

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580117

研究課題名（和文）糖タンパク質糖鎖の酵素的導入による生体認識配糖体創製のための基盤構築

研究課題名（英文）Fundamental Research for the synthesis of biorecognition glycosides by enzymatic introduction of oligosaccharides from glycoproteins

研究代表者

伊藤 和央（ITO KAZUO）

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：20183171

研究成果の概要（和文）：糖鎖遊離酵素遺伝子の高発現系の構築とその精製に成功し、高純度の糖鎖遊離酵素の供給基盤を構築した。組換え糖鎖遊離酵素は、各種糖タンパク質からN結合型糖鎖を遊離し、糖鎖分析への有用性が示唆された。また、遊離糖鎖を転移し、生体認識配糖体合成が可能となった。変異導入糖鎖遊離酵素を作成し、酵素分子の機能領域を調べた。さらに、X線立体構造解析のために組換え糖鎖遊離酵素の結晶化に成功した。

研究成果の概要（英文）：Expression system and purification method of recombinant N-linked oligosaccharide-releasing enzyme was established. The recombinant enzyme released oligosaccharides from various glycoproteins. Furthermore, it transferred the released oligosaccharides to form potential bio-recognition glycosides. Analysis of mutant recombinant enzyme showed the functional area on the enzyme. Furthermore, Crystallization of the recombinant enzyme succeeded for X-ray structural analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：糖鎖、生体認識、酵素、配糖体

1. 研究開始当初の背景

糖タンパク質に結合しているN結合型糖鎖は、血液型や血中糖タンパク質の肝臓への取り込みなどの生体認識機構に関与している。このような糖鎖を他の機能性分子に導入し、生体認識機能をもつ機能性配糖体分子を創製することが期待できる。エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼは、N結合型糖鎖を、糖鎖を遊離するとともに糖鎖受容体に糖鎖を転移する。本申請者らが発見した糖鎖遊

離酵素は、糖タンパク質から高分岐型糖鎖を特異的に遊離し、糖鎖を他の化合物に転移する。本酵素を利用して、糖タンパク質から天然の高分岐型糖鎖を導入し、糖鎖のもつ生体認識機能を備えた機能性配糖体を創製することができる。このためには、高品質な酵素標品を容易に利用できることが必須である。このために、本研究代表者らは本酵素遺伝子をクローニングしてきた。

2. 研究の目的

- (1) 組換え糖鎖遊離酵素の大量発現系の構築と高純度酵素の精製法の確立
- (2) 組換え糖鎖遊離酵素による、糖タンパク質からの糖鎖の遊離と転移導入の検証と機能性分子への糖鎖の導入、機能解析
- (3) 組換え糖鎖遊離酵素の機能領域の解析
- (4) 糖鎖遊離酵素遺伝子改変による特異性改変
- (5) 特異性改変組換え糖鎖遊離酵素を用いた糖タンパク質糖鎖の遊離、転移の検証
- (6) 組換え糖鎖遊離酵素の結晶化と立体構造の解明

3. 研究の方法

- (1) 組換え糖鎖遊離酵素遺伝子の大腸菌での大量発現系の構築

糖鎖遊離酵素の遺伝子をT7プロモーター系プラスミドあるいは非T7プロモーター系プラスミドに挿入し、大腸菌の形質転換体を作成し、可溶性の活性保持型組換え糖鎖遊離酵素の発現系を構築した。このとき、アフィニティー精製のためのタグや可溶化促進タグ遺伝子の付加も検討した。また、培養温度、培養時間、誘導時菌体濃度、誘導剤濃度、培地組成などの条件を詳細に検討し、発現した糖鎖遊離酵素のほとんどが大腸菌の可溶性画分への移行するような培養条件を確立した。

- (2) 糖鎖遊離酵素の効率的精製法の確立

Hisタグ用Niカラムなどを用いて発現タンパクを分離した。高回収率で精製組換え糖鎖遊離酵素標品を調製することを目指した。

- (3) 組換え糖鎖遊離酵素による、糖タンパク質からの糖鎖の遊離と転移導入の検証

組換え糖鎖遊離酵素を用いて、様々な構造の糖鎖を持つ各種糖タンパク質からの糖鎖遊離作用を電気泳動によって調べた。また、ヒト血清や赤血球などの生体試料中の糖タンパク質からの糖鎖遊離作用を同様に解析した。さらに、組換え糖鎖遊離酵素を用い、各種ヒト由来糖タンパク質の糖鎖を、水酸基を持つ化合物へ転移導入し、薄層クロマトグラフィーや質量分析によって確認した。また、仔牛由来糖タンパク質の糖鎖を転移導入した配糖体の選択的取込みを検証した。

- (4) 糖鎖遊離酵素の機能領域の解析

塩基置換プライマー、インサートプライ

マーなどを用いてインバースPCRを行い、部位特異的変異、挿入あるいは欠失を発現ベクター中の糖鎖遊離酵素遺伝子に導入した。また、error-prone PCRによってランダム変異を導入した。そして、大腸菌で発現させ、様々な糖タンパク質からの糖鎖遊離活性を測定し、活性に関与するアミノ酸残基や糖鎖認識領域を調べた。

- (5) 組換え糖鎖遊離酵素の結晶化とX線結晶解析

ハンギングドロップでの蒸気拡散法によって組換え糖鎖遊離酵素の結晶化条件を検討した。得られた結晶のX線構造解析を行った。

- (6) 組換え糖鎖遊離酵素の免疫化学的解析

精製した組換え糖鎖遊離酵素を抗原として家兔を免疫し、抗血清を調製した。得られた抗血清を用いて、イムノプロットイングによる解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 糖鎖遊離酵素遺伝子の大腸菌での発現系の構築

同酵素遺伝子をプラスミドに挿入し、大腸菌の形質転換体を作成した。また、アフィニティー精製や可溶化促進タグ遺伝子を付加し、その発現系も構築した。さらに、同遺伝子のうち、活性に必要な領域の発現系も構築した。また、アフィニティー精製のためのタグや可溶化促進タグ遺伝子を付加した発現系も構築することができた。そして、特定の誘導条件下で可溶性の状態が発現した。

- (2) 発現酵素の精製法の確立

アフィニティータグの付加した発現酵素の大腸菌からの最適な分離精製法を検討した。その結果、アフィニティーカラムには吸着しなかった。このため、同タグを付加しない酵素を発現させ精製法を検討し、二段階のカラムクロマトグラフィーによって高回収率で精製酵素票品を得ることに成功した。高純度の酵素を用いた糖鎖の遊離や糖鎖転移による生体認識配糖体の合成に利用する基盤が出来上がった。また、同酵素のX線結晶解析用の結晶を調製するための精製酵素標品を得ることができるようになった。

- (3) 組換え糖鎖遊離による糖タンパク質からの糖鎖遊離と遊離糖鎖の転移による生体認識配糖体の合成検証

組換え糖鎖遊離酵素の大量の発現と精製を行った。その結果、精製の過程で発現酵素の安定性が低下することを見出した。そこで、

誘導条件を再検討し、精製の過程を通じて安定な酵素を発現することができ、これを分離精製した。精製した発現酵素は各種糖タンパク質から高分岐型糖鎖を容易に遊離した。糖タンパク質プロテオミクス研究への有用性が示唆された。また、体液や細胞などの生体試料中の糖タンパク質からも糖鎖を遊離し、生体試料の糖鎖分析への利用が示唆された。さらに、遊離した高分岐糖鎖を水酸基結合化合物に転移した。このため、本酵素を用いて、糖鎖の生体認識機能をもつ配糖体を合成することができることが明らかとなった。

(4)糖鎖遊離酵素遺伝子への変異導入と変異酵素の機能解析

PCR 反応条件を変え、糖鎖遊離酵素遺伝子にランダム変異を導入した。変異導入酵素の糖タンパク質からの糖鎖遊離作用を調べた。その結果、糖タンパク質から高分岐型糖鎖を遊離する活性の低下した変異導入酵素が得られた。また、結合する糖鎖の多い糖鎖タンパク質からより早く糖鎖を遊離する変異酵素が得られた。また、インバース PCR によって様々な欠失を導入した酵素の発現系を構築した。欠失変異酵素の糖タンパク質からの糖鎖遊離作用を調べた。その結果、糖鎖遊離酵素の特定の領域が、糖鎖との相互作用に関与していることが示唆された。

(5)組換え糖鎖遊離酵素の結晶化と X 線結晶構造解析

精製発現酵素を用いて様々な結晶化条件を検討し、いくつかの条件において形状の異なる酵素の結晶を得た。さらに結晶化条件を検討し、複数の単結晶を得た。これらの結晶の X 線結晶解析を行ったところ、立体構造を決定するために適した結晶であることが明らかとなった。得られた結晶を用いてさらに X 線結晶構造解析を行うことによって立体構造が解明されるものと考えられた。

(6)組換え糖鎖遊離酵素の免疫化学的性質の解析

糖鎖遊離酵素に対する特異抗体が得られた。本抗体を用いて、組換え発現糖鎖遊離酵素と類似した酵素の存在を見出した。また、本抗体を用いた糖鎖遊離酵素の検出法を構築した。生体試料中の類似酵素の検出を行い、マスキリングに利用できることが明らかとなった。

以上の結果から、糖鎖遊離酵素の供給基盤が確立され、本酵素を用いることによって糖タンパク質から直接天然型の糖鎖を様々な化合物に導入し、糖鎖の持つ生体認識機能を備えた様々な機能性化合物を合成すること

が可能となった。今後、ドラッグデリバリーシステムなどの特異的局在化などへの応用が期待される。また、糖鎖遊離酵素を用いた糖鎖診断法の実現に向けて一歩前進した。また、同酵素の立体構造解明のための基礎ができた。

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 6 件)

- ① Asparagine-linked oligosaccharide-releasing enzymes produced by basidiomycetes: Tasuku Hamaguchi, Yukako Inoue, Tsukasa Ito, Kanako Shinohara, Satoshi Taniwaki, Nobuhiro Kaizumi, Hiromoto Hisada, Yoji Hata, Tipaporn Limpaseni, Piamsook Pongsawasdi, and Kazuo Ito, *Oyotositukagaku*, **1**, 159-167(2011)査読有
- ② Synthesis of epicatechin glucosides by a β -cyclodextrin glycosyltransferase: Pornpun Aramsangtienchai, Warinthorn Chavasiri, Kazuo Ito and Piamsook Pongsawasdi, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **73**, 27-34 (2011)査読有
- ③ Molecular and biochemical characterization of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01. Santhana Nakapong, Rath Pichyangkura, Masaru Iizuka, Kazuo Ito and Piamsook Pongsawasdi. The 3rd Biochemistry and Molecular Biology International Conference, Chiang Mai, Thailand, April 6-8, (2011). 査読無
- ④ Synthesis of a novel prebiotic trisaccharide by a type I α -glucosidase from *B. licheniformis* strain TH4-2:P. Nimpiboon, Santhana Nakapong, Rath Pichyangkura, Kazuo Ito, and Piamsook Pongsawasdi, *Process Biochem*, **46**, 448-457 (2011).査読有
- ⑤ Synthesis of cellobiose-containing oligosaccharides by Intermolecular transglucosylation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp A11: Wannapa Wongsangwattana, Jarunee Kaulpiboon, Kazuo Ito, and Piamsook Pongsawasdi, *Process Biochemistry*, **45**, 947-953 (2010).査読有
- ⑥ Purification, Characterization and Molecular Cloning of a Novel Endo- β -N-acetylglucosaminidase from the Basidiomycete, *Flammulina velutipes*: Tasuku Hamaguchi, Tsukasa Ito, Yukako Inoue, Tipaporn Limpaseni, Piamsook Pongsawasdi, and Kazuo Ito, *Glycobiology*, **20**, 420-432(2010).査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

- ① 高橋剛生、谷脇 聡、浜口 祐、岡 夕貴、Kuakarun Krusong、Jarunee Kaulpiboon、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2012年3月25日)担子菌 *Agaricus bisporus* 由来エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼABの遺伝子クローニングに関する研究、2012年日本農芸化学会大会(京都)
- ② 海住宜広、浜口 祐、後藤真璃子、Kuakarun Krusong、Jarunee Kaulpiboon、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2012年3月25日)担子菌 *Flammulina velutipes* 由来エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ FV のプロセシング酵素の精製とその同定、2012年日本農芸化学会大会(京都)
- ③ 浜口 祐、海住宜広、篠原かな子、宮原 郁子、田中里佳、Kuakarn Kursong、Jarunee Kaulpiboon、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2012年3月25日)担子菌 *Flammulina velutipes* 由来エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ FV 遺伝子の酵母での発現と X 線結晶構造解析、2012年日本農芸化学会大会(京都)
- ④ 海住宜広、濱口 祐、久田博元、秦 洋二、Kuakarun Krusong、Jarunee Kaulpiboon、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2011年9月22日)担子菌 *Flammulina velutipes* におけるアスパラギン結合型糖鎖遊離酵素のプロセシング酵素、第 84 回日本生化学会大会(京都)
- ⑤ 浜口 祐、海住宜広、篠原かな子、Kuakarn Kursong、Jarunee Kaulpiboon、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2011年9月22日)担子菌由来エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ FV 遺伝子の酵母での発現と発現酵素の性質、第 84 回日本生化学会大会(京都)
- ⑥ 海住宜広、濱口 祐、久田博元、秦 洋二、Kuakarun Krusong、Jarunee Kaulpiboon、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2011年5月21日)担子菌 *Flammulina velutipes* におけるアスパラギン結合型糖鎖遊離酵素のプロセシング、第 58 回日本生化学会近畿支部例会(大阪)
- ⑦ Nakapong, S., Pichyangkura, R., Iizuka, M., Ito, K., and Pongsawasdi, P.(2011, April 20)Molecular and biochemical characterization of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01, The 3rd Biochemistry and Molecular Biology International Conference, Chiang Mai, Thailand
- ⑧ 谷脇 聡、濱口 祐、Kuakarun Krusong、Jarunee Kaulpiboon、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2011年3月27日)担子菌 *Agaricus bisporus* 由来エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ AB の精製とその特異性、2011年日本農芸化学会大会(京都)
- ⑨ 谷脇 聡、濱口 祐、Kuakarun Krusong、Jarunee Kaulpiboon、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2010年12月10日)担子菌 *Agaricus bisporus* 由来エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ AB の精製とその性質、第 83 回日本生化学会大会(神戸)
- ⑩ Satoshi Taniwaki, Tasuku Hamaguchi, Kuakarun Krusong, Jarunee Kaulpiboon, Tipaporn Limpaseni, Piamsook Pongsawasdi, and Kazuo Ito (2010, November 21) Comparative study of basidiomycetes endoglycosidases acting on asparagine-linked oligosaccharides, The 2nd ACP Joint Seminar(Khon Kaen, Thailand)
- ⑪ Santhana Nakapong, Rath Pichyangkura, Masaru Iizuka, Kazuo Ito and Piamsook Pongsawasdi (2010, November 21) Mutation at subsite +2 asparagine residue of levansucrase caused the change in product size of levan, The 2nd ACP Joint Seminar(Khon Kaen, Thailand)
- ⑫ Kuakarun Krusong, Piriya Kaewpathomsri, Jarunee Kaulpiboon, Kazuo Ito, Shuichiro Murakami, and Piamsook Pongsawasdi (2010, November 21) Characterization of amyloamylase from *Thermus filiformis*, The 2nd ACP Joint Seminar(Khon Kaen, Thailand)
- ⑬ Prapai Hongsa, Kazuo Ito and Tipaporn Limpaseni(2010, November 21) Characterization of transglycosylation products of recombinant cyclodextringlycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. BT01, The 2nd ACP Joint Seminar (Khon Kaen, Thailand)
- ⑭ 谷脇 聡、濱口 祐、Kuakarun Krusong、Jarunee Kaulpiboon、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2010年10月2日)担子菌 *Agaricus bisporus* の産生する糖タンパク質糖鎖遊離酵素の精製とその特異性、2010年度日本農芸化学会関西支部大会(奈良)

- ⑮ 濱口 祐、井上裕香子、伊藤 司、篠原かな子、谷脇 聡、海住宜広、久田博元、秦洋二、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2010年9月17日)担子菌の産生するアスパラギン結合型糖鎖遊離酵素系、第18回糖質関連酵素化学シンポジウム(静岡)
- ⑯ 谷脇 聡、濱口 祐、Kuakarun Krusong、Jarunee Kaulpiboon、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2010年5月22日)担子菌 *Agaricus bisporus* 由来エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ AB の精製とその性質、第57回日本生化学会近畿支部例会(奈良)
- ⑰ 篠原かな子、井上裕香子、小島美保子、濱口 祐、伊藤和央(2010年5月15日)担子菌由来ペプチド *N*-グリカナーゼの多様性、第11回関西グライコサイエンスフォーラム(大阪)
- ⑱ 篠原かな子、井上裕香子、濱口 祐、Kuakarun Krusong、Jarunee Kaulpiboon、Tipaporn Limpaseni、Piamsook Pongsawasdi、伊藤和央(2010年3月28日)担子菌由来新規ペプチド *N*-グリカナーゼ FV 遺伝子のクローニングに関する研究、2010年日本農芸化学会大会(東京)
- ⑲ 濱口 祐、谷脇 聡、海住宜広、久田博元、秦 洋二、伊藤和央(2009年11月21日)担子菌由来エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの発現系構築と発現酵素の性質、日本応用糖質科学会中国四国・近畿支部合同シンポジウム(岡山)
- ⑳ 濱口 祐、井上裕香子、篠原かな子、谷脇 聡、伊藤和央(2009年10月24日)担子菌 *Flammulina velutipes* 由来ペプチド *N*-グリカナーゼの精製と遺伝子クローニング、第82回日本生化学会大会(神戸)
- ㉑ 濱口 祐、谷脇 聡、久田博元、秦 洋二、伊藤和央(2009年7月18日)担子菌由来エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の発現系の構築、第56回日本生化学会近畿支部例会(大阪)

[図書] (計1件)

- ① Enzymatic Synthesis of Linear, Cyclic and Complex Type Oligosaccharides, Piamsook Pongsawasdi and Kazuo Ito, in *Oligosaccharides: Sources, Properties and Applications* Nicole S. Gordon ed., Nova Science Publishers pp. 109-134(2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 和央 (ITO KAZUO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：21580117

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

宮原 郁子 (MIYAHARA IKUKO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：40271176

(4) 研究協力者 (学生)

濱口 祐 (HAMAGUCHI TASUKU)、谷脇 聡 (TANIWAKI SATOSHI)、梅林 秀宇 (UMEBAYASHI HIDETADA)、岡 夕貴 (OKA YUKI)、後藤 眞璃子 (GOTO MARIKO)、篠原 かな子 (SHINOHARA KANAKO)、劉 昊 (RYU HAO)、海住 宜広 (KAIGUMI TAKAHIRO)、高谷 尚弥 (TAKATANI NAOYA)、竹内 朋史 (TAKEUCHI TOMOFUMI)、吉田 達也 (YOSHIDA TATSUYA)、石井 麻衣子 (ISHII MAIKO)、高橋 剛生 (TAKAHASHI GO)