

平成 22 年 6 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19700276
 研究課題名（和文） 配列解析と酵素化学的解析による細胞壁を分解する酵素の分類に基づくメタゲノム解析
 研究課題名（英文） Metagenome analysis for the classification of enzymes related to hydrolysis of bacterial cell wall by sequential and enzymatic analysis
 研究代表者
 平川 英樹（HIRAKAWA HIDEKI）
 かずさ DNA 研究所・植物ゲノム研究部・研究員
 研究者番号：80372746

研究成果の概要（和文）：メタゲノム解析によって同定された遺伝子の中からペプチドグリカン加水分解する酵素を探索し、ペプチドグリカンの各部位を特異的に認識する5つの酵素群に分類した後、さらに、立体構造を元に酵素の基質結合部位を推測することを目的とした。分類の結果、5つの酵素群のうちペプチド ペプチド間を加水分解する Endopeptidase が最も多く存在していた。また、基質結合部位を推測するために、メタゲノム解析された遺伝子のうち立体構造が推定できるものを調べた結果、約 2,500 個の遺伝子については立体構造を推定することが出来ると考えられた。立体構造から基質結合部位を予測するために、機能が良く調べられている Lysozyme と Endopeptidase である酵素 ALE-1 に対して、それぞれペプチドグリカンとの基質結合シミュレーションを行った。その結果、Lysozyme では 24 個のアミノ酸残基が基質結合に関与すると推測でき、さらには、触媒残基も正しく推測できた。一方、ALE-1 については、13 個のアミノ酸残基が基質結合に関与すると推測できた。以上の結果から、メタゲノム由来の配列からドメイン検索と立体構造情報を用いて機能と基質結合部位を推定できると考えられた。今後はメタゲノム情報を元に上記の解析を行えるシステムの構築が必要であり、これにより、高能率な酵素のデザインが行えるようになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The enzymes related to hydrolyze the bacterial peptidoglycan were explored from the genes sequenced by metagenome projects and were classified into the five groups defined by their catalytic sites in peptidoglycan. Among the five groups, the genes related to endopeptidase were most frequently found in the metagenomic data. We estimated that the three-dimensional structure and binding sites of about 2,500 proteins could be predicted. Furthermore, to predict the binding site precisely, the binding simulations between peptidoglycan were performed for lysozyme and ALE-1, one of the endopeptidase. As results, twenty-four and thirteen amino acid residues were predicted to be interacted with the peptidoglycan in lysozyme and ALE-1, respectively. The protein functions and binding sites could be predicted by using the domain and structural information obtained from metagenomic data. In the future, we would construct the analysis system which could perform these analyses to design highly efficient enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：メタゲノム解析、加水分解酵素、配列解析、酵素化学、タンパク質立体構造

1. 研究開始当初の背景

原核生物から真核生物まで数多くの生物の全ゲノム配列が解読された後、サルガッソー海、マウスやヒトの腸管内、ヒトの口腔内、土壌といった様々な環境に生息する微生物の集団（フローラ；叢）やそこに存在するDNA配列を解読するメタゲノム解析が始まった。

微生物叢に生息する微生物を調べるためには16S rDNA配列が一般に用いられるが、微生物叢と生物学的機能との関係を明らかにするためには、機能が明らかな酵素群の分布を調べる必要がある。微生物叢における微生物間の相互作用に大きく関係するもの一つに微生物の細胞壁ペプチドグリカン加水分解する酵素群が挙げられる。これらの酵素は、その多糖類やペプチドにおける特異的な場所を加水分解する機能をもっており、グリコシダーゼ（ムラミダーゼ、グルコサミダーゼ）、アミダーゼ、ペプチダーゼに分類される。また、ペプチドグリカンは宿主細胞への定着や侵入、抗生物質への耐性、バイオフィルムの形成といった病原性にも深く関係している。微生物叢におけるペプチドグリカン加水分解する酵素の分布を調べることは、微生物叢の性質と病原性との関係を明らかにすることにも通じると考えられる。しかし、これまでに、ペプチドグリカン加水分解する酵素を網羅的に調べた研究は少ない。

