

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450140

研究課題名(和文) 厳密な基質特異性を有するアラビノフラノシダーゼの構造機能相関の解明

研究課題名(英文) Structure-function relationship of an arabinofuranosidase which have strict substrate specificity

研究代表者

金子 哲 (Kaneko, Satoshi)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：90343821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖加水分解酵素ファミリー62 (GH62) に分類されるアラビノフラノシダーゼはアラビノキシランには作用するが、アラビナンやアラビノガラクトンといったアラビノース含有多糖には作用しない厳密な基質特異性を有するが、そのメカニズムは不明であった。本研究では、放線菌のGH62アラビノフラノシダーゼの結晶構造を解明し、その基質特異性を決定するメカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：-L-Arabinofuranosidase, which belongs to the glycoside hydrolase family 62 (GH62), hydrolyzes arabinoxylan but not arabinan or arabinogalactan. The crystal structures of several -L-arabinofuranosidases have been determined, although the structures, catalytic mechanisms, and substrate specificities of GH62 enzymes remain unclear. To evaluate the substrate specificity of a GH62 enzyme, we determined the crystal structure of an -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces coelicolor*.

研究分野：農学

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

最も賦存量の多いヘミセルロースであるキシランは、セルロースに次いで地球上に2番目に多く存在するバイオマス資源である。ヘミセルロースの最大の特徴はヘテロ多糖であること、構成糖の種類・分岐構造が植物種や植物の生長段階・部位により異なることにある。従って、ヘミセルロースはホモ多糖類であるセルロースに比べ、この構造特性を生かして多種多様な用途へ展開が可能であり、高付加価値的に利用できる潜在能力を持っていると考えられる。ヘミセルロースの利用用途拡大に向けては、複雑な構造に対応するため、高い構造選択性を有する酵素を利用する必要がある。バイオマスから選択的にヘミセルロースをトリミングすることが必要不可欠である。

一般にキシランは、キシロースが β -1,4-結合した主鎖に、 α -1,2-結合のグルクロン酸側鎖や α -1,3-結合のアラビノフラノースを有する。キシランの分解には、 β -キシラナーゼ、 β -キシロシダーゼ、 α -グルクロニダーゼ、 α -アラビノフラノシダーゼ等の酵素が必要であるが、情報が不足しており、どの様な酵素を用いれば、効率的にキシランを分解できるのか不明な点が多い。例えば、主鎖を分解する酵素である β -キシラナーゼや β -キシロシダーゼのキシランに対する作用は、側鎖の影響を受ける。また、側鎖に作用する α -グルクロニダーゼ、 α -アラビノフラノシダーゼについては、多糖に作用するものと β -キシラナーゼの分解物であるオリゴ糖に作用するが多糖には作用できないものが知られているが、多くの場合は基質を保有していないため、詳細な基質特異性が解明されていない。

2. 研究の目的

糖加水分解酵素のファミリー分類 (CAZy: <http://www.cazy.org/>) は、アミノ酸配列の疎水クラスター解析によるものであり、同一のファミリーに分類された酵素は、例外なく同じフォールディングの立体構造をしており、活

性残基の位置が一致し、同じ様式の反応メカニズム (アノマー保持型、非保持型) となるのが本分類の特徴である。 α -アラビノフラノシダーゼは、糖加水分解酵素のファミリー3, 43, 51, 54, 62 に分類されている。このうち、ファミリー62は立体構造が解明された酵素が一つもないファミリーであり、本ファミリーの α -アラビノフラノシダーゼの性質については特に不明な点が多い。そこで、本研究では下記の点を解明することを目的とする。

(1) ファミリー62 α -アラビノフラノシダーゼの立体構造

(2) ファミリー62 α -アラビノフラノシダーゼの基質特異性のメカニズム

3. 研究の方法

(1) *Streptomyces coelicolor* 由来ファミリー62 α -アラビノフラノシダーゼ遺伝子を単離し、放線菌を用いた組換え酵素の大量発現を行った。

(2) 発現させた *Streptomyces coelicolor* 由来ファミリー62 α -アラビノフラノシダーゼの特性解析を行った。

(3) *Streptomyces coelicolor* 由来ファミリー62 α -アラビノフラノシダーゼの結晶構造解析を行った。

(4) *Streptomyces coelicolor* 由来ファミリー62 α -アラビノフラノシダーゼの基質結合構造の解析を行った。

(5) *Streptomyces coelicolor* 由来ファミリー62 α -アラビノフラノシダーゼの基質結合構造から、糖認識、糖結合認識、酵素の作用様式の決定に重要であると予想されるアミノ酸残基を特定し、重要であると予想されるアミノ酸を変異させた変異体酵素を構築した。

(6) 構築した各種変異体酵素の特性解析を行い、基質特異性のメカニズムを解明した。

4. 研究成果

放線菌 *Streptomyces coelicolor* のゲノム遺伝子より GH62 アラビノフラノシダーゼ遺伝子

(CAA16189)をPCRにより増幅し、放線菌の発現系を用いて発現させ、組換え酵素を得た(図1).

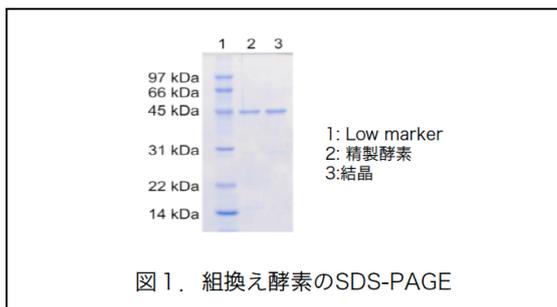


図1. 組換え酵素のSDS-PAGE

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、本酵素はアラビノース側鎖を有するキシランに作用したが、グルクロノキシラン、アラビナン、アラビノガラクトンには作用しなかった。本酵素がアラビノキシラン特異的に活性を示すことが示唆された(表1).

表1. GH62 アラビノフラノシダーゼの多糖に対する基質特異性

Substrates	Relative activity (%)
Wheat arabinoxylan	100
Corn hull arabinoxylan	96
Oat spelts xylan	55
Birchwood xylan	0
Arabinan	0
Debranched arabinan	0
Larch arabinogalactan	0
Gum Arabic	0

次に本酵素の結晶化を行った。20% PEG3350, 0.2 M tripotassium citrate, pH 8.3 の条件において、0.5 x 0.2 x 0.1 mm の結晶を得た。本結晶を用いて X 線構造解析を行い、立体構造を得た(図2)。

アラビノース、キシロトリオース、キシロヘキサオースを結晶にソーキングし、GH62 アラビノフラノシダーゼと基質の結合構造を解明した。本酵素は5つのサブサイトからな

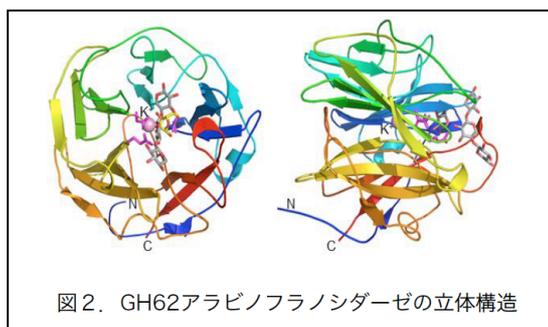


図2. GH62アラビノフラノシダーゼの立体構造

る基質結合クレフトを有し、クレフトの底部にはアラビノースと結合するポケット構造が存在することが明らかとなった(図3)。

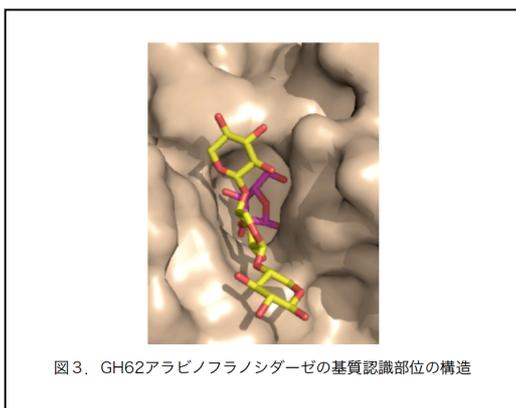


図3. GH62アラビノフラノシダーゼの基質認識部位の構造

糖結合構造をもとに、9種類の変異体酵素をデザインし、構築した。これら変異体酵素は野生型酵素と同様に放線菌の発現系を用いて発現させ、変異体酵素を得た。変異体酵素の PNP- α -L-アラビノフラノシドと Wheat アラビノキシランに対する活性を調べた(表2)。

表2. 変異体酵素の活性

Enzyme	PNP- α -L-arabinofuranoside				Substrates			
	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	Relative to WT	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	Relative to WT
Wild type	1.9 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	0.61	1	7.3 \pm 0.0	18 \pm 2	2.5	1
D202N	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA
E361Q	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA
W270A	18 \pm 1	0.71 \pm 0.13	0.038	0.06	27 \pm 9	16 \pm 2	0.65	0.3
W270Y	11 \pm 2	0.69 \pm 0.08	0.068	0.1	36 \pm 3	16 \pm 3	1.2	0.5
W270F	0.4 \pm 0.8	0.36 \pm 0.03	0.039	0.06	36 \pm 8	25 \pm 6	0.72	0.3
Y461A	ND	ND	ND	NA	15 \pm 4	30 \pm 9	2.0	0.8
Y461W	1.5E ⁻¹³ \pm 0.0	7.2E ⁻¹¹ \pm 0.0	0.47E ⁻³	0.8E ⁻³	ND	ND	ND	ND
Y461F	2.9 \pm 0.2	0.0038 \pm 0.000	0.0013	0.002	7.0 \pm 0.6	3.0 \pm 1.05	0.43	0.2
N462Q	0.88 \pm 0.00	0.62 \pm 0.0	0.71	1.2	28 \pm 13	51 \pm 23	1.8	0.7

GH43 ファミリーの酵素で保存されている3つの触媒に関与するアミノ酸, Asp²⁰², Asp³⁰⁹, Glu³⁶¹は本酵素でも保存されていたが, Asp³⁰⁹はキシロース主鎖の位置とは逆に位置していることに加え、以前の報告から Asp²⁰², Glu³⁶¹がそれぞれ general-base と general-acid として働いていると予想されたため, Asp²⁰² と Glu³⁶¹のアミノ酸置換による変異体を作製し D202N, E361Q 変異体について PNP- α -L-アラビノフラ

ノシドを基質に活性測定を行った。その結果、両変異体ともに酵素活性は消失し、Asp²⁰², Glu³⁶¹ が触媒活性に重要であることが確認された。

Trp²⁷⁰ は、サブサイト+3NR に位置するD-キシロースとインドール冠がスタッキング相互作用していると予測されたため、W270A, W270Y, W270F 変異体を構築した。PNP- α -L-アラビノフラノシドと wheat アラビノキシランに対する酵素活性を調べたところ、各変異体共に両基質に対する活性が野生型酵素より低下したが、wheat アラビノキシランを基質とした場合に比べ、PNP- α -L-アラビノフラノシドを基質として使用した場合の活性低下が著しかった。

サブサイト+1に位置するキシロースとスタッキングインターラクイションしていると考えられるアミノ酸である Tyr⁴⁶¹ の変異体 (Y461A, Y461F, Y461W) も Trp²⁷⁰ 変異体と同様の性質を示した。wheat アラビノキシランを基質とした場合に比べ、PNP- α -L-アラビノフラノシドを基質として使用した場合の活性低下が著しかった。これらの変異体は5つのサブサイトの1つのみを失ったため、主鎖の長いキシランに対する活性の影響が、小さな基質である PNP- α -L-アラビノフラノシドに比べて少なかったと考えられた。

Asn⁴⁶²-O δ 1 原子はサブサイト+2NR 位キシロースの O3 原子と水素結合しており、サブサイト+2NR に位置するキシロースと相互作用しているアミノ酸である。N462 の変異体 N462A, N462Q を PNP- α -L-アラビノフラノシドに作用させたところ、Tyr⁴⁶¹ や Trp²⁷⁰ の変異体と比べ活性低下の度合いは少なかった。一方、wheat アラビノキシランを基質とした場合には、酵素と基質の親和力が大きく低下し、大幅な活性の減少が観察された。この結果は+2NR のキシロースと Asn⁴⁶² の相互作用がアラビノキシランの分解に重要であることを示唆している。そこで、N462A, N462Q 変異体酵素の GH10 キシラナーゼの分解物であるアラ

ビノキシロオリゴ糖 (A₁X₂, A₁X₃) に対する活性を比較した (表3)。A₁X₂ を基質として使用した場合、野生型と変異体の k_{cat}/K_m 値に大きな変化は見られなかったが、A₁X₃ を基質とした場合には、変異体の k_{cat}/K_m が野生型の値の約 1/3 と低い値を示し、アミノ酸の変異によって酵素の活性が大きく低下していることが示された。

表3. アラビノキシロオリゴ糖に対する N462A, N462Q 変異体の活性

Enzyme	Substrates	
	A ₁ X ₂	A ₁ X ₃
Wild type	33 ± 9	178 ± 7
N462Q	24 ± 4	66 ± 14

以上の実験により、GH62 酵素はキシラン主鎖にフィットするクレフト構造により、主鎖キシランと相互作用しており、この相互作用が多糖中に存在する側鎖アラビノースの結合を切断する上で、重要な役割を果たしていることが、明らかとなった。

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1件)

①Tomoko Maehara, Zui Fujimoto, Hitomi Ichinose, Mari Michikawa, Koichi Harazono, and Satoshi Kaneko : Crystal structure and characterization of the glycoside hydrolase family 62 α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* 査読有(2014) 289, 7962-7972.

[学会発表] (計1件)

①Tomoko Maehara, Zui Fujimoto, Kei Kamino, Yoshiaki Kitamura, Satoshi Kaneko : Characterization of a GH30 glucuronoxylan specific xylanase from *Streptomyces turgidiscabies* C56. 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting, May 10-13 (2015),

Finland, Espoo.

6. 研究組織

(1)研究代表者

金子 哲 (KANEKO SATOSHI)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：90343821