

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 3 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：平成 23 年度～平成 24 年度

課題番号：23880016

研究課題名（和文） 酵素の至適温度の違いを利用したワンバッチ糖鎖連続合成系の確立

研究課題名（英文） Construction of one-batch system for glycan synthesis using enzymes showing different optimal temperature.

研究代表者

鶴田 祥子 (TSURUTA SACHIKO)

神戸大学・大学院農学研究科・農学研究科研究員

研究者番号：30608625

研究成果の概要（和文）：

本研究は、低温・中温・耐熱酵素を利用したワンバッチ連続糖鎖生産系の構築を目的としている。本研究では低温機能型糖転移酵素の作製に向けて、好冷菌 *Shewanella frigidimarina* のもつ 6 種類の glycosyltransferase, group 2 family protein (GT-2) についてクローニングと大量発現系の構築を行った。数種の発現ベクターを用いて発現条件の検討を行ったところ、pCold I を用いた際に、2 種類の可溶性タンパク質の取得に成功した。今後、組み換え型酵素の立体構造解析によって低温活性発現能を発揮する「構造要因」を解明し、低温機能型酵素を作製する予定である。

研究成果の概要（英文）

: The aim of this study is construction of one-batch system for glycan synthesis using enzymes showing different optimal temperature. To achieve the goal, we first cloned 6 genes of glycosyltransferase, group 2 family proteins (GT-2) from *Shewanella frigidimarina*, and constructed expression system of GT-2 proteins. As a result, we obtained two soluble recombinant GT-2s, using the expression vector derived from pCold I. Surveying the protein structure by X-ray analysis will enable us to clarify “structural factors” for eliciting cold-activity. Based on the results, we will create new types of GT-2 enzymes with cold-activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
1012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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：好冷菌、低温活性酵素、糖転移酵素、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

糖鎖はほぼ全ての生物に存在し、様々な生命現象を担うことが知られている。

近年、感染症やガンなどの疾病と糖鎖との関係が解明されるに伴い、診断・治療のための医薬品、あるいは基礎研究のための試薬として糖鎖の需要が高まってきた。

一方で、糖鎖合成技術の開発は発展途上にあるのが現状である。生体内における糖鎖合成は、糖鎖前駆体がゴルジ装置へ移行し、数種類の糖転移酵素による糖付加を受けることで達成される。この際、糖付加はランダムに起こるのではなく、*cis*、*med*、*trans golgi* に配置された各種糖転移酵素の作用を順序正しく連続的に受けることが重要となる（図1）。

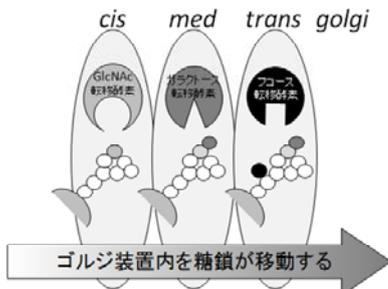


図1 「空間障壁」を利用した糖鎖合成（生体内）

すなわち、各酵素を空間的に分離する「空間障壁」が重要な役割を果たしている。生体内の合成システムに倣い *in vitro* で「空間障壁」をつくる方法はこれまでも試みられており、数本のカラムを連続的に用いる方法が開発されてきた。しかし、高価な特殊装置を必要とするために、一般の研究者が安価で簡単に糖鎖の連続合成を達成することは困難であった。従って、生体内を模倣した「空間障壁」、あるいはそれに代わる障壁をより安価に実現することが、糖鎖合成技術を開発する上で解決すべき課題であると言える。

自然界には、南極等の極低温、温泉等の極高温といった極限環境で生育する極限環境微生物（好冷菌・好熱菌）が存在する。好冷菌・好熱菌が産生する酵素（低温酵素・耐熱酵素）は、ヒトや植物がもつ中温酵素と比較して低温側・高温側で高い活性を有することが知られている。これは、中温酵素・耐熱酵素が不活性な低温（または、低温酵素・中温酵素が失活する高温）において、低温酵素（または耐熱酵素）が十分な活性を発揮できるということである。この酵素を利用し、低温→中温→高温と反応温度を変化させることで、効率の良い物質生産系が構築できるのではないかと考えた（図2）。

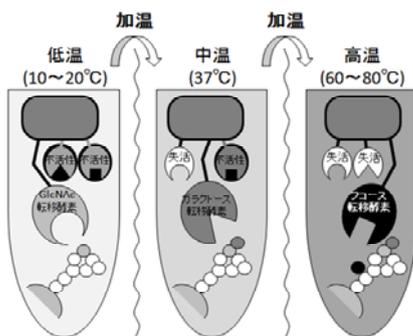


図2 「温度障壁」を利用した酵素合成

即ち、上で述べた「空間障壁」を「温度障壁」に置き換えることで効率の良い連続反応を達成できると着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、低温酵素・中温酵素・耐熱酵素を利用して、低温(15°C前後)～中温(37°C)～高温(70°C前後)の段階的な温度変化によるワンバッチ連続物質生産系の構築を目的とするものである。すなわち、温度を順次上昇させることで、ワンチューブに封入された低温、中温、耐熱酵素を順番に活性化させ、連続的に物質を合成するものである。本研究では糖鎖合成に着目し、各温度域で活性化される糖転移酵素の作製、およびその利用によって、連続的に単糖を付加することで糖鎖の合成を試みる。本申請期間においては「低温～中温」にターゲットを絞り、低温機能型糖転移酵素と中温(天然型)糖転移酵素を用いた連続合成に向けて研究を行う。本研究をモデル系として他酵素に応用することで、将来的には様々な物質の連続合成を可能にする技術の開発につなげることを目的としている。

3. 研究の方法

本申請期間においては、2つの温度障壁のうち「低温→中温」にターゲットを絞って研究を行う（図3）。まず(1)好冷菌 *Shewanella* sp. 由来低温糖転移酵素 (GT-2) のクローニングと大量発現系の構築を行い、(2)その立体構造解析を行うことで、低温活性発現能を発揮する構造要因（以下、「構造要因」）を解明する。その後、(3)「構造要因」が導入された低温機能型酵素を作製する。さらに、ビーズ固定化酵素の利用を指向して(4)タグ導入酵素の作製を行う。本申請期間終了後に、タグ導入酵素をビーズに固定化し、物質生産を試みる。

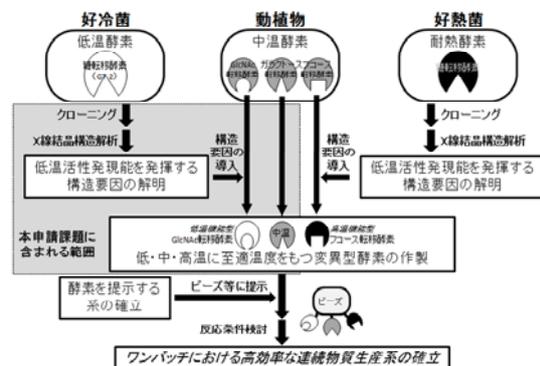


図3 研究の全体イメージ

好冷菌由来低温酵素のクローニングと大量発現系の構築においては、低温酵素を取得する材料として、好冷菌 *Shewanella* sp. を用

いる。本研究を遂行するにあたり、中温酵素と立体構造上相同性のある酵素をターゲットにする必要がある。そこで、*Shewanella* sp. のゲノム上に存在する糖転移酵素遺伝子のうち、真核生物のマンノース転移酵素や・-1,3-ガラクトース転移酵素等と同じ Protein family (PF00535) に分類されている glycosyltransferase, group 2 family protein (GT-2) に着目して実験を行う。

GT-2 遺伝子のクローニングおよび組換え型 GT-2 の大量発現系の構築では、遺伝子クローニングの定法に則り、PCR クローニング法を用いて実験を遂行する。GT-2 の大量発現系の構築には大腸菌を用いる計画である。発現した組換えタンパク質はイオン交換、ゲルろ過等の各種クロマトグラフィーを用いて精製する。

