

平成 23 年 4 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380049

研究課題名（和文）

細菌鞭毛フラジェリンの構造機能相関と細胞表面局在化機構

研究課題名（英文）

Structure/function relationship and cell surface localization mechanism of bacterial flagelin

研究代表者

村田 幸作 (MURATA KOUSAKU)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：90142299

研究成果の概要（和文）：*Sphingomonas* 属細菌 A1 株では、鞭毛形成タンパク質フラジェリンは鞭毛形成には与らず、細胞表面に局在し、強力なアルギン酸結合活性を示し、且つその欠失は細胞死を惹起する。フラジェリンのかかる特異的な性質の生物学的意義を明らかにするため、フラジェリン、フラジェリンの細胞表面繫留タンパク質、並びにフラジェリンの細胞表面通過を許容するペプチドグリカン分解酵素の立体構造を決定し、その構造機能相関とそこから導き出される生物学的意義を考察した。

研究成果の概要（英文）：Flagellin, a flagellar protein, in a bacterium *Sphingomonas* sp. A1 does not participate in the formation of flagella, localizes on the cell surface, and shows highly potent capability to bind alginate, an acidic polysaccharide present in brown sea algae. To elucidate these characteristic properties of flagellin, three-dimensional structures of flagellin, flagellin-anchoring protein on the cell surface, and peptidoglycan-hydrolyzing enzyme were determined and their relationships between structure and function clarified. Based on these results, the biological significance of flagellin were discussed from the standpoint of sensor for alginate, cell surface structure, and molecular evolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
21年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
22年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：フラジェリン、鞭毛、ペプチドグリカン加水分解酵素、メタロペプチダーゼ、X線結晶構造解析、体腔形成細菌

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性の絶対好気性細菌であるスフィンゴモナス (*Sphingomonas*) 属細菌 A1 株は、

強力で特異的なウロン酸資化能を持つ。特に、ウロン酸の高重合体である酸性多糖アルギン酸の資化においては、細胞表面に体腔(孔)

を形成し、そこからアルギン酸を高分子のまま細胞質に取り込み、細胞質で単糖(ウロン酸)にまで分解し、資化する巧妙な機能を持つ。もう一つの A1 株の特徴は、鞭毛形成遺伝子クラスターを持ちながら鞭毛を形成せず、鞭毛形成タンパク質(フラジェリン)は細胞表層に局在し、しかも強力なアルギン酸結合能を有する(この能力は、全ての細菌の鞭毛形成タンパク質の特性である)ことである。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではフラジェリンに焦点を当てて、①フラジェリンの構造機能相関、②フラジェリンの細胞表層局在化に関わるタンパク質の特定とその構造機能相関、並びに③細胞質で合成されたフラジェリンの細胞表層への移行を許容するペプチドグリカン分解酵素の特定とその構造機能相関を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

フラジェリン、フラジェリン繫留タンパク質、及びペプチドグリカン分解酵素は、それらの遺伝子を A1 株から大腸菌にクローニングし、大腸菌で大量発現させた。蒸気拡散法で各タンパク質の結晶を調製後、X線結晶構造解析に供した。

4. 研究成果

(1) フラジェリン

①鞭毛タンパク質フラジェリン：鞭毛は、螺旋フィラメントから成るタンパク質複合体であり、フックを介して細胞膜の H⁺または Na⁺依存回転モーターに接続されている。*Escherichia coli* と *Salmonella typhimurium* 鞭毛について、構造と機能に関する詳細な研究が行われているが、A1 株のフラジェリン(p5、p6)は、下記2点において他の細菌のフラジェリンとは様相を異にする。

アルギン酸結合能 A1 株フラジェリン(p5、p6)は、アルギン酸を特異的、且つ強力に結合($K_d \sim 10^{-9}M$)する。同様な活性は、大腸菌フラジェリンにも確認される。

細胞表層構造制御能 A1 株フラジェリン p5(または p6)の遺伝子破壊により、細胞表層は襞(プリーツ)構造から網目(ネットワーク)構造に転相し、同時に体腔形成能も消失する。また、フラジェリン p5 と p6 の二重変異は致死である。つまり、フラジェリンは、細胞表層構造と体腔形成を制御し、且つ細胞の生死をも左右する。

②細胞表層フラジェリンの一次構造: A1 株のフラジェリン p5 と p6 では、*E. coli* や *S. typhimurium* のフラジェリンに比して、その分子中央域のアミノ酸配列(アミノ酸残基数で 100 個程度)が欠落している。そのため、プロペラ部分が欠落したシャフト(軸)のみ

の鞭毛形成となるが、鞭毛機能は付随している。つまり、フラジェリンの中央域は可変性領域であり、この領域の構造が様々な生理機能に関わっていることが示唆される。

サルモネラ菌のフラジェリン(494 残基)においては、疎水性が高く、会合し易い N 末端残基(1~52 残基)と C 末端残基(451~494 残基)が鞭毛のフィラメント形成に関わっている。この N 末端及び C 末端のアミノ酸配列は、p5 においても強く保存されている。

つまり、種々のフラジェリン間で高いアミノ酸配列の相同性を示す N 末端領域及び C 末端領域が、p5 においてもその高次構造と機能に関与していると考えられる。従って、A1 株フラジェリンの立体構造解析は、フラジェリンの多形性、多機能性、多局在性の理解のみならず、鞭毛の起源の解釈にも繋がる。

③フラジェリンの X 線結晶構造：細胞表層局在性/アルギン酸結合性フラジェリンの分子特性を明らかにするため、フラジェリン p5 の結晶構造を決定した(図 1)。サルモネラ菌由来フラジェリンの X 線結晶構造に次ぐ 2 番目の成果であるが、フラジェリン_{IN}モチーフを含むフラジェリンの立体構造としては最初の決定例である。

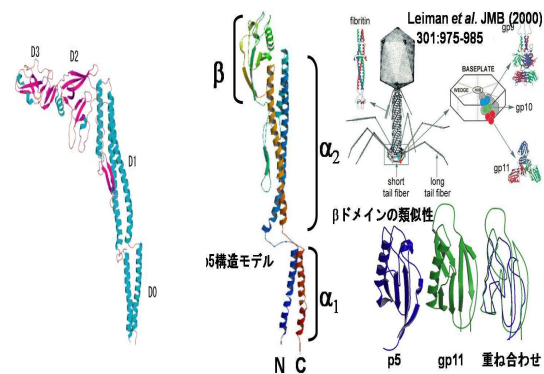


図 1. A1 株フラジェリン

(左)、A1 株フラジェリン p5(中)、及びフーージ gp11 と p5 β -ドメインの構造相関(右)

フラジェリン p5(383 残基)は、二つのドメイン(α -ヘリックスに富んだ α -ドメインと β -ストランドに富んだ β -ドメイン)から成り、両ドメインは 2 本の短鎖ペプチドリンカーによって繋がれている(図 2)。 α -ドメインは、N-末端領域と C-末端領域から成り、 β -ドメインは分子中央領域から成る。 α -ドメインの構造は、*S. typhimurium* フラジェリンの D1-ドメインに似ており、欠変異体の解析から 20~40 残基領域と 353~363 残基領域がアルギン酸結合に関与することを明らかにした。特に、 α -ヘリックスの延長上に存在するスポークと称されるクレフト領域が、p5 のアルギン酸結合部位であると想定された。クレフトは、アルギン酸 4 糖を包埋する

に十分な幅を有し、酸性残基(Asp、Glu)を配位している。アルギン酸は酸性多糖であるが、p5のアルギン酸結合活性はpH4付近を至適とするため、この酸性残基のクレフト内配置がアルギン酸結合の障害になることはないであろう。

β -ドメインの構造は、バクテリオファージT4の遺伝子産物であるpg11のフィンガードメインの構造と酷似している(図1)。pg11は、ベースプレートとファージが宿主に不可逆的接着する際に必要な長鎖または短鎖繊維とを結び付けているヒンジ様タンパク質である。pg11の中の α 4、 β 5、及び β 6の二次構造エレメントが、フラジェリン_INモチーフに相当する。

この新たな知見には、鞭毛の構築過程、並びに進化過程を理解する重要な意味が潜むと考えられる。フラジェリンは、最初に細胞表層タンパク質として合成され、その後鞭毛タンパク質に移行した(或いは、その逆)可能性が考えられる。また、鞭毛機械は、運動性とは全く無縁の他のシステムを構成する構造単位を寄せ集めて構築される、所謂モジュラーシステム(modular system)として進化したことを支持する。実際、各細菌の鞭毛を構成するタンパク質は、約50%程度しか共通性を持たない。

さて、A1株フラジェリンは細胞質で合成された後、内膜、ペリプラズム空間、外膜を横切って細胞表層に到達し、且つそこに繫留されなければならない。通常、フラジェリンはロッド管の中を通過して細胞表層に輸送されるが、A1株では如何なる装置がフラジェリン輸送に関わっているのであろうか?フラジェリンp5の細胞表層局在化に関わるタンパク質として、ペプチドグリカン分解酵素とメタロペプチダーゼ(M16ファミリー)が想定された。前者は、ペプチドグリカンを分解してフラジェリンの(同時に細胞質へのアルギン酸)通過を可能にし、後者はフラジェリンp5の β -ドメインと相互作用を通して、p5の細胞外膜へのアンカーリングに機能していると考えられる。そこで、この2種類のタンパク質のX線結晶構造解析を行い、フラジェリンの細胞表層局在化の機構の解明に迫った。

(2) ペプチドグリカン分解酵素

通常、フラジェリンは、鞭毛基部において仕分けされた後、TypeIII(T3SS: typeIII secretion system)輸送系によって内膜・外膜を縦断するロッド管を經由して細胞外に輸送される。従って、フラジェリンの輸送(同時にロッド管形成)とペプチドグリカン加水分解酵素との関連が重要になる。

A1株は、鞭毛形成遺伝子クラスター内とその近傍に計3種類のペプチドグリカン加水分

解酵素(SPH1045、SPH1787、SPH1797)を有する。この中、SPH1045の遺伝子破壊株では、フラジェリンp5の分泌が抑制されることを見出していた[Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(4), 673-692 (2005)]。つまり、少なくともフラジェリンp5は、TypeIII輸送系とは別の輸送系によって細胞質から外膜に分泌されていることが示唆された。

①ペプチドグリカン分解酵素: 細菌細胞壁の主要成分の一つであるペプチドグリカンは、細胞形態維持やストレス耐性などに関わる。その構造は、*N*-アセチルムラミン酸と*N*-アセチルグルコサミンの2糖の繰り返し配列に、*D*-、*L*-アミノ酸から成るテトラペプチドが付加した糖ペプチドである。細胞分裂や細胞表層タンパク質複合体の発現には、ペプチドグリカンの部分的な分解が必要である。ペプチドグリカン分解酵素としては、糖鎖部位に作用するリゾチームとペプチド部位に作用するアミダーゼやエンドペプチダーゼが知られている。

糖鎖部分に作用するペプチドグリカン分解酵素は、Henrissatらが提唱するCAZyデータベースでは5種類のGHファミリー(22, 23, 24, 25, 27)に分類されており、GHファミリー22~25についてはその構造・機能相関が明らかにされている。一方、GHファミリー73は、鞭毛形成に関連する酵素や自己溶菌酵素などを含み、細菌に普遍的に存在する酵素のファミリーであると考えられる。その中には、鞭毛のロッド部分の形成に関与する酵素や細胞分裂や自己溶菌に必要な酵素も含まれる。

フラジェリンp5は、TypeIII輸送系とは別の輸送系によって細胞質から外膜に輸送されていることが示唆された。この可能性を明らかにするため、鞭毛形成に関連する酵素や自己溶菌酵素などを含むGHファミリー73酵素の構造・機能相関の解明を進めた。尚、GHファミリー73酵素の立体構造解析は行われていない。

②GHファミリー73酵素の一次構造: A1株の全ゲノム構造に基づいてGHファミリー73酵素を探索した結果、SPH1045、SPH1787、SPH1797は、GHファミリー73酵素F1gJと相同性を示すことが判った。但し、SPH1045とSPH1797は全長に渡ってF1gJと相同性を示すが、SPH1787はF1gJのN末端領域のみをコードする。F1gJのC末端領域(特に、Glu223とAsp248)がペプチドグリカンの分解に重要であることが明らかにされているため、SPH1045のC末端領域(SPH1045-C)を大腸菌で発現させ、精製SPH1045-Cを以後の解析に用いた。

③SPH1045-Cの性質: 分子量17kDaの単体。ペプチドグリカン分解活性を、*Micrococcus luteus*の溶菌活性で評価した結

果、SPH1045-C 存在下で、*M. luteus* 細胞懸濁液の濁度が減少することから、SPH1045-C はペプチドグリカン分解(溶菌)活性を持つことが確認された。反応は pH7.5、37°C で最も良く進行する。1mM の EDTA 存在下では、活性は約 70%阻害される。熱安定性は非常に高く、沸騰水中で 10 分間加熱後も 70%の残存活性を有する。

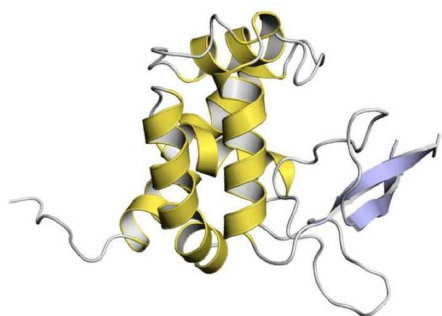


図 2. SPH1045-C の立体構造

④SPH1045-C の X 線結晶構造：SPH1045-C の結晶は、分解能 1.74 Å までの良好な X 線回折データを与えた。SPH1045-C は、N-と C-末端領域から成る α -ローブと分子中央領域から成る β -ローブを基本骨格としている(図 2)。分子中央(Glu224-Arg313)と C-末端(His316-His321)領域は、電子密度が薄く、構造の決定は不可能であった。

α -ローブは、7 本の α -ヘリックスから構成される(H1, 残基番号 154-171; H2, 175-186; H3, 243-256; H4, 258-260; H5, 269-278; H6, 287-296; H7, 298-307)。 β -ローブは、長いループと 1 枚の逆平行 β -シート(S1, 216-222; S2, 233-239)から構成される。SPH1045-C の α -ローブと β -ローブの間には、深いクレフトが存在する。このクレフトには隣の分子のペプチドループが挿入されるほど大きいため、長鎖基質であるペプチドグリカンはこのクレフトで分解されることが想定された。

PH1045-C の構造ホモログをタンパク質データベースから検索した結果、SPH1045-C は α/β -ローブを持つタンパク質と低い類似性を示すことが分かった(Dali スコア、Z=6.8 以下)。構造ホモログには、ファミリーGH-22 や GH-23 のリゾチームも含まれる。SPH1045-C とファミリーGH-23 リゾチームとを重ね合わせると、両者はよく似た基本骨格を示すことが分かる。多くの α/β -ローブを持つタンパク質の基本骨格がリゾチーム様フォールドとして分類されていることから、ファミリーGH-73 酵素もリゾチーム様フォールドファミリーの一酵素であると位置づけることができる。

ファミリーGH-22 と-23 リゾチームの場合、活性部位は二つのローブの間に位置するク

レフトに配置されている。この深いクレフトは SPH1045-C の両ローブ間にも存在することから、基質であるペプチドグリカンはこの活性クレフトに結合すると考えられる。部位特異的変異解析により、サルモネラ菌由来 FlgJ の Glu223 と Asp248 が活性残基であることが報告されている。しかし、FlgJ の Asp248 に相当する SPH1045-C の Asp249 は、活性クレフトより離れた箇所に位置しているため、この残基の触媒反応における重要性は再検討する必要がある。一方、電子密度マップが薄いためアサインメントは不可能であったが、SPH1045-C の Glu224 は活性部位近傍に位置することが予測される。

全体構造の類似性にもかかわらず、活性部位における触媒反応に重要なアミノ酸残基の配置は、ファミリーGH-22、-23、及び-73 酵素で異なる。ファミリーGH-22 リゾチームにおける Glu35 と Asp52 は、各々プロトン供与残基と求核性/塩基残基として機能する。プロトン供与残基である Glu は、ファミリーGH-22、-23、及び-73 酵素でよく重なる。一方、求核性/塩基残基として機能する Asp に関して構造的保存性は見られない。SPH1045-C の場合、Lys208 が求核性/塩基残基である可能性強く示唆される。

以上のことから、リゾチームを含め、ペプチドグリカンに作用する酵素は、 α/β -ローブを基本骨格に持つこと、また、活性部位ではプロトン供与残基 Glu は構造的に保存されているが、求核性/塩基残基には多様性があることが示唆された。

(3) メタロペプチダーゼ

フラジェリン p5 と相互作用するタンパク質を特定するため、フラジェリン p5 抗体固定化カラムに、A1 株細胞抽出液を導通し、50kDa タンパク質(SPH2681)を得た。その N 末端配列を決定し、既に決定している A1 株のゲノム配列に照合することによって、その全遺伝子構造と一次構造を確定、またタンパク質データベースに照合することにより、SPH2681 はメタロペプチダーゼである可能性を得た。

大腸菌を用いたメタロペプチダーゼ SPH2681 の大量調製法を確立し、本タンパク質が確かにフラジェリン p5 と相互作用することを確認した。この結果は、メタロペプチダーゼ SPH2681 がフラジェリンの細胞表層局在化に寄与していることを強く示唆した。そこで、本ペプチダーゼの X 線結晶構造を決定し、フラジェリンとの相互作用を明らかにすることを試みた。

①メタロペプチダーゼファミリーM16 酵素：メタロペプチダーゼファミリーM16 酵素は、亜鉛結合及び活性に関わるモチーフを持ったエンドペプチダーゼである。真核生物由

来の酵素として、インシュリンや β アミロイドを分解するインスライシン、ミトコンドリアやクロロプラストへのシグナル配列を切断するMPP、CPP、PreP、ヘモグロビンの分解に関わるFalcilycinなど、生体内で重要な働きを担っている酵素が多数存在する。

一方、M16タンパク質は、原核生物にも広く分布しており、3種類の酵素(大腸菌由来のピトリライシン、バチラス由来 ppBH4、リケッチア由来 RPP)の活性がこれまでに報告されている。しかし、これら原核生物由来 M16 酵素の生理機能は全く分かっていない。

M16 ファミリーは、一次構造に基づいて更に3種のサブファミリー(M16A、M16B、M16C)に分類される。M16AとM16Cは、30 kDa程度のサブユニット4個で構成される分子量約10万の酵素であり、M16Bは分子量約5万で、MPPのように活性モチーフを持つサブユニットと活性モチーフを持たないサブユニットがヘテロ会合体を形成することにより機能する酵素と、ppBH4やRPPのように活性モチーフを持つ酵素が単量体で活性を示す例が知られている。

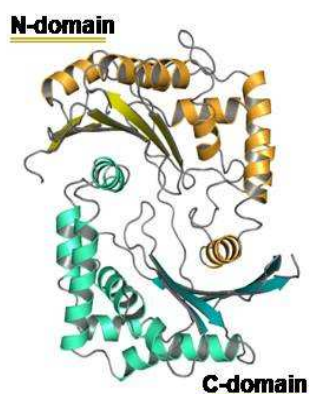


図3. SPH2681のX線結晶構造

一方、A1株ゲノム上で約10bp離れた位置に存在するSPH2682もM16Bサブファミリーに属し、互いに約20%の相同性を示すことを見出した。SPH2681とSPH2682は、N末端にシグナル配列を持つペリプラズムタンパク質である。他のM16B酵素と比較すると、SPH2681では亜鉛結合および活性に関わるモチーフが完全に保存されている。しかし、SPH2682には活性モチーフが見られず、代わりにMPP α サブユニットに保存されているグリシンリッチ領域が存在していた。また、SPH2681は単体では活性を示さないこと、そして、SPH2682と複合体を形成することにより初めて酵素活性を示すことを明らかにした。そこで、SPH2681単量体及びSPH2681-SPH2682複合体の構造解析を行った。

②SPH2681の結晶化及び構造解析：本結晶

は空間群 $P2_1$ に属し、非対称単位中に2分子が存在していた。セレンの異常分散を利用したSAD法により位相を計算し、モデルの構築、精密化を行った。Rファクター19.6%で精密化を終了し、最終モデルには6577個のアミノ酸と222個の水分子が含まれていた。SPH2681は、N末端ドメインとC末端ドメインの2つのドメインに分けられ、両ドメインは互いによく似た3次構造をとっている(図3)。しかし、本結晶構造中に亜鉛イオンの結合は見られな

③PH2681とSPH2682の複合体結晶：

SPH2681-SPH2682複合体は非対称単位中に2個、つまりダイマー当たり1個の亜鉛イオンを含んでいた。SPH2682の3次構造は、SPH2681のものと非常に良く似ているため、SPH2681-SPH2682ダイマーはM16AやM16Cサブファミリーに見られるのと同様によく似た4つのドメインで構成されている。

非対称単位中に含まれる2つのダイマーを比較すると、サブユニット同士が蜜にパッキングしたClose型構造とサブユニット間の接触面の狭いOpen型構造が見られた。亜鉛イオンは、2つのサブユニットにより形成される内部の空洞に結合している。亜鉛イオン結合部位を見ると、Open型ダイマーではSPH2682分子が活性部位から完全に離れているのに対し、Close型ダイマーではY310、R303、F294の3残基が活性部位付近に位置していることが分かる。これら3残基のうち、Y310とR303はM16ファミリー酵素において保存性の高い残基であり、これらの残基が活性中心に位置するClose型構造がペプチド分解に関与していると考えられる。また、Close型構造では活性部位が完全に溶媒から遮蔽されてしまうため、Open型構造は基質の取り込みと分解物の放出に関与していると考えられた。

SPH2681とSPH2682の各サブユニットの分子表面チャージを見ると、2つのサブユニットが会合してダイマーを形成すると、活性クレフトは全体的に負にチャージすることが分かる。同じM16Bサブファミリーのリケッチア族細菌由来ペプチダーゼRPPにおいて酸性ペプチドを分解せず、塩基性ペプチドを分解するという傾向が報告されているが、この分子表面構造からSPH2681-SPH2682も塩基性ペプチドの取り込みに適していると考えられる。また、このような負にチャージした活性中心構造と塩基性ペプチドに対する基質特異性はM16Bサブファミリーに共通したものであることが予測される。

以上の結果、SPH2681-SPH2682は、結晶中でOpen型とClose型の2種類のダイマー構造を形成すること、SPH2681-SPH2682の基質結合・分解を担うクレフトは負の電荷を帯び、塩基性ペプチドの取り込み・分解に適してい

ることが明らかになった。残された問題は、フラジェリン p5 とメタロペプチダーゼ SPH2681(または SPH2681-SPH2682)が如何なる立体配置で相互作用し、フラジェリン p5 が細胞表層に固定されているかである。フラジェリン p5 と SPH2681 の結合は左程強固ではないことから(両者の結合は、イオン強度の低下により比較的速やかに解離する)他の、更なるタンパク質の関与も検討する余地がある。

(4) フラジェリンの局在性と機能

一般的に、フラジェリンは細胞質で合成され、特殊なロッド装置(T3SS)によって細胞外に運ばれる。A1 株では、本来そうあるべきフラジェリンが細胞表層に留まったことになる。何のために細胞表層に留めるのか? 最近、フラジェリンに意外な生理機能が見出されている。スピロヘータ(螺旋淋菌)においては、フラジェリンはペリプラズムに局在し、細胞の屈曲運動に関わるようである。カンピロバクターでは、フラジェリンは細胞外に分泌され、宿主への感染を助長するらしい。

このように、フラジェリンは細胞の様々な場所に出現し、多様な機能を担っている。A1 株においては、フラジェリンは細胞表層に局在し、アルギン酸受容体として機能している。このアルギン酸結合能は、大腸菌の鞭毛フラジェリンにも確認されることから、フラジェリンの普遍的な性質のようである。この生物学的意義の解析は、鞭毛進化の源流に辿り着くことになるではなからうか?

5. 主な発表論文

①論文発表(数件のみ記載)

【雑誌論文】(計 24 件)

1. Yukie Maruyama, Akihito Ochiai, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata: Crystal structure of bacterial cell-surface alginate-binding protein with an M₇₅ peptidase motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **405**(3), 411-416 (2011). (査読有り)
2. Yukie Maruyama, Asako Chuma, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata: Heterosubunit composition and crystal structures of a novel bacterial M16B metallopeptidase. *J. Mol. Biol.*, **407**(1), 180-192 (2011). (査読有り)
3. Wataru Hashimoto, Shigeyuki Kawai, and Kousaku Murata: Bacterial supersystem for alginate import/metabolism and its environmental and bioenergy applications. *Bioengineered Bugs*, **1** (2), 1-13 (2010). (査読有り)
4. Wataru Hashimoto, Akihito Ochiai, Keiko Momma, Takafumi Itoh, Bunzo Mikami, Yukie

Maruyama, and Kousaku Murata: Crystal structure of the glycosidase family 73 peptidoglycan hydrolase FlgJ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **381**, 16-21 (2009). (査読有り)

5. Kousaku Murata, Shigeyuki Kawai, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto: Superchannel of bacteria: biological significance and new horizons. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**(2), 265-277 (2008). (査読有り)

6. Yukie Maruyama, Misato Momma, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata: Crystal structure of a novel bacterial cell-surface flagellin binding to polysaccharide. *Biochemistry*, **47**(5), 1393-1402 (2008). (査読有り)

①口頭発表(数件のみ記載)

【学会発表】(計 22 件)

1. 細菌由来メタロペプチダーゼファミリー M16 酵素の X 線結晶構造. 丸山如江、橋本 渉、村田幸作、日本農芸化学会 平成 22 年度大会、2010 年 3 月 28 日(東京)
2. *Sphingomonas* 属細菌 A1 株由来ペプチドグリカン分解酵素の立体構造に基づく触媒機構解析. 丸山如江、落合秋人、三上文三、橋本 渉、村田幸作、日本農芸化学会関西支部大会、2010 年 10 月 3 日(奈良)
3. *Sphingomonas* 属細菌 A1 株由来細胞表層に局在するアルギン酸結合タンパク質の遺伝子発現と X 線結晶構造解析. 橋本 渉、丸山如江、落合秋人、三上文三、村田幸作、日本農芸化学会関西支部大会、2010 年 10 月 3 日(奈良)
4. ファミリー GH73 ペプチドグリカン分解酵素の X 線結晶構造. 橋本 渉、落合秋人、門間敬子、丸山如江、伊藤貴文、三上文三、村田幸作、日本農芸化学会 2009 年度大会年 3 月 28 日(福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 幸作(京都大学・農学研究科)

研究者番号: 9 0 1 4 2 2 9 9

(2) 研究分担者

橋本 渉(京都大学・農学研究科)

研究者番号: 3 0 2 7 3 5 1 9

三上 文三(京都大学・農学研究科)

研究者番号: 4 0 1 3 5 6 1 1

(3) 連携研究者

()

研究者番号: