

学位論文題名

Structural biology of carbohydrate-active enzymes;
cellulose synthase and cellobiose 2-epimerase

(糖質関連酵素群の構造生物学;セルロース合成酵素とセロビオース 2-エピメラーゼ)

学位論文内容の要旨

糖質は、エネルギー源、細胞膜や細胞壁を成す主要な構成成分、アミノ酸の生合成過程における前駆体としてなど、生物の生命維持にとって必要不可欠であり、生命現象の根幹に関わる重要な機能を果たす。自然界には、鎖長や置換基の違いや異性体の存在により膨大な種類の糖が存在し、それに対応して、糖の合成、修飾、変換を行う非常に多くの糖質関連酵素が存在する。生体内での糖の代謝は、酸化、還元、置換、加水分解、糖鎖重合、異性化などの様々な反応を触媒する酵素の存在下で、特定の基質に対してのみ厳密に進行する。糖質は、生体にとって重要であるだけでなく、機能性物質や高分子素材としての利用を通して、我々の生活に密接に関連している。これらの有用物質の効率的かつ大規模な獲得を目的として、酵素を利用する他、微生物自身を生産系として利用することも期待されている。本研究では、新規産業材料として利用される微生物由来セルロースの合成酵素と、機能性糖質の生成に利用されるセロビオース 2-エピメラーゼに注目した。

セルロースは、自然界に最も多く存在する多糖であり、植物、藻類、一部の細菌、ホヤなどの様々な生物により産生される。細菌によるセルロースの合成は、細胞膜上に局在するセルロース合成酵素複合体 (Terminal Complex: TC) により行われる。セルロース合成のモデル生物として知られる酢酸菌 (*Acetobacter xylinum* ATCC23769) の TC には、同一オペロン上にコードされたセルロース合成酵素サブユニット (Cellulose Synthase: CeS) AB, C, D の 3 種類のタンパク質が含まれる他、このオペロンの上流にコードされたセルロース合成補完因子 (CcpAx) も TC の構成タンパク質であることが示されている。CeSAB は、セルロースの重合と、重合の制御を行う膜タンパク質である。CeSAB には、UDP-グルコースを基質として、セルロースを重合する GT2 ドメインと、セルロース合成を促進するサイクリックジグアニル酸 (c-di-GMP) が結合する PilZ ドメインが含まれる。c-di-GMP は、バイオフィルムの形成、細胞の運動性の変化、病原性遺伝子の発現などの様々な細胞プロセスを引き起こすシグナル伝達経路において、セカンドメッセンジャーとしてはたらくことが知られており、細菌によるセルロース合成の制御も、細胞内の c-di-GMP の有無によって調節されることが知られている。CeSC は、外膜貫通領域を含む膜タンパク質で、セルロース鎖の菌体外排出へ関与することが予想される。CeSD は、セルロース鎖の通過孔を形成し、菌体外におけるセルロース鎖の集合に寄与することが考えられている他、CcpAx と相互作用することも報告されている。このように、複数のタンパク質で構成される TC は、セルロースの合成だけでなく、セルロース合成の制御や、合成されたセルロース鎖の菌体外への排出の役割も担う多機能タンパク質である。しかし、セルロース合成の制御や、ペリプラズムから菌体外へのセルロース排出の詳細な分子メカニズムは明らかでない。

我々は、酢酸菌 ATCC23769 株由来 TC の構造解析に向けて、様々な TC の構成成分や TC 全体の試料調製を行い、PilZ ドメインの構造解析に成功した。また、PilZ ドメインによる c-di-GMP の認識機構を解明した。酢酸菌 ATCC23769 株由来 CeSAB 内の PilZ ドメイン (*AxCeSA-PilZ*) の大腸菌発現系による大量発現、精製、結晶化を行い、分解能 2.1 Å で結晶構造を決定した。*AxCeSA-PilZ* は、c-di-GMP の認識に関わる RxxxR モチーフを含む N 末端のループ、6 本の β -ストランドからなる β -バレル、1 本の α -ヘリックスで形成されていた。得られた立体構造を、既知の c-di-GMP 結合 PilZ タンパク質の立体構造と比較することで、RxxxR モチーフの他に、Position X と Position Y と呼ばれる位置にある Lys573 と Arg643 が c-di-GMP の結合に関与すると推察した。Lys573 と Arg643 の変異体 (K573A, K573V, R643A, R643W) を作製し、等温滴定熱量計 (isothermal titration calorimetry: ITC) を用いた結合実験により、c-di-GMP と *AxCeSA-PilZ* の結合親和性、結合化学量論比を決定した。野生型 *AxCeSA-PilZ* が 2 分子の c-di-GMP を結合するのに対して、Lys573 及び

Arg643 の各種変異体では、c-di-GMP に対する結合化学量論比が低下したことから、c-di-GMP の結合に対して Lys573 と Arg643 が関与することが示された。最後に、結晶構造と結合実験の結果を基に、PilZ ドメインに共通する c-di-GMP の結合様式を提案した。

セルロース分解性嫌気性細菌 *Ruminococcus albus* は、反芻動物の第 1 胃（ルーメン）に生息する微生物の一種で、宿主が摂取した食物に含まれる植物繊維を消化することで、宿主がエネルギー源として吸収可能な化合物へと分解するはたらきを有すると考えられている。*R. albus* から初めて単離されたセロビオース 2-エピメラーゼ (CE) は、 β -1,4 結合で連結したオリゴ糖の還元末端にあるグルコースとマンノースの間の異性化反応を触媒する酵素であり、セロビオース、ラクトース、マンノシルグルコースに作用し、グルコシルマンノース、エピラクトース、マンノビオースへと変換する。CE により産生されるエピラクトースは、稀少オリゴ糖のひとつで、腸内細菌の増殖促進効果やラット腸管からのミネラルの吸収促進効果があることが報告されている。

我々は、CE による基質認識や反応機構の解明を目的として、*R. albus* と高熱菌 *Rhodothermus marinus* 由来 CE (*RaCE* と *RmCE*)、並びに *RmCE* と二糖との複合体の構造解析を行った。CE の立体構造は、 $(\alpha/\alpha)_6$ パレルフォールドを形成しており、同じスーパーファミリーに属する糖異性化酵素 AGE (*N*-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ)、YihS (アルドース-ケトース異性化酵素) と共通の骨格をしていた。また、これらの構造を比較すると、活性部位には、CE、AGE、YihS 間で完全に保存された残基が集中し、類似の活性中心を形成していることが明らかとなった。しかし、基質の鎖長や置換基の種類の違いから、CE は AGE や YihS とは基質特異性が異なっている。*RmCE* と二糖との複合体の構造解析の結果、二糖結合部位には、異性化反応産物の明瞭な電子密度が観測され、CE による二糖の結合様式が明らかとなった。還元末端側の糖は、CE、AGE、YihS 間で完全に保存されたアミノ酸で認識される一方、非還元末端側の糖は、CE でのみ完全に保存された Trp 残基によるスタッキングで結合していた。この結合様式は、非還元末端側の糖が異なる二糖に対して作用する CE にとって有利な結合様式であると考えられる。

CE の立体構造を AGE や YihS の立体構造と比較すると、CE の活性部位には、AGE や YihS において活性残基としてはたらくと考えられる 2 つの His 残基と同様の位置に 2 つの His 残基 (*RaCE* では His243 と His374、*RmCE* では His259 と His390) が位置していた。また、2 つの His 残基に加えて、非修飾糖を基質とする CE と YihS では、活性部位にもう一つ別の His 残基 (*RaCE* では His184、*RmCE* では His200、YihS では His176) が存在しており、還元末端側の糖の 2'-OH と水素結合していた。我々は、この His 残基が、異性化反応の際に、還元末端側の糖の 2'-OH 基の分極を促すことで、不斉中心である C2 位からの脱プロトン化を促進するはたらきがあると考えて、*RaCE* の His184 変異体を用いた活性測定を行った。その結果、セロビオースに対する活性が失われたため、この His 残基は、CE の活性に必須であることが明らかとなった。従って、2 つの His 残基で行われる AGE の異性化反応機構と異なり、3 つの His 残基が関与する CE の反応機構を提唱した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	姚	関
副 査	教 授	出 村	誠
副 査	特任教授	田 中	勲
副 査	准教授	尾 瀬 農 之	

学 位 論 文 題 名

Structural biology of carbohydrate-active enzymes; cellulose synthase and cellobiose 2-epimerase

(糖質関連酵素群の構造生物学;セルロース合成酵素とセロビオース 2-エピメラーゼ)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

糖質は、エネルギー源、細胞骨格を成す主要な構成成分、芳香族アミノ酸の生合成過程における前駆体としてなど、生物の生命維持にとって必要不可欠であり、生命現象の根幹に関わる重要な機能を果たす。また、糖質は、機能性物質や生体高分子材料としての利用を通して、我々の生活にも密接に関連している。これらの有用物質の効率的かつ大規模な獲得を目的として、酵素を利用する他、微生物自身を生産系として利用することも期待されている。本研究では、新規産業材料として利用される微生物由来セルロースの合成酵素と、機能性糖質の生成に利用されるセロビオース 2-エピメラーゼに注目した。

セルロースは、自然界に最も多く存在する多糖であり、植物、藻類、一部の細菌、ホヤなどの様々な生物により産生される。細菌によるセルロースの合成は、細胞膜上に局在するセルロース合成酵素複合体 (ターミナルコンプレックス: TC) により行われる。セルロース合成のモデル生物として知られる酢酸菌 (ATCC23769 株) の TC は、同一オペロン上にコードされたセルロース合成酵素サブユニット (cellulose synthase subunit: CeS) AB, C, D の 3 種類のタンパク質から構成されている。CeSAB は、セルロースの重合活性を有する糖転移酵素ドメインとセルロース合成の制御を担う PilZ ドメインが含まれる膜タンパク質である。CeSC と D は、セルロース鎖の菌体外排出へ関与することが予想される。このように、複数のタンパク質から構成される TC は、セルロースの合成だけでなく、セルロース合成の制御や、合成されたセルロース鎖の細胞外への排出の役割も担う多機能タンパク質として知られている。

サイクリックジグアニル酸 (c-di-GMP) は、細菌におけるセカンドメッセンジャーのひとつである。その濃度変化に応答することで、細胞は、バイオフィルムの形成、細胞の運動性の変化、病原性遺伝子の発現などの多様な細胞プロセスを引き起こす。細菌におけるセルロース合成の制御も、c-di-GMP の細胞内の濃度に依存する。CeSAB には、c-di-GMP 結合ドメインである PilZ が含まれており、c-di-GMP の細胞内の濃度依存的なセルロース合成の制御と PilZ ドメインとの関連が示唆されているが、c-di-GMP の結合様式の詳細は明らかでない。

我々は、PilZ ドメインによる c-di-GMP の認識機構を解明し、セルロース合成に対する PilZ ドメインの寄与を明らかにすることを目的として、酢酸菌 ATCC23769 株由来 CeSAB 内の PilZ ドメイン (4xCeSA-PilZ) について、分解能 2.1 Å での結晶構造を決定した。得られた立体構造を、既知の c-di-GMP 結合 PilZ タンパク質の立体構造と比較することで、RxxxR モチーフの他に、Lys573 と Arg643 が c-di-GMP の結合に関与すると推察した。Lys573 と Arg643 の各種変異体を作製し、等温滴定型熱量測定 (isothermal titration calorimetry: ITC) により、c-di-GMP

と *AxCeSA-PilZ* の結合親和性、結合化学量論比を決定した。野性型 *AxCeSA-PilZ* と各種変異体間で、結合親和性の優位な差異は見られなかったが、野性型 *AxCeSA-PilZ* が、2 分子の c-di-GMP を結合するのに対して、変異体では、1 分子のみ結合できることから、両者で結合化学量論比が異なっていた。従って、c-di-GMP 結合に対する Lys573 と Arg643 の寄与が示された。最後に、結晶構造と結合実験の結果を基に、PilZ ドメインに共通した c-di-GMP の結合様式を提案した。

セルロース分解性嫌気性細菌 *Ruminococcus albus* は、反芻動物の第 1 胃（ルーメン）に生息する微生物の一種で、宿主が摂取した食物中に含まれる植物繊維を消化することで、宿主がエネルギー源として吸収可能な化合物へと分解するはたらきを有すると考えられている。*R. albus* から初めて単離されたセロビオース 2-エピメラーゼ (CE) は、 β -1,4 結合で連結したオリゴ糖の還元末端にあるグルコースとマンノースの間の異性化反応を触媒する酵素であり、セロビオース、ラクトース、マンノシルグルコースに作用し、グルコシルマンノース、エピラクトース、マンノピオースへ変換することが知られている。CE により産生されるエピラクトースは、稀少オリゴ糖のひとつで、腸内細菌の増殖促進効果やラット腸管からのミネラルの吸収促進効果があることが報告されている。

我々は、CE による基質認識や反応機構の解明を目的として、*R. albus* と *R. marinus* 由来 CE (*RaCE* と *RmCE*)、並びに *RmCE* と二糖との複合体の X 線結晶構造解析を行った。得られた *RmCE* と二糖の複合体構造では、二糖結合部位に異性化反応産物の明瞭な電子密度が観測され、CE による二糖の結合様式が明らかとなった。還元末端側の糖は、保存性アミノ酸により厳密に認識される一方、非還元末端側の糖は、CE にのみ保存された Trp によるスタッキングで結合していた。この結合様式は、非還元末端側の糖が異なる二糖に対して作用する CE に特有の結合様式であると考えられる。

また、CE の活性部位では、以前の研究から提案された 2 つの His 活性残基 (*RaCE* では His243 と His374, *RmCE* では His259 と His390) が存在していた。さらに、その 2 つの His 残基に加えて、活性部位にもう一つ別の His 残基 (*RaCE* では His184, *RmCE* では His200) が存在していた。*RaCE* の H184A 変異体において、セロビオースに対する活性が失われたことから、この His 残基は、CE の活性に必須であることが証明された。我々は、この His 残基が、異性化反応中の還元末端側の糖の 2'-OH の分極を促すことで、不斉中心である C2 位からの脱プロトン化を促進するはたらきがあると予想し、3 つの His 残基が関与する CE の反応機構を提唱した。

以上、本研究では酢酸菌 ATCC23769 株由来 *CeSAB* 内の PilZ ドメイン (*AxCeSA-PilZ*) の X 線結晶構造解析および結合実験により、*AxCeSA-PilZ* と 2 分子の c-di-GMP 結合することを明らかにし、さらに、*AxCeSA-PilZ* の解析を通して、一般的な c-di-GMP 結合様式を提案した。また、セロビオース 2-エピメラーゼ (CE) および生産物との複合体の X 線結晶構造解析および変異体のアッセイ実験により、CE の基質二糖との認識、3 つの His 残基が関与する反応機構を提唱した。本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり、よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認めた。