

## 立体構造に基づく糖質関連酵素の反応機構の解明とポストゲノミクスへの新展開



福井県立大学生物資源学部 准教授 伊藤 貴文

## はじめに

糖質は、微生物から植物、動物に至るまで多様かつ豊富に存在し、エネルギー貯蔵や細胞形態維持に重要な機能を果たしている。他方、生物は、多糖を利用するために、あるいは、宿主へ感染・腐生・共生するために、多様な酵素と洗練された戦略を持って多糖を分解している。本研究では、新規酵素である細菌特異的不飽和糖質ヒドロラーゼ、糖質異性化酵素、細菌細胞表層発現型キチナーゼに特に着目し、構造生物学的手法を用いて、それらの基質認識や触媒反応に関わる分子機構の解明を行った。同時に、これまで機能が不明であったタンパク質の機能を立体構造に基づいて明らかにすることにより、ポスト構造ゲノミクスの重要性を示した。これらの反応機構は、既知の反応機構とは全く異なり、細菌感染症に対する新規治療法の提案や糖質産業におけるバイオプロセスの選択肢の拡大に繋がった。以下にその概要を紹介する。

## 1. 不飽和糖質ヒドロラーゼの構造・機能相関

重篤な感染症（肺炎、敗血症、静脈炎や髄膜炎など）を引き起こす連鎖球菌は、多糖リアーゼを産生し、ヒアルロン酸やコンドロイチンといった動物細胞表層多糖（グリコサミノグリカン）を分解して宿主細胞に侵入する。その際、連鎖球菌は感染因子として不飽和グルクニルヒドロラーゼ（UGL）も協奏的に利用し、多糖リアーゼ反応産物である不飽和糖質を加水分解する。UGLの立体構造を1.8 Å分解能で決定した結果、本酵素が $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造を基本骨格に持ち、 $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造が糖質加水分解酵素に適した基本骨格であることが示された（図1A）。さらに、数種の基質との複合体の立体構造解析（1.7-1.9 Å分解能）、重水素を利用した同位体効果の解析、および酵素-18安定同位体標識水を用いた酵素反応産物の質量分析から、UGLが新規な反応機構を示すことが明らかとなった。一般的な糖質加水分解酵素はグリコシド結合を水和し切断するが、UGLは非還元末端の不飽和糖に存在する二重結合を水和することで触媒反応を開始し、グリコシド結合を水和することなく切断していた（図1B）。また、UGLの高次構造ホモログYteRを枯草菌から見出し、機能不明であったYteRが、植物細胞壁ラムノガラクトンに由来する不飽和糖質に作用し、不飽和ガラクトン酸を遊離する新規酵素であることを明らかにした。そして、Henrissatらが提唱するグリコシダーゼファミリーに新たなファミリーGH-105を構築した。GH-105には、枯草菌、*Erwinia*属や*Agrobacterium*属などの多数の植物病原性細菌由来の機能不明タンパク質が含まれ、GH-105酵素も、UGLと同様、植物の感染因子として働くことが示唆された。

これらの知見によって、グリコシド結合の水和を介さない新規な糖質加水分解機構が提唱されただけでなく、GH-105酵素の構造・機能相関解析によってポスト構造ゲノム解析の有用性も示された。また、多糖リアーゼやその反応産物に作用する不飽和糖質ヒドロラーゼは細菌特異的であるため、その新規でか

つ特異的な反応機構に基づいて、国内外で阻害剤研究が現在盛んに行われている。さらに、 $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造による加水分解反応機構および後述する異性化反応機構が示されたことで、これら $(\alpha/\alpha)_6$ バレル酵素の反応特異性の制御も可能となった。

## 2. 糖質異性化酵素の構造・機能相関

シアル酸の工業的生産に利用される腎臓由来N-アシル-D-グルコサミン 2-エピメラーゼ（AGE）は、N-アセチル-D-グルコサミン（GlcNAc）とN-アセチル-D-マンノサミン（ManNAc）の2-エピメリ化反応を触媒するが、血圧制御系レニン結合タンパク質としての機能も持つ。AGEの立体構造を2.0 Å分解能で決定した結果、基質結合部位の詳細な構造が明らかとなり、本酵素も $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造を基本骨格とすることが示された（図2A）。さらに、酵素のダイマー面は静電的相互作用と疎水性相互作用により形成されていることが示され、従来の説であったロイシンジッパーモチーフの関与を完全に否定した。この結果、血圧制御系と糖代謝系の連関が明らかとなり、血圧制御学に重要な視座を与えることとなった。また、ポスト構造ゲノム解析から、AGE立体構造ホモログとしてサルモネラ菌由来タンパク質YihSが見出された。機能解析の結果、YihSがグルコース、マンノース、およびフルクトースを基質とするイソメラーゼ/2-エピメラーゼ活性を有する酵素であることが示された。そして、基質との複合体の立体構造を1.6 Å分解能で解析した結果、 $(\alpha/\alpha)_6$ バレル基本骨格による異性化反応機構が提示された（図2B, C）。この反応機構は、工業用酵素キシロースイソメラーゼを代表とする既知の金属依存性異性化反応機構とは全く異なっていた。よって、 $(\alpha/\alpha)_6$ バレル異性化酵素は、

