

令和元年6月11日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07687

研究課題名(和文)担子菌のファミリー131に属する二種類のタンパク質の構造と機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of structure and function of two basidiomycete proteins belonging to glycoside hydrolase family 131

研究代表者

殿塚 隆史 (Tonozuka, Takashi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50285194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、担子菌 *Coprinopsis cinerea* の糖質加水分解酵素ファミリー(GH)131に属する二種類の酵素、CcGH131AおよびCcGH131Bの機能の探索を行った。CcGH131Bの触媒残基を改変した酵素の結晶を作製した。次に、得られた結晶をさまざまな糖を含む溶液に浸した後、X線結晶構造解析を行った。その結果、セロビオースとの複合体の立体構造を決定した。また、CcGH131Aと各種糖との反応の解析をおこない、キシランに結合することを明らかにした。本研究の結果、GH131に属する酵素は広くセルロース系バイオマスに対し作用し、その機能は多様であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、化石燃料の使用に伴う地球温暖化により、気候変動が自然や社会に対して深刻な影響を及ぼすことが懸念されており、再生可能エネルギーに関する技術の開発が囑望されている。本研究はセルロース系バイオマスの効率的な利用を目標とし、セルロース製剤によって発現が誘導される機能未知酵素がバイオマス分解に果たす役割の一端を示した。

研究成果の概要(英文)：This study focuses on the analysis of the function of two enzymes belonging to glycoside hydrolase family (GH) 131 from a basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, CcGH131A and CcGH131B. A catalytic residue of CcGH131B was modified and the resulted variant was crystallized. The crystals were then soaked in various solutions containing sugars, and the structures were determined using the X-ray crystallographic analysis. The results indicated that cellobiose was found in the structure of CcGH131B. The analysis of CcGH131A was also carried out, indicating that CcGH131A acted on xylan. These findings suggest that the GH131 enzymes widely acted on cellulosic biomass with divergent functions.

研究分野：酵素化学

キーワード：セルロース バイオマス キシラン 担子菌 糖質加水分解酵素

## 1. 研究開始当初の背景

近年、化石燃料の使用に伴う地球温暖化により、気候変動が自然や社会に対して深刻な影響を起すことが懸念されており、再生可能エネルギーに関する技術の開発が囑望されている。セルロース系バイオマスは地球上に豊富に存在し、その利用は食糧生産と競合しないため理想的な再生可能エネルギーの一つであると言える。しかしながら、セルロース系バイオマスを原料としたエネルギーの利用はあまり普及していない。その理由として、セルロース系バイオマスを効率的に分解する方法が見つかっていないことが挙げられる。

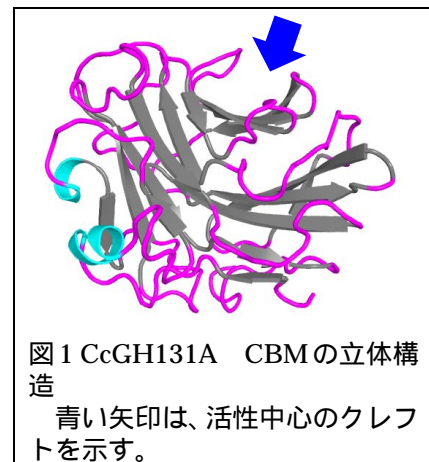
セルロース系バイオマスは、セルラーゼを始めとする各種酵素により分解を行うことができるものの、セルロース系バイオマスの構造は大変複雑で、セルロースの他にいわゆるヘミセルロースと総称される多種多様な糖、およびリグニンと呼ばれる難分解性の成分から構成されており、酵素による分解を受けにくい構造となっている。しかしながら自然界には、子囊菌や担子菌（いわゆるカビやキノコ）のような、セルロース系バイオマスを効率よく分解し栄養源として生育する生物が存在する。このような生物のセルロース系バイオマス分解機構は完全には解明されておらず、研究の進展が期待されている。

