

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440029

研究課題名(和文)グリコサミノグリカン糖鎖伸長反応メカニズムの解明

研究課題名(英文)Study of biosynthesis mechanism of glycosaminoglycan

研究代表者

角田 佳充 (Kakuta, Yoshimitsu)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00314360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：グリコサミノグリカンは、2種類の糖が交互に結合した直鎖状の糖鎖であり、ヒトにおいては、様々な重要な役割を果たしている。細菌由来で安定で高反応性のグリコサミノグリカン合成酵素がいくつか報告されている。これらの酵素は、2種類の糖が正確に交互に連続的糖転移反応をすることで、糖鎖を効率よく合成することができる。しかし、これらの反応メカニズムは、未だ不明なことが多い。これらの酵素の中でも、特に有用性が高いヒアルロン酸糖鎖合成酵素について、X線結晶構造解析により、立体構造を決定し、酵素反応メカニズムを明らかにした。本成果は、広くグリコサミノグリカン糖鎖の合成機構の解明に大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Microbial polysaccharides are structurally identical or very similar to mammalian GAGs. To know about biosynthesis mechanism of glycosaminoglycan, we have determined the X-ray crystal structure of the enzyme. We bacterially expressed, purified and crystallized. The X-ray crystal structure of the enzyme has now been determined. We reported the structural features of the bi-functional enzyme and have discussed their implications in understanding the catalytic mechanism.

研究分野：構造生物学

キーワード：結晶構造解析 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直鎖状の糖鎖であり、ヒトにおいては、細胞間の情報伝達や、クッションとしての役割を果たしている。医薬品、健康食品として、すでに広く産業的にも利用されている。しかし、現在利用されている製品は、ほぼ生体材料由来のもので、毒性物質の混入などの問題、環境への配慮などの観点からも、酵素を使った、安全で安定的なグリコサミノグリカン糖鎖の合成方法が模索されている。

グリコサミノグリカン糖鎖の生合成酵素の研究は、ヒトの酵素を中心に、これまでに複数の酵素のクローニングが報告され、その生化学的な性質等の研究が進められている。しかし、その立体構造解析を含めた詳細な酵素反応メカニズム、それもグリコサミノグリカン糖鎖の特徴である交互に正確に繰り返す酵素反応メカニズムについては、未だ不明な点が多い。

そのような状況の中、いくつかの種の細菌がヒトのグリコサミノグリカンと類似構造の糖鎖を持つことから、細菌の酵素が持つ安定で高反応性のグリコサミノグリカン合成酵素がいくつか報告されてきている。

我々は、この種の酵素として初めての結晶構造として、バクテリアの持つコンドロイチン糖鎖合成酵素の結晶構造を報告し、物理化学的な解析も進めている。また、ヘパロサン糖鎖生合成酵素については、ヘパロサン糖鎖生合成酵素の酵素反応機構の一端を明らかにして報告している。しかし、グリコサミノグリカンの糖鎖伸長反応を触媒する酵素の一般的なメカニズムについては、未だ明らかにされていない。



コンドロイチン合成酵素の結晶構造

### 2. 研究の目的

ヒアルロン酸はすべての脊椎動物からバクテリアまで、幅広い生物種に存在している。関節液や皮膚、細菌の夾膜を構成する成分であることが知られており、細胞の形態維持や細胞接着など生体において重要な役割を担っている。ヒアルロン酸は N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とグルクロン酸 (GlcUA) が交互に結合した糖鎖である。分子量 100 万を超える極めて高分子量の構造を持ち、その保水性や粘性から、関節炎など病気の治療や化粧品の保湿成分などに広く用いられている。ヒアルロン酸糖鎖は、医薬品としてすでに利用されているとともに、健康食品としても広く使われている。このことより、糖鎖の中でも、特に有用性が高いと考えられている。

そこで、我々はグリコサミノグリカンの一種であるヒアルロン酸糖鎖を合成する細菌の持つヒアルロン酸合成酵素の研究を行った。本研究は、様々な生理作用において重要ヒアルロン酸を合成する酵素について、その基質特異性と反応メカニズムを明らかにすることで、より効率的な酵素の創生を目指すものである。この酵素は、高効率にヒアルロン酸糖鎖を合成できることから、本酵素の立体構造解析を含む詳細な生化学的な解析を進めることで、コンドロイチン糖鎖合成酵素およびヘパロサン糖鎖合成酵素の研究と統合して考察することで、2糖繰り返しの特徴的な構造を持つグリコサミノグリカン糖鎖の生合成機構の一般的な効率化メカニズムが考察できると考えた。

ヒアルロン酸合成酵素は、2種類の糖が正確に交互に連続的糖転移反応をすることで、ヒアルロン酸糖鎖を効率よく合成することができる。しかし、これらの反応メカニズムは、立体構造情報が無い為、ほとんどわかっていない状況にある。本酵素の立体構造解析と変異体の酵素活性測定を行うことで、基質特異性を含めて酵素反応メカニズムを明らかにすることで、このことは、広くグリコサミノグリカン糖鎖の合成機構の解明の基盤情報を得ることにつながると期待できる。

### 3. 研究の方法

ヒアルロン酸糖鎖合成酵素の反応の様々な状態の立体構造を X 線結晶構造解析によって決める。また、立体構造解析から得られた情報により、機能を改変した変異体を作製し、糖転移活性測定および、糖鎖結合活性の解析を行う。さらに、機能を改変した変異体についても、立体構造解析を行うことで、詳細な反応機構の解明を目指した。

これらの実験から得られる情報と、コンドロイチン合成酵素及びヘパロサン合成酵素の研究で得られた情報を統合することで、2糖繰り返しの特徴的な構造を持つグリコサ

ミノグリカン糖鎖の生合成機構の一般的な効率化メカニズムを明らかにする。

X線結晶構造解析によって決定

ヒアルロン酸合成酵素について、大腸菌による大量発現系の構築、大量精製法の確立、および結晶化まですでに成功している。ただし、実験室系のX線回折装置で得られた分解能は、約4 Å程度であり、質の高い結晶を作製していく必要があった。

そこで、ヒアルロン酸合成酵素の結晶化条件の最適化を行った。X線回折実験は、研究室のX線回折実験装置とSPring-8のシンクロトロン放射光施設を併用して、効率的な実験を行った。位相情報は、30%程度の1次構造の類似性を持つコンドロイチン合成酵素の立体構造を用いて行った。構造計算等は、現在研究室にあるワークステーションを用いて行った。

#### 4. 研究成果

グリコサミノグリカンは、2種類の糖が交互に結合した直鎖状の糖鎖であり、ヒトにおいては、様々な重要な役割を果たしている。細菌由来であり、安定で高反応性のグリコサミノグリカン合成酵素がいくつか報告されている。これらの酵素は、2種類の糖が正確に交互に連続的糖転移反応をすることで、糖鎖を効率よく合成することができる。しかし、これらの反応メカニズムは、未だ不明なことが多い。これらの酵素の中でも、特に有用性が高いヒアルロン酸糖鎖合成酵素について、X線結晶構造解析により、立体構造を決定し、酵素反応メカニズムを明らかにした。

ヒアルロン酸合成酵素は、2つの活性部位を持ち、それぞれにGlcNAc転移活性とGlcUA転移活性がある。各活性部位で、異なるUDP-sugarを用い、糖をひとつずつ交互に転移することでヒアルロン酸を合成する。このような二機能性糖転移酵素の反応機構や基質認識機構は、分子レベルでの解明がほとんど進んでいない。大腸菌を用いて、GST融合タンパク質としてPmHASを発現させ、精製後GSTを取り除いて結晶化サンプルとした。UDPとMn<sup>2+</sup>を加えて結晶化を行い、得られた結晶でX線回折実験を行ったところ、分解能3.5 Åの回折データが得られた。

分子置換法により位相を決定し、構造精密化を行った。構造精密化は、結晶が双晶(twin)であることを考慮して行った。構造精密化の結果、ヒアルロン酸合成酵素-UDP複合体の立体構造を分解能3.5 Åで決定することに成功した。ヒアルロン酸合成酵素は2つの球状ドメイン、GlcNAc転移ドメインとGlcUA転移ドメインが連なった構造をとっており、それぞれの活性部位にUDPとMn<sup>2+</sup>が結合していた。また、GlcNAc転移ドメイン同士が相互作用することにより2量体を形成し

ていた。2量体を形成していることを考慮しても、2箇所の活性部位は互いに約50 Å以上も離れていた。現在、糖鎖伸長は、この離れた活性部位を鎖状の基質の末端が移動しながら行われていると考察される。

本成果は、広くグリコサミノグリカン糖鎖の合成機構の解明に大きく貢献するものと考えられる。

#### 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)

[学会発表](計 5件)

水上有紗・嶋田宏章・副島正行・西尾健明・杉浦信夫・木村誠・角田佳充  
Pasteurella multocida ヒアルロン酸合成酵素のX線結晶解析  
第50回化学関連支部合同大会  
北九州AIMビル(北九州市)  
2013年7月6日

水上有紗・嶋田宏章・副島正行・西尾健明・杉浦信夫・木村誠・角田佳充  
Pasteurella multocida ヒアルロン酸合成酵素のX線結晶構造解析  
平成25年度日本結晶学会年会  
熊本大学(熊本市)  
2013年10月12日

角田佳充  
グリコサミノグリカン糖鎖合成酵素の結晶構造解析  
アグリバイオシンポジウム 2013  
近畿大学農学部(奈良市)  
2013年11月13日

水上有紗・嶋田宏章・西尾健明・杉浦信夫・木村誠・角田佳充  
ヒアルロン酸合成酵素の立体構造解析とタンパク質改変  
平成26年度日本結晶学会年会  
東京大学(東京都)  
2014年11月2日

角田佳充  
微生物莢膜多糖合成酵素の結晶構造解析  
微生物学の新たな発展, ゲノムから機能・実用に関する九州シンポジウム  
ANA ホリデイ・イン リゾート(宮崎市)  
2015年12月7日

[その他]  
なし

## 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・教授  
研究者番号：00314360

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし