

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8日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580128

研究課題名（和文）ユニークな阻害選択性をもつ化合物による、基質特異性を反映した酵素分類法の検討

研究課題名（英文）Prediction of substrate specificity of enzymes based on sensitivity to a uniquely selective inhibitor.

研究代表者

仁戸田 照彦（NITODA TERUHIKO）

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：80284090

研究成果の概要（和文）：酵素 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（以後、 β -GlcNAcase とする）はヒトを含む幅広い生物種に分布しており、重要な生理機能をもつと考えられているが未解明な部分が多い。本研究は、新規 β -GlcNAcase 阻害剤 TMG-chitotriomycin に対する阻害感受性が β -GlcNAcase の基質特異性と明確な相関をもつことを明らかにした。 β -GlcNAcase の生理機能は基質特異性と密接な関係にあることから、TMG-chitotriomycin は β -GlcNAcase の生理機能を分類するツールとしても期待される。

研究成果の概要（英文）： β -*N*-Acetylhexosaminidase (β -GlcNAcase), an enzyme widely distributed in organisms, is thought to be responsible for numerous physiological processes. However, most of the physiological functions remain to be clarified. The present study revealed that the new β -GlcNAcase inhibitor TMG-chitotriomycin had the unique selectivity based on the substrate specificity of β -GlcNAcase, indicating that TMG-chitotriomycin can be used as a tool for classification of β -GlcNAcases differ in substrate specificity and even also in physiological functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：キチン、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ、酵素阻害剤、TMG-chitotriomycin、阻害選択性、糖質加水分解酵素ファミリー、基質特異性、基質認識

1. 研究開始当初の背景

β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（以後、 β -GlcNAcaseとする）は、キトオリゴ糖・*N*-グリカン・糖タンパク・糖脂質から非還元末端の*N*-アセチルグルコサミン（以後、GlcNAcとする）を遊離する糖質加水分解酵素であり、アミノ酸配列の類似性に基づく糖質加水分解酵素ファミリー（GHファミリー）分類により、family 3, family 20, family 84に分類されている。 β -GlcNAcaseは非常に幅広い生物種に分布しており、昆虫や糸状菌の構造的成分の維持をはじめ、病原菌からの防御・ウイルス感染・細胞シグナル伝達・受精過程・炎症反応など重要な生理過程に関与していると考えられているが、 β -GlcNAcaseの生理機能には依然として不明な部分が多く、解明が求められている。

β -GlcNAcaseの機能解明において、阻害剤は重要なツールとなっており、生体内における β -GlcNAcaseの阻害実験への利用に加えて、前述の糖質加水分解酵素familyによる分類の指標としての価値も高まっている。従来の代表的 β -GlcNAcase阻害剤としては、合成阻害剤PUGNAcとNAG-thiazolineがあり、前者は3つのfamilyすべて、後者はfamily 20とfamily 84の酵素を強力に阻害することが明らかとなっている(*Org. Biomol. Chem.*, **5**, 3013, 2007)。しかし、アミノ酸配列の類似性に基づく分類は、酵素の立体構造を反映していることから、触媒反応機構における性状解析には非常に有用であるが、酵素の基質特異性や基質親和性を必ずしも反映しているとはいえないことから、酵素の網羅的な性状解析や生理的機能の解明、応用研究を行なうために十分な情報を提供しているとはいえない。この点に関しては、PUGNAcやNAG-thiazolineによる分類も同様である。 β -GlcNAcaseの多くが属するfamily 20の酵素は、進化の過程で何回もの基質特異性の変化を経ていることが示唆されているこ

とから(*BMC Evol. Biol.*, **8**, 214, 2008)、 β -GlcNAcaseの多岐にわたる生理機能には基質特異性が大きく関わっていると考えられる。したがって、生理的機能の解明のためには、それらの特性に関する情報を提供できる分類法が非常に有用であり、そのためのプローブとなる阻害剤が求められる。

本研究代表者は、キチン分解酵素阻害剤の探索の過程において、*Streptomyces*属放線菌の培養上清より、新規オリゴ糖TMG-chitotriomycinを見いだした(*J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4146, 2008)。

TMG-chitotriomycinは従来の β -GlcNAcase阻害剤にはみられない阻害特異性を有しており、酵素の基質特異性を反映する阻害剤である可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では幅広い種類の β -GlcNAcaseについて、TMG-chitotriomycinによる阻害の程度を調べることにより、まず糖質加水分解酵素familyによる分類との関係を明らかにすることで、従来の阻害剤との相違点を明らかにすることを第1番目の目的とする。次に、基質特異性との関係を探ることにより、TMG-chitotriomycinの阻害選択性が酵素の基質特異性を反映するものであるかどうかの確認を行ない、TMG-chitotriomycinによる基質特異性を反映した酵素の分類が可能であるかどうかの結論を得ることを第2番目かつ最大の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各種 β -GlcNAcaseのTMG-chitotriomycin阻害感受性の検討

動物・植物・微生物由来の14種類の

β -GlcNAcaseについて、TMG-chitotriomycinによる阻害の程度を調べ、TMG-chitotriomycinが

既知の β -GlcNAcase阻害剤と異なる阻害特異性を有するかどうかを調べた。

① 14種類の β -GlcNAcaseについて、既知の β -GlcNAcase阻害剤であるPUGNAC（市販品）とNAG-thiazoline（自家合成）による阻害試験を行い、阻害感受性からGHファミリー分類を試みた。

② ①で分類した14種類の β -GlcNAcaseについてTMG-chitotriomycinによる阻害試験を行い、既知の β -GlcNAcase阻害剤との阻害特異性の違いについて調べた。

(2) TMG-chitotriomycin感受性酵素と

TMG-chitotriomycin非感受性酵素の基質特異性の検討

(1)により判明した14種類の β -GlcNAcaseのTMG-chitotriomycin阻害感受性と、これらの酵素の基質特異性や生体内機能についてのこれまでの報告の考察から、TMG-chitotriomycinはGH20の β -GlcNAcaseを基質特異性に基づいて分類すると推察されたことから、その確証を得ることを目的として、TMG-chitotriomycin感受性酵素とTMG-chitotriomycin非感受性酵素の基質特異性の検討を行った。

①キトオリゴ糖（重合度1～3）の*p*-ニトロフェニル誘導体に対する*p*-ニトロフェノール遊離活性の検討

②キトオリゴ糖（重合度1～4）に対する加水分解活性の検討

③複合型糖鎖の中核構造であるGnGnの2-アミノピリジン誘導体GnGn-PAに対する非還元末端GlcNAc遊離活性の検討

4. 研究成果

(1) 各種 β -GlcNAcaseのTMG-chitotriomycin阻害感受性の検討

14種類の β -GlcNAcaseについて、PUGNACとNAG-thiazolineによる阻害の有無を調べて検

討を行ったところ、PUGNACおよびNAG-thiazolineに対する阻害の有無から、13種類はGH20に、1種類はGH3に属するという結果が得られた。これらの酵素について、TMG-chitotriomycinによる阻害の有無を調べたところ、TMG-chitotriomycinはGH3の β -GlcNAcaseに対しては阻害を示さなかった。一方、GH20の β -GlcNAcase 13種類に対しては、5種類の酵素に阻害を示し、残り8種類の酵素に対しては阻害を示さないという結果が得られた。このことから、本化合物の阻害選択性は触媒反応機構だけによるものではないということが明らかとなった。さらに、検討を行った酵素のうち、基質特異性や生体内機能についての報告があるものについて、TMG-chitotriomycin阻害感受性との相関関係の可能性を考察したところ、TMG-chitotriomycinは生体内においてキトオリゴ糖を基質とする β -GlcNAcaseに対して阻害を示し、複合糖質の糖鎖などキトオリゴ糖以外の物質を基質とする β -GlcNAcaseに対しては阻害活性を示さないのではないかと推察された。

(2) TMG-chitotriomycin感受性酵素と

TMG-chitotriomycin非感受性酵素の基質特異性の検討

TMG-chitotriomycin感受性酵素は、キトオリゴ糖およびその誘導体を分解し、枝分かれのある複合型糖鎖の中核構造GnGnの2-アミノピリジン誘導体であるGnGn-PAを分解しなかった。一方、TMG-chitotriomycin非感受性酵素は、キトオリゴ糖およびその誘導体を分解せず、GnGn-PAのみを分解した。このように、酵素のTMG-chitotriomycin感受性と基質特異性との間には明確な相関関係があることが明らかとなり、TMG-chitotriomycinによる β -GlcNAcaseの分類が可能であることが示さ

れた。さらに、関連する他の研究結果と併せてβ-GlcNAcaseの生理的機能の面から考えると、TMG-chitotriomycin感受性酵素はキチン分解に寄与して生体維持や栄養獲得に関わる酵素であり、TMG-chitotriomycin非感受性酵素は、複合糖質（N-グリカン・糖タンパク・糖脂質など）の糖鎖プロセッシングに寄与する酵素と考えられる。これらのことから、TMG-chitotriomycinはβ-GlcNAcaseの生理的機能を分類するツールとしても利用できる可能性があると考えられる。なお、本研究期間中に中国の研究グループにより発表された論文（*J. Biol. Chem.*, **286**, 4049, 2011）では、主に酵素の基質結合部位の構造について解析を行い、TMG-chitotriomycinがキチン分解を担う昆虫β-GlcNAcaseを選択的に阻害することを示している。本研究は、酵素の基質特異性との関連からそれを実証し、昆虫以外のβ-GlcNAcaseについてもTMG-chitotriomycinによる阻害感受性との関係を示した点で、重要な意義をもつといえる。TMG-chitotriomycin感受性によるβ-GlcNAcaseの分類をまとめると、図1のようになる。

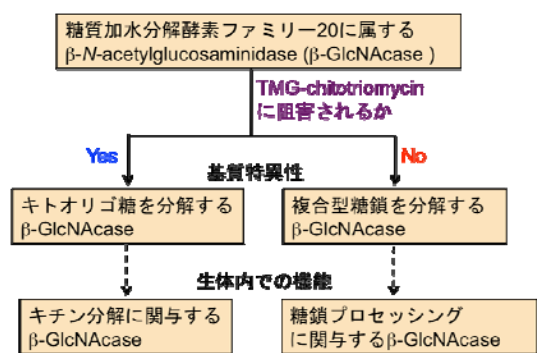


図1 TMG-chitotriomycin によるβ-GlcNAcase の分類

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1件）

Hirokazu Usuki, Miho Toyo-oka, Hiroshi Kanzaki, Toru Okuda, Teruhiko Nitoda,

Pochonicine, a polyhydroxylated pyrrolizidine alkaloid from fungus *Pochonia suchlasporia* var. *suchlasporia* TAMA 87 as a potent β-N-acetylglucosaminidase inhibitor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有, Vol, 17, 2009, 7248-7253

〔学会発表〕（計14件）

①塩田博人、臼木博一、神崎浩、仁戸田照彦、β-N-Acetylglucosaminidase 阻害物質 TMG-chitotriomycin の阻害選択性に関する詳細検討、第37回日本農薬学会大会、2012年3月16日、岡山大学（岡山市）

②塩田博人、臼木博一、神崎浩、仁戸田照彦、β-N-Acetylglucosaminidase 阻害物質 TMG-chitotriomycin の阻害選択性、平成23年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会、2011年9月17日、宮崎大学（宮崎市）

③塩田博人、臼木博一、神崎浩、仁戸田照彦、Inhibitory selectivity of β-N-acetylglucosaminidase inhibitor TMG-chitotriomycin produced by *Streptomyces anulatus*、国際微生物学連合2011会議、2011年9月8日、札幌コンベンションセンター（札幌市）

④仁戸田照彦、キチン分解酵素を特異的に阻害する有機化合物、第10回バイオアカデミックフォーラム2011、2011年6月30日、東京ビッグサイト（東京）

⑤塩田博人、行本千恵、臼木博一、神崎浩、仁戸田照彦、Inhibitory properties of β-N-acetylglucosaminidase inhibitor TMG-chitotriomycin and structurally related compounds produced by *Streptomyces anulatus*、2010環太平洋国際会議、2010年12月17日、ハワイコンベンションセンター（ホノルル市）

〔図書〕（計1件）

Teruhiko Nitoda, 他、Science Pub Inc、Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/Natural Products, 2009、pp. 499-512

〔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

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/pro>

file/nougaku01_2.html

研究者番号：80284090

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁戸田 照彦 (NITODA TERUHIKO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし