

キチン質分解酵素のエンジニアリングによる有用糖鎖合成法の確立

大沼貴之¹, 梅本尚之¹, 新家粧子¹, 北奥喜仁¹, 大澤拓生², 沼田倫征², 深溝 慶¹¹近畿大学農学部バイオサイエンス学科, 〒631-8505 奈良市中町 3327-204²産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門, 〒305-6602 つくば市東 1-1-1
Takayuki Ohnuma¹, Naoyuki Umemoto¹, Shoko Shinya¹, Yoshihito Kitaoku¹, Takuo Osawa²,
Tomoyuki Numata² and Tamo Fukamizo¹¹Kinki University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan²National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba
305-8566, Japan

1 はじめに

N-アセチルグルコサミンやグルコサミンを構成糖とするキトオリゴ糖は、ヒトの腫瘍血管新生に対する阻害能や抗酸化能を示すことが報告されている。また、脊椎動物の発生や分化、植物の生体防御応答において、シグナル伝達物質として機能することも知られている。これらに加えて、近年キトオリゴ糖が生物に対して示す活性や、キトオリゴ糖を介した生命現象が徐々に明らかにされつつあるが、オリゴ糖が引き起こす様々な現象の分子メカニズムについてはよくわかっていない。このような状況の下、分子種（鎖長およびアセチル基の分布）の均一なホモおよびヘテロキトオリゴ糖の容易な酵素合成法の確立が望まれている。申請者らはこれまでに、ライ麦（*Secale cereale*）とナガハハリガネゴケ（*Bryum coronatum*）より糖質加水分解酵素ファミリー（<http://www.cazy.org/>）の 19 に分類される酵素であるキチナーゼ RSC-c（ループフル型）と BcChi-A（ループレス型）を単離し、その酵素学的性質について明らかにしてきた。また、これらの酵素にアミノ酸置換を導入することにより、酵素が本来もつ加水分解活性を消失させ、糖鎖合成反応のみを触媒するグライコシターゼに変換することに成功した（*Biochemical J*, 444, 437-43, 2012）。

本研究では RSC-c と BcChi-A の酵素基質複合体の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定することを目的としている。立体構造の決定は、ファミリー 19 キチナーゼの触媒反応および基質認識機構を解明するものと予想される。また、糖質加水分解酵素による糖鎖合成反応の構造的基盤を明らかにするだけでなく、合成反応を効率よく触媒するための最適な変異導入部位や導入アミノ酸残基の種類の選択、および適した活性化ドナー基質の分子デザインに寄与することが期待される。

2 実験

RSC-c-E67Q/W72A とキチンオリゴ糖 4 糖の複合体結晶はシッティングドロップ蒸気拡散法によって

作製した。タンパク質溶液は 5 mg/ml になるよう調製し、終濃度 9.5 mM になるようにキチンオリゴ糖 4 糖を加えた。リザーバーには 0.1 M NaCl, 0.1 M HEPES (pH 7.5), 1.6 M (NH₄)₂SO₄ を用いた。BcChi-A-E61A とキチンオリゴ糖 4 糖の複合体結晶は同様にシッティングドロップ蒸気拡散法によって作製した。タンパク質溶液は 5 mg/ml になるよう調製し、終濃度 10 mM になるようにキチンオリゴ糖 4 糖を加えた。リザーバーには 90 mM Tris-HCl pH 8.5, 1.2-1.4 M di-ammonium hydrogen phosphate, 10 mM sodium acetate pH 4.6, 1 mM CoCl₂, 0.1 M 1,6-hexanediol を用いた。

3 結果および考察

RSC-c の E67Q/W72A 不活性変異体とキチンオリゴ糖 4 糖との複合体構造を 1.9 Å 分解能で決定した。結晶の格子定数は $a=78.8$, $b=78.8$, $c=95.1$ Å、空間群は $P4_32_12$ であった。構造決定は野生型 RSC-c (PDB 4DWX) をサーチモデルとした分子置換法により行った[1]。

BcChi-A の E61A 不活性変異体とキチンオリゴ糖 4 糖との複合体構造を 1.0 Å 分解能で決定した。Native および SeMet 導入タンパク質の結晶は、共に格子定数 $a=74.5$, $b=58.4$, $c=48.1$ Å、空間群は C2 であった。位相決定は SeMet 置換体を用いた SAD 法により行った[2]。

図 1A は決定したファミリー 19 キチナーゼ RSC-c-E67Q/W72A とキチンオリゴ糖 4 糖[(GlcNAc)₄]二分子の複合体構造、B は BcChi-A-E61A と (GlcNAc)₄ 一分子の複合体構造を示している。どちらの複合体においても酵素のクレフト上にこれ以上糖鎖が結合できるスペースがないことから、RSC-c のサブサイトは -4 ~ +4、BcChi-A のサブサイトは -2 ~ +2 の構造であることがわかった。また、RSC-c においてサブサイト -2 ~ +2 で糖との結合に関与するアミノ酸残基は、RSC-c と BcChi-A および他の GH19 キチナーゼの間でよく保存されていることがわかった。RSC-c において -2 ~ +2 より外側に位置する糖に関しては、主に

ループ II, IV および C 末端ループに存在するアミノ酸残基が直接的もしくは水分子を介した間接的な水素結合や疎水性相互作用により認識していることがわかった。以上のことから, RSC-c のループ構造は基質結合に関与し, BcChi-A の基質認識クレフトを倍の長さにまで延長していることが明らかになった (C)。

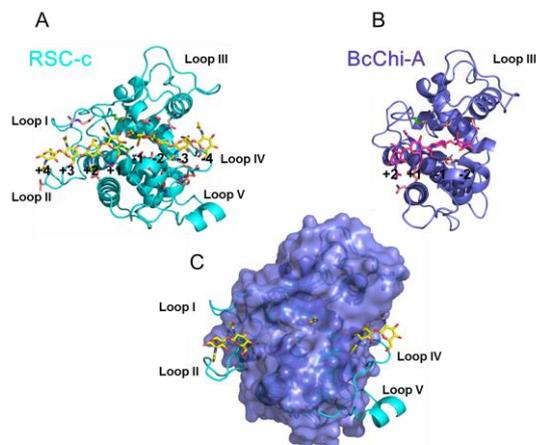


図 1 : RSC-c および BcChi-A のキチンオリゴ糖 4 糖複合体の立体構造

A: RSC-c-E67Q/W72A とキチンオリゴ糖 [(GlcNAc)₄]二分子の複合体構造 (PDB 4JOL), B: BcChi-A-E61A と (GlcNAc)₄ 一分子の複合体構造 (PDB 3WH1), C: 両複合体の重ね合わせ。

4 まとめ

2 種のファミリー19 キチナーゼの酵素基質複合体の立体構造を決定した。その結果、ループフル型の基質結合サブサイト数は 4、ループレス型のサブサイト数は 2 であることがわかった。

参考文献

- [1] T. Ohnuma *et al.*, *FEBS Lett.*, 587, 2691-2697 (2013).
- [2] T. Ohnuma *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1844, 793-802 (2014).

* ohnumat@nara.kindai.ac.jp