

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 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580110

研究課題名（和文）エンド型植物細胞表層多糖加水分解酵素の構造機能相関の解明

研究課題名（英文）Structure-function relationship of endo-type enzymes involved in plant cell surface 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：90343821

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サンの骨格である β -1,6-ガラクトサンに作用する酵素を放線菌から取得し、基質特異性、立体構造を解明した。詳細な基質認識機構の解明を目指し、配列的に区別できる別種の β -1,6-ガラクタナーゼを糸状菌から獲得し、立体構造の解明を試みたところ、結晶化には成功したが、立体構造を決定するには至らず、詳細な基質認識機構の解明には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：An endo- β -1,6-galactanase which act on thickening agent arabinogalactan was obtained from *Streptomyces avermitilis*. The substrate specificity and the crystal structure of the recombinant enzyme were elucidated. To understand the detail mechanism of substrate specificity of the endo- β -1,6-galactanase, the other endo- β -1,6-galactanase which consist from distinctive amino acid sequence was cloned and crystal of the recombinant enzyme was obtained. However, quality of the crystal was not enough to solve structure so that the mechanism of substrate specificity of the endo- β -1,6-galactanase could not be elucidated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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

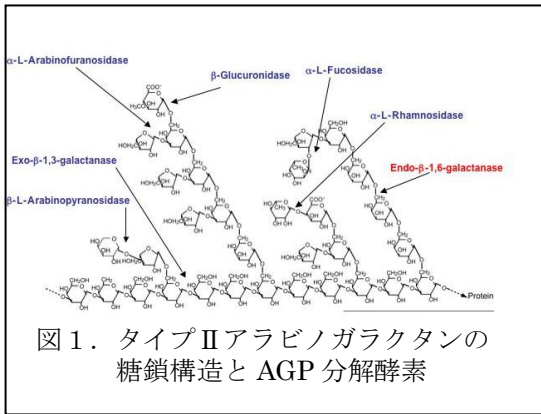
科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

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

アラビノガラクトサン-プロテイン (AGP) は高等植物の細胞表層プロテオグリカンであり、植物の生長、分化と密接な関係が示唆さ

れているが、詳細な機能は明らかになっていない。また、AGP は古くからガムアラビック等の増粘剤として食品に利用されてきた。一般的に AGP の分子量の約 90% 以上はアラビノ



ース、ガラクトースに富んだ糖鎖であり、タンパク部分はヒドロキシプロリン、セリン、スレオニン、アラニン、グリシンを多く含む事が知られている。AGPの糖鎖はタイプIIアラビノガラクトランであり、 β -1,3-結合のガラクトラン主鎖に β -1,6-結合のガラクトラン側鎖が分岐しており、更にその末端にはアラビノース、ラムノース、フコース、グルクロン酸などの糖が繋がった構造をしていると考えられている(図1)。

ゲノム解析の終了したシロイヌナズナでは少なくとも40種類以上のAGPのタンパク質部分をコードすると考えられる遺伝子が見出されており、極めて複雑な構造を持つ糖鎖とも関連して、研究は困難を極めている。

AGPの糖鎖構造を修飾できれば、新規なオリゴ糖生産、増粘剤の物性改変等、食品としての用途拡大が期待される他、生長・分化との関わりで注目されるAGPの機能解析にも有効な方法となり得る。AGPの糖鎖の分解には α -L-アラビノフラノシダーゼ、 β -1,6-ガラクトナーゼ、 β -1,3-ガラクトナーゼといった酵素が必要であるが、これらの酵素の研究例は少ない。特にガラクトナーゼについては遺伝子のクローニング例も報告されていなかったが、申請者を含む研究グループはエンド- β -1,6-ガラクトナーゼ、エキソ- β -1,3-ガラクトナーゼ、 α -L-アラビノピラノシダーゼなどの新規な酵素を世界に先駆けて獲得してきた。

エキソ- β -1,3-ガラクトナーゼとエンド- β -1,6-ガラクトナーゼは、タイプIIアラビノガラクトランの骨格をなすガラクトラン部分を加水分解するため、AGP糖鎖分解において重要な酵素である。エキソ- β -1,3-ガラクトナーゼは、 β -1,3-ガラクトランからガラクトースを遊離するエキソ型酵素であり、側鎖を持つガラクトースの結合をバイパスして加水分解することのできる特徴を有する珍しい酵素である。本酵素の構造機能相関については過去の科研費にて実施したが、エンド- β -1,6-ガラクトナーゼについては不明な点が多いため、本研究において実施する。

2. 研究の目的

本研究では下記の点を説明することを目的とする。

(1) AGP糖鎖分解能のある放線菌のゲノム上に見出されたエンド- β -1,6-ガラクトナーゼ遺伝子をクローニングし、異種発現する。組換え酵素の基質特異性を詳細に解析する。

(2) 組換えエンド- β -1,6-ガラクトナーゼの結晶化および立体構造解析を行う。

(3) 放線菌のエンド- β -1,6-ガラクトナーゼと同じファミリー(研究開始当初は放線菌のエンド- β -1,6-ガラクトナーゼは糖加水分解酵素ファミリー5(GH5)に分類されていたが、現在は分類が変更され、GH30に分類される)に分類されているが、配列的に区別されるエンド- β -1,6-ガラクトナーゼとの基質特異性のメカニズムを比較するため、*Aspergillus flavus*より、同酵素遺伝子をクローニングし、異種発現し、組換え酵素を得る。得られた組換え酵素の結晶化および立体構造解析を行う。

(4) 2種類のエンド- β -1,6-ガラクトナーゼの立体構造と基質特異性を比較し、同酵素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* のゲノム遺伝子を調製し、エンド- β -1,6-ガラクトナーゼ様遺伝子(SAV5205)を、PCRにより増幅し、大腸菌の発現系を用いて発現させ、組換え酵素の特性解析を行った。

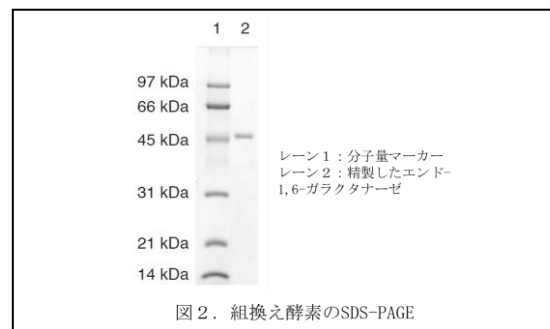
(2) 組換え酵素の結晶化・立体構造解析を行った。

(3) 糸状菌 *Aspergillus flavus* のcDNAを調製し、PCRによりエンド- β -1,6-ガラクトナーゼ様遺伝子(XP_002375352)を増幅し、*Pichia*の発現系により組換え酵素を得た。組換え酵素の結晶化を行った。

4. 研究成果

(1) 放線菌のエンド- β -1,6-ガラクトナーゼ

放線菌 *Streptomyces avermitilis* のゲノム遺伝子より、エンド- β -1,6-ガラクトナーゼ様遺伝子(SAV5205)を、PCRにより増幅し、大腸菌の発現系を用いて発現させ、組換え酵素を得た(図2)。



組換え酵素を様々な多糖に作用させ、活性を調べたところ、本酵素はAGPに作用したが、 β -1,3-ガラクトン、 β -1,4-ガラクトンには作用しなかった。また、 β -1,3- β -1,6-ガラクトンへの作用が確認されたことから、本酵素がエンド- β -1,6-ガラクタナーゼ活性を示すことが示唆された(表1)。

表1. 放線菌のエンド- β -1,6-ガラクタナーゼの多糖に対する基質特異性

Substrates	Relative activity (%)
β -1,3- β -1,6-Galactan from <i>P. zopfii</i>	100
Native AGP from tomato	9
Native AGP from radish	27
α -L-Arabinofuranosidase-treated AGP from radish	356
β -1,3-Galactan	0
Gum arabic	0
Larch arabinogalactan	0
Pectic galactan (β -1,4-galactan)	0
Lupin galactan (β -1,4-galactan)	0
Pustulan (β -1,6-glucan)	0
Laminarin (β -1,3- β -1,6-glucan)	0
CM-curdlan (β -1,3-glucan)	0
Lichenan (β -1,3- β -1,4-glucan)	0
CM-cellulose (β -1,4-glucan)	0
Guar gum (galactomannan)	0
Locust bean gum (galactomannan)	0
Soluble oat spelts xylan	0
Soluble birchwood xylan	0
Chitosan	0
Debranched arabinan	0
Arabinan	0

