

才木 桂太郎¹, 山田 太郎², 田草川 房夫²,
古西 清司¹

(¹日本歯科大学生命歯学部微生物学講座,
²カンザス大学分子生物化学講座)

Structure, function, and stability of cytolethal distending toxin

Keitarou Saiki¹, Taro Yamada², Fusao Takusagawa², and Kiyoshi Konishi¹ (¹Department of Microbiology, Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo, Fujimi 1-9-20, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan; ²Department of Molecular Biosciences, University of Kansas, 1200 Sunnyside Ave., Lawrence, KS 66045-7534, USA)

マルチドメインキチナーゼの全長構造

1. はじめに

キチナーゼは、*N*-アセチルグルコサミンが β -1,4結合で連結したポリマーであるキチンを分解する。キチンは、不溶性で強固な結晶構造を持ち、自然界において構造多糖として見出すことができる。キチンを細胞壁の構成成分の一つとして利用している真菌では、生育や形態形成にキチナーゼが必要であると考えられている¹。植物は生体中にキチンを持たないものの、生体防御機構の一部としてキチナーゼを発現し、病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで、その生育を阻むとされている²。細菌のキチナーゼの主要な役割は、キチンを資化し、栄養素を獲得することと言えるであろう³。いずれにしても、不溶性で強固なキチンを効率的に分解するために、キチナーゼはマルチドメインからなり、活性ドメインに加え、キチン吸着に関わるなどの補助的なドメインを併せ持っていることが多い。これは、キチナーゼに限らず、糖質加水分解酵素に普遍的な特徴であり、多くの場合、ドメイン間は柔軟なリンカーで結ばれている。現在、原子レベルでタンパク質の立体構造を知ろうとする場合、最も有力な手段となるのがX線結晶構造解析であるが、これには、目的のタンパク質を結晶化させることが必要不可欠である。しかしながら、柔軟なリンカーを持つタンパク質の結晶化は、その自由度が原因となって困難であることが多い。このような場合、ドメイン単位に分割して結晶化を行うことが最も現実的な解決法であるが、構造解析が成功しても全長タンパク質と

してのインタクトな構造情報を得ることはできない。最近、筆者らは、X線結晶構造解析のこのような短所を補うべく、低分解能ではあるが、溶液状態のまま構造解析が可能であるX線溶液散乱法を併用することで、初めてマルチドメインからなる*Bacillus circulans* キチナーゼ A1の全長構造を決定した⁴。これを含めて、マルチドメインキチナーゼの全長構造について概説したい。

2. キチナーゼの全長構造解析の現状

マルチドメインキチナーゼの全長構造はこれまで、*Serratia marcescens* キチナーゼ A (ChiA) と B (ChiB) の2例のみが、X線結晶構造解析により明らかにされている^{5,6}。これらのキチナーゼは、いずれも糖質加水分解酵素のファミリー18に属する活性ドメインと、キチン吸着に関わるドメインを一つずつ持っている。これらのドメインおよびリンカーは互いに密着しており、リンカーは硬直していると考えられる。実際、結晶中での原子の熱振動を表すパラメータである温度因子の値が、リンカーと両ドメインとで同程度である。つまり、これまではリンカーが柔軟なタイプのマルチドメインキチナーゼの立体構造解析はなされていなかった。

3. *Serratia marcescens* キチナーゼ A

ChiAはN末端のキチン吸着に関わるドメイン(N末端ドメイン)とC末端の活性ドメインからなる(図1)。活性ドメインには、深い基質結合クレフトが存在し、その内部に触媒部位が位置している。ChiAの属するファミリー18では、「substrate assisted catalysis mechanism」が反応機構として提唱されている⁷。すなわち、酸性アミノ酸(ChiAではGlu315)が酸塩基触媒として作用し、基質自体のC2位のアセトアミド基が求核性触媒として直接反応

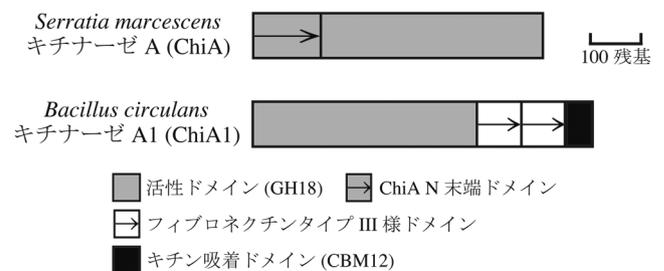


図1 ChiAとChiA1のドメイン構造

GHは糖質加水分解酵素 (glycoside hydrolase) の活性ドメイン、CBMは基質結合ドメイン (carbohydrate-binding module) を意味する。いずれもアミノ酸配列の相同性により分類される。

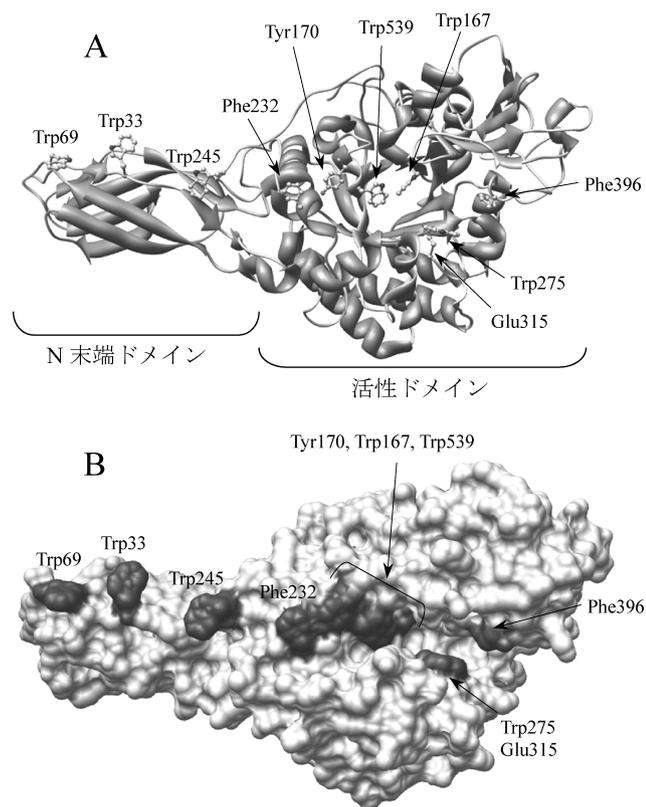


図2 ChiAの立体構造

ChiAの立体構造 (PDB ID: 1EDQ) をAはリボンモデルで、Bはサーフェスモデルで描写した。それぞれの図には、ChiAの表面に並ぶ9個の芳香族アミノ酸 (左から Trp69, Trp33, Trp245, Phe232, Tyr170, Trp167, Trp539, Trp275 および Phe396) と酸塩基触媒として働く Glu315 も併せて示した。提唱されている反応モデル⁸⁾では、ChiAは、Trp69, Trp33と Trp245でβキチンに吸着し、Phe232を用いてキチン鎖をクレフト内に導入し、N末端ドメインを先頭にβキチン上を非還元末端側 (図では左側) に移動しながら、キチン鎖をもう一方の末端 (還元末端) 側から二糖単位に分解する。Bの図では Glu315は、Trp275とほぼ重なる位置にある。

に参与するという機構である。分子表面には、キチン吸着に関わるN末端ドメインからC末端の活性ドメインのクレフト内部にかけて9個の芳香族アミノ酸が列をなしている (図2)。内山らは、N末端ドメイン側から順に並ぶ Trp69, Trp33, Trp245 および Phe232 を個別にアラニンに置換して作製した四種類の変異体のβキチンに対する吸着および分解活性を調べた⁸⁾。その結果、Trp69, Trp33 および Trp245 を置換した変異体は、βキチンとの吸着活性が劇的に減少し、したがって、吸着に対するこれらのアミノ酸の重要性が明らかとなった。一方、クレフトの入り口付近に位置する Phe232 の変異体の吸着活性は、野生型とほ

ぼ同じであった。しかしながら、この変異体のキチン分解活性は野生型の示す活性と比較して、明らかに低いことから、Phe232はキチン鎖をクレフト内部に導入する役割があると考えられた。ここで示した四つの芳香族アミノ酸においては、互いに隣り合う側鎖の環の重心間距離が、二糖、あるいは三糖分の長さとはほぼ一致することも、これらのアミノ酸がキチン鎖と相互作用するという仮説を支持している。これ以外の五つの芳香族アミノ酸については、ChiAと同じファミリーに分類される *Bacillus circulans* キチナーゼ A1 (後述) においても対応するアミノ酸が存在しており、これらの結晶性キチン分解に対する重要性がすでに確認されている^{9,10)}。以上のことを総合的に考えた結果、ChiAは、Trp69, Trp33と Trp245を使ってβキチンへ吸着し、Phe232の誘導によってキチン鎖をクレフト内部に導入し、プロセス (キチナーゼがキチン鎖と解離せずに、連続して分解を繰り返すことを意味する) にキチン鎖を分解する、という反応モデルが提唱されている⁸⁾。イメージとしては、カンナが木材の表面を削っている様子に近いと言えるであろう。ChiAの場合、N末端ドメインを先頭に、βキチン表面上を非還元末端側に進み、還元末端から活性ドメインが二糖単位でキチンを分解して行く。このような反応モデルが提唱されたのは、全長構造の決定により、ドメイン表面に列をなす芳香族アミノ酸の存在が明らかとなったことがきっかけである。

4. *Bacillus circulans* キチナーゼ A1

Bacillus circulans キチナーゼ A1 (ChiA1) はN末端側から、活性ドメイン、機能未知である二つのフィブロネクチンタイプ III 様 (FnIII) ドメイン、そしてキチン吸着ドメインと三種四つのドメインからなる (図1)。各ドメインの立体構造が、X線結晶構造解析あるいは核磁気共鳴により個別に明らかとなっている¹¹⁻¹³⁾。ChiA1全長の結晶化条件の探索は、これまで筆者らのグループで広範囲に渡り行われたものの、未だ成功していない。そこで、虎谷らはChiA1の低分解能の溶液構造を、X線溶液散乱法を用いて解析した⁴⁾。得られた全長構造は、最大長が約145Åで、N末端の活性ドメインに相当する球状領域と、それに付随するわずかに湾曲した棒状領域からなっていた。活性ドメインに続いて棒状領域には、二つのFnIIIドメインをタンデムに、さらにその先にはキチン吸着ドメインを当てはめることで全長構造とした (図3)。ChiA1のドメインはいずれも密着しているわけではなく、一つずつが連なって全体として伸びた構造を取っていた。ChiA1では、ChiAの表

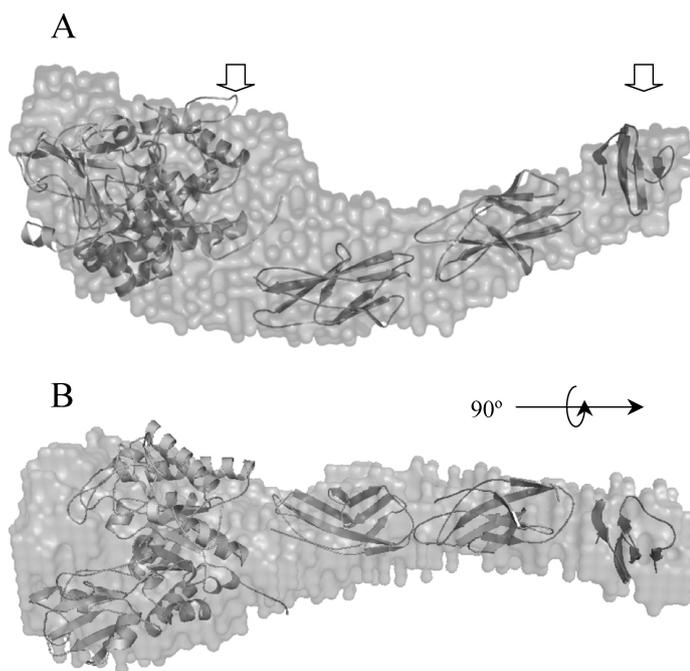


図3 ChiA1の溶液構造

X線溶液散乱法によって得た低分解能のモデル(サーフェスモデル)に個別に明らかとなっているドメイン(リボンモデル)を重ね合わせて示した。左側がN末端であり、活性ドメイン、二つのフィブロネクチンタイプIII様ドメイン、キチン吸着ドメインの順に並んでいる。Aの矢印は、キチン吸着に関与することが分かっている芳香族アミノ酸のうち、活性ドメインのTrp134とキチン吸着ドメインのTrp687の位置を示している。この間の距離は約90Åである。BはAを水平方向の軸に対して90°回転させたものである。

