



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Structural and functional insights into degradation and formation of glycosidic bond catalyzed by bacterial enzymes [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	小林, 桃子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11834号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59022
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Momoko_Kobayashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 小林 桃子

学 位 論 文 題 名

Structural and functional insights into degradation and formation of glycosidic bond catalyzed by bacterial enzymes

（グリコシド結合の分解および合成を触媒する細菌由来の酵素に関する構造および機能的考察）

I. SmDG の基質結合部位を構成する Trp238 の配向変化が関与する触媒反応機構

糖質加水分解酵素は多糖を単糖・オリゴ糖に分解する機能を持っており、食品、化学品など様々な分野の産業で幅広く利用されている。高効率な糖質生産および機能性を持つ新規糖生産のために、機能構造相関解明に基づく酵素機能の自在なコントロールが求められている。糖質加水分解酵素は一次配列に基づき 1 から 133 のファミリーに分類されている。その中で最大の糖質加水分解酵素ファミリー13 (GH13) には産業的に広く用いられる α -アミラーゼが含まれており、GH13 酵素の機能構造研究が盛んに行われている。GH13 酵素は **double displacement** メカニズムと呼ばれる触媒機構により、加水分解反応と糖転移反応の両方を触媒する。このメカニズムでは酵素と糖が共有結合した反応中間体を経ることが知られている。反応中間体の立体構造解明により反応中の酵素の構造変化の様子を知る事ができ、詳細な反応機構の議論が可能である。そのため、本研究では GH13 に属する *Streptococcus mutans* 由来デキストラングルコシダーゼ (SmDG) の X 線結晶構造解析および機能解析を行い、反応機構の詳細を明らかにすることで GH13 酵素全体への知見蓄積を目指した。

SmDG は基質の非還元末端を認識し α -1,6-グルコシド結合特異的な加水分解および糖転移反応を触媒する酵素である。その変異体 E236Q を用いてリガンドフリー体と共有結合中間体の結晶構造をそれぞれ分解能 2.1 および 2.4 Å で決定した。中間体の電子密度マップから、一般求核触媒残基である Asp194 とグルコース (Glc) の C1 が共有結合していることが確認できた。既に得られているイソマルトリオース複合体 (基質複合体) 構造と比較したところ、求核触媒残基 Asp194、一般酸塩基触媒残基 Gln236、及び基質結合部位のサブサイト+1/+2 を構成する Trp238 の構造変化が起こることが分かった。興味深いことにリガンドフリー体、基質複合体、中間体の 3 つの構造中で Trp238 側鎖は異なるコンフォメーション (free 型、closed 型、open 型) を形成しており、Trp238 の柔軟性を示唆した。リガンドフリー体では Trp238 側鎖は疎水性側鎖を持つアミノ酸で構成された疎水性の空間に配置されている (free 型) 一方、基質複合体ではサブサイト+1 と+2 の認識に役割を果たす closed 型となっている。これら 2 つの構造と比べ中間体構造では、Asp194 と Glc が共有結合を形成するように互いに近づく配向になっていた。Asp194 の配向変化に伴い隣接する Gln236 側鎖が回転し立体障害を避けていた。Gln236 の配向変化により Trp238 側鎖との間に形成されていた水素結合が失われ、Trp238 の側鎖の配向も顕著に変化していた。すなわち基質複合体で活性部位側を向く closed 型の Trp238 側鎖が、中間体では活性部位の外側を向き open 型を形成していた。

中間体では、open 型の Trp238 はサブサイト+1 を構成しない位置にあるため、open 型のままアクセプター基質が結合すると仮定すると、単糖はアクセプターになりにくい事が考えられる。アクセプターとして単糖の Glc と二糖のマルトースを用いてアクセプター特異性解析を行ったところ、いずれも転移産物が得られた。このことから、ドナーGlc がアクセプターに転移される時には、Trp238 は closed 型に戻っていることが示唆された。またこの結果から、Trp238 側鎖の構造変化がアクセプター受け入れすなわち糖転移反応に重要であることが考えられた。さらに、Trp238 とスタッキング作用を持つ Phe262 を置換した変異体 (F262A および F262W) を作製し、糖転移反応の解析を行った。その結果、野生体に比べ Trp238 とのスタッキング作用が弱くなった F262A では糖転移活性が低下し、スタッキング作用が強くなった F262W では糖転移活性が上昇した。Trp238 の柔軟性は糖転移反応に重要であることが示

唆された。すなわち、糖との共有結合形成により配向変化した触媒残基の影響を受け、Trp238 は closed 型から open 型となる。その後、アクセプター糖を受け入れる際に Trp238 が open 型から再び closed 型へ戻ることが、安定な中間体を破壊しその後の反応を促進している可能性が考えられる。

以上の構造機能解析の結果から、SmDG の Trp238 側鎖は反応の各段階においてその配向を大きく変化させ、さらにその変化が機能に影響を与えるという新たな知見を得た。この Trp 残基は GH13 のサブファミリー20 (GH13_20) および 36 (GH13_36) において保存性が見られた。さらにこれらの GH13_20 および GH13_36 酵素は SmDG の Phe262 と一致する位置に Phe もしくは Tyr 残基を持っていた。これらの酵素は SmDG と同じ位置に Trp 残基および一般求核触媒残基・一般酸塩基触媒残基・Trp 残基の 3 残基間の配向関係を持ち、同様の反応機構により触媒を行うと考えられる。

II. リピド A 合成酵素 PaLpxB についての研究

グラム陰性菌外膜外層はリポ多糖 (lipopolysaccharide、LPS、エンドトキシン) と呼ばれる糖脂質で構成されている。LPS は動物細胞の Toll 様受容体 4 を介して自然免疫を強く活性化するため、多量の LPS は敗血性ショックなど致死性の高い疾病を引き起こす。LPS 基部はリピド A と呼ばれる糖脂質で構成されており、リピド A 単体で LPS と同等の毒性を示すことがわかっている。リピド A は 6 つの合成酵素群 (LpxA, LpxC, LpxD, LpxH, LpxB, LpxK) が順番に作用することで合成され、この合成経路はほぼすべてのグラム陰性菌で保存されている。そのため薬剤開発の観点からもリピド A 合成を担う酵素群の機能構造研究が重要とされている。構造解析によりこれらのほとんどの酵素の詳細な反応機構が明らかにされ、創薬に向けた阻害剤探索が進められている。一方、LpxB (lipid A disaccharide synthase) は膜タンパク質と似た性質を持つため、構造解析が難航している。LpxB は合成経路の中流を担う酵素であり、経路の 1 つ前のステップで働く LpxH の基質 UDP-2,3-diacylglucosamine および生成物 2,3-diacylglucosamine 1-phosphate を 1 分子ずつ合成し disaccharide-1-P を生成する酵素である。LpxB は構造未知のため、どのように両分子を結合するか、LpxH から基質をどのように受け渡されるかが不明である。そこで本研究では、緑膿菌 *P. aer* 由来 LpxB (PaLpxB) の構造解析へ向けて大量調製および結晶化にチャレンジし、LpxH との相互作用を調べた。

PaLpxB 単体での結晶化に向けて精製条件検討を行ったところ、適切な界面活性剤の検討が結晶化に有効であることが考えられた。これまでに 700 条件以上の結晶化スクリーニングを行ったが、今のところ PaLpxB のタンパク質結晶はまだ得られていない。

本研究室において、LpxB の前のステップを担う緑膿菌由来 LpxH (PaLpxH) の野生体および不活性型変異体の結晶構造が解明されている。不活性型変異体の構造は、基質も生産物も結合していないアポ体であるのに対して、野生体では発現ホストとして用いた大腸菌由来の LpxH 生成物である 2,3-diacylglucosamine 1-phosphate が強く結合している様子が見られた。この理由として、大量発現した PaLpxH により生成された 2,3-diacylglucosamine 1-phosphate が PaLpxB に渡し切れなかったと考えられる。そこで生成物受け渡しの際 PaLpxH と PaLpxB が相互作用する可能性を予想し、共発現により PaLpxH 野生体もしくは不活性型変異体と PaLpxB の相互作用解析を行ったところ、2 つの酵素間に相互作用は見られなかった。この結果から、PaLpxH と PaLpxB は内膜の細胞質側の膜表面上で、膜を介した基質および生成物のやり取りをすることが考えられた。