

アノマー反転型 transglycosylase の発見 : *Xanthomonas* 属の植物病原性に関わる α -1,6-環状化 β -1,2-グルコ 16 糖の合成酵素

元内省, 中島将博
東京理科大学 創域理工学部

Discovery of anomer-inverting transglycosylase, which produces α -1,6-cyclized β -1,2-glucohexadecaose

Sei MOTOUCHI, Masahiro NAKAJIMA
Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science

Abstract

α -1,6-環状化 β -1,2-グルコ 16 糖 (C β G16 α) は *Xanthomonas* 属の植物病原菌が病原性因子として合成する環状糖である。本研究では、筆者らが以前発見した糖質加水分解酵素ファミリー GH186 が *Xanthomonas* 属のホモログ (XccOpgD) においては、C β G16 α の合成酵素としてはたらくことを発見した。さらに、AR-NW12A で取得した XccOpgD と基質の複合体構造により、糖質加水分解酵素群の反応機構の基礎の分類の一つである反応機構 (アノマー反転型 transglycosylation) を構造的に初めて示した。

1. はじめに

Xanthomonas 属は稲、小麦、トマト、胡椒、キャベツ、キャッサバ、バナナ、マメなどの 400 種を超える植物に対して病害を引き起こす植物病原菌群である [1]。これらの病害を抑制するために殺菌剤としての農薬が主に使用されるが、自然選択により生じる薬剤耐性菌問題は、農業界における重大な問題の一つである。したがって自然選択を起こさずに病原性を抑制するような新しいコンセプトの農薬の創成が求められる。

Xanthomonas campestris pv. *campestris* が細胞外に合成する α -1,6-環状化 β -1,2-グルコ 16 糖 (C β G16 α) の合成系は上記の新農薬の阻害ターゲットとなる可能性がある。それは C β G16 α がモデル植物である *Nicotiana benthamiana* や *Arabidopsis thaliana* に対する感染に必須であるが、

C β G16 α の合成の有無は菌の生存に関与しないからである [2]。しかし、C β G16 α の合成の鍵となる酵素は未同定であった。

この合成酵素の探索にあたり、筆者らは糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー GH186 に着目した。GH186 は筆者らが発見した β -1,2-グルカナーゼの系統群であり、PF の BL-5A での X 線結晶構造解析により、そのホモログの一つである EcOpgD (大腸菌由来の GH186 ホモログ) の加水分解機構を 2023 年に提唱している [3]。この機構は、グリコシド結合にプロトンを提供する一般酸触媒残基としてのアスパラギン酸と、基質のヒドロキシ基と水分子二つを経由して求核水のプロトンを引き抜くアスパラギン酸 (一般基触媒残基) が存在する機構であった (Fig. 1)。特に求核水を含む水分子同士の長いプロトン授受経路を安定化

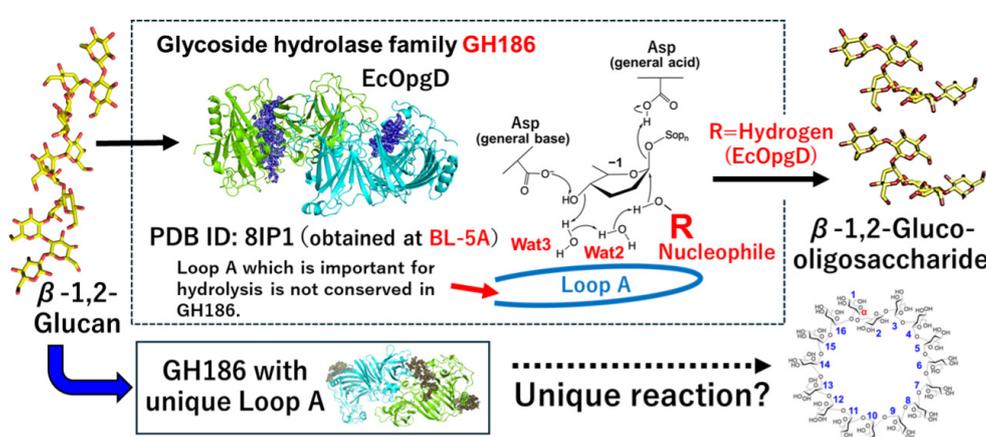


Figure 1 The functional summary of GH186 and the strategy for discovering unique reactions in GH186. Figures are partially cited from [3, 4].

