

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580092

研究課題名（和文） マルチ触媒ドメインを有する糖質加水分解酵素の構造と機能

研究課題名（英文） Structural and functional analysis of glycoside hydrolases with multiple catalytic domains.

研究代表者

炭谷 順一（SUMITANI JUN-ICHI）

大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10264813

研究成果の概要（和文）：*Streptomyces corchorusii* 由来細胞表面結合型アミラーゼと *Paenibacillus polymyxa* 由来 α -アミラーゼを用いて、2つの触媒ドメイン（CD）間、CDと複数のデンプン結合ドメイン（SBD）間、SBD間の相互作用について、それぞれ酵素化学的実験と構造生物学的解析を用いて明らかにし、1つのタンパク質が複数のCDを持つことが有用であることを示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we revealed the interactions between two catalytic domains (CD), starch-binding domains (SBD), and CD-SBD, respectively, by the experiments for enzymology and the analysis for structural biology, using cell-surface-associated amylase from *Streptomyces corchorusii* and α -amylase from *Paenibacillus polymyxa*, suggesting that a protein hold multi CD shows better catalytic efficiency than a protein hold single CD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：アミラーゼ，デンプン結合ドメイン，マルチ触媒ドメイン，構造機能相関

1. 研究開始当初の背景

Henrissatらは、様々な糖質加水分解酵素に存在する糖質結合ドメインについて、一次構造の相同性から大々的に Carbohydrate Binding Module Family (CBM) として分類を行っている。これによると、デンプン結合ドメイン (SBD) は CBM20, 21, 25, 26, 34, 41, 45, 48, 53 に分類されている (2009年 10

月現在)。申請者はこれまでアミラーゼの触媒ドメイン (CD) に対する SBD の効果について解析してきた (Sumitani, J., et al., Biochem. J., 350, 477-484, 2000)。 *Bacillus polymyxa* 由来 β/α -アミラーゼ (β/α -amy) は中央に CBM25 に分類される SBD を2コピー有し、N末端側に β -アミラーゼ CD、C末端側に α -アミラーゼ CD を有する非常に

ユニークなドメイン構造を有する酵素である。本酵素に存在する CBM25 に分類される SBD1 について NMR を用いた立体構造解析を行い、CD に与える影響や複数の SBD が基質分解にどのように寄与しているのかを明らかにしようと試みている。また、最近 *Streptomyces corchorusii* 菌体表層から菌体表層結合型アミラーゼ (CSAA) を精製、遺伝子クローニングし、本酵素が N 末端側から α -アミラーゼ CD, SBD (CBM41) \times 2, SBD (CBM48), プルラーゼ CD からなる分子量 18 万のマルチドメイン酵素であることを明らかにした (図 1)。これら 2 種のアミラーゼはファミリーの異なる複数の SBD を保持しているばかりか、CD も複数存在する。複数の CD を有する酵素の CD 間の協調的な反応の解析例として、TCA サイクルで機能する酵素等、連続した 2 反応を触媒する 2 つの CD を有する酵素が挙げられる。「トンネル効果」や「チャネリング」と呼ばれるような、第 1 の反応で生成した産物を第 2 の反応を担う CD に受け渡すことで反応を効率的に進めるしくみについて研究されている (Hung, X., et al., Annu. Rev. Biochem., 70, 149-180, 2001)。また、1 つのポリペプチドではないが、糖質加水分解酵素関連でも、*Clostridium* 属菌株が生産するセルロソームにみられるように、多種類のセルラーゼ系酵素が cohesin・dockerin 相互作用を介して集合することで結晶性セルロースを効率的に分解すると言われている。このように、一般的に複数の CD を保持する酵素や複合体を形成する酵素の多くは、異なる反応を触媒する CD を距離的に近づけることで、反応を効率的に行っていると考えられている。複数の CD を持つ糖質加水分解酵素については報告例がいくつか存在するが、それら CD 間の相互作用や協調的な反応について解析された報告はない。また、CBM 自体の解析例は数多く存在するが、複数の CBM 間の相互作用についての解析例もほとんどない。従って、複数の CD と複数の CBM との相互作用や連携的反応について解析された例もなく、非常に興味深い問題である。 β/α -amy や CSAA が複数の CD や CBM を保持した状態で存在するのは、生産菌にとって某かの優位性があるからだと考えられ、その理由は大変興味深く、また酵素反応の効率性を考える上で新たな視点をもたらすことになり、糖質加水分解酵素研究に対して大きな影響を与えるものと考えられる。さらに、最適な組み合わせの CD と最適な組み合わせの CBM を最適な配置になるように設計することで、高効率生デンプン分解アミラーゼを創製するなど応用的な面でも多大な成果が期待される。

