

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82648

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06898

研究課題名(和文)セルロース分解酵素のモーター運動に寄与する構造要素の解明

研究課題名(英文)Analysis of structural element of cellulases for processive movement

研究代表者

中村 彰彦 (NAKAMURA, Akihiko)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：20752968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：カビ由来(TrCel6A)とバクテリア由来(CfCel6B)セルラーゼは共に触媒ドメインと吸着ドメインがリンカー領域で繋がった構造をしている。しかしそれぞれのドメインは異なった構造をしている。そこで2つの酵素及び各ドメインの結晶性セルロースに対する吸着速度定数(kon)、脱着速度定数(koff)及び運動速度(ktr)を一分子蛍光観察により比較した。TrCel6Aでは糖鎖修飾されたリンカー領域がkon、吸着ドメインが疎水性面への吸着特異性を生み出す為に重要であった。対してCfCel6Bでは吸着ドメインのみでkonと吸着特異性を生み出していた。

研究成果の概要(英文)：Cellulase from fungi (TrCel6A) and bacteria (CfCel6B) is constructed by catalytic domain, binding domain and linker region, connecting the two domains. But each domain has different structure between the two enzymes. Therefore the role of domains on cellulose binding, dissociation and hydrolysis were compared between TrCel6A and CfCel6B by single fluorescence observation. For TrCel6A, glycosylated linker region and binding domain were important for binding and specificity for binding surface respectively. In contrast, binding domain of CfCel6B showed high binding rate and specificity. Additionally, catalytic domain of CfCel6B showed processive movement on cellulose but that of TrCel6A was not observed. This difference might be caused by the difference of length of loop region covering the catalytic site.

研究分野：酵素学

キーワード：セルラーゼ 一分子観察 キネティクス セルロース 糖鎖修飾

## 1. 研究開始当初の背景

再生可能エネルギー物質及び石油代替化学物質を生産する原料の供給法として植物の効率的な変換手法の開発は重要である (Ragauskas, A. J., *Science*, 2006)。しかし植物体の主要構成成分であるセルロースは  $\beta$ -1,4 結合で直鎖状に結合したグルコース残基が水素結合及び疎水性相互作用により強固にパッキングした結晶構造を取っている (Nishiyama, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003)。その為利用においてセルロースの分解がボトルネックとなっている。

一方、自然界においてカビ、キノコやバクテリアなどの微生物はセルラーゼと呼ばれる加水分解酵素群を菌体外に生産しセルロースを分解して生育する。これらのセルラーゼはそのアミノ酸配列に基づき糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase: GH) ファミリーの一部に分類されている。その中でそれぞれ還元末端と非還元末端から分解する GH7 のセルラーゼ (Cel7) 及び GH6 のセルラーゼ (Cel6) は特に結晶性セルロースの分解活性が高い。この 2 つの酵素はトンネル状の基質結合サイトを持ち (図 1)、末端から連続的に分解する (プロセッシブ) 反応を行うと考えられてきた。高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) によりカビ *Trichoderma reesei* 由来の TrCel7A 分子がセルロース表面上を連続的に運動している様子が観測された (Igarashi, K., *Science*, 2011)。その一方で TrCel6A 分子の明確な運動は観測されず、プロセッシブな酵素ではない可能性が示された。しかしこの結果は分解反応後のセルロース繊維を電子顕微鏡観察した際の端から削れた様な形状 (Chanzy, H., *FEBS J.*, 1985.) やプロセッシブ反応が結晶性セルロースの効率的な分解に重要である結果 (Nakamura, A., *J. Am. Chem. Soc.*, 2014) と反しており、TrCel6A

の反応メカニズム及び結晶性セルロース分解にどのような酵素の性質が必要であるのか疑問が深まる結果となった。高速 AFM で TrCel6A 分子の運動が観測できなかった理由の一つとしては、探針で走査する際に酵素分子にかかる力の影響が考えられる。そこで検証の為に TrCel6A の酵素分子に力をかけずに一分子の運動を観測する方法が必要であった。

## 2. 研究の目的

植物の細胞壁を温和な条件下で有用化学物質に変換する為に、カビやバクテリアが生産するセルロース加水分解酵素群の反応機構を理解する事は重要である。酵素群の中で特に 2 種 (Cel6 及び Cel7) の分解効率が高く、これらのトンネル状構造を持つ酵素はセルロースを末端から連続的に分解するとされてきた。TrCel7 分子については高速原子間力顕微鏡によりセルロース上での連続運動が観測されたが、TrCel6 の明確な運動は観測できていない。そこでまず酵素に力をかけずに蛍光一分子観察する事で TrCel6 の運動性を検証する。加えて TrCel6 よりもトンネル構造が長いと予測されるバクテリア *Cellulomonas fimi* 由来 CfCel6B の比較をする事でモーター運動に寄与している構造的要素を明らかにする。更に CfCel6B の結晶構造解析と生化学的な分解活性の測定を行い、一分子観察結果と合わせて二つの酵素を比較することで検証を行う。加えてこの 2 つの Cel6 では吸着ドメイン及び GH6 ドメインと吸着ドメインを繋ぐリンカー領域の構成も異なっている。特に TrCel6 のリンカー領域は糖鎖修飾された天然変性構造と推測されるのに対し、CfCel6B のリンカー領域は FN3 ドメインが 3 つ繋がった構造をしている。そこでこれらの領域がセルロースの分解性及び吸脱着特性にどのような役割を担っているのか明らかにする。

また当研究は農学で古くから研究されてきたセルラーゼを蛍光一分子観察という生物物理学的手法により解析する点で二つの分野の融合研究と言える。セルラーゼの分野から見た場合、分子の動きを直接観測した例は高速 AFM のみであり、特に探針で走査する際に酵素分子にかかる力の影響などについて他の手法を用いた検証が出来ていない状態である。加えてセルラーゼはセルロースの表面という固液界面で反応する為、実際に働いている酵素の濃度を定義する事が難しい。そのため蛍光一分子観察によりセルラーゼ分子の動きを解析する事は反応メカニズムの解析手法の拡張として重要性が高い。また生物物理学の観点から見た場合にも、セルラーゼは ATP などの高エネルギー物質を駆動力源とせず自発的にレールの加水分解と運動を行う省エネルギー型モータータンパク質であると言える。そのメカニズムを解析する事で他のモータータンパク質のデザイ

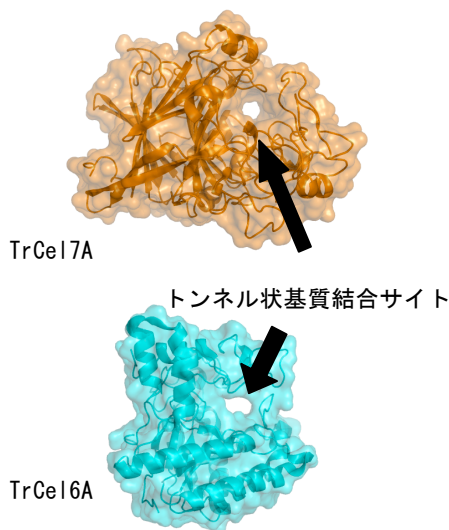


図 1 TrCel7A と TrCel6A のトンネル状構造

ンを行うための知見を得る事をもう一つの目標とする。

### 3. 研究の方法

TrCel6A 及び CfCel6B の表面にフリーのシステイン残基を導入し、位置特異的に蛍光色素 Cy3 でのラベルを行った。その際には酵素の活性中心と反対側でかつ溶媒に露出している残基を対称とした。複数の候補を作成し、ラベル率が高く、また野生型の酵素と比較して生化学的活性が遜色ない TrCel6A S386C 及び CfCel6B V43C を実際の測定用酵素とした。加えて各ドメインのセルロース分解活性及びセルロースに対する吸脱着特性への寄与を調べる為に、触媒ドメインのみ、リンカー領域と吸着ドメイン及び吸着ドメインのみの変異体も作成した。これらの変異体についてもフリーシステイン残基を導入し Cy3 でのラベルを行った。

一分子観察実験は全反射蛍光顕微鏡を用いて行った。Cy3 励起用の光源には 532 nm のレーザーを用い、回折拡散板を用いた輪帯照明法を適用した。これにより擬似的に偏光を解消し、色素の向きによる励起効率の違いを低減した。それにより正確な輝点のトラッキング及び吸脱着時定数の解析ができる様に注意を払った。また測定に用いた酢酸バッファー pH 5.0 の環境下では His タグがガラスに非特異吸着する事が判明したため、酵素と His タグの間に FactorXa 認識サイトを挿入し、精製後に His タグの除去を行った。吸着速度定数 ( $k_{on}$ ) は単位セルロース長さ ( $\mu\text{m}$ ) 辺りに毎秒いくつの分子が結合するかを酵素濃度で規格化した値 ( $\mu\text{m}\cdot\text{M}\cdot\text{s}$ ) と定義した。以前の研究で高速 AFM を用いてセルロース結晶を観察した所、結晶同士が数本凝集したものが存在している事が分かっている。ただし  $k_{on}$  の定義にはセルロース結晶の太さについてのパラメーターを含んでいない。これは光学顕微鏡の分解能では太さの区別ができない為である。そこで  $k_{on}$  の分布を作成し、複数観測されたピークのうちで最小となるものを単位結晶辺りの  $k_{on}$  として求めた。解離速度定数 ( $k_{off}$ ) はセルロース上に滞在している時間を測定し、その減衰速度 ( $1/s$ ) を解析する事で決定した。その際には 2 つの指数関数的減衰の重ね合わせとして解析を行った。それぞれの成分の割合は回帰曲線の式から算出される面積の比から推定した。また各フレームで輝点の重心位置を計算し繋ぎ合わせる事で運動の追跡を行った。運動を始めたフレームと停止したフレームの差から運動時間と運動距離を算出し運動速度 ( $k_{tr}$ ) を決定した。

CfCel6B 触媒ドメインの結晶構造解析では、触媒ドメインのみの酵素を作成した。His タグを用いたアフィニティ精製の後に陰イオン交換カラムとゲル濾過カラムを用いて精製し 100 mM 酢酸バッファー pH 5.0 の環境下で 21% PEG3350, 10 mM NaCl を沈澱

剤として用いて 20°C で結晶化した。得られた結晶を用いて高エネルギー加速器研究機構 フォトンファクトリー BL-5A において X 線回折像の測定を行った。高熱性バクテリア *Thermobifida fusca* 由来 TfCel6B (PDB ID: 4B4H) を鋳型として作成した CfCel6B 触媒ドメインの予測構造を用いて、分子置換法を適用して位相の決定を行った。更に Coot と Phenix refine を用いて構造精密化を行い、構造モデルを作成した。TrCel6A の構造と CfCel6B の構造を比較し一分子観察実験の結果と合わせて考察を行った。

### 4. 研究成果

TrCel6A の天然型酵素 (WT) と TrCel6A S386C (Intact) の結晶性セルロースに対する活性を比較した所、それぞれ  $k_{cat}$  値が 3.1 /s と 2.8 /s、Km 値が 0.26% と 0.27% であった。この事からフリーシステイン残基の導入による活性の阻害は無いと分かった。まず Intact、触媒ドメインのみ (CD)、リンカー及び吸着ドメイン (Linker-CBM) 及び吸着ドメインのみ (CBM) についてセルロースへの吸着特異性を調べた所、いずれの酵素もガラスへの非特異吸着が無くセルロースに特異的に吸着する事がわかった。そこでこれらの酵素について吸着速度定数  $k_{on}$  を比較した。Intact は  $7.5 \times 10^8 \pm 0.27 \times 10^8$  と  $16 \times 10^8 \pm 0.24 \times 10^8$  ( $\mu\text{m}\cdot\text{M}\cdot\text{s}$ ) のピークを示したため、単結晶辺りの  $k_{on}$  は  $7.5 \times 10^8 \pm 0.27 \times 10^8$  と決定した。他の酵素についても同様の解析を行い単結晶辺りの  $k_{on}$  を求めた。すると Linker-CBM は  $3.9 \times 10^8 \pm 0.45 \times 10^8$  と Intact 半分程度であったのに対し、CD は  $5.2 \times 10^7 \pm 0.42 \times 10^7$ 、そして CBM は  $5.6 \times 10^7 \pm 0.23 \times 10^7$  と Intact の 10 分の 1 程度であった。この事からリンカー領域がセルロースへの吸着速度に重要なことが明らかとなった。次に脱着速度定数  $k_{off}$  を比較した。全ての酵素の吸着時間の分布は 2 つの指数関数的減衰の重ね合わせで良く回帰できた。Intact については遅い解離速度  $0.10 \pm 0.02$  (/sec) が 30% と速い解離  $1.1 \pm 0.03$  (/sec) が 70% であった。他の酵素についてもほぼ同様の傾向を示し CD は  $1.5 \pm 0.03$  (72%) と  $0.16 \pm 0.02$  (28%)、Linker-CBM は  $2.6 \pm 0.05$  (65%) と  $0.14 \pm 0.02$  (35%)、そして CBM は  $2.3 \pm 0.05$  (70%) と  $0.083 \pm 0.02$  (30%) であった。 $k_{on}$  及び  $k_{off}$  の値から解離定数  $K_d$  の計算を行った。 $k_{off}$  が 2 種類観測された事から少なくとも 2 種類の吸着状態があると推測された。そこで  $k_{off}$  の割合の値で  $k_{on}$  を分割し、 $k_{off}/k_{on}$  の比を取る事で遅い解離と速い解離の  $K_d$  ( $\text{M}\cdot\mu\text{m}$ ) を算出した。すると Intact では強い結合の  $K_d$  が  $0.044 \times 10^{-8}$  で弱い結合は  $0.21 \times 10^{-8}$  であった。同様にそれぞれ CD では  $1.1 \times 10^{-8}$  と  $4.0 \times 10^{-8}$ 、CBM-Linker では  $0.1 \times 10^{-8}$  と  $1.0 \times 10^{-8}$ 、そして CBM では  $0.49 \times 10^{-8}$  と  $5.9 \times 10^{-8}$  であった。2 つの結合の  $K_d$  を比較すると、CBM