次に、組換え酵素を結合の異なるガラクトオリゴ糖へ作用させ、活性を確認した(表2)。

表2. 放線菌のエンド- β -1,6-ガラクタナーゼのガラクトオリゴ糖に対する基質特異性

Substrates	Relative activity (%)
β -1,6-Galactobiose	0.4
β -1,6-Galactotriose	11
β -1,6-Galactotetraoside	45
Methyl- β -1,6-galactopentaoside	100
Methyl- β -1,6-galactohexaoside	75
β -1,3-Galactobiose	0
β -1,3-Galactotriose	0
Methyl- β -1,3-galactotetraoside	0
Methyl- β -1,3-galactopentaoside	0
β -1,4-Galactobiose	0
β -1,4-Galactotriose	0

本酵素は β -1,3-結合、 β -1,4-結合のオリゴ糖には作用せず、 β -1,6-結合のオリゴ糖への作用が確認されたことから、本酵素がエンド- β -1,6-ガラクタナーゼ活性を示すことが示唆された。 β -1,3- β -1,6-ガラクトンの分解物をHPLCにより確認したところ、ガラクトビオースが主生成物であり、ガラクトースからガラクトヘプタオースまでのオリゴ糖の生成が確認されたことから、本酵素が、 β -1,6-結合を切断するエンド型酵素であることが明確になった(図3)。また、重合度の異なるオリゴ糖に対する活性から、本酵素が5個のサブサイトを有することが示唆された(表3)。

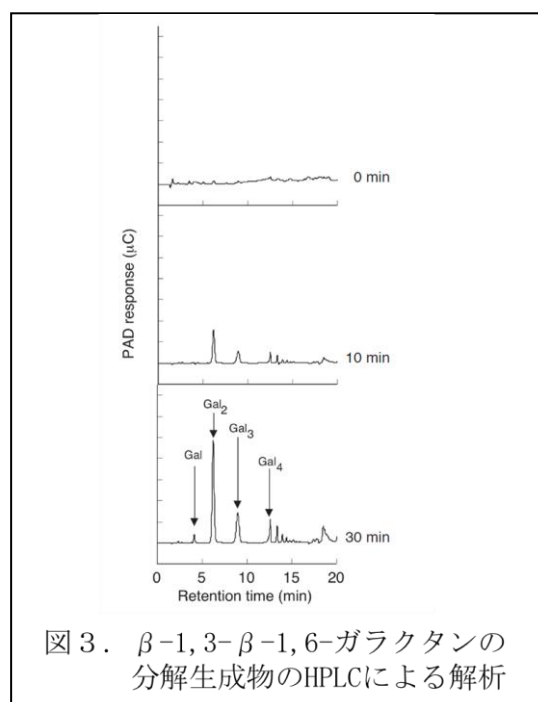


図3. β -1,3- β -1,6-ガラクトンの分解生成物のHPLCによる解析

表3. 放線菌のエンド- β -1,6-ガラクタナーゼの β -1,6-ガラクトオリゴ糖に対する反応速度

Degree of polymerization of β -1,6-galacto-oligosaccharides	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
2	35 ± 3
3	1019 ± 17
4	3975 ± 56
5	8933 ± 307
6	6688 ± 348

次に放線菌のエンド- β -1,6-ガラクタナーゼの結晶化を行った。20%Isopropanol, 20%PEG4000, 0.1M Sodium Citratre pH5.6の条件において、結晶を得た(図4)。

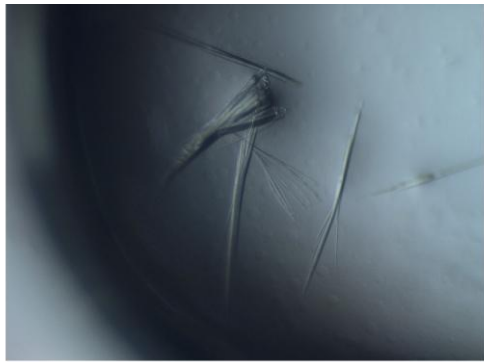


図4. 放線菌エンド-β-1,6-ガラクタナーゼの結晶

この結晶を用いて、立体構造が解明された(図5)。本酵素は(β/α)₈-バレル構造をしており、C末端側にもう一つのドメインが存在することが明らかとなった。しかしながら、このC末端側ドメインと基質との結合は確認できず、また、アミノ酸配列も既知の糖結合性タンパク質との相同性が低く、本ドメインがCBMである可能性は低い。



図5. 放線菌エンド-β-1,6-ガラクタナーゼの立体構造

β-1,6-ガラクトオリゴ糖のソーキングを試みたが、信頼できる解像度が得られなかったことから、表面モデルの凹凸、活性残基の位置により、本酵素の基質結合クレフトの位置を特定した(図6)。放線菌のエンド-β-1,6-ガラクタナーゼ基質結合クレフトには、数多くの芳香族アミノ酸が存在していることが確認され、これらアミノ酸と糖がスタッキング相互作用により、結合することが予想されたが、どの様にβ-1,3-結合、β-1,4-結合のガラクトンとβ-1,6-結合を識別しているかは、十分な情報が得られなかった。