低温活性発現能を発揮する「構造要因」の解明においては、結晶化条件のスクリーニングのために、上で得た組換えタンパク質の結晶化条件の検索を市販のスクリーニングキットを用いて行う。1000 以上の条件を試行し、その中で結晶成長が認められた条件についてさらに、pH、塩濃度、沈殿剤の種類と濃度などを細かく変化させることで構造解析に適した結晶の成長条件を検索する。その後、低温活性発現能を発揮する「構造要因」の解明に向けて、上で作製した GT-2 の結晶について大型放射光施設 (SPring-8, 兵庫県ビームライン) を用いた X 線結晶構造解析を行い、立体構造を決定する。一般的に活性中心近傍の構造の柔軟性が低温活性発現能に影響を与えると考えられているため、決定した GT-2 の活性中心近傍構造を植物やヒト由来の中温酵素と比較し、低温で高い活性を発揮できる「構造要因」を探索する。変異型低温酵素の作製・評価には「構造要因」を与えると推察された部位のアミノ酸残基に遺伝子クローニングの手法を用いて部位特異的に変異を導入し、変異型タンパク質を大腸菌で大量発現させる。X 線小角散乱、蛍光分析、示差走査熱量計 (DSC)、動的光散乱等で変異型タンパク質の評価を行い、導入した変異の効果を検証する。

4. 研究成果

好冷菌に存在する GT-2 遺伝子を取得するため、*Shewanella* sp. を鋳型として PCR クローニングを試みた。*Shewanella* sp. は gDNA がオープンになっていないため、他の 6~7 種類の *Shewanella* 属に共通して存在する糖転移酵素遺伝子 6 種類 (A~D) について、配列上の相同性をもとにプライマーを設計した。このプライマーを用いて、PCR を行った。電気泳動によって増幅を確認したところ、A~D の全てについて複数のバンドが検出され

た (図 4)。

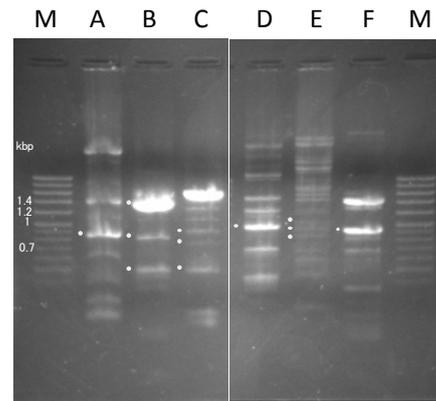


図4 PCR産物の電気泳動(A~F)

そこで、目的とするサイズの DNA 断片をゲルから切り出し、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いて pGEM-T Easy vector に精製した PCR 断片を挿入した。In-Fusion 反応液を用いて DH5 α をトランスフォーメーションし、青白セクションで挿入断片をもつと期待できるコロニー (白) を選択した。得られたポジティブクローンを解析した。しかし、ターゲットとした A~F では PCR 増幅産物として複数のバンドが見られ、いくつかの手法を用いたにも関わらずポジティブクローンの取得には至らなかった。そこで、全ゲノム配列が決定されている *Shewanella frigidimarina* を ATCC より入手し、これを鋳型として低温活性型の糖転移酵素を取得することに方針を変更した。

S. frigidimarina 上には 6 つの GT-2 が存在する。それらをゲノムの前から順番に H, I, J, K, L, M と名付けた。各々に適切な primer を作製して PCR 増幅を行ったところ、すべての GT-2 について単一の増幅断片を確認することができた (図 5)。

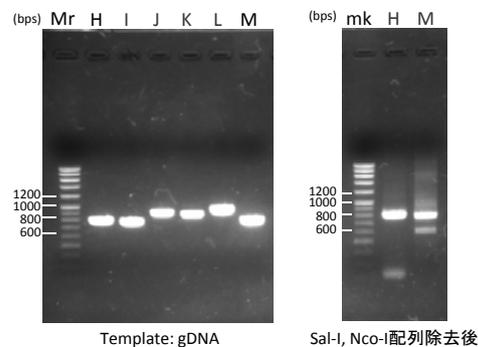


図5 PCR産物の電気泳動(H~L)

I~Lについては、PCR増幅断片をIn-Fusionを用いてpGEM-T Easyベクターに挿入し、インサートをもつプラスミドの取得に成功した。HおよびMについては、サブクローニングに用いる制限酵素 (Sal-I および Nco-I) サイトがインサート配列中に存在したため、PCRを用いて点変異を生じさせることでサイトを除去した。その後、I~L同様にIn-Fusionを用いてpGEM-T Easyベクターに挿入することでポジティブクローンを取得した。以上によって取得したプラスミドについて、DNAシーケンサによって塩基配列を確認した後、発現ベクター (pET-22b(+)) に乗せ換えてGT-2の発現を行った。

GT-2 (H~M)を挿入したpGEM-T EasyからNco-I および Sal-Iによってインサート部分を切り出し、同様に切断した発現ベクターpET-22b(+)に挿入することでタンパク質発現用plasmidを得た。IPTGを用いてタンパク質の発現を誘導したところ、H, I, MにおいてSDS-PAGEで発現が確認できた(図6)。

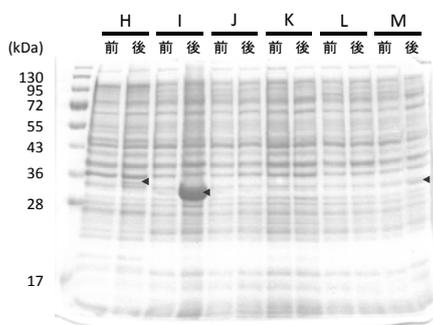


図6 誘導前後のSDS-PAGE

GT-2 (H~M)を挿入したpET-22b(+)について、Rosetta-gami (DE3)を宿主として組み換え型タンパク質の発現を試みた。IPTGの添加によって発現誘導を行った後、MgCl₂処理によってペリプラズム画分を調整した。H, I, Mについては発現が確認できたが、ペリプラズム画分には発現タンパク質は存在しなかった。濃縮を期待してHisTrapを用いた精製を試みたが、結合するタンパク質はみられなかった(図7)。

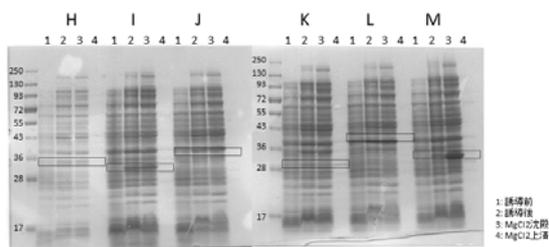


図7 誘導前後およびペリプラズム画分のSDS-PAGE

そこで次に、GT-2 (H~M)を挿入したpET-22b(+)についてRosetta-gami (DE3)およびLemo (DE3)を宿主として組み換え型タンパ

ク質の発現を試みた。その結果、H, I, K, Mについてタンパク質の発現が確認できた。BugBusterを用いて溶菌した後、可溶性および不溶性画分についてSDS-PAGEを行ったところ、大部分は不溶性画分に存在することが明らかになった(図8、上)。しかし、H, I, Kについては一部可溶性画分にも発現タンパク質が存在していた(図8、下)。

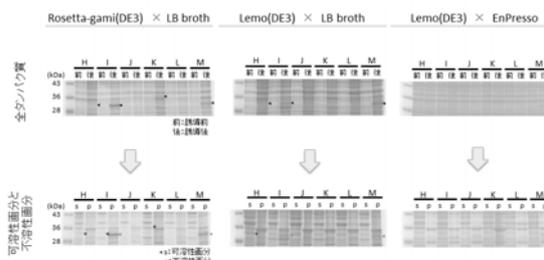


図8 不溶性画分および可溶性画分のSDS-PAGE

Lemo (DE3)について、培地をEnPressoおよびラムノース添加LBに変更した場合にも、可溶性画分への発現に改善は見られなかった。そのため、大量に組み換えタンパク質を取得するためには、ベクターの変更が必要と考えた。

そこで次にpCold IにGT-2 (H~M)を挿入し、SHuffle competent cellを宿主として用いて組み換え型タンパク質の発現を試みた。可溶性画分はHiTrap Chelating HP columnを用いて精製を行った。不溶性画分はHT Eq (G-HCl)バッファーに懸濁・可溶化し、変性条件下でHiTrap Chelating HP columnを用いて精製した。G-HCl濃度を徐々に低下させることでリフォールディングを行った後、再度HiTrap Chelating HP columnを用いて精製した。その結果、K, Lは少量であるが可溶性画分に発現タンパク質が得られた。H, I, Mは不溶性画分に存在し、リフォールディングを行っても可溶性タンパク質の取得には至らなかった。今後はより多くの組み換えタンパク質を発現できるように系の改良を行うと共に、取得したタンパク質を用いて立体構造解析を行う予定である。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴田 祥子 (TSURUTA SACHIKO)
神戸大学・大学院農学研究科・農学研究科
研究員
研究者番号：30608625