

平成21年 6月 5日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19780071

研究課題名(和文) 糸状菌・放線菌の糖質関連酵素の新規構造決定と機能解析

研究課題名(英文) Structure determination and functional analysis on novel carbohydrate active enzymes from fungi and actinomycete

研究代表者

伏信 進矢 (FUSHINOBU SHINYA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：00302589

研究成果の概要：糸状菌および放線菌由来の糖質関連酵素のうち、立体構造未知で新規性の高いものを対象に、立体構造解析と機能解析を行った。その結果、アセチルキシランエステラーゼの結晶構造を分解能 1.9 Å で決定することに成功した。この構造は新規性が高く、他の酵素には見られない特徴的なループ構造を見出した。さらに、立体構造を元に機能変換を目指した改変を行い、これにフェルラ酸エステラーゼ活性を付与することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	450,000	3,850,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：ヘミセルラーゼ、アクセサリー酵素、*Aspergillus*、*Streptomyces*、アセチルキシランエステラーゼ

1. 研究開始当初の背景

糖質はその構成糖・結合の違いなどから極めて多様な構造を持ち、エネルギー貯蔵物質・構造材料・情報伝達性物質などとして、生体の内外で多様な機能を発揮している。糖質の分解・伸長・結合に関わる酵素群(糖質関連酵素)のほぼ全てを網羅したデータベース CAZy(Carbohydrate Active enZYmes)ではこれらを、加水分解酵素を中心とした GH(Glycoside Hydrolase)、糖結合ドメインの CBM(Carbohydrate Binding Module)などにクラス分けし、それぞれ数十を超えるファミ

リーに分類している。特に、GHは現在100以上のファミリーを擁する最大のクラスであり、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、アミラーゼなどの代表的な分解酵素だけでなく、様々な基質を触媒できる酵素を含んでいる。CAZyには、農林水産業、食品産業において有用な酵素のうち、かなりの部分が含まれているといえる。糖質関連酵素は、これまでさまざまな場面で利用されてきたが、糖質の多様性を考えれば、今後も新たな利用方法の探索が可能であると期待された。

結晶性セルロースの分解酵素は古くから興

味深い対象であり現在も盛んに研究されている。しかし、ヘミセルロース、特にその側鎖（アラビノフラノース、アセチル基、フェルラ酸、D-グルクロン酸など）を分解する酵素群（アクセサリー酵素）は数多く存在し、いまだに研究の余地が残されていた。

Aspergillus awamori 由来アセチルキシランエステラーゼ（AwAXEA）は、 α -D-glucuronidase fold を持つ酵素を分類する ESTHER データベースにおいて、Esterase_PHB ファミリーに分類されている。Esterase_PHB に属する酵素の立体構造は、明らかにされていなかった。また AwAXEA は、CAZy において Carbohydrate Esterase ファミリー 1 (CE1) に分類されている。CE1 酵素で立体構造が明らかになっているものはあるが、AwAXEA と 1 次配列上で有意な相同性を示さない。これをふまえて我々は、AwAXEA は新規な構造を有すると期待した。また AwAXEA の属する Esterase_PHB には AXE と、アラビノキシランのフェルラ酸を加水分解するフェルラ酸エステラーゼ（FAE）がともに属している。このように、加水分解する基質の大きさが全く異なる 2 つの酵素が同一ファミリーに属しているのは Esterase_PHB のみであり、これらの基質認識機構を知ることは、学術的に興味深い。

2. 研究の目的

本研究では、*Aspergillus* 属または *Streptomyces* 属由来の糖質関連酵素（主にヘミセルラーゼ）のうち、立体構造未知で新規性の高いものを対象に、立体構造解析を軸に機能解析も平行して行うことを目的とした。

3. 研究の方法

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* の系を用いてリコンビナント AwAXEA および、そのセレノメチオニン置換体を発現した。カラムクロマトグラフィーを用いた数段階の精製ステップを経て、十分な純度の酵素を得た。得られた酵素をポリエチレングリコール存在下で結晶化し、放射光施設（高エネルギー加速器研究機構）で X 線回折実験を行った。さらに、得られた構造を元に部位特異的変異を導入して、各種基質に対するアッセイを行った。

