

平成22年 6月21日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19770093
 研究課題名（和文） ポリ-γ-グルタミン酸加水分解酵素の立体構造解析及び基質認識機構の解明
 研究課題名（英文） Crystallographic study of poly-γ-glutamate hydrolase.
 研究代表者 藤本 瑞
 (FUJIMOTO ZUI)
 独立行政法人農業生物資源研究所・タンパク質機能研究ユニット・主任研究員
 研究者番号：20370679

研究成果の概要（和文）：納豆菌(*Bacillus subtilis (natto)*)を宿主とするバクテリオファージ(ΦNIT1)が生産する、納豆菌の生産するポリ-γ-グルタミン酸 (poly-γ-glutamate; PGA) を分解する酵素 (PghP; 25kDa) の X 線結晶構造解析を行い、1.9 Å 分解能で結晶構造を決定した。PghP は平行βシートを主体とする構造を有し、1分子に一つの亜鉛イオンを配位していた。全体構造の比較から、本酵素は亜鉛ペプチダーゼである carboxypeptidase A と類似した構造をもつことが判明した。

研究成果の概要（英文）：Poly-γ-glutamate hydrolase P (PghP) of *Bacillus subtilis* bacteriophage ΦNIT1 hydrolyzes the γ-glutamyl peptide linkage of extracellular poly-γ-glutamate produced by *bacilli*. Crystal structure of PghP was determined at a resolution of 1.9 Å. Structure of PghP was elucidated as a globular protein with an open α/β mixed core structure and a seven-stranded parallel/anti-parallel β-sheet. Structure analysis demonstrated that PghP had a catalytic center containing a zinc ion and an overall topology resembling mammalian carboxypeptidase A and related enzymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

ポリ-γ-グルタミン酸 (poly-γ-glutamate; PGA) はグルタミン酸が γ-カルボキシル基と α-アミノ基で結合した分子量約 200 万ダルトン (2MDa) にも及ぶポリペプチドであ

り、納豆の糸に見られる粘質物の主成分である。納豆菌(*Bacillus subtilis (natto)*)のほか、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) などいくつかの *Bacillus* 属細菌が生産することが知られている。細菌には動物の体内に侵入した際白血球

などの食作用から逃れるために細胞の周りに莢膜と呼ばれる細胞保護構造を持つものがあり、一般的にその主成分は多糖類であることが多いが炭疽菌ではPGAが莢膜の主成分であることから、PGAは宿主の免疫機構から逃れるための重要な役割を担っていると考えられている。また、納豆菌は菌が増殖して栄養不足になったときに自身のもつPGA分解酵素によりPGAを分解し、分解産物であるグルタミン酸を栄養源として利用することが明らかとなっており、PGAは栄養貯蔵物の役割も果たしていると考えられている。

PGAは菌種によりその組成が異なるが、納豆菌の生産するPGAはほぼ同量のL型とD型のグルタミン酸を含み、その配列はランダムである。PGAの材料は生合成されたL-グルタミン酸やダイズタンパク質を分解したL-グルタミン酸であるが、細胞質膜上にあるタンパク質によりATPのエネルギーを利用して重合される際に、一部のグルタミン酸に異性化が起こるためだと考えられている。一方、PGAを分解する酵素は納豆菌に少なくとも2つ存在し、一つは γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT; 61kDa) と呼ばれるエキソ型の酵素で、PGAのアミノ末端からL型とD型の区別なくグルタミン酸を一つずつ切り出していく。もう一つのPGA加水分解酵素であるYwrDあるいはYwtD(44kDa)と呼ばれる酵素はエンド型の分解様式を持ち、PGAを異なる長さのポリペプチドに分解するが、YwtDはD-グルタミン酸同士の結合の間だけを特異的に切断するDD-アミドヒドロラーゼであることが報告されている。また、納豆菌を宿主とするバクテリオファージ (Φ NIT1) から、新規のPGA分解酵素 (PghP; 25kDa) が見い出されている。PghPを欠損させたファージは感染能がなくなることから、納豆菌のPGAも自身の莢膜成分としての役割をもつとともに、ファージのPghPが感染時に重要であると考えられている。PghPのPGA分解様式は納豆菌の持つYwtDと同様エンド型であるが、PghPの分解産物の詳細な解析の結果、PghPはYwtDとは異なりPGAのL-グルタミン酸同士の結合の間だけを特異的に切断する可能性が高いと考えられている。以上3つのPGA分解酵素に1次配列上の同一性は全くなく、それぞれが別のタンパク質として進化し、PGAを分解するようになったと考えられるが、その分解様式までもが全く異なっており、その分解機構は非常に興味深い。

PGA加水分解酵素は、納豆の粘性や旨味に影響する重要な酵素で、PGAの組成、構造を解析する上で非常に重要な役割を担うと考えられ、学術的にも注目されるようになってきた。さらに、上記のようにPGA加水分解酵素には3種類以上の酵素群があり、それぞ

れが異なる分解機構を有しているため、PGA加水分解酵素の光学異性体基質認識機構を研究する上で非常に貴重な研究ターゲットとなっている。そこで、立体構造からPGA加水分解酵素のPGA加水分解機構を解明する研究アプローチに着目した。

2. 研究の目的

PGAを加水分解する3種類の酵素のうち、PghPは食品総合研究所の木村博士らにより大腸菌でのタンパク質発現・大量精製の技術が確立されている。PghPはこれまでに立体構造が報告されているタンパク質との同一性はなく、立体構造が新規であることが予想されるため構造解析の必要性が高い。さらに、合成オリゴ- γ -L-グルタミン酸を用いた分解特性解析が精力的に進められてきており、PghPはグルタミン酸が6つ以上の長さのオリゴマーしか分解しないが、グルタミン酸6つの長さのものを切断した場合、1から5個の長さのオリゴマーがランダムに生産されることが示されており、そのユニークな分解機構も大変興味深い。従って、本研究課題では、合成PGAオリゴマーをリガンドとしたPghP-基質複合体の立体構造解析を行い、PghPの基質認識機構、特にL-グルタミン酸の選択的認識機構を明らかにするため、PghPの立体構造解析と結晶構造の決定を目的とした。

3. 研究の方法

①結晶化

結晶化に用いるタンパク質サンプルは食品総合研究所木村博士より供与されたものを使用したが、サンプル量が多く必要な場合もあり、自らもタンパク質の発現、精製を行った。

PghPの結晶化は、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて、市販の結晶化スクリーニングキットに対し、スクリーニングを行った。PEG600を沈殿剤として用いた条件で最初に結晶が得られたが、その後PEG400,PEG1000を沈殿剤とする条件でも結晶が得られた。

②X線回折データ測定

X線回折データは、最初に実験室X線解析装置で測定し、結晶の性質を検討した。その結果、PEG400,PEG1000を沈殿剤とする条件で得られた結晶が、データ測定により向いていることが判明した。

高エネルギー加速器研究機構放射光施設の共同利用研究を本課題で申請し、X線回折データの取得は基本的に放射光施設 (PF) で行った。NativeデータはビームラインBL-NW12で測定し、2.4 μ m分解能のデータを取得した。結晶のクライオ測定は、結晶化条件でPEG濃度が十分高いことから、そのまま直接凍らせることが可能であった。取得したX線データ

は、データ処理ソフト HKL2000 で必要な処理を行った。本酵素は新規な構造を持っていると考えられたので、PghP のセレノメチオン誘導体を調製し、Native タンパク質と同じ条件で結晶化を行った。

セレンの異常分散データはビームライン NW12 でセレン吸収端近傍の 4 波長で測定、を行った。

③構造解析

結晶構造解析はセレノメチオン誘導体結晶のピークデータを用いた単波長異常分散法で行った。プログラム solve で SAD 法による位相計算を行った後、初期位相から、構造モデルのトレースを行った。非対称単位結晶中の 2 分子の全体構造のトレースを行った後、1.8Å 分解能 native データへ構造の移設を行い、高分解能データを用いて、構造モデルの精密化を進めた。最終的に結晶学的 R 因子 21.1% の構造モデルを取得することに成功した。

構造構築後に、電子密度の重なった部分が存在したためデータの双晶が疑われ、各種プログラムで検証した結果、本結晶は空間群 $P3_2$ であり、merohedral twin で、twin fraction が 0.47 であり、空間群 $P3_221$ は双晶化による見かけの空間群であることが示唆された。そこで空間群 $P3_221$ で処理したデータを使用し、非結晶学的対称の拘束を利用し、結晶学的 R 因子 19.7% のモデルを得た後、データを空間群 $P3_2$ で再処理し、反射の分離を行った。Twin データ処理は、構造座標を利用したプログラム CNS による分離処理が、最も電子密度が鮮明に計算できたので、この方法を採用した。結晶学的 R 因子が約 28% のモデルを最終構造モデルとした。

④構造比較

立体構造の類似検索は Dali server または AVAST search を利用した。

⑤複合体作製

本酵素の基質認識機構を解明するためには基質や生成物、あるいは基質アナログとの複合体の立体構造が不可欠なので、オリゴ- γ -L-グルタミン酸等をリガンドとした PghP 複合体の X 線結晶構造解析を行うために、オリゴ- γ -L-グルタミン酸の、ソーキング法または共結晶化の検討を行った。

4. 研究成果

①結晶化

PEG600 あるいは PEG400, PEG1000 を沈殿剤とする条件で結晶を得ることができた。2 種類の結晶は塊状で外見酷似していた。X 線回折実験の結果からどちらの条件でも、空間群および格子定数はほぼ同じであることが明らかとなったが、データの分解能と、SeMet 誘導体タンパク質の結晶化の再現性から、

PEG400, PEG1000 を沈殿剤とする条件を使用することにした。結晶は大きいものでは直径 0.7mm 程もあるものが得られた (図 1)。

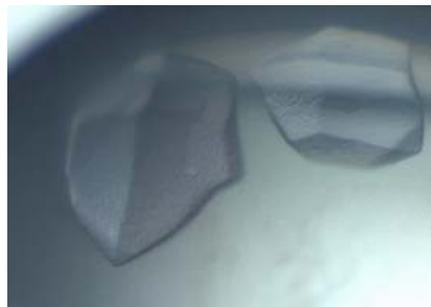


図 1 PghP の結晶

②X線回折データ測定

Native データはまず、2.4Å 分解能のデータを収集し、HKL2000 で処理を行った結果、結晶は空間群 $P3_221$ に属し、格子定数 $a = b = 85.9$, $c = 86.7\text{\AA}$ であった。完全度 98.7%、 R -merge 8.6 のデータが得られた。次にセレノメチオン誘導体結晶の解説データ収集を行った。2.4 Å 分解能までの収集で格子定数 $a = b = 86.2$, $c = 86.7\text{\AA}$ で、完全度 99.1%、 R -merge 10.6 のデータが得られた。Native データは、再度測定を行い、1.9Å まで分解能をのぼし、twin のため空間群 $P3_2$ で再処理を行い、格子定数 $a = b = 86.8$, $c = 85.1\text{\AA}$ 、完全度 99.6%、 R -merge 13.0 のデータが得られた。

③構造解析

最終構造モデルは、1.9Å 分解能で結晶学的 R 因子が 0.281 となった。Twin 処理を施したデータを使用しているため通常より R 値が高くなっている。Phi-Psi プロットではすべてのアミノ酸が許容範囲に収まっているモデルが得られた。

PghP は平行/逆平行混在 β シートを主体とする Open β α 構造を有し、中心の β シートは 6 本の β ストランドより形成されていた (図 2)。さらに非対称単位中の 2 分子が、それぞれの β シートをつなげるように二量体を形成していた (図 3)。1 分子内のその両端の位置にそれぞれの分子が一つずつ亜鉛イオンを配位しており、そこが触媒部位であると推定できた。亜鉛イオンは 2 つのヒスチジン残基と一つのグルタミン酸残基により配位されていた。亜鉛イオンの結合部位は分子を 2 分する溝の中心にあり、溝の中にはグルタミン酸やアルギニンなど、触媒基や基質認識にかかわると考えられるアミノ酸が存在していた。このことから本酵素はメタロプロテアーゼ様触媒機構を持つのではないかと考えられた。



図2 PghPの結晶構造リボンモデル

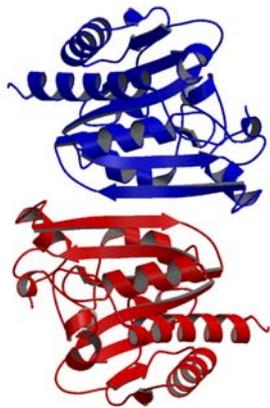


図3 PghPの二量体構造

④構造比較

Dali server を用いた類似構造検索では *N*-formylglutamate amidohydrolase from *Rastonia eutropha* (FGA), *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase from *Bacillus polymyxa*, carboxypeptidase B from *Helicoverpa zea*, cytosol aminopeptidase from *E. coli*, bovine carboxypeptidase A (CPA)などが類似タンパク質として示され、AVAST searchでもカルボキシペプチダーゼが上位を占めた。実際に構造を重ね合わせてみると、PghPはCPAと主鎖の重なりでよい一致を見せたものの、CPAに比べるとN末端C末端側のβストランドが1つつ少なくて、全体ではコンパクトな構造をとっているということが明らかとなった(図4)。一方で亜鉛イオンの結合部位は、CPAのものと同様により一致を示した。このことから、PghPの触媒反応機構はCPAのものと同様であると推定された。すなわち、結合金属である亜鉛イオンとその近傍にあるグルタミン酸が触媒基であると考えられた。

CPAや他のカルボキシペプチダーゼでよく保存されているアルギニン2つがPghPでは

保存されておらず、他のアミノ酸に置き換わっていることから、これらのアミノ酸が基質特異性、すなわちPghPではγペプチド結合を切断するが、他のペプチダーゼではαペプチド結合を認識するという特異性に重要であると推定された。この推察は変異体作製により立証する予定である。

一方で、PghPと同じようにPGAを加水分解するGGTとは、全く構造類似性が見当たらなかった。GGTはセリンプロテアーゼであり、PghPは亜鉛結合型メタロプロテアーゼであり、タイプの異なるペプチダーゼがたまたま同じ基質を認識し、分解活性を保有したと考えられる。全体構造が全く異なるので単純に比較するのも難しいが、基質認識に関わるアミノ酸も全く異なっていた。

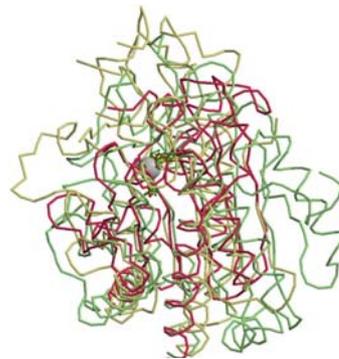


図4 PghP(赤)とCPA(緑)、FGA(黄)との構造の重ね合わせ

⑤複合体作製

基質複合体は作製を試みたものの、得ることができなかった。CPAファミリーの他の酵素でも複合体の解析例は乏しく、困難であることが明らかとなったので、今回は断念した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Zui Fujimoto, Isao Shiga, Yoshifumi Itoh and Keitarou Kimura, Crystallization and preliminary crystallographic analysis of poly-γ-glutamate hydrolase from bacteriophage FNIT1. *Acta Crystallog. sect. F Struct. Biol. Crystalli. Commun.*, 査読有, 65 (9) 913-916 (2009)

[学会発表] (計4件)

- ① 藤本瑞, 志賀勲, 伊藤義文, 木村啓太郎, 納豆菌ファージが生産するポリ-γ-グルタミン酸加水分解酵素のX線結晶構造解析、第26回PFシンポジウム要旨集 251 (2009)

つくば

- ② Keitarou Kimura and Zui Fujimoto, Bacteriophage contamination and fermentation of Natto by *Bacillus subtilis* (natto) –Study of phage related key enzyme that spoils sticky texture of natto-, BioMicroworld2009 T90 (2009) Lisbon Portugal
- ③ 藤本瑞、木村啓太郎, バクテリオファージ由来ポリ- γ -グルタミン酸加水分解酵素の結晶構造解析における双晶データの扱い、日本結晶学会 2009 年度大会講演要旨集 97 (2009) 西宮
- ④ 木村啓太郎, 藤本瑞、納豆菌ファージの γ ポリグルタミン酸分解酵素 PghP の構造, 日本農芸化学会 2010 年度大会講演要旨集 135 (2010) 東京

[図書] (計 1 件)

- ① Keitarou Kimura and Zui Fujimoto, Enzymic degradation of poly-gamma-glutamic acid. In Microbiology Monographs, Vol. 15, Amino-Acid Homopolymers Occurring in Nature. Edited by Hamano, Yoshimitsu Springer. 印刷中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 瑞 (FUJIMOTO ZUI)

独立行政法人農業生物資源研究所・タンパク質機能研究ユニット・主任研究員

研究者番号：20370679