2. 研究の目的

本研究ではマルチ触媒ドメインを有する糖質加水分解酵素の触媒ドメイン間での連携的反応や複数存在する基質結合ドメインとの関係について分子レベルで明らかにするとともに、高効率糖質加水分解酵素を設計するための分子基盤を得ることを目標として以下の目的を設定した。

- (1) *S. corchorusii* 由来 CSAA における各ドメインの機能解析
CSAA の各ドメインを欠失させたドメイン欠失変異酵素を作製し、その性質を評価することで、欠失させたドメインの酵素活性に及ぼす影響を調べる。
- (2) *P. polymyxa* 由来 β/α -amy に存在する β -アミラーゼ CD や CBM25 の構造解析
 β/α -amy 全体の構造情報を得るための基礎として、各ドメイン単位での立体構造を決定する。 β/α -amy に存在する 2 つの CBM25 のうち、N 末端側の SBD1 については NMR による立体構造が決定されているが、C 末端側に存在する SBD2 や、2 つの CBM25 がタンデムに連なった状態のタンパク質についても同様に NMR によって立体構造の情報を得る。また、CD についても、X 線結晶解析によって構造情報を得る。大腸菌での発現系が確立されている β -アミラーゼ CD について詳細な解析データを得る。
- (3) 各種機器分析や生化学的解析による CSAA および β/α -amy 各ドメイン間の相互作用解析
マルチ CD および CBM を有する糖質加水分解酵素の各ドメイン間 (CD 間, CBM 間, CD-CBM 間) の相互作用に関する情報を得るために、円二色性 (CD) スペクトル解析, 等温滴定型熱量計 (DSC) を用いた解析, 動的光散乱 (DSL) 解析, X 線小角散乱 (SAXS) 解析などと、生化学的解析を組み合わせることで、各ドメイン間の相互作用に関する情報を得る。

3. 研究の方法

本研究はマルチ CD を有する糖質加水分解酵素における CD 間, CBM 間, CD-CBM 間相互作用について、酵素化学的に解析するとともに、NMR や X 線結晶解析を始めとする各種機器分析を用いて詳細に解析を行うことでドメイン間相互作用を明らかにすることを目標としている。この目標を達成するために、以下に示す項目について検討を行う。

- (1) *S. corchorusii* 由来 CSAA のドメイン欠失変異酵素の生化学的解析
CSAA に存在する 2 つの CD と 3 つの CBM のデンプン分解に対する役割を解明するために、図 2 のような各ドメインを欠失させた変異酵素遺伝子を構築し、放線菌 *S. lividans* で発現させ、変異酵素

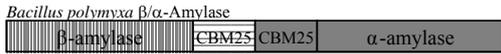


図1 本研究で使用するアミラーゼのドメイン構造を調製し、それらの酵素学的性質を比較検討することで、デンプン分解における各ドメインの役割を明らかにする。また、CDの触媒残基やCBMのデンプン結合に重要な役割を示すアミノ酸を置換することで、全長酵素でありながら、各ドメインの機能を欠失させた変異酵素を作製し、同様に評価することで各ドメインの役割を明らかにする。

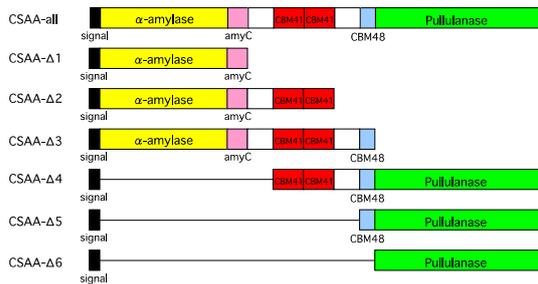


図2 CSAAドメイン欠失変異酵素の構造

- (2) *P. polymyxa* 由来β/α-amyに存在するCBM25のNMRによる立体構造解析
N末端側に存在するCBM25 (SBD1)については、既にNMRによる立体構造を明らかにしてきた。そこで、C末端側に存在するCBM25 (SBD2) および2つのCBM25がタンデムに連なったSBD1-SBD2についてNMRを用いて立体構造を決定する。大腸菌における発現系は確立されているので、¹⁵N標識NH₄Clまたは¹³C標識Glucoseでエンリッチした発現産物を精製し、NMRを用いて解析を行う。その際、サイクロデキストリンなどを添加することで基質結合に関与しているアミノ酸を同定したり、1つのCBM当たり何分子のサイクロデキストリンが結合するかを熱測定等によって明らかしたりする。SBD1, SBD2, SBD1-SBD2の結果を比較検討することで、2つのCBMがどのように基質結合に関与しているかを明らかにする。
- (3) *P. polymyxa* 由来 β/α-amyにおけるβ-アミラーゼCDのX線結晶構造解析
β/α-amyにおける2つのCDのうち、β-アミラーゼCDについては大腸菌における発現系が確立されているが、α-アミラーゼCDについてはN末端側に何か別のタンパクをコードする遺伝子を融合する必要があり、単一CDを大量に調製する系は確立されていない。そこで、発現系が確立されているβ-アミラーゼCDを大

量に調製し、X線構造解析を行うことで、立体構造を明らかにし、β/α-amy全体の構造に関する情報を得る。

- (4) 円二色性 (CD) スペクトル解析
マルチCDアミラーゼについて、CDおよびCBM単独と2つ以上のドメインが連結したタンパク質を調製し、spectropolarimeter model J-820 (Jasco)を用いてCDスペクトルを測定する。それぞれのスペクトルを比較解析することで、ドメイン間の相互作用の結果生じると考えられる二次構造変化の検出を試みる。
- (5) 示差走査熱量測定 (DSC) を用いた解析
マルチCDアミラーゼについて、CDおよびCBM単独と2つ以上のドメインが連結したタンパク質を調製し、nanoDSC II (TA Instruments) を用いてDSC測定を行う。それぞれのDSCグラムを比較解析することで、ドメイン間の相互作用の結果生じると考えられる熱安定性変化の検出を試みる。
- (6) 動的光散乱 (DSL) 解析
アポ状態のタンパク質とβ□□□との複合体タンパク質を調製し、nanopartica SZ-100 (堀場) を用いたDSL解析を行う。また、ビスコメイト VM-1G (CBCマテリアルズ) を用いた粘度測定を行うことで粒子径解析も行う。
- (7) X線小角散乱を用いた構造解析
CSAAおよびβ/α-amyについて、高濃度精製標品を調製し、X線小角散乱解析を行い、溶液中のタンパク分子の大きさや形に関する情報を得ることで、各ドメイン間の相互作用に関する知見を得る。

4. 研究成果

- (1) CSAAドメイン欠失変異酵素の生化学的解析
図2のような各種ドメイン欠失酵素遺伝子を放線菌用発現ベクターpSEV1由来プラスミドに挿入し、*S. lividans*を形質転換したが、全長遺伝子が挿入されたCSAA-allに加えて、CSAA-Δ2のみ変異酵素の生産が見られ、その他の変異酵素については、タンパク質の発現が全く見られなかった。次に触媒残基に変異を導入することで、特定のCDの機能を欠失させた変異酵素の作製を試みた。α-アミラーゼCD機能欠失酵素としてE350Q、プルラーゼCD機能欠失酵素としてE1443Qを作製し、*S. lividans*で発現させた。その結果、E350Qのみタンパク質の生産が見られた。そこで、野生型酵素としてCSAA-all、プルラーゼCD欠失酵素としてCSAA-Δ2、α-アミラーゼCD欠失酵素としてCSAA-E350Qの精製標

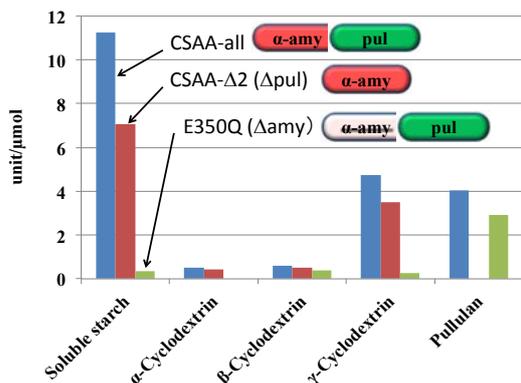


図3 CSAA ドメイン欠失変異酵素の基質特異性を調製し、性質検討を行った。各 CD 機能欠失酵素の基質特異性を調べた結果 (図3), それぞれの欠失酵素は欠失した CD に対応した基質特性を示した。さらに野生型酵素と各 CD 機能欠失酵素の混合物におけるデンプン分解活性を比較したところ、野生型酵素の方が高い活性を示した。このことから、 α -アミラーゼ CD とプルラーゼ CD が切り離されて存在するよりも、1つのポリペプチドとして存在している方がデンプン分解活性は高くなり、CD 間の相互作用が存在することが強く示唆された (図4)。

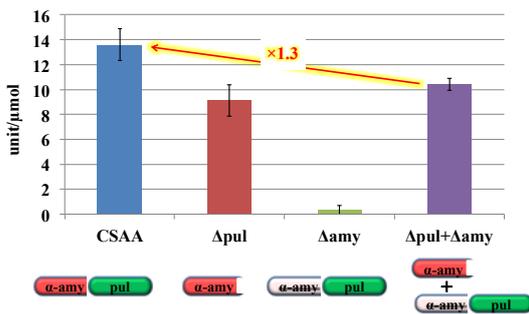


図4 CSAA 触媒ドメイン間の協調的なデンプン分解

- (2) CSAA の X 線小角散乱を用いた構造解析得られた X 線小角散乱像の予備的な解析から、CSAA-all および Δ pul の分子量が算出され、その値が実際の分子量と極めて近い値となったことから、得られたデータの信頼性が高いことが証明された。解析から得られた最大分子半径 R_g は CSAA-all よりも Δ pul の方が大きくなり、

表1 X線小角散乱から得られたCSAAの分子量と最大分子半径

Protein	R_g (Å)	MM_{exp} (kDa)	MM_{calc} (kDa)
CSAA-all	49.2 ± 1.5	197	188
Δ pul	51.9 ± 1.1	114	110

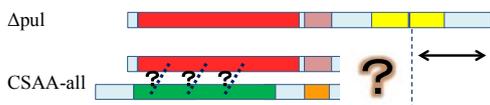


図5 X線小角散乱から推定されるCSAAドメイン間相互作用

プルラーゼ CD が存在することで最大分子半径が小さくなることが示された。以上のことから、CSAA において、プルラーゼ CD と恐らく α -アミラーゼ CD が物理的に相互作用していることが強く示唆された (図5)。

- (3) β/α -amy に存在する CBM25 の NMR による立体構造解析

^{15}N および $^{15}N/^{13}C$ 安定同位体標識した SBD2 および SBD1-SBD2 を調製し、pH 5.5, 30°C において測定した各種多次元異核 NMR スペクトルを解析し、シグナルの帰属と立体構造解析を行った結果、SBD2 は β -sandwich 構造を有していることが判明した。また β -CD の滴定によるスペクトル変化の解析によって、SBD2 は β -sandwich 構造の片側表面上に1つの基質結合部位を持つことが示された。SBD2 の立体構造および結合部位は SBD1 のそれらと酷似していた。一方、SBD1-SBD2 の NMR スペクトルはそれぞれ単独の SBD のスペクトルの重ね合わせとほぼ一致し、 β -CD の滴定によりケミカルシフトが大きく変化した部位も単独のものそれらと一致していた。この結果は、SBD1-SBD2 が β -CD と結合する際、2つの SBD が独立して働くことを示唆している (図6)。

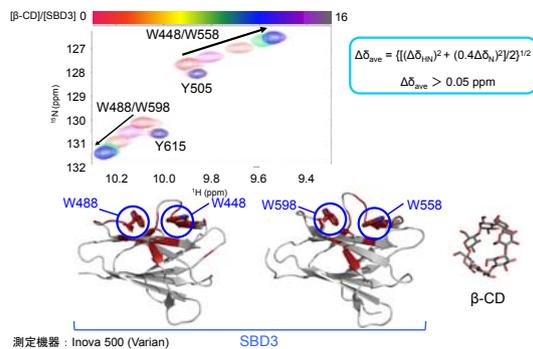


図6 β/α -amy における SBD1-SBD2 の立体構造と糖結合部位

- (4) タンデム CBM25 の X 線小角散乱による構造解析

SBD1-SBD2 の溶液中における全体構造を調べるために、pH5.5, 25°C において X 線小角散乱測定を行い解析した結果、SBD1-SBD2 の平均構造はダンベル様構造を示し、NMR 法で決定した SBD1 と SBD2 を並べた構造と同程度の大きさであることが判明した (図7)。

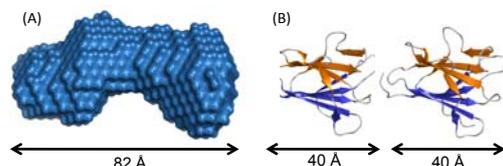


図7 SBD1-SBD2 の X 線小角散乱 (A) と NMR (B) による構造の比較

- (5) タンデム CBM25 の DSL による構造解析
pH 7.5, 25°C において DSL を測定したところ, SBD1-SBD2 の粒径が β -CD との結合に伴って 64 Å から 45 Å に変化することが明らかとなった。この結果は, SBD1 と SBD2 を繋ぐリンカーがフレキシブルであり, SBD1-SBD2 が β -CD に沿うように構造変化していることを示唆している (図 8)。

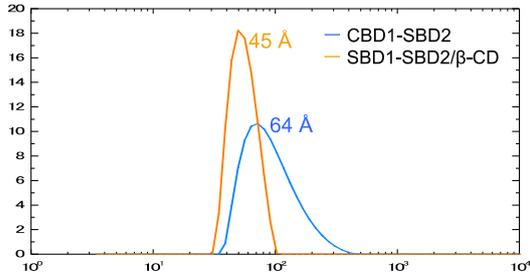


図 8 DSL を用いたタンデム CBM25 の構造変化の観測

- (6) タンデム SBD の ITC を用いた解析
等温滴定量熱計 (ITC) を用いて各 CBM25 に対する β -CD を滴定した際の熱量変化を測定した結果, 得られた結合部位当たりの熱力学パラメータは全て同程度であった。また 1 分子の β -CD に対して 2 分子の SBD が結合していることが示された (図 9)。

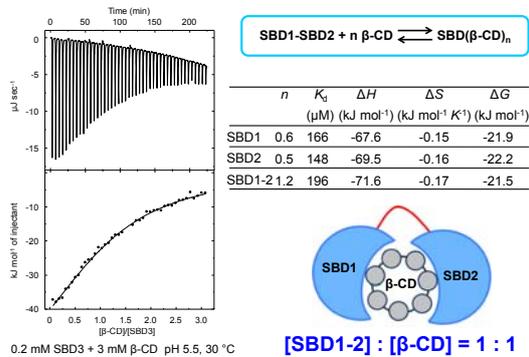


図 9 DSC を用いたタンデム SBD の基質結合に関する熱力学量の算出

- (7) β -アミラーゼ CD の X 線結晶解析

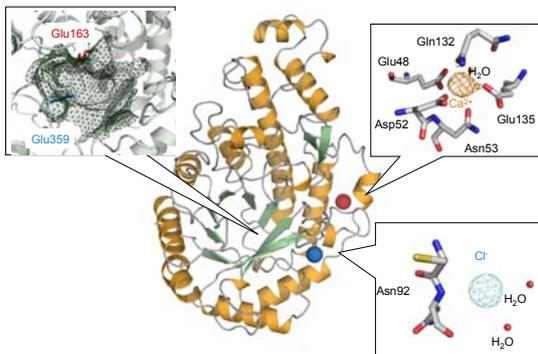


図 10 β -アミラーゼ CD の X 線結晶解析による全体構造

シッティングドロップ蒸気拡散法によって得た β -アミラーゼ CD 単結晶を Spring 8 ビームライン BL17A にて X 線回折強度データを収集し, 分解能 41.0 から 1.95 Å までの反射データを用いて分子モデルを構築し, A1 から P416 までについて構造精密化を行い PDB へ登録した (図 10)。

- (8) β -アミラーゼ CD および SBD の CD スペクトル解析

各々のドメイン単独と CD-SBD の CD 解析の比較から, CD-SBD の測定値は個々のドメインの測定値の相加したものと同じであったことから, CD-SBD となることで CD-SBD 間やリンカーの存在の影響によって局所的な二次構造が破壊されることがないことがわかった (図 11)。

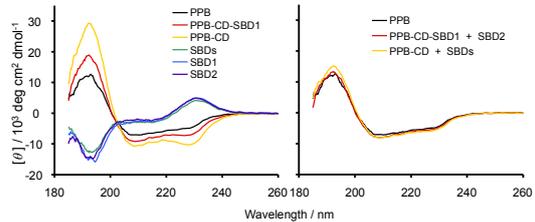


図 11 β -アミラーゼ CD および SBD の CD スペクトル解析

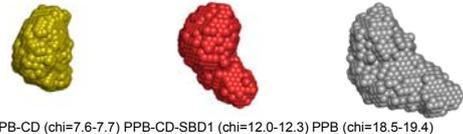
- (9) β -アミラーゼ CD および SBD の X 線小角散乱を用いた構造解析

得られた回折データ (表 2) と個々のドメインの立体構造のデータから β -アミラーゼ CD および SBD の構造モデルを構築した (図 12)。その結果, β -アミラーゼ CD-SBD は L 字型の構造となり, CD と SBD が相互作用していることが強く示唆された。

表 2 X 線小角散乱から得られた β -アミラーゼ CD と SBD の分子量と最大分子半径

	D_{max} (Å)	R_g (Å)	$I(0)/c$ (mL mg ⁻¹)	MM_{exp} (kDa)	MM_{calc} (kDa)
PPB	125	34.5	605	71	68
PPB-CD-SBD1	92	27.7	449	69	57
PPB-CD	70	23.1	380	58	46

Ab initio models made using the program GASBOR



Rigid body models made using the program BUNCH

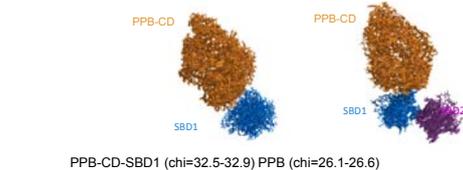


図 12 β -アミラーゼ CD-SBD の X 線小角散乱による構造解析

- (10) β -アミラーゼ CD および SBD の示差走査熱量計 (DSC) 解析

β -アミラーゼ CD および SBD,

CD-SBD1, CD-SBD1-SBD2 (PPB)のDSC解析を行ったところ, CDに結合したSBDの変性温度はSBD単独での変性温度と比較して明らかに低下しており, SBDがCDの影響を大きく受けていることが伺え, CD-SBD間での相互作用が強く示唆された(図13)。

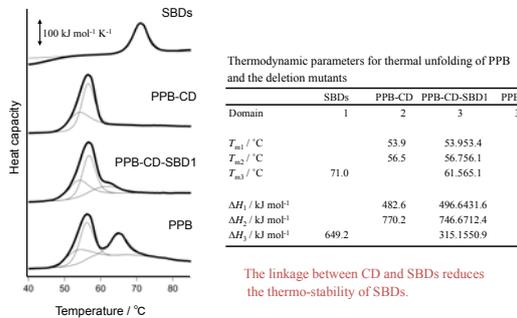


図13 β -アミラーゼCD-SBDのDSC解析

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)

炭谷順一, 谷修治, 荒井基夫, 川口剛司, α -アミラーゼ阻害剤を生産する放線菌の澱粉資化戦略, 応用糖質科学会誌, 査読有, Vol. 2, No. 2, 122-128, 2012

[学会発表] (計9件)

- ① 西村重徳, 高山葵, 深田はるみ, 炭谷順一, 川口剛司, 乾隆, *Paenibacillus polymyxa* 由来 β -アミラーゼのX線小角散乱による構造解析と示差走査熱量測定による各ドメイン間の相互作用解析, 日本農芸化学会大会 2013年度大会, 2013年3月25日, 仙台
- ② 久保江里果, 西村重徳, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司, *Streptomyces corchorusii* 由来細胞表層結合型アミラーゼの触媒ドメイン間の相互作用, 日本農芸化学会大会 2013年度大会, 2013年3月25日, 仙台
- ③ 掃部正浩, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司, *Paenibacillus* sp. MK-808株由来 β -アミラーゼ遺伝子のクローニングと発現, 2011年度日本生物工学会大会, 2013年3月25日, 仙台
- ④ 炭谷順一, 谷修治, 荒井基夫, 川口剛司, 蛋白性 α -アミラーゼ阻害剤を生産する放線菌のデンプン資化戦略, 日本応用糖質科学会平成23年度大会, 2011年9月30日, 札幌
- ⑤ 西村重徳, 糖加水分解酵素による効率的な不溶性基質の分解, 蛋白質科学会年会, 2011年6月8日, 大阪

- ⑥ 久米弘之, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司, *Streptomyces corchorusii* 由来細胞表層結合型アミラーゼの各ドメインの機能解析, 2011年度日本農芸化学会大会, 2011年3月27日, 京都
- ⑦ 掃部正浩, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司, *Paenibacillus* sp. MK-808株由来 β -アミラーゼに関する研究, 2011年度日本農芸化学会大会, 2011年3月26日, 京都
- ⑧ 高橋良輔, 藤岡創, 乾隆, 炭谷順一, 川口剛司, 西村重徳, X線小角散乱法(SAXS法)を用いた*Paenibacillus polymyxa*由来 β -アミラーゼの溶液構造解析, 2011年度日本農芸化学会大会, 2011年3月26日, 京都
- ⑨ 久米弘之, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司, *Streptomyces corchorusii* 由来細胞表層結合型アミラーゼ遺伝子の*S. lividans*における発現, 平成22年度日本生物工学会大会, 2010年10月28日, 宮崎

[その他]

ホームページ等

<http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/AM/>
<http://www.bioinfo.osakafu-u.ac.jp/~inu>
 it/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

炭谷 順一 (SUMITANI JUN-ICHI)

大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: 10264813

(2) 研究分担者

西村 重徳 (NISHIMURA SHIGENORI)

大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・助教

研究者番号: 90244665