

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：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660277

研究課題名(和文)ファミリー131に属する機能未知酵素がバイオマス分解に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Study on the role of uncharacterized enzymes belonging to glycoside hydrolase family 131 in biomass degradation

研究代表者

殿塚 隆史 (Tonozuka, Takashi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50285194

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)：本研究は、糖質加水分解酵素ファミリー131に属する担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来の機能未知酵素である CcGH131A および CcGH131B の、構造と性質の解明を目的とする。CcGH131A の酵母を用いた発現系を構築し、また CcGH131A 触媒ドメインとリガンドとの複合体の立体構造解析を行った。CcGH131B については cDNA を取得し大腸菌による発現系を構築した。さらに結晶化を行い、立体構造を決定することができた。蛍光光度計により、多糖との相互作用の解析を行った。これらの結果、糖に対する特異性は CcGH131A と CcGH131B で異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study focuses on enzymes belonging to glycoside hydrolase family 131, CcGH131A and CcGH131B, from a basidiomycete, *Coprinopsis cinerea*. A heterologous expression system of CcGH131A using *Pichia pastoris* was constructed, and the crystal structure of CcGH131A in a complex with ligand was determined. The cDNA of CcGH131B was cloned, and a heterologous expression system of CcGH131A using *Escherichia coli* was constructed. The protein was crystallized and the structure was determined. An experiment using fluorescence spectroscopy was performed to analyze the interaction between the proteins and polysaccharides. The results suggest that the substrate specificities of CcGH131A and CcGH131B are expected to be markedly different.

研究分野：酵素化学

キーワード：バイオマス 担子菌 糖質加水分解酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) バイオマス分解に関する研究について

近年、地球規模の経済活動および人口の増加に伴い、化石燃料の消費が増加し続けていることから、これに伴う地球温暖化により重大な気候変動が起こることが懸念されている。このため植物を原料とした燃料生産すなわちバイオエタノール生産が盛んに行われるようになった。しかしながら、現在はデンプンの糖化によるバイオエタノール生産が主流であり、これは安定的な食糧供給に競合している。このため、食糧生産と競合しない方法である、効率的なセルロース系バイオマス分解技術の開発が囑望されている。

このような社会的要請にもかかわらず、セルロース系バイオマスをセルラーゼのみで効率的に分解するのは現状では困難である。これは、セルロース系バイオマスは、セルロースのみならずヘミセルロースと総称される多様な糖やリグニンと呼ばれる成分で構成され、酵素による分解を受けにくい構造となっているからである。このことから、セルロース系バイオマス分解生物として知られる子囊菌や担子菌は、既知のセルラーゼの作用のみでは説明できないセルロース分解機構を有すると推定される。

(2) タンパク質ファミリーGH131 について

担子菌 *Coprinopsis cinerea* は、キノコ研究のモデル生物として知られ、その全ゲノム解析が終了している。私達のグループでは、*C. cinerea* のゲノム情報をもとに新規なバイオマス分解酵素の探索を行った。その結果、CC1G_07166 および CC1G_15039 という番号の遺伝子産物は、子囊菌 *Neurospora crassa* がセルロースの誘導體であるアピセルを含む培地において強く発現すると報告されたタンパク質 NCU09764 (Tian ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009) と同源性を有することが判明した。さらに、子囊菌 *Podospora anserina* において本タンパク質と同源性を有するタンパク質は、 α -1,4-グルカンすなわちセルロースおよび類縁多糖のみならず、 α -1,3-および α -1,6-グルカンに幅広く作用する酵素であると報告され、PaGluc131A と命名された (Lafond ら, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012)。このような研究により、本タンパク質ファミリーは、糖質分解酵素ファミリー131 (GH131) として新たに分類されるに至った。

我々は、本タンパク質ファミリーGH131 に属する *C. cinerea* の二つのタンパク質 CC1G_07166 および CC1G_15039 について、CcGH131A および CcGH131B と命名し研究を開始した。

(3) 本研究までの進捗状況

まず最初に、CcGH131A の cDNA を *C. cinerea* より取得した。本タンパク質 (CcGH131A) は、

325 アミノ酸残基から成り、N 末端側の 18 アミノ酸残基はシグナルペプチド、それに続く 234 アミノ酸残基は触媒ドメインであり、C 末端側の 73 アミノ酸残基は既知のタンパク質との同源性から、糖結合ドメインおよび触媒ドメインと糖結合ドメインをつなげるリンカーであると推定された。