面に並ぶ9個の芳香族アミノ酸のうち、活性ドメインに存在する7個(ChiAのN末端ドメインのTrp33とTrp69以外のアミノ酸に相当する)が保存されており、これらのアミノ酸は結晶性キチン分解に重要であることがすでに明らかにされている^{9,10}。ChiAのN末端ドメインとChiA1のFnIIIドメインのポリペプチド鎖は、類似したフォールドを取るが、FnIIIドメインには、ChiAのN末端ドメインのTrp33やTrp69に相当する芳香族アミノ酸は見つかっていない。実際、ChiA1のFnIIIドメインを削除した変異体のキチン吸着活性は野生型と同等であり、吸着活性は完全にキチン吸着ドメインに依存する¹⁴。キチン吸着には、C末端のキチン吸着ドメインにあるTrp687が関与することが明らかとなっている¹⁵ものの、その詳細な吸着機構は未だ不明である。X線溶液散乱法を用いて構築したChiA1の立体構造では、キチン吸着ドメインのTrp687と、これに最も近い活性ドメインの芳香族アミノ酸(Trp134)であっても、約90Å離れている(図3)。さらに、この間にある

二つのFnIIIドメインによりこれらのドメインが密着することは立体構造上難しいことから、ChiA1のキチン分解機構はChiAで提唱されている機構⁸とは異なることは容易に想像が付く。ドメイン間のリンカーはいずれも9~12残基と決して長くはないが、プロリンとスレオニンに富んでおり、柔軟であることが予想される。筆者らは、最近、10残基のリンカーが二つのドメインを繋ぐ*Streptomyces griseus*キチナーゼCの結晶化に成功し、全長構造を決定した¹⁶。二種類の異なる結晶を解析したところ、それぞれの結晶中でドメインの配置が全く異なることが分かった。つまり、リンカーの高い柔軟性により、ドメインの配置が可変であると考えられる。このことから類推すると、今回明らかとなったChiA1の溶液構造は、結晶性キチン表面に吸着する時の構造とは異なる可能性も考えられる。

5. おわりに

本稿で紹介したChiA1の溶液構造は、X線溶液散乱法を用いて決定された最初のマルチドメインキチナーゼの立体構造である。低分解能ではあるが、四つのドメインからなるという点は、他に例を見ない。活性ドメインとキチン吸着ドメインは二つのFnIIIドメインが間にあるため離れて存在しており、キチン分解時に、これらのドメインがどのような配置を取るのかは、現時点では不明である。各ドメインを結ぶリンカーが柔軟であるとする、今後、キチン分解機構を解明するためには、リンカーの柔軟性および、それによって生じるドメイン間相互作用に関する情報を得ることが非常に重要であると筆者は考えている。

本稿で述べたキチナーゼのX線構造解析は、新潟大学農学部の渡邊剛志博士らと関西医科大学の柘弓絃博士との共同研究で行われました。共同研究者の皆様にご場を借りてお礼申し上げます。

- 1) Adams, D.J. (2004) *Micobiology*, 150, 2029–2035.
- 2) Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I., & Mundy, J. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 1564–1573.
- 3) Gooday, G.W. (1999) *Chitin and Chitinases* (Jolles, P. & Muzzarelli, R.A.A. eds.), pp. 157–169, Birkhäuser Verlag.
- 4) Toratani, T., Kezuka, Y., Nonaka, T., Hiragi, Y., & Watanabe, T. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 348, 814–818.
- 5) Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., & Vorgias, C.E. (1994) *Structure*, 2, 1169–1180.
- 6) van Aalten, D.M.F., Synstad, B., Brurberg, M.B., Hough, E., Riise, B.W., Eijsink, V.G.H., & Wierenga, R.K. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5842–5847.

- 7) Tews, I., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Perrakis, A., Wilson, K.S., & Dijkstra, B.W. (1997) *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 7954-7959.
- 8) Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J., & Watanabe, T. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 41343-41349.
- 9) Watanabe, T., Ishibashi, A., Ariga, Y., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Sugiyama, J., Matsumoto, T., & Nonaka, T. (2001) *FEBS Lett.*, **494**, 74-78.
- 10) Watanabe, T., Ariga, Y., Sato, U., Toratani, T., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Kezuka, Y., Nonaka, T., & Sugiyama, J. (2003) *Biochem. J.*, **376**, 237-244.
- 11) Matsumoto, T., Nonaka, T., Hashimoto, M., Watanabe, T., & Mitsui, Y. (1999) *Proc. Japan Acad.*, **75**, 269-274.
- 12) Jee, J., Ikegami, T., Hashimoto, M., Kawabata, T., Ikeguchi, M., Watanabe, T., & Shirakawa, M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 1388-1397.
- 13) Ikegami, T., Okada, T., Hashimoto, M., Seino, S., Watanabe, T., & Shirakawa, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 13654-13661.
- 14) Watanabe, T., Ito, Y., Yamada, T., Hashimoto, M., Sekine, S., & Tanaka, H. (1994) *J. Bacteriol.*, **176**, 4465-4472.
- 15) Ferrandon, S., Sterzenbach, T., Mersha, F.B., & Xu, M.Q. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1624**, 31-40.
- 16) Kezuka, Y., Ohishi, M., Itoh, Y., Watanabe, J., Mitsutomi, M., Watanabe, T., & Nonaka, T. (2006) *J. Mol. Biol.*, **358**, 472-484.

水塚 雄一郎, 野中 孝昌
(岩手医科大学薬学部)

Structures of multiple-domain chitinases

Yuichiro Kezuka and Takamasa Nonaka (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Iwate Medical University, 2-1-1 Nishitokuda, Yahaba, Iwate 028-3694, Japan)

改変糖脂質抗原による iNKT 細胞を介した免疫制御

はじめに

生体が種々の外来性抗原に暴露されると、抗原特異的な T 細胞や抗体が誘導され、免疫応答が成立する。この時、ヘルパー T 細胞は IFN- γ 産生性の T ヘルパー 1 (Th1) 細胞あるいは IL-4 産生性の Th2 細胞に分化するが、自己免疫疾患やアレルギー疾患の回避には、Th1/Th2 バランスの維持が重要である¹⁾。iNKT (invariant natural killer T) 細胞は、その名の通り NK 細胞と T 細胞の機能を有するユニークな細胞であるが、活性化に伴い種々の免疫応答調節性のサイトカインを大量かつ迅速に産生する。この特性に

より iNKT 細胞は、生体内における Th1/Th2 バランスの調節細胞として近年注目を集めている。さて、通常の T 細胞とは異なり、iNKT 細胞は特定の構造を持つ糖脂質を抗原として認識する。今日、最も強力な外来性の iNKT 細胞抗原として、 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) が知られている²⁾。筆者等は、 α -GalCer 由来の改変糖脂質抗原 OCH が、種々の自己免疫疾患マウスモデルに対して、iNKT 細胞依存性の Th1/Th2 バランスの調節を介した病態抑制効果を有することを明らかにし、免疫応答調節における iNKT 細胞の重要性を提唱してきた³⁾。本稿では、 α -GalCer と OCH に対する iNKT 細胞応答を比較解析した結果を中心に、iNKT 細胞のユニークな抗原認識機構と細胞応答メカニズムを紹介する。

1. iNKT 細胞とは？

iNKT 細胞は、 α/β のヘテロ二量体からなる T 細胞受容体 (以下 TCR) と NK 細胞特異的受容体を共発現し、それぞれの性格を併せ持つユニークな細胞である⁴⁾。iNKT 細胞は、マウスでは V α 14-J α 18, ヒトでは V α 24-J α 18 の均一な α 鎖と、限られた β 鎖からなる TCR を発現し、多様性に富む通常の T 細胞の TCR とは対照的である。通常の T 細胞は、抗原提示細胞上の MHC 分子により提示されたペプチド抗原を認識するのに対し、iNKT 細胞は MHC 類縁分子である CD1d 上に提示された糖脂質抗原を認識する。TCR の多様性の欠如と裏腹に、各臓器における iNKT 細胞の頻度は高く、たとえば肝臓では全単核球の 20~30% にも達することがある。iNKT 細胞は、IFN- γ と IL-4 という免疫調節性サイトカインを同時にかつ大量に産生可能であり、自己免疫疾患をはじめとして、アレルギー、腫瘍免疫、感染免疫など様々な免疫応答の調節に関与する (図 1)。一般に、IFN- γ は主に Th1 反応を誘導し、感染免疫、腫瘍免疫などを賦活化する。一方、IL-4 は主に Th2 反応を誘導し、アレルギー反応などに関わるが、過度の Th1 反応依存性の種々の自己免疫疾患には抑制的に作用する。通常のナイーブ T 細胞は、抗原刺激後数日間の分化期間後に再刺激する必要があるのに対し、抗原で刺激された iNKT 細胞は、数時間以内に大量の IL-4 と IFN- γ を同時に産生する。すなわち iNKT 細胞は、免疫応答調節のためのサイトカインソースとして非常に魅力的な細胞集団である。ところが Th1/Th2 という観点からは、IFN- γ と IL-4 は相互抑制的に作用するので、これらのサイトカインを同時に産生させるような糖脂質リガンドでは、必ずしも求める免疫応答調節効果や疾患抑制効果が得られな