



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 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

審査担当者	主 査	教 授	姚 関
	副 査	教 授	門出 健次
	副 査	教 授	綾部 時芳
	副 査	准 教 授	田中 良和
	副 査	教 授	木村 淳夫（農学院）
	副 査	助 教	佐分利 亘（農学院）

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)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

I. SmDG の基質結合部位を構成する Trp238 の構造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、一次配列に基づき 133 個ファミリーに分類されている。その中で最大のファミリー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。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 線結晶構造解析と機能解析を行い、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。その変異体 E236Q を用いてリガンドフリーと中間体の構造をそれぞれ分解能 2.1、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 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。既に解析された基質との複合体構造と比較したところ、求核触媒残基 Asp194、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 の構造変化が起こっていたことが分かった。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 つの構造では、Trp238 側鎖は異なるコンフォメーション free、closed、open 型を形成しており、Trp238 の柔軟性を示唆した。基質複合体には、サブサイト+1/+2 を認識する closed 型となっている Trp238 側鎖は、中間体構造では、Asp194 と Glc が共有結合を形成すると伴い、活性部位の外側に向き open 型を形成していた。また、open 型の Trp238 はサブサイト+1/+2 を構成しないため、単糖はアクセプター基質になりにくいことが考えられ、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。いずれも転移産物が得られた。このことから、ドナーGlc が転移される時には、Trp238 は closed 型に戻っていることが考えられる。さらに、Trp238 とスタッキング作用する Phe262 の変異体を作製し、糖転移反応の解析を行った。Trp238 との相互作用は弱くなった F262A では糖転移活性が低下し、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。

また、この Trp 残基は GH13 のサブファミリー20、36 に保存性が見られ、さらに、SmDG の Phe262 と一致する位置に Phe もしくは Tyr 残基も存在している。よって、これらの酵素は SmDG と似ている一般求核触媒残基・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って触媒することが考えられる。

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を構成するリポ多糖 LPS (lipopolysaccharide) 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し、多量の LPS は敗血症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、LPS と同等の毒性を示している。リピド A は 6 つの合成酵素 (LpxA, C, D, H, B, K) が順番に作用することで合成される。そのうち、LpxA, C, D, K の詳細な反応機構が構造解析により明らかにされ、創薬に向けた阻害剤探索が進められている。一方、LpxB は 1 つ前のステップで働く LpxH の基質と生成物を 1 分子ずつ重合し disaccharide-1-P を生成する酵素であり、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。本研究では、*Pseudomonas aeruginosa* 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、PaLpxH との相互作用を調べた。

PaLpxB の精製・結晶化条件を検討したところ、適切な界面活性剤の使用が結晶化に有効であることが示唆されていた。また、本研究室において解明されている PaLpxH では発現ホスト由来の生成物 2,3-diacylglycosamine 1-phosphate が強く結合しているのに対して、不活性型変異体の構造はアポ体であった。そこで共発現により PaLpxB が PaLpxH および不活性型変異体との相互作用を解析し、2 つの酵素間に結合は見られなかった。この結果から、PaLpxH と PaLpxB は直接ではなく、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る。

以上、本研究では *S. mutans* 由来の SmDG 変異体 E236Q のリガンドフリーと中間体の構造解析および活性測定により、Trp238 側鎖は柔軟性を持ち、反応の各段階に応じて構造変化が起こり、機能に影響を与えるという新たな知見を得た。また、緑膿菌由来のリピド A 合成酵素 PaLpxB について、結合実験の結果から、LpxH と LpxB は膜を介した基質および生成物のやり取りを行うことを提案することができた。

本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり、よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格があるものと認めた。