

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05792

研究課題名(和文) サブサイト認識阻害剤による新奇 β -N-アセチルグルコサミニダーゼの探索と性質精査研究課題名(英文) Exploration and characterization of novel β -N-acetylglucosaminidase using sub-site recognition inhibitors.

研究代表者

神崎 浩 (Kanzaki, Hiroshi)

岡山大学・環境生命科学学域・教授

研究者番号：60183787

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)：昆虫GlcNAcaseは我々が見いだした特異的な阻害剤TMG-chitotriomycinに加えてその類縁体PNP-TMGによっても阻害されるが、活性は1000倍ほど低かった。一方、PNP-GlcNAc資化性菌MK26株から精製したGlcNAcaseは昆虫GlcNAcaseと同様にTMG-chitotriomycin、PNP-TMGにより阻害されるが、その阻害活性は同程度であり、昆虫GlcNAcaseの阻害特異性と大きく異なっていた。さらに、MK26株は培養時間の違いにより分子量などの性質が異なるGlcNAcaseを生産するが、TMG化合物に対する阻害特異性は類似していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖質加水分解酵素は、同じファミリーに属していても、そのサブサイト構造の違いにより基質特異性が異なり、得られる生成物が異なることが知られている。その研究は主に、精製酵素の結晶構造解析で進められてきたが、我々が見出したサブサイト認識阻害剤を使うことで、サブサイト構造の異なる酵素の存在を明らかにすることが可能であることが明らかとなった。この阻害剤を用いた研究と、タンパク質立体構造解析研究とを組み合わせることで、より詳細な酵素活性中心の機能解明が可能になると推察される。

研究成果の概要(英文)：We found that insect GlcNAcase is inhibited by a specific inhibitor TMG-chitotriomycin as well as its analog PNP-TMG, but the inhibitory activity of PNP-TMG is about 1000-fold lower than that of TMG-chitotriomycin. On the other hand, GlcNAcase purified from PNP-GlcNAc-assimilating bacterium MK26 was inhibited to the same degree by TMG-chitotriomycin and PNP-TMG, indicating that inhibition specificity of MK26 GlcNAcase against TMG-compounds was significantly different from that of insect GlcNAcase. Although strain MK26 produces GlcNAcases with different molecular weights and other properties depending on the cultivation time, their inhibition specificity against TMG compounds did not alter with cultivation time.

研究分野：応用微生物学

キーワード： β -N-アセチルグルコサミニダーゼ TMG-chitotriomycin PNP-TMG β -GlcNAcase

1. 研究開始当初の背景

糖質加水分解酵素(GH)はアミノ酸配列の類似性に基づいてファミリー分類がなされている。しかし、同じGHファミリーに属しているにもかかわらず、基質特異性が異なる酵素が存在し、これはサブサイト構造の違いによるものと考えられている。我々は、GHの一種であり、昆虫ハスモンヨトウ蛹のキチン分解に関与する *N*-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase) に対する阻害剤の探索の過程で、TMG-chitotriomycin (Trimethylglucosaminium-(GlcNAc)₃)¹⁾ という化合物を放線菌の代謝産物中に見つけた。(図1は我々が天然から単離した化合物の機器分析データから推測して報告した構造ではなく、後に中国の研究グループ²⁾が合成により確定した構造を示している) さらに、同じ放線菌が生産する TMG-biomycin (TMG-(GlcNAc)₂)、TMG-monomycin (TMG-(GlcNAc)) の GlcNAcase 阻害活性は *N*-acetylglucosamine ユニットの数に応じて低くなる傾向があることを示してきた²⁾。また、異なる生物由来の GlcNAcase には TMG-chitotriomycin 感受性の酵素と非感受性酵素があることも明らかにし³⁾、GlcNAcase には、糖部分認識 Subsite (-1) が TMG 残基と親和性を有している酵素とそうでない酵素が存在すること、さらに、TMG-chitotriomycin 感受性酵素の場合、アグリコン認識 Subsite (+1 ~ +3) のすべてに阻害剤が結合するとより強力な阻害活性を示すことも示してきた。これまでに、同じ酵素反応を触媒する GlcNAcase の Subsite 構造の違いをこのように阻害剤で分類するという研究はほとんど行われていなかった。

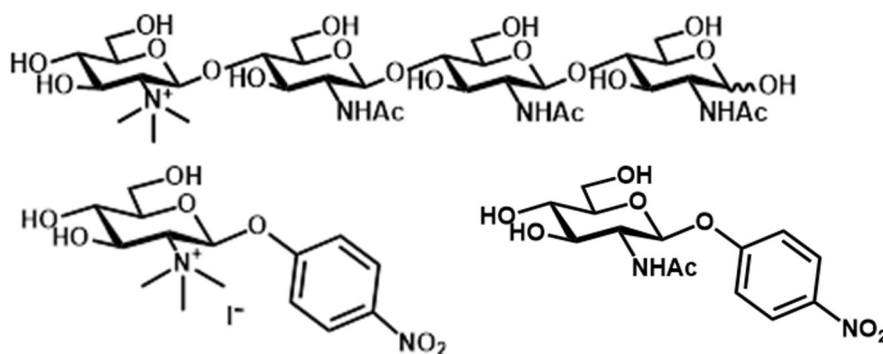


図1 TMG-chitotriomycin(上)PNP-TMG(下左)PNP-GlcNAc(下右)の構造式

2. 研究の目的

GlcNAcase は我々が見出した阻害剤 TMG-化合物によってその活性中心の Subsite 構造を分類することができるため、これまでに知られていない Subsite 構造を有する GlcNAcase の探索にも利用できると思われる。GlcNAcase の活性測定には人工基質 PNP-GlcNAc が用いられており、この化合物の資化性菌を取得して高い GlcNAcase 生産性を示す菌株を見つけ出し、その菌株が生産する GlcNAcase がこれまでの既存の生物種由来の GlcNAcase と同じ Subsite 構造を有するかどうかを、TMG-化合物に対する阻害感受性で判断することは、酵素の基質認識機構研究にとって大変有意義であると考えて、本研究を実施することにした。また TMG-monomycin のアナログとして PNP-TMG (図1) を合成し、ハスモンヨトウ蛹 GlcNAcase に対する阻害試験を行ったところ、TMG-monomycin と同程度の阻害活性を示すことがわかったため、本研究では、PNP-GlcNAc 資化性菌の GlcNAcase が TMG-thitotriomycin と PNP-TMG に対してどのような阻害感受性を示すかを明らかにし、GlcNAcase 類の Subsite 構造研究にあらたな知見を加えることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) PNP-TMG は(株)ナード研究所に依頼して合成した化合物を用い、TMG-chitotriomycin は我々の部屋で単離した化合物とコガネイ(株)に依頼して合成した化合物を用いた。その他の試薬類は市販品を用いた。
- (2) PNP-GlcNAc 資化性菌は PNP-GlcNAc を単一炭素源とする培地を作成し、各種の土壌などから、集積培養によって 26 株を分離した。
- (3) PNP-GlcNAc 資化性菌から GlcNAcase 高生産株を選抜するために、次の手順を採用した。まず、菌株の集積培養に用いた PNP-GlcNAc 培地と一般的な細菌の培養に用いられるピジョン培地の 2 種類の培地で菌株を培養し、PNP-GlcNAc 分解活性の高い菌株を休止菌体反応で選抜した。ピジョン培地を併用することで GlcNAcase を構成的に発現する菌株を選抜できると考え、この手法を選択した。
- (4) GlcNAcase 活性測定は PNP-GlcNAc を基質とし (最終濃度 0.5mM)、pH6.0 のリン酸緩衝液中で 37°C で 15 分間反応させ、生成した PNP をアルカリ条件下で比色定量して求めた。酵素 1 単位 (unit) は上記の標準反応条件で 1 分間に 1 μ mol の PNP を生成する酵素量と定義した。阻害率は、活性測定と同じ条件下で阻害剤を添加して反応をさせ、得られる PNP

量と、阻害剤を添加しない反応で得られる PNP 量との比較により計算した。また IC₅₀ 値 (50% 阻害濃度) はプロビット法で求めた。

- (5) ハスモンヨトウ蛹由来 GlcNAcase は、以前報告してきた方法に従って調製した¹⁾。PNP-GlcNAc 資化性菌から選抜した高活性株由来の GlcNAcase の精製は、ブイオン培地を用いたミニジャーファーメンター培養で得られた培養菌体を破碎し、得られた無細胞抽出液を、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、およびゲル濾過クロマトグラフィーの組み合わせで実施した。

4. 研究成果

- (1) pNP-GlcNAc 資化性菌の休止菌体反応による GlcNAcase 高活性株の選抜
集積培養法によって自然界から得た pNP-GlcNAc 資化性細菌 26 種類について、pNP-GlcNAc 含有培地とブイオン培地で GlcNAcase 生産性を確認した。菌体と同時に、培養濾液についても活性測定を行ったが、すべての菌株で活性は菌体内にのみ見られた。休止菌体を用いた活性測定結果について、培地 1 mL あたりの生産性を示す図 2 と湿菌体あたりの比活性を示す図 3 にまとめた。すべての資化性菌が 2 種類の培地で培養した際に活性を示し、今回単離した菌株はすべてブイオン培地中で構成的に GlcNAcase を発現していることが判明した。GlcNAc 培地ではブイオン培地と異なる性質の酵素を発現している可能性も別の実験で判明したが、本研究ではブイオン培地で生産される GlcNAcase に焦点を当てて実験を進めた。両方の培地で高い GlcNAcase を生産性と比活性 (湿菌体重量当たり) を示した No26 (MK-26) 株に注目し、その GlcNAcase について TMG-化合物による阻害感受性を調べることにした。
なお、本菌株は 16S rDNA の部分塩基配列解析により *Enterococcus* sp. MK26 と同定した。

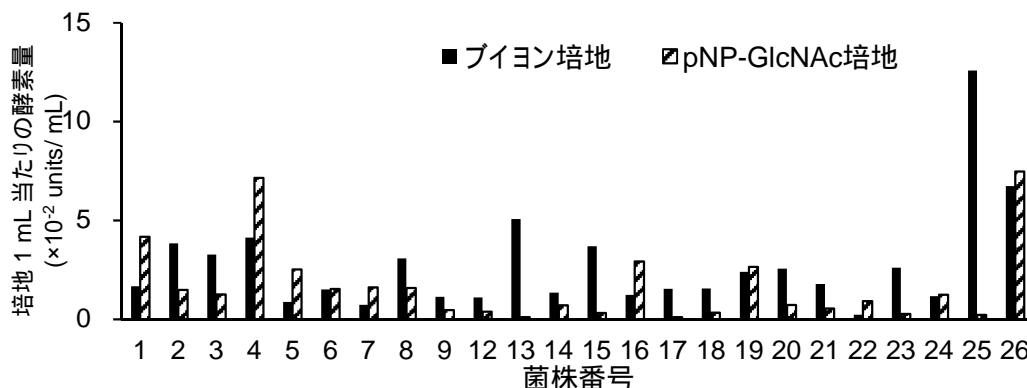


図 2 PNP-GlcNAc 資化性菌の培地 1mL 当たりの GlcNacase 量の比較

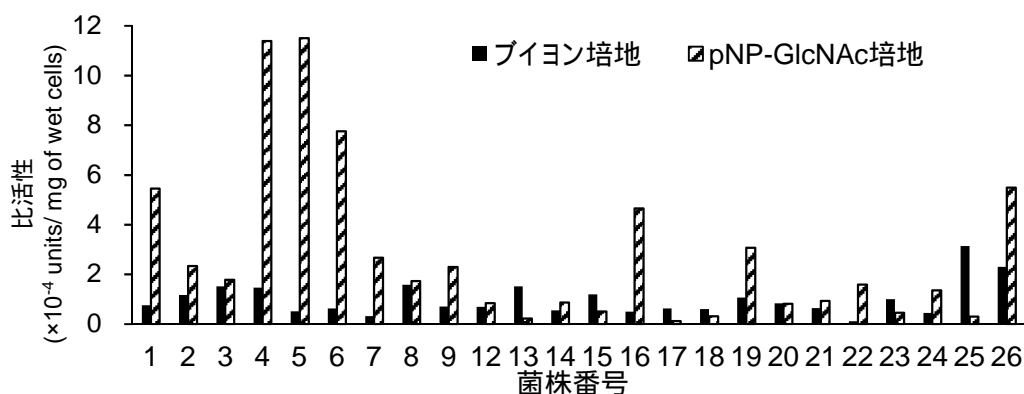


図 3 PNP-GlcNAc 資化性菌の菌体量あたりの GlcNacase 比活性の比較

- (2) 培養時間の異なる MK26 株菌体由来の酵素の調製
Enterococcus sp. MK26 株の GlcNAcase の TMG-化合物に対する阻害感受性を検討するにあたり、ブイオン培地で構成的に発現している GlcNAcase に焦点をあてることにしたが、高活性菌株の選抜の際に PNP-GlcNAc 培地での培養には 3 日間 (72 時間) の培養を行っていたこと、一方で一般の細菌をブイオン培地で培養する場合には 1 日程度が通常であることから、72 時間と 24 時間の 2 種の培養時間で培養した菌体からの酵素の精製を行った。

72 時間培養菌体からの酵素精製では、透析無細胞抽出液 → イオン交換クロマトグラフィー → ゲル濾過クロマトグラフィーの手順を採用し、一方 24 時間培養菌体からの酵素精製

は、透析無細胞抽出液 疎水性クロマトグラフィー 2 回目の疎水性クロマトグラフィーの手順を採用した。興味深いことに、24 時間培養菌体からの GlcNAcase は 72 時間培養菌体からの酵素と比較し、イオン交換クロマトグラフィーへの保持性質、ゲル濾過クロマトグラフィーにおける溶出位置（分子量）が異なっていた。これは、長時間の培養により酵素がプロセッシングを受けてタンパク質としての形状を変化したことを示唆している。このようにして、それぞれの菌体の酵素を無細胞抽出液から 100 倍程度精製することができ、24 時間培養菌体と 72 時間培養菌体からの GlcNAcase の比活性はそれぞれ 0.177, 0.550 units/mg であった。

- (3) 培養時間の異なる MK26 株菌体由来の酵素 MK-26 株の精製酵素の TMG-化合物（2 種）に対する阻害感受性

表 1 各種 GlcNAcase に対する TMG-chitotriomycin, PNP-TMG の阻害率

GlcNAcase の酵素源		pNP-TMG		TMG-chitotriomycin	
		IC ₅₀ (mM)	0.3 mM での阻害率(%)	IC ₅₀ (mM)	0.3 mM での阻害率(%)
<i>Enterococcus</i> sp. MK26	24h 培養	0.370	44.5	未決定	64.1
	72h 培養	0.109	77.3	0.289	51.1
ハスモンヨトウ蛹		0.411	41.7	0.000526	未測定

ハスモンヨトウ蛹由来の GlcNAcase と、今回の研究で新たに見出した PNP-GlcNAc 資化性菌由来の GlcNAcase 2 種に対する TMG-chitotriomycin と PNP-TMG の阻害率の結果を表 1 にまとめて示した。ハスモンヨトウ蛹由来 GlcNAcase は TMG-chitotriomycin に対して非常に高い感受性を示し（強く阻害され）、その感受性は、PNP-TMG の約 1000 倍も異なることがわかったことから、その構造を考慮すると、この GlcNAcase の触媒部位を構成する Substie +3 の認識によって阻害活性が説明されると推察される。

一方、今回新たに見出した *Enterococcus* sp MK26 株由来の酵素は、PNP-TMG と TMG-chitotriomycin に対してほぼ同じ阻害感受性を示し、その IC₅₀ は PNP-TMG のハスモンヨトウ蛹 GlcNAcase に対する値とほぼ同じレベルであったことから、*Enterococcus* sp MK26 株由来 GlcNAcase は、ハスモンヨトウ蛹由来 GlcNAcase と比べて、+Subsite 構造が大きく異なることが明らかとなった。

また、*Enterococcus* sp. MK26 株が培養時間を変更すると分子量などが変化する一方で TMG 化合物に対する阻害感受性は類似した GlcNAcase を生産するという興味深い事実も判明した。

我々はいくつか、GlcNAcase には、TMG-chitotriomycin で阻害を受ける TMG-chitotriomycin 感受性酵素と、阻害をほとんど受けない非感受性酵素があることを報告してきたが³⁾、本研究によって、TMG-chitotriomycin 感受性酵素の中に TMG-chitotriomycin と PNP-TMG という 2 種の阻害剤に対する阻害感受性の異なる GlcNAcase が存在することが判明し、その違いは GlcNAcase の Subsite 構造の違いを反映していると推測されることが明らかとなった。この Subsite 構造の違いにより GlcNAcase の基質特異性が異なると考えられ、その基質特異性の違いが生体における GlcNAcase の存在意義のさらなる解明につながることを期待される。

< 引用文献 >

1. Usuki Hirokazu; Nitoda Teruhiko; Ichikawa Misato; Yamaji Nahoko; Iwashita Takashi; Komura Hajime; Kanzaki Hiroshi, TMG-chitotriomycin, an enzyme inhibitor specific for insect and fungal β -N-acetylglucosaminidases, produced by actinomycete *Streptomyces anulatus* NBRC 13369, *J. Amer. Chem. Soc.* **130**, 4146-4152 (2008)
2. Yang, You; Li, Yao; Yu, Biao, Total Synthesis and Structural Revision of TMG-chitotriomycin, a Specific Inhibitor of Insect and Fungal β -N-Acetylglucosaminidases, *J. Amer. Chem. Soc.* **131**, 12076-12077 (2009)
3. Shiota Hiroto; Kanzaki Hiroshi; Hatanaka Tadashi; Nitoda Teruhiko, TMG-chitotriomycin as a probe for the prediction of substrate specificity of β -N-acetylhexosaminidases, *Carbohydr. Res.*, **375**, 29-34 (2013)
4. Usuki Hirokazu; Yamamoto Yukihiro; Kumagai Yuya; Nitoda Teruhiko; Kanzaki Hiroshi; Hatanaka Tadashi, MS/MS fragmentation-guided search of TMG-chitooligomycins and their structure-activity relationship in specific β -N-acetylglucosaminidase inhibition, *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 2943-2951 (2011)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小出麻奈, 菅沼笙子, 仁戸田照彦, 神崎 浩
2. 発表標題 N,N,N-trimethylglucosaminium残基を有する化合物に対するp-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide資化性菌由来 β -N-アセチルグルコサミニダーゼの感受性の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（福岡）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森岡京平, 小野はるか, 小出麻奈, 菅沼笙子, 仁戸田照彦, 神崎 浩
2. 発表標題 Enterococcus sp. MK26株由来 β -N-acetylglucosaminidaseの N,N,N-trimethyl- β -D-glucosaminium化合物に対する阻害感受性
3. 学会等名 おかもやまバイオアクティブ研究会 第61回シンポジウム
4. 発表年 2022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	仁戸田 照彦 (Nitoda Teruhiko) (80284090)	岡山大学・環境生命科学学域・教授 (15301)	
研究協力者	小出 麻奈 (Koide Mana)	岡山大学・環境生命科学学域・大学院学生 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小野 はるか (Ono Haruka)	岡山大学・農学部・学部学生 (15301)	
研究協力者	森岡 京平 (Morioka Kyohei)	岡山大学・環境生命科学研究科・大学院学生 (15301)	

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