

## 微生物の糖代謝酵素の構造生物学的研究

東京大学大学院農学生命科学研究科 伏信 進矢

### 【略歴】

- 1996年 3月 東京大学大学院農学生命科学研究科 修士課程修了
- 1997年11月 東京大学大学院農学生命科学研究科 博士課程中退
- 1997年11月 東京大学大学院農学生命科学研究科 助手
- 1999年 4月 農学博士（東京大学）
- 2006年7～10月 米国アイオワ州立大学（Visiting Scientist）
- 2007年11月 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教
- 2011年11月 東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授
- 2012年12月 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

### はじめに

生物にとって糖は最も重要なエネルギー源のひとつだが、その構造的多様性により、多種多様な状態で存在する。例えば澱粉やグリコーゲンのような貯蔵と効率的な分解に適した多糖、セルロースやキチンのように生体の構造材料として使われる硬く分解されにくい多糖、そして細胞表面に存在して目印として働く複合糖鎖などがある。これらを分解・代謝する酵素も非常に多様であり、糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase, GH) のファミリーだけでも 130 近くある。また、糖代謝においては、高エネルギーリン酸結合を形成するリン酸基の触媒が鍵となる。例えば、一般的に ATP をリン酸供与体とするヘキソキナーゼなどの糖キナーゼ、糖リン酸からリン酸を加水分解して外す糖ホスファターゼ、水の代わりにリン酸を利用して糖鎖を切断する糖質ホスホリラーゼなどがある。特に、糖質ホスホリラーゼはその反応が可逆的であり、逆反応により有用な糖質およびオリゴ糖を安価に効率よく大量合成できるという特長がある。このようなリン酸補助性糖質代謝酵素も、近年続々と発見されている。我々のグループでは糖の分解・代謝に関わる多様な酵素の中から、新規ファミリーに属して構造新規性が高く、産業界への応用の可能性が高いものを中心に立体構造解析と機能解析を行っている。特に、微生物は様々な環境に棲息するために、その代謝経路は多様性が広く、未だに機能や構造がわかっていない特殊な酵素が多数存在する。例えば、超好熱菌の代謝系は生命の起源に近い特徴を持っていると考えられており、その酵素は高い耐熱性を持つために、産業利用における価値が高い。糸状菌は菌体外の分解酵素の生産能力に優れており、ゲノムサイズも大きいために、多糖を分解するための酵素の遺伝子を多数隠し持っている。実際、糸状菌の菌体外糖質分解酵素群は工業スケールで大量生産され、食品加工、バイオ燃料生産などに大いに役立っている。また、腸内細菌は、宿主であるヒトにより易消化性糖質（澱粉など）が吸収しつくされた嫌気的環境に生育しており、難消化性糖質の発酵にエネルギー源の大部分を依存している。特に、ビフィズス菌は分類学上放線菌に近くゲノムサイズも比較的大きなことから、有用かつ新規な新規糖質分解酵素を多数有している。糖質加水分解酵素は糖転移酵素に比べて一般的に安定で扱いやすく、グライコシターゼ化などの変異導入により、高効率でオリゴ糖を合成する能力が付与できる。ビフィズス菌の酵素により合成されたオリゴ糖は、これら「善玉菌」と呼ばれるような腸内細菌に資化されやすいことから、新規なプレバイオティクスの生産に役立つと期待できる。このようなタンパク質工学的操作を行うにあたって、現在では立体構造情報は必須となる。本研究では、微生物から新規に発見された糖代謝酵素を対象に構造生物学的研究を行なった。

## 新規ファミリーの糖質関連酵素

従来は糖転移酵素ファミリーGT36に分類されていた糖質ホスホリラーゼの立体構造を決定した所、全体構造と活性中心の両方において、加水分解酵素でありGH15に属するグルコアミラーゼと類似性を示すことを発見した。すなわち、これらの糖質ホスホリラーゼは加水分解酵素から進化した酵素であり、GTではなくGHに分類されるべきである、という主張のもと、糖質関連酵素データベースCAZy (Carbohydrate-Active enZymes)の提唱者・管理者であるフランスのHenrissat博士らと協議の末に、GT36を廃止してGH94を新設することになった。この発見はその後のCAZyの分類・運営ルールに大きな影響を与えることになった。さらに、セロビオースホスホリラーゼを対象に、コンピュータ解析や阻害剤を利用して詳細な触媒機構・基質認識機構を明らかにした。GH94の他にも、GH42、GH54、GH55、GH57、GH112、GH127、PL20で世界初の立体構造決定に成功した。

## ビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖分解代謝酵素群

2005年に北岡らによってビフィズス菌から母乳に含まれるオリゴ糖（ヒトミルクオリゴ糖）の中の二糖ラクトNビオース(LNB)とヒトの腸管に存在する糖タンパク質ムチンに由来する二糖ガラクトNビオース(GNB)を代謝する酵素群が発見された。LNBとGNBを遊離するのに必要なビフィズス菌の菌体外酵素、菌体内に二糖を取り込むトランスポーターの溶質結合ドメイン、菌体内でその後の代謝を担う酵素群の結晶構造を決定した。一連の酵素群の構造決定により、ビフィズス菌の増殖因子であるLNBとGNBがどのように代謝されるかを明らかにすることに成功した。

## 超好熱性古細菌の糖・リン酸関連代謝酵素と「真の」二機能酵素

原始的な生命のなごりを残していると言われる超好熱性古細菌の糖代謝においては、通常の生物は持たない特殊な酵素が存在する。ATPではなくADPをリン酸供与体とするグルコキナーゼ、新規な古細菌特異的ヘキソキナーゼの結晶構造を世界に先駆けて決定した。また、超好熱性古細菌においては、糖新生に関わる2つの反応が一つの酵素（FBPアルドラーゼ/ホスファターゼ）によって触媒される。この酵素のFBPホスファターゼ状態とFBPアルドラーゼ状態の両方の結晶構造を決定した。その結果、3つのループが開閉することにより触媒残基が入れ替わり、あたかもスイッチが切り替わるように、全く異なる2つの触媒反応を行う様子を明らかにすることに成功した。生命進化の初期においては解糖系よりも糖新生の方が先に登場したと考えられており、原始生命ではこのような二機能性酵素を利用したシンプルな生合成系を持っていたのではないかと推測できる。

## 参考文献

- Fushinobu. Metalloproteins: A new face for biomass breakdown. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 88-89 (2014)
- Fushinobu *et al.* Multiple rewards from a treasure trove of novel glycoside hydrolase and polysaccharide lyase structures: new folds, mechanistic details, and evolutionary relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 652-659 (2013)
- Fushinobu *et al.* Structural basis for the bifunctionality of fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase. *Nature* **478**, 538-541 (2011)
- Fushinobu. Unique Sugar Metabolic Pathways of Bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 2374-2384 (2010)

## 謝辞

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻酵素学研究室で行われたものであり、同研究室でご指導いただいた先生方、共同研究して下さった多くの先生方、そして本研究に関わった大学院生、学部学生、研究室員のみなさまに心より感謝致します。