

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660083

研究課題名(和文)植物由来の新規な活性中心を持つグリコシダーゼの構造機能解析

研究課題名(英文)Structural and functional analysis of glycosidases from plants that have a novel active center

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(農学部)・教授

研究者番号：00302589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DUF1680に分類される植物由来の機能未知酵素の構造と機能を明らかにすることを当初の目的として研究を行った。シロイヌナズナとイネの遺伝子について異種発現を行い、多数の条件を試みたが、いずれも発現しないか不溶性でしか発現しなかった。新規ファミリーGH146に分類される植物病原菌(Xanthomonas属)由来の-L-アラビノフラノシダーゼについて立体構造を決定し、その活性中心がピフィズス菌由来のGH127酵素(HypBA1)と同様にシステインであることを明らかにした。さらに、本酵素が新規な糖質結合ドメインを有することがわかった。

研究成果の概要(英文)：We initially aimed to study the structure and function of uncharacterized enzyme from plants that belong to DUF1680. Although we examined heterologous expression of the genes from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* under various conditions, they did not express or expressed as insoluble aggregates. We determined a novel crystal structure of a GH146 -L-arabinofuranosidase from plant pathogen, *Xanthomonas*. The active site of the *Xanthomonas* enzyme was cysteine, like the case of GH127 enzyme (HypBA1), and the enzyme had a novel carbohydrate-binding module domain.

研究分野：酵素学、構造生物学、農芸化学

キーワード：グリコシダーゼ シロイヌナズナ イネ -アラビノオリゴ糖

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに糖質加水分解酵素(GH)ファミリー127 および機能未知ドメイン(DUF)1680 に分類されるピフィズス菌由来の $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ(HypBA1)の活性中心が、亜鉛に結合したシステインであることを明らかにした。システイン型のプロテアーゼはよく知られているが、グリコシダーゼでは、現在約150ものGHファミリーが存在するにもかかわらず、我々が研究を開始した当初においては、GH127以外に前例がなかった。また、研究開始当初は $\beta$ -L-アラビノフラノシドに作用する酵素は、GH127に属するピフィズス菌由来の酵素HypBA1が唯一の例であり、それ以外には知られていなかった。しかし、 $\beta$ -L-アラビノオリゴ糖は植物細胞壁のヒドロキシプロリン-リッチ糖タンパク質(HRGP)および糖ペプチドホルモンに豊富に普遍的に存在することが知られている。GH127には基本的には原核微生物由来のタンパク質しか分類されていないが、GH127を含むより広いタンパク質ファミリーであるDUF1680(図1)では、真核微生物や植物のゲノム由来のタンパク質が含まれている。したがって、これらのDUF1680タンパク質は、HRGPや糖ペプチドホルモンの分解および再構築に関わることで植物の発生、成長、病原性や生理機能に大きな影響を与える可能性があるかと予想される。

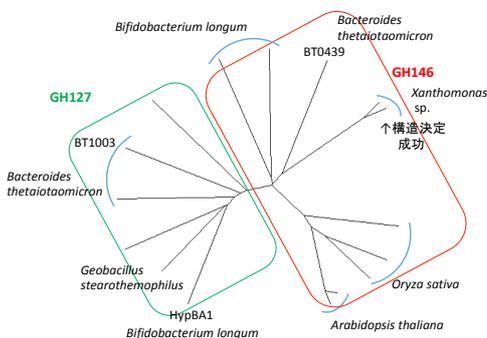


図1 GH127とGH146のDUF1680遺伝子の分子系統樹

## 2. 研究の目的

本研究ではシロイヌナズナとイネのDUF1680遺伝子をクローニングし、異種発現したタンパク質の機能を調べ、立体構造解析を組み合わせて、それらの酵素の作用機構を解明し、植物の生理に与える影響の考察につなげることを当初の目的とした。しかし、本研究を進めるにつれ、植物由来のタンパク質が活性を持った状態で可溶性の異種発現を行わせることが困難であることが明らかとなったため、植物病原菌であるXanthomonas属細菌由来の新規酵素の機能・構造解析を進めることにした。本研究では、機能あるいは構造が明らかとなっている酵素と配列相同性が極めて低い、新規性の高いタンパク質の構造機能解析を行うことを目的とした。

なお、ごく最近、英国を中心としたグループにより、腸内細菌Bacteroides thetaiotaomicron由来のゲノム配列から、ペクチン的一种であるラムノガラクトン-I分解酵素遺伝子群の中にある、DUF1680に属するBT0349が $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ活性を持つことが報告され(Luis et al., Nat. Microbiol. 3, 210-219, 2018)、これまでGH127に未分類だったDUF1680の多くが新規ファミリーGH146に分類されることになった。本研究で構造を明らかにしたXanthomonas属由来の新規酵素も、GH146に分類されている。

## 3. 研究の方法

(1)シロイヌナズナとイネのcDNAライブラリーを理化学研究所と農業生物資源研究所から取り寄せた。PCR法によって5種の植物由来DUF1680遺伝子(シロイヌナズナ由来のAT5G12950、AT5G12960、イネ由来のOs02g0195500、Os06g0612900、BAD35523)をクローニングし、発現ベクターにライゲーションした。これらの遺伝子の異種発現を、大腸菌Escherichia coliとメタノール産化性酵母Pichia pastorisを用いて検討した。各種の宿主株、ベクター、発現誘導条件、可溶化条件を検討した。

(2)植物病原菌であるXanthomonas属由来のDUF1680遺伝子2種類を、大腸菌BL21(DE3)株とpET-23bベクターを用いて大量発現した。Niアフィニティクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いてタンパク質を精製した。その後、スクリーニングキットを用いて、結晶化を行った。結晶が得られたサンプルに関しては、放射光施設(茨城県・つくば市の高エネルギー加速器研究機構および兵庫県の高エネルギー加速器研究機構)にてX線結晶構造解析を行った。位相の決定にはSe-SAD法を使用した。セレノメチオン置換体の発現には、BL21(DE3)CodonPlus-RIL-X株を用いて、セレノメチオンを用いた最少培地で培養してタンパク質を得た後、上記のステップを経て精製した。活性測定には共同研究者の石渡明弘博士と伊藤幸成博士(理化学研究所)らにより有機合成された基質であるpNP- $\beta$ -アラビノフラノースを用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1)植物由来の発現条件検討

シロイヌナズナとイネのDUF1680遺伝子群のクローニングに成功して、異種発現を検討した。

大腸菌では、まず、一般的な発現ベクターとしてpET-23bによりC末端にHis-tagを導入したものと、pET-28aによりN末端にHis-tagを導入したものを用意した。基本的な発現宿主として、BL21(DE3)株およびC43(DE3)株を用いた。それ以外に、各種の

レアコドン増強株(CodonPlus株)、レアコドン強化に加えてチオレドキシソレダクターゼ遺伝子およびグルタチオンレダクターゼ遺伝子変異によりジスルフィド結合を促進させる宿主である Rosetta-gami株も用いた。また、低温での発現およびフォールディングを行わせるために、pCold-Iベクターでの発現も試みた。さらに、GSTタンパク質とのフュージョンタンパク質の発現を、pGEX-5X-1およびpGEX-6P-1ベクターを用いて試みた。誘導条件に関しては、誘導基質であるイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)濃度、誘導時の菌体濃度(OD)、誘導後の培養温度および時間を検討した。また、還元状態を維持するためにジチオスレイトールを添加した条件での誘導条件も検討した。その結果の一例を図2に示す。

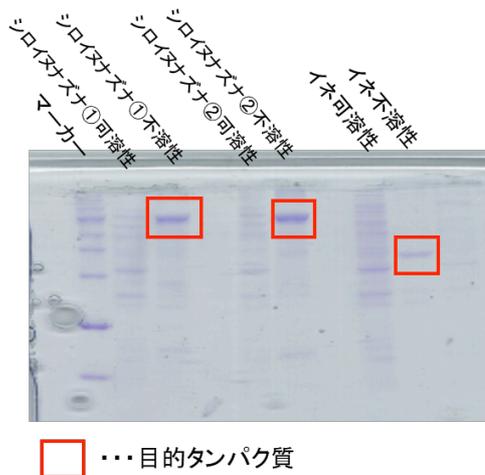


図2 シロイヌナズナ・イネ由来DUF1680の発現

ここに示したように、大腸菌で各種条件での発現を検討した結果、全ての条件でタンパク質の発現が全く観察されないか、もしくは不溶性タンパク質として発現していることがわかった。

続いて、真核生物由来の宿主として、メタノール産化性酵母である *Pichia pastoris* の発現を検討した。発現株としては KM71H株を用いた。また、本研究で用いたタンパク質は全てシグナル配列が存在するために、*Pichia* ではα-ファクターシグナルを用いた分泌発現系を構築することを目指して、pPICZαベクターを用いた。本ベクターへの遺伝子の載せ替えの後、形質転換株を取得した。全ての植物由来 DUF1680 遺伝子の形質転換株を取得し、それぞれの株について発現条件の検討を行った(図3)。その結果、全ての条件において、目的タンパク質のサイズに相当する 80 kDa 付近にバンドは見られず、異種発現を確認することは出来なかった。

