



生物間相互作用に関わる微生物多糖リニアーゼの構造生命科学とその応用展開に関する研究

京都大学大学院農学研究科 小倉 康平

はじめに

ウロン酸を含む多糖は生命環境の様々な場所に存在し、微生物はウロン酸含有多糖を資化することで宿主や周辺微生物と正あるいは負の相互作用関係を形成している。本研究では、褐藻類の主要な構成成分であるアルギン酸ならびに動物細胞上に豊富に存在するヒアルロン酸を分解する微生物多糖リニアーゼに焦点をあて、多糖リニアーゼがもつ分子メカニズムを解明し、分解による周辺微生物との相互作用や宿主への病原性について研究を進めることで、海洋資源の利用や感染症防除につながる知見を得ることを目指した。

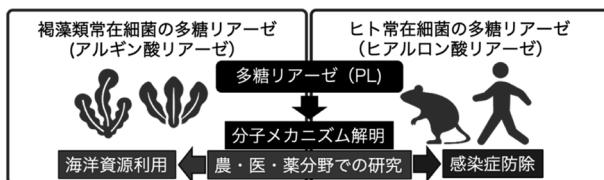


図1. 研究の総括図

1. 多糖リニアーゼ(PL) 7と14アルギン酸リニアーゼの分子メカニズム

アルギン酸は、褐藻類と一部の細菌が合成する多糖の一種であり、 β -D-マンヌロン酸(M)と α -L-グルロン酸(G)の2種類のウロン酸が直鎖状に重合した高分子酸性多糖である。アルギン酸リニアーゼは、アルギン酸におけるグリコシド結合を β 脱離反応により切断する。難消化性多糖であるアルギン酸の分解メカニズムの解明は、藻食性微生物の代謝・生理(生物間相互作用)機構の理解、アルギン酸を主成分とする緑膿菌バイオフィルムの除去剤としての応用、および生理活性を有するオリゴアルギン酸の開発・設計に直結するが、酵素分子が示す触媒反応・基質認識機構については多くが不明である。筆者は、一次構造(アミノ酸配列)により分類される多糖リニアーゼ(polysaccharide lyase, PL)のうち、PL7ファミリーに属する*Sphingomonas*属細菌A1株由来A1-II' とPL14ファミリーのクロレラウイルス由来vAL-1を主な対象として、2つのファミリーに属するアルギン酸リニアーゼの構造機能相関を明らかにした。

1-1. PL7ファミリーアルギン酸リニアーゼ A1-II'

アルギン酸は、MおよびGの構成比により、Mが豊富な領域(Mプロック)、Gプロック、MG混在プロックに分けられる。他の多くのアルギン酸リニアーゼがいずれかのプロックを優先して切断するのに対して、PL7ファミリーのアルギン酸リニアーゼA1-II'は全てのプロックに対して同等の活性を示すという特徴を示した。X線結晶構造解析によりA1-II'の立体構造を決定(分解能1.0 Å)したところ、本酵素は β ジェリーロール構造を有し、触媒残基Arg-Asn-His-Tyrを中心とした強固な

水素結合ネットワークを形成していた。触媒残基の部位特異的変異体を用いた糖複合体結晶構造(分解能1.6 Å程度)から、MプロックとGプロック両方との結合を可能にする構造要因として、2種類のヒドロキシル基結合サイトを本酵素が還元末端側に有していることを明らかにした¹⁾。

1-2. PL14ファミリーアルギン酸リニアーゼ vAL-1

クロレラウイルス由来vAL-1は、宿主であるクロレラに対して溶解活性を示す。本酵素はN末端側細胞壁結合ドメインとC末端側活性ドメインをもち、C末端側がアルギン酸リニアーゼ活性を有することを見いだした。PL14ファミリーに分類されたvAL-1の立体構造を決定したところ(分解能1.8 Å)、PL7ファミリーとはアミノ酸配列が大きく異なるにもかかわらず、共通の基本骨格(β ジェリーロール構造)を有していた(図2)。一方で、PL5、PL7、PL8ファミリーでは糖の種類にかかわらずArg-Asn-His-Tyrが共通して触媒反応を担うが、本酵素の触媒反応中心はArg-Lys-Tyr-Tyrにより構成されていた。また本酵素の特徴として、pH 7ではアルギン酸から二~四糖を、pH 10では二糖のみを产生するpH依存的な作用様式(pH 7エンド型、pH 10エキソ型)を示した。酵素-糖複合体結晶構造において、糖はpH 7ではクレフトの外側、pH 10では内側に結合していたことから、本酵素は糖との結合様式をpH依存的に変化させることで、固有の作用様式を発現させることを明らかにした²⁾。

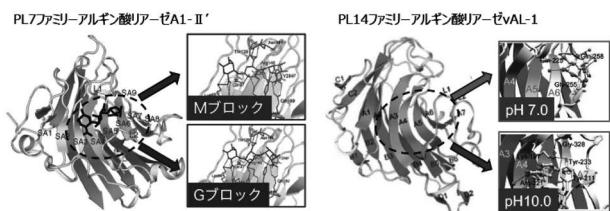


図2. β ジェリーロール構造をもつアルギン酸リニアーゼ2種(それぞれの全体構造と糖結合様式)

2. アルギン酸リニアーゼを介した海洋生物間相互作用

ブルーカーボンの貯蔵庫である褐藻類は地球上で最も豊富なバイオマスの一つであるが、その活用には効率的な分解システムの創出が必要である。その分解システム構築を目指す上で、筆者らは、海水と褐藻類における海洋微生物の多糖分解機構とそれによる生物間相互作用に着目し、褐藻類多糖(ラミナリンとアルギン酸)添加による細菌叢の変化や単離微生物の性状について解析した。

2-1. 褐藻類由来の低温下で増殖する *Pseudoalteromonas distincta* のアルギン酸リニアーゼ

褐藻類が存在する海水中的細菌叢では、*Pseudoalteromonas*属が優勢であった。また、褐藻類の主たる多糖ラミナリンを含む最少培地に褐藻類サンプルを接種し、海水温度を模倣した低

温下(15°C)で培養すると、*Pseudoalteromonas*属が支配的となった。ドラフトゲノム解析の結果、分離株は*Pseudoalteromonas distincta*として同定され、ラミナリン分解酵素に加え、PL6とPL7ファミリーのアルギン酸リーゼ遺伝子を検出した。また本分離株は、アルギン酸を代謝産物へと迅速に変換する能力を有していた。以上の結果より、*P. distincta*は低温条件下でラミナリンとアルギン酸を迅速に分解する酵素を產生することで、宿主としての褐藻類中に常在することを明らかにした³⁾。

2-2. アルギン酸リーゼによる分解・代謝を介した褐藻-細菌-酵母間相互作用

海水および褐藻類混合サンプルをアルギン酸最少培地に接種すると、*Marinomonas*属および*Vibrio*属細菌が優勢となった。アルギン酸集積培養の後に、PL7ファミリーアルギン酸リーゼ遺伝子をもつ3種の*Vibrio*属細菌に加え、酵母*Candida intermedia*を分離した。*C. intermedia*はアルギン酸を炭素源として生育しなかったが、*Vibrio*分離株(特に*V. algivorans*)との共培養により増殖した。これらの結果から、*C. intermedia*は*Vibrio*属細菌のアルギン酸代謝を介した栄養供給により増殖することを明らかにした。さらに*V. algivorans*との共培養により油糧海洋酵母*Yarrowia lipolytica*も生育可能となり、その生育に伴い油脂が生産されることを明らかにし、褐藻類を標的とする海洋*Vibrio*属細菌のアルギン酸リーゼを介した生物間相互作用が、酵母による工業的有用物質生産に貢献する可能性を提示した⁴⁾。

3. PL8 ファミリーヒアルロン酸リーゼ産生ヒト常在細菌による宿主障害機構

多糖リーゼは、難消化性である多糖を分解する点で産業的利用が期待される酵素であるが、一方でヒトを含む宿主由来の多糖を分解し増殖する際には、その微生物が病原菌となる側面を有する。急性レンサ球菌ストレスショック・壊死性筋膜炎の起因菌である溶血性レンサ球菌*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*(SDSE)は、高齢者・糖尿病患者への感染症例数が顕著であり、発症後は死亡あるいは予後不良の場合が多い。SDSEは健常なヒトの咽頭や皮膚などから分離されるが、そのヒト組織常在性や本菌固有の病原性に関する知見は乏しい。筆者らは、SDSEの常在から感染症惹起に至る機序を詳らかにすることを目的として、ヒト皮膚や粘液層に多く存在する酸性多糖ヒアルロン酸に着目し、SDSE由来PL8ファミリーヒアルロン酸リーゼの機能とそれに伴うSDSEの常在性獲得と病原性惹起機構を解析した⁵⁾。

