

糖質加水分解酵素のバレル構造: ファミリー42 と 57 のX線結晶構造解析

東京大学大学院農学生命科学研究科 伏信 進矢、日高 将文、今村 博臣*、
*現・JST ERATO ATP システムプロジェクト

Barrel structures of glycosyl hydrolases: crystal structures of family 42 and 57 enzymes

Shinya Fushinobu, Masafumi Hidaka, and Hiromi Imamura*

Department of Biotechnology, The University of Tokyo

*Present address: JST ERATO ATP system project

Saccharides and polysaccharides play a significant role in various cell functions. Structural diversity of carbohydrates and glycoconjugates in nature is a reflection of the corresponding variety in the related enzymes, "Carbohydrate-Active Enzymes". Glycoside hydrolases comprise a widespread group of enzymes that hydrolyze the glycosidic bonds. Currently, they are classified into many glycoside hydrolase (GH) families on the basis of amino acid sequence similarity. Here we present the first crystal structures of GH-42 (β -galactosidase from *Thermus thermophilus* A4), and GH-57 (4- α -glucanotransferase from *Thermococcus litoralis*). They had unique barrel structures, and could provide information on the evolutionary relationships of the $(\alpha/\beta)_n$ barrel enzymes, which comprise a major group in the GH families.

はじめに

糖質は極めて広範囲に渡る生理機能を担っており、植物におけるデンプンやマンナン、動物におけるグリコーゲンのように、エネルギー貯蔵物質として働くもの、植物の細胞壁におけるセルロースやヘミセルロース、昆虫や甲殻類における外殻物質のキチンのように生体の構造材料として働くもの、糖タンパク質・糖脂質のように様々な生理機能において特定のタンパク質や別の糖鎖と結合することにより他の分子や細胞に情報を伝える情報性分子として働くもの、などがある。一口に「糖質」と言っても、構成糖、結合様式、重合度の違いなどにより非常に多くの種類が存在し、それらを基質とする酵素群もそれに応じて多様な基質認識機構を持っている必要がある。糖質関連酵素(およびタンパク質)は Henrissat らによりアミノ酸配列の相同性を元にして分類されており¹⁾、2002年11月の時点で、糖質分解酵素および糖転移酵素(Glycosidases and Transglycosidases)は糖質加水分解酵素 Glycoside Hydrolase (GH) ファミリーとして 86 種類、糖転移酵素(Glycosyltransferases)は GT ファミリーとして 61 種類、多糖リアーゼ(Polysaccharide Lyases)は PL ファミリーとして 12 種類、炭水化物エステラーゼ(Carbohydrate Esterases)は CE ファミリーとして 13 種類、炭水化物結合モジュール(Carbohydrate-Binding Modules)は CBM ファ

ミリーとして 31 種類が登録されている。糖質関連酵素群の中で最も種類の多い GH ファミリーは、現在 49 種類で構造が知られており、同様の機能を持つ酵素群としては最大級の既知構造ファミリー群を形成している。ここでは、最近我々のグループが決定した GH-42 と GH-57 に属する酵素の結晶構造について紹介し、GH ファミリーの中で最も多く存在する(/)_n バレル酵素群の中での位置づけを中心に解説したい。

GH-42 に属する好熱菌由来 β -ガラクトシダーゼとその構造

β -ガラクトシダーゼは、発色基質である 5-プロモ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド(X-gal)や o-ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシド(ONPG)に対する加水分解活性を示すことから、大腸菌由来の酵素 (*lacZ* 遺伝子産物)は発現リポーターとして頻用されている。さらに、ラクトースに対する加水分解活性から、低ラクトース牛乳の生産や、チーズ生産の副産物であるチーズホエイ分解によるシロップ生産など、乳製品の加工にも利用されている。このような工業利用において、耐熱性を有する酵素は、微生物の繁殖できない高温条件下における連続反応が可能であり、衛生的にも経済的にも非常に有用である。好熱菌 *Thermus thermophilus* A4 株由来の β -ガラクトシダーゼ(A4- β -Gal)は高い耐熱性を有し、70 で 20 時間以上安定である²⁾。 β -ガラクトシダーゼは GH-1, 2, 35, 42 に見られるが(大腸菌由来の酵素は GH-2 に属する)、A4- β -Gal は GH-42 に属している。GH-42 は、好熱菌の他に、好塩菌、低温菌などの極限環境に生育する微生物に由来する β -ガラクトシダーゼを含んでおり^{3,4)}、これらの立体構造の解明は、分子進化上の観点からも非常に興味深い。

A4- β -Gal の X 線結晶構造解析は、セレノメチオニン置換体の結晶を用いて MAD 法により行った。MAD データ測定およびガラクトースとの複合体結晶のデータ測定は BL-18B で、native 結晶の高分解能のデータ測定は SPring-8 の BL40B2 で行った。プログラム SOLVE により初期位相を決定し、さらにプログラム DM により位相を改善した後、プログラム ARP/wARP を用いてモデルの構築を行い、native 構造と、ガラクトースを含む複合体構造について、それぞれ分解能 1.6 、2.2 の構造を得た⁵⁾。

A4- β -Gal は結晶中で三量体を形成しており(図1)、これはゲル濾過測定による分子量予測とほぼ一致した。三量体中央の3回軸は結晶学的3回軸と一致しており、各サブユニットは結晶学的に同一の構造である。3つのサブユニットはリング状に配置しており、大きな円錐状のトンネルが三量体の中央に存在しているため、あたかも植木鉢のような形をしていた。このトンネルの直径は、上面で約 35 、底面で約 5 であった。

A4- β -Gal の単量体は、A, B, C の3つのドメインからなっており、ドメイン A は(/)₈バレル(TIMバレル)フォールドをとっていた(図2 a)。ドメイン A と B の間にはクレフトが存在し、抗凍結剤に用いた MPD、バッファーに用いた酢酸、そしてガラクトースが結合していた(図2b)。このクレフトの片方の端は「植木鉢」の上面に抜けており、もう片方

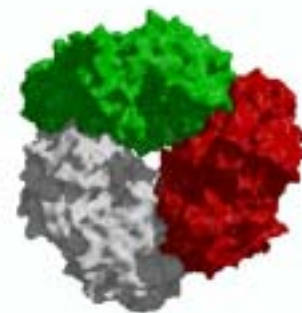


図1 A4- β -Gal の三量体構造

は、隣のサブユニットとの相互作用によって閉じている。(/)₈ バレル構造をとっているドメイン A を DALI サーバーにかけてみたところ、最も構造が似ているタンパク質は、GH-14 に属する *Bacillus cereus* -アミラーゼ(BCB)であることが分かった⁶⁾。どちらの構造も、(/)₈ バレルの 4ヘリックスが長くなっており、その前の 4との間に ヘリックスからなる部分(サブドメイン H)が挿入されているために、「6」の字のような形をしている(図2c)。BCB は(/)₈ バレルドメインの後に starch-binding ドメインが続く

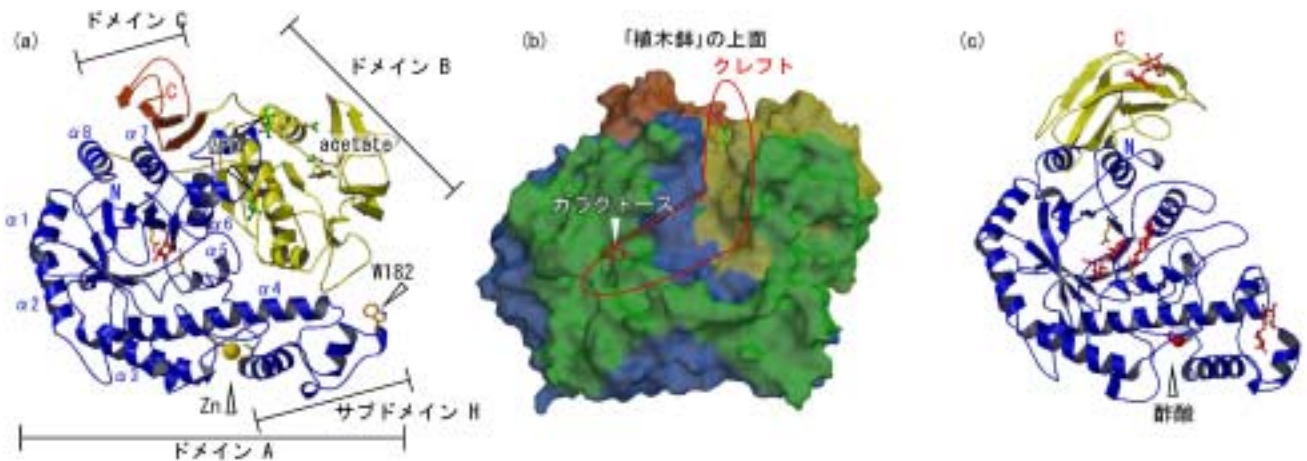


図2 (a) A₄-β-Galの単量体構造のリボンモデルと (b) 分子表面。ドメイン A, B, Cはそれぞれ青、黄、赤で、サブユニット接触表面は緑で表した。ガラクトース(赤)、MPD と酢酸(緑)は ball-and-stick で、亜鉛原子は球で、活性中心残基の Glu141, Glu312 と隣のサブユニットの活性部位を形成する Trp182 はワイヤーフレームモデルで表した。(c) *B. cereus* α-アミラーゼのリボンモデル。触媒ドメインと Starch-binding ドメインはそれぞれ青、黄で、マルトース(赤)は ball-and-stick、酢酸は CPK モデル、活性中心残基の Glu172, Glu367 はワイヤーフレームモデルで表した。

