

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 27 年度博士課程入学

氏名 阿部 紘一

指導教員名 伏信 進矢

### 論文題目 $\beta$ -1,2-グルカンの代謝に関わるタンパク質の構造生物学的研究

$\beta$ -1,2-グルカンは、グルコースが  $\beta$ -1,2-結合で繋がった多糖であり、自然界では環状構造のものが多く報告されている。この多糖は、一部のグラム陰性菌がペリプラズム空間もしくは細胞外に分泌することで主に知られる。これまでに、 $\beta$ -1,2-グルカンやその関連酵素の研究は進められてきたが、希少であるためにデンプン ( $\alpha$ -1,4/1,6-グルカン) やセルロース ( $\beta$ -1,4-グルカン) などに関する研究と比べると、依然として少ないのが現状である。特に、 $\beta$ -1,2-グルカンの代謝に関わるタンパク質の研究例は数える程しかなかった。

しかし、2013 年に東京理科大学の中島将博 講師のグループは、グラム陽性菌 *Listeria innocua* から  $\beta$ -1,2-グルカンを合成できる酵素、1,2- $\beta$ -オリゴグルカンホスホリラーゼ (SOGP) を発見した (1)。SOGP は  $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖 ( $Sop_n$ ,  $n$  は重合度) を、無機リン酸を使って分解し、 $Sop_{n-1}$  と  $\alpha$ -グルコース 1-リン酸を生成する反応、およびその逆反応 (合成反応) を触媒するが、グルコースと  $\alpha$ -グルコース 1-リン酸存在下で逆反応を行わせると、反応初期に直鎖状  $\beta$ -1,2-グルカンを合成する。私はこの点に着目し、SOGP を用いた直鎖状  $\beta$ -1,2-グルカンの大量調製を行った (2)。これにより  $\beta$ -1,2-グルカンの代謝に関わるタンパク質の構造と機能を調べるための材料を得ることができた。そこで、本研究では 2 つの  $\beta$ -1,2-グルカンの代謝に関わるタンパク質、エンド- $\beta$ -1,2-グルカナーゼと  $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖結合タンパク質の構造と機能の解明を試みた。

#### 第一章 細菌由来エンド- $\beta$ -1,2-グルカナーゼの構造機能解析

エンド- $\beta$ -1,2-グルカナーゼ活性は、いくつかの糸状菌と *Chitinophaga* 属細菌で見出されており、精製はされていたが、単離同定例はなかった。私は大量調製した直鎖状  $\beta$ -1,2-グルカンを用い、グラム陰性菌 *Chitinophaga pinensis* からエンド- $\beta$ -1,2-グルカナーゼ (Cpin\_6279) を単離同定し、その諸性質を明らかにした。本章では、X 線結晶構造解析と生化学的解析を用いて、Cpin\_6279 の構造と機能を明らかにすることを目指した。

X 線結晶構造解析により Cpin\_6279 のリガンドフリー状態の構造、および反応生成物である  $Sop_3$  との複合体構造をそれぞれ分解能 1.8 Å、1.7 Å で決定することに成功した (Fig. 1A)。

Cpin\_6279 の全体構造は  $(\alpha/\alpha)_6$ -barrel であり、表面モデルで描写するとエンド型酵素でよく見られるクレフト構造をとっていることがわかった。複合体構造ではクレフトの中心に Sop<sub>3</sub> とグルコースが結合している。Cpin\_6279 の全体構造は、構造ゲノミクスによって決定された 3 つの Cpin\_6279 ホモログとよく似ているが、これらのタンパク質は推定グルコアミラーゼとアノテーションされ、生化学的な解析は全く行われていない。よって、生化学的なデータと本研究で決定した Sop<sub>3</sub>-グルコース複合体構造により、これらのホモログはエンド- $\beta$ -1,2-グルカナーゼであることが示唆された。そして、新しい糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー144 が創設された (3)。

Cpin\_6279 と Sop<sub>5</sub> との複合体構造をドッキングシミュレーションにより推測したところ、結晶構造中のグルコースは-3 サブサイト、Sop<sub>3</sub> は+1 から+3 サブサイトに結合していることが示唆された (Fig. 1B)。リガンド結合部位の周辺には保存性の高い 6 つの酸性残基が存在する。一般的に GH は 2 つの酸性アミノ酸残基 (Asp or Glu) を触媒残基として用いるため、これら 6 つのアミノ酸のうち 2 つが触媒残基と推測された。また、ドッキング構造中で、切断されるグリコシド結合の C1 原子に求核攻撃できる位置に水分子が観察されたが、この水分子は酸性残基ではなく Tyr 残基と水素結合している。そこで、これらの残基の変異解析を行ったところ、2 つの Tyr 残基に関しては大幅な活性の低下は見られなかったが、6 つのうち 3 つの酸性残基に関しては顕著な活性の低下が見られ、触媒に重要であることが示された。しかし、これらの残基は切断されるグリコシド結合の O 原子に直接プロトンを付与できる位置になく、求核攻撃すると思われる水分子とも水素結合を形成していない。Cpin\_6279 と構造類似性が見られた GH の構造を比較し、触媒残基の推測を試みたが、推測は困難であった。これらのことから、Cpin\_6279 の反応機構は一般的な GH とは異なることが示唆された。

詳細な基質認識機構を調べるために、ESI-MS 分析を行ったところ、Cpin\_6279 は Sop<sub>7</sub> を主に -4 から+3 サブサイトで結合することが示された。また、-2 から+5 サブサイトでは Sop<sub>7</sub> と結合できないことも示され、-3 サブサイトが基質の結合に必須であることが示唆された。ドッキング解析で-3 サブサイトに結合すると推測されたグルコース分子は Cpin\_6279 と多くの相互作用を形成していることから、この位置が-3 サブサイトであることが示唆された。

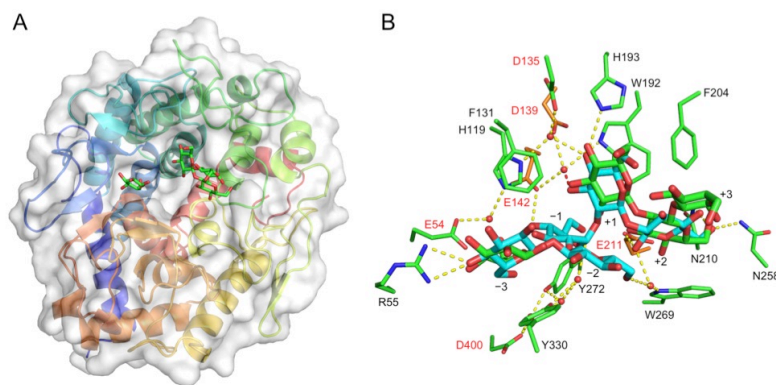


Fig. 1. Cpin\_6279 の立体構造

- (A) 全体構造。
- (B) 活性部位の構造。結晶構造とドッキングで得られた構造を重ね合わせている。

## 第二章 $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖結合タンパク質の構造・熱力学的解析

SOGP (Lin1839) 遺伝子周辺には、 $\beta$ -グルコシダーゼ (Lin1840)、推定 ABC トランスポーターの構成成分 (Lin1841-1843)、推定 LacI 転写制御因子 (Lin1838) がコードされている。SOGP と Lin1840 はどちらも菌体内酵素であり、SOGP は上記で述べたように無機リン酸を使って  $Sop_n$  を分解するのに対し、Lin1840 は  $Sop_2$  を好んで加水分解する (4)。ABC トランスポーターの構成成分のうち、Lin1841 は溶質 (基質) 結合タンパク質 (SBP) であり、 $\beta$ -1,2-グルカンもしくは  $Sop_n$  の取り込みに重要と思われる。しかし、その構造と機能は不明である。そこで Lin1841 に着目し、その結合メカニズムと構造基盤を明らかにするために、熱力学的な解析と構造解析を行った。

ITC により様々な糖リガンドとの結合を調べたところ、Lin1841 は 3 糖以上の  $Sop_n$  に特異的に結合したことから、Lin1841 を  $Sop_n$ -binding protein (SO-BP) と名付けた。結合定数 ( $K_a$ ) は  $10^{4-6} M^{-1}$  であり、結合メカニズムは他の多くの糖質結合タンパク質と同じくエンタルピー駆動型であった。結合の定圧モル熱容量 ( $\Delta C_p$ ) を算出したところ、SO-BP の結合において、糖リガンドと芳香族アミノ酸側鎖との間で 2 つから 3 つのスタッキング相互作用が形成されることが推測された。

X 線結晶構造解析により、SO-BP のリガンドフリー状態、および  $Sop_{3-5}$  との複合体構造を分解能 2.2–1.6 Å で決定することに成功した (Fig. 2A)。SO-BP の全体構造は他の SBP と同様に 2 つの球状ドメインとそれを繋ぐヒンジ領域から構成される。SO-BP はリガンドフリー状態では 2 つのドメインが離れた open 構造を取っているのに対し、 $Sop_{3-5}$  との複合体構造では 2 つのドメインが近接した closed 構造をとっている。リガンドフリー状態の SO-BP が溶液中で他にどのようなコンフォメーションをとるのかを分子動力学 (MD) シミュレーションにより調べたところ、SO-BP は溶液中でより開いた構造をとり得ることが示唆された。結合サイトにおいて、 $Sop_{3-5}$  は 2 つのドメインに挟まれるかたちで結合し、SO-BP の表面構造と相補的なジグザグなコンフォメーションをとっている。結合した各オリゴ糖と SO-BP との相互作用を調べたところ、水を介した極性結合が多数形成されており、SO-BP の結合がエンタルピー駆動型であることと対応していた (Fig. 2B)。また、 $Sop_{3-5}$  は、いずれも 2 つの Trp 残基の側鎖とスタッキング相互作用を形成しており、上記の  $\Delta C_p$  のデータと良い相関を示した。さらに、MD シミュレーションに基づく自由エネルギー計算を行ったところ、 $Sop_3$  の 3 つ目のグルコース残基の相互作用が結合に重要であることが明らかとなった。

系統学的な解析から、SO-BP ホモログは Firmicutes、Proteobacteria、Actinobacteria に主に分布していることが明らかとなった。SO-BP-ABC トランスポーターホモログ遺伝子の周辺には GH144 に属する酵素、その他の GH 酵素、トランスポーターなどがコードされており、これらが協調して  $\beta$ -1,2-グルカンもしくは  $Sop_n$  の分解、取り込みに関与することが示唆された。

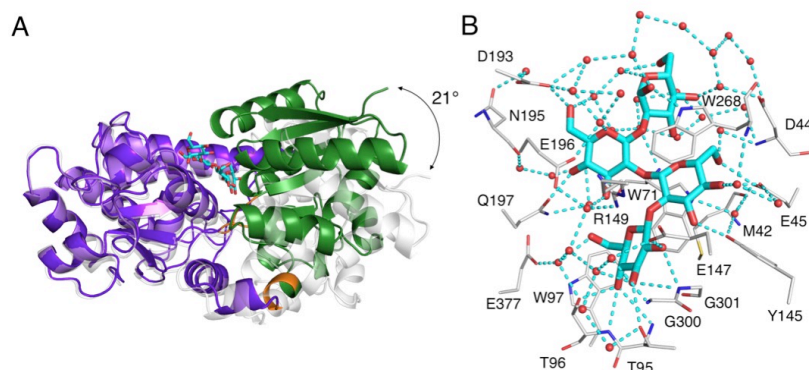


Fig. 2. SO-BP の結晶構造

(A) リガンド結合に伴う構造変化の様子

(B) リガンド結合部位の構造。

### 総合考察

以上のように 2 つの  $\beta$ -1,2-グルカンの代謝に関わる酵素、タンパク質の詳細な機能と構造を解明することに成功した。Cpin\_6279 と SO-BP の立体構造は、どちらもデンプンなどの  $\alpha$ -結合の糖に作用する酵素、タンパク質と類似性があることから、これらのタンパク質はアミラーゼやその関連タンパク質を起源として進化してきたのかもしれない。本研究は、新たな  $\beta$ -1,2-グルカン代謝タンパク質の発見やそれらのより良い理解につながるであろう。

Sop<sub>n</sub> は  $\beta$ -1,2-グルカン以上に希少であるが、Cpin\_6279 が同定されたことにより大量調製した  $\beta$ -1,2-グルカンから容易に調製できるようになった。本研究で決定した Cpin\_6279 の構造は今後 Sop<sub>n</sub> を調製する上で重要な情報となるであろう。また、SBP はバイオセンサーとして応用できるとの報告例もあることから、SO-BP は希少な Sop<sub>n</sub> を検出するバイオセンサーとして役に立つかもしれない。

### 参考文献

1. Nakajima, M., Toyozumi, H., Abe, K., Nakai, H., Taguchi, H., and Kitaoka, M. (2014) 1,2- $\beta$ -Oligoglucan phosphorylase from *Listeria innocua*. *PLoS One*. **9**, e92353
2. Abe, K., Nakajima, M., Kitaoka, M., Toyozumi, H., Takahashi, Y., Sugimoto, N., Nakai, H., and Taguchi, H. (2015) Large-scale preparation of 1,2- $\beta$ -glucan using 1,2- $\beta$ -oligoglucan phosphorylase. *J. Appl. Glycosci.* **62**, 47–52
3. Abe, K., Nakajima, M., Yamashita, T., Matsunaga, H., Kamisuki, S., Nihira, T., Takahashi, Y., Sugimoto, N., Miyanaga, A., Nakai, H., Arakawa, T., Fushinobu, S., and Taguchi, H. (2017) Biochemical and structural analyses of a bacterial *endo*- $\beta$ -1,2-glucanase reveal a new glycoside hydrolase family. *J. Biol. Chem.* **292**, 7487–7506
4. Nakajima, M., Yoshida, R., Miyanaga, A., Abe, K., Takahashi, Y., Sugimoto, N., Toyozumi, H., Nakai, H., Kitaoka, M., and Taguchi, H. (2016) Functional and structural analysis of a  $\beta$ -glucosidase involved in  $\beta$ -1,2-glucan metabolism in *Listeria innocua*. *PLoS One*. **11**, e0148870