3-1. PL8 ファミリーヒアルロン酸リーゼの大量発現によるSDSE の増殖と常在

他の溶血性レンサ球菌(*S. agalactiae*と*S. pyogenes*)と比較して、SDSEはPL8ヒアルロン酸リーゼ(HylD)を多量に分泌することで、ヒアルロン酸を单一炭素源とした培地で迅速に増殖した。組換え大腸菌発現系HylDは、pH 5.5から6.0において顕著な酵素活性を示す固有の性状を有した。ヒト皮膚pHは高齢化に伴いpH 6程度まで上昇する一方で、ヒアルロン酸量は変化しないことから、高齢者皮膚上のSDSEの常在にはHylD発現が鍵となることを明らかにした⁵⁾。

3-2. PL8 ファミリーヒアルロン酸リーゼ依存的なSDSE の病原性惹起

HylDが病原性に関与するかを明らかにするため、マウス創傷・全身感染モデルを用いた解析を実施した。創部の治癒時には、一時的にヒアルロン酸量が増大することが知られている。

マウス皮膚に形成させた創部にSDSE野生株ならびHylD遺伝子欠損株を感染させると、野生株は創部に残存し、炎症マーカーであるマウス血清中のインターロイキン6(IL-6)が高値を示したが、欠損株は免疫系により駆逐されていた。またマウスにSDSEを腹腔感染させた際の致死性は、HylD遺伝子の欠損により大幅に減少した。以上のことから、SDSEの产生するPL8ファミリーHylDは、常在性のみならず、皮膚創部感染と全身性感染において主要な病原因子であることを明らかにした。

おわりに

筆者は生物間相互作用に焦点を当てた応用微生物学と構造生物学を基盤とする構造生命科学を展開し、多糖リーゼの基質認識・反応触媒機構、アルギン酸リーゼの作用を介した海洋生物同士の相互作用機構、および哺乳類常在病原細菌によるヒアルロン酸リーゼ依存的な感染症惹起機構について研究を進めてきた。今後はその経験を農芸化学分野研究に還元することを目指して活動していく。

(引用文献)

- Ogura K et al., Substrate recognition by family 7 alginate lyase from *Sphingomonas* sp. A1. *Journal of Molecular Biology* 380(2): 373-85 (2008).
- Ogura K et al., Crystal structure of family 14 polysaccharide lyase with pH-dependent modes of action. *Journal of Biological Chemistry* 284(51): 35572-9 (2009).
- Katsuhiro N et al., Decomposition of brown algae in the ocean by microbiota: biological insights for recycling blue carbon. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 22; 88(12): 1487-1495 (2024).
- Nakata S et al., Potential role of alginate in marine bacteria-yeast interactions. *Applied and Environmental Microbiology* 90(12): e0168324 (2024).
- Nguyen VA et al., Novel hyaluronate lyase involved in pathogenicity of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Frontiers in Microbiology* 11: 552418 (2020).

謝 辞 本研究は、主に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と金沢大学新学術創成研究機構において行われました。学部学生時から博士後期課程までの指導教員であり、研究についての基礎をご指導いただきました京都大学名誉教授・村田幸作先生に心より感謝申し上げます。現在筆者が所属する研究室を主宰されます京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻教授・橋本涉先生には、学生時には日々の実験や研究活動で様々なご指導を賜り、現在も教育や研究について多くのご支援をいただいておりますこと、深く感謝申し上げます。学生時代や金沢大学在籍時に公私にわたりお世話になりました石川県立大学生物資源工学研究所教授・河井重幸先生に感謝申し上げます。金沢大学新学術創成研究機構に若手PIとして所属していた際には、ユニットリーダーの須釜淳子先生(現・保健衛生学部社会実装看護創成研究センター長)ならびに岡本成史先生(現・大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻教授)に多くのご支援をいただきましたこと、感謝申し上げます。これまでにお世話になりました京都大学大学院農学研究科、千葉大学大学院医学研究院、Beth Israel Deaconess Medical Center 病理学部門、国立国際医療研究センター研究所、金沢大学新学術創成研究機構、金沢大学医薬保健研究域保健学系の先生、職員、先輩、後輩、学生の皆様方に御礼申し上げます。末尾となりましたが、本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森直樹先生に厚く御礼申し上げます。