## 2. 研究の目的

我々のグループでは、担子菌 *Coprinopsis cinerea* (和名ウシグソヒトヨタケ) を材料とした研究を行っている。*C. cinerea* は子実体の形成が速いことから担子菌のモデル生物として知られており、全ゲノム解析は2010年に完了している( )。本研究では、*C. cinerea* の糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 131 に属する CC1G\_07166 および CC1G\_15039 と番号づけられた二つの酵素に着目し、それぞれ CcGH131A および CcGH131B と命名して研究を進めている。

GH131 に属する酵素の研究は、最初の子囊菌 *Neurospora crassa* (アカパンカビ) において NCU09764 と番号付けられたタンパク質が、セルロース製剤の一種であるアビセルで生産が誘導される機能未知タンパク質として同定されたことから始まった( )。その後子囊菌 *Podospora anserina* において、タンパク質 PaGluc131A が、-1,3-、-1,4-、-1,6-グルコシド結合を幅広く分解する活性があると報告され、これら一連のタンパク質は、糖質に作用する酵素のデータベースである CAZy において GH131 という分類がなされた( )。現在 CAZy データベースにおいて 50 以上の酵素が GH131 に分類されているが、全てセルロース系バイオマスを分解する子囊菌や担子菌由来のものである。このことから、セルロース系バイオマスの分解に重要な役割を担っている酵素であると考えられる。

これまで、我々のグループでは CcGH131A の触媒ドメイン (CcGH131A CBM) について大腸菌による発現系を構築し、世界で初めて GH131 酵素の立体構造を明らかにした( )。通常の酵素は、「基質と酵素は鍵と鍵穴である」と言われるとおり、基質が結合する活性中心は深い溝のような構造(クレフト)となっている場合がほとんどである。しかしながら、CcGH131A の立体構造解析より、本酵素の活性中心のクレフトは浅く、通常の糖質加水分解酵素と比較し特徴的な構造であることが明らかになった。本研究では、主に CcGH131B について解析を行い、GH131 の機能について考察を行った。



## 3. 研究の方法

### (1) CcGH131A CBM および CcGH131B 変異酵素の作製および大腸菌における発現系の構築

プラスミドの抽出、DNA の制限酵素による切断、DNA のライゲーションおよび構築したプラスミドの大腸菌への導入は、一般的に行われている遺伝子工学の方法によった。CcGH131A CBM および CcGH131B の発現プラスミドは、これまでに構築した pET21a プラスミドに組み込んだものを用いた。CcGH131A 触媒ドメインの触媒残基であるグルタミン酸 138 および CcGH131B の触媒残基であるグルタミン酸 161 をそれぞれアラニン残基に置換した酵素 CcGH131A CBM E138A および CcGH131B E161A の発現プラスミドを構築した。方法は、QuikChange site-directed mutagenesis kit (アジレントテクノロジー) を用いた部位指定変異によった。

### (2) CcGH131B の精製と結晶化

CcGH131B 野生型および CcGH131B E161A 変異型ともに、大腸菌 BL21(DE3) で発現させた。酵素は C 末端側に His タグが付加されたタンパク質として発現するため、Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。精製した酵素は、Amicon Ultra-15 限外濾過ユニット(メルクミリポア)を用いて 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 中で 10 mg/mL に濃縮した。精製タンパク質の濃度は、Expasy ProtParam サーバー

( <http://web.expasy.org/protparam/> ) によって計算した吸光係数を用いて 280 nm での吸光度を測定することによって決定した。結晶化は、以前報告したとおりの CcGH131B 野生型の結晶化条件によった。

### ( 3 ) 立体構造解析

CcGH131B 野生型とキシロオリゴ糖の複合体 ( CcGH131B - キシロオリゴ糖 ) の作製は CcGH131B 野生型の結晶を、10%キシロオリゴ糖を含むリザーバー溶液に浸すことによった。また、CcGH131B E161A 変異型とセロピオースとの複合体 ( CcGH131B E161A - セロピオース ) の作製は、CcGH131B E161A 変異型の結晶を 0.25 M セロピオースを含む溶液に浸すことによった。このようにして糖に浸した結晶を用い、X線回折収集は高エネルギー加速器研究機構シンクロトロン放射光施設にて行った。X線回折データのプロセスはソフトウェア iMosflm で行った。位相の決定は、ソフトウェア MOLREP を用い、野生型酵素を鋳型とした分子置換法によった。モデルの構築および精密化はソフトウェア COOT および REFMAC によった。

### ( 4 ) CcGH131A CBM E138A と各種糖に対する反応の解析

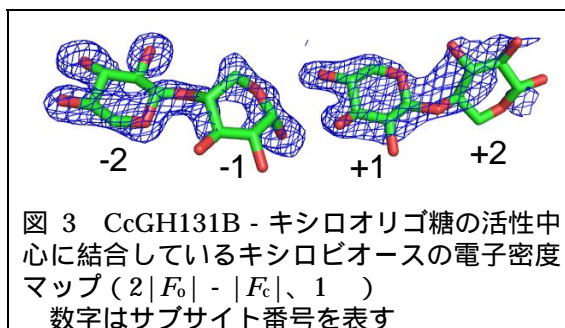
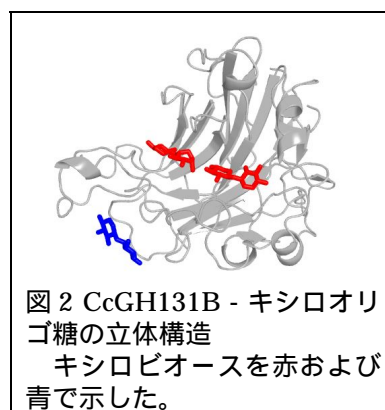
解析は、等温滴定カロリメトリー Malvern MicroCal VP-ITC を用いた。カバ ( Birchwood ) キシランとの反応は、シリンジに 181  $\mu$ M CcGH131A CBM E138A を充填し、1.4 mL の 0.5%(w/v) キシランが入ったセルに滴下することで行った。オリゴ糖との反応は、シリンジに 5 mM オリゴ糖を充填し、1.4 mL の 40  $\mu$ M CcGH131A CBM E138A が入ったセルに滴下することで行った。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) CcGH131B - キシロオリゴ糖の立体構造解析

CcGH131B は、CcGH131A とのアミノ酸配列の相同性が 30% である。CcGH131B 野生型の結晶をさまざまな糖に浸し立体構造を解析したところ、キシロオリゴ糖に浸した結晶について、1.8 分解能で立体構造を決定した。本構造において、リガンドと考えられる電子密度を観察することができた。電子密度から二つのキシロピオースが活性中心のクレフトに結合し ( 図 2 中赤で示した ) もう一つキシロピオースが酵素の表面に結合している ( 図 2 中青で示した ) ことが分かった。

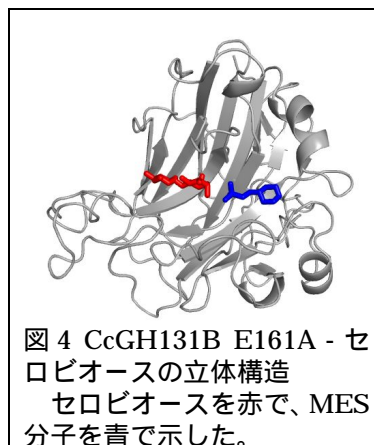
キシロピオースは、サブサイト - 2 と - 1、および +1 と +2 と考えられる位置に結合していると考えられた ( 図 3 )。サブサイト - 1 およびサブサイト +2 の電子密度はあまり明瞭でないが、サブサイト - 1 は通常ピラノースがとる椅子型コンフォメーションではなく、ボート型コンフォメーションであると推測された。



### ( 2 ) CcGH131B E161A - セロピオースの立体構造解析

野生型の酵素では何らかの反応が起きてしまうため、電子密度が明瞭でなく、どのような糖と結合するのか判別するのが難しかった。そこで、触媒残基に変異を導入した酵素 CcGH131B E161A の結晶をさまざまな糖に浸し、立体構造を解析した。その結果、セロピオースとの複合体を 1.45 分解能で決定することができた。マイナス側のサブサイトに、セロピオースが結合していた ( 図 4 中赤で示した )。一方、プラス側のサブサイトには緩衝液として用いた MES ( 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid ) 分子が結合していた ( 図 4 中青で示した )。

セロピオースおよび MES 分子と相互作用している主な残基を図 5 に示した。セロピオースの酸素原子は Gln156 および His167 の側鎖の原子と水素結合により直接結合しており、また、Phe110 が糖とスタッキングすることにより、認識されていた。これに対し、プラス側サブサイトに結合している MES 分子の周辺にはバリンやイソロイシンなど疎水性の残基が多く、糖と水素結合を形成できるような残基はほとんど存在しなかった。



### ( 3 ) CcGH131A CBM E138A と各種糖に対する反応の解析

等温滴定カロリメトリーで、いくつかの糖に対する結合を調べた。当初野生型酵素を用いて

解析を試みたが、妥当な測定値を得ることができなかった。これは、野生型酵素の場合、何らかの酵素反応を起こすためであると考えられたため、触媒残基に変異を導入した CcGH131A CBM E138A を用いて解析を行った(図6)。その結果、キシランに対しては結合することが分かったが、キシロペンタオースおよびセロペンタオースに対しては、反応は見られなかった。

#### (4) 関連酵素の構造機能解析

本研究では、バイオマス分解に関与する酵素として、ヘミセルラーゼ CcAbf62A、デキストラナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの構造と機能を明らかにした。

#### (5) 考察と総括

本研究では、主に CcGH131A および CcGH131B 変異型を用いて構造および機能の解析を行った。

CcGH131B は、立体構造解析の結果よりセルロース系バイオマスの糖であるキシロピオースやセロピオースを認識することが分かった。しかしながら、マイナス側サブサイトは糖を結合すると思われるが、プラス側サブ

サイトは糖と水素結合を形成できるような残基が見当たらず、疎水性物質を結合する機能があると考えられる。また、CcGH131A 等温滴定カロリーメトリーの解析では、多糖とは相互作用するものの、オリゴ糖とは反応しないことが分かった。

最近の報告では、GH131 で最初に活性が報告された *P. anserina* 由来 PaGluc131A の他に、子囊菌 *Colletotrichum higginsianum*、*Colletotrichum graminicol*、*Zymoseptoria tritici*、および担子菌 *Pycnoporus sanguineus* 由来の GH131 酵素において、 $\beta$ -グルカンに対する加水分解活性があることが報告された( )。しかしながら、現在のところ、CcGH131A および CcGH131B とも顕著な糖加水分解活性は確認されていない。これは、活性測定条件が異なる可能性も考えられるが、上記の GH131 酵素との相同性は 30~40%程度でありそれほど高いとは言えないため、機能が異なるということが考えられる。特に CcGH131B においては、プラス側サブサイトは糖を結合する構造であるとは言えず、何らかの配糖体に作用する酵素であると考えられる。本研究より、GH131 に属する酵素は広くセルロース系バイオマスに対し作用するが、その機能は多様であることが示された。

#### <引用文献>

Stajich et al., Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 2010, 11889-11894

Tian et al., Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 2009, 22157-22162

Lafond et al., Characterization of a broad-specificity  $\beta$ -glucanase acting on  $\beta$ -(1,3)-,  $\beta$ -(1,4)-, and  $\beta$ -(1,6)-glucans that defines a new glycoside hydrolase family, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 2012, 8540-8546

Miyazaki et al., Crystal structure of the N-terminal domain of a glycoside hydrolase family 131 protein from *Coprinopsis cinerea*, *FEBS Lett.*, 587, 2013, 2193-2198

Anasontzis et al., Broad-specificity GH131  $\beta$ -glucanases are a hallmark of fungi and oomycetes that colonize plants. *Environ. Microbiol.*, 2019, doi:10.1111/1462-2920.14596

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Tonozuka, T., Nihira, T., Mizuno, M., Nishikawa, A. and Kamitori, S. Mutagenesis-induced conformational change in domain B of a pullulan-hydrolyzing  $\alpha$ -amylase TVA I. *Amylase (De Gruyter)*, 2, 1-10 (2018). 査読有, DOI: 10.1515/amylase-2018-0001

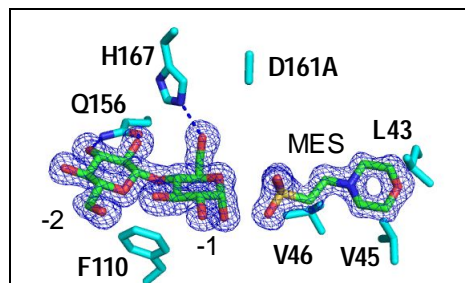


図5 CcGH131B E161A - セロピオースの活性中心

セロピオースはサブサイト - 2 および - 1 に、プラス側サブサイトには MES が結合しており、これらの電子密度マップ ( $|F_o| - |F_c|$ , 3  $\sigma$ ) をメッシュで示した。水素結合を点線で示した。

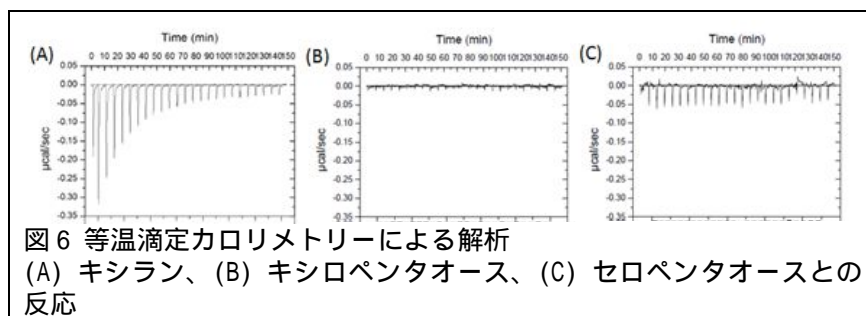


図6 等温滴定カロリーメトリーによる解析 (A) キシラン、(B) キシロペンタオース、(C) セロペンタオースとの反応

殿塚隆史「澱粉の酵素分解 - 研究の歴史的背景から最近の話題まで - 」応用糖質科学, 8, 267-275 (2018). 査読なし, DOI なし

Nagaya, M., Kimura, M., Gozu, Y., Sato, S., Hirano, K., Tochio, T., Nishikawa, A. and Tonozuka, T. Crystal structure of a  $\beta$ -fructofuranosidase with high transfructosylation activity from *Aspergillus kawachii*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 81, 1786-1795 (2017). 査読有, DOI: 10.1080/09168451.2017.1353405

Tonozuka, T., Tanaka, Y., Okuyama, S., Miyazaki, T., Nishikawa, A. and Yoshida, M. Structure of the catalytic domain of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Coprinopsis cinerea*, CcAbf62A, provides insights into structure-function relationships in glycoside hydrolase family 62. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 181, 511-525 (2017). 査読有, DOI: 10.1007/s12010-016-2227-0

Miyazaki, T., Nishikawa, A., Tonozuka, T., Crystal structure of the enzyme-product complex reveals sugar ring distortion during catalysis by family 63 inverting  $\alpha$ -D-glucosidase. *J. Struct. Biol.*, 196, 479-486 (2016). 査読有, DOI: 10.1016/j.jsb.2016.09.015

[学会発表](計 15 件)

Expression, purification, and some properties of a GH13 enzyme from *Rhodothermus marinus*. Qu Pu, 長屋美香, 藤井義晴, 西河淳, 殿塚隆史, 日本農芸化学会, 2019 年 3 月 27 日, 東京農業大学 (東京都世田谷区)

*Aspergillus niger* 由来の糖転移活性を有する新規  $\alpha$ -D-グルコシダーゼの結晶化, 堤賢太, 石川涼一, 松本雄治, 安武望, 西河淳, 殿塚隆史, 量子ビームサイエンスフェスタ, 2019 年 3 月 12 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来 CcGH131B と各種リガンドとの X 線結晶構造解析, 石川涼一, 吉田誠, 砂川直輝, 五十嵐圭日子, 西河淳, 殿塚隆史, 日本結晶学会, 2018 年 11 月 10 日, 東京工業大学大岡山キャンパス (東京都目黒区)

