

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580112

研究課題名(和文)連鎖球菌における宿主細胞外マトリックス(グリコサミノグリカン)の代謝機構

研究課題名(英文)Metabolic mechanism of host extracellular matrices, glycosaminoglycans, in streptococci

研究代表者

橋本 渉 (Hashimoto, Wataru)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30273519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：病原性連鎖球菌により宿主細胞外マトリックス(グリコサミノグリカン)の分解で生じる不飽和ウロン酸(グルクロン酸とイズロン酸)は、イソメラーゼGbs1892と還元酵素Gbs1891の逐次反応により2-ケト-3-デオキシ-D-グルコン酸に代謝されることを初めて明らかにした。本研究者らが見出した連鎖球菌遺伝子クラスターは、グリコサミノグリカンの断片化、分解並びに代謝に関わる酵素をコードしているため、本クラスターを細菌感染症対策のターゲットとして位置付けることができる。

研究成果の概要(英文)：Pathogenic streptococci degrade host extracellular matrices, glycosaminoglycans, to unsaturated uronic acid and amino sugar by polysaccharide lyase and unsaturated glucuronyl hydrolase (UGL). Unsaturated uronic acid was found metabolized to 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid through subsequent reaction of Gbs1892 isomerase and Gbs1891 reductase. These enzymes were encoded in the UGL genetic cluster, suggesting that repression of this cluster contributes to establishment of a novel therapy for streptococcal infectious diseases.

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：連鎖球菌 宿主細胞外マトリックス グリコサミノグリカン 代謝機構 イソメラーゼ 還元酵素 X線 結晶構造解析 不飽和グルクロニルヒドロラーゼ

1. 研究開始当初の背景

グリコサミノグリカンは、ウロン酸とアミノ糖から成る二糖の繰り返し配列をもつ多糖であり、哺乳類の細胞外マトリックスの重要な構成成分の一つである。グルクロン酸 (GlcA) 或いはイズロン酸 (IdoA:GlcA の C5 位エピマー体) がウロン酸として、(アセチル化) グリコサミン或いはガラクトサミンがアミノ糖として存在する。構成糖の相違により、グリコサミノグリカンにはヒアルロン酸、コンドロイチン、ヘパリン、ヘパランがあり、それらの多くは硫酸化されている。近年、病原性細菌による感染の初期ステップとして、細菌とグリコサミノグリカンとの相互作用に関する研究が盛んである。特に、連鎖球菌や腸球菌によるグリコサミノグリカンとの結合が報告されている。しかし、それらの相互作用に関わる分子機構には不明な点が多い。一方、重篤な疾患を誘発する化膿性溶血性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, 及び *S. pneumoniae*) は、ヒアルロン酸リアーゼを分泌し、哺乳類の細胞外マトリックスであるヒアルロン酸を不飽和二糖に断片化し、病原性発現に関連することが示唆されている。

本研究者は、酸性多糖分解細菌 (*Bacillus* 属) GL1 株において、多糖リアーゼの反応産物である不飽和二糖を単糖 (不飽和グルクロン酸 (Δ GlcA) とアミノ糖) に分解する新規酵素 [不飽和グルクロニルヒドロラーゼ (UGL)] の実体を明らかにし、UGL ホモログ遺伝子を 3 種類の溶血性連鎖球菌を始めとする種々の病原性細菌 (ピブリオ菌、ウェルシュ菌など) のゲノムに見出した。そこで、病原性細菌において多糖リアーゼと UGL が宿主への侵入・伝播の第一関門である宿主細胞外マトリックスの破壊分子として機能する宿主細胞侵入・感染モデルを提唱している。

2. 研究の目的

病原性細菌におけるグリコサミノグリカンの相互作用様式や分解・代謝機構を明らかにすることは、細菌による宿主細胞外マトリックスの分解を介した感染機構の理解に繋がる。本研究者は、これまでに連鎖球菌においてグリコサミノグリカンを単糖にまで分解する経路とそれに関わる酵素・遺伝子を明らかにしてきた。連鎖球菌を始めとする病原性細菌のゲノムを調べた結果、*S. agalactiae* UGL (Gbs1889) 遺伝子の近傍にアミノ糖 (グリコサミノグリカン構成糖) の輸送に関わるホストトランスフェラーゼ系 (PTS) の各サブユニット (PTS-EIIA, C, D) をコードする遺伝子と相同性を示すクラスターを見出した (図 1)。その遺伝子クラスターはヒアルロン酸存在下で誘導発現するため (図 1 括弧内数字: 発現上昇度) 連鎖球菌はグリコサミノグリカンを菌体外で多糖リアーゼにより不飽和二糖に断片化し、それを PTS により菌体内に取り込んだ後、UGL に

より単糖にまで分解することが示唆された。

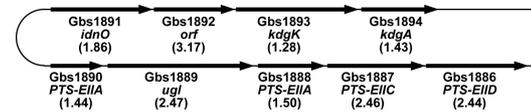


図 1. 連鎖球菌 UGL 遺伝子クラスター

グリコサミノグリカンの分解と比して、UGL 反応により生じる不飽和グルクロン酸 (= 不飽和イズロン酸) やアミノ糖の連鎖球菌における代謝機構は不明な点が多い。アミノ糖は、大腸菌では、デアミナーゼ、キナーゼ、アルドラーゼの逐次反応によりジヒドロキシアセトンリン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸に代謝されることが示されており、それらのホモログ遺伝子が連鎖球菌ゲノムにも見出される。また、アミノ糖はペプチドグリカンやリポ多糖の構成糖としても利用される。一方、不飽和グルクロン酸は非酵素的に 4-デオキシ-L-スレオ-5-ヘキサースロース-ウロン酸 (DHU) に変換されるが、その代謝機構 (経路とそれに関わる酵素・遺伝子) については全く不明である。

本研究課題では、連鎖球菌におけるグリコサミノグリカン (特に、不飽和グルクロン酸) の代謝機構に焦点を当て、その細菌生理学と分子・構造生物学的解析を行うことにより、UGL 遺伝子クラスターの感染過程への関与及び代謝系酵素の構造・機能相関を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細菌における UGL 遺伝子クラスターの遺伝子発現

これまでに、グリコサミノグリカン (ヒアルロン酸) 存在下で *S. agalactiae* における UGL 遺伝子クラスターの誘導発現を明らかにした。当該遺伝子クラスターは、連鎖球菌 (*S. pyogenes*, *S. suis*, *S. pneumoniae*) のみならず他の細菌にも見出される。そこで、グリコサミノグリカン (ヒアルロン酸、コンドロイチン、ヘパリン、ヘパラン) 存在及び非存在下で培養した種々の細菌菌体より全 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供する。各細菌における UGL 遺伝子クラスターの発現レベルを決定することにより、グリコサミノグリカンの分解・代謝に応答する細菌の遺伝子ネットワークを同定する。

(2) グリコサミノグリカン代謝系酵素の分子同定と機能解析

連鎖球菌において、グリコサミノグリカンは、多糖リアーゼと UGL の作用により不飽和ウロン酸 (C4 位と C5 位に二重結合をもつ Δ GlcA と Δ IdoA) とアミノ糖に分解される。細菌におけるアミノ糖の代謝はよく研究されているため、ここでは不飽和ウロン酸の代謝を解析する。連鎖球菌 *S. agalactiae* 由来機能不明タンパク質 Gbs1891 と Gbs1892 の大腸菌発現系を構築し、当該タンパク質を精製する。市販のグリコサミノグリカン不飽和二糖

に *S. agalactiae* 由来 UGL を作用させて生じる 4-デオキシ-L-スレオ-5-ヘキソスロース-ウロン酸 (DHU) を精製し、基質として用いる。DHU に Gbs1892 を作用させて、反応産物 (I) を調製する。反応産物 (I) に、Gbs1891 の作用により得られる化合物を反応産物 (II) とする。反応産物 (I) と (II) の化合物同定により、不飽和ウロン酸の代謝経路とそれに関わる酵素・遺伝子を明らかにする。

