

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570132

研究課題名(和文)糖鎖に作用する機能未知グリコシダーゼの構造解析とオリゴ糖創出への応用

研究課題名(英文)Structural analysis of uncharacterized enzymes acting on glycans and its application to the production of oligosaccharides

研究代表者

殿塚 隆史 (Tonozuka, Takashi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50285194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、真核生物の糖鎖に作用する酵素であるプロセッシング- $\alpha$ -グルコシダーゼおよびと相同性を有する細菌由来の機能未知酵素を材料とした。大腸菌由来酵素YgjKについて、グリコシターゼ化という手法を用いて糖を生成させることに成功し、Glc- $\alpha$ -1,2-Galという糖が生成したことから、このような構造を含む糖が基質であると考えられた。また、他にThermus属等由来の酵素についての研究を行った。本研究によって、糖質に作用する酵素のうち基質を入手することができないものについて、立体構造解析とグリコシターゼ化の組み合わせにより、その基質を同定できることが示された。

研究成果の概要(英文)：This study focuses on bacterial enzymes homologous to processing  $\alpha$ -glucosidase s I and II, both of which hydrolyze eukaryotic glycans. An enzyme from *E. coli*, YgjK, was successfully converted into a glycosynthase, and the enzyme efficiently produced Glc- $\alpha$ -1,2-Gal. The result suggests that the natural substrates of YgjK are likely to be sugars containing the Glc- $\alpha$ -1,2-Gal structure. We also studied related enzymes from *Thermus* and other bacterial species. This study shows that a combination of protein crystallography and glycosynthase reaction allows us to determine the natural substrates of carbohydrate-active enzymes, even if the substrates are not commercially available.

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：酵素 糖 糖質加水分解酵素 グリコシターゼ 糖タンパク質糖鎖 X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム解析技術の発展により、多くの生物の全ゲノム配列が明らかとなった。しかしながら、ゲノム解析から判明した遺伝子のうちの多くはその産物の機能が不明である。また、酵素には互いに配列相溶性が高いもの同士でも、基質特異性などの性質がかなり異なる場合も多く、配列の相溶性より機能既知と予測されている遺伝子産物においても実際は今までに知られていない機能を有しているものが多数存在すると考えられる。このような機能未知タンパク質の中から有用なものを見つけ出すことができれば、新たな物質生産技術につながると考えられる。本研究では、N結合型糖鎖に作用する酵素と相溶性を有する細菌由来の酵素に着目して研究を行った。

真核生物において、タンパク質へのN結合型糖鎖の付加およびそれに続く糖鎖プロセシングの過程は、酵母からヒトに至るまで見られることから、真核生物にとって最も基本的な生命現象であると言える。タンパク質のN結合型糖鎖の付加の過程の概要は以下の(1)~(3)のとおりである。

(1) 糖鎖の生合成：小胞体の膜に結合した脂質上で、N-アセチルグルコサミン（以下GlcNAc）が2つ、マンノース（以下Man）が9つ、グルコース（以下Glc）が3つつながった、 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ という糖鎖が生合成される。

(2) 糖鎖の転移： $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ という糖鎖は、タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、「アスパラギン-X-セリンまたはスレオニン（Xはプロリン以外の残基）」という特定の配列のアスパラギン残基に転移する。

(3) 糖鎖のプロセシング：転移した糖鎖に対し、さまざまな酵素により糖鎖の刈り込みや別の糖の付加が起こる。

本研究は以上の過程のうち、特に(3)の段階の初めに働く、プロセシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ I およびプロセシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ II に着目した。プロセシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ I は  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  の末端のグルコース残基を刈り取り  $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  を生成させる酵素で、プロセシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ II は  $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  の2つのグルコース残基を刈り取り  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  を生成させる酵素である（図1）。

近年のゲノム研究の進展により、細菌は真核生物型のN結合型糖鎖がタンパク質には付加しないにも関わらず、真核生物のプロセシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ I、プロセシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ II と相溶性を有するタンパク質の遺伝子が存在することが判明した。これらの酵素は、これまでに知られていない

基質特異性を有する酵素であると考えられるため、本研究を開始した。

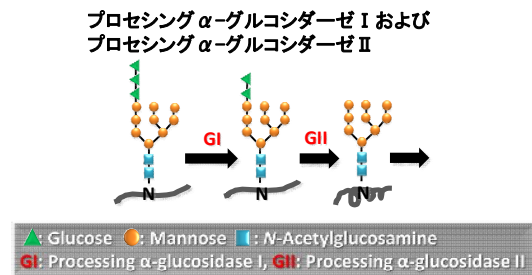


図1 プロセシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ I およびプロセシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ II の基質特異性

## 2. 研究の目的

糖質に作用する酵素を構造から分類したデータベース CAZy においては、プロセシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ I は糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 63、プロセシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ II は GH31 に分類される。本研究に先がけ、我々のグループでは GH63 に属する酵素である大腸菌 YgjK（以下 YgjK）の立体構造解析に成功しており、これは GH63 において世界で初めての報告である。しかしながら、単糖との複合体の立体構造解析の結果、活性中心にグルコース、マンノース、ガラクトースとさまざまな糖が結合することが判明し、本酵素の基質特異性を明確に決定することはできなかった。

近年、糖質加水分解酵素のグリコシターゼ化法が報告された。これは、触媒残基に変異を導入した酵素を作製し、水酸基をフッ素で置換した糖（以下フッ化糖）に作用させると、加水分解の逆反応に類似したグリコシターゼ反応が起き、糖が生成するというものである。本研究では、立体構造解析と  $\beta$ -D-glucosyl fluoride（以下フッ化グルコース）を基質としたグリコシターゼ化を組み合わせることで、機能未知酵素 YgjK の基質特異性の同定を行うことを考えた。

また、細菌由来の GH63 および GH31 に属する酵素は、YgjK の他にも多数存在する。本研究では、細菌の GH63 および GH31 の包括的な理解のため、*Thermus thermophilus* HB8 由来 GH63 機能未知酵素、*Pedobacter heparinus* 由来 GH31 機能未知酵素、また、GH27 でありながら GH31 との相溶性が高いことが報告されている *Arthrobacter globiformis* T6 由来イソマルトデキストラナーゼを材料に、構造と性質の解析を行った

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子工学

酵素の生産は大腸菌を宿主発現系として用い、大腸菌の培養、プラスミドの抽出、DNA

の制限酵素による切断、DNA のライゲーションおよび構築したプラスミドの大腸菌への導入は、一般的に行われている遺伝子工学の方法によった。DNA への変異の導入は、サーマルサイクラーを用いた PCR 法によって行い、DNA シーケンサーを用いて変異が導入されていることを確認した。 *Thermus thermophilus* HB8 由来の酵素である Tt8GMGH の大腸菌発現ベクターは、理研バイオリソースセンターより入手した。

## (2) 粗酵素液の調製と酵素の精製

構築した発現ベクターを導入した大腸菌は、LB (Luria-Bertani) 培地を用い振盪培養を行った。菌体は超音波破碎機で破碎し、遠心して上清を回収し粗酵素液とした。酵素の精製は、Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーなど、各種クロマトグラフィーによって行った。

## (3) 酵素の立体構造解析

酵素は限外濾過により、10~20 mg/mL 程度に濃縮し、結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法によった。プレートは 20°C の恒温器に静置し、顕微鏡によって結晶が得られたか観察を行った。得られた結晶は、高エネルギー加速器研究機構シンクロトロン放射光施設において、X線回折のデータ収集を行った。データの解析は、ソフトウェアとして CCP4 と COOT を用い、立体構造を決定した。

## (4) 酵素反応の解析

フッ化グルコースは、グルコースを無水酢酸でアセチル化した後、フッ化銀を反応させることによって調製した。使用直前にナトリウムメトキシドで脱保護し反応に用いた。酵素反応の検出はシリカゲルプレートを用いた薄層クロマトグラフィーによった。

# 4. 研究成果

## (1) GH63 に属する酵素である YgjK のグリコシターゼ化による基質の同定

機能未知酵素である YgjK の基質を同定するため、本酵素のグリコシターゼ化を行った。GH63 はアノマー反転型と称する反応機構であることが判明している。本機構は、触媒残基として一般酸触媒として働くアミノ酸残基と、一般塩基触媒として働くアミノ酸残基の組み合わせによることが知られている。アノマー反転型糖質加水分解酵素においては、一般塩基触媒に変異を導入し基質としてフッ化糖を用いることで、グリコシターゼ反応が起きることが報告されている。本研究では、YgjK の一般塩基触媒である Glu727 を Ala に置換した変異酵素 E727A を構築し、フッ化グルコースとさまざまな糖の混合物に対する酵素反応を、薄層クロマトグラフィー

を用いて検出した。YgjK はプロセッシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ I と相同性を有する酵素のため、当初フッ化グルコースとグルコースとの混合物を基質とした場合、最も多くの生成物が得られることを期待していたが、意外なことに実際は、フッ化グルコースとガラクトースの混合物を基質とした場合、最も多くの生成物が得られることが分かった (図 2)。

## E727A のグリコシターゼ反応

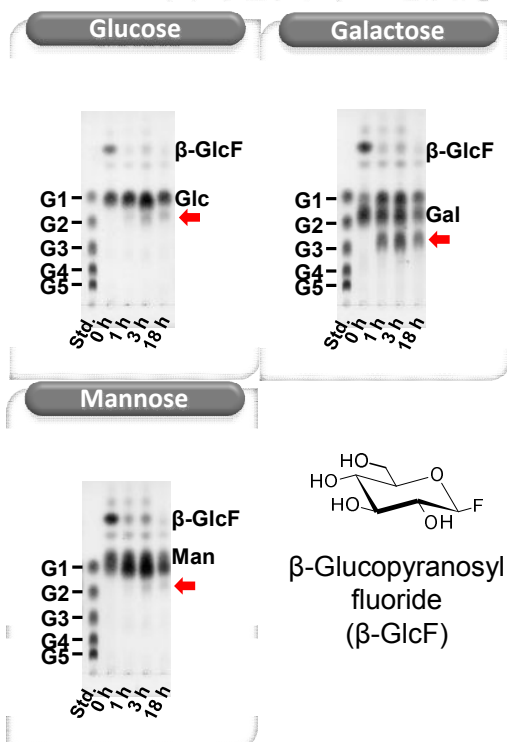


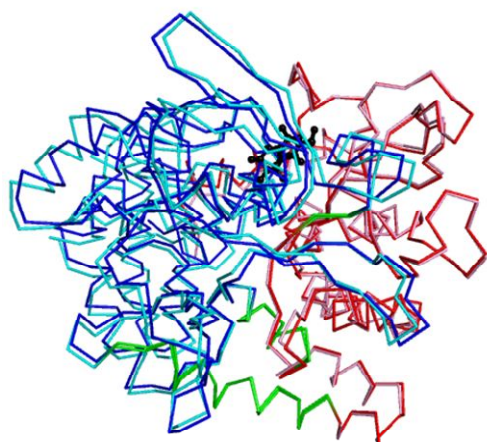
図 2 YgjK E727A 変異酵素のグリコシターゼ反応

フッ化グルコースとガラクトースの混合物を基質としたときに生成する糖について同定を行った。生成物を薄層クロマトグラフィーで分離した後に抽出し、<sup>1</sup>H-NMR を行ったところグルコースとガラクトースが  $\alpha$ -1,2-結合でつながった Glc- $\alpha$ -1,2-Gal (以下 Glc12Gal) であることが分かった。Glc12Gal はコラーゲンに付加している糖として報告されている。得られた糖である Glc12Gal と E727A との複合体の結晶を作製し、X線結晶構造解析を行った。YgjK は、 $\beta$ -サンドイッチより成るドメイン N、( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> バレルより成るドメイン A、およびドメイン N とドメイン A をつなぐ  $\alpha$ -ヘリックスより成るリンカーによって構成される。E727A-Glc12Gal 複合体の立体構造を野生型酵素の立体構造と比較したところ、Glc12Gal と結合することにより触媒ドメインであるドメイン A の構造が大きく変化しており、言わばオープン型からクローズ型に構造変化を起こすことが分かった (図 3)。以上のことから YgjK は Glc12Gal 単位を認識し、induced-fit する加水分解酵素であることが示唆された。このような触媒ドメインの大き



な構造変化は、類似する構造を有するグルコアミラーゼやトレハラーゼも含めた中で、初めての報告である。

## 触媒ドメインの構造変化



### Module-1

WT (unliganded) (pink)  
E727A-Glc12Gal (red)

### Module-2

WT (unliganded) (cyan)  
E727A-Glc12Gal (blue)

Bending region (green)

図 3 YgjK のドメイン A の構造変化

(2) GH63 に属する *Thermus thermophilus* HB8 由来酵素の糖との複合体の立体構造解析

*Thermus thermophilus* HB8 は超好熱性細菌として有名であり、全ゲノム解析がなされている。本菌は、GH63 に属する酵素の遺伝子を有しており、立体構造 (PDB 2Z07) も知られているが機能は不明であった。我々は GH63 に属する酵素の構造と機能を比較する目的で、本酵素の研究を行った。我々が本研究を行っている途中、2013 年に同じ *Thermus thermophilus* の異なる株である HB27 を研究しているグループより、本酵素と同一性を有する酵素がグルコシルグリセリン酸およびマンノシルグリセリン酸の両方を分解する酵素であると報告された。*T. thermophilus* HB8 由来酵素は HB27 由来酵素と N 末端側を除くと 3 アミノ酸残基しか違いがないことから同様の活性を有すると考えられ、本報告では Tt8GMGH と記載する。Tt8GMGH とグルコースおよびグリセリン酸との複合体の立体構造を解析した。Tt8GMGH は、 $(\alpha/\alpha)_6$  バレルの触媒ドメインおよび本ドメインの途中から延びる長大なループから成っている。 $(\alpha/\alpha)_6$  バレルは、YgjK の触媒ドメインと類似した構造である

(図 4)。

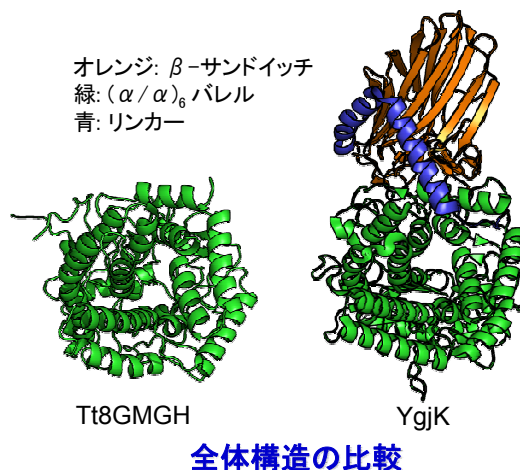


図 4 Tt8GMGH と YgjK の全体構造

一方、長大なループは、リガンドが存在しない時とグルコースおよびグリセリン酸との複合体とは、全く異なる構造をとっていることが判明した (図 5)。

リガンド結合時にループ構造が大きく変化していた。

Y28, Y81, R198: リガンドと水素結合形成  
K191, H192: 基質結合部位から外れていた。

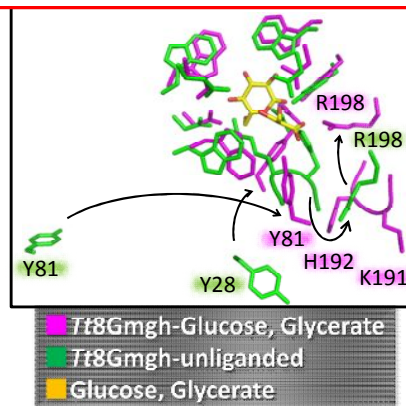


図 5 Tt8GMGH の構造変化

(3) GH31 に属する酵素および関連酵素の解析

細菌 *Pedobacter heparinus* は、ヘパリンリアーゼやコンドロイチンリアーゼなど、糖鎖を分解する多数の有用酵素を生産することから、本菌より糖鎖に作用するこれまでに知られていない有用酵素を取得することが期待される。本研究では、*Pedobacter heparinus* 由来 GH31 酵素の研究を行った。酵素遺伝子を PCR 法で増幅し、pET28 ベクターに組み込むことにより大腸菌による発現系を構築した。酵素は、Ni-NTA カラムにより電気泳動で均一になるまで精製することができた (図 6)。

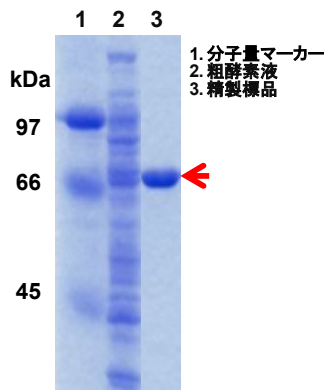


図 6 *P. heparinus* 由来 GH31 酵素の精製

GH31 に属する酵素の構造と機能を比較する目的で、細菌 *Arthrobacter globiformis* T6 由来イソマルトデキストラナーゼ (IMD) の立体構造を決定した。IMD は GH27 に分類されているものの、GH27 に属する主要な酵素である  $\alpha$ -ガラクトシダーゼとは相同性が低く、GH31 との相同性が  $\alpha$ -ガラクトシダーゼとほぼ同程度であるという、特徴的な酵素である。IMD は、触媒ドメインであり ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> バレルより成るドメイン A、 $\beta$ -シートより構成されるドメイン C、 $\beta$ -サンドイッチより構成されるドメイン D より構成され、ドメイン A には、フォールドの途中に挿入されているサブドメイン B が存在する。興味深いことにこのサブドメイン B は GH27 の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼには存在しておらず、GH31 の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼに存在するサブドメイン B と類似したフォールドをとることが分かった (図 7)。

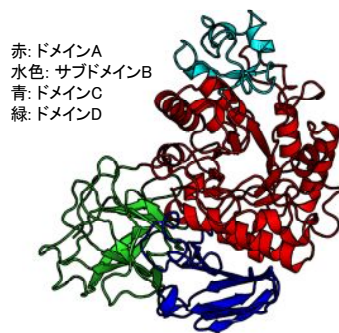


図 7 IMD の立体構造

#### (4) 総括

本研究で最も特筆すべきことは、基質未知であった酵素の基質を同定することに成功したことである。糖質に作用する機能未知酵素については、本研究における YgjK の解析のように、立体構造解析とグリコシターゼ化を組み合わせるにより、基質を入手することができないような酵素について、その基質を同定することができると考えられる。

本研究によって、YgjK はコラーゲンに付加している糖鎖に作用していると考えられた。今後の課題として、実際にコラーゲンに

付加している糖鎖に作用するか検証することがあげられる。

GH31 に属する細菌由来の酵素については、本研究で構造と機能の多様性の一端を示すことができた。今後、立体構造解析やグリコシターゼ化によって、GH63 の酵素同様、その基質や詳細な性質を明らかにできると考えられる。

YgjK および Tt8GMGH の立体構造解析から、GH63 に属する酵素は酵素反応において大きな構造変化を伴うことが判明した。プロセシング  $\alpha$ -グルコシダーゼ I は、N 結合型糖鎖の特定のグリコシド結合を分解する基質特異性の高い酵素であり、基質の部分的な構造を有するコージビオースという糖は、分解しないことが判明している。また、*T. thermophilus* HB27 由来グルコシル/マンノシルグリニンセリン酸分解酵素は、その基質特異性はグルコシル/マンノシルグリニンセリン酸に特異的であるという報告がなされている。このように GH63 は、基質特異性の高い酵素であると言えるが、GH63 の大きな構造変化によって、このような高い基質特異性が実現している可能性が考えられる。

#### 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 4 件)

① Miyazaki, T., Ichikawa, M., Yokoi, G., Kitaoka, M., Mori, H., Kitano, Y., Nishikawa, A. and Tonozuka, T., Structure of a bacterial glycoside hydrolase family 63 enzyme in complex with its glycosynthase product, and insights into the substrate specificity. *FEBS J.*, 280, 4560-4571 (2013). 査読有 DOI: 10.1111/febs.12424

② 宮崎剛亜、西河淳、殿塚隆史 「GH63 に属するグルコシダーゼの構造と基質特異性に関する新しい知見」*応用糖質科学*, 3, 151-158 (2013). 査読有 <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009625721>

③ Miyazaki, T., Matsumoto, Y., Matsuda, K., Kurakata, Y., Matsuo, I., Ito, Y., Nishikawa, A. and Tonozuka, T., Heterologous expression and characterization of processing  $\alpha$ -glucosidase I from *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642. *Glycoconj. J.*, 28, 563-571 (2011). 査読有 DOI: 10.1007/s10719-011-9356-z

(他に査読有論文 1 件)

[学会発表] (計 12 件)

① *Arthrobacter globiformis* T-6 由来イソマルトデキストラナーゼとパノースとの複合体の立体構造解析  
岡沢唯香、宮崎剛亜、西河淳、殿塚隆史  
日本農芸化学会、2014 年 3 月 28 日、川崎 (明治大学生田キャンパス)

② *Arthrobacter globiformis* T-6 由来イソマルトデキストラナーゼの糖結合モジュール CBM35 の構造解析  
岡沢唯香、横井岳、宮崎剛亜、西河淳、殿塚隆史  
物構研サイエンスフェスタ、2014 年 3 月 18 日、つくば (つくば国際会議場)

③ *Arthrobacter globiformis* T-6 由来イソマルトデキストラナーゼの X 線結晶構造解析  
岡沢唯香、横井岳、宮崎剛亜、西河淳、殿塚隆史  
日本応用糖質科学会、2013 年 9 月 25 日、鹿児島 (鹿児島大学郡元キャンパス)

④ *Thermus thermophilus* HB8 由来グルコシル/マンノシルグリセリン酸分解酵素とリガンドとの複合体の構造解析  
市川めぐみ、宮崎剛亜、吉田裕美、神鳥成弘、西河淳、殿塚隆史  
日本生化学会、2013 年 9 月 12 日、横浜 (パシフィコ横浜)

⑤ Conformational changes and substrate recognition of an uncharacterized glycosidase YgJK belonging to GH63 from *Escherichia coli*  
Takatsugu Miyazaki, Mugumi Ichikawa, Haruhide Mori, Motomitsu Kitaoka, Yoshikazu Kitano, Atsushi Nishikawa, and Takashi Tonozuka  
Miyazaki, T., Ichikawa, M., Mori, H., Kitaoka, M., Kitano, Y., Nishikawa, A. and Tonozuka, T.  
10th Carbohydrate Bioengineering Meeting, April 21-24, 2013, Prague, Czech Republic

⑥ GH63 に属する大腸菌由来機能未知酵素 YgJK のコンフォメーション変化  
宮崎剛亜、市川めぐみ、盛まりな、北岡本光、森春英、北野克和、西河淳、殿塚隆史  
日本農芸化学会、2013 年 3 月 25 日、仙台 (東北大学川内北キャンパス)

⑦ GH63 に属するグルコシダーゼの構造と基質特異性に関する新しい知見  
宮崎剛亜、西河淳、殿塚隆史  
日本応用糖質科学会シンポジウム、2012 年 9 月 21 日、東京 (東京農工大学府中キャンパス)

⑧ GH ファミリー63 に属する酵素 YgJK と糖

転移反応で生じた二糖との複合体構造解析  
宮崎剛亜、倉方悠馬、市川めぐみ、松田佳奈、西河淳、殿塚隆史  
第 29 回 PF シンポジウム、2012 年 3 月 15 日、つくば (つくば国際会議場)

⑨ Glycoside Hydrolase Family 63 に属する酵素 YgJK のグライコシターゼ化  
宮崎剛亜、松田佳奈、森春英、北岡本光、北野克和、西河淳、殿塚隆史  
日本応用糖質科学会、2011 年 9 月 28 日、札幌 (北海道大学)

(他 3 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

殿塚 隆史 (TONOZUKA TAKASHI)  
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：5 0 2 8 5 1 9 4

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者

西河 淳 (NISHIKAWA ATSUSHI)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：3 0 2 1 8 1 2 7