Studies of GH63 and GH31 enzymes Exploration of the properties of uncharacterized glycoside hydrolases by structural analysis, Takashi Tonozuka, Danish Japanese Network for Glycobiology, 2018 年 10 月 5 日, Technical University of Denmark (Lyngby, Denmark)

*Flavobacterium johnsoniae* 由来 GH31 デキストラナーゼ FjDex31A 改変酵素の性質解析, 堤賢太, 郷津佳史, 西河淳, 殿塚隆史, 日本応用糖質科学会, 2018 年 9 月 10 日, 秋田県立大学 (秋田県秋田市)

プルラン分解  $\alpha$ -アミラーゼ TVA I の改変酵素におけるドメイン B のコンフォメーション変化, 殿塚隆史, 西河淳, 神鳥成弘, 日本応用糖質科学会, 2018 年 9 月 10 日, 秋田県立大学 (秋田県秋田市)

担子菌の GH131 に属する酵素の立体構造と機能の解析, 殿塚隆史, セルラーゼ研究会, 2018 年 7 月 13 日, 佐久平プラザ 21 (長野県佐久市)

*Aspergillus kawachii* 由来  $\alpha$ -フルクトフラノシダーゼの改変による 1-ケストース生産能向上と改変酵素の構造解析, 長屋美香, 平野勝紹, 藤井匡, 柄尾巧, 西河淳, 殿塚隆史, 日本農芸化学会, 2018 年 3 月 16 日, 名城大学 (名古屋市天白区)

担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来 CcGH131B とセロピオースの複合体の立体構造解析, 石川涼一, 奥山舜朔, 砂川直輝, 五十嵐圭日子, 西河淳, 吉田誠, 殿塚隆史, 量子ビームサイエンスフェスタ, 2018 年 3 月 3 日, 茨城県立県民文化センター (茨城県水戸市)

*Flavobacterium johnsoniae* 由来 GH31 デキストラナーゼ FjDex31A とグルコースとの複合体の立体構造解析, 郷津佳史, 石川涼一, 西河淳, 殿塚隆史, 日本応用糖質科学会, 2017 年 9 月 7 日, 日本大学湘南キャンパス (神奈川県藤沢市)

担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来 CcGH131B とキシロオリゴ糖との複合体の立体構造解析, 石川涼一, 奥山舜朔, 砂川直輝, 五十嵐圭日子, 西河淳, 吉田誠, 殿塚隆史, 日本応用糖質科学会, 2017 年 9 月 6 日, 日本大学湘南キャンパス (神奈川県藤沢市)

担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来 -L-アラビノフラノシダーゼ CcAbf62A の触媒ドメインのX線結晶構造解析、殿塚隆史、田中祐太郎、奥山舜朔、宮崎剛亜、西河淳、吉田誠、日本農芸化学会、2017年3月18日、京都女子大学(京都市東山区)

GH31 に属する *Flavobacterium johnsoniae* 由来デキストラナーゼの結晶化と構造解析、郷津佳史、石川涼一、西河淳、殿塚隆史、量子ビームサイエンスフェスタ、2017年3月14日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

GH31 に属する *Flavobacterium johnsoniae* 由来デキストラナーゼ(FjDex31A)の性質解析、郷津佳史、石寄雄一、石川涼一、西河淳、殿塚隆史、日本生化学会、2016年9月27日、仙台国際センター(仙台市青葉区)

*Arthrobacter globiformis* GH27 isomalto-dextranase and *Flavobacterium johnsoniae* GH31 dextranase/glucosyltransferase – Two dextran-hydrolyzing enzymes belonging to clan GH-D, Gozu, Y., Ishizaki, Y., Miyazaki, T., Ishikawa, R., Okazawa, Y., Nishikawa, A. and Tonozuka, T. 6th Symposium on the Alpha-Amylase Family, 2016年9月13日, Smolenice Castle (Smolenice, Slovakia)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~seika/tonozuka/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 該当者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 吉田 誠、五十嵐 圭日子

ローマ字氏名: (YOSHIDA, Makoto) (IGARASHI, Kiyohiko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。