は強い結合へのアフィニティが非常に高く、CD では 2 つに殆ど差がない事が分かった。また CBM と CBM-Linker を比較すると CBM-Linker では二つの結合のアフィニティの差が小さくなっていて、即ち Linker はどちらのアフィニティも上昇させるが、特異性は低いことが分かった。CBM の構造は疎水性のアミノ酸が並び平面を作っている事が知られており、セルロースの疎水性面に特異的に吸着する事が報告されている (Palonen, H., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999)。そしてそれらの残基はセルラーゼの活性に重要であると報告されている。またリンカー領域は糖鎖で修飾されており、分子動力学シミュレーションではセルロースの親水面とも相互作用することが示されている。

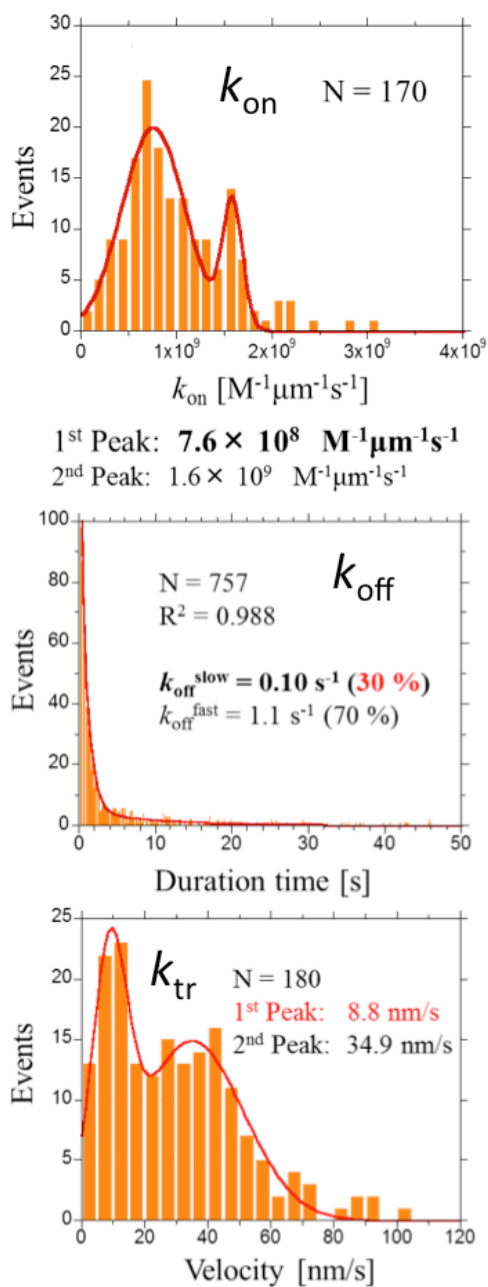


図 2 TrCel6A の  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ,  $k_{tr}$  解析結果

これらの結果から強い結合は疎水性面への吸着、弱い結合は親水性面への吸着であると推定された。つまり TrCel6A は糖鎖修飾されたリンカー領域でセルロース表面に吸着し、CBM で疎水性面への特異性を出していることが分かった。セルロース結晶はセルロース鎖が強固にパッキングしており、親水性面の分子鎖は疎水面を他の分子鎖に挟まっているため一本の分子鎖を取り出す事が難しい。そこでセルラーゼは疎水性面から分解することが分かっており (Liu, Y.-S., *J. Biol. Chem.*, 2011) CBM は CD を疎水性面に運び分解開始をサポートする役割も有ると推定される。

次に Intact、CD、CBM-Linker 及び不活性化変異体 (TrCel6A D221A: Inactive) の運動を比較した。Intact では  $8.8 \pm 5.5$  (nm/sec) と  $34.9 \pm 16.3$  (nm/sec) の 2 種類の運動が確認されたが、他の酵素ではそれぞれ CD で  $39.2 \pm 28.3$  (nm/sec)、CBM-Linker で  $42.6 \pm 28.0$  (nm/sec) として Inactive で  $35.5 \pm 17.4$  (nm/sec) と速い運動しか観測されなかった。この事から Intact の遅い運動はセルロース鎖の加水分解を伴ったプロセッシブ運動であると考えられた。また Intact とそれ以外の酵素の運動時間を比較すると、Intact の遅い運動のみ 10 秒以上の運動時間を示した。そこで 10 秒以上継続している遅い運動について運動時間の分布を作成し、運動持続時間の時定数を求めた所 7.7 sec であった。よって TrCel6A の連続反応回数 (プロセッシビティ) は  $68 \pm 42$  と推定できた。

CfCel6B の解析についても TrCel6A と同様に Intact、CD、CBD-Linker 及び CBM について結合速度定数と解離速度定数を求め、Intact、CD、CBD-Linker 及び Inactive について運動速度を求めた。まず結合速度定数  $k_{on}$  は Intact が  $4.3 \times 10^8 \pm 0.13 \times 10^8$  ( $\mu m \cdot M \cdot s$ )、CD が  $0.17 \times 10^8 \pm 0.06 \times 10^8$ 、CBM-Linker が  $2.0 \times 10^8 \pm 0.04 \times 10^8$ 、そして CBM が  $1.5 \times 10^8 \pm 0.05 \times 10^8$  であ

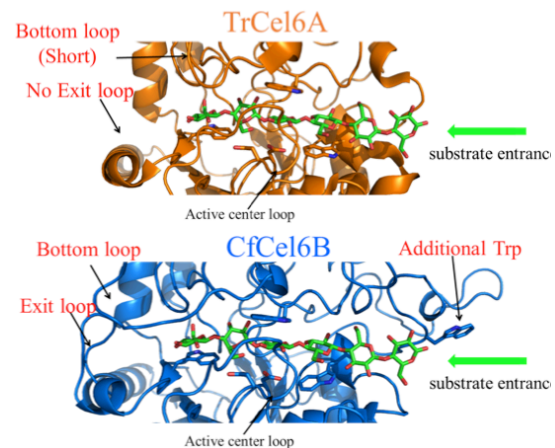


図 3 CfCel6B と TrCel6A の CD の比較

った。TrCel6A とは異なり、CfCel6B は CBM のみで Intact の 35% の  $k_{on}$  を示しており、CBM-Linker でも 47% である。この事から CfCel6B は CBM のみで初期吸着を担っていると考えられた。次に解離速度定数  $k_{off}/(sec)$  は Intact が  $0.086 \pm 0.007$  (67%) と  $0.85 \pm 0.05$  (33%)、CD が  $0.13 \pm 0.05$  (19%) と  $1.7 \pm 0.05$  (81%)、CBD-Linker が  $0.29 \pm 0.01$  (74%) と  $2.7 \pm 0.1$  (26%) そして CBM が  $0.47 \pm 0.02$  (70%) と  $3.1 \pm 0.1$  (30%) であった。TrCel6A では全ての酵素で速い脱着の成分が 70% 程度であったのに対し、CfCel6B の Intact、CBM-Linker 及び CBM では遅い脱着の成分が 70% 程度観測された。それぞれの解離定数  $K_d$  を算出すると Intact では強い結合の  $K_d$  が  $0.030 \times 10^{-8}$  で弱い結合は  $0.60 \times 10^{-8}$  であった。同様にそれぞれ CD では  $4.0 \times 10^{-8}$  と  $12 \times 10^{-8}$ 、CBM-Linker では  $0.20 \times 10^{-8}$  と  $5.2 \times 10^{-8}$  そして CBM では  $0.45 \times 10^{-8}$  と  $6.9 \times 10^{-8}$  であった。TrCel6A 及び CfCel6B のどちらも CD だけではセルロースへのアフィニティ及び 2 種の結合の特異性が非常に低い事が分かった。また TrCel6A 及び CfCel6B の Intact では疎水面に対するアフィニティが殆ど同じであった。これは  $k_{on}$  の違い (TrCel6A  $7.5 \times 10^8$ , CfCel6B  $4.3 \times 10^8$ ) が  $k_{off}$  の割合 (TrCel6A 30%, CfCel6B 67%) によって相殺されたためである。

CfCel6B についても Intact、CD、CBM-Linker 及び Inactive の運動速度を比較した。Intact では  $11.6 \pm 4.2$  (nm/sec) と  $25.3 \pm 17.5$  (nm/sec) の 2 種類の運動が確認された。CBM-Linker は  $39.8 \pm 24.7$  (nm/sec) そして Inactive で  $37.9 \pm 24.0$  (nm/sec) と速い運動しか観測されなかった。しかし CD では  $16.8 \pm 6.9$  (nm/sec) と  $40.2 \pm 8.7$  (nm/sec) の 2 種類の運動が観測された。X 線構造解析により得られた CfCel6B CD の構造を TrCel6A の CD と比較すると 3 カ所大きな違いがあった。まず CfCel6B ではトンネル構造の入り口にループ構造が存在し、そこにトリプトファン残基が配置されている。これは他の基質結合サイトの延長線上に有り、CfCel6B は TrCel6A よりも長い基質結合サイトを持っていると推測される。またトンネル構造を形成しているループも、CfCel6B の物の方が TrCel6A よりも長かった。加えて CfCel6B はトンネルの出口にも追加のループ構造を持っており、TrCel6A よりもセルロース鎖を離し難いと考えられる。この事から TrCel6A では CD 単独で運動する分子はすぐに解離してしまい見つける事ができなかったのに対して、CfCel6B では CD 単独で運動する分子が観測できたと考えられる。

10 秒よりも長く運動した分子について運動時間の分布を取り、時定数を解析した所 CfCel6B の運動時間は 4.8 sec と推定された。運動速度と合わせてプロセッシビティを算出すると  $52 \pm$  であり、TrCel6A よりも短

いと推定された。この結果は CD の構造ひかくの結果とは反対である。しかし分子動力学シミュレーションでは TrCel6A の糖鎖修飾されたリンカー領域がセルロース表面に吸着して安定化する事が示されている (Payne, C. 2013, PNAS)。即ち TrCel6A ではリンカー領域を用いてセルロース表面と相互作用し、プロセッシビティを高めている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Akihiko Nakamura, Tomoyuki Tasaki, Daiki Ishiwata, Mayuko Yamamoto, Yasuko Okuni, Akasit Visootsat, Morice Maximilien, Hiroyuki Noji, Taku Uchiyama, Masahiro Samejima, Kiyohiko Igarashi, and Ryota Iino, Single-molecule Imaging Analysis of Binding, Processive Movement, and Dissociation of Cellobiohydrolase Trichoderma reesei Cel6A and Its Domains on Crystalline Cellulose, Journal of Biological Chemistry, 査読有, Vol. 291, No.41, 2016, 22404-22413

[学会発表] (計 1 件)

① Daiki Ishiwata, Akihiko Nakamura, Tomoyuki Tasaki, Akasit Visootsat, Maximilien Morice and Ryota Iino, Single-molecule fluorescence analysis of binding, dissociation, and processive movement of bacterial and fungal cellobiohydrolases, 第 54 回日本生物物理学会, 2016 年 11 月 25 日-27 日, つくば国際会議場、茨城県つくば市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 彰彦 (NAKAMURA, Akihiko)

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号: 20752968

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )