博士論文　(要約)

Arthrobacter 属細菌の環状 α-1,6-マルトシルマルトース代謝経路に関わる酵素・タンパク質の構造解析

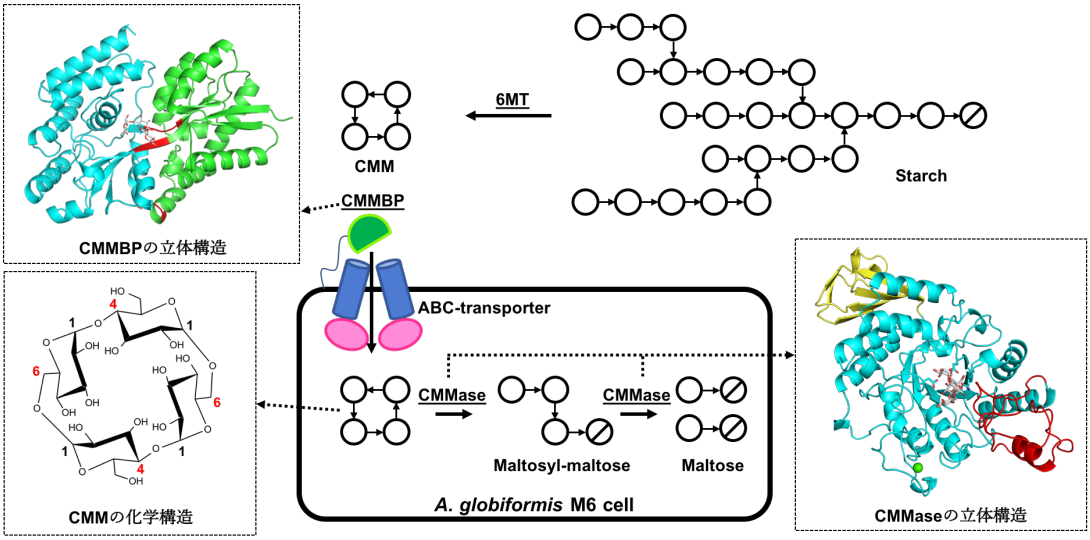
河野　正樹

本博士論文の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

酵素技術の発展や健康志向の高まりから、各種オリゴ糖などの機能性糖質が注目されている。しかし、一般的な糖質は還元力を有するため、アミノ酸やタンパク質などのアミノ基共存下でアミノカルボニル反応を引き起こし、品質劣化をもたらす場合がある。この様な問題を改善するため、非還元性オリゴ糖としてグルコースの還元末端同士が結合したトレハロースや 6~8 個のグルコース (DP6~8) から構成されるマルトオリゴ糖が環状に結合したサイクロデキストリンが開発されている。加えて両オリゴ糖は、様々な機能性を示すことから、食品・化粧品・医療品など多くの分野で使用されている。特に環状オリゴ糖は、近年においても様々な種類が発見され、それぞれの特性による多分野への応用が期待されている。

2005 年に、*Arthrobacter globiformis* M6 の培養上清を澱粉に作用させることによって、2 分子のマルトースが α-1,6 結合で環状化し、α-1,4、1,6 結合が交互に存在する新規環状四糖、環状 α-1,6-マルトシルマルトース (Cyclic α-Maltosyl-(1→6)-Maltose: CMM) が得られている。この CMM に関連する酵素として、培養上清中に CMM を生成する 6-α-maltosyltransferase (6MT)、無細胞抽出液中に CMM を分解する CMM hydrolase (CMMase) の存在が示されており、その酵素学的特徴についても明らかとなっている。6MT は DP3 以上のマルトオリゴ糖に作用し、分子間および分子内の 2 段階の α-1,6 転移反応の触媒によって CMM を生成する。一方、CMMase はマルトシルマルトース (MM) を経由した 2 段階の α-1,6 結合の加水分解により、CMM を 2 分子のマルトースまで分解する。アミノ酸配列から両酵素はともに糖質加水分解酵素ファミリー13 (GH13) に分類された。さらに、*A. globiformis* M6 における CMM 関連遺伝子のクローニングにより、菌体内への CMM 取り込みに関与する推定 ABC トランスポーターの存在が明らかとなった。以上のことから、新たな環状糖を経由した澱粉資化経路の存在が *A. globiformis* M6 に見出された。

これまでに、CMM 代謝経路に関わる酵素やタンパク質の立体構造およびそこから得られる基質認識や結合などの分子メカニズムに関する情報はまったく得られていない。また、取り込みに関わると推測された遺伝子については機能さえも調べられていない。そこで、本研究では CMM 代謝経路に関わる一連の酵素およびタンパク質群の構造解析を行うことで、その代謝経路の存在意義および機能の解明を目的とした。



***A. globiformis* M6 における CMM 代謝経路**

第 1 章 CMM 生成酵素 (6-α-maltosyltransferase: 6MT) の大量発現系の構築

構造解析において、結晶作成のためには多くのタンパク質が必要となる。そこで、本章では異種発現宿主を用いた 6MT の大量発現系の構築に取り組んだ。

まず、最も一般的な *Escherichia coli* を宿主とした発現系の構築を行った。pET および pCold ベクターを用いた発現では、6MT の発現性は確認されるもののほとんどが不溶性画分に存在していた。そのうち、可溶性画分に若干量を得ることができた pCold ベクターでさえ、最終的な収量は *E. coli* 培養液 1 L あたり約 0.5 mg と十分な量ではなく、また溶液中に NaCl が含まれていないと不安定であった。そのため、可溶化促進機能を持つ trigger factor (TF) が組み込まれた pCold-TF ベクターを用いたところ、ほぼ全てが可溶性画分に得られたが、TF の切断によって凝集してしまった。以上のことから、*E. coli* を宿主とした発現系の構築は困難であった。

次に、*Pichia pastoris* を宿主とした発現系の構築を行った。*P. pastoris* はタンパク質の分泌生産に優れており、フォールディングの正確性も高いとされる宿主であるため、本来分泌酵素である 6MT の生産に適していると考えられた。pPICZα ベクターを用いて発現させたところ、培養上清に活性のある 6MT を得ることに成功した。そして、大量培養および精製によって *P. pastoris* 培養上清 200 ml あたり約 4.4 mg と *E. coli* 発現系と比較しても安定かつ多くの 6MT を得ることができた。

発現系構築の過程において、6MT がデキストランを担体とするカラムへの吸着性を示したことから、糖質結合モジュール (CBM) の存在が示唆された。6MT のアミノ酸配列を相同性検索などを用いて解析したところ、触媒ドメイン (GH13) の C 末端側に澱粉などに結合する CBM20 と相同性を示す領域が見出された。

第 2 章 CMM 分解酵素 (CMM hydrolase: CMMase) の構造および変異解析による基質認識メカニズムの解明

本章では、構造および変異解析により、CMMase の分子メカニズム解明に取り組んだ。

X 線回折実験により、分解能 2.4-1.6 Å でリガンドフリーおよび各リガンド複合体構造を決定した。CMMase はサイズ排除クロマトグラフィーにより溶液中においても二量体を形成すると予測された。結晶構造中においても、これまでに GH13 に見られなかったユニークな羽状の二量体構造を形成していた。単量体は α-amylase 関連酵素のコア構造と同様に A、B、C の三つのドメインから構成されており、触媒ドメインであるドメイン A は $(\beta/\alpha)_8$-barrel 構造を取っていた。そして、この単量体構造は、CMMase と配列相同性が顕著に高く、同じ GH13_20 サブファミリーであるが CMM には作用しないネオプルラナーゼ (NPL) とよく似た主鎖構造を有していた。また、CMMase および NPL に基質が結合した複合体構造の比較から、活性部位もよく似ていることがわかった。しかし、特徴的な違いとして、NPL におけるサブサイト−1 および+1 周辺残基の ANE (A330, N331, E332)、サブサイト－3 周辺残基の FA (F289, A290)、Q (Q294) が CMMase においては PYF (P203, Y204, F205)、CS (C163, S164)、Y (Y168) に置き換わっていた。ANE が PYF に変わることによって、触媒ポケットの奥行きがなくなり、疎水性度も高くなっていた。また、Q が Y に変わることによってポケット手前に立体障害が生まれ、逆に FA が CS に変わることによってポケットの幅が広がっていた。つまり、これらの変異は触媒ポケットの形を CMM がフィットするようなお椀型に変化させ、NPL とは異なった位置にサブサイト+1 および－3 を形成させていることが示唆された。これらの残基の変異解析を行ったところ、それぞれ一部分の変異はあまり活性には影響を与えず、複数部位の変異によって著しい活性の低下を示した。構造および変異解析の結果から、CMMase の CMM に対する特異性は複数残基による複合的な作用によってもたらされていることが示唆された。

第 3 章 CMM 結合タンパク質 (CMM-binding protein) の機能および構造解析

本章では、CMM の取り込みに関わる推定 CMM-binding protein (CMMBP) の機能および構造解析により、その分子メカニズム並びに CMM 代謝経路の解明に取り組んだ。

まず、CMMBP の機能解析を行った。円偏光二色性測定により、CMMBP は広範囲の pH (4.0~9.1) および中高温程度 (約 51℃) まで安定であることが示された。ゲルシフトアッセイから CMMBP の CMM および MM への結合性が示唆され、さらに等温滴定型熱量測定により CMM に対して非常に高い結合性 ($K_a = 1.04 \pm 0.46 \times 10^8\ M^{-1}$) を有することを明らかにした。

X 線回折実験によって分解能 1.6 Å で決定した CMMBP の構造は、その他の sugar-binding

protein と同様に N-ドメインおよび C-ドメインの二つの α/β ドメインから構成されていた。結合クレフトにおいて MM の電子密度が観測されたが、非還元末端のグルコース残基は電子密度が弱く当てはめることができなかった。結合した MM は主に Tyr192、Trp204 および Trp269 によるスタッキング相互作用およびその他周辺残基との水素結合により安定化されていた。DALI server を用いた検索により、CMMBP は α-1,3、1,6 結合が交互に存在する環状四糖 Cyclic α-nigerosyl-(1→6)-nigerose (CNN) に対する binding protein と高い構造類似性を示すことが明らかとなった。また、N-および C-ドメイン間クレフトにクロスする形でリガンドを結合し、それに伴って C-ドメイン側にポケットが存在するなどの特徴も似ていた。CNN-binding protein を含めた構造類似 sugar-binding protein との主鎖構造の比較から、CMMBP-MM 複合体は open 状態であることが推測された。

結合した MM 構造を基に CMM のモデリングを行うことで、open-close メカニズムを推測した。その結果、CMMBP が close 状態へ移行するためには、今回電子密度が明瞭ではなかった MM の非還元末端グルコース残基位置の重要性が示唆された。CMM が結合した時のみ、この位置におけるグルコース残基が N-ドメインと相互作用できるため、close 状態へ移行できると推測した。

総括

本研究では、機能または構造解析によって CMM の取り込みにおいて重要な因子である CMMBP および取り込み後の分解を担う CMMase の分子メカニズムについて明らかにした。その結果、*A. globiformis* M6 が CMM に特化したユニークな代謝経路を持つことを明らかにした。また、本研究で得られた知見を基にその他菌種における CMM 代謝経路の存在が示唆された。これらの代謝経路の生物学的意義としては、多くの生物が資化できる澱粉を一度 CMM という環状糖に変換してから取り込みおよび代謝を行うことにより、炭素源獲得競争を有利に戦うためであると推測した。本研究で得られた知見は新規オリゴ糖の創出や既存のオリゴ糖製法の改善にも役立つことが期待される。