

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06077

研究課題名(和文)糖加水分解酵素の動的構造解析による立体反転型機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating the inversion reaction mechanism of glycoside hydrolase by structure dynamics

研究代表者

藤原 孝彰 (Fujiwara, Takaaki)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：70712751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：微生物由来セルロースの生産に関与するエンドグルカナーゼCeSZの酵素反応の分子メカニズムを解明することを目的として、反応中間状態の構造解析を行った。極低温条件下で、変異体酵素と基質との複合体構造解析を行い、加水分解後の状態を捉えた。同様に、野生型酵素と基質との複合体構造解析を行い、極低温条件下で遷移状態前の構造を捉えた。本研究により、これまで明らかでなかった二状態を決定したこと、反応過程で生じる全ての状態が明らかとなり、反応機構の理解に貢献した。また、研究開始時に予定していなかったアルギン酸分解・変換酵素AlgEの構造解析を行い、様々な鎖長の基質の認識に関する知見を得るに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クライオトラップ法により、実験的にコンフォメーションが異なる糖の状態を可視化した本研究成果は、糖加水分解酵素の反応機構を詳細に解明するための有用な知見となる。そして、本研究で用いた手法は、異なるコンフォメーションの糖を経由する他の糖加水分解酵素に対して、中間状態を捉えるための一般的な実験指針となり得る。また、本研究で対象としたCeSZやAlgEはいずれも、オリゴ糖や多糖類の生産に関わる酵素であり、本研究により得られた構造情報をもとに酵素の高機能化が果たされれば、機能性糖質などの効率的生産につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of the enzymatic reaction of endoglucanase CeSZ, which is involved in the production of bacterial cellulose, we performed structure analysis of the reaction intermediate state. Under cryogenic conditions, the mutant enzyme in complex with the intermediate captured the state after hydrolysis, while the wild-type enzyme complexed with the other intermediate captured the structure before the transition state. This study unveiled the remaining two reaction intermediate states in the proposed reaction mechanism of CeSZ, which contributes to further understanding of the reaction mechanism. In addition, the structural analysis of the bifunctional alginate epimerase AlgE, which was not planned at the beginning of this research, was performed, and obtained insights into the recognition of substrates with different chain lengths.

研究分野：構造生物学

キーワード：糖加水分解酵素 反応中間体 X線自由電子レーザー シリアルフェムト秒結晶構造解析 クライオトラップ法 セルロース

1. 研究開始当初の背景

天然のハイドロゲルとして知られるバクテリアセルロース (BC) は、植物由来セルロースを凌駕する純度や強度を有し、人工合成高分子ゲルでは得ることが困難な生体適合性や生分解性などの優れた性質を兼ね備えている。BC はこれらのユニークな特徴を有することから、人工血管や火傷被覆材などの医用材料としての利用が期待されている。微生物の細胞プロセスや酵素を利用することで、効率的な BC の生産を実現することは、BC の実用化に向けた応用研究を進展させるだけでなく、植物由来セルロースに依存しない持続可能な循環型社会の実現に向けて重要である。

BC の生産は膜タンパク質であるセルロース合成酵素複合体によって行われる (図 1(A))。複合体の構成成分をコードした遺伝子群には糖加水分解酵素 CeSZ が含まれている。CeSZ は細胞外へ適切に輸送されないセルロースを分解することで、セルロースの生産性に関与すると考えられている。CeSZ の加水分解機構は、加水分解前後でアノマー位の立体配座が変化する立体反転型機構に従い、反応過程で糖のコンフォメーションが $\beta\text{-}^1\text{C}_4$ (基質) \rightarrow $^2\text{S}_0$ \rightarrow $^2,5\text{B}$ \rightarrow $^5\text{S}_1$ \rightarrow $\alpha\text{-}^4\text{C}_1$ (生成物) へと段階的に変化することが計算科学的手法などを基に提案されている (図 1(B))。しかし、準安定な中間状態である $^2\text{S}_0$ や $^5\text{S}_1$ の存在を示す構造は得られていない。これらの中間状態の存在を実験的に確認し、CeSZ による糖鎖の加水分解反応メカニズムを精緻に検証することは、合理的な BC 生産プロセスの構築に貢献する。

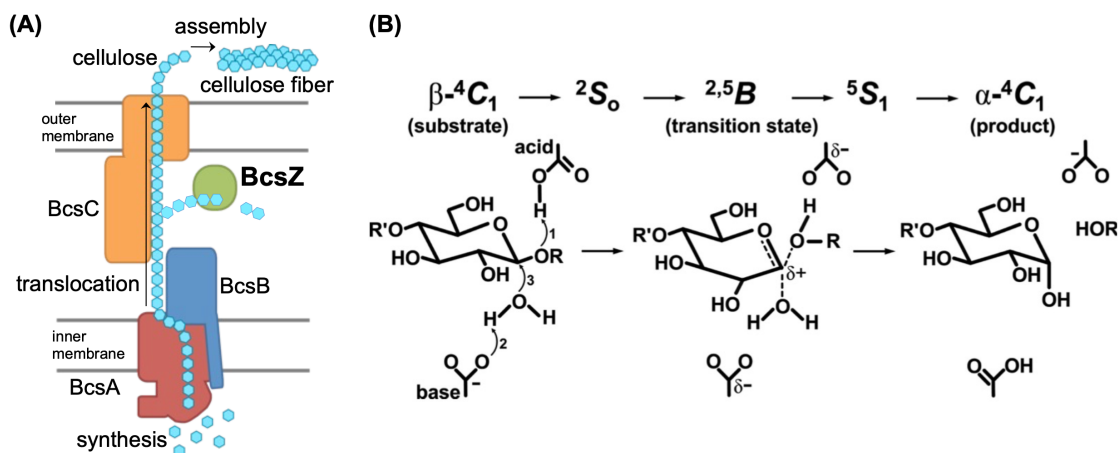


図 1 (A) セルロース合成酵素複合体の模式図, (B) CeSZ の反応機構

2010 年ごろから、高輝度極短パルス光源である X 線自由電子レーザー (X-ray free electron laser; XFEL) の照射施設が国内外で相次いで稼働して以来、XFEL 照射地点に連続的に送り出された無数の微小結晶から回折データを収集するシリアルフェムト秒結晶構造解析 (Serial femtosecond X-ray crystallography; SFX) が新たな構造決定手法として確立した (図 2(A))。一方、短パルス可視光レーザーの照射と XFEL を組み合わせたポンプ・プローブ法や、化合物溶液と結晶を混合させた一定時間後に XFEL を照射する二液混合法などの反応誘起システムが開発されたことで (図 2(B), 2(C))、多様なタンパク質の時間分解測定 (Time-resolved SFX; TR-SFX) による動的構造解析も可能となってきた。

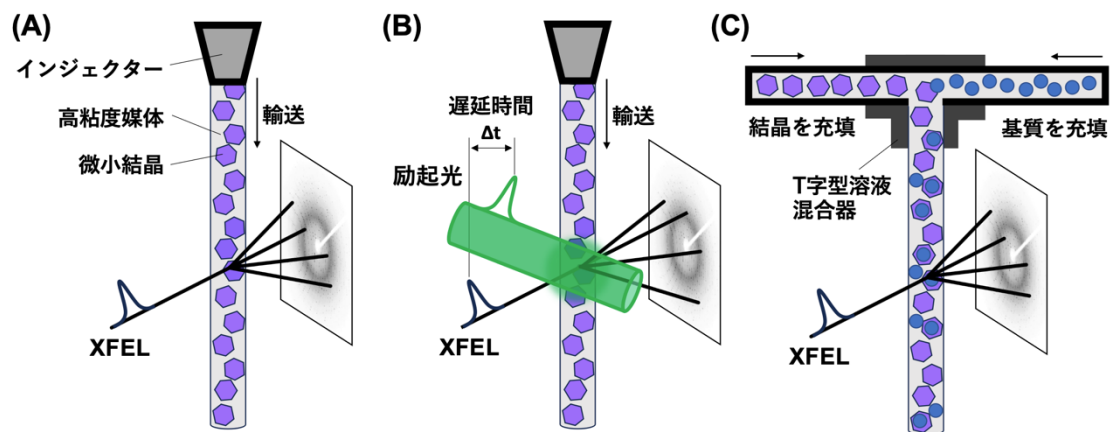


図2 XFEL を利用した回折測定の様式図 (A) SFX 測定, (B) ポンプ・プローブ型 TR-SFX, (C) 二液混合型 TR-SFX

2. 研究の目的

TR-SFX は、結晶内の分子の反応や動きを一斉に開始させる物理的、化学的刺激を与えることで、フェムト秒程度の時間で起こる分子の構造変化をオングストロームの精度で捉える精密構造解析手法である。本研究では、XFEL 等を用いた結晶構造解析により、CeSZ の動的構造情報や反応中間体構造を取得し、その加水分解反応の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) TR-SFX による動的構造解析

まず、バッチ法により SFX 測定に必要な微小結晶を作成し、国内の XFEL 施設 SACLA にて XFEL を照射して結晶の品質を確認する。次に、SFX 測定により室温条件における立体構造を決定し、極低温条件で得られた構造と比較する。最後に、結晶内の分子に対する基質の結合を反応開始の起点とする二液混合型 TR-SFX 測定を行い、異なる遅延時間における差フーリエマップなどをもとに、糖鎖基質や活性部位周辺の残基のコンフォメーションを観察することで、非平衡状態の構造を決定する。

(2) 凍結トラップ法による反応中間体構造の決定

XFEL を利用した回折測定の間機は限られているため、SFX 測定と並行して、従来の X 線結晶構造解析により平衡状態における中間体構造を決定する。そのため、野生型 CeSZ 及び変異体酵素の結晶と基質を混合し、一定時間後に凍結することで反応を停止させる凍結トラップ法を利用する。凍結の際は、酵素反応の pH 依存性と温度依存性を考慮して、結晶の pH 条件や基質との混合時間を検討する。得られた結晶を用いて、大型放射光施設 SPring-8 にて回折データを収集する。得られた電子密度をもとに中間体構造を決定し、糖鎖基質や活性部位周辺の残基のコンフォメーションを観察する。

4. 研究成果

(1) TR-SFX による動的構造解析

結晶化リザーバーとタンパク質溶液の混合比や結晶化温度などの条件を検討することで、大きさが 10~20 μm 角の微小結晶を作成した (図 3(A))。そして、これらの微小結晶が 10^8 個/mL 以上の結晶密度になるように調整し、結晶懸濁液を数百 μL ~mL スケールで準備した。XFEL を用いた回折測定を行い、微小結晶の品質を確認し、約 26,000 枚の回折像から分解能 1.8 Å のデータ

セットを取得した。得られた室温構造と極低温条件における構造を比較すると、基質結合に関与する一部の残基において、室温条件下では、極低温条件下では見られない複数のコンフォメーションを取りうることが示唆された (図 3(B)). TR-SFX 測定では、試料を XFEL 照射地点に一定速度で連続的に輸送する必要があるが、事前の SFX 測定では、試料を一定の流速で輸送するのが困難であることがわかり、高粘度媒体の種類などの検討を要すると考えられた。

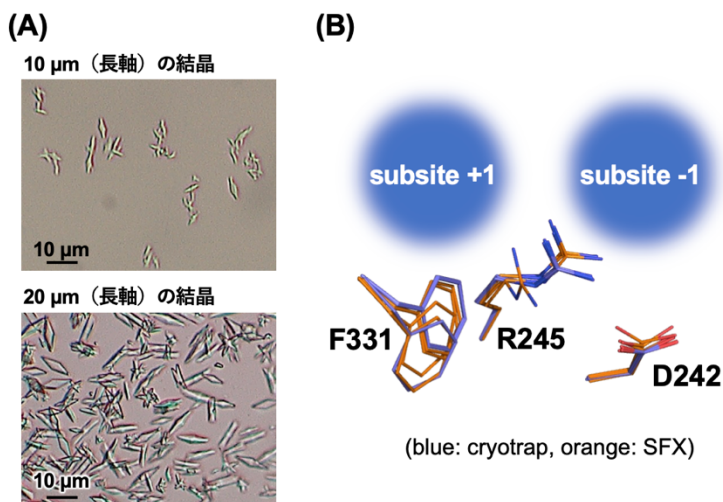


図 3 (A) CeSZ の微小結晶, (B) 極低温条件 (cryotrap) と室温条件 (SFX) の構造の比較

(2) 凍結トラップ法による反応中間体構造の決定

塩基触媒残基を置換した反応性が劇的に低下した変異酵素の結晶に対して、基質であるセロペンタオースを 20 °C で一晩ソーキングすることで複合体の結晶を作成し、SPring-8 の BL41XU にて、得られた結晶から回折データを取得した。構造解析の結果、基質結合部位には基質が分解した直後を示す電子密度が観測され、サブサイト-1 の糖のコンフォメーションは歪んだ 5S_1 であることが示された (図 4(A)). この結果は、研究期間内に学術論文にて発表した。一方、野生型酵素に対して、セロペンタオースを 4 °C で 10 分ソーキングすることで複合体の結晶を作成し、SPring-8 の BL45XU にて、得られた結晶から回折データを取得した。構造解析の結果、変異体酵素と糖鎖との複合体とは異なり、基質結合部位には一つづきの糖鎖の結合を示す電子密度が観測され、サブサイト-1 の糖のコンフォメーションは 2S_0 であることが示唆された (図 4(B)). CeSZ の類縁酵素 CelA の酸触媒残基変異酵素と基質との複合体構造が報告された先行研究では、 ${}^{2,5}B$ 中間体が決定されている (Guérin, D. M., *et. al.*, *J. Mol. Biol.*, **316**, (2002)). TR-SFX による動的構造解析では十分な成果が得られなかったが、本研究で、平衡状態における反応中間体が全て実験的に明らかとなったことで、反応機構に対する理解を進展させる結果となった。

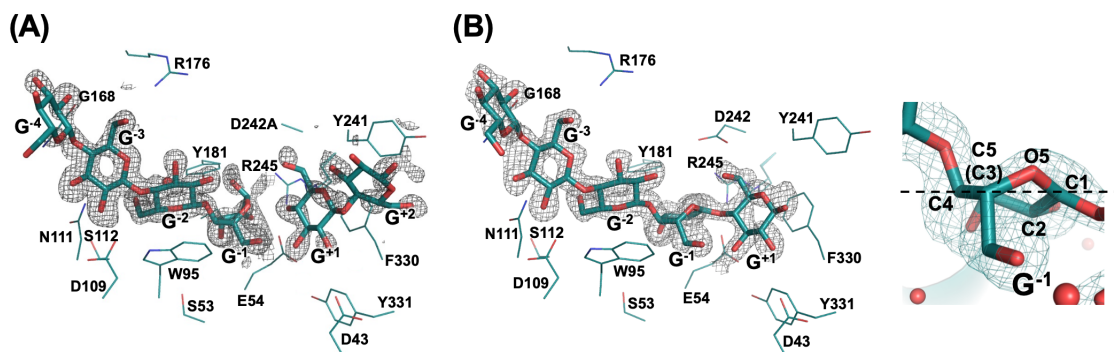


図 4 基質結合部位の構造 (A) 加水分解後の糖鎖構造, (B) 加水分解前の糖鎖構造

(3) 糖質関連酵素 AlgE の構造解析

XFEL を利用した TR-SFX の新たな標的を探索する目的で、当初予定していなかったアルギン酸分解変換酵素 AlgE の構造解析を行った。本研究では、アポ型に加えて、鎖長の異なるマンヌロ

ン酸オリゴマー（重合度：2~5）と AlgE との複合体構造を決定した。AlgE は N 末端側に A モジュールと呼ばれる触媒ドメインと C 末端側に R モジュールと呼ばれる制御ドメインを持ち、各ドメインは β シートを介して強固に相互作用していた（図 5(A)）。また、鎖長の異なる複数のオリゴ糖基質の結合状態を決定し、基質認識機構の一端を明らかにした（図 5(B)）。この結果は、研究期間内に学術論文にて発表した。今後、TR-SFX による時分割構造解析が期待される。

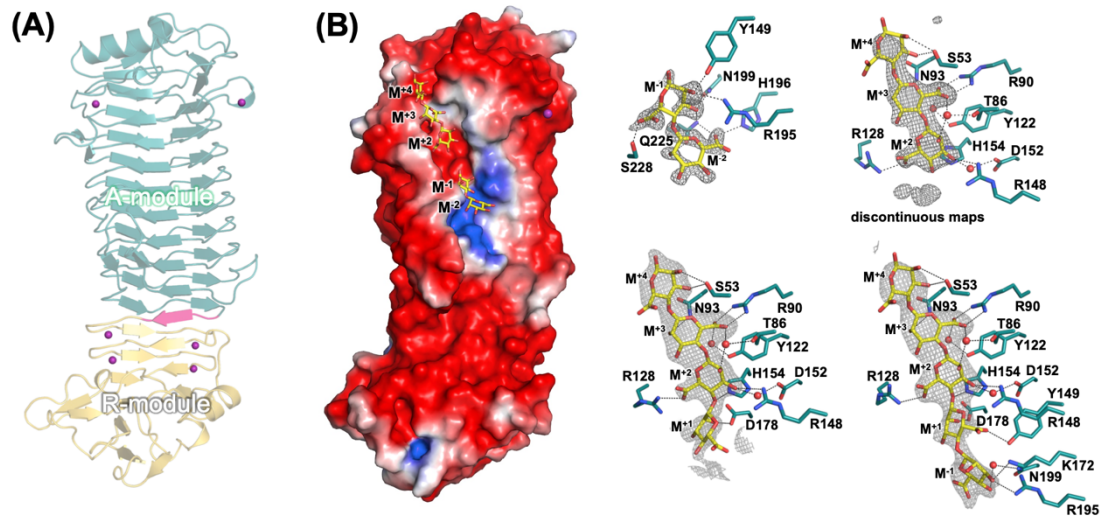


図 5 AlgE の構造 (A) 全体構造, (B) 静電ポテンシャルマップ及び基質結合部位の構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takaaki Fujiwara, Ayumi Fujishima, Yui Nakamura, Kenji Tajima, Min Yao	4. 巻 78
2. 論文標題 Structural snapshot of a glycoside hydrolase family 8 endo- α -1,4-glucanase capturing the state after cleavage of the scissile bond	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D	6. 最初と最後の頁 228-237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S2059798321012882	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujiwara Takaaki, Mano Eriko, Nango Eriko	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural basis for the minimal bifunctional alginate epimerase AlgE3 from <i>Azotobacter chroococcum</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14886	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原 孝彰, 南後 恵理子
2. 発表標題 アルギン酸分解・変換酵素AlgEの立体構造解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原 孝彰, 藤島 あゆみ, 中村 結衣, 姚 閔
2. 発表標題 バクテリアセルロース分解酵素BcsZの反応機構解明
3. 学会等名 日本応用糖質科学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原 孝彰, 藤島 あゆみ, 中村 結衣, 田島 健二, 姚 閔
2. 発表標題 GH8に属するエンドグルカナーゼBcsZの構造機能解析
3. 学会等名 令和3年(2021年)度日本結晶学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原 孝彰, 間野 絵梨子, 南後 恵理子
2. 発表標題 アルギン酸分解・変換酵素AlgEの酵素特性解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会 2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高崎 佑也, 藤原 孝彰, 南後 恵理子
2. 発表標題 クライオトラップ法によるセルロース分解酵素BcsZの反応中間体構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2024年度大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

X線自由電子レーザーを用いた高速分子動画像解析法の開発と展望
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcrsj/64/4/64_290/_article/-char/ja

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------