また、これまでに我々が発見した新規な糖質結合モジュール (CBM42) を持つ *Streptomyces* 属のヘミセルラーゼのクローニング、大腸菌での発現を行った。

4. 研究成果

(1) AwAXE の構造決定

Se-SAD 法によって初期位相を決定した後、構造モデルを精密化し、最終的に分解能 1.9 Å

で AwAXEA の構造を決定することに成功した。この構造は、R = 15.4%、R_{free} = 19.8% まで精密化を行った。AwAXEA は結晶中、二量体で存在し、全体構造は α -D-glucuronidase fold をとっていた。N 結合型糖鎖は、Asn161 において確認された(図 1)。

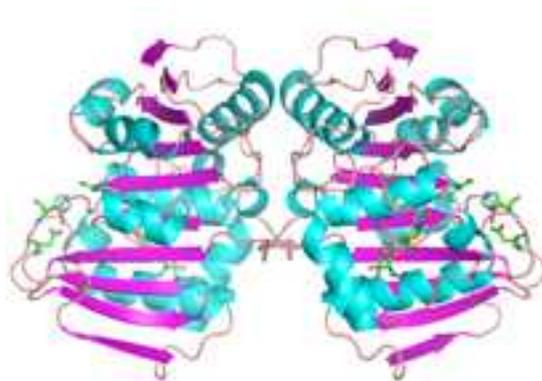


図 1 AwAXEA の構造

AwAXEA の二次構造のトポロジーを図 2 に示す。AwAXEA は β -strand を 10 本有しており、1~7、10 までは同一の CE1 ファミリーに属する FAE にも保存されていたが、8 と 9 を有するのが特徴となっている。また 6-7 の間に 6-4' loop を有しており、これも他の CE1 酵素では見られない。

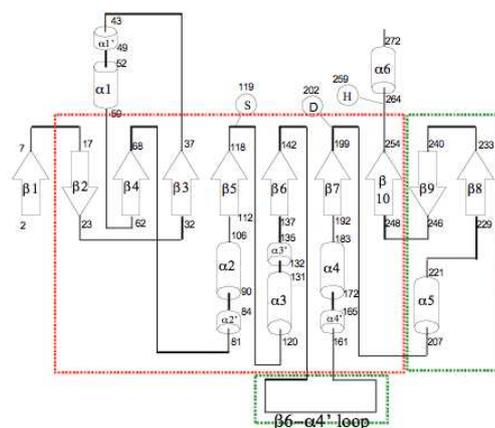


図 2 AwAXEA のトポロジー図

AwAXEA の活性中心は、Ser119、His259、Asp202 からなる catalytic triad であった(図 3)。

5 の後に Ser が、7 の後に Asp が、10 の後に His それぞれが位置していた。活性に重要であるセリンの OG atom と His の NE2 atom の距離は約 2.6 Å、また His の ND1 atom とアスパラギン酸 OD2 atom の距離は約 2.8 Å であった。また Ser はちょうど構造上折れ曲がった位置に存在し、周辺の残基である Ser118、Ser120 とともに nucleophilic elbow を形成していた。また反応における

tetrahedral な中間体において、ペプチドバックボーン NH と基質のカルボニル酸素アニオンが結合し安定化する。これはオキシアニオンホールと呼ばれている。今回解明した構造から、Ser120 の NH と Gly144 の NH がオキシアニオンホールを形成すると予測できた。同じファミリーのタンパク質のアミノ酸配列と比較しても、この2つの残基はよく保存されていた。

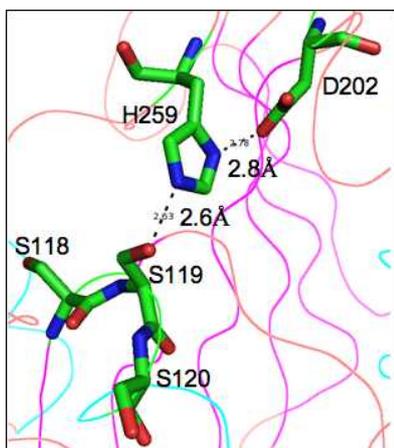


図3 AwAXEAの活性中心

さらに、AwAXEA と同一の Esterase_PHB ファミリーに属する *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum* 由来の FAE の構造を、ホモロジーモデリングによって予測した。どちらの FAE モデル構造も、活性中心付近に AwAXEA にはない大きなポケットを有していた。図4に予想された *Neurospora crassa* 由来の FAE の基質結合ポケットを示す。その付近のアミノ酸残基は、AwAXEA において Tyr39 と Trp160 に対応していた。そこで、これらのアミノ酸残基の変異体群酵素を構築し、機能を調べた。

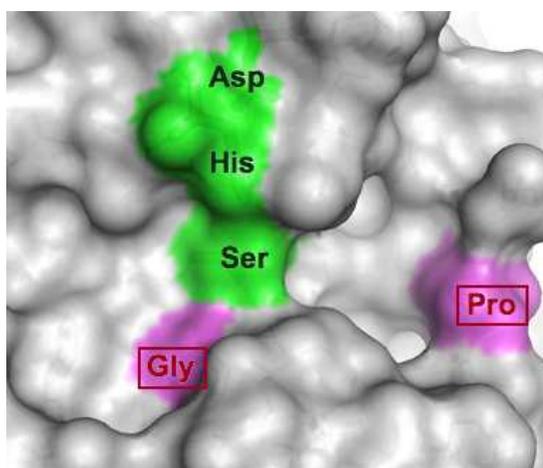


図4 *N. crassa* FAE の分子表面

(2) AwAXEA 変異体を用いた活性評価

合成基質である methyl ferulate (MFA) などのフェノール酸のエステルに対する活性を調べたところ、Tyr39 の変異型酵素では活性が見られなかったが、Trp160 の変異型酵素では MFA に対する活性が確認できた。特に、Tyr39 および Trp160 の両方の残基を置換した変異型酵素は、MFA に対して高い活性を示した。その活性は、*Penicillium funiculosum* 由来の FAE と比較し、約 1/1500 程度であった。また、天然の基質である insoluble wheat arabinoxylan に対する活性も調べた。その結果、いくつかの変異体は活性を示した。特に Y39P/W160S は、*Aspergillus awamori* 由来 FAE と比較し、約 1/60 もの活性を保持していた。

以上の結果は、AXE 活性を持つ酵素に対して変異を加え FAE 活性を有するような変換に成功したことを意味している。このように活性を変換した例は、今までに報告されていない。

(3) 新規な糖質結合モジュールを持つ

Streptomyces 属由来のヘミセルラーゼの解析

Streptomyces 属のヘミセルラーゼではクローニングには成功したが、大腸菌での発現系を検討した結果、不溶性に画分に発現し、その後の解析が困難となった。

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 2件)

T. Koseki, Y. Mese, S. Fushinobu, K. Masaki, T. Fujii, K. Ito, Y. Shiono, T. Murayama, and H. Iefuji: Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77 (6), 1279-1285 (2008) (査読有)

S. Fushinobu, M. Hidaka, A. Miyayama, and H. Imamura: New structural insights on carbohydrate-active enzymes. J. Appl. Glycosci. 54 (2), 95-102 (2007) (査読無)

[学会発表](計 3件)

小宮大, 伏信進矢, 小関卓也, 石田卓也, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 若木高善, 祥雲弘文: *Aspergillus awamori* 由来アセチルキシランエステラーゼの結晶構造解析 第22回セルラーゼ研究会 平成20年

7月28～29日 花王株式会社霞ヶ浦
研修所（茨城県稲敷郡美浦町）

小宮大、伏信進矢、小関卓也、石田卓也、
五十嵐圭日子、鮫島正浩、若木高善、祥雲
弘文：*Aspergillus awamori*由来アセチル
キシランエステラーゼの結晶構造解析
日本応用糖質科学会年会 平成20年9
月18～19日 琉球大学

小宮大、石田卓也、小関卓也、伏信進矢、
五十嵐圭日子、鮫島正浩、若木高善、祥雲
弘文：*Aspergillus awamori*由来アセチル
キシランエステラーゼの結晶構造解析と
酵素改変 日本農芸化学会大会 平成2
1年3月27～29日 マリンメッセ福
岡

〔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〕

<http://enzyme13.bt.a.u-tokyo.ac.jp/fushi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伏信 進矢 (FUSHINOBU SHINYA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：00302589