

氏 名	み しま ゆ み こ 三 島 由 美 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1343 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 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	X-ray Crystallographic Studies on Structure and Function of Alginate-binding Proteins in <i>Sphingomonas</i> Species A1 (<i>Sphingomonas</i> 属細菌 A1 株におけるアルギン酸結合タンパク質の構造と機能に関する X 線結晶構造学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 村 田 幸 作 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 井 上 國 世

論 文 内 容 の 要 旨

物質・エネルギー・情報の選択的輸送は細胞膜の重要な機能であり、トランスポーター（ポンプ）、チャネル、あるいはレセプターなど細胞膜に配位された分子機械がその役割を担っている。その中、ABC トランスポーターは、ATP 加水分解エネルギーを利用した能動輸送システムであり、グラム陰性細菌においては、ペリプラズム局在性の基質結合タンパク質と共役して様々な物質、特に低分子物質の輸送（排出と取り込み）を行う。1 分子イメージングのようなナノバイオロジーやコンピューターサイエンスにより、ABC トランスポーターとグラム陰性細菌の基質結合タンパク質の構造・機能相関解析が進展している。しかし、タンパク質の精密な立体構造に立脚した基質結合と膜輸送の分子機序、及び輸送装置全体の解明には至っていない。

アルギン酸資化性細菌として土壌より分離された *Sphingomonas* 属細菌（A1 株）は、微生物学の歴史の中で初めて見出された体腔形成細菌であり、エネルギー源としてアルギン酸やペクチンのようなウロン酸含有多糖を特異的に利用する。その場合、高分子基質であるアルギン酸は、細胞表層に形成された「体腔」に濃縮された後、「基質（アルギン酸）結合タンパク質」とそれに連動した「ABC トランスポーター」を介して、直接、細胞質に輸送される。従って、細菌 A1 株におけるアルギン酸輸送システムは、「基質結合タンパク質」と「ABC トランスポーター」の構造・機能相関、並びに高分子輸送システムの制御機構の解析に有用な実験系である。

本論文は、細菌 A1 株におけるアルギン酸輸送システムを、特にアルギン酸結合タンパク質の構造と機能に重心をおいて解析し、本結合タンパク質のアルギン酸結合様式と動的な高次構造（ドメインの開閉機構）、並びに ABC トランスポーター制御の詳細を明らかにしたものである。これにより、タンパク質の分子運動と機能の相関、並びに高分子物質を外・内膜を横切って直接細胞質に輸送する高次バイオシステムと細胞外分解酵素に依存しない高分子資化機構の存在の証明など、多くの新知見を与えた。

第 1 章では、細菌 A1 株におけるアルギン酸輸送（取り込み）関連遺伝子群を特定し、細胞表層に形成される体腔、ペリプラズム局在性のアルギン酸結合タンパク質 [AlgQ1 (60kDa), AlgQ2 (60kDa)], 及び細胞内膜の ABC トランスポーター (AlgM1: AlgM2/AlgS- AlgS) から成るアルギン酸輸送システムのタンパク質科学的・遺伝学的全容を確定した。また、ABC トランスポーターの ATPase ドメインと予測される AlgS (40kDa) の遺伝子破壊株が、高分子アルギン酸資化能、並びに細胞表層での体腔形成能を欠落することを見出した。Western blot 法と免疫染色法により、AlgS が細菌 A1 株の細胞内膜において膜タンパク質 [透過酵素: AlgM1 (37kDa), AlgM2 (33kDa)] と複合体を形成していることも明らかにした。これらの結果より、「体腔」と「ABC トランスポーター」はアルギン酸輸送において密接な関係にあり、体腔形成が ABC トランスポーターによって制御されている可能性を示した。

第 2 章では、アルギン酸結合タンパク質 (AlgQ1, AlgQ2) の機能解析を行い、両タンパク質がアルギン酸以外に、ゲランやペクチンなどのウロン酸含有多糖も認識・結合することを示した。また、ABC トランスポーター (AlgM1: AlgM2

/AlgS-AlgS) の ATPase 活性は, AlgQ1 (又は, AlgQ2) とウロン酸含有多糖存在下においてのみ賦活されることを明らかにした。これらの結果より, ABC トランスポーターは, 高分子基質を結合した状態 (ホロ型) の AlgQ1, AlgQ2 によってその活性が制御されていること, つまり, タンパク質間相互作用によるシグナル伝達機構の存在を明らかにした。

第3章では, AlgS の ATPase としての機能, 並びに結晶学的性質を明らかにした。AlgS は ATPase 活性を有し, ATP に対する K_m 値 0.11mM, 至適 pH8.5, 至適温度 42°C であり, その活性発現には, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} などの 2 価金属イオンを要求する。AlgS の結晶は, 溶媒含量を 50% と仮定した場合, 非対称単位当り 2 分子の AlgS を含むと推定され, ホモロジーモデリングによる構造予測から, L 字型の AlgS が向かい合わせに会合した二量体構造をとることが示唆された。また, AlgS には, ATP の結合と分解に必要な Walker モチーフ, 並びに透過酵素 (AlgM1, AlgM2) との結合部位と予測されている ABC signature 領域が保存されていた。これらの結果より, AlgS は, アルギン酸の輸送 (取り込み) エネルギーを産生するエンジンタンパク質であることを確認した。

第4章では, アルギン酸結合タンパク質 (AlgQ1, AlgQ2) のアポ型及びホロ型の X 線結晶構造を決定し, 本タンパク質の立体構造を解析した。その結果, 両結合タンパク質は, N ドメインと C ドメインの 2 つのドメインから構成され, ドメイン間に存在する巨大クレフト (クレフトの表面積は, 低分子量基質結合タンパク質のその約 2 倍) に基質を結合することを示した。クレフト周辺には塩基性アミノ酸残基の集中が認められ, AlgQ1, AlgQ2 は, 酸性多糖の結合に適した構造を有していることが示された。また, AlgQ1, AlgQ2 は, C ドメイン内に 1 個のカルシウムイオンを結合していたが, 結合クレフトとは離れた部位に存在することから, 構造の安定化に寄与していると推定された。AlgQ1, AlgQ2 は, 非常によく似た立体構造を有していたが, アポ型 AlgQ1 はアポ型 AlgQ2 に比べ, ドメインの開閉度が大きく (約 7°), 両者での微妙な構造的差が認められた。また, 基質結合に伴う構造変化 (ドメインの開閉: AlgQ1 の場合, 37°; AlgQ2 の場合, 30°) には, 水 1 分子の出入が関与していることを示した。基質結合部位の微細構造を解析することにより, 本タンパク質がアルギン酸の非還元末端糖 1 残基を強く結合し, 輸送することも明らかにした。

論文審査の結果の要旨

細胞膜は, 細胞とこれを取りまく環境とのインターフェイスとして, 物質・エネルギー・情報の選択的輸送に重要な機能を有し, トランスポーター (ポンプ), チャネル, あるいはレセプターなど細胞膜に配位されている分子機械がその役割を担っている。その中, ABC トランスポーターは, ATP 加水分解エネルギーを利用した能動輸送システムであり, グラム陰性細菌においては, ペリプラズム局在性の基質結合タンパク質と共役して様々な物質, 特に低分子物質の輸送 (排出と取り込み) を行う。現在, 単糖, アミノ酸, ビタミンなどの低分子物質を対象とした基質結合タンパク質と ABC トランスポーターの構造・機能相関解析が進展しているが, タンパク質の精密高次構造に基づいた基質結合と膜輸送の分子機序, 及び輸送装置全体の解明には至っていない。

本論文は, 微生物学の歴史の中で初めて見出された体腔形成細菌である *Sphingomonas* 属細菌 (A1 株) のアルギン酸輸送システムを対象に, 基質 (アルギン酸) 結合タンパク質の構造と機能の相関に重点を置いて, 高分子輸送装置の全体像, 並びに, 基質結合タンパク質と共役した ABC トランスポーターの制御機構を検討したものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. *Sphingomonas* 属細菌 A1 株におけるアルギン酸輸送 (取り込み) 遺伝子群を特定し, アルギン酸輸送システムの全体像を確定した。これにより, 細胞外の高分子物質を直接細胞質に輸送する分子装置, 及び細胞外分解酵素に依存しない微生物の新規高分子資化機構の存在を明らかにした。
2. アルギン酸結合タンパク質 (AlgQ1, AlgQ2) の基質 (高分子酸性多糖) 結合特性を明らかにした。
3. アルギン酸結合タンパク質 (AlgQ1, AlgQ2) のアポ型及びホロ型の X 線結晶構造を決定した。両タンパク質は 2 つのドメインから構成され, ドメインの開閉 (AlgQ1 の場合, 37°; AlgQ2 の場合, 30°) によって生じる巨大クレフトに基質を結合することを明らかにした。
4. アルギン酸結合タンパク質 (AlgQ1, AlgQ2) の基質結合に伴う構造変化 (ドメインの開閉) には, 水 1 分子の出入が関与していることを明らかにした。

5. アルギン酸結合タンパク質 (AlgQ1, AlgQ2) の基質結合部位の微細構造を明らかにした。また、アルギン酸の結合に関与するアミノ酸残基を同定し、非還元末端糖 1 残基が特異的に強く認識されることを明らかにした。
6. エンジンタンパク質 (AlgS) の酵素学的性状と結晶学的特性を明らかにした。
7. ABC トランスポーター (AlgM1:AlgM2/AlgS-AlgS) と基質結合タンパク質 (AlgQ1, AlgQ2) 間の相互作用を介したシグナル伝達機構の存在を明らかにした。

以上のように、本論文は、*Sphingomonas* 属細菌における基質結合タンパク質の基質 (高分子多糖) 結合様式とドメイン開閉を伴う動的な高次構造の詳細、並びに体腔、基質結合タンパク質、及び ABC トランスポーターから成る高分子輸送システムの分子機序とその制御機構を明らかにすることによって、タンパク質の分子運動と機能の相関、微生物における細胞表面構造と高分子輸送のダイナミクス、及び高分子物質の資化機構に関して新規な知見を加えたものであり、細胞形態学、細胞表面工学、タンパク質構造生物学、生体エネルギー変換学、微生物代謝学などの学術分野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15年2月17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。