

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成 23 年度～平成 27 年度）
「環境調和を志向した革新的植物アグリバイオ技術の統合型研究拠点の形成」

アグリバイオ・シンポジウム 2013

構造生物学が推進するアグリバイオ技術革新

講演要旨集

日時：2013年11月30日（土）13：00～17：30

場所：近畿大学農学部新教室棟311教室

はじめに

2012年12月8日、「アグリバイオ・シンポジウム2012—未来を切り開くアグリバイオ技術：植物機能の基盤解明と人類へのアウトプット」と題するシンポジウムを、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「環境調和を志向した革新的植物アグリバイオ技術の統合型研究拠点の形成」の支援を受け、近畿大学農学部において開催いたしました。植物に関連する研究で顕著な業績を挙げられている6名の先生方をシンポジストとしてお招きし、学術的に高いレベルの話題提供と実に意義深いディスカッションが行われました。是非、このシンポジウム、次年度へ引き継ごうと考え、このたび、「アグリバイオ・シンポジウム2013—構造生物学が推進するアグリバイオ技術革新」と題するシンポジウムを企画いたしました。

シンポジウムのタイトルに示す通り、このたびのアグリバイオ・シンポジウムは構造生物学に焦点をあてており、それらの研究成果がどのようにアグリバイオ技術革新に貢献しているか、是非皆様方に考えていただけたらと考えております。まず、松村先生（阪大院工）からは植物の二酸化炭素固定に関わる酵素系について、児嶋先生（阪大蛋白研）からは花成ホルモンとその受容体および転写因子との複合体について、最先端の植物機能の分子基盤に関する話題提供がなされます。微生物の脱窒過程に関する詳細を構造生物学的に解明された城先生（理研播磨）からのお話、また真菌由来のイオンチャンネルの構造基盤に関する伊原先生（近大院農）からのお話は、微生物を中心とした環境保全という観点から重要な情報が含まれていると思われまます。三上先生（京大院農）は工夫された結晶構造解析による食品関連酵素の反応機構について、また角田先生（九大院農）はグリコサミノグリカン糖鎖合成酵素のメカニズムについてお話していただきます。

いずれの話においても、我々が目指すアグリバイオ技術革新につながる重要な要素を含んでいますので、このプロジェクトをさらに推進していくために、また若い院生の皆さんの知識欲を大いに刺激するためにも、活発な討論をお願いいたします。

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「環境調和を志向した革新的植物アグリバイオ技術の統合型研究拠点の形成」

代表 深溝 慶

プログラム

- 13:00-13:05 はじめに 深溝 慶 近畿大・院・農学研究科
- 13:05-13:45 「カルビン回路調節システムの構造基盤」
松村浩由 大阪大・院・工学研究科
座長：田茂井 政宏
- 13:45-14:25 「花咲か爺さんの灰を求めて—構造生命科学からのアプローチ—」
児嶋長次郎 大阪大・蛋白研
座長：川崎 努
- 14:25-15:05 「一酸化窒素還元酵素：呼吸酵素の分子進化と環境保全」
城 宜嗣 理研・播磨
座長：内海 龍太郎
- 休憩（15:05-15:20）
- 15:20-16:00 「真菌 TRP チャネルの機能制御の分子基盤」
伊原 誠 近畿大・院・農学研究科
座長：松田 一彦
- 16:00-16:40 「結晶構造から探る食品関連酵素の機能」
三上文三 京都大・院・農学研究科
座長：森山 達哉
- 16:40-17:20 「グリコサミノグリカン糖鎖合成酵素の結晶構造解析」
角田佳充 九州大・院・農学研究院
座長：大沼 貴之
- 17:20-17:30 おわりに 重岡 成 近畿大・院・農学研究科

懇親会（近畿大農学部ログハウス2階 18:00-20:00）

カルビン回路調節システムの構造基盤

○松村 浩由 (阪大院・工・応用化学)

1. 緒言

大気中の二酸化炭素濃度の増加に伴う地球の温暖化現象の解決は今や全世界における最も重要な課題の1つであり、様々な研究分野からこの問題に対するアプローチがなされている。植物の二酸化炭素固定回路、すなわちカルビン回路の人為的な改良もその一つであり、これまで本回路の酵素の高発現によって植物の成長率を改良する研究が盛んに行われてきた。しかし、この方法では特定の代謝物が蓄積するなどの問題があり、本回路の調節機構を分子レベルで理解する必要性が認識されはじめている。本シンポジウムでは、私達のグループが研究しているカルビン回路の調節システムの構造基盤について発表させて頂く。

2. 天然変性タンパク質による調節¹⁾

CP12 は単独では特定の立体構造を有さない天然変性タンパク質であり、カルビン回路を構成している Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と Phosphoribulokinase (PRK) に結合して CP12-GAPDH-PRK 複合体を形成し、それによって両酵素の活性は調節されていることが知られている。この複合体は、暗期の酸化かつ NADP(H)/NAD(H)濃度比の低い条件において形成され、複合体内の GAPDH と PRK はその活性を低下させる。一方、明期の還元的かつ NADP(H)/NAD(H)濃度比の高い条件においてはこの複合体が解離し、GAPDH と PRK はその活性を取り戻す。これは、従来提案されてきたフェレドキシン/チオレドキシン系を介したカルビン回路酵素の調節とは異なる機構である。

