

平成22年06月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580112

研究課題名（和文） 植物細胞表層多糖分解における新規酵素の特性解析

研究課題名（英文） Characterization of a novel enzyme involved in the degradation of plant proteoglycans

研究代表者

金子 哲（KANEKO SATOSHI）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品バイオテクノロジー研究領域・主任研究員

研究者番号：9034821

研究成果の概要（和文）：食用増粘多糖類であるアラビノガラクトタンに作用し、アラビノースを生産する新規酵素  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼを放線菌から獲得し、酵素の立体構造・基質認識機構を解明した。本酵素は  $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼと同じ糖質加水分解酵素ファミリーに属するが、アミノ酸変異（アスパラギン酸からグルタミン酸への置換）により  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ活性を示す。本酵素にはアラビノピラノースに優先的に結合する基質結合部位も存在した。

研究成果の概要（英文）：A novel enzyme, beta-L-arabinopyranosidase, that liberates arabinose from thickening agent arabinogalactan was isolated from *Streptomyces avermitilis*, and the three dimensional structure was resolved. The enzyme belongs to the glycoside hydrolase family as same as alpha-D-galactosidases. One aspartic acid in the catalytic pocket of alpha-D-galactosidase changed to glutamic acid in that of beta-L-arabinopyranosidase, and the residue modulates the enzyme activity. Additionally, it has an arabinopyranose-binding module.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：酵素利用学・糖質関連酵素

## 1. 研究開始当初の背景

高等植物のプロテオグリカンであるアラビノガラクトタン-プロテイン（AGP）は、植物の生長・分化と密接な関係が示唆されており、その詳細な機能の解明が望まれていた。

一般的に AGP は、アラビノースやガラクトースに富む糖鎖と、タンパク部分からなる。タンパク部分は数十種類以上存在すると考えられており、巨大で複雑な構造を持つ糖鎖も加わって、AGP 研究は困難を極めていた。

AGP の一種であるガムアラビックやカラマツアラビノガラクトランは、古くから増粘剤として食品に利用されていた。AGP 糖鎖構造を修飾することができれば、増粘剤の物性改変、オリゴ糖生産など食品としての用途が拡大できると期待された。AGP 糖鎖に作用する酵素を獲得することは、植物における AGP の機能解析にとっても有用である。

研究開始当初、AGP 分解能のある放線菌の培養液中に新規糖質加水分解酵素活性を見出し、本酵素が AGP 糖鎖分解において重要な酵素であると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) AGP 糖鎖分解能のある放線菌が生産する  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼを精製し、その遺伝子をクローニングし、アミノ酸配列を明らかにする。組換えタンパクを作製し、諸性質、基質特異性解析を行う。

(2) 作製した組換えタンパクの結晶化および立体構造解析を行う。

(3) 基質認識に重要であると推測されるアミノ酸残基に関して変異体タンパクを作製し、基質特異性解析を行い、 $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼの基質認識機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 放線菌 *Streptomyces avermitilis* を、ガムアラビックを炭素源とする培地で培養し、培養上清より  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ活性を持つタンパクを精製した。N 末アミノ酸配列解析を行い、ゲノム情報から本タンパクをコードする遺伝子 SAV2186 を見出した。遺伝子をクローニングし、放線菌発現系を用いて組換えタンパクを発現させ、特性解析を行った。

(2) 組換えタンパクの結晶化・立体構造解析を行った。

(3)  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼは  $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼと同じ糖質加水分解酵素ファミリーに属していた。そこで、 $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼと  $\alpha$ -D-ガラクトースの識別に関与すると予測されたアミノ酸残基に変異を導入し、変異体の基質特異性解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ

放線菌 *Streptomyces avermitilis* を、ガムアラビックを炭素源とする培地で培養し、培養上清中に  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ活性があることを見出した (図 1)。

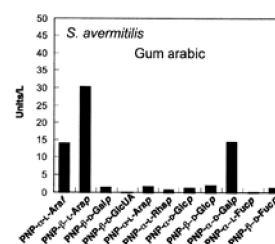


図 1. 培養上清中の各種酵素活性  
ガムアラビックで培養した培養上清の *p*-Nitrophenyl-基質 (PNP-基質) に対する活性測定を行ったところ、PNP- $\beta$ -L-Arap に対する活性が最も高く、 $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ活性を有するタンパクの存在が示唆された。

そこで、 $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ活性を持つタンパクを精製し、N 末アミノ酸配列解析を行い、得たアミノ酸配列 Ala Val Thr Thr Arg Gln Ile Thr Val Pro Ser Ala より、本タンパクは遺伝子 SAV2186 によってコードされるタンパクであることが明らかになった。

本遺伝子をクローニングし、放線菌発現系により組換えタンパク SaArap27A を発現させた (図 2)。

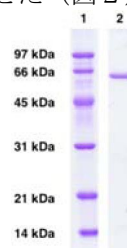


図 2. 組換えタンパクの SDS-PAGE  
レーン 1, 分子量マーカー; レーン 2, 精製した SaArap27A

SaArap27A は、PNP- $\beta$ -L-Arap に作用した (表 1)。得られた遺伝子は確かに  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼをコードするものであり、本タンパクは  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼであることを確認した。

表 1. SaArap27A の基質特異性

基質	分解率 (%)
PNP $\beta$ -L-アラビノピラノシド	100
PNP $\alpha$ -L-アラビノピラノシド	0
PNP $\alpha$ -L-アラビノフラノシド	0
PNP $\beta$ -D-ガラクトピラノシド	0
PNP $\alpha$ -D-ガラクトピラノシド	1.5
PNP $\beta$ -D-フコピラノシド	0
PNP $\alpha$ -L-フコピラノシド	0
PNP $\beta$ -D-グルコピラノシド	0
PNP $\alpha$ -D-グルコピラノシド	0
PNP $\beta$ -D-キシロピラノシド	0
PNP $\alpha$ -D-キシロピラノシド	0
PNP $\beta$ -D-マンノピラノシド	0
PNP $\alpha$ -D-マンノピラノシド	0
PNP $\alpha$ -L-ラムノピラノシド	0
PNP $\beta$ -D-グルタロシド	0
PNP $\beta$ -D-ガラクトツロシド	0

放線菌 *S. avermitilis* 由来の酵素 SaArap27A は、糖質加水分解酵素ファミリー27 (GH27) ドメインに加え、糖結合モジュールファミリー13 (CBM13) に属する基質結合モジュールを有していた。両者の間にはさらに2つのドメインが存在し、本酵素は4つのドメインで形成されていた (図3)。β-L-アラビノピラノシダーゼが GH27 に属する酵素であることを初めて明らかにし、さらにその立体構造解析にも成功した。

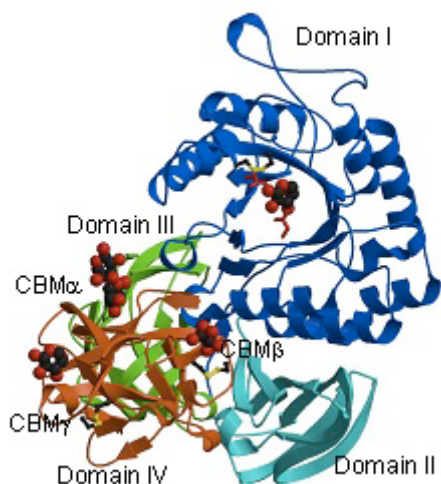


図3. β-L-アラビノピラノシダーゼの立体構造

Domain I, GH27 触媒モジュール; Domain II および III, 機能未知モジュール; Domain IV, CBM13 基質結合モジュール。触媒モジュールに1つ、基質結合モジュールには3つのアラビノースが結合している。

GH27 にはα-D-ガラクトシダーゼが分類されている。β-L-アラビノピラノースとα-D-ガラクトースの立体構造はC6の有無の違いであり (図4)、C6を認識するアミノ酸残基がβ-L-アラビノピラノシダーゼの基質認識に重要な役割を担っていると考えられた。

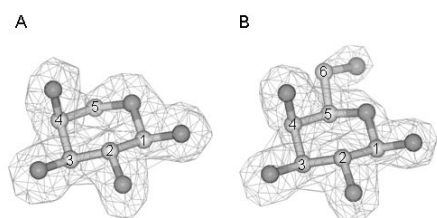


図4. β-L-アラビノピラノース (A) とα-D-ガラクトース (B)

β-L-アラビノピラノシダーゼの活性中心部位を構造既知のα-D-ガラクトシダーゼの活性中心部位と比較すると、β-L-アラビノピラノシダーゼの活性中心部位には、α-D-ガラクトシダーゼにとってα-D-ガラクトース

のC6の認識に関与しているアスパラギン酸が、グルタミン酸に置換されていた (図5)。

そこで、β-L-アラビノピラノシダーゼのグルタミン酸をアスパラギン酸に置換した変異体酵素 SaArap27A/Glu99Asp を作製し、基質特異性解析を行ったところ、変異体酵素はα-D-ガラクトシダーゼ活性を表すようになった (表2)。

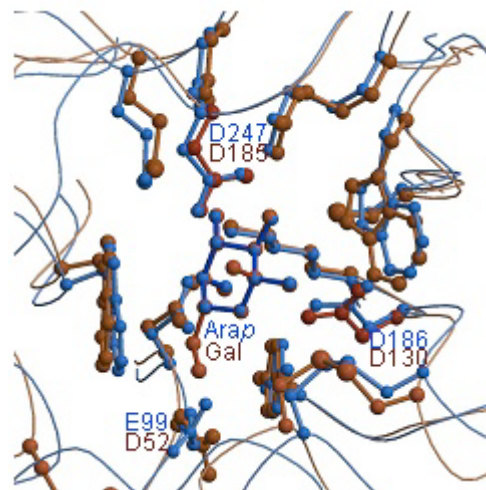


図5. β-L-アラビノピラノシダーゼ (青) とイネ由来α-D-ガラクトシダーゼ (茶) の活性中心部位の比較

β-L-アラビノピラノシダーゼは、α-D-ガラクトシダーゼのアスパラギン酸 (D52) がグルタミン酸 (E99) に置き換わっていた。

表2. SaArap27A と変異体酵素 SaArap27A/Glu99Asp の酵素活性

Enzyme	PNP-β-L-Arap			PNP-α-Galp		
	$k_{cat}$	$K_m$	$k_{cat}/K_m$	$k_{cat}$	$K_m$	$k_{cat}/K_m$
SaArap27A	317±10	3.6±0.4	88	2.3±0.1	5.1±0.3	0.5
SaArap27A/Glu99Asp	17±1	11.1±0.9	1.5	29±0.6	4.3±0.1	6.7

The enzyme was incubated at 37 °C up to 15 min in a mixture containing 0.5-5 mM substrate and Mclvaine buffer (pH 4.0).

グルタミン酸 E99 がβ-L-アラビノピラノシダーゼの基質認識にとって重要な役割を果たしていることを変異体解析により証明し、β-L-アラビノピラノシダーゼの基質認識機構を明らかにした。

## (2) 糖結合モジュール

CBM13 基質結合モジュールはガラクトース結合モジュールとして発見され、キシラナーゼが有する CBM13 はキシランに結合することが知られている。立体構造解析を行い、本酵素の CBM13 基質結合モジュールは、アラビノースに優先的に結合する新しい性質

を持った CBM13 基質結合モジュールであることを明らかにした (図6)。

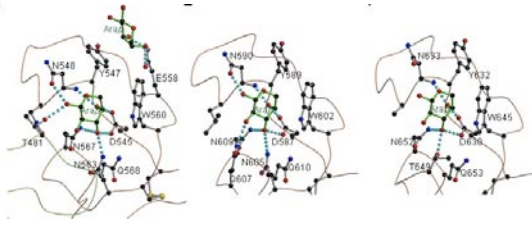


図6.  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼの基質結合モジュール

CBM13は3つのサブドメインからなる。 $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼのCBM13では、各サブドメインに対し、アラビノースが1つずつ結合していた。

本研究において $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼの存在を初めて明らかにし、その立体構造と基質認識機構を解明することができた。

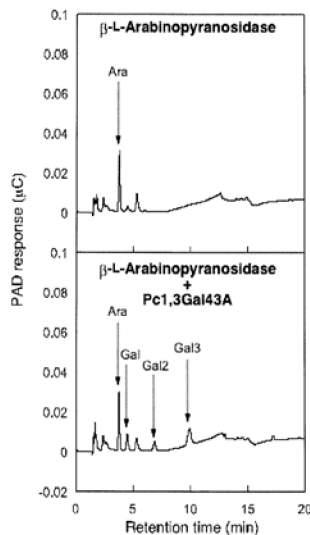


図7. SaArap27A とエキソ- $\beta$ -1,3-ガラクトナーゼ (Pc1,3Gal43A) によるカラマツアラビノガラクトランの分解物

Ara, アラビノース; Gal, ガラクトース; Gal2,  $\beta$ -1,6-ガラクトビオース; Gal3,  $\beta$ -1,6-ガラクトトリオース。

SaArap27A は AGP の一種であるガムアラビックやカラマツアラビノガラクトランに作用し、アラビノースを生産する。エキソ- $\beta$ -1,3-ガラクトナーゼ (Pc1,3Gal43A) は AGP 糖鎖の主鎖に作用する酵素であり、側鎖をバイパスして切断する特性があるためオリゴ糖生産が可能であるが、Pc1,3Gal43A 単独ではガムアラビックやカラマツアラビノガラクトランには作用できない。しかし、本研究で得られた SaArap27A を利用することにより、図7に示すように Pc1,3Gal43A がこれらにも

作用できるようになり、糖鎖構造を改変することが可能になった。

本研究により、AGP 糖鎖構造を修飾することが可能になり、増粘剤の物性改変、オリゴ糖生産などに利用できる酵素を獲得することができた。獲得した酵素はこれまでに獲得した AGP 糖鎖に作用する酵素と共に、植物における AGP の機能解析にとって有用なものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計2件)

①Hitomi Ichinose, Zui Fujimoto, Mariko Honda, Koichi Harazono, Atsuko Uzura, and Satoshi Kaneko: A beta-L-arabinopyranosidase from *Streptomyces avermitilis* is a novel member of glycoside hydrolase family 27. *J. Biol. Chem.* 査読有 (2009) 284, 25097-25106.

② Zui Fujimoto, Hitomi Ichinose, Koichi Harazono, Mariko Honda, Atsuko Uzura, and Satoshi Kaneko: Crystallization and preliminary crystallographic analysis of beta-L-arabinopyranosidase from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 査読有 (2009) 65, 632-634.

〔学会発表〕 (計4件)

①Hitomi Ichinose, Zui Fujimoto, Mariko Honda, Koichi Harazono, Yukifumi Nishimoto, Atsuko Uzura, and Satoshi Kaneko: Structural and functional analysis of beta-L-arabinopyranosidase from *Streptomyces avermitilis*. 2009 Gordon Research Conference (Cellulosomes, Cellulases & Other Carbohydrate Modifying Enzymes), Andover (U.S.A.) 2009/07/26-31.

②藤本瑞、一ノ瀬仁美、原園幸一、卯津羅淳子、平井雅寛、金子哲：放線菌由来  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼの結晶構造：日本農芸化学会、平成21年3月29日、福岡マリンメッセ

③一ノ瀬仁美、藤本瑞、原園幸一、卯津羅淳子、平井雅寛、金子哲：放線菌由来  $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ：日本農芸化学会、平成21年3月29日、福岡マリンメッセ

④一ノ瀬仁美、金子哲：放線菌のアラビノガラクトナン-プロテイン分解酵素：日本植物生理学会、平成20年3月21日、札幌コンベンションセンター

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称： $\beta$ -L-アラビノピラノシダーゼ

発明者：西本幸史、金子哲、一ノ瀬仁美

権利者：長瀬産業株式会社、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構  
種類：特許  
番号：特願 2008-310993.  
出願年月日：20 年 12 月 5 日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子 哲 (KANEKO SATOSHI)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品バイオテクノロジー研究領域・主任研究員  
研究者番号：903482