

# 志田 敏夫

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

17 年度研究テーマ

15-2-9：微生物酵素によって合成される繊維状高分子に関する研究

## ABSTRACT

The aminosugars (GlcNAc and MurNAc) of peptidoglycan are alternately connected by  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds, and the resultant glycans are cross-linked by the characteristic peptides. The peptidoglycan forms firm net-like structure. Bacteria produce a series of enzymes that hydrolyze the peptidoglycan layer of their own cell walls. These peptidoglycan hydrolases are necessary for the cell multiplication of bacteria, the spore formation, and the germination of the spore.

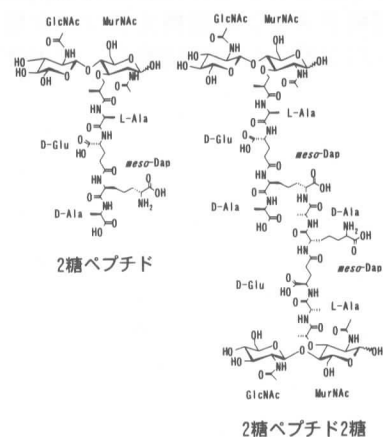
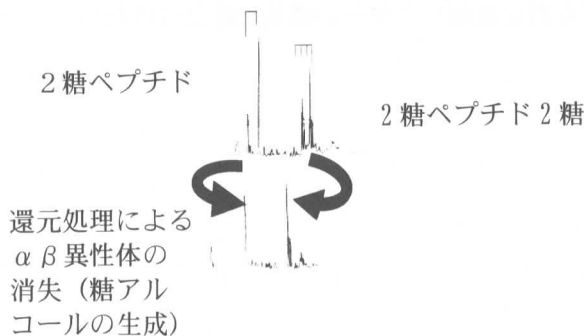
The three-dimensional structure of the catalytic domain of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase from *Paenibacillus polymyxa*, CwlV, has been determined, for the first time, at 1.8 Å resolution. The catalytic domain (CwlVI) at the C-terminal section consists of a single polypeptide chain of 179 amino acid residues and one  $Zn^{2+}$  ion, which is an essential component for hydrolyzing the amide bond between the muramic acid and the peptide of peptidoglycan. The catalytic  $Zn^{2+}$  ion exists with a square-pyramid geometry, which is coordinated by the side chains of three amino acid residues (E26, H10 and H80) and by two water molecules. CwlVI has an open  $\alpha/\beta/\alpha$  structure, composed of a six-stranded  $\beta$ -sheet and six  $\alpha$ -helices as secondary structural elements. Furthermore we have determined the crystal structure of the CwlVI E142Q mutant, which has no amidase activity. It has been elucidated that the minimum substrate of CwlVI and CwlC is the tetrasaccharide with two dangling tripeptides. These results improve considerably the understanding of peptidoglycan lytic mechanism by the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase family 3 such as the CwlV and CwlC amidases.

## 研究目的

酵素または化学修飾剤を用いて生体高分子間の特異的、あるいは非特異的な反応および高分子の修飾反応を利用して新規のバイオファイバマテリアルを創成することが目的である。繊維加工に関してはグラフと重合などの供与体として種々生体高分子を低分子化したもの（オリゴマー）を準備するとともに、トランスグルタミナーゼのような酵素の反応特性を明らかにして利用する。生体高分子の合成・分解に働く CwlV, CwlC, TagA についてまずその構造の解析を試みる目的で研究を行った。