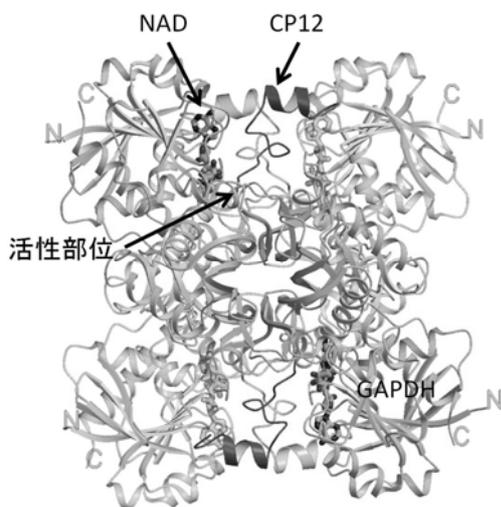


図1 GAPDH-CP12 複合体の結晶構造

この複合体の形成順序はきまっており、最初に CP12 が GAPDH と結合して CP12-GAPDH 複合体を形成し、さらにこの CP12-GAPDH 複合体が PRK に結合する。私達は、まず GAPDH-CP12 複合体の立体構造を 2.2Å 分解能で決定し、CP12 の C 末端部分 (Thr53-Asp75) が GAPDH に結合している様子を明らかにした (図1)。結合していた CP12 内にはジスルフィド結合があり、同時に NAD とも結合していたことから、両タンパク質の結合に酸化と NAD が必要である理由が明らかとなった。また、GAPDH の基質

結合部位は CP12 によって塞がれ、GAPDH は基質に結合できない状態にあった。これにより、CP12 による GAPDH 活性の阻害メカニズムが示された。さらに最近、CP12-GAPDH-PRK 複合体の構造研究についても進展がみられており、本シンポジウムでその詳細を報告したい。

3. 代謝物による調節²⁾

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) は、カルビン回路において二酸化炭素を固定する反応を触媒する酵素である。RuBisCO がその触媒能を発揮するためには、活性部位のリジン残基がカルバメート化され、そこに活性中心金属である Mg^{2+} が配位して活性化される必要がある。そしてこの活性化反応は、様々な代謝産物によって調節されていると考えられており、例えば、NADPH や 6PG (6-ホスホグルコン酸) が、この活性化反応を促進することが *in vitro* の実験で示されてきた。

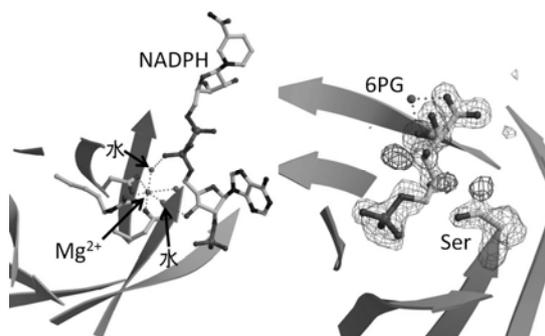


図2 イネ RuBisCO の NADPH 複合体 (左) と 6PG 複合体 (右) GAPDH-CP12 複合体の

私達は、これらの代謝物による RuBisCO の調節に着目し、イネ RuBisCO と NADPH, 6PG, 反応中間体アナログ (2CABP) との複合体の立体構造をそれぞれ 1.9, 1.65, 1.35 Å 分解能で決定した。NADPH と 6PG はいずれもオープン状態の RuBisCO の活性部位に結合しており、一方で 2CABP はクローズ状態の活性部位に結合していた。また、NADPH は活性中心の Mg^{2+} と水を介して結合しており、6PG は Mg^{2+} に直接結合しているものの構造異性体を呈していた (図2)。これらの結果より、RuBisCO の活性化反応の促進は、これらの代謝物が活性部位に緩く結合することによって達成される可能性が示された。

4. 結論

このようにカルビン回路は、ダイナミックな分子の結合・解離によって調節されていることが明らかになりつつある。これは、植物などの固着生物が、様々な環境ストレスに素早く対応するために必要な調節機構であると考えられる。今後、このような分子の集合・解離による調節機構を構造生物学的観点から解明すべく、研究を進めていきたいと考えている。

5. 引用文献

- 1) Matsumura, H. *et al.*, *Structure* **19**, 1846-1854 (2011).
- 2) Matsumura, H. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **422**, 75-86 (2012).

花咲か爺さんの灰を求めて - 構造生命科学からのアプローチ

田岡健一郎、大木出、辻寛之、島本 功、○児嶋長次郎（奈良先端大・バイオ、阪大・蛋白研）

植物に花を咲かせるホルモン（花成ホルモン・フロリゲン）は、「日長変化の刺激により葉で合成され、維管束を通過して茎頂へと運ばれ、花芽形成を誘導するホルモン」として1930年代に提唱された。その後、長い間その分子実体は謎であったが、2007年にシロイヌナズナ FT / イネ Hd3a タンパク質がフロリゲンであることを強く支持する結果が出された。しかし、茎頂へと運ばれた FT / Hd3a タンパク質の細胞内での役割は不明であった。2011年にわれわれは、Hd3a とその受容体 14-3-3 と転写因子 OsFD1 からなる複合体の構造と機能を明らかにした。本発表では、フロリゲン活性化複合体の研究を中心にその経緯を紹介し、NMR や X 線結晶構造解析から見えてきたフロリゲン機能の分子基盤について解説する。

シロイヌナズナのフロリゲン FT タンパク質と相互作用する因子として、2005年にシロイヌナズナ FD が報告された (1, 2)。FD は bZIP 型の転写因子であり、FT と FD の両者の過剰発現により花芽分裂組織決定遺伝子の一つである AP1 遺伝子の発現が誘導される (1)。しかし、フロリゲンがどのようなメカニズムで下流の標的遺伝子の発現を制御しているのかは不明であった。その制御機構を明らかにするために、われわれは酵母ツーハイブリッド法による Hd3a 相互作用因子の探索を行った (3)。その結果、GF14c (イネ 14-3-3)、OsFD1 (シロイヌナズナ FD のイネホモログ) などが得られた。GF14c を除く相互作用因子の C 末端には、FD-FT 相互作用モチーフ (Thr-Ala-Pro) (2) に類似した SAP モチーフ (Ser-Ala-Pro) が共通して見いだされ、それは Hd3a との相互作用に必須であった。ところが、NMR などを用いた *in vitro* での相互作用実験では、Hd3a と GF14c の間の相互作用は検出されたが、Hd3a と OsFD1 の相互作用は検出できなかった。これらの実験結果と、SAP モチーフと 14-3-3 認識配列 (Arg-X-X-Ser-X-Pro) の類似性、さらに GF14c に SAP モチーフがないことから、Hd3a とその相互作用因子は 14-3-3 を介して間接的に相互作用していると考えた。実際、OsFD1 と GF14c は *in vitro* で相互作用し、さらに変異解析により SAP モチーフ内のセリンのリン酸化が両者の相互作用に重要であることがわかった。

Hd3a, GF14 および OsFD1 の相互作用の詳細を調べるため、われわれはこれら三者からなるタンパク質複合体の立体構造解析を行い、結晶構造を 2.4 Å 分解能で決定することに成功した (3)。結晶化にあたって OsFD1 には、GF14 との結合に必要な十分なリン酸化 S192 を含む C 末端の 9 アミノ酸断片を用いた。得られた複合体構造では Hd3a, GF14, OsFD1 それぞれ 2 分子ずつからなる W 字型のヘテロ六量体を形成

しており (図 1A), ダイマーを形成した GF14 の W 字の底にあるくぼみにリン酸化された OsFD1 がはまり込み, その上側に Hd3a が 1 分子ずつ左右対称に離れて結合し, Hd3a と OsFD1 の間に直接的な相互作用は見られなかった (図 1B)。この三者複合体をフロリゲン活性化複合体 (Florigen Activation Complex ; FAC) と名づけた。

14-3-3 はリン酸化されたアミノ酸を認識することがよく知られているが, GF14 と Hd3a の相互作用はリン酸化非依存的である。両者の相互作用は, Hd3a の中央ループ領域に存在する 2 つの突き出たアルギニン残基 (R64, R132) が GF14 上部にある酸性のくぼみに錨のようにはまり込み, さらに Hd3a 本体は GF14 の C 末端ヘリックスの間にある疎水性の溝と広く相互作用している (図 1B)。一方, OsFD1 と GF14 の相互作用は, OsFD1 のリン酸化された S192 が GF14 の塩基性のリン酸化ペプチド結合ポケットにはまり込み, さらに SAP モチーフ全体も認識されており, 典型的な 14-3-3 とリン酸化ペプチドの結合様式に類似している (図 1B)。イネ FAC で観察された Hd3a-GF14, GF14-OsFD1 の相互作用部位はともに高等植物で高度に保存されていた (3)。FT と 14-3-3 が相互作用すること (4) も合わせると, フロリゲン-14-3-3-転写因子の相互作用は, 高等植物全般に共通して存在する花成経路であると考えられる (5)。