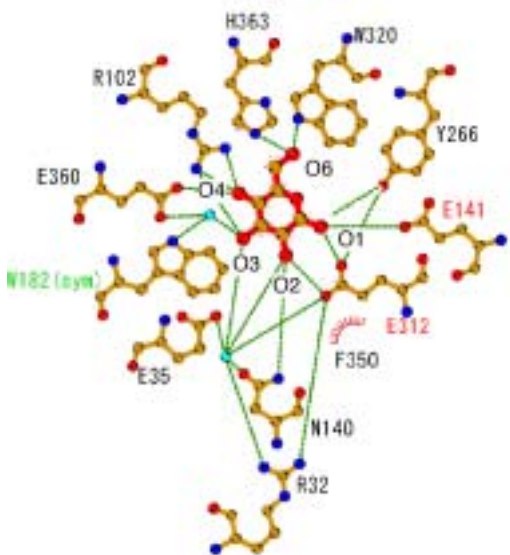


図3 ガラクトース分子を認識している周囲の残基。活性中心残基の Glu141, Glu312 は赤で、隣のサブユニットから来ている Trp182 は緑で表した。

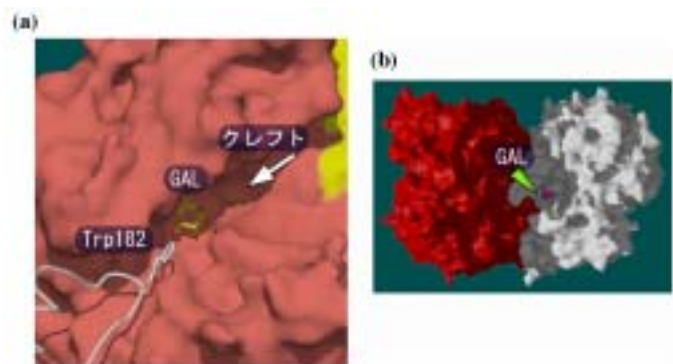


図4 A₄-β-Gal では、隣のサブユニットからクレフトに入り込んでポケット型の活性部位を形成している。

が、A4-β-Gal ではドメイン B、C が続いている。A4-β-Gal のサブドメイン H の根本にあたる部分には、亜鉛が結合していた。この亜鉛は活性には影響を与えず、構造安定化に寄与していると思われる。面白いことに、BCB では同様の部分に酢酸分子が結合していた。

A4-β-Gal のサブユニット間相互作用は緊密であり、三量体形成によって単量体の分子表面積の 19.4% に相当する 4700 Å² が埋もれることになる。それぞれの単量体は隣のサブユニットと 2 つの部位で相互作用していた(図 2b)。そのうち片方は、ドメイン A の(β/α)₈ パレルの C 末端側のループ部分(いわゆる、「パレルの上のふち」に当たる)からなり、もう片方は、ドメイン B の一部分と、ドメイン A のサブドメイン H からなっていた。

ガラクトース分子は、ドメイン A に β-アノマーの状態で結合していた。ガラクトース分子のヒドロキシル基と A4-β-Gal の間には 11 本の水素結合が存在し、さらに、2 分子の水を介した水素結合も存在していた(図 3)。従って、ガラクトース分子の 5 つのヒドロキシル基はいずれも複数の残基の水素結合によって、非常に厳密に認識されている。一方、疎水相互作用は唯一 Phe350 のみが形成していた。興味深いことに、隣のサブユニットの Trp182 が活性部位の形成に加わっており、ガラクトースの O3 ヒドロキシル基を、水を介して認識している。Trp182 はサブドメイン H の先端に位置し、三量体化にともなって、隣のサブユニットの活性部位に入り込んでいる(図 4)。このような相互作用が形成されることにより、A4-β-Gal の基質結合クレフトはポケット状になる。面白いことに、BCB では A4-β-Gal の Trp182 にあたる部分にマルトース分子が結合していた。

糖質加水分解酵素の構造と機能の分類

ここで、GH-42 としては初である A4-β-Gal の構造が GH ファミリーおよび(β/α)₈ パレル酵素の中でどのように位置付けられるのかを考える上で、反応機構、疎水性のアミノ酸の配列、立体構造による分類法について説明する(図 5)。

GH ファミリーの反応機構は、酵素反応における基質と生成物のアノマー構造の関係から、保持型酵素と反転型酵素の 2 種類に大別される。例えば、ラクトースの β-1,4-結合を切断して β-ガラクトピラノースを生成する大腸菌 β-ガラクトシダーゼ(EC-β-Gal)と A4-β-Gal はいずれも保持型酵素である。一方、デンプンの α-1,4 結合を切断して α-アノマーのマルトースを生成する α-アミラーゼは反転型酵素である。ほとんどの GH ファミリーの活性中心は 2 つの酸性残基(グルタミン酸またはアスパラギン酸)であり、これらは保持型酵素では求核性触媒残基と酸/塩基触媒残基として働き、反転型酵素では一般酸触媒残基と一般塩基触媒残基として働く、とされている。また、これら 2 つの活性中心残基のカルボキシル基の距離は、保持型酵素の場合には平均で 5.5 Å、反転型酵素の場合には 6.5 ~ 9.5 Å である⁷⁾。

先述したように、GH ファミリーはアミノ酸配列の相同性から分類されているが、hydrophobic cluster analysis (HCA)法により⁸⁾、そのうちのいくつかはさらに clan と呼ばれるスーパーファミリーに分類されている。HCA 法は疎水性残基のパターンを元にした方法であり、同じ clan に属する GH ファミリーは類似のフォールドを持つと予想される。例えば、最大の clan である clan A には現在 16 もの GH ファミリーが

属しており、これらは全て (/)₈ バレル酵素であると予想されている。実際、これまで構造の解かれた GH-1, 2, 5, 10, 17, 26, 42 は全て (/)₈ バレル酵素であることが明らかとなっている。また、clan A は全て保持型酵素(もしくは保持型と予想されている酵素)であり、反転型酵素である α -アミラーゼの属する GH-14 は clan A には入っていない。

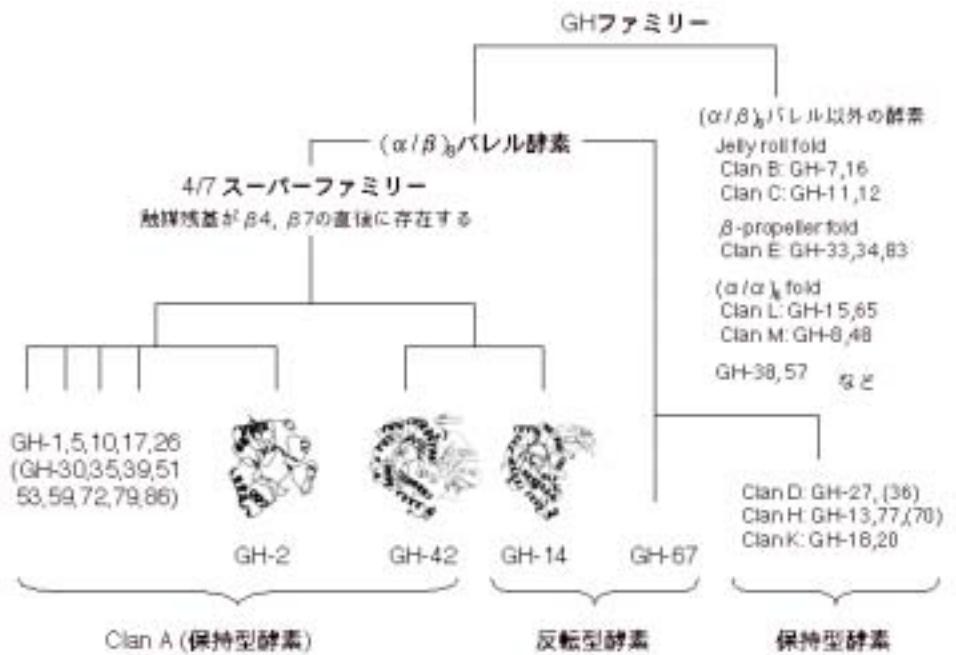


図5 GH ファミリーの構造・機能による分類。構造未知のファミリーは括弧内に示した。

一方、立体構造の解かれた (/)₈ バレル酵素群の分類から、活性中心残基が 4と 7の直後に位置する、等の構造的特徴を持つ酵素群が、4/7 スーパーファミリーとして定義された⁹⁾。この中には構造の分かっている clan A の酵素が全て含まれている。その後、反転型酵素である α -アミラーゼの属する GH-14 も、同様の構造的特徴を持っていることから、4/7 スーパーファミリーに含まれると考えられるようになってきた¹⁰⁾。

他の (/)₈ バレル酵素との比較

A4- α -Gal と EC- α -Gal はどちらも clan A に属し、活性部位は (/)₈ バレルドメインに存在している。活性中心残基はいずれも2つのグルタミン酸(A4- α -Gal では Glu141 と Glu312, EC- α -Gal では Glu461 と Glu537)であり、それぞれ 4、 7 の直後に位置している。これは、4/7 スーパーファミリーに属する酵素群の最も重要な構造的特徴である。2つの活性中心残基はいずれもガラクトースとの複合体構造で C1 原子の近くに存在しており、重ねあわせると、ガラクトースとそれを取り囲む結合部位はきれいに重なり合う(図6)。両者はいずれも保持型酵素であり、2つのグルタミン酸のカルボキシル基の距離は、A4- α -Gal の native 構造で 4.8 Å、ガラクトース複合体構造で 5.2 Å であった。ガラクトースを結合するサブサイトの認識はどちらも非常に厳密であるものの、それを構成する要素は両者で大きく異なり、EC- α -Gal ではナトリウムとマグネシウムイオンが認識に関わっているが、A4- α -Gal では金属イオンに相当する電子密度は見られなかった。一方、ラクトースのグルコース部分が結合するサブサイト+1 の認識はいずれも緩く、A4- α -Gal では 7の後に存在する Trp320 が、EC- α -Gal ではバレルとは別のドメインに存在する Trp999 との疎水相互作用からなる。しかし、ガラクトースのサブサイトで唯一の疎水性相

相互作用を形成する残基である A4- β -Gal の Phe350 と EC- β -Gal の Trp568 はいずれも 8 の直後に存在し、主鎖が *cis*-ペプチド結合になっているという共通点を持つ。この位置(サブサイト-1)に主鎖が *cis*-ペプチド結合を持つトリプトファンまたはフェニルアラニンが存在して、疎水相互作用を形成するという点も、4/7 スーパーファミリーの重要な特徴の一つである。従って、今回新たに構造が得られた A4- β -Gal の属する GH-42 も、EC- β -Gal の属する GH-2 と同様に 4/7 スーパーファミリーに分類される、ということが分かった。

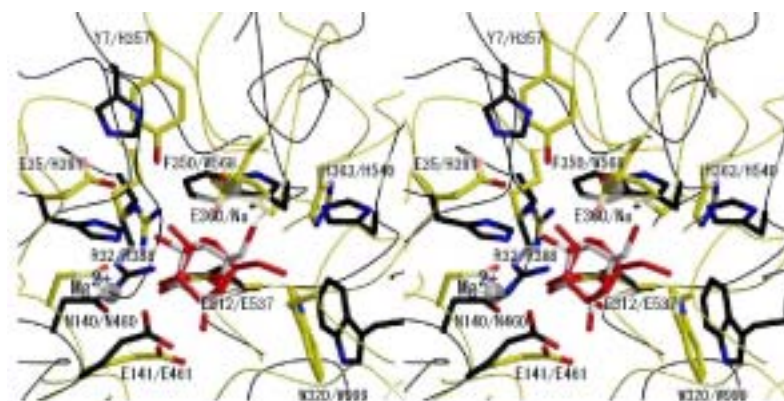


図6 A4- β -GalとEC- β -Galの活性部位の重ね合わせ。A4- β -Galの構造とガラクトース分子はそれぞれ黄と赤で、EC- β -Galの構造、ガラクトース分子、金属イオンはそれぞれ黒、CPK カラー、灰色で表した。残基名と番号は、A4- β -Gal/EC- β -Galの順に表示した。

Juers らは、4/7 スーパーファミリーの進化的な関係について考察を行っている¹⁰⁾。これらの酵素の基質結合部位の形状はクレフト型とポケット型に大別され、基質のサイズに対応している(図7)。例えば、GH-5, 10, 17 はクレフト型であり、GH-1, 2 (EC- β -Gal)はポケット型である。GH-17 に属する酵素はサイズも小さく単量体であり、この中では最も簡単な構造をとっている。GH-17 の基質である長鎖の多糖は(/)₈ バレルに沿って存在するいくつかのサブサイトに結合する。このようなプロトタイプから、基質結合部位の形状を変えることによって基質特異性が変化してきたと考えられる。例えば、GH-1 および GH-14 では、長いループが付加することによりサブサイトの片方の端を埋めて、より小さい基質の結合に適した構造をとっている。また、EC- β -Gal (GH-2)では、新たなドメインの付加により、基質結合部位がクレフト型からポケット型に変化している。一方、A4- β -Gal は単量体ではクレフト型の基質結合部位であるが、三

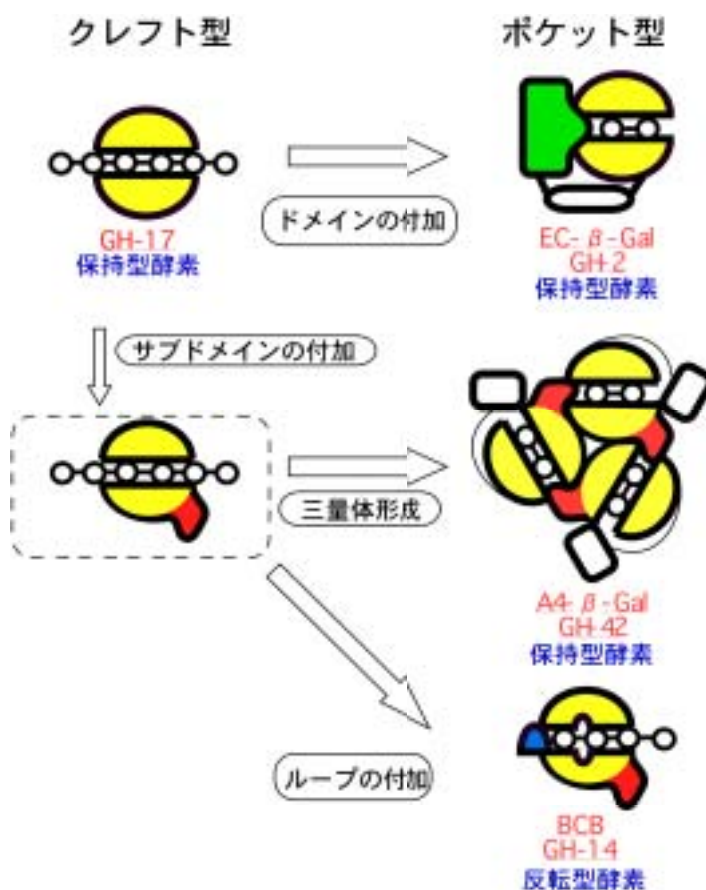


図7 4/7 スーパーファミリーの基質結合部位の形成。

量体を形成することにより、ポケット型となる。バレルドメイン自身がオリゴマー化することにより基質結合部位がポケット状になっているという例は、GH-42 が初めてである。従って、A4-β-Gal と EC-β-Gal ではガラクトースの認識機構が大幅に異なることと、A4-β-Gal と最も立体構造が似ている酵素が BCB であることも考えあわせると、両者は共に 4/7 スーパーファミリーの共通の祖先を持つものの、異なる道筋を辿って、同様の反応を触媒するように収束進化してきたのではないかと思われる。

GH-14 は 4/7 スーパーファミリーの中では特異な位置を占めており、構造的にも多くの特徴的な違いが見受けられる¹¹⁾という事実は非常に興味深い。特に重要な違いは、GH-14 のみが反転型酵素であるという点である。そのために、GH-14 は clan A には含まれていない。すなわち、GH-42 は 4/7 スーパーファミリーの中での保持型酵素と反転型酵素の双方に似た特徴を持つ、ユニークな存在であると言える。

超好熱性古細菌由来 4-β-グルカノトランスフェラーゼとその構造

超好熱性古細菌 *Thermococcus litoralis* 由来の 4-β-グルカノトランスフェラーゼ(TLGT)は GH-57 に属する酵素で、加水分解活性はほとんどないのに対し、糖転移活性を持つ酵素である¹²⁾。TLGT はマルトース以上のマルトオリゴ糖に作用して分子間転位反応を触媒し重合度不均化をもたらす他、アミロースに作用して分子内転位反応を触媒し重合度 16 以上の環状 α-1,4-グルカン(シクロアミロース)を生成する。シクロアミロースは、低重合度(6-8)の環状 α-1,4-グルカンであるシクロデキストリンと同様にその分子空洞内に他の物質を取り込み包接化合物を形成するほか、シクロデキストリンと比較して高い溶解性および低老化性という優れた特徴を有している¹³⁾。最近、シクロアミロースの包接作用¹⁴⁾を利用したタンパク質のリフォールディングキット(Refolding CA kit)がタカラバイオ(株)より発売されており、産業分野におけるさらなる用途開発が期待されている。

TLGT の結晶構造解析は、セレノメチオニン置換体の結晶を用いて MAD 法により行った。MAD データ測定および native 結晶のデータ測定は SPring-8 の BL45XU で、阻害剤であるアカルボースとの複合体結晶のデータ測定は BL-18B で行った。プログラム SOLVE により初期位相を決定し、さらにプログラム DM により位相を改善した後に得られた電子密度マップを元にモデルの構築を行い¹⁵⁾、native 構造とアカルボース複合体構造についていずれも分解能 2.4 Å の構造を得た。

TLGT は結晶中で二量体を形成しており、それぞれ I, II の2つのドメインからなっていた(図8)。N末端側のドメイン I は、(α/β)₇ バレルを中心とした構造を取っており、それにつづいて 10 本のヘリックスからなる領域が存在し、それが(α/β)₇ バレルの C 末端側を覆うようにしてクレフトを形成していた。活性中心の Glu123¹⁶⁾はその中央に位置しており、ここが活性部位クレフトであることを示している。一方、C末端側のドメイン II は、主に β-ストランドからなる α-サンドイッチフォールドをとっていた。また、ドメイン II のループ部分にカルシウムイオンが結合していた。

阻害剤であるアカルボースとの複合体構造とサブサイト構造の詳細、本酵素が持つ糖転移活性についての考察は別の機会に譲るが、ここでは GH-57 としては初の構造である TLGT が持つ、(α/β)₇ バ

レルの特徴について紹介したい。これまで多くのバレル蛋白質が報告されているが、(/) n バレル構造は非常に希である¹⁷⁾。数少ない例の一つは、GH-6 に属するセロビオヒドロラーゼ¹⁸⁾とエンドグルカナーゼ¹⁹⁾である。GH-6 のバレル構造は、中央に一枚のシートが存在し、最初の 1 と最後の 7 で閉じきらずに開いている。一方、TLGT では 3 と 4 の間と、 7 と 8 の間の 2 か所で破れが生じており、GH-6 に比べて、より開いた構造となっている。我々は以前より、TLGT と GH-38 に属するクラス II β -マンノシダーゼの間には、わずかながらアミノ酸配列の相同性が存在し、活性中心の求核性触媒残基が同じ位置に存在することを見いだしていた¹⁵⁾。最近、*Drosophila melanogaster* のゴルジ体型マンノシダーゼ II の立体構造が報告され²⁰⁾、GH-57 と GH-38 の構造の比較が可能となった。その結果、これらの酵素の触媒ドメインの間は、いずれも、ヘリックスに囲まれたシートのコア構造、ヘリックス 3 本のバンドル、4 の直後のループ部分に活性中心の求核性触媒残基を持ち、明らかな構造上の相同性がみられることが分かった(図 9)。ただし、 β -マンノシダーゼ II の触媒ドメインでは、TLGT の 7 と 8 にあたるストランド間に水素結合は見られず、バレル構造は形成していなかった。従って、 β -マンノシダーゼ II の β フォールドは、TLGT の (/) n バレルフォールドがさらに崩れた形になっていると言える。

おわりに

本研究で明らかにされた GH-42、GH-57 はいずれもユニークな(/) n バレル構造を持ち、これまでに明らかにされた多くのバレル構造の進化の道筋を想像する上での、「ミッシング・リンク(失われた

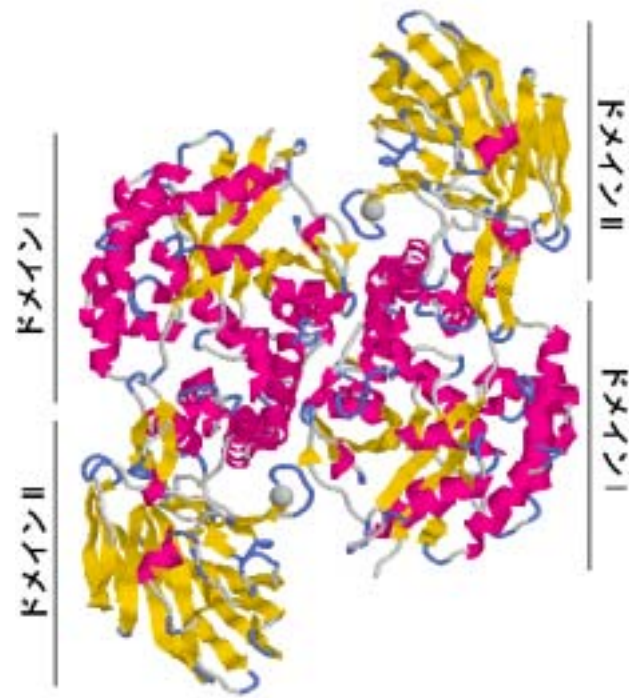


図 8 TLGT の全体構造。カルシウムイオンは灰色の球で表した。

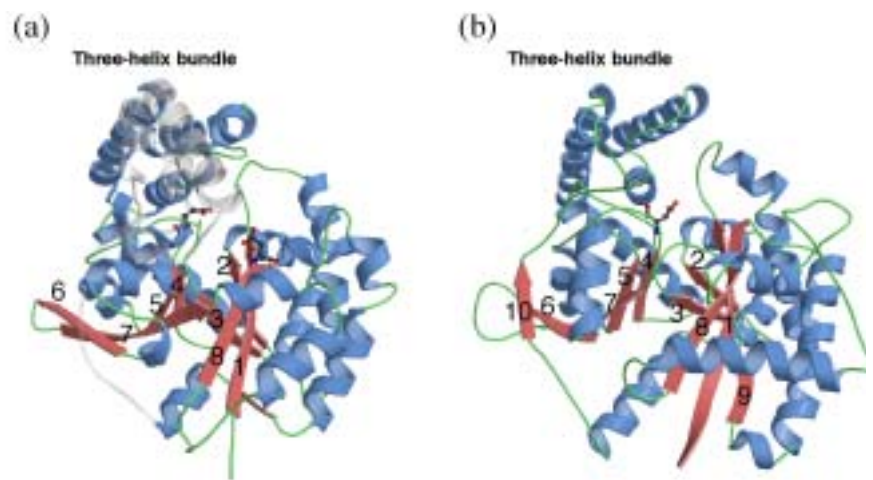


図 9 (a) TLGT のドメイン I と (b) *D. melanogaster* β -マンノシダーゼ II の触媒ドメイン。

環)」にあたる存在であった。clan A, H, K は(/)₈ バレルフォールドを持つと予想されており、これだけでも GH ファミリーの中で約4分の1を占めている。また、GH-57, 38 のようにバレルが崩れているものも含めれば、今後もさらに多くの(/)_n バレル構造が見いだされるであろう。最近、EU 諸国で、糖質関連酵素に関する構造ゲノミクスである、"Glycogenomics"がスタートした²¹⁾。これからは、極めて広範囲な生理機能をもつ多種多様な糖質を触媒・認識する蛋白質群の構造解析がさらに加速していくことが期待される。

謝辞

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科・酵素学研究室で行われたものであり、同研究室の若木高善助教授、祥雲弘文教授のご指導とご支援の元で行われました。また、本研究は初期の段階から現在に至るまで同研究室の松沢洋・元教授(現・青森大学工学部生物工学科教授)のご指導の元で行われました。A4-β-Gal の研究にはよつ葉乳業(株)リサーチセンターの大津奈穂美先生と元島英雅先生に、A4-β-Gal の構造解析には JASRI の三浦圭子先生に、TLGT の構造解析には理研播磨研究所の山本雅貴先生と東工大院生命理工学研究科の熊坂崇先生に大変お世話になりました。バレル構造の分類については産総研生命情報科学研究センターの長野希美先生に多くの示唆を頂きました。高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・放射光研究施設タンパク質結晶ビームラインスタッフの皆様と坂部構造生物プロジェクトのご協力とご支援に深く感謝いたします。その他、本研究に関わってご指導、ご支援を賜りました多くのみなさまに感謝致します。

参考文献

1. Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server at <http://afmb.cnrs-mrs.fr/cazy/CAZY/index.html>
2. Ohtsu, N., Motoshima, H., Goto, K., Tsukasaki, F., and Matsuzawa, H. (1998) *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 1539-45
3. Coombs, J. M., and Brenchley, J. E. (1999) *Appl Environ Microbiol* **65**, 5443-50
4. Holmes, M. L., and Dyall-Smith, M. L. (2000) *Mol Microbiol* **36**, 114-22
5. Hidaka, M., Fushinobu, S., Ohtsu, N., Motoshima, H., Matsuzawa, H., Shoun, H., and Wakagi, T. (2002) *J Mol Biol* **322**, 79-91
6. Mikami, B., Adachi, M., Kage, T., Sarikaya, E., Nanmori, T., Shinke, R., and Utsumi, S. (1999) *Biochemistry* **38**, 7050-61
7. McCarter, J. D., and Withers, S. G. (1994) *Curr Opin Struct Biol* **4**, 885-92
8. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1996) *Biochem J* **316**, 695-6
9. Jenkins, J., Lo Leggio, L., Harris, G., and Pickersgill, R. (1995) *FEBS Lett* **362**, 281-5

10. Juers, D. H., Huber, R. E., and Matthews, B. W. (1999) *Protein Sci* **8**, 122-36
11. Nagano, N., Porter, C. T., and Thornton, J. M. (2001) *Protein Eng* **14**, 845-55
12. Jeon, B. S., Taguchi, H., Sakai, H., Ohshima, T., Wakagi, T., and Matsuzawa, H. (1997) *Eur J Biochem* **248**, 171-8
13. Takaha, T., and Smith, S. M. (1999) *Biotechnol Genet Eng Rev* **16**, 257-80
14. Machida, S., Ogawa, S., Xiaohua, S., Takaha, T., Fujii, K., and Hayashi, K. (2000) *FEBS Lett* **486**, 131-5
15. 今村博臣、伏信進矢、山本雅貴、熊坂崇、若木高善、松沢洋 (2001) *応用糖質科学* **48**, 171-175
16. Imamura, H., Fushinobu, S., Jeon, B. S., Wakagi, T., and Matsuzawa, H. (2001) *Biochemistry* **40**, 12400-6
17. Nagano, N., Hutchinson, E. G., and Thornton, J. M. (1999) *Protein Sci* **8**, 2072-84.
18. Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K., and Jones, T. A. (1990) *Science* **249**, 380-6
19. Spezio, M., Wilson, D. B., and Karplus, P. A. (1993) *Biochemistry* **32**, 9906-16
20. van den Elsen, J. M., Kuntz, D. A., and Rose, D. R. (2001) *Embo J* **20**, 3008-17
21. Davies, G. J., and Henrissat, B. (2002) *Biochem Soc Trans* **30**, 291-7.