

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440022

研究課題名(和文)腸内細菌に特徴的なATP消費抑制型N-グリカン代謝経路の解明

研究課題名(英文)Studies on the energetically efficient metabolic pathway of N-glycans in intestinal bacteria

研究代表者

仁平 高則 (NIHIRA, Takanori)

新潟大学・農学部・特定研究支援者

研究者番号：80615469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：数種の腸内細菌で見出される加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)が関与するATP消費抑制型N-グリカン代謝経路を解明するために、本代謝経路の鍵酵素である β -1,4-マンノシル-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの反応速度論的および構造学的解析を進めた。結晶が得られたBacteroides thetaiotaomicron由来の当該酵素について現在構造解析中である。また当該酵素遺伝子の近傍に存在し、N-グリカンの代謝に寄与することが推測される機能未知遺伝子について調査するために、当該遺伝子がコードするタンパク質を各種構造のN-グリカンに作用させたが、酵素反応は確認されず性質決定に至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The kinetic and structural analyses of β -1,4-mannosyl-N-acetyl-glucosamine phosphorylase which is a key enzyme in novel metabolic pathway for N-glycan where phosphorylase participates, were carried out to elucidate this metabolic pathway in intestinal bacteria. The enzymes from some microbes have strict regioselectivity and acceptor specificity against N-acetyl-glucosamine and N,N'-diacetyl-chitobiose as acceptors in reverse phosphorylase. The three-dimensional structure of β -1,4-mannosyl-N-acetyl-glucosamine phosphorylase from Bacteroides thetaiotaomicron has not yet been determined. This structure analysis is carried out continuously now.

To investigate of an uncharacterized gene which is predicted to participate in N-glycan metabolism existing close to phosphorylase gene, the hydrolytic reaction of the protein encoded by this gene was examined using various N-glycans as the substrate candidates. However, this protein did not show hydrolytic reaction.

研究分野：酵素化学

キーワード：N-グリカン 酵素 代謝

1. 研究開始当初の背景

糖質は、生物にとり重要なエネルギー源である。生物は、光合成により自ら糖質を合成可能な植物などを除き、他生物の貯蔵糖質や生体分子に含まれる糖質を分解・摂取し生体エネルギーATP を獲得することで生命を維持している。この内、好気性生物は、解糖系、クエン酸回路および電子伝達系による酸素呼吸により 1 分子のグルコースからおよそ 27.54 分子の ATP を効率的に産出可能であるが、嫌気性生物では非効率な嫌氣的呼吸によりわずか 2 分子の ATP を産出するに過ぎない。したがって、嫌気性生物にとり ATP をいかに効率的に獲得しその消費を抑制するかという課題は、他生物との厳しい生存競争を勝ち抜く上で重要である。

多くの生物は、糖質を加水分解酵素によって単糖にまで分解し、それを ATP 依存的なキナーゼによって糖リン酸を獲得する解糖系初期段階を踏む (図 1A)。しかし一部の嫌気性細菌では、オリゴ糖段階で競合生物に先駆けて糖質を菌体内に取込み、加リン酸分解酵素 (ホスホリラーゼ) でオリゴ糖を単糖と糖 1 リン酸に分解するという進化的戦略を採用した。糖質の一部を ATP の消費なしにリン酸化するこのホスホリラーゼに依存した ATP 消費抑制型の代謝経路は、嫌気性生物の環境適応戦略の一端であり、進化的・生物学的にも興味深い代謝経路である (図 1B)。

我々は、腸内細菌からアスパラギン結合型糖鎖 (N-グリカン) の共通構成二糖を加リン酸分解する α -1,4-D-マンノシル-N-アセチル-D-グルコサミンホスホリラーゼを世界に先駆け発見し、N-グリカンの新たな代謝経路を提唱した。腸内細菌叢における占有率を上げるために獲得したであろうこのホスホリラーゼが関与する ATP 消費抑制型の N-グリカン代謝システムの全貌を解明することは学術的に非常に重要である。

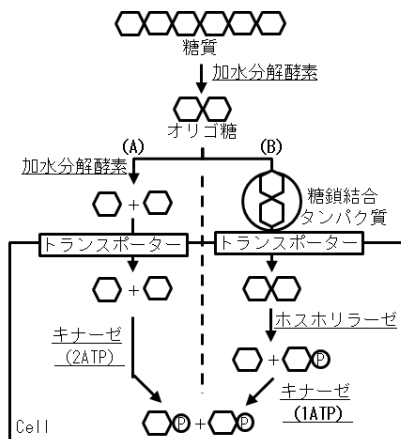


図 1. 糖代謝の比較

(A)従来代謝

(B)ホスホリラーゼによる代謝

2. 研究の目的

(1) N-グリカンの共通糖構造に特異的な認識性を示す新規 α -1,4-D-マンノシル-N-アセチル-D-グルコサミンホスホリラーゼの触媒および結合メカニズムを、結晶構造解析および反応速度論的解析により、構造学的および分子動力的に解析する。

(2) 上記ホスホリラーゼ遺伝子とクラスターを形成し、連携して N-グリカンを加水分解する酵素群の触媒および結合メカニズムを、反応速度論的解析、結晶構造解析および生体物質間相互作用解析技術により、酵素学的、構造学的および分子動力的解析を行なう。

3. 研究の方法

(1) 基質の調製

反応メカニズムの解析に必要な α -マンノース 1 リン酸および α -1,4-D-マンノシル-N-アセチル-D-グルコサミンは高価であるため安価な材料を用いて調製する。前者はコンニャクグルコマンナンから各種酵素を用いて調製し、後者は α -マンノース 1 リン酸および N-アセチル-D-グルコサミンを用いて、新規酵素の逆反応を利用して調製することで研究コストを削減する。反応生成糖は、各種カラムクロマトグラフィーおよび電気透析装置により精製する。

(2) X 線結晶構造解析による新規ホスホリラーゼの立体構造の解明

N-グリカンに共通する構造を加リン酸分解する新規酵素 α -1,4-D-マンノシル-N-アセチル-D-グルコサミンホスホリラーゼの機能と構造の相関を明らかにするため、当該酵素の反応速度論的解析および X 線結晶構造解析を行なう。数種の当該酵素ホモログ遺伝子をクローニング、タンパク質発現および速度解析を行なった後、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化条件のスクリーニングを行ない、ホスホリラーゼ単独および基質 (糖およびリン酸) または阻害剤との共結晶の回折強度データを獲得し、類似タンパク質の構造を基に分子置換法などにより位相決定を行なう。分子置換法が困難である際は、金や白金原子などの重原子を結晶中に浸透させネイティブ結晶との差から構造解析を行なう重原子同型置換法や、セレノメチオニルタンパク質を用いた多波長異常分散法による位相決定を行なうことで立体構造を明らかにする。

(3) 機能未知タンパク質の性質決定

ホスホリラーゼ遺伝子の近傍に存在し、N-グリカンの代謝に寄与することが推測される機能未知遺伝子について、各種 N-グリカンに作用させることにより性質決定を行なう。反応が確認された際には、ホスホリラーゼと同様 X 線結晶構造解析についても行なう。

4. 研究成果

(1) 基質の調製

グルコマンナンを主成分とする安価なコンニャク粉を α -マンノース 1-リン酸の生産の出発材料とした。出発材料を市販セルラゼ製剤にて加水分解し、反応によって生じた α -1,4-マンノシドを各種 α -1,4-マンノシドホスホリラーゼにて加リン酸分解することで、 α -マンノース 1-リン酸を遊離させた。反応停止後、残存する無機リン酸を分画分子量 100 の透析膜カートリッジを使用した電気透析により除去した後、分画分子量 300 の透析膜カートリッジを使用した電気透析により、中性糖が混在する反応液から α -マンノース 1-リン酸を分離・精製した。強陽イオン交換体に供することで遊離酸とした後、シクロヘキシルアミンおよびアセトンを経験的に加えることにより、 α -マンノース 1-リン酸ビス(シクロヘキシルアンモニウム)塩として結晶化することに成功した。

上記手法により調製した α -マンノース 1-リン酸および *N*-アセチルグルコサミンを α -1,4-D-マンノシル-*N*-アセチル-D-グルコサミンホスホリラーゼに作用させ、逆反応によって α -1,4-D-マンノシル-*N*-アセチル-D-グルコサミンを合成した(図 2A)。反応停止後、ゲルろ過クロマトグラフィーによって生成物と残存する出発材料を分離後、 α -1,4-D-マンノシル-*N*-アセチル-D-グルコサミンの凍結乾燥標品を十分量獲得した。

また、スクロースホスホリラーゼ、 α -グルコムターゼ、グルコース 6-リン酸イソメラーゼ、マンノース 6-リン酸イソメラーゼ、ホスホグルコムターゼおよび α -1,4-D-マンノシル-*N*-アセチル-D-グルコサミンホスホリラーゼを組み合わせた One-pot 構想合成法によっても α -1,4-D-マンノシル-*N*-アセチル-D-グルコサミンを獲得できたが、酵素調製の煩雑さから前述の合成手法を主に採用した(図 2B)。

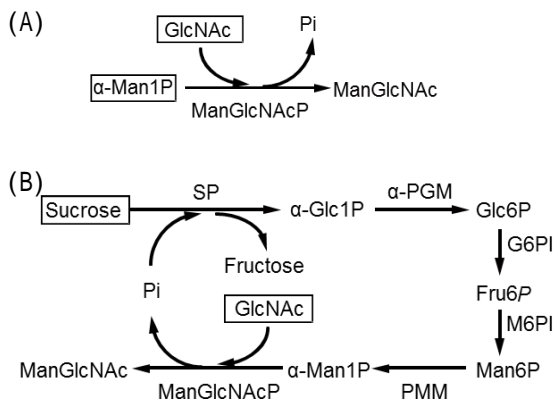


図 2. 基質の調製

(A) 逆反応による調製

(B) One-pot 酵素合成法による調製

(2) 当該酵素ホモログの調製・解析

腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* 由来の α -1,4-D-マンノシル-*N*-アセチル-D-グルコサミンホスホリラーゼの構造決定において困難を極めた際の対策として、他微生物起源の酵素についても遺伝子クローニング、酵素タンパク質の発現、性質決定を行なった。系統樹解析により当該酵素のホモログ遺伝子を所持すると推測された *Lachnoclostridium phytofermentans*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga petrophila* および *Thermotoga neapolitana* のホモログ遺伝子について検討した結果、*L. phytofermentans* および *F. johnsoniae* 由来のホモログ遺伝子は α -1,4-D-マンノシル-*N*-アセチル-D-グルコサミンホスホリラーゼをコードすることが判明した。一方 *Thermotoga* 属のホモログ遺伝子は他の酵素 α -1,4-D-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼであることが判明したため、解析を中断した。*L. phytofermentans* および *F. johnsoniae* 由来の酵素のアクセプター基質特異性を確認したところ、*B. thetaiotaomicron* 由来の酵素と同様、*N*-アセチルグルコサミンを最もよいアクセプター基質とすることが判明し、また程度の差はあるが同様に *N,N'*-ジアセチルキトビオースもアクセプターとして利用できることも判明した。

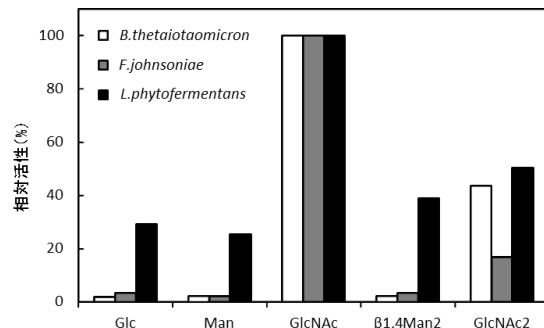


図 3. アクセプター特異性

(3) X線結晶構造解析による新規ホスホリラーゼの立体構造の解明

大腸菌 BL21 (DE3) を宿主として His-tag 融合タンパク質として各種起源の α -1,4-D-マンノシル-*N*-アセチル-D-グルコサミンホスホリラーゼをそれぞれ生産・精製し、結晶化を行なった。*B. thetaiotaomicron* 由来の当該酵素において結晶化に成功し、リガンドフリーの状態のものについて X線回折実験を進めた。現在、鋭意解析を行っており、既知 α -マンノシドホスホリラーゼとの差異について近く報告可能となる予定である。

(4) 機能未知タンパク質の性質決定

当該酵素遺伝子の近傍に存在し、*N*-グリカンの代謝に寄与することが推測される機能未知遺伝子 *bt1037* について調査するために、当該遺伝子がコードするタンパク質を各種構造の *N*-グリカンに作用させた (図 4)。リン酸存在下および非存在下において各種 PA 化 *N*-グリカンを 37 ℃, 18 時間作用させ、反応停止後 HPLC にて解析した結果、酵素反応は確認されず性質決定に至らなかった。

LNT

Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc-PA

AG12BSF6

GlcNAcβ1-2Manα1-6 Fucα1-6
GlcNAcβ1-4Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA
GlcNAcβ1-2Manα1-3

F3GaNb3Gb4core1

Fucα1-3GalNAcβ1-3Galβ1-4Galβ1-3GalNAc-PA

BI

Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6
Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA
Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3

M3FX

Manα1-6
Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA
Manα1-3 2 Fucα1-3
Xylβ1

AG1234

GlcNAcβ1-6
GlcNAcβ1-2Manα1-6
Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA
GlcNAcβ1-4Manα1-3
GlcNAcβ1-2

図 4. 機能未知タンパク質の性質決定に使用した 6 種の *N*-グリカン

研究者番号 : 80615469

(2) 研究分担者

なし

研究者番号 : -

(3) 連携研究者

なし

研究者番号 : -

(4) 研究協力者

中井 博之 (NAKAI, Hiroyuki)

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁平 高則 (NIHIRA, Takanori)

新潟大学・農学部・特定研究支援者