ヘテロ多糖を食べる細菌

鵜に限らず、多くの動物は鵜呑みに近い捕食形態をとる。大きな餌を丸飲みし、その後でゆっくり消化する食べ方である。自然界での危険を回避し、かつ高い摂食効率を可能にする優れた食べ方である。微生物界にも、大きな餌(高分子ヘテロ多糖)を丸飲みする細菌の存在が明らかになってきた。微生物が高分子ヘテロ多糖を丸飲みする機構およびその消化に関わる酵素リアーゼに焦点を当て、種々のヘテロ多糖の食べ方の特徴を比べてみた。

Cooking Manner of Bacteria for Heteropolysaccharide Assimilation

*Wataru HASHIMOTO, Keiko MOMMA, Kousaku MURATA, 京都大学食糧科学研究所

自然界には様々な多糖が存在しており、植物や微生物など、その生産者も多様である。多糖は、構造的にホモ多糖とヘテロ多糖の2種類に大別される。ホモ多糖は単一構成糖からなり、澱粉、セルロース、キチンなどがある。ヘテロ多糖は数種の構成糖からなり、アルギン酸、ゲラン、キサンタン、ヘパリンなどが知られている⁽¹⁾。本稿では、食品・医薬品分野で多用されているアルギン酸、ゲランおよびキサンタンのウロン酸含有ヘテロ多糖に焦点を絞り、細菌がもつこれら多糖の資化に関わる巧妙な分子装置について紹介する。

アルギン酸の資化

1. アルギン酸の構造と性質

アルギン酸は、ウロン酸であるマンヌロン酸(M)とグルロン酸(G)からなる高粘性多糖であり、マンヌロン酸のみからなるMブロック、グルロン酸のみからなるGブロックおよび両者からなるMGブロックが直鎖状に混在している⁽²⁾。分子サイズは、数万から数十万に達する。アルギン酸は、褐藻と数種の細菌によって産生される。褐藻由来のアルギン酸はカルシウム存在下でゲル化するため、細胞や生体分子の固定化あるいは人造イクラの膜などとして利用されている⁽³⁾。

他方、細菌が産生するアルギン酸は褐藻由来とは異なり、マンヌロン酸の一部がアセチル化されている。生体に感染した緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)によって合成されるアセチル化アルギン酸は、嚢胞性繊維症やびまん性汎細気管支炎患者にみられる難治性細菌感染症の原因となっている⁽⁴⁾。

2. アルギン酸分解菌の細胞表層と高分子アルギン酸の取り込み

アルギン酸分解菌として単離されたA1株は、*Sphingomonas* 属の細菌と同定された⁽⁵⁾。*Sphingomonas* 属細菌は、グラム陰性でありながら細胞表層にリポ多糖をもたない菌として特徴づけられており、その細胞表層構造に関心がもたれている。細菌が多糖を利用する場合、細胞外に分泌した低分子化酵素で多糖を低分子化してから取り込むのが一般的であるが、A1株は細胞質内にアルギン酸低分子化酵素(アルギン酸リアーゼ)をもっており、それがペリプラズムや培地中に分泌されることはない⁽⁵⁾。したがって、A1株には、高分子アルギン酸を直接細胞内に取り込む機構の存在が示唆された。

A1株の細胞表層を電子顕微鏡で観察すると、多数の膜状物質に覆われた特徴的な表層構造が認められる(図

図 1 ■ A1 株の細胞表層と体腔(ピット)の形成

アルギン酸を含む栄養培地での A1 株の細胞表層構造(電子顕微鏡観察)。A: 培養開始時, B: 培養後 2 時間, C: 培養後 7 時間, D: 培養後 14 時間, E: 培養後 20 時間

図 2 ■ A1 細胞のピット構造と高分子取り込みモデル

A: A1 細胞の切片構造, B: 高分子取り込みモデル

1)^(6,7)。アルギン酸が培地中に存在すると, A1 株の細胞表層に「体腔(ピット)」が形成され, アルギン酸が消失するとピットも消失する。すなわち, 高分子物質(アルギン酸)存在のシグナルを感知して膜構造が再編成され, ピットが形成されていく動的過程が観察される(図 1)。また, ピット付近にアルギン酸が濃縮されており, 細胞の超薄切片には, 細胞質膜が細胞質側に深く陥入した部位の存在も確認される(図 2)⁽⁶⁾。これらの結果より, A1

株はアルギン酸を高分子のままピット経由で細胞内に取り込むことが考えられた。このようなピット形成細菌は, 微生物学史上で初めての発見である。

A1 株における高分子取り込みの分子機構を明らかにするため, 高分子アルギン酸(26 kDa)には生育できないが低分子化したアルギン酸(1 kDa 未満)には生育可能な変異株(高分子アルギン酸取り込み欠損株: AL-L 株)を取得した。広宿主ベクターを用いて構築した A1 株のゲ

ノム遺伝子ライブラリーから、AL-L株の変異を相補する全長9 kbのDNA断片をクローニングし、その全一次構造とホモロジーを解析した⁽⁸⁾。その結果、低分子糖質の取り込みに関与するトランスポーターと相同性を示す2種類の遺伝子が認められた。両遺伝子を *algH*, *algM* と命名し、その機能について考察した。

algH は、363 アミノ酸残基からなる分子サイズ 39.5 kDa のタンパク質をコードしていた。AlgH は、大腸菌のグリセロール 3-リン酸トランスポーター; UgpC と相同性(52%)を示した。UgpC は、ATP 結合領域をもつ ABC(ATP-binding cassette)トランスポーターであり、グリセロール 3-リン酸を取り込む際、ATP を加水分解することにより取り込み駆動力を生じることが知られている⁽⁹⁾。AlgH にも、ATP 結合配列が完全に保存されていた。

一方、*algM* は、207 アミノ酸残基、23.3 kDa のタンパク質をコードしており、AlgM は、細菌の ABC トランスポーターの膜結合領域と相同性(大腸菌 UgpA との相同性: 26%)を示すことから、アルギン酸を認識して細胞質内に取り込む機能が考えられた。また、9 kb の A1 ゲノム断片にはアルギン酸リアーゼもコードされており、アルギン酸の取り込みと資化が密接に制御されていることが明らかになった。さらに、9 kb の A1 ゲノム断片をアルギン酸資化性のない他の *Sphingomonas* 属細菌(*S. mali*)に導入すると、アルギン酸資化能が付与され、同時にその細胞表層にピット様構造の形成が認められた。以上の結果から、AlgH と AlgM は連携して高分子アルギン酸の取り込みに関与していることが示された

(図2)。その場合、ピットはアルギン酸結合タンパク質に代わって細胞表層にアルギン酸を濃縮する部位になっていると考えられる。このように、筆者らは初めて高分子取り込み機構が細菌に存在することを明らかにした。

3. アルギン酸リアーゼ

細胞内に取り込まれたアルギン酸は、細胞内に局在している基質特異性を異にする3種類のエンド型アルギン酸リアーゼによって低分子化される(図3)⁽⁶⁾。高分子量(66 kDa)の ALY I は、褐藻および細菌アルギン酸に作用する。25 kDa の ALY II は、褐藻(非アセチル化)アルギン酸に特異的であり、40 kDa の ALY III は、細菌(アセチル化)アルギン酸に特異的である。アルギン酸によって誘導合成されるこれら3種類のリアーゼ分子種は、同一のオープンリーディングフレーム(ORF: 1,923 bp, 641 アミノ酸残基)にコードされており、共通の前駆体タンパク質 Po(71 kDa)から逐次翻訳後修飾により成熟体となる(図3)。

この修飾過程において、高分子リアーゼ(ALY I)は自己触媒的に ALY II と ALY III に分断される。つまり、ALY I は、基質特異性の異なる2種類のリアーゼ(ALY II と ALY III)を搭載し、かつプロテアーゼ活性も有する複雑な多機能・多触媒中心酵素である。多糖リアーゼが同時にプロテアーゼ活性をもつ特殊性は、後述するキサンタンリアーゼ(キサンタンの資化の項参照)の場合にも認められる。この事実は、タンパク質合成のエネルギー的側面と遺伝子の情報量の観点から重要な意義をもつと考えられる。

図 3 ■ A1 細胞におけるアルギン酸リアーゼの成熟過程

図 4 ■ ALYIII の構造モデル

A: リボンモデル, B: 分子表面

3 種類のアルギン酸リアーゼが、高分子アルギン酸に作用する機構も明らかになってきた。たとえば、ALYIII の X 線結晶構造解析の結果によると、本リアーゼはヘリックス構造に富んでおり、内側に 5 本、外側に 4 本のヘリックスで構成されるバレル中にトンネル様の大きな溝をもつ(図 4)⁽¹⁰⁾。この深い溝に基質アルギン酸が貫通し、触媒部位と相互作用している可能性が考えられる。その場合、ALYIII は 4 糖を最小基質とし、最終産物として 2 糖と 3 糖を与える⁽¹¹⁾。

ゲランの資化

1. ゲランの構造と性質

ゲランは、グラム陰性細菌 *Sphingomonas paucimobilis* が産生するウロン酸含有ヘテロ多糖で、平均分子量は約 50 万である。構造的にはグルコース-グルクロン酸-グルコース-ラムノースの 4 糖が直鎖状に連なっており、二重らせんを形成していると考えられている⁽¹²⁾。数種の *Sphingomonas* 属細菌は、ゲランと構造のよく似た多糖を菌体外に分泌することが知られており、それら一群の多糖はゲランファミリーに分類され、スフィンガンと呼ばれている。ゲランはカチオンとの反応性が高く、特に 2 価のカチオン存在下で熱不可逆性の強固なゲルを形成するため、ゲル化剤として食品業界で広く利用されている⁽¹³⁾。しかし、ゲランは高粘性のため、その利用が制限される場合がある。低粘性・低分子化ゲランの開発は、ゲランの利用範囲の拡大に繋がる⁽¹⁴⁾。

2. ゲラン分解菌

ゲランを単一炭素源とした集積培養によって土壌から分離されたゲラン分解菌 GL1 株は、*Bacillus* 属の細菌と同定された。ゲラン分解に関与する酵素活性を調べた結果、菌体外にリアーゼ活性(β -脱離反応)が、また菌体内にゲラン構成糖を加水分解する種々のエキソグリコシダーゼ活性(α -L-ラムノシダーゼや β -D-グルコシダーゼ)が認められた⁽¹⁵⁻¹⁷⁾。GL1 株がゲランを分解する現象を理解する上で重要なことは、GL1 株がゲラン生産菌である *S. paucimobilis* とともに分離されることである⁽¹⁸⁾。GL1 株は、*S. paucimobilis* が生産する粘調な高分子ゲランをバイオフィルムとした閉じられた環境(菌蓋)の中で棲息することによって、菌体外に分泌したゲランリアーゼとその反応産物の拡散的散逸を防ぎつつゲランの有効利用を可能にしていると考えられる。この場合、受益関係に対等性はないが、一種の共生と考えてよいであろう。

3. ゲランリアーゼとゲランの低分子化

GL1 株から細胞外に分泌されるゲランリアーゼは、アルギン酸リアーゼの場合と同様、巧妙な翻訳後修飾によって生成する。ゲランリアーゼ遺伝子の一次構造を決定した結果、2,475 アミノ酸残基からなる分子サイズ 263 kDa のタンパク質をコードしている ORF が認められた⁽¹⁹⁾。GL1 株から精製したゲランリアーゼの分子サイズは 140 kDa であったが、その N 末端アミノ酸配列が ORF に認められたことより、本酵素は 263 kDa という

図 5 ■ GL1 細胞におけるゲランリアーゼの成熟過程とゲランの分解経路

巨大な前駆体として合成された後に、35 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドの切除およびそれに引き続く翻訳後修飾を経て成熟体となることがわかった(図 5)。実際、大腸菌のクローニング株から単離されるゲランリアーゼの分子サイズは約 260 kDa であり、その比活性(タンパク質分子数当たりの活性)は成熟体とほぼ同程度であった。このことより、ゲランリアーゼは前駆体でも十分活性を有していることがわかった。なお、修飾によって生じる 120 kDa のタンパク質が、140 kDa タンパク質(ゲランリアーゼ)の膜輸送に関与しているか、それとも他の機能をもっているのかはわかっていない。

GL1 株をゲランで培養し、その培養濾液より精製したゲランリアーゼは分子量 140 kDa のモノマー酵素であり、ゲランに特異的に作用して 1 種類の反応産物(非還元末端に不飽和グルクロン酸、還元末端にグルコースを有する 4 糖: $\Delta\text{GlcA-Glc-Rha-Glc}$)を与える⁽¹⁶⁾。したがって、ゲランリアーゼは、ゲラン分子の末端からグルコース-グルクロン酸の間を β -脱離反応により切断するエキソ型酵素であることが明らかになった。この反応産物(4 糖)の分解に関わる 3 種のエキシグリコシダーゼはすべて細胞質に局在するため、4 糖の細胞内への取り込み系の存在が考えられるが、未だ明らかになっていない(図 5)。

図 6 ■ キサンタンの構造とリアーゼの作用部位

campestris によって生産されるウロン酸含有菌体外ヘテロ多糖である⁽²⁰⁾。構造的には主鎖にセルロース骨格を有しており、主鎖のグルコース 2 分子当たり単糖が 3 残基(マンノース-グルクロン酸-マンノース)付加されている(図 6)。したがって、キサンタンは 5 糖をサブユニットとした繰り返し構造をもっている。分子サイズは多様であり、粘性は塩濃度、pH などによらずほとんど一定である。キサンタン水溶液は、擬塑(シュードプラスチック)性を示し、耐 pH、耐酸・アルカリ、耐凍結・解凍性、耐酵素性に優れているため、食品業界では増粘剤として利用されている⁽¹³⁾。

キサンタンの資化

1. キサンタンの構造と性質

キサンタンは、植物病原菌である *Xanthomonas*

2. キサンタン分解菌とキサンタンリアーゼ

ゲラン分解菌として単離した GL1 株は、キサンタンやペクチンも分解する。GL1 株をキサンタンで培養する

と、キサンタンリアーゼ以外にゲランリアーゼも誘導合成される。キサンタン資化とは何の関係もないゲランリアーゼが、その基質であるゲランよりも高い効率で誘導されるのである。この、一見明らかなエネルギーの浪費と考えられる現象の中に、ヘテロ高分子多糖資化に関わる多糖リアーゼの合成制御の本質が存在するのかもしれない。キサンタン培養濾液には分子量の異なる2種類のリアーゼ(95 kDa, 75 kDa)が存在するが、75 kDa リアーゼのほうが多量に存在する。それらのN末端アミノ酸配列は同一であることから、キサンタンリアーゼも翻訳後修飾を受けて成熟化することが示唆された⁽²¹⁾。実際、アルギン酸リアーゼ分子種 ALY I (図3 参照)と同様に、95 kDa のキサンタンリアーゼ分子種は、自己触媒的(内在性プロテアーゼ活性による)に低分子の75 kDa リアーゼに転換される。

キサンタン培養濾液から精製されたキサンタンリアーゼは、分子サイズ 75 kDa のモノマー酵素でキサンタンに特異的に作用し、1種類の分解物(ピルビルマンノース)を遊離する⁽²²⁾。このことより、キサンタンリアーゼは、キサンタン側鎖の非還元末端糖に位置するピルビルマンノースを β -脱離反応により遊離することが示された(図6)。つまり、キサンタンリアーゼは、アルギン酸・ゲランの両リアーゼと異なり、キサンタン側鎖に作用する。さらに、GL1株のキサンタン分解に関わる酵素について検討した結果、菌体外酵素であるリアーゼとエンドグルカナーゼにより、キサンタン構成サブユニットである5糖から側鎖のピルビルマンノースが除去された4糖が生じ、その後4糖が菌体内に取り込まれ(結合タンパク質を含めた取り込み機構は不明)、菌体内酵素であるエキソグリコシダーゼ(α -D-マンノシダーゼや β -D-グルコシダーゼ)により、単糖にまで分解されることが明らかにになった⁽²³⁾。

キサンタンは主鎖に3つの糖が付加されており、さらに非還元末端糖のマンノースにはピルビン酸が配位している。また、グルクロン酸はカルボキシル基を有することから、キサンタンは負の荷電量がきわめて大きい。キサンタンリアーゼを作用させて生成する修飾キサンタンは、ピルビルマンノースが除去されているため負の荷電量が減少する。修飾キサンタンは野生型のキサンタンとは異なる性質を有しており⁽²⁴⁾、新たな利用法が期待できる。

*

高分子ヘテロ多糖の食べ方として2つの型を述べた。一つはアルギン酸資化でみられるようにピットを介して

高分子を丸飲みし、細胞内で低分子化する方法である。この場合、分解酵素を細胞外に出す手間は省けるが、高分子の取り込み系を構築しなければならない。もう一つの型(これは一般的な型であるが)は、ゲランとキサンタンの場合にみられるように高分子を細胞外で低分子化し、低分子化物を取り込む方法である。この場合は、分解酵素を外に出す系と低分子化物を取り込む系(低分子化糖結合タンパク質の合成・分泌も含む)を構築しなければならない。

微生物が開かれた環境の中で、しかも単独で存在するとすれば、菌体外酵素やその反応産物の拡散による散逸を防止できる高分子の丸飲み法が有効な手段となるかもしれない。しかし、自然界において微生物は単独で存在することは稀であり、生物および非生物界面に接着して外界との間に特殊なフィルム(バイオフィilm)を形成し、閉じられた環境の中に棲息する。さらに、その閉じられた環境の中には多種の微生物が共存している場合が多い。このような閉じられた系で考える限り、たとえゲランリアーゼの場合のように巨大な前駆体タンパク質を合成する経済的浪費、あるいはキサンタンがキサンタン分解には何の関わりもないゲランリアーゼを誘導合成する経済的浪費を伴っているとしても、上で述べた高分子の食べ方の優劣を論ずることは難しい。それは、基本的には個々の細菌の細胞経済の問題である。いずれにせよ、高分子を丸飲みする分子装置の発見は、高分子の資化機構に新たな生物学的原則を追加する重要な意味をもつ。今後、タンパク質やDNAの取り込み系の解析に道を拓く端緒となることが考えられる。細胞表層でのピット形成は、エンドサイトーシスの始原的な構造として位置づけることができるかもしれない。

多糖リアーゼの生合成の特徴は、その翻訳後修飾系に認められる。特に、プロテアーゼを内蔵したリアーゼの発見は、遺伝子のもつ情報量の解釈に新たな視点を与えると考えられる。また、多糖リアーゼには、グルクロン酸を認識して切断するという一般則があるが、アルギン酸リアーゼ、ゲランリアーゼおよびキサンタンリアーゼの一次構造上に相同性はあまり認められない。今回アルギン酸リアーゼについて、初めてその立体構造を明らかにした。今後、基質アナログとの複合体を用いた触媒機構の解析、反応様式の異なるこれら3種類の多糖リアーゼの構造生物学的研究を行なうことにより、多糖リアーゼの一般則の謎が解けるかもしれない。

文献

- 1) I.W. Sutherland : *Trends Biotechnol.*, **16**, 41 (1998).
- 2) A. Haug, B. Larsen & O. Smidsrod : *Acta Chem. Scand.*,

- 21, 691 (1967).
- 3) H.J. Gilbert & G.P. Hazlewood : *Proc. Nutr. Soc.*, **50**, 173 (1991).
 - 4) T.F. Boat, A.L. Beadet & M.J. Welsh : "The Metabolic Basis of Inherited Disease", McGraw-Hill, 1989, p. 2649.
 - 5) K. Murata, T. Inose, T. Hisano, S. Abe, Y. Yonemoto, T. Yamashita, M. Takagi, K. Sakaguchi, A. Kimura & T. Imanaka : *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 427 (1993).
 - 6) T. Hisano, Y. Yonemoto, T. Yamashita, Y. Fukuda, A. Kimura & K. Murata : *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 538 (1995).
 - 7) T. Hisano, N. Kimura, W. Hashimoto & K. Murata : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **220**, 979 (1996).
 - 8) K. Momma, M. Okamoto, Y. Mishima, W. Hashimoto & K. Murata : submitted.
 - 9) P. Overduin, W. Boos & J. Tommassen : *Mol. Microbiol.*, **2**, 767 (1988).
 - 10) 橋本 渉, 尹 恵珍, 三上文三, 村田幸作 : 日本農芸化学会関西支部第 404 回講演会講演要旨集, 1998 p. 4.
 - 11) W. Hashimoto, M. Okamoto, K. Momma & K. Murata : *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 236 (1998).
 - 12) P.-E. Jansson, B. Lindberg & P.A. Sandford : *Carbohydr. Res.*, **124**, 135 (1983).
 - 13) 浅井以和夫, 大本俊郎, 甲田秀康 : 応用糖質科学, **43**, 385 (1996).
 - 14) M.J. Mikolajczak, L. Thorne, T.J. Pollock & R.W. Armentrout : *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 402 (1994).
 - 15) W. Hashimoto, T. Inose, H. Nakajima, N. Sato, S. Kimura & K. Murata : *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1475 (1996).
 - 16) W. Hashimoto, K. Maesaka, N. Sato, S. Kimura, K. Yamamoto, H. Kumagai & K. Murata : *Arch. Biochem. Biophys.*, **339**, 17 (1997).
 - 17) W. Hashimoto, H. Miki, H. Nankai, N. Sato, S. Kawai & K. Murata : *Arch. Biochem. Biophys.*, in press.
 - 18) W. Hashimoto & K. Murata : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1068 (1998).
 - 19) W. Hashimoto, N. Sato, S. Kimura & K. Murata : *Arch. Biochem. Biophys.*, **354**, 31 (1998).
 - 20) P.-E. Jansson, L. Kenne & B. Lindberg : *Carbohydr. Res.*, **45**, 275 (1975).
 - 21) W. Hashimoto, H. Miki, N. Tsuchiya, H. Nankai, S. Kawai & K. Murata : unpublished.
 - 22) W. Hashimoto, H. Miki, N. Tsuchiya, H. Nankai & K. Murata : *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, in press.
 - 23) H. Nankai, H. Miki, S. Kawai, W. Hashimoto & K. Murata : submitted.
 - 24) N. Tsuchiya, T. Mukumoto, H. Miki, W. Hashimoto & K. Murata : unpublished.

お知らせ

科学技術庁放射線医学総合研究所

第 2 回ライフサイエンス課程“安全な RI 利用のために”研修生募集

目的：本課程は生物学、医学、薬学、農薬などのライフサイエンス分野における放射線の基礎および放射性同位元素 (RI) 利用技術に関する講義・実習を行なう中で、RI の安全取り扱いに必要な放射線防護の知識・技術を習得することを目的とします。

募集人員・研修期間：①募集人員約 16 名、②研修期間(予定)平成 11 年 1 月 18 日(月)より平成 11 年 2 月 5 日(金)まで

研修科目：講義では、①放射線に関する基礎の理解、②人体に対する放射線影響の理解、③ RI・標識化合物の理解と利用、④放射線防護の理解に必要な知識を学びます。また、分子レベルから個体レベルまでの生物材料を用いた RI 利用の実際とそれに即した RI の安全取り扱い技術を習得する実習を行ないます。

応募資格：ライフサイエンス分野に従事している、またはしようとしている研究者、技術者、および大学の理科系専門

課程に在学する学生。

申込方法：所定の申込書に必要事項を記入し、平成 10 年 12 月 11 日(金)までに放射線医学総合研究所長宛(人材育成開発センター)提出して下さい。

受講の決定通知：受講の可否は、選考委員会で書類審査の上、平成 10 年 12 月 25 日(金)までに郵送により所属長および本人(所属長経由)にお知らせします。

経費：①研修費(教材費、実習費)は研究所が負担します、②研修生の自己負担はおおむね以下の通りです。④宿舍利用の場合、清掃代などの実費(全期間)4,500 円、⑤雑費 1,000 円

申込先・問合せ先：〒 263-8555 千葉市稲毛区穴川 4-9-1
科学技術庁 放射線医学総合研究所
人材育成開発センター教務室
Tel. 043-251-2111 内線 361, Fax. 043-251-7819