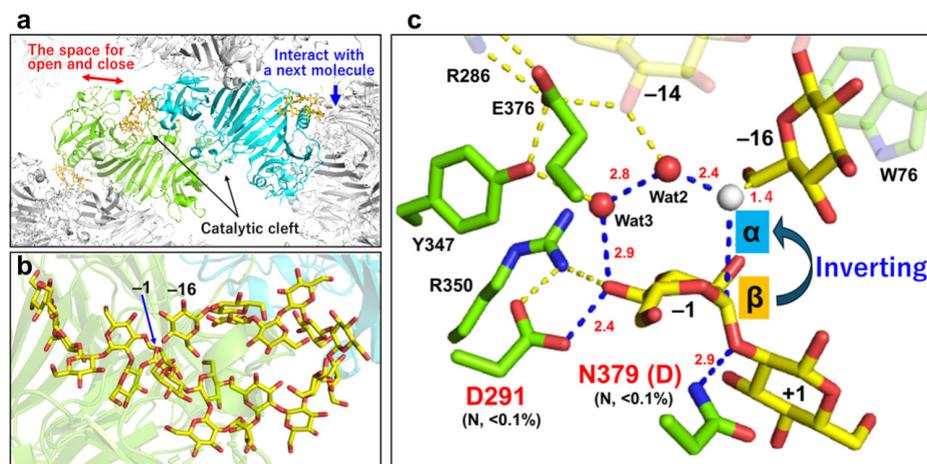


Figure 2 Michaelis complex of XccOpgD (PDB ID: 8X18). (a) Overall structure of XccOpgD in crystal packing. (b) Substrate in catalytic cleft. (c) Catalytic center of XccOpgD. Blue dotted lines represent the suggested reaction pathway. A white sphere represents a superimposed nucleophilic water in EcOpgD. This figure is cited from [4, 5] and partially modified.

するアミノ酸配列 (Loop A) が GH186 内で保存性が低い。このことから、GH186 ではその Loop A の多様性を主要因として、特に「求核種の異なる」新規な酵素反応が見つかる可能性が推察された。例えば、EcOpgD において求核水が位置する場所に水ではなく、糖のヒドロキシ基などを固定するホモログも存在するのではないかという推察である。*X. campestris* pv. *campestris* が有する GH186 ホモログは EcOpgD とは異なる Loop A を有していたため、本論文 [4] ではこの GH186 ホモログ (XccOpgD) が C β G16 α 合成酵素であると予想し、その機能と構造の解析を行った。

2. XccOpgD が触媒する反応

XccOpgD を大腸菌に異種発現させて精製し、 β -1,2-グルカンに対して作用させると、特異的な大きさの反応産物の生成が確認された。この反応産物を質量分析や NMR で解析したところ、XccOpgD は C β G16 α を特異的に合成する酵素と判明した [4]。これは XccOpgD が β -1,2-グリコシド結合を α -1,6-グリコシド結合に置き換える「アノマー反転型 transglycosylation」という反応を触媒することを示す結果であるが、実は一回のみのアノマー反転で完了する transglycosylation 反応は GH 酵素全体において極めて特殊な反応 (GH91 で提唱されているのみ) である。ましてや立体構造に基づいて明確にメカニズムが示された前例がなかった。したがって筆者らはこの反応メカニズムを明確に示すために、XccOpgD と基質との複合体構造の取得を目指した。

3. XccOpgD のミカエリス複合体構造の取得

EcOpgD の加水分解反応で一般酸触媒残基としてはたらく D388 は XccOpgD において D379 として保存されていたため、これが共通の一般酸触媒残基と推察し、D379N 変異 XccOpgD をミカエリス複合体構造の取得のために用いた (触媒残基の変異により基質が反応直前の結合様式で観察される複合体構造はミカエリス複合体と呼ばれる)。作

成した結晶は AR-NW12A で、クライオプロテクタントや基質濃度の条件検討を行い、最終的に 20% という高濃度の β -1,2-グルカンのソーキングにより、2.25 Å の分解能で XccOpgD のミカエリス複合体構造の解析に成功した [4]。GH186 は基本的に二量体であることがその機能に必須なため、触媒クレフトが biological assembly に二つ存在するが、今回の XccOpgD の構造では片方の触媒クレフトにのみ β -1,2-グルカンが鮮明に観察された (Fig. 2a,b)。これはクリスタルパッキングの影響と考えられる。すなわち、GH186 に共通すると考えられる触媒クレフトの開閉運動が、基質が観察されたサブユニットでのみ可能なように見える。実は XccOpgD は結晶が形成されやすく、様々な結晶化条件のデータを取得することができたが、今回のように基質が鮮明に観察されるような「開閉可能なクリスタルパッキング」の条件は 1 条件のみであった (Fig. 2a,b)。観察された β -1,2-グルカンの鎖長は EcOpgD などのホモログで観察されたものより長く、合計 22 個のグルコースユニットで構成されていた。そのうち、糖鎖の非還元末端から 1 個目 (サブサイト -16) と 16 個目 (サブサイト -1) のグルコースユニットが近傍にあり、重合度 16 の環状糖が生成することと合致していた (Fig. 2b) [4]。

この二つのサブサイト周辺を詳細に観察すると、EcOpgD の加水分解反応経路は基本的に保存されていた (Fig. 2c)。しかし、決定的な違いは XccOpgD では求核水の電子密度が観察されなかったことであり、代わりにサブサイト -16 のグルコースユニットの 6 位ヒドロキシ基が近傍に存在していた (Fig. 2c) [4]。以上のことは、サブサイト -1 のアノマー位とサブサイト -16 の 6 位ヒドロキシ基が結合し、 α -1,6-グリコシド結合が形成されることを強く示唆している。この XccOpgD の酵素反応は、100 年以上の GH 酵素の研究の歴史で、構造に基づいて初めて明らかにされたアノマー反転型 transglycosylation 反応といえる。詳細な提唱反応機構を Fig. 3a に示した [4]。

4. 基礎と応用への展望

今回、構造解析の結果から明らかになったサブサイト-1から-16にかけての糖鎖の認識アミノ酸残基は、系統解析により GH186 内であり保存されていないことが分かった。一方で求核種である非還元末端のグルコースユニットを CH- π スタッキング相互作用により固定する W76 はトリプトファンとしては保存されていないが、チロシンなどの同様の役割が期待される芳香族アミノ酸残基となっているホモログが GH186 内で主流となっている [4]。ここからアノマー反転型 transglycosylation という反応により、未知の糖鎖産物を合成しているホモログが多様に存在する可能性が考えられる。一方、*Xanthomonas* 属の有する GH186 という観点で見れば、XccOpgD の 16 糖合成機能に重要と考えられた基質認識残基が高度に保存されており [4]、共通の病原性阻害ターゲットとなる可能性も考えられる。将来的には今回明らかにした立体構造をベースとした創薬により、新たな農薬の創成も期待される。筆者ら自身、この基礎と応用の両面の発展可能性に着目し、さらなる研究を推進中である。

5. おわりに

今回、XccOpgD の基質がソーキングされた結晶化の条件では様々なクライオプロテクタントと基質のソーキング時間を検討し、3.0 - 2.1 Å 程度の分解能のデータを十数個、取得している。特に基質のソーキング時間が長いと、水分子の観察が可能な分解能の構造が得られず、しかし、ソーキング時間が短いと基質の電子密度が鮮明に観察されないという状況であった。こういった状況で両方の条件を満たす構造を AR-NW12A で取得したときの喜びは今でも思い

出す。これはその場で分子置換と簡易的な精密化を行い、基質の電子密度の状況に応じて基質濃度などの条件を変更することがリアルタイムで可能な現地での測定だったからこそ、得られたものと思っている。筆者自身、リモートでの測定も行っていく中で、このような現地での測定の利点も引き続き活用していきたいと考えている。

謝辞

本研究は PF 共同利用実験課題 2020G527 として実施しました。本研究課題に限らず、いつも手厚いサポートをいただいている KEK のスタッフの皆様に深く感謝いたします。

また本研究の共同研究者として力添えいただいた農研機構の今場司朗博士、新潟大学の中井博之准教授に深く感謝いたします。本研究成果は、次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2151、JSPS 科研費 JP24KJ2021 の助成を受けたものです。

引用文献

- [1] Timilsina, S. *et al.*, Nat. Rev. Microbiol. **18**, 415 (2020).
- [2] Rigano, L. *et al.*, Plant Cell **19**, 2077 (2007).
- [3] Motouchi, S. *et al.*, Commun. Biol. **6**, 961 (2023).
- [4] Motouchi, S. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **146**, 17738 (2024).
- [5] Motouchi S. *et al.*, Nihon Kessho Gakkaishi. **66**, 215 (2024).
- [6] Motouchi S. *et al.*, 日本応用糖質科学会和文誌 **15** (2), 70 (2025).

(原稿受付日：2025 年 6 月 13 日)

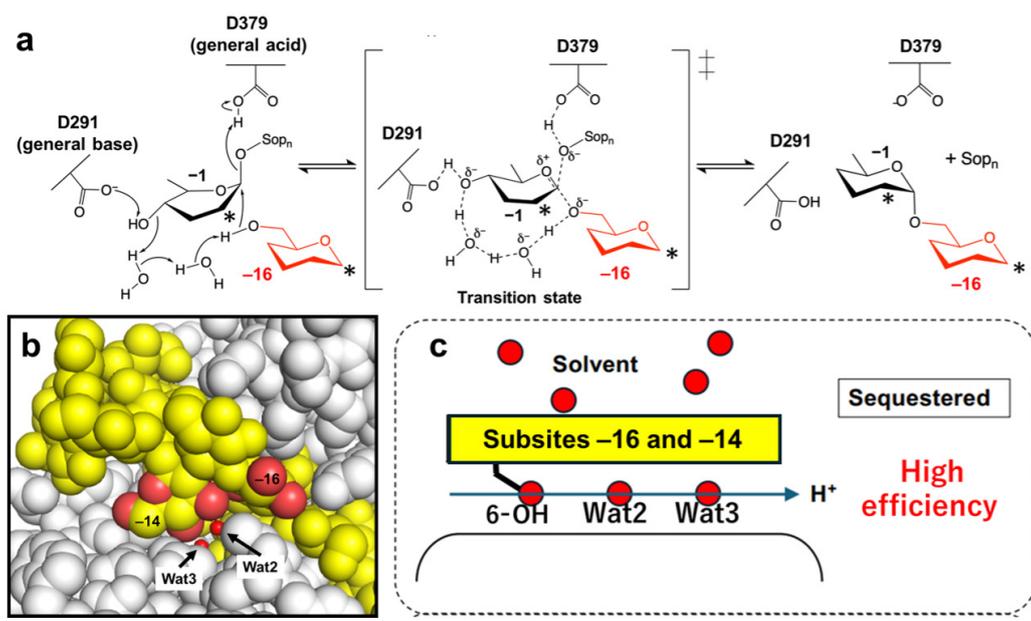


Figure 3 (a) Anomer-inverting transglycosylation of XccOpgD. This figure is cited from [4]. (b) Proton transfer pathway of XccOpgD sequestered by β -1,2-glucan. This figure is cited from [4] and partially modified. (c) Schematic diagram of molecular arrangement surrounding the proton transfer pathway of XccOpgD. This figure is cited from [6] and partially modified.

著者紹介

元内省 Sei MOTOUCHI



東京理科大学
創域理工学研究科生命生物科学専攻
博士後期課程1年（投稿当時）
〒278-8510 千葉県野田市山崎2641
e-mail: seimotouchi@rs.tus.ac.jp

略歴：2023年東京理科大学創域理工学研究科修士課程修了，同博士後期課程進学，2024年日本学術振興会特別研究員DC2。

最近の研究：植物 - 微生物間相互作用に関わる糖鎖の合成酵素及び受容体の探索と機能解明。

中島将博 Masahiro NAKAJIMA



東京理科大学
創域理工学部生命生物科学科 准教授
〒278-8510 千葉県野田市山崎2641
e-mail: m-nakajima@rs.tus.ac.jp

略歴：2006年東京大学農学生命科学研究科応用生命工学専攻博士課程修了，2006年独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所農研機構特別研究員，2010年岩手生物工学研究所研究員，2012年東京理科大学理工学部応用生物科学科助教，2017年東京理科大学理工学部応用生物科学科講師，2020年東京理科大学理工学部応用生物科学科准教授（2023年学部学科名称変更）。

最近の研究：主に β -1,2-グルカンに関連する酵素の探索と分子メカニズムの解明。

*PF-UA 学生論文賞とは？

PF ユーザーアソシエーション（PF-UA）は、放射光科学の未来を担う優秀な若手研究者の輩出と、PF を活用している博士課程学生の研究の奨励を目的として、2022年度より「PF-UA 学生論文賞」を創設しました。本賞は、PF を活用して得られた研究成果を含む論文を広く対象とします。PF における新規の測定法や解析法の開発に貢献した成果はもちろんのこと、既存の測定・解析法を用いて特定の分野で顕著な成果を挙げた研究も対象となります。

2024年度は、PF を活用して当該年（2023年12月～2024年12月）に発表した査読付英文誌（accept 済のものに限る）で、原則として応募者が first author であり、以下の（1）または（2）のいずれかに該当する方を対象としていました。

- （1）応募時点で博士後期課程学生であること
- （2）対象となる論文を投稿した時点で博士後期課程学生であったこと

公募の詳細はこちらをご覧ください。<http://pfwww2.kek.jp/pfua/gaiyo/ronbunyou.htm>