(3) グリコサミノグリカン代謝系酵素の X 線結晶構造解析

グリコサミノグリカン (不飽和ウロン酸) の代謝に関わる酵素群の構造と機能との相関を明らかにするため、それらの立体構造を決定する。具体的には、以下の通りである。96 或いは 24 穴プレートを用いた多検体結晶化条件の探索を行う。X 線回折実験により、結晶の基礎的データ (結晶系、空間群、格子定数、分解能など) を収集する。結晶学的データの収集には、京都大学農学研究科設置の X 線回折装置を用いる。高分解能でのデータ収集は、SPring-8 の放射光実験施設にて行う。京都大学及び SPring-8 で各々収集したデータのプロセスには、SADIE, SAINT 及び HKL2000 プログラムを用いる。酵素の立体構造は異常分散法或いは分子置換法により決定する。初期モデルは TURBO-FRODO プログラムを用いて作製し、CNS や SHELXL プログラムを用いてモデルの精密化を行う。

4. 研究成果

(1) 細菌における UGL 遺伝子クラスターの遺伝子発現

グリコサミノグリカンの分解に関わる UGL 遺伝子クラスターは、連鎖球菌のみならず他の病原性細菌 (腸球菌、ウェルシュ菌など) や常在菌 (乳酸菌など) にも見出される。連鎖球菌の UGL 遺伝子クラスターは、ヒアルロン酸存在下で誘導発現する。そこで、他の細菌として乳酸菌に焦点を当て、ヒアルロン酸存在及び非存在下での UGL 遺伝子クラスターの発現レベルを DNA マイクロアレイ解析で決定した。その結果、ヒアルロン酸による顕著な誘導発現は認められなかったが、UGL 遺伝子クラスターの発現レベルは全遺伝子の平均発現レベルより高いことが分かった。そのため、乳酸菌では UGL 遺伝子クラスターが恒常的に高発現しており、連鎖球菌とは異なる発現制御機構が存在することが示唆された。

(2) グリコサミノグリカン代謝系酵素の分子同定と機能解析

UGL 遺伝子クラスターにコードされている *S. agalactiae* 由来機能不明タンパク質 Gbs1891 と Gbs1892 の機能を解析した。大腸菌発現系と精製系を構築し、当該タンパク質の酵素活性を調べた。不飽和ウロン酸に Gbs1892 と Gbs1891 とを作用させて得られた反応産物 (I) と (II) は、各々 3-デオキシ-D-グリセロ-2,5-ジヘキソウロソ酸 (DHD) と 2-ケト-3-デオキシ-D-グルコン酸 (KDG) であることが分かった。

従って、Gbs1892 が 4-デオキシ-5-ケト-ウロン酸-ケトールイソメラーゼ (EC 5.3.1.17)、Gbs1891 が 2-デオキシ-3-デオキシ-D-グルコン酸 5-脱水素酵素 (EC 1.1.1.127) であることが明らかになった。以上のことから、不飽和グルクロン酸は Gbs1892 と Gbs1891 の逐次反応により KDG に代謝されることが明らかになった (図 2)。

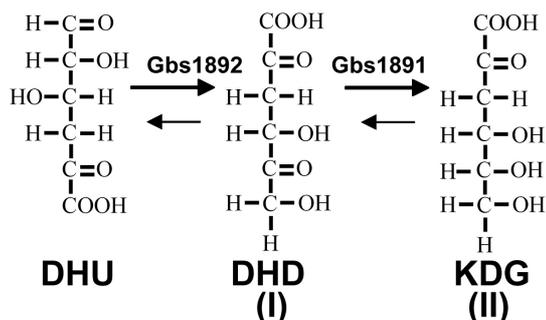


図 2. 不飽和ウロン酸の代謝経路

UGL 遺伝子クラスターのホモロジー解析から、不飽和グルクロン酸は 2-ケト-3-デオキシ-D-グルコン酸 (KDG) に代謝された後、KDG キナーゼ (Gbs1893) と KDG アルドラーゼ (Gbs1894) の逐次反応により、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸に変換されることが示唆された。

他の連鎖球菌 *S. pneumoniae* (Spn) と *S. pyogenes* (Spy) のゲノムにも UGL 遺伝子クラスターが存在する。遺伝子組換え酵素の特性を解析することにより、Gbs1892 と相同性を示す Spn0289 と Spy0637 がイソメラーゼ活性を示す。Gbs1891 と相同性を示す Spn0290 と Spy0636 が脱水素 (還元) 酵素活性を示すことを明らかにした。

(3) グリコサミノグリカン代謝系酵素の X 線結晶構造解析

Gbs1892 と Gbs1891 の構造と機能との相関を明らかにするため、それらの X 線結晶構造解析を進めた。両酵素の結晶を調製し、X 線回折実験により結晶の基礎的データを収集した。データをプロセスし、分子置換法により Gbs1892 と Gbs1891 の初期モデル構造を構築した。Gbs1892 は / -構造のサブユニットをもつホモ 4 量体酵素であり (図 3)、Gbs1891 は / / の 3 層からなるサブユニットをもつホモ 4 量体酵素であることが分かった (図 4)。Gbs1892 は、同一の活性を示す大腸菌由来 KduI と構造類似性を示さなかった。Gbs1891 は典型的な short-chain dehydrogenase/reductase ファミリーと同様の構造特性を示す。つまり、Gbs1891 の分子中央に 1 枚の -シートが存在し、その周りを -ヘリックスが取り囲む構造をとる。外周の -ヘリックスの中央には、大きなクレフト (Rossmann フォールド) が存在し、ここで還元反応が行われると示唆される。

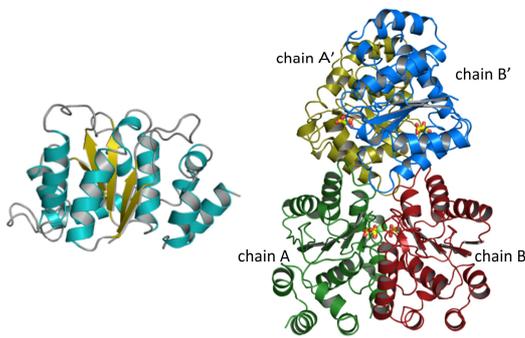


図3. イソメラーゼ Gbs1892 の構造
(左)単量体、(右)四量体

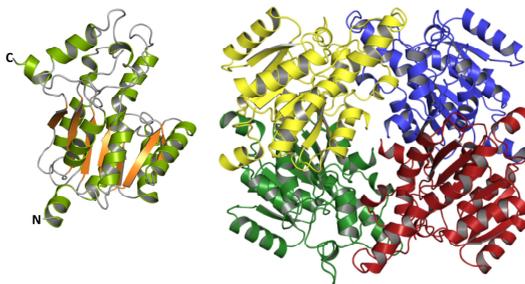


図4. 還元酵素 Gbs1891 の構造
(左)単量体、(右)四量体

Gbs1892 と基質との複合体の構造解析に着手した結果、結晶溶液に高濃度で含まれる基質アナログ(酒石酸カリウムナトリウム)が Gbs1892 と結合していた。酒石酸ナトリウムカリウムは本酵素反応を阻害することから、この部位が基質との結合に重要であることが示された。Gbs1892 は、一次構造上相同性が見られないリボース-5 リン酸イソメラーゼに対して構造類似性を示した。この構造類似性と酒石酸ナトリウムカリウムとの複合体の立体構造、並びに部位特異的変位解析から、Cys72、Thr74 及び Asn106 が Gbs1892 の触媒作用或いは基質認識に重要であることを明らかにした。同様に、Gbs1891 による還元反応には、Ser150、Tyr163 及び Lys167 が catalytic triad として機能することが分かった。

【結論】グリコサミノグリカンの代謝に関わる連鎖球菌由来イソメラーゼと還元酵素を分子同定した。また、それらの立体構造を高分解能で決定した。イソメラーゼについて、連鎖球菌 Gbs1892 と大腸菌 KduI は同一の反応を触媒する酵素であるが、その一次構造も立体構造も全く似ていないことが明らかになった。これは、両酵素が異なる起源から分子進化してきた可能性を示すものであり、タンパク質の構造と機能の分子進化を考える上でとても重要である。基質アナログとの複合体の構造解析から、Gbs1892 における基質結合部位を同定することができた。

