

乳酸菌由来多分岐デキストランの分解に関与するタンパク質の構造と機能に関する研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2024-06-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 駿太郎 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.14945/0002000669">https://doi.org/10.14945/0002000669</a>

(課程博士・様式7)

# 学位論文要旨

専攻：バイオサイエンス専攻 氏名：中村駿太郎

論文題目：乳酸菌由来多分岐デキストランの分解に関与するタンパク質の構造と機能に関する研究

論文要旨：細菌は、その生息環境に応じて、糖質加水分解酵素 (GH) や多糖リアーゼなど様々な酵素を産生し、糖質を資化している。中でも Bacteroidota 門に属する細菌は特定の多糖の認識と分解、分解産物の輸送を組織的に行う遺伝子群 (Polysaccharide Utilization Loci, PUL) を有している。PUL は主に糖結合タンパク質、糖トランスポーター、糖質分解酵素、転写制御因子などのタンパク質をコードしており、多糖の多様性に伴って PUL の種類は豊富に存在する。これまでに澱粉やペクチンなどを標的とする PUL の研究が行われており、その中から新規な活性を有する GH も複数報告されている。これまでに植物の細胞壁多糖や動物の糖鎖を標的とした PUL は多く報告されている。一方で、細菌の菌体外多糖を標的とした PUL の報告はほとんどない。デキストランはグルコースが  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-結合した主鎖で構成されており、*Leuconostoc* 属や *Streptococcus* 属などの細菌が産生する菌体外多糖である。また、菌種によっては  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-や  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-結合の分岐を有する多分岐デキストランを産生する。近年、土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae* から GH ファミリー31 として初めてのエンドデキストラナーゼ (FjDex31A) が報告された。興味深いことに、FjDex31A 遺伝子近傍には推定転写調節因子、推定糖トランスポーター、推定糖結合タンパク質、推定 GH が存在したため、これらの遺伝子群はデキストランの資化に関与する PUL (FjDexUL) であると考えられた。本研究では FjDexUL に着目し、*F. johnsoniae* が菌体外多糖を資化するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

第2章では、FjDexUL に存在する GH ファミリー65 タンパク質 (FjGH65A) を標的とした。GH65 は、オリゴ糖や多糖の  $\alpha$ -グルコシド結合に作用する GH と糖質加リン酸分解酵素 (GP) から構成されている。これまでに報告されている細菌の GH65 酵素はすべて GP であるのに対し、真核生物の GH65 酵素はすべて GH である。さらに、GH65 GH の結晶構造はまだ報告されていない。FjGH65A は既報の細菌由来 GH65 酵素と低いアミノ酸配列相同性 (約28%) を示したことから、新規な基質特異性を示すと考えられた。本研究では、FjGH65A の機能と構造を生化学的実験と X 線結晶構造解析を用いて解析した。大腸菌発現系を用いて組換え FjGH65A を調製し、機能解析を行ったところ、FjGH65A は GP ではなく、細菌由来 GH65 酵素で初めての GH であり、グルコースが  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-で結合したコージビオースを特異的に加水分解する GH であった。また、分解産物のアノマーを HPLC によって分析することで、

FjGH65A はアノマー反転型の反応機構を介して加水分解反応を触媒することが示された。FjGH65A の立体構造はリガンドフリー構造、グルコース複合体構造、イソマルトース複合体構造をそれぞれ 1.40–1.56 Å の分解能で決定した。FjGH65A の全体構造は他の GH65 GP と類似しており、一般酸触媒残基 Glu472 は保存されていた。一方で、FjGH65A では、GH65 GP のリン酸結合部位を形成するアミノ酸配列は保存されていなかった。その代わりに、FjGH65A は一般塩基触媒残基 Glu616 を有していた。これらの結果から、FjGH65A は kojibiose hydrolase として新しい酵素番号 (EC3.2.1.216) が付与された。

FjGH65A が kojibiose hydrolase であると同定したことで、FjDexUL が多分岐デキストランの資化に関与する PUL だと仮説を立てた。そこで、第 3 章では FjDexUL に存在するタンパク質の遺伝子発現量や生化学的性質を網羅的に解析した。*F. johnsoniae* を各種オリゴ糖や多糖を炭素源として培養したときの FjDexUL の各遺伝子発現量をリアルタイム PCR によって定量したところ、*Leuconostoc citreum* S-32 株が産生する多分岐デキストラン (S-32  $\alpha$ -グルカン) を炭素源としたときに FjDexUL 遺伝子の顕著な発現量の上昇が観察された。また、機能既知の FjDex31A と FjGH65A 以外に、FjGH66 と FjGH97A の酵素活性も解析したところ、FjGH66 はエンドデキストラナーゼであり、FjGH97A は  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-結合や  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-結合を有するグルコオリゴ糖を加水分解してグルコースを生成する酵素であった。S-32  $\alpha$ -グルカンに対して FjDexUL GHs (FjGH65A, FjGH97A, FjDex31A, FjGH66) を同時に作用させたところ、それぞれの酵素を単独で作用させた場合と比べて、グルコース生成量が顕著に増加した。FjGH66 の立体構造はリガンドフリー構造、グルコース複合体構造、イソマルトース複合体構造、イソマルトトリオース複合体構造をそれぞれ 1.18–1.85 Å の分解能で決定した。FjGH66 の立体構造から、いくつかのサブサイトが  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-および  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-分岐を受容できることが明らかになった。さらに、2 つの糖結合タンパク質 (FjDusD と FjDusE) を組換えタンパク質として調製し、各種多糖を含むポリアクリルアミドゲルを用いたアフィニティ電気泳動に供した。FjDusE はデキストランと多分岐デキストランに対して親和性を示したが、FjDusD の多糖に対する親和性は認められなかった。そこで、等温滴定カロリーメトリーを用いて様々な結合様式を有する  $\alpha$ -グルコオリゴ糖に対する FjDusD の結合能を解析した。その結果、FjDusD はイソマルトトリオース、イソマルトテトラオース、イソマルトペンタオース、イソマルトヘキサオースに親和性を示した。

本研究により、土壌細菌 *F. johnsoniae* が多分岐デキストランを認識し、FjDexUL GHs によって分解できることが明らかになった。この資化機構では、まず、FjDusE が多分岐デキストランを細胞表面にて捕捉し、FjGH66 が多分岐デキストランから  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-または  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-分岐を有するイソマルトオリゴ糖を生成する。次に、生成したオリゴ糖は FjDusD と糖トランスポーターによってペリプラズム内に取り込まれ、FjDex31A、FjGH97A および FjGH65A によってグルコースにまで分解される。細菌は様々な環境に生育しているが、細菌間相互作用については不明な点が多い。本研究結果は、自然界における微生物間の菌体外多糖を介した複雑な相互作用を分子レベルで理解する上で役立つと思われる。