

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292054

研究課題名(和文) 分裂酵母のピルビン酸転移酵素変異体を用いた新奇糖鎖の酵素合成と糖鎖工学への応用

研究課題名(英文) Neo-human-type oligosaccharide that imitates sialylation developed by structural analysis of fission yeast pyruvyltransferase Pvg1p

研究代表者

竹川 薫 (Takegawa, Kaoru)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50197282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母の糖タンパク質糖鎖には、ピルビン酸化されたガラクトースが存在する。分裂酵母のピルビン酸付加に重要なピルビン酸転移酵素について諸性質の解析を行った。本酵素は結合のガラクトースに特異的で、ラクトース(Gal-Glc)のガラクトースにはピルビン酸を付加できるが、Gal-GlcNAcには付加できないことがわかった。そこでPvg1タンパク質のX線構造解析を行った所、還元末端のグルコースの2位の位置に168番目のヒスチジンが極めて隣接していることが予想された。解析の結果、Pvg1H168A変異体はPvg1野生型が転移できなかったGal-GlcNAcへピルビン酸を転移できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Pyruvylation onto the terminus of oligosaccharide, widely seen from prokaryote to eukaryote, confers negative charges on the cell surface and seems to be functionally similar to sialylation, which is found at the end of human-type complex oligosaccharide. However, detailed molecular mechanisms underlying pyruvylation have not been clarified well. We first determined the crystal structure of fission yeast pyruvyltransferase Pvg1p. By combining molecular modeling with mutational analysis of active site residues, we obtained a Pvg1p mutant (Pvg1pH168C) that efficiently transferred pyruvyl moiety onto a human-type complex glycopeptide. The resultant pyruvylated human-type complex glycopeptide recognized similar lectins on lectin arrays as the 2,6-sialyl glycopeptides. This newly-generated pyruvylation of human-type complex oligosaccharides would provide a novel method for glyco-bioengineering.

研究分野：応用微生物学

キーワード：分裂酵母 糖タンパク質 シアル酸 ピルビン酸 糖鎖工学

## 1. 研究開始当初の背景

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* はヒト由来の遺伝子が出芽酵母よりも発現しやすいために、高等動物の細胞周期研究や転写翻訳機構研究などに広く用いられてきた。分裂酵母の細胞壁構成成分としてガラクトピラノースが存在することは古くから知られていたが、機能については全く不明であった。また出芽酵母の酸性糖鎖はマンノースリン酸由来であるが、分裂酵母にはリン酸化マンノースは存在せず、ガラクトースにピルビン酸が付加することが報告された。そこで申請者はまず、分裂酵母のガラクトース鎖がどのような機能を果たしているかを明らかにするため、ガラクトース欠損変異株の取得を試みた。その結果、*gms1* 変異株というガラクトースを完全に欠失した変異株の取得に成功した (BBRC, 232, 121-125, 1997)。分裂酵母 *gms1* 遺伝子はゴルジ体にガラクトース転移酵素の基質である UDP-ガラクトースを供給する新奇糖ヌクレオチド輸送体をコードしており、本遺伝子の欠損により細胞形態の異常や細胞表層糖鎖の厚みが減少することを見いだした。分裂酵母のガラクトース欠損 *gms1* 株は細胞形態異常や胞子形成欠損など、様々な表現型を示したが生育には必須ではないことがわかった (Yeast, 18, 903-914, 2001)。我々はさらに細胞が構成的に凝集する変異株 (*gsf1*) を取得し、その凝集はガラクトースで阻害されることから、分裂酵母の非性的凝集はガラクトースを介して行われていることを明らかにした (J. Bacteriol. 181, 1356-1359, 1999)。このように分裂酵母は細胞間のコミュニケーションにガラクトースを利用していることがわかり、分裂酵母が他の酵母の糖鎖成分には存在しないガラクトースを持つ優位性を明らかにすることができた。

分裂酵母のガラクトース転移酵素に関しては、横尾らが *gma12* や *gmh3* 遺伝子の機能解析を行っていたが (Yoko-o et al. Eur. J. Biochem. 257, 630-637, 1998)、分裂酵母ゲノム中には他にも複数のガラクトース転移酵素遺伝子が存在しており、さらに 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子については、全く明らかにされていなかった。そこで、申請者らは、分裂酵母ゲノムから糖転移酵素遺伝子を網羅的に検索して、3つの 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子を新たに同定する

ことができた (Ohashi et al. J. Biol. Chem. 287, 38866-38875, 2012)。

また分裂酵母のガラクトースには、酸性基としてピルビン酸が付加されることは Trimble らに報告されていたが、ピルビン酸転移酵素の諸性質についても全く明らかにされていなかった。そこで分裂酵母 Pvg1 タンパク質を大腸菌で発現・精製して、酵素反応を行ったところ、単独のタンパク質でピルビン酸転移活性を示すことを初めて明らかにした (Yoritsune et al. FEBS Lett. 587, 917-921, 2013)。

さらに出芽酵母の凝集素 *FLO1* と相同性の高い遺伝子が分裂酵母ゲノム中に見いだせなかったことから、分裂酵母の細胞間認識に重要である、細胞表層に局在するガラクトース認識レクチン様遺伝子の同定も全く行われていなかった。そこで申請者らは、凝集株で特異的に発現している遺伝子についてマイクロアレイ解析により検索を行い、*gsf2* 遺伝子産物が分裂酵母の非性的凝集素であることを明らかにした (Matsuzawa et al. Mol. Microbiol. 82, 1531-1544, 2011)。

## 2. 研究の目的

本研究では、ガラクトピラノースを細胞壁や糖タンパク質の構成成分として持つ最も下等な真核微生物である分裂酵母のガラクトース含有糖鎖の機能、特にガラクトースに付加しているピルビン酸の生合成及び機能を明らかにすることである。申請者はこれまでに分裂酵母のガラクトースが完全に欠損する変異株の取得に初めて成功し、ガラクトースが細胞の性的及び非性的凝集課程などの細胞間認識機構に必須であることを明らかにした。分裂酵母は糖鎖中の唯一の酸性残基としてピルビン酸が付加されるが、これまでピルビン酸化ガラクトースの機能については全く不明であった。申請者のこれまでの結果から、分裂酵母のピルビン酸化ガラクトースは高等動物のシアル酸-ガラクトースと類似した機能を持っていることが示唆された。そこでシアル酸のプロトタイプとしてのピルビン酸化ガラクトースの機能を解明することを目指した。さらにピルビン酸化糖鎖の糖鎖工学への応用についても検討を行った。

### 3. 研究の方法

本申請研究では、分裂酵母野生株に ARC039 株(h- *ura4-C190T leu1-32*)および ARC001 株(h- *leu1-32*)を用いた。分裂酵母の培養には栄養培地として YES 培地、最小培地として MM 培地を用いた。分裂酵母の形質添加は簡易形質転換法(Morita and Takegawa, *Yeast*, 21, 613-617, 2004)で行った。分裂酵母遺伝子の破壊は *ura4* カセットマーカーを用いて相同組換えにより行った。

### 4. 研究成果

#### (1)分裂酵母のピルビン酸転移酵素 Pvg1 の酵素化学的特性の解析

分裂酵母において糖鎖からピルビン酸が消失した変異株が取得され、その変異を相補する遺伝子(*pvg1<sup>+</sup>*)が報告された。Pvg1p は原核生物のピルビン酸転移酵素と予想されるタンパク質と弱い相同性があり、本研究では Pvg1p をピルビン酸転移酵素と予測し活性測定及び諸性質の解析を行った。

まず大腸菌で発現・精製した Pvg1p とドナー基質としてホスホエノールピルビン酸、アクセプター基質としてパラニトロフェニル-β-ガラクトピラノシド(*pNP*-β-Gal)を用い HPLC で検出したところ新たなピークが検出された。このピークは NMR を用いて解析すると 4,6-pyruvylated *pNP*-β-Gal であった、このことから Pvg1p がピルビン酸転移酵素であることが判明した。また Pvg1p の基質特異性について調べたところ、Pvg1p は 結合 Gal や Man、グルコースなどには活性を示さず 結合 Gal を特異的に認識することが分かった。

次に分裂酵母 Pvg1p の局在を Pvg1p の N-末端側に GFP を融合させて顕微鏡で観察したところ、ドット状の局在が観察されゴルジ体局在である事が示唆された。更に *pvg1* は -1,3- グルカン合成酵素阻害剤である Micafungin に対し感受性を示し、-1,3-glucanase である zymolyase に対し耐性を示すという表現型が得られた。

#### (2)分裂酵母のホスホエノールピルビン酸トランスポーターの機能解析

分裂酵母ピルビン酸転移酵母の研究結果から、PvGal はゴルジ体において、ピルビン酸転移酵素 Pvg1p がホスホエノールピルビン

酸 (PEP) を基質とし、Gal に転移することで合成される事を明らかにした。PEP は細胞質において解糖系により合成されると考えられるため、分裂酵母にはゴルジ体内腔に PEP を輸送する PEP トランスポーターが存在することが予想された。しかし、酵母における PEP トランスポーターの存在は報告がなく、そこで本研究では分裂酵母の PEP トランスポーターの同定を試みた。

まず、シロイヌナズナで同定されていた PEP トランスポーターである AtPPT1,2 とアミノ酸相同性の高い分裂酵母タンパク質の検索を行った。すると、弱い相同性を持つ Pet1,2,3p と名付けた 3 つのタンパク質が見つかった。Pet1,2,3p は全て複数膜貫通型のタンパク質であり、triose phosphate transmembrane transporter であると予想されている。そこでこれらの単独破壊株を作成したところ、*pet1* および *pet2* 遺伝子を破壊すると糖鎖から PvGal が減少する表現型が確認された。この Pet1p および Pet2p に GFP を融合させ局在を観察したところ、ゴルジ体局在マーカーである Gms1p と局在が一致したことから両タンパク質ともにゴルジ体に局在している事が分かった。更に *pet1* 破壊株において、分裂酵母のゴルジ体に局在するように改変した AtPPT1,2 を発現すると糖鎖への PvGal の付加が回復した。以上の結果から Pet1p および Pet2p は分裂酵母におけるゴルジ体局在 PEP トランスポーターであることが強く示唆された。

#### (3)ピルビン酸転移酵素 Pvg1 タンパク質の構造解析

Pvg1 のピルビン酸転移反応を分子レベルで解明するため、Pvg1 の X 線結晶構造解析を行った。供与基質の PEP 及び受容基質として *pNP*-Gal を用いた共結晶作製はできなかったものの、アポ体の Pvg1 の構造を 2.46 Å の解像度で決定できた。そしてホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びラクトース (Lac) を基質としたモデリングにより、Pvg1 の活性部位の推定を行った。Pvg1 の予想される基質結合部位は正電荷を帯びたくぼみとなっており、負電荷を帯びた基質の PEP と結合することと合致する結果であった。そして、Pvg1 の D106 が Lac における Gal の 6 位と相互作用し R217 と R337 が PEP と結合すると予想された。D106、R217、R337 は Pvg1 ホモログにも保存されて

