

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16064

研究課題名(和文)O-マンノース型糖鎖の酵素合成と分解酵素探索

研究課題名(英文)Enzymatic synthesis and degradation of O-Mannose glycan

研究代表者

田上 貴祥 (Tagami, Takayoshi)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：70709849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋肉は収縮によって力を発生させる組織であり、動物を“動”物たらしめる重要な器官である。近年、筋細胞の膜タンパク質に結合した“O-マンノース型糖鎖”が筋細胞の安定化に必須であることが発見され、その生合成に関する酵素群が明らかになってきた。一方で、壊死した筋細胞のO-マンノース型糖がどのように分解されているかは未知であった。本研究ではO-マンノース型糖鎖の代謝経路の解明を最終目標として、研究の基盤となる「生合成酵素に依存しないO-マンノース型糖鎖の酵素合成法の確立」を目指し、既知の酵素の中に α -マンノシル基転移反応を触媒するものが多数存在することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素のもっとも大きな特徴として「基質特異性(特定の化合物にしか作用しない性質)」があげられる。本研究において我々が発見した「 α -マンノシル基転移反応を触媒する酵素」は、これまで「一般的な α -マンノシドには作用しない」と信じられてきた酵素群であった。本研究成果は、基質特異性に囚われない新たな酵素利用法の開発研究のきっかけとなるものであり、ひいては新たな機能性物質の生産などを通して社会に還元されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Muscle is a tissue that generates force through contraction and is an important organ in animals. Recently, it has been discovered that "O-mannose-type glycans" attached to membrane proteins of muscle cells are essential for muscle cell stabilization, and the enzymes involved in their biosynthesis have been clarified. On the other hand, how O-mannose-type glycans are degraded in necrotic myocytes was unknown. In this study, we aimed to establish an enzymatic synthesis method of O-mannose-type glycans independent of biosynthetic enzymes, with the ultimate goal of elucidating the metabolic pathway of O-mannose-type glycans, and found that there are many known enzymes that catalyze α -mannosyltransfer reaction.

研究分野：生化学

キーワード：糖質加水分解酵素 糖鎖 配糖体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋肉は収縮によって力を発生させる組織であり、動物を“動物”たらしめる重要な器官である。健全な筋組織では損傷を受けた筋細胞は活発な代謝によって分解再生され、筋肉は肥大していく。一方、筋ジストロフィー等の筋疾患では筋再生が壊死に追いつかず、筋肉の萎縮を引き起こす。筋細胞の再生は運動機能の維持を担う重要な代謝反応であり、特に壊死した筋細胞の除去は筋再生過程の起点となる重要なステップである。壊死筋細胞除去のメカニズム解明を目指した研究は活発に行われ、これまでに多くのタンパク質分解酵素の関与が明らかとなっている。筋細胞の分解機構を解明するうえでタンパク質分解酵素が標的とされてきた理由は、「筋細胞の中心的成分はタンパク質である」と信じられてきたためであろう。しかし近年、筋細胞の膜タンパク質に結合した“糖”が筋細胞の安定化に必須であることが発見された。特に、 α -ジストログリカンのセリンかトレオニンに α -マンノースが結合したコア構造を持つ糖(O-マンノース型糖鎖)が、ラミニン等の細胞外マトリクス成分と結合することで筋細胞を固持している。この発見が契機となり、O-マンノース型糖鎖生合成不全が筋疾患を引き起こすことが明らかとなった。本発見は「筋細胞の中心的成分はタンパク質と糖である」という新たな概念を確立したと同時に、「筋細胞の除去において糖がどのように分解除去されるのか」という新たな問いを生んだといえる。

ある種の先天性筋ジストロフィーの原因がO-マンノース型糖鎖の生合成不全であることが示唆されたのは2001年のことであり(Yoshidaら, *Dev. Cell* (2001)), それ以来O-マンノース型糖鎖の生合成酵素が相次いで同定されてきた(Manyaら, *PNAS* (2004); Kanagawaraら, *Cell* (2004); Inamoriら, *Science* (2012); Yoshida-Moriguchiら, *Science* (2013); Kanagawaraら, *Cell Rep.* (2016))。これらの研究論文はいずれもトップジャーナルに掲載されており、O-マンノース型糖鎖研究への注目度の高さがうかがえる。近年ではPOMGnTI(生合成酵素の1つ)のX線結晶構造(Kuwabaraら, *PNAS* (2016))も明らかになるなど、O-マンノース型糖鎖の生合成に関する研究は原子レベルでのメカニズム解明にまで及んでいた。一方、O-マンノース型糖鎖の分解に注目した研究は研究開始当初までに無く、本研究が先駆的な位置付けにあった。これまでにない着眼点であるため、筋細胞の分解再生機構に関する新たな知見を得るためのブレークスルーをもたらすと申請者は考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、筋再生における壊死筋細胞の分解機構の解明である。この核心をなす「筋細胞の除去において糖がどのように分解除去されるのか」という問いに答えるために、申請者は「O-マンノース型糖鎖のコア構造の合成技術開発」を基盤とした研究を提案した。これまでO-マンノース型糖鎖分解酵素の同定が滞っている根本的な原因として、基質(O-マンノース型糖鎖のコア構造(α -マンノシル-Ser/Thr))の合成法が確立されていない点が挙げられた。この基質を合成できる唯一の酵素は糖鎖生合成酵素であるが、当該酵素は膜タンパク質である。糖リン脂質を基質とするという点で*in vitro*での利用が困難であった。そこで、本研究では生合成酵素に依存しない α -マンノシル-Ser/Thrおよび誘導体の新規化学酵素合成法の確立を目指した。さらに、 α -マンノシル-Ser/Thrおよび誘導体を用いることでO-マンノース型糖鎖のコア構造分解酵素を同定・酵素学的な機能解析を行うとともに、壊死筋細胞除去における当該酵素の寄与を明らかにすることを目的とした。

これまでの筋生理に関する研究は、骨格筋タンパク質やタンパク質分解酵素、あるいは低分子ホルモンの動態に注目したものが主流であった。しかし本研究は「糖質分解酵素という新しい切口から筋細胞の代謝に迫る」という画期的なものであると考えた。O-マンノース型糖鎖が他の不要物と同様にリソソームで分解されている可能性があるが、それを証明した研究例はなかった。O-マンノース型糖鎖の機能(筋細胞固定)を考慮すると、細胞外での糖鎖分解が骨格筋のリモデリングにおける筋細胞間の解離を支配することが示唆されたし、O-マンノース型糖鎖の存在頻度を考慮すると、糖鎖分解が壊死筋細胞消化の律速段階となる可能性も考えられた。本研究はこれらの仮説を検証するものであり、「筋生理」と「糖質分解酵素」という一見離れた研究分野に橋を渡すことで新たな知見を広げるものであると考えた。

3. 研究の方法

NCBIなどのデータベースに登録されているタンパク質のうちで α -マンノシド結合を加水分解することが期待されるものをアミノ酸配列に基づいて選定し、それらをコードする遺伝子(微

生物由来および哺乳動物由来)を取得した。市販の生産系を用いてそれらの組換えタンパク質を調製し、 β -マンノシド合成反応に供した。受容体には糖質、アミノ酸 (Ser/Thr/Cys)、ペプチドなどを用い、反応生成物を薄層クロマトグラフィーや HPLC や質量分析などで検出した。生成物が単離精製できたものについては NMR による構造決定を実施した。いくつかの候補タンパク質についてはタンパク質の X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡単粒子解析を実施して立体構造を明らかにし、基質認識機構や触媒メカニズムに関する知見を得た。得られた立体構造情報や AlphaFold2 による予測構造、類縁タンパク質とのアミノ酸配列比較などに基づいて候補タンパク質に部位特異的変異を導入し、 α -マンノシド合成反応に利用可能な変異酵素の作出を目指した。

4. 研究成果

哺乳動物由来の α -マンノシド分解酵素による β -マンノシド合成の検討

哺乳動物由来の α -マンノシド分解酵素 4 種について組換え酵素の生産条件を検討し、うち 1 種についてのみ組換え酵素が得られた。本酵素に部位特異的変異を導入した酵素を用いて α -マンノシド合成反応を実施したが、 β -マンノシル Ser/Thr/Cys の合成には至らなかった。近縁酵素の立体構造解析の結果などから、糖供与体の改善が必要であることが示唆された。

α -マンノシド非分解酵素による β -マンノシド合成反応の検討

微生物および哺乳動物由来の糖質加水分解酵素で、一般的な α -マンノシドには作用しないと考えられていた 7 つの酵素のうち、3 つの酵素がある種の α -マンノシド供与体を基質とした場合に β -マンノシル基転移反応を触媒して β -マンノシドを合成することを発見した。いずれの酵素も特定の糖質を受容体とし数種類の β -マンノシルオリゴ糖を合成したが、 β -マンノシル Ser/Thr/Cys を合成することはできなかった。

これらの酵素の内の 1 つについて部位特異的変異を導入したところ、多様な化合物を受容体として許容でき、20 種類を超える新規の β -マンノシドを合成することを明らかにした。本酵素について、特許出願の準備を進めている。なお、本変異酵素であっても β -マンノシル Ser/Thr/Cys の合成には至らなかった。

放線菌 *Kribbella flavida* 由来の isomaltose glucohydrolase の触媒機構の解明

研究成果を鑑みて、 β -マンノシド合成反応を触媒する酵素を酵素本来の基質特異性にとらわれずに探索することとし、放線菌由来 isomaltose glucohydrolase に注目した。本酵素は α -グルコシドの 1 種であるイソマルトースに対して厳密な基質特異性を示す酵素であり、様々な反応条件を検討したが、 α -マンノシド合成には至らなかった。X 線結晶構造解析および各種変異酵素の機能解析に基づいて α -マンノシドの分解反応および合成反応を触媒しない理由を明らかにした。

本酵素と近縁酵素である glucoamylase は工業的なデンプンの糖化に用いられているが、グルコース高濃度下では逆反応によってオリゴ糖を生成してしまい、デンプン糖化反応の歩留まりを下げる原因となることが知られていた。我々は isomaltose glucohydrolase と glucoamylase の立体構造比較から逆反応の触媒効率に関与する重要なアミノ酸残基を明らかにし、糖質加水分解酵素による逆反応の抑制・促進に関する新たな分子基盤を確立した。本研究成果は FEBS Journal 誌で 2021 年 10 月 19 日にオンライン公開された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tagami Takayoshi, Chen Minghao, Furunaga Yuta, Kikuchi Asako, Sadahiro Juri, Lang Weeranuch, Okuyama Masayuki, Tanaka Yoshikazu, Iwasaki Tomohito, Yao Min, Kimura Atsuo	4. 巻 289
2. 論文標題 Structural insights reveal the second base catalyst of isomaltose glucohydrolase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1118 ~ 1134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16237	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井大河, 床波篤, 田上貴祥, 奥山正幸, 木村淳夫
2. 発表標題 -グルコシダーゼによる -マンノシル基転移反応の受容体特異性の解析
3. 学会等名 令和2年度日本応用糖質科学会北海道支部ポスターセッション
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前山和輝, 田上貴祥, 奥山正幸, 木村淳夫
2. 発表標題 -グルコシダーゼを用いた -マンノシルオリゴ糖の合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田上 貴祥, 古永 雄太, 奥山 正幸, 木村 淳夫
2. 発表標題 Isomaltose glucohydrolase に特徴的なPhe290の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪内 里花子, 田上 貴祥, 奥山 正幸, 木村 淳夫
2. 発表標題 新奇 -L-glucosidaseの機能および結晶構造の解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会令和3年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大江剛平, 奥山正幸, 田上貴祥, 木村淳夫
2. 発表標題 Bifidobacterium adolescentis由来 -ガラクトシダーゼの機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会令和3年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大江 剛平, 奥山 正幸, 田上 貴祥, 中川 雄登, 菊池 麻子, 木村 淳夫
2. 発表標題 Bifidobacterium adolescentis由来 -ガラクトシダーゼの基質特異性
3. 学会等名 令和3年度日本応用糖質科学会北海道支部講演会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------