CcGH131A 触媒ドメイン (CcGH131A CBM) をコードする DNA を pET21a に挿入して発現ベクターを構築し、大腸菌を形質転換した。大腸菌より精製酵素を調製し、結晶化し立体構造を決定した (図 1)。これは、GH131 に属するタンパク質として世界で初めての報告である (Miyazaki ら, *FEBS Lett*, 2013)。

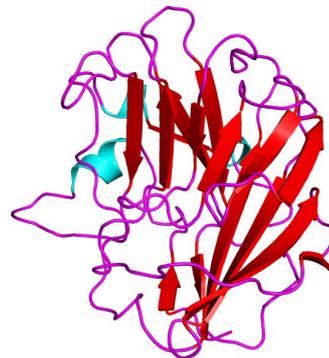


図 1 CcGH131A の立体構造

CcGH131A の触媒ドメインは、2 枚の β -シートから成る β -ゼリーロールフォールドで構成されていた。本酵素と同じファミリーに属する PaGluc131A の論文においては、PaGluc131A は加水分解酵素であるとされている。しかしながら、意外なことに CcGH131A に最も同源性がある酵素は、糖に作用するリアーゼであることが判明した。さらに、酵素の基質結合部位と考えられるクレフトは、一般的な糖の加水分解酵素に比べ大変浅いことが分かった。

2. 研究の目的

前のセクションで述べたとおり、GH131 に属するタンパク質は PaGluc131A でその性質が報告された。しかしながら、本報告においては α -グルカンに対する分解活性は低いことが記載されている。さらに、我々のグループによって立体構造が明らかになったが、既知の加水分解酵素とはかなり異なる構造であることが分かった。これらのことから、GH131 は既知のセルラーゼのような酵素とは異なる機能があると考えられる。

C. cinerea には二つの GH131 に属するタンパク質が存在する。CcGH131A の配列は上述したとおりであるが、CcGH131B については CcGH131A のような糖結合ドメインは見あたらず、318 アミノ酸残基から成り、うち N 末端側 17 残基はシグナルペプチドであると考

えられた。

本研究は、新規酵素ファミリーGH131 に属する CcGH131A および CcGH131B について、構造と機能を解析することにより、バイオマス分解に果たす役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子工学

大腸菌および酵母の培養、プラスミドの抽出、DNA の制限酵素による切断、DNA のライゲーションおよび構築したプラスミドの大腸菌への導入は、一般的に行われている遺伝子工学の方法によった。DNA への変異の導入は、サーマルサイクラーを用いた PCR 法によって行い、DNA シーケンサーを用いて目的の部位のみ変異が導入されていることを確認した。

(2) タンパク質の精製・結晶化と立体構造解析

目的タンパク質は、大腸菌または酵母によって生産させた。得られたタンパク質は His タグとの融合タンパク質として発現するので、粗タンパク質溶液を Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

精製タンパク質は限外濾過により、10~20 mg/mL 程度に濃縮し、結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法によった。プレートは 20 の恒温器に静置し、顕微鏡によって結晶が得られたか観察を行った。得られた結晶は、高エネルギー加速器研究機構シンクロトロン放射光において、X 線回折のデータ収集を行った。データの解析は、ソフトウェアとして CCP4 と COOT を用い、立体構造を決定した。

(3) トリプトファン残基の蛍光を指標とした蛍光強度変化の測定

蛍光光度計は、島津 RF-5300 を用いた。セルに 100 mM リン酸緩衝液に溶解した CcGH131A CBM (100 µg/mL) または CcGH131B (60 µg/mL) を 3 mL 入れ、同緩衝液に溶解した 1%(w/v) の糖を滴下し、280 nm の励起波長における 330 nm の蛍光強度の変化を測定した。

4. 研究成果

(1) 酵母における CcGH131A 全長 (CcGH131A-Full) の発現系構築および立体構造解析の試み

上述したとおり、本研究開始当初までに CcGH131A については、触媒ドメインの大腸菌による発現系を構築し、立体構造を決定している。しかしながら、CcGH131A には C 末端側