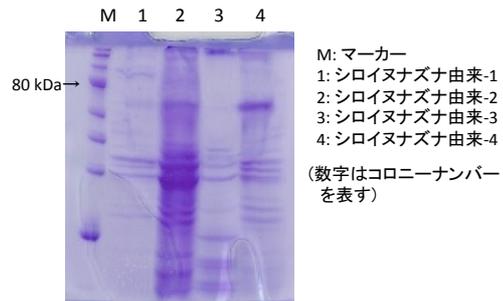


図3 *Pichia pastoris*を用いた発現の確認

## (2)植物病原菌 *Xanthomonas* 属由来β-L-アラビノフラノシダーゼの構造決定

*Xanthomonas* 属由来の GH146 タンパク質2種類を、大腸菌を用いて発現させ、合成基質である pNP-β-L-アラビノフラノースを用いて、β-L-アラビノフラノシダーゼの活性を確認した。Native結晶を用いて回折像を得た後、セレノメチオニンタンパク質を、大腸菌を用いて発現から精製を経て結晶化スクリーニングを行った結果、そのうち1種類で結晶が得られた。このサンプルについて、Se-SAD法によって初期位相を決定し、Nativeタンパク質の結晶により2.3Å分解能の立体構造を決定した。この構造は、 $R = 19.6\%$ 、 $R_{free} = 25.9\%$ まで精密化を行っている。本酵素はこれまでに明らかになっていた二量体で存在するビフィズス菌由来のβ-L-アラビノフラノシダーゼとは異なり、単量体で存在していた。また、新たに糖質結合モジュールと構造が類似する新規ドメインの存在が明らかになった(図4)。

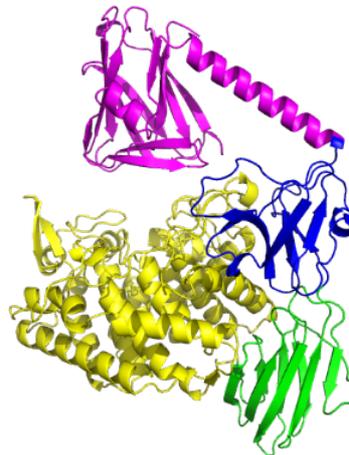


図4 *Xanthomonas*属由来GH146の全体構造

活性部位においては、HypBA1と同様に亜鉛原子が存在しており、3つのシステイン残基とグルタミン酸残基によって配位されていた(図5)。求核触媒残基と推定されるシステイン残基に加えて、酸/塩基触媒残基と推定されるグルタミン酸残基の位置もHypBA1と同様であった。すなわち、GH127で発見された新規なグリコシダーゼの活性中心は、GH146においても保存されていることが明らかになった。

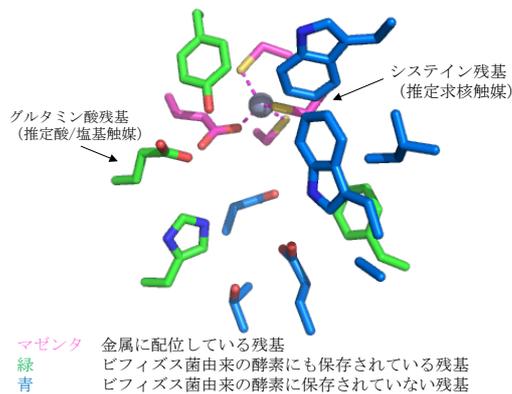


図5 *Xanthomonas*属由来  $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼの活性中心

その一方で、糖の認識に関わる残基については保存されていないことが分かった。*Xanthomonas* 属由来の GH146 酵素は植物への感染において重要な役割を果たすと予想されているのに対し、腸内細菌であるビフィズス菌および *Bacteroides* 属細菌由来の酵素(GH127 HypBA1 および GH146 BT0349) は、食品由来の糖タンパク質 (HRGP) や、食物繊維 (ペクチン) の分解に関わると予想されることから、同じ  $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼであっても、 $\beta$ -1,2-、 $\beta$ -1,3-などの結合特異性や、アグリコン部位などに対する基質特異性が異なると考えられる。なお、*B. thetaiotaomicron* 由来の別の GH127 酵素 (BT1003) は、 $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼではなく、ペクチンの一種であるラムノガラクトクロナン-II に含まれるアセル酸の加水分解酵素であると同定されており (Ndeh et al. *Nature*, **544**, 65-70, 2017)、DUF1680 に含まれる GH127 および GH146 の酵素には、さらなる多様性が存在すると予想される。

## 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 7件)

- ① A.H. Viborg, T. Katayama, T. Arakawa, M. Abou Hachem, L. Lo Leggio, M. Kitaoka, B. Svensson, and S. Fushinobu. Discovery of  $\alpha$ -L-arabinopyranosidases from human gut microbiome expands the diversity within glycoside hydrolase family 42. *J. Biol. Chem.* **292**, 21092-21101 (2018) (査読有)
- ② M. Sato, D. Liebschner, Y. Yamada, N. Matsugaki, T. Arakawa, S. S. Wills, M. Hattie, K. A. Stubbs, T. Ito, T. Senda, H. Ashida, and S. Fushinobu. The first crystal structure of a family 129 glycoside hydrolase from a probiotic bacterium reveals critical residues and metal Co-factors. *J. Biol. Chem.* **292**, 12126-12138 (2017) (査読有)
- ③ C. Yamada, A. Gotoh, M. Sakanaka, M. Hattie, K. A. Stubbs, A. Katayama-Ikegami, J. Hirose, S. Kurihara, T. Arakawa, M. Kitaoka, S.

Okuda, T. Katayama, and S. Fushinobu. Molecular insight into evolution of symbiosis between breast-fed infants and a member of the human gut microbiome *Bifidobacterium longum*. *Cell Chem. Biol.* **24**, 515-524 (2017) (査読有)

④ T. Tsuda, T. Nihira, K. Chiku, E. Suzuki, T. Arakawa, M. Nishimoto, M. Kitaoka, H. Nakai\*, and S. Fushinobu. Characterization and crystal structure determination of  $\beta$ -1,2-mannobiose phosphorylase from *Listeria innocua*. *FEBS Lett.* **589**, 3816-3821 (2015) (査読有)

⑤ Y.-W. Nam, T. Nihira, T. Arakawa, Y. Saito, M. Kitaoka, H. Nakai, and S. Fushinobu. Crystal structure and substrate recognition of cellobionic acid phosphorylase, which plays a key role in oxidative cellulose degradation by microbes. *J. Biol. Chem.* **290**, 18281-18292 (2015) (査読有)

⑥ K. Suzuki, A. Hori, K. Kawamoto, R. R. Thangudu, T. Ishida, K. Igarashi, M. Samejima, C. Yamada, T. Arakawa, T. Wakagi, T. Koseki, and S. Fushinobu. Crystal structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: a disulfide bond near a catalytic triad. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **82**, 2857-2867 (2014) (査読有)

⑦ T. Ito, K. Saikawa, S. Kim, K. Fujita, A. Ishiwata, S. Kaeothip, T. Arakawa, T. Wakagi, G. T. Beckham, Y. Ito, and S. Fushinobu. Crystal structure of glycoside hydrolase family 127  $\beta$ -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **447**, 32-37 (2014) (査読有)

[学会発表] (計 4件)

- ① 澤野孝太ら、*Xanthomonas* 属細菌由来  $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼの結晶構造、2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017年12月8日、「神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)」
- ② 伏信進矢、ビフィズス菌が腸内の糖質を分解するための酵素のかたちと動き、日本応用糖質科学会大会・特別シンポジウム (招待講演)、2016年9月16日、「福山県民文化センター (広島県・福山市)」
- ③ Shinya Fushinobu et al, Structural study of enzymes from beneficial gut bacteria for degradation of human glycans (依頼講演)、Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology Conference (7th ACGG)、2015年11月14日、「ホテル大観荘 (宮城県・松島)」
- ④ 伊藤佑ら、チオグリコシド中間体を經由する GH127  $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼの触媒メカニズム、日本糖質学会年会ワークショップ、2015年8月1日、「東京大学 (東京都・文京区)」

[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〕

ホームページ等

## 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・教授  
研究者番号：00302589

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

藤田 清貴 (FUJITA, Kiyotaka)  
鹿児島大学農学部・准教授

石渡 明弘 (ISHIWATA, Akihiro)  
理化学研究所・専任研究員

伊藤 幸成 (ITO, Yukishige)  
理化学研究所・主任研究員

Gregg T. Beckham  
米国 NREL・研究員