## 一年間の研究内容と成果

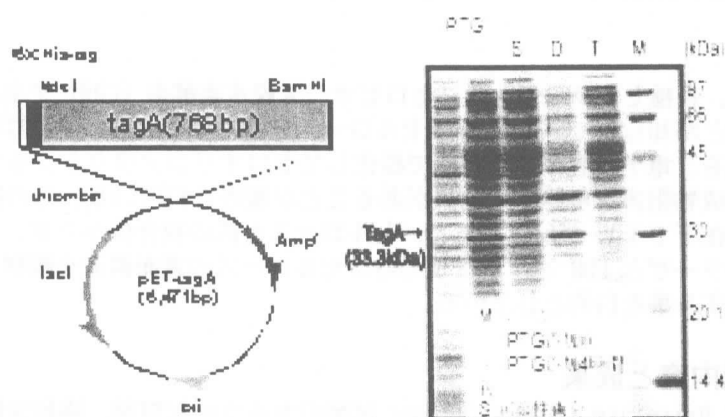
1. ペプチドグリカンをリゾチームで完全分解し、逆相クロマトグラフィーを用いて、2糖ペプチドと2糖ペプチド2糖を分離・精製した。またペプチドグリカンを CwlVI で完全分解し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて糖鎖とペプチド鎖を分離・精製した。さらに精製した糖鎖を YddH-N で部分分解し、逆相クロマトグラフィーを用いてオリゴ糖を分取した。



### C18 逆相-HPLC の溶出パターン

2. 枯草菌のテイコ酸は、ポリグリセロールリン酸を含むポリアルコール部分とペプチドグリカンとの結合部位である linkage unit から構成されている。このテイコ酸の合成に関与している酵素 TagA は枯草菌の形態維持に必須の酵素であり、他の細菌類にも広く存在している。しかしこれまでに TagA の大量発現や精製は行われておらず、詳しい性質や立体構造についてはまだ明らかになっていない。本研究では、TagA 発現用プラスミドを構築し、TagA の大量発現、精製を行い、TagA の立体構造解析を行うことを計画した。TagA のホモログは炭そ菌や破傷風菌などの重大な病気の原因となる細菌にも存在していて、TagA の立体構造が明らかになれば、TagA のホモログを持つ病原菌に対する新たな抗生物質の開発が期待できます。

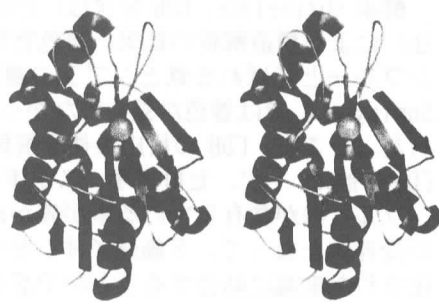
TagA 発現用プラスミド pET-tagA を構築した。次に TagA の大量発現をおこなった。構築したプラスミドを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、LB 液体培地で、37°C で培養、IPTG を加え、TagA の発現を誘導した。TagA は大量に発現していたものの、その大部分が不溶性画分にあるということが分かった。他の微生物由来の tagA 遺伝子のクローニングを試み、その中に易溶性の TagA 酵素を探すことを計画し、進行中である。



TagA 発現用プラスミドの構築とタンパク質発現 (SDS-PAGE)

### 3. CwIV1 の結晶構造解析

微生物細胞壁を構成しているペプチドグリカンの糖鎖 (グリカン) とペプチド鎖の間のアミド結合を切断するアミダーゼ CwIV の活性ドメイン部分を大腸菌で大量に調製し、結腸化した。空間群が P21P21P21 の約 0.4 x 0.2 x 0.2 mm の結晶が得られた。SPRING-8 の結晶構造解析装置で約 1.8 Å の解像度でデータがえられた。さらに精密化を行っていったところ右図のような構造をとることが分かった。これは枯草菌を初め微生物由来のアミダーゼとしては初めて明らかになった例である。



#### CwIB family

(CwIV1 [*Paebibacillus polymyxa* ver. *colisticus*])

#### CwIV1 のステレオ図

### 展望

細胞壁に由来する生体高分子の分子生物学的研究は自然免疫系とのかねあいからもさらに研究が進んでいく分野であるが、ペプチドグリカンが不均一な生体高分子であること、またそれに働く酵素の溶解性が低いケースが多いことなどからなかなか分子レベルでの研究が進んでいない。しかし本研究が着実に進んでいけば、単に微生物細胞表面の分子レベルでの理解が進むばかりではなく、新規の抗生物質の開発や新しいバイオファイバーマテリアルの創成につながっていくと思われる。