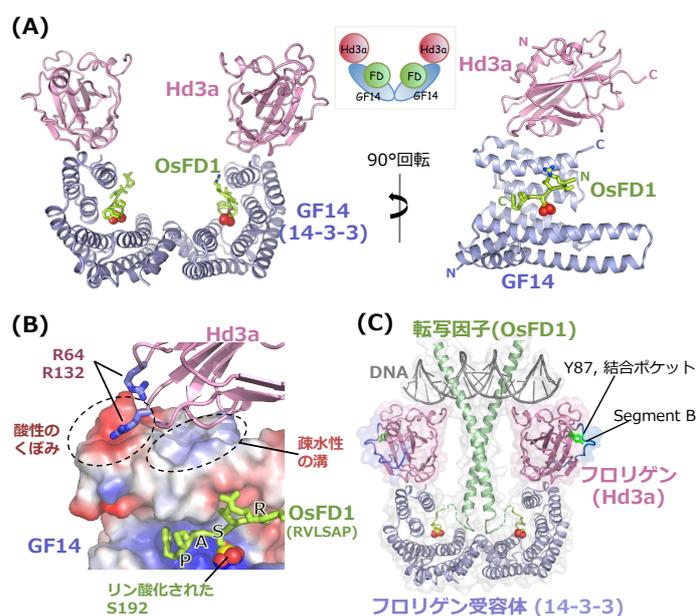


図 1. フロリゲン活性化複合体 (FAC) の構造

(A) Hd3a-GF14-OsFD1 ペプチドからなる 6 量体の結晶構造。(B) Hd3a-GF14 の相互作用面 (上部) と GF14-OsFD1 の相互作用面 (下部)。Hd3a と OsFD1 の間には直接的な結合は見られず, GF14 を介した相互作用であった。(C) DNA 上の FAC の構造モデル。Segment B やアニオン結合ポケットは FAC-DNA 外面に露出しており, 他因子 (co-activator など) のアクセスが可能となっている。

- 1) P. A. Wigge, M. C. Kim, K. E. Jaeger et al., Science, 309, 1056 (2005).
- 2) M. Abe, Y. Kobayashi, S. Yamamoto et al., Science, 309, 1052 (2005).
- 3) K. Taoka, I. Ohki, H. Tsuji et al., Nature, 476, 332 (2011).
- 4) L. Pnueli, T. Gutfinger, D. Hareven et al., Plant Cell., 13, 2687 (2001).
- 5) 田岡, 大木, 辻, 児嶋, 島本, 化学と生物, 50, 654 (2012).

一酸化窒素還元酵素：呼吸酵素の分子進化と環境保全

○城 宜嗣（理化学研究所）

1. 緒言

脱窒 denitrification は、硝酸塩 NO_3^- 、亜硝酸塩 NO_2^- を逐次還元し、窒素分子に変換する ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)、微生物の嫌気呼吸の一種である。脱窒の各ステップは、それぞれ金属酵素によって触媒される。このプロセスの反応中間体として、NO は亜酸化窒素還元酵素 nitrite reductase (Nir) によって産生されるが、NO の強い細胞毒性を消去する為に、産生後速やかに一酸化窒素還元酵素 nitric oxide reductase (NOR) によって亜酸化窒素 N_2O へと変換されている ($2\text{NO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$)。NOR は土壌中などの嫌気条件で生育する脱窒細菌のみならず、病原菌にも存在している。病原菌 NOR は、病原菌が感染したホストのマクロファージが産生する抗菌ガス NO を無毒化し、病原菌がホスト内で生存し増殖するために必須である。我々は、チトクロム *c* を電子供与体とする *Pseudomonas aeruginosa* cNOR とキノールを電子供与体とする *Geobacillus stearothermophilus* qNOR の2つの膜結合型 NOR の結晶構造解析に成功した^{1,2}。本講演では、NOR の持つ科学的な背景を説明し、その構造と機能の詳細を概説する。

2. 一酸化窒素還元酵素の結晶構造

図1に2つの NOR の全体構造を示した。NOR の全体構造は、酸素分子 O_2 を基質とする好気呼吸酵素であるチトクロム酸化酵素 cytochrome *c* oxidase (CCO) と構造類似性が非常に高かった。すなわち、NOR と CCO は共通の祖先から分子進化した事を示している。一方、活性中心の構造は、CCO はヘム（ポルフィリン鉄錯体）と銅の複核錯体であるのに対し、NOR はヘムと非ヘム鉄の複核錯体であった。また、CCO はプロトンポンプ機能を有するのに対し、NOR はその機能を持たず、確かに、細胞膜を介したプロトン輸送を担うようなチャンネルは見いださなかった。これらの構造の違いが、両呼吸酵素の生理的反応性・機能の違いとなっている。すなわち、地球上に O_2 が出現し増加した 30~20 億年前に、生物の呼吸酵素は、NOR を鋳型として、酵素活性を NO 還元から O_2 還元へと変換し、プロトンポンプ機能を獲得したと推定できる。NOR と CCO の詳細な構造機能比較から、呼吸酵素の分子進化のメカ

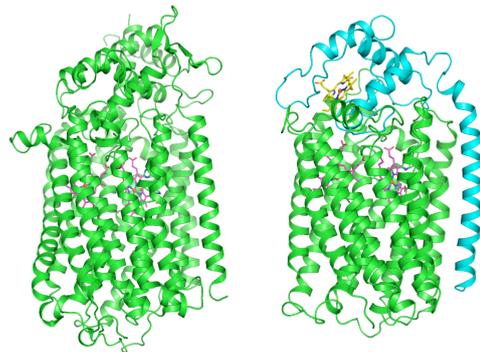


図1 (右) *P. aeruginosa* cNOR、(左) *G. stearothermophilus* qNOR の結晶構造

真菌 TRP チャネルの機能制御の分子基盤

○伊原誠（近畿大院農学研究科）

1. 緒言

TRP (transient receptor potential)チャネルは、電位依存性の N^+ チャネルや K^+ チャネルと同じ、膜電位依存性イオンチャネルスーパーファミリーに属するイオンチャネルであり、一般に、 Ca^{2+} や K^+ など複数種の透過性もつ非選択的なカチオンチャネルである。TRP チャネルは、膜電位、温度、浸透圧などの物理的な刺激や細胞の酸化還元状態、カプサイシンやメントールなどの外来化学物質、ジアシルグリセロール(DAG)、ホスファチジルイノシトールリン脂質 (PIP) などの細胞内メッセンジャー分子など多様な刺激への応答性を有し、生理学的に最も重要なイオンチャネルの一つである。

酵母やカビなどの真菌類にも、ほ乳類の TRP チャネルに分類されない TRP チャネルファミリーが見いだされており、それらはアミノ酸配列がシンプルであり構造解析研究に適すると考えられたことから、真菌の TRP チャネルファミリーに着目した。

2. 方法と結果

真菌 TRP チャネルファミリーから、発現スクリーニングによって、赤カビ病菌 *Gibberella zeae* 由来で種々の細胞外刺激に対し高い応答性を示す TRP チャネルを見だし、TRPGz と名付け、解析をおこなった。TRPY1 欠損出芽酵母を用いた機能アッセイにより、TRPGz は液胞膜上に局在発現し、1.2M 以上のソルビトール刺激、 H_2O_2 処理、急速な温度上昇によって細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こすこと、さらに液胞膜を使ったオルガネラパッチクランプ実験から細胞質内の Ca^{2+} 濃度依存的なチャネル開口活性と、膜電位依存的なチャネル開口活性をもつことが明らかになり、TRPGz 様々な刺激に対して応答するマルチモーダルなチャネル開口制御機構を有しており、TRP チャネルがもつ機能的特徴を持ったプロトタイプであることが示された(図1)。

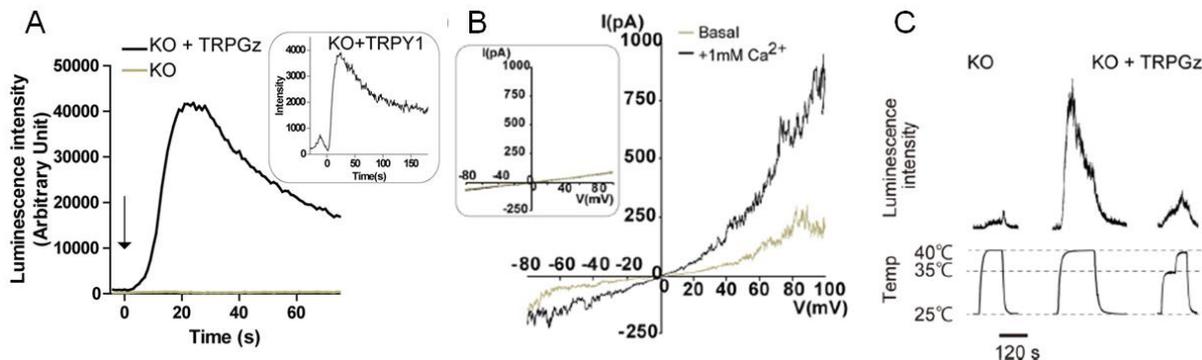


図1. TRPGz の (A)浸透圧(B)膜電位 (C)温度変化による活性化

NMR 解析ならびにアミノ酸配列解析によって、TRPGz の C 末端側細胞内ドメイン (CTD) のほとんどの領域は、特定の構造を持たない天然変成タンパク質であるが、coiled-coil 領域ならびに塩基性アミノ酸残基のクラスターが存在することが示唆された。各種解析により、CTD の塩基性領域は、ホスファチジルイノシトールリン脂質の結合によって、チャネル活性を抑制する領域であることが判明した。coiled-coil と予想された領域は X 線結晶構造解析から、強いねじれとらせん対称を伴ったヘリックスバンドルであることが明らかになった。このねじれのため、分子間相互作用が非対称になり、対称性を持つときと比べ相互作用が弱まることが示唆された。分析超遠心解析と NMR 解析から、TRPGz の CTD は coiled-coil 領域を介した安定な 4 量体を形成するのではなく、1-2-4 量体として存在する平衡状態にあることが明らかになった。この coiled-coil 形成による CTD の多量体化は、浸透圧および温度上昇によるチャネルの活性化に必須である一方、TRPGz 自体のチャネル形成（四量体化）には影響せず、 Ca^{2+} ・膜電位・高酸化状態による活性化にも影響しないことが明らかとなり、TRPGz のイオンチャネルの活性化には複数の独立した経路が存在する事が示唆された。

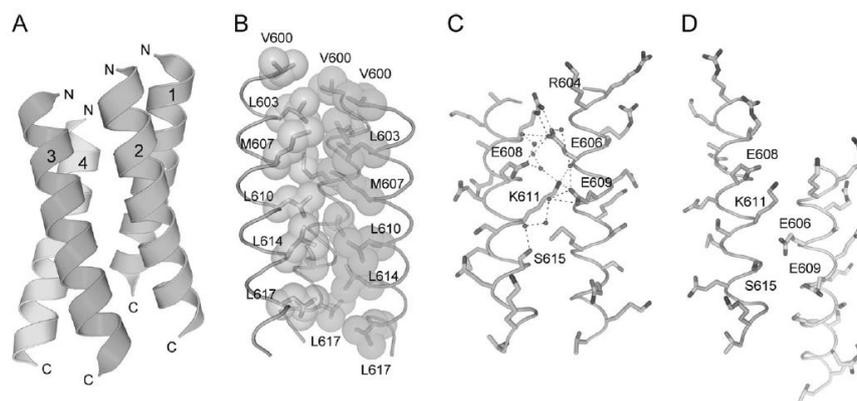


図 2. TRPGz ヘリックスバンドルの X 線結晶構造 (A)全体構造. (B) ロイシンやメチオニンによる密な疎水性相互作用が見られる。一方で、この分子がもつ強いねじれによって、構造に非対称性が生じ、(C)鎖 1-2 間では水素結合ネットワークや塩橋などの親水性相互作用が見られたが、(D)鎖 1-4 間では、鎖 1-2 間で見られたようなプロトマー間での親水性相互作用は見られなかった。

3. まとめ

TRPGz の機能制御領域に見られたように、他の TRP チャネルも細胞内ドメインに複数の機能モジュールをもつことから、ある程度の柔軟性のある構造を持っているのではないかと推測される。これまで TRP チャネルの構造解析を困難にしていた要因としてこのような構造の柔軟性にも一端があるのではないかと推察されるが、逆に生理学的意義を考えると、様々な機能モジュールを柔軟に効率よく機能させることで、多様な刺激に対する応答性を獲得するために適した構造であると考えられた。

4. 文献

Ihara et al., Molecular bases of multimodal regulation of a fungal transient receptor potential (TRP) channel., *J. Biol. Chem.* 2013 288: 15303-15317

結晶構造から探る食品関連酵素の機能

○三上 文三（京大院・農・応用生命科学）

1. 緒言

酵素の機能発現には、酵素タンパク質の様々な構造変化や動きが関わっている。酵素の活性部位では、基質結合部位を取り囲むループの構造変化が重要な場合が多い。このような構造変化を高精度で捉えるには、X線結晶構造解析法が有力な方法であるが、結晶構造解析は本来、静的な方法であるため、動きを捉えるためには多数のスナップショットが必要である。また、結晶格子による制約により、酵素の機能発現に重要なループが同時に結晶中でのパッキングにも重要である場合、ループの構造変化を観察することは困難になる。この問題を解決するには徹底的な結晶化のスクリーニングにより、問題部分のパッキングを回避した結晶を得ることが重要である。このような戦略によって結晶中での酵素タンパク質の構造変化を調べた例として β -アミラーゼとアルギン酸リアーゼの可動ループ¹⁾について紹介する。一方、酵素と基質の複合体形成が困難な場合に、プロ酵素に存在する成熟酵素の活性部位を覆うループを改変して、酵素・基質複合体の形成を試みた例として、プロテイングルタミナーゼ²⁾とトランスグルタミナーゼのプロ酵素の構造解析について紹介する。

2. β -アミラーゼとアルギン酸リアーゼの可動ループ

β -アミラーゼの活性部位には2種類の可動ループが存在し、基質の有無によりその構造を変化させる（図1A）。この構造変化と機能との関連を調べるために、基質アナログとしてマルトースを用い、種々の変異体の結晶を用いて、できるだけ高分解能で

