

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)(一般)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570103

研究課題名(和文) 糖鎖に作用するグルコシダーゼの構造と機能の解明

研究課題名(英文)

Study on the structure and function of glucosidases acting on glycochains

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：50285194

研究成果の概要(和文)：

本研究は、*N*結合型糖鎖に作用するグルコシダーゼおよび関連酵素の構造機能相関、および、*N*結合型糖鎖がタンパク質の構造に果たす役割の解明を目的とした。その結果、プロセシング α -グルコシダーゼ I と相同性を有するタンパク質の立体構造を明らかにし、本酵素によるオリゴ糖の創出に成功した。また、糸状菌プロセシング α -グルコシダーゼ I の発現系の構築を行い詳細な酵素化学的性質を明らかにした。関連酵素として細菌由来のエンド- α -1,2-マンノシダーゼと相同性を有するタンパク質の研究を行い、細菌の酵素として初めて酵素化学的性質を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

The purpose of this research was to elucidate the structure-function relationship of alpha-glucosidases and related enzymes, which act on the *N*-linked oligosaccharides. This research also investigated the relationship between the *N*-linked oligosaccharides and the protein structure. The three-dimensional structure of an enzyme homologous to processing alpha-glucosidase I has been determined, and the enzyme was shown to be useful for producing oligosaccharides. The expression system of a fungal processing alpha-glucosidase I was constructed, and the enzymatic properties were determined. We also investigated some enzymatic properties of a bacterial enzyme homologous to endo-alpha-1,2-mannosidase, an enzyme potentially physiologically related to processing alpha-glucosidases. This was the first report on the enzymatic characterization of a bacterial endo-alpha-1,2-mannosidase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成21年度	800,000	240,000	1,040,000
平成22年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析、糖タンパク質糖鎖、グルコシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報はDNAにコードされており、この情報がRNAに転写され、さらに

タンパク質に翻訳されることによって、生命活動が実現していることは、今や高校の教科書にも記載されている有名な事象である。しかしながら、タンパク質がその性質を発揮させるためには、糖鎖の付加を始めとする多くの翻訳後修飾がタンパク質に加わる必要があると、このような複雑な過程が、生物を生物らしくしているものであるといえる。

本研究でとりあげた *N*結合型糖鎖はタンパク質の翻訳後修飾の一つであるが、酵母からヒトに至るすべての真核生物において見られることから、真核生物にとっては遺伝情報のRNAの転写やタンパク質への翻訳と同様の、最も基本的な生命現象の一つであるといっても過言ではないように思われる。しかしながら、タンパク質への *N*結合型糖鎖の付加の過程は、DNAが均整のとれた二重らせん構造であることなどに比べると、はるかに複雑な過程のように見える。

タンパク質での *N*結合型糖鎖の付加およびその後の修飾の過程は以下のとおりである。(1)まず細胞器官の一つである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、Glc₃Man₉GlcNAc₂ という糖鎖が生合成される。(2)この糖鎖 Glc₃Man₉GlcNAc₂ 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 (図1)。(3)転移した糖鎖に対し、糖鎖の刈り込みや別の糖の付加が起こる。この過程はプロセッシングと呼ばれ、多くの場合、プロセッシング α -グルコシダーゼ I、プロセッシング α -グルコシダーゼ II、エキソマンノシダーゼによって加水分解されるが、動物ではプロセッシング α -グルコシダーゼ II やエキソマンノシダーゼの代わりに、エンド- α -1,2-マンノシダーゼが作用する経路も報告されている。さらに、ガラクトースやシアル酸などの糖が付加する場合があります、多様な糖鎖が形成される。

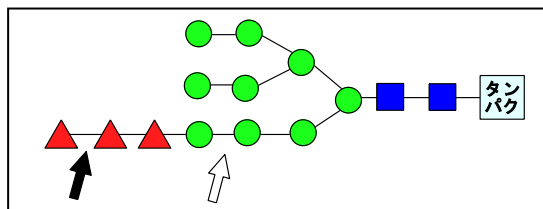


図1 タンパク質に付加した直後の *N*結合型糖鎖の構造 赤三角はグルコース (Glc)、緑丸はマンノース (Man)、青四角は *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を表す。黒矢印はプロセッシング α -グルコシダーゼ I の作用する箇所、白矢印はエンド- α -1,2-マンノシダーゼの作用する箇所を示す

*N*結合型糖鎖のタンパク質への付加とプロセッシングの過程は、重要な生命現象であり、その不全は多くの疾患と関わることが明らかになっていることから、特に細胞を材料とした研究は数多くなされてきた。しかしながら、*N*結合型糖鎖のタンパク質への付加とプロセッシングに関わる多くの酵素の立体構造は未知であり、特に、本研究の開始当初は、プロセッシング α -グルコシダーゼ I が属する糖質加水分解酵素の一群である Glycoside hydrolase family 63 において、立体構造の報告はなされていなかった。また、*N*結合型糖鎖の存在が、活性や安定性に重要なタンパク質が報告されているが、糖鎖がタンパク質の構造にどのような機能を果たしているか明らかにされていないなど、*N*結合型糖鎖に作用する酵素の構造機能相関および *N*結合型糖鎖がタンパク質の構造に果たす役割には、いまだに不明な点が多いと言える。

2. 研究の目的

本研究は、*N*結合型糖鎖に作用するグルコシダーゼおよび関連酵素の構造機能相関、および、*N*結合型糖鎖がタンパク質の構造に果たす役割の解明を目的とした。特に、*N*結合型糖鎖に作用するグルコシダーゼおよび関連酵素のうち、*N*結合型糖鎖前駆体がタンパク質に付加した直後に糖鎖に作用する酵素である、プロセッシング α -グルコシダーゼ I および、そのバイパス経路を担いプロセッシング α -グルコシダーゼ I および II に刈り込まれていない糖鎖を加水分解する酵素として報告されているエンド- α -1,2-マンノシダーゼを主な材料とした。また、研究を効果的に進めるため、糖鎖に作用する酵素と相同性を有する微生物のタンパク質に着目した。

特に哺乳類由来のタンパク質は現在の遺伝子工学の技術では大量発現系の構築が難しい場合が多いことから、多量のタンパク質を必要とする酵素の立体構造解析や基質特異性の解析といった研究は難しいと考えられる。近年さまざまな生物の全ゲノムが解析されたことにより、真核生物の糖鎖に作用する酵素と相同性を有するタンパク質の遺伝子を多くの細菌が保持していることが分かった。細菌は、真核生物に見られるような *N*結合型糖鎖は生産しないと報告されており、これらのタンパク質の多くは生理学的な機能は不明である。しかしながら、細菌由来の酵素は、大腸菌などの既存の遺伝子工学技術によって、発現系を構築することが容易なことや、これまでにない新たな酵素化学的性質を有し、新規な糖を創出するといった応用研

究につながるといった、多くの利点があると言える。

本研究においては、以下の4項目に関して成果を得たので、報告する。

(1) プロセシング α -グルコシダーゼ I と相同性を有するタンパク質、大腸菌 YgjK (以下 YgjK) の立体構造と酵素化学的性質の解析

(2) *Aspergillus brasiliensis* (旧名 *Aspergillus niger*) ATCC9642 のプロセシング α -グルコシダーゼ I (AbPGaseI) の発現系の構築と酵素化学的性質の解析

(3) *Shewanella amazonensis* 由来エンド- α -1,2-マンノシダーゼと相同性を有するタンパク質、Sama99 の発現系の構築と酵素化学的性質の解析

(4) *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642 イソプレナーゼ (IPU) における N 結合型糖鎖がタンパク質の構造に果たす役割の解析

3. 研究の方法

遺伝子工学

発現ベクターおよび変異酵素の構築に関する手法について、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、大腸菌を宿主発現系とした一般的な遺伝子工学の実験書に記載の方法によった。変異の導入は、サーマルサイクラーを用いた PCR 法を、変異導入の確認は DNA シーケンサーによった。

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を、LB (Luria-Bertani) 培地を用いて振盪培養を行った。菌体は超音波破碎機で破碎し、遠心して上清を集めることにより粗酵素液を調製した。酵素の精製は、疎水クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーによる方法 (YgjK および IPU)、グルタチオンアガロースによるアフィニティークロマトグラフィーによる方法 (AbPGaseI)、Ni-NTA カラムによるアフィニティークロマトグラフィーによる方法 (Sama99) のいずれかによった。

酵素の立体構造決定

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 のインキュベータに静置し、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。

酵素活性の測定

大腸菌 YgjK については、グルコーステストキットワコー (和光純薬) を用いたグルコースオキシダーゼ法、IPU については、プルランを基質とした Nelson-Somogyi 法によった。AbPGase I、および Sama99 は、各種糖鎖をピリジルアミノ化した基質を用い、高速液体クロマトグラフィーによって検出した。フッ化糖を用いた反応は、薄層クロマトグラフィーによって検出した。

4. 研究成果

(1) プロセシング α -グルコシダーゼ I と相同性を有するタンパク質、大腸菌 YgjK の立体構造と酵素化学的性質の解析

YgjK の立体構造を、X線結晶構造解析によって決定した。位相の決定はセレノメチオン置換体を用いた単波長異常分散 (SAD) 法によった。YgjK は β サンドイッチ構造から構成される N-ドメイン、および $(\alpha/\alpha)_6$ バレルから構成される A-ドメインの2つのドメインから構成され、ドメイン間を α ヘリックスから成るリンカーがつかないでいた (図2)。活性中心は $(\alpha/\alpha)_6$ バレルで構成される A-ドメインに存在すると推定される。また、この $(\alpha/\alpha)_6$ バレルの途中で、大きくループアウトする特徴的な構造が存在し、A' 領域と命名した。この A' 領域は活性中心付近に存在し、糖質加水分解酵素の一群である Glycoside hydrolase family 63 の基質特異性の決定に重要な役割を担っていると考えられる。この立体構造は Glycoside hydrolase family 63 の酵素として世界で初めての報告である。

YgjK の活性中心付近に位置すると考えられるアスパラギン酸およびグルタミン酸残基 Asp324、Asp501、Glu727 に変異を導入し、これらの変異体は、野生型に比べ活性が大幅に低下することを明らかにした。また、Asp324 を Asn に置換した変異体 D324N とフッ化グルコースおよび様々な糖を反応させたところ、ガラクトース、ラクトース、メリビオースとの反応でオリゴ糖を生成させることがわかった。

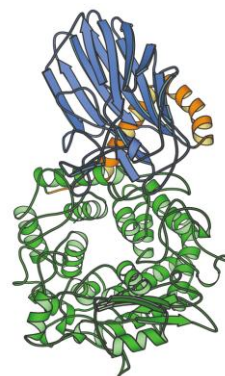


図2 YgjK の立体構造
N-ドメイン (青)、A-ドメイン (緑)、およびドメイン間つなぐリンカー (オレンジ) を示した

(2) *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642 のプロセシング α -グルコシダーゼ I (AbPGaseI) の発現系の構築と酵素化学的性質の解析

A. brasiliensis ATCC9642 の cDNA を調製し、プロセシング α -グルコシダーゼ I に保存されているアミノ酸配列に基づいて設計したオリゴ DNA プライマーを用いた PCR 法によって AbPGaseI の遺伝子を取得した。AbPGaseI は、グルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現させ、グルタチオンアガロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することに成功した。

AbPGaseI と YgjK の N 結合型糖鎖への作用についてピリジルアミノ化糖を用いて解析したところ、N 結合型糖鎖の切断部位は両酵素で同じであるが、YgjK の活性は AbPGaseI の 1 万分の 1 程度と大変低いものであることが判明した。

AbPGaseI の、N 結合型糖鎖に対する反応速度論的解析を行った。その結果、酵素と基質の結合の尺度である K_m 値は数 μ M 程度であることを明らかにした。YgjK と立体構造上同じフォールドから成るグルコアミラーゼにおいては、基質に対する K_m 値は数 mM 程度であることが知られており、AbPGaseI の基質に対する K_m 値は、グルコシダーゼとしては非常に小さい値を示すことを明らかにした。

(3) *Shewanella amazonensis* 由来エンド- α -1,2-マンノシダーゼと相同性を有するタンパク質、Sama99 の発現系の構築と酵素化学的性質の解析

エンド- α -1,2-マンノシダーゼは、真核生物において糖タンパク質の N 結合型糖鎖に作用する酵素で、プロセシング α -グルコシダーゼ I および II による N 結合型糖鎖の刈り込みのバイパス経路を担っている酵素であることが知られている。近年のゲノム解析の進展によりいくつかの細菌においても真核生物のエンド- α -1,2-マンノシダーゼと相同性を有するタンパク質の遺伝子を持つことが明らかになったが、その性質は知られていない。今回、*Shewanella amazonensis* 由来 GH99 酵素 (Sama99) の大腸菌における発現系を構築し、精製酵素の性質を解析した。

Sama99 は、ピリジルアミノ化 (PA) した $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ を Glc_1Man_1 と $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ に、 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ を Glc_3Man_1 と $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ に分解し、真核生物のエンド- α -1,2-マンノシダーゼと類似

の活性を示すことが判明した。 $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ と $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ に対する活性の比は、ラットエンド- α -1,2-マンノシダーゼが 1:0.08 であるのに対し Sama99 は 1:0.47 であり、その基質特異性は低いものであることを明らかにした。本報告は、細菌の Glycoside hydrolase family 99 の酵素の性質の報告としては世界で初めてである。

(4) *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642 イソプルラーゼ (IPU) における N 結合型糖鎖がタンパク質の構造に果たす役割の解析

IPU は、多糖プルランを分解してイソパノースという三糖を生成させる酵素である。IPU は、活性中心近傍に存在する N 結合型糖鎖を欠損させることによって、IPU の温度安定性が低下することが分かっている。本研究では、本酵素の活性中心近傍に存在する N 結合型糖鎖付加部位である Asn448 に変異を導入した N448A、およびその近傍の Tyr440 に変異を導入した Y440A を構築し、X 線結晶構造解析を行った。その結果 N448A では、活性中心近傍のループの立体構造が野生型と異なることを明らかにした。

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 3 件)

① Kurakata, Y., Uechi, A., Yoshida, H., Kamitori, S., Sakano, Y., Nishikawa, A., and Tonozuka, T., Structural insights into the substrate specificity and function of *Escherichia coli* K12 YgjK, a glucosidase belonging to the glycoside hydrolase family 63. *J Mol Biol.*, 381, 116-128, 2008, 査読有

② Matsuda, K., Kurakata, Y., Miyazaki, T., Matsuo, I., Ito, Y., Nishikawa, A., and Tonozuka, T., Heterologous expression, purification, and characterization of an α -mannosidase belonging to glycoside hydrolase family 99 from *Shewanella amazonensis*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 797-799, 2011, 査読有

③ Tonozuka, T., Miyazaki, T., and Nishikawa, A., Structural similarity between a starch-hydrolyzing enzyme and an N-glycan-hydrolyzing enzyme:

exohydrolases cleaving α -1,X-glucosidic linkages to produce β -glucose, *Trends Glycosci. Glycotechnol*, 23, 93-102, 2011, 査読有

[学会発表] (計6件)

①松田佳奈、倉方悠馬、宮崎剛亜、松尾一郎、伊藤幸成、西河淳、殿塚隆史、*Shewanella amazonensis* 由来 GH99 α -Mannosidase の発現系の構築と性質の解析
日本農芸化学会、2011年3月27日、京都(京都女子大学)

②殿塚隆史、機能未知酵素を用いた新規な糖の創出、アグリビジネス創出フェア、2010年11月26日、千葉(幕張メッセ)

③Miyazaki, T., Matsumoto, Y., Takeda, Y., Matsuo, I., Ito, Y., Nishikawa, A., and Tonozuka, T., Molecular cloning and heterologous production of *Aspergillus niger* processing α -glucosidase I, Plant Polysaccharide and Applied Glycoscience Workshop 2010, 2010年7月29日~31日, 東京(笹川記念会館)

④宮崎剛亜、矢代浩之、西河淳、殿塚隆史、イソプラナーゼの活性中心近傍に存在する残基 Tyr440 の役割の解明、日本応用糖質科学会、2009年9月16日、弘前(弘前大学文京町キャンパス)

⑤Kurakata, Y., Matsumoto, Y., Ito, Y., Nishikawa, A., and Tonozuka, T., Structure and function of *Escherichia coli* YgjK, a glucosidase belonging to the glycoside hydrolase family 63, and a comparison with related enzymes, 8th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 2009年5月10日~13日, Ischia, Naples, Italy

⑥倉方悠馬、松本雄治、武田陽一、松尾一郎、伊藤幸成、西河淳、殿塚隆史、Glycoside Hydrolase Family 63 に属する二種類の酵素の機能解析、日本農芸化学会、2009年3月28日、福岡(マリンメッセ福岡)

[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.tuat.ac.jp/~seika/tonozuka/>

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：50285194

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者

西河 淳 (NISHIKWA ATSUSHI)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：30218127