



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on New Enzymes Responsible for Peptidoglycan Biosynthesis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	馮, 若茵
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第13812号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75883
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ruoyin_Feng_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（工学） 氏名 馮 若茵

審査担当者 主査 教 授 松本 謙一郎

副査 教 授 高木 睦

副査 准教授 南 篤志

副査 教 授 大井 徹

学 位 論 文 題 名

Studies on New Enzymes Responsible for Peptidoglycan Biosynthesis

(ペプチドグリカンの生合成に関与する新規酵素に関する研究)

微生物の増殖に不可欠な一次代謝経路はモデル微生物を対象に解明され、普遍的に存在すると考えられてきた。しかし、多種多様な微生物のゲノム配列が決定されるにつれ、一次代謝に関与する遺伝子の一部が欠落した微生物の存在が明らかになった。これら微生物は、欠損遺伝子に対応する化合物の要求性を示す場合も多いが、近縁の微生物も同じ経路の遺伝子を欠落している場合は新規な生合成経路の存在が示唆される。実際に、ピロリ菌に代表される一部の微生物では生育に必須なメナキノンが既知経路とは全く異なる経路で生合成されること、また、葉酸の構成成分であるパラアミノ安息香酸の生合成に新規遺伝子（酵素）が関与することが報告されている。

本論文は、このような新規な代謝経路について同様に探索し、ペプチドグリカンの生合成に関与する新規酵素を見出し詳細な解析を行った。具体的には、ほとんどの微生物はペプチドグリカンを含み、その1ユニット単位であるUDP-N-アセチルムラミン酸 (UDP-MurNAc) は、6つの酵素によりUDP-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) から生合成される。この際に用いられるD-Gluは、多くの場合、GluラセマーゼによりL-Gluから供給されるが、*Xanthomonas* 属細菌のゲノムデータを精査した結果、他の全てのペプチドグリカン生合成遺伝子が存在するにもかかわらず、Gluラセマーゼ遺伝子が存在しなかった。したがって、本株ではD-Gluは新規酵素・経路で供給されたと考えられたことから、その解明を行った。

生育にD-Gluを要求する大腸菌変異株に、*X. oryzae* ゲノムDNAを供与体としたショットガンクローニングを行い、相補株を選択した結果、XOO1319とXOO1320の2つの遺伝子が相補に必須であることが分かった。前者は機能未知であったが、後者はMurD (UDP-MurNAc-L-AlaにD-Gluを付加する酵素) と相同性を有していた。したがって、XOO1319は新規なGlu racemaseと予想された。しかし、組換え酵素とL-Gluを用いた様々な反応条件で解析を行ったが、活性を確認することはできなかった。さらに、MurDと相同性を有するXOO1320に関しても、予想された活性を有するか組換え酵素を用いて検証したが、比較対照に用いた大腸菌由来のMurDに比べ微弱の活性しか検出できなかった。そこで、上述した相補実験でXOO1319とXOO1320の両者が相補に必須であった結果、およびUDP-MurNAc-L-AlaとL-GluはD-Glu要求大腸菌が供給可能である

ことを踏まえ、両組換え酵素と両基質を用いて反応を行ったところ、著量の UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu が生成した。この結果は、XOO1320 が UDP-MurNAc-L-Ala に D-Glu ではなく L-Glu を結合した後、XOO1319 が生成物末端の L-Glu を異性化する可能性を示唆した。これを検証するため、XOO1320 を UDP-MurNAc-L-Ala と L-Glu を基質に用いて反応させたところ、ATP 存在下で UDP-MurNAc-L-Ala-L-Glu が生成した。さらに、XOO1319 は その反応産物である UDP-MurNAc-L-Ala-L-Glu を ATP 存在下で UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu へ変換した。以上の結果より、UDP-MurNAc-L-Ala に L-Glu を結合する XOO1320 を MurD2、生成物末端の L-Glu を D-Glu に異性化する XOO1319 を MurL と命名した。

MurL には特徴的なモチーフや補酵素結合配列は存在せず、現時点で異性化の反応機構は予測できないが、ATP 依存反応であったため、基質活性化機構を検討した。酵素反応液を解析したところ、AMP が特異的に検出されたことから、基質はアデニル化により活性化されると示唆された。また、MurL で高度に保存され、酸・塩基触媒に成り得るアミノ酸残基に変異導入することにより、活性に必須な 3 アミノ酸残基を同定した。しかし詳細な反応機構の解明のためには結晶構造情報が不可欠である。

MurD と MurD2 (XOO1320) は、28%の相同性 (47%の類似性) を有するが、各々UDP-MurNAc-L-Ala に D-Glu と L-Glu を付加する。この立体の異なる基質の認識機構について興味を持たれたことから解析を行った。大腸菌由来 MurD の基質アナログ複合体の結晶構造に基づき XOO1320 の基質認識に関与するアミノ酸残基を予測し、これら大腸菌 MurD アミノ酸配列に置換し、1 アミノ酸置換酵素を調製した。*in vitro* 解析の結果、活性を失った酵素と D-Glu と L-Glu に同等の活性を示す 2 種類の変異酵素が得られた。そこで両者を組み合わせた 2 アミノ酸置換酵素を構築した結果、D-Glu のみを基質とする基質認識が完全に反転する酵素が得られた。次に、見出した 2 アミノ酸残基に対応する大腸菌由来 MurD のアミノ酸配列を XOO1320 の配列に置換した変異酵素も構築したが、野生型酵素同様に D-Glu のみを基質とした。大腸菌由来 MurD は基質特異性が厳密であることが知られており容易に基質特異性を変えることは困難と考えられた。そこで、MurD2 とより高い相同性を有する他の微生物由来 MurD の組換え酵素を調製し基質特異性を検討した結果、D-Glu に加え L-Glu にも微弱な活性を示す酵素を見出した。そこで本酵素にランダム変異を導入した結果、1 変異導入により野生型に比べ UDP-MurNAc-L-Ala に L-Glu を付加する活性が増加した変異酵素を得た。以上、MurD と MurD2 の異性体基質の認識には数アミノ酸が関与していることが分かった。

これを要するに、著者はペプチドグリカンの生合成に関与する新規酵素 2 つを見出し、これらが従来とは全く異なる経路での生合成に関与することを見出し、基礎微生物学や植物病原菌 *X. oryzae* に対する農薬開発のため有用な新知見を得たものであり、応用微生物学に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。