



東京大学
THE UNIVERSITY OF TOKYO



Tokyo Tech



岩手大学
IWATE UNIVERSITY



農研機構

2019年3月30日

新規な分子進化のルーツを持つ糖鎖分解酵素の発見
～真核生物由来 *endo*- β -1,2-グルカナーゼの単離同定及び機能構造解析～

東京理科大学
麻布大学
新潟大学
東京大学
東京工業大学
岩手大学

農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）

研究の要旨

・東京理科大学工学部応用生物科学科 田口速男 教授および中島将博 講師らのグループは、天然では希少な多糖である“ β -1,2-グルカン”を内部より加水分解する、真核生物由来の β -1,2-グルカナーゼを初めて単離同定することに成功し、そのアミノ酸配列、機能および立体構造から糖加水分解酵素の新規なファミリーを創設しました。また、本酵素が既知の糖加水分解酵素とは異なるユニークな反応機構をもつことも明らかにしました。

・本研究成果は *The Journal of Biological Chemistry* 誌に3月29日付け（米国東部時間）で掲載されました。

【研究の背景】

β -1,2-グルカンとは一部の共生細菌や病原性細菌が合成・分泌する多糖であり、宿主への共生や感染、また細胞内浸透圧の調節物質として知られています (Dylan et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4403–4407 (1986) 及び Rigano et al. *Plant Cell* 19, 2077–2089 (2007)) (図1A)。また、環状 β -1,2-グルカンの誘導体は合成フラボノイド（ビタミン様物質）の一種の水溶性を非常に向上させることが報告されています (Piao et al. *Carbohydr Polym.* 101, 733-740 (2014))。天然では希少とされていますが、近年、当グループにより直鎖状 β -1,2-グルカンの人工的な（酵素法による）大量調製法が確立され (Abe et al. *J. Appl. Glycosci.* 62, 47–52 (2015))、 β -1,2-グルカンに作用する関連酵素の探索が容易になりました。

β -1,2-グルカンを内部より加水分解する β -1,2-グルカナーゼ (SGL) はそのうちの一つであり、2017年に原核生物由来 SGL (CpSGL) の単離及び同定が行われ、新規な糖加水分解酵素 (GH) のファミリー(注 1)(GH144) が創設されています (Abe et al. *J. Biol. Chem.* 292, 7487–7506 (2017))。しかし、真核生物にも β -1,2-グルカン分解活性を示す微生物が報告 (Reese et al. *Can. J. Microbiol.* 7, 309–317 (1961)) されているにもかかわらず、CpSGL の近縁酵素の中には真核生物由来のものは全く見出されませんでした。そのため、真核生物と原核生物では SGL の起源が異なると考えられます。

【研究成果の概要】

唯一の炭素源として大量調製された直鎖状 β -1,2-グルカンを用いて、培養液上清中に β -1,2-グルカン分解活性が認められる糸状菌 *Talaromyces funiculosus* から SGL (TjSGL) の精製・単離を行いました。本酵素の遺伝子同定により判明した全アミノ酸配列から近縁酵素を系統的に検索したところ、既知の GH は全く見出されませんでした (図 1B)。また、これら近縁酵素のほとんどは真核生物由来のものであり、粘菌や子のう菌に機能未知タンパク質として分布していました。したがって、本酵素は、これらの機能未知タンパク質とともに、新規 GH ファミリーを構成していることが示唆されました。

酵母を宿主とした組換え型 TjSGL (TjSGLr) は、天然型酵素と同様に β -1,2-グルカンに対して特異的な分解活性を発揮しました。さらに生化学的な機能解析から、本酵素が基質内部から分解を行う *endo* 型(注 2)の分解活性を示すこと、アノマー反転型(注 3)の反応機構を持つこと、5 糖以上の β -1,2-グルコオリゴ糖 (Sop_ns, n は結合したグルコースの分子数を示す) に作用し、その還元末端から主に Sop₂ を遊離することも明らかになりました。

本酵素には立体構造既知の近縁酵素がありません。そこで、ヨウ素の異常分散効果を利用して位相決定を行い、(α/α)₆ toroid fold の全体構造を有する TjSGLr の立体構造の決定に成功しました。さらに、本酵素の触媒機構および基質認識機構を解明するために、非活性型変異体 E262Q (262 番目のグルタミン酸をグルタミンに置換した変異体) と β -1,2-グルカンを用いてミカエリス複合体構造(注 4)を構造解析から取得しました (図 2)。

GH 酵素において一般的なアノマー反転型の反応機構では、切断部位へ直接プロトン供給可能な距離と求核水を直接活性化可能な距離に酸性残基 (それぞれ一般酸触媒、一般塩基触媒) が存在します (Davies et al. *Structure* 3, 853–859 (1995))。しかし、大変興味深いことに、本酵素にそのような残基は見出されませんでした。そこで、切断点近傍に位置するすべての触媒候補アミノ酸残基に対して部位特異的置換変異体を作成し、それらの β -1,2-グルカンに対する活性を調べたところ、E262、D177 (一般酸触媒候補) 及び D446 (一般塩基触媒候補) の 3 変異体に顕著な活性低下が認められました。D446 は β -1,2-グルカンとの複合体構造中において、求核水とは別の水分子を介して求核水と相互作用可能な距離に存在していることから、この残基が一般塩基触媒である可能性が強く示唆されました。一方で、D177 及び E262 は、それぞれ基質自身の別々な 3 位ヒドロキシ基を介して基質の切断部位の酸素

原子と相互作用しており、これらのいずれかが一般酸触媒としてはたらくことが示唆されました。

そこで、D177 及び E262 のどちらが一般酸触媒かを決定するために、各々の残基と相互作用する 3 位ヒドロキシ基の酸素原子を除去した (各残基から基質の切断部位への作用が遮断された) 基質誘導体に対する分解活性を調べました。その結果、E262 と相互作用するヒドロキシ基が還元された基質のみで分解が認められませんでした (図 3)。この結果は、E262 が基質の 3 位ヒドロキシ基を介して一般酸触媒残基として機能することを示しており、本酵素が触媒機構の上でも新規な特徴をもつことが明らかになりました (図 4)。

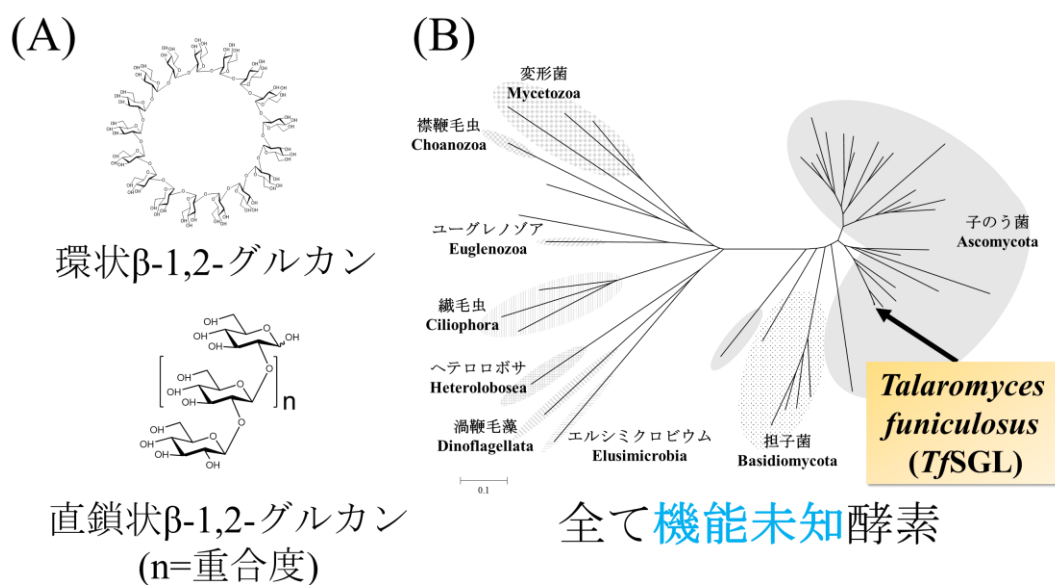


図 1. β-1,2-グルカンの構造 (A) と TjSGL の系統樹 (B)

