

膵臓酵素に見出した糖鎖認識とその糖結合部位の同定 Identification of the Carbohydrate-binding Sites Found for Pancreatic Enzymes

和田有沙¹, 三橋加奈¹, 小川温子^{1,2*}

¹お茶の水女子大学大学院,²同糖鎖科学教育研究センター,
〒112-8610 東京都文京区大塚 2-1-1

Arisa Wada¹, Kana Mitsuhashi¹ and Haruko Ogawa^{1,2*}

¹Graduate School of Humanities and Advanced Sciences, ²Glycoscience Institute,
Ochanomizu University, 2-1-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan

1 はじめに

私たちは、様々な複合糖質の持つ糖鎖の機能に関する研究をしております。

脊椎動物で摂取された食物は、膵臓で合成され膵液を通じて十二指腸へ分泌される消化酵素によって分解され、小腸から吸収されます。 α -アミラーゼは α -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で必須な役割を果たします。われわれはマメ科植物レクチンの機能に関する研究から、 α -アミラーゼの性質に興味を持ちました。以前からレクチンは反栄養素の一つと捉えられてきたことと、特にインゲン豆レクチンが α -アミラーゼ阻害剤との配列相同性を持ち、実際に昆虫生育阻害作用を示すという報告がアメリカで出されたことから、ブタ膵臓 α -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ました。

その結果、予想外にもPPA自身が糖鎖認識能力を持ち、 α -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型糖鎖を持つ糖タンパク質に結合することを発見しました¹⁾。糖タンパク質との結合によってPPAの触媒作用は活性化されました。さらに産総研の地神先生のグループの方々との協力で、PPAだけでなく、ヒト膵 α -アミラーゼも、共通の性質を持つことが明らかになりました²⁾。最近、十二指腸内で α -アミラーゼは腸上皮の糖鎖に結合してデンプン消化を促進する一方、分泌直後の高濃度の α -アミラーゼはグルコース吸収を顕著に阻害することが判明し、 α -アミラーゼの糖結合性は腸管吸収段階で血糖値恒常性の維持に寄与することを推定しました²⁾。1830年に発見されて以来、180年以上にわたり酵素科学的にも数多くの研究が為されてきたPPAに、まだ未知の側面が残っていることを大変意外に感じました。

ついでわれわれは膵トリプシンに α -アミラーゼとは少し異なる糖結合特異性を見出しました³⁾。さらに、膵リパーゼ、ヌクレアーゼ類も、それぞれ特有

の糖鎖結合活性をもつことを見出しました。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 α -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ます。

ウシ膵トリプシン(BPT)³⁾とその不活性前駆体のウシトリプシノーゲン(BPTG)はD-GalまたはD-GalNAcを含む糖タンパク質に $K_a=10^9 M^{-1}$ の高親和性で結合しGalNを含む糖類により活性化が抑制されることを見出しました。膵プロテアーゼはチモゲンとして合成され、ゴルジ体で分泌顆粒に包含され、膵液中へ開口分泌されます。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、プロテアーゼが膵臓細胞を破壊して膵炎を起こすため、膵炎抑止機構の一つとして、分泌顆粒膜は糖鎖に富み高いプロテアーゼ抵抗性を有することが知られています。糖質がトリプシノーゲンの活性化を抑制する働きを見出したことから、私達は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知りたいと考え、その糖結合部位の同定を計画しました。

2 実験

BPTG, BPTの糖複合体の結晶を得るため、これまでの実験から結合性が検出された単糖類を結晶にソークキングすることを最初に試みました。これらはよく知られた酵素で既に解析例があるにもかかわらず、初めての挑戦でタンパク質濃度や溶媒の選択などに時間がかかりました。ようやくできた結晶に糖溶液を加えると結晶が溶解してしまったため、次にBPTGおよびBPTと3種類の単糖との共結晶化を行い、得られた結晶についてX線回折の測定をPFで行いました。

3 結果および考察

BPTG, BPTの各結晶について1.37Åの分解能でX線回折像を得ましたが、糖の電子密度が観測された

のは、メチル α -D-N-アセチルガラクトサミニドとの複合体結晶のみでした。タンパク質分子上の糖の位置をそれぞれ決定することができ、BPTG, BPT について各分子上に 2 か所の糖結合部位が検出されたため、両方が機能部位であるかどうかを、塩基置換によるアミノ酸変異体を作成し、活性解析により検証することを進めています。

4 まとめ

X線結晶構造回折により BPTG, BPT 上の糖結合部位についての情報を得ることができました。この結果を基にアミノ酸変異体解析を行い、トリプシノーゲン活性化抑制に関わる糖結合部位の特定を進めていきます。本研究成果は、膵臓内の糖鎖に関わる膵炎抑止機構の解明に繋がると期待されます。

謝辞

結晶化、測定、解析において、多くの助言とご協力をいただいた今野美智子名誉教授(お茶の水女子大学)、白井剛教授(長浜バイオ大学)に感謝致します。

参考文献

- [1] Matsushita, H., Takenaka, M., Ogawa, H., Novel carbohydrate-binding activity of porcine pancreatic α -amylase to N-linked glycans of glycoproteins. *J Biol Chem* **277**, 4680-5 (2002)
- [2] Asanuma-Date, K., Hirano, Y., Le, N., Sano, K., Kawasaki, N., Hashii, N., Hiruta, Y., Nakayama, K., Umemura, M., Ishikawa, K., Sakagami, H., Ogawa, H. Functional regulation of sugar assimilation by N-glycan-specific interaction of pancreatic α -amylase with glycoproteins of duodenal brush border membrane. *J. Biol. Chem.*, **287**, 23104-18 (2012)
- [3] Takekawa, H., Ina C., Sato, R., Toma, K., Ogawa, H., Novel carbohydrate-binding activity of pancreatic trypsins to N-linked glycans of glycoproteins. *J Biol Chem* **281**, 8528-36 (2006)

成果

- 1 Wada, A., Saitoh, I., Sakagami, H., Watanabe, A., Kigawa, T., Ogawa, H. Pancreatic trypsinogen is controlled by sugar-specific interactions. The 25th International Carbohydrate Symposium. D-P2-037 (2010) August, 1-6, Chiba, Japan.
- 2 和田有沙、齋藤泉、坂上ひろみ、渡辺暁、木川隆則、小川温子 膵トリプシノーゲンの糖結合性と生物学的機能. 東京糖鎖研究会シンポジウム. 2010年11月27日 東京.
- 3 和田有沙、齋藤泉、渡部暁、木川隆則、白井剛、今野美智子、坂上ひろみ、小川温子. ブタおよびヒト膵トリプシノーゲンの糖結合性と膵

炎抑制に関わる生物学的機能. 第84回日本生化学会大会. 2011年9月23日 京都.

- 4 三橋佳奈、齋藤泉、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 2011年9月19日 鹿児島.
- 5 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.
- 6 三橋佳奈、齋藤泉、和田有沙、白井剛、今野美智子、小川温子. ウシトリプ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.