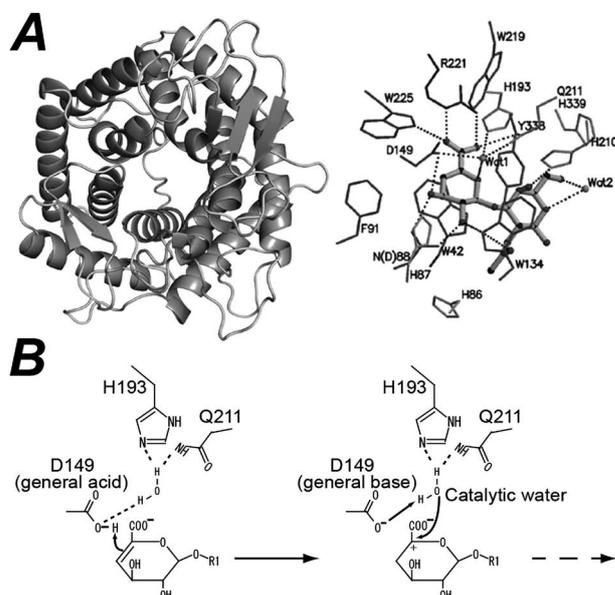


図1 不飽和グルクニルヒドロラーゼの立体構造および活性部位 (A) と不飽和二重結合への水和 (B)

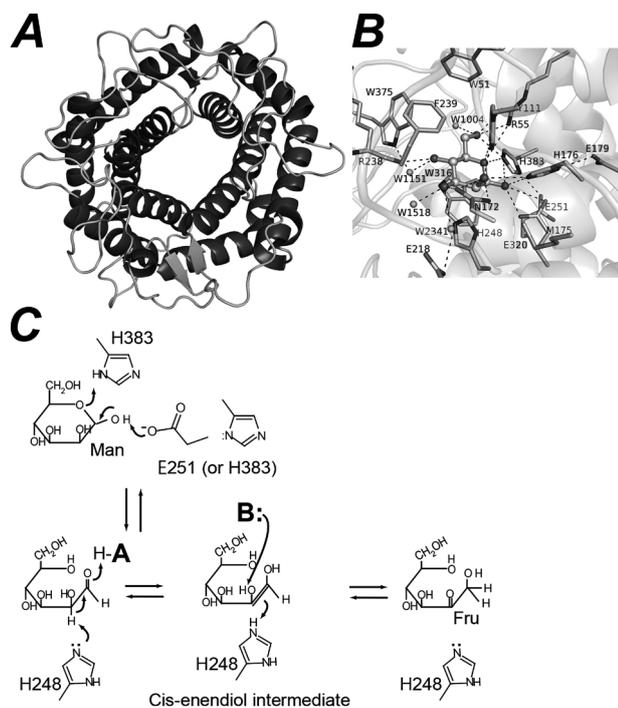


図2 腎臓由来N-アシル-D-グルコサミン2-エピメラーゼの立体構造 (A), サルモネラ菌由来YihSの活性部位 (B) と  $(\alpha/\alpha)$ -バレル構造ファミリーによる異性化反応機構 (C)

金属依存性酵素の反応機構に起因する反応pHの本質的な問題、つまり、アルカリ性の条件下でしか異性化反応を工業的に利用できなかった問題の解決に期待が持たれる。

### 3. 細胞表層発現型キチナーゼの構造・機能相関

多糖キチンは、セルロースに次いで地球上に多く存在するバイオマスであり、その多彩な機能を利用して農業資材や健康機能性食品として利用する研究が盛んに行われてきた。しかし、キチンの高度利用においては、利用目的に適した鎖長にまで分解することが必須であるが、GlcNAcが重合した構造は非常に安定であり、その分解は容易ではない。キチンの分解とその制御技術の確立は未だ重要な課題である。細菌 *Paenibacillus* sp. FPU-7 (*P. FPU-7*) は、真菌細胞壁のみならずカニ殻に含まれるキチンをも強力に分解する。また、*P. FPU-7* は従来知られている細胞外キチナーゼの他に、分子量15万の新規巨大キチナーゼ ChiW を細胞表層に提示しており、グラム陽性細菌が巧妙かつ強力な細胞表層多糖分解機構を有していることが示された (図3)。ChiW は、2つの相同な触媒ドメインを有し、不溶性の多糖キチンに対して極めて高い分解活性を持つ。ChiW の「複合ドメイン構造」と「高いキチン分解活性」の構造機能相関の解明は、難分解性高分子多糖の酵素的分解法の確立のみならず、糖質科学の発展に大きく貢献することが期待される。一方、キチンのオリゴ糖 (6糖など) には、高等動植物の生体防御機構を活性化するなどの機能が認められ、農業資材としての需要が急速に拡大しているが、現在、酸による部分分解により製造されているため、その生産効率の低さと高い環境負荷が問題となっている。目的とする鎖長のオリゴ糖を大量に生産する技術は未だに確立されていない。そのような背景の下、ChiW の新たな触媒作用として、オリゴ糖鎖を合成する強い糖転移活性を見出した。現在、タンパク質工学的手法を利用して、酵素機能の最適化を行い、機能性オリゴ糖合成法の確立に資する多くの知見を蓄積している。

### 1. 細胞外キチナーゼによるキチンの分解と ChiW の発現誘導

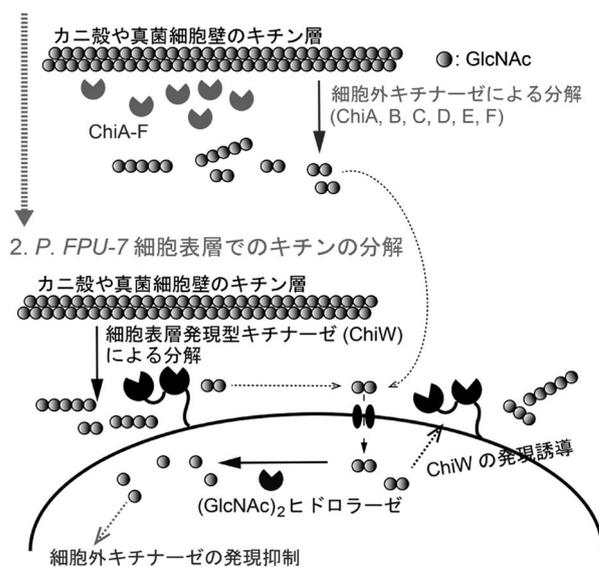


図3 *Paenibacillus* FPU-7株によるキチン分解機構

おわりに

これまで研究対象とした酵素は、糖質の加水分解や異性化といった極めて一般的な化学反応を触媒するが、それらの反応機構を構造生物学に基づいて詳細に解析した結果、既知の反応とは全く異なる新規な反応機構を示すことが明らかとなり、糖質関連酵素の分子設計の可能性を上げた。さらに、これらの研究成果は、農業や医薬の分子設計、産業分野における新規バイオプロセスの開発や代用酵素の利用、ならびに機能性オリゴ糖生産への画期的な展開をも可能とする。

謝辞 本研究は、京都大学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福井県立大学生物資源学部にて行われました。本研究を行う機会を与えていただくとともに、公私にわたり終始ご指導、ご鞭撻をいただいた京都大学名誉教授の村田幸作先生に深く感謝申し上げます。福井県立大学生物資源学部教授日井隆雄先生には、引き続き研究の機会を与えていただいたのみならず、多くのご助言と温かい励ましをいただきました。心より感謝申し上げます。京都大学農学研究科食品生物科学専攻生物機能変換学分野の准教授橋本渉先生には、温かい励ましをいただくとともに数々のご指導を賜りました。同分野の助教河井重幸先生には、多くの有意義なご助言をいただきました。両先生に深く感謝いたします。福井県立大学生物資源学部教授木元久先生にも多くの貴重なご助言をいただきました。深く感謝いたします。京都大学農学部生物機能化学科学生時代、最初に酵素への深い研究興味を抱く機会を与えていただきました京都大学名誉教授井上國世先生に厚くお礼申し上げます。京都大学農学研究科農学専攻教授の<sup>眞</sup>内海成先生と同研究科応用生命科学専攻教授の三上文三先生には、研究員として、多くの激励とご指導を賜りました。ここに深く感謝いたします。本研究は、住友化学株式会社とマルキンバイオ株式会社の研究員の方々、並びにこれまで所属してきました研究室に在籍された多くの方々のご指導の賜物であります。この場を借りて、深く感謝いたします。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井隆雄先生に重ねてお礼申し上げます。