

氏 名	み やけ おさむ 三 宅 統
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1450 号
学位授与の日付	平 成 16 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies on Molecular Diversity, Evolutional Process, and X-ray Crystal Structure of Bacterial Alginate Lyases (細菌アルギン酸リアーゼの分子多様性, 進化, および X 線結晶構造に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 村 田 幸 作 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 井 上 國 世

論 文 内 容 の 要 旨

アルギン酸はマンヌロン酸(M)とグルロン(G)から成るヘテロ多糖であり, ある種の褐藻や細菌によって生産される。アルギン酸分子には, ポリマンヌロン酸 (polyM), ポリグルロン酸 (polyG), およびヘテロポリマー (polyMG) 領域が存在する。アルギン酸リアーゼは, β -脱離反応によりアルギン酸分子中のグリコシド結合を切断し, 非還元末端に二重結合を持つ不飽和オリゴ糖を生成する。これらのオリゴ糖は, 植物組織や腸内細菌に対するエリシター活性など多彩な生理機能を発現する。一方, 難治性感染症を誘発する緑膿菌は, アルギン酸を主成分とする抗生物質抵抗性のバイオフィルムを形成するため, アルギン酸リアーゼをバイオフィルム感染症の治療に応用することが提案されている。かかる観点から, 様々な生物のアルギン酸リアーゼが単離され, その酵素学的・遺伝学的性質が明らかにされてきた。現在, アルギン酸リアーゼはその一次構造に基づいて, 多糖リアーゼファミリー PL-5, PL-7, および PL-14 に分類されている。しかし, アルギン酸リアーゼを含めた多糖リアーゼの多様性や進化, 並びに高次構造に関する研究は遅れている。

本研究では, 細菌におけるアルギン酸リアーゼの多様性, 進化, および高次構造の解明を目的として, 特に, *Sphingomonas* 属細菌 A1) 株 (以下 A1 株) におけるアルギン酸代謝経路の確定とそれに関わる分子の同定, A1 株ゲノム配列を用いたアルギン酸リアーゼの多様性の解析と進化モデルの構築, およびファミリー PL-7 アルギン酸リアーゼの X 線結晶構造解析を行った。

第 1 章では, A1 株におけるアルギン酸代謝経路の詳細を明らかにした。A1 株は, 細胞表層に形成する「孔 (体腔)」および細胞膜に発現する「ABC トランスポーター」から成る『超チャネル』を介して, アルギン酸を高分子のまま細胞質に取り込み, 細胞質局在性の 3 種類のエンド型アルギン酸リアーゼ (A1-I, A1-II, A1-III) により, アルギン酸を不飽和二糖から四糖にまで低分子化する。これら不飽和オリゴ糖に作用する新規な酵素 (A1-IV) を A1 株に見出した。A1-IV は, 細胞質に局在する 86kDa の単量体酵素であり, 種々の MG 組成の不飽和オリゴ糖のみならず高分子アルギン酸にもエキソ型で作用し, β -脱離反応により不飽和単糖を遊離する。単糖は非酵素的に α -ケト酸に変換するため, A1 株はアルギン酸を最終的に α -ケト酸代謝系で資化することが明らかになった。また, A1-IV 遺伝子は, 3 種類のエンド型アルギン酸リアーゼおよびアルギン酸取り込み ABC トランスポーター遺伝子の下流に位置していることから, アルギン酸の取り込みと完全分解に関わる遺伝子が, 一つのクラスターを形成していることも明らかにした。

第 2 章では, A1 株の全ゲノム配列に基づいてアルギン酸リアーゼの多様性を明らかにし, 本酵素の細菌における進化モデルを提唱した。細菌のアルギン酸リアーゼは, ファミリー PL-5 と PL-7 に大別される。A1 株の A1-I, A1-II, および A1-III は, 1 遺伝子から翻訳合成され, A1-I の自己触媒的プロセッシングにより生じる A1-III と A1-II は, 各々ファミリー PL-5 と PL-7 に属している。A1-II 遺伝子に相同な A1-II' 遺伝子を A1 株ゲノムに見出し, A1-II' の酵素学的・遺伝学的解析により, A1-II' 遺伝子が, A1-I 遺伝子から A1-II と A1-III 遺伝子に分離・切断・修飾を受けて, A1 株ゲノムに転座することによって誕生した可能性を示した。これに基づき, A1-I がファミリー PL-5 と PL-7 リアーゼの原

始酵素であることを提唱した。同様の進化プロセスが、A1-IVにも認められた。A1-IVと相同なA1-IV'がエンド型アルギン酸リアーゼ活性を示したため、A1-IVとA1-IV'を始めとする新たな多糖リアーゼファミリー(PL-15)を創成した。

第3章では、ファミリーPL-7に分類されている緑膿菌由来機能不明タンパク質(PA1167)のX線結晶構造を決定した。PA1167は、アルギン酸のpolyMG領域にエンド型で作用し、 β -脱離反応を触媒する新規なアルギン酸リアーゼであることを明らかにした。2.0ÅまでのX線回折データを用いて $R=18.7\%$ まで精密化したPA1167の構造モデルは、444個のアミノ酸残基(222/分子)および298個の水分子(149/分子)を含んでいた。PA1167は、8本のストランド[シートA(A1-8)], 7本のストランド[シートB(B1-7)], および3本のヘリックスから成る β サンドイッチ構造を示し、シートが片側に湾曲したグロブのような構造を形成していた。この構造は、他の多糖リアーゼファミリーの基本構造(平行 β -ヘリックス, α/α -バレル, α/α -バレル+逆平行 β -シート)とは異なり、新規なフォールディングであることが分かった。PA1167の分子表面における保存残基は、シートA(SA3,4,5)に集中していた。ファミリーPL-7で提唱されていた2ヶ所のモチーフ配列は、SA3とSA4にそれぞれ位置しており、SA5上のアミノ酸残基は、新たに見出された触媒作用に重要な配列であることが示唆された。ファミリーPL-5のA1-IIIにおいてHisとTyrが活性残基として機能することが明らかになっているため、分子表面に保存されているHis104, Tyr193, およびTyr199の3残基が、ファミリーPL-7酵素においても重要な役割を担っていると想定された。

論文審査の結果の要旨

アルギン酸は、マンヌロン酸(M)とグルロン(G)から成るヘテロ多糖であり、ある種の褐藻や細菌によって生産される。アルギン酸分子には、ポリマンヌロン酸(polyM), ポリグルロン酸(polyG), およびヘテロポリマー(polyMG)領域が存在する。アルギン酸リアーゼは、 β -脱離反応によりアルギン酸分子中のグリコシド結合を切断し、非還元末端に二重結合を持つ不飽和オリゴ糖を生成する。本酵素は、多彩な生理機能を示すアルギン酸オリゴ糖の分子設計やアルギン酸バイオフィルム細菌感染症の治療に重要である。そのため、様々な生物から単離され、その酵素学的・遺伝学的性質が明らかにされている。しかし、アルギン酸リアーゼを含めた多糖リアーゼの多様性や進化、並びに高次構造に関する研究は遅れている。

本研究は、細菌におけるアルギン酸リアーゼの多様性、進化、および高次構造の解明を目的として、アルギン酸リアーゼ(A1-I, A1-II, A1-III)生産菌である*Sphingomonas*属細菌A1株におけるアルギン酸代謝経路の確定とそれに関わる分子の同定、A1株ゲノム配列を用いたアルギン酸リアーゼの多様性の解析と進化モデルの構築、およびアルギン酸リアーゼ(多糖リアーゼファミリーPL-7)のX線結晶構造解析を行ったものである。評価すべき点は、以下の通りである。

1. A1株の細胞質にアルギン酸代謝の最終段階に作用する酵素(A1-IV)を見出し、A1株におけるアルギン酸代謝経路とそれに関わる分子を確定した。
2. A1-IVの酵素学的性状、遺伝子構造、および大量発現法を明らかにし、A1-IVが、MG比並びに分子量非依存的に、アルギン酸をエキソ型 β -脱離反応によって単糖にまで分解する新規酵素であることを明らかにした。
3. A1株におけるアルギン酸リアーゼの多様性をゲノムレベルで解析し、アルギン酸代謝に重要なA1-I, A1-II, A1-IIIとA1-IV遺伝子の他に、A1-IIとA1-IVに各々相同なA1-II'とA1-IV'をコードする遺伝子が、A1株ゲノムに存在することを見出した。
4. アルギン酸リアーゼの進化に関して、A1-II'遺伝子が、A1-I遺伝子からA1-IIとA1-III遺伝子に分離・切断・修飾を受けて、A1株ゲノムに転座することによって誕生した可能性を示した。また、A1-IVとA1-IV'を始めとする新たな多糖リアーゼファミリー(PL-15)を創成した。
5. ファミリーPL-7に属する緑膿菌由来機能不明タンパク質PA1167が、polyMGを良好な基質とする新規なアルギン酸リアーゼであることを明らかにした。
6. PA1167のX線結晶構造を決定し、本酵素が他の多糖リアーゼには見られない新規なフォールディング(グロブ様の β サンドイッチ構造)を有することを明らかにした。また、ファミリーPL-7に共通する触媒反応に重要と考えられる新たなモチーフ配列も明らかにした。

以上の様に、本論文は、細菌由来アルギン酸リアーゼの酵素学的・遺伝学的特性を明らかにすることによって、本酵素の

起源と分子進化、並びに多様性に関して新たな知見を加えるとともに、細菌多糖の分子設計やバイオフィーム細菌感染症の治療に有用な多くの酵素を提供した。また、新規なフォールディング(β サンドイッチ)を持つアルギン酸リアーゼの存在を証明し、高次構造に基づく多糖リアーゼの分類法の確立に新たな視点を導入した。これらの結果は、糖質化学、タンパク質工学、構造生物学、および進化生物学の進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16年10月18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。