

## 2.7.8 研究分野：生物機能変換学

構成員：	教授	村田 幸作
	准教授	橋本 渉
	助教	河井 重幸
	大学院博士後期課程	2名
	大学院修士課程	4名
	専攻4回生	3名
	博士研究員 (PD)	5名
	研究員	5名

### A. 研究活動 (2009.4~2010.3)

#### A-1. 研究概要

##### a) 細菌細胞表層における高分子認識機構

多糖アルギン酸資化性細菌 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株は、アルギン酸レセプターとして機能するフラジェリンホモログ p5 を細胞表層にもつ。レセプターにおけるアルギン酸結合領域の構造を明らかにするため、アルギン酸結合能を示す断片化タンパク質  $\Delta$ N20C20 (N 末端 20 残基と C 末端 20 残基を欠失) の結晶構造を決定した。この構造モデルでは、N 末端 23 残基の電子密度が薄く、最終的に N 末端 43 残基と C 末端 20 残基が欠失している ( $\Delta$ N43C20: 残基番号 44-364)。今回の構造モデルにより、アルギン酸結合性を示す C 末端領域 (残基番号 353-363) が  $\alpha$ ヘリックスを構成し、その領域の温度因子は分子全体の平均値より高いことが分かった。一方、アルギン酸結合性を示す N 末端領域 (残基番号 20-40) の構造決定には至らなかった。このことから、アルギン酸結合領域は揺らぎのある構造をとることが明らかになった。

##### b) 多糖リアーゼの構造プロテオミクス

クロレラウィルスタンパク質 vAL-1 は、N 末端側 11 kDa のクロレラ細胞壁吸着ドメインとファミリー PL-14 アルギン酸リアーゼと相同性を示す C 末端側 27kDa の触媒ドメインから構成される。触媒ドメインであるアルギン酸リアーゼ vAL-1(S) の作用様式を解析した。vAL-1(S) は、中性条件下ではエンド型の作用様式を示し、塩基性条件下ではエキソ型活性を発現することが分かった。このように一つの酵素がエンド型とエキソ型の両方の作用様式を示す vAL-1(S) は、多糖リアーゼの中で初めての例である。各 pH における vAL-1(S) とグルクロン酸との複合体結晶の構造を解析した。グルクロ

ン酸は、pH 7 ではクレフトの外側に、pH 10 ではクレフト内部に結合する。つまり、糖との親和性を示す領域は、中性条件下と塩基性条件下とで異なる。このことから、vAL-1(S)クレフト内各領域における基質との親和性が pH 依存的に変化し、各 pH における酵素とアルギン酸との結合部位が異なることにより、pH 依存的なエンド型とエキソ型の作用様式が生じると示唆された。

#### c) 窒素固定細菌における低窒素応答機構

窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* は、空気中の窒素をニトロゲナーゼによりアンモニアに同化し生育する。本菌における低窒素条件下で誘導発現する遺伝子アイランドは、ニトロゲナーゼの活性化に必要な鉄の取り込みに関与するシデロフォア（アゾトバクチン）合成関連遺伝子クラスターであることを明らかにした。低窒素条件下で、*A. vinelandii* はアゾトバクチン合成関連遺伝子を高発現させ、ニトロゲナーゼの活性化に必要な鉄の取り込みを昂進させると考えられる。また、アゾトバクチン遺伝子破壊株では、鉄の枯渇に応じてカテコールシデロフォアの生産量が上昇したため、*A. vinelandii* では、アゾトバクチンとカテコールシデロフォアの少なくとも 2 種類が鉄の取り込みに関与していることが示された。

#### d) 真核生物の NADP(H) 合成酵素 [NAD(H) キナーゼ] の構造

NAD キナーゼ (NADK) は、NAD のリン酸化反応を触媒する NADP 合成酵素である。真核生物由来の NADK の立体構造やその活性制御機構の詳細は不明である。一方で、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のミトコンドリア局在型 Pos5 は強力な NADH リン酸化 (NADH キナーゼ) 活性を示す NADH キナーゼである。本研究では、N 末端側から 87 アミノ酸残基を削除したヒト由来 NADK (HsNADK) の大腸菌における発現条件を検討し、最適な発現系を決定し、既報の約 20 倍の発現量の向上を達成した。さらに、本酵素標品が、生成物 NADP<sup>+</sup>ではなく、還元型補酵素 NADH および NADPH により活性が阻害されること、ATP に対してシグモイド型の挙動を示すことを明らかにした。これらは、細胞内レドックスおよびエネルギー状態が HsNADK の活性制御に関わることを示唆した。一方、Pos5/NADH 複合体の立体構造を初めて決定し、Pos5 の強力な NADH キナーゼ活性を可能にすると予想されるアミノ酸残基を明らかにした。

#### e) 出芽酵母 NAD<sup>+</sup>合成系の分子生物学

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の NAD 合成経路遺伝子欠損株 (npt1bna4) 作製の過程で、出芽酵母が QA を培地中に分泌することを偶然に見出した。NAD<sup>+</sup>前駆体 (ビタミン) として、QA のみを特異的かつ絶対的に必要とする出芽酵母株 (npt1bna4nrk1) を取得した。本株を用いて、QA 分泌量の評価および定量法を確立した。これらの系を用いることにより、出芽酵母をモデルとした、QA の合成と分泌の分子機序の理解が可能になると期待された。

#### f) 出芽酵母を用いた酸素生物学

酸素ガス、とりわけ高濃度酸素ガスは、医療や健康促進の目的で頻用されているが、高濃度酸素に対する細胞の応答機序には未解明な点が多い。本機序解明のため、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を液体培地で対数増殖期まで好気培養し、100%酸素ガスに短時間（5、15分間）曝した。これにより転写量が変動する遺伝子をマイクロアレイで解析した。その結果、幾つかの遺伝子の転写量が上昇した。特に、ペルオキシレドキシンの修復反応に関わる SRX1 の転写量が約 30 倍に増大した。

#### g) 海性バイオマスからの生物燃料生産

アルギン酸資化性細菌を用いて、海性バイオマス（アルギン酸）からのエタノール生産プロセスの確立を検討した。*Zymomonas mobilis* 由来ピルビン酸脱炭酸酵素とアルコール脱水素酵素の遺伝子を導入した *Sphingomonas* 属細菌 A1 株に、酵母由来補酵素再生系を付与した。得られた育種株は、5 日間の培養でアルギン酸から 1.0% 以上のエタノールを産生した。

#### h) 連鎖球菌によるグリコサミノグリカン分解

化膿性溶血型連鎖球菌（*Streptococcus* 属細菌）が、多糖リアーゼと不飽和グルクロニルヒドロラーゼ（UGL）の協調作用により宿主細胞外マトリックス（グリコサミノグリカン）を分解し、宿主細胞へ侵入・感染することを示唆してきた。本研究では、連鎖球菌 UGL の基質特異性とその構造要因を解析した。*Streptococcus agalactiae* 由来 UGL は、GalNAc の 6 位が硫酸化された不飽和コンドロイチン二糖（ $\Delta 6S$ ）を最良の基質とした。UGL の不活性変異体 D115N と  $\Delta 6S$  との複合体の立体構造を決定した。UGL は、分子中央のクレフトで基質  $\Delta 6S$  と結合する。UGL の Ser368 は、 $\Delta 6S$  の硫酸基と水素結合を介した相互作用を示す。また、硫酸基周辺に位置する正電荷アミノ酸残基 Lys370 は負電荷の基質を安定化すると示唆された。当該残基の部位特異的変異体（S368G と K370A）は、野性型酵素と比較すると、2~20 倍低い  $\Delta 6S$  に対する親和性を示した。従って、Ser368 と Lys370 が硫酸基との相互作用に重要であると示唆された。哺乳動物におけるグリコサミノグリカンは高度に硫酸化されているため、硫酸化糖に作用する連鎖球菌 UGL は宿主細胞外マトリックスの分解へ寄与していることが考えられる。

## A-2. 研究業績（国内・国外含む）

### a) 成果刊行

#### 著書

・Hashimoto, W., Y. Maruyama, T. Itoh, B. Mikami, and K. Murata:  
Bacterial system for alginate uptake and degradation. In "Alginates: Biology & Applications" Microbiology Monographs 13: (Ed. Bernd Rehm), Springer, pp73-94, 2009

### 原著論文 (査読付)

- Ogura, K., M. Yamasaki, T. Yamada, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:  
Crystal structure of family 14 polysaccharide lyase with pH-dependent modes of action. *J. Biol. Chem.*, 284; 35572–35579, 2009
- Maruyama Y., Y. Nakamichi, T. Itoh, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:  
Substrate specificity of streptococcal unsaturated glucuronyl hydrolases for sulfated glycosaminoglycan. *J. Biol. Chem.*, 284; 18059–18069, 2009
- Hashimoto, W., A. Ochiai, J. He, T. Itoh, B. Mikami and K. Murata:  
Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cell-surface alginate-binding protein Algp7 from *Sphingomonas* sp. A1. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 65; 515–517, 2009

### 総説

- Hashimoto W, S. Kawai and K. Murata:  
Bacterial supersystem for alginate import/metabolism and its environmental and bioenergy applications. *Bioengineered Bugs*, 1; 1–13, 2010

### 報告書等

- Takase, R., A. Ochiai, T. Itoh, K. Ogura, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:  
Crystal structure of NADP-bound  $\alpha$ -keto acid reductase prerequisite for alginate metabolism in *Sphingomonas* sp. A1. *SPring-8 User Experiment Report*, 2009B1177, 2009
- Maruyama, Y., A. Chuma, T. Itoh, A. Ochiai, K. Ogura, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:  
Crystal structure of the metallopeptidase family M16 enzyme from *Sphingomonas* sp. strain A1. *SPring-8 User Experiment Report*, 2009B1192, 2009
- Nakamichi, Y., Y. Maruyama, T. Itoh, A. Ochiai, K. Ogura, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:  
Crystal structure of streptococcal unsaturated glucuronyl hydrolase in complex with sulfated substrate. *SPring-8 User Experiment Report*, 2009B1201, 2009
- Maruyama, Y., A. Chuma, A. Ochiai, K. Ogura, Y. Nakamichi, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:  
X-ray structural analysis of the metallopeptidase family M16 enzyme. *SPring-8 User Experiment Report*, 2009A1179, 2009
- Takase, R., A. Ochiai, Y. Nakamichi, T. Itoh, K. Ogura, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:  
X-ray crystal structure of *Sphingomonas* sp. A1  $\alpha$ -keto acid reductase for alginate metabolism. *SPring-8 User Experiment Report*, 2009A1329, 2009

## 特許

・特願 2009-198972 「海洋バイオマスからのエタノール生産」、発明者：村田幸作、橋本 渉、河井重幸、織田浩司、庵原啓司、三上文三、竹田浩之、米山史紀、落合秋人、出願人：国立大学法人京都大学、株式会社マルハニチロホールディングス、出願日：平成 21 年 8 月 28 日

## b) 学会発表

- ・日本農芸化学会 2009 年度大会 (7 件)
- ・日本ビタミン学会第 61 回大会 (2 件)
- ・第 82 回日本生化学会大会 (7 件)
- ・第 2 回リン化合物討論会 (第 29 回 C-P 化合物研究会) (2 件)
- ・日本生物工学会 2009 年度大会 (1 件)

## **A-3. 国内における学会活動など**

### 所属学会等 (役割)

- ・村田 幸作：日本農芸化学会 (全国評議員・「化学と生物」編集委員長)、日本生物工学会 (評議員)、日本生化学会 (評議員・第 82 回日本生化学会大会組織委員)、日本栄養・食糧学会 (評議員)、日本ビタミン学会 (評議員)
- ・橋本 渉：日本農芸化学会 (代議員・2011 年度大会プログラム委員、シンポジウム委員)、日本生物工学会 (代議員)、酵母研究会 (運営委員)
- ・河井 重幸：日本農芸化学会 (代議員)

### 競争的資金等獲得状況

#### ①科学研究費補助金

- ・基盤研究(B)：村田 幸作：細菌鞭毛フラジェリンの構造機能相関と細胞表層局在化機構
- ・基盤研究(C)：橋本 渉：連鎖球菌におけるヘパリン分解・輸送系の構造・機能相関とその感染症への関与
- ・若手研究(B)：河井 重幸：出芽酵母における NADP(H) 合成および分解系の制御機構

#### ②その他の競争的資金

- ・生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業：村田 幸作：海性バイオマス (アルギン酸) からのエタノール生産基盤
- ・文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム：橋本 渉：多糖の輸送・分解に関わる細菌由来超分子の構造生物学とその食品・環境分野への応用

#### A-4. 国際交流・海外活動

##### 所属学会等（役割）

- ・ 橋本 渉 : Applied Microbiology and Biotechnology (Editor)

#### B. 教育活動（2009. 4～2010. 3）

##### B-1. 学内活動

###### a) 開講授業科目（担当教員）

- ・ 全学共通科目： 基礎情報処理演習（橋本分担）
- ・ 学部： 食品微生物学（村田）、生物機能変換学（村田・橋本）、食品生物科学入門及び演習（村田・橋本）、食品生物科学演習（村田・橋本）専門外国書講読 II（橋本分担）微生物学実験及び実験法（橋本・河井分担）
- ・ 大学院： 食品生産工学特論（村田分担）、生物機能変換学特論（村田・橋本）、生物機能変換学演習（村田・橋本）