

称号及び氏名 博士（理学） 枝 真広

学位授与の日付 平成 27 年 3 月 31 日

論 文 名 植物細胞壁代謝に関わる β -D-ガラクトシダーゼの構造と機能の解明

論文審査委員 主査 多田 俊治
副査 藤井 郁雄
副査 徳富 哲
副査 恩田 真紀
副査 石丸 恵（近畿大学）

学位論文要旨

構造生物学研究室
枝 真広

第一章 緒論

植物細胞壁は、自然界に最も多く存在する有機化合物であり、その構成成分の 90%以上が多糖類である。植物細胞壁を構成する多糖類は主にセルロース、ヘミセルロースおよびペクチンの 3 つに分類されるが、その構造は非常に複雑である。また、細胞壁に含まれる多糖類の組成は植物の生育や発達と共に変化しており、その制御には多種多様なタンパク質や酵素が関与していることが知られている。

植物細胞壁の合成・分解/再構築や修飾に関与する糖質加水分解酵素の 1 つである β -D-ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23) は GH1, GH2, GH35, GH42 に分類される。細菌類および菌類由来の β -D-ガラクトシダーゼは GH1, GH2, GH35, GH42 に分類されるが、被子植物および哺乳類由来の β -D-ガラクトシダーゼはすべて GH35 に分類される。GH35 に属する細菌類、菌類および哺乳類由来の酵素の構造は解明されているが、被子植物由来のものについては構造が明らかにされていない。被子植物由来の β -D-ガラクトシダーゼは、細菌類や菌類、哺乳類由来の酵素と比較してアミノ酸配列の相同性が非常に低く (<30%)、異なる構造や機能を有していることが推測される。

トマトにおいては、果実の軟化に伴い果実細胞壁のペクチン画分から多量のガラクトースが遊離する。そのため、 β -D-ガラクトシダーゼが果実の軟化に関与する酵素として注目され、7 種のトマト β -D-ガラクトシダーゼ (TBG) 遺伝子が単離された。その中でも、*TBGI*

および *TBG4* は、果実が急速に軟化する催色期特異的に発現するため、軟化への関与が示唆された。しかし、*TBG1* または *TBG3* の発現を抑制した形質転換体のトマト果実は、果実硬度や細胞壁構成多糖類の成分には影響を及ぼさなかった。一方、*TBG4* の発現を抑制した形質転換体のトマト果実は、対照果実と比較して約 1.4 倍の硬度を維持し、エキソ- β -1,4-D-ガラクタナーゼ活性の低下と遊離ガラクトースの減少が確認された。これらのことから、*TBG4* が果実成熟過程における軟化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

TBG1 は、遺伝子発現の時期が *TBG4* と同調しており、細胞壁中のガラクトース代謝への関与が示唆されるが、形質転換体の結果からもその機能は不明である。そのため、*TBG1* の基質特異性を解明し、その標的を明らかにすることは、*TBG1* の機能の解明につながると考えられる。一方、*TBG4* は、 β -1,3、 β -1,4 および β -1,6 結合に対する広い基質特異性を示し、強いエキソ- β -1,4-D-ガラクタナーゼ活性を有する。*TBG4* が特異的に有する酵素活性がトマト果実の軟化に重要であることが示唆されるため、*TBG4* の基質認識機構を明らかにすることはトマト果実の軟化機構の解明につながると考えられる。

そこで、本研究は *TBG1* の基質特異性の解明および *TBG4* の基質認識機構の解明を目的とした。

第二章 *TBG1* 組換えタンパク質の酵素特性および基質特異性

TBG1 組換えタンパク質の発現は、*Saccharomyces cerevisiae* を用いて行った。*TBG1* を導入した YEpFLAG1 ベクターを用いて *S. cerevisiae* HT3505 株を形質転換し、*TBG1* 発現株の選抜を行った。得られた *TBG1* 発現株を培養し、*TBG1* 組換えタンパク質を得た。anti-FLAG-M1 immunoaffinity resin を用いて *TBG1* 組換えタンパク質を精製し、酵素特性の測定に用いた。

まず、*p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を基質として用い測定した。*TBG1* 組換えタンパク質の酵素特性は、pH 5.0 において最大活性を示し、pH 4.5~7.0 において安定であった。また、40°C~50°C において最大活性を示した。*TBG1* 組換えタンパク質の本基質に対する *K_m* 値は 0.45 mM であった。

次に、種々の基質を用いて *TBG1* 組換えタンパク質の基質特異性を調べた。その結果、*TBG1* は β -1,3 および β -1,6 結合に対して高い活性を示し、 β -1,4 結合に対しては非常に低い活性であった (β -1,3> β -1,6>> β -1,4)。さらに、長鎖の基質に対する *TBG1* の活性は、 β -(1,6)-ガラクトヘキサオースおよび β -(1,4)-ガラクトヘプタオースを基質に用いて活性測定を行った。その結果、*TBG1* は β -(1,6)-ガラクトヘキサオースに対しては活性を示したが、 β -(1,4)-ガラクトヘプタオースに対しては活性を示さなかった。

以上のことから、*TBG1* は β -1,3/1,6-ガラクトシダーゼであることが明らかとなった。この結果は、*TBG1* が果実の軟化に関与しないことを示唆するものである。*TBG1* は成熟過程における果実軟化時期に発現することから、 β -1,3 および β -1,6 結合を有する細胞壁構成多糖類の代謝に関与していると考えられる。

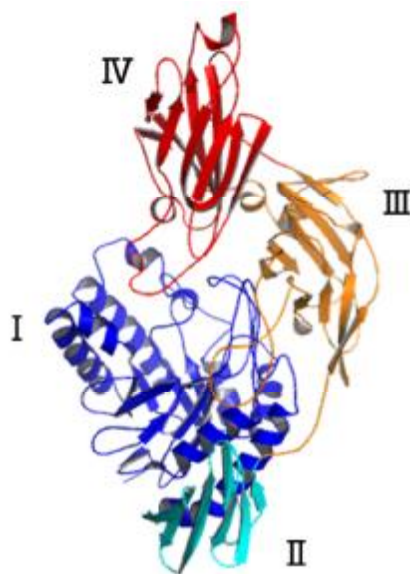
第三章 TBG4 組換えタンパク質の産生、精製および結晶化

TBG4 組換えタンパク質の発現は、*Pichia pastoris* を用いて行った。*TBG4* を導入した pPICZαA ベクターを用いて *P. pastoris* SMD1168H 株を形質転換した後、TBG4 発現株の選抜を行った。得られた TBG4 発現株をメタノール存在下で培養し、TBG4 組換えタンパク質を得た。硫酸分画および Ni Sepharose 6 Fast Flow を用いて TBG4 組換えタンパク質を精製し、SDS-PAGE を行ったところ、TBG4 組換えタンパク質に加え、高分子がスメア状に確認された。*P. pastoris* で発現した TBG4 には幅広い分子量の高マンノース型 *N*-結合型糖鎖が修飾されており、このような糖鎖が修飾されたタンパク質は結晶化には適さないため、TBG4 組換えタンパク質に結合した糖鎖の除去を試みた。その結果、タチナタマメ由来 α -mannosidase を用いることにより、一部の TBG4 組換えタンパク質に結合した糖鎖が均一に切断された。その後、Superdex 200 10/300 GL を用いて精製を行い、修飾糖鎖が均一に切断された TBG4 組換えタンパク質を得た。

シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて、TBG4 組換えタンパク質の結晶化を試みた結果、0.1 M HEPES buffer pH 7.5, 20% (w/v) PEG 10000 の条件下において板状結晶が得られた。この条件を基に、pH 7.0~8.0 の 0.1 M HEPES buffer および濃度 12~22% (w/v) の PEG 10000 を組み合わせた種々の沈殿剤を用いて結晶化条件の最適化を試みた結果、初期スクリーニングで得られた条件と同一の条件下において、0.6 x 0.3 x 0.1 mm の結晶が得られたため、本結晶を X 線回折測定に用いることとした。

第四章 TBG4 の X 線結晶構造解析

X 線回折測定は高エネルギー加速器研究機構のビームライン PF-BL17A において行った。TBG4 組換えタンパク質の結晶の X 線回折測定を波長 0.98 Å において行った結果、分解能



1.2 Å の良好なデータが得られた。また、タンパク質に本来含まれるメチオニンおよびシステインの硫黄原子を利用した単波長異常散乱法 (native-SAD) を用いた位相の決定を行うため、同結晶を用いて波長 2.0 Å において冗長性の高いデータ測定を行った。その結果、分解能が 2.8 Å、異常散乱の冗長度が 186.5、異常散乱差の相関が 0.74 である極めて良好な異常散乱データを得ることに成功した。

分子置換法および native-SAD の併用により位相の決定を行い、TBG4 の構造の構築および精密化を行った (R_{work} 12.9%, R_{free} 18.0%)。その結果、TBG4 は 4 つのドメインから構成される新規の構造を有していることが明らかとなった (図 1)。次に、TBG4 とその生成物で

図 1 TBG4 の立体構造

ある D-ガラクトースとの複合体の構造解析を行った。D-ガラクトース複合体の X 線回折測定は高エネルギー加速器研究機構のビームライン PFAR-NW12A において行い、分解能 3.0 Å のデータを得た。先に決定した TBG4 の構造を用いて分子置換法により位相を決定し、構造精密化を行った (R_{work} 20.0%, R_{free} 26.0%)。その結果、活性部位に β -D-ガラクトースの電子密度が認められた (図 2)。求核剤である Glu250 はガラクトースのアノマー炭素と 3.0 Å の距離にあり、一般酸/塩基触媒である Glu181 はアノマー炭素のヒドロキシ基と水素結合 (2.6 Å) を形成していた。これら 2 つの残基をアラニンに変異し、活性が失われることを確認した。また、Glu250 と水素結合を形成する Arg112 および Glu181 と水素結合を形成する Asn230 をアラニンに変異した結果、活性が約 1% に減少することが明らかとなった。このことから、これらの残基が触媒残基と相互作用をすることにより、触媒残基の配置や酸解離定数が調節されているものと考えられた。

Streptococcus pneumoniae 由来 β -D-ガラクトシダーゼでは、3 箇所の芳香族アミノ酸残基 (Trp240、Trp243、Tyr455) が β -1,3 結合の認識に関与していることが報告されている。これら 3 箇所の芳香族アミノ酸残基の内、1 番目と 2 番目の芳香族アミノ酸残基は、触媒ドメインである TIM バレルに存在し、GH35 に属する酵素において広く保存されている。また、3 番目の芳香族アミノ酸残基は、細菌類、菌類および哺乳類の酵素には広く保存されており、非触媒ドメインから活性部位に張り出す長いループの先に存在している。一方、被子植物由来の酵素は、3 番目の芳香族アミノ酸残基が側鎖の小さいアミノ酸残基に変異している傾向にある。TBG4 はこのアミノ酸残基がバリンであり、活性部位から離れた位置に存在していた。以上のことから、このアミノ酸残基の側鎖が小さいために、TBG4 は広い基質特異性を示す可能性が考えられた。

さらに、活性部位以外の 3 箇所にも D-ガラクトースの電子密度が認められた (図 2)。GH13 に属する大麦由来 α -アミラーゼ 1 では、このような糖結合部位が長鎖の基質の認識に関与することが報告されており、本結合部位も同様に、長鎖の基質の認識に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。TBG4 は、これら 3 つのガラクトース結合部位においてガラクトースを認識することにより、強いエキソ- β -1,4-D-ガラクトナーゼ活性を示す可能性が考えられる。

第五章 総括

TBG1 組換えタンパク質を用いて、TBG1 の酵素特性および基質特異性を明らかにした。

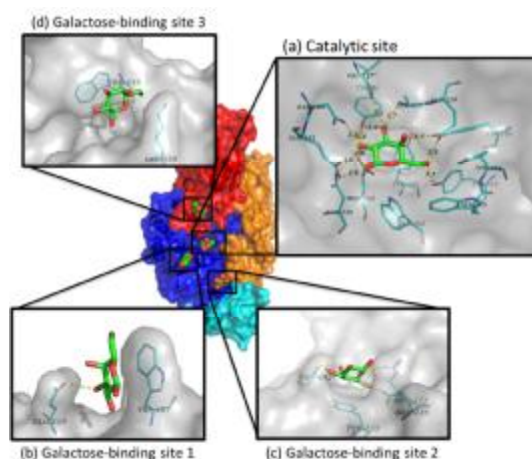


図 2 TBG4 のガラクトース複合体

TBG1 は、 β -1,3/1,6-ガラクトシダーゼであり、果実の軟化には関与しないが、果実成熟過程における β -1,3 および β -1,6 結合を有する細胞壁構成多糖類の代謝に関与していることが示唆された。次に、果実の軟化に深く関与する TBG4 組換えタンパク質の X 線結晶構造解析を行い、TBG4 の立体構造を明らかにした。TBG4 は、他の GH35 に属する酵素には保存されている基質特異性に重要な芳香族アミノ酸残基の一つが側鎖の小さいアミノ酸残基に変異しているため、広い基質特異性を有する可能性が考えられた。また、TBG4 は活性部位以外に 3 箇所のガラクトース結合部位を有していることが明らかとなり、これらのガラクトース結合部位が長鎖の基質の認識に関与することにより、TBG4 は強いエキソ- β -1,4-D-ガラクタナーゼ活性を示すのではなかと考えられた。

論文リスト

1. “Enzymatic activity and substrate specificity of the recombinant tomato β -galactosidase 1”, Masahiro Eda, Megumi Ishimaru, Toshiji Tada, Tatsuji Sakamoto, Toshihisa Kotake, Yoichi Tsumuraya, Andrew J. Mort and Kenneth C. Gross, *Journal of Plant Physiology*, **171**, 1454-1460 (2014).
2. “Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of tomato β -galactosidase 4”, Masahiro Eda, Megumi Ishimaru and Toshiji Tada, *Acta Crystallographica* **F71**, 153-156 (2015).
3. “Crystal structures of Tomato β -galactosidase 4 and its complex with β -D-galactose: Structural insights into exo- β -(1,4)-galactanase activity of the fruit softening related enzyme”, Masahiro Eda, Takashi Matsumoto, Megumi Ishimaru and Toshiji Tada, *Plant Journal*, submitted.

学位論文審査結果の要旨

植物細胞壁の構成成分の 90%以上が多糖類である。多糖類は主にセルロース、ヘミセルロースおよびペクチンの 3 つに分類されるが、その構造は非常に複雑である。また、細胞壁に含まれる多糖類の組成は植物の生育や発達と共に変化しており、その制御には多種多様なタンパク質や酵素が関与していることが知られている。 β -D-ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23) もその一つであり、

特に、トマト果実の軟化に関わる酵素として注目されており、これまでに 7 種類見出されている(TBG1-7)。本研究は、トマト果実の軟化機構の分子レベルでの解明の一環として、TBG1 および TBG4 に注目し、その機能と構造の解明を目指したものである。

第 2 章では、TBG1 の発現系を構築し、組換えタンパク質の酵素特性および基質特異性について検討している。その結果、TBG1 は β -1,3/1,6-ガラクトシダーゼであること明らかとし、トマト果実の軟化に働くのではなく、寧ろ、 β -1,3 および β -1,6 結合を有する多糖類の代謝に関与しているものとの結論を導いている。

第 3 章では、TBG4 の X 線結晶構造解析を目的とした組換えタンパク質の産生、精製および結晶化について検討したことを報告している。その結果、酵母を用いた発現系の構築、翻訳後修飾された高マンノース型 *N*-結合型糖鎖の除去処理などを行い、見事に X 線結晶構造解析に適した結晶化に成功し、高エネルギー加速器研究機構のビームライン PF-BL17A において分解能 1.2 Å のデータの取得に至っている。

第 4 章では、TBG4 の構造について報告している。未だ困難とされているイオウ原子を利用した単波長異常散乱法に分子置換法を加味した方法により見事に位相を決定し、構造解明に導いている。そのデータ収集法にも、冗長度 186.5 など特筆すべきものがある。まず、native TBG4 の構造を決定し(R_{work} 12.9%, R_{free} 18.0%)、TBG4 は 4 つのドメインから構成される新規の構造を有していることを明らかにしている。さらに、構造既知の β -D-ガラクトシダーゼとの比較により、TBG4 が広い基質特異性を示す可能性あるとの結論を導いている。さらに、TBG4 とその生成物である D-ガラクトースとの複合体の構造解析 (R_{work} 20.0%, R_{free} 26.0%)、反応部位および触媒残基などを特定している。これら残基をアラニンに変異し、活性が失われることを確認している。活性部位以外の 3 箇所にも D-ガラクトースの電子密度が認め、長鎖の基質の認識に重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

上記のように、本論文は、トマトに由来する 2 種の酵素の酵素学的、構造生物学的探求を行い、未解明であったトマト軟化における役割、植物由来酵素の機能発現機構の分子レベルでの解明など、特筆すべき優れた成果をあげており、酵素学、構造生物学の研究に大きく貢献している。したがって、本学位論文審査委員会は、当該論文が博士 (理学) の学位を授与するに相当すると結論した。