

## 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25年 6月10日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570111

研究課題名（和文） 膵臓酵素に見出した糖鎖認識による消化・吸収と外分泌調節機構の解明

研究課題名（英文） Regulation mechanism of nutrient assimilation and exocrine system which is achieved by the carbohydrate-recognition of pancreatic enzymes

研究代表者

小川 温子 (OGAWA HARUKO)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授

研究者番号：90143700

研究成果の概要（和文）：

デンプン分解酵素  $\alpha$ -アミラーゼ、トリプシノーゲンならびに膵リパーゼに見出した糖鎖結合部位とその生物機能について解明した。

1. ウシトリプシノーゲンと Me $\cdot$ -GalNAc との共結晶化と X線結晶解析により 2 か所の糖結合部位を決定した。
2. ヒト膵リパーゼの大腸菌での発現、精製、リフォールディング方法を検討し、大量精製法を確立した（特許出願済）。ブタ膵リパーゼとレコンビナントヒト膵リパーゼの糖鎖認識には類似性があることが示された。
3. ブタ膵  $\alpha$ -アミラーゼ (PPA) と腸管刷子縁の糖鎖リガンドとの結合によりデンプン消化が 2.5 倍に活性化する一方、膵液分泌時の PPA 高濃度下では糖吸収が阻害される事を見出した。PPA の糖タンパク質糖鎖結合性は、急激な高血糖を抑制し恒常性に寄与する。

研究成果の概要（英文）：

We found novel carbohydrate-binding activities of pancreatic enzymes:  $\alpha$ -amylase, trypsinogen/trypsin, and lipase, etc. The carbohydrate-binding sites of bovine trypsinogen and trypsin were identified by cocrystallization with Me $\cdot$ -GalNAc, and X-ray crystallography. Expression, purification, and refolding methods of recombinant human pancreatic lipase were established for the first time using *Escherichia coli*. The interaction between  $\alpha$ -amylase and N-glycans in the BBM activated starch degradation to produce much more Glc on one hand, while suppressing a sharp increase in Glc absorption on the other. Therefore, the carbohydrate recognition of  $\alpha$ -amylase was shown to play a key role in regulating Glc assimilation to maintain blood homeostasis in the intestine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：膵臓酵素、糖鎖認識、糖質消化、糖質吸収、外分泌調節、糖尿病

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物で摂取された食物は消化酵素によって分解され、小腸から吸収される。 $\alpha$ -アミラーゼは $\alpha$ -1,4結合で連なるグルコース配列をランダムに切断するエンド型のデンプン分解酵素で、動植物や微生物などの多くの生物がエネルギーを得る過程に必要な役割を果たす。われわれはマメ科植物レクチンの機能に関する研究との関わりで興味を持ち、以前からレクチンは反栄養素のひとつと捉えられてきたことと、特にインゲン豆レクチンが $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤との配列相同性を持つことから生体防御分子に分類され、実際に昆虫生育阻害作用を示すという報告に関心を持ち、ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ(PPA)と種々の植物レクチン、およびレクチン以外の糖タンパク質との相互作用を調べた。その結果、1830年に発見されて以来、170年以上もの間、幅広く数多くの研究が為されてきたPPAに未知の側面が残っており、予想外にもPPA自身が糖鎖認識能力を持ち、N-型糖鎖を持つ糖タンパク質に結合することが見つかった。試験管内ではレクチンとの結合によってPPAの酵素活性は阻害されず、むしろ活性化された。こうしてわれわれは、膵 $\alpha$ -アミラーゼが $\alpha$ -ManとN-アセチルラクトサミン配列に高親和性を示し、これらの糖を構成単位として含むN-型糖タンパク質と結合して活性化されることを発見した

ついでわれわれは膵トリプシンに $\alpha$ -アミラーゼとはやや異なる糖結合特異性を見出した<sup>2</sup>。さらに、膵リパーゼ、ヌクレアーゼ類もN-型糖鎖結合活性をもつことを明らかにしている。糖タンパク質の糖鎖に対する特異的結合性は、ヒトを含めた哺乳類膵臓酵

素群に共通な性質であるのに対して、ヒト唾液および枯草菌 $\alpha$ -アミラーゼ、微生物リパーゼは該当する糖結合活性を持たず、進化過程で膵臓酵素のみが獲得した性質と考えられた。申請者らがこれまでに得た知見を、I 腸管内消化・吸収とII 膵臓外分泌との関わりに分けて次に整理する。

I 腸管内消化と吸収における糖鎖調節  $\alpha$ -アミラーゼとリパーゼは、十二指腸内腔表面の刷子縁膜(BBM)にN-型糖鎖の局在と一致して検出され、特異糖であるManを含む緩衝液処理によって刷子縁から完全解離した(図1)。したがってBBMへの膵酵素の結合はManを含む糖特異的相互作用によることが示された。単離したBBMをリポソームに再構成し

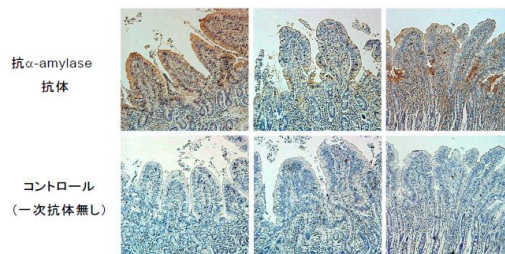


図1 ブタ十二指腸内腔上皮細胞表面(刷子縁)には膵消化酵素が糖特異的に結合している組織を緩衝液と特異糖でインキュベートした後、パラフィン切片として、抗 $\alpha$ -アミラーゼ抗体により免疫染色した。(左) 緩衝液(PBS)処理、(中) PBS+マンノース処理 (右) PBS+ラクトース処理

て加えると、 $\alpha$ -アミラーゼのデンプン分解活性を増強することが示された。すなわち腸管内レセプターとの結合は、酵素活性のアロステリックな増強とBBMに発現する膜型酵素や輸送体との会合により、食物消化と吸収速度を連携調節する機能が推定された。

### II 膵臓酵素外分泌への関与

膵トリプシンはGalまたはGalNAcを含む糖タンパク質に $K_a=10^9 M^{-1}$ の高い親和性で結合する<sup>2</sup>が、われわれは、不活性前駆体のトリプシノーゲンも高い糖結合性を有し、GalNを

含む糖鎖により活性化が抑制されることを見出した。膵プロテアーゼはチモーゲンとして合成され、ゴルジ体で分泌顆粒に封入されて、膵液中へ分泌される。通常は腸内で活性化されるトリプシンが早期に膵臓中で活性化すると、活性化されたプロテアーゼが膵臓細胞を破壊して急性膵炎を起こす。膵炎抑止機構の一つとして分泌顆粒膜は高いプロテアーゼ抵抗性を有する。われわれの発見は、分泌顆粒膜の糖鎖がトリプシノーゲンの活性化を抑制し、膵炎発症の防止に働く事を示唆している。

膵臓酵素はいずれも、分泌顆粒内の酸性 pH 5.5 と膵液または腸液の pH 8-7 では糖結合特異性が著しく変化した。この性質から、膵酵素が pH 6-7 のトランスゴルジにおいて分泌顆粒に封入される際、顆粒膜の糖鎖に対する結合によって選別され、開口分泌の際は pH 上昇により顆粒から膵液中へ放出される可能性が示唆される。膵酵素分泌に顆粒膜の硫酸化  $\alpha$ -型糖鎖の発現が必須<sup>3</sup> という報告からも、顆粒分泌過程にチモーゲンの糖鎖認識が関わる可能性が強く示唆される。

(引用文献)

<sup>1</sup> Matsushita, H et al, *J Biol Chem* **277**, 4680-5 (2002)

<sup>2</sup> Takekawa, H et al, *J Biol Chem* **281**, 8528-36 (2006)

<sup>3</sup> Boulatnikov et al, *J Biol Chem.* **279**, 40918-26 (2004).

## 2. 研究の目的

### 1 腸管内消化と吸収における糖鎖調節

各酵素に対する BBM 中の糖タンパク質レセプターを同定する。単離した BBM を用いて膜型酵素や輸送体を含むリポソームを再構成し、膵酵素との結合により基質から最終生成物にいたる連携消化の触媒速度、ならびに膜輸送体を介する輸送速度への影響を解明する。また個々のレセプターの機能への影響も解

析し、酵素-レセプターの糖特異的相互作用によって達成される腸管内機能を解明する。

### 2 膵臓酵素分泌過程における糖鎖レセプターの同定

各膵臓酵素またはチモーゲンが相互作用する分泌顆粒膜糖タンパク質レセプターを同定し、その糖鎖構造を解析する。

### 3 酵素分子上の糖結合部位の同定

各酵素と特異糖を共結晶化し、X線結晶解析により糖結合部位と結合様式を解明する。特異糖の有無によるトリプシノーゲン立体構造変化から、活性化抑制の分子機構を推定する。結晶解析が困難な場合はヒドロキシラジカルフットプリント法<sup>4</sup>により糖結合によって溶媒から遮蔽されるアミノ酸を同定し酵素分子上の糖結合部位を推定する。

## 3. 研究の方法

① 主要な膵臓酵素に対する BBM と分泌顆粒における糖鎖レセプターの単離 (小川) と nanoLC-MS<sup>n</sup> による解析・同定

各酵素を Sepharose 担体に糖結合活性を保持した状態で固定化する。ブタ十二指腸より BBM および膵腺房細胞ホモジネートからチモーゲン顆粒 (膜画分と内容物に分画) をそれぞれ調製し、糖鎖レセプターを酵素固定化吸着体を用いるアフィニティークロマトグラフィー (AFC) で糖溶出によりレセプターを単離する。各画分から電気泳動でタンパク質を相互分離した後、グリコプロテオミクスの方法により糖鎖含有レセプターを同定する。さらに抗体を用いる免疫沈降法により主要レセプターを精製し、各レセプターが持つ糖鎖構造を高感度解析する。

② 酵素-糖鎖レセプター相互作用による腸管消化と吸収への影響 (小川)

ブタ十二指腸と小腸から刷子縁膜を単離し、腸管刷子縁膜から生体膜リポソームを再構成し、各酵素についてリポソーム上の膜型

酵素との連携消化を高分子基質を用いて測定する。また、膜輸送体による生成物輸送活性を [<sup>14</sup>C] で標識した Glc 等を基質として測定する。

#### ③各酵素分子上の糖結合部位の同定

PCシミュレーションによる予測 糖を結合していない状態の各膵臓酵素の立体構造は既に大部分が解析され、PDB 等の公開データベースに登録されている。その立体構造データを活用して、既知のレクチンの糖鎖結合部位に類似した立体構造をもち、糖鎖結合部位を形成する部位と残基を、構造予測ソフト MOE を用いて予測する。

実験による検証 各酵素を既報の条件により結晶化し特異糖をソーキング、または共結晶化して、X線結晶解析により糖結合部位と結合様式を検証する。特異糖の有無によるトリプシノーゲン立体構造変化から、活性化抑制の分子機構を推定する。

#### 4. 研究成果

申請者らが発見した膵臓消化酵素の糖タンパク質糖鎖に対する特異的結合部位、ならびに糖鎖認識が生体内で果たす役割について、次の結果を得た。

1. ヒトトリプシノーゲンならびにブタ膵リパーゼについて、糖を結合していない状態の PDB 立体構造データと構造予測ソフト MOE を用いて糖鎖結合部位と残基を予測した。

2. ブタトリプシノーゲン、トリプシンについて条件検討の結果、特異糖との共結晶化によりメチル $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニドとの複合体結晶を得た。X線結晶解析により糖の電子密度と糖結合部位との結合様式を決定することに成功した。各酵素について、分子上に2か所の糖結合部位が存在したため、いずれの部位も機能部位であるかどうかを変異体解析により検証することを計画した。

3. ヒト膵リパーゼについてはまだ大腸菌発現系の報告が無いため、大腸菌での野生型ヒト膵リパーゼの標識体発現、精製、リフォールディング方法を検討し、活性酵素の大量精製の方策をほぼ確立することができた(特許出願中)。また糖-ビオチニルポリマープローブを用いて行った ELISA により、ブタとヒトの酵素での糖認識活性の類似性が示された。

4. 腸管刷子縁膜 (BBM) からブタ膵 $\alpha$ -アミラーゼ (PPA) に対する糖鎖レセプターを単離、同定したところ、デンプン消化において連携する膜型酵素、糖輸送体 (sucrase-isomaltase, SGLT1) および糖尿病鍵酵素である DPP4 が同定された。さらに BBM ベシクル (BBMV) を再構成し、ベシクル上の酵素と膜輸送体との連携への影響を基質を用いて測定したところ、PPA と BBMV との相互作用によりデンプン消化

が 2.5 倍に活性化することと、膵液分泌後に匹敵する PPA の高濃度下では <sup>14</sup>C-Glc の吸収が阻害される事を見出した。PPA の糖タンパク質糖鎖結合性は、血糖値の急激な上昇を抑制し血糖恒常性維持に寄与する生物学的意義を有すると考察した (J. Biol. Chem 287, 2012 に公表)

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計7件)

- ① Asanuma-Date, K., Hirano, Y., Le, N., Sano, K., Kawasaki, N., Hashii, N., Hiruta, Y., Nakayama, K., Uemura, M., Ishikawa, K., Sakagami, H., Ogawa, H.\*. Functional regulation of sugar assimilation by N-glycan-specific interaction of pancreatic  $\alpha$ -amylase with glycoproteins of duodenal brush border membrane. *J. Biol. Chem.*, 287, 23104-18, 2012. (査読有)  
doi: 10.1074/jbc.M111.314658.

- ② Nakamura, K., Ohtsuki, T., Hoshino, H., Tanamoto, K., Mori, H., Ushijima, H., Kawasaki, N., Akiyama, H., Yajima, T., Sakagami, H., Ogawa, H.\*. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating dextran with polyL-lysine.

*Antiviral Res.*, **94**, 89-97, 2012.

(査読有)

doi: 10.1016/j.antiviral.2012.02.011.

- ③ Ogawa, H.\*, Sano, K., Sobukawa, N., Asanuma-Date, K. Matrix Restructuring During Liver Regeneration is Regulated by Glycosylation of the Matrix Glycoprotein Vitronectin. *Liver regeneration*, Baptista, P. ed., pp. 79-98, InTech Publishers, ISBN: 978-953-51-0622-7, (Open Access)2012.

(査読有)

[http://cdn.intechopen.com/pdfs/36992/Intech-Matrix\\_restructuring\\_during\\_liver\\_regeneration\\_is\\_regulated\\_by\\_glycosylation\\_of\\_the\\_matrix\\_glycoprotein\\_vitronectin.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/36992/Intech-Matrix_restructuring_during_liver_regeneration_is_regulated_by_glycosylation_of_the_matrix_glycoprotein_vitronectin.pdf)

- ④ Le, N., Kato, M., Kubo, H., Hirashima, Y., Sakagami, H., Ogawa H. Usefulness of specific antibodies to immobilize pyridylaminated N-glycans for solid-phase interaction analyses. *Nat Sci. Rept. Ochanomizu Univ. Tokyo*, **61**, 31-45, 2011. (査読有)  
<http://hdl.handle.net/10083/49657>

- ⑤ Sano, K., Miyamoto, Y., Kawasaki, N., Hashii, N., Itoh, S., Yokoyama, M., Sato, C., Kitajima, K., Ogawa, H.\*. Survival of Hepatic Stellate Cell during Liver Regeneration is Regulated by the Changes in Glycosylation of Rat Vitronectin especially the Decreased Hypersialylation.

*J. Biol. Chem.*, **285**, 17301-17309, 2010.  
(査読有) doi: 10.1074/jbc.M109.077016.

[学会発表] (計 15 件)

- (1) K. Date, N. Kawasaki, N. Hashii, H. Sakagami, H. Ogawa. Another method of controlling Glc assimilation at high  $\alpha$ -amylase concentrations in

intestine through N-glycan-specific interactions. Int. Symp. Glycoconjugates (Glyco22) 2013年6月27日 Dalian, China.

- (2) 伊達 公恵、川崎 ナナ、橋井 則貴、蛭田 葉子、坂上 ひろみ、小川温子. 膵 $\alpha$ -アミラーゼと腸内糖鎖リガンドとの結合を介する糖吸収調節機構の発見. 第85回日本生化学会大会 2012年12月16日福岡国際会議場・マリンメッセ福岡.
- (3) 富田千尋、檜館里奈、樋上智子、相川京子、小川温子. ヒト膵リパーゼの大腸菌発現と糖結合性およびその脂質分解活性への影響. 第85回日本生化学会大会 2012年12月15日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡.
- (4) 富田千尋、檜館里奈、樋上智子、相川京子、小川温子. 膵リパーゼの糖結合性と複合糖質による活性への影響. GlycoTOKYO2012 2012年11月17日 東京、慶応大学薬学部.
- (5) K. Date, N. Kawasaki, N. Hashii, Y. Hiruta, H. Sakagami, H. Ogawa. Carbohydrate-specific interaction of mammalian pancreatic  $\alpha$ -amylases with glycoproteins on intestinal mucosa regulates their functions. ASMB/SFG Joint meeting 2012, 2012年11月12日 San Diego, USA.
- (6) 三橋佳奈、斉藤泉、和田有沙、坂上ひろみ、白井剛、今野美智子、小川温子. ウシトリプシノーゲンの糖特異的相互作用による活性化調節の構造的基盤. 第31回日本糖質学会年会 2012年09月20日 鹿児島国際会議場
- (7) K. Mitsuhashi, I. Saito, A. Wada, H. Sakagami, M. Konno, T. Shirai, H. Ogawa Pancreatic Trypsinogen Is Controlled by Sugar-specific Interaction. EWU, JWU, OU Joint Symposium 2012, 2012年07月15日, Seoul, Korea.
- (8) H. Tomita, R. Naradate, T. Higam, K. Aikawa, H. Ogawa Expression, purification and refolding of recombinant human pancreatic lipase in *Escherichia coli*. EWU, JWU, OU Joint Symposium 2012, 2012年07月15日, Seoul, Korea.
- (9) 伊達 公恵、楽 娜、川崎 ナナ、橋井 則貴、蛭田葉子、坂上 ひろみ、小川温子. 膵 $\alpha$ -アミラーゼの糖タンパク質糖鎖結合性は腸内の糖質消化・吸収を高次調節する. 平成24年度日本生化学会関東支部例会, 2012年06月23日, 群馬大学医学部、群馬.
- (10) 三橋佳奈、斉藤泉、和田有沙、白井剛、今野美智子、小川温子. ウシトリブ

シノーゲンの活性化の糖特異的相互作用による調節. 平成 24 年度 日本生化学会 関東支部例会, 2012 年 06 月 23 日, 群馬大学医学部, 群馬.

- (11) 富田千尋、檜館里奈、樋上智子、相川京子、小川温子. ヒト膵リパーゼの大腸菌における発現、精製とリフォールディング. 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012 年 05 月 22 日, 名古屋国際会議場.
- (12) 三ツ木礼子、大崎加奈恵、伊達公恵、小川温子. 膵酵素の糖結合性と膵臓外分泌顆粒における膵酵素間の相互作用解析. 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012 年 05 月 22 日, 名古屋国際会議場.
- (13) 三ツ木礼子、大崎加奈恵、伊達公恵、小川温子. 膵臓外分泌顆粒形成と膵臓酵素の持つ pH 依存的糖鎖結合性の関係. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 14 日, パシフィコ横浜
- (14) Kimie Date; Nana Kawasaki; Noritaka Hashii; Na Le; Yuki Hirano; Haruko Ogawa. Newly identified receptors for pancreatic  $\alpha$ -amylase controls blood glucose concentration via carbohydrate-specific interactions. 21th Int. Symp. Glycoconjugates (Glyco21) 2011 年 8 月 23 日, Vienna, Austria
- (15) K. Date; N. Kawasaki; N. Hashii; S. Ito; N. Le; Y. Hirano; H. Ogawa. Novel regulation of glucose production and assimilation by carbohydrate-specific interaction between pancreatic  $\alpha$ -amylase and brush border glycoproteins in duodenum. 25th Int. Carbohydrate Symp (ICS2010) 2010 年 8 月 3 日, Makuhari, Japan

〔図書〕(計 2 件)

- ① 佐野琴音, 小川温子. 化学—最新のトピックス. 糖鎖によるがん克服への挑戦—今なぜ糖鎖が重要か. 化学, **56**(5), 70-71 (2011) 化学同人刊. (査読無)  
<http://www.fujisan.co.jp/product/366/b/620179/>
- ② 伊達公恵, 佐野琴音, 小川温子. 細胞外マトリックス分子の糖鎖による肝再生の制御. 化学工業, **6** 巻, 12 月号(特集 多糖の資源活用と機能探求), p.902-907 (2010) 化学工業社刊. (査読無)  
<http://iss.ndl.go.jp/books/R000000004-I10911380-00>

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 組み替えヒト膵リパーゼの調製方法  
発明者: 小川温子、相川京子、富田千尋、檜館里奈、樋上智子  
権利者: 国立大学法人お茶の水女子大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-263442  
出願年月日: 2012 年 11 月 30 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: シュードプロテオグリカンおよびその用途  
発明者: 小川温子  
権利者: 国立大学法人お茶の水女子大学  
種類: 特許  
番号: 第 4759736 号  
取得年月日: 2011 年 6 月 30 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.ocha.ac.jp/chemHP/labos/ogawaHP/files/Page477.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 温子 (OGAWA HARUKO)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学  
研究科・教授

研究者番号: 90143700

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

川崎ナナ (KAWASAKI NANA)

国立医薬品食品衛生研究所

生物薬品部・部長

研究者番号: 2020186167