(B) TjSGL 及びその近縁タンパク質の中に、既知の GH は全く見出されませんでした。また、近縁タンパク質のほぼ全てが真核生物由来のタンパク質でした。

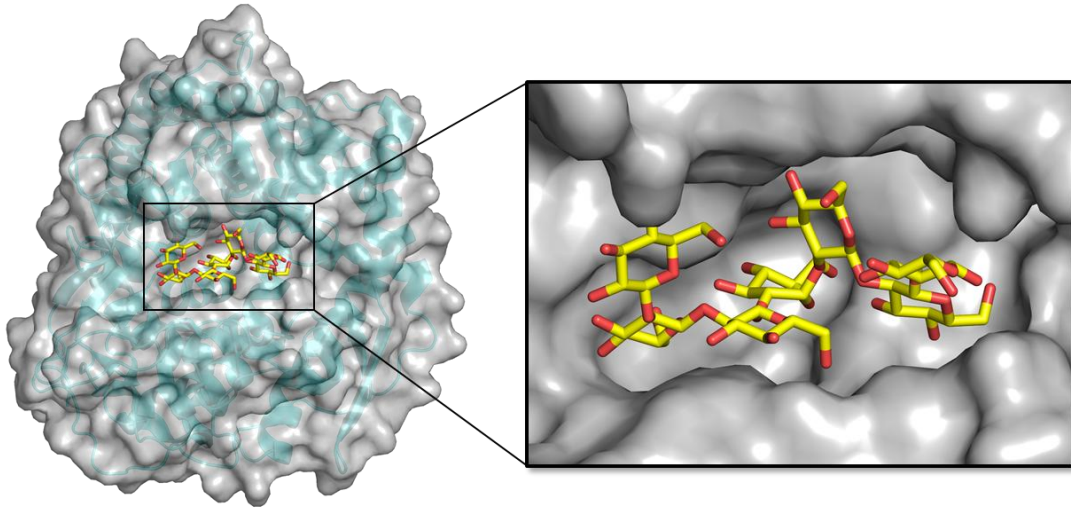
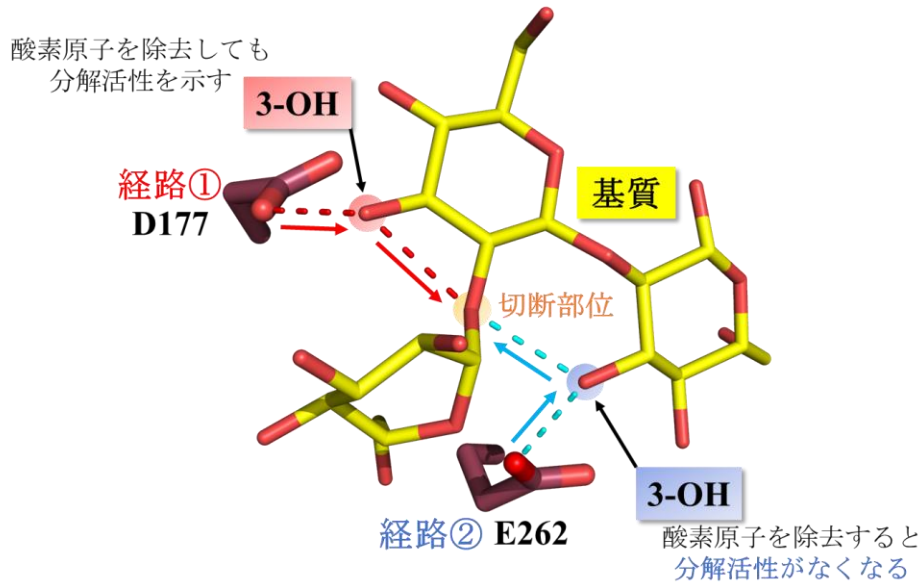


図 2. *TjSGL-β-1,2-グルカン*複合体の全体構造及び基質ポケット構造
 クレフト状の基質ポケットにしっかりと基質が結合していました。



異なる3位ヒドロキシ基 (3-OH) を介する2つの推定経路
 (経路①、②)

図 3. 推定された *TjSGL* の一般酸触媒経路

構造解析より推定された基質の3位ヒドロキシ基 (3-OH) を介して行われる触媒経路。赤色は酸素原子を表します。基質の3位ヒドロキシ基の酸素原子を還元して除去すると触媒経路が遮断されました。

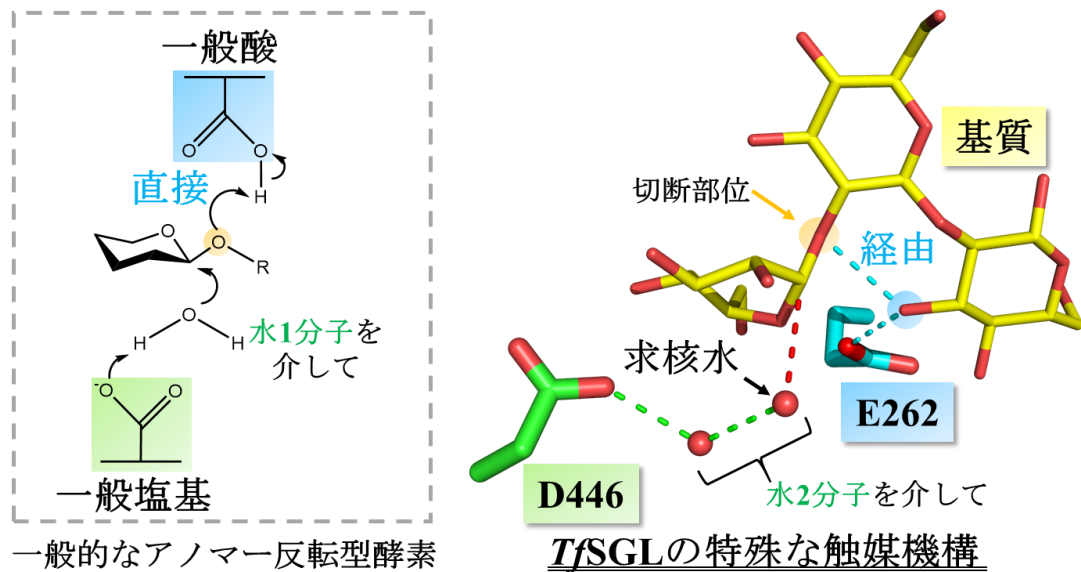


図 4. 本研究により明らかになった *TjSGL* の触媒機構

基質の一部を介して作用する一般酸触媒及び求核水とは別の水分子により求核水を活性化させる触媒反応を行う一般塩基触媒。いずれにおいても、*TjSGL* の反応機構は一般的なアノマー反転型酵素とは異なるものでした。

【今後の展望】

β -1,2-グルカン関連酵素の研究は、基質の大量合成法確立を皮切りに、近年急速に進展しています。本研究により報告した真核生物由来 SGL に関する知見は、原核生物由来 SGL と真核生物由来 SGL 間での分子進化を明らかにするための一助となり、新規な β -1,2-グルカン関連酵素を発見するために役立つと考えられます。また、真核生物由来 SGL は共生、または寄生を行う菌に多く存在することから、本酵素や、その近縁酵素は真核生物の共生や寄生に何らかの関わりをもっているかもしれません。

さらに、*TjSGL* の触媒機構は一般的な反転型酵素のものとは一般酸及び一般塩基触媒の両者において異なる非常に特殊なものでした。いずれか一方が異なる GH 酵素は稀に報告されていますが、両者とも異なるものは本酵素が初めてです。本研究成果の知見は、他の GH 酵素群のまだ見つかっていない多様な反応機構の推定や解析や *TjSGL* と同様の反応機構をもつ新規な酵素の発見につながると考えられます。

【論文情報】

雑誌名： The Journal of Biological Chemistry

論文タイトル： Identification, characterization and structural analyses of a fungal *endo*- β -1,2-glucanase reveal a new glycoside hydrolase family

【発表者】

田中信清	東京理科大学大学院理工学研究科応用生物科学専攻 博士学生 (筆頭著者)
中島将博	東京理科大学理工学部応用生物科学科 講師 (責任著者)
成川恵	東京理科大学理工学部応用生物科学科 助教 (当時)
松永大輝	東京理科大学理工学部応用生物科学科 修士卒
紙透伸治	麻布大学 獣医学部 講師
新正浩暉	新潟大学大学院自然科学研究科 (博士前期課程院生)
高橋佑汰	新潟大学大学院自然科学研究科 (博士前期課程修了)
杉本直久	新潟大学大学院自然科学研究科 博士研究員 (当時)
阿部紘一	東京大学大学院農学生命科学研究科 特任研究員
寺田透	東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授
宮永顕正	東京工業大学 理学院化学系 助教
山下哲郎	岩手大学 農学部 教授
菅原二三男	東京理科大学理工学部応用生物科学科 教授 (当時)
鎌倉高志	東京理科大学理工学部応用生物科学科 教授
今場司朗	農研機構食品研究部門 食品分析研究領域 上級研究員
中井博之	新潟大学 農学部 准教授
田口速男	東京理科大学理工学部応用生物科学科 教授

【用語】

注 1…endo 型

ポリマー基質の末端からではなく、内部から加水分解を行う分解様式のことです。末端のない基質 (環状基質) に対しても活性を示すことが可能です。

注 2…GH ファミリー

GH は、基本的に酵素のアミノ酸配列によって分類され、CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Database) には 161 のファミリー (2019 年 3 月 22 日現在) が設立されています。しかし、非常に多種多様な糖鎖に対して非常に数が少なく、今後も新規なファミリーが発見されていくと考えられます。

注 3…アノマー反転型酵素

図 4 (左) で示した基質のアノマー位のヒドロキシ基の向きが反応産物で反転する酵素のことです。一般的には 2 つの酸性アミノ酸残基がそれぞれ一般酸触媒および一般塩基触媒として働きます。この触媒機構では、切断部位近傍に存在する一般酸触媒が直接グリコシド結合中の酸素原子をプロトン化します。同時に、一般塩基触媒が求核攻撃を行う水分子 (求核水) を活性化し、求核水がアノマー位炭素原子に求核攻撃することにより分解が生

じます。

注 4…ミカエリス複合体

酵素が基質に結合し、反応が生じる直前の複合体構造を表します。

【参考論文】

1. Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D. R. and Ditta, G. (1986) *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4403–4407.
2. Rigano, L. A., Payette, C., Brouillard, G., Marano, M. R., Abramowicz, L., Torres, P. S., Yun, M., Castagnaro, A. P., Oirdi, M. E., Dufour, V., Malamud, F., Dow, J. M., Bouarab, K. and Vojnov, A. A. (2007) Bacterial cyclic β -(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses. *Plant Cell* **19**, 2077–2089.
3. Piao, J., Janga, A., Choi, Y., Tahir, M. N., Kim, Y., Park, S., Cho, E. and Jung, S. Solubility enhancement of α -naphthoflavone by synthesized hydroxypropyl cyclic-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucans (cyclophosphoroses) (2014) *Carbohydr Polym.* **101**, 733-740.
4. Abe, K., Nakajima, M., Kitaoka, M., Toyozumi, H., Takahashi, Y., Sugimoto, N., Nakai, H. and Taguchi, H. (2015) Large-scale preparation of 1,2- β -glucan using 1,2- β -oligoglucan phosphorylase. *J. Appl. Glycosci.* **62**, 47–52.
5. Abe, K., Nakajima, M., Yamashita, T., Matsunaga, H., Kamisuki, S., Nihira, T., Takahashi, Y., Sugimoto, N., Miyana, A., Nakai, H., Arakawa, T., Fushinobu, S. and Taguchi, H. (2017) Biochemical and structural analyses of a bacterial *endo*- β -1,2-glucanase reveal a new glycoside hydrolase family. *J. Biol. Chem.* **292**, 7487–7506.
6. Reese, E. T., Parrish, F. W. and Mandels, M. (1961) β -D-1,2-Glucanases in fungi. *Can. J. Microbiol.* **7**, 309–317.
7. Davies, G. and Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853–859.

【本研究内容に関するお問合せ先】

■東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 講師 中島将博

Tel : 0471-24-1501 内線 3416

e-mail : m-nakajima@rs.tus.ac.jp

【当プレスリリースの担当事務局】

■東京理科大学 研究戦略・産学連携センター (URA センター)

〒162-8601 東京都新宿区神楽坂 1-3

Tel : 03-5228-7440 e-mail : ura@admin.tus.ac.jp

*本資料中の図等のデータはご用意しております。上記 URA センターまでご連絡頂ければ幸いです。