還元酵素について、連鎖球菌 Gbs1891 は補酵素 NADH 依存的に還元活性を示す。その一次並びに立体構造解析から、本酵素が SDR フ

ァミリーに分類されることが分かった。ファミリー酵素との比較構造解析より、Gbs1891 の触媒反応に関わるアミノ酸残基を推定することができた。

本研究者らが見出した UGL 遺伝子クラスターは、グリコサミノグリカンの断片化、分解並びに代謝に関わる酵素をコードしているため、本クラスターを細菌感染症対策のターゲットとして位置付けることができる。

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8件)

Yusuke Nakamichi, Bunzo Mikami, Kousaku Murata, and Wataru Hashimoto. Crystal structure of a bacterial unsaturated glucuronyl hydrolase with specificity for heparin.

J. Biol. Chem., 289(8), 4787-4797 (2014). 査読有り

Wataru Hashimoto, Yukie Maruyama, Yusuke Nakamichi, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata. Crystal structure of *Pedobacter heparinus* heparin lyase Hep III with the active site in a deep cleft. *Biochemistry*, 53(4), 777-786 (2014). 査読有り

Wataru Hashimoto, Yukiko Miyamoto, Mayumi Yamamoto, Fuminori Yoneyama, and Kousaku Murata. A novel bleb-dependent polysaccharide export system in the nitrogen-fixing *Azotobacter vinelandii* subjected to low nitrogen gas levels. *Int. Microbiol.*, 16(1), 35-44 (2013). 査読有り

Bunzo Mikami, Mizuho Ban, Sachiko Suzuki, Hye-Jin Yoon, Osamu Miyake, Masayuki Yamasaki, Kohei Ogura, Yukie Maruyama, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Induced-fit motion of a lid loop involved in catalysis in alginate lyase A1-III.

Acta Crystallograph. Sect. D Biological Crystallography, 68(9), 1207-1216 (2012). 査読有り

Yu Nishitani, Yukie Maruyama, Takafumi Itoh, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Recognition of heteropolysaccharide alginate by periplasmic solute-binding proteins of a bacterial ABC transporter.

Biochemistry, 51(17), 3622-3633 (2012). 査読有り

Yukie Maruyama, Takafumi Itoh, Yu Nishitani, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Crystallization and preliminary X-ray analysis of alginate ABC importer from

Sphingomonas sp. strain A1.
Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 68 (3), 317-320 (2012). 査読有り
Fuminori Yoneyama, Mayumi Yamamoto, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. *Azotobacter vinelandii* gene clusters for two types of peptidic and catechol siderophores produced in response to molybdenum.
J. Appl. Microbiol., 111 (4), 932-938 (2011). 査読有り
Hiroyuki Takeda, Fuminori Yoneyama, Shigeyuki Kawai, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria.
Energy Environ. Sci., 4 (7), 2575-2581 (2011). 査読有り

〔学会発表〕(計10件)

橋本 涉、丸山如江、高瀬隆一、中道優介、三上文三、村田幸作. 連鎖球菌による宿主細胞外マトリクス(グリコサミノグリカン)の代謝機構.
日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学.
中道優介、三上文三、村田幸作、橋本 涉. 細菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼのヘパリン二糖認識機構. 日本農芸化学会 2013 年度関西・中四国・西日本支部大会、2013 年 9 月 6 日、県立広島大学.
高瀬隆一、河井重幸、橋本 涉、村田幸作. 細菌のアルギン酸代謝に関わる新規な NADH 要求性 -ケト酸還元酵素. 日本農芸化学会 2013 年度関西・中四国・西日本支部大会、2013 年 9 月 6 日、県立広島大学.
橋本 涉、丸山如江、中道優介、村田幸作. ヘパリン分解細菌由来ヘパラン硫酸リアーゼ HepC の結晶構造と活性部位.
日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学.
中道優介、丸山如江、橋本 涉、村田幸作. 酸性多糖の分解に関わる細菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼのクラスター分析. 日本生化学会 2012 年度大会、2012 年 12 月 16 日.
橋本 涉、丸山如江、中道優介、三上文三、村田幸作. ヒト関連細菌由来グリコサミノグリカン分解遺伝子クラスターにおけるヘパラン硫酸リアーゼ.
日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学.
中道優介、丸山如江、橋本 涉、村田幸作. グリコサミノグリカン分解に関わる細菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼの基質認識機構.
日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3

月 25 日、京都女子大学.
高瀬隆一、三上文三、橋本 涉、村田幸作. 酸性多糖の代謝に関わる細菌由来 -ケト酸還元酵素の X 線結晶構造解析.
日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学.
中道優介、丸山如江、三上文三、橋本 涉、村田幸作. 連鎖球菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼのヘパリン二糖認識機構.
日本農芸化学会 2011 年度関西支部大会、2011 年 10 月 2 日、京都大学.
高瀬隆一、三上文三、橋本 涉、村田幸作. ポリウロン酸の代謝に関わる細菌由来 -ケト酸還元酵素の構造機能相関.
日本農芸化学会 2011 年度関西支部大会、2011 年 10 月 2 日、京都大学.

〔図書〕(計0件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
該当なし
取得状況(計0件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
アウトリーチ活動(計3件)
2013 年 10 月 19、20 日、「京都大学宇治キャンパス公開」にて、一般市民向けに研究内容を紹介するパンフレットとポスターの作成に協力した。
2012 年 10 月 20、21 日、「京都大学宇治キャンパス公開」にて、一般市民向けに研究内容を紹介するパンフレットとポスターの作成に協力した。
2011 年 10 月 22、23 日、「京都大学宇治キャンパス公開」にて、一般市民向けに研究内容を紹介するパンフレットとポスターの作成に協力した。

ホームページ情報(計7件)
研究成果データベース
Yusuke Nakamichi, Ai Kaneko, Kanate Temtrirath, Ryuichi Takase, Yukie Maruyama, Bunzo Mikami, Kousaku Murata, and Wataru Hashimoto. Structural determinants in bacterial unsaturated glucuronyl hydrolase for degradation of heparin disaccharides.
SPring-8 User Experiment Report, 2013B1260 (2013).
Yukie Maruyama, Yusuke Nakamichi, Ai Kaneko, Ryuichi Takase, Bunzo Mikami, Kousaku Murata, and Wataru Hashimoto. Crystal structure of heparan sulfate lyase HepC from *Pedobacter heparinus*.
SPring-8 User Experiment Report,

2013A1106 (2013).

Yusuke Nakamichi, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Crystal structure of unsaturated glucuronyl hydrolase specific for heparin.

PDB ID, 3WIV, 2013年9月26日.

Yukie Maruyama, Yusuke Nakamichi, Bunzo Mikami, Kousaku Murata, and Wataru Hashimoto. Crystal structure of heparan sulfate lyase HepC from *Pedobacter heparinus*.

PDB ID, 4MMH, 2013年9月9日.

Yukie Maruyama, Yusuke Nakamichi, Bunzo Mikami, Kousaku Murata, and Wataru Hashimoto. Crystal structure of heparan sulfate lyase HepC mutant from *Pedobacter heparinus*.

PDB ID, 4MMI, 2013年9月9日.

Yusuke Nakamichi, Yukie Maruyama, Bunzo Mikami, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. Crystal structure of unsaturated glucuronyl hydrolase mutant D115N from *Streptococcus agalactiae*.

PDB ID, 3VXD, 2012年9月11日.

Wataru Hashimoto, Yukie Maruyama, Ryuichi Takase, Yusuke Nakamichi, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata. Crystal structure of streptococcal -keto acid reductase involved in metabolism of glycosaminoglycans.

SPring-8 User Experiment Report, 2011B2055 (2011).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 渉 (HASHIMOTO, Wataru)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30273519

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし