

## 構造解析に基づいたコラゲナーゼとキシラナーゼへの耐塩性の付与

保川 清, 滝田 禎亮

京都大学大学院農学研究科

**概要【研究目的】** 我々はコラゲナーゼとキシラナーゼの産業応用の拡大には、酵素の活性と安定性だけでなく、高い耐塩性が求められると考えた。本研究の目的は、*Grimontia hollisae* 由来コラゲナーゼ(Ghcol)と *Bacillus* 由来 GH10 キシラナーゼである XynR の立体構造を決定し、その知見に基づき、Ghcol と XynR に好塩性を付与することである。

**【方法】** Ghcol を *Brevibacillus* で発現させ、培養上清から精製した。XynR は大腸菌で発現させ、菌体から精製した。結晶化はともにシッティングドロップ法により行った。SPRING-8(兵庫県播磨市)のビームライン BL26B1 でシンクロトロン放射光を用いて回折データを取得した。分子置換を行った後、COOT でモデルを構築した後、PHENIX の phenix refine で立体構造を精密化した。Ghcol の活性測定には基質として FITC-コラーゲン、ゼラチン、合成ペプチド 2 種(MOCAc-KPLGL(Dpa)-AR, FALGPA)を用いた。XynR の活性測定にはブナ材キシランを用いた。

**【結果】** Ghcol は活性化ドメイン、リンカー、ペプチダーゼドメインから成り、全体として鞍型構造をとった。トポロジー図から、活性化ドメインは立体構造が似た 2 個のサブドメイン(Act1, Act2 と命名)を有することが見出された。

複合体では Gly-Pro-Hyp が活性部位、Act1, Act2 に 2 分子ずつ結合していた。活性部位に存在するチロシン残基の変異体の解析の結果、Tyr564 は活性に重要であり、Tyr476 と Tyr555 は基質特異性に重要であると考えられた。XynR のキシロース複合体およびキシロビオース複合体の全体構造は、GH10 ファミリーに典型的な 8 個の  $\alpha$  ヘリックスと  $\beta$  シートからなる TIM バレル構造を取っており、非対称単位に含まれる 2 分子のタンパク質は同様の構造をとった。それらは、基質を含まない XynR WT の構造(PDB ID:7CPK)と複合体とタンパク質の主鎖構造および一致した。Thr315 を他の 19 種のアミノ酸残基に置換した単変異体の解析の結果、T315H, T315N, T315Q, T315S は WT と比較して、アルカリ条件下での活性は向上したが、アルカリ条件下での安定性は低下した。

**【考察】** Ghcol の Act1 と Act2 は平均二乗偏差(RMSD)が 3.3 Å の似た立体構造をとった。一方、一致したアミノ酸残基は 3 残基しかなかった。このことから、進化の過程で、遺伝子重複が起こり、立体構造が保たれたまま、一次構造が変化したと考えられた。今後、Ghcol については、全アミノ酸スキャニングライブラリーを作製し、好塩性、高活性、耐熱性に優れた変異体を取得する。XynR については、T315 変異体の評価を継続し、好塩性、高活性、耐熱性に優れた変異体を取得する。

### 1. 研究目的

コラーゲンは哺乳類で最も量が多いタンパク質である。コラゲナーゼはコラーゲンの 3 重らせんを特異的に分解する酵素である。今日、ともに亜鉛プロテイナーゼである *Grimontia hollisae* および *Clostridium histolyticum* 由来のコラゲナーゼが膵島細胞分散剤として糖尿病治療に用いられている。コラゲ

ナーゼは廃コラーゲンの有効活用につながる事が期待されている。キシランは 5 炭糖のキシロースの重合体であり木質に大量に存在する。キシラナーゼはキシランを分解する酵素で、食品産業では果汁の清澄剤として、製紙産業では漂白剤として用いられている。本酵素はバイオエタノールの製造や醤油

粕等の食品廃棄物の分解への応用につながることを期待されている。

我々はこれまでに、*G. hollisiae* コラゲナーゼ(Ghcol)の活性のpH依存性の熱力学的解析を行い、触媒機構を推察した<sup>1)</sup>。また、各種変異体を作製し、塩基性側活性解離基を推定した<sup>2)</sup>。我々はさらに、*Bacillus* 由来糖質加水分解酵素ファミリー10 (GH10)キシラナーゼである XynR の耐熱型変異体 S92E<sup>3)</sup>と好アルカリ型変異体 T315N<sup>4)</sup>を取得した。また、GH11 キシラナーゼである XynJ の耐熱型変異体 T82A を取得し<sup>5)</sup>。XynR の X 線結晶構造解析は、野生型(WT)と S92E については完了した<sup>6)</sup>。T315N については実施中である。

我々は変異型キシラナーゼの醤油粕分解効果を検討したが、十分な活性がみられなかった。その原因を、好塩性・耐塩性が低いことであると考えた。そして、コラゲナーゼとキシラナーゼの産業応用の拡大には、酵素の活性と安定性だけでなく、高い耐塩性が求められると考えた。本研究の目的は、Ghcol と XynR の立体構造を決定し、その知見に基づき、Ghcol と XynR に耐塩性を付与することである。

## 2. 研究方法

### 2.1 Ghcol の生産

Ghcol の WT の発現には *Brevibacillus* での発現プラスミド pNY326-Ghcol (図 1A) を用いた。Ghcol 変異体の発現プラスミドは、pNY326-Ghcol を鋳型に、QuikChange 法により作製した。発現プラスミドを導入した *Brevibacillus* を MTNm プレートに塗布し、37°Cで一晩培養した。5 mL の 2SY 液体培地に形質転換菌を植菌し、30°Cで一晩振とう培養し、前培養液とした。500 mL 三角フラスコに、2SY 液体培地を 300 mL 分注し、これに前培養液を添加した後、30°Cで 48 時間振とう培養した。その後、遠心により培養上清を回収した。

培養上清に硫酸アンモニウムを 50%飽和となるように加え、4°Cで一晩攪拌した。その後、遠心により沈殿を回収した。沈殿を 10 mL の 20 mM HEPES-NaOH 緩衝液(pH 7.5), 2 mM CaCl<sub>2</sub> に溶解させ、20 mM HEPES-NaOH 緩衝液(pH 7.5), 2 mM CaCl<sub>2</sub> に対して透析を 3 回行った。透析内液を回収し、20 mM HEPES-NaOH 緩衝液(pH 7.5), 2.0 mM CaCl<sub>2</sub> で平衡化された HiTrap™ DEAE FF 5 mL (内径 1.6 cm × 長さ 2.5 cm) にかき、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。吸着した Ghcol を 0~0.5 M NaCl のグラディエントで溶出させた。活性画分を集め、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters-30K (MWCO-30, ミリポア)を用いて、遠心濃縮し、精製酵素とした。

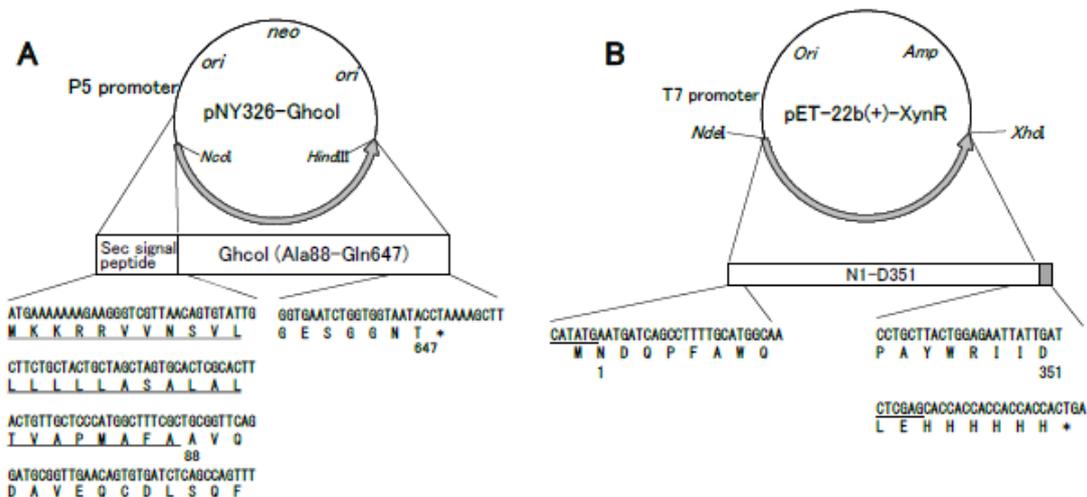


図 1. 発現プラスミド

(A) pNY326-Ghcol. 下線は Sec シグナルペプチドを示す。  
(B) pET-22b(+)-XynR. 下線は NdeI サイトと XhoI サイトを示す。  
\*は終止コドンを示す。

## 2. 2 Ghcol の結晶構造解析

シッティングドロップ法により結晶化を行った。96 穴プレート(Intelli-Plate, Art Robbins Instrument) 上に、1  $\mu\text{L}$  のタンパク質溶液(5~20 mg/mL Ghcol, 5~20 mM HEPES-NaOH 緩衝液(pH 7.5))と1  $\mu\text{L}$  の沈殿剤を入れ、100  $\mu\text{L}$  の沈殿剤に対して4°Cまたは20°Cで平衡化した。沈殿剤にはCrystal Screen I, II, PEG/Ion Screen (Hampton Research), Wizard Screen I, II (Emerald BioSystems) Structure Screen I, II (Molecular Dimensions)を用いた。一定期間後、顕微鏡で観察し、結晶が得られた場合は100 Kの窒素ガスで凍結した。

京都大学宇治キャンパスにて、MAC Science M18XHF 回転陽極発生器で生成された Cu K $\alpha$  線と Bruker HI-STAR マルチワイヤーエリア検出器にて結晶の回折データをチェックした。その後、SPring-8(兵庫県播磨市)のビームライン BL26B1 でシンクロトロン放射光を用いて回折データを取得し、XDS で処理した。次に、処理したデータを CCP4 の MOLREP を用いて分子置換を行った。分子置換のサーチモデルにはタンパク質構造予測プログラム AlphaFold2 で予測した構造を使用した。COOT でモデルを構築した後、PHENIX の phenix refine で立体構造を精密化した。得られたタンパク質の立体構造の図の作成には PyMOL を使用した。

## 2. 3 Ghcol の活性測定

FITC-collagen 分解活性の測定では、10 mM 酢酸に溶解した 0.1% FITC-collagen と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5), 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4 M NaCl を氷冷しながら混合し、基質液とした。反応は 37°C で 30 分間反応させた後、遠心して上清を回収し、520 nm における蛍光(励起波長: 485 nm)を測定した。

ゼラチン分解活性の測定では、ゼラチンザイモグラフィを行った。サンプルをゼラチン入り12.5% ポリアクリルアミドゲルにアプライし、40 mA の定電流で 40 分間泳動した。泳動後、ゲルを洗浄液に浸して SDS を除去した。次にゲルを反応液に浸して 37°C で反応させた後、染色液で染色と脱染色を行った。

MOCAc-KPLGL(Dpa)-AR 分解活性では DMSO に溶解した MOCAc-KPLGL(Dpa)-AR, 100 mM HEPES-NaOH 緩衝液(pH 7.5), 酵素溶液 を石英セル内で混合した。反応液の 393 nm の蛍光(励起波長: 328 nm)を 25°C で 5 秒ごとに 2 分間測定した。

FALGPA 分解活性の測定では、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した FALGPA, 100 mM HEPES-NaOH 緩衝液(pH 7.5), 200 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub>, 酵素溶液を石英セル内で混合した。反応液の 324 nm の吸光度を 25°C で 10 秒ごとに 5 分間測定した。測定開始時と終了時の吸光度の値の差を酵素活性とした。

## 2. 4 XynR の生産

XynR の発現には大腸菌での発現プラスミド pET-22b(+)-XynR (図 1B)を用いた。変異体の発現プラスミドは、pET-22b(+)-XynR を鋳型に、QuikChange 法により作製した。発現プラスミドを導入した大腸菌 BL21(DE3)を LB プレートに塗布し、37°Cで一晩培養した。50 mL の LB 液体培地に形質転換菌を植菌し、37°Cで一晩振とう培養し、前培養液とした。2 L 三角フラスコに、LB 液体培地を 1 L 分注し、これに前培養液を添加した後、OD 600 が 0.4~0.8 になるまで振とう培養した。0.5 M の IPTG を 1 mL 加え、30°C で 24 時間振とう培養した。その後、遠心により菌体を回収した。

菌体を 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH 緩衝液(pH 8.0) (以下 buffer A)で懸濁し、超音波破碎を行った。その後、遠心により上清を回収した。これに硫酸アンモニウムを加えることで 50%飽和とした。その後、遠心により沈殿を回収した。これを buffer A に溶解し、buffer A に対して透析した。透析内液を回収し、buffer A で平衡化した DEAE-TOYOPEARL 650M(直径 2.8 cm × 10.5 cm) (東ソー)にかけ、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。吸着した XynR を 0.25 M NaCl を含む Buffer A で溶出させた。活性画分を集め、0.5 M NaCl を含む Buffer A (以下 Buffer B)で平衡化した HisTrap HP (5 mL) (Cytiva)にかけ、アフィニティークロマトグラフィーを行った。吸着した XynR を 0~100 mM イミダゾールを含む Buffer B でグラディエント溶出させた。活性画分を集め、遠心濃縮し、精製酵素とした。

## 2. 5 XynR の結晶構造解析

上記2. 2項と同様の方法で XynR の結晶構造解析を行った。ただし、分子置換のサーチモデルには *Bacillus sp.* TAR-1 株由来キシラナーゼ XynR (PDB ID: 7CPK)を使用した。

## 2. 6 XynR の活性測定

緩衝液に溶解した beechwood Xylan (Megazyme), 緩衝液, 酵素溶液を混合した。同容量のジニトロサリチル酸

(DNS) 溶液 (0.5% (w/v) DNS, 1.6% (w/v) NaOH, 30% (w/v) 酒石酸ナトリウムカリウム) を加えて 100°C で 15 分間の熱処理することで反応を停止させ、4°C で 15 分間の冷却処理を行った。上清 80  $\mu$ L とイオン交換水 120  $\mu$ L を混合し、324 nm の吸光度を測定した。

### 3. 研究結果と考察

#### 3.1 Ghcol の結晶構造

Ghcol は活性化ドメイン (Ala88–Tyr355)、リンカー (Ala356–Gly365)、ペプチダーゼドメイン (Phe366–Gly622) から成り (図 2A)、全体としては鞍型構造をとった (図 2B)。ペプチダーゼドメインに 1 個の  $Zn^{2+}$  を、活性化ドメインに 1 個、ペプチダーゼドメインに 3 個の  $Ca^{2+}$  を有した (図 2B)。全体構造はクロストリジウム属コラゲナーゼ<sup>7,8)</sup>、ビブリオ属コラゲナーゼ VhaC<sup>9)</sup> と高い類似性を

示した。トポロジー図から、活性化ドメインは立体構造が似た 2 個のサブドメイン (Act1, Act2 と命名) を有することが見出された (図 2C)。複合体では Gly-Pro-Hyp が活性部位、Act1, Act2 に 2 分子ずつ結合していた (図 3A)。また、ラマチャンドラプロットから、全 6 分子がモデルコラーゲンと同じ構造をとっていることが見出された (図 3B)。

Act1 と Act2 の立体構造を重ね合わせると、平均二乗偏差 (RMSD) が 3.3Å の似た立体構造をとった (図 4A)。一方、Act1 と Act2 のアミノ酸配列を比較すると、一致したアミノ酸残基は 3 残基しかなく、相同性が低いことが示された (図 4B)。このことから、進化の過程で、遺伝子重複が起こり、立体構造が保たれたまま、一次構造が変化したと考えられた<sup>10)</sup>。

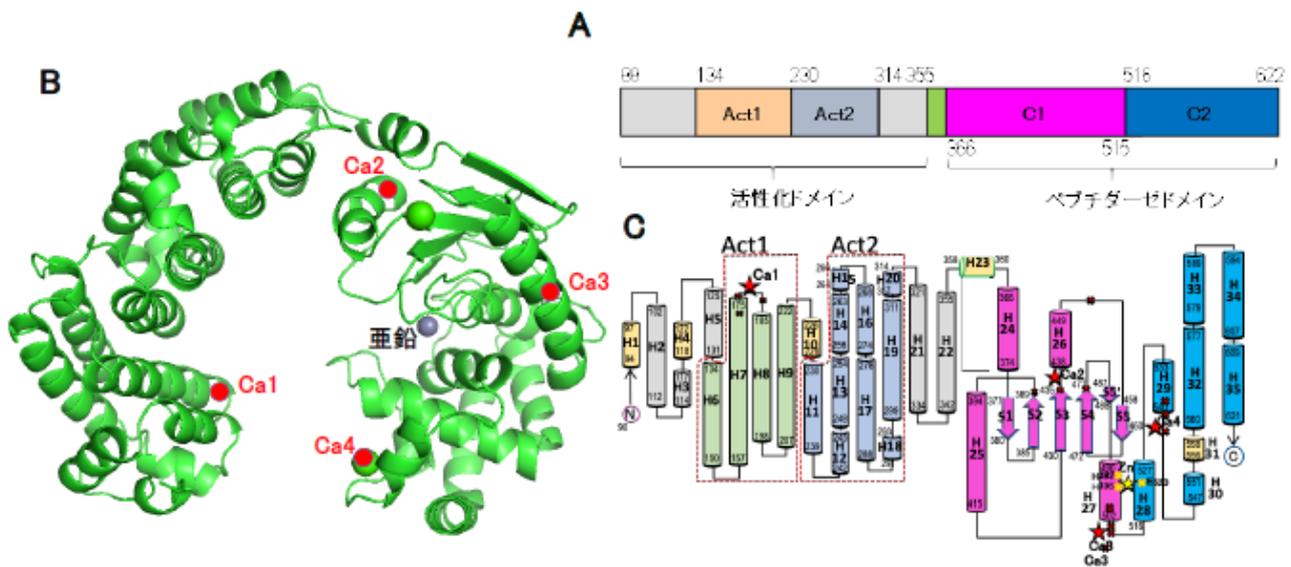


図 2. アポ型の Ghcol

- (A) ドメイン構造. 活性化ドメイン (Ala88–Tyr355)、リンカー (Ala356–Gly365) (緑色)、ペプチダーゼドメインの前半 (C1: Phe366–Val515)、後半 (C2: Val516–Gly622) を示す。
- (B) 立体構造.
- (C) トポロジー図.  $\alpha$  ヘルックスをカラムで、 $\beta$  ストランドを矢印で、活性部位の  $Zn^{2+}$  を黄色の星で、 $Ca^{2+}$  が結合しているアミノ酸残基を赤色の星でそれぞれ示す。

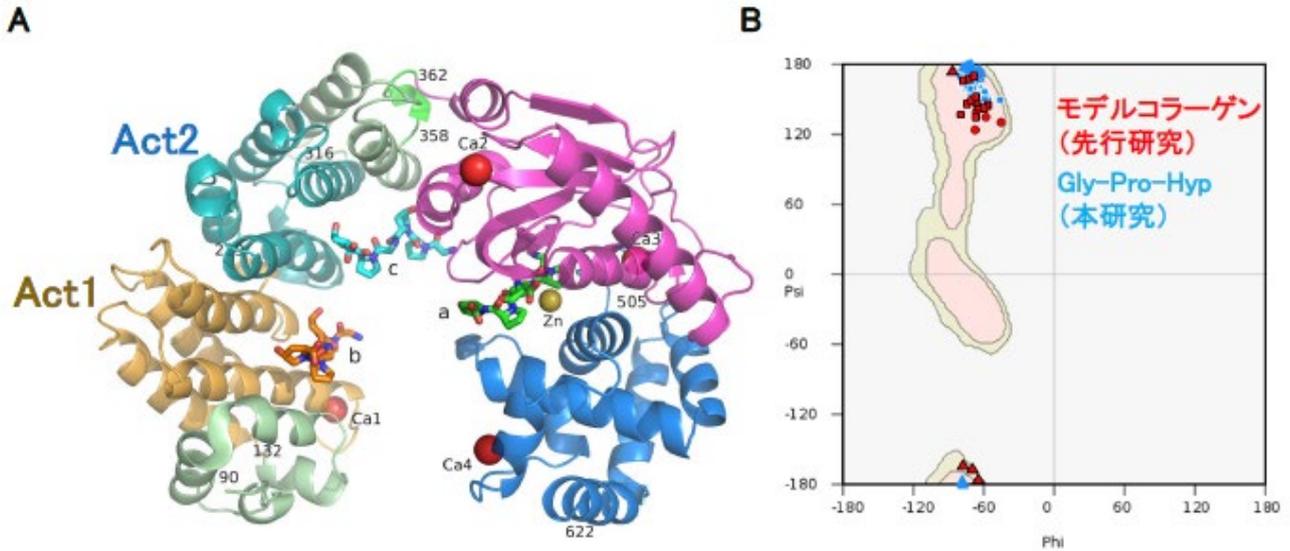


図 3. Gly-Pro-Hyp が結合した Ghcol

- (A) 立体構造. 活性部位の Zn<sup>2+</sup>を黄色の球で、Ca<sup>2+</sup>をピンクあるいは赤色の球で示す。結合した Gly-Pro-Hyp は、活性部位(a)では緑色のスティックで、Act1 (b)ではオレンジのスティックで、Act2 (c)ではシアン色のスティックでそれぞれ示す。
- (B) ラマチャンドラプロット. 主鎖の2面角を、先行研究であるモデルコラーゲンである(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> (PDB ID 1K6F)については赤色で、本研究の Gly-Pro-Hyp については青色でプロットした。いずれも、Gly は三角、Pro は四角、Hyp はマルで表示した。薄い赤と薄い青は COOT で計算されたプロリン残基の好ましい角度と許容される角度をそれぞれ示す。



図 4. 活性化ドメイン 1 と 2 (Act1 と Act2) の比較

- (A) 結晶構造. Gly-Pro-Hyp が結合した Act1 (Thr125-Asn223)と Act2 (Gly224-Asp315) を重ね合わせ、それぞれをライトオレンジとライトブルーで示す。側鎖 が Gly-Pro-Hyp と水素結合あるいは C-C 結合をしているアミノ酸残基である Arg167, Tyr175, Glu215 についてはオレンジのスティックで、Glu308 と Arg311 については青色のスティックで示す。数値は原子間の距離 (Å) を示す。
- (B) COOT による一次構造のアライメント. 152 個の C $\alpha$  原子のペアの RMSD 値は 3.3 Å と計算された。赤字は同じアミノ酸残基を示す。灰色は  $\alpha$  ヘリックス領域を示す。

### 3. 2 Ghcol の活性

コラーゲンは Gly-Pro-Hyp が基本構造であるが、Pro の位置にはアラニンやグルタミン酸も一定の割合で含まれる。コラーゲンに Ghcol あるいはクロストリジウム属コラーゲナーゼである Liberase-C を作用させ、反応液を経時的に採取し、ゲル濾過 HPLC にかけた (図 5A)。ともに矢印の位置

にトリペプチドのピークが現れ、反応の進行が確認された。20 時間後の反応液をエドマン分解にかけると、Ghcol では、サイクル 2 でグルタミン酸が現れたのに対し、Liberase-C ではグルタミン酸は現れなかった (図 5B)。

ヘキサペプチドに Ghcol あるいは Liberase-C を作用させ、反応液を経時的に採取し、生成物を LC-MS/MS で定

量した(図 6)。Ghcol と Liberase-C はともに P2 または P2' が Pro であるヘキサペプチドを切断した(図 6A)。一方, Ghcol は P2 または P2' が Glu であるヘキサペプチドを切断したが, Liberase-C はこれを切断しなかった(図 6B)。これらのことから, Ghcol は Liberase-C と異なり, グルタミン酸を P2 に含む配列を切断できることが示された。

Ghcol とクロストリジウム属コラーゲナーゼである ColG の活性部位にトリペプチドである Gly-Pro-Hyp を二分子入れたモデル構造を作成した。Ghcol ではトリペプチドとの立体障害がないのに対し, ColG では, P2 と P2' のグルタミン酸の側鎖がそれぞれトリプトファンとフェニルアラニンの側鎖と立体障害を引き起こした。このように, 基質特異性の違いが構造からも説明された<sup>10)</sup>。

Ghcol は活性部位に 3 つのチロシン残基(Tyr476, Tyr555, Tyr564)をもつ。我々の先行研究ではチロシンが塩基性側活性解離基であると推測された<sup>1)</sup>ため, この 3 残基に着目した。この 3 個チロシン残基と酸性側活性解離基と考えられる Glu493 をそれぞれアラニンに置換した単変異体を作製した。コラーゲン分解活性では, WT と比較して, Y555A は同等の活性を示したが, Y476A と Y564A は低い活性を示し, E493A は活性を欠いた(図 7A)。ゼラチン分解活性(図 7B), MOCac-KPLGL(Dpa)-AR 分解活性(図 7C), FALGPA 分解活性(図 7D)では, WT と比較して, Y476A と Y555A は低い活性を示し, Y564A と E493A は活性を欠いた。これらのことから, Tyr564 は活性に重要であり, Tyr476 と Tyr555 は基質特異性に重要であると考えられた。さらに, Tyr564 が塩基性側活性解離基である可能性が示唆された<sup>10)</sup>。

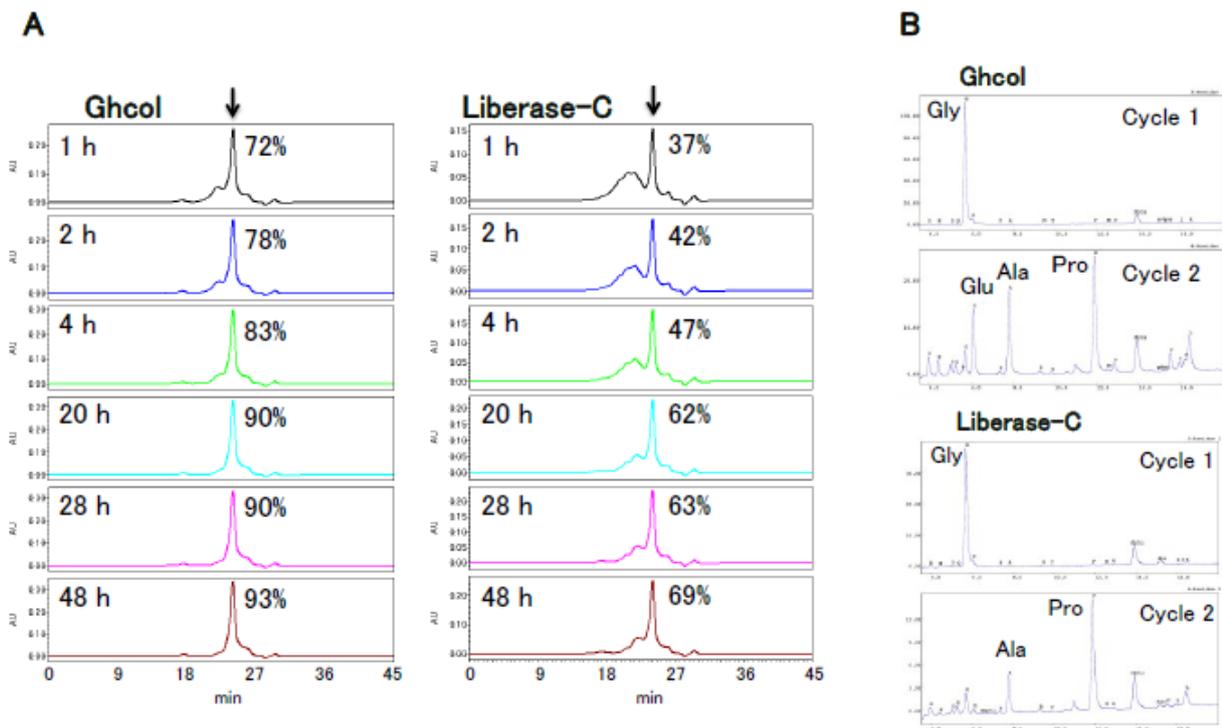


図 5. Ghcol と Liberase-C によるコラーゲン分解

- (A) コラーゲン分解反応の経時変化。Ghcol あるいは Liberase-C の反応液のゲル濾過クロマトグラフィーの溶出パターンを示す。矢印はトリペプチドの溶出位置を示す。数値(%)は, 全部の面積を 100%としたときの, トリペプチドの面積の相対値を示す。
- (B) トリペプチドの解析。Ghcol あるいは Liberase-C の 20 時間の反応液をエドマン分解に供したときのサイクル 1 とサイクル 2 の溶出パターンを示す。

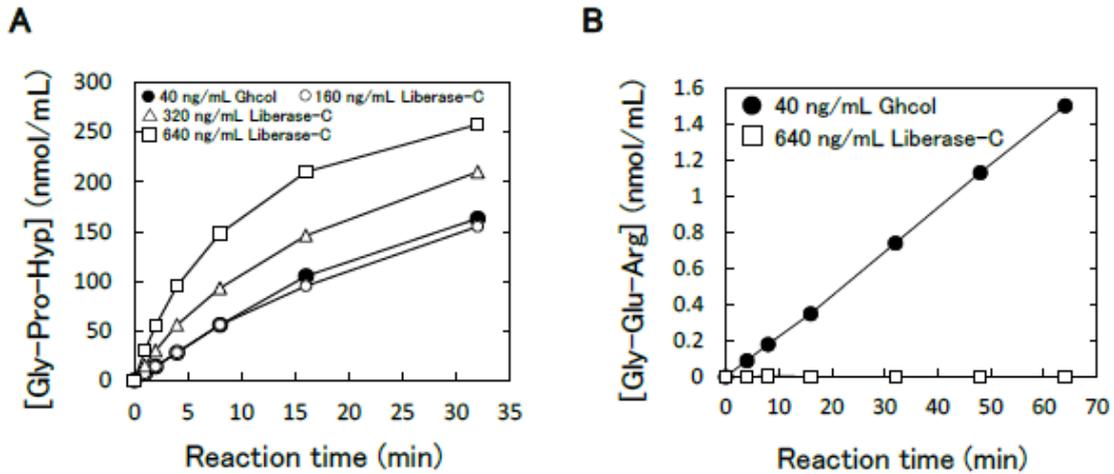


図 6. Ghcol と Liberase-C によるヘキサペプチドの分解

反応条件は、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 500 nmol/mL Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp(A)または Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Hyp (B), 37°Cである。Gly-Pro-Hyp と Gly-Glu-Arg の濃度は LC-MS/MS で定量した。

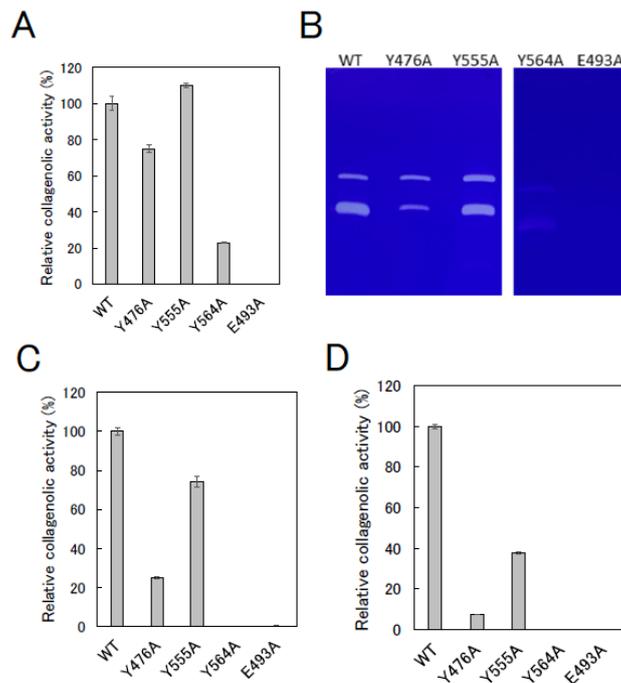


図 7. Ghcol 変異体の活性

- (A) FITC-コラーゲン加水分解活性。反応条件は、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5), 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl, 1.25 mM 酢酸, 35°Cである。酵素濃度は WT と Y476A が 0.50 μg/mL, Y555A と Y564A が 1.0 μg/mL, E493A が 100 μg/mL である。FITC-コラーゲンの濃度は 0.025% である。
- (B) ゼラチン加水分解活性。10 μg/mL の WT, Y476A, Y555A あるは 100 μg/mL の Y564A, E493A を 0.063%のゼラチンを含む 12.5% ポリアクリルアミドゲルにアプライした。
- (C) MOCac-KPLGL(Dpa)-AR 加水分解活性。反応条件は、50 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0), 25°Cである。酵素濃度は WT が 1.0 μg/mL, Y476A が 3.0 μg/mL, Y555A が 1.0 μg/mL, Y564A と E493A が 100 μg/mL である。MOCac-KPLGL(Dpa)-AR の濃度は 1.0 μM である。
- (D) FALGPA 加水分解活性。反応条件は、100 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5), 200 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 μM ZnCl<sub>2</sub>, 25°Cである。酵素濃度は WT, Y476A, Y555A が 1.0 μg/mL, Y564A が 57 μg/mL, E493A が 10 μg/mL である。FALGPA 濃度は 80 μM である。

### 3.3 XynR の結晶構造

我々はこれまでに XynR の構造を決定し報告した(図 8)<sup>6</sup>。今回キシロース複合体およびキシロビオース複合体の空間群はそれぞれ P21 であり、結晶中の非対称単位にはそれぞれ 2 分子のモデルが存在していた。分子置換のサーチモデルは XynR WT (PDB ID:7CPK) を用いて行い、それぞれ 1.97 - 1.95 Å, 1.82 - 1.80 Å の解像度で構造の精密化を行った。その結果、精密化の指標となる  $R_{work}$  と  $R_{free}$  はキシロース複合体で、16.8%と 20.2%, キシロビオース複合体で 16.6%と 19.8%の値でモデルが精密化された。

XynR WT のキシロース複合体(図 9A)およびキシロビオース複合体(図 9B)の全体構造は、GH10ファミリーに典型的な 8 個の  $\alpha$  ヘリックスと  $\beta$  シートからなる TIM バレル

構造を取っており、非対称単位に含まれる 2 分子のタンパク質は同様の構造をとった。また、基質を含まない XynR WT の構造(PDB ID:7CPK)と複合体の構造を重ね合わせたところ、タンパク質の主鎖構造はほぼ一致しており、各アミノ酸残基の  $C\alpha$  原子位置に関する RMSD 値は 0.221 Å(キシロース複合体)と 0.210 Å(キシロビオース複合体)であった。キシロース複合体の結晶構造では、XynR WT の浅いクレフトから成る活性部位に存在する 2 つの触媒残基 Glu150と Glu256を境にして、キシロース分子が 3 分子配位していた。キシロビオース複合体の結晶構造では活性部位にキシロビオース分子が 2 分子配位していた。

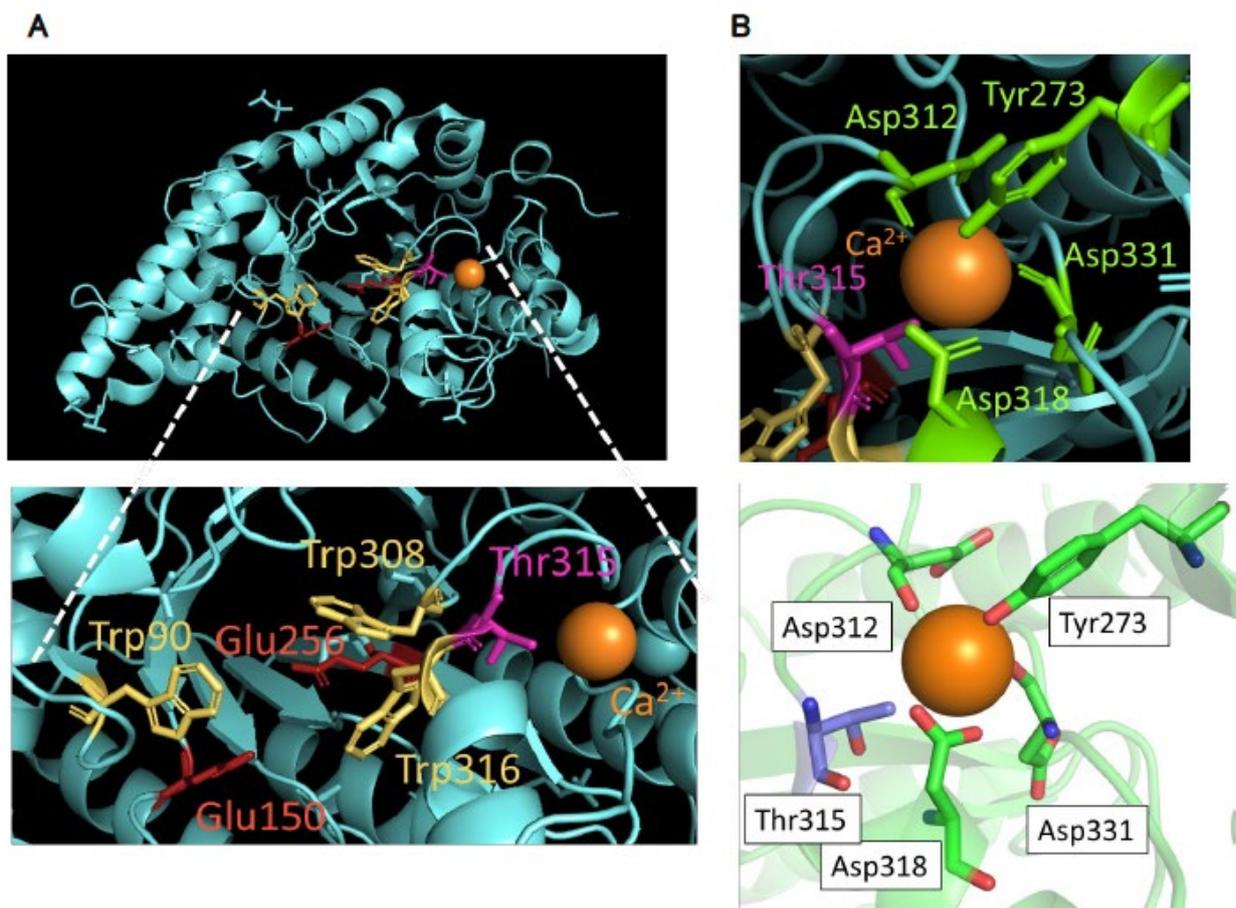


図 8. XynR の立体構造

構造は PDB ID 7CPK<sup>6</sup>に基づく。

(A) 全体構造と活性部位の構造。タンパク質の全体構造をリボンモデルで、 $Ca^{2+}$ をオレンジの球で、Trp90, Glu150, Glu256, Trp308, Thr315, Trp316をボールアンドスティックモデルで示す。

(B)  $Ca^{2+}$ の結合部位の構造。Tyr273, Asp312, Thr315, Asp318, Asp331をボールアンドスティックモデルで示す。

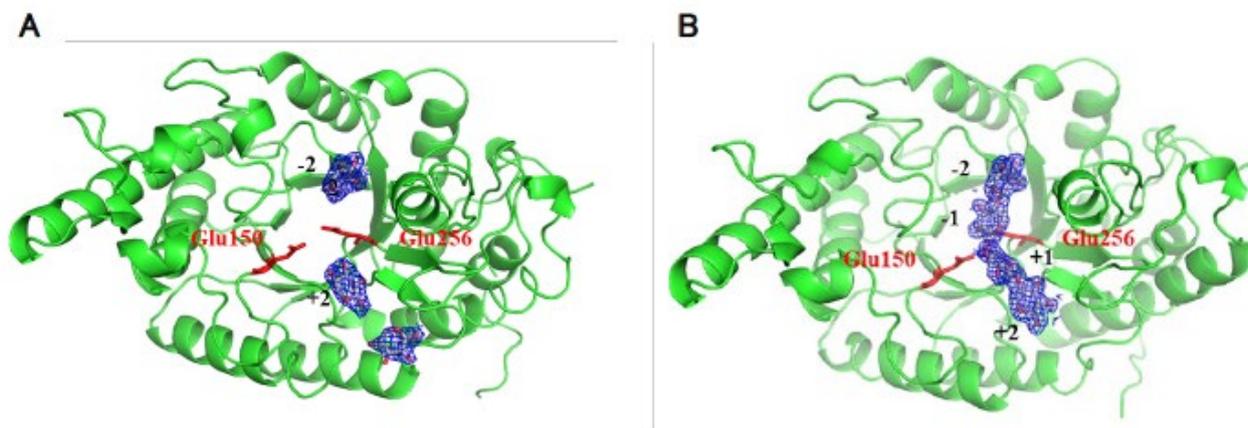


図 9. XynR 複合体の構造

キシロース残基が配位する結合部位. キシロース残基を灰色,  $1.0 \sigma$  の  $2Fo-Fc$  電子密度マップを青色の網目模様, 触媒残基である Glu150 と Glu256 を赤で表す。

(A) キシロース複合体.

(B) キシロビオース複合体.

### 3. 4 XynR の活性

Thr315 を他の 19 種のアミノ酸残基に置換した単変異体が大腸菌で作製した。各変異体の活性を, beechwood キシランを基質として pH 3.5~11.0, 25°C で測定した(図 10)。至適 pH は WT では 6.5 であった。T315N, T315Q, T315H, T315S では至適 pH が 8.0 へシフトし, pH 9.0 以上での相対活性が WT よりも高かった。pH 10.0 での相対活性を指標として, T315X のグループ分けを行った。80%以上は T315N と T315Q, 70%以上 80%未満は WT, T315A, T315H, T315S, 60%以上 70%未満は T315C, T315G, T315V, 60%未満はそれ以外であった。

図 11 は WT, T315N, T315A, T315H, T315S の安定性の pH 依存性を示す。各酵素を pH 3.5~11.0 で 24 時間処理した後, pH 8.0, 25°C で活性を, beechwood キシランを基質として測定した。pH 9.5~10.5 で処理したときの残存活性は, WT では 90%以上であったのに対し, T315S では 80%, T315H, T315N, T315Q では 25%未満であった。以上の結果は, T315H, T315N, T315Q は WT と比較して, アルカリ条件下での活性は向上したが, アルカリ条件下での安定性は低下したことを示す。315 位のアミノ酸残基の側鎖がアミノ基をもつ場合(Asn, Gln)は XynR を好アルカリ性し, ヒドロキシ基をもつ場合(Thr, Ser)はアルカリ耐性になると考えられた。

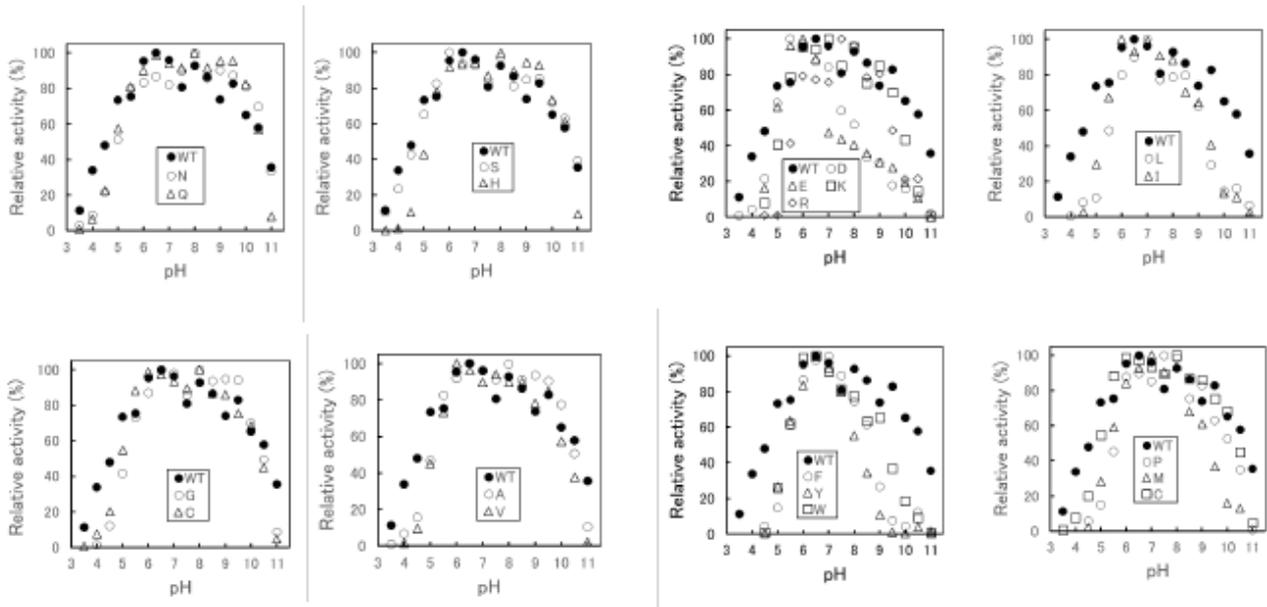


図 10. 315 位のアミノ酸残基の変異が XynR の活性に与える影響

beechnwood キシランの加水分解反応を酵素濃度 0.079  $\mu\text{M}$ , 基質濃度 9 mg/mL, pH 3.5~11, 37°Cで行った。

用いた緩衝液は pH 3.5~5.5 が 100 mM 酢酸緩衝液, pH 6.0~8.5 が 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH 9.0~11.0 が 100 mM 炭酸ナトリウム緩衝液である。相対活性は、最も高い活性を 100%としたときの各 pH での活性の相対値を表す。

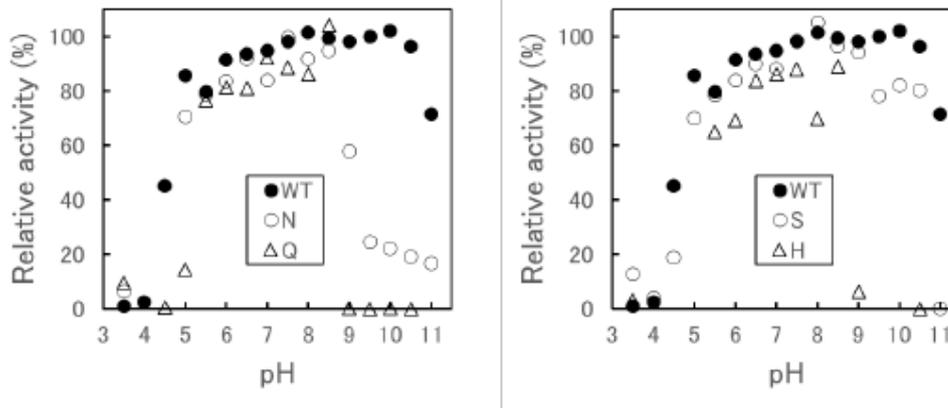


図 11. 315 位のアミノ酸残基の変異が XynR の安定性に与える影響

酵素 (0.15  $\mu\text{M}$ ) を各 pH, 37°Cで 24 時間保温した。

用いた緩衝液は pH 3.5~5.5 が 100 mM 酢酸緩衝液, pH 6.0~8.5 が 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH 9.0~11.0 が 100 mM 炭酸ナトリウム緩衝液である。その後, beechwood キシランの加水分解反応を酵素濃度 0.015  $\mu\text{M}$ , 基質濃度 9 mg/mL, pH 8.0, 37°Cで行った。相対活性は、最も高い活性を 100%としたときの各 pH での活性の相対値を表す。

