

論文の内容の要旨

生物材料科学専攻

平成 15 年度博士課程 進学

氏 名 川合理恵

指導教官名 鮫島正浩

Functions of extracellular β -1,3-glucanases from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生産する菌体外 β -1,3-グルカン分解酵素の機能解析

担子菌の細胞壁は、分岐構造を有する β -1,3/1,6-グルカンを主要構成成分とし、菌糸の形態維持や貯蔵糖としての役割に加えて、他の生物や環境との相互作用や菌体外酵素の局在性にも深く関与していることが知られている。このため、 β -1,3-グルカン分解酵素は、担子菌が生産する他の多くの糖質加水分解酵素（GH）と同様に炭素源としての β -1,3-グルカンを代謝するためだけでなく、菌糸の成長過程や外環境の変化に伴う菌体壁 β -1,3/1,6-グルカンの構造変換にも関与していると考えられる。担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、GH ファミリー 3 に属する菌体外 β -グルコシダーゼ（Bgl3A）を生産するが、その加水分解特性から、 β -1,3-グルカン分解に関与していることが示唆されている。本研究では、 β -1,3-グルカン分解酵素による菌体外 β -1,3/1,6-グルカンの構造制御機構を明らかにすることを目的として、本菌が生産する他の β -1,3-グルカン分解酵素を新たに獲得し、得られた酵素および Bgl3A の機能解析を行った。

担子菌 *P. chrysosporium* が生産する菌体外 β -1,3-グルカン分解酵素の獲得

近年において公開された担子菌 *P. chrysosporium* のゲノムデータベースによると、本菌は少なくとも 166 の GH 遺伝子を保有し、そのうちおよそ 30 遺伝子が β -1,3-グルカン分解酵素をコードすることが推測されている。これは、菌にとって β -1,3-グルカンの代謝が重要なプロセスであることを示唆しているが、これらの酵素機能に関する情報は非常に限られている。そこで、新たに β -1,3-グルカン分解酵素を獲得するために、担子菌細胞壁 β -1,3/1,6-グルカンと類似した構造を有するラミナリンを炭素源とする培

地で *P. chrysosporium* を 3 日間培養した。回収した菌体外液を SDS-PAGE に供したところ、Bgl3A と考えられる分子量 116 kDa のタンパク質に加えて、 β -1,3-グルカン分解活性を示す分子量 36kDa と 83kDa のタンパク質が確認された (Fig. 1)。36kDa のタンパク質は、クローニングの結果から GH ファミリー-16 に属する酵素であることが推定され (Lam16A)、一方、分子量 83kDa の酵素は GH ファミリー-55 に属していた (Lam55A)。また、得られたアミノ酸配列は、GH ファミリー-16 および 55 に属する糸状菌由来の β -1,3-グルカン分解酵素と高い相同性を示していた。

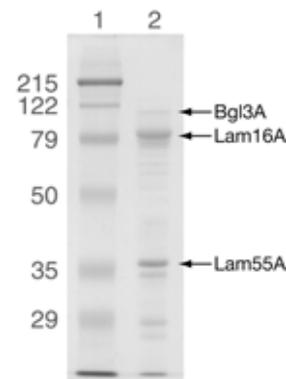


Fig. 1 SDS-PAGE of laminarin-degrading culture of *P. chrysosporium*. Lane 1, molecular weight standard (kDa); lane 2, a concentrated culture medium of *P. chrysosporium*.

酵母菌 *Pichia pastoris* を用いた β -1,3-グルカン分解酵素の大量発現系の構築

一般に異宿主発現系を用いてタンパク質を生産することは、精製された目的タンパク質を迅速にかつ大量に調整することを可能にし、また、部位特異的変異などを導入した変異体の生産にも有効である。本研究においては、酵母菌 *P. pastoris* を用いて *P. chrysosporium* 由来の菌体外 Bgl3A、および新たに得られた 2 種の β -1,3-グルカン分解酵素 (Lam16A および Lam55A) の大量発現系の構築を試みた。その結果、いずれの発現系においても得られた培養液中に分泌されるタンパク質の大部分を組換え体が占めていた。特に組換え Bgl3A の生産量は、*P. chrysosporium* 培養系で生産された野性 Bgl3A と比較しておよそ 40 倍であった。さらに、組換え体は、野性型の酵素的性質を保持していることが示唆されたことから、以後の酵素機能の解析には、本研究において得られた組換え体を用いることとした。

GH ファミリー-3 に属する Bgl3A の糖転移反応

立体保持機構を有する多くの GH が、加水分解反応に加えて糖転移反応を触媒することは一般に広く知られている。その触媒機構より、糖転移反応の速度は基質濃度の増加に伴って上昇し、加水分解反応速度を低下させる (基質阻害) ことが考えられるが、速度論的な解析はほとんど為されていない。*P. chrysosporium* の Bgl3A は、加水分解反応において基質阻害が認められていることから、本研究では糖転移反応の解析を行った。ラミナリピオースを基質として Bgl3A を作用させたところ、糖転移反応物として 6-O-グルコシル-ラミナリピオースが得られたことから (Fig. 2) Bgl3A は糖転移反応により新たに β -1,6-グルコシド結合を形成することが明らかとなった。また、様々な基質濃度において生産されるグルコースと糖転移反応物を定量的に

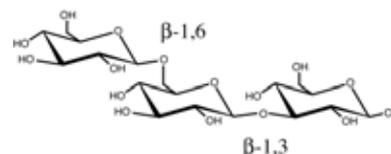


Fig. 2 Chemical structure of 6-O-glucosyl-laminaribiose, a transglycosylation product.

測定した結果、これまで基質阻害として考えられてきた現象が糖転移反応に因るものであることが速度論的に示された (Fig. 3)。

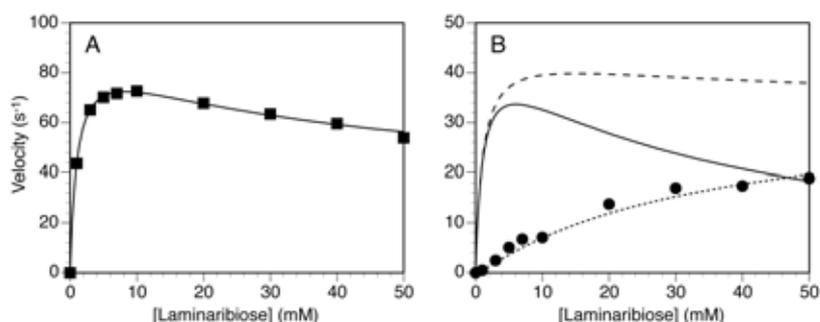


Fig. 3 Plots of laminaribiose concentration versus velocity of glucose (A) and 6-*O*-glucosyl-laminaribiose (B) production by Bgl3A. Filled squares, production rate of glucose; filled circles, production rate of 6-*O*-glucosyl-laminaribiose; dashed line, simulated curve for glucose from the reducing end; solid line, simulated curve for glucose from the non-reducing end; dotted line, simulated curve for transglycosylation products.

GH ファミリー16 に属する Lam16A の加水分解反応

GH ファミリー16 には数多くのエンド型の β -1,3-グルカン分解酵素が属しているが、基質の分岐構造に対するこれらの酵素の認識についての解析は限られている。そこで、構造の異なる種々の β -1,3-グルカンを用いて、Lam16A による加水分解産物の構造解析を行った。ラミナリオリゴ糖を基質とした場合、重合度6および7の基質に対して少なくとも2パターンの加水分解挙動を示したことから、Lam16A は、多くの GH ファミリー16 に属する酵素と同様にエンド型の β -1,3-グルカン分解酵素であることが示された。また、ラミナリンを基質とした場合には、6-*O*-グルコシル-ラミナリトリオースを与えたことから、Lam16A による β -1,3/1,6-グルカンの分解には、分岐を持たないラミナリビオース単位が必要であることが示唆された (Fig. 4)。更に、リケナン (β -1,3-1,4-グルカン) を作用させた結果、4-*O*-グルコシル-ラミナリビオースを最終加水分解産物として与えた。以上の結果より、Lam16A は β -1,3-結合以外のグルコシド結合、および β -1,6-グルコシド結合を有する基質の分岐構造を認識していることが明らかとなった。

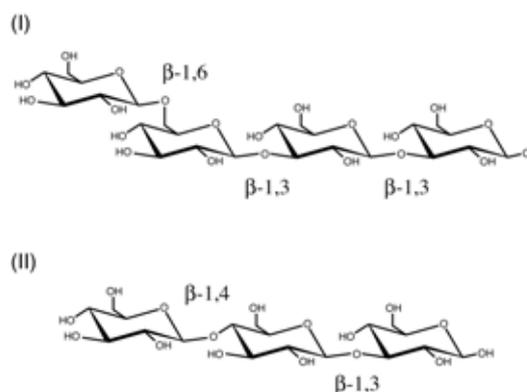
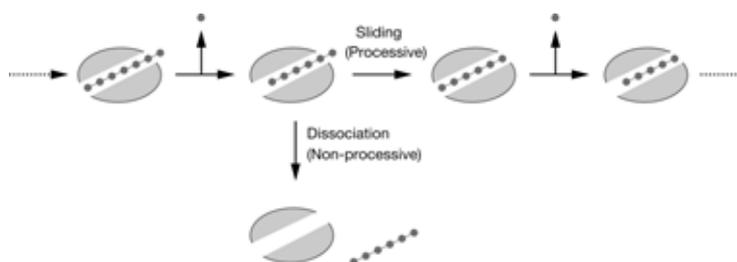


Fig. 4 Chemical structure of 6-*O*-glucosyl-laminaritriose (I), a product from laminarin hydrolysis, and 4-*O*-glucosyl-laminaribiose (II) from lichenan.

GH ファミリー55 に属する Lam55A の加水分解反応

これまで GH ファミリー55 には、糸状菌由来の β -1,3-グルカン分解酵素が分類されているが、酵素機能の知見は限られている。そこで、加水分解産物のアノマー解析により Lam55A の反応メカニズム、および β -1,3/1,6-グルカンに対する加水分解挙動を明らかにした。本酵素は、 β -1,3-グルカンを基質とした場合においては、加水分解産物として基質の非還元末端側から α -グルコースを生成したことから、立体反転機構を有するエキソ型の酵素であると考えられた。また、ラミナリンを基質とした場合において、生成物として主にグルコースと

ゲンチオピオースを与えた。そこで 6-O-グルコシル-ラミナリトリオースを作用させた結果、 α -ゲンチオピオースとラミナリピオースが生成したことから、Lam55A は β -1,6-グルコシド結合を有する基質の分岐構造を迂回して、主鎖の β -1,3-グルコシド結合を加水分解することが示唆された。さらに、重合度 7 のラミナリオリゴ糖の加水分解産物を経時的に測定した結果、グルコースに加えてラミナリトリオースの生成が顕著であったことから、本酵素は、酵素-基質複合体を形成した際に、連続的な加水分解を行う (scheme 1) プロセシビティの高い酵素であることが示唆された (Table 1)。



Scheme 1 Representation of processive and non-processive hydrolysis by Lam55A.

Table 1 Sliding and dissociation ratio after hydrolysis of laminarioligosaccharides by Lam55A.

DP of product	6	5	4	3	2
Sliding (%)	100	89.0	74.3	29.6	47.5
Dissociation (%)	0	11.0	25.7	70.5	52.4

総括

本研究においては、構造の異なる種々の β -1,3-グルカンを基質として 3 種の β -1,3-グルカン分解酵素 Bgl3A、Lam16A および Lam55A の機能解析を行った。その結果、それらすべての酵素は β -1,3/1,6-グルカンに対して高い活性を有していたが、その反応挙動はすべて異なることが明らかとなった。すなわち、Bgl3A は、基質の β -1,3-および β -1,6-グルコシド結合を加水分解するが、糖転移反応によって新たに β -1,6-グルコシド結合を形成した。また、Lam16A は β -1,6-グルコシド結合を有する分岐構造を認識し、その加水分解は制御されることが示された。一方で、Lam55A は、 β -1,3/1,6-グルカンの分岐構造を迂回し、連続的に主鎖である β -1,3-グルコシド結合を加水分解すると考えられた。以上の結果から、分岐構造に対する認識が異なる β -1,3-グルカン分解酵素の加水分解反応および糖転移反応により、菌体外 β -1,3/1,6-グルカンの構造形成は制御されていることが考えられた。