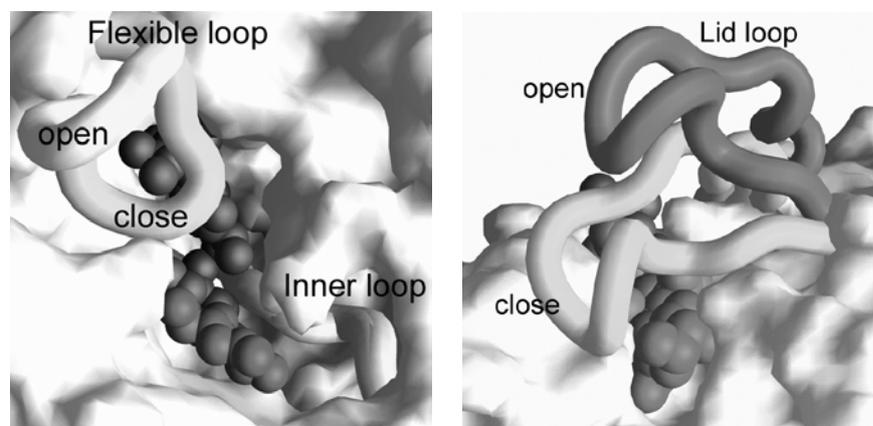


図1A, β -アミラーゼの活性部位 B,アルギン酸リアーゼの活性部位

構造解析を行った。その結果、外側のフレキシブルループの構造変化は緩慢であるのに対し、内側のインナーループの構造変化はサブサイト-2~-1に結合するマルトースに一致して変化することが分かった。インナーループ上での変異体によってはループが構造変化の前後の構造に固定され、両方でサブサイト-2~

-1 のマルトースに対する親和力が大きく異なるため、インナーループの構造変化は基質の結合と生成物の放出に重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方、アルギン酸リアーゼには β -アミラーゼのフレキシブルループよりも、より大きな部分（リッドループ）が活性部位を覆う構造変化をするが、結晶内でのパッキングにより、ループが閉じた構造を捉えることは困難であった。種々の条件で複合体の結晶化を行い、斜方晶の結晶で、ループが閉じた構造が得られたが、凍結により基質が遊離するため、非凍結状態で構造解析を行うことによって、はじめてリッドループの構造変化を捉えることができた（図 1B）。

3. プロテイングルタミナーゼとトランスグルタミナーゼのプロ酵素の構造解析

プロテイングルタミナーゼについては基質がタンパク質であり、酵素と基質の複合体形成が困難であった。そこで、プロ酵素に存在する成熟酵素の活性部位を覆うループを改変して、酵素・基質複合体の形成を試みた（図 2）。プロ酵素では、プロ領域の一部が本酵素の活性ポケット上部を覆っている。活性ポケット上部に存在する Ala47 を Gln47 に置換し、結晶構造解析を行った結果、Gln47 の側鎖は活性ポケットに収まり、アンモニアイオン非存在下では活性中心の Cys と S-アシル中間体を形成するが、アンモニアイオン存在下では S-アシル中間体を形成できず、Gln の状態にあることが分かった。

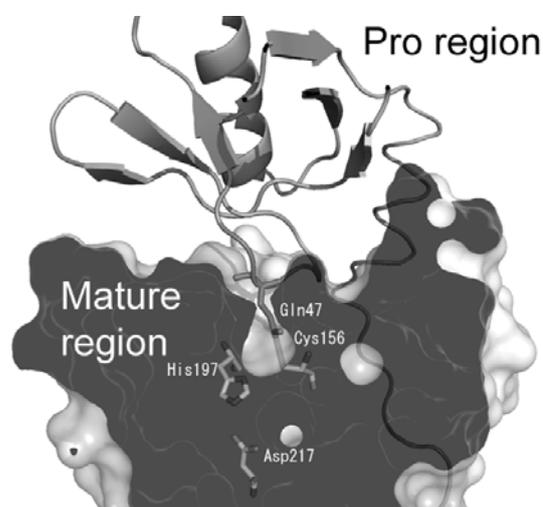


図 2, プロ型プロテイングルタミナーゼ変異体の構造

また Glu47 変異体でも全く同様の構造が得られたことから、本酵素の活性ポケットの中では Gln と Glu は平衡状態にあり、アンモニアイオン存在下では Gln の生成が主体となると考えられた。このことを利用し、活性ポケットの入口の残基を変異することにより、逆反応をする酵素の設計が可能となると考えられる。トランスグルタミナーゼはプロテイングルタミナーゼと同様の活性部位を持つが、そのプロ体の N 末端のプロ領域の α ヘリックスが活性クレフトを覆っている。N 末端 24 残基のペプチドは、成熟体酵素の活性を阻害する。ペプチドとの複合体の結晶構造解析を行った結果、ペプチド部分はプロ酵素と同様の構造をとり、以前に報告されている安定型（中間型）トランスグルタミナーゼと同様の構造をとっていることが明らかになった。

5. 引用文献

- 1) Mikami B. *et al. Acta Crystallogr. D* **68**, 1207-1216 (2012).
- 2) Hashizume R. *et al. J. Biol. Chem.* **286**, 38691-38702 (2011).

グリコサミノグリカン糖鎖合成酵素の結晶構造解析

九州大学大学院農学研究院

角田 佳充

グリコサミノグリカンは、2種類の糖が交互に結合した直鎖状の糖鎖であり、脊椎動物からバクテリアまで、幅広い生物種に存在している。ヒトにおいては、主に細胞外マトリックスに存在し、骨格構造の形成や、細胞による認識やシグナリングといった機能への関与が報告されている。一方、微生物では、特定の細菌の莢膜中に存在しており、宿主菌からの免疫応答を回避したり、病原性を高めたりしていると考えられている。

微生物が合成するグリコサミノグリカンは、ヒトの持つ糖鎖と同一のものであり、それらの生合成を担っている酵素は、安定で高反応性のグリコサミノグリカン合成酵素として知られている。これらの酵素は、すべて2種類の糖が正確に交互に連続的糖転移反応をすることで、それぞれの糖鎖を効率よく合成することができる。しかし、その反応メカニズムは、未だ不明なことが多い。

この様な状況において、私達はこれまでに、大腸菌 K4 株がもつ Chondroitin polymerase (K4CP) と、*Pasteurella multocida* が持つヒアルロン酸糖鎖合成酵素 (PmHAS) の2種類のグリコサミノグリカン糖鎖合成酵素について、X線結晶構造解析による立体構造解析を進めてきた。

コンドロイチン糖鎖を生合成する酵素である K4CP については、立体構造解析に成功し、その反応メカニズムを提案するに至った。Chondroitin 糖鎖は、K4CP が、UDP-GalNAc、UDP-GlcUA からそれぞれ GalNAc、GlcUA を Chondroitin の非還元末端に転移することで2糖ユニットの繰り返し構造からなる Chondroitin の伸長反応を行う。K4CP は2つの GT-A フォールドドメインからなる構造をしており、糖の供与体基質である UDP-GalNAc、および UDP-GlcUA との複合体結晶構造から、K4CP は2つのドメインがそれぞれ異なる供与体基質から糖の転移を行い、Chondroitin の伸長反応を行っていることが分かっている。さらに、K4CP とアクセプター基質である Chondroitin との複合体結晶構造を分解能 3.5Å で決定している。Chondroitin は K4CP の GalNAc 転移ドメインに結合していた。また、K4CP の変異体を用い、糖転移活性の測定を行った結果、K4CP は Chondroitin の非還元末端2糖を特に認識していることが示唆された。また W358 が、受容体基質や供与体基質が結合する際に活性部位に向かって構造変化し、基質の結合を安定化させ、反応に重要な役割をしていることが示唆された。K4CP の ES 複合体構造モデルから、K4CP は D362 が活性塩基として働き、S_N2-like の反応様式で GalNAc 転移を行っていることが強く支持された。

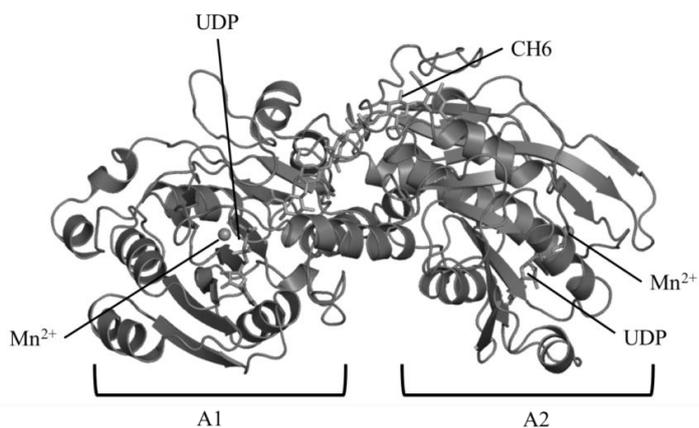


図1 Overall structure of K4CP

K4CP /UDP/CH6 複合体結晶構造の全体構造を示す。α-helices を ribbons で、β-strands を arrow で示す。A1 ドメイン(97-129)とA2 ドメイン(418-682)の二つのドメインから形成されている。CH6 は stick model で表している。

ヒアルロン酸糖鎖合成酵素である pmHAS については、低分解ながら立体構造決定がほぼ終了した状況である。PmHAS は 972 のアミノ酸残基から成っており、二つの糖転移活性を持つドメインを含む三つのドメインから構成されている。PmHAS は合成中のヒアルロン酸をアクセプター基質に、ヒアルロン酸の非還元末端が GlcUA のときは UDP-GlcNAc をドナー基質として GlcNAc を、非還元末端が GlcNAc のときは UDP-GlcUA をドナー基質として GlcUA を転移する反応を行っている。つまり、K4CP が転移する GalNAc に対応する部分が、GlcNAc になっている酵素ということができる。この酵素についての基質認識機構を明らかにすることで、コンドロイチン糖鎖とヒアルロン酸糖鎖という似て異なる糖鎖を選択的に伸長反応を進めるメカニズムの解明につなげていく予定である。

これらの研究は、グリコサミノグリカン糖鎖の生合成の詳細な分子メカニズムの解明に大きく貢献するものと考えられる。

以上の研究は、主に九州大学大学院農学研究院生物化学研究室の木村誠教授と愛知医科大学の木全弘治教授、杉浦信夫准教授、米国 NIEHS 根岸正彦先生、並びに生化学工業株式会社との共同研究で行われた。九州大学生物化学研究室では、大学院生の水上有紗氏、副島正行氏、西尾健明氏、嶋田宏章氏、大澤拓生氏らが実験を担当した。

謝辞

X線回折実験は、SPring-8 及び PF のビームラインを使用しました。感謝申し上げます。本研究は JSPS 科研費 25440029 の助成を受けたものです。