HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular and biophysical basis of cycloisomaltooligosaccharide recognition by a solute-binding protein
Author(s)	武井, 梓穂
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第17008号
Issue Date	2026-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k17008
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100061
Type	doctoral thesis
File Information	Shiho_Takei_summary.pdf, 全文の要約

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称:　博士(生命科学)　氏　名　　武井　梓穂

学 位 論 文 題 名

Molecular and biophysical basis of cycloisomaltooligosaccharide recognition by a solute-binding protein
(solute binding protein による環状イソマルトオリゴ糖認識の生物物理学的分子基盤)

第一章では本学位論文の背景として、ATP-binding cassette（ABC）トランスポーターとSolute binding protein の概要を述べる。ATP-binding cassette（ABC）トランスポーターは全生物に保存されたスーパーファミリーであり、多種多様なリガンドを生体膜内外へ輸送する。基質を生体膜内へ輸送するトランスポーターは特にインポーターと呼ばれるが、原核生物に存在する ABC インポーターの場合、インポーター本体以外に、基質結合タンパク質(Solute binding protein, SBP)が含まれる。SBP は特異的にリガンドと結合し、インポーターへ基質を輸送することから、トランスポーターの基質特異性を決定する重要なタンパク質である。SBP の特徴は、アミノ酸配列の類似性が低いにも関わらずドメイン構造が高度に保存されている点である。これまでに多くの構造機能解析が行われてきたものの、SBP が相手とするリガンドは低分子イオンから高分子化合物まで非常に多岐にわたることから、構造的・生化学的な情報はいまだに十分ではない。

本研究で着目したリガンド、環状イソマルトオリゴ糖 (cycloisomaltooligosaccharide; CI)は Glc 基が α-(1→6)-グリコシド結合を形成した環状オリゴ糖であり、抗う蝕性や色素包接能を示す機能性オリゴ糖である。CI は一部のバクテリアにて産生が知られており、CI グルカノトランスフェラーゼ(CITase)の分子内糖転移によりデキストランなどの α-(1→6)-グルカンから合成される。近年、グラム陰性細菌 *Tepidibacillus decaturensis* にて、CITase 遺伝子などの CI 代謝関連酵素の存在が明らかとなった。これらの遺伝子クラスター近傍には、ABC トランスポーター、SBP そしてデキストラナーゼの遺伝子がコードされていることから、*T.decaturensis* は CI を合成し、代謝利用すると推定される。しかし、CI が細胞内へどのように輸送されるのか、またどのような糖が輸送されるのかは十分に解明されていない。本研究では、この SBP を新規 CI-binding protein（TdCIBP）であると仮定し、そのリガンド特異性と結合機構の解明を通し、*T.decaturensis* の糖代謝システムの理解を目指した。

第二章では、CIBP の糖認識能を評価するため、精製タンパク質と各種糖リガンドを用いて等温滴定型カロリメトリー(ITC)を実施した。TdCIBP は CI7 と最も強く結合し、CI8・CI9 がこれに続いた。また直鎖オリゴ糖では、IG7 から IG3 で発熱が観測され、重合度の高いものほど結合親和性が高い傾向を示した。以上から、TdCIBP は CI や比較的高重合度の IG を認識する特徴を持つことが明らかになった。環状糖・直鎖糖認識の構造基盤を明らかにするため、X 線結晶構造解析により CI8 および IG7 との複合体構造をそれぞれ最高分解能 1.60 Å、1.90 Å にて決定した。CI8 では 8 つすべての Glc 基に相当する明瞭な電子密度が得られたのに対し、IG7 では 5 つの Glc 基のみモデル化に成功した。モデル化された 5 糖の両末端側に糖と思われる不鮮明な電子密度が確認されたことから、この 5 糖の両末端に存在する Glc 基の高い柔軟性が示唆された。両リガンドはタンパク質奥側で直接認識される共通配向の Glc 領域と、糖の配向に差が存在する領域

が存在した。糖の配向に差があるにもかかわらず、タンパク質の立体構造は側鎖レベルでほとんど変化せず、側鎖-Glc 基のネットワーク再編が起こることで、TdCIBP は環状糖と直鎖糖という物理的特性の異なるリガンドをしなやかに受け入れることができる。この解析から特定された TdCIBP の糖結合に重要なアミノ酸残基は、CI 代謝関連遺伝子を持つ複数の細菌の CIBP ホモログ間で高度に保存されていた。ITC から、CI との結合はエンタルピーおよびエントロピーの双方に有利な一方、IG との結合は主としてエンタルピー駆動であることが示された。構造情報と併せると、CI は結合を伴う自由度変化が IG よりも小さい可能性が示唆された。

第三章は、重合度の異なる環状糖の認識機構解明を目的とした。CI7、CI9 との複合体結晶構造解析の結果をから、環サイズの増大に伴い溶媒側糖の配向に差異が観測された一方、主要認識部位は保持されることが明らかとなった。これらの結果は、TdCIBP が同様の機構で環サイズ差を許容する階層的認識様式を有する可能性を示す。

以上の結果より、TdCIBP が CI や比較的大きなイソマルトオリゴ糖を認識する分子機構を明らかとした。この高い基質結合能により、TdCIBP と協働する ABC トランスポーターはこれらの糖を分解せずに直接取り込むことが可能と推定される。実際に AlphaFold3 を用いて ABC トランスポーターの複合体構造を予測したところ、トランスポーター内に基質結合キャビティの存在が示唆された。この空間は CI や IG を大きな構造変化なく収容可能なサイズであり、分解を伴わない CI・IG の直接輸送の可能性が推定される。

本研究では、バクテリアにおける CI 取り込み機構の一端を明らかにすることができた。それでは、*T. decaturensis* において CI や IG のような比較的大きな糖を合成し、輸送する意義は何であろうか。*T. decaturensis* は、TdCIBP 遺伝子上流に、切断型イソマルトデキストラナーゼをコードする偽遺伝子を有している。この不完全なイソマルトデキストラナーゼは、N 末端の触媒ドメインの一部を欠くことから、デキストラン分解において触媒活性を有さないと考えられる。一般にイソマルトデキストラナーゼは α-(1→6)-グルカンを加水分解し、マルトデキストリンから IG2 を生成する。しかし、この経路は *T. decaturensis* に提案されている CI を介した代謝経路とは整合しない。これらのことから、*T. decaturensis* は進化的に α-(1→6)-グルカン代謝中間体を IG2 から CI へと移行させ、CITase および CIBP を獲得した可能性が考えられる。ABC トランスポーターは通常、基質 1 分子の輸送に対して 2 分子の ATP を消費する。そのため、CI のような大きな炭水化物を取り込むことは、IG2 のような小分子を個別に取り込む場合と比較して、エネルギー効率の観点から有利である可能性がある。したがって、CI を介した代謝経路と CIBP 依存的輸送が組み合わさることで、*T. decaturensis* はより効率的にマルトデキストリン由来の炭素源を利用する戦略を有する可能性が示唆される。