

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450143

研究課題名(和文) バイオマス資源利用を目指した耐熱性キチン分解酵素の反応メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of catalytic mechanisms of thermostable glycoside-hydrolases by structural analyses

研究代表者

峯 昇平 (Mine, Shouhei)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：70415751

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)：本研究では、バイオマス資源の1つである「キチン」を医薬・健康食品として有用な「グルコサミン」に効率よく分解・産生するキチン代謝系酵素の構造解析およびその反応メカニズム解明を目的とする。申請者は、キチンから目的の「グルコサミン類」を得るために、好熱菌のキチン代謝経路を利用し、そこに関わる2種類の耐熱性キチン代謝酵素の構造、機能解析を行った。立体構造に関してはいずれも初めての報告であり、様々な有用な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Chitin is a polysaccharide that comprises a major constituent of fungal cell walls, the exoskeletons of insects, and the shells of crustaceans. N-acetylglucosamine (GlcNAc) and Glucosamine (GlcN), which is derived from the hydrolysis of chitin or chitosan, have a variety of biological functions and have therefore been used as a food additive and in medicines. Using the chitin catabolic pathway of hyperthermophilie, we have focused two thermostable enzymes, deacetylase (Dac) (EC 3.5.1.-) and -N-acetylglucosaminidases (NagA) (EC 3.2.1.52). To understand the catalysis and adaptation to extreme high temperature of these enzymes, we have determined the structures of Dac and NagA.

研究分野：構造生物学

キーワード：グルコサミン 好熱菌 酵素

1. 研究開始当初の背景

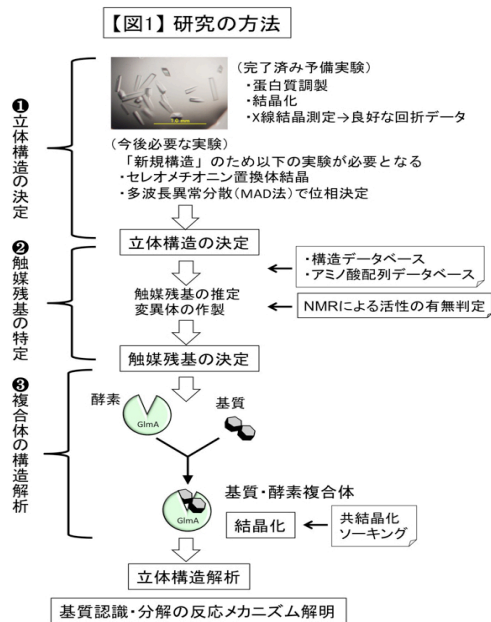
近年、環境問題の観点から利用可能な生物資源（バイオマス）の有効利用が注目されている。「キチン」はカニやエビの殻に含まれ、年間数十万トンが廃棄されているバイオマス資源である。現在、キチン分解には硫酸法が主流であるが、環境負荷が大きいいため、酵素を用いた生化学的な手法の開発が望まれている。また酵素利用に際し、化学触媒と同等に反応速度や生産物濃度を上げるためには、高温で高い触媒活性を有する「耐熱性酵素」が産業用として最も適している。しかしながら、好熱菌由来の耐熱性キチン代謝酵素群の構造・機能に関する研究報告はほとんどない。

2. 研究の目的

本課題で完成を目指すキチン代謝系の最終産物である単糖「グルコサミン」および「N-アセチルグルコサミン」は、その優れた効能（変形関節症の改善、美肌効果）により多くの企業から関連製品が販売されている。故に耐熱性キチン分解酵素の開発は有用性が高いと考えられる。そこで、その利活用に向けて、耐熱性キチン代謝酵素群の立体構造、機能解析を行い、その反応メカニズム解明することを目的とする。

3. 研究の方法

研究の方法を「図1」に示す。



4. 研究成果

好熱性バクテリア由来 β-アセチルグルコサミニダーゼ (NagA) はキトビオースを特異的に認識し、単量体 N-アセチルグルコサミンに分解する耐熱性酵素である。NagA の X 線結晶構造解析の結果、本酵素が 2 量体からなる新規構造であることが分かった。(図 2) (研究業績 2)。NagA は GH3 ファミリーに属する

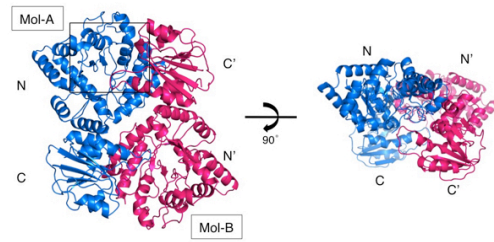


図2. Crystal structure of NagA as a ribbon model.

が、同じファミリーに属する構造類似酵素 BsNagZ とは大きくその構造は異なる。BsNagZ は単量体であり、その活性部位は N-ドメインと C-ドメインから形成される。しかしながら NagA の場合、一方の N-ドメインと他方の C-ドメインから形成されるユニークな構造であることが明らかとなった (図 3)。

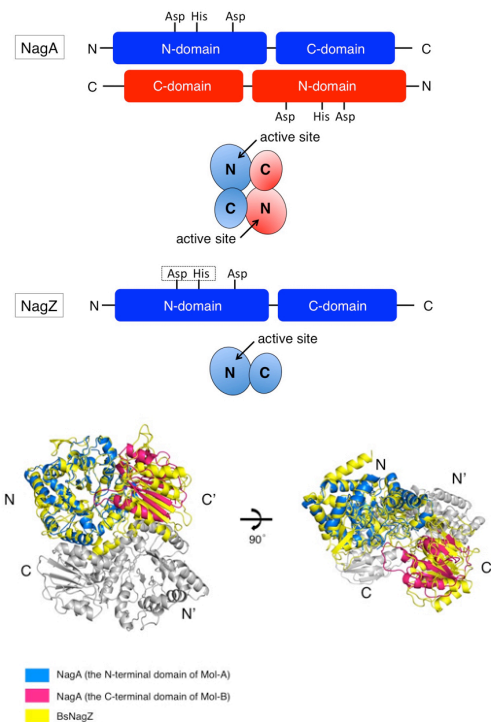


図3. Structure comparison of NagA with BsNagZ.

また、NagA 変異体の NMR による活性測定により、触媒残基 (acid/base His173、nucleophile Asp245) を同定した (図 4)。

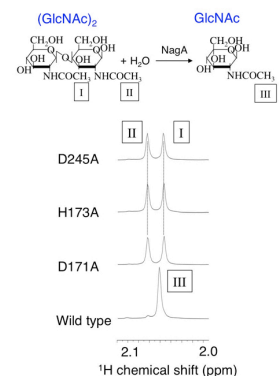


図4. NagA変異体のNMRによる活性測定

しかしながら、基質が結合していない状態では His173 は大きな運動性を有し、その構造は見えない (図 5)。一般的に糖質分解酵素の基質結合前後において、このような大きな構造変化は見られないことから、NagA はユニークな基質認識・分解の反応メカニズムを有すると考えられる。

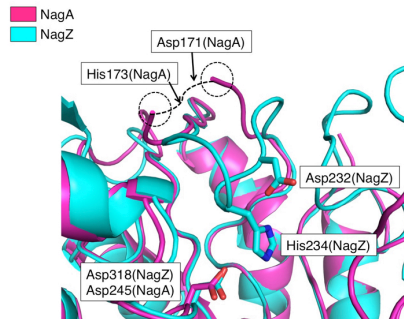


図5. NagAとNagZの活性部位構造比較

次に好熱性古細菌由来デアセチラーゼ (Dac) の構造解析を行った。Dac はキトビオースの非還元末端を特異的に認識し、そのアセトアミド基を脱アセチル化する酵素である。X線結晶構造解析の結果、本酵素は6量体からなる新規構造であることが分かった (研究業績 1, 3)。単量体は Rossmann fold 構造を有し、これは Dac と同じ CE14 ファミリーに属する BcZBP および MshB に高く保存された構造である。MshB は単量体であるが BcZBP は6量体である (図 6)。

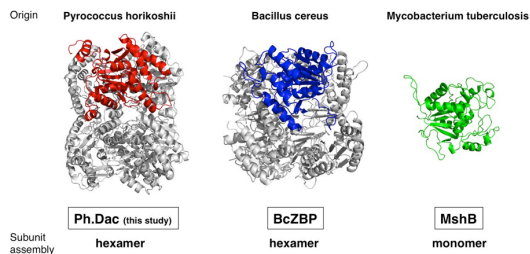


図6. CE-14 family 脱アセチル化酵素の構造比較

しかしながら BcZBP と Dac の6量体形成様式は大きく異なる。両者の構造を比較すると、6量体における単量体の配置が  $180^\circ$  異なっている (図 7)。

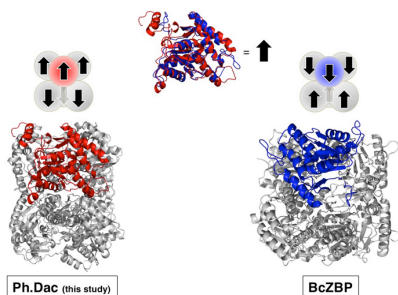


図7. Ph.DacとBcZBPの6量体構造比較

この構造形成様式の違いは Dac の基質特異性に大きく影響している。Dac の活性部位を見てみると、活性中心に亜鉛イオンを配位した金属蛋白であることがわかる。これは BcZBP でも同様であるが、注目すべきは Dac において、隣の単量体から His264 が活性部位に突き出していることである (図 8)。

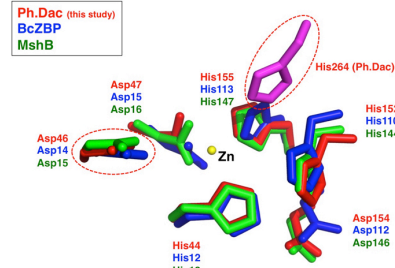


図8. CE-14 family 脱アセチル化酵素の活性部位構造比較

このような特徴は BcZBP では見られない。実際、この His264 を Ala に置換した変異体の活性を NMR により調べたところ、その活性はほぼ消失していた (図 9)。すなわち、Dac の単量体構造は他の CE14 ファミリーと共通であるが、その6量体構造形成様式を変化させることにより、独自の基質特異性を獲得している、と考えられる。Dac は古細菌由来の酵素であるため、ここで得られた成果は生物の収斂進化を考える上で非常に重要な意味を持つと思われる。

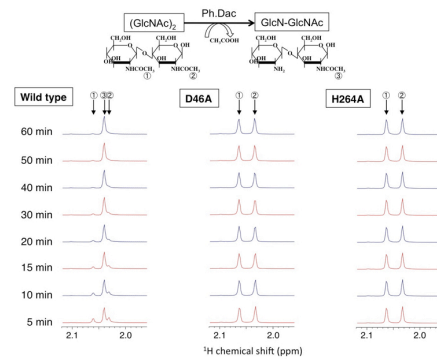


図9. Ph.Dac変異体の活性測定

## 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)

1. Ueno Y, Mine S, Kawasaki K. A tilt pair based method for assigning the projection directions of randomly oriented single-particle molecules. *Microscopy*. 64, 129-142 (2015)
2. Mine S, Kado Y, Watanabe M, Fukuda Y, Abe Y, Ueda T, Kawarabayashi Y, Inoue T, Ishikawa K. The structure of hyperthermophilic  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase reveals a novel dimer architecture associated

- with the active site. *FEBS J.* 281, 5092-5103 (2014).
3. Mine S, Niiyama M, Hashimoto W, Ikegami T, Koma D, Ohmoto T, Fukuda Y, Inoue T, Abe Y, Ueda T, Morita J, Uegaki K, Nakamura T. Expression from engineered *Escherichia coli* chromosome and crystallographic study of archaeal N,N-diacetylchitobiose deacetylase. *FEBS J.* 281, 2584-2596 (2014).
  4. Mine S, Nakamura T, Sato T, Ikegami T, Uegaki K. Solution structure of the chitin-binding domain 1 (ChBD1) of hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*. *J. Biochem.* 155, 115-122 (2014)

[学会発表] (計 1 件)

1. 渡邊真宏、蒲池沙織、秋田紘長、上地敬子、峯昇平. 蛋白質ビームラインを利用した AIST-ISC の研究成果について. 大阪大学蛋白質研究所セミナー. 2015 年 8 月 28 日大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

峯 昇平 (MINE SHOUHEI)

国立研究開発法人・産業技術総合研究所・  
バイオメディカル研究部門・主任研究員  
研究者番号：70415751