#### 4. 今後の課題

Ghcol については全アミノ酸スクランニングライブラリーを作製し, 好塩性, 高活性, 耐熱性に優れた変異体を取得する。変異導入領域は, 立体構造の知見に基づき, Ala352-D368, Asn454-Leu490, Val550-Leu569 を考え

ている。XynR については, T315 変異体の評価を継続し, 好塩性, 高活性, 耐熱性に優れた変異体を取得する。

#### 5. 謝辞

本研究は公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団の支援を受けて行われました。ここに深く感謝の意を表します。

## 6. 文献

1. Takita, T., Qian, J., Geng, H., He, Z., Nemoto, S., Mori, M., Tanaka, K., Hattori, S., Kojima, K., and Yasukawa, K.: Comparative studies on the activities of collagenases from *Grimontia hollisiae* and *Clostridium hystoliticum* in the hydrolysis of synthetic substrates. *J. Biochem.* 163(5), 425-431, 2018
2. Hayashi, K., Ikeuchi, T., Morishita, R., Qian, J., Kojima, K., Takita, T., Tanaka, K., Hattori, S., and Yasukawa, K.: The roles of histidine and tyrosine residues in the active site of collagenase in *Grimontia hollisiae*. *J. Biochem.* 168(4), 385-392, 2020
3. Nakatani, K., Katano, Y., Kojima, K., Takita, T., Yatsunami, R., Nakamura, S., and Yasukawa, K.: Increase in the thermostability of *Bacillus* sp. strain TAR-1 xylanase using a site saturation mutagenesis library. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82(10), 1715-1723, 2018
4. Kuwata, K., Suzuki, M., Takita, T., Yatsunami, R., Nakamura, S., and Yasukawa, K.: The mutation of Thr315 to Asn of GH10 xylanase XynR increases the alkaliphily but decreases the alkaline resistance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 85(8), 1853-1860, 2021
5. Takita, T., Nakatani, K., Katano, Y., Suzuki, M., Kojima, K., Saka, N., Mikami, B., Yatsunami, R., Nakamura, S., and Yasukawa, K.: Increase in the thermostability of GH11 xylanase XynJ from *Bacillus* sp. strain 41M-1 using a site saturation mutagenesis library. *Enzyme Microb. Technol.* 130, 109363, 2019
6. Suzuki, M., Takita, T., Kuwata, K., Nakatani, K., Li, T., Katano, Y., Mizutani, K., Mikami, B., Yatsunami, R., Nakamura, S., and Yasukawa, K.: Insight into the mechanism of thermostabilization of GH10 xylanase from *Bacillus* sp. strain TAR-1 by the mutation of S92 to E. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 85(2), 386-390, 2021
7. Eckhard, U., Schönauer, E., Nüss, D., and Brandstetter, H. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1109-1114, 2011
8. Eckhard, U., Schönauer, E., and Brandstetter, H. (2013) Structural basis for activity regulation and substrate preference of clostridial collagenases G, H, and T. *J. Biol. Chem.* 288(28), 20184-20194, 2013
9. Wang, Y., Wang, P., Cao, H. Y., Ding, H. T., Su, H. N., Liu, S. C., Liu, G., Zhang, X., Li, C. Y., Peng, M., Li, F., Li, S., Chen, Y., Chen, X. L., and Zhang, Y. Z. Structure of *Vibrio* collagenase VhaC provides insight into the mechanism of bacterial collagenolysis. *Nat Commun.* 13, 566, 2022
10. Ikeuchi, T., Yasumoto, M., Takita, T., Tanaka, K., Kusubata, M., Hayashida, O., Hattori, S., Mizutani, K., Mikami, B., and Yasukawa, K.: Crystal structure of *Grimontia hollisiae* collagenase provides insights into its novel substrate specificity toward collagen. *J. Biol. Chem.* 298(8), 102109, 2022

## Increase in Salt Resistance of Collagenase and Xylanase Based on Their Structural Analysis

Kiyoshi Yasukawa, Teisuke Takita

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

### Summary

It is thought that in order to expand the industrial use of collagenase and xylanase, not only high activity and stability but also high salt resistance is necessary. In this study, we aim to determine the X-ray crystal structures of *Grimontia hollisae* collagenase (Ghcol) and *Bacillus* GH10 xylanase XynR and increase their salt resistance.

Ghcol was expressed in *Brevibacillus* and purified from the supernatant. The crystal structures of ligand-free and Gly-Pro-hydroxyproline (Hyp)-complexed Ghcol were obtained. The structures revealed that the activator and peptidase domains exhibit a saddle-shaped structure with one zinc ion and four calcium ions. The activator domain comprises two homologous subdomains. In the ligand-complexed Ghcol, two Gly-Pro-Hyp molecules each bind at the active site and at two surfaces on the duplicate subdomains of the activator domain facing the active site. Analysis of variants with one of three active-site Tyr residues revealed that mutation of Tyr564 affected catalysis, while mutation of Tyr476 or Tyr555 affected substrate recognition. This was explained by the fact that Tyr564 is closer to the zinc ion than Tyr476 and Tyr555, and that Tyr476 and Tyr555 are closer to Gly-Pro-Hyp than Tyr564.

XynR was expressed in *Escherichia coli* and purified from the cells. The crystal structures of ligand-free and xylose or xylobiose-complexed XynR were obtained. The structures revealed a TIM-barrel structure consisting of eight  $\alpha$ -helices and eight  $\beta$  sheets, which was the same as the ligand-free XynR. We previously selected T315N as an alkaliphilic variant of XynR from the site saturation mutagenesis library. In this study, we examined the effects of amino acid residue at 315 position of XynR on its alkaliphily and alkaline resistance. In the hydrolysis of beechwood xylan at pH 8.0, four variants (T315H, T315N, T315Q, and T315S) exhibited higher activity (90–110% of that of WT), while other 15 variants exhibited lower activity (less than 60% of that of WT). T315H, T315N, and T315Q exhibited a narrower bell-shaped pH dependence of stability at alkaline side than WT and T315S. These results suggested that at position 315, the amino acid residue whose side chain has an amido group (Asn, Gln) makes XynR alkaliphilic, while that whose side chain has a hydroxyl group (Thr, Ser) makes it alkaline-resistant.

Screening of Ghcol and XynR with higher activity, thermostability, and/or salt resistance is currently underway.