おり、活性に重要なアミノ酸残基と推定された。実際に D106A 変異体では *p*NP-Lac に対する Pv 転移活性が無いことを確認した。

#### (4) 分裂酵母 Pvg1 変異体を用いたピルビン酸含有新奇ヒト複合型糖鎖の酵素合成

シアル酸を除いたヒト型複合糖鎖の末端部は、Gal-1,4-GlcNAc (LacNAc) 構造をとる。そこで、*p*NP-LacNAc を受容基質に Pvg1 のピルビン酸転移能を調べたが、その活性は非常に低いことがわかった。LacNAc を Pvg1 の推定基質結合部位に当てはめると、NAc 基と Pvg1 の H168 が立体障害となることが予想された。そこで、立体障害を解消するために H168A 変異体を作製したところ、*p*NP-LacNAc へのピルビン酸転移活性を確認することができた。しかし、その活性は微弱であったため、H168 を他の全てのアミノ酸残基に置き換えた変異体を作製し、*p*NP-LacNAc への Pv 転移活性を解析した結果、H168C 変異体が最も高い活性を示すことがわかった。実際に、2 本鎖ヒト型複合糖鎖を有する糖ペプチドで、糖鎖末端のシアル酸を欠いたもの (アシア口糖ペプチド, AGP) を受容基質にピルビン酸転移活性を調べた。すると H168C 変異体を用いることで AGP の両 2 本鎖末端にピルビン酸を付加した PvGP を合成することができた。

興味深いことに、PvGP では 2 本鎖ヒト型複合糖ペプチド (SGP) と同様のレクチン結合パターン、つまり 2,6-シアル酸結合レクチンには結合し、2,3-シアル酸結合レクチンには結合しないという結果が得られた。以上から、2 本鎖ヒト型複合糖ペプチドに付加されたピルビン酸は 2,6-シアル酸と同様の性質を示すことが明らかとなった。

#### 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 4 件)

1. Higuchi Y, Eshima Y, Huang Y, Kinoshita T, Sumiyoshi W, Nakakita S, Takegawa K: Highly efficient transglycosylation of sialo-complex-type oligosaccharide using *Coprinopsis cinerea* endoglycosidase and sugar oxazoline. *Biotechnol. Lett.* 39(1), 8-12 (2017) doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.018.

2. Higuchi Y, Yoshinaga S, Yoritsune K, Tateno H, Hirabayashi J, Nakakita S, Kanekiyo M, Kakuta Y, Takegawa K: A rationally engineered yeast pyruvyltransferase Pvg1p introduces sialylation-like properties in neo-human-type complex oligosaccharide. *Sci. Rep.* 6:26349 (2016) doi: 10.1038/srep26349.
3. Eshima Y, Higuchi Y, Kinoshita T, Nakakita S, Takegawa K: Transglycosylation activity of glycosynthase mutants of endo-beta-N-acetylglucosaminidase from *Coprinopsis cinerea*. *PLoS ONE* 10(7):e0132859 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0132859.
4. Yoritsune KI, Higuchi Y, Matsuzawa T, Takegawa K: Functional analysis of putative phosphoenolpyruvate transporters localized to the Golgi apparatus in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* 14(7), 1101-1109 (2014) doi: 10.1111/1567-1364.12207.

[学会発表](計 36 件)

1. 江島康成、竹川薫：担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来エンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの諸性質の解析、平成 26 年度日本生化学会九州支部例会 (2014) 5.17-18 九州大学
2. 江島康成、竹川薫：担子菌類ゲノム中に存在するエンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの諸性質の解析、第 51 回化学関連支部合同九州大会 (2014) 6.28 北九州市
3. 江島康成、竹川薫：担子菌類ゲノム中に存在するエンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの諸性質の解析、第 33 回日本糖質学会年会 (2014) 8.10-12
4. 吉永 将、頼経健一、中北慎一、館野浩章、平林 淳、竹川 薫：ピルビン酸転移酵素変異体を用いたピルビン酸含有 N-結合型糖鎖の酵素合成、平成 26 年度日本農芸化学会西日本支部大会 (2014) 9.18-19 佐賀大学
5. 竹川 薫：組換え糖タンパク質医薬品製造に必要なツール開発-新規酵素の検索と最適化-、第 5 回グライコバイオロジク

- ス研究会 (2014) 11.1 臨床研究情報センター神戸市
6. 竹川 薫: 糖鎖末端のガラクトースをめぐる真核微生物の生存戦略、第 8 回多糖の未来フォーラム (2014) 11.6 九州大学
  7. 庭山智史、頼経健一、竹川薫: 分裂酵母 *N*-結合型糖鎖のピルビン酸化ガラクトース合成に関わるタンパク質の機能解析、第 32 回 Yeast Workshop (2014) 11.14-15 ビュー・ポートくれ 広島県
  8. 江島康成、竹川 薫: 2 本鎖複合型糖鎖を遊離転移する担子菌由来 Endo-CC1, Endo-CC2 の諸性質の解析、日本生物工学会第 21 回九州支部熊本大会 (2014) 12.6 熊本大学
  9. 吉永 将、頼経健一、中北慎一、舘野浩章、平林 淳、竹川 薫: ピルビン酸転移酵素変異体を用いた新奇ピルビン酸含有糖鎖の酵素合成、日本生物工学会第 21 回九州支部熊本大会 (2014) 12.6 熊本大学
  10. 竹川 薫: 組換え糖タンパク質医薬品製造に有用な酵素類の探索と利用、複合糖質・糖鎖研究会 (2015) 1.31 高松市
  11. 竹川 薫: 糖タンパク質を分解するための微生物の戦略、エンドグリコシダーゼ会議 (2015) 4.21-22 弘前市
  12. 庭山智史、樋口裕次郎、竹川 薫: 分裂酵母におけるピルビン酸化ガラクトースの生合成に関与するタンパク質の機能解析、日本生化学会九州支部例会 (2015) 5.16-17 九州大学
  13. 松藤仁美、森 一樹、田代康介、久原 哲、樋口裕次郎、竹川 薫: ピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖を分解する酵素の同定と諸性質の解析、日本生化学会九州支部例会 (2015) 5.16-17 九州大学
  14. 竹川 薫: ピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖は分解できるのか、比較グライコーム研究会 (2015) 6.6 九州大学
  15. Takegawa K, Yoshinaga S, Yoritsune K, Tateno H, Hirabayashi J, Nakakita S, Kanekiyo M, Kakuta Y, Higuchi Y: Neo-human-type oligosaccharide that imitates sialylation developed by structural analysis of fission yeast pyruvyltransferase Pvg1p. 8<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting (2015) 6.21-26 神戸市
  16. 竹川 薫: バイオ医薬品製造に向けた糖鎖改変・分析技術の開発、第 52 回化学関連支部合同九州大会 (2015) 6.27-28 北九州市
  17. 松藤仁美、森 一樹、田代康介、久原 哲、樋口裕次郎、竹川 薫: ピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖の分解に必要な酵素の同定と諸性質の解析、第 52 回化学関連支部合同九州大会 (2015) 6.27-28 北九州市
  18. 庭山智史、樋口裕次郎、竹川 薫: 分裂酵母糖鎖中のピルビン酸化ガラクトースの生合成に関与するタンパク質の機能解析、第 52 回化学関連支部合同九州大会 (2015) 6.27-28 北九州市
  19. 木下崇司、江島康成、住吉 涉、中北慎一、平林 淳、竹川 薫: Coprinopsis cinerea 由来 endo-beta-N-acetylglucosaminidase(Endo-CC) の基質特異性の解析、第 34 回日本糖質学会年会 (2015) 7.31-8.2 東京大学
  20. 松藤仁美、森 一樹、田代康介、久原 哲、樋口裕次郎、竹川 薫: ピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖を分解する酵素の同定と諸性質の解析、第 34 回日本糖質学会年会 (2015) 7.31-8.2 東京大学
  21. 竹川 薫、吉永 将、頼経健一、舘野浩章、平林 淳、中北慎一、角田佳充、樋口裕次郎: ピルビン酸転移酵素変異体を用いた新奇酸性複合型糖鎖の合成、第 34 回日本糖質学会年会 (2015) 7.31-8.2 東京大学
  22. 松藤仁美、樋口裕次郎、竹川 薫: *Bacillus* 属細菌が生産するピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖分解酵素の同定と諸性質の解析、日本農芸化学会中四国支部・西日本支部合同大会 (2015) 9.17-18 愛媛大学
  23. 松藤仁美、森一樹、田代康介、久原 哲、樋口裕次郎、竹川 薫: ピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖を分解する酵素の検索および同定と特性解析、第 67 回日本生物工学会大会 (2015) 10.26-28 鹿児島市
  24. 江島康成、竹川 薫: 複合型糖鎖を遊離・転移する担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来のエンド-β-N-アセチルグルコサミナーゼの諸性質の解析、第 67 回日本生物

- 工学会大会 (2015) 10.26-28 鹿児島市
25. Eshima Y, Higuchi Y, Kinoshita T, Nakakita S, Takegawa K: Identification and characterization of endo- $\alpha$ -N-acetylglucosaminidases from *basidiomycete*. International Symposium on Agricultural, Food, Environment and Life Science in Asia, 2015 (2015) 11.4-5 Kurayoshi-city, Tottori, Japan
  26. 松藤仁美、樋口裕次郎、竹川 薫：分裂酵母が生産するピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖を分解する酵素の探索と諸性質の解析、第33回 YEAST WORKSHOP (2015) 11.13-14 せとうち児島ホテル岡山
  27. 江島康成、竹川 薫：担子菌由来のエンド- $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ変異体を用いた均一糖鎖含有糖タンパク質の酵素合成、日本生物工学会第22回九州支部宮崎大会 (2015) 12.5 宮崎大学
  28. 松藤仁美、樋口裕次郎、竹川 薫：*Bacillus*属細菌由来ピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖分解酵素の同定と諸性質の解析、日本生物工学会第22回九州支部宮崎大会 (2015) 12.5 宮崎大学
  29. 松藤仁美、樋口裕次郎、竹川 薫：ピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖を分解する酵素の探索と同定、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 (2015) 12.6-7 宮崎市
  30. 江島康成、竹川 薫：担子菌由来のエンドグリコシダーゼを利用した均一糖鎖を持つ糖タンパク質の合成、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 (2015) 12.6-7 宮崎市
  31. Takegawa K.: Biosynthesis and intracellular trafficking of galactose-containing oligosaccharides in *Schizosaccharomyces pombe*. Protein Trafficking and Intracellular Signaling of Plant and Fungal Cells (Progress 100: Second International Symposium), (2016) 2.8-9, Kyushu University
  32. Yibo Huang, Yasunari Eshima, Takashi Kinoshita, Wataru Sumiyoshi, Shin-ichi Nakakita, Yujiro Higuchi,

- Kaoru Takegawa: Efficient transfer of oligosaccharides onto proteins by combined use of *Coprinus cinerea* endoglycosidase and synthetic sialo-complex-type sugar oxazoline. 第53回化学関連支部合同九州大会 (2016) 7.2 北九州市
33. 竹川 薫：微生物におけるエンドグリコシダーゼの役割と糖鎖機能解析への応用、第40回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (2016) 8.26-28 指宿
  34. 竹川 薫：エンドグリコシダーゼを利用した糖タンパク質糖鎖改変技術、第35回日本糖質学会年会 (2016) 9.1-3 高知
  35. 松藤仁美, 伏信進矢, 樋口裕次郎, 竹川 薫：*Bacillus*属細菌由来ピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖を分解する酵素の諸性質の解析、日本農芸化学会2016年度西日本支部大会 (2016) 9.15-16 長崎大学
  36. 松藤仁美, 樋口裕次郎, 竹川 薫：*Bacillus*属細菌由来ピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖分解酵素の諸性質の解析、第68回日本生物工学会大会 (2016) 9.28-30 富山国際会議場

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
竹川 薫 (TAKEGAWA, Kaoru)  
九州大学大学院・農学研究院・教授  
研究者番号：50197282