

氏 名	尹 恵 珍
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2300 号
学位授与の日付	平 成 12 年 3 月 23 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	Crystallographic Studies on Structure of Alginate Lyases of <i>Sphingomonas</i> Species A 1 (スフィンゴモナス属細菌由来アルギン酸リアーゼの X 線結晶構造解析)

論文調査委員 (主 査) 教 授 村 田 幸 作 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 内 海 成

論 文 内 容 の 要 旨

アルギン酸は、褐藻類および細菌によって生産される細胞壁粘質多糖であり、グルロン酸とマンヌロン酸の2種のウロン酸から構成されている。褐藻が産生するアルギン酸は、増粘剤、ゲル化剤として食品及び医薬品産業分野で多用されている。一方、細菌が産生するアルギン酸は褐藻由来とは異なり、マンヌロン酸の一部がアセチル化されている。生体に感染した緑膿菌は、アセチル化アルギン酸を主成分とする強固なバイオフィームを形成し、これが難治性細菌感染症の原因となっている。このため、緑膿菌産生アルギン酸を分解する酵素は、バイオフィーム感染症の治療薬として注目されている。アルギン酸リアーゼを多糖修飾酵素あるいはバイオフィーム破壊薬として応用するためには、本酵素の立体構造と触媒反応機構の解明が不可欠である。そこで、本研究では、土壌より分離されたアルギン酸分解菌 (*Sphingomonas* sp. A 1) が産生する3種のアルギン酸リアーゼ (A 1-I, A 1-II 及び A 1-III) の酵素学的特性と結晶学的性質を明らかにし、本酵素の構造機能相関を解明するため X 線結晶構造解析を行った。さらに、その結果に基づき、部位特異的変異法を用いて本酵素の触媒残基を同定した。なお、A 1-II と A 1-III は、A 1-I の翻訳後修飾により生じる。

第2章では、*Sphingomonas* sp. A 1 が産生する3種のアルギン酸リアーゼ (A 1-I, A 1-II, A 1-III) の大腸菌における大量発現系を構築するため、各アルギン酸リアーゼの遺伝子を PCR により増幅した後、T7 プロモーターの下流に挿入して大腸菌に導入し、各酵素を大腸菌内で大量発現させた。各リアーゼの生産レベルは、親株である *Sphingomonas* sp. A 1 のその10倍以上であった。各酵素を電気泳動的に均一になるまで精製し、その諸性質 (分子量、至適 pH、至適温度、化合物の影響、基質特異性) を検討した。その結果、大腸菌で発現した酵素は、*Sphingomonas* sp. A 1 由来の酵素と同等であることを明らかにしている。

第3章では、大腸菌より精製した3種類のアルギン酸リアーゼ A 1-I, A 1-II, A 1-III を蒸気拡散平衡法により結晶化し、結晶学的性質を検討している。A 1-I と A 1-II に関しては、得られた結晶が微小であるため、それぞれ SPring-8 の放射光を用いて回折データを測定している。A 1-I の結晶は単斜晶で、 $P2_1$ の空間群に属し、非対称単位中に2分子の酵素を含むと推定した。本結晶中の A 1-III 分子の位置は、本研究の結果から明らかになった A 1-III の構造 (第4章記載) をモデルとした分子置換法により決定している。A 1-II の結晶は正方晶で、 $P4_32_12$ ($P4_32_12$) の空間群に属し、結晶の密度の測定から非対称単位中に16分子の酵素を含むと推定した。一方、A 1-III の硫酸アンモニウム溶液から得られた結晶は、単斜晶の $C2$ の空間群に属し、 $1.71 \text{ \AA}$ 分解能までの回折データをマルチワイヤーディテクターにより測定している。また、ポリエチレングリコール溶液から得られた結晶は、単斜晶の $P2_1$ の空間群に属し、両結晶とも非対称単位中に1分子の酵素を含むと推定した。

第4章では、最も良質の結晶が得られたアルギン酸リアーゼ A 1-III の構造解析のため、初期位相を多重重原子同型置換法により $3.0 \text{ \AA}$ 分解能で決定し、モデルの精密化を $1.78 \text{ \AA}$ 分解能で行っている。最終モデルは、351個のアミノ酸残基と299個の水分子及び2個の硫酸イオンを含み、 $1.78 \text{ \AA}$ 分解能までの回折データに対する R-値は18%であった。本酵素は、12本

の α -ヘリックスとループから成り、11本のヘリックスが新規の超二次構造である α_6/α_5 バレル構造を形成し、その中にトンネル様のクレフトを配置していた。このクレフト周辺には、他起源のマンヌロン酸特異的アルギン酸リアーゼと一次構造上相同性の高いアミノ酸残基が存在している。このクレフトでの基質複合体のモデルを予想した結果、His 192が触媒残基であることを示唆している。

第5章では、アルギン酸リアーゼ A 1-III の活性中心の同定を行っている。His 192 を Ala に置換した変異体 (H 192 A) を作製し、その酵素学的性質を調べた。H 192 A は、野生型と同様の CD スペクトルを示し、変異による大きな構造変化は認められなかった。基質飽和測定の結果、H 192 A の V_{max} は野生型の三万分の一に、 K_m は十分の一に減少していた。さらに、A 1-III をヒスチジンの修飾試薬で処理すると、野生型は失活するが H 192 A では失活が起こらないことを明らかにした。これらの結果は、His 192 が本酵素の触媒残基であることを強く支持している。

論文審査の結果の要旨

細菌酵素アルギン酸リアーゼを多糖修飾酵素あるいは緑膿菌バイオフィーム感染症の治療薬として用いるためには、本酵素の構造と機能に関する基礎的知見が不可欠である。本研究は、アルギン酸リアーゼの構造と機能の相関を解明することを目的として、① *Sphingomonas* sp. A 1 が合成する3種類のアルギン酸リアーゼ (A 1-I, A 1-II 及び A 1-III) の大腸菌における大量発現系と精製法の確立、② 3種類のアルギン酸リアーゼの結晶化と予備的 X 線結晶構造解析、③ A 1-III の高分解能 X 線結晶構造解析による三次構造の決定、並びに④部位特異的変異による変異体の作成による A 1-III の触媒残基の同定について検討したものであり、評価すべき点は次のとおりである。

1. 体腔形成細菌 *Sphingomonas* sp. A 1 が合成する3種類のアルギン酸リアーゼ (A 1-I, A 1-II 及び A 1-III) の大腸菌における大量発現系と精製法を確立し、本酵素をタンパク質工学的に取り扱う基礎を確立した。

2. 3種類のアルギン酸リアーゼ (A 1-I, A 1-II 及び A 1-III) の結晶化に成功し、それぞれ予備的 X 線結晶構造解析により結晶学的データを決定した。A 1-I については、分子置換法により A 1-II と A 1-III の部分から構成されることを明らかにした。

3. A 1-III の結晶について 1.78 Å 分解能で X 線結晶構造解析を行い、アルギン酸リアーゼの立体構造を初めて明らかにした。その結果、本酵素が今までに報告されていない新規の超二次構造である α_6/α_5 バレル構造を有し、その C 末端側にトンネル様の活性部位クレフトが配置されていることを見出した。また、基質であるマンヌロン酸の活性部位での結合部位を推定し、本酵素の His 192 が触媒残基である可能性を示した。

4. 部位特異的変異法を用いて A 1-III の His 192 を Ala に置換した変異体を作成し、その酵素的性質を検討した結果、立体構造は保持されているが、活性が野生型の 3 万分の 1 に低下していること、また、変異体の His 残基の化学修飾によってそれ以上の残存活性の低下が認められないことから、His 192 が本酵素の触媒残基であることを明確に示した。

以上のように、本論文は、アルギン酸リアーゼの立体構造を X 線結晶構造解析により初めて決定し、さらに本酵素の触媒残基を同定することによって本酵素の構造と機能の相関について多くの新知見を明らかにしたものであり、酵素化学、構造生物学、微生物生産学、食糧設計利用学などの発展に寄与するところが多い。

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 12 年 2 月 15 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。