

食品タンパク質の新機能の発見とその多面的利用への構造論的展開



新潟大学工学部工学科材料科学プログラム 落合 秋人

はじめに

タンパク質の立体構造は、その機能の理解に有用な知見を与えるだけでなく、新たな機能を有する分子の創出に不可欠な情報を与える。これまでに、納豆やコメなど食品由来のタンパク質に焦点を当て、その生理活性を探究し、立体構造情報に基づいたそれらの機能変換技術の開発を進めてきた。納豆菌由来の大豆細胞壁多糖分解酵素においては、エキソ型酵素からエンド型酵素を創出する技術を開発した。更にこの技術開発を契機として、コメ(イネ)由来 α -アミラーゼの研究において新規な生理活性ペプチドを創出する技術を確立した。これらの技術により創出した改変型タンパク質・ペプチドは、医薬品や化粧品素材などの物質生産において多様な選択肢を与え得る。以下にその概要を紹介する。

1. 納豆菌由来ラムノガラクトソナンリアーゼの構造と機能の解明およびその機能変換

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は、古くから植物に対して腐生性或いは共生性を示すことが知られている。枯草菌の一種である納豆菌もイネ属に多数存在し、その植物腐生性を利用して伝統的に納豆が製造されている。DNA マイクロアレイ解析の結果、*B. subtilis* の植物細胞壁成分の分解には、多糖ラムノガラクトソナン (RG)-I の分解に関わる遺伝子クラスターが関与することが判った。この遺伝子クラスター内において分泌シグナルをもつ YesW と YesX に着目し、その機能を解析したところ、両者は多糖リアーゼファミリー (PL)-11 に属し、RG-I 主鎖のラムノースとガラクトロン酸間の α -1,4 結合を β 脱離反応により切断する菌体外 RG リアーゼと同定した。更に、YesW は RG-I 主鎖から不飽和 4 糖 (Δ GRGR) 以上のオリゴ糖を遊離させるエンド型酵素であり、YesX は RG-I 主鎖に対してエキソ型で作用して不飽和 2 糖 (Δ GR) を遊離させることを見出し、2 つの酵素が協奏的に RG-I の分解に関わることを明らかにした。

一方で、枯草菌の研究に先立ち、海藻由来の食品多糖アルギン酸を基質として末端から不飽和単糖を遊離させる *Agrobacterium tumefaciens* 由来エキソ型リアーゼ Atu3025 の機能と立体構造を解明した。その結果、エキソ型活性の発見には、触媒部位の基質結合ポケット構造による末端糖の認識が重要であることを明らかにした。X線結晶構造解析により決定した YesW と YesX の立体構造は、共に多糖リアーゼファミリーにおいて新規なモチーフである β -プロペラ構造を有していた。更に YesW-ガラクトロン酸 2 糖の複合体の構造と YesX の立体構造を重ね合わせた結果、YesX のみに観察されるループ構造が活性部位に結合する 2 糖の非還元末端側を覆い被さるように位置することが明らかになった。Atu3025 の解析において得られた知見から、このループ構造が長鎖基質の活性部位への結合を制限し、YesX においてエキソ型活性を示す構造要因であること

が示唆された。そこで、この知見に基づいて、YesX の活性部位を覆うループ構造を欠失した改変型 YesX を設計した。HPLC を用いて基質 RG-I に対する反応産物を解析したところ、改変型 YesX は不飽和 2 糖のみを遊離させる YesX のエキソ型活性を喪失し、ランダム鎖長のオリゴ糖を遊離させる YesW 様のエンド型活性を示した。本研究により、RG リアーゼにおいてエンド型/エキソ型の相互機能変換技術を確立した (図 1)¹⁾。この変換技術は、バイオ燃料生産において、エンド型セルラーゼをエキソ型酵素に変換し、セルロースから直接グルコースへ糖化する酵素の分子設計などに有用である。

2. コメ由来 α -アミラーゼの構造と免疫亢進機能の解明およびその新規生理活性ペプチドの創出

コメ糠やコメ胚乳には、様々な生理活性タンパク質やペプチドが含まれる。合成ペプチドを基にした解析から、C 末端のチロシン残基を含むペプチドがメラニンの生合成に関わるチロシナーゼ酵素を阻害することを見出した。そこで、特定のプロテアーゼを用いることにより、コメ糠タンパク質から皮膚細胞においてメラニン合成を抑制する新規なペプチドを生産する技術を確立した。これらのペプチドは、色素沈着疾患を治療するための化粧品や医薬品への応用に繋がると期待される。

この成果を基に、生理活性タンパク質から新しい機能を有するペプチドを創出することを企図した。 α -アミラーゼ AmyI-1 は、イネの発芽段階において最も主要な機能を果たすデンプン分解酵素であり、Glycoside hydrolase ファミリー (GH)-13 に属する。AmyI-1 はデンプン共存下において、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の増殖を強力に阻害することを見出し

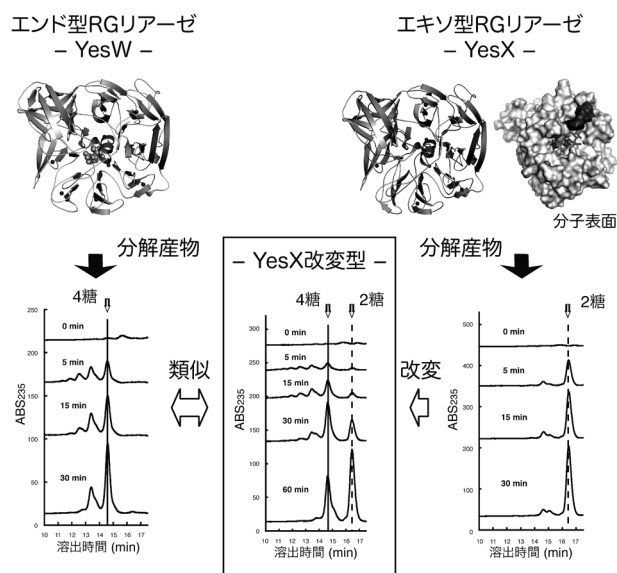


図 1. エンド型/エキソ型酵素の機能変換

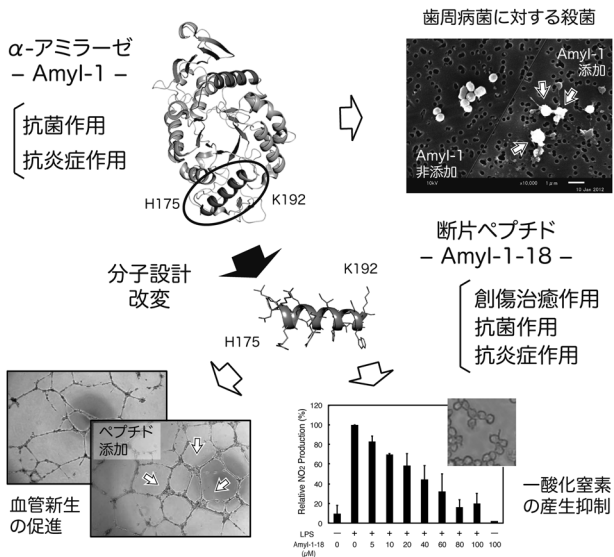


図2. α -アミラーゼ Amyl-1 の立体構造に基づく新規生理活性ペプチドの設計

た。また、生体分子間相互作用解析により、AmyI-1 は Lipopolysaccharide (LPS) などの細菌内毒素と直接的に結合することが判った。そこで、マウス RAW264 細胞を使用して一酸化窒素の産生抑制試験を行った結果、AmyI-1 は LPS により誘導される一酸化窒素の産生量を減少させ、ヒト免疫を亢進する作用を示すことを見出した。X 線結晶構造解析により明らかにした AmyI-1 の立体構造は、GH-13 に属する α -アミラーゼにおいて高度に保存されている (β/α)₈-barrel モチーフを有しており、比較構造解析の結果、AmyI-1 に特有の N 結合型糖鎖の結合サイトの構造を明らかにした²⁾。これらの知見は、AmyI-1 の抗炎症作用の理解を深めるのに役立つだけでなく、イネにおける生理学的機能の理解にも繋がる。更に、AmyI-1 の立体構造情報から 2 本の α -ヘリックスに着目した。これらは分子表面に位置し、両親媒性を持ち合わせている。この特徴は、抗菌ペプチドや抗炎症性ペプチドの一般的な構造的性質の一つである。それぞれの α -ヘリックスに相当する 2 本の短鎖ペプチド (AmyI-1-17, AmyI-1-18) は、*P. gingivalis* や日和見感染性真菌 *Candida albicans* などのヒト病原性微生物に対して広範な抗菌作用を示した。とりわけ、AmyI-1-18 は、 $K_D = 10$ nM レベルで強力に LPS と結合し、マウス RAW264 細胞において一酸化窒素の産生を抑制することにより抗炎症作用を示した。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を用いた解析の結果、細胞遊走や血管新生を促進することにより AmyI-1-18 は創傷治癒効果を示した。このように、コメタンパク質から新規生理活性ペプチドを創生する機能変換技術を確認した (図 2)。

3. コメ由来ディフェンシンの構造と機能の解明および新たな医薬品の創出を目指して

ディフェンシンは数十アミノ酸残基からなる生体防御タンパク質であり、分子内に複数のジスルフィド結合を有することから極めて高い安定性を有する。そこで、イネにおいて病原微生物の感染などのストレスに応答して発現するディフェンシン OsAFP1 に着目した。主にヒト病原性微生物に対して OsAFP1 の抗菌作用を調べた結果、*C. albicans* などの真菌に対して特異的に抗菌作用を示すことを見出した。また、OsAFP1 は既存の抗真菌薬とは異なり、ターゲット細胞にアポトーシスを誘

導することにより殺菌的に作用することを明らかにした。これらの結果は、抗真菌薬として OsAFP1 が有用な候補となり得ることを示す。一方で、OsAFP1 の 7 種類の断片ペプチドを設計した結果、2 つの断片ペプチド (Peptide-1, -7) が OsAFP1 と同様に抗真菌作用を示した³⁾。これらの結果もまた、新たな医薬品を設計する方法論として利用できる可能性を示す。最近、X 線結晶構造解析により OsAFP1 の立体構造を明らかにした。現在、これまでに得られた知見を基に、ターゲット微生物を選択する機能変換技術を確認し、機能制御可能な新たな医薬品の創出を目指している。

おわりに

食品や創薬業界をはじめとして、優れた機能を有するタンパク質を機能変換技術により開発したいというニーズは広く存在する。本研究は、それらのニーズに対する基盤的技術である。一方で、近年人工知能を用いたタンパク質設計が盛んである。本研究による情報と人工知能を組み合わせることにより、今後新規生理活性物質の設計をより効率化することも可能となる。

(引用文献)

- 1) A. Ochiai, T. Itoh, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata. *J. Biol. Chem.*, Vol. 284, p 10181-10189. (2009)
- 2) A. Ochiai, H. Sugai, K. Harada, S. Tanaka, Y. Ishiyama, K. Ito, T. Tanaka, T. Uchiumi, M. Taniguchi, T. Mitsui. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 78, p 989-997. (2014)
- 3) A. Ochiai, K. Ogawa, M. Fukuda, M. Otori, T. Kanaoka, T. Tanaka, M. Taniguchi, Y. Sagehashi. *Sci. Rep.*, Vol. 8, 11434. (2018)

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および新潟大学工学部工学科材料科学プログラムにおいて行われました。大学院時代の指導教員として本研究のきっかけを頂くとともに、7年の間ご指導ご鞭撻を頂きました京都大学名誉教授の村田幸作先生に心より感謝申し上げます。現所属においては、コメタンパク質の示す生理活性の世界を私に引き合わせてくださり、多くのサポートを頂きました新潟大学工学部工学科材料科学プログラム教授の谷口正之先生に深く感謝いたします。また、大学院時代に、私の研究基盤を支える多くの技術を伝授くださり、公私ともに多大なサポートを頂きました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教授の橋本渉先生に深く感謝いたします。X 線結晶構造解析に関しては、丁寧なご指導と様々な解析の場を提供くださった京都大学名誉教授 (現京都大学生存圏研究所特任教授) の三上文三先生に感謝申し上げます。本研究の展開に際して、様々な助言とサポートをくださった京都大学の河井重幸先生 (現石川県立大学生物資源工学研究所教授)、山崎正幸先生 (現龍谷大学農学部食品栄養学科准教授)、伊藤貴文先生 (現福井県立大学生物資源学部准教授)、および丸山如江先生 (元摂南大学理工学部特任助教)、さらに農業・食品産業技術総合研究機構の提督祥幸博士 (農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター地域戦略部研究推進室)、並びに新潟大学の田中孝明先生 (新潟大学工学部工学科教授) と三ツ井敏明先生 (新潟大学農学部農学科教授) に深く感謝申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長・小林達彦先生 (筑波大学大学院生命環境科学研究科) に深く御礼申し上げます。