

志田 敏夫

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

16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 Bacillus subtilis CwlC is the cell wall lytic N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases in the CwlB (LytC) family that contains a homologous catalytic domain. The enzymes are thought to play an important role in mother-cell lysis in sporulation. The CwlC consists of a N-terminal catalytic domain and a tandem repeat (repeat-1:184-219 and repeat-2:220-254) in the C-terminal region. Biochemical analysis has shown that the C-terminal tandem repeat, named as CwlCr, can bind to the B. subtilis peptidoglycan (unpublished).

We tried to determine the structure of CwlCr for understanding a peptidoglycan binding mechanism. Using standard multi-dimensional hetero nuclear NMR methods, we completed the main-chain and side-chain resonance assignments, and collected distance restraints and dihedral angle restraints. Furthermore, unambiguous 26 hydrogen bond restraints were obtained from HNCO($^h^3J_{NC}$) experiment. Structure calculation was performed using CYANA, and a low resolution structure was obtained so far. Intriguingly, the each repeat adopted a b a b structure making a b-sheet between repeat1 and repeat2. Thus, it was likely that both repeat-1 and repeat-2 were required for CwlCr folding. The refinement process of structure calculation and mutation analyses are under way. We will discuss the interaction of CwlCr with peptidoglycan in detail based on an NMR titration experiment.

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ーマテリアルを創成することがを開發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。

一年間の研究内容と成果

枯草菌細胞壁の主成分はペプチドグリカン（PG）である。しかしPGは不溶性である。そこで今年度はリゾチームおよびN β -アセチルムラモイル-L β -アラニンアミダーゼ Cw1V1でPGを低分子化した。Cw1V1で処理することにより糖鎖部分とペプチド鎖部分が分離され、可溶化された。また糖鎖の低分子化を試み、分取した。またCw1V1と同じ酵素反応を触媒するCw1Cの細胞壁結合ドメインの構造をNMRで解析して、立体構造を明らかにした。

展望

ペプチドグリカンを修飾する酵素についてはCw1C、Cw1Bについてその機能と構造の関係については従来どおり研究を進めていくことによりその機能のメカニズムが解明できるよう現在研究を進めている。Cw1Bの細胞壁結合ドメインについてはすでに部位特異的変異により機能アミノ酸残基を特定することを試みたが解析できていないので来年度は認識メカニズムを解明する。活性アミノ酸残基の特定とは異なるので、立体構造の解析もあわせて行う必要があると思われる。すでに種々の多糖フラグメントは準備でき、さらに細胞壁含有成分を調製する。また核酸の化学合成オリゴヌクレオチドや生理機能を持つオリゴペプチドを準備し、トランスグリコシラーゼのような酵素または化学修飾剤を用いた生体高分子間の特異的あるいは非特異的な生体高分子修飾を試み、条件検討を行う。調製した新規バイオマテリアルに関してはその機能評価を行う。