

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550099

研究課題名(和文)糖転移酵素を用いた糖鎖の構造特異的分解反応の検討と応用

研究課題名(英文)Oligosaccharide degradation based on the reverse reaction by glycosyltransferase

研究代表者

鄭文玉(池田義孝)(Tei(Ikeda), Bungyoku(Yoshitaka))

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：60252657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖転移酵素群の高い基質特異性・反応特異性に着目し、その逆反応に基づいた糖鎖の特異的分解反応を解析、至適化し色々な用途に応用するための基礎的な検討を行うことが目的である。主として、1,6フコース転移酵素をモデルとして、どのように反応の平衡をシフトさせ効率よく逆反応を進行させればよいかを検討した。

研究成果の概要(英文)：It is generally known that the reactions catalyzed by glycosyltransferases are highly specific. The enzymes strictly discriminate their own substrates and properly act on the certain position of the substrate, thereby allowing assemble of specific structure of oligosaccharide. This study was conducted to investigate the reverse reactions in which glycosyltransferases remove monosaccharide from sugar chains. The removal should be sufficiently specific comparably to the forward reaction, transfer of sugar. Using alpha1,6fucosyltransferase as a model, we examined effects of various factors on the equilibrium of the reversible reaction of the glycosyltransferase.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：糖鎖 フコース転移酵素 糖ヌクレオチド 逆反応 糖鎖構造 構造決定

1. 研究開始当初の背景

生体高分子を研究するにはその構造、とくに一次構造を知る必要があり、タンパク質や DNA の構造解析方法はすでに高効率化・高感度化され色々な自動化の手法も普及している。タンパク質や DNA では単量体の結合は全て同じであり、一次構造を知るのに 20 種類のアミノ酸あるいは 4 種類の塩基の並び方のみを明らかにすればよい。また、タンパク質や DNA は鋳型依存的に生合成されるので、鋳型の構造を明らかにしても一義的に一次構造を決定出来ることになる。一方、多糖とくに糖タンパク質糖鎖やプロテオグリカンなどの糖鎖の構造を知るのはそれほど簡単ではない。構造決定を困難にする最も大きな原因は、単量体どうしの結合に多数の様式があるためである。すなわち、結合にあずかることの出来る水酸基が 1 位、2 位、3 位、4 位、6 位の最大 5 個あり、さらに通常結合に関与する 1 位の水酸基には α と β のアノマー異性体が存在する。そのため、ペプチドや DNA とは異なり、単量体成分の順序を決定するだけでなく、1,4 であるとか 1,6 といった結合様式まで決定しなければならない。もしこういった問題を解決する簡単な方法が確立されれば、その意義は大きいのではないかと考えた。

2. 研究の目的

タンパク質や DNA は鋳型依存的に生合成されるのに対して、糖鎖は one linkage-one enzyme といわれるように一つ一つの単糖をそれぞれに特異的な糖転移酵素が結合させて合成されることがユニークな特徴である。そこでは、酵素が作用する基質、すなわち、どういう糖(鎖)に、どのような単糖を、どの水酸基に、どのような結合で転移するかが大変厳密に決まっている。それによって特異的な糖鎖構造が組み上げられているのである。このような厳密な特異性は、可逆反応の逆反応についても同様に発揮されるため、糖転移酵素の逆反応である糖の除去反応を上手く利用すれば、どのような糖がどのように結合していたかを簡便に明らかに出来るはずである。

申請者らは、これまであまり試みられていなかった糖転移酵素の逆反応を速度論的に解析し、糖転移反応の可逆性を明らかにし、エネルギー的な考察を行ってきた (Glycobiology 19, 368, 2009)。それまでの知見に基づいて、これを糖鎖の特異的な分解にどのような形で応用し新規構造解析法の確立につなげればよいかを検討しようと考えた。このような検討をさらに発展させられれば、試験管内で糖鎖を生合成を逆行させるように逐次分解することにより比較的大きな構造も解けるとことが期待出来るのであ

る。そのためには、糖転移酵素の平衡反応をいかにして定量的な分解反応にするかが鍵であり、本研究では反応の平衡をどのようにしてシフトさせ、高効率・定量的に糖鎖を分解すればよいかを中心に検討を行った

3. 研究の方法

申請者らは従来の研究において、糖タンパク質のアスパラギン結合型 (N 型糖鎖) のコア構造の形成に関与する 1,4-N アセチルグルコサミン転移酵素 III および 1,6 フコース転移酵素 (FUT8) について逆反応を確認し、どのような平衡なのかを解析している。その結果、糖転移酵素の反応は一般にきわめて糖鎖合成の方向へ傾いており、定量的に糖鎖を分解するのは困難であることがわかっている。この問題を克服するため、糖転移酵素逆反応によって生成する (順反応の糖供与体基質である) 糖ヌクレオチドを反応系から除去し、平衡を分解 (逆反応) へシフトさせる方策について様々な点から検討した。すなわち、イオン交換樹脂や透析膜、限界濾過膜による除去、あるいは糖ヌクレオチドの分解系を共役させ反応全体として実質的な糖鎖加水分解反応に変化させるなどを検討した。

4. 研究成果

糖鎖は糖転移酵素群の高い基質特異性によって生合成される。本研究は、糖転移酵素による糖転移反応の逆反応に基づいた構造特異的な分解を検討すること、またこのような逆反応を糖鎖構造の決定に利用することが目的である。すなわち、試験管内で糖鎖生合成を逆行させるという逐次分解法を検討し、将来的には新たな構造解析のベースとなりうるような糖鎖の高特異性逐次分解反応を確立するのに寄与したいと考えた。

糖タンパク質のアスパラギン結合型 (N 型糖鎖) のコア構造の形成に関与する 1,6 フコース転移酵素 (FUT8) について、逆反応を有利に進めるため逆反応生成物である GDP-フコースを分解する系についての検討を行った。GDP-フコースの加水分解活性をもつと報告されている大腸菌 GDP-mannose mannosyl hydrolase (GDPMH) を pET28 ベクターを用いて T7 プロモーター制御化で大腸菌 BL21 (DE3) に株を用いて発現させた。誘導後細胞を回収し電気泳動によって組換えタンパク質を確認したところ、全タンパク質の 20-30% の高レベルで発現させられることがわかった。pLys 株でも同様の検討を行ったが発現量にほとんど差はなかった。ニッケルキレートクロマトグラフィーにより組換えタンパク質を精製してみると、300 mL の培養スケールからほぼ均一なタンパク質を 50 mg 得ることが出来た。

FUT8 によるフコシル化糖鎖からのフコース除去反応では、蛍光標識フコシル化糖鎖を基質として用い、糖ヌクレオチドの変わりに GDP を糖の受容体として反応を行う。逆反応の結果、脱フコシル化された糖鎖を蛍光分析逆相 HPLC で検出、定量を行うとともに、同時に精製する GDP フコースをイオン交換 HPLC で検出した。このような系を用いて実際に逆反応は確認出来ている。このような反応系に上記の精製 GDPMH を添加し、どのように反応を行ったところ、GDPMH 非存在下に比べて、フコースの除去率は確かに上がっていることが確認出来た。しかし、反応時間や添加する酵素量などについていくつかの条件下で検討を行ったが、逆反応は促進されるものの、合成-分解の平衡を期待したほど分解側へシフトさせるに至っていない。GDPMH による生成 GDP フコースの分解除去の段階が、実は可逆であって、ある種の平衡に落ち着いている可能性も考えられた。pH などの条件を変える事によって平衡をシフトさせようと試みたが、今のところよい条件を見出すにいたっていない。

その一方で別の分解系を用いた検討も並行して開始した。大腸菌 yffH、GDP-mannose を GMP とマンノース 1リン酸に分解する酵素であるが、これを発現させ GDP-fucose 分解する反応系を共役させた場合の効果を検討しているところである。この酵素は先に検討した GDPMH の系に比べて分子活性が約 200 倍であり、より効率よく平衡をシフトさせる、あるいは逆反応と共役することによってフコース除去の効率を上げる可能性が考えられ、さらに検討を継続していきたいと考えている。

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 7件)

Ihara H, Tsukamoto H, Taniguchi N, Ikeda Y: An assay for alpha1,6-fucosyltransferase (FUT8) activity based on the HPLC separation of a reaction product with fluorescence detection. *Methods Mol. Biol.* 査読有り 1022: 335-348, 2013. doi: 10.1007/978-1-62703-465-4_25.

Tsukamoto H, Ihara H, Ito R, Ukai I, Suzuki N, Kimoto M, Tomioka Y, Ikeda Y: MD-2-dependent human Toll-like receptor 4 monoclonal antibodies detect extracellular association of Toll-like receptor 4 with extrinsic soluble MD-2 on the cell surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有り 440(1): 31-36, 2013. doi:

10.1016/j.bbrc.2013.09.004.

Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ohta S, Nagai Y, Ihara H, Miyake K, Ikeda Y, Kimoto M: Reduced surface expression of TLR4 by a V254I point mutation accounts for the low lipopolysaccharide responder phenotype of BALB/c B cells. *J. Immunol.* 査読有り 190(1): 195-204, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1201047.

Takahashi M, Hasegawa Y, Ikeda Y, Wada Y, Tajiri M, Ariki S, Takamiya R, Nishitani C, Araki M, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Kuroki Y: Suppression of Heregulin b Signaling by the Single N-Glycan Detection Mutant of Soluble ErbB3 Protein. *J. Biol. Chem.* 査読有り 288(46): 32910-32921, 2013. doi: 10.1074/jbc.M113.491902.

Ihara H, Hanashima S, Tsukamoto H, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Ikeda Y: Difucosylation of chitooligosaccharides by eukaryote and prokaryote alpha1,6-fucosyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 査読有り 1830(10): 4482-4490, 2013. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.013.

Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ihara H, Ikeda Y, Kimoto M: Multiple potential regulatory sites of TLR4 activation induced by LPS as revealed by novel inhibitory human TLR4 mAbs. *Int Immunol.* 査読有り 24(8): 495-506, 2012. doi: 10.1093/intimm/dxs053.

Ito R, Takahashi M, Ihara H, Tsukamoto H, Fujii J, Ikeda Y: Measurement of peroxiredoxin-4 in rat tissues and implication of its serum level as a potential marker for hepatic disease. *Mol Med Report.* 査読有り 6(2):379-384, 2012. doi: 10.3892/mmr.2012.935.

[学会発表](計 9件)

浜之上誠, 池田義孝, 緒方 徹, 高松 研: 糖転移酵素 GnT-V の神経幹細胞における特異的発現と神経再生への関与. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013,12,3-6.

井原秀之, 池田義孝: Cloning, expression and characterization of silkworm alpha1,6-fucosyltransferase. 第 86 回日本生化学会大会、2013,9,11-13、横浜.

浜之上誠, 池田義孝, 高松 研: 分裂期神経幹細胞特異的に限定的に発現する糖転移

酵素 GnT-V . Neuro 2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学大会)、2013,6,20-23 .

Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ohta S, Nagai Y, Ihara H, Miyake K, Ikeda Y, Kimoto M: Reduced surface expression of TLR4 by a V254I point mutation may account for the low LPS responder phenotype of BALB/c B cells. 第 85 回日本生化学会大会、2012, 12, 14-16、福岡 .

井原秀之、花島慎弥、塚本宏樹、山口芳樹、谷口直之、池田義孝 : ヒト及び根瘤菌 1,6-fucosyltransferase を用いたジフコシル化キトオリゴ糖の合成 第 85 回日本生化学会大会、2012, 12, 14-16、福岡 .

田中伸哉, 森脇佐和子, 上西一弘, 濃沼信夫, 田中清, 池田義孝, 新飯田俊平 : 骨粗鬆症スクリーニング検査としての尿中 -GTP 濃度および FRAX の有用性 . 第 13 回日本骨粗鬆症学会 2011, 11, 3, 神戸 .

浜之上誠, 池田義孝, 高松研 : 神経幹細胞における糖転移酵素の発現と機能解析 . 第 34 回日本神経科学大会 2011, 9, 14-17, 横浜 .

Tanaka S, Moriwaki S, Uenishi K, Koinuma N, Tanaka K, Ikeda Y, Niida S: The effectiveness of urinary gamma-glutamyltranspeptidase as a screening for osteoporosis. The American Society for Bone and Mineral Research, Annual Meeting 2011, 9, 16-20, California, USA

Tanaka S, Moriwaki S, Uenishi K, Koinuma N, Tanaka K, Ikeda Y, Niida S: The availability of urinary gamma-Glutamyltransferase as a screening for osteoporosis. The 3rd Joint Meeting of ECTS & IBMS. 2011, 5, 7-11, Athens, Greece.

〔図書〕(計 2 件)

Ihara H, Tsukamoto H, Gu J, Miyoshi E, Taniguchi N, Ikeda Y: Fucosyltransferase 8. GDP-fucose N-glycan core 6-fucosyltransferase (FUT8). In: Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes 2nd ed. Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., Angata, T. (Eds.), pp 581-596, Springer, 2014.

Ikeda Y, Ihara H, Tsukamoto H, Gu J, Taniguchi N: Mannosyl (beta-1,4-)-glycoprotein beta-1,4-N-

acetylglucosaminyltransferase (MGAT3); 1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III, GlcNAc-T III). In: Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes 2nd ed. Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., Angata, T. (Eds.), pp 209-222, Springer, 2014.

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
鄭 文玉(池田義孝)(Tei, Bungyoku (ikeda, Yoshitaka))
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号 : 60252657

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
井原 秀之 (Ihara, Hideyuki)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号 : 50452834