

記者会見 開催のお知らせ

**中性子回折法によってタンパク質の多彩さ、巧妙さを可視化することに成功  
—立体反転型セルラーゼは「かちかち玉」のような反応機構だった—**

1. 会見日時： 2015年8月21日(金) 14:00 ~ :  
(※ 記者発表の時間は、14:00~16:00頃に設定願います)

2. 会見場所： (※ 別紙に会見場所の地図も入れてください)  
茨城県庁

3. 出席者： お名前(東京大学大学院〇〇研究科〇〇専攻 職名)  
五十嵐圭日子(東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻 准教授)  
茨城大学からの参加者を入れてください

(※ 所属先・職名も正確に記載ください。教職員の場合、職員名簿に記載されている職名を記載します。)

4. 発表のポイント

(※ 内容のポイントを以下の要領で **3点**にまとめて簡潔に(それぞれ1~2行で)記載ください)

◆どのような成果を出したのか

きのこが生産する新規立体反転型セルラーゼ<sup>(注1)</sup>の構造(図1)を、中性子回折法<sup>(注2)</sup>によって世界で始めて明らかにしました。

◆新規性(何が新しいのか)

本酵素は、活性残基としてイミド酸型(図2)になったアスパラギンを使う非常にユニークな酵素であり、さらに活性残基付近でアミノ酸の互変異<sup>(注3)</sup>が連なって「かちかち玉」のようになることで、連続的な反応を行っていると考えられました。

◆社会的意義/将来の展望

洗剤用のセルラーゼとしても知られる酵素種の詳細な反応機構が分かっただけでなく、中性子回折法によってタンパク質の多彩さ、巧妙さを可視化できることも明らかにしました。この知見は、薬剤のデザインなどにおいても重要な情報となります。

5. 発表概要： (※ 研究内容を、非専門家に紹介する文章。300~500文字程度)

きのこやかびなどの糸状菌は、木や草のようなバイオマスを効率良く分解することが出来るため、生態系では「分解者」として働いている生き物です。化石資源の枯渇が危ぶまれる中、このような生き物が生産する酵素をうまく利用することで、「バイオマスを様々な物質に変換す

る」という次世代の技術を開発することが望まれています。東京大学大学院農学生命科学研究科の五十嵐圭日子（きよひこ）准教授のグループは、茨城大学、宇宙航空研究開発機構（JAXA）、琉球大学、（株）コンフォーカルサイエンス、（株）丸和栄養食品、兵庫県立大学との共同研究で、大強度陽子加速器施設（J-PARC）物質・生命科学実験施設（MLF）内にある茨城県生命物質構造解析装置（iBIX）を用いて、きのこが生産するセルラーゼ（PcCel45A）の中性子回折法による構造解析に成功しました。その結果、本酵素が通常のアミノ酸が互変異してできた「イミド酸」という特殊なアミノ酸の構造で化学反応を行っていることが分かり、さらに本酵素の活性残基付近は、ペプチド結合の互変異も連鎖して「かちかち玉」のようになることで、連続的な反応を行っていると考えられました。本研究から、中性子回折法によってタンパク質の多彩さ・巧妙さが可視化できることが明らかとなりましたが、洗剤などにも広く使われている酵素種がどのように反応しているかが分かっただけでなく、全てのタンパク質中のペプチド結合でこのような互変異の連鎖が起こっていると考えられました。現在、様々な薬剤がコンピュータによる計算でデザインされていますが、その計算手法にも影響する革新的な知見となります。

#### 6. 発表内容：

植物体の主成分であるセルロース<sup>（注4）</sup>は、地球上で最も豊富に存在するバイオマスです。セルロースは化学的に極めて安定なので、化学反応でセルロースを分解してその構成糖であるグルコース（ぶどう糖）を得るためには、強い酸やアルカリを用いて、さらに高温・高圧条件にしなければならないため多くのエネルギーが必要となります。しかし、セルロースは自然界では様々な微生物が出す「セルラーゼ」という酵素によって常温・常圧で分解され、このような微生物の栄養源として利用されています。つまり、私たちがセルラーゼを使いこなすことができれば、木や草などのセルロース系バイオマスから液体燃料やプラスチックを生産することができるようになるのです。

東京大学大学院農学生命科学研究科の鮫島正浩教授と五十嵐圭日子（きよひこ）准教授のグループは、きのこの一種（*Phanerochaete chrysosporium*）が生産する様々な酵素の研究を20年以上にわたって行っていますが、2008年に本菌のゲノム配列から立体反転型の新しいセルラーゼを発見し<sup>（文献1）</sup>、特許を取得しました。このセルラーゼ（PcCel45A）は、糖加水分解酵素ファミリー（glycoside hydrolase; GH）ファミリー45に属するエンドグルカナーゼの亜種で、カビから取られた本酵素ファミリーの酵素は洗剤に用いられる酵素としてもよく知られています。しかし、この酵素を構成しているアミノ酸の配列を詳細に調べると、セルロースの分解反応を行うために重要なアミノ酸の一つが見当たらないことが分かりました。これはPcCel45Aには「活性中心がないのに活性がある」という不思議なことが起こっていることを示しています。

そこで五十嵐准教授らは、本酵素がセルロースを分解する仕組みを明らかにするために、茨城県生命物質構造解析装置（iBIX）による中性子回折実験を行うことにしました。通常、タンパク質の構造を明らかにするためには「X線」が用いられるのですが、X線を用いた構造解析では「水素（H）」を見ることができません。そのため、水（H<sub>2</sub>O）や水酸基（-OH）、水素結合などの情報をX線結晶構造解析から得ることは難しいのです。しかし、X線の代わりに中性子を用いると、水素の場所を決めることができるので、セルラーゼのように「水」を反応に使う酵素の解析に適しています。しかしながら、中性子は回折強度がX線と比べて非常に低いので、X線回折実験に使うタンパク質の結晶の1,000倍もの大きさの結晶を準備する必要があり、そのために研究があまり進んでいないというのが現状でした。

東京大学の中村彰彦博士（当時、現自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 分子科学研究所 助教）と石田卓也特任助教は、*PcCel45A* の超巨大結晶作製に成功し（文献<sup>2</sup>）、本酵素の中性子構造を 1.5 Å の解像度で明らかにしました。その結果、本酵素では反応を行うと考えられるアミノ酸（92 番目のアスパラギン）が、通常の「アミド型」ではなく「イミド酸型」に互変異を起こしている様子が観察されました。図 1 に示したように「アミド型」と「イミド酸型」の違いは水素の付き方だけなので、X 線による構造解析でこの違いを判別することは非常に難しいのですが、中性子構造解析では明らかな違いとして観察できます。しかし「イミド酸」は一般的には不安定な構造であると言われているため、どのようにしてこのような構造が安定化されているのかを調べたところ、105 番目のアスパラギンも同じように「イミド酸」になっており、しかも二つのイミド酸に挟まれた部分のペプチド結合（ $-C(=O)-NH-$ ）<sup>(注5)</sup> も全てイミド酸型（ $-C(OH)=N-$ ）になっていることが明らかとなりました。これまでもタンパク質のペプチド結合は二重結合になり得る（互変異性がある）と言われていましたが、このようにイミド酸型で安定化していることは非常に珍しく、その様な現象が直接的に証明されたのははじめてです。

さらに、この互変異の連鎖を辿っていくと、105 番目のアスパラギン以降は通常のアミノ酸側鎖を介した水素結合となり、最終的に水素結合のネットワークは本酵素が反応を行うために必要なもう一つのアミノ酸（114 番目のアスパラギン酸）まで繋がっていることが明らかとなりました（図 3）。セルラーゼの反応には、これまでに二種類（立体保持型と立体反転型）があることが知られていましたが、立体反転型の酵素がどのように酵素反応を繰り返すのかは不明でした。今回の実験結果から、*PcCel45A* は 92 番目のアスパラギン（イミド酸型）と 114 番目のアスパラギン酸の間で双方向の水素の玉突きを起こす、つまり「かちかち玉」（英語では「ニュートンのゆりかご (Newton's cradle)」と呼ばれています）のような反応機構で、反応を繰り返すと考えられました（図 4）。

今回の結果は、洗剤にも用いられるようなセルラーゼがどのように反応するのかを詳細に解明することに繋がりましたが、その一方で全てのタンパク質がペプチド結合を持つことを考えると、セルラーゼだけでなく様々なタンパク質でこのような「互変異の連鎖」が起こっている可能性があります。これまでも、タンパク質の構造からコンピュータを用いて医薬品をデザインする研究が盛んに行われてきましたが、その際に「互変異の連鎖」を考慮していることはほとんどありません。J-PARC/MLF は世界最高レベルの強度を誇る中性子源であるため、今後 iBIX を用いた中性子構造解析が様々なタンパク質の解析に用いる必要があることが、本研究の結果から明らかとなりました。

本研究は、日本学術振興会の科学研究費補助金新学術領域研究「植物細胞壁の情報処理システム」（領域代表：東北大学 西谷和彦 教授）、JAXA オープンラボ公募（研究代表者：五十嵐圭日子）、JAXA JEM 利用高品質タンパク質結晶生成実験（研究代表者：五十嵐圭日子）、文部科学省科学研究費補助金 基盤研究（B）（研究代表者：五十嵐圭日子）、文部科学省地球観測技術等調査研究委託事業「高品質蛋白質結晶化技術の宇宙科学研究拠点形成」（研究代表者：筑波大学 裏出良博 教授）の補助を受けたものです。深く感謝いたします。

## 7. 発表雑誌：

雑誌名：「Science Advances」（8月21日オンライン公開）

論文タイトル：

"Newton's cradle" proton relay with amide-imidic acid tautomerization in inverting cellulase visualized by neutron crystallography

著者 :

Akihiko Nakamura (中村彰彦)、Takuya Ishida (石田卓也)、Katsuhiko Kusaka (日下勝弘)、Taro Yamada (山田太郎)、Shinya Fushinobu (伏信進矢)、Ichiro Tanaka (田中伊知郎)、Satoshi Kaneko (金子 哲)、Kazunori Ohta (太田和敬)、Hiroaki Tanaka (田仲広明)、Koji Inaka (伊中浩治)、Yoshiki Higuchi (樋口芳樹)、Nobuo Niimura (新村信雄)、Masahiro Samejima (鮫島正浩)、Kiyohiko Igarashi\* (五十嵐圭日子)

DOI 番号 : 10.1126/sciadv.1500263

アブストラクト URL (※分かり次第ご連絡ください) :

8. 注意事項 :

日本時間 8 月 22 日 (土) 午前 3 時 (米国東海岸時間 : 21 日 (金) 午後 2 時) 以前の公表は禁じられています。

9. 問い合わせ先 :

東京大学 大学院農学生命科学研究科 生物材料科学専攻 森林化学研究室  
准教授 五十嵐 圭日子 (いがらし きよひこ)

Tel : 03-5841-5258

携帯番号 : 090-4432-3711

Fax : 03-5841-5273

E-mail : aquarius@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

**10. 用語解説：**（※ 解説が必要な用語がございましたら記載ください）

（注1）立体反転型セルラーゼ（*invertin* cellulase）：

セルラーゼはセルロースを加水分解する酵素の総称ですが、反応によって生成される糖の構造の違いから、保持型（*retaining*）と反転型（*invertin*）に分けられることが知られています。本研究で構造解析が行われた *PcCel145A* は、セルロースの分解性から立体反転型であることが知られています。

（注2）中性子回折法（*Neutron diffraction*）：

試料に中性子線を照射し、回折（回り込み）される中性子線のパターンを解析することで試料の原子構造を明らかにする手法。タンパク質の中性子構造解析を行うためには、比較的大型のタンパク質の結晶を作製し、その結晶に中性子線を照射することで原子構造が明らかになります。

（注3）互変異（*tautomerization*）：

同じ種類の原子を持っているが構造が異なる二つの物質（異性体）同士が互いに変換する現象。本研究では、アミノ酸の一種であるアスパラギンの側鎖で起こるアミド型（ $-C(=O)-NH_2$ ）とイミド酸型（ $-C(-OH)=NH$ ）間の互変異と、通常のペプチド結合（ $-C(=O)-NH-$ ）とそのイミド酸型（ $-C(-OH)=N-$ ）間の互変異が含まれています。どちらの場合も、水素イオン（プロトン： $H^+$ ）の移動を伴っていることから「プロトン互変異性」と呼ばれます。

（注4）セルロース（*cellulose*）：

グルコース（ぶどう糖）が直鎖状につながった多糖で、植物細胞壁の約半分を占める物質です。地球上で、最も豊富に存在する有機物であり、植物によって二酸化炭素と水から光合成によって作り出されるため、再生可能なバイオマスとしての利用が望まれています。

（注5）ペプチド結合（*peptide bond*）

タンパク質は、アミノ酸がいくつもつながってできていますが、その継ぎ目（結合している部分）をペプチド結合と呼びます。これは、アミノ酸が持っているアミノ基（ $-NH_2$ ）と隣のアミノ酸のカルボキシル基（ $-COOH$ ）が、水を除きながら結合することで $-C(=O)-NH-$ ができます。本研究では、このようにすべてのタンパク質が共通して持つペプチド結合が、周りの環境によってイミド酸型（ $-C(-OH)=N-$ ）になり得ることを直接示しています。

（文献1） Igarashi, K., Ishida, T., Hori, C., and Samejima, M., *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5628-5634 (2008)

（文献2） Nakamura, A., Ishida, T., Fushinobu, S., Kusaka, K., Tanaka, I., Inaka, K., Higuchi, Y., Masaki, M., Ohta, K., Kaneko, S., Niimura, N., Igarashi K., and Samajima, M., *J. Sync. Rad.* 20: 859-863 (2013)

11. 添付資料： （※ 図や写真等があれば記載ください。）

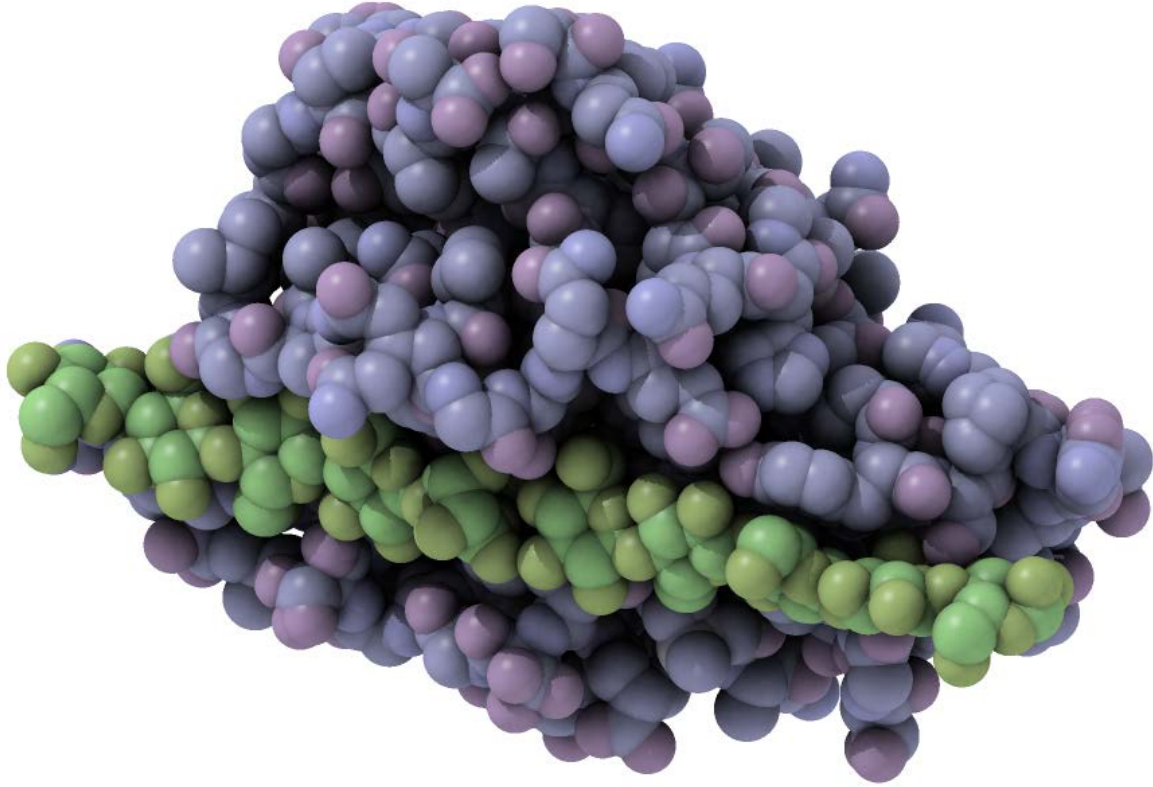


図1 きのこの一種である *Phanerochaete chrysosporium* がセルロースを分解するために生産するセルラーゼ *Pccel45A* の分子構造。図中で、紫色の部分が酵素 (*Pccel45A*)、緑色の部分がセルロースの分子を表している。酵素がセルロースをきれいに取り込んでいる。

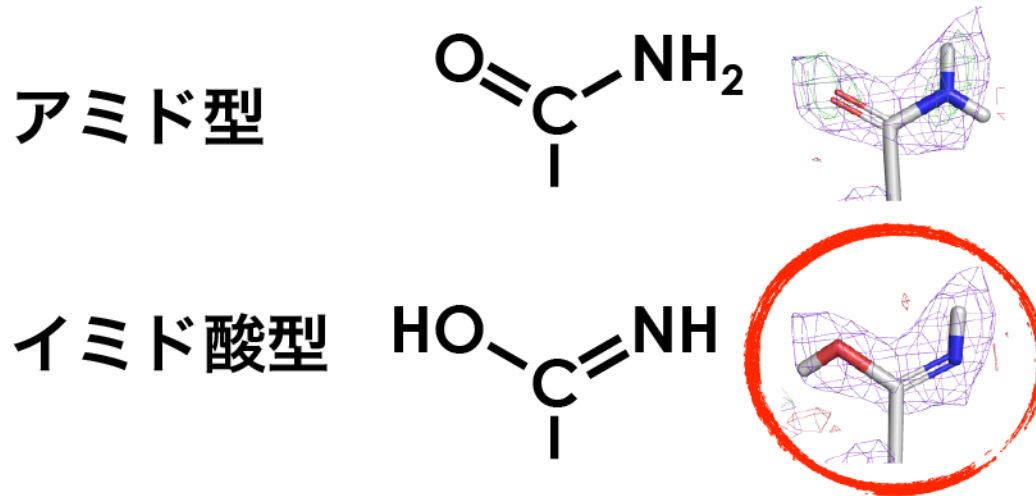


図2 *PcGe145A* の 92 番目アスパラギン酸側鎖の拡大図。中性子散乱密度に炭素 (C)、水素 (H)、酸素 (O) および窒素 (N) 原子を入れてみると、イミド酸型の方がきちんとそれぞれの原子が収まることが分かる。



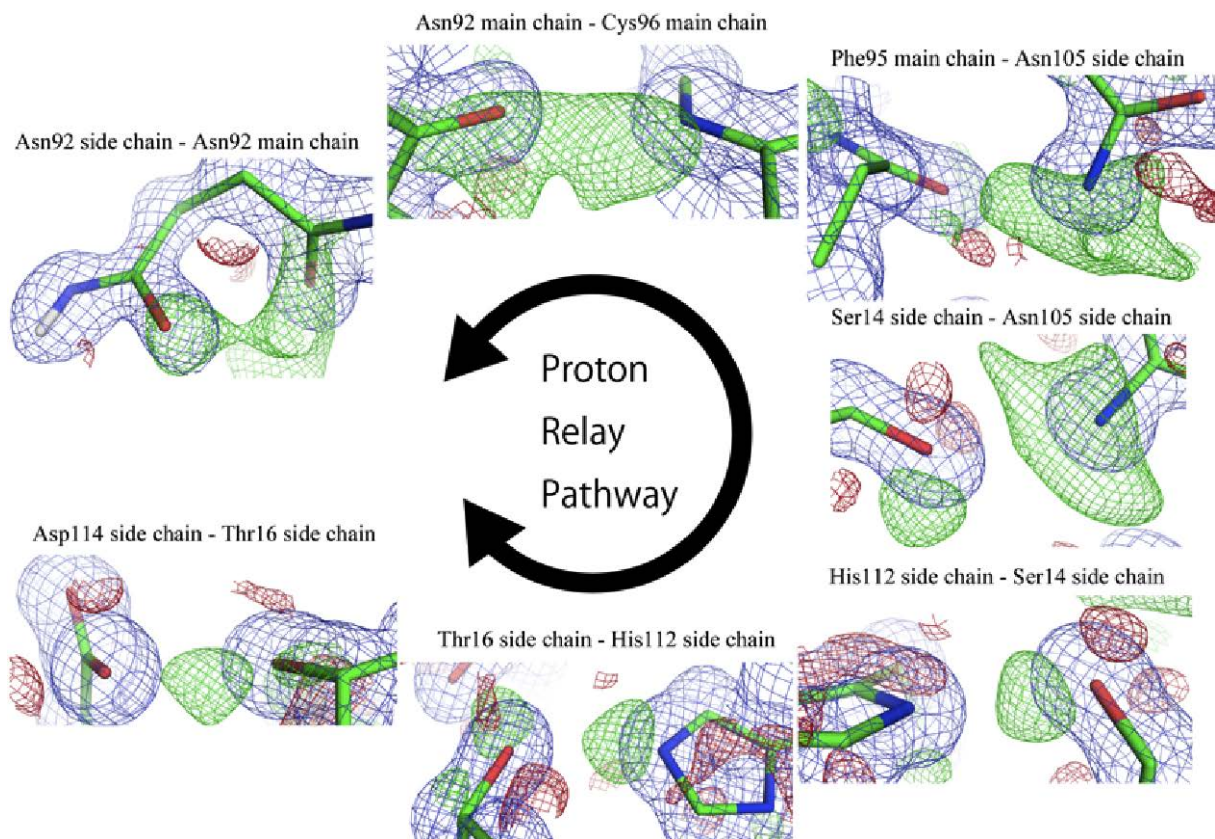


図3 *PαCel45A*における活性残基周辺の水素イオンネットワーク。活性残基の一つ（一般塩基性触媒残基）である92番目アスパラギン（Asn92）から、96番目システイン（Cys96）と95番目フェニルアラニン（Phe95）、105番目アスパラギン（Asn105）、14番目セリン（Ser14）、112番目ヒスチジン（His112）、16番目スレオニンを経て（Thr16）、最後にもう一つの活性残基（一般酸性触媒残基）である114番目アスパラギン酸（Asp114）までが水素（図中緑色の編み目）が繋がって「Proton Relay Pathway」を形成している様子がわかる。



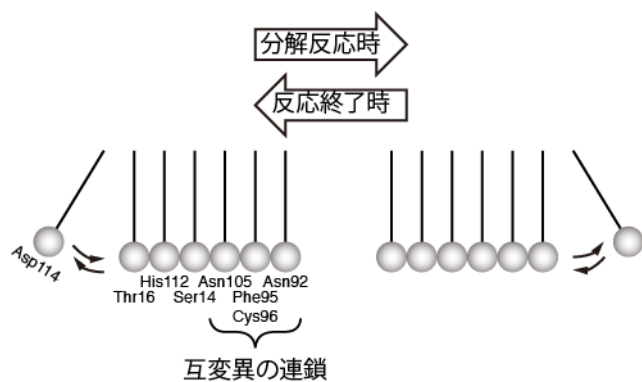


図4 *Pccel45A* がセルロースを分解するときの水素イオンの動きを模式的に表したもの。*Pccel45A* はかちかち玉(ニュートンのゆりかご)のような動きを繰り返して反応すると考えられる。アミノ酸の名前と番号はそれぞれ図2参照のこと。