

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 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：23580281

研究課題名(和文) 魚類体表粘液糖タンパク質を基質に用いた新規グリカナーゼの探索

研究課題名(英文) Screening for the novel glycanase using fish mucus glycoprotein

研究代表者

濱 洋一郎 (Hama, Yoichiro)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：00243999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：粘液の本体であるムチン(O型糖タンパク質)の糖鎖を根元から遊離させるエンド型酵素は、特定の糖鎖構造にのみ作用するものしか見つかっておらず、ムチンの構造解析、機能解析の両面で大きな障害になっている。本研究では、魚類体表粘液から新奇糖鎖構造をもつムチンを分離し、これを主な炭素源とする培地で本酵素産生細菌を探索した。土壌、環境水など様々な環境由来の試料、魚類体表および消化管の粘液など、500種以上の試料を試験したが、目的酵素を検出できなかった。また、非還元末端糖のKDNの遊離もごく希にしか検出されなかった。KDNを含む魚類体表ムチンは、環境微生物からの魚類の生体防御に役立っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：O-Glycanase is an enzyme which is capable of releasing entire sugar chains from O-glycan such as mucin. However, since the enzymes which were reported to date act only specific structures, those which could liberate sugar chains from O-glycans more universally are required. In this study, we isolated O-glycan from fish mucus with novel sugar chain structures, and used the O-glycan as the substrate for screening the O-glycanase-producing bacterium. We tested over 500 samples such as soil, environmental water, and fish mucus, but we could not detect the activity of the target enzyme. However, release of KDN at the non-reducing end of the glycan observed very often. KDN-containing O-glycan in the fish mucus is thought to be a protective barrier from the environmental microbes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：O-グリカナーゼ 糖質分解酵素 粘質物 魚類体表

1. 研究開始当初の背景

糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質は、様々な生理機能を有しており、多くの生理機能は複合糖質の糖鎖部分に由来することが示されている。糖タンパク質は、骨格ポリペプチド鎖中のアスパラギンのアミノ基に糖鎖が結合した N 型糖タンパク質、同様にセリンまたはスレオニンの水酸基に糖鎖が結合した O 型糖タンパク質に大別される。これら糖タンパク質の構造や機能を研究する上で、糖タンパク質からの糖鎖の遊離は必須であるとともに最も重要なステップの一つである。

N型糖タンパク質からの糖鎖の遊離は、化学的方法（ヒドラジン分解）が確立され、酵素的方法においても糖鎖構造を問わず網羅的に糖鎖（N-グリカン）を遊離させる有用な酵素（N-グリカナーゼ，peptide-N4(N-acetyl- β -D-glucosaminy) asparagine amidase, EC 3.5.1.52) が主に植物種子から開発されており、N-グリカンの構造解析、機能解析に汎用されている。一方、O型糖タンパク質からの糖鎖の遊離には、もっぱら化学的遊離法である還元条件下での β -eliminationが用いられている。これは、共通のコア構造を持つN-グリカンに比べO-グリカンは構造上の多様性に富むので、網羅的に作用する酵素が未だ見つかっておらず化学的方法に依存せざるを得ない、という事実起因している。しかし、この方法により得られるO-グリカンの還元末端は、アルカリ性反応液中での還元剤の作用により、糖アルコールとなる。このため、還元基の反応性を利用した蛍光ラベル化などの微量分析には不適

当である。

このような理由で、ユニバーサルに作用する O-グリカナーゼは「夢の酵素」の一つであり、長く開発が待たれている。

2. 研究の目的

O 型糖タンパク質の糖鎖を根元から遊離させるエンド型酵素，O-グリカナーゼ（endo- α -N-acetylgalactosaminidase, EC 3.2.1.97) は、多様な O 型糖鎖構造のうちの非常に限定された構造にのみ作用するものしか見つかっておらず、O 型糖タンパク質の構造解析、機能解析の両面で大きな障害になっている。本申請研究は、これまでとは異なる基質特異性をもつ利便性の高い O-グリカナーゼの開発が目的である。本酵素は、魚類体表粘質物から分離した新奇糖鎖構造をもつ KDN 含有粘液糖タンパク質を主な糖（炭素）源として培地に混合し、これを分解資化する細菌から探索する。

3. 研究の方法

(1) KDN 含有魚類体表粘液糖タンパク質の分離精製：試料にはドジョウを用いた。研究室で確立した粘液糖タンパク質の分離精製方法は以下の通りである。

①粘質物の分離：生きた魚体を簡単に水洗した後、フリーザー中で凍結した。必要に応じてフリーザーから取り出し、半解凍とした試料にエタノールを振りかけ、粘質物をゲル状に凝固させた。採集した粘質物をろ別し、脱脂後乾燥し、脱脂乾燥物を得た。

②糖タンパク質の抽出：脱脂乾燥物に 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8) を加え、しばらく放置し十分に膨潤させた後、超音波抽出

を行った後、遠心分離により上清を分離した。

③糖タンパク質の精製：上清を沸騰水中で加熱後、遠心上清に酢酸を加え pH 5.0 に調整した。上清にヌクレアーゼを加え、共存する核酸を分解した。沸騰水中で加熱後、遠心上清をとり、限外ろ過により濃縮物を得た。陰イオン交換クロマトグラフィー (DE52) で分画し、シアル酸画分を回収した。次いでゲルろ過クロマトグラフィー (Sephrose CL-4B) で分画し、同様にシアル酸画分を回収し、精製糖タンパク質とした。

(2) 魚類体表粘液糖タンパク質を分解資化する細菌 (O-グリカナーゼ産生細菌) のスクリーニング：

①培地の調製および試料の接種：栄養要求性の高い細菌の分離に用いられる培地、Heart Infusion Broth にドジョウ体表粘液糖タンパク質を加えた液体培地 450 μ l を調製し、これに細菌試料液 50 μ l を加えた。Heart Infusion Broth および糖タンパク質の終濃度は、それぞれ 2.5%、0.5%とした。試料は、魚類の体表、エラ、消化管表面の粘質物など、粘質物を豊富に含む環境の試料の他に、ランダムに環境水や土壌を採集し、個体の場合は純水または生理食塩水に懸濁後、接種した。

②培養と遊離糖鎖の検出：30℃で一週間好氣的に培養した。培養中および培養終了後、培養液の一部を取り、TLC で分析した。展開したプレートに aniline-diphenylamine 試薬を噴霧後加熱し、糖を検出した。遊離の糖類 (オリゴ糖、単糖) が検出されれば、糖タンパク質の糖鎖が微生物の作用により遊離した、と判断した。このとき、オリゴ糖 (ドジ

ョウの糖タンパク質の主要糖鎖：2 糖 KDN α 2 \rightarrow 6GalNAc と 3 糖 KDN α 2 \rightarrow 3(KDN α 2 \rightarrow 6)GalNAc) が検出されれば、エンド型酵素、すなわち O-グリカナーゼの存在を意味している。

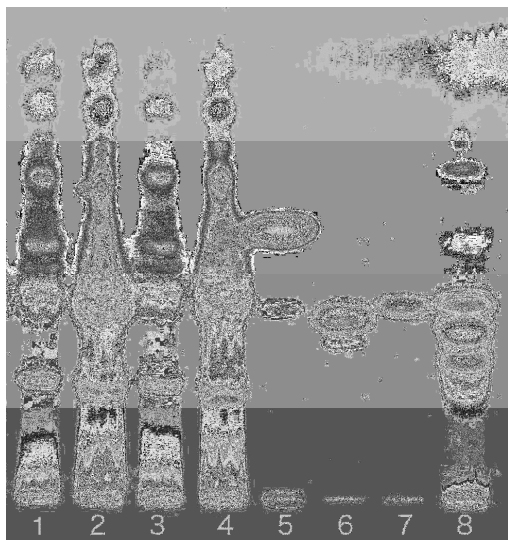
③スクリーニング方法の有効性の検証：対照実験として、培地に市販の O 型糖タンパク質 (ウシ顎下腺ムチン、シアル酸 (NeuAc) 含量約 5%) を混合し、同様にスクリーニング実験を行った。ウシ顎下腺ムチンの糖鎖構造は、非還元末端が KDN でキャップされていないので、シアリダーゼ (ノイラミニダーゼ)、 β -ガラクトシダーゼ、 β -ヘキソサミニダーゼ、などのエキソ型グリコシダーゼの連続的な作用により非還元末端から容易に分解されることが推察される。ドジョウ体表粘液糖タンパク質を使用した場合と比較し、本スクリーニング方法の有効性を検証した。

4. 研究成果

(1) ドジョウ体表粘液糖タンパク質の分離精製：「3. 研究の方法」に記したように、まず、生きたまま凍結した魚体を半解凍後、エタノールを体表に振りかけ、ゼリー状に凝固した体表粘質物をかき取った。これを脱脂乾燥後、緩衝液中で超音波抽出し、さらにイオン交換クロマト、ゲルろ過クロマト等により分画することにより精製粘液糖タンパク質を調製した。生きたドジョウ 1 キロ (約 100 尾) あたりからの収量は、脱脂乾燥物で約 8 グラム、最終精製物の収量は約 0.8 グラムでシアル酸 (KDN) 含量は約 20%だった。

(2) O-グリカナーゼ産生細菌のスクリーニング：培地にドジョウ体表粘液糖タンパク

質を溶解させ、これに細菌試料液を摂取後30℃で培養した。一週間後、培養上清をTLCで分析した。一例を下図に示している。



lane 1-4は、研究室で飼育した金魚から体表粘液をかき取ったものを試料として、ドジョウ体表粘液糖タンパク質を含む培地で一週間培養したもので、1-2、3-4は別の個体、1,3は培養液の上清をそれぞれ10 μ l, 2,4は20 μ l TLC分析に供している。lane 5-8は標準物質で、lane 5はガラクトース、6はNeuAc、7はKDNである。lane 8はドジョウ体表粘液糖タンパク質をヒドラジン分解して得られた糖鎖画分で、上から遊離KDN、二糖 (KDN α 2 \rightarrow 6GalNAc)、三糖 (KDN α 2 \rightarrow 3(KDN α 2 \rightarrow 6)GalNAc) である。TLC上でDPAの噴霧によって検出されたスポットは、標準物質の移動度との比較に加え、DPA試薬によって呈する個々の糖質独特の色調 (例えば、ガラクトースは紺色、NeuAcは赤紫色、KDNは紫色) を加味して同定した。糖鎖に加えて、還元末端糖 (ドジョウ体表粘液糖タンパク質の場合はKDN、ウシ額下腺ムチンの場合は

NeuAc) の遊離も同時に判定した。

試料には、九州内外から採取した土壌、環境水 (河川水、湖水、海水、灌漑用水)、鮮魚店などで購入した魚類の体表、エラおよび消化管粘質物、研究室で飼育したフナ、金魚、ドジョウの体表粘質物、計五百余种を用いた。その結果、本法によって根元からの糖鎖の遊離、すなわちO-グリカナーゼは検出できなかった。一方、魚類の体表や消化管などの魚類粘液由来の試料約170種では、約6割の試料からNeuAcの遊離が検出された。一方、KDNの遊離は約2割の試料から検出されたに過ぎなかった。さらに、同一の試料がNeuAcとKDNの双方を遊離させた例は見られなかった。これらのことから、O-グリカナーゼ産生細菌のスクリーニングのための基質として、KDNで非還元末端がキャップされているドジョウ体表粘液糖タンパク質は、エンド型酵素の作用を受けにくいと、非常に有効であることが確認できた。また、環境微生物に豊富に存在するノイラミダーゼによる作用をKDNが受けにくいことは、KDNで体表をカバーしているドジョウなどの一部の魚類は、環境中に存在する無数の微生物から身を守る術として、KDN含有体表粘液糖タンパク質を生体防御の第一次バリアとして有効に機能させていることが推察された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱 洋一郎 (HAMA, Yoichiro)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：00243999