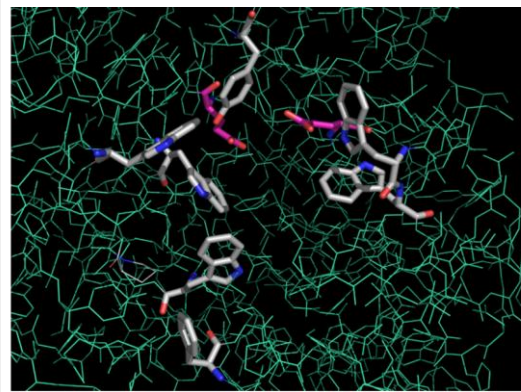


図6. 放線菌エンド-β-1,6-ガラクタナーゼの基質結合クレフト

(2)糸状菌のエンド-β-1,6-ガラクタナーゼ

糸状菌 *Aspergillus flavus* の cDNA を調製し、PCR によりエンド-β-1,6-ガラクタナーゼ様遺伝子 (XP_002375352) を増幅し、*Pichia* の発現系により組換え酵素を得た(図7)。組換え酵素の結晶化を行い。結晶を得ることができたが、構造解析に耐え得る質ではなかったため、エンドHにより糖鎖を除去した組換え酵素を調製し(図8)、結晶化を行った。しかしながら、現在までに、再現性良く結晶を得ることが出来ておらず、立体構造を解明するには至っていない。

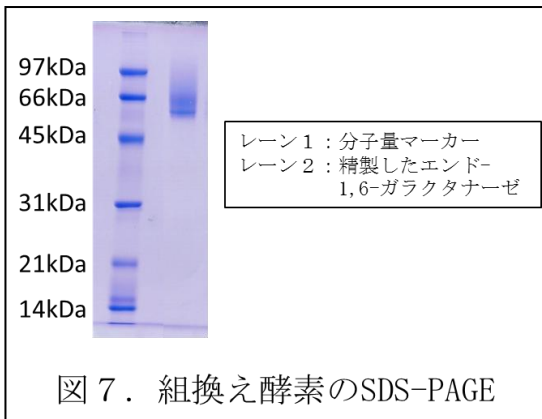


図7. 組換え酵素のSDS-PAGE

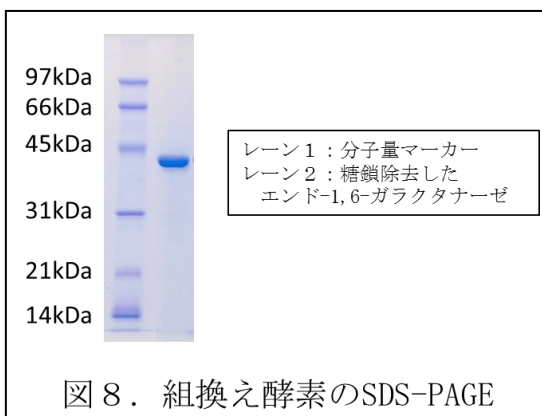


図8. 組換え酵素のSDS-PAGE

研究は予定通り進行しなかったが、本研究では、GH30 に分類されるエンド- β -1, 6-ガラクトナーゼの立体構造を世界で初めて明らかにした。図6に示す基質結合クレフトを形成するアミノ酸の変異体の解析により、エンド- β -1, 6-ガラクトナーゼの基質特異性のメカニズムが解明されることが期待される。今後も研究を継続し、エンド- β -1, 6-ガラクトナーゼの基質認識機構を詳細に解明していく予定である。

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)

①Hitomi Ichinose, Zui Fujimoto, and Satoshi Kaneko : Characterization of a α -L-rhamnosidase from *Streptomyces avermitilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 (2013) 77, 213-216.

②Zui Fujimoto, Adam Jackson, Mari Michikawa, Tomoko Maehara, Mitsuru Momma, Bernard Henrissat, Harry J. Gilbert, and Satoshi Kaneko : The structure of a *Streptomyces avermitilis* α -L-rhamnosidase reveals a novel carbohydrate-binding module CBM67 within the six-domain arrangement. *J. Biol. Chem.* 査読有 (2013) 288, 12376-12385.

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：9034821