

体の分子実体が解明され、遺伝子疾患や薬剤性低マグネシウム血症の発症機序が明らかになってきた。高血圧や糖尿病などの生活習慣病と低マグネシウム血症との関連が指摘されているため、マグネシウム輸送体の異常と病態との関係を解明する必要がある。今後、マグネシウム輸送体を標的とした疾患治療薬が開発されることを期待する。

謝辞

本研究は、静岡県立大学薬学部産業衛生学講座および生体情報分子解析学分野に配属された学部学生、大学院生とともに行われたもので、この場を借りてお礼申し上げる。

- 1) Quamme, G.A. & de Rouffignac, C. (2000) *Front. Biosci.*, 5, D694-D711.
- 2) Simon, D.B., Lu, Y., Choate, K.A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S., & Lifton, R. P. (1999) *Science*, 285, 103-106.
- 3) Weber, S., Schneider, L., Peters, M., Misselwitz, J., Ronefarth, G., Bowald, M., Bonzel, K.E., Seeman, T., Sulakova, T., Kuwertz-Broking, E., Gregoric, A., Palcoux, J.B., Tasic, V., Manz, F., Scharer, K., Seyberth, H.W., & Konrad, M. (2001) *J. Am. Soc. Nephrol.*, 12, 1872-1881.
- 4) Tajima, T., Nakae, J., & Fujieda, K. (2003) *Pediatr. Nephrol.*, 18, 1280-1282.
- 5) Ikari, A., Hirai, N., Shiroma, M., Harada, H., Sakai, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., & Takagi, K. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 54826-54832.
- 6) Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., & Miwa, M. (2006) *J. Cell Sci.*, 119, 1781-1789.
- 7) Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Degawa, M., Takahashi, T., Sugatani, J., & Miwa, M. (2006) *J. Physiol. Sci.*, 56, 379-383.
- 8) Ikari, A., Okude, C., Sawada, H., Sasaki, Y., Yamazaki, Y., Sugatani, J., Degawa, M., & Miwa, M. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, 1778, 283-290.
- 9) Schlingmann, K.P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsun, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H.W., & Konrad, M. (2002) *Nat. Genet.*, 31, 166-170.
- 10) Walder, R.Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M.B., Beck, G.E., Englehardt, R.K., Carmi, R., & Sheffield, V.C. (2002) *Nat. Genet.*, 31, 171-174.
- 11) Ikari, A., Okude, C., Sawada, H., Yamazaki, Y., Sugatani, J., & Miwa, M. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 1129-1133.
- 12) Ikari, A., Sanada, A., Okude, C., Sawada, H., Yamazaki, Y., Sugatani, J., & Miwa, M. (2010) *J. Cell. Physiol.*, 222, 481-487.
- 13) Tejpar, S., Piessevaux, H., Claes, K., Piront, P., Hoenderop, J. G., Verslype, C., & Van Cutsem, E. (2007) *Lancet Oncol.*, 8,

387-394.

- 14) Ikari, A., Okude, C., Sawada, H., Takahashi, T., Sugatani, J., & Miwa, M. (2008) *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 377, 333-343.

五十里 彰

(静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学分野)

Molecular mechanism of magnesium transport in renal tubule

Akira Ikari (Department of Pharmacology-Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan)

遺伝子探索による耐熱性キチン分解酵素の開発と機能解明

1. はじめに

カニやエビの甲殻を構成する主成分のキチンは地球上でセルロースに次ぐ生産量を占めるバイオマス資源である。キチンは *N*-アセチルグルコサミン (NAG) のホモポリマーであり、その構成成分である NAG には関節痛改善や美肌効果といった優れた特性が見いだされ、近年食品や医薬品といった幅広い分野で応用されている。現在、NAG はキチンの酸加水分解によって (工業的に) 得られているが、酸加水分解を行うとアセチル基が脱離してしまい大部分がグルコサミンになってしまう。そこで副反応の少ない酵素法が注目されており、我々はキチンを効率よく分解できるキチン分解酵素を発見・開発することでキチン系バイオマスの有効利用を目指している。

2. 遺伝子探索によるキチナーゼの発見

自然界に存在する様々な微生物の未利用遺伝子の中で、100℃ 近い高温環境で生育できる超好熱菌由来の酵素は極めて高い熱安定性を有し、産業用酵素としての可能性を秘めている。しかしながら超好熱菌由来のキチン分解酵素群に関する報告は今中らによる超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* の遺伝子および酵素学的性質に関する報告のみであった¹⁾。この *T. kodakaraensis* のキチン代謝経路は既知のものと大きく異なる (図 1A)¹⁾。すなわち、キチナーゼによるキチン分解反応①は他の生物でも見られるが、次の二糖の部分的脱アセチル化反応②、*N*-アセチルグルコサミンとグルコサミンへの加水分解反応③、そして、

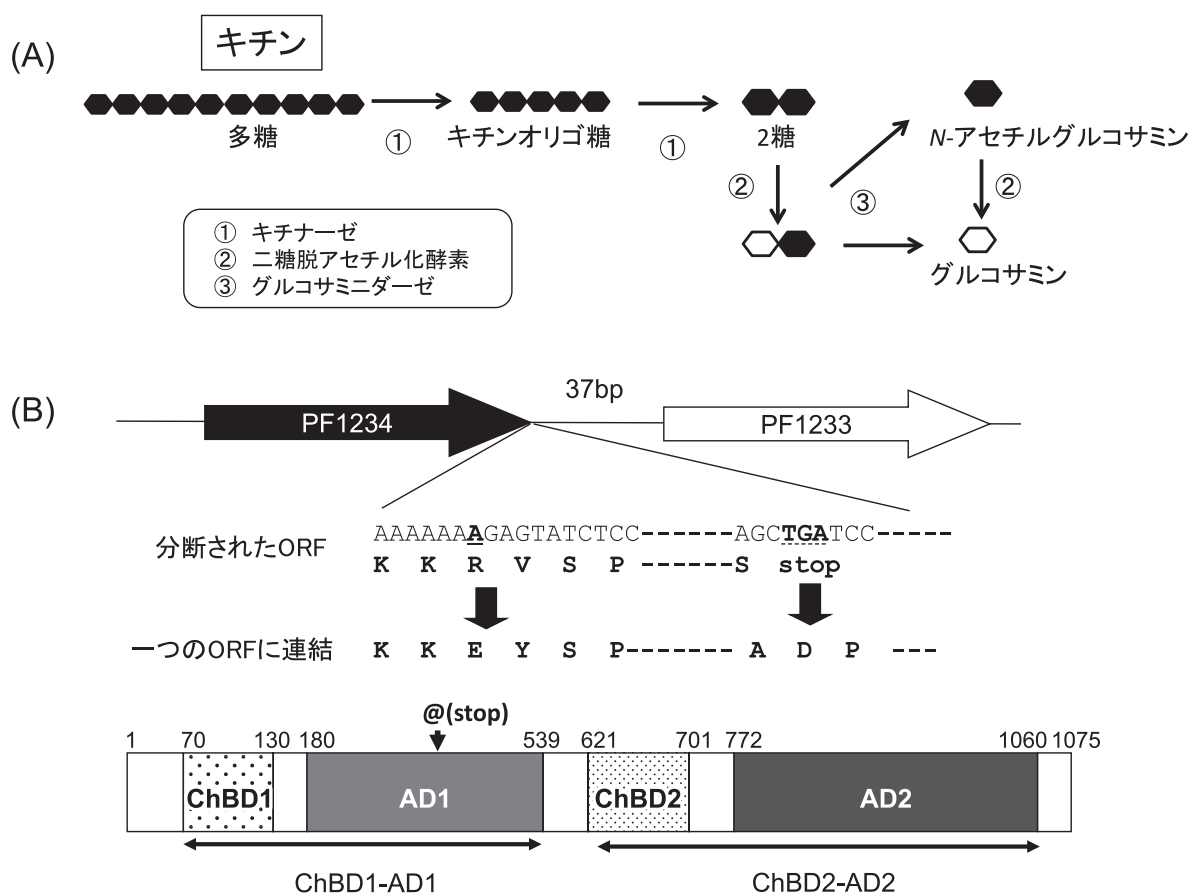


図1 超好熱性古細菌のキチン代謝経路および *P. furiosus* 由来キチナーゼ (Pf-ChiA) の構造

(A) *T. kodakaraensis* におけるキチン代謝経路. 近縁の *P. furiosus* においても同じ代謝経路を利用しているが, ①のキチナーゼはゲノム上でフレームシフトを起こしているため自然界では発現していない. 黒色の六角形は *N*-アセチルグルコサミンを白抜きはグルコサミンを表す.

(B) *P. furiosus* 由来キチナーゼ (Pf-ChiA) の遺伝子構造とドメイン構造. 自然界では二つの ORF (PF1233, PF1234) に分断されている. 下線で示したアデニン (A) が挿入されているため途中でストップコドン (破線) が出現する. このアデニンを削除することで一つの ORF になり, 完全なキチナーゼとなる. 1 分子内に基質結合力の異なる結合ドメイン ChBD1, ChBD2 および基質分解機構が異なる触媒ドメイン AD1 (エキソ型, 細菌型), AD2 (エンド型, 植物型) が存在するため効率よく結晶性キチンを分解できると考えられる.

N-アセチルグルコサミンの脱アセチル化反応②は新たに見いだされた代謝経路である. では, 他の超好熱菌も同じ代謝経路を利用しているのだろうか? また, 各経路の詳細な反応機構はどのようになっているのだろうか? このように超好熱菌特有のキチン代謝酵素群は産業利用だけでなく酵素学的にも興味深いものである. ここでは超好熱性古細菌由来のキチン分解酵素に着目し最近の知見を紹介する.

近縁の *Pyrococcus* 属に着目すると①のキチナーゼ遺伝子に相当する配列が *Pyrococcus furiosus* ゲノム上にも見いだされる. しかしながら, この遺伝子はゲノム上でフレー

ムシフトを起こして, 自然界では機能していない (図 1B). おそらく進化の過程で不要となり休眠状態となったのであろう. このフレームのシフトを遺伝子工学的手法で解消すると人工キチナーゼ遺伝子を得ることができた^{2,3)}.

この遺伝子を発現させることで得られるキチナーゼ Pf-ChiA は, 全長 1075 残基からなり, 分子内に二つの触媒ドメイン (AD1, AD2) と二つの基質結合ドメイン (ChBD1, ChBD2) を持つ (図 1B). また, 優れた耐熱性と 100℃ という高い至適温度を有し, 自然界で大半を占める難分解性の α 型結晶性キチンを効率的に分解できることが判明した. 我々はこのような Pf-ChiA の結晶性キチンに対する分

解機構を理解するため各ドメインの構造解析に取り組み ChBD1 は溶液 NMR 法で、また AD2 は X 線結晶構造解析で⁴⁾、ChBD2 は溶液 NMR 法と X 線結晶構造解析で立体構造を明らかにした⁵⁾。

3. 基質吸着ドメインの構造

ChBD1 と ChBD2 間でアミノ酸配列の相同性はなく、各々、糖吸着モジュール (CBM) ファミリー 5 と 2 に分類され (<http://www.cazy.org/>) 構造類似性もない (図 2A)。しかし基質との結合は、他の生物由来キチン結合ドメイン同様、タンパク質表面上に露出した芳香族アミノ酸とキチンの疎水面との相互作用による (図 2A)⁵⁾。ChBD2 の場合、構造解析や変異体解析を基にキチンへの結合モデルを作製

すると、表面にある三つのトリプトファンが、キチンの糖骨格の一つおきの NAG と重なり、さらにトリプトファン 308 と 274 の間にあるグルタミン酸とアスパラギン酸がアセトアミド基と相互作用するのに都合のよい配置にあることがわかった (図 2B)。これら酸性アミノ酸を中性アミノ酸に置換するとセルロース吸着能が高まったことから、これらの酸性アミノ酸が ChBD2 にキチンへの特異性を与えていると考えられる⁵⁾。興味深いことに基質結合力は ChBD2 の方が ChBD1 より 2 倍強い。これは ChBD2 の芳香族アミノ酸がすべてトリプトファンであるのに対し、ChBD1 ではそのうち二つがチロシンであるため糖との疎水的相互作用が弱まったことが原因だと考えられる (図 2A, 投稿準備中)。またこれらの吸着ドメインの利用法と

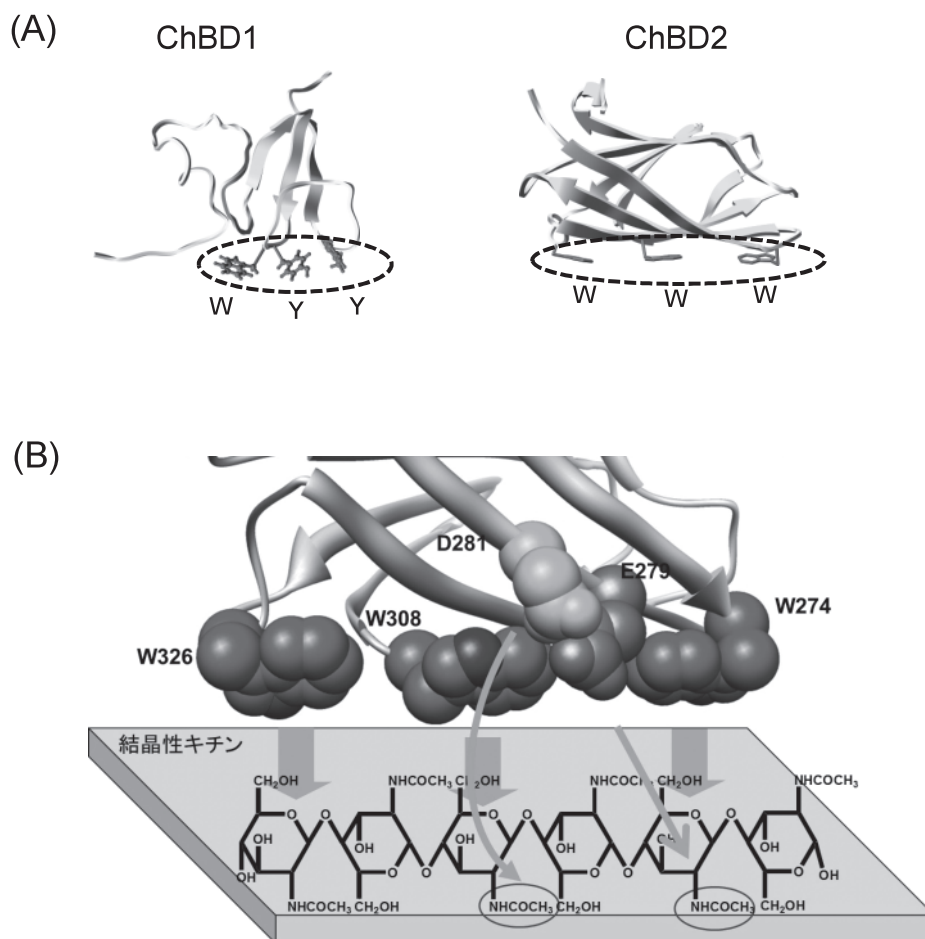


図 2 吸着ドメインの構造と相互作用モデル

(A) CBM ファミリー 5 の ChBD1 と CBM ファミリー 2 の ChBD2 の立体構造。点線の丸が相互作用面を表し相互作用に関与する芳香族アミノ酸を示す。

(B) ChBD2 とキチンとの相互作用モデル。三つの芳香環が糖と疎水的な相互作用を持ち酸性アミノ酸がアセトアミド基と相互作用すると考えられる。

して、他の耐熱性糖分解酵素と融合させることで、その糖分解活性を向上できることを見だし、現在、融合酵素の開発に取り組んでいる（投稿準備中）。

4. 触媒ドメインの構造と分類

Pf-ChiA をアミノ酸配列相同性に基づいて分類すれば、二つの触媒ドメイン（AD1, AD2）はともに細菌や真菌、植物、動物など多種多様な生物から見いだされる糖加水分解酵素ファミリー18に分類される（<http://www.cazy.org/>）。

さらに本ファミリーは立体構造の特徴から「植物型」と「細菌型」のサブグループに分類される^{6,7)}（図3A）。「細菌型」キチナーゼは基本構造（ β/α ）₈-バレルに加え、数本の β ストランドと α ヘリックスを含む α/β 構造を有する。このような付加構造の存在により、「細菌型」キチナーゼは比較的深い基質結合クレフトを有する（図3A, 実線で示す）。一方「植物型」キチナーゼは非常にシンプルな（ β/α ）₈-バレル構造を持ち「細菌型」キチナーゼのような付加構造を持たない。結果として「植物型」キチナー

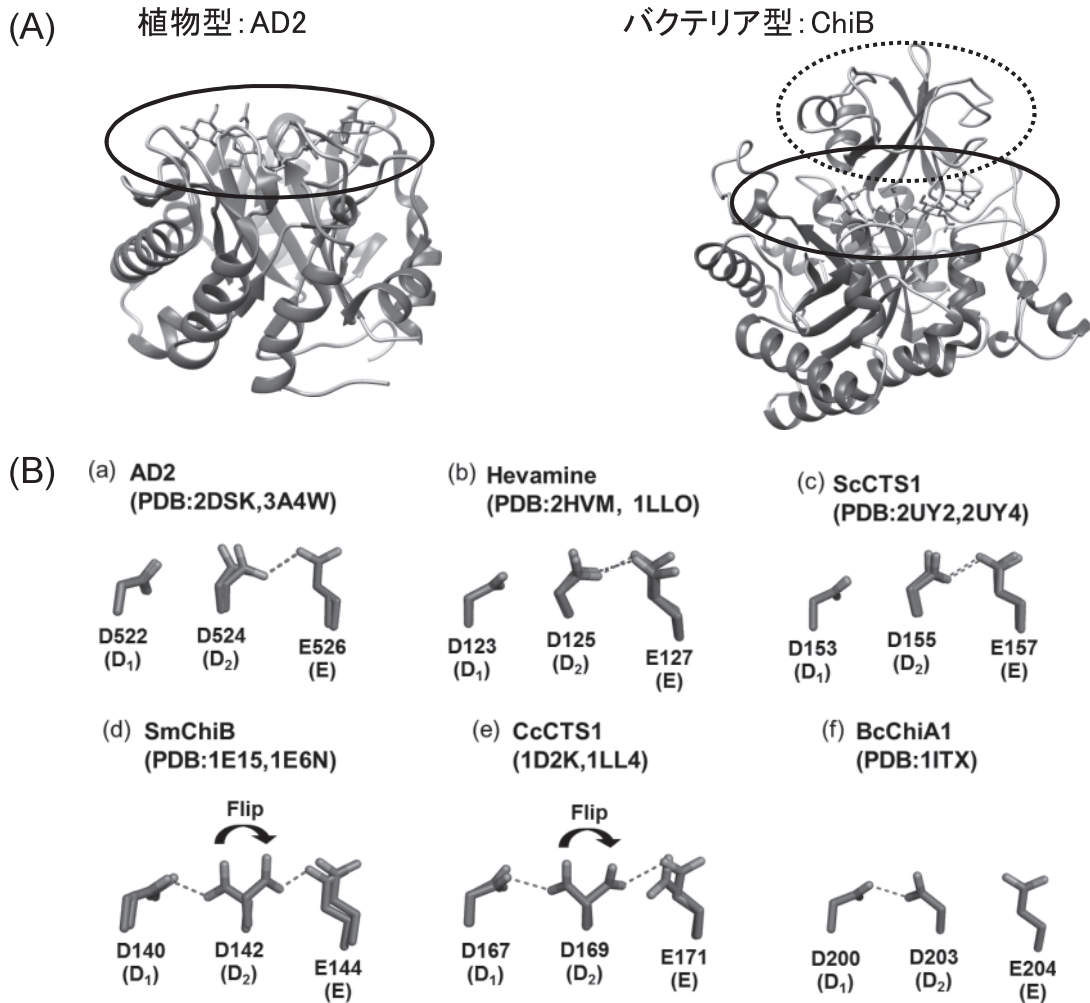


図3 植物型キチナーゼと細菌型キチナーゼの構造比較

(A) 植物型キチナーゼと細菌型キチナーゼの構造比較. 活性部位は実線で, 細菌型の α/β 構造は点線で示す。

(B) 植物型と細菌型キチナーゼのリガンド結合, 非結合時のD₁XD₂XEモチーフの構造比較。

「植物型」キチナーゼの例としてAD2, *Hevea brasiliensis* 由来 hevamine, および *Saccharomyces cerevisiae* 由来キチナーゼ1 (ScCTS1) を(a)~(c)に示し, 「細菌型」キチナーゼの例として *Serratia marcescens* 由来キチナーゼB (SmChiB), *Coccidioides immitis* 由来キチナーゼ1 (CcCTS1), および *Bacillus circulans* 由来キチナーゼA1 (BcChiA1) を(d)~(f)に示す。SmChiB, および CcCTS1 は活性部位への基質の結合に伴いD₁XD₂XEモチーフにおける中央のアスパラギン酸残基 (D₂) の側鎖の向きが反転する。

ぜの基質結合クレフトは比較的浅い (図 3A)。

古細菌由来キチナーゼである AD2 は「細菌型」キチナーゼにおいて見られるような付加構造を持たない (図 3A)^{4,7)}。したがって、立体構造の特徴からは AD2 は「植物型」キチナーゼに分類される。一方、AD1 は「細菌型」である *Bacillus circulans* 由来キチナーゼ A1 と高い配列相同性をもち、立体構造予測でも「細菌型」であることが支持された。このように Pf-ChiA は二つの吸着ドメインと二つの触媒ドメインを持つが、異なる型 (ファミリー) の組み合わせになっていることは興味深い。

5. 活性部位の構造を基にした分類

これまで「植物型」と「細菌型」は全体構造の特徴だけで区別されてきた。ファミリー 18 キチナーゼの構造的特徴をさらに詳しく見ていくと、活性部位に三つの酸性アミノ酸残基を含む高度に保存された共通配列 (D_1XD_2XE モチーフ) を有する。我々は AD2/基質複合体の構造解析を進め、「細菌型」と「植物型」の間には基質の結合に伴う D_1XD_2XE モチーフ中のアスパラギン酸残基 (D_2) のコンホメーション変化に関しても相違点が存在することを明らかにした⁸⁾。図 3B に 3 種類の「植物型」キチナーゼ (AD2, hevamine, ScCTS1), および 3 種類の「細菌型」キチナーゼ (SmChiA, CcCTS1, BcChiA1) に関して、リガンド非結合時とリガンド結合時における D_1XD_2XE モチーフ中の三つの酸性残基 (D_1 , D_2 , E) の側鎖構造を重ね合わせた。BcChiA1 に関しては基質複合体の構造が未決定なため、アボ体構造のみを掲載する。

「細菌型」では基質の非結合時には D_2 残基の側鎖は D_1 残基の方を向き水素結合を形成しているが、基質が活性部位に結合すると D_2 残基は側鎖の向きを反転させて触媒残基 (E) の方を向き、E 残基と水素結合を形成する (図 3B)^{9,10)}。このような D_2 残基のコンホメーション変化は E 残基の pK_a 調節において重要な役割を持つと考えられている^{9,11)}。SmChiB の D_1 残基をアスパラギンに置換すると酵素活性が約 500 分の 1 に低下したことは¹²⁾、このコンホメーション変化の重要性を支持しており、「細菌型」では酵素の触媒反応に D_1XD_2XE モチーフ中の三つの酸性残基すべてが直接的に関与していると考えられる。

一方「植物型」では、基質の結合時および非結合時ともに D_2 残基は E 残基の方を向き、水素結合を形成している。すなわち、 D_1 残基は基質の結合の有無に関わらず、 D_2 残基とは相互作用しない。さらに、AD2 の D_1 残基をアラニンに置換しても約 20% 程度の活性が保持されてい

た⁸⁾。これらのことから「植物型」では D_1XD_2XE モチーフ中の三つの酸性残基のうち、 D_2 および E 残基のみが重要な役割を果たし、 D_1 残基は触媒反応に直接関与しない。以上の結果から、活性部位への基質の結合に伴う D_1XD_2XE モチーフにおける D_2 残基のコンホメーション変化の有無は「植物型」と「細菌型」に対する、新たな分類基準となり得ることが示唆された。

6. ま と め

超好熱性古細菌 *P. furiosus* 由来の Pf-ChiA は常温菌由来の酵素が失活するような高温においても強い結晶性キチン分解活性を示すので、キチン含有廃棄物の処理など産業分野への応用が大いに期待できる酵素である。Pf-ChiA は二つのキチン結合ドメイン (ChBD1, ChBD2) と二つの触媒ドメイン (AD1, AD2) がタンデムに結合した非常にユニークなマルチドメイン構造を有する。AD2 の結晶性キチンに対する活性は AD1 より 2 倍高いが³⁾、これは立体構造や反応機構の違い、さらには触媒ドメインに隣接する結合ドメインの基質結合力の差が影響していると考えられる。このように Pf-ChiA は構造や基質反応性の異なるドメイン同士を相乗的に組み合わせることで結晶性キチンを効率よく分解しているのであろう。

7. 今後の展望

P. furiosus および *P. horikoshii* のゲノム上には、脱アセチル化酵素、グルコサミニダーゼの遺伝子配列もあり、それぞれが活性を有するタンパク質として発現されることが明らかとなっている¹³⁾。ところで、*P. horikoshii* にはキチナーゼ遺伝子が見つからない。また、*P. furiosus* の遺伝子は休眠状態である。それに関わらず脱アセチル化酵素およびグルコサミニダーゼが存在するという①のキチナーゼ (図 1A) に相当する酵素が別に存在する可能性を示唆している。そうすると *Pyrococcus* 属から新たなキチン代謝経路が発見されるかもしれない。

ここまで超好熱性古細菌のキチン代謝経路について、筆者らの知見を中心に紹介してきた。Pf-ChiA は休眠状態の遺伝子であり、それがコードするタンパク質の発現と構造解析は超好熱性古細菌由来キチナーゼとしては初めてのものである。このように超好熱菌の代謝経路をタンパク質構造学的アプローチで明らかにし、有用な情報を得ていくことがバイオマスの有効利用につながっていくと期待している。

- 1) Tanaka, T., Takahashi, F., Fukui, T., Atomi, H., & Imanaka, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 30021–30027.
- 2) Nakamura, T., Ishikawa, K., Hagihara, Y., Oku, T., Nakagawa, A., Inoue, T., Ataka, M., & Uegaki, K. (2005) *Acta Crystallogr., Sect. F.*, **61**, 476–478.
- 3) Oku, T. & Ishikawa, K. (2006) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1696–1701.
- 4) Nakamura, T., Mine, S., Hagihara, Y., Ishikawa, K., & Uegaki, K. (2007) *Acta Crystallogr., Sect. F.*, **63**, 7–11.
- 5) Nakamura, T., Mine, S., Hagihara, Y., Ishikawa, K., Ikegami, T., & Uegaki, K. (2008) *J. Mol. Biol.*, **381**, 670–680.
- 6) Hurtado-Guerrero, R. & van Aalten, D.M. (2007) *Chem. Biol.*, **14**, 589–599.
- 7) Rao, F.V., Houston, D.R., Boot, R.G., Aerts, J.M., Hodkinson, M., Adams, D.J., Shiomi, K., Omura, S., & van Aalten, D.M. (2005) *Chem. Biol.*, **12**, 65–76.
- 8) Tsuji, H., Nishimura, S., Inui, T., Kado, Y., Ishikawa, K., Nakamura, T., & Uegaki, K. (2010) *FEBS J.*, **277**, 2683–2695.
- 9) van Aalten, D.M., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M.G., & Eijssink, V.G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8979–8984.
- 10) Bortone, K., Monzingo, A.F., Ernst, S., & Robertus, J.D. (2002) *J. Mol. Biol.*, **320**, 293–302.
- 11) Kolstad, G., Synstad, B., Eijssink, V.G., & van Aalten, D.M. (2001) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **58**, 377–379.
- 12) Synstad, B., Gaseidnes, S., van Aalten, D.M., Vriend, G., Nielsen, J.E., & Eijssink, V.G. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 253–262.
- 13) Mine, S., Ikegami, T., Kawasaki, K., Nakamura, T., & Uegaki, K. (2012) *Protein Expr. Purif.*, **84**, 265–269.

上垣 浩一¹, 中村 努¹, 峯 昇平¹, 西村 重徳²

(¹産業技術総合研究所,

²大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

Development of hyper-thermostable chitinolytic enzymes by gene hunting and functional analysis

Koichi Uegaki¹, Tsutomu Nakamura¹, Shouhei Mine¹ and Shigenori Nishimura² (¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-8-31 Midorigaoka, Ikeda, Osaka 563-8577, Japan; ²Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuencho, Sakai, Osaka 599-8531, Japan)

上皮構造とバリア機能の調節分子機構

はじめに

多細胞生物の器官構築と生理機能の成立・維持には上皮細胞が深く関わっている。様々に分化した上皮細胞が単層

もしくは重層に整列し互いに強固に接着してシート状構造を形成するのが上皮組織の大きな特徴であり、この性質が生体の内外を隔て恒常性維持に重要な働きを果たす。シート状構造の形成には、上皮細胞間の頂端部に存在する、密着結合 (tight junction)・接着結合 (adherens junction)・接着斑 (desmosome) の3種類の構造からなる接着複合体 (apical junction complex) が重要である¹⁾。これらは各々に固有の構成分子を介して細胞骨格と連結し、特有の機能を果たしている。この中で最も頂端部に位置する密着結合は、隣接する細胞の細胞膜同士を文字通り“密着”させ、細胞間を通じた物質透過を調節する選択的バリアとして機能する。一方で細胞内においては、頂端部近傍で細胞の内縁部を環状に取り囲むアクチン・ミオシンフィラメント perijunctional actomyosin ring (PJAR) に結合しており、収縮力を持つ PJAR は接着構造と協調して細胞形態の変化、極性の形成、バリアの調節など、多様な細胞生理現象に深く関わることを示唆されている²⁾。近年、PJAR と密着結合の間をつなぐ調節分子機構の解明が進展し、予想以上に複雑な経路の存在が浮かび上がってきている。本稿では、筆者らの研究を中心にこうした点に関する最近の知見を紹介する。

1. 密着結合の構造と分子基盤の概要

密着結合を最も形態的に特徴づけるのは、凍結切断電子顕微鏡法と呼ばれる特殊な手法で観察されるストランド構造である。この構造は、隣り合う細胞の細胞膜が頂端部位で連続的に密着した状態を反映するものと考えられ、これに関わる接着分子の存在が推定されていた。密着結合に集積する膜タンパク質として、4回膜貫通型のオクルディンが最初に同定され、後に同じく4回膜貫通型のクローディン、トリセルリンが発見された。加えて、junctional adhesion molecule (JAM) および coxsackie adenovirus receptor (CAR) といった免疫グロブリン様ドメインを持つ分子の存在が明らかになった³⁾。

密着結合を持たない線維芽細胞にこれら膜タンパク質を強制発現させた場合、クローディンのみがストランド様の構造を再構築する活性を示したことから、密着結合の特徴的構造は主にクローディン分子の集積によって形成されているものと考えられている。クローディンには20種類以上のファミリー分子が存在し、組織器官の特定部位ごとにそれらが様々な組み合わせで発現している。また、クローディンはタイプによって異なる種類のイオンを選択的に透過調節することも示され、多様なクローディンの発現は各