

氏名	いとう たかふみ 伊藤 貴文
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第 2626 号
学位授与の日付	平成 18 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	X-ray Crystallographic Studies on Catalytic Mechanism and Substrate Recognition of Bacterial Unsaturated Glycoside Hydrolases (X 線結晶構造解析による細菌由来不飽和グリコシドヒドロラーゼの触媒機構と基質認識に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 村田 幸作 教授 井上 國世 教授 三上 文三

### 論 文 内 容 の 要 旨

一般に、多糖分解酵素はヒドロラーゼとリアーゼに大別される。多糖ヒドロラーゼは、多糖分子中のグリコシド結合を加水分解する。一方、多糖リアーゼは、多糖分子中のウロン酸残基を認識し、 $\beta$ -脱離反応により二重結合を持つウロン酸を非還元末端糖とする不飽和糖質を遊離する。多糖リアーゼ反応によって生じる不飽和糖質に作用する酵素の存在は報告されているが、それらの構造・機能相関は明らかにされていない。

*Bacillus* 属細菌 GL1 株由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼ (UGL) は、不飽和糖質における非還元末端の不飽和グルクロン酸とそれに結合している糖との間のグリコシド結合を加水分解する。UGL の基質には、多糖リアーゼ反応により生じた哺乳動物の細胞外マトリクスであるヒアルロン酸やコンドロイチンなどのグリコサミノグリカン、あるいは細菌バイオフィームであるキサントランやゲラン由来の不飽和糖質が含まれる。そのため、UGL は多糖リアーゼと共に多糖の代謝に重要である。実際、重篤な感染症（肺炎、敗血症、静脈炎や髄膜炎など）を引き起こす病原性連鎖球菌は、宿主細胞の相互作用に重要なヒアルロン酸（細胞外マトリクス）を分解する病原性因子ヒアルロン酸リアーゼを産生すると同時に、UGL 遺伝子も有している。そのため、UGL と多糖リアーゼに関する構造生物学は、多糖代謝における一連の反応機構の解明や細菌感染症治療に有効な薬剤の分子設計を可能とする。

本研究では、不飽和糖質に作用する新規な酵素 (UGL および YteR) の構造・機能相関を解析した。X 線結晶構造解析により、UGL の立体構造を決定し、その触媒反応機構を明らかにした。また、UGL の立体構造ホモログである枯草菌由来機能不明タンパク質 YteR が、植物細胞壁ラムノガラクトン由来の不飽和糖質に作用する新規な糖質加水分解酵素であることを示し、かつ UGL と同様の触媒反応機構を示すことを明らかにした。これらの結果は、酵素阻害剤の開発に有効な情報を与え、動物や植物に対する細菌感染症の新たな治療法の確立に繋がる。

第 1 章では、X 線結晶構造解析により、新規 UGL の立体構造を決定した。

UGL は、他の立体構造既知のタンパク質と一次構造上の相同性を示さない。そのため、位相決定には多重原子同型置換法を利用した。酵素分子のモデリングおよび精密化を行い、UGL の立体構造を  $1.8 \text{ \AA}$  分解能、 $R$  因子 16.7% で決定した。精密化したモデルは、UGL1 分子、水 478 分子、グリシン 4 分子、ジチオスレイトール 2 分子、および 2-メチル-2,4-ペンタンジオール 1 分子を含んでいた。UGL の立体構造は、 $\alpha_6/\alpha_6$ -バレル構造を基本骨格としていた。そのバレルの中心には、芳香族アミノ酸残基を多く含む大きなポケットが存在した。

第 2 章では、新規な糖質加水分解酵素ファミリー GH-105 を創設した。

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来機能不明タンパク質 YteR と UGL の間には、一次構造の相同性は殆ど見られないにも関わらず、立体構造の類似性が見出された。また、枯草菌ゲノム中には、YteR と一次構造上の相同性を示す YesR をコードする遺伝子が存在する。そこで、これらの機能を明らかにするため、大腸菌大量発現系を用いて YteR および YesR を精製した。酵素学および遺伝学的解析により、YteR および YesR が植物細胞壁の分解に関わる新規な酵素（不飽和ガラクト

ロニルヒドロラーゼ)であることを明らかにした。この結果により、Henrissatらが提唱する糖質加水分解酵素ファミリーに新たなファミリー GH-105 を創設した。

第3章では、UGL および YteR の不飽和糖質加水分解機構を解明した。

不活性な UGL 変異体 (D88N) と不飽和コンドロイチン 2 糖, 不飽和ヒアルロン酸 2 糖, 不飽和ゲラン 4 糖を利用して、各酵素-基質複合体の立体構造を 1.7~1.9 Å 分解能で決定した。その結果、UGL は、従来の糖質加水分解酵素とは異なる触媒部位を持ち、新規な反応機構を有することが示唆された。そこで、複合体の立体構造解析、部位特異的変異解析や反応産物の質量分析などによって、次のような新規な反応機構を提唱した。まず、UGL の Asp-149 が、一般酸触媒として不飽和グルクロン酸の二重結合 (C4=C5) の C4 炭素に水素を供与する。次に、Asp-149 が、一般塩基触媒として水分子から水素を受け取る。脱プロトン化した水分子は、不飽和グルクロン酸の C5 炭素を求核攻撃する。つまり、反応は、グリコシド結合ではなく、二重結合 (ビニル-エーテル基) を水和することにより開始される。この水和により、ヘミケタールが生成される。ヘミケタールは不安定であり、直ちにヘミアセタールとなる。ヘミアセタールは、アルデヒドとの平衡によりグリコシド結合が切断され、アルデヒド (不飽和グルクロン酸) と遊離の糖となる。

不活性な YteR 変異体 (D143N) と不飽和ラムノガラクトツロナン 2 糖を利用して、酵素-基質複合体の立体構造を 1.9 Å 分解能で決定した。その結果、YteR も UGL と同様に Asp-143 が一般酸/塩基触媒として機能し、不飽和ガラクトツロン酸の二重結合を水和することによってグリコシド結合の切断を引き起こすことが示された。

以上、本研究では、構造生物学的解析により、新規な糖質加水分解酵素の立体構造を決定するのみならず、グリコシド結合の水和を介さない新規な糖質加水分解機構を提唱した。

## 論文審査の結果の要旨

多糖は、微生物から植物、動物にいたるまで広く存在し、細胞形態維持、エネルギーの貯蔵、および生物間相互作用による生態系の構築などに重要な機能を果たしている。細胞形態維持に関わる多糖として、細菌のバイオフィームであるキサンタンやゲラン、哺乳動物の細胞外マトリクス構成成分であるグリコサミノグリカン、および植物の細胞壁構成成分であるセルロース、ヘミセルロース、ペクチンなどがよく知られている。細菌による宿主の細胞表層に存在する多糖の分解は、両者が相互作用 (寄生・腐生・共生) する際の初期応答の一つである。これらの多糖は、主に加水分解酵素 (ヒドロラーゼ) と脱離酵素 (リアーゼ) により分解される。

枯草菌や連鎖球菌などの細菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼ (UGL) は、グリコサミノグリカン、キサンタンやゲランなどのグルクロン酸を含む多糖の分解に関与する新規な糖質加水分解酵素であり、多糖リアーゼ反応により生じた不飽和糖質から不飽和グルクロン酸を遊離する。UGL の構造と機能に関する解析は、新規な加水分解酵素の構造生物学的観点、および細菌による多糖分解における加水分解酵素と脱離酵素の機能分担の観点から重要であるのみならず、宿主細胞への細菌感染機構、あるいは多糖由来の新規な生理機能性糖質の分子設計に対しても有用な知見を与えたと考えられる。

本研究では、多糖リアーゼ反応により生じる不飽和糖質に作用する新規な酵素 (UGL および YteR) に焦点を当て、X 線結晶構造解析によりそれらの構造・機能相関を明らかにした。また、部位特異的変異体の酵素学的解析や酵素反応産物の機器分析により、UGL と YteR が一般的な糖質加水分解酵素とは異なる新規な触媒反応機構を示すことを明らかにした。評価すべき点は、以下の通りである。

1. *Bacillus* 属細菌 GL1 由来 UGL の X 線結晶構造を決定し、UGL が  $\alpha_6/\alpha_6$ -バレル構造を基本骨格とすることを明らかにした。
2. 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来機能不明タンパク質 YteR が、UGL と類似の立体構造を示し、植物細胞壁ラムノガラクトツロナン不飽和糖質に作用する新規な加水分解酵素であることを明らかにした。これにより、新たな糖質加水分解酵素ファミリー GH-105 を創設した。
3. UGL の触媒部位と反応生成物の構造を明らかにすることにより、本酵素が触媒する新規な反応機構を提唱した。すなわち、UGL は、グリコシド結合を水和するのではなく、先ず Asp-149 を一般酸/塩基触媒基として利用し、不飽和グルクロン酸の二重結合を水和することにより触媒反応を開始し、最終的にグリコシド結合を切断する。

4. YteR の触媒部位も  $\alpha_6/\alpha_6$ -バレル中央のポケットに存在することを明らかにし、Asp-143 が一般酸 / 塩基触媒基として機能することを示した。
5. UGL と YteR の基質認識機構を明らかにした。両酵素は、水素結合や疎水性相互作用により、サブサイト-1 で不飽和ウロン酸残基を特異的に認識する。

以上のように、本論文は、グリコシド結合の水和を介さない糖質加水分解酵素の新規な反応機構を初めて提唱したものであるとともに、ポストゲノミクスとしての構造プロテオミクスにより、機能不明タンパク質の機能を同定できることを実証したものである。この成果は、糖質加水分解酵素の分子生物学や構造生物学の研究領域だけに留まらず、動物や植物における細菌感染機構の理解や有効な治療法の確立に貢献し、応用糖質学、構造生物学、酵素化学、応用微生物学、および生物機能変換学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年10月19日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。