎖の単位胞を支持する結果である(関連論文4)。

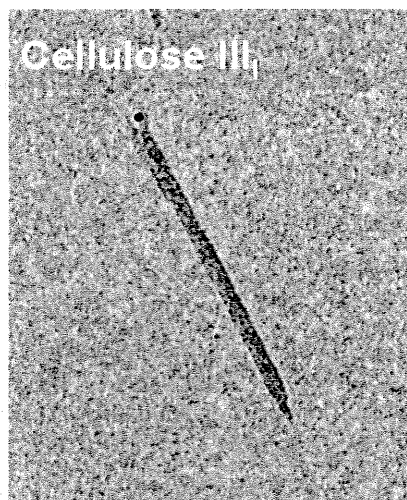


図7 片端のみラベル化されるセルロース III_I

α -chitin

逆平行鎖構造と報告されている。今回の実験では微結晶の片方だけが染まる比率が非常に高かった(図8)。平行鎖の可能性も示唆された。

以上の結果をまとめて現在投稿準備中である。

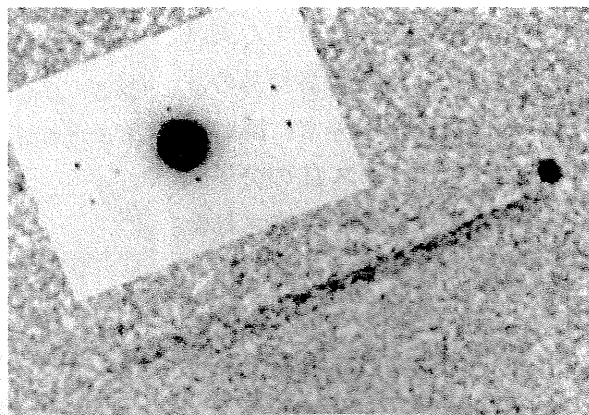


図8 片端のみラベル化される α -キチン微結晶

IV. 酵素分解における選択性

糖分解酵素の分子鎖に対する選択性についても可視化による検討を行った。セラチア菌の生産する Chitinase A と B (関連論文 2) の β -キチンに対する分解挙動の比較をしたところ、ChiA はマイクロフィブリルの還元末端側から分解するのに対して、ChiB は非還元末端側から分解することが明らかになった(図 9)。近年報告された各酵素の 3D 構造、特に基質結合部位が、活性中心に対して各酵素では逆方向に配置していることから、基質結合部位が分子鎖の認識に影響を及ぼすことが示唆された。現在投稿中 (Eva-Lena Hult, Fuminori Katouno, Taku Uchiyama, Takeshi Watanabe and Junji Sugiyama, Recognition of Molecular Directionality in Crystalline β -chitin Hydrolysis by Chitinases A and B from *Serratia marcescens* 2170) である。

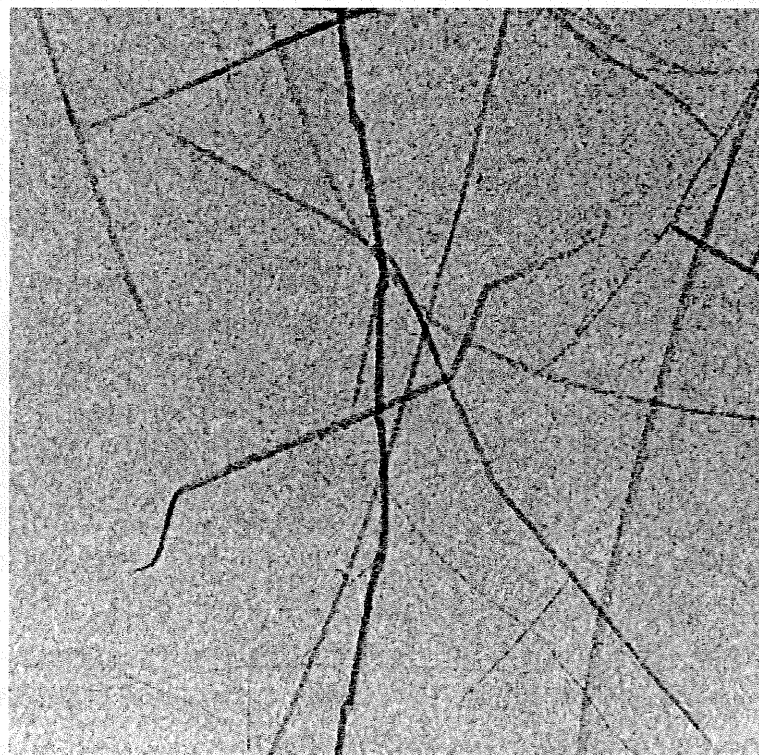


図 9 ChiA/ChiB 同時処理による分解残渣の形態。両端から先細りしていることが明らかに示された。

V. 酵素の結合部位の選択性

トリコデルマ起源のセルラーゼ結合モジュールの吸着部位についても検討した。セロビオヒドラーゼの結合部位に周期的に配置したトリプトファンなどの芳香族アミノ酸残基がセルロース表面の疎水面（ピラノース平面）を認識するとされている。免疫標識した結合モジュールのセルロース表面への吸着を立体観察した結果、モジュールは矩形断面の対角上にある2角（(100)面）に選択的に結合していることが示され、上の仮定が正しいことが示された（図10）。現在投稿中（Janne Lehtiö, Junji Sugiyama, Malin Gustavsson, Linda Fransson and Tuula T. Teeri, The binding specificity and affinity determinants of the family 1 cellulose-binding domains from *Trichoderma reesei* Cel6A and Cel7A）である。

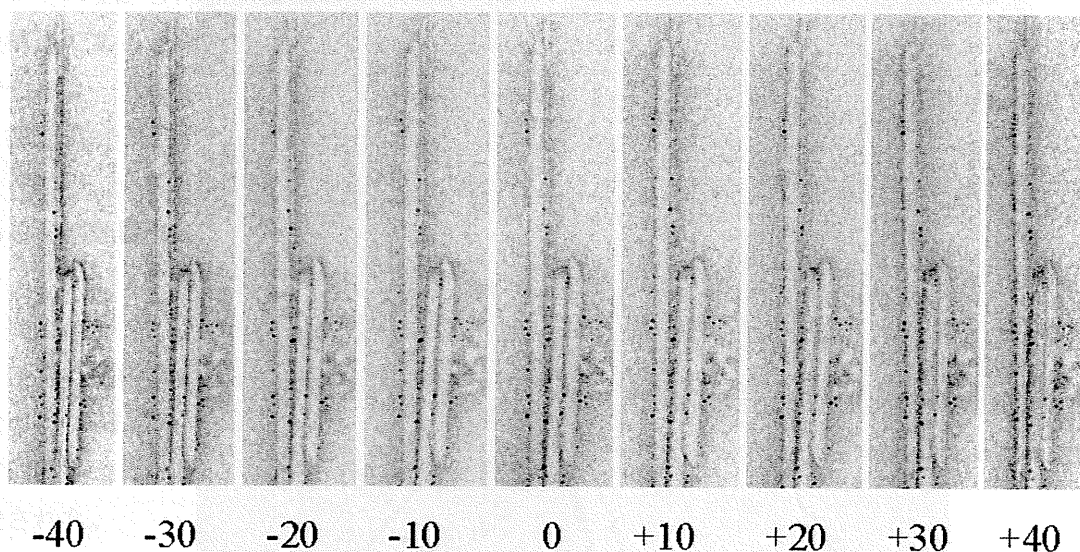


図10 Auラベルしたトリコデルマ由来のCel7AのCBMをバロニアに作用させた一例。同一個所より傾斜して撮影した画像よりAu粒子の3次元的な分布を求めた。

VI. おわりに

天然でマイクロフィブリル構造をとるセルロースや β -キチンについては、開発した還元末端可視化法によって、分子鎖がマイクロフィブリル内で平行に充填されていることが明らかになった。そこでもうひとつの代表的な天然繊維である α -キチンについて詳しく検討することにした。 α -キチンは、深海に住むカニの甲羅から抽出したものをを用いた。市販のカニ甲羅キチンに比べ、赤外線吸収スペクトルは先鋭であり、結晶性がよいことが示唆された。塩酸処理によって比較的良好な微結晶分散懸濁液を調製することができ、これを還元末端染色法に用いることにした。染色は、既報のビオチンヒドラジドを還元的アミノ化により還元末端に安定的に導入した後、ストレプトアビジン金標識物で電子顕微鏡的に可視化する方法でおこなった。染色効率はセルロースや β -キチンの場合に比べてきわめて低かったが、ほとんどの場合、標識は片端のみに認められ、構造解析結果から信じられている α -キチンの逆平行鎖構造と矛盾する結果を得た。さらにセルロースの結晶多系であるセルロース II についても検討した。セルロース II は緊張マーセル化により調製した繊維を加水分解により、微結晶状態としたものを用いた。加水分解後の微結晶残渣がセルロース II 型の結晶であることを電子回折により確認した後、還元末端染色を施した。この場合も染色効率はセルロースや β -キチンの場合に比べてきわめて低かったが、標識が両端に見られる頻度が高く、構造解析結果から信じられている逆平行鎖構造と一致した。 α -キチン、およびセルロース II とともに微結晶が天然のマイクロフィブリルに比べて完成度（結晶化度）が低いことが還元末端の局在密度を低くし、また逆平行の場合は微結晶の末端に平行鎖の半分しか還元末端が存在しないことも、染色効率を下げる要因であると思われる。

天然セルロースの重合が非還元末端で起こることが明らかになったので、ほかのフィブリル状構造物に応用した。マンナンは、カサノリと象牙ヤシ、またキシランは褐藻から抽出したものを出発材料とした。試行錯誤にもかかわらず、還元末端染色に供する良好な試料を得ることができなかった。また以前報告した、 β -キチンの重合方位に関する実験に誤りがあることが判明したので再度詳細に検討した。すなわちバチルス菌の生産する Chitinase A1 が可溶性のオリゴマーの場合を分解する際にはキチンの非還元末端から分解し、 β -キチン（結晶性のフィブリル）に対しては還元末端側から働くことが明らかになった。その結果、 β -キチン結晶内での分子の充填方向やキチン鎖の重合方位についても再考せざるおえなくなった。検討の結果、結晶内における充填様式はパラレルアップ（還元末端が c 軸方位と一致する）であり、合成方位に関しては重合が非還元末端で起こることが示された。一方、糖分解酵素の分子鎖に対する選択性についても可視化による検討を行った。セラチア菌の生産する Chitinase A と B の β -キチンに対する分解挙動の比較をしたところ、ChiA はマイクロフィブリルの還元末端側から分解するのに対して、ChiB は非還元末端側から分解することが明らかになった。近年報告された各酵素の 3D 構造、特に基質結合部位が、活性

中心に対して各酵素では逆方向に配置していることから、基質結合部位が分子鎖の認識に影響を及ぼすことが示唆された。最後にトリコデルマ起源のセルラーゼ結合モジュールの吸着部位についても検討した。セロビオヒドラーゼの結合部位に周期的に配置したトリプトファンなどの芳香族アミノ酸残基がセルロース表面の疎水面（ピラノース平面）を認識するとされている。免疫標識した結合モジュールのセルロース表面への吸着を立体観察した結果、モジュールは矩形断面の対角上にある2角（(100)面）に選択的に結合していることが示され、上述の仮定が正しいことが示された。

1. Imai, T., Watanabe, T., Yui, T., and Sugiyama J. (2002) Directional degradation of β -chitin by chitinase A1 revealed by a novel reducing end labelling technique, *FEBS Lett.* 510, 201-205

2. Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J. and Watanabe, T. (2001), Roles of the Exposed Aromatic Residues in Crystalline Chitin Hydrolysis by Chitinase A from *Serratia marcescens* 2170, *J. Biol. Chem* **276**(44), 41343-41349.

3. Watanabe, T., Ishibashi, A., Ariga, Y., Hashimoto, M. Nikaido, N., Sugiyama, J, Matsumoto, and T., Nonaka, T. (2001) Trp122 and Trp134 on the surface of the catalytic domain are essential for crystalline chitin hydrolysis by *Bacillus circulans* chitinase A1. *FEBS Lett.* **494**, 74-78

4. Wada, M., Heux, L., Isogai, A., Nishiyama, Y., Chanzy, H. and Sugiyama, J. (2001) Improved structural data of cellulose III₁ prepared in supercritical ammonia. *Macromolecules*, **34**, 1237-1243

to, M. Nikaido, N., Sugiyama, J, Matsumoto, and
surface of the catalytic domain are essential for
chitinase A1. *FEBS Lett.* **494**, 74-78
, Chanzy, H. and Sugiyama, J. (2001) Improved
tical ammonia. *Macromolecules*, **34**, 1237-1243