

2025 年 6 月 11 日

系統的に新規な β -1,2-グルカナーゼ群の発見
～酵素の構造解析・機能解析から解明された分子進化の手がかり～

研究の要旨とポイント

- β -1,2-グルカンの分解酵素について、アミノ酸配列の網羅的な相同性検索を行い、機能未知で系統的に新規な 4 つのグループ(Group 1~4)を発見しました。これらのうち 3 つのグループ(Group 1~3)で β -1,2-グルカンを分解する活性を発見しました。
- これらグループの酵素の立体構造と予測構造の解析、反応機構の解析、推定される触媒残基の位置の比較から、これら 3 つのグループが系統的に新規な糖質加水分解酵素(GH)のファミリー(*1)であることが示され、新規 GH ファミリーGH192、GH193、GH194 が創設されました。
- 本研究のさらなる発展により、新規酵素の探索や酵素反応メカニズムの解明が進展し、新たなオリゴ糖合成のための酵素機能改変などへの応用が期待されます。

【研究の概要】

東京理科大学 創域理工学部 生命生物科学科の中島 将博准教授、同大学大学院 創域理工学研究科 生命生物科学専攻の元内 省博士（日本学術振興会特別研究員 PD）、産業技術総合研究所 人工知能研究センターの小林 海渡研究員、新潟大学 農学部 農学科の中井 博之准教授の共同研究グループは、糖質加水分解酵素(Glycoside Hydrolase; GH)に関して、 β -1,2-グルカンを分解して β -1,2-グルコオリゴ糖を生成する GH ファミリー(GH144、GH162)に属する酵素 (β -1,2-グルカナーゼ, SGL) (図 1) を基にしたアミノ酸配列の網羅的な相同性検索により、機能未知で系統的に新規な 4 つのグループ(Group1~4)を発見しました(図 2)。機能と構造の側面から解析を行った結果、Group 1~3 のタンパク質が SGL であることがわかりました。また、構造的な特徴や反応機構の比較から、Group 1~3 は既知の GH ファミリーである GH144、GH162、GH189 とは異なる新規ファミリーに

分類されるべきであることが示され、この Group 1~3 に対してそれぞれ GH192、GH193、GH194 が新たに創設されました。

β -1,2-グルカンとは細菌によって生産される天然のグルコースポリマーであり、共生因子、浸透圧調節、宿主免疫系の回避など、生理学的に重要な役割を果たしています。しかし、その希少さのため、 β -1,2-グルカンの合成と分解に関与する酵素の研究例は限られており、関連酵素の自然界における分布の全体像の把握には至っておりません。本研究グループは、過去にさまざまな β -1,2-グルカン関連酵素に関する研究を行い、酵素がはたらく分子メカニズムを解明してきました。今回、さらに理解を深めるべく、土壌細菌 *Chitinophaga pinensis* 由来の SGL(CpSGL)と、糸状菌 *Talaromyces funiculosus* 由来の SGL(TfSGL)を用いた相同性検索を行い、既知の GH ファミリー周辺の探索を行いました。

その結果、系統的に全く新しい 4 つのグループ(Group 1~4)を発見しました。これらのタンパク質について詳細に解析したところ、Group 1~3 のタンパク質は β -1,2-グルカンの特異的に分解する作用を示しました。Group 4 のタンパク質については分解対象となる基質を同定することができませんでした。Group 1~3 の酵素について、反応速度論的解析や酵素特性解析を行ったところ、既知の GH144 や GH162 に属する SGL と類似した性質を示したことから、今回発見した酵素も SGL であると結論付けられました。さらに、これら 3 つの GH ファミリーはいずれも既知の SGL と同様の全体構造[(α/α)₆ バレル構造]を有し、アノマー反転型(*2)の反応機構を示すことから、構造分類群としては GH144 や GH162 と同じく clan GH-S に属することを見出しました。しかし、推定される触媒残基位置の違いや系統樹における位置関係から、Group 1~3 は既知の GH ファミリーとは異なる新規ファミリーであることが示され、それぞれのグループに対して GH192、GH193、GH194 という新しい GH ファミリーが創設されました。

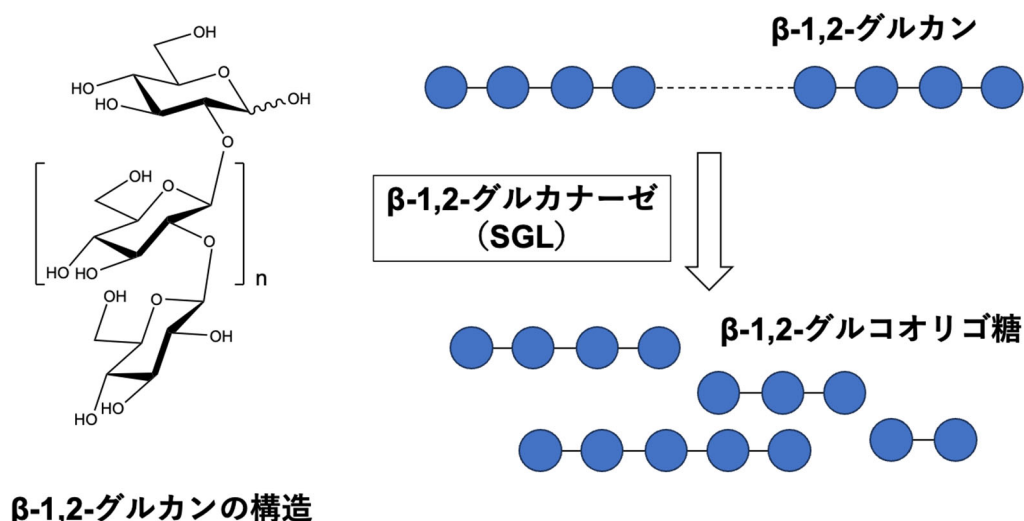


図 1. β -1,2-グルカンの構造と β -1,2-グルカナーゼ

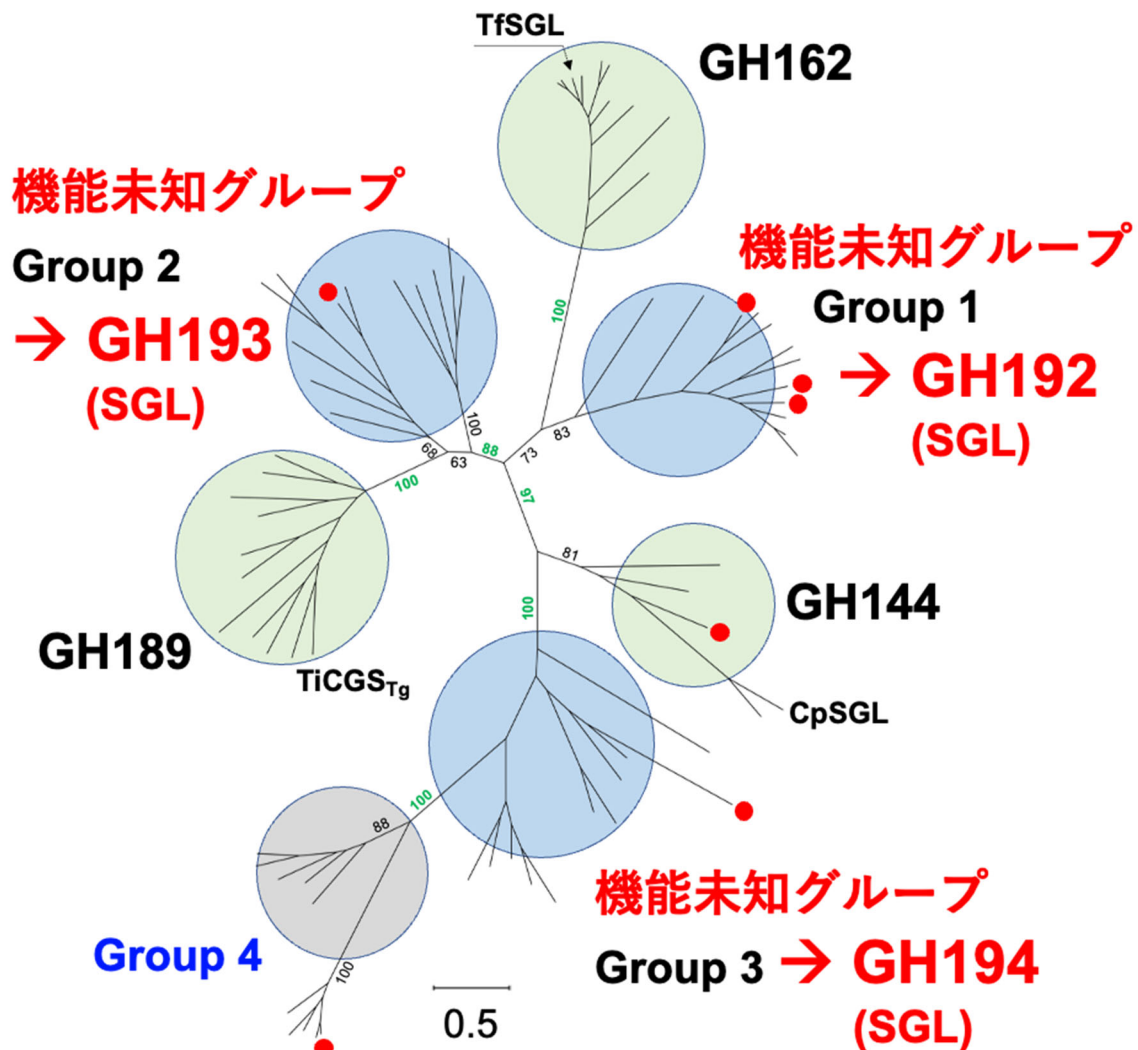


図 2. β -1,2-グルカナーゼの系統解析

赤丸は本研究で使用したタンパク質を示している。それらの由来の菌は Group 1、グラム陰性菌 *Photobacterium gaetbulicola*、グラム陰性菌 *Endozoicomonas elysicola* ; Group 2、グラム陽性菌 *Sanguibacter keddiei* ; Group 3、*P. gaetbulicola* ; Group 4、*P. gaetbulicola* ; GH144、植物病原菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*。

本研究成果は、2025 年 5 月 24 日に国際学術誌「[Protein Science](#)」にオンライン掲載されました。

【研究の背景】

β -1,2-グルカンは細菌によって生産される天然のグルコースポリマーであり、共生因子、浸透圧調節、宿主免疫系の回避など生理的に重要な役割を果たしています。細菌における役割だけでなく、 β -1,2-グルカンの分解産物である β -1,2-グルコオリゴ糖が植物において免疫を誘導することも報告されています。 β -1,2-グルカンの合成酵素としては、日和見感染菌 *Brucella abortus*、根粒菌 *Sinorhizobium meliloti*、植物病原菌 *Rhizobium radiobacter* 由来の環状 β -1,2-グルカン合成酵素(CGS)が報告されています。分解酵素としては、2014 年のグラム陽性細菌 *Listeria innocua* 由来 1,2- β -オリゴグルカンホスホリラーゼの遺伝子同定が初めての報告になります。その後、この酵素を利用

した β -1,2-グルカンの大量合成法が確立されました。この β -1,2-グルカンを用いて、 β -1,2-グルカンから β -1,2-グルコオリゴ糖を遊離するエンド型酵素(*3)である β -1,2-グルカナーゼ(SGL)が、細菌および糸状菌それぞれから遺伝子同定されています。これらの酵素は GH ファミリーに属しており、細菌由来 SGL は GH144、糸状菌由来 SGL は GH162 として新規な GH ファミリーが創設されました(*1)。近年では、好熱性細菌 *Thermoanaerobacter italicus* 由来の CGS の機能未知ドメイン(TiCGS_{Tg})が糖転移反応により直鎖状糖鎖を環状化できることが明らかになり、このドメインのグループに対しても新たな GH ファミリー(GH189)が創設されました(*2)。

このように、近年さまざまな β -1,2-グルカン関連酵素が新たに発見され、研究が大きく進展してきました。特に、新規 GH ファミリーの発見や生化学的機能の解明が進み、 β -1,2-グルカン代謝に関する理解が深まっています。しかし、 β -1,2-グルカン代謝関連遺伝子が広く微生物に存在し、 β -1,2-グルカンが植物を含む生物間の相互作用に関わっていることを踏まえると、これらの酵素の分布や多様性、生理的役割についての理解はまだ十分とは言えません。

そこで今回、GH144 に属する *Chitinophaga pinensis* 由来の SGL(CpSGL)と、GH162 に属する糸状菌 *Talaromyces funiculosus* 由来の SGL(TfSGL)に着目して、新たな分解酵素の検索を行いました。そして、発見した酵素の生化学的解析および構造解析を通じて、触媒残基の配置の変化や基質認識機構の相違など、反応機構の変化を伴う複雑な分子進化過程を解明することを本研究の主要な目的としました。

※1: 日本経済新聞プレスリリース (2019 年 3 月 30 日付)

[『新規な分子進化のルーツを持つ糖鎖分解酵素を発見』](#)

※2: 東京理科大学プレスリリース (2024 年 2 月 13 日付)

[『 \$\beta\$ -1,2-グルカンの環化に関わるメカニズムを解明 ～生理学的に重要な環状 \$\beta\$ -1,2-グルカン研究の進展に寄与～』](#)

【研究結果の詳細】

① SGL の GH ファミリーにおけるアミノ酸配列の相同性検索

CpSGL (GH144)と TfSGL (GH162)をそれぞれクエリとして PSI-BLAST を用いた相同性検索を行いました。その結果、GH144、GH162、GH189 は互いに遠縁の関係にあっただけでなく、これまで報告されていなかった 4 つの機能未知の Group 1~4 が見出されました。また、これらが GH144、GH162、GH189 とともに、巨大な系統群 (SGL クラン) を形成していることがわかりました (図 2)。

SGL クランの各グループから代表的な酵素を選定して以降の解析に用いました。また、基質の結合のポーズについては、植物病原菌 *Xanthomonas campestris* 由来の GH144 SGL (XcSGL)と β -1,2-グルカンとの複合体構造の取得を行い、この構造との比較により考察を行いました。

② 機能未知グループの各酵素の機能探索

β -1,2-グルカンに対する加水分解活性は、Group 1~3 の酵素で確認されました。これらの酵素は全て β -1,2-グルカンに特異的でしたが、最適 pH や糖鎖の分解パターンはそれぞれ異なることが明

らかになりました。一方で、Group 4 については反応を示す基質は見出されませんでした。Group 1~3 の酵素については反応速度論的解析も行い、これらの酵素が GH ファミリーの酵素として十分に高い加水分解速度を有することが示されました。これらの結果から、Group 1~3 という機能未知グループの真の酵素機能を発見したと言えます。

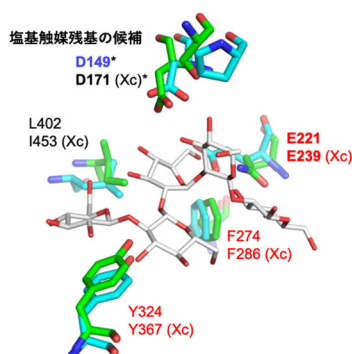
GH ファミリーの酵素は基本的に 2 種類の反応機構（アノマー保持型とアノマー反転型、*2）のいずれかを有しています。Group 1~3 の酵素の反応機構における基礎的な性質を決定するため、これらの酵素による β -1,2-グルカンの加水分解過程における旋光度変化を解析しました。その結果、これら 3 つの酵素はいずれも TfSGL や CpSGL と同様の変化を示し、アノマー反転型で反応が進行することが明らかになりました。

③ SGL クランの構造的特徴

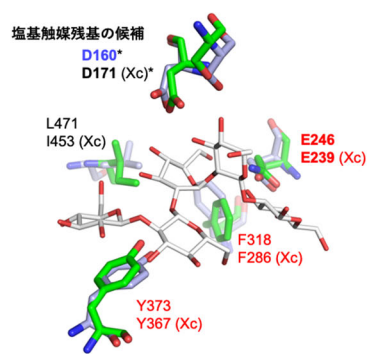
Group 1~4 の酵素の立体構造を詳細に分析し、いずれも既知の GH144, GH162, GH189 と同様の $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造を有することを明らかにしました。新たに発見した酵素と既知 GH ファミリーの酵素との構造比較では、 α -ヘリックスの位置や長さに特徴的な違いが見られ、特に GH189 には固有の挿入配列があり、それが構造的特徴となっていることが見出されました。これらの構造的差異は、酵素の進化的起源や機能の多様化に関連している可能性があります。

また、SGL クラン全体で保存されている重要なアミノ酸残基として、(XcSGL (GH144) の残基番号で) E239、Y367 が見出されました。F286 も GH162 以外の全てで保存されている残基でした。これらは全て基質ポケットに存在する残基であり、E239 は触媒残基の一つ、Y367 は基質と相互作用をする残基、F286 は酵素反応の際に基質と反応する水分子または触媒残基の近傍にあり、全て十分な酵素機能の発揮に重要と考えられます (図 3)。これらの残基に相当するアミノ酸は、SGL クランに属するタンパク質を特徴づける指標として利用できます。さらに、このような保存性は機能未知の Group 4 のタンパク質においても認められました。

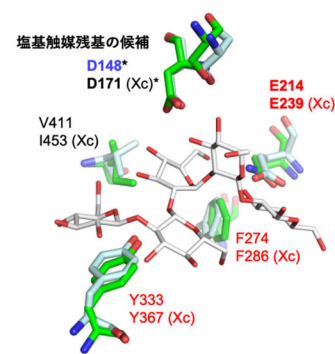
Group 1 - XcSGL (GH144)



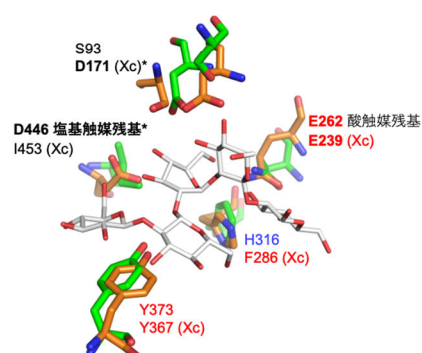
Group 2 - XcSGL



Group 3 - XcSGL



TfSGL (GH162) - XcSGL



TiCGS_{Tg} (GH189) - XcSGL

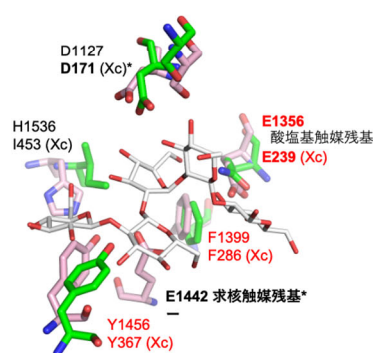


図 3, SGL クランの各グループ、ファミリー間の基質ポケットの残基の比較
上段は各グループ、ファミリーの残基、下段は XcSGL(GH144)の残基を記載している。緑と白のスティック表示はそれぞれ XcSGL の残基と基質の一部を示している。その他の色のスティック表示は各グループ、ファミリーの残基を示している。赤でラベルした残基は SGL クランを特徴付ける残基。触媒残基と触媒残基の候補は太字で示し、日本語でラベルしている。塩基触媒残基 (GH189 の場合は求核触媒残基) またはその候補の残基は、それらの位置の比較のためにアスタリスクを添えている。Group 1 は *E. elysicola* 由来 SGL の構造である。右下 E1442 の下の - は対応する残基がないことを示している。

④ 触媒残基の位置と GH ファミリーの分類

GH 酵素のファミリー間における本質的な相違は、その一つとして触媒残基の位置に反映されるため、それらの位置は分子進化を知る上での有力な情報です。一般的に GH 酵素は 2 個の酸性アミノ酸残基が触媒残基となります (アノマー反転型の場合は一般酸触媒残基と一般塩基触媒残基、以下は一般の記載を省略)。そこで、SGL クランにおいて機能が明らかになった各グループの酸性アミノ酸残基の位置を比較しました。TfSGL(GH162)で同定されている酸触媒残基(E262)は SGL クランの全グループで保存されていました (図 3、4)。これは、先述の SGL クランに属するタンパク質を特徴づける指標となる残基の一つです。Group 1~3 の酵素における対応する残基はその変異体で活性をほぼ失ったため、これらの残基は酸触媒残基であることが示唆されました。

一方で、塩基触媒残基については、一般的なパターンである求核水に直接相互作用する酸性ア

ミノ酸残基が存在しませんでした。しかし、GH144 酵素の基質ポケット中で保存されている酸性アミノ酸残基が Group 1~3 に保存されており（図 3、4）、その変異体は活性をほぼ失いました。したがって、これらの保存残基は触媒残基の有力な候補であり、反応機構は GH144 と Group 1~3 で共通しているものと推定されます。ただし、これらの残基の位置は特殊なため、触媒残基として確定するにはシミュレーションなどの他の証拠も必要です。GH162 の塩基触媒残基や GH189 の求核触媒残基（アノマー保持型における塩基触媒残基に対応する残基）は、Group 1~3 では対応する位置に触媒可能な残基が存在していませんでした（図 3、4）。これは、Group 1~3 の塩基触媒残基の位置が確定しているかどうかにかかわらず、Group 1~3 と GH162、GH189 で反応機構が明らかに異なっていることを示しています。系統樹では反応機構ごとにグループが配置されてはおらず、Group 1 と Group 2 はそれぞれ GH162、GH189 と近いところに位置しています。アミノ酸配列、立体構造、反応機構の情報を総合した結果、Group 1~3 は既存の GH ファミリーの拡張ではなく新規の GH ファミリーと認定されました。

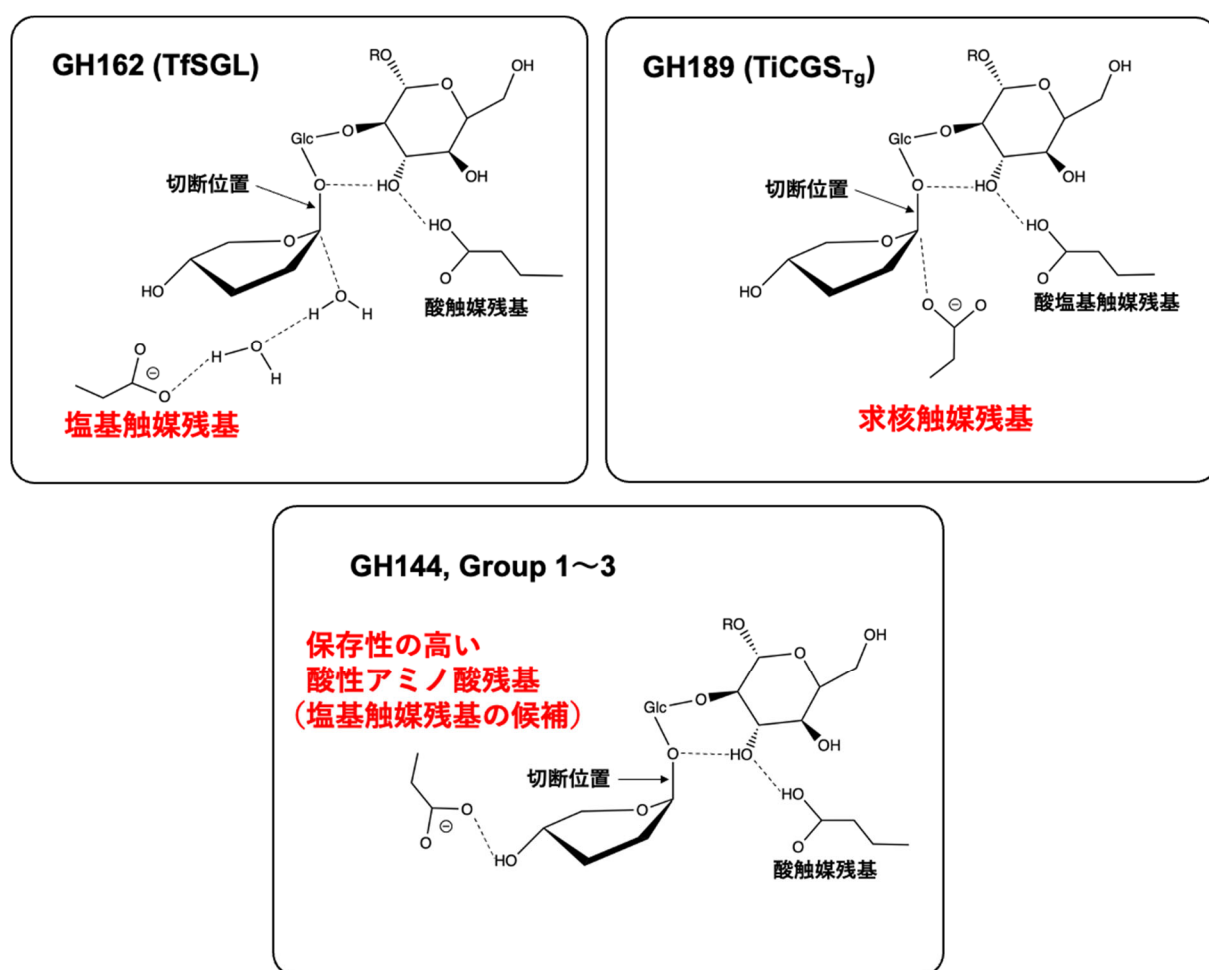


図 4. SGL クランの各グループ、ファミリーの触媒残基の比較

本研究では、これまで機能が不明だった 4 つの Group のうち 3 つについて、生理学的機能と立体構造を解明し、Group 1~3 それぞれに対して新たな GH ファミリー (GH192、GH193、GH194) が創設されました（図 2）。SGL クランではアミノ酸配列の同一性が極めて低く、保存残基も少な

いことから、分子進化の過程で大きな構造的・機能的多様化が生じたと考えられます。このように、SGL 関連酵素の広範な分布と多様性は、自然界における β -1,2-グルカン代謝の重要性と進化的複雑性を示しています。

本研究を主導した中島准教授は、「糖鎖はさまざまな生理機能を持っていますが、その構造が複雑で調製が難しく、機能の解明が容易でないものが多いです。それゆえに、そういった糖鎖に作用する新たな分解酵素の探索も同様に困難な課題の 1 つです。糖鎖を合成するには酵素を用いた方法が広く採用されており、新たな分解酵素が発見されれば新たな糖鎖の合成に応用できる可能性を秘めています。このような背景から、新しい分解酵素の探索研究は非常に重要だと考えています。系統的に新たな酵素群が見つければ、それを起点にさらなる新規酵素の発見につながるため、本研究成果には大きな意義があると考えています」と、コメントしています。

※本研究は、日本学術振興会(JSPS)の科研費(23K05041)、科学技術振興機構(JST)の次世代研究者挑戦的研究プログラム(SPRING, JPMJSP2151)の助成を受けて実施したものです。

【用語】

*1: GH ファミリー

GH ファミリーは、糖鎖を加水分解する酵素群であり、主にアミノ酸配列の相同性に基づいて分類される。進化的に近縁な酵素同士を同じファミリーにまとめるという考えに従っており、[CAZy](#) データベースにおいて体系的に整理されている。ファミリーごとに基質の認識や反応機構などの特性を共有していることが多い。

*2: アノマー保持型、アノマー反転型

アノマーとは、糖が環状構造（ピラノースやフラノース）をとる際に、環の形成によって生じる新たな不斉炭素（アノマー炭素）におけるヒドロキシ基の立体配置の違いに基づく異性体を指す。グリコシド結合を加水分解する酵素反応において、基質のアノマー型と生成物のアノマー型が一致するものをアノマー保持型、異なる型に変化するものをアノマー反転型という。

*3: エンド型酵素

ポリマー状の基質に対して、その末端ではなく内部の結合を切断する加水分解酵素の一種。環状構造など、末端を持たない基質にも作用できる点が特徴である。この酵素の作用により末端から分解するエキソ型酵素が作用できる箇所が増えるため、基質の分解代謝の効率を高める重要な役割を果たす。

【論文情報】

雑誌名： Protein Science

論文タイトル： New glycoside hydrolase families of β -1,2-glucanases

著者： Masahiro Nakajima, Nobukiyo Tanaka, Sei Motouchi, Kaito Kobayashi, Hisaka

Shimizu, Koichi Abe, Naoya Hosoyamada, Naoya Abara, Naoko Morimoto, Narumi Hiramoto, Ryosuke Nakata, Akira Takashima, Marie Hosoki, Soichiro Suzuki, Kako Shikano, Takahiro Fujimaru, Shiho Imagawa, Yukiya Kawadai, Ziyu Wang, Yoshinao Kitano, Takanori Nihira, Hiroyuki Nakai, Hayao Taguchi

DOI : [10.1002/PRO.70147](https://doi.org/10.1002/PRO.70147)

【発表者】

中島 将博	東京理科大学 創域理工学部 生命生物科学科 准教授 <責任著者>
元内 省	東京理科大学 創域理工学部 生命生物科学科 日本学術振興会特別研究員 PD
小林 海渡	産業技術総合研究所 人工知能研究センター 研究員
中井 博之	新潟大学 農学部 農学科 准教授

【研究に関する問い合わせ先】

東京理科大学 創域理工学部 生命生物科学科 准教授
中島 将博

【報道・広報に関する問い合わせ先】

東京理科大学 経営企画部 広報課

産業技術総合研究所 報道室

新潟大学 広報事務室

TEL: 025-262-7000

Email: pr-office@adm.niigata-u.ac.jp