

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05340

研究課題名（和文）新奇糖転移酵素によるS-結合型糖鎖修飾の構造基盤の解明

研究課題名（英文）Structural analysis of a novel S-linked sugar transferase

研究代表者

中村 顕（Nakamura, Akira）

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：40432356

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の糖修飾はリン酸化などと並び重要な共有結合性の化学修飾である。一般的にはアスパラギン残基やセリン・スレオニン残基の側鎖への糖付加が知られているが、近年、システイン残基側鎖チオール基へのS-結合型糖付加が報告された。本研究では、化学的・生物学的安定性の高いS-結合型糖修飾のメカニズムを詳細に解明することを目的として、細菌由来のペプチド性抗生物質合成酵素であるS-結合型糖転移酵素に着目し、その構造解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、S-結合型糖転移酵素の立体構造が明らかとなり、他の糖転移酵素とは異なる構造的特徴も見出された。S-結合型糖は、構造的に類似したO-結合型糖よりも加水分解されにくいという特徴があるため、本研究結果により得られた知見をもとに、ペプチド性抗生物質へのS-結合型糖付加による新規抗生物質の開発や、チオール含有化合物への糖付加による物性変化といった研究に資するS-結合型糖転移酵素の酵素改変へと繋がるのが期待される。

研究成果の概要（英文）：Protein glycosylation is one of the most common post-translational modifications. N-linked and O-linked glycosylation are the most abundant types, in which sugar is attached to the side chain of asparagine and serine/threonine residues, respectively. In addition, S-linked glycosylation on cysteine residues has been recently known. In this study, a bacterial S-linked glycosyltransferase involved in biosynthesis of a peptide antibiotic was focused on for the purpose of understanding the reaction mechanism of S-glycosylation by the glycosyltransferase, and the crystal structure of the enzyme was successfully determined.

研究分野：構造生物学

キーワード：抗生物質 ペプチド 糖転移酵素 構造生物学 結晶構造解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳後修飾の一種である糖修飾(グリコシル化)は、リン酸化やアセチル化などとともに重要な共有結合性の化学修飾である。タンパク質への糖付加により、適切なフォールディングを促進したり、タンパク質自身の安定性を上昇させたり、活性を調節したりすることが可能となる。タンパク質中への糖修飾として、アスパラギン残基側鎖への *N*-結合型、セリンやスレオニン残基側鎖への *O*-結合型が一般的であるが、細菌由来のペプチド性抗生物質(バクテリオシン)等においては、システイン残基側鎖への *S*-結合型グリコシル化も知られている。

バクテリオシンにおける *S*-結合型糖修飾は、特定の糖転移酵素のはたらきによるものであり、*Bacillus subtilis* 168 由来の Sublancin 168 では SunS タンパク質、*Lactobacillus plantarum* KW30 由来の Glycrocin F では GccA タンパク質によって担われている。*Bacillus thuringiensis* serovar *andalousiensis* BGSC 4AW1 由来の Thurandacin (図1) においては、Cys28 および Ser19 へのグリコシル化が報告されており、その *S*-結合型および *O*-結合型糖修飾を担うのは、糖転移酵素 ThuS タンパク質である。これらバクテリオシン生合成系の *S*-結合型糖転移酵素はいずれも glycosyltransferase family 2 (GT2) に属すると考えられている。また、同ファミリーの糖転移酵素と同様に、UDP- $\alpha$ -D-glucose などの糖ヌクレオチドから基質ペプチドへの糖転移反応を触媒するが、一般的な糖転移酵素とのアミノ酸配列の相同性は高くない。これまでに *S*-結合型糖転移酵素の三次元構造は報告されておらず、反応に関わるアミノ酸残基の情報を含め、酵素の反応機構の詳細についても明らかになっていない。

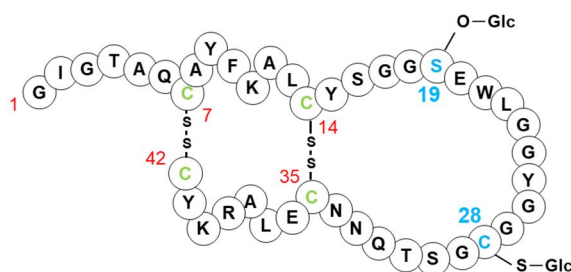


図1. ペプチド性抗生物質 Thurandacin の構造

### 2. 研究の目的

本研究では、バクテリオシン生合成に関与し、*S*-結合型糖転移反応を触媒する新奇糖転移酵素 ThuS を対象として、糖転移酵素の基質結合や基質選択性に関わる構造基盤を解析し、化学的・生物学的安定性の高い *S*-結合型糖修飾の反応機構の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

GST-タンパク質を融合させた状態および His-タグを付加させた状態での ThuS タンパク質を大腸菌で大量発現させるための条件を検討し、手法を確立した。得られた大腸菌は超音波破碎し、アフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーによって、高純度で ThuS タンパク質を精製することに成功した。この精製標品を用いて、結晶化条件のスクリーニングと円偏光二色性スペクトル測定、予備的な X 線小角散乱測定を行った。また、得られた結晶については、放射光施設 Photon Factory における X 線回折実験に供した。その他、調製した ThuS タンパク質の糖転移活性を確認するためのアッセイ系も構築した。

### 4. 研究成果

円偏光二色性スペクトル測定の結果、ThuS タンパク質は  $\alpha$  ヘリックスに富んだ構造を持つことが明らかとなった。また、予備的な X 線小角散乱測定からは ThuS タンパク質が複数のドメインで構成されていることが示唆された。結晶化条件スクリーニングによって得られた単結晶について放射光施設 Photon Factory で X 線回折実験を行った結果、最高で 2.7 Å 分解能の回折強度データを取得することができた。位相決定のため、重原子誘導体を調製して回折強度データを収集し、異常分散効果を利用した重原子同型置換法により、初期位相を決定した。その後、2.71 Å 分解能で構造精密化した。構造解析の結果、モデルが構築できたのは ThuS タンパク質の C 末ドメインに相当する領域のみであった。その理由として、結晶化の過程で ThuS タンパク質が切断・分解された可能性が高いと考えた。しかし、この ThuS タンパク質の C 末ドメインの立体構造はこれまでに報告のない新規構造であった(図2)。

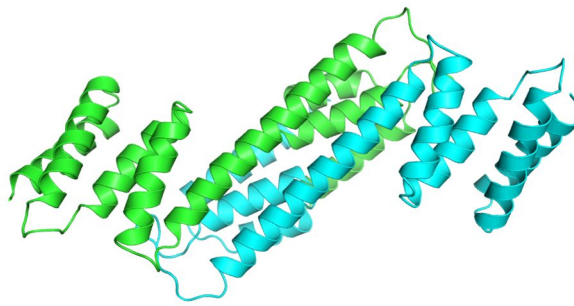


図 2 . ThuS タンパク質の C 末ドメインの結晶構造 (二量体)

その後、結晶化条件探索を進め、以前とは異なる条件で得られた結晶について、回折強度データを収集した。先に決定した ThuS タンパク質の C 末ドメインの立体構造および他の *O*-結合型糖転移酵素の立体構造をモデル分子とした分子置換法により初期位相を決定し、1.92 Å 分解能で構造精密化し、ThuS タンパク質全長の立体構造を決定した (図 3)。

ThuS タンパク質は糖転移反応に重要な金属イオン結合部位を持つ N 末ドメインと、二量体形成に重要な C 末ドメインから構成されていた。N 末ドメインは糖転移酵素に見られる GT-A fold をとっていた。また、N 末端約 50 残基は他の糖転移酵素には存在しないか、あるいはアミノ酸配列が保存されていない領域であった。C 末ドメインについて、他の糖転移酵素とアミノ酸配列を比較すると、*S*-結合型糖転移酵素の間では保存性が比較的高いものの、*O*-結合型糖転移酵素との有意な相同性は見出されなかった。C 末ドメインの立体構造は、先に構造解析したドメイン単独の構造と大きな変化はなく、複数の  $\alpha$ -ヘリックスで二量体境界面を形成していた。

基質の一つである UDP- $\alpha$ -D-glucose との複合体構造解析から、ThuS タンパク質は、その N 末ドメインに触媒活性部位が存在することが予想された。しかしながら、精製タンパク質を用いた *in vitro* 活性試験の結果、ThuS タンパク質の N 末ドメインだけでは基質ペプチドに対する糖転移活性を持たないことも明らかとなった。すなわち、ThuS タンパク質の C 末ドメインは単に二量体形成を担っているだけでなく、酵素活性にも寄与することが示唆された。このことは、*S*-結合型糖転移酵素の特徴であるかもしれない。

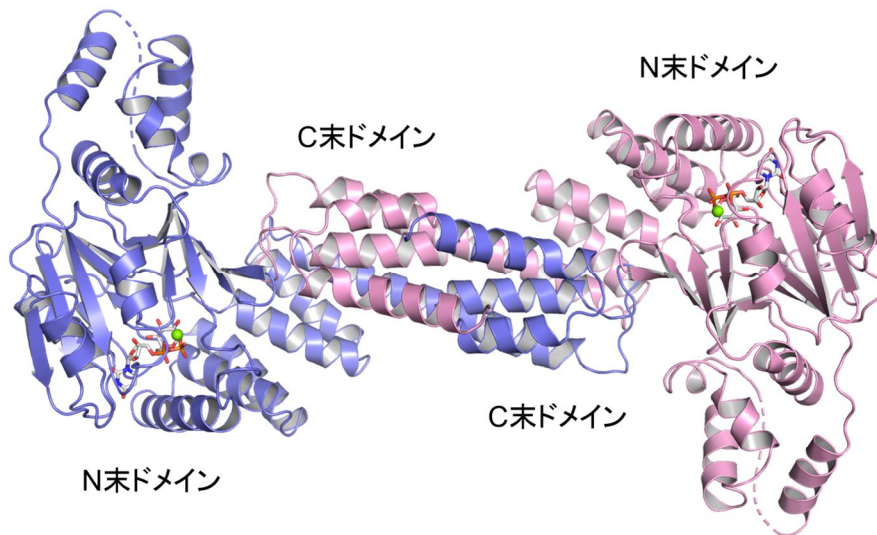


図 3 . ThuS タンパク質の結晶構造 (二量体)

本研究では、これまでに報告例のない、*S*-結合型糖転移酵素の立体構造を決定することに成功した。既報の糖転移酵素とは異なる構造をとっていることが明らかとなったため、本研究成果から *S*-結合型糖転移酵素の構造的特徴や *S*-結合型糖転移反応に関する知見が得られると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Soeda Yoshiyuki, Saito Marino, Maeda Sumihiro, Ishida Kohki, Nakamura Akira, Kojima Shuichi, Takashima Akihiko	4. 巻 68
2. 論文標題 Methylene Blue Inhibits Formation of Tau Fibrils but not of Granular Tau Oligomers: A Plausible Key to Understanding Failure of a Clinical Trial for Alzheimer's Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1677 ~ 1686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-181001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura Noriko, Shindo Mayumi, Ohtsuka Jun, Nakamura Akira, Tanokura Masaru, Hiroi Takachika, Kaminuma Osamu	4. 巻 34
2. 論文標題 Identification of novel interacting regions involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 3197 ~ 3208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201902229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nosaki Shohei, Terada Tohru, Nakamura Akira, Hirabayashi Kei, Xu Yuqun, Bui Thi Bao Chau, Nakano Takeshi, Tanokura Masaru, Miyakawa Takuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Highlighting the potential utility of MBP crystallization chaperone for Arabidopsis BIL1/BZR1 transcription factor-DNA complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83532-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田 航基, 西本 亜香音, 中村 顕, 小島 修一
2. 発表標題 プロセッシング前の状態の結晶構造に基づくSubtilisinの成熟過程の解析
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田 航基, 西本 亜香音, 中村 顕, 小島 修一
2. 発表標題 X線結晶構造解析に基づくSubtilisinにおける成熟過程の分析
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 顕, 松浦 辰信, 椎名 彩圭, 関 友梨栄, 関口 和樹, 初山 瑞季, 小島 修一
2. 発表標題 リゾクチシン生合成酵素の結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 顕, 松浦 辰信, 深谷 翼, 椎名 彩圭, 関 友梨栄, 関口 和樹, 初山 瑞季, 小島 修一
2. 発表標題 特徴的な化学結合を形成するペプチド性抗生物質の生合成酵素の構造解析
3. 学会等名 日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------