

構造生物学を基盤とした糖質の認識・輸送・分解機構に関する研究

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻 特別研究員 丸山如江

はじめに

柑橘類などの植物に由来するペクチン、藻類に含まれるアルギン酸やカラギナン、マメ科植物のグアガム、ローカストビーンガム、微生物が生産するキサンタン、カードラン、ジェランなどの多糖は、食品分野をはじめ、化学や医薬分野でも増粘安定剤（増粘剤、安定剤、ゲル化剤、糊料）として広く用いられている。このような糖質（多糖）の分解や修飾に関わる酵素やタンパク質の機能解析、ならびにそれらの生産と機能発現を許容する細胞、特に微生物システムの理解は、食品・化学・医薬分野への応用のみならず、基礎生物学的にも重要な課題である。

アルギン酸は β -D-マンヌロン酸とそのC-5エピマーである α -L-グルロン酸から成る直鎖状の酸性多糖である。グラム陰性のスフィンゴモナス属細菌A1株（以下A1株）は、アルギン酸の認識・輸送・分解に関して極めて巧妙な分子機構を発達させている。その特徴は、まず、アルギン酸レセプターにより細胞外のアルギン酸を認識し、細胞表面の体腔と連動した輸送体を介してペリプラズムに取り込み、ペリプラズム局在基質結合タンパク質で捕捉した後に内膜局在のABCトランスポーターによって細胞質に輸送し、最終的に、細胞質局在のエンド型およびエキソ型アルギン酸リアーゼによって単糖に分解し、資化することにある（図1）。

このA1株の示すアルギン酸資化の全容を解明するため、そこに関与するタンパク質や酵素を構造生物学に重点を置いて解析してきた。また、糖質関連酵素の構造生物学的解析にも取り組んできた。本講演では、特にアルギン酸の取り込み系を中心に、これまでに得られた知見について紹介する。

1. 細胞表面局在アルギン酸認識タンパク質

A1株の細胞表面でアルギン酸誘導的に発現するタンパク質のうち、アルギン酸に最も強い親和性（ K_d : $\sim 10^{-9}$ M）を示すタンパク質p5は、細菌のべん毛繊維タンパク質であるフラジェリンのホモログであるにも拘らず、A1株の細胞表面全体

に存在する。本タンパク質の変異解析、X線結晶構造解析、機能解析を行い、アルギン酸結合にはアミノ酸残基21-41と363-373の領域が重要であることを明らかにした。これらの領域は細菌フラジェリン間で高度に保存されており、べん毛繊維を構成する場合、2つの α -ヘリックスドメインを連結するループを形成する。しかし、繊維を形成しないp5では2つのドメインをつなぐループ領域がなく、一続きの長い α -ヘリックスを形成していた。

A1株の細胞表面タンパク質p7は、大腸菌の鉄取り込み系の構成分子と相同性を示す。ある種の金属イオンと結合する他、高分子アルギン酸特異的な結合活性（ K_d : $\sim 10^{-8}$ M）を持つ。決定したp7の構造は、2つのアップダウンヘリックスバンドルから構成されており、分子表面には特徴的なイオンネットワークがみられた。

2. ペリプラズム局在アルギン酸結合タンパク質

外膜を通過したアルギン酸は、ペリプラズムの結合タンパク質AlgQ1もしくはAlgQ2に捕捉される。アルギン酸は、その構成成分あるいは非還元末端の状態（不飽和、飽和）および鎖長により様々な分子形態をとる。AlgQ1とアルギン酸オリゴ糖との共結晶構造解析により、AlgQ1のサブサイト1にはアルギン酸の非還元末端が不飽和・飽和の区別なく結合するが、グルロン酸は結合しないこと、サブサイト2と3にはマンヌロン酸とグルロン酸が区別なく結合できること、およびその構造要因が明らかになった。アルギン酸結合に関わる構造要因は、AlgQ1とAlgQ2の間で保存されている。このような基質認識機構により、結合タンパク質はヘテロ多糖であるアルギン酸を認識し、輸送することができると考えられる。また、アルギン酸は、その生合成過程において、非還元末端にはグルロン酸を配置しないことから、AlgQ1とAlgQ2がアルギン酸生合成機構と連携した合理的な構造をとっていることがわかる。

3. 内膜局在ABCトランスポーター

AlgQ1もしくはAlgQ2に捕捉されたアルギン酸は、内膜のABCトランスポーターへと受け渡される。A1株のアルギン酸輸送ABCトランスポーター（AlgM1M2SS: 内膜のAlgM1M2ヘテロダイマーと細胞質のAlgSSホモダイマーより構成される）は、AlgSのATP加水分解エネルギーを用いてアルギン酸を細胞質へと輸送する。大腸菌発現系を用いて発現させ、界面活性剤存在下で精製したAlgM1M2SSをAlgQ2とアルギン酸オリゴ糖の存在下で結晶化し、3.2 Å分解能で構造を決定した（図2）。結晶中で、AlgQ2はアルギン酸オリゴ糖を捕捉した状態でABCトランスポーターと結合していた。AlgM1とAlgM2はどちらも6回膜貫通ヘリックスを持ち、ペリプラズム側（AlgQ2接触面）が閉じ、細胞質側（AlgSS接触面）に開いた状態（inward-facing構造）で2量体を形成していた。また、AlgSSホモダイマーは、各モノマーのATP結合部位が離れた状態で、

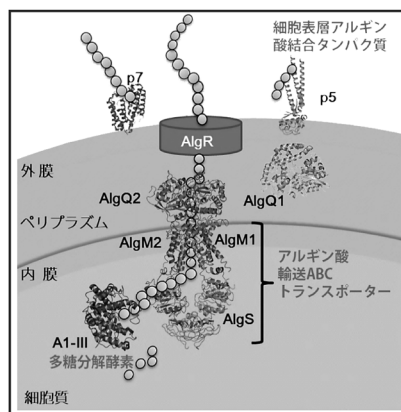


図1 A1株によるアルギン酸の取り込みと分解

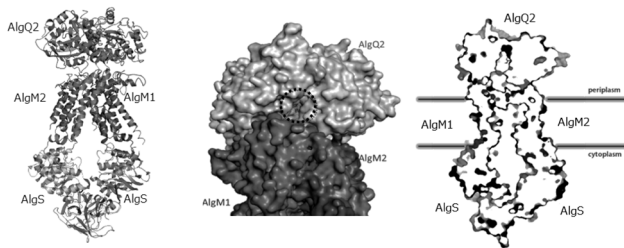


図2 アルギン酸輸送ABCトランスポーター複合体の全体構造

AlgM1M2と結合していた。このような構造的特徴は、得られた結晶構造が基質を輸送する前の状態であることを示す。AlgQ2は、AlgM1M2と結合した状態でも外界から基質結合サイトへと続く長さ約30 Å（アルギン酸8糖相当）のトンネル状の空洞を形成しており（図2中）、この構造が、高分子のアルギン酸をトランスポーターへと受け渡すために必須であると考えられた。実際に *in vitro* 測定系において、高分子アルギン酸と AlgQ1 もしくは AlgQ2 を加えると、リポソームに再構成した AlgM1M2SS の ATP 加水分解活性が上昇することを確認した。AlgM1M2 の内部には基質アルギン酸が通過するための空洞がみられた（図2右）。内腔の表面は、中性糖（マルトース）輸送 ABC トランスポーターとは異なり、酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸が適度に配置されており、このような構造的特徴が、酸性糖であるアルギン酸の効率的な取り込みと排出を可能にしていると考えられる。一般的に、ABC トランスポーターは、結合タンパク質の結合・解離や ATP の加水分解に伴って構造が変化し、内腔の入り口（ペリプラズム側）と出口（細胞質側）が閉じたり開いたりすることにより基質を運搬する。A1株のアルギン酸ABCトランスポーターにおいて、この空洞の長さは約27 Åで、直鎖状のアルギン酸6糖分に相当する。したがって、多糖アルギン酸が AlgM1M2 の内腔を通過するためには、内腔の入り口と出口が共に開いた状態をとることが必要と考えられる。

おわりに

A1株の高分子取り込み系の構造生物学を中心に研究を展開してきた。ABCトランスポーターは幅広い化合物を基質とす

ることが知られる一方で、その構造との相関の理解は限定的である。そのような状況下において、酸性多糖アルギン酸を基質とするトランスポーターの構造決定は、ABCトランスポーターの構造と機能の研究に大きく貢献すると思われる。ABCトランスポーターによりA1株の細胞質に取り込まれたアルギン酸は、エキソ型およびエンド型アルギン酸リアーゼにより単糖にまで分解された後、代謝される。これまでに、アルギン酸リアーゼをはじめ、キサンタンリアーゼ（キサンタン側鎖を分解）、ラムノシダーゼ（ラムノース含有複合糖質を分解）、ポリガラクトuron酸リアーゼ（ペクチンを分解）などの多糖分解酵素の構造機能相関を明らかにしてきた。これらの知見は、多糖の性質を改変し、食品への応用用途を拡大するために有効と考えられる。また、近年、こうした多糖が食糧と競合しないバイオ燃料の原料として注目されるに伴い、これらの糖質の取り込み系、分解系の理解はますます重要となっている。

謝辞 本研究は、京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻生物機能変換学分野にて行われました。ポスドクとして継続して研究を行う機会を与えていただき、また、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました同分野の村田幸作先生（現 摂南大学）に深く感謝申し上げます。同分野の橋本 渉先生には、研究全般にわたり数々のご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。同研究科農学専攻の^眞内海 成先生と同研究科応用生命科学専攻の三上文三先生には、博士課程在学中よりご指導、ご助言いただきました。ここに深く感謝いたします。大阪大学大学院基礎工学研究科在学中にX線結晶構造解析の機会を与えていただき、研究を基礎から教えていただきました森本英樹先生ならびに諸先生方に厚く御礼申し上げます。また、本研究は京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻生物機能変換学分野に在籍された多くの方々の共同研究として遂行されました。常期的確なご助言をいただきました同分野の河井重幸先生に感謝致します。共に実験や議論をしてくださった博士研究員の皆様、卒業生および在校生の皆様にご感謝致します。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関西支部長の内海龍太郎先生ならびにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。