

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780085

研究課題名(和文)糸状菌細胞壁溶解に適した  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of alpha-1,3-glucanase: the enzyme participates in fungal cell-wall hydrolysis

研究代表者

矢野 成和 (YANO, Shigekazu)

山形大学・理工学研究科・助教

研究者番号：50411228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：Bacillus circulans KA-304の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼAgl-KAは、DS1、CB6、DS2、UCDと触媒ドメインから成るマルチドメイン酵素である。ドメイン機能を解明するため、欠失変異酵素やGFP融合タンパク質を作製した。その結果、DS1、CB6とDS2が  $\alpha$ -1,3-グルカンやカビ細胞壁結合に関わる新規結合ドメインであった。さらなる構造や機能情報を得るため、新規  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼAgl-FH1を単離し、解析を行った。その結果、Agl-FH1はAgl-KAと似た性質を持つが、触媒ドメインの相同性は約20%であった。本結果は、触媒メカニズム解明に役立つものである。

研究成果の概要(英文)：Bacillus circulans KA-304 alpha-1,3-glucanase (Agl-KA) is a multi-domain enzyme, and it includes N-terminal DS1, CB6, DS2, UCD, and C-terminal catalytic domain. To clarify the role of these domains, we constructed several domain deletion enzymes and GFP-fusion proteins. As the results, DS1, CB6, and DS2 domain bound to alpha-1,3-glucan and fungal cell-wall, and that binding efficiency was increased by combined action. The findings indicate that DS1, CB6, and DS2 are novel alpha-1,3-glucan binding domain.

In order to obtain the further information on structure and function of alpha-1,3-glucanases, we purified and characterized a novel alpha-1,3-glucanase (Agl-FH1) of Paenibacillus glycanilyticus FH11. Although the properties of Agl-FH1 were almost the same as those of Agl-KA, the amino acid sequence of catalytic domain of Agl-FH1 showed approximately 20% identity to that of Agl-KA. The results may be beneficial to clarify the catalytic mechanism of the enzyme in the future.

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： $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ 細胞壁

## 1. 研究開始当初の背景

糸状菌類は、細胞の維持や外界からの保護のために細胞壁を持ち、その構成多糖として、 $\beta$ -グルカン、 $\alpha$ -1,3-グルカン、キチンやマンナンなどが知られている。動・植物に対する病原糸状菌の中には、宿主に感染する際に  $\alpha$ -1,3-グルカンで細胞壁表層を覆い隠すことで、宿主免疫機構による認識を回避できるものが存在する。例えば、イネイモチ病カビ (*Magnaporthe grisea*) は、イネ葉面に付着し菌糸を侵入させる際に、細胞壁表層を  $\alpha$ -1,3-グルカンで覆い隠す。イネは、真菌細胞壁多糖の  $\beta$ -グルカンやキチンを異物と認識することはできるが、 $\alpha$ -1,3-グルカンを認識することはできず、また、それを分解する酵素を持たないので、容易に感染されてしまう。また、動物感染性糸状菌のなかにも、 $\alpha$ -1,3-グルカンを利用して生体内に侵入するものが報告されている。病原糸状菌の  $\alpha$ -1,3-グルカンによる防衛策を解除することができれば、医療、農業や食品分野での甚大な被害を軽減できる。

申請者は、*Bacillus circulans* KA-304 が  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ (Agl-KA) を分泌することを見出した。培養濾液から単離した Agl-KA は、長鎖で直鎖  $\alpha$ -1,3-グルカンのみを加水分解し、糸状菌細胞壁  $\alpha$ -1,3-グルカンの溶解活性も有していた。すなわち、*B. circulans* KA-304 の Agl-KA は、病原糸状菌の防除や解析に利用できる有用酵素であることを示している。

本酵素遺伝子をクローニングしアミノ酸配列を解析した結果、本酵素は、Glycoside hydrolases family 87 型酵素 (GH87 型酵素) に分類された。GH87 型酵素に関していくつかの報告があるが、ドメイン機能解析などは行われていない。本酵素の構造や機能を解析することで、新規の病原糸状菌防除技術や検出・解析技術の開発につながる。

## 2. 研究の目的

*B. circulans* KA-304 の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ Agl-KA は、N 末端から carbohydrate-binding module family32 (CBM32) に分類される Discoisin domain 1 (DS1)、CBM6 domain (CB6)、トレオニンとプロリンの繰り返し配列、DS2、機能未知 domain (UCD) と C 末端に GH87 型酵素の特徴的な触媒ドメインから構成されている。本酵素を利用した新規の病原糸状菌防除技術や検出・解析技術を開発するためには、複雑なドメイン構造を持つ理由を個々のドメイン機能を解析することで明らかにしなければならない。また、触媒ドメインはアミノ酸配列解析の結果から、C 末端のおおよそ 600 アミノ酸残基から構成されていることは予測できるが、触媒必須アミノ酸や基質取り込み

に關与するアミノ酸などは全く分かっていない。

本研究では、DS1、CB6、DS2、UCD を欠失させた変異酵素や、それらドメインに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を結合させた GFP 融合タンパクを作製する。作製した変異酵素や融合タンパクの機能解析を行い各ドメインの機能や糸状菌細胞壁溶解への寄与を明らかにする。次いで、触媒機構を解明するために、触媒ドメインだけからなる変異酵素を作製し、反応特性を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 欠失変異酵素と GFP 融合タンパク質の作製

Agl-KA の各ドメインの機能を解明するために、Agl-KA の N-末端から順にドメインを欠失させた変異酵素 (Agl-KA $\Delta$ DS1、Agl-KA $\Delta$ DS1CB6、Agl-KA $\Delta$ DS1CB6DS2、Agl-KA $\Delta$ DCD-UCD) の遺伝子を調製する (図 1A)。それぞれの遺伝子を発現ベクターに導入し、*Escherichia coli* Rosetta-gami B (DE3) で発現させる。各種クロマトグラフィーを用いて精製し、得られた変異酵素の  $\alpha$ -1,3-グルカン加水分解活性、 $\alpha$ -1,3-グルカン結合活性や *Shizophyllum commune* プロトプラスト生成活性を調べる。

DS1、CBM6、DS2、UCD domain の  $\alpha$ -1,3-グルカン結合能を評価するために、図 1B に示す融合タンパク質の発現ベクターを作製し、大腸菌で発現させる。精製タンパク質を用いて、 $\alpha$ -1,3-グルカン結合活性と *S. commune* 菌糸に対する結合活性を測定する。

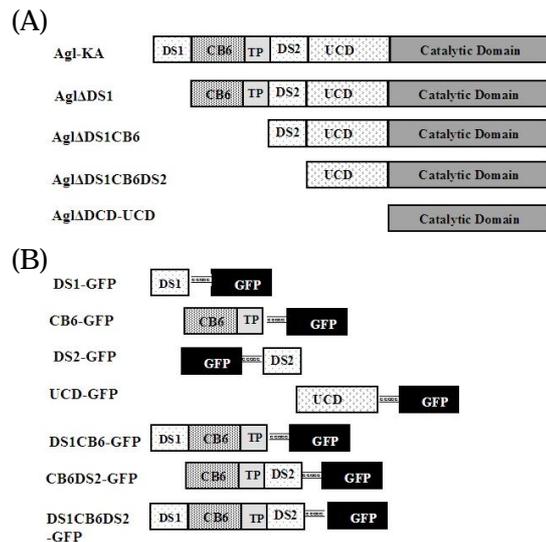


図 1 Schematics for the structure of deletion enzymes (A) and GFP fusion proteins (B).

### (2) 新規 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ生産菌のスクリーニング

$\alpha$ -1,3-グルカナーゼの触媒必須アミノ酸を明らかにするため、新規の GH87 型酵素の探索を行う。土壌サンプルより  $\alpha$ -1,3-グ

ルカーゼ生産菌を探索し、酵素の精製を行う。次に、精製酵素の部分アミノ酸配列の情報をもとに遺伝子をクローニングする。大腸菌での発現系を確立し、酵素の性質を解析する。さらに、アミノ酸配列比較を行い、触媒必須アミノ酸を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) Agl-KA と欠失変異酵素の比較

Agl-KA と欠失変異酵素の  $\alpha$ -1,3-グルカン加水分解活性を測定した。図 2A に示すように、*N*-末端から DS1、CB6 と DS2 ドメインの欠失数が増えるにつれ、基質の加水分解によって生じる遊離還元糖量が減少した。

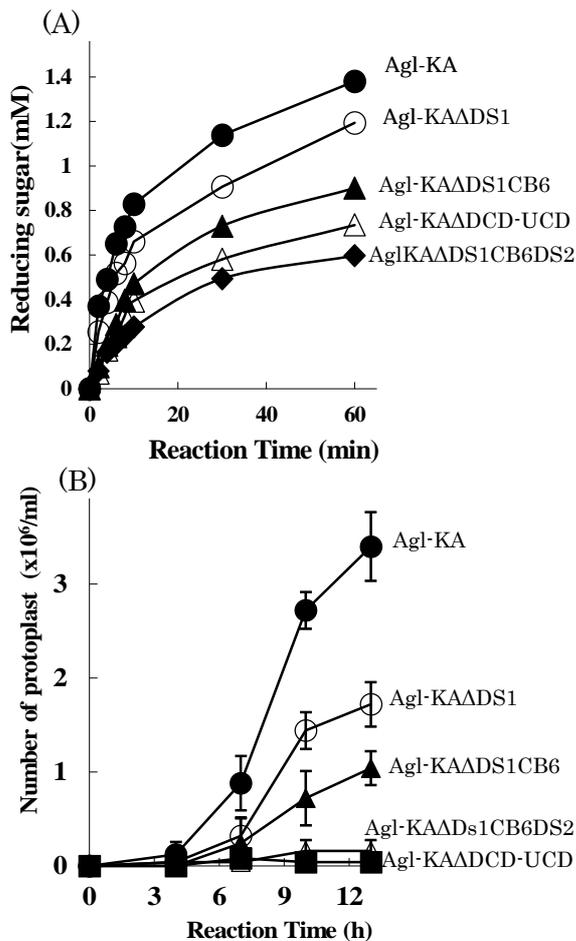


図 2  $\alpha$ -1,3-Glucan hydrolyzing activity (A) and Protoplast forming activity (B).

(A)  $\alpha$ -1,3-Glucan hydrolyzing activity was determined at 30°C in 50 mM potassium phosphate buffer using 1% of substrate and 0.15 nmol/mL enzyme

(B) Each enzyme (2 nmol/mL) was added to a reaction mixture for protoplast formation, which contained 2 nmol/mL chitinase I, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 5), 500 mM monnitol, and 0.1 mg of *S. commune* mycelia.

次いで、欠失変異酵素の  $\alpha$ -1,3-グルカン結合活性を測定したところ、野生型 Agl-KA は基質に対して 32% 結合するが、DS1 ドメイン欠失させることで結合率が 23% まで低下した。DS1 と CB6 の 2 ドメインを欠失させると結合能はほとんど失われた。以

上の結果は、DS1、CB6 と DS2 ドメインが  $\alpha$ -1,3-グルカンの結合に関わる新規のドメインであることを、また、基質分解に対しても影響を及ぼすことを示唆した。

Agl-KA は、*B. circulans* KA-304 由来の GH 19 型キチナーゼ (CHI 1) と共同して *S. commune* 菌糸よりプロトプラストを生成する。これは、両酵素が細胞壁多糖を溶解することで起こる現象であり、欠失変異酵素の細胞壁溶解活性の測定に利用できる。図 2B に、*S. commune* 菌糸とキチナーゼ CHI 1 を含む反応液に欠失変異酵素を添加し、プロトプラスト数を計測した結果を示す。Agl-KA と Agl-KA $\Delta$ DS1 を比較すると、プロトプラスト生成数がおおよそ半分になった。さらに、ドメイン欠失数が増加することでプロトプラスト生成数は減少した。

##### (2) GFP 融合タンパク質の結合活性

DS1、CB6 と DS2 ドメインが、細胞壁への結合に関与しているか確認するために、各種 GFP 融合タンパク質を調製し、*S. commune* 菌糸に対する結合能を評価した。

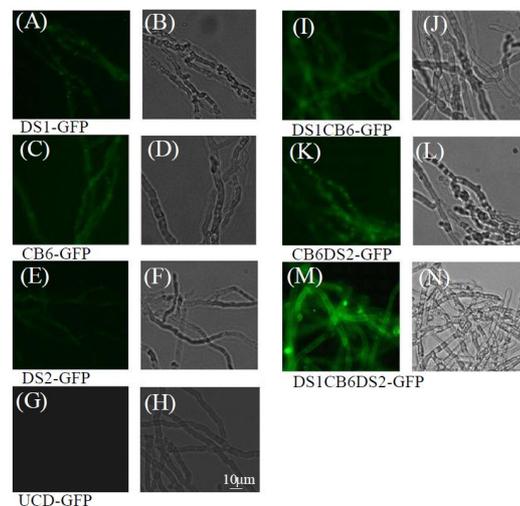


図 3 Cell wall-binding activity of GFP fusion proteins.

A, C, E, G, I, K and M are fluorescence images, B, D, F, H, J, L and N are light images.

図 3 が示すように、DS1、CB6、あるいは DS2 は単独ではほとんど細胞壁には結合しなかったが、2 つのドメインが並んだ DS1CB6-GFP と CB6DS2-GFP では、細胞壁に対する結合能が増した。さらに、3 ドメイン (DS1CB6DS2-GFP) が揃うことで、細胞壁に対する結合はより強固になった。

以上の結果から、Agl-KA は、 $\alpha$ -1,3-グルカン結合ドメインを複数持つことによって、細胞壁に結合でき、容易に細胞壁  $\alpha$ -1,3-グルカンを分解できることを示している。なお、ここまでの研究成果は、英文科学雑誌に発表した。また、今回得られた DS1CB6DS2-GFP は、細胞壁  $\alpha$ -1,3-グルカンに特異的に結合する性質があるので、糸状

菌検出技術に応用できる成果である。

現在、DS1、CB6とDS2に関して、一般的な多糖結合タンパク質の結合アミノ酸として報告されているトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンアラニンに置換した変異酵素を作製し、 $\alpha$ -1,3-グルカン結合能を評価している。現時点で、各ドメイン中に、基質結合に関わるトリプトファンが存在することを明らかにしており、この研究結果を英文科学雑誌発表すべく、準備を進めている。

### (3) 新規 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ Agl-FH1

GH87型  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼに関する報告例は複数存在するが、それら酵素の多くは、類似した触媒ドメイン配列を持つ。 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの触媒必須アミノ酸を明らかにするため、新規のGH87型酵素の探索を行った。その結果、土壌より分離した *Paenibacillus glycanilyticus* FH11 が、新規  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ Agl-FH1 を生成することを明らかにした。Agl-FH1 触媒ドメインのアミノ酸配列は、*B. circulans* KA-304 の Agl-KA と約 20% しか相同性を示さなかった。既知のGH87型  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼと系統解析を行った結果が図4であり、Agl-FH1 はグループ2に属している。一方、既知酵素のほとんどがグループ1に属しており、その違いが明らかである。

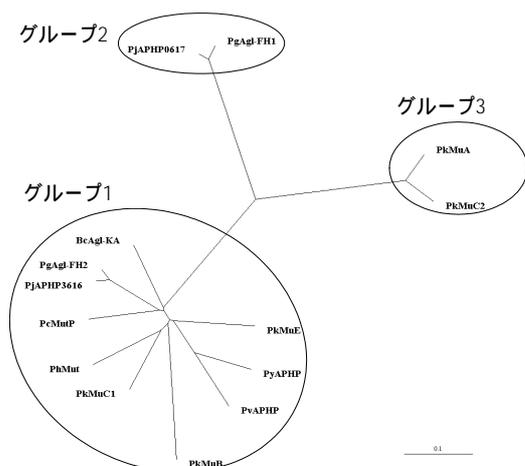


図4 Phylogenetic tree of  $\alpha$ -1,3-glucanases.

Abbreviations and accession number of  $\alpha$ -1,3-glucanases are as follows: PgAgl-FH1,  $\alpha$ -1,3-glucanase *P. glycanilyticus* FH11 (type I); PgAgl-FH2,  $\alpha$ -1,3-glucanase *P. glycanilyticus* FH11 (type II); BcAgl-KA,  $\alpha$ -1,3-glucanase *B. circulans* KA-304 (BAE98302); PhMut,  $\alpha$ -1,3-glucanase *P. humicus* (BAI23187); PcMutP,  $\alpha$ -1,3-glucanase *P. curdianolyticus* (ADT91063); PkMuA,  $\alpha$ -1,3-glucanase *Paenibacillus* sp. KSM-35 (BAG15878); PkMuB,  $\alpha$ -1,3-glucanase *Paenibacillus* sp. KSM-86 (BAF56208); PkMuC1,  $\alpha$ -1,3-glucanase *Paenibacillus* sp. KSM-126 (BAG15879); PkMuC2,  $\alpha$ -1,3-glucanase *Paenibacillus* sp. KSM-126 (BAG15880); PkMuE,  $\alpha$ -1,3-glucanase *Paenibacillus* sp. KSM-138 (BAH10514); PjAHPH0617, AHPH *Paenibacillus* sp. JDR 2 (YP\_003009383); PjAHPH3616, *Paenibacillus* sp. JDR 2 (YP\_003012334); PyAPHP, AHPH *Paenibacillus* sp. Y412MC10 (YP\_003242479); PvAPHP, *P. vortex* (WP\_006209693).

さらに、Agl-FH1の基質特異性や反応至適条件、プロトプラスト生成活性を調べたが、Agl-KAとの間に大きな差は見つからなかった。以上の研究結果は、GH87型  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの触媒必須アミノ酸を明らかにするために重要な情報であり、英文科学雑誌に報告した。

### (4) $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの触媒必須アミノ酸の解析

多糖加水分解酵素の触媒必須アミノ酸が、グルタミン酸やアスパラギン酸であることが多い。Agl-KAの触媒ドメインのみから構成されるAgl-KA $\Delta$ DCD-UCDのグルタミン酸、あるいはアスパラギン酸アラニンに置換するために、部位特異的変異を導入した。約20種の変異酵素について、 $\alpha$ -1,3-グルカンの加水分解活性を測定したところ、活性が著しく低下するアスパラギン酸を3箇所見出した。これらアミノ酸は、Agl-FH1や既知の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼにも保存されていた。さらに、触媒残基と思われるアスパラギン酸をグルタミン酸に置換した結果、 $\alpha$ -1,3-グルカンを加水分解した際に遊離するオリゴ糖の鎖長が変化した。

以上の研究成果は、反応機構が明らかにされていないGH87型  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼにとって、新たな知見を与えるものであり、英文科学雑誌発表すべく、準備を進めている。

### 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 4件)

Suyotha W., Yano S., Itoh T., Fujimoto H., Hibi T., Tachiki T., Wakayama M. Characterization of  $\alpha$ -1,3-glucanase isozyme from *Paenibacillus glycanilyticus* FH11 in a new subgroup of family 87  $\alpha$ -1,3-glucanase. *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, in press. (2014).

Yoshimi A., Sano M., Inaba A., Kokubun Y., Fujioka T., Mizutani O., Hagiwara D., Fujikawa T., Nishimura M., Yano S., Kasahara S., Shimizu K., Yamaguchi M., Kawakami K., Abe K. Functional analysis of the  $\alpha$ -1,3-glucan synthase genes agsA and agsB in *Aspergillus nidulans*: agsB is the major  $\alpha$ -1,3-glucan synthase in this fungus. *PLoS One*, 査読有, 8(1):e54893. (2013).

Suyotha W., Yano S., Takagi K., Rattanakit-Chandet N., Tachiki T., Wakayama M. Domain structure and function of  $\alpha$ -1,3-glucanase from *Bacillus circulans* KA-304, an enzyme essential for degrading basidiomycete cell walls. *Biosci. Biotechnol.*

Biochem., 査読有, 77(3): 639-647. (2013)

Fujikawa T., Sakaguchi A., Nishizawa Y., Kouzai Y., Minami E., Yano S., Koga H., Meshi T., Nishimura M. Surface  $\alpha$ -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants. PLoS Pathog., 査読有, 8(8):e1002882. (2012).

〔学会発表〕(計 6件)

矢野 成和、ワサナ スヨータ、立木 隆、若山 守. *Bacillus circulans* KA-304 由来  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの基質結合ドメイン. 日本農芸化学会東北支部第 148 回大会. 2013 年 10 月 26 日. 岩手大学農学部.

ワサナ スヨータ、藤本 寛子、矢野 成和、立木 隆、若山 守. *Paenibacillus* sp. FH11 が生成する  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼのクローニング. 第 65 回日本生物工学会大会. 2013 年 9 月 19 日. 広島国際会議場.

矢野 成和、ワサナ スヨータ、立木 隆、若山 守. 細菌型  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼのドメイン構造. 第 65 回日本生物工学会大会. 2013 年 9 月 19 日. 広島国際会議場.

矢野 成和、ワサナ スヨータ、藤本 寛子、立木 隆、若山 守. 糸状菌細胞壁溶解に寄与する *Paenibacillus* sp. No.11 株由来  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの解析. 日本農芸化学会 2013 年度大会. 2013 年 3 月 25 日. 東北大学.

安井 智美、ワサナ スヨータ、矢野 成和、立木 隆、若山 守.  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ生産菌の探索と系統分類. 日本生物工学会 第 19 回九州支部大分大会. 2012 年 12 月 1 日. 別府大学

Suyotha W., Yano S., Tachiki T., Wakayama M. N-terminal region of  $\alpha$ -1,3-glucanase from *Bacillus circulans* KA-304. 15<sup>th</sup> International Biotechnology Symposium and Exhibition. 16-21 Sep. 2012. Exco. Daegu. Korea.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢野 成和 (YANO, SHIGEKAZU)

山形大学・大学院理工・助教

研究者番号：50411228