に糖結合モジュールが存在し、PaGluc131A においては、C 末端側の糖結合モジュールが活性に必須であるという報告がなされている。また、糸状菌由来タンパク質では、多くのタンパク質に糖鎖が付加しており、活性や安定性に重要な役割を果たしている。

このことから、CcGH131A の機能解明を目的とし、糖結合モジュールを含んだ全長 (CcGH131A-Full) の発現系を酵母 *Pichia pastoris* を宿主として構築することとした。*C. cinerea* の cDNA を PCR で増幅し、断片をプラスミド pPICZ に組み込み、*P. pastoris* を形質転換することにより His タグに融合した CcGH131A-Full の発現系を構築した。発現は *P. pastoris* 用の培地である YP 培地中で培養を行いメタノールにより発現を誘導し、得られた上清を Ni-NTA アガロースによって精製を行った。この結果、100 mL の培地より 1.5 mg の精製タンパク質を得た。

本タンパク質の結晶化を行ったところ、0.1 M HEPES pH7.5、10% ポリエチレングリコール 6000、5% 2-メチル-2,4-ペンタンジオールをリザーバーとしたハンギングドロップ蒸気拡散法で、結晶を得ることができた。X 線回折強度測定を行い、1.59 分解能での構造を決定した。しかしながら、結晶中において糖結合モジュールに相当している部分が欠失しており、結晶化の際に微量ながら混入した酵母由来のプロテアーゼによって分解されてしまったことが考えられた。また、糖鎖は 29 番目のアスパラギン残基 (Asn29) に結合しており、触媒部位と考えられるクレフトとは反対側に位置していることが分かった (図 2)。

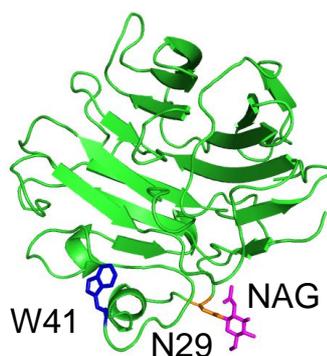


図 2 酵母によって発現させた CcGH131A の立体構造

図中には Asn29 (N29)、Trp41 (W41)、糖鎖 (NAG) を示した。

(2) CcGH131A 触媒ドメイン (CcGH131A CBM) とリガンドとの結晶構造解析の試み

CcGH131A の機能を明らかにするため、大腸菌で発現させた CcGH131A CBM の結晶化を行い、さまざまな糖を含んだ溶液に結晶をソー

キングさせ、X線回折強度データを収集した。その結果、キシロースを含んだ溶液へのソーキングにおいて、4分解能という低分解能ではあるものの、41番目のトリプトファン残基(Trp41)に、キシロースと考えられる電子密度が存在することが分かった(図3)。

また、CcGH131A-CBM および CcGH131A-Full 存在下で市販セルラーゼ製剤をいくつかの多糖に作用させたが、セルラーゼとの顕著な協同効果は見られなかった。



図3 キシロースとの複合体の CcGH131A CBM の立体構造

4分解能ながら、リガンドと思われる電子密度が得られた($F_o - F_c$, 2)

(3) CcGH131B の結晶化と立体構造解析

まず CcGH131B の発現系を構築した。cDNA を PCR で増幅した DNA 断片を pET21a プラスミドに組み込むことによって、大腸菌の発現ベクターを構築した。得られたベクターによって形質転換した大腸菌を培養し、菌体より得られた粗酵素液を Ni-NTA アガロースによって、CcGH131B を精製することができた。

得られた CcGH131B の結晶化を行った。その結果 0.1 M MES pH6.5、3% ポリエチレングリコール 20000、10% ポリエチレングリコール 10000 をリザーバーとしたハンギングドロップ蒸気拡散法で、結晶を得ることができた。X線回折強度測定を行い、1.9分解能で回折データを収集することができた(図4)。空間群は $R6_3$ で、結晶学的非対称単位中に 2分子の CcGH131B が存在することが分かった。

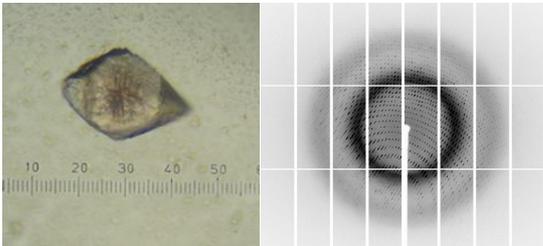


図4 CcGH131B の結晶およびX線回折イメージ

立体構造の決定を試みた。CcGH131B は、立体構造が既知の二つの GH131 タンパク質、

CcGH131A および PaGluc131A との相同性はそれぞれ 30%および 28%と低いため、分子置換法は難しいと考えられたが、ソフトウェア CCP4 中のプログラム MrBump を用い、CcGH131A および PaGluc131A を組み合わせたモデルを生成させた分子置換法により位相を決定することができた。CcGH131B は他の GH131 タンパク質同様ゼリーロールフォールドによって構成されていた。CcGH131A および PaGluc131A の立体構造と比較し、最大の特徴として基質結合部位と考えられるクレフトが CcGH131A および PaGluc131A では大変浅いのに対し、CcGH131B では深かった(図5)。

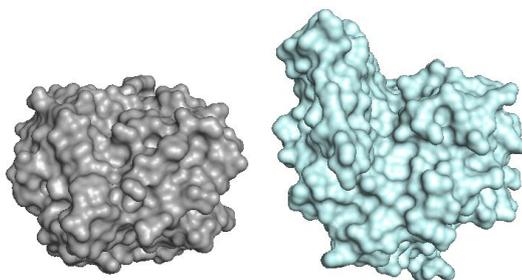


図5 CcGH131A(左、グレー)および CcGH131B(右、水色)の表面モデルの比較

CcGH131B の方が基質結合部位と考えられるクレフトが深いことが分かる。

(4) 蛍光光度計を用いた CcGH131A および CcGH131B の糖結合活性の測定

CcGH131A および CcGH131B の機能を探索するため、アビセルおよびキシランを 1%(w/v) となるよう 50 mM HEPES pH6.5 に懸濁し、CcGH131A-Full または CcGH131A CBM が $5 \mu\text{M}$ になるように添加し、30-24 h おだやかに攪拌した後、上清の還元糖量を測定した。しかしながら、顕著な還元糖量の増加は見られなかった。また、CcGH131B についても同様の実験を行ったが、酵素反応は見られなかった。

次に、本タンパク質の糖に対する特異性を調べるため、トリプトファン残基の蛍光を指標とした蛍光強度の変化を測定した。トリプトファン残基は 280 nm の励起波長により 330 nm 付近に蛍光が観察される。CcGH131A では活性中心と考えられるクレフトに Trp41 が、CcGH131B ではクレフトの端に Trp191 が存在することから、糖の結合により蛍光強度が変化すると考えられる。

蛍光強度測定の結果、CcGH131A CBM、CcGH131B とともにカルボキシメチルセルロースに対しては蛍光強度の変化はあまりないのに対し、キシランでは大幅に変化することが分かった(図6)。

(5) 関連酵素の構造解析

本研究では GH131 のタンパク質と並行して、関連する糖質分解酵素の立体構造および性

質の解析を行った。その結果、イソプルラーゼ、マンノシルグリセリン酸分解酵素、イソマルトデキストラナーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ヘパリンリアーゼの立体構造や性質を明らかにした。

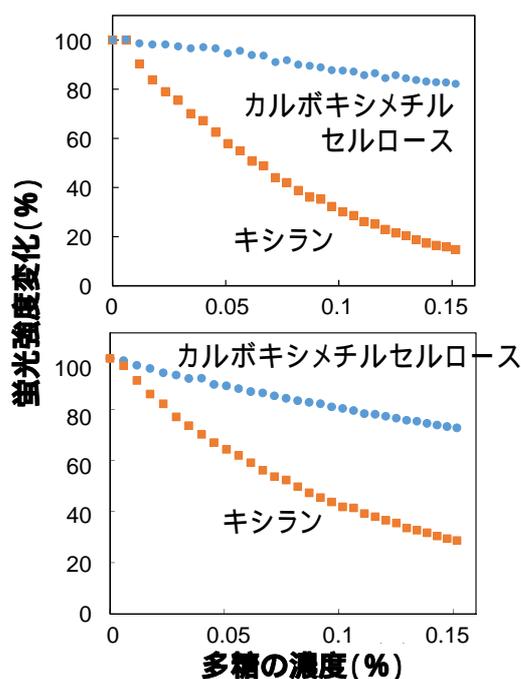


図 6 CcGH131A CBM (上) および CcGH131B (下) の蛍光強度の変化

(6) 総括

本研究では、CcGH131B の発現系の構築、結晶化を行い、立体構造を決定することができた。その結果、本タンパク質はこれまで立体構造が決定されている CcGH131A および PaGluc131A と比較し、基質結合部位と考えられるクレフトが深いことが分かった。このため、CcGH131A および PaGluc131A とは、糖に対する特異性はかなり異なるものと考えられた。

CcGH131A とリガンドとの複合体の立体構造解析や蛍光強度の変化による解析から、CcGH131A、CcGH131B ともセルロースのような β -グルカンよりは、むしろキシランなどのヘミセルロースに作用していることが示された。しかしながら、CcGH131A、CcGH131B とも、これまでセルロースやキシランに対する分解活性は観察されていない。これらの結果をあわせると、本タンパク質は、セルロース鎖とキシラン鎖の結合をほどくような役割を果たすタンパク質というような可能性が考えられる。

以上、本研究では CcGH131A、CcGH131B の機能の一端を明らかにするとともに関連タンパク質の立体構造を明らかにした。今後、予想される機能についてさらなる検証を行うとともに、CcGH131A と CcGH131B の役割の相違を明らかにすることが望まれる。

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6件)

Gozu, Y., Ishizaki, Y., Hosoyama, Y., Miyazaki, T., Nishikawa, A. and Tonozuka, T. A glycoside hydrolase family 31 dextranase with high transglucosylation activity from *Flavobacterium johnsoniae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,掲載決定、査読有
DOI: 10.1080/09168451.2016.1182852

Mori, M., Ichikawa, M., Kiguchi, Y., Miyazaki, T., Hattori, M., Nishikawa, A. and Tonozuka, T. A surface loop in the N-terminal domain of *Pedobacter heparinus* heparin lyase II is important for activity. *J. Appl. Glycosci.*, 63, 7-11 (2016). 査読有
DOI: 10.5458/jag.jag.JAG-2015_019

Okazawa, Y., Miyazaki, T., Yokoi, G., Ishizaki, Y., Nishikawa, A. and Tonozuka, T. Crystal structure and mutational analysis of isomalto-dextranase, a member of glycoside hydrolase family 27. *J. Biol. Chem.*, 290, 26339-26349 (2015). 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M115.680942

Miyazaki, T., Ishizaki, Y., Ichikawa, M., Nishikawa, A. and Tonozuka, T. Structural and biochemical characterization of novel bacterial α -galactosidases belonging to glycoside hydrolase family 31. *Biochem. J.*, 469, 145-158 (2015). 査読有
DOI: 10.1042/BJ20150261

Miyazaki, T., Ichikawa, M., Iino, H., Nishikawa, A. and Tonozuka, T. Crystal structure and substrate-binding mode of GH63 mannosylglycerate hydrolase from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Struct. Biol.*, 190, 21-30 (2015). 査読有
DOI: 10.1016/j.jsb.2015.02.006

Miyazaki, T., Yashiro, H., Nishikawa, A. and Tonozuka, T. The side chain of a glycosylated asparagine residue is important for the stability of isopullulanase. *J. Biochem.*, 157, 225-234 (2015). 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvu065

〔学会発表〕(計2件)

担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来タンパク質 CcGH131B のX線結晶構造解析
奥山舜朔、林昌宏、砂川直輝、石田卓也、五十嵐圭日子、吉田誠、西河淳、殿塚隆史
日本農芸化学会、2016年3月28日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市白石区)

担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来機能未知タンパク質 CcGH131A の結晶構造解析
林昌宏、奥山舜朔、田中祐太郎、田村瑞、砂川直輝、石田卓也、梅澤究、吉田誠、五十嵐圭日子、西河淳、殿塚隆史
2015年度量子ビームサイエンスフェスタ、2016年3月15日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

〔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

<http://web.tuat.ac.jp/~seika/tonozuka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

殿塚 隆史 (TONOZUKA TAKASHI)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：50285194

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者

吉田 誠 (YOSHIDA MAKOTO)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：30447510