また、遺伝子の配列に対して機能予測を行い分類しても、どのアミノ酸残基が酵素の活性に関与するかを配列から予測するのは難しいため立体構造の情報を取り入れることは有効であると思われる。そこで、立体構造の予測や基質結合シミュレーションといった手法を取り入れた解析方法を試みた。

2. 研究の目的

ペプチドグリカン加水分解する酵素を分類し、その多様性を明らかにすれば、ある微生物種に特化して溶菌することができる酵素を同定できる可能性がある。その酵素が明らかになれば、特異性を高めることによって病原性微生物といった特定のものを効率よく溶菌できると考えられる。そのためには、酵素においてどのアミノ酸残基が酵素反応（基質結合）に重要であるかを明らかにし、酵素反応メカニズムを明らかにする必要がある。

そこで、本研究では、

1) メタゲノム解析によって同定された遺伝子の中から細胞壁ペプチドグリカン加水分解する酵素を探索し分類する

2) 配列から機能推定をする際に立体構造を予測し基質結合シミュレーションを取り入れて基質結合部位を推定するという2つの目的に従い研究を進めた。

3. 研究の方法

現在、微生物の細胞壁ペプチドグリカン加水分解する酵素に特化したデータベースは存在していないため、まずは、メタゲノム解析から得られた遺伝子の中からペプチドグリカン加水分解する酵素をPfamに対するドメイン検索とnrに対するホモロジー検索により探索した。それらの酵素がペプチドグリカンの糖鎖とペプチドのどの部分を特異的に加水分解するかを推定しLayecら（Research in Microbiology, 159, (2008), 507-515）によって定義された5つの酵素群に従い分類した。酵素がもつ機能の推定はホモロジー検索やドメイン検索から行えるが、基質結合部位の推定はアミノ酸配列のみからでは困難である。なぜならば酵素はアミノ酸配列が折り畳むことで機能を発揮するためである。基質結合部位を予測するためには、立体構造に関する情報を加えた方が精度が上がると考えられる。そこで、メタゲノム解析から得られた遺伝子のうち立体構造が推測できるものをPDB（Protein Data Bank）に登録されたタンパク質に対してホモロジー検索することにより調べた。さらに、立体構造から基質結合部位を推定するために、立体構造が既知なタンパク質とペプチドグリカンとの結合シミュレーションを行い、基質と相互作用する領域を基質結合部位として推測した。

4. 研究成果

当初、メタゲノム解析によって得られた遺伝子配列はNCBI（National Center for Biotechnology Information）から入手し、環境サンプル毎に分類する予定であったが、DOE Joint Genome Institute(JGI)により各環境からサンプリングされた遺伝子配列がメタゲノムデータベースimg/m (integrated microbial genomes with microbiome samples)で公開されたため、そのデータを用いることにした。

JGIで公開している81のメタゲノムデータから3,155,811個の遺伝子を収集し、その中

から細胞壁ペプチドグリカンを加水分解する酵素群を探索するために、Pfam データベースに対するドメイン検索を行った。ペプチドグリカンの加水分解に關与すると考えられた遺伝子群を Layec らの定義に基づき 5 つの酵素群に分類した。その結果、5 つの酵素群における酵素の個数は以下の通りとなり、ペプチド ペプチド間を加水分解する Endopeptidase が最も多く検出された(括弧内は個数)。

1. *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase(2,238)
2. Carboxypeptidase (2,778)
3. Endopeptidase (7,926)
4. *N*-acetylglucosaminidase (305)
5. *N*-acetylmuramidase (2,713)

これにより、環境における細胞壁ペプチドグリカンを加水分解する酵素のドメインの分布を明らかにし分類することが出来た。そこで、各環境において各ドメインが存在する割合を計算し、それに基づきクラスタリングを行った結果、腸管における環境を例に挙げると、マウスとヒトの腸管は近いクラスターに属していたが、シロアリのは遠いクラスターに属していた。これは、シロアリでは、*N*-acetylmuramidase に属する Transglycosylase の割合が非常に高いことが要因の一つと考えられた。また、ペプチドグリカンのペプチド架橋におけるペプチドペプチド間を加水分解する Peptidase_M23 は殆どの環境において存在していた。一方、ペプチドグリカンの *N*-アセチルムラミン酸とペプチドとの結合を加水分解する *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase には、Amidase_2、Amidase_3、Amidase_5 の3つのドメインが定義されているが、その中で Amidase_5 はヒト腸管のみに見られ、それ以外の環境には存在していなかった。このように、環境の性質によってドメインの分布に傾向があることが分かり、また、環境に特有な遺伝子があることが分かった。

基質結合部位を Pfam に対するドメイン検索により推定した場合、タンパク質の全体がドメインとして定義されたものがあつたため、その推定は困難であつた。そこで、ドメイン情報に立体構造情報を加えることで基質結合部位を推定した。ドメイン検索において E-value が e^{-10} 以下、かつ、PDB に登録されている配列に対するホモロジー検索により長さの保存度が 90~110%、相同性 25%以上の条件を満たすタンパク質を選出した。その結果、5 つの酵素群のうち、立体構造を推定できうるものは以下の個数であつた。

1. *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (342 個)
2. Carboxypeptidase(883 個)
3. Endopeptidase(874 個)

4. *N*-acetylglucosaminidase(62 個)

5. *N*-acetylmuramidase(434 個)

一方、立体構造が既知な酵素に対する基質結合シミュレーションによって、基質結合部位を推定することを試みた。そのために、酵素反応メカニズムが調べられているペプチドグリカンの糖鎖を加水分解するグース型 Lysozyme (PDB id ; 1531) の立体構造に対して、*N*-acetyl-D-glucosamine の 6 量体を結合させるシミュレーションを行った。これまでにグース型 Lysozyme において、基質と相互作用すると推定されていたアミノ酸残基は 7 個であつたが、基質結合シミュレーションの結果、相互作用するアミノ酸残基は 24 個と推定でき基質結合部位を推測することが出来た(雑誌論文、学会発表)。

さらに、立体構造から基質結合部位を推測するため、立体構造が既知なペプチドグリカンのペプチド架橋を加水分解する酵素 ALE-1 (PDB id:1r77B) とペプチド架橋グリシン 5 量体との結合シミュレーションを行った。その結果、13 個のアミノ酸残基が基質と相互作用することが分かった。また、13 個のうち 3 個のアミノ酸残基 (Tyr276, Pro300, Glu320) がメタゲノム由来の遺伝子に対してホモログであり、さらに立体構造上の位置から Tyr276 が触媒残基の可能性が高いと推測された(雑誌論文、学会発表)。以上の結果から、メタゲノム由来の配列からドメイン検索と立体構造情報を用いて機能と基質結合部位を推定できうると考えられた。今後はメタゲノム解析によって得られた配列に対してホモロジー解析やドメイン解析を行い、さらに、立体構造情報を加えた解析を行うことで基質結合部位が推定できるシステムの構築が必要であり、これにより、ペプチドグリカンを高能率に加水分解することが出来る酵素のデザインが行えるようになることが期待される。

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2件)

Hirakawa H., Ochi A., Kawahara Y., Kawamura S., Torikata T., Kuhara S. (2008) Catalytic reaction mechanism of goose egg-white lysozyme by molecular modeling of enzyme-substrate complex. *J. Biochem.*, **144**, 753-761.

Hirakawa H., Akita H., Fujiwara T., Sugai M., Kuhara S. (2009) Structural insight into the binding mode between the targeting domain of ALE-1 (92AA) and pentaglycine of peptidoglycan. *Protein Eng Des Sel.*, **22**, 385-391.

〔学会発表〕(計2件)

平川英樹, 仲宗根公一, 河村俊介, 鳥潟隆雄, 久原哲: グース型リゾチームにおける Tyr147 変異体の活性, 安定性および構造変化に関する研究. 日本生化学会, 神戸, 2008. 12.

平川英樹, 秋田英範, 藤原環, 菅井基行, 久原哲: Staphylococcus capitis EPK1 が 産 生 す る Glycylglycine endopeptidase (ALE-1) の細胞壁ペプチドグリカン認識機構の解明. 第3回日本ゲノム微生物学会, 東京, 2009. 3.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

平川 英樹 (HIRAKAWA HIDEKI)

(財)かずさDNA研究所

植物ゲノム情報研究部・研究員

研究者番号: 80372746

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし