

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570115

研究課題名（和文） ヘパロサン糖鎖生合成酵素複合体における連続した糖転移反応効率化メカニズムの解明

研究課題名（英文） Study on glucuronyltransferase activity of KfiA

研究代表者

角田 佳充（YOSHIMITSU KAKUTA）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00314360

研究成果の概要（和文）：

KfiA および KfiC について、大腸菌を用いたリコンビナント蛋白質の発現、精製に成功し、これら二つの酵素を使って試験管内において、ヘパロサン糖鎖を生合成することに成功した。さらに、KfiA と KfiC は複合体を形成して初めて糖鎖合成反応を進めることができる事実を明らかにした。また、変異体とトランケート体を使った実験により、KfiA と KfiC が相互作用する部位を限定することにも成功した。これらの結果は、複合体を形成することで、2つの異なる糖転移反応を高速かつ正確に交互に行う分子メカニズムの詳細を解明する上で、重要な知見が得られたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Heparan sulfate is a ubiquitous glycosaminoglycan in the extracellular matrix of most animals. It interacts with various molecules and exhibits important biological functions. K5 antigen produced by *Escherichia coli* strain K5 is a linear polysaccharide N-acetylheparosan consisting of GlcUA beta1-4 and GlcNAc alpha1-4 repeating disaccharide, which forms the backbone of heparan sulfate. Here, we expressed and purified the recombinant KfiA and KfiC proteins and then characterized these enzymes. Whereas the recombinant KfiC alone exhibited no GlcUA transferase activity, it did exhibit GlcUA transferase and polymerization activities in the presence of KfiA. In contrast, KfiA had GlcNAc transferase activity itself, which was unaffected by the presence of KfiC. The GlcNAc and GlcUA transferase activities were analyzed with various truncated and point mutants of KfiA and KfiC. The point mutants replacing aspartic acid of a DXD motif and lysine and glutamic acid of an ionic amino acid cluster, and the truncated mutants deleting the C-terminal and N-terminal sites, revealed the essential regions for GlcNAc and GlcUA transferase activity of KfiC and KfiA, respectively. The interaction of KfiC with KfiA is necessary for the GlcUA transferase activity of KfiC but not for the enzyme activity of KfiA. Together, these results indicate that the complex of KfiA and KfiC has polymerase activity to synthesize N-acetylheparosan, providing a useful tool toward bioengineering of defined heparan sulfate chains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：ヘパロサン、糖鎖生合成

1. 研究開始当初の背景

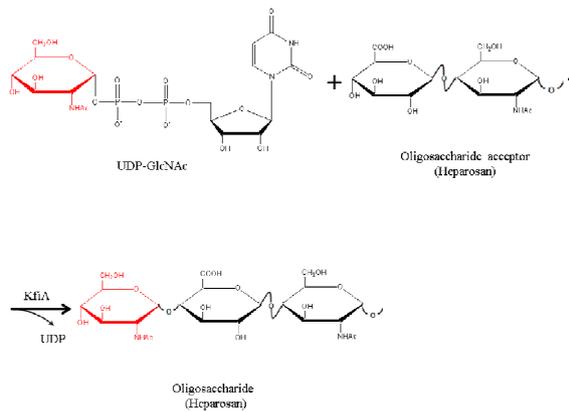
グリコサミノグリカンは、2種類の糖が交互に結合した高分子量糖鎖であり、正確に交互に糖転移反応が行われることで生合成される。ある種の細菌の細胞表面には、ヒトの持つグリコサミノグリカンと同じ構造を持った糖鎖が存在し、それらを合成する酵素の存在が報告されている。

大腸菌K5株は、その様な細菌の一つで、ヘパロサン糖鎖をその細胞表面に持っており、それを合成するのは、KifA、KfiCという2つの蛋白質の複合体であると報告されている。

2. 研究の目的

大腸菌K5株は、ヘパロサン糖鎖をその細胞表面に持っており、それを合成するのは、KifA、KfiCという2つの蛋白質の複合体である。

本研究は、この2つの蛋白質成分が複合体を形成することで、2つの異なる糖転移反応を高速かつ正確に交互に行うと報告されているヘパロサン糖鎖合成酵素複合体の詳細な反応メカニズムを明らかにすることである。この研究を通じて、細胞内で広く見られる連続的に起きる糖転移反応の蛋白質複合体形成による効率化メカニズムを解明することを目指している。



KfiA の酵素反応

KfiAとGT-A糖転移酵素GpgSの1次構造比較

```

KfiA -----MIVANSSYPRRKVE 15
GpgS MTASELVAGDLAAGRAPGALPLDTTWRPGWTI GELEAAKAGRTI SVVLPALNEEATIES 60
      * . . . . .

KfiA LVHSIQSLHAQWVKI NLCLN----EFEETPEELDGF SKLN----PVI PDKDYKDYGRFI 66
GpgS VIDSISPLVDGLVDELIVLDSGSTDDEIRAIASGARVYSRE GALPEVVRPGKGEALWR 120
      : : * . . . . . * : * : * . . .

KfiA FPCAKN-DMI VLV LDDI IYP-PDYVEKMLNFYNSFAIFNCIYGIHG-----CIYIDA 116
GpgS SLAATSGLI VYF I DSI LNPHPLFVPIVLGSLPLTGEGLQYKSFYRRLQVSDVTSGVCA 180
      . * . * : * . * * * * * : : : : :

KfiA FDGDSGRKRVKFSFTOGLLRPRVYVQLG--TGTVFLKADOLPSLKYMDSG----- 163
GpgS TGGGRV TELVARPLL AALRPELGGVLOPLSGEYAASRELLTSLPFAPGVGVEIGLLITDF 240
      . * . . * . * . * . * * * * * * * * * * *

KfiA -----GRFVDFVRFGRVWLENI GMICVPREKWLREVS SSGMEGLNITFTKMP-- 212
GpgS DRLGLDAIAQVNLGVBAHRNRPLEDLGMSRQVIATLLSRCGIPDSGGVLTQLFPGSPDQ 300
      * : * * * * * : * * * . . . . .

KfiA LDI IKETQA IAGYSKLNLELYVVEG 238 赤DxD モチーフ
GpgS SDYTRITW P VSLVDRPPMKVNRPR-- 324 CpgS: Mycobacterium tuberculosis 由来
      * : * . . . . . glucosyl-3-phosphoglycerate synthase
    
```

### 3. 研究の方法

活性のある2種類の酵素 KfiA と KfiC をリコンビナント蛋白質を大量に発現、精製する方法を確立し、その機能解析を行う。

KfiA はN末端に His-tag を融合させて、シャペロンと同時に発現させることで、可溶性で活性のある蛋白質を得ることを試みた。

KfiC は、N末端にトリガーファクターを融合させた状態で、低温で発現させることで、可溶性蛋白質として得ることを試みた。

### 4. 研究成果

KfiA および KfiC について、大腸菌を用いたリコンビナント蛋白質の発現、精製に成功した。

KfiA について、糖転移反応の金属イオン要求性を調べたところ、マンガンイオンを加えた場合に、高い活性が得られた。また、鉄イオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンの種々の金属イオンを加えた場合にも、マンガンイオンよりは低い、明らかに糖転移活性が観測された。

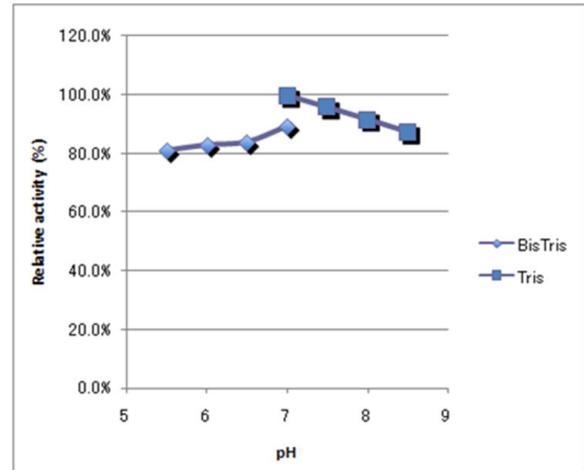
KfiA について、さらに酵素活性の最適 pH を測定したところ、中性付近において最大活性が得られた。

KfiC については、単独では、上のあらゆる条件において、糖転移活性は観測されなかった。

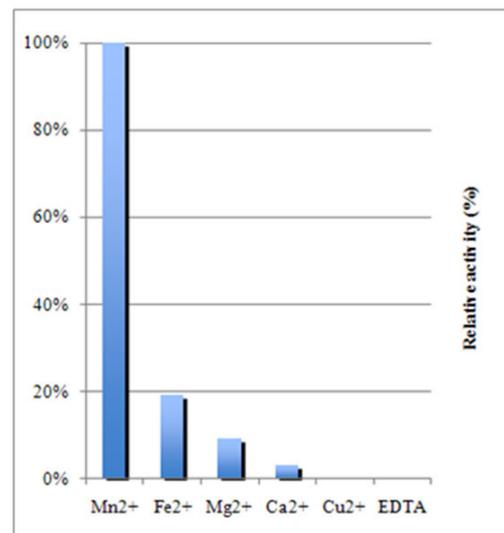
KfiA は、驚いたことに、KfiA が存在している時のみ、糖転移活性が観測された。

これら二つの酵素を使って試験管内において、ヘパロサン糖鎖を生合成することに成功した。さらに、KfiA と KfiC は複合体を形成して初めて糖鎖合成反応を進めることができる事実を明らかにした。また、変異体とトランケート体を使った実験により、KfiA と KfiC が相互作用する部位を限定することにも成功した。これらの結果は、複合体を形成することで、2つの異なる糖転移反応を高速かつ正確に交互に行う分子メカニズムの詳細を解明する上で、重要な知見が得られたと考えられる

<最適 pH>



<金属イオン選択性>



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Glucuronyltransferase activity of KfiC from *Escherichia coli* strain K5 requires association of KfiA: KfiC and KfiA are essential enzymes for production of K5 polysaccharide, N-acetylheparosan., Sugiura N, Baba Y, Kawaguchi Y, Iwatani T, Suzuki K, Kusakabe T, Yamagishi K, Kimata K, Kakuta Y, Watanabe H., *J Biol Chem.*,285(3):1597-1606. ,2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田佳充 (KAKUTA YOSHIMITSU)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：00314360