

論文内容要旨 (和文)

平成 14 年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生要素科学 講座

氏名

鈴木龍一郎

論文題目 R型レクチンに属する糖結合タンパク質群の構造と機能解析

R型レクチン群は、レクチンのなかで最も広範囲な生物種で存在が確認されている一群であり、構造上3つの繰り返し配列(サブドメイン α 、 β 、 γ)がコンパクトに折りたたまれた β -trefoil構造を必須ドメイン単位としている。またR型レクチン群は、その機能の相違から、細胞表面糖鎖への結合能を有する「レクチングループ」と、酵素の機能ドメインとして存在する「エンザイムグループ」に分類できる⁽¹⁾。レクチングループで最も著名なタンパク質は、ヒマ種子由来リボソーム不活化タンパク質(RIP)のリシンであり、構造機能相関が詳細に明らかにされている。リシンは構造上A鎖と、レクチンドメインであるB鎖がジスルフィド結合で連結している。またB鎖は、 β -trefoil構造のドメイン単位が2つタンデムに連結しており、このタンデム化が細胞表面糖鎖への結合能や赤血球凝集能を示す要因となっている⁽²⁾。既報のレクチングループのタンパク質は、ほぼリシンと同様の構造、機能を呈しているが、最近になりレクチンドメイン単独で存在するR型レクチンの存在が幾つか報じられた。しかし現時点でその構造機能相関を明確にした例はない。一方エンザイムグループは、放線菌由来キシラナーゼ(SoXyn10A)が最も構造機能相関や反応メカニズムの解明が進んでいるが、完全解明には至っていない⁽³⁻⁵⁾。基質結合に最も重要と考えられているサブドメイン β の基質結合様式が未知であること、および基質と接触した後の触媒ドメインの反応の一部始終が可視化できていないためである。以上の背景をふまえ、R型レクチン群の構造機能相関および反応メカニズムの完全理解を達成するため、本研究では各グループ1種のタンパク質に焦点を絞り、構造機能相関を解明することを目的とした。

レクチングループに属するミミズ由来レクチン(EW29)は、タンデムリピート型のレクチンドメインが単独で存在し、その糖鎖結合特性が詳細に研究されている⁽¹⁾。興味深いことにEW29は、C末端側ドメインであるC-halfのみでも赤血球凝集能を示すことが明らかになっているが、構造が未知であるためその分子メカニズムは解明されていない⁽¹⁾。そこでC-half-Lactose複合体の構造解析を行うことで構造機能相関の解明を計った。その結果、Lactoseがサブドメイン α および γ のそれぞれに結合している様子を観察することに成功した⁽⁶⁾。この結果はEW29の糖結合価は2価であり、すなわち単独ドメインで赤血球凝集能を持ちうることを示唆している。

エンザイムグループに属するSoXyn10Aは、触媒ドメインと基質結合ドメイン(SoCBM13)の2つの機能ドメインから構成される。SoCBM13のサブドメイン β は、糖結合部位に芳香族アミノ酸を2つ有する唯一のサブドメインであり、これまでの研究からキシランと2点でスタッキング相

相互作用し、キシランとの結合を強化していると考えられている⁽⁷⁾。しかし、結晶中におけるサブドメインβの糖結合ポケットはクリスタルパッキングの影響で塞がれており、キシラン-サブドメインβ複合体の可視化は不可能であった^{(8),(9)}。そこでサブドメインγの糖結合部位の環境をサブドメインβへ変換し、間接的に結合様式を解明することにした。サブドメインγをβと同等の環境にした変異体 S426W の機能解析から、その変異体はキシランに対し結合力が向上していることが判明した。次に S426W キシロオリゴ糖複合体の X 線構造解析を行ったところ、予想通りサブドメインγ中でキシランが 2 点でスタッキング相互作用を形成している様子が確認でき、サブドメインβの結合様式を間接的に解明することに成功した。

SoXyn10A の反応機構は、基質のアノマー炭素の水酸基を 2 回反転させる Double displacement mechanism であることが判明しており、反応開始から中間体を形成するまでの Glycosylation と、中間体から生成物を得るまでの Deglycosylation の 2 つの反応段階から構成されている。最近、反応の各ステップを可視化するため、不活化酵素変異体やフッ素含有基質アナログを用いて X 線構造解析を行い、Glycosylation の各段階の可視化がなされている。しかし、反応産物の可視化が困難なため、反応の後半である Deglycosylation のメカニズムを証明した例は存在しない。そこで、理にかなったタンパク質デザインにより特殊な変異体を創出し、その X 線構造解析により反応の一部始終の可視化を試みた。目的変異体は、E128H を出発酵素とし、ランダム変異を導入した変異体プールから MU-active selection 法を用い、Azide で活性の制御ができるもの (Switching Enzyme with Azide (SEA)) として選出された⁽⁴⁾。機能解析の結果、SEA は Azide 非存在下ではほぼ活性を示さないが、Azide 添加によりその活性は約 78 倍にまで向上し、また至適 pH が野生型に比べアルカリ側にシフトしていた⁽¹⁰⁾。この性質を利用し、酵素反応の一部始終の観察を試みた。まず酸性 pH 条件下で構造解析することで、酵素反応の進行を抑制し、酵素-基質複合体の安定化および立体構造の決定に成功した。次いでソーキングの条件をアルカリ側にシフトさせたところ、酵素反応は中間体形成まで速やかに進行し、結果として安定な反応中間体の構造が得られた。さらに Azide を添加し構造解析することで、Azide の求核攻撃に伴う反応中間体の壊裂と同時に反応産物を生じさせ、安定な反応産物-酵素複合体の可視化に成功した。これらの結果は、反応の各ステップ全ての可視化を示唆し、目的としていた酵素反応の一部始終の観察に成功したことを意味している。また反応産物-酵素複合体の可視化により、Deglycosylation における H₂O や Azide による求核攻撃が、中間体中にトラップされている糖のアノマー炭素のβ面から行われることを世界で初めて直接証明することにも成功した⁽¹¹⁾。

References 1) Hirabayashi, J. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14450-14460. 2) Rutember, E. and Robertus, J. D. (1991) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **10**, 260-269. 3) Fujimoto, Z. *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* **300**, 575-585. 4) Kuno, A. *et al.* (1999) *FEBS Lett.* **450**, 299-305. 5) Kuno, A. *et al.* (2000) *FEBS Lett.* **482**, 231-236. 6) Suzuki, R. *et al.* (2004) *Acta. Crystallog.* **D60**, 1895-1896. 7) 伊藤茂泰 2003 年度山形大学博士論文 8) Fujimoto, Z. *et al.* (2002) *J. Mol. Biol.* **316**, 65-78. 9) Fujimoto, Z. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 9606-9614. 10) Suzuki, R. *et al.* (2003) *Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization*, 72-78. 11) Suzuki, R. *et al.* 投稿中

論文内容要旨 (英文)

平成 14 年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻

共生要素科学 講座

氏名

鈴木龍一郎

論文題目 Studies on the Structure-function Relationship of Carbohydrate-binding Proteins Belonging to R-type Lectin Family

R-type lectins, exist ubiquitously in both animals and bacteria, consist of triple-repeated peptide (subdomains α , β and γ) and form “ β -trefoil fold”. The R-type lectin family is classified into lectin group and enzyme group, and these functions as binder the glycan on cell surface and the substrate-binding domain of enzyme, respectively⁽¹⁾. A plant toxin ricin (RIP), classified into lectin group, is one of the most prominent lectin and its structure-function relationship has been well characterized. Ricin is composed of two functional subunit (A-chain and a B-chain), which are linked via disulfide bond. The ricin toxin B-chain (RTB) exists as tandem arranged two β -trefoil domains, resulting in hemagglutination activity⁽²⁾. Recently, a single domain R-type lectin having a hemagglutination activity which consists of only one β -trefoil domain, LSL from *Laetiporus sulphureus*, was reported. However, its structure-function relationships have not been clarified yet. In enzyme group, the structure- function relationship of *Streptomyces* xylanase (SoXyn10A) is characterized in detail⁽³⁻⁵⁾. However, its substrate-binding mechanism and hydrolysis mechanism of hydrolysis have not been clarified completely. From these viewpoints, the author has tried to elucidate the structure-function relationships of both lectin group and enzyme group.

The EW29 lectin from earthworm belonging to the lectin group is composed of homologous N-terminal domain (N-half) and C-terminal domain (C-half) and its sugar-binding specificity was well characterized⁽¹⁾. Interestingly, its truncated mutant comprising only C-half (rC-half) have hemagglutination activity in itself, however, its structure-function relationship have not been clarified⁽¹⁾. The crystal structures of the rC-half in complex with ligands were, therefore, determined and sugar-binding structure was analyzed⁽⁶⁾. 3D-structure of the rC-half demonstrated that two of sugar-binding pockets were found to be able to bind the non-reducing-end galactose unit of glycan so as to hemagglutinate the erythrocyte.

The SoXyn10A composed of a catalytic domain belongs to family 10 of glycoside hydrolase and of a xylan-binding domain (SoCBM13) belonging to the enzyme group of R-type lectin family. Subdomain β of SoCBM13 has been considered to make a double

stacking interaction with two sugar ring units of the xylan using two aromatic residues from the results of biochemical studies⁽⁷⁾. However, to date, sugar-binding manner of subdomain β has not been visualized directly, because of the crystal packing around the subdomain β ^(8,9). In order to clarify the sugar-binding manner of the subdomain β , S426W mutant, which was expected to be able to make a double stacking interaction with xylan, was constructed. The S426W was, then, crystallized and its crystal structure with or without substrate was determined. Consequently, double stacking interaction was clearly visualized in the subdomain γ of the S426W.

Retaining glycosyl hydrolases, that involve glycosylation and deglycosylation steps, are the most abundant hydrolases. The visualization of both steps has been researched in order to know their accurate reaction mechanisms. However, visualization of both steps has not yet been successful and the focus has been on the glycosylation step since glycosylation could be visualized by either inactivating the enzyme for the deglycosylation step and/or using substrate analogues to isolate covalent intermediates. Soaking products with glycosyl hydrolases suffered from mutarotation of an anomeric carbon of reaction products and thus visualization of the second step has been impossible. Therefore the mutant, which makes it possible to visualize each step of enzyme reaction, was constructed by random mutagenesis. The resulting mutant acted as a "switching-enzyme with azide (SEA)"⁽¹⁰⁾. The entire step of an enzyme reaction was tried to visualize using SEA. Intriguingly, the electron density maps of Michaelis complex were obtained by the soaking crystals in to the substrate solution with acidic pH. The covalent glycosyl- enzyme intermediate were trapped by the soaking crystals in to the substrate solution with pH 6.5. Furthermore, the crystals were soaked into the substrate solution (containing sodium azide) at pH 6.5, the maps for hydrolytic product were also obtained. In conclusion, for the first time, the author could provide complete snapshots for the entire reaction catalyzed by the active retaining enzyme using both natural and more reactive substrates⁽¹¹⁾.

References 1) Hirabayashi, J. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14450-14460. 2) Rutenber, E. and Robertus, J. D. (1991) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **10**, 260-269. 3) Fujimoto, Z. *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* **300**, 575-585. 4) Kuno, A. *et al.* (1999) *FEBS Lett.* **450**, 299-305. 5) Kuno, A. *et al.* (2000) *FEBS Lett.* **482**, 231-236. 6) Suzuki, R. *et al.* (2004) *Acta Crystallog.* **D60**, 1895-1896. 7) Ito, S. (2004) Doctoral Thesis 8) Fujimoto, Z. *et al.* (2002) *J. Mol. Biol.* **316**, 65-78. 9) Fujimoto, Z. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 9606-9614. 10) Suzuki, R. *et al.* (2003) *Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization*, 72-78. 11) Suzuki, R. *et al.* Submitted

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成17年2月18日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

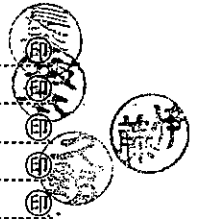
主査 長谷川 典巳

副査 坂本 政臣

副査 伊藤 廣記

副査 久野 敦

副査



学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

1. 論文申請者

専攻名 地球共生圏科学専攻
氏名 鈴木 龍一郎

2. 論文題目 (英文の場合は, その和訳を併記すること。)

Studies on the Structure-function Relationship of Carbohydrate-binding
Proteins Belonging to R-type Lectin Family
(R型レクチンに属する糖結合タンパク質群の構造と機能解析)

3. 学位論文公聴会

開催日 平成17年 2月10日
場所 理学部先端科学実験棟S401 (大講義室)

4. 審査年月日

論文審査 平成17年1月26日 ~ 平成17年2月10日
最終試験 平成17年2月10日 ~ 平成 年 月 日

5. 学位論文の審査及び最終試験の結果 (「合格」・「不合格」で記入すること。)

(1) 学位論文審査 合格
(2) 最終試験 合格

6. 学位論文の審査結果の要旨(1,200字程度)

別紙のとおり

7. 最終試験の結果の要旨

別紙のとおり

専攻名	地球共生圏科学専攻	氏名	鈴木 龍一郎
学位論文の審査結果の要旨			
<p>第一章では、レクチングループに属する単独ドメイン型の凝集素の構造機能相関を解明した成果についてまとめた。R型レクチン群は、その機能の相違から、「レクチングループ」と「エンザイムグループ」に分類され、レクチンドメインと機能ドメインから構成されている。最近、レクチンドメイン単独で存在するR型レクチンが報じられたが、その構造機能相関を明確にした例はない。ミミズ由来レクチン(EW29)のC末ドメインであるrC-halfは単独ドメイン型の凝集素として機能するので、rC-halfを用いて rC-half/Lactose複合体の構造解析を行うことで単独ドメイン型のR型レクチンの構造機能相関解明を行った。その結果、Lactoseがサブドメインαおよびγのそれぞれに結合している様子を観察することに成功した。rC-halfの糖結合価は2価であり、すなわち単独ドメインで赤血球凝集能を持ちうることを強く示唆していた。</p> <p>第二章では、エンザイムグループに属する放線菌由来キシラーゼ(<i>SoXyn10A</i>)の基質結合ドメイン(<i>SoCBM13</i>)のサブドメインβの結合様式の解明についてまとめた。<i>SoCBM13</i> のサブドメインβは、これまでの研究からキシランと2点でスタッキング相互作用し、結合を強化していると考えられていた。しかし、結晶中におけるサブドメインβはクリスタルパッキングで塞がれており、糖複合体の可視化はいままで不可能であった。そこで、サブドメインγの環境をサブドメインβへ変換した変異体S426Wを用いて、間接的に結合様式を解明した。X線構造解析の結果、サブドメインγ中でキシランが2点でスタッキング相互作用を形成している様子が確認でき、サブドメインβの結合様式を間接的に解明することに成功した。</p> <p>第三章では、<i>SoXyn10A</i> の反応機構の各ステップを可視化するための変異体(Switching Enzyme with Azide)SEA を創製し、詳細な機能解析を行った結果についてまとめた。目的変異体 SEA は、E128Hを出発酵素とし、ランダム変異を導入した変異体プールから MU-active selection 法を用いて選出した。機能解析の結果、SEA は Azide 非存在下ではほぼ活性を示さないが、Azide 添加によりその活性は約78倍にまで向上し、また至適 pH が野生型に比べアルカリ側にシフトしていた。</p> <p>第四章では、SEA の性質を利用し、酵素反応の一部始終の可視化への挑戦についてまとめた。まず酸性 pH 条件下で構造解析することで、酵素/基質複合体の立体構造の決定に成功した。次いで条件を至適 pH 側にシフトさせたところ、反応中間体の構造が得られた。さらに Azide を添加して構造解析することで、反応産物/酵素複合体の可視化に成功した。これらの結果は、目的としていた酵素反応の一部始終の観察に成功したことを意味している。また反応産物/酵素複合体の可視化により、Deglycosylation における H₂O や Azide による求核攻撃が、中間体中にトラップされている糖のアノマー炭素のβ面から行われることを世界で初めて直接証明することにも成功した。</p> <p>本研究の成果は国際学術誌に掲載済みで、酵素反応の一部始終の可視化についての論文は投稿中である。また、これらの研究成果は、2回の国際会議で発表された。</p> <p>本研究成果は学術的に大きな価値があり、本論文を博士(理学)論文として合格と判定する。</p>			
最終試験の結果の要旨			
<p>最終試験は公聴会形式で行われ、研究成果の発表の後に質疑応答が行われた。様々な角度からの質問に対して明確な説明、応答があり、鈴木龍一郎氏は研究背景の基礎知識を含め、専門領域についても深い知識をもち、公聴会後の審査委員会で、審査委員全員一致で鈴木龍一郎氏に博士(理学)の学位を授与することは妥当であると結論し、合格と判定した。</p>			