

担子菌・子囊菌由来  $\beta$ -キシロシダーゼの比較による  
進化的に異なるキシラン分解システムの解明  
Comparison of  $\beta$ -xylosidases from basidiomycetes and ascomycetes reveals  
evolutionarily distinct xylan degradation systems

小島 圭輔<sup>1</sup>, 砂川 直輝<sup>1</sup>, 五十嵐 圭日子<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Keisuke Kojima<sup>1</sup>, Naoki Sunagawa<sup>1</sup>, Kiyohiko Igarashi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi,  
Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

キシランは、高等植物の細胞壁を構成する多糖のうちセルロースではない多糖の総称であるヘミセルロースの一つであり、木か草か、針葉樹か広葉樹かによって構造が異なることが知られている。本研究では、キシランから分解酵素によって切り出されたキシロオリゴ糖をキシロースにまで分解できる酵素である  $\beta$ -キシロシダーゼ (Bxl) が、木を分解するキノコと草を分解するカビで異なることを示し、その違いはキシラン主鎖を分解する他の酵素の性質を補うように進化することで獲得されてきたことが明らかになった。

### 1 はじめに

植物の細胞壁は、三大成分と呼ばれるセルロース・ヘミセルロース・リグニンが高度に入り組んだマトリックス状の構造をしている。そのうち、ヘミセルロースの一つであるキシランは、キシロースが  $\beta$ -1,4 結合した主鎖に 4-O-メチルグルクロン酸やアラビノース、アセチル基等の側鎖がバリエーションを与えており、その構造の多様性が微生物による細胞壁の分解を妨げていると考えられている。一方、担子菌 (キノコ等) や子囊菌 (カビ等) の糸状菌は、木や草の細胞壁に適した分解酵素群によって分解して栄養にしているが、それぞれのキシランの分解戦略には未だ不明な点が多く残されている。

そこで本研究では、キノコの一つである *Phanerochaete chrysosporium* とカビの一つである *Trichoderma reesei* のキシラン分解系において最も下流で働く  $\beta$ -キシロシダーゼ (Bxl) の組換え酵素を生産し、X 線結晶構造解析の結果をキシロオリゴ糖に対する活性と比較した。

### 2 実験

糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー3 に属する *P. chrysosporium* 由来  $\beta$ -キシロシダーゼ (*PcBxl3*) を酵母 *Pichia pastoris* を用いた異宿主発現系で生産し、2 段のカラム精製を行なった。シッティングドロップ蒸気拡散法で作製した結晶の X 線回折データを PF BL-5A にて取得し、構造解析を行なった。GH ファミリー3 に属する *T. reesei* 由来  $\beta$ -キシロシダーゼ (*TrXyl3A*) の結晶構造は、スウェーデン農業科学大学の Mats 研究室にて解かれたものを使用し、N 末端領域や活性中心の構造を両酵素で比較した。

### 3 結果および考察

*PcBxl3* は *TrXyl3A* と比べて N 末端側のループ構造 (27 個のアミノ酸残基) が欠損しており、その分基質を認識するサブサイトが短くなっていることが分かった (図 1)。また、*PcBxl3* はキシロースが二つ繋がったキシロビオースに対する分解活性が高かった一方、*TrXyl3A* ではキシロースが三つ以上繋がったキシロオリゴ糖に対する活性が高いことが分かり、サブサイトの構造が活性にも影響していることが分かった (図 2)。

さらに、二つの酵素それぞれの特徴が他の糸状菌でどの程度保たれているのかを比較ゲノム解析によって調べたところ、Bxl 遺伝子を有するのは石炭紀 (3 億 5920 万年前から 2 億 9900 万年前) に現れた菌<sup>11</sup> であり、カビの場合はキシランから長いオリゴ糖を切り出す GH ファミリー11 に属する酵素遺伝子を多く持っているのに対し、キノコの場合は生成物としてキシロビオースを生産しやすい GH ファミリー10 のキシラナーゼの遺伝子しか持っていない菌が多いことが明らかになった。

以上の結果は、キノコとカビではそれぞれ分解する細胞壁の種類に合わせて用意している酵素群が異なるのと同時に、同じ反応をする酵素の場合でも、上流の酵素が生産するオリゴ糖の長さに合わせて酵素の構造をファインチューニングしながら進化してきたことを示しており、植物が細胞壁を進化させると糸状菌がそれに合わせて酵素群を進化させるという「いたちごっこ」<sup>12</sup> の一端を垣間見ることができた。

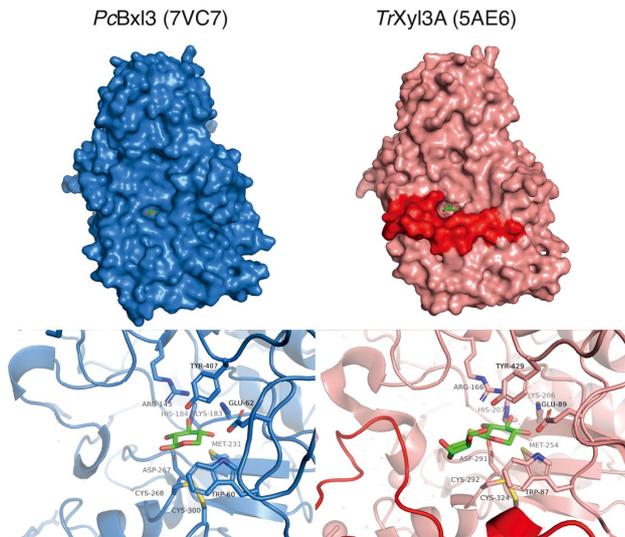


図1：キノコの一つ *P. chrysosporium* (左) とカビの一つ *T. reesei* (右) 由来  $\beta$ -キシロシダーゼ (*PcBxl3*, *TrXyl3A*) の X 線結晶構造。上段：全体構造；下段：サブサイト周辺。右の図において濃い赤色の部分が *PcBxl3* には存在しない部分。括弧中の記号は PDB ID を表す。

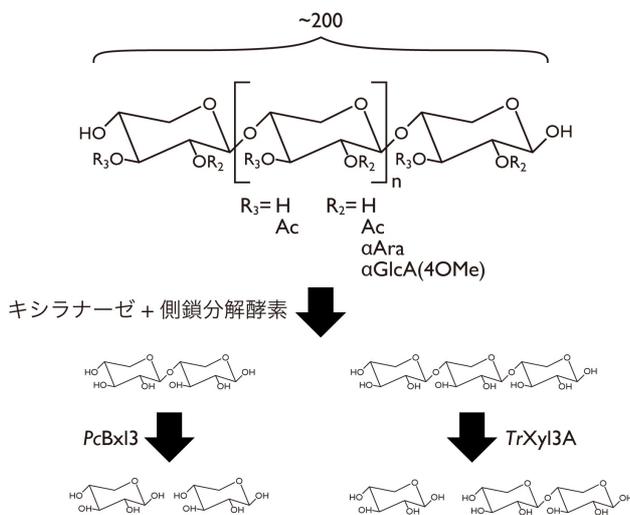


図2：キシランの構造（上）と分解酵素の作用機序（下）。*PcBxl3* と似たような酵素を多く持つキノコでは、キシロピオースのような短いオリゴ糖を生産しやすい GH10 キシラナーゼの遺伝子数が多く、*TrXyl3A* と似た酵素を多く持つカビでは、長いオリゴ糖を生産しやすい GH11 キシラナーゼの遺伝子数が多いことから、上流で働く分解酵素の性質に合わせて進化してきたことが分かる。図中の Ac はアセチル基、Ara はアラビノース、GlcA はグルクロン酸を表す。

#### 4 まとめ

キノコとカビ由来の糖質加水分解酵素ファミリー 3 に属する  $\beta$ -キシロシダーゼ (*Bxl*) の構造と活性の関係を調べた。

キノコ由来の *Bxl* (*PcBxl3*) は、カビ由来の *Bxl* (*TrXyl3A*) と比較して N 末端側 27 個のアミノ酸残基が欠失しており、その部分がサブサイト（酵素が基質を掴む部分）を短くすることによって、キシロピオース等の短いオリゴ糖の分解に適していることが分かった。

これらの酵素は、古生代の石炭紀に糸状菌が獲得したと考えられているが、二つの *Bxl* の違いが基質であるキシランを分解する酵素（キシラナーゼ）の種類と相関があることが比較ゲノム解析<sup>[1]</sup>から判明し、分解対象であるヘミセルロースの違いに合わせて、菌が微妙に分解戦略を変えてきた進化の歴史が明らかになった。

#### 謝辞

X 線回折測定の際には KEK の皆様に大変お世話になりました。深く感謝申し上げます。

また、科学研究費補助金基盤研究 (B) 「きのこのゲノム編集技術を利用した木材腐朽現象の理解とバイオマス変換系の構築」（研究代表者:五十嵐圭日子）、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「植物の力学的最適化戦略に基づくサステナブル構造システムの基盤創成」（計画研究代表者:五十嵐圭日子、領域代表:奈良先端科学技術大学 出村 拓 教授）および Business Finland フィンランド卓越教授 (FiDiPro) プログラム「Advanced approaches for enzymatic biomass utilization and modification (BioAd)」（五十嵐圭日子）による補助に感謝いたします。

#### 参考文献

- [1] Floudas *et al.*, The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes, *Science* 336(6089) 1715-1719 (2012)
- [2] 堀 千明、五十嵐圭日子、鮫島正浩「木材腐朽担子菌のゲノム・ポストゲノム解析から植物細胞壁と分解酵素の共進化を考える」*化学と生物* 53 巻 6 号 381-388 頁 (2015)

#### 成果

1. 論文発表：Keisuke Kojima, Naoki Sunagawa, Nils Egil Mikkelsen, Henrik Hansson, Saeid Karkehabadi, Masahiro Samejima, Mats Sandgren, Kiyohiko Igarashi, “Comparison of glycoside hydrolase family 3  $\beta$ -xylosidases from basidiomycetes and ascomycetes reveals evolutionarily distinct xylan degradation systems”, *Journal of Biological Chemistry*, 298 (3), 101670 (2022); doi: 10.1016/j.jbc.2022.101670

\* aquarius@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp