

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06847

研究課題名(和文)複合型糖鎖生合成に必須なN-アセチルグルコサミン転移酵素IIの立体構造解析

研究課題名(英文)Structural analysis of N-acetylglucosaminyltransferase II, an enzyme essential for complex-type N-glycan biosynthesis

研究代表者

宮崎 剛亜 (Miyazaki, Takatsugu)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・助教

研究者番号：30775721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、複合型糖鎖生合成に重要なN-アセチルグルコサミン転移酵素IIの構造と機能の相関を解明することを目的とし、ヒトおよびカイコ由来酵素を研究対象とした。それぞれを大腸菌またはカイコを宿主とした発現系を構築し、カイコで発現させた場合に優位に高い活性を有する組換え酵素を取得することができた。カイコ由来酵素はヒトと同等の基質特異性および活性を有していた。いずれの酵素も自身にN結合型糖鎖が付加した糖タンパク質であり、ヒトよりカイコ由来酵素の方が糖鎖が多く付加していたが、糖鎖を切断しても酵素活性が変化しないことから、糖鎖は酵素活性や構造安定性に重要でないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study focuses on the structure-function relationship of N-acetylglucosaminyltransferase (GnTII) which is essential for complex-type N-glycan biosynthesis. We obtained recombinant GnTII enzymes from human and Bombyx mori using Escherichia coli and silkworm as hosts, and the enzymes expressed in silkworm showed higher activity than those in E. coli. The substrate specificity and enzymatic activity of B. mori GnTII were almost identical to those of human GnTII. Although B. mori GnTII was more highly N-glycosylated than human GnTII, enzymatic cleavage of N-glycans did not affect their activity and thermostability, indicating that N-glycans which were attached to the enzymes are not important for their activity and stability.

研究分野：酵素学

キーワード：糖鎖 糖転移酵素 糖タンパク質

1. 研究開始当初の背景

タンパク質への糖鎖付加は最も普遍的な翻訳後修飾の一つであり、特にヒトなどの真核生物が有するタンパク質のおよそ半数以上は糖鎖が付加した糖タンパク質であると言われている。糖鎖は生体内においてあらゆる生理機能や疾患、細菌やウイルスの感染に関与しているため、創薬・医療の観点からも重要な研究対象である。N結合型糖鎖はほぼすべての真核生物に共通して見られる翻訳後修飾であり、タンパク質中の特定のアスパラギン残基に付加する糖鎖である。糖鎖付加は小胞体内において行われ、オリゴ糖転移酵素により前駆体 14 糖 (Glc₃Man₉GlcNAc₂) がアスパラギン残基に付加されたのち、グルコース (Glc) 残基とマンノース (Man) 残基が種々の加水分解酵素によりトリミングされる (図 1)。その後、ヒトなどの哺乳動物においてはゴルジ体に局在する各種糖転移酵素 (GnTII、GalT、SiaT など) により N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、シアル酸等が付加され複合型糖鎖構造となる。一方、昆虫では GlcNAc 転移酵素により付加された GlcNAc 残基が N-アセチルグルコサミナーゼ (FDL) により加水分解され、パウチマンノース型となることが知られている。

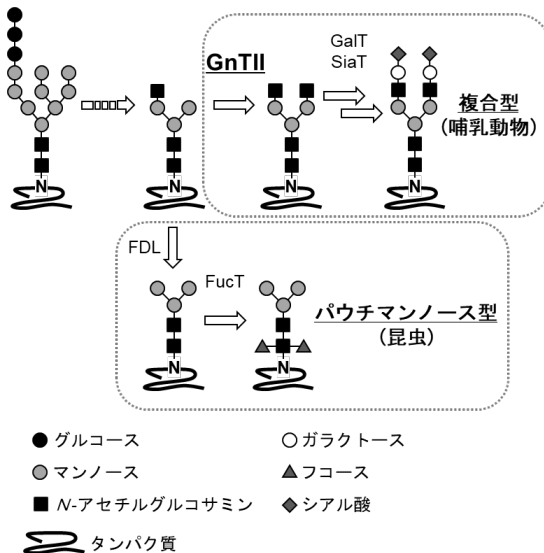


図1. N結合型糖鎖の生合成経路の一部

昆虫であるカイコは、高いタンパク質生産能力、糖鎖修飾やリン酸化などのヒトに近い翻訳後修飾、飼育のしやすさ、安全性などから、医療用タンパク質の生産系として近年注目されているが、既述のようにN結合型糖鎖の構造がヒトとは異なっていることが問題となっている。一方で、カイコのゲノムには複合型糖鎖生成に必要な GlcNAc 転移酵素 (GnTII) やガラクトース転移酵素 (GalT) のオルソログ遺伝子が見出されているが、その機能は明らかではない。特に GnTII は複合型糖鎖が構築される際の足場となる GlcNAc を付加する重要な鍵酵素であり、ヒトを含む多くの高等動物で保存されているにもか

わらず、大量発現系が確立しておらず、立体構造が解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、複合型糖鎖生成に必須である GnTII に着目し、本酵素の構造機能相関を解明することを目的とした。

ヒト由来 GnTII (hGnTII) を含む既知の GnTII は昆虫細胞を用いた発現系が報告されているが、ミリグラムオーダーでの大量発現系は確立されていない。また、複合型糖鎖を産生しないカイコ由来 GnTII オルソログ (BmGnTII) は性質や機能が明らかでない。そこで、両酵素の大量発現系を構築するとともに、基質特異性の解析や X 線結晶構造解析による構造解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 発現系の構築

ヒト培養細胞およびカイコ虫体から抽出した total RNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。cDNA を鋳型に各遺伝子特異的なプライマーを用い、N 末端側膜貫通領域を含む領域を削除し、分泌シグナル配列、His タグおよび FLAG タグを付加した目的タンパク質をコードする DNA を増幅し、pFastBac1 ベクター (Thermo Fisher Scientific) へ挿入した。構築したプラスミドを大腸菌 BmDH10Bac CP⁻Chi⁻ 株 (Park et al., Biotechnol. Appl. Biochem., 49, 135, 2008) に導入し、菌体内でカイコ多角体ウイルス (BmNPV) バクミドへ目的タンパク質の遺伝子を導入した。組換えバクミドをカイコ 5 齢幼虫に注射し 6 日間飼育を行ったのち、体液および脂肪体を回収し、組換えタンパク質の発現の有無を確認した。

(2) 組換えタンパク質の精製

回収したカイコ幼虫体液を Ni sepharose カラムおよび抗 FLAG 抗体ビーズによるアフィニティークロマトグラフィーに供し、目的タンパク質の精製を行った。また、体液を予めポリエチレングルコール沈澱し、純度の向上を検討した。

(3) 酵素活性の測定

精製酵素および基質であるウリジン二リン酸 (UDP-) GlcNAc とピリジルアミノ化標識した糖鎖を混合し、Mn²⁺等の 2 価陽イオン存在下で酵素反応を行い、反応産物を高速液体クロマトグラフィーで分離、定量を行った。

(4) 結晶化条件スクリーニング

精製酵素を濃縮し、シットティングドロップまたはハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化条件の検討を行った。条件検討は市販のスクリーニングキットなどを用いた。

4. 研究成果

(1) 組換え酵素の発現と精製

バキュロウイルスに感染したカイコ幼虫から回収した体液および脂肪体を SDS-PAGE およびウエスタンブロットングに供したところ、組換え酵素の発現と体液への分泌が確認された(図2)。hGnTII はN末端側あるいはC末端側に His タグおよび FLAG タグを付加した酵素(それぞれ HF-hGnTII と hGnTII-FH)を作製し、BmGnTII はN末端側にタグを付加させたもの(HF-BmGnTII)のみを作製した。

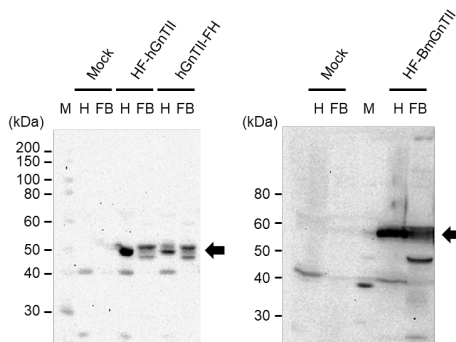


図2. ヒトGnTIIおよびカイコGnTIIの組換え発現のウエスタンブロットング解析

M, 分子量マーカー; H, 体液; FB, 脂肪体

また、組換え酵素に糖鎖切断酵素である PNGase F を作用させたところ、見かけの分子量が低下したことから、本酵素は糖タンパクであることが明らかになった(図3)。

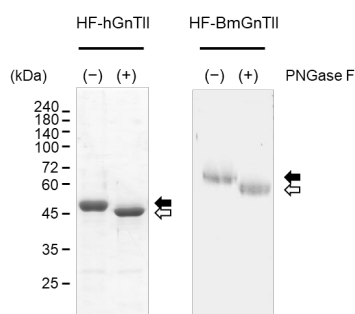


図3. 精製した組換えGnTIIの糖鎖切断
精製酵素にN結合型糖鎖切断酵素PNGase Fを作用させた。

(2) 組換え酵素の性質

両酵素は UDP-GlcNAc をドナー基質、Man(1-6)[GlcNAc(1-2)Man(1-3)]ManGlcNAc₂糖鎖をアクセプター基質として糖転移反応を示した。いずれも Mn²⁺イオン存在下で最も高い活性を示し、至適温度はともに 37 であり至適 pH は 6.5-7.0 であった。組換え酵素に付加している N結合型糖鎖が活性に関与しているか調べたところ、糖鎖を切断しても活性はほぼ変化しなかった。

(3) 立体構造の比較

濃縮した精製酵素を、市販のスクリーニングキットを用いて結晶化に供したところ、X線回折測定に用いることのできる単結晶は得られなかった。ごく最近、米国の研究グループによりヒトGnTIIの結晶構造が報告され

た(Kadirvelraj et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 115, 4637-4642, 2018)。この構造を鋳型にBmGnTIIのホモロジーモデリングを行ったところ、全体構造はRossmann-likeフォールドを呈しており、基質認識に重要なアミノ酸残基は完全に保存されていることが示唆された。また、ヒトGnTIIは予想糖鎖付加部位が2ヶ所存在するのに対し、カイコは9ヶ所存在する。しかしながら、モデリングによるといづれも活性部位と離れたところに存在するため(図4)、糖鎖を切断しても活性には影響がなかったものと考えられた。

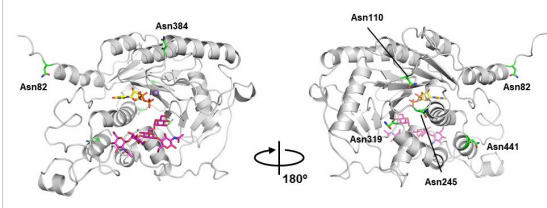


図4. BmGnTIIのホモロジーモデル
UDP(黄色)、ドナー基質糖鎖(マゼンタ)、予想糖鎖付加部位(緑)をスティックモデルで示した。

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10件)

(1) Yagi R, Miyazaki T, Oyoshi T, G-quadruplex binding ability of TLS/FUS depends on the α -spiral structure of the RGG domain. Nucleic Acids Res., 印刷中 (2018). 査読有

DOI: 10.1093/nar/gky391

(2) Miyazaki T, Kato T, Park EY, Heterologous expression, purification and characterization of human α -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II using a silkworm-BmNPV bacmid system. J. Biosci. Bioeng., 印刷中 (2018). 査読有

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.01.011

(3) Miyazaki T, Ishizaki M, Dohra H, Park S, Terzic A, Kato T, Kohsaka T, Park EY, Insulin-like peptide 3 expressed in the silkworm possesses intrinsic disulfide bonds and full biological activity. Sci. Rep., 7, 17339 (2017). 査読有

DOI: 10.1038/s41598-017-17707-1

(4) Kato T, Kako N, Kikuta K, Miyazaki T, Kondo S, Yagi H, Kato K, Park EY, N-Glycan modification of a recombinant protein via coexpression of human glycosyltransferases in silkworm pupae. Sci. Rep., 7, 1409 (2017). 査読有

DOI: 10.1038/s41598-017-01630-6

(5) Miyazaki T, Nishikawa A, Tonozuka T, Crystal structure of the enzyme-product complex reveals sugar ring distortion during catalysis by family 63 inverting α -glycosidase. J. Struct. Biol., 196(3),

479-486 (2016). 査読有
DOI: 10.1016/j.jsb.2016.09.015

(他に査読有り論文 5 件)

〔学会発表〕(計 16 件)

(1) 宮崎 剛亜、*N* 結合型糖鎖プロセシング酵素と相同性を有する細菌由来酵素の構造と機能、第 19 回 静岡ライフサイエンスシンポジウム、2018 年

(2) 稲垣 裕、林谷 美貴子、宮崎 剛亜、デオ ヴィピン クマル、Murhandarwati Elsa Heridiana、加藤 竜也、朴 龍洙、カイコバクミド遺伝子発現系を用いた熱帯熱マラリア原虫に対するワクチン開発の基盤構築、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

(3) 宮崎 剛亜、加藤 竜也、朴 龍洙、カイコ BmNPV バクミド発現系を用いた N-アセチルグルコサミン 転移酵素 II の発現と性質の解析、第 69 回日本生物工学会大会、2017 年

(4) 宮下 龍之介、宮崎 剛亜、加藤 竜也、朴 龍、カイコ由来 *N*-acetylgalactosaminyl transferase の基質特異性、第 69 回日本生物工学会大会、2017 年

(5) 堀場 早紀、加子 夏未、宮崎 剛亜、加藤 竜也、近藤 幸子、矢木 宏和、加藤 晃一、朴 龍洙、カイコで発現させたヒトエリスロポエチンの糖転移酵素共発現による N 型糖鎖構造改変、第 69 回日本生物工学会大会、2017 年

(6) 稲垣 裕、朴 龍洙、加藤 竜也、宮崎 剛亜、Deo Vipin Kumar、カイコ BmNPV バクミド発現系を用いた熱帯熱マラリア原虫抗原提示ウイルス様粒子の作製、第 69 回日本生物工学会大会、2017 年

(7) 堀場 早紀、加子 夏未、宮崎 剛亜、加藤 竜也、近藤 幸子、加藤 晃一、矢木 宏和、朴 龍洙、ヒト由来糖転移酵素の共発現によるカイコ発現エリスロポエチンの N 型糖鎖構造改変、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

(8) 稲垣 裕、宮崎 剛亜、加藤 竜也、朴 龍洙、カイコ-BmNPV バクミド系で発現させた熱帯熱マラリア原虫抗原の解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

(9) 宮下 龍之介、宮崎 剛亜、加藤 竜也、朴 龍洙、カイコ由来糖転移酵素 GnTII 及び GalT オルソログの機能解析、第 68 回日本生物工学会大会、2016 年

(10) 鹿島 諒人、吉田 佐和子、尾形 慎、宮崎 剛亜、加藤 竜也、朴 龍洙、インフルエンザウイルス A(H5N1)由来のヘマグルチニンと受容体結合解析、第 68 回日本生物工学会大会、2016 年

(他に学会発表 6 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

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biotech/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 剛亜 (MIYAZAKI, Takatsugu)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・助教
研究者番号: 30775721

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

朴 龍洙 (PARK, Enoch Y.)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

加藤 竜也 (KATO, Tatsuya)

静岡大学・農学部・准教授