

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05444

研究課題名(和文) 生体認識配糖体生産のための特異的糖鎖遊離酵素の構造解析とその機能開発

研究課題名(英文) Structural analysis and developmental research of specific glycosidases for production of glycosides bearing biorecognition

研究代表者

伊藤 和央 (Ito, Kazuo)

大阪公立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：20183171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：特異的糖鎖遊離酵素エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(エンド)の立体構造を、X線結晶構造解析によって解明した。エンドHSは、異なるドメイン(D)I～Vから構成される新規マルチドメイン構造をとり、D-I中の4アミノ酸残基が触媒部位を構成していた。また、*P. melaninogenica*由来エンドPMのアイソザイム、エンドPMは、D-I～Vで構成され、D-Iは( / )8バレル、D-II～Vはバレルであった。D-I～IIIが活性領域を形成し、D-IVとVはそれぞれ糖鎖認識と菌体外膜移行に関わると考えられた。低角X線散乱解析から、本酵素の溶液構造は結晶構造と異なると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規特異的糖鎖遊離酵素エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(エンド)HSの立体構造が世界に先駆けて解明され、未知のドメインから構成される新規マルチドメイン構造が明らかとなった。既知糖鎖遊離酵素とは異なり、4アミノ酸残基が触媒部位を構成し、新規触媒機構を提唱する発見であった。

また、新分離菌*P. melaninogenica*由来エンドPMのアイソザイム、エンドPMの立体構造を初めて解明された。エンドPMも未知ドメインで構成される新規マルチドメイン酵素で、各ドメインの構造上の特徴と機能が明らかとなった。また、本酵素の立体構造は、溶液中と結晶中では異なることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Crystal structure of recombinant endo-β-N-acetylglucosaminidase(Endo) HS resolved with 1.95 Å resolution was revealed to be a novel multi-domain structure composed of 5 domains(D). The structure composed of D-I～III was similar to those of GHF85 enzymes, D-IV and V were characteristic of Endo HS. Four amino acid residues, N216, E218, Y252 and Y282 in D-I were revealed to compose catalytic site.

Crystal structure of recombinant Endo PM, one of 3 isozymes of Endo PM from the isolate, *Prevotella melaninogenica* resolved with 2.1 Å was composed of D-I～V from N-terminal. D-I was ( / )8 barrel of catalytic D, D-II～V were barrels of different from each other. The structure composed of D-I～III was similar to those of GHF85 enzymes, D-IV and V were likely to be responsible for oligosaccharide recognition and sorting Endo PM to outer membrane, respectively. Small angle X-ray scattering analysis indicated that the structure in solution was different from the crystal structure.

研究分野：酵素化学

キーワード：生体認識配糖体 エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ 立体構造 ドメイン マルチドメイン

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖タンパク質に結合しているアスパラギン結合 (*N*) 型糖鎖は多様な構造を示し、ハイマンノース型、ハイブリッド型、コンプレックス型に大別される。ヒトなどの高等動物に特徴的なコンプレックス型糖鎖は、血液型や血中糖タンパク質の特定臓器移行などの生体認識能を示す。このような糖鎖を導入すると、特異的生体認識機能を有す配糖体分子を創製できる。また、抗体医薬品などのバイオ医薬品は、*N*-型糖鎖の構造によって薬効が著しく変化する。このため、糖鎖構造の均一・最適化はバイオ医薬品の開発における共通した重要課題である。

(2) エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ(エンド)は、*N*-型糖鎖をエンド的に加水分解・遊離する。本申請者が発見したエンド HS は、糖タンパク質から特異的に 2~4 本鎖分岐コンプレックス型糖鎖を遊離し、遊離糖鎖を様々な水酸基結合化合物に転移する。このため、本酵素を用いて、コンプレックス型糖鎖の転移導入による様々な生体認識配糖体の合成が可能となる。また、バイオ医薬品糖鎖の均一・最適化のための糖鎖組換えが可能となる。

(3) 本申請者らは、エンド HS を用いて糖タンパク質の糖鎖をサリシンなどの生理活性物質に導入した。また、有機溶媒が転移導入効率を向上することを明らかにした。しかし、転移導入効率は 100%に達しない。グリコシド結合の切断に関わる触媒アミノ酸を置換し、水分子以外の水酸基結合化合物でグリコシド結合を切るような糖鎖転移合成酵素に改変できれば、100%の糖鎖導入転移が可能となる。ところが、本酵素の立体構造は未解明で、水分子や水酸基結合化合物の認識あるいは糖鎖認識に関わるアミノ酸残基は不明である。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究ではエンド HS の立体構造を明らかにし、その構造情報を基盤として同酵素の触媒部位と糖鎖認識部位の構造上の特徴を解明する。

(2) 触媒部位のアミノ酸置換によって、糖鎖加水分解型から糖鎖転移合成型酵素へと機能変換し、生体認識配糖体の生産への利用を目指す。

(3) 抗体医薬品などのバイオ医薬品の糖鎖構造の均一・最適化への利用を目指し、糖鎖認識部位の改変を通じて、様々な構造のアスパラギン結合型糖鎖を備えた生体認識配糖体合成用酵素を創出する。

### 3. 研究の方法

#### (1) エンド HS の精製

エンド HS 遺伝子を挿入したベクター pET50 b (+) で大腸菌 BL21 (DE3) 形質転換した。発現した組換えエンド HS を、硫酸分画、疎水、イオン交換、ゲルろ過の各種カラムクロマトグラフィーによって精製した。同大腸菌をセレノメチオニン (Se-Met) 含有培地で培養し、発現したメチオニンを Se-Met に置換したエンド HS (Se-Met エンド HS) を、硫酸分画、疎水、イオン交換、ゲルろ過の各カラムクロマトグラフィーで精製した。

#### (2) エンド HS の結晶化

精製エンド HS と Se-Met エンド HS を用い、結晶化スクリーニングキットを利用したハンギングドロップ蒸気拡散法で 20°C における結晶化条件を検討した。得られた条件をもとに、最適結晶化条件を特定し、結晶を調製した。

#### (3) X 線結晶構造解析によるエンド HS の立体構造解析

得られたエンド HS の結晶を用いて、つくば高エネルギー加速器研究機構において X 線結晶回析を測定した。測定は、Rigaku FR-X で行った。測定条件は、検出器 R-AXIS VII、波長 1.5418 (CuK $\alpha$ ) オングストローム、カメラ長 120 mm、露光時間 60 sec/image、振動角 0.50° で合計 360 枚のイメージデータを収集した。データ処理は、HKL2000 で行った。Se-Met エンド HS の X 線結晶構造解析はヨーロッパ放射光施設 (SLS) で行った。測定は、SLS X065A で行った。測定条件は、検出器 Pilatus NX、波長 0.98 オングストローム、カメラ長 170 mm、振動角 0.50° で合計 720 枚のイメージデータを収集した。データ処理は XDS で行った。また、単波長異常散乱法 (SAD 法) によって位相を決定した。

#### (4) エンド HS の触媒アミノ酸残基の機能検証

エンド HS に保存されている、GH ファミリー-85 (GHF85) に属するエンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの 3 つの触媒アミノ酸残基、N216、E218、Y252 の置換体を作成し、これらの活性を検証した。また、エンド HS に特有の Y282 の機能を同様に検証した。エンド HS 遺伝子

を挿入したベクターpET50 b (+)をテンプレートとして、塩基置換プライマーを用いたインバース PCB によって部位特異的変異エンド HS 遺伝を挿入した pET50 b (+)を作成した。これを用いて大腸菌 ECOS BL21 (DE3)を形質転換し、アミノ酸置換エンド HS を発現した。ヒトトランスフェリンを基質としてアミノ酸置換エンド HS の糖鎖遊離活性を測定した。

#### (5) エンド PM $\alpha$ の精製と結晶化

*Prevotella melaninogenica* 由来エンド PM の 3 つのアイソザイムのうちエンド PM $\alpha$  の遺伝子を挿入したベクターpET23a (+)で大腸菌 BL21 (DE3)を形質転換した。発現した組換えエンド PM $\alpha$  を、硫酸分画、イオン交換およびゲルろ過カラムクロマトグラフィーで精製した。

精製酵素を用い、結晶化スクリーニングキットを利用したハンギングドロップ蒸気拡散法で 20°C での結晶化条件を検討した。得られた条件から最適結晶化条件を特定し、結晶を調製した。

#### (6) X 線結晶構造解析によるエンド PM $\alpha$ の立体構造解析

エンド PM $\alpha$  の結晶を用いて、つくば高エネルギー加速器研究機構 PF-BL17A において X 線結晶回折を測定した。測定条件は、検出器 ELGER X16M、波長 0.98 オングストローム、カメラ長 288 mm、振動角 0.5° でイメージデータを収集した。データ処理は XDS を使用した。

#### (7) 低角 X 線散乱解析によるエンド PM $\alpha$ の溶液中における立体構造解析

つくば高エネルギー加速器研究機構において、ゲルろ過クロマトグラフィーカラムを用いた低角 X 線散乱法 (SEC-SAXS 法) による測定を行った。測定条件は、Light source, PF BL-10C; Detector, PILATUS3 2M; Wavelength, 1.0 オングストローム; Exposure time, 20 sec/image; Camera length (Vacuum chamber), 2 m; Buffer solution, 10 mM Na, K-PB pH 6.5 であった。

### 4. 研究成果

#### (1) 研究の主な成果

##### ① エンド HS の精製

SDS-PAGE で単一なエンド HS 標品を約 300mg 調製した。約 10mg/ml の溶液とし、結晶化に供した。また、SDS-PAGE で単一な Se-Met エンド HS を約 100 mg を調製した。約 10mg/ml の溶液とし、結晶化に供した。

##### ② エンド HS の結晶化

3 種類の条件において結晶が生成した。これらの条件をもとに、沈澱剤組成・濃度、添加剤および酵素濃度条件を検討し、最適結晶化条件を特定した。その結果、図 1-1 に示したように板状単結晶を得た。本結晶は安定で、X 結晶回折に適していた。Se-Met エンド HS は複数の条件下で結晶が生成した。これらの条件をもとに沈澱剤組成・濃度、添加剤および酵素濃度条件を検討し、最適結晶化条件を特定した。その結果、図 1-2 に示したように板状単結晶を得た。本結晶は安定で、X 結晶回折に適していた。

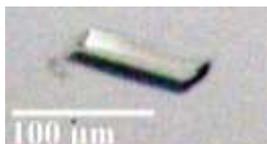


図 1-1. エンド HS の結晶

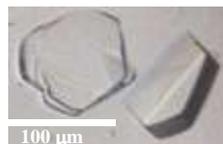


図 1-2. Se-Met エンド HS の結晶

##### ③ エンド HS の X 線結晶構造解析

エンド HS の結晶を用いて X 線結晶回折を測定し、空間群が P 2, 格子定数が a = 75.3 Å, b = 72.2 Å, c = 216.1 Å, でフルデータを収集した。

また、Se-Met エンド HS の結晶を用いて X 線結晶回折を測定し、空間群が P 212121, 格子定数が a = 71.7 Å, b = 135 Å, c = 237 Å と決定し、分解能 1.95 Å でフルデータを収集した。また、単波長異常散乱法 (SAD 法) によって位相を決定した。

これらのデータをもとに、図 2 に示したような立体構造を解明した。エンド HS は、N-末端側から I~V の 5 つのドメイン (D) で構成されるマルチドメイン酵素であった。D-I は ( $\alpha/\beta$ ) 8 バレル構造で、D-I~V は、異なる  $\beta$  バレル構造であった。D-I~III で構成される構造は、GHF85 に属するエンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼと類似し、D-IV と V はエンド HS に特有であった。

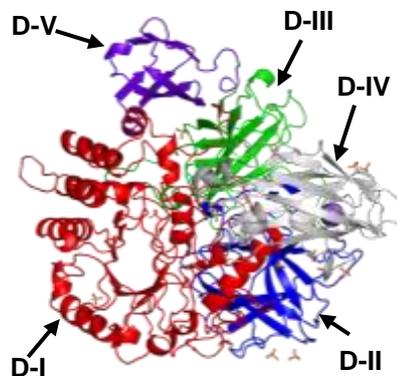


図 2. エン HS の立体構造

##### ④ エンド HS の触媒アミノ酸残基の機能検証

エンド HS の 1 アミノ酸置換体 N216A, E218Q および E218A の各活性は、野生型酵素の 1/1000 以下で、Y252F は 1/7, Y282F では 1/50 となった。2 アミノ酸置換体 N216A/Y252F の活性は野生型酵素の

1/10000以下であった。2アミノ酸置換体N216A/E218QとE218Q/Y252Fおよび3アミノ酸置換N216A/E218Q/Y252Fの活性は検出不可であった。他のGHF85酵素とは異なり、エンドHSの触媒部位は、E218を中心にN216、E218、Y252、Y282の4アミノ酸残基で構成され、新規な触媒機構が存在するものと考えられた。

#### ⑤ エンドPM $\alpha$ の精製と結晶化

SDS-PAGEで単一なエンドPM $\alpha$ 標品を約200mg調製した。約10mg/mlの溶液とし、結晶化に供した。

結晶化条件を検討し、重層薄板結晶が生成する条件を見出した。さらに条件を最適化し、図3に示したような板状単結晶を得た。本結晶は安定で、X結晶回析に適していた。



図3. エンドPM $\alpha$ の結晶

#### ⑥ エンドPM $\alpha$ のX線結晶構造解析

エンドPM $\alpha$ の結晶を用いてX線結晶回析測定を行い、空間群がP212121、格子定数が $a=72.6\text{ \AA}$ 、 $b=128\text{ \AA}$ 、 $c=238\text{ \AA}$ と決定し、分解能 $2.1\text{ \AA}$ でフルデータを収集した。この回折データを用いて図4-1に示したエンドPM $\alpha$ の立体構造を解明した。エンドPM $\alpha$ は、5つのドメインで構成されるマルチドメイン酵素であった。N末端側からD-I~Vとした。D-Iは( $\alpha/\beta$ )8バレル構造で、GHF85酵素触媒部位構成アミノ酸、N、EおよびYが存在し、触媒ドメインと考えられた。D-II~Vは異なる $\beta$ バレル構造であった。D-I~IIIで構成される構造はGHF85酵素と類似していた。D-IVとVは他のGHF85酵素には存在しなかった。D-IVはエンドPM $\alpha$ に特有で、特異的糖鎖認識ドメインと考えられた。D-Vは外膜移行モチーフで構成され、本酵素の菌体外膜移行ドメインと考えられた。図4-2に示したように、N型糖鎖のうち2本鎖分岐コンプレックス型糖鎖が触媒反応に適した位置に結合したエンドPM $\alpha$ のドッキングモデルを構築した。

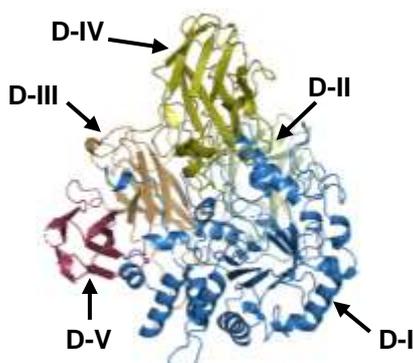


図4-1. エンドPM $\alpha$ の立体構造

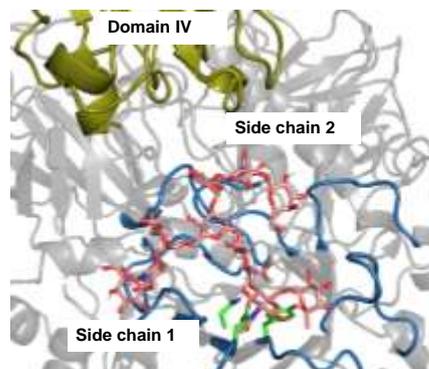


図4-2. エンドPM $\alpha$ と2本鎖コンプレックス型糖鎖のドッキングモデル

#### ⑦ 低角X線散乱解析によるエンドPM $\alpha$ の溶液中での立体構造

SEC-SAXAS法で得られた散乱曲線の解析から、エンドPM $\alpha$ のR<sub>g</sub>は $33.5 \pm 1.1\text{ \AA}$ 、R<sub>max</sub>値は $129\text{ \AA}$ となった。ダミー分子で構築した立体構造は極めて非対称性の高い構造であった。得られた実験散乱曲線と結晶構造から計算される理論曲線との違いを示す $\chi^2$ 値は1.28で、両者は著しく異なっていた。このため、エンドPM $\alpha$ の溶液中の立体構造は結晶状態とは異なると考えられた。

#### (2) 得られた研究成果の国内外における位置づけとインパクト

① これまでに立体構造が解明された糖鎖遊離酵素エンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼは10種に満たず、いずれもN型糖鎖のうちコンプレックス型糖鎖を糖タンパク質から遊離しない。これらは分子量約3~8万で、1または3つのドメインから構成されている。一方、我々が発見したエンドHSとエンドPM $\alpha$ の分子量約110万で、糖タンパク質からコンプレックス型糖鎖を特異的に遊離する。本研究によって、両酵素は、異なる5つのドメインから構成される新規なマルチドメイン構造をとることを世界に先駆けて提示することができた。

② 既知GHF85酵素の触媒部位は3つのアミノ酸残基から構成され、これらによる触媒機構が提唱されている。一方、本研究によって、エンドHSの触媒部位は4つのアミノ酸残基から構成されていることが明らかとなった。これは、新たな触媒機構を提唱する重要な発見であった。

③ 本研究によって、*P. melaninogenica*の産生する糖鎖遊離酵素エンドPM $\alpha$ は、活性に関わるドメインと酵素の菌体膜移行に関わるドメインをから構成されていることが国内外を問わず初めて明らかとなった。これは、菌体膜結合型酵素であるエンドPM $\alpha$ が、*P. melaninogenica*の菌体膜移行システムを利用して菌体膜に局在化していることを示唆する重要な発見であった。

### (3) 今後の展望

#### ① 糖鎖転移合成型酵素の作成とその生体認識配糖体合成効率の検証

解明した立体構造情報をもとに、水分子の認識に関わるアミノ酸の置換によって、エンド HS とエンド PM $\alpha$  を糖鎖加水分解酵素から糖鎖転移合成型酵素に改変し、生体認識配糖体合成酵素を創生する。これを用いて様々な生体認識能を有する配糖体を合成し、その機能を検証する。

#### ② 糖鎖認識機構の解明

酵素・基質複合体の立体構造を明らかにし、エンド HS とエンド PM $\alpha$  の、*N*-型糖鎖のうちコンプレックス型糖鎖特異的認識機構を解明する。特に、基質糖タンパク質との複合体の立体構造の解明を通じて、エンド HS とエンド PM $\alpha$  の糖タンパク質からの糖鎖遊離機構を明らかにする。

#### ③ 糖鎖認識改変型酵素の創生と各種生物起源糖タンパク質糖鎖の転移導入

エンド HS の立体構造から特定した糖鎖認識・結合部位を構成するアミノ酸残基を置換し、変異酵素を作成する。変異エンド HS を用いて、植物、酵母あるいは糸状菌由来糖タンパク質から、これら生物種特有の構造のアスパラギン結合型糖鎖を、各種薬剤に転移導入し、その配糖体の生理活性と生体認識能を検証する。

#### ④ 糖鎖転移合成型酵素によるバイオ医薬品糖鎖のリモデリング

バイオ医薬品の不均一なアスパラギン結合型糖鎖をエンド HS で除去する。次いで、糖鎖転移合成型酵素に改変したエンド HS を用いて、ヒト  $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質から均一な 4 本鎖分岐コンプレックス型糖鎖を転移導入し、バイオ医薬品の生体内での機能向上を目指す。

#### ⑤ エンド PM $\alpha$ の菌体外膜移行ドメインの機能検証と *P. melaninogenica* における菌体外膜輸送機構の解明

菌体外膜移行ドメインを有するエンド PM $\alpha$  のドメイン V の機能を、産生する *P. melaninogenica* のゲノム編集によって明らかにする。また、同ドメインを利用して、同菌に存在すると予想される菌体外膜移行システムの存在とその全容を明らかにする。

### (4) 当初予期していないことから得られた新たな知見

① エンド HS の立体構造は、GHF85 酵素と同様に 3 つの触媒アミノ酸残基が触媒部位を構成しているものと予想された。しかし、本研究によって、エンド HS の触媒部位は 4 つのアミノ酸残基から構成されることが明らかとなった。

② 一次構造上 GHF85 酵素に分類されるエンド HS は、従来の GHF85 と同様の立体構造であることが予想された。しかし、本研究によって、エンド HS の立体構造は、従来の GHF85 酵素とは異なる新規マルチドメイン構造であることが明らかとなった。

③ 生体認識配糖体生産のために有用なエンド HS に加えて、我々が分離・同定した *P. melaninogenica* が産生する、コンプレックス型糖鎖特異的な糖鎖遊離酵素エンド PM $\alpha$  の立体構造を明らかにすることができた。本酵素は、他の GHF85 酵素と同様の立体構造をとるものと予想された。しかし、本酵素は、酵素活性にかかわるドメインに加えて糖鎖認識と酵素局在化に関与するドメインから構成されていることが明らかとなった。

④ 当初エンド PM $\alpha$  の結晶構造は、溶液中の立体構造と同様であると予想された。しかし、本研究によって、本酵素の立体構造は溶液中と結晶中で著しく異なることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tomofumi Takeuchi, Shinji Mori, Kazuki Okura, Methus Kuraeokura, Santhana Nakapong, Nobuo Kamiya, Ikuko Miyahara and Kazuo Ito	4. 巻 -
2. 論文標題 Structure and function of endo- -N-acetylglucosaminidase PM responsible for deglycosylation of host glycoproteins in <i>Prevotella melaninogenica</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Abstract and Proceeding Book of 30th FAOBMB & 8th BMB Conference ( <a href="https://www.bmbconference.org/faobmb2023/wp-content/uploads/2023/12/FAOBMB_2023_Abstract-Book.pdf">https://www.bmbconference.org/faobmb2023/wp-content/uploads/2023/12/FAOBMB_2023_Abstract-Book.pdf</a> )	6. 最初と最後の頁 402-408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Charoenwongpaiboon, T., Wangpaiboon, K., Klaewkla, M., Nakapong, S., Visessanguan, W., Ito, K., Pichyangkura, R., Kuttiyawong, K.,	4. 巻 10
2. 論文標題 Levansucrase from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KK9 and its Y237S variant producing the high bioactive levan-type fructooligosaccharides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 692-703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom10050692	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nopvichai Chatchai, Charoenwongpaiboon Thanapon, Luengluepunya Navaporn, Ito Kazuo, Muanprasat Chatchai, Pichyangkura Rath	4. 巻 7
2. 論文標題 Production and purification of mannan oligosaccharide with epithelial tight junction enhancing activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peer J	6. 最初と最後の頁 e7206 ~ e7206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.7206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nopvichai Chatchai, Pongkorpsakol Pawin, Wongkrasant Preedajit, Wangpaiboon Karan, Charoenwongpaiboon Thanapon, Ito Kazuo, Muanprasat Chatchai, Pichyangkura Rath	4. 巻 7
2. 論文標題 Galactomannan Pentasaccharide Produced from Copra Meal Enhances Tight Junction Integration of Epithelial Tissue through Activation of AMPK	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 81 ~ 81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines7040081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計32件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 倉内郁哉、大倉和貴、森 真司、米澤健人、清水伸隆、田中里佳、細川千絵、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 エンド- -N-アセチルグルコサミニダーゼHSの構造と機能発現
3. 学会等名 第23回関西グライコサイエンスフォーラム（於大阪）（2023年5月20日）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉内郁也、大倉和貴、森 真司、米澤健人、清水伸隆、田中里佳、細川千絵、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 エンド- -N-アセチルグルコサミニダーゼHSの立体構造とその機能発現
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（於福岡）（2023年10月31日～11月2日）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomofumi Takeuchi, Shinji Mori, Kazuki Okura, Methus Kuraeokura, Santhana Nakapong, Nobuo Kamiya, Ikuko Miyahara and Kazuo Ito
2. 発表標題 Structure and function of endo- -N-acetylglucosaminidase PM responsible for deglycosylation of host glycoproteins in <i>Prevotella melaninogenica</i>
3. 学会等名 30th FAOBMB&8thBMB Conference in Bangkok (November 22-23, 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉内郁也、大倉和貴、森 真司、米澤健人、清水伸隆、田中里佳、細川千絵、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 エンド- -N-アセチルグルコサミニダーゼHSの立体構造と機能発現機構
3. 学会等名 2024年日本農芸化学会大会（於東京）（2024年3月25～27日）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 倉内郁哉、大倉和貴、森 真司、米澤健人、清水伸隆、田中里佳、細川千絵、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 エンド- -N-アセチルグルコサミニダーゼHSの機能とドメイン構造
3. 学会等名 第22回関西グライコサイエンスフォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 財津真生、西村優伸、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella bivia(100)の産生するエンド- -N-アセチルグルコサミニダーゼ
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村優伸、財津真生、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella melaninogenica(99.0)の産生するエンド- -N-アセチルグルコサミニダーゼ
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 財津真生、西村優伸、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella bivia(100)の産生するエンド- -N-アセチルグルコサミニダーゼの性質
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村優伸、財津真生、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella melaninogenica(100)の産生するエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの性質
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉内郁也、大倉和貴、森 真司、米澤健人、清水伸隆、田中里佳、細川千絵、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼHSの立体構造とそのドメイン
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉内郁哉、大倉和貴、田中里佳、米澤健人、清水伸隆、細川千絵、伊藤和央、宮原郁子
2. 発表標題 エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼHS におけるドメインIV の役割
3. 学会等名 2022年度日本結晶学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉内郁也、大倉和貴、森 真司、米澤健人、清水伸隆、田中里佳、細川千絵、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼHSの立体構造と構成ドメイン
3. 学会等名 2023年日本農芸化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大倉和貴、森 真司、米澤健人、清水伸隆、神谷信夫、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella melaninogenicaの産生する宿主糖タンパク質糖鎖遊離酵素の立体構造
3. 学会等名 第21回関西グライコサイエンスフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋剛生、海住宜広、伊藤和央
2. 発表標題 担子菌の産生するアスパラギン結合型糖鎖遊離酵素のプロセッシングプロテアーゼ
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大倉和貴、森 真司、米澤健人、清水伸隆、神谷信夫、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella melaninogenicaの産生する宿主糖タンパク質糖鎖遊離酵素の立体構造
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉内郁哉、大倉和貴、田中里佳、細川千絵、伊藤和央、宮原郁子
2. 発表標題 エンド- $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ HSのX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会令和3年度年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉内郁哉、大倉和貴、田中里佳、細川千絵、伊藤和央、宮原郁子
2. 発表標題 エンド- <i>-N</i> -アセチルグルコサミニダーゼ HSのX線結晶構造解析
3. 学会等名 2021年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Prevotella melaninogenicaの産生するエンド- <i>-N</i> -アセチルグルコサミニダーゼPMの立体構造
2. 発表標題 大倉和貴、森 真司、米澤健人、清水伸隆、神谷信夫、宮原郁子、伊藤和央
3. 学会等名 2022年日本農芸化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大倉和貴、森 真司、神谷信夫、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella melaninogenicaの産生する宿主糖タンパク質糖鎖遊離酵素の高発現系の構築と立体構造の解析
3. 学会等名 第93回日生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大倉和貴、森 真司、伊藤和央、米澤健人、清水伸隆、神谷信夫、宮原郁子
2. 発表標題 Endo- <i>-N</i> -acetylglucosaminidase PM の立体構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会令和2年度年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大倉和貴、森真司、伊藤和央、米澤健人、清水伸隆、神谷信夫、宮原郁子
2. 発表標題 Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase PM の構造と機能
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ・つくば
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大倉和貴、森 真司、神谷信夫、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella melaninogenicaの産生する宿主糖タンパク質糖鎖遊離酵素の立体構造解析
3. 学会等名 2021年日本農芸化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 真司、大倉和貴、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella melaninogenicaの産生する宿主糖タンパク質糖鎖遊離酵素とその局在性
3. 学会等名 第20回関西グライコサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 真司、大倉和貴、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella melaninogenicaの産生する宿主糖タンパク質糖鎖遊離酵素とその局在性
3. 学会等名 第92回日生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 真司、大倉和貴、宮原郁子、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella melaninogenica由来の宿主糖タンパク質糖鎖遊離酵素
3. 学会等名 2020年日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内 朋史、高谷 尚弥、森 真司、伊藤 和央
2. 発表標題 Prevotella 属菌群における糖タンパク質糖鎖遊離酵素の特異性と宿主糖タンパク質糖鎖遊離・分解酵素系の存在
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 真司、竹内朋史、高谷尚弥、伊藤和央
2. 発表標題 Prevotella属菌群の産生する糖タンパク質糖鎖遊離酵素の特異性と宿主糖タンパク質糖鎖遊離・分解酵素系の存在
3. 学会等名 2019年日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jarunee Kaulpiboon, Prakarn Rudeekulthamrong, Kuakarun Krusong, Kamontip Kuttiyawong, Santhana Nakapong, Shuichiro Murakami, Kazuo Ito and Piamsook Pongsawasdi
2. 発表標題 Engineering and improvement of carbohydrate-modifying enzymes for synthesis of functional oligosaccharides
3. 学会等名 The Final Joint Seminar of CCP (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuo Ito, Piamsook Pongsawasdi, Jarunee Kaulpiboon, Kuakarun Krusong, Santhana Nakapong, Kamontip Kuttiyawong and Prakarn Rudeekulthamrong
2. 発表標題 Application of endoglycosidases responsible for the release of N-glycans from the glycoproteins in basidiomycetes and posttranslational processing of the enzymes by a novel protease,
3. 学会等名 The Final Joint Seminar of CCP (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kamontip Kuttiyawong, Santhana Nakapong, Kuakarun Krusong, Jarunee Kaulpiboon, Prakarn Rudeekulthamrong, Shuichiro Murakami, Kazuo Ito and Piamsook Pongsawasdi,
2. 発表標題 Preparation, characterization and release study of astaxanthin encapsulated-levan nanoparticles
3. 学会等名 The Final Joint Seminar of CCP (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Santhana Nakapong, Kamontip Kuttiyawong, Kazuo Ito and Piamsook Pongsawasdi
2. 発表標題 Molecular and Biochemical characterizations of Levanase from Bacillus amyloliquefaciens
3. 学会等名 The Final Joint Seminar of CCP (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Santhana Nakapong, Kamontip Kuttiyawong, Kazuo Ito and Piamsook Pongsawasdi
2. 発表標題 Molecular and Biochemical characterizations of Levanase from Bacillus amyloliquefaciens
3. 学会等名 The Final Joint Seminar of CCP (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宮原 郁子  (Miyahara Ikuko)  (40271176)	大阪公立大学・大学院理学研究科・准教授   (24402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
タイ	チュラロンコン大学理学部	ラムカンヘン大学理学部	カセサート大学教養学部